

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-510251

(P2005-510251A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-547966 (P2003-547966)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成14年11月28日 (2002.11.28)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月26日 (2004.5.26)		スイス国、4 0 5 6 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/013448		ユトラーセ 3 5
(87) 国際公開番号	W02003/046578	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		弁理士 青山 稜
(31) 優先権主張番号	60/334, 264	(74) 代理人	100067035
(32) 優先日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二
		(74) 代理人	100072730
			弁理士 小島 一晃
		(72) 発明者	サラデーヌ・チボ
			フランス、エフ-6 8 7 2 0 タゴルシエム
			、ルート・ドゥ・ミュルーズ5番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サルコイドーシスの評価法と予後判定法

(57) 【要約】

本発明では、サルコイドーシス患者の診断情報および予後情報を提供するバイオマーカーとして使用し得る遺伝子およびその遺伝子の発現産物である mRNA とポリペプチドを同定する。これらのバイオマーカーはサルコイドーシスの重篤度および進行度のモニター、および当該疾患の処置に有用な薬物の同定に使用することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、
 (a) 該対象から生体サンプルを採取すること、
 (b) 当該サンプル中の遺伝子HLA - DRB1* 1502に対応するmRNAの発現レベルを検出すること、
 (c) 該遺伝子HLA - DRB1* 1502が当該生体サンプル中に有意のレベルで発現されているかを判定し、その場合に、当該遺伝子の有意なレベルでの発現がなければI型サルコイドーシスであると同定し、当該遺伝子の有意なレベルでの発現があればII & III型サルコイドーシスであると同定する、
 ことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、
 (a) 該対象から生体サンプルを採取すること、
 (b) 当該サンプル中の遺伝子HLA - DRB1* 1502に対応するポリペプチド産物の発現レベルを検出すること、
 (c) 該遺伝子HLA - DRB1* 1502に対応するポリペプチド産物が当該生体サンプル中に有意のレベルで発現されているかを判定し、その場合に、当該遺伝子の有意なレベルでの発現がなければI型サルコイドーシスであると同定し、当該遺伝子の有意なレベルでの発現があればII & III型サルコイドーシスであると同定する、
 ことを特徴とする方法。

20

【請求項 3】

生体サンプルが、組織生検、血液、血清、血漿、リンパ液、腹水、のう胞液、尿、CSF、喀痰、または気管支吸引物からなる群より選択される請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

生体サンプルが、組織生検細胞サンプルまたはその培養細胞である請求項3記載の方法。

【請求項 5】

サンプルが当該細胞サンプルの溶解液である請求項4記載の方法。

【請求項 6】

ポリペプチドの存在を該ポリペプチドと特異的に結合する試薬により検出する請求項2記載の方法。

30

【請求項 7】

試薬が、抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントからなる群より選択される請求項6記載の方法。

【請求項 8】

患者のサルコイドーシスがI型であるかまたはII & III型であるかの判定に使用するテストキットであって、該生体サンプルとの接触に適した容器中に請求項6または7記載の試薬を含んでなるテストキット。

【請求項 9】

試薬が抗体を含んでなり、その場合に該抗体が請求項2記載の遺伝子発現産物に対応するポリペプチドと特異的に結合するものである請求項8記載のテストキット。

40

【請求項 10】

遺伝子HLA - DRB1* 1502がコードするポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求項2記載の方法。

【請求項 11】

標識化プローブが抗体である請求項10記載の方法。

【請求項 12】

抗体がモノクローナル抗体である請求項11記載の方法。

50

【請求項 13】

mRNA の発現レベルを、ノーザンブロット分析、逆転写PCR、実時間定量PCR、RNAアーゼ保護およびマイクロアレイからなる群より選択される技法により検出する請求項1記載の方法。

【請求項 14】

サルコイドーシスを有する対象またはサルコイドーシスの発症する危険のある対象の作用物質による処置の有効性をモニターする方法であって、

- (a) 該作用物質の投与前に対象から投与前サンプルを採取すること、
 - (b) 表2、3、4または5に記載した遺伝子からなる群より選択される遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出すること、
 - (c) 対象から1種以上の投与後サンプルを採取すること、
 - (d) 投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出すること、
 - (e) 投与前サンプル中の少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルと投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルとを比較すること、および
 - (f) それに応じて作用物質の投与を調節すること、
- を特徴とする方法。

10

【請求項 15】

サルコイドーシスを有する対象またはサルコイドーシスの発症する危険のある対象の作用物質による処置の有効性をモニターする方法であって、

- (a) 該作用物質の投与前に対象から投与前サンプルを採取すること、
 - (b) 表2または4に記載した遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出すること、
 - (c) 対象から1種以上の投与後サンプルを採取すること、
 - (d) 投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出すること、
 - (e) 投与前サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルと投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルとを比較すること、および
 - (f) それに応じて作用物質の投与を調節すること、
- を特徴とする方法。

20

30

【請求項 16】

サルコイドーシスの処置に使用する作用物質の同定方法であって、

- (a) サルコイドーシスの疑いのある対象から採取した生体サンプルを候補作用物質と接触させること、
 - (b) 該サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出すること、その場合の遺伝子が表2、3、4または5に記載した遺伝子からなる群より選択される遺伝子であること、
 - (c) 候補作用物質存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルと、候補作用物質不存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルとを比較し、その場合に、候補作用物質不存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルに比例して、候補作用物質存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルが変化し、それがサルコイドーシスの処置に有用な作用物質を示唆するものであること、
- を特徴とする方法。

40

【請求項 17】

少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求

50

項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

標識化プローブが抗体である請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

作用物質が小型分子からなる群から選択される請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 2 1】

サルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、

(a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 4 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する m R N A の発現レベルを検出して、第一値を得ること、

(b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 4 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する m R N A の発現レベルを検出して、第二値を得ること、および

(c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであること、

を特徴とする方法。

【請求項 2 2】

生体サンプルが、組織生検、血液、血清、血漿、リンパ液、腹水、のう胞液、尿、C S F、喀痰、または気管支吸引物からなる群より選択される請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

工程 (a) および (b) における m R N A の発現レベルを、ノーザンプロット分析、逆転写 P C R、実時間定量 P C R、R N アーゼ保護およびマイクロアレイからなる群より選択される技法により検出する請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

サルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、

(a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 4 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、

(b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 4 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および

(c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであること、

を特徴とする方法。

【請求項 2 5】

生体サンプルが、組織生検、血液、血清、血漿、リンパ液、腹水、のう胞液、尿、C S F、喀痰、または気管支吸引物からなる群より選択される請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

工程 (a) および (b) におけるポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 7】

プローブが抗体である請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 8】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

サルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 5 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第一値を得ること、

(b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 5 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第二値を得ること、および

(c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであること、

を特徴とする方法。

【請求項 30】

工程 (a) および (b) における mRNA の発現レベルを、ノーザンプロット分析、逆転写 PCR、および実時間定量 PCR からなる群より選択される技法により検出する請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

サルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、

(a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 5 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、

(b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 5 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および

(c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであること、

を特徴とする方法。

【請求項 32】

工程 (a) および (b) におけるポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

プローブが抗体である請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、

(a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第一値を得ること、

(b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第二値を得ること、および

(c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであること、

を特徴とする方法。

【請求項 36】

工程 (a) および (b) における mRNA の発現レベルを、ノーザンプロット分析、逆転写 PCR、および実時間定量 PCR からなる群より選択される技法により検出する請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、

(a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、

(b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの

10

20

30

40

50

遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および
 (c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、
 該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであること
 、
 を特徴とする方法。

【請求項 38】

工程 (a) および (b) におけるポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

プローブが抗体である請求項 38 記載の方法。

10

【請求項 40】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、
 (a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第一値を得ること、
 (b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第二値を得ること、および
 (c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、
 該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであること
 、
 を特徴とする方法。

20

【請求項 42】

工程 (a) および (b) における mRNA の発現レベルを、ノーザンブロット分析、逆転写 PCR、および実時間定量 PCR からなる群より選択される技法により検出する請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、
 (a) 該対象から採取した生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、
 (b) 未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および
 (c) 第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、
 該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであること
 、
 を特徴とする方法。

30

【請求項 44】

工程 (a) および (b) におけるポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求項 43 記載の方法。

40

【請求項 45】

プローブが抗体である請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

サルコイドーシスの処置方法であって、かかる処置の必要な対象に、表 1、2、3 または 4 に示した遺伝子の 1 種以上の遺伝子または遺伝子産物の合成、発現または活性を調節する化合物を投与し、サルコイドーシスの少なくとも 1 つの症候を改善することを特徴とする方法。

50

【請求項 48】

化合物が、アンチセンス分子、二本鎖RNA、リボザイム、小型分子化合物、抗体または抗体フラグメントからなる群より選択される請求項 20 記載の方法。

【請求項 49】

サルコイドーシスに罹患しているかまたは罹患する危険のある対象のサルコイドーシスの進行状況をモニターする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 2 または 4 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを経時的に測定することからなり、その場合に、少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルが経時的に上昇しているならば、該対象のサルコイドーシスが進行していることを示唆するものであるとすることを特徴とする方法。

10

【請求項 50】

サルコイドーシスに罹患しているかまたは罹患する危険のある対象のサルコイドーシスの進行状況をモニターする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 2 または 4 に示した遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを経時的に測定することからなり、その場合に、少なくとも 1 つの遺伝子の mRNA の発現レベルが経時的に上昇しているならば、該対象のサルコイドーシスが進行していることを示唆するものであるとすることを特徴とする方法。

【請求項 51】

mRNA の発現レベルを、ノーザンブロット分析、逆転写PCR、実時間定量PCR、RNAアーゼ保護アッセイおよびマイクロアレイからなる群より選択される技法により検出する請求項 50 記載の方法。

20

【請求項 52】

少なくとも一つの遺伝子が、ヒトNF- κ B転写因子p65サブユニット(NFKB)、ヒトサイクリックAMP-応答要素モジュレーターmRNA(CREM)、ヒトサイクリックAMP-応答要素モジュレーター・ベータイソタイプS68134(CREM、ベータイソタイプ)、ヒトCD69遺伝子(CD69)からなる群より選択される請求項 50 記載の方法。

【請求項 53】

少なくとも一つの遺伝子が、ヒトT-細胞レセプター・アルファ鎖C領域およびヒトインターロイキン-10レセプターmRNAからなる群より選択される請求項 50 記載の方法。

30

【請求項 54】

サルコイドーシスに罹患しているかまたは罹患した疑いのある患者の処置方法であって：
1) 該患者から採取した生体サンプル中の表 2 または表 3 に示した遺伝子から選択される 1 種以上の遺伝子の遺伝子発現に対応する mRNA の発現レベルまたは該遺伝子がコードするポリペプチドもしくはタンパク質のレベルを定量すること；
2) このレベルまたはレベルのパターンと、正常対照者または既知タイプの疾患患者のレベルとを比較すること；
および
3) その結果、該患者のレベルまたはレベルのパターンがII&III型サルコイドーシスであるとされた患者を免疫抑制療法により処置すること；
を特徴とする方法。

【請求項 55】

遺伝子がHLA-DRB1*1502(ヒトMHCクラスII HLA-DR2-Dw12 mRNA DQw1-ベータ；ジェンバンク寄託番号M16276)である請求項 54 記載の方法。

40

【請求項 56】

免疫抑制療法が、コルチコステロイド、シクロスポリン、メトトレキセート、アザチオプリン、クロラムシル、またはシクロホスファミドからなる群より選択される請求項 55 記載の方法。

【請求項 57】

免疫抑制療法が、シクロスポリンにより、1~100mg/kg/日の範囲の投与量で処置することからなる請求項 56 記載の方法。

50

【請求項 58】

免疫抑制療法が、シクロスポリンにより、2～50 mg/kg/日の範囲の投与量で処置することからなる請求項 56 記載の方法。

【請求項 59】

免疫抑制療法が、シクロスポリンにより、3～20 mg/kg/日の範囲の投与量で処置することからなる請求項 56 記載の方法。

【請求項 60】

遺伝子 HLA-DRB1*1502 に対応する mRNA の発現レベルを検出するための手段を含有してなるサルコイドーシス患者同定用キット。

【請求項 61】

表 2、3、4 または 5 に示された少なくとも一つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出するための手段を含有してなるサルコイドーシス患者同定用キット。

【請求項 62】

サルコイドーシス患者が I 型であるかまたは II & III 型であるかを同定するためのキットであって、表 2 または 3 に示された少なくとも一つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出するための手段を含有してなるキット。

【請求項 63】

mRNA の発現レベルを、ノーザンブロット分析、逆転写 PCR、実時間定量 PCR、RNアーゼ保護およびマイクロアレイからなる群より選択される技法により検出する請求項 60 ないし 62 記載の方法。

【請求項 64】

遺伝子 HLA-DRB1*1502 がコードするポリペプチドの発現レベルを検出するための手段を含有してなるサルコイドーシス患者同定用キット。

【請求項 65】

表 2、3、4 または 5 に示された少なくとも一つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出するための手段を含有してなるサルコイドーシス患者同定用キット。

【請求項 66】

サルコイドーシス患者が I 型であるかまたは II & III 型であるかを同定するためのキットであって、表 2 または 3 に示された少なくとも一つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出するための手段を含有してなるキット。

【請求項 67】

ポリペプチドの発現レベルを、該ポリペプチドに特異的な標識化プローブの利用により、ウエスタンブロッティングを介して検出する請求項 64 または 66 記載のキット。

【請求項 68】

標識化プローブが抗体である請求項 67 記載のキット。

【請求項 69】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 68 記載のキット。

【請求項 70】

さらに対象から生体サンプルを採取する手段を含有してなる請求項 60 ないし 69 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本発明はサルコイドーシスのモニター法、予後判定法および処置法に関する。より詳しくは、本発明はサルコイドーシスのタイプ、予後および処置の必要性を判定するための、遺伝子発現分析の使用または遺伝子発現産物の測定に関する。

【0002】

関連技術の記載

サルコイドーシスは原因不明の疾患である。該疾患は 1 種以上の臓器系において非乾酪

10

20

30

40

50

化肉芽腫の存在することを特徴とする。最も共通する関連部位は、肺および縦隔と肺門域のリンパ節である。しかしながら、サルコイドーシスは全身性疾患であり、様々な臓器系または組織が原発性または随伴性の臨床的発症および発症率の起源であり得る。サルコイドーシスの臨床経過は非常に多様であり、緩和なまたは無症候でさえある自発消散性の疾患から、慢性進行性で臓器系不全に至る疾患にまで及び、症例の1～5%が死に至る。参照：Cecil Textbook of Medicine, 21st Edition, Goldman L., Bennett, J.C. Editors, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000 (pages 433-436)。

【0003】

サルコイドーシスは北ヨーロッパ、北アメリカおよび日本で比較的良好に起こる。米国の場合、サルコイドーシスは白人よりも黒人に頻度が高く、年齢調整年間発症数はそれぞれ100,000人につき10人および35.5人と報告されている。サルコイドーシス発症ピークの年齢は20歳代と30歳代にあり、男性よりも女性でやや罹患率が高い。

10

【0004】

サルコイドーシスの原因は不明である。しかし、情報の実体は、免疫メカニズムが疾患の病因に重要であることを示唆しており、また仮説として、様々な外来因子が、感染性、非感染性を含め、可能のあるサルコイドーシスの原因であるとされている。これらの因子はミコバクテリア、真菌類、スピロヘータ、およびホウイップル病関連因子である。

【0005】

サルコイドーシスの病原性には、 TH^1 表現型のCD4リンパ球のオリゴクローナル拡張の始動が、IL-2およびIFN- γ の産生と共に関与している。IL-2はさらなるCD4細胞の増殖を引き起こし、それがマクロファージを肉芽腫形成に取り込むサイトカインを生成する。

20

【0006】

サルコイドーシスはその多様な臨床上の発現および様々な予測し得ない経過がとりわけ顕著である。この疾患は臓器系に影響を及ぼし、この疾患の臨床的提示と発達病歴は、一定の臓器系においてさえ、非常に多様である。呼吸器系は最も共通して影響を受けやすく、患者の約90%が胸部ラジオグラフ上、胸腔内の関りを示す。患者では胸腔外の疾患が発症している場合もしていない場合もあるが、いずれも無症状であるか、あるいは臨床像の顕著な構成部分となり得る。共通の影響を受ける肺以外の臓器系は、皮膚、眼、心臓、肝臓、および中枢神経系である。

30

【0007】

サルコイドーシスの診断評価は臨床医に幾つかの問題を突きつける。診断は1ヶ所以上の罹患臓器系または組織に明瞭な形の非乾酪化肉芽腫を見出すことにより確認し得るが、他の原因の肉芽腫、初期感染性疾患を排除するためにさらに適切な検討を行うことが必要である。診断ではしばしば胸部ラジオグラフを最初の実施する。さらに、コンピュータートモグラフィー(CT)または核磁気共鳴画像(MRI)が補助手段となり得る。肺または他の組織の組織生検は不定数のリンパ球の縁取りに囲まれた上皮様組織球からなる典型的な非乾酪化肉芽腫を示す。

【0008】

胸部ラジオグラフは胸腔内サルコイドーシスの段階を判定するために使用される。一般的に使用される方法は肺門のアデノパシーと実質病、例えば、肺浸潤または線維症の有無にしたがって0～4の病期を割り振ることである。したがって、胸腔内変化には5つのレントゲン像上の段階またはタイプがある(表1参照)。参照：Silzbach, L.E. (1967) Med. Clin. N. Am. 51:483; Hunninghake, G.W. (1999) サルコイドーシス、脈管炎および瀰漫性肺疾患; 16:149-173 and Cecil Textbook of Medicine, 21st Edition, Goldman L., Bennett, J.C. Editors, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000 (Pages 433-436)。

40

【0009】

[表1]

【表 1】

サルコイドーシスの胸部ラジオグラフによる病期分類*

病期 0 : 目視可能な胸腔内所見なし

病期 1 : 両側肺門リンパ節腫脹 (BHL) があり、気管傍アデノパシーを伴う。肺分野に浸潤はないが、肺組織生検にしばしば実質性肉芽腫が認められる。

病期 2 : 両側肺門アデノパシー (BHL) であり、実質性浸潤を伴う。

病期 3 : 実質性浸潤であるが、両側肺門アデノパシー (BHL) はない。

病期 4 : 進行した肺線維症からなり、蜂巣状、肺門退縮、水泡、のう胞、および気腫をもつ。

*分類は背腹胸部ラジオグラムのみに基づく。

10

【0010】

しかし、すでに検討したように非常に多様なサルコイドーシスの発達病歴を予言し得る簡単な試験法は存在しない。本疾患は自発的に解消するか、または持続性かつ慢性的であり、ステロイドまたは他の強力かつ毒性の高い免疫抑制剤による広範囲の処置を必要とする。この疾患が臨床的に余りに多様であるため、それが治療を始めるべきか、何時始めるべきかを定めることを非常に難しくしている。サルコイドーシス患者の3分の2は自然軽快するが、20%までが慢性的機能欠損となり、疾患の1~5%が死に至る。一部患者において、臨床的表徴とラジオグラフの病期分類は一部予後の判定を可能とする。しかしながら、感度のよい予測法と疾患活性度のマーカーがなく、自然軽快の割合が高いことと相俟って、何時処置をし、どのくらいの期間とすべきか、また有意な数の患者の発症可能性を知ることは難しい。

20

【0011】

サルコイドーシスの発症に至らしめる環境要因と遺伝子因子の確認には多くの関心が向けられている。肉芽腫形成が抵抗性の細胞内抗原、例えば、ミコバクテリアまたはベリリウムに対する身体の遺伝子応答であると思われる限りにおいて、抗原が原因の可能性もあると思われる。さらに、肺エフェクター細胞上のHLAクラスII分子の密度が増大することも示されている。参照：Spurzem, J.R., et al. 1989: サルコイドーシス患者の肺胞マクロファージにおけるHLAクラスII遺伝子の発現。Am. Rev. Respir. Dis. 140:89-94; Haslem, P.L. et al. 1990: サルコイドーシスにおける肺胞マクロファージ上でのHLA-DQ、DP、DRおよびトランスフェリンレセプターの増大およびアレルギー性肺炎と線維化肺炎との比較、Chest 97:651-661; およびT-細胞レセプター(TCR)は最新の抗原刺激の証拠を示す; 参照：Du Bois, R.M. et al., 1992: サルコイドーシスの肺に蓄積するT-リンパ球はT-細胞抗原レセプターの最新の刺激の証拠をもつ; Am. Rev. Rev. Respir. Dis. 145:1205-1211。

30

【0012】

多くの感染性および非感染性作用因子がサルコイドーシスの原因として提案されているが、その罹患患者からそれと一致するものは単離されていない。参照：Saboor, S.A., et al. 1992: サルコイドーシスおよび結核におけるポリメラーゼ連鎖反応によるミコバクテリアDNAの検出：Lancet 339:1012-1015; Almenoft, P.L. et al. 1996: サルコイドーシス患者の血液からの抗酸菌L型の増殖：Thorax 51:530-533; Di Alberti, L., et al. 1997: サルコイド組織におけるヒトヘルペスウイルス8変異体、Lancet 350: 1655-1661; Ishigi, I., et al. 1999: 日本人サルコイドーシス患者のリンパ節におけるミコバクテリアおよびプロピオニバクテリアDNAの定量的PCR：Lancet 354:120-123。繰返しとなるが、HLA-クラスIIアレル(対立遺伝子)、とりわけHLA-DRアレルはサルコイドーシスに感染し易い遺伝子であると主張されている; 参照：Kunikane, H., et al., 1987: サルコイドーシスの日本人患者におけるHLA-DR抗原の役割; Am. Rev. Respir. Dis. 135:688-691; Shousake, A., E. et al., 1987; HLA-DRとサルコイド

40

50

ーシスとの関連 : Chest 92:488-490; Martinetti, M., C. et al. 1995 : ヨーロッパ 2 国における臨床免疫遺伝学知見の共同調査 ; Am. J. Respir Crit Care Med. 152:557-564; Berlin, M., A. et al. 1997 : H L A - D R はスカンジナビアのサルコイドーシス患者における予後を予告する ; Am. J. Respir Crit. Care Med. 156:1601-1605。これらの知見および家族事例の一群についての多くの報告はサルコイドーシス発症における遺伝的背景の重要な役割を強調している。参照 : Headings, V.E., et al., 1976 : 7 家族に多発して存在する家族性サルコイドーシス : 遺伝性の可能なメカニズム ; Ann. N.Y. Acad. Sci. 278:377-385; Harrington, D.W., et al., 1993 : 家族性サルコイドーシス ; 9 1 家族の分析 : Sarcoidosis 11:210-243 ; および人種間の広がりおよび表現型における差 ; 参照 : Luisetti, M., et al., 2000 : サルコイドーシスの遺伝的側面 ; Eur. Respir. J. 16:768-780。 10

【 0 0 1 3 】

最近、サルコイドーシスの病因について理解には多くの進歩がなされている。マクロファージの蓄積、そしてとりわけ C D 4 陽性 T リンパ球が疾患の活性部位に存在し、後に集塊して肉芽腫を形成する。参照 : Hunninghake, G.W., and R.G. Crystal, 1981 : 疾患活性部位での過剰なヘルパー T - リンパ球活性により成立する疾病 ; N. Engl. J. Med. 305 :429-434 ; Hunninghake, G.W., et al. 1981 : 間質性肺疾患患者の肺実質における炎症性および免疫エフェクター細胞の特性化 ; Am. Rev. Respir. Dis. 123:407-412。この細胞性拡張に寄与する現在判明しているメカニズムは : (1) M I P - 1、M C P - 1、ランテスおよび I L - 8 などの強力な走化性因子の影響下に血液からの C D 4 陽性 T リンパ球と単球の活性化移行 ; 参照 : J. Immunol. 151(5) : 2852-2863; Car, B.D. et al. 1994 ; 特発性肺線維症と肺サルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄液中の I L - 8 および M C P - 1 の上昇 ; Am. J. Respir. Crit Care Med. 149:655-659; Girgis, R., et al. 1995 : 活性肺サルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン ; Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152:71; Lida, K. et al. 1997 : 肺サルコイドーシス患者における T 細胞サブセットと ケモカインの分析 ; Thorax 52:431-437; Kodoma, N., et al. 1998 : 非喫煙間質性肺疾患個体における気管支肺胞洗浄細胞によるランテスの発現 ; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18:526-531; Ziegenhagen, M.W., et al. 1998 : 進行性間質性肺線維症およびサルコイドーシス患者の気管支肺胞洗浄細胞における炎症前サイトカインの発現増加 ; J. Invest. Med. 46:223-231; および (2) リンパ球の組織中増殖 (I L - 2 介在) ; 参照 : Hunninghake, G.W. et al. 1983 : 活性肺サルコイドーシスにおける肺 T - 細胞によるインターロイキン - 2 放出の役割 ; Am. Rev. Respir. Dis. 128:634-638; Pinkston, P. et al. 1983 : 活性肺サルコイドーシスにおける肺 T - リンパ球によるインターロイキン - 2 の自発放出 ; N. Engl. J. Med. 308:793-800; Semenzato, G., et al. 1984 Clin. Exp. Immunol. 57:331-337; Muller-Quernheim, J. et al. 1989 : 肺サルコイドーシスにおける気管支肺胞洗浄リンパ球によるインターロイキン - 2 レセプター遺伝子発現 ; Am. Rev. Respir. Dis. 140:82-88。サルコイドーシスには疾患活性部位にインターロイキン 2 レセプターを保持する細胞 (可能性としてマクロファージ) の証拠がある。参照 : Agostini, C., et al. 1987 : サルコイドーシスと過敏性間質性肺炎患者からの肺胞マクロファージ : モノクローナル抗体による特性化 ; J. Clin. Immunol. 7:64-70。 20 30 40

【 0 0 1 4 】

自己制限疾患における炎症と進行性疾患における慢性化と線維化の封じ込めに導く因子は未だ説明されていない。参照 : Textbook of Medicine, 21st Edition, Goldman L., Bennett, J.C. Editors, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000 (esp. pages 433-436)。

【 0 0 1 5 】

今日まで、サルコイドーシスの研究は P C R を利用する比較的少数の遺伝子の実験に限られていた。しかしながら、現在ではサルコイドーシスにおける抗原のプロセッシング / 提示および認識、T - リンパ球とエフェクター細胞の活性化、免疫調節と組織改造作用の重要な領域に光を当てる高処理能力アレイと確認技術を使用することが可能である。サルコ 50

イドーシスに対する家族集団についての多くの報告が遺伝的罹病性を強く支持している。参照：Headings, V.E., D. Weston, R.C. Young, and R.L. Hackney, 1976: 7 家族に多発する家族性サルコイドーシス: 可能性のある遺伝メカニズム; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 278:377-385; Harrington, D.W., et al. 1993: 家族性サルコイドーシス: 9 1 家族の分析; *Sarcoidosis* 11:210-243; および人種間の広がりおよび表現型における差; Luisetti, M., et al., 2000: サルコイドーシスの遺伝的側面; *Eur. Respir. J.* 16:768-780。

【0016】

シューマン (Schuman) は M H C 領域に隣接し、それに及ぶ 7 種の多型についてドイツの 5 5 家族から 1 2 2 人の罹患姉妹細胞を遺伝子型分類し、その全領域に有意な多点非要因のつながりを見出した。参照：Schuman, M., et al. 2000: 家族性サルコイドーシスは主要組織適合性遺伝子複合体につながりがある; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162(3 pt 1):861-864。

10

【0017】

本発明において、進行型サルコイドーシスと H L A - D R B 1 * 1 5 0 2 遺伝子の発現とのつながりを新たに見出したことは、M H C 複合体に関する他の研究に、またしたがって、サルコイドーシスにおける抗原提示、罹患性および疾患の結果に関する研究に重みを加える。近年、H L A クラス I I 分子は、サルコイドーシスの病因において鍵となる細胞である C D - 4 陽性 T - リンパ球の外来抗原提示と選択的活性化において重要な役割をもつという観点で最も注目を集めている。日本の研究では、H L A - D R 5 J (H L A - D R B 1 * 1 1 / 1 2) は疾患の非自発性軽快と有意に関連性があった。参照：Shousake, A., et al., 1987: H L A - D R とサルコイドーシスとの関連性; *Chest* 92:488-490; Kunikane, H. et al., 1987: 日本人サルコイドーシス患者における H L A - D R の役割; *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:688-691。

20

【0018】

イタリア - チェコの研究において、H L A - D R 4 (H L A - D R B 1 * 0 4) は III 型ラジオグラフ病と有意に関連する。参照：Martinetti, M., et al., 1995: “サルコイドーシス・マップ”: ヨーロッパ 2 カ国における臨床的免疫遺伝学的知見の共同調査; *Am. J. Respir Crit Care Med.* 152:557-564。興味深いことに、スカンジナビアでの研究では、H L A - D R B 1 * 1 5 0 1 が、対照群と比較してサルコイドーシス集団に有意に過剰な提示のない一方、慢性疾患とは有意に関連していた; 慢性とはその疾患が 2 年以上活性であったと診断される場合と定義する (6 0 % に対し対照対象で 3 0 % 、 $p < 0.001$) 。参照：Berlin, M., et al., 1997: H L A - D R はスカンジナビア人サルコイドーシス患者の予後を予言する; *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 156:1601-1605。このグループは H L A - D R B 1 * 1 4 0 1 との同様の関連性も記載している。

30

【0019】

この H L A - D R 分子の重要な役割についての可能なメカニズムは幾つか存在する。H L A - D R B 1 * 1 5 0 2 は誇張された T - 細胞活性化と自己永続的炎症カスケードを刺激する非常に効率的な抗原提示分子であり得る。あるいは、H L A - D R B 1 * 1 5 0 2 が不適切に抗原を提示し、結果として抗原不寛容となる無効な最初の免疫応答に導き得る、したがって疾患慢性となり得る。この後者の仮説は、抗原不寛容が慢性的免疫応答を維持するために必要であるために最も可能性が高いが、一方で高効率抗原提示は有効な免疫応答と抗原クリアランス / トレランスに導く可能性がある。

40

【0020】

サルコイドーシスと関連する予後の不確定性は臨床医にとって深刻な問題であったが、その理由は唯一有効な既知の処置がまったく良好でないからである。これらの処置は、高投与量のコルチコステロイドまたは細胞毒性作用物質、例えば、メトトレキサート、アザチオプリン、クロラムブシル、またはシクロホスファミドなど、または他の免疫抑制療法である。これらの作用物質は有意な有害作用、例えば、血液学および胃腸毒性、催奇形性および発癌性を有する。

【0021】

50

したがって、わずかな処置で、あるいは処置なしで自然軽快を示すサルコイドーシス患者と、該疾患のより重症の慢性型に進展する患者とを識別し得る方法が強く要望されている。後者のグループでは、関連する臓器へ拡大すること、重症化することを最小とするために、攻撃的な早期の処置が必要とされる。

【0022】

発明の要約

本発明は、サルコイドーシス患者の末梢血単核細胞(PBMC)に発現される複数の遺伝子を同定することにより、該疾患の予測される重症度と慢性度を判定する現在利用可能な方法の欠陥を克服する。これら遺伝子の発現レベルを利用してサルコイドーシスの診断を確認するか、または予後を判定することが可能であり、したがって、サルコイドーシス患者の処置の必要性を判定することができる。これらの遺伝子に対応するmRNA転写物およびタンパク質は、例えば、疾患の予後および必要な処置の代替マーカーまたはインジケータとしての用途を有する。

10

【0023】

したがって、本発明の一側面は、サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、該対象から生体サンプルを採取すること、当該サンプル中の遺伝子HLA-DRB1*1502に対応するmRNAの発現レベルを検出すること、および該遺伝子HLA-DRB1*1502が当該生体サンプル中に有意のレベルで発現されているかを判定し、その場合に、当該遺伝子の有意なレベルでの発現がなければI型サルコイドーシスであると同定し、当該遺伝子の有意なレベルでの発現があればII&III型サルコイドーシスであると同定することを特徴とする方法にある。

20

【0024】

本発明のもう一つの側面は、サルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、該対象から生体サンプルを採取すること、当該サンプル中の遺伝子HLA-DRB1*1502に対応するポリペプチド産物の発現レベルを検出すること、および該遺伝子HLA-DRB1*1502に対応するポリペプチド産物が当該生体サンプル中に有意のレベルで発現されているかを判定し、その場合に、当該遺伝子の有意なレベルでの発現がなければI型サルコイドーシスであると同定し、当該遺伝子の有意なレベルでの発現があればII&III型サルコイドーシスであると同定することを特徴とする方法にある。

30

【0025】

上記方法のいずれにおいても、生体サンプルとして、組織生検、血液、血清、血漿、リンパ液、腹水、のう胞液、尿、CSF、喀痰、または気管支吸引物からなる群より選択されるサンプルおよび多様な試薬類を使用することができる。

【0026】

本発明のもう一つの側面は、患者のサルコイドーシスがI型であるかまたはII&III型であるかの判定に使用するテストキットであって、該生体サンプルとの接触に適した容器中に上記の試薬を含んでなるテストキットにある。

【0027】

もう一つの側面において、本発明はサルコイドーシスを有する対象またはサルコイドーシスの発症する危険のある対象の作用物質による処置の有効性をモニターする方法であって、該作用物質の投与前に対象から投与前サンプルを採取すること、表2、3、4または5に記載した遺伝子からなる群より選択される遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出すること、対象から1種以上の投与後サンプルを採取すること、投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出すること、投与前サンプル中の少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルと投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルとを比較すること、およびそれに応じて作用物質の投与を調節することを特徴とする方法を提供する。

40

【0028】

もう一つの側面において、本発明はサルコイドーシスを有する対象またはサルコイドー

50

シスの発症する危険のある対象の作用物質による処置の有効性をモニターする方法であって、該作用物質の投与前に対象から投与前サンプルを採取すること、表2または4に記載した遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出すること、対象から1種以上の投与後サンプルを採取すること、投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出すること、投与前サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルと投与後サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルとを比較すること、およびそれに応じて作用物質の投与を調節することを特徴とする方法を提供する。

【0029】

10

さらに、本発明はサルコイドーシスの処置に使用する作用物質の同定方法であって、サルコイドーシスの疑いのある対象から採取した生体サンプルを候補作用物質と接触させること、該サンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出すること、その場合の遺伝子が表2、3、4または5に記載した遺伝子からなる群より選択される遺伝子であること、候補作用物質存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルと、候補作用物質不存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルとを比較し、その場合に、候補作用物質不存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルに比例して、候補作用物質存在下のサンプル中の少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルが変化し、それがサルコイドーシスの処置に有用な作用物質を示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

20

【0030】

さらに、本発明はサルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表4に示した少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表4に示した少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

30

【0031】

本発明のもう一つの側面は、サルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表4に示した少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表4に示した少なくとも1つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであることを特徴とする方法にある。

【0032】

40

さらに、本発明はサルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の危険のある対象をスクリーニングする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表5に示した少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表5に示した少なくとも1つの遺伝子に対応するmRNAの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

【0033】

本発明のもう一つの側面は、サルコイドーシスの対象またはサルコイドーシスの発症の

50

危険のある対象をスクリーニングする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 5 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 5 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、該対象がサルコイドーシスに罹患しているか、サルコイドーシスを発症する危険のあることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

【0034】

さらに、本発明はサルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

10

【0035】

さらなる態様において、本発明はサルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 2 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が大きい場合、該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

20

【0036】

さらに、本発明はサルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

30

【0037】

さらに、本発明はサルコイドーシスを有する対象の疾患タイプを判定するスクリーニング方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第一値を得ること、未罹患対象から採取した同様の生体サンプル中の表 3 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを検出して、第二値を得ること、および第一値と第二値とを比較し、その場合に第二値に比例して第一値が小さい場合、該対象が I I & I I I 型サルコイドーシスに罹患していることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

40

【0038】

さらなる態様において、本発明はサルコイドーシスの処置方法であって、かかる処置の必要な対象に、表 1、2、3 または 4 に示した遺伝子の 1 種以上の遺伝子または遺伝子産物の合成、発現または活性を調節する化合物を投与し、サルコイドーシスの少なくとも 1 つの症候を改善することを特徴とする方法を提供する。該化合物は、アンチセンス分子、二本鎖 RNA、リボザイム、小型分子化合物、抗体または抗体フラグメントからなる群より選択し得る。

【0039】

さらに、本発明はサルコイドーシスに罹患しているかまたは罹患する危険のある対象のサルコイドーシスの進行状況をモニターする方法であって、該対象から採取した生体サン

50

ブル中の表 2 または 4 に示した少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルを経時的に測定することからなり、その場合に、少なくとも 1 つの遺伝子がコードするポリペプチドの発現レベルが経時的に上昇しているならば、該対象のサルコイドーシスが進行していることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

【 0 0 4 0 】

本発明はまたサルコイドーシスに罹患しているかまたは罹患する危険のある対象のサルコイドーシスの進行状況をモニターする方法であって、該対象から採取した生体サンプル中の表 2 または 4 に示した遺伝子からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子に対応する mRNA の発現レベルを経時的に測定することからなり、その場合に、少なくとも 1 つの遺伝子の mRNA の発現レベルが経時的に上昇しているならば、該対象のサルコイドーシスが進行していることを示唆するものであることを特徴とする方法を提供する。

10

【 0 0 4 1 】

さらなる側面において、本発明はサルコイドーシスに罹患しているかまたは罹患した疑いのある患者の処置方法であって、該患者から採取した生体サンプル中の表 2 または表 3 に示した遺伝子から選択される 1 種以上の遺伝子の遺伝子発現に対応する mRNA の発現レベルまたは該遺伝子がコードするポリペプチドもしくはタンパク質のレベルを定量すること；このレベルまたはレベルのパターンと、正常対照者または既知タイプの疾患患者のレベルとを比較すること；およびその結果、該患者のレベルまたはレベルのパターンが I I & I I I 型サルコイドーシスであるとされた患者を免疫抑制療法により処置することを特徴とする方法を提供する。

20

【 0 0 4 2 】

発明の詳細な記載

本発明はサルコイドーシス患者において個別的に発現される遺伝子の対照群と比較しての同定、および I 型サルコイドーシス患者において個別的に発現される遺伝子の I I & I I I 型サルコイドーシス患者と比較しての同定に関する。

【 0 0 4 3 】

本出願に開示された特定の遺伝子はすべて、特に H L A - D R B 1 * 1 5 0 2 としての遺伝子および表 2、3、4、および 5 の遺伝子は、本発明の意味する範囲内で、自然界に存在するその多型変異体を含む。表 2、3、4、および 5 に具体的に開示した遺伝子は好適な態様の代表である。

30

【 0 0 4 4 】

本明細書にて使用する場合、“疾患の型”という用語は、サルコイドーシス患者との関連で使用するとき、これらの用語について下に定義するように、該疾患が“I型”と分類するかまたは“I I & I I I 型”と分類するかを意味するものとする。

【 0 0 4 5 】

本明細書にて使用する場合、“I型”サルコイドーシスとはサルコイドーシスの症候を示す患者の胸部ラジオグラフがシルズバッハ (Silzbach) の分類にしたがい 0 または 1 の病期とされた患者をいう；また、本明細書にて使用する場合、“I I & I I I 型”サルコイドーシスとはサルコイドーシスの症候を示す患者の胸部ラジオグラフがシルズバッハの分類にしたがい I I、I I I または I V の病期とされた患者をいう。参照：Silzbach, L. E. (1967) Med. Clin. N. Am. 51:483；Hunninghake, G.W. (1999)：サルコイドーシス、脈管炎および慢性肺疾患；16:149-173 and Cecil Textbook of Medicine, 21st Edition, Goldman L., Bennett, J.C. Editors, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000 (esp. pages 433-436)。

40

【 0 0 4 6 】

表 2 および 3 に示した遺伝子、すなわち、ヒト M H C クラス I I H L A - D R 2 - D w 1 2 m R N A D Q w 1 - ベータ (H L A - D R B 1 * 1 5 0 2)、ヒト N F - カッパ - B 転写因子 p 6 5 サブユニット (N F K B)、ヒトサイクリック A M P - 応答要素モジュレーター m R N A (C R E M)、ヒト C D 6 9 遺伝子 (C D 6 9)、ヒト T - 細胞レセ

50

プターアルファ鎖C領域 (T R A @) およびヒトインターロイキン 10 レセプター m R N A - (I L 10 R A) などの遺伝子の発現度合い間に、また病型、すなわち、I型または I I & I I I 型の間に、したがって、サルコイドーシス患者の予後と処置の必要性の間に、統計的に有意な高い相関が見出された。

【 0 0 4 7 】

I I & I I I 型サルコイドーシスの患者は I 型サルコイドーシス患者よりも予後が悪く、また非常に慢性疾患に進行し易い。さらに、I型サルコイドーシス患者では、通常、疾患が自己制限的であり、処置を必要としない。対して、I I & I I I 型病患者では、該疾患の有害な長期作用を最少化するために、免疫抑制剤での早期の介入を要求するのが適当である。

10

【 0 0 4 8 】

したがって、これら遺伝子の発現度とその発現産物のレベルは、サルコイドーシスの患者またはその危険のある患者の管理、予後予測および処置に使用することができる。これらの遺伝子を表 2 および 3 に具体的に示す。これら遺伝子の完全な配列は、表 2 および 3 に示したユニジーンクラスター (Unigene Cluster) 発現番号とジェンバンク寄託番号により利用可能である。

【 0 0 4 9 】

ポリペプチドまたは m R N A 発現の異常に低下または上昇したレベルの検出は、本発明疾患対象の罹病性の診断または判定にも使用することが可能である。m R N A の発現レベルを検出する方法は技術上周知である。発現の低下または上昇は、ポリヌクレオチド定量の技術的に既知の方法のいずれか、例えば、核酸増幅法、例えば、P C R、R T - P C R、実時間定量 P C R、R N アーゼ、ノーザンプロット法および他のハイブリッド形成法などにより R N A レベルで測定し得る。

20

【 0 0 5 0 】

開示した遺伝子の 1 種以上から得られる m R N A 転写物のレベルを検出する特に有用な方法は、オリゴヌクレオチドの定序配列に標識化 m R N A をハイブリッド形成させることである。かかる方法では遺伝子発現のプロフィールまたはパターンを生成させるために、これら複数の遺伝子の転写レベルを同時に決定することを可能とする。対象から採取したサンプル由来の遺伝子発現プロフィールは、もう一つの態様において、未罹患対象から採取したサンプル由来の遺伝子発現プロフィールと比較することが可能であり、それによって対象がサルコイドーシスに罹患しているか、またはその危険状態にあるかを判定することができる。

30

【 0 0 5 1 】

したがって、本発明は異なるタイプのサルコイドーシス患者に別々に発現される複数の遺伝子を提供する。これら遺伝子のいずれか、少なくとも一つを選択し、該疾患のタイプと予後の判定に、バイオマーカーとして利用することができる。ある有用な態様においては、これら複数の遺伝子を選択し、その m R N A 発現を同時にモニターして種々の局面で有用な発現プロフィールを提供することができる。特に好適な態様において、遺伝子 H L A - D R B 1 * 1 5 0 2 (ヒト M H C クラス I I H L A - D R 2 - D w 1 2 m R N A D Q w 1 - ベータ ; ジェンバンク寄託番号 M 1 6 2 7 6) を測定し、サルコイドーシスのタイプと予後の判定に、バイオマーカーとして使用することができる。もう一つの好適な態様において、遺伝子 H L A - D R B 1 * 1 5 0 2 のタンパク発現産物のレベルを、サルコイドーシス患者からの生体サンプルにて測定し、このレベルを該疾患のタイプと予後の判定に、バイオマーカーとして使用する。

40

【 0 0 5 2 】

さらに、正常対照と比較して、サルコイドーシス患者での遺伝子発現のレベル間には統計的に有意な相関が見出されている。すべてのタイプのサルコイドーシス患者で発現レベルの上昇する遺伝子を、対照と比較して、表 4 に示す。対照と比較してすべてのタイプのサルコイドーシス患者で発現レベルの低下する遺伝子を表 5 に示す。これら遺伝子の完全な配列は、表 4 および 5 に示したユニジーンクラスター (Unigene Cluster) 発現番号と

50

ジェンバンク寄託番号により利用可能である。

【0053】

したがって、もう一つの態様において、本発明は遺伝子の発現レベルが、特にサルコイドーシス患者で、正常個体におけるよりも有意に高いかまたは低い複数の遺伝子を提供する。これら遺伝子のいずれか、少なくとも一つを選択し、サルコイドーシスの診断バイオマーカーとして利用することができる。さらに、該疾患過程に関係するこれら遺伝子の発現の差を使用して、該疾患を処置し得る作用物質を同定することが可能であり、また該疾患の範囲または進行をモニターするために使用することができる。ある有用な態様においては、これら複数の遺伝子を選択し、そのmRNA発現（またはポリペプチド発現産物）を同時にモニターして種々の局面で有用な発現プロフィールを提供することができる。

10

【0054】

本発明のさらなる態様において、遺伝子発現産物（タンパク質またはポリペプチド）はサルコイドーシスに罹患したまたはその疑いのある患者からの生体サンプルおよび正常対照者からのサンプル中でモニターすることができる。

【0055】

本明細書にて使用する場合、“生体サンプル”という用語は組織、細胞もしくは生物学的液体のサンプルまたはその単離物であって、試験対象者から取り出せるもの、ならびに対象内の組織、細胞もしくは生物学的液体のサンプルまたはその単離物を意味する。これらは限定されるものではないが、あらゆる種類の生検サンプル、かかるサンプルの無細胞溶解物および体液、例えば、限定されるものではないが、血液、血漿、血清、リンパ液、CSF、のう胞液、腹水、尿、糞便および胆汁などである。宿主由来のサンプル中のタンパク質、例えば、本発明のポリペプチドのレベルを決めるために使用し得るアッセイ技法は当業者周知である。かかるアッセイ法とは、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析およびELISAアッセイ法などである。

20

【0056】

本明細書にて使用する場合、“類似の生体サンプル”という用語は一人の患者のサンプルであって、別の患者のサンプルと同じ全身起源または部位からのサンプルを意味する。例えば、両者のサンプルが同じ臓器または身体領域からの血液、血清、血漿または生検サンプルである。

【0057】

この発現産物のレベルは遺伝子発現の程度を示すために使用することが可能であり、したがって、サルコイドーシスの予後を判定するための、または対象の疾患のタイプと応答性および免疫抑制処置の必要性を判定するための簡単かつ簡便な試験法を提供する。さらに、これら発現産物のレベルは当該疾患の処置に有効たり得る薬物の同定に使用可能であり、また個々の患者の疾患の重症度または進行度をモニターするためにも使用し得る。

30

【0058】

さらに、これら遺伝子の一つまたは複数の発現プロフィールは、サルコイドーシスの経過と予後における多様性を分子レベルで試験するための価値ある分子的手段、またサルコイドーシスを処置する薬物の有効性を評価するための分子的手段を提供する。細胞を種々変化させた条件にさらすこと、例えば、薬物または他の活性分子と接触させることの間、発現プロフィールがベースラインのプロフィールからどのくらい変化するかは、このような効果の指標として使用することができる。

40

【0059】

したがって、本発明は異なる臨床型のサルコイドーシスにおいて、また正常対照者と比較した該疾患患者において別々に発現する遺伝子の同定法を提供する。これら遺伝子の差別的発現手段によって、これらの遺伝子および/またはその発現産物を利用して、診断の確度を上げること、該疾患の重症度または進行度をモニターすること、または特定患者の予後を判定すること、またその患者が免疫抑制療法もしくは他の療法を必要としているかどうかを判定すること、およびサルコイドーシスに対する有用な新規処置法を同定することが可能である。これらの遺伝子を表2、3、4、および5に掲載する。開示した遺伝子

50

の発現レベルは、遺伝子の発現に対応する mRNA または該遺伝子がコードするポリペプチドもしくはタンパク質を測定することにより検出することができる。該ポリペプチドは何らかの生体サンプル、例えば、生検標本において、または簡便な体液、例えば、限定されるものではないが、血液、血漿、血清、リンパ液、CSF、のう胞液、腹水、尿、糞便および胆汁などで測定し得る。

【0060】

したがって、本発明はサルコイドーシスを有する対象をスクリーニングする方法であって、該対象の疾患が自然軽快するか、または慢性となって攻撃的な処置、例えば、これに限定されるものではないが、免疫抑制療法、例えば、高用量のコルチコステロイドまたは細胞毒剤（メトトレキセート、シクロスポリン、アザチオプリン、クロランブシル、またはシクロホスファミドなど）による処置などを必要とするか、その可能性を判定する方法を提供する。

10

【0061】

さらに、本発明はサルコイドーシスに罹患しているか、またはその疑いのある患者の処置方法を提供する。この方法は：1) 該患者から採取した生体サンプル中の本明細書に開示した遺伝子の1種以上の遺伝子発現に対応する mRNA の発現レベルまたは該遺伝子がコードするポリペプチドもしくはタンパク質のレベルを定量すること；2) このレベルまたはレベルのパターンと、正常対照者または既知タイプの疾患患者のレベルとを比較すること；および3) その結果、該患者のレベルまたはレベルのパターンがII&III型サルコイドーシスであるとされた患者を免疫抑制療法により処置すること；を特徴とする方法である。好適な態様において、本発明はサルコイドーシスに罹患しているか、またはその疑いのある患者からの生体サンプル中に、遺伝子HLA-DRB1*1502（ヒトMHCクラスII HLA-DR2-Dw12 mRNA DQw1-ベータ；ジェンバンク寄託番号M16276）の mRNA またはタンパク質発現産物のレベルを測定すること、2) このレベルまたはレベルのパターンと、正常対照者または既知タイプの疾患患者のレベルとを比較すること；および3) 該患者のレベルまたはレベルのパターンがII&III型サルコイドーシスであるとされた患者を免疫抑制療法により処置することからなる。この免疫療法は限定されるものではないが、高用量のコルチコステロイドまたは細胞毒剤、例えば、シクロスポリン、メトトレキセート、アザチオプリン、クロランブシル、もしくはシクロホスファミド、または他の免疫抑制療法による処置である。好適な態様において、この処置はシクロスポリンにより、1~100mg/kg/日の範囲の用量で、より好ましくは2~50mg/kg/日の用量で、最も好ましくは3~20mg/kg/日の範囲の用量で処置することからなる。

20

30

【0062】

さらに、本発明は純粋に臨床的根拠に基づいてなされた診断を確認するために、対象をスクリーニングしてサルコイドーシスのバイオマーカーが存在するか否かを判断する方法を提供する。本発明はまた個々人における該疾患の重症度または進行度をモニターする方法およびサルコイドーシスの新規有用な処置の確認法を提供する。

【0063】

【表 2】

【表 2】 I 型対 I I & I I I 型サルコイドーシスにおいて個別に発現する遺伝子 (I I & I I I 型において増加)

遺伝子記号	遺伝子名	エンジーン番号	寄託番号
1) HLA-DRB1*1502	ヒトMHCクラスII HLA-DR 2-Dw12 mRNA DQw1-ベータ	180255	M16276
2) RELA	ヒトNF-カッパーB転写因子p65サブユニット	75569	L19067
3) CREM	ヒトサイクリックAMP-応答要素モジュレーターmRNA	155924	S68271
4) CD69	ヒトCD69遺伝子	82401	Z22576

10

【0064】

【表 3】

【表 3】 I 型対 I I & I I I 型サルコイドーシスにおいて個別に発現する遺伝子 (I I & I I I 型において減少)

遺伝子記号	遺伝子名	エンジーン番号	寄託番号
1) TRA@	ヒトT-細胞レセプターアルファ鎖C領域	74647	X02883
2) IL10RA	ヒトインターロイキン10レセプターmRNA	327	U00672

20

【0065】

【表 4】

【表 4】 すべてのタイプのサルコイドーシス患者に高レベルで発現する遺伝子

遺伝子記号	遺伝子名	エンジーン番号	寄託番号
1) CTSS	ヒト・カテプシンS mRNA	181301	M90696
2) CTSZ	ヒト・カテプシンZ前駆体mRNA	252549	AF032906
3) MEP	ヒト・プロ-カテプシンL	78056	X12451
4) IL1B	ヒト・インターロイキン1-ベータ mRNA	126256	M15330
5) IL8	ヒト・インターロイキン8遺伝子	624	M28130
6) GRO-ベータ	GRO-ベータ・ヒト・サイトカイン	75765	M36820
7) GRO-ガンマ	GRO-ガンマ・ヒト・サイトカイン	89690	M36821
8) CCR2	ケモカイン (C-Cチーフ) レセプター2	395	U95626
9) NINJ1	ヒト接着分子ニンジュリンmRNA	11342	U91512
10) EDN1	ヒト・エンドセリン-1遺伝子	2271	J05008
11) DTR	ヒトヘパリン結合EGF様増殖因子mRNA	799	M60278
12) VEGF	ヒト脈管エンドセリン増殖因子	73793	AF024710
13) BCL-2	ヒトB細胞白血病リンパ腫2プロト-オンコジーンmRNA	79241	M13995
14) BCL2A1	ヒトBcl-2関連mRNA	227817	U27467

30

40

【0066】

50

【表 5】

[表 5] すべてのタイプのサルコイドーシス患者に低レベルで発現する遺伝子			
遺伝子記号	遺伝子名	ユニゾン 番号	寄託番号
1) TNFSFS	ヒトCD40リガンド遺伝子	652	D31797
2) TNFRSF7	ヒトT細胞活性化抗原mRNA	180841	M63928
3) TOSO	ヒト抗Fas誘導アポトーシスマRNA	58831	AF057557
4) TNFRSF12	ヒト死ドメインレセプター3 mRNAから可溶	180338	U83598
5) TGFBR2	ヒトTgf-β-β IIRアルファ	82028	D50683

10

【0067】

[転写状態測定]

転写状態の測定は、好ましくは、転写物アレイへのハイブリッド形成により実施するが、これについてはこのサブセクションに記載する。一部他の転写状態測定法についてはこのサブセクションの後半に記載する。

【0068】

転写物アレイ一般

好適な態様において、本発明では“転写物アレイ”（本明細書では“マイクロアレイ”とも呼ぶ）を使用する。転写物アレイは細胞の転写状態の解析に、また癌または他の疾患細胞の転写状態の測定に採用することができる。

20

【0069】

一態様において、転写物アレイは細胞中に存在するmRNA転写物を提示する検出可能に標識したポリヌクレオチド（例えば、全細胞mRNAから合成される蛍光標識cDNA）をマイクロアレイにハイブリッド形成させることにより製造する。マイクロアレイは細胞または生体のゲノム中の遺伝子の多く、好ましくは遺伝子のほとんどまたはほとんどすべての産物の結合（例えば、ハイブリダイゼーション）部位の規則的な配列の面である。マイクロアレイは多くの方法で調製し得るが、その幾つかについて以下に記載する。どのように調製した場合にも、マイクロアレイはある特性を共有する：配列は再現性があり、調製すべき所定の配列の多数コピーが可能であり、互いに容易に比較し得るものとする。好ましくは、マイクロアレイは小型で、通常、5cm²未満であり、結合（例えば、核酸ハイブリダイゼーション）条件下に安定な材料から造る。マイクロアレイの所定の結合部位または結合部位のユニークセットは、細胞中の単一遺伝子の産物に特異的に結合する。そこには特異的mRNAあたり1つ以上の結合部位（以下、“部位”）が存在するが、明確にするために、以下の考察では単一の部位が存在すると仮定する。具体的態様において、各位置に既知配列の付着核酸を含むその位置を追跡し得るアレイを使用する。

30

【0070】

認識すべきは、細胞のRNAに相補的なcDNAを造り、それを適切なハイブリダイゼーション条件下にマイクロアレイにハイブリッド形成させる場合、特定の遺伝子に対応する配列において当該部位にハイブリッド形成するレベルは、当該遺伝子から転写されるmRNAの細胞における優先性を反映していることである。例えば、検出可能に標識化（例えば、発蛍光団により）した全細胞mRNAに相補的なcDNAをマイクロアレイにハイブリッド形成させるとき、該細胞中で転写されていない遺伝子（すなわち、遺伝子産物に特異的に結合し得る）に対応する配列上の部位は、ほとんどまたはまったくシグナル（例えば、蛍光シグナル）を發せず、エンコードされたmRNAが優勢である遺伝子では比較的強いシグナルを發する。

40

【0071】

マイクロアレイの調製

マイクロアレイは技術的に既知であり、配列が遺伝子産物（例えば、cDNA、mRNA

50

A、cRNA、ポリペプチド、およびそのフラグメント)に対応するプローブが、既知の位置で特異的にハイブリッド形成するか、または結合することの可能な表面から構成される。一態様において、マイクロアレイは遺伝子がコードする産物(例えば、タンパク質またはRNA)に対し個別的な結合部位を各位置で提示する配列(すなわち、マトリックス)であり、その結合部位が生体のゲノムにおける遺伝子のほとんどまたはほとんどすべての産物に対して存在する配列である。好適な態様において、“結合部位”(以下“部位”)は核酸または核酸類似体であり、それに対して特定の同族cDNAは特異的にハイブリッド形成することができる。結合部位の核酸または類似体は、例えば、合成オリゴマー、全長のcDNA、全長未満のcDNA、または遺伝子フラグメントであり得る。

【0072】

好適な態様において、マイクロアレイは標的生体ゲノムのすべてのまたはほとんどすべての遺伝子産物に対して結合部位を有するが、このような包括力は必ずしも必要ではない。通常、マイクロアレイは少なくとも約50%のゲノム遺伝子、多くの場合少なくとも約75%、より多くの場合少なくとも約85%、さらにより多くの場合約90%以上、そして最も多くの場合少なくとも約99%に対応する結合部位を有する。好ましくは、該マイクロアレイは対象の生物学的ネットワークモデルのテストおよび確認に関連する遺伝子に対する結合部位をもつ。“遺伝子”は、好ましくは、少なくとも50、75、または99個のアミノ酸のオープンリーディングフレーム(ORF)として同定されるが、ここからメッセンジャーRNAが生物体(例えば、単一の細胞であるなら)にて、または多細胞生物体のある細胞において転写される。ゲノム中の遺伝子数は生物体により発現されるmRNAの数から、またはゲノムのよくキャラクタリゼーションされた部位からの外挿法によって推定される。対象生物体のゲノムが配列決定されている場合には、DNA配列の解析によりORFの数を決定し、mRNAコード領域を同定することができる。例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)は完全に配列決定がなされており、99アミノ酸よりも長い約6275オープンリーディングフレーム(ORF)を有すると報告されている。これらのORFの解析ではタンパク質産物を特定すると思われる5885のORFが存在することを示している(Goffeau et al., 1996, 6000の遺伝子をもつ生命、*Science* 274:546-567(すべての目的のためにその全文を参照により本明細書の一部とする)。対照的に、ヒトのゲノムはおおよそ 10^5 個の遺伝子を含むと予測される。

【0073】

マイクロアレイ用核酸の調製

上記のように、特定の同族cDNAが特異的にハイブリッド形成する“結合部位”は、通常、その結合部位に付着した核酸または核酸類似体である。一態様において、マイクロアレイの結合部位は生物体ゲノム中の各遺伝子の少なくとも一部に対応するDNAポリヌクレオチドである。これらのDNAは、例えば、ゲノムcDNA、cDNA(例えば、RT-PCRにより)、またはクローン化配列からの遺伝子セグメントのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により入手し得る。PCRプライマーは遺伝子またはcDNAの既知配列に基づき選択し、それがユニークフラグメント(すなわち、マイクロアレイ上の他のいずれのフラグメントとも10塩基を超えて隣接する同一の配列を共有しないフラグメント)の増幅に至る。コンピュータープログラムは必要とされる特異性と最適増幅性をもつプライマーの設計に有用である。参照:例えば、Origo pl バージョン5.0(ナショナルバイオサイエンス)。非常に長い遺伝子に対応する結合部位の場合、遺伝子の3'末端に近いセグメントを増幅することが場合によっては望ましく、それによってオリゴ-dT感作cDNAがマイクロアレイにハイブリッド形成するとき、完全長未満の長さのプローブが効率的に結合する。典型的に、マイクロアレイ上の各フラグメントは約50bpと2000bpの間、より典型的には約100bpと約1000bpの間にあり、通常、約300bpと約800bpとの間である。PCR法は周知であり、例えば、Innis et al. eds., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(PCRプロトコール:方法と応用の手引き)、Academic Press Inc. San Diego, Calif.(すべての目的のため

10

20

30

40

50

めにその全文を参照により本明細書の一部とする)に記載がある。コンピュータ制御ロボットシステムは核酸を単離・増幅するために有用であることは明らかである。

【0074】

マイクロアレイ用の核酸を生成させる代替手段は、N-ホスホネートまたはホスホロアミダイト化学を用いる合成ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの合成によるものである(Froehier et al., 1986, Nucleic Acid Res 14:5399-5407; McBride et al., 1983, Tetrahedron Lett. 24:245-248)。合成配列は鎖中の約15と約500塩基間に、より典型的には約20と約50塩基間にある。一部態様において、合成核酸とは非天然塩基、例えば、イノシンなどである。上記のように、核酸類似体をハイブリダイゼーションの結合部位として使用することができる。適切な核酸類似体はペプチド核酸である(参照:例えば、Egholm et al., 1993, PNAはワトソン-クリック水素結合規則にしたがい相補性オリゴヌクレオチドにハイブリッド形成する; Nature 365:566-568; 米国特許第5,539,083号公報も参照)。

10

【0075】

代わり得る態様において、結合(ハイブリダイゼーション)部位は遺伝子のプラスミドもしくはファージクローン、cDNA(例えば、発現配列タグ)、またはその挿入物から調製する(Nguyen et al., 1995, 配列したcDNAクローンの定量的ハイブリダイゼーションにより検定したマウス胸腺内での差別的遺伝子発現; Genomics 29:207-209)。さらに他の態様において、結合部位のポリヌクレオチドはRNAである。

【0076】

固体表面に対する核酸の付着

核酸または類似体は固体支持体に付着するが、該支持体はガラス、プラスチック(例えば、ポリプロピレン、ナイロン)、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、または他の材料から作製し得る。核酸を表面に付着させる好適な方法はガラスプレート上にプリントすることによる(一般的記載例: Schena et al., 1995, 相補性DNAマイクロアレイによる遺伝子発現パターンの定量的モニター; Science 270:467-470)。この方法はcDNAのマイクロアレイの調製に特に有用である。参照例: DeRisi et al., 1996, ヒト癌における遺伝子発現パターンを解析するためのcDNAマイクロアレイの使用; Nature Genetics 14:457-460; Shalon et al., 1996, 二色蛍光プローブハイブリダイゼーションによる複雑なDNAサンプルの解析用DNAマイクロアレイシステム; Genome Res. 6:639-645; および Schena et al., 1995, 平行ヒトゲノム解析; 1000遺伝子のマイクロアレイに基づく発現; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10539-11286。上記の文献はそれぞれ、すべての目的のためにその全文を参照により本明細書の一部とする。

20

30

【0077】

マイクロアレイを作製する第二の好適な方法は、高密度オリゴヌクレオチド配列を作製することによる。面上の定まった位置に原位置合成写真平板技法により、定まった配列に相補的な数千のオリゴヌクレオチドを含むアレイを製造する技法は既知であり(参照: Fodor et al., 1991, 光指向空間的接近平行化学合成; Science 251:767-773; Pease et al., 1994, 迅速DNA配列分析用光指向オリゴヌクレオチドアレイ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5022-5026; Lockhart et al., 1996, 高密度オリゴヌクレオチド配列に対するハイブリダイゼーションによる発現モニター; Nature Biotech 14:1675; 米国特許第5,578,832号、第5,556,752号および第5,510,270号公報; これらの文献はそれぞれ、すべての目的のためにその全文を参照により本明細書の一部とする)、また定まったオリゴヌクレオチドの他の迅速合成沈着法も既知である(Blanchard et al., 1996, 高密度オリゴヌクレオチドアレイ; Biosensors & Bioelectronics 11:687-90)。これらの方法を使用する場合、既知配列のオリゴヌクレオチド(例えば、20マー)は誘導化したガラススライドなどの表面に直接合成する。通常、調製した配列はRNA1個あたり数個のオリゴヌクレオチド分子と重複している。オリゴヌクレオチドプローブは選択的にスプライスしたmRNAを検出するために選択することができる。

40

【0078】

50

マイクロアレイの他の作製法、例えば、マスキング法 (Maskos and Southern, 1992, *Nuc. Acids Res.* 20:1679-1684) も使用可能である。原則として、いずれのタイプのアレイも、例えば、ナイロンハイブリダイゼーション膜上のドットプロット (参照: Sambrook et al., *Molecular Cloning--A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 本文献はすべての目的のためにその全文を参照により本明細書の一部とする) も使用し得るが、当業者が認識しているように、ハイブリダイゼーション容積が小さいために、極小のアレイが好適である。

【0079】

標識プローブの生成

全長およびポリ(A)⁺RNAの調製法は周知であり、上記の Sambrook et al. 上記に一般的な記載がある。一態様において、RNAは本発明対象の種々の種類の細胞から、チオシアン酸グアニジニウム溶解を用いて抽出し、次いで、CsCl遠心分離に付す (Chirgwin et al., 1979, *Biochemistry* 18:5294-5299)。ポリ(A)⁺RNAはオリゴdT-セルロースによる選択により選択する (参照: Sambrook et al., 上記)。対象の細胞は、野生型細胞、薬物接触野生型細胞、修飾/摂動細胞性成分をもつ細胞、および薬物接触細胞である。

【0080】

標識化cDNAはオリゴdT-感作またはランダム感作逆転写から調製するが、両方ともに技術的に周知である (参照: 例えば、Klug and Berger, 1987, *Methods Enzymol.* 152:316-325)。逆転写は検出可能な標識に結合したdNTP (最も好ましいのは蛍光標識dNTP) の存在下に実施し得る。別法として、標識したdNTPの存在下に、単離したmRNAは二本鎖cDNAのインビトロ転写により合成した標識アンチセンスRNAに変換し得る (Lockhart et al., 1996, 高密度オリゴヌクレオチドアレイへのハイブリダイゼーションによる発現のモニター; *Nature Biotech.* 14:1675; 本文献はすべての目的のためにその全文を参照により本明細書の一部とする)。別途態様において、cDNAまたはRNAプローブは検出可能標識の不在下に合成し、次いで、ビオチニル化dNTPまたはrNTP、あるいはある種同様の手段 (例えば、ビオチンのプソラレン誘導体をRNAに光架橋すること) を取り込ませることにより標識し、さらに標識化ストレプトアビジン (例えば、フィコエリスリン接合ストレプトアビジン) またはその等価物を添加することができる。

【0081】

蛍光標識プローブを使用する場合、多くの適切な発蛍光団、例えば、フルオレセイン、リサミン、フィコエリスリン、ローダミン (パーキンエルマー・シートス)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7、FluorX (アマシャム)、その他が既知である (参照: 例えば、Kricka, 1992, 非同位体DNAプローブ技法, Academic Press San Diego, Calif.)。発蛍光団の対は両者が容易に識別し得るように別個の発光スペクトルを選ぶのがよい。

【0082】

もう一つの態様においては、蛍光標識以外の標識を用いる。例えば、放射活性標識、または一対の別個の放射スペクトルを有する放射活性標識を使用することができる (参照: Zhao et al., 1995, 高密度cDNAフィルター分析: 遺伝子発現の大規模定量分析の新規方法; *Gene* 156:207; Pietu et al., 1996; 高密度cDNAアレイの定量的ハイブリダイゼーションにより明らかとなったヒト筋肉に優先的に発現される新規遺伝子転写物; *Genome Res.* 6:492)。しかしながら、放射活性粒子の散乱があり、その結果広範な空間的結合部位を必要とするために、放射性同位体の使用は余り好ましい態様ではない。

【0083】

一態様において、標識cDNAは0.5mMのdGTP、dATPおよびdCTPプラス0.1mM-dTTPプラス蛍光デオキシリボヌクレオチド (例えば、0.1mMローダミン110UTP (パーキンエルマー・シートス) または0.1mM-Cy3dUTP (アマシャム) を含む混合物を逆転写酵素 (例えば、スーパースクリプトTM.II、LT I In

10

20

30

40

50

c.) と 42 で 60 分間インキュベートすることにより合成する。

【0084】

マイクロアレイへのハイブリダイゼーション

核酸のハイブリダイゼーションと洗浄条件は、プローブが特定の配列部位に“特異的に結合する”かまたは“特異的にハイブリッド形成する”ように、すなわち、プローブが相補的核酸配列をもつ配列アレイ部位にハイブリッド形成、二重鎖形成または結合するが、非相補的核酸配列をもつ部位にはハイブリッド形成しないように選択する。本明細書にて使用する場合、一つのポリヌクレオチド配列は、もしそのポリヌクレオチドの短い方が 25 塩基以下であるならば塩基対合規則を用いることにミスマッチはなく、またはもしポリヌクレオチドの短い方が 25 塩基よりも長いならばミスマッチは 5% を超えないとする場合、もう一方に対して相補性であるとする。好ましくは、該ポリヌクレオチドは完全に相補的（ミスマッチなし）である。特異的なハイブリダイゼーション条件が、陰性対照を含むハイブリダイゼーションアッセイを実施することで、結果として特異的なハイブリダイゼーションに至ることを証明するのは容易である（参照：例えば、Shalon et al., 上記、および Chee et al., 上記）。

10

【0085】

最適なハイブリダイゼーション条件は標識プローブおよび固定化ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの長さ（例えば、200 塩基以上のポリヌクレオチドに対するオリゴマー）とタイプ（例えば、RNA、DNA、PNA）に左右される。核酸についての特異的（すなわち、ストリンジェント）ハイブリダイゼーション条件の一般的パラメータについては上記文献（Sambrook et al.）および以下の文献：Ausubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York（本文献はすべての目的のためにその全文を参照により本明細書の一部とする）に記載がある。シェナら（Schena et al.）の cDNA マイクロアレイを使用する場合、代表的なハイブリダイゼーション条件は、5 × SSC プラス 0.2% SDS 中、65、4 時間のハイブリダイゼーションと、引き続き低ストリンジェント性洗浄バッファー（1 × SSC プラス 0.2% SDS）による 25 での洗浄と高ストリンジェント洗浄バッファー（0.1 × SSC プラス 0.2% SDS）による 25、10 分間の洗浄である（Shena et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:10614）。有用なハイブリダイゼーション条件はまた、例えば、Tijessen, 1993, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Elsevier Science Publishers B.V. and Kricka, 1992, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, Calif, にも提供されている。

20

30

【0086】

シグナル検出およびデータ解析

蛍光標識したプローブを用いる場合、転写物アレイの各部位での蛍光発光は、好ましくは、走査共焦点レーザーマイクロスコブ法により検出し得る。一態様において、個別の走査は、適切な励起光を用いて、使用する 2 種の発蛍光団のそれぞれについて実施する。あるいは使用した発蛍光団に特異の波長での標本照射を可能とするレーザーを用い、発蛍光団からの発光を分析する。好適な態様において、該アレイはコンピューター制御 X-Y ステージと顕微対物レンズをもつレーザー蛍光スキャナーで走査する。発蛍光団の連続励起は多重線混合ガスレーザーにより実施し、放出される光は波長によって分かれ、光増幅管によって検出する。蛍光レーザー走査装置は、Schena et al., 1996, Genome Res. 6:639-645 および本明細書に引用した他の文献に記載がある。あるいは、線維光学束（Ferguson et al., 1996, Nature Biotech. 14:1681-1684）を使用して、多数の部位で同時に mRNA の存在量レベルをモニターすることもできる。

40

【0087】

シグナルを記録し、好適な態様では、コンピューターにより、例えば、12 ビットのアナログ/デジタルボードを用いて解析する。一態様において、走査像はグラフィックプログラム（例、ハイジャック（HiJaak）グラフィックーツ）を用いて干渉模様を除き、次いで各部位で各波長での平均ハイブリダイゼーションのスプレッドシートを生じる画像格

50

子プログラムを用いて解析する。

【0088】

要すれば、2つの蛍光体用チャンネル間の“クロストーク”（またはオーバーラップ）は、実験的に決定し補正し得る。転写物アレイ上のいずれかの特定のハイブリダイゼーション部位については、2つの発蛍光団の発光比は好適に計算される。この比は同族体遺伝子の絶対的発現レベルからは独立しているが、その発現が薬物投与、遺伝子欠失、または何らかの他の試験事象により有意に調節される遺伝子にとっては有用である。

【0089】

好ましくは、摂動を陽性または陰性と確認することに加えて、摂動の大きさを決定することが有利である。これは当業者にとって容易に明らかとなる方法により実施し得る。

10

【0090】

転写状態測定の方法

細胞の転写状態は技術上既知の他の遺伝子技法により測定し得る。

【0091】

タックマン (TAQMANTM) に基づく mRNA レベルの解析

RT-PCR (実時間定量PCR) アッセイでは、mRNA 鎖などのRNA鎖からDNA鎖する合成する触媒、RNA逆転写酵素を利用する。得られるDNAは特異的に検出・定量可能であり、この工程を使用してmRNAの具体的種のレベルを定量することができる。これを実施するための一方法はタックマン (TAQMAN) (PEアプライドバイオシステムズ、フォスターシティ、カリフォルニア)の商標で知られているが、この方法はPCR反

応に際し、プローブの特異形状を切断するために、アンプリタック・ゴールド (AMPLITAQ GOLDTM) DNAポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性を利用する。これはタックマン (TAQMANTM) プローブという。参照: Luthra R, et al., 濾胞性リンパ腫患者における t (14;18) (q32;q21) 検出のための新規5'エキソヌクレアーゼに基づく実時間PCRアッセイ; Am J Pathol., Vol 153, (1998), pp:63-68. このプローブは5'-レポーター色素と3'-消光色素をもつオリゴヌクレオチド (通常~20マー) からなる。FAM (6-カルボキシフルオレセイン) などの蛍光レポーター色素はオリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合している。レポーターは3'末端に位置するリンカーの腕を介して付着する TAMRA (6-カルボキシ-N,N,N',N'-テトラメチルローダミン) により消光する。参照: Kuimelis RG, et al., 実時間定量PCR用タックマンプローブの構造類似体; Nucleic Acids Symp Ser., Vol 37, (1997), pp:255-256; and Mullah B, et al., 二重色素標識オリゴデオキシリボヌクレオチドプローブの効率的合成と実時間PCRアッセイにおけるその応用; Nucleic Acids Res., Vol 15, (1998), pp:1026-1031. この反応に際し、プローブの切断がレポーター色素と消光色素を分断し、レポーターの蛍光を増大させる。

20

30

【0092】

PCR産物の蓄積はレポーター色素の蛍光増大をモニターすることにより直接検出する。参照: Heid CA, et al., 実時間定量PCR: Genome Res., Vol 6, (1996), pp:986-994. 反応は、PCR産物の増幅が所定サイクル数後に蓄積したPCR産物の量よりも、むしろ先に検出されるサイクルの時点が特徴である。核酸標的の開始コピー数の高い方が、蛍光の有意な増加がより早期に観察される。参照: Gibson UE, et al., 実時間定量RT-PCRの新規方法; Genome Res., Vol 6, (1996), pp:995-1001.

40

【0093】

プローブが未変化である場合、レポーター色素が消光色素に近接していると、主としてフォスター (Forster) 型エネルギー転移によりレポーター蛍光の抑制が起こる。参照: Lakowicz JR, et al., タンパク質におけるチロシン残基の酸素消光と蛍光脱分極; J Biol Chem., Vol 258, (1983), pp:4794-4801. PCRに際し、もし対象の標的が存在するならば、プローブは前進および逆向きプライマー部位の間に特異的にアニールする。アンプリタック・ゴールド (AMPLITAQ GOLDTM) DNAポリメラーゼの5'-3'核開裂活性は、プローブが標的にハイブリッド形成する場合にのみ、レポーターと消光剤間でプロー

50

ブを切断する。プローブフラグメントは次いで標的から置換わり、鎖のポリマー化が継続する。この工程はすべてのサイクルで起こり、産物の対数的蓄積を阻害しない。プローブの3'末端はブロックされてPCRに際してのプローブの伸張を妨げる。

【0094】

受動対照標準はタックマン^{T M}バッファーに含まれる色素であり、5'ヌクレアーゼアッセイには関与していない。受動対照標準は内部基準を提供するが、この基準に対してレポーター色素シグナルは解析に際し標準化される。標準化は濃度または容積の変化による蛍光のゆらぎを補正するために必要である。

【0095】

標準化はレポーター色素の発光強度を受動対照標準の発光強度で割って、所定の反応チューブに対する R_n (標準化レポーター)と定義する比を得ることにより実施する。 10

【0096】

閾値サイクルまたは C_t 値は、統計的に有意な増加 R_n が最初に検出されるサイクルである。 R_n 対サイクル数のグラフ上、閾値サイクルは、配列検出適用がPCR産物の対数増加と関連したシグナルの増大を検出することで始まるときに起こる。

【0097】

定量測定を遂行するために、 $cRNA$ (標準)の段階希釈を各実験に含め、正確で素早い $mRNA$ 定量に必要な標準曲線を作成する。この技法の再現性を評価するために、同じ $cRNA$ サンプルの増幅を数回実施してもよい。

【0098】

細胞の転写状態を測定する他の技法では、電気泳動分析のために限度はあるが複雑な制限フラグメントのプールを生じる；例えば、二重制限酵素消化とフェージングプライマーとを組み合わせる方法(参照：例えば、欧州特許第0 534 858 A 1 公報；1992年9月24日出願；Zabeau et al.)、または限定された $mRNA$ 末端に最も近接する部位をもつ制限フラグメントを選択する方法(参照：例えば、Prashar et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:659-663)などである。他の方法では統計的に $cDNA$ プールを試験する；例えば、多数の $cDNA$ のそれぞれの十分な塩基(例えば、20~50塩基)の配列を決定するか、または限定された $mRNA$ 末端(参照：例えば、Velculescu, 1995, Science 270:484-487)経路パターンに比例して既知位置に生成する短いタグ(例えば、9~10塩基)の配列を決定する。 20 30

【0099】

他の状況の測定

本発明の様々な態様において、転写状態以外の生物学的状態の状況、例えば、翻訳状態、活性状態、または混合状況などは、薬物応答および経路応答を得るために測定し得る。これらの態様の詳細をこのセクションで記載する。

【0100】

翻訳状態測定

遺伝子がコードするタンパク質の発現は、検出可能に標識したプローブまたは後に続いて標識し得るプローブにより検出し得る。一般に、該プローブは発現されたタンパク質を認識する抗体である。 40

【0101】

本明細書にて使用する場合、抗体という用語は、限定されるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化またはキメラ抗体、および抗体フラグメントのタンパク質に対する結合に十分な生物学的に機能する抗体フラグメントを包含する。

【0102】

開示した遺伝子の一つがコードするタンパク質に対する抗体を製造するには、種々の宿主動物にポリペプチドまたはその一部分を注射して免疫する。かかる宿主動物は、限定されるものではないが、ウサギ、マウス、およびラットなど、ほんの一部ではあるが例示される。免疫応答を上昇させるために種々のアジュバントを使用し得る；これは宿主の種により、フロイントの(完全および不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネ 50

ラルゲル、リソレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、スカシガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、および BCG (無菌化ウシ型結核菌) やコリネバクテリウム・パルバム (*Corynebacterium parvum*) などの潜在的に有用なヒトアジュバントなどであるが、これらに限定されるものではない。

【0103】

ポリクローナル抗体は、標的遺伝子産物などの抗原またはその抗原性機能誘導体により免疫した動物の血清から由来する不均一な抗体分子の集団である。ポリクローナル抗体の産生には、上記のような宿主動物にエンコードタンパク質またはその一部分を上記のアジュバントと共に注射し、免疫する。

10

【0104】

モノクローナル抗体 (mAb) は特定の抗原に対する抗体の均一な集団であり、連続細胞株の培養による抗体分子の生産に供されるいずれの技法によっても入手し得る。これらの方法は、制限されるものではないが、コーラーとミルシュタインのハイブリドーマ技法 (Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); および米国特許第 4,376,110 号公報); コスボールらのヒト B 細胞ハイブリドーマ技法 (Kosbor et al., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-2030 (1983); および EBV - ハイブリドーマ技法 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985); などである。かかる抗体は免疫グロブリンクラスのもので、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD などとそのサブクラスを包含する。本発明の mAb 産生ハイブリドーマはインビトロまたはインビボで培養し得る。高力価の mAb をインビボで生産することが現在の好適な生産方法である。

20

【0105】

さらに、“キメラ抗体”生産用に開発された技法 (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312:604-608 (1984); Takdea et al., *Nature*, 314:452-454 (1985) は、適切な抗原特異性をもつマウスの抗体分子からの遺伝子と、適切な生物活性をもつヒト抗体分子からの遺伝子とをつなぎ合わせるもので、これらの技法も使用し得る。キメラ抗体は異なる部分が異なる動物種由来の分子であり、マウス mAb 由来の可変もしくは超可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とをもつ抗体である。

30

【0106】

別法として、一本鎖抗体生産について記載した技法 (米国特許第 4,946,778 号公報; *Science*, 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988); and Ward et al., *Nature*, 334:544-546 (1989)) は、別個に発現された遺伝子 - 一本鎖抗体を生産するために適合する。一本鎖抗体は Fv 領域の重鎖と軽鎖フラグメントをアミノ酸架橋を介してつなぎ、一本鎖ポリペプチドとすることにより形成する。

【0107】

より好ましくは、“ヒト化抗体”の生産に有用な技法がタンパク質またはそのフラグメントもしくは誘導体に対する抗体を生産するのに適合させ得る。かかる技法は以下の米国特許に記載されている: 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; および 5,770,429。

40

【0108】

抗体フラグメントは特定のエピトープを認識するものであり、既知技法により生成させることができる。例えば、かかるフラグメントは限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化により製造し得る F(ab'ab')₂ フラグメント、F(ab'ab')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成させ得る Fabab フラグメントなどである。あるいは、Fabab 発現ライブラリーを構築し (Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989))、所望の特異性を有するモノクローナル Fab フラグメントを迅

50

速かつ容易に同定し得るようにしてもよい。

【0109】

次に、既知タンパク質がサンプル中に発現されている程度を、上記の抗体を利用するイムノアッセイ法により定量する。かかるイムノアッセイ法は限定されるものではないが、ドットプロット法、ウエスタンプロット法、競合・非競合タンパク結合アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、免疫組織化学、蛍光活性化セルソーター（FACS）、およびその他の一般的に使用され、科学文献および特許文献に広く記載され、かつ商業的に採用される多くの方法を含む。

【0110】

検出が容易であるという点で特に好適なのはサンドイッチELISAであり、これについては多くの変法があるが、本発明ではそのすべてを包含するものとする。例えば、典型的なフォワードアッセイ法では、未標識抗体を固体基板に固相化し、適当な時間インキュベーションした後に、テストするサンプルを結合した分子と十分な時間接触させて、抗体-抗原二元複合体を形成させる。この時点で、検出可能なシグナルを誘発し得るレポーター分子で標識した第二抗体を加えてインキュベートし、十分な時間を掛けて抗体-抗原-標識抗体の三元複合体を形成させる。未反応物質はすべて洗い流し、抗原の存在をシグナル観察により判定するか、または既知量の抗原を含む対照サンプルを比較することにより定量し得る。フォワードアッセイの変法は同時アッセイも含み、その場合、サンプルと抗体の両方を結合した抗体に同時に添加する；逆進アッセイでは標識した抗体と試験するサンプルを最初に組合せ、インキュベートした後に、未標識表面結合抗体に加える。これらの技法は当業者周知であり、わずかな変更の可能性は容易に明らかとなる。本明細書にて使用する場合、“サンドイッチ”アッセイとは基本的な2つの部位による技法に関するすべての変法を包含するものとする。本発明のイムノアッセイにとって、唯一の制限因子は標識抗体が対象とする遺伝子の発現するタンパク質に特異的な抗体でなければならないということである。

【0111】

このタイプのアッセイに最も共通に使用されるレポーター分子は、酵素、発蛍光団-または放射性核-含有分子である。酵素イムノアッセイの場合、酵素は第二抗体に、通常、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸により接合させる。しかし、容易に分かるように、多様な連結反応法が存在することが、当業者周知である。一般的に使用される酵素としては、とりわけ、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼである。特定の酵素と共に使用すべき基質は、一般に、対応する酵素による加水分解により、検出可能な色調変化を生ずるように選択する。例えば、p-ニトロフェニルリン酸エステルはアルカリホスファターゼ接合体との使用に適しており、ペルオキシダーゼ接合体には1,2-フェニレンジアミンまたはトルイジンが共通して使用される。発蛍光基質を採用することも可能であり、その場合は上記の色素原基質よりもむしろ蛍光性産物を生じる。適切な基質を含有する溶液を次いで三級複合体に加える。この基質を第二抗体に接続した酵素と反応させて、定量的可視シグナルを生じさせ、このシグナルを通常分光光度法によりさらに定量して、血清サンプル中に存在するタンパク質量を評価する。

【0112】

フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光化合物を、その結合能力を変化させることなく交互に抗体に化学的に共役させる。特定波長の光の照射により活性化した場合、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収し、分子に励起状態を誘発し、次いで特徴的な長波長にて光を放出する。放出光は光学顕微鏡により可視的に検出し得る特徴的な色として現れる。免疫蛍光とEIA技法は共に技術的によく確立されており、とりわけ本発明では好適である。しかし、放射性同位体、化学発光または生物発光分子などの他のレポーター分子も採用し得る。必要な用途に合致させるために手法をどのように変更するかは当業者にとって容易に明らかである。

【0113】

10

20

30

40

50

翻訳状態の測定もまた幾つかのさらなる方法にしたがって実施し得る。例えば、タンパク質についての全ゲノムのモニター（すなわち、“プロテオーム”、Goffeau et al., 上記）は、その結合部位が細胞ゲノムのコードする複数のタンパク質種に特異的な固定化抗体、好ましくはモノクローナル抗体からなるマイクロアレイを構築することにより実施し得る。好ましくは、抗体はエンコードされたタンパク質の実質的な画分に対し、または少なくとも対象の生物学的ネットワークモデルのテストまたは確認に関連するタンパク質に対し存在する。モノクローナル抗体の作製方法は周知である（参照：例えば、Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.; すべての目的のためにその全文を一部とする）。一態様において、モノクローナル抗体は細胞のゲノム配列に基づいて設計した合成ペプチドフラグメントに対して起こす。かかる抗体アレイにより、細胞からのタンパク質はアレイに接触させ、その結合を技術上既知のアッセイ法によりアッセイする。

10

【0114】

別法として、タンパク質は二次元ゲル電気泳動システムにより分離することができる。二次元ゲル電気泳動法は技術上周知であり、典型的には第一の次元に沿う等電点電気泳動と引き続く第二の次元に沿うSDS-PAGE電気泳動からなる。参照：例えば、Hames et al., 1990, *タンパク質のゲル電気泳動：実用法*; IRL Press, New York; Shevchenko et al., 1996, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:1440-1445; Sagliocco et al., 1996, *Yeast* 12:1519-1533; Lander, 1996, *Science* 274:536-539。得られる電気泳動図は幾つかの技法、例えば、質量スペクトル技法、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を使用するウエスタンブロット法および免疫ブロット解析、および内部およびN-末端ミクロ配列決定法などにより解析し得る。これらの技法を用い、所定の生理的条件下、例えば、薬物に接触した細胞、または例えば、特定遺伝子の欠失または過剰発現により修飾された細胞などで産生されたすべてのタンパク質の実質的な画分を同定することが可能である。

20

【0115】

生物学的状態の他の観点に基づく態様

mRNAの存在量以外の細胞構成成分のモニターは、mRNAのモニターに際しては遭遇することのなかったある種の技術的難しさが現在存在するが、当業者にとって、細胞機能の特性化に関連するタンパク質の活性を測定し得る本発明の使用、すなわち、本発明の態様がかかる測定に基づくものであることは明らかである。活性の測定は特性化すべき特定の活性に適切な機能的、生物化学的、または物理的手段により実施し得る。その活性が化学的形質転換に関する場合、細胞性タンパク質を天然の基質と接触させ、その形質転換率を測定する。その活性が多重単位における会合、例えば、DNAとの活性化DNA結合複合体の会合に関する場合、会合したタンパク質の量または会合の二次的結果、例えば、転写されたmRNAの量を測定する。また、機能的活性のみが判明している場合、例えば、細胞サイクル制御における機能など、その機能の仕事能力を観察し得る。それが既知であり測定されていたとしても、タンパク質活性の変化は本発明の前記方法により解析された応答データを形成する。

30

【0116】

別の制限のない態様において、応答データは細胞の生物学的状態の混じりあった側面から形成されることもある。応答データは、例えば、あるmRNAの存在量の変化、あるタンパク質存在量の変化、およびあるタンパク質活性の変化から構成し得る。

40

【0117】

マーカーとしての核酸およびタンパク質の検出

特定の態様において、マーカーに対応するmRNAのレベルは、技術上周知の方法を用い生体サンプル中にインシトゥ形式およびインビトロ形式の両方により決定し得る。“生体サンプル”という用語は、対象から採取した組織、細胞、生体液およびその分離株、ならびに対象内に存在する組織、細胞および体液を含むものとする。多くの発現検出法で単離したRNAを使用する。インビトロ法では、RNA単離技法としてmRNAの単離に反しない方法を選択し、細胞からのRNA精製に使用することができる（参照：例えば、Au

50

subel, et al., Ed., Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1987-1999)。さらに、大量の組織サンプルは当業者周知の技法、例えば、チョムチンスキーの一工程RNA単離方法(Chomczynski, 米国特許第4,843,155号公報(1989))により容易に処理加工し得る。

【0118】

単離したmRNAはハイブリダイゼーションまたは増殖アッセイ、例えば、限定されるものではないが、サザンもしくはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブアレイなどに使用し得る。mRNAレベルの一つの好適な診断検出法は、検出すべき遺伝子がコードするmRNAにハイブリッド形成し得る核酸分子(プローブ)と該単離mRNAとを接触させることからなる。核酸プローブは、例えば、全長cDNAまたはその一部分、例えば、長さが少なくとも7、15、30、50、100、250または500ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであって、本発明のマーカをコードするmRNAまたはゲノムDNAにストリンジェント条件下で特異的にハイブリッド形成するのに十分なものである。本発明の診断アッセイに使用する他の適切なプローブを本明細書に記載する。mRNAとプローブとのハイブリダイゼーションは問題のマーカが発現していることを示すものである。

10

【0119】

一形式において、mRNAは固体面に固定し、例えば、単離mRNAをアガロースゲル上走行させ、次いでゲルからニトロセルロースなどの膜にmRNAを移動させることによりプローブと接触させる。代替の形式では、プローブを固体面に固定し、mRNAとプローブとを、例えば、アフィメトリックス(Affymetrix)遺伝子チップアレイにて接触させる。当業者は本発明のマーカがコードするmRNAのレベル検出に使用する既知のmRNA検出法を適合させることができる。

20

【0120】

サンプル中本発明のマーカに対応するmRNAレベルを決定する代替法は、核酸増幅法、例えば、RT-PCRによる方法である(実験態様については以下参照:Mullis, 米国特許第4,683,202号公報;リガーゼ連鎖反応、Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193 (1991);自己持続性配列複製;Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878 (1990);転写増幅システム;Kwoh et al., Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 86:1173-1177 (1989);Q-ベータレプリカーゼ;Lizardi et al., Bio/Technology, 6:1197 (1988);回転環式複製;Lizardi et al., 米国特許第5,854,033号公報(1988);または他の核酸増幅法とそれに続く当業者周知の技法による増幅分子の検出)。これらの検出工程図は核酸分子の検出のために、かかる分子が非常に低い分子数で存在する場合にとりわけ有用である。本明細書にて使用する場合、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域(それぞれプラス鎖とマイナス鎖、またはその逆)にアニールし、かつその間に短い領域を含み得る一対の核酸分子と定義する。一般に、増幅プライマーは長さが約10ないし30個のヌクレオチドからなり、長さ約50ないし200個のヌクレオチドの領域に隣接する。適切な条件下、適切な試薬類により、かかるプライマーは該プライマーが隣接するヌクレオチド配列からなる核酸分子の増幅を可能とする。

30

【0121】

インシトゥ法の場合、mRNAは検出に先立って細胞から単離する必要がない。かかる方法において、細胞または組織サンプルは既知の組織学的方法を用い、調製/処理加工する。次いで、サンプルを支持体、一般にはガラススライドに固定化し、次いで該マーカをコードするmRNAにハイブリッド形成し得るプローブと接触させる。

40

【0122】

マーカの絶対的発現レベルに基づき判定する代替法としては、該マーカの標準化発現レベルに基づいて判定を下してもよい。発現レベルは、その発現と、マーカではない遺伝子、例えば、構成的に発現する自家保有の遺伝子の発現とを比較することによりマーカの絶対的発現レベルを補正して標準化する。標準化に適した遺伝子はアクチン遺伝子などの自家保有遺伝子または表皮細胞特異遺伝子である。この標準化は一サンプル、例え

50

ば、患者のサンプルの発現レベルと別のサンプルとの比較、または異なる起源からのサンプル間の比較を可能とする。

【0123】

あるいは、発現レベルは相対的発現レベルとして提供し得る。マーカーの相対的発現レベルの決定のために、正常サンプルと疾患生体サンプルからの10以上のサンプル、好ましくは50以上のサンプルにつき、問題サンプルの発現レベル決定前に、マーカーの発現レベルを決定する。大量のサンプルにてアッセイした遺伝子それぞれの平均発現レベルを決定し、それをマーカーの発現レベルのベースラインとして使用する。次いで、テストサンプルについて決定されたマーカーの発現レベル(絶対的発現レベル)をそのマーカーについて得られた平均発現値で割る。これが相対的発現レベルとなる。

10

【0124】

好ましくは、ベースライン決定に使用したサンプルはサルコイドーシスに罹患していない患者からのものである。細胞源の選択は相対的発現レベルの使用に依存する。平均発現スコアとして正常組織に見出される発現を使用することは、アッセイしたマーカーが特異的である(正常細胞に対して)か否かを確認する上での助けとなる。さらに、より多くのデータが蓄積された場合には、平均発現値を改正し、蓄積データに基づく改善相対発現値とする。

【0125】

ポリペプチドの検出

本発明のもう一つの態様においては、マーカーに対応するポリペプチドを検出する。本発明のポリペプチドを検出する好適な作用物質は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドに結合し得る抗体であり、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体はポリクローナルでもよいし、より好ましくはモノクローナル抗体である。未処理抗体、またはそのフラグメント(例えば、FabまたはF(ab')₂)を使用し得る。プローブまたは抗体に関連して“標識化”という用語は、プローブまたは抗体に検出可能な物質を接合(すなわち、物理的連結)させることによるプローブまたは抗体の直接標識化、ならびに直接標識したもう一つの作用物質との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識化を包含するものとする。間接的標識化の例は、蛍光標識した第二抗体による第一抗体の検出、および蛍光標識したストレプトアビジンで検出し得るようにDNAプローブをビオチンで標識することである。

20

30

【0126】

サルコイドーシス患者からのタンパク質は、当業者周知の技法を用いて単離することができる。採用されるタンパク質単離方法は、例えば、以下に記載がある: Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)。

【0127】

サンプルが所定の抗体に結合するタンパク質を含んでいるかどうかを判断するためには様々な方式を採用し得る。かかる方式の例は、限定されるものではないが、酵素免疫アッセイ(EIA)、ラジオ免疫アッセイ(RIA)、ウエスタンブロット分析および酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などである。当業者は細胞が本発明のマーカーを

40

【0128】

一方式において、抗体または抗体フラグメントは発現したタンパク質検出のために、ウエスタンブロットまたは免疫蛍光技法などの方法に使用し得る。かかる使用において、固体支持体上に抗体またはタンパク質のいずれかを固定化することが一般に好ましい。適当な固相支持体または担体は抗原または抗体を結合し得る支持体である。周知の支持体または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、および磁鉄鉱である。

50

【0129】

当業者は抗体または抗原を結合する多くの他の適切な担体を知っていようし、本発明で使用し得るようにかかる支持体を改造することも可能である。例えば、患者細胞から単離されるタンパク質はポリアクリルアミドゲル電気泳動上で走行させ、ニトロセルロースなどの固相支持体に固定化することができる。次いで、支持体は適当なバッファーで洗浄し、検出可能に標識した抗体で処理する。固相支持体は、次いでバッファーで二度目の洗浄を行い、未結合抗体を除去する。固体支持体上に結合した標識の量は次いで常套手段で検出し得る。

【0130】

本発明ではまた生体サンプル（例えば、肺関連体液、血清、血漿、リンパ液、のう胞液、尿、糞便、c s f、腹水、または血液）中の本発明マーカースに対応するポリペプチドまたは核酸の存在を検出するキットをも包含する。かかるキットは対象がサルコイドーシスに罹患している場合、その予後を判定するために使用し得る。例えば、該キットは生体サンプル中本発明のマーカースに対応するポリペプチドまたはポリペプチドをコードするmRNAを検出し得る標識化合物または作用物質、および該サンプル中のポリペプチドまたはmRNAの量を決定する手段（例えば、該ポリペプチドに結合する抗体または該ポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）を含んでなる。キットはまたキットを使用して得られる結果の解釈についての指示書を含む。

【0131】

抗体ベースのキットの場合、該キットは、例えば、1)本発明マーカースに対応するポリペプチドに結合する第一抗体（例えば、固体支持体に付着）；および選択肢として2)該ポリペプチドまたは第一抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識に接合する第二の異なる抗体；を含有してなる。

【0132】

オリゴヌクレオチドベースのキットの場合、該キットは、例えば、1)本発明マーカースに対応するポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識したオリゴヌクレオチド；または2)本発明のマーカースに対応する核酸分子を増幅するのに有用な一対のプライマー；を含んでなる。該キットはまた、例えば、バッファー試薬、保存剤、またはタンパク質安定化剤を含んでなる。該キットはさらに検出可能な標識を検出するために必要な成分（例えば、酵素または基質）をさらに含んでなる。該キットはまた一つの対照サンプルまたは一連の対照サンプルであって、これをアッセイして試験サンプルと比較するためのサンプルを含み得る。該キットの各成分は個々の容器に納め得るものであり、その容器はすべて本キットを使用して実施したアッセイの結果を解釈するための指示書と共にひとつのパッケージに収め得る。

【0133】

細胞への抗体導入

抗体はいろいろな様式で、例えば、抗体のマイクロインジェクション（Morgan et al., 1988, Immunology Today 9:84-86）または所望の抗体をコードするmRNAによるハイブリドーマの形質転換（Burke et al., 1984, Cell 36:847-858）などにより、細胞中に導入することができる。さらなる技法において、組換え抗体を設計し、広範な非リンパ球細胞型中で異所性に発現させて、標的タンパク質に結合させること、また標的タンパク質の活性を遮断することができる（Biocca et al., 1995, Trends in Cell Biology 5:248-252）。該抗体の発現は、好ましくは、T e tプロモーターなどの制御可能プロモーター、または構成的に活性なプロモーター（摂動を飽和させる産生用）の制御下にある。第一工程では標的タンパク質に適切な特異性をもつ特定のモノクローナル抗体を選択する（下記参照）。選択した抗体の可変領域をコードする配列は、様々に設計した抗体方式、例えば、全抗体、F a b F a bフラグメント、F vフラグメント、一本鎖F vフラグメント（ペプチドリンカーにより結合させたV_HとV_L領域）（“S c F v”フラグメント）、ジアボディ（diabodies）（異なる特異性をもつ2つ会合したS c F vフラグメント）などにクローン化することができる（Hayden et al., 1997, Current Opinion in Immunology 9

:210-212)。細胞内に発現される様々な方式の抗体は種々の既知細胞内リーダー配列との融合体として発現し、細胞性区画（例えば、細胞質、核、ミトコンドリアなど）を標的とすることができる（Bradbury et al., 1995, *Antibody Engineering* (vol.2)(Borrebaeck ed.), pp.295-361, IRL Press)。特に、ScFv方式が細胞質標的化にとりわけ適していると思われる。

【0134】

有用な抗体型の多様性

抗体のタイプは、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーである。標的タンパク質に対するポリクローナル抗体の産生には技術上既知の種々の手法が使用し得る。抗体を生産するには、種々の宿主動物に標的タンパク質を注射して免疫するが、かかる宿主動物としては限定されるものではないが、ウサギ、マウス、ラットなどである。宿主の種類に応じて、種々のアジュバントを使用して免疫応答を上昇させることができるが、アジュバントとしては、限定されるものではないが、フロイントの（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リソレシチンなどの界面活性物質、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノール、および無菌化ウシ型結核菌（BCG）やコリネバクテリウム・パルバム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントなどである。

【0135】

モノクローナル抗体

標的タンパク質に向けてのモノクローナル抗体の調製には、培養連続細胞株による抗体分子の製造技法が使用し得る。かかる技法は、制限されるものではないが、コーラーとミルシュタインが最初に開発したハイブリドーマ技法（Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975)）；トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72）；およびヒトモノクローナル抗体を産生するEBV-ハイブリドーマ技法（Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）；などである。本発明のさらなる態様において、モノクローナル抗体は最新の技法を利用して無菌動物で製造することができる（PCT/US90/02545）。本発明によると、ヒト抗体が使用可能で、ヒトのハイブリドーマを用いることにより（Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030）またはEBVウイルスによりインビトロでヒトB細胞を形質転換することにより（Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96）入手し得る。事実、本発明によると、標的タンパク質に特異的なマウス抗体分子からの遺伝子と、適切な生物活性をもつヒト抗体分子からの遺伝子とを繋ぐことによる“キメラ抗体”の製造のために開発された技法を使用し得る（Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855；Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608；Take da et al., 1985, *Nature* 314:452-454）；かかる抗体は本発明の範囲内にある。

【0136】

さらに、モノクローナル抗体が有利な場合、ファージディスプレイ技法を用いて大型の抗体ライブラリーから二者択一的に選択し得る（Marks et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:16007-16010）。この技法を使用し、 10^{12} までの異なる抗体のライブラリーはfd繊維状ファージの表面に発現され、モノクローナル抗体の選択に利用し得る抗体の“シングルポット”インビトロ免疫系を生じる（Griffiths et al., 1994, *EMBO J.* 13:3245-3260）。かかるライブラリーから抗体を選択するには、技術上既知の技法にしたがい、例えば、ファージと固定化標的タンパク質とを接触させること、標的に結合したファージを選択しクローニングすること、および抗体可変領域をコードする配列を、所望の抗体フォーマットを発現する適切なベクターへサブクローニングすることにより実施する。

【0137】

本発明によると、一本鎖抗体の製造について記載した技法（米国特許第4,946,778号公報）を標的タンパク質に特異的な一本鎖抗体を製造するために適合させることがで

10

20

30

40

50

きる。本発明のさらなる態様では、F a b 発現ライブラリーの構築について記載した技法 (Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) を利用して、標的タンパク質に対し所望の特異性をもつモノクローナル F a b フラグメントの迅速かつ容易な同定を可能とする。

【0138】

抗体フラグメントが標的タンパク質のイディオタイプを含む場合には技術上既知の技法により生成させ得る。例えば、かかるフラグメントは限定されるものではないが以下のとおりである：抗体分子のペプシン消化により製造し得る F (a b ')₂ フラグメント； F (a b ')₂ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成させ得る F a b ' フラグメント；抗体分子をパインと還元剤で処理することにより生成させ得る F a b フラグメント；および F v フラグメント。

10

【0139】

抗体製造において、所望の抗体のスクリーニングは技術上既知の技法、例えば、E L I S A (酵素結合免疫吸着アッセイ) により実施し得る。標的タンパク質に特異的な抗体を選択するためには、標的タンパク質に結合する抗体について生成したハイブリドーマまたはファージディスプレイ抗体ライブラリーをアッセイし得る。

【0140】

用語集および定義

以下の定義は本明細書にてしばしば使用される正確な用語の理解を容易にするために提供するものである。

“ 有意なレベル ” : 本明細書にて使用する場合、特定の対立遺伝子 (例えば、H L A - D R B 1 * 1 5 0 2) から mRNA またはポリペプチド産物の発現レベルに関連して、問題の対立遺伝子が存在したと当業者が信じるに足る発現レベルを意味する。

20

【0141】

“ 抗体 ” : 本明細書にて使用する場合、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ、一本鎖、およびヒト化抗体、ならびに F a b または他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む F a b フラグメントを包含する。

【0142】

“ 単離した ” : 自然状態からヒトの手で変化させたことを意味する。すなわち、それが自然界に存在する場合、その当初の環境から変化したか、または取り出されたか、またはその両方である。例えば、生物体に自然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは “ 単離した ” ものではなく、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドであっても、その自然状態の共存する物質から分離されたものは “ 単離した ” ものであり、本明細書ではこの用語を採用する。さらに、形質転換、遺伝子操作または他の組換え方法により生物に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、たとえそれが当該生物 (生きていてもいなくてもよい) になお存在していたとしても、 “ 単離した ” ものである。

30

【0143】

“ ポリヌクレオチド ” : 一般的にはポリリボヌクレオチド (R N A) またはポリデオキシヌクレオチド (D N A) をいい、未修飾または修飾した R N A または D N A であってもよい。 “ ポリヌクレオチド ” には制限がなく、一本鎖および二本鎖 D N A 、一本鎖および二本鎖領域の混合した D N A 、一本鎖および二本鎖 R N A 、一本鎖および二本鎖領域の混合した R N A 、 D N A と R N A からなる混成分子であって一本鎖またはより典型的には二本鎖または一本鎖および二本鎖の混合物でもよい混成分子などである。さらに、 “ ポリヌクレオチド ” は R N A または D N A からなるか、または R N A と D N A の両方からなる三本鎖領域をいう。 “ ポリヌクレオチド ” という用語は 1 種以上の塩基を含む D N A または R N A 、および安定化またはその他の理由で修飾したバックボーンを有する D N A または R N A をも包含する。

40

【0144】

“ 修飾した ” 塩基とは、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの特殊な塩基である。 D N A および R N A に対しては様々な修飾がなし得る；したがって、 “ ポリヌクレオチド ” とは自然界に一般に見出されるポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的に

50

修飾した形状のもの、ならびにウイルスや細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的
形状のものを包含する。“ポリヌクレオチド”はまた比較的短いポリヌクレオチド、しばし
ばオリゴヌクレオチドと呼ぶヌクレオチドも包含する。

【0145】

“ポリペプチド”：2個以上のアミノ酸がペプチド結合または修飾ペプチド結合（すな
わち、ペプチドアイソスター）により互いに結合しているポリペプチドをいう。“ポリペ
プチド”は短鎖のもの（一般的にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーという）、
および長鎖のもの（一般的にタンパク質という）の両者をいう。ポリペプチドは20個の
遺伝子エンコードアミノ酸以外のアミノ酸を含んでいてもよい。“ポリペプチド”は自然
の工程、例えば、翻訳後プロセッシングなどにより、または技術上周知の化学的修飾技法
により修飾したアミノ酸配列も含む。かかる修飾については基礎的教科書およびより詳細な
研究論文、ならびに膨大な数の研究文献に記載されている。修飾はポリペプチドのどの場
所にも、例えば、ペプチドバックボーン、アミノ酸の側鎖、およびアミノまたはカルボキ
シ末端でも起こり得る。

10

【0146】

同じタイプの修飾が所定のポリペプチドの数ヶ所に同じ程度にまたは様々な程度で存在
し得ることは認識し得る。また、所定のポリペプチドは多くのタイプの修飾を含み得る。
ポリペプチドはユビキチン化の結果として分岐し得るものであり、分枝をもち得る環状で
あってもよい。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは翻訳後の自然過程で生じ得るし
、あるいは合成方法により調製してもよい。修飾とは、アセチル化、アシル化、ADP-
リボシル化、アミド化、ピオチニル化、フラビンの共有結合付着、ヘム部分の共有結合付
着、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合付着、脂質または脂質誘導体の共
有結合付着、ホスホチジルイノシトールの共有結合付着、架橋、環化、ジスルフィド結合
形成、脱メチル化、共有架橋結合形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホル
ミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化
、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク分解プロセッシング、リン酸化、
プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、トランスファーRNAが介在するアルギ
ニル化などのアミノ酸のタンパク質への付加、およびユビキチン化などである（参照：例
えば、タンパク質-構造と分子特性、2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Comp
any, New York, 1993; Wold, F., 翻訳後タンパク質の修飾：展望と概観、翻訳後タンパ
ク質の共有結合修飾1-12、B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; S
eifter et al., “タンパク質修飾と非タンパク補助因子の分析”、Meth Enzymol, 182, 6
26-646, 1990, and Rattan et al., “タンパク質合成：翻訳後修飾と加齢”、Ann NY Ac
ad Sci. 663, 48-62, 1992）。

20

30

【0147】

“フラグメント”：ポリペプチド配列のフラグメントは、基準の配列よりも短い
が、実質的に基準ポリペプチドと同じ生物学的機能または活性を保持するポリペプチド配列をい
う。

【0148】

“変異体”：基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、その実質的な
性質を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの代表的
変異体は基準のポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配
列における変化は基準のポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を変
えるものであってもなくてもよい。ヌクレオチドの変化は以下に考察するように、基準配
列がコードするポリペプチドにおいて、アミノ酸の置換、付加、欠失、融合および末端切
断を生じる。ポリペプチドの代表的変異体はそのアミノ酸配列が基準ポリペプチドと異な
る。一般に、変更は、基準ポリペプチドと変異体の配列が全体として密接に類似しており
、多くの領域で一致するように制限される。変異体と基準ポリペプチドは1つ以上の置換
、挿入、欠失、その組合せによりアミノ酸配列が異なり得る。置換または挿入アミノ酸残
基は遺伝子コードがコードするものであってもなくてもよい。典型的な保存置換はGly、

40

50

Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu: Asn、Gln - I Ser、Thr; Lys、Arg; および Pheと Tyrである。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は対立遺伝子などの天然産でもよく、または自然界に存在することの不明な変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然産変異体は変異誘発技法により、または直接合成により調製してもよい。さらに変異体としては、1種以上の翻訳後修飾、例えば、糖鎖形成、リン酸化、メチル化、ADPリポシル化などを有するポリペプチドを包含する。その態様はN末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびスレオニンのリン酸化、およびC末端グリシンの修飾である。

【0149】

“対立遺伝子(アレル)” : ゲノムの所定の遺伝子座に存在する遺伝子の2種以上の代替形状の一つをいう。 10

“多型性” : 集団内のゲノムの所定位置におけるヌクレオチド配列(およびもし関連するならエンコードされるポリペプチド)の変化をいう。

【0150】

“単一ヌクレオチド多型性”(SNP) : 集団内のゲノムの単一ヌクレオチドの位置におけるヌクレオチドの変異の発生をいう。SNPは遺伝子内に、またはゲノムの遺伝子間に発生し得る。SNPはアレル特異増幅(ASA)によりアッセイすることができる。この方法には、少なくとも3種のプライマーが必要である。共通のプライマーはアッセイすべき多型性に対して逆の補体として用いる。この共通のプライマーは多型性塩基からの50~1500bpである。他の2つ(またはそれ以上)のプライマーは互いに同一であるが、ただし、最終3'塩基は多型性を構成する2つ(またはそれ以上)のアレルに対合するようにゆらぐ。2つ(またはそれ以上)のPCR反応は次いでサンプルDNA上で実施し、それぞれ共通のプライマーおよびアレル特異プライマーの一つを使用する。 20

【0151】

“スプライスパリアント” : 本明細書にて使用する場合、同じゲノムDNA配列から最初に転写されたRNAから産生されるcDNA分子であるが、別のRNAのスプライシングを受けている分子をいう。別のRNAスプライシングは一次RNA転写がスプライシングを受けるときに起こるが、一般にはイントロンの除去のために起こり、結果としてそれぞれが異なるアミノ酸配列をエンコードし得る1つを超えるmRNA分子の産生に至る。スプライスパリアントという用語は上記のcDNA分子がコードするタンパク質をいう。 30

【0152】

“同一性” : 2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係を反映し、該配列の比較により決定される。一般に、同一性は比較すべき2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列につき、その配列の全長にわたって、ヌクレオチドからヌクレオチドまたはアミノ酸からアミノ酸それぞれを正確に対応させることをいう。

【0153】

“%同一性” : 正確な対応のない配列については、“%同一性”を決定し得る。一般に、比較すべき2つの配列を整列させ、配列間に最大の相関が得られるようにする。この場合、整列の度合いを上げるために、一方または両方の配列に“ギャップ”を挿入することがある。%同一性は比較すべき23の配列(いわゆる、グローバルアラインメント)のそれぞれ全長にわたり決定し得るが、これは特に同一のまたは非常に類似している長さの配列にとって適している; またより短い明確な長さ(いわゆる、ローカルアラインメント)についても決定可能であり、これは長さの等しくない配列により適している。 40

【0154】

“類似性” : 類似性は2つのポリペプチド間の関係性のさらにより複雑な基準である。一般に、“類似性”とは2つのポリペプチド鎖の残基ごとのアミノ酸間の比較を意味するが、(同一性に関して)比較すべき配列のそれぞれ1つについての残基間の対の間の正確な対応のみならず、正確な対応がない場合には、進化に基づき、1つの残基を可能性のある他のものに置換えてみることも考慮すべきである。可能性は関連のある“スコア”を有 50

し、そのスコアから2つの配列の“%同一性”を決定し得る。

【0155】

2つ以上の配列の同一性と類似性を比較する方法は技術上周知である。したがって、例えば、ウイスコンシン配列解析パッケージ、バージョン9.1にて利用可能なプログラム (Devereux J et al, *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395, 1984; Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA から入手可能)、例えば、プログラム・ベストフィットとギャップ (BESTFIT and GAP) が2つのポリヌクレオチド間の%同一性および2つのポリペプチド配列間の%類似性の決定に使用し得る。ベストフィットはスミスとウォーターマンの“局所相同性”アルゴリズム (Smith and Waterman, *J Mol Biol*, 147, 195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981) を使用し、2つの配列間の最良の単一類似性領域を見出す。ベストフィットは長さの異なる2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチドを比較するのに適しており、このプログラムでは短い方の配列が長い方の一部を表すもの推定する。比較に際し、ギャップ (GAP) は2つの配列を整列し、ネードルマンとブンシュのアルゴリズム (Neddleman and Wunsch, *J Mol Biol*, 48, 443-453, 1970) にしたがって“最大類似性”を見出す。ギャップは略同じ長さの配列を比較するのにより適しており、整列させると全長におよぶことが期待される。

10

【0156】

好ましくは、各プログラムに使用するパラメータ“ギャップウエイト”および“長さウエイト”はポリヌクレオチド配列についてはそれぞれ50および3、またポリペプチド配列については12および4である。好ましくは、%同一性および類似性は、比較すべき2つの配列が最適に整列したときに決定される。

20

【0157】

配列間の同一性および/または類似性を決定する他のプログラムもまた技術上既知であり、例えば、ブラスト (BLAST) 系統のプログラム (Altschul S F et al, *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:389-3402, 1997; 国立生物工学情報センター (NCBI) (ベセスダ、メリーランド、米国) から入手可能であり、NCBIのホームページ、www.ncbi.nlm.nih.gov、からアクセス可能) およびファスタ (FASTA) (Pearson W R, *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444-2448, 1988, ウイスコンシン配列解析パッケージの一部として入手可能) がある。

30

【0158】

好ましくは、ブロサム (BLOSUM) 62アミノ酸置換マトリックス (Henikoff S and Henikoff J G, *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 89, 10915-10919, 1992) をポリペプチド配列比較に使用するが、ヌクレオチド配列については、比較の前に先ずアミノ酸配列に翻訳する。

【0159】

好ましくは、プログラム・ベストフィットは基準となるポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関して問題のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の%同一性を決定するために使用する; 問題の配列および基準配列は、すでに記載したように、最適に整列させ、プログラムのパラメータはデフォルト値にセットする。

40

【0160】

“同一性指標”: 候補配列 (ポリヌクレオチドまたはポリペプチド) と基準配列を比較するために使用し得る配列関連性の基準である。したがって、例えば、基準のポリヌクレオチド配列と比較して、0.95の同一性指標を有する候補ポリヌクレオチド配列は、候補ポリヌクレオチド配列が基準配列の各100個のヌクレオチド当たり平均5個までの差異を含む点を除き基準配列と同一である。かかる差異は少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換 (転移と転換を含む)、または挿入からなる群より選択される。これらの差異は基準ポリヌクレオチド配列の5'または3'末端位置に、またはこれら末端位置間のいずれかの位置に生じ、基準配列のヌクレオチド内に個々に散在するか、または基準配列内の1個以上の相接する群に散在する。換言すると、基準ポリヌクレオチド配列と比較して

50

、0.95の同一性指標を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、基準配列内の100個のヌクレオチドのいずれについても平均5個までの上記のような欠失、置換もしくは挿入、またはその組合せがあってもよい。同様のことが他の同一性指標の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても必要な変更を加えて適用される。

【0161】

同様に、ポリペプチドについては、例えば、基準ポリペプチド配列に比較して0.95の同一性指標を有する候補ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列が基準配列の各100個のアミノ酸当たり平均5個までの差異を含み得る点を除き、基準配列と同一である。かかる差異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存および非保存置換を含む）、または挿入からなる群より選択される。これらの差異は基準ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシ末端位置に、またはこれら末端位置間のいずれかの位置に生じ、基準配列のアミノ酸内に個々に散在するか、または基準配列内の1個以上の相接する群に散在する。換言すると、基準ポリペプチド配列に比較して、0.95の同一性指標を有するポリペプチド配列を得るためには、基準配列内の100個のアミノ酸のいずれについても平均5個までの上記のような欠失、置換もしくは挿入、またはその組合せがあってもよい。同様のことが他の同一性指標の値、例えば、0.96、0.97、0.98および0.99についても必要な変更を加えて適用される。

10

【0162】

ヌクレオチドまたはアミノ酸の差の数と同一性指標との間の関係は以下の等式にて表すことができる：

20

$$n_a = X_a - (X_a \cdot I)$$

ただし、式中、

n_a はヌクレオチドまたはアミノ酸の差の数である；

X_a は配列番号1または配列番号3または配列番号2または配列番号4それぞれのヌクレオチドまたはアミノ酸の総数である；

I は同一性指標である；

・は掛け算の記号であり、 X_a と I の積が非整数であれば、 X_a から引き算する前に最も近い整数に切り下げる。

【0163】

“ 相同体 ”：ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が基準配列に対して高程度の配列関連性を有することを示す技術上使用される一般的用語である。かかる関連性はすでに定義したように、2つの配列間の同一性および/または類似性の程度を決定することにより定量化し得る。この一般用語に入る用語は、“ オルソログ ” および “ パラログ ” である。“ オルソログ ” はポリヌクレオチドまたはポリペプチドが他の種のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的等価物をいう。“ パラログ ” とは機能的に類似である同じ種内のポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

30

【0164】

“ 融合タンパク質 ”：2種の無関係の融合遺伝子またはそのフラグメントがコードするタンパク質をいう。例は米国特許第5,541,087および5,726,044号公報（両特許をすべての目的のために参照により本明細書の一部とする）に開示されている。Fc-PGPCR-3の場合、融合タンパク質の一部として免疫グロブリンFc領域を採用することが、Fc-PGPCR-3またはPGPCR-3のフラグメントの機能的発現を遂行して、治療に使用する場合のかかる融合タンパク質の薬物動態特性を改善するために、また二量体のFc-PGPCR-3を生成させるために有利である。Fc-PGPCR-3 DNA構築物は5'から3'方向に、分泌カセット、すなわち、哺乳動物細胞からの放出の引き金を引くシグナル配列、融合パートナーとしての免疫グロブリンFc領域フラグメントをコードするDNA、およびFc-PGPCR-3またはそのフラグメントをコードするDNAを含有してなる。一部用途において、機能的なFc側を変異させ、一方、融合タンパク質の残り部分には手を着けないか、または発現後にFc部分を完全に除去することにより、固有の機能的性質（相補的結合、Fc-レセプター結合）を変え得るようにす

40

50

ることが望ましい。

【実施例 1】

【0165】

方法

1999年8月から2000年8月までの間に発病した急性サルコイドーシスを示す12名の継続性ステロイド感受性症候患者を本潜在研究に含めた。患者と12名の健常対照者は年齢と性別を合わせ、非喫煙者、非アトピー性とし、悪性腫瘍、慢性炎症性疾患またはコルチコステロイドによる処置の前歴のない者とした。参加した対象はすべてアイルランド西部出身ケルト族起源のコークサス白人種とした。非アトピー状態はその病歴と、ハウスダストダニ、草花粉、ネコとイヌの鱗屑などに対する皮膚プリック誘発に陰性であることにより確認した。無機ダストとの接触、カビおよびミコバクテリア感染を排除した後、サルコイドーシスの診断は、9名の患者では気管支経由肺生検により、また結節性紅斑と両側肺門リンパ節症を示す3名の患者では気管支肺胞洗浄CD4/CD8比 >3.5 により組織学的に確認した。Costabel, U. 1992、サルコイドーシスにおけるBAL知見の感受性と特異性、Sarcoidosis 9 (Suppl.1): 211-214; Winterbauer, R., et al. 1993、サルコイドーシスの診断における気管支肺胞洗浄細胞集団、Chest 104:352-361。

10

【0166】

すべての患者が6ヶ月目に胸部放射線撮影と肺機能試験などの臨床追跡を受けた。胸部放射線図はシルツバッハ (Silzbach) の分類にしたがって階層化した。参照: Silzbach, L.E. 1967, サルコイドーシス: 臨床上的の特徴と管理、Med. Clin. N. Am. 51:483。肺気量と拡散能力をセンサーメディックス Vmax 2.2 シリーズにより測定した。

20

【0167】

末梢血単核細胞 (PBMC) は基準来診時に採血したヘパリン化全血 50 mL から勾配遠心分離 (フィコールパック (Ficoll Paque; コピーライト)、ファルマシア、ウブサラ、スウェーデン) により分離した。白血球層を注意深く回収し、培地 (例えば、市販品として入手可能な商標名 AIM V として販売されている培地; ライルテクノロジー・ペイスレイ (Paisley)、英国) 中で3回洗浄した。細胞ペレットを凍結し、 -80°C で保存した。

【0168】

プローブアレイ・ハイブリダイゼーション実験のために、市販品として入手可能なプローブアレイ (商標名ジェネチップ (GENECHIP; 登録商標) プローブアレイとして販売; 参照: Duggan, D.J., et al. 1999, cDNA ミクロアレイを用いる発現プロファイル、Nature Genetics 21 (Suppl.1): 10-14; DeRisi, J.L. et al. 1996, ヒト癌における遺伝子発現パターンを解析するための cDNA ミクロアレイの使用、Nature Genetics 14:457-460; DeRisi, J.L., et al. 1997, ゲノムスケールでの遺伝子発現の代謝と遺伝子制御の探求、Science 278:680-686; Brutsche, M.H., et al. 2001, アトピーおよび喘息におけるアポトーシスシグナル、Clin Exp Immunol 123(2): 181-187; Brutsche, M.H., et al. 2001, アトピーおよび喘息における B 細胞イソタイプ制御、Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 280(4): L627-637) を使用し、PBMC から抽出した RNA を、例えば、商標名スーパースクリプト (SUPERSCRIPT; コピーライト) チョイスシステム (ライフテクノロジー、米国) として販売されている市販品として入手可能なキットを用い、逆転写した。次いで、cDNA をインビトロで転写した; その際、商標名バイオアレイ (登録商標) ハイールド (BIOARRAY High Yield) RNA 転写物標識キット (エンゾー (Enzo) 米国) として販売されている市販品として入手可能なキットを用い、ピオチン標識 cRNA を形成した。市販品として入手可能な商標名ジェネチップ (GENECHIP; 登録商標) プローブアレイ (12.6 k アフィメトリックス (Affymetrix)) として販売されているプローブアレイに対するプローブハイブリダイゼーション、洗浄、染色および走査は、製造業者 (アフィメトリックス (Affymetrix)) の指示書にしたがって実施した。発現の変化した特異遺伝子の確認検査のために、確認検査実験を実時間 RT-PCR により実施した; その際、商標名タックマン (TAQMAN; 登録商標) として販売されている市販品として入

30

40

50

手可能なキット（タックマン（TaqMan）逆転写試薬キットPEアプライドバイオシステムズ；フォスターシティ、カナダ）を使用した。

【0169】

クラスII HLA-D R分子に対するタンパク質レベルでのHLAハプロタイプの確認検査実験は、生検で証明されたか、または臨床放射線学的特徴をもつ103人の患者と105人の健常対照者について、潜在症例-制御関連研究において実施した。末梢血4mlを、3.2%クエン酸を容れたチューブに引き抜いた。血清学的分類は標準的リンパ球毒性技法、例えば、商標名HLAクラスIIダイナビーズ（Dynabeads；登録商標）（210.03ダイナル（Dynal）AS、オスロ、ノルウェー）およびHLA-D Rトレイ（ゲン・トラック・インク（Gen Trak. Inc.）、リバティ、ノースカロライナ、米国）として販売されている市販品として入手可能なキットを採用して実施した。

10

【0170】

データ解析と探索のために、我々は商標名ジーンスプリング（GENE SPRINGTM）（バージョン4.0.0、シリコンジェネティックス）およびSPSS（登録商標）（v10.02、SPSSインク）として販売されている市販品として入手可能なデータ解析ソフトウェアパッケージを使用した。サルコイドーシス患者と健常対照者間の2群の遺伝子発現比較はマン-ホットニー（Mann-Whitney）Uテストを使用して実施した。Clin Exp Immunol 123(2): 181-187; Brutsche, M.H., et al. 2001, アトピーと喘息におけるB細胞イソタイプ制御、Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 280(4): L627-637。p値<0.05の場合のみ、3群、すなわち、健常対照、I型サルコイドーシスおよびII&III型サルコイドーシス患者についての比較、また他の2群、すなわち、2つの表現型間の比較を実施した。肺機能パラメータ（DLCO、FEV₁、FVC）と遺伝子発現の相関はスピーマン（Speaman）ランク相関により解析した。ジーンチップ（登録商標）実験とタックマン（登録商標）による試験結果の相関はピアソン（Pearson）相関により実施した。簡便な有意水準を0.05としたが、有意試験が多数に及んだため、慎重な解釈が必要であった。

20

【0171】

結果

患者の臨床上的特徴を表6に示す。

【0172】

30

【表6】

【表6】患者の特徴

特徴	対照	患者	自己限定性 サルコイドーシス	持続性 サルコイドーシス
[n]	12	12	7	5
年齢 (才)	32±8	36±12	33±11	39±13
性別 [男:女]	5:7	5:7	4:3	1:4
平均症候期間 診断前 [月±SD (範囲)]		3.7±4.9 [0.75-18]	1.3±0.8 [0.8-2.5]	7.9±7.0 [2.5-18]
平均追跡期間 [月±SD (範囲)]		14.3±4.4 [7.5-12]	13.6±4.5 [7.5-20]	15.3±4.6 [2.5-18]
結節性紅斑			7	0
基線でのシルツバツハスコア [n]			7	
1			0	3
2			0	2
3			0(0)	5(100)
免疫抑制処置 [n (%)]				
肺機能				
[%前±SD]			102±11	84±26
FVC%基線			107±9	93±11
追跡			97±19	89±25
FEV%基線			101±10	88±16
追跡			97±13	66±26
TLCO%基線			101±7	68±16
追跡				

10

20

【0173】

【表7】

【表7】アフィメトリックスU95Aジーンチップによりサルコイドーシス患者血液中に測定されるRNAレベル		
患者番号	サルコイドーシス型	アフィメトリックスU95Aで測定されるRNAレベル
19	I型	0
23	I型	145.4
33	I型	0
34	I型	0
35	I型	0
36	I型	0
39	I型	0
22	II&III型	840.6
24	II&III型	1,348.7
25	II&III型	679.9
32	II&III型	492.4
38	II&III型	866

30

40

【0174】

50

I型サルコイドーシスと結節性紅斑を示す7人の患者については、すべてが追跡で完全に疾患の退行した自己限定性疾患であった。当初間質性肺疾患（II&III型）を示した5人の患者については、すべてが免疫抑制療法を必要とし、当初評価で2人、また追跡で3人が進行性疾患によるものであった。

【0175】

12'626の遺伝子と発現した試験配列タグの内、4'152（32.8%）は、20%を超えるプローブに発現されることが判明した。遺伝子発現は表現型間でよく相関した（ R^2 乗0.97、 $p < 0.001$ ）。サルコイドーシス患者と対照間の有意差のある発現レベルは、それぞれ1'860（14.9%）および729（5.8%）の遺伝子産物について、 $p = 0.05$ および $p = 0.01$ のレベルで確認された。

10

【0176】

サルコイドーシスの病因に関連する介在経路における遺伝子の発現結果を以下に要約する。

HLAクラスII分子に対する抗原プロセッシング：我々は対照に比較して、患者でのカテプシン遺伝子L、SおよびZの一貫したアップレギュレーションを見出した。

抗原提示：健常対照対象の8/12（67%）がHLA-DRB1*1502陽性であった。自己限定性疾患患者はいずれもHLA-DRB1*1502陽性ではなかったが、持続性疾患の患者はすべて陽性であった。対照に比較し、II&III型疾患の患者におけるT-細胞レセプターアルファ鎖C領域の発現には有意なダウンレギュレーションがあった。

20

【0177】

共刺激：共刺激遺伝子CD40Lの発現は対照に比較し患者で有意にダウンレギュレーションを受けた。共刺激分子CD28、CD80およびCD86の発現に差はなかった。

T-細胞活性化：CD71（トランスフェリンレセプター）は最新のT-細胞活性化と矛盾なくすべての患者でアップレギュレーションを受けていた。より強いT-細胞活性化が持続性疾患の患者に見出され、CD69がこれらの患者においてアップレギュレーションを受けていた。CD27遺伝子は対照に比較し、すべての患者でダウンレギュレーションを受けていた。INF-ガンマ、IL2およびIL2RB鎖レセプター遺伝子の発現に差はなかった。

【0178】

転写因子：NFkBとCREMの発現はII&III型疾患の患者で有意にアップレギュレーションを受けていた。

エフェクター細胞活性化：単球およびマクロファージが主に発現分泌するIL1およびIL8遺伝子の発現は、サルコイドーシス患者において首尾一貫してアップレギュレーションを受けていた。同様に、TNF-アルファ発現はII&III型サルコイドーシス患者でアップレギュレーションを受けていた。B-細胞由来免疫グロブリン遺伝子の発現は、アップレギュレーションを受けた免疫グロブリン-GとFc-ガンマ-レセプター、およびダウンレギュレーションを受けた免疫グロブリン-Eと高親和性Fc-イプシロンRIレセプターを示し、IgG1B-細胞イソタイプが優位にあることを暗示していた。

30

【0179】

細胞転移と接着：ケモカインレセプター遺伝子複合体CCR2/CCR5/CCR6およびGROベータとガンマ遺伝子は有意に、特にI型疾患患者でアップレギュレーションを受けていた。II&III型疾患においてはより高い発現可変性のために、GROベータとガンマ遺伝子のアップレギュレーションが統計的な有意性に達しなかった。ケモカインMCPの発現は対照と比較して変化がなかった。測定した接着分子の中、ニンジュリン、インテグリンベータ-5およびアルファ-3、ならびにCD11b（CCR3）はアップレギュレーションを受けた。

40

【0180】

増殖因子：エンドセリン-1、血小板由来増殖因子-1およびメタロプロティナーゼ組織インヒビター（TIMP1）-1遺伝子の発現は、I型疾患の患者で有意にアップレグ

50

ュレーションを受けていたが、I I & I I I型疾患においてはその傾向があるのみであった。ヘパリン結合エンドセリン増殖因子と血管エンドセリン増殖因子は高レベルで発現するのみならず、肺機能で測定した疾患の重症度と相関した。

【0181】

免疫応答に関するメカニズム：アポトーシス阻害遺伝子 Bcl - 2 および Bfl - 1 はアップレギュレーションを受けており、アポトーシス死前ドメイン・レセプター - 3 と抗 Fas 誘導アポトーシス遺伝子はダウンレギュレーションを受けていた。この一群は正味の抗アポトーシスの状況と矛盾しない。制御サイトカイン IL 10 と TGF - ベータの発現は対照と比較してもサルコイドーシス患者で変わりがなかった。TGF - ベータレセプター遺伝子の発現はすべての患者で有意に減少しており、IL 10 レセプター遺伝子の発現は I I & I I I 型疾患患者で減少していた。

10

【0182】

確認検査実験 T A Q M A N (登録商標)

潜在症例 - 制御クラス I I H L A - D R アレルの関連性研究 (データは下記表 8 に示す) : 患者 103 名の内の 46 名 (45%)、および対照 105 名の内の 28 名 (27%) は H L A D R 2 (H L A D R B 1 * 15 / 16) 陽性であった。H L A D R 2 (H L A D R B 1 * 15 / 16) は予後不良と関連があった。診断の 2 年以内に疾患の退行のあった 6 名の患者 (21%) のみ、診断後 2 年以上疾患が活性の患者 22 名 (47%) に比較して、H L A D R 2 (H L A D R B 1 * 15 / 16) 陽性であった。

【0183】

20

[表 8]

R N A レベルを R T - P C R により測定した。R N A の最初の量に標準化するために、ベータアクチンを基線として用いた (ベータアクチンの R N A レベルが一定であるという仮定に基づく)。比はサンプル中ベータアクチンに対して報告された H L A - D R 2 - D w 1 2 の量を表す。N D : 検出されず。

【0184】

【表 8】

患者番号	サルコイドーシス タイプ	ベータアクチン	H L A - D R 2 - D w 1 2	比* 10 ⁵
19	I型	3.9E+08	ND	
23	I型	6.1E+07	ND	
33	I型	8.7E+08	ND	
34	I型	6.1E+08	ND	
35	I型	4.8E+08	ND	
36	I型	1.0E+09	ND	
39	I型	2.7E+08	ND	
22	I I & I I I 型	9.3E+07	2.2E+04	23.66
24	I I & I I I 型	2.0E+08	7.5E+03	3.75
25	I I & I I I 型	2.3E+08	8.1E+03	3.52
38	I I & I I I 型	5.6E+08	3.8E+04	6.79

30

40

【0185】

考察

末梢血についてのこの高密度遺伝子アレイ法により、健常個体と急性発症肺サルコイドーシス患者との間の遺伝子発現に明瞭な差異のあることが証明できる。この知見は抗原 - プロセッシング / 提示、T - リンパ球の活性化、エフェクター細胞 (B リンパ球、単球) の活性化、細胞転移と組織改造作用などの増大を、炎症関与メカニズムの変化と共に示すも

50

のである。

【0186】

さらに、これらの結果は自己制限疾患型の患者に比較して、進行性のサルコイドーシス患者間に特別の差があることを証明している。とりわけ、HLA-DRB1*1502陽性は、慢性かつより重症の疾患、免疫抑制療法の必要性、および予後不良と関連があった。逆に、HLA-DRB1*1502を発現しない患者はすべて6~12ヶ月以内に完全な自発的疾患退行を示したが、このことは抗原提示の差が免疫応答を変え得ること、いずれも急性期に発赤を生じさせ、HLA-DRB1*1502の存在しない場合には自発的に応答が鎮まるか、または存在する場合には免疫応答がより低く慢性型となることを示唆している。103名のサルコイドーシス患者による潜在関連研究において、疾患の罹病性における、また成果の乏しい予測因子としてのHLA-DR2(HLA-DRB1*15/16)の重要性が確認された。

10

【0187】

自己制限サルコイドーシス患者における免疫系の差別的活性化の存在を強調するもにはI型疾患におけるより顕著にアップレギュレーションを受けたIL1Bおよびケモカイン/レセプター(GRO-ベータ/-ガンマ、CCR2/5/6)、ならびにII&III型サルコイドーシス患者におけるT-リンパ球活性化のより明白なマーカーおよびアップレギュレーションを受けた転写因子NFkBとCREMがある。ノックアウトマウスモデルはTh1-特異的遅延型過敏性反応に対するNFkBの重要性を示している；参照：Aronica M.A., et al. 1999, 1型にはあるが、2型にはないT細胞依存性インビボ免疫応答におけるNF-カッパB/ReIシグナル伝達に対する優先的役割、J. Immunol. 63:5116-5124；サルコイドーシスに観察される場合。これらの知見は抗原除去のための免疫応答に対応し、I型疾患ではそれがよりエフェクター細胞に基づいており、一方、II&III型疾患はT-ヘルパーリンパ球の活性化により依存し、より顕著な慢性的遅延型過敏性反応を示す。

20

【0188】

引用文献

すべての出版物および参照文献は、限定されるものではないが、本明細書に引用された出版物、特許、特許出願、ジェンバンク寄託番号、ユニジーン・クラスター番号およびタンパク質寄託番号を含め、これら全文を参照により本明細書の一部とする。それぞれの出版物または参照文献は具体的かつ個々にそれが発表された完全なものとして参照により本明細書の一部とすることを示していたものとする。本出願が優先権を要求するいずれの特許出願も、出版物および参照文献について上に記載した様式同様に、その全文を参照により本明細書の一部とする。

30

【0189】

本発明は本明細書に記載した特定態様の用語に限定されるものではなく、本発明の個々の側面の単なる説明を意図したものである。本発明の多くの修飾および変更は当業者に自明のようにその精神と範囲を逸脱せず実施し得るものである。本発明の範囲内において機能的に等価の方法および装置類は、本明細書に列挙したものに加えて、本明細書の記載とその添付の図面から当業者には自明である。かかる修飾および変更も添付の請求項の範囲に包含されるものとする。本発明は添付の請求項によってのみ制限されるものであり、かかる請求項はその等価の全範囲についても権利を有する。

40

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 02/13448
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 14067 A (GRUENEWALD JOHANN ;WIGZELL HANS (SE); JONSON CARL HARALD (SE); T C) 23 June 1994 (1994-06-23) the whole document	1-40, 47-70
Y	SWIDER CEZARY ET AL: "TNF-alpha and HLA-DR genotyping as potential prognostic markers in pulmonary sarcoidosis." EUROPEAN CYTOKINE NETWORK, vol. 10, no. 2, June 1999 (1999-06), pages 143-146, XP009015988 ISSN: 1148-5493 the whole document	1-20, 35-40, 47-70
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 August 2003		Date of mailing of the international search report 11/09/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 02/13448

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WAHLSTROM J ET AL: "Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis." THORAX, vol. 54, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 339-346, XP002252132 ISSN: 0040-6376 the whole document	14-20, 35-40, 47-59, 61-63, 65-70
Y	KERN J A ET AL: "INTERLEUKIN-1-BETA GENE EXPRESSION IN HUMAN MONOCYTES AND ALVEOLAR MACROPHAGES FROM NORMAL SUBJECTS AND PATIENTS WITH SARCOIDOSIS" AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASE, vol. 137, no. 5, 1988, pages 1180-1184, XP009015991 ISSN: 0003-0805 the whole document	14-28, 47-53, 61,65,70
Y	YOKOYAMA TOMOYUKI ET AL: "Serum levels of interleukin-8 as a marker of disease activity in patients with chronic sarcoidosis." JOURNAL OF MEDICINE (WESTBURY), vol. 26, no. 5, 1995, pages 209-219, XP009015993 ISSN: 0025-7850 the whole document	24-28,49
Y		14-23, 47,48, 50-53, 61,65,70
Y	HIZAWA N ET AL: "THE ROLE OF THE C-C CHEMOKINE RECEPTOR 2 GENE POLYMORPHISM Y641 (CCR2-641) IN SARCOIDOSIS IN A JAPANESE POPULATION" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, US, vol. 159, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 2021-2023, XP001000532 ISSN: 1073-449X the whole document	14-28, 47-53, 61,65,70

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13448

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; July 1999 (1999-07) LI ZHENHUA ET AL: "Changes of the activities of ET-1 in the serum and BALF of ILD patients and their clinical significance." Database accession no. PREV199900535227 XP002252134 abstract & ZHONGHUA JIEHE HE HUXI ZAZHI, vol. 22, no. 7, July 1999 (1999-07), pages 411-413, ISSN: 1001-0939</p> <p>---</p>	<p>14-28, 47-53, 61,65,70</p>
Y	<p>TOLNAY EDINA ET AL: "Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptor flt in pulmonary sarcoidosis." VIRCHOWS ARCHIV, vol. 432, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 61-65, XP002252133 ISSN: 0945-6317 the whole document</p> <p>---</p>	<p>14-28, 47-53, 61,65,70</p>
P, Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2002 (2002-11-16) SCHILLER GARY J ET AL: "Hairy Cell Leukemia Complicating a Diagnosis of Sarcoidosis- A Case Report and Review of the Literature." Database accession no. PREV200300368447 XP002252135 abstract & BLOOD, vol. 100, no. 11, 16 November 2002 (2002-11-16), page Abstract No. 4964 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Philadelphia, PA, USA; December 06-10, 2002 ISSN: 0006-4971</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>14-28, 47-53, 61,65,70</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/13448

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 KONISHI K: "AN ASPECT OF PULMONARY FIBROSIS FROM A VIEWPOINT OF MOLECULAR BIOLOGY" Database accession no. PREV198988020785 XP002252136 abstract & JAPANESE JOURNAL OF CHEST DISEASES, vol. 48, no. 1, 1989, pages 1-10, ISSN: 0385-3667</p> <p>-----</p>	<p>14, 16-20, 29-34, 61,65</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/13448**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 13448

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 47, 48 and 54-59 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

The step "obtaining a biological sample from the subject" in claims 1-7 and 10-15 may be considered as surgery.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 1-7, 10-15, 47, 48 and 54-59 as regards industrial applicability

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/13448

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9414067 A	23-06-1994	WO 9414067 A1	23-06-1994
		US 5958410 A	28-09-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, E
E, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL
, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 オリヴィエ・グレネ

フランス 6 8 7 3 0 プロツェム、リュ・オブフェ 2 6 番

(72) 発明者 ジャンヌ・ケラン

フランス、エフ - 6 8 4 9 0 バンツェネム、リュ・デ・アベイユ 1 番

(72) 発明者 フランク・シュテットラー

ドイツ連邦共和国デー - 7 9 5 9 1 アイメルディンゲン、ガルテンヴェーク 4 番

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QR32 QR48 QR51

QR56 QR82 QS25 QS33 QS36 QX02 QX07

4C084 AA07 AA17 BA25 MA66 NA14 ZB081 ZB211 ZB261 ZC781

专利名称(译)	结节病的评价方法和预后方法		
公开(公告)号	JP2005510251A	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2003547966	申请日	2002-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	サラディーヌチボ オリヴィエグレネ ジャンヌケラン フランクシュテットラー		
发明人	サラ-ディーヌ・チボ オリヴィエ・グレネ ジャンヌ・ケラン フランク・シュテットラー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/74 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/577 G06F19/00		
CPC分类号	C07K14/70539 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N2333/70539		
FI分类号	C12Q1/68.A A61K45/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.105 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/577.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA25 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB081 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC781		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/334264 2001-11-29 US		
其他公开文献	JP2005510251A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本发明中，鉴定了可用作生物标记物的基因，所述基因可用于提供结节病患者的诊断信息和预后信息以及作为基因表达产物的mRNA和多肽。这些生物标志物还可用于监测结节病的严重程度和进展，并鉴定可用于治疗疾病的药物。

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)			
(51) Int. Cl. ⁷	FI		テーマコード(参考)
C12Q 1/68	C12Q 1/68	A	4B063
A61K 38/00	A61K 45/00		4C084
A61K 45/00	A61P 35/00		
A61P 35/00	A61P 37/06		
A61P 37/06	A61P 43/00	105	
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 53 頁) 最終頁: 1
(21) 出願番号	特願2003-547966 (P2003-547966)	(71) 出願人	597011463
(22) 出願日	平成14年11月28日(2002.11.28)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャ
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月26日(2004.5.26)		スイス国、4056 バーゼル、リヒ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/013448		ュトラーセ 35
(87) 国際公開番号	WO2003/046578	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成15年6月5日(2003.6.5)		弁理士 青山 淳
(31) 優先権主張番号	60/334,264	(74) 代理人	100067035
(32) 優先日	平成13年11月29日(2001.11.29)		弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二
		(74) 代理人	100072730
			弁理士 小島 一晃
		(72) 発明者	サラディーヌ・チボ
			フランス、エフ-68720タゴルシ
			、ルト・ドゥ・ミユルズ5番
			最終頁に続

(54) 【発明の名称】 サルコイドーシスの評価法と予後判定法