

99.10.14
日修(更)正本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 96116910

※申請日期： 96.5.11

※IPC 分類：

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

一種判定患者是否帶有 HLA-B*1502 或 HLA-B*5801 對偶基因之方法、試劑組及判定患者是否帶有 HLA-B*4601 之試劑組、一種評估患者是否具有針對藥物發展出不良藥物反應風險之方法，以及一種決定化合物是否成為誘導帶有不良藥物反應關連 HLA 對偶基因的患者，發生不良藥物反應之藥物候選物的決定方法

HLA ALLELES ASSOCIATED WITH ADVERSE DRUG REACTIONS AND METHODS FOR DETECTING SUCH

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 中央研究院/Academia Sinica
2. 世基生物醫學股份有限公司/PharmiGene Inc

代表人：(中文/英文)

1. 翁啟惠/Chi-Huey, Wong
2. 許弘卿/Hsu, Hong Ching

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 台北市南港區研究院路二段 128 號/128, Sec. 2, Academia Sinica Road
Nan-Kang, Taipei, Taiwan (ROC)
2. 台北市中山區長安東路一段 61 之 1 號 2 樓/2F., No.61-1, Sec. 1,
Chang-an E. Rd., Jhongshan District, Taipei City 104, Taiwan (R.O.C.)

國籍：(中文/英文)

1. 中華民國/R.O.C

2. 中華民國/R.O.C

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 陳垣崇/ Yuan-Tsong Chen
2. 洪舜郁/ Shuen-lu Hung
3. 沈志隆/ Chih-Lung Shen
4. 張綺芬/ Chi-Feng Chang
5. 林心郁/ Hsin-Yu Lin
6. 陳維萱/ CHEN, Wei-Hsuan

國 籍：(中文/英文)

1. 美國/USA
2. 中華民國/R.O.C
3. 中華民國/R.O.C
4. 中華民國/R.O.C
5. 中華民國/R.O.C
6. 中華民國/R.O.C

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006 年 5 月 11 日；60/800,121

本專利係第 1-2 次優先權

2. 美國；2007 年 5 月 11 日；11/747,674

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種評估個體發展藥物不良反應風險之方法。

【先前技術】

藥物不良反應(Adverse Drug Reaction, 簡稱ADR)為一種非預設且不希望發生的藥物反應。特別是指藥物在劑量上為預防用劑量、診斷用劑量,或是治療用劑量所造成之非預期與非預定之反應。依據廣泛擷用之統合分析,ADR位在最常見死因之第四位與第六位之間(Lazarou et al., 1998)。2-3%住院患者是因皮膚ADR而住院治療(Bigby et al., 1986),其病徵之嚴重性從輕微斑狀丘疹(MPE),隨著嚴重性的增加,到甚至有致命危險的病徵,例如:過度敏感症候群(HSS)、史狄芬-強生徵候群(SJS)及毒性表皮壞死溶解(TEN; 李耶氏徵候群(Lyell's syndrome)),而後者的致死率可高達40%。

過度敏感症候群(HSS)除皮膚發疹外,其特徵在於另伴隨有全身性表徵(如:發燒、嗜酸性白血球增多症,以及淋巴腺腫)的多重器官涉入(如:肝炎或腎臟炎)。史狄芬-強生徵候群(SJS)及毒性表皮壞死溶解(TEN)屬於免疫複體導致之過度敏感病變,特徵在於迅速發展出水疱斑疹、涉及黏膜之特定部位損傷以及脫皮(Roujeau et al., 1994)。大多數的史狄芬-強生徵候群(SJS)及毒性表皮壞死溶解(TEN)病例是由藥物引起,例如磺醯胺類、抗痙攣藥、別嘌醇(allopurinol)、非類固醇消炎藥(NSAID),及抗瘧疾藥(Roujeau et al., 1995)。在台灣抗痙攣藥(如卡馬西平(carbamazepine)、苯妥英(phenytoin)與苯巴比妥)及別嘌醇,為最常引起史狄芬-強生徵候群(SJS)及毒性表皮壞

死溶解(TEN)之藥物。

近來藥物遺傳學之發展已傾向將ADR之罹患機率與特定遺傳對偶基因有關。例如，硫嘌呤甲基轉化酶(TPMT)的基因多樣性，被發現與硫唑嘌呤(azathioprine，係一種類風濕或癌症藥物)所導致的藥物不良反應有絕大關係(Yates et al., 1997)。此外，研究結果也顯示罹患由特定藥物引發SJS/TEN/HSS的機率是由遺傳決定(Gennis MA, 1991; Edwards SG, 1999)，但其負責之遺傳因子仍有待判別。

這些藥物遺傳學之研究顯示，偵測患者體內不良藥物相關之對偶基因有益於評估患者是否有發展藥物不良反應之風險。這種由臨床實驗改良修正(Clinical Laboratory Improvement Amendments)之分子診斷法現已在美國及歐洲之認證實驗室(reference laboratories)獲得認可。

為了決定一特定對偶基因的存在，需偵測一個或多個特定之核苷酸。在許多例子中，需針對對偶基因內的多重區域為目標以達到精確的判定。例如：目前已知用來判定一HLA-B對偶基因(如：HLA-B*1502或HLA-B*5801)的方法，需偵測該對偶基因內至少六個區域。

【發明內容】

本發明提供一種評估患者發展出藥物不良反應之危險性之方法，尤其是SJS、TEN，或過度敏感症候群(Hypersensitivity, HSS)。已發現一HLA-B對偶基因，HLA-B*1502，與多種藥物(例如卡馬西平(carbamazepine, CBZ))所誘發之SJS/TEN有關。此外，另一種HLA-B對偶基因，HLA-B*5801也特別與別嘌醇所誘發SJS/TEN有關。HLA-B*5801也與別嘌醇誘發的過敏症狀

(Hypersensitivity, HSS)有關。由卡馬西平(CBZ)所誘發較溫和之皮膚反應，如：斑丘疹、多形性紅斑(EM)、蕁麻疹及固定藥物發疹，則特別與HLA-B*4601有關。

因此，本發明提供一種評估患者因藥物而發展藥物不良反應風險之方法，包括採用來自患者之生物檢體進行HLA定型。本發明採用之HLA對偶基因可為任一與ADR相關且其靈敏度至少為40%者。危險因子至少為50%、60%、70%、80%、85%或90%者為佳，95%者則更佳。該藥物最好選自以下各群組：卡馬西平(Carbamazepine, 簡稱CBZ)、奧卡西平(Oxcarbazepine; 商品名：除癲達(Trileptal))、利卡西平(Licarbazepine)、別嘌醇(Allopurinol)、苯妥英(Phenytoin)、柳氮磺胺嘧啶(Sulfasalazine)、安默西林(Amoxicillin)、異丁苯丙酸(Ibuprofen)與苯酮苯丙酸(Ketoprofen)。相對地，該藥物最好不要選擇非類固醇消炎藥，而該危險因子為一HLA-B對偶基因為佳。

評估患者因藥物而發展出藥物不良反應之危險性之方法可由測定選自HLA-B*1502、HLA-B*5801與HLA-B*4601組群中之HLA-B對偶基因之存在來達成，其中HLA-B對偶基因之存在為藥物不良反應危險性之指標。該藥物可選自下列群組：卡馬西平、奧卡西平、利卡西平、別嘌醇、奧昔嘌醇、莫待芬寧、苯妥英、柳氮磺胺嘧啶、安默西林、異丁苯丙酸與苯酮苯丙酸。

藥物不良反應可為一皮膚藥物不良反應，如：史狄芬-強生徵候群、毒性表皮壞死溶解，或過度敏感症候群。在一實例中，該藥物為卡馬西平、奧卡西平，或利卡西平，該對偶基因為HLA-B*1502。另一項實例中，使用對偶基因HLA-B*5801來預估史狄芬-強生徵候群、毒性表皮壞死溶解，或過度敏感症候群之風險，該藥物可選自別嘌醇或奧昔嘌醇。亦可使用

HLA-B15、B58或B46之其他亞型(如：HLA-B*1503或HLA-B*1558)來預估發展藥物不良反應之風險。

測定對偶基因之存在可藉著使用由生物檢體(如：血液、唾液、尿液，或毛髮)製備之基因組DNA來直接測定該基因內之區域或核苷酸。該對偶基因亦可利用如血清學或微細胞毒性方法測定，亦可藉由檢測對偶基因之等效基因標記(equivalent genetic marker)來測定，例如：單一核酸多型性(single nucleotide polymorphism, SNP)、微衛星標記(microsatellite marker)、或任何種類之基因多樣性。換言之，HLA-B*1502、5801或4601單倍體(而非該對偶基因本身)之存在即為藥物不良反應之指標。HLA-B*1502單倍體之等效基因標記包括：DRB1*1202、Cw*0801、Cw*0806、A*1101及MICA*019。HLA-B*5801單倍體之等效標記包括：HLA-A*3303、Cw*0302、DRB1*0301與MICA*00201。

另一方面，本發明提供一種藥物遺傳學圖譜分析法，本方法包括測定至少一種選自HLA-B*1502、HLA-B*5801與HLA-B*4601組群中之HLA-B對偶基因存在。在一實例中，測定至少兩種選自以下族群中對偶基因之存在，如：HLA-B*1502與HLA-B*5801。在另一實例中，則測定所有三種對偶基因存在。該方法可視需要包括測定其他遺傳因子。其他遺傳因子可能與任何疾病或病症之發生傾向有關，包括藥物不良反應。例如，此等其他遺傳因子可選自由硫嘌呤甲基轉化酶與長-QT徵候群之基因所組群組。

本發明亦提供一種方法來測定患者是否帶有HLA-B*1502或HLA-B*5801。本方法包括下列步驟：(1)測定由HLA-B*1502的區域1-6或HLA-B*5801的區域1-6中擇一選出之第一區域；

(2)測定由HLA-B*1502的區域1-6或HLA-B*5801的區域1-6中擇一選出之第二區域，第一區域與第二區域可以區別之；以及(3)判定該患者是否帶有選定之基因，上述第一區域與第二區域之存在，表示該患者帶有HLA-B*1502或HLA-B*5801。這些區域之測定方式，可為即時聚合酶連鎖反應(Real-Time PCR)，或序列專一性寡核苷酸競爭雜交試驗及經結合之序列專一性寡核苷酸-酵素連結免疫吸附試驗(conjugated single strand oligonucleotides enzyme linked immuno-sorbent assay, CSSO-ELISA)。在一實例中，偵測選自HLA-B*1502的區域1-6或HLA-B*5801的區域1-6的兩個區域即足以判定HLA-B*1502或HLA-B*5801存在或缺失。相對地，HLA-B*1502或HLA-B*5801中之區域也可測定三個或三個以上。

偵測HLA-B*1502的區域1、區域2，與區域3可分別藉由判別下列位置之核苷酸：區域1中的位置1與3、區域2中的位置1與6、以及區域3中的位置1與3(包括這些位置的義股及反義股上的核苷酸)。

偵測HLA-B*5801的區域1-6可分別藉由判別下列位置之核苷酸：區域1中的位置1、2及5，區域2中的位置1、4、6、7、8、15、16及20，區域3中的2、4、5、8及9，區域4中的位置3與5，區域5中的位置1與9，以及區域6中的位置3與10。

本發明亦提供一用來偵測對偶基因(如：HLA-B*1502或HLA-B*5801)之試劑組。在一實例中，本試劑組包含一第一探針與一第二探針，各自針對選自HLA-B*1502的區域1-6或HLA-B*5801的區域1-6的一個區域。此兩種探針所針對之區域並不相同。該試劑組可更進一步包括一針對內部對照組使用之第三探針，也可包括一個以上的額外探針，用以偵測

HLA-B*1502或HLA-B*5801中一或多個額外區域。

本發明進一步提供一種方法，用以測定一化合物對於一帶有HLA對偶基因（如HLA-B*1502、HLA-B*5801，或HLA-B*4601）的患者是否為誘發一種藥物不良反應（如SJS/TEN、HSS，或較輕微之皮膚藥物不良反應）之候選藥物，該HLA對偶基因與一藥物（如卡馬西平、別嘌醇，或苯妥英）引發之藥物不良反應有關。本方法包括下列步驟：(1)由帶有一與藥物不良反應有關HLA對偶基因之患者體內分離出T細胞；(2)培養增生對於引發該藥物不良反應之藥物有反應的T細胞；(3)由該患者身上分離出抗原表現細胞；(4)在抗原表現細胞存在的狀況下，將增生之T細胞與化合物接觸；以及(5)檢測該化合物是否會活化該增生之T細胞。一活化該T細胞之化合物則為會在帶有同樣HLA對偶基因患者體內引發藥物不良反應之候選物。

如果患者發展藥物不良反應之可能性高於一般大眾，則稱該患者屬於發展該藥物不良反應之「高危險群」。該患者發展該藥物不良反應之可能性至少為1.5倍，至少2倍為佳，至少3、4、5、6、7、8或9倍者更佳，最佳者之可能性為至少比一般大眾高10倍，並採已知任何方法（如使用危險因子之發生率分析）來決定該可能性。例如，已知一危險因子在一般大眾之普行率為5%，若此危險因子之普行率於患有藥物不良反應之患者群中為10%，則帶有此因子之患者發展該藥物不良反應之可能性是一般大眾發展該藥物不良反應之可能性的2倍。

一藥物不良反應之「危險因子」係為與該藥物不良反應有關聯之一因子。一危險因子之靈敏度以至少40%為佳，至少50%、60%、70%、80%、85%或90%者更佳，而最佳靈敏度為至少95%。以危險因子用來預測藥物不良反應的靈敏度，是以

患有該藥物不良反應之患者帶有該危險因子之百分比來表示。換言之，若每一個SJS患者皆帶有對偶基因A，該對偶基因A用來預測SJS的靈敏度為100%。若40名SJS患者中有20位帶有對偶基因B，則對偶基因B用來預測SJS的靈敏度為50%。

所需對偶基因之「等效基因標記」係為與所需對偶基因有連鎖關係之遺傳標記物，亦即該基因標記與所需對偶基因係呈現一連鎖不平衡(linkage disequilibrium)狀態。

「藥物遺傳學圖譜分析」係指在患者體內決定是否有與疾病或病症(尤其是藥物不良反應)相關之遺傳因子之存在。在典型的藥物遺傳學圖譜分析中通常會定出一組遺傳因子，該組因子可能與該相同疾病、病症或藥物反應有關或無關。

以下就本發明之數種實施例加以詳細說明，其餘本發明之特徵、物件與優點可由以下敘述、圖示與請求項中明顯推知。

【實施方式】

某些證據顯示，幾種類似之多重系統藥物過敏反應之致病機制涉及藥物或其代謝物之主要組織相容性複合體(Major Histocompatibility Complex, MHC)限制呈現，該藥物直接與MHC分子或與內生性蛋白結合，並且活化T細胞(Svensson et al., 2000)。已發現在大泡性水痘反應中，如：SJS/TEN，顯著出現皮膚浸潤之CD8+細胞毒性T細胞(Hari et al., 2001)，而較溫和之皮膚藥物不良反應(如斑丘疹)之特徵則為CD4+助手T細胞(Pichler et al., 1997)。

HLA-B*1502、HLA-B*5801、與HLA-B*4601發現分別與CBZ所導致之SJS/TEN、別嘌醇導致之SJS/TEN/HSS、以及CBZ所導致較溫和之皮膚藥物不良反應(如斑丘疹、多形性紅斑

(EM)、蕁麻疹及固定藥物發疹)有關。因此這些HLA-B對偶基因係為判定患者對於CBZ、別嘌醇，或與上述化合物具有相似結構之藥物是否具有發展藥物不良反應之風險(如SJS、TEN、HSS或較溫和之皮膚藥物不良反應)的有效基因標記。

卡馬西平(CBZ)，亦稱為癲通(Tegretol)、Tegol、G-32883、Biston、Calepsin、Carbatrol、Epitol、Finlepsin、Sirtal、Stazepine、Telesmin或Timonil，為一種芳香系抗痙攣劑。其他芳香系抗痙攣劑包括苯妥英(Dilantin)與苯巴比妥，其會如同卡馬西平引起類似藥物不良反應。因此，HLA-B*1502亦可用於評估對此等其他芳香系抗痙攣藥出現藥物不良反應之危險性。可使用HLA-B*1502作為危險因子之芳香系抗痙攣藥亦包括卡馬西平、苯妥英或苯巴比妥之化合物或代謝物。此等藥物之代謝物係為相關技術領域具有通常知識者所能明瞭(參見例如：Gennis et al., 1991; Leeder, 1998; Naisbitt et al., 2003)，如：卡馬西平-10,11環氧化物、卡馬西平-10,11-二醇、卡馬西平 2,3-二醇、二氫卡馬西平、卡馬西平兒茶酚與卡馬西平鄰醌、對羥基苯妥英、苯妥英二氫二醇、苯妥英兒茶酚、苯妥英甲基兒茶酚與苯妥英鄰醌。

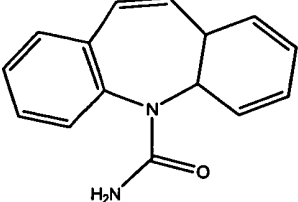
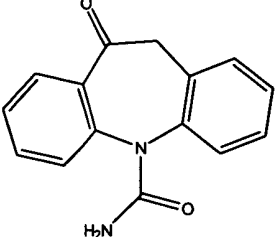
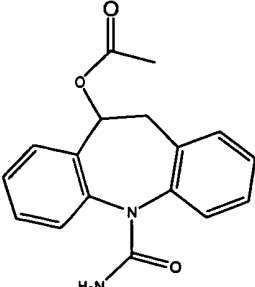
別嘌醇(allopurinol)係為一治療高尿酸血症與慢性痛風之藥物。

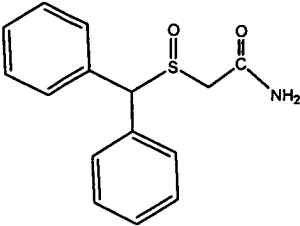
本發明提供一種方法，該方法乃藉由檢測患者體內是否具有某些特定之HLA-B對偶基因或其同等基因標記，來判定該患者是否具有發展藥物不良反應之風險。

在一實例中，患者體內具有HLA-B*1502，表示該患者具有由CBZ、與CBZ結構類似之化合物、或其代謝物所導致SJS/TEN之風險。表一所示之化合物為可導致帶有HLA-B*1502

患者發展 SJS/TEN 之實例。

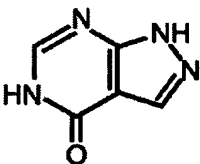
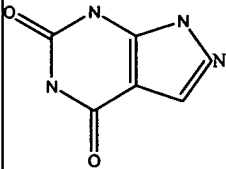
表一：與帶有 HLA-B*1502 患者發展 SJS/TEN 相關之化合物

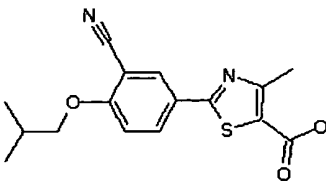
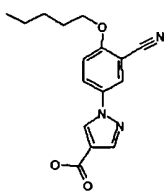
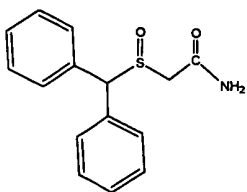
有效成份或品牌名	有效成份結構式
卡馬西平, Epitol, 癲通 (Tegretol), Microtrol Bipotrol, Pharmavene, Carbatrol, SPD-417 [CAS]: 5 氫-二苯[b, f] 平-5-羧胺 (5H-Dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide)	
奧卡西平, 除癲達(Trileptal), GP-47680, GP-47779, GP-47779 MHD, KIN-493, TRI-476, TRI-477, TRI-477 (MHD), 除癲達 NP (Trileptal NP), [CAS]: 10, 11-二氫-10-氧代-5 氫-二 苯[b, f] 平-5-羧胺 (5H-Dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide, 10,11-dihydro-10-oxo)	
利卡西平 BIA-2-093 BIA-2-005 [CAS]: (S)-(-)-10-乙醯氧基-10,11- 二氫-5 氫-二苯[b, f] 平-5-羧胺 ((S)-(-)-10-acetoxy-10,11-dihydro-5H- dibenzo[b,f]azepine-5-carboxamide)	

有效成份或品牌名	有效成份結構式
莫待芬寧, Sparlon(新化學式藥物), [CAS] : 2-[(二苯甲基)氧化硫基-乙 醯胺(Acetamide, 2-[(diphenylmethyl)sulfinyl]-)	

在另一項實例中，一患者體內具有HLA-B*5801，表示該患者具有由別嘌醇、與別嘌醇結構類似之化合物、或其代謝物所導致SJS/TEN或HSS之風險。表二所示之化合物為可導致帶有HLA-B*5801患者發展SJS/TEN或HSS之實例。

表二：與帶有HLA-B*5801患者發展SJS相關之化合物

名稱	有效成份結構式
別嘌醇, Alopurinol, Zyloprim, 異嘌呤醇錠(Apo-Allopurinol), 普利酸錠(Purinol)	
奧昔嘌醇, Oxyprim [CAS] : 1 氫-吡唑[3,4-d]嘓啶-4,6(5 氫,7 氫)-二酮 (1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4,6(5H,7H)-dione)	

名稱	有效成份結構式
Febuxostat, TEI-6720, TMX-67 [CAS]: 2-[3-氯-4-(2-甲基丙醚)苯]-4-甲基-5-噻唑乙酸 (5-Thiazolecarboxylic acid, 2-[3-cyano-4-(2-methylpropoxy)phenyl]-4-methyl-)	
Y-700 [CAS]: 1-(3-氯-4-異苯氧基)吡唑-4-乙酸 (1-(3-Cyano-4-neopentyloxyphenyl)pyrazole-4-carboxylic acid)	
莫待芬寧, Sparlon(新化學式藥物), [CAS]: 2-[(二苯甲基)氧化硫基-乙醯胺] (Acetamide, 2-[(diphenylmethyl)sulfinyl]-)	

另一項實例中，患者體內具有HLA-B*4601表示該患者具有由CBZ所導致較溫和之皮膚藥物不良反應風險，例如：斑丘疹。

其他HLA-B對偶基因也可用於皮膚藥物不良反應之預測，例如，僵直性脊椎炎與HLA-B27對偶基因(如B*2701至B*2703)就有強烈關聯性(Khan, 2000; Feltkamp et al., 2001)。

直接偵測基因標記(如HLA-B對偶基因)或是其內部之特殊區域可用來判定該基因標記是否存在。從患者體內抽取製備其基因組DNA來測定對偶基因之存在已屬公知，例如：美國明

尼蘇達州的 Gentra Systems 公司所出產之 PUREGENE DNA 純化系統。其係用以測定指定基因標記內的一段區域包括檢驗在義股與反義股上的核苷酸，測定特定區域的方法為眾所周知的習知技藝，例如序列專一性寡核苷酸雜交試驗、即時聚合酶連鎖反應，或是經結合之序列專一性寡核苷酸-酵素連結免疫吸附試驗 (M. Hiratsuka et al., 2006)。

HLA-B*1502 的存在可藉由偵測至少區域 1-6 (如圖一所示，且核苷酸序列如補充序列表中之 SEQ ID NO:1 及 SEQ ID NO:2 之序列) 中的 2 個區域來判定，而這些區域的存在可藉由偵測區域內某些位置的核苷酸來判定，例如：區域 1 中的位置 1 與 3、區域 2 中的位置 1 與 6、以及區域 3 中的位置 1 與 3。區域 1-6 中只要任 2 個區域有存在，即代表該患者帶有 HLA-B*1502。

HLA-B*5801 的存在可藉由偵測至少區域 1-6 (如圖二所示，且核苷酸序列如補充序列表中之 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 之序列) 中的 2 個區域來判定，而這些區域的存在可藉由偵測區域內某些位置的核苷酸來判定，例如：區域 1 中的位置 1、2、5，區域 2 中的位置 1、4、6、7、8、15、16 及 20，區域 3 中的 2、4、5、8 及 9，區域 4 中的位置 3 與 5，區域 5 中的位置 1 與 9，以及區域 6 中的位置 3 與 10。區域 1-6 中只要任 2 個區域存在，即代表該患者帶有 HLA-B*5801。

由聚合酶連鎖反應取得之 DNA 產物可用序列專一性探針來偵測，如：TaqMan、Beacon、Scorpions 的水解性探針或是雜交探針。這些探針被設計成可與指定區域鍵結，例如：HLA-B*1502 的區域 1-6 或是 HLA-B*5801 的區域 1-6。該聚合酶連鎖反應產物可藉由 DNA 黏合物 (如 SYBR® Green) 來偵測。

對偶基因之存在也可藉由偵測該對偶基因之等效基因標

記來判定。由於接近所需HLA對偶基因之基因標記與該對偶基因易於共同分離或呈現連鎖不平衡狀態，因此此等標記(等效基因標記)為所需對偶基因是否存在之指標，進而可代表患者是否具有發展不良藥物之風險。HLA-B*1502之等效基因標記舉例包括：DRB1*1202、Cw*0801、Cw*0806、A*1101與MICA*019。HLA-B*5801之等效基因標記舉例包括：A*3303、Cw*0302、DRB1*0301與MICA*00201。

等效基因標記可為任何型式，包括：HLA對偶基因、微衛星標記與單一核酸多型性(SNP)標記。來自所需基因之適用基因標記的大小為200 kb或以下(100 kb、80 kb、60 kb、40 kb，或20 kb或以下)。等效基因標記可採用上述之方法或已知相關方法檢測。

反之，或者此外，所需對偶基因之RNA序列、cDNA序列、或是蛋白質產物均可用於測定該對偶基因存在或缺失，例如：可採用血清定型法或顯微細胞毒性法來測定該HLA對偶基因之蛋白質產物。

為進一步提高風險預估之準確性，且可同時檢測所需之對偶基因與/或其等效基因標記及涉及抗原呈現細胞與T細胞之間交互作用之附屬分子與共同刺激分子之基因標記。此等效基因標記包括微衛星標記，與單一核酸多型性(SNP)標記。該附屬及共同刺激分子包括細胞表面分子(例如：CD80、CD86、CD28、CD4、CD8、T細胞受器(TCR)、ICAM-1、CD11a、CD58、CD2等)，及發炎或促炎細胞素、趨化激素(例如：TNF- α)與媒介物(例如：補體、細胞凋亡蛋白、酵素、細胞外間質組成物等)。此外，涉及藥物之生物活化作用及去毒作用之藥物代謝性酵素之基因標記亦為所需之物。此等基因標記亦包括微衛星標記與

SNP標記物，而藥物代謝性酵素則包括I期酵素(例如：細胞色素P450超級家族等)，與II期酵素(例如：微粒體環氧化物水解酶、芳基胺N-乙醯基轉化酶、UDP-葡萄糖醛酸糖苷基轉化酶等)。

本發明進一步提供一種藥物遺傳學圖譜分析法。針對特定個體決定一組遺傳因子，而各遺傳因子則與預測疾病或病症(包括藥物不良反應)相關。本方法中，該組遺傳因子包括至少一種選自HLA-B*1502、5801與4601所組組群之對偶基因，亦包括選自該群中至少2種或所有3種之對偶基因。除了HLA-B*1502、5801與/或4601以外，該組中可包括任何其他已知遺傳因子，如：硫嘌呤甲基轉化酶與長-QT徵候群之基因，亦可包括上述附屬分子、共同刺激分子，與/或藥物代謝性酵素之基因標記。

本發明另一方面也提供一種試劑組，包括如檢測HLA-B*1502、5801與4601所組群群之基因標記探針。此處所述之「探針」係指任何可用於探測其他物質之物。因此，探針可為會與所需基因中特定區域進行專一性雜交鍵結之寡核苷酸片段或複合寡核苷酸片段。該複合寡核苷酸片段係指一與發色基團或含有配體之分子(如抗原)形成共價鍵結之寡核苷酸片段，其針對一受器分子具有專一性之高親和力(如抗體對抗原之專一性)。該探針亦可為一聚合酶連鎖反應引子，與另一條引子用來共同增幅該所需基因內部的特定區域。更進一步地說，該探針可為一抗體，該抗體認識一所需基因或該基因之蛋白產物。該試劑組可選擇性地包含一探針，該探針係針對一用於內部對照之對偶基因，其可為任何一普遍存在之對偶基因(例如甘油醛磷酸脫氫酶(GAPDH)、 α -肌動蛋白、殺手細胞免疫球蛋白

類似受器(Killer cell Ig-like receptor, KIR)。偵測內部對照用的對偶基因之設計係為了確認該試劑組之效能。

該試劑組可更進一步包括其他工具與/或試劑，用以收集患者生物檢體，以及製備該檢體之基因組DNA、cDNA、RNA或蛋白質。例如，該試劑組可包含用來增幅基因組DNA中特定區域之聚合酶連鎖反應之引子，亦可包括適用於藥物藥物遺傳學圖譜分析法之探針，例如硫嘌呤甲基轉化酶。

在一實例中，該試劑組包含有一第一探針與一第二探針，各自針對選自HLA-B*1502的區域1-6或HLA-B*5801的區域1-6的一個區域。該第一探針與一第二探針所針對之區域並不相同，此兩個探針可為一對聚合酶連鎖反應引子，或是適用於雜交試驗之標記寡核苷酸。該試劑組可選擇性地包括一第三探針，用以針對內部對照組，也可包括一個以上的額外探針，用以偵測HLA-B*1502或HLA-B*5801的額外區域。

再一方面，本發明還提供一種方法，用以測定一化合物是否會對於帶有HLA對偶基因(如HLA-B*1502、HLA-B*5801，或HLA-B*4601)的患者誘發一種藥物不良反應(如SJS/TEN、或HSS)。研究結果顯示該藥物可能被某些HLA複合體呈現以活化T淋巴球，而後引發藥物不良反應。對於這些藥物有反應的T細胞顯示該T細胞涉及由該藥物誘發之藥物不良反應。因此，活化該T細胞之化合物會成為在帶有一個以上與藥物不良反應的HLA對偶基因患者其引發藥物不良反應之候選物。

用於藥物不良反應患者之基因組定型分析，可判定該患者是否帶有與該疾病相關之HLA對偶基因。該患者體內可分離出T淋巴球與抗原呈現細胞(例如B細胞或單核球)，並且經過體外培養，分離技術與培養方法均依照習知技藝實施(Naisbitt DJ.

2003; Wu et al. 2006)。依此法分離出之B細胞可被鼻咽癌病毒(Epstein-Bar virus)感染導致轉型，以製成B細胞株，在該藥物與自體抗原呈現細胞同時存在的狀態下，培養增殖對有藥物反應之T細胞。增殖後的T細胞可在自體抗原呈現細胞存在的狀態下加入一待測化合物，視該化合物是否會活化該T細胞。若然，則該待測化合物即會成為在帶有該相同HLA對偶基因的患者其誘發藥物不良反應之候選物。

以上之敘述咸信已適當地將本發明在不需更進一步演繹的情況下加以說明，而使習知此領域之一般人皆能藉此實施本發明。因此，以下之實例僅為本發明提供說明，且無意以任何方式限制本發明之範圍。所有公開文獻皆已以引用之方式完整地併入本發明各參考文獻之中。

實例一：使用即時聚合酶連鎖反應偵測HLA-B*1502及HLA-B*5801

由病人血液或唾液中抽取基因組DNA，並合成三組聚合酶連鎖反應引子，該引子分別以HLA-B*1502的區域1和5、區域1和4、區域1, 3及4(參閱圖一)為目標，此外，合成一組引子，該引子以HLA-B5801的區域2和4(參閱圖二)為目標。使用SYBR® Green即時聚合酶連鎖反應系統(美商應用生命系統，Applied Biosystem)來增幅並偵測上述之目標區域。簡言之，將引子、基因組DNA、及Power SYBR® Green PCR master mixture(包含於該PCR試劑組中)，並依照下列步驟操作：(i)在95°C下加熱10分鐘，活化聚合酶；(ii)在95°C下加熱15秒進行變性後，使其處於71°C下1分鐘進行DNA片段的黏合及延長；(iii)進行40次「變性/黏合/延長」的循環，以及(iv)在95°C下加熱15秒後置於60°C 1

分鐘，將增幅後之產物自其模版分離下來。針對殺手細胞免疫球蛋白類似受器(KIR)進行PCR增幅以作為內部對照組。測定患者體內之HLA-B*1502或HLA-B*5801存在或缺失係取決於HLA-B*1502/HLA-B*5801與KIR兩者間Ct值之差(Δ Ct值)，該Ct值(閾循環)藉由該回報染料發光強度高於背景雜訊之循環數來決定，該閾循環數係由該反應之最大指數期來決定，且比傳統PCR方法測量終點之累積PCR產物來得更加可靠。該閾循環數與其模版基因的複製數量有倒數比例關係，模版複製數量越大，測量到的閾循環數則越低。

由人類B細胞株中抽取的170個基因組DNA檢體，以及從人類血液或唾液中製備的35個基因組DNA檢體，依照上述之方法進行測試，以檢測HLA-B*1502之存在。HLA-B*1502與KIR的Ct值範圍分別為23-27及19-25，當HLA-B*1502與KIR之 Δ Ct值小於7，則該HLA-B*1502被認定為存在。在此等170個超級對照組中，15個gDNA發現HLA-B*1502存在，且經由Dynal SSO試劑組測試確認，且該結果顯示本方法之靈敏度及專一性皆超過99%。

由人類B細胞株中抽取的170個基因組DNA檢體，以及從人類血液或唾液中製備的35個基因組DNA檢體，依照上述之方法進行測試，用以檢測HLA-B*5801存在。HLA-B*5801與KIR的Ct值範圍分別為22-28及10-26，當HLA-B*5801與KIR之 Δ Ct值小於7，則該HLA-B*1502被認定為存在。由不帶有HLA-B*5801之患者體內取出之DNA檢體，其HLA-B*5801之Ct值約為34，且其 Δ Ct值大於13。所有檢體中，51個gDNA發現HLA-B*5801存在，經由Dynal SSO試劑組測試確認，結果顯示本方法之靈敏度及專一性皆超過99%。

實例二：使用經結合之序列專一性寡核苷酸-酵素免疫連結吸附試驗偵測HLA-B*1502及HLA-B*5801

實施經結合之序列專一性寡核苷酸-酵素免疫連結吸附試驗之步驟，如圖三所示。

一般來說，使用基因組DNA作為模版，進行聚合酶連鎖反應來生成如圖一或圖二所示之該專一區域的DNA產物。前向引子(forward primer)或是反向引子(reverse primer)均以配體I(Ligand I, LI)標示，且辨識方式係藉由一連結有酵素(如HRP)的分子I(Molecule I, MI)。該PCR反應經由設計實施而產生包含一個以上的專一區域(即HLA-B*1502的區域1-6或是HLA-B*5801的區域1-6)。設計出有專一性的寡核苷酸競爭序列，CSSO1與CSSO2，其中CSSO1對於HLA-B*1502的區域1-6或是HLA-B*5801的區域1-6的辨識上有專一性，而CSSO2則是設計成辨識HLA-B的一般型(即非B*1502對偶基因，或是非B*5801對偶基因)。該CSSO1則以配體2(Ligand 2)標示，之後被塗布於一反應盤(reaction plate or strip)上的分子II(Molecule II)所辨識結合。在洗掉未結合分子後，將該酵素的受質加入該反應盤中。該酵素有反應(有顏色出現為有反應的訊號)即代表HLA-B*1502或HLA-B*5801的存在。

實例三：CBZ所導致之SJS/TEN與HLA-B*1502之相關性

本研究中納入238位ADR患者(蒙古人種或其後裔)，患者來自長庚紀念醫院(Chang Gung Memorial Hospital)或全臺灣其他醫學中心，記錄患者服用藥物之歷史(包括劑量與服藥期)及ADR之表現型。診斷標準係依據Roujeau (Roujeau JC, 1994)所

定義之臨床形態。例如，SJS之定義為脫皮程度低於體表面積之10%，重疊之SJS-TEN之定義為脫皮10-30%，而TEN則為30%以上。SJS、重疊之SJS-TEN與TEN統稱為SJS/TEN。

每名患者均停止服用有嫌疑之藥物，並觀察患者症狀。發展出皮膚藥物不良反應之患者，若停止服用藥物後ADR症狀仍未緩解，即不納入本研究範圍中。

根據上述之標準，對不同藥物，有112位患者被診斷出患有SJS/TEN，另外126位患者出現較溫和之過度敏感反應。在該112位SJS/TEN患者中，有42位患者接觸過卡馬西平(癲通)、17位服用過別嘌醇，及53位接受過除了卡馬西平或別嘌醇以外其他藥物的治療。

本研究中納入73位可耐受顛通之患者作為對照組，亦納入來自台灣一般人民之自願者(n=94；年齡範圍：20至80歲)。本試驗係由人體試驗評議委員會(institutional review board)核准，且已取得同意書。

所有患者均進行基因組定型分析。簡言之，使用序列專一性寡核苷酸(SSO)片段進行「逆向直線墨點分析法」之試劑係購自DYNAL Biotech Ltd.(Bromborough, UK)。採用連結有生物素之引子對以產生連結有生物素之PCR產物，該引子對之序列係針對I類或II類HLA基因位點中第二與第三表現序列，然後將上述連結有生物素之PCR產物與固定在一尼龍膜上之SSO探針直線墨點進行雜交。使用streptavidine-HRP及一發色性可溶性受質，判定該連結有生物素之PCR產物是否存在，當連結有生物素之PCR產物連結至其對應之專一探針時，會於陽性探針之位置產生一條藍色「直線」。探針反應樣式則利用基因組定型分析軟體 Dynal RELITMSSO(DYNAL Biotech Ltd.;

Bromborough, UK)來解讀。模擬兩可者則再進一步採用以序列為主之定型分析及DNA定序來解析，實施方法則依據IHWG技術手冊(International Histocompatibility Working Group)。

另採用高效率MALDI-TOF質譜分析儀針對某些患者則進行單一核苷酸多形性(SNP)基因組定型分析。簡言之，引子及探針之設計係採用SpectroDESIGNER軟體(Sequenom, San Diego, CA, USA)。進行重複聚合酶連鎖反應(Multiplex PCR)後，使用蝦子鹼性去磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase)(Hoffman-LaRoche, Basel, Switzerland)將未嵌入之dNTPs進行去磷酸化，接著進行引子延伸(primer extension)。將純化過後的引子延伸反應產物，點在一384孔之矽晶片上(SpectroCHIP, Sequenom)，使用Bruker Biflex III MOLDI-TOF SpectroREADER質譜分析儀(Sequenom)進行分析，其結果圖譜係經由SpectroTYPER(Sequenom)處理。

不同組之對偶基因出現頻率在製成2x2表格後進行葉慈校正(Yates correction)，採用開方檢定法(Chi-square method)比較其差異。由原始P值乘以在該基因位點中所觀察到的HLA對偶基因數，以校正P值，以此用來比較多重HLA對偶基因(P_c)。風險對比值(odds ratio)，或稱勝算比，係採用Haldane's改良法計算，不論何種細胞，該值再加0.5，以配合可能出現數值為零的狀況。

如表三所示，一位於HLA-B基因位點中的DNA變體對偶基因(HLA-B* 1502)與罹患藥物所誘發SJS/TEN之患者有關，特別是接受卡馬西平(癲通)之患者。

表三：42位患有卡馬西平(癲通)誘發之史狄芬-強生徵候群/毒性

表皮壞死溶解症的臺灣患者體內之HLA-B*1502出現頻率

對偶基因	患者 n=42	對照組1 ^a n=142	對照組2 ^b n=94	對照組3 ^c n=73	X ²	風險對比值 (odds ratio)	Pc
B*1502	42(100%)	9(6.3%)			137.28	1194.47	3.6x10 ⁻³⁰
B*1502	42(100%)		5(5.3%)		110.919	1383.2	2.15x10 ⁻²⁴
B*1502	42(100%)			3(4.1%)	98.936	1712	9.1x10 ⁻²²

a, 出現SJS以外之較溫和藥物不良反應之患者

b, 台灣一般民眾

c, 具有卡馬西平耐受性之患者

X², 經過葉慈校正之開方檢定後之P值

Pc, 原始P值乘以所觀察到之HLA-B對偶基因數(35)之計算值。

42位接受卡馬西平之SJS/TEN患者中有42位帶有HLA-B*1502(100%)。53位接受其他藥物之SJS/TEN患者中，有17位(32%)患者(苯妥英8位，別嘌醇2位，安默西林2位，柳氮磺胺嘧啶1位，苯酮苯丙酸1位，異丁苯丙酸1位，以及未知藥物2位)亦帶有該對偶基因。特別一提，17位在接受苯妥英後發展出SJS/TEN之患者中有8位(47.05%)亦帶有HLA-B*1502對偶基因。另一方面，該對偶基因在卡馬西平耐受組患者中出現的頻率僅為4.1%(3/73)，苯妥英耐受組為0%(0/32)，罹患SJS以外之較溫和藥物不良反應為6.3%(9/142)，而一般族群的出現頻率則為5.3%(5/94)。採用耐受組作為對照組時，與卡馬西平-所誘發SJS/TEN相關之B*1502之風險對比值、靈敏度、專一性、正預估值及負預估值分別為1712、100%、95.89%、96.0%與100%。與苯妥英所誘發SJS/TEN相關之B*1502之風險對比值、靈敏度、專一性、正預估值及負預估值分別為58、47%、100%、100%與65.35%。由於具有如此高度的預估值與靈敏度，此HLA-B對

偶基因之存在可用於判別出何者為藥物所誘發SJS/TEN(尤其是卡馬西平與苯妥英所誘發SJS/TEN)之高危險患者。

卡馬西平所誘發溫和不良反應被發現與另一種對偶基因HLA-B*4601相關。偵測HLA-B*4601的方法與上述之偵測HLA-B*1502或HLA-B*5801類似，係合成三組寡核苷酸引子或探針，利用即時聚合酶鏈鎖反應（Real-time PCR）或經結合之序列專一性寡核苷酸-酵素免疫連結吸附試驗（CSSO-ELISA）來偵測患者是否帶有HLA-B*4601，偵測標的係選自HLA-B*4601變異性最大區域（未圖示）。結果顯示，在16位對卡馬西平表現出此等較溫和反應之患者中，有10位(62.5%)患者帶有HLA-B*4601。相反地，該對偶基因在卡馬西平耐受組中的出現頻率僅為26%(19/73)。B*4601基因與卡馬西平所誘發較溫和皮膚藥物不良反應相關的風險對比值為4.73。因此，HLA-B*4601可用於評估卡馬西平對患者是否具有誘發溫和皮膚ADR之風險。

表四：患者出現卡馬西平所誘發皮膚藥物不良反應的表現型/基因型資料

ID	有嫌疑之藥物	表現型	HLA-B基因型
1	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3802
2	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3501
3	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4006
4	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3802
5	卡馬西平 苯妥英	SJS	B*1502/B*3802
6	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3802
7	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4001
8	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3901
9	卡馬西平	SJS	B*1502/B*5801
10	卡馬西平	SJS	B*1502/B*5801

11	卡馬西平	SJS	B*1502/B*1525
12	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4002
13	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4006
14	卡馬西平	SJS	B*1502/B*5801
15	卡馬西平	重疊 SJS/TEN	B*1301/B*1502
16	卡馬西平	重疊 SJS/TEN	B*1502/B*3501
17	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3802
18	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4601
19	卡馬西平	SJS	B*1301/B*1502
20	卡馬西平	SJS	B*1502/B*5801
21	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4601
22	卡馬西平 非固醇類消炎藥	SJS	B*1502
23	卡馬西平	SJS	B*1502/B*3501
24	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4601
25	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4601
26	卡馬西平	SJS	B*1502/B*5801
27	卡馬西平	SJS	B*1501/B*1502
28	卡馬西平	SJS	B*1502/B*4001
29	卡馬西平	SJS	B*1502
30	卡馬西平，美樂西 肯，速靈丹，苯妥英	SJS	B*1502/B*5801
31	卡馬西平	SJS	B*1502/4601
32	卡馬西平	SJS	B*1502/5801
33	卡馬西平	SJS	B*1502/4601
34	卡馬西平	SJS	B*1502/5502
35	卡馬西平	SJS	B*1502
36	卡馬西平 苯妥英	SJS	B*1502/4002
37	卡馬西平	SJS	B*1502/4001
38	卡馬西平	SJS	B*1502
39	卡馬西平 苯妥英	SJS	B*1502
40	卡馬西平	重疊 SJS/TEN	B*1502/4001
41	卡馬西平	重疊 SJS/TEN	B*1502/4601
42	卡馬西平	SJS	B*1502/3802
43	卡馬西平	斑丘疹	B*5801/B*4601
44	卡馬西平	多形性紅斑	B*4001/B*4601
45	卡馬西平	斑丘疹	B*1301/B*4001

46	卡馬西平	血管性水腫	B*4601/B*5401
47	卡馬西平	斑丘疹	B*4001/B*4601
48	卡馬西平，非固醇類 消炎藥	斑丘疹	B*4001/B*4001
49	卡馬西平	斑丘疹	B*1301/B*5502
50	卡馬西平	唇腫大、口腔與生殖器潰瘍	B*4601/B*5801
51	卡馬西平	斑丘疹	B*4601/B*5801
52	卡馬西平	血管性水腫	B*4001
53	卡馬西平	斑丘疹	B*4001/B*5101
54	卡馬西平	斑丘疹	B*1301/4001
55	卡馬西平	斑丘疹	B*4001/B*4601
56	卡馬西平	多形性紅斑	B*4601/B*5401
57	卡馬西平	斑丘疹	B*4601
58	卡馬西平	多形性紅斑	B*4601/5101

實例四：別嘌醇所導致之SJS/TEN與HLA-B*5801之相關性

HLA-B*5801對偶基因被發現與別嘌醇所誘發SJS/TEN有關。17位對別嘌醇出現SJS/嚴重ADR之患者均檢測到帶有HLA-B*5801對偶基因(100%)(表五與六)，但在台灣一般民眾中HLA-B*5801出現比率僅為18% (風險對比值155，敏感度100%，專一性82%，正預估值84.7%，負預估值100%， $P_c=3.7 \times 10^{-9}$)。這些結果顯示，HLA-B*5801對偶基因可單獨或與其他基因標記合併，用以評估服用別嘌醇之患者是否有發展出SJS/TEN之風險。

表五： 17位患有別嘌醇誘發之嚴重皮膚藥物不良反應的臺灣患者體內之HLA-B*5801頻率

對偶基因	患者 n=17	對照組1 ^a n=142	對照組2 ^b n=94	X ²	風險對比值 (odds ratio)	P _c
B*5801	17(100%)	26(18.3%)		47.2	153.86	2.1×10^{-10}
B*5801	17(100%)		17(18.0%)	41.7	155	3.7×10^{-9}

- a, 出現別嘌醇所誘發皮膚ADR以外之藥物不良反應之患者
- b, 台灣一般民眾
- X^2 , 經過葉慈校正之開方檢定後之P值
- Pc, 原始P值乘以所觀察到之HLA-B對偶基因數(35)之計算值。

表六：出現別嘌醇所誘發皮膚ADR之患者之表現型/基因型數據

患者ID	有嫌疑之藥物	表現型	HLA-B 基因型
59	別嘌醇	SJS	B*0705/B*5801
60	別嘌醇	SJS	B*4001/B*5801
61	別嘌醇	SJS	B*1554/B*5801
62	別嘌醇	SJS	B*3901/B*5801
63	別嘌醇	SJS	B*5801
64	別嘌醇	SJS	B*3901/B*5801
65	別嘌醇	SJS	B*3901/B*5801
66	別嘌醇	SJS	B*4001/B*5801
67	別嘌醇	SJS	B*1502/B*5801
68	別嘌醇	SJS	B*4001/B*5801
69	別嘌醇	SJS與腿部脈管炎	B*4601/B*5801
70	別嘌醇	SJS與苔蘚樣疹	B*4001/B*5801
71	別嘌醇	SJS	B*4002/B*5801
72	別嘌醇	SJS	B*4001/B*5801
73	別嘌醇	SJS	B*5101/B*5801
74	別嘌醇	SJS	B*1301/5801
75	別嘌醇	SJS	B*5801

實例五：別嘌醇所導致之HSS與HLA-B*5801之相關性

HLA-B*5801對偶基因也被發現與別嘌醇所誘發之過度敏感症候群(HSS)有關，其病徵為皮膚發疹(例如瀰漫性丘疹、剝落性皮膚炎)、發熱、嗜酸性白血球增多症、非典型循環性淋巴球、白血球增多症、急性肝損傷、或是腎功能惡化(Arellano et al., 1993)。

本研究中的31位患者中，患有SJS的有21位、SJS/TEN有3位、TEN有1位，以及有15位患有HSS。在納入本研究中所有的病例中，如果該藥物不良反應症候群病發於接觸別嘌醇後的兩個月內，以及該不良藥物症候群症狀隨著停藥消退，則認為別嘌醇是造成該病症之藥物。統計時，患者具有下列症狀任何之一者將被排除在外：再度接觸別嘌醇後無症狀，或是出現較溫和的皮膚出疹(症狀未達到HSS、SJS或是TEN之標準)患者。

在上述31位患者中，所有患者均在接觸別嘌醇後的兩個月內發生HSS症候群，其中有兩位患者在再度接觸別嘌醇的兩天後又病發。有12位患者接受除了別嘌醇之外的藥物，但是在他們的病歷中發現，患者在這種合併用藥的情況下，將其服用藥物去除別嘌醇後，患者則未出現藥物不良反應。所有的患者均患有高尿酸血症且/或痛風、以及其他慢性疾病，包括高血壓(14/31)、慢性腎病(16/31)、及糖尿病(9/31)。

在服用別嘌醇至少6個月仍未出現藥物不良反應症候群的98位痛風患者則納入可耐受別嘌醇之對照組(服藥平均時間為38個月，範圍為6-107個月)。耐受對照組中的性別比例與一般中國人的痛風普行率相當。此外，本研究更進一步地納入93位正常民眾做為正常對照組。上述三組之人口統計學資料如表七所示。

表七：嚴重藥物不良反應患者組、耐受對照組、以及正常民眾的人口統計學資料、服用別嘌醇的劑量與時間

	嚴重藥物不良反應 (n=31)	耐受對照組 (n=98)	正常民眾 (n=93)
性別			
男性	12	89	52
女性	19	9	41
年齡 (歲)			
中位數 (範圍)	57.9 (18-91)	57.3 (21-84)	53.9 (22-91)
服用別嘌醇的劑量(毫克/天)			
中位數 (範圍)	143.3 (50-300)	159.2 (100-400)	無
服用別嘌醇的時間			
中位數 (範圍)	28.2 天(1-56)	38 個月 (6-107)	無

在31位得到由別嘌醇誘發之藥物不良反應的患者均帶有(100%)HLA-B*5801對偶基因，98位可耐受別嘌醇之患者中有16位(16.3%)帶有HLA-B*5801對偶基因(風險對比值315， $P<10^{-15}$)，93位正常中有19位(20%)帶有HLA-B*5801對偶基因(風險對比值241， $P<10^{-13}$)。與耐受對照組相比，對於別嘌醇誘發之藥物不良反應，HLA-B*5801的缺失其負預估值為100%，而HLA-B*5801的存在其正預估值為66%。因此，由於具有如此高度的專一性(84%)與靈敏度(100%)，HLA-B*5801之存在可用於判別出何者為對別嘌醇所誘發嚴重藥物不良反應(包含皮膚藥物不良反應，例如SJS/TEN或HSS，以及別嘌醇所誘發之DRESS(drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms))之高危險患者。

實例六：HLA-B*1502或HLA-B*5801之等效基因標記(Genetic markers Equivalent)

接近所需HLA對偶基因之基因標記傾向於共同分離(co-segregate)，或與所需對偶基因出現一連鎖不平衡狀態

(linkage disequilibrium)。因此，此等標記(等效基因標記)之存在即代表該對偶基因之存在。

為了測試藥物不良反應之患者帶有等效基因標記之好發率，本研究測定HLA-B*1502單倍體中數種標記與藥物不良反應之相關性。事實上，HLA-B*1502單倍體之HLA標記，如：DRB1*1202、Cw*0801、Cw*0806、A*1101與MICA*019，在曾接觸過卡馬西平之SJS/TEN患者中具有顯著較高之出現頻率(表八)。

表八：B*1502祖傳單倍體之標記與藥物不良反應之相關性

	卡馬西平 SJS/TEN (n=42)	卡馬西平 輕微症狀 (n=16)	卡馬西平 耐受 (n=73)	別嘌醇1 SJS/TEN (n=17)	一般大眾 (n=94)
HLA-B*1502	42 (100%)	0 (0%)	3 (4.1%)	1 (5.8%)	5 (5.3%)
HLA-Cw*0801	38 (90%)	ND	10 (13.7%)	2 (11.7%)	10 (10.6%)
HLA-Cw*0806	3 (7.1%)	ND	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
HLA-A*1101	31 (73.8%)	ND	ND	ND	28 (29.8%)
HLA-DRB1*1202	35 (83.3%)	ND	ND	ND	19 (20.2%)

本研究也判定與HLA-B*5801相關之標記。在四位為HLA-B*5801同型合子的患者中研究其對偶基因分佈，而其祖傳單倍體被定義為包括HLA-A*3303、Cw*0302、B*5801、與DRB1*0301。31位患有別嘌醇所誘發藥物不良反應之患者中，有12位(38.7%)帶有此祖傳單倍體(表九)，但是只有7.1%的耐受組患者以及9.7%的正常民眾帶有此祖傳單倍體。

表九：HLA-B*5801 祖傳單倍體之單獨或組合基因位點在別嘌醇誘發藥物不良反應患者、別嘌醇耐受患者、以及正常大眾中的出現頻率

	別嘌醇誘發藥物不良反應組 (n=31)	別嘌醇耐受組 (n=98)	正常大眾 (n=93)
B*5801	31 (100%)	16 (16.3%) ¹	19 (20.4%) ²
Cw*0302	29 (93.5%)	15 (15.3%)	19 (20.4%)
A*3303	20 (64.5%)	18 (18.4%)	20 (21.5%)
DRB1*0301	21 (67.7%)	14 (14.3%)	14 (15.1%)
B*5801, Cw*0302	29 (93.5%)	15 (15.3%)	19 (20.4%)
B*5801, Cw*0302, A*3303	20 (64.5%)	13 (13.3%)	16 (17.2%)
B*5801, Cw*0302, DRB1*0301	19 (61.3%)	9 (9.2%)	10 (10.8%)
B*5801, Cw*0302, A*3303, DRB1*0301	12 (38.7%)	7 (7.1%)	9 (9.7%)

¹風險對比值 (別嘌醇誘發藥物不良反應組/耐受組): 315 (95% CI, 18.3-5409.5), $p_c = 7.5 \times 10^{-16}$.

²風險對比值(別嘌醇誘發藥物不良反應組/正常大眾組): 241 (95% CI, 14.1-4111), $p_c = 6.1 \times 10^{-14}$.

本研究也使用短序列重複多型性(short tandem repeat polymorphism, STRP)試驗決定HLA-B*5801此MHC標記之表現。簡言之，由NCBI資料庫中選擇20個位於MHC區域內具有高度多型性的微衛星標記(microsatellite marker)，如：D6S258、D6S2972、D6S510、D6S265、D6S388、D6S2814、HLAC_CA1、HLABC_CA2、MIB、MICA、TNFd、BAT2 CA、D6S273、D6S1615、DQCAR、G51152、D6S2414、D6S1867、D6S1560、以及D6S1583。此等標記之平均異質性為0.72，預期長度為230kb。

依據資料庫中資料設計引子以實施聚合酶連鎖反應，來增幅並偵測患者體內是否帶有上述標記。實驗使用GeneAmp 9700自動梯度溫度循環調控機(美商應用生命系統, Foster City, CA, USA)，反應體積為5微升，反應試管中含有10奈克的基因組DNA，各引子的濃度為0.33微莫爾濃度。將至多6個具有適當長度且顯示出螢光訊號的聚合酶連鎖反應產物，在實施毛細管電泳之前混合。使用ABI 3730 DNA定序儀(美商應用生命系統)進

行電泳來判定該多型性產物的長度，並使用LIZ500尺寸標準做為內部長度基準(美商應用生命系統)，使用GENMAPPER(美商應用生命系統)第三版來計算對偶基因長度。使用SAS程式來進行對偶基因的分型與掃描。所有基因組定型實驗中，使用3個CEPH對照個體(1331-01、1331-02、1347-2)以及H20做為品質控制之用。

使用連鎖不平衡的方式進行分析，發現到在別嘌醇誘發藥物不良反應患者組別中，有一對偶基因區塊落於HLA-C與TNFd之間，但是在別嘌醇耐受組中並無此發現。在此區塊中，辨識出靠近HLA-B對偶基因處有一單倍體(MIC*358-MICA*206-TNFd*140)。此單倍體與藥物不良反應之關聯性和HLA-B*5801與該相同藥物不良反應之關聯性一致($p=0.0018$)。藉由使用STRP標記以及將MICA對偶基因做定序，在所有的別嘌醇誘發藥物不良反應患者體內均帶有該相同的B對偶基因(B*5801)、MICA對偶基因(MICA*00201)、以及TNF STRP標記(TNFd*140)。除了一位患者外，其餘所有患者均帶有該相同的MIB標記(MIB*358)。

實例七：卡馬西平反應之T細胞對奧卡西平與利卡西平的交錯反應

兩位患有卡馬西平誘發SJS/TEN之患者係來自長庚紀念醫院，其中一位患者帶有HLA-B*1502/B*4601，另一位則帶有HLA-B*1502/B*5101。使用PUREGENE DNA純化系統(Gentra system, Minnesota, USA)自患者體內抽取基因組DNA，患者的HLA-B對偶基因基因型則是使用序列專一性寡核苷酸(SSO)片段進行「逆向直線墨點分析法」(DYNAL Biotech Ltd.,

Bromborough, U.K.)來鑑定。

使用 Ficoll-Isopaque(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)密度梯度離心法自患者體內分離出周邊血液單核球(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)，其中一部分的周邊血液單核球用鼻咽癌病毒(Epstein-Bar virus)感染後轉型，以建立自體B細胞株。

增殖對卡馬西平有反應之T細胞的方法如下所述：由該患者體內製備之周邊血液單核球培養於完整RPMI(Sigma)培養液(內含10%經過加熱去活化的人類血清、25單位/毫升的介白素-2(IL-2)，以及25微克/毫升的卡馬西平)之中，並將其置於37°C、含有5%二氧化碳的恆溫培養箱中培養七天。在卡馬西平存在的狀態下，加入經放射線照射(50Gy)後之自體B細胞共同培養10天，以增殖該T細胞。經過2輪上述之共同培養步驟之後，收集該經卡馬西平活化之T細胞，進行酵素連結免疫點漬試驗(ELISPOT)(eBioscience)。

測試該卡馬西平活化之T細胞對於下列化合物的交錯反應性：10, 11-環氧卡馬西平、奧卡西平(商品名：除癲達(Trileptal))、利卡西平，以及蘇林酸(sunlindac)。簡言之， 5×10^3 顆T淋巴球與 5×10^4 顆自體B細胞於200微升的RPMI培養液中(內含10%胎牛血清)相互混合，並加入或不加入一待測化合物。之後將上述之細胞置於一酵素連結免疫點漬試驗(ELISPOT)試驗盤的培養孔中培養24小時，該試驗盤上塗有抗干擾素- 抗體(Millipore)。經過培養後，收集培養細胞之上清液。使用一抗體試驗方式偵測上清液所含之的干擾素- ，該抗體試驗方式為一習知技藝。

本研究之實驗結果顯示，對卡馬西平有反應之T細胞對於

10, 11-環氧卡馬西平、奧卡西平、利卡西平亦具有交錯反應性，但對於蘇林酸(sunlindac)則不具交錯反應性。

於本說明書中所揭露之特徵可以任何方式加以組合，且各個特徵可被一具有相同、等效，或相似功效之特徵所取代。因此，除非額外加以說明，所揭露之特徵僅為由等效或相似之特徵組成之系列其中之一例。

以上所述僅為本創作之較佳實施例而已，並非用以限定本發明之申請專利權利；同時以上的描述，對於熟知本技術領域之專門人士應可明瞭及實施，因此其他未脫離本創作所揭示之精神下所完成的等效改變或修飾，均應包含在下述之申請專利範圍中。

【圖式簡單說明】

圖一係為判定是否帶有HLA-B*1502基因之區域1至6核酸序列圖；

圖二係為判定是否帶有HLA-B*5801基因之區域1至6核酸序列圖；以及

圖三係為經結合之序列專一性寡核苷酸-酵素免疫連結吸附試驗之步驟之示意圖。

補充序列表

<110> 中央研究院、世基生物醫學股份有限公司

<120> 一種判定患者是否帶有 HLA-B*1502 或 HLA-B*5801 對偶基因之方法、試劑組及 判定患者是否帶有 HLA-B*4601 之試劑組、一種評估患者是否具有針對藥物發展出不良 藥物反應風險之方法，以及一種決定化合物是否成為誘導帶有不良藥物反應關連 HLA 對偶基因 的患者，發生不良藥物反應之藥物候選物的決定方法

<140> 096116910

<141> 2007-05-11

<160> 5

<210> 1 (HLA-B*1502)

<211> 297

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 相當 HLA-B*1502 的外顯子 (exon) 2 表現序列中變異性之區域及其後的內含子，其中 240 與 241 位置為外顯子 2 與內含子 (intron) 之間的結合區域 (junction)

<400> 1

```
GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCTACACCG CCATGTCCCG GCCCGGCCGC GGGGAGCCCC 60
GCTTCATCGC AGTGGGCTAC GTGGACGACA CCCAGTTCGT GAGGTTCGAC AGCGACGCCG 120
CGAGTCCGAG GATGGCGCCC CGGGCGCCAT GGATAGAGCA GGAGGGGCCG GAGTATTGGG 180
ACCGGAACAC ACAGATCTCC AAGACCAACA CACAGACTTA CCGAGAGAGC CTGCGGAACC 240
TGCGCGGCTA CTACAACCAG AGCGAGGCCG GGTCTCACAT CATCCAGAGG ATGTATG 297
```

<210> 2 (HLA-B*1502)

<211> 249

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 相當 HLA-B*1502 的外顯子 3 表現序列中變異性之區域

<400> 2

```
GCTGCGACGT GGGGCCGGAC GGGCGCCTCC TCCGCGGGTA TGACCAGTCC GCCTACGACG 60
GCAAGGATTA CATCGCCCTG AACGAGGACC TGAGCTCCTG GACCGCGGCG GACACGGCGG 120
CTCAGATCAC CCAGCGCAAG TGGGAGGCGG CCCGTGAGGC GGAGCAGCTG AGAGCCTACC 180
TGGAGGGCCT GTGCGTGGAG TGGCTCCGCA GATACCTGGA GAACGGGAAG GAGACGCTGC 240
```

AGCGCGCGG

249

<210> 3 (HLA-B*5801)

<211> 246

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 相當 HLA-B*5801 的外顯子 2 表現序列中變異性之區域

<400>3

GCTCCCACTC CATGAGGTAT TTCTACACCG CCATGTCCCG GCCCGGCCGC GGGGAGCCCC 60
GCTTCATCGC AGTGGGCTAC GTGGACGACA CCCAGTTCGT GAGGTTCGAC AGCGACGCCG 120
CGAGTCCGAG GACGGAGCCC CGGGCGCCAT GGATAGAGCA GGAGGGGCCG GAGTATTGGG 180
ACGGGGAGAC ACGGAACATG AAGGCCTCCG CGCAGACTTA CCGAGAGAAC CTGCGGATCG 240
CGCTCC 246

<210> 4 (HLA-B*5801)

<211> 67

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 相當 HLA-B*5801 的外顯子 2 表現序列中變異性之區域與其後的內含子，其中 23 與 24 位置為外顯子 2 與其後的內含子之間的結合區域

<400> 4

GCTACTACAAC CAGAGCGAGG CCGGGTCTCA CATCATCCAG AGGATGTATG GCTGCGACCT 60
GGGGCCC 67

<210> 5 (HLA-B*5801)

<211> 232

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 相當 HLA-B*5801 的外顯子 3 表現序列中變異性之區域

<400> 5

GACGGGCGCC TCCTCCGCGG GCATGACCAG TCCGCCTACG ACGGCAAGGA TTACATCGCC 60
CTGAACGAGG ACCTGAGCTC CTGGACCGCG GCGGACACCG CGGCTCAGAT CACCCAGCGC 120

-
.
AAGTGGGAGG CGGCCC GTGT GCGGAGCAG CTGAGAGCCT ACCTGGAGGG CCTGTGCGTG 180
.
GAGTGGCTCC GCAGATACCT GGAGAACGGG AAGGAGACGC TGCAGCGCGC GG 232
.

.

.

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種決定某些特定HLA對偶基因（例如HLA-B*1502或HLA-B*5801）存在之方法，及一種可實施本方法之試劑組。本發明並同時揭露一種評估患者是否具有發展因某個基因標記的存在或缺失（例如HLA-B*1502、HLA-B*5801，或是HLA-B*4601）而導致的藥物不良反應（例如史狄芬-強生徵候群、毒性表皮壞死溶解症，或是過度敏感症候群）風險之方法。

六、英文發明摘要：

This invention relates to a method of determining the presence of certain HLA alleles, such as HLA-B*1502 or HLA-B*5801, and a kit for carrying out this method. Also disclosed is a method for assessing whether a patient is at risk for developing adverse drug reactions (e.g., Stevens-Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis, or hypersensitivity syndrome) based on the presence or absence of a genetic marker (e.g., HLA-B*1502, HLA-B*5801, or HLA-B*4601).

十、申請專利範圍：

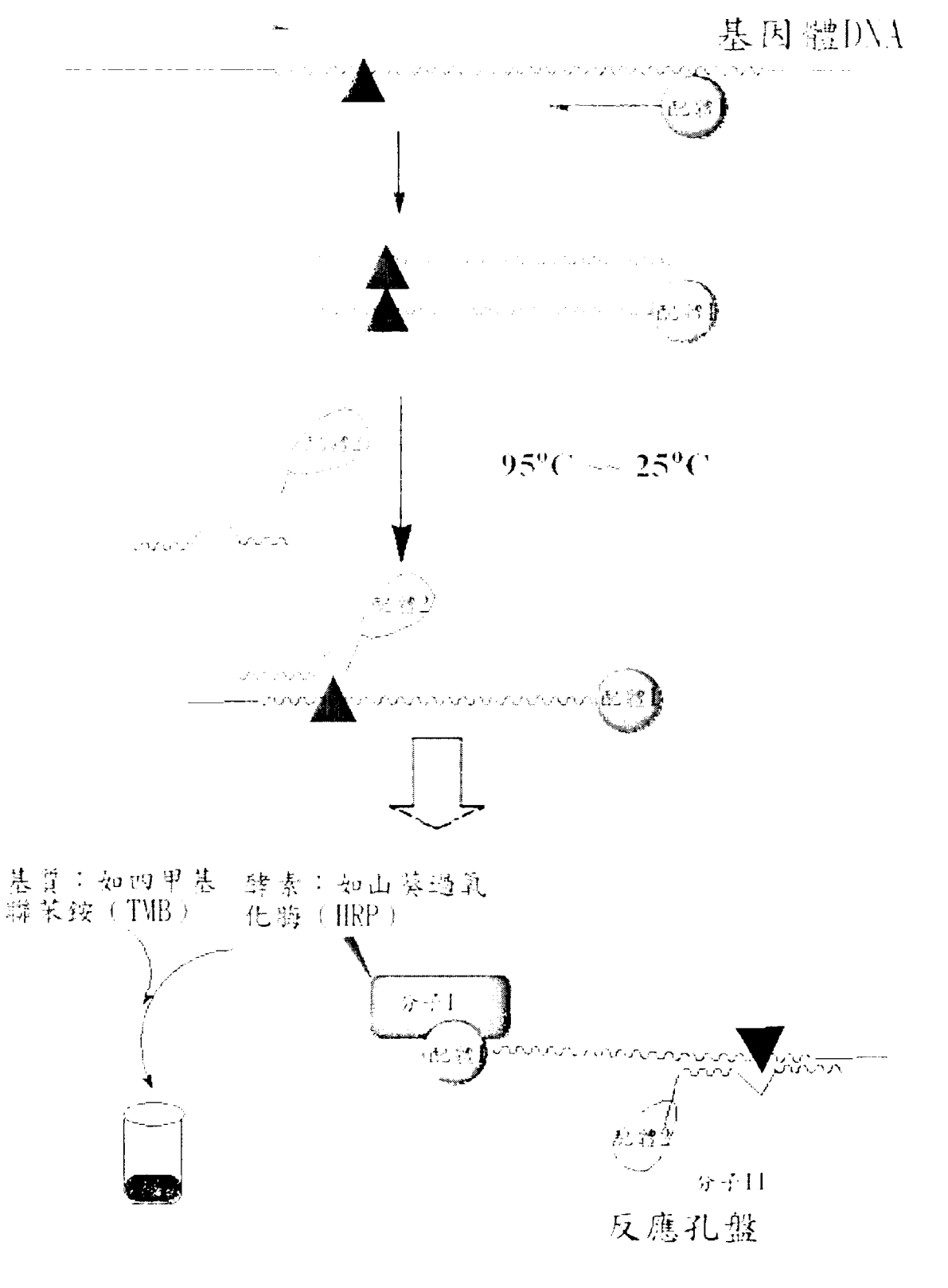
1. 一種評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，該方法之步驟包括：
 - (a).自該患者取得一生物檢體；以及
 - (b).測定該生物檢體中是否存在與該藥物不良反應相關之HLA-B*1502對偶基因及與該HLA-B*1502對偶基因等效基因標記任一者，其中該HLA-B*1502對偶基因及與該HLA-B*1502對偶基因等效基因標記任一者為存在，即表示該患者具有針對該藥物發展出藥物不良反應之風險，其中，該藥物不良反應係選自以下所組組群之一者：史狄芬-強生徵候群(SJS)及毒性表皮壞死溶解(TEN)，且該藥物為奧卡西平、或利卡西平。
2. 依據申請專利範圍第1項之評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，其中該藥物為利卡西平。
3. 依據申請專利範圍第1項之評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，其中該生物檢體為一基因組DNA。
4. 依據申請專利範圍第3項之評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，其中測定該基因組DNA中是否存在與該藥物不良反應相關之HLA-B*1502對偶基因及與該HLA-B*1502對偶基因等效基因標記任一者，係藉由一寡核苷酸與該HLA-B*1502對偶基因進行專一性雜交之結果而定。
5. 依據申請專利範圍第3項之評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，其中該基因組DNA之來源係選自該患者之血液、唾液、尿液及毛髮之任一者。
6. 依據申請專利範圍第1項之評估患者是否具有針對一藥物發展

出藥物不良反應風險之方法，其中該生物檢體之來源係為該患者之週邊血液（peripheral blood）。

7. 依據申請專利範圍第1項之評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，其中該藥物不良反應係為史狄芬-強生徵候群(SJS)。
8. 依據申請專利範圍第1項之評估患者是否具有針對一藥物發展出藥物不良反應風險之方法，其中該藥物不良反應係為毒性表皮壞死溶解(TEN)。

HLA-B*1502 亚型与 2 号外显子多态性表现型

一



圖三

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)