

(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2008-512099

(P2008-512099A)

(43) 公表日 平成20年4月24日(2008.4.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 7 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-530539 (P2007-530539)	(71) 出願人	507074122
(86) (22) 出願日	平成17年8月31日 (2005.8.31)		テレソン インスティテュート フォー
(85) 翻訳文提出日	平成19年4月11日 (2007.4.11)		チャイルド ヘルス リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2005/001325		オーストラリア ウェスタン オーストラ
(87) 国際公開番号	W02006/026807		リア州 スピアコ ロバーツ ロード 1
(87) 国際公開日	平成18年3月16日 (2006.3.16)		〇〇
(31) 優先権主張番号	60/607, 270	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成16年9月7日 (2004.9.7)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
(31) 優先権主張番号	2004905098		弁理士 新見 浩一
(32) 優先日	平成16年9月7日 (2004.9.7)	(72) 発明者	ホルト パトリック
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		オーストラリア ウェスタン オーストラ
			リア州 ネドランド モナシュ アベニュー 22
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 アレルギー性疾患の処置または予防のための物質

(57) 【要約】

本発明は動物におけるアレルギー性疾患を処置または予防できる物質およびこれらの物質をスクリーニングするための方法に関する。特に、本発明は

(a) 核酸の発現レベルが、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの高い哺乳動物とは異なるように、アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、発現が変調されている単離された核酸分子であって、核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、または

(b) (a) の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、または

(c) (a) もしくは (b) の核酸とストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、

を含む単離された核酸分子に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 核酸の発現レベルが、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように、アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、発現が変調されている単離された核酸分子であって、核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、または

(b) (a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、または

(c) (a)もしくは(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、

を含む単離された核酸分子。

10

【請求項 2】

アレルギー関連遺伝子である、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

アレルギー関連遺伝子が、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHまたはそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項2記載の単離された核酸分子。

【請求項 4】

アレルギー関連遺伝子がKRT1、PECAM1またはPLXDC1である、請求項2記載の単離された核酸分子。

20

【請求項 5】

哺乳動物がヒトまたは家畜、愛玩動物、または動物園の動物である、請求項1～4のいずれか一項記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

アレルギー状態の治療または予防のために使用する、

(a) 核酸の発現レベルが、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように、アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、発現が変調されている単離された核酸分子であって、核酸は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される配列を含む、または核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、

30

(b) (a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、および

(c) (a)または(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、

からなる群より選択される単離された核酸分子。

【請求項 7】

請求項1～6のいずれか一項記載の単離された核酸分子によりコードされる単離されたポリペプチド分子。

40

【請求項 8】

アレルギー状態の治療または予防のために使用する、請求項1～6のいずれか一項記載の核酸分子によりコードされる単離されたポリペプチド分子。

【請求項 9】

薬学的に許容されるキャリアと共に、

i) 核酸の発現レベルが、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように、アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、発現が変調されている単離された核酸分子であって、核酸は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、KRT1、LNPEP、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、RA

50

B27B、GNG8、およびGJB2からなる群より選択される配列を含む、もしくは核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、または

(ii)(a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、

(iii)(a)もしくは(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、または

(iv)(a)、(b)もしくは(c)の核酸によってコードされる単離されたポリペプチド分子、を含む治療的または予防的組成物。

【請求項 10】

10

核酸分子がアレルギー関連遺伝子である、請求項9記載の治療的または予防的組成物。

【請求項 11】

アレルギー関連遺伝子が、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHまたはそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項10記載の治療的または予防的組成物。

【請求項 12】

アレルギー関連遺伝子が、KRT1、PECAM1またはPLXDC1である、請求項10記載の治療的または予防的組成物。

【請求項 13】

キャリアが、滅菌水、リン酸ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項10～12のいずれか一項記載の治療的または予防的組成物。

20

【請求項 14】

アレルギー状態を治療または予防するために使用する、

(a)核酸の発現レベルが、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように、アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、発現が変調されている単離された核酸分子であって、核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、または

30

(b)(a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、または

(c)(a)もしくは(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、または

(d)(a)、(b)もしくは(c)の核酸によってコードされる単離されたポリペプチド分子、を含む単離された核酸分子。

【請求項 15】

cig5 フォワード: 5'CAAGACCGGGGAGAATACCTG3' (SEQ ID NO:1)

cig5 リバース : 5'GCGAGAATGTCCAAATACTCACC3' (SEQ ID NO:2),

IFIT4 フォワード: 5'GAGTGAGGTCACCAAGAATTC3' (SEQ ID NO:3)

IFIT4 リバース : 5'CACTCTATCTTCTAGATCCCTTGAGA3' (SEQ ID NO:4),

LAMP3 フォワード: 5'GCGTCCCTGGCCGTAATTT3' (SEQ ID NO:5)

LAMP3 リバース : 5'TGGTTGCTTAGCTGGTTGCT3' (SEQ ID NO:6),

10

DACT1 フォワード: 5'AACTCGGTGTTTCAGTGAGTGT3' (SEQ ID NO:7)

DACT1 リバース : 5'GGAGAGGGAACGGCAAACCT3' (SEQ ID NO:8),

IL17RB フォワード: 5'TGTGGAGGCACGAAAGGAT3' (SEQ ID NO:9)

IL17RB リバース : GATGGGTAAACCACAAGAACCT3' (SEQ ID NO:10),

KRT1 フォワード: 5'TCAATCTCGGTTGGATTCGGA3' (SEQ ID NO:11)

20

KRT1 リバース : 5'CTGCTTGGTAGAGTGCTGTAAGG3' (SEQ ID NO:12),

LNPEP フォワード: 5'TTCACCAATGATCGGCTTCAG3' (SEQ ID NO:13)

LNPEP リバース : 5'CTCCATCTCATGCTCACCAAG3' (SEQ ID NO:14),

MAL フォワード: 5'TCGTGGGTGCTGTGTTTACTCT3' (SEQ ID NO:15)

MAL リバース : 5' CAGTTGGAGGTTAGACACAGCAA3' (SEQ ID NO:16),

30

NCOA3 フォワード: 5'CCTGTCTCAGCCACGAGCTA3' (SEQ ID NO:17)

NCOA3 リバース : 5'TCCTGAAAGATCATGTCTGGTAA3' (SEQ ID NO:18),

OAZ フォワード: 5'TCAATTTACACCTGCGATCACTG3' (SEQ ID NO:19)

OAZ リバース : 5'GTTGTGGGTCGTCATCACCA3' (SEQ ID NO:20),

PECAM1 フォワード: 5'AGTCCAGATAGTCGTATGTGAAATGC3' (SEQ ID NO:21)

PECAM1 リバース : GGTCTGTCCTTTTATGACCTCAAAC3' (SEQ ID NO:22),

40

PLXDC1 フォワード: 5'CCTGGGCATGTGTCAGAGC3' (SEQ ID NO:23)

PLXDC1 リバース : 5'GGTGTGGAGAGTATTGTGTGG3' (SEQ ID NO:24),

RASGRP3 フォワード: 5'TCAGCCTCATCGACATATCCA3' (SEQ ID NO:25)

RASGRP3 リバース : 5'TCAGCCAATTCAATGGGCTCC3' (SEQ ID NO:26),

SLC39A8 フォワード: 5'GCAGTCTTACAGCAATTGAACTTT3' (SEQ ID NO:27)

SLC39A8 リバース : 5'CCATATCCCCAACTTCTGAA3' (SEQ ID NO:28),

10

XBP1 フォワード: 5'GTAGATTTAGAAGAAGAGAACC AAAAC3' (SEQ ID NO:29)

XBP1 リバース : 5'CCCAAGCGCTGTCTTA ACTC3' (SEQ ID NO:30),

NDFIP2 フォワード: 5'AGTGGGGAATGATGGCATTTT3' (SEQ ID NO:31)

NDFIP2 リバース : AAATCCGCAGATAGCACCA3' (SEQ ID NO:32),

RAB27B フォワード: 5'CAGAACTGGATGAGCCAACT3' (SEQ ID NO:33)

20

RAB27B リバース : 5'GACTTCCCTCTGATCTGGTAGG3' (SEQ ID NO:34),

243610_at フォワード: 5'TGCATTGACAACGTACTCAGAA3' (SEQ ID NO:35)

243610_at リバース : 5'TCATCTTGACAGGGATAAGCAT3' (SEQ ID NO:36),

GNG8 フォワード: 5'GAACATCGACCGCATGAAGGT3' (SEQ ID NO:37)

GNG8 リバース : 5'AGAACACAAAAGAGGCGCTTG3' (SEQ ID NO:38),

30

GJB2 フォワード: 5'GCTTCCTCCCGACGCAGA3' (SEQ ID NO:39)

GJB2 リバース : 5'AACGAGGATCATAATGCGAAA3' (SEQ ID NO:40),

1556097_at フォワード: 5'TCTTATTTCACTTTCTCAACTCATCA3' (SEQ ID NO:41)

1556097_at リバース : 5'GGCATAACCTGAATGTATAATTCAA3' (SEQ ID NO:42),

242743_at フォワード: 5'GAAAAAGCTGTTGAGTGAAGAAGACT3' (SEQ ID NO:43)

242743_at リバース : 5'TGCAGGATGAGCAATGCTGAGA3' (SEQ ID NO:44),

40

および

CISH フォワード: 5'GGGAATCTGGCTGGTATTGG3' (SEQ ID NO:45)

CISH リバース : 5'TTCTGGCATCTTCTGCAGGTGTT3' (SEQ ID NO:46)

からなる群より選択される、核酸の発現レベルが、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように、アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、発現が変調されている核酸分子の増幅のための、プライマーセット。

50

【請求項 16】

cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に同定された、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、少なくとも1つの遺伝子の、1領域に特異的な1つまたは複数のプライマーを含む、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング用キット。

【請求項 17】

プライマーセットが請求項15に定義されている、請求項16記載のキット。

10

【請求項 18】

cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される遺伝子、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子、またはこれらの遺伝子の2つもしくはそれ以上の組み合わせの発現を調節するために十分な量の治療的または予防的物質を哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防する方法。

【請求項 19】

20

物質が、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む1つもしくは複数の遺伝子、またはこれらの遺伝子の2つもしくはそれ以上の組み合わせの発現のダウンレギュレーターである、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

遺伝子が、KRT₁、PECAM₁またはPLXDC₁である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

30

物質がcig5、IFIT4またはLAMP3の発現のアップレギュレーターである、請求項18記載の方法。

【請求項 22】

(a)哺乳動物から生体試料を提供する段階；
(b)試料中で、アレルギー性疾患に関連する1つまたは複数の特異的な遺伝子の活性化の程度を決定する段階；
(c)生体試料に候補物質を接触させる段階；および
(d)接触段階後に試料中の活性化の程度が変化するかどうかを決定する段階、
を含み、物質の非存在下で観察される場合と比較して、物質の非存在下で観察される活性化の程度が変化すれば、物質がアレルギー性疾患を処置または予防できることを示す、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング方法。

40

【請求項 23】

(a)哺乳動物から生体試料を提供する段階；
(b)1つまたは複数のアレルギー関連遺伝子のmRNA転写物のレベルを決定する段階であって、遺伝子はcig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、段階；
(c)生体試料を物質に接触させる段階；および

50

(d) 接触段階後に試料中のmRNA転写物のレベルが変化するかどうかを決定する段階を含み、物質のない場合と比較して物質の接触後に試料中のmRNA転写物のレベルが変化すれば、物質がアレルギー性疾患を処置または予防できることを示す、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 4】

(a) 哺乳動物から生体試料を得る段階；

(b) *cig5*、*IFIT4*、*LAMP3*、*DACT1*、*IL17RB*、*KRT1*、*LNPEP*、*MAL*、*NCOA3*、*OAZ*、*PECAM1*、*PLXDC1*、*RASGRP3*、*SLC39A8*、*XBP1*、*NDFIP2*、*RAB27B*、*GNG8*、*GJB2*および*CISH*からなる群より選択される、またはそれぞれプローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、またはそれらの組み合わせである1つまたは複数の遺伝子由来のmRNA転写物の試料中のレベルを決定する段階；および
(c) mRNA転写物またはタンパク質の有無を補正する治療用モジュレーターを選択する段階

10

、を含むアレルギー性疾患に罹患するまたはそれを発症する素因がある哺乳動物の処置のために適当な治療剤を選択する方法。

【請求項 2 5】

アレルギー関連遺伝子が、アトピー性個体由来のアレルゲン抗原投与PBMCにおいてアップレギュレートされているが、そのアレルゲンにアレルギー性ではない個体由来のPBMCにおいて、アップレギュレートされるとしてもわずかである、請求項22～24のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 2 6】

遺伝子が、*DACT1*、*IL17RB*、*KRT1*、*LNPEP*、*MAL*、*NCOA3*、*OAZ*、*PECAM1*、*PLXDC1*、*RASGRP3*、*SLC39A8*、*XBP1*、*NDFIP2*、*RAB27B*、*GNG8*、*GJB2*および*CISH*からなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子のうちの1つまたは複数である、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

遺伝子が、アトピー性個体においてアップレギュレートされており、かつ非アトピー性個体においてダウンレギュレートされている、請求項26記載の方法。

30

【請求項 2 8】

遺伝子が、*KRT1*、*PECAM1*または*PLXDC1*である、請求項27記載の方法。

【請求項 2 9】

アレルギー関連遺伝子が、非アトピー性個体由来のアレルゲン抗原投与PBMCにおいてダウンレギュレートされているが、アトピー性個体由来のPBMCにおいてはダウンレギュレートされていない、請求項22～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 0】

遺伝子が*cig5*、*IFIT4*および*LAMP3*からなる群より選択される、請求項29記載の方法。

【請求項 3 1】

遺伝子がアレルギー性疾患に関連している、請求項18～21のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 3 2】

mRNAが、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、またはマイクロチップ技術を利用した特異的な核酸アレイを用いて検出される、請求項23または24記載の方法。

【請求項 3 3】

生体試料がアトピー性哺乳動物から単離される、請求項22～30のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

生体試料が非アトピー性哺乳動物から単離される、請求項22～30のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 35】

生体試料が、血液、骨髓、血漿、血清、リンパ液、脳脊髄液、またはそれらの細胞もしくは液体成分；皮膚、呼吸器、小腸、および尿生殖器官の外部部分；涙液、唾液、または乳汁のような他の分泌物；組織または臓器生検試料；または培養細胞もしくは細胞培養上清からなる群より選択される、請求項22～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 36】

生体試料が血液もしくはリンパ液、またはそれらの細胞もしくは液体成分である、請求項22～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 37】

生体試料が、哺乳動物がアレルギー性である1つまたは複数のアレルゲンにインビトロで曝露することによって刺激された、骨髓由来の末梢血単核細胞(PBMC)である、請求項22～34のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項 38】

物質がsiRNA分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項18～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 39】

物質が、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2もしくはCISHからなる群より選択される遺伝子、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子の、コード領域に特異的にハイブリダイズし、かつ遺伝子の発現を阻害する、長さ8～50ヌクレオチド塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項38記載の方法。 20

【請求項 40】

物質がポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかである、請求項18～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 41】

抗体がヒト化モノクローナル抗体である、請求項40記載の方法。

【請求項 42】

物質が、 α ステロイド、 $\alpha\beta 2$ 拮抗薬、メチルキサンチン、ロイコトリエン修飾因子、抗コリン作動因子、全身性コルチコステロイド、または抗ヒスタミンである、請求項18～20のいずれか一項記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質、ならびにそれらの物質のスクリーニング方法に関する。本発明は、アレルギー患者において非アレルギー患者と比較して発現が異なる調節をされる遺伝子を提供する。これらの遺伝子にはそれ自体が新規のものもあるが、既知ではあるが以前にはアレルギー状態と関連付けられていなかったものもある。 40

【0002】

1つの態様では、本発明は、生体試料において特定のアレルギー関連遺伝子のmRNA転写物またはmRNAによってコードされたタンパク質を同定する段階、その生体試料を試験物質に曝露する段階、および試料中のmRNAまたは対応するタンパク質のレベルが接触させた段階以後に変化するかどうかを決定する段階を含む、喘息などのアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

本明細書に引用される、任意の特許または特許出願を含む全ての参考文献は参照により本明細書に組み入れられる。参考文献が先行技術であるとは認めない。参考文献の議論は、その著者らが主張することを述べるものであり、出願者らは引用された文献の正確性および適切性に異議を申し立てる権利を有する。本明細書にはいくつかの先行技術文献が参照されているが、その参照は、これらの文献のいずれもがオーストラリアまたは他の国で当技術分野における共通の一般的知識の一部を形成することを認めるものではないことは明らかだろう。

【0004】

喘息、アトピー性皮膚炎、高IgE症候群、およびアレルギー性鼻炎のようなアレルギー性疾患はヒトにおいて最も一般的で最も解析された免疫疾患のいくつかである。実際、アレルギー性疾患は米国では人口の約20%に見られる。

10

【0005】

アレルギー性疾患の現在の処置には、アレルゲンの回避、薬剤に基づく治療、および免疫療法が含まれる。アレルゲンを完全に回避することは最も論理的な手段であるが、これは大多数の場合において非常に困難であるか不可能である。抗ヒスタミン、ステロイド、 β アゴニスト、およびアドレナリンのような医用薬剤は有用であるが、これらはアレルギー症状を緩和するのみであり、その原因には影響を与えない。さらに薬学的処置は通常、特にステロイドの場合に、望ましくない副作用によって制限される。

【0006】

現在の免疫療法には、脱感作、特定の抗体による認識低下を目的としたアレルゲン改変、およびアレルゲン由来のペプチドの利用があり、これらは特定のB細胞とT細胞の間の同種相互作用に介入する。脱感作では、問題のアレルゲンの粗抽出物を、次第に用量を上げながら繰り返し注射する。アレルゲン抽出物を用いた処置は、アレルゲン関連の症状の緩和という点でクリニックでは適度に有効であることが示されており、アレルギークリニックで現在広く使用される一般的な治療法であるが、脱感作のメカニズムは不明である。さらに、アナフィラキシー性の副作用が重大または致死的でさえあり得るので、脱感作療法は非常に注意深く実施する必要がある。

20

【0007】

したがって、上述の治療法は全てアレルギー性疾患の処置に役割を果たしているが、現在、さらに有効な処置の必要性が当技術分野には残っている。残念ながら、これらの処置の開発は、アレルギーの原因論が未解明であるため、理解の欠如によって妨げられている。

30

【0008】

発明者らは、アレルギーの根底にあるメカニズムの理解を進め、それにより、より有効な治療法、およびヒトのような動物においてアレルギー性疾患を予防および/または処置することのできる物質のスクリーニング方法を開発できるようになったと考えている。

【発明の開示】

【0009】

発明の概要

発明者らは、アレルギー性疾患に罹患する動物由来の末梢血単核細胞(PMBC)において、新規の遺伝子および既知ではあるがアレルギー性疾患への関連が以前には示唆されていなかった遺伝子を含む、いくつかの遺伝子の発現の程度が変調されていることを見いだした。しかし、これらの遺伝子の発現は、アレルギー性疾患を有さない動物では異なる変調を受けているか、変調されていない。大部分の場合、観察される変調は、遺伝子のアップレギュレーションまたは発現の活性化だった；しかし、いくつかの場合には発現のダウンレギュレーションだった。

40

【0010】

第1の局面では、本発明は

(a)アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように発現

50

レベルが変調されている単離された核酸分子であって、核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、

(b)(a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、または

(c)(a)もしくは(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、

を提供する。

【0011】

本発明のこの局面は、(a)、(b)または(c)の核酸によってコードされる単離されたポリペプチド分子も提供する。

【0012】

本発明は、第2の局面で、

(i) アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように発現レベルが変調されている単離された核酸分子であって、核酸は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、KRT1、LNPEP、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、RAB27B、GNG8、およびGJB2からなる群より選択される配列を含む、もしくは核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、または

(ii)(a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、

(iii)(a)もしくは(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、または

(iv)(a)、(b)または(c)の核酸によってコードされる単離されたポリペプチド分子、を含む治療的または予防的組成物を提供する。

【0013】

第3の局面では、本発明は、アレルギー状態の治療または予防に使用するために、

(i) アレルギー状態に罹患するまたはその発症リスクの高い哺乳動物において、アレルギー状態に罹患していないまたはその発症リスクの低い哺乳動物とは異なるように発現レベルが変調されている単離された核酸分子であって、核酸は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される配列を含む、または核酸はそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、核酸分子、

(ii)(a)の核酸の相補鎖である単離された核酸分子、または

(iii)(a)または(b)の核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子、または

(iv)(a)、(b)または(c)の核酸によってコードされる単離されたポリペプチド分子、を提供する。

【0014】

第4の局面では、本発明はアレルギー状態に罹患するまたは発症リスクの高い哺乳動物において発現が変調されて、アレルギー状態に罹患していないまたは発症リスクの低い哺乳動物と比較して核酸の発現レベルが異なっている核酸分子の増幅のための、

cig5 フォワード: 5'CAAGACCGGGGAGAATACCTG3' (SEQ ID NO:1)

cig5 リバーズ : 5'GCGAGAATGTCCAAATACTCACC3' (SEQ ID NO:2)

10

20

30

40

IFIT4 フォワード: 5'GAGTGAGGTCACCAAGAATTC3' (SEQ ID NO:3)

IFIT4 リバース : 5'CACTCTATCTTCTAGATCCCTTGAGA3' (SEQ ID NO:4)

LAMP3 フォワード: 5'GCGTCCCTGGCCGTAATTT3' (SEQ ID NO:5)

LAMP3 リバース : 5'TGGTTGCTTAGCTGGTTGCT3' (SEQ ID NO:6)

DACT1 フォワード: 5'AACTCGGTGTTTCAGTGAGTGT3' (SEQ ID NO:7)

DACT1 リバース : 5'GGAGAGGGAACGGCAAACCT3' (SEQ ID NO:8)

10

IL17RB フォワード: 5'TGTGGAGGCACGAAAGGAT3' (SEQ ID NO:9)

IL17RB リバース : GATGGGTAAACCACAAGAACCT3' (SEQ ID NO:10)

KRT1 フォワード: 5'TCAATCTCGGTTGGATTTCGA3' (SEQ ID NO:11)

KRT1 リバース : 5'CTGCTTGGTAGAGTGCTGTAAGG3' (SEQ ID NO:12)

LNPEP フォワード: 5'TTCACCAATGATCGGCTTCAG3' (SEQ ID NO:13)

20

LNPEP リバース : 5'CTCCATCTCATGCTCACCAAG3' (SEQ ID NO:14)

MAL フォワード: 5'TCGTGGGTGCTGTGTTTACTCT3' (SEQ ID NO:15)

MAL リバース : 5' CAGTTGGAGGTTAGACACAGCAA3' (SEQ ID NO:16)

NCOA3 フォワード: 5'CCTGTCTCAGCCACGAGCTA3' (SEQ ID NO:17)

NCOA3 リバース : 5'TCCTGAAAGATCATGTCTGGTAA3' (SEQ ID NO:18)

30

OAZ フォワード: 5'TCAATTTACACCTGCGATCACTG3' (SEQ ID NO:19)

OAZ リバース : 5'GTTGTGGGTCGTCATCACCA3' (SEQ ID NO:20)

PECAM1 フォワード: 5'AGTCCAGATAGTCGTATGTGAAATGC3' (SEQ ID NO:21)

PECAM1 リバース : GGTCTGTCCTTTTATGACCTCAAAC3' (SEQ ID NO:22)

PLXDC1 フォワード: 5'CCTGGGCATGTGTCAGAGC3' (SEQ ID NO:23)

PLXDC1 リバース : 5'GGTGTGAGAGTATTGTGTGG3' (SEQ ID NO:24)

40

RASGRP3 フォワード: 5'TCAGCCTCATCGACATATCCA3' (SEQ ID NO:25)

RASGRP3 リバース : 5'TCAGCCAATTCAATGGGCTCC3' (SEQ ID NO:26)

SLC39A8 フォワード: 5'GCAGTCTTACAGCAATTGAACTTT3' (SEQ ID NO:27)

SLC39A8 リバース : 5'CCATATCCCCAAACTTCTGAA3' (SEQ ID NO:28)

XBP1 フォワード: 5'GTAGATTTAGAAGAAGAGAACCAAAAAC3' (SEQ ID NO:29)

XBP1 リバース : 5'CCCAAGCGCTGTCTTAACTC3' (SEQ ID NO:30)

NDFIP2 フォワード: 5'AGTGGGGAATGATGGCATT3' (SEQ ID NO:31)

NDFIP2 リバース : AAATCCGCAGATAGCACCA3' (SEQ ID NO:32)

10

RAB27B フォワード: 5'CAGAACTGGATGAGCCAACT3' (SEQ ID NO:33)

RAB27B リバース : 5'GACTTCCCTCTGATCTGGTAGG3' (SEQ ID NO:34)

243610_at フォワード: 5'TGCATTGACAACGTACTCAGAA3' (SEQ ID NO:35)

243610_at リバース : 5'TCATCTTGACAGGGATAAGCAT3' (SEQ ID NO:36)

GNG8 フォワード: 5'GAACATCGACCGCATGAAGGT3' (SEQ ID NO:37)

20

GNG8 リバース : 5'AGAACACAAAAGAGGCGCTTG3' (SEQ ID NO:38)

GJB2 フォワード: 5'GCTTCCTCCCGACGCAGA3' (SEQ ID NO:39)

GJB2 リバース : 5'AACGAGGATCATAATGCGAAA3' (SEQ ID NO:40)

1556097_at フォワード: 5'TCTTATTTCACTTTCTCAACTCATCA3' (SEQ ID NO:41)

1556097_at リバース : 5'GGCATAACCTGAATGTATAATTCAA3' (SEQ ID NO:42)

30

242743_at フォワード: 5'GAAAAAGCTGTTGAGTGAAGAAGACT3' (SEQ ID NO:43)

242743_at リバース : 5'TGCAGGATGAGCAATGCTGAGA3' (SEQ ID NO:44)

および

CISH フォワード: 5'GGGAATCTGGCTGGTATTGG3' (SEQ ID NO:45)

CISH リバース : 5'TTCTGGCATCTTCTGCAGGTGTT3' (SEQ ID NO:46)

40

からなる群より選択されるプライマーセットを提供する。

【 0 0 1 5 】

第5の局面では、本発明は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、少なくとも1つの遺伝子の、1領域に特異的な1つまたは複数のプライマーを含む哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング用キットを提供する。

【 0 0 1 6 】

50

第6の局面では、本発明は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される遺伝子、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子、またはこれらの遺伝子の2つもしくはそれ以上の組み合わせの発現を調節するために十分な量の治療的または予防的物質を哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防する方法を提供する。

【0017】

いくつかの態様では、物質は、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む1つもしくは複数の遺伝子、またはこれらの遺伝子の2つもしくはそれ以上の組み合わせの、発現のダウンレギュレーターである。 10

【0018】

他の態様では、物質はcig5、IFIT4またはLAMP3のアップレギュレーターである。

【0019】

物質は、さらに薬学的に許容されるキャリアを含む組成物の形で投与できる。これは通常少なくとも1つの賦形剤、例えば、滅菌水、リン酸ナトリウム、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、およびそれらの任意の組み合わせを含む。 20

【0020】

第7の局面では、本発明は、

- (a) 哺乳動物から生体試料を提供する段階；
 - (b) 試料中でアレルギー性疾患に関連する1つまたは複数の特定の遺伝子の活性化の程度を決定する段階；
 - (c) 生体試料に候補物質を接触させる段階；および
 - (d) 接触段階後に試料中の活性化の程度が変化するかどうかを決定する段階
- を含み、物質の非存在下で観察される場合と比較して、物質の非存在下で観察される活性化の程度が変化すれば、物質がアレルギー性疾患を処置または予防できることを示す、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング方法を提供する。 30

【0021】

第8の局面では、本発明は、

- (a) 哺乳動物から生体試料を提供する段階；
 - (b) 1つまたは複数のアレルギー関連遺伝子のmRNA転写物のレベルを決定する段階であって、遺伝子はcig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、段階；
 - (c) 生体試料を物質に接触させる段階；および
 - (d) 接触段階後に試料中のmRNA転写物のレベルが変化するかどうかを決定する段階
- を含み、物質のない場合と比較して物質の接触後に試料中のmRNA転写物のレベルが変化すれば、物質がアレルギー性疾患を処置または予防できることを示す、哺乳動物においてアレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニング方法を提供する。 40

【0022】

第9の局面では、本発明は、

- (a) 哺乳動物から生体試料を提供する段階； 50

(b) cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される、またはそれぞれプローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、またはそれらの組み合わせである、1つもしくは複数の遺伝子のmRNA転写物の試料中のレベルを決定する段階；および(c) mRNA転写物またはタンパク質の有無を補正する治療的モジュレーターを選択する段階

、を含むアレルギー性疾患に罹患するまたはその素因がある哺乳動物の処置のために適当な治療剤を選択する方法を提供する。

10

【0023】

いくつかの態様では、モジュレーターは作動薬であるが、別の態様ではモジュレーターは拮抗薬である。本発明の第7から第9の局面では、遺伝子はアレルギー性疾患に関連する任意の遺伝子でよい。好ましくは遺伝子は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される1つもしくは複数の遺伝子、またはそれぞれプローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子、またはこれらの遺伝子の2つもしくはそれ以上の組み合わせでもよい。

20

【0024】

本発明の全ての局面において、遺伝子の活性化レベルを決定する段階は、当技術分野で公知の任意の方法によって実施できる。好ましくは、これは逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によるmRNAの存在の検出、またはマイクロチップ技術を利用した特異的核酸アレイの使用によって行われ得る。または、活性化レベルは、例えばELISA、プロテオミックアレイ、またはフローサイトメトリーによって検出される細胞内染色を用いて、mRNAによってコードされるタンパク質を検出しても決定できる。これらの方法は全て当技術分野で周知である。遺伝子は不活性、すなわちそれほど転写または翻訳されない場合もあるが、遺伝子の発現が変調される、すなわちアップレギュレーションまたはダウンレギュレートされる場合もあることが理解されるだろう。

30

【0025】

本発明の全ての局面において、1つの態様ではアレルギー関連遺伝子はアトピー性の個体由来のアレルゲン抗原投与PBMCにおいてアップレギュレートされているが、そのアレルゲンにアレルギー性ではない個体由来のPBMCにおいては、アップレギュレートされているとしてもわずかである。好ましくは、この態様では遺伝子は、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される1つまたは複数の遺伝子、およびそれぞれプローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子である。より好ましくは、遺伝子はアトピー性の個体ではアップレギュレートされており、非アトピー性の個体ではダウンレギュレートされている。さらに好ましくは遺伝子はKRT₁、PECAM₁またはPLXDC₁である。

40

【0026】

代替の態様では、アレルギー関連遺伝子は、非アトピー性個体のアレルゲン抗原投与PBMCにおいてダウンレギュレートされているが、アトピー性の個体のPBMCにおいてはダウンレギュレートされていない。好ましくはこれらの態様では遺伝子はcig5、IFIT4およびLAMP3からなる群より選択される。

【0027】

生体試料は、血液、骨髓、血漿、血清、リンパ液、脳脊髄液、またはその細胞もしくは液体成分；皮膚、呼吸器、小腸、および尿生殖器官の外部部分；涙液、唾液、または乳汁

50

のような他の分泌物；組織または臓器生検試料；または培養細胞または細胞培養上清を含むがこれらに限定されない、アトピー性または非アトピー性哺乳動物から単離された任意の生体材料であり得る。好ましくは生体試料は血液もしくはリンパ液、またはその細胞もしくは液体成分である。より好ましくは、生体試料はその哺乳動物がアレルギーである1つまたは複数のアレルゲンに、インビトロで曝露することによって刺激した末梢血の骨髓由来単核細胞(PBMC)である。当業者は、特定の場合にインビトロでのアレルゲンに対する事前の曝露が有利であるかどうかを容易に決定できるだろう。これは生体試料の性質に依存する可能性がある。

【0028】

本発明の第6から第9の局面のいくつかの態様では、物質はsiRNA分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

10

【0029】

好ましくは物質は、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2もしくはCISHからなる群より選択される、またはそれぞれプローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、または242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子の、コード領域に特異的にハイブリダイズする長さが8~50ヌクレオチド塩基のアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、その遺伝子の発現を阻害する。

20

【0030】

別の態様では、物質はポリクローナルまたはモノクローナル抗体である。好ましくは抗体はヒト化モノクローナル抗体である。

【0031】

さらに別の態様では、物質はステロイド、 β 2拮抗薬、メチルキサンチン、ロイコトリエン修飾因子、抗コリン作動因子、全身性コルチコステロイド、または抗ヒスタミンである。

【0032】

哺乳動物はヒト、または家畜、愛玩動物、もしくは動物園の動物でよい。本発明の化合物はヒトの医学的処置に適していると特に考えられるが、イヌおよびネコのような愛玩動物、およびウマ、ウシ、およびヒツジのような家畜、または非ヒト霊長類、ネコ科の動物、イヌ科の動物、ウシ科の動物、および有蹄類のような動物園の動物の処置を含む、獣医学的処置にも応用できる。薬学的組成物の調製のための方法および薬学的キャリアは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 米国Williams & Wilkins, Pennsylvania, USAに記載のように当技術分野で周知である。

30

【0033】

本発明の化合物および組成物は、任意の適切な経路で投与でき、当業者は処置する疾患のために最も適切な経路および用量を容易に決定できるだろう。用量は担当医師または獣医師の裁量によるが、処置する疾患の性質および状態、処置する被験体の年齢および全身性健康状態、投与経路、ならびに以前に投与された処置に依存する。

【0034】

キャリアまたは希釈剤、および他の賦形剤は投与経路により、やはり当業者は各々の特定の場合に最も適当な製剤を容易に決定できるだろう。

40

【0035】

発明の詳細な説明

本発明を詳細に説明する前に、本発明は特に例示された診断方法に限定されず、当然、変化する可能性があることを理解する必要がある。また、本明細書で使用される用語は本発明の特定の態様を説明するためのみのものであり、限定する意図はなく、本発明は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることを理解する必要がある。

【0036】

本明細書に引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、上記であろうと下記

50

であろうと、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。しかし、本明細書に記載される刊行物は、刊行物中に報告されるプロトコルおよび試薬であって本明細書に関連して使用される可能性のある記述および開示を目的として引用される。本明細書中のいかなる記述も、先行技術のために本発明がそのような開示に先行する権利がないと認めるものと解釈することはできない。

【 0 0 3 7 】

さらに、本発明の実施には、特に他に記載がない限り、当技術分野における通常の免疫学的、化学的、および薬理学的技術を使用する。そのような技術は当業者に周知であり、文献に十分説明されている。例えば、Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher and Wingfield “Current protocols in Protein Science” (1999) Volume I and II (John Wiley & Sons Inc.); および Bailey, J.E. and Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986を参照されたい。

10

【 0 0 3 8 】

本明細書中で使用される略語は以下の通りである。

ELISA：酵素結合免疫吸着検定法

HDM：イエダニ

IL-4：インターロイキン4

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

PBMC：末梢血単核細胞

RT-PCR：逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

20

【 0 0 3 9 】

本出願の特許請求の範囲および本発明の説明においては、明確な言語または必要な含意のために文脈上他の解釈が必要な場合を除き、「含む」という用語および「含んでいる」というような活用形は、包含的な意味で使用され、すなわち、述べられた特徴の存在を指示するが、本発明の様々な態様において別の特徴が存在または追加されることを除外するものではない。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される単数形の「1つの」「1」および「その」は、文脈上明らかにそうでない場合を除き、複数形も含む。したがって、例えば「1つの遺伝子」への言及は、複数のそのような遺伝子を含み、「1つのアレルギー」への言及は、1つまたは複数のアレルギーを意味する等である。

【 0 0 4 0 】

30

他に規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明の属する分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を持つ。本発明の実施または試験には、本明細書に説明されるものと類似または同等の任意の材料および方法が使用できるが、好ましい材料および方法が説明される。値の範囲が表示される場合には、この範囲は、範囲の上限および下限、ならびにそれらの間の全ての値を含むことは明らかに理解されるだろう。

【 0 0 4 1 】

特定の理論または仮説に縛られることは望まないが、発明者らは以前にはアレルギー性疾患に関連すると考えられていなかったものを含むいくつかの遺伝子が、アレルギー性疾患を有する動物のアレルゲン刺激PBMCで活性化されることを観察および実証した。しかし、これらの遺伝子は、アレルギー性疾患を有さない動物では、たとえ活性化されていてもその程度はより低い。例えば、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHのような遺伝子、ならびにそれぞれプロブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、または242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子は、イエダニにアレルギー性のヒト由来のイエダニ(HDM)刺激PBMC中では強く活性化されるが、これらの遺伝子はイエダニにアレルギー性ではないヒトのPBMCでは弱く活性化されるのみか全く活性化されないことを発明者らは見いだした。反対に、cig5、IFIT4およびLAMP3のような他の遺伝子は、非アトピー性の個体(正常個体)由来のHDM刺激PBMCでは活発にダウンレギュレートされる

40

50

が、これらの遺伝子はアトピー性の(「アレルギー性の」)個体由来の対応するPBMC試料中ではダウンレギュレートされない。これらの遺伝子は、やはり非アトピー性の表現型を示すと考えられる；これらはまた、「保護性」遺伝子を代表する、すなわち、これらの遺伝子の産物はアレルギー発症に対する何らかの保護を与えとも考えられる。

【0042】

したがって、いくつかの態様では、本明細書で互換的に使用される「アレルギー関連遺伝子」または「アレルギー特異的遺伝子」という用語は、アレルギー性疾患の臨床症状を示す動物は刺激化合物またはアレルゲンの存在下で活性化される遺伝子を持ち、遺伝子の活性化レベルは非アレルギー性動物とは異なっているという点で、アレルギー性疾患に通常関連しているか、またはアレルギー性疾患に関連することが示される遺伝子のいずれかを指す。通常、遺伝子の活性化は、アレルギー性の動物から得られる細胞におけるアレルゲンに応答したインビトロの発現によって示される。

【0043】

本明細書で使用される「活性化された」という用語は、遺伝子が動物において盛んに転写されている、すなわち、対応するmRNAまたはそのmRNAにコードされるタンパク質が検出されることを意味する。

【0044】

本明細書で使用される「アレルギー性疾患」または「アレルギー状態」という用語は、様々な刺激に対する気管および気管支の反応性の増大、またはアレルゲン曝露に対するこれらまたは他の部位の炎症を含む疾患によって特徴付けられる、異常な生物学的機能を指す。これらのアレルギー性疾患に関連する症状には、風邪、風邪のようなおよび/または「インフルエンザ様」の症状、咳、皮膚刺激、呼吸困難、流涙、鼻漏、くしゃみおよび喘鳴、ならびに皮膚の症状発現が含まれるが、これらに限定されない。アレルギー性疾患は、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-9およびIL-13のようなTh2サイトカインの上昇もしくは伴う。アレルギー性疾患の例には、喘息、アトピー性皮膚炎、気管支収縮、慢性気道炎症、アレルギー性接触性皮膚炎、湿疹、食物アレルギー、枯草熱、高IgE症候群、鼻炎、およびアレルギー性蕁麻疹が含まれるが、これらに限定されない。

【0045】

本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、非限定的に、チンパンジーならびに他の類人猿およびサル種のような非ヒト霊長類を含むヒトおよび他の霊長類；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマのような家畜；イヌおよびネコのような愛玩動物；マウス、ラット、およびモルモットのような齧歯類を含む実験動物を含む。本用語は特定の年齢を示さず、したがって成体および未熟な個体の両方がカバーされる。全ての哺乳動物の免疫系は同様に働くので、本明細書に記述される方法は、上述の哺乳動物種のいずれにも使うことが意図されている。

【0046】

したがって本発明は、ヒト、ならびにネコ、イヌ、およびより大きなネコ科の動物およびイヌ科の動物のような肉食動物、子ブタ、ブタ、およびイノシシのようなブタ、ウシ、雄牛、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン、およびラクダのような反すう動物、ウマ、および類人猿およびサルのような非ヒト霊長類を含む、ヒトにとって経済的および/または社会的に重要な哺乳動物を含む任意の哺乳動物における、アレルギー性疾患を処置または予防できる物質のスクリーニングを含む。したがって、本発明は、家畜のブタ、反すう動物、ウマ等を含むがこれらに限定されない家畜、ならびに動物園または絶滅の危機に瀕した動物の処置を含む。

【0047】

本明細書で使用される「アトピー性」または「アレルギー性」という用語は、アレルギー反応を有する動物を指す。逆に「非アトピー性」動物は、アレルギー性反応を有さないものである。アレルギーは通常、皮膚プリック、皮内または皮膚パッチ試験のような皮膚試験、IgE抗体放射性アレルギー吸着試験(RAST)、またはELISAもしくは関連法によって診断される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

アレルギーはアレルゲンによって引き起こされるが、アレルゲンは花粉もしくは他の植物成分、埃、カビまたは真菌、食物、動物もしくは鳥の鱗屑、昆虫毒、または化学物質を含むがこれらに限定されない様々な発生源に存在する可能性がある。

【 0 0 4 9 】

生体試料は、単離後、直接に本明細書に記述される技術を用いて試験してもよいが、生成するデータの質を上げるためにさらに処理してもよい。この点に関して、発明者らは文献から、増殖を誘導するためにアレルゲンを用いた最初の刺激によるアレルゲン特異的細胞を選択的な増殖が、関連細胞の頻度が動物から直接単離された生体試料中の同じ細胞よりも1桁高い「細胞株」を生成し有用であることに注目している。必要ならば、細胞は公知の方法を用いて、特定の細胞をクローニングすることにより、さらに濃縮および精製できる。

【 0 0 5 0 】

したがって、1つの態様では、アレルギー性疾患の発症の疑われる、または感受性のある動物から、末梢血のような生体試料を得る。その後、生体試料は、血液から実質的に白血球を単離するために処理する、すなわち他の混入細胞から白血球を分離する(またはそうでなければ、実質的に取り除く)。その後、生体試料を環境のアレルゲンに曝露する。本明細書で使用される「環境のアレルゲン」という用語は、アレルギー性疾患の発症と特異的に関連したアレルゲンを指す。例えば、そのようなアレルゲンには、イエダニのアレルゲン der p1(Scobie et al.(1994)Biochem. Soc. Trans. 22 : 448S ; Yssel et al.(1992)J. Immunol. 148 : 738-745), der p2(Chua et al.(1996)Clin. Exp. Allergy 26 : 829-837), der p3(Smith and Thomas(1996)Clin. Exp. Allergy 26 : 571-579), der p5, der pV(Lin et al.(1994)J. Allergy Clin. Immunol. 94 : 989-996), der p6(Bennett & Thomas(1996)Clin. Exp. Allergy 26 : 1150-1154), der p 7(Shen et al.(1995)Clin. Exp. Allergy 25 : 416-422), der f2(Yuuki et al.(1997)Int. Arch. Allergy Immunol. 112 : 44-48), der f3(Nishiyama et al.(1995)FEBS Lett. 377 : 62-66), der f7(Shen et al.(1995)Clin. Exp. Allergy 25 : 1000-1006) ; Mag 3(Fujikawa et al.(1996)Mol. Immunol. 33 : 311-319)のような、イエダニ、例えばヤケヒョウダニ(Dermatophagoides pteronyssinus)、コナヒョウダニ(Dermatophagoides farinae)、ネッタイタマニクダニ(Blomia tropicalis)を含む動物のアレルゲンが含まれる。アレルゲンとしてやはり興味深いのは、イエダニのアレルゲン Tyr p2(Eriksson et al.(1998)Eur. J. Biochem. 251 : 443-447)、Lep d1(Schmidt et al.(1995)FEBS Lett. 370 : 11-14)、およびグルタチオンSトランスフェラーゼ(O'Neill et al.(1995)Immunol Lett. 48 : 103-107) ; グルタチオンSトランスフェラーゼと相同性を有する25,589 Daの219アミノ酸のポリペプチド(O'Neill et al.(1994)Biochim. Biophys. Acta. 1219 : 521-528) ; Blo t 5(Arruda et al.(1995)Int. Arch. Allergy Immunol. 107 : 456-457) ; ハチ毒ホスホリパーゼA2(Carballido et al.(1994)J. Allergy Clin. Immunol. 93 : 758-767 ; Jutel et al.(1995)J. Immunol. 154 : 4187-4194) ; ウシ皮膚/鱗屑物質BDA 11(Rautiainen et al.(1995)J. Invest. Dermatol. 105 : 660-663)およびBDA20(Mantyjarvi et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 97 : 1297-1303) ; ウマ主要アレルゲンEqu c1(Gregoire et al.(1996)J. Biol. Chem. 271 : 32951-32959) ; キバハリアリM. pilosulaアレルゲンMyr p 1およびその相同アレルゲン性ポリペプチドMyr p2(Donovan et al.(1996)Biochem. Mol. Biol. Int. 39 : 877-885) ; ダニBlomia tropicalisの1~13、14、16 kDアレルゲン(Caraballo et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 98 : 573-579) ; ゴキブリアレルゲンBla g Bd90K(Helm et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 98 : 172-80)およびBla g 2(Arruda et al.(1995)J. Biol. Chem. 270 : 19563-19568) ; ゴキブリCr-PIアレルゲン(Wu et al.(1996)J. Biol. Chem. 271 : 17937-17943) ; カミアリ毒アレルゲンSol i 2(Schmidt et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 98 : 82-88) ; コンチュウChironomus thummi主要アレルゲンChi t 1-9(Kipp et al.(1996)Int. Arch. Allergy Immunol. 110 : 348-353) ; イヌアレルゲンCan f 1、またはネコアレルゲンFel d 1(Ingram et al.(1995)J. Allergy Clin. Immunol. 96 : 449-456) ; 例えばウマ、

10

20

30

40

50

イヌ、またはネコ由来のアルブミン(Goubran Botros et al.(1996)Immunology 88 : 340-347) ; 分子量22 kD、25 kDまたは60 kDのシカアレルゲン(Spitzauer et al.(1997)Clin. Exp. Allergy 27 : 196-200) ; およびウシの20 kD主要アレルゲン(Ylonen et al.(1994)J. Allergy Clin. Immunol. 93 : 851-858)である。

【 0 0 5 1 】

花粉および草のアレルゲンには、Hor v9(Astwood and Hill(1996)Gene 182 : 53-62), Lig v1(Batanero et al.(1996)Clin. Exp. Allergy 26 : 1401-1410) ; Lol p 1(Muller et al.(1996)Int. Arch. Allergy Immunol. 109 : 352-355)、Lol p II(Tamborini et al.(1995)Mol. Immunol. 32 : 505-513)、Lol pVA、Lol pVB(Ong et al.(1995)Mol. Immunol. 32 : 295-302)、Lol p 9(Blaher et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 98 : 124-132) ; Par J I(Costa et al.(1994)FEBS Lett. 341 : 182-186 ; Sallusto et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 97 : 627-637)、Par j 2.0101(Duro et al.(1996)FEBS Lett. 399 : 295-298) ; Bet v1(Faber et al.(1996)J. Biol. Chem. 271 : 19243-19250)、Bet v2(Rihs et al.(1994)Int. Arch. Allergy Immunol. 105 : 190-194) ; Dac g3(Guerin-Marchand et al.(1996)Mol. Immunol. 33 : 797-806) ; Phl p 1(Petersen et al.(1995)J Allergy Clin. Immunol. 95 : 987-994)、Phl p 5(Muller et al.(1996)Int. Arch. Allergy Immunol. 109 : 352-355)、Phl p 6(Petersen et al.(1995)Int. Arch. Allergy Immunol. 108 : 55-59) ; Cry j I(Sone et al.(1994)Biochem. Biophys. Res. Commun. 199 : 619-625)、Cry j II(Namba et al.(1994)FEBS Lett. 353 : 124-128) ; Cor a 1(Schenk et al.(1994)Eur. J. Biochem. 224 : 717-722) ; cyn d1(Smith et al.(1996)J. Allergy Clin. Immunol. 98 : 331-343)、cyn d7(Suphioglu et al.(1997)FEBS Lett. 402 : 167-172) ; Pha a 1およびPha a 5のアイソフォーム(Suphioglu and Singh(1995)Clin. Exp. Allergy 25 : 853-865) ; Cha o 1(Suzuki et al.(1996)Mol. Immunol. 33 : 451-460) ; プロフィリン由来、例えばオオアワガエリまたはカバノキの花粉(Valenta et al.(1994)Biochem. Biophys. Res. Commun. 199 : 106-118) ; P0149(Wu et al.(1996)Plant Mol. Biol. 32 : 1037-1042) ; Ory s1(Xu et al.(1995)Gene 164 : 255-259) ; ならびにAmb a VおよびAmb t 5(Kim et al.(1996)Mol. Immunol. 33 : 873-880 ; Zhu et al.(1995)J. Immunol. 155 : 5064-5073)が含まれる。

【 0 0 5 2 】

真菌のアレルゲンには、Cladosporium herbarumのアレルゲンCla h III(Zhang et al.(1995)J. Immunol. 154 : 710-717) ; 担子菌のPsilocybe cubensisから得られる真菌のサイクロフィリンであるアレルゲンPsi c 2(Homer et al.(1995)Int. Arch. Allergy Immunol. 107 : 298-300) ; Cladosporium herbarumのcDNAライブラリーからクローニングされたhsp 70(Zhang et al.(1996)Clin Exp Allergy 26 : 88-95) ; アオカビ(Penicillium notatum)の68 kDアレルゲン(Shen et al.(1995)Clin. Exp. Allergy 26 : 350-356) ; アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)(Achatz et al.(1995)Mol. Immunol. 32 : 213-227) ; エノラーゼ(Achatz et al.(1995)Mol. Immunol. 32 : 213-227) ; YCP4(同上) ; 酸性リボソームタンパク質P2(同上)が含まれるがこれらに限定されない。

【 0 0 5 3 】

適切な食物アレルゲンには、プロフィリン(Rihs et al.(1994)Int. Arch. Allergy Immunol. 105 : 190-194) ; α アミラーゼ/トリプシン阻害剤遺伝子ファミリーに属するコメアレルゲン性cDNA(Alvarez et al.(1995)Biochim Biophys Acta 1251 : 201-204) ; オリーブの主要アレルゲンOle e I(Lombardero et al.(1994)Clin Exp Allergy 24 : 765-770) ; カラシ由来の主要アレルゲンSin a 1(Gonzalez De La Pena et al.(1996)Eur J Biochem. 237 : 827-832) ; サケの主要アレルゲンであるパルブアルブミン(Lindstrom et al.(1996)Scand. J. Immunol. 44 : 335-344) ; 主要アレルゲンMal d 1のようなリンゴのアレルゲン(Vanek-Krebitz et al.(1995)Biochem. Biophys. Res. Commun. 214 : 538-551) ; Ara h Iのようなラッカセイのアレルゲン(Burks et al.(1995)J Clin. Invest. 96 : 1715-1721)が含まれる。

【 0 0 5 4 】

本段階は本明細書に記述される方法の刺激段階に当たる。環境アレルゲンへの曝露後、アレルギー性疾患に関連する1つもしくは複数の遺伝子の活性化が決定または測定される。この段階の根拠は、非アトピー性個体と比較して、アトピー性個体では特定の遺伝子が活性化するという発明者らの所見に基づく。アレルギー関連遺伝子が活性化するかどうかの分析段階は、当技術分野で公知の任意の標準的な技術を用いて実行できる。例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)またはDNAアレイ解析、ELISA、プロテオミックアレイ、またはフローサイトメトリーで検出する細胞内染色を用いることができる。

【0055】

遺伝子発現を検出するための多くの技術が利用できる。薬理ゲノミクス測定のための技術システムが最近論評されている(Koch, WH: Nature Reviews Drug Discovery 2004 3 74 9-761)。遺伝子発現は、例えば、アレルギー関連核酸分子の既知の配列に基づいて適切に標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを用いて、DNAの定量のための従来のサザンブロット、またはmRNA定量のためのノーザンブロットによって、生体試料で直接測定することができる。様々なmRNAの混合物におけるアレルギー関連核酸分子由来mRNAの同定は通常、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応および検出可能な成分で標識したオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを用いて、実施されている。様々な標識、最も一般的には放射性同位元素、特に³²Pを使用できる。しかし、ポリヌクレオチドへの導入のためのビオチン修飾ヌクレオチドの使用のような、他の技術も利用できる。その後ビオチンは、放射性同位元素、蛍光体、発色団等のような広範囲の標識で標識できるアビジンまたは抗体の結合部位となる。Keller, et al., DNA Probes, pp.149-213(Stockton Press, 1989)。または二重鎖DNA、二重鎖RNA、およびDNA・RNAハイブリッド二重鎖またはDNA・タンパク質二重鎖を含む特定の二重鎖を認識できる抗体も利用できる。次に抗体を標識し、二重鎖を表面に結合させ、表面に二重鎖が形成されると二重鎖に結合した抗体の存在が検出されるような測定を行なうことができる。

【0056】

1つの方法では、生体試料中のmRNAを逆転写してcDNA鎖を生成する。ポリメラーゼ連鎖反応のような通常の技術によってcDNAを増幅し、分析に十分な量を提供することができる。

【0057】

増幅を用いて、所望の配列に特異的に結合するプライマーを使用して、特定の配列が存在するかどうかを決定することもできるが、この場合、増幅産物が存在すれば、特定の結合複合体が形成されたことを示す。または、mRNA試料を、例えばキャピラリーまたはゲル電気泳動のような電気泳動によって分画し、例えばニトロセルロースのような適当な支持体に移し、転写因子配列の断片でプローブする。オリゴヌクレオチド連結アッセイ、固体状態のアレイへの結合等を含む他の技術も使用できる。対象配列を有するmRNAが検出されれば、試料中に転写因子の遺伝子発現があることを示す。

【0058】

本明細書で使用される「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」は一般的に、米国特許第4,683,195号に記述されるような、インビトロにおける所望のヌクレオチド配列の増幅のための方法を指す。一般に、PCRでは鋳型核酸に選択的にハイブリダイズする能力のある2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、プライマー延長合成のサイクルを繰り返す。通常は、PCR法で使用されるプライマーは、増幅するヌクレオチド配列の両端または隣接する鋳型内のヌクレオチド配列に相補的であるが、増幅するヌクレオチド配列に相補的なプライマーも使用できる。Wang, et al., PCR Protocols, pp. 70-75(Academic Press, 1990); Ochman, et al., PCR Protocols, pp. 219-227; Triglia, et al., Nucl. Acids Res. 16: 8186(1988)を参照されたい。

【0059】

「オリゴヌクレオチド」とは、Engels, et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 28: 71 6-734(1989)に記述されるような、公知の方法(例えば、トリエステル、ホスホラミダイト、またはホスホン酸化学を含む)で化学的に合成される短い、一本鎖または二本鎖のポリ

デオキシヌクレオチドである。その後、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動によってこれを精製する。本明細書で使用される「PCR試薬」とは、標的核酸配列以外に、PCR過程を実行するために必要な化学物質を指す。これらの化学物質は、一般的に5つのクラスの成分からなる：(i)水性緩衝液、(ii)水溶性マグネシウム塩、(iii)少なくとも4つのデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)、(iv)オリゴヌクレオチドプライマー(通常は各標的配列につき2つのプライマーであり、二本鎖の標的配列の2本の相補鎖の5'末端を規定する配列である)、および(v)ポリヌクレオチドポリメラーゼ、好ましくはDNAポリメラーゼ、より好ましくは熱安定性DNAポリメラーゼ、すなわち90 ~ 100 の温度でその活性の約半分以上を失うことなく、少なくとも合計10分耐えられるDNAポリメラーゼ。

【0060】

通常の4つのdNTPはチミジン3リン酸(dTTP)、デオキシアデノシン3リン酸(dATP)、デオキシシチジン3リン酸(dCTP)、およびデオキシグアノシン3リン酸(dGTP)である。これらの通常の3リン酸は、通常の4つの塩基のようにワトソン・クリックの塩基対を形成する塩基アナログを含むdNTP、例えばデオキシウリジン3リン酸(dUTP)で、補完または置換することができる。

【0061】

検出可能な標識を増幅反応液に入れることができる。適切な標識には、蛍光色素、例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)、2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM)またはN,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、放射性標識、例えば³²P、³⁵S、³H；ならびに他の標識が含まれる。標識は、増幅されたDNAにビオチン、ハプテン、または結合パートナーに高親和性を有する同様な物質、例えばアビジン、特異的抗体等、を結合させ、結合パートナーに検出可能な標識を結合させる2段階システムでもよい。標識は片方または両方のプライマーに結合させることができる。または、増幅に使用されるヌクレオチドのプールを標識し、標識が増幅産物に取り込まれるようにする。

【0062】

したがって、1つの好ましい態様では、アレルギー関連遺伝子のmRNAがPCRによって逆転写および増幅され、それはオリゴヌクレオチドプローブを含めた様々な手段によって検出される。本発明のオリゴヌクレオチドプローブは、アレルギー関連遺伝子核酸内の隣接した核酸残基の領域に対して、好ましくはストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズするために十分な相補性を有するDNA分子である。プローブの例には、少なくとも15核酸残基の長さで、本発明のDNAの任意の15またはそれ以上の隣接する残基から選択されるオリゴマーが含まれる。好ましくは本発明で使用されるオリゴマープローブは、少なくとも約20核酸残基の長さを有する。本発明は150核酸残基またはそれ以上の長さのオリゴマープローブも考慮する。当業者は、特定の長さのプローブが本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするための核酸ハイブリダイゼーション条件は、容易に決定できることを理解している。様々な長さのプローブの最適なハイブリダイゼーション条件を達成するための操作は、当技術分野で周知である。例えば、参照として本明細書に組み入れられる Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor (1989)を参照されたい。

【0063】

好ましくは、本発明のオリゴマープローブは、その検出が容易になるように標識される。検出可能な標識は、視覚的または装置を用いて検出できる任意の種または成分でよい。一般的に使用される検出可能な標識は、例えば、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および³⁵Sのような放射性標識である。蛍光剤・消光剤のペアの例は、フルオレセインを含むキサンチン染料、およびローダミン染料から選択できる。フェニル成分が置換され、結合部位として、またはオリゴヌクレオチドへの連結のための結合官能基として使用できるようになった、

10

20

30

40

50

これらの化合物の多くの適当な形が広く市販されている。蛍光化合物の別のグループは、 α または β の位置にアミノ基を有するナフチルアミンである。そのようなナフチルアミノ化合物には、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネートおよび2-p-トイジニル-6-ナフタレンスルホネートが含まれる。他の染料には、3-フェニル-7-イソシアナトクマリン、9-イソチオシアナトアクリジンのようなアクリジン、アクリジンオレンジ；N-(p-(2-ベンゾキサゾリル)フェニル)マレイミド；ベンゾキサジアゾール、スチルベン、ピレン等が含まれる。最も好ましくは、蛍光化合物は、VIC、カルボキシフルオレセイン(FAM)、Lightcycler(登録商標)640およびCy5からなる群より選択される。

【0064】

ビオチン標識ヌクレオチドは、ニックトランスレーション、化学的および酵素的手段等のような技術によって、DNAまたはRNAに取り込むことができる。ビオチン化プローブは、アビジン/ストレプトアビジン、蛍光標識剤、酵素、金コロイド結合体等のような表示手段を用いて、ハイブリダイゼーション後に検出される。核酸は、他の蛍光化合物、免疫検出可能な蛍光誘導体、ビオチンアナログ等でも標識できる。核酸はタンパク質への連結を用いて標識することもできる。放射性または蛍光のヒストン一本鎖結合タンパク質に架橋された核酸も使用できる。当業者は、本発明の実施に使用できるオリゴマープローブを検出するために他の適切な方法があり、他の適切な検出可能標識があることを認識するだろう。さらに、化学合成の間に、蛍光残基をオリゴヌクレオチドに取り込ませることもできる。

【0065】

2つのDNA配列は、少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%のヌクレオチドが、DNA配列の規定された長さにおいて一致する場合に、「実質的に類似している」という。実質的に類似した配列は、例えば、特定の系で規定されたストリンジェントな条件下で実施するサザンハイブリダイゼーションによって同定できる。適当なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当技術分野の範囲内である。例えば、Maniatis et al., DNA Cloning, vols. I and II, Nucleic Acid Hybridisationを参照されたい。しかし、簡単に述べると、核酸分子のハイブリダイゼーションまたはアニーリングの「ストリンジェントな条件」とは、(1)洗浄のために低イオン強度および高温を使用する、例えば、50 で0.015M NaCl/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、または(2)ハイブリダイゼーションの間にホルムアミドのような変性剤を使用する、例えば、42 で、50%(vol/vol)ホルムアミド、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5、750 mM NaCl、75 mM クエン酸ナトリウムである。別の例では、42 で50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075M クエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、音波処理したサケ精子DNA(50 μ g/mL)、0.1% SDS、および10%硫酸デキストランを使用し、42 で0.2×SSCおよび0.1% SDS中で洗浄する。

【0066】

特に好ましい態様では、本発明は、参照としてその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第6,140,054号および6,174,670号に開示されるFRETプローブの利用のような、閉鎖試験管または均一アッセイ系を利用するために、PCRおよびハイブリダイゼーションプローブ統合システムを利用する。最も簡単な構成の1つでは、FRETまたは「蛍光共鳴エネルギー移動」の手法は、増幅する核酸の同じ鎖の隣接する部位に結合する2つのオリゴヌクレオチドを利用する。1つのオリゴヌクレオチドは、第1の波長で光を吸収し、それに応答して光を発するドナー蛍光体で標識され、第2のオリゴヌクレオチドは、第1のドナーが発する光に応答して蛍光を発する能力があるが第1のドナーを励起する光源では実質的に蛍光発光せず、その発光が第1の蛍光体の発光から区別できるアクセプター蛍光体で標識される。この構成では、第2すなわちアクセプター蛍光体は、例えばPCRのアニーリング段階のように、2つのオリゴヌクレオチドが増幅する核酸の隣接部位にハイブリダイズした時

に近接して存在し蛍光発生複合体を形成するように、第1すなわちドナー蛍光体に近接して存在する場合に、蛍光強度が大幅に上昇する。増幅される核酸が蓄積するにつれ、アクセプタープローブからの蛍光強度が上昇し、これを測定することができる。したがって、本方法では産物が形成される間に、その量を検出することができる。PCRに基づく測定におけるFRETプローブの利用に適用できる別の単純な態様では、標識オリゴヌクレオチドの1つはPCRに使用されるPCRプライマーでもある場合がある。全体が参照として本明細書に組み入れられるNeoh et al(J Clin Path 1999 ; 52 : 766-769)、von Ahsen et al(Clin Chem 2000 ; 46 : 156-161)に記述されるように、この構成では、標識PCRプライマーは第2の標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするDNA鎖の一部である。

【0067】

10

当業者は、例えば、まずPCR増幅を行い、その後、増幅された核酸の量を測定するために適した条件下でハイブリダイゼーションプローブを添加するように、増幅およびハイブリダイゼーションプローブを用いた増幅の検出は、2つの別々の段階で実施できることを理解するだろう。しかし、本発明の好ましい態様では、閉鎖試験管または均一アッセイ系を利用するために、PCRおよびハイブリダイゼーションプローブ統合システムを利用し、これをRoche Lightcycler(登録商標)または他の同様に指定されたまたは適切に構成された装置を用いて行なう。

【0068】

そのようなシステムは、本明細書に説明される検出法に適合する。当業者は、欠失および挿入に加えて点変異を検出するために適切に設計されていれば、そのようなプローブを用いて対立遺伝子の区別ができることを理解するだろう。あるいは、または加えて、当業者に周知の方法によって、対立遺伝子の区別のための非標識PCRプライマーを設計することができる(Ausubel 1989-1999)。

20

【0069】

均一および/または閉鎖試験管における増幅の検出は、例えば、PCR反応においてTaqMan(登録商標)ハイブリダイゼーションプローブの利用、および十分な増幅が行われた後の標的核酸に特異的な蛍光の測定のような、当技術分野の様々な手段を用いて行われ得ることも、当業者に理解されるだろう。

【0070】

当業者は、TaqMan手法に基づく方法(米国特許第5,538,848号および5,691,146号)、蛍光偏向測定(例えばGibson et al., Clin Chem、1997 ; 43 : 1336-1341)、およびInvader測定(例えばAgarwal P et al., Diagn Mol Pathol 2000 Sep ; 9(3) : 158-164 ; Ryan D et al., Mol Diagn 1999 Jun ; 4(2) : 135-144)のような、他の同様な定量的「リアルタイム」および均一核酸増幅/検出システムが利用できることを認識しているだろう。そのようなシステムも、本発明で使用するように適合でき、核酸増幅のリアルタイムのモニタリングが可能になる。

30

【0071】

本発明の1つの態様において、最初の手順では、オリゴヌクレオチドマトリックスまたはマイクロチップの製造を行なう。マイクロチップは一連の固定された合成オリゴマーを含んでおり、これらは転写因子DNAの所望の部分に相補的な配列を含むように合成されている。その後、オリゴマーに、クローニングしたまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅した転写因子核酸を、以下に示すようなストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせる。高度にストリンジェントな条件では、ハイブリダイゼーションの際に、マイクロチップに埋め込まれた配列と、標的配列の間で完璧またはほぼ完璧な一致のみが起こることになる。各最初のハイブリダイゼーション後、チップを洗浄して大部分のミスマッチした断片を除去する。その後、反応液を変性させ、結合したDNA断片を取り出し、その後これらを蛍光マーカで標識する。次に、異なる固定オリゴヌクレオチドセットを含むシークエンスマイクロチップ上で、標識DNA断片による第2回ラウンドのハイブリダイゼーションを行なう。最初にこれらの断片を、より短い長さに切断してもよい。異なる固定オリゴヌクレオチドセットは、全体の配列決定、部分的配列決定、配列比較、または配列同定のため

40

50

に必要なオリゴヌクレオチドを含む可能性がある。最終的に、この第2のハイブリダイゼーション段階の蛍光を、例えば、CCDカメラに連結したエピ蛍光顕微鏡を用いて検出できる。(参照として本明細書に組み入れられる米国特許第5,851,772号を参照されたい。)

【0072】

または、遺伝子発現は、遺伝子産物、サイトカイン転写因子の発現を直接定量するために、組織切片の免疫組織化学染色のような免疫学的方法、および細胞培養または体液のアッセイによっても測定できる。免疫組織化学染色の技術では、通常は乾燥および固定によって細胞試料を調製し、遺伝子産物に特異的な標識抗体と反応させるが、標識は通常酵素標識、蛍光標識、発光標識等のように目視で検出できる。本発明に使用するのに適した特に感度の高い染色技術は、Hsu, et al., Am. J. Clin. Path., 75: 734-738(1980)に記述されている。免疫組織化学染色および/または試料液の測定に有用な抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれでもよい。抗体は、cig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2もしくはCISHのような、本明細書でアレルギー関連であることが分かった遺伝子、またはそれぞれプローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子の、既知のDNA配列に基づいた合成ペプチドに対して、都合よく調製できる。

【0073】

例えば、適当な場合にはペプチドを免疫原として用いて、抗サイトカイン転写因子抗体を作製できる。そのような抗体は、アレルギー関連遺伝子の産物に特異的に結合するが、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫測定法、または競合型受容体結合測定または放射受容体測定のような測定、ならびにアフィニティ精製技術における標準として有用である。

【0074】

アレルギー性疾患に関連する1つまたは複数の遺伝子の活性化レベルを検出するための段階を実施したら、対応する生体試料に試験物質を接触させる。本明細書で使用する「物質」という用語は、試験をするアレルギー性疾患に関連する1つまたは複数の遺伝子の活性化の有無を変調または変化させる能力を有する可能性がある、化合物、組成物または物を指す。1つの態様では、物質はsiRNA分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ステロイド、 β 2アゴニスト、メチルキサンチン、ロイコトリエン修飾因子、抗コリン剤、全身性コルチコステロイド、抗体、拮抗剤、作動薬、または抗ヒスタミンである。

【0075】

物質を接触させる段階は、当技術分野で公知の任意の方法であり得るが、一般に、反応を誘導するために十分な時間、生体試料と物質をインキュベーションする。インキュベーション後、アレルギー性疾患に関連する1つまたは複数の遺伝子の活性化の有無を検出する段階を繰り返す。最初の段階とインキュベーション後の段階の間で活性化の変化が検出されれば、物質はアレルギー性疾患の予防および/または処置に有用だと考えられる。

【0076】

一般に、本明細書で使用される「処置する」、「処置」などの用語は、所望の薬理学的および/または生理的效果を得るために、個体または動物、その組織または細胞に影響を与えることを意味する。効果は、予防的である、すなわちアレルギー性疾患、またはその1つもしくは複数の徴候もしくは症状を、完全にまたは部分的に予防する、および/または治療的である、すなわちアレルギー性疾患の部分的または完全な治癒を達成する可能性がある。本明細書で使用される「処置する」という用語には、動物、哺乳動物、特にヒトにおけるアレルギー性疾患の任意の処置または予防が含まれ、

(a)アレルギー性疾患の素因を有するが、まだ疾患の診断がついていない動物において、アレルギー性疾患の発症を予防すること；

(b)アレルギー性疾患を阻害する、すなわちその進行を停止させること；または

(c)アレルギー性疾患の症状を緩和または改善する、すなわちアレルギー性疾患の症状の低下を引き起こすこと、

10

20

30

40

50

が含まれる。

【0077】

1つの態様では、処置は、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHからなる群より選択される遺伝子、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む遺伝子の発現産物(以後「遺伝子産物」と呼ぶ)と特異的に反応し、遺伝子産物の成体活性を低下させるために有効な抗体を使用する。例えば、これらの遺伝子産物、ペプチド、またはcDNA配列に基づくポリペプチドに由来する免疫原を使用して、標準的なプロトコールによって、抗血清またはモノクローナル抗体を作製できる(例えば、Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press: 1988)を参照されたい)。マウス、ハムスター、またはウサギのような哺乳動物に、抗体反応を誘導する能力のある、ペプチドもしくはポリペプチドの免疫原性形態、またはその抗原性断片もしくは融合タンパク質を免疫できる。ポリペプチドまたはペプチドに免疫原性を与える技術には、キャリアとの結合、または当技術分野で周知の他の技術が含まれる。ポリペプチドまたはペプチドの免疫原性の部分は、アジュバントの存在下で投与できる。免疫の進行は、血漿または血清中の抗体の力価の検出によってモニターできる。免疫原を抗体レベルの評価のための物質として、標準的なELISAまたは他の免疫測定が使用できる。好ましい態様では、抗体は本明細書に開示されるアレルギー関連遺伝子の産物の抗原決定基に免疫特異的である。

10

20

【0078】

抗原性調製物によって動物の免疫を行なった後、抗血清を入手し、必要ならば、血清からポリクローナル抗体を単離することができる。モノクローナル抗体を作製するためには、免疫された動物から抗体産生細胞(リンパ球)を採取し、標準的な体細胞融合手順によってミエローマ細胞のような不死化細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。そのような技術は当技術分野で周知であり、例えば、ハイブリドーマ技術(もともとKohler and Milstein、(1975)Nature、256: 495-497によって開発された)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbar et al., (1983)Immunology Today、4: 72)、およびヒトモノクローナル抗体を生産するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., (1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、Inc. pp. 77-96)を含む。ハイブリドーマ細胞は、本発明の遺伝子産物と特異的に反応する抗体の生産に関して免疫化学的にスクリーニングし、そのようなハイブリドーマ細胞を含む培養液からモノクローナル抗体を単離することができる。

30

【0079】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、対象遺伝子産物の1つともまた特異的に反応する抗体断片も含むことを意図している。抗体は、通常の技術で断片化し、抗体全体について上述したのと同じようにして、断片の有用性をスクリーニングすることができる。例えば、F(ab)₂断片は、ペプシンで抗体を処理することにより作製できる。得られたF(ab)₂断片は、ジスルフィド架橋を還元する処理をして、Fab断片を生産できる。本発明の抗体はさらに、少なくとも抗体の1つのCDR領域が提供する遺伝子産物への親和性を有する、二重特異性、一本鎖、およびキメラならびにヒト化分子を含むことを意図している。

40

【0080】

特定の好ましい態様では、本発明の抗体はモノクローナル抗体であり、本発明の特定の態様は、新規の抗体を作製するための方法を利用できるようにする。例えば、本発明の遺伝子産物に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製する方法は、検出可能な免疫応答を刺激するために有効な、遺伝子を含む免疫原性組成物の量をマウスに投与する段階、マウスから抗体産生細胞(例えば脾臓の細胞)を得る段階、および抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させて抗体産生ハイブリドーマを得る段階、ならびに抗体産生ハイブリドーマを試験して、遺伝子に特異的に結合するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを同定する段階を含む可能性がある。ハイブリドーマが得られたら、これを細胞培養で増殖

50

させることができ、ハイブリドーマ由来の細胞が遺伝子産物に特異的に結合するモノクローナル抗体を生産する条件下で培養してもよい。モノクローナル抗体は細胞培養から精製できる。

【0081】

本発明の別の局面は、「アンチセンス」療法の利用に関する。本明細書で使用されるアンチセンス療法とは、細胞条件下で対象アレルギー関連遺伝子の1つをコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAと特異的にハイブリダイズ(例えば結合)し、例えば、転写および/または翻訳を阻害することにより、その分子の発現を阻害するオリゴヌクレオチドプローブもしくはその誘導体の投与、またはインサイチューでの生成を指す。結合は、通常の塩基対の相補性によるか、または例えば、二重鎖DNAへの結合の場合には二重らせんの主溝での特異的相互作用を介してなされ得る。一般に、アンチセンス療法は、当技術分野で一般的に利用される広範囲の技術を指し、オリゴヌクレオチド配列への特異的結合に依存する任意の療法を含む。

10

【0082】

本発明のアンチセンスコンストラクトは、例えば、細胞中で転写されると、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2もしくはCISHをコードする細胞mRNA、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む細胞mRNAの、少なくとも1つの独特の部分に相補的なRNAを生産する発現プラスミドとして送達することもできる。または、アンチセンスコンストラクトは、エクスピボで生産され、細胞に導入されると、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2もしくはCISHをコードする、またはそれぞれ、プローブ243610_atによりヒト染色体9q21.13の遺伝子座138255に、1556097_atによりヒト染色体15q25.2に、および242743_atによりヒト染色体16p12.1に同定された配列からなる群より選択される配列を含む、mRNAおよび/またはゲノム配列と、ハイブリダイズすることにより発現を阻害するオリゴヌクレオチドプローブである。そのようなオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは内在性のヌクレアーゼ、例えばエキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼに抵抗性の修飾オリゴヌクレオチドであり、したがってインピボで安定である。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして使用される核酸分子の例は、DNAのホスホラミデート、ホスホチオエート、およびメチルホスホネートアナログである(米国特許第5,176,996号; 5,264,564号; および5,256,775号も参照されたい)。さらに、アンチセンス療法に有用なオリゴマーを作製する一般的な手法は、例えば、van der Krol et al., (1988)Biotechniques 6: 958-976; およびStein et al., (1988)Cancer Res 48: 2659-2668により論評されている。

20

30

【0083】

別の態様では、アレルギー性疾患の処置にRNA干渉(RNAi)が使用される。RNAiは動物における配列特異的、転写後遺伝子サイレンシングの一形態であり、サイレンシングされる遺伝子の配列に相同な、二本鎖RNA(dsRNA)によって誘導される。Elbashir et al., Nature, 2001、411、494-498。dsRNAは相同性のある領域内でのみ、相同RNAの特異的分解を誘導する。dsRNAは、配列特異的mRNA分解のためのガイド断片であると考えられ、しばしば低分子干渉RNA(siRNA)と呼ばれる、21から23ヌクレオチドの断片へと処理される。より長いdsRNAからこれらの短いsiRNA断片への処理は、RNase IIIが行なうと考えられている。Elbashir et al., 同上、Elbashir, et al., Genes and Devel., 2001、15、188-200。

40

【0084】

したがって、アレルギー性疾患に罹患する個体が診断され、有用な可能性のある物質または物質の組み合わせが、本明細書に開示される方法により同定されれば、物質の「有効量」が動物に投与される。

【0085】

本明細書では「投与」、「投与する」および「投与された」という用語は互換的に使用

50

される。物質は、舌下を含む経口的に、局所、または非経口的に、通常为非毒性で薬学的に許容されるキャリア、アジュバント、および媒体を含む用量単位の製剤で投与できる。

【0086】

臨床現場では、本発明の治療的または予防的物質は、いずれも当技術分野で公知のいくつかの方法のうち任意のものによって動物に導入できる。例えば、遺伝子送達系またはペプチドの薬学的調製物は、例えば静脈注射により全身に導入することができ、遺伝子送達媒体によって提供されるトランスフェクションの特異性、受容体遺伝子の発現を制御する転写調節配列による細胞タイプもしくは組織タイプの発現、またはその組み合わせにより主に標的細胞におけるタンパク質の特異的トランスダクションが起こる。別の態様では、アンチセンスまたはsiRNAの最初の送達はより限定的であり、動物への導入は非常に局所的である。例えば、カテーテルによって(米国特許第5,328,470号を参照されたい)、または定位固定の注入によって(例えばChen et al.(1994)PNAS 91: 3054-3057)、遺伝子送達媒体またはペプチドを導入することができる。

10

【0087】

そのような化合物の毒性および治療効果は、例えばLD50(集団の50%に致死的な用量)およびED50(集団の50%の治療上有効な用量)の決定のような、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法によって、決定できる。毒性および治療効果の間の用量比は治療指数であり、これはLD50/ED50という比として表現される。治療指数の大きい化合物のほうが好ましい。毒性の副作用を示す化合物を使用することもできるが、非感染細胞への潜在的損傷を抑え、それにより副作用を低減させるために、罹患組織の部位にそのような化合物を標的化する送達システムを設計するように注意する必要がある。

20

【0088】

細胞培養試験および動物試験から得られたデータを用いて、ヒトにおいて使用する用量範囲を計算することができる。そのような化合物の用量は、好ましくはED50を含む循環濃度の範囲内であり、ほとんどまたは全く毒性のないものである。用量は、利用する剤形および使用する投与経路に依存して、この範囲内で変わる可能性がある。本発明の方法で使用する任意の化合物では、治療上有効な用量を最初に細胞培養試験から推定することができる。動物モデルにおいて、細胞培養で決定されたIC50(症状の最大の障害の半分を達成する試験化合物濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、1回分を調製することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定できる。

30

【0089】

本発明は、以下の非制限的实施例にのみ言及することによりさらに詳述する。しかし、以下の実施例は説明のためのみであり、上述の発明の一般性を制限するものと理解してはならない。特に、本発明はHDMに曝露されたPMBCから得られるcig5、IFIT4、LAMP3、DACT1、IL17RB、KRT1、LNPEP、MAL、NCOA3、OAZ、PECAM1、PLXDC1、RASGRP3、SLC39A8、XBP1、NDFIP2、RAB27B、GNG8、GJB2およびCISHのmRNAの検出に関して詳述されているが、本明細書の所見はこれらの特定のアレルゲンまたは方法に限定されないことは明確に理解されるだろう。

【0090】

40

実施例1

アレルギー性および非アレルギー性被験体における、アレルゲンに応答したmRNAの特異的発現を決定するためのマイクロアレイの利用

イエダニ(HDM)に応答した血漿IgE陽性に基づいて選択された10人のアレルギー性個体から血液試料を、血清中のHDM特異的IgEの存在を検定して全て陰性であった10人の非アレルギー性対照被験体からの試料と共に、入手した。10人のアレルギー性被験体は、すべてアレルゲンによる皮膚プリック試験で5~14 mmのサイズの膨疹を示したが、非アレルギー性被験体はすべて陰性反応を示した。HDMに対するIgEの存在は、RAST(CAP)(Pharmacia、Australia)を用いた放射性アレルギー吸着イムノアッセイキャプチャー試験系によって検出され、この試験のアレルギー性志願者はRAST(CAP)スコアが 2だった。

50

【0091】

新しく単離した末梢血単核細胞(PBMC)は 1×10^6 細胞/mlで再懸濁し、細胞懸濁液0.5 mlを、30 µg/mlのHDM(Dermatophagoides pteronyssinus、CSL Limited、Parkville、オーストラリア)総抽出物を添加してまたは添加しないで、 4×10^{-5} 2-メルカプトエタノールを添加した無血清培地AIM-V⁴(Life Technologies、Mulgrave、オーストラリア)中で、丸底プレートにおいて、5%CO₂、37 °Cで、16、24、または48時間培養した。

【0092】

各時点で、等しいサイズの細胞の一定分量を遠心し、細胞沈殿物を直ちに総RNA抽出に用いた。または、総RNA抽出の前に、CD8⁺ T細胞の正の選択後、CD4⁺ T細胞の正の選択をするためにDynabeads(商標)を用いた。RNAの抽出は、標準的な技術で行なった。総RNAはTRIzol(Invitrogen)を用いた後、Rneasyミニキット(QUIAGEN)を用いて抽出した。 10

【0093】

またはTotally RNA抽出キット(Ambion、Austin、Texas、米国)を用いることができる。必要ならば、MessageMaker(商標)キット(Invitrogen、オランダ)を用いて総RNAの2 mgからメッセンジャーRNAを精製することもできる。

【0094】

各グループ(アレルギー性および非アレルギー性)の10人の個体から抽出されたRNAをプールして、標準的なAffymetrix(商標)プロトコルを用いて、標識し、Affymetrix(商標)Genechip(登録商標)U133AまたはU133plus2アレイにハイブリダイズさせた。アレイおよびプロトコルの完全な詳細は、Affymetrixのウェブサイト(<http://www.affymetrix.com/index.affx>)で得られる。U133Aアレイは39,000以上のヒトゲノムに対応するプローブセットを提供するが、U133plus2アレイはU133Aアレイの全てを含む、47,000以上の転写物に対応するプローブセットを提供する。対応する核酸配列はすべて、一般に公開されたデータベースで得られる。プール中の個々のRNAのサンプルは、後のTaqman(商標)PCR検証試験のために別に保管した(以下の実施例6を参照されたい)。 20

【0095】

マイクロアレイ実験のデータおよび以下の実施例2~3のデータは、log2目盛りで何倍という表示(刺激した培養 対 未刺激の培養)で図1に示されている。データは統計パッケージR(Irizarry R.A. et al. 2003、Biostatistics 4(2):249-64)を用いてrmaアルゴリズムにより解析した。遺伝子は、何倍という変化量が、各々の実験に示されているカットオフ値(バックグラウンドノイズ)よりも大きい場合に、刺激された培養と未刺激の培養において発現が異なると考えられた。カットオフ値は、実験毎にノイズの標準偏差を元にして決定された。その後、アレルギー性および非アレルギー性個体の間で一貫して異なるレベルで発現される遺伝子、すなわち、アレルギー性個体と非アレルギー性個体の間で、何倍という表現で大きな値の変化がある遺伝子が同定された。合計で23の遺伝子が異なる発現を示した；そのうち16はU133aアレイ、さらに7つがU133plus2アレイを用いて同定された。選択された遺伝子の例示的な発現パターンは図2から40に示されている。これらの図のデータは、均等目盛上で絶対発現量として示されている。 30

【0096】

図2から40にまとめられているマイクロアレイデータは、cig5、IFIT4およびLAMP3が非アレルギー性個体でアップレギュレートされている、すなわち、これらの遺伝子は、少なくとも16および24時間の培養では、アレルギー性個体よりも、非アレルギー性個体においてより高い程度まで、非刺激培養と比較してHDMで刺激した培養において、アップレギュレートされていることを示す。残りの20の遺伝子は、アレルギー性個体でアップレギュレートされており、実際にKRT1、PECAM1およびPLXDC1は非アレルギー性個体においてはダウンレギュレートされている。 40

【0097】

これらのデータは次のように解釈される：遺伝子が「保護的」すなわち遺伝子の発現がアレルギーの欠如と関連しているならば、アレルギー性個体は非アレルギー性個体よりも低いレベルの発現を示すはずである。例えば、刺激の48時間後のPBMC速度実験では、cig5 50

は、アレルギー性個体では1.8306という数字で、非アレルギー性個体の2.2612という対応する数字よりも低い。同様に、IFIT4はアレルギー性個体で1.2859という数字を示すが、これは非アレルギー性個体の1.6380という対応する値よりも低い。したがってこれらの遺伝子の発現は、「保護的」である。

【0098】

アレルギー性疾患を示す遺伝子は、アレルギー性個体での発現レベルが非アレルギー性個体よりも高い遺伝子である。例えば、刺激の48時間後のPBMC速度実験では、DACT1は、アレルギー性個体では1.2822という数字で、非アレルギー性個体の0.3281という対応する数字よりも高い。同様に、IL17RBはアレルギー性個体で1.2878という数字を示すが、これは非アレルギー性個体の0.5429という対応する値よりも高い。したがってこれらの遺伝子の発現は、「アレルギーの素因を予測する」と考えられる。

10

【0099】

実施例2

アレルギー性および非アレルギー性被験体のCD69⁺細胞から単離されたmRNAの特異的発現を決定するためのマイクロアレイの利用

イエダニ(HDM)に反応した血漿IgE陽性に基づいて選択された4人のアレルギー性個体、および血清中のHDM特異的IgEの存在を検定して全て陰性であった4人の非アレルギー性対照被験体から、血液試料を入手した。HDMに対するIgEの存在は、RAST(CAP)(Pharmacia、Australia)によって検出され、この試験のアレルギー性志願者はRAST(CAP)スコアが2だった。

20

【0100】

全ての個体から得られたPBMCは、実施例1に記述されるようにHDM(10 µg/ml)の存在下または非存在下で14時間培養した。14時間の刺激後、製造元の説明書に従ってCD14およびCD19でコートされたDynabeads(商標)を用いて、高レベルでCD69を発現する単球およびB細胞を除去した。その後、抗CD69モノクローナル抗体をコートしたDynabeads(商標)を用いて、残りの細胞集団から活性化したCD69⁺ T細胞の正の選択をした。RNAを抽出し、標識し、実施例1に記述されるようにして、標準的なAffymetrix(商標)プロトコルを用いて、Affymetrix(商標)U133aアレイにハイブリダイズさせた。

【0101】

これらの実験の結果は、図1カラム1に示されており、データの解析は実施例1に記述されるようにして行われた。やはり「保護的」であると考えられる遺伝子では、アレルギー性個体の発現レベルは非アレルギー性個体と比較して低く、アレルギーを発症する素因を予測すると考えられる遺伝子では、アレルギー性個体のほうが非アレルギー性個体よりも高いレベルで発現されていることが分かる。数字がゼロに近いほど、バックグラウンドの干渉レベルが大きく、試験の正確性が低下することは指摘に値する。

30

【0102】

実施例3

アレルギー性被験体および非アレルギー性被験体の、新しく分裂した細胞から単離されたmRNAの特異的発現を決定するためのマイクロアレイの使用

4人のアレルギー性および4人の非アレルギー性個体のPBMCを、標準的な手法によって、5 µmカルボキシフルオレセインジアセテート、スクシンイミジルエステル(CFSE)により標識し、その後実施例1に記述されるようにHDM(10 µg/ml)で6日間刺激した。CFSE蛍光染色は、細胞分裂をモニターするために使用された。新しい細胞分裂事象の子孫である細胞は、染色の程度が低く(CFSE^{low})；非分裂細胞は強く染色される。生きた子孫細胞(CFSE^{low})をフローサイトメトリーでソートし、一晚静置し、その後PMAおよびイオノマイシンで6時間刺激した。RNAを抽出し、標識し、上記のように、標準的なAffymetrix(商標)プロトコルを用いて、Affymetrix(商標)U133aアレイにハイブリダイズさせた。

40

【0103】

これらの実験の結果は、図1カラム2に示されており、データの解析は実施例1に記述されるようにして行われた。これらの実験では、非アレルギー性被験体のHDM特異的細胞の

50

増殖が非常に悪かったため、アレルギー性被験体のみから解析に十分なRNAが得られた。しかし、この実験では、最初に「細胞株」を作製して、その後、当技術分野で公知の物質、例えばPMA/イオノマイシンを用いて再刺激して「最適な」刺激を提供することにより、特定のT細胞を濃縮することが可能であることを示す。これは総PBMCを用いた未分画T細胞の場合の低濃度の特異的アレルゲンによるわずかな刺激と対照をなす。

【0104】

実施例4

実施例1の結果の検証

IL-4はすべてのTh2細胞に必須の増殖因子である。したがって、各PBMC試料の「Th2状態」を確認するため、実施例1に記述された速度実験のためのプールを作製するために使用した個々の試料の、48時間細胞の沈殿物から抽出したRNAにおける、指標遺伝子IL-4の発現レベルを測定するために、ABI Prism 7900HT Sequence Detection Systemを用いて、リアルタイムの定量的PCRを実行した。

10

【0105】

QuantiTect SYBRGreen PCR Master Mix(QIAGEN)を用いて、2.5 mM MgCl₂(最終濃度)を含む標準的なPCRプレミックスが調製された。SYBRGreenは全ての二本鎖DNAに結合するので、プローブは不要である。プライマーは最終濃度0.3 μMで使用された。HotStar Taqポリメラーゼ活性化のために10分ではなく15分が使用された以外は、標準的な条件が用いられた。さらに、単一産物の増幅を確認するために、解離段階を行い、融解曲線分析が行なわれた。増幅産物は、関心対象の標的の特異的な増幅を確認するために、配列決定が行なわれたか、行われる予定である。PCRに使用されたプライマーは：

20

IL-4 フォワード：5' AACAGCCTCACAGAGCAGAAGACT3' (SEQ ID NO:47)

IL-4 リバース : 5' CAGCGAGTGTCCCTTCTCATGGT3' (SEQ ID NO:48)

LAMP3 フォワード：5' GCGTCCCTGGCCGTAATTT3' (SEQ ID NO:5)

LAMP3 リバース : 5' TGGTTGCTTAGCTGGTTGCT3' (SEQ ID NO:6)

DACT1 フォワード：5' AACTCGGTGTTCACTGAGTGT3' (SEQ ID NO:7)

30

DACT1 リバース : 5' GGAGAGGGGAACGGCAAAC3' (SEQ ID NO:8)

PLXDC1 フォワード: 5' CCTGGGCATGTGTCAGAGC3' (SEQ ID NO:23)

PLXDC1 リバース : 5' GGTGTTGGAGAGTATTGTGTGG3' (SEQ ID NO:24)

cig5 フォワード: 5' CAAGACCGGGGAGAATACCTG3' (SEQ ID NO:1)

cig5 リバース : 5' GCGAGAATGTCCAAATACTCACC3' (SEQ ID NO:2)

10

IFIT4 フォワード: 5' GAGTGAGGTCACCAAGAATTC3' (SEQ ID NO:3)

IFIT4 リバース : 5' CACTCTATCTTCTAGATCCCTTGAGA3' (SEQ ID NO:4)

MAL フォワード: 5' TCGTGGGTGCTGTGTTTACTCT3' (SEQ ID NO:15)

MAL リバース : 5' CAGTTGGAGGTTAGACACAGCAA3' (SEQ ID NO:16)

NCOA3 フォワード: 5' CCTGTCTCAGCCACGAGCTA3' (SEQ ID NO:17)

NCOA3 リバース : 5' TCCTGAAAGATCATGTCTGGTAA3' (SEQ ID NO:18)

20

PECAM1 フォワード: 5' AGTCCAGATAGTCGTATGTGAAATGC3' (SEQ ID NO:21)

PECAM1 リバース : GGTCTGTCCTTTTATGACCTCAAAC3' (SEQ ID NO:22)

SLC39A8 フォワード: 5' GCAGTCTTACAGCAATTGAACTTT3' (SEQ ID NO:27)

SLC39A8 リバース : 5' CCATATCCCCAACTTCTGAA3' (SEQ ID NO:28)

XBP1 フォワード: 5' GTAGATTTAGAAGAAGAGAACC AAAAC3' (SEQ ID NO:29)

XBP1 リバース : 5' CCAAGCGCTGTCTTAACTC3' (SEQ ID NO:30)

30

NDFIP2 フォワード: 5' AGTGGGGAATGATGGCATTTT3' (SEQ ID NO:31)

NDFIP2 リバース : AAATCCGCAGATAGCACCA3' (SEQ ID NO:32)

RAB27B フォワード: 5' CAGAACTGGATGAGCCAACT3' (SEQ ID NO:33)

RAB27B リバース : 5' GACTTCCCTCTGATCTGGTAGG3' (SEQ ID NO:34)

40

243610_at フォワード: 5' TGCATTGACAACGTACTCAGAA3' (SEQ ID NO:35)

243610_at リバース : 5' TCATCTTGACAGGGATAAGCAT3' (SEQ ID NO:36)

GNG8 フォワード: 5' GAACATCGACCGCATGAAGGT3' (SEQ ID NO:37)

GNG8 リバース : 5' AGAACACAAAAGAGGCGCTTG3' (SEQ ID NO:38)

GJB2 フォワード: 5'GCTTCCTCCCGACGCAGA3' (SEQ ID NO:39)

GJB2 リバース : 5'AACGAGGATCATAATGCGAAA3' (SEQ ID NO:40)

1556097_at フォワード: 5'TCTTATTTCACTTTCTCAACTCATCA3' (SEQ ID NO:41)

1556097_at リバース : 5'GGCATAACCTGAATGTATAATTCAA3' (SEQ ID NO:42)

242743_at フォワード: 5'GAAAAAGCTGTTGAGTGAAGAAGACT3' (SEQ ID NO:43)

242743_at リバース : 5'TGCAGGATGAGCAATGCTGAGA3' (SEQ ID NO:44)

10

および

CISH フォワード: 5'GGGAATCTGGCTGGTATTGG3' (SEQ ID NO:45)

CISH リバース : 5'TTCTGGCATCTTCTGCAGGTGTT3' (SEQ ID NO:46)

である。

【 0 1 0 6 】

データはハウスキーピング遺伝子EEF1A1に対して標準化し、結果は図41から45に示されている。図41から、最初に培養実験に選択されたアレルギー性と推定される個体由来の試料のうちの7つは活発なIL-4遺伝子転写物を示したが、矢印で示す3つの試料では、反応が弱いまたは検出されないことが理解できる。これは、皮膚プリック試験が陽性であるにも関わらず、試料採取時にこれらの個体において循環血中に存在したHDM特異的T細胞は、インビトロの免疫応答の検出には低過ぎることを示す。これらの3人の被験体は、皮膚プリック試験で最も低い応答を示し(5~6 mm)、またDACT1およびPLXDC1の発現も低レベルだったが、LAMP3の発現は高レベルだった。

20

【 0 1 0 7 】

検証実験のために、PMBCのマイクロアレイ解析、または16および48時間のCD4速度実験に使用されたプールを作製するために利用された個々の試料のRNAを、cDNAに変換し、その後、定量的PCRを行なって一連の代表的遺伝子を検出した。結果は図42から63にまとめられている。いくつかの場合では、48時間のインキュベーション後にのみ有意な変化が見られた。

30

【 0 1 0 8 】

以下のプライマーセットを用いて、残りの遺伝子に関しても同様に検証が行われた。

IL17RB フォワード: 5' TGTGGAGGCACGAAAGGAT3' (SEQ ID NO:9)

IL17RB リバース : GATGGGTAAACCACAAGAACCT3' (SEQ ID NO:10)

KRT1 フォワード: 5' TCAATCTCGGTTGGATTCGGA3' (SEQ ID NO:11)

KRT1 リバース : 5' CTGCTTGGTAGAGTGCTGTAAGG3' (SEQ ID NO:12)

LNPEP フォワード: 5' TTCACCAATGATCGGCTTCAG3' (SEQ ID NO:13)

LNPEP リバース : 5' CTCCATCTCATGCTCACCAAG3' (SEQ ID NO:14)

10

OAZ フォワード: 5' TCAATTTACACCTGCGATCACTG3' (SEQ ID NO:19)

OAZ リバース : 5' GTTGTGGGTCGTCATCACCA3' (SEQ ID NO:20)

および

RASGRP3 フォワード: 5' TCAGCCTCATCGACATATCCA3' (SEQ ID NO:25)

RASGRP3 リバース : 5' TCAGCCAATTCAATGGGCTCC3' (SEQ ID NO:26)

20

【 0 1 0 9 】

本発明は、明確さと理解のためにいくらか詳細に説明されたが、本明細書に開示される発明概念の範囲を超えることなく、本明細書に記述される態様および方法に対して様々な改変および変更が可能であることが、当業者には明らかだろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 0 】

【 図 1 】 HGU133A アレイ上で行なったCD69、CFSE、CD4およびCD8速度実験、ならびにHGU133plus2アレイ上で行なったPMBC速度実験の結果を示す。t16、t24およびt48は16、24および48時間の培養を表す。

【 図 2 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のci g5遺伝子の発現レベルの比較を示す。

30

【 図 3 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のIF IT4遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 4 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のLA MP3遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 5 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のDA CT1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 6 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のIL 17RB遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 7 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のKR T1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

40

【 図 8 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のLN PEP遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 9 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のMA L遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 1 0 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のNCOA3遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 1 1 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のOAZ遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【 図 1 2 】 HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中の

50

PECAM1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 3】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のPLXDC1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 4】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のRASGRP3遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 5】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のSLC39A8遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 6】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のXBP1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 7】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4細胞中のCISH遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 8】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のcig 5遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 1 9】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のIFI T4遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 0】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のLAM P3遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 1】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のDAC T1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 2】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のIL1 7RB遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 3】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のKRT 1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 4】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のLNP EP遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 5】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のMAL 遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 6】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のNCO A3遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 7】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のOAZ 遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 8】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のPEC AM1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 2 9】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のPLX DC1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 0】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のRAS GRP3遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 1】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のSLC 39A8遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 2】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のXBP 1遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 3】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のNDF IP2遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 4】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のRAB 27B遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 5】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中の242 743_AT遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 6】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のGNG 8遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図 3 7】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のGJB

10

20

30

40

50

2遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図38】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中の1556097遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図39】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中の243610_AT遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図40】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC中のCISH遺伝子の発現レベルの比較を示す。

【図41】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のIL4 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

10

【図42】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のDACT1 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図43】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のLAMP3 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図44】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のPLXDC1 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図45】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激48時間後のPLXDC1 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

20

【図46】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のcig5 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図47】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のIFIT4 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図48】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のMAL mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

30

【図49】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のPECAM1 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図50】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のSLC39A8 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図51】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のXBP1 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

40

【図52】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のNDFIP2 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図53】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後の243610_at CISH mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図54】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後のCISH mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図55】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の

50

刺激48時間後のNCOA3 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図56】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後のNDFIP2 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図57】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後のRAB27B mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図58】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後の243610_at mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

10

【図59】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後のGNG8 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図60】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後のGJB2 mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図61】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後の1556097_at mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

20

【図62】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたCD4+細胞の刺激16時間後の242743_at mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

【図63】HDMにアレルギー性の個体および非アレルギーの個体から得られたPBMC細胞の刺激16時間後の242743_at mRNAの、定量的リアルタイムPCRで評価した発現レベルの比較を示す。

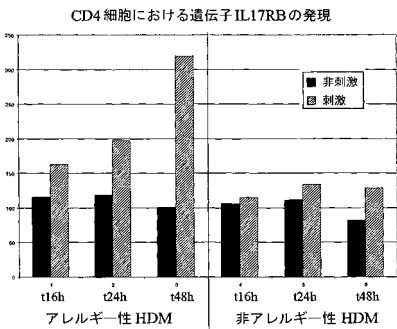
【 図 2 】

CD69, CFSE, CD4 速度実験、および CD8 速度実験は HGU133a アレイで行われ、PBMC 速度実験は HGU133plus2 アレイで行われた。

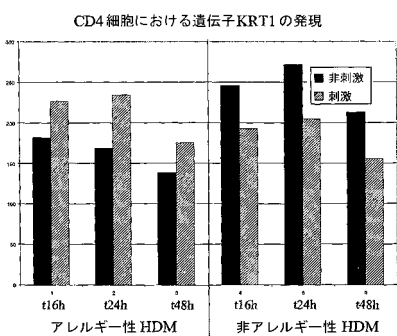
Condition	Time	Number of positive cells	
		Non-stimulated (黒色)	Stimulated (灰色)
アレルギー性 HDM	t16h	~250	~250
	t24h	~250	~450
	t48h	~250	~800
非アレルギー性 HDM	t16h	~250	~450
	t24h	~250	~500
	t48h	~250	~700

Group	Time	非刺激 (Non-stimulated)	刺激 (Stimulated)
アレルギー性 HDM (Allergic HDM)	t16h	~300	~250
	t24h	~280	~320
	t48h	~250	~700
非アレルギー性 HDM (Non-allergic HDM)	t16h	~200	~280
	t24h	~220	~350
	t48h	~180	~750

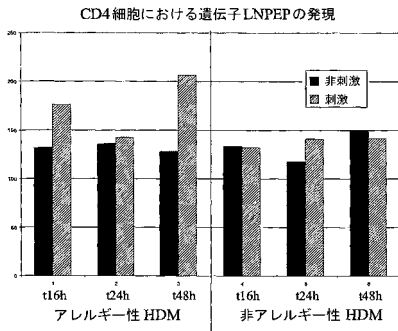
【 図 6 】



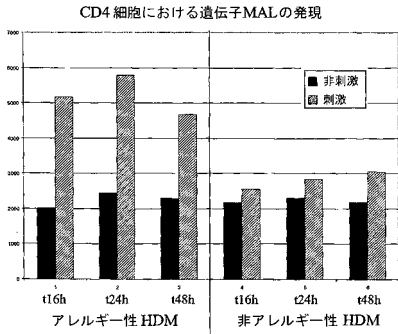
【 圖 7 】



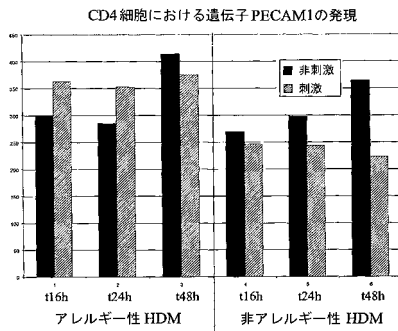
【図 8】



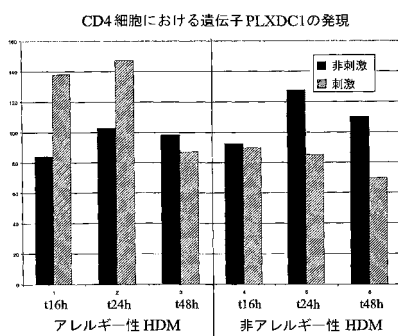
【図 9】



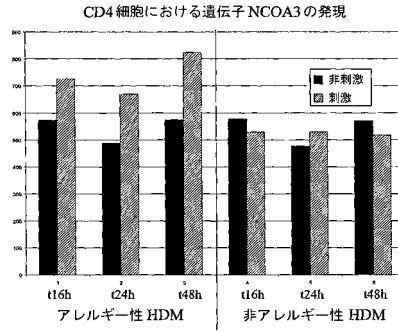
【図 12】



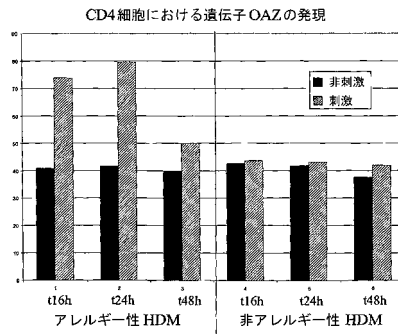
【図 13】



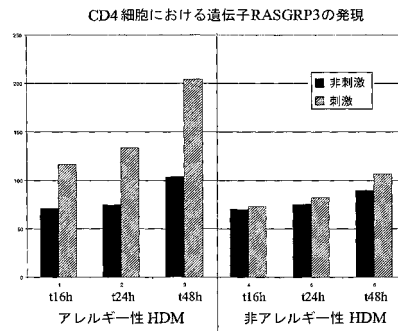
【図 10】



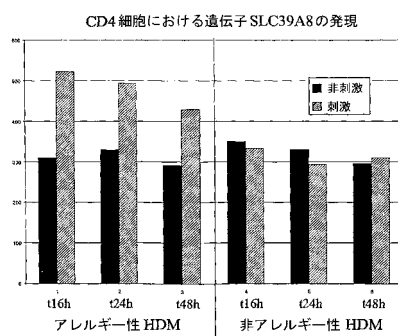
【図 11】



【図 14】

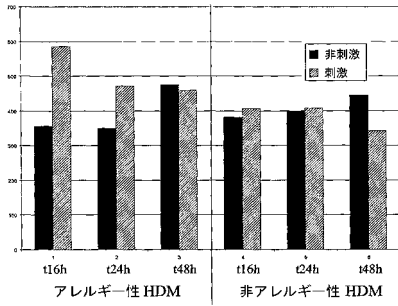


【図 15】



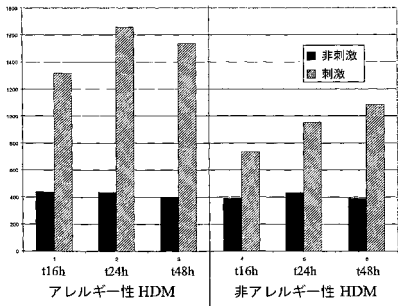
【図 16】

CD4細胞における遺伝子XBP1の発現



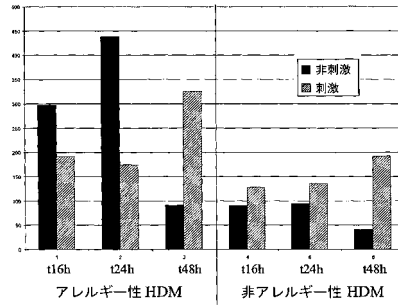
【図 17】

CD4細胞における遺伝子CISHの発現



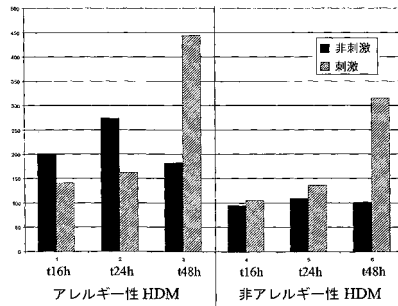
【図 18】

PBMCにおける遺伝子cig5の発現



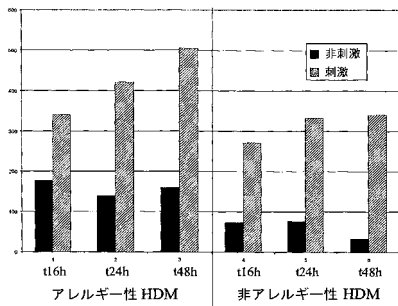
【図 19】

PBMCにおける遺伝子IFTT4の発現



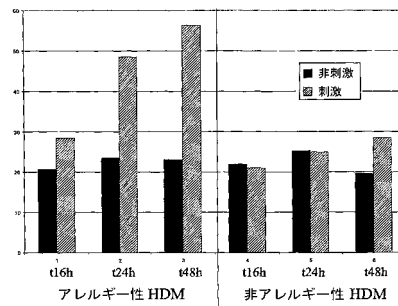
【図 20】

PBMCにおける遺伝子LAMP3の発現



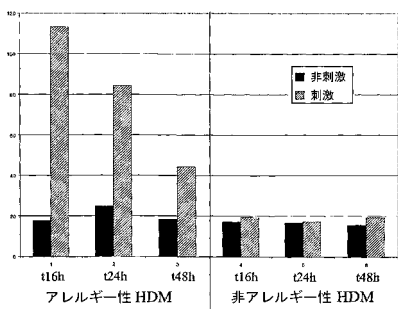
【図 22】

PBMCにおける遺伝子IL17RBの発現



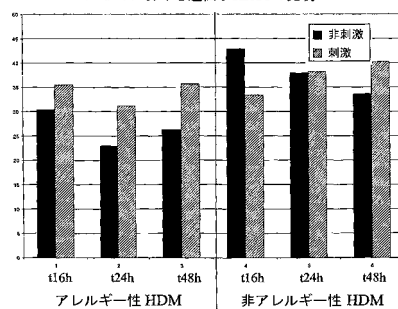
【図 21】

PBMCにおける遺伝子DACT1の発現



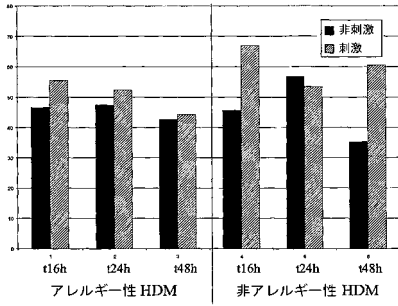
【図 23】

PBMCにおける遺伝子KRT1の発現



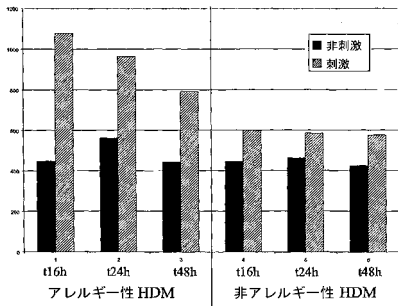
【図 2 4】

PBMCにおける遺伝子LNPEPの発現



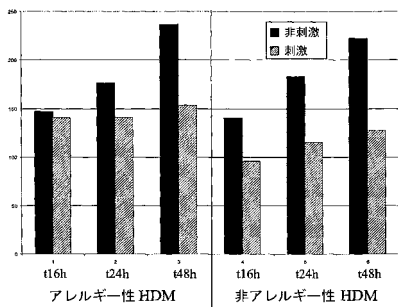
【図 2 5】

PBMCにおける遺伝子MALの発現



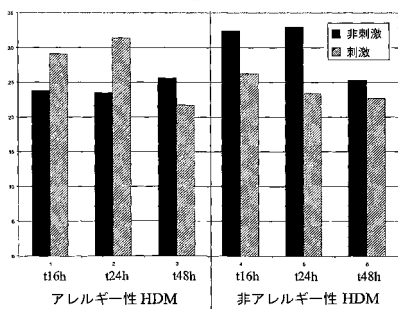
【図 2 8】

PBMCにおける遺伝子PECAM1の発現



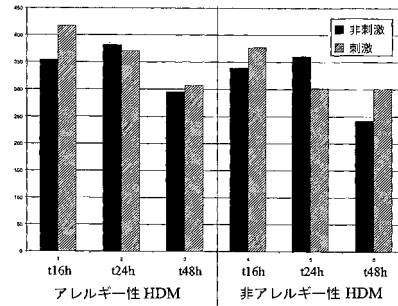
【図 2 9】

PBMCにおける遺伝子PLXDC1の発現



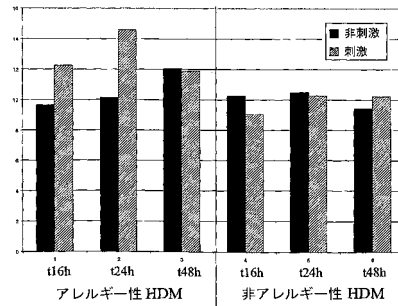
【図 2 6】

PBMCにおける遺伝子NCOA3の発現



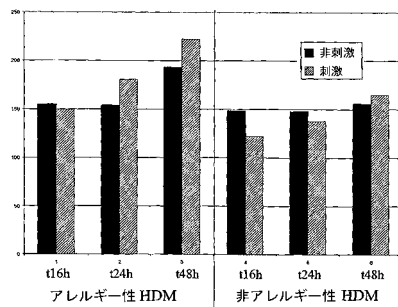
【図 2 7】

PBMCにおける遺伝子OAZの発現



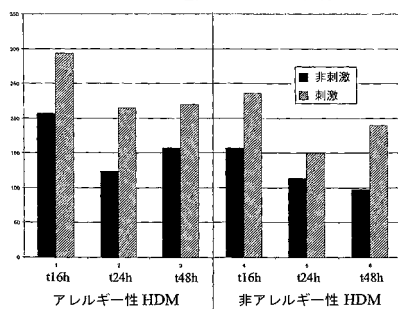
【図 3 0】

PBMCにおける遺伝子RASGRP3の発現



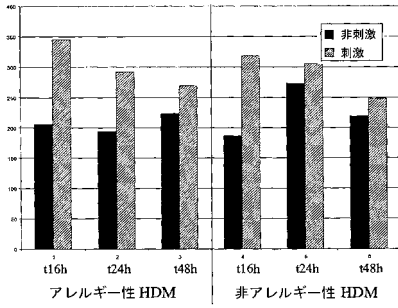
【図 3 1】

PBMCにおける遺伝子SLC39A8の発現



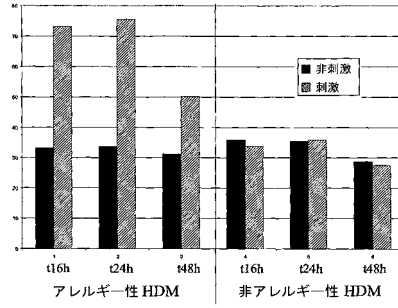
【図 3 2】

PBMCにおける遺伝子XBP1の発現



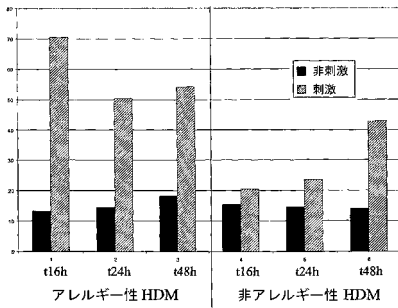
【図 3 4】

PBMCにおける遺伝子RAB27Bの発現



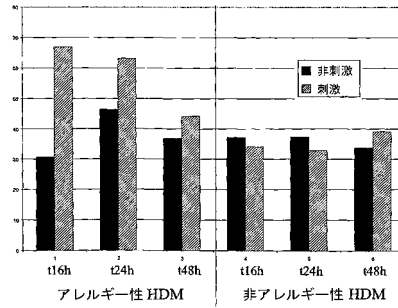
【図 3 3】

PBMCにおける遺伝子NDFIP2の発現



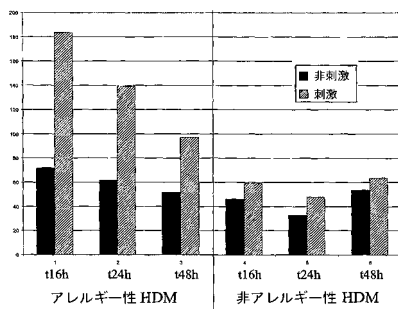
【図 3 5】

PBMCにおける遺伝子242743_atの発現



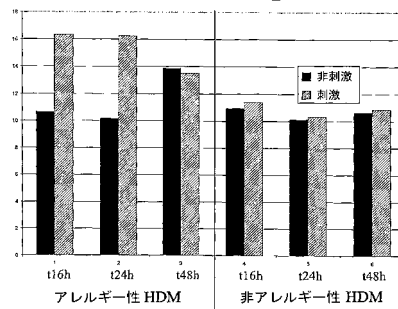
【図 3 6】

PBMCにおける遺伝子GNG8の発現



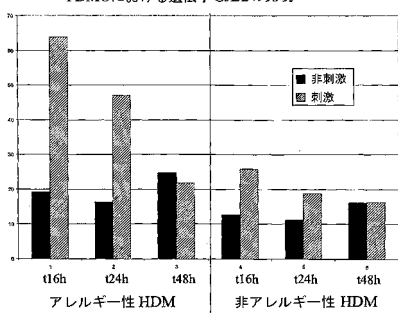
【図 3 8】

PBMCにおける遺伝子1556097_atの発現



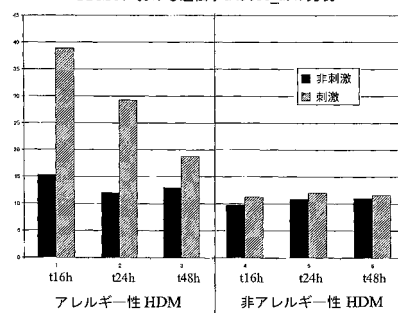
【図 3 7】

PBMCにおける遺伝子GJB2の発現

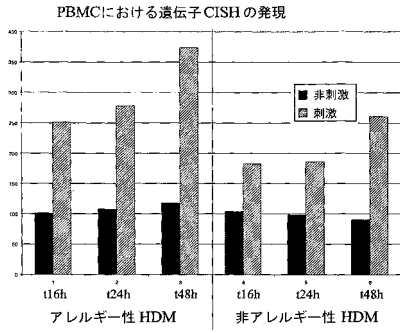


【図 3 9】

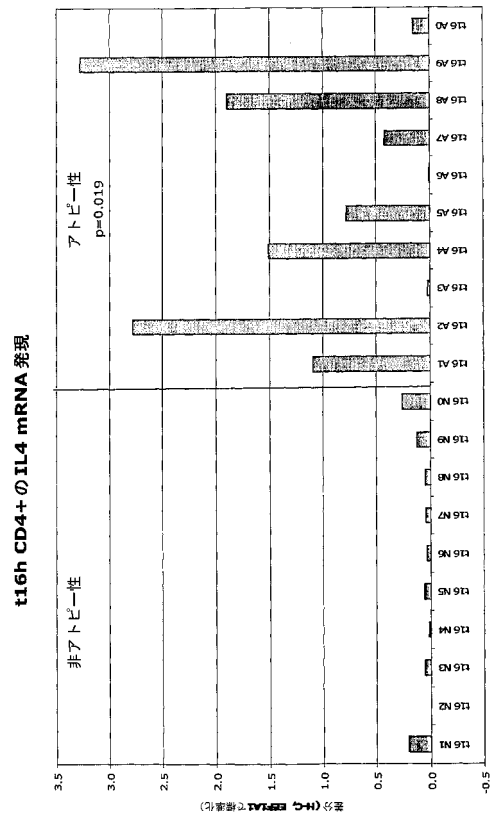
PBMCにおける遺伝子243610_atの発現



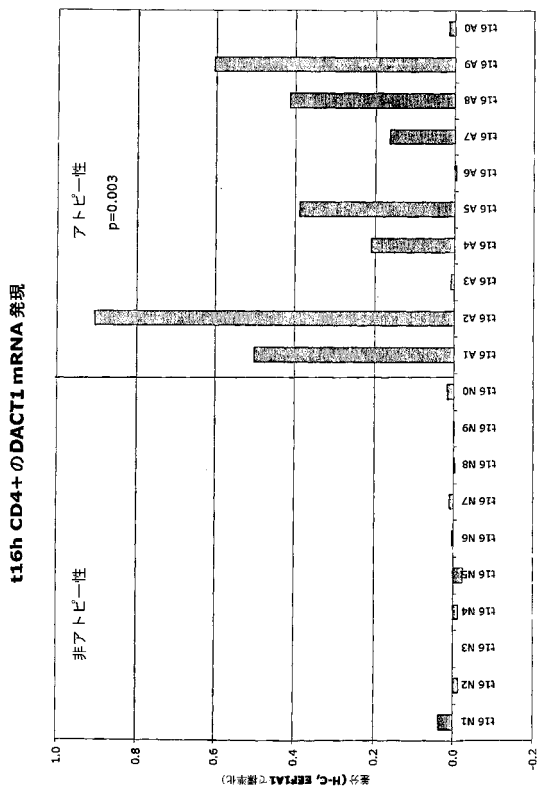
【図 40】



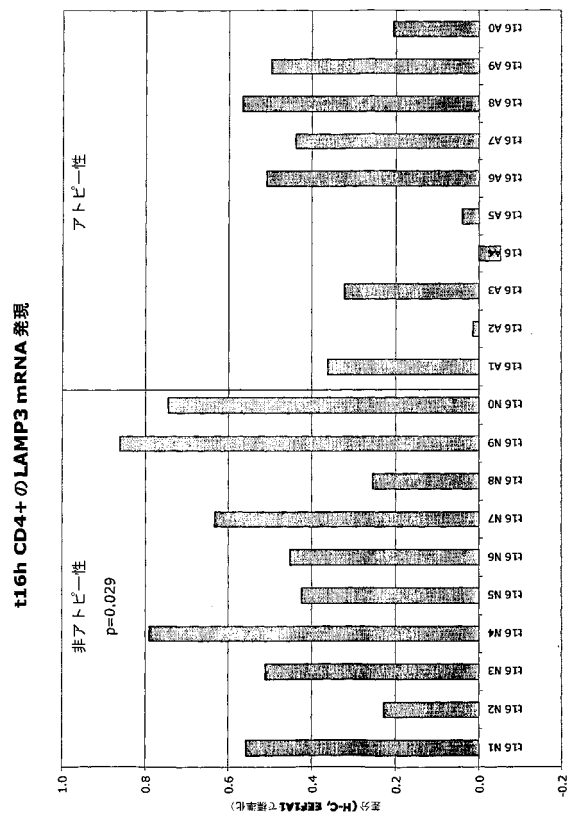
【図 41】



【図 42】

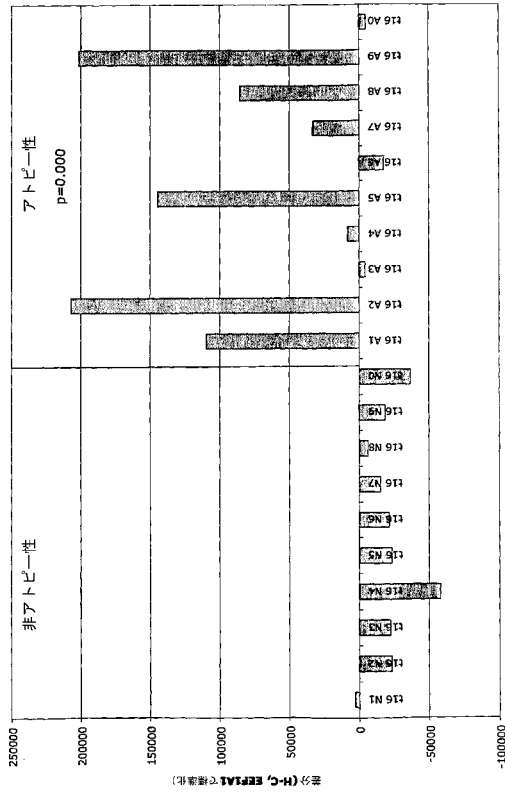


【図 43】



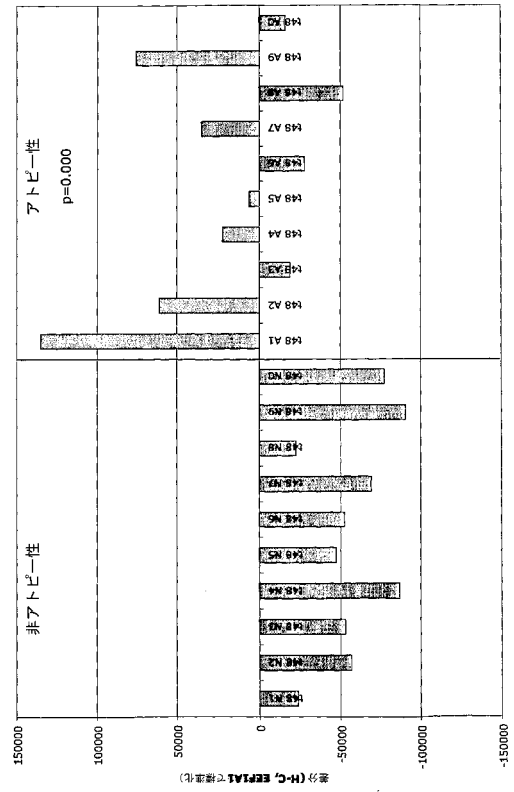
【図 4 4】

t16h CD4+ の PLXDC1 mRNA 発現



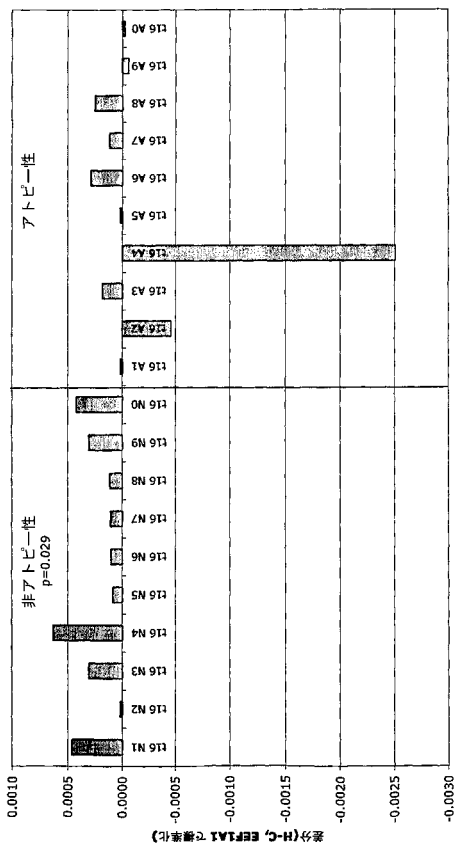
【図 4 5】

t48h CD4+ の PLXDC1 mRNA 発現



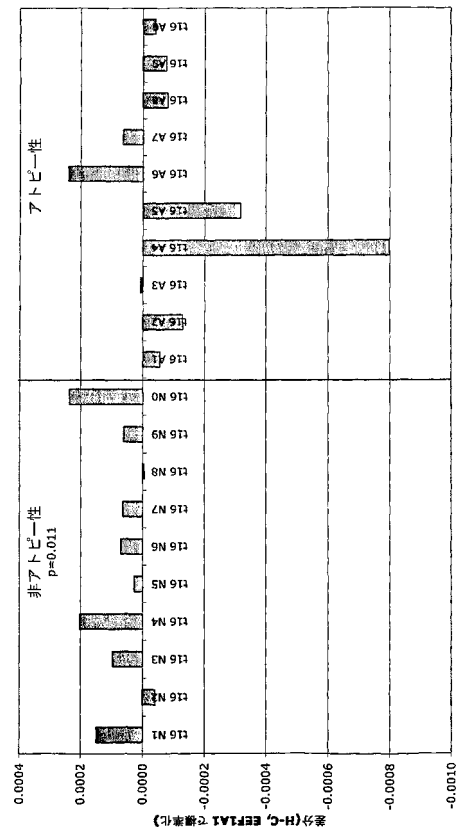
【図 4 6】

t16h CD4+ の ci95 mRNA 発現



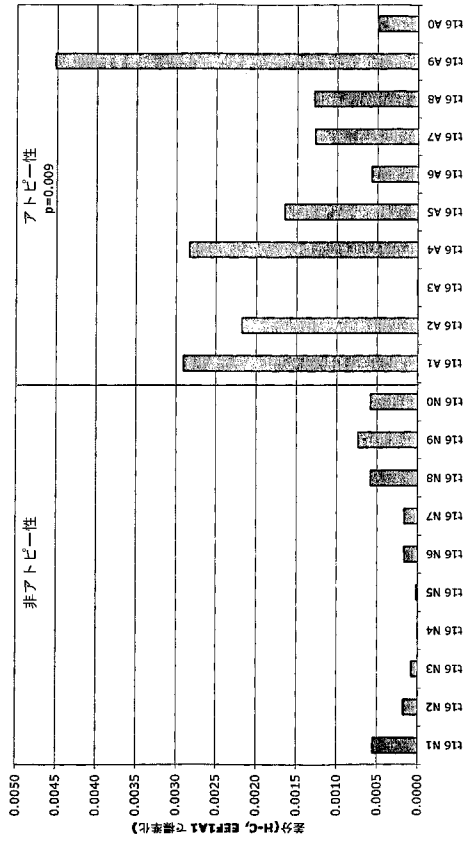
【図 4 7】

t16h CD4+ の IFIT4 mRNA 発現



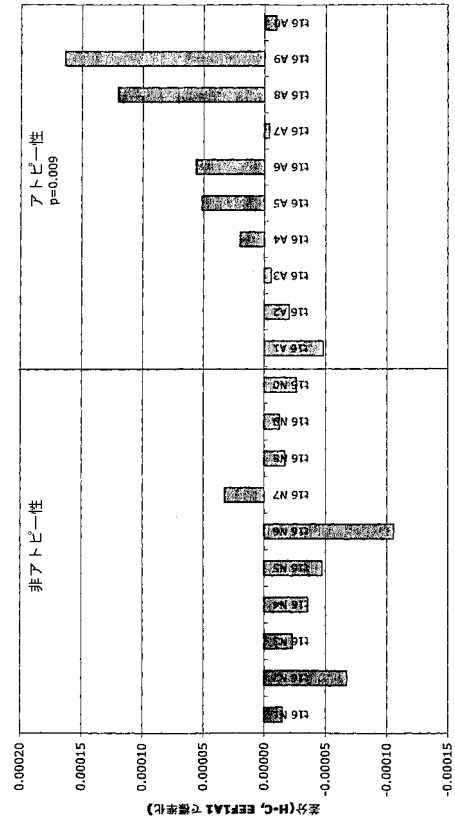
【図 48】

t16h CD4+ の MAL mRNA 発現



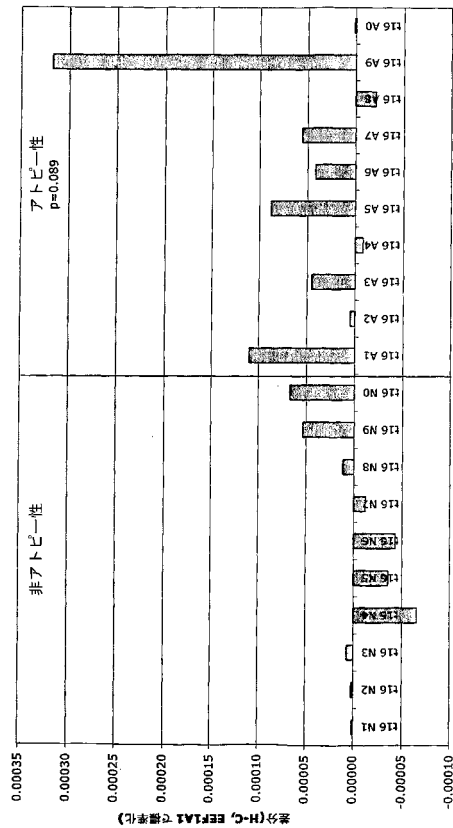
【図 49】

t16h CD4+ の PECAM1 mRNA 発現



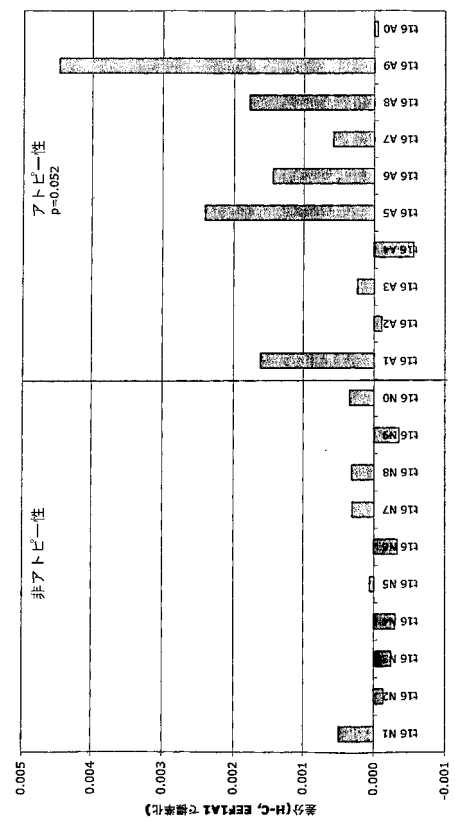
【図 50】

t16h CD4+ の SLC39A8 mRNA 発現



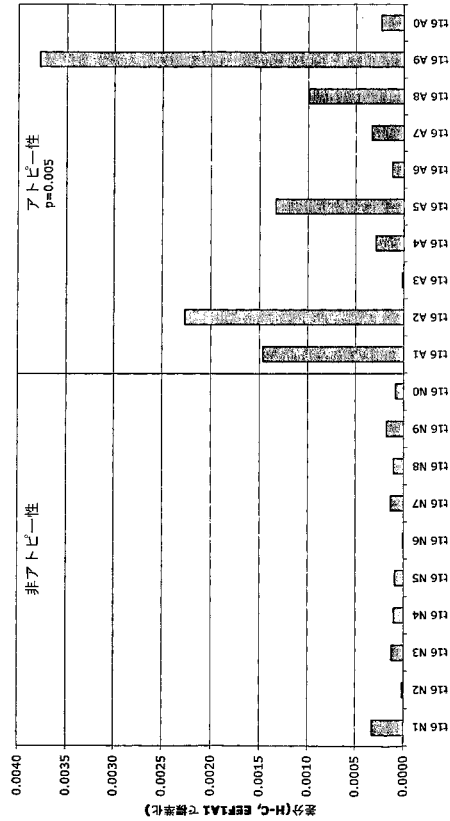
【図 51】

t16h CD4+ の XBP1 mRNA 発現



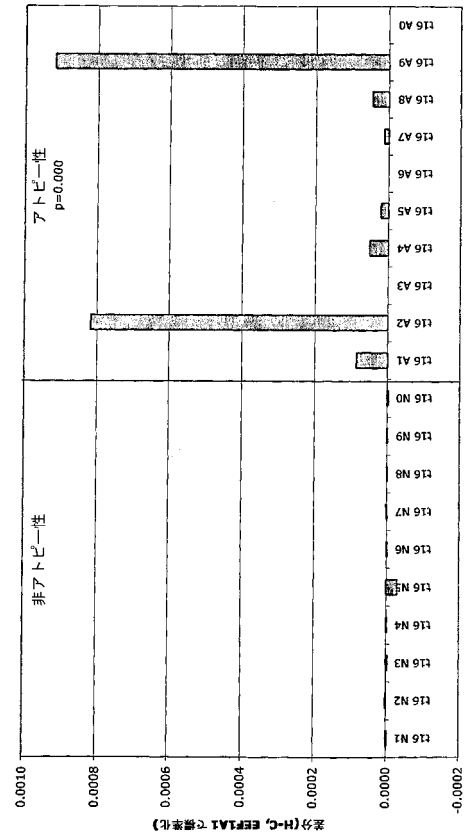
【図 5 2】

t16h CD4+ の NDFIP2 mRNA 発現



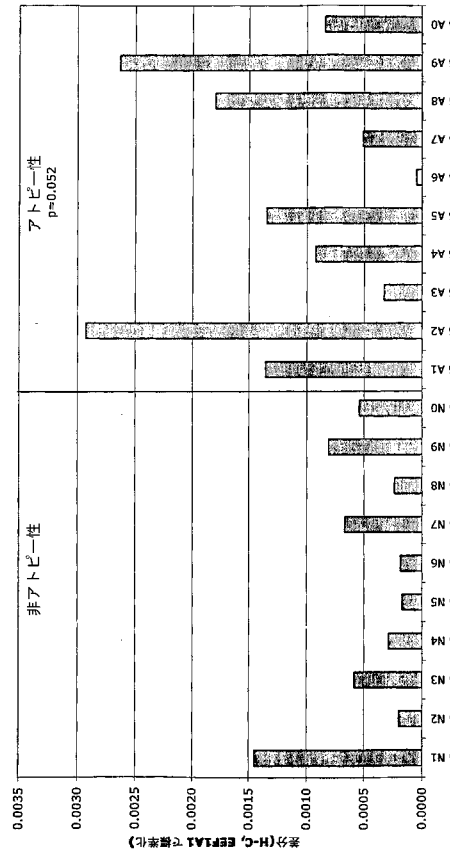
【図 5 3】

t16h CD4+ の 243610_at mRNA 発現



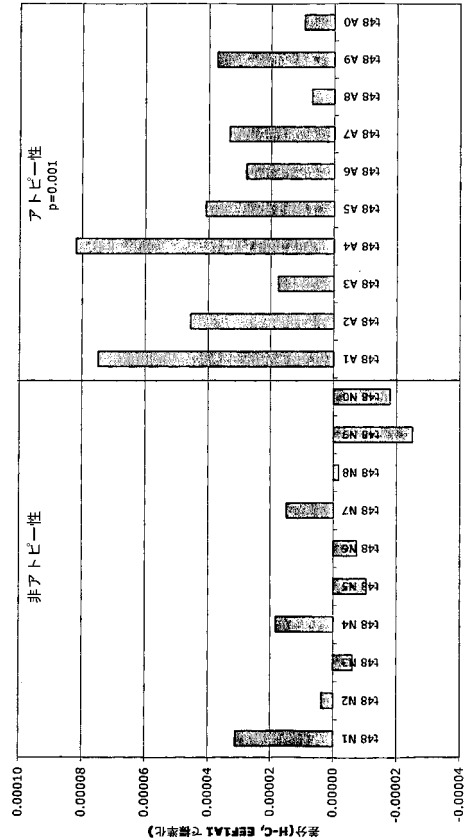
【図 5 4】

t16h CD4+ の CISH mRNA 発現



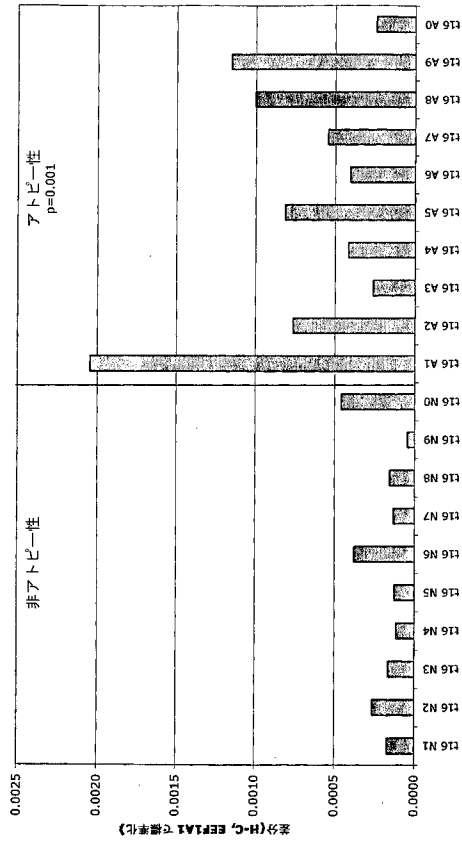
【図 5 5】

t48h CD4+ の NCOA3 mRNA 発現



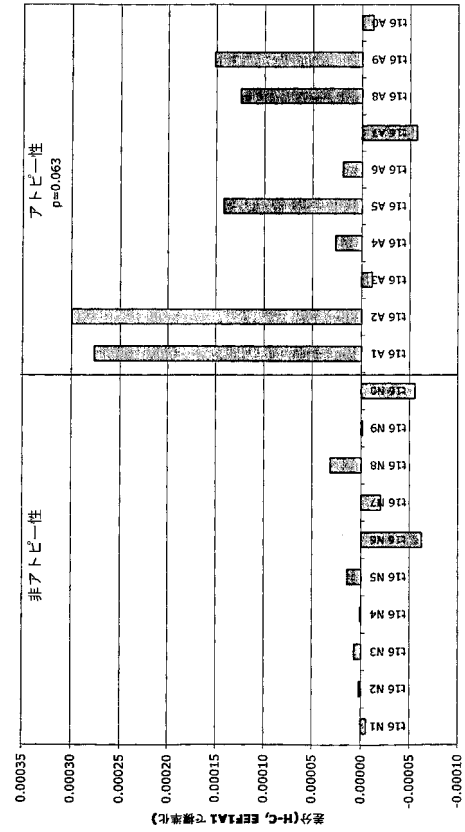
【図 5 6】

t16h PBMC の NDFIP2 mRNA 発現



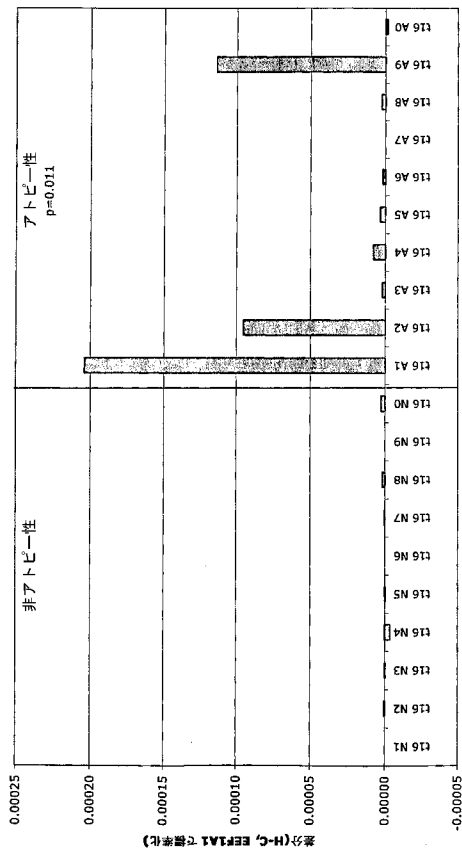
【図 5 7】

t16h PBMC の RAB27B mRNA 発現



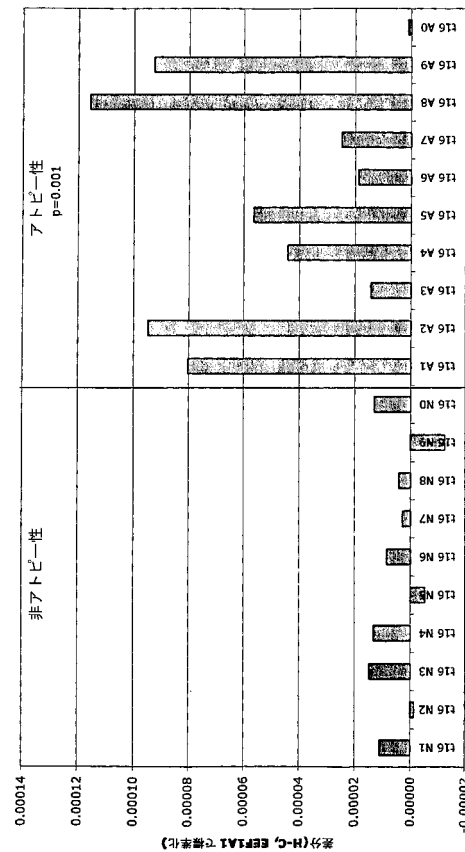
【図 5 8】

t16h PBMC の 243610_at mRNA 発現



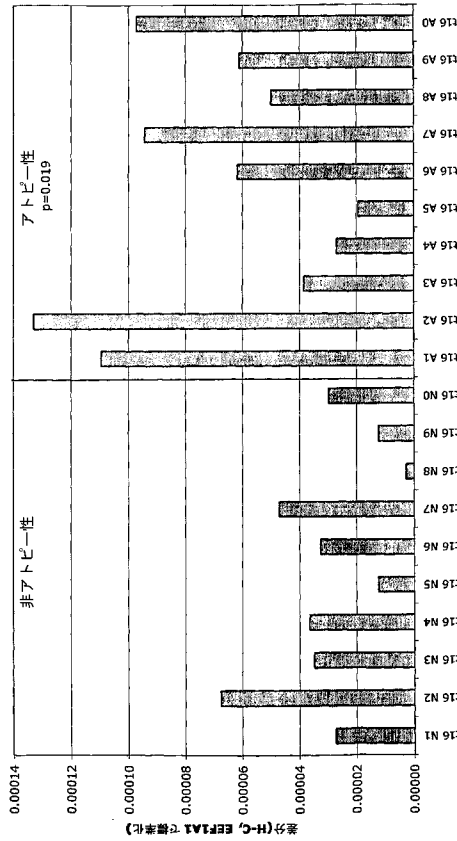
【図 5 9】

t16h PBMC の GNG8 mRNA 発現



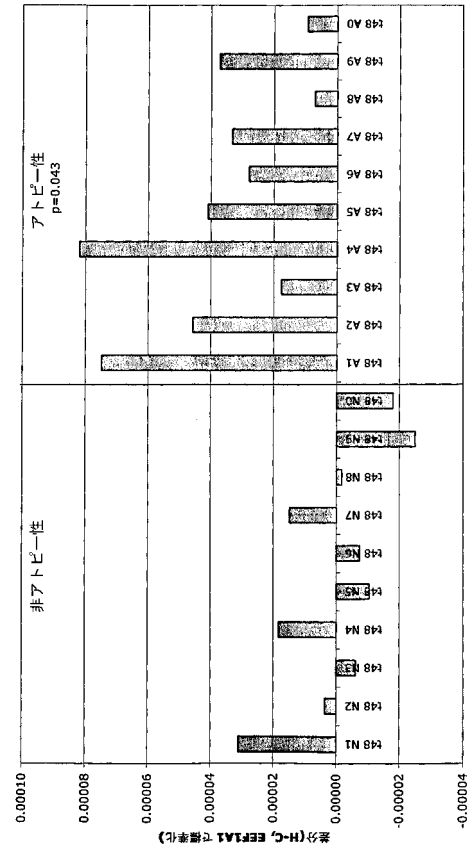
【図 60】

t16h PBMC の GJB2 mRNA 発現



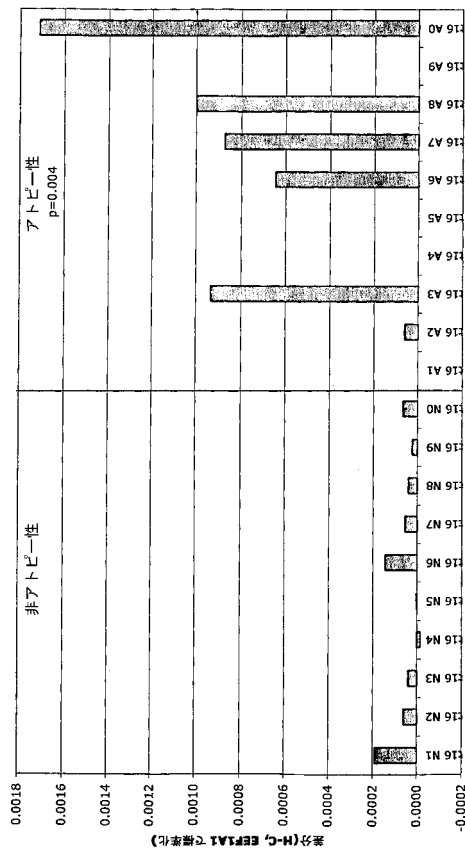
【図 61】

t16h PBMC の 1556097_at mRNA 発現



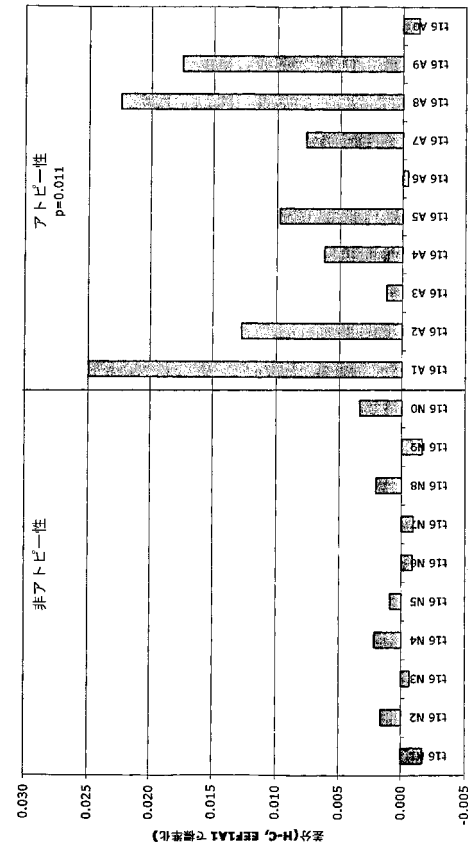
【図 62】

t16h CD4+ の 242743_at mRNA 発現



【図 63】

t16h PBMC の 242743_at mRNA 発現



【配列表】

2008512099000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2005/001325
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ : C12Q 1/68; G01N 33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, CAPLUS, DGENE, WPIDS: SEQ ID Nos 7 & 8, dact1, dapper, gene expression or activation, predict?, diagnos?, prognos?, susceptibil?, asthma, allerg?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Genbank Accession no. NM_016651, Katoh M et al Homo Sapiens dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus) (DACT1) mRNA, published 23 December 2001.	1-3, 5-11 and 13-17
X	WO 2002 090526 A (HUMAN GENOME SCIENCES) 14 November 2002 See pages 1-11 and claims in particular.	18, 19, 22-27, 29 and 31-42
X	Szalai C et al (2001) "Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity" J Allergy Clin Immunol 108, 375-81 See whole document.	18, 19, 22-27, 29 and 31-42
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 November 2005		Date of mailing of the international search report 18 NOV 2005
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer TERRY MOORE Telephone No : (02) 6283 2632

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2005/001325

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: Claims 18 – 21 in part.
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 18-21 are not limited to the technical features of the invention. The technical features of the invention relate to specific genes and the use of agents that are specific for these genes. In contrast the claims do not define agents that are *specific* for the genes mentioned in the claims. As such, the claims will only be searched with respect the use of agents specific for the genes of the claims.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention in claims Nos.: 1-3, 5-11, 13-19, 22-27, 29 and 31-42 as they relate to the gene DACT1 (see supplemental box).

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2005/001325

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to VIII is not sufficient)

Continuation of Box No: III (lack of unity)

The international application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Note that Rule 13.2 states that where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention referred to in Rule 13.1 shall be fulfilled only where there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The ISA has identified 23 separate inventions.

The claims are directed to isolated nucleic acid molecules whose expression is modulated in mammals having an allergic condition selected from the group consisting of *cig5*, *IFIT4*, *LAMP3*, *DACT1*, *IL17RB*, *KRT1*, *LNPEP*, *MAL*, *NCOA3*, *OAZ*, *PECAM1*, *PLXDC1*, *RASGRP3*, *SLC39A8*, *XBP1*, *NDFIP2*, *RAB27B*, *GNG8*, *GJB2*, *CISH*, chromosome 9q21.13 at locus 138255 identified by probe 243610_at, chromosome15q25.2 identified by probe 1556097_at and chromosome 16p12.1 identified by probe 242743_at, and compositions, expression products and uses thereof (see claims 1 – 14, 23, 24, 26 – 28, 30, 39), and primer sets and kits associated with these genes (see claims 15 – 17)

Claims 18 – 21 are broad and unsupported by the description. The only support provided in the specification is for the specific genes noted above. Therefore the claims will only be searched to the extent that the agents used to treat or prevent allergic disorders are *specific* for the genes mentioned in the claims.

The concept of a 'gene associated with an allergic disorder', is broad and ill defined. The only support provided in the specification is for the specific genes noted above. Therefore, at best, claims 22, 25, 29 – 38 and 40 - 42 will only be searched in part, to the extent that the claims are supported by the disclosure in the specification.

The concept of identifying and associating genes with allergic disorders is known –

Howard, T. D., et. al. CHEST (2003) 123:363S-368S. Mapping Susceptibility Genes for Allergic Diseases.

Immervoll, T., et. al. NUCLEIC ACIDS RESEARCH (1999) 27(2):213-4. Current Status of the Asthma and Allergy Database.

-and therefore, *a posteriori*, this is not a special technical feature of the invention. The applicant concedes that some of the genes which have been specifically associated with allergic disorders, for which there is support in the description, are known (p. 3). Therefore if the Markush approach was applied, although the genes have a common function or role, they cannot be regarded as a novel group because the applicant has already conceded that at least some of the groups are known. Hence each gene represents a different invention. Therefore there are 23 different inventions.

The applicant chose not to pay any extra fees and elected to have the invention relating to the gene *DACT1* searched and examined for the fee already paid.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2005/001325

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report			Patent Family Member			
WO 02090526	AU	19313/99	AU	23064/99	AU	27833/01
	AU	29656/00	AU	30067/99	AU	43658/00
	AU	45308/01	AU	46829/99	AU	49695/99
	AU	49893/99	AU	51347/99	AU	52122/99
	AU	59233/98	AU	59273/98	AU	60303/98
	AU	62416/98	AU	65452/98	AU	65453/98
	AU	65521/98	AU	78120/98	AU	80667/98
	AU	84045/98	AU	84743/98	AU	85711/98
	AU	89109/98	AU	91304/98	AU	94678/01
	CA	2278118	CA	2278154	CA	2278248
	CA	2278349	CA	2283299	CA	2283678
	CA	2284131	CA	2291260	CA	2294526
	CA	2295474	CA	2296762	CA	2296815
	CA	2301796	CA	2302808	CA	2314379
	CA	2315295	CA	2322728	CA	2331154
	CA	2333917	CA	2334075	CA	2336406
	CA	2339301	CA	2371611	CA	2402839
	CA	2441397	CA	2441416	CA	2441417
	CA	2441702	CA	2441755	CA	2441832
	CA	2441840	EP	0972022	EP	0972023
	EP	0972025	EP	0972029	EP	0972030
	EP	0973892	EP	0988385	EP	1000084
	EP	1005544	EP	1007663	EP	1012260
	EP	1019091	EP	1027430	EP	1039801
	EP	1040117	EP	1042346	EP	1044210
	EP	1062236	EP	1088071	EP	1095060
	EP	1095159	EP	1097199	EP	1100869
	EP	1192168	EP	1333092	EP	1346999
	EP	1352962	EP	1379132	EP	1379264
	EP	1381622	EP	1390390	EP	1394252
	EP	1404702	EP	1414845	EP	1423134
	EP	1428833	EP	1439189	EP	1557425

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2005/001325

US	6046031	US	6312937	US	6342581
US	6420526	US	6444440	US	6448230
US	6475753	US	6476195	US	6486301
US	6525174	US	6534631	US	6590075
US	6605699	US	6623938	US	6627741
US	6653445	US	6680171	US	6774216
US	6878687	US	6878806	US	6878812
US	6881823	US	6906178	US	6914047
US	6919433	US	6951924	US	2001024813
US	2002042119	US	2002076756	US	2002077287
US	2002164669	US	2002172994	US	2003004324
US	2003017500	US	2003022185	US	2003022289
US	2003027132	US	2003032098	US	2003040088
US	2003044851	US	2003049618	US	2003050455
US	2003055236	US	2003064412	US	2003065151
US	2003065160	US	2003069405	US	2003087339
US	2003092893	US	2003129696	US	2003166906
US	2003175858	US	2003180892	US	2003181692
US	2003204071	US	2003208044	US	2003208054
US	2003225009	US	2003225248	US	2004002591
US	2004014954	US	2004030115	US	2004034196
US	2004044191	US	2004121387	US	2004146893
US	2004146930	US	2004147733	US	2005095612
US	2005118679	US	2005119457	US	2005176044
US	2005197285	US	2005208621	US	2005208622
US	2005214844	US	2005215775	WO	0001728
WO	0004140	WO	0004183	WO	0006698
WO	0042189	WO	0063221	WO	0151504
WO	0162891	WO	0226931	WO	9831799
WO	9831800	WO	9831801	WO	9831806
WO	9831818	WO	9839446	WO	9839448
WO	9840483	WO	9854963	WO	9856804
WO	9902546	WO	9903982	WO	9903990
WO	9909155	WO	9911293	WO	9931116
WO	9931117	WO	9946289	WO	9966041
WO	02057420	WO	02076488	WO	02095010
WO	02102993	WO	02102994	WO	03004622

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/24 (2006.01)		A 6 1 K 47/24	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/10 (2006.01)		A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/04 (2006.01)		A 6 1 K 47/04	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z

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

(72)発明者 スリ ピーター
オーストラリア ウェスタン オーストラリア州 イースト パース トラファルガー ロード
2 9
(72)発明者 ボスコ アンソニー
オーストラリア ウェスタン オーストラリア州 クーギー フェアビュー ストリート 1 2
(72)発明者 デビット キャサリン
オーストラリア ウェスタン オーストラリア州 コモ ガードナー ストリート 3 ユニット
3
(72)発明者 マッケンナ キャサリン
オーストラリア ウェスタン オーストラリア州 オスマストン ロード 4 0

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA25 AA40 BB10 BB20 BB50 CA25 DA14 FA11 FB02
FB12 GC15
4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA05 CA09 CA11 CA20 EA04 GA11
HA01 HA12 HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS32 QS34
QS39 QX02
4C076 AA12 CC03 DD23A DD26A DD38A FF02
4C084 AA02 BA01 BA22 BA23 NA14 ZB131
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50