

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4575775号
(P4575775)

(45) 発行日 平成22年11月4日(2010.11.4)

(24) 登録日 平成22年8月27日(2010.8.27)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/68

(2006.01)

C 12 Q 1/68

Z N A A

G 01 N 33/92

(2006.01)

G 01 N 33/92

A

C 12 N 15/09

(2006.01)

C 12 N 15/00

A

請求項の数 19 (全 33 頁)

(21) 出願番号 特願2004-539048 (P2004-539048)
 (86) (22) 出願日 平成15年9月29日 (2003.9.29)
 (65) 公表番号 特表2006-500930 (P2006-500930A)
 (43) 公表日 平成18年1月12日 (2006.1.12)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2003/010798
 (87) 國際公開番号 WO2004/029618
 (87) 國際公開日 平成16年4月8日 (2004.4.8)
 審査請求日 平成18年9月27日 (2006.9.27)
 (31) 優先権主張番号 60/415,123
 (32) 優先日 平成14年9月30日 (2002.9.30)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 葉
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆
 (74) 代理人 100064610
 弁理士 中嶋 正二
 (74) 代理人 100072730
 弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫抑制療法に際してのコレステロール上昇予知方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫抑制剤投薬処置により患者に生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法であつて、

a) 患者から採取した試料中に存在する I L - 1 遺伝子の 2 つのコピーについて、 I L - 1 遺伝子の多形部位 - 5 1 1 C T (配列 X 0 4 5 0 0 の 1 4 2 3 位置) でのヌクレオチド対の同一性を判定すること ; および

b) 両方の対が A T である場合、その患者は高コレステロール上昇群とし、一対が A T で一対が G C である場合、その患者は中間のコレステロール上昇群とし、また両方の対が G C である場合、その患者は低コレステロール上昇群とすること ;
10 を特徴とする方法。

【請求項 2】

低コレステロール上昇群が免疫抑制剤投薬処置に付す群であり、高コレステロール上昇群または中間のコレステロール上昇群が別途の処置に付す群である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

免疫抑制剤投薬がラパマイシン、エベロリムス、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、シクロスボリンおよびタクロリムスから選択される請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

免疫抑制剤投薬がエベロリムスによるものである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

別途の処置がコレステチポール、クロフィブレート、ゲムフィブロジル、フェノフィブレート、フルバスタチン、アトロバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチンおよびナイアシンから選択されるコレステロール低下剤投薬を追加することからなる請求項 2、3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

免疫抑制剤投薬処置により患者に生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法であって、

a) 患者から採取した試料中に存在する I L - 1 遺伝子の 2 つのコピーについて、I L - 1 遺伝子の多形部位 - 3 1 T C (配列 X 0 4 5 0 0 の 1 9 0 3 位置) でのヌクレオチド対の同一性を判定すること；および

b) 両方の対が C G である場合、その患者は高コレステロール上昇群とし、一対が A T で一対が G C である場合、その患者は中間のコレステロール上昇群とし、また両方の対が A T である場合、その患者は低コレステロール上昇群とすること；
を特徴とする方法。

【請求項 7】

低コレステロール上昇群が免疫抑制剤投薬処置に付す群であり、高コレステロール上昇群または中間のコレステロール上昇群が別途の処置に付す群である、請求項 6 に記載の方法。

10

20

【請求項 8】

免疫抑制剤投薬がラパマイシン、エベロリムス、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、シクロスボリンおよびタクロリムスから選択される請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

免疫抑制剤投薬がエベロリムスによるものである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

別途の処置がコレステチポール、クロフィブレート、ゲムフィブロジル、フェノフィブレート、フルバスタチン、アトロバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチンおよびナイアシンから選択されるコレステロール低下剤投薬を追加することからなる請求項 7、8 または 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

免疫抑制剤投薬処置により患者に生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法であって、

a) 患者から採取した試料中に存在する I L - 1 遺伝子を含む染色体の 2 つのコピーについて、I L - 1 遺伝子に関するハプロタイプ (I L - 1 遺伝子の - 5 1 1 および - 3 1 位置での多形の組合せからなるハプロタイプ) を判定すること；および

b) 当該コピーの両方が“高コレステロール”ハプロタイプ (- 5 1 1 が T および - 3 1 が C) を含む場合には、その患者を高コレステロール上昇群とすること；および

c) 当該コピーの一方が“高コレステロール”ハプロタイプを含み、もう一方が“低コレステロール”ハプロタイプ (- 5 1 1 が C および - 3 1 が T) を含む場合、その患者は中間のコレステロール上昇群とすること；および

d) 当該コピーの両方が“低コレステロール”ハプロタイプを含む場合、その患者は低コレステロール上昇群とすること；
を特徴とする方法。

40

【請求項 12】

低コレステロール上昇群が免疫抑制剤投薬処置に付す群であり、高コレステロール上昇群または中間のコレステロール上昇群が別途の処置に付す群である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

50

免疫抑制剤投薬がラパマイシン、エベロリムス、ミコフェノール酸、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、シクロスボリンおよびタクロリムスから選択される請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

免疫抑制剤投薬がエベロリムスによるものである請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

別途の処置がコレスチポール、クロフィブレート、ゲムフィブロジル、フェノフィブレート、フルバスタチン、アトロバスタチン、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチンおよびナイアシンから選択されるコレステロール低下剤投薬を追加することからなる請求項 12、13 または 14 に記載の方法。

10

【請求項 16】

該ヌクレオチド対またはハプロタイプの同一性を判定する方法が、IL-1 遺伝子の -511 多形または -31 多形と連鎖不平衡にある当該染色体のどこかに存在する SNP を見出し、当該 1 個またはそれ以上の SNP の関係を用いて、対象のヌクレオチド対またはハプロタイプの性質を判定することを特徴とする請求項 1、2、6、7、11 または 12 に記載の方法。

【請求項 17】

患者における IL-1 遺伝子の多形部位 -511 でのヌクレオチド対を判定するキットであって、

a) IL-1 遺伝子の多形部位 -511 でのヌクレオチド対の性質を検出する特異的な少なくとも 1 種の薬物を含む容器；および

b) 当該ヌクレオチド対の性質にもとづき推奨される処置を選択するための説明書；を含んでなる請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法において使用するためのキット。

20

【請求項 18】

患者における IL-1 遺伝子の多形部位 -31 でのヌクレオチド対を判定するキットであって、

a) IL-1 遺伝子の多形部位 -31 でのヌクレオチド対の性質を検出する特異的な少なくとも 1 種の薬物を含む容器；および

b) 当該ヌクレオチド対の性質にもとづき推奨される処置を選択するための説明書；を含んでなる請求項 6 から 10 のいずれかに記載の方法において使用するためのキット。

30

【請求項 19】

指摘されたハプロタイプの性質にもとづき推奨される処置を選択するための当該キットおよび説明書の結果から、IL-1 遺伝子のハプロタイプの性質を判定するための説明書を含む請求項 17 および 18 に記載のキットを含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は薬理学および医薬の分野に属し、免疫抑制剤による処置に際し、どの患者が血清コレステロールレベルの上昇を起こし得るかを判定する方法を提供する。特に、本発明は免疫抑制剤療法に際してコレステロールレベルが上昇する危険性のある患者を同定するために、ゲノム解析を用いること、およびそれらの患者に最適な処置方策を決定する方法に関する。

40

【0002】

関連分野の記載

免疫抑制剤は現代医学において多くの重要な適応を有する。これらの薬物は心臓、肺および腎臓などの移植臓器の拒絶反応を抑制し、移植臓器の有用な寿命を引き延ばすために使用される。さらに、免疫抑制剤は自己免疫疾患、心筋炎およびリウマチ様関節炎などの広範な他の疾患の処置に使用される。しかし、免疫抑制剤は癌およびリンパ腫の原因となり、腎臓などの内臓に様々な毒性作用を生じるなどの多くの、時には深刻な副作用を有す

50

る。

【0003】

免疫抑制剤の毒性作用のために、毒性の少ない代替品を開発するために、また相乗作用の組合せ剤を用いて全体として副作用を低減させ得るような他の免疫抑制剤とは作用メカニズムの異なる薬物を見出すために、多くの努力がなされてきた。

【0004】

最近、ラパマイシン (rapamycin) (シロリムス (sirolimus) およびラマパミューン (RAPAMUNE(TM)) としても知られる) と呼称される抗真菌、抗腫瘍および免疫抑制抗生物質が異種移植拒絶反応を阻害する効果のあることが判明した。ラパマイシンはユニーク、かつ他の免疫抑制剤とは明らかに異なる作用メカニズムを有する。ラパマイシンおよびその誘導体、たとえば、エベロリムス (everolimus) (セルチキヤン (CERTICAN(TM))) (R A D) は、 Ca^{2+} に依存しない様式で、活性化 T 細胞の G 1 - S 期の進行に関する生化学経路を阻害することにより作用する。参考文献 : Schuler et al., Transplantation, Vol. 64, pp. 36-42 (1997)。この様式で、エベロリムスなどのラパマイシン誘導体は、シクロスボリンなどの他の免疫抑制剤の場合のようなサイトカインの産生を遮断するよりもむしろサイトカインのシグナル伝達を遮断する。

10

【0005】

ラパマイシンとその誘導体およびミコフェノール酸は有効な免疫抑制剤ではあるが、一部の患者においてこれらの薬物投与は血清コレステロールおよびトリグリセリドの上昇を引き起こすこと、すなわち、高コレステロール血症および高脂血症の原因となることが分かっている。これらの症状は共にとりわけ糖尿病患者において、冠動脈疾患 (C A D) および一般的なアテローマ動脈硬化症アテローム性動脈硬化症の危険因子である。

20

高コレステロール血症それ自体は一般的な症状であり、数種の主要分類の薬物で処置することができる。これらは H M G - C o A 還元酵素インヒビターまたはいわゆるスタチン類、胆汁酸結合樹脂およびニコチン酸などである。

【0006】

ラパマイシンまたはその誘導体などの免疫抑制剤、たとえば、限定されるものではないが、エベロリムス、(セルチキヤン^{T M}) (R A D) などでの処置、またはミコフェノール酸による処置に際し、血清コレステロールレベルの上昇することは、深刻かつ不利な副作用である。このことは臓器移植患者にとっては長期の(一般的には生涯) 処置を必要とするため、特に重要である。血清中コレステロールレベルの上昇は患者ごとに大きく異なるが、本発明以前には、どの患者がこのような上昇に発展していくかを予知することは不可能であった。したがって、ラパマイシンおよびその誘導体またはミコフェノール酸などの免疫抑制剤を患者に投与したとき、とりわけ長期間の使用的の場合、どの患者が血清コレステロールの上昇を経験するかを予知する方法が必要となる。

30

【0007】

発明の要約

本発明は免疫抑制剤投薬による処置中の患者において生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法を提供することによりこの問題を克服する; 当該方法は、患者に存在する I L - 1 遺伝子の 2 つのコピーについて、I L - 1 遺伝子の多形部位 - 5 1 1 C T (配列 X 0 4 5 0 0 の 1 4 2 3 位置) でのヌクレオチド対の同一性を判定すること; および両方の対が A T である場合、その患者は高コレステロール上昇群とし、一対が A T で一対が G C である場合、その患者は中間のコレステロール上昇群とし、また両方の対が G C である場合、その患者は低コレステロール上昇群とすること; からなる。

40

【0008】

さらなる態様において、本発明は免疫抑制剤投薬法により患者を処置するもう一つの方法を提供する; 当該方法は患者に存在する I L - 1 遺伝子の 2 つのコピーについて、I L - 1 遺伝子の多形部位 - 5 1 1 C T (配列 X 0 4 5 0 0 の 1 4 2 3 位置) でのヌクレオチド対の同一性を判定すること; および両方の対が G C である場合、その患者は免疫抑制剤投薬法により処置し、また一対が A T で一対が G C である場合、または両方の対が

50

A T である場合、その患者には別途の処置を用いること；からなる。免疫抑制剤投薬法は表2のリストから選択することが可能であり、エベロリムスであり得る。さらに本発明は、別途の処置として表1に掲載した方法から選択されるコレステロール低下投薬法を追加することからなる。

【0009】

さらなる態様において、本発明は免疫抑制剤投薬による処置中の患者において生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法を提供する；当該方法は、患者に存在するIL-1 遺伝子の2つのコピーについて、IL-1 遺伝子の多形部位 - 31T C (配列X04500の1903位置)でのヌクレオチド対の同一性を判定すること；および両方の対がC Gである場合、その患者は高コレステロール上昇群とし、一対がA Tで一対がG Cである場合、その患者は中間のコレステロール上昇群とし、また両方の対がA Tである場合、その患者は低コレステロール上昇群とすること；からなる。10

【0010】

なおさらなる態様において、本発明は免疫抑制剤投薬法により患者を処置する方法を提供する；当該方法は、患者に存在するIL-1 遺伝子の2つのコピーについて、IL-1 遗伝子の多形部位 - 31T C (配列X04500の1903位置)でのヌクレオチド対の同一性を判定すること；および両方の対がA Tである場合、その患者は免疫抑制剤投薬法により処置し、また一対がA Tで一対がG Cである場合、または両方の対がC Gである場合、その患者には別途の処置を用いること；からなる。免疫抑制剤投薬法は表2のリストから選択することが可能であり、エベロリムスであり得る。さらに別途の処置として表1に掲載した方法から選択されるコレステロール低下投薬法を追加することからなる。20

【0011】

なおさらなる態様において、本発明は患者におけるIL-1 遺伝子の多形部位 - 51 1でのヌクレオチド対を判定するキットであって、IL-1 遺伝子の多形部位 - 51 1でのヌクレオチド対の性質を検出する特異的な少なくとも1種の試薬を含む容器；および当該ヌクレオチド対の性質にもとづき推奨される処置を選択するための説明書；を含んでなるキットを提供する。

【0012】

なおさらなる態様において、本発明は患者におけるIL-1 遺伝子の多形部位 - 31 でのヌクレオチド対を判定するキットであって、IL-1 遺伝子の多形部位 - 31 でのヌクレオチド対の性質を検出する特異的な少なくとも1種の試薬を含む容器；および当該ヌクレオチド対の性質にもとづき推奨される処置を選択するための説明書；を含んでなるキットを提供する。30

【0013】

さらなる態様において、本発明は免疫抑制剤投薬による処置中の患者において生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法であって、患者に存在するIL-1 遺伝子を含む2つのコピーについて、IL-1 遺伝子に関するハプロタイプを判定することを特徴とする方法を提供する。用語“IL-1 遺伝子に関するハプロタイプ”とは、IL-1 遺伝子の - 51 1 および - 31 位置の多形の組合せからなるハプロタイプをいうものとする。両方の染色体が“高コレステロール”ハプロタイプを含む場合、すなわち、IL-1 遺伝子の - 51 1 で C の代わりに T および - 31 で T の代わりに C を含む場合、患者は高コレステロール上昇群とし、染色体の一方が“高コレステロール”ハプロタイプを含み、一方が“低コレステロール”ハプロタイプを含む場合、患者は中間のコレステロール上昇群とし、また両方の染色体が“低コレステロール”ハプロタイプを含む場合、すなわち、部位 - 51 1 に C を、部位 - 31 に T を含む場合、患者は低コレステロール上昇群とする。40

【0014】

なおさらなる態様において、本発明は免疫抑制剤投薬法により患者を処置する方法であって、患者に存在するIL-1 遺伝子を含む2つの染色体について、IL-1 遺伝子50

に関するハプロタイプを判定すること；および当該染色体の両方が“低コレステロール”ハプロタイプを含むか、または染色体の一方が“低コレステロール”ハプロタイプを含み、もう一方が“高コレステロール”ハプロタイプを含む場合には、その患者を免疫抑制剤投薬法により処置し、また染色体の両方が“高コレステロール”ハプロタイプを含む場合には、その患者には別途の処置を用いること；を特徴とする方法を提供する。免疫抑制剤投薬法は表2のリストから選択することが可能であり、エベロリムスであり得る。別途の処置とは、表1に掲載した方法から選択されるコレステロール低下投薬法を追加することとなる。

【0015】

さらなる態様において、本発明はIL-1 遺伝子の-511多形または-31多形と連鎖不平衡にある当該染色体のどこかに存在するSNPを見出すことにより、患者のIL-1 遺伝子の部位-511および-31でのヌクレオチド対の同一性または患者のIL-1 遺伝子のハプロタイプを判定し、当該1個またはそれ以上のSNPの関係を用いて、対象のヌクレオチド対またはハプロタイプの性質を判定し、この情報を用いてIM療法に際してのコレステロール上昇を推定して処置を判断することとなる方法を提供する。10

【0016】

本発明のさらなる態様は、IL-1 遺伝子のハプロタイプの性質を判定するキットであって、IL-1 遺伝子の多形部位-511でのヌクレオチド対の性質を検出する特異的な少なくとも1種の試薬を含む容器；およびIL-1 遺伝子の多形部位-31でのヌクレオチド対の性質を検出する特異的な少なくとも1種の試薬を含む容器；上記の結果から、ハプロタイプを判定するための説明書および指摘されたハプロタイプの性質にもとづき推奨される処置を選択するための説明書；を含んでなるキットである。20

【0017】

図面の簡単な説明

図1：RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均総コレステロールレベル。30

図2：RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均総コレステロールレベル。

図3：RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均HDLコレステロールレベル。

図4：RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均HDLコレステロールレベル。

図5：RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均LDLコレステロールレベル。

図6：RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均LDLコレステロールレベル。

【0018】

発明の詳細な説明

本発明はラバマイシンまたはその誘導体などの免疫抑制剤投薬(IM)による処置中の患者において生じる血清コレステロールの上昇度を判定する方法を提供する。40

一態様において、IM処置の有力な候補である患者は多形の存在、すなわち、ヌクレオチドの-511位置(アミノ酸変化のないプロモーター領域)でのシトシン(C) チミン(T)を判定するために採血する；これは患者に存在するインターロイキン-1-ベータ(IL-1)遺伝子の2つのコピーにおいて、配列X04500のヌクレオチド位置1423でのC T変化である。位置-511での該ヌクレオチド対が該遺伝子の両方のコピーにおいてATである場合、その患者はIM処理の間に血清コレステロールレベルの高い上昇を経験することとなる。

【0019】

位置-511でのヌクレオチド対が一方のコピーでATであり、他のコピーがCGである場合、免疫抑制剤投薬で処置中の患者のコレステロールレベルは中程度の上昇となる。50

位置 - 511 でのヌクレオチド対が両方のコピーで G C である場合、IM で処置中の患者のコレステロールレベルは低上昇となる。

【0020】

もう一つの態様において、IM での処置を必要とする患者の処置にどの投薬法を使用するかの判定は、患者に存在する IL - 1 遺伝子の位置 - 511 におけるヌクレオチド対の性質の判定結果にもとづくものである。

ヌクレオチド対の両方が G C である場合、患者は IM で処置することとなる。この免疫抑制剤投薬は表 2 に示したもののはずれかであり、ラパマイシンまたはその誘導体の一つ、たとえば、制限されるものではないが、エベロリムス (everolimus) (セルチキャン (CERTICAN(TM))) (RAD) などである。

10

【0021】

両方のヌクレオチド対が A T であるか、または一方が A T で、一方が G C である場合、患者はコレステロールレベルを上昇させない別途の投薬法で処置するか、あるいは患者は IM に加えてコレステロール低下剤で処置し、処置の間、患者のコレステロールレベルをモニターする。IM と組み合わせて使用するこのコレステロール低下剤は、下記表 1 のリストから選択する 1 種以上の投薬法であり得る。

【0022】

さらなる態様において、IM 処置の有力な候補である患者は、ヌクレオチドの - 31 位置 (アミノ酸変化のないプロモーター領域) での多形 T C の存在を判定するために採血する；これは患者に存在する IL - 1 遺伝子の 2 つのコピーにおいて、配列 X04500 のヌクレオチド位置 1903 での T C 変化である。位置 - 31 での該ヌクレオチド対が該遺伝子の両方のコピーにおいて CG である場合、その患者は IM 処置の間に血清コレステロールレベルの高い上昇を経験することとなる。位置 - 31 でのヌクレオチド対が一方のコピーで A T であり、他のコピーが CG である場合、IM で処置中の患者のコレステロールレベルは中程度の上昇となる。位置 - 31 でのヌクレオチド対が両方のコピーで A T である場合、IM で処置中の患者のコレステロールレベルは低上昇となる。

20

【0023】

もう一つの態様において、IM での処置を必要とする患者の処置にどの投薬法を使用するかの判定は、患者に存在する IL - 1 遺伝子の位置 - 31 におけるヌクレオチド対の性質の判定結果にもとづくものである。ヌクレオチド対の両方が A T である場合、患者は IM で処置することとなる。

30

この免疫抑制剤投薬は表 2 に示したもののはずれかであり、ラパマイシンまたはその誘導体の一つ、たとえば、制限されるものではないが、エベロリムス (セルチキャン (TM)) (RAD) などである。

【0024】

両方のヌクレオチド対が G C であるか、または一方が A T で、一方が CG である場合、患者はコレステロールレベルを上昇させない別途の投薬法で処置するか、あるいは患者は IM に加えてコレステロール低下剤で処置し、処置の間、患者のコレステロールレベルをモニターする。IM と組み合わせて使用するこのコレステロール低下剤は、下記表 1 のリストから選択する 1 種以上の投薬法であり得る。

40

【0025】

本発明にて使用する適切なラパマイシンは、たとえば、米国特許第 3,929,992 および 5,258,389 号公報、および国際特許出願 WO 94/09010 および WO 01/60345 公報に記載されているとおりである；これらの公報はすべて全文を目的の如何を問わず参照により本明細書の一部とする。

【表1】

表1：抗脂血症剤（コレステロール低下剤）

胆汁酸金属イオン封鎖剤コレステチポール（コレステチド（COLESTIDTM）ファルマシアーアップジヨン（Pharmacia & Upjohn））フィブリノ酸誘導体クロフィブレート（アトロミドーS（ATROMID-STM）ワイス-アイエルスト（Wyeth-Ayerst））ゲムフィブロジル（ロピド（LOPIDTM）パークーディビス（Park-Davis））フェノフィブレート（トリコア（TRICORTM）アボット（Abbott））HMG-CoA還元酵素インヒビターフルバスタチン（レスコール（LESCOLTM）ノバルティス（Novartis））

10

アトロバスタチン（リピトール（LIPITORTM）パークーディビス（Parke-Davis））ロバスタチン（メバコール（MEVACORTM）メルク（Merck））プラバスタチン（プラバコール（PRAVACOLTM）ブリストル-マイヤースキッブ（Bristol-Myers Squibb））

)

シンバスタチン（ゾコール（ZOCORTM）メルク（Merck））ニコチン酸ナイアシン（ニアスパン（NIASPANTM）コス（Kos））

20

【表2】

表2：免疫抑制剤

ラパマイシン（シロリムス、ラパミューン（RAPAMUNETM））エベロリムス（セルチキヤン（CERTICANTM））（RAD）ミコフェノール酸とミコフェノール酸モフェチル（セルセプト（CELLCEPTTM）（MMF））アザチオプリン（イムラン（IMURANTM））シクロスボリン（ネオーラル（NEORALTM））タクロリムス（プログラム（PROGRAFTM））

30

【0026】

以下の実施例はさらなる説明のみを目的とするものであり、開示した発明を限定しようとするものではない。

【実施例1】

【0027】

[R A D B 2 5 1 の研究]

全般の研究設計

R A D B 2 5 1 の研究は、無作為多施設での二重盲検並行群での研究であり、シクロスボリン（C s A）（ネオーラル（NEORAL）登録商標）およびプレドニゾンとの組合せで使用したエベロリムス（セルチキヤンTM）（R A D）対ミコフェノール酸モフェチル（M M F）の有効性と安全性についてのものであった。該研究は3期間で構成した：スクリーニング期間；ベースライン期間；および二重盲検処置期間。ベースライン評価に続いて、包含／除外基準に合致する患者であって、同種異系移植が機能しており、かつ経口投薬が寛容化した（移植後48時間以内）ことを確認した患者につき、3群の処置群（1:1:1）の中の1群を無作為に選択した。同種異系移植の機能の判定は研究者の判断と、適切な尿排出とクレアチニンレベルの低下の証拠にもとづいた。無作為選抜と研究投薬の最初の用量を投与した日を研究の第1日として記録した。3群の処置群を以下に記載する：

40

50

【0028】

用量レベル1 : 0.75 mg RAD (1日2回) + ネオーラル(登録商標) +
プレドニゾン

用量レベル2 : 1.5 mg RAD (1日2回) + ネオーラル(登録商標) +
プレドニゾン

比較対照 : 1 g MMF (1日2回) + ネオーラル(登録商標) + プレドニゾン

【0029】

[隅伴療法]

ネオーラル(登録商標)の開始と維持

経口CsA(ネオーラル(登録商標))の投与を6~12mg/kg/日(経口)で開始し、標準の標的アッセイ範囲を反映する12時間最低濃度を維持するように調整した。CsAの静脈内投与(i.v.)は、臨床状況が要求しない限り、回避した。全血レベルはできるだけ迅速に下記にリストした治療範囲とした。これを達成した後、CsAの用量は最低血液濃度を標的範囲内に維持するためにのみ調整した。

1~4週 : 200~350ng/mL

2~3ヶ月 : 100~300ng/mL

【0030】

CsAまたはRAD測定のために採血した当日に、患者はネオーラル(登録商標)の事前投与を受け、採血の12±1時間前に研究投薬を受けた。患者には適切なタイミングとなるように、採血の前日に投薬スケジュールを調整するように指示し、夕刻時用量投与の正確な時間を記録した。採血当日のため、患者は研究投薬とネオーラル(登録商標)を服用しなかったが、診療所に持って来て、採血終了後に服用した。

【0031】

プレドニゾン

移植直前に、患者は1gまでのメチルプレドニゾロン(i.v.)、次いで、12時間後に500mgまでのメチルプレドニゾロン(i.v.)の投与を受けた。移植手術後、できるだけ早期に、プレドニゾンの経口投与を0.35~2.0mg/kg/日で開始し、30日目までに用量が20mg/日または0.25mg/kg/日となるように次第に減量したが、最初の6ヶ月間は5mg/日以下とならないような用量とした。

【0032】

サイトメガロウイルス(CMV)予防

CMVの予防措置は、CMVに対してドナーのテストが陽性であって、受容者テストが陰性であるすべての事例で必須であった。ガンシクロビル、CMV過免疫グロブリンまたはアシクロビルでの処置が可能であり、局所方式で投与した。CMV陽性ドナーからCMV陰性受容者へ以外の事例については、すべて局所方式にしたがって処置した。CMV予防措置は急性拒絶反応エピソードの抗体処置後にも推奨された。

【0033】

P C P 予防

患者はすべてトリメトプリム・スルファメトキサゾールでも開始し、1日あたり1個の単強度錠剤として、経口投薬が寛容となった時点で開始し、移植手術後最初の6ヶ月間継続した。投与量は研究者の判断で、1個の単強度錠剤を1週間3回に減量し、さらに6ヶ月間とした。1年後の処置は局所方式に従った。トリメトプリム・スルファメトキサゾールに寛容となれない患者には噴霧化したペニタミジンまたはダブソンを投与した。

【0034】

その他の隅伴療法

研究の全処置期間、すなわち、スクリーニングの初日から最終の研究評価がすべて終了するまでの期間、研究薬物、研究予防薬および通常の患者の投薬以外の投薬は実施しなかった。この規則に対する例外は有害事象(AE)を処置するために必要な投薬にのみ適用した。他の投薬(薬局での投薬およびビタミン類を含む)の管理については事前および隅伴投薬事例報告様式(Prior and Concomitant Medications Case Report Form(CRF))

10

20

30

40

50

に詳細に記載されている。A Eについて必要な場合には、随伴投薬法がA E s C R Fに詳細に記載され、関連文献も引用されている。

【0035】

プロトコールにより特定した薬物以外の免疫抑制剤はすべて否定された。許容し得る抗拒反応療法としては、“急性拒絶反応エピソードの処置”(Treatment of Acute Rejection Episodes)のガイドラインによるメチルプレドニゾロンおよび抗リンパ球抗体療法である。レスキュー療法のためにタクロリムスまたはMMFを必要とする患者は研究薬物を中断した。テルフェナジン、アステミゾールおよびシサブリドは患者が研究投薬にある間禁止した。フェノバルビタール、フェニトイン、カルバマゼピン、またはケトコナゾールの使用は痛く落胆させるものであった。

10

【0036】

移植手術後、処置期間は3年とした。二重盲検処置期間、患者は7、14および28日目に、また月として2、3、6、9、12、18、24、30および36ヶ月目に診察した。腎組織検査がベースライン(手術中であり得る)で、また拒絶反応の疑わしい時点が必要であった。盲検研究の薬物投与は3年で中止した。

10

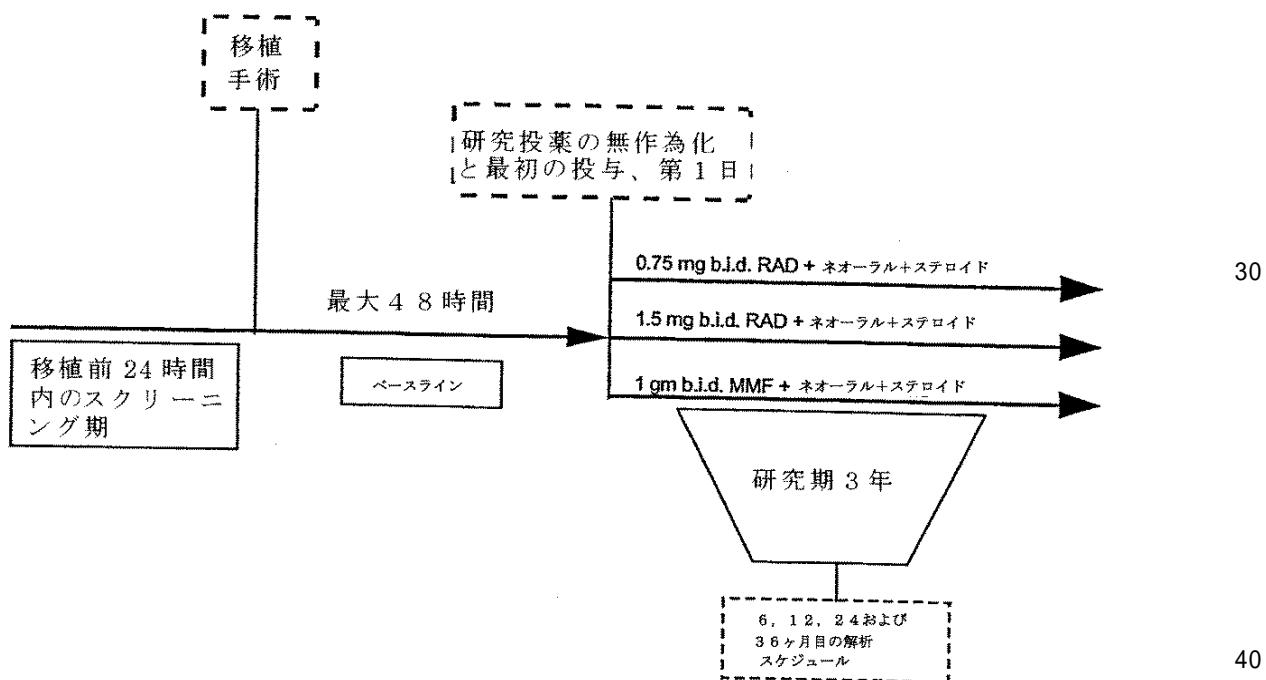
【0037】

一次死体生存非関連または非HLA一致関連ドナー腎臓の移植手術を受ける予定の年齢16～65歳の男女患者を本研究に加えた。研究未完のまま中断した患者は取り替えることをしなかった。本研究に参加適格であるために、各患者は包含／除外基準のすべてに合致せねばならなかった。

20

研究の図式

【化1】



30

【0038】

RAD B251研究はあらたな腎移植受容者におけるMMFと比較して、RADの2通りの経口用量の安全性と有効性を評価するために設計したものであり、組織検査により証明した急性同種異系移植拒絶反応エピソード、移植片喪失または死亡の発生率により測定したものである。MMFは腎移植において広く使用されているという理由で、比較対照薬として選択した。

40

【0039】

[薬理遺伝学的解析]

エベロリムス(RAD)で処置した患者で観察されるコレステロールおよび脂質レベル

50

の上昇と関連する遺伝因子を同定する努力において、R A D B 2 5 1 臨床試験に参加した患者のゲノムポリデオキシリボヌクレオチド(D N A)内の24個の遺伝子からの47個の一塩基多形(S N P)について試験した。試験した47個のS N Pの中、21個は実験的に多形ではないと判定した。多形であるとした26個の中、位置(-511)と(-31)のI L - 1 遺伝子プロモーター中の2つのS N Pは、R A D B 2 5 1 臨床試験に参加した患者のコレステロールレベルにおける変化に関連して、統計的に有意であることを示した。

【0040】

I L - 1 (-511) C T 塩基遷移(T-T)またはI L - 1 (-31) T C 塩基遷移(C-C)についてホモ接合であった患者は、研究期間に受けた処置にもかかわらず、彼らの最終訪問時、総コレステロールの最小平均レベルが最高であった(それぞれp = 0.0018およびp = 0.0013)。(この数値は最終訪問時の絶対血清コレステロールレベルをいうが、統計的解析では、この数値が依存性変数と定義され、またベースラインでのコレステロールレベルは、自動的にベースラインレベルを考慮して、独立変数と定義された)。

【0041】

総コレステロールレベルの上昇は、H D LおよびL D L両レベルの上昇によるものであった; (-511)位置でのT対立遺伝子または(-31)位置でのC対立遺伝子についてホモ接合である患者は、最終訪問時に、最高の最小二乗平均レベルのH D L(それぞれ、p = 0.0214およびp = 0.0514)およびL D L(それぞれ、p = 0.0159およびp = 0.0091)を示した。しかし、重要なことは、遺伝子型に関係なく、H D LとL D Lの比は同じままであったことである。

【0042】

したがって、我々の知見が示唆することは、I L - 1 遺伝子プロモーターの位置(-511)でのT対立遺伝子についてホモ接合であり、かつ位置(-31)でのC対立遺伝子についてホモ接合である個体は、R A D / ネオーラル(登録商標)またはM M F / ネオーラル(登録商標)処方で処置したことにより、総血中コレステロールレベルがさらに上昇し易くなるということである。

【0043】

[方法]
サンプル

R A D B 2 5 1 臨床試験からの合計82のユニークサンプルについて、薬理遺伝学的評価に参加するとの同意にもとづき、その遺伝子型を検討した。この数字はR A D B 2 5 1 臨床試験に参加した総母集団の約15%にあたる。各患者の血液サンプルは個々の試験施設で集め、コバンス(Covance)(ジュネーブ、スイス)に搬送した。各患者のゲノムD N Aはピュアージーン(PUREGENETM)D N A分離キット(D-50K)(ジェントラ(Gentra)、ミネアポリス、ミネソタ)を用いて、コバンスで血液から抽出した。

【0044】

遺伝子型決定
24遺伝子に相当する合計47のユニーク多形について、各臨床試験のために解析した。薬物代謝、高コレステロール血症、高脂肪血症、免疫抑制および炎症に関わる候補遺伝子を本研究用に選択した。S N Pアッセイは、O M I M、S N P協会、遺伝子座リンクおよびd b S N P、およびサーード・ウェーブ・テクノロジーズ・インク(T W T、マジソン、ウィスコンシン)ウェブサイト(<http://64.73.25.65:8080/coe/index.jsp>)などの公共データベースからの情報を用いて設計した。遺伝子型決定アッセイ用の得られたプローブセットはT W Tが作製した。遺伝子型決定はT W T(9-10)が開発したインベーダー(INVADER)(登録商標)アッセイを用い、製造業者の指示に従い、ゲノムD N A 60 n gにより実施した。参照文献: Lyamichev et al., Nat. Biotechnol., Vol. 17, pp. 292-296 (1999); and Ryan, Mol. Diagn., Vol. 4, pp. 135-144 (1999)。

【0045】

10

20

30

40

50

(- 5 1 1) I L - 1 S N P についてのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) は、 1 0 ~ 7 0 n g のゲノム D N A 、 1 6 0 μ M - d N T P 、 1 0 m M トリス H C l (p H 8 . 3) 、 5 0 m M - K C l 、 1 . 5 m M - M g C l ₂ 、 0 . 6 μ M - I L - 1 (- 5 1 1) 前進プライマー、 0 . 6 μ M - I L - 1 (- 5 1 1) 逆進プライマーおよび 0 . 0 3 U - T a q D N A ポリメラーゼ (アップライド・バイオシステムズ、 フォスター・サイティ、 カリフォルニア) を含む 2 0 μ L の反応液中で実施した。以下の条件で 3 6 回の増幅を実施した： 9 4 、 3 0 秒； 5 5 、 3 0 秒； 7 2 、 3 0 秒。次いで、 9 種のサンプルを 2 % アガロースゲル上で分画 (5 μ L) し、 臭化エチジウム染色により可視化し、 増幅を確認した。 P C R 産物の 1 : 7 希釀は増幅 D N A 用 3 8 4 穴バイプレックスプレートにより、 T W T S N P # 1 2 8 0 6 9 に対し実施した。

10

プライマー配列は以下のとおりである：

I L - 1 (- 5 1 1) - 前進 5 ' - G C A G A G C T C A T C T G G C A T T G - 3 ' (配列番号 1)

I L - 1 (- 5 1 1) - 逆進 5 ' - T A T G T G G G A C A A A G T G G A A G - 3 ' (配列番号 2)

【 0 0 4 6 】

(- 3 1) I L - 1 S N P の P C R は、 1 n g のゲノム D N A 、 4 0 μ M - d N T P 、 1 0 m M トリス H C l (p H 8 . 3) 、 5 0 m M - K C l 、 1 . 5 m M - M g C l ₂ 、 0 . 7 5 μ M - I L - 1 (- 3 1) 前進プライマー、 0 . 7 5 μ M - I L - 1 (- 3 1) 逆進プライマーおよび 0 . 1 5 U ゴールド T a q D N A ポリメラーゼ (アップライド・バイオシステムズ、 フォスター・サイティ、 カリフォルニア) を含む 2 5 μ L の反応液中で実施した。以下の条件で 3 8 回の増幅を実施した： 9 4 、 3 0 秒； 5 8 、 3 0 秒； 7 2 、 3 0 秒。次いで、 すべてのサンプルを 2 % アガロースゲル上で分画 (5 μ L) し、 臭化エチジウム染色により可視化し、 増幅を確認した。

20

プライマー配列は以下のとおりである：

I L - 1 (- 3 1) - 前進 5 ' - G C A C A A C G A T T G T C A G G A A A C 3 ' (配列番号 3) ;

I L - 1 (- 3 1) - 逆進 (5 ' - A T G C A T A C A C A C A A G A G G C A G - 3 ' (配列番号 4) .

【 0 0 4 7 】

P C R 産物の 1 : 1 0 希釀は増幅 D N A 用 3 8 4 穴バイプレックスプレートにより、 R A D B 2 5 1 用の T W T S N P # 2 7 4 3 3 9 に対し実施した。 R F L P 解析は A l u - I 制限酵素 (ニューイングランド・バイオラブス、 ビバリー、 マサチューセッツ) を用いて遺伝子型を決定するために使用した。 R F L P 消化物は、 5 0 m M - N a C l 、 1 0 m M トリス H C l 、 1 0 m M - M g C l ₂ 、 1 m M - D T T (p H 7 . 9) 、 8 n g 増幅ゲノム D N A および 0 . 5 m M - A l u - I 酵素を含む 2 0 μ L の反応液中で処理した。サンプルはすべて 3 7 で 1 7 時間インキュベートし、 3 % アガロースゲル上で分画 (1 9 μ L) し、 臭化エチジウム染色により可視化し、 バンドサイズを確認した。

30

【 表 3 】

(- 5 1 1) I L - 1 β 多形周囲のヌクレオチド配列

遺伝子	位置	対立遺伝子		周囲配列
		1	2	
I L - 1 β	-511	C	T	C T G C A A T T G A C A G A G A G C T C C [C, T] G A G G C A G A G A C A G C A C C C A A G G T A G A G A C C C A

40

【 0 0 4 8 】

対立遺伝子 1 (配列番号 5) :

C T G C A A T T G A C A G A G A G C T C C [C] G A G G C A G A G A C A G C A C C C A A G G T A G A G A C C C A

対立遺伝子 2 (配列番号 6) :

C T G C A A T T G A C A G A G A G C T C C [T] G A G G C A G A G A C A G C A C C C A A G G T A G A G A C C C A

【表4】

(-31) IL-1 β 多形周囲のヌクレオチド配列

遺伝子	位置	対立遺	対立遺	周囲配列
		伝子1	伝子2	
IL-1 β	-31	C	T	TCCTACTTCTGCTTTGAAAGC [T, C] ATAAAAACAGCGAGGGAGAACTGGCAGATACCAAACCTC GGAGAAACTGGCAGATACCAAACCTC

【0049】

対立遺伝子1（配列番号7）：

TCCTACTTCTGCTTTGAAAGC [C] ATAAAAACAGCGAGGGAGAACTGGCAGATACCAAACCTC

10

対立遺伝子2（配列番号8）：

TCCTACTTCTGCTTTGAAAGC [T] ATAAAAACAGCGAGGGAGAACTGGCAGATACCAAACCTC

【0050】

[統計的解析]

24ヶ月のlab_b.sd2 R A D B 251臨床データセットを用い、コレステロールレベルに対する遺伝子型と処置の影響を解析するために、共分散モデルの解析を使用した。該モデルの条件は、最終コレステロールレベル、共変量としての初期コレステロールレベル、および主エフェクターとしての遺伝子型と処置である。適用し得る場合、オッズ比、95%信頼限界、およびカイ二乗解析を計算した。統計解析はすべてSAS 8.02ソフトウェアにより実施した。多重テストの補正のために、ボンフェロニ補正を行った。

20

【0051】

[結果]

R A D B 251研究において、R A D B 251臨床試験に参加する薬理遺伝学解析に同意している各患者について、24遺伝子に相当する47のユニークSNPを遺伝子型決定した。各それぞれの臨床試験について患者全体の分布に対する薬理遺伝学解析に同意した患者の比較を表3に示す。

【表5】

表3：R A D B 2 5 1：全臨床試験サンプルに比較した薬理遺伝学サンプルの分布

	薬理遺伝学サンプル	治験サンプル	
年齢（才）	43.34	43.49	
人種			
白人	(61) 74%	(388) 68%	
黒人	(9) 11%	(93) 16%	
東洋人	(0) 0%	(11) 2%	
その他	(12) 15%	(76) 13%	
性別			10
男性	(51) 62%	(357) 63%	
女性	(31) 38%	(211) 37%	
処置			
RAD001 (1.5 mg/d)	(24) 29.3%	(189) 33.3%	
RAD001 (3.0 mg/d)	(29) 35.3%	(189) 33.3%	
MMF (2 g/d)	(29) 35%	(190) 33.4%	
体重 (kg)	80.7	77.1	
ベースライン			
CHO (mg/dL)	168.7	162.8	
HDL (mg/dL)	40.9	40.8	20
LDL (mg/dL)	96.6	96.8	
TGC (mg/dL)	155.3	119.9	
処置終了時			
CHO (mg/dL)	234.5	232.2	
HDL (mg/dL)	52.7	53.3	
LDL (mg/dL)	123.2	126.6	
TGC (mg/dL)	283.0	254.6	

【0052】

唯一の統計的有意差は、R A D B 2 5 1 臨床試験における全患者全体集団に比較して薬理遺伝学研究に使用した患者集団との間に見られた：薬理遺伝学患者集団の中の平均T G C 値とR A D B 2 5 1 患者母集団における平均値との差は、統計的に有意 ($p < 0.01$) であることが判明した。したがって、この比較は薬理遺伝学研究に使用した患者母集団が、各治験で試験した全患者集団の典型であることを示唆する。本研究で試験した47のS N P の内、21は実験的に多形ではないと判定した。それ故、26のS N P は下記の解析に使用した。

【0053】

R A D B 2 5 1 臨床データセットによる遺伝子型の統計的解析では、コレステロールレベルと有意な関連性をもつ (-511) 位置でのI L - 1 遺伝子プロモーター内に多形が確認された。表4と図1に示すように、両処置群からの患者のI L - 1 (-511) (T-T) 遺伝子型は共に、患者の最終訪問時に測定した総コレステロールレベルの最高上昇と相關した ($p = 0.0018$)。

30

40

【表6】

表4：

(-511) IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型によるLS平均総コレステロールレベル(mg/dL)およびRAD B251臨床試験内の処置群

遺伝子型	RAD (1.5 および 3.0 mg/日)			MMF (2 mg/日)			RAD および MMF 処置群併合		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
患者数	20	25	9	12	9	7	32	34	16
LS 平均	217.3	242.9	290.3	200.9	229.6	254.1	211.4	239.5	272.9
P-値	0.0125	0.0125	0.0125	0.0866	0.0866	0.0866	0.0018	0.0018	0.0018

10

【0054】

同様の関連性はIL-1(-31)(C-C)遺伝子型($p = 0.0013$)について観察された(表5および図2)。

表5：

(-31) IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型によるLS平均総コレステロールレベル(mg/dL)およびRAD B251臨床試験内の処置群

遺伝子型	RAD (1.5 および 3.0 mg/日)			MMF (2 mg/日)			RAD および MMF 処置群併合		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
患者数	9	26	19	7	9	12	16	35	31
LS 平均	291.1	240.4	216.6	254.1	239.6	200.9	272.9	239.5	211.4
P-値	0.009	0.009	0.009	0.0625	0.0625	0.0625	0.0013	0.0013	0.0013

20

【0055】

この相関をさらに解析するために、IL-1(-511)遺伝子型とHDLおよびLDLのレベル間に関連性があるかどうかを試験した。図3と表6に示すように、両処置群からの患者のIL-1(-511)(T-T)遺伝子型は共に、患者の最終訪問時に測定したHDLの最高レベルと相關した($p = 0.0214$)。

30

表6：

(-511) IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型によるLS平均HDLレベル(mg/dL)およびRAD B251臨床試験内の処置群

遺伝子型	RAD (1.5 および 3.0 mg/日)			MMF (2 mg/日)			RAD および MMF 処置群併合		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
患者数	20	25	9	12	9	7	32	34	16
LS 平均	47.6	54.9	68.4	45.5	56.8	50.4	47.8	54.4	58.9
P-値	0.0164	0.0164	0.0164	0.0819	0.0819	0.0819	0.0214	0.0214	0.0214

40

【0056】

すでに報告されていることであるが、IL-1(-511)多形は、位置(-31)でのIL-1プロモーターにおけるもう一つの多形に強い連鎖不平衡がある。参照：El-Omar et al., Nature, Vol. 404, pp. 398-402 (2000)。本研究において、254の対立遺伝子はRAD B251臨床試験において薬理遺伝学的解析に同意している患者にて試験した。IL-1(-511)および(-31)多形には99.2%の連鎖不平衡が

50

ある。それ故、同様の関連性が I L - 1 (- 5 1 1) 多形で起こり、コレステロールレベルは I L - 1 (- 3 1) 多形によるものと検出され得る。I L - 1 (- 3 1) 多形に対する R A D B 2 5 1 臨床データセットの統計的解析では、コレステロールレベルとの有意な関連性が証明された。表 5 と図 2 に示すように、両処置群からの患者の I L - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型は共に、患者の最終訪問時に測定した総コレステロールレベルの最高上昇と相關した ($p = 0.0013$)。この相関をさらに解析するために、I L - 1 (- 3 1) 遺伝子型と H D L および L D L のレベル間に関連性が存在するかどうかを試験した。図 4 と表 7 に示すように、両処置群からの患者の I L - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型は共に、患者の最終訪問時に測定した H D L の最高レベルと弱いながら相關した ($p = 0.0514$)。

10

【表 9】

表 7 :

(- 3 1) I L - 1 β C C、C T または T T 遺伝子型による L S 平均 H D L レベル (m g / d L) および R A D B 2 5 1 臨床試験内の処置群

遺伝子型	RAD (1.5 および 3.0 mg/日)			MMF (2 mg/日)			RAD および MMF 処置群 併合		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
患者数	9	26	19	7	9	12	16	35	31
LS 平均	65.1	55	48.4	50.4	56.8	45.5	58.9	54.4	47.8
P-値	0.0205	0.0205	0.0205	0.1893	0.1893	0.1893	0.0514	0.0514	0.0514

20

【0057】

同様の相関は L D L レベルでも同様に確認された ($p = 0.0159$) (図 5 および表 8)。

【表 10】

表 8 :

(- 5 1 1) I L - 1 β C C、C T または T T 遺伝子型による L S 平均 L D L レベル (m g / d L) および R A D B 2 5 1 臨床試験内の処置群

遺伝子型	RAD (1.5 および 3.0 mg/日)			MMF (2 mg/日)			RAD および MMF 処置群 併合		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
患者数	20	25	9	12	9	7	32	34	16
LS 平均	112.5	123.6	144.5	113.9	118.6	143.7	110.5	123.8	145.8
P-値	0.1646	0.1646	0.1646	0.2848	0.2848	0.2848	0.0159	0.0159	0.0159

30

【0058】

より強力な相関性が L D L レベルと - 3 1 I L - 1 多形に証明された ($p = 0.0091$; 図 6 および表 9)。

40

【表11】

表9：(-31) IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型によるLS平均LDLレベル(mg/dL)およびRAD/B251臨床試験内の処置群

	RAD (1.5 および 3.0 mg/日)			MMF (2 mg/日)			RAD および MMF 処置群 併合		
	遺伝子型	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT
患者数	9	26	19	7	9	12	16	35	31
LS 平均	145.1	124.1	112.2	143.1	119.8	107.8	145.9	124.5	108.5
P-値	0.143	0.143	0.143	0.2061	0.2061	0.2061	0.0091	0.0091	0.0091

10

【0059】

重要なことは、HDLとLDLの比が、遺伝子型群間で未変化のままであったことである。本研究にて示される知見は、RAD/ネオーラル(登録商標)処方での処置によるコレステロールレベルの持続的な上昇を経験するある種対立遺伝子をもつ個体の可能性が、該対立遺伝子をもたない個体よりも高くなることを予測している。同様の傾向がMMF/ネオーラル(登録商標)処方で処置した個体で示されたが、その結果は統計上の有意性 $p = 0.05$ に適合しなかった。

【0060】

総血中コレステロールレベル 240 mg/dL は上昇しすぎであると一般には考えられるので、総血中コレステロールレベルを上昇させ、最終濃度 240 mg/dL とするために、RAD/ネオーラル(登録商標)またはMMF/ネオーラル(登録商標)処方で処置した後に、IL-1 (-511) または IL-1 (-31) 多形をもつ患者のオッズ比を決定することとした。参照 : Cecil Textbook of Medicine, Goldman and Bennett, editors, Saunders, 6th Edition (2000)。

20

【0061】

下記表10に示すように、オッズ比が示すには、患者が IL-1 遺伝子プロモーターの位置 (-511) に T を含むならば、RAD/ネオーラル(登録商標)処方で処理した場合、総血中コレステロールレベルが最終濃度 240 mg/dL に上昇する可能性は 5.67 倍 (95% 信頼限界 : 1.20 ~ 9.01) となり、あるいは患者が IL-1 遺伝子プロモーターの位置 (-31) に C を含むならば、RAD/ネオーラル(登録商標)処方で処理した場合、総血中コレステロールレベルが最終濃度 240 mg/dL に上昇する可能性は 7.23 倍 (95% 信頼限界 : 1.20 ~ 9.01) となる。これらの知見は統計的に有意であり (それぞれ、 $p = 0.0207$ および $p = 0.0096$)、高コレステロール血症を容易に処置し得るため、RAD/ネオーラル(登録商標)処方により移植手術患者を処置する際に、予防策として使用することができる。

30

【表12】

表10：

(-511) と (-31) IL-1 β 遺伝子型のオッズ比およびコレステロールレベル

(-511) IL-1 β 多形			(-31) IL-1 β 多形		
実験値	遺伝子型		実験値	遺伝子型	
	CT-TT	CC		CC-CT	TT
>239 mg/dL	24	7	31	25	6
	18.90	12.10		19.28	11.72
≤ 239 mg/dL	26	25	51	26	25
	31.10	19.90		31.72	19.28
	50	32	82	51	31

オッズ比= 5.67 (95% CI: 1.20-9.01)

 $p=0.0207$ (フィッシャーの正確検定)

40

オッズ比= 7.23 (95% CI: 1.20-9.01)

 $p=0.0096$ (フィッシャーの正確検定)

50

【0062】

多重試験のポンフェロニの補正

補正因子は本研究で解析したS N P数のために必要である。そうするために、ポンフェロニ補正法を実施し、0.0019のp値を規定した。

【数1】

$$\text{ポンフェロニ} = \frac{0.05}{\eta} = \frac{0.05}{26} = 0.0019$$

= テスト R A D 数 (RAD_number_of_tests)

それ故、IL-1 (-511) と IL-1 (-31) 多形および総コレステロール 10 レベル間の知見はなお有意であると考える。

【0063】

(-511) と (-31) IL-1 S N P の連鎖不平衡

IL-1 (-511) C T 多形が位置 (-31) に位置する IL-1 プロモーター内のもう一つの多形と強力な連鎖不平衡 (99.5%) にあり、結果として T C 塩基遷移を生じることは報告されている。参照 : El-Omar et al., Nature, Vol. 404, pp. 39 8-402 (2000)。それ故、IL-1 プロモーターの位置 (-511) に T をもつ患者は、位置 (-31) に C をもつであることが予知される。この知見はこれら 2 つの治験において試験した患者で確認される。野生型 IL-1 遺伝子において、T は -31 の位置に見出される。この T は IL-1 の転写開始に決定的な役割を果たす T A T A ボックス配列 (T A T A A A A) の一部であるため、IL-1 の発現のために非常に重要である。一般に、T A T A ボックス配列は、転写が正しい位置で始まることを確かなものとするために、遺伝子内の正しい位置に転写機構を供給し、位置を定めることに関わっている。位置 (-31) での T C 多形はこの重要な T A T A ボックス配列 (T A T A A A A から C A T A A A A へ) を崩壊させて不活性化し、IL-1 遺伝子転写の効率的な開始を禁止する。この変化した IL-1 T A T A ボックス配列への転写機構の結合欠如はすでに示されている。上記参照 : El-Omar。 20

【0064】

したがって、IL-1 プロモーター (T C 塩基遷移を起こす位置 (-31) に位置する) 内の多形または IL-1 プロモーターの -511 (C T) に位置する多形のいずれかと連鎖不平衡にある他の多形の存在は、IM 処置中の患者に予測されるコレステロール上昇度に対して予知可能な影響をもつことになる。 (-31) 多形と連鎖不平衡にある他の多形の判定手段は当業者周知である。現在既知の、または将来発見されるいずれの多形も本発明に使用可能であり、IM で処置した患者のコレステロール上昇可能性の程度を予測すること、またはかかる患者にとっての処置選択判定の一助とすることができます。 30

【0065】

該知見の生物学的意義

IL-1 (-31) (C-C) 遺伝子型は臨床上の関連性を有する。IL-1 はコレステロールの生合成を 25% 阻害することが示されている。上記参照 : El-Omar。それ故、この多形の結果が意味することは、IL-1 (-511) (T-T) 遺伝子型に相当する IL-1 (-31) (C-C) 遺伝子型をもつ患者は IL-1 レベルが低下しており、そのために IL-1 によるコレステロール生合成の阻害力を失い、その結果、血中コレステロールレベルが上昇したことである。この型の知見は R A D B 251 の治験で観察された。表 4 と 5 および図 1 ~ 2 に示すように、IL-1 (-511) (T-T) 遺伝子型および IL-1 (-31) (C-C) 遺伝子型をもつ患者は、処置に関係なく総コレステロールの最高最小二乗平均レベルを示した。 40

IL-1 は細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の活性化により LDL レセプター遺伝子発現を増大させるということも報告されている。参照 : Kumar et al., J. Biol. Chem., Vol. 273, pp. 15742-15748 (1998)。

【0066】

L D L レセプター発現の上昇は、細胞内に取込まれるコレステロール量の増加につながり、その結果、血中の総コレステロールレベルが低下する。これはこの薬物が後期 G 1 を経て S に入る細胞の発展に必要な生化学的経路を阻害することが示されているため、R A D (エベロリムス) に関連性をもつ。重要なことは、この過程には E R K の関与が示されていることである。それ故、E R K 活性はエベロリムスにより低下させることが可能である。エベロリムスは E R K 活性を阻害するため、L D L レセプターの発現が I L - 1 の発現から独立してすべての患者で低下し、その結果、L D L のレベルを低下させ、したがって、エベロリムスを服用した患者の総コレステロールを低下させる。エベロリムスが E R K の活性化を完全に阻害することはありそうにない。それ故、I L - 1 (- 5 1 1) (T - T) および I L - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型をもつ患者は、L D L レセプターの一部発現を誘導することができる。しかし、これらの患者は I L - 1 のレベルが非常に低い、そのため、L D L レセプターの発現が低く、その結果、細胞内に取込まれるコレステロール量が低下し、血中コレステロールレベルが上昇する。したがって、この説明は I L - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型をもつ患者に観察される最高レベルのコレステロールの説明となる。有意義なことは、I L - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型に相当する I L - 1 (- 5 1 1) (T - T) 遺伝子型をもつ患者は、他の I L - 1 遺伝子型をもつ患者に比較して、有意に高い L D L ($p = 0.0159$) を有することであった(図3および表4)。

【0067】

S N P の同定と特性化

10

S N P の同定と特性化には多くの異なる技法が使用し得るが、たとえば、一本鎖コンホーメーション多形解析、変性高速液体クロマトグラフィー (D H P L C) によるヘテロ二本鎖解析、直接 D N A 配列決定および計算法などである。参照 : Clin. Chem., Vol. 47, pp. 164-172 (2001)。公共データベースの豊富な配列情報のお陰で、計算手段を使用し、所定の遺伝子についてそれぞれに提出された配列 (c D N A またはゲノム配列のいずれか) を整列させることにより、コンピュータ内で S N P を同定することができる。実験的に得られた S N P とコンピュータで得た S N P とを比較すると、S N P ファインダー (http://lpgws.nci.nih.gov:82/perl/snp/snp_cgi.pl) で見つかった候補 S N P の 55% が実験的にも発見されたことを示した。参照 : Cox et al., Hum. Mutal., Vol. 17, pp. 141-150 (2001)。しかし、これらのコンピュータによる方法では真の S N P の 27% を見出しただけであった。

20

【0068】

最も一般的な S N P 型決定方法は、現在、ハイブリッド形成、プライマー伸張および開裂法である。これら方法のそれぞれは適切な検出システムに接続しなければならない。検出技法としては、蛍光偏光 (参照 : Chan et al., Genome Res., Vol. 9, pp. 492-499 (1999))、ピロリン酸放出の発光度検出 (ピロ配列決定) (参照 : Ahmadiian et al., Anal. Biochem., Vol. 280, pp. 103-110 (2000))、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) にもとづく開裂アッセイ、D H P L C、および質量分析法 (参照 : Shi, Clin. Chem., Vol. 47, pp. 164-172 (2001) および米国特許第 6,300,076 B 1 号公報) などである。その他の S N P の検出および特性化法は米国特許第 6,297,018 B 1 号および 6,300,063 B 1 号公報に開示された方法である。上記文献の開示はその全文を参照により本明細書の一部とする。

30

【0069】

特に好適な態様において、多形の検出は、いわゆるインベーダー (INVADERTM) 技法 (カード・ウェーブ・テクノロジーズ・インク (T W T、マジソン、ウィスコンシン) から入手可能) により実施し得る。本アッセイ法において、特異的上流 “インベーダー” オリゴヌクレオチドおよび部分的に重なり合う下流のプローブが共に相補性 D N A 鑄型に結合したとき、特異的構造を形成する。この構造をクリバーゼ (Cleavase) 酵素が特定の部位で認識し、切断する；その結果、プローブオリゴヌクレオチドの 5' フラップを放出する。次いで、このフラグメントが反応混合物に含まれる合成二次標的と二次蛍光標識シグナ

40

50

ルプローブに関し、“インベーダー”オリゴヌクレオチドとして作用する。これがクリバーゼ酵素による二次シグナルプローブの特異的開裂を生じる。蛍光共鳴エネルギー移動し得る色素分子で標識したこの二次プローブが開裂するとき、蛍光シグナルを発生する。クリバーゼ酵素は重なり合うDNA配列またはフラップにより形成される構造に相關した緊縮要件を有し、それ故、下流DNA鎖上、開裂部位の直ぐ上流の單一塩基対ミスマッチを特異的に検出するために使用し得る。参照：Ryan et al., Molecular Diagnosis, Vol. 4, No 2, pp. 135-144 (1999)；and Lyamichev et al., Nat. Biotechnol., Vol. 17, p p. 292-296 (1999)；参照関連米国特許第5,846,717号および6,001,567号公報（これらの開示はその全文を参照により本明細書の一部とする）。

【0070】

10

一部の態様において、組成物は2つ以上の多形部位でのヌクレオチドの同一性を同時にプローブするための2つ以上の異なる標識の遺伝子型決定オリゴヌクレオチドを含む。さらに予測されることは、プライマー組成物が、対立遺伝子特異的プライマー対の2つ以上のセットを含み、多形部位を含む2ヶ所以上の領域の同時標的化と増幅を可能とすることである。

【0071】

本発明のIL-1 遺伝子型決定オリゴヌクレオチドは、マイクロチップ、ビーズまたはガラススライドなどの固体表面上に固定するか、またはその上で合成し得る（参照例：国際特許WO98/20020およびWO98/20019）。かかる固相化遺伝子型決定オリゴヌクレオチドは様々な多形検出アッセイ法、たとえば、限定されるものではないが、プローブハイブリッド形成およびポリメラーゼ伸張アッセイなどにおいて使用し得る。固相化した本発明のIL-1 遺伝子型決定オリゴヌクレオチドは、多重遺伝子の多形についてDNAサンプルを同時に迅速に選抜するために設計したオリゴヌクレオチドの定序アレイを含み得る。

20

【0072】

本発明の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、3'末端ヌクレオチドまたは好ましくは3'末端前ヌクレオチドを有し、それが特定のSNPの唯一のヌクレオチドに相補性であり、それによって、そのヌクレオチドを含む対立遺伝子が存在する場合にのみ、ポリメラーゼ仲介伸張のためにプライマーとして作用する。コーディングまたは非コーディング鎖にハイブリッド形成する対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーが本発明の期待するものである。IL-1 遺伝子多形を検出するためのASOプライマーは、当業者既知の技法により開発し得た。

30

【0073】

本発明の他の遺伝子型決定オリゴヌクレオチドは、ここに同定した新規多形部位の1つの下流にある標的領域に位置する1個ないし数個のヌクレオチドにハイブリッド形成する。かかるオリゴヌクレオチドは本明細書に記載した新規多形の1つを検出するポリメラーゼ仲介プライマー伸張法に有用であり、したがって、かかる遺伝子型決定オリゴヌクレオチドは“プライマー伸張オリゴヌクレオチド”と本明細書ではいう。好適な態様において、プライマー伸張オリゴヌクレオチドの3'末端は、多形部位に隣接して位置するヌクレオチドに相補性のデオキシヌクレオチドである。

40

【0074】

もう一つの態様において、本発明は別個の容器に詰めた少なくとも2種類の遺伝子型決定オリゴヌクレオチドを含んでなるキットを提供する。該キットは、別個の容器に詰めた他の成分、たとえば、ハイブリッド形成バッファー（該オリゴヌクレオチドをプローブとして使用すべき場合）を含み得る。あるいは、該オリゴヌクレオチドが標的領域の増幅に使用される場合、該キットは、別個の容器に詰めて、ポリメラーゼおよびPCRなどのポリメラーゼが仲介するプライマー伸張を最適化する反応バッファーを含み得る。上記のオリゴヌクレオチド組成物およびキットは個体におけるIL-1 遺伝子の遺伝子型決定および/またはハプロタイプ決定の方法に有用である。

【0075】

50

本明細書にて使用する場合、“IL-1 遺伝子に関するハプロタイプ”とは、IL-1 遺伝子の -511 および -31 位置での多形の組合せからなるハプロタイプをいうものとし、これらのハプロタイプは以下の方法で命名するものとする；IL-1 遺伝子の多形部位 -511 で C から T への多形（配列 X04500 の位置 1423）および IL-1 遺伝子の多形部位 -31 で T から C への多形（配列 X04500 の位置 1903）の両方が IL-1 遺伝子の 1 コピーに存在する場合、ハプロタイプは“高コレステロール”と呼ぶものとする。逆に、これら多形の両方が IL-1 遺伝子の所定のコピーに存在せず、したがって、この IL-1 遺伝子の部位 -31 のヌクレオチドが T であり、この IL-1 遺伝子の部位 -511 のヌクレオチドが IL-1 遺伝子において C である場合、ハプロタイプは記載の染色体中において“低コレステロール”と呼ぶものとする。

10

【0076】

遺伝子型決定法の一態様は、個体から個体に存在する IL-1 遺伝子の 2 つのコピー、またはそのフラグメントを含んでなる核酸混合物を単離し、2 つのコピーにおける 1ヶ所以上の多形部位でのヌクレオチド対の同一性を判定し、IL-1 遺伝子型を個体に対応させることからなる。当業者なら直ぐに理解するように、個体の遺伝子の 2 つのコピーは同じ対立遺伝子であり得るし、または異なる対立遺伝子であり得る。とりわけ好適な態様において、遺伝子型決定法は各多形部位でのヌクレオチド対の同一性を判定することからなる。

【0077】

典型的には、核酸混合物またはタンパク質は、個体から採取した生体サンプル、たとえば、血液サンプルまたは組織サンプルなどから単離する。適当な組織サンプルとは、全血、精液、唾液、涙液、尿、糞便物質、汗、口腔内塗抹、皮膚、および特定の臓器組織、たとえば、筋肉もしくは神経組織および毛髪などのバイオプシーである。核酸混合物はゲノム DNA、メッセンジャー・ポリリボヌクレオチド（mRNA）、または cDNA からなるが、後者の 2 種については IL-1 遺伝子を発現する臓器から生体サンプルを採取しなければならない。さらに、当業者の理解するところであるが、mRNA または cDNA 調製物は、イントロン、5' および 3' 非転写領域またはプロモーター領域に位置する多形の検出には使用しない。IL-1 遺伝子フラグメントが単離される場合、それについて遺伝子型決定するには多形部位を含まなければならない。

20

【0078】

ハプロタイプ決定法の一態様は、個体から個体に存在する IL-1 遺伝子の 2 つのコピーの一方のみ、またはそのフラグメントを含んでなる核酸分子を単離し、当該コピーにおける 1ヶ所以上の多形部位でのヌクレオチドの同一性を判定し、IL-1 ハプロタイプを個体に対応させることからなる。該核酸は IL-1 遺伝子の 2 つのコピーまたはフラグメントを分離し得る方法を用いて単離し得るが、上記の IL-1 イソ遺伝子の調製法などによるものであって、制限されるものではなく、標的インビオクローニング法が好適な方法である。

30

【0079】

当業者であれば容易に認めるように、個体のクローランは個体に存在する 2 つの IL-1 遺伝子コピーの 1 つについて、ハプロタイプの情報を提供するだけである。ハプロタイプの情報が個体の他のコピーについて欲しい場合には、追加の IL-1 クローランを試験する必要がある。一般的に、個体における IL-1 遺伝子の両コピーについてハプロタイプ決定する確率を 90% 以上とするためには、少なくとも 5 つのクローランを試験すべきである。特に好適な態様においては、各多形部位でのヌクレオチドを同定する。

40

【0080】

好適な態様において、IL-1 ハプロタイプ対は、個体に存在する IL-1 遺伝子の各コピーにおける 1ヶ所以上の多形部位でのヌクレオチドの位相配列を同定することにより、個体について判定する。特に好適な態様において、ハプロタイプ決定法は、IL-1 遺伝子の各コピーにおける各多形部位でヌクレオチドの位相配列を同定することを含む。 遺伝子の両コピーについてハプロタイプ決定する場合、同定ステップは、好ましくは

50

別個の容器に収容した遺伝子の各コピーにより実施する。しかし、2つのコピーが異なるタグ標識で標識してあるか、またはさもなくば別々に識別し得るかもしくは同定し得る場合、ある場合には同じ容器中でこの方法を実施することが可能であるとも想定し得る。たとえば、遺伝子の第一および第二コピーをそれぞれ異なる第一および第二蛍光色素により標識し、さらに第三の異なる蛍光色素で標識した対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを使用して多形部位（1または複数部位）をアッセイする場合、第一および第三色素の組合せを検出することで第一遺伝子コピー中の多形を同定し、一方、第二および第三色素の組合せを検出することで第二遺伝子コピー中の多形を同定する。

【0081】

遺伝子型決定法およびハプロタイプ決定法の両方法において、多形部位（1または複数部位）でのヌクレオチド（またはヌクレオチド対）の同一性は、多形部位（1または複数部位）を含む標的領域（1または複数箇所）を I L - 1 遺伝子の 1 コピーもしくは両コピーまたはそのフラグメントから直接增幅することにより判定し、増幅した領域（1または複数箇所）の配列は常套法で決定する。当業者であれば容易に認めるように、同じヌクレオチドは当該部位でホモ接合である個体における多形部位で 2 回検出し、一方、2つの異なるヌクレオチドは該個体が当該部位に対してヘテロ接合である場合に検出される。該多形は直接同定し得るものであり、陽性型同定として知られるか、または推論して陰性型同定という。たとえば、S N P が対照母集団においてグアニンとシトシンであることが分かっている場合、一つの部位は当該部位でホモ接合である個体すべてについてグアニンまたはシトシンのいずれかであると明確に判定し得るし、個体が当該部位でヘテロ接合である場合には、グアニンおよびシトシンの両方であると判定し得る。あるいは、該部位はグアニンではない（したがって、シトシン / シトシン）か、またはシトシンではない（したがって、グアニン / グアニン）と否定的に判定し得る。

10

【0082】

さらに、本明細書に記載した新規多形部位のいずれかに存在する対立遺伝子の同一性は、対象である該多形部位と連鎖不平衡にあるここには記載していない多形部位を遺伝子型決定することにより間接的に判定することができる。1部位に特定の変異体が存在し、第二部位のもう一つの変異体の予測可能性を高めるならば、2つの部位は連鎖非平衡であると言われる。参照：Stevens, Mol. Diag., Vol. 4, pp. 309-317 (1999)。ここに開示された多形部位と連鎖不平衡にある多形部位は、該遺伝子の領域に、またはここでは試験していない他のゲノム領域に位置し得る。ここに記載した新規多形部位と連鎖不平衡にある多形部位の遺伝子型決定は、限定されるものではないが、多形部位での対立遺伝子の同一性を検出する上記方法のいずれかにより実施し得る。

20

【0083】

標的領域（1または複数箇所）はオリゴヌクレオチド配向増幅法、たとえば、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）（米国特許第 4,965,188 号公報）、リガーゼ連鎖反応（L C R）（参照：Barany et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, Vol. 88, pp. 189-193 (1991)；国際特許出願 W O 90/01069 号公報）、およびオリゴヌクレオチド連結反応アッセイ（O L A）（参照：Landegren et al., Science, Vol. 241, pp. 1077-1080 (1988)）などにより増幅し得る。かかる方法においてプライマーまたはプローブとして有用なオリゴヌクレオチドは、多形部位を含むかあるいはそこに隣接する核酸の領域に特異的にハイブリッド形成する。典型的には、該オリゴヌクレオチドはその長さが 10 個ないし 35 個のヌクレオチドであり、好ましくは 15 個ないし 30 個のヌクレオチドからなる。最も好ましくは、該オリゴヌクレオチドは 20 個～25 個のヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドの確かな長さは、当業者が通常考え、また実施する際の多くのファクターに左右される。

30

【0084】

他の既知核酸増幅手法を使用して標的領域を増幅することができるが、その手法としては転写にもとづく増幅システム（参照：米国特許第 5,130,238 および 5,169,766 号公報；欧州特許 E P 329,822 号公報；および国際特許 W O 89/06700

40

50

号公報)および等温法である。参照: Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 392-396 (1992)。

【0085】

標的領域における多形は、技術上既知の数種のハイブリッド形成にもとづく方法の一つにより、増幅の前または後にアッセイすることもできる。典型的には、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドをかかる方法の実施に利用する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは異なる標識化プローブ対として使用可能であり、その場合、対の一方は標的配列の1変異体に完全な合致を示し、他方は別の変異体に完全な合致を示す。一部態様において、1ヶ所を超える多形部位が対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド対のセットを用い、一度に検出し得る。好ましくは、セットのメンバーは、検出すべき多形部位のそれぞれにハイブリッド形成したときに、互いに5以内の融点、より好ましくは2以内の融点を有する。10

【0086】

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの標的オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成は、両因子を溶液として実施するか、またはかかるハイブリッド形成はオリゴヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドが固体支持体に共有結合として、または非共有的に附着する場合に実施し得る。附着には、たとえば、抗体-抗原相互作用、ポリ-L-Lys、ストレプトアビジンまたはアビジン-ビオチン、塩橋、疎水性相互作用、化学的結合、UV架橋ベーキングなどが仲介する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは固体支持体上で直接合成するか、または合成に続いて固体支持体に附着させ得る。本発明の検出法での使用に適する固体支持体は、シリコン、ガラス、プラスチック、紙などで作られた基板であり、たとえば、ウエル(96穴プレートなどの)、スライド、シート、膜、ファイバー、チップ、皿、およびビーズなどに加工し得るものである。固体支持体は処理、被覆または誘導化して対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドまたは標的核酸の固相化を容易にすることができる。20

【0087】

個体のIL-1遺伝子の遺伝子型またはハプロタイプは、該遺伝子のコピーの一方または両方を含む核酸サンプルを、国際特許出願WO 95/11995に記載されているような核酸アレイおよびサブアレイにハイブリッド形成させることによっても判定し得る。該アレイは遺伝子型またはハプロタイプに含まれているはずの多形部位のそれぞれを提示する一連の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含む。30

【0088】

多形の同一性はミスマッチ検出技法を用いても判定し得る; 該方法は限定されるものではないが、リボプローブを用いるRNアーゼ保護法(参照: Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 7575 (1985); and Meyers et al., Science, Vol. 230, p. 1242 (1985))および大腸菌mutSタンパク質などのヌクレオチドミスマッチを認識するタンパク質を用いる方法などである。参照: Modrich, Ann. Rev. Genet., Vol. 25, pp. 229-253 (1991)。別法として、変異体対立遺伝子は一本鎖コンホメーション多形(SSCP)解析(参照: Orita et al., Genomics, Vol. 5, pp. 874-879 (1989); and Humphries et al., Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Elles, Ed., pp. 321-340 (1996))または変性勾配ゲル電気泳動法(DGGE)によって同定し得る。参照: Wartell et al., Nucl. Acids Res., Vol. 18, pp. 2699-2706 (1990); and Sheffie Id et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 232-236 (1989)。40

【0089】

また、ポリメラーゼ仲介プライマー伸張法を用いて多形を同定することもできる。かかる方法の幾つかは特許および科学文献に記載されており、“遺伝的ピット分析”法(国際特許出願WO 92/15712号公報)およびリパーぜ/ポリメラーゼ仲介遺伝的ピット分析(米国特許第5,679,524号公報)を包含する。関連方法は国際特許出願WO 91/02087、WO 90/09455、WO 95/17676、米国特許第5,302,509および5,945,283号公報に開示されている。多形を含む伸張プライマーは米50

国特許第5,605,798号公報に記載されているように質量分析法により検出し得る。もう一つのプライマー伸張法は対立遺伝子特異的PCRである。参照: Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Vol. 17, p.8392 (1989); Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Vol. 19, pp. 6877-6882 (1991); WO93/22456; および Turki et al., J. Clin. Invest., Vol. 95, pp. 1635-1641 (1995)。さらに、多重多形部位はワレイスら (Wallace et al. (WO 89/10414)) が記載しているように、対立遺伝子特異的プライマーのセットを用いて核酸の多重領域を同時に増幅することにより検討し得る。

【0090】

好適な態様において、各民族的地理的群についてのハプロタイプ頻度データは、それがハーディ - ワインバーグ平衡と矛盾がないかを判定するために試験した。ハーディ - ワインバーグ平衡 (参照: Hartl et al., Principles of Population Genomics, Sinauer Associates, 3rd Edition, Sunderland, MA (1997)) は、ハプロタイプ対 H_1 / H_2 を見出す頻度が、もし $H_1 = H_2$ であれば、 $P_{H-W}(H_1 / H_2) = 2p(H_1)p(H_2)$ に等しく、もし $H_1 \neq H_2$ であれば $P_{H-W}(H_1 / H_2) = p(H_1)p(H_2)$ に等しいと仮定する。観察されるハプロタイプ頻度と予測されるハプロタイプ頻度との間の統計的有意差は、母集団における有意な近親交配、遺伝子に対する強い選択圧、サンプル採取の偏り、および / または遺伝子型決定過程における誤差などの1つ以上のファクターによるものである。もしハーディ - ワインバーグ平衡から大きな偏差が民族的地理的群に観察されるならば、その偏差がサンプル採取の偏りによるものかどうかを見るために、その群の個体数を増加させることができる。サンプルサイズを大きくしても観察されるハプロタイプ対の頻度および予測される頻度間の差が小さくならない場合には、直接的ハプロタイプ決定法、たとえば、クラスパー・システム (CLASPER SystemTM) 技法 (米国特許第5,866,404号明細書)、SMS または対立遺伝子特異的長距離PCRなどを使用して、個体のハプロタイプ決定を考慮してもよい。参照: Michalotos-Beloin et al., Nucl. Acids Res., Vol. 24, pp. 4841-4843 (1996)。

【0091】

IL-1 ハプロタイプ対を予知するこの方法の一態様において、対応させるステップは以下の解析を実施することからなる。先ず、可能性のあるハプロタイプ対のそれぞれを対照母集団のハプロタイプ対と比較する。一般に、対照母集団におけるハプロタイプ対の一つのみが可能性のあるハプロタイプ対と合致し、その対をその個体に対応させる。時により、対照ハプロタイプ対に提示される唯一のハプロタイプは、個体に対し可能性のあるハプロタイプ対と矛盾せず、そのような場合には、個体にはこの既知のハプロタイプと新しいハプロタイプを含むハプロタイプ対を対応させる; 新しいハプロタイプは可能性のあるハプロタイプ対から既知のハプロタイプを差し引くことにより誘導されるものである。希な事例において、対照母集団には可能性のあるハプロタイプ対と調和するハプロタイプは存在しない; あるいは多重対照ハプロタイプ対は可能性のあるハプロタイプ対と矛盾しない。かかる事例において、個体は好ましくは、直接分子ハプロタイプ決定法、たとえば、クラスパー・システム (CLASPER SystemTM) 技法 (米国特許第5,866,404号明細書)、SMS または対立遺伝子特異的長距離PCRなどを使用してハプロタイプ決定する。参照: Michalotos-Beloin et al., 上記。

【0092】

【表 1 3】

[用語集]	
対立遺伝子	特異的な染色体位置（遺伝子座）での遺伝子またはDNA配列の特定の形状。
抗体	ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖およびヒト化抗体、ならびにFabフラグメント、たとえば、Fabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を包含。
候補遺伝子	疾患、症状または処置への応答の原因であると、またはこれらの一 つに相關すると仮定される遺伝子。
完全遺伝子型	一個体において、一対の相同染色体上の遺伝子座の既知多形部位のすべてに見出されるヌクレオチド対の非位相5'から3'への配列。 10
完全ハプロタイプ	一個体において、一個の染色体上遺伝子座の既知多形部位のすべてに見出されるヌクレオチドの5'から3'への配列。
遺伝子	RNA産物の制御された生合成について情報のすべてを含むDNAのセグメントであって、プロモーター、エクソン、イントロン、および発現を制御するその他の非翻訳領域を含む。
遺伝子型	一個体において、一対の相同染色体上の遺伝子座の1ヶ所以上の多形部位に見出されるヌクレオチド対（1または複数個）の非位相5'から3'への配列。本明細書で使用する場合、遺伝子型は完全遺伝子型および／または下記のサブ遺伝子型を含む。 20
遺伝子型決定	個体の遺伝子型を決定する過程。
ハプロタイプ	一個体からの单一染色体上遺伝子座における1ヶ所以上の連鎖多形部位に見出されるヌクレオチドの5'から3'への配列。
ハプロタイプデータ	特定の遺伝子に関する1つ以上の以下の情報：集団内の各個体におけるハプロタイプ対の一覧表示；集団内の異なるハプロタイプの一覧表示；当該集団または他の集団における各ハプロタイプの頻度、および1つ以上のハプロタイプと形質間の何らかの既知の関連性。
ハプロタイプ対	一個体において遺伝子座に見出される2つのハプロタイプ。
ハプロタイプ決定	個体の1つ以上のハプロタイプを決定する過程であり、家族系統、分子技法および／または統計的推論を使用することからなる。 30

【表 14】

同族体	対照配列に対し、高度の配列関連性をもつポリヌクレオチドまたはポリペプチドを示すために技術上使用する一般用語。かかる関連性は前記定義の 2 つの配列間の同一性および／または類似性の度合いを決定することにより定量し得る。この一般用語に含まれるものは“オルソログ”および“パラログ”という用語である。	
同一性	当該配列に比較することにより判定される 2 つ以上のポリペプチド配列間、または 2 つ以上のポリヌクレオチド配列間の関連性。一般に、同一性とは、比較する配列の全長にわたり、2 つのポリヌクレオチドまたは 2 つのポリペプチド配列について、それぞれヌクレオチドとヌクレオチドまたはアミノ酸とアミノ酸が正確に対応することをいう。	10
イソ型	遺伝子、mRNA、cDNA またはそれらがエンコードするタンパク質の特定の形状であって、その特定の配列および／または構造により他の形状から識別される形状。	
イソ遺伝子	集団内に見出されるイソ型遺伝子の一つ。イソ遺伝子は遺伝子の特定のイソ型に存在する多形のすべてを含む。	
単離された	RNA、DNA、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質などの生体分子に適用される場合、単離されたとは分子が他の生体分子、たとえば、核酸、タンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質、たとえば、細胞碎片および増殖培地などを実質的に含まないことを意味する。一般に、“単離された”という用語はかかる物質が本発明の方法を実質的に妨害する量として存在するものでない限り、それらが完全に存在しないとか、水、バッファー、または塩が存在しないと言おうとするものではない。	20
連鎖	同じ染色体上、遺伝子の所在の結果として共に遺伝する遺伝子の傾向を説明；遺伝子座間の再組合せをパーセントにより評価。	
連鎖不平衡	遺伝的マーカーのある組合せが、それらの距離間隔から予測されるよりも、その集団において多少高頻度で起こる状況を説明。これは一群のマーカーが協調的に遺伝したことを意味する。これは該領域において再組合せの減少したことから、または創始効果から生じ得るものであり、そこではマーカーの 1 つが集団内に導入されたために、平衡に達する時間が不十分であった。	30
遺伝子座	遺伝子または物理的もしくは表現型の特徴に相当する染色体または DNA 分子上の位置。	

【表15】

修飾塩基

たとえば、トリチル化塩基およびイノシンなどの非日常的塩基を含む。様々な修飾がDNAとRNAになし得る；したがって、ポリヌクレオチドは自然界に一般的に見出されるような化学的、酵素的または代謝により修飾された形状、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形状を包含する。ポリヌクレオチドはまた比較的短鎖のポリヌクレオチドを包含し、しばしばこれをオリゴヌクレオチドという。

天然産

この用語を適用する対象が天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドであり、自然界を起源として単離可能であり、人為的に修飾していないことを示すために使用する用語。

10

ヌクレオチド対

個体からの染色体の2つのコピー上の多形部位に認められるヌクレオチド。

オルソログ

他の種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと機能的等価物であるポリヌクレオチドまたはポリペプチド。

パラログ

同じ種内で機能的に類似しているポリヌクレオチドまたはポリペプチド。

位相

遺伝子座の2ヶ所以上の多形部位に対してヌクレオチド対の配列に適用されるように、位相とは遺伝子座の單一コピー上のこれら多形部位に存在するヌクレオチドの組合せが既知であることを意味する。

20

【表 1 6】

多形部位 (P S)	少なくとも 2 つの代わり得る配列が集団内に見出される遺伝子座内の位置 ; その最高の頻度は 9 9 % を超えない。	
多形変異体	遺伝子、 m R N A 、 c D N A 、ポリペプチドまたはペプチドであつて、そのヌクレオチドまたはアミノ酸配列がその遺伝子に多形の存在することにより対照配列と異なっているもの。	
多形	集団中 > 1 % の頻度で存在する配列変異体。個体中多形部位に観察される配列変化。多形はヌクレオチドの置換、挿入、欠失およびマイクロサテライトを含み、遺伝子発現またはタンパク質機能に検出可能な差異を生じ得るが、必ずではない。	10
多形データ	特定の遺伝子に関する 1 つ以上の以下の情報 : 多形部位の位置 ; これらの部位での配列変化 ; 1 つ以上の集団における多形の頻度 ; 該遺伝子について決定した異なる遺伝子型および / またはハプロタイプ ; 1 つ以上の集団における 1 種以上のこれらの遺伝子型および / またはハプロタイプの頻度 ; 該遺伝子についての形質および遺伝子型またはハプロタイプ間の既知の関連性。	
多形データベース	系統的または組織的方法で整理し、また電子的または他の手段で個々にアクセスし得る多形データの収集。	
ポリヌクレオチド	R N A または D N A であつて、未修飾または修飾した R N A または D N A でもよい。ポリヌクレオチドについて制限はないが、一本鎖および二本鎖 D N A 、一本鎖および二本鎖領域の混合物である D N A 、一本鎖および二本鎖 R N A 、一本鎖および二本鎖領域の混合物である R N A 、一本鎖であるか、またはより典型的には二本鎖であるか、または一本鎖および二本鎖領域の混合物でもよい D N A および R N A からなるハイブリッド分子を含む。さらに、ポリヌクレオチドは R N A もしくは D N A または R N A と D N A の両方を含む三本鎖領域をいう。また、ポリヌクレオチドという用語は、 1 個以上の修飾塩基を含む D N A または R N A 、および安定化のため、もしくはその他の理由で修飾した基本構造をもつ D N A または R N A を含む。	20

【表 1 7】

ポリペプチド	2 個以上のアミノ酸がペプチド結合または修飾したペプチド結合 (すなわち、アイソスター) により互いに結合したアミノ酸からなるポリペプチド。ポリペプチドとは短鎖のもの (一般に、ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーという) および長鎖のもの (一般に、タンパク質をいう) 両方をいう。ポリペプチドは 20 種の遺伝子エンコードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでいてもよい。ポリペプチドは翻訳後プロセシングなどの自然の過程により、または技術的に周知の化学的修飾技法により修飾したアミノ酸配列を含む。かかる修飾は基礎の教科書に十分に、またより詳細な研究論文ならびに夥しい研究書に記載されている。	40
集団群	共通の特性、たとえば、民族的地理的起源、医療条件、処置に対する応答などの特性を分け持つ個体群。	
対照集団	集団群の 1 つ以上の特性を象徴していると予告される被験者または個体の群。典型的には、対照集団は確実性のレベルが少なくとも 8 5 % 、好ましくは少なくとも 9 0 % 、より好ましくは 9 5 % 、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % で集団内の遺伝的変異を示す。	

【表 18】

単一ヌクレオチド
多形 (S N P)

集団内でのゲノム單一ヌクレオチド位置におけるヌクレオチド可変性の出現。S N Pは遺伝子内に、またはゲノムの遺伝子間領域内に出現し得る。S N Pは対立遺伝子特異的増幅 (A S A) を用いてアッセイし得る。この方法では、少なくとも3つのプライマーを必要とする。アッセイすべき多形に逆の補体には1つの共通のプライマーが使用される。この共通のプライマーは多形塩基からの5'ないし1500 bpの間に存在し得る。他の2つ(またはそれ以上)のプライマーは互いに同一であるが、ただし、終末3'塩基は多形を構成する2つ(またはそれ以上)の対立遺伝子の一方に合致するためにゆらぐ。次いで2回(またはそれ以上)のP C R反応をサンプルD N Aについて実施するが、それぞれ該共通のプライマーと対立遺伝子の一方を使用する。

スプライスバリエント

同じゲノムD N A配列から当初転写されたR N A分子から生じるが、代わりのR N Aスプライシングを受けているc D N A分子。代わりのR N Aスプライシングは、一次R N A転写物がイントロン除去のためにスプライシングを受け、結果として、それぞれ異なるアミノ酸配列をエンコードし得る1種を超えるm R N A分子を產生する。“スプライスバリエント”という用語はまた上記c D N A分子がエンコードするタンパク質をもいう。

サブ遺伝子型

一個体において、一対の相同性染色体上の遺伝子座において、既知多形部位のサブセットに見られるヌクレオチドの非位相5'から3'への配列。

サブハプロタイプ

一個体からの单一染色体上の遺伝子座において、既知多形部位のサブセットに見られるヌクレオチドの5'から3'への配列。

被験者

ヒト個体であって、その遺伝子型またはハプロタイプまたは処置もしくは病状に対する応答を判定すべき個体。

処置

被験者に内的または外的に与える刺激。

非位相

遺伝子座の2ヶ所以上の多形部分に対しヌクレオチド対の配列に適用されるように、非位相とは遺伝子座の單一コピー上のこれら多形部位に存在するヌクレオチドの組合せが未知であることを意味する。

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

10

20

30

【0093】

[引用文献]

本明細書に引用した文献は、それぞれ個々の出版物または特許または特許出願が具体的かつ個別的にその全文を目的の如何を問わず参照により取込むことを表明したと同様の程度に、すべてその全文を目的の如何を問わず参照により本明細書の一部とする。本明細書の文献についての考察は、これらの著者がなした主張を要約しようとしただけのものであり、いずれの文献も先行技術を構成すると認めたものではない。出願人は引用文献の正確さおよび適切さについて争う権利を保有する。

【0094】

さらに、本明細書中に引用したジェンバンク受託番号、ユニジーン・クラスター番号およびタンパク質受託番号は、それぞれのかかる番号が具体的かつ個別的にその全文を目的の如何を問わず参照により取込むことを表明したと同様の程度に、すべてその全文を目的の如何を問わず参照により本明細書の一部とする。

40

50

【0095】

本出願に記載した特定の態様は、本発明の個々の側面を単に説明するためのものであつて、本発明を制限しようとするものではない。当業者にとって明らかのように、本発明ではその精神と範囲から逸脱することなく、多くの改良および変更をなし得る。本明細書に列挙したことに加えて、本発明の範囲内で機能的に等価な方法および装置が、これまでの記載と添付の図面から、当業者には明らかである。かかる改良および変更も添付の請求項の範囲内に包含されるものとする。本発明は添付の請求項によってのみ制限されるものであり、その請求項に等価のすべての範囲とともにかかる請求項には権利がある。

【図面の簡単な説明】

【0096】

10

【図1】RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均総コレステロールレベル。

【図2】RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均総コレステロールレベル。

【図3】RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均HDLコレステロールレベル。

【図4】RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均HDLコレステロールレベル。

【図5】RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均LDLコレステロールレベル。

20

【図6】RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均LDLコレステロールレベル。

【図1】

【図2】

図1 RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均総コレステロールレベル

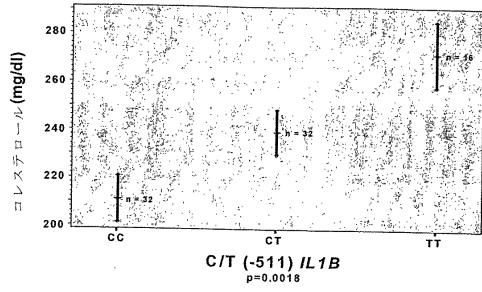
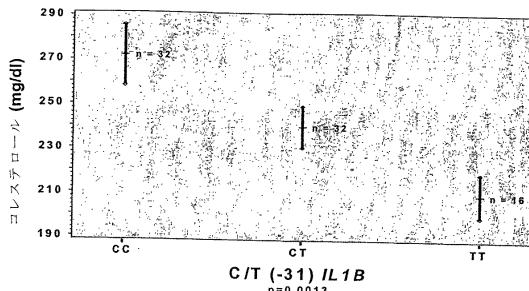
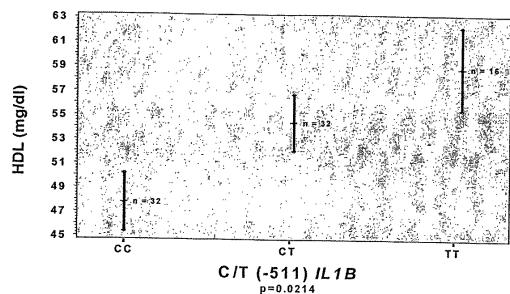


図2 RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31)IL-1 β CC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均総コレステロールレベル



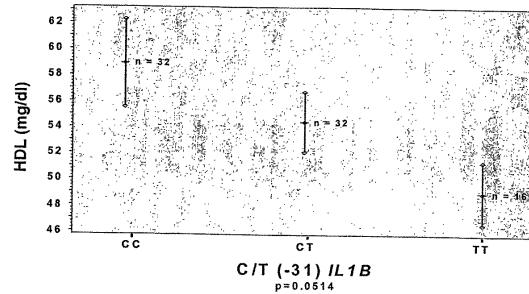
【図3】

図3 RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511) IL-1 β CCC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均HDLコレステロールレベル



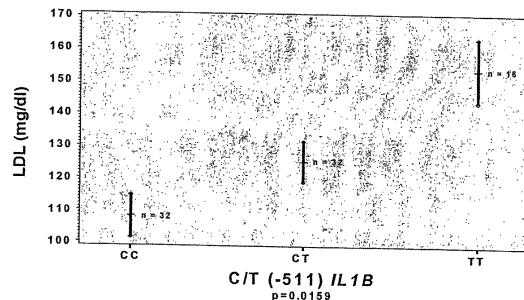
【図4】

図4 RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31) IL-1 β CCC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均HDLコレステロールレベル



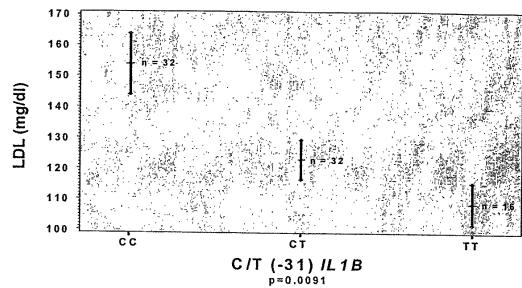
【図5】

図5 RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-511) IL-1 β CCC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均LDLコレステロールレベル



【図6】

図6 RAD B251臨床試験内でまとめたすべての処置群における(-31) IL-1 β CCC、CTまたはTT遺伝子型と比較したLS平均LDLコレステロールレベル



【配列表】

0004575775000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 スリダル・クダラヴァリ
アメリカ合衆国 6 0 6 1 5 イリノイ州シカゴ、アパートメント 4 0 5、イースト・ハイド・パーク
・ブルーバード 1 4 0 1 番
- (72)発明者 ミハエル・フリストス・ポリメロプロス
アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州ボトマック、リッジ・ミスト・テラス 1 1 3 0 0 番
- (72)発明者 ロサレリス・トレス
アメリカ合衆国 2 0 8 1 4 メリーランド州ベセズダ、キング・チャールズ・ウェイ 5 3 1 7 番
- (72)発明者 カート・ダグラス・ウルフガング
アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州ジャーマンタウン、ニアワインダー・プレイス 1 3 3
3 1 番

審査官 上條 肇

- (56)参考文献 國際公開第 0 0 / 0 7 2 0 1 5 (WO , A 1)
Nature, Vol.404(2000)p.398-402
血栓と循環, Vol.7, No.2(1999)p.164-168

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
C12N 15/09 - 15/28
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed