



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 603 19 719 T2 2009.03.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 549 770 B1

(51) Int Cl.⁸: C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: 603 19 719.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP03/10798

(96) Europäisches Aktenzeichen: 03 779 798.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2004/029618

(86) PCT-Anmeldetag: 29.09.2003

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 08.04.2004

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 06.07.2005

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 12.03.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 12.03.2009

(30) Unionspriorität:

415123 P 30.09.2002 US

(73) Patentinhaber:

Novartis AG, Basel, CH

(74) Vertreter:

Spott, Weinmiller & Böhm, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR

(72) Erfinder:

KUDARAVALLI, Sridhar, Chicago, IL 60615, US;
POLYMEROPoulos, Mihael Hristos, Potomac,
MD 20854, US; TORRES, Rosarelis, Bethesda, MD
20814, US; WOLFGANG, Curt Douglas,
Germantown, MD 20874, US

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VORAUSSAGE DER ERHÖHUNG VON CHOLESTERIN WÄHREND EINER IM-
MUNOSUPPRESIVEN THERAPIE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung gehört zu den Gebieten einer Pharmakologie und Medizin und schafft Verfahren für eine Bestimmung, welche Patienten während einer Behandlung mit einem Immunsuppressivum erhöhte Serumcholesterinspiegel entwickeln. Besonders bezieht sich diese Erfindung auf die Anwendung einer genomen Analyse zur Identifikation von Risikopatienten für eine Entwicklung erhöhter Cholesterinspiegel während einer Therapie mit einem Immunsuppressivum und auf Verfahren zur Bestimmung optimaler Behandlungsstrategien für diese Patienten.

Beschreibung des einschlägigen Standes der Technik

[0002] Immunsuppressiva haben in der modernen Medizin viele wichtige Anwendungen. Diese Arzneimittel werden verwendet zur Suppression der Abstoßung transplantiertener Organe unter Einschluss von Herzen, Lungen und Nieren, um die Lebensdauer des transplantierten Organs zu verlängern. Darüber hinaus werden Immunsuppressiva auch verwendet zur Behandlung einer breiten Vielfalt anderer Krankheiten, wie Autoimmunkrankheiten, Myocarditis und rheumatoider Arthritis. Allerdings haben die Immunsuppressiva zahlreiche und gelegentlich auch schwere Nebeneffekte, die unter anderem Krebs und Lymphome hervorrufen und eine Reihe toxischer Effekte auf innere Organe verursachen, wie auf die Niere.

[0003] Infolge des toxischen Effekts der immunsuppressiven Wirkstoffe werden große Anstrengungen unternommen, um weniger toxische Alternativen zu entwickeln und Wirkstoffe zu finden, deren Wirkungsmechanismus sich von dem der anderen Immunsuppressiva unterscheidet, so dass synergistische Kombinationen mit weniger Gesamtnebenwirkungen verwendet werden können.

[0004] Vor kurzem wurde ein antifungales antitumorales und immunsuppressives Antibiotikum, das als Rapamycin bezeichnet wird und auch als Sirolimus und Rapamun^R bekannt ist, gefunden, das wirksam ist zur Inhibition einer Allograftabstoßung. Rapamycin hat einen Wirkungsmechanismus, der einmalig und ausgeprägt unterschiedlich ist von dem Wirkungsmechanismus anderer Immunsuppressiva. Rapamycin und dessen Derivate, wie Everolimus (Certican^R) (RAD) wirken durch Inhibition der biochemischen Wege, die bei der G1-S Phasenprogression aktiver T Zellen in einer von Ca^{2+} unabhängigen Weise involviert sind, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf Schuler et al., Transplantation, Band 64, Seiten 36 bis 42 (1997). Bei diesem Weg blockieren Rapamycin-Derivate, wie Everolimus, eine Cytokinsignaltransduktion mehr als eine Blockierung der Produktionen von Cytokinen, wie dies bei anderen Immunsuppressiva, wie Cyclosporin, der Fall ist.

[0005] Rapamycin und seine Derivate sowie Mycophenolsäure sind wirksame immunsuppressive Mittel, wobei sich aber bei gewissen Patienten gezeigt hat, dass die Verabreichung dieser Wirkstoffe Erhöhungen von Serumcholesterin und Triglyceriden verursacht, wie eine Hypercholesterolemie und eine Hyperlipidämie. Bei dieser Zustände sind Risikofaktoren für eine Coronararterienkrankheit (CAD) und eine Atherosklerose im Allgemeinen, was speziell für Diabetespatienten gilt.

[0006] Hypercholesterolemie selbst ist ein üblicher Zustand, der mit mehreren größeren Wirkstoffklassen behandelt werden kann. Hierzu gehören die HMG-CoA Reduktaseinhibitoren oder die so genannten Statine, die Gallensäure-bindenden Harze und die Nikotinsäure.

[0007] In Nephron (2000) 84, Seiten 333 bis 341, wird von Radeau et al. die Evaluierung der Effekte eines Tag1B Polymorphismus im CETP Gen (Allele B1, B2) auf die HDL-C Spiegel bei 78 männlichen Nierentransplantatpatienten beschrieben, die einer Behandlung mit einem Immunsuppressivum unterzogen worden sind.

[0008] Erhöhte Serumcholesterinspiegel während einer Behandlung mit einem Immunsuppressivum, wie mit Rapamycin oder Derivaten hiervon unter Einschluss von, aber ohne Beschränkung auf Everolimus (Certican^R) (RAD) oder mit Mycophenolsäure sind ernsthafte Nebeneffekte. Dies gilt besonders für Organtransplantatpatienten, da diese Patienten eine Langzeitbehandlung (allgemein lebenslang) benötigen. Die Erhöhung der Serumcholesterinspiegel variiert breit von Patient zu Patient, wobei vor der vorliegenden Erfindung keine Vorhersage möglich war, welche Patienten diese Erhöhungen entwickeln würden. Es besteht daher ein Bedarf an Verfahren für eine Vorhersage, welche Patienten Erhöhungen im Serumcholesterin erfahren, wenn ihnen Immunsuppressiva, wie Rapamycin und dessen Derivate oder Mycophenolsäure, besonders für eine Langzeitanwendung, verabreicht werden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung überwindet das obige Problem durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Bestimmung des Ausmaßes einer Cholesterinerhöhung im Serum, die bei einem Patienten während einer Behandlung mit einer immunsuppressiven Medikation auftritt, umfassend eine Bestimmung für die zwei im Patienten vorhandenen Kopien des IL-1 β Gens der Identität eines Nukleotidpaars, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus dem Nukleotidpaar an der polymorphen Stelle –511 C → T (an der Position 1423 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare AT sind, einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung, falls ein Paar AT ist und ein Paar GC ist, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare GC sind, und des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –31 T → C (Position 1903 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare CG sind, einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung, falls ein Paar AT ist und ein Paar GC ist, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare AT sind.

[0010] Weiter wird ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einer immunsuppressiven Medikation beschrieben, umfassend eine Bestimmung für die zwei im Patienten vorhandenen Kopien des IL-1 β Gens der Identität eines Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –511 C → T (Position 1423 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und eine Behandlung des Patienten mit der immunsuppressiven Medikation, wenn beide Paare GC sind, und unter Anwendung einer alternativen Methode, wenn ein Paar AT ist und ein Paar GC ist, oder wenn beide Paare AT sind. Die immunsuppressive Medikation kann aus der Liste in der später folgenden Tabelle 2 ausgewählt werden und kann eine Behandlung mit Everolimus sein. Darüber hinaus kann die alternative Behandlung einen Zusatz einer Cholesterin-senkenden Medikation umfassen, die aus der Liste in der später folgenden Tabelle 1 ausgewählt ist.

[0011] Weiter wird ein Verfahren zur Bestimmung des Ausmaßes einer Cholesterinerhöhung im Serum beschrieben, das bei einem Patienten während einer Behandlung mit einer immunsuppressiven Medikation auftritt, umfassend eine Bestimmung für die zwei im Patienten vorhandenen Kopien des IL-1 β Gens der Identität eines Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –31 T → C (Position 1903 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare CG sind, einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung, falls ein Paar AT ist und ein Paar GC ist, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare AT sind.

[0012] Ferner wird ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einer immunsuppressiven Medikation beschrieben, umfassend eine Bestimmung der zwei im Patienten vorhandenen Kopien des IL-1 β Gens der Identität eines Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –31 T → C (Position 1903 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und eine Behandlung des Patienten mit der immunsuppressiven Medikation, falls beide Paare AT sind, und eine Anwendung einer alternativen Behandlung, falls ein Paar AT ist und ein Paar GC ist oder falls beide Paare CG sind. Diese immunsuppressive Medikation kann aus der Liste in der später folgenden Tabelle 2 ausgewählt und auch Everolimus sein. Ferner kann die alternative Behandlung die Addition einer Cholesterin-senkenden Medikation umfassen, die aus der Liste der später folgenden Tabelle 1 ausgewählt ist.

[0013] Weiter wird ein Bausatz zur Bestimmung des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –511 im IL-1 β Gen eines Patienten beschrieben, der umfasst ein Behältnis, das wenigstens ein Reagenz enthält, das für eine Detektion der Art des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –511 in einem IL-1 β Gen spezifisch ist, und Instruktionen für empfohlene Behandlungsoptionen auf Basis der Art dieses Nukleotidpaars.

[0014] Darüber hinaus wird ein Bausatz zur Bestimmung des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –31 im IL-1 β Gen eines Patienten beschrieben, wobei dieser Bausatz umfasst ein Behältnis, das wenigstens ein Reagenz enthält, das für eine Detektion der Art des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle –31 des IL-1 β Gens spezifisch ist, und Instruktionen für empfohlene Behandlungsoptionen auf Basis der Art dieses Nukleotidpaars.

[0015] Ferner wird ein Verfahren zur Bestimmung des Ausmaßes einer Cholesterinerhöhung im Serum beschrieben, die bei einem Patienten während einer Behandlung mit einer immunsuppressiven Medikation auftritt, umfassend eine Bestimmung für die zwei Kopien, die das IL-1 β Gen enthalten und im Patienten vorhanden sind, des Haplotyps bezüglich des IL-1 β Gens. Unter einem Haplotype bezüglich des IL-1 β Gens soll der Hap-

lotyp verstanden werden, der besteht aus einer Kombination an Polymorphismus in der -511 Position und dem Polymorphismus in der -31 Position des IL-1 β Gens. Der Patient würde einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung zugeordnet, falls beide Chromosomen den Haplotyp für ein hohes Cholesterin enthalten, nämlich bei T für C an der Stelle -511 und bei C für T an der Stelle -31 des IL-1 β Gens, und der Patient würde einer Gruppe mit einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung zugeordnet, falls eines der Chromosomen den Haplotyp mit hohem Cholesterin und eines der Chromosomen den Haplotyp mit niedrigem Cholesterin enthält, und der Patient würde einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung zugeordnet, falls beide Chromosomen einen Haplotyp mit niedrigem Cholesterin enthalten, nämlich für C an der Stelle -511 und für T an der Stelle -31.

[0016] Weiter wird ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einer immunsuppressiven Medikation beschrieben, umfassend eine Bestimmung für die zwei im Patienten vorhandenen Chromosomen, die das IL-1 β Gen enthalten, des Haplotyps bezüglich des IL-1 β Gens, und eine Behandlung des Patienten mit einer immunsuppressiven Medikation, falls beide Chromosomen den Haplotyp niedriges Cholesterin enthalten, oder falls ein Chromosom den Haplotyp niedriges Cholesterin enthält und ein Chromosom den Haplotyp hohes Cholesterin enthält, und eine Anwendung einer alternativen Behandlung, falls beide Chromosomen den Haplotyp hohes Cholesterin enthalten. Die immunsuppressive Medikation kann aus der Liste in der späteren Tabelle 2 ausgewählt und auch Everolimus sein. Die alternative Behandlung kann den Zusatz einer Cholesterin-senkenden Medikation umfassen, die aus der Liste in der späteren Tabelle 1 ausgewählt ist.

[0017] Ferner werden Verfahren zur Bestimmung der Identität des Nukleotidpaars an der Stelle -511 und -31 des IL-1 β Gens bei einem Patienten, oder des Haplotyps des IL-1 β Gens bei einem Patienten durch Auffindung der SNPs irgendwo im Chromosom beschrieben, die sich im Verknüpfungsungleichgewicht mit dem -511 Polymorphismus oder dem -31 Polymorphismus im IL-1 β Gen befinden und unter Anwendung der Beziehung dieses SNP oder dieser SNPs zur Bestimmung der Art des Nukleotidpaars oder des jeweils interessierenden Haplotyps, und durch Anwendung dieser Information zur Abschätzung einer Cholesterinerhöhung während einer IM Therapie und zur Erstellung von Behandlungsempfehlungen beschrieben.

[0018] Weiter wird ein Bausatz zur Bestimmung der Art des Haplotyps des IL-1 β Gens beschrieben, wobei dieser Bausatz umfasst ein Behältnis, das wenigstens ein Reagenz enthält, das für eine Detektion der Art des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle -511 des IL-1 β Gens spezifisch ist, und ein Behältnis, das wenigstens ein Reagenz enthält, das für eine Detektion der Art des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle -31 des IL-1 β Gens spezifisch ist, und Instruktionen zur Bestimmung des Haplotyps aus den obigen Ergebnissen sowie Instruktionen für empfohlene Behandlungsoptionen auf Basis der Art des indizierten Haplotyps.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0019] [Fig. 1](#): Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD 6251 kombiniert sind.

[0020] [Fig. 2](#): Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD 8251 kombiniert sind.

[0021] [Fig. 3](#): Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der HDL Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD 6251 kombiniert sind.

[0022] [Fig. 4](#): Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der HDL Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD 8251 kombiniert sind.

[0023] [Fig. 5](#): Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der LDL Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD B251 kombiniert sind.

[0024] [Fig. 6](#): Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der LDL Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD B251 kombiniert sind.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0025] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung des Ausmaßes einer Cholesterinerhöhung im Serum, die bei einem Patienten während einer Behandlung mit einer immunsuppressiven Medikation (IM) auftritt, wie mit Rapamycin oder dessen Derivaten.

[0026] Bei einer Ausführungsform wird einem Patienten, der ein potentieller Kandidat für eine Behandlung mit einer IM ist, Blut entnommen für eine Bestimmung der Anwesenheit eines Polymorphismus, nämlich von Cytosin (C) → Thymin (T) an der Nukleotidposition –511 (in der Promotorregion mit keiner Aminosäureveränderung), dies ist eine C → T Veränderung an der Nukleotidposition 1423 der Sequenz X04500, in der zwei Kopien des Gens von Interleukin-1-beta (IL-1 β) im Patienten vorhanden sind. Ist das Nukleotidpaar an der Position –511 AT in beiden Kopien des Gens, dann erfährt der Patient eine starke Erhöhung der Cholesterinspiegel im Serum während einer Behandlung mit einer IM.

[0027] Ist das Nukleotidpaar in der Stellung –511 AT in einer Kopie und CG in der anderen Kopie, dann hat der Patient eine unmittelbare Erhöhung in den Cholesterinspiegeln während einer Behandlung mit einer immunsuppressiven Medikation.

[0028] Ist das Nukleotidpaar GC an beiden Kopien der Position –511, dann hat der Patient eine niedrige Erhöhung der Cholesterinspiegel im Serum während einer Behandlung mit einer IM.

[0029] Bei einer anderen Ausführungsform würde eine Bestimmung, welche Medikationen für eine Behandlung eines behandlungsbedürftigen Patienten mit einer IM verwendet werden, basieren auf den Ergebnissen der Bestimmung der Art der Nukleotidpaare an der Position –511 im IL-1 β Gen, das im Patienten vorhanden ist.

[0030] Sind beide Nukleotidpaare GC, dann würde der Patient mit einer IM behandelt. Diese Medikation mit einem Immunsuppressivum wäre irgendeine Behandlung mit Mitteln, wie sie in der Tabelle 2 gezeigt sind, unter Einschluss von Rapamycin oder dessen Derivaten unter Einschluss von unter anderem, aber ohne Beschränkung auf Everolimus (Certican^R) (RAD).

[0031] Sind beide Nukleotidpaare AT oder ist ein Paar AT und ein Paar GC, dann würde der Patient mit einer alternativen Medikation behandelt, die die Cholesterinspiegel nicht erhöht, oder der Patient würde alternativ zusätzlich zur IM mit einem Cholesterin-senkenden Wirkstoff behandelt, wobei die Cholesterinspiegel des Patienten während einer solchen Behandlung überwacht würden. Dieser Cholesterin-senkende Wirkstoff, der in Kombination mit einer IM verwendet werden würde, könnte eine oder mehr der Medikationen sein, wie sie aus der Liste in der später folgenden Tabelle 1 ausgewählt sind.

[0032] Bei einer weiteren Ausführungsform würde einem Patienten, der ein möglicher Kandidat für eine Behandlung mit einer IM ist, eine Blutprobe entnommen für eine Bestimmung der Anwesenheit eines Polymorphismus T → C an der Nukleotidposition –31 (in der Promotorregion mit keiner Aminosäureveränderung), dies ist eine T → C Veränderung an der Nukleotidposition 1903 der Sequenz X04500 in den beiden Kopien des IL-1 β Gens, das im Patienten vorhanden ist. Ist das Nukleotidpaar an der Position –31 ein CG in beiden Kopien des Gens, dann erfährt der Patient eine starke Erhöhung der Cholesterinspiegel im Serum während einer Behandlung mit einer IM. Ist das Nukleotidpaar an der Position –31 AT in einer Kopie und CG in der anderen Kopie, dann hat der Patient eine unmittelbare Erhöhung der Cholesterinspiegel während der Behandlung mit einer IM. Ist das Nukleotidpaar AT an beiden Kopien an der Position –31, dann hat der Patient eine niedrige Erhöhung der Cholesterinspiegel im Serum während einer Behandlung mit einer IM.

[0033] Bei einer weiteren Ausführungsform würde eine Bestimmung, welche Medikationen für eine Behandlung eines behandlungsbedürftigen Patienten mit einer IM zu verwenden wären, basiert sein auf den Ergebnissen der Bestimmung der Art der Nukleotidpaare an der Position –31 im IL-1 β Gen, das im Patienten vorhanden ist. Sind beide Nukleotidpaare AT, dann würde der Patient mit einer IM behandelt.

[0034] Diese IM könnte irgendeine der in der Tabelle 2 gezeigten sein, unter Einschluss von, aber nicht beschränkt auf, Rapamycin oder eines seiner Derivate unter Einschluss von, aber nicht beschränkt auf, Everolimus (Certican^R) (RAD).

[0035] Sind beide Nukleotidpaare GC oder ist das Nukleotidpaar AT in einer Kopie und CG in der anderen Kopie, dann würde der Patient mit einer alternativen Medikation behandelt, die die Cholesterinspiegel nicht erhöht, oder würde der Patient alternativ mit einem Cholesterinsenker zusätzlich zur IM behandelt, wobei die

Cholesterinspiegel des Patienten während einer solchen Behandlung überwacht würden. Der Cholesterin-senkende Wirkstoff, der in Kombination mit einer IM verwendet werden würde, könnte eine oder mehr der Medikationen sein, die aus der in der folgenden Tabelle 1 enthaltenen Liste ausgewählt werden.

[0036] Geeignete Rapamycine für eine Verwendung bei den erfindungsgemäßen Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 3 929 992 A und US 5 258 389 A und in WO 94 009 010 A und WO 01 060 345 A.

Tabelle 1. Antilipidämische Mittel (Cholesterinsenker)

Gallensäuresequestranten	
	Colestipol (Colestid ^R , Pharmacia & Upjohn)
Fibrinsäurederivate	
	Clofibrat (Atromid-S ^R , Wyeth-Ayerst)
	Gemfibrozil (Lopid ^R , Parke-Davies)
	Fenofibrat (Tricor ^R , Abbott)
HMG-CoA Reduktaseinhibitoren	
	Fluvastatin (Lescol ^R , Novartis)
	Atorvastatin (Lipitor ^R , Parke-Davis)
	Lovastatin (Mevacor ^R , Merck)
	Pravastatin (Pravacol ^R , Bristol-Myers Squibb)
	Simvastatin (Zocor ^R , Merck)
Nikotinsäure	
	Niacin (Niaspan ^R , Kos)

Tabelle 2. Immunsuppressiva

Rapamycin (Sirolimus, Rapamun ^R)
Everolimus (Certican ^R) (RAD)
Mycophenolsäure und Mycophenolatmofetil (Cellcept ^R)(MMF)
Azathioprin (Imuran ^R)
Cyclosporin (Neoral ^R)
Tacrolimus (Prograf ^R)

[0037] Das folgende Beispiel dient zur weiteren Illustration der Erfindung, soll diese aber in keiner Weise beschränken.

Beispiel 1

Studie mit RAD B251

Gesamte Studienauslegung

[0038] Die Studie mit RAD B251 ist eine randomisierte multizentrale doppelblinde Parallelgruppenstudie der Wirksamkeit und der Sicherheit von Everolimus (Certican^R) (RAD) gegen Mycophenolatmofetil (MMF) in Kombination mit Cyclosporin (CsA)(NeoralR) und Prednison. Diese Studie besteht aus drei Perioden, nämlich einer Screeningperiode, einer Grundlinienperiode und einer Doppelblindbehandlungsperiode. Nach den Grundlinienzuordnungen werden Patienten, die die Einschlusskriterien/Ausschlusskriterien erfüllen, randomisiert in eine der drei Behandlungsgruppen (1:1:1), sobald sichergestellt ist, dass das Allograft funktional ist und dass eine orale Medikation toleriert werden kann (innerhalb von 48 h post Transplantation). Eine Bestimmung der Allograftfunktion erfolgt entsprechend der Beurteilung des Untersuchenden und beruht auf einem adäquaten Urinoutput und auf Anzeichen für fallende Creatinininspiegel. Der Tag der Randomisierung und der Verabreichung der ersten Dosis der Studienmedikation wird als Tag 1 der Studie eingetragen. Die drei Behandlungs-

gruppen werden wie folgt beschrieben.

- Dosisspiegel 1: 0,75 mg RAD bid + Neoral^R + Prednison
- Dosisspiegel 2: 1,5 mg RAD bid + Neoral^R + Prednison
- Komparator: 1 g MMF bid + Neoral^R + Prednison

Konkomitante Therapie

Initiation und Aufrechterhaltung von Neoral^R

[0039] Eine orale Verabreichung von CsA (Neoral^R) wird mit einer peroralen Dosis von 6 bis 12 mg/kg und Tag begonnen und so eingestellt, dass ein durchgehender Spiegel von 12 h aufrechterhalten wird, was einem üblichen Zielbereich für einen Assay entspricht. Eine intravenöse (i. v.) Verabreichung von CsA wird so lange vermieden, bis dies durch die klinische Situation bedingt wird. Die Gesamtblutspiegel werden möglichst schnell in die im folgenden gezeigten therapeutischen Bereiche gebracht. Nach Erreichung dieser Bereiche werden die Dosen an CsA nur so eingestellt, dass durchgehend Blutspiegel innerhalb der Zielbereiche beibehalten werden.

- Wochen 1 bis 4: 200 bis 350 ng/ml
- Monate 2 bis 36: 100 bis 300 ng/ml

[0040] An den Tagen, an denen Blutproben für Messungen von CsA oder RAD gezogen werden, erhält der Patient die vorherige Dosis an Neoral^R und die Studienmedikation 12 ± 1 h vor der Blutentnahme. Die Patienten werden dabei instruiert, ihren Medikationsplan am Tag vor der Blutentnahme so einzustellen, dass ein sauberes Timing und die genaue Zeit an Verabreichung der Abenddosis ermittelt werden kann. Die Studienmedikation und die Menge an Neoral^R am Tag der Blutentnahme werden nicht vom Patienten bestimmt, sondern in der Klinik vorgenommen und erst nach beendeter Blutentnahme ermittelt.

Prednison

[0041] Unmittelbar vor einer Transplantation können die Patienten intravenös bis zu 1 g Methylprednisolon und dann 12 h später intravenös bis zu 500 mg Methylprednisolon erhalten. Möglichst bald nach einer Transplantation wird mit einer oralen Verabreichung von Prednison in einer Dosis von 0,35 bis 2,0 mg/kg/Tag initiiert, die dann allmählich so abgeschwächt wird, dass eine Dosis von 20 mg/Tag oder von 0,25 mg/kg/Tag bis zum Tag 30 oder von nicht weniger als 5 mg/Tag während der ersten sechs Monate erreicht wird.

Prophylaxe von Cytomegalovirus (CMV)

[0042] Eine Prophylaxe von CMV ist in all den Fällen unerlässlich, bei denen die Donortests positiv und die Rezipiententests negativ für CMV sind. Eine Behandlung mit Ganciclovir, CMV Hyperimmunglobulin und Acyclovir wird zugelassen und entsprechend der lokalen Praxis verabreicht. Alle Fälle anders als CMV positive Donoren bis CMV negative Rezipienten werden der lokalen Praxis entsprechend behandelt. Eine CMV Prophylaxe ist auch empfehlenswert im Anschluss an irgendeine Antikörperbehandlung akuter Abstoßungsepisoden.

PCP Prophylaxe

[0043] Bei allen Patienten wird auch begonnen mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol mit einer einzelnen Tablette pro Tag, wobei begonnen wird, sobald eine orale Medikation toleriert werden kann und wobei diese während der ersten sechs Monate nach einer Transplantation fortgeführt wird. Sodann wird diese Dosis im Ermessen des behandelnden Arztes auf je eine Tablette dreimal wöchentlich während der zweiten sechs Monate erniedrigt. Eine Behandlung nach einem Jahr erfolgt der lokalen Praxis entsprechend. Patienten, die Trimethoprim-Sulfamethoxazol nicht vertragen, wird aerosolisiertes Pentamidin oder Dapson verabreicht.

Sonstige begleitende Therapie

[0044] Während der vollen Behandlungsdauer der Studie, nämlich vom ersten Tag eines Screenings bis zur Beendigung aller Evaluierungen der abschließenden Studie, erhalten die Patienten keine andere Medikation

als die zu studierenden Wirkstoffe, die zu untersuchende Prophylaxe und die üblichen Medikationen, die während der gesamten Behandlungsdauer der Studie gegeben werden. Ausnahmen von dieser Regel gelten nur für Medikationen, die zur Behandlung besonderer Ereignisse (AE) benötigt werden. Die Verabreichung irgendeiner zusätzlichen Medikation (unter Einschluss von Übermedikationen und Medikationen mit Vitaminen) werden sauber im Berichtsblatt über die vorherigen und die begleitenden Medikationen (CRF) dokumentiert. Falls für AE erforderlich, dann werden auch hier begleitende Medikationen sauber dokumentiert und kreuzweise bezogen auf die AEs CRF.

[0045] Alle Immunsuppressiva, die anders sind als die durch den Behandlungsplan vorgeschriebenen Wirkstoffe, werden nicht zugelassen. Zu einer zulässigen Antiabstoßtherapie gehören eine Therapie mit Methylprednisolon und mit Antilymphozytentantikörpern nach den Vorschriften von „Treatment of Acute Rejection Episodes“ (Behandlung akuter Abstoßepisoden). Patienten, die für eine Nottherapie Tacrolimus oder MMF brauchen, werden vom zu studierenden Wirkstoff abgesetzt. Terfenadin, Astemizol und Cisaprid sind während der Studienmedikation des Patienten verboten. Von der Verwendung von Phenobarbital, Phenytoin, Carbamazepin oder Ketoconazol ist stark abzuraten.

[0046] Einer Transplantation folgt eine Behandlungsdauer von drei Jahren. Während der Zeit der Doppelblindbehandlung werden die Patienten an den Tagen 7, 14 und 28 und an den Monaten 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 und 36 untersucht. Renale Biopsien sind an der Grundlinie (womöglich intraoperativ) und zum Zeitpunkt irgendeiner vermuteten Abstoßung notwendig. Eine Blindstudienwirkstoffverabreichung wird bei 3 Jahren abgebrochen.

[0047] Männliche und weibliche Patienten mit einem Alter von 16 bis 65 Jahren mit einer primären cadaveren lebenden unverwandten oder nicht-HLA identischen verwandten Donornierentransplantation werden ebenfalls für die Studie zugelassen. Patienten, die diese Studie vorzeitig abbrechen, werden nicht ersetzt. Jeder Patient muss allen Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien gerecht werden, um für den Eintritt in die Studie gewählt zu werden.

Studienschema

Transplantations- operation	Randomisierung und erste Dosis einer Studienmedikation Tag 1	0,75 mg b.i.d. RAD + Neoral + Steroid
Maximum 48 h		1,5 mg b.i.d. RAD + Neoral + Steroid
Screeningphase innerhalb von 24 h vor der Transplan- tation	Grundlinie	1 g b.i.d. MMF + Neoral + Steroid
		Studiendauer 3 Jahre
Geplante Analysen bei 6, 12, 24 und 36 Monaten		

[0048] Die Studie mit RAD 6251 ist so angelegt, dass hierdurch die Sicherheit und Wirksamkeit von zwei oralen Dosen an RAD im Vergleich zu MMF in de novo Renaltransplantatzipienten bewertet werden kann, wie dies gemessen wird durch die Inzidenz von durch Biopsie belegten akuten Allograftabstoßungsepisoden, Transplantatverlust oder Tod. MMF wird als das Vergleichsmittel gewählt, da dies bei Nierentransplantationen weitverbreitet verwendet wird.

Pharmakogenetische Analyse

[0049] In einem Versuch zur Identifizierung genetischer Faktoren, die mit erhöhten Cholesterinspiegeln und Lipidspiegeln assoziiert sind, welche bei Patienten zu beobachten sind, die mit Everolimus (RAD) behandelt

worden sind, werden 47 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) von 24 Genen innerhalb eines genomischen Polydeoxyribonukleotids (DNA) von Patienten untersucht, die an den klinischen Versuchen mit RAD 8251 teilnehmen. Von den 47 SNPs, die untersucht werden, hat sich gezeigt, dass 21 davon nicht polymorph sind. Von den 26 übriggebliebenen polymorphen Patienten sind zwei SNPs im 1L-1 β Genpromotor an den Positionen (-511) und (-31) von statistischer Signifikanz in Bezug auf Veränderungen in den Cholesterinspiegeln bei Patienten, die am klinischen Versuch mit RAD 6251 teilnehmen.

[0050] Patienten, die homozygot sind für den IL-1 β (-511) C → T Basenübergang (t-T) oder den IL-1 β (-31) T → C Basenübergang (C-C), zeigen die höchsten kleinsten Quadratspiegel an gesamtem Cholesterin bei ihrer letzten Visite, unabhängig von einer Behandlung, die sie während der Studie erhalten ($p = 0,0018$ bzw. $p = 0,0013$). Die Werte in den Figuren und dergleichen beziehen sich auf die absoluten Cholesterinspiegel im Serum bei der letzten Visite, wobei während der statistischen Analyse dieser Wert aber definiert ist als die abhängige Variable und der Cholesterinspiegel an der Grundlinie als die unabhängige Variable, so dass hierdurch automatisch der Grundlinienspiegel in Betracht gezogen ist.

[0051] Die Erhöhung der gesamten Cholesterinspiegel ist zurückzuführen auf sowohl erhöhte Spiegel an HDL und LDL, wobei Patienten, die homozygot sind für das T Allel an der Position (-511) oder das C Allel an der Position (-31), die höchsten Quadratmittelspiegel an HDL ($p = 0,0214$ bzw. $p = 0,0514$) und LDL ($p = 0,0159$ bzw. $p = 0,0091$) bei der letzten Visite haben. Wichtig ist aber, dass die Verhältnisse von HDL zu LDL unabhängig vom Genotypus gleichgeblieben sind.

[0052] Die vorliegenden Erkenntnisse legen daher nahe, dass Individuen, die homozygot sind für das T Allel an der Position (-511) und homozygot sind für das C Allel an der Position (-31) des IL-1 β Genpromoters prädisponiert sein können für stärkere Erhöhungen der gesamten Cholesterinspiegel im Blut nach einer Behandlung mit entweder den Behandlungsplänen mit RAD/NeoralR oder mit MMF/NeoralR.

Verfahren

Probanden

[0053] Insgesamt 82 unikale Probanden aus dem klinischen Versuch mit RAD B251 werden auf ihre Zustimmung zur Teilnahme an der pharmakogenetischen Evaluation genotypisiert. Dies repräsentiert etwa 15% der Gesamtpopulation, die am klinischen Versuch mit RAD 6251 partizipiert. Von jedem Patienten werden Blutproben an den einzelnen Versuchsstellen gesammelt und dann zur Firma Covance (Genf, Schweiz) geschickt. Die genomische DNA eines jeden Patienten wird von der Covance unter Verwendung des Puregen^R DNA Isolationsbausatzes (D-50K) (Gentra, Minneapolis, MN) extrahiert.

Genotypisierung

[0054] Insgesamt 47 unikale Polymorphismen entsprechend 24 Genen werden für jeden klinischen Versuch analysiert. Für diese Studie werden Kandidatengene ausgewählt, die involviert sind in einem Metabolismus des Wirkstoffs, einer Hypercholesterolemie, einer Hyperlipidämie, einer Immunsuppression und einer Inflammation. Die SNP Assays sind ausgelegt unter Anwendung entsprechender Informationen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken, wie OMIM, dem SNP Consortium, dem Locus Link und dem dbSNP und der Third Wave Technologies, Inc. (TWT, Madison, WI), Website (<http://64.73.25.65:8080/coe/index.jsp>). Die erhaltenen Probesätze für den Genotypisierungsassay werden durch TWT generiert. Eine Genotypisierung wird durchgeführt mit 60 ng genomer DNA unter Verwendung des Invader^R Assays, der durch TWT (9–10) nach den Instruktionen des jeweiligen Herstellers durchgeführt wird. Hierzu wird beispielsweise hingewiesen auf Lyamichev et al., Nat. Biotechnol., Band 17, Seiten 292 bis 296 (1999), und auf Ryan, Mol. Diagn., Band 4, Seiten 135 bis 144 (1999).

[0055] Eine Polymerasekettenreaktion (PCR) für das (-511) IL-1 β SNP wird in einer 20 μ l Reaktion durchgeführt, die enthält 10 bis 70 ng genomische DNA, 160 μ g dNTPs, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,6 μ M IL-1 β (-511) Vorwärtsprimer, 0,6 μ M IL-1 β (-511) Umkehrprimer und 0,03 E Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sechsunddreißig (36) Runden einer Amplifikation werden unter Anwendung der folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C, 30 Sekunden, 55°C, 30 Sekunden, 72°C, 30 Sekunden. Sodann erfolgt eine Fraktionierung (5 μ l) von neun Proben eines 2% Agarosegels und eine Visualisierung unter Anfärbung mit Ethidiumbromid zur Bestätigung der Amplifikation. Anschließend lässt man eine 1:7 Verdünnung des PCR Produkts gegen TWT SNP Nr. 128069 unter Verwendung einer Bplexplatte mit 384 Löchern für die amplifizierte DNA laufen.

[0056] Die Primersequenzen sind wie folgt:

1L-1 β (-511) vorwärts 5'-GCAGAGCTCATCTGGCATTG-3' (SEQ ID Nr. 1)

1L-1 β (-511) rückwärts 5'-TATGTGGGACAAAG TGGAAG-3' (SEQ ID Nr. 2).

[0057] Hierauf wird eine PCR für das (-31) IL-1 β SNP in 25 μ l einer Reaktion durchgeführt, die folgendes enthält: 1 ng genomische DNA, 40 μ M dNTPs, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,75 μ M IL-1 β (-31) Vorwärtsprimer, 0,75 μ M IL-1 β (-31) Umkehrprimer und 0,15 E Gold Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Anschließend wird eine Amplifikation über achtunddreißig (38) Runden unter Anwendung der folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C, 30 Sekunden, 58°C, 30 Sekunden, 72°C, 30 Sekunden. Sodann werden alle Proben auf einem 2%igen Agarosegel fraktioniert (5 μ l) und anschließend durch Anfärbung mit Ethidiumbromid visualisiert, um hierdurch die Amplifikation zu bestätigen.

[0058] Die hierdurch erhaltenen Primersequenzen sind wie folgt:

1L-1 β (-31) vorwärts 5'-GCACAAACGATTGTCAGGAAAAC-3' (SEQ ID Nr. 3)

1L-1 β (-31) rückwärts 5'-ATGCATACA CACAAAGAGGCAG-3' (SEQ ID Nr. 4).

[0059] Sodann lässt man eine 1:10-Verdünnung des PCR-Produkts unter Verwendung einer Bplexplatte mit 384 Löchern gegen TWT SNP Nr. 274339 für RAD B251 auf amplifizierte DNA laufen. Anschließend erfolgt eine RFLP-Analyse zwecks Bestimmung der Genotypen unter Verwendung des Alu-I Restriktionsenzymes (New England Biolabs, Beverly, MA). Die Verdauung von RFLP erfolgt in einer 20 μ l Reaktion, die folgendes enthält: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7,9), 8 ng amplifizierte genomische DNA und 0,5 mM Alu-I Enzym. Alle Proben werden 17 h bei 37°C inkubiert und dann auf einem 3%igen Agarosegel fraktioniert (19 μ l) und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid zwecks Bestimmung der Bandgröße visualisiert.

Nukleotidsequenz, die den (-511) IL-1 β Polymorphismus umgibt

Gen	Position	Allel 1	Allel 2	Umgebende Sequenz
1L-1 β	-511	C	T	CTGCAATTGACAGAGAGCTCC[C,T]GAGGCAGAGA ACAGCACCCAAAGGTAGAGACCCA

Allel 1 (SEQ ID Nr. 5)

CTGCAATTGACAGAGAGCTCC[C]GAGGCAGAGAACAGCACCCAAAGGTAGAGACCCA

Allel 2 (SEQ ID Nr. 6)

CTGCAATTGACAGAGAGCTCC[T]GAGGCAGAGAACAGCACCCAAAGGTAGAGACCCA

Nukleotidsequenz, die den (-31) 1L-1 β Polymorphismus umgibt

Gen	Position	Allel 1	Allel 2	Umgebende Sequenz
1L-1 β	-31	C	T	TCCTACTTCTGCTTTGAAAG[C,T]ATAAAAACAGC GAGGGAGAAACTGGCAGATAACCAACCTC

Allel 1 (SEQ ID Nr. 7)

TCCTACTTCTGCTTTGAAAGC[C]ATAAAAACAGCGAGGGAGAAACTGGCAGATAACCAACCTC

Allel 2 (SEQ ID Nr. 8)

TCCTACTTCTGCTTTGAAAGC[T]ATAAAAACAGCGAGGGAGAAACTGGCAGATAACCAACCTC

Statistische Analyse

[0060] Eine Analyse eines Kovarianzmodells wird zur Analyse der Wirkung des Genotyps und der Behandlung auf Cholesterinspiegel herangezogen, wozu ein klinischer Datensatz eines 24 Monate lab_b.sd2 RAD B251 angewandt wird. Die Daten dieses Modells schließen ein den finalen Cholesterinspiegel, den initialen

Cholesterinspiegel als die Kovariate und den Genotyp und die Behandlung als die hauptsächlichen Effektoren. Die Quotenverhältnisse, 95% Konfidenzgrenzen und die Chi-Quadratanalysen werden, falls anwendbar, berechnet. Alle statistischen Analysen werden unter Verwendung der Software SAS 8.02 durchgeführt. Zur Korrektur einer multiplen Testung wird das Korrekturverfahren von Bonferroni angewandt.

Ergebnisse

[0061] Bei der Studie mit RAD B251 werden 47 unikale SNPs entsprechend 24 Genen für jeden Patienten genotypisiert, der mit einer pharmakogenetischen Analyse einverstanden ist und am klinischen Versuch mit RAD 8251 teilnimmt. Ein Vergleich der Patienten, die mit einer pharmakogenetischen Analyse einverstanden sind, mit der gesamten Patientenverteilung für jeden jeweiligen klinischen Versuch ist in der folgenden Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3. RAD 6251: Verteilung pharmakogenetischer Proben im Vergleich zu den gesamten Proben des klinischen Versuches

	Pharmakogenetische Proben	Versuchsproben
Alter (Jahre)	43,34	43,49
Rasse		
Kaukasier	(61) 74%	(388) 68%
Schwarze	(9) 11%	(93) 16%
Orientalen	(0) 0%	(11) 2%
Sonstige	(12) 15%	(76) 13%
Geschlecht		
Männlich	(51) 62%	(357) 63%
Weiblich	(31) 38%	(211) 37%
Behandlung		
RAD001 (1,5 mg/d)	(24) 29,3%	(189) 33,3%
RAD001 (3,0 mg/d)	(29) 35,3%	(189) 33,3%
MMF (2 g/d)	(29) 35%	(190) 33,4%
Gewicht (kg)	80,7	77,1
Grundlinie		
CHO (mg/dl)	168,7	162,8
HDL (mg/dl)	40,9	40,8
LDL (mg/dl)	96,6	96,8
TGC (mg/dl)	155,3	119,9
Ende der Behandlung		
CHO (mg/dl)	234,5	232,2
HDL (mg/dl)	52,7	53,3
LDL (mg/dl)	123,2	126,6
TGC (mg/dl)	283,0	254,6

[0062] Zwischen der beim pharmakogenetischen Studium verwendeten Patientenpopulation und der gesamten Patientenpopulation beim klinischen Versuch mit RAD 6251 wird nur ein statistisch signifikanter Unterschied gefunden: Die Unterschiede der mittleren TGC Werte unter der pharmakogenetischen Patientenpopulation und der gesamten RAD 8251 Patientenpopulation sind statistisch signifikant ($p < 0,001$). Dieser Vergleich legt daher nahe, dass die beim pharmakogenetischen Studium verwendete Patientenpopulation repräsentativ ist für die Patientenpopulation, die bei jedem Versuch getestet worden ist. Von den 47 SNPs, die bei dieser Studie getestet worden sind, sind einer experimentellen Bestimmung zufolge 21 nicht polymorph. Daher werden 26 SNPs bei der im folgenden beschriebenen Analyse verwendet.

[0063] Eine statistische Analyse der Genotypen des klinischen Datensatzes von RAD B251, der als ein Polymorphismus innerhalb des IL-1 β Genpromotors an der Position (-511) identifiziert worden ist, zeigt eine signifikante Assoziation mit den Cholesterinspiegeln. Wie in der Tabelle 4 und der [Fig. 1](#) gezeigt ist, korreliert der IL-1 β (-511) (T-T) Genotyp bei Patienten aus beiden Behandlungsgruppen zusammen mit der höchsten Erhöhung der gesamten Cholesterinspiegel bei einer Messung an der jeweiligen letzten Visite ($p = 0,0018$).

Tabelle 4. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel (mg/dl) durch (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen und Behandlungsgruppen innerhalb des klinischen Versuchs mit RAD 6251

Genotyp	RAD (1,5 und 3,0 mg/Tag)			MMF (2 mg/Tag)			RAD und MMF Behandlungsgruppen kombiniert		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Anzahl an Patienten	20	25	9	12	9	7	32	34	16
Kleinste quadratische Mittel werte	217,3	242,9	290,3	200,9	229,6	254,1	211,4	239,5	272,9
P-Wert	0,0125	0,0125	0,0125	0,0866	0,0866	0,0866	0,0018	0,0018	0,0018

[0064] Eine ähnliche Assoziation ist für den Genotyp IL-1 β (-31) (C-C) zu beobachten ($p = 0,0013$), wozu auf die folgende Tabelle 5 und die [Fig. 2](#) hingewiesen wird.

Tabelle 5. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel (mg/dl) durch (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen und Behandlungsgruppen innerhalb des klinischen Versuchs mit RAD 6251

	RAD (1,5 und 3,0 mg/Tag)				MMF (2 mg/Tag)		RAD und MMF Behandlungsgruppen kombiniert		
Genotyp	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Anzahl an Patienten									
Patienten	9	26	19	7	9	12	16	35	31
Kleinste quadratische Mittel werte									
werte	291,1	240,4	216,6	254,1	239,6	200,9	272,9	239,5	211,4
P-Wert	0,009	0,009	0,009	0,0625		0,0625	0,0013	0,0013	0,0013

[0065] Zur weiteren Analyse dieser Korrelation wird geprüft, ob eine Assoziation besteht zwischen dem IL-1 β (-511) Genotyp und den Spiegeln von HDL und LDL. Wie in der [Fig. 3](#) und der folgenden Tabelle 6 gezeigt ist, korreliert der IL-1 β (-511) (T-T) Genotyp bei Patienten aus beiden Behandlungsgruppen zusammen mit den höchsten Spiegeln an HDL bei einer Messung bei der jeweiligen letzten Visite ($p = 0,0214$).

Tabelle 6. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel (mg/dl) durch (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen und Behandlungsgruppen innerhalb des klinischen Versuchs mit RAD B251

	RAD (1,5 und 3,0 mg/Tag)				MMF (2 mg/Tag)		RAD und MMF Behandlungsgruppen kombiniert		
Genotyp	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Anzahl an Patienten									
Patienten	20	25	9	12	9	7	32	34	16
Kleinste quadratische Mittel werte									
werte	47,6	54,9	68,4	45,5	56,8	50,4	47,8	54,4	58,9
P-Wert	0,0164	0,0164	0,0164	0,0819	0,0819	0,0819	0,0214	0,0214	0,0214

[0066] Es ist bereits vorher berichtet worden, dass der IL-1 β (-511) Polymorphismus in einem starken Verknüpfungsungleichgewicht zu einem anderen Polymorphismus im IL-1 β Promotor der Position (-31) steht, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf El-Omar et al., Nature, Band 404, Seiten 398 bis 402 (2000). Bei dieser Studie werden 254 Allele bei Patienten getestet, die mit einer pharmakogenetischen Analyse bei einem klinischen Versuch mit RAD B251 übereinstimmt. Dabei wird berichtet, dass der IL-1 β (-511) Polymorphismus und der (-31) Polymorphismus zu 99,2% in einem Verknüpfungsungleichgewicht steht. Es sollte daher eine ähnliche Assoziation zwischen dem IL-1 β (-511) Polymorphismus und den Cholesterinspiegeln geben, wie dies mit dem IL-1 β (-31) Polymorphismus detektiert worden ist. Eine statistische Analyse des klinischen Datensatzes von RAD 6251 auf den IL-1 β (-31) Polymorphismus hat daher eine signifikante Assoziation mit Cholesterinspiegeln bestätigt. Wie in der Tabelle 5 und [Fig. 2](#) gezeigt ist, korreliert der IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp bei Patienten aus beiden Behandlungsgruppen zusammen mit den höchsten Cholesterinspiegeln bei einer Messung anlässlich der letzten Visite ($p = 0,0013$). Um diese Korrelation weiter zu analysieren, wurde getestet, ob eine Assoziation zwischen dem IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp und den HDL und LDL Spiegeln besteht. Wie in [Fig. 4](#) und der folgenden Tabelle 7 gezeigt ist, korreliert der IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp bei Patienten aus beiden Behandlungsgruppen zusammen schwach mit den höchsten HDL Spiegeln bei einer Messung anlässlich der letzten Visite ($p = 0,0514$).

Tabelle 7. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel (mg/dl) durch (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen und Behandlungsgruppen innerhalb des klinischen Versuchs mit RAD 6251

	RAD (1,5 und 3,0 mg/Tag)				MMF (2 mg/Tag)		RAD und MMF Behandlungsgruppen kombiniert		
Genotyp	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Anzahl an									
Patienten	9	26	19	7	9	12	16	35	31
Kleinste quadra									
tische Mittel									
werte	65,1	55	48,4	50,4	56,8	45,5	58,9	54,4	47,8
P-Wert	0,0205	0,0205	0,0205	0,1893	0,1893	0,1893	0,0514	0,0514	0,0514

[0067] Eine ähnliche Korrelation ist auch mit den LDL Spiegeln identifiziert worden ($p = 0,0159$, [Fig. 5](#) und Tabelle 8).

Tabelle B. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel (mg/dl) durch (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen und Behandlungsgruppen innerhalb des klinischen Versuchs mit RAD B251

	RAD (1,5 und 3,0 mg/Tag)				MMF (2 mg/Tag)		RAD und MMF Behandlungsgruppen kombiniert		
Genotyp	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Anzahl an									
Patienten	20	25	9	12	9	7	32	34	16
Kleinste quadra									
tische Mittel									
werte	112,5	123,6	144,5	113,9	118,6	143,7	110,5	123,8	145,8
P-Wert	0,1646	0,1646	0,1646	0,2848	0,2848	0,2848	0,0159	0,0159	0,0159

[0068] Eine stärkere Korrelation ist identifiziert worden mit LDL Spiegeln und dem (-31) IL-1 β Polymorphismus ($p = 0,0091$, [Fig. 6](#) und Tabelle 9).

Tabelle 9. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel (mg/dl) durch (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen und Behandlungsgruppen innerhalb des klinischen Versuchs mit RAD B251

	RAD (1,5 und 3,0 mg/Tag)				MMF (2 mg/Tag)		RAD und MMF Behandlungsgruppen kombiniert		
Genotyp	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Anzahl an									
Patienten	9	26	19	7	9	12	16	35	31
Kleinste quadra tische Mittel									
werte	145,1	124,1	112,2	143,1	119,8	107,8	145,9	124,5	108,5
P-Wert	0,143	0,143	0,143	0,2061	0,2061	0,2061	0,0091	0,0091	0,0091

[0069] Noch wichtiger ist, dass die Verhältnisse von HDL zu LDL zwischen den Genotypgruppen unverändert bleiben. Die Erkenntnisse dieser Studie sprechen somit für eine größere Ähnlichkeit von Individuen mit einem bestimmten Allel zur Erzielung persistenter Erhöhungen der Cholesterinspiegel nach einer Behandlung mit dem Behandlungsplan für RAD/Neoral^R als mit Individuen, die das Allel nicht besitzen.

[0070] Ein ähnlicher Trend hat sich auch bei Individuen gezeigt, die nach dem Behandlungsplan von MMF/Neoral^R behandelt worden sind, wobei die dabei erhaltenen Ergebnisse nicht der statistischen Signifikanz von $p = 0,05$ entsprechen.

[0071] Gesamte Cholesterinspiegel im Blut von ≥ 240 mg/dl werden allgemein als exzessiv erhöht angesehen, so dass entschieden worden ist, das Quotenverhältnis für einen Patienten mit den IL-1 β (-511) oder IL-1 β (-31) Polymorphismen zu bestimmen, um so auf eine Erhöhung der gesamten Blutcholesterinspiegel mit einer Endkonzentration von ≥ 240 mg/dl nach einer Behandlung mit den Behandlungsvorschriften für RAD/Neoral^R oder MMF/Neoral^R zu stoßen. Hierzu wird beispielsweise hingewiesen auf Cecil Textbook of Medicine, Herausgeber Goldman und Gennett, Saunders, 6. Auflage (2000).

[0072] Wie in der folgenden Tabelle 10 gezeigt ist, indiziert das Quotenverhältnis, dass Patienten um das 5,67-fache (95% Konfidenzgrenzen von 1,20 bis 9,01) wahrscheinlicher eine Erhöhung der gesamten Cholesterinspiegel auf eine Endkonzentration von ≥ 240 mg/dl haben bei einer Behandlung nach dem Behandlungsplan mit RAD/Neoral^R, wenn die Patienten ein T an der Position (-511) im IL-1 β Genpromoter haben, oder um eine um das 7,23-fache (95% Konfidenzgrenzen von 1,20 bis 9,01) höhere Wahrscheinlichkeit verfügen, eine Erhöhung der gesamten Blutcholesterinspiegel bis zu einer Endkonzentration von ≥ 240 mg/dl zu haben, wenn sie nach der Behandlungsvorschrift mit RAD/Neoral^R behandelt worden sind, die ein C an der Position (-31) im IL-1 β Genpromoter haben. Diese Erkenntnisse sind statistisch signifikant ($p = 0,0207$ bzw. $p = 0,0096$) und könnten als eine vorsorgliche Maßnahme bei der Behandlung von Transplantationspatienten nach einem Behandlungsplan mit RAD/Neoral^R verwendet werden, da eine Hypercholesterolemie leicht behandelbar ist.

Tabelle 10. Quotenverhältnis für die (-511) und (-31) IL-1 β Genotypen und Cholesterinspiegel

(-511) IL-1 β Polymorphismus				(-31) IL-1 β Polymorphismus			
Obs.	Genotyp			Obs.	Genotyp		
Exp.	CT-TT	CC	Gesamt	Exp.	CC-CT	TT	Gesamt
< 239 mg/dl	24	7	31	< 239 mg/dl	25	6	31
	18,90	12,10			19,28	11,72	
≤ 239 mg/dl	26	25	51	≤ 239 mg/dl	26	25	51
	31,10	19,90			31,72	19,28	
	50	32	82		51	31	82

[0073] Quotenverhältnis = 5,67 (95% Konfidenz- Quotenverhältnis = 7,23 (95% Konfidenzgrenzen: 1,20 bis

9,01) Grenzen: 1,20 bis 9,01) $p = 0,0207$ (genauer Test nach Fischer) $p = 0,0096$ (genauer Test nach Fischer)

Korrektur für eine multiple Testung nach Bonferroni

[0074] Infolge der Anzahl an SNPs, die bei dieser Studie analysiert werden, ist ein Korrekturfaktor notwendig. Dies erfolgt nach dem Korrekturverfahren von Bonferroni, das einen p Wert von 0,0019 ergab.

$$\text{Bonferroni} = \frac{0,05}{\eta} = \frac{0,05}{\eta} = 0,0019$$

$$\eta = \text{RAD_Anzahl_an_Tests}$$

[0075] Die Auffindung der IL-1 β (-511) und IL-1 β (-31) Polymorphismen und der Gesamtcholesterinspiegel ($p = 0,0018$ bzw. $p = 0,0013$) ist daher ebenfalls als signifikant anzusehen.

Verknüpfungsungleichgewicht von (-511) und (-31) IL-1 β SNPs

[0076] Es ist bereits berichtet worden, dass der IL-1 β (-511) C \rightarrow T Polymorphismus in starkem Verknüpfungsungleichgewicht (99,5%) mit einem anderen Polymorphismus innerhalb des IL-1 β Promotors steht, der an der Position (-31) einen C \rightarrow T Basenübergang ergibt, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf El-Omar et al., Nature, Band 404, Seiten 398 bis 402 (2000). Patienten mit einem T an der Position (-511) des IL-1 β Promotors sollten daher ein C an der Position (-31) haben. Diese Erkenntnis wird bei den Patienten bestätigt, die in diesen beiden Versuchen getestet wurden. Beim Wildtyp IL-1 β Gen ist T an der Position bei (-31) zu finden. Dieses T ist sehr wichtig für die Expression von IL-1 β , da es Teil der TATA Kästchensequenz (TATAAAA) ist, die eine kritische Rolle spielt bei der transkriptionalen Initiation von IL-1 β . Allgemein sind TATA Kästchensequenzen involviert bei einer Rekrutierung und Positionierung der transkriptionalen Maschinerie an der korrekten Position innerhalb von Genen, um sicher zu stellen, dass eine Transkription an der korrekten Stelle beginnt. Der T \rightarrow C Polymorphismus an der Position (-31) würde diese wichtige TATA Kästchensequenz (TATAAAA zu CATAAAA) unterbrechen und diese somit inaktiv machen und die effiziente Initiation einer Transkription des IL-1 β Gens verhindern. Das Fehlen einer Bindung der transkriptionalen Maschinerie an diese veränderte IL-1 β TATA Kästchensequenz ist schon gezeigt worden, wozu beispielsweise auf El-Omar, supra, verwiesen wird.

[0077] Die Existenz irgendeines anderen Polymorphismus, der sich im Verknüpfungsungleichgewicht mit entweder dem Polymorphismus innerhalb des IL-1 β Promotors (der an der Position (-31) lokalisiert ist, so dass sich ein T \rightarrow C Basenübergang ergibt) oder des Polymorphismus, der an der Position (-511) (C \rightarrow T) des IL-1 β Promotors lokalisiert ist, würde somit einen vorhersagbaren Einfluss auf das Ausmaß einer Cholesterinerhöhung haben, die bei einem Patienten während einer Behandlung mit einer IM zu erwarten wäre. Die Mittel für die Determination anderer Polymorphismen, die sich in einem Verknüpfungsungleichgewicht mit dem (-31) Polymorphismus befinden, sind dem Durchschnittsfachmann wohl bekannt. Irgendein solcher Polymorphismus, der bereits bekannt ist oder in der Zukunft aufgefunden wird, sollte daher bei den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, um das Ausmaß einer ähnlichen Cholesterinerhöhung bei Patienten vorherzusagen, die mit einer IM behandelt sind, oder bei einer Bestimmung von Behandlungsauswahlen für solche Patienten zu helfen.

Biologische Signifikanz der Erkenntnisse

[0078] Der IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp ist von klinischer Relevanz. Es hat sich nämlich gezeigt, dass IL-1 β eine Biosynthese von Cholesterin um 25% inhibiert, wozu auf El-Omar et al., supra, verwiesen wird. Das Resultat dieses Polymorphismus würde daher bedeuten, dass Patienten mit dem IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp, der dem IL-1 β (-511) (T-T) Genotyp entspricht, erniedrigte Spiegel von IL-1 β haben würden, und hierdurch die Inhibition einer Biosynthese von Cholesterin durch IL-1 β mit dem Ergebnis erhöhter Cholesterinspiegel im Blut verlieren würden. Diese Art an Erkenntnis ist nun bei einem Versuch mit RAD B251 beobachtet worden. Wie in den Tabellen 4 und 5 und den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt ist, haben Patienten mit dem IL-1 β (-511) (T-T) Genotyp und dem IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp unabhängig von der Behandlung die höchsten kleinsten Quadratmittelwerte an Gesamtcholesterin.

[0079] Weiter ist darüber berichtet worden, dass IL-1 β eine Erhöhung der Expression von LDL Rezeptoren durch die Aktivierung der extrazellulären und Signal-regulierten Kinasen (ERKs) ergibt, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf Kumar et al., J. Biol. Chem., Band 273, Seiten 15742 bis 15748 (1998).

[0080] Erhöhungen der LDL Rezeptorexpression würden mit einer Erhöhung der Menge an Cholesterin ver-

bunden sein, die in Zellen internalisiert wird und hierdurch die Gesamtcholesterinspiegel im Blut erniedrigt. Dies ist für RAD (Everolimus) von Relevanz, da sich mit diesem Wirkstoff eine Inhibition biochemischer Wege gezeigt hat, die für eine Zellprogression durch spätes G1 und einen Eintritt in S erforderlich sind. Noch wichtiger hat sich gezeigt, dass ERKs bei diesem Verfahren involviert sind. Es ist daher möglich, dass eine ERK Aktivität durch Everolimus erniedrigt wird. Everolimus würde eine ERK Aktivität inhibieren, und eine LDL Rezeptorexpression würde sich bei allen Patienten erniedrigen, unabhängig von einer IL-1 β Expression, und somit eine Erhöhung der LDL Spiegel und demnach von Gesamtcholesterin bei Patienten, die Everolimus nehmen, verursachen, wobei unwahrscheinlich ist, dass Everolimus eine Aktivierung von ERK vollständig inhibiert. So mit wären Patienten mit den Genotypen IL-1 β (-511) (T-T) und IL-1 β (-31) (C-C) zur Induktion einer gewissen Expression des LDL Rezeptors fähig. Diese Patienten würden aber sehr niedrige IL-1 β Spiegel haben und somit eine geringere Expression des LDL Rezeptors zeigen, was dazu führen würde, dass geringere Mengen an Cholesterin in die Zellen internalisiert werden und sich die Cholesterinspiegel im Blut erhöhen. Diese Erklärung würde somit für die höchsten Cholesterinspiegel sprechen, die sich bei Patienten mit dem IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp beobachten lassen. Signifikant haben Patienten mit dem IL-1 β (-511) (T-T) Genotyp, der dem IL-1 β (-31) (C-C) Genotyp entspricht, die signifikant höheren Spiegel an LDL ($p = 0,0159$) im Vergleich zu Patienten mit anderen IL-1 β Genotypen, wozu auf [Fig. 3](#) und Tabelle 4 hingewiesen wird.

Identifikation und Charakterisierung von SNPs

[0081] Für eine Identifikation und Charakterisierung von SNPs können viele unterschiedliche Techniken angewandt werden, wie eine Analyse des Polymorphismus einer Einzelstrangkonformation, eine Heteroduplexanalyse durch Denaturierung einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC), eine direkte DNA Sequenzierung und Computerverfahren, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf Shi, Clin. Chem., Band 47, Seiten 164 bis 172 (2001). Dank des Reichtums an Sequenzinformationen in öffentlichen Datenbanken können Computerwerkzeuge verwendet werden, um SNPs in silico zu identifizieren durch Ausrichtung unabhängig vonbreiteter Sequenzen auf ein vorliegendes Gen (entweder cDNA oder genomische Sequenzen). Ein Vergleich der experimentell und durch in silico Verfahren erhaltenen SNPs zeigt, dass 55% der SNPs von Kandidaten, die durch einen SNP Finder gefunden worden sind (http://lpgws.nci.gov:82/perl/snp/_cgi.pl) ebenfalls experimentell gefunden werden konnten, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf Cox et al., Hum. Mutat., Band 17, Seiten 141 bis 150 (2001). Bei diesen in silico Verfahren konnten aber nur 27% wirkliche SNPs gefunden werden.

[0082] Zu den üblichsten Verfahren zur Typisierung von SNP gehören derzeit eine Hybridisierung, eine Primerextension und ein Spaltung. Jedes dieser Verfahren muss mit einem geeigneten Detektionssystem verbunden sein. Zu Detektionstechnologien gehören eine Fluoreszenzpolarisierung (siehe Chan et al., Genome Res., Band 9, Seiten 492 bis 499 (1999)), eine luminometrische Detektion einer Freisetzung von Pyrophosphat (Pyrosequenzierung) (siehe Ahmadiian et al., Anal., Biochem., Band 280, Seiten 103–110 (2000)), Spaltungsassays, die auf einem Energietransfer auf einer Fluoreszenzresonanz (FRET) basieren, eine DHPLC und eine Massenspektrometrie (siehe Shi, Clin. Chem., Band 47, Seiten 164 bis 172 (2001) und US 6 300 076 B1). Andere Verfahren zur Detektion und Charakterisierung von SNPs werden beispielsweise beschrieben in US 6 297 018 B1 und US 6 300 063 B1.

[0083] Eine bevorzugte Ausführungsform zur Detektion des Polymorphismus kann mittels einer so genannten Invader[®] Technologie erreicht werden (erhältlich von der Third Wave Technologies Inc., Madison, WI). Bei diesem Assay bilden ein spezifisches stromaufwärts befindliches Invader-Oligonukleotid und eine teilweise überlappende und stromabwärts angeordnete Sonde zusammen eine spezifische Struktur, bei einer Bindung, die komplementär ist zur DNA. Diese Struktur wird erkannt und an einer speziellen Stelle durch das Cleavase-Enzym geschnitten, und dies führt zur Freisetzung der 5' Klappe des Sondenoligonukleotids. Dieses Fragment dient dann als ein Invader-Oligonukleotid mit Bezug auf synthetische Sekundärziele und Sekundärfluoreszenz-markierte Signalsonden, die im Reaktionsgemisch enthalten sind. Hierdurch ergibt sich eine spezifische Spaltung der Sekundärsignalsonden durch das Cleavase-Enzym. Ist diese Sekundärsonde, die mit Farbmolekülen markiert ist, welche für einen Fluoreszenzsignal erzeugt. Cleavasen haben stringente Erfordernisse hinsichtlich der Struktur, die durch die überlappenden DNA Sequenzen oder Klappen gebildet werden, und können daher für eine spezifische Detektion einzelner Basenfehlpaaarungen unmittelbar stromaufwärts von der Spaltungsstelle am stromabwärtsigen DNA Strang verwendet werden. Hierzu wird beispielsweise hingewiesen auf Ryan et al., Molecular Diagnosis, Band 4, Nr. 2, Seiten 135 bis 144 (1999), und Lyamichev et al., Nat. Biotechnol., Band 17, Seiten 292 bis 296 (1999), und auch auf US 5 846 717 A und US 6 001 567 A.

[0084] Bei einigen Ausführungsformen enthält eine Zusammensetzung zwei oder mehr unterschiedlich mar-

kierte genotypisierende Oligonukleotide für ein simultanes Sondieren der Identität von Nukleotiden an zwei oder mehr polymorphen Stellen. Es wird auch in Betracht gezogen, dass Primerzusammensetzungen zwei oder mehr Sätze Allel-spezifischer Primerpaare enthalten, was dann eine simultane Zielansteuerung und Amplifikation von zwei oder mehr Regionen ermöglicht, die an einer polymorphen Stelle enthalten sind.

[0085] Die erfindungsgemäßen IL-1 β genotypisierenden Oligonukleotide können auch immobilisiert oder synthetisiert werden auf einer festen Oberfläche, wie einem Mikrochip, einem Kägelchen oder einem Glasobjektträger, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf WO 98 020 020 A und WO 98 020 019 A. Solche immobilisierte genotypisierende Oligonukleotide können bei einer Reihe an Assays zur Detektion von Polymorphismus verwendet werden, wozu unter anderem Assays zur Sondenhybridisierung und Polymeraseextension gehören. Die erfindungsgemäßen immobilisierten IL-1 β genotypisierenden Oligonukleotide können auch eine geordnete Reihe von Oligonukleotiden enthalten, die so ausgelegt ist, dass eine DNA Probe gleichzeitig in multiplen Genen rasch auf Polymorphismus gescreent werden kann.

[0086] Ein erfindungsgemäßer Allel-spezifischer Oligonukleotidprimer hat ein 3' terminales Nukleotid oder vorzugsweise ein vorletztes 3' Nukleotid, das komplementär ist für nur ein Nukleotid einer besonderen SNP und folglich als ein Primer für eine durch eine Polymerase medierte Extension nur dann agiert, wenn das dieses Nukleotid enthaltende Allel vorhanden ist. Allel-spezifische Oligonukleotidprimer, die entweder den kodierenden Strang oder den nichtkodierenden Strang hybridisieren, werden von der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen. Unter Anwendung von dem Fachmann bekannten Techniken konnte nun ein ASO Primer zur Detektion eines IL-1 β Genpolymorphismus entwickelt werden.

[0087] Andere erfindungsgemäße genotypisierende Oligonukleotide hybridisieren zu einer Zielregion, die an einem oder mehreren Nukleotid stromabwärts einer der hierin identifizierten neuen polymorphen Stellen lokalisiert ist. Solche Oligonukleotide sind brauchbar bei durch eine Polymerase medierten Primerextensionsverfahren zur Detektion eines der hierin beschriebenen neuen Polymorphismen, so dass derartige genotypisierende Oligonukleotide hierin auch als Primerextensionsoligonukleotide bezeichnet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der 3' Terminus eines Primerextensionsoligonukleotids ein Deoxynukleotid, das komplementär zum Nukleotid ist, das unmittelbar benachbart zur polymorphen Stelle angeordnet ist.

[0088] Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform bezieht sich auf einen Bausatz, der wenigstens zwei genotypisierende Oligonukleotide umfasst, die in getrennte Behältnisse abgepackt sind. Dieser Bausatz kann auch andere Komponenten enthalten, wie Hybridisierungspuffer (falls die Oligonukleotide als eine Sonde verwendet werden sollen), welche in einem getrennten Behältnis abgepackt sind. Dienen die Oligonukleotide zur Amplifikation einer Zielregion, dann kann der Bausatz alternativ und in separate Behältnisse abgepackt eine Polymerase und einen Reaktionspuffer enthalten, die für eine Primerextension optimiert sind, welche durch die Polymerase mediert wird, wie PCR. Die oben beschriebenen Oligonukleotidzusammensetzungen und Bausätze hiervon eignen sich bei Verfahren zur Genotypisierung und/oder Haplotypisierung des IL-1 β Gens eines Individuums.

[0089] Die hierin verwendete Angabe Haplotyp bezüglich des IL-1 β Gens soll sich auf den Haplotyp beziehen, der besteht aus der Kombination der Polymorphismen an den Positionen -511 und -31 des IL-1 β Gens, und diese Haplotypen werden wie folgt bezeichnet. Der Haplotyp wird als hohes Cholesterin bezeichnet, wenn beide der C bis T Polymorphismen an der polymorphen Stelle -511 des IL-1 β Gens (Position 1423 der Sequenz X04500) und der T bis C Polymorphismen an der polymorphen Stelle -31 des IL-1 β Gens (Position 1903 der Sequenz X04500) in einer Kopie des IL-1 β Gens vorhanden sind. Umgekehrt wird der Haplotyp als niedriges Cholesterin bezeichnet, wenn beide dieser Polymorphismen in einer gegebenen Kopie des IL-1 β Gens nicht vorhanden sind und daher das Nukleotid an der Stelle -31 dieses IL-1 β Gens ein T ist und das Nukleotid an der Stelle -511 ein C ist in diesem IL-1 β Gen im jeweiligen Chromosom.

[0090] Eine Ausführungsform des Genotypisierungsverfahrens beinhaltet eine Isolation aus dem Individuum eines Nukleinsäuregemisches, das zwei Kopien des IL-1 β Gens umfasst, oder eines Fragments hiervon, das im Individuum vorhanden ist, und eine Bestimmung der Identität des Nukleotidpaars an ein oder mehr der polymorphen Stellen in den zwei Kopien, um einen IL-1 β Genotyp dem Individuum zuzuordnen. Es versteht sich natürlich für den Fachmann, dass zwei Kopien eines Gens in einem Individuum das gleiche Allel oder auch unterschiedliche Allele sein können. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das genotypisierende Verfahren eine Bestimmung der Identität des Nukleotidpaars an jeder polymorphen Stelle.

[0091] Typischerweise wird das Nukleinsäuregemisch oder das Protein aus einer einem Individuum entnommenen Probe, wie einer Blutprobe oder einer Gewebeprobe, isoliert. Geeignete Gewebeproben schließen Voll-

blut, Samen, Speichel, Tränen, Urin, fäkales Material, Schweiß, Mundhöhlenabstriche, Haut, und Biopsien spezieller Organgewebe ein, wie Muskel- oder Nervengewebe und Haare. Die Nukleinsäuregemische können genomische DNA, Messenger Polyribonukleotid (mRNA) oder cDNA umfassen, und bei den letzten beiden Fällen muss die biologische Probe aus einem Organ erhalten sein, in dem das IL-1 β Gen exprimiert ist. Weiterhin wird es vom Fachmann verstanden werden, dass mRNA oder cDNA Präparate nicht verwendet werden würden zur Detektion von Polymorphismen, die in Introns, in 5' und 3' nicht-transkribierten Regionen oder in Promotorregionen lokalisiert sind. Wenn ein IL-1 β Genfragment isoliert wird, muss es die zu genotypisierenden polymorphen Stellen enthalten.

[0092] Eine Ausführungsform des Haplotypisierungsverfahrens umfasst die Isolierung eines Nukleinsäuremoleküls, das nur eine der zwei Kopien des IL-1 β Gens enthält, von einem Individuum, oder eines Fragments davon, das in dem Individuum vorhanden ist, und Bestimmung in der einen Kopie die Identität des Nukleotids an einer oder mehr der polymorphen Stellen, und in der anderen Kopie die Zuordnung des IL-1 β Haplotyps an das Individuum. Die Nukleinsäure kann unter Verwendung jeglicher zur Trennung der zwei Kopien des IL-1 β Gens oder Fragments fähigen Verfahren isoliert werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, eines der oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung des IL-1 β Isogens, wobei auf das in vivo Klonen als bevorzugte Lösung abgezielt ist.

[0093] Es ist für den Fachmann selbstverständlich, dass jeder individuelle Klon nur die Haplotypinformation von einer der beiden Kopien des IL-1 β Gens, die in einem Individuum vorhanden sind, liefern wird. Wird die Haplotypinformation auch für die andere Kopie des Individuums gewünscht, müssen zusätzliche der IL-1 β Klonen getestet werden. Typischerweise sollten mindestens fünf Klonen getestet werden zur mehr als 90 %igen Wahrscheinlichkeit der Haplotypisierung beider Kopien des IL-1 β Gens in einem Individuum. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleotid an jeder der polymorphen Stellen identifiziert.

[0094] Bei einer vorzügten Ausführungsform wird ein IL-1 β Haplotypenpaar für ein Individuum bestimmt durch eine Identifikation der Phasensequenz von Nukleotiden an jeder polymorphen Stelle in jeder Kopie des IL-1 β Gens, das im Individuum vorhanden ist. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Haplotypisierungsverfahren die Identifikation der Phasensequenz an jeder polymorphen Stelle in jeder Kopie des IL-1 β Gens. Bei einer Haplotypisierung beider Kopien des Gens wird die Identifikationsstufe vorzugsweise durchgeführt mit jeder Kopie des Gens, das in getrennten Behältnissen angeordnet ist. In Betracht gezogen wird aber auch, dass falls die beiden Kopien mit unterschiedlichen Tags markiert sind oder ansonsten getrennt unterscheidbar oder identifizierbar sind, es in einigen Fällen auch möglich sein könnte, das Verfahren im gleichen Behältnis durchzuführen. Ist beispielsweise die erste und die zweite Kopie des Gens mit verschiedenen ersten und zweiten fluoreszierenden Farbstoffen markiert, und ein Allel-spezifisches Oligonukleotid mit einem dritten fluoreszierenden Farbstoff markiert, um die polymorphen Stellen zu prüfen, dann würde eine Kombination aus dem ersten und dem dritten Farbstoff den Polymorphismus in der ersten Genkopie identifizieren, während eine Kombination des zweiten und des dritten Farbstoffs den Polymorphismus in der zweiten Genkopie identifizieren würde.

[0095] Bei beiden Verfahren zur Genotypisierung und Haplotypisierung kann die Identität eines Nukleotids (oder eines Nukleotidpaares) an einer polymorphen Stelle bestimmt werden durch Amplifikation einer Zielregion, die die polymorphe Stelle enthält, direkt aus einer oder beiden Kopien des IL-1 β Gens oder eines Fragments hiervon, und die Sequenz der amplifizierten Region durch herkömmliche Verfahren bestimmt werden. Es ist für den Fachmann selbstverständlich, dass das gleiche Nukleotid zweimal an einer polymorphen Stelle bei Individuen detektiert werden kann, die an dieser Stelle homozygot sind, während zwei unterschiedliche Nukleotide detektiert werden, wenn das Individuum für diese Stelle heterozygot ist. Der Polymorphismus kann direkt identifiziert werden, was als eine Identifikation vom Positivtyp bekannt ist, oder durch Interferenz, die als Identifikation vom Negativtyp bezeichnet wird. Ist für ein SNP beispielsweise bekannt, dass es sich dabei um Guanin und Cytosin in einer Referenzpopulation handelt, dann kann eine Stelle positiv determiniert werden für entweder Guanin oder Cytosin für alle an dieser Stelle homozygoten Individuen, oder sowohl Guanin als auch Cytosin sein, wenn das Individuum an dieser Stelle heterozygot ist. Alternativ kann die Stelle negativ determiniert werden als Nicht-Guanin (und somit als Cytosin/Cytosin), oder als Nicht-Cytosin (und somit als Guanin/Guanin).

[0096] Ferner kann die Identität des Allels, das an irgendeiner hierin beschriebenen neuen polymorphen Stelle vorhanden ist, indirekt determiniert werden durch Genotypisierung einer polymorphen Stelle, die hierin nicht beschrieben ist, nämlich in einem Verknüpfungsungleichgewicht mit der jeweils interessierenden polymorphen Stelle. Beide Stellen werden dann als in einem Verknüpfungsungleichgewicht befindlich bezeichnet, wenn eine besondere Variante an einer Stelle die Vorhersagbarkeit einer anderen Variante an der zweiten Stelle verbes-

sert, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf Stevens, Mol. Diag., Band 4, Seiten 309 bis 317 (1999). Polymorphe Stellen, die sich im Verknüpfungsungleichgewicht mit den derzeit bekannten polymorphen Stellen befinden, können in Regionen des Gens oder in anderen genomischen Regionen lokalisiert sein, die hierin nicht geprüft worden sind. Eine Genotypisierung einer polymorphen Stelle in einem Verknüpfungsungleichgewicht mit den hierin beschriebenen neuen polymorphen Stellen kann unter anderem durchgeführt werden nach einem der oben beschriebenen Verfahren zur Detektion der Identität des Allels an einer polymorphen Stelle, ohne hierauf beschränkt zu sein.

[0097] Die Zielregion kann amplifiziert werden unter Anwendung irgendeines auf ein Oligonukleotid gerichteten Amplifikationsverfahrens, unter Einschluss von beispielsweise einer Polymerasekettenreaktion (PCR) (US 4 965 188 A), einer Ligasekettenreaktion (LCR) (siehe Barany et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 88, Seiten 189 bis 193 (1991), und auch WO 90 001 069 A), und durch einen Oligonukleotidligrationsassay (OLA) (siehe Landegren et al., Science, Band 241, Seiten 1077 bis 1080 (1988)), ohne hierauf beschränkt zu sein. Die bei solchen Verfahren als Primer oder Sonden brauchbaren Oligonukleotide sollen spezifisch an eine Region der Nukleinsäure hybridisieren, die die polymorphe Stelle enthält oder dazu benachbart ist. Typischerweise haben die Oligonukleotide eine Länge zwischen 10 und 35 Nukleotiden und vorzugsweise zwischen 15 und 30 Nukleotiden. Besonders bevorzugt sind die Oligonukleotide 20 bis 25 Nukleotide lang. Die genaue Länge des Oligonukleotids ist von vielen Faktoren abhängig, die für den Durchschnittsfachmann Routine und Praxis sind.

[0098] Es können auch andere bekannte Amplifikationsverfahren von Nukleinsäure verwendet werden, um die Zielregion zu amplifizieren, unter Einschluss von beispielsweise auf einer Transkription basierenden Amplifikationssystemen (siehe US 5 130 238 A und US 5 169 766 A, EP 0 329 822 A und WO 89 006 700 A) und isothermale Verfahren (siehe Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 89, Seiten 3392 bis 3396 (1992)).

[0099] Ein Polymorphismus in der Zielregion kann auch vor oder nach einer Amplifikation unter Anwendung eines von mehreren bekannten und auf einer Hybridisierung basierenden Verfahrens geprüft werden. Zur Durchführung solcher Verfahren werden typisch Allel-spezifische Oligonukleotide verwendet. Die Allel-spezifischen Oligonukleotide können als unterschiedlich markierte Sondenpaare verwendet werden, wobei ein Vertreter des Paars eine perfekte Übereinstimmung zu einer unterschiedlichen Variante zeigt.

[0100] Bei einigen Ausführungsformen lässt sich mehr als eine polymorphe Stelle auf einmal detektieren unter Anwendung eines Satzes Allel-spezifischer Oligonukleotide oder Oligonukleotidpaare. Vorzugsweise haben die Vertreter des Satzes Schmelztemperaturen innerhalb von 5°C oder bevorzugter innerhalb von 2°C jeweils zueinander, wenn eine Hybridisierung an jeder der polymorphen Stellen detektiert werden soll.

[0101] Eine Hybridisierung eines Allel-spezifischen Oligonukleotids an ein Zielpolynukleotid kann durchgeführt werden mit beiden Gebilden in Lösung, oder eine solche Hybridisierung lässt sich auch durchführen, wenn entweder das Oligonukleotid oder das Zielpolynukleotid kovalent oder nichtkovalent an einem festen Träger fixiert ist. Eine Befestigung kann beispielsweise mediert sein durch Antikörper-Antigeninteraktionen, Poly-L-Lys, Streptavidin oder Avidin-Biotin, Salzbrücken, hydrophobe Interaktionen, chemische Bindungen, UV Verfahren zur Vernetzung und dergleichen. Allel-spezifische Oligonukleotide können direkt auf dem festen Träger oder im Anschluss an eine Synthese auf den festen Träger gebunden synthetisiert werden. Zu festen Trägern, die sich bei den erfindungsgemäßen Detektionsverfahren verwenden lassen, gehören Substrate, die hergestellt sind aus Silicon, Glas, Kunststoff, Papier und dergleichen, und diese Verfahren können beispielsweise durchgeführt werden in Löchern, wie Lochplatten mit 96 Löchern, mit Objektträgern, Folien, Membranen, Fasern, Chips, Schälchen und Kügelchen. Der feste Träger kann behandelt, beschichtet oder derivatisiert sein, um die Immobilisation des Allel-spezifischen Oligonukleotids oder der Zielnukleinsäure zu erleichtern.

[0102] Der Genotyp oder Haplotyp für das IL-1 β Gen eines Individuums kann auch bestimmt werden durch Hybridisierung einer Nukleinsäureprobe, die eine oder beide Kopien des Gens enthält, zu Nukleinsäurerenien oder Subreihen hiervon, wie dies in WO 95 011 995 A beschrieben ist. Diese Reihen würden eine Batterie Allel-spezifischer Oligonukleotide enthalten, die jeweils die polymorphen Stellen repräsentieren, die im Genotyp oder Haplotyp eingeschlossen sein sollen.

[0103] Die Identität der Polymorphismen kann auch bestimmt werden durch Anwendung einer Nichtübereinstimmungs-Detektionstechnik unter Einschluss von unter anderem dem RNase Schutzverfahren unter Verwendung von Ribosonden (siehe Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Band 82, Seite 7575 (1985), und Meyers et., Science, Band 230, Seite 1242 (1985)) und von Proteinen, die Nukleotid Fehlpaarungen erkennen, wie das E. coli mutS Protein, wozu beispielsweise hingewiesen wird auf Modrich, Ann. Rev. Genet., Band 25, Seiten 229 bis 253 (1991). Alternativ können Variantenallele auch identifiziert werden durch eine Analyse eines

Einzelstrangkonformationspolymorphismus (SSCP) (siehe Orita et al., Genomics, Band 5, Seiten 874 bis 879 (1989), und Humphries et al., Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Herausgeber Elles, Seiten 321 bis 340 (1996)) oder durch eine Denaturierungsgradientengelektrophorese (DGGE) (siehe Wartell et al., Nucl. Acids Res., Band 18, Seiten 2699 bis 2706 (1990), und Sheffield et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, Band 86, Seiten 232 bis 236 (1989)).

[0104] Zur Identifikation des Polymorphismus kann auch vom Verfahren einer Polymerase-medierten Primerextension Gebrauch gemacht werden. In der Patentliteratur und der wissenschaftlichen Literatur sind mehrere derartige Verfahren beschrieben worden, und hierzu gehören das Verfahren einer genetischen Bitanalyse (WO 92 015 712 A) und der Ligase/Polymerase-medierten genetischen Bitanalyse (US 5 679 524 A). Damit verwandte Verfahren werden beispielsweise beschrieben in WO 91 002 087 A, WO 90 009 455 A, WO 95 017 676 A, US 5 302 509 A und US 5 945 283 A. Extendierte Primer, die einen Polymorphismus enthalten können, können durch eine Massenspektrometrie detektiert werden, wie dies in US 5 605 798 A beschrieben ist. Ein weiteres Verfahren einer Primerextension ist eine Allel-spezifische PCR. Siehe Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Band 17, Seite 8392 (1989), Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Band 19, Seiten 6877 bis 6882 (1991), WO 93/022456 A und Turki et al., J. Clin. Invest., Band 95, Seiten 1635 bis 1641 (1995). Darüber hinaus können multiple polymorphe Stellen auch untersucht werden durch Amplifizierung multipler Regionen der Nukleinsäure unter Anwendung von Sätzen an Allel-spezifischen Primern, wie dies beispielsweise in WO 89 010 414 A beschrieben ist.

[0105] Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die Daten der Haplotypfrequenz für jede ethnogeographische Gruppe geprüft, um zu bestimmen, ob diese konsistent ist mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (siehe Hartl et al., Principles of Population Genomics, Sinauer Associates, 3. Auflage, Sunderland, MA (1997) postuliert, dass die Frequenz einer Auffindung des Haplotypenpaares H_1/H_2 gleich ist zu $P_{H-W}(H_1/H_2) = 2p(H_1)p(H_2)$, wenn $H_1 \neq H_2$ ist, und $P_{H-W}(H_1/H_2) = p(H_1)p(H_2)$, falls H_1 für H_2 steht. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der beobachteten und der erwarteten Haplotypenfrequenz können auf ein oder mehr Faktoren beruhen unter Einschluss einer signifikanten Inzucht in die Populationsgruppe, eines stark selektiven Drucks auf das Gen, von verzerrter Auswahl und/oder Fehlern bei Genotypisierungsverfahren. Werden bei einer ethnogeographischen Gruppe breite Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet, dann kann die Anzahl an Individuen in dieser Gruppe erhöht werden, um zu sehen, ob sich die Abweichung aufgrund einer verzerrten Auswahl ergibt. Reduziert ein größerer Probenumfang die Differenz zwischen den beobachteten und den erwarteten Haplotypenpaarfrequenzen nicht, dann kann eine Betrachtung einer Haplotypisierung des Individuums unter Anwendung eines Verfahrens zur direkten Haplotypisierung in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise nach der Technologie des Clasper® Systems (US 5 866 404 A), durch SMD oder durch eine Allel-spezifische Langbereichs-PCR. Hierzu wird beispielsweise hingewiesen auf Michalotos-Beloin et al., Nucl. Acids Res., Band 24, Seiten 4841 bis 4843 (1996).

[0106] Bei einer Ausführungsform dieses Verfahrens zur Vorhersage eines IL-1 β Haplotypenpaares ist bei der Stufe der Zuordnung eine Durchführung der folgenden Analyse involviert. Zuerst wird jedes der möglichen Haplotypenpaare mit den Haplotypenpaaren bei der Referenzpopulation verglichen. Allgemein stimmt nur eines der Haplotypenpaare in der Referenzpopulation mit einem möglichen Haplotypenpaar überein, und dieses Paar wird dem Individuum zugeordnet. Gelegentlich ist nur ein Haplotyp, der durch das Referenzhaplotypenpaar repräsentiert ist, konsistent mit einem möglichen Haplotypenpaar für ein Individuum, und in solchen Fällen wird das Individuum einem Haplotypenpaar zugeordnet, das diesen bekannten Haplotyp enthält, und ein neuer Haplotyp wird durch Subtraktion des bekannten Haplotyps vom möglichen Haplotypenpaar abgeleitet. In seltenen Fällen ist entweder kein Haplotyp in der Referenzpopulation konsistent mit dem möglichen Haplotypenpaar, oder es sind multiple Referenzhaplotypenpaare mit den möglichen Haplotypenpaaren konsistent. In solchen Fällen wird das Individuum vorzugsweise haplotypisiert unter Verwendung eines Verfahrens zur direkten molekularen Haplotypisierung, wie beispielsweise der Technologie des Clasper® Systems (US 5 866 404 A), durch SMD oder durch eine Allel-spezifische Langbereichs-PCR. Hierzu wird beispielsweise hingewiesen auf die oben bereits zitierte Literaturstelle von Michalotos-Beloin et al.

Glossar

Allel

[0107] Eine besondere Form eines Gens oder einer DNA Sequenz an einer speziellen chromosomal Stelle (Ort).

Antikörper

[0108] Hierzu gehören unter anderem polyklonale und monoklonale Antikörper, chimäre, einzelkettige und humanisierte Antikörper und auch Fab Fragmente unter Einschluss der Produkte einer Fab Expressionsbibliothek oder einer sonstigen Immunglobulinexpressionsbibliothek.

Kandidatengen

[0109] Ein Gen, das als verantwortlich hypothetisiert ist für eine Krankheit, einen Zustand oder die Antwort auf eine Behandlung oder in Korrelation mit irgendeinem dieser Zustände.

Vollgenotyp

[0110] Die nicht-phasige 5'- bis 3'-Sequenz eines Nukleotidpaars, das bei allen bekannten polymorphen Stellen am Ort eines Paars an homologen Chromosomen in einem einzelnen Individuum zu finden ist.

Vollhaplotyp

[0111] Die 5'- bis 3'-Sequenz von Nukleotiden, die bei allen bekannten polymorphen Stellen in einem Ort an einem einzelnen Chromosom eines einzelnen Individuums zu finden ist.

Gen

[0112] Ein Segment der DNA, das alle Information für die regulierte Biosynthese eines RNA Produkts enthält, unter Einschluss von Promotoren, Exons, Introns und anderen untranslatierten Regionen, die die Expression kontrollieren.

Genotyp

[0113] Eine nicht-phasige 5'- bis 3'-Sequenz eines Nukleotidpaars, das an ein oder mehr polymorphen Stellen in einem Ort an einem Paar homologer Chromosomen bei einem Individuum zu finden ist. Unter einem Genotyp wird hierin auch ein Vollgenotyp und/oder ein Subgenotyp verstanden, wie er noch beschrieben wird.

Genotypisierung

[0114] Ein Verfahren zur Bestimmung eines Genotyps bei einem Individuum.

Haplotyp

[0115] Eine 5'- bis 3'-Sequenz von Nukleotiden, die an einer oder mehr verknüpften polymorphen Stellen an einem Ort eines einzelnen Chromosoms bei einem einzelnen Individuum zu finden ist.

Haplotypendaten

[0116] Information bezüglich ein oder mehr der folgenden Angaben für ein spezifisches Gen: eine Auflistung der Haplotypenpaare bei jedem Individuum in einer Population, eine Auflistung der verschiedenen Haplotypen in einer Population, eine Frequenz eines jeden Haplotyps in dieser oder in anderen Populationen, und irgendwelche bekannten Assoziationen zwischen ein oder mehr Haplotypen und einem Merkmal.

Haplotypenpaar

[0117] Zwei Haplotypen, die für einen Ort bei einem einzelnen Individuum zu finden sind.

Genotypisierung

[0118] Ein Verfahren zur Bestimmung von ein oder mehr Haplotypen bei einem Individuum unter Einschluss des Einsatzes von Familienstammbäumen, molekularen Techniken und/oder einer statistischen Inferenz.

Homolog

[0119] Eine in der Technik verwendete generische Bezeichnung zur Indikation einer Polynukleotid- oder Polypeptidsequenz mit einem hohen Ausmaß einer Sequenzverwandtschaft für eine Referenzsequenz. Solche Verwandtschaften können quantifiziert werden durch Bestimmung des Ausmaßes der Identität und/oder Ähnlichkeit zwischen den zwei Sequenzen gemäß obiger Definition. Unter diesen generischen Ausdruck fallen auch die Bezeichnungen ortholog und paralog.

Identität

[0120] Eine Beziehung zwischen zwei oder mehr Polypeptidsequenzen oder zwei oder mehr Polynukleotidsequenzen, was durch Vergleich der Sequenzen bestimmt worden ist. Im Allgemeinen bezieht sich eine Identität auf ein exaktes Nukleotid zum Nukleotid oder zur Aminosäure auf eine Aminosäurekorrespondenz der zwei Polynukleotid- oder zwei Polypeptidsequenzen, über die Länge der zu vergleichenden Sequenzen.

Isoform

[0121] Eine besondere Form eines Gens, einer mRNA, einer cDNA oder des Proteins, das hierdurch einkodiert wird, das sich von anderen Formen durch die besondere Sequenz und/oder Struktur unterscheidet.

Isogen

[0122] Eine der Isoformen eines in einer Population zu findenden Gens. Ein (sogenannter) enthält alle Polymorphismen, die in der besonderen Isoform des Gens vorhanden sind.

Isoliert

[0123] Anwendung auf ein biologisches Molekül, wie RNA, DNA, Oligonukleotid oder Protein, wobei isoliert bedeutet, dass das Molekül im Wesentlichen frei an sonstigen biologischen Molekülen ist, wie Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden, Kohlehydraten oder sonstigem Material wie zellularem Debris und Wachstumsmedien. Allgemein soll sich die Bezeichnung isoliert nicht auf ein komplettes Fehlen eines solchen Materials oder eine komplett Abwesenheit von Wasser, Puffern oder Salzen beziehen, sofern all dies nicht in Mengen vorhanden ist, die substantiell mit den erfindungsgemäßen Verfahren interferieren.

Verknüpfung

[0124] Hierdurch wird die Tendenz von Genen beschrieben, die zusammen geerbt werden können als ein Ergebnis ihrer Lokation am gleichen Chromosom, was in Prozent Rekombination zwischen den Stellen gemessen wird.

Verknüpfungsungleichgewicht

[0125] Hierdurch wird eine Situation beschrieben, bei der gewisse Kombinationen an genetischen Markern mehr oder weniger häufig in der Population auftreten, als dies von ihrem Abstand zu erwarten wäre. Dies impliziert, dass eine Gruppe von Markern koordiniert geerbt ist. Herkömmlich kann dies von einer reduzierten Rekombination in der Region oder von einem Foundereffekt, wo es ausreichend Zeit gegeben hat für ein Erreichen eines Gleichgewichts, da einer der Marker in die Population eingeführt worden ist.

[0126] Eine Lokation an einem Chromosom oder einem DNA Molekül entsprechend einem Gen oder einem physikalischen oder phänotypischen Merkmal.

Modifizierte Basen

[0127] Hierzu gehören beispielsweise tritylierte Basen und unübliche Basen wie Inosin. DNA und RNA können einer Reihe an Modifikationen unterzogen werden. Ein Polynukleotid umfasst daher chemisch, enzymatisch oder metabolisch modifizierte Formen von Polynukleotiden, wie sie in der Natur typisch zu finden sind, und auch die chemischen Formen von DNA und RNA, wie sie für Viren und Zellen charakteristisch sind. Die Bezeichnung Polynukleotid umfasst auch relativ kurze Polynukleotide, die häufig als Oligonukleotide bezeichnet werden.

Natürliches Vorkommen

[0128] Eine für die Bestimmung verwendete Bezeichnung, dass das Objekt, wofür dieses Anwendung findet, beispielsweise ein natürlich vorkommendes Polynukleotid oder Polypeptid, aus einer natürlichen Quelle isoliert werden kann und nicht vom Menschen beabsichtigt modifiziert worden ist.

Nukleotidpaar

[0129] Die Nukleotide, die an einer polymorphen Stelle an den beiden Kopien eines Chromosoms eines Individuums zu finden sind.

Ortholog

[0130] Ein Polynukleotid oder Polypeptid, das funktional äquivalent ist zum Polynukleotid oder Polypeptid bei einer anderen Spezies.

Paralog

[0131] Ein Polynukleotid oder Polypeptid, das innerhalb der gleichen Spezies funktional ähnlich ist.

Phasig

[0132] Anwendung auf eine Sequenz von Nukleotidpaaren für zwei oder mehr polymorphe Stellen an einem Ort, wobei Phasig die Kombination von Nukleotiden bedeutet, die an den polymorphen Stellen an einer einzelnen Kopie des Ortes bekannt ist.

Polymorphe Stelle (PS)

[0133] Eine Position innerhalb eines Ortes, an der wenigstens zwei alternative Sequenzen bei einer Population zu finden sind, deren häufigste eine Frequenz von nicht mehr als 99% hat.

Polymorphe Variante

[0134] Ein Gen, eine mRNA, eine cDNA, ein Polypeptid oder ein Peptid, wo die Nukleotidsequenz oder die Aminosäuresequenz infolge der Anwesenheit eines Polymorphismus im Gen von einer Referenzsequenz variiert.

Polymorphismus

[0135] Irgendeine Sequenzvariante, die mit einer Frequenz von > 1% in einer Population vorhanden ist.

[0136] Die Sequenzvariation, die bei einem Individuum an einer polymorphen Stelle zu beobachten ist. Zu Polymorphismen gehören Nukleotidsubstitutionen, Insertionen, Deletionen und Makrosatelliten, die zu detektierbaren Unterschieden in einer Genexpression oder Proteinfunktion führen können, aber nicht müssen.

Polymorphismusdaten

[0137] Information über ein oder mehr der folgenden Angaben für ein spezifisches Gen: Lokation polymorpher Stellen, Sequenzvariation an diesen Stellen, Frequenz von Polymorphismen in ein oder mehr Populationen, unterschiedliche Genotypen und/oder Haplotypen, wie sie für das Gen bestimmt sind, Frequenz von ein oder mehr dieser Genotypen und/oder Haplotypen bei ein oder mehr Populationen, jegliche bekannte Assoziationen zwischen einem Merkmal und einem Genotyp oder einem Haplotyp für das Gen.

Datenbank für Polymorphismus

[0138] Sammlung von polymorphen Daten, die in einem systematischen oder methodischen Weg angeordnet sind und zu denen durch elektronische oder sonstige Mittel individuell Zugang besteht.

Polynukleotid

[0139] Jede RNA oder DNA, bei der es sich um nicht-modifizierte oder modifizierte RNA oder DNA handelt. Zu Polynukleotiden gehören unter anderem einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, DNA, die ein Gemisch von einzelsträngigen und doppelsträngigen Regionen ist, einzelsträngige und doppelsträngige RNA, und RNA, die ein Gemisch von einzelsträngigen und doppelsträngigen Regionen ist, Hybridmoleküle, die DNA und RNA umfassen, und die einzelsträngig oder typischer doppelsträngig sind, oder ein Gemisch einzelsträngigen und doppelsträngigen Regionen. Darüber hinaus bezieht sich Polynukleotid auf dreisträngige Regionen, die RNA oder DNA oder sowohl RNA als auch DNA umfassen. Die Bezeichnung Polynukleotid schließt auch DNAs oder RNAs ein, die ein oder mehr modifizierte Basen enthalten, und DNAs oder RNAs mit Grundgerüsten, die aus Stabilitätsgründen oder anderen Gründen modifiziert sind.

Polypeptid

[0140] Irgendein Polypeptid, das zwei oder mehr Aminosäuren umfasst, die über Peptidbindungen oder modifizierte Peptidbindungen miteinander verbunden sind, wie über Peptidisostere. Polypeptid bezieht sich sowohl auf kurze Ketten, die gewöhnlich auch als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, und auf längere Ketten, die allgemein als Proteine bezeichnet werden. Polypeptide können Aminosäuren enthalten, die anders sind als die 20 Gen-einkodierten Aminosäuren. Zu Polypeptiden gehören Aminosäuresequenzen, die modifiziert sind entweder durch natürliche Prozesse, wie eine post-transkriptionale Prozessierung, oder durch chemische Modifikationstechniken, die in der Fachwelt bekannt sind. Solche Modifikationen sind in Basisarbeiten und stärker detailliert in Monographien, und auch in der umfangreichen Forschungsliteratur beschrieben.

Populationsgruppe

[0141] Eine Gruppe von Individuen, die eine gemeinsame Charakteristik teilt, wie einen ethnogeographischen Ursprung, einen medizinischen Zustand, eine Antwort auf eine Behandlung und dergleichen.

Referenzpopulation

[0142] Eine Gruppe von Subjekten oder Individuen, der vorausgesagt wird, dass es sich dabei um Vertreter von ein oder mehr Charakteristiken der Populationsgruppe handelt. Typisch bezieht sich die Referenzpopulation auf die genetische Variation in der Population an einer bestimmten Höhe von wenigstens 85%, vorzugsweise von wenigstens 90%, bevorzugter von wenigstens 95% und noch bevorzugter von wenigstens 99%.

Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP)

[0143] Das Auftreten einer Nukleotidvariabilität an einer einzelnen Nukleotidposition im Genom innerhalb einer Population. Innerhalb eines Gens oder innerhalb intergenischen Regionen des Genoms kann eine SNP auftreten. SNPs lassen sich unter Anwendung einer Allel-spezifischen Amplifikation (ASA) untersuchen. Für diese Zwecke sind wenigstens drei Primer erforderlich. Ein üblicher Primer wird in einem reversen Komplement im zu untersuchenden Polymorphismus angewandt. Bei diesem herkömmlichen Primer können zwischen 50 und 1500 bp von der polymorphen Basis sein. Die anderen zwei (oder mehr) Primer sind miteinander identisch mit der Ausnahme, dass die finalen 3'-Rasenschwankungen einem der beiden (oder mehreren) Allele entsprechen, so dass es zum Polymorphismus kommt. Sodann werden zwei (oder mehr) PCR Reaktionen an einer Proben-DNA durchgeführt, und zwar jede unter Verwendung des üblichen Primers und eine unter Verwendung der Allel-spezifischen Primer.

Spleißvariante

[0144] Die aus RNA Molekülen erzeugten cDNA Moleküle werden zu Beginn aus der gleichen genomischen DNA Sequenz transkribiert, die aber einer alternativen RNA Spleißeung unterzogen worden ist. Alternativ kommt es zu einer RNA Spleißeung, wenn ein primäres RNA Transkript eine Spleißeung erfährt, allgemein für die Entfernung von Introns, was zur Bildung von mehr als einem mRNA Molekül führt, wovon jedes für unterschiedliche Aminosäuresequenzen kodiert. Die Bezeichnung Spleißvariante bezieht sich auch auf die Proteine, die durch die obigen cDNA Moleküle kodiert werden.

Subgenotyp

[0145] Die nicht-phänotypische 5'- bis 3'-Sequenz von Nukleotiden, die an einem Subsatzz der bekannten polymorphen Stellen bei einem Ort an einem Paar homologer Chromosomen bei einem einzelnen Individuum zu sehen sind.

Subhaplotyp

[0146] Die 5'- bis 3'-Sequenz von Nukleotiden, die an einem Subsatzz der bekannten polymorphen Stellen bei einem Ort an einem einzelnen Chromosom bei einem einzelnen Individuum zu finden sind.

Subjekt

[0147] Ein menschliches Individuum, dessen Genotypen oder Haplotypen oder Antwort auf eine Behandlung oder einen Krankheitzzustand zu bestimmen sind.

Behandlung

[0148] Ein Stimulus, der intern oder extern einem Subjekt verabreicht wird.

Nicht-phänotypisch

[0149] Angewandt auf eine einzelne Sequenz von Nukleotidpaaren für zwei oder mehr polymorphe Stellen an einem Ort bedeutet nicht-phänotypisch, dass die Kombination von Nukleotiden, die an den polymorphen Stellen an einer einzelnen Kopie des Ortes vorhanden sind, nicht bekannt ist.

[0150] Ergänzend wird hierzu auch hingewiesen auf Human Molecular Genetics, 2. Auflage, Tom Strachan und Andrew P. Read, John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, 1999.

Zitierte Literaturstellen

[0151] Die Diskussion der hierin angegebenen Literaturstellen ist lediglich als eine Zusammenfassung der Erklärungen beabsichtigt, die durch die jeweiligen Autoren gemacht werden, wobei kein Anerkenntnis gemacht wird, dass irgendeine dieser Literaturstellen einen Stand der Technik bedeutet.

[0152] Die vorliegende Erfindung soll nicht auf die hierin beschriebenen Ausführungsformen beschränkt sein, die als einzelne Illustrationen individueller Aspekte der Erfindung beabsichtigt sind. Die vorliegende Erfindung wird lediglich durch den Wortlaut der Ansprüche limitiert.

<110> Sridar Kudaravalli
 Rosarelis Torres
 Curt Wolfgang
 Mihael Polymeropoulos
 Novartis AG

<120> Methoden zur Vorhersage von Cholesterinerhöhungen
 während einer Therapie mit einem Immunsuppressivum

<130> 4-32702A/USN

<150> US 60/415 123
 <151> 2002-09-30

<160> 8

<170> SchnellSEQ für die Version 4.0 von Windows

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 1
 gcagagctca tctggcattg 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 2
 tatgtggac aaagtggaaag 20

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 3
 gcacaacgat tgtcaggaaa ac 22

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<400> 4
 atgcatacac acaaagaggc ag 22

<210> 5
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 ctgcaattga cagagagctc ccgaggcaga gaacagcacc caaggttagag accca 55

<210> 6
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 ctgcaattga cagagagctc ctgaggcaga gaacagcacc caaggttagag accca 55

<210> 7
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 tcctacttct gctttgaaa gccataaaaa cagcgaggga gaaactggca gataccaaac 60
 ctc 63

<210> 8
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 tcctacttct gctttgaaa gctataaaaa cagcgaggga gaaactggca gataccaaac 60
 ctc 63

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vitro Bestimmung des Ausmaßes einer Cholesterinerhöhung im Serum, die bei einem Patienten während einer Behandlung mit einer immunsuppressiven Medikation auftritt, umfassend eine Bestimmung für die zwei im Patienten vorhandenen Kopien des IL-1 β Gens der Identität eines Nukleotidpaars, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus dem Nukleotidpaar an der polymorphen Stelle -511 C \rightarrow T (an der Position 1423 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und eine Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare AT sind, einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung, falls ein Paar AT ist und ein Paar GC ist, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare GC sind, und des Nukleotidpaars an der polymorphen Stelle -31 T \rightarrow C (Position 1903 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare CG sind, einer Zuordnung des Patienten zu einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung, falls ein Paar AT ist und ein Paar GC ist, und einer Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung, falls beide Paare AT sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend:

- a) eine Bestimmung für die zwei Kopien des Chromosoms, das das IL-1 β Gen enthält, das im Patienten vorhanden ist, des Haplotyps, der besteht aus der Kombination an Polymorphismus in der -511 Position und dem Polymorphismus in der -31 Position des IL-1 β Gens, und
- b) eine Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer hohen Cholesterinerhöhung, falls beide Kopien den Haplotyp mit hohem Cholesterin enthalten, und
- c) eine Zuordnung des Patienten zu einer Gruppe mit einer unmittelbaren Cholesterinerhöhung, falls eine dieser Kopien den Haplotyp mit hohem Cholesterin enthält, und eine den Haplotyp mit niedrigem Cholesterin enthält, und
- d) eine Zuordnung des Patienten einer Gruppe mit einer niedrigen Cholesterinerhöhung, falls beide Kopien den Haplotyp mit einem niedrigen Cholesterin enthalten.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Verfahren zur Bestimmung der Identität des Nukleotidpaars oder des Haplotyps, umfassend eine Auffindung von SNPs irgendwo in diesem Chromosom, die in einem Bindungsungleichgewicht mit dem -511 Polymorphismus oder dem -31 Polymorphismus im IL-1 β Gen stehen, und eine Verwendung dieser Beziehung dieses SNP oder dieser SNPs zur Bestimmung der Art des jeweils interessierenden Nukleotidpaars oder Haplotyps.

4. Verwendung eines Immunsuppressivums in Kombination mit einer Cholesterin-senkenden Medikation

zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung eines Patienten mit einer durch ein Immunsuppressivum induzierten Cholesterinerhöhung im Serum, die mit einem Polymorphismus in einem IL-1 β Gen assoziiert ist, wobei dieser Polymorphismus aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus einer polymorphen Stelle –511 C → T (Position 1423 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens und einer polymorphen Stelle –31 T → C (Position 1903 der Sequenz X04500) des IL-1 β Gens, wobei dieser Polymorphismus bestimmt wird für zwei Kopien des IL-1 β Gens, und worin der Patient, falls die polymorphe Stelle –511 C → T ist, ein Paar hat, das AT ist, und ein Paar hat, das GC ist, oder beide Paare AT sind, oder, falls die polymorphe Stelle –31 T → C ist, ein Paar hat, das AT ist, und ein Paar hat, das GC ist, oder beide Paare CG sind.

5. Verwendung nach Anspruch 4, worin das Immunsuppressivum aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Rapamycin (Sirolimus, RAPAMUNTM), Everolimus (CERTICANTM) (RAD), Mykophenolsäure und Mykophenolatmofetil (CELLCEPTTM) (MMF), Azathioprin (IMURANTM), Cyclosporin (NEORALTM) und Tacrolimus (PROGRAFTM).

6. Verbindung nach Anspruch 4, worin das Immunsuppressivum Everolimus ist.

7. Verwendung nach Anspruch 4, 5 oder 6, worin die Cholesterin-senkende Medikation aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus Colestipol (COLESTIDTM), Clofibrat (ATROMID-STM), Gemfibrozil (LOPIDTM), Fenofibrat (TRICORTM), Fluvastatin (LESCOLTM), Atorvastatin (LIPITORTM), Lovastatin (MEVACORTM), Pravastatin (PRAVACOLTM), Simvastatin (ZOCORTM) und Niacin (NIASPANTM).

8. Verwendung eines Bausatzes zur Bestimmung einer Cholesterinerhöhung im Serum in einer Probe, wobei dieser Bausatz umfasst:

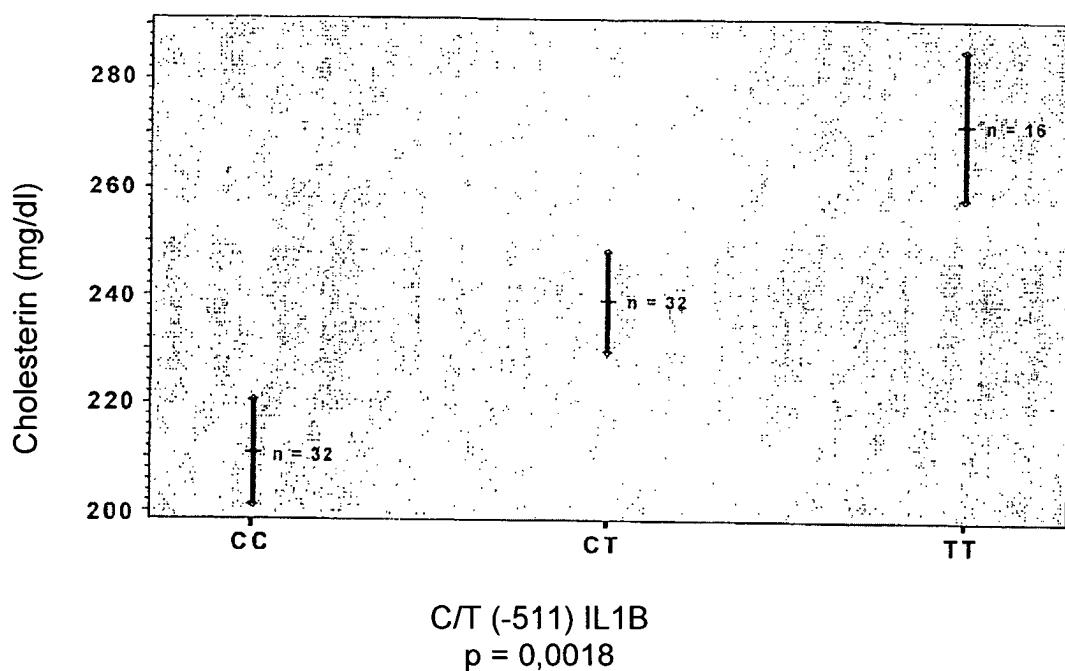
a) ein Behältnis, das wenigstens ein Reagenz enthält, das für eine Detektion der Art des Nukleotidpaars an einer polymorphen Stelle in einem IL-1 β Gen spezifisch ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus der polymorphen Stelle –511 des IL-1 β Gens und der polymorphen Stelle –31 des IL-1 β Gens, und
b) Instruktionen für empfohlene Behandlungsoptionen auf Basis der Art dieses Nukleotidpaars.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei dieser Bausatz weiter umfasst Instruktionen zur Bestimmung der Art des Haplotyps des IL-1 β Gens aus den Ergebnissen des obigen Bausatzes und Instruktionen für empfohlene Behandlungsoptionen auf Basis der Art des indizierten Haplotyps.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

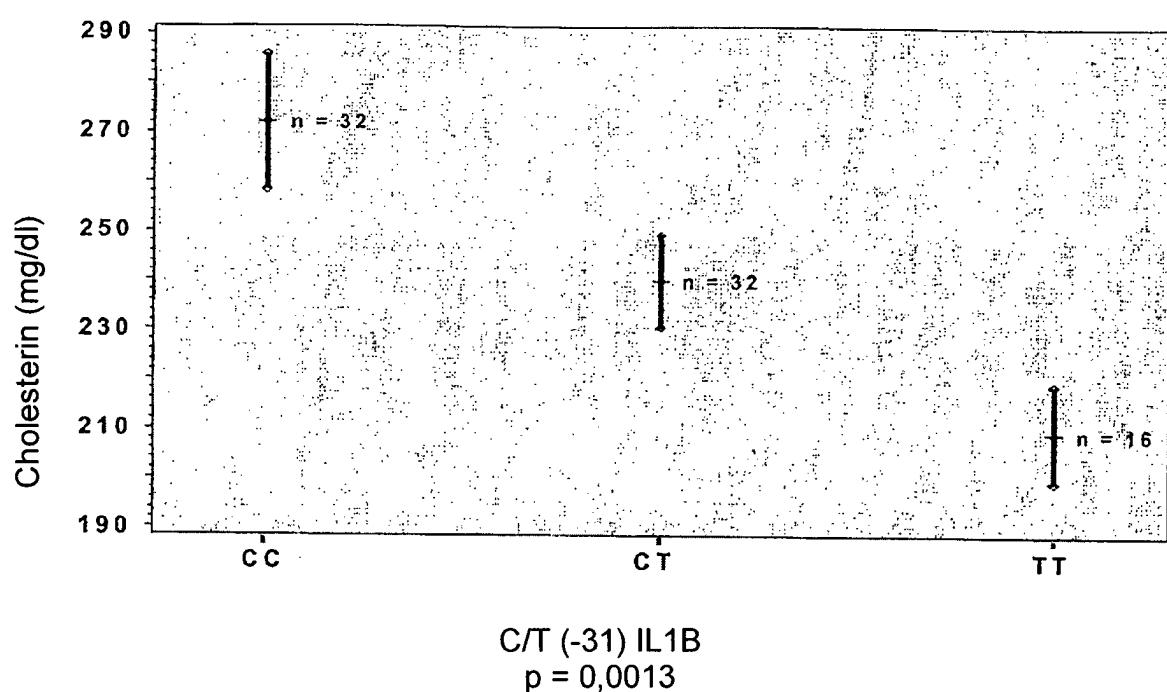
Figur 1.

Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD B251 kombiniert sind

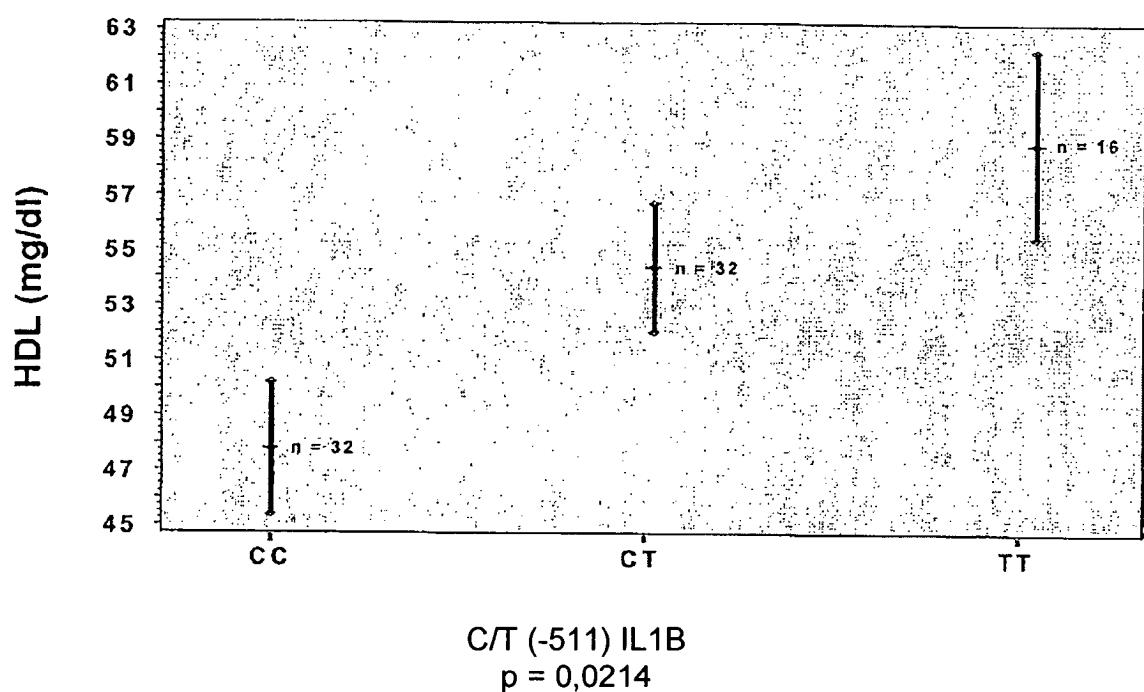


Figur 2.

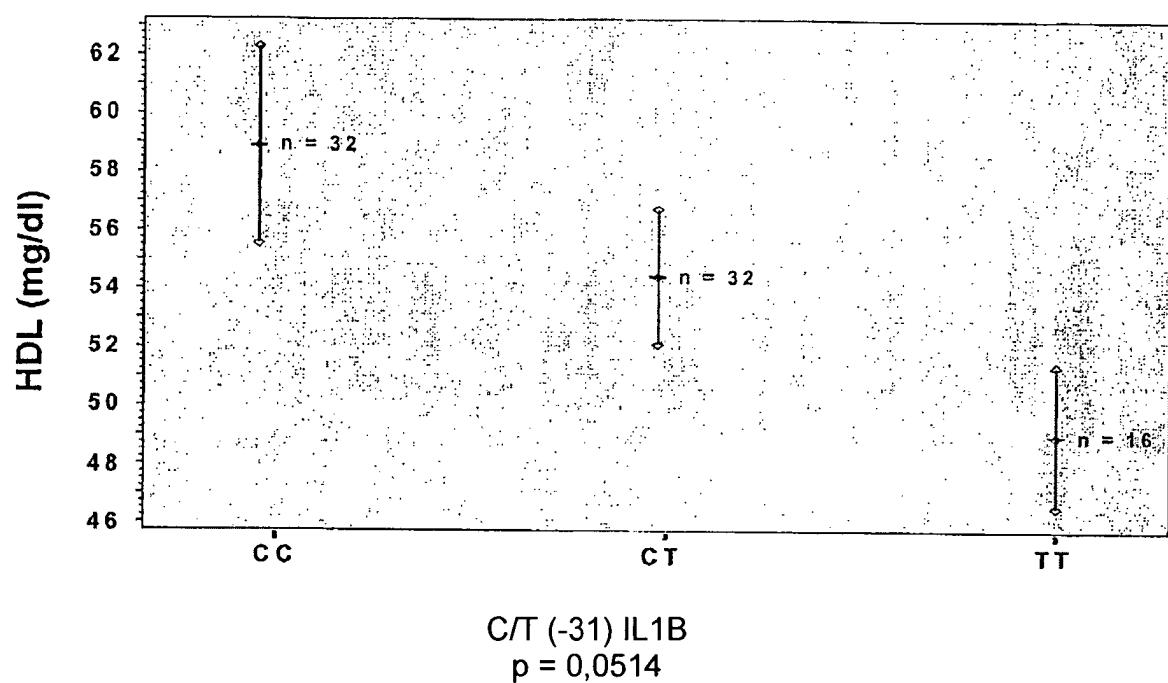
Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der gesamten Cholesterinspiegel im Vergleich zu den (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit dem RAD B251 kombiniert sind



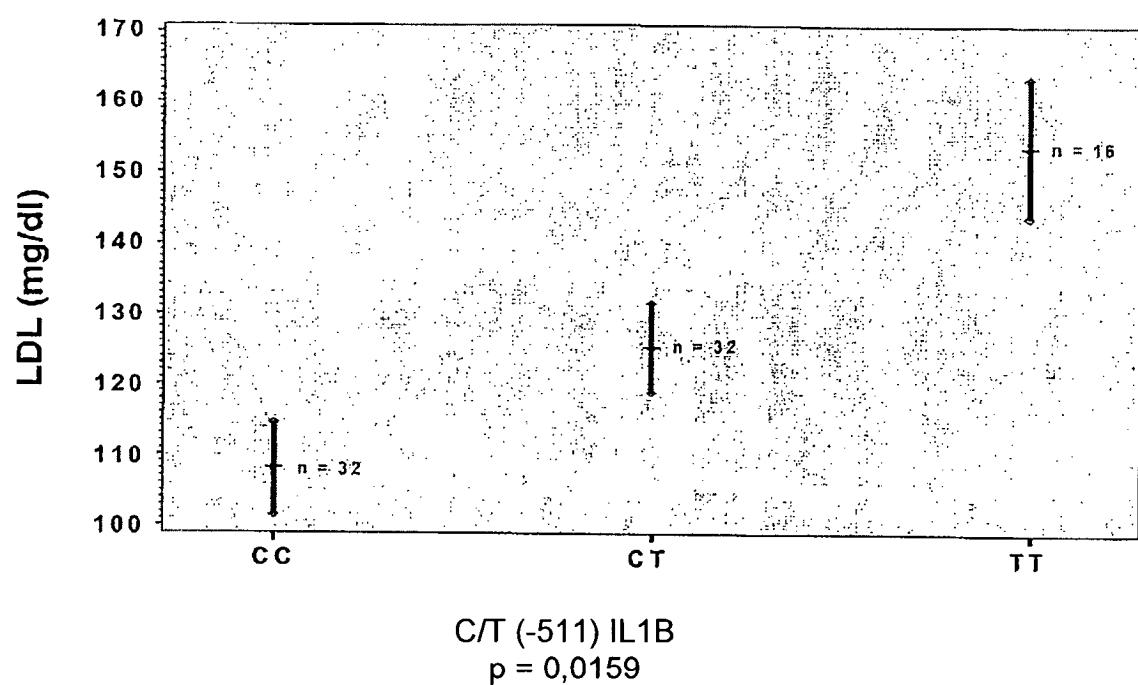
Figur 3. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der HDL Cholesterin-
spiegel im Vergleich zu den (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in
allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit
dem RAD B251 kombiniert sind



Figur 4. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der HDL Cholesterin-
spiegel im Vergleich zu den (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in
allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit
dem RAD B251 kombiniert sind



Figur 5. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der LDL Cholesterin-
spiegel im Vergleich zu den (-511) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in
allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit
dem RAD B251 kombiniert sind



Figur 6. Mittel der kleinsten Fehlerquadrate (LS Mittel) der LDL Cholesterin-
spiegel im Vergleich zu den (-31) IL-1 β CC, CT oder TT Genotypen in
allen Behandlungsgruppen, die innerhalb des klinischen Versuchs mit
dem RAD B251 kombiniert sind

