

(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2014-526681

(P2014-526681A)

(43) 公表日 平成26年10月6日 (2014. 10. 6)

|                                |                |             |
|--------------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                  | F I            | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 33/50 (2006. 01)</b> | GO 1 N 33/50 Z | 2 G O 4 5   |
| <b>GO 1 N 33/15 (2006. 01)</b> | GO 1 N 33/15 Z |             |
| <b>GO 1 N 33/68 (2006. 01)</b> | GO 1 N 33/50 D |             |
| <b>GO 1 N 33/92 (2006. 01)</b> | GO 1 N 33/68   |             |
|                                | GO 1 N 33/92 Z |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁)   |                |             |

|               |                              |          |                               |
|---------------|------------------------------|----------|-------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2014-529131 (P2014-529131) | (71) 出願人 | 508020155                     |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年9月12日 (2012. 9. 12)     |          | ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピア          |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成26年5月9日 (2014. 5. 9)       |          | B A S F S E                   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/IB2012/054731            |          | ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)  |
| (87) 国際公開番号   | W02013/038341                |          | D-67056 Ludwigshafen, Germany |
| (87) 国際公開日    | 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)     | (74) 代理人 | 100091096                     |
| (31) 優先権主張番号  | 11181156.8                   |          | 弁理士 平木 祐輔                     |
| (32) 優先日      | 平成23年9月13日 (2011. 9. 13)     | (74) 代理人 | 100118773                     |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                   |          | 弁理士 藤田 節                      |
| (31) 優先権主張番号  | 61/533, 867                  | (74) 代理人 | 100122389                     |
| (32) 優先日      | 平成23年9月13日 (2011. 9. 13)     |          | 弁理士 新井 栄一                     |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |                               |
|               |                              | 最終頁に続く   |                               |

(54) 【発明の名称】 造血毒性を評価するための手段及び方法

## (57) 【要約】

造血毒性を診断するための方法であって、(a)造血毒性を患っていることが疑われる対象の試験サンプルにおける少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、(b)ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、造血毒性を診断するステップとを含む方法。化合物が、対象においてそうした造血毒性を誘導できるかどうかを判定するための方法、造血毒性を治療するための薬物を同定する方法、造血毒性を診断するための装置及びキットも開示する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

造血毒性を診断するための方法であって、

(a)造血毒性を患っていることが疑われる対象の試験サンプルにおいて表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較して、造血毒性を診断するステップと

を含む、方法。

10

**【請求項 2】**

造血毒性を誘導できることが疑われる化合物と前記対象を接触させた、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

対象において化合物が造血毒性を誘導することができるかどうかを判定するための方法であって、

(a)造血毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bの種類の中のいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

20

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較して、化合物の造血毒性誘導能力を判定するステップと

を含む、方法。

**【請求項 4】**

前記化合物が、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物である、請求項2又は3に記載の方法。

30

**【請求項 5】**

前記リファレンスが、

(i)造血毒性を患う対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から

40

選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群

に由来する、請求項1から4のうちのいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、造血毒性の指標になる、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記リファレンスが、

(i)造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマ

50

イシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する、請求項1から4のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記リファレンスが、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである、請求項1から4のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、造血毒性の指標になる、請求項7又は8に記載の方法。

【請求項 10】

造血毒性を治療するための物質を同定するための方法であって、

(a)造血毒性を治療できると推測される候補物質と接触させた、造血毒性を患う対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較して、造血毒性を治療できる物質を同定するステップとを含む、方法。

【請求項 11】

前記リファレンスが、

(i)造血毒性を患う対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

試験サンプルとリファレンスの間で異なるバイオマーカーの量が造血毒性を治療できる物質の指標になる、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記リファレンスが、

(i)造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する、請求項10に記載の方法。

【請求項 14】

前記リファレンスが、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである、請求項10に記載の方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカの量が、造血毒性を治療できる物質の指標になる、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】

対象のサンプルにおいて造血毒性を診断するための、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a若しくは12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカ又は前記バイオマーカ用の検出剤の使用。

【請求項17】

造血毒性を患っていることが疑われる対象のサンプルにおいて造血毒性を診断するための装置であって、

10

(a) サンプル中に存在するバイオマーカの量の測定を可能にする、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカ用の検出剤を備える分析ユニットと、それと作動可能に連結された、

(b) 格納されたリファレンス、及び分析ユニットで測定された前記少なくとも1種のバイオマーカの量を格納されたリファレンスと比較することを可能にするデータ処理装置を備え、それによって造血毒性が診断される評価ユニットとを含む、装置。

【請求項18】

前記格納されたリファレンスが、造血毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置が、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同一である試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、造血毒性が存在することの指標になり、又はリファレンスと比較して異なる試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、造血毒性が存在しないことの指標になる、請求項17に記載の装置。

20

30

【請求項19】

前記格納されたリファレンスが、造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置が、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、造血毒性が存在することの指標になり、又はリファレンスと比較して本質的に同一である試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、造血毒性が存在しないことの指標になる、請求項17に記載の装置。

40

【請求項20】

表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、

50

5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤、及び少なくとも1種のバイオマーカーに関するスタンダードであって、その濃度が、

(i)造血毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニューロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するか、

10

(ii)造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニューロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する

スタンダードを含む、造血毒性診断のためのキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、造血毒性診断、及び化学化合物のリスク層別化のための毒物学的評価の分野に関する。詳細には、造血毒性を診断するための方法に関する。本発明は、化合物が、対象においてそうした造血毒性を誘導することができるかどうかを判定するための方法及び造血毒性を治療するための薬物を同定する方法にも関する。さらに本発明は、造血毒性を診断するための装置及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

骨髄は体の中で最も大きな器官の1つであり、化学物質暴露の重要な潜在的標的器官である。骨髄は、軸骨及び長骨の中心腔内に見出される。骨髄は、造血組織島、及び骨梁骨の網目構造内に分散した脈管洞で取り囲まれた脂肪細胞からなる。骨髄は重要な造血器官及び主要なリンパ組織であり、赤血球、顆粒球、単球、リンパ球及び血小板の産生に関与する。骨小腔の内面及び腔内の海綿骨の骨片の外面は、薄層の網様結合組織によって支持される単層の扁平な「骨ライニング細胞(bone-lining cell)」からなる骨内膜ライニング(endosteal lining)で覆われ、骨芽細胞及び破骨細胞も骨内膜ライニング内に見出される。長骨では、1つ以上の栄養管が骨髄腔に斜めに進入して皮質骨を貫通する。扁平骨においては、骨髄は、大及び小の栄養管を介して骨髄に進入する様々なサイズの多数の血管が役立てられている。

30

40

【0003】

骨髄は、大規模に血液を供給する。また、栄養動脈から派生した毛細血管は、ハバース管に伸長し、骨髄腔に戻り、次いで静脈洞に通じるように思われる。したがって、骨髄腔内の血流には、骨髄腔の中心から骨髄腔の末梢へ、次いで中心へ戻る循環パターンが存在する。長骨及び扁平骨では、骨及び骨髄の血液供給は、骨内膜の血管網を通して相互接続する。

【0004】

骨髄の神経支配は、栄養管から進入する有髄神経及び無髄神経によって起こる。ある種の神経支配は、骨端及び骨幹端の孔を通して起こる。神経束は、血管平滑筋を供する、分枝を有する細動脈に続き、又は場合によっては造血細胞に囲まれた造血組織中で終結す

50

る。

【0005】

造血組織は、血液細胞及びその前駆体、外膜/バリア細胞、脂肪細胞並びにマクロファージを含めた種々の細胞型からなる。造血組織の細胞は不規則に配列しているのではなく、組織内で特定の組織化を示す。造血については、造血幹細胞を認識且つ保持することができ、コミットされた分化系列に沿って、幹細胞の増殖、分化及び成熟を支持するのに必要な因子を提供することができる微小環境に支持されなければならない。

【0006】

造血は、赤血球を産生する造血組織内に区分されたプロセスであり、赤芽球島で生じる。顆粒球生成は、ほとんど変わらない細胞増殖巣で起こり、巨核球形成は、洞内皮の近傍で起こる。成熟する際に、造血細胞は、バリア細胞によって調節され、静脈洞壁を横切って血流に進入し、血小板は、洞壁から洞内腔の内部に入り込む巨核球の細胞質突起から血液に直接放出される。

【0007】

血液細胞の産生、分化及び成熟は、体液性因子によって調節される。ある種の因子は、より初期の細胞に作用し、一般的な作用を有するが、一方で他の因子(例えばエリスロポエチン)は、特定の細胞系統の後期の前駆細胞に作用する。造血因子源は様々である。

【0008】

造血は連続的なプロセスであるが、異なる段階に分けることができる。第1段階は、骨髓に含有されるコミットされていない(多能性の)幹細胞を含む。こうした多能性細胞は2つの主要な機能を有する。第1に、これらは自己複製プロセスによってその数を維持し、第2に、これらは全ての造血細胞を生じさせる能力を有する。これらは、骨ライニング細胞近くの中心軸から末梢により多く見つけられるようにも思われる。

【0009】

リンパ球生成は、成体哺乳動物の骨髓の微小環境内で起こる。骨髓に由来するB系細胞は、細胞サイズの連続した変化及び免疫グロブリン鎖の発現によって同定することができる。一連のBリンパ球生成の増殖/成熟は可溶物によって調節され、骨髓毒性の化学物質による混乱の影響を受けやすい。例えば、ベンゼンのポリヒドロキシ代謝物(例えばヒドロキノン)は、Bリンパ球生成に影響を及ぼすことが示されている。

【0010】

種々の薬物及び毒物への暴露は骨髓損傷を誘導し、造血を変質させる。骨髓には大きな予備力があるので、広範且つ重篤な骨髓ダメージだけが、末梢血中の細胞数を変化させることになる。大抵の毒性のある薬剤に関して、骨髓損傷の原因は不明なままである。ある種の薬剤、とりわけ特に化学療法剤は予測可能な、急速増殖性骨髓前駆体の用量依存的な毒性を誘導するが、多くの薬剤は、特異な骨髓ダメージをもたらす。直接的な骨髓ダメージは、適切な全身性反応を開始する骨髓の能力を妨げる可能性がある。或いは、骨髓ダメージは、いずれかの又は全ての増殖性骨髓細胞系統における成熟異常に反映される可能性がある。これは、さらに、種々の末梢血異常及び骨髓での形態異常を引き起こし得る。一方では、骨髓が主要な効果器官である場合は、1つ以上の細胞系統での増殖反応は、全身性の問題に対する補償反応よりはむしろ、適切な直接的な化合物関連作用を反映し得る。

【0011】

毒性環境での骨髓の変化の解釈は、極めて複雑であり得、毒性及び/又は薬理反応の局部的及び全身的な症状発現の両方を含み得る。一般的に、骨髓の変化は、量的又は質的のいずれかに分類することができる。量的な異常には、増殖性細胞系統の様々な過形成及び低形成が含まれ、適切に解釈するには、末梢血データの同時評価が必要となる。質的な異常は、骨髓前駆体の形態的な異常(骨髓異形成)、並びに骨髓壊死、マクロファージ過形成及び形質細胞増加などの変化を指す。

【0012】

骨髓毒性は、細胞質及び核の両方が影響を受ける可能性がある、特殊な型の成熟停止である。全身性毒血は、全ての増殖性細胞系統の細胞の発達に影響を及ぼし得るが、毒性は

10

20

30

40

50

、後期の顆粒球前駆体(後骨髄球、带状核細胞及び成熟好中球)で最も容易に認識される。骨髄毒性は、重篤な感染症のケースでは循環する細菌性毒素に付随する薬物誘導性の可能性があり、又は大規模な組織壊死部位から放出される循環する毒物が原因となる可能性がある。

#### 【0013】

可能性のある作用が多様であるため、抑制及び無機質化に関する骨髄毒性の評価はかなり複雑なプロセスである。現行方法は、血液学的な検討、病理学的及び病理組織学的検討並びに生化学的分析を通常含む。しかし、バイオマーカーは、かなり複雑に調節されており、かなり進行したステージでさえも時々変化が生じ得る。病理組織学的評価の主な欠点は、病理組織学的評価が侵襲的であり、評価が、検討する毒物学者の個々の解釈にある程度基づくので、臨床病理学/血液学的測定と組み合わせた場合でさえも信頼性が低いことである。(例えば、Andrews CM (1998) The haematopoietic system: Target organ pathology, a basic text、Turton J及びHooson J (編) Taylor & Francis、London、United Kingdom、1998; Heaney RP、Whedon GD (2010) Bone morphology、Encyclopedia Britannica(これは、2010年10月26日にEncyclopedia Britannica Online: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/72869/bone/41883/Bone-morphology>から取得した); Rebar 1993、Toxicol. Pathol. 21: 118~129; Travlos 2006、Toxicol. Pathol. 35: 548~565; Weiss 1993、Toxicol. Pathol. 21: 135~140を参照されたい)。

10

#### 【0014】

効率的且つ信頼性をもって骨髄毒性を、特にその早期発病を判定するための感度がよく且つ特異的な方法は現在利用可能でないが、それにもかかわらず、高く評価されるであろう。リンパ球生成を含めた造血に与えるその影響を考えれば、骨髄毒性の重要性は明らかとなり得る。さらに、欧州共同体のあらゆる種類の産業で使用されている化学化合物は、例えば、現在、REACH(化学物質の登録、評価、認可(Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals))に順守する必要がある。化学化合物が抑制及び無機質化に関する骨髄毒性を誘導する可能性は、その化合物にとってリスクが高いと見なされ、その結果、その化合物は、限られた用途且つ高い安全基準に従う場合のみ利用可能であることを理解されたい。

20

#### 【0015】

造血毒性の影響を受ける可能性のある別の重要な造血器官は、血液である。血液は体の中で最も大きな器官の1つであり、化学物質の暴露の重要な潜在的な標的器官である。血液は急速に分裂する組織であり、造血能力は拡大する可能性が高い。ヒトでは、血液細胞のターンオーバーはかなりのものであり、一日当たり $2 \sim 3 \times 10^{11}$ 細胞のオーダーである。骨髄は、赤血球、顆粒球、単球、リンパ球及び血小板の産生に關与する重要な造血器官である。造血は、赤血球を産生する造血組織内に区分されたプロセスであり赤芽球島で生じる。顆粒球生成は、ほとんど変わらない細胞増殖巢で起こり、巨核球形成は、洞内皮の近傍で起こる。成熟する際に、造血細胞は、静脈洞壁を横切って血流に進入し、血小板は、洞壁から洞内腔の内部に入り込む巨核球の細胞質突起から血液に直接放出される。血液細胞の産生、分化及び成熟は、体液性因子によって調節される。赤血球を除く他の細胞型は、それらの機能を必要とする部位に向かっていく途中である。全ての細胞型は絶えず循環を去り、異なる割合で交換される。

30

40

#### 【0016】

赤血球は、循環血量の40~45パーセントを占め、肺から末梢組織への酸素輸送の主要な媒体として働く。加えて、赤血球は、組織から肺への二酸化炭素輸送及び血液のpHを一定に維持するのに關与する。赤血球は、炎症反応を調節するのに役立ち、及び/又は薬物及び毒物のリザーバーである。赤血球産生は、頻繁な細胞分裂及び高速のヘモグロビン合成に依存する連続的なプロセスである。ヘモグロビン合成は、グロビン鎖とヘム部分の協調的な産生に依存する。ヘム合成は、ポルフィリン環への鉄の取り込みを必要とする。鉄欠乏は、通常、栄養欠乏又は失血の増大の結果である。非ステロイド性抗炎症剤など、失血の一因となる任意の薬物は、消化性潰瘍及び出血の高い危険性を有し、鉄欠乏性貧血の発

50

症の危険性を増強する可能性がある。ヘムのポルフィリン環合成の異常は、骨髓赤芽球中の特徴的な鉄蓄積を伴う鉄芽球性貧血につながる可能性がある。

【0017】

薬物誘導性再生不良性貧血は、生体異物に対する予測可能な反応又は特異な反応のいずれかに相当し得る。生命を危うくするこの障害は、末梢血汎血球減少、網状赤血球減少及び骨髓低形成に特徴付けられる。ベンゼンなどの薬剤及び放射線は、造血前駆細胞に対して予測可能な影響を有し、もたらされた再生不良性貧血は、こうした作用因子への暴露の規模に対応する。その一方、特異な再生不良性貧血は、このプロセスを惹起する薬剤の用量に関連しているようには思われない。再生不良性貧血の発症と関係付けられた多くの作用因子が存在し、それらの多くは少数の患者でしか報告されていない。再生不良貧血又は非再生貧血は、骨髓機能不全に関連する症候群であり、貧血、汎血球減少、汎血球減少及び様々な程度の骨髓の低細胞充実性に特徴付けられる。再生不良性貧血は、その発病が既知の原因、例えば電離放射線、薬物又は化学物質の暴露に起因し得るかどうかによって特発性又は続発性として分類される。再生不良性貧血は、数の枯渇又は分化異常のいずれかによる幹細胞調節の障害であり、血液細胞の発生を繰り返すことができない。間葉系細胞の異常も、慢性骨髓機能不全で重要な役割を果たし得る。こうしたケースのいくつかでは、再生不良性貧血についてのクローン起源を支持する証拠がある。再生不良性貧血の動物モデルは比較的少なく、ウイルス、ブスルファン、照射又はベンゼンによって誘導されるものに大部分は限られている。イヌ、サル及びマウスを含めた多くの種で、骨髓は特に放射線誘導性再生不良性貧血に罹りやすいと長い間認識されてきた。再生不良性貧血は、クロラムフェニコール、カルバマゼピン、フェルバメート、フェニトイン、キニーネ及びフェニルブタゾンを含めた薬物への暴露に付随することもある。

10

20

30

40

50

【0018】

とりわけ鉛は多数の血液学的な作用を有し、フェロケラターゼ活性を低下させる。この酵素は、ポルフィリン環構造への第1鉄イオンの取り込みを触媒する。プロトポルフィリンへの鉄の挿入ができないと、ヘム形成が抑制される。過剰量のプロトポルフィリンはヘモグロビン分子のヘムに取って代わり、プロトポルフィリンを含有する赤血球として循環し、亜鉛が、分子の中心において通常鉄が占める部位でキレートされる。亜鉛プロトポルフィリン含有赤血球は強い蛍光性であり、鉛毒性を診断するのに使用することができる。ヘム合成の抑制は、ヘム合成経路の第1ステップの活性速度を増大させる刺激であると考えられる。

【0019】

止血は、血管損傷部位から失血を防止すること及び液体状態で循環血を維持することに関与する多成分系である。止血系の主成分としては、循環血小板、種々の血漿タンパク質及び血管内皮細胞が挙げられる。血小板は、血管損傷に応じて安定的な止血栓を形成するのに必須である。これは、倍数体細胞である成熟巨核球から形成される。血小板放出の機序は不明であるが、細胞質の細分化によるように思われる。サイトカインであるトロンボエチンは、巨核球増殖、血小板産生及び共通幹細胞からの分化を刺激する。血小板の寿命は種によって異なり、ヒトで10日、イヌで8日、ラットで4.5日及びマウスで4日である。同様に、平均血小板量は、げっ歯類ではヒトより低く(及び血小板数は多く)、イヌ及びネコでは、血小板量は人類より多い。血小板は、フォンウィルブランド因子(vWF)が血小板糖タンパク質Ib/IX/V(GP Ib/IX/V)受容体複合体と結合することによって、ダメージを受けた壁に最初に接着する。

【0020】

生体異物は、血小板を減少させること又は血小板の機能を妨げることによって、血小板反応を妨げる可能性があり、ある種の薬剤は、血小板の数及び機能の両方に影響を及ぼすことができる。血小板の機能は、いくつかの生化学的な反応経路の協調的な相合作用に依存する。種々の薬物及び食品は、血小板機能を阻害することが見出されている。血小板機能に影響を及ぼす主要な薬物群としては、非ステロイド性抗炎症剤、 $\beta$ -ラクタム含有抗生物質、心血管薬、特に遮断薬、向精神薬、麻酔、抗ヒスタミン薬及びある種の化学療



法剤が挙げられる。凝血は、トロンビン形成に至る一連のセリンプロテアーゼの逐次活性化の結果である。トロンビンは、フィブリノゲンをフィブリンに転換する多機能酵素であり、第V因子、第VIII因子、第XI因子、第XIII因子、プロテインC及び血小板を活性化し、種々の細胞と相互作用する。フィブリン血餅形成に対する生体異物の最も一般的な毒性作用は、このプロセスに必要なクリティカルな1つ以上のタンパク質のレベルの低下に関連する。凝固因子活性の低下は、タンパク質(複数可)合成の低下又は循環からのクリアランスの増大が原因であり得る。凝血カスケードに関与する大部分のタンパク質は肝臓で合成される。したがって、肝臓機能を障害する任意の薬剤は、凝血因子産生の低下を引き起こし得る。

#### 【0021】

種々の薬物及び毒物への暴露は、とりわけ再生不良性貧血、血小板凝集阻害及びポルフィリン合成阻害に特徴付けられる血液毒性を誘導する。可能性のある作用が多様性であるため、血液毒性の評価はかなり複雑なプロセスである。現行方法は、血液学的な検討、病理学的及び病理組織学的検討並びに生化学的な分析を通常含む。しかし、バイオマーカーはかなり複雑に調節されており、かなり進行した段階でさえも時々変化が生じ得る。病理組織学的評価の主な欠点は、病理組織学的評価が侵襲的であり、評価が検討する毒物学者の個々の解釈にある程度基づくので、臨床病理学/血液学的測定と組み合わせた場合でさえも信頼性が低いことである。(例えば、Aksoy 1989、Environ. Health Perspect. 82: 193~197; Andrews CM (1998) The haematopoietic system: Target organ pathology, a basic text、Turton J及びHooson J (編) Taylor & Francis、London、United Kingdom、1998; Bloom JC、Brandt JT (2008)第11章、Toxic responses of the blood: Casarett & Doull's Toxicology、The basic science of poisons、Klaassen CD (編)、McGraw-Hill P、改訂第7版、New York (2008); Haschek WM、Wallig MA、Rousseaux (2010) Fundamentals of toxicologic pathology、第2版、Academic Press、Elsevier、London、UKを参照されたい)。

#### 【0022】

再生不良性貧血、血小板凝集阻害及びポルフィリン合成阻害並びに特にそれらの早期発病に関する血液毒性を効率的且つ信頼性をもって判定するための感度がよく且つ特異的な方法は現在利用可能でないが、それにもかかわらず、高く評価されるであろう。再生不良性貧血、血小板凝集阻害及びポルフィリン合成阻害のようなその結果を考えれば、血液毒性の重要性は明らかとなり得る。さらに、欧州共同体のあらゆる種類の産業で使用されている化学化合物は、例えば、現在、REACH(化学物質の登録、評価、認可)を順守する必要がある。化学化合物が血液毒性、特に再生不良性貧血、血小板凝集阻害又はポルフィリン合成阻害を誘導する可能性は、その化合物にとってリスクが高いと見なされ、その結果、その化合物は、限られた用途且つ高い安全基準に従う場合のみ利用可能であることを理解されたい。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0023】

化学化合物の毒物学的な性質、特に造血毒性を効率的且つ信頼できる様式で評価するための感受性が高く且つ特異的な方法はまだ利用可能でないが、それにもかかわらず高く評価されるであろう。

#### 【0024】

したがって、本発明の根底にある技術的課題は、前述のニーズに応じる手段及び方法を提供することと考えることができる。この技術的課題は、特許請求の範囲で特徴付けられ且つ本明細書の以下に記載される実施形態によって解決される。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0025】

したがって、本発明は、造血毒性を診断するための方法であって、

(a)造血毒性を患っていることが疑われる対象の試験サンプルにおいて、表1a、1b、1

10

20

30

40

50

c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b又は9のうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較して、造血毒性を診断するステップと

を含む、方法に関する。

【0026】

前述の方法の好ましい実施形態では、造血毒性を誘導できることが疑われる化合物と前記対象を接触させた。

【0027】

本発明は、対象において化合物が造血毒性を誘導することができるかどうかを判定するための方法であって、

(a)造血毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b又は9のうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較して、化合物の造血毒性誘導能力を判定するステップと

を含む、方法にも関する。

【発明を実施するための形態】

【0028】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記化合物は、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物である。

【0029】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i)造血毒性を患う対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、造血毒性の指標になる。

【0030】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i)造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフ

10

20

30

40

50

エンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群

に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、造血毒性の指標になる。

【0031】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、前記リファレンスは、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、造血毒性の指標になる。

【0032】

10

本発明は、造血毒性を治療するための物質を同定する方法であって、

(a)造血毒性を治療できると推測される候補物質と接触させた造血毒性を患う対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較して、造血毒性を治療できる物質を同定するステップと

を含む方法も企図する。

【0033】

20

前述の方法の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i)造血毒性を患う対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプルとリファレンスとの間で異なるバイオマーカーの量が、造血毒性を治療できる物質の指標になる。

30

【0034】

前述の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i)造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群

40

に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、造血毒性を治療できる物質の指標になる。

。

【0035】

前述の方法のさらに別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、対象集団におけるバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一である、バイオマーカーの量が、造血毒性を治療できる物質の指標になる。

【0036】

50

本発明は、対象のサンプルにおいて造血毒性を診断するための、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a若しくは12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー又は前記バイオマーカー用の検出剤の使用にも関する。

【0037】

さらに、本発明は、造血毒性を患っていることが疑われる対象のサンプルにおいて造血毒性を診断するための装置であって、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の測定を可能にする、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種の前記バイオマーカー用の検出剤を備える分析ユニットと、それと作動可能に連結された、

(b) 分析ユニットで測定された前記少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較することを可能にし、それによって造血毒性が診断される、格納されたリファレンス及びデータ処理装置を備える評価ユニットとを具備する装置に関する。

【0038】

本発明の装置の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、造血毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカー量が、造血毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在しないことの指標になる。

【0039】

本発明の装置の別の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在しないことの指標になる。

【0040】

さらに、本発明は、造血毒性診断のためのキットであって、表1a、1b、1c、1d、1e、1f

10

20

30

40

50

、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤、及び、その濃度が、造血毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来する又は造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来する、少なくとも1種のバイオマーカーのためのスタンダードを含むキット、に関する。

【0041】

特に本発明は、骨髄毒性を診断するための方法であって、

(a)骨髄毒性を患っていることが疑われる対象の試験サンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、骨髄毒性を診断するステップと

を含む、方法に関する。

【0042】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記対象は、骨髄毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた。

【0043】

本発明は、化合物が対象において骨髄毒性を誘導できるかどうかを判定する方法であって、

(a)骨髄毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、化合物の骨髄毒性誘導能力を判定するステップと

を含む方法にも関する。

【0044】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記化合物は、アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物である。

【0045】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i)骨髄毒性を患っている対象若しくは対象群、又は

(ii)アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群

に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、骨髄毒性の指標となる。

【0046】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i)骨髄毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii)アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群

に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、骨髄毒性の指標となる。

【0047】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、前記リファレンスは、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、骨髄毒性の

10

20

30

40

50

指標となる。

【0048】

本発明は、骨髄毒性を治療するための物質を同定する方法であって、

(a) 骨髄毒性を治療できると推定される候補物質と接触させた骨髄毒性を患っている対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b) ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、骨髄毒性を治療することができる物質を同定するステップとを含む方法も企図する。

【0049】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i) 骨髄毒性を患っている対象若しくは対象群、又は

(ii) アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド一水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて異なるバイオマーカーの量が、骨髄毒性を治療することができる物質の指標となる。

【0050】

前述の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i) 骨髄毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii) アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド一水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、骨髄毒性を治療することができる物質の指標となる。

【0051】

前述の方法のさらに別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、骨髄毒性を治療することができる物質の指標となる。

【0052】

本発明は、対象のサンプルにおいて骨髄毒性を診断するための、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー又は前記バイオマーカー用の検出剤の使用にも関する。

【0053】

さらに、本発明は、骨髄毒性を患っていることが疑われる対象のサンプルにおいて骨髄毒性を診断するための装置であって、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の測定を可能にする、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤を備える分析ユニットと、それに作動可能に連結された、

(b) 格納されたリファレンス、及び分析ユニットで測定された前記少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較することを可能にするデータ処理装置を備え、それによって骨髄毒性が診断される評価ユニットと、を具備する装置に関する。

【0054】

本発明の装置の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、骨髄毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド一水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の

10

20

30

40

50

化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカの量を格納されたりリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、骨髄毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、骨髄毒性が存在しないことの指標となる。

【0055】

本発明の装置の別の好ましい実施形態では、前記格納されたりリファレンスは、骨髄毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアドリマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカの量を格納されたりリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、骨髄毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカの量が、骨髄毒性が存在しないことの指標となる。

10

【0056】

さらに、本発明は、骨髄毒性診断のためのキットであって、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカ用の検出剤、及びその濃度が、骨髄毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来する、又は骨髄毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来する、少なくとも1種のバイオマーカ用のスタンダードを含むキットに関する。

20

【0057】

特に本発明は、血液毒性を診断するための方法であって、

(a)血液毒性を患っていることが疑われる対象の試験サンプルにおいて、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、血液毒性を診断するステップと

30

を含む、方法に関する。

【0058】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記対象は、血液毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた。

【0059】

本発明は、化合物が対象において血液毒性を誘導できるかどうかを判定する方法であって、

(a)血液毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた対象のサンプルにおいて、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカの量を測定するステップと、

40

(b)ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、化合物の血液毒性誘導能力を判定するステップと

を含む方法にも関する。

【0060】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記化合物は、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン

50

、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物である。

【0061】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i) 血液毒性を患っている対象若しくは対象群、又は

(ii) 1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、血液毒性の指標となる。

10

【0062】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i) 血液毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は

(ii) 1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、血液毒性の指標となる。

20

【0063】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、前記リファレンスは、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、血液毒性の指標となる。

30

【0064】

本発明は、血液毒性を治療するための物質を同定する方法であって、

(a) 血液毒性を治療できると推測される候補物質と接触させた血液毒性を患っている対象のサンプルにおいて、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b) ステップ(a)で測定された量をリファレンスと比較して、血液毒性を治療できる物質を同定するステップとを含む方法も企図する。

【0065】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、

(i) 血液毒性を患っている対象若しくは対象群、又は

(ii) 1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて異なるバイオマーカーの量が、血液毒性を治療できる物質の指標となる。

40

50



## 【0066】

前述の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、(i)血液毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は(ii)1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象又は対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、血液毒性を治療

10

## 【0067】

前述の方法のさらに別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同一であるバイオマーカーの量が、血液毒性を治療できる物質の指標となる。

## 【0068】

本発明は、対象のサンプルにおいて血液毒性を診断するための、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a若しくは12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー又は前

20

## 【0069】

さらに、本発明は、血液毒性を患っていることが疑われる対象のサンプルにおいて血液毒性を診断するための装置であって、

(a)サンプル中に存在するバイオマーカーの量の測定を可能にする、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤を備える分析ユニットと、それと作動可能に連結された、

(b)格納されたリファレンス、及び分析ユニットで測定された前記少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較することを可能にするデータ処理装置を備え、それによって血液毒性が診断される評価ユニットとを具備する装置に関する。

30

## 【0070】

本発明の装置の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、血液毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、血液毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、血液毒性が存在しないことの指標となる。

40

## 【0071】

本発明の装置の別の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、血液毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン

50

、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、血液毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、血液毒性が存在しないことの指標となる。

10

#### 【0072】

さらに、本発明は、血液毒性診断のためのキットであって、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤、及び、その濃度が、血液毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来する、又は血液毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来する、少なくとも1種のバイオマーカー用のスタンダードを含むキットに関する。

#### 【0073】

特に本発明は、以下の特定の方法、使用、装置及びキットも企図する。

#### 【0074】

以下の定義及び説明は、前記の本発明の実施形態全て及び以下に記載する実施形態に準用する。

20

#### 【0075】

本発明に従って言及される方法は、基本的に前述のステップから構成されてもよいし、さらなるステップを含んでもよい。さらなるステップは、サンプルの前処理又はこの方法によって得られた診断結果の評価に関し得る。好ましいさらなる評価ステップは、本明細書の他の個所に記載される。この方法は、ある程度又は完全に自動化により補助することができる。例えば、バイオマーカー量の測定に係るステップは、ロボット化及び自動化読取装置によって自動化することができる。同様に、量の比較に係るステップも、実行の際に、自動的に比較するプログラムコードを備える、コンピューターなどの適切なデータ処理装置によって自動化することができる。そうした場合のリファレンスは、格納されたリファレンスから、例えばデータベースから提供される。好ましくは、この方法は、対象のサンプルについてex vivoで行われる方法であり、すなわちヒト又は動物の体について実施しない方法であることを理解されたい。

30

#### 【0076】

本明細書で使用する用語「診断」は、対象が、本明細書で言及する中毒、疾患若しくは障害などの状態を患っている、又はそうした状態に関する素因を有する確率を評価することを指す。素因の診断は、対象がその後既定の時間窓内にその状態を発症する見込みの予後又は予測として時にはみなされる場合もある。当業者に理解されるように、そうした評価は、診断される対象の100%について正確であることが好ましいが、通常はそうではない可能性がある。しかし、この用語は、統計的に有意な一部の対象を、その状態を患っている又はその状態に関する素因を有すると特定できることを必要とする。ある一部が統計的に有意かどうかは、様々な周知の統計的な評価ツール、例えば、信頼区間の決定、p値の決定、スチューデントのt検定、マンホイットニー検定などを使用して、当業者であれば容易に判定することができる。詳細は、Dowdy及びWearden、Statistics for Research、John Wiley & Sons、New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%又は少なくとも95%である。p値は、好ましくは、0.2、0.1、0.05である。

40

#### 【0077】

本発明による診断は、ある状態又はその症状及びそれらの素因のモニタリング、確認及

50

び分類も含む。モニタリングは、既に診断された状態又は素因の経過を追うことを指す。モニタリングは、例えば、その状態若しくは素因の進行の判定、その状態の進行に対する特定治療の効果の判定、又は素因を有する対象における、その状態の発症に対する予防的治療若しくは食事療法などの予防策の効果の判定を包含する。確認は、既に判定された状態又はその状態の素因の診断を、他の指標又はマーカーを使用して強化すること又は実証することに関する。分類は、(i)例えばその状態に付随する症状の強さに応じて、その状態を様々なクラスに割り当てること、又は(ii)その状態に付随する、様々なステージ、疾患若しくは障害を区別することに関する。状態の素因は、リスクの程度、すなわち対象が後でその状態を発症する確率に基づいて分類することができる。さらに、分類は、好ましくは、本発明の方法によって試験化合物に作用様式を割り当てることも含む。具体的には、本発明の方法によって、作用様式がまだ知られていない化合物の特異的な作用様式の判定が可能になる。これは、好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーに関して測定された量又は前記化合物の代表的なバイオマーカープロファイルを、リファレンスとして作用様式が知られている化合物に関して測定されたバイオマーカーの量又はバイオマーカープロファイルと比較することによって達成される。化合物の分子標的が同定されるので、作用様式の分類によって、より一層信頼できる化合物の毒性評価が可能になる。

10

20

30

40

50

#### 【0078】

本明細書で使用する用語「造血毒性」は、造血機能障害、特に、造血障害又は赤血球若しくは白血球などの免疫系細胞のいずれかの機能障害をもたらす、造血系の器官又は細胞の任意のダメージ又は機能障害に関する。好ましくは、造血毒性によって影響を受けるものは、骨髓における造血又は免疫系機能である。したがって、概して、本明細書で使用する造血毒性という用語は、骨髓毒性及び血液毒性を包含する。好ましくは、本明細書で使用する造血毒性は、化学化合物又は薬物に誘導されるか、それらの投与の結果であり、すなわち、いわゆる毒素誘導性造血毒性である。

#### 【0079】

造血毒性の前述の発現の症状及び臨床徴候は、当業者に周知であり、毒性学の標準的な書籍、例えば、H. Marquardt、S. G. Schafer、R. O. McClellan、F. Welsch (編)、「Toxicology」、第13章：The Liver、1999、Academic Press、Londonに詳細に記載されている。

#### 【0080】

好ましくは、本明細書で使用する骨髓毒性は、骨髓機能障害を指す。好ましくは、骨髓毒性は、骨髓中の多能性幹細胞の増殖又は分化(リンパ球生成)の低減を伴う。好ましくは、骨髓毒性は、急速に増殖する骨髓前駆体の毒性又は特異な骨髓ダメージを伴い得る。直接的な骨髓ダメージは、適切な全身性反応を開始する骨髓の能力を妨げる可能性がある。或いは、骨髓ダメージは、任意の又は全ての増殖性骨髓細胞系統における成熟異常に反映され得る。これは、さらに、種々の末梢血異常及び骨髓での形態異常を引き起こし得る。一方では、骨髓が主要な効果器官である場合は、1つ以上の細胞系統の増殖反応は、全身性の問題に対する補償反応よりはむしろ、適切な直接的な化合物関連作用を反映し得る。一般に、骨髓毒性及び付随する骨髓変化は、量的又は質的のいずれかに分類することができる。量的な異常には、増殖性細胞系統の様々な過形成及び低形成が含まれ、適切に解釈するには、末梢血データの同時評価が必要となる。質的な異常は、骨髓前駆体の形態的な異常(骨髓異形成)、並びに骨髓壊死、マクロファージ過形成及び形質細胞増加などの変化を指す。骨髓毒性は、細胞質及び核の両方が影響を受ける可能性がある、特殊な型の成熟停止と見なすことができる。全身性毒血症は、全ての増殖性細胞系統の細胞の発達に影響を及ぼし得るが、好ましくは、毒性は、後期の顆粒球前駆体(後骨髓球、带状核細胞及び成熟好中球)で最も容易に認識される。骨髓毒性は、薬物誘導性の可能性があり、重篤な感染症のケースでは循環する細菌性毒素に付随する可能性があり、又は大規模な組織壊死部位から放出される循環する毒物が原因となる可能性がある。

#### 【0081】

好ましくは、造血毒性が骨髓毒性である場合は、本発明の方法によって測定される少な

くとも1種のバイオマーカーは、表1a、1b、1c、1d、1e又は1fのうちのいずれか1つから選択される。より好ましくは、前記骨髄毒性は骨髄抑制であり、最も好ましくは、オキサリプラチンなどのプラチンによって誘導される骨髄抑制である。

#### 【0082】

好ましくは、本明細書で使用する血液毒性は、血液機能障害を指す。好ましくは、赤血球の機能及び/又は白血球の機能が障害され得る。好ましくは、血液毒性は、末梢血汎血球減少、網状赤血球減少及び骨髄低形成に特徴付けられる薬物誘導性再生不良性貧血を含む。ベンゼン及び放射線などの作用因子は、造血前駆細胞に対して予測可能な影響を有し、もたらされた再生不良性貧血は、こうした作用因子への暴露の規模に対応する。その一方、特異な再生不良性貧血は、このプロセスを惹起する薬剤の用量に関連しているように10  
は思われない。再生不良性貧血の発症と関連付けられた多くの作用因子が存在し、それらの多くは少数の患者でしか報告されていない。再生不良貧血又は非再生貧血は、骨髄機能不全に関連する症候群であり、貧血、汎血球減少、及び様々な程度の骨髄の低細胞充実性に特徴付けられる。再生不良性貧血は、その発病が既知の原因、例えば電離放射線、薬物又は化学物質の暴露に起因し得るかどうかによって、特発性又は続発性として分類される。再生不良性貧血は、数の枯渇又は分化異常のいずれかによる幹細胞調節の障害であり、その結果、幹細胞は血液細胞の発生を繰り返すことができない。間葉系細胞の異常も、慢性骨髄機能不全で重要な役割を果たし得る。こうしたケースのいくつかでは、再生不良性貧血についてのクローン起源を支持する証拠がある。再生不良性貧血の動物モデルは比較的少なく、ウイルス、ブスルファン、照射又はベンゼンによって誘導されるものに大部分20  
は限られている。イヌ、サル及びマウスを含めた多くの種で、骨髄は特に放射線誘導性再生不良性貧血に罹りやすいと長い間認識されてきた。再生不良性貧血は、クロラムフェニコール、カルバマゼピン、フェルバメート、フェニトイン、キニーネ及びフェニルブタゾンを含めた薬物への暴露に付随することもある。また、血液毒性という用語は、鉛毒性を含む。とりわけ鉛は多数の血液学的な作用を有し、フェロケラターゼ活性を低下させる。この酵素は、ポルフィリン環構造への第一鉄イオンの取り込みを触媒する。プロトポルフィリンへの鉄の挿入ができないと、ヘム形成が抑制される。過剰量のプロトポルフィリンはヘモグロビン分子のヘムに取って代わり、プロトポルフィリンを含有する赤血球として循環し、亜鉛が分子の中心において通常鉄が占める部位でキレートされる。亜鉛プロトポルフィリン含有赤血球は強い蛍光性であり、鉛毒性を診断するのに使用することができる30  
。ヘム合成の抑制は、ヘム合成経路の第一ステップの活性速度を増大させる刺激であると考えられる。さらに血液毒性は、好ましくは、血小板及び/又は血小板機能に影響を及ぼし得る。特に、血液毒性は、血小板を減少させること又は血小板の機能を妨げることによって、血小板反応機能障害を引き起こし得る。ある種の薬剤は、血小板の数及び機能の両方に影響を及ぼすことができる。好ましくは、血小板の機能は、血小板の凝血機能を測定するための凝固アッセイによって測定することができる。したがって、本明細書で使用する血液毒性は、好ましくは、再生不良性貧血、鉛毒性、血小板凝集阻害及び/又はポルフィリン合成阻害を含む。

#### 【0083】

好ましくは、造血毒性が血液毒性である場合は、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、表2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから40  
選択される。

#### 【0084】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表2a、2b、12a又は12bに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性は血液の貧血によって特徴付けられる。特に、表12a及び/又は12bのバイオマーカーは、血液の貧血の早期指標であることが見出された。本発明の方法で対象としてラットを使用する場合は、2-クロロアニリン、アニリン又は4-クロロ-3-ニトロアニリンのうちのいずれか一種で刺激してから早ければ7日後に、前記バイオマーカーが変化する。50

## 【0085】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表3a、3b、3c、3d、3e、3f又は3gに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性はポルフィリン合成阻害によって特徴付けられる。

## 【0086】

同様により好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表4a、4b、4c又は4dに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性はメトヘモグロビンレベルの障害によって特徴付けられる。

## 【0087】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表5a、5b、5c又は5dに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性は脾臓ヘモジデリン沈着によって特徴付けられる。

10

## 【0088】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表6a又は6bに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性は、造血系細胞の(抗)増殖全身性障害によって特徴付けられる。

## 【0089】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表7a又は7bに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性は血液の再生不良性貧血によって特徴付けられる。

## 【0090】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表8a又は8bに示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性は免疫抑制によって特徴付けられる。

20

## 【0091】

より好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーが表9に示すバイオマーカーから選択される場合は、前記血液毒性は脾臓の造血によって特徴付けられる。

## 【0092】

各バイオマーカーが、診断について見かけ上統計的に独立した予測因子であるので、表に収載されているバイオマーカーのうちの2種以上の組み合わせが、さらに診断を強化することが本発明によって見出された。さらに、マーカー存在量に対する他の組織からの影響が均衡されるので、造血毒性に対する特異性も有意に増大する。したがって、本明細書で使用する用語「少なくとも1」は、好ましくは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9又は少なくとも10の、添付の表のうちのいずれか1つで言及されるバイオマーカーの組み合わせを指す。好ましくは、それらの表のうちのいずれか1つで列挙される全てのバイオマーカーが、本発明の方法に従って組み合わせて測定される。

30

## 【0093】

それぞれの表の造血毒性に対するバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせ、及び表中で言及される指標に対するバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、以下の通りである：

表1a、1b：プロゲステロン、4-ヒドロキシフェニルビルビン酸、21-ヒドロキシプロゲステロン(11-デオキシコルチコステロン)、18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン又はクエン酸。

40

## 【0094】

表1c、1d：コリンプラスマロゲン第2、バリン、ロイシン、イソロイシン又はケトロイシン。

## 【0095】

表1e、1f：トリプトファン、オルニチン、14-メチルヘキサデカン酸、グルコース-6-リン酸又は18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン。

## 【0096】

表2a、2b：リパール、シトシン、18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン、TAG(

50

C16:0、C18:2)又はTAG第2。

【0097】

表3a、3b: バリン、尿素、フェニルアラニン、ヒスチジン又はTAG(C16:0、C18:1、C18:3)。

【0098】

表3c、3d: リシン、スフィンゴミエリン(d18:2、C18:0)、リンゴ酸、DAG(C18:1、C18:2)又はイソロイシン。

【0099】

表3e、3f: イソロイシン、メチオニン、ロイシン、セリン又はトレオン酸。

【0100】

表3g: イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、ロイシン又はバリン。

【0101】

表4a、4b: セリン、リバール、シトシン、トレオニン又はドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)。

【0102】

表4c、4d: トレオニン、セリン、尿素、パルミトレイン酸(C16:cis[9]1)又はグリシン。

【0103】

表5a、5b: リノール酸(C18:cis[9,12]2)、ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)、ヘプタデカン酸(C17:0)、フィトスフィンゴシン又はシトシン。

【0104】

表5c、5d: リバール、ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)、シトシン、トレオン酸又はパルミトレイン酸(C16:cis[9]1)。

【0105】

表6a、6b: 補酵素Q9、補酵素Q10、シトシン、マンノース又はリバール。

【0106】

表7a、7b: リノレン酸(C18:cis[6,9,12]3)、スフィンゴミエリン(d18:1、C24:0)、ヒスチジン、コリンプラスマロゲン第1又はシトシン。

【0107】

表8a、8b: コレステロールエステル第1、ケトロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸又は18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン。

【0108】

表9a、9b: 尿酸、シトシン、ウラシル、アスコルビン酸又はリバール。

【0109】

したがって好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーは、前述の群から選択される少なくとも1種のバイオマーカーであり、又は少なくとも1種のバイオマーカーは、前述の群のバイオマーカーからなる若しくはそれを含むバイオマーカーの組み合わせである。前述のバイオマーカー及びバイオマーカーの組み合わせは、より詳細に付属の実施例で記載されるように、特に高い診断価値を有する重要なバイオマーカーとして同定された。

【0110】

さらに、他のバイオマーカー又は既知の代謝物、遺伝子変異、転写産物及び/若しくはタンパク質の量若しくは酵素活性を含めた臨床的パラメーターをさらに加えて測定することができる。そうした、本発明の方法によって測定することができる追加的な臨床的又は生化学的パラメーターは、当技術分野で周知である。

【0111】

本明細書で使用する用語「バイオマーカー」は、サンプル中の存在又は濃度が、ある状態、好ましくは本明細書で言及する造血毒性の有無又は強さの指標になる化学化合物を指す。好ましくは、化学化合物は、代謝物又はそれに由来するアナライトである。アナライトは、生物で見出される実際の代謝物と同一であり得る化学化合物である。しかし、この用語は、内因的に生成される、又は単離若しくはサンプルの前処理の間、若しくは本発明

10

20

30

40

50

の方法の実施の結果として、例えば、精製及び/若しくは測定ステップの間に生成される代謝物の誘導体も含む。特定の場合では、アナライトは、溶解度などの化学的性質によりさらに特徴付けられる。前記性質のため、アナライトは、精製及び/又は測定プロセス中に得られる極性又は脂質画分中に生じ得る。したがって、化学的性質、好ましくは溶解度は、精製及び/又は測定プロセス中に得られる極性又は脂質画分のいずれかの中にアナライトを生じさせるものとする。したがって、前記化学的性質、特に、精製及び/又は測定プロセス中に得られる極性画分又は脂質画分のいずれかの中のアナライトの発生として考慮される溶解度は、アナライトをさらに特徴付け、その同定を補助するものとする。こうした化学的性質を判定及び考慮することができる方法についての詳細は、以下に記載される付属の実施例に見出される。好ましくは、アナライトは、定性的及び定量的な様式で代謝物を表し、これによって、対象又は少なくとも前記対象の試験サンプル中の代謝物の有無又は量に関する決定が必然的に可能になる。バイオマーカー、アナライト及び代謝物は、本明細書では単数形で言及されるが、これらの用語の複数形も含み、すなわち、同一分子種の複数のバイオマーカー、アナライト又は代謝物分子を指す。さらに、本発明によるバイオマーカーは、必ずしも1つの分子種に対応するとは限らない。むしろ、バイオマーカーは、化合物の立体異性体又は鏡像異性体を含み得る。さらに、バイオマーカーは、異性体分子のある生物学的クラスの異性体の和を表すこともできる。前記異性体は、場合によっては同一の分析的特徴を示すものとし、したがって、以下に記載される付属の実施例で適用されるものを含めた種々の分析方法によって区別できない。しかし、異性体は、少なくとも同一の和公式パラメーターを有するので、例えば脂質の場合には、脂肪酸及び/又はスフィンゴ塩基部分において、同一の鎖長並びに同一の二重結合数を有する。

10

20

30

40

50

#### 【0112】

本明細書で使用する用語「試験サンプル」は、本発明の方法による造血毒性の診断に使用されるサンプルを指す。好ましくは、前記試験サンプルは生物サンプルである。生物源からのサンプル(すなわち生物サンプル)は、複数の代謝物を通常含む。本発明の方法で使用する好ましい生物サンプルは、体液、好ましくは、血液、血漿、血清、唾液、胆汁、尿若しくは脳脊髄液からのサンプル、又は例えば生検によって、細胞、組織若しくは臓器から、好ましくは肝臓から得られるサンプルである。より好ましくは、サンプルは、血液、血漿又は血清サンプルであり、最も好ましくは、血漿サンプルである。生物サンプルは、本明細書の他の個所で明記される対象に由来する。前述の様々な種類の生物サンプルを得るための技術は、当技術分野で周知である。例えば、血液サンプルは採血によって得ることができるが、組織又は臓器サンプルは、例えば生検によって得ることになる。

#### 【0113】

好ましくは、前述のサンプルは、前処理してから本発明の方法で使用する。より詳細に以下に記載するように、前記前処理は、化合物を遊離若しくは分離する又は過剰な材料若しくは廃物を除去するのに必要となる処理を含み得る。適切な技術は、遠心分離、抽出、分画、限外濾過、タンパク質沈殿、それに続く化合物の濾過及び精製並びに/又は濃縮を含む。さらに、化合物の分析に適した形状又は濃度で化合物を提供するために、他の前処理が行われる。例えば、ガスクロマトグラフィー連結質量分析を本発明の方法で使用する場合は、前記ガスクロマトグラフィーより前に化合物を誘導体化することが必要となる。適切且つ必要な前処理は、本発明の方法の実施に使用する手段に依存し、当業者に周知である。先に記載したように前処理されたサンプルも、本発明によって使用される用語「サンプル」に含まれる。

#### 【0114】

本明細書で使用する用語「対象」は、動物、好ましくは哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、サル又はウシなど、さらに、好ましくはヒトに関する。より好ましくは、対象はげっ歯類であり、最も好ましくはラットである。本発明の方法を適用して診断することができる他の動物は、魚類、鳥類又は爬虫類である。好ましくは、前記対象は、造血毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触したか、又は接触させたものである。造血毒性を誘導することが疑われ

る化合物と接触させた対象は、例えば化合物の毒性に関するスクリーニングアッセイで使用する、例えばラットなどの実験動物でもよい。造血毒性を誘導することができる化合物と接触したことが疑われる対象は、適切な療法を選択するために診断される対象でもあり得る。好ましくは、本明細書で使用する造血毒性を誘導することができる化合物は、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン又はイブuproフェンである。

10

#### 【0115】

好ましくは、対象が雌の場合は、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、表1a、1b、2a、2b、3a、3b、3c、3d、4a、4b、5a、5b、6a又は6bのうちのいずれか1つから選択される。雌の対象における造血毒性のバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン、21-ヒドロキシプロゲステロン(11-デオキシコルチコステロン)、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、クエン酸、補酵素Q10、補酵素Q9、シトシン、DAG(C18:1、C18:2)、ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)、ヘプタデカン酸(C17:0)、ヒスチジン、イソロイシン、リノール酸(C18:cis[9,12]2)、リシン、リンゴ酸、マンノース、フェニルアラニン、フィトスフィンゴシン、プロゲステロン、リバー、セリン、スフィンゴミエリン(d18:2、C18:0)、TAG(C16:0、C18:1、C18:3)、TAG(C16:0、C18:2)、TAG第2、トレオニン、尿素及びバリンである。

20

#### 【0116】

好ましくは、対象が雄の場合は、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、表1c、1d、1e、1f、3e、3f、3g、4c、4d、5c、5d、7a、7b、8a、8b、9、12a又は12bのうちのいずれか1つから選択される。雄における造血毒性のバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、14-メチルヘキサデカン酸、18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン、アスコルビン酸、アスパラギン酸、コレステロールエステル第1、コリンプラスマロゲン第1、コリンプラスマロゲン第2、シトシン、ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)、リノレン酸(C18:cis[6,9,12]3)、グルコース-6-リン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ケトロイシン、ロイシン、メチオニン、オルニチン、パルミトレイン酸(C16:cis[9]1)、フェニルアラニン、リバー、セリン、スフィンゴミエリン(d18:1、C24:0)、トレオン酸、トレオニン、トリプトファン、ウラシル、尿素、尿酸及びバリンである。

30

#### 【0117】

本明細書で使用する用語「量を測定する」は、バイオマーカー、すなわち代謝物又はアナライトの少なくとも1つの特徴的な特性を測定することを指す。本発明による特徴的な特性は、生化学的性質を含めた、バイオマーカーの物理的及び/又は化学的性質を特徴付ける特性である。そうした性質としては、例えば、分子量、粘性、密度、電荷、スピン、光学活性、色、蛍光、化学発光、元素組成、化学構造、他の化合物と反応する能力、生物学的読み取りシステム(例えばレポーター遺伝子の誘導)で応答を惹起する能力などが挙げられる。前記性質に関する値は、特徴的な特性としての役割を果たすことができ、当技術分野で周知の技術によって測定することができる。さらに、特徴的な特性は、標準的な操作、例えば乗算、除算又は対数計算などの数学的計算によってバイオマーカーの物理的及び/又は化学的性質の値から導かれる任意の特性でもよい。最も好ましくは、少なくとも1つの特徴的な特性によって、バイオマーカー及びその量の測定及び/又は化学的な同定が可能になる。したがって、特性値は、好ましくは、特性値が導かれるバイオマーカーの存在量に関する情報も含む。例えば、バイオマーカーの特性値は、質量スペクトルのピークでもよい。そうしたピークは、バイオマーカーの特徴的な情報、すなわちm/z(質量電荷比)情報及びサンプル中の前記バイオマーカーの存在量(すなわちその量)に関する強度値を

40

50



含有する。

【0118】

先に論じたように、好ましくは、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、定量的に又は半定量的に測定することができる。定量的な測定については、本明細書の上記で言及した特徴的な特性(複数可)に関して測定された値に基づいて、バイオマーカーの絶対量又は正確な量のいずれかが測定されるか、又はバイオマーカーの相対量が測定される。相対量は、バイオマーカーの正確な量が測定できない又は測定すべきでない場合に、測定することができる。前記の場合では、バイオマーカーの存在量が第2の量で前記バイオマーカーを含む第2のサンプルに対して増大又は低下しているのかを判定することができる。したがって、バイオマーカーの定量分析は、バイオマーカーの半定量分析と呼ばれることもある分析も含む。

10

【0119】

さらに、本発明の方法で使用される測定は、好ましくは、先に言及された分析ステップより前に、化合物分離ステップの使用を含む。好ましくは、前記化合物分離ステップによって、サンプルに含まれる少なくとも1種のバイオマーカーの時間分解分離がもたらされる。したがって、本発明に従って好んで使用される適切な分離技術には、全てのクロマトグラフィー分離技術、例えば、液体クロマトグラフィー(LC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。こうした技術は、当技術分野で周知であり、当業者であれば容易に適用することができる。最も好ましくは、LC及び/又はGCが本発明の方法で想定されるクロマトグラフィー技術である。バイオマーカーのそうした測定に適切な装置は、当技術分野で周知である。好ましくは、質量分析が使用され、特に、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、直接注入質量分析若しくはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(FT-ICR-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)、高速液体クロマトグラフィー連結質量分析(HPLC-MS)、四重極質量分析、MS-MS又はMS-MS-MSなどの任意の逐次連結質量分析、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、熱分解質量分析(Py-MS)、イオン移動度質量分析又は飛行時間型質量分析(TOF)が使用される。最も好ましくは、以下で詳細に記載されるように、LC-MS及び/又はGC-MSが使用される。前記技術は、例えば、Nissen 1995、Journal of Chromatography A、703: 37~57、US 4,540,884又はUS 5,397,894に開示されており、その開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。質量分析技術の代わりとして又はそれに加えて、以下の技術を化合物の測定に使用することができる:核磁気共鳴(NMR)、磁気共鳴画像(MRI)、フーリエ変換赤外分析(FT-IR)、紫外(UV)分光、屈折率(RI)、蛍光検出、放射化学的検出、電気化学的検出、光散乱(LS)、分散ラマン分光法又は炎イオン化検出(FID)。こうした技術は当業者に周知であり、容易に適用することができる。好ましくは、本発明の方法は、自動化によって補助されるものとする。例えば、サンプルの処理又は前処理は、ロボットによって自動化することができる。好ましくは、データの処理及び比較は、適切なコンピュータプログラム及びデータベースによって補助される。先に本明細書に記載した自動化によって、ハイスループットアプローチで本発明の方法を使用することが可能になる。

20

30

40

【0120】

さらに、バイオマーカーは、特異的な化学的又は生物学的アッセイによって測定することもできる。前記アッセイは、サンプル中のバイオマーカーの特異的な検出を可能にする手段を含むものとする。好ましくは、前記手段は、他の化合物と反応するバイオマーカーの能力、又は生物学的読み取りシステム(例えばレポーター遺伝子の誘導)において応答を惹起するその能力に基づいて、バイオマーカーの化学構造を特異的に認識することができるか、又はバイオマーカーを特異的に同定することができる。バイオマーカーの化学構造を特異的に認識することができる手段は、好ましくは、バイオマーカーに特異的に結合する検出剤、より好ましくは、化学構造物と特異的に相互作用する抗体又は他のタンパク質、例えば受容体又は酵素又はアプタマーである。例えば、特異的な抗体は、抗原としてバ

50

イオマーカーを使用して、当技術分野で周知の方法によって得ることができる。本明細書で言及する抗体には、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方、及びそれらのフラグメント、例えば、抗原又はハプテンと結合することができるFv、Fab及びF(ab)<sub>2</sub>フラグメントが含まれる。本発明は、所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプター抗体の配列と組み合わせ、ヒト化ハイブリッド抗体も含む。さらに、単鎖抗体が包含される。ドナー配列は、通常少なくともドナーの抗原結合アミノ酸残基を含むが、ドナー抗体の他の構造的及び/又は機能的に関連性のあるアミノ酸残基もまた含んでもよい。そうしたハイブリッドは、当技術分野で周知のいくつかの方法によって調製することができる。代謝物を特異的に認識することができる適切なタンパク質は、好ましくは、前記バイオマーカーの代謝的変換に関与する酵素である。前記酵素は、バイオマーカー、例えば代謝物を基質として使用してもよいし、基質をバイオマーカー、例えば代謝物に変換してもよい。さらに、前記抗体は、バイオマーカーを特異的に認識するオリゴペプチドを生成するための基盤として使用することができる。こうしたオリゴペプチドは、例えば、酵素の結合ドメイン又は前記バイオマーカーに対するポケットを含むものとする。適切な抗体及び/又は酵素に基づくアッセイは、RIA(放射免疫測定法)、ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチ免疫測定法(electrochemiluminescence sandwich immunoassays)(ECLIA)、解離促進ランタニド蛍光免疫測定法(dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay)(DELFI)又は固相免疫試験でもよい。バイオマーカーに特異的に結合するアプタマーは、当技術分野で周知の方法で生成することができる(Ellington 1990、Nature 346:818~822; Vater 2003、Curr Opin Drug Discov Devel 6(2): 253~261)。さらに、バイオマーカーは、他の化合物と反応するその能力に基づいて、すなわち特異的な化学反応によって、同定することもできる。さらに、バイオマーカーは、生物学的読み取りシステムで応答を惹起するその能力のため、サンプル中で測定することができる。生物学的な応答は、サンプルに含まれる代謝物の存在及び/又は代謝物の量を示す読み取り値として検出されるものとする。生物学的な応答は、例えば、細胞又は生物の遺伝子発現誘導又は表現型応答でもよい。

#### 【0121】

用語「リファレンス」は、少なくとも1種のバイオマーカーに特徴的な特性の値を指し、好ましくは、造血毒性と相関し得る前記バイオマーカーの量の指標になる値を指す。

#### 【0122】

好ましくは、そうしたリファレンスは、造血毒性を患っている対象若しくは対象群に由来するサンプル、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブプロフェンに接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られる。対象又は対象群は、化合物が生物学的に利用可能である限り、局所又は全身の各投与様式で前記化合物に接触させることができる。

#### 【0123】

好ましくは、前述の化合物は、リファレンスが以下の付属の実施例及び表に記載されているように得られる対象又は対象群の個体に投与することができる。

#### 【0124】

特に、本明細書で言及するアドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン、イブプロフェン及びオキサリプラチンは、骨髄毒性を誘導することができる化合物であり、一方で、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エボキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン

、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス又はトリエタノールアミンは、血液毒性を誘導することができる。

【0125】

或いは、とはいえ同様に好ましいことであるが、リファレンスは、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド三水和物、シタラビン若しくはイブプロフェンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプル、又は造血毒性に関して、より好ましくは他の疾患に関して、健康な対象若しくはそうした対象の群に由来するサンプルから得ることができる。

10

【0126】

リファレンスは、バイオマーカーの量について上で記載したように測定することができる。特に、好ましくは、リファレンスは、本明細書で言及する一群の対象のサンプルから得られ、これは、その群の各個体由来のサンプル中の少なくとも1種のバイオマーカー(複数可)それぞれの相対量又は絶対量を別々に測定し、その後、本明細書の他の個所で言及される統計的技術を使用して、前記相対量若しくは絶対量に対する中央値若しくは平均値又はそれらから得られる任意のパラメーターを決定することによって得られる。或いは、好ましくは、本明細書で言及するように、リファレンスは、対象群のサンプル混合物由来のサンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーそれぞれに対する相対量又は絶対量を測定することによって得ることができる。好ましくは、そうした混合物は、前記群の各個体から得られるサンプル由来の等容量の部分からなる。

20

【0127】

さらに、また好ましくは、リファレンスは計算されたリファレンスでもよく、最も好ましくは、個体集団に由来する少なくとも1種のバイオマーカーのそれぞれの相対量又は絶対量に対する平均値又は中央値でもよい。前記個体集団は、本発明の方法によって調査される対象が生じる集団である。しかし、計算されたリファレンスを決定するために調査する対象集団は、好ましくは、見かけ上健康な対象(例えば未処理)からなるか、又は前記集団内に試験対象(複数可)が存在することに起因する平均値又は中央値の有意な変化に対して統計的に耐えるのに十分な大きさの、見かけ上健康な多数の対象を含むことを理解されたい。前記集団の個体の少なくとも1種のバイオマーカーの絶対量又は相対量は、本明細書の他の個所で明記されるように判定することができる。適切なリファレンス値、好ましくは平均値又は中央値を計算する方法は、当技術分野で周知である。適切なリファレンスを計算するための他の技術としては、受信者動作特性(ROC)曲線計算を用いる最適化が挙げられ、これは、当技術分野で同様に周知であり、対象の所与のコホートに基づく所与の特異性及び感受性を有するアッセイ系について、容易に実施することができる。先に言及した集団又は対象群は、複数の対象、好ましくは、少なくとも5、10、50、100、1,000又は10,000の対象、最大で集団全てまでを含むものとする。より好ましくは、この文脈において言及される対象群は、所与の集団を統計的に代表する大きさを有する対象群、すなわち統計的に代表的なサンプルである。本発明の方法によって診断される対象及び前記複数の対象の対象は同一種であり、好ましくは同じ性別であることを理解されたい。

30

40

【0128】

より好ましくは、リファレンスは、データベースなどの適切なデータ記憶媒体に格納されるので、その後の診断にも利用可能である。これによって、造血毒性の素因を効率的に診断することが可能になる。なぜなら、対応するリファレンスサンプルが得られた対象が(実際に)造血毒性を発症したことが(その後)一度確認されれば、適切なリファレンス結果をデータベース中で特定することができるからである。

【0129】

50

用語「比較する」は、少なくとも1種のバイオマーカーの定性的又は定量的な測定量が、リファレンスと同一であるか又はそれと異なるかを評価することを指す。

【0130】

リファレンス結果が、造血毒性を患う対象若しくは対象群に由来するサンプル、又は1, 3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブuproフェンと接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られる場合は、造血毒性は、試験サンプル及び前述のリファレンスから得られる量の間の同一度又は類似度に基づいて、すなわち、少なくとも1種のバイオマーカーに関する同一の定性的又は定量的な組成に基づいて診断することができる。同一の量は、統計的に有意な様式で異なる量を含み、好ましくは、少なくともリファレンスの1から99パーセンタイル、5から95パーセンタイル、10から90パーセンタイル、20から80パーセンタイル、30から70パーセンタイル、40から60パーセンタイルの区間内、より好ましくは、リファレンスの50、60、70、80、90又は95パーセンタイル内である。造血毒性を患う対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、アドリアマイシン塩酸塩、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブuproフェンと接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、造血毒性を診断するために、又は対象において化合物が造血毒性を誘導することができるかどうかを判定するために、本発明の方法で適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと本質的に同一である、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性の存在又は造血毒性を誘導することができる化合物の指標となり、一方で、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性の不存在又は造血毒性を誘導することができない化合物の指標になる。

【0131】

さらに、造血毒性を患う対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブuproフェンと接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、造血毒性を治療するための物質を同定するのに適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性を治療するのに適した物質の指標となり、一方で、リファレンスと本質的に同一である、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性を治療できない物質の指標になる。

【0132】

リファレンス結果が、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニュロン、リトコール酸、メチマゾール

、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブプロフェンに接触させていない対象若しくは対象群のサンプル、又は造血毒性を患っていない対象若しくは対象群のサンプルから得られる場合は、前記造血毒性は、試験サンプルから得られる試験量と前述のリファレンスの差異、すなわち、少なくとも1種のバイオマーカーに関する定性的又は定量的な組成における差異に基づいて診断することができる。

【0133】

上で明記した計算されたリファレンスを使用される場合も、同じことが当てはまる。

【0134】

差異は、少なくとも1種のバイオマーカーの絶対量又は相対量の増大(バイオマーカーのアップレギュレーションといわれることもある。実施例も参照されたい。)でもよいし、前記量のいずれかの低下若しくは検出可能なバイオマーカーの量が存在しないこと(バイオマーカーのダウンレギュレーションといわれることもある。実施例も参照されたい。)でもよい。好ましくは、相対量又は絶対量の差異は有意であり、すなわち、リファレンスの45から55パーセント、40から60パーセント、30から70パーセント、20から80パーセント、10から90パーセント、5から95パーセント、1から99パーセントの区間外である。

【0135】

1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブプロフェンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は造血毒性を患っていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、造血毒性を診断するために、又は対象において化合物が造血毒性を誘導することができるかどうかを判定するために、本発明の方法で適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性の存在又は造血毒性を誘導することができる化合物の指標となり、一方で、リファレンスと本質的に同一である、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性の不存在又は造血毒性を誘導することができない化合物の指標になる。さらに、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン若しくはイブプロフェンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は造血毒性を患っていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、造血毒性を治療するための物質を同定するのに適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと本質的に同一である、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性を治療するのに適した物質の指標となり、一方で、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性を治療するのに適さない物質の指標になる。

【0136】

好ましいリファレンスは、付属の表で言及されるもの又は以下の付属の実施例で生成することができるものである。さらに、相対的差異、すなわち個々のバイオマーカーについての量の増大又は低下は、好ましくは、以下の表に列挙されるものである。さらに、好ま

10

20

30

40

50

しくは、観察される差異の程度、すなわち増大又は低下は、好ましくは、以下の表に示される因子による増大又は低下である。

【0137】

好ましくは、表1a、1c、1e、2a、3a、3c、3e、4a、4c、5a、5c、6a、7a、8a又は12bから選択される場合の少なくとも1種のバイオマーカーは、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラピン若しくはイブプロフェンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は前記表に示される健康な対象若しくは対象群から得られるサンプルから得られるリファレンスに対して増大する。

【0138】

好ましくは、表1b、1d、1f、2b、3b、3d、3f、3g、4b、4d、5b、5d、6b、7b、8b、9又は12aから選択される場合の少なくとも1種のバイオマーカーは、1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラピン若しくはイブプロフェンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は健康な対象若しくは前記表に示される対象群から得られるサンプルから得られるリファレンスに対して低下する。

【0139】

好ましくは、比較は自動化によって補助される。例えば、2つの異なるデータセット(例えば、特徴的な特性(複数可)の値を含むデータセット)を比較するためのアルゴリズムを含む適切なコンピュータプログラムを使用することができる。そうしたコンピュータプログラム及びアルゴリズムは、当技術分野で周知である。上記にもかかわらず、比較は手動で実施することもできる。

【0140】

用語「造血毒性を治療するための物質」は、本明細書の他の個所で言及される造血毒性を誘導する生物学的機序を直接的に妨げることができる化合物を指す。或いは、造血毒性に付随する症状の発症又は進行を妨げることができる化合物も好ましい。本発明の方法によって同定される物質は、有機及び無機化学物質、例えば、低分子、ポリヌクレオチド、siRNA、リボザイム若しくはマイクロRNA分子を含めたオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体を含めたポリペプチド又は他の人工的若しくは生物学的な高分子、例えばアプタマーなどでもよい。好ましくは、この物質は、薬物、プロドラッグ又は薬物若しくはプロドラッグを開発するためのリード物質として適する。

【0141】

本発明の方法が、造血毒性の療法のための薬物の同定、又は化合物の毒物学的評価(すなわち、化合物が造血毒性を誘導することができるかどうかの判定)のために使用されることになる場合は、統計的理由のために、複数の対象の試験サンプルが調査され得ることを理解されたい。好ましくは、試験対象のそうしたコホートの内メタボロームは、例えば調査化合物以外の因子によって引き起こされる差異を回避するために、できるだけ類似しているものとする。前記方法に使用する対象は、好ましくはげっ歯類などの実験動物、より好ましくはラットである。前記実験動物は、好ましくは、本発明の方法が終了した後で屠殺するものとするをさらに理解されたい。コホート試験の対象及びリファレンス動物の全ては、いかなる特異な環境上の影響も回避するために、同一条件下で維持されるものとする。そうした動物を提供する適切な条件及び方法は、WO2007/014825に詳細に記載

10

20

30

40

50

されている。前記条件は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0142】

好ましくは、本発明の方法は本発明の装置に実装され得る。本明細書で使用する装置は、少なくとも前述のユニットを備えるものとする。装置のユニットは、互いに作動可能に連結される。作動的にユニットを連結する方法は、装置中に備えられるユニットの種類に依存する。例えば、少なくとも1種のバイオマーカーを定性的又は定量的に自動的に測定するための手段が分析ユニット中に適用される場合は、前記自動的な作動ユニットによって得られるデータは、診断を容易にするために、評価ユニットによって、例えば、データ処理装置であるコンピューターで動作するコンピュータープログラムによって処理することができる。好ましくは、そのような場合は、これらのユニットは単一装置に備えられる。しかし、分析ユニットと評価ユニットは、物理的に離れていてもよい。そのような場合では、作動的な連結は、データ伝達を可能にする、ユニット間の有線接続及び無線接続によって達成することができる。無線接続は、無選LAN(WLAN)又はインターネットを使用することができる。有線接続は、ユニット間の光及び非光ケーブル接続によって達成することができる。好ましくは、有線接続に使用するケーブルは、ハイスループットなデータ転送に適する。

10

【0143】

少なくとも1種のバイオマーカーを測定するための好ましい分析ユニットは、本明細書の他の個所で明記されるような、少なくとも1種のバイオマーカーを特異的に認識する検出剤、例えば抗体、タンパク質又はアプタマーなど、及び前記検出剤を試験サンプルと接触させるゾーンを備える。検出剤は、ゾーン上に固定化して接触させてもよいし、サンプルを負荷した後に前記ゾーンに加えてもよい。好ましくは、分析ユニットは、検出剤と少なくとも1種のバイオマーカーの複合物の量を定性的及び/又は定量的に測定するように適合させるものとする。検出剤が少なくとも1種のバイオマーカーへ結合する際に、少なくとも1種のバイオマーカー、検出剤のいずれか又は両方の少なくとも1つの測定可能な物理的又は化学的性質が変化し、その結果、好ましくは分析ユニットに備えられる検出器によって前記変化を測定できることを理解されたい。しかし、試験ストライプなどの分析ユニットを使用する場合は、検出器及び分析ユニットは、測定のためだけに結合させられる分離したコンポーネントでもよい。少なくとも1つの測定可能な物理的又は化学的性質において検出された変化に基づいて、分析ユニットは、本明細書の他の個所で明記される少なくとも1種のバイオマーカーに関する強度値を計算することができる。次いで、さらに処理及び評価するために、前記強度値を評価ユニットに伝達することができる。最も好ましくは、本明細書の他の個所で明記される検出剤を使用して、少なくとも1種のバイオマーカーの量をELISA、EIA又はRIAに基づく技術によって判定することができる。或いは、本明細書で言及する分析ユニットは、好ましくは、クロマトグラフィー装置などのバイオマーカーを分離するための手段、及び分光測定装置などのバイオマーカーを測定するための手段を備える。適切な装置は、詳細に先に記載されている。本発明のシステムで使用する化合物分離用の好ましい手段としては、クロマトグラフィー装置、より好ましくは液体クロマトグラフィー装置、HPLC装置及び/又はガスクロマトグラフィー装置が挙げられる。化合物測定用の好ましい装置は、質量分析装置、より好ましくは、GC-MS、LC-MS、直接注入質量分析装置、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四重極質量分析装置、(MS-MS若しくはMS-MS-MSを含めた)逐次連結質量分析装置、ICP-MS、Py-MS又はTOFを含む。好ましくは、分離及び測定の手段は互いに連結される。最も好ましくは、LC-MS及び/又はGC-MSが、本発明によって言及される分析ユニットで使用される。

20

30

40

【0144】

好ましくは、本発明の装置の評価ユニットは、本明細書の他の個所で明記されるように、比較を実施するためのルールを実行するように適合させたデータ処理装置又はコンピューターを備える。さらに、好ましくは、評価ユニットは、リファレンスを格納したデータベースを備える。本明細書で使用するデータベースは、適切な記憶媒体のデータ集合を備える。さらに、データベースは、好ましくはデータベース管理システムをさらに備える。

50

好ましくは、データベース管理システムは、ネットワーク型、階層型又はオブジェクト指向型データベース管理システムである。さらに、データベースは、連邦データベースでもよいし、統合データベースでもよい。より好ましくは、データベースは、分散(連邦)システムとして、例えばクライアントサーバシステムとして実装される。より好ましくは、データベースは、検索アルゴリズムが、試験データセットをデータ集合に含まれるデータセットと比較できるように構築される。具体的には、そうしたアルゴリズムを使用することによって、造血毒性の指標になる類似又は同一のデータセットについてデータベースを検索することができる(例えばクエリ検索)。したがって、同一又は類似のデータセットをデータ集合中に特定することができる場合は、試験データセットは造血毒性と関係があることになる。評価ユニットは、好ましくは、造血毒性の確定診断に基づく治療的若しくは予防的な介入又は生活習慣の適応に対する助言を有するさらなるデータベースを備えてもよいし、それに作動可能に連結されてもよい。好ましくは、造血毒性を治療又は予防するために、試験サンプルを得た対象に対する適切な助言を特定する目的で、評価ユニットによって得られた診断結果を用いて前記のさらなるデータベースを自動的に検索することができる。

#### 【0145】

本発明の装置の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、造血毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在することの指標になり、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在しないことの指標になる。

#### 【0146】

本発明の装置の別の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又は1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、サフルフェナシル、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルブレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在することの指標となり、又はリファレンスと比較して本質的に同一である、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、造血毒性が存在しないことの指標になる。

#### 【0147】

したがって、助言を行うエキスパートシステムが含まれる場合は特に、メディカルスタッフ若しくは検査室スタッフ又は患者が特別な医学知識なしで装置を使用することもでき



る。この装置は、携帯型に適合させることができるので、患者の近くでの用途にも適する。

【0148】

用語「キット」は、好ましくは別々に又は単一の容器内に提供される、前述のコンポーネントの集合を指す。容器は、本発明の方法の実施に関する指示も備える。こうした指示は、取扱説明書の形でもよいし、コンピューター又はデータ処理装置上に実装される場合には、本発明の方法で言及される比較を実施でき、それに応じて診断を確定するためのコンピュータープログラムコードによって提供されてもよい。コンピュータープログラムコードは、データ記憶媒体若しくは装置、例えば光若しくは磁気記憶媒体(例えば、コンパクトディスク(CD)、CD-ROM、ハードディスク、光記録媒体若しくはディスケット)上に、又はコンピューター若しくはデータ処理装置上に直接的に提供することができる。本発明のキットに関して言及される「スタンダード」は、溶液中に存在する又は既定の溶液量中に溶解されている場合は、少なくとも1種のバイオマーカーの量であり、

(i)造血毒性を患っていることが分かっている対象若しくは対象群、若しくは1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群中に存在する少なくとも1種のバイオマーカーの量、又は

(ii)造血毒性を患っていないことが分かっている対象若しくは対象群、若しくは1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する少なくとも1種のバイオマーカーの量に類似している。

【0149】

好都合なことに、本明細書に明記される少なくとも1種のバイオマーカーの量によって、造血毒性、具体的には1,3-ジニトロベンゼン、1,4-ジニトロベンゼン、2-ブトキシエタノール、2-クロロアニリン、シクロヘキサノンオキシム(CHO)、4-クロロ-3-ニトロアニリン、アドリアマイシン塩酸塩、アニリン、シクロスポリンA、エポキシコナゾール、フルタミド、酢酸鉛三水和物、リニユロン、リトコール酸、メチマゾール、メチルプレドニゾロン、オキサリプラチン、プロベネシド、タクロリムス、トリエタノールアミン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド水和物、シタラビン及びイブプロフェンによって誘導される造血毒性の診断が可能になることが、本発明の根底となる研究において見出されている。本方法の特異性及び正確性は、前述のバイオマーカーの数を増加させて測定することによって又はさらにその全てを測定することによって、より一層向上する。こうした特異的なバイオマーカーに関するメタボロームの定量的及び/又は定性的組成の変化は、造血毒性の他の徴候が臨床的に明らかになる前でさえ、造血毒性の指標になる。造血毒性を診断するのに現在使用されている形態的、生理的及び生化学的なパラメーターは、本発明で提供するバイオマーカー測定と比較すると、特異性及び感受性が低い。本発明によって、化合物の造血毒性を、より効率的且つ確実に評価することができる。さらに、前述の知見に基づいて、造血毒性の療法に有用な薬物のスクリーニングアッセイが実行可能である。概して、本発明は、造血毒性を診断するために、化合物が造血毒性を誘導

できるかどうかを判定するために、又は造血毒性を治療できる物質を同定するために、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、9、12a若しくは12bのうちのいずれか1つから選択される対象のサンプルの少なくとも1種のバイオマーカー又は前記バイオマーカー用の検出剤の使用を企図する。さらに、本発明は概して、造血毒性の治療に対して感受性である対象を同定するために、対象のサンプルの少なくとも1種のバイオマーカー、又はそのバイオマーカーの検出剤の使用を企図する。本発明のこの文脈において使用するのに好ましい検出剤は、本明細書の他の個所で言及されるものである。さらに好都合なことに、発明の方法は装置中に実装することができる。さらに、本方法を実施できるようにするキットを提供することができる。

10

#### 【0150】

本発明は、表1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、5a、5b、5c、5d、6a、6b、7a、7b、8a、9、12a又は12bのうちのいずれか1つに列挙されるバイオマーカーに対する特性値を含むデータ集合にも関する。用語「データ集合」は、物理的及び/又は論理的にグループ化され得るデータの集合を指す。したがって、データ集合は、単一のデータ記憶媒体又は互いに作動可能に連結された物理的に離れたデータ記憶媒体に実装することができる。好ましくは、データ集合は、データベースによって実装される。したがって、本明細書で使用するデータベースは、適切な記憶媒体上にデータ集合を備える。さらに、好ましくは、データベースはデータベース管理システムをさらに備える。好ましくは、データベース管理システムは、ネットワーク型、階層型又はオブジェクト指向型のデータベース管理システムである。さらに、データベースは、連邦データベースでも統合データベースでもよい。より好ましくは、データベースは、分散(連邦)システムとして、例えばクライアントサーバシステムとして実装される。より好ましくは、データベースは、検索アルゴリズムが試験データセットをデータ集合に含まれるデータセットと比較できるように構築される。具体的には、そうしたアルゴリズムを使用することによって、造血毒性の指標になる類似の又は同一のデータセットについてデータベースを検索することができる(例えばクエリ検索)。したがって、同一又は類似のデータセットをデータ集合中に特定することができる場合は、試験データセットは造血毒性と関係があることになる。結果として、データ集合から得られる情報を使用して、対象から得られる試験データセットに基づいて造血毒性を診断することができる。

20

30

#### 【0151】

さらに、本発明は、前記データ集合を備えるデータ記憶媒体に関する。本明細書で使用する用語「データ記憶媒体」は、CD、CD-ROM、ハードディスク、光記録媒体又はディスクセットなどの単一の物理エンティティに基づくデータ記憶媒体を包含する。さらにこの用語は、好ましくはクエリ検索に適切なやり方で、前述のデータ集合を提供するように互いに作動可能に連結された、物理的に分離したエンティティからなるデータ記憶媒体をさらに含む。

#### 【0152】

本発明はまた、

(a) サンプルの少なくとも1種のバイオマーカーの特性値を比較するための手段と、それに作動可能に連結された、

40

(b) 本発明のデータ記憶媒体とを含むシステムに関する。

#### 【0153】

本明細書で使用する用語「システム」は、互いに作動可能に連結される種々の手段に関する。前記手段は、単一装置に実装されてもよいし、互いに作動可能に連結された物理的に分離した装置に実装されてもよい。好ましくは、バイオマーカーの特性値を比較するための手段は、上で言及したような比較アルゴリズムに基づいて作動する。好ましくは、データ記憶媒体は、前述のデータ集合又はデータベースを備え、各記憶データセットが造血毒性の指標になる。したがって、本発明のシステムによって、試験データセットがデータ

50

記憶媒体に格納されるデータ集合に含まれるかどうかを特定することが可能になる。結果として、本発明のシステムは、造血毒性診断の診断手段として適用することができる。本システムの好ましい実施形態では、サンプルのバイオマーカーの特性値を測定するための手段が含まれる。用語「バイオマーカーの特性値を測定するための手段」は、好ましくは、質量分析装置、ELISA装置、NMR装置又はアナライトについて化学的若しくは生物学的アッセイを実施するための装置などの、バイオマーカーを測定するための前述の装置に関する。

#### 【0154】

先に言及した全ての参考文献は、その開示内容全体及び先の記述で明確に言及したその具体的な開示内容に関して、参照により本明細書に組み込むものとする。

10

#### 【0155】

以下の実施例は、本発明を説明する目的のためにすぎない。これらは、いかなる観点においても本発明の範囲を限定するものと何ら解釈されるべきでない。

#### 【実施例】

#### 【0156】

#### 実施例：造血毒性に関連するバイオマーカー

各5匹の雄及び雌ラットの群に、指示化合物(化合物、投与量及び投与詳細について以下の表10を参照のこと)を28日間にわたって1日1回投与した。

#### 【0157】

本研究の各投与群は、性別あたり5匹のラットからなっていた。それぞれ5匹の雄及び雌の動物の追加的な群を対照とした。処理期間の開始前に、供給時に62～64日齢の動物を、居住及び環境条件に7日間順応させた。動物集団の全ての動物を、同一の一定温度(20～24±3)及び同一の一定湿度(30～70%)下で維持した。動物集団の動物は、不断給餌させた。使用する餌には、化学物質又は微生物の混入物は基本的に含まれていなかった。飲料水も自由に与えた。したがって、欧州飲料水指令(European Drinking Water Directive)98/83/EGに規定されている通り、水には、化学物質及び微生物の混入物は含まれていなかった。照明期間は、12時間明期、続いて12時間暗期(6:00から18:00までの12時間明期及び18:00から6:00までの12時間暗期)とした。本研究は、ドイツ動物保護法及び欧州理事会指令86/609/EEに従って、AAALACに認可された実験室で実施した。試験系は、げっ歯類での28日間反復投与経口毒性試験について化学物質を試験するために、OECD 407指針に従ってアレンジした。表1～9の試験物質(化合物)を、上の表10に記載されるように用量決定し、投与した。

20

30

#### 【0158】

7日目、14日目及び28日目の朝に、絶食させた麻酔下の動物の眼窩後静脈叢から採血した。抗凝血剤としてEDTAを用いて、各動物から1mlの血液を採取した。このサンプルを遠心分離して、血漿を生成した。全ての血漿サンプルをN<sub>2</sub>雰囲気中で覆い、次いで分析まで-80で保管した。

#### 【0159】

質量分析に基づく代謝物プロファイリング分析のために、血漿サンプルを抽出し、極性及び非極性(脂質)画分を得た。GC-MS分析のために、非極性画分を酸性条件下でメタノールで処理して、脂肪酸メチルエステルを得た。O-メチル-ヒドロキシアミン塩酸塩及びピリジンを用いて両画分をさらに誘導体化してオキシ基をO-メチルオキシムに変換し、その後シリル化剤を用いて誘導体化してから分析した。LC-MS分析では、両画分を適切な溶媒混合液中で再構成した。HPLCは、逆相分離カラムによって勾配溶離で実施した。WO2003 073464に記載されるように、フルスクリーン分析と並行して、標的及び高感度MRM(多重反応モニタリング)プロファイリングを可能にする質量分析検出を適用した。

40

#### 【0160】

ステロイド及びその代謝物は、オンラインSPE-LC-MS(固相抽出-LC-MS)によって測定した。カテコールアミン及びその代謝物は、Yamadaら(Yamada 2002, Journal of Analytical Toxicology, 26(1): 17～22))によって記載されるように、オンラインSPE-LC-MSによ

50

て測定した。

【0161】

総合的な分析検証ステップに続いて、各アナライトに関するデータを、プールサンプル由来のデータに対して標準化した。これらのサンプルは、プロセス変動を説明するために、全プロセスを通して並行して処理した。性別、処理期間及び代謝物に対して特異的な処理群値の有意性を、処理群の平均と対応する未処理の対照群の平均をWELCH試験を用いて比較することによって判定し、対照に対する処理比及びp値を用いて定量化した。

【0162】

毒性パターン毎の最も重要なバイオマーカーを、以下の表のアナライトの序列化によって同定した。したがって、所与のパターンのリファレンス処理における代謝変化(表に示す)を、他の関係のない処理における同一代謝物の変化と比較した。各代謝物について、リファレンス及び対照処理からT値を得て、Welch試験によって比較して、これら2群に有意差があるかどうかを評価した。それぞれのT値の最大絶対値を選んで、そのパターンについての最も重要な代謝物を示した。

10

【0163】

ラットを処理した後の、造血毒性の指標になる血漿代謝物群の変化を以下の表に示す。

【表1】

表1a:雌ラットにおける血液毒性に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。骨髓抑制を誘導するオキサリプラチンは、低用量で投与した。

20

|                              | カルボプラチン | シスプラチン | イブプロフェン | オキサリプラチン |
|------------------------------|---------|--------|---------|----------|
| 代謝物                          | f28     | f28    | f28     | f28      |
| ロイシン                         | 1.27*   | 1.3*   | 1.25*   | 1.35*    |
| イソロイシン                       | 1.18*   | 1.28*  | 1.22*   | 1.39*    |
| バリン                          | 1.13*   | 1.23   | 1.23*   | 1.22*    |
| アスパラギン酸                      | 1.58*   | 1.14   | 1.08*   | 2.09*    |
| リン酸<br>(無機及び有機リン酸塩)          | 1.57*   | 1.25*  | 1.58*   | 1.53*    |
| グリセロール-3-リン酸、<br>極性画分        | 1.94*   | 1.2*   | 1.27*   | 1.28*    |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:0、C18:2)＃ | 1.22*   | 1.04*  | 0.93    | 1*       |
| トレオン酸                        | 1.51*   | 1.13*  | 1.11    | 0.95     |

30

【表 2】

表1b:雌ラットにおける血液毒性に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。骨髄抑制を誘導するオキサリプラチンは、低用量で投与した。

|                                      | カルボプラチン | シスプラチン | イブプロフェン | オキサリプラチン |
|--------------------------------------|---------|--------|---------|----------|
| 代謝物                                  | f28     | f28    | f28     | f28      |
| プロゲステロン                              | 0.49*   | 0.53*  | 0.41*   | 0.69*    |
| 4-ヒドロキシフェニル<br>ピルビン酸                 | 0.39*   | 0.76*  | 0.84*   | 0.75*    |
| 21-ヒドロキシプロゲステロン<br>(11-デオキシコルチコステロン) | 0.09*   | 0.26*  | 0.19*   | 0.16*    |
| 18-ヒドロキシ-11-<br>デオキシコルチコステロン         | 0.33*   | 0.46*  | 0.24*   | 0.37*    |
| クエン酸                                 | 0.78*   | 0.87*  | 0.94*   | 0.82*    |
| コルチコステロン                             | 0.31*   | 0.49*  | 0.32*   | 0.43*    |

10

【表 3】

表1c:雄ラットにおける血液毒性に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                | シクロホスファミド<br>一水和物 | アドリアマイシン<br>塩酸塩 | シタラビン |
|----------------|-------------------|-----------------|-------|
| 代謝物            | m28               | m28             | m28   |
| コリンプラスマロゲン第2#  | 1.13*             | 1.18*           | 1.11* |
| バリン            | 1.25*             | 1.21*           | 1.1*  |
| ロイシン           | 1.33*             | 1.4*            | 1.12* |
| イソロイシン         | 1.23*             | 1.35*           | 1.1*  |
| タウリン           | 1.21*             | 1.39*           | 1.27* |
| トリコサン酸(C23:0)  | 1.44*             | 2.14*           | 1.3   |
| リグノセリン酸(C24:0) | 1.29*             | 2.04*           | 1.31* |

30

【表 4】

表1d:雄ラットにおける血液毒性に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                          | シクロホスファミド<br>一水和物 | アドリアマイシン<br>塩酸塩 | シタラビン |
|--------------------------|-------------------|-----------------|-------|
| 代謝物                      | m28               | m28             | m28   |
| ケトロイシン                   | 0.88*             | 0.69*           | 0.75* |
| クエン酸                     | 0.78*             | 0.86            | 0.81* |
| 18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン | 0.16*             | 0.44*           | 0.13* |
| 3-ヒドロキシ酪酸                | 0.75*             | 0.66*           | 0.53* |

40

【表 5】

表 1e:雄ラットにおける血液毒性に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                   | シスプラチン | カルボプラチン |
|-------------------|--------|---------|
| 代謝物               | m28    | m28     |
| トリプトファン           | 1.27*  | 1.17*   |
| オルニチン             | 1.16*  | 1.11*   |
| グルコース-6-リン酸       | 1.32*  | 2.2*    |
| フェニルアラニン          | 1.17*  | 1.2*    |
| タウリン              | 1.29*  | 1.47*   |
| インドール-3-乳酸        | 1.27*  | 1.13*   |
| フルクトース-6-リン酸      | 1.05*  | 1.74*   |
| アスパラギン酸           | 1.18*  | 1.45*   |
| ヒスチジン             | 1.12*  | 1.17*   |
| バリン               | 1.16*  | 1.29*   |
| ロイシン              | 1.36*  | 1.41*   |
| イソロイシン            | 1.26*  | 1.3*    |
| グリセロール-3-リン酸、極性画分 | 1.3*   | 2.21*   |

10

20

【表 6】

表 1f:雄ラットにおける血液毒性に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                          | シスプラチン | カルボプラチン |
|--------------------------|--------|---------|
| 代謝物                      | m28    | m28     |
| 14-メチルヘキサデカン酸            | 0.83*  | 0.72*   |
| 18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン | 0.42*  | 0.18*   |
| コリンプラスマロゲン(C18、C20:4)    | 0.89*  | 0.89*   |
| 3-ヒドロキシ酪酸                | 0.73*  | 0.74*   |
| クエン酸                     | 0.71*  | 0.76*   |
| アスコルビン酸                  | 0.83*  | 0.84*   |

30

【表 7】

表2a:雌ラットにおける血液毒性(血液の貧血)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化( $p$ 値 $\leq 0.15$ )に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                     | 4-クロロ-3-ニトロアニリン |       |       | アニリン  |       |       | 2-クロロアニリン |       |       |
|-------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|
|                         | f7              | f14   | f28   | f7    | f14   | f28   | f7        | f14   | f28   |
| リバー                     | 1.36*           | 1.36* | 1.48* | 1.67* | 1.16* | 1.7*  | 1.87*     | 1.26* | 1.22* |
| シトシン                    | 1.57*           | 1.14* | 1.54* | 1.8*  | 1.3*  | 1.37* | 1.82*     | 1.28* | 1.22* |
| TAG(C16:0、C18:2)＃       | 2.71*           | 2*    | 3.13* | 2.24* | 3.58* | 4.71* | 1.89*     | 1.67* | 2.19* |
| TAG(C18:2、C18:2)＃       | 3.38*           | 1.67  | 4.93* | 1.97* | 3.29* | 5.17* | 1.67      | 1.84* | 2.12* |
| TAG(C16:0、C18:1、C18:3)＃ | 2.05*           | 1.92  | 3.93* | 2.25* | 3.59* | 5.33* | 1.9*      | 2.27* | 1.74* |
| TAG第5＃                  | 1.79            | 2.34* | 5.86* | 2.17* | 2.59* | 4.41* | 1.44*     | 1.33* | 1.74* |
| TAG(C18:1、C18:2)＃       | 3.13*           | 1.75* | 3.36* | 1.56  | 2.87* | 3.77* | 1.64      | 1.32* | 1.59* |
| TAG(DAG-フラグメント)＃        | 3.64*           | 1.86* | 3.77* | 1.78  | 3.18* | 5.12* | 1.72*     | 1.39* | 1.95* |

10

【表 8】

表2b:雌ラットにおける血液毒性(血液の貧血)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化( $p$ 値 $\leq 0.15$ )に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                          | 4-クロロ-3-ニトロアニリン |       |       | アニリン  |       |       | 2-クロロアニリン |       |       |
|------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|
|                              | f7              | f14   | f28   | f7    | f14   | f28   | f7        | f14   | f28   |
| 18-ヒドロキシ-11-<br>デオキシコルチコステロン | 0.25*           | 0.5*  | 0.75* | 0.4*  | 0.63* | 0.49* | 0.7*      | 0.77  | 0.5*  |
| TAG第2＃                       | 0.65*           | 0.85* | 0.72* | 0.67* | 0.71* | 0.55* | 0.78*     | 0.85* | 0.95  |
| ケトロイシン                       | 0.87            | 0.7*  | 0.88* | 0.84* | 0.83  | 0.86* | 0.73*     | 1.07  | 0.79* |
| 乳酸                           | 0.83            | 0.43* | 0.58* | 0.98  | 0.7   | 0.73* | 0.91      | 0.75  | 0.84* |
| ピルビン酸                        | 1.35            | 0.49* | 0.45* | 0.79* | 0.84  | 0.59* | 0.94      | 0.81  | 0.54* |

20

30

【表 9】

表3a:雌ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                      | サフルフェナシル |       |       | 酢酸鉛三水和物 |       |       |
|--------------------------|----------|-------|-------|---------|-------|-------|
|                          | f7       | f14   | f28   | f7      | f14   | f28   |
| 尿素                       | 1.35*    | 1.63* | 1.06  | 1.22*   | 1.32* | 1.13* |
| TAG(C16:0、C18:1、C18:3)＃  | 1.74*    | 2.17* | 2*    | 1.42*   | 1.64  | 1.46* |
| ホスファチジルコリン(C16:0、C16:0)＃ | 1.11*    | 1.08  | 1.2*  | 1.28*   | 1.19  | 1.22* |
| クレアチニン                   | 1.47*    | 0.96  | 0.88  | 1.2*    | 1.09  | 1.02  |
| リゾホスファチジルコリン(C17:0)＃     | 1.18*    | 1.04  | 1.19  | 1.21*   | 1.18* | 0.91  |
| ホスファチジルコリン第2＃            | 0.98     | 1.16* | 1.19  | 1.13    | 1.15* | 1.23  |
| アスパラギン酸                  | NA       | 1.13  | 1.46  | 1.24*   | 1.06  | 1.3*  |
| DAG(C18:1、C18:2)＃        | 1.49     | 1.3   | 1.38* | 1.5*    | 1.07  | 1.27* |
| TAG第7＃                   | 1.43*    | 2.07* | 1.89* | 1.77*   | 1.33  | 0.97  |
| セラミド(d18:1、C24:1)        | 1.58*    | 0.77  | 1.39  | 1.07    | 1.07* | 1.25* |
| TAG第5＃                   | 1.29*    | 1.95* | 2.03* | 1.32*   | 1.53  | 1.38* |
| リノール酸(C18:cis[9,12]2)    | 1.12     | 1.22* | 1.27* | 1.02    | 1.18* | 1.1   |
| TAG(C16:0、C18:2)＃        | 1.59*    | 1.83* | 1.77* | 1.58*   | 1.31  | 1.41* |
| TAG(C18:2、C18:3)＃        | 1.84*    | 1.49  | 1.27* | 1.49*   | 1.48  | 1.3   |
| グリセロール、脂質画分              | 1.11     | 1.26  | 1.02* | 1.23*   | 0.93  | 1.2*  |
| TAG(DAG-フラグメント)＃         | 1.4      | 1.49  | 1.63* | 1.71*   | 1.19  | 1.38* |
| TAG第59＃                  | 1.57*    | 1.59* | 1.4*  | 1.69*   | 1.17  | 1.25* |

10

20

【表 10】

表3b:雌ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物      | サフルフェナシル |       |       | 酢酸鉛三水和物 |       |       |
|----------|----------|-------|-------|---------|-------|-------|
|          | f7       | f14   | f28   | f7      | f14   | f28   |
| バリン      | NA       | 0.8*  | 0.71* | 0.89*   | 0.91  | 0.76* |
| フェニルアラニン | 1.01     | 0.83* | 0.78* | 0.84*   | 0.94* | 0.91* |
| ヒスチジン    | NA       | 0.83* | 0.79* | 0.92    | 0.99  | 0.77* |
| TAG第2＃   | 0.78*    | 0.78* | 0.8*  | 0.95*   | 0.92* | 0.88  |
| ケトロイシン   | 0.98     | 0.76* | 0.73* | 1.04    | 0.84* | 0.63* |
| リシン      | NA       | 0.73* | 0.8*  | 1.15    | 1.05  | 0.82* |

30

40



【表 1 1】

表3c:雌ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                          |     | サフルフェナシル | 酢酸鉛三水和物 |
|--------------------------|-----|----------|---------|
| 代謝物                      | 方向  | f28      | f28     |
| スフィンゴミエリン(d18:2、C18:0)＃  | アップ | 1.11*    | 1.09*   |
| DAG(C18:1、C18:2)＃        | アップ | 1.38*    | 1.27*   |
| ホスファチジルコリン(C16:0、C16:0)＃ | アップ | 1.2*     | 1.22*   |
| TAG第5＃                   | アップ | 2.03*    | 1.38*   |
| TAG(C16:0、C18:2)＃        | アップ | 1.77*    | 1.41*   |
| TAG(C16:0、C18:1、C18:3)＃  | アップ | 2*       | 1.46*   |
| グリセロール、脂質画分              | アップ | 1.02*    | 1.2*    |
| コレステロールエステル第1＃           | アップ | 1.12*    | 1.28*   |
| ホスファチジルコリン(C16:0、C18:2)＃ | アップ | 1.01*    | 1.06*   |
| TAG(C18:2、C18:2)＃        | アップ | 1.67*    | 1.48*   |
| TAG第1＃                   | アップ | 1.29*    | 1.5*    |
| TAG(C18:1、C18:2)＃        | アップ | 1.3*     | 1.33*   |
| TAG(DAG-フラグメント)＃         | アップ | 1.63*    | 1.38*   |
| TAG第59＃                  | アップ | 1.4*     | 1.25*   |

【表 1 2】

表3d:雌ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                          |     | サフルフェナシル | 酢酸鉛三水和物 |
|--------------------------|-----|----------|---------|
| 代謝物                      | 方向  | f28      | f28     |
| リシン                      | ダウン | 0.8*     | 0.82*   |
| リンゴ酸                     | ダウン | 0.77*    | 0.73*   |
| イソロイシン                   | ダウン | 0.74*    | 0.72*   |
| バリン                      | ダウン | 0.71*    | 0.76*   |
| ケトロイシン                   | ダウン | 0.73*    | 0.63*   |
| ロイシン                     | ダウン | 0.76*    | 0.72*   |
| フェニルアラニン                 | ダウン | 0.78*    | 0.91*   |
| プロリン                     | ダウン | 0.85*    | 0.91*   |
| メチオニン                    | ダウン | 0.84*    | 0.89*   |
| アラニン                     | ダウン | 0.8*     | 0.81*   |
| 18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン | ダウン | 0.57*    | 0.4*    |

【表 1 3】

表3e:雄ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物           | サフルフェナシル |       |       | 酢酸鉛三水和物 |       |      |
|---------------|----------|-------|-------|---------|-------|------|
|               | m7       | m14   | m28   | m7      | m14   | m28  |
| コリンプラスマロゲン第3# | 1.21*    | 1.21* | 1.23* | 1.11*   | 1.05  | 0.94 |
| コリンプラスマロゲン第2# | 1.1*     | 1.42* | 1.15* | 1.05    | 1.16* | 0.93 |

10

【表 1 4】

表3f:雄ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                      | サフルフェナシル |       |       | 酢酸鉛三水和物 |       |       |
|--------------------------|----------|-------|-------|---------|-------|-------|
|                          | m7       | m14   | m28   | m7      | m14   | m28   |
| イソロイシン                   | 0.87*    | 0.89* | 0.89* | 0.86*   | 0.94* | 0.87* |
| メチオニン                    | 0.86*    | 0.86* | 0.86* | 0.95*   | 0.96* | 0.89* |
| ロイシン                     | 0.84*    | 0.82* | 0.8*  | 0.87*   | 0.91* | 0.82* |
| セリン                      | 0.86*    | 0.92* | 0.98* | 0.85*   | 0.85* | 0.9*  |
| トレオン酸                    | 0.5*     | 0.62* | 0.61* | 0.67*   | 0.68* | 0.77  |
| バリン                      | 0.82*    | 0.85* | 0.87* | 0.88*   | 0.93* | 0.87* |
| アラニン                     | 0.68*    | 0.83* | 0.83* | 0.68*   | 0.8*  | 0.77* |
| 尿酸                       | 0.65*    | 0.67* | 0.83* | 0.64*   | 0.86  | 0.76* |
| フェニルアラニン                 | 0.91*    | 0.91* | 0.8*  | 0.83*   | 0.89* | 0.87* |
| 5-オキソプロリン                | 0.84*    | 0.84* | 0.74* | 0.88*   | 0.93* | 0.93  |
| グルタミン                    | 0.81*    | 0.84* | 0.79* | 0.83*   | 0.85* | 0.92* |
| ケトロイシン                   | 0.74*    | 0.76* | 0.86* | 0.66*   | 0.89* | 0.73* |
| リンゴ酸                     | 0.36*    | 0.46* | 0.42* | 0.69*   | 1.08  | 0.75* |
| 18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン | 0.47*    | 0.49* | 0.3*  | 0.73    | 0.46* | 0.67  |
| trans-4-ヒドロキシプロリン        | 0.93*    | 0.98  | 0.92* | 0.81    | 0.82* | 0.97  |
| myo-イノシトール               | 0.77*    | 1.06  | 0.77* | 0.72*   | 0.93  | 1.16  |

20

30

40

【表 15】

表3g:雄ラットにおける血液毒性(血液のポルフィリン阻害)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|           | サフルフェナシル | 酢酸鉛三水和物 |
|-----------|----------|---------|
| 代謝物       | m28      | m28     |
| イソロイシン    | 0.89*    | 0.87*   |
| メチオニン     | 0.86*    | 0.89*   |
| フェニルアラニン  | 0.8*     | 0.87*   |
| ロイシン      | 0.8*     | 0.82*   |
| バリン       | 0.87*    | 0.87*   |
| セリン       | 0.98*    | 0.9*    |
| グルコース     | 0.82*    | 0.91    |
| 尿酸        | 0.83*    | 0.76*   |
| ケトロイシン    | 0.86*    | 0.73*   |
| アラニン      | 0.83*    | 0.77*   |
| グルタミン     | 0.79*    | 0.92*   |
| リンゴ酸      | 0.42*    | 0.75*   |
| 5-オキソプロリン | 0.74*    | 0.93    |
| プロリン      | 0.87*    | 0.82*   |

10

20

【表 16】

表4a:雌ラットにおける血液毒性(脾臓のメトヘモグロビン)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値≤0.1)に印(\*)をつける。(#で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                                  | 4-クロロ-<br>3-ニトロアニリン |       |       | リトコール酸 |       |       | 1,3-<br>ジニトロベンゼン |       |       | 1,4-<br>ジニトロベンゼン |       |       |
|--------------------------------------|---------------------|-------|-------|--------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
|                                      | f7                  | f14   | f28   | f7     | f14   | f28   | f7               | f14   | f28   | f7               | f14   | f28   |
| セリン                                  | 1.18                | 1.43* | 1.42* | 1.2*   | 1.29* | 1.97* | 1.22*            | 1.14* | 1.23* | 1.35*            | 1.27* | 1.27* |
| リバール                                 | 1.88*               | 1.58* | 1.52* | 1.17*  | 1.05  | 1.19* | 1.69*            | 1.34* | 2.42* | 1.55*            | 2.3*  | 2.3*  |
| シトシン                                 | 1.69*               | 1.38* | 1.49* | 1.23*  | 1.1   | 1.26* | 1.75*            | 1.44* | 2.57* | 1.66*            | 2.1*  | 2.1*  |
| トレオニン                                | 1.55*               | 1.95* | 2.05* | 1.26*  | 1.25* | 2.4*  | 1.59*            | 1.22* | 1.47* | 1.24*            | 1.67* | 1.67* |
| ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6) | 1.31*               | 1.71* | 1.43* | 1.09*  | 1.05  | 1.39  | 1.26             | 1.58* | 1.28* | 1.29*            | 1.22* | 1.22* |
| 3-メトキシチロシン                           | NA                  | NA    | NA    | 1.32*  | 1.22* | 1.36* | 1.61*            | 1.2*  | 1.46* | 1.36*            | 1.47* | 1.47* |
| フィトスフィンゴシン                           | 1.45*               | 1.66* | 1.81* | 1.34*  | 1.1   | 1.44* | 1.31*            | 1.49* | 1.27* | 1.08*            | 1.34* | 1.34* |
| リノール酸(C18:cis[9,12]2)                | 1.26                | 1.58* | 1.59* | 1.61*  | 1.29* | 2*    | 1.34             | 1.37* | 1.44* | 1.67*            | 1.72* | 1.72* |
| トレオン酸                                | 1.25*               | 1.45* | 1.25* | 1.35   | 1.24* | 1.45* | 0.92             | 1.22* | 1.3*  | 1.67*            | 1.28* | 1.28* |

10

20

30

40

【 表 17 】

表4b:雌ラットにおける血液毒性(脾臓のメトヘモグロビン)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値≤0.1)に印(\*)をつける。(＃で印をつけたいくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|        | 4-クロロ-<br>3-ニトロアニリン |       |       | リトコール酸 |       |       | 1,3-<br>ジニトロベンゼン |       |     | 1,4-<br>ジニトロベンゼン |       |       |
|--------|---------------------|-------|-------|--------|-------|-------|------------------|-------|-----|------------------|-------|-------|
|        | f7                  | f14   | f28   | f7     | f14   | f28   | f7               | f14   | f28 | f7               | f14   | f28   |
| 代謝物    |                     |       |       |        |       |       |                  |       |     |                  |       |       |
| ケトロイシン | 0.55*               | 0.44* | 0.65* | 1.03   | 0.94  | 0.88* | 0.83             | 0.78* |     | 0.81*            | 0.72* | 0.71* |
| 乳酸     | 1.04                | 0.51* | 0.61* | 0.96   | 0.62* | 0.86* | 0.69*            | 0.65* |     | 1.09             | 0.79* | 0.66* |

10

20

30

40

【 1 8 】

表4c:雄ラットにおける血液毒性(脾臓のメトヘモグロビン)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.1)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物           | 4-クロロ-<br>3-ニトロアニリン |       |       | フルタミド |       |       | 1,3-<br>ジニトロベンゼン |       |       | 1,4-<br>ジニトロベンゼン |       |       |
|---------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
|               | m7                  | m14   | m28   | m7    | m14   | m28   | m7               | m14   | m28   | m7               | m14   | m28   |
| トレオニン         | 1.46*               | 1.58* | 1.68* | 1.33* | 1.24* | 1.22* | 1.32*            | 1.39  | 1.32* | 1.58*            | 1.37* | 1.32* |
| セリン           | 1.57*               | 1.77* | 1.48* | 1.47* | 1.52* | 1.2*  | 1.22*            | 1.38* | 1.39* | 1.39*            | 1.39* | 1.39* |
| グリシン          | 1.4*                | 1.42* | 1.34* | 1.22  | 1.25* | 1.17* | 1.19*            | 1.13* | 1.13* | 1.34*            | 1.24* | 1.2*  |
| セロトニン(5-HT)   | 9.5*                | 3.45* | 4.88* | 2.29* | 1.88* | 1.56* | 1.8              | 2.92* | 3.51* | 4.53*            | 2.57* |       |
| 3-メトキシチロシン    | 1.9*                | 2.05* | 2.23* | 1.97* | 1.47* | 1.55* | 1.43*            | 1.8*  | 1.75* | 1.67*            | 1.52* |       |
| プロリン          | 1.28*               | 1.43* | 1.41* | 1.18* | 1.37* | 1.13  | 1.05             | 1.1*  | 1.28* | 1.29*            | 1.27* |       |
| エイコサン酸(C20:0) | 1.32*               | 1.55* | 1.75* | 2.11* | 1.84* | 1.93  | 1.23*            | 1.44* | 1.71* | 1.98*            | 2.14* |       |
| リバール          | 1.89*               | 1.93* | 1.74* | 0.62* | 0.76  | 0.86  | 1.43*            | 1.29* | 1.61* | 1.43*            | 1.98* |       |

10

20

30

40

【 表 1 9 】

表4d:雄ラットにおける血液毒性(脾臓のメトヘモグロビン)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値≦0.1)に印(\*)をつける。(#で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                         | 4-クロロ-<br>3-ニトロアニリン |       |       | フルタミド |       |       | 1,3-<br>ジニトロベンゼン |       |       | 1,4-<br>ジニトロベンゼン |       |       |
|-------------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
|                         | m7                  | m14   | m28   | m7    | m14   | m28   | m7               | m14   | m28   | m7               | m14   | m28   |
| 代謝物                     |                     |       |       |       |       |       |                  |       |       |                  |       |       |
| 尿素                      | 0.89                | 0.7*  | 0.89  | 0.82* | 0.82  | 0.73  | 0.79*            | 0.63* | 0.82* | 0.81*            | 0.81* | 0.82* |
| パルミトレイン酸(C16:cis[9]1)   | 0.63*               | 0.51* | 0.49* | 0.77* | 0.68* | 0.6*  | 0.42*            | 0.22* | 0.38* | 0.92             | 0.55* | 0.38* |
| 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC) | 0.23*               | 0.16* | 0.19* | 0.6*  | 0.67* | 0.47* | 0.71*            | 0.67* | 0.54* | 0.84*            | 0.94  | 0.54* |
| エライジン酸(C18:trans[9]1)   | 0.77*               | 0.77* | 0.79* | 0.97  | 0.8*  | 0.6*  | 0.6*             | 0.7*  | 0.58* | 0.83*            | 0.68  | 0.58* |

10

20

30

40

【 2 0 】

表5a: 雌ラットにおける血液毒性(脾臓のヘモジデリン沈着)に関するマーカー; 有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                                   | シクロヘキサノンオキシム<br>(CHO) |       |       |  | 1,4-ジニトロベンゼン |       |       |  | 4-クロロ-3-ニトロアニリン |       |       |  |
|---------------------------------------|-----------------------|-------|-------|--|--------------|-------|-------|--|-----------------|-------|-------|--|
|                                       | f7                    | f14   | f28   |  | f7           | f14   | f28   |  | f7              | f14   | f28   |  |
| リノール酸(C18: cis[9,12]2)                | 1.46*                 | 1.21* | 1.13* |  | 1.44*        | 1.67* | 1.72* |  | 1.26            | 1.58* | 1.59* |  |
| ドコサヘキサエン酸(C22: cis[4,7,10,13,16,19]6) | 1.72*                 | 1.55* | 1.6*  |  | 1.28*        | 1.29* | 1.22* |  | 1.31*           | 1.71* | 1.43* |  |
| ヘプタデカン酸(C17:0)                        | 1.14*                 | 1.34* | 1.32* |  | 1.15         | 1.19* | 1.24* |  | 1.07            | 1.42* | 1.38* |  |
| フィトスフィンゴシン                            | 1.33*                 | 1.27* | 1.31* |  | 1.27*        | 1.08* | 1.34* |  | 1.45*           | 1.66* | 1.81* |  |
| シトシン                                  | 1.31*                 | 1.13* | 1.45* |  | 2.57*        | 1.66* | 2.1*  |  | 1.69*           | 1.38* | 1.49* |  |
| リバール                                  | 1.15*                 | 1.16  | 1.38* |  | 2.42*        | 1.55* | 2.3*  |  | 1.88*           | 1.58* | 1.52* |  |
| 3-メトキシチロシン                            | NA                    | NA    | NA    |  | 1.46*        | 1.36* | 1.47* |  | NA              | NA    | NA    |  |
| パルミチン酸(C16:0)                         | 1.45*                 | 1.28* | 1.22* |  | 1.19*        | 1.24* | 1.42* |  | 1.12            | 1.34* | 1.34* |  |
| トレオニン                                 | 1.22*                 | 1.53* | 1.47* |  | 1.47*        | 1.24* | 1.67* |  | 1.55*           | 1.95* | 2.05* |  |
| 3-ヒドロキシインドール                          | 1.59*                 | 1.55* | 0.75  |  | 1.55*        | 1.79* | 1.63* |  | 1.76*           | 1.97* | 2.79* |  |
| セロトニン(5-HT)                           | NA                    | NA    | NA    |  | 1.46         | 2.66* | 3.09* |  | NA              | NA    | NA    |  |
| グリセロール、脂質画分#                          | 1.12*                 | 1.11* | 1.49* |  | 1.41*        | 1.86* | 2.17* |  | 1.07            | 1.45* | 1.56* |  |
| リン酸(無機及び有機リン酸塩)                       | 1.24*                 | 1.31* | 1.09  |  | 1.11         | 1.2*  | 1.22* |  | 0.92*           | 1.11* | 1.21* |  |
| アンドロステンジオン                            | NA                    | NA    | NA    |  | 0.9          | 1.97* | 2.34* |  | NA              | NA    | NA    |  |
| グルクロン酸                                | 0.96                  | 1.2*  | 1.22* |  | 1.97*        | 1.86* | 1.66* |  | 2.62*           | 2.29* | 1.52* |  |
| グルタミン酸                                | 1.12                  | 1.15* | 1.27* |  | 1.36*        | 1.52* | 1.22* |  | 1.13*           | 1.3*  | 1.46* |  |

10

20

30

40



【 2 1 】

表5b:雌ラットにおける血液毒性(脾臓のヘモジドリン沈着)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値≤0.2)に印(\*)をつける。(#で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                        | シクロヘキサノンオキシム<br>(CHO) |       |       |  | 1,4-ジニトロベンゼン |       |       |  | 4-クロロ-3-ニトロアニリン |       |       |  |
|----------------------------|-----------------------|-------|-------|--|--------------|-------|-------|--|-----------------|-------|-------|--|
|                            | f7                    | f14   | f28   |  | f7           | f14   | f28   |  | f7              | f14   | f28   |  |
| ホモバニリン酸(HVA)               | NA                    | NA    | NA    |  | 1.23         | 0.79* | 0.52* |  | NA              | NA    | NA    |  |
| ピルビン酸                      | 0.78*                 | 0.59* | 0.66* |  | 0.83*        | 0.59* | 0.55* |  | 0.98            | 0.53* | 0.51* |  |
| ケトロイシン                     | 1.02                  | 0.92* | 0.74* |  | 0.81*        | 0.72* | 0.71* |  | 0.55*           | 0.44* | 0.65* |  |
| 3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール(DOPEG) | NA                    | NA    | NA    |  | 0.94*        | 0.72* | 0.7*  |  | NA              | NA    | NA    |  |
| プロゲステロン                    | NA                    | NA    | NA    |  | 0.84*        | 0.41* | 0.74* |  | NA              | NA    | NA    |  |

10

20

30

40

【表 2 2】

表5c:雄ラットにおける血液毒性(脾臓のヘモジドリン沈着)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値≤0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                                  | シクロヘキサノンオキシム<br>(CHO) |       |       | リニュロン |       |       | 1,4-ジニトロベンゼン |       |       | 4-クロロ-3-ニトロアニリン |       |       |
|--------------------------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|                                      | m7                    | m14   | m28   | m7    | m14   | m28   | m7           | m14   | m28   | m7              | m14   | m28   |
| リノール                                 | 1.47*                 | 1.56* | 1.77* | 1.46* | 1.36* | 1.26* | 1.61*        | 1.43* | 1.98* | 1.51*           | 1.57* | 1.52* |
| ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6) | 1.41*                 | 1.36* | 1.35* | 1.05  | 1.25  | 1.22* | 1.58*        | 1.55* | 1.55* | 1.33            | 1.36* | 1.22  |
| シトシン                                 | 1.39*                 | 1.49* | 1.68* | 1.13* | 1.31* | 1.05  | 1.66*        | 1.37* | 1.97* | 1.31*           | 1.64* | 1.71* |
| トレオン酸                                | 1.21*                 | 1.34* | 1.34* | 1.9*  | 1.77* | 1.24* | 1.04         | 1.31* | 1.19* | 0.85            | 1.15  | 1.24* |
| パントテン酸                               | 1.25                  | 1.37* | 1.68* | 1.54* | 1.96* | 2.24* | 1.06         | 1.24* | 1.12* | 1.27*           | 1.51* | 0.98  |
| キシリトール                               | 1.59*                 | 1.55* | 2.08* | 2.86* | 2.93* | 2.06* | 1.51*        | 1.26  | 1.99* | 1.7*            | 1.45* | 1.44  |
| リノール酸(C18:cis[9,12]2)                | 1.31*                 | 1.18* | 1.18  | 1.44* | 1.49* | 1.5*  | 1.68*        | 1.88* | 1.56* | 1.1*            | 1.24* | 1.39* |
| グルクロン酸                               | 1.35*                 | 1.36* | 1.74* | 4.64* | 2.54* | 2.25* | 1.27*        | 1.09  | 1.18* | 2*              | 1.68* | 1.08  |
| フィトスフィンゴシン                           | 1.18*                 | 1.15  | 0.94  | 1.89* | 2.14* | 2.47* | 1.28*        | 1.07  | 1.12* | 1.93*           | 1.6*  | 1.3   |
| トレオニン                                | 1.25*                 | 1.23* | 1.28* | 1.48* | 1.62* | 1.53* | 1.5*         | 1.32* | 1.36* | 1.37*           | 1.4*  | 1.47* |
| アラントイン                               | 1.1*                  | 1.25* | 1.35* | 0.98  | 1.36* | 1.1*  | 1.2*         | 1.19* | 1.42* | 1.43*           | 1.2*  | 1.21* |

10

20

30

40

【表 2 3】

表5d:雄ラットにおける血液毒性(脾臓のヘモジドリン沈着)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値≤0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                   | シクロヘキサノンオキシム<br>(CHO) |       |       | リニユロン |       |       | 1,4-ジニトロベンゼン |       |       | 4-クロロ-3-ニトロアニリン |       |       |
|-----------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|                       | m7                    | m14   | m28   | m7    | m14   | m28   | m7           | m14   | m28   | m7              | m14   | m28   |
| パルミトレイン酸(C16:cis[9]1) | 1.22                  | 0.78  | 0.8*  | 0.75* | 0.5*  | 0.77* | 0.92         | 0.55* | 0.38* | 0.64*           | 0.59* | 0.44* |
| 16-メチルヘプタデカン酸         | 1.14                  | 0.82* | 0.72* | 0.75* | 0.69* | 0.69* | 0.91         | 1.01  | 0.61* | 0.88*           | 0.84* | 1.05  |

10

20

30

40

【表 2 4】

表6a:雌ラットにおける血液毒性(全身性抗増殖)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化( $p$ 値 $\leq 0.1$ )に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。オキサリプラチンは高用量で投与した。

| 代謝物    | オキサリプラチン |       |       | アドリアマイシン塩酸塩 |       |       |
|--------|----------|-------|-------|-------------|-------|-------|
|        | f7       | f14   | f28   | f7          | f14   | f28   |
| 補酵素Q9  | 1.18*    | 1.48* | 1.63* | 1.98*       | 1.71* | 2.3*  |
| 補酵素Q10 | 1.31*    | 1.67* | 1.56* | 1.22        | 1.19* | 1.82* |
| シトシン   | 1.27*    | 1.5*  | 1.34* | 1.77*       | 1.71* | 2.05* |
| マンノース  | 1.13     | 1.24* | 1.23* | 1.35*       | 1.31* | 1.36* |
| リバール   | 1.48*    | 1.41  | 1.47* | 1.51*       | 1.6*  | 2.11* |
| ロイシン   | 1.23*    | 1.13* | 1.43* | 1           | 1.24* | 1.36* |
| イソロイシン | 1.27*    | 1.11* | 1.36* | 0.97        | 1.21* | 1.28* |
| バリン    | 1.21*    | 1.08* | 1.31* | 0.95        | 1.14* | 1.27* |

10

【表 2 5】

表6b:雌ラットにおける血液毒性(全身性抗増殖)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化( $p$ 値 $\leq 0.1$ )に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。オキサリプラチンは高用量で投与した。

| 代謝物    | オキサリプラチン |       |       | アドリアマイシン塩酸塩 |       |      |
|--------|----------|-------|-------|-------------|-------|------|
|        | f7       | f14   | f28   | f7          | f14   | f28  |
| クレアチニン | 0.69*    | 0.77* | 0.81* | 0.77*       | 0.95* | 0.92 |
| リンゴ酸   | 0.85*    | 0.67* | 1.3   | 0.55*       | 0.67* | 0.93 |

20

【表 2 6】

表7a:雄ラットにおける血液毒性(血液の再生不良性貧血)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.1)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                           | プロベネシド |       |       | メチマゾール |       |       |
|-------------------------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|                               | m7     | m14   | m28   | m7     | m14   | m28   |
| γリノレン酸(C18:cis[6,9,12]3)      | 2.14*  | 2.74* | 2.26* | 1.85*  | 2.63* | 2.23* |
| スフィンゴミエリン(d18:1、C24:0)＃       | 1.39*  | 1.49* | 1.23* | 1.35*  | 1.64* | 1.41* |
| ヒスチジン                         | 1.31*  | 1.4*  | 1.34* | 1.25*  | 1.2*  | 1.21* |
| コリンプラスマロゲン第1＃                 | 1.36*  | 1.19* | 1.38* | 1.24*  | 1.34* | 1.21* |
| オルニチン                         | 1.37*  | 1.09  | 1.3*  | 1.17*  | 1.34* | 1.59* |
| 補酵素Q9                         | 1.66*  | 1.63* | 1.02  | 1.23   | 1.54* | 2.14* |
| ホスファチジルコリン(C18:0、C18:1)＃      | 1.2*   | 1.31* | 1.28* | 1.36*  | 1.55* | 1.6*  |
| ホスファチジルコリン(C18:0、C18:2)＃      | 1.08*  | 1.12* | 1.13* | 1.11*  | 1.28* | 1.35* |
| ホスファチジルコリン(C16:0、C20:5)＃      | 1.28*  | 1.36* | 1.15* | 1.05*  | 1.35* | 1.35* |
| ロイシン                          | 1.18*  | 1.1   | 1.18* | 1.24*  | 1.34* | 1.78* |
| フィトスフィンゴシン                    | 1.44*  | 2.24* | 1.96* | 2*     | 3.12* | 3.11* |
| ジホモ-γリノレン酸(C20:cis[8,11,14]3) | 1.48*  | 1.43* | 1.41* | 2.38*  | 3.18* | 2.09* |
| エイコサン酸(C20:0)                 | 1.39   | 1.29* | 1.18  | 1.32*  | 1.71* | 1.74* |
| バリン                           | 1.13*  | 1.2*  | 1.09* | 1.28*  | 1.5*  | 1.77* |
| α-トコフェロール                     | 1.16   | 1.31* | 1.11* | 2.26*  | 3.65* | 2.04* |

【表 2 7】

表7b:雄ラットにおける血液毒性(血液の再生不良性貧血)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.1)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物           | プロベネシド |       |       | メチマゾール |       |       |
|---------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|               | m7     | m14   | m28   | m7     | m14   | m28   |
| シトシン          | 0.7*   | 0.69* | 0.68* | 0.64*  | 0.44* | 0.32* |
| ホスファチジルコリン第4＃ | 0.53*  | 0.79* | 0.68* | 0.84*  | 0.75* | 0.64* |
| リバール          | 0.78*  | 0.87* | 0.68* | 0.65*  | 0.46* | 0.42* |
| 16-メチルヘプタデカン酸 | 0.63*  | 0.64* | 0.55* | 1.21*  | 0.73* | 0.47* |

10

20

30

【表 2 8】

表8a:雄ラットにおける血液毒性(免疫抑制)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq 0.2$ )に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                    | シクロスポリンA | タクロリムス | メチルプレドニゾロン |
|--------------------|----------|--------|------------|
| 代謝物                | m28      | m28    | m28        |
| コレステロールエステル第1#     | 1.15*    | 1.05*  | 1.08*      |
| グルタミン酸             | 1.16*    | 1.29*  | 1.11*      |
| アスパラギン酸            | 1.31*    | 1.42*  | 1.37*      |
| グリセロール-3-リン酸、極性画分# | 1.2*     | 1.54*  | 1.4*       |

10

【表 2 9】

表8b:雄ラットにおける血液毒性(免疫抑制)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq 0.2$ )に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

|                          | シクロスポリンA | タクロリムス | メチルプレドニゾロン |
|--------------------------|----------|--------|------------|
| 代謝物                      | m28      | m28    | m28        |
| ケトロイシン                   | 0.65*    | 0.85*  | 0.75*      |
| 18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン | 0.23*    | 0.48*  | 0.15*      |
| ピルビン酸                    | 0.89*    | 0.77*  | 0.65*      |

20

【 3 0 】

表9:雄ラットにおける血液毒性(脾臓の造血)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)に印(\*)をつける。(＃で印をつけた)いくつかの代謝物に関して、追加の情報を表11に提供する。

| 代謝物                     | エポキシコナゾール |       |       | トリエタノールアミン |       |       | 2-ブトキシエタノール |       |       |
|-------------------------|-----------|-------|-------|------------|-------|-------|-------------|-------|-------|
|                         | m7        | m14   | m28   | m7         | m14   | m28   | m7          | m14   | m28   |
| 尿酸                      | 0.85*     | 0.69* | 0.62* | 0.76*      | 0.52* | 0.67* | 0.75*       | 0.71* | 0.66* |
| シトシン                    | 0.82*     | 0.78* | 0.84* | 0.91       | 0.86* | 0.92* | 0.86*       | 0.93  | 0.86* |
| ウラシル                    | 0.91      | 0.84* | 0.93  | 0.79*      | 0.81* | 1.07  | 0.77*       | 0.9   | 0.71* |
| アスコルビン酸                 | 0.9*      | 0.9*  | 0.89* | 1.04       | 0.85* | 0.83* | 0.91        | 0.8*  | 0.94* |
| リパール                    | 0.77*     | 0.8*  | 0.78* | 0.82*      | 0.7*  | 0.86* | 0.82*       | 1.06  | 0.91* |
| グルコース                   | 0.72*     | 0.79* | 0.71* | 1.13*      | 0.82* | 0.82* | 0.81*       | 0.73* | 0.93* |
| 18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチステロン | 0.31*     | 0.4*  | 0.93  | 0.36*      | 0.17* | 0.29  | 0.18*       | 0.44* | 0.68* |
| リンゴ酸                    | 1.04      | 0.66* | 0.62* | 0.83       | 0.61* | 0.75* | 0.81*       | 0.79* | 0.7*  |
| アラニン                    | 0.87*     | 0.74* | 0.85* | 0.78*      | 0.7*  | 0.92* | 0.83*       | 0.93  | 0.91* |
| myo-イノシトール              | 0.85*     | 1.02  | 1.21* | 0.7*       | 0.7*  | 0.82* | 0.88        | 0.82* | 0.93* |
| フェニルアラニン                | 0.94*     | 0.92* | 0.98  | 0.85*      | 0.91* | 0.9   | 0.87*       | 0.94* | 0.95* |
| リゾホスファチジルコリン(C20:4)＃    | 0.76*     | 0.67* | 0.7*  | 0.85*      | 0.89* | 0.78* | 0.89*       | 0.85* | 0.94  |

10

20

30

40

【表 3 1】

表10:化合物及び投与(CMC=カルボキシメチルセルロース)

| 化合物                   | 異名   | CAS番号       | 投与用量                  | 詳細   |
|-----------------------|--|-------------|-----------------------|--|
| 1,3-ジニトロベンゼン          | m-ジニトロベンゼン   | 99-65-0     | 強制栄養により<br>10mg/kg体重  | トウモロコシ油中;<br>投与容量:5ml/kg体重                           |
| 1,4-ジニトロベンゼン          | p-ジニトロベンゼン   | 100-25-4    | 強制栄養により<br>20mg/kg体重  | トウモロコシ油中、<br>投与容量:5ml/kg体重                           |
| 2-ブトキシエタノール           | na   | 111-76-2    | 食物中に6,000ppm          | 食物中の混合物  |
| 2-クロロアニリン             | 1-アミノ-2-クロロベンゼン  | 95-51-2     | 強制栄養により<br>160mg/kg体重 | トウモロコシ油中;<br>投与容量:5ml/kg体重                           |
| 4-クロロ-3-ニトロアニリン       | 4-クロロ-3-ニトロベンゼンアミン   | 635-22-3    | 強制栄養により<br>90mg/kg体重  | トウモロコシ油中;<br>投与容量:5ml/kg体重                           |
| アドリアマイシン塩酸塩           | ドキソルビシン  | 25316-40-9  | 2mg/kg体重 皮下、<br>週1回   | 0.9% NaCl中;<br>投与容量:1ml/kg体重;<br>0、6、13、20及び27日目に週1回 |
| アニリン                  | アミノベンゼン  | 62-53-3     | 強制栄養により<br>100mg/kg体重 | 再蒸留水 (aqua bideest) 溶液;<br>投与容量:10ml/kg体重            |
| サフルフェナシル              | N <sup>1</sup> -[2-クロロ-4-フルオロ-5-(3-メチル-2,6-ジオキソ-4-(トリフルオロメチルメチル)-3,6-ジヒドロ-1(2H)-ピリミジニル)ベンゾイル]-N-イソプロピル-N-メチルスルファミド | 372137-35-4 | 食物中に1,000ppm          | 食物中の混合物  |
| シクロヘキサノンオキシム<br>(CHO) | (ヒドロキシイミノ)シクロ-ヘキサ  | 100-64-1    | 強制栄養により<br>200mg/kg体重 | 再蒸留水中、<br>投与容量:15ml/kg体重                             |



|            |                                 |             |                         |   |
|------------|---------------------------------|-------------|-------------------------|---|
| エポキシコナゾール  | na                              | 106325-08-0 | 食物中に2,000ppm            | 食物中の混合物   |
| フルタミド      | na                              | 13311-84-7  | 強制栄養により<br>100mg/kg体重   | トウモロコシ油中;<br>投与容量:5ml/kg体重                            |
| 酢酸鉛三水合物    | na                              | 6080-56-4   | 食物中に500ppm              | 食物中の混合物   |
| リニユロン      | 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1-メトキシ-1-メチル尿素 | 330-55-2    | 強制栄養により<br>100mg/kg体重   | トウモロコシ油中、<br>投与容量:10ml/kg体重                           |
| リトコール酸     | na                              | 434-13-9    | 強制栄養により<br>1000mg/kg体重  | トウモロコシ油中;<br>投与容量:5ml/kg体重                            |
| メチマゾール     | an                              | 60-56-0     | 強制栄養により<br>100mg/kg体重   | 飲料水中、<br>投与容量:10ml/kg体重                               |
| オキサリプラチン   | na                              | 61825-94-3  | 2mg/kg体重 i.p.、<br>週2回   | 0.9% NaCl中;<br>投与容量:3ml/kg体重                          |
| プロベネシド     | na                              | 57-66-9     | 強制栄養により<br>800mg/kg体重   | トウモロコシ油中、<br>投与容量:5ml/kg体重                            |
| トリエタノールアミン | トリ-(2-ヒドロキシエチル)アミン              | 102-71-6    | 強制栄養により<br>2,000mg/kg体重 | 再蒸留水中、<br>投与容量:10ml/kg体重                              |
| カルボプラチン    | cis-ジアミン(1,1-シクロプロパンジカルボキシラト)白金 | 41575-94-4  | 2mg/kg体重 i.p.、<br>週2回   | 0.9% NaCl中;<br>投与容量:3ml/kg体重                          |
| シスプラチン     | na                              | 15663-27-1  | 0.1mg/kg体重 i.p.         | 0.9% NaCl中;<br>投与容量:3ml/kg体重;週2回                      |
| イブプロフェン    | na                              | 15687-27-1  | 強制栄養により<br>30mg/kg体重    | 0.5% CMC(チロースCB30000)を<br>含有する飲料水中、<br>投与容量:10ml/kg体重 |
| オキサリプラチン*) | na                              | 61825-94-3  | 0.7mg/kg体重 i.p.、<br>週2回 | 0.9% NaCl中;<br>投与容量:3ml/kg体重                          |

|                   |                      |            |   |  |
|-------------------|----------------------|------------|---|--|
| シクロホスファミド<br>一水和物 | 1-ブロモナフタレン           | 6055-19-2  | 強制栄養により<br>8mg/kg体重(0から9日目)、<br>強制栄養により<br>4mg/kg体重(10日目から) | 飲料水中、<br>投与容量:10ml/kg体重                              |
| アドリアマイシン塩酸塩       | ドキシルビシン              | 25316-40-9 | 2mg/kg体重 皮下、<br>週1回   | 0.9% NaCl中;<br>投与容量:1ml/kg体重;<br>0、6、13、20及び27日目に週1回 |
| シタラビン             | $\beta$ -D-アラビノフラノシド | 147-94-4   | 100mg/kg体重 i.p.   | 0.9% NaCl中;<br>投与容量3ml/kg体重                          |

\*)骨髄抑制のみの低用量

10

20

30

40

【表 3 2】

表11:選択されたアナライトの化学的/物理的性質。これらのバイオマーカーを、化学的及び物理的性質によって本明細書で特徴づける。

| 代謝物                       | フラグメンテーションパターン(GC-MS)及び解説  |    |
|---------------------------|--|----|
| 3-O-メチルスフィンゴシン<br>(d18:1) | 3-O-メチルスフィンゴシン(d18:1)は、酸性メタノリシス、及びピリジン中の2% O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた誘導体化、それに続くN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた誘導体化の後に、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用してGC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオンフラグメントを示す:MS(EI, 70eV):m/z(%):204(100)、73(18)、205(16)、206(7)、354(4)、442(1)。  | 10 |
| 5-O-メチルスフィンゴシン<br>(d18:1) | 5-O-メチルスフィンゴシン(d18:1)は、酸性メタノリシス、及びピリジン中の2% O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた誘導体化、それに続くN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた誘導体化の後に、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用してGC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオンフラグメントを示す:MS(EI, 70eV):m/z(%):250(100)、73(34)、251(19)、354(14)、355(4)、442(1)。 | 20 |
| コレステロールエステル第1             | 代謝物はコレステロールエステル種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、369.2(+/-0.5)である。   |    |
| コリンプラスマロゲン第1              | 代謝物はコリンプラスマロゲン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、772.6(+/-0.5)である。  | 30 |
| コリンプラスマロゲン第2              | 代謝物はコリンプラスマロゲン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、767(+/-0.5)である。  |    |
| コリンプラスマロゲン第3              | 代謝物はコリンプラスマロゲン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、768.8(+/-0.5)である。  |    |
| DAG<br>(C18:1、C18:2)      | DAG(C18:1、C18:2)は、C18:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含むジアシルグリセロールの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、641.6Da(+/-0.5Da)である。  | 40 |

|                         |   |    |
|-------------------------|---|----|
| エイコサエン酸<br>(C20:1)第2    | エイコサエン酸(C20:1)は、酸性メタノリシス、及びピリジン中の2% O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた誘導体化、それに続くN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた誘導体化の後に、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用してGC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオンフラグメントを示す:MS(EI, 70eV):m/z(%):55(100)、69(75)、41(57)、83(54)、74(53)、97(45)、110(20)、292(13)、293(13)、124(12)、250(9)、152(8)、138(8)、208(7)、324(2)。 | 10 |
| グリセロールリン酸、<br>脂質画分      | グリセロールリン酸、脂質画分はグリセロール-2-リン酸又はグリセロール-3-リン酸部分を含有し、抽出及び抽出物を極性及び脂質画分に分離した後に脂質画分に存在する代謝物の和パラメーターを表す。   |    |
| リゾホスファチジルコリン<br>(C17:0) | リゾホスファチジルコリン(C17:0)は、C17:0脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、510.4Da(+/-0.5Da)である。  | 20 |
| リゾホスファチジルコリン<br>(C18:0) | リゾホスファチジルコリン(C18:0)は、C18:0脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、546.6Da(+/-0.5Da)である。  |    |
| リゾホスファチジルコリン<br>(C18:1) | リゾホスファチジルコリン(C18:1)は、C18:1脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、522.2Da(+/-0.5Da)である。  | 30 |
| リゾホスファチジルコリン<br>(C18:2) | リゾホスファチジルコリン(C18:2)は、C18:2脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、542.4Da(+/-0.5Da)である。  |    |
| リゾホスファチジルコリン<br>(C20:4) | リゾホスファチジルコリン(C20:4)は、C20:4脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、544.4Da(+/-0.5Da)である。  | 40 |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| リゾホスファチジル<br>エタノールアミン (C22:5) | リゾホスファチジルエタノールアミン(C22:5)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、528.2(+/-0.5)である。   |
| ホスファチジルコリン<br>(C16:0、C16:0)   | ホスファチジルコリン(C16:0/C16:0)は、2つのC16:0脂肪酸単位のいずれかの組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、734.8Da(+/-0.5Da)である。   |
| ホスファチジルコリン<br>(C16:0、C20:5)   | ホスファチジルコリン(C16:0、C20:5)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、780.8(+/-0.5)である。  |
| ホスファチジルコリン<br>(C16:1、C18:2)   | ホスファチジルコリン(C16:1、C18:2)は、C16:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、756.8Da(+/-0.5Da)である。 |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:0、C18:1)   | ホスファチジルコリン(C18:0、C18:1)は、C18:0脂肪酸単位とC18:1脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、788.6Da(+/-0.5Da)である。 |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:0、C18:2)   | ホスファチジルコリン(C18:0、C18:2)は、C18:0脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、786.6Da(+/-0.5Da)である。 |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:0、C20:3)   | ホスファチジルコリン(C18:0、C20:3)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、812.6(+/-0.5)である。  |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:0、C20:4)   | ホスファチジルコリン(C18:0、C20:4)は、C18:0脂肪酸単位とC20:4脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、810.8Da(+/-0.5Da)である。 |

10

20

30

40

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| ホスファチジルコリン<br>(C18:0、C22:6) | ホスファチジルコリン(C18:0、C22:6)は、C18:0脂肪酸単位とC22:6脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、834.8Da(+/-0.5Da)である。 |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:1、C18:2) | ホスファチジルコリン(C16:0/C20:3 C18:1/C18:2)は、C18:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、784.6Da(+/-0.5Da)である。                                    |
| ホスファチジルコリン<br>(C18:2、C20:4) | ホスファチジルコリン(C16:0/C22:6 C18:2/C20:4)は、C16:0脂肪酸単位とC22:6脂肪酸単位の組み合わせ又はC18:2脂肪酸単位とC20:4脂肪酸単位の組み合わせのいずれかを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、806.6Da(+/-0.5Da)である。  |
| ホスファチジルコリン第2                | 代謝物はグリセロホスホコリン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、808.4(+/-0.5)である。   |
| ホスファチジルコリン第4                | 代謝物はグリセロホスホコリン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、796.8(+/-0.5)である。   |
| スフィンゴミエリン<br>(d18:1、C23:0)  | スフィンゴミエリン(d18:1、C23:0)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、801.8(+/-0.5)である。   |
| スフィンゴミエリン<br>(d18:1、C24:0)  | スフィンゴミエリン(d18:1、C24:0)は、d18:1長鎖基本単位とC24:0脂肪酸単位の組み合わせを含有するスフィンゴミエリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、815.8Da(+/-0.5Da)である。    |
| スフィンゴミエリン<br>(d18:2、C16:0)  | スフィンゴミエリン(d18:2、C16:0)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、723.6(+/-0.5)である。   |
| スフィンゴミエリン<br>(d18:2、C18:0)  | スフィンゴミエリン(d18:2、C18:0)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、729.8(+/-0.5)である。   |

10

20

30

40

|                            |  |    |
|----------------------------|--|----|
| TAG<br>(C16:0、C16:1)       | 代謝物は、C16:0脂肪酸単位とC16:1脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は549.6(+/-0.5)である。  |    |
| TAG<br>(C16:0、C18:1、C18:3) | TAG(C16:0、C18:1、C18:3)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、855.6(+/-0.5)である。                                  | 10 |
| TAG<br>(C16:0、C18:2)       | 代謝物は、C16:0脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、575.6(+/-0.5)である。 |    |
| TAG<br>(C18:1、C18:2)       | 代謝物は、C18:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、601.6(+/-0.5)である。 | 20 |
| TAG<br>(C18:2、C18:2)       | 代謝物は、C18:2脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、599.6(+/-0.5)である。 |    |
| TAG<br>(C18:2、C18:3)       | 代謝物は、C18:2脂肪酸単位とC18:3脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、597.6(+/-0.5)である。 | 30 |
| TAG<br>(DAGフラグメント)         | 代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、600.6(+/-0.5)である。                                 |    |
| TAG第1                      | 代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、547.6(+/-0.5)である。                                 | 40 |

|        |  |
|--------|--|
| TAG第2  | 代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、695.6(+/-0.5)である。 |
| TAG第5  | 代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、879.6(+/-0.5)である。 |
| TAG第59 | 代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、904(+/-0.5)である。   |
| TAG第7  | 代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、853.6(+/-0.5)である。 |

10

20

【表 3 3】

表12a:雄ラットにおける血液毒性(血液の貧血)に関するマーカー;全ての代謝物が有意なダウンレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)を示した。

|                            | 4-クロロ-3-ニトロアニリン | アニリン | 2-クロロアニリン |
|----------------------------|-----------------|------|-----------|
| 代謝物                        | m7              | m7   | m7        |
| ケトロisin                    | 0.61            | 0.94 | 0.60      |
| 3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール(DOPEG) | 0.53            | 0.84 | 0.87      |
| 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)   | 0.93            | 0.81 | 0.76      |

30

【表 3 4】

表12b:雄ラットにおける血液毒性(血液の貧血)に関するマーカー;全ての代謝物が有意なアップレギュレーション変化(p値 $\leq$ 0.2)を示した。

|              | 4-クロロ-3-ニトロアニリン | アニリン | 2-クロロアニリン |
|--------------|-----------------|------|-----------|
| 代謝物          | m7              | m7   | m7        |
| リバー          | 1.89            | 1.66 | 1.24      |
| シトシン         | 1.75            | 1.62 | 1.41      |
| 3-ヒドロキシインドール | 1.25            | 1.61 | 1.40      |
| 3-インドキシル硫酸   | 1.34            | 1.64 | 1.68      |
| セロトニン(5-HT)  | 9.50            | NA   | 2.64      |
| 3-メトキシチロシン   | 1.90            | 1.35 | 1.48      |

40



## 【 國際調查報告 】

|   |  |  |
|---|--|--|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>  |  | International application No.<br>PCT/IB2012/054731                                     |
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  |  |  |
| G01N33/50 (2006.01) i   |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>   |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)   |  |  |
| IPC: G01N33, C12Q1  |  |  |
| 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)  |  |  |
| WPI, EPODOC, CPRS, CNKI: hematopoietic, haematopoietic, toxicity, hematotoxicity, anemia, bone marrow suppression, leucine, Isoleucine, valine, aspartate, phosphate, phosphatidylcholine, progesterone, hydroxyphenylpyruvate, citrate, deoxycorticosterone, corticosterone, taurine, tricosanoic, lignoceric, ketoleucine, hydroxybutyrate, tryptophan, ornithine, phenylalanine, indole, histidine, methylhexadecanoic, choline, ascorbic, ribal, cytosine, lactate, urea, creatinine, ceramide, pyruvate, sphingomyelin, methionine, serine, glucose, uric, malate, oxoproline, proline, threonine, docosahexaenoic, methoxytyrosine, phytosphingosine, linoleic, glycine, serotonin, eicosanoic, palmitoleic, DOPAC, elaidic, heptadecanoic, phytosphingosine, DOPA, DOPEG   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X   | XIAO, Yanfeng et al., dynamic observations on changes of serotonin in the whole blood of children suffered from iron deficiency, Shanxi Medical Journal, Mar. 1989 (03.1989), no.3, pages 10-12, see the sections of method and discussion | 1-20   |
| X   | HU, Ruimei et al., Changes in Bra in Monoamine Neurotransmitter in Iron Deficiency nonanemic Rats, Chinese Journal of preventive medicine, Nov. 1996 (11.1996), vol. 30, no.6, pages 351-353, see the sections of method and discussion    | 1-20   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual publication of the international search<br>07 Jan. 2013 (07.01.2013)   |  | Date of mailing of the international search report<br><b>24 Jan. 2013 (24.01.2013)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br>The State Intellectual Property Office, the P.R.China<br>6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China<br>100088<br>Facsimile No. 86-10-62019451  |  | Authorized officer<br><b>WANG, Lihua</b><br>Telephone No. (86-10)62085676              |

International application No.  
PCT/IB2012/054731

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | WO2004018996A (HEMOGENIX INC) 04 Mar. 2004 (04.03.2004), see the whole document     | 1-20                  |
| A         | US2008211586A1 (DERTINGER et al.) 18 Dec. 2008 (18.12.2008), see the whole document | 1-20                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/IB2012/054731

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family  | Publication Date |
|--|------------------|----------------|------------------|
| WO2004018996A                              | 2004-03-04       | CA2496251A     | 2004-03-04       |
|  |                  | AU2003258319A  | 2004-03-11       |
|  |                  | AU2003258319B  | 2009-09-17       |
|  |                  | US2004110243A  | 2004-06-10       |
|  |                  | US7354730B     | 2008-04-08       |
|  |                  | EP1539997A     | 2005-06-15       |
|  |                  | US2007148668A  | 2007-06-28       |
|  |                  | US7666615B     | 2010-02-23       |
|  |                  | US2008160544A  | 2008-07-03       |
|  |                  | US7883861B     | 2011-02-08       |
| US2008311586A1                             | 2008-12-18       | US8062222B     | 2011-11-22       |
|  |                  | WO2008157398 A | 2008-12-24       |
|  |                  | US2012052509A  | 2012-03-01       |

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100171505

弁理士 内藤 由美

(72)発明者 ウォーク, ティルマン ベー .

ドイツ連邦共和国 1 4 5 3 2 クラインマハノヴ, レッシングシュトラッセ 1 5

(72)発明者 ラヴェンツヴァーイ, ベナード ヴァン

ドイツ連邦共和国 6 7 1 2 2 アルトリップ, ラインシュトラッセ 6

(72)発明者 メラート, ヴェルナー

ドイツ連邦共和国 6 7 4 5 4 ハスロッホ, アルテ ツィーゲライ 9

(72)発明者 ファビアン, エリック

ドイツ連邦共和国 6 7 3 4 6 シュバイヤー, ジークベルトシュトラッセ 3

(72)発明者 シュトラウス, フォルカー

ドイツ連邦共和国 6 7 0 9 8 バド ドュルクハイム, カール - レーダー - アレー 2 1 デー

(72)発明者 カンプ, ヘニッケ

ドイツ連邦共和国 6 7 2 9 4 ビシュハイム, キルヒハイムボランダー シュトラッセ 9

(72)発明者 ヴィーマー, ヤン ツェー

ドイツ連邦共和国 1 3 5 0 3 ベルリン, ヘニッヒスドルファー シュトラッセ 1 3 9 アー

(72)発明者 ルーサー, ラルフ

ドイツ連邦共和国 1 3 1 5 8 ベルリン, ハウプトシュトラッセ 2

(72)発明者 ヘロルド, ミヒャエル マンフレッド

ドイツ連邦共和国 1 0 5 5 1 ベルリン, クヴィッツォフシュトラッセ 8 7

(72)発明者 プロコディーヌ, アレクサンドル

ドイツ連邦共和国 1 3 1 8 9 ベルリン, エッセングラベン 1 0 1

F ターム(参考) 2G045 CA26 DA02 DA35 DA61 FB06