

(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2009-535642

(P2009-535642A)

(43) 公表日 平成21年10月1日(2009.10.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO1N 33/576 (2006.01)	GO1N 33/576	Z 4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	A 4C084
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C085
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 48/00	4C086
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-509761 (P2009-509761)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月3日 (2007.5.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年12月30日 (2008.12.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/010939
 (87) 国際公開番号 W02007/130636
 (87) 国際公開日 平成19年11月15日 (2007.11.15)
 (31) 優先権主張番号 60/797,457
 (32) 優先日 平成18年5月3日 (2006.5.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508246526
 ゲイシンガー クリニック
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ダン
 ビル ノースアカデミー 100
 (74) 代理人 100096699
 弁理士 鹿嶋 英實
 (72) 発明者 ゲルハルト グレン エス
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 17
 837 リューイスバーグ ジェファー
 ソン アベニュー 1401
 (72) 発明者 スチル クリストファー ドゥベット
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 17
 889 ウィンフィールド ウェストウ
 ド ドライブ 108

最終頁に続く

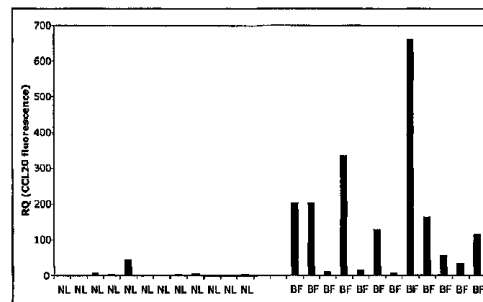
(54) 【発明の名称】 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を診断及び予測する方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を診断するのに役立つ遺伝子パネルを提供すること、NASH関連遺伝子のパネルにおける特定の遺伝子の発現に基づいた非侵入性のアッセイにおいてNASHを診断する方法を提供すること、及びNASHの治療法及びNASHを治療するための成分を提供すること。

【解決手段】 患者がNASHの病状であると診断する方法であって、患者のサンプルにおいて、NASHの発病又は進行に関連した遺伝子パネルの発現レベルを測定し、該発現レベルと前記遺伝子パネルにおけるNASHに関連した遺伝子発現に対する所定値とを比較して、該発現レベルとNASHの病状とを関連づける方法。

【選択図】 図10B



【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者がNASHの病状であると診断する方法であって、
患者のサンプルにおいて、NASHの発病又は進行に関連した遺伝子パネルの発現レベルを測定し、

該発現レベルと前記遺伝子パネルにおけるNASHに関連した遺伝子発現に対する所定値とを比較して、該発現レベルとNASHの病状とを関連づける方法。

【請求項2】

前記遺伝子パネルは1又は2以上の小誘導性サイトカインを含む請求項1の方法。

【請求項3】

前記小誘導性サイトカインはSCYA19、SCYA20、SCYA21及びSCYB6から成るグループから選択される少なくとも1つである請求項2の方法。

【請求項4】

前記パネルは、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldoketoreductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix G1a protein (MGP) (マトリクスG1aタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3end / clone = IMAGE 30172

10

20

30

40

50

3); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン(アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J領域); normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される少なくとも1つの遺伝子を備える請求項1の方法。

【請求項5】

NASHに関連した遺伝子発現の前記所定値は、遺伝子の正常な発現に対し少なくとも4倍の増加である請求項1の方法。

【請求項6】

NASHに関連した遺伝子発現の前記所定値は、遺伝子の正常な発現に対し少なくとも4乃至12倍の増加である請求項1の方法。

【請求項7】

該遺伝子発現のレベルは、前記遺伝子から発現されたタンパク質のレベルを測定する免疫測定によって測定される請求項1の方法。

【請求項8】

前記患者のサンプルは血液である請求項1の方法。

【請求項9】

哺乳類の対象におけるNASHを治療する方法であって、NASHを有する疑い又は罹患し易い疑いのある哺乳類の対象に対し、少なくとも1つのNASH関連の遺伝子又はタンパク質の阻害剤を、NASHを減衰させ、除去させ又は予防するのに有効な量の形において治療的有効量投与方法。

【請求項10】

前記哺乳類の対象はヒトである請求項9の方法。

【請求項11】

10

20

30

40

50

前記阻害剤は少なくとも1つの小誘導性サイトカインを阻害する請求項9の方法。

【請求項12】

前記小誘導性サイトカインは、SCYA19、SCYA20、SCYA21及びSCYB6から成るグループから選択される請求項11の方法。

【請求項13】

前記阻害剤は、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldo keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix Gla protein (MGP) (マトリクスGlaタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3end / clone = IMAGE 301723); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質

2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン(アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成 μ 鎖遺伝子V N D N J 領域); normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される少なくとも1つの遺伝子の発現を阻害する請求項9の方法。

【請求項14】

前記阻害剤は少なくとも1つの抗体である請求項9の方法。

【請求項15】

前記抗体はモノクローナル抗体である請求項14の方法。

【請求項16】

前記抗体は、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテ

ンI、初期Tリンパ球活性1)) ; fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)) ; aldoketoreductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)) ; matrix Gla protein (MGP) (マトリクスGlaタンパク質 (MGP)) ; IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域) ; Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6) ; collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)) ; DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列) ; Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体) ; cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3end / clone = IMAGE 301723) ; interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)) ; small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)) ; small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)) ; clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域) ; superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)) ; heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2) ; EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)) ; Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10) ; Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン (アルファ2)) ; immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10) ; pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)) ; reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)) ; lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)) ; Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J領域) ; normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)) ; 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される少なくとも1つのタンパク質に特異的に結合する請求項14の方法。

【請求項17】

哺乳類の対象におけるNASHを治療する方法であって、NASHを有する疑い又は罹患し易い疑いのある哺乳類の対象に対し、NASH関連のタンパク質に対する少なくとも1つの受容体の阻害剤を、NASHを減衰させ、除去させ又

は予防するのに有効な量の形において治療的有効量投与方法。

【請求項18】

前記受容体は小誘導性サイトカインに対する受容体である請求項17の方法。

【請求項19】

前記小誘導性サイトカインは、CLC19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6から成るグループから選択される少なくとも1つである請求項18の方法。

【請求項20】

前記受容体は、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldo keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix G1a protein (MGP) (マトリクスG1aタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3end / clone = IMAGE 301723); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocy

te chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン(アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J 領域); normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択されるタンパク質に対するものである請求項17の方法。

【請求項21】

サブストレート上で不可動とされた非アルコール性脂肪性肝炎に関連する複数の単離されたポリヌクレオチドを備える診断ツールであって、前記複数のポリヌクレオチドは、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン

、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)) ; fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)) ; aldoketoreductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)) ; matrix Gla protein (MGP) (マトリクスGlaタンパク質 (MGP)) ; IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、V カッパ 2領域) ; Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6) ; collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)) ; DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列) ; Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体) ; cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3 end / clone = IMAGE 301723) ; interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)) ; small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)) ; small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)) ; clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域) ; superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)) ; heat shock protein 70 kD protein 2 (熱ショックタンパク質70 kDタンパク質2) ; EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)) ; Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10) ; Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン (アルファ2)) ; immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10) ; pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)) ; reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)) ; lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)) ; Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J領域) ; normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)) ; 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択されるタンパク質に対して少なくとも95%の同一性を有するタンパク質をコードする少なくとも2つのポリヌクレオチドに特異的に結合する少なくとも2つのポリヌクレオチドを備えるツール。

【請求項22】

サブストレート上で不可動とされた非アルコール性脂肪性肝炎に関連する複数の単離されたポリヌクレオチドを備える診断ツールであって、

前記複数のポリヌクレオチドは、小誘導性サイトカインに対して少なくとも95%の同一性を有するタンパク質をコードする少なくとも2つのポリヌクレオチドに特異的に結合する少なくとも2つのポリヌクレオチドを備えるツール。

【請求項23】

前記小誘導性サイトカインは、CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6から成るグループから選択される請求項22の診断ツール。

【請求項24】

NASHを予防し又はNASHの進行を阻害する方法であって、少なくとも2つのNASH関連遺伝子の発現を阻害する成分を治療的に有効量投与することを備える方法。

10

【請求項25】

前記NASH関連遺伝子の少なくとも1つは小誘導性サイトカインである請求項24の方法。

【請求項26】

前記小誘導性サイトカインは、CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6から成るグループから選択される請求項25の方法。

【請求項27】

前記NASH関連遺伝子は、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J領域); ubiquitin (UBD) (ジユピキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldo keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix G1a protein (MGP) (マトリクスG1aタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from PAC

20

30

40

50

845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3 end / clone = IMAGE 301723); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン (アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J 領域); normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される請求項24の方法。

【請求項28】

前記成分は、アンチセンスRNA、モルホリノポリヌクレオチド、及び干渉RNA (RNAi) から選択される遺伝子発現の阻害剤を備える請求項24の方法。

【請求項29】

NASHを予防し又はNASHの進行を阻害する方法であって、患者がNASHであると又はNASHを進展させる危険があると同定し、少なくとも1つのNASH関連タンパク質の生物活性を阻害する成分を治療的に有効量投与する方法。

【請求項30】

前記成分は前記NASH関連タンパク質に特異的に結合する抗体又は小さな分子を備える請求項29の方法。

【請求項31】

前記NASH関連タンパク質は少なくとも1つの小誘導性サイトカインを備える請求項30の方法。

【請求項32】

前記小誘導性サイトカインは、CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6から成るグループから選択される請求項31の方法。

【請求項33】

前記NASH関連タンパク質は、immunoglobulin A1 A2 lambda da hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldo keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix G1a protein (MGP) (マトリクスG1aタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3end / clone = IMAGE 301723); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM

36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン(アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成 μ 鎖遺伝子V N D N J 領域); normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される少なくとも1つのタンパク質を備える請求項31の方法。

【請求項34】

前記阻害剤はモノクローナル抗体である請求項30の方法。

【請求項35】

前記阻害剤はポリクローナル抗体である請求項30の方法。

【請求項36】

NASHを阻害する化合物をスクリーニング方法であって、試験物質とNASHに関連した少なくとも1つのタンパク質とを接触させて、前記試験物質が前記タンパク質又はその受容体に結合するかどうか判断することを備え、結合が前記試験物質がNASHを阻害することが可能であることを示す方法。

【請求項37】

前記タンパク質は小誘導性サイトカイン又はその受容体である請求項36の方法。

【請求項38】

前記小誘導性サイトカインは、CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6又はその受容体から成るグループから選択される請求項37の方法。

【請求項39】

前記タンパク質は、immunoglobulin A1 A2 lambda hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cyt

okine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldo keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix Gla protein (MGP) (マトリクスGlaタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from PAC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3end / clone = IMAGE 301723); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン (アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J領域); normal mucosa of esophagus specific

10

20

30

40

50

1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及び collagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される請求項36の方法。

【請求項40】

前記試験物質が前記タンパク質又はその受容体の生物活性を阻害するかどうかを判断することを更に備える請求項36の方法。

【請求項41】

前記試験物質が前記タンパク質又はその受容体の生物活性を阻害するかどうかを判断する前期ステップは、細胞ベース分析をさらに備える請求項36の方法。

【請求項42】

NASH関連タンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的に結合する少なくとも1つのポリヌクレオチド・プローブ、及び使用に対する指示を備える、患者のNASH診断用キット。

【請求項43】

NASH関連のポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの抗体又は抗体の抗原結合性フラグメント、及び使用に対する指示を備える、患者のNASH診断用キット。

【請求項44】

前記NASH関連タンパク質は、immunoglobulin A1 A2 lambda da hybrid GAU heavy chain (免疫グロブリンA1 A2ラムダハイブリッドGAU重鎖); natural killer cell transcript 4 (NK4) (ナチュラルキラー細胞トランスクリプト4 (NK4)); Immunoglobulin rearranged kappa chain gene V J region (免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V J 領域); diubiquitin (UBD) (ジユビキチン (UBD)); GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) (骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質 (GEM)); interleukin 8 (IL8) (インターロイキン8 (IL8)); defensin, alpha 1, myeloid related sequence (DEFA1) (デフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列 (DEFA1)); prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) (プロスタグランジンD2合成酵素 (21kD、脳) (PTGDS)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 19 (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー19); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (SCYA20) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー20 (SCYA20)); nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T lymphocyte activation 1) (ネフロポンチン (分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期Tリンパ球活性1)); fibulin 5 (FBLN5) (フィブリン5 (FBLN5)); aldo keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) (アルドケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10 (アルドース還元酵素) (AKR1B10)); matrix G1a protein (MGP) (マトリクスG1aタンパク質 (MGP)); IgK chain from GM 607, V kappa 2 region (IgK鎖フロムGM607、Vカッパ2領域); Olfactory receptor, family 2, subfamily I, member 6 (嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリーI、メンバー6); collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) (コラーゲン、タイプI、アルファ2 (COL1A2)); DNA sequence from P

10

20

30

40

50

AC 845024 on chromosome 1p36.1 36.2 (染色体1p36.1 36.2上PAC845024由来DNA塩基配列); Interleukin 7 receptor (インターロイキン7受容体); cDNA, 3 end / clone = IMAGE 301723 (cDNA、3 end / clone = IMAGE 301723); interleukin 8 C terminal variant (IL8) (インターロイキン8C末端変異体 (IL8)); small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 21 (SCYA21) (小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys Cys)、メンバー21 (SCYA21)); small inducible cytokine subfamily B (Cys X Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (小誘導性サイトカインサブファミリーB (Cys X Cys)、メンバー6 (顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6)); clone KM36 immunoglobulin light chain variable region (クローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域); superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) (上頸神経節、神経特異10 (SCGN10)); heat shock protein 70kD protein 2 (熱ショックタンパク質70kDタンパク質2); EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) (EGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1 (EFEMP1)); Superior cervical ganglia, neural specific 10 (上頸神経節、神経特異10); Hemoglobin, alpha 2 (ヘモグロビン (アルファ2)); immunoglobulin lambda variable 3 10 (免疫グロブリンラムダ可変部3 10); pyruvate kinase, muscle (PKM2) (ピルビン酸キナーゼ、筋 (PKM2)); reticulon 1 (RTN1) (レチクロン1 (RTN1)); lymphocyte specific protein tyrosine kinase (LCK) (リンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ (LCK)); Immunoglobulin rearranged mu chain gene V N D N J region (免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V N D N J 領域); normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) (正常粘膜オブ食道特異1 (NMES1)); 及びcollagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) (コラーゲン、タイプXV、アルファ1 (COL15A1))、から成るグループから選択される請求項42又は43のキット。

【請求項45】

前記遺伝子パネルはCCL19から本質的に構成される請求項1の方法。

【請求項46】

前記遺伝子パネルはSCYA20から本質的に構成される請求項1の方法。

【請求項47】

サブストレート上で不可動とされた非アルコール性脂肪性肝炎に関連する単離されたポリヌクレオチドを備える診断用ツールであって、前記ポリヌクレオチドはCCL19をコードするポリヌクレオチド配列に特異的に結合するポリヌクレオチド配列を備えるツール。

【請求項48】

サブストレート上で不可動とされた非アルコール性脂肪性肝炎に関連する単離されたポリヌクレオチドを備えた診断用ツールであって、前記ポリヌクレオチドはSCYA20をコードするポリヌクレオチド配列に特異的に結合するポリヌクレオチド配列を備えるツール。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

(関連出願へのクロスレファレンス)

本願は2006年5月3日になされた米国仮出願第60/797,457号の利益を主張するものであり、その開示は参照によりここに全体として取り入れられる。

【0002】

(本発明の技術分野)

本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH: non alcoholic steatohepatitis)に関する。より詳細には、本発明は患者のNASHを評価する方法に関する。

【背景技術】

10

【0003】

肥満の蔓延により、糖尿病、心疾患及び高血圧症を含む様々な疾患がますます増加している。重要だが未だ研究下にある肥満の合併症として、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)がある。NASHは、多くの場合は臨床的に診断不能の肝臓疾患であり、また、合衆国における死因のトップ10のうちの1つであって肝細胞癌の前癌状態である肝硬変に進行する場合がある(Thomas, M. B. and A. X. Zhu (2005) J. Clin. Oncol. 23(13): 2892-2899)。NASHは、既に原因不明肝硬変の主要原因になっており(Clark, J. M. and A. M. Diehl (2003) JAMA 289(22): p. 3000-3004)、何れは肝硬変の主要原因としてアルコールを抜くかもしれない。生検を基に評価される肝臓組織検査だけが、NASHの診断をするための唯一明確で臨床上受容されている方法である。これは、脂肪肝(脂肪の蓄積)、炎症及び線維形成を含む所見に基づくものである(Brunst, E. M. et al. (1999) Am. J. Gastroenterol. 94(9): p. 2467-2474)。合衆国における成人の20%から30%が、肝臓に余分な脂肪蓄積を有していると推定されており(Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepatology, 37(5): 1202-1209)、その約10%(すなわち全成人の2%~3%)がNASHについての現在の診断基準を満たす。NASHが肝硬変にどのように進展・進行するのかについての分子学的基礎があまり明らかになっておらず、血清診断検査法は有効でなく、また、有効な薬学的治療法も存在しない。これは巨大で未達成の医学的必要性を意味する。

20

30

【0004】

NASHは、有意な程度にアルコール消費がない脂肪性肝炎の患者における肝生検に基づく所見に関する(Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepatology 37(5): 1202-1209)。それは、通常は重さで5%から10%を超える肝臓における脂肪蓄積として定義される非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD: non alcoholic fatty liver disease)という用語により包含されるが、実際には光学顕微鏡によって観察された脂質を含んでいる肝細胞の割合として推定される。ここで用いられるように、NASHという用語は、単純脂肪肝及びその極端な形態であるNASHの双方を含むNAFLDによって画される、組織学的に異常である範疇を意味する。脂肪(大脂肪及び小脂肪)、小葉状炎症(急性及び/又は慢性)及び線維形成(ゾーン3及びポータル)の量及び型といった具体的な所見の必要性及び性質を含め、どのようにすればNASHを最も良く定義できるかに関して若干の議論が存するが、Brunstによって提案されて刊行された組織学的基準が一般的に用いられている(Brunst, E. M. et al. (1999) Am. J. Gastroenterol. 94(9): p. 2467-2474)。原因不明肝硬変は、殆どの患者において典型的な壊死炎症性で且つ脂肪沈着性の特徴を失ったNASHの後期を意味するかと思われる。

40

【0005】

NASHは、すべての肝臓疾患に最も共通のものかもしれない(Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepato

50

logy 37(5):1202-1209)。脂肪肝は肥満患者の60~70%及び細身患者の35%に存在し、その肥満患者の20~25%、細身患者の2.7%が脂肪性肝炎及び線維症となる。NASHを有する肥満患者の2~3%程度が肝硬変を有しているかもしれない。2型糖尿病患者の70~75%以上は、NASHの何らかの形態を有している。多くの報告は、NASHの臨床的な予測因子を取り扱ってきた。これらの中で、40歳~50歳を越える年齢と、肥満、糖尿病、又は高脂血症(特に高トリグリセリド血症)の重度性とが、特異度に欠けるものの、最も確実性が高いものの中にある。女性の役割もいくつかのシリーズにおいて研究されてきた。進展したNASHは女性において相対的に多いようであり、進行にとっての危険因子としての女性についての役割を支持する。日常的評価で検出された異常な肝酵素レベルは、患者をNASHであると同定するための一般的な方法である。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)の上昇、及びAST:ALT比が1.5超であることは、予測因子として研究されてきた。これらの要因は、初期の生検上で進展した疾患を発見する蓋然性をサポートするが、高感度でも特有のものでもない。また、それらは長期予後的意義を伴うかもしれない。しかしながら、臨床医は、肝酵素が正常範囲の場合にNASHがしばしば発見されることをよく知っている。また、肥満患者が長年の診療にもかかわらず診断未確定の肝硬変を潜伏させることは非一般的でない。なぜなら、これらの患者が肝硬変に係る古典的栄養変化を往々にして欠くからである。

【0006】

肝生検は、NASHにおいて特有の壊死炎症性変化及び線維形成の存在及び程度を評価する唯一の手段であり続ける。しかしながら、日常的な臨床設定において肝生検をいつ実行すべきかについての確固たる提言は未だ展開されていない。臨床研究では必要なアミノ基転移酵素及び線維症マーカーのようなサロゲートマーカーの使用は、疾患をモニタリングするのには十分でない。

【0007】

NASHは、一般に肥満、糖尿病、及び高脂血症に関係しており、また高血圧症、高尿酸血症、及び多嚢胞卵巣にも関係する。NASHは、リポジストロフィーの患者に見ることができ(Garg, A. (2000) Am. J. Med. 108(2):143-152)、また、ペルオキシゾーム疾患、ミトコンドリアオーバシーズ、ウェーバークリスチャン病、ウィルソン病、工業溶剤被曝、薬物投与(アミオダロン、タモキシフェン、ヌクレオシド・アナログ、及びメトトレキサート)、セリアック病、及び無リポ蛋白血症のような様々な他の疾患の患者にも見ることができる(Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepatology 37(5):1202-1209)。これらの疾患に共通の特徴は、異常な脂肪代謝及び/又はミトコンドリアの障害若しくは機能障害である。

【0008】

死は多くの場合複合的な病的状態によって惹起されるが、NASHにおける5年~及び10年~の存命はそれぞれ67%及び59%と見積もられている(Propst, A. et al. (1995) Dig. Dis. Sci. 40(8):1805-1815)。家族関連性もまた記載されており(Struben, V. M. et al. (2000) Am. J. Med. 108(1):9-13)、遺伝因子がNASHの進展を起こしやすいかもしれないことが示唆されている。

【0009】

脂肪肝、脂肪性肝炎、進行性の肝線維症、及び肝硬変の進展は、大いに恐らくは多くの代謝性異常の結果である。NASHの主要な所見を包括する詳細で統一的な病態生理学上の定説は未だ出現していないが、病因についてもっともらしいパラダイムは「2段ヒット」仮説である(Day, C. P. and O. F. James (1998) Gastroenterology 114(4):842-845)。第1の「ヒット」は肝細胞での脂肪の蓄積であり、これは高脂血症、糖尿病、及び肥満を含む多くの症状に起因しうる。脂肪酸の酸化の抑制、肝臓への脂肪酸の送達の増加、及び/又は超低比重リポタンパク質

10

20

30

40

50

の合成若しくは分泌の減少もまた、脂肪蓄積に何らかの役割を果たすのかもしれない。第2の「ヒット」は、特徴的な炎症、肝細胞腫大及び細胞死、さらには後続する線維化に至るトリガーである。

【0010】

ある主要な理論によれば、インスリン抵抗性の増加による肝臓の酸化ストレスの増加、遊離脂肪酸代謝の増加、ミトコンドリア脱共役タンパク質の活性の増加、シトクロムP 450 2 E 1の活性の増加、鉄貯蔵の増加、及び/又はアンチオキシダント活性の減少により、肝臓星細胞が活性化され、前炎症性サイトカインの生成及び進行性の炎症が続くと考えられている (Agrawal, S. and H. L. Bonkovsky (2002) J. Clin. Gastroenterol. 35 (3) : 253 261)。

10

【0011】

インスリン抵抗性と高インスリン血症はNASHにおける主要な異常である (Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepatology 37 (5) : 1202 1209 ; Sanyal, A. J. (2001) Am. J. Gastroenterol. 96 (2) : 274 276)。インスリン抵抗性の主要な機序は、余分な遊離脂肪酸によって信号する、インスリン受容体サブストレート1 (IRS 1)のダウンレギュレーションである場合がある。脂肪酸は、IRS 1のチロシンリン酸化を減少させる。インスリン感受性もペプチドメディエータによって制御される。脂肪組織、特に静脈血が肝臓に直接に流れる腸間膜の脂肪は、代謝活性を下流に制御するサイトカイン及びペプチドホルモンの生産の豊富な源である。

20

【0012】

酸化ストレスとミトコンドリアの機能障害はNASHにおける肝細胞性障害の中心的機序として取り込まれている (Caldwell, S. H. et al. (2004) Clin. Liver Dis. 8 (3) : 595 617)。酸化ストレスのマーカーとNASHの間の関連付けは、脂肪肝疾患の動物モデルにおいてなされた (Koteish, A. and A. Mae Diehl (2002) Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 16 (5) : 679 690)。脂肪肝における酸化ストレスの多数の可能なソースは、シトクロムP 450ペルオキシソームベータ酸化、ミトコンドリアの電子リーク及び動員された炎症細胞を含め、ある役割を果たす場合がある。

30

【0013】

遊離脂肪酸のレベルの増加は、インスリン抵抗性をメディエートするだけでなく、肝細胞に直接に有毒となりうる (Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepatology 37 (5) : 1202 1209)。脂質を循環させるレベルを調節する1つの機序は、末梢における貯蔵脂肪の代謝である。リポジストロフィー (Garg, A. (2000) Am. J. Med. 108 (2) : 143 152)、脂肪組織を形成する能力の部分的又は完全な欠落によって特徴づけられる遺伝障害は、肝臓脂肪症、NASH、及び肝硬変に関係する (Garg, A. and A. Misra (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 (7) : 3019 3022)。先天性全身性リポジストロフィーは、喪失された末梢脂肪、重度の肝臓脂肪症、及び肝硬変の著しいリスクによって特徴づけられる。

40

【0014】

エネルギー代謝もまた、NASHにおいてある役割を果たす場合がある。アデノシン三リン酸 (ATP : adenosine triphosphate) は細胞の完全性を維持するために必要であり、したがってその喪失は肝細胞性の障害を起こしやすいかもしれない。肝臓のATPレベルは、NASHでは減ぜられている (Cortez Pinto, H. et al. (1999) JAMA 282 (17) : 1659 1664)。ミトコンドリア障害が、恐らくは、NASHにおける肝細胞性ATPストア減少の1つの原因であろう (Caldwell, S. H. et al (2004) Clin. Liver Dis. 8 (3) : 595 617)。電子顕微鏡による研究により、不確かな組成の結

50

晶組織がミトコンドリアのマトリクスであると同定された (Caldwell, S. H. et al. (1999) *J. Hepatol.* 31 (3): 430-434)。ミトコンドリア障害は、ミトコンドリアDNAの変形及び喪失に至る場合がある。ミトコンドリアDNAの損傷又は喪失は、アルコールによる肝臓損傷 (Mansouri, A. et al. (1997) *J. Hepatol.* 27 (1): 96-102) 及び老化 (Van Remmen, H. and A. Richardson (2001) *Exp. Gerontol.* 36 (7): 957-968) において生じる。ある限定的データによれば、ミトコンドリアDNA損傷がNASHでも生じることが示唆されている (Caldwell, S. H. et al. (1999) *J. Hepatol.* 31 (3): 430-434)。

10

【0015】

肝臓線維化は、コラーゲンのような細胞外マトリックスタンパク質の沈着を誘発する慢性の細胞の障害に起因する (Battaler, R. and D. A. Brenner (2005) *J. Clin. Invest.* 115 (2): 209-218)。肝臓線維化の主な要因には、慢性のHCV感染、アルコール中毒、及びNASHが含まれる。細胞外マトリックスタンパク質の蓄積は、線維痕の形成により肝臓の組織学的完全性を分裂させる。この線維状物質の初期分布は、肝臓損傷の原因に左右される。慢性ウイルス性肝炎においては、線維化組織は当初は門脈路の周囲に位置するが、他方アルコール誘導肝炎及びNASHにおいては、それは中心周囲領域及び類洞周囲領域に位置する。線維症の肝臓病は、コラーゲンバンドから、架橋線維化、明白な肝硬変へと明らかに進行する。肝細胞を再生成する結節が成長したときに、肝硬変であると認定される

20

【0016】

肝硬変は、血流に対する増加した肝臓内抵抗と門脈圧亢進症、腹水、腎不全、肝性脳症及び静脈瘤出血を引き起こす。肝硬変の患者は、病的状態の発現前に長期にわたりかなり無症候性である場合がある (代償性肝硬変)。肝硬変は、肝細胞癌 (HCC: hepatocellular carcinoma) の殆どの場合に関係する。HCCの約18,000の新規の症例が2005年の米国において発生すると予測されている (Thomas, M. B. and A. X. Zhu (2005) *J. Clin. Oncol.* 23 (13): 2892-2899)。HCCの発生率は過去30年にわたって2倍になっており、今も上昇し続けている。これは、C型肝炎の感染者数が多いことと初期感染とHCCの進展の間に数十年間という長いインターバルがあることによる。NASHに関連する肝硬変は、また、米国において増加しており、急成長するHCCの蔓延に著しく寄与している。HCCは主として肝細胞障害のコンテキストにおいて進展し、これは、炎症、肝細胞再生、肝臓マトリックス・リモデリング、線維化、そして最終的には肝硬変に至る。

30

【0017】

肝生検組織の組織学的検査は、肝臓の線維化を評価するための最善の標準である (Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) *Hepatology* 37 (5): 1202-1209; Zafarani, E. S., (2004) *Virchows Arch.* 444 (1): 3-12)。しかしながら、肝生検は侵襲的で費用のかかる手技であり、死を含め患者の約0.5%における重大な合併症に関連する (Thampanitchawong, P. and T. Piratvisuth (1999) *World J. Gastroenterol.* 5 (4): p. 301-304)。特に針生検を得る場合には、サンプリング誤差が生じる場合がある (Regev, A. et al. (2002) *Am. J. Gastroenterol.* 97 (10): 2614-2618)。肝臓の線維化を評価するための、信頼性があり、簡易であり、かつ非侵襲的である方法が、したがって必要となる。TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) タイプ1、ヒアルロン酸、III型コラーゲンのN末端プロペプチドなどの、肝臓の線維形成プロセスと直接に関係するタンパク質の血中濃度が肝臓線維化のサロゲートマーカーとして用いられた (Battaler, R. and D. A. Brenner (2005) *J. Clin*

40

50

. Invest. 115 (2) : 209 - 218)。これらのマーカーは一定の患者における肝硬変を識別するのに有用である場合があるが、線維化の病期が数段ある中においては十分な識別力に欠ける。それらはまた、線維化が他の器官において存在する場合に明確でない。したがって、臨床治験において潜在的な治療薬を評価することは、肝生検により肝臓の線維化を判断する必要があるので、不確実である。肝臓の線維化を判断する非侵襲性のバイオマーカーは、臨床治験のデザインを促進するに相違ない。

【0018】

今日までの肝線維症に関する殆どの研究は、限定的な遺伝子レポーターを備えたマイクロアレイを用いてウイルス性肝炎又はアルコール性肝臓疾患による肝硬変に焦点を当ててきた。また、組織源は肝移植を受けた患者や診断のための針生検からであったので、肝線維症がかなり進行した段階にある患者からとなっていた。

10

【0019】

限定的な遺伝子発現プロファイルが、NASHにおいて報告された。ある研究 (Younossi, Z. M. et al. (2005) Liver Int. 25 (4) : 760 - 771) において、29人のNASH患者 (脂肪肝だけの12人、残りは特になし)、7人の肥満コントロール、及び6人の非肥満コントロールからなるグループが、5220の遺伝子を含むカスタマイズされたcDNAマイクロアレイを用いて解析された。8つの遺伝子のみが、肥満コントロールと比較して、NASH患者において有意な差別的発現を示した。別の研究において、NASHによる肝硬変の患者からの肝臓における遺伝子発現が、C型肝炎ウイルス (HCV: hepatitis C virus) 感染に付随して起こる肝硬変、原発性胆汁性肝硬変症 (primary biliary cirrhosis) に付随して起こる肝硬変の患者及び健全コントロールと比較された (Sreekumar, R. et al. (2003) Hepatology 38 (1) : 244 - 251)。各グループにおける被検者の総数は6で、6,412の既知の遺伝子用プローブを含んでいるオリゴヌクレオチド Affymetrix Hu6800 配列が用いられた。4つのグループの平均年齢は約50歳で、平均BMIは約30で、各グループは4人の女性の及び2人の男性のコーカサス人の被検者を備える。調査された6,412の遺伝子のうち、16個だけが、他のグループのすべてと比較した場合、NASHの被検者において差別的に発現した (NASH vs. 健康コントロール, NASH vs. HCV, NASH vs. PBC)。12個の遺伝子は、NASH被検者では有意な発現には至らなかった。

20

30

【0020】

NASH、特に肝炎ウイルス以外の原因からの肝線維症/肝硬変について多くの研究が報告されている。たとえば、日本からの研究では、肝細胞癌の8人、及び肝臓を含む転移癌の3人の患者を含め、C型肝炎ウイルス (HCV) に感染した19人の患者からの線維症肝生検からのRNAを解析するために、3,800の遺伝子のオリゴヌクレオチド・マイクロアレイが用いられた (Shao, R. X. et al. (2005) World J. Gastroenterol. 11 (13) : 1995 - 1999)。HCVに感染した肝臓において、免疫学的応答に含まれる遺伝子が高度に発現した。架橋線維化 (bridging fibrosis) 及び肝硬変とそれほど重度でない線維化との対比において、血漿たんぱく (アルブミンとアポリポ蛋白質を含む) 及び薬物代謝酵素 (アルドケト還元酵素及びシトクロムP450 遺伝子) についての遺伝子の発現レベルは減少し、細胞周期に含まれる遺伝子のそれら (たとえば、セリン/トレオニン・キナーゼ) は増加した。少数の患者については、小規模の針生検、及びマイクロアレイ上の限定的な数の遺伝子からの電位変動、重度・軽度の線維化間の差異は達成することができなかった。

40

【0021】

より大きな研究では、B型肝炎 (n = 7) 及びHCV (n = 11) 感染、遺伝性ヘモクロマトーシス (n = 3)、ウィルソン病 (n = 5)、アルコール性肝臓疾患 (n = 10)、原発性胆汁性肝硬変症 (n = 16)、及び自己免疫性肝炎 (n = 7) による肝硬変の59人の患者からの肝臓組織が、8,400個の遺伝子のマイクロアレイで研究された (Ki

50

m, J. W. et al (2004) *Hepatology* 39 (2) : 518-527)。患者は肝細胞癌を進展させるリスクによって、肝炎、血色素沈着症及びウイルソン病の者を高リスク・グループに他の原因の者を低リスク・グループとしてグループ化された。556個の遺伝子群が、それらのグループ間で差別的であった。メタロチオネイン1B、メタロチオネイン1E、メタロチオネイン1L、セルロプラスミン、ATP結合カセットA1、カルシウム・チャンネル・ベータ3サブユニット、タンパク質S、カルボキシペプチダーゼB2、抗トロンピンIII、組織因子阻害因子、ミッドカイン、補体成分6、補体成分9、及びCD5抗原様は、最も有意な差別的遺伝子の中にあつた。肝臓癌腫遺伝子発現データとの対比によって、273個の遺伝子の共通セットが明らかになった。

【0022】

HCVに感染した硬変した肝臓に関する別の研究が、正常の肝臓と比較して、約13,600個の遺伝子のマイクロアレイを用いて実行された (Anders, R. A. et al. (2003) *Am. J. Pathol.* 162 (3) : 991-1000)。加えて、遺伝子発現における正常の生理学的なバリエーションを判定するために、正常の複数の肝臓サンプルが相互に比較された。あるグループの遺伝子は、ストレス、急性期免疫反応、及び肝臓の星細胞活性化に関連したものを含め、正常の肝臓において可変の発現を示すことが分かった。肝細胞癌に関連した遺伝子だけでなくこれらの遺伝子も、硬変した肝臓において差別的に発現した遺伝子のセットから除外された。遺伝子セットは、活性化リンパ球及び活性化された肝臓マクロファージにおいて発現したHCVに感染した硬変症の肝臓遺伝子、細胞外マトリックスのリモデリングに含まれる遺伝子、Bcl-2信号の抗アポトーシス経路と関係する遺伝子、並びにインターフェロン反応及びウイルス宿主相互作用に関連した遺伝子に関連する。

【0023】

進行した末期アルコール誘発肝硬変の7人の男性の患者からのヒト肝臓サンプルが、3600個の遺伝子マイクロアレイを用いて、7つの正常の肝臓と比較された (Seth, D., et al. (2003) *Am. J. Pathol.* 163 (6) : 2303-2317)。平行して、アルコールが与えられたヒト肝臓も解析された。線維形成、異物代謝、炎症、酸化ストレス、細胞信号と関係する遺伝子は、アップレギュレートされた。コラーゲン、マトリックス・メタロプロテアーゼ、マトリックス・メタロプロテアーゼの組織阻害因子、及びアネキシン遺伝子は、ヒトにおいてアップレギュレートされた。

【0024】

American Association for the Study of Liver Diseasesによって後援され、2002年9月20-22日に開催されたSingle Topic Conferenceからのレポートは、脂肪肝疾患を対象とした (Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) *Hepatology* 37 (5) : 1202-1209)。この会議では、NASHの臨床的及び基礎的な側面について議論された。本願に関連する要点は、NASHにおける肝生検のための一般的に認識された見解の欠如、及び肝酵素は感度が鈍く、NASHの診断を確認するためにも線維化の程度を段階分けするためにも信頼して用いることができないということを含む。会議報告書は、次のように結論した：「将来の研究アジェンダには、NASHにおけるインスリン抵抗性及び異常なリポタンパク代謝の役割を解明すること、細胞の障害の病因を決定すること、素因的遺伝的異常を説明すること、疾患に係るよりよい非侵襲性の予測因子を同定すること、及び有効な治療法を示すことが含まれる。」

【0025】

したがって、NASHのための非侵襲性の診断検査法及びNASHの治療法のための標的に対する大きなニーズが、当該技術分野に存在する。

【0026】

【非特許文献1】 Thomas, M. B. and A. X. Zhu (2005) *J. Clin. Oncol.* 23 (13) : 2892-2899

10

20

30

40

50

- 【非特許文献2】Clark, J. M. and A. M. Diehl (2003) JAMA 289 (22): p. 3000 3004
- 【非特許文献3】Brunt, E. M. et al. (1999) Am. J. Gastroenterol. 94 (9): p. 2467 2474
- 【非特許文献4】Neuschwander Tetri, B. A. and S. H. Caldwell (2003) Hepatology, 37 (5): 1202 1209
- 【非特許文献5】Garg, A. (2000) Am. J. Med. 108 (2): 143 152
- 【非特許文献6】Propst, A. et al. (1995) Dig. Dis. Sci. 40 (8): 1805 1815 10
- 【非特許文献7】Struben, V. M. et al. (2000) Am. J. Med. 108 (1): 9 13
- 【非特許文献8】Day, C. P. and O. F. James (1998) Gastroenterology 114 (4): 842 845
- 【非特許文献9】Agrawal, S. and H. L. Bonkovsky (2002) J. Clin. Gastroenterol. 35 (3): 253 261
- 【非特許文献10】Sanyal, A. J. (2001) Am. J. Gastroenterol. 96 (2): 274 276
- 【非特許文献11】Caldwell, S. H. et al. (2004) Clin. Liver Dis. 8 (3): 595 617 20
- 【非特許文献12】Koteish, A. and A. Mae Diehl (2002) Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 16 (5): 679 690
- 【非特許文献13】Garg, A. and A. Misra (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 (7): 3019 3022
- 【非特許文献14】Cortez Pinto, H. et al. (1999) JAMA 282 (17): 1659 1664
- 【非特許文献15】Caldwell, S. H. et al. (1999) J. Hepatol. 31 (3): 430 434
- 【非特許文献16】Mansouri, A. et al. (1997) J. Hepatol. 27 (1): 96 102 30
- 【非特許文献17】Van Remmen, H. and A. Richardson (2001) Exp. Gerontol. 36 (7): 957 968
- 【非特許文献18】Bataller, R. and D. A. Brenner (2005) J. Clin. Invest. 115 (2): 209 218
- 【非特許文献19】Thomas, M. B. and A. X. Zhu (2005) J. Clin. Oncol. 23 (13): 2892 2899
- 【非特許文献20】Zafarani, E. S., (2004) Virchows Arch. 444 (1): 3 12
- 【非特許文献21】Thampanitchawong, P. and T. Piratvisuth (1999) World J. Gastroenterol. 5 (4): p. 301 304 40
- 【非特許文献22】Regev, A. et al. (2002) Am. J. Gastroenterol. 97 (10): 2614 2618
- 【非特許文献23】Younossi, Z. M. et al. (2005) Liver Int. 25 (4): 760 771
- 【非特許文献24】Sreekumar, R. et al. (2003) Hepatology 38 (1): 244 251
- 【非特許文献25】Shao, R. X. et al. (2005) World J. Gastroenterol. 11 (13): 1995 1999 50

【非特許文献26】Kim, J. W. et al (2004) Hepatology 39 (2) : 518 527

【非特許文献27】Anders, R. A. et al. (2003) Am. J. Pathol. 162 (3) : 991 1000

【非特許文献28】Seth, D., et al. (2003) Am. J. Pathol. 163 (6) : 2303 2317

【発明の開示】

【0027】

本発明は、NASHの発現及び進行と高い相関を有する、NASHに関連した遺伝子のパネルを提供する。そのため、本発明はNASHに関連する遺伝子のパネルを備える診断ツールを提供し、そのパネルは表1に示される遺伝子から選択された少なくとも2つの遺伝子を備える。いくつかの実施形態において、該パネルは少なくとも1つのsmall inducible cytokineを備える。いくつかの実施形態において、該small inducible cytokineは、CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6から成るグループから選択される。いくつかの実施形態において、該パネルは少なくともSCYA20を又は少なくともCCL19を備える。一実施形態において、該パネルはCCL19のみである。別の一実施形態において、該パネルはSCYA20のみである。

10

【0028】

本発明は、正常の患者と比較して、NASHに関連する遺伝子のパネルの少なくとも1つの発現レベルを判定することにより、NASHを診断する方法を提供する。その発現レベルは、核酸レベル又はアミノ酸レベルで判定することができる。いくつかの実施形態において、表1から選択された多数の遺伝子の発現レベルが用いられる。いくつかの実施形態において、該パネルは、small inducible cytokines (CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6)の少なくとも1つを含む。いくつかの好適な実施形態において、該パネルにおける遺伝子の発現は血液ベースのアッセイにおいて判定され、遺伝子の発現レベルは患者から受け取られた血液のサンプルにおいて判定される。NASHに関連した遺伝子の発現レベルは、正常なレベルの遺伝子の発現と比較される。ここで示されるように、いくつかの遺伝子の高い発現が、NASHの発生率と相関する。一実施形態において、CCL19の発現レベルは正常なCCL19発現と比較され、発現の増加はNASHと相関する。他の実施形態において、SCYA20の発現レベルは正常なSCYA20発現と比較され、発現の増加はNASHと相関する。

20

30

【0029】

本発明は、また、NASHに関連した遺伝子の発現又は活性を調節することにより、NASHを治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、遺伝子発現は増加される。他のいくつかの実施形態において、遺伝子発現は減少される。他のいくつかの実施形態において、発現のレベルは修飾されないが、タンパク質プロダクトの活性が、そのタンパク質のためのレセプタの調節により又は細胞間のシグナリングを乱すことにより変更される。いくつかの実施形態において、発現レベルは治療によって減少される。いくつかの実施形態において、表1における少なくとも1つの遺伝子の遺伝子発現レベルが、治療によって減少される。いくつかの実施形態において、表1から選択された複数の遺伝子の発現レベルが、治療によって減少される。いくつかの実施形態において、small inducible cytokines (CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6)の少なくとも1つの発現レベルが、治療によって減少される。いくつかの実施形態において、CCL19の発現レベルが減少される。いくつかの実施形態において、SCYA20の発現レベルが減少される。

40

【0030】

本発明に係る該治療法において、タンパク質又はそのレセプタの発現又は生物活性を抑制するために治療で用いられる化合物は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、モルホリノ・オリゴヌクレオチド、RNAi、抗体、抗体フラグメント又は小さな分子を含む(こ

50

れらに限定されない。) 阻害因子である。

【0031】

本発明は、また、NASHを治療するか又はNASHの進行を遅くするのに有用である化合物を発見する方法を提供する。該方法は、表1からの少なくとも1つのタンパク質を試験物質とコンタクトさせることを含み、該試験物質が表1のタンパク質又はそのレセプタに結合するかを判断する。そのようなアッセイはインビトロでなされても良いし、細胞ベースのアッセイであっても良い。さらに、本発明の当該方法において、試験物質はタンパク質又はそのレセプタの生物活性を抑制すると細胞ベースのアッセイにおいて判定することができ、これによりNASHの治療に有用である化合物であると同定される。

【0032】

本発明は、また、核酸ベースの試験又はタンパク質ベースの試験でありうる、患者のサンプル(好ましくは血液)からNASHを診断するためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、該キットは、NASH関連のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに結合する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、該キットは、少なくとも1つのNASH関連のタンパク質に特異的に結合する、少なくとも1つの抗体又は抗体の抗原結合部を含む。いくつかの実施形態において、NASH関連のタンパク質は、あるsmall inducible cytokineである。他のいくつかの実施形態において、NASHに関連するタンパク質は表1からの少なくとも1つのタンパク質である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

本明細書で参照されるGenBankデータベース配列への受入番号を含め、参照される業績、特許、特許出願、及び科学文献は、当業者の知識を確認するものであり、各々が引用によって組み入れられるべく具体的かつ個別的に示されるのと同程度に、引用により全体としてここに組み入れられる。ここで引用される文献と本明細書の特定の教示との間に矛盾がある場合には、後者の利益になるように解決されることとする。

【0034】

種々の定義が本文書を通してなされる。殆どの語は、当業者によってそれらの語に帰せられる意味を有する。以下において又は本書類の他の箇所において具体的に定義される語は、全体として本発明の文脈において与えられ、当業者によって典型的に理解されるような意味を有する。ある語又は熟語の技術的に理解される定義と、その語又は熟語について本明細書において具体的に教示される定義との間に矛盾が生じた場合には、後者の利益になるように解決されることとする。本明細書に使用される見出しは便宜上のものであり、限定するものとして解されるべきでない。

【0035】

当業者には既知である組み換えDNA技術の一般原理を記述している標準的な参考業績には、Ausbel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1998; Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2D ED., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989; Kaufman et al., Eds., HANDBOOK OF MOLECULAR AND CELLULAR METHODS IN BIOLOGY AND MEDICINE, CRC Press, Boca Raton, 1995; McPherson, Ed., DIRECTED MUTAGENESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press, Oxford, 1991が含まれる。

【0036】

ここで用いられるように「NASH」は非アルコール性脂肪性肝炎を意味し、実施可能性に関する如何なる特定の理論と結合することを望むことなく、NASHに関連するとして

10

20

30

40

50

ここで議論される遺伝子は、炎症、線維化、脂肪肝及び肝硬変のようなNASHの1又は2以上の構成要素と関連すると考えられる。

【0037】

ここで用いられるように、「単離される」とは、物質がその最初の環境（たとえば、それが自然に存するのであれば、自然環境）から除去されることを意味する。たとえば、生きている動物中に現れる自然に存在しているポリヌクレオチド又はポリペプチドは単離されていないが、自然システム中に共存する物質の全部又は一部から単離された同一のポリヌクレオチド又はポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの一部であってもよく、及び/又はそのようなポリヌクレオチド若しくはポリペプチドは組成物の一部であってもよく、そしてそのようなベクター若しくは組成物がその自然環境の一部でない場合にはなお単離されてもよい。

10

【0038】

「精製された」又は「十分に精製された」ポリヌクレオチド又はポリペプチドとは、生来の（又は野生型の）核酸又はポリペプチドが自然に随伴する他の細胞成分から、及び/又は他の不純物（たとえば、アガロースゲル）から十分に分離されることをいう。精製されたポリペプチド又はタンパク質は、サンプルの約60%～99%w/w以上を備え、約90%、約95%、又は約98%の純度であってもよい。

【0039】

ここで用いられる「約」とは、基準値の+/-10%を指す。

【0040】

ここで用いられるように、「バリエーション」核酸又はアミノ酸配列とは、たとえば、関心のある配列のイソ型、種変異体、対立遺伝子変異体、及びフラグメントを含む、相同体を指す。「相同性ヌクレオチド配列」若しくは「相同性アミノ酸配列」、又はその変異体とは、基準配列、又は機能的ドメインをコードしているか若しくは有するその部分若しくはフラグメントに関して、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、より好ましくは100%のパーセンテージ同一性（ポリヌクレオチドに関する場合）又は相同性（ポリペプチドに関する場合）によって特徴付けられる配列を指す。相同性とは、基準アミノ酸配列の、同類若しくは非同類のアミノ酸置換又は同類及び非同類のアミノ酸置換の双方との許容性の、割合的同一性を意味する。

20

30

【0041】

NASHに関連した核酸又はタンパク質の、すなわちNASHの調節ないし改善のための標的に対する抗体の「治療学的有効量」という用語は、肝臓において、すなわち血漿において（全身的に投与される場合）治療学的に有効なレベルを達成かつ維持して、NASHを抑制するように計算された量を意味する。もちろん、治療学的用量は、各アゴニスト又はアンタゴニストの効力、また、身体による及び/又は血漿におけるアゴニスト又はアンタゴニストの排除又は代謝の速度により変化するであろう。また、治療学的用量は、治療の任意の組合せ療法を増進するであろうアゴニスト又はアンタゴニストの量に適合する。

40

【0042】

ここで用いられるように、「分析物」とは検出すべき物質である。それは、核酸（例えば、DNA又はRNAそれらの断片）、タンパク質、タンパク質断片、ペプチド、代謝物質などである。

【0043】

実施例に記載されているように、いくつかの遺伝子は、遺伝子プロファイリングによってNASHに関連することが明らかになった。本発明の方法に有用である遺伝子には、限定するものでないが、small inducible cytokines、コラーゲン、マトリックスG1aタンパク質、IL-8、EGF含有fibulin様細胞外マトリックスタンパク質1（例えば、表1に示される遺伝子）が含まれる。

50

【0044】

身体においてNASH状態の存在を検出するために、複数の遺伝子の複数のパネルを選択してもよい。パネルにおける遺伝子の配置構成は表1における遺伝子の少なくとも1つかもしれない。たとえば、IL 8がパネルにある場合、そのパネルは表1の少なくとも1つの他の遺伝子を備えるというように、表1の遺伝子とそれらの遺伝子の任意のサブセットの総数を含め、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つの遺伝子等々、表1から選択された任意の合計数の遺伝子であってもよい。

【0045】

いくつかの実施形態において、パネルは、small inducible cytokinesである遺伝子を備える。たとえば、限定するものでないが、パネルは、small inducible cytokine Subfamily A, members 19 (CCL19), 20 (SCYA20又はCCL20), 21 (SCYA21)と、small inducible cytokine Subfamily B, member 6 (CXCL6)とから選択された少なくとも1つのsmall inducible cytokineを備える。

10

【0046】

いくつかの実施形態において、パネルは、例えば、small inducible cytokines、コラーゲン、インターロイキン、マトリクスタンパク質など、遺伝子の同一のファミリーにおける遺伝子を備える。他の実施形態において、パネルは、遺伝子の1つを超えるファミリーからの代表的な遺伝子を備える。さらに別の実施形態において、パネルは、遺伝子のすべてのファミリーからの代表を備える。

20

【0047】

いくつかの実施形態において、パネルは、表1から、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は36個の遺伝子を備える。

【0048】

本発明の遺伝子のパネルは、患者からサンプルを取得し、パネルにおける遺伝子の発現のレベルを判定し、スクリーンの結果と、結果の患者におけるNASHの蓋然性との相関性のため1セットの予め定められた値とを比較することによって、NASHのための診断スクリーンにおいて用いることができる。

30

【0049】

本発明の方法の一実施形態において、患者のサンプルを試薬と接触させ、NASHに関連した遺伝子又は遺伝子産物に対応する、当該サンプル中の分析物の存在が検出される。いくつかの実施形態において、分析物はNASHに関連した遺伝子に対応する核酸であり、制限するものでないが、マイクロアレイ解析(例えば、Affymetrix GeneChip Expressionを使用)、PCR、RT-PCR、核酸ハイブリダイゼーション、核酸保護アッセイ、制限消化プロファイリングなどを含む、核酸の検出及び解析のために知られている任意の方法によって検出することができる。

40

【0050】

本発明の他の実施形態において、患者のサンプルを試薬と接触させ、NASHに関連した遺伝子産物に対応する当該サンプル中の分析物の存在が検知される。いくつかの実施形態において、分析物は、NASHに関連した遺伝子に対応するタンパク質、ペプチド又はタンパク質断片であり、制限するものでないが、免疫測定(ELISA、ウェスタン法、放射免疫検定、蛍光ベースの免疫測定などを含むが、これらに限定されない。)、FPLC解析などを含め、タンパク質の検出及び解析のために知られている任意の方法によって検出することができる。

【0051】

NASHタンパク質の抗体は生成可能であり、抗体は、対応するタンパク質の検出、特性解析又は単離に有用であるとともに、タンパク質の活性を修飾するのに有用でもある。抗

50

体は、免疫原としてヒト又は動物の純化又は組み換えられた受容蛋白又はその断片を用い、標準的な技術によって生成可能である。

【0052】

NASHタンパク質に対するモノクローナル抗体は、たとえば、Esmon, et al. (1993) Methods Enzymol. 222:359-385によって他のタンパク質のために記述されるようにして得ることができる。抗体には、放射ラベリング、酵素ラベリング、フルオレスセイン、金粒子状物質、着色料などの蛍光ラベル等の標準的技術、及び他の抗体検出のための手段を用いてラベルを付けることができる。たとえば、抗体は、標準的な手順を用いて、ビオチンアミドカプロエートN-ヒドロキシスクシンイミドエステルでビオチン化することができる。抗体は、免疫測定での使用のために、又は溶液フェーズ免疫測定での使用のために、たとえばAffiGel 10（登録商標）、ニトロセルロース、マイクロタイタ・ウェルなどの固いサポートに固定することができる。一実施形態において、タンパク質は、実施例4に記載されているようにmAbでコートされた微量定量プレートにおいてELISAアッセイを用いて測定される。

10

【0053】

多くの場合において、当該技術分野において公知の表1における遺伝子又は遺伝子の遺伝子産物の存在を検出するための、当該技術分野における公知の試薬が存在する。遺伝子の配列は公知であり、また、当業者は、遺伝子の存在を検出するプローブないしプライマーとして有用となるオリゴヌクレオチド配列を導き出すために、利用可能なオリゴヌクレオチド予測プログラムの任意のものを用いることができる。加えて、タンパク質及びタンパク質の断片に対する抗体は、遺伝子配列を知っている標準的技術を用いて容易に作製することができる。さらに、該パネルのタンパク質に結合して検出する、当該技術分野において利用可能な抗体のうちの任意のものを、本発明の方法において用いてもよい。

20

【0054】

本発明の方法は、末梢血のスクリーニング（血清又はPBMCの何れかにおける対象遺伝子の発現の存在の検出）に適している。前者の場合において、タンパク質の検出はELISA又は他の具体的で、定量可能な、蛋白質検出方法を用いて行うことができ、肝臓起源であって今は末梢を循環しているであろうタンパク質の検出という利点を有する。如何なる特定の動作原理によって束縛されることを望まずに、SCYA20（CCL20）は肝臓において発現され放出されたタンパク質であると考えられている。そして、その循環レベルは検出してNASHと関連付けることができる（実施例7を参照）。

30

【0055】

他の実施形態において、核酸レベルの遺伝子発現は、PBMCから抽出されたRNA上のリアルタイムPCRのような具体的で、定量可能な方法によって、PBMCにおいて検出される。Taqmanアッセイは、RNAサブストレートで始まる解析のための遺伝子発現を定量する手段として、当該技術分野において周知である。（対象遺伝子によって）増加したか又は減少した発現をNASHの診断を関連付けるべく遺伝子発現を検出して発現レベルを正常のレベルと比較するために、当該技術分野において公知の任意のタイプの正確で、定量可能な解析法を用いてもよい。

40

【0056】

本発明は、また、患者のサンプル（好ましくは血液）からNASHを同定するためのキットを提供する。核酸ベースの試験であっても、タンパク質ベースの試験であってもよい。いくつかの実施形態において、該キットは、NASH関連のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに結合する少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、該キットは、別個のコンテナにおいて、1又は2以上のNASH関連のタンパク質をコードする1又は2以上のポリヌクレオチドを検出するために、複数のプローブを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質はCCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6を含め（これらに限定するものでない。）、small inducible cytokinesである。他の実施形態において、タンパク質は、表1に示されるタンパク質の1又は2以上である。他の実施形態において、該キットは、少なくと

50

も1つのNASH関連のタンパク質に特異的に結合する少なくとも1つの抗体又は抗体の抗原結合部を含む。いくつかの実施形態において、該キットは、別個のコンテナにおいて、1又は2以上のNASH関連のタンパク質を検出するために、複数の抗体又は抗体の抗原結合部（又はそれらの混合物）を含む。いくつかの実施形態において、NASH関連のタンパク質は、CCL19、SCYA20、SCYA21及びCXCL6を含め（これらに限定するものでない。）、small inducible cytokinesである。他の実施形態において、NASHに関連するタンパク質は、表1からの少なくとも1つのタンパク質を含む。該キットは、また、使用のための説明書を含んでいてもよい。

【0057】

本発明は、また、NASHに関連した遺伝子の発現の調節により、あるいはNASHのシグナル経路を変化することにより、患者のNASHを治療しかつ/または予防する方法を提供する。

【0058】

本発明の方法において、本発明の方法によって予測されるようなNASHを有しているか又はNASHを進展させるリスクがある患者を同定し、そして、NASHに関連した少なくとも1つの遺伝子の発現を調節し又はNASHに関連した少なくとも1つの発現されたタンパク質の生物学的活性を変化するために、その患者をレジメンにより治療することができる。ある場合には、そのタンパク質の生物活動の調整は、NASHに関連したタンパク質のための受容体の発現又は機能を変えることにより、達成することができる。一定の実施形態において、調節される遺伝子又はタンパク質は、表1に示されるタンパク質又はその受容体である。いくつかの実施形態において、調節された遺伝子又はタンパク質は、small inducible cytokines又はその受容体である。他の実施形態において、調節される遺伝子又はタンパク質は、CCL19、SCYA20、SCYA21、CXCL6及びその受容体から選択される。

【0059】

NASHに関連した遺伝子の発現を変化する方法は、当該技術分野において知られている任意の手段であってよい。発現を強化するために、インビボ又はエスクビボで患者の細胞へ発現ベクターを導入し、NASHと相関する特定のタンパク質の発現を増加することができる。これは、その発現のレベルが低すぎる場合に行われる。このように、タンパク質の発現の増加によって、NASHの進行又は発症が改善される。2つ以上のポリペプチドをコードする核酸は、同一の発現ベクターに組み入れられてもよいし、別個の発現ベクター上に存在してもよい。細胞の中へのベクターのトランスフェクションは、同時であっても連続であってもよい。1つ又は両方のポリペプチドの制御された発現を可能にするために、複数のポリペプチドの発現は、同一の調節エレメント又は異なる調節エレメントの下で制御されてもよい。あるいは、ポリペプチドの発現は構成的となるようになされてもよい。

【0060】

逆に、NASHと相関する遺伝子が、正常者と比較して高すぎるレベルで発現する場合、そのような患者における遺伝子の発現又は活性を減少するために当該技術分野において既知の種々の方法を用いることができる。たとえば、限定するものでないが、阻害因子を用いて遺伝子の発現を変化することができる。阻害因子は、たとえば、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、モルホリノオリゴヌクレオチド、抑制性（RNAi）、免疫療法（モノクローナル抗体又はアポリクローナル抗体又は抗体フラグメントのいずれか）などである。

【0061】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、動物及びヒトにおける疾病状態の処置において治療上の成分として使用することができる。リボザイムを含むアンチセンス・オリゴヌクレオチド薬物は、ヒトに安全かつ有効に投与されており、多くの臨床試験が現在進行中である。かくして、オリゴヌクレオチドは、細胞、組織及び動物、特にヒト、の処置のための処置法において有用となるように構成可能な有用な治療手段になり得ることが確立される

10

20

30

40

50

。

【0062】

本発明の文脈上、「オリゴヌクレオチド」との用語は、リボ核酸(RNA)若しくはデオキシリボ核酸(DNA)又はそれらの擬似物のオリゴマー若しくはポリマーを指す。この用語は、自然に存在する核酸塩基、糖及びヌクレオシド間(骨格)共有結合からなるオリゴヌクレオチド並びに同様に機能する自然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。そのような改変され又は置換されたオリゴヌクレオチドは、所望の特性、たとえば細胞の取込み増進、核酸標的に対する親和力増進及びヌクレアーゼの存在下での安定性増大のために、しばしば本来の形態物以上に好適である。

【0063】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドが本発明によって熟考されるが、限定されるものではないが下記のようなオリゴヌクレオチド擬似物を含む、他のオリゴマーのアンチセンス化合物もまた含まれる。本発明によるアンチセンス化合物は、好ましくは、約8~約50個の核酸塩基(すなわち、約8~約50個の連結ヌクレオチド)を含む。いくつかの実施態様では、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは約8~約15個の核酸塩基を含む。他の実施態様では、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは約16~約25個の核酸塩基を含む。他の実施態様では、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは約20~約30個の核酸塩基を含む。他の実施態様では、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは約25~約35個の核酸塩基を含む。他の実施態様では、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは約30~約45個の核酸塩基を含む。他の実施態様では、アンチセンス・オリゴヌクレオチドは約40~約50個の核酸塩基を含む。アンチセンス化合物には、標的核酸にハイブリダイズし、そしてその発現を調節する、リボザイム、エクスターナルガイド(external guide)配列(EGS)オリゴヌクレオチド(オリゴザイム)、及び他の短い触媒RNA又は触媒オリゴヌクレオチドを含む。

【0064】

当該技術分野において既知であるように、ヌクレオチドは塩基 糖の組合せである。ヌクレオチドの塩基部分は通常は複素環式塩基である。そのような複素環式塩基の2種の最も典型的なクラスは、プリンとピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖部分に共有結合されたリン酸基をさらに含むヌクレオチドである。ペントフラノシル糖を含むそれらのヌクレオチドでは、リン酸基は糖の2', 3'又は5'ヒドロキシル部分のいずれかに結合することができる。オリゴヌクレオチドの形成では、リン酸基は隣接するヌクレオチドを他のヌクレオチドに共有結合して、直線状ポリマー化合物を形成する。順に、この直線状ポリマー構造物のそれぞれ末端がさらに連結されて、環状構造物が形成されてもよいが、開放された直線状構造物が一般に好適である。オリゴヌクレオチド構造物において、リン酸基は通常、オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間骨格の形成に向けられる。RNA及びDNAの通常の結合又は骨格は、3'~5'ホスホジエステル結合である。

【0065】

本発明において有用である好適なアンチセンス化合物の具体的な例には、修飾骨格又は非天然のヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書で定義されるように、修飾骨格を有するオリゴヌクレオチドには、骨格中にリン原子を保持するもの、及び骨格中にリン原子を有しないものが含まれる。本明細書の目的のためには、また、当該技術分野において時々引用されるように、それらのヌクレオチド間骨格中にリン原子を有しない修飾オリゴヌクレオチドもまたオリゴヌクレオチドであると考えることができる。

【0066】

いくつかの実施態様では、修飾オリゴヌクレオチド骨格は、たとえば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3' アルキレンホスホネート、5' アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含むメチル及び他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3' アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むホス

10

20

30

40

50

ホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、正常な3' - 5'結合を有するセレノホスフェート及びボラノホスフェート、これらの2' - 5'結合類似体、及び1個以上のヌクレオチド間結合が3' ~ 3', 5' ~ 5'又は2' ~ 2'結合である反転極性を有するそれらのものを含む。反転極性を有する好適なオリゴヌクレオチドは、3' 大多数ヌクレオチド間結合における単一の3' ~ 3'結合、すなわち、塩基性であってもよい単一の反転ヌクレオチド残基(核酸塩基が失われているか、又はその代わりにヒドロキシル基を有する)を含む。

【0067】

他の好適なオリゴヌクレオチド擬似物では、両糖及びヌクレオチド間の結合、すなわち、ヌクレオチド単位の骨格が、新規の基により置換される。塩基単位は、適当な核酸標的化合物とのハイブリダイゼーションのために維持される。1つのそのようなオリゴマー化合物、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されたオリゴヌクレオチド擬似物は、ペプチド核酸(PNA)として言及される。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格は、骨格、特にアミノエチルグリシン骨格を含有するアミドにより置換される。核酸塩基は保有され、そして骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合される。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許は、限定されるものではないが米国特許第5,539,082号;同第5,714,331号;及び同第5,719,262号を含み、これらの各々は引用によって本明細書に組み入れられる。PNA化合物のさらなる教示は、Nielsen et al. (1991) Science 254: 1497-1500において見出される。

10

20

【0068】

改変されたオリゴヌクレオチドはまた、1又は2個以上の置換糖部分を含有していてもよい。

【0069】

さらなる改変は、2' ヒドロキシル基が糖環の3'又は4'炭素原子に結合されて、二環式糖部分を形成するLocked Nucleic Acids (LNA)を含む。結合は、好ましくは、2'酸素原子と4'炭素原子を架橋しているメチレン(-CH₂-)_n基[式中、nは1又は2である]であり、そしてその調製はWO98/39352およびWO99/14226に記述されている。

30

【0070】

他の改変は、2' メトキシ(2' - O - CH₃)、2' アミノプロポキシ(2' - O - CH₂CH₂CH₂NH₂)、2' アリル(2' - CH₂ - CH = CH₂)、2' - O - アリル(2' - O - CH₂ - CH = CH₂)及び2' フルオロ(2' - F)を含む。2' - 改変は、アラビノ(up)位置又はリボ(down)位置に存在してもよい。好適な2' アラビノ改変は2' Fである。類似の改変もまた、オリゴヌクレオチドにおける他の位置、具体的には3'末端ヌクレオチドにおける糖の3'位又は2' 5'結合オリゴヌクレオチド及び5'末端ヌクレオチドの5'位において作成されてもよい。またオリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分のような糖擬似物を有してもよい。

40

【0071】

また、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基(しばしば、当該技術分野では単に「塩基」と呼ばれる。)改変物又は置換物を含んでもよい。ここで使用されるように、「未改変」ないし「自然の」核酸塩基は、プリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を含む。改変核酸塩基は、他の合成及び自然の核酸塩基、たとえば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル(-C=C-CH₃)ウラシル及びシトシン及びピリミジン塩基の他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、

50

5 ウラシル(プソイドウラシル)、4 チオウラシル、8 ハロ、8 アミノ、8 チオール、8 ヒドロキシル及び8 置換アデニン及びグアニン、5 ハロ、特に5 ブロモ、5 トリフルオロメチル及び他の5 置換ウラシル及びシトシン、7 メチルグアニン及び7 メチルアデニン、2 F アデニン、2 アミノアデニン、8 アザグアニン及び8 アザアデニン、7 デアザグアニン及び7 デアザアデニン及び3 デアザグアニン及び3 デアザアデニンを含む。さらなる改変核酸塩基は、三環式ピリミジン、たとえばフェノキサジンシチジン(1H ピリミド[5, 4 b][1, 4]ベンゾキサジン 2(3H) オン)、フェノチアジンシチジン(1H ピリミド[5, 4 b][1, 4]ベンゾチアジン 2(3H) オン)、G clamps、たとえば置換フェノキサジンシチジン(たとえば、9 (2 アミノエトキシ) H ピリミド[5, 4 b][1, 4]ベンゾキサジン 2(3H) オン)、カルバゾールシチジン(2H ピリミド[5, 4 b]インドール 2 オン)、ピリドインドールシチジン(H ピリド[3', 2':4, 5]ピロロ[2, 3 d]ピリミジン 2 オン)を含む。また改変核酸塩基は、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環式化合物、たとえば7 デアザアデニン、7 デアザグアノシン、2 アミノピリミジン及び2 ピリドンにより置換されるものを含んでもよい。さらなる核酸塩基は、米国特許第3, 687, 808号に開示されるもの、THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING, pages 858 859, Kroschwitz, J. J., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されるもの、Englisch et al. Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613によって開示されるもの、及びSanghvi, Y. S., Chapter 15, ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, pages 289 302, Crooke, S. T. and Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993に開示されるものを含む。これらの核酸塩基のあるものは、本発明のオリゴマー化合物の結合親和力を増大するために特に有用である。これらは、2 アミノプロピルアデニン、5 プロピニルウラシル及び5 プロピニルシトシンを含む、5 置換ピリミジン、6 アザピリミジン及びN₂, N₆及びO₆置換プリンを含む。5 メチルシトシン置換物は、0.6~1.2 だけ核酸二重らせんの安定性を増強することが示され(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B. eds., ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276 278)、そしてより特別には、2' O メトキシエチル糖改変と組み合わせられた場合、現在、好適な塩基置換物である。

【0072】

本発明のオリゴヌクレオチドの他の改変は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞分配又は細胞取込みを増進する1又は2個以上の部分又は結合物(conjugate)をオリゴヌクレオチドに化学的に結合することを伴う。本発明の化合物は、官能基、たとえば第1又は第2ヒドロキシル基に共有結合された結合基を含んでもよい。本発明の結合基は、インターカレータ、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的性質を増進する基、及びオリゴマーの薬動学的性質を増進する基を含む。典型的な結合基は、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、フォラシン、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、ローダミン、クマリン及び染料を含む。本発明の文脈上、薬力学的性質を増進する基は、オリゴマーの取込みを改良し、分解に対するオリゴマーの抵抗性を増進し、及び/又はRNAとの配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基を含む。本発明の文脈上、薬動学的性質を増進する基は、オリゴマーの取込み、分配、代謝又は排泄を改良する基を含む。結合部分は、限定されるものではないが、脂質部分、たとえばコレステロール部分(Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553 6556)、コール酸(Manoharan et al. (1994) Bioorg. M

ed. Chem. Let. 4:1053 1060)、チオエーテル、たとえばヘキシル S トリチルチオール (Manoharan et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:306 309; Manoharan et al., (1993) Bioorg. Med. Chem. Let. 3:2765 2770)、チオコレステロール (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20:533 538)、脂肪族鎖、たとえばドデカンジオール又はウンデシル残基 (Saison Behmoaras et al., (1991) EMBO J. 10:1111 1118; Kabanov et al., (1990) FEBS Lett. 259:327 330; Svinarchuk et al., (1993) Biochimie 75:49 54)、リン脂質、たとえばジヘキサデシル rac グリセロール又はトリエチルーアンモニウム 1, 2 ジオヘキサデシル rac グリセロ 3 H ホスホネート (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett. 36:3651 3654; Shea et al., (1990) Nucl. Acids Res. 18:377 3783)、ポリアミン又はポリエチレングリコール鎖 (Manoharan et al., (1995) Nucleosides & Nucleotides 14:96 973)、又はアダマンタン酢酸 (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett. 36:3651 3654)、パルミチル部分 (Mishra et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta 1264:229 237)、又はオクタデシルアミン又はヘキシルアミノ カルボニル オキシコレステロール部分 (Crooke et al., (1996) J. Pharmacol. Exo. Ther. 277:923 937)を含む。また、本発明のオリゴヌクレオチドは、活性薬物物質、たとえば、アスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S) (+) プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2, 3, 5 トリヨード安息香酸、フルフェナミン酸 (flufenamic acid)、ベンゾチアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメチシン、バルビタール酸塩、セファロスポリン、サルファ剤、抗糖尿病薬、抗菌剤又は抗生物質に結合されてもよい。

【0073】

所与の化合物の全ての位置について均一に改変されることは必ずしも必要でなく、事実、1を超える前記改変を、オリゴヌクレオチド内の単一の化合物又は単一のヌクレオチドにおいてさえ組み入れてもよい。また本発明はキメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈上、「キメラの」アンチセンス化合物ないし「キメラ」は、各々が少なくとも1個のモノマー単位、すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドから作成された、2個以上の化学的に異なる領域を含有するアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性の増大、細胞取り込みの増大及び/又は標的核酸への結合親和力の増大をオリゴヌクレオチドに与えるようにオリゴヌクレオチドが改変される、少なくとも1つの領域を含有する。オリゴヌクレオチドのさらなる領域が、RNA:DNAまたはRNA:RNAハイブリッドを開裂できる酵素のための基質として働いてもよい。例を挙げれば、RNAアーゼHは、RNA:DNA二重らせんのRNA鎖を切断する細胞エンドヌクレアーゼである。したがって、RNAアーゼHの活性化はRNA標的の切断をもたらし、それによって遺伝子発現のオリゴヌクレオチド抑制の効力を大きく増進する。結果的に、同じ標的領域へハイブリダイズするホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドに比較して、キメラオリゴヌクレオチドが使用される場合、匹敵する結果が、しばしば、より短いオリゴヌクレオチドを用いて得ることができる。RNA標的の切断は、日常的にはゲル電気泳動によって検出でき、必要であれば当該技術分野において既知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術によって検出できる。

【0074】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、前記のような2個以上のオリゴヌクレオチド、改

変オリゴヌクレオチド及び/又はオリゴヌクレオチド擬似物の複合体構造物として形成されてもよい。そのような化合物もまたハイブリッド又はギャップマー (gapmer) として当該技術分野において呼ばれている。

【0075】

本発明に従って使用されるアンチセンス化合物は、便利かつ日常的には、周知の固相法という技術により作成されてもよい。そのような合成の機器は、例えば、Applied Biosystems (フォスターシティ、カリフォルニア州) を含むいくつかの販売元によって販売されている。当該技術分野において既知のそのような合成のための任意の他の手段が、追加的又は代替的に使用されてもよい。ホスホロチオエート及びアルキル化誘導体のようなオリゴヌクレオチドを調製するために類似技術を使用することは周知である。

10

【0076】

本発明のアンチセンス化合物はインビトロで合成され、そして生物学的起源のアンチセンス組成物、又はアンチセンス分子のインビボ合成を指導するように設計された遺伝ベクター構築物を含まない。また本発明の化合物は、取込み、分配及び/又は吸収を助けるために、たとえば、リポソーム、受容体標的分子、経口、肛門、局所又は他の調合物として、他の分子、分子構造物又は化合物の混合物とともに、混合、カプセル化、結合又は他に会合されてもよい。

【0077】

アンチセンス技術の具体的形態はモルホリノ・オリゴヌクレオチドである (Summer ton, J. and D. Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7:187-195; Nasevicius, A. and S. C. Ekker (2000) Nat. Genet. 26:216-220; Yan, Y. K. et al. (2002) Development 129:5065-5079)。モルホリノ・オリゴヌクレオチドは、DNA又はRNAと比較して変更された骨格結合をもつ非イオン性のDNA類似体であるが、相補的配列をもつWatson-Crick塩基対に従う。典型的には、モルホリノは少なくとも長さ約18~25の核酸塩基であり、ある実施態様では、モルホリノは少なくとも長さ約25~30の核酸塩基であり、さらに別の実施態様では、モルホリノは少なくとも長さ約30~35かそれ以上の核酸塩基である。脊椎動物の発生を研究するための道具としてのモルホリノの長さは、Ekker S. C. (2000) Yeast 17:302-306による最近の説に十分記述されており、この開示は引用によって本明細書に組み入れられる。

20

30

【0078】

モルホリノは、RNアーゼHの基質でなく、分解されないRNA-モルホリノハイブリッドを形成する。モルホリノオリゴマーは、配列に特異的な様式で遺伝子発現を明瞭にブロックする。

【0079】

本発明は、NASHに関連した遺伝子のパネルのメンバーの5'非翻訳領域、すなわちNASHに関連したポリヌクレオチド又は遺伝子のスプライス部位を標的とするモルホリノ改変オリゴヌクレオチドを提供する。そのようなモルホリノ改変オリゴヌクレオチドは、1又は2以上のこれらの遺伝子の発現を抑制するのに有効であり、これらの改変オリゴヌクレオチドにより処置された動物におけるNASHの開始又は進行を妨害する。

40

【0080】

モルホリノは高度に無極性である。したがって、改変された又は未改変のモルホリノオリゴは、細胞/組織中にモルホリノオリゴの送達を促進する任意の既知の送達担体/ベクターと組み合わせて投与することができる。

【0081】

本発明の核酸構築物は、当該技術分野において既知の任意の手段によって送達してよい。ある実施態様では、核酸はエキスピボ手段を用いて細胞中に送達される。他の実施態様では、核酸はインビボ手段を用いて細胞中に送達される。

50

【0082】

エクスピボ遺伝子療法では、細胞は、実験操作前に宿主生物、たとえばヒトから除去される。これらの細胞は、次に、当該技術分野において周知の方法を用いてインビトロで核酸がトランスフェクトされる。次いで、これらの遺伝的に操作された細胞が宿主生物中に再導入される。一方、インピボの遺伝子治療アプローチでは、宿主生物からの標的細胞の除去は必要でない。それとは異なり、核酸は、試薬、たとえばリボソーム又はレトロウイルスと複合され、続いて既知の方法を用いて生物内の標的細胞に投与することができる。たとえば、Morgan et al., (1987) Science 237:1476、1987; Gerrard et al. (1993) Nat. Genet. 3:180を参照。

10

【0083】

エクスピボ又はインピボいずれかの遺伝子治療アプローチのために、細胞をトランスフェクトするための数種の異なる方法を使用することができる。これらの既知のトランスフェクション法は、標的細胞中に選ばれた核酸を送達するために使用されるエージェントに従って分類することができる。トランスフェクション作用物には、ウイルス依存性、脂質依存性、ペプチド依存性、及び直接トランスフェクション(「裸DNA」)アプローチが含まれる。トランスフェクションのために使用される他のアプローチには、カルシウム共沈法及び電気穿孔法が含まれる。

【0084】

ウイルスアプローチは、宿主細胞を感染させるために遺伝的に工作されたウイルスを使用し、それによって、外因性核酸により細胞を「トランスフェクトする」。既知のウイルスベクターには組換えウイルスがあり、その例は既に開示されている。たとえば、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス及びレトロウイルスがある。そのような組換え体は、プロモータやエンハンサエレメントの制御下で異種の遺伝子を担持でき、ベクターで感染された宿主細胞においてそれらの発現を惹起することができる。ワクシニア及び他の種類の組換えウイルスは、Mackett et al. (1994) J. Virol. 49:3によって概説されている。また、Kotani et al. (1994) Hum. Gene Ther. 5:19も参照されたい。

20

【0085】

リボソームなどの非ウイルスベクターもまた、遺伝子治療における核酸送達のための媒介物として使用されてもよい。ウイルスベクターに比較して、リボソームは安全であり、比較的高い能力を有し、比較的低い毒性であり、種々の核酸に基づく分子を送達でき、そしてかなり非免疫原性である。参照、Felger, P. L. and Ringold, G. M., (1989) Nature 337:387-388。これらのベクターの中では、カチオン性リボソームが、インビトロの哺乳動物細胞トランスフェクションの媒介におけるそれらの有効性により最も研究されている。リポフェクション(lipofection)として既知の1つの技術は、核酸及び細胞へのトランスフェクションを促進するカチオン性脂質から作成されるリポプレックス(lipoplex)を使用する。脂質/核酸複合体は、原形質又はエンドソーム膜を融合するか、さもなくば破壊し、そして細胞中に核酸を移送する。リポフェクションは、典型的には、リン酸カルシウムトランスフェクション法よりも細胞へのDNAの導入において一層効率的である。Chang et al., (1988) Focus 10:66。

30

40

【0086】

1つの既知タンパク質依存のアプローチは、核酸と混合されたポリリジンの使用を伴う。ポリリジン/核酸複合体は、次いで侵入のために標的細胞に曝露される。参照、たとえば、Verma and Somia (1997) Nature 389:239; Wolff et al. (1990) Science 247:1465。

【0087】

「裸のDNA」トランスフェクションアプローチは、核酸がインピボで直接投与される方法を伴う。参照、Germanらへの米国特許第5,837,693号。核酸の投与は、

50

筋肉又は皮膚のような、器官における組織の間質空間中への注入、血流中、所望の体腔中への直接導入によって、あるいはまた吸入によって実施できる。これらの所謂「裸のDNA」アプローチでは、核酸は注入されるか、さもなくばいかなる補助剤もなしに動物と接触される。体組織、たとえば骨格筋又は皮膚中へ直接、遊離の（「裸の」）プラスミドDNAの注入がタンパク質の発現をもたらすことが報告されている。参照、Ulmer et al. (1993) Science 259: 1745-1749; Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4157-4160; Raz et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9519-9523。

【0088】

電気穿孔法は別のトランスフェクション法である。参照、Szoka, Jr. への米国特許第4,394,448号及びHauserへの米国特許第4,619,794号。種々の動物及び植物細胞への短い高電圧電気パルスの印加により、原形質膜にナノメートルサイズの孔が形成される。DNAは、これらの小孔を通して又は孔の閉鎖を伴う膜構成成分の再分配の結果として細胞原形質中に直接侵入することができる。

【0089】

本発明のNASHに関連した核酸分子、ポリペプチド（タンパク質の細胞透過性改変バージョンを含む）、及びNASHに関連した抗体（ここでは「有効成分」としても参照される）、並びにその誘導体、フラグメント、類似体及び同族体は、投与のために適当な治療学的に有効な量において薬剤組成物中に組み入れることができる。そのような組成物は、典型的には、核酸分子、タンパク質又は抗体及び製薬学的に許容され得る担体を含む。ここで使用されるように、「薬剤学的に許容され得る担体」は、製薬学的投与に適合する、いずれか及び全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤などを含むことを意図している。適当な担体は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、当該分野における標準的参考テキストの最新版に記述されており、これは参照により本明細書に組み入れられる。そのような担体又は賦形剤の好適な例は、限定されるものではないが、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液及び5%ヒト血清アルブミンを含む。リポソーム及び非水性媒質、たとえば不揮発油がまた使用されてもよい。製薬学的活性物質のためのそのような媒質及び作用物の使用は当該技術分野においては周知である。いずれか慣用の媒質又は作用物が活性化化合物と適合しない限りそれを除いて、組成物におけるその使用が考えられる。補足的な活性化化合物がまた組成物中に組み入れられてもよい。

【0090】

本発明の薬剤組成物は、その意図される投与経路に適合するように調合される。投与経路の例は、非経口的、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（たとえば、吸入）、経皮（局所的）、経粘膜及び肛門投与を含む。非経口、皮内又は皮下適用のために使用される液剤又は懸濁剤は次の成分を含む：無菌希釈剤、たとえば注射用の水、無菌食塩水、不揮発油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒；抗菌剤、たとえばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、たとえばアスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、たとえばエチレンジアミン四酢酸；バッファー、たとえば酢酸、クエン酸又はリン酸塩、及び等張性調節用作用物、たとえば塩化ナトリウム又はデキストロース。pHは、酸又は塩基、たとえば塩酸又は水酸化ナトリウムにより調節することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨て注射器又はガラス又はプラスチック製の多用量バイアル中に封入することができる。

【0091】

注射用途のために適当な製薬学的組成物は、無菌の水性液剤（ここでは水溶性）または分散剤、及び無菌の注射用液剤又は分散剤の即席調製のための無菌散剤を含む。静脈内投与では、適当な担体は、生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor EL（商標）（BASF, パーシッパニー, ニュージャージー州）又はリン酸バッファー食塩水（PBS）を含む。すべての場合において、組成物は無菌であらねばならず、そして容易に注射

10

20

30

40

50

可能である程度に流体でなければならない。それは、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならない。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの適当な混合液を含有する溶媒又は分散媒質であってもよい。適当な流動性は、たとえば、レシチンのようなコーティングの使用、分散剤の場合に要求される粒径の維持及び界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用防御は、種々の抗菌及び抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に等張剤、たとえば、糖、マンニトールのようなポリアルコール、ソルビトール及び塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。

注射用組成物の遅延吸収は、吸収を遅らせる作用物、たとえばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物中に含むことによってもたらされる。

10

【0092】

無菌の注射用液剤は、要求される先に列挙された成分の1種又は組合せ物を含む適当な溶媒中に要求される量において有効成分を組み入れ、続いて無菌ろ過によって調製できる。一般に、分散剤は、基剤の分散媒質及び先に列挙されたものからの要求される他の成分を含有する無菌媒質中に活性化化合物を組み入れることによって調製される。無菌注射用液剤の調製のための無菌分散剤の場合には、調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、これらは、予め無菌濾過された溶液から、有効成分に加えて任意のさらに所望の成分の粉末を生成する。

20

【0093】

経口組成物は、一般に、不活性な賦形剤及び食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセル中に封入されるか又は錠剤に圧縮することができる。経口的治療投与の目的では、活性化化合物は添加物とともに組み入れられ、そして錠剤、トローチ剤又はカプセル剤の形態で使用することができる。また経口組成物は、口内洗浄液としての使用のために流体担体を用いて調製されてもよく、この場合、流体担体中の化合物は、経口的に適用され、ウガイをして吐き出されるか又は飲み下される。製薬学的に適合する結合剤及び/又は補助材料は組成物の一部として含まれてもよい。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは任意の次の成分又は類似の性質をもつ化合物を含有してもよい：結合剤、たとえば微結晶セルロース、トラガカントガム又はゼラチン；添加物、たとえば澱粉又はラクトース、崩壊剤、たとえばアルギン酸、Primogel又はコーンスターチ；滑沢剤、たとえばステアリン酸マグネシウム又はSterotes；滑り剤、たとえばコロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、たとえばスクロース又はサッカリン；又は香味剤、たとえばペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジフレーバ。

30

【0094】

吸入による投与では、化合物は、適当な噴射剤、たとえば二酸化炭素のような気体を含有する加圧容器又はディスペンサ、又はネブライザーからのエアゾル噴霧の形態で送達される。

【0095】

また、全身投与は、経粘膜又は経皮手段によるものであってもよい。経粘膜又は経皮投与のためには、透過されるべきバリアーに適する浸透剤が調合物において使用される。そのような浸透剤は、一般に当該技術分野において既知であり、たとえば、経粘膜投与では、洗剤、胆汁塩及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻内噴霧剤又は坐剤の使用によって達成できる。経皮投与では、活性化化合物は、当該技術分野において一般に既知の軟膏剤、膏薬、ゲル剤又はクリーム剤に調合される。

40

【0096】

また化合物は、坐剤（たとえば、ココアバター及び他のグリセリドのような慣用の坐剤基剤を用いて）又は直腸送達のための保持浣腸剤の形態で調製されてもよい。

【0097】

一実施態様では、活性化化合物は、たとえばインプラント及び微小内包送達システムを含む

50

徐放性調合物などの、身体からの急速な排除に対して化合物を保護するであろう担体とともに調製される。生体分解性、生体適合性ポリマー、たとえばエチレンビニルアセテート、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル及びポリ乳酸が使用されてもよい。そのような調合物の製造方法は、当業者には明らかである。また材料はAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販品を得ることができる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含有する感染細胞に対して標的化されたりリポソームを含む）もまた、製薬学的に許容され得る担体として使用できる。これらは、たとえば、米国特許第4,522,811号に記述されるような当業者に既知の方法に従って製造することができる。

10

【0098】

投与の容易さ及び用量の均一性のために用量単位形態物において経口又は非経口組成物を調合することは特に得策である。ここで使用されるような用量単位形態物は、処置される被験者のために単位用量として適合された物理的に区別された単位物を指し；各単位物は、要求される製薬学的担体と合わせて所望される治療効果を生じるように計算された活性化化合物の予定量を含有する。本発明の用量単位形態物に関する詳細は、活性化化合物の独特な特性及び達成されるべき特定の治療効果、並びに個人の処置のためにそのような活性化化合物を調合することの技術上固有の制約によって指示され、そしてそれらに直接依存する。

20

【0099】

本発明の核酸分子はベクター中に挿入され、そして遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、たとえば、静脈内注射、局所投与（参照、米国特許第5,328,470号）又は定位注射（参照、たとえば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057）によって被験者に送達できる。遺伝子治療ベクターの薬剤調製物は、許容できる賦形剤中に遺伝子治療ベクターを含むか、又は遺伝子送達担体が包埋されている徐放性マトリックスを含むことができる。あるいはまた、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトに生産できる、たとえばレトロウイルスベクターの場合は、薬剤調製物は、遺伝子送達システムを生産する1種以上の細胞を含むことができる。

30

【0100】

薬剤組成物は、投与についての指示書とともに、容器、包装物又はディスペンサ中に包含されてもよい。

【0101】

本発明の別の側面は、NASHの開始及び/又は進行に関連したタンパク質に結合する化合物又はタンパク質をコードする核酸分子を同定する方法に関する。一実施形態において、該方法は、NASHに関連したタンパク質又はNASHに関連したタンパク質をコードするポリヌクレオチドと試験化合物とを接触させ、その試験化合物がNASHに関連したタンパク質又はポリヌクレオチドに結合するかどうか判断することを備える。

いくつかの実施形態において、NASHに関連した当該タンパク質は、表1のグループから選択された少なくとも1つのタンパク質である。

40

【0102】

結合は、限定されるものではないがゲルシフトアッセイ、ウエスタン・ブロット、放射能標識競合アッセイ、ファージに基づく発現クローニング、クロマトグラフィーによる同時分画、共沈、架橋、相互作用トラップ(trap)/2 ハイブリッド解析、サウスウエスタン解析、ELISAなどを含む、当該技術分野において既知のいかなる結合アッセイによっても決定することができ、これらは、たとえば、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1999, John Wiley & Sons, N.Y. に記述されている。そのような試験において使用されるポリペプチド又はポリヌクレオチドは、溶液中で遊離であっても、固体支持体に接着されていても、細胞内に局在していても、細胞画分と会合されていてもよい。本発明の一実施態様では、

50

C X C R 4、L E C 3 又は E D N R A に対して適当な結合親和力を有する化合物の高処理能スクリーニング(「H T S」)が用いられる。多数の試験化合物が N A S H に関連した 1 又は 2 以上の固定化されたタンパク質に曝露されてもよい。結合されたタンパク質が、次に当該技術分野において周知の方法によって検出される。

【0103】

標的タンパク質のリガンドを同定するその他の方法は、W i e b o l d t e t a l . , A n a l . C h e m . , 6 9 : 1 6 8 3 1 6 9 1 (1 9 9 7) において記述されている。この技術は、標的タンパク質への結合について溶液相において同時に 2 0 ~ 3 0 の作用物の組み合わせライブラリをスクリーニングする。フィルタ上に保持されている標的タンパク質に特異的に結合する作用物は、続いて標的タンパク質から遊離され、H P L C 及び空気圧によるエレクトロスプレー(イオンスプレー)イオン化質量分光法によって分析される。この手法は、標的タンパク質に対する最大親和力をもつライブラリ構成成分を選択し、かつ低分子ライブラリのために特に有用である。

10

【0104】

本発明の他の実施態様は、抗体に基づく競合スクリーニングアッセイの使用を含む。一実施態様では、N A S H に関連したタンパク質を結合する特異的な中和抗体が、N A S H に関連したタンパク質への結合について試験化合物と特異的に競合する。この方式では、抗体は、N A S H に関連したタンパク質とともに 1 種以上の抗原決定基を共有するいずれかのペプチドの存在を決定するために使用することができる。そのような結合の研究は、標識された抗体及び/又は標識された試験化合物を使用してもよい。そのような手法の例は、たとえば、L i n , A . H . e t a l . (1 9 9 7) A n t i m i c r o b i a l A g e n t s a n d C h e m o t h e r a p y 4 1 (1 0) : 2 1 2 7 2 1 3 1 において見出すことができる。

20

【0105】

本発明の別の側面は、N A S H に関連したタンパク質の生物学的活性を調節する(すなわち、増大させ又は減少させる)化合物を同定する方法に関する。そのような方法は、試験化合物と N A S H に関連した少なくとも 1 つのタンパク質を接触させ、化合物が、試験化合物の不在下での N A S H に関連したタンパク質の活性に比較して、ポジティブ(アゴニスト)又はネガティブ(アンタゴニスト)な方式で N A S H に関連した 1 又は 2 以上のタンパク質の生物学的活性に影響を与えるか否かを決定することを含む。表 1 の遺伝子については、目的は、これらの遺伝子の増加した発現が N A S H の表現型に関連するように、これらの遺伝子の発現を減少させることである。

30

【0106】

いくつかの実施形態では、N A S H に関連したタンパク質の発現又は生物学的活性を調節する化合物は、試験化合物が、N A S H に関連したタンパク質を発現するか又は N A S H に関連したタンパク質をコードするポリヌクレオチドを有する細胞とともにインキュベートされ、そして試験化合物が N A S H に関連したタンパク質の発現又は生物学的活性に及ぼす効果を決定する、インビトロの細胞アッセイにおいて同定されてもよい。そのようなポリヌクレオチド、タンパク質又は活性のモジュレータは、N A S H 治療において治療学的に有用であろう。インビトロで発現又は生物学的活性を調節すると同定された化合物は、関連する有効な活性を確認するためにインビボにおいてさらに試験してもよい。

40

【0107】

本発明によって考慮される試験化合物は、天然生産物及び/又は組合せ化学合成からの合成生成物を含む、化学ライブラリからの化合物を含む。そのような化合物は、ランダムペプチド、オリゴヌクレオチド又は有機分子を含んでもよい。

【0108】

以下に示す実施例は、本発明を具体的に説明するためにのみあり、いかなる点においても本発明を限定するものと考えてはならない。

実施例

実施例 1

50

A．NASHに関連する遺伝子の同定

【0109】

ゲイシンガークリニックでの包括的体重管理クリニック（Comprehensive Weight Management Clinic）における現在進行中の肥満に関する臨床調査プログラムからの患者サンプル及び対応する臨床データを、本研究において用いた。

1．肥満に関する臨床調査プログラム

【0110】

基本的には、ゲイシンガーでの包括的体重管理クリニックの肥満手術プログラム（Bariatric Surgery Program）に登録されているすべての患者を、肥満とNASHに関するIRBにより承認された研究計画へ募集した。次の組入基準と除外基準を用いた。

A．組入基準：

【0111】

NIH基準に基づいた胃バイパス外科手術に相応しい適当な患者；睡眠時無呼吸と高血圧症を含む2つの合併症を備えた肥満指数すなわちBMI > 40の者；合併症のないBMI > 45の者。

B．除外基準：

【0112】

重度の心理的禁忌の患者；前後外科手術推奨基準に適合しない患者；すなわち、年齢 < 21又は > 60；妊婦；5年以内に致命的となるであろうと予想される関連する腫瘍の存在がある者；明白な炎症性の疾患（例えば肝炎、感染、結合組織病）のある者；リポジストロフィー、ペルオキシゾーム疾患、ミトコンドリアオーパシズ、ウェーバークリスチャン病、ウィルソン病、工業溶剤被曝、薬物投与（アミオダロン、タモキシフェン、ヌクレオシド・アナログ、及びメトトレキサート）、セリアック病、及び無リポ蛋白血症を含む、NASHを誘発する症状の履歴がある者。ウイルス性肝炎又はアルコール中毒の履歴がある者（線維化のウイルス性又は代謝性の原因を除外する試験を、肝生検で線維化の患者に後で行なう。）。

【0113】

その肥満手術プログラムに登録されている患者は、6～8か月の前手術評価と準備期間を経る。医師スタッフとの初期診察には、包括的な病歴及び健康の診断、個別化された食事指示、行動修正モジュールのレビュー、Med Gemによる代謝速度判定、並びに身体活動処方が含まれる。疾患詳細、及びケア検体検査の基準を得る。たとえば、トリグリセリドおよび総コレステロール、HDL、LDL、ヘモグロビンA1C、インスリン、グルコース、アルブミン、総ビリルビン、直接型ビリルビン、アルカリ性ホスファターゼ、AST、ALT、全蛋白量、TSH、ビタミンD、亜鉛、鉄、TIBC、フェリチン、PTH、フォラシン、コルチゾール、TSHが含まれる。また、テストステロン/エストロゲン/プロゲステロンのレベルや種々の挙動的・食事的調査も得る。Roux en Y胃バイパスでは、標準的なケアとして肝生検が慣例的に行われる。この既に摘出された生検から、約3分の1（0.5mm x 0.5mm x 10mm）は直ちに分離され、追って研究使用のためにRNAにストアされる。6か月後、手技により；肝機能、任意の疾患具体的な検体検査（すなわち血糖、脂質プロファイル、鉄調査、甲状腺機能調査）や、十分なカルシウム摂取のための副甲状腺ホルモンレベルを得る。

【0114】

昨秋にIRBの承認を得て以来、採用率は平均約90%となった。現在、週当たりで約10人の患者が肥満手術を受けている。研究の初年に450人超の患者から同意が得られ、225以上の肝臓サンプルが貯蓄されている（差異は、6～8か月前外科手術プログラムの患者が手術に先立って完了しなければならないことによる）。その肥満手術プログラムに登録する患者の将来的採用に加え、既に肥満手術を受けていて肝臓組織構造が知られている800人を超える患者も、DNAと血清のサンプルを得るために募集されている。

10

20

30

40

50

2. 肝生検

【0115】

肝生検は、同一の解剖学的な位置で、すなわち鎌状間膜の左横約10cmの位置で、外科医によって得られる。そして、手術中生検の3分以内に、組織は分割され、3分の1から4分の1があらかじめラベルが付けられたプラスチック遠心分離管内でRNA later (Ambion社, テキサス州オースチン) に直接に浸漬される。肝生検サンプルは、手術室から、通りを挟んで病院の真向いのWeiss Center内にあるGeisinger Clinic Genomics Core研究室へ搬送される。保存されていた肝生検の一部はRNA単離のために除去され、残りは容器取り扱いソフトウェアで追跡されるバーコード・ラベルが付された管内に-80°Cで保管される。

10

【0116】

肝生検のいくつかの部分は、肝臓組織構造を評価するために用いられる。ある病理医は、肥満手術プログラム患者からの肝生検スライドを、Brunst, E. M., et al. (1999) Am. J. Gastroenterol. 94(9): 2467-2474によって提案された基準を用いてすべて読む。慣例的なHE染色着色では識別可能でないかもしれない傍類洞の線維化の初期ステージを検出するために、マッソン・トリクロームを用いる。最初の200人の患者からのデータに基づくと、NASHに関する組織学的所見の範囲は次のとおりである(図3の代表例においてDとFで青く染まっている線維化)：

正常組織構造：22%

20

脂肪肝のみ(ミクロ又はマクロ、任意の重症度)：31%

脂肪性肝炎(任意の重症度)

線維化なし：22%

線維化(門脈又は中心静脈周囲)：20%

架橋線維化：5%

3. 臨床的なデータベース

【0117】

患者統計、身体所見、併発症、病歴、研究室方策、挙動的及び社会的調査、並びに薬歴などの広汎な臨床データはすべて、SASにおける研究データベースに入力される。大多数の患者は、中央年齢が46歳で平均BMIが約55の女性である。収集された検体には、DNA単離のための追加的な血液サンプル、血清サンプル、及び手術時の生検から得られた肝臓組織が含まれる。頭の中にある研究グレード品質要求事項を備えた臨床データを得るために、最高品質のケアの維持に多大の注意を払いつつ、臨床プログラムを最適化した。このデータの多くは、Geisinger Clinic Information Technologyの従業者によって構築されたツールを用いて電子的な健康記録から抽出される。データ収集はまた、継続的研究を可能にする将来的なものである。すなわち、将来のバイオマーカー有効性確認研究にとって重要である。たとえば、血液において測定されたNASHバイオマーカーを手術後の減量中に追跡してもよい。この豊富なデータベースは、また種々様々の2次的変数に照らして、遺伝子発現データを解析する機会を提供する。

30

40

【0118】

病理所見は、統計的分析を可能にする脂肪肝、小葉状の炎症、線維化のレベルについての簡便なスコアリングシステムを用いて、データベースアクセス可能なフォーマットに変換した。電子医療記録(n=164)の最初の抽出に対する初期解析では、正常の肝臓組織構造の患者(n=44)、傍類洞の線維化のないNASH患者(n=85)、及び傍類洞の線維化の患者(n=35)における様々な臨床検査室パラメータに注目した。予想どおり、肝機能検査AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)及びALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)は、傍類洞の線維化で著しく高く、予測されるより重度の肝臓損傷と調和しており、一方でアルカリ性ホスファターゼはグループ間で異なっていなかった(図1)。HDL、インスリン、ヘモグロビンA1C、グルコース及びトリグリセ

50

リドがそうであったように、BMIも傍類洞の線維化と関連していた（データは不図示）。年齢、総コレステロール、LDL、フェリチン、カルシウム、副甲状腺ホルモン、アルブミン、葉酸、鉄結合能力、カリウム、ナトリウム、亜鉛、TSH、パン、クレアチニン、鉄、及び転移飽和度は、傍類洞の線維化と関連しなかった。HDLコレステロールの傍類洞線維化に対する関係について、スタチン薬剤使用による効果を検討した（図2）。スタチン治療には、アトルバスタチン、 Crestor、フルバスタチン、レスコール、リピトール、ロバスタチン、メバコール、プラバコール、プラバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチン、又はゾコールが含まれる。興味深いことに、スタチンを使用しなかった患者において、HDLレベルは傍類洞の線維化とともに減少し、スタチン使用との間に差異が存しなかったことである。血清コレステロール（合計）とLDLレベルは、3つのグループ間で変わらなかった（データ不図示）。合併症や拳動調査データなどの他の臨床的なパラメータの解析は進行中である。

4. NASH遺伝子発現プロファイリング

【0119】

遺伝子発現プロファイルを、NASHの異なるサブタイプを備えた患者からのいくつかの個々のRNAサンプルを基にして（データ不図示）、また、正常、脂肪性肝炎及び架橋線維化からのサンプルのプールを基にして（図3）、Affymetrixマイクロアレイを用いて得た。Total RNAは、以下のaim 1に記載されているように、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays に対して調製し、ラベルを付し、ハイブリッドした。サンプルは採用された第1の190人の患者から選択した。洗浄とスキャンの後、Spotfire遺伝子発現解析ソフトウェアを用いてデータを解析した。個々のサンプルもプールされたサンプルも、架橋線維化が正常の肝臓組織構造に関連のある別個の遺伝子発現プロファイルによって特徴づけられることを示す（図4）。

【0120】

架橋線維化からのプール（ $n = 9$ 、同様の組織構造のために選択された）の解析によれば、約100の遺伝子が正常組織構造（ $n = 9$ ）に対して少なくとも4倍（少なくとも2の信号対数比で）アップレギュレートされることが示された。これらの遺伝子の発現レベルの等級序列（100の任意の蛍光性ユニットをカット）により、遺伝子は約40となった（表1）。このグループに含まれるのは、線維化でアップレギュレートされると予想される遺伝子であり、I型コラーゲン2及びXV型1、マトリクスG1aタンパク質、並びにEGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1が含まれる。加えて、インターロイキン8は、NASH患者の血液において増加されると先に報告されていたとおりアップレギュレートされた（Bahcecioglu, L.H. et al. (2005) Hepatogastroenterology 52(65): 1549-1553）。いくつかのsmall inducible cytokinesの発現レベルも増加した。これらは、発現レベル、血液における潜在的な検出可能性、及び測定のための利用可能な試薬の存在により優先度の高い候補バイオマーカーである。

5. 候補遺伝子

【0121】

ゼブラフィッシュにおけるフォアグラ遺伝子のヌル突然変異により、未成熟魚の肝臓に脂肪が蓄積した（Sadler, K.C. et al. (2005) Development 132(15): 3561-3572）。我々はマイクロアレイ遺伝子発現データを調べたところ、フォアグラ遺伝子（すなわちflj127161）のための4つのプローブがAffymetrix GeneChips上に存在することを発見した。4つのプローブのうち最も発現したものが、架橋線維化の患者において約2倍ダウンレギュレートされることが判明した。我々は、このアイソフォームを検出するためにPCRプライマーを設計し、正常組織構造、脂肪肝、無架橋線維化、及び架橋線維化の患者からの肝臓のRNAを解析した（図5）。架橋線維化の患者はマイクロアレイの結果と一致するレベルまで減少した。一方、限定的な標本数のみであるが、半定量的条件下でRT-PCRを実行す

10

20

30

40

50

ることで、我々はフォアグラ遺伝子発現がNASHの他の組織学的サブタイプにおいて有意に変化されるようには思われないと結論する。

【0122】

【表1】

架橋線維化 (BF) により、正常組織構造 (NL) に対して、発現がアップレギュレートされた遺伝子

NL シグナル	BF シグナル	LOG2 BF/NL	GENE
2645	11098	2.2	<i>Homo sapiens</i> immunoglobulin A1-A2 lambda hybrid GAU heavy chain ホモサピエンス免疫グロブリンA1-A2ラムダハイブリッドGAU重鎖
379	1497	2	<i>Homo sapiens</i> natural killer cell transcript 4 (NK4) ホモサピエンスナチュラルキラー細胞トランスクリプト
235	1393	2.4	Human Ig rearranged kappa-chain gene V-J-region ヒト免疫グロブリン再構成カッパ鎖遺伝子V-J領域
232	1301	3	<i>Homo sapiens</i> diubiquitin (UBD) ホモサピエンスジユビキチン(UBD)
313	1242	2	<i>Homo sapiens</i> GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle (GEM) ホモサピエンス骨格筋内過剰発現GTP結合タンパク質
198	1194	2.2	<i>Homo sapiens</i> interleukin 8 (IL8) ホモサピエンスインターロイキン8(IL8)
117	1166	3.4	<i>Homo sapiens</i> defensin, alpha 1, myeloid-related sequence (DEFA1) ホモサピエンスデフェンシン、アルファ1、骨髄関連配列(DEFA1)
260	1030	2.2	<i>Homo sapiens</i> prostaglandin D2 synthase (21kD, brain) (PTGDS) ホモサピエンスプロスタグランジンD2合成酵素(21kD、脳)(PTGDS)
167	948	2.5	Human small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 19 (CCL19) ヒト小誘導性サイトカインサブファミリーA (Cys-Cys)、メンバー19 (CCL19)
9	896	5.9	<i>Homo sapiens</i> small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20 (SCYA20) (CCL20) ホモサピエンス小誘導性サイトカインサブファミリーA(Cys-Cys)、メンバー20(SCYA20) (CCL20)
275	851	2.2	Human nephropontin (secreted phosphoprotein 1, osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) ヒトネフロポンチン(分泌型燐タンパク質1、オステオポンチン、骨シアロプロテインI、初期T-リンパ球活性1)

10

20

30

40

197	831	2.1	<i>Homo sapiens</i> fibulin 5 (FBLN5) ホモサピエンスフィブリン5(FBLN5)
66	778	3.8	<i>Homo sapiens</i> aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase) (AKR1B10) ホモサピエンスアルド-ケト還元酵素ファミリー1、メンバーB10(アルドース還元酵素)(AKR1B10)
179	768	2.1	matrix G1a protein (MGP) マトリクスG1aタンパク質(MGP)
251	727	2	Human active IgK chain from GM 607, V-kappa-2 region ヒト活性IgK鎖フロムGM 607、V-カッパ-2領域
119	589	2.3	Olfactory receptor, family 2, subfamily 1, member 6 嗅覚受容体、ファミリー2、サブファミリー1、メンバー6
129	497	2	<i>Homo sapiens</i> collagen, type I, alpha 2 (COL1A2) ホモサピエンスコラーゲン、タイプ1、アルファ2(COL1A2)
80	430	2.6	<i>Homo sapiens</i> DNA sequence from PAC 845O24 on chromosome 1p36.1-36.2 ホモサピエンス染色体1p36.1-36.2上PAC 845O24由来DNA塩基配列
124	414	2.2	Interleukin 7 receptor インターロイキン7受容体
110	407	2.1	<i>Homo sapiens</i> cDNA, 3 end /clone=IMAGE-301723 ホモサピエンスcDNA、3 end /clone=IMAGE-301723
48	347	2.3	<i>Homo sapiens</i> interleukin 8 C-terminal variant (IL8) ホモサピエンスインターロイキン8 C末端変異体(IL8)
84	342	2.2	<i>Homo sapiens</i> small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 21 (SCYA21) (CCL21) ホモサピエンス小誘導性サイトカインサブファミリーA(Cys-Cys)、メンバー21(SCYA21)
76	333	2.1	<i>Homo sapiens</i> small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 6 (granulocyte chemotactic protein 2) (SCYB6) (CXCL6) ホモサピエンス小誘導性サイトカインサブファミリーB(Cys-X-Cys)、メンバー6(顆粒球走化性タンパク質2) (SCYB6) (CXCL6)
34	224	2.3	<i>Homo sapiens</i> clone KM36 immunoglobulin light chain variable region ホモサピエンスクローンKM36免疫グロブリン軽鎖可変領域
7	223	4.3	<i>Homo sapiens</i> superior cervical ganglia, neural specific 10 (SCGN10) ホモサピエンス上頸神経節、神経特異10(SCGN10)

10

20

30

40

66	208	2.1	Human heat shock protein 70kD protein 2 ヒト熱ショックタンパク質70kDタンパク質2
43	203	2.1	<i>Homo sapiens</i> EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) ホモサピエンスEGF含有フィブリン様細胞外マトリクスタンパク質1(EFEMP1)
5	193	5.3	Superior cervical ganglia, neural specific 10 上頸神経節、神経特異10
18	192	3	Hemoglobin, alpha 2 ヘモグロビン、アルファ2
9	188	3.9	<i>Homo sapiens</i> immunoglobulin lambda variable 3-10 ホモサピエンス免疫グロブリンラムダ可変部3-10
52	186	2.4	<i>Homo sapiens</i> pyruvate kinase, muscle (PKM2) ホモサピエンスピルビン酸キナーゼ、筋(PKM2)
9	167	4	<i>Homo sapiens</i> reticulon 1 (RTN1) ホモサピエンスレチクロン1(RTN1)
10	144	3.4	<i>Homo sapiens</i> lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) ホモサピエンスリンパ球特異タンパク質チロシンキナーゼ(LCK)
5	113	4.1	Human Ig rearranged mu-chain gene V-N-D-N-J-region ヒト免疫グロブリン再構成μ鎖遺伝子V-N-D-N-J-領域
20	110	2.2	<i>Homo sapiens</i> normal mucosa of esophagus specific 1 (NMES1) ホモサピエンス正常粘膜オブ食道特異1(NMES1)
11	101	3.2	<i>Homo sapiens</i> collagen, type XV, alpha 1 (COL15A1) ホモサピエンスコラーゲン、タイプXV、アルファ1(COL15A1)

10

20

30

40

50

【0123】

6. 研究の設計と方法
概観と根拠

【0124】

本研究は、National Cancer InstituteのEarly Detection Research Network (EDRN)におけるバイオマーカーの進展のために用いられたプロセスに基づいてモデリングされている (Sullivan Pepe, M. et al. (2001) J. Natl. Cancer Inst. 93 (14): 1054-1061、また、Srivastava, S. and B. S. Kramer (2000) Lab. Invest. 80 (8): 1147-1148)。殆どの癌及びNASHは組織学的に定義される。したがって、組織形態は研究の設計において中心的な役割を果たす。癌生態学における遺伝子発現解析の同様の適用により、診断

・予後の再分類がなされ、新規の治療上の標的が同定された (Wadlow, R. and S. Ramaswamy, (2005) *Curr. Mol. Med.* 5 (1): 111-120)。組織の大きさが非常に小さいかもしれない初期段階で癌を検出するという潜在的に困難な目的とは対照的に、肝臓は、NASHによって、一様でないにしても多大に影響される大きな器官である。

【0125】

プールされたマイクロアレイ分析によって同定された遺伝子の複製は、RT-PCRによって個々のRNAサンプルにおいて有効化され、血清においてテストするためのタンパク質バイオマーカーとして開発される。

【0126】

本研究は、NASHに関連する線維化について独特の分子的シグネチャを定義する遺伝子発現プロファイルに焦点を当てる。線維化を反映するNASHの組織学的構成要素を評価するための公表されている基準 (Brunst, E. M. et al. (1999) *Am. J. Gastroenterol.* 94 (9): 2467-2474) を表2に示す。NASHの個々の特徴の評価において病理医の一致が困難であると証明するが、本研究は、2人の病理医により目隠しされた読取りのために、マウス研究において先に用いられたシステムと類似のものを実行した (Sinclair, P. R. et al. (2003) *Hepatology* 37 (2): 351-358)。今、1人の病理医が肥満手術患者たちからの肝生検の全部を、日常的な治療標準の一環として読む。その後、主任医師が、その1次的な診断の読取りに続いて目隠しされた方法でスライドを再検討し、所見と各患者に関する病理レポートとを比較する。有意な差異があれば、これをその1次病理医と協議することにより、また必要に応じて他のスタッフ病理医から見解を得ることにより解決する。

A. 患者群

【0127】

遺伝子発現解析は、重度の線維化 (傍類洞及び/又は門脈) だけでなく架橋線維化の患者からプールされたRNAサンプルに対して実行した。重要なことには、肥満の患者からの正常組織構造を備えた多くのサンプルが利用可能であるということである。患者は、年齢、性別、また合併症状などの主要な臨床徴候について、可及的に分類される。我々は、架橋線維化については少なくとも10人の患者、重度の線維化については > 25の患者からプールが構成されるであろうと予測する。

B. マイクロアレイ法

【0128】

Total RNAは、RNeasy total RNA単離キット (Qiagen) を用いて、肝生検組織から単離する。RNAサンプルのラベリングの後、遺伝子発現を、ヒトゲノムからの > 47,000の転写産物及び変異体をカバーするGeneChip human genome U133 plus 2.0 array (カリフォルニア州サンタクララのAffymetrix社) を用いることにより検査する。アレイ設計に内蔵されている冗長性により、複数の異なるプローブセットが、ときどき同一の遺伝子又は転写産物とマッピングし、最終合計ではHG U133アレイ上の39,000の最も特徴づけられたヒト遺伝子に寄与する。最終のハイブリダイゼーションカクテルを作るために用いたすべての試薬は、Affymetrix GeneChip Expression 3' Amplification One Cycle Target Labeling and Control Reagents Kit (カリフォルニア州サンタクララのAffymetrix社) から得た。RNAターゲット (ビオチンでラベリングされたRNA断片) は、二重らせん構造のcDNA合成により1-10 µgのtotal RNAから生成され、その後インビトロの転写反応及び断片化反応が続く。断片化されたcRNA、アレイコントロール (カリフォルニア州サンタクララのAffymetrix社)、BSA及びニシン精子DNAを含むハイブリダイゼーションカクテルを調製し、45°Cで16時間アレイにハイブリッドする。ハイブリッドされた配列を洗浄し、

10

20

30

40

50

結合されたビオチンラベルされたcRNAをストレプトアビジン フィコエリトリン 結合体によって検出する。洗浄と染色の手順はAffymetrix Fluidics Station (model 450)を用いることで自動化される。各配列は、Affymetrix Gene Array Scanner 3000を用いることによりスキャンを1回する。Affymetrix GeneChip Operating Software Ver 1.2により、アーチファクト、ノイズ、及びバックグラウンドが調節される。スケールング/ノーマライゼーションに係る全体的な方法を各チップに対して使用することとなる。Affymetrixのプラットフォームからの蛍光信号値は、解析のためのSpotfireソフトウェアアプリケーション (URLアドレスが「spotfire.com」のワールドワイドウェブ上にある。)に送られる。チップ間偏差、すなわちプローブ間の可変性を正規化するために、Z scoreとANOVAを実行し、有意に変化した発現を有する遺伝子を同定する。

10

20

30

40

50

【0129】

【表2】

NASHの程度と病期

程度	
程度1、軽度:	脂肪肝:顕著に大脂肪滴性、小葉の33%未満から66%までの範囲、風船様膨化:時々観察; 第3層の肝細胞、小葉炎症:点在した軽度の鋭形(多型)及び慢性炎症(単核細胞)、門脈域の炎症:無し又は軽度
程度2、中程度:	脂肪肝:任意の程度、大脂肪滴性と小脂肪滴性の混在、風船様膨化:第3層に存在、小葉の炎症:多型が膨化肝細胞に関連して観察される場合あり、及び/又は細胞周囲の線維化:軽度の慢性炎症、門脈域の炎症:無し、軽度から中程度
程度3、重度(激しい脂肪性肝炎):	脂肪肝:通常66%(第3層又は汎細葉性); 一般に混合脂肪肝、風船様膨化:第3層に優勢;顕著、小葉の炎症:点在した鋭形及び慢性炎症;多型が風船様膨化及び傍類洞線維化の第3層領域において濃縮して現れる場合あり、門脈域の炎症:軽度又は中程度;優勢でも顕著でもない
病期	
病期(Massonの三色染色又は同等の染色が必要):	第3層を取り分けた別個の門脈に基づいたプロセスが提案されたが、より確固たるものとされるか、あるいは覆される必要あり
病期1:	第3層 中心静脈周囲の、傍類洞の又は細胞周囲の線維化;局所的又は広汎的
病期2:	病期1に加え、局所的又は広汎的な門脈域の線維化
病期3:	架橋線維化、局所的又は広汎的
病期4:	肝硬変、残留した傍類洞の線維化がある場合もない場合もある

【0130】

C. プール

【0131】

1プール当たり最低10のサンプルで、1プール当たり2つの配列を備えたプール・デザイン(各グループにつき少なくとも20のサンプル)を、本研究で用いる。プーリングに関する1つの懸念は、自由度が喪失するので、非プール・デザインのパワーに匹敵するだけのパワーを達成するためには、サンプルの数を大きくする必要があるということである (Shih, J. H., et al. (2004) Bioinformatics 20 (18): 3318-3325)。プール・デザインは、また、適切にデータを変換し、外れ値を除去し、集団偏差を評価することができないので批判された。これらの懸念は、サンプル規模が限定的であるか、あるいはサンプルを得ることが高価である場合に妥当する。かくして、マイクロアレイ上のいかなる保留物も無効化される。大きなサンプル数を得ることができれば、不適当な代表についての蓋然性は回避される (Glass, A. et al. (2005) Biosci. Biotechnol. Biochem. 69 (6): 1098-1103)。プーリングは、殆どの遺伝子にとって、全体的な変異性を減少し、かつ正確な生物学的加算平均に帰着することが示された (Kendzior ski, C. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005. 102 (12): 4252-4257)。したがって、あるプールにおける平均

RNA発現量と同一物の個々に解析されたRNAサンプルの平均との間に差異を生じさせるかもしれない、マイクロアレイ・データの生成及び処理に導入される潜在的な非線形性は、重要な要因でないように思われる。ほんの少数の配列が各生物学的状態において用いられる小さな設計については、プーリングは正確性を劇的に改善し、それは生物学的複製でさらに改善可能である。これは、Affymetrixプラットフォームを用いる我々の経験と一致する；すなわち、ハイブリダイゼーション、洗浄、染色、及びスキャニングは、大きな技術的变化を生じさせない。また、我々は、また、Qiagenキットを用いて単離したRNAサンプル中の変異性が最小であること、すなわちRNAは通常高品質であるということを見出した。生物学的な複製は、同一の組織構造の独立したプールを含んでいる。生物学的な複製は、また、重度の線維化及び架橋線維化の解析で生じる場合があり、これは遺伝子発現において同様の变化を共有する場合がある。

10

D．マイクロアレイ・データ解析

【0132】

Spotfireによる解析に加えて、遺伝子をq値によって階層化し、誤り発見率を10%で制御して、Significance Analysis of Microarraysの手法に従って「one gene at a time」差分解析を行う(Tusher, V. G. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(9): 5116-5121、及びBenjamini, Y. et al (2001) Behav. Brain Res. 125(1-2): 279-284)。このソフトウェアは、統計プログラムRのためのアドオン・パッケージである。

20

E．潜在的な問題と代替的手法

【0133】

組織採集、RNA保存、及びマイクロアレイ・パフォーマンスに関するロジスティックスの問題は、従来の研究において解消された。術中の得られた生検サイズは外来患者を設定して一般に実行される針生検より遥かに大きいので、豊富なRNAと組織を解析に利用することができる。重要な点は、組織が完全であることを保証するために対応する組織構造を再検討するという点である。初期試料におけるかなりの焼灼アーチファクトのため、外科医は今では肝生検のために切断法のみを用いる。

【0134】

プールされたマイクロアレイ解析によって検出された遺伝子発現における変化を確認するために、選択された遺伝子の遺伝子発現変化をリアルタイムPCR (RT-PCR) を用いて測定する。蛍光がdsDNAへの結合によって大幅に強化されるDNA二本鎖特有の染料であるSYBR Green Iを用いる、簡便な定量逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction))を使用する。SYBR Green Iは各サイクル中に増幅されたPCRプロダクトに結合し、その蛍光によって容易に検出することができる。プライマーとプローブのための配列は、Primer Expressというプログラム(ABI社)を用いて選択する。標的遺伝子及び内因性コントロール・アンプリコンのためのPCR反応を、先に記述されたように実行する(Malek, R. L. et al. (2004) Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 138(3): 363-373)。複数の試験にわたって一貫した基準を提供するために、すべてのPCR試験について、プールされたヒト肝臓cDNAのアリコットを用いる。PCR発現データを、 $p < 0.05$ で有意として、標準の非対称t検定を用いて解析する。2次解析には、年齢、性別、BMI、及び他の研究室・臨床上的パラメータの個々の遺伝子の発現に対する寄与度を判定するために、回帰分析が含まれる(これで次元の数が大幅に減少される)。

30

40

【0135】

統計変数、臨床上的変数及び生物学的変数を、対応するタンパク質が血清において高スループット法を用いて高い検出蓋然性を有する遺伝子を選択するために用いる。

【0136】

50

候補バイオマーカーは、異常調節されていると分かった遺伝子から評価され、選択され、優先順位を付けられる。肝臓は血液に存在するタンパク質の主要な源であり、したがって、NASHにより異常調節された遺伝子に由来するタンパク質プロダクトもまた、血清又は血漿における通常の要素として検知することができる。加えて、肝細胞の風船様変性はNASHの目印であり、また血液の中へのタンパク質の放出を備えた細胞死は、肝臓遺伝子に由来したタンパク質バイオマーカーが循環において見つかるかもしれない別の機序かもしれない。我々の1次データによって示唆されるように、NASHの炎症性の構成要素も多く、可溶メディエータに関連する場合がある。過剰発現又は過少発現の程度、遺伝子に関する既知情報、及びマーカー・アッセイ開発用試薬（例えば抗体）の有効性は、リード・バイオマーカー候補の選択と優先度を導く主要な要因である。我々のデータに基づくと、架橋線維化においてアップレギュレートされたsmall inducible cytokinesのグループは、強固なリード候補である。

10

B. 高スループットタンパク質ベースアッセイ

【0137】

リード・バイオマーカー候補を評価するために、かなりの高スループットフォーマットにおいて実行することが可能なアッセイが実行され及び/又は開発されている。事前評価は、免疫プロット法又は酵素免疫吸着法（ELISA：enzyme linked immunosorbent assay）のいずれかの免疫アッセイを用いて実行される。何れの技術にとってもキーとなる試薬は、バイオマーカーに対応する抗体である。そのような試薬が利用可能でない遺伝子については、抗原性であって抗原抗体相互作用に利用可能な領域から合成されたペプチドに対して免疫血清が生成されよう。あるいは、抗体は、当該技術分野において公知の標準的手法を用いて、ペプチド又はタンパク質全体を備えた動物の免疫化によって生成されてもよい。抗体開発のための配列を同定するのを助けるために、バイオインフォマティク手法が用いられる。利用可能な抗体を用い、開発の第1フェーズでは、血清、肝臓、及び末梢血免疫細胞で免疫プロット法を実行する。これにより、免疫血清の特異度に関する基本的な情報が提供され、種々の組織画分におけるバイオマーカー・タンパク質に関する情報も提供される。定量化のための鍵となる側面は、各プロット上で実行され、再現可能となるように多量から準備されて等分されている内的制御である（例えば正常血清又は血漿）。

20

【0138】

第2フェーズは、ELISAベースのアッセイの開発である。これは、最初の免疫プロット解析をパスするリード・バイオマーカーに対して、すなわちELISAが既に利用可能なリードに対して実行される。この高度に感度のよいフォーマットは、また、低レベルで存在したり限界に近かったりするか、又は免疫プロット法では検知不能なバイオマーカー候補にとって理想的であろう。ELISAについては、直接的方法及び間接的方法を含め、アッセイを開発するためのいくつかの手法が存在する。選択される手法は、利用可能な抗体及び抗原試薬の有効性及びパフォーマンスに左右される。

30

C. バイオマーカー・アッセイの評価

【0139】

リード・バイオマーカー候補のために上記で開発されたタンパク質ベースのアッセイのパフォーマンスは、肝臓組織構造が既知である小規模の患者上で評価する。検出の感度が十分であることが分かれば、すなわち、タンパク質は、NASH/線維化の患者で検出可能であることが分かれば、第2相試験において、マーカーの有効性確認をより大規模の患者集団において縦断的研究として行うことに焦点が当てられる。バイオマーカーの発見は、続く事前評価と同一の集団から引き出されたケースから実行されるので、人工的なケース/コントロール間の差分によるサンプリング・バイアスは回避されるであろう。サンプルの採集、処理、及び保管に係るラボでの手続は、したがって将来の有効性確認研究及び最初のアッセイ評価と同一である。血液サンプルは標準化された条件下で収集される（例えば、患者断食し、朝に仰臥位において）。

40

【0140】

50

タンパク質ベースのマーカーについて、多数のアイソフォームに遭遇する場合がある。したがって、免疫プロット法による定性評価は、潜在的な試薬としての抗体の有効性を判定するためだけでなく、バイオマーカー・タンパク質についての一定の初期の生物学的情報を得るために実行される。バイオマーカー可変性の潜在的な根源は、分泌の日中変動、固有なアッセイ可変性、及び性又は年齢差に因るものかもしれない。重要なのは、バイオマーカーは、異なる併発症又は薬物投与に応じて変化する場合があるということである。したがって、バイオマーカーの評価研究からの結果は、臨床的なデータベースにおける臨床的な変数のコンテキストにおいて解析される必要がある。

【0141】

この研究において同定されたバイオマーカーは、我々の研究集団における病的な患者を代表する。種々のレベルの肥満度を有する他の集団に対するバイオマーカーの拡張的評価が、継続的な有効性確認にとって重要となろう。分子マーカーの感度及び特異度は、丁寧な試験が多くの検体において行なわれてコントロールと比較されるまでは、完全には実現することができない。高いリスクでNASH線維化に進展する患者を含め、大規模の患者集団において有効性を研究することは、臨床的な使用に向けた重要なステップである。これらの有効性研究の重要な要素は、結果の評価、すなわち、これらの新規の分子マーカーを用いる試験が、肝硬変及び肝細胞癌を含め、重大な後遺症を予防するのに十分早い病期においてNASH線維化を検出するかどうかの評価である。

実施例 2

【0142】

1次マイクロアレイ発現データからの2つのリード候補バイオマーカーの発現における変化が、RT-PCRによって確認された。この文献 (Asselah, T. et al. (2005) *Gastroenterology* 129 (6): 2064-2075; Bonacchi, A. et al. (2003) *Gastroenterology* 125 (4): 1060-1076) からの関連するデータに基づくと、これらの分子は、NASH関連の線維化のための診断バイオマーカーとして、続く開発のための2つのリード候補である。

【0143】

NASH関連の肝線維症において発現が増加したいくつかの遺伝子を、表1に示されるマイクロアレイ遺伝子発現データに基づいて更なる研究のために選択した。4つの *small inducible cytokines* の存在は、それらの誘導性及び診断テストとしての高い特異性のための対応可能性、並びにそれらの可溶性及び末梢血での検出のための対応可能性のため、興味深かった。これらのうちの2つを、NASHだが線維化していない患者からのマイクロアレイ結果の解析に基づいて(データ不図示)、更なる研究のために選択した。最初のマイクロアレイ結果はプールされたサンプル上で実行されたものであるので、*small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys)*, member 19 (CCL19)、及び *small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys)*, member 6 (CXCL6) を増幅するために、逆転写酵素PCRをそのプールにおける個々の患者の各々からのRNA上で実行した。図6において下記で示されているように、各遺伝子は容易に検知された。ある者たち (Bonacchi, A., I. et al. (2003) *Gastroenterology* 125 (4): 1060-1076) によってC型肝炎患者からの線維症の肝臓サンプルにおける遺伝子発現の解析に用いられていたGAPDHをコントロール遺伝子として用いたところ、その発現は我々のマイクロアレイ結果における線維化によっては不変であることが分かった(データ不図示)。これらのデータにより、蛍光定量リアルタイムPCRを実行する基礎が提供され、相対的な発現レベルのより正確な定量化が提供される。

【0144】

このリアルタイムPCRデータの代わりに、発現レベルの推計をPCRバンドのデジタル画像及び定量化によって得た。平均CCL19/GAPDH比は、正常の肝臓組織構造

10

20

30

40

50

患者で1.45、架橋線維化患者で2.17であった。正常と架橋線維化での平均CXCL6/GAPDH比は、それぞれ0.542と1.35であった。これらの値は、実際の比を、特にCCL19について、恐らくは低く評価するであろう。そこでは、バンドのいくつかは強くてPCRの線形の範囲を超えている。

【0145】

その後、各患者についてのCCL19/GAPDH及びCXCL6/GAPDH比を、いくつかの病理学的・血清学的なパラメータと関連付けた(表3)。この2つの遺伝子は互いに0.53の相関(r)を有していた。興味深いことに、どちらも、肝臓に存する炎症の程度と際立った相関を示さず、脂肪肝及び門脈域の線維化の程度と広く不一致でなかった。最も強固な相関は、CCL19とLDL(-0.88)、CCL19とフェリチン(-0.69)、及びCXCL6とインスリン(+0.61)の間にあった。これらのデータは、2つのサイトカインがNASHに関連する線維化の病態生理学において、非常に異なる役割を有しているかもしれないことを示す。この分析は、また、将来の研究にとって追尾すべき潜在的な方法を提供する。

【0146】

【表3】

遺伝子発現と血清又はNASHの病理パラメータとの相関

遺伝子	ST	INFL	VF	PF	FERR	HDL	LDL	TRI	INS	GLU	A1C
CCL19	-0.49	-0.05	-0.15	-0.12	-0.69	-0.44	-0.88	-0.21	0.27	0.44	0.50
CXCL6	0.25	-0.00	-0.39	0.34	-0.03	-0.57	-0.45	-0.58	0.61	-0.37	-0.28

ST=脂肪肝の程度; INFL=炎症の程度; VF=中心静脈周囲の線維化の程度; PF=門脈域の線維化の程度; FERR=血清フェリチン; HDL=高比重リポタンパク質; LDL=低密度リポタンパク質; TRI=トリグリセリド; INS=インスリン; GLU=グルコース; A1C=ヘモグロビンA1C

【0147】

興味深いことに、CCL19とCXCL6の何れも、C型肝炎感染により、以前から肝線維症の原因であるとされていた。CXCL6の発現は、慢性C型肝炎感染の患者からの線維症の肝臓サンプルでRNAにおいて軽度から重度にアップレギュレートされることが分かった(Asseilah, T. et al (2005) Gastroenterology 129(6): 2064-2075)。small inducible cytokine CCL21だけでなくCCL19、CCR7のための受容体の発現も、C型肝炎感染における活性化された肝臓の星細胞から線維形成の促進に関係すると示唆されてきた(Bonacchi, A., et al. (2003) Gastroenterology 125(4): 1060-1076)。NASH線維化及びC型肝炎線維化の両方におけるこれらのサイトカインの調節異常の発見は、線維化の過程におけるそれらの潜在的な関与及び線維化のバイオマーカーとしてのそれらの潜在的有用性に対する支持を追加する。

実施例3

末梢血RNAにおけるNASHマーカーの検出

【0148】

NASHに関連した架橋線維化を備えた肝臓サンプルにおいて過剰発現していると分かった3つの遺伝子の発現を、病的に肥満のNASH患者から得られた末梢血単核細胞からのRNAにおいて逆転写酵素PCRによって解析した。small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys), member 19(CCL19)と、small inducible cytokine subfamily A(Cys-Cys), member 20(CCL20)と、small inducible cytokine subfamily B(Cys-X-Cys), member 6(CXCL6)とを増幅し、これを図7に示す。各遺伝子は容易に検出可能であった。GAPDHを、コントロール遺伝子として用いた。バンドは、これら

のサイトカインのうち2つについては容易に検出されたが、CCL20については違った。これらの結果は、肝臓RNAにおいて発現が変化されると分かった遺伝子を、循環する末梢血の単核細胞から得られたRNAにおいても測定することができることを示す。

血漿及び血清の採集。

【0149】

全血は、Cell Processing Tubes (CPT, Becton Dickinson社)又は抗凝血剤の無い管 (Vacutainer tubes; Becton Dickinson社, フランクリンレークス, ニュージャージー州)の中への静脈穿刺によって病的肥満患者から収集した。ドナーのスクリーニングは、年齢、食事又は他の変数に関しては試みなかった。全ボランティアに研究のことが知らされ、彼等は書面による同意を与えた。血液は、1160xgで10分間遠心分離した。血漿と血清は、等分し、アッセイまで-80°Cで冷凍保管した。

実施例4

血清におけるNASHマーカーの検出

【0150】

正常の肝臓組織構造を有する(n=3)、中程度の脂肪性肝炎を有する(n=4)及び架橋線維化を有する(n=8)病的肥満患者の血清におけるCCL20タンパク質レベルを測定するために、CCL20 ELISAキット(RandD Systems社、ミネアポリス、ミネソタ州)を用いた。このアッセイについて、マイクロプレートストリップの各ウェルに100µlのAssay Diluent RD 157を加えた。100µlのStandard、サンプル、すなわちコントロールを各ウェルに加えた。ウェルを提供された接着性のストリップで覆い、室温で2時間培養した。その後各ウェルを吸引して洗浄し、このプロセスを3回繰り返して合計4回洗浄した。洗浄は、噴出ボトルを用いて各ウェルをWash Buffer (400µl)で満たし、最後の洗浄後、吸引により残留しているWash Bufferをきれいに除去することにより行った。その後、200µlのMIP 3コンジュゲートを各ウェルに加え、新たな接着性のストリップで覆い、室温で2時間培養した。そして、吸引/洗浄を繰り返して行った。200µlのSubstrate Solutionを各ウェルに加え、室温で30分間培養し、光から防御した。その後、50µlのStop Solutionを各ウェルに加えた。各ウェルの光学濃度を、マイクロプレートリーダーにおいて450nmにセットして30分以内で測定した。波長補正を540nmで用いた。

【0151】

CCL20 ELISAアッセイについての検量線を図8に示す。線形性と感度は、アッセイが非常にロバストであることを示す。

【0152】

その後、病的肥満患者からの血清サンプルを、正常組織構造の患者、中程度の炎症の患者、及び架橋線維化の患者から解析した。図9に示されるように、正常の肝臓組織構造の患者、又は中程度の炎症の患者は、架橋線維化の患者よりも血清におけるCCL20タンパク質のレベルが低かった。CCL20は末梢血単核細胞RNAでは検出されなかったもので、恐らくは肝臓に、少なくとも一部は、又は顕著に由来するのであろう。

実施例5

リード候補CCL20の発現確認

【0153】

あるsmall inducible cytokine遺伝子(small inducible cytokine subfamily A (Cys Cys), member 20 (CCL20))を、最初の追尾すべきリード候補として選択した。なぜなら、それはその最初の選択基準に適合したリストに存する最もアップレギュレートされた遺伝子だったからであり、また、その発現が半定量的PCRを用いて確認されたからである。GAPDHが当該技術分野ではC型肝炎の患者からの繊維症の肝臓サンプルにおける遺伝子発現の解析に用いられているので(Bonacchi, A., et al. (200

10

20

30

40

50

3) Gastroenterology 125(4):1060-1076)、それをコントロール遺伝子として用い、その発現は我々のマイクロアレイ結果における線維形成によって不変であると分かった(データ不図示)。リアルタイムPCRを、正常組織構造を備えた肝臓組織からの約12のRNAサンプルに対し、また架橋線維化を備えた約12のRNAサンプルに対し、ABI 7300リアルタイムPCR機上でTaqmanアッセイを用いて実行した。GAPDHを、再びコントロールとして用いた。図10Aにおいて示されているように、CCL20(黒線)は、正常の組織構造の患者及び重度の(架橋)線維化の患者にわたって、さまざまな発現レベルを示した。蛍光プロットのタイトなグルーピングにおいて明らかのように、GAPDHレベル(灰色線)はそのような種々のサンプルにわたって非常に一貫しており、NASHにおける遺伝子発現の研究のためのコントロールとしてその使用が有効であるといえる。GAPDH mRNAのレベルを基準ハウスキーピング・コントロール遺伝子として用いたところ、CCL20の発現は、正常組織構造サンプルのうちの一つを除くすべてにおいて、架橋線維化サンプルにおけるよりも遥かに少なかった(図10B)。このデータはAffymetrixチップ・データを確認する。

10

実施例6

血清におけるCCL20の検出

【0154】

CCL20のためのELISAキット(R&D Systems社、ミネソタ州)を、NASH患者の血清におけるレベルを解析するために購入した。CCL20タンパク質レベルを、正常の肝臓組織構造の患者からの30の血清サンプルにおいて、また肝硬変の4人の患者を含め、中程度から重度の線維化の患者の35サンプルにおいて測定した。14pg/mlの閾値を用い、NASH線維化を検出する予測力は83%であったのに対し、通常の上限の2倍の肝生検のための臨床的なガイドラインを用いたLFTs(AST及び/又はALTの高さ)はたったの9%であった。もし、代わりに、遥かに保守的な閾値(>80u/ml)を用いると、予測力は丁度15%に改善する。ALTかASTのいずれかのための基準レンジの上限を用いたとしても、陽性的中率は尚も<25%なので、それは肝生検に着手するためには用いられないであろう。重要なのは、この集団における肝硬変の4人の患者はみな、正常のLFTであったが高いCCL20レベルを有していたということである。

20

30

【0155】

65人の患者集団における軽度から重度のNASH線維化についてのLFTsに対するCCL20の臨床的有用性

	陽性的中率	陰性的中率
CCL20	81%	79%
LFTs (>2X)	9%	47%
LFTs (>80)	15%	49%
LFTs (>NL)	24%	52%

実施例7

末梢血単核細胞mRNAの解析

【0156】

血清に加えて、末梢血の細胞成分もまた、バイオマーカー解析にとって有用である。末梢において循環する白血球の大多数は非常に短い寿命を有する好中球であり、多くの刺激に対して非常に反応的であり、通常は肝臓におけるNASHの重要な構成要素でないので、我々はmRNAを末梢血単核細胞(PBMC)から単離することにした。これらの細胞はリンパ細胞と単核細胞を含んでおり、これらは、NASHにおける炎症性の成分の多くを構成する。我々はCCL19、CCL20、及びCXCL6について半定量的な従来のPCRを用い、これらの遺伝子からのmRNAをNASH患者からの循環するPBMCにおいて検出することができるかどうか判定した。バンドはCCL19とCXCL6について検知できたが、CCL20についてはできなかった(データ不図示)。CCL20タンバ

40

50

ク質は血清において検知できたので、P B M Cからの欠如は、C C L 2 0の主たる肝臓性の起源と一致する。

実施例 8

末梢血単核細胞 (P B M C)からのRNAにおけるバイオマーカー候補 C C L 1 9の測定【 0 1 5 7】

最初の100人の患者のP B M Cを収集するためにC P T管を用いた。C C L 1 9 R N AレベルをP B M C R N Aサンプルにおいて測定した。正常の肝臓組織構造の13人の患者 (N L)、脂肪性肝炎だが無線維化の6人の患者 (S H)、傍類洞の線維化の10人の患者 (P F)、架橋線維化の2人の患者 (B F)、及び肝硬変の1人の患者 (C R)からのサンプルにおいて、A B I 7300リアルタイムPCR機上でTaqmanアッセイを用いて測定した (図11の黒線)。コントロール遺伝子G A P D Hのレベルは一般的に一貫しており (図11の灰色線)、サンプルの採集・調製の高品質性及び完全性を反映する。C C L 1 9 / G A P D H比を患者群にわたって評価した。正常の肝臓組織構造の患者からの2番目に高い値を閾値カットオフとして用いる場合、このレベル以上の値は、N A S H (S H、P F、B F又はC Rを包含する)について88.9%の陽性的中率と、52%の陰性的中率と、を有するであろう。これに対し、肝臓機能検査A S T又はA L Tは、これらの患者の12%のみにおいて高くなった。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 8】

【図1】図1は、正常の肝臓組織構造の患者 (白色)、傍類洞の線維化の無いN A S Hの患者 (軽い灰色)、及び傍類洞の線維化の患者 (濃い灰色)における、アルカリフォスファターゼ (A L K P H O S)、A L T、A S T及びB M Iを示す。* $p < 0.01$.

【図2】図2は、スタチン療法を受けていないか (白色) 又はスタチン療法を受けている (灰色)、正常の肝臓組織構造の患者 ($n = 30 / 15$)、傍類洞の線維化の無いN A S Hの患者 ($n = 66 / 20$)、及び傍類洞の線維化の患者 ($n = 26 / 9$)における血清H D Lコレステロールレベルを示す。* $p < 0.05$.

【図3】図3は、患者からの代表的な肝臓組織構造 (100X)を示す。パネルA：正常の表出H & E染色部；パネルB：中程度の脂肪肝及び軽度の脂肪性肝炎だがH & E上に線維化なし；パネルC：中程度の脂肪肝及び軽度の脂肪性肝炎でH & E上に軽度の傍類洞の線維化；パネルD：Cと同様だが線維化のためにトリクロム染色を使用；パネルE：H & E上の架橋線維化；パネルF：Eと同様だが線維化のためにトリクロム染色を使用。

【図4】図4は、A f f y m e t r i x G e n e C h i p sを用いた、プールされた肝臓RNA ($n = 9 /$ プール)の遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタリング図表を示す。「正常」は正常の肝臓を、「中程度の炎症」は中程度の脂肪性肝炎だが無線維化の肝臓を、「架橋線維化」は中程度から重度の脂肪性肝炎及び架橋線維化の肝臓を、それぞれ示す。

【図5】図5は、ヒトF o i e G r a s (f l j 1 2 7 1 6 1) mRNAの逆転写 (R T) P C Rを示す。左：M Wは分子量 (m o l e c u l a r w e i g h t) マーカー；N Lは正常 (n o r m a l) 組織構造；S Tは軽度の脂肪肝 (s t e a t o s i s)；F Lは非架橋線維化 (f i b r o s i s)；B Fは架橋線維化 (b r i d g i n g f i b r o s i s)である。右：(インプットRNAのためのコントロールとしての) 18 S r R N A。

【図6】図6は、正常の肝臓組織構造又は架橋線維化を備えた個々の患者からのG A P D H、C C L 1 9及びC X C L 6のR T P C Rを示す。

【図7】図7は、5人の病的に肥満な患者の末梢血単核細胞からのRNAのR T P C Rを示す。マーカーレーンはゲルをフランクし、G A P D Hをコントロールとして用いた。サイトカインのうち2つ (C C L 1 9及びC X C L 6)に対応するバンドが検出された。C C L 2 0の発現の証拠は見つからなかった。

【図8】図8は、C C Y A 2 0 (C C L 2 0) E L I S Aアッセイについての検量線を示す。

10

20

30

40

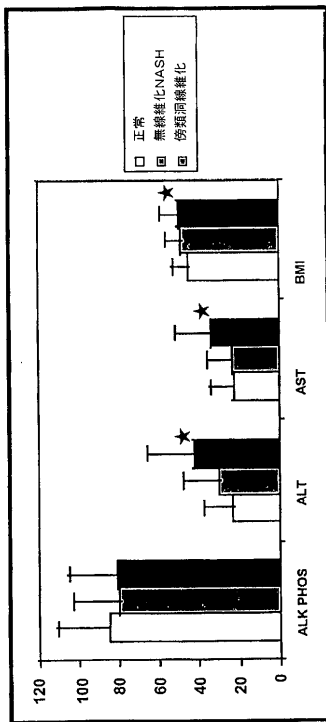
50

【図9】図9は、NASHの患者からの血清においてELISAによって測定されたCCYA20(CCL20)タンパク質レベルを示す。

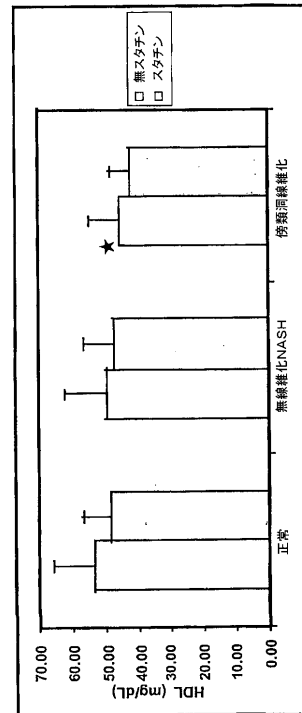
【図10】図10は、GAPDH及びCCYA20(CCL20)のリアルタイムPCRを示す。パネルAは、正常組織構造及び架橋線維化の患者からの個々の肝臓RNAサンプルのGAPDH(黒線)及びCCL20(灰色線)の増幅のリアルタイムPCR蛍光プロットを示す。GAPDH蛍光のタイトなグルーピングは、その発現レベルが種々のサンプルにわたって類似しており、RNA調製が高品質であることを示す。パネルBは、Aにおける試験から得られたリアルタイムPCR値を示す(NL=正常組織構造;BF=架橋線維化)。正常組織構造については1つのサンプルだけが架橋線維化サンプルよりも大きかった。

【図11】図11は、個々のPBMC RNAサンプルのGAPDH(後のサイクルで上昇する黒線)及びCCL19(前のサイクルで上昇する灰色線)の増幅のリアルタイムPCR蛍光プロットを示す。GAPDH蛍光カーブの多くはかなりタイトなグルーピングは、その発現レベルが種々のサンプルにわたって類似しており、RNAが非常に高品質であることを示す。CCL19増幅プロットは、レベルがGAPDHについてのものよりも低く、レベルが広く分散することを示した。

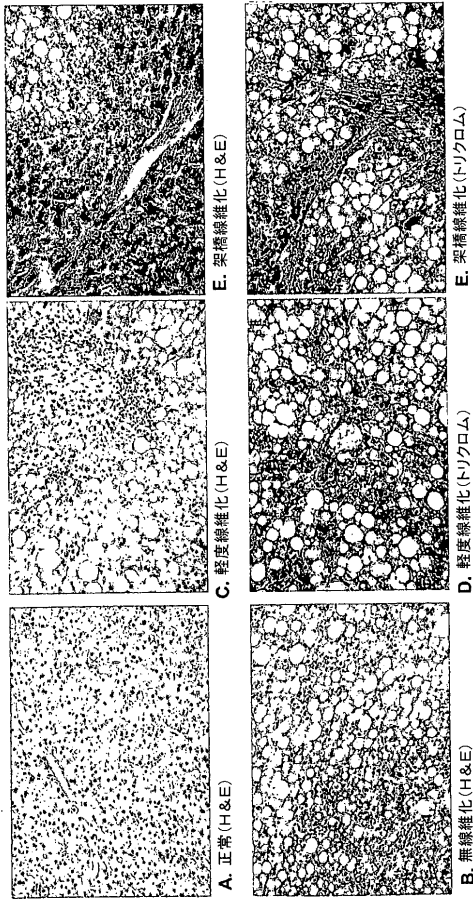
【図1】



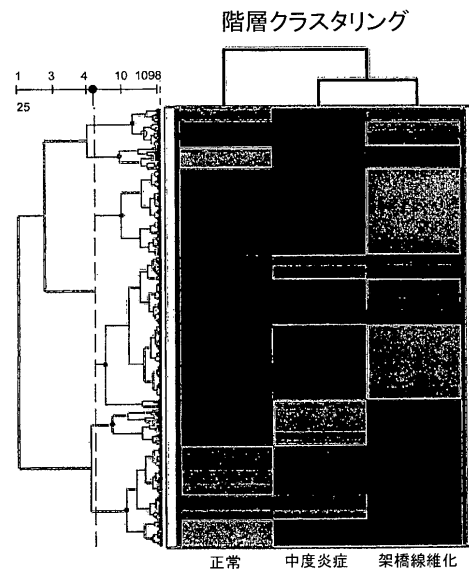
【図2】



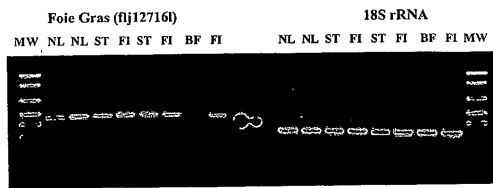
【 図 3 】



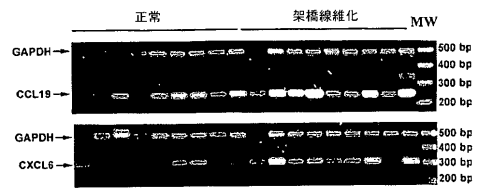
【 図 4 】



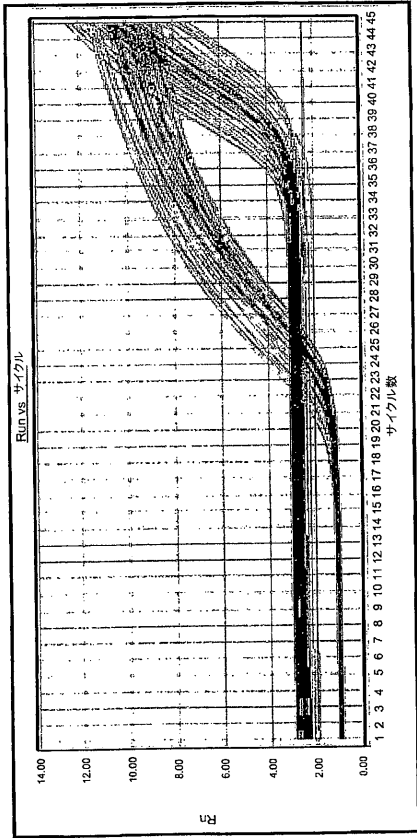
【 図 5 】



【 図 6 】



【図 11】



【 国際調査報告 】

60900140020



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/10939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12Q 1/68(2006.01);G01N 33/53(2006.01) C07H 21/04(2006.01) USPC: 435/6,7.1;536/23.5 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) U.S. : 435/6,7.1; 536/23.5 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	HAUKELAND et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. Journal of Hepatology. June 2006, Vol. 44, No. 6, pages 1167-1174, see entire reference, particularly Table 3.	1-8, 45
A	YOUNOSSI et al. Hepatic gene expression in patients with obesity-related non-alcoholic steatohepatitis. Liver International. August 2005, Vol. 25, No. 4, pages 760-771, see entire reference, particularly Tables 3-4.	1-8, 45
A	SREEKUMAR et al. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. July 2003, Vol. 38, No. 1, pages 244-251, see entire reference, particularly Table 2.	1-8, 45
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 August 2008 (28.08.2008)		Date of mailing of the international search report 17 OCT 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Diana B. Johannsen Telephone No. 571/272-1600 16.3.2009

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/10939

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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 additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
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.: 1-8 and 45, drawn to SCYA19/CCL19

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/10939**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-8 and 45-46, drawn to methods of diagnosing a "NASH disease state". Group I encompasses 36 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group II, claim(s) 9-13 (in part), drawn to methods of treatment using an inhibitor of a "NASH-related gene". Group II encompasses 35 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group III, claim(s) 9-13 (in part), 14-16, and 29-35, drawn to methods of treatment using an inhibitor of "NASH-related" protein. Group III encompasses 36 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group IV, claim(s) 17-20 drawn to methods of treatment using an inhibitor of a receptor for a "NASH-related protein". Group IV encompasses 36 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group V, claim(s) 21-23, drawn to a "diagnostic tool" including at least 2 polynucleotides. Group V encompasses 598 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group VI, claim(s) 24-28, drawn to methods of treatment using an inhibitor of at least two "NASH-related genes". Group VI encompasses 598 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group VII, claim(s) 36-41, drawn to methods of screening for protein inhibitors. Group VII encompasses 72 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group VIII, claim(s) 42 and 44 (in part), drawn to a kit comprising polynucleotide probes. Group VIII encompasses 35 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group IX, claim(s) 43 and 44 (in part), drawn to a kit comprising an antibody or fragment thereof. Group IX encompasses 35 different species and is subject to a species election requirement as set forth below.

Group X, claim(s) 47, drawn to a diagnostic tool comprising an isolated polynucleotide comprising a sequence that binds a polynucleotide encoding CCL19.

Group XI, claim(s) 48, drawn to a diagnostic tool comprising an isolated polynucleotide comprising a sequence that binds a polynucleotide encoding SCYA20.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:
Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/10939

With regard to Groups I-II, each of the different genes encompassed by the claims constitutes a separate species. Accordingly, if either of Groups I-II is elected, applicant should also specify an elected gene (or genes, if multiple groups are elected).

With regard to Group III, each of the different proteins encompassed by the claims constitutes a separate species. Accordingly, if Group III is elected, applicant should also specify an elected protein (or proteins, if multiple groups are elected).

With regard to Group IV, each of the different receptors encompassed by the claims constitutes a separate species. Accordingly, if Group IV is elected, applicant should also specify an elected receptor (or receptors, if multiple groups are elected).

With regard to Groups V-VI, each of the different combinations of two genes encompassed by the claims constitutes a separate species. Accordingly, if either of Groups V-VI is elected, applicant should also specify an elected combination of two genes (or multiple gene combinations, if multiple groups are elected).

With regard to Group VII, each of the different proteins and each of the different receptors encompassed by the claims constitute a separate species. Accordingly, if Group VII is elected, applicant should also specify an elected protein or receptor (or multiple proteins and/or receptors, if multiple groups are elected).

With regard to Group VIII, each of the different probes encompassed by the claims constitutes a separate species. Accordingly, if Group VIII is elected, applicant should also specify an elected probe (or probes, if multiple groups are elected).

With regard to Group IX, each of the different antibodies encompassed by the claims constitutes a separate species. Accordingly, if Group IX is elected, applicant should also specify an elected antibody (or antibodies, if multiple groups are elected).

The claims are deemed to correspond to the species listed above in the following manner:

With regard to Group I, each of the 36 different genes recited in the alternative in dependent claims 3-4, as well as CCL19 (recited in claim 45), correspond to species of the invention. (It is noted that claim 46 also recites a gene that is included in the list of genes in both claims 3-4). Claim 1 is generic.

With regard to Group II, each of the 35 different genes recited in the alternative in dependent claims 12-13 correspond to species of the invention. Claim 9 is generic.

With regard to Group III, each of the 36 different proteins recited in the alternative in dependent claims 12-13, 16, and 32-33 correspond to species of the invention. Claims 9 and 29 are generic.

With regard to Group IV, each of the 36 different receptors recited in the alternative in dependent claims 19-20 correspond to species of the invention. Claim 17 is generic.

With regard to Group V, each of the 598 different combinations of two pairs of polynucleotides encompassed by claims 21 and 23 correspond to species of the invention. No claim is generic (it is noted that while claim 22 does not recite particular gene names, the claim is limited to polynucleotides sharing identity with small inducible cytokines).

With regard to Group VI, each of the 598 different combinations of two pairs of genes encompassed by dependent claims 26-27 correspond to species of the invention. Claim 24 is generic.

With regard to Group VII, each of the 72 different proteins and receptors therefore recited in the alternative in dependent claims 38-39 correspond to species of the invention. Claim 36 is generic.

With regard to Group VIII, each of the 35 different polynucleotides recited in the alternative in dependent claim 44 correspond to species of the invention. Claim 42 is generic.

With regard to Group IX, each of the 35 different proteins recited in the alternative in dependent claim 44 correspond to species of the invention. Claim 43 is generic.

The inventions listed as Groups I-XI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons. Groups I-XI share a technical feature in that each of the Groups encompasses or employs in some manner one or more of the group of genes as listed in, e.g., claim 4, or proteins encoded thereby or the corresponding receptors or antibodies. However, each of these biomolecules was known in the prior art at the time of applicant's invention, as evidenced by the teaching in the disclosure at, e.g., page 33 that the molecules are present on commercially available microarrays. Further, the prior art as exemplified by Younossi et al (Hepatology 42(3):665-674 [Sept 2005]) discloses the use of such microarrays of human nucleic acids in screening for differential gene expression in human NASH patients, as well as the analysis of protein expression profiles in such patients and the use of the results of such analyses in developing treatments/therapies (see entire

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/10939

reference). Thus, diagnosis of NASH, treatment of NASH, and/or screening for NASH therapies are also not contributions over the prior art, and cannot constitute a special technical feature under PCT Rule 13.2. As Groups I-XI do not share any other technical features (e.g., common method steps, reagents, objectives, etc.) that make a contribution over the prior art and which therefore could be considered a special technical feature, unity of invention is lacking.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons. Groups I-IX embrace various different biomolecules and combinations thereof (particularly, different genes, proteins, receptors, polynucleotide combinations, gene combinations, probes, and antibodies). Such varying biomolecules are considered to share a special technical feature under PCT Rule 13.2 if they are "of a similar nature." In order for such molecules to be considered "of a similar nature," they must have a "common property or activity" (see Annex B of the Administrative Instructions under the PCT). However, in the instant case, the various genes, proteins, receptors, polynucleotide combinations, gene combinations, probes and antibodies of Groups I-IX differ from one another with respect to both sequence/structure and functional characteristics. Thus, as a common property or activity is lacking with respect to the various biomolecules embraced by each Group, unity of invention is lacking with respect to these groups of molecules.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Medline, Lifesci, Scisearch, Embase, Biosis, Caplus, Biotechno, USPT, PGPB, DWPI

search terms: SCYA19, CCL19, CKB11, exodus 3, Mip 3B, (chemokine near3 ligand 19), ((small inducible cytokine near3 a) near3 19), NASH, non alcoholic steatohepatitis; inventors' names

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ52 QR32 QR55 QR66 QR77 QR84 QS03
 QS12 QS28 QS34 QS36 QX02
 4C084 AA13 AA17 MA02 NA14 ZA752 ZC022
 4C085 AA13 AA14
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA75 ZC02

专利名称(译)	诊断和预测非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的方法		
公开(公告)号	JP2009535642A	公开(公告)日	2009-10-01
申请号	JP2009509761	申请日	2007-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	同性恋歌手诊所		
申请(专利权)人(译)	同性恋歌手诊所		
[标]发明人	ゲルハルトグレンエス スチルクリストフアードウベツト		
发明人	ゲルハルト グレン エス スチル クリストフアードウベツト		
IPC分类号	G01N33/576 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K48/00 A61K45/00 A61K39/395 A61K31/7105 A61K31/7088 A61P43/00 A61P1/16 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/16 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/576 G01N33/6863 G01N2500/00 G01N2800/044		
FI分类号	G01N33/576.Z C12Q1/68.A C12Q1/02 A61K48/00 A61K45/00 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K31 /7105 A61K31/7088 A61P43/00.111 A61P1/16 G01N33/53.M G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063 /QR77 4B063/QR84 4B063/QS03 4B063/QS12 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA752 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA75 4C086/ZC02		
优先权	60/797457 2006-05-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种基因组，可用于在非侵入性测定中诊断非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) ，该方法基于一组特定的基因在NASH相关基因NASH中的表达 提供一种诊断方法，并提供用于治疗NASH的方法和用于治疗NASH的组件。一种诊断患者NASH状况的方法，包括测量与患者样品中NASH的发作或进展相关的基因组的表达水平，该基因组中的表达水平和NASH。通过将表达水平与基因表达的预定值进行比较，将表达水平与NASH的病理状况相关联的方法。 [选择图]图10B

