



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0005926
(43) 공개일자 2008년01월15일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 31/165</i> (2006.01) <i>A61P 9/12</i> (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7024124
 (22) 출원일자 2007년10월19일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2007년10월19일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/009913
 국제출원일자 2006년03월20일
 (87) 국제공개번호 WO 2006/102177
 국제공개일자 2006년09월28일
 (30) 우선권주장
 60/664,248 2005년03월22일 미국(US)
 60/742,401 2006년02월06일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 노파르티스 아게
 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
 (72) 발명자
 구, 제시
 미국 01702 메사츨세스주 프라밍햄 리저버 리지 9
 마이어, 조안
 미국 01702 메사츨세스주 프라밍햄 싱글레타리 레
 인 150
 (74) 대리인
 양영준, 위혜숙</p> |
|--|--|

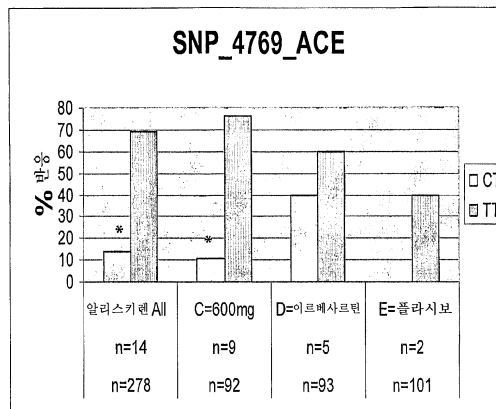
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 항고혈압제로서 알리스키렌의 효능에 대한 바이오마커

(57) 요약

항고혈압제로서 알리스키렌의 효능의 임상 시험 결과와 유전적 변화 사이의 잠재적인 연관을 평가하기 위하여 후향적 약리유전학적 분석을 수행하였다. 레닌-안지오텐신-알도스테론계(RAS)로부터의, 또는 혈압 조절에서 이전에 관련된 12개의 유전자에서 48개의 다형성을 검사하였다. 안지오텐신 전환 효소(ACE) 유전자의 하나의 다형성, 안지오텐신 II 유형 2 수용체(AGTR2) 유전자의 2개의 다형성, 및 평균 좌위 이완기 및 수축기 혈압 감소의 임상적 파라미터 사이에서 현저한 연관성이 나타났다. 이러한 효과는 이르베사르탄과 플라시보 처치에서는 관찰되지 않았으나, 알리스키렌 처치에 특이적이었다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

선택된 환자군에서 고혈압 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 알리스키렌의 용도로서, 상기 환자군이 환자에 존재하는 바이오마커 유전자의 유전적 다형성에 기초하여 선택되고, 상기 유전적 다형성이 고혈압 치료에서 알리스키렌의 효능의 지표인 용도.

청구항 2

제1항에 있어서, 유전적 다형성이 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 중의 SNP_4769; 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자 중의 SNP_1445; AGTR2 유전자 중의 SNP_4795; 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 용도.

청구항 3

(a) 개체에 존재하는 2카피의 유전자에 대해, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자, 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는, 하나 이상의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍의 실체 (identity)를 얻는 단계; 및

(b) 상기 다형성좌에서의 뉴클레오티드쌍이 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성임을 나타내는 경우, 그 개체를 "고" 반응자군으로 지정하는 단계

를 포함하는, 고혈압을 갖는 개체의 항고혈압제 치료에 대한 반응성을 결정하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 유전적 다형성이 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 중의 SNP_4769; 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자 중의 SNP_1445; AGTR2 유전자 중의 SNP_4795; 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 항고혈압제가 알리스키렌인 방법.

청구항 6

(a) 개체에 존재하는 2 카피의 유전자에 대해, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자, 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍의 실체를 얻는 단계; 및

(b) (i) 상기 다형성좌에서의 뉴클레오티드쌍이 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성임을 나타내는 경우에는, 개체에 항고혈압제를 투여하고, 또는 (ii) 다형성좌에서의 뉴클레오티드쌍이 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성이 아님을 나타내는 경우에는, 그 개체에 대체 치료를 투여하는 단계

를 포함하는, 개체에서 고혈압을 치료하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 유전적 다형성이 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 중의 SNP_4769; 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자 중의 SNP_1445; AGTR2 유전자 중의 SNP_4795; 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 항고혈압제가 알리스키렌인 방법.

청구항 9

(a) 개체에 존재하는 2 카피의 유전자에 대해, 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자의 SNP_4795에서의

뉴클레오티드쌍의 실체를 얻는 단계; 및

(b) (i) SNP_4795에서의 뉴클레오티드쌍이 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성임을 나타내는 경우에는, 그 개체에 항고혈압제를 투여하고, 또는 (ii) SNP_4795에서의 뉴클레오티드쌍이 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성이 아님을 나타내는 경우에는, 그 개체에 대체 치료를 투여하는 단계

를 포함하는, 개체에서 평균 좌위 수축기 혈압 (MSSBP)를 감소시키는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 항고혈압제가 알리ски렌인 방법.

청구항 11

(a) 이완기 혈압의 감소가 필요한 개체에 존재하는 2 카피의 유전자에 대해, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자, 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는, 하나 이상의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍의 실체를 얻는 단계; 및

(b) (i) 상기 하나 이상의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍의 실체가 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성임을 나타내는 경우에는, 그 개체에 항고혈압제를 투여하고, 또는 (ii) 하나 이상의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍의 실체가 그 개체가 항고혈압제 치료에 반응성이 아님을 나타내는 경우에는, 그 개체에 대체 치료를 투여하는 단계

를 포함하는, 개체에서 이완기 혈압을 감소시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 항고혈압제가 알리ски렌인 방법.

청구항 13

(a) 고혈압에 대한 알리ски렌으로의 치료에 높은 반응성을 나타내는 선택된 유전자 영역 내의 다형성 부위에서 뉴클레오티드쌍을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 첫번째 유전자 산물과 약물을 접촉시키는 단계;

(b) 상기 첫번째 유전자 산물에 대한 약물의 활성을 확인하는 단계;

(c) 고혈압에 대한 알리ски렌으로의 치료에 낮은 반응성을 나타내는 선택된 유전자 영역 내의 다형성 부위에서 뉴클레오티드쌍을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 두번째 유전자 산물과 약물을 접촉시키는 단계;

(d) 상기 두번째 유전자 산물에 대한 약물의 활성을 확인하는 단계;

(e) 단계 (b)에서 확인된 활성과 단계 (d)에서 확인된 활성 사이의 유사점과 차이점을 확인하는 단계

를 포함하는, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 및 안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2) 유전자로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 유전자 산물의, 약물 활성의 표적으로서의 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 시험관내 조직 샘플의 분석 시험에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 항고혈압제로서 알리ски렌의 효능의 지표인 유전적 다형성의 측면에 관한 것이다.

배경기술

<2> 레닌 안지오텐신계 (RAS)는 혈압의 조절과 부피 항상성에 있어서 중요한 역할을 한다. 레닌은 순환하는 부피와 혈압의 감소에 반응하여 신장에서 분비되고, 기질인 안지오텐시노겐을 절단하여 비활성 데카펩티드 안지오텐신 I (Ang I)을 형성한다. Ang I은 안지오텐신 전환 효소 (ACE)에 의하여 활성 옥타펩티드 Ang II로 전환된다. Ang II는 혈관수축을 유도하는 세포 수용체와 상호작용하여, 부신 수질 및 전접합 신경 말단으로부터 카테콜아민을 유리한다. 이는 또한 알도스테론 분비 및 소듐 재흡수를 촉진한다. 또한, Ang II는 레닌 유리를 억제하여, 시스템에 음성 피드백을 야기한다. 따라서, Ang II는 다양한 수준에서 (예를 들어, 혈관, 교감신경계, 부

신 수질 및 피질) 작용하여 혈관 저항성과 혈압을 증가시킨다.

- <3> 레닌 안지오텐신계 (RAS)는 다양한 수준에서 차단될 수 있다. 레닌 억제제는 RAS를 ACE 억제제 및 Ang II 길항제보다 높은 수준으로 차단하기 때문에, 이들은 RAS의 성분들에 상이한 효과를 가진다. 레닌 억제제를 투여한 후에는, Ang I 및 Ang II 둘다의 형성이 차단된다. 한편, ACE 억제 후에는, Ang II 형성만이 차단되고, Ang I의 수준이 증가한다. 따라서, Ang I은 여전히 치마제 시스템 (chymase system)과 같은 다른 경로에 의하여 Ang II 및 다른 안지오텐신 펩티드로 전환될 수 있다.
- <4> 알리스키렌 (SPP100)은 저분자량 (609.8) 비-펩티드 (non-peptide) 항고혈압제이다. 문헌[Wood JM et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308(4): 698-705 (September 5, 2003)] 참조. 작용 기전은 시장의 다른 항고혈압제와는 상이하다. 알리스키렌은 레닌 안지오텐신계 (RAS)를 그의 첫번째 속도 결정 단계에서 차단한다. 시험관내에서, 알리스키렌은 인간 레닌의 강력한 억제제이다 ($IC_{50} = 0.6 \text{ nM}$). 생체내에서, 소듐-결핍된 명주원숭이 (marmoset)로의 여러가지 연구에서 경구로 (p.o.) 또는 정맥내로 (i.v.) 투여된 알리스키렌은 혈장 레닌 활성 (PRA)의 완전한 억제, 평균 동맥압 (MAP)의 지속적인 감소, 활성 및 전체 레닌의 혈장 농도의 현저한 증가를 유발한다. 인간에서, 알리스키렌의 혈장 농도는 신속하게 증가하여 3-5시간 내에 피크 수준에 도달한다. C_{max} 및 AUC는 둘다 용량에 따라서 비선형으로 증가한다. 알리스키렌의 반감기는 대략 25시간이고, 그의 생체이용율은 대략 2.7%이다.
- <5> 질병의 진단과 치료에 대한 통상적인 의학적 접근법은 임상 자료 단독에 기초하거나, 또는 진단 시험과 연결된다. 그러한 전통적인 실시는 종종 개개의 개체에 있어서 처방 약물 치료의 효능에 최적이지 않은 치료적 선택을 유발하거나, 또는 부작용 가능성을 최소화한다. 진단 특이적인 치료법 (즉, 치료진단 (theranostic))은 질병을 진단하고, 정확한 치료 방식을 선택하고, 개체의 반응을 모니터링하는데 유용한 시험을 제공하는 신형 의학 기술 분야이다. 즉, 치료진단은 개체에서의 약물 반응을 예측하고, 측정하는데 유용하다 (즉, 개체화된 의약). 치료진단 시험은 또한 치료가 지연을 최소화하도록 변화될 수 있도록 개체에서 치료 효능을 초기의 객관적 지표를 제공하거나, 또는 특히 치료로부터의 이익을 얻을 수 가능성이 큰, 치료에 대한 개체를 선택하는데 유용하다.
- <6> 특정 약물에 대한 반응과 개별 환자의 유전적 프로파일 사이의 상관관계를 확립하는 약물유전학의 발전은 새로운 치료진단 접근법의 개발에 기초가 된다. 이와 같이, 유전자 서열 및 유전자 발현에 있어서 환자-대-환자의 평가가 당업계에 요구된다. 유전자 프로파일링의 보통의 형태는 단일 뉴클레오티드 다형성 ("SNPs")이라고 불리는 DNA 서열 변화의 확인에 의존하며, 이는 각각의 약물 반응에서 환자-대-환자 변화를 야기하는 유전적 돌연변이 (genetic mutation)의 유형 중 하나이다. 이는 약물 반응과 관련된 개체의 유전형을 동정하는데 유용한 SNPs와 같은 유전적 돌연변이를 동정하고 확인하는 것이 당업계에서 요구된다.

발명의 상세한 설명

- <7> 발명의 요약
- <8> 본 발명은 당업계의 필요에 대한 반응을 제공한다. 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자의 다형성, 안지오텐신 II 유형 2 수용체 (AGTR2) 유전자의 다형성 및 항고혈압제로 알리스키렌에 의한 치료에 따른 평균 좌위 이완기 및 수축기 혈압 저하의 임상적 파라미터 사이의 현저한 관계를 확인한다. 이들 효과는 이르베사르탄 및 플라스비오 치료에서는 발견되지 않지만, 알리스키렌 치료에는 특이적이다.
- <9> 따라서, 본 발명은 선택된 환자군에서 고혈압의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 알리스키렌의 용도를 제공한다. 치료되는 환자군은 환자에서 존재하는 바이오마커 유전자의 유전적 다형성에 기초하여 선택된다. 바이오마커 유전자는 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 및 안지오텐신 II 유형 2 수용체 (AGTR2) 유전자이다. 유전적 다형성은 고혈압 치료에서 알리스키렌의 효능의 지표이다.
- <10> 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 다형성 유전자좌에서 뉴클레오티드쌍의 확인에 기초하여, 알리스키렌으로 고혈압이 있는 개체의 치료에 대한 반응성을 결정하는 진단 방법을 제공한다.
- <11> 본 발명은 추가로 개체에서 고혈압을 치료하기 위한 치료진단 방법을 제공한다. 본 발명의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍이 개체가 항고혈압제로 치료하는데 반응성임을 나타내는 경우에는, 항고혈압제를 개체에게 투여한다. 한 실시태양에서, 항고혈압제는 알리스키렌이다. 본 발명의 다형성 유전자좌에서의 뉴클레오티드쌍이 개체가 항고혈압제로 치료하는 것에 반응성이 아님을 나타내는 경우에는 다른 치료법을 개체에게 투여한다.

- <12> 본 발명은 일반적으로 주간 보행 이완기 혈압 (DADBP)을 감소시키는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 본 발명은 평균 좌위 이완기 혈압 (MSDBP)을 감소시키는 치료진단 방법을 제공한다.
- <13> 또한, 본 발명은 주간 보행 수축기 혈압 (DASBP)을 감소시키는 방법을 제공한다. 구체적인 실시태양에서, 본 발명은 평균 좌위 수축기 혈압 (MSSBP)을 감소시키는 치료진단 방법을 제공한다.
- <14> 또한, 본 발명은 고혈압 치료를 위한 항고혈압제의 효능을 결정하기 위한 임상 시험에 포함되는 개체를 선택하는 방법을 제공한다. 개체는 개체의 유전자형이 그 개체의 고혈압을 치료하기 위한 항고혈압제의 효능의 지표인 경우에, 시험에 포함될 수 있다. 개체의 유전자형이 그 개체의 고혈압을 치료하기 위한 항고혈압제의 효능의 지표가 아닌 경우에는, 개체를 시험에 포함시킬 수 없다.
- <15> 본 발명은 본 발명의 방법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명은 또한 약물 발견의 표적으로 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 산물 및 안지오텐신 II 유형 2 수용체 (AGTR2) 유전자 산물을 사용하는 방법을 제공한다.

실시예

- <135> 경증 내지 중등도 본태성 고혈압 환자에서 알리스키렌과 플라시보 및 이르베사르탄의 비교
- <136> 서론 및 요약. 항고혈압제로서 알리스키렌의 효능의 임상 시험 결과와 유전적 변화 사이의 잠재적인 연관성을 평가하기 위하여 후향적 약리유전학적 분석을 수행하였다. 구체적으로는, 레닌-안지오텐신-알도스테론계 (RAS)으로부터의, 또는 혈압 조절에서 이전에 관련된 12개의 유전자에서 48개의 다형성을 검사하였다. 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자의 하나의 다형성, 안지오텐신 II 유형 2 수용체 (AGTR2) 유전자의 2개의 다형성, 및 평균 좌위 이완기 및 수축기 혈압 감소의 임상적 파라미터 사이에서 현저한 연관이 나타났다. 이러한 효과는 이르베사르탄과 플라시보 처치에서는 관찰되지 않았으나, 이 분석에서 알리스키렌 처치에 특이적이었다.
- <137> 임상 시험. 멀티센터, 랜덤, 이중-맹검, 평행군 임상 시험을 고안하여 경증 내지 중등도 고혈압 환자군에서 플라시보와 비교한 알리스키렌의 효능과 안전성을 검사하였다. 처치는 8주 동안이었으며, 즉 임상시험 최종시점은 이 특정 시험에서 8주였다. 시험의 1차적인 목표는 경증 내지 중등도 본태성 고혈압 환자에서 150 mg 이르베사르탄 및 플라시보에 비교하여, 알리스키렌 150 mg, 알리스키렌 300 mg, 및 알리스키렌 600 mg의 혈압 강화 효과를 평가하는 것이다. 인구통계학적 특성은 일반적으로 처치군에 걸쳐 동등하였다. 환자들의 대부분은 백인 (Caucasia)이고, 65세 이하이며, 평균 연령은 50대 중반이었다. 남성과 여성의 전체적인 분포는 동일하였다.
- <138> 분석된 1차적인 효능 변수는 MSDBP 변화 (기준선으로부터의 MSDBP 감소)였다. 분석된 2차적인 효능 변수는 MSSBP 변화 (기준선으로부터의 MSSBP 감소), 반응자비, 기준선으로부터의 혈장 레닌 활성 (PRA) 감소 및 혈장 레닌 (AREN) 증가였다.
- <139> 1차적인 효능에 있어서, 쌍대 (pairwise) 비교는 활성 처치의 모든 용량에서 처치 (intend-to treat (ITT)) 군에서 최종시점 및 제8주에, 또한 각 프로토콜군의 최종시점에서 평균 좌위 이완기 혈압 (MSDBP)의 감소에 있어서 플라시보보다 통계적으로 월등하였다. 유사한 MSDBP 감소가 알리스키렌 150 mg 및 이르베사르탄 150 mg에서 달성되었다. 알리스키렌 300 및 600 mg에서 최대 감소하였으나, 600 mg에서 더 큰 감소가 관찰되지는 않았다.
- <140> 2차 효능과 관련하여, 평균 좌위 수축기 혈압 (MSSBP)에 있어서, 활성 처치의 모든 용량은 최종시점에서 플라시보보다 통계적으로 월등하였다. 제8주에, 알리스키렌 300 및 600 mg은 최종시점에서 플라시보 및 이르베사르탄보다 통계적으로 월등하였다. 유사한 MSSBP 감소가 알리스키렌 150 mg 및 이르베사르탄 150 mg에서 달성되었다. 알리스키렌 300 및 600 mg에서 최대의 감소가 이루어졌으나, 600 mg 용량에서 더 큰 감소가 관찰되지는 않았다.
- <141> 성공적인 반응자 (MSDBP < 90 mm Hg 또는 ≥ 10 mm Hg의 기준선으로부터의 감소; 또는 MSSBP < 140 mm Hg 또는 ≥ 20 mm Hg의 기준선으로부터의 감소로 정의됨)의 비율은, 모든 활성 치료가 최종시점에서 플라시보보다 통계적으로 월등함을 나타내었다. 최종시점에서 ITT 군에 대한 MSDBP 결과는 알리스키렌군에서 59-67% 반응자인 한편, 이르베사르탄에서는 56%이고 플라시보에서는 38%였다. 최종시점에서 ITT 군에 대한 MSSBP 결과는 알리스키렌군에서 57-68% 반응자인 한편, 이르베사르탄에서는 59%이고 플라시보에서는 36%였다. ITT 군에서, 활성 레닌의 용량-관련 평균 증가가 알리스키렌 군에서 관찰되었다 (각각 알리스키렌 150, 300 및 600 mg에 있어서 20.8, 29.9 및 93.6 mu/mL). 알리스키렌 150 mg은 이르베사르탄 150 mg (11.2 mu/mL)보다 레닌의 더 큰 평균 증가를

야기하였다. 이는 레닌 억제제의 작용 기전과 일치하였다.

<142> 임상 시험에 참여한 환자에게 약리유전학적 분석의 참여에 대한 별도의 동의를 제공할 것을 요청하였다. 모든 동의한 환자로부터 혈액 샘플을 각각의 시험 위치에서 수집하고, 코반스 (Covance (Indianapolis, IN, USA))로 운반하였다. 각 환자의 게놈 DNA를 퓨어젠 DNA 단리 키트 (PUREGENE™ DNA Isolation Kit) (D-50K) (Gentra, Minneapolis, Minnesota, USA)를 이용하여 코반스에 의하여 혈액을 추출하였다. 최종적으로, 각각의 처치 암 (treatment arm)의 대략의 동일한 비율로 511명의 환자를 제노타이핑하였다.

<143> **약리유전학적 분석 목적 및 고안.** 후향적인 약리유전학적 분석을 약리유전학적 조사를 위하여 샘플을 제공하기로 동의한 모든 환자들에 대하여 수행하였다. 1차적인 목적은 우선 MSDBP, 또한 2차적으로 MSSBP 및 반응자비로 측정하여, 알리스크렌 처치의 효능의 변화와 유전적 변화 사이의 연관성을 확인하는 것이다.

<144> 후보 유전자 접근법을 사용하여 레닌 안지오텐신계 (RAS)로부터의, 또는 이전에 혈압 조절과 연관되었던 12개의 유전자에서 48개의 다형성을 선택하였다 (표 1). 모든 이용가능한 샘플을 각 SNP에 대하여 제노타이핑하였다. 그후, 연관 연구를 이하와 같이 수행하였다.

표 1

약리유전학적 분석을 위하여 선택된 후보 유전자	
유전자 기호	유전자 명칭
RENBP	레닌 결합 단백질
REN	레닌
ACE	안지오텐신 I 전환 효소 (펩티달-디펩티다제 A) 1
ACE2	안지오텐신 I 전환 효소 (펩티달-디펩티다제 A) 2
AGT	안지오텐시노겐
AGTR1	안지오텐신 II 수용체, 유형 1
AGTR2	안지오텐신 II 수용체, 유형 2
ABCC2/MRP2	ATP-결합 카세트, 서브패밀리 C (CFTR/MRP), member 2
AGTRAP	안지오텐신 II 수용체-연관 단백질
CYP11B2	시토크롬 P450, 패밀리 11, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 2
	알도스테론 신타제
TGFB 1	변형 성장 인자, 베타 1
NOS3/eNOS	산화질소 신타제 3 (내피 세포)

<146> **제노타이핑.** 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 분석을 공공 dbSNP 데이터베이스 및 독점 Celera/ABI 데이터베이스로부터의 정보를 이용하여 고안하였다. 제노타이핑 분석에 대하여 얻어진 프로브 세트를 ABI's Assays-by-Design (등록상표) platform을 위하여 형성하였다. 문헌[Livak KJ, Marmaro J, & Todd JA, Nature Genetics 9: 341-2 (1995)]. 제노타이핑을 제조자의 지시에 따라서 10 ng의 게놈 DNA에 대하여 수행하였다.

<147> 내부 CPG 자리 코드, 유전자, 경로, 데이터베이스 참고자료 및 효과를 포함한, 이 분석에서의 제노타이핑된 다형성의 목록을 이하의 표 2에 기재하였다.

표 2A

제노타이핑된 다형성

pg 자리 id	유전자	rs 수	기재
5284	ABCC2	hCV11305436	인트론
4786	ABCC2	rs2273697	A>G I417V
4783	ABCC2	rs2756104	인트론
4784	ABCC2	rs2756109	인트론
4785	ABCC2	rs3740066	T>C I1324I
4782	ABCC2	rs717620	비번역 A>G
4797	ABCC2	rs8187710	Y1515C
5286	ACE	hCV1247681	인트론
4766	ACE	rs4293	인트론
4769	ACE	rs4317	C>T P32S
4767	ACE	rs4329	인트론
4768	ACE	rs4362	C>T F1129F
400	ACE	rs4364	A>C S712R
1345	ACE		ins/del
4746	ACE2	rs2285666	인트론
1669	ACE2	rs879922	인트론
4773	AGT	rs1926723	인트론
1667	AGT	rs4762	T>C M207T
2	AGT	rs699	C>T T268M
4772	AGT	rs943580	개념
4796	AGTR1	rs2638362	인트론
4780	AGTR1	rs3772616	인트론
411	AGTR1	rs5182	C>T L191L

<148>

표 2B

제노타이핑된 다형성			
pg 자리 id	유전자	rs 수	기재
5287	AGTR2	hCV1841569	
1445	AGTR2	rs1403543	비번역
186	AGTR2	rs5193	비번역
4795	AGTR2-LD	rs4497127	개념
5288	AGTRAP	hCV516817	인트론
4787	AGTRAP	rs4073574	개념
4789	CYP11B2	rs4539	G>A R173K
575	CYP11B2	rs4544	C>T T339I
4788	CYP11B2	rs4545	A>G S435G
3541	CYP11B2	rs6431	인트론
4792	NOS3	rs1007311	인트론
482	NOS3	rs1799983	G>T E298D
4791	NOS3	rs1800779	개념
4464	NOS3	rs1800780	인트론
4793	NOS3	rs891512	인트론
5292	REN	rs11571092	인트론
1513	REN	rs1464816	인트론
4771	REN	rs3730103	인트론
4794	REN	rs6704321	C>G P403A
4770	RENBp	rs2269371	G>A G274D
2407	RENBp	rs2269372	인트론
1676	RENBp	rs762656	개념
5285	TGFB1	hCV11707868	인트론
4790	TGFB1	rs2241717	인트론
4798	TGFB1	rs8105161	인트론

<149>

<150> 통계적 분석. 유전자형-표현형 연관 연구 및 관련 분석은 아날리스트 (Analyst (등록상표))를 사용하여 SAS에서 수행하였다.

<151> 연관 시험은 우성에 대한 가정 없이 독립 변수로 분류별 유전자형을 사용하고, 종속 변수로 다양한 효능 변수를 사용하였다. 연속적인 종속 변수 시험은 ANCOVA 분석을 사용하였고, 로지스틱 회귀가 분류별 종속 변수에 대하여 사용되었다. 유전자형-표현형 연관 분석에서의 공동변량 (covariate)은 처치, 시험 영역 및 기준선 측정이다.

<152> ANCOVA 분석은 각각의 처치군에 대하여 동일한 모델로 반복하였다. 또한, 인자로서 처치 및 영역으로, 또한 공동변량으로 기준선으로 로지스틱 회귀 모델을 이용하여 반응자의 백분율을 분석하였다. 모든 데이터셋에서 $p < 0.05$ 의 연관이 유의적인 것으로 간주하였다.

<153> 안지오텐신 전환 효소 (ACE). Ang I은 안지오텐신 전환 효소 (ACE)에 의하여 활성 옥타펩티드 Ang II로 전환된다. SNP_4769는 RAS의 이 중요한 효소의 6개의 다른 다형성과 함께 환자 중에서 제노타이핑하였다. SNP_4769와 기준선으로부터의 MSDBP 감소의 1차적인 변수 변화 사이에 ($p=0.0058$), 또한 반응자비의 2차 변수와 유의적인 연관이 관찰되었다 ($p=0.001$). 기준선으로부터의 MSSBP 감소의 다른 2차 변수에 있어서, 유의적인 연관은 없었으나, 단지 동일한 경향성이 관찰되었다 ($p=0.0745$).

<154> ANCOVA 분석을 각 처치군에서 반복하는 경우에, 연관은 알리스키렌 처치군에서만 관측되며, 이르베사르탄 또는 플라시보군에서는 관찰되지 않았다. 임의의 SNP와 2차 파라미터인 혈장 레닌 활성 (PRA) 및 활성 레닌 (AREN) 사이에 유의적인 연관이 발견되지 않았다. 알리스키렌 특이적인 효과를 이하의 표 3에 나타내었다.

표 3

알리스키렌 처치군에서의 MSDBP, MSSBP와 반응자비에 대한 ACE 및 AGTR2 변이체의 효과

	SNP_4769			SNP_1445			SNP_4795		
	TT	CT	CC	AA	AG	GG	GG	GA	AA
n	278	14	0	106	69	118	106	72	115
MSDBP 감소 (mmHg)	-11.1	-4.7	NA	-11.2	-13.2	-9.3	-11.1	-13.3	-9.0
p	0.0058*			0.0074*			0.0022*		
MSSBP 감소	-13.7	-6.2	NA	-13.9	-15.7	-11.8	-13.6	-16.3	-11.5
p	0.0384*			0.1360			0.0479*		
반응자비	69%	14%	NA	74%	71%	58%	74%	73%	56%
p	0.0024*			0.1399			0.0382*		

<155>

<156>

SNP_4769는 ACE 효소의 코돈 32에서 프롤린을 세린으로 아미노산 서열을 변화시키는 코딩 SNP이다. ACE I/D 다형성 (인트론 16에서 287 bp Alu 반복 서열의 존재 또는 부재)은 ACE 수준의 조절 및 그의 RAS의 세분화 (ramification)와 연관되어 있다. 문헌[Rigat B et al., J. Clin. Invest. 86(4): 1343-6 (1990)].

<157>

안지오텐신 II 수용체, 유형 2 (AGTR2). AGTR2는 안지오텐신 II 수용체, 유형 II를 코딩한다. 유형 I 안지오텐신 II 수용체는 몇몇 항고혈압제의 표적이다. Ang II는 유형 I 수용체로의 결합을 통하여 혈관수축 및 혈압 상승을 유도하도록 신호한다. 유형 II 안지오텐신 II 수용체는 ACE 활성을 저해하고, 유형 I 수용체에 의하여 매개되는 작용을 약화시킴으로써, 혈관이완을 야기한다고 나타났다. 문헌[Hunley TE et al., Kidney Int. 57(2): 570-7 (2000); Ichiki T et al, Nature 377(6551): 748-50 (1995)].

<158>

유의적인 연관이 AGTR2 SNPs (SNP_1445 및 SNP_4795)과 기준선으로부터의 MSDBP 감소의 1차 효능 변수 사이에서 관찰되었다 (각각, p=0.0078 및 0.0004). SNP_4795는 또한 기준선으로부터의 MSSBP 감소의 2차 변수와는 유의적인 연관을 나타내었으나 (p=0.0245), 반응자비의 다른 2차 파라미터와는 유의적인 연관이 나타나지 않았다. 한편, SNP_1445는 2차 파라미터와 유의적인 연관이 나타나지 않았다. 어떤 SNPs와 2차 파라미터 혈장 레닌 활성 (PRA) 및 활성 레닌 (AREN) 사이에 유의적인 연관이 발견되지 않았다.

<159>

ANCOVA 분석을 각 처치군에 대하여 반복하는 경우, 연관은 알리스키렌 처치군에서만 관찰되었으며, 이르베사르탄 또는 플라시보군에서는 관찰되지 않았다. 알리스키렌 처치 환자에서의 유전자형의 효과는 상기 표 3에 나타내었다.

<160>

이들 2개의 SNP는 비-코딩이다. SNP_1445는 AGTR2 유전자의 비번역 영역에 있으며, SNP_4795는 AGTR2 유전자와 연결 불균형인 게놈 영역으로부터 유래된다.

<161>

논의. 요약하면, ACE 유전자 중의 한 변이체와 AGTR2 유전자 중의 2개의 SNP는 1차 파라미터 MSDBP와 유의적인 연관을 나타낸다. ACE 변이체와 AGTR2 변이체 중 하나는 또한 2차 파라미터 MSSBP 및 반응자비와 유의적인 연관을 나타내었다. 두번째 AGTR2 변이체는 유의적인 연관을 나타내지 않았지만, 두번째 파라미터와 동일한 경향성만을 나타내었다. 이러한 유전자형의 효과는 알리스키렌 처치군에서만 관찰되었으며, 이르베사르탄 또는 플라시보군에서는 관찰되지 않았다. 그러므로, 상기 효과는 알리스키렌에 특이적인 약리유전학적 효과이다.

<162>

ACE 변이체 효과는 특히 흥미로운데, TT 및 CT 유전자형 사이의 차이가 매우 큰 것으로 나타나기 때문이다 (MSDBP 감소 11.1 대 4.7 mm Hg, MSSBP 감소 13.7 대 6.2 mm Hg, 및 반응자비 69% 대 14%). CC 호모접합의 유전자형이 환자들 중에서 관찰되지 않았고, 이는 관찰된 대립 유전자 빈도가 0.1의 대립유전자 빈도로 보고된 SNP DB보다 훨씬 낮도록 한다.

<163>

유전자형에 의하여 알리스키렌 반응을 분리하는 경우에, TT 유전자형에 대한 반응자비는 대략 70%까지 증가한다. 이 의미는 이러한 결과가 표 1에 나타난 바와 같이, 우수한 반응자비를 갖는 일반적인 집단의 대부분 (SNP DB 대립유전자 빈도에 따라서 약 80%이지만, 이 분석에서 나타나는 것 만큼 높을 수도 있음)을 뒷받침함으로써 밀집한 항암제 시장에서 알리스키렌이 자리잡는 것을 도울 수 있다. 또한, 이는 장래의 연구에서 알리스키렌에 대한 잠재적으로 "더 우수한" 반응자를 모집하는 것을 돕는 방법을 제공할 수도 있다.

<164>

AGTR2 유전자의 2개의 SNP는 연결 불균형에서 매우 유사하다.

<165>

이러한 보고된 SNP는 MSDBP 및 MSSBP의 기준선 측정과의 연관을 나타내지 않으며, 유전적 영향이 알리스키렌 관련 약리유전학적 효과라는 것을 다시 한번 제시한다.

<166>

실시예 II

임상 시험 A2203에 대한 임상 약물유전학 분석

서론 및 요약. 유전적 변화와 임상 시험에서의 임상 결과 사이의 잠재적인 연관을 평가하기 위하여 후향적 약리유전학적 분석을 수행하였다. 실시예 I 참조. 이어서, 다른 임상 시험 (A2203)의 결과는 복제(replication) 분석을 위하여 고려하였다. 구체적으로는, 본원 발명자들은 레닌-안지오텐신-알도스테론계(RAS)으로부터, 또는 혈압 조절에서 이전에 관련된 12개의 유전자에서 48개의 다형성을 검사하였다.

실시예 I에서, 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자 중의 하나의 다형성, 안지오텐신 II 유형 2 수용체 (AGTR2) 유전자의 2개의 다형성 및 평균 좌위 이완기 및 수축기 혈압 강하의 임상 파라미터 사이에서 유의적인 연관 관찰되었다. 이러한 효과는 이르베사르탄 및 플라시보 처치에서는 발견되지 않았다. 추가로, 반응 감소와 연관된 ACE 미스센스 변이체 (Pro32Ser)에 있어서, 본원 발명자들은 흑인에서 백인보다 더 높은 C (Pro) 대립유전자 빈도를 발견하였다 (19/154 대 2/790).

이 실시예에서, 세린 잔기 (C 대립 유전자)를 갖는 모두 4명의 환자는 흑인이었다. C 대립 유전자를 갖는 환자의 수가 너무 적어서, 이 SNP에 대하여 실시예 I에서와 동일한 모델에서 분석을 수행할 수 없었다. 또한, 실시예 I에서 발견된 AGTR2의 2개의 SNPs의 연관은 재현되지 않았다.

본 실시예 (A2203)에서의 임상 시험은 고혈압 환자에서 알리스키렌과 발사르탄의 조합의 효능과 안전성을 이들의 단일성분 치료 및 발사르탄 및 히드로클로로티아지드 (HCTZ)의 조합과 비교하여 평가하기 위한 랜덤, 이중-맹검, 멀티센터, 멀티팩토리알 (multifactorial), 플라시보-조절, 평행군 연구였다. 본 실시예의 1차 목표는 임상적 평균 좌위 이완기 혈압 ([MSDBP] > 95 mmHg 및 < 110 mmHg)를 갖는 환자에게 6주간 투여된 그의 단일성분 치료에 비교하여 알리스키렌 및 발사르탄 (75/80 mg, 150/160 mg 및 300/320 mg)의 조합의 혈압 강하 효과를 특정하고, 임상적 평균 좌위 이완기 혈압 ([MSDBP] > 95 mmHg 및 < 110 mmHg)을 갖는 환자에서 6주간 투여된 단일 알리스키렌 75 mg, 150 mg 및 300 mg 대 플라시보의 혈압 강하 효과를 측정하는 것이다. 처치군은 일반적으로 인구통계학 및 기준선 특징과 유사하였고 (comparable), 평균 연령은 56세이고, 56%가 남성이고, 6.8%가 흑인이었다.

1차 효능 변수, 알리스키렌 단일치료 대 플라시보에서의 MSDBP에서 기준선으로부터의 변화는 알리스키렌 300 mg 군에서 통계적으로 유의적이었다. 단일 치료에 대한 혈압 강하의 전체적인 강도는 이전의 연구에서 보여진 것과 일치하였다. 그러나, 플라시보 효과의 강도는 예상보다 높았으며, 이전의 알리스키렌 연구에서 나타난 것보다 높았다. 알리스키렌 및 발사르탄의 조합의 혈압 강하는 히드로클로로티아지드 (HCTZ) 12.5mg/발사르탄에서 관찰된 것보다 낮았고, 상가효과 (additivity)는 보다 낮은 강도의 조합에서보다 최대 용량 알리스키렌 300mg/발사르탄 320mg에서 더 작았다.

약리유전학적 분석 목적. 후향적 약리유전학적 분석을 약리유전학적 조사에 대하여 샘플을 제공하는데 동의한 모든 환자에서 수행하였다. 1차 목표는 일차적으로는 MSDBP로, 2차적으로는 MSSBP와 반응자비로, 알리스키렌 처치의 효능에서 유전적 변화와 변이체 사이의 연관을 확인하는 것이다.

후보 유전자 접근법을 사용하여 RAS로부터의, 또는 이전에 혈압 조절과 연관되었던 12개의 유전자에서 48개의 다형성을 선택하였다 (표 4). 모든 이용가능한 샘플을 각 SNP에 대하여 제노타이핑하였다. 그후, 연관 연구를 실시예 I에서 기재한 바와 같이 수행하였다.

표 4

약리유전학적 분석을 위하여 선택된 후보 유전자	
유전자 기호	유전자 명칭

RENBP	레닌 결합 단백질
REN	레닌
ACE	안지오텐신 I 전환 효소 (펩티딜-디펩티다제 A) 1
ACE2	안지오텐신 I 전환 효소 (펩티딜-디펩티다제 A) 2
AGT	안지오텐시노겐
AGTR1	안지오텐신 II 수용체, 유형 1
AGTR2	안지오텐신 II 수용체, 유형 2
ABCC2/MRP2	ATP-결합 카세트, 서브패밀리 C (CFTR/MRP), member 2
AGTRAP	안지오텐신 II 수용체-연관 단백질
CYP11B2	시토크롬 P450, 패밀리 11, 서브패밀리 B, 폴리펩티드 2
	알도스테론 신타제
TGFB 1	변형 성장 인자, 베타 1
NOS3/eNOS	산화질소 신타제 3 (내피 세포)

<176> 샘플. 임상 시험 A2201 (실시예 I 참고) 및 임상 시험 A2203에 참가한 환자에게 약리유전학적 분석의 참가에 대한 별도의 동의를 제공해줄 것을 부탁하였다. 동의한 모든 환자로부터의 혈액 샘플을 각각의 시험 위치에서 수집한 후, 코반스 (Covance (Indianapolis, IN, USA))로 운반하였다. 각각의 환자의 게놈 DNA를 퓨어젠™ 단 리 키트 (D-50K) (Gentra, Minneapolis, MN)를 사용하여 코반스에 의하여 혈액을 추출하고, 제노타이핑을 위하여 NIBR로 수송하였다. 최종적으로, 실시예 I (A2201)의 임상 시험으로부터 511명의 환자를 각각의 처치 암의 대략 동일한 비율로 제노타이핑하였다. 플라시보 및 알리스키렌 단일치료 암 대 다른 처치 암의 3:1 환자수의 비율로 A2203으로부터의 684명의 환자를 제노타이핑하였다.

<177> 1차 효능 변수는 MSDBP 변화 (최종시점에서 기준선으로부터의 MSDBP 감소)이다. 2차 효능 변수는 MSSBP 변화 (최종시점에서 기준선으로부터의 MSSBP 감소), 반응자비, 혈장 레닌 활성 (PRA) 감소 및 기준선으로부터의 활성 레닌 (AREN) 증가이다.

<178> 제노타이핑. SNP 분석을 공공 dbSNP 데이터베이스 및 독점 Celera/ABI 데이터베이스로부터의 정보를 이용하여 고안하였다. 제노타이핑 분석에 대하여 얻어진 프로브 세트를 ABI's Assays-by-Design (등록상표) platform을 위하여 형성하였다. 문헌[Livak KJ *et al.*, *Nat. Genet.* 9: 341-2 (1995)]. 제노타이핑을 제조자의 지시에 따라서 10 ng의 게놈 DNA에 대하여 수행하였다.

<179> 제노타이핑된 다형성. 자리 코드, 유전자, 데이터베이스 참고자료 및 효과를 포함한, 이 분석에서의 제노타이핑된 다형성의 목록을 이하의 표 5에 기재하였다.

표 5

제노타이핑된 다형성			
pg 자리 id	유전자	rs 수	기재
5284	ABCC2	hCV11305436	인트론
4786	ABCC2	rs2273697	A>G I417V
4783	ABCC2	rs2756104	인트론
4784	ABCC2	rs2756109	인트론
4785	ABCC2	rs3740066	T>C I1324I
4782	ABCC2	rs717620	비번역
4797	ABCC2	rs8187710	A>G Y1515C
5286	ACE	hCV1247681	인트론
4766	ACE	rs4293	인트론
4769	ACE	rs4317	C>T P32S
4767	ACE	rs4329	인트론
4768	ACE	rs4362	C>T F1129F
400	ACE	rs4364	A>C S712R
1345	ACE		ins/del
4746	ACE2	rs2285666	인트론
1669	ACE2	rs879922	인트론
4773	AGT	rs1926723	인트론
1667	AGT	rs4762	T>C M207T
2	AGT	rs699	C>T T268M
4772	AGT	rs943580	개놈
4796	AGTR1	rs2638362	인트론
4780	AGTR1	rs3772616	인트론
411	AGTR1	rs5182	C>T L191L
5287	AGTR2	hCV1841569	
1445	AGTR2	rs1403543	비번역
186	AGTR2	rs5193	비번역
4795	AGTR2-LD	rs4497127	개놈
5288	AGTRAP	hCV516817	인트론
4787	AGTRAP	rs4073574	개놈
4789	CYP11B2	rs4539	G>A R173K
575	CYP11B2	rs4544	C>T T339I
4788	CYP11B2	rs4545	A>G S435G
3541	CYP11B2	rs6431	인트론
4792	NOS3	rs1007311	인트론
482	NOS3	rs1799983	G>T E298D
4791	NOS3	rs1800779	개놈
4464	NOS3	rs1800780	인트론
4793	NOS3	rs891512	인트론
5292	REN	rs11571092	인트론
1513	REN	rs1484816	인트론
4771	REN	rs3730103	인트론
4794	REN	rs6704321	C>G P403A
4770	RENBp	rs2269371	G>A G274D
2407	RENBp	rs2269372	인트론
1676	RENBp	rs762656	개놈
5285	TGFB1	hCV11707868	인트론
4790	TGFB1	rs2241717	인트론
4798	TGFB1	rs8105161	인트론

<180>

<181>

통계적 분석. 유전자형-표현형 연관 연구 및 관련 분석을 아날리스트를 이용하여 SAS (Cary, North Carolina) 에서 수행하였다.

<182>

연관 시험은 우성에 대한 가정 없이 독립 변수로 분류별 유전자형을 사용하고, 종속 변수로 다양한 효능 변수를 사용하였다. 연속적인 종속 변수 시험은 ANCOVA 분석을 사용하였고, 로지스틱 회귀가 분류별 종속 변수에 대하여 사용되었다. 다중 가설 시험에 적합한 결과가 없다는 것에 주의한다. $p < 0.05$ 의 역치를 암시 연관을 정의 하는데 사용하였다. 유전자형-표현형 연관 분석의 공동변량은 이하와 같다: (1) 처치의 용량 수준; (2) A2201 에서 STU1A로 코딩된 시험 영역 (실시에 I 참조) 또는 A2203의 영역; (3) MSDBP 및 MSSBP의 기준선 측정; 및 (4) 인종. 3종의 알리스키렌 처치 암으로부터의 모든 샘플에 대한 분석을 처음에 수행하였다. 암시 연관이 나타날 때, 동일한 분석을 이르베사르탄 및 플라시보 암에서 수행하였다.

표 6

제노타이핑된 환자의 인구 통계학적 및 기준 MSDBP 특징 (mean ± SE)								
A2201 (실시에 참조 I)				A2203 (본 실시예)				
치료	N=	BMI	Age	MSDBP 기준	치료	N=	연령	MSDBP 기준선
알리스키렌	99	31.01±	54.15C	98.76±	알리스키렌 75 mg	102	54.73±	98.69±
150 mg		0.67	1.30	0.34			1.37	0.28
알리스키렌	96	30.79±	55.93±	99.16±	알리스키렌 150 mg	115	55.83 ±	99.47±
300 mg		0.58	1.03	0.36			1.18	0.35
알리스키렌	101	30.53±	55.97±	98.90±	알리스키렌 300 mg	102	57.09 ±	99.26±
600 mg		0.65	1.08	0.38			1.22	0.34
이르베사르탄	99	31.81 ±	56.66±	99.41±	발사르탄 80 mg	39	58.08 ±	99.30±
150 mg		0.72	1.21	0.40			1.77	0.61
플라시보	103	30.65±	58.21±	98.89±	발사르탄 160 mg	33	53.45 ±	98.87±
		0.60	1.15	0.33			2.15	0.69
					발사르탄	34	55.50 ±	99.16±
					320 mg		1.65	0.57
					알리스키렌 75 mg 및	35	55.43 ±	99.73±
					발사르탄 80 mg		1.95	0.64
					알리스키렌 150 mg 및	34	56.26±	99.32±
					발사르탄 160mg		1.94	0.61
					알리스키렌 300 mg 및	41	57.10 ±	98.82±
					발사르탄 320 mg		1.86	0.46
					발사르탄 160mg 및	41	55.41 ±	98.83±
					HCTZ 12.5 mg		1.93	0.55
					플라시보	108	55.80 ±	98.86±
							1.24	0.29

ACE. SNP 4769를 RAS의 이 중요한 효소에서 6종의 다른 다형성을 갖는 환자에서 제노타이핑하였다. SNP 4769와 1차 효능 변수, 기준선으로부터의 MSDBP 감소 사이에서 ($p=0.023$), 또한 2차 변수, 반응자 비율 ($p=0.0048$)에서 유의적인 연관이 관찰되었다. 다른 2차 변수, 기준선으로부터의 MSSBP 감소에 있어서, 유의적인 연관은 없지만, 동일한 경향성이 관찰되었다 ($p=0.14$).

ANCOVA 분석을 각각의 처치군에 대하여 동일한 모델로 반복하였을 때, 연관은 알리스키렌 처치군에서만 관찰되었으며, 이르베사르탄 또는 플라시보군에서는 관찰되지 않았다. 알리스키렌 특이적 효과를 표 7에 나타내었다. SNPs와 2차 파라미터 혈장 레닌 활성 (PRA) 및 활성 레닌 (AREN) 사이에는 유의적인 연관이 발견되지 않았다.

표 7

A2201에서 모든 알리스키렌 처리군에서 MSDBP, MSSBP 및 반응자비의 ACE 및 AGTR2 변이체의 영향 (*는 유의성을 나타냄, p<0.05)										
	SNP_4769			SNP_1445			SNP_4795			
n	TT	CT	CC	AA	AG	GG	GG	GA	AA	
MSDBP 감소의 LSMEAN(mmHg)	278	14	0	106	69	118	106	72	115	
p	-11.4	-5.6	NA	-11.0	-13.3	-9.4	-10.8	-13.4	-9.2	
MSSBP 감소의 LSMEAN(mmHg)		0.023*			0.0071*			0.0026*		
p	-11.7	-5.9	NA	-11.2	-13.8	-9.8	-10.8	-14.2	-9.5	
반응자비		0.14			0.13			0.046*		
p	70%	14%	NA	75%	71%	58%	75%	74%	57%	
		0.0048*			0.17			0.060		

SNP_4769는 ACE 효소 동형 (isoform) 2 및 3의 코돈 32에서 프롤린을 세린으로 아미노산 서열을 변화시키는 코딩 SNP이다. ACE I/D 다형성 (인트론 16에서 287 bp Alu 반복 서열의 존재 또는 부재)은 ACE 수준 및 활성의 조절 및 그의 RAS의 세분화와 연관되어 있다. 문헌[Rigat B et al, J. Clin. Invest. 86(4): 1343-6 (1990)]. 본 발명자는 본 연구에서 ACE I/D를 시험하였고, 알리스키렌 반응에 연관이 없음을 관찰하였다. SNP_4769는 체성 동형 (somatic isoform)에 대하여 코딩하는 ACE 유전자의 12번째 인트론에 위치하며, 이는 제2 및 제3 동형을 코딩하는 유전자의 첫번째 엑손에 위치한다. ACE I/D는 16번째 인트론에 위치하며, 이는 백인, 아프리카 미국인, 및 중국인 집단에서 특징지어지는 SNP_4769로서 동일한 연결 불균형 블록 중에 있다 (SNPbrowser, Applied Biosystems, Foster City, California).

AGTR2. 유형 II 안지오텐신 II 수용체는 ACE 활성을 억제하고, 유형 I 수용체에 의하여 매개된 작용을 약화시키며, 이에 따라서 혈관이완이 야기된다고 나타났다. 문헌[Ichiki T et al, Nature 377(6551):748-50 (1995); Hunley TE et al, Kidney Int. 57(2):570-7 (2000)].

SNPs 1445 및 4795과 1차 효능 변수, 기준선으로부터의 MSDBP 감소 사이에 유의적인 연관이 관찰되었다 (각각

$p=0.0071$ 및 0.0026). 또한, SNP 4795는 2차 변수, 기준선으로부터의 MSSBP 감소와 유의적인 연관성을 나타내었으나 ($p=0.046$), 다른 2차 파라미터인 반응자 비율과는 유의적인 연관성을 나타내지 않았다. 한편, SNP 1445는 2차 파라미터와 유의적인 연관성을 나타내지 않았다. 임의의 SNPs와 2차 파라미터 PRA 및 AREN 사이에는 유의적인 연관성이 발견되지 않았다.

<190> ANCOVA 분석을 각 처치군에서 반복하는 경우에, 연관성은 알리스키렌 처치군에서만 관측되며, 이르베사르탄 또는 플라시보군에서는 관찰되지 않았다. 알리스키렌 처치 환자에서의 유전자형의 효과를 표 7에서 나타내었다.

<191> 알리스키렌 처치 암에서 A2203의 이들 2종의 SNPs와 보여지는 연관성을 복제하기 위하여 시도하는 경우에, 결과는 복제되지 않았다 ($p > 0.05$). 연관성의 경향 또한 관찰되지 않았다. 예비 임상 연구 결과 요약에서, 이전에 보여진 플라시보 반응보다 높은 반응으로 인하여 (8.6 mmHg), 알리스키렌 처치에 대한 플라시보를 뺀 효과의 용량-반응 및 강도는 예상보다 낮았다. 이러한 불일치는 적어도 부분적으로 AGTR2 연관성의 복제의 부재에 기여할 수 있다.

<192> 이들 2종의 SNPs 둘다 비-코딩이다. SNP 1445는 AGTR2 유전자의 비번역 영역 중에 있고, SNP_4795는 AGTR2 유전자에 연결 불균형인 게놈 영역으로부터 유래되었다. 적어도 중국인에서, 이들 2종의 SNPs는 동일한 연결 불균형 블록 중에 있다 (SNPbrowser, Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

<193> 논의. 이 분석은 A2201 연구에서 임상 결과 변수와 유의적인 연관성을 갖는 2종의 유전자에서 다형성을 확인하였다 (실시예 I 참조). ACE 유전자 중의 한 변이체와 AGTR2 유전자의 2종의 SNPs는 1차 파라미터 MSDBP와 유의적인 연관성을 나타내었다. 또한, ACE 변이체 및 AGTR2 변이체 중의 하나가 또한 2차 파라미터인 MSSBP 및 반응자비와 유의적인 연관성을 나타내었다. 제2의 AGTR2 변이체는 유의적인 연관성을 나타내지 않았으며, 단지 제2의 파라미터에 동일한 경향성만을 나타내었다. 이 유전자형 효과는 알리스키렌 처치군에서만 관찰되었고, 이르베사르탄 또는 플라시보군에서는 관찰되지 않았다. 따라서, 상기 효과는 알리스키렌에 특이적인 약리유전학적 효과라는 것을 제시한다.

<194> ACE Pro32Ser 변이체 효과가 특히 흥미로운데, TT 및 CT 유전자형 사이의 차이가 매우 큰 것으로 나타나기 때문이다 (MSDBP 감소 11.4 대 5.6 mm Hg, MSSBP 감소 11.7 대 5.9 mm Hg, 및 반응자비 70% 대 14%). 모든 환자들 중에서 CC 호모접합의 유전자형이 관찰되지 않았다. 이는 관찰된 대립 유전자 빈도가 0.1의 대립유전자 빈도로 보고된 SNP DB보다 훨씬 낮도록 하며, CT 유전자형을 갖는 환자의 전체수가 매우 작은 면을 갖도록 한다. 본 발명자들은 흑인에서 백인보다 더 높은 C 대립유전자 빈도를 발견하였다 (19/154 대 2/790). A2203에서, 세린 잔기 (C 대립유전자)를 갖는 모두 4명의 환자는 흑인이었다. C 대립유전자를 갖는 환자의 수가 너무 적어서, 동일한 모델에서 A2203 분석을 수행할 수 없었다.

<195> ACE 다형성 및 ACE 효소 혈장 농도 및 혈압에 대한 이들의 영향은 대부분 아프리카인 및 아프리카-미국인 집단에서 관찰되었다. 문헌[Bouzekri N et al, Eur. J. Hum. Genet. 12(6):460-8 (2004); Cox R et al, Hum. Mol. Genet. 11(23):2969-77 (2002); Zhu X et al, Am. J. Hum. Genet. 68(5):1139-48 (2001)]. SPP100 연구로부터의 흑인 환자의 ACE 유전자의 SNP_4769의 보다 높은 대립유전자 빈도의 관찰은 이 다형성이 ACE 수준 또는 활성에 가질 수 있는 기능적 영향의 추가의 조사를 가능하게 한다. 또한, 코돈 32에서의 아미노산 변화는 효소의 고환 동형 (testis isoform)에 있는 것으로 추측된다.

<196> 유전자형에 의하여 알리스키렌 반응을 분리하는 경우에, TT 유전자형에 대한 반응자비는 대략 70%까지 증가한다. 이 의미는 이러한 결과가 표 2에 나타난 바와 같이, 우수한 반응자비와 연관된 TT 유전자형을 갖는 일반적인 집단의 대부분 (SNP DB 대립유전자 빈도에 따른 약 80%는, 이 연구에서 보여지는 것처럼 높을 수도 있다)을 표적화함으로써, 밀집한 항암제 시장에서 자리잡는 것을 도울 수 있다. 또한, 이는 장래의 연구에서 알리스키렌에 대한 잠재적으로 "더 우수한" 반응자를 모집하는 것을 돕는 방법을 제공할 수도 있다.

<197> 이 자리 주변의 염색체 영역이 대부분 하나의 연결 불균형 블록이 있기 때문에 AGTR2 유전자의 2종의 SNPs는 연결 불균형에서 매우 유사하다. 유형 II 수용체를 통한 Ang II 신호의 기능은 유형 I 수용체에 비교하여 덜 연구되었다. 이러한 발견은 레닌 억제 하류에서 혈압 조절에서 Ang II 기능에서 AGTR2의 포함을 제시할 수 있다.

<198> 이들은 SNPs가 MSDBP 및 MSSBP의 기준선 측정과 연관성을 나타내지 않는다는 것을 보고한다. 이들은 유전적 효과가 알리스키렌 관련 약리유전학적 효과라는 것을 제시한다.

<199> **균등물**

<200> 본 발명의 하나 이상의 실시태양의 상세내용은 상기 발명의 상세한 설명에서 기재하였다. 본원에서 기재된 것

과 유사하거나 균등의 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질은 여기서 기재한다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 장점은 상세한 설명 및 청구항으로부터 명백할 것이다. 명세서 및 첨부된 청구항에서, 문맥이 명백하게 다르게 나타내지 않는 한 복수의 대상을 포함하는 것이다. 다르게 정의하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적, 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련인에게 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에서 언급된 모든 참고 문헌은, 각각의 간행물, 특허 또는 특허 출원이 그 전부가 구체적으로 및 개별적으로 모든 목적을 위해 참고로 포함되는 것과 동일한 정도로, 모든 목적을 위해 그 전부가 본원에 참고로 포함된다.

<201> 본 발명은 본 발명의 각각의 측면의 하나의 예시로 의도된, 본 출원에 기재된 특정 실시태양에 따라서 한정되는 것이 아니다. 당업자에게 명백한 취지 및 범위를 벗어나지 않고, 본 발명의 다수의 변형과 변이체가 이루어질 수 있다. 본원에서 열거된 것 이외에, 본 발명의 범위 내에서 기능적으로 등가의 방법 및 장치가 상기 기재내용으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 그러한 변형과 변이체는 첨부된 청구항의 범위에 포함되는 것으로 의도된다. 본 발명은 첨부하는 청구항의 균등물의 전체 범위와 함께 상기 청구의 범위의 용어에 의해서만 제한된다.

도면의 간단한 설명

<16> 도 1은 최고 용량 알리ски렌 군 (600 mg), 이르베사르탄 군 및 플라시보 군의 세가지 군인 알리ски렌 처치군에 대한 SNP_4769 유전자형에 의하여 분리되는 반응자비를 나타내는 막대 그래프 세트이다. 도면의 바닥의 열에서, 상부 열은 CT 대립유전자를 나타내며, 바닥 열은 TT 대립유전자를 나타낸다.

<17> 발명의 상세한 설명

<18> 후향적 약리유전학적 분석 (retrospective pharmacogenetic analysis)이 유전적 변화와 임상 시험의 임상 결과 사이의 잠재적인 관련성을 평가하기 위하여 수행되었다. 임상 시험에서, 하루 1회 75, 150 또는 300 mg로 투여되는 알리ски렌은 주간 보행 수축기 혈압 (DASBP)에서 통계적으로 유의적인 감소를 야기하는, 경증 내지 중등도 고혈압 환자에서 효과적인 항고혈압제로 나타났다. 활성 치료법의 모든 용량은 임상 시험 최종시점에서 각 프로토콜 마다 제8주에서 치료군 (intend-to treat (ITT))에서 임상 시험 최종시점에 평균 좌위 이완기 혈압 (MSDBP)을 감소시키는 데 있어서 플라시보보다 통계적으로 우수하였다. 유사한 MSDBP 감소가 알리ски렌 150 mg 및 이르베사르탄 150 mg에서 이루어졌다. 이하의 실시예 1 참고.

<19> 평균 좌위 수축기 혈압 (MSSBP)에 있어서, 활성 치료법의 모든 용량이 임상 시험 최종시점에서 플라시보보다 통계적으로 우수하였다. 알리ски렌 300 및 600 mg은 임상 시험 최종시점에서 플라시보 및 이르베사르탄보다 통계적으로 우수하였다. 유사한 MSSBP 감소가 알리ски렌 150 mg 및 이르베사르탄 150 mg에서 이루어졌다. 이하의 실시예 1 참고.

<20> 약리유전학적 분석에서, 48개의 다형성이 레닌-안지오텐신-알도스테론계로부터의 또는 혈압 조절에 이전에 관련되어 있었던 12개의 유전자 중에서 검사되었다. 안지오텐신 전환 효소 (ACE) 유전자의 1종의 다형성 (SNP_4769, 서열번호:1), 안지오텐신 II 유형 2 수용체 (AGTR2) 유전자의 2종의 다형성 (SNP_1445, 서열번호:2 및 SNP_4795, 서열번호:3) 및 평균 좌위 이완기 및 수축기 혈압 감소의 임상적 파라미터 사이에 현저한 관련성이 관찰되었다. 이러한 효과는 이르베사르탄과 플라시보 치료에서는 관찰되지 않았으며, 이들은 이 분석에서 알리ски렌 치료에 특이적이었다.

<21> SNP_4769의 뉴클레오타이드 서열 (서열번호: 1)은 이하와 같다:

```
AGGACTTCCC AGCCTCCTCT TCCTGCTGCT CTGCTACGGG CACCCTCTGC
TGTTCCCCAG CCAGGAGGCA/Y CCCAACAGGT GACAGTCACC CATGGGACAA
GCAGCCAGGC AACAAACCAGC AGCCAGACAA CCACCCACCA
```

<23> SNP_4769는 ACE 효소의 코돈 32에서 프롤린을 세린으로 아미노산 서열을 변화시키는 코딩 SNP이다.

<24> SNP_1445의 뉴클레오티드 서열 (서열번호:2)은 이하와 같다:

```

TGGAACTTC ATTTTITTTTG TTTGAGATTT ATTTGAATGA GCTGTTATGA
TTGGAGACAG TGAGAATTC AGATTAAATGT TTTGCAGACA AAAAAAACCC
TCTCTGGAAA GCTGGCAAGG GTTCATAAGT CAGCCCTAGA ATTATGTAGG
TTGAAGGCTC CCAGTGGACA GACCAACAT ATAAGAAGGA AACCAGAGAT
CTGGTGCTAT TACGTCCCAG CGTCTGAGAG AACGAGTAAG CACAGAATTC
AAAGCATTCT GCAGCCTGAA TTTTGAAGGT AAGTATGAAC AATTTATATA
TAATTTACTT GGAAAGTAGA ACATACATTA AATGAAAATA TTTTITATGG
ATGAACTTCT GTTTTTCCTG TGTTTTAACA CTGTATTTTG CAAAACCTCT/R
AATTATTTAG CTGCTGTTTC TCTTACAGGA GTGTGTTTAG GCACTAAGCA
AGCTGATTTA TGATAACTGC TTTAAACTTC AACCAACAGT AAGTCTTCAA
GTGGAATTTA TTATTGATTC TTTTATGTTA ATTTGTTAGG TCAAAGAAA
AATCTTTAGA GCAAAATAAA AGTTTGTCTC TTTATTAGGA GGTTCTTTAG
ATATTACACT TTTAATTGGG TAGCTTATTT GCATGTATTT TGAAACTATC
TAAAGTAAAT AGTGTTCCTT TTGTATGCTT ATCTTTAGCT AATGTGTTTT
TTTTTTTGGT TTTAAATAA TGCTTCTAGT GAAAAAATC ACAAACCTT
CAACACTGTA ACGTTTGAGA GCAACGGCTA TTCAGTTCGG TTAAACCGAA

```

<25>

<26> SNP_1445는 AGTR2 mRNA의 비번역 영역이다 (표 2B 참조).

<27> SNP_4795의 뉴클레오티드 서열 (서열번호:3)은 이하와 같다:

```

ccaacacaaa agcacagcag ttgagaactg ggaaagcatc gcactacaac
tgctactgcc attaacaca ttgtcctgga tgcccaagag cttagagacc
cacttaccta cctggtagac tgctactaca actgacatct gagaagcca
cccaaggaa caagaatttc cctgtctgga accaacagaa ttgtcactat/R

```

<28>

```

ttctgtacca gatccaagg atacacatgc ttagcttact attactacca
ctgaaacttg caaagaacc catcaagcat tccattcccc agcacaattt
catcagtttc tatcaataac ctcaaatgc cacacagagg aatagacaga
tactactaag gctgtttata gccaatgaaa tcatacacag tcttcacca

```

<29>

<30> SNP_4795는 AGTR2 게놈 영역에 있다 (표 2B 참고).

<31> 본 발명의 실질적인 이해를 제공하기 위하여 다양한 상세한 수준으로 이하에서 본 발명의 임의의 측면, 방식, 실시태양, 변이 및 특징을 기재한다는 것을 이해하여야 한다. 일반적으로, 그러한 개시내용은 이를 필요로 하는 개체에서 진단 및 치료에 유용한 폴리뉴클레오티드 변이, SNP의 새로운 용도를 제공한다. 따라서, 본 발명의 다양한 측면은 ACE 및 AGTR2 유전자에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드 변이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명의 다양한 측면은 추가로 약물 반응성, 부작용, 또는 최적 약물 용량과 관련된 개체를 분류하거나 치료하기로 미리 정해진 개체를 확인하기 위한 본 발명의 폴리뉴클레오티드 변이를 사용하는 진단/치료진단 방법 및 키트에 관한 것이다. 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 변이와 관련된 데이터를 저장하고 분석하는 컴퓨터 시스템 및 화합물 평가 방법을 제공한다. 따라서, 이들 측면을 예시하는 다양한 특정 실시태양을 이하에서 기재한다.

<32> 정의. 본 명세서에서 사용되는 임의의 용어의 정의는 이하에서 제공한다. 다른 용어의 정의는 미국 에너지 분야, 과학연구소, 인간 게놈 프로젝트 (U.S. Department of Energy, Office of Science, Human Genome Project) <http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/glossary/>에서 제공되는 용어집에서 발견할 수 있다. 의학적 정의는 문헌[Chobanian et al, "JNC-7 - Complete Version" Hypertension 42: 1206-1252 (2003)]에서 제공된다. 미국 심장학회의 고혈압의 정의는 웹사이트 <<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4623>>에서 발견할 수 있다. 이들 모든 참고문헌들은 본원에 참고로 도입된다.

<33> 본원에서 사용된 용어 "대립유전자 (allele)"는 특이적 염색체 위치 (좌 (locus))에서 유전자 또는 DNA 서열의

특정 형태를 의미할 것이다.

- <34> 본원에서 사용된 용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화 또는 키메라 항체, 및 단백질에 대한 항체 단편의 결합을 위해 충분히 생물학적으로 기능성인 항체 단편을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.
- <35> 본원에서 사용된 용어 "임상 반응"은 반응, 무반응 및 유해한 반응 (즉, 부작용)의 정량적 측정 중의 어느 하나 또는 전부를 의미한다.
- <36> 본원에서 사용된 용어 "임상 시험"은 특정 처치에 대한 반응의 임상 데이터를 수집하기 위해 고안된 임의의 연구를 의미하고, I상, II상 및 III상 임상 시험을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 표준 방법을 사용하여 환자 집단을 규정하고 대상을 등록시킨다.
- <37> 본원에서 사용된 용어인, 화합물의 "유효량"은 원하는 치료적 및(또는) 예방적 효과를 얻기 위하여 충분한 양, 예를 들어 고혈압과 관련된 증상의 감소 또는 예방을 야기하는 양이다. 바람직한 실시태양에서, 화합물은 알리스키렌이다.
- <38> 개체에 투여되는 화합물의 양은 질병의 유형 및 심도, 및 개체의 특징, 예를 들어 일반적 건강, 연령, 성별, 체중 및 약물에 대한 내성에 따라서 달라질 것이다. 이는 또한 질병의 정도, 심도, 및 유형에 따라서 달라질 것이다. 당업자는 이들 및 다른 인자들에 따라서 적절한 용량을 결정할 수 있을 것이다. 통상적으로, 치료적 또는 예방적 효과를 얻기 위하여 충분한 본 발명의 화합물의 유효량은 하루에 kg 체중 당 약 0.000001 mg 내지 약 10,000 mg 범위이다. 바람직하게는, 용량은 하루에 kg 체중 당 약 0.0001 mg 내지 약 100 mg 범위이다. 본 발명의 화합물은 또한 서로 조합하여 투여될 수 있거나, 또는 1종 이상의 추가의 치료적 화합물과 함께 투여될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 알리스키렌의 유효량은 1일 당 75, 150, 또는 300 mg이다.
- <39> 본원에서 사용되는 용어 "발현"은 유전자의 전구체 mRNA로의 전사; 성숙 mRNA를 생산하기 위한 전구체 mRNA의 스플라이싱 및 다른 프로세싱; mRNA 안정성; 성숙 mRNA의 단백질로의 번역 (코돈 사용 및 tRNA 이용가능성 포함); 및 적절한 발현 및 기능을 위해 요구되는 경우 번역 산물의 글리코실화 및(또는) 다른 변형 중 하나 이상을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.
- <40> 본원에서 사용되는 용어 "유전자"는 프로모터, 엑손, 인트론, 및 발현을 제어하는 다른 비번역 구역을 포함하는, RNA 산물의 조절된 생합성에 대한 모든 정보를 함유하는 DNA의 절편을 의미할 것이다.
- <41> 본원에서 사용되는 용어 "유전자형 (genotype)"은 개체에서 상동 염색체쌍 상의 좌에서 하나 이상의 다형성 부위에서 뉴클레오티드쌍(들)의 비상관된 (unphased) 5' 내지 3' 서열을 의미한다. 본원에서 사용되는 유전자형은 완전-유전자형 및(또는) 서브-유전자형을 포함한다.
- <42> 본원에서 사용되는 용어 "좌 (locus)"는 유전자 또는 신체적 또는 표현형 특징에 대응하는 염색체 또는 DNA 분자 상의 위치를 의미할 것이다.
- <43> 본원에서 사용되는 용어 "ACE 조절제" 또는 "AGTR2 조절제"는 조절제가 없을 때의 폴리펩티드의 생물학적 활성 수준 또는 발현 수준에 비교하여, 각각 ACE 폴리펩티드 또는 AGTR2 폴리펩티드의 생물학적 활성 수준 또는 발현 수준을 변화시키는 (예를 들어, 증가시키거나 감소시키는) 임의의 화합물이다. 조절제는 소분자, 탄수화물, 지질, 뉴클레오티드 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 조절제는 유기 화합물 또는 무기 화합물일 수 있다.
- <44> 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이체 (mutant)"는 돌연변이의 결과인 야생형으로부터 유전가능한 변이, 예를 들어 단일 뉴클레오티드 다형성을 의미한다. 용어 "돌연변이체"는 명세서를 통하여 "마커", "바이오마커", 및 "표적"이라는 용어와 호환되어 사용된다.
- <45> 본원에서 사용되는 "의학적 상태"는 치료가 요구되는 하나 이상의 물리적 및/또는 심리학적인 증상으로 나타나는 임의의 상태 또는 질병을 포함하고 이로 제한되지 않으며, 이전에 및 새로 확인된 질병 및 다른 질환을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 의학적 상태는 고혈압이다.
- <46> 본원에서 사용되는 용어 "뉴클레오티드쌍"은 개체로부터 염색체의 2 카피 상의 다형성 부위에서 발견된 뉴클레오티드를 의미할 것이다.
- <47> 본원에서 사용되는 용어 "다형성 부위"는 그의 최고 빈도가 99% 이하의 빈도를 갖는 적어도 2개의 대체 서열이 집단에서 발견되는 자리 내의 위치를 의미할 것이다.
- <48> 본원에서 사용되는 용어 "다형성"은 집단 내에 >1%의 빈도로 존재하는 임의의 서열 변이체를 의미할 것이다.

서열 변이체는 1%보다 유의하게 더 큰, 예를 들어 5% 또는 10% 이상의 빈도로 존재할 수 있다. 또한, 상기 용어는 다형성 부위에서 개체에서 관찰된 서열 변이를 나타내도록 사용될 수 있다. 다형성은 뉴클레오타이드 치환, 삽입, 결손 및 마이크로새틀라이트(microsatellite)를 포함하고, 유전자 발현 또는 단백질 기능에서 검출 가능한 차이를 생성시킬 수 있지만 그래야 할 필요는 없다.

<49> 본원에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 임의의 RNA 또는 DNA를 의미할 것이고, 이는 비변형 또는 변형 RNA 또는 DNA일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 비제한적으로 단일- 및 이중-스트랜드 DNA, 단일- 및 이중-스트랜드 구역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-스트랜드 RNA, 및 단일- 및 이중-스트랜드 구역의 혼합물인 RNA, 및 단일-스트랜드 또는 보다 일반적으로 이중-스트랜드일 수 있거나 단일- 및 이중-스트랜드 구역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 삼중-스트랜드 구역을 나타낸다. 용어 폴리뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 또는 RNA, 및 안정성 또는 다른 이유로 변형된 주쇄를 갖는 DNA 또는 RNA를 포함한다.

<50> 본원에서 사용되는 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합 또는 변형 펩티드 결합, 즉 펩티드 동배체(isostere)에 의해 서로 연결된 2 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 폴리펩티드를 의미할 것이다. 폴리펩티드는 흔히 펩티드, 당펩티드 또는 올리고머로 불리는 짧은 사슬, 및 일반적으로 단백질로 불리는 보다 긴 사슬을 모두 의미한다. 폴리펩티드는 20개의 유전자에 의해 코딩된 아미노산 이외의 아미노산을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 자연적 과정, 예를 들어 번역후 프로세싱에 의해, 또는 당업계에 공지된 화학 변형 기술에 의해 변형된 아미노산 서열을 포함한다. 상기 변형은 기초 문헌 및 보다 상세한 각론과 또한 방대한 연구 문헌에 잘 설명되어 있다.

<51> 본원에서 사용되는 "SNP 핵산"은 개체 또는 개체의 그룹 사이에서 그렇지 않으면 동일한, 따라서 대립유전자로서 존재하는 뉴클레오타이드 서열 내에서 가변적인 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산 서열이다. 상기 SNP 핵산의 길이는 바람직하게는 약 15 내지 약 500개의 뉴클레오타이드이다. SNP 핵산은 염색체의 일부일 수 있거나, 예를 들어 PCR 또는 클로닝을 통한 염색체의 일부의 증폭에 의한 염색체의 일부의 정확한 카피일 수 있다. SNP 핵산은 이후에 간단히 "SNP"로 언급된다. SNP는 게놈의 단일 위치에서의 뉴클레오타이드의 변화의 발생이며, 여기서 2개의 교대의 염기는 인간 집단에서 적절한 빈도로 발생한다(즉, >1%). 본 발명에 따른 SNP 프로브는 SNP 핵산에 상보적인 올리고뉴클레오타이드이다.

<52> 본원에서 사용되는 용어 "개체(subject)"는 바람직하게는, 사람과 같은 포유동물이지만, 동물, 예를 들어 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험 동물(예를 들어, 원숭이(예를 들어, 사이노멀거스 원숭이), 래트, 마우스, 기니아피그 등)일 수 있다.

<53> 본원에서 사용된 바와 같이, 개체 또는 환자로서의 약제 또는 약물의 투여는 자기 투여 및 타인에 의한 투여를 포함한다. 기재한 의학적 상태의 치료 또는 예방의 다양한 방식은 "실질적인" 것을 의미하는 것이며, 이는 전체 치료 또는 예방 보다 적으며, 생물학적으로 또는 의학적으로 의미있는 결과가 얻어진다.

<54> 유전자 서열 변이의 동정 및 확인. 그의 광범위하고 널리 퍼지는 특성으로 인하여, SNP는 인간 질병 상태에 포함되는 유전자를 위치시키는 중요한 도구로서의 가능성을 가진다. 예를 들어, 문헌[Wang *et al.*, Science 280: 1077-1082 (1998)] 참조. 한 변이체의 효과가 작을지라도, 이러한 상태를 치료하는 데 사용되는 의약의 대사와 많은 공통의 장애의 진행의 위험이 실질적으로 잠재되어 있는 게놈 변화에 의하여 영향을 받는다는 것이 점점 명백해진다.

<55> 다형성의 존재로 인하여, 종의 일부의 구성원이 돌연변이되지 않은 서열(즉, 원래의 대립유전자)을 가질 수 있고, 한편 다른 구성원은 돌연변이된 서열(즉, 변이체 또는 돌연변이체 대립유전자)을 가질 수 있다는 면에서, SNP는 "대립유전자"로 불린다.

<56> SNP와 특정 표현형 사이의 연관성은 SNP가 표현형의 원인일 것을 요구하거나, 필수적으로 나타내지 않는다. 대신에, 그러한 연관성은 SNP와 상기 유전적 인자가 가깝게 연결되도록 단순히 SNP와 주어진 표현형을 실제로 담당하는 이들 유전적 인자 사이의 게놈 근접성에 기인한 것일 수 있다. 즉, "진정" 기능적 변이체와 결합 불균형("LD")에 있을 수 있다. 게놈의 2개의 상이한 위치의 대립유전자가 예상보다 매우 연관되어 있는 경우에, LD(즉, 대립유전자 연관)이 존재한다. 그러므로, SNP는 특정 표현형을 야기하는 돌연변이에 그의 근접성으로 인하여 가치를 갖는 마커로서 작용할 수 있다.

<57> 본 발명의 다형성 부위를 기재하는 데 있어서, 편이를 위하여 유전자의 센스 스트랜드를 참고로 한다. 그러나, 당업자가 인식하는 바와 같이, 유전자를 함유하는 핵산 분자는 상보적인 이중 스트랜드 분자일 수 있으며, 따라

서 센스 스트랜드 상의 특정 부위는 상보적인 안티센스 스트랜드 상의 상응하는 부위를 지칭한다. 즉, 한 스트랜드 및 올리고뉴클레오타이드 상의 동일한 다형성 부위가 다형성 부위를 함유하는 표적 영역에서의 스트랜드와 특이적으로 혼성화되도록 고안될 수 있음을 참고할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 본원에 기재된 게놈 변이체의 센스 스트랜드에 상보적인 단일 스트랜드 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

- <58> SNP의 확인 및 특성 분석. 단일체 형태 구조 다형성 (SSCP) 분석, 변성 고성능 액체 크로마토그래피 (DHPLC)에 의한 이중이중체 (heteroduplex) 분석, 직접 DNA 서열결정 및 컴퓨터 이용 분석 방법을 포함하여 많은 상이한 기술을 사용하여 SNP를 확인하고 특성을 분석할 수 있다 (Shi et al., Clin. Chem. 47:164-172 (2001) 참조). 공공 데이터베이스에는 서열 정보가 풍부하다.
- <59> 현재 가장 통상적인 SNP 타이핑 방법은 혼성화, 프라이머 연장, 및 절단 방법을 포함한다. 각각의 상기 방법은 적합한 검출 시스템에 연결되어야 한다. 검출 기술은 형광 편광 (Chan et al., Genome Res. 9:492-499 (1999) 참조), 피로포스페이트 방출의 발광 검출 (pyrosequencing), (Ahmadiian et al., Anal. Biochem. 280:103-110 (2000) 참조), 형광 공명 에너지 전달 (FRET)-기반 절단 분석, DHPLC 및 질량 분광법 (Shi, Clin. Chem. 47:164-172 (2001) 및 미국 특허 6,300,076 B1 참조)을 포함한다. SNP를 검출하고 특성을 분석하기 위한 다른 방법은 미국 특허 6,297,018 및 6,300,063에 개시되어 있다.
- <60> 특히 바람직한 실시태양에서, 다형성의 검출은 INVADER™ 기술 (써드 웨이브 테크놀로지스 인크. (Third Wave Technologies Inc. 미국 위스콘신 매디슨)으로부터 입수가 가능함)에 의해 달성할 수 있다. 상기 분석에서, 상류의 특정 "인베더 (invader)" 올리고뉴클레오타이드 및 부분적으로 중복되는 하류의 프로브가 상보성 DNA 주형에 결합할 때 함께 특정 구조를 형성한다. 상기 구조는 클리바제 (Cleavase) 효소에 의해 인식되어 특이적 부위에서 절단되어, 프로브 올리고뉴클레오타이드의 5' 플랩 (flap)을 방출시킨다. 이어서, 상기 단편은 반응 혼합물에 포함된 합성 2차 표적 및 2차 형광 표지된 시그널 프로브에 대한 "인베더" 올리고뉴클레오타이드로서 기능한다. 문헌[Ryan D et al., Molecular Diagnosis 4(2): 135-144 (1999) 및 Lyamichev V et al. Nature Biotechnology 17: 292-296 (1999)], 및 미국 특허 5,846,717 및 6,001,567 참조.
- <61> 다형성의 동정은 리보프로브 (Winter et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7575 (1985); Meyers et al, Science 230:1242 (1985)) 및 E. coli mutS 단백질과 같은 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질 (Modrich P, Ann Rev Genet 25:229-253 (1991))을 이용한 RNase 보호 방법을 포함하지만 이로 한정되지는 않는 미스매치 검출 기술을 이용하여 측정할 수도 있다. 다르게는, 변이체 대립유전자는 단일 스트랜드 형태 (SSCP) 분석 (Orita et al, Genomics 5:874-879 (1989); Humphries et al, in Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Elles R, ed., pp. 321-340 (1996)), 또는 또는 변성 구배 겔 전기영동 (DGGE) (Wartell et al, Nucl. Acids. Res. 18:2699-2706 (1990); Sheffield et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:232-236 (1989))으로 확인할 수 있다. 폴리머라제-매개 프라이머 연장 방법이 또한 다형성을 동정하는데 사용될 수 있다. 그러한 몇몇 방법은 특허 및 과학 문헌에 기재되어 있고, "유전자 비트 분석 (Genetic Bit Analysis)" 방법 (WO 92/15712) 및 리가제/폴리머라제 매개 유전자 비트 분석 (미국 특허 5,679,524)을 포함한다. 관련 방법들이 WO 91/02087, WO 90/09455, WO 95/17676, 및 미국 특허 5,302,509 및 5,945,283에 개시되어 있다. 다형성을 함유하는 연장된 프라이머는 미국 특허 5,605,798에 기재된 바와 같이 질량 분광기에 의하여 검출될 수 있다. 다른 프라이머 연장 방법은 대립유전자-특이적 PCR이다 (Ruafio et al, Nucl. Acids. Res. 17:8392 (1989); Ruafio et al., Nucl. Acids. Res. 19: 6877-6882 (1991); WO 93/22456; Turki et al, J. Clin. Invest. 95:1635-1641 (1995)). 또한, 다중 다형성 부위는 PCT 공개 특허 출원 WO 89/10414에 기재된 대립유전자-특이적 프라이머의 세트를 이용하여 핵산의 다중 영역을 동시에 증폭하여 조사할 수 있다.
- <62> 올리고뉴클레오타이드의 제노타이핑 및 하플로타이핑. 본 발명은 개체에서 유전자를 제노타이핑 및/또는 하플로타이핑하기 위한 방법 및 조성물에 유용하다. 용어 "유전자형" 및 "반수체형"은 본원에 기재된 다형성 부위의 하나 이상에 존재하는 뉴클레오타이드 쌍 또는 뉴클레오타이드를 각각 함유하는 유전자형 또는 반수체형을 의미하고, 임의로 유전자에서 하나 이상의 추가의 다형성 부위에 존재하는 뉴클레오타이드 쌍 또는 뉴클레오타이드를 또한 포함할 수 있다. 추가의 다형성 부위는 후속적으로 발견된, 현재 공지된 다형성 부위(들)일 수 있다.
- <63> 본 발명의 조성물은 다형성 부위에 인접하거나, 또는 다형성 부위를 함유하는 하나 이상의 표적 영역에 특이적으로 혼성화되도록 고안된 올리고뉴클레오타이드 프로브 및 프라이머를 함유한다. 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 조성물은 개체에서 유전자를 제노타이핑하고(하거나) 하플로타이핑하는 방법에 있어서 유용하다. 본원에 기재된 신규한 다형성 부위에서 개체의 유전자형 또는 반수체형을 확립하기 위한 방법 및 조성물은 단백질의 기능

및 발현에 의하여 영향을 받는 질병의 병인론에서의 다형성의 효과를 연구하는데 있어서, 약물 표적의 효능을 연구하는데 있어서, 단백질의 발현 및 기능에 의하여 영향을 받는 질병의 각각의 감수성을 예측하는데 있어서, 또한 유전자 산물을 표적하는 약물에 대한 각각의 반응을 예측하는데 있어서 유용하다.

- <64> 본 발명의 올리고뉴클레오타이드를 제노타이핑하는 것은 마이크로칩, 비드, 또는 유리 슬라이드와 같은 고체 표면에 고정하거나 합성할 수 있다. 예를 들어, WO 98/20020 및 WO 98/20019 참조.
- <65> 제노타이핑 올리고뉴클레오타이드는 본원에서 동정된 신규 다형성 부위 중 하나의 하류의 몇몇의 뉴클레오타이드에 표적 영역에 혼성화될 수 있다. 그러한 올리고뉴클레오타이드는 본원에 기재된 신규 다형성 중 하나를 검출하는 폴리머라제-매개 프라이머 연장 방법에서 유용하고, 따라서 제노타이핑 올리고뉴클레오타이드는 "프라이머-연장 올리고뉴클레오타이드"로 지칭된다.
- <66> 본 발명의 직접적 제노타이핑 방법. 본 발명의 제노타이핑 방법은 2 카피의 목적하는 유전자 또는 그의 단편을 포함하는 핵산 혼합물을 개체로부터 분리하고, 2 카피의 다형성 부위 중의 하나 이상에서 뉴클레오타이드 쌍의 실체를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 당업자가 쉽게 이해할 바와 같이, 개체에서 유전자의 2 "카피"는 동일한 대립유전자이거나 상이한 대립유전자일 수 있다. 특히 바람직한 실시태양에서, 제노타이핑 방법은 각각의 다형성 부위에서 뉴클레오타이드 쌍의 실체를 결정하는 것을 포함한다. 통상적으로, 핵산 혼합물은 개체로부터 취한 생물학적 샘플, 예를 들어 혈액 샘플 또는 조직 샘플로부터 분리된다. 적합한 조직 샘플은 전혈, 정액, 타액, 눈물, 뇨, 대변, 땀, 구강 표본, 피부 및 모발을 포함한다.
- <67> 이하의 실시예에서는, 제노타이핑 분석을 위한 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP) 검정 프로브 세트는 ABI's Assays-by-Design^(R) platform에 있어서 형성된다. 문헌 [Livak KJ, Marmaro J & Todd JA, Nature Genetics 9: 341-2 (1995)] 참조. 제노타이핑은 제조자의 지시서에 따라서 게놈 DNA 10 ng으로 수행한다.
- <68> 본 발명의 직접적 하플로타이핑 방법. 본 발명의 하플로타이핑 방법은 관심 있는 유전자의 2개의 카피 중 하나만을 함유하는 핵산 분자 또는 그의 단편을 개체로부터 분리하고, 이 카피 중의 다형성 부위 중 하나 이상에서 뉴클레오타이드의 실체를 측정하는 것을 포함할 수 있다. 직접적 하플로타이핑 방법은 예를 들어 CLASPER 시스템TM 기술 (미국 특허 5,866,404) 또는 대립유전자-특이적 긴 범위 PCR (Michalotos-Beloin et al, Nucl Acids. Res. 24: 4841-4843 (1996))을 포함한다. 핵산은 유전자 또는 단편의 2 카피를 분리할 수 있는 임의의 방법을 이용하여 분리할 수 있다. 당업자가 용이하게 이해할 바와 같이, 임의의 개체의 클론은 개체에서 나타나 있는 2개의 유전자 카피 중 하나 상에 반수체형 정보를 제공할 것이다. 한 실시태양에서, 반수체형 쌍은 개체에 있어서 개체에서 존재하는 유전자의 각 카피 중의 하나 이상의 다형성 부위에서 뉴클레오타이드의 단계적 서열을 확인하여 결정한다. 바람직한 실시태양에서, 하플로타이핑 방법은 유전자의 각 카피 중의 각각의 다형성 부위에서 뉴클레오타이드의 단계적 서열을 확인하는 것을 포함한다.
- <69> 제노타이핑 및 하플로타이핑 방법 둘다에서, 다형성 부위에서의 뉴클레오타이드 (또는 뉴클레오타이드쌍)의 실체는 유전자의 하나 또는 2개의 카피, 또는 그의 단편으로부터 직접적으로 다형성 부위를 함유하는 표적 영역을 증폭하고, 통상적인 방법에 의하여 증폭된 영역을 시퀀싱하여 측정할 수 있다. 개체의 유전자에 대한 유전자형 또는 반수체형은 WO 95/11995에 기재된 것과 같은 핵산 어레이 및 하부어레이에 대한 유전자의 하나 또는 2개의 카피를 함유하는 핵산 샘플의 혼성화에 의하여 결정할 수 있다.
- <70> 표적 다형성을 갖는 결합 불균형의 다형성 부위를 사용하는 간접적 제노타이핑 방법. 또한, 본 발명의 신규한 다형성 부위 중 임의의 것에 존재하는 대립유전자의 실체는 관심있는 이들 부위를 갖는 결합 불균형에서 다른 다형성 부위를 제노타이핑하여 간접적으로 측정할 수 있다. 앞서 기재한 바와 같이, 하나의 부위에서 특정 변이체의 존재가 두번째 부위에서의 다른 변이체의 존재의 지표인 경우에, 2개의 부위가 결합 불균형으로 지칭된다. 문헌 [Stevens JC, Mol Diag. 4: 309-317 (1999)] 참조. 본 발명의 다형성 부위를 갖는 결합 불균형에서 다형성 부위는 다른 게놈 영역에서 또는 동일한 유전자의 영역에 위치할 수 있다.
- <71> 표적 유전자 영역의 증폭. 표적 영역은 폴리머라제 쉘 반응 (PCR) (U.S. Pat. No. 4,965,188), 리가제 쉘 반응 (LCR) (Barany et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:189-193 (1991); PCT 특허 출원 공개 WO 90/01069), 및 올리고뉴클레오타이드 라이게이션 검정법 (OLA) (Landegren et al, Science 241: 1077-1080 (1988))을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 올리고뉴클레오타이드-지시 증폭 방법을 이용하여 증폭될 수 있다. 그러한 방법에서 프라이머 또는 프로브로서 유용한 올리고뉴클레오타이드는 다형성 부위에 인접하거나 다형성 부위를 함유하는 핵산의 영역에 특이적으로 혼성화되어야 한다. 통상적으로, 상기 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 35 뉴클레오타이드 길이이고, 바람직하게는 15 내지 30 뉴클레오타이드 길이이다. 가장 바람직하게는, 올리고뉴클레오타이드는

20 내지 25 뉴클레오타이드 길이이다. 올리고뉴클레오타이드의 정확한 길이는 당업자에게 일상적으로 고려되고 실시되는 많은 인자들에 달려있을 것이다.

<72> 다른 공지된 핵산 증폭 과정은 전자-기초 증폭 시스템 (미국 특허 5,130,238; EP 329,822; 미국 특허 5,169,766, PCT 특허 출원 공개 WO 89/06700) 및 등은 방법 (Walker et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396 (1992))을 포함하여 표적 영역을 증폭하는데 사용될 수 있다.

<73> 표적 유전자로 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드의 혼성화. 표적 영역의 다형성은 당업계에 알려져 있는 몇몇 혼성화-기초 방법 중 하나를 이용하여 증폭 전 또는 후에 분석할 수 있다. 통상적으로, 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드는 상기 방법을 수행하는데 이용된다. 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열의 한 변이체로의 완전한 매치를 나타내는 쌍의 한 구성원 및 다른 변이체에 완전한 매치를 나타내는 다른 구성원과 함께 상이하게 표지된 프로브 쌍으로 사용될 수 있다. 일부 실시태양에서, 하나 초과 다형성 부위가 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드쌍의 세트를 이용하여 동시에 검출될 수 있다. 바람직하게는, 다형성 부위 각각으로의 혼성화가 검출될 때, 세트의 구성원은 서로 5℃ 이내, 바람직하게는 2℃ 이내의 용점을 가진다.

<74> 표적 폴리뉴클레오타이드로 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 용액 중에 두개의 실체로 수행될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드 또는 표적 폴리뉴클레오타이드가 고체 지지체에 공유적으로 또는 비공유적으로 고정될 때 상기 혼성화가 수행될 수 있다. 부속은 예를 들어 항체-항원 상호작용, poly-L-Lys, 스트렙타비딘 또는 아비딘-비오틴, 염 다리, 소수성 상호작용, 화학적 연결, UV 가교, 베이킹 등에 의하여 매개될 수 있다. 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드는 고체 지지체 상에서 직접적으로 합성될 수 있거나, 또는 합성 이후에 고체 지지체에 부착될 수 있다. 본 발명의 검출 방법에 사용하기에 적절한 고체-지지체는 규소, 유리, 플라스틱, 종이 등으로 만들어진 기판을 포함하며, 이는 웰 (96-웰 플레이트), 슬라이드, 시트, 막, 섬유, 칩, 디쉬, 및 비드 내로 형성될 수 있다. 고체 지지체는 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오타이드 또는 표적 핵산의 고정화를 촉진하기 위하여 처리되거나, 코팅되거나, 또는 유도체화될 수 있다.

<75> 유전자형 및 반수체형 군의 결정 및 이들과 형질의 상호관련성의 측정. 본 발명은 군에서 유전자형 또는 반수체형의 빈도를 결정하는 방법을 제공한다. 본 방법은 군의 각각의 구성원 중에 존재하는 유전자를 위한 유전자형 또는 반수체형을 결정하고 (여기서, 유전자형 또는 반수체형은 유전자 중의 다형성 부위의 하나 이상에서 검출되는 뉴클레오타이드쌍 또는 뉴클레오타이드를 포함한다), 유전자형 또는 반수체형이 군에서 발견되는 빈도를 계산하는 것을 포함한다. 상기 군은 기준 군, 가족 군, 동일한 성별의 군, 인구 군, 또는 형질 군 (예를 들어, 치료에 대한 반응 또는 의학적 상태와 같은 흥미있는 형질을 나타내는 개체의 군)일 수 있다.

<76> 본 발명의 다른 측면에서, 기준 군에서 발견되는 유전자형 및(또는) 반수체형의 빈도 데이터는 형질 및 유전자형 또는 반수체형 사이의 연관성을 확인하는 방법에서 사용된다. 형질은 질병에 대한 감수성 또는 질병에 대한 반응을 비제한적으로 표현하는 검출가능한 임의의 표현형일 수 있다. 본 방법은 기준 군의 관심있는 유전자형 또는 반수체형의 빈도에 대한 데이터를 얻고, 이 데이터를 형질을 나타내는 군의 유전자형 또는 반수체형의 빈도와 비교하는 것을 포함한다. 기준군 및 형질 군 중 하나 또는 둘다에 대한 빈도 데이터는 상기 방법 중 하나를 이용하여 군에서의 각 개체를 제노타이핑 또는 하플로타이핑하여 얻을 수 있다. 형질 군에 대한 반수체형은 직접적으로, 또는 다르게는 상기 예측되는 유전자형 대 반수체형의 접근법에 의하여 결정할 수 있다.

<77> 기준 군 및(또는) 형질 군에 대한 빈도 데이터는 서면으로 되거나 전자적 형태일 수 있는 미리 결정된 빈도 데이터에 접근하여 얻는다. 예를 들어, 빈도 데이터는 컴퓨터로 접근가능한 데이터베이스에 존재할 수 있다. 일단 빈도 데이터가 얻어지면, 기준 군 및 형질 군에서의 관심있는 유전자형 또는 반수체형의 빈도를 비교한다.

<78> 다형성을 분석하는 경우, 계산은 우연히 발견될 수 있는 현저한 연관성을 보정하기 위하여 수행할 수 있다. 본 발명의 방법에서 유용한 통계적 방법에 있어서, 문헌[Statistical Methods in Biology, 3rd edition, Bailey NTJ, (Cambridge Univ. Press, 1997); Waterman MS, Introduction to Computational Biology (CRC Press, 2000) and Bioinformatics, Baxevanis AD & Ouellette BFF editors (John Wiley & Sons, Inc., 2001)] 참고.

<79> 다른 실시태양에서, 상이한 군에 대한 반수체형 빈도 데이터는 하디-와인버그 평형 (Hardy-Weinberg equilibrium)와 일치하는지 여부를 결정하기 위하여 조사한다. 문헌[Hartl DL et al, Principles of Population Genomics, 3rd Ed. (Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1997)] 참조.

<80> 다른 실시태양에서, 통계적 분석은 본페로니 (Bonferoni) 보정 또는 유전자형/표현형 상호관계를 다수회 시뮬레이션하고 유의성 값을 계산하는 부트스트래핑 (bootstrapping) 방법을 사용하는 표준 ANOVA 시험에 의해 수행된

다. ANOVA는 반응 변수가 측정될 수 있는 변수 또는 하나 이상의 형질과 상호관련되거나 또는 그에 의하여 야기되는지에 대한 가설을 시험하는데 사용된다. 문헌[Fisher LD & vanBelle G, Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences (Wiley-Interscience, New York, 1993) Ch. 10] 참조.

- <81> 반수체형 쌍을 예측하기 위한 한 실시태양에서, 분석은 이하와 같이 배정 단계 (assigning step)를 포함한다: 첫째로, 가능한 반수체형쌍 각각은 기준 군에서 반수체형쌍과 비교한다. 일반적으로, 기준 군 중의 반수체형쌍의 단 하나가 가능한 반수체형 쌍에 매치되고, 그 쌍은 개체에게 배정된다. 이따금, 기준 반수체형 쌍에 존재하는 단 하나의 반수체형이 개체에 있어서 가능한 반수체형 쌍과 일치하고, 그러한 경우에, 개체는 가능한 반수체형 쌍으로부터 공지된 반수체형을 뺀으로써 유도된 새로운 반수체형과 공지된 반수체형을 함유하는 반수체형쌍이 배정된다.
- <82> 다른 실시태양에서, 관심있는 유전자형 또는 반수체형과 결합 불균형인 검출가능한 유전자형 또는 반수체형은 대용 마커로 사용될 수 있다. 다른 유전자형과 결합 불균형인 유전자형은, 주어진 유전자에 대한 특정 유전자형 또는 반수체형이 기준군에서보다 보다 높은 빈도로 존재하는 경우를 나타낸다. 빈도가 통계적으로 유의적인 경우에, 마커 유전자형은 유전자형 또는 반수체형보다 예측가능하며, 대용 마커로 사용될 수 있다.
- <83> 반수체형 함량과 임상 반응 사이의 상호관계를 발견하는 다른 방법은 유전자 알고리즘인 에러-최소화 최적화 알고리즘에 기초한 예측 모델을 사용한다. 문헌[Judson R, "Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry" in Reviews in Computational Chemistry, Ch. 10, Lipkowitz PCB & Boyd DB, eds. (VCH Publishers, New York, 1997) pp. 1-73] 참조. 자극받은 어닐링 (Press et al, Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing, Ch. 10 (Cambridge University Press, Cambridge, 1992)), 신경 네트워크 (Rich E & Knight K, Artificial Intelligence, 2nd Edition, Ch. 10 (McGraw-Hill, New York, 1991)), 표준 구배 강하 방법 (Press et al, supra Ch. 10), 또는 다른 전체적인 또는 국제적인 최적화 접근법 (see discussion in Judson, supra)이 사용될 수도 있다.
- <84> 이하의 실시예에서, 유전자형-표현형 연관 연구 및 관련 분석은 Analyst^(R)를 이용한 SAS (Cary, NC, USA)에서 수행된다. 연관 시험은 우세에 대한 가정 없이 독립 변수로 분류별의 유전자형을, 의존 변수로 다양한 효능 변수를 이용한다. 연속적인 의존 변수의 시험은 ANCOVA 분석을 이용하며, 논리적인 회귀는 분류 의존 변수에 있어서 사용된다. 유전자형-표현형 연관에서의 공동변량 (Covariate)은 이하와 같다: 질병, 시험 영역 및 기준 측정. ANCOVA 분석은 각각의 질병 군에 있어서 동일한 모델로 반복하였다. 또한, 반응자의 백분율은 공동변량으로 기준선, 또한 인자들로 치료 및 영역으로 로지스틱 회귀 모델의 수단으로 분석하였다. 모든 데이터 세트에서 $p < 0.05$ 인 연관이 유의적인 것으로 간주된다.
- <85> 치료 반응에 대한 개체 유전자형 또는 반수체형의 상관관계. 바람직한 실시태양에서, 형질은 질병에 대한 감수성, 질병의 심도, 질병의 단계 또는 약물에 대한 반응이다. 상기 방법들은 효능 측정, 약물동력학 측정 및 부작용 측정을 포함하는, 유전자형과 치료 결과 사이의 연관에 대한 가능성이 있는 모든 약물유전자적 적용을 위한 진단 시험 및 치료법에 있어서 적용가능성을 갖는다.
- <86> 다른 바람직한 실시태양에서, 관심있는 형질은 일부의 치료법에 대하여 환자에 의하여 나타나는 임상적인 반응이며, 예를 들어 약물 타게팅 또는 의학적 상태에 대한 치료에 대한 반응을 들 수 있다.
- <87> 치료에 대한 임상 반응과 유전자형 또는 반수체형 사이의 상호관계를 연역하기 위하여, 치료를 받은 개체들의 군에 의하여 나타나는 임상 반응에 대하여 유전자형 또는 반수체형 데이터를 얻었으며, 이를 이하에서 "임상 군"으로 지칭한다. 이러한 임상적인 데이터는 이미 진행한 임상 시험 결과를 분석하고(하거나) 하나 이상의 새로운 임상 시험을 고안하고 수행함으로써 얻을 수 있다.
- <88> 임상 군에 포함된 개체는 보통 흥미있는 의학적 상태의 존재에 대하여 등급을 매긴다. 잠재적인 환자들에 대한 이러한 등급화는 표준 신체 검사 또는 하나 이상의 실험실 시험을 사용할 수 있다. 다르게는, 환자들의 등급화는 반수체형 쌍과 질병 감수성 또는 심도 사이의 강한 상호관계가 있는 상황에 대하여 하플로타이핑을 이용할 수 있다.
- <89> 관심있는 치료법을 시험 군의 각각의 개체에게 투여하고, 치료에 대한 각 개체의 반응을 하나 이상의 미리정해진 기준을 이용하여 측정하였다. 많은 경우에, 실험군은 광범위한 반응을 나타낼 것이고, 조사자들은 다양한 반응에 의하여 만들어진 반응자군 (예를 들어, 낮음, 중간, 높음)의 수를 선택할 것이다. 또한, 시험군에서 각각의 개체에 대한 유전자는 제노타이핑되고(되거나) 하플로타이핑되며, 이들은 치료 전 또는 이후에 수행될 수 있

다.

- <90> 그후, 다형성 군 사이에서 임상 반응에서 관찰된 변이가 통계적으로 유의성이 있는지를 측정하기 위하여 분석한다. 사용될 수 있는 통계 분석은 문헌[Fisher LD & vanBelle G, Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences (Wiley-Interscience, New York, 1993)]에 기재되어 있다. 이 분석은 유전자의 다형성 부위가 표현형의 상이함에 가장 현저하게 영향을 주는 회귀 계산을 포함할 수 있다.
- <91> 임상 데이터 및 다형성 데이터를 둘다 얻은 후에, 개체 반응과 유전자형 또는 반수체형 함량 사이의 상호관계를 형성하였다. 상호관계는 다양한 방법으로 만들어질 수 있다. 한 방법에서는, 개체는 그의 유전자형 또는 반수체형 (또는 반수체형 쌍) (다형성군으로도 지칭됨)에 의하여 군을 이룬 후, 각각의 다형성 군의 구성원에 의하여 나타나는 임상 반응의 평균 및 표준 편차를 계산한다.
- <92> 상기 분석으로부터, 유전자형 또는 반수체형 함량의 기능으로서 임상 반응을 예측하는 당업자는 수학적 모델을 용이하게 구성할 수 있다. 유전자에 대하여 임상 반응과 유전자형 또는 반수체형 (또는 반수체형 쌍) 사이의 연관성의 확인은 치료에 반응하거나 반응하지 않거나, 또는 다르게는 보다 낮은 수준으로 반응하여 더욱 강한 치료를 필요로 하는 (즉, 약물의 보다 고용량) 개체를 결정하는 진단 방법을 고안하기 위한 기초가 될 수 있다. 진단 방법은 여러가지 형태 중 하나를 취할 수 있다: 예를 들어, 직접 DNA 시험 (즉, 유전자의 하나 이상의 다형성 부위를 제노타이핑 또는 하플로타이핑), 혈청 시험, 또는 신체 검사 측정. 유일한 조건은 진단 시험 결과와 잠재적인 유전자형 또는 반수체형 사이에 우수한 상호관계가 있어야 하는 것이다. 바람직한 실시태양에서, 이 진단 방법은 상기 예상가능한 하플로타이핑 방법을 사용한다.
- <93> 개체를 유전자형 군으로 배정. 당업자가 이해할 바와 같이, 이러한 결정에는 어느 정도의 불확실성이 있을 것이다. 따라서, 대조군 수준의 표준 편차를 사용하여 가능성에 근거한 결정을 내리고, 본 발명의 방법은 넓은 범위의 가능성에 기초한 유전자형 군 결정에 대해 적용될 것이다. 따라서, 예를 들어 한 실시태양에서 (이로 제한되지 않음), 유전자 발현 산물의 측정된 수준이 임의의 대조군의 평균의 2.5 표준 편차 내에 해당할 경우, 개체는 그 유전자형 군에 배정될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 유전자 발현 산물의 측정된 수준이 임의의 대조군의 평균의 2.0 표준 편차 내에 해당할 경우, 개체는 그 유전자형 군에 배정될 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 유전자 발현 산물의 측정된 수준이 임의의 대조군의 평균의 1.5 표준 편차 내에 해당할 경우, 개체는 그 유전자형 군에 배정될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 유전자 발현 산물의 측정된 수준이 임의의 대조군의 평균의 1.0 이하의 표준 편차 내에 해당할 경우, 개체는 그 유전자형 군에 배정될 수 있다.
- <94> 따라서, 상기 방법을 사용하여 다양한 수준의 가능성으로 특정 환자가 어느 군에 배정되어야 하는지 결정할 수 있고, 이러한 유전자형 군으로의 배정은 어느 개체를 위험 카테고리에 배정하여야 하는지 결정할 것이다.
- <95> 임상 반응과 유전자형 또는 반수체형 사이의 상호관계. 처치에 대한 임상 반응과 유전자형 또는 반수체형 사이의 상호관계를 추론하기 위해, 처치를 수행한 개체 집단 (이후 "임상 집단")이 보인 임상 반응에 대해 데이터를 수집하는 것이 필요하다. 상기 임상 데이터는 이미 수행한 임상 시험의 결과의 분석 및/또는 하나 이상의 새로운 임상 시험의 설계 및 실행에 의해 얻을 수 있다.
- <96> 상이한 대조군에서 유전자 발현을 측정함으로써 결정된 유전자 발현 산물의 표준 대조 수준은, 이어서 주어진 환자에서의 유전자 발현 산물의 측정된 수준과 비교될 것이다. 상기 유전자 발현 산물은 특정 유전자형 군 또는 유전자형 군의 폴리펩티드 유전자 발현 산물과 연관된 특징적인 mRNA일 수 있다. 이어서, 환자는 측정된 수준이 주어진 군에 대한 대조 수준과 유사한 정도를 기초로 하여 특정 유전자형 군으로 분류 또는 배정될 수 있다.
- <97> 다형성 데이터를 저장 또는 디스플레이하는 컴퓨터 시스템. 본 발명은 또한 유전자에 대하여 결정되는 다형성 데이터를 저장하고 디스플레이하는 컴퓨터 시스템을 제공한다. 컴퓨터 시스템은 컴퓨터 프로세싱 단위, 디스플레이 및 다형성 데이터를 포함하는 데이터베이스를 포함한다. 다형성 데이터는 기준군에서 소정의 유전자에 대하여 확인된 다형성, 유전자형 및 반수체형을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 컴퓨터 시스템은 그의 진화적인 관련성에 따라서 조직화된 반수체형을 나타내는 디스플레이를 형성할 수 있다. 컴퓨터는 본 발명의 방법의 실시와 관련되는 임의의 또는 모든 분석적 및 수학적 작동을 실행할 수 있다. 또한, 컴퓨터는 디스플레이 장치 상에 화면 (또는 스크린)을 생성시키는 프로그램을 실행하고, 사용자를 이를 통해 검색체 위치, 유전자 구조 및 유전자 패밀리, 유전자 발현 데이터, 다형성 데이터, 유전자 서열 데이터, 및 임상 집단 데이터 (예를 들어, 하나 이상의 집단에 대한 민족지리학적 기원, 임상 반응, 유전자형 및 반수체형에 대한 데이터)를 포함하여 유전자 및 그의 게놈 변이에 관한 다량의 정보를 보고 분석할 수 있다. 본원에 설명된 다형성 데이터는 관련 데이

타베이스 (예를 들어, Oracle 데이터베이스 또는 ASCII 플랫폼 파일 (flat file))의 일부로서 저장될 수 있다. 상기 다형성 데이터는 컴퓨터의 하드 드라이브에 저장될 수 있거나 또는 예를 들어 CD-ROM 또는 컴퓨터로 실행시킬 수 있는 하나 이상의 다른 저장 장치에 저장될 수 있다. 예를 들어, 데이터는 네트워크를 통해 컴퓨터와 연결되는 하나 이상의 데이터베이스에 저장될 수 있다.

<98> **핵산-기초 진단.** 다른 측면에서, 본 발명은 유전자 변이의 종류에 따라 대상을 분류할 때 유용한 SNP 프로브를 제공한다. 본 발명에 따른 SNP 프로브는 통상적인 대립유전자 식별 분석에서 SNP를 식별하는 올리고뉴클레오타이드이다. 특정 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 상기 측면에 따른 올리고뉴클레오타이드는 SNP 핵산의 한 대립유전자에는 상보성이지만, SNP 핵산의 임의의 다른 대립유전자에는 상보성이 아니다. 본 발명의 상기 실시태양에 따른 올리고뉴클레오타이드는 상이한 방식으로 SNP를 식별할 수 있다. 예를 들어, 엄격한 혼성화 조건 하에, 적절한 길이의 올리고뉴클레오타이드는 하나의 SNP에 혼성화하지만 임의의 다른 SNP에는 혼성화하지 않을 것이다. 올리고뉴클레오타이드는 방사성 표지 또는 형광 분자 태그를 이용하여 표지될 수 있다. 별법으로, 적절한 길이의 올리고뉴클레오타이드는 PCR에 대한 프라이머로서 사용될 수 있고, 여기서 3' 말단 뉴클레오타이드는 SNP를 포함하는 하나의 대립유전자에는 상보성이지만, 임의의 다른 대립유전자에는 상보성이 아니다. 상기 실시태양에서, PCR에 의한 증폭의 존재 또는 부재가 SNP의 반수체형을 결정한다.

<99> 본 발명의 게놈 및 cDNA 단편은 본원에서 확인된 적어도 하나의 신규한 다형성 부위를 포함하고, 적어도 10개 뉴클레오타이드의 길이를 갖고, 유전자의 전체 길이까지 걸칠 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 단편은 100 내지 3000개의 뉴클레오타이드 길이, 보다 바람직하게는 200 내지 2000개의 뉴클레오타이드 길이, 가장 바람직하게는 500 내지 1000개의 뉴클레오타이드 길이이다.

<100> **본 발명의 키트.** 본 발명은 개체의 유전자를 하플로타이핑 및(또는) 제노타이핑하는데 유용한 핵산 및 폴리펩티드 검출 키트를 제공한다. 그러한 키트는 개체를 분류하기 위한 목적으로 개체를 분류하는데 유용하다. 구체적으로는, 본 발명은 생물학적 샘플, 예를 들어 혈청, 혈장, 림프, 낭성액, 소변, 대변, 뇌척수액, 복수액 또는 혈액을 포함하여 이로 제한되지 않는 임의의 체액 및 신체 조직의 생검 샘플에서 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드 또는 핵산의 존재를 검출하기 위한 키트를 포함한다. 예를 들어, 키트는 생물학적 샘플에서 표지된 화합물 또는 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA를 검출할 수 있는 물질 및 샘플 내의 폴리펩티드 또는 mRNA의 양을 결정하기 위한 수단, 예를 들어 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 mRNA에 결합하는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함할 수 있다. 또한, 키트는 키트를 사용하여 얻은 결과를 해석하기 위한 지시서를 포함할 수 있다.

<101> 또다른 실시태양에서, 본 발명은 별개의 용기에 포장된 적어도 2개의 제노타이핑 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 또한 별개의 용기에 포장된 다른 성분, 예를 들어 혼성화 버퍼 (올리고뉴클레오타이드가 프로브로서 사용되는 경우)를 포함할 수 있다. 별법으로, 올리고뉴클레오타이드가 표적 구역 증폭을 위해 사용되는 경우, 키트는 별개의 용기에 포장된 폴리머라제 및 예를 들어 PCR의 경우에 폴리머라제에 의해 매개되는 프라이머 연장을 위해 최적화된 반응 버퍼를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 키트는 DNA 샘플 수거 수단을 추가로 포함할 수 있다.

<102> 항체 기반 키트의 경우, 키트는 예를 들어 1) 예를 들어 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드에 결합하는, 고체 지지체에 부착된 제1 항체, 및 임의로; 2) 폴리펩티드 또는 제1 항체에 결합하고 검출가능한 표지에 컨쥬게이팅된 제2의 상이한 항체를 포함할 수 있다.

<103> 올리고뉴클레오타이드 기반 키트의 경우, 키트는 예를 들어 1) 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 본 발명의 마커에 대응하는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 혼성화하는 검출가능하게 표지된 올리고뉴클레오타이드; 또는 2) 본 발명의 마커에 대응하는 핵산 분자의 증폭에 유용한 프라이머의 쌍을 포함할 수 있다.

<104> 키트는 또한 예를 들어 완충제, 보존제 또는 단백질-안정화제를 포함할 수 있다. 키트는 검출가능한 표지, 예를 들어 효소 또는 기질을 검출하기 위해 필요한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 키트는 분석되어 시험 샘플과 비교될 수 있는 대조 샘플 또는 일련의 대조 샘플을 포함할 수도 있다. 키트의 각각의 성분은 개별 용기에 봉입될 수 있고, 상이한 모든 용기가 키트를 사용하여 수행된 분석 결과를 해석하기 위한 지시서와 함께 단일 패키지 내에 포함될 수 있다.

<105> **본 발명의 핵산 서열.** 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명은 또한 동일한 것의 대립유전자 변이체, 즉 폴리뉴클레오타이드에 의하여 코딩되는 것과 동일하거나, 상동이거나 (homologous), 또는 관련된 돌연변이 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드의 천연의 다른 형태를 포

함한다. 다르게는, 비-천연 변이체는 당업계에 잘 알려져 있는 돌연변이형성 (mutagenesis) 기술 또는 직접적 합성 기술에 의하여 생산할 수 있다.

<106> 따라서, 본 발명의 돌연변이 폴리펩티드를 코딩하는 어느 핵산 서열을 낮은 엄격도 (stringency)에서 혼성화할 수 있는 핵산 서열이 본 발명의 범위 내로 고려된다. 표준 엄격도 상태는 표준 분자 생물학 클로닝 교재에서 확인된다. 예를 들어, 문헌[Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook, Fritsch & Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]; [DNA Cloning, Volumes I and II, Glover DN, ed. (1985)]; [Oligonucleotide Synthesis, Gait MJ, ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames BD & Higgins SJ, eds. (1984)] 참조.

<107> 유전자 발현 수준의 확인. mRNA 수준 (즉, 유전자 전사 수준) 및 폴리펩티드 유전자 발현 산물의 수준 (즉, 유전자 번역 수준)을 검출하고 측정하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 뉴클레오티드 마이크로어레이의 사용, 및 질량 분광법 및(또는) 항체 검출 및 정량화 기술을 포함하는 폴리펩티드 검출 방법을 포함한다 [Human Molecular Genetics, 2nd Edition. Tom Strachan & Andrew Read. (John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York, 1999)].

<108> 표적 유전자 전사의 측정. 생물학적 샘플, 예를 들어 개체의 조직 또는 체액 중의 유전자의 발현 산물의 수준을 결정하는 것은 다양한 방법으로 수행할 수 있다. 용어 "생물학적 샘플"은 대상으로부터 단리된 조직, 세포, 생물학적 유체 및 그의 단리물과 대상 내에 존재하는 조직, 세포 및 유체를 포함하도록 의도된다. 많은 발현 검출 방법에서는 단리된 RNA를 이용한다. 시험관내 방법에서, mRNA의 단리에 대해 선택하지 않는 임의의 RNA 단리 기술이 세포로부터 RNA의 정제를 위해 이용될 수 있다 (예를 들어 문헌[Ausubel et al., Ed., Curr. Prot. Mol. Biol., John Wiley & Sons, NY (1987-1999)] 참조).

<109> 한 실시태양에서, 표적 유전자의 mRNA 발현 산물의 수준을 측정한다. 특이적 mRNA의 수준을 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 노던 블롯 분석, 역전사 PCR 및 실시간 정량적 PCR 또는 올리고뉴클레오티드 어레이 또는 마이크로어레이로의 혼성화를 포함한다. 다른 보다 바람직한 실시태양에서, 발현 수준의 측정은 혈액 또는 혈청을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 체액 또는 조직 샘플에서의 유전자의 단백질 또는 폴리펩티드 발현 산물의 수준을 측정함으로써 수행할 수 있다. 다수의 조직 샘플은 예를 들어, 미국 특허 제4,843,155호의 1단계 RNA 단리 방법과 같은 당업자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 용이하게 가공할 수 있다.

<110> 단리된 mRNA는 서던 또는 노던 분석, PCR 분석 및 프로브 어레이를 포함하고 이로 제한되지 않는 혼성화 또는 증폭 분석에 사용될 수 있다. mRNA 수준의 검출을 위한 하나의 바람직한 진단 방법은 단리된 mRNA를 검출되는 유전자에 의해 코딩되는 mRNA에 혼성화할 수 있는 핵산 분자 (프로브)와 접촉시키는 것을 수반한다. 핵산 프로브는 예를 들어 전장 cDNA 또는 그의 일부, 예를 들어 적어도 7, 15, 30, 50, 100, 250 또는 500개 뉴클레오티드 길이의 올리고뉴클레오티드일 수 있고, 엄격한 조건 하에서 본 발명의 마커를 코딩하는 mRNA 또는 게놈 DNA와 특이적으로 혼성화하기에 충분하다. 본 발명의 진단적 분석에 사용하기 적합한 다른 프로브가 본원에 기재된다. mRNA와 프로브의 혼성화는 목적하는 마커가 발현되고 있음을 나타낸다.

<111> 한 포맷에서, 프로브가 예를 들어 Affymetrix 유전자 칩 어레이 (Affymetrix, Calif, USA)에서 고체 표면 상에 고정되고, mRNA는 프로브와 접촉된다. 당업자는 본 발명의 마커에 의해 코딩되는 mRNA의 수준을 검출할 때 사용하기 위해 공지된 mRNA 검출 방법을 쉽게 적용할 수 있다.

<112> 본 발명의 마커에 대응하는 mRNA의 샘플내 수준을 결정하는 다른 방법은 예를 들어 RT-PCR (Mullis의 미국 특허 4,683,202 (1987)에 제시된 실험 실시태양); 리가제 연쇄 반응 [Barany et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193 (1991)]; 자기부양 서열 복제 [Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 (1990)]; 전사 증폭 시스템 [Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177 (1989)]; Q-베타 레플리카제 [Lizardi et al., Biol. Technology 6: 1197 (1988)]; 롤링 서클 (rolling circle) 복제 [미국 특허 5,854,033 (1988)]; 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법에 의한 핵산 증폭 과정 및 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 증폭된 분자의 검출을 수반한다. 이러한 검출 과정은 핵산 분자가 극히 적은 수로 존재할 경우 핵산 분자의 검출을 위해 특히 유용하다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "증폭 프라이머"는 유전자의 5' 또는 3' 영역 (각각 플러스 및 마이너스 스트랜드, 또는 그 반대)에 어닐링하고 짧은 영역을 포함할 수 있는 핵산 분자의 쌍으로서 규정된다. 일반적으로, 증폭 프라이머는 약 10-30개의 뉴클레오티드 길이이고 약 50-200개의 뉴클레오티드 길이의 영역에 플랭킹(flaning)된다.

<113> 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)은 예를 들어 본 발명의 유전자 (예를 들어 목적하는 SNP 및 다형성을 포함하는 유

전자)의 유전자 발현 수준을 평가하는 한 방법이다. RT-PCR 분석은 mRNA 스트랜드를 포함하여 RNA 스트랜드로부터 DNA 스트랜드의 합성을 촉매화하기 위해 RNA 역전사효소를 이용한다. 생성되는 DNA는 특이적으로 검출 및 정량화될 수 있고, 상기 방법을 사용하여 특이적인 종의 mRNA의 수준을 결정할 수 있다. 이를 수행하는 하나의 방법은 아래에서 보다 상세하게 설명되는 TAQMAN™ (피어 어플라이드 바이오시스템즈 (PE Applied Biosystems, 미국 캘리포니아주 포스터 시티))로 알려져 있으며, PCR 반응 도중에 프로브의 특이적인 형태를 절단하도록 앰플리태그 골드 (AMPLITAG GOLD™) DNA 폴리머라제의 5' 뉴클레아제 활성을 이용한다. 이는 TAQMAN™ 프로브로 지칭된다. 문헌[Luthra et al, Am. J. Pathol. 153: 63-68 (1998)]; [Kuimelis et al, Nucl. Acids Symp. Ser. 37: 255-256 (1997)]; 및 [Mullah et al, Nucl. Acids Res. 26(4): 1026-1031 (1998)] 참조. 반응 도중에, 프로브의 절단은 리포터 염료와 켄처 염료를 분리하여, 리포터의 형광을 증가시킨다. PCR 산물의 축적은 리포터 염료의 형광의 증가를 모니터링함으로써 직접 검출된다. 문헌[Heid et al, Genome Res. 6(6): 986-994 (1996)]. 핵산 표적의 시작 카피수가 많을수록, 형광의 현저한 증가가 급방 관찰된다. 문헌[Gibson, Heid & Williams et al, Genome Res. 6: 995-1001 (1996)] 참조.

<114> 세포의 전사 상태를 측정하는 다른 방법은 예를 들어 이중 제한 효소 소화를 페이징 (phasing) 프라이머와 조합하는 방법에 의해 전기영동 분석을 위해 복잡성이 제한된 제한 단편의 풀을 생성시키는 것 (예를 들어, EP 0 534858 A1 참조), 또는 규정된 mRNA 말단에 가장 가까운 부위를 갖는 제한 단편을 선택하는 방법을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Prashar & Weissman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2) 659-663 (1996)] 참조).

<115> 다른 방법은 각각의 cDNA를 확인하기 위하여 다수의 cDNA 각각에서 충분한 염기, 예를 들어 20-50개의 염기를 시퀀싱하거나, 또는 짧은 태그, 예를 들어 9-10개의 염기 (이들은 정의된 mRNA 및 경로 패턴에 대하여 공지된 위치에서 형성됨)를 시퀀싱함으로써 통계적인 샘플 cDNA 풀을 형성하는 것이다. 예를 들어, 문헌[Velculescu, Science 270: 484-487 (1995)] 참조. 샘플 중의 cDNA 수준이 정량화되고, 당업자에게 잘 알려진 표준 통계 수단을 이용하여 각 cDNA의 중간값 (mean), 평균 (average) 및 표준 편차가 결정된다. 문헌[Norman TJ. Bailey, Statistical Methods In Biology, 3rd Edition (Cambridge University Press, 1995)].

<116> **폴리펩티드의 검출. 면역학적 검출 방법.** 본 발명의 유전자에 의하여 코딩되는 단백질의 발현은 검출가능하게 표지된 프로브, 또는 연속적으로 표지된 프로브에 의하여 검출가능하다. 프로브 또는 항체와 관련하여, 용어 "표지된 (labelled)"는 검출가능한 물질과 프로브 또는 항체의 커플링, 즉 물리적 연결에 의한 프로브 또는 항체의 직접-표지, 및 직접 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 프로브 또는 항체의 간접 표지를 포함하는 것으로 의도된다. 간접 표지의 예는 형광-표지된 2차 항체 및 비오틴으로 DNA 프로브의 말단 표지를 이용하여 형광-표지된 스트렙타비딘으로 검출할 수 있게 되는, 1차 항체의 검출을 포함한다. 일반적으로, 프로브는 발현된 단백질을 인식하는 항체이다. 샘플이 주어진 항체에 결합하는 표적 단백질을 포함하는지 여부를 결정하기 위하여 다양한 포맷이 사용될 수 있다. 본 발명의 표적 폴리펩티드의 검출에 유용한 면역분석 방법은 예를 들어, 도트 블로팅 (dot blotting), 웨스턴 블로팅, 단백질 칩, 경쟁적 및 비-경쟁적 단백질 결합 분석, 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA), 면역 조직 화학, 형광 활성화 세포 분리 (FACS), 및 통상 사용되고 과학 및 특허 문헌에 널리 기재된, 상업적으로 사용되는 다른 분석을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 당업자는 세포가 본 발명의 마커를 발현하는지 여부 및 혈액 또는 다른 신체 조직에서 그 특이적 폴리펩티드 발현의 상대적인 농도를 결정하기 위하여 공지된 단백질/항체 검출 방법을 용이하게 조절할 수 있다. 개체로부터의 단백질은 당업자에게 잘 알려진 기술을 이용하여 분리할 수 있다. 사용되는 단백질 분리 방법은 예를 들어, 문헌[Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988)]에 기재된 것일 수 있다.

<117> 본원에 개시된 유전자 중 하나에 의해 코딩되는 단백질에 대한 항체를 생산하기 위해, 다양한 숙주 동물을 폴리펩티드 또는 그의 일부를 주사하여 면역화시킬 수 있다. 상기 숙주 동물은 일부 예를 들어 토끼, 마우스 및 래트를 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다. 면역 반응을 증가시키기 위해 숙주 종에 따라 다양한 항원보강제, 비제한적인 예를 들어 프로인트 (Freund) (완전 및 불완전), 미네랄 겔, 예를 들어 수산화알루미늄; 표면 활성 물질, 예를 들어 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다중음이온, 펩티드, 오일 에멀전, 키텔 림펩 헥소시아닌 및 디 니트로페놀; 및 잠재적으로 유용한 인간 항원보강제, 예를 들어 BCG (bacille Camette-Guerin) 및 코리네박테리움 파르븀 (*Corynebacterium parvum*)을 사용할 수 있다.

<118> 특정 항원에 대한 항체의 동종 집단인 모노클로날 항체 (mAb)는 배양물 내 연속 세포주에 의해 항체 분자의 생산을 제공하는 임의의 기술에 의해 얻을 수 있다. 이는 하이브리도마 기술 [Kohler & Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975) 및 미국 특허 4,376,110], 인간 B-세포 하이브리도마 기술 [Kosbor et al., Immunol. Today,

4: 72 (1983); Cole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-2030 (1983)]; 및 EBV-하이브리도마 기술 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (Alan R. Liss, Inc., 1985) pp. 77-96]을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

- <119> 또한, 적절한 항원 특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 적절한 생물학적 활성의 인간 항체 분자로부터의 유전자와 함께 스플라이싱함으로써 "키메라 항체"를 생산하기 위해 개발된 기술 (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984); 및 Takeda et al., Nature, 314: 452-454 (1985) 참조)이 사용될 수 있다. 키메라 항체는 상이한 부분이 상이한 동물종으로부터 유래하는 분자, 예를 들어 쥐 mAb로부터 유래된 가변 또는 초가변 영역 및 인간 면역글로불린 불변 구역을 갖는 것이다.
- <120> 별법으로, 단쇄 항체 생산을 위해 설명된 기술 (미국 특허 4,946,778; Bird, Science, 242: 423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988); 및 Ward et al., Nature, 334: 544-546 (1989))이 상이하게 발현된 유전자 단쇄 항체를 생산하기 위해 채용될 수 있다.
- <121> 보다 바람직하게는, "인간화 항체" 생산에 유용한 기술을 단백질에 대한 항체, 단편 또는 그의 유도체 생산에 채용할 수 있다. 상기 기술은 미국 특허 5,932,448; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,661,016; 및 5,770,429에 개시되어 있다.
- <122> 항체 또는 항체 단편은 발현된 단백질을 검출하기 위해 웨스턴 블롯 또는 면역형광 기술과 같은 방법에서 사용될 수 있다. 상기 용도에서, 항체 또는 단백질을 고체 지지체 상에 고정시키는 것이 일반적으로 바람직하다. 적합한 고체상 지지체 또는 캐리어는 항원 또는 항체에 결합할 수 있는 임의의 지지체를 포함한다. 공지된 지지체 또는 캐리어는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스틀란, 나일론, 아밀라제, 천연 및 변형 셀룰로스, 폴리아크릴아미드, 반려암 및 자철광을 포함한다.
- <123> 용이한 검출을 위한 유용한 방법은 샌드위치 ELISA이며, 여기서 다수의 변화가 존재하며, 이들 모두는 본 발명의 방법 및 분석에서 사용하기 위한 의도이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "샌드위치 분석"은 기본 2-부위 기술에 기초한 모든 변형물을 포함하려는 의도이다. 면역형광 및 EIA 기술은 둘다 당업계에 잘 알려져 있다. 그러나, 다른 리포터 분자, 예를 들어 방사성동위원소, 화학발광 또는 생물발광 분자가 또한 이용될 수 있다. 필요한 용도에 과정을 변화시키는 방법은 당업자에게 명백할 것이다.
- <124> 단백질의 전체 게놈 모니터링 (즉 "프로테오믹스 (proteome)")은 결합 부위가 세포 게놈에 의해 코딩되는 다수의 단백질 중에 특이적이며, 고정된, 바람직하게는 모노클로날 항체를 포함하는 마이크로어레이를 제조함으로써 수행될 수 있다. 바람직하게는, 코딩되는 단백질의 실질적인 분획, 또는 적어도 목적하는 생물학적 네트워크 모델의 시험 또는 확인에 관련된 단백질에 대한 항체가 존재한다. 앞서 기재된 바와 같이, 모노클로날 항체의 제조 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY, 1988)] 참조. 바람직한 실시태양에서, 모노클로날 항체는 세포의 게놈 서열을 기초로 하여 설계된 합성 펩티드 단편에 대해 생성된다. 상기 항체 어레이를 사용하여, 세포로부터의 단백질을 어레이에 접촉시키고, 그의 결합은 당업계에 공지된 분석으로 측정한다.
- <125> **폴리펩티드의 검출. 2차원 겔 전기영동.** 2차원 겔 전기영동은 당업계에 공지되어 있고, 일반적으로 제1 차원을 따른 등전 집속 (focusing) 및 제2 차원에 따른 SDS-PAGE 전기영동을 수반한다. 예를 들어, 문헌[Hames et al., Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (IRL Press, NY, 1990); Shevchenko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14440-14445 (1996); Sagliocco et al., Yeast 12: 1519-1533 (1996); 및 Lander, Science 274: 536-539 (1996)] 참조.
- <126> **폴리펩티드의 검출. 질량 분광법.** 표적 폴리펩티드의 발현 수준 및 실체는 질량 분광 기술 (MS)를 사용하여 결정할 수 있다. MS-기초 분석 방법은 단리된 표적 폴리펩티드의 분석 및 생물학적 샘플에서의 표적 폴리펩티드의 분석에 있어서 유용하다. 표적 폴리펩티드를 분석하는데 사용되는 MS 포맷은 매트릭스 보조 레이저 제거 (matrix assisted laser desorption (MALDI)), 연속적 또는 펄스 전기분무 이온화 (ESI) 및 관련 방법, 예를 들어 이온분무 또는 열분무 (thermospray) 및 대규모 클러스터 임팩트 (massive cluster impact (MCI))를 포함하지만 이에 한정되지는 않는 이온화 (I) 기술을 포함한다. 그러한 이온 공급원은 선형 또는 비선형 비행 굴절 시간 (reflectron time of flight (TOF)), 단일 또는 다중 4중극, 단일 또는 다중 자성 부분, 푸리에 변환 이온 사이클로트론 공명 (Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)), 이온 트랩 및 이들의 조합, 예를 들어 이온-트랩/TOP를 포함하는 검출 포맷과 매치할 수 있다. 이온화에 있어서, 다수의 매트릭스/과장 조합

(예를 들어, 매트릭스 보조 레이저 제거 (MALDI)) 또는 용매 조합 (예를 들어, ESI)가 사용될 수 있다.

- <127> 질량 분광법 (MS) 분석에 있어서, 표적 폴리펩티드는 적절한 용액 또는 시약 시스템 중에 용해될 수 있다. 용액 또는 시약 시스템의 선택, 예를 들어 유기 또는 무기 용매는 표적 폴리펩티드의 특성 및 수행된 MS의 유형에 따라서 달라지며, 당업계에 잘 알려진 방법에 기초한다. 예를 들어, MALDI에 있어서 문헌[Vorm et al, Anal. Chem. 61: 3281 (1994); 및 ESI에 있어서 문헌[Valaskovic et al., Anal. Chem. 67: 3802 (1995)] 참조. 펩티드의 MS가 또한 예를 들어 국제 PCT 출원 WO 93/24834호 및 미국 특허 제5,792,664호에 기재되어 있다. 용매는 표적 폴리펩티드가 기화 공정에 도입된 에너지에 의하여 분해될 위험을 최소화하도록 선택된다. 표적 폴리펩티드 분해의 위험 감소를 예를 들어 매트릭스 중에 샘플을 끼워넣어 달성할 수 있다. 적절한 매트릭스는 유기 화합물, 예를 들어 당, 예를 들어 펜토스 또는 헥소스 또는 폴리사카라이드, 예를 들어 셀룰로스일 수 있다. 그러한 화합물은 열적으로 (thermolytically) CO₂ 및 H₂O으로 분해되어, 화학적 반응을 야기할 수 있는 잔기가 형성되지 않게 된다. 매트릭스는 또한 암모늄의 니트레이트와 같은 무기 화합물일 수 있으며, 이는 본질적으로 잔기를 남기지 않고 분해된다. 이러한 또한 다른 용매의 사용이 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,062,935호 참조. 전자분무 MS는 문헌[Fenn et al, J. Phys. Chem. 88: 4451-4459 (1984)] 및 PCT 출원 제WO 90/14148호에 기재되어 있으며, 최근의 출원들이 리뷰 논문에 요약되어 있다. 문헌[Smith et al, Anal. Chem. 62: 882-89 (1990)] 및 [Ardrey, Spectroscopy 4: 10-18 (1992)] 참조.
- <128> MS에 의하여 측정된 표적 폴리펩티드의 질량을 대응하는 공지된 폴리펩티드의 질량과 비교할 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리펩티드가 돌연변이 단백질인 경우, 대응하는 공지된 폴리펩티드는 대응하는 비-돌연변이 단백질, 예를 들어 야생형 단백질일 수 있다. ESI로, 샘플의 펩토몰 (femtomole) 양의 분자량의 측정은 모두가 질량 계산에 사용될 수 있는 다수의 이온 피크의 존재로 인하여 매우 정확하다. 하위-아토몰 (Sub-attomole) 수준의 단백질을 예를 들어 ESI MS (Valaskovic et al, Science 273: 1199-1202 (1996)) 및 MALDI MS (Li et al, J. Am. Chem. Soc. 118: 1662-1663 (1996))를 사용하여 검출하였다.
- <129> 매트릭스 보조 레이저 제거 (MALDI). 생물학적 샘플, 예를 들어 체액 또는 조직 샘플 중의 표적 단백질의 수준을 이하에서 상세하게 설명하는 매트릭스-보조 레이저 제거/이온화, 비행시간형 (time-of-flight) 질량 분광법 (MALDI-TOF-MS) 및 레이저 제거/이온화를 위한 개선된 표면 (surfaces enhanced for laser desorption/ionization), 비행시간형 질량 분광법 (SELDI-TOF-MS)과 같이 당업계에 공지된 기술을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는 질량 분광 (MS) 방법에 의하여 측정할 수 있다. MALDI 수행 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Juhász et al., Analysis, Anal. Chem. 68: 941-946 (1996)], 또한 MALDI 및 연장 추출 프로토콜 (delayed extraction protocol)의 기재에 있어서 미국 특허 제5,777,325; 5,742,049; 5,654,545; 5,641,959; 5,654,545 및 5,760,393호 참조. 해상도 개선을 위한 다양한 방법이 또한 공지되어 있다. MALDI-TOF-MS는 문헌[Hillenkamp et al., Biological Mass Spectrometry, Burlingame & McCloskey, eds. (Elsevier Science Publ., Amsterdam, 1990) pp. 49-60]에 기재되어 있다.
- <130> 질량 분광법을 이용한 마커 검출을 위한 다양한 기술을 사용할 수 있다. 문헌[Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report, Hillenkamp, ed., pp. 354-362 (1988)]; [Bordeaux Mass Spectrometry Conference Report, Karas & Hillenkamp, eds., pp. 416-417 (1988)]; [Karas & Hillenkamp, Anal. Chem. 60: 2299-2301 (1988)]; 및 [Karas et al, Biomed. Environ. Mass Spectrum 18: 841-843 (1989)] 참조. TOF-MS에서의 레이저 빔의 용도가 예를 들어 미국 특허 제4,694,167; 4,686,366, 4,295,046 및 5,045,694호에 나타나 있고, 이는 본원에 그 전체가 참고문헌으로 도입되었다. 다른 MS 기술은 분열 (fragmentation) 없이 고분자량 생중합체의 성공적인 휘발을 가능하게 하며, 다양한 생물학적 거대분자가 질량 분광법에 의하여 분석되도록 한다.
- <131> 레이저 제거/이온화를 위한 개선된 표면 (SELDI). 프로브 요소가 친화도 질량 분광법 (Affinity Mass Spectrometry (AMS))로 기재된 특이적 분석물의 포획 및 도킹에 활발하게 참여하도록 하는 표면과 새로운 MS 프로브 요소 조성물을 사용하는 다른 기술이 사용된다. SELDI 특허: 미국 특허 제5,719,060; 5,894,063; 6,020,208; 6,027,942; 6,124,137호; 및 공개 미국 특허 출원 제2003/0003465호 참조. 새로운 MS 프로브 요소의 몇몇 유형은 친화도 포획을 위한 개선된 표면 (Surfaces Enhanced for Affinity Capture (SEAC))으로 고안되었다. 문헌[Hutchens & Yip, Rapid Commun. Mass Spectrom. 7: 576-580 (1993)] 참조. SEAC 프로브 요소는 단백질 표면 구조 및 생물특이적 분자 인식으로 알려져 있는 방법을 사용하여 상이한 분류의 생중합체, 특히 단백질을 성공적으로 회수하고 속박하는데 사용되었다. MS 프로브 요소 표면 상에 고정된 친화도 포획 장치, 즉 SEAC는 프로브 표면의 분석물의 위치 및 친화도 (특이성)를 결정하고, 이로써 연속적인 분석 MS 공정이 효율적으로 된다.

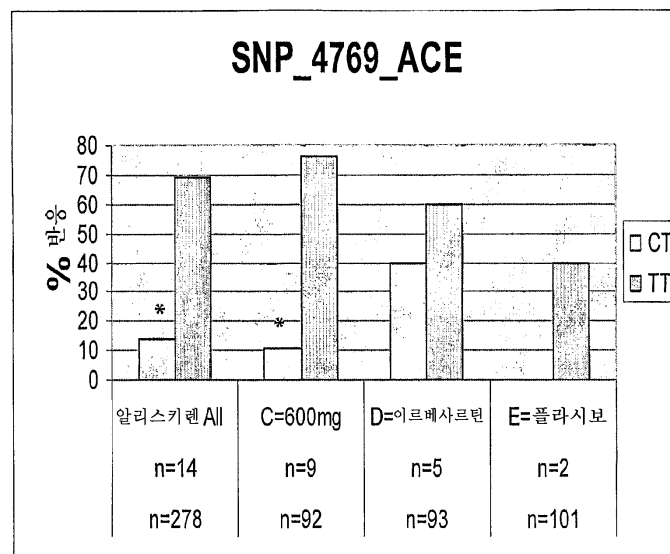
<132> SELDI의 일반적인 분류 내에는 3종의 별도의 하위분류가 있다: (1) 니트 제거를 위하여 개선된 표면 (Surfaces Enhanced for Neat Desorption (SEND)), 여기서 프로브 요소 표면, 즉 샘플 표시 수단 (sample presenting means)은 표면으로 직접 (니트) 첨가된 분석물의 제거/이온화를 촉진하기 위하여 "매트릭스" 대신에 에너지 흡수 분자 (EAM)을 포함하도록 고안된다. (2) SEAC, 여기서 프로브 요소 표면, 즉 샘플 표시 수단은 다양한 기전에 의하여 (대부분 비공유적으로) 프로브 표면으로 분석물의 특이적 또는 비특이적 부착 또는 흡착 (소위, 도킹 또는 속박 (tethering))을 촉진하는 화학적으로 한정되고(되거나) 생물학적으로 한정된 친화도 포획 장치를 포함하도록 고안된다. (3) 광불안정 부착 및 유리를 위하여 개선된 표면 (SEPAR), 여기서 프로브 요소 표면, 즉 샘플 표시 수단은 공유적 도킹 장치로 작용하는 1종 이상의 화학적으로 한정된 가교 분자를 함유하도록 고안되거나 개질되어 있다. SEPAR 샘플 표시 수단 (즉, 프로브 요소 표면) 및 분석물 (예를 들어, 단백질) 사이의 광불안정 분자 부착 지점의 유형과 수를 결정하는 화학적 특성들은 분석물 중에서 하나 이상의 다수의 상이한 잔기 또는 화학 구조 (예를 들어, 단백질 및 펩티드의 경우에 His, Lys, Arg, Tyr, Phe 및 Cys 잔기)를 포함할 수 있다.

<133> 생물학적 상태의 다른 측면. 본 발명의 다양한 실시태양에서, 생물학적 활성 상태의 측면, 또는 혼합 측면이 약물 및 경로 반응을 얻기 위하여 측정될 수 있다. 세포 기능을 확인하는데 해당하는 단백질의 활성을 측정할 수 있고, 본 발명의 실시태양은 그러한 측정에 기초할 수 있다. 활성 측정은 특성이 분석되는 특정 활성에 적합한 임의의 기능적, 생화학적 또는 물리적 수단에 의해 수행될 수 있다. 활성이 화학적 변형을 수반하는 경우, 세포 단백질은 천연 기질과 접촉할 수 있고, 변형 비율을 측정할 수 있다. 활성이 다량체 단위의 회합, 예를 들어 활성화된 DNA 결합 복합체와 DNA의 회합을 수반하는 경우, 회합된 단백질의 양 또는 회합의 2차적인 결과, 예를 들어 전사되는 mRNA의 양을 측정할 수 있다. 또한, 예를 들어 세포 주기 조절에서와 같이 단지 기능성 활성만이 알려진 경우에는, 기능의 수행이 관찰될 수 있다. 그러나, 알려지고 측정된, 단백질 활성의 변화는 본 발명의 방법에 의해 분석된 반응 데이터를 형성한다. 별도의 비제한적 실시태양에서, 반응 데이터는 세포의 생물학적 상태의 혼합 측면으로 형성될 수 있다. 반응 데이터는 예를 들어 특정 mRNA 풍부도의 변화, 특정 단백질 풍부도의 변화 및 특정 단백질 활성의 변화로부터 얻을 수 있다.

<134> 다음 실시예는 본 발명의 바람직한 실시태양을 더욱 충분히 예시하기 위해 제시된다. 이들 실시예는 어떠한 식으로도 청구의 범위에 의해 규정되는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

도면1



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG
Gu, Jesse
Meyer, Joanne

<120> BIOMARKERS FOR EFFICACY OF ALISKIREN AS
A HYPERTENSIVE AGENT

<130> 34130 WO PCT

<140> PCT/US06/00913

<141> 2006-03-20

<150> 60/664,248

<151> 2005-03-22

<150> 60/742,401

<151> 2005-12-05

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 140

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variation

<222> (1)...(140)

<223> The nucleotide sequence of SNP_4769, a single
nucleotide polymorphism of the angiotensin
converting enzyme (ACE) gene

<400> 1

aggacttccc agcctctctt tctgtctgct ctgctacggg caccctctgc tgggtcccag 60

ccaggaggcy cccaacaggt gacagtcacc catgggacaa gcagccaggc aacaaccagc 120
agccagacaa ccacccacca 140

<210> 2

<211> 800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variation

<222> (1)...(800)

<223> The nucleotide sequence of SNP_1445, a single
nucleotide polymorphism of the angiotensin II type
2 receptor (AGTR2) gene

<400> 2

tggaacttc attttttttg tttgagattt atttgaatga gctgttatga ttggagacag 60
tgagaatttc agattaatgt tttgcagaca aaaaaaaccc tctctggaaa gctggcaagg 120
gttcataagt cagccctaga attatgtagg ttgaaggctc ccagtgagca gaccaaact 180
ataagaagga aaccagagat ctgggtgctat tacgtcccag cgtctgagag aacgagtaag 240
cacagaattc aaagcattct gcagcctgaa ttttgaaggc aagtatgaac aatttatata 300
taatttactt ggaaagtaga acatacatta aatgaaaata ttttttatgg atgaacttct 360
gtttttcctg tgttttaaca ctgtattttg caaaactccr aattatttag ctgctgtttc 420
tcttacagga
gtgtgttttag gcactaagca agctgattta tgataactgc tttaaacttc 480
aacaaccagt aagtccttcaa gtggaattta ttattgattc ttttatgtta atttgtagg 540
tcaaaagaaa aatctttaga gcaaaataaa agttttgctc tttattagga ggttcttttag 600
atattacact ttttaattggg tagcttattt gcatgtattt tgaaactatc taaagtaaat 660
agtgtttcct ttgtatgctt atcttttagc aatgtgtttt tttttttggt tttaaaataa 720
tgcttctagt gaaaaaaatc acaaaaacct caacactgta acgtttgaga gcaacggcta 780
ttcagttcgg ttaaaccgaa 800

<210> 3

<211> 399

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variation

<222> (1)...(399)

<223> The nucleotide sequence of SNP_4795, a single

nucleotide polymorphism of the angiotensin II type
2 receptor (AGTR2) gene

<400> 3

```

ccaacacaaa agcacagcag ttgagaactg ggaaagcatc gcactacaac tgctactgcc 60
attaaccaca ttgtcctgga tgcccaagag cttaagagcc cacttaccta cctggtacac 120
tgctactaca actgacatct gagaaagcca cccaaaggaa caagaatttc cctgtctgga 180
accaacagaa ttgtcactar ttctgtacca gatccaagg atacacatgc ttagcttact 240
attactacca ctgaaacttg caaaagaacc catcaagcat tccattcccc agcacaaatt 300
catcagtttc tatcaataac ctacacaatgc cacacagagg aatagacaga tactactaag 360
gtgttttata gccaatgaaa tcatacacag tcttcacca 399

```