

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4933435号
(P4933435)

(45) 発行日 平成24年5月16日(2012.5.16)

(24) 登録日 平成24年2月24日(2012.2.24)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
G O 1 N 30/88 (2006.01)	G O 1 N 30/88 J
A 6 1 K 31/4045 (2006.01)	A 6 1 K 31/4045

請求項の数 59 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-532454 (P2007-532454)	(73) 特許権者	508214950
(86) (22) 出願日	平成17年9月14日(2005.9.14)		ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ ティ・オブ・コロラド, ア・ボディー・コ ーポレート
(65) 公表番号	特表2008-513019 (P2008-513019A)		アメリカ合衆国コロラド州80203, デ ンバー, グラント・ストリート 1800 , エイトゥス・フロア
(43) 公表日	平成20年5月1日(2008.5.1)	(73) 特許権者	507083630
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/032901		ザ ユニバーシティー オブ シンシナテ イ
(87) 国際公開番号	W02006/031955		アメリカ合衆国 オハイオ州 シンシナテ イ ピー. オー. ボックス 670829
(87) 国際公開日	平成18年3月23日(2006.3.23)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成20年9月11日(2008.9.11)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/609, 689		
(32) 優先日	平成16年9月14日(2004.9.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/610, 706		
(32) 優先日	平成16年9月17日(2004.9.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子ターゲティングに基づくブシンドロール処置方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アドレナリン受容体遺伝子中の少なくとも一つの多型に関する配列情報を得る方法であって、アドレナリン受容体遺伝子が₁ARおよび/または_{2c}ARであり、該配列情報は、患者でのブシンドロールの効用を予測する、および/または患者のブシンドロール処置を評価するために使用されるものであり、かつ該配列情報が以下を含む、方法：

(a) 配列情報が以下のいずれかを含む：

(i) ₁AR対立遺伝子の一方もしくは両方のコード配列中のヌクレオチド1165位の配列；または

(ii) ₁ARタンパク質の389位のアミノ酸；および/または

(b) 配列情報が以下のいずれかを含む：

(i) _{2c}AR対立遺伝子の一方もしくは両方において、964-975位のヌクレオチド配列が欠失しているかどうか；または

(ii) _{2c}ARタンパク質において、322-325位のアミノ酸配列が欠失しているかどうか。

【請求項2】

患者がブシンドロールによる処置が検討されているものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

一方または両方の₁AR対立遺伝子のコード配列中のヌクレオチド1165位の配列の配列情報が得られる、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

両 γ AR対立遺伝子のコード配列中のヌクレオチド1165位の配列の配列情報が得られる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

γ ARタンパク質中の389位のアミノ酸の配列情報が得られる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

γ AR対立遺伝子の一方もしくは両方における964-975位のヌクレオチド配列の欠失の配列情報が得られる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

両 γ AR対立遺伝子における964-975位のヌクレオチド配列の欠失の配列情報が得られる、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 8】

γ ARタンパク質における322-325位の欠失の配列情報が得られる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

配列情報が、患者からの生体サンプルから得られるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

生体サンプルが血液サンプルである、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

配列情報が患者歴から得られる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項 12】

配列情報を得ることが、(a)の(i)または(ii)を決定することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

γ AR対立遺伝子の一方または両方のコード配列中のヌクレオチド1165位の配列を決定する、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

配列の決定が連鎖停止配列決定、制限酵素消化、対立遺伝子特異的なポリメラーゼ反応、一本鎖高次構造多型解析、遺伝子ビット解析、温度勾配ゲル電気泳動、またはリガーゼ連鎖反応を含む、請求項13記載の方法。 30

【請求項 15】

一方または両方の γ AR対立遺伝子が、コード配列中の1165位にシトシンを有することを決定する、請求項13記載の方法。

【請求項 16】

一方の γ AR対立遺伝子が、コード配列中の1165位にシトシンを有することを決定し、かつもう一方の γ AR対立遺伝子が、コード配列中の1165位にグアニンを有することを決定する、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

γ ARタンパク質の389位のアミノ酸を決定する、請求項12記載の方法。 40

【請求項 18】

アミノ酸の決定が抗体、高圧液体クロマトグラフィー、または質量分析の使用を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

γ ARタンパク質が389位にアルギニンを有することを決定する、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

γ ARタンパク質中が389位にグリシンを有することを決定する、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

一部の γ ARタンパク質中が389位にアルギニンを有することを決定し、かつ他の γ ARタンパク質が389位にグリシンを有することを決定する、請求項17記載の方法。 50

【請求項 2 2】

配列情報を得ることが、(b)の(i)または(ii)を決定することを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

${}_{2c}$ AR対立遺伝子の一方または両方のコード配列中の、ヌクレオチド964-975位の欠失の有無を決定する、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

配列の決定が連鎖停止配列決定、制限酵素消化、対立遺伝子特異的なポリメラーゼ反応、一本鎖高次構造多型解析、遺伝子ピット解析、温度勾配ゲル電気泳動、またはリガーゼ連鎖反応を含む、請求項 2 3 記載の方法。

10

【請求項 2 5】

一方または両方の ${}_{2c}$ AR対立遺伝子が、コード配列中のヌクレオチド964-975位の欠失を有することを決定する、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】

二方の ${}_{2c}$ AR対立遺伝子がコード配列中のヌクレオチド964-975位の欠失を有することを決定し、かつもう一方の ${}_{2c}$ AR対立遺伝子がコード配列中のヌクレオチド964-975位の欠失を有していないことを決定する、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

${}_{2c}$ ARタンパク質中の、アミノ酸322-325位の欠失の有無を決定する、請求項 2 2 記載の方法。

20

【請求項 2 8】

アミノ酸の決定が抗体、高圧液体クロマトグラフィー、または質量分析の使用を含む、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

${}_{2c}$ ARタンパク質が、アミノ酸322-325位の欠失を有することを決定する、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 0】

いかなる ${}_{2c}$ ARタンパク質もアミノ酸322-325位の欠失を有していないことを決定する、請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 3 1】

アミノ酸322-325位の欠失のある ${}_{2c}$ ARタンパク質とアミノ酸322-325位の欠失のない ${}_{2c}$ ARタンパク質の両方の存在を決定する、請求項 2 7 記載の方法。

30

【請求項 3 2】

配列情報を得た後で、該配列情報を含んだ報告書が準備される、請求項 1 2 ~ 3 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 3】

患者が心不全、拡張型心筋症、虚血性心疾患、褐色細胞腫、片頭痛、心不整脈、高血圧もしくは不安障害を含む病状の症状を有する、またはその病状と診断されている、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

患者が虚血性心疾患の症状を有する、または虚血性心疾患と診断されている、請求項 3 3 記載の方法。

40

【請求項 3 5】

虚血性心疾患がアングイナおよび/または心筋梗塞である、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

患者が心不全の症状を有する、または心不全と診断されている、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 7】

心不全が進行性心不全である、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

50

進行性心不全がNYHAクラスIIIまたはIVの心不全である、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

患者が心不整脈の症状を有する、または心不整脈と診断されている、請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 4 0】

患者がArg389/Arg389遺伝子型を有する、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4 1】

患者がArg389/Arg389遺伝子型を有していない、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4 2】

患者が $_{2c}$ AR 322-325欠失についてホモ接合性野生型である、請求項 1 または 2 記載の方法。

10

【請求項 4 3】

患者が $_{2c}$ AR 322-325欠失の保有者である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4 4】

患者が $_{1}$ ARタンパク質中の389位にグリシンを有していない、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4 5】

患者がArg389多型についてホモ接合性ではない、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4 6】

心臓病を有する患者を処置するための薬学的組成物を製造するためのブシンドロールの使用であって、該薬学的組成物はブシンドロールの有効量を含み、かつ該患者が389位にグリシンを有する $_{1}$ ARタンパク質の検出可能なレベルを持たない、使用。

20

【請求項 4 7】

心臓病を有する患者を処置するための薬学的組成物を製造するためのシンドロールの使用であって、該薬学的組成物はブシンドロールの有効量を含み、かつ該患者が両 $_{1}$ AR対立遺伝子のヌクレオチドコード配列中の1165位でシトシンについてホモ接合性である、使用。

【請求項 4 8】

心臓病が心不全または心不整脈である、請求項 4 6 または 4 7 記載の使用。

【請求項 4 9】

アドレナリン受容体遺伝子中の多型に関する情報を得る方法であって、
 a) i) 一方もしくは両方の $_{1}$ AR対立遺伝子のコード配列中のコード位置1165での多型の存在またはii) $_{1}$ ARタンパク質の389位のアミノ酸での多型の存在を示す情報を得る段階
を含み、該情報が、心不全患者がブシンドロールに正に応答するかどうかを評価するために使用される、方法。

30

【請求項 5 0】

アドレナリン受容体遺伝子中の多型に関する情報を得る方法であって、
 a) i) 一方もしくは両方の $_{1}$ AR対立遺伝子のコード配列中のコード位置1165での多型の存在またはii) $_{1}$ ARタンパク質の389位のアミノ酸での多型の存在を示す情報を得る段階
を含み、該情報が、心不整脈患者がブシンドロールに正に応答するかどうかを評価するために使用される、方法。

40

【請求項 5 1】

アドレナリン受容体遺伝子中の多型に関する情報を得る方法であって、
 a) i) 一方もしくは両方の $_{1}$ AR対立遺伝子のコード配列中のコード位置1165での多型の存在またはii) $_{1}$ ARタンパク質の389位のアミノ酸での多型の存在を示す情報を得る段階
を含み、該情報が、遺伝子型が $_{1}$ ARタンパク質でホモ接合性Arg389である個体にブシンドロール療法を処方するために、または遺伝子型が $_{1}$ ARタンパク質でホモ接合性Arg389

50

ではない個体にブシンドロールを処方しないために使用される、方法。

【請求項 5 2】

心臓病を有する患者を処置するための薬学的組成物を製造するためのブシンドロールの使用であって、該薬学的組成物はブシンドロールの有効量を含み、かつ該患者が322-325位の欠失を有する $_{2c}$ ARタンパク質の検出可能なレベルを持たない、使用。

【請求項 5 3】

心臓病を有する患者を処置するための薬学的組成物を製造するためのブシンドロールの使用であって、該薬学的組成物はブシンドロールの有効量を含み、かつ該患者が両方の $_{2c}$ AR対立遺伝子のヌクレオチドコード配列中の964-975位においてホモ接合性野生型である、使用。

10

【請求項 5 4】

心臓病が心不全または心不整脈である、請求項 5 2 または 5 3 記載の使用。

【請求項 5 5】

アドレナリン受容体遺伝子中の多型に関する情報を得る方法であって、

a) i) 一方もしくは両方の $_{2c}$ AR対立遺伝子の964-975位に相当する残基の欠失または i) $_{2c}$ ARタンパク質の322-325位に相当する残基の欠失を示す情報を得る段階を含み、該情報が、心不全患者がブシンドロールに正に応答するかどうかを評価するために使用される、方法。

【請求項 5 6】

アドレナリン受容体遺伝子中の多型に関する情報を得る方法であって、

a) i) 一方もしくは両方の $_{2c}$ AR対立遺伝子の964-975位に相当する残基の欠失または i) $_{2c}$ ARタンパク質の322-325位に相当する残基の欠失を示す情報を得る段階を含み、該情報が、心不整脈患者がブシンドロールに正に応答するかどうかを評価するために使用される、方法。

20

【請求項 5 7】

アドレナリン受容体遺伝子中の多型に関する情報を得る方法であって、

a) i) 一方もしくは両方の $_{2c}$ AR対立遺伝子の核酸964-975位の欠失または ii) $_{2c}$ ARタンパク質の322-325位に相当する残基の欠失を示す情報を得る段階を含み、該情報が、遺伝子型が $_{2c}$ ARタンパク質でDe1322-325についてホモ接合性野生型である個体にブシンドロール療法を処方するために、または患者の遺伝子型が $_{2c}$ ARタンパク質でDe1322-325保有者である個体にブシンドロールを処方しないために使用される、方法。

30

【請求項 5 8】

心臓病を有する患者を処置するための薬学的組成物であって、有効量のブシンドロールを含み、かつ

(a) 389位にグリシンを有する $_{1}$ ARタンパク質の検出可能なレベルを持たない患者；
(b) 両 $_{1}$ AR対立遺伝子のヌクレオチドコード配列中の1165位でシトシンについてホモ接合性である患者；

(c) 322-325位の欠失を有する $_{2c}$ ARタンパク質の検出可能なレベルを持たない患者；
または

(d) 両方の $_{2c}$ AR対立遺伝子のヌクレオチドコード配列中の964-975位においてホモ接合性野生型である患者

に投与されるものである、薬学的組成物。

40

【請求項 5 9】

心臓病が心不全または心不整脈である、請求項 5 8 記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は薬理遺伝学および心臓病学に関する。より具体的には、本発明は $_{1}$ -アドレナ

50

リン受容体(α_1 AR)遺伝子および β_2 -アドレナリン受容体(β_2 AR)遺伝子を含む、アドレナリン受容体遺伝子中の多型の患者遺伝子型に基づくブシンドロールによる個別的な心不全治療の方法に関する。

【0002】

本出願は2004年9月14日付で出願された米国仮特許出願第60/609,689号および2004年9月17日付で出願された米国仮特許出願第60/610,706号の優先権を主張するものであり、それらはともにその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

米国政府は米国立衛生研究所による助成金交付番号HL052318、同HL07071609、同ES06096、同HL071118、および同HL48013に基づき、本発明において自らの権利を有することができる。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の説明

米国心臓協会(AHA)によれば、およそ6200万のアメリカ人は何らかの心血管疾患にかかっている。心血管疾患には、高血圧、冠状動脈疾患(心臓発作や胸の痛み)、脳梗塞、心臓・血管の先天性異常およびうっ血性心不全などがあり、毎年これらの疾患によって100万近くの人が死亡している。さらに、AHAの年次報告によれば、心血管疾患によって死亡するアメリカ人は、がんを含め、順位の上で心血管疾患の後に来る死因7つによる死亡者を合わせた数よりも多い。驚くべきことに、総じてわずかに男性より女性の方が心血管疾患に罹りやすい。1999年には、米国では心臓病が全死亡の40%を占めた。最近の治療技術の進歩にもかかわらず、心不全からくる死亡はこの5年で約50%になっている。

【0005】

米国だけで見ても、人口の約1.5%、約600万人が慢性心不全(「HF」)に罹っており、毎年550,000人の患者が新規で診断を受けている。HF治療に当たっては医学療法が進歩したが、罹患率と死亡率は高止まりしている(Mann et al., 2005)。HFについて現在行われている標準対処法にはレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系(RAAS)抑制剤(ACE抑制剤、ARBs、および/またはアルドステロン受容体アンタゴニスト)および遮断薬の使用などが含まれる。遮断薬は心筋細胞上のアドレナリン受容体を競合的に抑制する。遮断薬は死亡率減少に効果があり、全体としては最も効果的なHF治療薬の部類に入ると考えられているが、これを投与した患者の50~60%にしか効果を奏していない。さらに、死亡率試験において認可された遮断薬の効果に関する米国人の患者臨床データは、唯一の大規模な治療する意図に基づく(intention-to-treat)死亡率試験の公開データがプラセボとの比較で米国人患者における死亡率の増加を示しており、さらに印象に乏しい。

【0006】

したがって、より有効で反応速度が早く、患者が痛みを感じずに糖尿病のような特別な要求を持った亜集団に適合した、HF治療法の改良が強く望まれている。しかし、この治療面の背景に対する新薬の開発は極度に挑戦的であることが明らかになった。2001年来、心不全に関する13回の第III相試験で、わずか3回が陽性であった。これら陽性の試験の内、2回はARB(カンデサルタン)(McMurray et al., 2003; Granger et al., 2003)を用いたものであった。3つ目の陽性試験、BiDiI(硝酸イソソルビドとヒドラジンの組合せ)を用いたA-HeFT試験は、アメリカ心不全患者集団のわずか12%(Taylor et al., 2004)しか含まない小集団でのものであった。明らかに、次世代の心不全治療薬の開発の必要性は依然として残っている。

【0007】

α_1 アゴニストは心室機能を損なっている患者の急性悪化の治療に使われる一方、投与されたアゴニストの心臓への長時間暴露や、あるいは体内で生成されたカテコールアミン作動物質の増加により、心不全を悪化させることにつながっている。これに反して、アドレナリン受容体アンタゴニスト(遮断薬という)が、慢性心不全の主要な処置方法として登場した。

10

20

30

40

50

【0008】

1990年代初頭、心不全に対する 遮断薬の効用を研究した米国心不全研究者のグループは、死亡率試験はなおも議論の余地があるこの治療法を正当化するために必要であるとの判断を下した。米国の一グループは、後にVA協同組合臨床試験プログラムとNHLBIによる資金拠出について承認を受けるプロトコルと承認申請を作成した。承認されたプロトコルでは薬を特定していないが、最適な 遮断薬は第II相のデータが示す成功と利点を示す可能性に基づいて選択されることが望ましい、と規定している。検討された薬はカルベジロール、酒石酸メトプロロール、コハク酸メトプロロールCR/XR、およびブシンドロールである。コハク酸メトプロロールはMDC試験(Waagstein et al., 1993); コハク酸メトプロロールCR/XRは心疾患の有効性と反応性に欠けるという理由で選ばれていない。ならびに、カルベジロールは、進行した心不全にあっては忍容性に乏しい(Krum et al., 1995)ということを経験の一つとして選ばれなかった。ブシンドロールはその卓越した忍容性(Eichhorn et al., 1997; Gilbert et al., 1990; Bristow et al., 1994; Pollock et al., 1990)、効用(Gilbert, 1990; Bristow et al., 1994; Pollock et al., 1990; Eichhorn et al., 1990)およびスポンサーの関心の高さに基づき選定委員会で満場一致で選択された。かくして、ブシンドロールは、心不全において最初に計画され実施された試験である 遮断薬生存率試験評価(「BEST」)での主題になった。

10

【0009】

BEST試験は1995年に始まり、1999年に終了した。BESTが始まった後、他の3つの死亡率試験が計画され、実行された。すなわち、コハク酸メトプロロールCR/XRでのMERIT-HF (MERIT-HF Study Group, 1999)、ピソプロロールでのCIBIS-II (CIBIS-II Investigators, 1999)およびカルベジロールでのCOPERNICUS (Packer et al., 2002)である。これらの試験はより迅速に行われ参加制限がゆるかったため、CIBIS-IIとMERIT-HFはBEST前に完了し、共に陽性の結果をもたらした。

20

【0010】

BEST試験は終了以前の1999年、未完のまま終了したが、これは一部研究者による釣り合いの欠如によっており、また先の2件の陽性試験(BEST Trial Investigators, 2001; Domanski et al., 2003)の知見に基づいて、非盲検の 遮断薬の降下速度が加速したことによっている。スポンサーは、試験が中止された時点で知り得た結果に基づきブシンドロールの商業開発を進めないという道を選んだ。BEST試験研究者は、CIBIS-IIとMERIT-HFで6ヶ月前に報告されていた陽性の結果と同様に、クラスIII非アフリカ系アメリカ人、における効果を観察する一方、研究者はまた、クラスIVのアフリカ系アメリカ人における思わしい結果が出なかったことも認めた。さらに、BESTは試験が中止された時点で、総死亡率(10%の減少、 $p=0.10$)のプライマリーエンドポイントに適合しなかった(BEST Trial Investigators, 2001)。研究者は他の 遮断薬とブシンドロールの両者の結果の間の相違は、多様な薬剤を網羅した分類内の化学的、機能的特性間で認められる相違を際立たせる「ブシンドロールの独特の薬理学的性質」(BEST Trial Investigators, 2001)に帰することができると主張している。

30

【0011】

さらに、心不全におけるほとんどの 遮断薬は治療群全体に有益な作用を提示しているとはいえ、ベースライン時の臨床上的特性で説明されていない予後には目立った個体間の差異も存在している(CIBIS-II Investigators, 1999)。薬物治療に呼応した個体間の差異はほとんどすべての薬に認められる。 遮断薬での慢性的心不全の治療下では、罹患率と死亡率が高い場合には用量設定の段階的増加は複雑な形をとり、個体間の差異がかなりあり、別の治療の選択肢も存在するため、投薬治療に応じた好ましい(もしくは有害な)長期的な反応性の尤度を評価することは意思決定に重要なインパクトを及ぼしている。心不全の患者の5年以内の死亡率が約50%であることは治療法の選択肢についての真剣な検討を促し、典型的には 遮断薬、アンギオテンシン転換酵素抑制剤(アンギオテンシン受容体アンタゴニスト)、利尿剤、およびジゴキシンを含んだ、多重薬投与を行うにいたった。遮断薬治療は比較的安定した患者に何ヶ月間かけて、少量投与(すなわち、約10 mg)で

40

50

始めて徐々に目標とする投与量もしくは忍容し得る投与に向け増やしていく。他の薬の投与量の調整、もしくは他の薬の開始は、増量期間中は一般的ではない。したがって、遮断薬による心不全の治療は個別化されなければならない。実際、「投与量を個別化され綿密にモニターすること」という表現は、心不全の治療用に認可された2種類の遮断薬製剤に対する米国における処方情報の中に見られる。さらに、動物モデルやヒトでの研究では、心不全を起こした心臓の細胞および全体でのリモデリングを遮断薬に促される形で改善するには何ヶ月間かの安定した治療が必要である(Lowes et al., 2002)。左室駆出分画(LVEF)変化(van Campen et al., 1998)、運動負荷(Bolger, 2003)および生存率(Packe, et al., 2001)などを含め、遮断薬への反応性のかなりの個体差は注目されてきた。にもかかわらず、圧倒的に数の多いデータに基づいて、遮断薬治療は大部分の慢性心不全の患者について、容量過負荷、変力作用の投入が必要な状況、徐脈、血行動態不安定およびぜんそくのような禁忌事項なしと想定して、その使用を検討するべきである。

10

【0012】

したがって、種々の遮断薬の間で、特にブシンドロールを他の遮断薬と比較した場合にのみ相違が認められるだけでなく、患者間の個体差は、これらの患者がそれぞれ持っている特定の遮断薬治療に好適な応答を示す能力中にも認められる。ブシンドロールの薬物としての価値についての証拠、特にこの個体差を説明する証拠が求められている。

【発明の開示】

【0013】

発明の概要

20

本発明は、ブシンドロールに対する個体の応答に影響を与えるアドレナリン受容体中の多型の同定に基づく個別的な心血管疾患治療の方法を提供する。ある種の態様では、それは心不全の個別的な治療法に関係する。

【0014】

ある種の態様では、患者のアドレナリン受容体遺伝子中の少なくとも一つの多型に関する配列情報であり、患者でのブシンドロールの効用を予測する情報を得る段階を含む、患者のブシンドロール処置を評価するための方法がある。配列情報は核酸配列情報および/またはアミノ酸配列情報とすることができる。特定の態様では、アドレナリン受容体遺伝子は α_1 ARまたは α_2c ARである。場合によっては、両遺伝子中の多型に関する配列情報が得られる。

30

【0015】

さらに、多型はコードタンパク質中のアミノ酸389位に対応する α_1 -アドレナリン受容体(α_1 AR)遺伝子中のヌクレオチド1165位のものおよびコードタンパク質中のアミノ酸322-325位に対応する α_2c AR遺伝子のヌクレオチド964-975位の別のものを含む。

【0016】

本発明は、遺伝子産物中の389位でアルギニンをコードする α_1 AR遺伝子がホモ接合性であることで、ブシンドロールによる処置に適した生理機能が患者にもたらされるという本発明者らによる判定に基づく。さらに、本発明は、遺伝子産物中のアミノ酸322-325位の欠失を引き起こす α_2c AR遺伝子中の欠失がブシンドロールによる心不全後期の処置に有害であるという判定に基づく。「処置」という用語は、予防措置とは対照的に、心血管疾患とまたは心血管の症状と診断された患者に対する治療のことをいうものと理解される。

40

【0017】

多型は遺伝子との関連で生じるが、しかしながらコード遺伝子産物に影響を及ぼす多型の場合、その遺伝子産物の変化を多型と呼ぶこともできることが一般に理解される。

【0018】

本発明によれば、方法は、心血管疾患を有する患者にブシンドロールを処方するまたは投与するかどうかを評価する段階を含み、患者からブシンドロールに対する応答に影響を及ぼす、アドレナリン受容体遺伝子および/またはそのコード遺伝子産物中のその多型に関する情報を得る段階を含む。

【0019】

50

したがって、本発明は、直接的にまたは α_1 AR遺伝子上の1165位および/もしくは α_2 cAR遺伝子上の964-975位のヌクレオチド配列を判定することで推定されるように α_1 ARおよび/または α_2 cARタンパク質中の多型に関する情報を得る段階、ならびに得られた情報に基づきブシンドロールを処方するまたは投与する段階に係る。 α_1 ARまたは α_2 cARタンパク質に対する同種の核酸は、そのタンパク質をコードするmRNA転写産物、mRNA転写産物から作出される任意のcDNAの両鎖、および α_1 ARまたは α_2 cAR遺伝子に対するゲノムDNAの両鎖を含むことが理解されることが思われる。

【0020】

心血管疾患患者が α_1 ARの389位および/または α_2 cARの322-325位に有するのがどの多型であるかに関する知識は、患者にブシンドロールを投与するまたは処方するかどうかを評価するための基礎となる。

10

【0021】

本発明はさらに、遮断薬、具体的にはブシンドロールを用いた処置に正に応答しうる心不全患者を同定する。

【0022】

本発明は同様に、遮断薬、具体的にはブシンドロールの送達用の装置および組成物をそのような治療の必要性がある個体に提供する。

【0023】

本発明の方法は個体の α_1 AR遺伝子での心不全患者の遺伝子型を判定する段階を含み、患者が α_1 Gly389の保有者(すなわち、一つまたは二つのGly389対立遺伝子を有する)でなければ、患者が標準的な用量のブシンドロールに正の応答を示す可能性が高い。一つの態様では、ブシンドロールは α_1 Arg389についてホモ接合性である心不全患者に処方される。本発明の方法はさらに、患者の両 α_1 AR遺伝子が遺伝子産物中の389位でアルギニンをコードすることを意味する、患者が「ホモ接合性の α_1 Arg389」であることを知ることに基づいて、標準的な用量のブシンドロールをそのような治療の必要性がある患者に処方するまたは投与する段階を企図する。本発明の方法は、ホモ接合性の α_1 Arg389である患者にブシンドロールを処方するまたは投与する段階を含み、これは患者がその遺伝子型を有することの判定の仕方を問うものではない。

20

【0024】

さらなる態様では、本発明の方法は個体の α_2 cAR遺伝子での心不全患者の遺伝子型を判定する段階を含み、患者が α_2 cDel322-325の保有者でなければ、患者が標準的な用量のブシンドロールに正の応答を示す可能性が高い。ある種の態様では、ブシンドロールはアミノ酸322-325位で α_2 cについてホモ接合性野生型である(すなわち、アミノ酸が欠失していない)心不全患者に処方される。本発明の方法はさらに、患者には α_2 cAR中のアミノ酸322-325位をコードする α_2 cAR遺伝子配列中の欠失がないことを意味する、患者が「ホモ接合性野生型 α_2 cAR」であることを知ることに基づいて、標準的な用量のブシンドロールをそのような治療の必要性がある患者に処方するまたは投与する段階を企図する。本発明の方法は、欠失についてホモ接合性野生型である(欠失保有者ではない)患者にブシンドロールを処方するまたは投与する段階を含み、これは患者がその遺伝子型を有することの判定の仕方を問うものではない。

30

40

【0025】

ある状況では、患者はこれらの多型の一方について遺伝子型を特定されることができ、その後もう一方の多型に対して次の判定が行われることが考えられる。このシナリオでは、二つの異なるサンプルが評価される。または、単一のサンプルを得て、二つの別個の多型について評価してもよい。別の態様では、ブシンドロールはホモ接合性の α_1 Arg389およびホモ接合性野生型 α_2 cARのディプロタイプを有する心不全患者に処方される。本発明の方法はさらに、患者が α_1 Arg389についてもしくは野生型 α_2 cARについてホモ接合性、またはそのディプロタイプの組合せであることを知ることに基づいて、標準的な用量のブシンドロールをそのような治療の必要性がある患者に処方するまたは投与する段階を企図する。

50

【0026】

本発明の方法は同様に、個体がその₁AR遺伝子でArg389についてホモ接合性である(かつ389Glyの保有者ではない)かどうかおよび/または個体が_{2c}AR遺伝子についてホモ接合性野生型でありかつ_{2c}Del322-325の保有者ではないかどうかに基づき、以下に限定されないが、拡張型心筋症、虚血性心筋症、虚血性心疾患(アンギナ、心筋梗塞)、褐色細胞腫、片頭痛、心不整脈、高血圧およびさまざまな不安障害などの、類似の病態生理学的状態を有する個体が標準的な用量のブシンドロールに正に応答する可能性が高いかどうかを判定する段階を含む。

【0027】

ある種の態様では、本発明は、(i) 患者の₁AR遺伝子の一方もしくは両方のコード配列のヌクレオチド1165位の配列または(ii) 患者の₁ARタンパク質の389位のアミノ酸のいずれかを知る段階を含み、個体がブシンドロールによる処置が検討されている、患者のブシンドロール処置を評価するための方法に関係する。

10

【0028】

さらなる態様では、本発明は、(i) 患者の_{2c}AR対立遺伝子の一方もしくは両方のヌクレオチド964-975位の配列のまたは(ii) 患者の_{2c}ARタンパク質の322-325位のアミノ酸のいずれかの欠失が存在するかどうかを知る段階を含み、個体がブシンドロールによる処置が検討されている、患者のブシンドロール処置を評価するための方法に関係する。

【0029】

患者のタンパク質の全てを本発明の任意の態様において評価できるのではなく、サンプルを得ることができ、サンプル中のタンパク質の一部をそのタンパク質配列について評価できると考えられる。

20

【0030】

「知る」という用語は、特定の情報の所有のことをいうようその通常のおよび平易な意味にしたがって用いられることも考えられる。典型的には医療従事者がブシンドロールを患者に処方するまたは投与するかどうかを評価するはずであり、その評価を行う際に、医療従事者が患者の₁AR対立遺伝子の一方もしくは両方またはそのコードタンパク質に関するおよび/あるいは患者の_{2c}AR対立遺伝子の一方もしくは両方またはそのコードタンパク質に関する一つまたは複数の試験を指図するものと考えられる。本明細書において論じられる多型との関連で、「対立遺伝子」および「遺伝子」という用語は同じ意味で用いられる。

30

【0031】

本発明の他の局面は、心臓病を有する患者を処置するための方法を含み、これは389位にグリシンを有する₁ARタンパク質の検出可能なレベルを持たない、または両₁AR対立遺伝子のヌクレオチドコード配列中の1165位でシトシンについてホモ接合性である患者にブシンドロールの有効量を投与するまたは処方する段階を含むことができる。いずれにせよ、医者またはその他の医療従事者は、その患者が₁AR遺伝子中のArg389/Arg389多型を有するという理由で、ブシンドロールがその患者に適した医用薬剤であることに気付いているならブシンドロールを処方するまたは投与することができる。

【0032】

あるいはまたはさらに、心臓病を有する患者を処置するための方法は、アミノ酸322-325位の欠失を有する_{2c}ARタンパク質の検出可能なレベルを持たない、または両_{2c}AR対立遺伝子のコード配列中のヌクレオチド964-975位の存在についてホモ接合性(「非欠失」)である患者にブシンドロールの有効量を投与するまたは処方する段階を含むことができる。いずれにせよ、医者またはその他の医療従事者は、その患者が_{2c}AR遺伝子中のDel322-325多型の保有者ではない、つまり、欠失についてヘテロ接合性またはホモ接合性ではないという理由で、ブシンドロールがその患者に適した医用薬剤であることに気付いているならブシンドロールを処方するまたは投与することができる。

40

【0033】

さらなる方法は、a) i) 患者の一方もしくは両方の₁AR遺伝子のコード配列中のコー

50

ド位置1165での多型の存在またはii) α_1 ARタンパク質の389位のアミノ酸での多型の存在を示す情報を得る段階; およびb) ブシンドロールを処方するまたは投与する段階を含む、心不全患者がブシンドロールに正に应答するかどうかを評価する段階を含む。

【0034】

さらに、本発明により網羅されるその他の方法は、a) i) 患者の一方もしくは両方の α_1 AR対立遺伝子のコード配列中のコード位置1165での多型の存在またはii) α_1 ARタンパク質の389位のアミノ酸での多型の存在を示す情報を得る段階; およびb) 患者の遺伝子型から α_1 ARタンパク質においてホモ接合性Arg389であることが示唆される患者にブシンドロール療法を処方するかまたは患者の遺伝子型から α_1 ARタンパク質においてホモ接合性Arg389でないことが示唆される患者にブシンドロールを処方しないかのいずれかの段階を含む、ブシンドロールを用いて患者を処置する段階を含む。

10

【0035】

本発明は α_1 AR遺伝子中のArg389/Arg389多型を有する患者での心臓病の処置のための医用薬剤の製造におけるブシンドロールの使用に関係するとさらに考えられる。方法について論じられる態様は、医用薬剤の製造におけるブシンドロールの使用により実行することができる。

【0036】

同様に、本発明は、患者から生体サンプルを得ることおよび(i) 患者の α_1 AR遺伝子の一方もしくは両方のコード配列のヌクレオチド1165位の配列または(ii) 患者の α_1 ARタンパク質の389位のアミノ酸のいずれかを判定することによりArg389多型についてそのサンプルを評価することに関係する。 α_1 ARタンパク質が評価される場合には、サンプルが389位にグリシンを有する任意の α_1 ARタンパク質を含むかどうかを探ることができると考えられる。

20

【0037】

さらなる方法は、a) i) 964-975位のヌクレオチド配列が患者の α_2 cAR対立遺伝子の一方もしくは両方で欠失されているまたはii) 322-325位のアミノ酸配列が患者の α_2 cARタンパク質で欠失されているかどうかを示す情報を得る段階; およびb) ブシンドロールを処方するまたは投与する段階を含む、心不全患者がブシンドロールに正に应答するかどうかを評価する段階を含む。 α_2 cARタンパク質が評価される場合には、サンプルが該当の欠失を有する任意の α_2 cARタンパク質を含むかどうかを探ることができると考えられる。

30

【0038】

さらに、本発明により網羅されるその他の方法は、a) i) 964-975位のヌクレオチド配列が患者の α_2 cAR対立遺伝子の一方もしくは両方で欠失されているまたはii) 322-325位のアミノ酸配列が患者の α_2 cARタンパク質で欠失されているかどうかを示す情報を得る段階; およびb) 患者の遺伝子型から α_2 cAR対立遺伝子においてホモ接合性野生型であることが示唆される患者にブシンドロール療法を処方するかまたは患者の遺伝子型から α_2 cARタンパク質においてホモ接合性野生型でないことが示唆される患者にブシンドロールを処方しないかのいずれかの段階を含む、ブシンドロールを用いて患者を処置する段階を含む。

【0039】

本発明は α_2 cAR対立遺伝子中のホモ接合性野生型の322-325多型を有する患者での心臓病の処置のための医用薬剤の製造におけるブシンドロールの使用に関係するとさらに考えられる。方法について論じられる態様は、医用薬剤の製造におけるブシンドロールの使用により実行することができる。

40

【0040】

同様に、本発明は、ブシンドロールによる処置が検討されている患者から生体サンプルを得ることならびに(i) 患者の α_1 AR対立遺伝子の一方もしくは両方のコード配列のヌクレオチド1165位の配列; (ii) 患者の α_1 ARタンパク質中の389位のアミノ酸; (iii) 一方もしくは両方の α_2 cAR対立遺伝子のコード配列中のヌクレオチド964-975位の欠失が存在するかどうか; および/またはiv) 患者の α_2 cARタンパク質中のアミノ酸322-325位の欠失が

50

存在するかどうかを判定することにより、 α_1 ARタンパク質中のArg389多型および/または α_2 ARタンパク質中のDel322-325多型についてサンプルを評価することに関係する。

【0041】

これらの方法を達成するため、医者、医療従事者、またはその職員は評価用の生体サンプルを得ることができる。サンプルは医療従事者もしくはその職員により分析されてもよく、またはそれは外部のもしくは独立の研究室に送られてもよい。医療従事者は、試験によって患者の α_1 AR遺伝子もしくは対立遺伝子を、コードタンパク質とは区別されると見なす情報が供与されているかどうかを認識することができ、または医療従事者は、試験によって患者の遺伝子型はGly389/Gly389表現形(「ホモ接合性Gly」配列)、Arg389/Gly389表現形(「ヘテロ接合性」配列)、もしくはArg389/Arg389表現形(「ホモ接合性Arg」もしくは「ホモ接合性野生型」配列)を反映することが直接的にもしくは間接的に示唆されるだけであることに気付くことができる。

10

【0042】

同様に、医療従事者は、試験によって患者の α_2 AR遺伝子もしくは対立遺伝子を、コードタンパク質とは区別されると見なす情報が供与されているかどうかを認識することができ、または医療従事者は、試験によって患者の遺伝子型はホモ接合性野生型配列(どちらの対立遺伝子にも欠失がない)、ヘテロ接合性Del322-325表現形(「ヘテロ接合性」配列)、もしくはDel322-325/Del322-325表現形(「ホモ接合性欠失」配列)を反映することが直接的にもしくは間接的に示唆されるだけであることに気付くことができる。

20

【0043】

実施例で論じられるいくつかの態様では、 α_1 ARについてヘテロ接合性配列またはホモ接合性Gly配列のいずれかを有する患者は「Gly保有者」と呼ばれる。同様に、 α_2 ARについてヘテロ接合性配列またはホモ接合性欠失配列のいずれかを有する患者は「Del322-325保有者」または「欠失保有者」と呼ばれる。

【0044】

これらのいかなる場合でも、医療従事者はブシンドロールが適切な医用薬剤選択肢であるかどうかを判断することをその者らに可能にさせる関連情報を「知っている」。例えば、研究室ではその人員も適切な情報を知るように患者の遺伝子型を判定するための試験が行われると考えられる。その者らは行われた試験の具体的結果を医療従事者に折り返し報告することができ、または研究室ではブシンドロールが適切な薬物であることを研究室での結果に基づいて単純に報告することができる。

30

【0045】

さらなる態様では、一方または両方の α_1 AR対立遺伝子のコード配列のヌクレオチド1165位の患者の遺伝子型が知られる。本発明との関連で、コード配列の1165位で一方または両方の対立遺伝子の中にグアニンまたはシトシンが含まれるかどうか重要である。これによって、どのアミノ酸を α_1 ARタンパク質配列の389位に見出すことができるかが示唆される。コード配列中の1165位のシトシンはアルギニンをコードし、その一方でコード配列中のグアニンはグリシンをコードする。特定の態様では、患者の両 α_1 AR対立遺伝子中の1165位の配列が知られる。この結果は両対立遺伝子でグアニン、両対立遺伝子でシトシン、または一方の対立遺伝子でグアニンおよびもう一方の対立遺伝子でシトシンとすることができる。

40

【0046】

ある種の態様では、一方または両方の α_2 AR対立遺伝子のコード配列のヌクレオチド964-975位の患者の遺伝子型が知られる。本発明との関連で、 α_2 AR遺伝子の一方または両方の対立遺伝子に欠失が存在するかどうか重要である。これによって、 α_2 ARタンパク質配列のアミノ酸322-325位(アミノ酸322位、323位、324位、および325位)の欠失アミノ酸が存在するかどうか示唆される。特定の態様では、患者の両 α_1 AR対立遺伝子中の964-975位に対応するヌクレオチド配列の欠失が存在するかどうか知られる。

【0047】

遺伝子のコード配列は、伝令RNAの転写に使われる遺伝子の鎖をいうことを当業者は容

50

易に理解する。コード配列の配列は、転写された転写産物の配列に相補的である。コード配列と非コード配列との間の配列の相補的性質のため、任意のコード配列の配列は転写産物、非コード鎖、またはコードタンパク質の配列を知ることにより判定することができる。一方または両方の対立遺伝子中のその位置の核酸配列は、当業者に公知のいくつかの方法により判定することができる。そのような方法は連鎖停止配列決定、制限酵素消化、対立遺伝子特異的なポリメラーゼ反応、一本鎖高次構造多型解析、遺伝子ビット解析、温度勾配ゲル電気泳動、またはリガーゼ連鎖反応を含むが、これらに限定されることはない。

【0048】

または、 $_1$ ARタンパク質配列を評価することができる。ある種の態様では、患者の $_1$ ARタンパク質の一つまたは複数での389位のアミノ酸が知られる。患者由来の評価される任意のサンプルは、分析されうる複数の $_1$ ARタンパク質を含むことが考えられる。これらのタンパク質の分析では、患者が389位にアルギニンのみ、389位にグリシンのみを有する $_1$ ARタンパク質、または両タイプの混合物を有するかどうかを判定することができる。同様に、 $_2$ cARタンパク質配列を評価することができる。特定の態様では、患者の $_2$ cARタンパク質の一つまたは複数でのアミノ酸322-325位の欠失が存在するかどうか知られる。

10

【0049】

患者由来の評価される任意のサンプルは、分析されうる複数の $_1$ ARおよび $_2$ cARタンパク質を含むことが考えられる。これらのタンパク質の分析では、患者が389位にアルギニンのみ、389位にグリシンのみを有する $_1$ ARタンパク質、または両タイプの混合物を有するかどうかを判定することができる。同様に、その分析では患者がアミノ酸322-325位に野生型配列(欠失なし)のみ、322-325に対応するアミノ酸の欠失のみを有する $_2$ cARタンパク質、または両タイプの混合物を有するかどうかを判定することができる。

20

【0050】

タンパク質中の特定位置での配列を判定するための方法は、当業者に周知である。それらは抗体、高圧液体クロマトグラフィー、または質量分析の使用を含むことができる。

【0051】

上記のように、 $_1$ AR遺伝子もしくはタンパク質および/または $_2$ cAR遺伝子もしくはタンパク質中の特定位置の配列を知ることができる。本発明のいくつかの方法は、 $_1$ AR遺伝子もしくはタンパク質配列および/または $_2$ cAR遺伝子もしくはタンパク質配列において配列を判定する段階を含む。

30

【0052】

その結果、いくつかの態様には患者から生体サンプルを得る段階が含まれると考えられる。生体サンプルは、臓器の全部もしくは一部、組織、細胞、核酸、タンパク質、またはその他のそのような高分子および物質などの生体材料を含むサンプルである。サンプルは唾液、血清、血液、血しょう、髄液、精液、リンパ液、尿、糞便、胸水、腹水、組織サンプル、組織生検、細胞スワブ、またはその組合せを含むことができる。本発明のその他の態様では、サンプルは肺、皮膚、筋肉、肝臓、腎臓、結腸、前立腺、乳房、脳、膀胱、小腸、大腸、頸部、胃、膵臓、精巣、卵巣、骨、髄、または脊椎由来の細胞を含むことができる。いくつかの態様では、サンプルは白血球、血しょうまたは血清サンプルであり、一方でその他の態様では、サンプルは洗浄液、塗布標本、または患者表面もしくは内部領域のスワブにより得られる。ある種の態様では、生体サンプルは血液サンプルである。

40

【0053】

本発明のいくつかの態様では、患者の $_1$ AR遺伝子および/もしくはタンパク質の配列ならびに/または患者の $_2$ cAR遺伝子および/もしくはタンパク質の配列は、既に評価されている可能性がある。この分析は患者がブシンドロールによる処置を検討される前にまたは一般検査の一部として行われている可能性があると考えられる。例えば、患者の $_1$ AR遺伝子および/またはタンパク質の配列、ならびに患者の $_2$ cAR遺伝子および/またはタンパク質の配列を判定し、データベースの中に入れておくかまたは患者の病歴の中に入れておくことができる。この場合、医療従事者は、i) 一方もしくは両方の $_1$ AR対立遺伝子のコ

50

ード配列中の1165位の配列またはii) $_1$ ARタンパク質のアミノ酸配列中の389位の配列; iii) 一方もしくは両方の $_2$ cAR対立遺伝子のコード配列中の964-975位の配列; および/あるいはiv) $_2$ cARタンパク質のアミノ酸配列中の322-325位の配列に関する患者歴を得ることによって配列が何であるかを知りようになる。

【0054】

本発明は同様に、 $_1$ AR対立遺伝子もしくはタンパク質および/または $_2$ cAR対立遺伝子もしくはタンパク質中の関連位置での核酸またはタンパク質配列の判定結果の報告を含むことができる。ある種の態様では、方法は、前段落に記述されている(i)、(ii)、(iii)、および/または(iv)の判定結果を含んだ報告書を準備する段階を含む。そのような報告書は患者を名前、社会保障番号、および/またはその他の識別番号もしくは識別子によって

10

特定することができる。報告書は同様に、実際のデータを判定の結果としてまたはそのデータの概要を含むことができる。

【0055】

いくつかの態様では、方法は、ブシンドロールによる処置の必要性がありそうな患者を特定する段階を含む。ブシンドロールが処置選択肢として検討されている患者は、心不全、拡張型心筋症、虚血性心疾患、褐色細胞腫、片頭痛、心不整脈、高血圧または不安障害などの病状の症状を有する可能性があり、またはその病状と診断されている可能性がある。ある種の態様では、患者は、具体的にはアンギナおよび/または心筋梗塞とできる虚血性心疾患の症状を有する、または虚血性心疾患と診断されている。特定の場合、患者は心不全の症状を有する、または心不全と診断されている。心不全は進行性心不全と考えられるが、本発明はそのような患者に限定されなくてもよい。「進行性心不全」という用語は、心臓病学の分野におけるその通常のおよび平易な意味にしたがって用いられる。いくつかの態様では、ブシンドロールが処方される患者は、NYHA分類体系によるクラスIIIまたはクラスIVの心不全を抱えることがある。NYHA分類体系は一つの評価体系であるが、本発明はこのような方法で限定されないこと、およびこれは限定ではなく例示であると意図されることが考えられる。患者は別のそのような体系によって分類することができる。患者は異なる方法論によって分類できること、しかし本発明は同様に実施できることがさらに考えられる。

20

【0056】

しかしながら、その他の態様では、患者は進行性心不全とまでいかないが心不全の徴候または症状を抱えることがある。そのような状況では、患者はNYHA分類体系によるクラスIもしくはII心不全患者であった可能性があり、またはその患者と特徴付けられる可能性がある。これらの態様では、患者はArg389 $_1$ 多型について遺伝子型を特定されることができ、その場合、Arg/Arg表現形を有する者がブシンドロール処置の候補者である。その結果、本発明の方法は患者がArg389/Arg389多型を有するかどうかを判定する段階により、およびそうならばブシンドロールを投与する段階により患者において心不全を予防する段階を含むことができる。心不全の症状を有する、心不全の危険因子を有する、または心不全の家族歴もしくは前歴を有する患者を含むが、これらに限定されない、特定の患者がとりわけこれに適しているかもしれない。

30

【0057】

さらに、方法は、その他の治療薬を投与するもしくは処方する段階または患者を処置するため外科的なもしくはその他の介入的な戦略を実行する段階を含むことができる。

40

【0058】

本発明によれば、方法はさらに、389多型での患者の遺伝子型が、ホモ接合性のアルギニン遺伝子型としても知られるArg389/Arg389であることを知った後でブシンドロールを患者に処方するまたは投与する段階を含むことができる。さらにまたはあるいは、患者がホモ接合性野生型 $_2$ cAR多型を有する($_2$ cAR遺伝子のどちらの対立遺伝子の中にもヌクレオチド964-975位の欠失を保有していない)ことを知った後でブシンドロールを処方するまたは投与することができる。さらに、これは一方または両方の遺伝子型を示さない患者にブシンドロールを処方できないまたは投与できない場合とすることができる。具体的に

50

はブシンドロールでない 遮断薬を患者に処方するまたは投与することができる。

【0059】

さらなる態様では、方法は、(iii) 患者の 2_c AR遺伝子の一方もしくは両方のコード配列中の964-975位のヌクレオチド配列または(iv) 患者の 2_c ARタンパク質の一方もしくは両方の322-325位のアミノ酸配列の欠失が存在するかどうかを知る段階を含むことができる。これは 1 AR遺伝子中1165位(タンパク質中389位)で患者が野生型かどうかに加えてまたはそれとは無関係に知ることができる。

【0060】

進行性心不全(つまり、NYHAクラスIIIまたはIV)患者がホモ接合性 2_c AR Del322-325遺伝子型を示し、その患者がArg389/Arg389遺伝子型を示さない場合には、患者にブシンドロールを処方または投与できないと考えられる。ある種の態様では、患者は、その人種が黒人である患者とされる。あるいは、患者がホモ接合性 2_c AR Del322-325遺伝子型を示さない場合には、患者にブシンドロールを処方するまたは投与することができる。

【0061】

ブシンドロールが患者にとって適切な薬物であるかどうかを判定する際に、その他の情報を考慮することもできる。これは人種、性別、年齢、既往手術、心不全病期、心血管疾患に関する患者歴、その他の疾患もしくは状態の診断、その他の疾患もしくは状態の危険性、薬物アレルギー、薬物中毒、および/または服用中のその他の医用薬剤を含むことができる。

【0062】

したがって、本発明は同様に、ディプロタイプ解析を行うことまたはディプロタイプ解析の結果を得ることに関係すると考えられる。特定の態様では、ディプロタイプ解析は、(1) 患者がArg389/Arg389遺伝子型を有するかどうか判定するために 1 ARの389位の多型をおよび(2) 患者がDel322-325/Del322-325遺伝子型を有するかどうか判定するために 2_c ARの322-325位の多型を直接的にまたは間接的に評価することを含む。その他の多型、特に影響を受けるものまたは治療薬としてのブシンドロールに好ましく応答する患者の能力に影響を及ぼすものはハプロタイプで含まれることができる。

【0063】

本発明の一つの局面について論じられている任意の態様は、同様に本発明の他の局面に当てはまる。これには 1 ARおよび 2_c ARのそれぞれについて論じられる態様が含まれる。具体的には、 1 AR遺伝子、対立遺伝子、またはタンパク質について論じられている任意の態様を 2_c AR遺伝子、対立遺伝子、またはタンパク質について実施することができ、その逆もまた同様である。

【0064】

実施例の部分の態様は、本発明の全ての局面に適用できる本発明の態様であると理解される。

【0065】

特許請求の範囲の中の「または」という用語の使用は、代替物のみをいうことが明示的に示されない限り、または代替物が相互に排他的でない限り、「および/または」を意味するよう用いられるが、開示では代替物ならびに「および/または」のみのことをいう定義を支持する。

【0066】

本出願を通じて、「約」という用語は、数値にはその数値を測定するために使用される装置または方法に対する誤差の標準偏差が含まれることを示唆するよう用いられる。

【0067】

長年にわたる特許法に従って、「一つの(a)」および「一つの(an)」という単語は、特許請求の範囲または明細書の中で「含む(comprising)」という単語と併せて用いられる場合、具体的に断りのない限り、一つまたは複数を意味する。

【0068】

本発明のその他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになると思わ

10

20

30

40

50

れる。しかしながら、詳細な説明および具体例は、本発明の具体的な態様を示すとはいえ、本発明の趣旨および範囲内のさまざまな変更および修正がこの詳細な説明から当業者には明らかになるので、例証としてのみ与えられることが理解されるべきである。

【0069】

例示的な態様の説明

本発明の発明者らは、他の遮断薬に比較して、若干の患者の垂集団において、ブシンドロールは好ましくない治療応答性を示し、ある条件下で見ると好ましくない反応性を示すと思われるというデータに直面した。本発明者らは、心不全(HF)におけるブシンドロールに対する応答の個体差は遺伝的個体差によっていると仮定し、この原因を究明した。そうすることにより、本発明者らはブシンドロールの治療的価値とヒトにおける心不全治療への妥当性についての重大な論証を行うことができた。

10

【0070】

タンパク質のアミノ酸389位(遺伝子の核酸1165位)にある β_1 ARの遺伝的可変性を評価した。これは、ここではトランスフェクト細胞中で突き止められた、Arg389とGly389という名称で示す2種類の受容体の性質に基づいており、基本的でアゴニスト刺激を受けたアデニル酸シクラーゼ活性はArg受容体の約3倍である(Mason et al., 1999)。ところが、本試験以前はArg389の保有者である患者と、またはGly389の保有者である患者のいずれがブシンドロール投与による利益を多く受けるかということが明らかでなかった。例えば、Arg389の機能を高めた場合、ブシンドロールは効果的な抑制因子として作用することが不可能となる可能性があった。心臓病患者の移植ないしはHF入院(プラセボもしくはブシンドロールを投与した実際の患者の心不全の悪化)が評価されたが、かかる仮定の最終的な試験は行われていない。

20

【0071】

かくして、本発明は、トランスフェクト細胞(以下に詳述されている実施例1を参照のこと)、トランスジェニックマウス(以下に詳述されている実施例2を参照のこと)および多施設プラセボ対照臨床試験(以下に詳述されている実施例3を参照のこと)での調査を含めた三段階のアプローチを用いて、Arg(またはGly)389 β_1 AR対立遺伝子が、遺伝薬理的に見て心不全における遮断薬への反応性を予測するための遺伝子座となっているかという疑問にアプローチしている。臨床試験はBEST(遮断薬評価生存試験)と呼ばれる。トランスフェクト細胞では、ノルエピネフリン刺激を受けたcAMPのブシンドロールによる機能の拮抗作用が評価された。Arg389受容体がノルエピネフリンに刺激されて著しく高いcAMP産生を示したとはいえ、ブシンドロールはこの反応に対して拮抗作用を示した。cAMP産生の絶対量の減少は、Gly389発現細胞に比較してArg389発現細胞の方がかなり大きかったが、それはArg389の高ノルエピネフリン刺激に加えて、反応性に対して完全に拮抗作用を示すブシンドロールの効力によるものである。Arg389 cAMPの約80%抑制が0.1 μ Mブシンドロールで観察されたが、これはBEST(未公開データ)で使われた投与量の薬の血しょう濃度と同程度のものである。これらの結果によって、患者にあっては、ブシンドロール投与による心臓 β_1 AR活性度の変化は β_1 Gly389遺伝子型保有者の患者に比べて β_1 Arg389遺伝子型保有者の患者において大きなものとなり得ることが示唆され、さらにこれらの結果は、可能性としてはより好ましい臨床的反応性に結びつくと考えられる。本発明者らは、トランスジェニックマウス実験で心臓中の主要なシグナル伝達タンパク質およびCa²⁺-操作タンパク質の発現に関し、6ヶ月間を通じて遮断薬の作用を調べた。Gly389マウスでは、投与によって、これらのタンパク質の発現に対する効果がなかった。他方、遮断薬の全体的治療効果はArg389マウスでは、分子レベルでのリモデリングの改善と合致した変化が認められた。次いで、BESTという、広範に表現形の検査を行いかつプラセボ処置群をマッチングさせた試験で保存されたDNAが使用されたが、トランスフェクト細胞とトランスジェニックマウスの結果によれば、本発明者らは β_1 Arg389が生存にとって最も好ましい遺伝子型となりうるという推測的仮定を持った。ここに有力なモデルを仮定した。かくして、二つの遺伝子型はArg389ホモ接合体と1種類ないし2種類のGly389対立遺伝子を有する患者(すなわち、Glyに対するホモ接合体またはヘテロ接合体に対して同型であり、このグ

30

40

50

ループは「Gly389保有者」という)。BEST試験の臨床エンドポイントにおける結果は、 β_1 Gly389保有者である患者にブシンドロールを投与した場合に、死亡、心不全による入院、または死亡および心不全による入院というエンドポイントの改善はなかったが、プラセボ処置の場合と比較して β_1 Arg389ホモ接合型患者にブシンドロール投与を行った場合には、三つの結果全てに臨床的に著しい改善を示した。心拍数、血圧ならびにLVEF、もしくは心不全の原因を含め、ベースライン時の臨床的パラメータは、全ての β_1 AR遺伝子変異体を含むコホート全体においてはエンドポイントへの反応性を予測できなかった。さらに、これらの関係における β_1 Gly49多型の効果は全く明らかではなかった。そこで総合的に、これらを検討して得られた結果から、 β_1 ARの389位変異体は心不全におけるブシンドロールへの反応性の有力な予測判断因子であることがわかる。

10

【0072】

さらに、ブシンドロールの効用に対する β_2 cAR遺伝子における遺伝子変異体の役割もまた、仮定された。本発明の発明者らは心不全におけるブシンドロールへの反応性における個体差は β_2 cARの遺伝子の個体差によっているという仮定を行った。かくして、本発明は、 β_2 cDel1322-325 AR対立遺伝子が、大規模多施設プラセボ対照試験であるBESTを用いて、遺伝薬理的に見て、心不全に対するブシンドロールの反応性を予測するために、遺伝子座となりうるかどうかの疑問に迫るものである(以下に詳述されている実施例を参照のこと)。BESTという、広範に表現形の検査を行いかつプラセボ処置群を対照とした試験から保存されたDNAが使用された。ここに、有力なモデルが仮定された。こうして、二つの遺伝子型のグループ、1) β_2 c野生型のホモ接合型(いずれの対立遺伝子にも322-325に欠失のない患者)と2) β_2 cDel1322-325ヘテロ接合型もしくはホモ接合型(一方または両方の対立遺伝子に欠失のある患者で、「 β_2 cDel1322-325保有者」という)を用意した。BESTの臨床上的エンドポイントでの結果から、 β_2 cDel1322-325保有者である患者でのブシンドロール処置の死亡、心不全による入院、または死亡および心不全入院というエンドポイントの改善はないことが明らかになったが、プラセボ処置の場合と比較してブシンドロール治療を行った β_2 c野生型のホモ接合体の患者においては、三つの結果全てに臨床的に重大な改善を示した。心拍数、血圧ならびにLVEF、もしくは心不全の原因を含むベースライン時の臨床的パラメータは、全 β_2 cAR遺伝子変異体を含むコホート全体においてエンドポイントへの反応性を予測するものではなかった。そこで総合的に、これらを検討して得られた結果から、 β_2 cDel1322-325の多型は心不全におけるブシンドロールへの反応性の有力な予測因子であることがわかる。

20

30

【0073】

したがって、本発明はArg389 β_1 AR多型とブシンドロール療法との間のおよびDel1322-325 β_2 cAR多型とブシンドロール療法との間の遺伝的関係を利用する方法に関係する。

【0074】

1. アドレナリン受容体および遮断薬

心不全の処置にはアドレナリン受容体(AR)の標的化が必要とされている。アドレナリン受容体の少なくとも9つのサブタイプが存在しており(Dohlman et al., 1991; およびLiggett et al., 1993)、そのうちの少なくとも3つのサブタイプがアドレナリン受容体である。

40

【0075】

感受性、進行および処置に対する応答における一般的な遺伝的変異体の潜在的役割は、表現形の家族内集積、家族性心筋症の不完全浸透ならびに進行および処置成果の著しい個人間変動によって示唆される。アドレナリン受容体での多型が同定されているが、任意の多型と治療薬に対する臨床応答との間の相関関係が特定された患者データに関する研究は今のところない。本発明は二つの多型: 1) β_1 -AR中の389位のアミノ酸をコードする多型および2) β_2 c-AR中のアミノ酸322-325位をコードする多型に関係する。しかしながら、これらの特定の遺伝的変異体と任意の処置成果との間の関係は、本発明以前のどの臨床的証拠でも立証されておらず、少しの相関関係もブシンドロールで実証されていない。

【0076】

50

A. α_1 アドレナリン受容体

α_1 アドレナリン受容体 (α_1 -AR) は心筋細胞に発現される主要なサブタイプである。ヒトの心臓は α_1 AR と α_2 AR の両サブタイプを発現する (Bristow et al., 1986; Bristow et al., 1988)。各々の受容体が内在性カテコールアミンおよび外来的に投与されたアゴニストに対する陽性変力作用および陽性変時作用を媒介する (Bristow et al., 1986; Brodde et al., 1986; Brodde et al., 1992)。

【 0 0 7 7 】

α_1 AR は活性化時に、ノルエピネフリンによるのと同様、心臓の収縮反応を誘発する。さらに、 α_1 受容体は心筋症およびその他の疾患経路の進行において中心的な役割を担う。この受容体ならびにその関連する筋疾患のおよび不整脈の経路の活性化増大が心不全の自然歴において主要な役割を果たす。いったん心筋症の過程が始まると、心不全を起こした心臓ではさらに多くのノルエピネフリンを放出し、 α_1 受容体シグナル伝達を増加させることでその機能障害を補おうとするので、慢性的な α_1 アドレナリン作用性の活性化が疾患の進行を速める。受容体遮断の理論の一つには、 α_1 受容体を遮断し、ノルエピネフリンシグナル伝達を低下させることで、この心筋症の過程に拮抗することに基礎を置く。

【 0 0 7 8 】

α_1 アドレナリン受容体はクローニングされ、配列決定されている (Frielle et al., 1987)。この遺伝子は第10染色体の染色体q24-q26に局在していた (Yang-Feng et al., 1990)。ヒト α_1 AR は477アミノ酸の推定アミノ酸配列を有する。

【 0 0 7 9 】

α_1 AR 遺伝子のコードヌクレオチド1165位で、シトシンまたはグアニンのいずれかをヒトの個体群では見出すことができ、この結果、アミノ酸389位ではArgまたはGlyのいずれかがコードされる (Mason et al., 1999)。この位置は刺激性Gタンパク質 G_s との共役に関わる受容体細胞内ドメインのなかにある。二つの受容体の等量を発現するようにトランスフェクトされた線維芽細胞では、 α_1 -Arg389受容体は α_1 -Gly389に比べて実質的に高いアデニル酸シクラーゼ刺激を示す (Mason et al., 1999)。 α_1 AR のあまり一般的ではない多型Gly49も同定されているが、その機能的関連性に関して矛盾する報告が存在する (Rathz et al., 2002; およびLevin et al., 2002)。

【 0 0 8 0 】

α_1 -AR389Arg/Arg多型は実際に α_1 アドレナリン受容体のうち最もよく見られる型であり、米国人の約50%に存在している (アフリカ系アメリカ人ではわずかに低い)。この受容体のもう一方の変異体は389位にグリシン (Gly) を有し、これが最初にクローニングされたという理由だけで、野生型と考えられている。389位のコドンでのアルギニン (Arg) の存在がその他全ての公知の非ヒト動物種ではこの受容体の好ましい (および唯一の) 構造であり、389位の領域は重要な機能ドメインの中にある。389Arg/Argはこの受容体の最高の機能変異でもある (Mason et al., 1999); そのシグナル伝達効果は389位でGlyヘテロ接合性またはGly/Glyの場合よりも3~4倍大きい (実施例およびMason et al., 1999を参照のこと)。 α_1 -AR 389Arg/Argのシグナル伝達能力の増大は、cAMP産生 (Mason et al., 1999)、単離ヒト心筋収縮 (Mason et al., 1999)、およびトランスジェニックマウスでの心筋症の生成 (Mialet Perez et al., 2003) に当てはまる。

【 0 0 8 1 】

ある種の遮断薬がさまざまな結果を有する特異的な遺伝的変異との関係で評価されている。Sofoworaらは、血液動態反応に基づき、Gly389についてホモ接合性である患者が選択的 α_1 アドレナリン受容体アテノロールの作用に対していっそう感受性が低いことを報告しており、その変異が安静時血圧反応に特に関連する可能性があることを著者らに示唆している。Johnsonら (1993) は、Arg389についてホモ接合性では、血圧により測定した場合、選択的遮断薬メトプロロールに反応する可能性がいっそう高いことを報告している。Perezら (2003) は、マウスでの標的化遺伝子導入を使用し、損なわれていない心臓機能との関連で α_1 AR の389位変異体を評価している。389位でホモ接合性のArgまたはGlyのい

10

20

30

40

50

れかを過剰発現しているこれらのトランスジェニックマウスにおいて、Arg/Argマウスでは心筋機能の増加に対するイソプロテレノール応答の喪失がいっそう大きく、心筋障害により測定される心筋症の程度、心室リモデリングの程度、および組織構造がいっそう大きかった。その者らは同様に、非選択的 遮断薬カルベジロールにより処置された患者での左心室機能のいっそう大きな改善について報告しており、これはホモ接合性またはヘテロ接合性のいずれかの状態の、Arg389多型と関連していた。

【0082】

Liuら(2003)は、メトプロロールに対するいっそう大きな応答(心拍数の変化という点で)がGly389に比べてArg389と関連していたという発見について報告している。著者らは同様に、この結果が健常で若い男性中国人のボランティアであったその患者プールを超えて拡大することについて警告している。その者らは、この研究では多型についてメトプロロールの長期的作用が調べられていないと明確に述べている。

10

【0083】

2004年に刊行された総説(Lohse, 2004)では、Arg389多型は 遮断薬の処置の効果に関連しているかもしれないが、心不全での 遮断薬に対する応答に及ぼす β_1 アドレナリン受容体多型の影響に関する研究はなかったと指摘している。別の総説では、アドレナリン受容体中の多型が 遮断薬を用いた処置に対する応答を変化させる可能性があることを示唆する研究もあるが、異なる研究での患者数が少ないという理由で患者管理に対する確固たる結論または提言を行えなかったことを示唆している。

【0084】

20

さらに、いくつかの報告では、 β_1 -ARの389位での多型と 遮断薬に対する処置応答との間の何らの相関関係も検出されていない。このように、明細書では、死亡または死亡および心不全による入院の複合エンドポイントによる評価でメトプロロール処置心不全患者を調べたとしているWhiteらの参考文献(以下の議論#1を参照のこと)を挙げているが、本開示について際立った点が存在しており、関連性のないことが認められる。O'Shaughnessyら(2000)は、389位の多型に起因して 遮断薬(アテノロールまたはピソプロロール-両アンタゴニスト)に対する血圧または心拍反応の相違が見られなかったことを報告している。別の論文Josephら(2004)でも389位の多型での 遮断薬に対する受容体親和性に違いのないことが認められている。さらに、最近の研究では、Arg389多型についてメトプロロール処置に及ぼす「遺伝薬理学的作用」の何らの証拠も見つけられないことが報告されている。White et al., Eur. J. Heart Fail. 5:463-8, 2003。

30

【0085】

したがって、治療薬のクラスとしての 遮断薬の有効性と β_1 -AR中の389位の多型との間の相関関係は立証されていなかった。さらに、いくつかの重要な点で他の 遮断薬とは異なる、特にブシンドロールに関して、何の相関関係も得られていない。種々の 遮断薬の間での相違は著しいので、 遮断薬応答に及ぼす β_1 AR-389変異体の作用は個別の薬剤に依存することができる。

【0086】

本開示は、BESTデータを個々の遺伝子型との関連で、特にArg389多型で評価する場合、ブシンドロールが相当な治療効用を有するというデータを提供する。BEST試験では、試験された全個体群で観察されたその死亡率への影響はカルベジロール、メトプロロールCR/XLおよびピソプロロールなどの他の 遮断薬で観察されていたものよりも低かったことを考えれば、このデータは驚きである。さらに、本明細書において提供される科学的データは、初めてブシンドロールの治療効用と二つの遺伝的変異体との間の相関関係を実証する。

40

【0087】

詳細には、本発明はブシンドロールを患者に処方すべきかどうかを判定するための方法であって、 β_1 ARおよび β_2 -ARの多型ヌクレオチドまたはアミノ酸部位の同一性を判定し、その診断試験の結果に基づいてブシンドロールを処方するか否かのいずれかである方法を提供する。同様に、遺伝子型に基づき、改善された臨床応答を得ようと試みるため、好

50

ましくない α_1 AR遺伝子型を有する患者に別の医用薬剤を処方することができる。どちらのシナリオでも、薬物処置の決定は、患者の α_1 AR遺伝子型に基づく。

【0088】

このように、本発明は、個体が α_1 AR遺伝子でホモ接合性Arg389であるか、アミノ酸322-325位で α_2c ARの野生型についてホモ接合性であるか、またはその両方であるかどうかに基づき、患者、特に心不全患者に向けてブシンドロール療法を評価するための方法に関係する。または、本発明は α_1 AR389Gly保有者および α_2c ARDel322-325保有者のディプロタイプに関する方法に関係する。

【0089】

B. α_2c アドレナリン受容体

α_2c -ARは心臓交感神経末端に位置しており、シナプス間隙領域への接合部前の神経細胞によるノルエピネフリン放出を調節する。 α_2c -ARとのノルエピネフリンの結合は、神経細胞によるさらなるノルエピネフリンの放出を弱める負のフィードバック交感神経遮断反応を惹起する。マウス遺伝子除去モデルにより、 α_2c -ARは長期にわたる定常速度のノルエピネフリン放出を制御するのに主に参与していると示唆されている(Hein et al., 1999)。このように、 α_2c -ARは心臓において「保護的な」役割を担っており、ヒト心不全に見られる慢性的に上昇したノルエピネフリン量を減らしている。

【0090】

ヒト遺伝的多型が α_2c -AR遺伝子ADRA2Cについて報告されている(Small et al., 2000)。ADRA2C中の12個のヌクレオチドの喪失は、受容体の3番目の細胞内ループ中の4個の連続アミノ酸の欠失(α_2c Del322-325)に変換される(Small et al., 2000)。この欠失多型はアフリカ系アメリカ人においてはるかに一般的であり、非アフリカ系アメリカ人での0.04に比べて0.4の対立遺伝子頻度となる。全体では、この多型は米国人の約15%に存在している。

【0091】

Arg389多型とは対照的に、 α_2c アドレナリン受容体の322-325 Del多型は、この受容体のうちの稀で低機能な変異である(Small et al., 2000)。これらの4残基の喪失によって受容体機能の低下が予測されており、このことは受容体機能が50~85%抑制される細胞トランスフェクション実験で支持されている(Small et al., 2000)。 α_2c 受容体は通常、アドレナリン作用性神経末端においてノルエピネフリン放出を接合部前で持続的に阻害する

【0092】

322-325位の欠失は本質的に受容体機能を破壊し(Small et al., 2000)、より高いレベルのノルエピネフリンおよびアドレナリン作用性の駆動を引き起こす(Neumister et al., 2005)。阻害制御の低下が招く結果は、ノルエピネフリン基礎放出が構成的に増大し、いっそう高い交感神経活性状態を引き起こすということである(Hein et al., 1999)。心不全では、 α_2c Del322-325受容体では交感神経による駆動効果の増大を「保護する」制動効果が欠けているので、これは特に関心対象になる。

【0093】

ある研究では慢性心不全を有する白人のわずか7.4%でしかし黒人の52.6%でホモ接合性の遺伝子型として存在する α_2c Del322-325受容体多型は、アデニル酸シクラーゼ刺激の阻害によって評価される機能喪失を引き起こす(Small et al., 2002)。この欠陥は α_2c -AR機能に機能的影響をもたらし、個体群のなかで比較的共通であるという特徴およびその著明な構造的/機能的効果を反映して、それぞれ、「多型」ともおよび「突然変異」とも同じ意味で呼ばれている。この提案を通じて、変異体は、これが心不全を有する多くの被験者に存在する共通の変異体であることを反映するように「多型」と主に呼ばれる。しかしながら、その重要性は、受容体活性を大いに弱めるその機能的影響に端を発する。マウスでの遺伝子除去の影響に基づく、野生型の完全に機能的な α_2c 受容体は接合部前でノルエピネフリン放出に対し阻害性であるが、一方でノックアウトマウスはこの阻害の喪失を示し、これがノルエピネフリン量の増大や病的肥大を引き起こす(Hein et al., 1999)。

10

20

30

40

50

この多型のヒトでの臨床的重要性は、 $_{2c}$ Del322-325遺伝子型を心不全の危険因子と、つまりヘテロ接合体および非保有者と比較してこの遺伝子型についてホモ接合性の黒人では心不全に対する未調整の可能性比5.54 (95% CI 2.68, 11.45; $p < 0.001$)を有すると同定した試験で明らかにされている(Small et al., 2002)。 $_{1}$ Arg389変異体と併せて、その影響は未調整の可能性比12.67 (95% CI 2.70, 59.42; $p = 0.001$)となってさらに顕著であった。しかしながら、本開示とは対照的に、これらの多型が治療学的展望から関連性があることは示唆されていない。

【0094】

C. 遮断薬

ドブタミンなどの $_{1}$ アゴニストは心室機能を損なっている患者の急性悪化の治療に使われる一方、投与されたアゴニストの心臓への長時間暴露や、あるいは体内で生成された内在性カテコールアミンアゴニストの増加により、心不全を悪化させることにつながっている。実際に $_{1}$ ARおよび $_{2}$ ARは心不全では鈍感となり、これは心不全で存在する高レベルのカテコールアミンに対する自己防衛の機構であると考えられている。アンタゴニストの投与は、恐らくカテコールアミンのこれらの悪影響を遮断することで心室機能および臨床転帰を改善することができる。それから実際に、心臓のAR発現および機能は、心不全の遮断処置の間に改善する。カテコールアミンの悪影響の大部分、および遮断薬療法の成功は $_{1}$ ARサブタイプの変異体に起因する(Zhu et al., 2001; およびBristow et al., 2003)。

【0095】

アドレナリン受容体アンタゴニスト(遮断薬ともいう)が、慢性心不全の主要な処置方法として登場した。当初は、アドレナリン作用性の駆動の増大は心不全を起こした心臓の補助にとって重大な意味を持つと思われていたので、これらの薬剤は心不全では禁忌とされると思われていた。実際、第1世代の化合物プロプラノロールを用いた初期の経験では、標準的な用量の投与では心不全の悪化と結び付くことが多かった(Stephen, 1968)。しかしながら、低い開始用量と減速滴定を使用し、第2世代(選択的 $_{1}$ 遮断薬)または第3世代(非選択的遮断薬-血管拡張剤)の化合物は、収縮不全ならびに構造的および分子のリモデリングを逆転させることや、心不全の罹患率および死亡率を改善することが明らかにされている(Bristow, 2000); CIBIS-II Investigators and Committees。心不全ピソプロロール試験II: (CIBIS-II, 1999); MERIT-HF Study Group。慢性心不全でのメトプロロールCR/XLの効果: うっ血性心不全でのメトプロロールCR/XL無作為化介入試験(MERIT-HF, 1999)。Packer et al. (2001); BEST Trial Investigators, (2001); Lowes et al., 2002)。一つには、これらの有益な効果は、この症候群で見られるノルエピネフリン量の上昇によって媒介される持続性の生物学的副作用からの、代謝的および生理的予備力が限られている、心不全を起こした心臓の保護に起因するものと考えられている(Bristow, 2000; Cohn et al., 1984; およびLiggett, 2001)。さらに、遮断薬は心不全の分子的表现形を部分的に逆転させることが明らかにされており(Lowes et al., 2002)、このためこれらの薬剤は進行性の心筋障害およびリモデリングを阻止することも逆転させることもできる(Eichhorn and Bristow, Circulation 1996)。

【0096】

興味深いことに、最近の研究によって、遮断薬メトプロロールおよびアテノロールに対する心拍および/または血圧反応はGly389個体に比べて正常血圧のArg389個体でいっそう大きいことが明らかにされている(Liu et al., 2003; およびSofowora et al., 2003)。また、高血圧患者では、メトプロロールに対する血圧反応はGly389患者に比べてArg389患者でいっそう大きい(Johnson et al., 2003)。心不全で公開されている研究の一つでは、メトプロロール処置に対する $_{1}$ AR多型と入院および死亡を組み合わせた反応との間の明白な関連性または傾向がないとしている(White et al., 2003)。しかし、この研究では、メトプロロール処置患者は、遺伝子型によってプラセボ患者と直接的に比較されておらず、患者のおよそ45%は軽度の心不全(NYHAクラスII)であり、平均的な追跡調査期間はたったの12ヶ月であった。このような相違により、この潜在的な矛盾を説明することができ

10

20

30

40

50

る。しかしながら、ブシンドロールおよびメトプロロールは、その薬理学的特性にいくらかの顕著な違いがある(Bristow, 2000; およびBristow et al., 1997)。具体的には、ブシンドロールはノルエピネフリンを低下させ、末梢血管系を拡張させ、より強力にヒト β_1 アドレナリン受容体を遮断する。

【0097】

HFを処置するために使われている全ての遮断剤に共通する薬理学的特性は、心不全を起こしたヒトの心臓では病的なアドレナリン作用性の刺激のおよそ90%までを伝達すると推定されている β_1 ARをそれらが遮断するということであるが(Zhu et al., 2001; およびBristow et al., 2003)、使用可能な遮断薬は β_1 ARサブタイプ選択性、 β_1 ARに対する親和性、部分的なアゴニスト活性、交感神経遮断(Bristow et al., 2004)および血管拡張(Bristow, 2000; およびBristow et al., 1997)を含めて、いくつかの際立った特徴を有する。

10

【0098】

一部の遮断薬の化学構造が図1に示されており、これらの薬剤が著しい構造的相違を有することは明らかである。さらに、それらは異なる薬理学的相違を有する。図2に示されるように、開発でのまたは第II相もしくは第III相臨床試験での種々の抗アドレナリン剤の比較によって、これらの相違が図示されている。例えば、カルベジロールは効果的な β_1 -ARおよび β_2 -AR遮断薬、ならびに β_1 -AR遮断薬である。その一方、ブシンドロールは弱い β_1 -AR遮断薬であり、メトプロロールおよびピソプロロールは β_1 -ARを全く遮断しない。交感神経遮断特性がないカルベジロール、メトプロロール、およびピソプロロールとは対照的に、ブシンドロールはその交感神経遮断特性が遮断薬のなかでかなり独特である。その他の遮断剤に比べて、ブシンドロールは全身のノルエピネフリン量を特有の形で低下させ(Lowes et al., 2000; Bristow et al., 1997; BEST NEJM, Bristow, 2004)、 β_3 アドレナリン受容体に対する完全なアゴニストである(Strosberg, 1997)。

20

【0099】

ブシンドロールは、(2-{2-ヒドロキシ-3-[(2-(3-インドリル)-1,1-ジメチルエチル]アミノ}プロポキシ}-ベンゾニトリル塩酸塩)の化学名と構造を有する第3世代の遮断薬-血管拡張剤である。これは高血圧のために、その後心不全のために最初に開発された。その低い逆アゴニストおよび血管拡張作用のため、ブシンドロールの非選択的遮断は心不全患者で比較的良好な許容性が示されており、一つにはこの理由で1994年、ブシンドロールはNIHおよびVA協同組合臨床試験グループによって、遮断薬が進行性心不全での死亡率を低下させることができるという仮説を検証するため選択された。この仮説の検証がBEST試験であった。この試験は1995年5月31日~1999年7月29日に行われた。

30

【0100】

遮断薬生存率試験評価(「BEST」)は、原因を問わない死亡率のプライマリーエンドポイントに対する危険率が0.9 (C.I.s 0.78~1.02)となった時点で、データ安全性モニタリング委員会の勧告で未完のまま中止された(BEST Investigators, 2001; Domanski et al., 2003)。しかしながら、BESTコホート全体の結果は、死亡または心不全による入院の上位セカンダリーエンドポイントが陽性となり、ブシンドロールによってp値<0.0001で19%減少した(Domanski et al., 2003)。このエンドポイントは実際、HF主試験に対する好ましいプライマリーエンドポイントであったと評価されるようになっている。

40

【0101】

BESTが中止された理由は、1) これらのタイプの心不全患者が遮断による実質的な生存率延長効果を有するというCIBIS-II (CIBIS Investigators, 1999)およびMERIT-HF (MERIT-HF Study Group, 1999)試験から最近になって公開された情報の、クラスIII非黒人患者でもたらされたBEST試験データによる確認、2) 心不全での遮断の効用が実証されていると考えた、研究者間での釣り合いの欠如の増大、ならびに3) 遮断薬による心不全試験で以前には検討されていなかった下位集団(クラスIVおよび黒人)での有害事象の傾向および無効用であった。さらなるブシンドロール開発は、その後、断念された。ブシンドロールはたとえ承認されたとしても、うまく市場参入できるかどうかは不明であったから

50

である。

【0102】

したがって、エンドポイント評価が全生存率であったこの大規模な生存率試験では、最近になってその他の試験で明らかにされた効果の確認や、大規模な臨床試験で以前には評価されていなかった患者下位集団にまでブシンドロールの効用を及ぼすことができないため、BEST臨床試験は早期に打ち切られた(BEST Investigators, 2001)。その当時、ブシンドロールを用いてまたはプラセボを用いて処置された者の中で観察された死亡率には有意な差がなかった。BESTの結果とはまったく対照的に、アドレナリンアンタゴニストの、ブシンドロールを用いた類似研究(「CIBIS-II」試験という)、メトプロロールを用いた類似研究(「MERIT-HF」試験という)、およびカルベジロールを用いた類似研究(「COPERNICUS」試験という)では、それらのアンタゴニストを用いて処置された者とプラセボを用いて処置された者との間で非常に好ましい相違(死亡率の34~35%低下)が報告された。BEST研究者らは、これらの結果の相違で考えられる説明の一つは「ブシンドロール独特の薬理学的特性から導き出すことができる」と推察している。

10

【0103】

CIBIS-II試験では、この研究も早期に、しかし死亡率がピソプロロールを用いて処置された者で有意に低かったので中止された。CIBIS-II Investigators, 1999。同様に、メトプロロールを用いたMERIT-HF研究では、所定の判断基準を満たし、超えたので、研究は未完のまま終わった。MERIT-HF Study Group, 1999。カルベジロールに関するCOPERNICUS研究は同様に、処置により観察された有意な効果のため早期に中断された。Packer et al., 2001。BEST研究者らは、それらの結果が遮断薬の等価性について疑問を提起することに気付いていた。

20

【0104】

さらに、カルベジロールを用いた以前の非死亡率での研究(Yancy et al., 2001)では、黒人と非黒人被験者との間で反応の違いは観察されなかったが、これはブシンドロールに対して別の特異的な、かつ関連性のある相違である。BEST試験において、進行性心不全を有する黒人患者は、非黒人よりも悪い結果を示した。Bristow, 1997。

【0105】

異なる試験での1つの概説によれば、「BEST研究においてブシンドロールを用いて得られた効果の低減について明確な説明を提示することはできない」と述べられている。Bouzamondo et al., 2001 (BEST試験が除外される場合には、証拠から、遮断薬処置によって達成された危険度の減少が示唆されることを見出している)。その著者らによれば、それらの研究は、心不全患者集団の下位集団が異なれば遮断薬療法に対する反応が異なることを示唆するとしている一方で、その者らは遮断薬が異なれば特性が異なるという可能性を排除していないし、その者らは多型がその理由であるとも言っていない。同様に、Sallach et al., 2003. (「権威者のなかには[BEST試験での相違]が、調べられた患者集団に起因するものであったと提言する者もいる一方で、死亡率低減の欠如がブシンドロールそれ自体に起因すると考えている者もいる。」)を参照されたい。

30

【0106】

したがって、ブシンドロールとその他の遮断薬との間に治療上の相違があり、総体的なブシンドロールの治療的効用に関する重大な疑問があった。こういうわけで、ブシンドロールと特定の遺伝的変異体との間の何らかの関係は明らかでなかった。

40

【0107】

本明細書において開示される遺伝子データに基づく既往分析の利点は、心不全患者を処置する際の有効性に寄与するブシンドロール独特の薬理学的特徴を浮き彫りにする。これらの特徴のうちの一つは、アドレナリン受容体遺伝子変異体との薬物の相互作用にも関する。

【0108】

これらの特徴のうちの一つ目は、交感神経遮断、または直接的にアドレナリン作用性の駆動を低下させる(血中および組織中ノルエピネフリン量を低下させる)薬物の能力である

50

。上で述べたように、心不全を処置するために使われている 遮断薬のなかで、ブシンドロールはこの点で独特である(BEST Trial Investigators, 2001; Lowes et al., 2000; Bristow et al., 2004)。ブシンドロールの交感神経遮断作用は、アドレナリン作用性の駆動を活性化するには不十分な β_1 遮断と連動した β_2 遮断、ならびに β_1 -および β_2 -受容体が心筋抑制に基づくアドレナリン作用性の活性化を最小限に抑えるための低い逆アゴニスト活性による可能性が高い。交感神経遮断に寄与しうるブシンドロールの他の特性は、酸化窒素生成および β_3 受容体アゴニズムである(Strosberg, 1997)。これらの後者の二つの特性プラスまたはマイナス弱 β_1 受容体遮断はカルベジロールとは違って、反射性のアドレナリン作用による活性化を誘発するのに十分に強力ではない、ブシンドロールの軽度の血管拡張作用(Gilbert et al., 1990)の主な原因となる可能性が高い。

10

【0109】

適度の量で存在する場合、(ノルエピネフリンの減少が軽微な)交感神経遮断は好ましい特定であり、ブシンドロールの治療上の抗アドレナリン作用に寄与する。過剰なノルエピネフリンを系から除去する場合に、これは単純な 遮断よりも潜在的に優れた作用機序である。ノルエピネフリンは心筋に対して毒性があり、過剰な量ではさまざまな心疾患経路を誘発する。しかしながら、大げさに言えば、交感神経遮断は有害になることがあり、死亡率を増大させることがある(Bristow et al. 2004)。以下に論じられるように、ブシンドロールの遺伝子ターゲティングは、この特性を好ましい形でのみ機能させることを可能にする。

【0110】

20

遺伝薬理学的標的と関係を持つブシンドロールの二番目の薬理学的特性は、高親和性の β_1 受容体遮断である(Hershberger et al., 1990; Asano et al., 2001)。ブシンドロールはヒト β_1 受容体に対し、および β_2 受容体に対し高い親和性を有する(Hershberger et al., 1990)。さらに、ブシンドロールは翻訳またはタンパク質代謝回転のいずれかに及ぼす非アゴニスト作用を通じて、 β_1 受容体密度を低下させる(Asano et al., 2001)。ブシンドロールは非常によく許容されるので、非常に高い 遮断用量で投与することができ、これらの特性のそれぞれが高機能ヒト β_1 受容体389Arg/Arg遺伝子変異体に及ぼすその有益な影響の一因となる(実施例、Mason et al., 1999)。ブシンドロールはラット心筋において内因性交感神経刺激活性(ISA)を有するが、ヒト心臓組織で機能する際、ブシンドロールにはISAがない(Bristow et al., 1994; Sederberg et al., 2000; Bristow et al., 1998, 実施例7)。これは図13のパネルAおよびBで明らかに見てとることができ、この場合、力の発生の有意な増加は β_1 AR Arg/ArgまたはGly保有者遺伝子型のいずれにおいても、ジテルペン化合物フォルスコリンを用いたシグナル伝達増強の存在下においてさえ、抽出した、心不全を起こしたヒト右心室小柱で起こっていない。対照的に、図13のパネルCに示されるように、陽性対照のISA化合物としてのキサモテロールは、 β_1 AR Arg/Arg遺伝子型では高低いずれのシグナル伝達活性化でも力の増加を示しているが、Gly保有者ではフォルスコリンの前処理によってもたらされた高活性化状態でのみ力の増加を示す。最後に、図13に示されるように、抽出したヒト心臓の調製物では、ブシンドロールは β_1 ARのGlyに比べてArg/Arg保有者の受容体に及ぼす独特の影響を有する。心不全を起こした心臓においてシグナル伝達の低レベル(受容体の低活性化)条件(パネルA)の下では、ブシンドロールはヒト心筋の β_1 AR Arg/Arg受容体で真正アンタゴニスト(アゴニストまたは逆アゴニスト活性のない)として機能するが、アデニル酸シクラーゼがフォルスコリンによって直接的に活性化される場合のようにシグナル伝達が高い場合(パネルB)には、ブシンドロールは逆アゴニストとして機能し、治療量により血しょう中で達成可能な最高濃度 10^{-6} Mまで統計学的に有意な傾斜因子によって示されるように受容体を不活性化する。このような作用はGly保有者の受容体では起きておらず、この場合、ブシンドロールは低活性化状態では逆アゴニストとして、およびフォルスコリンの存在下では真正アンタゴニストとして機能する。これらのデータから、ブシンドロールは、最も心筋症に多いと予想されうる受容体型である β_1 389 Arg/Arg受容体の高活性化状態に拮抗する際に、他に類を見ないほど効果的であることが示唆される。

30

40

50

【0111】

これらの特性が、ブシンドロール処置との関連において、 γ_1 ARのArg389遺伝的変異体および γ_2c ARのDel322-325遺伝的変異体で認められた驚くべき、しかも予想外の結果の理由である可能性が高い。

【0112】

II. 多型の解析

遺伝的変異体は γ_1 -ARおよび γ_2c -AR遺伝子のコード領域内に存在しており、コードタンパク質に影響を与えるので、Arg389またはDel322-325多型の存在は、核酸またはタンパク質の配列のいずれかにより判定することができる。結果として、さまざまな異なる方法論をこの目的で使用することができる。

【0113】

A. 核酸

本発明のある種の態様は、増幅プライマー、オリゴヌクレオチドプローブ、およびゲノムDNAの解析に関わるその他の核酸要素を含めて、種々の核酸に係る。ある種の局面では、核酸は野生型、変異、または多型核酸を含む。

【0114】

「 γ_1 -アドレナリン受容体」多型または「 γ_1 AR」多型という用語は、したがって専門用語であり、 γ_1 -アドレナリン受容体遺伝子または遺伝子産物の核酸またはアミノ酸配列の多型のことをいう。参照目的のみで、GenBankアクセッション番号J03019 (Gly389)およびAF169007 (Arg389) (このどちらも参照により本明細書に組み入れられる)は、それぞれ、 γ_1 -アドレナリン受容体遺伝子配列のGly389およびArg389型の例である。

【0115】

同様に、「 γ_2c -アドレナリン受容体」多型または「 γ_2c AR」多型という用語は、したがって専門用語であり、 γ_2c -アドレナリン受容体遺伝子または遺伝子産物の核酸またはアミノ酸配列の多型のことをいう。参照目的のみで、GenBankアクセッション番号NM00683は野生型(非欠失)に対応し、AF280400は欠失に対応する(このどちらも参照により本明細書に組み入れられる)。

【0116】

多型の位置を同定する目的で、 γ_1 AR遺伝子または γ_2c -ARのコード領域の開始コドンの1番目のヌクレオチド(DNA分子ではATGのアデニンおよびRNA分子ではAUGのアデニン)がヌクレオチド「1」位と考えられ、この数はコード配列に沿って一致して進む。同様に、翻訳されたタンパク質産物の1番目のアミノ酸(メチオニン)がアミノ酸「1」位と考えられる。

【0117】

「核酸」という用語は当技術分野において周知である。本明細書において用いられる「核酸」とは、通常、核酸塩基を含むDNAまたはRNAの分子(すなわち、鎖)をいうことができる。核酸塩基は、例えば、DNA(例えば、アデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」またはシトシン「C」)またはRNA(例えば、A、G、ウラシル「U」またはC)に見られる天然由来のプリンまたはピリミジン塩基を含む。「核酸」という用語は、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語を、それぞれ「核酸」という用語の亜属として包含する。「オリゴヌクレオチド」という用語は、長さが約3~約100核酸塩基の分子のことをいう。「ポリヌクレオチド」という用語は、長さが約100核酸塩基を超える少なくとも一つの分子のことをいう。「遺伝子」とは、遺伝子産物のコード配列、ならびに遺伝子産物のイントロンおよびプロモーターのことをいう。

【0118】

いくつかの態様では、本発明の核酸はcDNA配列中の1165位にシトシンもしくはグアニンのいずれかを有するヒト γ_1 AR cDNA配列のまたはヌクレオチド964~975位が存在するもしくは存在しない γ_2c AR cDNA配列の全てのヌクレオチドまたは5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52

10

20

30

40

50

、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1100、1165、1200、1300、1400、1500個のもしくはそれ以上の連続的なヌクレオチド、あるいはその中で導き出せる任意の範囲のヌクレオチドを含む、またはそのヌクレオチドに相補的である。当業者は、プライマーおよびプローブを実践するのに必要な相同性の限界を含めて、ハイブリダイゼーションおよび増幅用のプライマーおよびプローブをデザインするおよび使用する方法を承知している。

10

【0119】

これらの定義は、通常、一本鎖分子のことをいうが、具体的な態様において一本鎖分子に部分的に、実質的にまたは完全に相補的なさらなる鎖も包含するものとする。したがって、核酸は、分子を含む特定配列の一つまたは複数の相補鎖または「相補体」を含んだ二本鎖分子または三本鎖分子を包含することができる。本明細書において用いられる場合、一本鎖核酸は接頭語「ss」により示されることがあり、二本鎖核酸は接頭語「ds」により示されることがあり、および三本鎖核酸は接頭語「ts」により示されることがある。

20

【0120】

特定の局面では、核酸はタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードする。ある種の態様では、本発明は、少なくとも一つのタンパク質性分子を含む新規の組成物に係する。本明細書において用いられる「タンパク質性分子」、「タンパク質性組成物」、「タンパク質性化合物」、「タンパク質性鎖」、または「タンパク質性物質」とは、通常、遺伝子から翻訳される約200アミノ酸を超えるもしくは完全長の内在性配列のタンパク質、約100アミノ酸を超えるポリペプチド、および/または約3~約100アミノ酸のペプチドをいうが、これらに限定されることはない。上記の「タンパク質性(の)」という用語は全て、本明細書において同じ意味で使うことができる。

【0121】

1. 核酸の調製

核酸は、例えば、化学的合成、酵素的産生または生物学的産生などの、当業者に公知である任意の技術により作出することができる。合成核酸(例えば、合成オリゴヌクレオチド)の非限定的な例としては、参照により本明細書に組み入れられる、欧州特許第266,032号に記述されているような、ホスホトリエステル、ホスファイトもしくはホスホロアミダイト化学反応および固相技術を用いた、または各々が参照により本明細書に組み入れられる、Froehler et al., 1986および米国特許第5,705,629号により記述されているような、デオキシヌクレオシドH-ホスホネート中間体を介したインビトロでの化学的合成により作出される核酸が挙げられる。本発明の方法では、一つまたは複数のオリゴヌクレオチドを使用することができる。さまざまな異なるオリゴヌクレオチド合成機構が、例えば、米国特許第4,659,774号、同第4,816,571号、同第5,141,813号、同第5,264,566号、同第4,959,463号、同第5,428,148号、同第5,554,744号、同第5,574,146号、同第5,602,244号に開示されており、これらの文献の各々は参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0122】

酵素的に産生される核酸の非限定的な例としては、PCR(商標)などの増幅反応(例えば、米国特許第4,683,202号および米国特許第4,682,195号を参照されたく、各々が参照により本明細書に組み入れられる)で、または参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,645,897号に記述のオリゴヌクレオチド合成で酵素により産生されるものが挙げられる。生物学的に産生される核酸の非限定的な例としては、細菌中で複製される組換えDN Aベクターなどの、生細胞中で産生される(すなわち、複製される)組換え核酸が挙げられ

50

る(例えば、Sambrook et al. 2001を参照されたく、これは参照により本明細書に組み入れられる)。

【0123】

2. 核酸の精製

核酸はポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム遠心勾配、クロマトグラフィーカラムでまたは当業者に公知のその他任意の手段により精製することができる(例えば、Sambrook et al., 2001を参照されたく、これは参照により本明細書に組み入れられる)。いくつかの局面では、核酸は薬理学的に許容される核酸である。薬理学的に許容される組成物は、当業者に公知であり、本明細書において記述される。

【0124】

ある種の局面では、本発明は、単離核酸である核酸に関係する。本明細書において用いられる「単離核酸」という用語は、一つまたは複数の細胞の全ゲノム核酸および転写核酸の大部分を含まないように単離された、または別の方法で含んでいない、核酸分子(例えば、RNAまたはDNA分子)のことをいう。ある種の態様では、「単離核酸」とは、例えば、脂質またはタンパク質などの高分子、小さな生体分子などのような、細胞成分またはインピトリの反応成分の大部分を含まないように単離された、または別の方法で含んでいない、核酸のことをいう。

【0125】

3. 核酸セグメント

ある種の態様では、核酸は核酸セグメントである。本明細書において用いられる「核酸セグメント」という用語は、非限定的な例で、 $_1AR$ 遺伝子座もしくは $_1AR$ 遺伝子配列の一部、または $_2cAR$ 遺伝子座もしくは $_2cAR$ 遺伝子配列の一部しかコードしないものなどの、核酸の断片である。したがって、「核酸セグメント」は、約2ヌクレオチドないしプロモーター領域からポリアデニル化シグナルを含む完全長の遺伝子までを含んだ、遺伝子配列の任意の一部およびコード領域の全てを含んだ任意の長さを含むことができる。

【0126】

種々の核酸セグメントを特定の核酸配列に基づいてデザインすることができ、および任意の長さのものとすることができる。例えば、1番目の残基が1である、2番目の残基が2であるなど、配列に数値を割り当てることにより、全ての核酸セグメントを定義するアルゴリズムを生み出すことができる。

$$n \sim n + y$$

ここで n が1から配列の最後の数までの整数であり、 y が核酸セグメント引く1の長さであり、ここで $n + y$ が配列の最後の数を超えない。したがって、10merの場合、核酸セグメントは塩基番号1~10、2~11、3~12...などに相当する。15merの場合、核酸セグメントは塩基番号1~15、2~16、3~17...などに相当する。20merの場合、核酸セグメントは塩基番号1~20、2~21、3~22...などに相当する。ある種の態様では、核酸セグメントはプローブまたはプライマーとすることができる。本明細書において用いられる「プローブ」とは、通常、検出のための方法または組成物で使われる核酸のことをいう。本明細書において用いられる「プライマー」とは、通常、伸長または増幅のための方法または組成物で使われる核酸のことをいう。

【0127】

4. 核酸相補体

本発明は同様に、核酸に相補的である核酸を包含する。核酸は、これが標準的なWatson-Crick、Hoogsteenまたは逆Hoogsteenの結合相補性規則にしたがって別の核酸と塩基対合できる場合、別の核酸に対し「相補体」であるか、または相補的である。本明細書において用いられる「別の核酸」とは、別個の分子または同一分子の空間的な分離配列をいうことができる。好ましい態様では、相補体は核酸多型の検出用のハイブリダイゼーションプローブまたは増幅プライマーである。

【0128】

本明細書において用いられる「相補的(な)」または「相補体」という用語は同様に、決

10

20

30

40

50

して全ての核酸塩基が対応の核酸塩基と塩基対合しなくても、別の核酸鎖または二重鎖にハイブリダイズできる連続的な核酸塩基または半連続的な核酸塩基(例えば、一つまたは複数の核酸塩基部分が分子内に存在していない)の配列を含む核酸のことをいう。しかしながら、いくつかの診断的または検出の態様では、完全に相補的な核酸が好ましい。

【0129】

5. 核酸の検出および評価

遺伝子型決定はSmall et al., (2002)に既報の方法を正確に用いて行われた。この文献は参照により本明細書に組み入れられる。その他の標準的な技術を遺伝子型決定に使用できることや任意の技術を本発明で使用できることが当業者により理解されると思われる。核酸検出法の一般法を、一塩基多型(SNPs)を含む、多型の同定に使用される具体例に先立って、以下に示す。

10

【0130】

遮断薬療法の必要性がある個体の遺伝子型を判定するために使われる特定の遺伝子型決定法は、本発明の一部ではないが、要するに、個体に存在する β_1 AR遺伝子、もしくはその断片の2コピーを含む核酸混合物を個体から単離する段階、および β_1 AR中の1165位のヌクレオチド対の同一性を判定する段階または α_{2c} AR遺伝子中のヌクレオチド964~975位の欠失が存在するかどうかを判定する段階を含む。 β_1 ARおよび α_{2c} ARに対する遺伝子中の好ましい多型および多型部位は、表1中の以下のものを含む。

【0131】

(表1)

20

<u>β_1-アドレナリン受容体多型</u>				
ヌクレオチド	ヌクレオチド	アミノ酸	アミノ酸	表示
1165位	GまたはC	389位	GlyまたはArg	Gly389, Arg389

<u>α_{2c}-アドレナリン受容体多型</u>				
ヌクレオチド	ヌクレオチド	アミノ酸	アミノ酸	表示
964~975位	欠失	322~325位	欠失	α_{2c} Del322-325

30

【0132】

これらの多型は以前に報告されている。野生型 β_1 ARヌクレオチド配列は、一般にヌクレオチド1165位にグアニンを含む。野生型 β_1 ARタンパク質配列は、一般にアミノ酸389位にグリシンを含む。野生型 α_{2c} ARヌクレオチド配列と考えられることは、一般にヌクレオチド964~975位の欠失が存在しない、したがってアミノ酸322~325位の欠失が存在しないことを意味する。

【0133】

核酸分子は二本鎖分子とできること、および一本鎖上の特定部位への言及は、同じく、相補鎖上の対応部位について言及することを当業者は容易に認識すると思われる。したがって、多型部位を定義する際、核酸分子のプラス(センスまたはコード)鎖上の特定部位のアデニン、チミン(ウリジン)、シトシン、またはグアニンへの言及は同様に、核酸分子の相補鎖のマイナス(アンチセンスまたは非コード)鎖上の対応部位の(それぞれ)チミン(ウリジン)、アデニン、グアニン、またはシトシンを含むよう意図される。このように、両鎖について言及することができる。この言及はそれでも同じ多型部位を含むことができ、両鎖にハイブリダイズするようオリゴヌクレオチドをデザインすることができる。本文を通じて、多型部位を同定する際、便宜上の目的のみで、センス鎖について言及する。

40

【0134】

典型的には、核酸混合物は、Jones (1963)に開示されているような標準的な技術を用いて血液サンプルまたは組織サンプルなどの、個体から採取された生体サンプルから単離さ

50

れる。その文献は参照により本明細書に組み入れられる。適当な組織サンプルは、全血、精液、唾液、涙液、尿、糞便物質、汗、頬、皮膚および毛髪を含む。核酸混合物はゲノムDNA、mRNA、またはcDNAからなることができ、後者の二つの場合、生体サンプルは、 α_1 AR遺伝子が発現される臓器から得なければならない。さらに、mRNAまたはcDNA調製物は、イントロンにまたは5'および3'非転写領域に位置する多型を検出するのに使用できないことを当業者は理解すると思われる。 α_1 AR遺伝子断片が単離される場合には、これは遺伝子型を特定される多型部位を含まなければならない。

【0135】

-アゴニストに対する患者の応答を予測する能力は、心不全を抱える患者を処置する方法について医師が決定する際に有用である。患者がアゴニストによく応答しそうなことが遺伝子型から示唆される患者は、中間の応答を示すまたは応答を示さない可能性が高い患者よりも遮断薬療法に対する良好な候補者になるはずであり、医師は、どの個体が代替療法を受けるべきかを試験や間違いをさらに少なくして決定することができると思われる。

10

【0136】

本発明で使われる遺伝子型決定法では、多型部位でのヌクレオチド(またはヌクレオチド対)の同一性は、個体に存在する α_1 AR遺伝子および/または α_2 cAR遺伝子の一方または両方のコピーから直接的に多型部位を含有する標的領域を増幅することによって判定することができ、増幅領域の配列は従来法により決定することができる。多型部位でホモ接合性である個体では一つのヌクレオチドしかその部位で検出されないが、個体はその部位についてヘテロ接合性である場合には、二つの異なるヌクレオチドが検出されることを当業者は容易に理解すると思われる。多型は直接的に同定することができ、これは肯定型の同定として知られ、または多型は推測により同定することができ、これは否定型の同定と呼ばれている。例えば、SNPが準拠集団内でグアニンおよびシトシンであることが知られている場合、その部位でホモ接合性の個体では部位をグアニンもしくはシトシンのいずれかであると、または個体はその部位でヘテロ接合性である場合には、グアニンとシトシンの両方であると肯定的に判定することができる。あるいは、部位をグアニンではない(したがってシトシン/シトシン)とまたはシトシンではない(したがってグアニン/グアニン)と否定的に判定することができる。

20

【0137】

標的領域は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(米国特許第4,965,188号)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(Barany et al., 1991; 国際公開公報第90/01069号)、およびオリゴヌクレオチド連結アッセイ法(OLA)(Landegren et al., 1988)を含むがこれらに限定されない、任意のオリゴヌクレオチド依存性増幅法を用いて増幅することができる。そのような方法において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、多型部位を含むまたは多型部位に隣接する核酸の領域に特異的にハイブリダイズしなくてはならない。典型的には、オリゴヌクレオチドは長さが10~35ヌクレオチドであり、好ましくは、長さが15~30ヌクレオチドである。最も好ましくは、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、当業者により日常的に考慮され実践される多くの要因に依存すると思われる。

30

40

【0138】

転写に基づく増幅系(米国特許第5,130,238号; 欧州特許第329,822号; 米国特許第5,169,766号、国際公開公報第89/06700号)および等温法(Walker et al., 1992)を含め、その他の公知の核酸増幅手順を用いて標的領域を増幅することができる。

【0139】

標的領域中の多型は同様に、当技術分野において公知のいくつかのハイブリダイゼーションに基づく方法の一つを用いて増幅の前または後にアッセイすることができる。典型的には、そのような方法を行う際に、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドが使用される。対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを、別々に標識されたプローブ対として使用し、対の1つのメンバーは一方の標的配列変異体に完全な一致を示し、残る1つのメンバーは

50

異なる変異体に完全な一致を示すことができる。いくつかの態様では、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド対のセットを使用し、複数の多型部位を一度に検出することができる。

【0140】

標的ポリヌクレオチドとの対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、両実体を溶液中で用いて行うことができ、あるいはそ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または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的にまたは非共有結合的に固着される場合に行うことができる。付着は、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、塩架橋、疎水性相互作用、化学的結合、UV架橋結合、ベーキングなどによって媒介されることができ、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドは、固相支持体上に直接的に合成することができ、または合成の後に固相支持体に付着することができる。本発明の検出方法で用いるのに適した固相支持体は、例えば、ウェル中(96ウェルプレート中など)に形成されるシリコン、ガラス、プラスチック、紙などでできた基材、スライド、シート、メンブレン、ファイバー、チップ、ディッシュ、およびビーズを含む。固相支持体を処理して、コーティングしてまたは誘導体化して、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドまたは標的核酸の固定化を促進することができる。

10

【0141】

個体の₁AR遺伝子中の一つまたは複数の多型部位の遺伝子型は同様に、国際公開公報第95/11995号に記述されているような核酸アレイおよびサブアレイとの遺伝子、またはその断片の一方または両方のコピーのハイブリダイゼーションにより判定することができる。このアレイは、多型部位の各々が遺伝子型または単相型(ハプロタイプ)で含まれることを示す一連の対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを含む。

20

【0142】

多型の同一性は同様に、リボプローブ(Winter et al., 1985; Meyers et al., 1985)および大腸菌(*E. coli*) mutSタンパク質などの、ヌクレオチドミスマッチを認識するタンパク質(Modrich, 1991)を用いたRNase保護法を含むがこれに限定されない、ミスマッチ検出技術を使用して判定することができる。あるいは、変異型対立遺伝子は一本鎖高次構造多型(SSCP)解析(Orita et al., 1989; Humphries, et al., 1996)または変性剤濃度勾配電気泳動法(DGGE) (Wartell et al., 1990; Sheffield et al., 1989)により同定することができる。

30

【0143】

ポリメラーゼを介したプライマー伸長法を用いて、多型を同定することもできる。いくつかのそのような方法が特許および化学文献に記述されている。米国特許第5,605,798号に記述されているように、多型を含む伸長されたプライマーを質量分析法により検出することができる。その他のプライマー伸長法は対立遺伝子特異的なPCR法である(Ruano et al., 1989); Ruano et al., 1991; 国際公開公報第93/22456号; Turki et al., 1995)。

【0144】

ヒト₁AR遺伝子のヌクレオチド1165位の多型変異は同様に、ある種の制限酵素によるDNAの識別的消化を用いて(Small et al., 2002)または₁AR遺伝子の1165位のヌクレオチドを同定するその他任意の方法により検出することができる。

40

【0145】

a. ハイブリダイゼーション

7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、60、70、80、90、もしくは100ヌクレオチド間の、好ましくは長さが17~100ヌクレオチドの、または本発明のいくつかの局面では、長さが1~2キロベースもしくはそれ以上までのプローブまたはプライマーの使用によって、安定でもあり選択的でもある二重鎖分子の形成が可能になる。得られるハイブリッド分子の安定性および/または選択性を増大させるため、長さが20塩基を超える連続的なストレッチにわたり相補的配列を有する分子が一般的に好ましい。20~30ヌクレオチド、または必要に応じてさらに長いヌクレオチドの相補

50

的配列の一つまたは複数を有するハイブリダイゼーション用核酸分子をデザインすることが一般的に好まれると思われる。そのような断片は、例えば、化学的手段により断片を直接的に合成することで、または選択の配列を組換え産生用の組換えベクターに導入することで容易に調製することができる。

【 0 1 4 6 】

したがって、本発明のヌクレオチド配列はDNAおよび/もしくはRNAの相補的ストレッチと二重鎖分子を選択的に形成するその能力で、またはサンプルからのDNAもしくはRNAの増幅用のプライマーを供与するその能力で使用することができる。想定される用途に応じ、さまざまなハイブリダイゼーション条件を使用して、標的配列に対するプローブまたはプライマーのさまざまな選択度を達成することが望まれると思われる。

10

【 0 1 4 7 】

高い選択性を必要とする用途の場合、通常は、比較的高いストリンジェンシー条件を使用して、ハイブリッドを形成することが望まれると思われる。例えば、約50 から約70の温度での約0.02 Mから約0.10 M NaClによって供与されるような、比較的低い塩および/または高い温度条件。そのような高いストリンジェンシー条件は、プローブまたはプライマーと鋳型または標的鎖との間のミスマッチを、もしあれば、ほとんど許容せず、特異的遺伝子を単離するのにまたは特異的多型を検出するのにとりわけ適すると思われる。増加量のホルムアミドの添加により、条件をさらにストリンジェントにできることが一般的に理解されている。例えば、高度にストリンジェントな条件の下では、フィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションは65 にて0.5 M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1 mM EDTA中でおよび68 にて0.1×SSC/0.1% SDS中の洗浄で行うことができる(Ausubel et al., 1989)。

20

【 0 1 4 8 】

塩濃度を増加させることでおよび/または温度を減少させることで条件をいっそう低いストリンジェントにすることができる。例えば、中ストリンジェンシー条件は、約37 ~ 約55 の温度で約0.1~0.25 M NaClにより与えることができ、その一方で低ストリンジェンシー条件は、約20 ~ 約55 に及ぶ温度で約0.15 M~約0.9 M塩により与えることができる。適度にストリンジェントな条件などの、低ストリンジェントな条件の下では、洗浄は例えば、42 にて0.2×SSC/0.1% SDS中で行うことができる(Ausubel et al., 1989)。ハイブリダイゼーション条件は、所望の結果に応じて容易に操作することができる。

30

【 0 1 4 9 】

その他の態様では、ハイブリダイゼーションは、例えば、およそ20 ~ 約37 の温度にて、50 mM Tris-HCl (pH 8.3)、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、1.0 mMジチオスレイトールの条件の下で達成することができる。使用されるその他のハイブリダイゼーション条件は、およそ40 ~ 約72 に及ぶ温度でおよそ10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂を含むことができる。

【 0 1 5 0 】

ある種の態様では、ハイブリダイゼーションを判定するのに、標識などの、適切な手段と併せて本発明の定義済み配列の核酸を使用することが好都合であると思われる。検出することができる蛍光性リガンド、放射性リガンド、酵素リガンドまたはアビジン/ビオチンなどのその他のリガンドを含めて、多岐にわたる適切な指示手段が当技術分野において公知である。好ましい態様では、放射性試薬またはその他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどの蛍光標識または酵素タグを使用することが望まれるかもしれない。酵素タグの場合、サンプルを含有する相補的核酸との特異的ハイブリダイゼーションを同定するため、可視的にまたは分光学的に検出できる検出手段を供与するよう使用できる発色指示基質が知られている。その他の局面では、特定のヌクレアーゼ切断部位が存在してもよく、特定のヌクレオチド配列の検出を核酸切断の有無によって判定することができる。

40

【 0 1 5 1 】

一般に、本明細書において記述されるプローブまたはプライマーは、対応する遺伝子の

50

発現または遺伝子型の検出のため、PCRなどで、溶液ハイブリダイゼーションの試薬として、および固相を使用する態様において有用であるものと想定される。固相を伴う態様では、試験DNA（またはRNA）は選択のマトリックスまたは表面に吸着されるかまたは別の方法で固着される。この固定された一本鎖核酸を次いで、所望の条件下での選択プローブとのハイブリダイゼーションに供する。選択される条件は、特定の環境（例えば、G+C含量、標的核酸のタイプ、核酸の供給源、ハイブリダイゼーションプローブのサイズなどに依る）に依存すると思われる。対象とする特定の用途に対するハイブリダイゼーション条件の最適化は、当業者に周知である。ハイブリダイズされた分子を洗浄して、非特異的に結合されたプローブ分子を除去した後、結合された標識の量を測定することでハイブリダイゼーションを検出する、および/または定量化する。代表的な固相ハイブリダイゼーション法は、米国特許第5,843,663号、同第5,900,481号および同第5,919,626号に開示されている。本発明の実施に際して使用できるその他のハイブリダイゼーション法は、米国特許第5,849,481号、同第5,849,486号および同第5,851,772号に開示されている。本明細書のこの項に規定されているこれらのおよびその他の参考文献の関連部分は、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0152】

b. 核酸の増幅

増幅用の鋳型として使用される核酸は、標準的な方法論にしたがって細胞、組織またはその他のサンプルから単離することができる(Sambrook et al., 2001)。ある種の態様では、解析は全細胞もしくは組織ホモジネートまたは生体液サンプルに対し、鋳型核酸の実質的な精製を伴いまたは伴わずに行われる。核酸はゲノムDNAまたは分画細胞もしくは全細胞RNAとすることができる。RNAが使われる場合、RNAを相補的DNAに最初に変換することを望まれることがある。

20

【0153】

本明細書において用いられる「プライマー」という用語は、鋳型依存的な過程で新生核酸の合成をプライミングできる任意の核酸を包含するよう意図される。典型的には、プライマーは長さが10~20および/または30塩基対のオリゴヌクレオチドであるが、さらに長い配列を使用することができる。プライマーは二本鎖および/または一本鎖の形態で供与されてもよいが、一本鎖の形態が好ましい。

【0154】

AR遺伝子座に対応する核酸、またはその変異体、およびその断片に選択的にハイブリダイズするようデザインされたプライマー対を、選択的なハイブリダイゼーションを可能にする条件の下で鋳型核酸と接触させる。所望の用途に応じ、プライマーに完全に相補的な配列とのハイブリダイゼーションを可能にするだけのような高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を選択することができる。その他の態様では、低減されたストリンジェンシーの下でハイブリダイゼーションを行って、一つまたは複数のミスマッチを含む核酸の増幅を、プライマー配列を用いて可能にすることができる。ハイブリダイズしたら、鋳型依存的な核酸合成を促進する一つまたは複数の酵素と鋳型-プライマー複合体を接触させる。十分な量の増幅産物が産生されるまで、「サイクル」とも呼ばれる複数ラウンドの増幅を行う。

30

40

【0155】

増幅産物は検出されても、解析されてもまたは定量化されてもよい。ある種の用途では、検出は視覚的な手段により行うことができる。ある種の用途では、検出は化学発光、取り込まれた放射性標識の放射線シンチグラフィまたは蛍光標識による、場合によっては電気および/もしくは熱衝撃シグナルを用いたシステム(Affymax technology; Bellus, 1994)による産物の間接的同定を含むことができる。

【0156】

所与の鋳型サンプルに存在するオリゴヌクレオチド配列を増幅するため、いくつかの鋳型依存的な過程を使用できる。最もよく知られた増幅法の一つは、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,800,159号、ならびにInnis et al., 1988に詳述されて

50

いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR(商標)とも呼ばれる)であり、それらの文献の各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0157】

増幅のための別の方法は、欧州特許出願第320 308号に開示されているリガーゼ連鎖反応(「LCR」)であり、その文献はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。米国特許第4,883,750号は、標的配列とのプローブ対の結合に向けてLCRに類似の方法について記述している。米国特許第5,912,148号に開示されている、PCR(商標)およびオリゴヌクレオチド連結アッセイ法(OLA)に基づく方法(以下にさらに詳述される)を使用することもできる。

【0158】

本発明の実施に際して使用できる標的核酸配列の増幅のための代替法は、米国特許第5,843,650号、同第5,846,709号、同第5,846,783号、同第5,849,546号、同第5,849,497号、同第5,849,547号、同第5,858,652号、同第5,866,366号、同第5,916,776号、同第5,922,574号、同第5,928,905号、同第5,928,906号、同第5,932,451号、同第5,935,825号、同第5,939,291号および同第5,942,391号、英国特許出願第2 202 328号に、ならびにPCT出願PCT/US89/01025に開示されており、これらの文献の各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。PCT出願PCT/US87/00880に記述されているQbetaレプリカーゼを本発明での増幅法として使用することもできる。

【0159】

制限エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを用いて、制限部位の片鎖にヌクレオチド5'-[-チオ]-三リン酸を含む標的分子の増幅を達成できる等温増幅法を、本発明での核酸の増幅に有用とすることもできる(Walker et al., 1992)。米国特許第5,916,779号に開示されている鎖置換増幅(SDA)は、核酸の等温増幅を行う別法であり、この方法は複数ラウンドの鎖置換および合成、すなわち、ニックトランスレーションを含む。

【0160】

その他の核酸増幅手順は、核酸配列に基づく増幅(NASBA)および3SR (Kwoh et al., 1989; PCT出願国際公開公報第88/10315号、これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる)を含めて、転写に基づく増幅系(TAS)を含む。欧州特許出願第329 822号は、一本鎖RNA(「ssRNA」)、ssDNA、および二本鎖DNA(dsDNA)を化学的に合成する段階を含む核酸増幅過程について開示しており、この過程が本発明によって使用されてもよい。

【0161】

PCT出願国際公開公報第89/06700号(その全体が参照により本明細書に組み入れられる)は、標的一本鎖DNA(「ssDNA」)とのプロモーター領域/プライマー配列のハイブリダイゼーションに続いて配列の多くのRNAコピーの転写を行うことに基づく核酸配列増幅スキームについて開示している。このスキームは循環的ではない、すなわち、得られたRNA転写産物から新たな鋳型は産生されない。その他の増幅法は「RACE」および「片側(one-sided) PCR」(Frohman, 1990; Ohara et al., 1989)を含む。

【0162】

c. 核酸の検出

任意の増幅の後、増幅産物を鋳型および/または過剰なプライマーから分離することが望ましい場合がある。一つの態様では、増幅産物をアガロース、アガロース-アクリルアミドまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動により標準的な方法を用いて分離する(Sambrook et al., 2001)。分離された増幅産物をさらなる操作のためゲルから切り出すおよび溶出させることができる。低融点アガロースゲルを用いることで、ゲルを加熱し、引き続き核酸の抽出を行うことにより、分離されたバンドを取り出すことができる。

【0163】

核酸の分離は同様に、スピンカラムおよび/または当技術分野において公知のクロマトグラフィー技術により達成することができる。吸着、分配、イオン交換、ヒドロキシアパタイト、分子ふるい、逆相、カラム、ペーパー、薄層およびガスクロマトグラフィーならびにHPLCを含めて、本発明の実施に際して使用できる多くの種類のクロマトグラフィーが

10

20

30

40

50

存在する。

【0164】

ある種の態様では、増幅産物を分離の有無にかかわらず、視覚化する。典型的な視覚化の方法は、エチジウムブロマイドによるゲルの染色およびUV光の下でのバンドの視覚化を含む。あるいは、増幅産物が放射分析的にまたは蛍光分析的に標識されたヌクレオチドで一体的に標識される場合には、分離された増幅産物をX線フィルムに曝露するか、または適切な励起スペクトルの下で視覚化することができる。

【0165】

一つの態様では、増幅産物の分離後、標識核酸プローブを増幅マーカ配列と接触させる。プローブは好ましくは発色団に複合化されるが、放射性標識されてもよい。別の態様では、プローブは抗体もしくはビオチンなどの結合パートナー、または検出可能な成分を保有する別の結合パートナーに複合化される。

【0166】

特定の態様では、検出はサザンブロットングおよび標識プローブとのハイブリダイゼーションによるものである。サザンブロットングに関わる技術は、当業者に周知である (Sambrook et al., 2001を参照のこと)。上記の一例が、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,279,721号に記述されており、その文献は自動化された核酸電気泳動および転写のための機器および方法について開示している。この機器はゲルの外部操作なしで電気泳動およびブロットングを可能にし、本発明による方法の実行に理想的に適している。

【0167】

本発明の実施に際して使用できるその他の核酸検出方法は、米国特許第5,840,873号、同第5,843,640号、同第5,843,651号、同第5,846,708号、同第5,846,717号、同第5,846,726号、同第5,846,729号、同第5,849,487号、同第5,853,990号、同第5,853,992号、同第5,853,993号、同第5,856,092号、同第5,861,244号、同第5,863,732号、同第5,863,753号、同第5,866,331号、同第5,905,024号、同第5,910,407号、同第5,912,124号、同第5,912,145号、同第5,919,630号、同第5,925,517号、同第5,928,862号、同第5,928,869号、同第5,929,227号、同第5,932,413号および同第5,935,791号に開示されており、これらの文献の各々が参照により本明細書に組み入れられる。

【0168】

d. その他のアッセイ法

その他の遺伝子スクリーニング方法を本発明の範囲内で使用して、例えば、ゲノムDNA、cDNAおよび/またはRNAサンプル中の突然変異を検出することができる。点突然変異を検出するのに使われる方法は変性剤濃度勾配電気泳動法(「DGGE」)、制限断片長多型解析(「RFLP」)、化学的または酵素的切断法、PCR(商標)により増幅された標的領域の直接配列決定(上記参照)、一本鎖高次構造多型解析(「SSCP」)および当技術分野において周知の他の方法を含む。

【0169】

点突然変異のスクリーニング方法の一つは、RNA/DNAまたはRNA/RNAヘテロ二重鎖中の塩基対ミスマッチのRNase切断に基づく。本明細書において用いられる「ミスマッチ」という用語は、二本鎖RNA/RNA、RNA/DNAまたはDNA/DNA分子中の一つまたは複数の不対合または誤対合ヌクレオチドの領域と定義される。この定義はしたがって、挿入/欠失突然変異、および単一または複数の塩基点突然変異によるミスマッチを含む。

【0170】

米国特許第4,946,773号は、一本鎖DNAまたはRNA試験サンプルをRNAプローブにアニーリングさせる段階と、その後RNase Aを用いて核酸二重鎖を処理する段階とを含む、RNase Aミスマッチ切断アッセイ法について記述している。ミスマッチの検出のため、サイズにしたがって電気泳動的に分離されたRNase A処理の一本鎖産物を、同様に処理された対照の二重鎖と比較する。対照の二重鎖には見られない、より小さな断片(切断産物)を含むサンプルを陽性と記録する。

【0171】

その他の研究者らは、ミスマッチアッセイ法でのRNase Iの使用について記述している。ミスマッチ検出のためのRNase Iの使用は、Promega Biotechからの文献に記述されている。Promegaは、四つのうち三つの公知のミスマッチを切断すると報告されているRNase Iを含むキットを市販している。他者らは、単一塩基ミスマッチの検出のためMutSタンパク質またはその他のDNA修復酵素を使用することについて記述している。

【0172】

本発明の実施に際して使用できる欠失、挿入または置換突然変異の検出のための代替法は米国特許第5,849,483号、同第5,851,770号、同第5,866,337号、同第5,925,525号および同第5,928,870号に開示されており、これらの文献の各々はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0173】

e. 多型核酸スクリーニング方法の具体例

生物のゲノム中に進化の過程において生じる自然突然変異は、種のメンバーの全体にすぐには伝わらないことが多く、それにより種個体群内に共存する多型対立遺伝子を生み出す。多くの場合、多型は遺伝的疾患の原因である。いくつかのクラスの多型が同定されている。例えば、可変ヌクレオチド型の多型(VNTRs)は、ヌクレオチドのジヌクレオチドまたはトリヌクレオチド繰り返しモチーフの自然発生的な直列重複から生じる。そのような変異が制限エンドヌクレアーゼ切断によって作出されるDNA断片の長さを変える場合には、変異は制限断片長多型(RFLPs)と呼ばれる。RFLPsはヒトおよび動物の遺伝子解析で広く使われている。

20

【0174】

別のクラスの多型は一塩基の置換により作出される。そのような一塩基多型(SNPs)は、制限エンドヌクレアーゼ部位の変化を稀に引き起こす。このように、SNPsは稀に検出可能な制限断片長解析である。SNPsは最も一般的な遺伝的変異であり、100~300塩基に1回発生し、実際に遺伝的疾患を引き起こすのに十分な形でタンパク質コード遺伝子中の一塩基に影響を及ぼす、いくつかのSNP突然変異が見出されている。SNP疾患は血友病、鎌状赤血球貧血、遺伝性ヘモクロマトーシス、遅発性アルツハイマー病などにより例示される。

【0175】

いくつかの方法が多型をスクリーニングするために開発されており、一部の例を以下に記載する。Kwok and Chen (2003)およびKwok (2001)の参照文献は、これらの方法の一部の概説を提供している。これらの参照文献のどちらも参照により具体的に組み入れられる。

30

【0176】

ABCC2に関連するSNPsは、これらの方法またはその適当な変法のいずれかの使用によって特徴付けることができる。そのような方法は、部位の直接的もしくは間接的な配列決定、部位の各対立遺伝子が制限部位を生み出しもしくは破壊している制限酵素の使用、対立遺伝子特異的なハイブリダイゼーションプローブの使用、異なる多型対立遺伝子によってコードされるタンパク質に特異的な抗体の使用、またはその他任意の生化学的解釈を含む。

40

【0177】

i. DNA配列決定

多型を特徴付けるのに最も一般的に用いられている方法は、多型に隣接するおよび多型を含む遺伝子座の直接的なDNA配列決定である。そのような解析は「サンガー法」(Sanger et al., 1975)としても周知である「ダイデオキシ連鎖停止法」または「マキサム-ギルバート法」(Maxam et al., 1977)としても周知である「化学的分解法」のいずれかを用いて成し遂げることができる。ポリメラーゼ連鎖反応などの、ゲノム配列特異的な増幅技術と一緒に配列決定を使用して、所望の遺伝子の回収を促進することができる(Mullis et al., 1986; 欧州特許出願第50,424号; 欧州特許出願第84,796号; 欧州特許出願第258,017号; 欧州特許出願第237,362号; 欧州特許出願第201,184号; 米国特許第4,683,202号; 同

50

第4,582,788号; および同第4,683,194号)。上記の全てが参照により本明細書に組み入れられる。

【0178】

ii. エキソヌクレアーゼ耐性

多型部位に存在するヌクレオチドの同一性を判定するのに使用できるその他の方法では、特殊なエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド誘導体を用いる(米国特許第4,656,127号)。多型部位のすぐ3'側の対立遺伝子配列に相補的なプライマーを、調査中のDNAにハイブリダイズさせる。DNAの多型部位が、存在する特定のエキソヌクレオチド耐性ヌクレオチド誘導体に相補的なヌクレオチドを含むならば、その誘導体はポリメラーゼによって、ハイブリダイズされたプライマーの末端に組み込まれると思われる。そのような組込みはプライマーをエキソヌクレアーゼ切断に耐性とし、それによりその検出を可能にする。エキソヌクレオチド耐性誘導体の同一性は分かっているので、DNAの多型部位に存在する特定のヌクレオチドを判定することができる。

10

【0179】

iii. 微量配列決定法

DNA中の多型部位をアッセイするためのその他いくつかのプライマー誘導によるヌクレオチド組込み手順が記述されている(Komher et al., 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppaswamy et al., 1991; Prezant et al., 1992; Ugozzoli et al., 1992; Nyren et al., 1993)。これらの方法は、多型部位の塩基を識別するため標識デオキシヌクレオチドの組込みに依存している。シグナルは組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するので、同一ヌクレオチドの運転で発生する多型は、運転の長さに比例するシグナルを引き起こす(Syvanen et al., 1990)。

20

【0180】

iv. 溶液中での伸長

仏国特許第2,650,840号およびPCT出願国際公開公報第91/02087号は、多型部位のヌクレオチドの同一性を判定するための、溶液に基づく方法について論じている。これらの方法によれば、多型部位のすぐ3'側の対立遺伝子配列に相補的なプライマーが使われる。その部位のヌクレオチドの同一性は、多型部位のヌクレオチドに相補的なプライマーの末端に組み込まれる標識ダイデオキシヌクレオチド誘導体を用いて判定される。

【0181】

v. 遺伝子ビット解析または固相伸長

PCT出願国際公開公報第92/15712号は、標識停止剤と多型部位の3'側配列に相補的なプライマーとの混合物を用いる方法について記述している。組み込まれる標識停止剤は、評価中の標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドに相補的であり、このようにして同定される。ここではプライマーまたは標的分子は固相に固定化される。

30

【0182】

vi. オリゴヌクレオチド連結アッセイ法(OLA)

これは異なる方法論を用いた別の固相法である(Landegren et al., 1988)。標的DNAの一本鎖の隣接配列にハイブリダイズできる二つのオリゴヌクレオチドが使われる。これらのオリゴヌクレオチドの一方がビオチン化されており、もう一方が検出可能に標識されている。正確な相補的配列が標的分子に見出される場合には、それらのオリゴヌクレオチドはその末端が隣接するようにハイブリダイズし、連結基質を生み出すと考えられる。アビジンを用いることにより、連結によって標識オリゴヌクレオチドの回収が可能になる。この方法に基づき、PCRと組み合わせられたその他の核酸検出アッセイ法も記述されている(Nickerson et al., 1990)。ここではPCRを用いて標的DNAの指数関数的増幅を達成し、これを次にOLAにより検出する。

40

【0183】

vii. リガーゼ/ポリメラーゼを介した遺伝子ビット解析

米国特許第5,952,174号は、標的分子の隣接配列にハイブリダイズできる二つのプライマーを同様に含む方法について記述している。ハイブリダイズ産物は、標的が固定化され

50

る固相支持体上に形成される。ここではハイブリダイゼーションは、プライマーが互いとは一塩基の空間によって分離されるように行われる。このハイブリダイズ産物をポリメラーゼ、リガーゼ、および少なくとも一つのデオキシヌクレオシド三リン酸を含有するヌクレオシド三リン酸混合物の存在下でインキュベートすることにより、ハイブリダイズされた隣接オリゴヌクレオチドの任意の対の連結が可能になる。リガーゼの添加によって、シグナル、伸長および連結をもたらすのに必要な二つの事象が引き起こされる。これは伸長または連結のいずれかのみを用いる方法よりも高い特異性と低い「ノイズ」を供与し、ポリメラーゼに基づくアッセイ法とは異なり、この方法はポリメラーゼ段階と固相に付着されるシグナルに対する2度目のハイブリダイゼーションおよび連結段階を組み合わせることでポリメラーゼ段階の特異性を促進する。

10

【0184】

viii. 侵襲的切断反応

侵襲的切断反応を用いて、特定の多型に対し細胞DNAを評価することができる。INVADER (登録商標)と呼ばれる技術では、そのような反応を使用する(例えば、de Arruda et al., 2002; Stevens et al., 2003、これらは参照により組み入れられる)。一般に、三つの核酸分子がある。1) 標的部位の上流のオリゴヌクレオチド(「上流オリゴ」)、2) 標的部位を網羅するプローブオリゴヌクレオチド(「プローブ」)、および3) 標的部位を有する一本鎖DNA(「標的」)。上流オリゴおよびプローブは重複しないが、それらは連続的な配列を含む。プローブはフルオレセイン(fluorescein)などの供与体発蛍光団、およびDabcylなどの受容体色素を含む。上流オリゴの3'末端のヌクレオチドは、プローブ-標的二重鎖の最初の塩基対に重複する(「侵襲する」)。次いで、プローブを構造特異的な5'ヌクレアーゼにより切断し、発蛍光団/消光剤対の分離を引き起こし、これにより検出できる蛍光の量が増大する。Lu et al., 2004を参照されたい。

20

【0185】

場合によっては、このアッセイ法は固体表面でまたはアレイ形式で行われる。

【0186】

ix. SNPsを検出するためのその他の方法

多型の検出および同定のためのその他いくつかの特異的方法が以下に示されており、本発明における₁AR遺伝子の多型の同定と連動させてそれ自体としてまたは適当な修正を加えて使われてもよい。その他いくつかの方法が同様に、参照により本明細書に組み入れられる、World Wide Web上のNCBIのSNPウェブサイトncbi.nlm.nih.gov/SNPに記述されている。

30

【0187】

特定の態様では、広範囲の(extended)ハプロタイプを集団内の所与の遺伝子座で判定することができ、これにより正確にどのSNPsが重複性であるかや、どれが関連研究において不可欠であるかを同定することが可能になる。後者は、遺伝子のハプロタイプまたは連鎖不均衡の領域を捕捉するマーカー「ハプロタイプタグSNPs(htSNPs)」と呼ばれている。例示的な方法としては、Johnson et al. (2001)およびKe and Cardon (2003)を参照されたく、これらの文献の各々は参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0188】

VDAアッセイ法では、TaKaRa LA Taq試薬およびその他の標準的な反応条件を用いたロングPCR法によるゲノムセグメントのPCR増幅を使用する。長時間増幅では約2,000~12,000 bpのDNAサイズを増幅することができる。変異体検出アレイ(VDA)との産物のハイブリダイゼーションは、Affymetrix High Throughput Screening Centerで行うことができ、コンピュータ化されたソフトウェアを用いて解析することができる。

【0189】

Chip Assayと呼ばれる方法では、標準的なまたはロングPCRプロトコルによるゲノムセグメントのPCR増幅を使う。ハイブリダイゼーション産物は、参照により本明細書に組み入れられるHalushka et al. (1999)のVDAにより解析される。SNPsは一般に、ハイブリダイゼーションパターンのコンピュータ解析に基づき、「確実な(Certain)」または「可

50

能性のある (Likely) 」に分類されている。ヌクレオチド配列決定などの代替的な検出方法との比較により、「確実な」SNPsはこの方法による時間の100%と確認されており、「可能性のある」SNPsはこの方法による時間の73%と確認されている。

【 0 1 9 0 】

その他の方法は単純にPCR増幅の後、関連する制限酵素を用いた消化を含む。さらにその他のものは、公知のゲノム領域からの精製PCR産物の配列決定を含む。

【 0 1 9 1 】

さらに別の方法では、個々のエキソンまたは大きなエキソンの重複断片がPCR増幅される。プライマーは公開済みのまたはデータベースの配列からデザインされ、ゲノムDNAのPCR増幅は以下の条件を用いて行われる：鋳型DNA 200 ng、0.5 μ Mの各プライマー、各80 μ MのdCTP、dATP、dTTPおよびdGTP、5%ホルムアミド、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.5 UのTaqポリメラーゼならびに0.1容量のTaq緩衝液。サーマルサイクリングを行い、得られるPCR産物をさまざまな条件、例えば、5%グリセロール有りまたは無しの、15%尿素を有する5%または10%ポリアクリルアミドゲルの下でPCR-一本鎖高次構造多型(PCR-SSCP)解析により解析する。電気泳動を一晩行う。移動度シフトを示すPCR産物を再増幅し、配列決定して、ヌクレオチド変異を同定する。

【 0 1 9 2 】

CGAP-GAI (DEMIGLACE)と呼ばれる方法では、配列およびアライメントデータ(PHRAP.aceファイルからの)、配列ベースコールに対する品質スコア(PHRED品質ファイルからの)、距離情報(PHYLIPのdnadistおよびこれに近いプログラムからの)ならびにベースコーリングデータ(PHRED 「-d」スイッチからの)をメモリーにロードする。配列をアライメントし、得られたアセンブリの各垂直チャンク(「スライス」)について不一致がないか調べる。そのような任意のスライスが候補SNPと考えられる(DEMIGLACE)。真の多型に相当する可能性が低いスライスを排除するため、DEMIGLACEではいくつかのフィルターが使われる。これらは(i) 隣接配列の品質スコアが40%またはそれ以上落ちる、SNP検討材料からの所与のスライス中の配列を除外し；(ii) ピーク振幅がそのヌクレオチド型に対する全てのベースコールの15パーセント未満であるコールを除外し；(iii) コンセンサスと多数の不一致を有する配列の領域がSNP計算に関与することを不適格と判定し；(iv) コールされたピークの面積の25%またはそれ以上をピークが占める別のコールを有する任意のベースコールを検討材料から除外し；(v) 一方の読取り方向でしか生じない変異を除外するフィルターを含む。PHRED品質スコアはスライス中の各ヌクレオチドに対するエラー確率値に変換された。標準的なベイシアン(Baysian)法を用いて、所与の位置でヌクレオチド不均一性の証拠が存在する事後確率を計算する。

【 0 1 9 3 】

CU-RDF (RESEQ)と呼ばれる方法では、各SNPに対する特異的プライマーを用いてPCR増幅を、血液より単離されたDNAから行い、未使用のプライマーおよび遊離ヌクレオチドを除去するための典型的な精製プロトコルの後、同じまたはネスト化プライマーを用いて直接的に配列決定する。

【 0 1 9 4 】

DEBNICK (METHOD-B)と呼ばれる方法では、クラスター化されたEST配列の比較分析を行い、蛍光に基づくDNA配列決定により確認する。DEBNICK (METHOD-C)と呼ばれる関連方法では、ミスマッチの部位でphredの品質 > 20、SNPの3'側および5'-FLANKの5塩基にわたって平均的phredの品質 20、SNPの3'側および5'側の5塩基中にミスマッチなし、各対立遺伝子の少なくとも二つの存在を有するクラスター化されたEST配列の比較分析を行い、トレースの調査により確認する。

【 0 1 9 5 】

ERO (RESEQ)で特定される方法では、電子的に公開されたSTSsに向けて新たなプライマーセットをデザインし、異なるマウス10系統からDNAを増幅するために用いる。次いで、各系統由来の増幅産物をゲル精製し、³³P標識ターミネーターを用いた標準的なダイデオキシサイクル配列決定法によって配列決定する。全てのddATP終結反応物を、ddGTP反応物

10

20

30

40

50

などの全てが後に続く配列決定用ゲルの隣接レーンに負荷する。X線写真を視覚的に精査することでSNPを同定する。

【0196】

ERO (RESEQ-HT)として特定される別の方法では、電子的に公開されたマウスDNA配列に向けて新たなプライマーセットをデザインし、異なるマウス10系統からDNAを増幅するために用いる。エキソヌクレアーゼIおよびエビ由来アルカリホスファターゼを用いた処理により、各系統由来の増幅産物を配列決定用に調製する。ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)を用いて配列決定を行い、配列サンプルを3700 DNA Analyzer (96 Capillary Sequencer)で泳動する。

【0197】

FGU-CBT (SCA2-SNP)は、プライマーSCA2-FP3およびSCA2-RP3を用い、SNPを含む領域をPCR増幅させた方法を特定する。ゲノムDNAおよそ100 ngを、5 mM Tris、25 mM KCl、0.75 mM MgCl₂、0.05%ゼラチン、20 pmolの各プライマーおよび0.5 UのTaq DNAポリメラーゼの終濃度を含有する反応容量50 ml中で増幅させる。サンプルを変性させ、アニーリングさせ、伸長させて、PCR産物を、例えば、QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いたアガロースゲルからのバンドの切出しにより精製し、PCRプライマーとともにABI Prism 377自動DNAシーケンサーでのダイターミネーター化学反応を使って配列決定する。

【0198】

JBLACK (SEQ/RESTRICT)として特定される方法では、二つの独立したPCR反応をゲノムDNAで行う。一回目の反応由来の産物を配列決定により解析し、独特なFsp I制限部位を指し示す。Fsp Iを用いて消化することにより、突然変異を二回目のPCR反応の産物で確認する。

【0199】

KWOK (1)として記述される方法では、ダイターミネーター化学反応を用いたPCR産物の直接的DNA配列決定により、無作為に選択された四個体由来の高品質のゲノム配列データを比較することでSNPsを同定する(Kwok et al., 1996を参照のこと)。KWOK (2)として特定される関連方法では、細菌人工染色体(BACs)またはP1に基づく人工染色体(PACs)などの大きな重複インサートのクローン由来の高品質のゲノム配列データを比較することでSNPsを同定する。次いで、このSNPを含むSTSを明らかにし、プールDNAの配列決定によって種々の個体群におけるSNPの存在を確認する(Taillon-Miller et al., 1998を参照のこと)。KWOK (3)と呼ばれる別の類似方法では、大きな重複インサートのクローンBACsまたはPACs由来の高品質のゲノム配列データを比較することでSNPsを同定する。この手法により見出されるSNPsはドナー2個体の染色体間のDNA配列変異に相当するが、一般の個体群における対立遺伝子頻度は未定である。KWOK (5)法では、ダイターミネーター化学反応を用いたPCR産物の直接的DNA配列決定により、ホモ接合性DNAサンプルおよび一つまたは複数のプールDNAサンプル由来の高品質のゲノム配列データを比較することでSNPsを同定する。使われるSTSsは、使用可能な公開データベースで見出される配列データから明らかにする。具体的には、これらのSTSsを、全ての遺伝子座でホモ接合性であることが明らかにされている完全胞状奇胎(CHM)と、CEPH家系80人の親由来のDNAサンプルのプールに対するPCRによって増幅する(Kwok et al., 1994を参照のこと)。

【0200】

別のそのような方法KWOK (ポリベイによる重複Snp検出法 (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes))では、SNPsは大きなインサートのヒトゲノムクローン配列の重複領域の自動コンピュータ解析により発見される。データ収集のため、クローン配列は大規模な配列決定センターから直接的に得られる。塩基品質配列はGenBankを通じて与えられない/入手できないので、これは必要である。未加工のデータ処理は、整合性に向けたクローン配列および付随の塩基品質情報の解析を含む。関連する塩基品質配列のない、完了した(「ベース・パーフェクト (base perfect)」、10,000中1 bpよりも低い誤り率)配列には、一様な塩基品質値40 (10,000中1 bpの誤り率)が割り当てられる。塩基品質値のないドラフト配列は拒絶される。処理配列はローカルデータベースに入れられる。公知のヒト繰返し (re

10

20

30

40

50

peat) がマスクされた各配列のバージョンも保存される。繰返しマスクング(Repeat masking)は「MASKERAID」プログラムを用いて行われる。重複検出: 推定上の重複は「WUBLAST」プログラムを用いて検出される。間違っただ重複検出の結果、すなわち、真の重複ではなく配列複製によって生じるクローン配列の対の間の類似性を排除するため、いくつかのフィルタリング段階が次に行われている。重複の全長、全体的な類似性の割合、高い塩基品質値「高品質ミスマッチ」を有するヌクレオチド間の配列相違の数。結果をワシントン大学ゲノム配列決定センターでのゲノムクローンの制限断片マッピングの結果、重複に関するフィッシャーの報告、およびNCBIでの配列コンテイング構築の努力の結果とも比較する。SNP検出: 「POLYBAYES」SNP検出ソフトウェアを用い、重複するクローン配列の対を候補SNP部位について解析する。配列の対の間の配列相違を、配列決定の誤りではなく真の配列変異に相当する可能性についてスコア化する。この過程には両配列に対する塩基品質値の存在が必要になる。スコアの高い候補が抽出される。探索は置換型の単一塩基対変異に限定される。候補SNPの信頼スコアがPOLYBAYESソフトウェアによりコンピュータで計算される。

10

【0201】

KWOK (TaqManアッセイ法)により特定される方法では、TaqManアッセイ法を用いて無作為の90個体について遺伝子型を判定する。KYUGEN (Q1)により特定される方法では、指示された個体群のDNAサンプルをプールし、PLACE-SSCPにより解析する。プール解析における各対立遺伝子のピーク高さをヘテロ接合体でのもので補正し、その後、対立遺伝子頻度の計算に用いる。10%よりも高い対立遺伝子頻度は、この方法により確実に定量化される。対立遺伝子頻度 = 0 (ゼロ)とは、対立遺伝子が個体間に見出されたが、対応するピークがプールの試験では見られないことを意味する。対立遺伝子頻度 = 0~0.1とは、微量な対立遺伝子がプール中に検出されるが、ピークが低すぎて確実に定量化できないことを示す。

20

【0202】

KYUGEN (方法1)として特定されるさらに別の方法では、PCR産物を蛍光色素で後標識し、SSCP条件の下で自動キャピラリー電気泳動システム(PLACE-SSCP)により解析する。四つまたはそれ以上の個体DNAを一連の実験において二つのプールDNA (日本人由来プールおよびCEPHの親由来プール)有りまたは無しで解析する。対立遺伝子を目視検査により同定する。異なる遺伝子型を有する個体DNAを配列決定し、SNPsを同定する。ヘテロ接合体でのピーク高さを用いたシグナルバイアスの補正後に、対立遺伝子頻度をプールサンプルでのピーク高さから推定する。PCRプライマーは両鎖の後標識のため、その末端に5'-ATTまたは5'-GTTを有するようタグ付けする。DNAのサンプル(10 ng/μl)を、緩衝液(10mM Tris-HCl、pH 8.3または9.3、50 mM KCl、2.0 mM MgCl₂)、0.25 μMの各プライマー、200 μMの各dNTP、および抗Taq抗体と予め混合された0.025 単位/μlのTaq DNAポリメラーゼを含有する反応混合物中で増幅させる。PCR産物の両方の鎖をDNAポリメラーゼIのKlenow断片の交換反応により、R110およびR6Gで修飾されたヌクレオチドを用いて個別に標識する。反応をEDTAの添加によって停止させ、取り込まれなかったヌクレオチドを仔ウシ腸アルカリホスファターゼの添加によって脱リン酸化する。SSCPのため、蛍光的に標識されたPCR産物の一定分量およびTAMRA標識内部マーカを脱イオン化ホルムアミドに加え、変性させる。ABI Prism 310 Genetic Analyzerを用いキャピラリー中で電気泳動を行う。Genescanソフトウェア(P-E Biosystems)をデータ収集およびデータ処理のために用いる。SSCPにて異なる遺伝子型を示したものを含む個体(2~11個体)のDNAをABI Prism 310シーケンサーでの、ビッグダイターミネーター化学反応を用いた直接配列決定に供する。ABI Prism 310から得られた複数の配列トレースファイル进行处理し、Phred/Phrapによりアライメントし、Consedビューワーを用いて閲覧する。SNPsをPolyPhredソフトウェアおよび目視検査により同定する。

30

40

【0203】

KYUGEN (方法2)として特定されるさらに別の方法では、異なる遺伝子型を有する個体を変性HPLC (DHPLC)またはPLACE-SSCP (Inazuka et al., 1997)により探索し、その配列を

50

判定してSNPsを同定する。両鎖の後標識のため末端に5'-ATTまたは5'-GTTをタグ付けされたプライマーを用いてPCRを行う。DHPLC分析をWAVE DNA断片分析システム(Transgenomic)により実行する。PCR産物をDNASepカラムに注入し、WAVEMakerプログラム(Transgenomic)を用いて決定される条件の下で分離する。PCR産物の両方の鎖をDNAポリメラーゼIのKlenow断片の交換反応により、R110およびR6Gで修飾されたヌクレオチドを用いて個別に標識する。反応をEDTAの添加によって停止させ、取り込まれなかったヌクレオチドを仔ウシ腸アルカリホスファターゼの添加によって脱リン酸化する。電気泳動によるSSCPをABI Prism 310 Genetic Analyzerによってキャピラリー中で行う。Genescanソフトウェア(P-E Biosystems)。DHPLCまたはSSCPにて異なる遺伝子型を示したものを含む個体のDNAをABI Prism 310シーケンサーでの、ビッグダイターミネーター化学反応を用いた直接配列決定に供する。ABI Prism 310から得られた複数の配列トレースファイル进行处理し、Phred/Phrapによりアライメントし、Consedビューワーを用いて閲覧する。SNPsをPolyPhredソフトウェアおよび目視検査により同定する。PHREDを用いて、Unigeneの中のEST配列のトレースクロマトグラムデータを処理する。可能性の高いSNPsを同定するために、単一塩基ミスマッチが各Unigene クラスターに対しPHRAP、BROおよびPOAプログラムによってもたらされた複数の配列アライメントから報告されている。BROでは誤報告の可能性があるESTオリエンテーションが補正されており、その一方POAでは偽SNPsをもたらしうる遺伝子混合/キメラを示す非線形アライメント構造が同定され解析されている。ベイズ推論を用いて配列決定の誤り、アライメントの誤りもしくは不明確さ、クラスタリングの誤りまたはキメラEST配列に対して真の多型の証拠を比較考量し、未加工のクロマトグラムの高さ、鋭さ、重複および間隔；配列決定の誤り率；コンテキスト感度；cDNAライブラリー起源などのようなデータを評価する。

【0204】

MARSHFIELD (方法-B)として特定される方法では、推定上の挿入/欠失多型を含んだヒトDNA重複配列が公開データベースの検索を通じて同定される。各多型部位に隣接したPCRプライマーをコンセンサス配列から選択する。プライマーを用いて個体またはプールのヒトゲノムDNAを増幅する。得られたPCR産物を変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、PhosphorImagerを用いてDNAプールの対立遺伝子頻度を推定する。

【0205】

f. 連鎖不均衡

ある多型の同定が連鎖多型の同一性を予測する別の多型を有する連鎖不均衡にある多型。「連鎖不均衡」(当技術分野において「LD」とも呼ばれるが、本明細書において用いられる「LD」とは、二つの遺伝子座の対立遺伝子(すなわち、所与の遺伝子の変異体)または多型の特定の組合せが偶然に予測されるよりも高い頻度で現れる状況のことをいう。連鎖不均衡に関して用いられる「有意な」とは、当業者によって判定されるように、0.25または0.1とできる、および0.1、0.05、0.001、0.00001またはそれ以下とできる統計上のpまたは値であると企図される。₁ARタンパク質中の389位の多型は、連鎖不均衡にある多型の核酸配列を389位の多型で評価することにより判定することができる。本発明は、ハプロタイプ解析を可能とするよう一つまたは複数の多型に対してこのような方法で実施することができる。「ハプロタイプ」とは、当業者にとってその平易なおよび通常の意味にしたがって用いられる。これは相同染色体の一つに沿った二つまたはそれ以上の対立遺伝子または多型の集合的な遺伝子型のことをいう。

【0206】

B. タンパク質の評価

または、多型変異は、₁ARタンパク質の389位のアミノ酸変異を検出する任意の方法により判定することができる。本発明はこれを達成するための任意の特定の方法により限定されるべきではない。例えば、体液または組織のサンプルを個体から得ることができ、₁ARタンパク質の389位のアミノ酸を判定する。そのような検出は、抗体に基づくアッセイ法(ウエスタンブロット、ELISA)を含めさまざまな方法によるものとでき、またはタンパク質がArgもしくはGlyを有するかどうかを検出できるようアミノ酸分析(高圧液体クロマ

10

20

30

40

50

トグラフィーまたは質量分析)を用いることができる。

【0207】

したがって、ある種の態様では、本発明は、 γ ARタンパク質または γ ARタンパク質を結合するタンパク質、例えば、抗体などの、少なくとも一つのタンパク質性分子を含む組成物に係する。本明細書において用いられる「タンパク質性分子」、「タンパク質性組成物」、「タンパク質性化合物」、「タンパク質性鎖」、または「タンパク質性物質」とは、通常、遺伝子から翻訳される約200アミノ酸を超えるもしくは完全長の内在性配列のタンパク質、約100アミノ酸を超えるポリペプチド、および/または約3~約100アミノ酸のペプチドをいうが、これらに限定されることはない。上記の「タンパク質性(の)」という用語は全て、本明細書において同じ意味で使うことができる。

10

【0208】

タンパク質性組成物は標準的な分子生物学的技術を通じたタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの発現、天然源からのタンパク質性化合物の単離、またはタンパク質性物質の化学的合成を含めて、当業者に公知の任意の技術により作出することができる。さまざまな遺伝子に対するヌクレオチドならびにタンパク質、ポリペプチドおよびペプチド配列がこれまでに開示されており、当業者に公知のコンピュータ化されたデータベースで見出すことができる。そのようなデータベースの一つが全米バイオテクノロジー情報センターのGenbankおよびGenPeptデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)である。これらの公知の遺伝子に対するコード領域は、本明細書において開示される技術を用いてまたは当業者に周知であるように増幅することができ、および/または発現することができる。

20

【0209】

1. タンパク質精製

γ ARをサンプルから精製することまたは抗体などの、 γ ARを結合するタンパク質を精製することが望ましいことがある。そのような技術は広く使用されており、本発明は、タンパク質精製に関して限定されることを意図するわけではない。タンパク質精製技術は当業者に周知である。これらの技術は、あるレベルで、細胞環境のポリペプチドおよび非ポリペプチド画分への粗分画化を含む。ポリペプチドをその他のタンパク質から分離したら、対象とするポリペプチドをクロマトグラフィー技術および電気泳動技術によりさらに精製して、部分的なまたは完全な精製(または均質までの精製)を達成することができる。純粋なペプチドの調製に特に適した分析的方法は、イオン交換クロマトグラフィー法、排除クロマトグラフィー法; ポリアクリルアミドゲル電気泳動法; 等電点電気泳動法である。ペプチドを精製する特に効果的な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィー法またはさらにはHPLC法である。

30

【0210】

本発明のある種の局面は、コードタンパク質またはペプチドの精製、および特定の態様では、それらの実質的な精製に係することができる。本明細書において用いられる「精製タンパク質またはペプチド」という用語は、その他の成分から単離可能な組成物であり、タンパク質またはペプチドがその天然に得られる状態に比べて任意の程度にまで精製されている組成物のことをいうよう意図される。精製タンパク質またはペプチドはしたがって、それが天然に存在しうる環境から開放されているタンパク質またはペプチドのこともいう。

40

【0211】

一般に、「精製(された)」とは、さまざまな他の成分を除去するため分画化に供されたタンパク質またはペプチド組成物であり、この組成物がその発現される生物学的活性を実質的に保持していることをいうことができる。「実質的に精製された」という用語が用いられる場合、この表記はタンパク質またはペプチドが組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%またはそれ以上を構成するなど、組成物の主要な成分を形成する組成物をいうことができる。

50

【0212】

タンパク質またはペプチドの精製度を定量化するためのさまざまな方法は、本開示の観点から当業者には公知であると思われる。これらは、例えば、活性画分の特異的活性の測定、またはSDS/PAGE分析による画分内のポリペプチド量の評価を含む。画分の純度を評価するのに好ましい方法は、画分の特異的活性を算出すること、それを初期抽出物の特異的活性と比較すること、およびこのようにして、本明細書において「-倍精製数」により評価される純粋度を算出することである。活性量を表すのに使われる実際の単位は、もちろん、精製に追従するよう選択される特定のアッセイ技術や発現タンパク質またはペプチドが検出可能な活性を示すかどうかによって依存すると考えられる。

【0213】

タンパク質精製で用いるのに適したさまざまな技術は当業者に周知であると思われる。これらは、例えば、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈殿または熱変性、その後の遠心分子によるもの；イオン交換、ゲルろ過、逆相、ヒドロキシアパタイトおよび親和性クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー段階；等電点電気泳動；ゲル電気泳動；ならびにそのようなおよびその他の技術の組合せを含む。当技術分野において一般に知られているように、各種の精製段階を行う順序は変えられてもよいものと、またはある段階が省略されても、依然として実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製に適した方法をもたらすものと考えられる。

【0214】

タンパク質またはペプチドは常にその最も精製された状態で供与されねばならないという一般的な必要性はない。実際に、実質的にあまり精製されていない産物がある種の態様において有用性を持ちうることを考えられる。部分的な精製はいっそう少ない精製段階を組み合わせることで、または同じ一般的精製スキームの異なる形態を使用することで成し遂げることができる。例えば、HPLC機器を使用して行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーが低圧クロマトグラフィーシステムを使用した同じ技術よりも高い「-倍」精製を一般にもたらすことを理解されたい。低い相対精製度を示す方法は、タンパク質産物の全回収において、または発現タンパク質の活性の維持において有利でありうる。

【0215】

ポリペプチドの移動は、時に著しく、SDS/PAGEの異なる条件によって変わりうるということが知られている(Capaldi et al., 1977)。したがって、異なる電気泳動条件の下では、精製されたまたは部分的に精製された発現産物の見掛け上の分子量は変わりうるということが理解されると思われる。

【0216】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、並外れたピーク分解とともに非常に迅速な分離によって特徴付けられる。これは十分な流速を維持するため、微細粒子と高圧の使用により達成される。分離はほんの数分間で、またはせいぜい1時間で成し遂げることができる。さらに、空隙容量は総容量のうちごくわずかであるように粒子が小さく、ぎっしり詰められているので、ごく少量のサンプルが必要になるだけである。同様に、サンプルの希釈がほとんどないほどバンドが狭いので、サンプルの濃度はあまり大きい必要がない。

【0217】

ゲルクロマトグラフィー、または分子ふるいクロマトグラフィーは、分子サイズに基づく特別なタイプの分配クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーの理論は、小孔を含む不活性物質の微粒子を用いて調製されているカラムが、より大きな分子をより小さな分子から、それらの分子が孔の中をまたは周りを通過する際に、そのサイズに応じて分離するというものである。粒子を作り出している材料が分子を吸着しないかぎり、流速を決める唯一の要因はサイズである。故に、分子はその形状が相対的に一定であるかぎり、サイズの大きいものよりカラムから溶出される。分離がpH、イオン強度、温度などのようなその他全ての要因とは無関係であるため、ゲルクロマトグラフィーは、異なるサイズの分子の分離では他に並ぶものがない。また、実質的に吸着がなく、分離帯が少なく、溶出量が単に分子量との問題に関連している。

10

20

30

40

50

【0218】

親和性クロマトグラフィーは、単離される物質とこの物質が特異的に結合できる分子との間の特異的親和性に依るクロマトグラフィー手順である。これは受容体-リガンド型の相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの一方を不溶性マトリックスに共有結合的にカップリングさせることで合成される。カラム材料はその後、溶液から物質を特異的に吸着することができる。溶出は条件を、結合が起こらないようなものに変える(例えば、pH、イオン強度、および温度を変化させる)ことで行われる。

【0219】

化合物を含有する糖質の精製において有用な特定タイプの親和性クロマトグラフィーは、レクチン親和性クロマトグラフィーである。レクチンは、さまざまな多糖類および糖タンパク質に結合する物質のクラスである。レクチンは、通常、臭化シアンによりアガロースにカップリングされる。セファロースにカップリングされたコンカナバリン(Concanavalin)Aは、使われるこの手の最初の材料であり、多糖類および糖タンパク質の単離で広く使われている。使われているその他のレクチンはレンチルレクチン、N-アセチルグルコサミニル残基の精製において有用とされている小麦胚芽凝集素およびヘリックス・ポマティア(Helix pomatia)レクチンを含む。レクチンはそれ自体が糖質リガンドを用いた親和性クロマトグラフィーにより精製される。ラクトースはレクチンを唐胡麻および落花生から精製するのに使われており;マルトースはレクチンをレンチル豆およびタチナタ豆から抽出する際に有用とされており;N-アセチル-Dガラクトサミンはレクチンを大豆から精製するのに使われ; N-アセチルグルコサミニルは小麦胚由来のレクチンに結合し; D-ガラクトサミンはレクチンを二枚貝から得る際に有用とされているならびにL-フコースはハス由来のレクチンに結合すると考えられる。

【0220】

マトリックスは、それ自体がかなりの程度まで分子を吸着しない物質であり、幅広い化学的、物理的および熱的安定性を有する物質とすべきである。リガンドはその結合特性に影響を与えないようにカップリングされるべきである。リガンドは同様に、比較的強固な結合を供与すべきである。それからサンプルまたはリガンドを破壊することなく物質を溶出することが可能であるべきである。親和性クロマトグラフィーの最も一般的な形態の一つが免疫親和性クロマトグラフィーである。本発明によって用いるのに適する抗体の作製を以下に論じる。

【0221】

2. 抗体

本発明の別の態様は抗体、場合によっては、ヒト₁ARのポリペプチド配列と免疫反応性のヒトモノクローナル抗体である。抗体を₁AR、とりわけ特定の多型の結果である₁ARを検出するのに使用できることが理解される。本発明との関連でとりわけ有用な抗体は、二つの集団を区別するため、Arg389を有する₁ARタンパク質に比べてGly389を有する₁ARタンパク質を識別的に結合するものであることが考えられる。

【0222】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなどの任意の免疫学的結合因子を広くいうよう意図される。一般に、IgGおよび/またはIgMが好ましい。これはそれらが生理学的状況において最も一般的な抗体であるためであり、それらが実験環境で最も容易に作出されるためである。

【0223】

「抗体」という用語は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子をいうよう用いられており、Fab'、Fab、F(ab')₂、単一のドメイン抗体(DABs)、Fv、scFv(一本鎖Fv)などのような抗体断片を含む。さまざまな抗体に基づく構築体および断片を調製するおよび使用するための技術は、当技術分野において周知である。抗体を調製するおよび特徴付けるための手段は同様に、当技術分野において周知である(例えば、Harlow et al., 1988を参照されたく; これは参照により本明細書に組み入れられる)。

【0224】

10

20

30

40

50

a. 抗体産生

ある種の態様では、本発明は抗体に関わる。例えば、モノクローナルの全部または一部を389位のアミノ酸を判定する際に使用することができる。上記に詳述されているように、完全長のタンパク質に対して産生される抗体に加えて、抗体は野生型および変異エピトープを含めて、エピトープの中心領域を含むさらに小さい構築体に応じて産生されてもよい。さまざまな抗体に基づく構築体および断片を調製するおよび使用するための技術は、当技術分野において周知である。抗体を調製するおよび特徴付けるための手段は同様に、当技術分野において周知である(例えば、Harlow and Lane, 1988を参照されたく; これは参照により本明細書に組み入れられる)。

【0225】

モノクローナル抗体(mAb)にはある種の利点、例えば、再現性および大量産生が有ると認識されており、その使用が一般に好ましい。本発明はしたがって、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギおよびさらにはニワトリ由来のモノクローナル抗体を提供する。

【0226】

モノクローナル抗体(mAb)を産生するための方法は一般に、ポリクローナル抗体を調製するためのものと同じ方針で始まる。手短に言えば、ポリクローナル抗体は、動物を本発明による免疫原性ポリペプチド組成物で免疫し、その免疫動物から抗血清を回収することにより調製することができる。または、本発明のいくつかの態様では、特定の抗原に曝露されている可能性がある者から血清を回収する。特定の抗原への曝露は労働環境で起こる可能性があり、従ってその者らは特定の抗原に職業的に曝露されており、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に対するポリクローナル抗体を作り出している。本発明のいくつかの態様では、職業的に曝露された者由来のポリクローナル抗血清は、免疫検出法を用いてゲロニン毒素中の抗原性領域を同定するのに使われる。

【0227】

幅広い動物種を抗血清の産生に使うことができる。典型的には、抗血清の産生に使われる動物はウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはヤギである。ウサギの血液量が比較的多いので、ウサギがポリクローナル抗体の産生には好ましい選択である。

【0228】

当技術分野において周知であるように、所与の組成物はその免疫原性が異なる場合がある。したがって、宿主免疫系を追加免疫することが必要である場合が多く、これはペプチドまたはポリペプチド免疫原を担体にカップリングさせることにより達成することもできる。典型的なおよび好ましい担体は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)およびウシ血清アルブミン(BSA)である。卵白アルブミン、マウス血清アルブミンまたはウサギ血清アルブミンなどのその他のアルブミンを担体として使用することもできる。ポリペプチドを担体タンパク質に複合化させるための手段は、当技術分野において周知であり、グルタルアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミドおよびビスジアゾ化(bis-biazotized)ベンジジンを含む。

【0229】

同様に当技術分野において周知であるように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして周知である、免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって促進することができる。適当な分子アジュバントはサイトカイン、毒素または合成組成物などの、許容される全ての免疫刺激性化合物を含む。

【0230】

使用できるアジュバントはIL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -インターフェロン、GM-CSF、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDPおよびnor-MDPなどのMDP化合物、CGP (MTP-PE)、脂質A、ならびにモノホスホリル脂質A (MPL)を含む。細菌から抽出された三つの成分、つまりMPL、トレハロースジマイコレート(TDM)および細胞壁骨格(CWS)を2%スクアレン/Tween 80乳濁液中に含有するRIBIも考えられる。MHC抗原をさらに使用することができる。例示的な、多くの場合、好ましいアジュバントは完全フロインドアジュバント(結核(Myco

10

20

30

40

50

bacterium tuberculosis)死菌を含有する免疫応答の非特異的刺激因子)、不完全フロインドアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントを含む。

【0231】

アジュバントに加えて、T細胞免疫を上方制御することまたはサプレッサー細胞活性を下方制御することが示されている生物応答修飾物質(BRM)を同時投与することが望ましいことがある。そのようなBRMは、シメチジン(CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド(CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ)、 γ -インターフェロン、IL-2、もしくはIL-12などのサイトカインまたはB-7などの、免疫ヘルパー機能に参与するタンパク質をコードする遺伝子を含むが、これらに限定されることはない。

【0232】

ポリクローナル抗体の産生において使われる免疫原組成物の量は、免疫原の性質および免疫化に使われる動物によって変わる。免疫原を投与するため、さまざまな(皮下の、筋肉内の、皮内の、静脈内のおよび腹腔内の)ルートを用いることができる。ポリクローナル抗体の産生は、免疫化後のさまざまな時点で免疫動物の血液をサンプリングすることでモニターすることができる。

【0233】

2回目の追加免疫注射が行われてもよい。適当な力価が達成されるまで、追加免疫および力価測定のプロセスを繰り返す。所望のレベルの免疫原性が得られた時点で、免疫動物から採血し、血清を単離し、保存することができ、および/またはその動物を使ってmAbを産生することができる。

【0234】

mAbは、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,196,265号に例示されているものなどの、周知の技術の使用によって容易に調製することができる。典型的には、この技術は適当な動物を、野生型または変異組成物であるかに関わらず、選択の免疫原組成物、例えば、精製されたまたは部分的に精製されたポリペプチド、ペプチドまたはドメインで免疫化する段階を含む。抗体産生細胞を刺激するのに有効な方法で、免疫化組成物を投与する。

【0235】

mAbは、必要に応じて、ろ過、遠心分離およびHPLCまたは親和性クロマトグラフィーなどのさまざまなクロマトグラフィー法を用いてさらに精製することができる。本発明のモノクローナル抗体の断片は、そのように産生されたモノクローナル抗体からペプシンもしくはパインなどの酵素での消化を含む方法により、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断により得ることができる。または、本発明により包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて合成することができる。

【0236】

分子クローニング手法を使ってmAbを産生できることも考えられる。この場合、免疫動物の脾臓から単離されたRNAからコンビナトリアル免疫グロブリンフェージミドライブラリーを調製し、抗原を発現する細胞および対照細胞を用いたパニングにより適切な抗体を発現するフェージミドを選択する。従来のハイブリドーマ技術に対するこの手法の利点は、単一のラウンドでおおよそ10⁴倍も多く抗体を産生し、スクリーニングできることや、新たな特異性がHおよびL鎖の組合せにより作出され、これによって適切な抗体を見出す機会がさらに増すことである。

【0237】

b. 免疫検出法

先に述べたように、いくつかの態様では、本発明はポリペプチドおよびペプチドの抗原性領域などの生物学的要素を結合する、精製する、取り除く、判定する、および/または別の方法で検出するための免疫検出法に関係する。本発明の免疫検出法は、とりわけ標的被験者におけるペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の免疫原性または抗原性を低減するうえで、治療との関連を有するペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の抗原性領域を同定するのに使用することができる。

10

20

30

40

50

【0238】

免疫検出法は酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)、放射免疫アッセイ法(RIA)、免疫放射アッセイ法、蛍光免疫アッセイ法、化学発光アッセイ法、生物発光アッセイ法、およびウエスタンブロットを含むが、その他いくつかのものが当業者に周知である。種々の有用な免疫検出法が、例えば、Doolittle et al., 1999; Gulbis et al., 1993; De Jager et al., 1993; および Nakamura et al., 1987などの科学文献に記述されており、各々が参照により本明細書に組み入れられる。

【0239】

一般に、免疫結合法はタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを含有すると推測されるサンプルを得る段階、ならびに免疫複合体の形成を可能とするのに有効な条件の下で、場合によっては、本発明による、モノクローナルまたはポリクローナルの第一の抗体とサンプルを接触させる段階を含む。

10

【0240】

これらの方法はタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを細胞小器官、細胞、組織または生物のサンプルから精製するための方法を含む。これらの場合には、抗体により抗原性のタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド成分をサンプルから取り除く。抗体は好ましくは、例えば、カラムマトリックスの形状の固相支持体に結び付けられ、固定化された抗体にタンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド抗原成分を含有すると推測されるサンプルを適用する。溶出される、固定化抗体に免疫複合体化された抗原は残したままで、望ましくない成分をカラムから洗浄することができる。

20

【0241】

免疫結合法は同様に、サンプル中の抗原成分の量を検出するおよび定量化するための方法ならびに結合過程の間に形成された任意の免疫複合体の検出および定量化を含む。ここで、抗原または抗原ドメインを含有すると推測されるサンプルを得て、抗原または抗原ドメインに対する抗体とサンプルを接触させたら、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出するおよび定量化する。

【0242】

抗原検出の観点で、分析される生体サンプルは、例えば、組織切片もしくは標本、ホモジナイズされた組織抽出物、細胞、細胞小器官、上記の抗原含有組成物のいずれかの分離および/もしくは精製形態、またはさらには血液および/もしくは血清を含めて、細胞もしくは組織と接触する任意の生体液などの、抗原または抗原ドメインを含有すると推測される任意のサンプルとすることができる。

30

【0243】

選択の生体サンプルを免疫複合体(一次免疫複合体)の形成を可能とするのに、有効な条件の下でおよび十分な時間にわたって抗体と接触させることは、通常、単純に抗体組成物をサンプルに加えることや抗体が、存在する任意の抗原と免疫複合体を形成する、すなわち、その抗原に結合するのに十分長い時間にわたって混合物をインキュベートするということである。この時間の後、組織切片、ELISAプレート、ドットブロットまたはウエスタンブロットなどの、サンプル-抗体組成物を、通常は洗浄して、非特異的に結合された任意の抗体種を除去し、一次免疫複体内の特異的に結合された抗体だけが検出されるのを可能にすることができる。

40

【0244】

一般に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数の手法の適用によって達成することができる。これらの方法は一般に標識またはマーカー、例えば、その放射性的、蛍光性的、生物学的なおよび酵素的なタグのいずれかの検出に基づく。そのような標識の使用に関係する米国特許は同第3,817,837号; 同第3,850,752号; 同第3,939,350号; 同第3,996,345号; 同第4,277,437号; 同第4,275,149号および同第4,366,241号を含み、各々が参照により本明細書に組み入れられる。もちろん、当技術分野において公知であるように、第二の抗体および/またはビオチン/アビジンリガンドの結合配置などの二次結合リガンドの使用によるさらなる利点を見出すことができる。

50

【0245】

検出に使用される抗体は、それ自体が検出可能な標識に結び付けられてもよく、この場合には、次いでこの標識を単純に検出し、それにより組成物中の一次免疫複合体の量が測定されることを可能とする。または、一次免疫複体内に結合している第一の抗体は、この抗体に結合親和性を有する第二の結合リガンドによって検出されてもよい。これらの場合には、第二の結合リガンドを検出可能な標識に結び付けることができる。第二の結合リガンドは、それ自体が抗体であることが多く、これはしたがって「二次」抗体といえることができる。一次免疫複合体を二次免疫複合体の形成を可能とするのに、有効な条件の下でおよび十分な時間にわたって、標識された、二次結合リガンド、または抗体と接触させる。次いで、二次免疫複合体を、通常は洗浄して、非特異的に結合された任意の標識二次抗体またはリガンドを除去し、次いで二次免疫複合体中の残存する標識を検出する。

10

【0246】

さらなる方法は、二段階手法による一次免疫複合体の検出を含む。抗体に結合親和性を有する、抗体などの、第二の結合リガンドを用いて、上記のように、二次免疫複合体を形成させる。洗浄後、二次免疫複合体を、この場合もやはり免疫複合体(三次免疫複合体)の形成を可能とするのに、有効な条件の下でおよび十分な時間にわたって、二次抗体に結合親和性を有する第三の結合リガンドまたは抗体と接触させる。第三のリガンドまたは抗体を検出可能な標識に結び付け、このように形成された三次免疫複合体の検出を可能にする。この系はシグナル増幅を、これが望まれる場合には、供与することができる。

【0247】

Charles Cantorによりデザインされた免疫検出法の一つでは、二つの異なる抗体を使用する。第一段階のビオチン化モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて標的抗原を検出し、次いで第二段階の抗体を用いて、複合体化ビオチンに付着されているビオチンを検出する。その方法では、試験されるサンプルを、第一段階の抗体を含有する溶液中で最初にインキュベートする。標的抗原が存在する場合には、抗体の一部が抗原に結合して、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次いで、ストレプトアビジン(またはアビジン)、ビオチン化DNA、および/または相補的なビオチン化DNAの連続溶液中でのインキュベーションにより、各段階がさらなるビオチン部位を抗体/抗原複合体に付加するようにして、抗体/抗原複合体を増幅する。適当なレベルの増幅が達成されるまで増幅段階を繰り返し、その時点で、ビオチンに対する第二段階の抗体を含有する溶液中でサンプルをインキュベートする。この第二段階の抗体は、例えば、発色基質を用いた組織酵素学によって抗体/抗原複合体の存在を検出するのに使用できる酵素を用いるなどして標識する。適当な増幅によって、肉眼で見える複合物を産生することができる。

20

30

【0248】

別の公知の免疫検出法では免疫-PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)の方法論を利用する。このPCR法はビオチン化DNAとのインキュベーションまではCantor法と似ているが、複数ラウンドのストレプトアビジンおよびビオチン化DNAのインキュベーションを用いる代わりに、DNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体を、抗体を放出させる低pHまたは高塩濃度緩衝液で洗い流す。次いで、得られた洗浄液を用いて、適切な対照とともに適当なプライマーを用いてPCR反応を行う。少なくとも理論的には、PCRの多大な増幅可能性および選択性を使用して、単一の抗原分子を検出することができる。

40

【0249】

i. ELISA

上記に詳述したように、免疫アッセイ法は、その最も単純なおよび/または直接的な意味で、結合アッセイ法である。ある種の好ましい免疫アッセイ法は、当技術分野において周知のさまざまなタイプの酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)および/または放射免疫アッセイ法(RIA)である。組織切片を用いた免疫組織化学検出も特に有用である。しかしながら、検出はそのような技術に限定されず、および/またはウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、FACS解析なども使用できることが容易に理解されると思われる。

【0250】

50

一つの例示的なELISAでは、抗体をポリスチレンマイクロタイタープレート中のウェルなどの、タンパク質親和性を示す選択の表面に固定化する。次いで、臨床サンプルなどの、抗原を含有すると推測される試験組成物をウェルに加える。結合および/または非特異的に結合された免疫複合体を除去するための洗浄の後に、結合された抗原を検出することができる。検出は、通常、検出可能な標識に連結されている別の抗体の添加によって達成される。このタイプのELISAが単純な「サンドイッチELISA」である。検出は同様に、第二の抗体の添加の後、第二の抗体に結合親和性を有する第三の抗体であり、検出可能な標識に連結されている第三の抗体の添加により達成することができる。ELISAは、Gly389に対してArg389を有するタンパク質との抗体の識別的結合に基づくことができる。

【0251】

別の例示的なELISAでは、抗原を含有すると推測されるサンプルをウェル表面に固定化し、および/または次いで抗体と接触させる。結合および/または非特異的に結合された免疫複合体を除去するための洗浄の後に、結合された抗-抗体を検出する。最初の抗体が検出可能な標識に連結されている場合、免疫複合体は直接的に検出することができる。この場合もやはり、免疫複合体は、第一の抗体に結合親和性を有する第二の抗体であり、検出可能な標識に連結されている第二の抗体を用いて検出することができる。

【0252】

抗原が固定化される別のELISAは、検出での抗体競合の使用を伴う。このELISAでは、抗原に対する標識抗体をウェルに加え、結合させ、および/またはその標識によって検出する。次に未知サンプル中の抗原の量は、コーティングウェルとのインキュベーションの間に抗原に対する標識抗体とサンプルを混合することにより測定する。サンプル中の抗原の存在は、ウェルとの結合に使用可能な、抗原に対する抗体の量を減らすように作用し、したがって最終的なシグナルを減らす。未標識の抗体が抗原コーティングウェルに結合し、同様に標識抗体に結合するのに使用可能な抗原の量を減らす場合、これは同様に、未知サンプル中の抗原に対する抗体を検出するのに適している。

【0253】

使用される形式に関係なく、ELISAはコーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的に結合された種を除去するための洗浄、ならびに結合された免疫複合体の検出などの、ある種の特徴を共通して有する。これらを以下に記述する。

【0254】

プレートを抗原または抗体のいずれかでコーティングする際に、一般にプレートのウェルを抗原または抗体の溶液で、一晚または一定時間インキュベートすることができる。次いでプレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着された材料を除去することができる。次いで任意の使用可能な残存ウェル表面を、試験抗血清に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質で「コーティング」する。これらはウシ血清アルブミン(BSA)、カゼインまたは粉乳溶液を含む。コーティングは固定化表面上の非特異的な吸着部位のブロッキングを可能にし、したがって表面上への抗血清の非特異的結合により引き起こされるバックグラウンドを減らす。

【0255】

ELISAでは、直接的手順よりはむしろ二次または三次検出手段を用いることが恐らく通例である。したがって、ウェルとのタンパク質または抗体の結合、バックグラウンドを減らすための非反応性材料でのコーティング、および非結合材料を除去するための洗浄の後に、固定化表面を、免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能とするのに有効な条件の下で、試験される生体サンプルと接触させる。次いで免疫複合体の検出には、標識された二次結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または第三の結合リガンドと併せて二次結合リガンドまたは抗体が必要とされる。

【0256】

「免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能とするのに有効な条件の下で」とは、条件がBSA、ウシガンマグロブリン(BGG)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)/Tweenなどの溶液による抗原および/または抗体の希釈を含むのが好ましいことを意味する。これらの添加剤は非特

10

20

30

40

50

異的なバックグラウンドの低減を支援する傾向もある。

【0257】

「適当な」条件とは同様に、インキュベーションが、有効な結合を可能とするのに十分な温度または時間であることを意味する。インキュベーション段階は通常、好ましくはおよそ25 ~ 27 の温度で、約1~2時間ないし4時間くらいであり、または約4 くらいで一晩とすることができる。

【0258】

ELISAでの全インキュベーション段階の後、非複合体形成材料を除去するために、接触表面を洗浄する。洗浄手順の例はPBS/Tween、またはホウ酸緩衝液などの溶液での洗浄を含む。試験サンプルと元々結合されている材料との間の特異的な免疫複合体の形成と、それに続く洗浄の後、ごく微量の免疫複合体の発生を測定することができる。

【0259】

検出手段を供与するため、第二または第三の抗体は、検出を可能とするよう結合標識を有することができる。これは、適切な発色性基質とインキュベートすることで着色をもたらす酵素とすることができる。したがって、例えば、第一および第二の免疫複合体をさらなる免疫複合体形成の発生に好ましい時間および条件の下でウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたは水素ペルオキシダーゼ複合化抗体と接触させるかまたはインキュベートすること(例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中で室温にて2時間のインキュベーション)が望まれると考えられる。

【0260】

標識抗体とのインキュベーション後、および未結合の材料を除去するための洗浄に引き続いて、標識の量を、例えば、尿素、もしくはプロモクレゾールパープル、もしくは2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)などの発色性基質、または酵素標識としてペルオキシダーゼの場合、 H_2O_2 とのインキュベーションにより定量化する。次いで生じた色の度合いを、例えば、可視スペクトル分光光度計を用いて測定することにより、定量化を達成する。

【0261】

ii. 免疫組織化学

本発明の抗体は同様に、免疫組織化学(IHC)による研究用に調製された新鮮凍結組織ブロックおよび/またはホルマリン固定の、パラフィン包埋組織ブロックの両方と併せて使用することができる。例えば、免疫組織化学を使用して、Fortilinを特徴付けるまたは細胞中のFortilin量を評価することができる。これらの粒子状の標本から組織ブロックを調製する方法は、さまざまな予後因子に関する以前のIHC研究で使われ成功し、および/または当業者に周知である(Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990)。

【0262】

手短に言えば、凍結切片は小さなプラスチック製カプセル中でリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中にて室温で凍結「粉碎」組織50 mgを再水和する段階; 粒子を遠心分離によりペレットにする段階; それらを粘性包埋剤(OCT)に再懸濁する段階; カプセルを転倒混和する段階および/もしくは再び遠心分離によりペレットにする段階; -70 のイソペンタン中で急速凍結する段階; プラスチック製カプセルを切断する段階および/もしくは円筒状の凍結組織を取り除く段階; クリオスタットマイクロームチャックに円筒状組織を固定する段階; ならびに/または25~50枚の連続切片に切断する段階により調製することができる。

【0263】

永久切片はプラスチック製微量遠心管中でのサンプル50 mgの再水和; ペレットにする段階; 4時間の固定化のため10%ホルマリンに再懸濁する段階; 洗浄する段階/ペレットにする段階; 温かい2.5%寒天に再懸濁する段階; ペレットにする段階; 氷水中で冷却して寒天を固める段階; 試験管から組織/寒天ブロックを取り除く段階; 浸透する段階および/もしくはブロックをパラフィンに包埋する段階; ならびに/または50枚までの連続永久切片に切断する段階を含む類似の方法により調製することができる。

【0264】

III. 療法

個体の γ ARの遺伝子型またはタンパク質配列が判定されたら、治療上の処置過程を個別化することができる。この方法の好ましい態様では、対象とする体質はある治療上の処置に対して患者が示す臨床応答、例えば、以下に限定されないが γ ARを標的化する、ブシンドロールなどの、遮断薬のような薬物に対する応答または病状に関する治療上の処置に対する応答である。本明細書において用いられる「病状」とは、以下に限定されないが、処置が望ましい一つまたは複数の身体的および/または精神的症状を呈する任意の状態または疾患を含み、以下に限定されないが、心不全、褐色細胞腫、片頭痛、心不整脈、高血圧、拡張型心筋症、虚血性心疾患(心筋症、アンギナ、心筋梗塞)、およびさまざまな不安障害などの、以前におよび新たに同定された疾患ならびに類似の病態生理学的状態を有するその他の障害を含む。本明細書において用いられる「臨床応答」という用語は、以下のいずれかまたは全てを意味する：療法および有害事象(すなわち、副作用)の効力または能力の定量的測定。

10

【0265】

このように病状を有するホモ接合性 γ Arg389の個体を、以下に限定されないがブシンドロールなどの、遮断薬を含む療法に配することができる。遮断薬は単独でまたは安定化化合物などの、少なくとも一つの他の薬剤との併用で投与することができる。遮断薬は同様に、装置を必要とした病態によって以前には禁忌とされた医療装置との併用で投与することができる。例えば、通常は、徐脈を有する心不全患者は遮断薬を受けられないと考えられる。しかし個体の遺伝子型がArg389(好ましい遺伝子型)である場合には、ブシンドロールを処方するため、ペースメーカーを移植することができる。

20

【0266】

A. 投与経路

遮断薬の投与は経口の、静脈内の、筋肉内の、動脈内の、髄内の、くも膜下腔内の、脳室内の、皮内の、気管内の、膀胱内の(intravesicle)、眼内の、経皮の、皮下の、腹腔内の、鼻腔内の、腸内の、局所の、舌下の、または直腸の経路を含むが、これらに限定されない、任意の数の経路によるものとして行うことができる。処方および投与の技術に関するさらなる詳細は、Remington's Pharmaceutical Sciencesの最新版(Maack Publishing Co., Easton, Pa.)で見出すことができる。ある種の態様では、ブシンドロールを経口投与用に処方する。

30

【0267】

B. 製剤

臨床的用途が考えられる場合、薬学的組成物は対象とする用途に適した形態で調製することができる。一般に、このことには発熱物質、およびヒトまたは動物に有害となりうるその他の不純物を本質的に含まない組成物を調製することが必要になる。

【0268】

適切な塩および緩衝液を使用して、送達ベクターを安定にすることや標的細胞による取込みを可能にすることが一般に望まれると考えられる。緩衝液は同様に、組換え細胞が患者に導入される場合に使用されることが考えられる。本発明の水性組成物は、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散された、有効量のベクターまたは細胞を含む。「薬学的にまたは薬理的に許容される」という語句は、動物またはヒトに投与される場合に有害な、アレルギー性の、またはその他の不適当な反応をもたらさない分子成分および組成物のことをいう。本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」とは、ヒトへの投与に適した医用薬剤などの、医用薬剤の処方で用いるのに許容される溶媒、緩衝液、溶液、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的に活性な物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は当技術分野において周知である。任意の従来媒体または薬剤が本発明の活性成分と不適合であるような場合を除き、治療用組成物でのその使用が考えられる。補助的な活性成分も組成物に組み入れることができる。ただし、それらが組成物のベクターまたは細胞を不活性化しない

40

50

という条件である。

【0269】

本発明の活性組成物は古典的な薬学的調製物を含むことができる。本発明によるこれらの組成物の投与は、任意の共通経路によるものとできるが、標的組織がその経路により使用可能である限りにおいてである。これは経口の、経鼻の、または口腔の経路を含む。あるいは、投与は皮内の、皮下の、筋肉内の、腹腔内のもしくは静脈内の注射によるもの、または心臓組織への直接的な注射によるものとできる。そのような組成物は、通常、上記に記述されるように、薬学的に許容される組成物として投与される。

【0270】

活性化合物は同様に、非経口的にまたは腹腔内に投与することができる。例証として、遊離塩基または薬理的に許容される塩としての活性化合物の溶液をヒドロキシプロピルセルロースなどの、界面活性剤と適当に混合された水の中で調製することができる。分散液を同様に、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物の中でならびに油中で調製することができる。保存および使用の通常状況下では、これらの調製物は一般に、微生物の増殖を防ぐよう保存剤を含む。

【0271】

注射可能な用途に適した薬学的形態は、例えば、無菌の水溶液または分散液および無菌の注射可能な溶液または分散液の即時調製用の無菌の粉末を含む。一般に、これらの調製物は無菌であり、容易に注射可能となる程度に流動性である。調製物は製造および保存の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの、微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。適切な溶媒または分散媒は、例えば、水、エタノール、多価アルコール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、適当なそれらの混合物、ならびに植物油を含むことができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要とされる粒径の維持によりおよび界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の予防はさまざまな抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましいと思われる。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物中での使用によってもたらすことができる。

【0272】

経口投与の場合、本発明のポリペプチドは、通常、賦形剤を用いて組み入れることができ、摂取不可能な洗口剤および歯磨剤の形態で使用することができる。洗口剤は必要量の活性成分をホウ酸ナトリウム溶液(Dobell's Solution)などの、適切な溶媒に組み入れて調製することができる。または、活性成分を、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび重炭酸カリウムを含有する殺菌洗浄液に組み入れることができる。活性成分を同様に、ゲル、ペースト、粉末およびスラリーを含む歯磨剤に分散させることができる。活性成分を、水、結合剤、研磨剤、香料添加剤、起泡剤および保湿剤を含みうるペースト状歯磨剤に治療的に有効な量で加えることができる。

【0273】

本発明の組成物は、通常、中性型または塩型で処方することができる。薬学的に許容される塩は、例えば、無機酸(例えば、塩酸またはリン酸)由来の、または有機酸(例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など)由来の酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基と形成される)を含む。タンパク質の遊離カルボキシル基と形成される塩は同様に、無機塩基(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化第二鉄)に由来する、または有機塩基(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど)に由来することができる。

【0274】

処方によって、溶液は投薬製剤と適合する方法および治療的に有効であるような量で投与されることが好ましい。製剤は注射可能な溶液、薬物放出カプセルなどのような種々

10

20

30

40

50

の投薬形態で容易に投与することができる。水溶液での非経口投与の場合、例えば、溶液を一般に適当に緩衝化し、液体希釈液を最初に、例えば、十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張にする。そのような水溶液を、例えば、静脈内の、筋肉内の、皮下のおよび腹腔内の投与に使用することができる。好ましくは、無菌の水性媒体が当業者に公知であるように、とりわけ本開示の観点で使用される。例証として、単回用量をNaCl等張液1 mlに希釈し、皮下注射液1000 mlに加えるかまたは提案の注入部位に注射するかのいずれかとすることができる(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」15th Edition, 1035~1038および1570~1580頁を参照のこと)。若干の投薬量のばらつきは処置される被験者の状態に応じて必然的に生じると考えられる。いずれにしても、投与責任者が個々の被験者に適した用量を判定すると考えられる。さらに、ヒトに投与する場合、調製物はFDA生物製剤室の標準規格によって要求される無菌性、発熱性、一般的安全性および純度の標準規格を満たさなければならない。

10

【0275】

1. 制御/長期/持続/遅延放出投与

本発明の別の局面では、制御放出製剤として、ホモ接合性の1Arg389遺伝子型を有する患者に遮断薬を送達することにより心不全患者を処置する方法を提供する。本明細書において用いられる、本発明の組成物の「制御」、「長期」、「持続」、または「遅延」放出という用語は、まとめて本明細書において「制御放出」と呼ぶことができ、本発明の組成物の連続的または不連続的、および直線的または非直線的な放出を含む。遮断薬の制御放出製剤には多くの利点がある。

20

【0276】

a. 錠剤

本発明の目的に適した制御放出錠剤は米国特許第5,126,145号に開示されており、この文献は参照により本明細書に組み入れられる。この錠剤は、混合物中に、約5~30%高粘度ヒドロキシプロピルメチルセルロース、約2~15%の水溶性の薬学的結合剤、ろう状物質、例えば、脂肪酸などの、約2~20%の疎水性成分、および約30~90%活性成分を含む。

【0277】

b. フィルム

本発明はさらに、プシンドロールなどの、遮断薬を含む生分解性で生体適合性の重合体フィルムを患者に投与する段階を含む、侵襲的心手技後の、ホモ接合性の1Arg389遺伝子型を有する患者の予防法またはその患者を処置する方法を提供する。重合体フィルムはその長さおよび幅と比較して薄い。フィルムは典型的には、約60マイクロメートル~約5 mmの均一な選択厚さを有する。約600マイクロメートル~1 mmおよび約1 mm~約5 mm厚のフィルム、ならびに約60マイクロメートル~約1000マイクロメートル、および約60~約300マイクロメートルのフィルムが患者の体内への挿入用の治療用インプラントの製造において有用である。フィルムは、癒合手術で用いられる方法に類似のやり方で患者に投与することができる。例えば、プシンドロールなどの遮断薬のフィルム製剤を外科手術の間に心臓組織部位または動脈に吹き付けるかまたは滴下することができ、あるいは形成されたフィルムを選択の組織部位の上に置くことができる。別の態様では、以下にさらに詳細に論じられるように、フィルムをステントなどの医療装置上の制御放出コーティングとして使用することができる。

30

40

【0278】

生分解性または非生分解性のいずれかの重合体を用いて、遮断薬が重合体マトリックス全体に均一に分配されているインプラントを製造することができる。ポリ無水物および脂肪族ポリエステル、好ましくはポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)ならびにその混合物および共重合体、より好ましくはPLA:PGAの50:50共重合体および最も好ましくはPLA:PGAの75:25共重合体を含めて、本発明の生分解性フィルムを作製する際に用いるのに適したいくつかの生分解性重合体が当技術分野において公知である。PLAの単一の鏡像異性体、好ましくはL-PLAを単独でまたはPGAとの併用で用いることもできる。ポリカーボネート、ポリマレートおよびカプロラク톤を用いて、本発明のインプラントを作製すること

50

もできる。

【0279】

本発明の重合体フィルムに組み入れられるブシンドロールなどの、遮断薬の量は、以下に限定されないが、心不全、褐色細胞腫、片頭痛、心不整脈、高血圧、虚血(aschemia)、心筋症、およびさまざまな不安障害などの、類似の病態生理学的状態を有する疾患を処置する際に測定可能な効果を示すのに有効な量である。本発明の組成物はさまざまな技術により、例えば、溶液法、懸濁法、または溶融圧着によりフィルムに組み入れることができる。

【0280】

c. 経皮パッチ装置

経皮送達は、血液の循環による体内での分配のための皮膚を通じた治療薬の送達を伴う。経皮送達は、静脈注射針の代わりに進入口として皮膚を使った薬物の持続的な、静脈内制御送達に例えることができる。治療薬は皮膚の外層を通過し、皮内の毛細血管または小血管中に拡散し、次いで主要な循環系の中に輸送される。

【0281】

皮膚を通じての治療薬の制御された、持続的投与をもたらす経皮パッチ装置は、当技術分野において周知である。そのような装置は、例えば、米国特許第4,627,429号；同第4,784,857号；同第5,662,925号；同第5,788,983号；および同第6,113,940号に開示されており、これらは全て参照により本明細書に組み入れられる。特徴として、これらの装置は装置の外面を規定する薬物非透過性の裏打ち層と障壁層にシールされた、付着層などの、透過性の皮膚付着膜とを、治療薬が入れられる貯留層をそれらの間に生み出すように含む。本発明の一つの態様では、遮断薬の製剤を経皮パッチの貯留層に導入し、1AR遺伝子でホモ接合性のArg389である患者に使用する。

【0282】

d. 医療装置

別の態様では、医療装置の中にブシンドロールなどの遮断薬を組み入れ、この装置を体内の所望の標的位置に配置し、そこで遮断薬が医療装置から溶出することを企図する。本明細書において用いられる「医療装置」とは、病状の予防または治療のため哺乳類の中に一時的にまたは永続的に導入される装置のことをいう。これらの装置は臓器、組織または内腔内に残るよう皮下に、経皮的にまたは外科的に導入される任意のものを含む。医療装置は人工臓器を血管循環系につなげるためのステント、人工移植片、人工心臓弁、人工心臓および固定具、静脈弁、腹部大動脈瘤(AAA)移植片、下大静脈フィルター、持続性薬物注入カテーテルを含むカテーテル、塞栓コイル、血管塞栓で使われる塞栓材料(例えば、PVA発泡体)、メッシュ修復材料、Dracon血管小片整形外科用金属板(Dracon vascular particle orthopedic metallic plate)、ロッドおよびスクリューならびに血管縫合糸を含むが、これらに限定されることはない。

【0283】

一つの態様では、ステントまたは移植片などの医療装置をマトリックスでコーティングする。本発明によってステントまたは移植片をコーティングするために使われるマトリックスは、さまざまな材料から調製することができる。マトリックスに対する主な必要条件は、それがステントまたは合成移植片の曝露表面に未破裂のまま留まるのに十分に弾力性かつ柔軟性でなければならないということである。

【0284】

C. 投薬量

患者に投与されるまたは処方されるブシンドロールの量は、約、少なくとも約、またはせいぜい約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、9

10

20

30

40

50

8、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500 mg、またはその中で導き出せる任意の範囲とすることができる。あるいは、投与されるまたは処方される量は、患者の体重に対して、約、少なくとも約、またはせいぜい約0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0 mg/kg、またはその中で導き出せる任意の範囲とすることができる。

10

【0285】

別個の量で供与される場合、ブシンドロールの各摂取量は「用量」と見なすことができる。医療従事者は特定の時間的経過にわたって(処置計画)または無期限にブシンドロールの複数回用量を処方するまたは投与することができる。ブシンドロールが考えられる。

【0286】

ブシンドロールは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80回、もしくはそれ以上の回数またはその中で導き出せる任意の範囲で投与することができる。薬物は無期限にあるいはブシンドロールが処方されたまたは投与された病状の症状を患者が示す限り服用できるとさらに考えられる。同様に、薬物は2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55分ごとに、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間ごとに、または1、2、3、4、5、6、7日ごとに、または1、2、3、4、5週ごとに、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12ヶ月もしくはそれ以上の月ごとに、あるいはその中で導き出せる任意の範囲で投与することができる。または、それはそのような任意の期間にわたって全身的に投与することができ、1年を超えて期間を引き延ばすことができる。

20

【0287】

D. その他の治療法の選択肢

本発明のある種の態様では、方法は、ブシンドロールではないもしくはイノトロープ(inotrope)である 遮断薬、利尿薬、ACE-I、AIIアンタゴニスト、BNP、Ca⁺⁺遮断薬、またはHDAC阻害剤を投与する段階を含むことができる。これらの薬剤は、 β_1 -ARおよび/または β_2 -AR多型の評価後に、ブシンドロールに代えてまたは加えて処方または投与することができる。

30

【0288】

第二の治療計画として、薬剤はブシンドロールと同時に、またはブシンドロールの前もしくは後に投与または服用することができる。処置によって、運動能力の上昇、心臓駆出量の増加、左心室拡張末期圧の低下、肺毛細管楔入圧の低下、心拍出量または心係数の増加、肺動脈圧の低下、左心室収縮末期径および左心室拡張末期径の減少、左心室および右心室壁応力の減少、壁張力および壁厚の減少、生活の質の上昇、ならびに疾患関連罹患率および死亡率の減少が提供されるなど、病的な心肥大または心不全の一つまたは複数の症状が改善されることができる。

40

【0289】

別の態様では、その他の治療様式との併用でブシンドロールを用いることが想定される。したがって、上記の療法に加えて、さらに「標準的な」薬学的心臓療法を患者に供与することもできる。その他の療法の例としては、非限定的に、その他の 遮断薬、降圧剤、強心剤、抗血栓剤、血管拡張剤、ホルモンアンタゴニスト、イノトロープ(inotrope)、利尿薬、エンドセリンアンタゴニスト、カルシウムチャンネル遮断薬、ホスホジエステラーゼ阻害剤、ACE阻害剤、2型アンジオテンシンアンタゴニストおよびサイトカイン遮断薬/阻害剤、ならびにHDAC阻害剤が挙げられる。

【0290】

50

併用は、両方の薬剤を含む単一の組成物もしくは薬理的製剤と心臓細胞を接触させることにより、または二つの別個の組成物もしくは製剤と心臓細胞を同時に接触させることにより達成することができ、後者の場合には、一方の組成物が発現構築体を含み、もう一方が薬剤を含む。あるいは、ブシンドロールを用いる療法は、数分から数週間に及ぶ間隔でその他の薬剤の投与に先行しても、またはその後に行ってもよい。その他の薬剤および発現構築体を細胞に別々に適用する態様では、一般に、薬剤および発現構築体がそれでも細胞に対し有利な併用効果を及ぼすことができるように、それぞれの送達時の間に大幅な時間が経過しないことが確実にされる。このような例において、典型的には、互いに約12~24時間内に、より好ましくは互いに約6~12時間内に細胞を両方の様式と接触させることが考えられるが、約12時間のみが遅延時間が最も好ましい。場合によっては、処置の時間を大幅に延長することが望ましいこともあるが、この場合には各投与の間に数日(2、3、4、5、6または7)~数週間(1、2、3、4、5、6、7または8)が経過する。

10

【0291】

ブシンドロール、またはその他の薬剤のいずれかの2回以上の投与が所望されることも考えられる。これに関しては、種々の組合せを使用することができる。例証として、ブシンドロールが「A」であり、その他の薬剤が「B」である場合、3回および4回の総投与に基づく以下の順列が例示される。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

20

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

その他の組合せも同様に考えられる。

【0292】

1. 薬理的治療薬

薬理的治療薬および投与方法、投薬量などは当業者に周知であり(例えば、関連部分が参照により本明細書に組み入れられる「Physicians Desk Reference」、Klaassenの「The Pharmacological Basis of Therapeutics」、Remington's Pharmaceutical Sciences、および「The Merck Index, Eleventh Edition」を参照のこと)、本明細書の開示の観点で本発明と組み合わせることができる。若干の投薬量のばらつきは処置される被験者の状態に応じて必然的に生じると考えられる。いずれにしても、投与責任者が個々の被験者に適した用量を判定するはずであり、そのような個々の判定は当業者の技術の範囲内である。

30

【0293】

本発明において使用できる薬理的治療薬の非限定的な例としては、抗高リポタンパク血症薬、抗動脈硬化薬、抗血栓/線維素溶解薬、血液凝固薬、抗不整脈剤、血圧降下剤、昇圧剤、うっ血性心不全の処置薬剤、抗狭心症薬、抗菌剤またはその組合せが挙げられる。

【0294】

さらに、本実施例において遮断薬が用いられたように(以下参照)、以下のいずれかをを用いて心臓治療標的遺伝子の新たなセットを開発できることに留意されたい。これらの遺伝子の多くは重複しうることが予想されるが、新たな遺伝子標的を開発できる可能性が高い。

40

【0295】

a. 抗高リポタンパク血症薬

ある種の態様では、「抗高リポタンパク血症薬」として本明細書において周知である、血中脂質および/またはリポタンパク質の一つまたは複数の濃度を低減する薬剤の投与を特にアテローム性動脈硬化症および血管組織の肥厚または閉塞の処置において、本発明による心血管治療法と組み合わせることができる。ある種の局面では、抗高リポタンパク血症薬はアリアルオキシアルカン酸/フィブリン酸誘導体、樹脂酸/胆汁酸抑制薬、HMG-CoA

50

還元酵素阻害剤、ニコチン酸誘導体、甲状腺ホルモンもしくは甲状腺ホルモン類似体、種々の薬剤またはその組合せを含むことができる。

【0296】

i. アリールオキシアルカン酸/フィブリン酸誘導体

アリールオキシアルカン酸/フィブリン酸誘導体の非限定的な例としては、ベクロブラート、エンザフィブラート、ピニフィブラート、シプロフィブラート、クリノフィブラート、クロフィブラート(アトロミド-S)、クロフィブリン酸、エトフィブラート、フェノフィブラート、ゲンフィプロジル(ロビッド(lobid))、ニコフィブラート、ピリフィブラート、ロニフィブラート、シンフィブラートおよびテオフィブラートが挙げられる。

【0297】

10

ii. 樹脂酸/胆汁酸抑制薬

樹脂酸/胆汁酸抑制薬の非限定的な例としては、コレステラミン(コリバー(cholybar))、クエストラン)、コレステポール(コレステド)およびポリデキシドが挙げられる。

【0298】

iii. HMG CoA還元酵素阻害剤

HMG CoA還元酵素阻害剤の非限定的な例としては、ロバスタチン(メバコール)、プラバスタチン(プラバコール)またはシンバスタチン(ゾコール)が挙げられる。

【0299】

iv. ニコチン酸誘導体

ニコチン酸誘導体の非限定的な例としては、ニコチネート、アセピモックス(acepimox)、ニセリトロール、ニコクロナート、ニコモールおよびオキシニアク酸が挙げられる。

【0300】

20

v. 甲状腺(Thyroid)ホルモンおよび類似体

甲状腺ホルモンおよびその類似体の非限定的な例としては、エトロキサート、チロプロブ酸およびチロキシシンが挙げられる。

【0301】

vi. 種々の抗高リポタンパク血症薬

種々の抗高リポタンパク血症薬の非限定的な例としては、アシフラン、アザコステロール、ベンフルオレクス、 α -ベンザルブチルアミド、カルニチン、コンドロイチン硫酸、クロメストロン、デタキストラン、デキストラン硫酸ナトリウム、5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸、エリタデニン、フラザボール、メグルトール、メリナミド、ミタトリエンジオール、オルニチン、 α -オリザノール、パンテチン、テトラ酢酸ペンタエリスリトール、 α -フェニルブチルアミド、ピロザジル、プロブコール(ロレルコ)、 α -シトステロール、スルトシル酸-ピペラジン塩、チアデノール、トリパラノールおよびキセンブシンが挙げられる。

【0302】

30

b. 抗動脈硬化薬

抗動脈硬化薬の非限定的な例としては、ピリジノールカルバメートが挙げられる。

【0303】

c. 抗血栓/線維素溶解薬

40

ある種の態様では、特にアテローム性動脈硬化症および脈管構造(例えば、動脈)の閉塞の処置において、血栓の除去または予防を補助する薬剤の投与をモジュレーターの投与と組み合わせることができる。抗血栓および/または線維素溶解薬の非限定的な例としては、抗凝血剤、抗凝血剤アンタゴニスト、抗血小板薬、血栓溶解剤、血栓溶解剤アンタゴニストまたはその組合せが挙げられる。

【0304】

ある種の局面では、例えば、アスピリンおよびワーファリン(コーマディン)などの、経口的に投与できる抗血栓薬が好ましい。

【0305】

i. 抗凝血剤

50

抗凝血剤の非限定的な例としては、アセノクマロール、アンクロド、アニシンジオン、プロミンジオン、クロリンジオン、クメタロール、シクロクマロール、デキストラン硫酸ナトリウム、ジクマロール、ジフェナジオン、ビスクマ酢酸エチル、エチリデンジクマロール、フルインジオン、ヘパリン、ヒルジン、リアポレートナトリウム(Iyapolate sodium)、オキサジジオン、ペントサン多硫酸、フェニンジオン、フェンブロクモン、ホスピチン、ピコタミド、チオクロマロールおよびワルファリンが挙げられる。

【0306】

ii. 抗血小板薬

抗血小板薬の非限定的な例としては、アスピリン、デキストラン、ジピリダモール(ペルサンチン)、ヘパリン、スルフィンピラゾン(アンツールン)およびチクロピジン(チクリッド)が挙げられる。

10

【0307】

iii. 血栓溶解剤

血栓溶解剤の非限定的な例としては、組織プラスミノゲン活性化因子(アクティベース)、プラスミン、プロウロキナーゼ、ウロキナーゼ(アボキナーゼ)、ストレプトキナーゼ(ストレプターゼ)、アニストレプラーゼ/APSAC (エミナーゼ)が挙げられる。

【0308】

d. 血液凝固薬

患者が出血(hemorrhage)または出血(hemorrhaging)の可能性(likelihood)の増大に苦しんでいるある種の態様では、血液凝固を増強する薬剤を使用することができる。血液凝固促進物質の非限定的な例としては、血栓溶解剤アンタゴニストおよび抗凝血剤アンタゴニストが挙げられる。

20

【0309】

i. 抗凝血剤アンタゴニスト

抗凝血剤アンタゴニストの非限定的な例としては、プロタミンおよびビタミンK1が挙げられる。

【0310】

ii. 血栓溶解剤アンタゴニストおよび抗血栓剤

血栓溶解剤アンタゴニストの非限定的な例としては、アミノカプロン酸(amiocaproic acid)(アミカル)およびトラネキサム酸(アムスタット(amstat))が挙げられる。抗血栓剤の非限定的な例としては、アナグレライド、アルガトロバン、シルスタゾール、ダルトロバン、ディフィプロタイド、エノキサパリン、フラキシパリン、インドプフェン、ラモパラン(lamoparan)、オザグレル、ピコタミド、プラフィブリド、ダルテパリン、チクロピジンおよびトリフルサルが挙げられる。

30

【0311】

e. 抗不整脈剤

抗不整脈剤の非限定的な例としては、クラスI抗不整脈(antiarrhythmic)剤(ナトリウムチャンネル遮断薬)、クラスII抗不整脈剤(アドレナリン遮断薬)、クラスIII抗不整脈剤(脱分極持続薬)、クラスIV抗不整脈剤(カルシウムチャンネル遮断薬)および種々の抗不整脈剤が挙げられる。

40

【0312】

i. ナトリウムチャンネル遮断薬

ナトリウムチャンネル遮断薬の非限定的な例としては、クラスIA、クラスIBおよびクラスIC抗不整脈剤が挙げられる。クラスIA抗不整脈剤の非限定的な例としては、ジソピラミド(ノルベース)、プロカインアミド(プロネスチル(pronestyl))およびキニジン(キニデックス(quinidex))が挙げられる。クラスIB抗不整脈剤の非限定的な例としては、リドカイン(キシロカイン)、トカイニド(トノカード(tonocard))およびメキシレチン(メキシチール)が挙げられる。クラスIC抗不整脈剤の非限定的な例としては、エンカイニド(エンカイド)およびフレカイニド(タンボコール)が挙げられる。

【0313】

50

ii. 遮断薬

別名 -アドレナリン遮断薬、 -アドレナリンアンタゴニストまたはクラスII抗不整脈剤として周知である 遮断薬の非限定的な例としては、アセプトロール(セクトラール)、アルプレノロール、アモスラロール、アロチノロール、アテノロール、ベフノロール、ベタキソロール、ベバントロール、ビソプロロール、ボピンドロール、ブクモロール、ブフェトロール、ブフラロール、ブニトロロール、ブプラノロール、塩酸ブチドリン、ブトフィロロール、カラゾロール、カルテオロール、カルベジロール、セリプロロール、セタモロール、クロラノロール、ジレバロール、エパノロール、エスモロール(プレビブロック)、インデノロール、ラベタロール、レボブノロール、メピンドロール、メチプラノロール、メトプロロール、モプロロール、ナドロール、ナドキシソロール、ニフェナロール、ニブラジロール、オクスプレノロール、ペンプトロール、ピンドロール、プラクトロール、プロネタロール、プロパノロール(インデラル)、ソタロール(ベータペース(betapace))、スルフィナロール、タリノロール、テルタトロール、チモロール、トリプロロールおよびキシベノロール(xibinolol)が挙げられる。ある種の局面では、 遮断薬はアリールオキシプロパノールアミン誘導体を含む。アリールオキシプロパノールアミン誘導体の非限定的な例としては、アセプトロール、アルプレノロール、アロチノロール、アテノロール、ベタキソロール、ベバントロール、ビソプロロール、ボピンドロール、ブニトロロール、ブトフィロロール、カラゾロール、カルテオロール、カルベジロール、セリプロロール、セタモロール、エパノロール、インデノロール、メピンドロール、メチプラノロール、メトプロロール、モプロロール、ナドロール、ニブラジロール、オクスプレノロール、ペンプトロール、ピンドロール、プロパノロール、タリノロール、テルタトロール、チモロールおよびトリプロロールが挙げられる。

10

20

【0314】

iii. 脱分極持続薬

クラスIII抗不整脈剤としても周知である、脱分極を持続させる薬剤の非限定的な例としては、アミオダロン(コルダロン)およびソタロール(ベータペース)が挙げられる。

【0315】

iv. カルシウムチャネル遮断薬/アンタゴニスト

別名クラスIV抗不整脈剤として周知であるカルシウムチャネル遮断薬の非限定的な例としては、アリールアルキルアミン(例えば、ベプリジル、ジルチアゼム、フェンジリン、ガロパミル、プレニルアミン、テロジリン、ベラパミル)、ジヒドロピリジン誘導体(フェロジピン、イスラジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニモジピン、ニソルジピン、ニトレンジピン)、ピペラジン誘導体(例えば、シンナリジン、フルナリジン、リドフラジン)またはベンシクラン、エタフェノン、マグネシウム、ミベフラジル、もしくはペルヘキシリンなどの種々のカルシウムチャネル遮断薬が挙げられる。ある種の態様では、カルシウムチャネル遮断薬は持続性ジヒドロピリジン(ニフェジピン型)カルシウムアンタゴニストを含む。

30

【0316】

v. 種々の抗不整脈剤

種々の抗不整脈剤の非限定的な例としては、アデノシン(アデノカード)、ジゴキシン(ラノキシン)、アセカイニド、アジマリン、アモプロキサシ、アプリンジン、トシル酸ブレチリウム、ブナフチン、プトベンジン、カポベン酸、シフェンリン、ジソピラニド、ヒドロキニジン、インデカイニド、臭化イプラトロピウム(ipatropium bromide)、リドカイン、ロラジミン(lorajmine)、ロルカイニド、メオベンチン、モリシジン、ピルメノール、プラジマリン、プロパフェノン、ピリノリン、キニジンポリガラクツロナーゼ、硫酸キニジンおよびピキジルが挙げられる。

40

【0317】

f. 血圧降下剤

血圧降下剤の非限定的な例としては、交感神経遮断薬、 / 遮断薬、 遮断薬、抗アンギオテンシンII剤、 遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、血管拡張剤および種々の降

50

圧剤が挙げられる。

【0318】

i. 遮断薬

アドレナリン遮断薬または β -アドレナリンアンタゴニストとしても周知である 遮断薬の非限定的な例としては、アモスラロール、アロチノロール、ダピブラゾール、ドキサゾシン、メシル酸エルゴロイド、フェンスピリド、インドラミン、ラベタロール、ニセルゴリン、プラゾシン、テラゾシン、トラゾリン、トリマゾシンおよびヨヒンビンが挙げられる。ある種の態様では、遮断薬はキナゾリン誘導体を含むことができる。キナゾリン誘導体の非限定的な例としては、アルフゾシン、プナゾシン、ドキサゾシン、プラゾシン、テラゾシンおよびトリマゾシンが挙げられる。

10

【0319】

ii. α / 遮断薬

ある種の態様では、血圧降下剤は α および β アドレナリンアンタゴニストの両方である。 α / 遮断薬の非限定的な例はラベタロール(ノルモダイン(normodyne)、トランデート)を含む。

【0320】

iii. 抗アンジオテンシンII剤

抗アンジオテンシンII剤の非限定的な例としては、アンジオテンシン変換酵素阻害剤およびアンジオテンシン(angiotension)II受容体アンタゴニストが挙げられる。アンジオテンシン変換酵素阻害剤(ACE阻害剤)の非限定的な例としては、アラセプリル、エナラプリル(パソテック)、カプトプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリラト、フォシノプリル、リシノプリル、モベルトプリル(moveltopril)、ペリンドプリル、キナプリルおよびラミプリルが挙げられる。アンジオテンシンII受容体アンタゴニスト、ANG受容体遮断薬または1型ANG-II受容体遮断薬(ARBS)としても周知であるアンジオテンシンII受容体遮断薬の非限定的な例としては、アンジオカンデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタンおよびバルサルタンが挙げられる。

20

【0321】

iv. 交感神経遮断薬

交感神経遮断薬の非限定的な例としては、中枢性交感神経遮断薬または末梢性交感神経遮断薬が挙げられる。中枢神経系(CNS)交感神経遮断薬としても周知である中枢性交感神経遮断薬の非限定的な例としては、クロニジン(カタプレス)、グアナベンズ(ウィテンシン)、グアンファシン(テネックス)およびメチルドパ(アルドメット)が挙げられる。末梢性交感神経遮断薬の非限定的な例としては、神経節遮断薬、アドレナリン作用性ニューロン遮断薬、 β -アドレナリン遮断剤または $1-\beta$ -アドレナリン遮断剤が挙げられる。神経節遮断薬の非限定的な例としては、メカミラミン(インベルシン)およびトリメタファン(アルフォナード)が挙げられる。アドレナリン作用性ニューロン遮断薬の非限定的な例としては、グアネチジン(イスメリン)およびレセルピン(セルパシル)が挙げられる。 β -アドレナリン遮断薬の非限定的な例としては、アセニトロール(acenitolo) (セクトラール)、アテノロール(テノルミン)、ベタキソロール(ケルロン)、カルテオロール(カルトロール(cartrol))、ラベタロール(ノルモダイン、トランデート)、メトプロロール(ロプレソール)、ナドロール(コルガード)、ペンブトロール(レバトール)、ピンドロール(ビスケン(visken))、プロプラノロール(インデラル)およびチモロール(プロカドレン)が挙げられる。 $1-\beta$ -アドレナリン遮断薬の非限定的な例としては、プラゾシン(ミニプレス)、ドキサゾシン(カルデュラ)およびテラゾシン(ハイトリン)が挙げられる。

30

40

【0322】

v. 血管拡張剤

ある種の態様では、心血管治療薬は血管拡張剤(例えば、脳血管拡張剤、冠血管拡張剤または末梢血管拡張剤)を含むことができる。ある種の好ましい態様では、血管拡張剤は冠血管拡張剤を含む。冠血管拡張剤の非限定的な例としては、アモトリフェン、ベンダゾール、ベンフロジルヘミスクシナート、ベンジオダロン、クロラシジン、クロモナール、

50

クロベンフロール、クロニトラート、ジラゼブ、ジピリダモール、ドロプレニラミン、エフロキサート、四硝酸(tetranitrate)エリスリチル、エタフェノン、フェンジリン、フロレジル、ガングレフェン、ヘキセストロールビス(-ジエチルアミノエチルエーテル)、ヘキソベンジン、トシル酸イトラミン、ケリン、リドフラジン、六硝酸(hexanitrate)マンニトール、メジバジン、ニトログリセリン、四硝酸ペンタエリスリトール、ペントリニトロール、ペルヘキシリン、ピメフィリン、トラピジル、トリクロミル、トリメタジジン、リン酸トロールニトレートおよびビスナジンが挙げられる。

【0323】

ある種の局面では、血管拡張剤は長期治療用血管拡張剤または高血圧性緊急症用血管拡張剤を含むことができる。長期治療用血管拡張剤の非限定的な例としては、ヒドララジン(アプレゾリン)およびミノキシジル(ロニテン)が挙げられる。高血圧性緊急症用血管拡張剤の非限定的な例としては、ニトロプルシッド(ニブリド)、ジアゾキシド(ハイパースタットIV (hyperstat IV))、ヒドララジン(アプレゾリン)、ミノキシジル(ロニテン)およびベラパミルが挙げられる。

10

【0324】

vi. 種々の降圧剤

種々の降圧剤の非限定的な例としては、アジマリン、-アミノ酪酸、ブフェニオド、シクレタニン、シクロシドミン、タンニン酸クリプテナミン、フェノールドパム、フロセキナン、ケタンセリン、メブタート、メカミラミン、メチルドパ、メチル4-ピリジルケトンチオセミカルバゾン、ムゾリミン、パルギリン、ペンピジン、ピナシジル、ピペロキサソ、プリマペロン、プロトベラトリン、ラウバシン、レシメトール、リルメニジン、サララシン、ニトロプルシッドナトリウム、チクリナフェン、カンシル酸トリメタファン、チロシナーゼおよびウラピジルが挙げられる。

20

【0325】

ある種の局面では、降圧剤はアリールエタノールアミン誘導体、ベンゾチアジアジン誘導体、N-カルボキシアルキル(ペプチド/ラクタム)誘導体、ジヒドロピリジン誘導体、ゲアニジン誘導体、ヒドラジン/フタラジン、イミダゾール誘導体、4級アンモニウム化合物、レセルピン誘導体またはスルホンアミド誘導体を含むことができる。

【0326】

アリールエタノールアミン誘導体

アリールエタノールアミン誘導体の非限定的な例としては、アモスラロール、ブフロロール、ジレパロール、ラベタロール、プロネタロール、ソタロールおよびスルフィナロールが挙げられる。

30

【0327】

ベンゾチアジアジン誘導体

ベンゾチアジアジン誘導体の非限定的な例としては、アルチジド、ベンドロフルメチアジド、ベンズチアジド、ベンジルヒドロクロロチアジド、プチアジド、クロロチアジド、クロルタリドン、シクロベンチアジド、シクロチアジド、ジアゾキシド、エピチアジド、エチアジド、フェンキゾン、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチクロチアジド、メチ克蘭、メトラゾン、パラフルチジド、ポリチアジド、テトラクロルメチアジドおよびトリクロルメチアジドが挙げられる。

40

【0328】

N-カルボキシアルキル(ペプチド/ラクタム)誘導体

N-カルボキシアルキル(ペプチド/ラクタム)誘導体の非限定的な例としては、アラセプリル、カプトプリル、シラザプリル、デラプリル、エナラプリル、エナラプリラト、フォシノプリル、リシノプリル、モベルチプリル(moveltipril)、ペリンドプリル、キナプリルおよびラミプリルが挙げられる。

【0329】

ジヒドロピリジン誘導体

ジヒドロピリジン誘導体の非限定的な例としては、アムロジピン、フェロジピン、イス

50

ラジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニルバジピン、ニソルジピンおよびニトレンジピンが挙げられる。

【0330】

グアニジン誘導体

グアニジン誘導体の非限定的な例としては、ベタニジン、デブリソキン、グアナベンズ、グアナクリン、グアナドレル、グアナソジン、グアナチジン、グアンファシン、グアノクロル、グアノキサベンズおよびグアノキサが挙げられる。

【0331】

ヒドラジン/フタラジン

ヒドラジン/フタラジンの非限定的な例としては、ブトララジン、カドララジン、ジヒドララジン、エンドララジン、ヒドラカルバジン、ヒドララジン、フェニプラジン、ピルドララジンおよびトドララジンが挙げられる。

10

【0332】

イミダゾール誘導体

イミダゾール誘導体の非限定的な例としては、クロニジン、ロフェキシジン、フェントラミン、チアメニジンおよびトロニジンが挙げられる。

【0333】

4級アンモニウム化合物

4級アンモニウム化合物の非限定的な例としては、臭化アザメトニウム、塩化クロリソングダミン、ヘキサメトニウム、ペンタシニウムビス(メチル硫酸)、臭化ペンタメトニウム、酒石酸ペントリニウム、塩化フェナクトロピニウム(phenactropinium chloride)およびトリメチジニウムメトサルファイトが挙げられる。

20

【0334】

レセルピン誘導体

レセルピン誘導体の非限定的な例としては、ピエタセルピン、デセルピジン、レシナミン、レセルピンおよびシロシンゴピンが挙げられる。

【0335】

スルホンアミド誘導体

スルホンアミド誘導体の非限定的な例としては、アンブシド、クロパミド、フロセミド、インダパミド、キネタゾン、トリパミドおよびキシパミドが挙げられる。

30

【0336】

vii. 昇圧剤

昇圧剤は一般に、手術の際に起こり得るショックの間に血圧を上昇させるために使用される。抗低血圧薬としても周知である昇圧剤の非限定的な例としては、メチル硫酸アメジニウム、アンギオテンシンアミド、ジメトフリン、ドーパミン、エチフェルミン、エチレフリン、ゲペフリン、メタラミノール、ミドドリン、ノルエピネフリン、フォレドリンおよびシネフリンが挙げられる。

【0337】

g. うっ血性心不全の治療薬

うっ血性心不全の治療薬の非限定的な例としては、抗アンギオテンシンII剤、後負荷-前負荷軽減処置、利尿薬および強心薬が挙げられる。

40

【0338】

i. 後負荷-前負荷軽減処置

ある種の態様では、アンギオテンシンアンタゴニストを許容できない動物患者は、併用療法で処置することができる。そのような療法はヒドララジン(アプレゾリン)および硝酸イソソルビド(イソルディル、ソルビトレート)の投与を組み合わせることができる。

【0339】

ii. 利尿薬

利尿薬の非限定的な例としては、チアジドまたはベンゾチアジジン誘導体(例えば、アルチアジド、ベンドロフルメチアジド(bendroflumethazide)、ベンズチアジド、ベンジ

50

ルヒドロクロロチアジド、ブチアジド、クロロチアジド、クロロチアジド、クロルタリドン、シクロペンチアジド、エピチアジド、エチアジド、エチアジド、フェンキゾン、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、メチクロロチアジド、メチ克蘭、メトラゾン、パラフルチジド、ポリチアジド、テトラクロロメチアジド、トリクロルメチアジド)、有機水銀化合物(例えば、クロルメロドリン、メラルリド、メルカムファミド(mercamphamide)、メルカプトメリンナトリウム、マーキュマリル酸(mercumallylic acid)、マーキュマチリン(mercumatilin)ナトリウム、塩化第1水銀、メルサリル)、プテリジン(例えば、フルテレン、トリアムテレン)、プリン(例えば、アセフィリン、7-モルホリノメチルテオフィリン、パモプロム(pamobrom)、プロテオプロミン、テオプロミン)、アルドステロンアンタゴニストを含むステロイド(例えば、カンレノン、オレアンドリン、スピロノラクトン)、スルホンアミド誘導体(例えば、アセタゾラミド、アンブシド、アゾセミド、ブメタニド、ブタゾラミド、クロルアミノフェナミド、クロフェナミド、クロパミド、クロレキソロン、ジフェニルメタン-4,4'-ジスルホンアミド、ジスルファミド、エトキシゾラミド、フロセミド、インダパミド、メフルシド、メタゾラミド、ピレタニド、キネタゾン、トラセミド、トリパミド、キシパミド)、ウラシル(例えば、アミノメトラジン、アミノメトラジン)、カリウム保持性アンタゴニスト(例えば、アミロリド、トリアムテレン)またはアミノジン、アルブチン、クロラザニル、エタクリン酸、エトゾリン、ヒドラカルバジン、イソソルピド、マンニトール、メトカルコン、ムゾリミン、ペルヘキシリン、チクリナフェン(ticnafen)および尿素などの種々の利尿薬が挙げられる。

10

【0340】

20

iii. 強心薬

強心剤としても周知である陽性変力薬の非限定的な例としては、アセフィリン、アセチルジギトキシン、2-アミノ-4-ピコリン、アムリノン、ベンフロジルヘミスクシナート、ブクラデシン、セルベロシン(cerberosine)、カンフォタミド、コンバラトキシン、シマリン、デノパミン、デスラノシド、ジギタリン、ジギタリス、ジギトキシン、ジゴキシン、ドブタミン、ドーパミン、ドベキサミン、エノキシモン、エリスロフレイン(erythrophleine)、フェナルコミン、ギタリン、ギトキシン、グリコシアミン、ヘプタミノール、ヒドラスチニン、イボパミン、ラナトシド、メタミバム(metamivam)、ミルリノン、ネリフォリン、オレアンドリン、ウアバイン、オキシフェドリン、プレナルテロール、プロシラリジン、レジブフォゲニン、シラレン、シラレニン、ストロファンチン、スルマゾール、テオプロミンおよびキサモテロールが挙げられる。

30

【0341】

特定の局面では、強心薬は強心配糖体、アドレナリンアゴニストまたはホスホジエステラーゼ阻害剤である。強心配糖体の非限定的な例としては、ジゴキシン(ラノキシン)およびジギトキシン(クリストディジン(crystodigin))が挙げられる。アドレナリンアゴニストの非限定的な例としては、アルブテロール、バンブテロール、ビトルテロール、カルブテロール、クレンブテロール、クロルプレナリン、デノパミン、ジオキセテドリン、ドブタミン(ドブトレックス)、ドーパミン(イントロピン(intropin))、ドベキサミン、エフェドリン、エタフェドリン、エチルノルエピネフリン、フェノテロール、フォルモテロール、ヘキサプレナリン、イボパミン、イソエタリン、イソプロテレノール、マブテロール、メタプロテレノール、メトキシフェナミン、オキシフェドリン、ピルブテロール、プロカテロール、プロトキロール、レプロテロール、リミテロール、リトドリン、ソテレノール、テルブタリン、トレトキノール、ツロブテロールおよびキサモテロールが挙げられる。ホスホジエステラーゼ阻害剤の非限定的な例としては、アムリノン(イノコール(inocor))が挙げられる。

40

【0342】

iv. 抗狭心症薬

抗狭心症薬は、有機硝酸薬、カルシウムチャンネル遮断薬、遮断薬およびその組合せを含むことができる。

【0343】

50

ニトロ血管拡張薬としても周知である有機硝酸薬の非限定的な例としては、ニトログリセリン(ニトロピッド、ニトロスタット)、硝酸イソソルビド(イソルディル、ソルビトレート)および硝酸アミル(アスピロール(aspirol)、バポロール(vaporole))が挙げられる。

【0344】

2. 外科的治療薬

ある種の局面では、第二の治療薬は、例えば、予防、診断または病期分類、治療および症状緩和を目的とした手術を含むある種の手術を含むことができる。手術、特に治療目的の手術を、本発明および一つまたは複数の他の薬剤などの他の療法と併せて用いることができる。

【0345】

血管および心血管の疾患および障害のためのそのような外科的治療薬は当技術分野において周知であり、以下に限定されないが、生物に対する手術の施行、機械的人工心血管の提供、血管形成術、冠動脈再灌流、カテーテルアブレーション、被験者への植え込み型除細動器の提供、機械的循環補助またはその組合せを含むことができる。本発明において使用できる機械的循環補助の非限定的な例には、大動脈内バルーンカウンスターパルセーション、左心室補助装置またはその組合せが含まれる。

【0346】

IV. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施に際して十分に機能することが本発明者によって見出された技術に相当し、したがってその実施に好ましい様式を構成するものと考えられうることは、当業者によって理解されるはずである。しかしながら、本開示に照らして、開示される具体的な態様において多くの変更が行われ、それでもなお本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることを当業者は理解するはずである。

【0347】

実施例1

トランスフェクト細胞

A. 方法

チャイニーズハムスター線維芽細胞(CHW細胞)に既報のとおり(Mason et al., 1999)ヒトArg389およびGly389 cDNAを安定的にトランスフェクトした。放射性リガンド結合によって測定される等価な発現レベルを有する細胞系を研究して、ノルエピネフリン刺激によるcAMPの蓄積に及ぼすブシンドロールのアンタゴニスト作用を確認した。単層の細胞を37℃にて20分間さまざまな濃度のブシンドロールの非存在下および存在下で10 μMノルエピネフリンによって処理し、³H]cAMPをカラムクロマトグラフィーにより単離した(Salomon, 1991)。

【0348】

B. 結果: トランスフェクト細胞でのブシンドロールに対する応答

機能的拮抗研究に対する受容体のCHW細胞中発現レベルは、それぞれ、Arg389およびGly389細胞系に対して123 ± 19 fmol/mgおよび137 ± 16 fmol/mgであった。細胞をさまざまな濃度のブシンドロールの非存在下または存在下で、10 μMのアゴニスト・ノルエピネフリンに曝露し、cAMPレベルを測定した。図3に示されるように、Arg389はGly389に比べ、ブシンドロールの非存在下でノルエピネフリンに対していっそう高いcAMP刺激を示しており、これはその二つの受容体の主な表現形に当たる(Mason et al., 1999)。Arg389受容体のノルエピネフリン媒介刺激の程度が実質的にいっそう高いにもかかわらず、ブシンドロールはその応答に効果的に拮抗した。ブシンドロールによって生じたcAMP産生の絶対的減少の相違は、1-Arg389を発現している細胞でいっそう大きかった。ブシンドロールはGly389細胞での115 ± 23 fmol/ml cAMPに比べ、Arg389細胞で435 ± 80 fmol/ml cAMPの最大減少を引き起こした(P<0.008, N=4)。ブシンドロールの効力は応答に対して異なることが認められなかった(それぞれED50= 46 ± 4.5および35 ± 11 nM, P=0.94, N=4)。さらなる実験において、ブシンドロール単独では10 μMまでの濃度で、どちらかの受容体変異体を発現し

10

20

30

40

50

ている細胞においてcAMPの刺激が引き起こされなかった(データは示されていない)。これらの結果によりしたがって、Arg389受容体は心不全処置においてブシンドロールに対しいっそう高い臨床応答を供与できることが示唆された。

【0349】

実施例2

トランスジェニックマウスでの 遮断に対する応答

-ミオシン重鎖プロモーターを用い、ヒト 1AR (Arg389またはGly389型)の心室標的発現を有するトランスジェニックマウスを使用して、 遮断薬プロプラノロールの長期投与に対する対立遺伝子特異的な応答を確認した。その二つの受容体の発現レベルは同等であった。これらのマウスの作出およびその部分的な特徴が最近になって、他の文献(Perez et al., 2003)に詳細に報告されている。現行の研究では、3月齢の両遺伝子型マウス、および非トランスジェニックマウスをその飲用水に入ったプロプラノロール(0.5 mg/ml)、またはプロプラノロールなしの水(対照)で6ヶ月間継続的に処置した。次いで心臓を取り出し、心室タンパク質抽出物を調製した。既報(Perez et al., 2003)の方法を使用し、これらをウエスタンブロッティングに供して以下のタンパク質の発現を確認した: G_s、G_{i2}、Gタンパク質共役受容体キナーゼ-2 (GRK2)、5型アデニルシクラーゼ(AC5)、総ホスホランパン(T-PLN)、リン酸化ホスホランパン(P-PLN)および筋小胞体カルシウムATPase-2A (SERCA)。未処置およびプロプラノロール処置マウスのタンパク質の発現を比較することで、処置効果をANOVAにより、遺伝子型の範囲内で評価した。この研究はシンシナティ大学、動物の使用と世話に関する委員会によって承認された。

【0350】

最近になって報告されているように(Perez et al., 2003)、心臓に対する 1-Gly389または 1-Arg389の標的発現を有するトランスジェニックマウスは、ある種の心臓性シグナル伝達タンパク質およびCa⁺⁺輸送タンパク質の発現の、長期にわたる(早ければ6ヶ月齢で観察される)複数の変化を示す。長期 遮断に対する遺伝子特異的な応答の可能性を評価するため、各 1AR遺伝子型を発現する3ヶ月齢マウスをプラセボまたは 遮断薬プロプラノロールで6ヶ月間処置し、心室を取り出し、タンパク質抽出物を調製した。ウエスタンブロットを使用して、記載のタンパク質の発現を定量化し、 1AR遺伝子型の群内での、処置による発現の変化を比較した。図4に示されるように、プロプラノロール処置は、Gly389マウス由来の心臓では記載のタンパク質の発現に効果がなかった(P=0.67)。対照的に、全体的な処置応答(発現の増加または減少のいずれか)がArg389マウス由来の心臓ではプロプラノロール処置で観察された(P<0.002)。G_s、P-PLNおよびT-PLNの増加、ならびにG_iおよびGRK2の減少を含め、 遮断により誘発されたこれらの傾向の方向は、全て肥大心/心不全を起こした心臓との関連で回復性の生化学的応答と考えられる(Liggett, 2001)。ひいては、総合すれば、このトランスジェニックマウスモデルでの長期 遮断と関連するタンパク質発現プロファイルから、 遮断薬ブシンドロールに対するいっそう好ましい応答は 1-Gly389遺伝子型を有する心不全患者に比べて 1-Arg389の心不全患者で期待できることが示唆される。

【0351】

実施例3

ブシンドロール 対 プラセボ臨床試験

A. 材料と方法

1. 患者集団

遮断薬生存率試験評価(BEST) (Lowes et al., 2002)に参加し、DNA補助研究に同意した患者は、コード 1AR多型部位で遺伝子型を特定された。BESTへの登録は1995年5月31日から1998年12月31日までであった。この研究デザインは他(BEST Trial Investigators, 2001; およびLowes et al., 2002)に詳述されている。手短かに言えば、この研究はクラスII/IV心不全を有する患者2708人における第3世代の非選択的 遮断薬-血管拡張剤ブシンドロール(Bristow, 2000)の無作為化による多施設プラセボ対照臨床試験であった(BEST Trial Investigators, 2001)。活性薬物の服用者には最初の1週間、1日2回ブシンドロール3

mgを投与し、1日2回50 mg (または体重が75 kgを超える患者の場合1日2回100 mg)まで週1回の頻度で許容に応じて徐々に増量を行った。患者2708人のうち、1040人は補助研究に同意し、血液サンプルから十分なDNAが調製された。この研究はBEST DNA監督委員会およびシンシナティー大学施設内倫理委員会によって承認された。

【0352】

2. 遺伝子型の特定

標準的な技術(Jones, 1963)を用いて白血球からDNAを抽出した。遺伝子型の特定はこれまでに詳述されている方法(Small et al., 2002)を正確に用いて行われた。1ARの場合、アミノ酸49位および389位に対応する、コードヌクレオチド145位および1165位で変異が示された。これらの対立遺伝子を 1-Ser49、1-Gly49および 1-Arg389、1-Gly389と表す。DNAサンプルは全て 1AR-389遺伝子座で遺伝子型を特定することに成功し、1030サンプルは 1AR-49で遺伝子型を特定するのに成功した。

10

【0353】

3. 統計解析

プライマリーエンドポイントは、原因を問わない死亡率、エンドポイント委員会(BEST Trial Investigators, 2001)が心不全に起因するものであると判断した入院、および死亡または心不全による入院の複合エンドポイントであった。1ARのアミノ酸389位での変異体(ArgおよびGly)は、遮断薬の効用に影響を及ぼすと仮定される主要な遺伝子型と考えられた。連続臨床変数は平均±SDとして報告されており、比較はt-検定またはWilcoxonの順位和検定によった。カテゴリ変数は比例として報告されており、比較は二乗検定またはフィッシャーの正確検定によった。累積生存率曲線はKaplan-Meier法(Kaplan et al., 1958); およびSAS (r)専売権付きソフトウェア、リリース6.12. Cary, NC: SAS Institute, 1996)によって作図された。Cox 比例危険回帰モデルを用いて、表示の遺伝子型によって層別化された処置の効果を調べた。結果を年齢、性別、人種、および、表示のように、1-Gly49多型に応じて適応した。限定された比較数、ならびに細胞、トランスジェニック、およびその他ヒトでの研究(Kaplan et al., 1958); およびSAS (r)専売権付きソフトウェア、リリース6.12. Cary, NC: SAS Institute, 1996; Perez et al., 2003); およびWagoner et al., 2002)に基づいた事前仮説のため、P値<0.05は多重比較の適合なしに、有意と見なされた。

20

【0354】

30

B. 結果

トランスフェクト細胞およびトランスジェニックマウスの結果によって、プラセボ治療群を含んだクラスIII-IV心不全の処置における遮断薬ブシンドロールの試験BEST (BEST Trial Investigators, 2001)由来の患者の遺伝子型の特定が促進された。大部分の人口学的特徴およびベースライン時の臨床的特徴は、DNA補助研究に参加しなかった者に比べて参加した者の間で統計学的に相違がなかった。特に注目すべきは、年齢、性別、NYHAクラスおよび心不全の病因が違っていなかった。DNA補助研究参加者 対 非参加者との間のわずかなおよび臨床的に重要でない相違は、ベースライン時の心拍数(-1.3 bpm)、最大血圧(+1.7 mmHg)、体重(+1.9 kg)、LVEF (+0.9%)および非白人の割合(-5%)で顕著であった。全体的なArg389対立遺伝子頻度は67%となり、これは一般集団(Mason et al., 1999)においておよび心不全コホート(Smal et al., 2002)において報告されている、この多型の対立遺伝子頻度に類似している。

40

【0355】

主仮説の遺伝子型(1AR-389)と処置によって分類された患者の特徴を表2に示す。プラセボ、ブシンドロール処置、または遺伝子型によって層別化されたグループ間の年齢、性別、人種、心不全の病因、NYHAクラス、またはベースライン時のLVEFの相違は認められなかった。見てわかるように、ホモ接合性Gly389の個体数は比較的少なかった(プラセボ52名、ブシンドロール42名)。それゆえ、Argホモ接合体をGly保有者(一方または両方のいずれかのGly対立遺伝子を有する者)と比べた。その結果、処置と遺伝子型によって分類された4つのコホートは、それぞれが200を超える被験者からなった(表2)。

50

【 0 3 5 6 】
(表 2)

	プラセボ対照群 N=525				ブシンドロール群 N=515			
	Arg ホモ接合性 N=236	Arg/Gly ヘテロ接合性 N=237	Gly ホモ接合性 N=52	Gly 保有者 N=289	Arg ホモ接合性 N=257	Arg/Gly ヘテロ接合性 N=216	Gly ホモ接合性 N=42	Gly 保有者 N=258
年齢-平均(標準偏差)	60.5 (11.8)	60.3 (12.4)	59.6 (13.2)	60.2 (12.5)	59.8 (11.8)	61.6 (12.0)	56.6 (14.2)	60.8 (12.5)
性別-N (%)								
男性	187 (79%)	183 (77%)	42 (81%)	225 (78%)	206 (80%)	173 (80%)	34 (81%)	207 (80%)
女性	49 (21%)	54 (23%)	10 (19%)	64 (22%)	51 (20%)	43 (20%)	8 (19%)	51 (20%)
人種-N (%)								
非黒人	212 (90%)	182 (77%)	33 (63%)	215 (74%)	215 (84%)	165 (76%)	26 (62%)	191 (74%)
黒人	24 (10%)	55 (23%)	19 (37%)	74 (26%)	42 (16%)	51 (24%)	16 (38%)	67 (26%)
病因-N (%)								
虚血性	145 (61%)	137 (58%)	34 (65%)	171 (59%)	138 (54%)	129 (60%)	23 (55%)	152 (59%)
非虚血性	91 (39%)	100 (42%)	18 (35%)	118 (41%)	119 (46%)	87 (40%)	19 (45%)	106 (41%)
NYHA 機能 クラス-N (%)								
III	223 (94%)	217 (92%)	48 (92%)	265 (92%)	242 (94%)	194 (90%)	36 (86%)	230 (89%)
IV	13 (6%)	20 (8%)	4 (8%)	24 (8%)	15 (6%)	22 (10%)	6 (14%)	28 (11%)
LVEF (%) -平均(標準偏差)	23.3 (7.0)	24.2 (7.1)	23.6 (6.8)	24.1 (7.0)	23.4 (7.2)	23.7 (7.1)	22.6 (6.9)	23.5 (7.1)

処置と遺伝子型によって階層化されたBESTにおける患者のベースライン時の特徴。データは平均±SDである。

【 0 3 5 7 】

1AR-389遺伝子型によって層別化されたプラセボおよびブシンドロール処置患者の生存を図5および6に示す。年齢、性別、および人種に応じて適応された個体比較により、ブシンドロール処置されたホモ接合性Arg389患者はプラセボ処置されたArg389患者に比べて

10

20

30

40

50

生存が増大したことが明らかになった(危険率=0.62、95% CI=0.40~0.96、P=0.03)。このように、Arg389患者でのブシンドロールによる生存の改善は、プラセボに比べて38%に達した。Gly保有者でのこの同じ比較によって、ブシンドロールに対する処置応答がないことを示す、生存曲線に違いのないことが明らかになった(危険率=0.90、95% CI=0.62~1.30、P=0.57)。ブシンドロールに対する心不全入院応答に及ぼす 1AR遺伝子型の明白な影響も認められた(図5)。ホモ接合性Arg389患者でのブシンドロール処置による入院の減少が、同じ遺伝子型を有するプラセボ患者と比べて観察された(危険率=0.64、95% CI=0.46~0.88、P=0.006)。Gly389保有者では入院という観点でプラセボに比して薬物の効果が示されなかった(危険率=0.86、95% CI=0.64~1.15、P=0.298)。心不全による入院または死亡の複合転帰の場合、ブシンドロールに関連した好ましい処置効果(図5および7)は、プラセボに比べArg389患者で明らかであった(危険率=0.66、95% CI=0.50~0.88、P=0.004)が、ブシンドロールで処置されたGly389保有者 対 プラセボでは明白でなかった(危険率=0.87、95% CI=0.67~1.11、P=0.250)。49位の変異体(1-Ser49、 1-Gly49)の適応では、上記の結果のいずれに対しても有意な効果がなかった。このような適応(年齢、性別および人種を含む)を用いると、 1-Arg389ホモ接合体の生存に対する危険率は0.62、95% CI=0.40~0.97、P=0.035となった。 1-Gly389保有者の場合、明白な処置効果は残らなかった(危険率=0.89、95% CI=0.61~1.30、P=0.56)。同様に、49位の適応では入院に対する危険率に及ぼす目に見える効果がなかった；Arg389ホモ接合体の場合、危険率=0.63、95% CI=0.45~0.86、P=0.007；Gly389保有者の場合、危険率=0.85、95% CI=0.63~1.14、P=0.54。 1-389遺伝子型によって層別化された死亡および入院の複合転帰の結果は同様に、1-49遺伝子型によって変わらなかった。

【0358】

実施例4

若干のBEST試験対象患者における交感神経遮断に関わる死亡リスク

BEST試験の中核的なプロトコルとしての全身静脈のノルエピネフリン測定は、死亡リスクのベースラインでの最も強力な予測因子となっており、Lnノルエピネフリンは、一変数分析ならびに多変数分析により得られる死亡リスクが、それぞれ1.8倍さらには1.6倍増大することと関連している。驚くべきことに、上に示したとおり、ノルエピネフリン量の3ヶ月間での変化は、処置群ごとに異なる死亡率の変化との間に、複雑な関係を保っている。ブシンドロール処置群において、非常に多くの数の患者(対象処置群の患者数の18%)がノルエピネフリン量の減少を示し、このことはその後の死亡率を1.7倍に高める結果につながっているが、プラセボ処置群においてはこのような現象は見られなかった。

【0359】

全てではないが大部分の研究によって、アドレナリン作用性の活性が慢性心不全(CHF)の予後における主要な決定要因であること(Cohn et al., 1984; Kaye et al., 1995; Isnard et al., 2000; Rockman et al., 1989)が示されている。さらに、心臓のアドレナリン作用性の活性は、左心室機能不全との関係で増大する最初の神経ホルモンマーカーである(Runquist et al., 1997)。これらの所見が、心不全に対して 遮断薬による治療を選択する根拠の基礎をなしている(Bristow, 2000)。

【0360】

他方、アドレナリン作用性の機能向上は、心不全を起こした心臓の重要な代償機序であり、これは安静時の心筋機能を比較的正常な状態に維持するのに役立っている(Port et al., 2001)。慢性心不全との関連でアドレナリン作用性の駆動が急速に減少した場合に、心筋機能が悪化(Gaffney et al., 1963)し、ここでアドレナリン作用性の駆動を著しく減少させる治療法を用いた場合には、死亡例を含め深刻な副作用が発生する件数を増大させることもある(Cohn et al., 2003; Swedberg et al., 2002)。これらの所見に基づいて、「交感神経遮断作用を有する」薬剤によってアドレナリン作用性の活性を減少させようとする、遮断薬により阻害する場合とは非常に異なった形で、心不全の自然な進展に影響を与える。

【0361】

ベースライン時のアドレナリン作用性の活性は、慢性心不全の予後の研究や臨床試験において検討されている(Benedict et al., 1996; Swedberg et al., 1996; Francis et al., 1993; Anand et al., 2003)が、最近までこれらの研究では、比較的少数の患者(通常数百名)しか試験対象とはならなかった(Anand et al., 2003)。さらに、自然な進展の決定要因である可能性のあるノルエピネフリンの時間軸で見た挙動は、これまで上記以外の2件の試験でしか検討されておらず、慢性心不全の大規模なコホート試験、すなわち、強力な抗アドレナリン作用薬を用いたプラセボ対照試験では検討された実績が全くない。それゆえ、BEST試験対照患者の臨床での予後に対するアドレナリン作用性の活性のベースライン値とその変化の影響、さらに、プシンドロールという、臨床での予後に対して交感神経遮断特性を有する遮断薬との相関関係が検討される。

10

【0362】

A. 方法

1. 臨床プロトコル

BEST試験のプロトコルとその主要な結果については、以前に報告されている(Mason et al., 1999; Small et al., 2002)。初期段階で手順の作成に遅れが生じたため、無作為抽出した患者におけるノルエピネフリンに関する血液サンプルの採集は、試験開始から6ヵ月後に行われた。結果として、BEST無作為抽出した患者2708名中2126名について、最低ベースラインのノルエピネフリン量を有しているサンプルが採取され測定された。

【0363】

2. ノルエピネフリンのサンプル採取と測定

末梢の静脈血でのノルエピネフリンのサンプルを、ベースライン時、3ヶ月および12ヶ月経過時に、腕静脈に21ゲージ翼状針を挿入し、患者を騒音のない室内で30分間仰臥位にした状態で採取した。最初に採取された3 mlの血液は廃棄され、続いて5 mlの血液が採取され、直にEDTA含有5 ml試験管に移しかえられた。30分以内に血しょうが分離され、-70℃で冷却された。試験現場から発送されたサンプルは、3ヶ月毎にドライアイスに載せて中央研究所(LabCorp、ラリタン(Raritan)社、ニュージャージー州)へと運び込まれ、中央研究所ではサンプルは-85℃で保存され、3週間アッセイされた。ノルエピネフリンは、Bio-Rad社(Bio-Rad社研究所、ハーキュレス(Hercules)社、カリフォルニア州)の高速液体クロマトグラフィー法を用いた高速液体クロマトグラフィー法による電気化学的検出によって測定された。品質管理では、最初の数値が200 pg/mlより小さいあるいは2000 pg/mlより大きい全てのサンプルを2回目の試験管から再測定することも含まれている。さらに、日常的に(20サンプルごとに)、既知の数値が測定された。

20

【0364】

3. 統計的手法

連続するデータに対しては平均と標準偏差(SD)が、カテゴリデータに対しては比率または百分率が提示される。連続データに対してはT検定またはWilcoxon順位和検定が用いられ、分野別データに対しては χ^2 検定またはFisher直接確率検定が用いられた。統計的有意性を示すには α レベルとして.05(両側検定、未調整)を用いた。

【0365】

ベースライン時のノルエピネフリン量もしくは3ヶ月時の変化は、生存と、死亡および慢性心不全による入院という複合エンドポイントを予測するのに使われた。最初は絶対値もしくは対数変換されたデータが解析に使われた。ノルエピネフリンレベルにゆがみが生じたため、自然対数(Ln)変換データが、多変量のCox比例危険回帰モデルに用いられた。

40

【0366】

最大尤度基準の方法(Kalbfleisch et al., 1980)が、死亡、さらには死亡および慢性心不全による入院の複合エンドポイントの予測を目的として、ノルエピネフリンの変化を3つのグループに分類するために用いられた。この分類方法によって、結果として作られるCox比例危険モデルを最尤化するノルエピネフリン値の最適分割が検出される。さらに、柔軟な三次スプライン分析(Green et al., 1994)が、3ヶ月時の、生存とノルエピネフリン量の変化との関係の形状と有意性を決定するために使われた。

50

【 0 3 6 7 】

B. 結果

1. 試験群

少なくともベースライン時にノルエピネフリン量を引用した被験者においては、階層別データおよび人口記述用データは試験群全体とは相違していなかった(BEST Trial Investigators, 2001)。

【 0 3 6 8 】

2. ノルエピネフリンのデータ

ベースライン時のノルエピネフリン量の平均値は、プラセボ処置群では 501 ± 316 pg/ml (n=1061)、ブシンドロール処置群では 529 ± 370 pg/ml (n=1065、 $p=.061$ 対 プラセボ)。3ヶ月時($p=.0085$)および12ヶ月($p=.0002$)時の対応のあるt検定によると、プラセボ処置群ではノルエピネフリンに統計的に有意な増加を示したが、ブシンドロール処置群では3ヶ月時で有意に減少し($p=.0001$)、12ヶ月時には減少傾向($p=.067$)を示した(図8)。ノルエピネフリンのグループ間の変化は3ヶ月時($p < .0001$)および12ヶ月時($p < .0001$)において、統計的に高度の有意差を示した。プラセボ処置群における変化に比較して、ブシンドロール処置群におけるノルエピネフリン量の減少は、それぞれ、3ヶ月時で19%、12ヶ月時で13%であった。

【 0 3 6 9 】

3. 死亡または死亡および慢性心不全による入院の複合エンドポイントの予測因子としてのベースライン時のノルエピネフリン

図9では、危険率(HR)1.0を指定した第1四分位数と他の四分位数の比較によって、ベースライン時のノルエピネフリンの全死亡率リスクの危険率をグラフ上に示したものである。コホート全体とそれぞれの治療グループに対しては、四分位数増加に伴う死亡率リスクの漸増が見られる。同様の結果は死亡および慢性心不全による入院の複合エンドポイントについても得られている。

【 0 3 7 0 】

表3ではベースライン時のノルエピネフリン量の一変量・多変量分析、さらに他のプロトコルで事前に指定した死亡率の修正因子となる可能性のある要素が示されている。ノルエピネフリンの自然対数をとると一変量HR (95%信頼区間の限界)は1.82 (1.58-2.09)、 $p < .001$ となった。多変量解析では、ノルエピネフリン量の自然対数は死亡率の最も有力な予測因子である。

【 0 3 7 1 】

4. 死亡または死亡および慢性心不全による入院の複合エンドポイントの予測因子としてのノルエピネフリン量の変化

3ヶ月時のノルエピネフリンの四分位数変化に続いて起こる死亡ないしは死亡および慢性心不全による入院という複合エンドポイントとの関係を表4に示し、HRは第1四分位数変化との比較で計算されている。四分位数分析はノルエピネフリン変化と四分位数の比率を、コホート全体から由来する切点により、プラセボとブシンドロール処置群で同等に保つように実行される。これでノルエピネフリン減少の二つの四分位数(第1および第2)およびノルエピネフリン増加の二つ(第3および第4)が得られることになる。ベースライン値からの絶対量としてのノルエピネフリンの変化(単位pg/ml)およびパーセンテージの変化は表4に示す。ブシンドロールに交感神経遮断効果があるという理由で、第1四分位数にはブシンドロール処置を受けた患者が増加し、第4四分位数ではプラセボ処置群の患者が増加した。

【 0 3 7 2 】

表4で見られるように、ノルエピネフリンの絶対量の変化と死亡率を比較するために、プラセボ処置群は第4・第1四分位数における増加リスクの傾向を示し、危険率は1.38 ($p=.099$)で、第1四分位数と比較した2番目または第3四分位数の死亡率に変化傾向はなかった。死亡および慢性心不全による入院に対し、プラセボ処置群で第4四分位数:第1四分位数は1.46 ($p=.011$)という有意な危険率を有していた。対照的に、ブシンドロール処置群

10

20

30

40

50

は、いずれの臨床上の予後に対しても第4四分位数:第1四分位数におけるリスク増加に何の傾向も示さなかったが、第1四分位数(HR 0.66, $p=.046$)に比較した第3四分位数の死亡リスク減少および死亡および慢性心不全による入院に対し第3四分位数:第1四分位数にリスク減少傾向($p=.22$)を示した。

【0373】

ノルエピネフリンのパーセンテージ変化に対し、プラセボ第3四分位数:第1四分位数および第4四分位数:第1四分位数におけるリスクの増加もしくは増加傾向が、死亡さらには死亡および慢性心不全による入院のいずれに対してもあった。対照的に、ブシンドロール処置群では、いずれの臨床エンドポイントに対しても、第1に比較して第3または第4四分位数でのそのような危険率の増加傾向はなかった。またノルエピネフリンの絶対量変化と同様に第3四分位数:第1四分位数($p=.021$)に危険率の減少(.77)傾向があった。

10

【0374】

表4はまた、ブシンドロールとプラセボの比として表される処置群により、各ノルエピネフリン四分位数を絶対量またはパーセンテージの変化について危険率を示している。死亡率については、ブシンドロールとプラセボの危険率の比は絶対量(HR=0.63)またはパーセンテージ(HR=0.56)のいずれにおいても第3四分位数において、1より有意に小さい値(プラセボに比較してブシンドロールによる死亡率低下)をとった。死亡および慢性心不全による入院について、第4四分位数の危険率がまた有意に減少したことを除いて同様のパターンが観察されている。死亡率とは対照的に、死亡および慢性心不全による入院に対し、第2の四分位数では、絶対量の変化についてブシンドロールとプラセボの危険率の比はほぼ有意な増加($p=.021$)が生じ、パーセンテージ変化についても有意な($p=.067$)増加(HR=1.39)が生じた。

20

【0375】

ノルエピネフリン変化に伴う治療上の微分的死亡率をさらに検討するために、尤度基準の解析(Bristow, 1984)をおこなった。図11に示されるように、各処置グループ内の個別の尤度解析により、3ヶ月時にノルエピネフリン減少にそれぞれ高い死亡のリスク(HR 3.31, $p=.004$; HR 1.69, $p=.002$)に晒された被験者を、プラセボ処置群で11名、ブシンドロール処置群で153名を特定した。これらのリスク群でのノルエピネフリンの低下はプラセボ処置群で 783 pg/ml、ブシンドロール処置群で 244.5 pg/mlであった。図11はまた、3ヶ月時のノルエピネフリン増加を呈した下位集団はいずれの処置群でも、死亡率が高いものと特定されることを示している。

30

【0376】

尤度基準法は、死亡率増加を予測するノルエピネフリン変化の切点を最大限最適化するもので、柔軟性を有した三次スプライン適合法を使って識別力の低い適合法を採用した(Flowler and Bristow, 1985)。本法における最良適合性は節5、自由度3のあるU型をした非線形曲線であり、ブシンドロール処置群とプラセボ処置群およびコホート全体それぞれに対して、2乗値が13.2 ($p=.0042$)、11.1 ($p=.011$)および32.5 ($p<.0001$)であった。

【0377】

5. 死亡リスク増加に伴うノルエピネフリンの増加ないしは減少のあった被験者の特徴

尤度基準分析によってノルエピネフリン変化スペクトルの両端で特定された死亡リスクの高い下位集団の特徴を、対照としての役割を持つ中間変化の集団とそれぞれ比較して表5に示している。ノルエピネフリン減少に伴うより高い死亡リスクで特定されるブシンドロール下位集団内の153名の被験者は、ベースライン時で高いノルエピネフリン量を有し、3ヶ月時にノルエピネフリン量は529 pg/mlの平均的減少を示した。これら被験者はまた、ノルエピネフリン変化がごくわずかであるか全くない(-44 pg/ml)中間変化の対照群に比べて、LVEFおよびRVEFが低下しており、高い心拍数を示した。著しいノルエピネフリン量の減少を示したブシンドロール処置群の153名の被験者はさらに、クラスIVの被験者割合が高く、中間変化集団に比較して、非黒人被験者に対する黒人の割合が高くなる傾向($p=.088$)を有していた。これら153名の被験者に起きた52例の死亡のうち、79%は心臓病患者に、63%は心臓病患者の突然死に、27%は心不全に、かつ2%は心筋梗塞がそれぞれ原因であ

40

50

るとされた。対照的に、ノルエピネフリン増加に伴い死亡リスクが比較的高いブシンドロール処置を受けた下位集団(n=137)は、ベースライン時にはRVEF値が低目でLVEF値も同様に低かったが、中間変化グループと比べて3ヶ月時にLVEF増加は著しく劣っていた。この下位集団において、クラスIVの割合と非黒人/黒人の分布は中間変化グループと違いがなかった。この下位集団の43例の死亡の内、35例は心臓血管上のものであったが、突然死は少数であった(51%が心不全、6%が心筋梗塞によるのに対して34%)。

【0378】

C. 考察

BEST試験のベースライン時のノルエピネフリン量のデータは、以前にアドレナリン作用性の活性レベルと予後に臨床上有害な事象が発生することとの間に陽性の関係があると報告されている内容を確認しかつ発展させるものである。ベースライン時のノルエピネフリンに関するデータは、このパラメータが慢性心不全患者集団において特定されたと同じくらい強力な臨床結果の予測因子であることを示している。驚くべきことに、BESTにおいて、死亡ないしは死亡および慢性心不全による入院の危険率はブシンドロールおよびプラセボ処置群の両方のノルエピネフリン四分位数の増加に伴って漸増するので、ベースライン時のノルエピネフリン量が比較的高いことから生ずるリスク増加は抗アドレナリン治療によってそれほど低下しない。ベースライン時のノルエピネフリン四分位数が高い値をとった場合にブシンドロールによる防御的効果の上に見たように機能しなくなる可能性の一つとしては、最も病状の進行した慢性心不全および心筋機能障害が最大限に進行した被験者に発生する交感神経遮断作用である。

【0379】

一方、ブシンドロールは3ヶ月時にアドレナリン作用性の活性の増加を示す患者の四分位数における臨床的防御効果を与えた。臨床エンドポイントにおけるこういった低下は、ノルエピネフリンが低下を見た四分位数には観察されなかった。事実、死亡および慢性心不全による入院について、ノルエピネフリンが低下を見た第2四分位数では、ブシンドロールを投与した患者におけるリスク増加の証拠は示さなかった。さらに、3ヶ月時のノルエピネフリンの変化の四分位数が第1四分位数(最も減少の度合いが大きいもの)を基準としている場合、第3四分位数と第1四分位数との比の値が、第1四分位数におけるブシンドロール処置群の死亡率の増加についての証拠を示すが、これは、プラセボ処置群の死亡率の増加は示すものではない。3ヶ月時にノルエピネフリンの低下を示した患者におけるブシンドロールの副作用を示唆していることから、この唯一の遮断薬の交感神経遮断作用を追加的に分析する必要性が高まっている。

【0380】

プラセボに比較して、ブシンドロールは3ヶ月でノルエピネフリンを19%減少した。このことはMOXCON試験(Cohn et al., 2003)における中心的交感神経遮断剤による3ヶ月のノルエピネフリンの相対的減少が24%であるのと比較される。MOXCONにおいて、ブシンドロールの交感神経遮断効果は、臨床上有害な予後、特に突然死のリスクが高まっていることと関連しているように見える。上で検討されたノルエピネフリン減少の四分位数内の証拠に加えて、尤度基準分析によって、ブシンドロール処置群の18%が著しいノルエピネフリン減少(>224pg/mlだけ)を伴いさらに死亡リスクが1.65倍増加を示していることが確認された。一方、プラセボ処置患者では、著しいノルエピネフリン減少があっても死亡率リスク増加に晒されている者は1%に過ぎないことが確認された。本分析によって、さらにノルエピネフリンの増加を見た患者の死亡率のリスク増加が明らかになった。しかし、ブシンドロール処置を受けた患者でもおよびプラセボ処置群の患者でも同様の数であった。3ヶ月時のノルエピネフリン変化スペクトルの両端の死亡率リスクが増加していることは柔軟性を有した三次スプライン適合で確認され、この適合によってブシンドロールおよびプラセボ処置の両患者に対する統計的に有意なU型曲線が作成された。

【0381】

死亡率のリスク増加にある尤度解析により特定されたノルエピネフリン減少に関するブシンドロール処置被験者の下位集団には、比較的進行した(クラスIV対III)心不全の患者

、ベースライン時のノルエピネフリン量が比較的高い患者、左心室および右心室の機能がより強力に抑えられた患者が含まれており、非黒人に比較して大きな比率の黒人患者を参加させる傾向がある。こうして、ブシンドロールの交感神経遮断作用は、重度の心筋機能障害を持った被験者であり、心機能支援のためにアドレナリン作用性の活性に依存している可能性の高い者から成る下位集団にとっては、予後に有害事象が発生する可能性が高いが、そのような機序は本発明者らのデータでは証明されておらず、他の説明が可能である。

【0382】

以前に公開された唯一の系統的なアドレナリン作用性の活性の変化と結果の関係についての臨床データはCONSENSUS (Swedberg et al., 1990)のもので、神経ホルモンの6週間時の変化は239名の被験者においては予後に無関係で、Val-HeFT (Anand et al., 2003)では4301人の患者においては、4ヶ月時にノルエピネフリンの絶対量に変化は起こらなかったが、パーセンテージの変化によって、プラセボおよびバルサルタン処置群において、その後の死亡率の変化を予測できた。しかし、Val-HeFTと違って陽性の関係が、ノルエピネフリンの絶対量の増加と死亡率または死亡および慢性心不全による入院リスクの増加の間に見出された。本試験の主要な新しい発見はアドレナリン作用性の活性の減少と増加の両方が慢性心不全集団の臨床的に有害な予後に関係がある可能性があることである。これらリスクに対するブシンドロールの緩和効果は、ノルエピネフリン量の増加という副作用は抗アドレナリン剤投与の併用により、治療開始に先立って測定されたベースライン時のノルエピネフリン量によって与えられたリスクに反して抑制されることを示している。

【0383】

まとめると、BEST試験で測定された末梢静脈のノルエピネフリン量から推定されるように、全身のアドレナリン作用性の活性の包括的調査により進行した慢性心不全において1) ベースライン時のノルエピネフリンが臨床上的有害な予後の予測因子であるが治療応答を予測するものではないこと、2) 3ヶ月時のノルエピネフリンの増加と減少が共に、有害な予後を予測するものであること、3) ブシンドロールはノルエピネフリンの増加リスクを緩和するが、その交感神経遮断特性によりある種の患者をノルエピネフリン低下から来る臨床的リスクに晒す事が示された。

【0384】

(表3) ベースライン時のノルエピネフリン量の多変量解析

共変動	危険率 (95%信頼区間)	P 値
一変量としての ノルエピネフリン量の自然対数	1.82 (1.58-2.09)	<0.001
多変量解析		
NEの自然対数	1.61 (1.40-1.85)	<0.001
冠動脈疾患(CAD) (CAD対非CAD)	1.68 (1.42-2.01)	<0.001
左心室駆出分画率(LVEF) (≤20% 対 >20%)	1.46 (0.25-1.71)	<0.001
人種(黒人 対 非黒人)	1.26 (1.04-1.50)	0.016
性別(男 対 女)	1.04 (0.84-1.28)	0.724
NYHA (IV 対 III)	1.61 (1.28-2.01)	<.001

【0385】

(表4) プラセボおよびブシンドロール処置群における、3ヶ月時のノルエピネフリン(NE)変化が、その後の死亡(M)または死亡および慢性心不全による入院(M+H)に及ぼす効果、およびプラセボと比較したノルエピネフリン変化四分位数、危険率、および(信頼区間9

10

20

30

40

50

5%)によるブシンドロールの治療効果

NE変化	第1四分位数と相対比較した NE変化による死亡危険率			未処理の死亡率(%)とNE変化四分位数に よるブシンドロール対プラセボ危険率の 比率			
	第2/第1	第3/第1	第4/第1	第1	第2	第3	第4
絶対量、 pg/ml							
プラセボ (P): M	0.98 (0.65- 1.48)	1.01 (0.68- 1.51)	1.38 (0.94- 2.03)	24.5	27.2	27.5	37.5
M + H	1.21 (0.89- 1.64)	1.11 (0.82- 1.50)	1.46 (1.09- 1.96)				
ブシンドロール (B): M	0.99 (0.70- 1.41)	0.66 (0.43- 0.99)	1.15 (0.80- 1.65)	26.1	25.7	17.7*	28.6
M + H	1.00 (0.75- 1.32)	0.83 (0.61- 1.12)	1.10 (0.82- 1.47)				
B/P: M	-	-	-	0.96 (0.65- 1.43)	0.98 (0.68- 1.43)	0.63 (0.41- 0.96)	0.80 (0.57- 1.14)
M + H				1.19 (0.88- 1.61)	1.30 (0.98- 1.72)	0.58 (0.43- 0.78)	0.74 (0.56- 0.98)
変化 %							
プラセボ (P): M	1.21 (0.80- 1.84)	1.42 (0.96- 2.10)	1.37 (0.92- 2.04)	23.1	27.3	32.1	29.2
M + H	1.27 (0.93- 1.72)	1.33 (0.99- 1.78)	1.35 (1.00- 1.81)				
ブシンドロール (B): M	1.14 (0.80- 1.62)	0.77 (0.51- 1.16)	1.19 (0.83- 1.71)	25.2	26.0	18.8	29.1
M + H	1.18 (0.89- 1.56)	0.91 (0.67- 1.24)	1.18 (0.88- 1.58)				
B/P: M	-	-	-	1.03 (0.69- 1.54)	0.98 (0.68- 1.42)	0.56 (0.38- 0.84)	0.90 (0.63- 1.29)
M + H				1.44 (0.84- 1.54)	1.39 (1.05- 1.85)	0.65 (0.48- 0.88)	0.66 (0.50- 0.88)

四分位数は：絶対値NE変化、pg/ml、第1 < -144 (プラセボ n=155、ブシンドロール n=268); 第2 -144から < -9へ (プラセボ n=206、ブシンドロール n=214); 第3 -9から 111 (プラセボ n=236、ブシンドロール n=186); 第4 > 111 (プラセボ n=248、ブシンドロール n=173); NE変化%, 第1 < -30.2 (プラセボ n=160、ブシンドロール n=262); 第2 30.2から < -2.5へ (プラセボ n=198、ブシンドロール n=223); 3番目 -2.5から 31.1 (プラセボ n=240、ブシンドロール n=181); 第4 > 31.1 (プラセボ n=247、ブシンドロール n=175)。*, P < .05 対 第1四分位Fisherの直接確率検定

【 0 3 8 6 】

(表5) 尤度の層別特性-中間変化を示す下位集団との比較での減少(Redxn)または増加(Inc)によるノルエピネフリン(NE、単位pg/ml)の変化()に伴う増加リスクを有する特定の下位集団。NEの単位はpg/ml; データは、平均値 ± SDの形で表示されており; * は、中間値との比較で p < .05、# は、中間値との比較で p < .10

10

20

30

40

パラメータ	プラセボ			ブシンドロール		
	減少 ($\Delta NE \leq -783$)	中間値 ($\Delta NE > -783, \leq 362$)	増加 ($\Delta NE > 362$)	減少 ($\Delta NE \leq -244.5$)	中間値 ($\Delta NE - 244.5, \leq +145$)	増加 ($\Delta NE > 145$)
被験者数	n = 11	n = 762	n = 72	n = 153	n = 551	n = 137
ベースライン時の NE、Pg/ml	1500* ±405	464 ±245	514 ±328	932* ±544	422 ±189	409 ±199
NE変化、 3ヶ月時、pg/ml	-1024* ±220	-16 ±188	642* ±335	-529* ±458	-44 ±103	326* ±244
NE変化、 12ヶ月時、pg/ml	-667* ±528	45 ±268	297* ±560	-349* ±347	17.5 ±216	161* ±246
死亡数 (%)	6 (55%)*	200 (26%)	34 (47%)*	52 (34%)*	114 (21%)	43 (31%)*
年齢(歳)	63.6 ±9.8	60.3 ±11.9	64.7* ±10.8	60.1 ±12.2	60.7 ±12.1	62.0 ±12.7
性別(M/F, %)	64/36	80/20	82/18	79/21	81/19	82/18
人種 (非黒人/黒人, %)	73/27	80/20	82/18	74/26 [#]	80/20	77/23
NYHAクラス (III/IV, %)	82/18	92/8	83/17*	86/14*	93/7	93/7
慢性心不全の 罹患期間、 月数中央値	73.0 [#]	39.0	36.0	36.0	36.0	31.0
病因 (非虚血性/ 虚血性, %)	45/55	42/58	29/71*	46/54	42/58	31/69*
ベースライン時 心拍数(HR、BPM)	79.2 ±12.4	81.6 ±12.8	78.3* ±12.3	85.5* ±13.8	81.0 ±13.0	80.6 ±13.7
HR変化、 3ヶ月時	-5.5 ±17.0	-2.3 ±12.5	1.0* ±13.3	-13.6* ±14.8	-9.7 ±12.4	-7.1* ±12.8
HR変化、 12ヶ月時	-10.7 [#] ±13.2	-2.6 ±13.5	-1.8 ±13.5	-12.6* ±14.4	-7.9 ±13.5	-8.1 ±14.6
最大血圧 (SBP、mmHg)	111 ±20	118 ±18	116 ±19	116 ±19	118 ±18	120 ±18.2
SBP変化、 3ヶ月時	4.7 ±13.8	0.0 15.4	-0.1 ±18.1	-0.7 ±18.2	-0.5 ±15.7	-4.7* ±16.4
SBP変化、 12ヶ月時	5.6 ±19.5	0.7 ±18.1	1.9 ±21.0	2.7 ±20.1	0.7 ±18.0	-0.9 ±16.8
LVEF (EFユニット数 (EFU) %)	22.8 ±6.6	23.1 ±7.2	23.3 ±7.6	20.1* ±8.0	24.1 ±7.0	23.3 ±6.7
LVEF変化、 3ヶ月時、EFU	0.2 ±6.4	2.3 ±6.6	0.6* ±7.2	7.0 [#] ±8.4	5.7 ±7.9	4.2* ±7.0
LVEF変化、 12ヶ月時、EFU	5.7 ±11.9	3.3 ±8.7	1.4 ±7.6	8.8 ±9.2	7.3 ±10.4	7.1 ±8.8

【 0 3 8 7 】

実施例5

BESTでのA2C-アドレナリン受容体の遺伝的変異体保有者の割合

下の表は、BESTにおいて、リゲットのグループによって最初に報告されたものとの比較で、_{2c}アドレナリン受容体の遺伝的変異体(WT/WT=ホモ接合性の野生型、WT/DEL=ヘテロ接合型、DEL/DEL=ホモ接合性_{2c} De1322-325)保有者の割合(%)を示している(Small et al., 2002)。BESTのサンプルは、_{2c}AR配列のa-領域によって増幅させて欠失を補うためにプライマーを使い、次いでゲル上で、欠失のある場合でもない場合でも、産物間にある12-塩基対の長さの相違が解消できる増幅反応をおこさせることによって評価された。

【 0 3 8 8 】

(表6)

10

20

30

40

試験	非黒人			黒人			コホート全体		
	WT/WT	WT/DEL	DEL/DEL	WT/WT	WT/DEL	DEL/DEL	WT/WT	WT/DEL	DEL/DEL
BEST	91.6	8.2	0.2	33.8	47.8	18.4	80.0	16.1	3.9
Small et al、慢性心不全	86.4	6.2	7.4	29.5	17.9	52.6	58.5	11.9	29.6
Small、対照	94.3	3.8	1.9	34.5	48.8	16.6	67.7	23.8	8.5

【0389】

上の表に見られるように、 $2c$ Del1322-325対立遺伝子の頻度は、非黒人集団に比較して、黒人集団では著しく高く、その頻度は、BEST試験において、0.423 ($p < .0001$)に対して0.043となる。次に、BESTにおける黒人では、 $2c$ Del1322-325対立遺伝子の頻度はSmallらの黒人慢性心不全患者ほどは高くはない(.615, $p < .0001$)が、Smallらの黒人対照と同程度である(0.411, $p = .85$)。このような差は、Smallら(黒人慢性心不全患者 $n=78$ 、黒人対照群 $n=84$)およびBEST試験(DNA補助調査での黒人 $n=207$)で採用された試験の規模が相対的に小さいことを反映していることは確実である。

【0390】

ヒトにおいて、 $2c$ Del1322-325多型に伴うアドレナリン作用性の駆動の増加は、単に仮定されただけで直接観察されたものではない。

【0391】

$2c$ Del1322-325ホモ接合体と本提案に直接的に示されている $2c$ 野生型対照との間のベースライン時のノルエフリンにある相違が小さいことの理由の一つである可能性のあるものは、心臓病患者のアドレナリン作用性の駆動である全身静脈ノルエピネフリンが好適な代理指標ではないこと、かつ臨床的心不全において心臓病患者のアドレナリン作用性の駆動の変化は、非全身性ノルエピネフリンがない時には起こらないことである。

【0392】

$2c$ 受容体型によるノルエピネフリンのベースライン時と3ヶ月時の変化の結果を表7に示す。

【0393】

(表7) $2c$ 受容体型によるノルエピネフリン(NE)、平均 \pm SD、およびBEST試験の(n); * $p < .05$ プラセボ変化との比較

$\alpha 2c$ 受容体型	ベースライン時 NE、 pg/ml	NE (pg/ml)の3ヶ月時の変化		
		プラセボ	ブシンドロール	全て
$\alpha 2c$ 野生型 ホモ接合体または ヘテロ接合体	479 \pm 264 (710)	12 \pm 274 (305)	-50* \pm 227 (304)	-19 \pm 254 (609)
$\alpha 2c$ Del1322-325 ホモ接合体	521 \pm 350 (161)	51 \pm 323 (60)	-153* \pm 468 (67)	-57 \pm 417 (127)

【0394】

表7に見られるように、ベースラインレベルまたはBESTにおける全身静脈NEの変化はアドレナリン作用性の駆動ベースラインでの $2c$ Del1322-325受容体異形効果に関する上述の仮定の強力な裏づけとなっている。つまり、そこにはよりベースライン時のノルエピネフリン量の3ヶ月値に対する $2c$ Del1322-325ホモ接合体の存在を裏づける傾向はわずかなものでしかないという仮定である。他方、表7では、ブシンドロールによるノルエピネフリンの減少は、 $2c$ Del1322-325ホモ接合体における方が $2c$ 野生型ホモ接合体あるいはヘテロ接合体におけるよりも著しく大きいと言うことが容易に理解できる。

【0395】

実施例6

実施例4と5の発展

A. 材料と方法

1. エクスピボでのヒト心室の試験

10

20

30

40

50

心不全を起こしていない心臓が、肉体的またはABO血液型不適合の理由で移植されなかった地区の潜在的臓器ドナーから得られた。心不全を起こした心臓は、虚血性ないしは非虚血性拡張型心筋症のために末期心不全で、心臓移植を行った患者から得られた。心臓の層別特徴は結果の項で提示される。単離し、電場刺激を受けたヒト小柱の収縮反応について以前に記述した { 1755; a-c } ような形で評価した。一様な寸法 (1 ~ 2 × 6 ~ 8 mm) の小柱を、36 で 95%O₂-5%CO₂ を気泡状で導入し pH 7.45 のタイロッド溶液中で 80 ml の筋肉浴槽に備えつけた。平衡後、Lmax の 75% の張力をそれぞれの小柱に与えた。閾値を 10% 上回る電場刺激を、パルス幅 5 ms で与え、平衡後 イソプロテレノール、ブシンドロールまたはキサモテロールへの総量反応曲線が表示濃度と 5 分おきの用量増加による投与を使って作成された。フォルスコリンを用いてシグナル伝達を増強する実験 { e, f } では、この 10⁻⁶ M アデニル酸シクラーゼ活性剤を用量反応曲線の実行の 15 ~ 20 分前に組織に使用し、緊張反応が安定して得られるようにした。各投与での収縮緊張が、刺激を受けた時点での張力からベースライン時の張力を差し引いて計算された [単位 mN/mm²]。最大張力、最大到達張力 (EC₅₀) の 50% を発生させたイソプロテレノール濃度および曲線の勾配が非線形線りかえし測定 of 共分散分析により計算された。グループ化されたデータの統計的に有意な負または正の曲線勾配が、それぞれ負または正の変力効果を確認するために使われ、遺伝子型グループ間の曲線勾配差は相互作用テストによって検出された。実施例 3 と 4 に記載された統計的手法が採用された。

10

【 0 3 9 6 】

2. トランスフェクト細胞、放射性リガンド結合、cAMP アッセイ法

20

ヒト α_1 Arg389 または α_1 Gly389 受容体を別々に発現させるため、前述の構築体を用いてチャイニーズハムスター線維芽細胞に安定的にトランスフェクトした。 α_1 AR 発現、およびブシンドロールに対する親和性は、記述したように、非特異的結合を規定するため 1 μ M プロプラノロールを使用し、¹²⁵I-シアノピンドロール (¹²⁵I-CYP) を用いた放射リガンド結合試験によって測定した。全細胞 cAMP 蓄積試験は、記述したように、二つの受容体の等価な発現レベルを有する細胞系を用い [³H]-アデニン法によって行った。付着細胞を 37 で 15 分間、ビヒクル (基準)、10 μ M ノルエピネフリンまたは表示濃度のブシンドロールとともに 10 μ M ノルエピネフリンに曝露した。

【 0 3 9 7 】

B. 結果

30

1. ヒト心室エクスピボ収縮反応は α_1 AR 遺伝子型と相互関連する

これらの試験では、ヒト心臓由来の単離右心室小柱を使用して、その組織を内因性発現の下、心不全の存在下および非存在下で用い、収縮に及ぼす遺伝子型の効果を確認した。非心不全群における事前外植 LVEF は、Arg が 0.61 + 0.13、Gly が 0.53 + 0.15 であり、また心不全群では Arg が 0.21 + 0.11、Gly が 0.17 + 0.07 であった。心不全を起こした Arg 保有者 11 名のうち 5 名、心不全を起こした Gly 保有者 11 名のうち 6 名が虚血性拡張型心筋症を有し、他の全ての心不全を起こした心臓は非虚血性拡張型心筋症であった。心不全を起こしていない患者の年齢は、Arg で 39 ± 16 歳、Gly で 43 ± 20 歳であった (p=0.64)。心不全を起こした患者の年齢は、Arg で 48 ± 15 歳、Gly で 54 ± 8 歳であった (p=0.26)。心不全を起こしていない患者の性別分布は、Arg で 男 3 名、女 8 名、Gly で 男 5 名、女 6 名であった。心不全患者の性別分布は、Arg で 男 8 名、女 3 名、Gly で 男 2 名、女 9 名ずつであった。図 12 には、 α_1 AR-389 で層別化された、心不全を起こしていない患者と心不全患者のヒト心臓から取り出された右心室小柱のイソプロテレノールの伸縮緊張反応が示されている。非不全心臓では、反応は遺伝子型間で異なり、最大張力は、 α_1 Gly389 保有者で 5.2 ± 1.4 mN/mm² であるのに対して、 α_1 Arg389 ホモ接合型の方が 13 ± 2.5 mN/mm² と高かった (p=0.01)。重要なことは、この同じ表現形は、集団特有の相対的差異はより大きい状態で、心不全患者の心臓由来の小柱で観察されており、最大のイソプロテレノール刺激を受けた時点での張力は、 α_1 Arg389 では 9.4 ± 1.9 mN/mm²、 α_1 Gly389 で 2.4 ± 0.60 mN/mm² であった (p=0.008)。

40

【 0 3 9 8 】

23 個の心不全患者の心臓からなる第二集団はブシンドロール、 α_1 AR の選択的部分作用

50

薬であるキサモテロール {d}、および単離した右心室小柱のイソプロテレノールの心筋収縮効果を評価するのに使われた。この集団のLVEFは平均 0.18 ± 0.09 であり、10個の心臓では非虚血性拡張型心筋症、13個の心臓では虚血性拡張型心筋症を伴っていた。平均年齢は 52 ± 11 歳で男20名、女3名であった。23個の心臓のうち13個はArg389に対してホモ接合体であり、他方10個の心臓はGly保有者であった(全てヘテロ接合体)。LVEF、年齢、心筋症の病因、および性別に関してArgホモ接合体とGly保有者間に差はなかった。23個の心臓のうち8個に対してはブシンドロールとキサモテロール試験が行われ、その他の15個の心臓では他の薬剤なしでキサモテロールまたはブシンドロールのいずれかの用量反応曲線が作成された。23個の心臓の全てで十分なイソプロテレノール用量反応曲線が作成された。

【0399】

二つの遺伝子型集団間のイソプロテレノール用量反応の結果は図12に示された結果に非常に良く類似している。示されていないデータの中にArg/Arg遺伝子型に有利な用量反応の著しい相違があり、相互反応試験による曲線における勾配勾配にきわだって有意な($p < 0.001$)差異、さらに最大値の差異があった(Arg, xxxx; Gly, yyyy, $p < 0.05$)。図3に見られるように、ブシンドロール単独では、両遺伝子型集団の負の変力性作用を生じた(両方での負の勾配、両方の p 値 < 0.01 、曲線の勾配間の相互作用に対する非有意性に関する検定)。フォルスコリンの前処置が行われた場合、Arg保有者の患者の心臓は負の曲線勾配に留まったが($p < .05$)、Gly用量反応曲線の勾配は0ではなかった($p = .25$)。フォルスコリンのない状態では(図13C)、キサモテロールはArg保有者の患者の心臓には正の変力性効果が生じたがGly小柱では負の変力性効果を生じた(両方とも勾配 p 値は、 $p < 0.05$)。キサモテロールはフォルスコリン処置と共に適用されると両遺伝子型の集団で正の変力性作用を生じ(遺伝子型集団の正の曲線勾配、 $p = < 0.05$)、Arg/Arg保有者の心臓は、 3×10^{-8} Mおよび 10^{-7} Mのキサモテロール用量でベースラインに比べて有意性に達するまでのより大きな変力性効果があった。

【0400】

2. トランスフェクト細胞におけるNE刺激を受けたcAMPの機能的拮抗作用

これらの試験では、等価なレベル(fmol/mg, $n=4$)のArg389 (123 ± 19)およびGly389 (137 ± 16)ヒト β_1 ARを発現している細胞が使用された。cAMPの基準レベルは 72 ± 8.5 および 59 ± 9.1 fmol/ウェルであった。10 μ Mまでのブシンドロールの存在下での初期のcAMP蓄積実験は、いずれの受容体の交感神経刺激活性(ISA)に対しても何らの証拠も示さなかった。機能的拮抗作用を試験するため、細胞はブシンドロールの濃度の変化がある場合とない場合それぞれについて、ノルエフリン作用薬10 μ Mに暴露しcAMPレベルを測定した。図13に示したように、Arg389はGly389に比べてブシンドロールの無い場合にアゴニストに対してより大きなcAMP刺激を示したが、これは前に指摘した {998} ように2種類の受容体の主要な表現形を表わしている。Arg389受容体のノルエピネフリンの媒介を受けた刺激がかなり激しかったにもかかわらず、ブシンドロールは効果的に反応を緩和した。ブシンドロールによりもたらされたcAMP産生の絶対量減少における相違は、 β_1 Arg389を発現する細胞に対してより大きかったが、ブシンドロールはGly389細胞内でのcAMPで 115 ± 23 fmol/mlに比べてArg389細胞内でのcAMP 435 ± 80 fmol/mlという最大の減少を引き起こした($p=0.008$, $n=4$)。ブシンドロールの力価は反応性に対して差があるとは認められなかった($p=0.94$, $n=4$ で、それぞれ EC_{50} は、 46 ± 4.5 および 35 ± 11 nM)。加えて、 125 I-CYP競合結合試験ではブシンドロール親和性は β_1 -Arg389 ($pKi=9.6 \pm 0.04$)と β_1 Gly389受容体($pKi=9.6 \pm 0.11$, $n=3$)の間に相違はなかった。これらの所見からブシンドロールが β_1 Arg389の反応促進に拮抗できることが示唆される。

【0401】

3. Arg389遺伝子型の治療上の利点の機序

アドレナリン作用性の活性が増加した場合、これは典型的に高い全身性静脈ノルエピネフリン量により特定され、心不全患者における障害の起きた心筋機能を補助し心不全を進行させる{h}。アドレナリン作用性の活性と予後の間のこの複雑な関係は、BESTで観察され、この試験においてはベースライン時のノルエピネフリン量の増加は独立に有害事象を

10

20

30

40

50

伴う予後に関連していたが、アドレナリン作用性の活性化を極端に行わないと死亡率増加を伴う{i}。心不全を処置するために使われてきたその他の遮断薬とは異なり、ブシンドロールは強力な交感神経遮断特性を有し、BESTではブシンドロールを用いて処置した患者の18%が、3ヶ月時に大きなノルエピネフリン低下を示し、その後の死亡リスクの1.7倍の増大と関連し{i}、さらに、MOXCON試験において、純粋な交感神経遮断剤モクソニジンを投与した患者の死亡率増大を思い起こさせた{j}。交感神経遮断作用過剰の場合の死亡リスクの増加は完全には理解されていないが、心不全を起こした心臓においては、アドレナリンを媒介とした収縮補助が喪失していることが関わっている。したがってArgホモ接合体である患者は、可能性としては、Gly保有者に比べてうまくシグナルを発するノルエピネフリンの喪失に対する忍容性を持つことができるが、それは図12や13に示すように、カテコールアミン作用薬が低レベルであってもArgホモ接合体において増加が実現するからである。Argホモ接合体がブシンドロール投与の治療的優位性を獲得できるもう一つの機序は、図3に示すように、 β_1 -ARによる有害なシグナル送達の度合いが高まったことに対する拮抗作用であると考えられる。Argホモ接合体とGly保有者とを比較した場合にブシンドロールのより好適な治療効果につながっているか判断するために、本発明者らは、ベースライン時のノルエピネフリンと3ヶ月時のノルエピネフリン変化それぞれの死亡という事象に対する効果を比較した(表8)。表8に見られるように、Argホモ接合体のGly保有者の危険率はベースライン時のノルエフリン量の増加によって減少するが、ブシンドロール投与したArgホモ接合体保有者の患者に対する優位が、アドレナリン作用性の駆動の増加に伴い徐々に増していることを示唆している。ノルエピネフリン分析における変化に対して、本発明者らは、ノルエピネフリンにおける著しい減少(3ヶ月治療で $>244\text{pg/ml}$)に 20
 関係して以前に死亡リスクが増加していると特定した集団、ノルエピネフリンのわずかな変化しか認められないもしくは変化なしで、死亡リスクが増加していない($-244 \sim 145\text{pg/ml}$)の比較集団、ノルエフリンの増加のために死亡リスクが増加するグループ($>145\text{pg/ml}$)などにおいて、Argホモ接合体の死亡率をGly保有者のそれと比較した。表8に見られるように、交感神経遮断作用過剰による死亡リスクの増加した下位集団におけるArgホモ接合体には優位性はないが(第1群)、危険率が1.07であることにより、このグループGly保有者に無視しうる優位性しかないことを示している。他方、ベースライン時のノルエピネフリンに関しては3ヶ月時のノルエピネフリン上昇により危険率が増加し、ノルエピネフリン増加群ではArgホモ接合体の優位が64%という比較的良好的な死亡率減少($p=0.08$)によって 30
 いる所まで減少している。このようなノルエピネフリン変化とベースライン時のデータは β_1 ARのArgホモ接合性の状態に対するブシンドロールの治療的優位性は、アドレナリン作用性の活性の程度に直接関係し交感神経遮断作用への防御には関係していないということである。

【 0 4 0 2 】

(表8) ノルエピネフリン(NE)測定に関するBEST DNAサブ試験におけるブシンドロール処置患者(pg/ml , $n=439$)

NE患者集団	Gly保有者: 死亡危険率、Arg/ArgとGly保有者間の比較	95%信頼区間	Cox p値	件数
BSL NE (n)				
64-356 (146)	0.90	0.37,2.22	0.82	19
358-545 (144)	0.74	0.37,1.51	0.41	31
546-2571 (149)	0.68	0.32,1.47	0.33	29
*NE変化、3ヶ月時(n)				
第1群, <-244 (70)	1.07	0.41,2.78	0.89	17
第2群, -244 to 145 (248)	0.82	0.43,1.59	0.56	36
第3群, >145 (54)	0.36	0.11,1.15	0.08	14

BSL=ベースライン。*、ブシンドロールにおけるNEの3ヶ月時(mos)の変化は続く生存率の結果に関係した。切り捨て点は以前に公開された全集団の尤度分析から由来する。第2群と比較したその分析ではグループは死亡率で1.69倍の増加($p < .05$)、第3群では1.65倍の増加を有していた($p < .05$)。 40

10

20

30

40

50

【0403】

実施例7

BEST試験から見た別の分析

慢性心不全においては、アドレナリン作用性の神経系の活性化が、二つの面を持った、一見すると相反する結果をもたらす(図14)。一方では、進行性のアドレナリン作用性の活性化によって、心不全の心臓に重大な補助をもたらされるため、交感神経遮断薬によってこの補助を停止すると、死亡率の増加につながる(Bristow et al., 2004; Cohn et al., 2003)。他方、慢性 アドレナリン作用性の刺激は心筋症の症状であり、 アドレナリン受容体阻害は、拡張型心筋症の表現形および臨床上の予後を改善する。抗アドレナリン剤療法が抱える課題とは、副作用を阻害する一方、アドレナリンによるサポートを妨げる度合いが著しくないようにすることにある。可逆性の、質量作用/拮抗的な 阻害剤は、このデリケートなバランスを扱う際に、特に、心不全が比較的進行していない患者において効果をあげる。

10

【0404】

BEST試験においては、ブシンドロールは、クラスIVの患者では補助を取り除いたことで、抗アドレナリン剤療法の効果のバランスをとることは困難であったことが明らかである(Anderson et al., 2003)。ブシンドロールを投与したクラスIVの患者では、投与開始後最初の6ヶ月間の死亡例と心不全による入院というエンドポイントを合わせると、統計上有意な、すなわち1.7倍の増大を示した一方、クラスIIIの患者では、ここまで早期に副作用が発生することはなく、全体として、非常に有意な($p=0.0001$)、すなわち、発現率の22%の減少を示した。ブシンドロールに対して、高い交感神経遮断作用を示す形で応答する下位集団は、予期されたとおり、クラスIVの患者で過剰に発生した。というのはこの下位集団は、ベースライン時で非常に高いノルエピネフリン量を示している(図15)からである。ブシンドロールに対して、高い交感神経遮断作用を示す形で応答するこの下位集団は、また、予期されたとおり、比較的左心室と右心室の機能が低かった(図16)。

20

【0405】

BEST試験においては、重度の交感神経遮断作用(ノルエピネフリン量の224.5 pg/ml以上の減少)を発現した下位集団(投与を受けたコホートの18%)において、死亡率の1.7倍の増加があった。この下位集団に見られる結果は、モクソニジンによるうっ血性心不全に関する(MOXCON)試験において、「純度の高い」交感神経遮断剤モクソニジンの投与を受けた患者に見られる結果と同様のものであった(Cohn et al., 2003)。患者をこの副作用から保護するためには、遺伝薬理学的に見て次の2つの方法がある。1) α_2 受容体の野生型で、ノルエピネフリン放出の決定要因の一つを患者が保有する(Bristow, 2000)というものの、さらに2) α_1 受容体の機能の高い変異型で、患者がノルエピネフリンシグナルの損失に耐えることを可能にすると想定されるものを患者が保有するというものである。野生型の α_2 アドレナリン受容体あるいは α_1 アドレナリン受容体389Arg/Arg型を事前に選別しておくことで、死亡率の減少が、個別に示した場合29% ($p=0.031$)と38% ($p=0.030$)という値を示す患者の集団を特定される。

30

【0406】

黒人の下位集団においては、ブシンドロールを投与した場合に効果を奏さず、予後において有害事象が生じるという結果につながる、患者の大多数に特有の薬理ゲノム学上の特性があることが明らかになった。黒人の患者では、機能喪失した α_2 受容体変異型の対立遺伝子頻度が、他に比較して著しく高く(約10倍)になり、結果として受容体タンパク質の細胞質内第3ループはアミノ酸322-325位に欠失が生じる(Small et al., 2000)。このように α_2 アドレナリン受容体が損失することで、通常の α_2 受容体が持つアドレナリン阻害作用が補償されるため、アドレナリン作用性の駆動が増大することが予測される(Brum et al., 2002)。BEST試験対象患者、特にこの遺伝子変異型に対してヘテロ接合性またはホモ接合性を示す(α_2 アドレナリン受容体-Del322-325保有者)黒人の患者は、ベースライン時に全身のノルエピネフリン量が高いという傾向を示し、ブシンドロールに対して著しく交感神経遮断作用を示す応答を示した(図17)。実際、BEST試験対象の黒人患者の約61%

40

50

が、 α_2c アドレナリン受容体-De1322-325保有者であったが、非黒人においては、全体の約8%であった(図18)。 α_2c アドレナリン受容体-De1322-325保有者である対照においては、ブシンドロール処置群のコホートにおいて、死亡率が10%増大したが、野生型の α_2c アドレナリン受容体を保有する患者においては、死亡率は29%減少した($p=.031$) (図19)。
【0407】

ブシンドロールの交感神経遮断作用から患者を守るもう一つの方法は、機能の高い389Arg/Arg型の α_1 アドレナリン受容体の変異型を保有することであるが、この受容体変異型は、BEST試験の対象患者群の約47%が保有している(図15)(Mason et al., 1999)。図20および実施例4において示したように、個々の患者が α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg型(Argホモ接合性)の保有者であるか389Gly型の保有者であるかという問題が、アゴニストに対する応答の主要な決定要素である可能性が高く、心不全に罹患しているかどうかという問題よりもかかる働きをする可能性は高い。 α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg型の保有者である患者は、交感神経遮断作用の副作用に対する耐性が比較的高いことが予想される。というのは、ノルエピネフリン量がさらに低くなった場合でも比較的強い変力応答が発生するからである(図20)。これが実際に当てはまることは、図19に示したとおりである。図21では、 α_2c アドレナリン受容体-De1322-325保有者である患者においては、 α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg型である受容体が存在すると、 α_1 アドレナリン受容体の389Gly型の保有者における死亡率の36%増加が、死亡率の18%増加に転換する。

【0408】

交感神経遮断作用の結果として生じる心筋抑制から患者を保護することに加えて、 α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg型によって、ブシンドロールに対するさらに大きい「過剰応答」がもたらされる(図5~7)。機能の高い α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg型変異型では、心筋症の割合が増大することになる。この変異体の機能は比較的高いため、ブシンドロールによるシグナル伝達の障害の絶対的な割合は、さらに高くなり、結果として α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg遺伝子型の保有者である患者において、好都合な結果が生じる可能性がさらに高くなる。

【0409】

図21および図20に示したとおり、389Arg/Arg受容体変異形を持つ患者において、ブシンドロールに対する応答としてさらに大きい死亡率の減少がコホート全体において(38%の死亡率の減少($p=0.030$)に対して、Gly型の保有者においては有意でない、10%の減少)、さらに野生型の α_2c アドレナリン受容体においても(40%の死亡率の減少($p=0.037$)に対して、Gly型の保有者においては有意でない、22%の減少)見られた。それゆえ、過剰応答を行うマーカーである α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg遺伝子型を保有しているかないかという問題は、心不全が進行した患者におけるブシンドロールに対する応答の主要な決定要因である。図22は、下位集団を決定するために遺伝子変異型を用いたBEST試験における死亡率の減少の効率の漸次的な増加を示している。比較のために、本試験以外に遮断薬を用いて比較的多数(500名を超える)の米国人の患者が参加した心不全の死亡率の試験である、MERIT-HF試験の結果も、図7に記載されている。BEST試験における死亡率の減少の割合は、コホート全体における有意でない、10%の減少から、野生型の α_2c アドレナリン受容体の保有者である患者の80%においては29%の減少、 α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg遺伝子型の保有者である患者の47%の患者においては38%の減少、野生型の α_2c アドレナリン受容体の保有者および α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg遺伝子型の保有者双方の患者の40%においては40%の減少という形で、増加する。これに比べて、メトロプロロールのCR/XRをMERIT-HF試験に参加した米国人の患者に用いた場合に、危険率は1.05であった(Wedel et al., 2001)。

【0410】

BEST試験において収集された、 α_1 アドレナリン受容体の389遺伝子型に特有のデータは、全ての遮断薬に有効である可能性はあるが、この所見はブシンドロールのみに当てはまりうると考える十分な理由はある。第一に、上で論じたとおり、 α_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg遺伝子型は、交感神経遮断作用の副作用を回避するものであり、遮断薬

のうちで、交感神経遮断作用はブシンドロールのみに見られる。第二に、高機能の β_1 アドレナリン受容体-389Arg/Arg受容体によるシグナルの送達を最大限阻害するために、ノルエピネフリン量を減少させて、受容体を阻害する、という、ブシンドロールが所有する特性の組み合わせが有効になりうる。最終的に、ブシンドロールを用いたBEST試験において収集された、遺伝子変異型データは、進行した、クラスIIIおよびIVの心不全のみにおいて有効であると考えられる。病状の進行していない心不全の患者(NYHA分類クラスI-II)において、 β_2 アドレナリン受容体-DEL322-325保有者および β_1 アドレナリン受容体-389Arg/Arg型が組み合わせられた被験者において、選択薬となる可能性は十分にある。というのは、交感神経遮断作用および心筋機能のサポートの喪失は、この患者群において問題になる可能性はさらに少なくなり、さらに β_2 アドレナリン受容体DEL/DEL型および β_1 アドレナリン受容体-389Arg/Arg型の組み合わせが心不全を進行させるリスクが、10倍増大するためである(Small et al., 2002)。ブシンドロールは、これらの患者に対する究極的な治療薬となる可能性がある。それは、ノルエピネフリン量を減少させ(これによって β_2 アドレナリン受容体-DEL322-325の影響に対応する)、さらに β_1 アドレナリン受容体を阻害する。

【0411】

研究文献において、ブシンドロールがヒト心臓に対して内因性交感神経作動活性(ISA)という、ブシンドロールを用いたBEST試験結果の説明として提示された特性があるかどうかという点に関しては、意見の対立があった。げっ歯類の心筋においては、ブシンドロールは明白にISAを有しているが、本発明者らによる大規模な試験によって、ブシンドロールが、ヒト左心室の心筋を機能させるに当たって、ISAは全くないが、逆のアゴニスト活性を有することが明らかになった。Bristow et al., 1998によって明らかになったように、ヒト心臓においてISAを最も敏感に感知する指標であり、キサモテロールあるいはセリプロポルのISAを容易に特定することが可能な試験である(Xameterol Study Group, 1990; Silke et al., 1997)。ホルター心電図では、ブシンドロールにより夜間の心拍数が増加することはない。さらに、本発明者らが単離された心臓標本に対して大規模な試験が行われ、ブシンドロールは、心不全に罹患していない(図23および24)心臓に対しても、心不全に罹患した(図25および26)心臓に対しても、なんらISAの兆候を示さなかった。事実、心不全を起こした心臓では、カルベジロールは、フォルスコリンを前投与した心臓標本(ISAの弱まった部分を検知するために必要)に対して、ブシンドロールに比べて多くの変力シグナルを発した(図26)。BEST試験においては、ブシンドロールが高機能 β_1 アドレナリン受容体の389Arg/Arg変異型においてさらに好都合な応答をすることが、ヒト心室の心筋においてブシンドロールが示すISAのさらなる証拠となっている。

【0412】

実施例8

BEST試験再考

1040名の患者に対して行われたBEST試験のDNAサブ試験は、モデルシステム(Mialet et al., 2003)および心不全の疫学研究(Small et al., 2002)に基づき、ブシンドロール投与の効果と相互作用を示す可能性のある2種類のアドレナリン受容体の多型に関して、将来について立てた仮説を検証するものである。これらの2種類のアドレナリン受容体の遺伝子変異型は、いずれも黒人と非黒人の患者群で比較した場合に、異なった対立遺伝子頻度を示すもので、BEST試験における薬剤投与の予後に著しい影響を与えることが分かった。第一の多型は、 β_2 DEL322-325多型という、アドレナリン作用性の駆動を向上させブシンドロールの交感神経遮断作用を高める傾向のある機能損失型の遺伝子変異型である。 β_2 DEL322-325保有者で、ブシンドロールの投与を受けた患者は、3ヶ月目に 153 ± 57 pg/ml (平均値の標準誤差)のノルエピネフリン量の減少を示したのに対して、 β_2 WT/WTアドレナリン受容体保有者の患者にブシンドロールを投与した場合には、 50 ± 13 pg/mlの減少しか示さなかった($p=0.008$)。BEST試験において、このような強調された交感神経遮断反応は、死亡率が統計学的に有意である1.7倍の増加に関連していた(Bristow et al., 2004)臨床的あるいは人口上の下位集団として、顕著な交感神経遮断作用を示す傾向のあるも

のには2つ、すなわちクラスIVの患者と黒人があり、この2つの下位集団のみが、BEST試験において1.0を上回る死亡危険率を示した集団であった(BEST Writing Committee, 2001)。_{2c}DEL322-325の対立遺伝子頻度は、黒人において0.42であり、非黒人において0.04であった($p < 0.0001$)。表9の第3列目において示したように、BEST試験に参加した患者で_{2c}アドレナリン受容体のホモ接合性を有する野生型(WT/WT)の保有者では、総死亡率が30%の減少を見せ($p = 0.031$)、心血管系の疾患による死亡率が41%の減少を見せており($p = 0.004$)、他方、アミノ酸322-325位に欠失が生じた多型の保有者は、総死亡率が9%の増加(p は有意ではない)を見せ、心血管系の疾患による死亡率が3%の増加(p は有意ではない)を見せている。全体として、BEST試験の参加者のうち80%は、24%の黒人で構成されているが、この80%の参加者は、34%の黒人を含め、ホモ接合性を有する野生型(WT/WT)である。それゆえ、単純にアミノ酸322-325位に欠失が生じた多型のみでスクリーニングをかけて、_{2c}アドレナリン受容体のホモ接合性を有する野生型を有する米国人の患者のみに投薬を行うことにすると、ブシンドロールを病状が進行した心不全患者に投与した場合に増大する交感神経遮断作用/死亡のリスクを除去することになる。以下で論じるように、_{2c}DEL322-325保有者である患者は、その患者が₁389Arg/Arg遺伝子型(BEST試験において、遺伝子型の分布は、黒人において0.32であり、非黒人において0.51である)を保有している場合にのみ投与を行うことにすれば、その際にはブシンドロールが適格である患者は、米国民の心不全患者の総人口のうち、85%+6%=91%になり、人種別の内訳で示すと、黒人12%に対して非黒人は88%になる。さらに、50%を上回る黒人(34%+21%=55%)に対して、遺伝子型による選別を行えば、ブシンドロールを投与することが可能である。

10

20

【0413】

BEST試験において、ブシンドロールの治療効果に影響を与えられようとするもう一つのアドレナリン受容体の多型は、₁389Arg/Glyの一塩基多型であり、ここでは、対立遺伝子Glyが存在する場合(「Gly保有者」、表9、列6)に比べて、比較的機能の高いArg/Arg変異型によって、ブシンドロールに対して「過剰応答」がもたらされる(表9、列5)。389Arg/Arg変異型がGly保有者に比べて高いシグナル伝達機能を示すという証拠は、2005年3月28日の会合の資料で呈示されており、さらに、389Arg対立遺伝子保有者の方が389Gly保有者に比べて心筋症に罹患しやすいという証拠は、リゲット博士のグループ(Mialet et al., 2003)によって発表されている。BEST試験において、表9に見るように、389Arg/Arg保有者である患者は、ブシンドロールによって、総死亡率で見ると38%($p = 0.030$)の減少、さらには心血管系の疾患による死亡率で見ると46%の減少($p = 0.015$)を示すのに対して、389Gly保有者である患者では、それぞれ10%ならびに22%の減少しか示さない(いずれも p は有意ではない)。カルベジロール(Small et al., 2002)あるいはメトロプロロールのCR/XR(White et al., 2003)が、₁389Arg/Arg保有者と₁389Gly保有者との間で、きわだった相違のある治療効果を示すという証拠はないため、ブシンドロールが₁389Arg/Arg遺伝子変異型をもつ患者に与える有益な作用は、ノルエピネフリンシグナルの抑制と受容体の競合的拮抗によるものである可能性が高い。これに関して、プリストフ博士のグループは、生理学的さらに分子/生体マーカーのデータに基づいて、心不全の患者に遮断薬全量投与した場合、心筋にアドレナリンシグナルが継続的に提供されているという証拠が示され(Lowes et al., 2001)、かつ₁の高機能389Arg/Arg保有者である患者においてノルエピネフリン量を減少させた場合、さらに効果が上がるという証拠を示した。

30

40

【0414】

さらに、₁389Arg/Arg保有者であり_{2c}のWT/WT保有者(表9、8列)でもある患者は、総死亡率で47%の減少($p = 0.037$)、心血管系の疾患による死亡率で47%の減少($p = 0.020$)、死亡率と心不全による入院率の総計で39%の減少($p = 0.002$)を示し、すなわち、BEST試験のコホート全体のデータで見ても、同族の対立するディプロタイプと比較しても、高い薬物応答を示すことを示している。この関連で、表9の第11列では、_{2c}DEL322-325保有者であり、₁389Gly保有者でもある患者においては、BEST試験において、総死亡率で35%の増加、心血管系の疾患による死亡率で36%の増加があることが明らかになっている。このような有害な応答に対する明確な説明としては、機能の低い389Gly保有者の₁アドレナリン

50

受容体は、欠失が生じた Δ 保有者の状態に関連して交感神経遮断作用が高まった応答に対する耐性がないということが挙げられる。これに対して、高機能(389Arg/Arg)の Δ 保有者である患者は、低いカテコラミン濃度に対して強力に応答していることを特徴としているが、これによってかかる有害な作用が総死亡率にも心血管系の疾患による死亡率にも生じることはない(表9、列9)。患者や事象の件数が比較的少ないことから、{ (Δ DEL322-325保有者)かつ(Δ 389Gly保有者) } の下位集団におけるいずれかのエンドポイントを死亡とした場合の統計学的有意性が排除されるが、これらの所見と交感神経遮断作用に関するデータおよびアドレナリン受容体の分子薬理学的所見が一致していることが、患者の安全が問題になった場合に、この所見の科学的臨床的重要性に対する裏づけになる。

【0415】

BEST試験において、 Δ 389Arg/Arg対立遺伝子頻度は、非黒人において0.72であるが、黒人においては0.57にすぎない($p < 0.0001$)。それゆえ、BEST試験被験者の黒人においては、死亡率を増大させる傾向をもつ対立遺伝子(Δ DEL322-325)の頻度は他のカテゴリに比較して高く、「過剰応答を行う」 Δ 389Arg/Arg対立遺伝子の頻度は低い。アメリカ黒人におけるこの遺伝的相違はいずれも、この人種グループにおいて有害な結果が生じる傾向に寄与している可能性は高い(BEST Writing Committee, 2001)。

【0416】

BEST試験の薬理ゲノム学サブ試験では、ブシンドロールと以前にモデルや人間の組織において包括的に研究された特定のアドレナリン受容体との間の相互作用に基づいて、前もって立てた仮説を利用した。それゆえ、薬理ゲノム学的観点から立てた仮説は、通常行われる、後向きに発生した、下位集団の分析よりも有効性をもつ。

【0417】

BEST試験から得られた遺伝薬理学データが以下に記載されている。DNAサブ試験および薬理ゲノム学分析に同意した患者群は、ベースライン時の特性においては、コホート全体と差異はなかった。さらに、いずれの多型においても、遺伝子の用量効果についての証拠はなかった。また、ヘテロ接合体の作用は、ホモ接合体の場合と同様またはそれを上回るものであった。このため、 Δ DEL322-325対立遺伝子も Δ 389Gly対立遺伝子もドミナントネガティブとして機能すると考えられている。

【0418】

(表9)

10

20

30

エンドポイント	BEST コホート群全体 ブシンドロール (n=2708) 平均f/u2年	BEST α 2c WT/WT ブシンドロール (n=829/1036) 平均f/u2年	BEST α 2c DEL保有者 ブシンドロール (n=207/1036) 平均f/u2年	BEST β 1 389 Arg/Arg ブシンドロール (n=493/1040) 平均f/u2年	BEST β 1 389 Gly 保有者 ブシンドロール (n=547/1040) 平均f/u2年
死亡	0.90; 860 Ev (0.78, 1.02) p = 0.10	0.70; 155 Ev (0.51, 0.97) p = 0.031	1.09; 37 Ev (0.57, 2.08) p = 0.79	0.62; 82 Ev (0.40, 0.96) p = 0.030	0.90; 111 Ev (0.62, 1.30) p = 0.57
心血管系の 疾患による死亡	0.86; 731 Ev (0.74, 0.99) p = 0.040	0.59; 130 Ev (0.42, 0.85) p = 0.004	1.03; 32 Ev (0.52, 2.07) p = 0.92	0.54; 66 Ev (0.33, 0.89) p = 0.015	0.78; 97 Ev (0.52, 1.18) p = 0.24
死亡+心不全 による入院	0.81; 1421 Ev (0.73, 0.90) p < 0.0001	0.72; 341 Ev (0.59, 0.90) p = 0.003	0.89; 84 Ev (0.58, 1.37) p = 0.60	0.66; 190 Ev (0.50, 0.88) p = 0.004	0.87; 236 Ev (0.62, 1.30) p = 0.25
心不全による 入院	0.78; 1045 Ev (0.69, 0.88); p < 0.001	0.74; 267 Ev (0.58, 0.95) p = 0.016	0.76; 67 Ev (0.47, 1.24) p = 0.27	0.64; 154 (0.48, 0.90) p = 0.006	0.86; 181 Ev (0.64, 1.15) p = 0.30
エンドポイント	BEST β 1 389 Arg/Arg + α 2c WT/WT ブシンドロール (n=418/1036) 平均f/u2年	BEST β 1 389 Arg/Arg + α 2c DEL 保有者 ブシンドロール (n=73/1036) 平均f/u2年	BEST β 1 389 Gly 保有者+ α 2c WT/WT ブシンドロール (n=411/1036) 平均f/u2年	BEST β 1 389 Gly 保有者+ DEL 保有者 ブシンドロール (n=134/1036) 平均f/u2年	MERIT-HF 米国人患者 メトプロロール CR/XR (n=1071/3991) 平均f/u1年
死亡	0.60; 69 Ev (0.38, 0.97) p = 0.037	0.71; 13 Ev (0.24, 2.11) p = 0.53	0.82; 86 Ev (0.54, 1.26) p = 0.37	1.35; 24 Ev (0.61, 3.02) p = 0.46	1.05; 100 Ev 0.71, 1.56 p = NS
心血管系の 疾患による死亡	0.53; 56 Ev (0.31, 0.90) p = 0.020	0.58; 73 Ev (0.17, 2.02) p = 0.39	0.67; 411 Ev (0.42, 1.07) p = 0.09	1.36; 22 Ev (0.59, 3.15) p = 0.47	-0.96; 90 Ev p = NS
死亡+心不全 による入院	0.61; 156 Ev (0.44, 0.84) p = 0.002	0.85; 34 Ev (0.43, 1.69) p = 0.64	0.86; 185 Ev (0.64, 1.16) p = 0.32	0.81; 50 Ev (0.46, 1.43) p = 0.47	-0.84; 200 Ev (0.61, 1.12) p = NS
心不全による 入院	0.59; 126 Ev (.41, .84) p = 0.004	0.81; 73 Ev (0.38, 1.72) p = 0.59	0.93; 411 Ev (0.67, 1.29) p = 0.66	0.62; 134 Ev (0.32, 1.21) p = 0.16	NA

10

20

30

遮断薬とプラセボの効果の比較は、米国の心不全患者で実施した治療する意図に基づく患者群死亡率試験で唯一取得可能であったあるいは公開されていたデータに見られるものである。Evは事象、NAは該当なしの意味。

【 0 4 1 9 】

実施例9

追加研究: デザインI

倫理的な理由から、一次あるいは二次の拡張型心筋症を原因とする心不全の患者を対象とした遮断薬を用いたプラセボ対照試験をこれ以上実施するのは不可能であった。これにより、研究デザインの選択肢として活性型遮断薬を対照とした非劣性あるいは優性試験、さらには各遺伝子変異型間でブシンドロール応答を比較するという選択肢が残った。非劣性試験という選択肢は、他の何らかの薬剤についての遺伝子変異型に関するデータがない場合には、除外されることになる(第III相試験の中でも、MERIT-HF試験のみが薬理ゲノム学的サブ試験を行っている(Small et al., 2002)が、この試験は規模が小さすぎて意味のある結論を引き出すことは不可能である)。図27に研究デザインIとして示したものは、標的遺伝子組み換えとブシンドロールを組み合わせて治療を行った場合と、遺伝子組み換えを行わずにメトプロロールCR/XRを投与した場合との比較したもので、ここではプライマリーエンドポイントとして死亡あるいは心不全による入院までの時間を用いた。デザインIにおいては、無作為化してブシンドロールを投与した患者の中に、 β 1アドレナリン

40

50

受容体の389Gly保有者があれば、試験には参加させない。というのは、BEST試験で得られたデータから、ブシンドロールに対する応答が十分でなく、今後も評価を行うための保証が与えられないからである。この患者については、最小限の情報、可能性としては生命状態に限定して、これを担当の医師による選択の方法で治療する際に捕捉するようにする。デザインIの主要な比較は、 α_1 アドレナリン受容体389Arg/Arg保有者の患者にブシンドロールを投与した場合と、遺伝子組換えを行わずにメトプロロールCR/XR(トプロロールXL)を投与した全ての遺伝子型との比較である。デザインIの無作為化される症例数は、900例となると思われ、うち662名の患者が主要な結果の比較に参加することになる。

【0420】

実施例10

追加研究:デザインII

追加の研究デザインとしての研究デザインII(図28)においては、症候性心不全および病状の進行した心不全の患者(前年の心不全による入院の既往で補強し;それゆえ、スクリーニングの時点でクラスIIの患者は、試験への参加が認められる)で、左室駆出分画が0.35以下(BEST試験の対象患者群の一般的特徴)の者のうち、保有者の状態で見ると、スクリーニングされて α_2 DEL322-325多型(ヘテロ接合型あるいはホモ接合型)を持たない患者が選出された。このように制限を設けることで、BEST試験(危険率1.09、表9列4)やMOXCON試験の初期に死亡率の増加の傾向として発現していた、ブシンドロールによる交感神経遮断作用という副作用は除外され、ブシンドロールが、ホモ接合型の野生型(WT/WT)アドレナリン受容体というバックグラウンドのもと投与が行われるその他の遺伝子型にメトプロロールCR/XRを投与した場合に比較して、若干優位に立つことが期待される。

【0421】

この試験のプライマリーエンドポイントは、死亡および心不全による入院というエンドポイントに到達するまでの時間についてMERIT-HF試験で測定された危険率の95%信頼区間の上限値(UCL)を用いて、メトプロロールCR/XR(トプロロールXL)を投与した場合と比較した場合の非劣性にある(Hjalmarson et al., 2000)。このMERIT-HF試験には全ての遺伝子型が登録されているが、登録された患者3991名のうち208名のみ(5.2%)が黒人であった。 α_2 DEL322-325保有者は、黒人において大きな比重を占めていた(BEST試験では、 α_2 DEL322-325対立遺伝子頻度は、黒人において0.423であったが、これに対して非黒人では0.043であり、他方DEL保有者の陽性率は黒人で66%であるのに対して、非黒人で8%であった)。それゆえ、このMERIT-HF試験は約90%が α_2 野生型であり、つまり遺伝子型としてはデザインIで提案された患者群に匹敵するものである。さらに、メトプロロールCR/XRを投与した場合には、交感神経遮断作用が発生しないため、 α_2 野生型とDEL保有者を比較した場合のメトプロロールCR/XRに対する応答が異なることを想定する理由がない。ブシンドロールとメトプロロールCR/XRを比較した場合の危険率の95%信頼区間の上限値(「非劣性区間」)は、次の式によって求められる(Hasselblad et al., 2001)。 $\{(ブシンドロールとメトプロロールCR/XRを比較した場合の信頼区間の上限値) \times (メトプロロールCR/XRとプラセボを比較した場合の信頼区間の上限値) - 1, 0\}$ 。さらに、メトプロロールCR/XRとプラセボを比較した場合のMERIT-HF試験のコホート群全体の信頼区間の上限値0.80を用いると、 $x \times 0.80 - 1.0$ の関係が成り立ち、すなわち非劣性の区間xについて、 $x - 1.25$ の関係が成り立つ。この1.25という値をここで1.16に減じ、非劣性の確実性をさらに高める。目標とする信頼区間の上限である1.16は、MERIT-HF試験の危険率/信頼区間の上限を、観測された数値0.69/0.80と危険率1.0との間で測定する際に得られる値である。 0.05 の両側検定について、推定された検出力85%はここで、危険率の期待値0.90から測定される(α_2 WT/WTの患者群が若干優位であることは、ブシンドロールが α_1 389Arg/Argおよび/またはその α_2 受容体の阻害を抑制する度合いが高いことから得られる)。

【0422】

ブシンドロールがメトプロロールCR/XRに対して優位であることの裏づけは、MERIT-HF試験に登録した米国人の患者によって提供される(表9)。この患者は、メトプロロールCR/XRを投与した場合は、死亡率が5%の増加を見せ、死亡および心不全による入院は16%の減

10

20

30

40

50

少を見せた。これに対して、BEST試験においては、コホート全体において死亡率が10%の減少を見せ($p=0.10$)、死亡および心不全による入院は19%の減少を見せた($p < 0.0001$)。一方、 $_{2c}$ 野生型の患者は死亡率が30%の減少を見せ($p=0.031$)、死亡および心不全による入院は28%の減少を見せた($p=0.003$)。一方の危険率を他方の危険率で割る($0.72/0.84$)と、危険率の期待値0.86が得られ、ここからブシンドロールとメトプロロールCR/XRとを比較した場合の効果量は、 $1.00-0.86$ 、すなわち0.14となる。それゆえ、 $_{2c}$ WT/WTである米国人の患者群において、メトプロロールCR/XRに対してブシンドロールに10%分有利な値が得られることを期待するのは、不合理であるとは言えない。図28で提示された基準から、ブシンドロールとメトプロロールの危険率の比にかかわらず、信頼区間の上限が1.16未満であれば、結論としては、100% $_{2c}$ アドレナリン受容体ホモ接合型野生型である病状が進行した心不全患者において、死亡あるいは心不全による入院までの時間に対する効果について、ブシンドロールはメトプロロールCR/XRに対して非劣性であるということになる。

【0423】

この試験デザインの第二の部分は、薬理ゲノム学的に遺伝子組換えを行ったブシンドロールが遺伝子組換えを行っていないメトプロロールCR/XRに対して優性であるというさらなる証拠を提示することを目的としており、これがセカンダリーエンドポイントとなる。ここでは、ブシンドロールを投与する患者群は、 $_{1389}$ Arg/Arg保有者の患者であり、かつ $_{2c}$ 野生型の患者である。BEST試験では、コホート全体の47%が $_{1389}$ Arg/Arg保有者の患者であり、 $_{2c}$ 野生型の患者の50%も同様であった。図9に示したように、 $_{1389}$ Arg/Argおよび $_{2c}$ 野生型のディプロタイプは、死亡率において40%の減少を示しており($p=0.037$)、死亡および心不全による入院において39%の減少を示し($p=0.002$)、さらには心不全による入院において41%の減少を示している($p=0.004$)。ブシンドロールとメトプロロールCR/XRとを比較した場合の死亡および心不全による入院の危険率の期待値(米国のMERIT試験データ)は、 $0.61/0.74$ 、すなわち0.73となる。メトプロロールCR/XRと比較した場合のブシンドロールを投与した $_{1389}$ Arg/Argおよび $_{2c}$ 野生型のディプロタイプの患者における効果量27%を用いると、検出力の測定値81%が得られる。それゆえ、図28に示したここで提示する試験においては、プライマリーエンドポイントについての非劣性の区間は、保存的に、MERIT-HF試験のコホート全体の結果に基づいて決まり、プライマリーエンドポイントとセカンダリーエンドポイント双方についての検出力の測定値には、米国人の患者群においてブシンドロールとメトプロロールCR/XRと双方について収集した現実のデータに基づいて、選択された遺伝子型におけるブシンドロールの優位の期待値が含まれることになる。この比較が有効であることの裏づけは、BEST試験DNAサブ試験において、プラセボを投与した $_{1389}$ Arg/Arg保有者の患者は、プラセボを投与した $_{1389}$ Gly保有者の患者と同一の事象率を示したことである(図6および図7)。換言すれば、図7に示したように、ブシンドロールを投与した $_{1389}$ Arg/Arg保有者の患者において最も好適な事象率を示したことは、完全に治療効果によるものであり、 $_{1389}$ Arg/Arg遺伝子型を有した患者の自然な進展が他と比較して良好だったことによるものではない。この第一級のセカンダリーエンドポイントによって、臨床医に対して、遺伝子組換えを行ってブシンドロールを投与した場合の方が、遺伝子組換えを行わないで認可された心不全治療薬である 遮断薬を投与した場合に比べて、良好な臨床結果が得られるというさらなる証拠が提示される。

【0424】

図28に示した試験デザインにおいては、ブシンドロールを投与した患者群とは、 $_{1389}$ Arg/Argの保有者の患者であり、かつ $_{2c}$ 野生型の保有者の患者であった。BEST試験では、コホート全体の47%が $_{1389}$ Arg/Arg保有者の患者であり、 $_{2c}$ 野生型の患者の50%も同様であった。図9に示したように、 $_{1389}$ Arg/Argおよび $_{2c}$ 野生型のディプロタイプは、死亡率において40%の減少を示しており($p=0.037$)、死亡および心不全による入院において39%の減少を示し($p=0.002$)、さらには心不全による入院において41%の減少を示している($p=0.004$)。ブシンドロールとメトプロロールCR/XRとを比較した場合の死亡および心不全による入院の危険率の期待値(米国のMERIT試験データ)は、 $0.61/0.74$ 、すなわち0.73となる。メトプロロールCR/XRと比較した場合のブシンドロールを投与した $_{1389}$ Arg/Argおよ

10

20

30

40

50

び_{2c}野生型のディプロタイプの患者における効果量27%を用いると、検出力の測定値81%が得られる。それゆえ、図28に示したここで提示する試験においては、プライマリーエンドポイントについての非劣性の区間は、保存的に、MERIT-HF試験のコホート全体の結果に基づいて決まり、プライマリーエンドポイントとセカンダリーエンドポイント双方についての検出力の測定値には、米国人の患者群においてブシンドロールとメトプロロールCR/XRと双方について収集した現実のデータに基づいて、選択された遺伝子型におけるブシンドロールの優位の期待値が含まれることになる。

【0425】

実施例11

追加研究:デザインIII

10

1.16の非劣性の区間においては、メトプロロールCR/XRの治療効果がプラセボに対して36%の治療効果を維持するが、この結果が有効性を示すのに十分であるとは見なされない場合には、別の試験がデザインされる。1.14信頼区間では、90%の検出力でプラセボの投与に対してメトプロロールCR/XRは50%の治療効果を維持するが、これは許容される。それゆえ、図28に示した研究デザインは、90%の検出力で、この目標を達成するために調整されたものである(図29)。信頼区間の上限を下げるために必要となる統計上の検出力は、症例数を1300名から1600名に増加させることで達成され、また、これには劣るが、ブシンドロール処置群とメトプロロールCR/XR処置群との間の2対1の割り付けから1対1の割り付けへと変換することでも、この検出力は達成される。また、作用フィードバックに反応して、本発明者らは、₁389Arg/Arg患者において、もう1つのセカンダリーエンドポイント、つまりブシンドロール対メトプロロールCR/XLを加えた。効果量の期待値25%に基づいて計算される、セカンダリーエンドポイントについての検出力の推定値は、71%であり、効果量の期待値27%に基づいて計算される、別のセカンダリーエンドポイントについての検出力の推定値は、88%である。最初に掲げた効果量25%は、メトプロロールCR/XRを₁389Arg/Arg保有者である患者群に対して投与した場合のデータが限られているため、推定が困難である。また、使用可能なデータのみからは、プラセボと比較しても、メトプロロールCR/XRの治療効果の向上は、ほとんどないか、皆無である(White et al., 2003)。別のセカンダリーエンドポイントについての効果量27%は、上で論じたように、米国のMERIT-HF試験のデータに基づいている。

20

【0426】

30

先の記述は本発明の原理の例証のみと見なされる。さらに、多数の修正および変更が当業者には容易に想到されうるので、本発明を前述の正確な構成および過程に限定することは望ましくない。したがって、適当な全ての修正物および等価物は、付随する特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内に入るものと訴えることができる。「含む(comprise)」、「含む(comprising)」、「含む(include)」、「含む(including)」、および「含む(includes)」という単語は、本明細書においておよび以下の特許請求の範囲において用いられる場合、記述された特徴、整数、成分、または段階の存在を明記するよう意図されるが、それらは一つまたは複数の他の特徴、整数、成分、段階、またはその群の存在または付加を排除するものではない。

【0427】

40

参照文献

以下の参照文献は、例示的な手順の補足または他の詳細な補足を本明細書に記述したものに供与する範囲内で、参照により本明細書に明確に組み入れられる。

米国特許第 3,817,837号	
米国特許第 3,850,752号	
米国特許第 3,939,350号	
米国特許第 3,996,345号	
米国特許第 4,196,265号	
米国特許第 4,275,149号	
米国特許第 4,277,437号	
米国特許第 4,366,241号	10
米国特許第 4,582,788号	
米国特許第 4,627,429号	
米国特許第 4,659,774号	
米国特許第 4,683,194号	
米国特許第 4,683,195号	
米国特許第 4,683,202号	
米国特許第 4,683,202号	20
米国特許第 4,683,202号	
米国特許第 4,784,857号	
米国特許第 4,800,159号	
米国特許第 4,816,571号	
米国特許第 4,883,750号	
米国特許第 4,946,773号	
米国特許第 4,959,463号	30
米国特許第 4,965,188号	
米国特許第 5,126,145号	
米国特許第 5,130,238号	

米国特許第 5,141,813 号	
米国特許第 5,169,766 号	
米国特許第 5,264,566 号	
米国特許第 5,279,721 号	
米国特許第 5,428,148 号	
米国特許第 5,554,744 号	
米国特許第 5,574,146 号	
米国特許第 5,602,244 号	10
米国特許第 5,605,798 号	
米国特許第 5,645,897 号	
米国特許第 5,662,925 号	
米国特許第 5,705,629 号	
米国特許第 5,788,983 号	
米国特許第 5,840,873 号	
米国特許第 5,843,640 号	20
米国特許第 5,843,650 号	
米国特許第 5,843,651 号	
米国特許第 5,843,663 号	
米国特許第 5,846,708 号	
米国特許第 5,846,709 号	
米国特許第 5,846,717 号	
米国特許第 5,846,726 号	30
米国特許第 5,846,729 号	
米国特許第 5,846,783 号	
米国特許第 5,849,481 号	
米国特許第 5,849,483 号	
米国特許第 5,849,486 号	
米国特許第 5,849,487 号	
米国特許第 5,849,497 号	
米国特許第 5,849,546 号	40
米国特許第 5,849,547 号	

米国特許第 5,851,770号	
米国特許第 5,851,772号	
米国特許第 5,853,990号	
米国特許第 5,853,992号	
米国特許第 5,853,993号	
米国特許第 5,856,092号	
米国特許第 5,858,652号	10
米国特許第 5,861,244号	
米国特許第 5,863,732号	
米国特許第 5,863,753号	
米国特許第 5,866,331号	
米国特許第 5,866,337号	
米国特許第 5,866,366号	
米国特許第 5,900,481号	
米国特許第 5,905,024号	20
米国特許第 5,910,407号	
米国特許第 5,912,124号	
米国特許第 5,912,145号	
米国特許第 5,912,148号	
米国特許第 5,916,776号	
米国特許第 5,916,779号	
米国特許第 5,919,626号	30
米国特許第 5,919,630号	
米国特許第 5,922,574号	
米国特許第 5,925,517号	
米国特許第 5,925,525号	
米国特許第 5,928,862号	
米国特許第 5,928,869号	
米国特許第 5,928,870号	
米国特許第 5,928,905号	40
米国特許第 5,928,906号	

米国特許第 5,929,227 号
 米国特許第 5,932,413 号
 米国特許第 5,932,451 号
 米国特許第 5,935,791 号
 米国特許第 5,935,825 号
 米国特許第 5,939,291 号
 米国特許第 5,942,391 号
 米国特許第 5,952,174 号
 米国特許第 6,113,940 号
 米国特許第 4,656,127 号
 米国特許第 4,682,195 号

10

Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.

Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1):107-113, 1990.

Anand *et al.*, *Circulation*, 107(9):1278-1283, 2003.

20

Anderson *et al.*, *J. Card. Fail.*, 9:266-277, 2003.

Asano *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 37:678-691, 2001.

Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1989.

Barany, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193, 1991

Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.

Benedict *et al.*, *Circulation*, 94(4):690-697, 1996.

30

BEST Trial Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 344(22):1659-1667, 2001.

Bolger, *Int J Cardiol*, 92(1):1-8, 2003.

Bouzamondo *et al.*, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 15:95-109, 2001.

Bristow *et al.*, *Circ. Res.*, 59(3):297-309, 1986.

Bristow *et al.*, *Cardiovasc/ Drugs Ther.*, 11:291-296, 1997.

Bristow *et al.*, *Circulation*, 110:1437-1442, 2004.

Bristow *et al.*, *Circulation*, 89(4):1632-1642, 1994.

Bristow *et al.*, *Clin. Cardiol.*, 21(12 Suppl 1):I3-13, 1998.

40

Bristow *et al.*, *J Card Fail.*, 9(6):444-53, 2003.

- Bristow *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 35:296-303, 1988.
- Bristow, *Circulation*, 101:558-569, 2000.
- Brodde *et al.*, *J. Cardiovasc., Pharmacol.*, 8:1235-1242, 1986.
- Brodde *et al.*, *Z. Kardiol.*, 81:71-78, 1992.
- Brown *et al.*, *Immunol Ser*, 53:69-82, 1990.
- Brum *et al.* *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283:H1838-18345, 2002.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977. 10
- CIBIS-II Investigators, *Lancet*, 353:9-13, 1999.
- Cohn *et al.*, *Eur. J. Heart Fail.*, 5:659-667, 2003.
- Cohn *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 311:819-823, 1984.
- de Arruda *et al.*, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2(5):487-496, 2002.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993.
- Dohlman *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 60:653-688, 1991.
- Domanski *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42:914-922, 2003.
- Doolittle *et al.*, *Methods Mol Biol.*, 109:215-237, 1999. 20
- Eichhorn *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 79:794-798, 1997.
- Epstein *et al.*, *Ann. Inn. Med.*, 65:20-7, 1968.
- European Appln. 201,184
- European Appln. 237,362
- European Appln. 258,017
- European Appln. 266,032
- European Appln. 320 308 30
- European Appln. 329,822
- European Appln. 50,424
- European Appln. 84,796
- Fowler and Bristow, *Am. J. Cardiol.*, 55(10)D120-D124, 1985.
- Francis *et al.*, *Circulation*, 87(6 Suppl):VI40-6, 1993.
- French Appln. 2,650,840
- Frielle *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7920-7924, 1987.
- Froehler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986. 40

- Frohman, In: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.
- Gaffney et al., *Circ Res.*, 12:264-268, 1963.
- Gilbert et al., *Amer. J. Med.*, 88:223-229, 1990.
- Granger et al., *Lancet.*, 362:772-776, 2003.
- Great Britain Appln 2 202 328
- Green et al., 1994 10
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12):1271-1285, 1993.
- Halushka et al., *Nat. Genet.*, 22(3):239-247, 1999.
- Harlow and Lane, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988
- Hasselblad et al., *Drug Information J.*, 35:435-449, 2001.
- Hein et al., *Nature*, 402:181-184, 1999.
- Hershberger et al., *J. Cardiovasc. Pharm.*, 15:959-967, 1990.
- Hjalmarson et al., *J. Am. Med. Assoc.*, 283:1295-1302, 2000. 20
- Humphries, et al., In: *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*, Elles (Ed.), 321-340, 1996.
- Innis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Isnard et al., *Am. J. Cardiol.*, 86(4):417-421, 2000.
- Johnson et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 73:366-71, 2003.
- Johnson et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 74(1):44-52, 2003.
- Jones, *Nature*, 199:280-282, 1963. 30
- Joseph et al., *Br. J. Pharm.* 142:51-56, 2004.
- Kalbfleisch et al., 1980
- Kaplan et al., *J. Amer. Statistical Assoc.*, 53:457-481, 1958.
- Kaye et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 26(5):1257-1263 1995.
- Ko and Catlett *Bioinformatics*, 19(2):287-288, 2003.
- Klaassen, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman and Gilman, Eds., Pergamon Press, 8th Ed., pp. 49-61, 1990. 40
- Krum et al. *Circulation*, 92:1499-1506, 1995.
- Kuppuswamy, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1143-1147, 1991.

- Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.
- Kwok and Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, Apr;5(2):43-60, 2003.
- Kwok *et al.*, *Genomics*, 23(1):138-144, 1994.
- Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2:235-258, 2001.
- Landegren, *et al.*, *Science* 241:1077-1080, 1988.
- Landegren, *et al.*, *Science*, 241:1077-1080, 1988.
- Levin *et al.*, *J Biol Chem.*, 277(34):30429-30435, 2002. 10
- Liggett *et al.*, In: *Catecholamines*, Bouloux (Ed.), W. B. Saunders, London, 1993.
- Liggett, *J. Clin. Invest.*, 107:947-948, 2001.
- Liu *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 74:372-9, 2003.
- Lohse, *Trends Mol. Med.*, 10:55-58, 2004.
- Lowes *et al.*, *Circulation*, 102:II-628, 2000.
- Lowes *et al.*, *Circulation*, 104:II-436, 2001.
- Lowes *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 346:1357-1365, 2002. 20
- Mann *et al.*, *Circulation*, 111(21):2837-2849, 2005.
- Mason *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:12670-12674, 1999.
- Maxam, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560, 1977.
- McMurray *et al.*, *Lancet.*, 362:767-771, 2003.
- MERIT-HF Study Group, *Lancet.*, 353:2001-2007, 1999.
- Meyers, *et al.*, *Science*, 230:1242, 1985.
- Mialet *et al.*, *Nat. Med.*, 9:1300-1305, 2003.
- Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253, 1991. 30
- Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273, 1986.
- Nakamura *et al.*, In: *Handbook of Experimental Immunology* (4th Ed.), Weir *et al.*, (eds).
1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- Neumister *et al.*, *Pharmacogenet. Genomics*, 15:143-149, 2005.
- Nickerson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8923-8927, 1990.
- Nyren *et al.*, *Anal. Biochem.* 208:171-175, 1993.
- O'Shaughnessy *et al.*, *Clin. Sci.*, 99:233-238, 2000. 40
- Ohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.
- Orita *et al.*, *Genomics*, 5:874-879, 1989.

- Packer *et al.*, *Circulation*, 106(17):2194-2199, 2002.
- Packer *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 344:1651-1658, 2001.
- PCT Appln. PCT/US87/00880
- PCT Appln. PCT/US89/01025
- PCT Appln. WO 88/10315
- PCT Appln. WO 89/06700
- PCT Appln. WO 93/22456 10
- PCT Appln. WO 95/11995
- PCT Appln. WO89/06700
- PCT Appln. WO90/01069
- PCT Appln. WO91/02087
- PCT Appln. WO92/15712
- Perez *et al.*, *Nature Med.*, 9:1300-1305, 2003.
- Physicians Desk Reference”
- Pollock *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 66:603-607, 1990. 20
- Port *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 60(4):629-631, 2001.
- Prezant *et al.*, *Hum. Mutat.*, 1:159-164, 1992.
- Rathz *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 39:155-160, 2002.
- Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580
- Rockman *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 64(19):1344-1348, 1989.
- Ruano *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19:6877-6882, 1991.
- Ruano *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:8392, 1989. 30
- Sallach *et al.*, *Ann. Med.*, 35:259-266, 2003
- Salomon, *Methods Enzymol.*, 195:22-28, 1991.
- Sambrook *et al.*, *In: Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Sanger *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 94:441, 1975.
- SAS (r) proprietary software, release 6.12. Cary, NC: SAS Institute, 1996
- Sederberg *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 35(2) 207A:147, 2000. 40
- Sheffield, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:232-236, 1989.
- Silke *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 30(6):817-823, 1997.

- Small *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:23059-23064, 2000.
- Small *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 347:1135-1142, 2002.
- Sofowora *et al.*, *Clin Pharmacol Ther.*, 73:366-71, 2003.
- Sokolov, *Nucl. Acids Res.* 18:3671, 1990.
- Stephen, *Am. J. Cardiol.*, 18:463-472, 1966.
- Stevens *et al.*, *Biotechniques*, 34:198-203, 2003.
- Strosberg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37:421-450, 1997. 10
- Swedberg *et al.*, *Circulation*, 105(15):1797-803, 2002.
- Swedberg *et al.*, *Circulation*, 82(5):1730-1736, 1990.
- Swedberg *et al.*, *Eur. Heart J.*, 17(9):1306-1311, 1996.
- Taillon-Miller *et al.*, *Genome Res*, 8(7):748-754, 1998.
- Taylor *et al.*, *Cong. Heart Failure*, 10:281-288, 2004.
- The Merck Index, Eleventh Edition
- Trial Investigators, 2001
- Turki, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:1635-1641, 1995. 20
- Ugozzoli *et al.*, *GATA* 9:107-112, 1992.
- van Campen *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 32 Suppl 1:S31-S35, 1998.
- Waagstein *et al.*, *Lancet.*, 342:1441-1446, 1993.
- Wagoner *et al.*, *Am. Heart J.*, 144(5):840-846, 2002.
- Walker, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396, 1992.
- Wartell, *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:2699-2706, 1990.
- Wedel *et al.*, *Am. Heart J.*, 142:502-511, 2001. 30
- White *et al.*, *Eur. J. Heart Fail.*, 5:463-468, 2003.
- Winter, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:7575, 1985.
- Xameterol Study Group, 1990
- Yancy *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29:284A, 1997.
- Yancy *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 344(18):1358-1365, 2001.
- Yang-Feng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1516-1520, 1990.
- Zhu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(4):1607-12, 2001. 40

【図面の簡単な説明】

【0428】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある種の局面をさらに実証するために含まれる。本明細書において示される具体的な態様の詳細な説明と併せてこれらの図面の一つまたは複数を参照することで、本発明をよりよく理解することができる。

【図1】ブシンドロールを含めて、いくつかの遮断薬の化学構造が示されている。

【図2】第II相もしくは第III相の心不全臨床試験データまたはその他の開発データに基づく種々の抗アドレナリン剤および処置の比較表。

【図3】この図は₁Arg389または₁Gly389を安定的に発現している細胞でのブシンドロールの対立遺伝子特異的な効果を図示している。結果は実験4回の平均±SEである。 50

【図4】棒グラフは、心臓に対してGly389およびArg389 α_1 ARの標的化過剰発現を有するトランスジェニックマウスでの遮断に対する応答を図示している。 α_1 -Arg389および α_1 -Gly389マウス(各群中n=3~4)の心臓に由来する表示のタンパク質に対するウエスタンブロットの平均(\pm SE)の結果が示されている。データは対照(未処置)の値に対して正規化されている。プロプラノロールに対する全体的な処置応答は α_1 -Arg389マウス由来の心臓でのみ認められた(ANOVAによる $P<0.002$)。

【図5】これは α_1 AR遺伝子型によって層別化された心不全の転帰に対する危険率および95%信頼区間を図示している。

【図6】このグラフは処置および α_1 AR遺伝子型によって層別化されたブシンドロール-プラセボ研究での患者の生存を図示している。

10

【図7】このグラフは処置および α_1 AR遺伝子型によって層別化されたブシンドロール-プラセボ研究での死亡または心不全による入院の複合エンドポイントに到達した可能性を図示している。

【図8】処置群による、3ヶ月および12ヶ月時点でのベースライン時のノルエピネフリン量からの変化 \pm SEM。AおよびBともに、バーの下のは、各時点でベースラインおよび間隔測定を受けた各群中の患者数であり; p値は各処置群での変化の比較を表す。

【図9】ベースライン時のノルエピネフリンの四分位数による、原因を問わない死亡率の第1四分位数に対する危険率。四分位数を規定するノルエピネフリン切点は第1、304 pg/ml; 第2、305 pg/ml~436 pg/ml; 第3、437 pg/ml~635 pg/ml; 第4、636 pg/mlである。四分位数当たりの患者数は、プラセボ群 第1 294、第2 255、第3 248、第4 264; ブシンドロール群 第1 239、第2 274、第3 284、第4 267である。

20

【図10】ベースライン時のノルエピネフリンの四分位数による、原因を問わない死亡率およびCHFによる入院の複合エンドポイントの第1四分位数に対する危険率。

【図11】3ヶ月時のノルエピネフリンの変化 対 その後の原因を問わない死亡率の、プラセボおよびブシンドロール処置群に対する尤度解析。

【図12】心不全を起こしていないおよび心不全を起こしたヒト心室のエクスピボ伸縮反応は α_1 AR遺伝子型と相互関連する。方法で記述されているように心不全を起こしていないおよび心不全を起こしたヒト心臓から右心室小柱を使用した。心臓11個から得た小柱を4群のそれぞれで研究した。Arg strps (短タンデム重複多型)は全てホモ接合性の被験者から得た。Gly保有者はヘテロ接合体が非心不全群で10名および心不全群では9名からなり、残りはGlyについてホモ接合性であった。用量反応曲線から導かれる最大反応は非心不全での研究($P=0.01$)と心不全での研究($P=0.008$)の両方で、Arg389の場合にいっそう大きかった。

30

【図13】心不全を起こしたヒト心臓由来の単離右心室小柱での最大収縮力(mN/mm^2)に及ぼすブシンドロールまたはキサモテロールの漸増用量の効果。用量反応曲線は、 α_1 -ARシグナル伝達を促進するための 10^{-5} Mフォルスコリンによる前処理なし(ブシンドロール、パネルA; キサモテロール、パネルC)およびあり(ブシンドロール、パネルB; キサモテロール、パネルD)で実施された。フォルスコリン前処理実験では、フォルスコリン単独の小柱を処理時間の間中インキュベートさせておき、収縮力に及ぼす任意の影響をブシンドロールまたはキサモテロール処理の小柱から取り除いた。*, = $p<0.05$ 対 ベースライン時の張力; †, $p<0.10$ 対 ベースライン時の張力; §, $p<0.05$ 対 曲線全体に対し0の勾配; ¶, $p<0.05$ 対 10^{-9} M~ 10^{-6} Mの用量に対し0の勾配; 大括弧に付随するp値は曲線勾配間の相互関係の検定を表し、1番目のp値は 10^{-9} M~ 10^{-6} Mの、および2番目のp値は曲線全体の用量を表す。

40

【図14】慢性心筋 α_1 アドレナリン作用性刺激の相反する結果。

【図15】リスク群およびブシンドロール処置患者のノルエピネフリン変化の特徴。標準偏差(SD)が図表中に含まれている。

【図16】リスク群およびブシンドロール処置患者のノルエピネフリン変化のさらなる特徴。標準偏差(SD)が図表中に含まれている。

【図17】BEST患者における α_2c AR遺伝子型と全身のノルエピネフリン量との間の相関関

50

系の図解。

【図18】 2cAR遺伝子型と3ヶ月後のBEST患者における全身性ノルエピネフリン反応(pg ± SEM)との間の相関関係の図解。

【図19】 2cAR遺伝子型、3ヶ月後のBEST患者における全身性ノルエピネフリン反応(pg ± SEM)と、BEST患者間の処置群による生存との間の相関関係。

【図20】単離ヒトRV小柱においてイソプロテレノール反応に及ぼす 1-AR Arg/Gly389 遺伝子変異体の効果。A. 心不全を起こしたホモ接合性 1-AR Arg389保有者でのIso反応。B. 心不全を起こした 1-AR Gly389保有者でのIso反応。C. 心不全を起こしていないホモ接合性 1-AR Arg389保有者でのIso反応。D. 心不全を起こしていない 1-AR 389Gly保有者でのIso反応。

【図21】BESTにおける 2c-ARおよび 1-AR遺伝子変異体:処置効果(死亡率)。

【図22】米国人個体群での 遮断薬の死亡率試験、死亡危険率 ± 95% C.I.

【図23】NF hRV小柱において収縮機能に及ぼす 遮断剤の効果。

【図24】10 μMフォルスコリン(F)処置によるシグナル伝達の増幅を伴うNF hRV小柱において収縮機能に及ぼす 遮断剤の効果。

【図25】心不全hRV小柱において収縮機能に及ぼす 遮断剤の効果。

【図26】10 μMフォルスコリン(F)処置によるシグナル伝達の増幅を伴う心不全hRV小柱において収縮機能に及ぼす 遮断剤の効果。

【図27】研究デザインI。

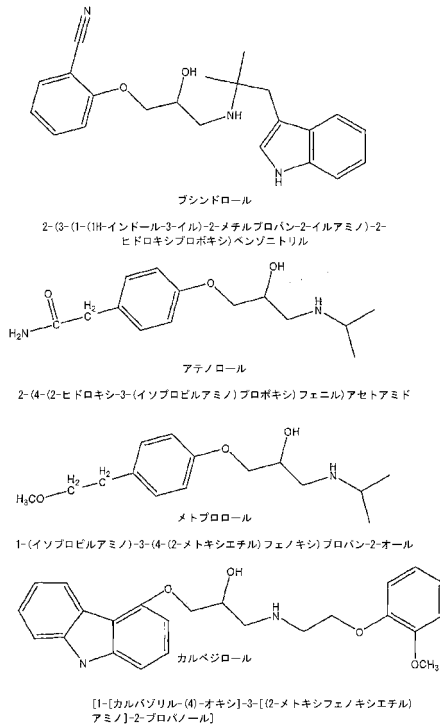
【図28】研究デザインII。

【図29】研究デザインIII。

10

20

【図1】



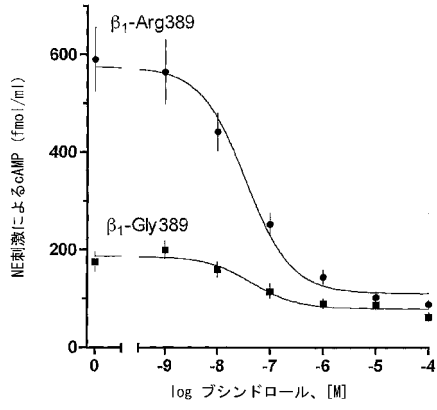
【図2】

第III相もしくは第III相の心不全臨床試験データを有する、または開発中の抗アドレナリン剤/処置

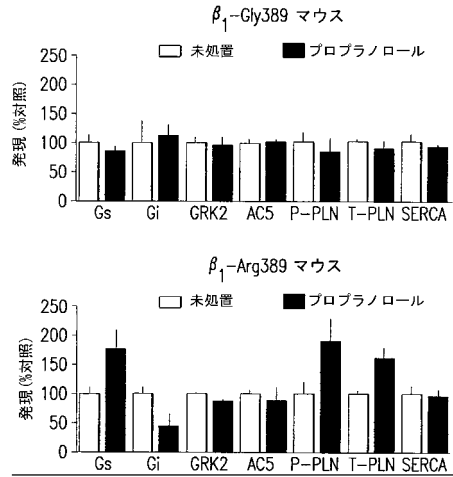
化合物、 (装置)	薬理学的特性 (0~4+)					交感神経遮断
	β1-AR 遮断	β2-AR 遮断	α1-AR 遮断	ISA、 ヒト	GNMB* 逆アゴニズム	
メトプロロール	+++	++	0	0	0	0
ピソプロロール	+++	++	0	0	0	0
カルベジロール	+++	+++	+++	0	+	+
ブシンドロール	+++	+++	+	0	+	+++
ネビボロール	+++	+	0	0	0	?
モキシジジン	0	0	0	0	0	+++
クロニジン	0	0	0	0	0	+++
(運動能阻害剤)	0	0	0	0	0	+++

*. グアニンヌクレオチド阻害可能なまたはアゴニスト結合、αGsに 拮抗する能力

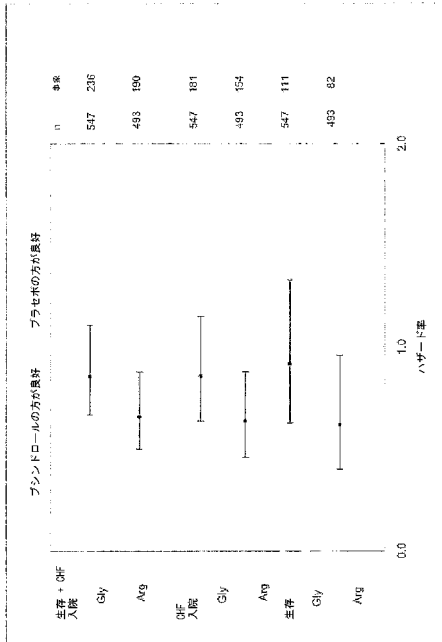
【 図 3 】



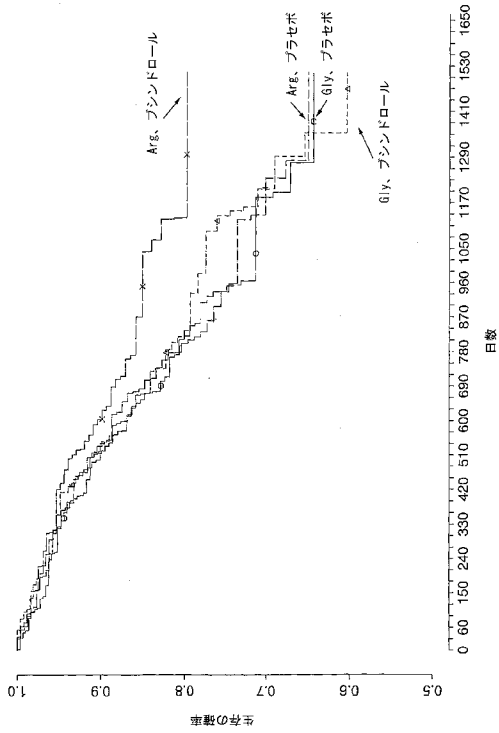
【 図 4 】



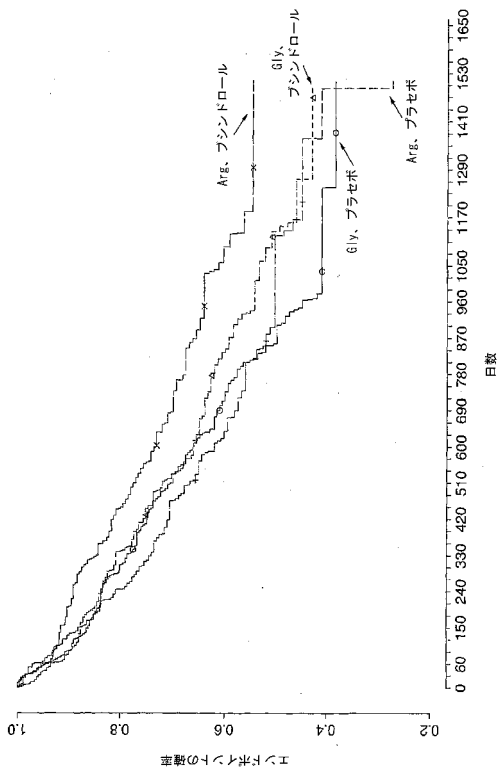
【 図 5 】



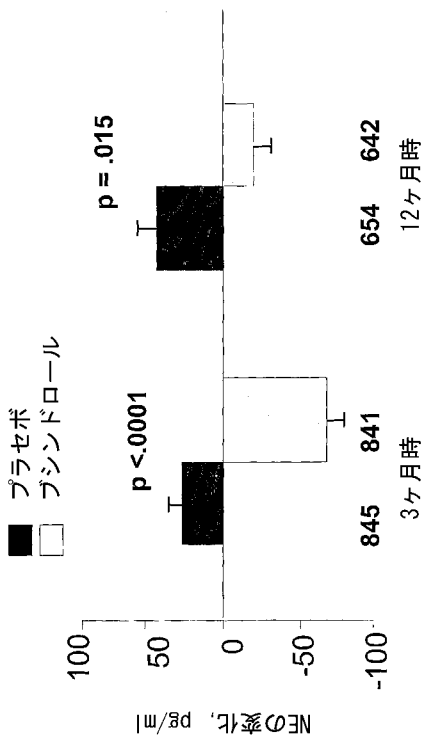
【 図 6 】



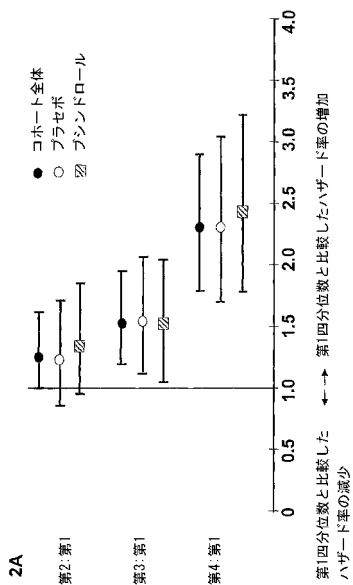
【 図 7 】



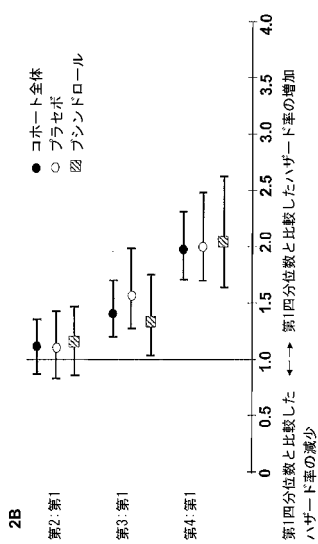
【 図 8 】



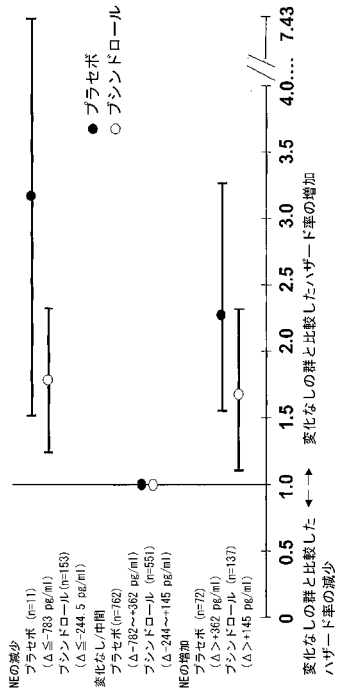
【 図 9 】



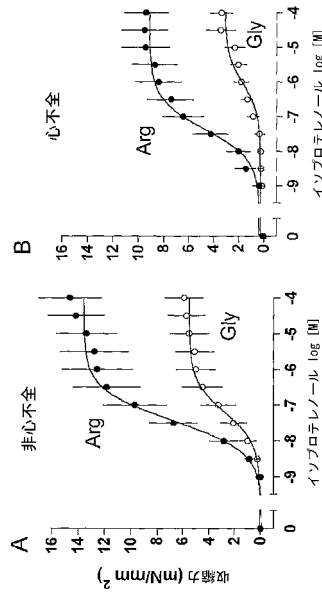
【 図 10 】



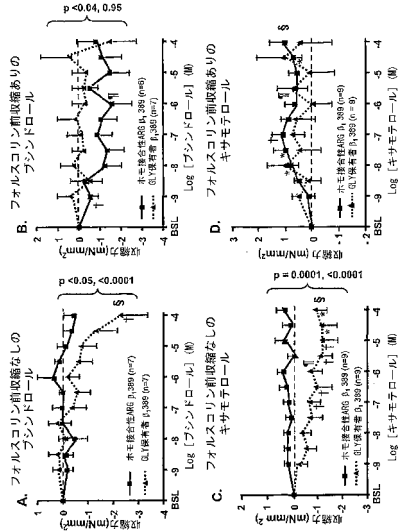
【 図 1 1 】



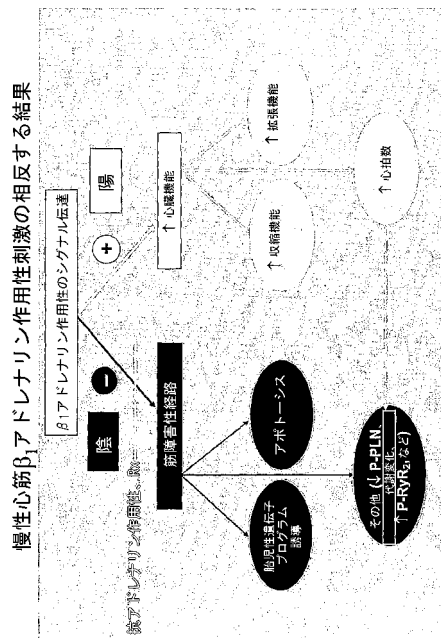
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

リスク群、プシンドロール処置患者のNE変化の特徴(±SD) (1)

パラメータ	NE Δ > 244.5 (n = 153)	NE Δ ≤ 244.5, + (n = 551)	NE Δ > 145 (n = 137)
ベースライン時のNE, pg/ml	932* ± 544	422 ± 189	409 ± 199
3 mo NE Δ, pg/ml	-529* ± 458	-44 ± 103	-326* ± 244
クラスIII/IV	86/14*	93/7	93/7
ベースライン時のHR-BPM	95.5 ± 13.8	81.0 ± 13.0	80.6 ± 13.7
処置後の目録	13.6 ± 14.3	9.1 ± 12.3	7.1 ± 12.3
年齢	50 ± 11	50 ± 11	50 ± 11
CVT (mmHg)	79/21	81/16	82/18

p < .05 対 中間群, * p < .10 対 中間群

【 図 1 6 】

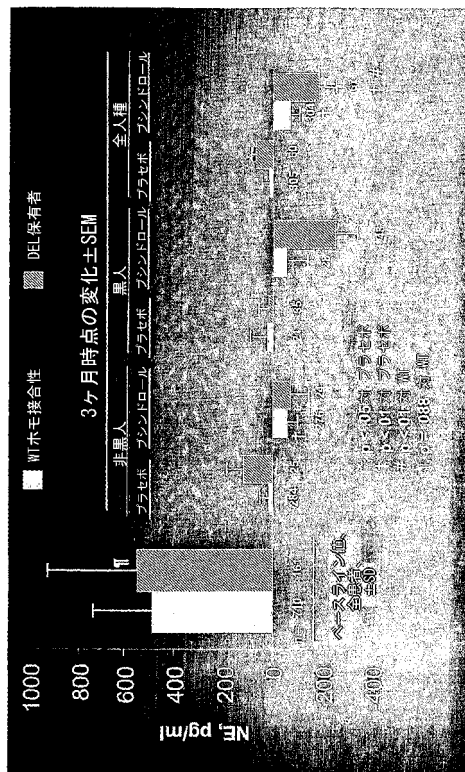
リスク群、プシンドロール処置患者のNE変化の特徴(±SD) (2)

パラメータ	NE Δ > 244.5 (n = 153)	NE Δ ≤ 244.5, + (n = 551)	NE Δ > 145 (n = 137)
死亡数 (%)	52 (34%)*	114 (21%)	43 (31%)
CHFの罹患期間、月数中央値	36.0	31.0	31.0
原因 (非血栓性/血栓性)	46/54	42/58	31/69*
女性/男性 (%)	74/26	80/20	77/23
LVESV (ml)	204	221	233
EF (%)	33	37.0	37
RVESV (ml)	320	365	322
RV EF (%)	13	15.5	15.0
NYCTの割合 (%)	40	35	42
副作用 (%)	38.4	32.4	34.0

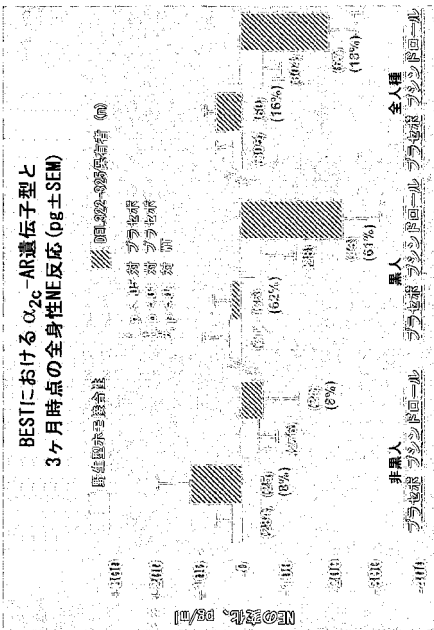
p < .05 対 中間群, * p < .10 対 中間群

【 図 1 7 】

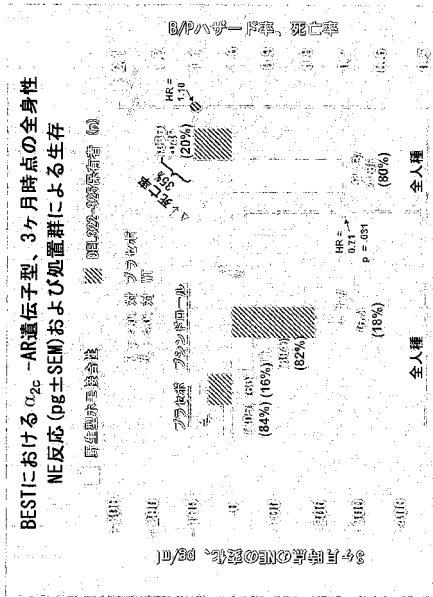
BESTIにおける α_{2c}-AR遺伝子型と全身のNE



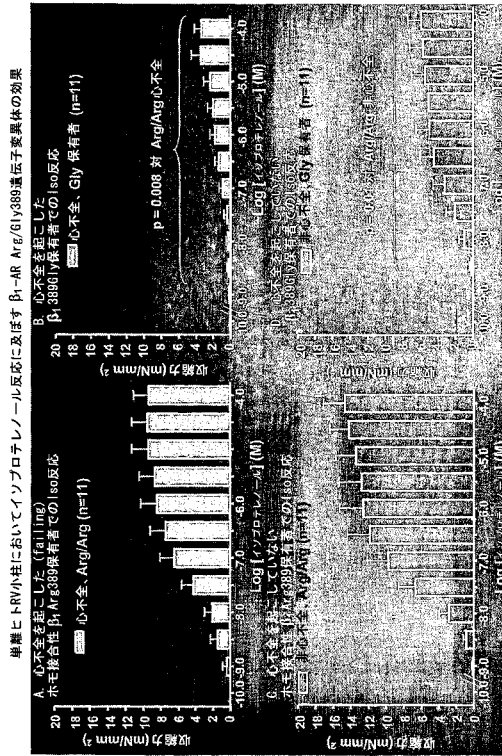
【 図 1 8 】



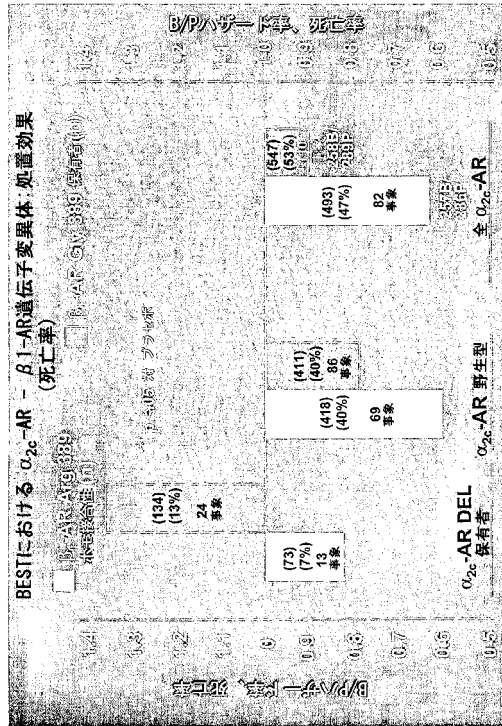
【 図 19 】



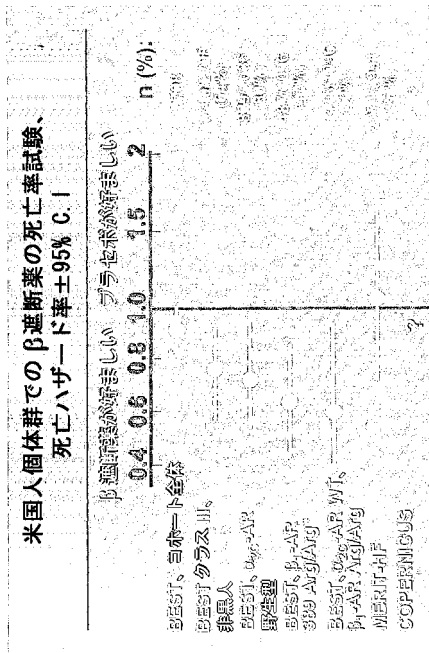
【 図 20 】



【 図 21 】

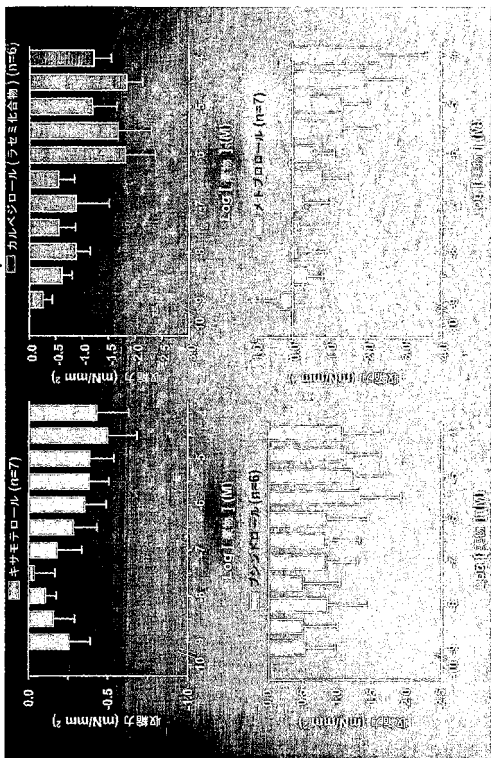


【 図 22 】



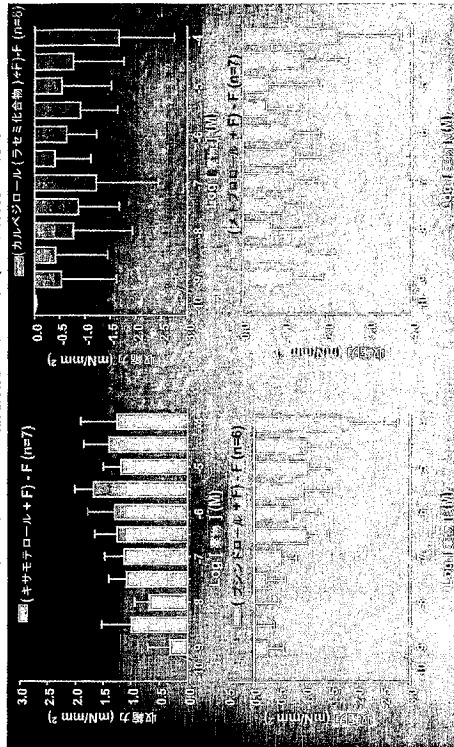
【 図 2 3 】

NF hRV小柱において収縮機能に及ぼすβ遮断剤の効果



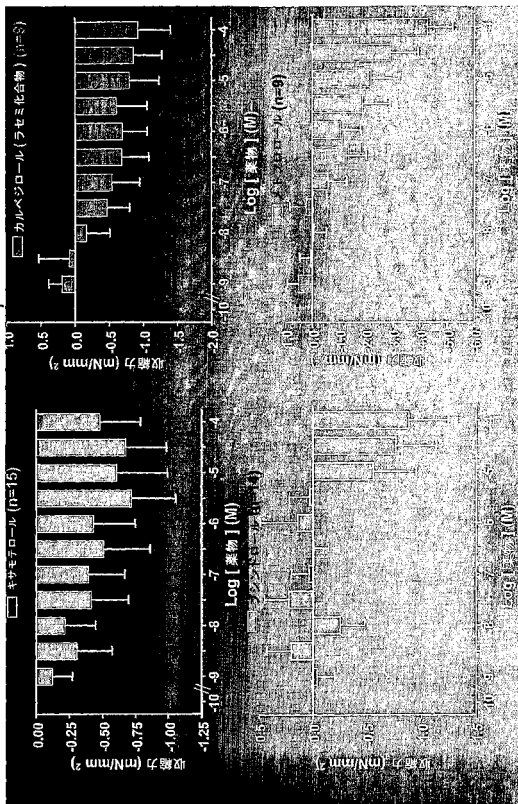
【 図 2 4 】

10 μM フォルスコリン(F)によるシグナル伝達の増幅を伴う NF hRV小柱において収縮機能に及ぼすβ遮断剤の効果



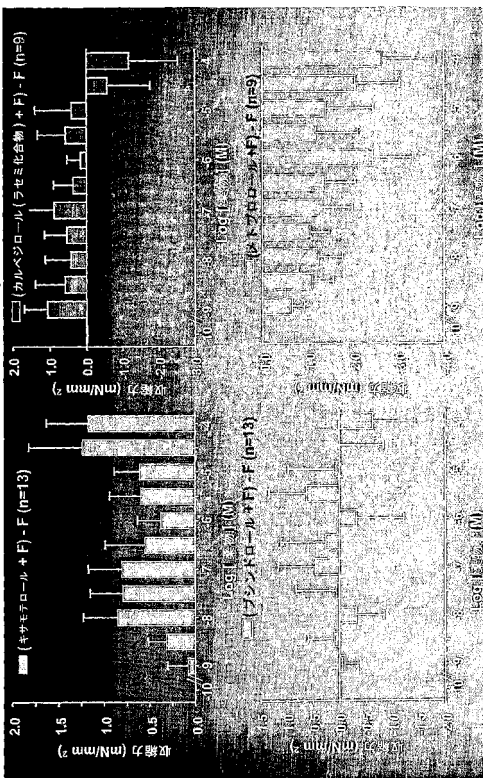
【 図 2 5 】

心不全hRV小柱において収縮機能に及ぼすβ遮断剤の効果



【 図 2 6 】

10 μM フォルスコリン(F)によるシグナル伝達の増幅を伴う 心不全hRV小柱において収縮機能に及ぼすβ遮断剤の効果



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	9/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P	9/06 (2006.01)	A 6 1 P 9/06
A 6 1 P	25/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/06
A 6 1 P	25/22 (2006.01)	A 6 1 P 25/22
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(72)発明者 ブリストー マイケル

アメリカ合衆国 コロラド州 エングルウッド ブラックマー ロード 5

(72)発明者 リゲット ステファン ビー .

アメリカ合衆国 メリーランド州 クラークスビル ブライトン ダム ロード 1 2 9 8 6

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第02/071070(WO, A1)

国際公開第2004/023101(WO, A1)

篠山重威, 心不全の薬物治療の変遷(最終回), B I O C l i n i c a , 2004年 6月20日, Vol. 19, No. 7, p. 94 - 99

The New England journal of medicine. 2002, Vol.347, No.15, p.1135-1142

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

