

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-516718

(P2007-516718A)

(43) 公表日 平成19年6月28日(2007.6.28)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2006-546470 (P2006-546470)	(71) 出願人	505252241
(86) (22) 出願日	平成16年11月3日 (2004.11.3)		ラッパポート・ファミリー・インスティテュート・フォー・リサーチ・イン・ザ・メディカル・サイエンス
(85) 翻訳文提出日	平成18年8月25日 (2006.8.25)		RAPPAPORT FAMILY INSTITUTE FOR RESEARCH IN THE MEDICAL SCIENCES
(86) 国際出願番号	PCT/IL2004/001006		イスラエル国ハイファ31 096・ピーオーボックス9697・エフロンストリート (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02005/062706		Efron Street, P. O. B OX 9697, 31 096 Haifa, Israel
(87) 国際公開日	平成17年7月14日 (2005.7.14)		
(31) 優先権主張番号	10/748,177		
(32) 優先日	平成15年12月31日 (2003.12.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高血糖患者の心血管系疾患の予防に抗酸化療法が有効であることを予測する方法

(57) 【要約】

【課題】特定のDM患者が心血管系疾患の発症リスクが低いか、特定のサブグループの患者に予防的抗酸化療法が有効であることを予測する方法を提供する。

【解決手段】糖尿病患者の血管合併症の治療に抗酸化療法が有効である可能性を測定する方法で、糖尿病患者のハプトグロビン表現型を測定する方法と、それによって糖尿病患者に抗酸化療法が有効である得る可能性を測定する方法が含まれている。ハプトグロビン表現型2-2型を有する患者は、ハプトグロビン表現型1-2型又はハプトグロビン表現型1-1型の患者よりも、抗酸化療法が有効である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

糖尿病患者の血管合併症の治療に、抗酸化療法が有効である可能性を判定する方法であって、

前記糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定し、

それによって前記抗酸化療法が有効か、前記糖尿病患者の前記可能性を判定する前記方法を含み、

ハプトグロビン表現型 2 - 2 型を有する患者は、ハプトグロビン表現型 1 - 2 型又はハプトグロビン表現型 1 - 1 型を有する患者と比較して、前記抗酸化療法がより有効であることを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記血管合併症が、微小血管合併症及び大血管合併症からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記血管合併症が、慢性心不全、心血管系死亡、脳卒中、心筋梗塞及び再狭窄による冠動脈形成術からなるグループから選択される大血管合併症であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記微小血管合併症が、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシー及び糖尿病性神経障害からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記大血管合併症が、冠動脈の側副血管が少ないこと及び心筋虚血からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ハプトグロビン表現型の前記判定が、前記糖尿病患者のハプトグロビン遺伝子型を判定することによって行われることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記糖尿病患者の前記ハプトグロビン遺伝子型を判定する前記手段が、信号増幅法、直接観測法及び少なくとも 1 つの配列変化の検出法からなるグループから選択される方法によって実行されることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記信号増幅法が、DNA 分子及び RNA 分子からなるグループから選択される分子を増幅することを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記信号増幅法が、PCR、LCR (LAR)、自律合成反応 (3SR / NASBA) 及び Q - ベータ (Q) レプリカーゼ反応からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記直接観測法が、サイクリングプローブ反応 (CPR) 及び分岐 DNA 解析からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの配列変化の検出法が、制限断片長多型 (RFLP 解析)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) 解析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 / 温度勾配ゲル電気泳動 (DGGE / TGGE)、一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析及びジデオキシフィンガープリント法 (ddF) からなるグループから選択される方法を用いることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ハプトグロビン表現型の前記判定が、前記糖尿病患者の前記ハプトグロビン表現型を直接判定することによって行われることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

50

前記ハプトグロビン表現型を判定する手段が、免疫学的検出法によって実行されることを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記免疫学的検出法が、ラジオイミュノアッセイ (R I A)、酵素免疫測定法 (E L I S A)、ウエスタンブロット法、免疫組織化学法及び蛍光活性化細胞分類 (F A C S) からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

糖尿病性の血管合併症を予防するために、糖尿病患者の酸化的ストレスを減少する重要性を判定する方法であって、

前記糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定する手段と、

それによって特定の前記糖尿病患者の前記酸化的ストレスを減少する前記重要性を判定する方法とを含み、

ハプトグロビン表現型 2 - 2 型を有する患者は、ハプトグロビン表現型 1 - 2 型又はハプトグロビン表現型 1 - 1 型を有する患者と比較して、前記酸化的ストレスを減少する前記重要性がより大きいことを特徴とする方法。

【請求項 1 6】

前記血管合併症が、微小血管合併症及び大血管合併症からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記血管合併症が、慢性心不全、心血管系死亡、脳卒中、心筋梗塞及び再狭窄による冠動脈血管形成術からなるグループから選択される大血管合併症であることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記微小血管合併症が、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシー及び糖尿病性神経障害からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記大血管合併症が、冠動脈の側副血管が少ないこと及び心筋虚血からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ハプトグロビン表現型を判定する前記手段が、糖尿病患者のハプトグロビン遺伝子型を判定することによって行われることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記糖尿病患者の前記ハプトグロビン遺伝子型を判定する前記手段が、信号増幅法、直接観測法及び少なくとも 1 つの配列変化の検出法からなるグループから選択される方法によって実行されることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記信号増幅法が、D N A 分子及び R N A 分子からなるグループから選択される分子を増幅することを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記信号増幅法が、P C R、L C R (L A R)、自律合成反応 (3 S R / N A S B A) 及び Q - ベータ (Q) レプリカーゼ反応からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記直接観測法が、サイクリングプローブ反応 (C P R) 及び分岐 D N A 解析からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記少なくとも 1 つの配列変化の検出法が、制限断片長多型 (R F L P 解析)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (A S O) 解析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 / 温度勾配ゲル電気泳動 (D G G E / T G G E)、一本鎖 D N A 高次構造多型 (S S C P) 解析及びジデオキシ指紋法 (d d F) からなるグループから選択される方法を用いることを特徴と

10

20

30

40

50

する請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記ハプトグロビン表現型を判定する前記手段が、前記糖尿病患者の前記ハプトグロビン表現型を直接測定することによって行われることを特徴とする請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ハプトグロビン表現型を判定する前記手段が、免疫学的検出法によって実行されることを特徴とする請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記免疫学的検出法が、ラジオイミュノアッセイ (R I A)、酵素免疫測定法 (E L I S A)、ウエスタンブロット法、免疫組織化学解析、及び蛍光活性化細胞分類 (F A C S) からなるグループから選択されることを特徴とする請求項 2 7 に記載の方法。 10

【請求項 2 9】

糖尿病患者の血管合併症の治療に、抗酸化療法が有効である可能性を評価するためのキットであって、

前記キットが、前記糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定するためのパッケージ化された試薬を含み、

前記キットのラベル又は説明書には、キットは糖尿病患者の血管合併症の治療に、抗酸化療法が有効である可能性を評価するために使用する旨を表示してあることを特徴とするキットである。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は糖尿病患者の心血管系疾患の予防のため、抗酸化物質を補給した場合の予測効果を判定する方法に関し、ハプトグロビン 2 型の対立遺伝子の多型に基づいている。

【背景技術】

【0002】

心血管系疾患 (C V D) は、2 型糖尿病の合併症で最も頻繁に発生し、症状は重く、費用がかかる¹。それは糖尿病を患った期間に関係なく、2 型糖尿病患者の主要死亡原因である²。いくつかの集団ベースの試験は、これと矛盾しない結果を示しており、糖尿病患者が C V D に罹る相対リスクは非糖尿病の人に比較して数倍高い^{3 - 7}。この増加リスクは女性に更に当てはまる^{4、5、8}。高血圧症、高脂血症及び喫煙のようなリスク要因は、それぞれ糖尿病患者において C V D が進展する相対リスクを互いに独立した要因として増加させるが、糖尿病による影響は従来のリスク要因とはやはり独立して存在する⁹。 30

【0003】

試験が行われた全集団において、糖尿病患者の C V D 発生率は非糖尿病の人と比較して高く、また糖尿病患者の C V D の相対リスクには、地域及び民族間で明らかな違いがあるが、これらグループ間の従来の心臓病のリスク要因における相違によって説明が完全に行われているわけではない^{10 - 20}。例えば、英国に住む異なる民族グループにおける C V D の相対リスクの分析では、南アジア生まれの患者は明らかに高いリスクを有しており^{12、15}、一方でアフリカ系カリブ人の糖尿病患者は、ヨーロッパ生まれの糖尿病患者と比較して、C V D のリスクは明らかに低い^{14、16}。 40

【0004】

これらの試験は、遺伝子の違いが糖尿病患者の C V D の罹りやすさの違いの原因であり得ることを示唆している。

【0005】

本発明を考えるにあたって、その 1 つの可能性はハプトグロビン遺伝子の機能的な対立遺伝子の多型にあるという仮説が立てられた。

【0006】

ハプトグロビン (H p) は、ヘモグロビンと結合する血清蛋白質であり、ヘム主導の酸 50

化的ストレスに対する防御に重要な役割を果たす^{2 3}、^{2 4}。H p 遺伝子が欠乏している鼠は酸化的ストレスが劇的に増加し、酸化組織は特に腎臓にダメージを与えることを明らかにしている。人間にはH p (1型及び2型) という2つの一般的な対立遺伝子があり、主に3つの表現型、1 - 1型、2 - 1型及び2 - 2型で表す^{2 1} - ^{2 3}。

【0007】

その3つの表現型のヘモグロビン結合能力の機能的な相違は実証されている。H p 1 - 1表現型を有する患者のH p は、ハプトグロビン2型の対立遺伝子の生成物を含むH p よりも、1グラム当たり、より多くのヘモグロビンを結合することができる^{2 3}。ハプトグロビン表現型1 - 1型を有する患者のハプトグロビン分子もまた、更に抗酸化に優れている。なぜなら、ハプトグロビン1 - 1型のサイズはハプトグロビン2型の対立遺伝子の生成物と比較して小さいので、血管外の部位の酸化組織障害への進入を容易にするからである。これはハプトグロビン1 - 1型を有する患者は、ハプトグロビンの著しく大きな系球体を濾過することも含んでいる^{2 2}。

10

【0008】

ハプトグロビン2型の対立遺伝子は、約2000万年前の部分的な遺伝子重複を経て1型の対立遺伝子から発生し、感染因子に対する抵抗力に関連した選択圧によって全世界の住民に広まった^{2 4}、^{2 5}。現在ハプトグロビンの対立遺伝子は、異なる民族グループ間で相対度数が劇的に異なっている^{2 6}。遺伝子重複は、2つの対立遺伝子それぞれでエンコードされたハプトグロビン蛋白質の、生物物理的性質及び生化学的性質に劇的な変化を引き起こした。例えば1型の対立遺伝子の蛋白質生成物は、2型の対立遺伝子によって生成されたものと比較して、抗酸化に優れた物質である^{2 3}。ハプトグロビン表現型の様々な個体、1 - 1型、2 - 1型又は2 - 2型は、10マイクロリットルの血漿からゲル電気泳動によって容易に判定される。

20

【0009】

ハプトグロビン表現型は、糖尿病患者における多数の微小血管合併症の進展を予測できることが明らかにされた^{2 7} - ^{2 9}。特にハプトグロビン1型の対立遺伝子がホモ接合体である患者は、網膜症及び腎症が進展するリスクが減少することが分かった。少なくとも腎症について、1型及び2型糖尿病患者の両方でこの結果が観察され、その妥当性はハプトグロビン2型の対立遺伝子の数と腎症の進展に関する勾配効果の研究結果によって強まった^{2 9}。更にハプトグロビン表現型は、糖尿病患者の大血管合併症の進展を予測し得ることが分かった。我々は経皮的冠動脈血管形成術後の再狭窄の進展が、ハプトグロビン表現型1 - 1型を有する糖尿病患者では著しく減少することを明らかにした^{2 7}、^{3 0}。以前の後向き且つ横断的な試験では、母集団におけるハプトグロビン表現型及び冠動脈疾患について調査し、矛盾する結果を生じた^{3 1} - ^{3 8}。糖尿病患者のアテローム動脈硬化性冠動脈疾患の進展に対するハプトグロビン表現型の役割が調査されていなかった。

30

【0010】

アメリカンインディアンは、以前は冠動脈疾患の進展に対して抵抗力があると思われていたが、現在はC V Dの発生が多発している^{2 0}。このC V Dの発生率の増加は、この民族で2型糖尿病が急激に増加しているためである¹、²。ストロング・ハート・スタディ (Strong Heart Study) は、1988年から現在まで、3つの対象地域におけるアメリカンインディアンの心血管系疾患の発生率、罹患率及びリスク要因について継続して調査を行ってきた^{2 0}。この民族の患者の相対的な遺伝的等質性は、糖尿病患者のC V D疾患の原因となる特定の遺伝子要因の同定を可能にし得る。

40

【0011】

従って、米国特許第6, 613, 519号のストロング・ハート・スタディからの症例/対照サンプルで、初めてハプトグロビン表現型による糖尿病患者のC V Dの相対リスクを判定するための相関関係が作られた。

【0012】

いくつかの従来技術は、ハプトグロビン表現型と疾患とを関連付ける方法を示している。W O 9 8 / 3 7 4 1 9 は、ハプトグロビン表現型を判定する方法及びキットを示してお

50

り、特に人ハプトグロビンについての発明に関連している。この発明は独立したリスク要因としてハプトグロビン表現型 2 - 2 型の使用に焦点を当てており、特に難治性の本態性高血圧症における標的臓器障害の関係、(母集団における)アテローム性動脈硬化と急性心筋梗塞の関係及び HIV 感染による死亡の関係に焦点を当てている。この発明は、DM の心血管系疾患のリスク要因としてのハプトグロビン表現型の使用を示していない。ハプトグロビン表現型 2 - 2 型は、患者が酸化ストレスを受けやすい傾向があるため、DM の心血管系疾患について、表現型 2 - 2 型をネガティブな予測の判断材料に使用することが、この発明で間接的に示されていると議論され得る。しかしながら、この発明はハプトグロビン表現型 1 - 1 型が、DM が心血管系疾患になる傾向の減少又は抗酸化物質の補給の効果について、ポジティブな予測の判断材料であるというアイデアを含んでいない。実際、最近の研究で、PCT WO 98 / 37419 の出願人は反対の結果を報告し、Hp 1 - 1 患者は心血管系疾患による死亡に対して高リスクであると結論付けている (De Bacquer et al, *Atherosclerosis* 2001; 157: 161-6)。ハプトグロビン表現型と疾患との有益な相関関係を導き出すことは、慎重且つ創造的な分析を必要とする。なぜなら多くの研究が何の結果も出せないか又は混乱するような結果を報告しているからである (Buhlin et al *Eur Heart J* 2003; 24: 2099-107、Lind et al *Angiology* 2003; 54: 401-10、Hong et al *Hum Hered* 1997; 47: 283-7)。

10

【0013】

つまり、母集団の中の Hp 表現型 2 - 1 型又は 2 - 2 型に生じる酸化ストレスは、血管合併症に導くとされてきた。いくつかの血管合併症は、DM に伴う酸化ストレスに関係があることも知られている。しかしながら、現時点で Hp 表現型 1 - 1 型が、糖尿病患者の血管合併症予防のための抗酸化薬補給に対する反応に影響を及ぼせるか明らかになっておらず、予測されてもいない。

20

【0014】

PCT WO 98 / 37419 は、ハプトグロビンと結合するパートナーの使用を含んでいる。PCT WO 98 / 37419 によれば、結合するパートナーは少なくとも 2 ヶ所でハプトグロビンと結合する様々な分子であって良い。その位置はペプチド、抗体又はその一部で形成されて良く、又レクチン、細胞受容体、分子インプリント又は細菌性抗原又はその一部で形成されて良い。この発明は化膿連鎖球菌の T4 抗原の使用に特に焦点を当てている。全てのハプトグロビンは、鎖及び鎖の両方を含んでいる。鎖は全てのハプトグロビンで同一であるが、鎖はハプトグロビン遺伝子の 2 つの対立遺伝子間で異なっている。ハプトグロビンの鎖は、不等交差に基づく変異の結果であり、142 アミノ酸を含み、鎖の 83 アミノ酸と対照をなしている。鎖のアミノ酸残留物のユニーク配列 (Ala - Val - Gly - Asp - Lys - Leu - Pro - Glu - Cys - Glu - Ala - Asp - Asp - Gly - Gln - Pro - Pro - Pro - Lys - Cys - Ile、SEQ ID NO: 1) を除いては、鎖及び鎖は免疫学的に類似している。従って、このユニークなペプチド配列の様々な部分は、鎖及び鎖を含むハプトグロビンを識別するための抗体を増加するのに好適なエピトープであると、「Using Antibodies: A Laboratory Manual」(Ed Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)) に述べられており、これをあらゆる面においてここに言及したことで本願の一部とする。そのような抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体又はその様々な部分であって良く、当業者にとって既知の多くの技術の内のいずれかによって濃縮又は純化されても良い。加えて、この配列をエンコードしたヌクレオチド配列は、Hp 遺伝子型を識別するのに容易に用いることができる。

30

40

【0015】

抗酸化物質、ハプトグロビン及び糖尿病患者の心血管系疾患 (CVD) の予防: 成人糖尿病患者 (DM) の冠動脈疾患の総罹患率は 55% を超えているが、これに対して母集団は 2.4% である。CVD による死亡率を DM と非糖尿病の人で比較した場合、DM の方が男性では 2 倍、女性では 4 倍高い (Stamler, et al. *Diabetes Care* 1993; 16: 434-444)。酸化ストレスの増加は、糖尿病性の血管疾患に介在することを知られているいく

50

つかの信号変換経路の配位の活性化を説明する、魅力的な統合メカニズムを示唆する。(Nishikawa et al., Nature 2000; 404: 787-790)。高血糖及びグルコースの自己酸化の結果としてできた酸化環境は、終末糖化合物 (AGEs) (Ohgami et al., J Diabetes Complic 2002; 16: 56-59) 及び酸化低比重リポ蛋白質 (ox-LDL) (Steinberg D J Biol Chem 1997; 272: 20963-6) の生成をもたらし、糖尿病性の血管疾患で見られる病理学的及び形態学的変化に関わる多数の炎症性サイトカインの生成を刺激することができる。酸化仮説は、ビタミンEのような抗酸化物質がアテローム性動脈硬化のプロセスを明らかに遅らせることを実証した動物実験のデータによって支持される (Williams et al Atherosclerosis 1992; 94: 153-59)。しかしながら、インビトロ及び実験室の研究での有望な結果にもかかわらず、最近のいくつかの大規模で前向きなプラセボ対照試験は、主要な心血管系疾患の副作用の発生率を減少させる効果が、ビタミンE単独 (HOPE Study Investigators NE J Med 2000; 342: 154-160、Hodis et al, Circulation 2002; 106: 1453-59、Jiang et al, J Biol Chem 2002; 277: 31850-6)、又は他の抗酸化ビタミンとの併用 (GISSI, Lancet 1999; 354: 4477-55、Brown et al NE J Med 2001; 345: 1538-92、Marchioli et al, Lipids; 2001: 36 Suppl: S53-63、Waters et al, JAMA 2002; 288: 2432-40、Witztum et al Trends Cardio Med 2001; 11: 93-102) で得られることを支持する決定的な証拠を提供することができなかった。HOPE試験 (Heart Outcomes Prevention Evaluation: 無作為化二重盲検プラセボ対照試験) は、特に糖尿病患者のCVDを予防するビタミンE療法の効果について取り組む試験の1つであった (HOPE Study Investigators NE J Med 2000; 342: 154-160)。HOPE試験は、4年半に渡って400IUのビタミンEを連日投与した心血管(CV)のアウトカムで、何の臨床的有益性も実証することができなかった。いくつかの手段が、これらの試験におけるビタミンEの明白な機能不全を説明するために提示された。スタインバーグは、抗酸化療法の効果は、強い酸化的ストレスを経験した特定の患者のサブグループだけが証明し得ることを提示した (Steinberg et al Circulation 2002; 105: 2107-111)。

10

20

【0016】

糖尿病患者は、血糖値がインスリン又は経口血糖降下薬によって抑制され得るとしても、時間が経てば血管合併症を発症する。糖尿病患者において進展するリスクのある多くの血管合併症には、糖尿病性網膜症、糖尿病性白内障及び緑内障、糖尿病性ネフロパシー、糖尿病性神経障害、間欠性跛行及び壊疽、高脂血症及び高血圧症のような心血管障害、アテローム性動脈硬化及び冠動脈疾患が含まれる。アテローム性動脈硬化は、狭心症発作及び心臓発作の原因になることがあり、糖尿病患者は非糖尿病の人よりも発作が2倍起こりやすく、発生に男女差はない。

30

【0017】

増加する多数の証拠が、それらの糖尿病性の血管疾患は遺伝的に感受性の強い患者だけに進展していることを示している (UK Prospective Study Group Diab Care 1998; 21: 1271-77)。ハプトグロビン遺伝子は2つの主要な分類を有する多型であり、1型及び2型と表示される。ハプトグロビン遺伝子のこの多型は、糖尿病患者個人のCVDに対する独立したリスク要因であることが最近実証された (2003年9月2日付公表のレビュー他による米国特許第6,613,519号、本明細書後述の実施例I及び「Levy et al J Am Coll Card 2002; 40: 1984-90」を参照されたい)。ハプトグロビン2型の対立遺伝子がホモ接合体である糖尿病患者は、ハプトグロビン1型の対立遺伝子がホモ接合体である患者と比較して、CVDのリスクが5倍大きいことが分かった。同出願人は、ハプトグロビン2型の対立遺伝子の蛋白質生成物は、ハプトグロビン1型の対立遺伝子の蛋白質生成物と比較して、抗酸化能力が劣ることも実証した (Melamed-Frank et al Blood 2001; 98: 3693-98)。しかしながら、上述の研究は抗酸化物質の補給と糖尿病患者のCVDとの相関関係、抗酸化物質の補給とハプトグロビン表現型との相関関係、即ち抗酸化療法から得られる効果の予測に関するそのような相関関係の有用性を追求もしなければ、含んでもいない。従って、我々はハプトグロビン2型の対立遺伝子がホモ接合体である糖尿病患者

40

50

に対する抗酸化物質の補給が、心血管系疾患の副作用を予防する効果があると仮説を立てた。この仮説をテストするために、我々はH O P E試験からハプトグロビンの型で分類された参加者を抽出し、考えられる3つのハプトグロビンの型について、ビタミンE及びラミプリル治療による主要な心血管系評価項目の相対リスク比を判定した。

【0018】

特定のDM患者が心血管系疾患の発症リスクが低いと、そして特定のサブグループの患者に予防的抗酸化療法が有効であることを予測する方法が求められていることは広く認識されており、その方法を実現することは非常に有益である。そのような方法は、医師が利用可能な資源を最大限活用することで、各患者のリスクを最小限にすることができる。

【発明の開示】

10

【課題を解決するための手段】

【0019】

本発明によれば、糖尿病患者の血管合併症の治療に抗酸化療法が有効であることを判定する方法が提供される。その方法は糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定する方法と、それによって糖尿病患者に前記抗酸化療法が有効であることを判定する方法とを含み、ハプトグロビン表現型2-2型を有する患者は、ハプトグロビン表現型1-2型又はハプトグロビン表現型1-1型を有する患者と比較して、前記抗酸化療法がより有効である。

【0020】

本発明のまた別の実施態様によれば、糖尿病に伴う血管合併症を予防するべく糖尿病患者の酸化的ストレスを減少させる重要性を判定する方法が提供される。その方法は糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定する手段と、それによって特定の糖尿病患者の酸化的ストレスを減少させる重要性を判定することを含み、ハプトグロビン表現型2-2型を有する患者は、ハプトグロビン表現型1-2型又はハプトグロビン表現型1-1型を有する患者と比較して、酸化的ストレスを減少させる重要性が大きい。

20

【0021】

後述される本発明の好ましい実施態様における更なる特徴によれば、血管合併症は微小血管合併症及び大血管合併症からなるグループから選択される。

【0022】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、血管合併症は慢性心不全、心血管系死亡、脳卒中、心筋梗塞及び再狭窄による冠動脈血管形成術からなるグループから選択される大血管合併症である。

30

【0023】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、微小血管合併症は、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシー及び糖尿病性神経障害からなるグループから選択される。

【0024】

後述される本発明の好ましい実施態様における更なる特徴によれば、大血管合併症は、冠動脈の側副血管が少ないこと及び心筋虚血からなるグループから選択される。

【0025】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、ハプトグロビン表現型の判定は、糖尿病患者のハプトグロビン遺伝子型の判定によって行われる。

40

【0026】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、糖尿病患者のハプトグロビン遺伝子型を判定する手段は、信号増幅法、直接観測法及び少なくとも1つの配列変化の検出法からなるグループから選択される方法によって実行される。

【0027】

後述される本発明の好ましい実施態様における更なる特徴によれば、信号増幅法は、DNA分子及びRNA分子からなるグループから選択される分子を増幅する。

【0028】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、信号増幅法は

50

、PCR、LCR(LAR)、自律合成反応(3SR/NASBA)及びQ-ベータ(Q)レプリカーゼ反応からなるグループから選択される。

【0029】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、直接観測法は、サイクリングプローブ反応(CPR)及び分岐DNA解析からなるグループから選択される。

【0030】

後述される本発明の好ましい実施態様における更なる特徴によれば、少なくとも1つの配列変化の検出法は、制限断片長多型(RFLP解析)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)解析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動/温度勾配ゲル電気泳動(DGGE/TGGE)、一本鎖DNA高次構造多型(SSCP)解析及びジデオキシフィンガープリント法(ddF)からなるグループから選択される方法を用いる。

【0031】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、前記ハプトグロビン表現型の判定は、糖尿病患者のハプトグロビン表現型を直接判定することによって行われる。

【0032】

後述される本発明の好ましい実施態様におけるまた更なる特徴によれば、ハプトグロビン表現型を測定する手段は、免疫学的検出法によって実行される。

【0033】

後述される本発明の好ましい実施態様における更なる特徴によれば、免疫学的検出法は、ラジオイミュノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、ウエスタンブロット法、免疫組織化学法及び蛍光活性化細胞分類(FACS)からなるグループから選択される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

本発明は、高血糖患者の心血管系疾患の進展に対するリスクを評価する方法であり、適切な予防薬の投与を可能にする。特に本発明は、糖尿病患者の心血管系疾患(CVD)の予防に抗酸化療法が有効である可能性を評価する方法である。

【0035】

本発明の少なくとも1つの実施態様の詳細説明を行う前に、本発明は以下に記載される説明又は表示による詳細な構成要素の構造及び配置に対して、その内容が限定されるわけではないことを理解されたい。本発明は、別の実施態様又は様々な方法によって実施又は実行することが可能である。また、ここで用いられた表現及び専門用語は、説明することが目的であり、意味をこれに限定しているわけではないことを理解されたい。

【0036】

最近公表されたいくつかの大規模な臨床試験に基づくと、抗酸化療法はCVDに対して高いリスクをもった患者のCVAアウトカム(副作用防止には勧められない(The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N Eng J Med 2000; 342: 154-160、Hodis, et al. Circulation 2002; 106: 1453-1459、Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico. Lancet 1999; 354: 447-455、Brown et al. N Engl J Med 2001; 345: 1583-1592))。

【0037】

しかしながら、これらの試験は、その患者の部分集合に対する潜在的な効果を排除できなかった(Steinberg D, Witztum JL. Circulation 2002; 105: 2107-2111)。抗酸化療法の予防効果についての大規模な試験のデータ分析では、サンプル全体で抗酸化療法から何らかの効果が得られることを示せなかったが、本発明の出願人はサブグループにおいて抗酸化物質の補給による効果を確認できることを初めて実証した。特に、HOPE試験の糖尿病患者がHp表現型2-2型を有していると、ビタミンEの補給によってCVによる死亡と非致死性心筋梗塞が統計的に有意な減少を示し、ラミプリル治療によって各種の要素

10

20

30

40

50

からなる評価項目（非致死性M I、脳卒中又は心血管系死亡）が統計的に有意な減少を示した（後述の実施例I Iを参照されたい）。ストロング・ハート・スタディのハプトグロビン表現型とC V Dの相関関係の分析は、H p 2 - 2型を有する患者は糖尿病性のC V Dに対してリスクが高いことを示している（後述の実施例I、「Levy AP et al. J Am Coll Card 2002; 40: 1984-1990」を参照されたい）。そして、H p 2 - 2型は抗酸化能力も劣っていることを示している（Melamed-Frank M, et al. Blood 2001; 98: 3693-3698）。1つの仮説によって限定されることを望まないが、抗酸化能力に劣るH p 2 - 2型の特性が、なぜ抗酸化物質の効果が糖尿病患者のこのサブグループで選択的に得られたのかということと、これらの発見が明らかに統計的に有意であることを説明し得る。ハプトグロビンのそのような効果に対する更なる支持が実際に発見されており、ハプトグロビンの型の非糖尿病患者のC V D発症率に対する著しい影響は観察されておらず（後述の実施例Iを参照されたい）、非糖尿病患者の抗酸化療法（ビタミンE使用）には何の効果もなかったことが示された（後述の実施例I Iを参照されたい）。1つの仮説によって限定されることを望まないが、H p 2 - 2型の抗酸化活性低下の重要性は、酸化ストレス（糖尿病）を生成する付加的なメカニズムが存在する場合のみ臨床的に証明されると仮定される。

10

【0038】

従って本発明によれば、糖尿病患者の血管合併症治療に抗酸化療法が有効である可能性を判定する方法が提供される。その方法は糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定することと、それによって前記抗酸化療法が糖尿病患者に有効である可能性を判定することとを含み、ハプトグロビン表現型2 - 2型を有する患者の方が、ハプトグロビン表現型1 - 2型又はハプトグロビン表現型1 - 1型を有する患者と比較して、前記抗酸化療法はより有効である。

20

【0039】

H O P E及びG I S S I等による試験結果は、抗酸化療法が有効であるという亜母集団を何ら示すことができなかった。ここに開示されるデータは、H p表現型2 - 2型を有する糖尿病患者において、ビタミンEの補給によってC Vによる死亡と非致死性心筋梗塞が統計的に有意な減少を示したことと、ラミプリル治療によって各種の評価項目（非致死性M I、脳卒中又は心血管系死亡）が統計的に有意な減少を示したことを、初めて明らかにした（後述の実施例I I参照）。従って、本発明は更に、糖尿病に伴う血管合併症を予防するべく糖尿病患者の酸化ストレスを減少する重要性を判定する方法を提供する。その方法は糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定する手段と、それによって特定の糖尿病患者における酸化ストレスを減少する重要性を判定することとを含み、ハプトグロビン表現型2 - 2型を有する患者の方が、ハプトグロビン表現型1 - 2型又はハプトグロビン表現型1 - 1型を有する患者と比較して、酸化ストレスを減少する前記重要性が高い。

30

【0040】

本発明は、糖尿病患者の血管合併症治療に抗酸化療法が有効である可能性を評価するキットも提供する。そのキットは、糖尿病患者のハプトグロビン表現型を判定するパッケージ化された試薬を含み、糖尿病患者の血管合併症治療に抗酸化療法が有効である可能性の評価に使用することに特定される。これらの試薬の性質は、下記の説明と更に詳しくは既知のハプトグロビン1型及び2型の対立遺伝子の特徴付けられた配列データから当業者には明らかである。

40

【0041】

本発明の判定方法及びキットの有用性は、後述の実施例の表1～6で示されるデータによって実証される。

【0042】

従って、集団ベースの長期試験からのサンプルにおいて、ハプトグロビン表現型は、糖尿病患者の血管合併症治療に抗酸化療法が有効である可能性を予測する重要な判断材料であることがここに実証される。本発明の一実施態様において、血管合併症は微小血管合併症及び大血管合併症からなるグループから選択される。

50

【0043】

糖尿病患者において進展するリスクがある血管合併症は多くあり、糖尿病性網膜症、糖尿病性白内障及び緑内障、糖尿病性ネフロパシー、糖尿病性神経障害、間欠性跛行及び壊疽、高脂血症及び高血圧症のような心血管障害、アテローム性動脈硬化及び冠動脈疾患等を含んでいる。アテローム性動脈硬化は、狭心症発作及び心臓発作の原因になることがあり、糖尿病患者は非糖尿病の人よりも発作が2倍起こりやすく、発生に男女差はない。ここで用いられているように、糖尿病の微小血管合併症は、糖尿病性神経障害（神経損傷）、糖尿病性ネフロパシー（腎臓病）及び視覚障害（例えば、糖尿病性網膜症、緑内障、白内障及び角膜疾患）を含んでいる。大血管合併症は、心筋梗塞、慢性心不全、心血管系死亡及び心臓病、脳卒中及び末梢血管障害（潰瘍、壊疽及び切断をもたらす）のような、アテローム性動脈硬化症が進展した冠血管の状態を含んでいる。 10

【0044】

更にある実施態様において、血管合併症は慢性心不全、心血管系死亡、脳卒中、心筋梗塞、再狭窄に伴う冠動脈血管形成術、冠動脈の側副血管が少ないこと及び心筋虚血からなるグループから選択される大血管合併症である。別の実施態様において、血管合併症は糖尿病性神経障害、糖尿病性ネフロパシー又は糖尿病性網膜症のような微小血管合併症である。

【0045】

糖尿病患者の血管系疾患に対する抗酸化物質補給の潜在的効果についてのハプトグロビンの適中率は、異なった民族グループにおけるハプトグロビン1型の対立遺伝子の度数とこれらのグループにおける糖尿病性の微小血管合併症及び大血管合併症の相対発生率との相関関係によって更に支持される。 20

【0046】

例えば、糖尿病のアフリカ系カリブ人は、CVDの相対リスクは低く¹⁴、¹⁶、微小血管合併症の相対リスクも低い、ハプトグロビン1型の対立遺伝子の度数は高い（いくつかの集団では0.87に達する）²⁶。一方で、糖尿病のオーストラリア先住民¹⁹及び南アジア人¹²、¹⁵は、CVD及び糖尿病性の微小血管合併症の相対リスクは高く⁴⁷、ハプトグロビン1型の対立遺伝子の度数は比較的低い（各々0.18及び0.09）²⁶。

【0047】

ハプトグロビン表現型が、アテローム性動脈硬化によるCVDの臨床経過に影響し得るという2つのメカニズムが最近確認された。1つは経皮経管冠動脈血管形成術後の再狭窄の段階的なリスクが、ハプトグロビン2型の対立遺伝子の数に関係していることが実証された²⁷、³⁰。もう1つはハプトグロビン表現型2-1型を有する糖尿病患者が、同程度の冠動脈疾患に罹っているハプトグロビン表現型2-2型を有する人と比較して、冠動脈に側副があるという傾向が著しく強いことが実証された。冠動脈の側副血行路の発達に関する個体差が、心筋梗塞の進展の重要な決定要因であることは既に実証されている⁴⁸。

【0048】

ハプトグロビン蛋白質にはいくつかの機能があり、アテローム性動脈硬化の進展に影響し得る。60年以上に渡って、血清ハプトグロビンの主な機能はフリーヘモグロビンと結合することだとされてきた²²。この相互作用は鉄分を除去し、尿中のその損失を防ぎ、ヘモグロビンの媒介による組織酸化に対して組織を保護する抗酸化物質の役割を果たすと考えられている²³。異なるハプトグロビン表現型の抗酸化能力には差があることがわかっており、ハプトグロビン1-1型蛋白質は、その他の型の蛋白質と比較して優れた抗酸化保護ができる²³。このような抗酸化仮説を、糖尿病性の血管合併症の進展における酸化的ストレスの非常に重要な役割と仮定すると、特に興味深い⁴⁹、⁵⁰。或いは異なるハプトグロビンの型毎に提供される酸化保護の明らかな違いは、更に詳しくは、異なる表現型の個人が有するハプトグロビン蛋白質のサイズが著しく異なることである。ハプトグロビン1-1型はハプトグロビン2-2型より著しく小さく、従って、血管外コンパート 40 50

メントに通り返けやすく、血管障害の部位でヘモグロビンの媒介による組織障害を防ぎ得る^{2 3}。いずれにしても、アテローム性動脈硬化におけるハプトグロビンの役割は、いまだに良く理解されておらず、いくつかの研究では、H p 1 - 1型は心血管系死亡率が高いというリスクがあると逆説的に証明している (De Bacquer et al, Atherosclerosis 2001; 157: 161-6)。

【0049】

ハプトグロビンは、免疫調節物質としての役割も果たすことが実証されており、ヘモグロビン代謝におけるその役割と無関係ではないかもしれない^{2 1、2 3}。ハプトグロビン - ヘモグロビン複合体の特定の受容体はCD 1 6 3 5 1、即ちグループBのスカベンジャー受容体のシステインが豊富なスーパーファミリーのメンバーであると、単球/マクロファージではっきりと確認された^{5 2}。スカベンジャー受容体のこのスーパーファミリーの別のメンバーであるCD 3 6は、アテローム性動脈硬化障害の進展に重要な意味を持つLDL代謝において重要な役割を果たしていることが以前からわかっている^{5 3 - 5 5}。ハプトグロビン2 - 2型とヘモグロビンの複合体は、ハプトグロビン1 - 1型とヘモグロビンの複合体よりも、この受容体に対して10倍高いアフィニティーがあることが発見された^{5 1}。CD 1 6 3へのリガンド結合は、多くの炎症性サイトカインの分泌をもたらすチロシンキナーゼの接触型のシグナルカスケードを生じることがわかっている^{5 6}。ハプトグロビン単独でも、顆粒球及び単球に結合することが実証されている。ハプトグロビンは、細胞膜受容体と定義されるアゴニストの一種に対する好中球の反応を妨げようとし、免疫システムを受容体 - リガンド相互作用のアンタゴニストとして機能し得ると示唆している^{5 7}。ハプトグロビンの特定の結合は、インテグリンファミリーのメンバーであるMAC - 1即ちCD 1 1 b / CD 1 8受容体^{5 8}が実証されている。これらのインテグリンは、障害までの血管壁の反応に重要な役割を果たしていることがわかっている^{5 9}。

10

20

【0050】

アテローム性動脈硬化血小板の進展及び不安定化における細菌感染の重要な役割が、多くの研究によって最近提示された^{6 0}。このことは、ハプトグロビン表現型と関係するアテローム性動脈硬化の特異的リスクに対し重要であり得る^{2 3 - 2 5}。表現型は試験管内及び生体外で細菌及びウイルスの複製を予防するその能力が異なるからである。これは異なる表現型による免疫調整の相違^{5 1}だけではなく、鉄分除去の相違^{2 3}に起因していることもあり得る。

30

【0051】

これらの研究結果は、ハプトグロビン表現型及び糖尿病性の血管合併症予防に抗酸化物質補給が有効であるということに関する、本願明細書に開示される結果と完全に一致する。抗酸化療法に対する異なるハプトグロビン表現型を有する糖尿病患者の相対反応の明白な違いは、CVDリスク階層化アルゴリズムが用いられた糖尿病患者の大規模な試験と、糖尿病患者のCVDを予防するべくデザインされた、例えば抗酸化物質の補給及び抗酸化療法と薬物療法の組み合わせの、潜在的治療効果の評価によって保証される。

【0052】

本発明の様々な好適な実施態様の方法によれば、被験者のハプトグロビン表現型の判定は、信号増幅法、直接観測法及び少なくとも1つの配列変化の検出法が含まれる複数の方法のいずれか1つによって実行されるが、これらの方法に限定されるわけではない。これらの方法は遺伝子型を判定することによって、表現型を間接的に判定する。後述されるように、ハプトグロビン表現型の判定は、ハプトグロビン遺伝子生成物の解析によって直接行われても良い。

40

【0053】

本発明の様々な好適な実施態様による信号増幅法は、例えばDNA分子又はRNA分子を増幅し得る。本発明の一部として用いられ得る信号増幅法には、PCR、LCR (LAR)、自律合成反応 (3SR / NASBA) 又はQ - ベータ (Q)レプリカーゼ反応を含むが、これらの方法に限定されるわけではない。

【0054】

50

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) : ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、クローニングや純化をせずにゲノム DNA の混合体のターゲット塩基配列の 1 つのセグメント濃度を増加させる方法であり、米国特許第 4,683,195 号 (マリス他) 及び同第 4,683,202 号 (マリス) によって開示されている。この技術はターゲット塩基配列濃度が低いという問題に 1 つのアプローチを提供する。PCR はターゲットの濃度を容易に検出できるレベルまで、直接増加するために用いられる。ターゲット塩基配列を増幅するこのプロセスは、所望のターゲット塩基配列を含む DNA 混合体に対して二本鎖ターゲット塩基配列の各ストランドを補完する 2 つのオリゴヌクレオチドプライマが過剰な分子の導入に関係している。その混合体は変性後にハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションに続いて、プライマはポリメラーゼで相補鎖を形成するように伸長される。変性、ハイブリダイゼーション (アニーリング) 及びポリメラーゼによる伸長 (エロンゲーション) のステップは、所望のターゲット塩基配列の 1 つのセグメントが比較的高い濃度を得るために、必要に応じて何回も繰り返される。

10

【0055】

所望のターゲット塩基配列のセグメントの長さは、互いのプライマの相対位置によって決定されるので、この長さは制御可能なパラメータである。ターゲット塩基配列の所望のセグメントは、混合体の中で (濃度に関しては) 優性配列になるので、「PCR 増幅」と呼ばれる。

【0056】

リガーゼ連鎖反応 (LCR 又は LAR) : リガーゼ連鎖反応 (LCR ; 時に「リガーゼ増幅反応」(LAR) と呼ばれる) は、核酸を増幅する既知のまた別の方法であり、「Barany, Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 189 (1991)、Barany, PCR Methods and Applic., 1: 5 (1991)、Wu and Wallace, Genomics 4:560 (1989)」で開示されている。LCR では 4 つのオリゴヌクレオチド、即ちターゲット DNA の 1 つのストランドにユニークにハイブリダイズする 2 つの近接するオリゴヌクレオチドと、対向するストランドにハイブリダイズする 1 組の近接するオリゴヌクレオチドの補集合、が混合され、そして DNA リガーゼが混合体に追加される。結合部で完全に補完されるように供給されると、リガーゼはハイブリダイズされた分子のそれぞれの集合と共有結合する。重要なことは、LCR ではターゲットサンプルに塩基対の配列があって、ズレ即ち塩基対ミスマッチがないときに限り、2 つのプローブが互いに結合される。変性及びライゲーションが繰り返されるサイクルによって、DNA の短いセグメントを増幅する。LCR は単一塩基対の変異の検出を増強するために、PCR と組み合わせることもあった (Segev, PCT Publication No. W09001069 A1 (1990))。しかしながら、この解析に用いられる 4 つのオリゴヌクレオチドは、連結可能な 2 つの短いフラグメントを形成するようにペアにすることができるので、ターゲットに依存しないバックグラウンドシグナルを生成する可能性がある。LCR を変異のスクリーニングに使用する場合、特定の位置にある核酸の検査に限定される。

20

30

【0057】

自律合成反応 (3SR / NASBA) : 自律配列複製反応 (3SR) (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:1874-1878, 1990) Proc. Natl. Acad. Sci., 87:7797, 1990 に訂正あり) は、転写ベースのインビトロの増幅システムであり (Kwok et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 1173-1177, 1989)、一様な温度で RNA 配列を急激に増幅できる。増幅された RNA は、変異の検出に使用され得る (Fahy et al., PCR Meth. Appl., 1: 25-33, 1991)。この方法では、オリゴヌクレオチドプライマは、インタレストの配列の 5' 端へファージ RNA ポリメラーゼのプロモータを加えるべく用いられる。第 2 のプライマ、逆転写酵素、RNase H、RNA ポリメラーゼ、リボ及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む酵素及び基質の混合物において、ターゲット塩基配列は、インタレストの領域で増幅するべく、転写、cDNA 合成及び第 2 のストランド合成が何回も繰り返される。3SR を変異の検出に使用する場合、DNA の小さなセグメントをスクリーニングするため、動力学的に限定される (例えば、200 - 300 塩基対)。

40

【0058】

50

Q-ベータ (Q) レプリカーゼ：この方法では、インタレストの配列を認識するプローブが、Q レプリカーゼによって転写可能なRNAテンプレートに取り付けられる。ハイブリダイズされていないプローブの転写による偽りの好結果によって以前に証明された重要な問題は、配列特異的ライゲーションの方法を使って発表された。しかしながら、現在ある耐熱性DNAリガーゼは、このRNA基質には有効ではないため、ライゲーションは低温 (37度) でT4 DNAリガーゼによって行われなければならない。これはLCRにおいては特異性を得る方法であった高温の使用を妨げる。ライゲーションイベントは結合部位で変異を検出するべく使用されるが、その他の場所では使用できない。

【0059】

成功した試験方法は、非常に特殊な方法である。核酸ハイブリダイゼーションの特異性を制御する単純な制御方法は、反応温度を制御することである。3SR/NASBA及びQシステムのいずれもが、大量の信号を生成できる一方で、互いに干渉する1つ以上の酵素は高温 (即ち、55度より高い温度) で使用できない。従って、反応温度がプローブの非特異性のハイブリダイゼーションを妨げるため上昇させられない。プローブの長さが低温で容易に溶解するように短くなると、複数個の合成ゲノムと完全に一致する可能性が増加する。これらの理由から、現在はPCR及びLCRが、検出技術の研究分野において優勢である。

【0060】

PCR及びLCRの増幅手順の原理は、1サイクルの生成物が、その後の全てのサイクルで使用可能なテンプレートになるため、結果的に各サイクルで集団を倍増する。そのような倍増システムの最終収量は、 $(1 + X)^n = y$ として表すことができ、「X」が平均効率 (各サイクルでコピーされたパーセント)、「n」がサイクル数、「y」が全体効率即ち反応収率である (Mullis, PCR Methods Applic., 1:1, 1991)。ターゲットDNAの全てのコピーがポリメラーゼ連鎖反応のサイクル毎にテンプレートとして利用される場合、その平均効率は100%である。PCRが20サイクル実行された場合、収率は開始時点の物質が 2^{20} 即ち1,048,576倍となる。反応の状態が平均効率85%まで減少した場合、その20サイクルにおける収率は、開始時点の物質の 1.85^{20} 即ち220,513倍だけとなる。つまり、PCRを効率85%で実行すると、効率100%で実行した反応と比較して、得られる最終生成物はわずか21%しかない。平均効率が50%に減少された反応は、本来得られるはずの生成物の1%未満しか得られない。

【0061】

実施例において、所定のポリメラーゼ連鎖反応が、理論上の最大収量を得ることはまれであり、PCRは低い収量を補償するために通常は20サイクル以上実行される。平均効率50%では、理論上20サイクルで可能な100万倍の増幅を達成するのに34サイクルかかり、更に低い効率では、必要なサイクル数が極めて多くなる。加えて、指定されたターゲットよりも良い平均効率で増幅する様々なバックグラウンド生成物は、優性の生成物となる。

【0062】

また、多くの変数がPCRの平均効率に影響を与えることができ、いくつかあげると、ターゲットDNAの長さ及び二次構造、プライマの長さ及び構造、プライマとdNTP濃度及びバッファ構成等がある。外生的なDNA (例えば、白衣表面にこぼれたDNA) による反応の汚染又は二次汚染も、考慮すべき重要な事項である。反応状態は各々異なるプライマペア及びターゲット塩基配列を注意深く最適化しなければならない。このプロセスには経験豊富な研究者でさえも数日かかる。このプロセスの困難さは、多くの技術的要因とその他の要因を含んでおり、臨床設定でPCRを使用することに著しい不利益をもたらす。実際、PCRは臨床現場にあまり浸透していない。同様な懸念がLCRにもあり、LCRでは各々のターゲット塩基配列に、異なるオリゴヌクレオチド配列を使用するように最適化しなければならない。加えて、どちらの方法も高価な設備が必要であり、正確な温度サイクルを実行する必要がある。

【0063】

核酸検出技術の多くの応用、例えば複雑なバックグラウンドにおける特定配列の検出だけでなく、少数の又は単体のヌクレオチドによる異なる配列間の識別に関する対立遺伝子の変異の研究などがある。PCRによる対立遺伝子の特定変異の検出の1つの方法は、テンプレート鎖とプライマの3'端にミスマッチがある時、TaqポリメラーゼをDNA鎖に合成させることが難しいという事実に基づいている。対立遺伝子の特定変異は、たった1つの潜在的な対立遺伝子と完全にマッチするプライマを使用することによって検出され得る。他の対立遺伝子に対するミスマッチは、プライマの伸長を妨げるべく働き、それによってその配列の増幅を妨げる。この方法には、ミスマッチの塩基組成が、ミスマッチ全域に伸長するのを防ぐ能力に影響を与えるという重要な制限があり、いくつかのミスマッチは伸長を防げない又は最低限の効果しか有していない (Kwok et al., Nucl. Acids Res., 18: 999, 1990)。

10

【0064】

同様な3'ミスマッチ方法の使用は、LCRのライゲーションを防ぐのに大きな効果がある (Barany, PCR Meth. Applic., 1:5, 1991)。様々なミスマッチは効果的に耐熱性リガーゼの活動を防ぎ、LCRはターゲットに依存しないバックグラウンドのライゲーションの生成物が増幅を始めるという不利益がまだある。更に、個々の位置でヌクレオチドを確認するためのLCRとPCRの組み合わせも、明らかに臨床研究室では扱いにくい方法である。

【0065】

本発明のいくつかの好適な実施態様による直接観測法は、例えば、サイクリングプローブ反応 (CPR) 又は分岐DNA解析であり得る。

20

【0066】

十分な量の核酸が検出される時、(例えばPCR及びLCRのように) そのターゲットのコピーを大量に作る代わりに、配列を直接検出するという利点がある。最も顕著なのは、信号を急激に増幅しない方法なので、定量分析ができることである。複数の染色体が単体のオリゴヌクレオチドに付着することによって信号が増幅される場合でも、最終的な信号強度とターゲットの量との相関関係は正比例である。このようなシステムは、反応の生成物が、自分自身を更に反応させないという追加的な利点もあり、生成物による白衣表面の汚れが重要なことではなくなる。ノーザン及びサザンバンドRNAseプロテクションアッセイを含む直接検出法の従来の方法は、一般的に放射能の使用が必要であり、自動化できない。最近考案された技術は、放射能の使用の排除及び/又は自動化可能なフォーマットでの感度改善を試みた。その2つの例が、「サイクリングプローブ反応」(CPR) 及び「分岐DNA」(bDNA) である。

30

【0067】

サイクリングプローブ反応 (CPR) : サイクリングプローブ反応 (CPR) (Duckett et al., BioTech., 9: 142, 1990) は、長いキメラオリゴヌクレオチドを使用し、その中心部はRNAであり、両端はDNAである。ターゲットDNAへのプローブのハイブリダイゼーションと耐熱性RNAse Hへの暴露は、RNA部分が消化される原因となる。これは残りの二本鎖のDNA部分を不安定にし、ターゲットDNAからプローブの残物を解放し、別のプローブ分子にこのプロセスを繰り返させる。切断されたプローブ分子の形状をした信号が線形速度で蓄積する。その繰り返しのプロセスで信号は増幅するが、オリゴヌクレオチドのRNA部分は、試料調製を行い得るRNAseに影響を受けやすい。

40

【0068】

分岐DNA : 分岐DNA (bDNA) は、「Urdea et al., Gene 61: 253-264 (1987)」によって開示され、分岐構造をしたオリゴヌクレオチドが、個々のオリゴヌクレオチドを35から40ラベルにすることに関している (例として、アルカリホスファターゼ酵素)。これがハイブリダイゼーションイベントによって信号を増加させる一方で、非特定結合の信号も同様に増加される。

【0069】

本発明のいくつかの好適な実施態様による少なくとも1つの配列変化の検出法は、例え

50

ば、制限断片長多型 (RFLP 解析)、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) 解析、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 / 温度勾配ゲル電気泳動 (DGGE / TGGE)、一本鎖 DNA 高次構造多型 (SSCP) 解析又はジデオキシフィンガープリント法 (ddF) であって良い。

【0070】

特定の核酸配列及び配列変化の検出を可能にする試験の需要が、臨床診断において急速に拡大している。人間の遺伝子及び病原体を蓄積した遺伝子の核酸配列データのような、特定配列内部での変異に対する、迅速で経済的且つ簡便な試験の需要が、現在急速に増加している。

【0071】

核酸セグメントの変異をスキャンする、いくつかの方法が考えられてきた。そのうちの1つは、各試験サンプル (例として、細菌分離株) の遺伝子配列全体を判定するものである。約600個以下のヌクレオチドの配列であれば、この方法は増幅された物質 (例として、PCR 反応生成物) を用いることによって達成し得る。この方法はインタレストのセグメントを転写することに伴う時間と費用を節約する。しかしながら、特殊な装置と良く訓練された人材が必要とされるため、この方法を臨床において実用的且つ効果的に使用するには、大変な手間がかかり、そして高価である。

【0072】

シーケンスに伴う困難さを考えると、核酸の任意のセグメントが、いくつかの別のレベルに特徴付けられ得る。最低の解像度では、電気泳動法を使用して、同一ゲルの既知の標準稼動との比較によって分子のサイズが測定される。分子の更に詳細な画像は、電気泳動法を実施する前に、制限酵素の組み合わせによる切断によって取得できることがあり、規則正しい写像を構成させ得る。フラグメント内の特定配列の有無が、ラベルされたプローブのハイブリダイゼーションによって検出され得る。即ち、鎖終結ヌクレオチドアナログの存在下で、部分的な化学分解又はプライマ伸長によって、正確なヌクレオチド配列が測定され得る。

【0073】

制限断片長多型 (RFLP) : 類似した配列間の単一塩基の相違の検出において、しばしば解析に必要とされるのは、最高レベルの解像度である。ヌクレオチドの位置が疑わしいことが事前にわかっている場合には、ダイレクトシーケンスせずに単一塩基の変異を検査するいくつかの方法が考えられてきた。例えば、インタレストの変異が制限認識配列の範囲に入れば、消化パターンの変異は診断ツールとして使用できる (例として、制限断片長多型 [RFLP] 解析)。

【0074】

単一変異は RFLP の産出又は破壊でも検出されてきた。変異はミスマッチでの切断によって生成される RNA フラグメントの有無及びサイズによって検出され、位置が特定される。DNA ヘテロ二本鎖における単一ヌクレオチドのミスマッチも、「ミスマッチ化学分解」(MCC) (Gogos et al., Nucl. Acids Res., 18: 6807-6817, 1990) と呼ばれる、単一塩基置換を検出する別な方法が提供するいくつかの化学物質によって認識され、切断される。しかしながら、この方法は四酸化オスミウム及びピペリジンの使用を必要とするが、これらは非常に有害な化学物質であるため、臨床検査への使用には適さない。

【0075】

RFLP 解析は低感度に弱く、大量のサンプルを必要とする。RFLP 解析が点変異の検出に使用される時、その性質から、既知の制限エンドヌクレアーゼの制限配列の範囲に入るような単一塩基の変異のみの検出に限定される。更に、存在する酵素の大部分は4から6塩基対の制限配列を有しており、多くの大規模な DNA マニピュレーションによって頻繁に分裂する (Eckstein and Lilley (eds.), Nucleic Acids and Molecular Biology, vol. 2, Springer-Verlag, Heidelberg, 1988)。従って、ほとんどの変異が制限認識配列の範囲に入らないので、ごくわずかにしか適用されない。

【0076】

10

20

30

40

50

8塩基対の特異性を持った少数のレアカットな制限酵素が発見されており、これらは遺伝子のマッピングに広く使用されている。しかしこれらの酵素は数少なく、G + Cが豊富な配列の認識に限定され、高度に密集されやすい場所で分裂する (Barlow and Lehrach, Trends Genet., 3: 167, 1987)。最近、グループIイントロンによってエンコードされたエンドヌクレアーゼが、12塩基対の特異性より優れているかもしれないことが発見された (Perlman and Butow, Science 246: 1106, 1989)、しかし、これもまた数は少ない。

【0077】

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) : 変異が認識配列内ではない場合、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) は、プライマ伸長又はライゲーションイベントが、マッチ又はミスマッチのインジケータとして働くように、変異されたヌクレオチドに近接してハイブリダイズするようにデザインされる。放射活性物質でラベルした対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO) によるハイブリダイゼーションも、特定の点変異の検出に応用されてきた (Conner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 278-282, 1983)。その方法は、単一ヌクレオチドによって異なる短いDNAフラグメントの融解温度の相違を基にしている。ストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーション及び洗浄状態が、変異と野生型対立遺伝子との識別を可能にする。PCR生成物に応用されるASOのアプローチも、様々な研究者に広く利用されており、ラス遺伝子の点変異を検出して特徴付けること (Vogelstein et al., N. Eng. J. Med., 319: 525-532, 1988、Farr et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:1629-1633, 1988)、gsp / gipの癌遺伝子の点変異を検出して特徴付けること (Lyons et al., Science 249: 655-659, 1990) に利用されている。複数の位置に様々なヌクレオチド変異が存在するため、ASO法は全ての潜在的な発癌性の変異をカバーするべく多くのオリゴヌクレオチドの使用を必要とする。

【0078】

上述のいずれの技術 (即ち、RFLP及びASO) も、疑わしい変異の正確な位置を試験の前に知っていなければならない。つまり、遺伝子又はインタレストの配列の範囲内での変異の有無を検出する必要がある時には、適用することができない。

【0079】

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 / 温度勾配ゲル電気泳動 (DGGE / TGGE) : 2つの別な方法では、わずかな配列の変化に反応する電気泳動移動度の変化を検出することを利用する。このうちの1つの方法は、「変性剤濃度勾配ゲル電気泳動」(DGGE) と呼ばれ、電気泳動が濃度勾配ゲルを変化させる時、わずかに異なる配列は、異なるパターンの局所融解を示すという観察に基づいている。この方法は、電気泳動移動度に対応する変化により、変異が認識され得る。単一ヌクレオチドで異なるヘテロ二本鎖対ホモ二本鎖の融解特性の違いが、ターゲット塩基配列の変異の有無を検出させる。解析されるフラグメントは通常PCR生成物であり、長いG - C塩基対 (30 - 80) によって1つの端部で「クランプ」され、ストランドの完全な分裂なしにインタレストの配列の完全な変異を可能とする。DNAフラグメントに「クランプ」しているGCの付着は、DGGEによって認識できる変異の割合を増加させる (Abrams et al., Genomics 7: 463-475, 1990)。GCクランプを1つのプライマに付着させるには、増幅された配列が低分裂温度を有していることが不可欠である (Sheffield et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 232-236, 1989、Lerman and Silverstein, Meth. Enzymol., 155:482-501, 1987)。この技術を変更して、温度勾配 (Wartell et al., Nucl. Acids Res., 18: 2699-2701, 1990) を用いる方法に発展した。そしてその方法は、RNA : RNA二本鎖にも適用可能である (Smith et al., Genomics 3: 217-223, 1988)。

【0080】

DGGEの使用を制限する要件には、試験されるDNAのタイプ毎に、変性状態を最適化させなければならないということが含まれる。更にこの方法は、ゲルを準備し、電気泳動中は所望の高温に維持するための特殊な装置が必要である。試験される配列毎に、1つのオリゴヌクレオチドにクランプしている端部の合成をするための費用も重要な課題であ

る。加えて、D G G Eには長い実行時間が必要とされる。D G G Eの長い実行時間は、均一変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(C D G E)と呼ばれるD G G Eに変更することによって短縮される(Borrensen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8405, 1991)。C D G Eは、変異の検出を効率良く行うために、異なった変性状態の下でゲルが機能することを必要とする。

【0081】

D G G Eに類似の温度勾配ゲル電気泳動(T G G E)と呼ばれる技術は、化学的な変性勾配ではなく、温度勾配を用いる(Scholz, et al., Hum. Mol. Genet. 2: 2155, 1993)。T G G Eは、電界に対して垂直に配置される温度勾配を生成できる特殊な装置の使用が必要である。T G G Eは、D N Aの比較的小さなフラグメントの変異を検出できるため、大きな遺伝子のセグメントをスキャンするには、ゲルを動作させる前に複数のP C R生成物の使用を必要とする。

10

【0082】

一本鎖D N A高次構造多型(S S C P)：「一本鎖D N A高次構造多型」(S S C P)と呼ばれる、また別の一般的な方法は、ハヤシ、セキヤ及びその同僚によって開示されており(ハヤシによって監修された「PCR Meth. Appl., 1: 34-38, 1991」)、核酸の一本鎖が非変性状態において特徴的な構造を得ることができ、これらの構造が電気泳動移動度に影響を与えることを観察する方法を基にしている。相補的なストランドは、1つのストランドが他方のストランドから分解され得る、十分に異なった構造であるとする。フラグメントの範囲内の配列の変化も構造を変化させ、その結果、移動度を変化させるので、配列変異によるアッセイとしてこれが用いられることを可能とする(Orita, et al., Genomics 5: 874-879, 1989)。

20

【0083】

S S C Pプロセスは、両方のストランドにラベルされたD N Aセグメント(例えば、P C R生成物)を変性し、その後非変性ポリアクリルアミドゲルによるゆっくりとした電気泳動分離が続くことに関係し、分子内部の相互作用が形成でき、実行中に中断されることがない。この技術はゲル成分及び温度の変化に対してきわめて敏感である。この方法の重大な制限は、明らかに同様の状況下で生成されたデータであっても、それが異なった研究室で生成されたものであれば、データを比較することが比較的難しいことである。

【0084】

ジデオキシフィンガープリント法(d d F)：ジデオキシフィンガープリント法(d d F)は、変異の有無について遺伝子をスキャンするために開発された別の技術である(Liu and Sommer, PCR Methods Appl., 4: 97, 1994)。d d F技術は、サンガーのジデオキシ法によるシーケンスの構成をS S C Pと組み合わせている。ジデオキシによるシーケンス反応は、1つのジデオキシターミネータを使用することによって実行される。反応の生成物が非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動され、S S C P解析のように、ターミネーションセグメントの移動度の変化を検出する。d d Fは感度を増加させる点でS S C Pより改善されているが、d d Fは高価なジデオキシヌクレオチドの使用を必要とするため、この技術はS S C Pに好適なサイズのフラグメントの解析に限定される(即ち、変異の最適な検出は200 - 300塩基のフラグメント)。

30

40

【0085】

上記の制限に加えて、これら全ての方法は、解析可能な核酸フラグメントのサイズに制限がある。直接シーケンスアプローチでは、600塩基対より大きい配列がクローニングに必要であり、フラグメント全体をカバーするため、結果として遅れが生じ、欠失サブクローニング又はプライマウォーキングのいずれかを犠牲にする。S S C P及びD G G Eは、更に厳しいサイズの制限がある。配列変化に対して低感度であるため、これらの方法は大きなフラグメントに好適ではないと考えられている。S S C Pは200塩基対フラグメント以内で単一塩基置換の90%は検出できると報告されているが、400塩基対フラグメントでの検出は50%未満に下がる。同様に、D G G Eの感度はフラグメントの長さが500塩基対に達すると減少する。d d F技術も、直接シーケンス法とS S C Pの組み合

50

わせなので、スクリーニングできる比較的小さなサイズのDNAに限定される。

【0086】

本発明の現状好適な実施態様によれば、上述された様々な遺伝子、例えば癌細胞又は癌患者から得られた細胞にある還元葉酸輸送体(RFC)遺伝子の、1つ又は複数の変異を探する方法は、一本鎖DNA高次構造多型(SSCP)技術、例えばcDNA-SSCP又はゲノムDNA-SSCP等によって結果が得られる。しかしながら、別な方法を用いることも可能であり、核酸シーケンス、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、自律合成反応、Q-レプリカーゼ、サイクリングプローブ反応、分岐DNA、制限断片長多型解析、ミスマッチ化学切断法、ヘテロ二本鎖解析、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動、均一変性剤濃度勾配ゲル電気泳動、温度勾配ゲル電気泳動及びジデオキシフィンガープリント法等を含むが、これらに限定されるわけではない。

10

【0087】

ハプトグロビン表現型の判定は、後述の実施例の項で更に説明されるが、直接実施されても良く、ハプトグロビン遺伝子の蛋白質遺伝子生成物又はその一部の解析によって行われる。そのような直接的な解析は、しばしば免疫学的検出法を用いて実施される。

【0088】

免疫学的検出法は、例えば、「Using Antibodies: A Laboratory Manual」(Ed Harlow, David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999))で十分に説明されており、それらの技術に詳しくれば、本発明の一部として後述される様々な技術を実施することができる。全ての免疫学的技術は、2つのハプトグロビン対立遺伝子の少なくとも1つに対して特異的な抗体を必要とする。免疫学的検出法は、本発明の一部として用いるのに好適であり、ラジオイミュノアッセイ(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、ウエスタンブロット法、免疫組織化学法及び蛍光活性化細胞分類法(FACS)を含むが、これらに限定されるわけではない。

20

【0089】

ラジオイミュノアッセイ(RIA)：この方法の一つのバージョンは、特定の抗体及び放射性標識の抗体が結合した蛋白質(例として、 I^{125} がラベルされたプロテインA)を有する所望の基質(この事例及び後述の方法ではハプトグロビン)の沈降が、アガロースビーズのような沈降性キャリアに固定化されることに関係している。

【0090】

RIAの別のバージョンでは、ラベルされた基質及びラベルされていない抗体が結合した蛋白質が用いられる。大量の基質を含むサンプルが、様々な量で加えられる。沈降の減少はラベルされた基質から数えられ、加えられたサンプル中の基質の量に比例している。

30

【0091】

酵素免疫測定法(ELISA)：この方法はサンプル(例えば、固定細胞又は蛋白質溶液)に関係し、蛋白質基質をマイクロタイタープレートのウェルのような表面に浮上させることを含んでいる。酵素に連結される基質に特有の抗体は、基質に結合するべく用いられ、結合される。そして、抗体の有無は抗体に連結された酵素を用いた比色反応によって検出され、計量される。この方法に通常用いられる酵素には、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを含んでいる。適切に測定され且つ反応が直線範囲内であれば、サンプルに存在する基質の量は生成された色の量に比例している。基質の基準は、一般に定量的精度を改善するために用いられる。

40

【0092】

ウエスタンブロット法：この方法は、アクリルアミドゲルを用いて基質を他の蛋白質から分離させ、基質をメンブレン(例えば、ナイロン又はPVDF)にトランスファーさせることに関係している。その後、基質の有無は基質に対して特定の抗体によって検出される。基質は抗体結合した試薬によって順に検出される。抗体結合した試薬は、例えば、プロテインA又は他の抗体であって良い。抗体結合した試薬は、上述の放射性標識又は酵素連結であって良い。検出はオートラジオグラフィ、比色反応又は化学発光であってよい。この方法は、基質の量の計量と、電気泳動中のアクリルアミドゲルの泳動距離を示すメ

50

ンブレン上の相対位置によるその正体の判定との両方が可能である。

【0093】

免疫組織化学法：この方法は、基質に特有の抗体による固定細胞の上皮内基質の検出に関係している。基質に特有の抗体は、酵素結合又は蛍光プローブへの結合であって良い。検出は顕微鏡又は主観的評価によって行われる。酵素結合した抗体が用いられる場合、比色反応が必要とされ得る。

【0094】

蛍光活性化細胞分類 (FACS)：この方法は、基質に特有の抗体による細胞内の上皮内基質の検出に関係する。基質に特有の抗体は蛍光プローブに連結されている。検出は、光線を通過する時に各セルから放射される光の波長を読むセルソーティング機器を用いて行われる。この方法は2又は3個の抗体を同時に用いても良い。

【0095】

本発明を実施してみると、HOPE試験のデータ分析から、ビタミンE及びラミプリルが同類のハプトグロビンの型に特定の効果を有することを初めて明らかにした。ラミプリルは一般に高血圧症に処方され、CVDの予防に役立つとされている。しかしながら、ラミプリルによる治療の予防効果の大きさ (RR = 0.57) 及び1つのハプトグロビン表現型サブグループ (Hp 2 - 2型) に対する予防に限れば、ラミプリルによる治療の予防成分は、高血圧症に対する効果を越えていることを示している。アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤としての機能に加えて、ラミプリルは抗酸化物質としての機能を有し、ラミプリルによる治療で体内のフリーラジカルな酸化種の減少をもたらす (Lopez-Jaramillo, et al J Hum Hypertens 2002; 16SI: S100-300)。ここに示す、生化学構造が劇的に異なる2つの異なった抗酸化物質が、ハプトグロビンの型によって分類された糖尿病患者のサブグループに対して、同様の臨床効果を提供するという事は、抗酸化療法の理論的枠組みが、例えば、トロロックス (Sagach et al Pharma Res 202; 45: 435-39)、ラキソフェラスト (Campo et al, Cardiovasc Drug Rev 1997; 15: 157-73)、TMG (Meng et al Bioorg Med Chem Ltrs 2002; 12: 2545-48)、AGI - 1067 (Yoshida et al Atheroscler 2002; 162: 111-17)、プロブコール (Kita et al PNAS USA 1987; 84: 7725) のような他の抗酸化物質に加えて、更に、ビタミンEと類似の抗酸化作用のメカニズムを持つニソルジピン、ニフェジピン及びニカルジピンのような、カルシウムチャンネル遮断薬 (Mak I, et al. Pharma Res. 2002; 45: 27-33) に応用され得ることを示唆している。従って、そのような抗酸化物質による予防療法が最も効果があると期待される患者の集団 (Hp 2 - 2型の糖尿病患者) は、ここで実証されたビタミンE及びラミプリルの補給が有効な集団と同様であろう。しかしながら、DM患者の抗酸化物質補給が有効かどうかの判定は、全ての抗酸化ビタミンには応用できないかもしれない。なぜなら、任意抽出のサンプル又は糖尿病患者のどちらにおいても、CVDアウトカムとビタミンCの補給には相関関係が発見されなかったからである (データは示していない)。

【0096】

ここで開示されるHOPE試験データの分析に対する新しいアプローチが、今、明らかな証拠を提供した。糖尿病患者を階層化していない集団では、抗酸化ビタミンEの効果が明らかではなかったのに対して、糖尿病患者のサブグループでは、抗酸化療法が著しい効果を示すことを確認できる。従って、これらのデータは、全ての糖尿病患者に、ハプトグロビン表現型を検査することの重大な価値と、糖尿病性のCVDを予防するために、Hp表現型2 - 2型の患者に対する抗酸化物質補給という予防療法の提供を示す。おそらく、この抗酸化物質の予防効果は、単一の抗酸化物質 (例えばビタミンE) に限定されず、トロロックス、ラキセフィロファスト、AGI - 1067、プロブコール、TMG及びカルシウムチャンネル遮断薬のような様々な潜在的な抗酸化物質でも効果的である。これらの異なる試料の相対効果は、更なる臨床研究の分析から測定され得る。

【0097】

個々のハプトグロビン表現型を直接的に又は遺伝子から判定するのに、被験者から様々な好適な生体サンプルを入手して使用することが効果をもたらす可能性があることは、当

業者には理解できるであろう。生体サンプルには、血液、血漿、血球、唾液又は洗口剤によって得られる細胞、尿及び涙のような身体の分泌物及び生検の結果等が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0098】

本発明の追加の目的、利点及び新規性は、以下の実施例に限定されるわけではないが、これらの試験より当業者には明らかである。加えて、本発明の各々の実施態様は、上述の内容及び請求項の内容及び以下の実験の実施例から得られることを明らかにする。

【0099】

実施例

【0100】

以下の実施例を、上述の説明と併せて、本発明が限定されないように説明する。

【0101】

全体として、ここに使用されている用語及び本発明に用いられる検査法には、分子、生化学、微生物学及び組み換えDNA技術を含んでいる。それらの技術は、文献によって全て説明されている。例として、以下の文献を参照されたい。「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrook et al., (1989)、「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)、Ausubel et al.,「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)、Perbal,「A Practical Guide to Molecular Cloning」John Wiley & Sons, New York (1988)、Watson et al.,「Recombinant DNA」Scientific American Books, New York、Birren et al. (eds)「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)。方法論は下記の特許及び文献に記述されている。米国特許第4,666,828、同第4,683,202、同第4,801,531、同第5,192,659及び同第5,272,057、「Cell Biology: A Laboratory Handbook」Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)、「Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique」Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition、「Current Protocols in Immunology」Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)、Stites et al. (eds)、「Basic and Clinical Immunology」(8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)、Mishell and Shiigi (eds)、「Selected Methods in Cellular Immunology」W. H. Freeman and Co., New York (1980)。利用可能な免疫測定は、特許及び科学文献に広く記述されており、例として下記の特許及び文献を参照されたい。米国特許第3,791,932、同第3,839,153、同第3,850,752、同第3,850,578、同第3,853,987、同第3,867,517、同第3,879,262、同第3,901,654、同第3,935,074、同第3,984,533、同第3,996,345、同第4,034,074、同第4,098,876、同第4,879,219、同第5,011,771及び同第5,281,521、「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J., ed. (1984)、「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)、「Transcription and Translation」Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984)、「Animal Cell Culture」Freshney, R. I., ed. (1986)、「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press, (1986)、「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B., (1984)、「Methods in Enzymology」Vol. 1-317, Academic Press、「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」Academic Press, San Diego, CA (1990)、Marshak et al.,「Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual」CSHL Press (1996)。これら全てを、あらゆる面においてここに言及したことで本願の一部とする。他の一般的な参考文献は、本願明細書の様々な場所に提供される。その方法は、公知技術と見られており、読者の利便性のために提供される。それらに含まれる全ての情報は、ここに言及したことで本願の一部とする。

【0102】

実験方法

10

20

30

40

50

【0103】

本発明を支持する実験データを提供する実施例を示す前に、次の内容について述べる。

【0104】

患者：

【0105】

ストロング・ハート・スタディの計画、調査方法及び試験方法と、インディアンコミュニティの参加者の詳細説明は、以前に発表されている。²⁰、³⁹、⁴⁰

【0106】

調査コホートは、45歳から74歳までの4,549人以上の個人からなり、1989年7月から1992年1月の間に行った1回目の試験に参加していた。全適格者における参加率は、平均64%であった。非参加者の年齢及び糖尿病の自己報告の度数は、参加者と同様であった。それらの人々の内、2回目の試験(1993年7月から1995年12月)時点で生存していた人の再試験率は平均88%で、3回目の試験(1997年7月から1999年12月)時点での再試験率は平均90%であった。

10

【0107】

各段階の臨床検査は、個人面談及び身体診察からなる。空腹時の血液サンプルが生化学的方法によって採取され、75グラム経口ブドウ糖負荷試験が実施された。血液サンプルはEDTAによって収集され、血漿は-20度で採取されて保存された。標準血圧測定が実施され、心電図が記録され、以前に説明されているとおりコーディングされた³⁹、⁴⁰。参加者は世界保健機構の基準によって糖尿病に分類された⁴¹。降圧薬を服用している参加者又は最高血圧が140 mmHgより高い参加者又は最低血圧が90 mmHgより高い参加者は、高血圧とされた。

20

【0108】

ストロング・ハート・スタディのコホートの中で1988年から現在までに死亡した人について、部族及び病院の記録及び研究者による参加者とその家族への直接聴取によって確認が行われた。死亡証明書のコピーは州保健局から入手し、分類担当者によってICD-9を中心にコーディングされた。潜在的なCVDによる死亡は、以前に説明されているとおり初めは死亡証明書から確認された⁴²。死亡原因が、検死報告、医療記録要約及び以前に説明されているとおりインタビューによる情報を介して調査された⁴²。全ての資料が、ストロング・ハート・スタディ・モータリティ・レビュー・コミッティのメンバーの医師によって別々に再調査された。致命的なCVD及び脳卒中の基準は以前に説明されている⁴²。

30

【0109】

以前の試験以降に発症した様々な非致死性心血管系イベント、以前に説明されているような確定されたMI及び確定されたCVDを確認するために、各試験での医療記録が再調査された²⁰、⁴³。2回目又は3回目の試験に参加しなかった人の記録も再調査された。全ての潜在的なCVDイベント又はインターベンションについて、訓練を受けた医療記録要約者によって、医療記録が再調査された。外来患者の来診の記録が再調査され、CVDの診断プロセス(例として、トレッドミルテスト、冠動脈造影法)がまとめられた。病歴の再調査から得られた情報は、特定のCVDの診断結果を実証するため、ストロング・ハート・スタディのモータリティ・レビュー・コミッティ又はモービディティ・レビュー・コミッティのメンバーの医師によって再調査された。モービディティ・レビュー・コミッティのメンバーの別の医師による要約記録のブラインドレビューは、診断結果と90%以上一致した。

40

【0110】

HOPE試験及び患者特性：HOPE試験(Heart Outcomes Prevention Evaluation:無作為化二重盲検プラセボ対照試験)は、2つの予防的インターベンション治療、即ちアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤又はビタミンEが、プラセボと比較して心血管系イベントの高いリスクをもった患者の発病率及び死亡率が改善するという仮説をテストするために計画された。試験には、年齢(55歳

50

より高齢)、現在又は過去に心血管系疾患又は糖尿病であるという理由から、将来的に致死性又は非致死性心血管系イベントのリスクが高いと考えられた患者が含まれていた。糖尿病は、少なくとももう1つのリスク要因があり、血管系疾患又は喫煙、高コレステロール又は高血圧症等が知られている。ラミプリル又はプラセボは、かなりの割合の患者に、降圧薬(ACE-Iを除く)、高脂血症治療薬又はアスピリンを含む併用薬が加えられていた。HOPE試験の計画及び手順の詳細は、既に説明されている(例として、「The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators NE J Med, 2000; 342: 154-60、Sleight, P, J Renin Angioten Aldost Sys 2000; 1: 18-20」を参照されたい)。簡単に言えば、試験集団はCVDの高いリスクを持った9,451人以上の患者からなっていた(DMは3,654人)。試験は400IUの天然ビタミンE(RRR-a-酢酸トコフェロール)又はプラセボをランダム化した2x2の要因計画、及び10mgのラミプリル又はプラセボをランダム化した2x2の要因計画で行われた。患者には平均4年半継続して行われた。主要な試験アウトカムは、非致死性MI、脳卒中又は心血管系死亡からなっていた。

10

20

30

40

50

【0111】

症例及び対照の定義:

【0112】

本試験は症例対照サンプルであり、CVDとハプトグロビン表現型の関係を調査するためにデザインされた。206件のCVD症例及び対照(年齢、性別及び地域によるマッチング)が、この分析の対象となった。

【0113】

ハプトグロビン表現型の検査:

【0114】

ハプトグロビン表現型の検査は、ゲル電気泳動による10 μ lのEDTA血漿及びスターチゲル電気泳動とベンジンによるペルオキシダーゼ染色を用いるスミティーズによって開示された元の方法^{4,6}を変更したペルオキシダーゼ染色^{4,4,4,5}から測定された。患者の血漿は-20度で保存された。全ての薬品はシグマ・イスラエル(レホボト、イスラエル)から購入された。水中の10%ヘモグロビン溶液は、血球を先ずリン酸緩衝生理食塩水で5回洗浄し、その後ペレットセル容積1mlにつき9mlの滅菌水で細胞を溶解したヘパリン添加血液から作られた。細胞溶解物は10,000Gで40分間遠心分離され、ヘモグロビンを含む上澄みが分離されて-70度で保存された。血清(10 μ l)は2 μ lの10%ヘモグロビン溶液と混合され、そのサンプルはハプトグロビン-ヘモグロビン複合体を形成させるために、室温で5分間放置された。125mM トリスベース pH6.8、20%(w/v)グリセロール及び0.001%(w/v)プロモフェノール・ブルーを含む、同じ量(12 μ l)のサンプル緩衝液が、ゲルを泳動させる前に各サンプルに加えられた。ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体は、25mM トリスベース及び192mM グリシンを含む緩衝液を用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分解された。積層ゲルは125mM トリスベース、pH6.8中の4%ポリアクリルアミド(29:1 アクリルアミド/ビスアクリルアミド)であり、分離ゲルは360mM トリスベース、pH8.8中の4.7%ポリアクリルアミド(29:1 アクリルアミド/ビスアクリルアミド)であった。電気泳動は250ボルトの定電圧で3時間実施された。電気泳動完了後、ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体は、ガラストレーに新たに準備された染色液にゲルを浸すことによって視覚化された。染色液(記載された順番で試薬を加えることによって作られる)には、メタノール中の5mlの0.2%(w/v) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジン、0.5mlのジメチルスルホキシド、10mlの5%(v/v)氷酢酸、1mlの1%(w/v)フェリシアン化カリウム及び150 μ lの30%(w/w)過酸化水素が含まれていた。ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体に対応するバンドは15分以内で容易に視覚化され、48時間以上安定していた。全てのゲルは写真で記録された。全てのサンプルのハプトグロビン表現型が、患者に関する様々な知識無しに研究所で判定された。

【0115】

血漿サンプルは分析のために研究室に渡され、ハプトグロビン表現型の検査は、これらのサンプルのうち6個を除いて全て分析可能であった。これら6人の患者は、いかなるハプトグロビンも作らない患者(Hp0型表現型)なのか^{2,2}、^{2,3}、ハプトグロビンの濃度が上述したアッセイの検出リミットより低かったのか、明らかではない。

【0116】

H O P E 試験のサンプルは、ハプトグロビン表現型の検査を、実証された方法(Hochberg *et al* *Atherosclerosis* 2002; 161: 441-446)に従い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって10 μ lの血漿を用いて実施された。重要なバンドパターンが、1型対立遺伝子のホモ接合体(Hp1-1型)、2型対立遺伝子のホモ接合体(Hp2-2型)又はハプトグロビン遺伝子座においてヘテロ接合体(Hp2-1型)である個人から得られた。我々は、血漿から判定されたハプトグロビン表現型と、ポリメラーゼ連鎖反応によってゲノムDNAから判定されたハプトグロビン遺伝子型(Koch *W, et al* *Clin Chem* 2002; 277 :13635-40)が、100%一致することを実証した。はっきりとしたハプトグロビン表現型が、全てのサンプルアッセイの99.6%以上から得られた。ハプトグロビン表現型の検査は、患者の臨床又は治療状況の知識を持たずに実施された。

10

【0117】

統計的分析：

【0118】

C V Dのリスク要因である、年齢、性別、LDLとHDLコレステロール、トリグリセリド、最高血圧、BMI、糖尿病、喫煙、C V Dに関する家族歴及び登録センターについて、3つのハプトグロビン表現型間の比較はもちろん、症例と対照間の比較も行われた。加えて、インスリン、空腹時血糖値、HbA1c、DM期間及びDMの家族歴からなるDM特性について、3つのハプトグロビン表現型間の比較はもちろん、症例と対照間の比較も行われた。単変量及び多項ロジスティック回帰モデルが、これらのC V Dのリスク要因とDM特性が表現型に関係しているかを判定するために使用された。尤度比がパラメータをテストするために用いられた。

20

【0119】

C V Dのリスク要因及びDM特性を調整した3つのハプトグロビン表現型毎に、糖尿病患者がC V Dイベントを有する確率をモデル化するために、条件付のロジスティック回帰モデルが実行された。糖尿病と表現型の相互作用は、2つの指標変数を用いてコード化されており、1つは糖尿病患者で、もう1つは非糖尿病患者であった。モデルの適合は、残留物の分析によって評価された。

30

【0120】

H O P E 試験データの全ての分析は、S A S 6 . 0 2を使用して行われた。ハプトグロビンによる患者の基準特性は、必要に応じてtテスト又は²テストによって比較された。相対リスク(RRs)及び95%信頼区間が、心血管系死亡、非致死性心筋梗塞及び脳卒中の主要なアウトカムについて報告された。

【0121】

実験結果

40

【0122】

実施例I

【0123】

ハプトグロビン表現型は、糖尿病患者のC V Dのリスクの予測をする。

【0124】

C V Dのリスク要因及びDM特性による、症例対照コホートの臨床特性は、表1に示されている。

【0125】

【表1】

表1
症例対照によるCVDリスク要因状況

CVDリスク要因	対照群			症例群		
	平均	標準偏差		平均	標準偏差	
年齢	59.16	8.01		60.09	8.08	
LDLコレステロール	112.1	30.44		123.0	40.47	
	中央値	最小値	最大値	中央値	最小値	最大値
DM期間				6.00	0.00	41.00
最高血圧	124.0	81.00	210.0	131.0	88.00	205.0
BMI	29.76	17.71	48.07	29.84	19.59	72.36
HbA1c	4.00	4.00	13.10	7.20	4.00	15.50
空腹時血糖	118.5	77.00	365.0	148.0	57.00	354.0
インスリン	15.99	2.20	144.7	18.45	1.50	314.5
	n	%		N	%	
女性	102	49.51		102	49.51	
糖尿病	93	45.15		146	70.89	
現在喫煙者	136	66.0		143	70.69	
DM家族歴	131	63.5		145	70.34	
CVD家族歴	119	57.77		148	71.84	
センター	オクラホマ	74	35.92	74	35.92	
	オースタコ	73	35.44	73	35.44	
	アリゾナ	59	28.64	59	28.64	

10

20

30

【0126】

症例及び対照は、年齢、性別及び対象地域でマッチングされた。これらのデータは、糖尿病、LDLコレステロール及び高血圧症が、全てCVDの予測を行うための独立した判断材料であるという、この集団の以前の調査結果と一致している²⁰。

【0127】

このコホートのハプトグロビン表現型の検査は、1-1型が25%、2-1型が44%及び2-2型が31%という分布を明らかにした。1型対立遺伝子の度数は0.47であり、以前に報告されたこの集団のハプトグロビン対立遺伝子の度数と一致している²⁶。様々なCVDのリスク要因又はDM特性について、単変量解析及び1-1型表現型を有する確率をモデル化する多項ロジスティック回帰分析の両方で測定されたが、異なるハプトグロビン表現型間に著しい相違は発見されなかった。

40

【0128】

表2は条件付ロジスティック回帰を提供して、CVDのリスク要因及びDM特性の調整前後の、糖尿病及び非糖尿病の個人のハプトグロビン表現型毎にCVDイベントの確率を予測する。

【0129】

【表 2】

表2

CVD疾患の確率を予測する条件付ロジスティック回帰

未調整			
変数	OR	95% CI	p値
DM及びHp2-1 (対 DM及びHp1-1)	2.32	(1.27-4.23)	0.006
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp1-1)	5.08	(2.37-10.89)	<0.001
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp2-1)	3.26	(1.67-6.37)	<0.001
非DM、Hp2-1 (対 非DM及びHp1-1)	0.63	(0.33-1.20)	0.159
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp1-1)	1.10	(0.53-2.30)	0.795
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp2-1)	0.75	(0.40-1.38)	0.350

10

DM特性のみ調整済			
変数	OR	95% CI	p値
DM及びHp2-1 (対 DM及びHp1-1)	1.86	(0.93-3.69)	0.078
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp1-1)	3.90	(1.68-9.09)	0.002
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp2-1)	2.10	(1.00-4.40)	0.049
非DM、Hp2-1 (対 非DM及びHp1-1)	1.40	(0.48-4.09)	0.542
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp1-1)	2.31	(0.76-7.05)	0.141
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp2-1)	1.65	(0.73-3.75)	0.228

20

DM特性及びCVDリスク要因調整済			
変数	OR	95% CI	p値
DM及びHp2-1 (対 DM及びHp1-1)	1.85	(0.86-3.96)	0.116
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp1-1)	4.70	(1.86-11.88)	0.001
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp2-1)	2.55	(1.14-5.67)	0.022
非DM、Hp2-1 (対 非DM及びHp1-1)	1.70	(0.53-5.49)	0.373
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp1-1)	2.97	(0.90-9.77)	0.073
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp2-1)	1.75	(0.71-4.29)	0.225

30

40

【0130】

全てのCVDのリスク要因及びDM特性の調整後のこれらのデータは、ストロング・ハート・スタディ参加者の内の糖尿病患者で、ハプトグロビン表現型2-2型の患者は、CVDイベントを有している可能性が、1-1型表現型(p=0.001)の人より、4.7倍(1.86-11.88 OR 95% CI)高く、2-1型表現型(p=0.0

50

22)の人より、2.5倍(1.14 - 5.67 OR 95% CI)高いことを示している。更に、ハプトグロビン表現型2-1型の患者は、CVDイベントを有している可能性が、1-1型表現型の患者より1.8倍(0.86 - 3.96 OR 95% CI)高いが、統計的に有意ではなかった。総合すれば、これらのデータは糖尿病患者のCVDの進展が、ハプトグロビン2型の対立遺伝子の数によって与えられる段階的なリスクの存在を示唆している。

【0131】

最後に、非糖尿病患者では統計学的には五分五分な傾向が観察されており、ハプトグロビン表現型2-2型の非糖尿病患者は、CVDイベントを有している可能性が、1-1型表現型(p=0.073)の非糖尿病患者より、3.0倍(0.90 - 9.77 OR 95% CI)高いことを示している。

10

【0132】

表3はこれらの結果を要約している。

【0133】

【表3】

表3

DM及びCVDリスク要因調整済のCVD疾患の確率を予測する
条件付ロジスティック回帰

リスク要因	OR (CVD)	95% CI		p値
		最小値	最大値	
DM及びHp2-1 (対 DM及びHp1-1)	1.85	0.86	3.96	0.116
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp1-1)	4.70	1.86	11.88	0.001
DM及びHp2-2 (対 DM及びHp2-1)	2.55	1.14	5.67	.022
非DM、Hp2-1 (対 非DM及びHp1-1)	1.70	0.53	5.49	0.373
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp1-1)	2.97	0.90	9.77	0.073
非DM、Hp2-2 (対 非DM及びHp2-1)	1.75	0.71	4.29	0.225

20

30

【0134】

実施例II

【0135】

ハプトグロビン表現型は、糖尿病患者の抗酸化療法の効果を予測する。

【0136】

ハプトグロビン表現型の検査を受けるHOPEサンプルの患者の特性：血漿が初めに保管されていた元のHOPEコホートから、患者3176人分(糖尿病は1078人)のハプトグロビン表現型が得られた。これらの患者は、HOPEコホート全体からランダムに選択された一連の患者の代表であった。CVDのリスク要因及び投薬治療によるHOPEコホートの臨床特性は表4に示されている。

40

【0137】

【表4】

表4 HOPE試験における患者特性

	Hp 1-1 (N=487)	Hp 2-1 (N=1454)	Hp 2-2 (N=1226)
<u>人口統計データ</u>			
年齢(標準偏差)歳	65.8 (6.5)	65.4 (6.4)	65.3 (6.7)
女性 n (%)	105 (21.6)	309 (21.3)	290 (23.7)
<u>臨床特性</u>			
高血圧症 n (%)	220 (45.2)	577 (39.7)	499 (40.7)
糖尿病(DM) n (%)	177 (36.3)	502 (34.5)	399 (32.5)
高コレステロール血症 n (%)	324 (66.5)	967 (66.5)	841 (68.6)
現在喫煙者 n (%)	66 (13.6)	194 (13.3)	175 (14.3)
BMI(標準偏差)(kg/m ²)	28.0 (4.4)	27.9 (4.3)	27.6 (4.2)
<u>薬 n (%)</u>			
ベータブロッカー	216 (44.4)	636 (43.7)	527 (43.0)
アスピリン/抗血小板物質	384 (78.9)	1197 (82.3)	992 (80.9)
高脂血症治療薬	147 (30.2)	442 (30.4)	418 (34.1)
ラミプリル	256 (52.6)	808 (55.6)	641 (52.3)
ビタミンE	228 (46.8)	717 (49.3)	645 (52.6)

10

20

【0138】

HOPEコホートのこの小集団の基準特性は、全体コホートから著しく異ならなかった。ハプトグロビン表現型によって分類されたサンプルの基準特性は、基準人口統計、臨床又は治療特性に関して、著しい相違を示さなかった(表4)。

30

【0139】

Hp表現型のCVアウトカムへの影響：試験サンプル全体のハプトグロビン表現型(Hp 1-1型 45/259 17.4%、Hp 2-1型 113/737 15.3%、Hp 2-2型 95/581 16.4%、²のトレンド0.08、P=0.87)によれば、抗酸化療法を受けなかった被験者において、主要な評価項目(非致死性MI、脳卒中又は心血管系死亡)の発生率に著しい相違はなかった。しかしながら、上述のストロング・ハート・スタディで報告された結果(例として、実施例I及び「Levy AP, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: the strong heart study. J Am Coll Card 2002; 40: 1984-1990」を参照されたい。)と一致するが、抗酸化療法を受けなかったHOPE試験のDM患者については、Hp 2型の対立遺伝子と関係がある主要な評価項目(非致死性MI、脳卒中又は心血管系死亡)のリスクが増加することを発見した(Hp 1-1型 13/79 16.5%、Hp 2-1型 44/225 19.6%、Hp 2-2型 48/187 25.7%、²のトレンド5.67、P=0.02)。

40

【0140】

ビタミンEのCVアウトカムへの影響：表5はCVアウトカム(非致死性MI、脳卒中又は心血管系死亡)を、ビタミンE補給の有無、ハプトグロビン表現型との相関関係に関して、全患者及び糖尿病(DM)患者別に分析した結果を表している。

【0141】

【表 5】

表5 CVアウトカムとビタミンE補給の相対リスク比

全患者

	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	487	1454	1226
主要項目 (95% CI)	0.97 (0.63-1.50)	0.96 (0.74-1.25)	0.92 (0.69-1.22)
p値	NS	NS	NS
心血管系死亡 (95% CI)	1.10 (0.56-2.12)	1.07 (0.69-1.64)	0.75 (0.48-1.16)
p値	NS	NS	NS
心筋梗塞 (95% CI)	0.79 (0.47-1.33)	1.02 (0.75-1.38)	0.94 (0.68-1.30)
p値	NS	NS	NS
脳卒中 (95% CI)	1.50 (0.56-4.04)	0.92 (0.53-1.60)	0.85 (0.46-1.57)
p値	NS	NS	NS

10

DM患者のみ

	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	177	502	399
主要項目 (95% CI)	0.84 (0.40-1.79)	1.08 (0.72-1.61)	0.70 (0.45-1.10)
p値	NS	NS	NS
心血管系死亡 (95% CI)	0.64 (0.21-1.92)	1.0 (0.53-1.93)	0.45 (0.23-0.90)
p値	NS	NS	*
心筋梗塞 (95% CI)	0.83 (0.33-2.06)	0.99 (0.45-2.18)	0.57 (0.33-0.97)
p値	NS	NS	*
脳卒中 (95% CI)	2.24 (0.41-12.4)	0.99 (0.45-2.18)	1.15 (0.47-2.82)
p値	NS	NS	NS

20

30

【0142】

RRRはビタミンE無補給時と比較したビタミンE補給時のCVイベントのリスクの平均(95% CI)として与えられる。*、 $P < 0.05$ は統計的に有意。NS、統計的に有意ではない。

40

【0143】

試験されたサンプル全体において、ハプトグロビンの型が何であれ、いずれの主要なCVアウトカムにもビタミンEの補給に伴う著しい効果はなかった(表5、全患者)。更に、以前の報告(The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. N Eng J Med 2000; 342: 154-160)のように(表5、DM患者)、任意抽出のDM患者グループでは、ビタミンEの補給に著しい効果はなかった。意外にも、ハプトグロビン2-2型表現型を有するDM患者において、ビタミンE療法がCVによる死亡のリスクを著しく低下させ(RR 0.45、95% CI 0.23-0.90; $P = 0.003$)、非致死性心

50

筋梗塞 (M I) のリスクも著しく低下させた (R R 0 . 5 7、9 5 % 0 . 3 3 - 0 . 9 7 ; P = 0 . 0 2) 。その一方で、他のハプトグロビン表現型 (H p 1 - 1 型及び H p 2 - 1 型) を有する D M 患者では、いずれの主要な C V アウトカムに対してもビタミン E 療法の著しい効果は示されなかった。

【 0 1 4 4 】

ラミプリルの C V アウトカムへの影響：表 6 は C V アウトカム (非致死性 M I、脳卒中又は心血管系死亡) を、ラミプリル補給の有無、ハプトグロビン表現型との相関関係に関して、全患者及び糖尿病 (D M) 患者別に分析した結果を表している。

【 0 1 4 5 】

【表 6】

表 6 CVアウトカムとラミプリル補給の相対リスク比

全患者

	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	453	1349	1129
主要項目 (95% CI)	0.74 (0.47-1.17)	0.81 (0.62-1.07)	0.76 (0.57-1.02)
p値	NS	NS	NS
心血管系死亡 (95% CI)	0.58 (0.29-1.18)	1.02 (0.66-1.58)	0.87 (0.55-1.37)
p値	NS	NS	NS
心筋梗塞 (95% CI)	0.61 (0.35-1.06)	0.88 (0.64-1.20)	0.83 (0.59-1.17)
p値	NS	NS	NS
脳卒中 (95% CI)	0.91 (0.33-2.51)	0.68 (0.38-1.21)	0.53 (0.27-1.04)
p値	NS	NS	NS

DM患者のみ

	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2
N	177	502	399
主要項目 (95% CI)	0.78 (0.35-1.75)	0.97 (0.72-1.61)	0.57 (0.36-0.90)
p値	NS	NS	*
心血管系死亡 (95% CI)	0.42 (0.13-1.36)	0.97 (0.50-1.88)	0.56 (0.28-1.12)
p値	NS	NS	NS
心筋梗塞 (95% CI)	0.53 (0.19-1.46)	0.99 (0.81-2.13)	0.57 (0.38-1.12)
p値	NS	NS	NS
脳卒中 (95% CI)	1.29 (0.21-7.82)	0.58 (0.25-1.34)	0.42 (0.16-1.09)
p値	NS	NS	NS

【 0 1 4 6 】

*、P < 0 . 0 5 は統計的に有意。NS、統計的に有意ではない。RRRはラミプリル無補給時と比較したラミプリル補給時の C V イベントのリスクの平均 (9 5 % C I) として与えられる。

【 0 1 4 7 】

サンプル全体の分析から明らかなように、ハプトグロビンの型が何であれ、いずれの主要な C V アウトカムにもラミプリルの補給に伴う著しい効果はなかった (表 6、全患者)

10

20

30

40

50

。そして、ビタミンEの効果と同様に(表5、DM患者)、任意抽出のDM患者グループでは、ラミプリルの補給に著しい効果はなかった。意外にも、脳卒中、CVによる死亡及び心筋梗塞からなる主要な評価項目に対するラミプリルからの著しい効果が、ハプトグロビン2-2型表現型を有する糖尿病(DM)患者だけに認められた(RR0.57、95%CI0.36-0.90; P<0.05)。他のハプトグロビン表現型(Hp1-1型、Hp1-2型)では、いずれの主要なCVアウトカムに対してもラミプリルによる効果はなかった(表6)。

【0148】

本発明のいくつかの特徴は、その内容を明確にするために実施態様を分けて記載されているが、それらを組み合わせた単一の実施態様で提供されても良いことを理解されたい。反対に、本発明の様々な特徴は、その説明を簡潔にするために単一の実施態様として記載されているが、別の即ちいくつかの好適なサブコンビネーションで提供されても良い。

10

【0149】

本発明は、特定の実施態様を基に記載されているが、多くの選択肢、変更及び変化があることは、当業者には明らかである。従って、そのような選択肢、変更及び変化の全てを含むことは、本願明細書に記載の請求項の精神と範囲を逸脱しない。本願明細書に記載された全ての出版物、特許及び特許出願は、あらゆる面においてここに言及したことで本願の一部とする。同様に、各出版物、特許又は特許出願が具体的及び個別に示されている場合も、ここに言及したことで本願の一部とする。加えて、本願明細書中では、様々な参考文献を引用し、或いは特定しているが、それらが本発明に対する従来技術であると自ら認められたものであると解釈しないでいただきたい。

20

【0150】

参考文献リスト

1. Howard BV, Magee MF. Diabetes and Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2: 476-481.
2. Aronson D, Rayfield EJ. Diabetes in *Textbook of Cardiovascular Medicine*. Topol EJ ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1998: 171-194.
3. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diab Care* 1993; 16: 434-444.
4. Kannel W, McGee D. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease. The Framingham Study. *Diab Care* 1979; 2: 120-126.
5. Jarrett RJ, Shipley MJ. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus and cardiovascular disease-putative association via common antecedents: Further evidence from the Whitehall Study. *Diabetologia* 1988; 31: 737-740.
6. Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, et al. Hyperhyglyceridemia as a risk factor for coronary artery disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes: Results from the 11-year follow up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 1989; 32: 300-304.
7. Donahue RP, Orchard TG. Diabetes mellitus and macrovascular complications. An epidemiological perspective. *Diab Care* 1992; 15: 1141-1155.
8. Barret-Connor E, Cohn B, Wingard D, Edelstein SL. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *JAMA* 1991; 265: 627-631.
9. Hammoud T, Tanguay JF, Bourassa MG. Management of coronary artery disease: therapeutic options in patients with diabetes. *J Am Coll Card* 2000; 36: 355-365.
10. Head J, Fuller JH. International variations in mortality among diabetic patients. The WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics. *Diabetologia* 1990; 33: 447-481.
11. Grimaldi A, Heurtier A. Epidemiology of cardiovascular complications of diab

30

40

50

- etes. *Diab Metab* 1999; 3: 12-20.
12. Woods KL, Samanta A, Burden AC. Diabetes mellitus as a risk factor for acute myocardial infarction in Asians and Europeans. *Br Ht J* 1989; 62: 118-122.
13. Cruickshank JK, Alleyne SA. Black West Indian and matched white diabetics in Britain compared with diabetics in Jamaica: body mass, blood pressure and vascular disease. *Diab Care* 1987; 10: 170-179.
14. UK Prospective Diabetes Study Group. Ethnicity and cardiovascular disease. The incidence of myocardial infarction in white, south Asian and afro-Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diab Care* 1998; 21: 1271-1277.
15. Mather HM, Chaturvedi N, Fuller JH. Mortality and morbidity from diabetes in south Asians and Europeans: 11-year follow up of the southall diabetes survey, London, UK. *Diab Med* 1998; 15: 53-59. 10
16. Chaturverdi N, Jarrett J, Morrish N, Keen H, Fuller JH. Differences in mortality and morbidity in African-caribbean and European people with non-insulin dependent diabetes mellitus: results of 20 year follow up of a London cohort of a multinational study. *Brit Med J* 1996; 313: 848-852.
17. Chaturverdi N, Fuller JH. Ethnic differences in mortality from cardiovascular disease in the UK: do they persist in people with diabetes? *J Epid Comm Health* 1996; 50: 137-139.
18. Samanta A, Burden AC, Jagger C. A comparison of the clinical features and vascular complications of diabetes between migrant Asians and Caucasians in Leicester, UK. *Diab Res Clin Pract* 1991; 14: 205-213. 20
19. Hoy W, Kelly A, Jacups S, et al. Stemming the tide: reducing cardiovascular disease and renal failure in Australian Aborigines. *Aust N Z J Med* 1999; 29: 480-483.
20. Howard BV, Lee ET, Cowan LD, et al. Rising tide of cardiovascular disease in American Indians. The Strong Heart Study. *Circ* 1999; 99: 2389-2395.
21. Dobryszczycka W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem* 1997; 35: 647-654.
22. Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Gen* 1982; 12: 189-261. 30
23. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42: 1589-1600.
24. Delanghe J, Langlois M, Ouyang J, Claeys G, De Buyzere M, Wuyts B. Effect of haptoglobin phenotypes on growth of *Streptococcus pyogenes*. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 691-696.
25. Quaye IK, Ekuban FA, Goka BQ, et al. Haptoglobin 1-1 is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 216-219.
26. Giblett ER. *Genetic Markers in Human Blood*. Oxford, Blackwell Scientific, 1969: 63-125. 40
27. Levy AP, Roguin A, Marsh S, et al. Haptoglobin phenotype and vascular complications in diabetes. *N Eng J Med* 2000; 343: 369-370.
28. Nakhoul F, Marsh S, Hochberg I, Leibur R, Miller B, Levy AP. Haptoglobin phenotype and diabetic retinopathy. *JAMA* 2000; 284: 1244-1245.
29. Nakhoul F, Zoabi R, Kantor Y, et al. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001; in press.
30. Roguin A, Hochberg I, Nikolsky E, et al. Haptoglobin phenotype as a predictor of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Card* 2001; 87: 330-332. 50

31. Delanghe J, Cambier B, Langlois M, et al. Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery. *Atheroscler* 1997; 132: 215-219.
32. Chapelle JP, Albert A, Smeets JP, Heusghem C, Kulbertus HE. Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct. *N Eng J Med* 1982; 307: 457-463.
33. Delanghe JR, Duprez DA, De Buyzere ML, et al. Haptoglobin polymorphism and complications in established essential arterial hypertension. *J Hyper* 1993; 11: 861-867.
34. Surya Prabha P, Padma T, Ramaswamy M. Haptoglobin patterns in essential hypertension and associated conditions-increased risk for Hp 2-2. *Hum Herid* 1987; 37: 345-348. 10
35. Golabi P, Kshatriya GK, Kapoor AK. Association of genetic markers with coronary heart disease (myocardial infarction)-a case-control study. *J Ind Med Assoc* 1999; 97: 6-7.
36. Hong SH, Kang BY, Lim JH, et al. Haptoglobin polymorphism in Korean patients with cardiovascular disease. *Hum Herid* 1997; 47: 283-287.
37. Bilgrami G, Tyagi SP, Qasim A. Serum haptoglobin cases of ischemic heart disease. *Jpn Heart J* 1980; 21: 505-510.
38. Frohlander N, Johnson O. Haptoglobin groups in acute myocardial infarction. *Hum Herid* 1989; 39: 345-350. 20
39. Lee ET, Welty TK, Fabsitz R, et al. The Strong Heart Study: a study of cardiovascular disease in American Indians: design and methods. *J Epid* 1990; 132: 1141-1155.
40. Howard BV, Welty TK, Fabsitz R, et al. Risk factors for coronary heart disease in diabetic and nondiabetic North Americans: the Strong Heart Study. *Diabetes* 1992; 41: 4-11.
41. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second Report. Geneva, World Health Organization. 1980 (technical report series 646).
42. Lee ET, Cowan LD, Howard WJ, et al. All cause mortality and cardiovascular disease mortality in 3 American Indian populations aged 45 to 74 years, 1984 to 1988: the Strong Heart Study. *Am J Epidem* 1998; 147: 995-1008. 30
43. Howard BV, Lee ET, Cowan LD, et al. Coronary heart disease prevalence and its relation to risk factors in American Indians: the Strong Heart Study. *Am J Epidem* 1995; 142: 254-268.
44. Linke RP. Typing and subtyping of haptoglobin from native serum using disc gel electrophoresis in alkaline buffer: application to routine screening. *Anal Biochem* 1984; 141: 55-61.
45. Wassell J, Keevil B. A new method for haptoglobin phenotyping. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 609-612.
46. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem* 1955; 61: 629-641. 40
47. McGill MJ, Donnelly R, Molyneaux L, Yue DK. Ethnic differences in the prevalence of hypertension and proteinuria in NIDDM. *Diab Res Clin Pract* 1996; 33: 173-179.
48. Habib G, Heibig J, Forman S, et al. Influence of coronary artery collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase 1 thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. *Circulation* 1991; 83: 739-746.
49. Guigliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diab Care* 1996; 19: 257-267.
50. Nisbikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism 40

hanism for diabetic complications. *Kid Int* 2000; 58 (S77): S26-S30.

51. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the hemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409: 198-201.

52. Resnick D, Pearson A, Krieger M. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 5-8.

53. Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. Current concepts: the macrophage as an effector cell. *N Eng J Med* 1980; 303: 622-626.

54. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 333-337. 10

55. Rosenfeld ME, Khoo JC, Miller E, Parthasarathy S, Palinski W, Witztum JL. Macrophage-derived foam cells freshly isolated from rabbit atherosclerotic lesions degrade modified lipoproteins, promote oxidation of low-density lipoproteins, and contain oxidation specific lipid protein adducts. *J Clin Invest* 1990; 87: 90-99

56. Van den Heuvel MM, Tensen CP, van As JH, et al. Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leuk Biol* 1999; 66: 858-866.

57. Wagner L, Gessl A, Baumgartner Parzer S, Base W, Waldhausl W, Pasternack MS. Haptoglobin phenotyping by newly developed monoclonal antibodies. Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes. *J Imm* 1996; 156: 1989-1996. 20

58. El Ghmati SM, Van Hoeyveld EM, Van Strijp JAG, Ceuppens JL, Stevens EAM. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J Imm* 1996; 156: 2542-2552.

59. Chia MC. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998; 35: 573-602.

60. Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Art Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1417-1420. 30

【配列表】

[2007516718000001.xml](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/IL04/01006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/04; C12Q 1/68		
US CL : 435/6; 536/23.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6; 536/23.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/37419 A (DELANGHE) 27 August 1998 (27.08.1998), see Claim 33 for example	29
Y	DELANGHE et al. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. Atherosclerosis, Vol. 145, pages 287-292, 1999.	1-28
Y	ASLEH et al. Genetically Determined Heterogeneity in Hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. Circulation Research. Vol. 92, pages 1193-1200, 2003.	1-29
Y	MELAMED-FRANK et al. Structure-Function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. Blood. Vol. 98, pages 3693-3698, December 2001.	1-29
X, P	LEVY et al. The effect of vitamin therapy on the progression of coronary artery atherosclerosis varies by haptoglobin type in postmenopausal women. Diabetes Care. Vol. 27, No. 4, pages 925-930, April 2004.	1-29
A	LEVY et al. The effect of vitamin E supplementation on Cardiovascular risk in diabetic individuals with different haptoglobin phenotypes. Diabetes Care. Vol. 27, No. 11, page 2767.	1-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 17 November 2005 (17.11.2005)		Date of mailing of the international search report 07 FEB 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Jeanine Enewold Golabeg Telephone No. (571)-272-1600

フロントページの続き

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

(74)代理人 100089266

弁理士 大島 陽一

(72)発明者 レビー、アンドリュー・ピー

イスラエル国キリヤットシュミュエル2 6 3 4 1・マリストリート 2 / 4

Fターム(参考) 4B063 QA12 QA19 QQ43 QR32 QR40 QR62 QS16 QS24 QS25

专利名称(译)	预测抗氧化疗法是否有效预防高血糖症患者的心血管疾病的方法		
公开(公告)号	JP2007516718A	公开(公告)日	2007-06-28
申请号	JP2006546470	申请日	2004-11-03
申请(专利权)人(译)	小号口家庭研究院研究在医学科学		
[标]发明人	レビーアンドリューパー		
发明人	レビー、アンドリューパー		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/156 G01N33/6893 G01N2800/042 G01N2800/32		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS24 4B063/QS25		
优先权	10/748177 2003-12-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种预测特定DM患者是否具有发生心血管疾病的低风险或预防性抗氧化剂疗法对于特定亚组患者是否有效的方法。在方法在糖尿病患者的血管并发症的治疗中的抗氧化剂疗法来测量是有效的有效糖尿病患者的潜力，并测定糖尿病患者的触珠蛋白的表型的方法，由此抗氧化剂治疗为了确定获得它的可能性。患者表型触珠蛋白2-2型，而不是患者触珠蛋白表型1-2型或触珠蛋白表型1-1型，抗氧化剂治疗是有效的。

CVDリスク要因	対照群			症例群		
	平均	標準偏差		平均	標準偏差	
年齢	59.16	8.01		60.09	8.08	
LDLコレステロール	112.1	30.44		123.0	40.47	
	中央値	最小値	最大値	中央値	最小値	最大値
DM期間				6.00	0.00	41.00
最高血圧	124.0	81.00	210.0	131.0	88.00	205.0
BMI	29.76	17.71	48.07	29.84	19.59	72.36
HbA1c	4.00	4.00	13.10	7.20	4.00	15.50
空腹時血糖	118.5	77.00	365.0	148.0	57.00	354.0
インスリン	15.99	2.20	144.7	18.45	1.50	314.5
	n	%		N	%	
女性	102	49.51		102	49.51	
糖尿病	93	45.15		146	70.89	
現在喫煙者	136	66.0		143	70.69	
DM家族歴	131	63.5		145	70.34	
CVD家族歴	119	57.77		148	71.84	
センター	オクラホマ	74	35.92	74	35.92	
	サウスカロ	73	35.44	73	35.44	
	アリゾナ	59	28.64	59	28.64	