

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-510248

(P2005-510248A)

(43) 公表日 平成17年4月21日(2005.4.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
<b>GO 1 N 33/53</b>	GO 1 N 33/53	D
<b>GO 1 N 33/566</b>	GO 1 N 33/53	M
	GO 1 N 33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2003-547654 (P2003-547654)	(71) 出願人	599154630
(86) (22) 出願日	平成14年11月27日 (2002.11.27)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレー ション
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月25日 (2004.5.25)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O 2 1 1 4, ポストン, 5 5 フルーツ ス トリート
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/038010	(71) 出願人	504201224
(87) 国際公開番号	W02003/046224		ファンダシオ デ ゲスティオ サニタリ ア ホスピタル サンタ クルー イ サ ント ポー デー/ビー/エイ ホスピテ ィアル スタ クルー イ サント ポー スペイン国 バルセロナ 08025 ア ヴィングダ パレ クラレット ナンバー 1 6 7
(87) 国際公開日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		
(31) 優先権主張番号	60/333,895		
(32) 優先日	平成13年11月28日 (2001.11.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジスフェリノパシーのための血液ベースアッセイ

## (57) 【要約】

ジスフェリンが血液中で発現されること、および筋肉においてジスフェリンを欠く個体はまた、CD14(+)細胞においてもジスフェリンを欠くことが発見されている。これらの発見に基づいて、ジスフェリン発現についての血液ベースの試験およびかかる試験の使用が記載される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 哺乳動物由来の血液試料を提供する工程、および  
 (b) 該血液試料をジスフェリン発現の存在に関してアッセイする工程  
 を含む、哺乳動物においてジスフェリンが発現されているかどうかを決定する方法。

## 【請求項 2】

工程 (b) がジスフェリン核酸発現を検出する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

工程 (b) がジスフェリタンパク質発現を検出する工程を含む、請求項 1 記載の方法

。

## 【請求項 4】

工程 (b) が免疫学的アッセイを含む、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

哺乳動物がジスフェリノパシーを有すると推測される、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

ジスフェリノパシーが肢体筋ジストロフィー 2B (LGMD) またはミヨシミアパシー (MM) である、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

更に血液試料においてジスフェリタンパク質またはジスフェリン mRNA のレベルを決定する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

更に血液試料においてジスフェリタンパク質またはジスフェリン mRNA のレベルを参考と比較する工程を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 9】

参考と比べて血液試料における低いレベルのジスフェリン発現が哺乳動物におけるジスフェリノパシーの存在を示す、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 10】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 ~ 9 いずれか記載の方法。

## 【請求項 11】

(a) 哺乳動物由来の血液試料を提供する工程；および  
 (b) 該血液試料におけるジスフェリン発現のレベルを決定する工程であって、ここで、前もって決定された値よりも低いレベルが、該哺乳動物がジスフェリノパシーを有しやすいまたはジスフェリノパシーの遺伝的キャリアであることの指標である、工程  
 を含む、哺乳動物がジスフェリノパシーを有するかどうか、ジスフェリノパシーを有しやすいかどうか、またはジスフェリノパシーの遺伝的キャリアであるかどうかを決定する方法。

## 【請求項 12】

(a) 治療の処置後に哺乳動物由来の血液試料を提供する工程、および  
 (b) 該血液試料においてジスフェリン発現のレベルを決定する工程であって、ここで治療開始前の該哺乳動物から得られた血液試料におけるジスフェリン発現のレベルよりも高いレベルのジスフェリン発現が、該治療が有効であることの指標である、工程  
 を含む、哺乳動物においてジスフェリノパシーの治療が有効であるかどうかを決定する方法。

## 【請求項 13】

ジスフェリン発現のレベルを決定する工程が、ストリンジентな条件下でジスフェリン mRNA にハイブリダイズする核酸分子へ血液試料を曝露する工程を含む、請求項 11 ~ 12 いずれか記載の方法。

## 【請求項 14】

ジスフェリン発現のレベルを決定する工程が、ジスフェリンポリペプチドの存在を検出する工程を含む、請求項 11 ~ 12 いずれか記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

ジスフェリン発現のレベルを決定する工程がジスフェリンに選択的に結合する抗体へ血液試料を曝露する工程を含む、請求項 14 記載の方法。

## 【請求項 16】

哺乳動物がヒトである、請求項 11 ~ 12 いずれか記載の方法。

## 【請求項 17】

ジスフェリノパシーが肢体筋ジストロフィーまたはミヨシミアパシーである、請求項 11 ~ 12 いずれか記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は、2001年11月28日に出願された米国仮特許出願第60/333,895号の出願日の恩典を主張する。米国仮特許出願第60/333,895号の内容はその全体が参照により本明細書に援用される。

## 【0002】

## 技術分野

本発明は、筋ジストロフィー、より詳細には筋ジストロフィーの診断試験に関する。

## 【0003】

## 背景

肢帯筋ジストロフィー 2B (LGMD) およびミヨシミアパシー (MM) はどちらも、常染色体性の劣性遺伝、成人期発症、および筋酵素クレアチンキナーゼの著しい上昇を特徴とする (Bushby, 1999, Brain 122: 1403-1420)。これらはどちらもジスフェリンをコードする遺伝子の欠損により起こることが示されている (Bashirら, 1998, Nat. Genet. 20:37-42; Liuら, 1998, Nat. Genet. 20:31-36)。ジスフェリン遺伝子における同様の突然変異は、同じファミリーのメンバーの中でさえ異なる臨床的提示を起し得る (Illarioshkinら, 2000, Neurology 55:1931-1933; Weilerら, 1999, Hum. Mol. Genet. 8:871-877; Weilerら, 1996, Am. J. Hum. Genet. 59: 872-878)。さらに、前方遠位ミオパシーはジスフェリン突然変異に関連している (Illaら, 2001, Ann. Neurol. 49: 130-134)。従って、ジスフェリノパシー (dysferlinopathy) には多くの臨床的異質性が存在する。

## 【0004】

150 kbを越すゲノム領域にまたがる55のエクソンを含むジスフェリン遺伝子は巨大である (Aokiら, 2001, Neurology 57:271-278)。ジスフェリン遺伝子は、2,080のアミノ酸より構成される、膜結合性の膜結合型237 kDaジスフェリンタンパクをコードする (Andersonら, 1999, Hum Mol. Genet. 8:855-861; Matsudaら, 1999, Neurology 53:1119-1122; Selcenら, 2001, Neurology 56:1472-81)。

## 【0005】

現在は、ジスフェリノパシーの正確な診断には、臨床的評価、筋組織のタンパク研究 (免疫プロットもしくは免疫組織化学分析)、および/または直接遺伝子分析の組み合わせが必要である。さらに、ジスフェリン遺伝子の欠損は大部分は単一のヌクレオチド変化であり、検出を手助けする反回変異、全体再配列、または変異ホットスポットの証拠がない (Liuら, 1998, Nat. Genet. 20:31-36; Aokiら, 2001, Neurology 57:271-278; Andersonら, 1999, Hum. Mol. Genet. 8:855-861)。これらの理由のために、DNAベースの診断は、ジスフェリノパシーを他の筋ジストロフィーの形態と区別するための初期スクリーニングストラテジーとして用いるには困難である。

## 【0006】

## 要旨

本発明は部分的に、ジスフェリンが末梢白血球 (単球またはCD14(+)細胞) の部分母集団において発現され、筋肉においてジスフェリンを欠損する個体ではまたCD14(+)細胞においてもジスフェリンを欠損するという発見に基づく。これらの発見により、ジスフェリンの異常発現に対する血液ベースの試験の本発明に至った。このような試験は、例えば、

10

20

30

40

50

ジスフェリノパシーの試験として用いられ得、ジスフェリノパシーを治療するために施されるモニタリング治療の方法を提供する。

【0007】

1つの態様において、本発明は、哺乳動物においてジスフェリンが発現されるかどうかを決定する方法を提供する。この方法は、哺乳動物由来の血液試料を提供する工程およびジスフェリン発現の存在について血液試料をアッセイする工程を含む。ジスフェリン発現は、ジスフェリン核酸の発現を検出することにより、またはジスフェリタンパク質の発現を検出する（例えば、免疫学的アッセイを用いて）ことによりアッセイされ得る。この方法は、血液試料中のジスフェリンmRNAまたはジスフェリタンパク質レベルを決定する工程を含み得る。いくつかの態様において、この方法は、血液試料中のジスフェリタンパク質またはジスフェリンmRNAのレベルを参考と比較する工程を含む。例えば、本発明のいくつかの局面において、参考と比較して血液試料中の低いレベルのジスフェリン発現は、哺乳動物におけるジスフェリノパシーの存在を示す。特定の態様において、哺乳動物がジスフェリノパシー（肢帯筋ジストロフィー 2B (LGMD) およびミヨシミアパシー (MM)）を有することが推測される。哺乳動物は、例えばマウスやヒトであり得る。

10

【0008】

本発明は、哺乳動物がジスフェリノパシーを有するか、ジスフェリノパシーを有する傾向があるか、またはジスフェリノパシーの遺伝的キャリアであるかどうかを決定する方法を含む。この方法は、哺乳動物由来の血液試料を提供する工程；および、血液試料中のジスフェリン発現のレベルを決定し、その結果前もって決定した値より低いレベルは、哺乳動物がジスフェリノパシーを有しているか、ジスフェリノパシーを有する傾向があるか、またはジスフェリノパシーの遺伝的キャリアである指標である工程を含む。

20

【0009】

別の態様において、本発明は、哺乳動物においてジスフェリノパシーに対する治療が有効かどうかを決定する方法を提供する。この方法は哺乳動物由来の血液試料を提供する工程、続く治療における処置工程、および血液試料のジスフェリン発現のレベルを決定し、その結果治療開始以前の哺乳動物から得られた血液試料中のジスフェリン発現レベルよりも高いジスフェリン発現レベルが、治療が効果的である指標である工程を含む。

【0010】

本発明の特定の局面において、ジスフェリン発現レベルを決定する工程は、血液試料を、ストリンジェントな条件下でジスフェリンmRNAにハイブリダイズする核酸分子に曝露することを含む。

30

【0011】

本発明の他の態様において、ジスフェリン発現レベルを決定する工程は、例えば、ジスフェリンに選択的に結合する抗体と血液試料を接触させることによりジスフェリンポリペプチドの存在を検出することを含む。

【0012】

本発明のいくつかの態様において、哺乳動物はマウスもしくはヒトである。本発明の他の局面において、ジスフェリノパシーはLGMDもしくはMMである。

【0013】

本明細書で使用される場合、ジスフェリノパシーとは、ジスフェリン発現の異常なパターンに関連した障害をいう。このような障害は当該分野で公知であり、肢帯筋ジストロフィー 2B (LGMD) およびミヨシミアパシー (MM) が挙げられる。

40

【0014】

本明細書で使用される場合、「誤発現 (misexpression) または異常発現」とは、血球中 (例えば、単球) のRNAまたはタンパクレベルが、正常な個体 (すなわち、ジスフェリノパシーを有さない、ジスフェリノパシーを有する傾向のない、およびジスフェリノパシーに関連する遺伝子配列のキャリアでない個体はまた、野生型または正常対照をいう) とは異なる遺伝子発現パターンをいう。これは以下のことを含む；非正常レベルの発現、(すなわち、ジスフェリンの過剰な、または低い発現)/遺伝子が発現する時期またはステ

50

ジの点で正常型と異なる発現パターン（例えば、前もって決定した発生時期またはステージにおける発現の増加または減少（正常型と比較））/前もって決定した細胞型または組織型における発現の減少（野生型と比較）の点で野生型と異なる発現パターン/スプライシングサイズ、アミノ酸配列、翻訳後修飾、または発現したポリペプチドの生物学的活性の点で、野生型と異なる発現パターン/遺伝子発現における環境刺激または細胞外刺激の影響の点で野性型と異なる発現パターン（例えば、刺激の強さの増加または減少の存在下での発現の増加または減少パターン（野性型と比較して））。これはまた、ジスフェリンRNAまたはポリペプチドの正常型と比較して、ターンオーバーの速度の変化（例えば、ジスフェリンポリペプチド分解の速度の増加）によりおこる異常発現または誤発現も含む。一般的には、誤発現または異常発現は、ジスフェリンRNAまたはポリペプチドの発現においては減少する。一般的に、「mRNA」はpolyA+ RNAをいう。

10

## 【0015】

動物、例えばヒトは、母集団（例えば、一般的集団、年齢が合致する集団、同性の集団）と比較して、状態を発症する可能性が増加している場合、状態を発症する「危険性がある」または「傾向がある」。この可能性の増加は、遺伝子の特有の対立遺伝子/突然変異の存在、または特定の環境への暴露を含む因子の1つまたは組み合わせに起因し得る。例えば、ある個体が正常な対照集団と比べてジスフェリン発現（例えば単球などの血球における）のレベルの減少を示した場合、ジスフェリノパシーを発症する危険性がある。

## 【0016】

試験血球または血液試料（例えばジスフェリノパシーを有すると推測される、ジスフェリノパシーの傾向のある、またはジスフェリノパシーに関連するジスフェリン遺伝子配列の遺伝的キャリアである個体由来の細胞）のジスフェリン発現量は、前もって決定した値もしくは参考（例えば正常血球における発現レベル）、または正常対照細胞における発現と比較することにより評価され得る。

20

## 【0017】

本発明の1つ以上の態様の詳細は、添付の図面および下の記載に示される。本発明の他の特性、目的、利点は記載および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかである。

## 【0018】

詳細な説明

免疫プロット分析による欠損タンパク質発現のスクリーニングは、筋ジストロフィーにおける鑑別診断のために確実に迅速な手段であることが判明している（AndersonおよびDavison, 1999, *Am. J. Pathol.* 154:1017-1022）。しかしながら、現在の方法は筋肉生検試料を必要とする。本発明は、ジスフェリノパシーを診断するのに有用な方法を提供する。特に、この方法は非筋肉組織および侵襲性の少ないサンプリング技術を用いる。ジスフェリンは、心臓、胎盤、および腎臓を含む特定の非筋肉組織で発現することが見出されているが（Liuら, 1998, 前出; Matsudaら, 1999, 前出）、末梢血球で発現することはこれまでに知られていなかった。単球においてジスフェリンが発現すること、および単球におけるジスフェリンの発現が、骨格筋におけるジスフェリンの発現と相互に関連することが発見されている（表1）。従って、単球におけるジスフェリン発現の検出は、ジスフェリノパシー（例えばLGMD 2BおよびMM）のための血液ベース診断アッセイとして使用され得る。

30

40

## 【0019】

この新たな血液ベース診断アッセイは、現在の筋肉免疫診断方法を上回る様々な利点を提示する。本発明の方法は、筋肉試料の取り扱いおよび貯蔵に関連する特定の問題を克服する。この方法は筋肉生検と比較して、侵襲性の少ないサンプリング方法を用いて達成される。この侵襲性の少ない方法により、診断を確認するため、更なる試験を導くため、または治療の効力を評価するために、患者から試料を得ることを容易に、かつより消耗性を少なくするはずである。さらに、この方法に用いるための試料の回収はオペレーティングシアターを必要とせず、明らかにコスト削減の利点がある。

## 【0020】

50

診断上の用途に加えて、単球におけるジスフェリン発現は、インビトロでの機能的アッセイに利用し易くかつ影響を受けやすい非筋肉細胞型における、このタンパク質の生物学的機能を研究するために用いられ得る、新しいパラダイムを提供する。また、本発明は個体におけるジスフェリンパシーの進行をモニタリングするため、個体のジスフェリンレベル増加を意図した治療の効果をモニタリングするための（例えば、骨格筋ではなくむしろ血液におけるジスフェリンレベルをモニタリングすることによって治療効力をモニターする）勝手のよい方法を提供し得る。

#### 【0021】

本発明の方法は、二次的な影響としてジスフェリン発現が変化する（例えば、ジスフェリン遺伝子の突然変異以外の何らかの原因による筋ジストロフィーにおいて）障害を同定するために有用である。ジスフェリン発現が減少しているがジスフェリン遺伝子の欠損のない患者の同定は、例えば、ジスフェリン発現に正常に関与するタンパク質またはジスフェリン発現を制御するタンパク質の発見を導き得、ジスフェリンパシーに関係する病態生理学的経路を解明する手助けともなり得る。

10

#### 【0022】

本発明は、血液試料におけるジスフェリン発現検出の方法を用いる。この方法は、ジスフェリン核酸またはジスフェリンポリペプチドの検出を用い得る。核酸およびポリペプチドの検出のための血液試料（例えば単球）の調整方法は当該分野で公知である。

#### 【0023】

##### ジスフェリン核酸

本発明のいくつかの態様において、試験血液試料はRNAを検出することにより、ジスフェリン発現についてアッセイされる。従って、本発明の様々な方法は、ジスフェリン、例えば、全長ジスフェリンタンパク質またはその断片、例えば、ジスフェリンタンパクの抗原性断片をコードする、単離または精製した核酸分子（またはその相補体）、ならびに、例えば極めてストリンジェントな条件下で、ジスフェリンをコードする核酸分子およびジスフェリンをコードする核酸分子（例えば、Genbankアクセッション番号 XM 034329（ヒトmRNA）、XM 010780（ヒトmRNA）、NM 003494（ヒトmRNA）、AF 075575（ヒトmRNA）、AJ 007973（ヒトゲノムDNA）、およびAF 188290（musculus mRNA）に対して特定の度合いの配列同一性（例えば、少なくともおよそ60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性）をもつ核酸分子にハイブリダイズする核酸分子を用いる。ジスフェリンcDNA配列は、WO 00/11157およびWO 00/11016に開示されており、参考として本明細書中に援用される。

20

30

#### 【0024】

配列間の相同性もしくは配列同一性（これらの用語は、本明細書中では相互に用いられる）の計算は、下記のように実行される。

#### 【0025】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性の割合を決定するためにこれらの配列は、最適の比較目的に対して並べられる（例えば、ギャップ、最適なアラインメントのために、第1および第2のアミノ酸の1つまたは両方、または核酸配列に導入され得、非相同配列は比較目的に対して無視され得る）。1つの態様において、比較目的に対して並べられた参考配列の長さは、参考配列の長さの少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、80%、90%、もしくは100%である（例えば、ジスフェリンアミノ酸配列に対して第2の配列を並べた場合）。次いで、アミノ酸位置またはヌクレオチド位置に対応するアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、その位置での分子は同一である（本明細書中で用いられる場合、アミノ酸または核酸「同一性」はアミノ酸または核酸「相同性」と同意義である）。2種の配列間の同一性の割合は、2種の配列の最適なアラインメントのため導入される必要のあるギャップの数および各ギャップの長さを配慮した、配列により共有された同一位置の数の関数である。

40

50

## 【0026】

2つの配列間の配列の比較および同一性割合の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい態様においては、2つのアミノ酸配列間の同一性割合は、GCGソフトウェアパッケージ（インターネットwww.gcg.comで入手可能）内のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48:444-453,1970）アルゴリズムを用いて、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに、16、14、12、10、8、6または4のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5または6の長さウェイトを用いて、決定される。さらに別の態様において、2つのヌクレオチド配列間の同一性割合は、GCGソフトウェアパッケージ（インターネットwww.gcg.comで入手可能）内のGAPプログラムを用いて、NWSgapdna.CMPマトリックス、ならびに、40、50、60、70または80のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5または6の長さウェイトを用いて、決定される。特に好ましいパラメーターのセット（および開業医が、ある分子が本発明の配列同一性または相同性の範囲内かどうかを決定するために、どのパラメーターが適用されるべきかについて不確かな場合に、使われるべきパラメーターセット）は、12のギャップペナルティ、4のギャップ延長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを有するBlossum 62スコアリングマトリックスである。

10

## 【0027】

2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間の同一性割合は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているMeyersおよびMiller（CABIOS（1989）4:11-17）のアルゴリズムを用いて、PAM120ウェイト残基表、12のギャップ長さペナルティおよび4のギャップペナルティを用いて決定され得る。

20

## 【0028】

本明細書で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とはハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を説明している。ストリンジェントな条件は当業者には公知であり、Molecular Biology（John WileyとSons, N.Y.(1989), 6.3.1-6.3.6）のCurrent Protocols内に見出され得る。水溶性および非水溶性の方法がこの参考文献に記載されており、いずれも使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、約45 での6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中でのハイブリダイゼーション、次いで50 での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の別の例は、約45 での6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中でのハイブリダイゼーション、次いで55 での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の更なる例は、約45 での6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中でのハイブリダイゼーション、次いで60 での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄である。一般的に、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、約45 での6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中でのハイブリダイゼーション、次いで65 での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄である。他のストリンジェンシー条件（および開業医が、ある分子が本発明のハイブリダイゼーション限度以内かどうかを決定するために、どの条件が適用されるべきかについて不確かな場合に、使われるべき条件）は、65 での0.5 Mリン酸ナトリウム、7% SDS、次いで65 での0.2×SSC、0.1% SDSでの1回以上の洗浄である。

30

40

## 【0029】

ジスフェリンプローブおよびプライマーは、多くの検出方法において有用である。典型的に、プローブ/プライマーは、単離されたまたは精製されたオリゴヌクレオチドである。このオリゴヌクレオチドは典型的に、ジスフェリンのセンスもしくはアンチセンス配列、または、天然に存在するジスフェリン核酸配列の対立遺伝子のバリエーションもしくは変異体の、少なくとも約7、12または15、好ましくは約20または25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65または75の連続したヌクレオチドに対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

## 【0030】

50

ジスフェリン配列の選択された領域を増幅するために用いられ得る、PCRにおける使用に適したプライマーは、本発明の特定の方法において有用である。このプライマーは、少なくとも5、10、または50の塩基対長であるべきであり、また、一般的には100より少ない、または200未満の長さの塩基対長である。

#### 【0031】

他の有用な核酸分子は、260、300、400、500、600、700、800、900、1000または1100以上のヌクレオチド長であり、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でジスフェリン核酸分子に対してハイブリダイズする。

#### 【0032】

本発明の方法においてまた有用であるものは、対立遺伝子のバリエーション（同じ遺伝子座）、ホモログ（異なる遺伝子座）、およびオースログ（異なる生物）など天然に存在する、または、天然に存在し得ない核酸分子である。他の有用なバリエーションとしては、ジスフェリノパシーに関連した突然変異を含む配列が挙げられる。このような突然変異の例は、例えば、WO 11157およびWO 11016に見出され得る。変異はコード領域および非コード領域のいずれかまたは両方に起こり得る。このようなコード領域における変異は、保存的および非保存的アミノ酸置換の両方を引き起こし得る。

#### 【0033】

ジスフェリンの有用な対立遺伝子のバリエーション（例えば、抗原または参照タンパク質として有用であるもの）は、機能的および非機能的タンパク質の両方を含む。機能的な対立遺伝子のバリエーションは、ジスフェリンの生物学的活性を媒介する能力を維持する集団の範囲内のジスフェリタンパク質の天然に存在するアミノ酸配列バリエーションである（例えば、対立遺伝子のバリエーションをコードする配列に対する動物ホモ接合体は、正常な筋肉の機能を有する）。機能的な対立遺伝子のバリエーションは、典型的に、ジスフェリン配列の1つ以上のアミノ酸の保存的置換、またはこのタンパク質の重要でない残基の置換、欠失または挿入のみを含む。非機能的な対立遺伝子のバリエーションは、ジスフェリンバリエーションをコードする遺伝子の2つのコピーを保有する動物において、ジスフェリンの生物学的活性を媒介する能力を持たないジスフェリタンパク質の、天然に存在するアミノ酸配列バリエーションである（すなわち、この動物はジスフェリノパシーを発症する）。非機能的な対立遺伝子のバリエーションは、典型的に、ジスフェリタンパク質のアミノ酸配列の非保存的置換、欠失、挿入もしくは成熟前切断、または、このタンパク質の重要な残基もしくは重要な領域における置換、挿入もしくは欠失を含む。

#### 【0034】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換されたものである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝状側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、を有するアミノ酸が挙げられる。

#### 【0035】

単離されたジスフェリンポリペプチド

単離されたジスフェリタンパク質またはその断片（例えば、生物学的活性部分）は、診断上のアッセイにおいておよび治療組成物の調製において有用な抗ジスフェリン抗体を惹起する、または試験する（またはより一般的には、結合する）ために、例えば免疫原または抗原として使用され得る。ジスフェリタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いて、細胞または組織供給源より単離され得る。ジスフェリタンパク質またはその断片は、組換えDNA技術により生成されるか、または化学合成され得る。このポリペプチドは、ポリペプチドがシステム天然の細胞において発現される場合に存在するのと実質的

10

20

30

40

50

に同じ翻訳後修飾を生る系（例えば培養細胞）において、または、天然の細胞で発現される場合に存在する翻訳後修飾（例えばグリコシル化または切断）の変化もしくは省略を生じる系内において、発現され得る。

【0036】

有用なジスフェリンタンパク質またはその断片は、既知のジスフェリンタンパク質配列とは異なり得る（例えば、その中の残基の少なくとも1つの、しかし15%、10%または5%未満のアミノ酸残基、または、少なくとも1つの残基、しかし20%、15%、10%または5%未満異なる）。有用なタンパク質は、既知のジスフェリンタンパク質配列に対し、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上が同一であるアミノ酸配列を含む。

【0037】

抗ジスフェリン抗体

ジスフェリンポリペプチドに対して惹起された抗体は、本発明の特定の態様において有用である。このような抗体は市販されているか、または、当該分野で公知である方法を用いて生成され得る。

【0038】

抗ジスフェリン抗体は、診断的に用いられ得、また、治療用途に有用であり得る。本明細書中において使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子またはその免疫学的に活性な部分、すなわち抗原結合部分をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、抗体をペプシンなどの酵素で処理することにより生成され得るF(ab)およびF(ab')<sub>2</sub>断片が挙げられる。

【0039】

この抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、組換え（例えば、キメラまたはヒト化、完全なヒト、非ヒト（例えばマウス））、または一本鎖抗体であり得る。1つの態様において、これはエフェクタ機能を有し、補体を固定し得る。この抗体は、造影剤に結合され得る。

【0040】

全長ジスフェリンタンパク質またはジスフェリンの抗原性ペプチド断片は、(a)本発明の特定の態様において有用な抗体を生成するために使用され得るか、または、(b)他の免疫原（例えば、単球、単球膜調製物など）を用いて作製された抗ジスフェリン抗体を同定するために使用され得る。

【0041】

抗原性ポリペプチドに含まれる好ましいエピトープは、一般的にタンパク質の表面に位置するジスフェリンの領域（例えば、親水性の領域）、ならびに、高い抗原性を有する領域である。例えば、ジスフェリンタンパク質配列のEmini表面可能性分析は、ジスフェリンタンパク質表面に局在する特に高い可能性を有し、従って抗体生産を標的にするのに有用な表面残基をおそらく構成する領域を示すために用いられ得る。

【0042】

この抗ジスフェリン抗体は、一本鎖抗体であり得る。一本鎖抗体（scFV）は遺伝子工学で作製され得る（例えば、Colcherら、1999、Ann. N.Y. Acad. Sci. 880:263-80；およびReiter、1996、Clin. Cancer Res. 2:245-52を参照のこと）。一本鎖抗体は、同じ標的ジスフェリンタンパク質の、異なるエピトープに対する特異性を有する多価抗体を生成するために、二量体化または多量体化され得る。

【0043】

いくつかの態様において、この抗体はFcレセプターを結合する能力が低いか、または無く、例えば、アイソタイプ、サブタイプ、断片、または他の変異体であり、これは、Fcレセプターに結合することをサポートせず、例えば、突然変異をおこしている、または欠失しているFcレセプター結合領域を有する。

【0044】

本発明の方法において使用するための抗ジスフェリン抗体（例えば、モノクローナル抗

10

20

30

40

50

体)は、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的な技術により血液試料からジスフェリンを単離するために用いられ得る。抗ジスフェリン抗体は、タンパク質発現の豊富さ(すなわち量)およびパターンを評価するためにジスフェリンタンパク質(例えば、細胞溶解物または細胞上清における)を検出するために用い得る。例えば、ジスフェリノパシーを有する個体において、抗体を用いて血液試料中で検出可能なジスフェリンの量は、ジスフェリノパシーを有さない個体由来の血液試料中で検出された量よりも有意に少ない。いくつかの場合において、ジスフェリノパシーを有する個体由来の血液試料中でジスフェリン免疫活性は検出されない。抗ジスフェリン抗体は、例えば、所定の治療養生法の効力を決定するために、臨床試験手順の一部として血液中(例えば、単球)のジスフェリンタンパク質の量をモニターするために、診断的に用いられ得る。検出は、検出可能な基質に抗体を連結(すなわち物理的に連結)する(すなわち、抗体標識)ことによって容易になり得る。検出可能な基質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる;適切な補欠分子族複合体としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる;適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはフィコエリトリンが挙げられる;発光物質の例は、ルミノール(luminol)である;生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられる、適切な放射性物質の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ が挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

##### 予測医学

本発明の特定の態様は、診断アッセイ、予後アッセイおよび臨床試験のモニタリングが、予後(予測)目的のために使用され、それにより個々を治療する、予測医学の分野に関する。例えば、被験体が障害、ジスフェリノパシーの危険がある(すなわち、かかりやすい)かどうかを決定し得る。一般に、このような障害は、ジスフェリンポリペプチドをコードする遺伝子における損傷、または誤発現と関連がある。しかしながら、本発明の方法は、(例えば、ジスフェリン遺伝子以外の遺伝子における欠損による)血液中のジスフェリン発現の量が二次的効果となる、障害においてジスフェリンをモニターするためにもまた有用である。

#### 【0046】

##### 診断および予後アッセイ

血液試料(例えば、単球)におけるジスフェリンタンパク質または核酸の存在、レベル、または非存在は、試験被験体(例えば、LGMDまたはMMといったジスフェリノパシーと推測される個体)由来の血液サンプルを得、その血液試料を、ジスフェリンタンパク質または、ジスフェリンタンパク質もしくはその断片(例えば、ジスフェリンの分解産物)をコードする核酸(例えばmRNA)を検出し得る化合物または薬剤と接触させ、その結果、ジスフェリンタンパク質または核酸の存在が血液試料において検出されることにより評価され得る。ジスフェリン遺伝子の発現のレベルは、多くの方法(血液試料中のジスフェリンmRNAを測定すること、または、血液試料中のジスフェリン遺伝子によりコードされたタンパク質の量を測定することが挙げられるが、これらに限定されない)で測定され得る。このような方法は、例えば核酸またはタンパク質の絶対的なレベルまたは相対的なレベルを測定し得る。細胞内のジスフェリンmRNAのレベルは、インサイチュおよびインビトロの形式の両方によって決定され得る。

#### 【0047】

用語「血液試料」とは、全血液、血清、血漿、特定の細胞型(例えば単球)に対して富化された試料および、核酸またはタンパク質の検出を高めるために処理されている血球を含む試料を含む。一般に、血液試料はジスフェリノパシーを有する、または有することが

推測される、個体由来である。この試料はまた、ジスフェリノパシーを有する傾向があること、またはジスフェリノパシーに関連したジスフェリン遺伝子を有することが推測される個体（すなわち、個体はジスフェリノパシーに対するキャリアである）由来でもあり得る。

**【0048】**

ジスフェリン mRNA は、ハイブリダイゼーションまたはサザンもしくはポリメラーゼ連鎖反応分析、およびプローブアレイを含むが、これらに限定されない、増幅アッセイにおいて使用され得る。この mRNA は当該分野で公知の方法を用いて単離され得る。一般に、細胞（例えば、血球）由来の polyA+ RNA が、このようなアッセイのために使用される。この RNA は全血液試料または特定の細胞型（例えば、単球）に対して富化された試料から単離され得る。mRNA レベルの検出のための 1 つの診断方法は、単離された mRNA を目的の mRNA にハイブリダイズし得る核酸分子（プローブ）と接触させる工程を含む。この核酸プローブは、例えば、全長、一本鎖アンチセンスジスフェリン核酸（例えば Genbank アクセッション番号、XM 034329（ヒト mRNA）、XM 010780（ヒト mRNA）、NM 003494（ヒト mRNA）、AF 075575（ヒト mRNA）、AJ 007973（ヒトゲノム DNA）、および AF 188290（musculusculus mRNA）のうちのいずれか 1 つの核酸）、またはその部分（例えば、少なくとも 15、30、50、100、250 または 500 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドおよびジスフェリン mRNA にストリンジェントな条件下で特異的にハイブリダイズするために十分なオリゴヌクレオチド）である。本発明における使用のための他の適切なプローブとしては、例えば本明細書に記載されたものが挙げられる。

10

20

**【0049】**

1 つの形式において、例えば単離された mRNA をアガロースゲルにおいて泳動し、この mRNA をゲルからメンブレン（例えば、ニトロセルロース）に転写することにより、mRNA（または cDNA）が表面に固定され、プローブと接触する。代替の形式において、例えば、二次元遺伝子チップアレイにおいて、プローブが表面に固定され、mRNA（または cDNA）はプローブと接触する。当業者は、公知の mRNA 検出方法を、血液試料におけるジスフェリン mRNA のレベルを検出する際の使用のために適合し得る。

**【0050】**

試料内のジスフェリン mRNA のレベルは、例えば RT-PCR（Mullis, 米国特許第 4,683,202 号）、リガーゼ連鎖反応（Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193）、自己継続的な（self-sustained）配列複製（Guatelli ら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅系（Kwoh ら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-レプリカーゼ（Lizardi ら, 1988, Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardi ら, 米国特許第 5,854,033 号）または他の核酸増幅方法のいずれかによる核酸増幅、それに引き続く、当該分野で公知である技術を用いた増幅分子の検出で評価され得る。適切な条件下および適切な試薬を用いて、このようなプライマーはプライマー間のヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。このようなプライマーの例は、WO 00/11157 および WO 11016 に記載される。

30

**【0051】**

インサイチュ方法のために、血液試料は調製され/処理され、および支持体、典型的にはスライドガラスの上に固定され得、次いで、ジスフェリン mRNA に対してハイブリダイズし得るプローブと接触される。

40

**【0052】**

別の態様において、この方法は、さらに対照試料をジスフェリン mRNA もしくは cDNA を検出し得る化合物または薬剤と接触させる工程、および、対照試料中のジスフェリン mRNA または cDNA の存在と試験試料中のジスフェリン mRNA または cDNA の存在を比較する工程を含む。

**【0053】**

多様な方法が、ジスフェリンポリペプチドを検出するために、または試料中に存在するジスフェリンタンパク質の量を決定するために使用され得る。本発明のいくつかの局面に

50

において、参考と比較した試験血液試料中のジスフェリンポリペプチドの量が決定される。参考は、前もって決定された標準量または試験試料と同時に評価される試料（例えば、対照）であり得る。一般的に、これらの方法は、試料中のタンパク質のレベルを評価するために、抗体など選択的にタンパク質に結合する薬剤を、血液試料と接触させる工程を含む。本発明のいくつかの態様において、抗体は検出可能なラベルを保有する。抗体はポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。インタクトな抗体またはその断片（たとえば、Fab またはF(ab')<sub>2</sub>）が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」とは、検出可能な基質をそのプローブもしくは抗体に結合（すなわち、物理的に連結）することによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに検出可能な基質との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を含むと意図される。検出可能な基質の例は、本明細書中に提供される。

10

**【0054】**

この検出方法は、インビトロで血液試料中のジスフェリンタンパク質を検出するために使用され得る。血液試料中に存在するジスフェリンタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素免疫測定法（ELISA）、免疫沈降、免疫蛍光、酵素免疫アッセイ（EIA）、放射性免疫測定（RIA）、およびウエスタンブロット分析が挙げられる。

**【0055】**

この方法はさらに、対照試料を、ジスフェリンタンパク質を検出し得る化合物または薬剤と接触させる工程、および対照試料におけるジスフェリンタンパク質のレベルを試験試料中のジスフェリンタンパク質の存在と比較する工程を含み得る。

20

**【0056】**

本発明はまた、生物学的試料中の、ジスフェリンタンパク質または（of）mRNAの存在を検出するためのキットを含む。例えば、このキットは生物学的試料におけるジスフェリンタンパク質もしくはmRNAを検出し得る化合物または薬剤、および任意に標準を含む。この化合物または薬剤は適切な容器内に梱包され得る。このキットはさらに、血球中のジスフェリンタンパク質または核酸を検出するためのキットを使用するための使用説明書を含み得る。

**【0057】**

抗体ベースのキットに関して、このキットは：（1）ジスフェリンポリペプチドに結合する一次抗体（例えば、固体支持体に付着された）；および任意に（2）ジスフェリンまたは一次抗体のいずれかに結合し、検出可能な薬剤に結合体化された二次の、異なる抗体を含み得る。任意に、このキットはまた、血液試料を含むのに適切なバイアルおよび本発明の方法において使用するための使用説明書を含む。

30

**【0058】**

オリゴヌクレオチドベースのキットに関して、このキットは：（1）ジスフェリンmRNAに対してハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または（2）ジスフェリンmRNAに対応する核酸分子を増幅するために有用な一対のプライマーを含み得る。このキットはまた、緩衝剤、防腐剤、またはタンパク質安定剤の少なくとも1つを含み得る。このキットはまた、検出可能な薬剤を検出するために必要な成分（例えば、酵素または基質）を含み得る。このキットはまた、対照試料（例えば、ポジティブまたはネガティブ対照試料）、またはアッセイされ試験試料と比較され得る一連の対照試料を含み得る。キットの各成分は別々の容器内に封入され得、各種容器の全ては、このキットを使用して実行されたアッセイの結果を判断するための使用説明書と共に、単独の梱包内にあり得る。

40

**【0059】**

本明細書中に記載された診断方法は、誤発現、異常なもしくは所望でないジスフェリン発現に関連した疾患または障害を、有するあるいは発症する危険性のある被験体を同定し得る。本明細書中に記載された予後アッセイを使用して、被験体がジスフェリノパシーの症状を発症しそうかどうか、または被験体が、ジスフェリノパシーを治療するために薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸

50

、低分子、または他の薬物候補物)を投与され得るかどうかを決定し得る。例えばこのような方法を使用して、被験者がジスフェリン発現または活性を増加させる薬剤で効果的に治療され得るかどうかを決定し得る。

#### 【0060】

本発明の方法はまた、ジスフェリン遺伝子における遺伝的变化を検出し、それにより変化した遺伝子を持つ被験体がジスフェリンノパシーを発症する危険性があるかどうかを決定するために使用され得る。この方法は、被験体由来の試料中において、ジスフェリントタンパク質をコードするmRNAの完全性に影響するもしくはジスフェリン遺伝子の誤発現を引き起こす変化の少なくとも1つにより特徴づけられる、遺伝的变化の存在または非存在を検出する工程を含む。例えば、このような遺伝的变化は、1)ジスフェリン遺伝子のmRNA転写産物のレベルにおける変化、2)ジスフェリン遺伝子のmRNA転写産物の非野生型プライミングパターンの存在、3)ジスフェリントタンパク質の非野生型レベル、4)ジスフェリントタンパク質の不適切な翻訳後修飾、および5)ジスフェリン転写産物の配列における変化、の少なくとも1つの存在を確認することにより検出され得る。このような方法は当該分野で公知である。

10

#### 【0061】

ジスフェリンmRNAの配列における変化は、ジスフェリン遺伝子において点突然変異を検出するために特に有用であり得るアンカー-PCRもしくはRACE-PCRなどのポリメラーゼ連鎖反応、または代替としてライゲーション連鎖反応(LCR)において、プローブ/プライマーを用いず検出され得る。この方法は、被験体由来の血球の試料を回収する工程、試料からpolyA+ RNA(mRNA)を単離する工程、mRNAを、(存在する場合)ジスフェリン配列のハイブリダイゼーションと増幅が起こるような条件下でジスフェリン核酸配列に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させる工程、および増幅産物の存在または非存在を検出する工程、または増幅産物のサイズを検出し対照試料と長さを比較する工程を含み得る。PCRおよび/またはLCRは、WO 11157およびWO 11016に記載されているようなジスフェリン遺伝子における突然変異を検出するために使用されるいずれかの技術と共に、予備的な増幅工程として使用されることが所望され得ると予想される。

20

#### 【0062】

代替の増幅方法は、以下を含む：自己継続的な配列複製(Guatelliら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwohら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardiら, 1988, Bio-Technology 6:1197)および他の核酸増幅方法、次いで当業者に公知である技術を用いた増幅された分子の検出。

30

#### 【0063】

別の態様において、血球中のジスフェリンmRNAにおける突然変異は、リボザイム切断パターンにおける変化を検出することにより同定され得る。このような方法において、配列特異的なリボザイム(例えば米国特許第5,798,531号を参照のこと)は、リボザイム切断部位の発生または損失による特異的な突然変異の存在を記録するために使用され得る。あるいは、デオキシリボザイムが使用され得る。

#### 【0064】

他の態様において、ジスフェリンにおける遺伝的突然変異は、血球から得られたmRNA試料(またはcDNA)をプローブ核酸、例えばDNAまたはRNA、に対してハイブリダイズすることにより、例えば二次元アレイ、または、例えばチップベースのアレイにより、同定され得る。このようなアレイは複数のアドレスを含み、それぞれは他と位置的に区別できる。異なるプローブは複数の各アドレスに位置する。このアレイは高い密度のアドレスを有し得る、例えば、数百のまたは数千のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る(Croninら, 1996, Human Mutation 7:244-255; Kozalら, 1996, Nature Medicine 2:753-759)。例えば、ジスフェリンmRNAにおける突然変異は、Cloninら, 前出に記載されているように、発光DNAプローブを含む2次元アレイにおいて同定され得る。端的にいえば、プローブの一次ハイブリダイゼーションアレイを使用して、連続的な重複したプローブの直線状アレイ

40

50

を作製することによって、配列間の塩基変化を同定するため、試料および対照中のRNAの長い伸長の端から端まで走査し得る。この工程は点突然変異の同定を可能にする。この工程は、検出される全てのバリエーションまたは変異体に対して相補的な、より小さく特殊化したプローブアレイを使用することによって、特異的な突然変異の特徴付けを可能にする二次ハイブリダイゼーションアレイの前である。それぞれの二次ハイブリダイゼーションアレイは、野生型遺伝子と相補的なものおよび変異体遺伝子と相補的なもう一方の、並行なプローブのセットで構成される。

**【0065】**

ジスフェリン遺伝子における突然変異を検出するための他の方法としては、ジスフェリノパシーを有すると推測される個体由来の血液試料より得られたmRNAを用いて、切断薬剤からの保護がRNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二量体 (Myersら, 1985, Science 230:1242; Cottonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら, 1992, Methods Enzymol. 217:286-295) におけるミスマッチの塩基を検出するために使用される方法が挙げられる。

10

**【0066】**

また別の態様において、このミスマッチ切断反応は、血球の試料より得られたジスフェリンcDNAにおける点突然変異の検出およびマッピングのための規定された系において、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上の酵素(従って「DNAミスマッチ修復」酵素と呼ばれる)を使用する。例えば、E.ColiのmutY酵素はG/AミスマッチにおいてAを切断し、HeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼはG/TミスマッチにおいてTを切断

20

**【0067】**

点突然変異を検出するための他の技術の例としては、例えば血液試料より生成されたcDNAを使用した、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長 (Saikiら, 1986, Nature 324:163; Saikiら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230) が挙げられるが、これに限定されない。あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術が、本発明と共に使用され得る。血球において発現されたジスフェリン配列の特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(ゆえに増幅はディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存する) (Gibbsら, 1989, Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)、または適切な条件下で、ミスマッチがポリメラーゼ伸長を防ぎもしくは減少し得る一つのプライマーの極度な3'末端において (Prossner, 1993, Tibtech 11:238)、目的の突然変異を有し得る。特定の態様において、増幅はまた、増幅のためのTaqリガーゼを用いて実行され得ると予想される (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。このような場合において、ライゲーションは5'側配列の3'末端において完全な適合がある場合にのみおこり、増幅の存在または非存在を探ることにより、特異的部位における公知の突然変異の存在を検出することを可能にしている。

30

**【0068】**

特異的なジスフェリン突然変異の同定はまた、薬理ゲノム科学の用途において有用であり得る。例えば、特定のジスフェリン突然変異、ジスフェリン発現のレベル、またはジスフェリン発現のパターンはジスフェリノパシーを治療するための治療介入に対する特異的な応答に関連し得る。従って、ジスフェリンの突然変異、発現のレベル、または発現のパターンの同定は、ジスフェリノパシーを有する個体に対する治療養生法の調整のために有用であり得る。

40

**【0069】**

本明細書中に記載された方法は例えば、例えばジスフェリン遺伝子に関連する疾患の症状または家系病歴を示す患者を診断するための臨床設定において便利に使用され得る、本明細書中に記載された少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む前もって梱包された診断キットを利用することにより、実行され得る。

**【実施例】**

50

## 【0070】

## 実施例1：材料および方法

## ジスフェリン遺伝子発現の検出

Qiagen製QIAamp blood mini kitを用いて、製品使用説明書に従い、総RNAを全血より単離した。およそ10 $\mu$ gの総RNAを1%ホルムアルデヒドゲルにおいて分画し、Hybond<sup>TM</sup> N+メンブレン (Amersham) に転写した。Genbankアクセッション番号AF 075575におけるジスフェリンcDNA配列のヌクレオチド5364-5732に対応する標識プローブを用いて、標準のプロトコルに従い、ハイブリダイゼーションを65℃で実行した。メンブレンを65℃で2×SSC、0.1% SDS中で15分間洗浄し、次いで1×SSC、0.1% SDSおよび0.2×SSC、0.1% SDS中で15分間、それぞれ洗浄した。

10

## 【0071】

試験血液試料中のジスフェリン遺伝子発現を検出するためにこのような方法を使用し得る。

## 【0072】

## 末梢血単核細胞の単離と免疫プロット分析

製品使用説明書 (Amersham) に従い、Ficoll<sup>TM</sup>-Paque勾配遠心分離により、末梢血単核細胞 (PBMC; 単球) を、患者および健常対照の全血より単離した。PBMCをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で2回洗浄し、10倍容量のタンパク質抽出バッファー、M-PER (Pierce, Rockford, IL) 中で溶解した。この試料を遠心 (約18,000×gで10分間) し、細胞残屑をペレット化し、上清をジスフェリンのSDS-PAGE分析のために使用した。およそ20 $\mu$ gのタンパク質を、4~15%の勾配SDS-PAGEゲルにおいて分離した。免疫プロットングを、1次抗ジスフェリンモノクローナル抗体 (NCL-Hamlet, Novacastra, UKから得た) を1:300希釈で用いて、標準的な方法に従って実行した。免疫反応性結合を、ECL chemiluminescence system (Amersham) を用いて検出した。

20

## 【0073】

## CD14-ポジティブおよび-ネガティブ細胞集合へのPBMCの分離

どの血球型がジスフェリンを発現するかを決定する実験のため、CD14(+)およびCD14(-)血球を分離した。PBMC (およそ10<sup>7</sup>細胞) を20 $\mu$ lのCD14抗体コーティングマイクロビーズと混合し、6~12℃で30分間、インキュベートした。非結合細胞を、過剰のPBSバッファー中で細胞を洗浄し、次いで300×gで10分間遠心することにより取り除いた。この細胞ペレットを、製品使用説明書に従ったMACS (磁性細胞選別/分離) 装置 Milteny Biotec, Germany) における分離前に、2×10<sup>8</sup>細胞/mlの濃度になるようにPBS中に再懸濁した。

30

## 【0074】

## 免疫細胞化学

免疫細胞化学を使用し、血球中のジスフェリンタンパク質発現をアッセイした。PBMCを、Cytospin<sup>1m</sup> (Shandon, UK) 遠心分離機を用いて顕微鏡スライド上にかけた。この細胞を次いで、氷上において10分間、アセトン中で固定した。免疫細胞化学のために、このスライドを0.5% BSAおよび5%正常ヤギ血清を含むPBS (リン酸緩衝生理食塩水) 中でプレインキュベートした。この切片を次いで室温で一時間、5%正常血清を含むPBSに1:20に希釈したNCL-Hamlet (Novacastra, UK) とインキュベートした。このスライドを次いでPBS中で2回 (各5分) 洗浄した。抗体の検出を、標準技術を用いて行なった。洗浄したスライドを、製品使用説明書に従って、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体 (Jackson ImmunoResearch, PA) 中でインキュベートし、スライドをジアミノベンジジン (diaminobenzidine) 使用およびABC染色キット (Vector labs, CA) 中でインキュベートすることにより可視化した。

40

## 【0075】

## 実施例2：末梢血単核細胞 (PBMC) におけるジスフェリン発現の検出

ジスフェリンノパシーのための非筋肉診断アッセイを展開するための最初の工程として、健常個体の血球におけるジスフェリン遺伝子発現をノーザンプロット分析により試験した。ジスフェリン転写産物に対応する、弱い明確な約7.5 kbのバンドを、末梢血球および

50

骨格筋から単離した総RNAにおいて検出した(図1A)。1レーンあたりおよそ10 $\mu$ gのRNAを積載した。およそ4.5 kbおよび2.0 kb、より小さい転写産物をもまた、末梢血球において検出し、組織特異的なスプライズバリエーションの存在を示唆する。これらのデータは、血球中にジスフェリン遺伝子発現があることを実証する。従ってジスフェリン発現をアッセイする方法として、例えば個体がジスフェリノパシーを有するかどうかを決定するため、ノーザンブロット分析を使用し得る。

#### 【0076】

血球においてジスフェリンタンパク質が発現しているかどうかを決定するために、白血球(WBC)、末梢血単核細胞(PBMC)、脳および骨格筋由来の総タンパク質のウエスタンブロットを、実施例1に記載したように、抗ジスフェリンモノクローナル抗体(NCL-Hamlet)を用いてスクリーニングした。ジスフェリンタンパク質に対応するおよそ230 kDaの顕著なバンドを、PBMC、骨格筋、および脳で検出したが、試料における総WBCタンパク質では検出しなかった。PBMCおよびWBC試料は2つの関連のない、健常個体由来であった(図1B)。PBMCは主にリンパ球および単球から成るので、この結果はこれらの細胞型においてジスフェリンが発現することを示唆する。これらのデータは、ジスフェリンタンパク質が少なくとも血球の部分集合において発現することを実証する。ジスフェリンのための免疫細胞化学ベースアッセイにおいて、アッセイの感度を増加するために、PBMC(単球)に対して富化されている血液試料を使用することが一般的に好ましい。

#### 【0077】

実施例3：PBMCにおけるジスフェリン発現の免疫細胞化学分析

ジスフェリンを発現する細胞型を更に規定するために、PBMCをCD14抗体でコーティングした磁性ビーズを用いてCD14-ポジティブおよび-ネガティブ細胞に分離した。CD14は単球の特異的マーカーであるので、このアプローチはPBMCにおける二つの主要な細胞型を識別する。図1CおよびDに示される通り、免疫細胞化学分析はCD14(+)細胞におけるジスフェリン染色を示したが、CD(-)細胞においては示さなかった。この結果を、ウエスタンブロット分析により確認した(図1E)。まとめると、これらの知見は、血液におけるジスフェリン発現は主に単球においてであることを示す。単球は総WBCの3~7%のみを構成し、その結果ジスフェリンはWBCにおける総タンパク質の比較的少量を構成するので、WBCにおける検出可能なジスフェリンタンパク質発現の欠如が好ましい。

#### 【0078】

実施例4：PBMCにおけるジスフェリン発現の診断用途

ジスフェリノパシーのための血液ベース診断アッセイの正確性を評価するために、LGMD 2BまたはMMと診断されていた12人の患者におけるPBMCおよび骨格筋におけるジスフェリン発現の比較を行った。患者についてのウエスタンブロットングにより、骨格筋におけるジスフェリン欠損を確認した。PBMCの免疫ブロット分析は、対照においてジスフェリン反応性を示した(試験した6人中6人)が、患者から得られた12の血液試料のいずれにおいても、ジスフェリンを検出せず(図2、表1)、PBMCおよび骨格筋におけるジスフェリン発現間に優れた相関があることを示唆している。これらのデータは、ジスフェリノパシーを診断するために血液ベースアッセイを使用し得ることを実証する。

#### 【0079】

常に速やかに試料を処理し得ないので、ジスフェリンタンパク質の安定性における血液試料の遅延した処理の影響をまた、上記したノーザンブロット分析を用いて試験した。抜き取り36時間以内に処理された血液試料はジスフェリン分解の証拠を示さなかったが、一方、48時間放置した試料においては軽微な分解を観察し得る(図2)。24時間以上放置した対照試料において約55 kDaの低いバンドを検出したが、6時間経った試料においては検出しなかった(図2)。これは、対象のみに存在するが、患者試料においては存在しないので、55 kDaのタンパク質が部分的に分解されたジスフェリン産物であることを示唆する。一般的に、ジスフェリン欠損の診断指標として全長ジスフェリンタンパク質を使用する。

#### 【0080】

10

20

30

40

50

本発明の多数の態様を記載している。それでもなお、本発明の趣旨および範囲から逸脱すること無く、様々な変更がされ得ることが理解される。従って、他の態様は以下の特許請求の範囲内である。

【0081】

【表1】

表1. 末梢血単核細胞 (PBMC) および骨格筋における免疫診断によるジスフェリン欠損の評価

患者	臨床診断	突然変異	PBMCにおけるジスフェリン発現	骨格筋におけるジスフェリン発現	PBMCの免疫細胞化学分析
RB 2329	MM	E1883X, 6319 +1G	(-)	(-)	(-)
RB 1859	MM	6071におけるAGGの欠失	(-)	(-)	n.d.
RB 2079	DACM	5966におけるGGの欠失	(-)	(-)	(-)
II 1101	MM	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1102	MM	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1103	MM	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1104	MM	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1303	LGMD 2B	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1304	LGMD 2B	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1305	LGMD 2B	n.d.	(-)	(-)	(-)
II 1306	LGMD 2B	n.d.	(-)	(-)	(-)
RB 3533	MM	n.d.	(-)	(-)	n.d.

MM, ミオジミオパシー; LGMD 2B, 肢帯筋ジストロフィー; DACM, 遠位前区画ミオパシー (ref 7); X = ジスフェリン欠損; n.d., 決定されず; PBMC, 末梢血単核細胞; (-) = ジスフェリン染色の非存在。ボジティブ対照について、健康個体から得た6つのPBMC試料のうち6つが、ウエスタンブロットによりボジティブなジスフェリン反応性を示した。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1A】図1Aは、ジスフェリンcDNAのヌクレオチド5364-5732に対応するプローブを用いた、正常個体由来の末梢血単核細胞におけるジスフェリン遺伝子の発現を示すノーザンプロットの結果を示す。

【図1B】図1Bは、NCL-Hamletモノクローナル抗体を用いた、複数の組織におけるジスフェリンタンパク質の発現を示すウエスタンプロットの結果を示す。ポジティブ対照には、マウスおよびヒト由来の骨格筋および脳組織が含まれる。

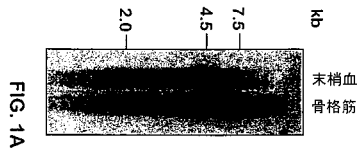
【図1C】図1Cは、CD14-ネガティブ細胞におけるジスフェリン発現の免疫細胞化学分析の結果を示す。

【図1D】図1Dは、CD14-ポジティブ細胞におけるジスフェリン発現の免疫細胞化学分析の結果を示す。

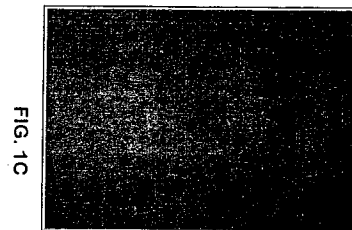
【図1E】図1Eは、CD14-ポジティブ細胞（レーン1）およびCD14-ネガティブ細胞（レーン2）におけるジスフェリン発現のウエスタンプロット分析の結果を示す。両方の調製物において、42 kDaのアクチン抗原イムノプロットをポジティブ対照として取り扱った（レーン1およびレーン2、下のパネル）。

【図2】図2は、健常対照ミヨシオパシー患者由来のPBMCにおけるジスフェリン発現の免疫細胞化学分析の結果を示す。レーン1、2、3、7および8は、正常な健常対照由来の末梢血単核細胞（PBMC）を含み、レーン4、5および6（それぞれ、RB 2329、RB3533およびRB2079）はMM患者由来のものである（患者の遺伝子型の詳細は表1を参照）。ジスフェリンタンパク質の安定性に対する血液試料の処理の遅れの影響は、イムノプロット分析のための処理前に48時間（レーン1）、36時間（レーン2）、24時間（レーン3および7）ならびに6時間（レーン8）放置した試料を比較することにより示され得る。

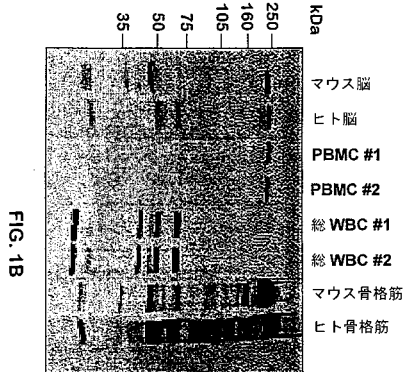
【図1A】



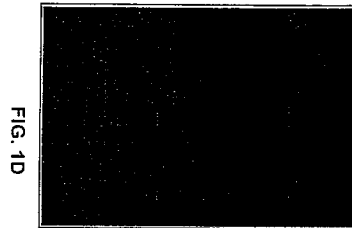
【図1C】



【図1B】



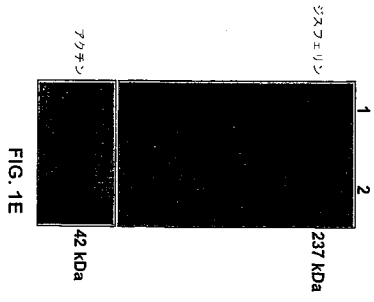
【図1D】



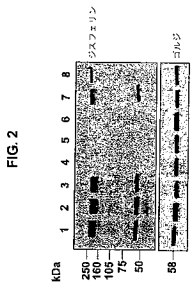
10

20

【 1 E】



【 2】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/38010		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; G01N 33/53; C07H 21/04 US CL : 435/6, 7.1, 91.2, 91.51; 536/23.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1, 91.2, 91.51; 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				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	ARGOV et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews: clinical and genetic features. Brain. June 2000, Vol. 123, No. 6, pages 1229-1237, see entire reference, especially page 1230, right column.	1-17		
A	ANDERSON et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. Human Molecular Genetics. May 1999, Vol. 8, No. 5, pages 855-861, see entire reference.	1-17		
A	BUSHBY, K.M.D. The limb-girdle muscular dystrophies - multiple genes, multiple mechanisms. Human Molecular Genetics. September 1999, Vol. 8, No. 10, pages 1875-1882, see entire reference.	1-17		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier application or patent published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 21 February 2003 (21.02.2003)		Date of mailing of the international search report 28 MAR 2003		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Diana B. Johannsen <i>Leticia D. Roberts for</i> Telephone No. 703/308-0196		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US02/38010

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
USPT, DWPI, POPUB, Medline, Lifesci, Scisearch, Embase, Biosis, CAPlus  
search terms: dysferlin, dysf, blood, CD14#, muscle; inventors' names

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(72) 発明者 ブラウン, ロバート エイチ., ジュニア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02192 ニーダム, オークランド アベニュー 16

(72) 発明者 ホー, モン エフ.

シンガポール国 ユニット 22-275 270008 ギム モー ロード ブロック 8

(72) 発明者 イリヤ, イザベル

スペイン国 バルセロナ 08041 シー/フェルー ナンバー5 (カーサ)

(72) 発明者 ガリヤルド, エドゥアルド

スペイン国 バダロナ 08915 シー/ペレ III ナンバー12 4ファイ - 2 エ  
スカレラ エイ

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34

QX02

专利名称(译)	基于血液的分析用于dysferrinopathy		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005510248A</a>	公开(公告)日	2005-04-21
申请号	JP2003547654	申请日	2002-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司 泛达菟猜猜氧化钛卫生某医院圣诞老人船员李保罗 - 圣戴维的Apex酒店撕裂Rusuta船员李保罗城主		
申请(专利权)人(译)	总医院集团 Fandashio德Gesutio疗养医院圣诞老人船员李保罗 - 圣天/蜂/ El Hosupitariu星船员李保罗城主		
[标]发明人	ブラウンロバートエイチジュニア ホーモンエフ イリヤイザベル ガリヤルドエドゥアルド		
发明人	ブラウン,ロバート エイチ.,ジュニア ホー,モン エフ. イリヤ,イザベル ガリヤルド,エドゥアルド		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 C12Q1/6881 C12Q2600/158 G01N33/6887 G01N2800/2878		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	60/333895 2001-11-28 US		
其他公开文献	JP4282483B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

Dysferlin在血液中表达，并且还发现肌肉中缺乏dysferlin的个体在CD14 (+) 细胞中缺乏dysferlin。在这些发现的基础上，描述了基于血液的dysferline表达测试和这些测试的使用。

請求項	特許請求の範囲	特許請求の範囲	特許請求の範囲	特許請求の範囲
1	血液	血液	血液	血液
2	血液	血液	血液	血液
3	血液	血液	血液	血液
4	血液	血液	血液	血液
5	血液	血液	血液	血液
6	血液	血液	血液	血液
7	血液	血液	血液	血液
8	血液	血液	血液	血液
9	血液	血液	血液	血液
10	血液	血液	血液	血液
11	血液	血液	血液	血液
12	血液	血液	血液	血液
13	血液	血液	血液	血液
14	血液	血液	血液	血液
15	血液	血液	血液	血液
16	血液	血液	血液	血液
17	血液	血液	血液	血液
18	血液	血液	血液	血液
19	血液	血液	血液	血液
20	血液	血液	血液	血液
21	血液	血液	血液	血液
22	血液	血液	血液	血液
23	血液	血液	血液	血液
24	血液	血液	血液	血液
25	血液	血液	血液	血液
26	血液	血液	血液	血液
27	血液	血液	血液	血液
28	血液	血液	血液	血液
29	血液	血液	血液	血液
30	血液	血液	血液	血液
31	血液	血液	血液	血液
32	血液	血液	血液	血液
33	血液	血液	血液	血液
34	血液	血液	血液	血液
35	血液	血液	血液	血液
36	血液	血液	血液	血液
37	血液	血液	血液	血液
38	血液	血液	血液	血液
39	血液	血液	血液	血液
40	血液	血液	血液	血液
41	血液	血液	血液	血液
42	血液	血液	血液	血液
43	血液	血液	血液	血液
44	血液	血液	血液	血液
45	血液	血液	血液	血液
46	血液	血液	血液	血液
47	血液	血液	血液	血液
48	血液	血液	血液	血液
49	血液	血液	血液	血液
50	血液	血液	血液	血液
51	血液	血液	血液	血液
52	血液	血液	血液	血液
53	血液	血液	血液	血液
54	血液	血液	血液	血液
55	血液	血液	血液	血液
56	血液	血液	血液	血液
57	血液	血液	血液	血液
58	血液	血液	血液	血液
59	血液	血液	血液	血液
60	血液	血液	血液	血液
61	血液	血液	血液	血液
62	血液	血液	血液	血液
63	血液	血液	血液	血液
64	血液	血液	血液	血液
65	血液	血液	血液	血液
66	血液	血液	血液	血液
67	血液	血液	血液	血液
68	血液	血液	血液	血液
69	血液	血液	血液	血液
70	血液	血液	血液	血液
71	血液	血液	血液	血液
72	血液	血液	血液	血液
73	血液	血液	血液	血液
74	血液	血液	血液	血液
75	血液	血液	血液	血液
76	血液	血液	血液	血液
77	血液	血液	血液	血液
78	血液	血液	血液	血液
79	血液	血液	血液	血液
80	血液	血液	血液	血液
81	血液	血液	血液	血液
82	血液	血液	血液	血液
83	血液	血液	血液	血液
84	血液	血液	血液	血液
85	血液	血液	血液	血液
86	血液	血液	血液	血液
87	血液	血液	血液	血液
88	血液	血液	血液	血液
89	血液	血液	血液	血液
90	血液	血液	血液	血液
91	血液	血液	血液	血液
92	血液	血液	血液	血液
93	血液	血液	血液	血液
94	血液	血液	血液	血液
95	血液	血液	血液	血液
96	血液	血液	血液	血液
97	血液	血液	血液	血液
98	血液	血液	血液	血液
99	血液	血液	血液	血液
100	血液	血液	血液	血液