

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成20年10月30日(2008.10.30)

【公表番号】特表2008-518598(P2008-518598A)

【公表日】平成20年6月5日(2008.6.5)

【年通号数】公開・登録公報2008-022

【出願番号】特願2007-539186(P2007-539186)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 37/00 1 0 3

【手続補正書】

【提出日】平成20年9月11日(2008.9.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 5】

本発明の方法において、細胞に対する種々の化合物の効果の評価のモダリティーは、細胞と試験する化合物のインキュベートの何らかの結果を含む。故に、例えば、細胞形態、細胞代謝または生理、何らかの細胞表現型、差次的遺伝子発現、差次的タンパク質発現、差次的代謝物発現、および類似の現象または特質が、問題の化合物と同じクラスに入らない化合物により証明されない化合物により誘発される特徴的效果の同定に役立つ。実施例において示す態様において、差次的遺伝子発現は実験のアウトプットを提供する；差次的に発現される遺伝子を、細胞サンプルから得たRNAと、細胞が由来する種の全ゲノムの大部分を包含するプローブをハイブリダイズすることにより評価する。使用した複数のクラス中の種々の化合物に曝した全細胞からの実験のアウトプットを、上記に同定したような教師付き統計法により評価する。本発明に関連する分野の当業者に既知の、トレーニングできる評価法を提供する全ての同等な統計分析のセットを、ある細胞を他のものから分けるために役立つ細胞特性の同定に使用できる。本発明の重要な態様において、細胞特性は、その差次的発現が、使用する化合物のクラスを最適に分ける遺伝子を含む。この方法で同定されたこれらの特性は、候補薬剤を分類するために本発明において使用すべき特性の予測セットとなる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 7】

本発明は、試験化合物の毒性または非毒性、および特に、遺伝毒性または非遺伝毒性、または遺伝毒性または細胞毒性としての有効な分類を可能にする、ここに記載のもののような方法により同定された単離ポリヌクレオチドのセットを提供する。これらのポリヌクレオチドセットは、上記のようなある毒性分類のサブセットまたはサブクラスの間の分類をさらに可能にする。本セットは、試験化合物の分類法において使用すべき2個以上の単離ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド(下記に説明の通り、これらの用語は、本明細書においては交換可能に使用される)を含む。一般にポリヌクレオチドを差次的遺伝子発現アッセイのプロープとして使用し、すなわち、それらはオリゴヌクレオチドプロープとして役立つ。2個以上、または3個以上、または4個以上、さらに多数のオリゴヌクレオチドのセットは、ここに記載するアッセイ法において使用するために、本発明において初めて同定された。重要な事に、完全コード配列は、典型的に、その差次的発現が試験化合物の分類に使用できるものであるとして同定されており、そして、完全コード配列が特定のプロープポリヌクレオチドを構成できるが、有利なことにプロープオリゴヌクレオチドはこのようなコード配列のフラグメントである。より包括的に、プロープポリヌクレオチドはa)NCBI(National Center for Biotechnology Information)受託番号(別名GenBankまたはRefseq受託番号)により同定される配列のような完全コード配列; b)アイテムa)のコード配列に相補的なヌクレオチド配列; c)アイテムa)において同定されているコード配列と少なくとも90%同一であるヌクレオチド配列; d)アイテムc)において同定したヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列; またはe)アイテムa)からd)のヌクレオチド配列のいずれかのフラグメントであるヌクレオチド配列のいずれかである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

標識を含む、検出、定量法は、非限定的例として、分光學、核酸化学、生化学、分子生物学および細胞生物学を含む、本発明に関連する分野の当業者に一般に既知である。定量は、プロープに結合している核酸またはポリヌクレオチド、またはそのフラグメントの量、質量、または濃度の測定を可能にする。定量は、このおよび前の段落に記載の通りの物理学的、化学的、または生物学的特性が変化した量の測定を含む。例えば、標識が発生するシグナルの強度を、プロープに結合した核酸の量の評価に使用できる。プロープ核酸にハイブリダイズしたポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの存在および/または量、質量、または濃度を検出する全ての同等な方法は、本発明の範囲内にあるとみなす。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0059

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0059】

本発明において使用する核酸分子、例えば、NCBI GenBankまたはRefseq受託番号によりここで同定したヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの相補鎖は、標準分子生物学法およびここに提供する配列情報を使用して、単離できる。ここで、NCBI受託番号により同定するいずれかの配列の核酸配列の全てまたは一部をハイブリダイゼーションプロープとして使用して、試験核酸配列を、標準ハイブリダイゼーションおよびクロニング法(例えば、Sambrook et al., eds., MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; およびBrent et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (2003)に記載の通り)を使用して単離できる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0062】

他の態様において、本発明の単離核酸分子は、ここでNCBI GenBankまたはRefseq受託番号により同定したいずれかの配列、またはそのヌクレオチド配列の一部の相補鎖である核酸分子である。ここでNCBI GenBankまたはRefseq受託番号により同定したヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、ここでNCBI GenBankまたはRefseq受託番号により同定したヌクレオチド配列と十分相補的であり、すなわち、ここでNCBI GenBankまたはRefseq受託番号により同定したヌクレオチド配列とほとんどまたは全くミスマッチがなく水素結合でき、それにより安定な二本鎖を形成できるものである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0067】

NCBI GenBankまたはRefseq受託番号によりここで同定したヒト試験ヌクレオチド配列に加えて、試験タンパク質のアミノ酸配列に変化をもたらすDNA対立遺伝子配列多形が集団(例えば、ヒト集団)内に存在し得ることは当業者に認識される。このような天然対立遺伝子変異は、典型的に試験遺伝子のヌクレオチド配列中、1 - 5 %分散をもたらし得る。天然対立遺伝子変異の結果であり、試験タンパク質の機能活性を変えないこのようなヌクレオチド変化および結果としての試験タンパク質におけるアミノ酸多形の何れかおよび全て、本発明の範囲内であると意図される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0084

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0084】

## IX. アレイ

本発明の重要な態様において単離ポリヌクレオチドのセットまたは単離ポリペプチドのセットを、固体支持体に付着して、アレイを形成させる。アレイに付着させるためのポリペプチドの有用なクラスは、抗試験抗体分子を含む。アレイ中の各位置またはスポットはアドレス可能であり、アレイ中の他の場所またはスポットと異なる。各場所を、そこに付着した組成物により同定できる。故に、原則として各場所は、その部位のアドレスにより同定する独特な組成物を担持する。非限定的例として、ポリヌクレオチドプローブから成るアレイにおいて、例えば、アレイの各場所は、a)NCBI(National Center for Biotechnology Information)GenBankまたはRefseq受託番号により配列同定したような完全コード配列；b)アイテムa)のコード配列に相補的なヌクレオチド配列；c)アイテムa)において同定したコード配列と少なくとも90 %同一のヌクレオチド配列；d)アイテムc)において同定したヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列；またはe)アイテムa)からd)のいずれかのヌクレオチド配列のフラグメントであるヌクレオチド配列のいずれかであるそこに付着されたプローブポリヌクレオチドを有し得る。タンパク質またはポリペプチド、または特定のタンパク質またはポリペプチドと特異的に結合する特異的結合剤のような他の組成物を、ポリヌクレオチドプローブの代わりにアレイの場所に付着し得る。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

#### X. 候補化合物の分類法

本発明は、どのクラスの毒性に、候補薬剤のような候補化合物が入るかの決定に関する。上記の通り、本発明における重要な意義あるクラス識別は、毒性と非毒性、または遺伝毒性と非遺伝毒性のような2要素識別、ならびにより複雑な分類スキームを含む。薬剤となり得る化合物の強いリード化合物の同定法を加速するために、この目的のためのインビトロアッセイのようなハイスループットアッセイの使用が有利である。インビトロでの細胞ベースのアッセイがこのグループに含まれる。上記に詳述の通り、何らかの適当な細胞特性または細胞特性の群を、分類結果を提供するための識別力として同定し得る。これらは、非限定的例として、細胞形態、細胞代謝または生理学、何らかの細胞表現型、差次的遺伝子発現、差次的タンパク質発現、差次的代謝物発現、および類似の現象または特質を含む。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

候補化合物を分類するために、化合物が有利な薬理的または治療作用を発揮することが予測される濃度または濃度範囲を決定する。本方法のインビトロアッセイにおいて、インビボ試験で予測されるものを非常に反映する結果をアッセイにおいて提供すると見なされる適当な細胞を使用する。数個の複製されたサンプルにおいて、細胞を少なくとも1濃度の、および有利には数種の濃度の候補化合物に、毒性作用、または遺伝毒性作用のような作用が種々のクラスの細胞成分上に発揮されるのに十分と見なされる条件および期間、曝す。この方法の種々の態様において、分析し得る細胞成分のクラス为非限定的例は、DNAおよび種々のタイプの細胞RNA種のような核酸、細胞のタンパク質およびポリペプチド成分、膜結合タンパク質およびポリペプチド、細胞の脂質成分、細胞、小器官およびその成分内で起こる生化学的に特異的な代謝物、および細胞のイオン成分を含む。十分な時間経過後、選択法において目的の細胞成分のメンバーを細胞から単離する。クラスの1以上のメンバーが分類を行うことを可能にする化合物の適用に応答することが既に決定されている。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0091】

#### XI. 差次的遺伝子発現を使用する候補化合物分類

候補化合物の分類法の重要な態様において、分析に付す細胞成分は、細胞と候補化合物との接触に応答する細胞に存在するRNA分子の集団である。候補化合物の特徴付けおよび分類前に、細胞は、差次的遺伝子発現を分析する方法を使用して、非毒性化合物とは逆に毒性化合物の適用により有意な形態に応答する、複数の遺伝子の同定のために使用されている。特に顕著な態様において、本分類は、遺伝毒性またはその欠失に従い成されている。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0147

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0147】

これと比較して、この3個の遺伝毒性化合物は、著しく低い $EC_{50}$ 値( $0.10 \mu M \sim 6.3 \mu M$ の範囲)を有し、細胞周期パラメータにおいて著しいシフトを導いた。最も顕著な作用は、 $EC_{50}$ 値付近が最大であると概算される明白な $G_2$ 期ブロックであり、DNA修復活性を示す(図1)。この観察は、この細胞モデル系内で外因性遺伝毒性ストレスに応答して適応応答が起こるという、基本的仮説と一致する。幸運なことに、これは細胞数測定レベルで既に可視である。

## 【手続補正12】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0173

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0173】

PLS-DAに基づく6個の遺伝子モデルの予測力を、真のクラス構成員で得た結果と、サンプルのクラス構成員を無作為に入れ替えた後に得た結果を比較する、無作為順列により確認できる；これは100回行った。本バリデーション結果を図9に示す。元のデータは $x = 1$ 、 $y = 0.8$ に位置する；毒性クラス構成員を無作為に入れ替えたデータは、 $x < 0.45$ でいくつかの値が示され、入れ替えたデータが元のものと非常に類似するものではないことを示唆する。 $R^2$ は“適合度”の指標であり、 $Q^2$ は“予測度”の指標である。両方の値とも、無作為応答順列と比較して、元のデータで有意に高い。 $R^2$ および $Q^2$ の負の切片値( $-0.0612$ および $-0.162$ )が顕著である。回帰線の切片はモデルの力の指標である。それは、 $R^2$ について $-0.0612$ および $Q^2$ について $-0.162$ であり、これらの点は、無作為を遙かに超える高い予測値に向かう。

## 【手続補正13】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0174

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0174】

実施例3-5に示す結果は、2個の独立した統計分析法が、各々23個のおよび27個の予測遺伝子をもたらすことを示す。重要なことに、両セットに共通する6遺伝子セットも、相対的に小さいクラスのサイズにもかかわらず、予測力を何ら落とすことなく、それらの毒性に従い、2クラスのモデル化合物を一意的に分類できた。

## 【手続補正14】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0175

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0175】

加えて、本方法は、 $tPt$ および $cPt$ のような不明瞭なトレーニングサンプル間を識別するのに十分感受性である。トランスプラチンは、シスプラチンと対症的に抗腫瘍活性を何ら示さないため、非遺伝毒性であると長い間考えられてきた。しかしながら、いくつかの古い文献が、トランスプラチンは典型的遺伝毒ではないが、高濃度である弱い正の効果に至り得ることを記している。故に、実施例で使用した非常に異なる濃度(トランスプラチン： $33 \mu M$ 、シスプラチン： $1.3 \mu M$ )にも係わらず、本方法は、あいまいさなく、それらのモデルクラスに分離することに成功した。あるいは、シスおよびトランスプラチンが、約99%しか純粋でない異性体のため、トランスプラチン中のシスプラチンから成るわずかな不純物が、前者を高濃度で適応したとき、なぜトランスプラチンおよびシスプラチンの両方が分離線の近くに位置するかを説明する。