

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成18年11月16日(2006.11.16)

【公表番号】特表2006-500930(P2006-500930A)

【公表日】平成18年1月12日(2006.1.12)

【年通号数】公開・登録公報2006-002

【出願番号】特願2004-539048(P2004-539048)

【国際特許分類】

C 12 Q	1/68	(2006.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 K	49/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/06	(2006.01)
G 01 N	33/92	(2006.01)
C 12 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 12 Q	1/68	Z N A A
A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	49/00	A
A 6 1 P	3/06	
G 01 N	33/92	A
C 12 N	15/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成18年9月27日(2006.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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(CAD)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。

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HMG-CoA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。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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-511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 -511 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 -511 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。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

その他の随伴療法

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随伴投薬事例報告様式(Prior and Concomitant Medications Case Report Form(CRF))に詳細に記載されている。AEについて必要な場合には、随伴投薬法がAES-CRFに詳細に記載され、関連文献も引用されている。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。SNP アッセイは、OMIM、SNP 協会、遺伝子座リンクおよび dbSNP、およびサード・エーブル・テクノロジーズ・インク(TWT、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 TWT が作製した。遺伝子型決定は TWT(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 DNA 60 ng 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)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

(- 511) 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、 10 ~ 70 ng のゲノム D N A 、 160 μ M - d N T P 、 10 mM トリス H C l (pH 8.3) 、 50 mM - K C l 、 1.5 mM - M g C l₂ 、 0.6 μ M - I L - 1 (- 511) 前進プライマー、 0.6 μ M - I L - 1 (- 511) 逆進プライマーおよび 0.03 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、カリリフォルニア) を含む 20 μ L の反応液中で実施した。以下の条件で 36 回の増幅を実施した： 94 、 30 秒； 55 、 30 秒； 72 、 30 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 384 穴バイプレックスプレートにより、 T W T S N P # 128069 に対し実施した。

プライマー配列は以下のとおりである：

I L - 1 (- 511) - 前進 5' - GCAGAGCTCATCTGGCATTG - 3' (配列番号 1)

I L - 1 (- 511) - 逆進 5' - TATGTGGGACAAAG TGGAAG - 3' (配列番号 2)

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

P C R 産物の 1 : 10 希釀は増幅 D N A 用 384 穴バイプレックスプレートにより、 R A D B 251 用の T W T S N P # 274339 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、 50 mM - N a C l 、 10 mM トリス H C l 、 10 mM - M g C l₂ 、 1 mM - D T T (pH 7.9) 、 8 ng 増幅ゲノム D N A および 0.5 mM - A l u - I 酵素を含む 20 μ L の反応液中で処理した。サンプルはすべて 37 度で 17 時間インキュベートし、 3 % アガロースゲル上で分画 (19 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。

【表3】

(- 511) 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
		伝子 1	伝子 2	
I L - 1 β	-511	C	T	CTGCAATTGACAGAGAGCTCC [C, T] GAGGCAGAGAACAGCAC CCAAGGTAGAGACCCA

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、およびカイニ乗解析を計算した。統計解析はすべてS A S 8 . 0 2 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。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

この相関をさらに解析するために、I L - 1 (- 5 1 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I L - 1 (- 5 1 1) (T - T) 遺伝子型は共に、患者の最終訪問時に測定したH D L の最高レベルと相關した ($p = 0 . 0 2 1 4$)。

【表8】

表6：

(-511) 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

	R A D (1.5 および 3.0 mg/日)			M M F (2 mg/日)			R A D および M M F 処置群 併合		
	C C	C T	T T	C C	C T	T T	C C	C T	T T
遺伝子型	C C	C T	T T	C C	C T	T T	C C	C T	T T
患者数	20	25	9	12	9	7	32	34	16
L S 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

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

下記表10に示すように、オッズ比が示すには、患者がI L - 1 遺伝子プロモーターの位置 (- 5 1 1) にTを含むならば、R A D / 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 2 4 0 m g / d L 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I L - 1 遺伝子プロモーターの位置 (- 3 1) にCを含むならば、R A D / 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 2 4 0 m g / d L 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、 $p = 0 . 0 2 0 7$ および $p = 0 . 0 0 9 6$)、高コレステロール血症を容易に処置し得るため、R A D / 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。

【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
\leq 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)			オッズ比= 7.23 (95% CI: 1.20-9.01)		
p=0.0207 (フィッシャーの正確検定)			p=0.0096 (フィッシャーの正確検定)		

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

(-511)と(-31)IL-1 SNP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. 398-402 (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TATAボックス配列(TATAAAAA)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、TATA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TATAボックス配列(TATAAAAAからCATAAAA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 TATA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。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0066】

LDL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G1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、RAD(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ERKの関与が示されていることである。それ故、ERK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ERK活性を阻害するため、LDLレセプターの発現がIL-1 の発現から独立してすべての患者で低下し、その結果、LDL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ない。それ故、IL - 1 (- 5 1 1) (T - T) および IL - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型をもつ患者は、LDL 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 IL - 1 のレベルが非常に低い、そのため、LDL 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 IL - 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、IL - 1 (- 3 1) (C - C) 遺伝子型に相当する IL - 1 (- 5 1 1) (T - T) 遺伝子型をもつ患者は、他の IL - 1 遺伝子型をもつ患者に比較して、有意に高い LDL ($p = 0.0159$) を有することであった(図3および表4)。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0069

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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(サード・ウエーブ・テクノロジーズ・インク (TWT、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DNA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単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. 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(これらの開示は全文を参照により本明細書の一部とする)。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

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 - 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 - 5 1 1 で C から T への多形(配列 X 0 4 5 0 0 の位置 1 4 2 3) および IL - 1 遺伝子の多形部位 - 3 1 で T から C への多形(配列 X 0 4 5 0 0 の位置 1 9 0 3) 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 - 3 1 のヌクレオチドが T であり、この IL - 1 遺伝子の部位 - 5 1 1 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。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

当業者であれば容易に認めるように、個体のクロー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。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、“遺伝的ビット分析”法（国際特許出願WO92/15712号公報）およびリバーゼ／ポリメラーゼ仲介遺伝的ビット分析（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WO91/02087、WO90/09455、WO95/17676、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. (WO89/10414))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。