

(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2011-505579

(P2011-505579A)

(43) 公表日 平成23年2月24日(2011.2.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50 P	2 GO 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 37/00 1 O 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁)

(21) 出願番号	特願2010-537043 (P2010-537043)	(71) 出願人	306036668 ユニバーシティ オブ マイアミ アメリカ合衆国 フロリダ 33136, マイアミ, エヌ. ダブリュー. 12 ティーエイチ アベニュー 1475
(86) (22) 出願日	平成20年12月4日 (2008.12.4)	(74) 代理人	100080089 弁理士 牛木 護
(85) 翻訳文提出日	平成22年7月30日 (2010.7.30)	(74) 代理人	100137800 弁理士 吉田 正義
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/085489	(74) 代理人	100125081 弁理士 小合 宗一
(87) 国際公開番号	W02009/073764	(74) 代理人	100161665 弁理士 高橋 知之
(87) 国際公開日	平成21年6月11日 (2009.6.11)		
(31) 優先権主張番号	60/992, 204		
(32) 優先日	平成19年12月4日 (2007.12.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 眼圧を変調し、ステロイドの応答者と非応答者とを鑑別するための分子標的

## (57) 【要約】

ステロイドに応答する指標因子、薬物標的、ステロイド応答の予測因子、及び、眼圧を変調するための薬物を同定することに関する分子バイオマーカー。ステロイド応答者と非応答者とを同定及び鑑別するためのキット及び方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25 - 相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38 kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かのうち、少なくとも1個のマーカーを含むことを特徴とする、バイオマーカー組成物。

## 【請求項2】

10

20

30

40

50

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項1に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項3】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項1に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項4】

NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tiger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、

オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かを含むことを特徴とする、ステロイドに反応する患者を予測するためのバイオマーカー組成物。

【請求項 5】

1 個又は 2 個以上のマーカーが少なくとも 1 個の多型を含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項 6】

少なくとも 1 個のマーカーが少なくとも 1 個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項 7】

グルココルチコイド受容体の一塩基多型、及び / 又は、BclI、N766N 又はイントロン 4 の一塩基多型をさらに含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のバイオマーカー組成物。

【請求項 8】

患者から生物学的試料を得るステップと、

グルココルチコイド受容体の多型、及び / 又は、BclI、N766N 及び / 又はイントロン 4 の一塩基多型のうち、少なくとも 1 個を含むバイオマーカーを前記試料中で検出するステップと、

前記試料中の前記バイオマーカーのレベルと対照試料中の前記バイオマーカーのレベルとを比較するステップと、

ステロイド反応に関するリスクを予測するステップとを含むことを特徴とする、ステロイド反応に関するリスクを予測する方法。

【請求項 9】

前記バイオマーカーは、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体 158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー 6、サブファミリー C、メンバー 4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー 1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及び C2ドメイン含有 1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ 1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビン A 受容体、I 型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子 2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA 結合タンパク質 2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25 - 相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPL ヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126 染色体 14 オープン・リーディング・フレーム 126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子 1 デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子 1 デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 F ボックスタンパク質 3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様 1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質 LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有 32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様 3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン - プロリン、2 - オキソグルタル酸 4 - ジオキシゲナーゼ (プロリン 4 - ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ 1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン - 5 - カルボン酸レダクターゼ様)、

10

20

30

40

50

NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー2 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富口リシニリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かのうちの少なくとも1個を検出するステップを含むことを特徴とする、請求項4に記載の方法。

10

20

【請求項10】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

患者のステロイドのリスクは、対照患者と比較して眼圧が上昇することを含むことを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項13】

少なくとも1個のバイオマーカーの一塩基多型の1個又は2個以上を検出することが、ステロイドで患者を治療することのリスク予測であることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

30

【請求項14】

患者から生物学的試料を得るステップと、  
グルココルチコイド受容体の多型、及び/又は、BclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型のうち、少なくとも1個を含むバイオマーカーを前記試料中で検出するステップと、

前記試料中の前記バイオマーカーのレベルと対照試料中の前記バイオマーカーのレベルとを比較するステップと、

ステロイド応答者の患者とステロイド非応答者の患者とを鑑別するステップとを含むことを特徴とする、ステロイド応答者の患者とステロイド非応答者の患者とを鑑別する方法。

40

【請求項15】

前記バイオマーカーが、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM

50

\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、ミトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー2(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かのうちの少なくとも1個を検出するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項18】

少なくとも1個のバイオマーカーの一塩基多型1個又は2個以上を患者の試料中で検出

10

20

30

40

50

するステップが、ステロイド応答者と非応答者とを鑑別することを特徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

生物学的試料を提供するステップと、

候補治療剤とともに該生物学的試料をインキュベーションするステップと、

NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tiger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38 kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_02922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バ

10

20

30

40

50

リアント、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かを含むマーカーの1個又は2個以上を検出するために前記生物学的試料をスクリーニングするステップと、

前記生物学的試料と対照との発現レベルを比較するステップと、

候補治療剤を同定するステップとを含むことを特徴とする、候補治療剤を同定する方法。

【請求項20】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項17に記載の方法。

10

【請求項22】

前記バイオマーカーは、グルココルチコイド受容体の一塩基多型、及び/又は、BC1I、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型を前記試料中にさらに含むことを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

前記一塩基多型は、イムノアッセイ、ハイブリダイゼーション、プロット法、PCR又はバイオチップアレイを用いて検出されることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項24】

前記バイオチップが核酸アレイであることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

20

【請求項25】

NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキシグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (L

30

40

50

PP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)又はNM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かのうち、1個又は2個以上を含むことを特徴とする、ステロイド応答に関するリスクを予測するためのキット。

【請求項26】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項22に記載のキット。

【請求項27】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項22に記載の方法。

【請求項28】

前記バイオマーカーは、グルココルチコイド受容体の一塩基多型と、BclI、N766N及びイントロン4の一塩基多型とをさらに含むことを特徴とする、請求項22に記載のキット。

【請求項29】

前記マーカーが、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチピンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、

10

20

30

40

50

NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキシグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富口リシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBc1I、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、バリエント、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエント、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かからなるグループから選択された少なくとも1個の一塩基多型を含む、マーカ-か、その遺伝子産物かに特異的な抗体。

【請求項30】

NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチピンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富口イシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_01555

0 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かのうちの少なくとも1個を検出するステップを含むことを特徴とする、ステロイド応答者と非応答者とを同定、診断又は鑑別する方法。

【請求項31】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項27に記載の方法。 30

【請求項32】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デ 40 50

ルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質)、NM\_\_012175(FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406(FBXO3)、NM\_\_005574(LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835(LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512(LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010(MAP2K4、ミトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550(OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320(OSBPL3)、NM\_\_145321(OSBPL3)、NM\_\_000918(P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845(PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078(PYCR1、PYCR1 ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862(TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955(SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578(LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946(DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051(FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163(APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565(ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116(FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717(LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060(SLC22A5)、NM\_\_003060(SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813(LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962(NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922(RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782(RGS18)、NM\_\_001009992(ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697(POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かを含む、1個又は2個以上の核酸、それらの変異体、バリエーション、断片及び対応するペプチドのいずれかを含むことを特徴とする、バイオチップ。

【請求項34】

NM\_\_020752(GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494(OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791(FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487(MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721(CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504(BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105(ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548(IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225(IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248(SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152(NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664(C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179(DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960(EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378(EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デ

ルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質)、NM\_\_012175(FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406(FBXO3)、NM\_\_005574(LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835(LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512(LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010(MAP2K4、ミトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550(OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320(OSBPL3)、NM\_\_145321(OSBPL3)、NM\_\_000918(P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845(PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078(PYCR1、PYCR1 ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862(TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポートザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955(SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578(LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946(DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051(FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163(APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565(ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116(FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717(LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060(SLC22A5)、NM\_\_003060(SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813(LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962(NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922(RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782(RGS18)、NM\_\_001009992(ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697(POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かの遺伝子産物又は核酸に特異的な1種類又は2種類以上の抗体及びその断片か、アプタマーかのいずれかを含むことを特徴とする、バイオチップ。

【請求項35】

NM\_\_020752(GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494(OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791(FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487(MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721(CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504(BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105(ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548(IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225(IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248(SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152(NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664(C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179(DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960(EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378(EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デ

ルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質)、NM\_\_012175(FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406(FBXO3)、NM\_\_005574(LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835(LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512(LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010(MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550(OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320(OSBPL3)、NM\_\_145321(OSBPL3)、NM\_\_000918(P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845(PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078(PYCR1、PYCR1 ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862(TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポートザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955(SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578(LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946(DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051(FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163(APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565(ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116(FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717(LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060(SLC22A5)、NM\_\_003060(SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813(LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962(NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922(RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782(RGS18)、NM\_\_001009992(ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697(POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルコルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かを含む分子の1種類又は2種類以上を標的にすることによって前記遺伝子産物の発現又は活性を変調することを特徴とする、薬剤。

10

20

30

40

50

【請求項36】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項32に記載の薬剤。

【請求項37】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項32に記載の薬剤。

【請求項38】

NM\_\_020752(GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494(OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791(FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487(MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721(CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504(BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105(ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548(IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225(IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_

025248 (SNIP、SNAP25 - 相互作用タンパク質)、NM\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_033406 (FBXO3)、NM\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_145320 (OSBPL3)、NM\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tiger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター(dedicator)2)、NM\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38 kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_003060 (SLC22A5)、NM\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_014813 (LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_130782 (RGS18)、NM\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのアレル、バリエーション、変異体、ホモログ、断片か、相補性配列かのうち、いずれか1個又は2個以上のバイオマーカーを含むバイオチップに接触するステップを含むことを特徴とする、ステロイドのように使用するための新規の治療用組成物を同定し、及び/又は、眼圧を変調する方法。

【請求項39】

1個又は2個以上のマーカーが少なくとも1個の多型を含むことを特徴とする、請求項35に記載の方法。

【請求項40】

少なくとも1個のマーカーが少なくとも1個の一塩基多型を含むことを特徴とする、請求項35に記載の方法。

【請求項41】

前記バイオチップは、前記バイオマーカーのいずれか1個又は2個以上に特異的なポリヌクレオチド、アダマー、ペプチド又は抗体を含むことを特徴とする、請求項35に記載

10

20

30

40

50

載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施態様は、分子バイオマーカー、薬物標的、ステロイド応答の予測及び眼圧の変調に関する。

【背景技術】

【0002】

出願に関する相互参照

本出願は、2007年12月4日に出願され、受理された米国仮特許出願第60/992,204号の優先権を主張し、引用により全体として本明細書に取り込まれる。

【0003】

緑内障は、視神経乳頭の陥凹と、視神経からの軸索の喪失と、これらの軸索を投射する網膜神経節細胞の死とによって特徴付けられる一連の疾患である。この特徴的な一連の特徴は緑内障性視神経症と呼ばれる。眼の眼圧の上昇は緑内障の主要なリスク因子である。

【0004】

コルチコステロイド治療は、黄斑疾患、ブドウ膜炎及びドライアイ疾患を含む、眼のさまざまな疾患のための一般的な治療となった。薬物は、点眼薬と、硝子体内注射と、外科的に移植されたデバイスからの徐放性放出とを含む、さまざまな手段によって眼に直接的に送達される。これは、コルチコステロイド治療の全身性の副作用を非常に小さくする。コルチコステロイド治療の主要な合併症は、眼圧(IOP)の上昇である。この上昇はかなり著しい場合があり、管理しない場合には、急速に視神経症になる場合がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

概要

この概要は、本発明の性質及び実体を簡潔に表すための本発明の概要を示すために提供される。概要は、特許請求の範囲、すなわち、意味を解釈するか、あるいは限定するために用いられないであろうとの理解のもとに提示される。

【0006】

本発明の実施態様は、一塩基多型によって同定された分子バイオマーカーの組成物を提供する。これらのマーカーは、ステロイドで誘導されたIOPの上昇と、ステロイド応答を予測するために用いられる場合がある一連の一塩基多型との薬理ゲノミクス的な関係があることを示す。これらのSNPsのそれぞれは、約 $10^{-2}$ から $10^{-8}$ までの統計的有意差でステロイド応答と連鎖した。

【0007】

これらのSNPsは、特定の遺伝子の非コード領域に主にある。ヒトゲノムは、一連のSNPsが進化の過程で一緒に留まるハプロタイプブロック(haplotype blocks)から構成され、非原因性SNPsは原因性多型が残存する場合があり、したがって、表現型予測因子として役立つ場合がある。さらに、それらは眼圧の制御に潜在的に関係する遺伝子も同定する。これらの遺伝子は、いったんより完全に特徴付けられると、眼圧及び緑内障を制御するための薬物標的として役立つ場合がある。

【0008】

本発明の別の局面は以下に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】バイオマーカーを同定するのに用いられた方法のうちのステップ1つを示す概略図。

【図2】得られた結果のうちのいくつかを示すゲルの写真。

【図3】ステロイド応答リスク、例えば、眼圧を示す概略図。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0010】

## 詳細な説明

本発明は、ステロイドに応答しないであろう患者を同定する際の一塩基多型 (SNP) を含む、バイオマーカーの分子的特徴 (molecular signatures) を含む。コルチコステロイド治療の主要な合併症は、眼圧 (IOP) の上昇である。この上昇はかなり著しい場合があり、管理しない場合には、急速に視神経症をもたらす場合がある。医学的に重要なコルチコステロイド応答は患者の約40%で起こるが、今のところ、ステロイドに応答するであろう患者を予測することは不可能である。治療前に応答者と非応答者とを同定するための方法及びキットが提供される。

10

## 【0011】

本発明の多くの局面が、例示のための応用例に関して以下に説明される。多数の具体的な詳細、相互関係及び方法が、本発明の完全な理解を提供するために列挙されると理解されるべきである。しかし、当業者は、本発明が、1つ又は2つ以上の具体的な詳細なしにか、あるいは別の方法とともに実施される場合があると容易に認識するであろう。別の例では、周知の構造又は作業は、本発明を不明瞭にすることを回避するために詳細に示されない。本発明は、いくつかの作業が、異なる順番で、及び/又は、別の作業又は事象と同時に起こる場合があるように、作業又は事象の図示された順番によって限定されない。さらに、図示された作業又は事象の全てが、本発明に応じる方法を実行するために必要とされるわけではない。

20

## 【0012】

別に定義される場合を除いて、本明細書で用いられる (技術用語及び科学用語を含む) 用語の全ては、本発明の属する当業者によって一般的に理解されるのと同じの意味を有する。一般的に用いられる辞書で定義されるような用語は、関連技術に関するそれらの意味と一致する意味を有しているとして解釈されるべきであり、本明細書で特に明確に定義される場合を除いて、理想とされるか、あるいは過度に形式ばった意味で解釈されないであろうとさらに理解されるであろう。

## 【0013】

## 定義

本明細書で用いられる用語は、特定の実施態様をただ説明するだけの目的であり、本発明を限定することを意図するものではない。本明細書で用いられるところの単数形の「1つ (a)」、「1つ (an)」及び「前記又は該 (the)」は、状況が別に明示される場合を除いて、複数形も含むことが意図される。さらに、詳細な説明及び/又は特許請求の範囲のいずれかで用いられる「含む (including)」、「含む (includes)」、「有する (having)」、「有する (has)」、「有する (with)」又はそれらの変形 (variants) の用語である限り、かかる用語は前記用語の「含む」と類似するやり方で含むことが意図される。

30

## 【0014】

本明細書で用いられるところの「試験物質」又は「候補治療剤」という用語は本明細書で互換的に用いられ、前記用語は、疾患その他の医学上の症状を予防するか、軽減するか、あるいは治療することが可能な分子、化合物 (chemical entity)、組成物、薬物、治療剤、化学療法剤又は生物製剤のいずれかを含むことを意味する。前記用語は、低分子化合物、アンチセンス試薬、siRNA試薬、抗体等を含む。試験物質は、臨床試験中か、試行前の試験中か、あるいはFDAの承認後のいずれかの段階で本発明の方法に従ってアッセイされる場合がある。

40

## 【0015】

本明細書で用いられるところの「遺伝子」という用語は、遺伝子と、現在知られるこのバリエーション全てと、明らかにされる場合があり、異なる種を含む追加のバリエーションのいずれかとを意味する。

## 【0016】

50

本明細書で用いられる「バイオマーカーポリヌクレオチド」（又はバイオマーカー核酸）は、例えば、表1-3に開示されたようなヌクレオチド配列を含む分子を指す。これらのマーカーは少なくとも1個の多型を含み、一塩基多型（SNPs）が好ましいが、本発明の実施態様はSNPsだけに限られない。特に含まれるものは、細胞、無細胞又は合成の供給源と、ゲノム及びcDNAの配列、スプライシングされていないか、あるいは部分的にスプライシングされた転写産物及びスプライシング産物とから得られたDNA及びRNAの分子である。また、含まれるものはアミノ酸骨格（backbone）に塩基を結合することによって形成された「タンパク質核酸」（PNAs）である。本発明の核酸配列は、1本鎖又は2本鎖（例えば、DNA-DNA、DNA-RNA及びRNA-RNAのハイブリダイゼーション産物）の場合があり、センス鎖又はアンチセンス鎖（例えば、相補的配列）を示す場合がある。また、バイオマーカーポリヌクレオチドの機能的な等価物をエンコードしている核酸（例えば、その断片、アレル、ホモログ、バリエーション及び誘導体）は本発明によって包含される。

10

**【0017】**

「バイオマーカーポリペプチド」（又はバイオマーカータンパク質）とは、例えば、表1-3のポリヌクレオチドの核酸配列のアミノ酸配列を含む分子を指し、いずれかの種、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトと、細胞、無細胞、合成、半合成又は組換え体の供給源を含むさまざまな供給源とから得られる場合がある。また、ポリペプチド（例えば、その断片、バリエーション及び誘導体）の機能的な等価物は本発明によって包含される。

20

**【0018】**

本明細書で用いられるところの「分子的特徴」又は「特徴（signature）」又は「バイオマーカープロファイル」は、表1ないし3に同定された核酸、その変異体、バリエーション、断片及びペプチドを指す。しかし、このリストは、より多くの核酸分子が同定される際には、拡張されるか、あるいは修正される場合がある。

30

**【0019】**

ポリヌクレオチド及びポリペプチドの「バリエーション」は、例えば、表1-3の前記核酸分子と比較して、1個又は2個以上の欠失、挿入及び/又は置換を含む分子を含む。ポリペプチドバリエーションは、同一又は機能的な等価物のバイオマーカーポリペプチドをエンコードする場合がある。「バリエーション」という用語とは、ポリペプチドに関して用いられる際には、1種類又は2種類以上のアミノ酸残基によって変化されるアミノ酸配列を指す。前記バリエーションは「保存的な」変化を有する場合があり、置換されたアミノ酸は、類似の構造又は化学的特徴を有する（例えば、イソロイシンでのロイシンの置換）。より稀に、バリエーションは「非保存的な」変化を有する場合がある（例えば、トリプトファンでのグリシンの置換）。類似の小さな変化は、アミノ酸の欠失又は挿入か、両方かを含む場合もある。生物学的活性を消失することなく、置換されるか、挿入されるか、あるいは欠失される場合があるアミノ酸を決定する際の指針が、当業者に周知のコンピュータープログラム、例えば、LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）を用いて見出される場合がある。

40

**【0020】**

「バリエーション」という用語とは、ポリヌクレオチド配列に関して用いられる際には、野生型遺伝子に関するポリヌクレオチド配列を含む場合がある。この定義は、例えば、「アレル」、「スプライシング」、「種」又は「多型」のバリエーションも含む。スプライシングバリエーションは参照分子と顕著な同一性を有する場合があるが、mRNAのプロセッシング中にエクソンのスプライシングが交互に起こるために、より大きいか、あるいはより小さいポリヌクレオチドであることが一般的である。対応するポリペプチドは、追加の機能的ドメインを有するか、あるいはドメインを有しない場合がある。種バリエーションは、1種類の種からもう1種類の種に変化するポリヌクレオチド配列である。本発明で特に有用なものは、野生型遺伝子産物のバリエーションである。バリエーションは核酸配列の少なくとも1個の突然変異から生じる場合があり、構造又は機能が変化されるか、あるいは変化されない場合がある、改変型mRNA又はポリペプチドを生じる場合がある。特定の天然遺伝子又は

50

50

組換え遺伝子のいずれかは、アレル型を、全く有しないか、1個有するか、あるいは多数有する場合がある。バリエーションを生じる通常の突然変異の変化は、ヌクレオチドの天然の欠失、付加又は置換が原因であることが一般的である。これらの変化タイプのそれぞれは、特定の配列において1回又は2回以上、単独か、別の変化タイプとの組み合わせかで生じる場合がある。

#### 【0021】

生成ポリペプチドは、互いに関連する重要なアミノ酸の同一性を有することが一般的であろう。多型バリエーションは、個別の特定の種間における特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列の変化である。多型バリエーションは「一塩基多型」(SNPs)、すなわち、前記ポリヌクレオチド配列が一塩基によって変化する一塩基突然変異を含む場合もある。SNPsの存在が、例えば、感受性又は耐性である疾患状態の性質を有する特定の集団を示す場合がある。

10

#### 【0022】

「ポリヌクレオチド誘導体」は、化学修飾、例えば、アルキル基、アシル基又はアミノ基による水素の置換を受けた核酸を含む。誘導体、例えば、オリゴヌクレオチド誘導体は、改変型糖原子団か、糖間(inter-sugar)結合かのような非天然部分を含む場合がある。これらのうちで模範的なものは、ホスホロチオエートと、硫黄を含む当業者に知られるその他の化学種とである。核酸誘導体は、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光物質、化学発光剤、発色剤、基質、補因子、阻害剤、磁性粒子等を含む、標識を含む場合もある。

20

#### 【0023】

ポリペプチド又はペプチドの「誘導体」は、例えば、グリコシル化、ペグ化、リン酸化、硫酸化、還元/アルキル化、アシル化、化学共役又は軽いホルマリン処理によって改変されたものである。誘導体は、放射性同位元素、蛍光及び酵素の標識を含むが、これらに限られない検出可能な標識を含むように、直接的か、間接的かのいずれかで改変される場合もある。

#### 【0024】

「オリゴヌクレオチド」又は「オリゴマー」とは核酸を指し、該核酸は、長さが、少なくともヌクレオチド約6個ないしヌクレオチド約60個の連続的なヌクレオチドを含むことが好ましく、少なくともヌクレオチド約8個ないし10個が好ましく、少なくともヌクレオチド約12個がより好ましく、例えば、ヌクレオチド約15個ないし35個か、ヌクレオチド約15個ないし25個か、ヌクレオチド約18個ないし20個か、ヌクレオチド約20個ないし35個かは、PCR増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ又はマイクロアレイで典型的に用いられる場合がある。「オリゴヌクレオチド」という用語は、当業者に一般的に定義されたようなプライマー、プローブ又はアンプリマー(amplimer)という用語と実質的に同義であると理解されるであろう。また、より長いオリゴヌクレオチドプローブか、プローブの混合物、例えば、縮重プローブかは、より長い又はより複雑な核酸配列、例えば、ゲノムDNAを検出するために用いられる場合があると適切な当業者によって認識されるであろう。かかる場合には、前記プローブは少なくともヌクレオチド20-200個を含む場合があり、少なくともヌクレオチド30-100個が好ましく、少なくともヌクレオチド50-100個がより好ましい。

30

40

#### 【0025】

本発明に関して「マーカー」という用語とは、ステロイド応答者の被験者からもたらされた比較可能な試料と比較して、非ステロイド応答者である個人、すなわち、患者からもたらされた試料中で差次的に存在する、核酸断片、ペプチド又はポリペプチドを指す。

#### 【0026】

本明細書で用いられるところの「差次的に存在する」という語句は、非ステロイド応答者からもたらされた比較可能な試料と比較して、ステロイド応答者からもたらされた試料中に存在するマーカー量の違いを指す。例えば、核酸断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び/又はNATを利用したアッセイ(NAT-based assays)によ

50

って測定されるように、1種類の試料中の核酸断片の量が、別の試料中の該核酸断片の量と顕著に相違する場合には、2種類の試料間で任意に差次的に存在する場合がある。ポリペプチドは、1種類の試料中のポリペプチド量が、別の試料中の該ポリペプチド量と顕著に相違する場合には、2種類の試料間で差次的に存在する。前記マーカが、1種類の試料中で検出可能であり、別の試料中で検出不可能である場合に、その後、かかるマーカは差次的に存在すると考えられる場合があると特筆されるべきである。当業者は、前記マーカのかかる相対レベルを容易に決定する場合があった。

【0027】

本明細書で用いられるところの「レベル」という用語は、本発明のマーカのRNA及び/又はタンパク質の発現レベルか、DNAのコピー数を指す。典型的に、被験者から得られた生物学的試料中の前記マーカの前記レベルは、健常人から得られた類似の試料中の同一バリエーションの前記レベルと異なる(例えば、増大されるか、あるいは低下される。)(生物学的試料の例は本明細書で説明される。)。同一起源の正常組織中の前記同一バリエーションの前記レベルを決定することが、前記正常組織と対照的に、前記バリエーションの発現の上昇及び/又は増幅及び/又は発現の低下を検出するために達成されることが好ましい。

10

【0028】

マーカの「試験量」とは、試験される試料中に存在するマーカ量を指す。試験量は、絶対量(例えば、マイクログラム/mL)か、相対量(例えば、シグナルの相対強度)かのいずれかの場合がある。マーカの「対照量」は、マーカの試験量に対して比較されるべきいずれかの量か、量の範囲かの場合がある。対照量は、絶対量(例えば、マイクログラム/mL)か、相対量(例えば、シグナルの相対強度)かのいずれかの場合がある。

20

【0029】

「検出」とは、検出されるべき物の有無又は量を同定することを指す。

【0030】

本明細書で用いられるところの「診断(diagnostic)」という語句は、病状の存在又は性質を同定することを意味する。診断方法は、それらの感度及び特異度で異なる。診断アッセイの「感度」は、試験陽性の患者の百分率である(「真の陽性」の百分率)。前記アッセイによって検出されない患者は「偽陰性」である。病気ではなく、かつ、前記アッセイでの試験結果が陰性の被験者は「真の陰性」と称される。診断アッセイの前記「特異度」は、1引く偽陽性度であり、前記「偽陽性」度は、試験結果が陽性であるが、その症状を有しない被験者の割合として定義される。特別な診断方法は、症状の決定的な診断を提供しない場合があるが、前記方法は診断の目的とする陽性指標を提供すれば十分である。

30

【0031】

本明細書で用いられるところの「診断する(diagnosing)」という語句とは、疾患又は徴候を分類すること、前記疾患の重症度を決定すること、疾患の進行を監視すること、疾患の予後(outcome)及び/又は回復の見込みを予測することを指す。「検出」という用語は、上記のいずれかを任意に含む場合もある。本発明に応じる疾患の診断は、前記被験者から得られた生物学的試料中で本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドのレベルを決定することによって達成される場合があり、決定されたレベルは、前記疾患の素因か、有無かと関係付けられる場合がある。「前記被験者から得られた生物学的試料」は、以下により詳細に説明されるように、前記被験者から物理的に除去されない試料を任意に含む場合もあると特筆されるべきである。

40

【0032】

「試料」という用語は、その最も広い意味で解釈されることになっている。「試料」とは、例えば、患者又は細胞培養成分から単離された(血漿と、血清と、全血と、脳脊髄液と、リンパと、涙と、尿と、唾液と、母乳と、膿と、組織滲出液及び分泌物とを含むが、これらに限られない)1種類又は2種類以上の細胞、組織又は体液と、例えば、検査手技

50

から得られた試料とのような生物学的試料を指す。生物学的試料は、細胞から単離された染色体（例えば、分裂中期染色体の展開）、細胞から単離された細胞小器官又は膜、全ての細胞又は組織、溶液中のゲノムDNA又はサザン解析のためのような固体支持体に結合したゲノムDNAのような核酸、溶液中のRNA又はノーザン解析のためのような固体支持体に結合したRNA、溶液中のcDNA又は固体支持体に結合したcDNA、溶液中のオリゴヌクレオチド又は固体支持体に結合したオリゴヌクレオチド、溶液中のポリペプチド又はペプチドか、あるいは固体支持体に結合したポリペプチド又はペプチド、組織、組織付着痕（tissue print）等を含む場合がある。

#### 【0033】

組織又は体液の周知の採取方法の多くが、前記被験者で興味のあるバリエーションのDNA、RNA及び/又はポリペプチドのレベルを決定するために、前記被験者から前記生物学的試料を採取するために利用される場合がある。例は、細針生検、針生検、太針生検（core needle biopsy）及び外科生検（例えば、脳生検）と、洗浄とを含むが、これらに限られない。供された手法にかかわらず、いったん生検/試料が得られると、前記バリエーションの前記レベルは決定される場合があり、したがって、診断が行われる場合がある。

10

#### 【0034】

「マイクロアレイ」は、紙、ナイロン又は別の種類の膜か、フィルターか、チップか、スライドガラスか、いずれかの別の種類の適切な支持体かのような基板に貼り付けられた、個別のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド又は抗体のアレイである。

20

#### 【0035】

本明細書で用いられるところの「リンカー」という用語とは、前記基板上に既にある反応基と、最終的に不動化されるべき分子（例えば、DNA、抗体又はポリペプチド）とを共有結合する化学原子団を意味し、該化学原子団は、前記基板上の反応基と、結合成分との連続的な結合を形成する化学結合の骨格を有し、その骨格に沿って複数の自由回転する結合を有する。

#### 【0036】

##### バイオマーカー

治療前にステロイド応答者を同定することが、より安全なステロイドの使用を可能にする。さらに、患者集団を応答者及び非応答者に階層化できることが、例えば、眼に使用するためのコルチコステロイド薬物の臨床試験の設計に非常に役立つであろう。

30

#### 【0037】

理論に拘束されないが、グルココルチコイド応答又は代謝経路の遺伝的変異はステロイド応答に連鎖すると仮説が立てられた。研究のために最初に選択された候補遺伝子の1個は、ステロイド応答の最初の媒体であると仮説が立てられたグルココルチコイド受容体遺伝子（GCR）（5q31）であった。用いられた方法の詳細な説明は、以下の実施例の段落で説明される。簡潔には、ステップは、患者のコホートの表現型決定及び遺伝子型決定と、連続変数としてIOP変化値を連鎖させることと、例えば、グルココルチコイド受容体の多型の候補遺伝子解析と、経路解析と、全ゲノムスクリーニングとであった。結果は、遺伝子33個中に異なるSNPs 48個が、IVTA後のIOP値と相関することが発見された（ $p < 0.001$ ）ことを示した。最も強い連鎖は、今までのところはほとんど説明されていないGタンパク質共役受容体中のSNPと関係する（ $p = 3.05 \times 10^{-8}$ ）。単一の輸送体遺伝子中に個別のSNPs 4個が同定された（ $p$ が $5.59 \times 10^{-4}$ ないし $2.81 \times 10^{-5}$ ）。複数のSNPsを有する別の遺伝子は、翻訳伸長因子と、Fボックスタンパク質と、オキシステロール結合タンパク質と、電解質運搬体（solute carrier）ファミリー遺伝子とを含んだ。

40

#### 【0038】

前記グルココルチコイド受容体はGR遺伝子によってエンコードされる。ヒトGR遺伝子中に少なくとも24個の多型が存在する。かかる多型のいくつかの例は、1. ER22

50

/ 23 EK (HapMap rs6190)、22 - 23 番目のコドンで GluArg から GruLys (ER から EK) への置換を生じる GAGAGG (配列番号 1) から GAAAG (配列番号 2) への置換 (ヘテロ接合体で 7% の頻度) と、2. N363S (HapMap rs56149945)、363 番目で Asn から Ser (N から S) への置換を生じる AAT から AGT への置換 (ヘテロ接合体で 6% の頻度) と、3. Bc1I (HapMap rs62375508)、エキソン 2 から 646 nt 下流のイントロン 2 の C から G への置換 (ヘテロ接合体で 48%、ホモ接合体で 12% の頻度) と、4. N766N (HapMap rs6196)、766 番目のコドンで Asn から Asn (N から N) への置換を生じる AAT から AAC への置換 (ホモ接合体で 23%、ホモ接合体で 10% の頻度) と、5. エキソン 4 から 46 nt 上流のイントロン 3 中の A G から C への置換 (HapMap rs61753484) (ヘテロ接合体で 3% の頻度) と、6. エキソン 5 から nt 上流のイントロン 4 中の A G から T への置換 (HapMap rs6188) (ヘテロ接合体で 42%、ホモ接合体で 10% の頻度) とを含む。

#### 【0039】

発明者は、1 個又は 2 個以上の多型を含む表 1 ないし 3 に列挙された核酸分子に対応するバイオマーカーが、ステロイド治療に応答する可能性があるか、あるいは応答しない可能性がある患者か、場合により、例えば、眼圧の上昇のようなステロイド治療に有害反応を示すであろう患者かを予測、同定及び診断するのに重要であることを発見した。同定された前記バイオマーカー (例えば、表 2 及び 3 を参照せよ。) は、ステロイド治療に連鎖するリスクの可能性を示すヌクレオチド多型を含む。これらの SNPs はステロイド応答のリスク (コルチコステロイドによって誘導された続発性緑内障) についてのマーカーとして役立ち、ステロイドの応答者又は非応答者を鑑別するためか、前記ステロイド治療に有害反応を示すであろう患者を同定するためか用いられる場合もある。これらの分子のいくつか、例えば、表 3 に図示された核酸分子の遺伝子は、差次的に発現される (又は、例えば、一塩基多型で改変される) 場合もある。したがって、それらの NCBI RefSeq アクセッション番号によって同定された前記分子は、特に、分子医学の適用で用いられる場合があり、新たな薬物及び療法を同定するための標的として用いられる場合もある。

#### 【0040】

好ましい実施態様では、バイオマーカーは、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体 158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー 6、サブファミリー C、メンバー 4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー 1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及び C2ドメイン含有 1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ 1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビン A 受容体、I 型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子 2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA 結合タンパク質 2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25 - 相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126 染色体 14 オープン・リーディング・フレーム 126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子 1 デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子 1 デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 F ボックスタンパク質 3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様 1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質 LOC152485)、NM\_\_005512 (LRR32、富ロイシンリピート含有 32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ 4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タ

10

20

30

40

50

ンパク質様3)、NM\_\_145320(OSBPL3)、NM\_\_145321(OSBPL3)、NM\_\_000918(P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸4-ジオキシゲナーゼ(プロリン4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845(PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078(PYCRL、PYCRLピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862(TIGD5、TIGD5ティガー(tiggeer)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955(SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578(LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946(DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051(FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163(APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565(ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116(FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717(LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060(SLC22A5)、NM\_\_003060(SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813(LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962(NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922(RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782(RGS18)、NM\_\_001009992(ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)又はNM\_\_002697(POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのバリエーション、変異体、ホモログ、アレル及び断片が、相補性配列かのうち、少なくとも1個を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0041】

好ましい実施態様では、前記マーカーは少なくとも1個の一塩基多型を含む。前記多型は、前記分子に沿って連続するか、あるいは分散される場合がある。

#### 【0042】

別の好ましい実施態様では、前記バイオマーカーは、グルココルチコイド受容体の多型と、BclI、N766N及びイントロン4の一塩基多型とをさらに含む。

#### 【0043】

これらの実施態様によれば、前記バイオマーカーは、表1ないし3に説明されたような該バイオマーカーに対応する遺伝子、mRNA及びタンパク質に関する。バイオマーカーは、表1ないし3に列挙された特定の核酸分子、表1ないし3に列挙された核酸分子の一塩基多型、前記遺伝子の選択的スプライシングバリエーション、前記遺伝子(又はその断片)を含むゲノムDNA断片、前記遺伝子(又はその断片)に対応するmRNA分子、前記遺伝子(又はその断片)に対応するcDNA、前記遺伝子(又はその断片)に対応するタンパク質等の場合がある。一連のバイオマーカーは、さまざまな方法によって本発明に従って評価される場合がある。応答者と非応答者とが本発明に応じるバイオマーカーの特徴(biomarker signature)を有するかどうかを特徴付けるかかる方法は、一塩基多型と、表1ないし3に列挙されたような遺伝子を有するゲノム領域1箇所又は2箇所以上のDNAコピー数解析と、表1ないし3に列挙されたような遺伝子1個又は2個以上のRNA発現解析と、表1ないし3に列挙されたような前記核酸分子の遺伝子1個又は2個以上から発現されたタンパク質の検出とを含むが、これらに限られない。この実施態様の1つの局面では、提供される組成物(例えば、キット又はアレイ)は、表1ないし3に列挙されたバイオマーカーのうち、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30又は35個を検出可能な一連のプローブを含む。

#### 【0044】

好ましい実施態様では、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25 - 相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン - プロリン、2 - オキソグルタル酸 4 - ジオキシゲナーゼ (プロリン 4 - ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン - 5 - カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー2 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのバリエーション、変異体、ホモログ、アレル及び断片か、相補性配列かを含むバイオマーカーの1個又は2個以上で少なくとも1個の一塩基多型を検出することは、患者がステロイド治療に反応するかどうかと、例えば、眼圧の上昇があるかどうかとを予測することである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 5 】

別の好ましい実施態様では、前記バイオマーカーは、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25 - 相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン - プロリン、2 - オキソグルタル酸 4 - ジオキシゲナーゼ (プロリン 4 - ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン - 5 - カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tigger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのバリエーション、変異体、ホモログ、アレル及び断片が、相補性配列かの遺伝子からエンコードされた産物の少なくとも1個を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

好ましい実施態様では、前記マーカ―は少なくとも1個の一塩基多型を含む。前記多型は、前記分子に沿って連続するか、あるいは分散される場合がある。

## 【 0 0 4 7 】

バイオマーカ―のポリペプチド又はペプチドか、相補配列か、関連する断片又はバリエーションかのアミノ酸配列をエンコードするポリヌクレオチドのいずれかは本発明に含まれる。本発明のポリヌクレオチドバリエーションは、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D 2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、BclI、N766N及

びノ又はイントロン4のグルコシルチコイド受容体多型及びノ又は一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのバリエーション、変異体、ホモログ、アレル及び断片か、相補性配列かの前記配列のうち、いずれか1個と、少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%又は99.9%の核酸配列同一性を共有するバリエーションを含むが、これらに限られない。

#### 【0048】

さまざまな実施態様では、本発明はポリヌクレオチド断片を含み、該ポリヌクレオチド断片は、NM\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_001105 (ACVR1、アクチピンA受容体、I型)、NM\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_033406 (FBXO3)、NM\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_145320 (OSBPL3)、NM\_145321 (OSBPL3)、NM\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター (dedicator) 2)、NM\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_003060 (SLC22A5)、NM\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、N

10

20

30

40

50

M\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルコシルコリド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、Gタンパク質共役受容体、翻訳伸長因子、Fボックスタンパク質、オキシステロール結合タンパク質、電解質運搬体ファミリー遺伝子、それらのバリエーション、変異体、ホモログ、アレル及び断片か、相補性配列かの配列のいずれか1個のうち、少なくとも8、10、12、15、18、20、25、30、35、36、40、45個の連続的なヌクレオチドを含む断片を含むが、これらに限られない。

【0049】

好ましい実施態様では、前記マーカーは少なくとも1個の一塩基多型を含む。前記多型は、前記分子に沿って連続するか、あるいは分散される場合がある。

【0050】

1つの実施態様では、本発明は、一連のDNAのコピー数又は配列のバイオマーカーを提供する。この実施態様によれば、前記バイオマーカーは、表1ないし3に説明されたような前記バイオマーカーに対応するゲノムDNA領域に関する。この実施態様によれば、前記バイオマーカーは、ゲノム領域か、マーカーか、遺伝子座か、表1ないし3に列挙された核酸分子の特定の一塩基多型を含むようなものかの場合がある。

【0051】

1つの実施態様では、本発明は一連のmRNAバイオマーカーを提供する。この実施態様によれば、前記バイオマーカーは、表1ないし3に説明された前記バイオマーカーに対応するmRNAsに関する。この実施態様の1つの局面では、ステロイド非応答者又はステロイド応答者は、表1ないし3に列挙された前記核酸分子に対応する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30又は35個のmRNAバイオマーカーを測定すること、及び/又は、配列決定することによって分類される。この実施態様の1つの局面では、分類は、表1ないし3に列挙された前記バイオマーカーに対応し、参照(又は対照)に対する測定値及び/又は配列を構成する、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30又は35個の一連のmRNAsを測定すること、及び/又は、配列決定することによって行われる場合がある。癌が本発明に応じるバイオマーカーの特徴を有するかどうかを特徴付けるかかる方法は、表1ないし3に列挙されたような前記遺伝子に対応する(これらの断片の)1種類又は2種類以上の転写産物のマイクロアレイを利用するmRNA発現解析か、定量PCR解析かを含むが、これらに限られない。この実施態様の1つの局面では、提供される組成物(例えば、キット又はアレイ)は、表1ないし3に列挙された前記核酸分子に対応する少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30又は35種類の前記mRNAs(又はそれらの断片)を検出することが可能な一連のプロブを含む。

【0052】

また、本発明に含まれるものは、さまざまなストリンジェンシー(stringency)の条件下で、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_

10

20

30

40

50

025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_033406 (FBXO3)、NM\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_145320 (OSBPL3)、NM\_145321 (OSBPL3)、NM\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_004845 (PCT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tiger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_003060 (SLC22A5)、NM\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_130782 (RGS18)、NM\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、それらのバリエーション、変異体、ホモログ、アレル及び断片か、相補性配列かの前記ヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションすることが可能なポリヌクレオチドである。

【0053】

好ましい実施態様では、前記ヌクレオチドは少なくとも1個の一塩基多型を含む。

【0054】

ハイブリダイゼーション条件は、核酸結合複合体又はプローブの融解温度(T<sub>m</sub>)を利用することが典型的であり(G.M. Wahl及びS.L. Berger、1987; Methods Enzymol、152:399-407と、A.R. Kimmel、1987; Methods of Enzymol、152:507-511とを参照せよ。)、定義されたストリンジェンシーで用いられる場合がある。非限定的な例として、適度なストリンジェンシー条件は、2xSSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA、pH8.0の予洗液と、50°C、5xSSCのハイブリダイゼーション条件と、一晩中のインキュベーションとを含む。

【0055】

当業者によって理解されるであろうように、遺伝暗号の縮重は、ポリペプチドバイオマ

ーカーをエンコードしている多数のヌクレオチド配列を作成する。縮重配列のいくつかは、前記バイオマーカの前記ヌクレオチド配列に最小限の相同性をもたらす場合がある。したがって、本発明は、可能なコドン選択を利用する組み合わせを選択することによって作成される場合があるヌクレオチド配列の可能な変化のいずれも考慮する。これらの組み合わせは、最初に同定されたバイオマーカポリペプチドの前記ヌクレオチド配列に適合するように標準的なトリプレット (triplet) 遺伝暗号に従って作成され、かかる全ての変化は明確に開示されたように考慮されるべきである。

#### 【0056】

いくつかの目的のために、実質的に異なるコドンの使用法を有する、バイオマーカのポリペプチドか、その断片か、バリエーションか、誘導体をエンコードしているポリヌクレオチドを作成するための長所の場合がある。コドンは、特定のコドンが宿主によって利用される頻度に応じて、ペプチド/ポリペプチドの発現が、特定の原核生物又は真核生物の前記宿主で生じる割合を増加するために選択される場合がある。コドンの使用法の変化が、天然の配列から生成される転写産物と比較してより長い半減期のようなより望ましい特徴を有するRNA転写産物を生成するために用いられる場合もある。特に、RNA分子は、細胞内の安定性及び半減期を増大するために改変される場合がある。可能な改変は、前記分子の5'末端及び/又は3'末端で隣接配列を付加すること、又は、前記分子の骨格中でのホスホジエステラーゼ結合よりもむしろホスホロチオエート又は2'-O-メチルを使用することを含むが、これらに限られない。この概念はPANsの生成に固有のものであり、内在性エンドヌクレアーゼによって容易に認識されない、イノシン、クエオシン (queosine) 及びワイブトシン (wybutosine) と、アセチル、メチル、チオ及び類似の改変型形状のアデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウリジンとのような非従来型塩基を包含することによって、これらの分子全てに拡張される場合がある。

#### 【0057】

前記バイオマーカポリペプチドと、その相補配列及び断片とは、さまざまな理由で前記配列を変化するために当業者に一般的に知られる方法を用いて設計される場合があり、該方法は、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング及び/又は発現を改変する変化を含むが、これらに限られない。例えば、ランダムな断片化によるDNAシャッフリングと、遺伝子断片のPCR再構築と、合成オリゴヌクレオチドとは、前記ヌクレオチド配列を設計するために用いられる場合がある。さらに、部位特異的突然変異導入が、新たな制限酵素部位の挿入、グリコシル化パターンの変化、コドン優先度の変化、スプライシングバリエーションの生成、突然変異の導入等のために用いられる場合がある。

#### 【0058】

また、本発明に含まれる前記バイオマーカポリヌクレオチドと、その相補配列及び断片との誘導体は、1種類又は2種類以上の化学修飾、例えば、アルキル基、アシル基又はアミノ基による水素の置換を含む。代替的に、ポリヌクレオチド誘導体は、改変型糖原子団か、糖間結合かのような非天然部分を含む場合がある。これらのうちで模範的なものは、ホスホロチオエートと、硫黄を含む当業者に知られるその他の化学種とである。ポリヌクレオチド誘導体は、放射性ヌクレオチド (例えば、 $^{32}\text{P}$ 、 $^3\text{H}$ 及び $^{35}\text{S}$ ) と、酵素と、蛍光物質 (例えば、ローダミン、フルオレセイン及びCy3、Cy5) と、化学発光剤と、発色剤と、基質、補因子、阻害剤、磁性粒子等のようなその他の標識 (例えば、DNP、ジゴキシゲニン及びビオチン) とを含む、検出標識を含む場合もある。

#### 【0059】

広範な標識及び結合の技術が当業者によって知られ、供される。核酸標識は、オリゴ標識、ニックトランスレーション (nick translation)、末端標識又は標識されたプライマーを用いるPCR増幅によって達成される場合がある。代替的に、ポリヌクレオチドか、あるいはこの部分又は断片のいずれかが、標識されたmRNA配列の生成のためにベクター中にクローニングされる場合がある。当業者に知られるかかるベクターは商業的に入手可能であり、T7、T3又はSP(6)のような適切なRNAポリメラーゼと、標識されたヌクレオチドとを添加することによってin vitroで標識さ

10

20

30

40

50

れたRNAを合成するために用いられる場合がある。これらの手続は、商業的に入手可能なさまざまなキット（例えば、アマシャム・ファルマシア、プロメガ社及び米国バイオケミカル社（オハイオ州クリーブランド））を用いて行われる場合がある。

#### 【0060】

本発明は、いずれかの手段によって、バイオマーカーのポリヌクレオチド（例えば、表1-3を参照せよ。）と、その断片及び誘導体とをエンコードするポリヌクレオチド又はその一部を生成することも含む。例えば、合成化学（例えば、M. H. Caruthersら、1980、Nucl. Acids Res. Symp. Ser.、215-223と、T. Hornら、1980、Nucl. Acids Res. Symp. Ser.、225-232とを参照せよ。）。生成後、合成配列は、当業者に周知の試薬を用いて、多くの入手可能な発現ベクターと、細胞システムとのいずれかに挿入される場合がある。さらに、合成化学は、バイオマーカーのポリペプチドか、あるいはその断片、バリエーション又は誘導体のいずれかをエンコードしている配列に突然変異を導入するために用いられる場合がある。代替的に、本発明の前記ポリヌクレオチドは、クローニングされた配列のPCR増幅によって生成される場合がある。さらに、前記ポリヌクレオチドは、細胞を利用するシステム及び無細胞システムを含む組換えシステムによって生成される場合がある。

10

#### 【0061】

バイオマーカーのポリペプチドか、その断片、バリエーション又は誘導体かをエンコードするポリヌクレオチドは、適切な宿主細胞で、バイオマーカーか、断片か、その機能的な等価物かの発現を行うための組換えDNA分子で用いられる場合がある。遺伝暗号の固有の縮重のために、実質的に同一又は機能的に等価なアミノ酸配列をエンコードする別のDNA配列が生成される場合があり、これらの配列はバイオマーカーポリペプチドをクローニングし、発現するために用いられる場合がある。組換えシステムで発現するために、開始コドン及び終止コドンがバイオマーカーポリペプチドの前記核酸配列に付加される場合がある。さらに、エピトープ又はタンパク質タグをエンコードしているヌクレオチドが、本明細書で詳細に説明されたように、前記バイオマーカーポリペプチドの前記核酸配列に付与される場合がある。クローニング及び発現の方法は当業者に周知であり、多くの出版物、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory出版社、米国（1989）で説明される。

20

30

#### 【0062】

##### ポリペプチド

1つの実施態様では、NM\_\_020752（GPR158、Gタンパク質共役受容体158）、NM\_\_001005494（OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4）、NM\_\_001039791（FLJ45825、FLJ45825ナンセンス）、NM\_\_153487（MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1）、NM\_\_017721（CC2D1A、コイルドコイル（coiled-coil）及びC2ドメイン含有1A）、NM\_\_005504（BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1）、NM\_\_001105（ACVR1、アクチビンA受容体、I型）、NM\_\_006548（IGF2BP2、インスリン様成長因子2）、NM\_\_001007225（IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2）、NM\_\_025248（SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質）、NM\_\_025152（NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様）、NM\_\_080664（C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126）、NM\_\_139179（DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ）、NM\_\_001960（EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ（グアニンヌクレオチド交換タンパク質））、NM\_\_032378（EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ（グアニンヌクレオチド交換タンパク質））、NM\_\_012175（FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3）、NM\_\_033406（FB

40

50

XO3)、NM\_\_005574(LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835(LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512(LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010(MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550(OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320(OSBPL3)、NM\_\_145321(OSBPL3)、NM\_\_000918(P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸4-ジオキシゲナーゼ(プロリン4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845(PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078(PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862(TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955(SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578(LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946(DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051(FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163(APBAL、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565(ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116(FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717(LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060(SLC22A5)、NM\_\_003060(SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813(LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962(NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922(RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782(RGS18)、NM\_\_001009992(ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697(POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルコルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、それらのペプチド、断片及び誘導体の少なくとも1個の遺伝子産物を含む、試料中の遺伝子産物を検出することが、ステロイドの応答者と非応答者とを予測及び鑑別するために用いられる場合がある。

【0063】

別の好ましい実施態様では、前記マーカーは少なくとも1個の一塩基多型を含む。

【0064】

別の好ましい実施態様では、組成物は、表1ないし3の分子いずれか1個を含む、一塩基多型の遺伝子産物、その変異体及びパリアントに特異的な抗体を含む。

【0065】

別の好ましい実施態様では、例えば、表3に同定された前記遺伝子の一塩基多型を含む前記ポリヌクレオチドはバイオマーカーポリペプチドをエンコードする。

【0066】

バイオマーカータンパク質は、本発明によれば、表1ないし3の前記核酸分子に対応する前記遺伝子のいずれか1個又は2個以上に対応したタンパク質(又はこの断片)の場合がある。一連のバイオマーカータンパク質は、特定のタンパク質のタンパク質発現レベルを確かめることが可能なさまざまな方法によって本発明に従って評価される場合がある。かかる方法は、表1ないし3の前記核酸分子に対応する遺伝子1個又は2個以上から発現されたタンパク質の(IHC、ELISAその他の適切な方法を介する)モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を利用する検出を含むが、これらに限られない。

【0067】

本発明によれば、バイオマーカーペプチドは、5個のアミノ酸残基から完全長配列のほとんど全てのアミノ酸残基までのサイズにわたる場合がある。したがって、ペプチドは、NM\_\_020752(GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_0010

05494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_033406 (FBXO3)、NM\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_145320 (OSBPL3)、NM\_145321 (OSBPL3)、NM\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_003060 (SLC22A5)、NM\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_014813 (LRIG2、富ロリシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_130782 (RGS18)、NM\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、それらの断片又はバリエーションのいずれか1個のうち、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個の連続的なアミノ酸を含む断片を含むが、これらに限られない。

#### 【0068】

前記バイオマーカーのポリペプチド、ペプチドか、それらの断片又はバリエーションかは、例えば、HA等のようなエピトプタグの短いタグか、GST、GFP(例えば、GFP Y66F、GFP Y66H、GFP Y66W、野生型GFP、GFP S65A、

10

20

30

40

50

GFP S65L、GFP S65T、ECFP、EYFP、DsRed；BDバイオサイエンスCLONTECH、カリフォルニア州パロアルト）、チオレドキシン、マルトース結合タンパク質等のようなその他のタンパク質かに結合される場合がある。また、本発明によって提供されるものは、前記ポリペプチドの溶解性、安定性及び循環時間の増大のような追加の利点を提供する場合がある、本発明の前記ペプチド及びポリペプチドの化学修飾された誘導体である。誘導体化のための化学原子団は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等のような水溶性ポリマーから選択される場合がある。前記ポリペプチドは、前記分子中のランダムな位置か、前記分子中の予定された位置かで改変される場合があり、1個、2個、3個又は4個以上の結合した化学原子団を含む場合がある。

10

## 【0069】

さらに、本発明のアミノ酸配列のバリエーションは、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBE1、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRR32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキシグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポートザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケーター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電

20

30

40

50

解質運搬体ファミリー 22 (有機カチオン輸送体)、メンバー 5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富口リシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン 2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン 1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングの RGS1 制御因子 1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子 18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス 2、転写因子 1)、グルコシルコイド受容体多型及び/又は BclI、N766N 及び/又はイントロン 4 の一塩基多型、バリエーション又は断片のうち、いずれか 1 個と、少なくとも 40%、50%、60%、61%、67%、70%、74%、76%、80%、81%、84%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8% 又は 99.9% の核酸配列同一性を共有するバリエーションを含むが、これらに限られない。

10

#### 【0070】

ポリペプチド及びペプチドのバリエーションは、1 個又は 2 個以上のアミノ酸残基の付加、欠損又は置換によって異なっているバリエーションを含む。例えば、バイオマーカーのポリペプチド又はペプチドを単離するためには、商業的に入手可能な抗体によって認識される場合がある、タグが付加されたバイオマーカーのポリペプチド又はペプチドをエンコードすることが有用な場合がある。特に、ペプチド又はポリペプチドは、エピトープタグ (例えば、FLAG、HA、GST、チオレドキシニン、マルトース結合タンパク質等) か、ピオチン及び/又はストレプトアビジンのような親和性タグかに融合されるか、あるいは結合される場合がある。1 つの例として、ヒト細胞株で発現された未変性融合タンパク質を即座に精製するためのシステムが、Janknechtら (1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:8972-8976) によって説明された。このシステムでは、興味のある遺伝子は、該遺伝子のオープン・リーディング・フレームがヒスチジン残基 6 個を有するアミノ末端タグに翻訳可能に融合されるように痘疹組換えプラスミドにサブクローニングされる。前記タグは、融合タンパク質のマトリクス結合ドメインとして役立つ。組換え痘疹ウイルスに感染した細胞からの抽出物が Ni<sup>+</sup>ニトリロ酢酸アガロースカラム上に充填され、ヒスチジンでタグが付加されたタンパク質はイミダゾールを含む緩衝剤で選択的に溶出される。

20

30

#### 【0071】

エピトープ又はタンパク質でタグが付加されたペプチド又はポリペプチドは、結合部分 (binder) をコードしている配列と、タグをコードしている配列との間に配置される開裂部位を含むように設計される場合もある。これは前記タグを除去し、バイオマーカーのペプチド又はポリペプチドを単離するために用いられる場合がある。本発明の前記バイオマーカーのペプチド又はポリペプチドは、アミノ酸骨格を介して化学原子団に共有結合される場合がある。これらの目的のために、前記ペプチド又はポリペプチドは、前記配列の N 末端又は C 末端のプロセッシング (例えば、タンパク質分解性プロセッシング)、N 末端のメチオニン残基の欠失等によって改変される場合がある。前記ポリペプチドは、本明細書で詳細に説明されたような前記タンパク質を検出及び単離できる酵素、蛍光物質、同位体又は親和性の標識のような検出可能な標識で改変される場合もある。

40

#### 【0072】

また含まれるものは、1 個又は 2 個以上の残基が改変された改変型のポリペプチド及びペプチドと、1 個又は 2 個以上の改変型残基を含む変異体とである。本発明のアミノ酸バリエーションは、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング及び/又はコドンシャッフリング (以下、「DNA シャッフリング」と集合的にいう) の手法を用いることによって生成される場合がある。DNA シャッフリングは、改変型活性を有するペプチド又はポリペプチドを生成するために供される場合がある。一般的に、米国特許第 5,605,793 号明細書、米国特許第 5,811,238 号明細書、米国特許第 5,830,721 号明細書、米国特許第 5,834,252 号明細書及び米国特許

50

第5, 837, 458号明細書と、Pattenら、1997、Curr. Opin. Biotechnol., 8:724-33、Harayama、1998、Trends Biotechnol., 16(2):76-82、Hanssonら、1999、J. Mol. Biol., 287:265-76、及び、Lorenzo及びBlasco、1998、Biotechniques、24(2):308-313とを参照し、各内容は引用により全体として本明細書に取り込まれる。

#### 【0073】

本発明の1つの実施態様では、1個又は2個以上のバイオマーカーのポリペプチド配列の改変は、DNAシャッフリングによって達成される場合がある。DNAシャッフリングは、タンパク質をコードしている配列に変化をもたらすための相同組換えか、部位特異的組換えかによって、2個又は3個以上のDNAセグメントの構築を含む。別の実施態様では、エンコードされたペプチド又はポリペプチドは、組換え前に、コード配列の校正(error-prone)PCR、ランダムヌクレオチド挿入その他の方法を行うことによって改変される場合がある。別の実施態様では、本発明のペプチド又はポリペプチドをエンコードしているポリヌクレオチドの構成部分、モチーフ、区画、部分、断片等の1個又は2個以上が、1個又は2個以上の異種分子の構成部分、モチーフ、区画、部分、断片等の1個又は2個以上で組み換えられる場合がある。

10

#### 【0074】

前記ペプチド及びポリペプチドは、例えば、既知の保護(protecting)基/保護(blocking)基、タンパク質分解性開裂、抗体分子その他の細胞性リガンド等への結合を用いて誘導体化することによって、翻訳の前又は後に差次的に改変される場合がある。有用な改変は、グリコシル化、アミド化、リン酸化、硫酸化、還元/アルキル化(Tarr、1986、Methods of Protein Microcharacterization、J.E. Silver編、Humana出版社、ニュージャージー州クリフトン、155-194頁)と、アシル化(Tarr、上記)と、化学共役(Mishell及びShiigi(編)、1980、Selected Methods in Cellular Immunology、W.H. Freeman、カリフォルニア州サンフランシスコ;米国特許第4,939,239明細書)と、軽度ホルマリン処理(Marsh、1971、Int. Arch. of Allergy and Appl. Immunol. 41:199-215)とを含む場合がある。多数の化学修飾のいずれかが、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パバイン、V8プロテアーゼ、NaBH<sub>4</sub>による特異的な化学開裂;アセチル化、ホルミル化、酸化、還元;ツニカマイシン存在下での代謝合成等を含むが、これらに限られない既知の手法によって実施される場合がある。本発明に含まれる追加の翻訳後修飾は、例えば、N結合型又はO結合型の糖鎖の付加と、N末端又はC末端のプロセッシングと、N結合型又はO結合型の糖鎖の化学修飾と、原核宿主細胞の発現によって生じるN末端のメチオニン残基の付加又は欠失とを含む。

20

30

#### 【0075】

追加的に、Dアミノ酸、非天然アミノ酸又は非アミノ酸アナログが、改変型ポリペプチドを生成するために置換されるか、あるいは付加される場合がある。さらに、本明細書に説明された前記ポリペプチドは、PEGでコンジュゲート化されたタンパク質を生成するために、既知の方法に従ってポリエチレングリコール(PEG)を用いて改変される場合がある(S.I. Wieら、1981、Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 64(1):84-99)。さらに、PEGは前記タンパク質の化学合成中に付加される場合がある。改変又は配列の変化は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端又はカルボキシ末端部位か、それらの末端部位の間のいずれかの部位かで生じる場合があり、前記参照配列のアミノ酸間に個別に散在するか、該参照配列内の1個又は2個以上の連続的なグループで散在するかのいずれかである。本発明の前記ポリペプチド及びペプチドは、単離されるか、合成物か、あるいは組換え体の場合がある。アミノ酸配列は、個別のポリペプチド又はペプチドか、複合体の一部かとして得られる場合が

40

50

ある。

【0076】

ポリペプチド又はペプチドは、直接的又は間接的のいずれかで検出可能なシグナルを提供することが可能である、放射性同位体、蛍光及び酵素の標識を含むが、これらに限られない標識で改変される場合もある。蛍光標識は、例えば、クマリン（例えば、ヒドロキシクマリン、アミノクマリン、メトキシクマリン）、R-フィコエリトリン（PE）、フルオレセイン、FITC、フルオロX、DTAF、オーラミン、アレクサ（例えば、アレクサフルオロ（商標）350、-430、-488、-532、-546、-555、-568、-594、-633、-647、-660、-680、-700、-750）、BODIPY-FL、スルホローダミン（例えば、テキサスレッドRTM.）、カルボシアニン（例えば、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7）、ローダミン、XRITC、TRITC、リサミンローダミンB、ペリジニクロロフィルタンパク質（PerCP）、アロフィコシアニン（APC）、PE-Cy5コンジュゲート（例えば、サイクローム、TRI-カラー（商標）、カンタムレッド（商標））、PE-Cy5.5コンジュゲート、PE-Cy7コンジュゲート、PE-テキサスレッドコンジュゲート（例えば、レッド613）、PC5-PE-Cy5コンジュゲート、PerCP-Cy5.5コンジュゲート（例えば、TruRed）、APC-Cy5.5コンジュゲート、APC-Cy7コンジュゲート、ECD-PE-テキサスレッドコンジュゲート、スルホン化ピレン（例えば、カスケードブルー）、AMCAブルー、ルシファーイエローを含む。

10

20

【0077】

同位体標識は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^9\text{O}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 及び $^{186}\text{Re}$ を含むことが好ましい。酵素標識は、ペルオキシダーゼ、ベータ-グルクロニダーゼ、ベータ-グルコシダーゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼプラスペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを含むことが好ましい（例えば、米国特許第3,654,090号明細書、米国特許第3,850,752号明細書及び米国特許第4,016,043号明細書を参照せよ。）。酵素は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド等のような架橋分子との反応によってコンジュゲート化される場合がある。酵素標識は、熱量測定法、分光光度法、蛍光分光光度法、電流測定法又は気体測定法によって、可視的に検出されるか、あるいは測定される場合がある。アビジン/ビオチン、コロイド金（例えば、ナノゴールド（商標））、チラミドシグナル増幅（TSA（商標））のような別の標識システムは当業者に周知であり、商業的に入手可能である（例えば、ABCキット、ベクターラボラトリーズ社、カリフォルニア州バーリングゲーム；NEN（商標）ライフサイエンスプロダクト社、マサチューセッツ州ボストン；ナノプローブ社、ニューヨーク州ヤファンク、ホースブロックロード95を参照せよ。）。

30

【0078】

（例えば、NM\_\_020752（GPR158、Gタンパク質共役受容体158）、NM\_\_001005494（OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4）、NM\_\_001039791（FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス）、NM\_\_153487（MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1）、NM\_\_017721（CC2D1A、コイルドコイル（coiled-coil）及びC2ドメイン含有1A）、NM\_\_005504（BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1）、NM\_\_001105（ACVR1、アクチビンA受容体、I型）、NM\_\_006548（IGF2BP2、インスリン様成長因子2）、NM\_\_001007225（IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2）、NM\_\_025248（SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質）、NM\_\_025152（NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様）、NM\_\_080664（C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126）、NM\_\_139179（DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ

40

50

、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_145321 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター(dedicator)2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム38kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_130782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型)の産物をエンコードした)バイオマーカーのポリペプチド、ペプチドと、それらの断片、バリエーション及び誘導体とは、固相技術を用いる直接ペプチド合成によって生成される場合がある(J. Merrifield、1963、J. Am. Chem. Soc.、85:2149-2154; J. Y. Robergeら、1995、Science、269:202-204)。タンパク質又はペプチドの合成は、手動技術又は自動制御を用いて実施される場合がある。自動合成は、例えば、ABI 431A ペプチド合成装置(PEバイオシステム)によって達成される場合がある。バイオマーカーのポリペプチド又はペプチドのさまざまな断片は、個別に化学的に合成され、その後、完全長分子を生成するための化学法を用いて組み合わされる場合がある。新たに合成されたペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィー(例えば、T. Creighton、1983、Proteins, Structure and Molecular Principles、W. H. Freeman and Co.、ニューヨーク州ニューヨーク)か、逆相高速液体クロマトグラフィーか、当業者に知られるようなその他の精製方法かによって実質的に精製される場合がある。合成ペプチドの組成物は、アミノ酸解析又は配列決定(例えば、エドマン分析法;クレイトン、上述)によって確認される場合がある。さらに、バイオマーカーのペプチド又はポリペプチドか、それらのいずれかの一部分かの前記アミノ酸配列は、直接合成中に改変され、及び/又は、バリエーションのペプチド又はポリペプチドを生成するために、別のタンパク質か、そのいずれかの一部かに由来する配列とともに化学法を用いて組み合わされる

10

20

30

40

50

場合がある。

【0079】

マイクロアレイ

本発明の前記バイオマーカーは、マイクロアレイ技術を用いて、同定、確認及び/又は測定される場合もある。したがって、バイオマーカーの発現プロファイルは、生組織又はパラフィン包埋組織、別の生物学的試料のいずれかでマイクロアレイ技術を用いて測定される場合がある。この方法では、興味のあるポリヌクレオチド配列が、マイクロチップ基板上に配置されるか、あるいは整列される。したがって、整列された配列は、興味のある細胞又は組織由来の特異的プローブでハイブリダイゼーションされる。RT-PCR法を用いる際には、mRNAの供給源は、ヒトの腫瘍又は腫瘍細胞株と、対応する正常な組織又は細胞株とから単離された全RNAであることが典型的である。したがって、RNAはさまざまな試料から単離される場合がある。以下の実施例の段落は用いられた方法の詳細な説明を提供する。

10

【0080】

前記マイクロアレイ法の1つの実施態様では、PCRで増幅された興味のあるcDNAクローンが高密度アレイの基板に適用される。1つの局面では、少なくとも10,000個のヌクレオチド配列が前記基板に適用される。10,000個の構成部分それぞれでマイクロチップ上に不動化された、マイクロアレイされた遺伝子は、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションに適している。蛍光的に標識されたcDNAプローブは、興味ある組織から抽出されたRNAの逆転写による蛍光ヌクレオチドの取込みを通じて生成される場合がある。前記チップに適用された、標識されたcDNAプローブは、前記アレイ上のDNAの各場所に特異的にハイブリダイゼーションされる。非特異的に結合したプローブを除去するためのストリンジェントな洗浄後、前記チップは、共焦点レーザー顕微鏡か、CCDカメラのような別の検出法かによって走査される。整列された各構成部分のハイブリダイゼーションを定量することが、対応するmRNAの存在量の評価を可能にする。2色の蛍光を用いて、RNAの供給源2種類から生成された個別に標識されたcDNAプローブが、前記アレイに1対でハイブリダイゼーションされる。その後、特定の遺伝子それぞれに対応する2種類の前記供給源由来の転写産物の相対的存在量が同時に決定される。小規模の前記ハイブリダイゼーションは、多数の遺伝子の発現パターンの簡便で、迅速な評価を提供する。かかる方法は、1細胞あたり数コピーで発現する希少転写産物を検出し、前記発現レベル(Schenaら、(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2):106-149)か、SNPsの検出かで少なくとも約2倍の違いを再現性よく検出するために必要とされる感度を有することが示された。マイクロアレイ解析は、製造者のプロトコルを伴う商業的に入手可能な機器、例えば、アフィメトリクスジーンチップ技術か、インサイトのマイクロアレイ技術かを用いることによって実施される場合もある。

20

30

【0081】

遺伝子発現の大規模解析のためのマイクロアレイ法を開発することが、癌の分類と、さまざまな種類の腫瘍の予後の予測との分子マーカーを体系的に研究することを可能にする。

40

【0082】

データ及び解析

本発明の実行は、従来の生物学の方法、ソフトウェア及びシステムを用いる場合もある。本発明のコンピューターソフトウェア製品は、本発明の前記方法の論理ステップを実施するためのコンピューターで実行可能な命令を有する、コンピューターで読取り可能な媒体を含むことが典型的である。適切なコンピューターで読取り可能な媒体は、フロッピーディスク、CD-ROM/DVD/DVD-ROM、ハードディスクドライブ(hard-disk drive)、フラッシュメモリ(flash memory)、ROM/RAM、磁気テープ等を含む。前記コンピューターで実行可能な命令は、適切なコンピューター言語か、複数の言語の組み合わせかで書き込まれる場合がある。基本的な計算生物

50

学の方法は、例えば、Setubalら、Introduction to Computational Biology Methods (PWS出版社、ボストン、1997)と、Salzbergら(編)、Computational Methods in Molecular Biology (Elsevier、アムステルダム、1998)と、Rashidi及びBuehler、Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine (CRC出版、ロンドン2000)と、Ouellette及びBzevanis Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins (Wiley & Sons社、第2版、2001)とに説明される。米国特許第6,420,108号明細書を参照せよ。

10

**【0083】**

本発明は、プローブ設計、データ管理、解析及び機器操作のようなさまざまな目的のためにさまざまなコンピュータプログラム製品及びソフトウェアを使用する場合もある。米国特許第5,593,839号明細書、米国特許第5,795,716号明細書、米国特許第5,733,729号明細書、米国特許第5,974,164号明細書、米国特許第6,066,454号明細書、米国特許第6,090,555号明細書、米国特許第6,185,561号明細書、米国特許第6,188,783号明細書、米国特許第6,223,127号明細書、米国特許第6,229,911号明細書及び米国特許第6,308,170号明細書を参照せよ。

20

**【0084】**

さらに、本発明は、インターネットのようなネットワーク上で遺伝情報を提供するための方法を含む実施態様に関する。

**【0085】**

別の遺伝子/バイオマーカーを解析する方法

本発明は、患者が、1個又は2個以上の前記遺伝子(又はタンパク質)に1個又は2個以上のヌクレオチドバリエーション(又はアミノ酸バリエーション)を有するかどうかを決定することによって、(表1ないし3のバイオマーカー及び/又は)遺伝子1個又は2個以上の遺伝子型を決定するための方法も提供する。いくつかの実施態様で本発明の前記方法に従って遺伝子1個又は2個以上の遺伝子型を決定することが、治療、診断及び予後を決定するためのより多くの根拠を提供する場合がある。

30

**【0086】**

本発明の(表1ないし3のバイオマーカー及び/又は)前記遺伝子は、それらをエンコードする核酸又はタンパク質の変化を決定するために有用な方法のいずれかによって解析される場合がある。1つの実施態様によれば、当業者は、欠失変異体、挿入変異体、フレームシフト変異体、ナンセンス変異体、ミスセンス変異体及びスプライシング変異体を含む突然変異に関する遺伝子1個又は2個以上を解析する場合がある。

**【0087】**

(表1ないし3のバイオマーカー及び/又は)前記遺伝子1個又は2個以上の解析のために用いられた核酸は、標準的な方法に従って試料の細胞から単離される場合がある(Sambrookら、1989)。例えば、前記核酸は、ゲノムDNAか、分画されたRNA又は全細胞RNAかの場合がある。RNAが用いられる場合には、該RNAを相補的DNAに変換することが望ましい場合がある。1つの実施態様では、前記RNAは全細胞RNAであり、別の実施態様では、前記RNAはポリA RNAである。前記核酸は増幅されることが通常である。腫瘍抑制遺伝子1個又は2個以上を解析するためのアッセイの形式に依存するため、興味のある特定の核酸は、増幅を用いて試料中で直接的にか、あるいは増幅後の第2番目の既知の核酸とともに同定される。次に、同定された産物が検出される。特定の用途では、検出は可視化手段(例えば、ゲルの臭化エチジウム染色)によって実施される場合がある。代替的に、前記検出は、放射性標識又は蛍光標識の化学発光、放射活性シンチグラフィ、電気又は熱の刺激シグナルを用いるシステム(アフィマック

40

50

ステクノロジー、ベルス、1994)かを介して産物を間接的に同定することを含む場合がある。

【0088】

欠損のさまざまなタイプが、本発明の(表1ないし3のバイオマーカー及び/又は)前記遺伝子で生じる場合がある。したがって、「変化」は、欠失、挿入、点突然変異及び重複を含むように解釈されるべきである。点突然変異は、終止コドン、フレームシフト変異又はアミノ酸置換を生じる。前記遺伝子1個又は2個以上のコード領域の中及び外で突然変異が生じる場合があり、本発明の前記方法に従って解析される場合がある。

【0089】

同様に、遺伝子1個又は2個以上のハプロタイピング(haplotyping)の方法も提供される。ハプロタイピングは当業者に知られた方法のいずれかによって行われる場合がある。例えば、遺伝子1個又は2個以上のコピー1個のみが患者から単離される場合があり、バリエーションの位置のそれぞれのヌクレオチドが決定される。代替的に、アレル特異的PCRか、類似の方法かが、患者の遺伝子1個又は2個以上のコピー1個のみを増幅するために用いられる場合があり、本発明のバリエーションの位置のSNPsが決定される。当業者に知られたクラーク法がハプロタイピングのために用いられる場合もある。また、ハイスループットの分子ハプロタイピング法が、Tostら、Nucleic Acids Res.、30(19):e96(2002)で開示され、引用により本明細書に取り込まれる。

10

【0090】

したがって、本発明のバリエーション及び/又はハプロタイプと連鎖不平衡である追加のバリエーションが、遺伝学及びハプロタイピングの分野の当業者に明らかにされる際に、当業者に知られたハプロタイピング法によって同定される場合がある。本発明のバリエーション又はハプロタイプと連鎖不平衡である前記追加のバリエーションは、以下に詳細に説明されるように、さまざまな用途で有用な場合もある。

20

【0091】

遺伝子型決定及びハプロタイピングの目的のために、ゲノムDNA及びmRNA/cDNAの両方が用いられる場合があり、両方は本明細書で一般的に「遺伝子」という。

【0092】

ヌクレオチドバリエーションを同定するための複数の手法は当業者に知られ、全てが本発明の前記方法のために用いられる場合がある。前記手法は、タンパク質を利用するか、あるいは核酸を利用する場合がある。いずれの場合でも、用いられた前記手法は、低分子ヌクレオチド又は核酸のバリエーションを正確に検出するために十分に感度が高くなければならない。利用されるプローブは、検出可能なマーカーで頻繁に標識される。以下に説明された特定の手法で特に指定されない限り、放射性同位体、蛍光化合物、ストレプトアビジンを用いて検出可能なビオチン、酵素(例えば、アルカリホスファターゼ)、酵素の基質、リガンド及び抗体等を含むが、これらに限られない、当業者に知られた適切なマーカーのいずれかが用いられる場合がある。Jablonskiら、Nucleic Acids Res.、14:6115-6128(1986)、Nguyenら、Biotechniques、13:116-123(1992)、Rigbyら、J. Mol. Biol.、113:237-251(1977)を参照せよ。

30

40

【0093】

核酸を利用する検出法では、前記遺伝子1個又は2個以上に対応する、例えば、ゲノムDNA、cDNA及び/又はmRNAの標的DNA試料を含む試料は、試験されるべき患者から得られなければならない。前記遺伝子1個又は2個以上に対応する、前記ゲノムDNA、mRNA及び/又はcDNA(又はそれらの一部)を含む組織又は細胞の試料のいずれかが用いられる場合がある。この目的のために、細胞核、つまりゲノムDNA又は細胞等を含む組織試料は前記患者から得られる場合がある。血液試料は、白血球細胞その他のリンパ球のみが細胞核を有する一方、赤血球細胞はmRNAのみを含むということを除いて、有用な場合もある。それにもかかわらず、mRNAは、その配列のヌクレオチドバ

50

リアントの存在が解析される場合に有用であるか、あるいはcDNA合成のための鋳型として役立つ場合がある。前記組織又は細胞の試料は、多くの処理なしに直接的に解析される場合がある。代替的に、標的配列を含む核酸は、それらが以下に議論されたさまざまな同定手順に用いられる前に、抽出、精製及び/又は増幅される場合がある。組織又は細胞の試料以外に、試験されるべき患者から得られた組織又は細胞の試料を用いて構築されたcDNA又はゲノムDNAのライブラリー由来のcDNAs又はゲノムDNAsは有用でもある。

#### 【0094】

特定のヌクレオチドバリエーションの有無を決定するために、1つの手法は、前記標的ゲノムDNA又はcDNA、特に、検出されるべき前記ヌクレオチドのバリエーションの遺伝子座を含む領域を配列決定することである。サンガー法及びギルバート化学法を含むさまざまな配列決定法が、当業者に一般的に知られ、広く用いられる。パイロシーケンス法は、化学発光検出システムを用いるDNA合成をリアルタイムに監視する。パイロシーケンス法は一塩基多型のような遺伝多型の解析で有効であることが示され、したがって、本発明で用いられる場合もある。Nordstromら、*Biotechnol. Appl. Biochem.*、31(2):107-112(2000)と、Ahmadianら、*Anal. Biochem.*、280:103-110(2000)とを参照せよ。

10

#### 【0095】

代替的に、制限酵素断片長多型(RFLP)法及びAFLP法が有用な手法であることが証明される場合もある。特に、前記遺伝子1個又は2個以上に対応する前記標的DNAのヌクレオチドのバリエーションが制限酵素認識部位の消失又は作成をもたらす場合には、その後、特定の制限酵素を用いる前記標的DNAの消化は改変型制限酵素断片長パターンを生じるであろう。したがって、検出されたRFLP又はAFLPは、特定のヌクレオチドのバリエーションの存在を示すであろう。

20

#### 【0096】

別の有用なアプローチは、興味のある前記ヌクレオチドにまたがる1本鎖標的DNAの移動度の変化を利用する、1本鎖高次構造多型アッセイ(SSCA)である。標的配列の一塩基変化は異なる分子内塩基対合パターンを生じる場合があり、したがって、前記1本鎖DNAの異なる2次構造は非変性ゲルで検出される場合がある。Oritaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、86:2776-2770(1989)を参照せよ。固定型(clamped)変性ゲル電気泳動(CDGE)及び変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)のような変性ゲルを利用する技術は、変性ゲルでの野生型配列と比較して、変異型配列の泳動率の違いを検出する。Millerら、*Biotechniques*、5:1016-24(1999)と、Sheffieldら、*Am. J. Hum. Genet.*、49:699-706(1991)と、Wartellら、*Nucleic Acids Res.*、18:2699-2705(1990)と、Sheffieldら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、86:232-236(1989)とを参照せよ。さらに、2本鎖高次構造解析(DSCA)は本発明に有用な場合もある。Arguelloら、*Nat. Genet.*、18:192-194(1998)を参照せよ。

30

40

#### 【0097】

患者の遺伝子1個又は2個以上の特定の遺伝子座においてヌクレオチドのバリエーションの有無が、増幅難治性変異システム(amplification refractory mutation system)(ARMS)法を用いて検出される場合もある。欧州特許第0,332,435号明細書と、Newtonら、*Nucleic Acids Res.*、17:2503-2515(1989)と、Foxら、*Br. J. Cancer*、77:1267-1274(1998)と、Robertsonと、*Eur. Respir. J.*、12:477-482(1998)とを参照せよ。ARMS法では、プライマーは、試験されるべき遺伝子座のヌクレオチドに対応する3'末端のヌク

50

レオチドが所定のヌクレオチドであることを除いて、前記遺伝子座の直近の5'上流のヌクレオチド配列に対合するように合成される。例えば、前記3'末端ヌクレオチドは変異型遺伝子座と同一の場合がある。前記プライマーは、その3'末端ヌクレオチドが試験される遺伝子座で前記ヌクレオチドと対合する際に、ストリンジェントな条件下のみで標的DNAにハイブリダイゼーションする限り、いずれかの適切な長さの場合がある。前記プライマーは、少なくともヌクレオチド12個を有することが好ましく、ヌクレオチド約18個から50個までがより好ましい。試験された患者が前記遺伝子座で突然変異を有し、このヌクレオチドが前記プライマーの3'末端ヌクレオチドと対合する場合には、その後、前記プライマーは標的DNAの鋳型にハイブリダイゼーションするまでさらに伸長される場合があり、前記プライマーは別の適切なPCRプライマーとともにPCR増幅反応を開始する場合がある。対照的に、前記遺伝子座のヌクレオチドが野生型である場合には、その後、プライマーの伸長は達成されない場合がある。過去数年間に開発されたARMS法のさまざまな形式が用いられる場合がある。例えば、Gibsonら、Clin. Chem., 43:1336-1341(1997)を参照せよ。

#### 【0098】

ARMS法に類似のものは、小規模配列決定(mini sequencing)か、一塩基の取込みを利用する一塩基プライマー伸長法(single nucleotide primer extension method)かである。試験された前記遺伝子座の近傍の5'のヌクレオチド配列に対合するオリゴヌクレオチドプライマーが、標識されたジデオキシリボヌクレオチドの存在下で標的DNA又はRNAにハイブリダイゼーションされる。前記ジデオキシリボヌクレオチドが検出される遺伝子座バリエーションのヌクレオチドに対合する際に、標識されたヌクレオチドは、前記プライマーのみに取り込まれるか、あるいは結合される。したがって、遺伝子座バリエーションのヌクレオチドの同定が、取り込まれたジデオキシリボヌクレオチドに結合した検出標識を利用して示される場合がある。Syvanenら、Genomics, 8:684-692(1990)と、Shumakerら、Hum. Mutat., 7:346-354(1996)と、Chenら、Genome Res., 10:549-547(2000)とを参照せよ。

#### 【0099】

本発明の有用な別の一連の手法は、野生型遺伝子座と、突然変異とを鑑別することが、標的DNA分子上でオリゴヌクレオチド2個がお互いに近接してアニーリングでき、該オリゴヌクレオチド2個はDNAリガーゼによってともに連結できることを利用する、いわゆる「オリゴヌクレオチド結合アッセイ」(OLA)である。Landergrénら、Science, 241:1077-1080(1988)と、Chenら、Genome Res., 8:549-556(1998)と、Iannoneら、Cytometry, 39:131-140(2000)とを参照せよ。したがって、例えば、遺伝子1個又は2個以上の特定の遺伝子座において一塩基変異を検出するために、オリゴヌクレオチド2個が合成される場合があり、1個のオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の遺伝子座バリエーションのヌクレオチドに同一の3'末端ヌクレオチドとともに前記遺伝子座の直近の5'上流の配列を有し、もう1個のオリゴヌクレオチドは前記遺伝子の前記遺伝子座から下流の3'に近傍の配列に対合するヌクレオチドを有する。前記オリゴヌクレオチドは、検出の目的のために標識される場合がある。ストリンジェントな条件下で標的遺伝子にハイブリダイゼーションすると、前記オリゴヌクレオチド2個は適切なりガーゼの存在下で結合される。前記オリゴヌクレオチド2個の結合は、前記標的DNAが検出される前記遺伝子座のヌクレオチドのバリエーションを有することを示すであろう。

#### 【0100】

小さな遺伝的変化の検出は、さまざまなハイブリダイゼーションを利用するアプローチによって達成される場合もある。アレル特異的オリゴヌクレオチドが最も有用である。Connerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:278-282(1983)と、Saikiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234(1989)とを参照せよ。特定の遺伝子座の特

10

20

30

40

50

定のバリエーション遺伝子を有するアレル遺伝子に特異的に（アレル特異的に）ハイブリダイゼーションするが、別のアレルにはハイブリダイゼーションしないオリゴヌクレオチドプローブが、当業者に知られた方法によって設計される場合がある。前記プローブは、例えば、10個から約50個のヌクレオチド塩基の長さを有する場合がある。前記標的DNA及びオリゴヌクレオチドプローブは、前記ヌクレオチドのバリエーションがハイブリダイゼーションの有無を利用して野生型遺伝子と鑑別される場合があるために、十分にストリンジエントな条件下で互いに接触させられる場合がある。前記プローブは検出シグナルを提供するために標識される場合がある。代替的に、前記アレル特異的オリゴヌクレオチドプローブが「アレル特異的PCR」のPCR増幅プライマーとして用いられる場合があり、予測された長さのPCR産物の有無が特定のヌクレオチドのバリエーションの有無を示す。

10

#### 【0101】

別の有用なハイブリダイゼーションを利用する手法は、ヌクレオチドの置換、挿入又は欠失のために不対合が存在する場合でさえ、1本鎖核酸2個がともにアニーリングできる。その後、前記不対合はさまざまな技術を用いて検出される場合がある。例えば、アニーリングした2本鎖は電気泳動される場合がある。不対合した2本鎖は、好ましく対合した2本鎖と異なるそれらの電気泳動の移動度を利用して検出される場合がある。Carriello、Human Genetics、42:726(1988)を参照せよ。代替的に、RNアーゼプロテクションアッセイでは、RNAプローブが検出されるべきヌクレオチドのバリエーション部位にまたがり、検出マーカーを有するように調製される場合がある。Giuntaら、Diagn. Mol. Pathol.、5:265-270(1996)と、Finkelsteinら、Genomics、7:167-172(1990)と、Kinszlerら、Science 251:1366-1370(1991)とを参照せよ。前記RNAプローブは、その後、リボヌクレアーゼRNアーゼA消化を受けるヘテロ2本鎖を形成する、前記標的DNA又はmRNAにハイブリダイゼーションされる場合があり、RNアーゼAは、不対合部位でのみヘテロ2本鎖の前記RNAプローブを消化する。前記消化は、サイズ変化を利用した変性電気泳動ゲル上で決定される場合がある。さらに、不対合は当業者に知られた化学的開裂によって決定される場合もある。

20

#### 【0102】

mutSアッセイでは、プローブは、予定されたヌクレオチドがバリエーション遺伝子座で用いられることを除いて、突然変異の有無が検出されるべきである遺伝子座の周囲の遺伝子配列に対合するように調製される場合がある。2本鎖を形成するための前記標的DNAに前記プローブをアニーリングすると、E. coliのmutSタンパク質が前記2本鎖に接触される。前記mutSタンパク質がヌクレオチド不対合を含むヘテロ2本鎖配列にのみ結合するため、前記mutSタンパク質の結合は突然変異の存在を示すであろう。Modrichら、Ann. Rev. Genet.、25:229-253(1991)を参照せよ。

30

#### 【0103】

非常にさまざまな改善及び改変が、上記で説明された基礎的な手法を利用して当業者に開発され、全ては本発明で突然変異又はヌクレオチドバリエーションを検出するのに有用な場合がある。例えば、「サンライズプローブ(sunrise probes)」又は「分子ビーコン(molecular beacons)」は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用し、高感度を生じる。Wolfら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85:8790-8794(1988)を参照せよ。典型的に、検出されるべきヌクレオチド遺伝子座にまたがるプローブはヘアピン型構造に設計され、1個の末端の消光フルオロフォアと、別の末端のリポーターフルオロフォアとで標識される。その自然状態では、前記リポーターフルオロフォア由来の蛍光は、1個のフルオロフォアが別のフルオロフォアに接近するために、消光フルオロフォアによって消光される。標的DNAに前記プローブがハイブリダイゼーションすると、5'末端は3'末端から離れて分離され、したがって、蛍光シグナルが再生される。Nazarenkoら、Nucleic Acids Res.、25:2516-2521(1997)と、Rychlik

40

50

ら、Nucleic Acids Res.、17:8543-8551(1989)と、Sharkeyら、Bio/Technology 12:506-509(1994)と、Tyagiら、Nat. Biotechnol.、14:303-308(1996)と、Tyagiら、Nat. Biotechnol.、16:49-53(1998)とを参照せよ。ホモタグ補助非ダイマーシステム(homo-tag assisted non-dimer system、HANDS)は、プライマー二量体の蓄積を抑制するために分子ビーコン法と組み合わせて用いられる場合がある。Brownieら、Nucleic Acids Res.、25:3235-3241(1997)を参照せよ。

#### 【0104】

色素標識オリゴヌクレオチド結合アッセイは、OLAアッセイとPCRとを組み合わせる、FRETを利用する方法である。Chenら、Genome Res. 8:549-556(1998)を参照せよ。TaqManは、ヌクレオチドのバリエーションを検出するためのFRETを利用する別の方法である。TaqManプローブは興味のあるバリエーション遺伝子座にまたがる遺伝子のヌクレオチド配列を有し、異なるアレルに差次的にハイブリダイゼーションするように設計された、オリゴヌクレオチドの場合がある。前記プローブの末端2個は、消光フルオロフォア及びリポーターフルオロフォアそれぞれで標識される。前記TaqManプローブは、Taqポリメラーゼを用いて興味のある前記遺伝子座を含む標的遺伝子領域を増幅するためのPCR反応に取り込まれる。Taqポリメラーゼは5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を示すが、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を全く有しない際に、前記TaqManプローブは標的DNAの鑄型にアニーリングされる場合には、前記TaqManプローブの5'末端は、PCR反応中にTaqポリメラーゼによって分解され、したがって、前記消光フルオロフォアから前記リポーターフルオロフォアを分離して、蛍光シグナルを放出する。Hollandら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:7276-7280(1991)と、Kalinaら、Nucleic Acids Res.、25:1999-2004(1997)と、Whitcombeら、Clin. Chem.、44:918-923(1998)とを参照せよ。

#### 【0105】

さらに、本発明の検出は化学発光を利用する手法を用いる場合もある。例えば、オリゴヌクレオチドプローブは、野生型遺伝子の遺伝子座と、バリエーション遺伝子の遺伝子座との両方ではなく、野生型遺伝子の遺伝子座か、バリエーション遺伝子の遺伝子座かのいずれかにハイブリダイゼーションするように設計される場合がある。前記プローブは、高化学発光性アクリジニウムエステルで標識される。前記アクリジニウムエステルの加水分解は化学発光を無くする。前記プローブを前記標的DNAにハイブリダイゼーションすることが、前記アクリジニウムエステルの加水分解を妨げる。したがって、前記標的DNAの特定の突然変異の有無が化学発光の変化を測定することによって決定される。Nelsonら、Nucleic Acids Res.、24:4998-5003(1996)を参照せよ。

#### 【0106】

本発明に従って遺伝子の遺伝的変化の検出は、「塩基除去配列走査(base excision sequence scanning)」(BESS)法を利用する場合もある。前記BESS法はPCRを利用する突然変異走査法である。生成されるBESSのT-スキャン及びBESSのG-トラッカー(Tracker)は、ジデオキシ配列決定法のT及びGのラダー(ladders)に類似する。突然変異は、正常DNA及び変異体DNAの配列を比較することによって検出される。例えば、Hawkinsら、Electrophoresis、20:1171-1176(1999)を参照せよ。

#### 【0107】

人気上昇している別の有用な技術は質量分析法である。Grabnerら、Curr. Opin. Biotechnol.、9:14-18(1998)を参照せよ。例え

10

20

30

40

50

ば、プライマーオリゴ塩基伸長 (PROBE (商標)) 法では、標的核酸が固相支持体に不動化される。プライマーは解析されるべき遺伝子座の直近の 5' 上流の標的にアニーリングされる。プライマー伸長は、デオキシリボヌクレオチド及びジデオキシリボヌクレオチドの選択された混合物の存在下で行われる。その後、新たに伸長されたプライマーの生成混合物は MALDI-TOF によって解析される。例えば、Monforteら、Nat. Med.、3:360-362 (1997) を参照せよ。

【0108】

さらに、マイクロチップ又はマイクロアレイの技術が本発明の検出方法に適用可能である。基本的に、マイクロチップでは、多数の異なるオリゴヌクレオチドプローブが、基板又は担体、例えば、シリコンチップ又はスライドガラス上のアレイに不動化される。解析されるべき標的核酸配列は、前記マイクロチップ上に不動化されたオリゴヌクレオチドと接触される場合がある。Lipshutzら、Biotechniques、19:442-447 (1995) と、Cheerら、Science、274:610-614 (1996) と、Kozalら、Nat. Med.、2:753-759 (1996) と、Haciaら、Nat. Genet.、14:441-447 (1996) と、Saijiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:6230-6234 (1989) と、Gingerasら、Genome Res.、8:435-448 (1998) とを参照せよ。代替的に、研究されるべき多数の標的核酸配列は基板上に固定され、プローブのアレイは不動化された前記標的配列に接触される。Drmanacら、Nat. Biotechnol.、16:54-58 (1998) を参照せよ。多数のマイクロチップ技術が、上記で説明された突然変異を検出するための手法 1 種類又は 2 種類以上を取り込んで開発された。コンピューター化された解析ツールと組み合わせた前記マイクロチップ技術は、大規模のスクリーニングを即座にできる。前記マイクロチップ技術の本発明に適合することが、本明細書の開示で当業者に明らかになるであろう。例えば、Fodorらの米国特許第 5,925,525 号明細書を参照せよ。

【0109】

好ましい実施態様では、バイオチップは、表 1 ないし 3 で同定された核酸、その変異体、バリエーション、断片及び対応するペプチドのうち、いずれか 1 個又は 2 個以上を含む。

【0110】

別の好ましい実施態様では、バイオチップは、表 1 ないし 3 に同定された核酸、その変異体、バリエーション、断片及び対応するペプチドの遺伝子産物に特異的な抗体及びその断片が、アプタマーかのうち、いずれか 1 個又は 2 個以上を含む。最初に、バイオマーカーの分子的特徴は、特注されたマイクロアレイチップを製造するための基礎となるであろう。

【0111】

別の好ましい実施態様では、ステロイドのような新規治療用組成物と、眼圧の変調のための組成物とを同定することは、表 1 ないし 3 に同定された核酸、その変異体、バリエーション、断片、ペプチドのうち、いずれか 1 個又は 2 個以上を含むバイオチップを化合物ライブラリーに接触することを含む。

【0112】

別の好ましい実施態様では、前記バイオチップは、表 1 ないし 3 に同定された核酸、その変異体、バリエーション、断片及びペプチドの遺伝子産物のうち、いずれか 1 個又は 2 個以上に特異的な抗体を含む。

【0113】

適切な検出法の上記調査から明らかのように、用いられた該検出法に依存して、標的 DNA 分子の数を増加するために、標的 DNA、例えば、遺伝子、その cDNA、mRNA 又は一部を増幅するために必要とされる場合があるか、あるいは必要とされない場合がある。例えば、PCR を利用する手法の多くが、前記標的の一部の増幅と、突然変異の検出とを組み合わせる。PCR 増幅は当業者に周知であり、米国特許第 4,683,195 号明細書及び米国特許第 4,800,159 号明細書で開示され、両方が引用により本明細書に取り込まれる。PCR を利用しない検出法のために、必要な場合には、前記増幅は、

10

20

30

40

50

例えば、*in vivo*プラスミド増加か、大量の組織又は細胞の試料由来の標的DNAの精製かによって達成される場合がある。一般的に、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. sup. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州、1989を参照せよ。しかし、高感度の手法の多くが開発され、希少な試料でさえ、一塩基置換のような少数の遺伝的变化が前記試料の標的DNAを増幅することなしに検出される場合がある。例えば、開発された手法は、例えば、前記標的DNAにハイブリダイゼーションする場合がある、分岐DNA又はデンドリマー(dendrimer)を用いることによって、前記標的DNAと比べて、シグナルを増幅する。前記分岐DNA又はデンドリマーDNAは、それを結合するためのハイブリダイゼーションプローブに対する多数のハイブリダイゼーション部位を提供し、したがって、検出シグナルを増幅する。Detmerら、*J. Clin. Microbiol.*、34:901-907(1996)と、Nilsenら、*J. Theor. Biol.*、187:273-284(1997)とを参照せよ。

10

## 【0114】

一塩基変化を検出するためのさらに別の手法では、インベーター(商標)アッセイは、典型的なPCRのDNAの配列決定を利用する解析が必要とした長い演算処理時間(long turnaround times)を改善する新規線形シグナル増幅技術を利用する。Cookseyら、*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44:1296-1301(2000)を参照せよ。このアッセイは、「フラップ」を形成するための興味のある標的配列にハイブリダイゼーションする、2個の重なっているオリゴヌクレオチド間で形成されたユニークな2次構造の開裂を利用する。その後、各「フラップ」は1時間あたり数千のシグナルを生じる。したがって、この手法の結果は容易に解読され、方法は前記標的DNAの指数関数的増幅を必要としない。前記インベーター(商標)システムは、標的DNAにハイブリダイゼーションする短いDNAプローブ2個を利用する。ハイブリダイゼーション事象によって形成された構造は、短いDNA「フラップ」を放出するために前記プローブの1種類を切断する、特殊なクリベース(cleavase)酵素によって認識される。その後、放出された「フラップ」それぞれは、別の開裂構造を形成するために蛍光的に標識されたプローブに結合する。前記クリベース酵素が前記標識されたプローブを切断する際に、該プローブは検出可能な蛍光シグナルを放出する。例えば、Lyamichevら、*Nat. Biotechnol.*、17:292-296(1999)を参照せよ。

20

30

## 【0115】

ローリングサークル法(rolling circle method)は、指数関数的増幅を避ける別の方法である。(引用により本明細書に取り込まれる)Lizardiら、*Nature Genetics*、19:225-232(1998)。例えば、この方法の商業上の実施態様のSNIPER(商標)は、特定のバリエーションの正確な蛍光検出のために設計された、高感度でハイスループットなSNPスコアリングシステムである。各ヌクレオチドのバリエーションのために、直線状のアレル特異的プローブ2種類が設計される。前記アレル特異的プローブ2種類は、バリエーション部位を相補するために変更される3'塩基を除いて同一である。前記アッセイの第1段階では、標的DNAは分解され、その後、アレル特異的で開環状の一塩基多型オリゴヌクレオチドプローブ1種類とハイブリダイゼーションされる。3'塩基が前記標的DNAに正確に相補する際に、前記プローブの結合が優先的に起こるのであろう。環状化されたオリゴヌクレオチドプローブのその後の検出は、ローリングサークル増幅法によるものであり、そこで、増幅されたプローブ産物は蛍光によって検出される。Clark及びPickering、*Life Science News* 6、2000、アマシャム・ファルマシア・バイオテック(2000)を参照せよ。

40

## 【0116】

一緒の増幅を回避する多数の別の手法は、例えば、表面増強共鳴ラマン散乱法(SER

50

R S ) と、蛍光相関分光法と、一分子電気泳動法とを含む。さらに、アレル特異的オリゴヌクレオチド ( A S O ) が、試料として組織又は細胞を用いる、*in situ* ハイブリダイゼーションで用いられる場合もある。野生型遺伝子配列か、突然変異を有する該遺伝子配列かと差次的にハイブリダイゼーションする場合があるオリゴヌクレオチドプローブは、放射活性同位体、蛍光その他の検出可能なマーカーで標識される場合がある。*in situ* ハイブリダイゼーション法は当業者に周知であり、特定の患者の遺伝子 1 個又は 2 個以上のヌクレオチドのバリエーションの有無を検出するための本発明に適合することが、本明細書の開示で当業者に明らかになるであろう。

#### 【 0 1 1 7 】

タンパク質を利用する検出法は、特に、前記ヌクレオチドのバリエーションが、タンパク質の 1 次構造、2 次構造又は 3 次構造に影響するアミノ酸の置換又は欠損又は挿入又はフレームシフトをもたらす際に、有用であることを証明する場合もある。前記アミノ酸の変化を検出するために、タンパク質配列決定法が用いられる場合がある。例えば、遺伝子に対応するタンパク質又はその断片が、試験されるべき患者から単離された DNA 断片を用いる組換え体の発現によって合成される場合がある。決定されるべき多型遺伝子座を含むたった 1 0 0 個ないし 1 5 0 個の塩基対の c DNA 断片が用いられることが好ましい。その後、ペプチドのアミノ酸配列が従来のタンパク質配列決定法によって決定される場合がある。代替的に、HPLC-顕微鏡タンデム質量分析法が前記アミノ酸配列変化を決定するために用いられる場合がある。この手法では、タンパク質分解性消化がタンパク質で行われ、生成ペプチド混合物は、逆相クロマトグラフィー分離によって分離される。その後、タンデム質量分析法が行われ、その採取されたデータは解析される。Gatlinら、*Anal. Chem.*、72:757-763(2000)を参照せよ。

#### 【 0 1 1 8 】

別の有用なタンパク質を利用する検出法は、本発明に応じる変異体遺伝子がエンコードしたタンパク質と選択的に免疫応答する、抗体を利用したイムノアフィニティーアッセイを含む。かかる抗体を産生するための方法は当業者に知られる。抗体は、液体試料由来の特定のタンパク質を免疫沈降するためか、例えば、ポリアクリルアミドゲルによって分離されたタンパク質をイムノプロットするためか用いられる場合がある。免疫細胞化学的方法が、組織又は細胞の特定のタンパク質多型を検出するのに用いられる場合もある。例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いるサンドウィッチアッセイを含む、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) と、ラジオイムノアッセイ ( R I A ) と、免疫放射線測定法 ( I R M A ) と、免疫酵素アッセイ ( I E M A ) とを含む別の周知の抗体を利用する技術が用いられる場合もある。例えば、米国特許第 4,376,110 号明細書と、米国特許第 4,486,530 号明細書とを参照し、両方は引用により本明細書に取り込まれる。

#### 【 0 1 1 9 】

したがって、患者の遺伝子 1 個又は 2 個以上のヌクレオチドのバリエーションか、アミノ酸のバリエーションかの有無が、上記で説明された検出方法のいずれかを用いて決定される場合がある。

#### 【 0 1 2 0 】

いったん遺伝子 1 個又は 2 個以上のヌクレオチドのバリエーションか、アミノ酸のバリエーションかの有無 ( 又は表 1 ないし 3 のバイオマーカーの状態 ) が決定されると、医師又は遺伝カウンセラー又は患者又は別の研究者は、その結果を通知される場合があることが典型的である。特別に、その結果は、別の研究者又は医師又は遺伝カウンセラー又は患者に伝達されるか、あるいは送信される場合がある、送信可能な形態で放たれる場合がある。かかる形態は変化可能で、有形又は無形の場合がある。試験された患者の本発明に応じるヌクレオチドのバリエーションの有無に関する結果は、説明的な記載、図、写真、図表、画像その他のいずれかの目に見える形態で具体化される場合がある。例えば、PCR産物のゲル電気泳動の画像が前記結果を説明するのに用いられる場合がある。また、バリエーションが患者の遺伝子で生じることを示す図は試験結果を示すのに有用である。前記記載及び目に見え

10

20

30

40

50

る形態は、フロッピーディスク、コンパクトディスクのようなコンピューターで読取り可能な媒体、紙等のような有形媒体か、無形媒体、例えば、Eメールか、インターネット又はイントラネット上のウェブサイトかのような形態の電子媒体かに記録される場合がある。さらに、試験された患者のヌクレオチドのバリエーション又はアミノ酸のバリエーションの有無に関する結果は、音の形態で記録され、適切な媒体、例えば、電話、ファクシミリ、無線携帯電話、インターネット電話等を介するアナログ又はデジタルのケーブル線、光ファイバーケーブル等のいずれかを通して送信される場合もある。

#### 【0121】

したがって、試験結果の情報及びデータは世界中のどこでも作成され、異なる場所に送信される場合がある。例えば、遺伝子型決定アッセイが海外で行われる際に、試験結果の前記情報及びデータは上記で説明されたような送信可能な形態で作成され、放たれる場合がある。したがって、送信可能な形態の前記試験結果がアメリカ合衆国に輸入される場合がある。したがって、本発明は、患者由来の癌と考えられる試料2種類又は3種類以上の遺伝子型の送信可能な形態の情報を作成する方法も含む。前記方法は、(1)本発明に従って前記試料由来のDNAの遺伝子型を決定すること、及び、(2)決定するステップの結果を送信可能な形態で具体化することを含む。前記送信可能な形態は製造方法の産物である。

10

#### 【0122】

##### 候補治療剤

好ましい実施態様では、ステロイドが有効であろう、緑内障その他の疾患のような疾患を治療するための候補治療剤を同定する方法は、(a)ステロイド非応答者及びステロイド応答者の患者由来の生物学的試料を候補剤と接触し、1個又は2個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定すること、すなわち、ステロイド応答者と非応答者とを比較してバイオマーカーのプロファイルと同定するステップと、(b)前記候補剤と接触されない前記生物学的試料の一定分量中の対応するバイオマーカー(biomarker or biomarkers)の前記発現レベルを決定するステップと、(c)前記候補剤と接触された前記生物学的試料の一定分量中の前記バイオマーカーの前記発現レベルと、前記候補剤と接触されなかった前記生物学的試料の一定分量中の対応するバイオマーカーの前記発現レベルとを比較することによって前記候補剤の効果を観察するステップと、(d)かかる観察された効果からかかる薬剤を同定するステップとを含み、前記候補剤と接触された前記生物学的試料の一定分量中のバイオマーカー遺伝子か、バイオマーカー遺伝子(バイオマーカーのプロファイル)の組み合わせかの前記発現レベルと、前記候補剤と接触されなかった前記生物学的試料の一定分量中の対応するバイオマーカー遺伝子か、バイオマーカー遺伝子の組み合わせかの前記発現レベルとの少なくとも10%の違いが前記候補剤の効果を示す。

20

30

#### 【0123】

好ましい実施態様では、前記薬剤の効果が、特定のバイオマーカーの発現、すなわち、前記バイオマーカーのプロファイルを用いて採取され、これらの患者が応答者であろうか、あるいは特定の患者が、例えば、ステロイド治療の結果として生じる眼圧を生じるリスクを有すかどうかを同定する。したがって、同定された薬物はステロイド治療と対照的に用いられるであろう。

40

#### 【0124】

本発明の別の実施態様では、本発明に応じる薬剤を含む医薬品製剤が提供される。

#### 【0125】

本発明の別の好ましい実施態様では、薬物を製造する方法は本発明に応じる方法のステップを含み、該ステップは、(i)被験者に治療上有効な量のかかる薬物を提供するために十分な量の上記ステップ(c)で同定された前記候補剤か、そのアナログか、誘導体を合成すること、及び/又は、(ii)上記ステップ(c)で同定された、薬物候補、前記候補剤か、それらのアナログか、誘導体かと薬学的に許容可能な塩とを組み合わせることである。

50

## 【 0 1 2 6 】

いくつかの実施態様では、ベクター及び細胞のバイオマーカーを含む生体分子を発現することが望ましい。かかる組み合わせの用途は限定されない。1個又は2個以上の生体分子を発現している前記ベクター及び細胞が、アッセイ、キット、創薬、診断、予後判断等で用いられる場合がある。前記細胞は、前駆細胞のような骨髄から単離された幹細胞か、例えば、ATCCのような別の供給源のいずれかから得られた細胞かの場合がある。

## 【 0 1 2 7 】

別の好ましい実施態様では、薬剤又は薬物は、細胞受容体が、本発明の方法、例えば、調節（例えば、上向き調節、又は、受容体の発現の抑制）を用いて調節された、単離された細胞を培養し、候補治療剤を培養細胞に投与するステップと、正常な細胞と、調節された受容体を有し、候補治療剤の存在下で培養された細胞とを比較して、候補治療剤の存在下又は非存在下での発現レベルと、受容体のリン酸化とを採取するステップとを含む方法によって同定され、薬物は所望の治療上の予後を利用して同定される。例えば、受容体の発現を増加し、受容体の発現を低下し、受容体をリン酸化又は脱リン酸化し、ステロイド等に応答する薬物であり、したがって、受容体を調節する候補治療剤を同定することである。

10

## 【 0 1 2 8 】

予後判断、リスク評価及び候補薬物の開発のための別の適切な方法は、受容体又はその遺伝子か、それらのアレルか、断片かを発現している細胞に試験試料を接触するステップと、前記試験試料と、前記遺伝子、そのアレル又は断片との相互作用か、該遺伝子、そのアレル又は断片の発現産物かを検出するステップとを含む。所望の遺伝子、そのアレル又は断片か、該遺伝子、そのアレル又は断片の発現産物かは、例えば、蛍光又は放射活性の成分で適切に検出可能に標識される場合がある。

20

## 【 0 1 2 9 】

別の好ましい実施態様では、患者由来の細胞は単離され、候補治療用分子と接触される。遺伝子及びその発現産物は同定するために監視され、遺伝子又は発現産物は前記薬物によって調節される。その後、干渉用RNAが、前記薬物によって調節される同定された遺伝子、発現産物を調節し、したがって、治療用オリゴヌクレオチドを提供するために合成される場合がある。これらは個別の患者に適合される場合があり、異なる患者が同一の薬物に等しく効果的に応答しない際に、有用である。したがって、前記オリゴヌクレオチドは、従来の薬物治療よりも安価な個別治療を提供するであろう。

30

## 【 0 1 3 0 】

プローブは関連した配列を検出するために用いられる場合もあり、同定された遺伝子をエンコードしている配列のいずれかに少なくとも50%の配列同一性又は相同性を有すべきであることが好ましく、前記同定された遺伝子をエンコードしている配列のいずれかに少なくとも約60、70、75、80、85、90又は95パーセントの配列同一性であることがより好ましい（上述の配列同一性を決定することはBLASTプログラムを使用することを含む。）。主題発明のハイブリダイゼーション用プローブは、DNA又はRNAの場合があり、本発明の配列か、あるいは前記遺伝子のプロモーター、エンハンサー及びイントロンを含むゲノム配列から得られる場合がある。

40

## 【 0 1 3 1 】

標的遺伝子をエンコードしているポリヌクレオチド配列は、サザン解析又はノーザン解析か、ドットプロットか、その他の膜を利用する技術かと、PCR技術と、試験紙、ピン（pin）及びマルチフォーマットのELISA様アッセイと、変化した標的遺伝子発現を検出するための患者由来の体液又は組織を利用するマイクロアレイとで用いられる場合がある。ゲルを利用する移動度シフト解析が用いられる場合がある。その他の適切な定性法又は定量法は当業者に周知である。

## 【 0 1 3 2 】

遺伝子又はそのパリアントの同一性が当業者に周知の手法を用いて確かめられる場合があり、上記に説明された。簡潔には、例は、増幅された遺伝子の核酸配列決定法と、一塩

50

基多型解析 (SNP)、興味のある分子がバイオチップ上に不動化されるマイクロアレイのようなハイブリダイゼーション法とを含むが、これらに限られない。重複している cDNA クローンは、蛍光色素ターミネーターと、ABI シークエンサー (アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州フォスターシティ) とを用いて、ジデオキシ連鎖反応によって配列決定される場合がある。1 個の構成要素が不動化されるアッセイのいずれかの種類が、本発明の基板プラットフォームを用いて行われる場合がある。不動化された構成要素を利用するバイオアッセイは当業者に周知である。不動化された構成要素を利用するアッセイの例は、例えば、イムノアッセイ、タンパク質間の相互作用解析、タンパク質 - 核酸の相互作用解析、核酸間の相互作用解析、受容体結合アッセイ、酵素アッセイ、リン酸化アッセイ、疾患状態を決定するための診断アッセイ、薬物適合性解析のための遺伝プロファイリング、SNP 検出等を含む。

10

#### 【0133】

興味のある生体分子に結合可能な核酸配列を同定することは、ユニークな核酸それぞれが、アレイを形成するための画された位置に配置されたため、核酸ライブラリーを基板表面上に不動化することによって達成される場合がある。その後、前記アレイは、前記生体分子を前記核酸に結合することが好ましい条件下で該生体分子に曝されるであろう。非特異的に結合する生体分子は、所望の結合特異性レベルに依存する中程度ないしストリンジエントな緩衝液条件で洗い流される場合があった。その後、核酸アレイは、前記生体分子に結合した核酸配列を決定するために解析されるであろう。前記生体分子は、結合した前記核酸の局在の検出で使用するための蛍光タグを保有するであろうことが好ましい。

20

#### 【0134】

核酸配列が不動化されたアレイを用いるアッセイは、未知の核酸配列、一塩基多型 (SNP) 解析、特定の種、組織、細胞タイプ等由来の遺伝子発現パターン解析、遺伝子同定等を決定するために用いられる場合がある。

#### 【0135】

所望の遺伝子発現産物をエンコードしている配列から設計されたオリゴヌクレオチドのための追加の診断上の使用は、PCR の使用を含む場合がある。これらのオリゴマーは、化学的に合成されるか、酵素的に生産されるか、あるいは *in vitro* で製造される場合がある。オリゴマーは、発現産物をエンコードしているポリヌクレオチドの断片か、ポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドの断片かを含むことが好ましいであろうし、特異的遺伝子を同定するために最適化された条件下で用いられるであろう。オリゴマーは、密接に関連した DNA 又は RNA の配列を検出するか、あるいは定量するためにストリンジエントではない条件下で用いられる場合もある。

30

#### 【0136】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチド配列のいずれかに由来する、オリゴヌクレオチドか、より長い断片かが、マイクロアレイの標的として用いられる場合がある。前記マイクロアレイは、標的遺伝子又はその産物が相互作用する遺伝子を同時に同定するため、及び / 又は、例えば、神経疾患を仲介する遺伝子発現産物を調節する候補治療剤の有効性を評価するための多数の遺伝子及び遺伝子転写産物の同一性及び / 又は発現レベルを監視するために用いられる場合がある。この情報は、遺伝子機能を決定するためと、治療剤の活性を開発し、監視するためとに用いられる場合がある。

40

#### 【0137】

候補薬剤は多くの化学クラスを含むが、低分子有機化合物を含む有機化合物、オリゴヌクレオチド及びペプチドを含む核酸であることが典型的である。低分子有機化合物は、例えば、約 40 又は 50 よりも大きい、約 2,500 よりも小さい分子量を適切に有する場合がある。候補薬剤は、タンパク質及び / 又は DNA と相互作用する化学官能基を含む場合がある。

#### 【0138】

化学薬剤、合成化合物又は天然化合物のライブラリーを含む広範な供給源から得られる場合がある。例えば、多くの手段が、ランダム化されたオリゴヌクレオチドの発現を含む

50

、広範な有機化合物及び生体分子のランダム合成及び指向型合成のために利用可能である。代替的に、例えば、細菌、真菌及び動物の抽出物の形状の天然化合物ライブラリーが利用可能か、あるいは容易に作成される。

【0139】

本発明の治療剤のアッセイは、動物モデルと、細胞を利用するシステムと、細胞を利用しないシステムとを適切に含む。同定された遺伝子、そのバリエーション、断片又はオリゴペプチドが、例えば、化合物のライブラリーをスクリーニングすることによって、治療上の利益がある薬剤を同定するか、あるいはその他のさまざまな薬物スクリーニング法又は解析法のいずれかによって興味のある化合物を同定するために用いられることが好ましい。かかるスクリーニングで用いられた遺伝子、そのアレル、断片又はオリゴペプチドは、溶液中に遊離されるか、固体支持体に付着されるか、細胞表面上で産生されるか、細胞内に局在されるかの場合がある。

10

【0140】

薬物スクリーニングのための別の手法は、興味のあるタンパク質に対する適切な結合親和性を有する化合物のハイスループットのスクリーニングを提供する（例えば、Geysenら、1984、PCT出願第WO84/03564号明細書を参照せよ。）。この方法では、多数の異なる低分子の試験化合物が固体基板上で合成される。前記試験化合物は、同定された遺伝子又はその断片と反応し、洗浄される。その後、結合した分子は当業者に周知の方法によって検出される。代替的に、非中和抗体が、ペプチドを捕捉し、固体基板上にそれを不動化するために用いられる場合がある。

20

【0141】

本発明のスクリーニング方法は、多様な分子のライブラリーから所望の活性を有する化合物1種類又は2種類以上を同定するためのスクリーニングアッセイを使用することを含む。「スクリーニングアッセイ」は、予め選択された活性を有する採取物中の化合物の構造を同定、単離及び/又は決定するために設計された選択的アッセイである。「同定すること」とは、所望の活性を有する化合物が単離され、その化学構造が決定されること（核酸及びポリペプチドそれぞれのヌクレオチド及びアミノ酸の配列を決定することを含むが、これらに限られない）、及び、スクリーニングした活性を有する化合物を追加的又は代替的に精製することを意味する。生化学アッセイ及び生物アッセイは、タンパク質間相互作用、酵素触媒反応、低分子タンパク質の結合から細胞機能までにわたる広範なシステムで活性を試験するために設計される。かかるアッセイは、自動化アッセイ、半自動化アッセイ及びHTS（ハイスループットスクリーニング）アッセイを含む。

30

【0142】

HTS法では、多くの個別の化合物は、多数の試験化合物が、同時か、ほとんど同時に所望の活性についてスクリーニングされるため、ロボット、自動又は半自動の方法によって並行して試験されることが好ましい。本発明の一貫生産システムを用いて、1日あたり異なる化合物を約6,000個ないし20,000個、約100,000個ないし1,000,000個でさえもアッセイし、スクリーニングすることが可能である。

【0143】

典型的にHTSでは、標的分子が、適切な対照を含む変調された受容体を有する単離した細胞とともに、投与されるか、あるいは培養される。

40

【0144】

1つの実施態様では、スクリーニングは、標的とリガンドとの複合体が形成される場合がある条件下で、化合物メンバーのいくつかが前記標的のリガンドである、多様なライブラリーの化合物メンバーと各培養細胞を接触するステップと、ライブラリーのメンバーが、かかる複合体で存在することを同定するステップとを含む。別の非限定的な態様では、スクリーニングは、酵素によって触媒された反応の生産物又は反応物が検出可能なシグナルを産生する条件下で、化合物メンバーのいくつかが前記標的の阻害剤（又は活性化剤）である、多様なライブラリーの化合物メンバーと標的を接触するステップを含む。後者の態様では、標的の阻害剤は、検出可能な生産物由来のシグナルを低下するか、あるいは検

50

出可能な反応物由来のシグナルを増加する（又は、活性化剤については逆である。）。

【0145】

化学ライブラリー

コンビナトリアルケミストリーの開発は、数百個ないし数千個の個々の化合物の速く、経済的な合成を可能にする。これらの化合物は、有効性のスクリーニングのために設計された低分子の中規模のライブラリーに整列されることが典型的である。コンビナトリアル法は、新規化合物を同定するために適切な不偏性ライブラリーを作成するために用いられる場合がある。さらに、作成される場合がある低分子の多様性のないライブラリーは、以前に決定された生物学的活性を有する片親の化合物に由来する。いずれかの場合には、重要な酵素の阻害剤のようなコンビナトリアルケミストリーによって作成される、治療上の適切な生体分子を特異的に標的化するための有効なスクリーニングシステムを欠くことが、それらの資源を最適に使用することを妨げる。

10

【0146】

コンビナトリアルケミストリーのライブラリーは、化学合成又は生合成か、試薬のような多数の化学「構成要素」の組み合わせか、のいずれかによって作成された多様な化学化合物の収集物である。例えば、ポリペプチドライブラリーのような線形コンビナトリアルケミストリーのライブラリーは、多数の組み合わせで一連の化学構成要素（アミノ酸）と、特定の化合物の長さ（例えば、ポリペプチド化合物のアミノ酸の数）に関して潜在的に可能な方法全てとを組み合わせることによって形成される。数百万の化学化合物が、化学構成要素のかかるコンビナトリアル混合を通じて合成される場合がある。

20

【0147】

「ライブラリー」は、2種類から50,000,000種類までの多様な化合物メンバーを含む場合がある。ライブラリーは少なくとも48種類の多様な化合物を含むことが好ましく、96種類又は97種類以上の多様な化合物であることが好ましく、384種類又は385種類以上の多様な化合物であることがより好ましく、10,000種類又は10,001種類以上の多様な化合物であることがより好ましく、10,000種類よりも多い多様なメンバーであることが好ましく、1,000,000種類よりも多い多様な化合物メンバーであることが最も好ましい。「多様な」とは、ライブラリーの化合物の50%よりも多くが、前記ライブラリーの別のメンバーに全く同一ではない化学構造を有することを意味する。ライブラリーの化合物の75%よりも多くが、前記収集物の別のメンバーに全く同一ではない化学構造を有することが好ましく、90%よりも多いことがより好ましく、約99%よりも多いことが最も好ましい。

30

【0148】

コンビナトリアルケミストリーのライブラリーの調製は当業者に周知である。復習のために、Thompsonら、Synthesis and application of small molecule libraries、Chem Rev 96:555-600、1996と、Kenanら、Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries、Trends Biochem Sci 19:57-64、1994と、Janda、Tagged versus untagged libraries: methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries、Proc Natl Acad Sci USA. 91:10779-85、1994と、Leblら、One-bead-one-structure combinatorial libraries、Biopolymers 37:177-98、1995と、Eichlerら、Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries、Med Res Rev. 15:481-96、1995と、Chabal、Solid-phase combinatorial chemistry and novel tagging methods for identifying leads、C

40

50

urr Opin Biotechnol. 6:632-9、1995と、Dolle、Discovery of enzyme inhibitors through combinatorial chemistry、Mol Divers. 2:223-36、1997と、Fauchereら、Peptide and nonpeptide lead discovery using robotically synthesized soluble libraries、Can J. Physiol Pharmacol. 75:683-9、1997と、Eichlerら、Generation and utilization of synthetic combinatorial libraries、Mol Med Today 1:174-80、1995と、Kayら、Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries、Comb Chem High Throughput Screen 4:535-43、2001とを参照せよ。

10

## 【0149】

多様な化学ライブラリーを作成するための別の化学法が用いられる場合もある。かかる化学法は、ペプチド(PCT出願第WO 91/19735号公報)、エンコードされたペプチド(PCT出願第WO 93/20242号公報)、ランダムなバイオオリゴマー(PCT出願第WO 92/00091号公報)、ベンゾジアゼピン(米国特許第5,288,514号公報)、ヒダントイン(hydantoins)、ベンゾジアゼピン及びジペプチドのようなダイバーソマー(diversomers)(Hobbsら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、90:6909-6913(1993))、ビニル性ポリペプチド(Hagiharaら、J. Amer. Chem. Soc. 114:6568(1992))、ベータ-D-グルコースの足場(scaffolding)を有する非ペプチド性ペプチド模倣物(Hirschmannら、J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218(1992))、低分子の化合物ライブラリーの類似体有機合成物(Chenら、J. Amer. Chem. Soc. 116:2661(1994))、オリゴカルバミン酸塩(Chora、Science、261:1303(1993))、及び/又は、ペプチジルホスホン酸塩(Campbellら、J. Org. Chem. 59:658(1994))、核酸ライブラリー(上述のAusubel、Berger及びSambrookを参照せよ。)、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5,539,083号公報を参照せよ。)、抗体ライブラリー(例えば、Vaughnら、Nature Biotechnology、14(3):309-314(1996)と、PCT出願第US 96/10287号公報とを参照せよ。)、炭水化物ライブラリー(例えば、Liangら、Science、274:1520-1522(1996)と、米国特許第5,593,853号公報とを参照せよ。)、有機低分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum C&E News、1月18日、33頁(1993)を参照せよ。)、イソプレノイド(米国特許第5,569,588号公報)、チアゾリジノン及びメタチアザノン(米国特許第5,549,974号公報)、ピロリジン(米国特許第5,525,735号公報及び米国特許第5,519,134号公報)、モルフォリノ化合物(米国特許第5,506,337号公報)、ベンゾジアゼピン(米国特許第5,288,514号公報)等を含むが、これらに限られない。

20

30

40

## 【0150】

コンビナトリアルライブラリーを調製するためのデバイスが商業的に入手可能である。(例えば、357 MPS、390 MPS、Advanced Chem. Tech、ケンタッキー州ルイスビルと、シンフォニー、レイニン、マサチューセッツ州ウォバートンと、433A アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州フォスターシティー、9050と、ミリポア、マサチューセッツ州ベッドフォードとを参照せよ。)。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリーは、それ自体を商業的に入手可能である(例えば、コムジェネックス、ニュージャージー州プリンストン、アシネックスロシア国モスクワ、

50

トリポス社、ミズーリ州セントルイス、ケムスター社、ロシア国モスクワ、3Dファーマシューティカルズ、ペンシルバニア州エクストン、マーテック (Martek) バイオサイエンス、メリーランド州コロンビア等を参照せよ。 )。

【0151】

ハイスループットスクリーニングは、シグナル伝達経路のような複合体分子事象で薬物の効果と、細胞機能、アポトーシス、細胞分裂、細胞接着、遊走、エキソサイトーシス及び細胞間情報伝達を含むが、これらに限られない細胞機能とを測定するために用いられる場合がある。多色の蛍光は、多数の標的及び細胞工程を1回のスクリーニングでアッセイすることを可能にする。細胞応答の相互相関関数は、標的の確認と、リード化合物の最適化とのために必要とされる豊富な情報をもたらすであろう。

10

【0152】

別の局面では、本発明は、細胞が1個又は2個以上の蛍光リポーター分子を含む、複数の細胞を含む位置のアレイを提供するステップと、前記細胞の前記蛍光リポーター分子由来の蛍光シグナルを得るための細胞を含む、前記位置それぞれの複数の細胞を走査するステップと、前記蛍光シグナルをデジタルデータに変換するステップと、前記細胞内の前記蛍光リポーター分子の分布、環境又は活性を決定するために前記デジタルデータを利用するステップとを含む、細胞を解析するための方法を提供する。

【0153】

新しい創薬パラダイムの主成分は、細胞内のイオン、代謝物、高分子及び細胞内小器官の時空間分布、含有量及び活性を測定するために用いられる、連続的に増えている蛍光及び化学発光の試薬のファミリーである。これらの試薬のクラスは、生細胞及び固定細胞の分子の分布及び量を測定する標識試薬と、時空間のシグナル伝達事象を伝えるための環境指標と、生細胞内の標的分子活性を測定するための蛍光タンパク質バイオセンサーとを含む。1種類の細胞で多数の試薬を組み合わせるマルチパラメータアプローチは、創薬のための新しい強力な手段である。

20

【0154】

この方法は、特定の細胞成分のための蛍光又は化学発光の分子の高い親和性に依存する。特定成分のための親和性は、イオン性相互作用、(タンパク質を利用するクロモフォア、フルオロフォア及びルミフォア (lumiphores) とのキメラ融合を含む) 共有結合と、疎水性相互作用、電位と、場合によっては、細胞成分内への単純な封入とのような物理学的な力によって支配される。化学発光プローブは、低分子か、標識された高分子か、緑色蛍光キメラタンパク質を含むが、これらに限られない遺伝子工学的に改変されたタンパク質かの場合がある。

30

【0155】

当業者は、タンパク質、ホスホリン脂質、RNA及びDNAのハイブリダイゼーション用プローブのような蛍光標識された生体分子を含むが、これらに限られない、本発明で用いられる場合がある広範な蛍光リポーター分子を認識するであろう。同様に、結合又は会合のための特定の化学的性質で特異的に合成された蛍光試薬が蛍光リポーター分子として用いられた (Barakら、(1997)、J. Biol. Chem. 272: 27497 - 27500、Southwickら、(1990)、Cytometry 11: 418 - 430、Tsien (1989)、Methods in Cell Biology、29巻、Taylor及びWang (編)、127 - 156頁)。蛍光標識された抗体は、細胞又は組織と同じくらい複雑な分子混合物で単一の分子標的に結合するための特異性が高いために、特に有用なリポーター分子である。

40

【0156】

化学発光プローブが、生細胞内で合成される場合があるか、あるいは、拡散と、促進型又は活性型の輸送と、シグナル配列で仲介される輸送と、エンドサイトーシス又はピノサイトーシスの取込みとを含む、多数の非機械的機序を通じて前記細胞に輸送される場合がある。当業者に周知である機械的大量充填法が、蛍光プローブを生細胞に充填するために用いられる場合もある (Barberら、(1996)、Neuroscience L

50

etters 207:17-20、Brightら、(1996)、Cytometry 24:226-233、McNeil (1989)、Methods in Cell Biology、29巻、Taylor及びWang(編)、153-173頁)。これらの方法は、電気穿孔法と、割裂による充填、ピーズによる充填、衝撃による充填、注射器による充填、高張性及び低張性による充填のようなその他の機械的方法とを含む。代替的に、細胞は、以前に説明されたような興味のあるタンパク質に結合した、GFPのようなリポーター分子を発現するために遺伝子工学的に改変される場合がある(Chalfie及びPrasher、米国特許第5,491,084号公報、Cubitら、(1995)、Trends in Biochemical Science 20:448-455)。

10

**【0157】**

いったん細胞で使用されると、前記化学発光プローブは、それらの標的ドメインとの特異的で高親和性の相互作用か、シグナル配列で仲介される輸送のような分子ターゲティングのその他の機序かのために、前記標的ドメインで蓄積する。蛍光標識されたりポーター分子は、該リポーターの位置、量及び化学環境を決定するために有用である。例えば、前記リポーターが、脂溶性の膜環境か、より水溶性の環境かに存在するかどうか決定される場合がある(Giulianoら、(1995)、Ann. Rev. of Biophysics and Biomolecular Structure 24:405-434、Giuliano及びTaylor、(1995)、Methods in Neuroscience 27.1-16)。前記リポーターのpH環境が決定される場合がある(Brightら、(1989)、J. Cell Biology 104:1019-1033、Giulianoら、(1987)、Anal. Biochem. 167:362-371、Thomasら、(1979)、Biochemistry 18:2210-2218)。キレート基を有するリポーターが、Ca<sup>++</sup>のようなイオンに結合するか、結合しないかが決定される場合がある(Brightら、(1989)、Methods in Cell Biology、30巻、Taylor及びWang(編)、157-192頁、Shimouraら、(1988)、J. of Biochemistry (トウキョウ) 251:405-410、Tsien(1989)、Methods in Cell Biology、30巻、Taylor及びWang(編)、127-156頁)。

20

30

**【0158】**

さらに、生物の特定の細胞タイプは、特異的に標識される場合があり、別の細胞タイプでは標識されない場合がある、成分を含む場合がある。例えば、神経細胞は、分極化した膜成分をしばしば含む。つまり、それらの細胞は、それらの細胞膜に沿って高分子を非対照的に分配する。結合組織又は支持組織の細胞は、別の細胞タイプに特異的に分子が閉じ込められた顆粒をしばしば含む(例えば、ヘパリン、ヒスタミン、セロトニン等)。筋肉組織細胞のほとんどは、筋小胞体、機能が細胞質中のカルシウムイオン濃度を調節するために特殊化した細胞内小器官を含む。神経組織細胞の多くは、神経ホルモン又は神経伝達物質が閉じ込められた分泌性の顆粒及び小胞を含む。したがって、蛍光分子は、特定細胞内の特定成分だけでなく、混合された細胞タイプの集団内の特定細胞をも標識するために設計される場合がある。

40

**【0159】**

当業者は蛍光を測定するための広範な方法を認識するであろう。例えば、蛍光リポーター分子のいくつかは、励起又は放出のスペクトルの変化を示し、いくつかは、1個の蛍光リポーターが蛍光を消失する一方、第2の蛍光リポーターが蛍光を獲得する、共鳴エネルギー移動を示し、いくつかは、蛍光の消失(消光)又は発光を示す一方、いくつかは回転運動を伝える(Giulianoら、(1995)、Ann. Rev. of Biophysics and Biomol. Structure 24:405-434、Giulianoら、(1995)、Methods in Neuroscience 27:1-16)。

50

## 【0160】

手順全てが完全に自動化される場合がある。例えば、試料物質の試料採取は、試料容器から試料を取り出すステップと、取り出された試料の少なくとも一部を試験細胞培養（例えば、遺伝子発現が調製される細胞培養）に加えるステップとを含む、複数のステップで達成される場合がある。試料採取は、追加のステップ、特に好ましくは試料調製のステップを含む場合もある。1種類のアプローチでは、たった1種類の試料のみが、ある時にはオート・サンプラー・プローブ（auto-sampler probe）に吸い込まれ、たった1種類の試料のみが、ある時には前記プローブに存在する。別の実施態様では、多数の試料が溶媒によって分離されたオート・サンプラー・プローブに吸い込まれる場合がある。さらに別の実施態様では、多数のプローブが自動試料採取のために平行して用いられる場合がある。

10

## 【0161】

一般的な場合には、試料採取は、手動か、半自動のやり方か、自動のやり方かで達成される場合がある。試料は、例えば、ピペットか、注射器型の手動式プローブかを用いて、手動で試料容器から取り出され、その後、評価システムの充填口又は注射口に手動で送達される場合がある。半自動のプロトコルでは、該プロトコルのいくつかの局面が自動で達成される（例えば、送達）が、別の局面のいくつかは手動操作を必要とする（例えば、作業制御工程からの試料の取り出し）。しかし、前記試料は、例えば、オート・サンプラーを用いる完全に自動化されたやり方で、試料容器から取り出され、評価システムに送達されることが好ましい。

20

## 【0162】

1つの実施態様では、自動採取は、マイクロプロセッサで制御する自動化システムを用いて行われる場合がある。前記マイクロプロセッサは、試料の変化する配置（例えば、 $n$ 、 $m$ 、 $r$ 及び $s$ が整数である、横「 $n$ 行」縦「 $n$ 列」の正方形のレイ、横「 $n$ 行」縦「 $m$ 列」の長方形のレイ、丸形のレイ、一辺が「 $r$ 」の正三角形のレイ、底辺が「 $r$ 」であり、斜辺が「 $s$ 」である二等辺三角形等）の試料ライブラリーに適應するために使用者がプログラム可能であることが好ましい。

## 【0163】

試料物質の自動試料採取は、加熱された注入プローブ（チップ）を有するオート・サンプラーで任意に達成される場合がある。かかるオート・サンプラーの1つの例は、（引用により取り込まれた）米国特許第6,175,409 B1号公報で開示される。

30

## 【0164】

本発明によれば、1種類又は2種類以上のシステム、方法又は両方が、複数の試料物質を同定するために用いられる。手動又は半自動のシステム及び方法が可能であるが、自動化システム又は方法が用いられることが好ましい。さまざまなロボット又は自動のシステムは、予定されたプロトコルに従って、固体状、液体状又はガス状の物質の取扱い、接触、分注その他の操作のための予定された動作を、自動的か、あるいはプログラム可能に提供するステップを利用可能である。かかるシステムは、物質の機械的性質を決定する前記システムを補助するためのさまざまなハードウェア、ソフトウェア又は両方を含むように適合されるか、あるいは増大される場合がある。ロボットシステムを増大するためのハードウェア及びソフトウェアは、センサー、変換器、データ取得及び操作ハードウェア、データ取得及び操作ソフトウェア等を含むが、これらに限られない場合がある。模範的なロボットシステムは、CAVROサイエンティフィックインストルメント（例えば、モデル第RSP9652番）又はバイオドット（マイクロドットモデル3000）から商業的に入手可能である。

40

## 【0165】

前記自動化システムは、情報、例えば、基板に関して配置された物質ライブラリーに関連する、合成、組成、位置の情報その他の情報でプログラムされる場合がある、適切なプロトコル設計及び実行ソフトウェアを含むことが一般的である。前記プロトコル設計及び実行ソフトウェアは、ロボットその他の自動化装置又はシステムを制御するためのロボッ

50

ト制御ソフトウェアと通信することが典型的である。前記プロトコル設計及び実行ソフトウェアは、応答を測定するハードウェアからの収集データのためのデータ取得ハードウェア/ソフトウェアとも通信する。いったん前記データがデータベースに収集されると、解析ソフトウェアは、前記データを解析するために、より好ましくは候補薬物の性質を決定するために用いられる場合があり、すなわち、前記データは手動で解析される場合がある。

【0166】

別の好ましい実施態様では、細胞培養での候補薬物又は試料のアッセイは、1種類又は2種類以上の方法と組み合わせられる。1つの実施態様では、試料はサイズ排除クロマトグラフィーを用いて試料のタンパク質のサイズに応じて予め分画される場合がある。利用可能な試料量が少ない生物学的試料のために、サイズ選択スピンカラムが用いられることが好ましい。一般的に、カラムから溶出された第1分画(「分画1」)は、高分子量のタンパク質が最高の百分率であり、分画2は、高分子量のタンパク質がより低い百分率であり、分画3は、高分子量のタンパク質がいっそう低い百分率であり、分画4は、高分子量のタンパク質が最低量である、等。その後、分画それぞれは、化合物を検出するためのイムノアッセイ、気相イオンスペクトロメトリー等によって解析される場合がある。

10

【0167】

別の実施態様では、試料は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって予め分画される場合がある。陰イオン交換クロマトグラフィーは、それらの電荷の特徴に応じて大雑把に試料中のタンパク質を予め分画することができる。例えば、Q陰イオン交換樹脂が用いられる場合があり(例えば、QハイパーD F、バイオセパラ)、試料は、異なるpHの溶出剤で連続的に溶出される場合がある。陰イオン交換クロマトグラフィーは、別のタイプの化合物からより陰性に荷電される試料中の化合物を分離することができる。高いpHの溶出剤で溶出されるタンパク質は弱く陰性に荷電される可能性があり、低いpHの溶出剤で溶出される分画は強く陰性に荷電される可能性がある。したがって、試料の複雑性を低下することに加えて、陰イオン交換クロマトグラフィーは、それらの結合の特徴に応じてタンパク質を分離する。

20

【0168】

さらに別の実施態様では、試料は、ヘパリンクロマトグラフィーによって予め分画される場合がある。ヘパリンクロマトグラフィーは、ヘパリンと、電荷の特徴との親和性相互作用に基づいても試料中の化合物を予め分画することができる。硫酸化ムコ多糖のヘパリンは、陽性に荷電した原子団の化合物に結合するであろうし、試料は、異なるpH又は塩濃度の溶出剤で連続的に溶出される場合がある。低いpHの溶出剤で溶出された試料は、弱く陽性に荷電される可能性が高い。高いpHの溶出剤で溶出された試料は、強く陽性に荷電される可能性が高い。したがって、ヘパリンクロマトグラフィーは試料の複雑性も低下し、それらの結合の特徴に応じて試料を分離する。

30

【0169】

さらに別の実施態様では、試料は、特定の特徴を有する、例えば、グリコシル化される、タンパク質を単離することによって予め分画される場合がある。例えば、CSF試料は、(糖類に対する高い親和性を有する)レクチンクロマトグラフィーカラムに前記試料を通すことによって分画される場合がある。グリコシル化タンパク質は前記レクチンカラムに結合するであろうし、非グリコシル化タンパク質は貫流を通じて通過するであろう。その後、グリコシル化タンパク質は、糖、例えば、N-アセチル-グルコサミンを含む溶出剤で前記レクチンカラムから溶出され、さらなる解析に利用可能である。

40

【0170】

したがって、前記試料中のタンパク質の前記結合の特徴か、前記試料中のタンパク質の特徴かを利用する、試料の前記複雑性を低下するための多くの方法がある。

【0171】

キット

本発明は、患者由来の試料中の遺伝子1個又は2個以上において、1個又は2個以上の

50

ヌクレオチド又は核酸のパリアントの有無を決定する、遺伝子1個又は2個以上の遺伝子型決定のためのキットも提供する。前記キットは、該キットのさまざまな構成要素のための担体を含む場合がある。前記担体は、例えば、鞆、箱、チューブ、ラックの形状の容器又は支持体の場合があり、任意に区画化される。前記担体は、輸送及び保管中の安全の目的のための密封容器 (enclosed confinement) を画する場合がある。前記キットは、上記で議論された検出法を用いて、本発明に従って発見されたヌクレオチド又はアミノ酸のパリアントを検出するのに有用なさまざまな構成要素も含む。

【0172】

別の好ましい実施態様では、ステロイド応答に関するリスクを予測するためのキットは、NM\_\_020752 (GPR158、Gタンパク質共役受容体158)、NM\_\_001005494 (OR6C4、嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4)、NM\_\_001039791 (FLJ45825、FLJ45825 ナンセンス)、NM\_\_153487 (MDGA1、MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1)、NM\_\_017721 (CC2D1A、コイルドコイル (coiled-coil) 及びC2ドメイン含有1A)、NM\_\_005504 (BCAT1、分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1)、NM\_\_001105 (ACVR1、アクチビンA受容体、I型)、NM\_\_006548 (IGF2BP2、インスリン様成長因子2)、NM\_\_001007225 (IGF2BP2、mRNA結合タンパク質2)、NM\_\_025248 (SNIP、SNAP25-相互作用タンパク質)、NM\_\_025152 (NUBPL、NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様)、NM\_\_080664 (C14orf126、C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126)、NM\_\_139179 (DAGLBETA、ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ)、NM\_\_001960 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_032378 (EEF1D、真核生物翻訳伸長因子1デルタ (グアニンヌクレオチド交換タンパク質))、NM\_\_012175 (FBXO3、FBXO3 Fボックスタンパク質3)、NM\_\_033406 (FBXO3)、NM\_\_005574 (LMO2、LMO2 LIMドメインオンリー (only) 2 (ロンボチン様1))、NM\_\_178835 (LOC152485、仮想タンパク質LOC152485)、NM\_\_005512 (LRRC32、富ロイシンリピート含有32)、NM\_\_003010 (MAP2K4、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4)、NM\_\_015550 (OSBPL3、オキシステロール結合タンパク質様3)、NM\_\_145320 (OSBPL3)、NM\_\_000918 (P4HB、プロコラーゲン-プロリン、2-オキソグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ (プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド)、NM\_\_004845 (PCYT1B、リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ)、NM\_\_023078 (PYCRL、PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様)、NM\_\_032862 (TIGD5、TIGD5ティガー (tiger) トランスポーザブルエレメント由来5)、NM\_\_031955 (SPATA16、精子形成関連16)、NM\_\_005578 (LPP、脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー)、NM\_\_004946 (DOCK2、細胞質分裂のデジケター (dedicator) 2)、NM\_\_199051 (FAM5C、配列類似性を有するファミリー5、メンバーC)、NM\_\_001163 (APBA1、アミロイドベータ (A4) 前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1)、NM\_\_152565 (ATP6V0D2、ATPアーゼ、H<sup>+</sup>輸送、リソソーム 38 kDa、V<sub>0</sub>サブユニットd<sub>2</sub>)、NM\_\_020116 (FSTL5、フォリスタチン様5)、NM\_\_001013717 (LOC441108、AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子)、NM\_\_003060 (SLC22A5)、NM\_\_003060 (SLC22A5、電解質運搬体ファミリー22 (有機カチオン輸送体)、メンバー5)、NM\_\_014813 (LRIG2、富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2)、NM\_\_013962 (NRG1、ニューレグリン1)、NM\_\_002922 (RGS1、Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1)、NM\_\_13

0782 (RGS18)、NM\_\_001009992 (ZNF648、Gタンパク質シグナリングの制御因子18)、NM\_\_002697 (POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1)、グルココルチコイド受容体多型及び/又はBclI、N766N及び/又はイントロン4の一塩基多型、それらのパリアント、変異体、アレル及び断片か、相補配列のうちの核酸、そのパリアント、変異体及び断片の1個又は2個以上を含む。

#### 【0173】

本発明の前記キットは、本発明のバイオマーカー1個又は2個以上を検出するための上記で説明されたプローブ及び試薬を含む場合があり、任意に、遺伝子1個又は2個以上を解析するためか、本発明のバイオマーカー1個又は2個以上を再解析するためかの試薬及びプローブを含む。

10

#### 【0174】

1つの実施態様では、検出キットは、遺伝子1個又は2個以上においてヌクレオチドのパリアント1個又は2個以上を検出するのに有用なオリゴヌクレオチド1個又は2個以上を含む。前記オリゴヌクレオチドはアレル特異的であり、例えば、それらがストリンジェントな条件下で、本発明に従って発見された特定のヌクレオチドのパリアントを含む変異体遺伝子のみハイブリダイゼーションするように設計されることが好ましい。したがって、オリゴヌクレオチドが、アレル特異的オリゴヌクレオチド(ASO)と、アレル特異的PCRと、TAQMANと、化学発光を利用する手法と、分子ビーコンと、それらの改良法又は派生法とのような突然変異体の検出法、例えば、マイクロチップ技術で用いられる場合がある。この実施態様では、前記オリゴヌクレオチドは、検出されるべきヌクレオチドのパリアントを含む、パリアント遺伝子のアレルのヌクレオチド配列と対合するヌクレオチド配列を有することが好ましい。本発明の実施態様に依る前記オリゴヌクレオチドの長さは、そのヌクレオチド配列と、検出手順で用いられたハイブリダイゼーション条件とに依存して変わる場合がある。前記オリゴヌクレオチドは、例えば、遺伝子核酸の18、19、20、21、22、23、24又は25個ないし21、22、23、24、26、27、28、29又は30個のヌクレオチド残基の連続的な長さのヌクレオチド約10個からヌクレオチド約100個までが好ましく、ヌクレオチド約15個からヌクレオチド約75個までがより好ましい。いずれの事象では、前記オリゴヌクレオチドは、予定されたストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、特定の遺伝子座の1個のヌクレオチドのパリアントをもう1個のヌクレオチドのパリアントから鑑別するのに用いられる場合があるように設計されるべきである。ヌクレオチドのパリアントは前記遺伝子のいずれかに局在される場合があり、すなわち、前記オリゴヌクレオチドの中心か、該オリゴヌクレオチドの3'又は5'の末端の1個のヌクレオチドに局在される場合がある。オリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションと、長さ及びハイブリダイゼーション条件の最適化とが、当業者に明らかにされるべきである。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、1989を一般的に参照せよ。特に、この実施態様に依るオリゴヌクレオチドは、電気泳動移動度シフトアッセイ、RNAプロテクションアッセイ、mutSアッセイ等のような上記で説明された不対合を利用する検出法でも有用である。

20

30

40

#### 【0175】

本発明の別の実施態様では、前記キットは、ARMS、オリゴヌクレオチド結合アッセイ(OLA)等のような検出法で使用するのに適切なオリゴヌクレオチド1個又は2個を含む。この実施態様の前記オリゴヌクレオチドは、例えば、解析されるべき前記ヌクレオチドのパリアントの直近の5'上流の18、19、20、21、22、23、24又は25個ないし21、22、23、24、26、27、28、29又は30個のヌクレオチド残基の連続的な長さの約10個ないし約100個のヌクレオチドの遺伝子配列を含み、約15個から約75個までのヌクレオチドが好ましい。かかるオリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドは、本発明に依るヌクレオチドのパリアントである。

#### 【0176】

50

前記検出キットの前記オリゴヌクレオチドは、放射性同位体、フルオロフォア、ビオチン、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ）、酵素基質、リガンド及び抗体等を含むが、これらに限られない、適切な検出マーカーのいずれかで標識される場合がある。Jablonskiら、Nucleic Acids Res.、14:6115-6128(1986)、Nguyenら、Biotechniques、13:116-123(1992)、Rigbyら、J. Mol. Biol.、113:237-251(1977)を参照せよ。代替的に、使用者が使用時に前記オリゴヌクレオチドを標識する場合があるため、前記キットに含まれる前記オリゴヌクレオチドは標識されておらず、その代わり、マーカー1個又は2個以上が前記キットで提供される。

#### 【0177】

本発明の別の実施態様では、前記検出キットは、本発明で発見された特定のアミノ酸のバリエーションを含む、（前記遺伝子によってエンコードされた）特定のタンパク質又はポリペプチドと選択的に免疫反応する抗体1種類又は2種類以上を含む。

#### 【0178】

検出法で有用な別のさまざまな構成要素が、本発明の前記検出キットに含まれる場合もある。かかる構成要素の例は、Taqポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、標的DNA配列を増幅するための適切な別のプライマー、RNAアーゼA、mutSタンパク質等を含むが、これらに限られない。さらに、前記キットは、遺伝子配列その他の核酸分子、例えば、RNAにおいて、ヌクレオチドのバリエーションを検出するための前記キットの取扱説明書を含むことが好ましい。

#### 【0179】

##### 治療剤

いくつかの局面では、本発明の方法、バイオマーカー及び組成物は、特定のバイオマーカーのプロファイルを有する患者について治療上の処置を選択するために有用である。これらの実施態様によれば、一連のバイオマーカーが、バイオマーカーの特徴と、特定の治療又は治療クラスに対する応答又は非応答との連鎖を利用して、ステロイドの非応答者か、ステロイドが眼圧の上昇のような有害、すなわち、所望しない効果をもたらすであろう患者かのための処置を選択するために用いられる。本発明の1つの局面では、前記方法及びバイオマーカーは、特定の治療に対する応答者及び非応答者として患者を分類するために用いられる。

#### 【0180】

本明細書で説明された化合物は医薬品組成物に取り込まれる場合がある。かかる組成物は、活性成分及び薬学的に許容可能な担体を含むことが典型的である。本明細書で用いられるところの「薬学的に許容可能な担体」という用語は、薬学的投与に適合性の生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張性吸収遅延剤等を含む。追加の活性化合物が前記組成物に取り込まれる場合もある。

#### 【0181】

医薬品組成物は、その意図した投与経路に適合するように形成される。投与経路の例は、非経口投与、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局部）、口腔粘膜及び直腸の投与を含む。非経口、皮内又は皮下の用途のために用いられた溶液又は懸濁液は、注射用の水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールその他の合成溶媒のような滅菌希釈液と、ベンジルアルコール又はメチルパラベンのような抗菌剤と、アスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤と、エチレンジアミン四酢酸のようなキレート剤と、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩のような緩衝剤と、塩化ナトリウム又はブドウ糖のような浸透圧調節剤との成分を含む場合がある。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムのような酸又は塩基で調節される場合がある。非経口調製剤は、ガラス又はプラスチックで作成された、アンプルか、使い捨ての注射器か、複数回投与用バイアルかに封入される場合がある。

#### 【0182】

注射用の使用のための適切な医薬品組成物は、（水に可溶性の）滅菌水溶液、すなわち

10

20

30

40

50

、分散剤と、滅菌注射用溶液又は分散剤を即時調製するための滅菌粉末とを含む。静脈内投与のために、適切な担体は、生理食塩水、静菌性の水、CREMOPHOR（商標）（BASF、ニュージャージー州パーシッパニー）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合で、前記組成物は滅菌されなければならない、容易に注射できる程度に液性であるべきである。組成物は、製造及び保管の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌のような微生物の汚染作用から予防されなければならない。前記担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液性ポリエチレングリコール等）及びそれらの適切な混合物を含む、溶媒又は分散媒の場合がある。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングを使用すること、分散の場合に必要なとされる粒子サイズを維持すること、及び、界面活性剤を使用することによって維持される場合がある。微生物の前記作用を予防することが、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等さまざまな抗菌剤及び抗真菌剤によって達成される場合がある。多くの場合には、例えば、糖か、マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコールか、塩化ナトリウムかの等張剤を前記組成物中に含むことが好ましいであろう。前記注射用組成物の遅延性吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、ステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを前記組成物に含むことによってもたらされる場合がある。

10

**【0183】**

滅菌注射用溶液は、上記に列挙された成分の1種類又は組み合わせとともに、必要な場合には、濾過滅菌後に、適切な溶媒に必要な量の前記活性化化合物を取り込むことによって調製される場合がある。分散剤は、塩基性分散媒と、上記に列挙されたものに由来する必要とされる別の成分とを含む、滅菌賦形剤に前記活性化化合物を取り込むことによって調製されることが一般的である。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、前もって滅菌濾過されたその溶液から活性成分に加えて追加の所望の成分のいずれかの粉末を産出する、真空乾燥及び凍結乾燥である。

20

**【0184】**

経口組成物は、不活性賦形剤又は食用担体を含むことが一般的である。経口投与治療の目的のために、前記活性化化合物が賦形剤とともに取り込まれる場合があり、錠剤、トローチ又はカプセル、例えば、ゼラチンカプセルの形状で用いられる場合がある。経口組成物は、口腔洗浄剤に使用するための液性担体を用いて調製される場合もある。薬学的に許容可能な結合剤及び/又はアジュバント物質は、前記組成物の一部として含まれる場合がある。錠剤、ピル、カプセル、トローチ等は、結晶セルロース、トラガントゴム又はゼラチンのような結合剤か、澱粉又は乳糖のような賦形剤か、アルギン酸、プリモゲル（Primogel）又はトウモロコシ澱粉のような崩壊剤か、ステアリン酸マグネシウム又はステロート（Sterotes）のような潤滑剤か、コロイド状二酸化ケイ素のような流動促進剤（glidant）か、ショ糖又はサッカリンのような甘味剤か、ペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジ風味のような風味剤かの類似の性質の成分又は化合物のいずれかを含む場合がある。

30

**【0185】**

吸入投与のために、前記化合物は、適切な噴霧剤、例えば、二酸化炭素のような気体か、ネブライザー（nebulizer）かを含む、加圧された容器又は分注器からのエアロゾールスプレーの形状で送達される場合がある。かかる方法は米国特許第6,468,798号公報で説明されたものを含む。吸入用組成物は、例えば、分散、供給及び生物学的利用能を向上するために、噴霧剤、界面活性剤その他の添加物を含む場合もある。

40

**【0186】**

全身性投与は、口腔粘膜又は皮膚を介する手段によって行われる場合もある。経口腔粘膜投与又は経皮投与のために、透過されるべき障壁に適切な浸透性が処方用いられる。かかる浸透性は当業者に一般的に知られ、例えば、経口腔粘膜投与のための界面活性剤、胆汁酸塩及びフシジン酸誘導体を含む。経口腔粘膜投与は、経鼻スプレー又は坐薬を使用することを通じて達成される場合がある。経皮投与のために、前記活性化化合物は、当業者

50

に一般的に知られるような軟膏 ( o i n t m e n t s )、軟膏 ( s a l v e s )、ゲル又はクリームに処方される。

【 0 1 8 7 】

本発明の組成物及び方法の実施態様は以下の実施例で図示される。これらの実施例は例示目的のために提供され、本発明の組成物及び方法の技術的範囲を限定的に解釈するものではない。

【 0 1 8 8 】

以下の実施例は例示のために提供され、限定するためではない。特定の実施例が提供された際に、上記の説明は例示であり、限定するものではない。以前に説明された実施態様のいずれか 1 種類又は 2 種類以上の特徴が、本発明の別の実施態様のいずれか 1 種類又は 2 種類以上の特徴を有する方法と組み合わせられる場合がある。さらに、本発明の改変の多くが明細書の概説で当業者に明らかとなるであろう。

10

【 0 1 8 9 】

本出願で引用された刊行物及び特許文献の全てが、個別の刊行物又は特許文献それぞれが個別に表示されたのと同じ程度に、全ての目的のために対応する箇所に引用により取り込まれる。出願人は、本明細書においてさまざまな文献を引用することによって、いずれかの特定の文献が「従来技術」であると認めるものではない。

【 0 1 9 0 】

以下の非限定的な実施例は本発明の選択された実施態様を例示するために役立つ。比率の変化と、示された構成要素の要素の変化とが当業者に明らかとなるであろうし、本発明の実施態様の技術的範囲内であると理解されるであろう。

20

【 実施例 1 】

【 0 1 9 1 】

材料及び方法

本研究は、ヘルシンキ宣言と、マイアミ大学の治験審査委員会と、医療保険の相互運用性と説明責任とに関する法律 ( t h e H e a l t h I n s u r a n c e P o r t a b i l i t y a n d A c c o u n t a b i l i t y A c t ) とを遵守した。インフォームド・コンセントが、本研究の性質及び考えられる重要性を説明した後、被験者から得られた。

【 0 1 9 2 】

募集された患者は、さまざまな網膜疾患のための I V T A を用いる処置が提供されたか、あるいは過去に I V T A を受けた。各患者は、治療医の自由裁量でさまざまな徴候のために、0.1 cc あたり 4 mg の I V T A で処置された。組み入れ基準は 18 歳よりも高い年齢で、適切なインフォームド・コンセントを施すことができる年齢を含む。除外基準は、研究対象の眼で以前に経扁平部水晶体切除術が行われたか、研究対象の眼で前方セグメントの血管新生を起こしたか、研究対象の眼で低い I O P を意図した薬物療法のいずれかが使用されたか、研究対象の眼で緑内障か、緑内障と疑われたか、高眼圧症かの病歴があるかを含む。

30

【 0 1 9 3 】

I O P 測定の前全てが、典型的には、圧平眼圧計又はトノ - ペン ( T o n o - p e n ) ( レイチャート、ニューヨーク州デピュー ) のいずれかによる治療医の標準的診療によるものである。標準化された I O P 測定プロトコルは全く理解されていない。眼圧 ( I O P ) は、I V T A を用いる処置前に研究対象の眼で記録された ( 基線 I O P )。経過観察が治療医の自由裁量で行われる。各再診で、I O P は、1 年間、又は、前記研究対象の眼が、後の眼内手術のいずれか、後の硝子体内注射のいずれか、あるいは低い I O P を意図した薬物療法のいずれかで処置されるまで、記録された ( 経過観察 I O P )。したがって、本研究に関係する期間中に、各眼は硝子体内注射 1 回のみを受けた。

40

【 0 1 9 4 】

処置判断の前全てが治療医の自由裁量であった。経過観察 I O P の最大値が記録された ( 最大 I O P )。最初の予後の測定値は、最大 I O P と、基線 I O P との間で算出された違

50

い ( I O P ) であり、陽性値は I O P の上昇を示す。

【 0 1 9 5 】

末梢静脈血が D N A 解析のために得られた。ゲノム D N A が、ジェントラ・ピュアジーン細胞キット ( キアゲン社、カリフォルニア集パレンシア ) を用いて末梢血の白血球から抽出された。グルココルチコイド受容体の多型のアレル状態が、標準的なポリメラーゼ連鎖反応と、直接配列決定とによって決定された。制限断片長多型解析が B c l I の多型を用いて行われた。D N A 試料のいくつかは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法、飛行時間型質量分析法 ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) によって識別された一塩基伸長反応によって遺伝子型が決定された。

【 0 1 9 6 】

シークエノム遺伝子決定プラットフォームによって行われた前記一塩基伸長反応は 2 段階処理である。最初に、S N P を含む領域が増幅される。その後、多型部位で終了しているプライマーが前記一塩基伸長反応のために用いられる。その後、産物は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法、飛行時間型質量分析法 ( M A L D I - T O F M S ) によって選別される。

【 0 1 9 7 】

簡潔には、P C R 用プライマー及び一塩基伸長反応は、M a s s A R R A Y アッセイ設計 3 . 0 ソフトウェアパッケージ ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) を用いることによって設計された。2 . 5 - 1 0 n g / μ L のゲノム D N A 1 ミリリットルは、水 1 . 8 5 μ L 、 2 5 m M d N T P s ( インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド ) 0 . 1 μ L 、 5 ユニット / μ L H O T S T A R T a q ( キアゲン社、カリフォルニア州パレンシア ) 0 . 1 μ L 、 1 5 m M M g C l <sub>2</sub> を含む 1 0 X H o t S t a r P C R 緩衝液 0 . 6 2 5 μ L 、多重反応のために 5 0 0 n M の濃度とともに混合された P C R プライマー 1 μ L 及び 2 5 m M M g C l <sub>2</sub> 0 . 3 2 5 μ L と組み合わせられた。反応は、9 5 ° C で 1 5 分間を 1 サイクル、その後、9 5 ° C で 2 0 秒間、5 6 ° C で 3 0 秒間及び 7 2 ° C で 1 分間を 4 5 サイクル、最後のインキュベーションで 7 2 ° C で 3 分間加熱された。P C R 増幅後、残っている d N T P s は、水 1 . 5 μ L 、 1 0 X S A P 緩衝液 ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) 0 . 1 7 μ L 及びシュリンブアルカリホスファターゼ 0 . 3 ユニット ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) を添加することによって脱リン酸化された。反応は 3 7 ° C で 2 0 分間静置され、酵素は 8 5 ° C で 5 分間インキュベーションすることによって不活性化された。シュリンブアルカリホスファターゼ処理後、遺伝子型決定反応は、水 0 . 7 6 μ L 、 i P L E X 反応停止混合物 ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) 0 . 2 μ L 、 i P L E X 酵素 ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) 0 . 0 4 μ L 、 1 0 X i P L E X 緩衝液 0 . 2 μ L 及び 7 - 1 4 μ M の多重伸長プライマー 0 . 8 1 μ L と組み合わせられた。M a s s E X T E N D 反応は、9 4 ° C で 2 分間、その後、9 4 ° C で 5 秒間、5 2 ° C で 5 秒間及び 7 2 ° C で 5 秒間を 9 9 サイクル行われた。反応混合物は、陽イオン樹脂 3 m g 、 S p e c t r o C L E A N ( シークエノム社、カリフォルニア州サンディエゴ ) を添加することによって脱塩され、水 3 0 μ L に再懸濁された。完成した遺伝子決定反応物は、シリコンチップ ( シークエノム、S p e c t r o C H I P ) 上の 3 8 4 個の構成部分に整列されたマトリックス上にナノリットルでスポットされ、伸長産物のアレル特異的な質量が M A L D I - T O F M S によって決定された。データ解析は S P E C T R O T Y P E R ソフトウェアを用いて達成された。

【 0 1 9 8 】

ハプロタイプ解析は S A S / G e n e t i c s 9 . 1 ( S A S 、 ノースカロライナ州ケリー ) を用いて行われた。

【 0 1 9 9 】

結果

患者 5 2 人 ( 眼 5 6 個 ) は、この研究のための開始基準全てを満たした。I V T A 処置

10

20

30

40

50

時に、平均年齢が70歳であった(標準偏差13歳)。患者23人(44%)が女性であった。前記患者は、(光線力学療法と頻りに組み合わせられる)脈絡膜血管新生、糖尿病が原因の黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症その他の原因を含む、さまざまな網膜疾患について治療された。ブドウ膜炎の患者は、この研究から特に除外されないが、この一連の研究の患者は、IVTAを用いる治療時に活性型ブドウ膜炎ではまったくなかった。

#### 【0200】

眼30個(54%)がフェイク(phakic)術を施された。眼47個(84%)は以前にIVTAの経歴がなく、眼9個(16%)は以前にIVTAで処置され、以前のIVTA処置と、この研究の開始との間隔は平均1年間隔(標準偏差0.8年)であった。平均基線IOPは15mmHg(標準偏差3mmHg)であった。平均最大経過観察IOPは22mmHg(標準偏差7mmHg)であった。平均IOPは7mmHg(標準偏差6mmHg)であった。IOPは、眼20個(36%)では5mmHg未満であり、眼27個(48%)では5-10mmHg未満であり、眼9個(16%)では10mmHgよりも高かった。

10

#### 【0201】

IOPに関して、ER22/23EK、N363S及びイントロン3の多型は情報値がなく、統計解析から除外された。N766N、Bc1I及びイントロン4の多型はハーディ-ワインベルグの平衡検定に合格し、良好な遺伝子決定の質と、アレル頻度の正常な母分布とを示す(表1)。

20

#### 【0202】

N766N及びイントロン4の多型と、N766N及びBc1Iの多型とは、それらの物理的な距離の近さを利用して予測される場合に、お互いに強い連鎖不均衡であることが発見された(表2)。

#### 【0203】

##### 議論

特に、緑内障の薬物療法に関して、薬理ゲノミクスの研究に興味が集まってきている。例えば、正常な志願者48人の研究では、1アドレナリン作動性受容体の平均389個のホモ接合体の遺伝子型は、高い基線IOPと、ベタキソロールを用いる処置への高い応答値とに相関する。正常な志願者100人の研究では、プロスタグランジンF<sub>2</sub>受容体のrs3753380及びrs3766355の多型はラタノプロストを用いる処置への応答値に相関する。本明細書で説明された結果は、IVTA後のステロイド応答との薬理ゲノミクスの相関を最初に探し出した。

30

#### 【0204】

最初の予後の測定値は、最大IOPから基線IOPを減算して定義されたIOPであった。前記最大IOPは、IVTA後の1年間か、眼が、後の硝子体内注射のいずれか、後の眼内手術のいずれか、あるいは低いIOPを意図した薬物療法のいずれかで処置されるまでかに記録された最も高いIOPとして定義された。最初の予後の測定値としてIOPの長所は、ステロイド応答の事象を1変数に変えることである。

#### 【0205】

18歳未満の患者、又は、IOPを低くするための薬物療法のいずれかを用いるか、あるいは緑内障か、緑内障と疑われたか、高眼圧症かの病歴があるの患者が、この研究から除外された。ブドウ膜炎の患者は、特に除外されないが、この一連の研究の患者は、活性型ブドウ膜炎ではまったくなかった。グルココルチコイド受容体の多型は、予備研究のための合理的な候補であることと考えられる。デキサメタゾン抑制試験を用いて、ER22/23EKはグルココルチコイドの感受性の低下と連鎖した一方、N363S及びBc1Iはグルココルチコイドの感受性の増加と連鎖した。この研究では、統計的に有意な連鎖は、グルココルチコイド受容体遺伝子の多型6個と、IVTA後のIOPとの間に発見されなかった。ステロイド応答の詳細なメカニズムは理解しにくいままである。研究のための多くの別の可能性のある候補遺伝子、例えば、熱ショックタンパク質を含むグルココルチコイド経路の別の遺伝子が存在する。例えば、表3も参照せよ。さらに、これらの試

40

50

料でのゲノムワイドスクリーニングは、研究のための別の候補遺伝子を同定するために行われるであろう。

【 0 2 0 6 】

【表 1】

遺伝子座	アレル数	P I C	ヘテロ接合度	少数アレル頻度	カイ二乗値	自由度	カイ二乗値を超える確率
N766N	2	0.2241	0.2727	0.2571	0.2433	1	0.6218
BclI	2	0.3428	0.5303	0.4393	2.8338	1	0.0923
イントロン4	2	0.3484	0.4394	0.4494	0.0326	1	0.8567

【 0 2 0 7 】

【表 2】

遺伝子座 1	遺伝子座 2	ヘテロ型	頻度	係数	D'
イントロン4	N766N	G-C	0.1417	0.0901	0.9021
イントロン4	N766N	G-T	0.1992	-0.0901	-0.9021
イントロン4	N766N	T-C	0.0098	-0.0901	-0.9021
イントロン4	N766N	T-T	0.6493	0.0901	0.9021
イントロン4	BclI	G-C	0.2217	-0.0082	-0.0380
イントロン4	BclI	G-G	0.1192	0.0082	0.0380
イントロン4	BclI	T-C	0.4525	0.0082	0.0380
イントロン4	BclI	T-G	0.2065	-0.0082	-0.0380
N766N	BclI	C-C	0.0099	-0.0923	-0.9034
N766N	BclI	C-G	0.1416	0.0923	0.9034
N766N	BclI	T-C	0.6644	0.0923	0.9034
N766N	BclI	T-G	0.1841	-0.0923	-0.9034

10

20

【 0 2 0 8 】

【表3】

SNPsと、該SNPsの線内障との連鎖とを示す代表的なリスト

染色体	転写産物	遺伝子	Reps <sup>1</sup>	p値指数	遺伝子	SNP局在
10	NM_020752	GPR158		10 <sup>-8</sup>	Gタンパク質共役受容体158(グルタミン酸塩類のメンバー)	イントロン
12	NM_001005494	OR6C4		10 <sup>-4</sup>	嗅覚受容体、ファミリー6、サブファミリーC、メンバー4	?
6	NM_001039791 NM_153487	FLJ45825 MDGA1	2	10 <sup>-4</sup>	FLJ45825 ナンセンス MDGA1 MAMドメイン含有グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー1	??
19	NM_017721	CC2D1A		10 <sup>-4</sup>	コイルドコイル(coiled-coil)及びC2ドメイン含有1A	イントロン
12	NM_005504	BCAT1		10 <sup>-4</sup>	分枝鎖アミノトランスフェラーゼ1、細胞質基質	?
2	NM_001105	ACVR1	2	10 <sup>-4</sup>	アクチビンA受容体、I型	??
3	NM_006548 NM_001007225	IGF2BP2 IGF2BP2		10 <sup>-4</sup>	インスリン様成長因子2 mRNA結合タンパク質2	イントロン
17	NM_025248	SNIP		10 <sup>-3</sup>	SNAP25-相互作用タンパク質	イントロン
	NM_025152 NM_080664	NUBPL C14orf126		10 <sup>-3</sup>	NUBPLヌクレオチド結合タンパク質様 C14orf126染色体14オープン・リーディング・フレーム126	イントロン
14	NM_139179	DAGLBETA		10 <sup>-2</sup>	ジアシルグリセロールリパーゼ、ベータ	イントロン
7	NM_001960 NM_032378	EEF1D EEF1D	2	10 <sup>-2</sup>	真核生物翻訳伸長因子1デルタ(グアニンヌクレオチド交換タンパク質)	イントロン
8	NM_012175 NM_033406 NM_005574	FBXO3 FBXO3 LMO2	2	10 <sup>-2</sup>	FBXO3 Fボックスタンパク質3  LMO2 LIMドメインオンリー(only)2(ロンボチン様1)	?
11	NM_178835	LOC152485		10 <sup>-2</sup>	仮想タンパク質LOC152485	
	NM_005512	LRRRC32		10 <sup>-2</sup>	富ロイシンリピート含有32	
	NM_003010	MAP2K4		10 <sup>-2</sup>	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ4	
	NM_015550 NM_145320 NM_145321	OSBPL3 OSBPL3 OSBPL3		10 <sup>-2</sup>	オキシステロール結合タンパク質様3	
	NM_000918	P4HB		10 <sup>-2</sup>	プロコラーゲン-プロリン、2-オキシグルタル酸 4-ジオキシゲナーゼ(プロリン 4-ヒドロキシラーゼ)、ベータポリペプチド	
	NM_004845	PCYT1B		10 <sup>-2</sup>	リン酸シチジルトランスフェラーゼ1、コリン、ベータ	
	NM_023078 NM_032862	PYCRL TIGD5		10 <sup>-2</sup>	PYCRL ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ様(PYCRL) TIGD5ティガー(tigger)トランスポーザブルエレメント由来5	
	NM_031955	SPATA16	2	10 <sup>-2</sup>	精子形成関連16	
	NM_005578	LPP		10 <sup>-2</sup>	脂肪腫におけるLIMドメイン含有優先転座パートナー	
	NM_004946	DOCK2		10 <sup>-2</sup>	細胞質分裂のデジケーター(dedicator)2	
	NM_199051	FAM5C	2	10 <sup>-2</sup>	配列類似性を有するファミリー5	
	NM_001163	APBA1		10 <sup>-2</sup>	アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質結合、ファミリーA、メンバー1	
	NM_152565	ATP6VOD2		10 <sup>-2</sup>	ATPアーゼ、H <sup>+</sup> 輸送、リソソーム38kDa、V0サブユニットd2	
	NM_020116	FSTL5		10 <sup>-2</sup>	フォリスタチン様5(FSTL5)	
5	NM_001013717 NM_003060	LOC441108 SLC22A5		10 <sup>-2</sup>	AK128882によって支持されたLOC441108仮想遺伝子	?
5	NM_003060	SLC22A5	5	10 <sup>-2</sup>	電解質運搬体ファミリー22(有機カチオン輸送体)、メンバー5	イントロン 3' UTR イントロン イントロン
	NM_014813	LRIG2		10 <sup>-2</sup>	富ロイシンリピート及び免疫グロブリン様ドメイン2	
	NM_013962	NRG1		10 <sup>-2</sup>	ニューレグリン1	
	NM_002922 NM_130782	RGS18 RGS18		10 <sup>-2</sup>	Gタンパク質シグナリングのRGS1制御因子1 RGS18	
	NM_001009992	ZNF648		10 <sup>-2</sup>	Gタンパク質シグナリングの制御因子18	
	NM_002697	POU2F1		10 <sup>-2</sup>	POU2F1、POUドメイン、クラス2、転写因子1	

10

20

30

40

Rep s<sup>1</sup>は同一遺伝子の異なるSNPsの反復数である。

【0210】

遺伝子536件のスクリーニング、コルチコステロイド487件、臨床(ヒト)又は疫学研究462件：予後/合併症

【実施例2】

【0211】

個別の患者についてステロイド応答を予測するための薬理ゲノミクスの連鎖目的

硝子体内トリアムシノロンアセトニドの注射(IVTA)後に眼圧が上昇(IOP)する現象は、病因がほとんど理解されていない重要な臨床的問題である。

10

【0212】

方法

小さなDNAバンクが、さまざまな網膜疾患のためにIVTAで処置された患者53人からの末梢血試料を用いて作成された。IOPは、1年間か、眼が、後の眼内手術のいずれか、後の硝子体内注射のいずれか、あるいは低いIOPを意図した薬物療法のいずれかで処置されるまでかの再診それぞれで、基線で測定された。IOPは最も高い注射後のIOPから基線IOPを減算して定義され、陽性値はIVTA後のIOPの上昇を示す。前記末梢血試料は、ジーンチップ(登録商標)ヒトマッピング500Kアレイセット(アフメトリクス、カリフォルニア州サンタクララ)を用いるゲノムワイドスクリーニングに供された。

20

【0213】

結果

440,000個を超える遺伝子がスクリーニングされた。遺伝子33個内に異なる一塩基多型(SNPs)48個が、IVTA後のIOP値と相関することが発見された( $p < 0.001$ )。最も強い連鎖は、今までのところはほとんど説明されていないGタンパク質共役受容体のSNPと関係する( $p = 3.05 \times 10^{-8}$ )。単一の輸送体遺伝子中に個別のSNPs4個が同定された( $p$ が $5.59 \times 10^{-4}$ ないし $2.81 \times 10^{-5}$ )。複数のSNPsを有する別の遺伝子は、翻訳伸長因子と、Fボックスタンパク質と、オキシステロール結合タンパク質と、電解質運搬体ファミリー遺伝子とを含んだ。SNPs18個の1つのグループは試料53種類を2種類のグループに分別し(FDR-補正  $p = 0.000709$ )、1種類のグループは最も高いIOP2個を有する試料を含み、1種類のグループはその他の試料51個を含む。

30

【0214】

結論

多数の新規SNPsが同定され、統計的に有意な高い程度でIVTA後のIOP応答値と相関すると考えられる。さらなる研究がこれらの連鎖を検証し、関連する遺伝子を同定するために必要である。しかし、これらのデータは個別の患者についてのIVTA後のIOPの上昇を予測することができる将来性を示す。

【0215】

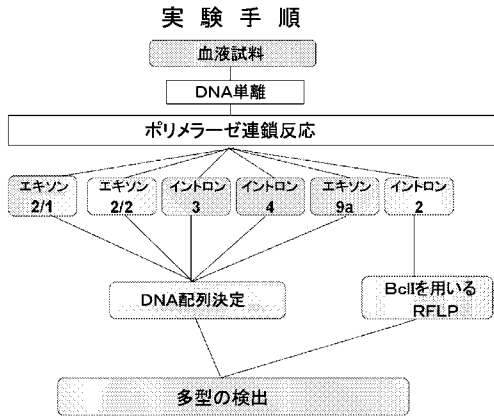
本発明は、1つ又は2つ以上の実施態様に関して図示され、説明されたが、同等の変化及び改変は、この明細書及び添付図面を読み、理解することで当業者が想到するであろう。さらに、本発明の特定の特徴が多数の実施態様のうち1つのみに関して開示される場合がある際に、かかる特徴は、特定又は特別な用途のいずれかのために所望され、長所となる場合に、別の実施態様の1つ又は2つ以上の別の特徴と組み合わせられる場合がある。

40

【0216】

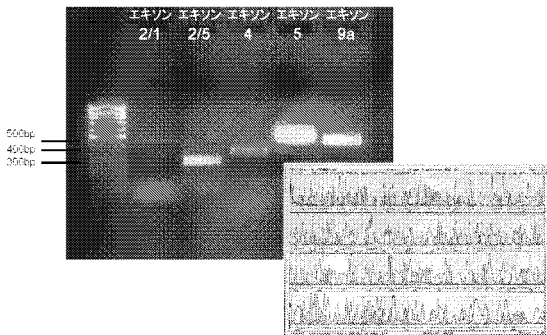
要約書の意図は、読者に技術的開示内容の性質を素早く確かめることができるようにすることである。要約書は、以下の請求項の範囲又は意味を解釈するか、あるいは限定するために用いられないであろうとの理解のもとに提示される。

【 図 1 】



【 図 2 】

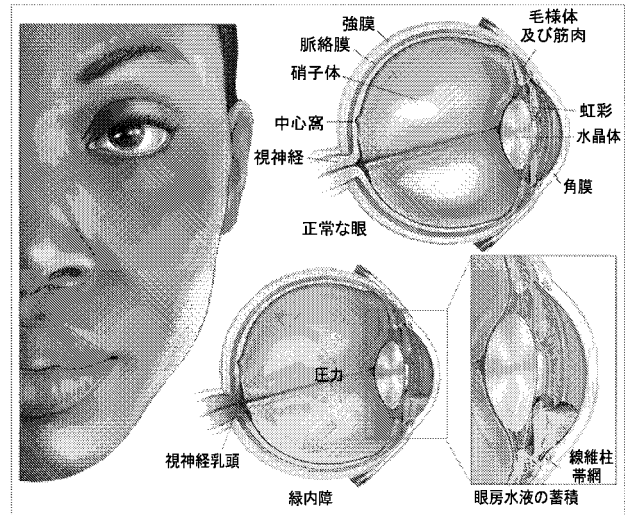
PCR-遺伝子クリーニング-配列決定



【 配列表 】

[2011505579000001.app](#)

【 図 3 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/85489
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68 (2009.01) USPC - 435/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 435/6  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/7.1, 7.32, 7.9; 250/282; 514/12; 530/350; 536/23.1 (see search terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST, Google Scholar Search Terms: Steroid sensitivity, steroid risk IOP, intraocular pressure, single nucleotide polymorphism, SNP, polymorphism, glucocorticoid receptor, Intron 4, n755n, bcl1, all biomarkers in claim 1, eye, biomarker, biochip, antibody		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0246495 A1 (GARRETT et al.) 02 Nov. 2006 (02.11.2006) para [0008], [0213], [0360], [0560]-[0561]; Table 34	1-3
Y — A	US 2003/0068640 A1 (NGUYEN et al.) 10 Apr. 2003 (10.04.2003) para [0012]-[0013], [0108]-[0110], [0123], [0145], [0188]-[0189]	8-10, 13, 14-16, 27-29, 32-38 ----- 17-22, 22a, 23-25
Y	STEVENS et al. Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid receptor haplotype. J. Clinical Endocrinology and Metabolism, 2004, Vol 89, No. 2, pp 892-897, abstract, pg 892, para 2	8-10, 13, 14-16, 26-38
Y	US 2006/0257946 A1 (DING et al.) 16 Nov. 2006 (16.11.2006) para [0009]	26, 30-31, 35-38
A	LEUNG et al. The dual role of dexamethasone on anti-inflammation and outflow resistance demonstrated in cultured human trabecular meshwork cells. Molecular Vision, 2003, Vol 9, pp 425-539, abstract, pg 435, para 3	4-7, 8a, 11-12, 13a, 17-22, 22a, 23-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 Jan. 2009 (22.01.2009)		Date of mailing of the international search report <b>10 FEB 2009</b>
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: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 シュワルツ, ステファン, ジー.

アメリカ合衆国, フロリダ州 3 4 1 1 9, ネーブルズ, ツリーライン ドライヴ 7 5 1 2

(72)発明者 フィニ, エリザベス, エム.

アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 1 3 1, マイアミ, ユニット 2 0 0 2, ブリッケル キー  
ドライヴ 8 4 8

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA13

专利名称(译)	用于调节眼内压和区分类固醇反应者与非反应者的分子靶点		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011505579A</a>	公开(公告)日	2011-02-24
申请号	JP2010537043	申请日	2008-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	迈阿密大学		
申请(专利权)人(译)	迈阿密大学		
[标]发明人	シュワルツステファンジー フィニエリザベスエム		
发明人	シュワルツ,ステファン,ジー. フィニ,エリザベス,エム.		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/16 C12Q2600/172		
FI分类号	G01N33/50.P G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA13		
代理人(译)	吉田 正义 高桥智之		
优先权	60/992204 2007-12-04 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

分子生物标志物作为对类固醇反应，药物靶标，类固醇反应的预测因子和用于调节眼内压的药物的鉴定的指标。确定和区分类固醇反应者和非反应者的试剂盒和方法。

【表 2】

遺伝子座1	遺伝子座2	ヘテロ型	頻度	係数	D'
イントロン4	N766N	G-C	0.1417	0.0901	0.9021
イントロン4	N766N	G-T	0.1992	-0.0901	-0.9021
イントロン4	N766N	T-C	0.0098	-0.0901	-0.9021
イントロン4	N766N	T-T	0.6493	0.0901	0.9021
イントロン4	Bc1I	G-C	0.2217	-0.0082	-0.0380
イントロン4	Bc1I	G-G	0.1192	0.0082	0.0380
イントロン4	Bc1I	T-C	0.4525	0.0082	0.0380
イントロン4	Bc1I	T-G	0.2065	-0.0082	-0.0380
N766N	Bc1I	C-C	0.0099	-0.0923	-0.9034
N766N	Bc1I	C-G	0.1416	0.0923	0.9034
N766N	Bc1I	T-C	0.6644	0.0923	0.9034
N766N	Bc1I	T-G	0.1841	-0.0923	-0.9034