

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公表特許公報 ( A )

(11)特許出願公表番号

## 特表2003 - 509064

(P2003 - 509064A)

(43)公表日 平成15年3月11日(2003.3.11)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088		35/56	4 B 0 6 3
35/56		35/76	4 B 0 6 4
35/76		39/395	4 B 0 6 5
			D

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全129数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 523797(P2001 - 523797)

(86)(22)出願日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月11日(2002.3.11)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/08827

(87)国際公開番号 W001/020026

(87)国際公開日 平成13年3月22日(2001.3.22)

(31)優先権主張番号 99118120.7

(32)優先日 平成11年9月10日(1999.9.10)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(71)出願人 エピダウロス バイオテクノロジー アク  
ツィエンゲゼルシャフト

ドイツ連邦共和国 ベルンリード アン  
ニューランド 1

(72)発明者 ウォナウスキ レシェク

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン エベナウ  
アー シュトラーセ 9

(72)発明者 ハスタート エリザベス

ドイツ連邦共和国 ジャーメリング ゲシ  
ユウィスター - スコール - リング 2

(74)代理人 弁理士 清水 初志 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト h P X P 遺伝子における多型および、診断的および治療的適用におけるその使用

### (57)【要約】

表現型スペクトル、ならびにhPXR遺伝子の遺伝する異常発現および/または機能の様々な形態を伴う重複する臨床特性を診断および治療する一般的な手段および方法が述べられる。特に、例えば薬物の不十分な代謝および/または感受性に関連する分子変異型hPXR遺伝子のポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。さらに、そのようなポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞、および変異型hPXRタンパク質の生産のためのその使用が述べられる。加えて、変異型hPXRタンパク質、ならびにそのようなタンパク質を特異的に認識する抗体、さらに上述のポリヌクレオチドまたはベクターを含むトランスジェニック非ヒト動物個体が提供される。また、hPXR遺伝子の多機能性に関連する障害の治療のための阻害剤を同定および獲得する方法、ならびにそのような障害の状態を診断する方法が述べられる。上述のポリヌクレオチド、ベクター、タンパク質、抗体および上述の方法による阻害剤を含む、薬学的組成物および診断用組成物が提供される。hPXR遺伝子産物の基質、阻害剤または調節剤である薬物を用いる様々な疾患の診断および治療に、この組成物は特に有用である。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 以下からなる群より選択されるポリヌクレオチド：

(a)配列番号：

56, 57,  
60, 61, 64, 65, 68, 69, 72, 73, 76, 77, 80, 81, 84, 85, 88, 89, 92, 93, 96, 97,  
100, 101, 104, 105, 108, 109, 112, 113, 116, 117, 120, 121, 124, 125, 128,  
129, 132, 133, 136, 137, 140, 141, 144, 145, 148, 149, 152, 153, 156, 157,  
160, 161, 164, 165, 166, 168, 170, 172, 174または176

に記載の核酸配列をもつポリヌクレオチド；

(b)配列番号：167、169、171、173、175または177のアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c)hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-201位、-131位、-57位、-42位、52位、79位、106位、225位、315位、418位、488位、492位、543位、696位、834位、984位、1108位、1308位もしくは1320位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-100位もしくは-20位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が位置477から開始する）のイントロン2の-29位に対応する位置に、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が610位で終了する）のイントロン3の+72位に対応する位置に、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン6が1216位で終了する）のイントロン6の+99位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-73位もしくは-17位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1333位で終了する）のイントロン7の+36位に対応する位置、またはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン8が位置1439で終了する）のイントロン8の+43位に対応する位置に、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、付加的なヌクレオチドまたはヌクレオチド欠失およびヌクレオチド置換をもつ

ポリヌクレオチド；

(d)hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-201位、-131位、52位、106位、418位、834位、1108位、1308位あるいは1320位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン6が1216位で終了する）のイントロン6の+99位に対応する位置に、またはhPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン8が1439位で終了する）のイントロン8の+43位に対応する位置に1つのAをもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-57位、79位、315位、543位、696位あるいは984位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン3が477位から開始する）のイントロン2の-29位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-17位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン7が1333位で終了する）のイントロン7の+36位に対応する位置に1つのTをもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-20位に対応する位置に1つの欠失をもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-42位、225位あるいは492位に対応する位置に1つのCをもつポリヌクレオチド、またはhPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の488位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-100位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン3が610位で終了する）のイントロン3の+72位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセス番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-73位に対応する位置に1つのGをもつポリヌクレオチド；

(e)hPXRポリペプチド（アクセス番号：gi3769538、開始コドンCTGにおけるCが位置280位）の18位、27位、36位、140位、163位または370位におけるアミ

ノ酸置換を含む、該hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および (f)hPXRポリペプチド（アクセッション番号：gi3769538）の18位におけるEからKへの、27位におけるPからSへの、36位におけるGからRへの、140位におけるVからMへの、163位におけるDからGへの、または370位におけるAからTへのアミノ酸置換を含む、該hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項2】 変異型hPXRタンパク質またはその断片をコードする、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 ヌクレオチドの欠失、付加および/または置換が、対応する野生型遺伝子と比較して、hPXR遺伝子の発現を変化させる、請求項1または2記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項5】 ポリヌクレオチドが、原核細胞または真核細胞で発現を誘導する発現制御配列に機能的に連結される、請求項4記載のベクター。

【請求項6】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項4もしくは5記載のベクターを用いて遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項7】 以下の段階を含む、分子変異型hPXRタンパク質またはその断片を生産する方法：

- (a)請求項6記載の宿主細胞を培養する段階；および
- (b)該タンパク質または断片を培養物から回収する段階。

【請求項8】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項4もしくは5のベクターを用いて細胞を遺伝子操作する段階を含む、分子変異型hPXR遺伝子を発現することが可能な細胞を生産する方法。

【請求項9】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドにコードされる、または請求項7記載の方法により得られる、または請求項8記載の方法により生産される細胞から得られる、hPXRタンパク質またはその断片。

【請求項10】 請求項9記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項11】 請求項1から3のいずれか一項において定義されるような、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含むエピトープを特異的に認識する、請求

項10記載の抗体。

【請求項12】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドに相補的な核酸分子。

【請求項13】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを特異的に認識および切断できる核酸分子。

【請求項14】 請求項12または13の核酸分子を含むベクター。

【請求項15】 請求項1から3のいずれか一項記載の少なくとも一つのポリヌクレオチドまたは、請求項4もしくは5記載のベクターを含むトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項16】 少なくとも1つのhPXR遺伝子の不活性化された野生型対立遺伝子をさらに含む、請求項15記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項17】 マウスまたはラットである、請求項15または16記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項18】 以下の段階を含む、hPXR遺伝子の分子変異またはその遺伝子産物の活性を調節できる、hPXR阻害剤を同定および獲得する方法：

(a) 請求項9記載のタンパク質、または請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む分子変異型hPXR遺伝子を発現する細胞を、薬剤の代謝に応答して検出可能なシグナルを提供できる構成成分の存在下において、CYP3A4またはCYP3A7を介した薬剤代謝を許容する条件下で、スクリーニングされる化合物と接触させる段階、および

(b) シグナルの存在または増加が推定上の阻害剤を示唆するような、シグナルの存在または不在、または薬剤代謝によって生じるシグナルの増加を検出する段階。

【請求項19】 細胞が、請求項8記載の方法によって得られる、または請求項15から17のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物に含まれる、請求項6記載の細胞である、請求項18記載の方法。

【請求項20】 以下の段階を含む、hPXR遺伝子の分子変異またはその遺伝子産物の活性を調節することが可能なhPXR阻害剤を同定および獲得する方法：

(a) hPXRタンパク質に結合し、該タンパク質と第一の分子との第一の複合体が形

成されることが知られている第一の分子と、請求項9記載のタンパク質とを接触させる段階；

(b)該第一の複合体とスクリーニングされる化合物とを接触させる段階；および

(c)該化合物が、該第一の分子を該第一の複合体から置換するかどうかを測定する段階。

【請求項21】 測定段階が、タンパク質および化合物の第二の複合体の形成を測定する段階を含む、請求項20記載の方法。

【請求項22】 測定段階が、上記タンパク質に結合しない第一分子の量を測定する段階を含む、請求項20または21記載の方法。

【請求項23】 第一の分子がニフェジピン、リファンピシンまたはコルチコステロンである、請求項20から22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】 第一の分子が標識される、請求項20から23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】 以下の段階を含む、hPXR遺伝子の分子変異の存在に関連する障害、またはそのような障害への感受性を診断する方法：

(a)被験者からの試料における請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドの存在を決定する段階；および/または

(b)請求項9記載のタンパク質の存在を決定する段階。

【請求項26】 障害が癌である、請求項25記載の方法。

【請求項27】 PCR法、リガーゼ連鎖反応法、制限酵素切断法、直接配列決定法、核酸増幅技術、ハイブリダイゼーション技術または免疫学的検定法を含む、請求項25または26記載の方法。

【請求項28】 障害をなくすまたは軽減するため、被験者に薬物を投与する段階をさらに含む、請求項25から27記載のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】 (i)機能的および発現可能な野生型hPXR遺伝子、または(ii)請求項12もしくは13記載の核酸分子、または請求項14記載のベクターを細胞に導入する段階をさらに含む、請求項25から28記載のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】 請求項18から24のいずれか一項記載の方法の段階および以下の段階を含む薬学的組成物を生産する方法

(c)段階(b)において同定および獲得される化合物、またはその誘導体を、薬学的に許容される形態に合成および/または製剤化する段階。

【請求項31】 薬剤またはプロドラッグを治療的適用に適した形態に製剤化する段階、および請求項25から27記載のいずれか一項記載の方法において診断された被験者の障害を予防または改善する段階を含む、薬学的組成物を調製する方法。

【請求項32】 化合物薬剤またはプロドラッグが、請求項28において定義されるような薬物の誘導体である、請求項30または31記載の方法。

【請求項33】 請求項18から24のいずれか一項記載の方法により同定される、または得られる阻害剤。

【請求項34】 請求項9記載のタンパク質に特異的に結合する請求項33記載の阻害剤。

【請求項35】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドの検出のための、および/または個々のhPXR対立遺伝子の遺伝子型決定のための、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの使用。

【請求項36】 ポリヌクレオチドが請求項1から3記載のいずれか1つのポリヌクレオチドである、または請求項12もしくは13記載の核酸分子である、請求項35記載の使用。

【請求項37】 上記オリゴヌクレオチドが約15~50ヌクレオチド長であり、配列番号：1~165のいずれか一つのヌクレオチド配列、または相補的配列を含む、請求項35記載の使用。

【請求項38】 請求項37において定義されるようなオリゴヌクレオチドを含むプライマーまたはプローブ。

【請求項39】 請求項9記載のタンパク質、請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む分子変異型hPXR遺伝子の発現を検出するための、および/または請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むhPXR対立遺伝子を識別するための、hPXR遺伝子の遺伝子産物に特異的に結合することが可能な抗体または物質の使用。

【請求項40】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含

む組成物、請求項4もしくは5記載のベクター、請求項6記載の宿主細胞もしくは請求項8記載の方法により得られる宿主細胞、請求項9記載のタンパク質、請求項10もしくは11の抗体、請求項12もしくは13記載の核酸分子、請求項14記載のベクター、請求項33記載の阻害剤、または請求項38記載のプライマーもしくはプローブ。

【請求項4 1】 診断用組成物または薬学的組成物である、請求項40記載の組成物。

【請求項4 2】 請求項1から4記載のいずれか一項記載のポリヌクレオチドをゲノム内に含む被験者の障害を治療または予防するための、薬学的組成物を調製するための、有効用量の薬剤またはプロドラッグの使用。

【請求項4 3】 障害が癌である、請求項42記載の使用。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の分野**

本発明は、表現型スペクトル、およびヒトプレグナンX受容体(hPXR)遺伝子遺伝子の遺伝する異常発現および/または機能の幾つかの形態を伴う重複する臨床特性を、診断および治療する手段および方法に広く関連する。特に、本発明は、例えば異常な薬物応答または環境発癌物質に引き起こされる幾つか共通の癌の個々の素因に関係する、分子変異型hPXR遺伝子のポリヌクレオチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドを含有するベクターに関連する。さらに、本発明はそのようなポリヌクレオチドまたはベクターを含有する宿主細胞、ならびに変異型hPXRタンパク質を産生するためのその使用に関連する。さらに、本発明は変異型hPXRタンパク質および特異的にそのようなタンパク質を認識する抗体に関連する。本発明はまた、上述のポリヌクレオチドまたはベクターを含有するトランスジェニック非ヒト動物に関連する。加えて、本発明は、hPXR遺伝子の多機能に関する疾病の治療のための薬物候補および阻害剤を同定および獲得するための方法、ならびにそのような疾病の状態の診断方法に関連する。本発明はさらに、上述の方法によって得られる、上述のポリヌクレオチド、ベクター、タンパク質、抗体および薬物および阻害剤を含む薬学的組成物および診断用組成物を提供する。組成物は特に、hPXR遺伝子またはその産物の基質、阻害剤または調節剤である薬物を用いた、様々な疾患の診断および治療に有用である。

**【0002】**

本明細書の本文を通して幾つかの文書が引用されている。本明細書で引用される各文書(任意の製造者の仕様書、指示書等を含む)は本明細書において参照として組み入れられるが、引用される任意の文書が実際に本発明に関する先行技術であるということを認めただけではない。

**【0003】****発明の背景**

血液蛋白のチトクロームP450(CYP)ファミリーのメンバーは、広い種類の、ステロイドホルモンのような内因性基質や、発癌物質、トキシンおよび薬物を含

む生体異物を代謝する(1, 2)。ヒトCYPタンパク質のうち、集合的に、全てのヒトCYPアイソフォームのうち飛びぬけて最も量が多いため、CYP3Aサブファミリーのものが主な重要性をもつものである。さらに、それらの基質特異性は著しく広い；したがって、多くの構造的に異なる化合物は、独占的に、またはある程度までは、CYP3Aタンパク質の基質である。得られるデータに基づき、一般に、全てのCYP3Aアイソフォームは同様の基質スペクトルをもつと仮定される；しかし、限られた研究では、相違の可能性が示唆される(3)。全てのCYP3Aアイソフォームは、薬物の処理に特定の重要性がある器官(胃腸管、腎臓および肝臓)に局在している。

#### 【0004】

少なくとも3つの機能的CYP3Aタンパク質が、ヒトにおいて存在する。CYP3A4モノオキシゲナーゼは、ヒトの肝臓および小腸における支配的なチトクロームP450である。このタンパク質は広い基質特異性を示し、避妊ステロイド、抗うつ薬、ベンゾジアゼピン、免疫抑制薬、イミダゾール抗有糸分裂薬、およびマクロライド系抗生物質を含む、現在使用される全ての薬物の60%以上を代謝する(4, 5)。さらに、CYP3A4は、環境トキシンからの防護において主要な役割を担う。例えば、このタンパク質は、アフリカおよびアジアの多くの地域における早死の主な原因である、肝臓癌の病因に関係があるとされるアフラトキシンB1を代謝する。アフラトキシンB1はアスペルギルス種により産生されるマイコトキシンであり、ヒトへの曝露は主にカビに汚染された貯蔵食品の摂取の結果起こる。発癌性は肝チトクロームP450依存のモノオキシゲナーゼ系による8,9-酸化物へのその変換に関連している。フォレスター(Forrester)ら(6)は、アフラトキシンB1の代謝活性率はミクロソーム中のCYP3A遺伝子ファミリーのタンパク質レベルと高い相関があることを見出した。さらに、パオリーニ(Paolini)ら(7)は、 $\beta$ -カロチンの高用量で処理したラットの肺におけるCYP3Aの著しい増加を見出した。その結果、ヒトにおける、同様に高レベルのCYP3A4が、生物活性化されたタバコ喫煙の前発癌物質からの、癌のリスクの素因を個体に与え、ゆえに、喫煙者における $\beta$ -カロチンの発癌補助効果が説明されることが提案された。これら全ては、CYP3A4活性における個体差が様々な薬物治療の有効性、および、環境発癌物質に

引き起こされる幾つかの主要な癌への個々の素因に影響する可能性があることを意味する。

#### 【0005】

CYP3A4の含有量および触媒活性におけるかなりの変異が、実際に一般集団で述べられてきた。例えば、遺伝子基質の代謝クリアランスは20倍までの個体相互の可変性で単様式の分布を表す。肝臓生検におけるCYP3A4タンパク質の活性は、30倍まで変動する(8)。さらに、多くの一般的薬物は遺伝子の発現レベル(誘導または抑制)を変化させ、この現象の程度は各々変化する。CYP3A4発現の誘導物質は、糖質コルチコイドデキサメタゾン、抗生物質リファンピシン、および抗有糸分裂性クロトリマゾールのような、一般に使用される薬物を含む。CYP3A4発現の誘導能は、基質の多様な範囲と組み合せて、多剤療法を行う患者においては、このアイソザイムに関わる潜在的に有害な薬物相互作用の可能性を生じる。

#### 【0006】

CYP3A1はCYP3A4に密接に関連したアイソフォームである(>98%のcDNA配列類似性)が、これが別々の遺伝子産物を反映するのか、または対立遺伝子の変異を反映するのかは知られていない。対照的に、CYP3A5はCYP3A4とは別個の遺伝子であり、成人および胎児の肝臓および腎臓および腸管において多型的に発現する。成人の白人においては、試料の10~30%の肝臓においてmRNAおよびタンパク質が検出され、一方、被験者の70%の腎臓および腸管においてタンパク質が検出された(9)およびその文献を参照のこと)。おそらく不安定なタンパク質を合成させる、CYP3A5遺伝子で述べられた点突然変異は、この酵素の多型的発現を説明する可能性がある(9)。CYP3A7は第3の機能的CYP3Aアイソフォームである。CYP3A7は当初、胎児の肝臓から単離されたが、後に成人の肝臓の54%において発見された(10)。

#### 【0007】

個々の患者におけるCYP3Aアイソザイムの誘導能および活性を評価する試験は、それらの基質である薬物を用いた治療の最大限の利用、および関連する副作用の防止と明らかな関係があると考えられる。肝臓生検におけるCYP3Aアイソザイム活性の直接評価は可能であるが、倫理的および費用上の理由から実用に適さな

い。エリスロマイシン呼気分析試験または6-β-ヒドロキシコルチゾール試験等のCYP3A4活性の間接的インビボ試験は、望ましくないプローブ物質の侵襲的投与等の倫理的な問題を引き起こし、またそれらは明らかに定常的な試験には適していない。加えて、これらの試験間の相関欠如は、CYP3A4活性に関するそれらの有益な価値を疑問視する(11)。

#### 【0008】

個体相互間CYP3A4可変性の大部分(83%)は、遺伝子的要因によるものであった(12)。それらの要因の事前同定を想定し、CYP3A4および他のCYP3Aアイソザイムの活性についての遺伝子的試験を確立することが可能である。CYP3Aアイソザイムの活性および発現に影響を及ぼす遺伝分散は遺伝子そのものに、または一つもしくはそれ以上のそれらの制御因子に局限できる。最も良く特徴付けられたCYP3A遺伝子、CYP3A4の、最初に公表された3つの配列の比較により、CYP3A4タンパク質のアミノ酸配列に影響する多型の存在が示唆された(13)。あいにく、本発明者らの知る限り、この知見は、一般集団においては確証されなかった。より最近には、CYP3A4プロモーターのニフェジピン特異的な反応因子における多型(CYP3A4-W)が述べられた(14)。その存在は、より進行した前立腺腫瘍の病期と関連している(14)。フェリックス(Felix)ら(15)は、新規の99例、および治療関連白血病の30例において、この多型を調べた。全ての治療関連例において、一つまたはそれ以上の、CYP3Aにより代謝される、エピポドフィロトキシン(epipodophyllotoxin)のような抗癌剤への事前曝露があった。これらのデータは、CYP3A-W多型をもつ個体では、治療に関連した白血病への危険性が増加する可能性があり、CYP3A4によるエピポドフィロトキシン(epipodophyllotoxin)代謝は二次的な癌の危険性に寄与する可能性があることを示唆する。現在のところ、多型がCYP3A4タンパク質の発現性または誘導能に影響するかどうかは不明である。最初に公表された分析により、CYP3A4の基礎発現レベルには影響がないことが示唆される(8)。CYP3A5において点突然変異が述べられたが(9)一方、CYP3A7においては突然変異は報告されなかった。

#### 【0009】

人工的にCYP3A4遺伝子に導入したアミノ酸置換を用いた実験により、ファミリ

一のメンバーの機能がアミノ酸置換に対して非常に感受性が高いことが示される(16~21)。アミノ酸置換に加え、サイレント多型および、非翻訳配列またはイントロン配列に局在するものもまた、これらの遺伝子の発現レベルに影響を及ぼす可能性がある。または、そのような多型は周辺の、同定されていない多型のマーカーとしての役割を担う可能性がある。この効果は連鎖として知られており、即ち、定義された多型は、それらが原因とならない表現型のマーカーとしての役割を担う。

#### 【0010】

1998年、CYP3A4の発現がhPXR(プレグナンX受容体)またはPARと呼ばれるオーファン核受容体ファミリーのメンバーにより制御されることを3つの研究グループが独立して示し、CYP3A発現および誘導性を理解する上での重大な躍進が起こった(22~24)。CYP3A4の誘導物質を用いた処理により、hPXRは9-シスレチノイン酸受容体(RXR)をもつヘテロ二量体として、CYP3A4プロモーターのリファンピシン/デキサメタゾン反応要素に結合する。ノーザンブロット解析により、肝臓、結腸、および小腸、即ちCYP3A4を発現する主要な器官において、hPXRの最も多量の発現が検出された。利用可能な証拠により、ヒトhPXRは、CYP3A4遺伝子の主要な転写制御因子としての役割を担うことが示唆される。近年の報告により、hPXRに仲介されるCYP3A7の誘導が記述され、ファミリーの全てのメンバーがこの共通の転写活性化因子により制御される可能性があることが示唆されている(25)。

#### 【0011】

hPXRにおいて自然に生じた突然変異が存在する場合、それらは、特に癌治療において、薬物の代謝および薬物治療の有効性に影響を及ぼす可能性があることは明らかである。しかし、ヒトhPXR遺伝子において、そのような変異がどれほど、またどの程度の頻度でどの位置に存在するのかは知られていない。

#### 【0012】

したがって、hPXR遺伝子多型に起因し、例えば疾患、特に癌の化学療法を妨げる個々の薬物不耐性および薬物治療の無効性の多様な形態を診断および治療する手段および方法は、従来利用可能ではなかったが、やはり非常に望ましい。

## 【0013】

ゆえに、本発明の技術的な課題は上述の要求に応じることである。

## 【0014】

この技術的課題の解決は添付の特許請求の範囲において特徴付けられる態様の提供により達成される。

## 【0015】

発明の概要

本発明はhPXR遺伝子のヌクレオチド配列における、新規かつこれまで未知の変異および、これらの対立遺伝子の集団分布の知見に基づいている。これらの新規の配列に基づき、診断試験およびそのような試験のための試薬は、hPXR遺伝子のホモ接合体およびヘテロ接合体、高頻度対立遺伝子および低頻度対立遺伝子を含む、ヒトにおけるhPXR対立遺伝子の特異的な検出および遺伝形質決定のために設計された。そのような試験法を用いたヒトのhPXR対立遺伝子の状態の決定は、CYP3A4およびCYP3A7の多くの基質を用いた治療の最適化に有用である。環境発癌物質によって引き起こされる幾つかの共通の癌の個々の素因を試験するのにも有用であり得る。

## 【0016】

第一の態様において、本発明は分子変異型hPXR遺伝子のポリヌクレオチド、ならびにそれに関連する態様、例えばベクター、宿主細胞、変異型hPXRタンパク質ならびにそれらの産生方法等を提供する。

## 【0017】

その他の態様において、本発明は、後天性の薬物感受性低下または薬物過感受性に関連する疾病の治療のため、薬物候補ならびにhPXRの阻害剤を同定および獲得する方法、またそのような疾病の状態を診断する方法を提供する。

## 【0018】

さらなる態様において、本発明は、上述のポリヌクレオチド、それらを含むベクター、タンパク質、それに対する抗体、ならびに上述の方法により得られる薬物および阻害剤を含む、薬学的組成物および診断用組成物を提供する。

## 【0019】

本発明の薬学的組成物および診断用組成物、方法および利用は、治療が薬物治療および薬物耐性に依存している癌および他の疾患の診断および治療に有用である。本発明によるhPXR遺伝子の新規の変異形態は、一定の患者に対する薬物の薬力学的プロファイルの開発の可能性を提供する。

#### 【0020】

##### 発明の説明

hPXR遺伝子における変異の知見および特徴付け、ならびにヒト個体における異なるhPXR対立遺伝子の区別についての診断試験は、CYP3A4遺伝子産物またはCYP3A7遺伝子産物の標的であり、ゆえにその代謝がCYP3A4またはCYP3A7に依存するような薬物を用いた疾患の治療法を改善するために、非常に有力な手段を提供する。個々の対立遺伝子hPXRの状態の診断により、例えば、薬物の個別の用法の適用の可能性を開くことにより、焦点を絞った治療が可能となる。それはまた、治療の結果についての予後を知る手段としても有用である。さらに、hPXR、および新規hPXR変異を遺伝形質決定するための診断試験は、確立した薬物で治療法を改善し、遺伝子型を薬物活性または副作用と関連付けるのに役立つのみではない。これらの試験および配列はまた、個々の型のhPXRの活性を特異的に調節する新規阻害剤の開発のための試薬を提供する。

#### 【0021】

ゆえに、本発明は分子生物学および薬物療法についての薬学的研究を開発する新規の方法を提供する一方、変異型hPXR遺伝子の発現に起因する、それらの潜在的な有害効果については回避している。

#### 【0022】

したがって、本発明は以下からなる群より選択されるポリヌクレオチドに関連する：

(a)配列番号：

56, 57, 60,  
61, 64, 65, 68, 69, 72, 73, 76, 77, 80, 81, 84, 85, 88, 89, 92, 93, 96, 97, 100,  
101, 104, 105, 108, 109, 112, 113, 116, 117, 120, 121, 124, 125, 128, 129, 132,  
133, 136, 137, 140, 141, 144, 145, 148, 149, 152, 153, 156, 157, 160, 161, 164,  
165, 166, 168, 170, 172, 174または176

に記載の核酸配列を有するポリヌクレオチド；

(b)配列番号：167、169、171、173、175または177のアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c)hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-201位、-131位、-57位、-42位、52位、79位、106位、225位、315位、418位、488位、492位、543位、696位、834位、984位、1108位、1308位もしくは1320位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-100位もしくは-20位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が位置477から開始する）のイントロン2の-29位に対応する位置に、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が610位で終了する）のイントロン3の+72位に対応する位置に、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン6が1216位で終了する）のイントロン6の+99位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-73位もしくは-17位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1333位で終了する）のイントロン7の+36位に対応する位置、またはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン8が位置1439で終了する）のイントロン8の+43位に対応する位置に、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、付加的なヌクレオチドまたはヌクレオチド欠失およびヌクレオチド置換をもつポリヌクレオチド；

(d)hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-201位、-131位、52位、106位、418位、834位、1108位、1308位あるい

は1320位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン6が1216位で終了する）のイントロン6の+99位に対応する位置に、またはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン8が1439位で終了する）のイントロン8の+43位に対応する位置に1つのAをもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-57位、79位、315位、543位、696位あるいは984位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が477位から開始する）のイントロン2の-29位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-17位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1333位で終了する）のイントロン7の+36位に対応する位置に1つのTをもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-20位に対応する位置に1つの欠失をもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の-42位、225位あるいは492位に対応する位置に1つのCをもつポリヌクレオチド、またはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける）の488位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-100位に対応する位置、hPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が610位で終了する）のイントロン3の+72位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-73位に対応する位置に1つのGをもつポリヌクレオチド；

(e)hPXRポリペプチド（アクセッション番号：gi3769538、開始コドンCTGにおけるCが位置280位）の18位、27位、36位、140位、163位または370位におけるアミノ酸置換を含む、該hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および

(f)hPXRポリペプチド（アクセッション番号：gi3769538）の18位におけるEからKへの、27位におけるPからSへの、36位におけるGからRへの、140位におけるVからMへの、163位におけるDからGへの、または370位におけるAからTへのアミノ酸置

換を含む、該hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【0023】

本発明の状況においては、本明細書にて使用されるような「分子変異型」hPXR遺伝子またはタンパク質という用語は、hPXR遺伝子またはタンパク質が、ヌクレオチドの置換、付加および/または欠失により、野生型のhPXR遺伝子またはタンパク質とは異なることを意味する（hPXR遺伝子のcDNA配列は、Bertilsson, Proc Natl Acad Sci USA 95(1998), 12208~13; Lehmann, J Clin Invest.102(1998), 1016~23; アクセッション番号: AF061056 (gi3511137)、AF084645 (gi376938)、AF084644 (gi376936)、AJ009936 (gi5852062)、AJ009937 (gi5852066)である)。多型の番号付けは、hPXR遺伝子（アクセッション番号: gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける）の-100位または-20位に対応する変異については配列gi3769536、またはhPXR遺伝子の他の全ての変異についてはgi3769538を指す。好ましくは、このヌクレオチド置換は、hPXRタンパク質のアミノ酸配列において、対応する変化をもたらす。

【0024】

本明細書にて使用される「対応する」という用語は、ある位置は先行するヌクレオチドおよびアミノ酸の数のみによってそれぞれ決定されるのではないことを意味する。欠失、置換の可能性のある、または一つもしくはそれ以上の付加的なヌクレオチドを含む可能性のある、本発明による一定のヌクレオチドまたはアミノ酸の位置は、遺伝子またはポリペプチドにおけるどこか他の欠失または付加的なヌクレオチドもしくはアミノ酸によって変化する可能性がある。ゆえに、本発明による「対応する位置」のもとでは、ヌクレオチドまたはアミノ酸は示された数において異なる可能性があるが、なおも同様の近傍ヌクレオチドまたはアミノ酸を有する可能性があることが理解されるべきである。置換、欠失される、または付加的なヌクレオチドまたはアミノ酸を含む可能性のあるヌクレオチドまたはアミノ酸は、「対応する位置」という用語にも含有される。ヌクレオチドまたはアミノ酸は、例えばそれらの近傍のヌクレオチドまたはアミノ酸と共に、遺伝子発現の制御、対応するRNAまたはRNAエディティングの安定性に関する可能性のある配列、加えて本発明のタンパク質の機能的ドメインまたはモチーフをコード

する可能性のある配列を形成し得る。

#### 【0025】

表4の第2列に一覧にされるような単一ヌクレオチド多型 (SNP) を含む変異の命名法は、アントナラキス (Antonarakis) および命名法審議会 (Nomenclature Working Group) (Antonarakis, Hum Mutat 11(1998), 1~3) に基づいている。翻訳開始部位として、cDNA (gi3769538) の280位にCをもつCTGを+1と番号付ける。+1の5'に位置するヌクレオチドを-1と番号付ける。イントロンに位置するSNPはヌクレオチドの、あるエキソンの最初または最後のヌクレオチドのヌクレオチド位置の上流 (+) または下流 (-) のヌクレオチド数により示される。エキソン1bまたはイントロン1bに位置するSNPは、アクセッション番号: gi3769536をもつ、前述の命名法の60位における、開始ATGのA(+1)を指す番号により示される。

#### 【0026】

上記に示されるように、あるエキソンが終了または開始する位置に近接したあるヌクレオチドにおいて、あるイントロンが開始または終了することがさらに理解される。エキソンからイントロンへの、またはイントロンからエキソンへの移行 (transition) を含む配列もまた、本明細書においては以下、エキソンイントロン境界 (exon-intron boundary) として言及される。通常、連続した番号付けが全てのエキソンおよび/または全てのイントロンに対して適用される。好ましくは、イントロン1はエキソン1に続き、イントロン2はエキソン2に続く等である。代替エキソンが使用できる場合、この代替使用エキソンは文字により設計し得る。ゆえに、2つの代替使用された「エキソン1」は、各々エキソン1aおよびエキソン1bと呼ぶことができる。エキソン1aの場合、イントロン1aはエキソン1aに続き、イントロン1bはエキソン1bに続く。

#### 【0027】

本発明に従い、hPXR遺伝子における新規のこれまで未同定の遺伝子変異の様式および集団分布は、多くの異なる個体から得たヒトhPXR遺伝子の関連領域の配列解析により解析された。hPXRを含む全ての遺伝子の各々の遺伝子的性質をもつ、個体のゲノムDNAが、個々の血液試料から容易に精製できることは既知の事実である。これらの個々のDNA試料はその後、血液試料を提供した個体に存在するhPX

R対立遺伝子の配列組成の解析に使用される。配列解析はhPXR遺伝子の関連領域のPCR増幅、それに続くPCR産物の精製、その後の、確立された方法（ABI ダイタ－ミネーターサイクルシーケンシング）を用いた自動DNAシーケンシングにより実施した。

#### 【0028】

ヒト血液ゲノムDNAのPCR産物の直接DNA配列決定法によって個々のhPXR遺伝子型を決定し、新規hPXR変異を同定する試みにおいて、考慮しなければならなかったある重要なパラメータは、各ヒトは各々の常染色体上の遺伝子（二倍性）の2つの遺伝子コピーを有する（通常、異常な例外は非常に少ない）という事実である。それにより、ホモ接合配列変異のみならず、ヘテロ接合変異をも明瞭に同定できるようにするため、配列の評価には非常に慎重を要した。新規hPXR遺伝子多型（ホモ接合およびヘテロ接合）の同定および特徴付けにおける異なる段階の詳細は、下記の実施例に記載される。

#### 【0029】

本発明に従って検出されるhPXR遺伝子における突然変異は表4、表5および図4にて示される。突然変異解析の方法は標準プロトコールに従い、実施例にて詳細に記載される。一般に、表現型スペクトルおよび、hPXR遺伝子において突然変異をもつ患者における薬物代謝および変化した薬物耐性という、他の形態と重複する臨床的特徴の評価のため、本発明に従って使用されるそのような方法は、例えばハプロタイプ解析、単鎖コンフォメーション多型解析（SSCA）、PCR法および直接配列決定法を含む。多くの患者の徹底的な臨床的特徴付けに基づいて、表現型は後にこれらの突然変異、また以前に述べられた突然変異と関連付けることができる。

#### 【0030】

当業者には明白であるように、この新しい分子遺伝学的知識は現在、投与された薬物が異常な効果をもたらすような、指標となる患者の遺伝子型およびその家族の遺伝子型を正確に特徴付けるために使用することができる。

#### 【0031】

過去20年間にわたって、遺伝子の異質性は薬物への反応にみられる変異の重要

な原因としてますます認識されるようになった。多くの科学発表論文 (Meyer, *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37(1997), 269~296およびWest, *J.Clin.Pharmacol.* 37(1997), 635~648) は、ある種の薬物は、ある患者においては他の患者においてよりも、より良く作用する、または非常に毒性が高いことすらあること、また薬物に対する患者の反応におけるこれらの変異は分子的基盤に関連する可能性があることを明らかに示している。この「ゲノム薬理学」の概念は、患者の薬物への反応と遺伝子のプロフィールとの間の相関に焦点を向けている (Marshall, *Nature Biotechnology*, 15(1997), 954~957; Marshall, *Nature Biotechnology*, 15(1997), 1249~1252)。

#### 【0032】

薬物療法に関連する集団変異性のこのような状況において、ゲノム薬理学は、特定の薬物に対して副作用なく反応できる患者の同定および選択に有用な手段として提案されてきた。この同定/選択は、例えば患者の血中の白血球からのDNAを遺伝形質決定することによる、遺伝子多型の分子診断および疾患の特徴付けに基づくことができる (Bertz, *Clin.Pharmacokinet.* 32(1997), 210~256; Engel, *J.Chromatogra.B.Biomed.Appl.* 678(1996), 93~103)。米国の民間健康保険医療団体、および多くの欧州諸国の政府公衆衛生局のような健康管理提供者のためには、このゲノム薬理学的アプローチにより健康管理を改善すること、ならびに不必要な治療、有効性のない薬物、および副作用のある薬物に対してかかる巨額な費用を削減することの双方の改善を示すことが可能である。

#### 【0033】

変異型hPXR遺伝子における突然変異は時には、単独または複合の、アミノ酸の欠失、挿入、および特に置換を生じる。野生型遺伝子または他の突然変異形態におけるそのような突然変異を遺伝子的に操作することは当然ながら可能である。hPXR遺伝子のDNA配列におけるそのような改変の導入法は、当業者にはよく知られている；例えばサムブルック (Sambrook)、「分子クローニング実験マニュアル」(Molecular Cloning A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバー研究所 (Cold Spring Harbor Laboratory) (1989) N.Y.を参照のこと。

#### 【0034】

hPXRタンパク質のアミノ酸配列における変化の性質の研究のために、インターネットから得られるBRASMOLのようなコンピュータプログラムが使用できる。さらに、他の適切なコンピュータプログラムを用いて、構造モチーフの折りたたまれ方のシミュレーションおよびコンピュータによる再設計を行うことができる (Olszewski, Proteins 25(1996), 286~299; Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 11(1995), 675~679)。コンピュータは詳細なタンパク質モデルの構造解析およびエネルギー解析に使用できる (Monge, J. Mol. Biol. 247(1995), 995~1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376(1995), 37~45)。これらの解析は、hPXRタンパク質の機能における特定の突然変異の影響の決定に使用できる。

#### 【0035】

一般に、本発明のポリヌクレオチドにコードされるタンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸の欠失、付加または置換は、一つ又は複数のヌクレオチドの置換、挿入または欠失、またはそれらの任意の組み合わせによるものである。

#### 【0036】

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書の上記にて特定される他に、例えば先行技術；例えば(13)に記述された、少なくとも一つのヌクレオチドおよび任意にアミノ酸の欠失、付加および/または置換をさらに含み得る。本発明のこの態様は、遺伝子のそのような突然変異形態、または上述のタンパク質により模倣され得る同様の突然変異形態をもつ患者における、薬物の薬理学的プロフィールに対する、hPXR遺伝子における突然変異の相乗効果の研究を可能にする。相乗効果の解析により、癌およびその他の疾患のある形態の薬物耐性表現型または薬物感受性表現型の発現についてより深い洞察が提供されることが期待される。より深い洞察から、癌に関連する診断用組成物および薬学的組成物の開発は大いに恩恵を受けると考えられる。

#### 【0037】

ゆえに、好ましい態様において、本発明は、ヌクレオチドの欠失、付加および/または置換が、対応する野生型遺伝子と比較して、変異型hPXR遺伝子の変化した発現をもたらすような、分子変異型hPXR遺伝子のポリヌクレオチドに関連する

## 【0038】

本発明のポリヌクレオチドは、例えばDNA、cDNA、ゲノムDNA、RNA、または合成によって産生されたDNAもしくはRNA、またはこれらのうち任意のポリヌクレオチドを単独でもしくは組合せで含む、組換えにより産生したキメラ核酸分子が可能である。好ましくはポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを含む、遺伝子的な操作に従来使用されるベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージの一部である。そのようなベクターはさらに、適した宿主細胞および適切な条件下においてベクターを選択させるマーカー遺伝子のような遺伝子を含む可能性がある。

## 【0039】

本発明のベクターのさらに好ましい態様において、本発明のポリヌクレオチドは、原核細胞または真核細胞における発現をさせる発現制御配列に、有効に連結される。ポリヌクレオチドの発現はポリヌクレオチドの転写、好ましくは翻訳可能なmRNAへの転写を含む。真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞における発現を保証する制御要素は、当業者によく知られている。それらは通常、転写開始を保証する制御配列、および任意に、転写終結および転写の安定化を保証するポリAシグナルを含む。付加的な制御要素は転写エンハンサーおよび翻訳エンハンサーを含み得る。原核宿主細胞における発現を許容する可能な制御要素は、例えば、大腸菌におけるlac、trpまたはtacプロモーターを含み、真核宿主細胞における発現を許容する制御要素の例は、酵母におけるAOX1またはGAL1プロモーター、またはCMV、SV40、RSVプロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、または哺乳動物細胞および他の動物細胞におけるグロビンイントロンである。転写開始を担う因子に加えて、そのような制御要素は、ポリヌクレオチドの下流に、SV40ポリA部位またはtkポリA部位のような転写終結シグナルをも含み得る。この状況において、Okayama-Berg cDNA発現ベクター-pcDV1（Pharmacia）、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3（In-vitrogene）、pSPORT1（GIBCO BRL）のような、適切な発現ベクターが、当技術分野において既知である。好ましくは、ベクターは発現ベクターおよび/または遺伝子転移ベクターもしくはターゲティングベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ関

連ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシパピローマウイルスのようなウイルスに由来する発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの標的細胞集団への導入に使用できる。組換えウイルスベクターを構築するため、当業者に既知の方法が使用できる；例えば、サムブルック、「分子クローニング実験マニュアル」コールドスプリングハーバー研究所 N.Y.および、オースベル (Ausubel)、「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)に記載の技術を参照のこと。または、本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、標的細胞への運搬のためリポソームへ再構成することができる。

#### 【0040】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを用いて形質転換した宿主細胞に関連する。宿主細胞は原核細胞または真核細胞が可能である；上記を参照のこと。宿主細胞において存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを、宿主細胞のゲノムへ組み込むか、または染色体外に維持することができる。この点において、本発明の組換えDNA分子を「遺伝子ターゲティング」および/または「遺伝子置換」のために、突然変異遺伝子の回復または、相同組換えを介した突然変異遺伝子の作製のために使用できることもまた理解される；例えばモウリック (Mouellic, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87(1990), 4712~4716)；ジョイナー (Joyner)、「遺伝子ターゲティング、実践アプローチ (Gene Targeting, A Practical Approach)」Oxford University Pressを参照のこと。

#### 【0041】

宿主細胞としては、バクテリア、昆虫、真菌類、植物、動物またはヒトの細胞のような、任意の原核細胞または真核細胞が可能である。好ましい真菌類細胞は、例えば、サッカロミセス属の細胞、特にサッカロミセス・セレヴィシエ (*S. cerevisiae*)種の細胞である。「原核」という用語は、変異型hPXRタンパク質またはその断片の発現のために、ポリヌクレオチドを用いて形質転換またはトランスフェクションできる全てのバクテリアを含むことを意味する。原核宿主はグラム陰性バクテリアおよびグラム陽性バクテリア、例えば大腸菌、チフス菌 (*S. typhimurium*)、セラチアマルセッセンス (*Serratia marcescens*)および枯草菌 (*Ba*

cillus subtilis)等を含み得る。hPXR変異タンパク質の突然変異形態をコードするポリヌクレオチドを、当業者に一般に知られた任意の技術を用いた宿主の形質転換またはトランスフェクションに使用できる。融合した、使用可能なように連結した遺伝子を調製する方法、およびそれらをバクテリア細胞または動物細胞において発現する方法は当技術分野にて既知である(サムブルック、上記)。そこで記述される遺伝子構築物および方法は、例えば原核細胞宿主における変異型hPXRタンパク質の発現に利用できる。一般に、挿入されたポリヌクレオチドの十分な転写を容易にする、プロモーター配列を含む発現ベクターが、宿主に関連して使用される。発現ベクターは概して、複製起点、プロモーターおよびターミネーター、および形質転換した細胞の表現型による選抜を提供できる特定の遺伝子を含む。最適な細胞成長を達成するため、形質転換した原核宿主は発酵槽において増殖でき、当技術分野にて既知の技術に従って培養できる。本発明のタンパク質はその後、成長培地、細胞抽出物、または細胞膜分画から単離できる。微生物を用いてまたは別の方法で発現した本発明のポリペプチドの単離および精製は、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の使用に関わるもののような、分離用クロマトグラフィーおよび免疫学的分離等の、任意の従来法によって行うことが可能である。

#### 【0042】

ゆえに、さらなる態様において本発明は、上記に定義されるような、タンパク質を発現させるような条件下での宿主細胞の培養、および産生されたタンパク質または断片の培養からの回収を含む、変異型hPXRタンパク質およびその断片を産生する方法に関連する。

#### 【0043】

もう一つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはベクターを用いて遺伝子的に操作した細胞を含む、変異型hPXR遺伝子を発現できる細胞を産生する方法に関連する。本発明の方法によって得られる細胞は、例えば、サムブルック、フリッヒ(Fritsch)、マニアティス(Maniatis)(1989)「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular cloning: a laboratory manual)」、コールドスプリングハーバー研究所出版、コールドスプリングハーバー；ペイロニュー

ー (Peyronneau)、Eur J Biochem 218(1993)、355-61 ; ヤマザキ (Yamazaki)、Carcinogenesis 16(1995)、2167~2170に記載の方法に従い、薬物を試験するために使用できる。さらに、既知の薬物およびその未知の誘導体を、hPXR遺伝子の突然変異によって生じる薬物効力の損失を相補する能力について研究するために、この細胞を使用できる。これらの態様については、宿主細胞は好ましくは野生型対立遺伝子を、好ましくはhPXR遺伝子の両方の対立遺伝子を欠いており、および/または、少なくとも一つのその突然変異したものを有している。または、正常な対立遺伝子を超えた突然変異対立遺伝子の強度の過剰発現、および正常な対立遺伝子を同様のレベルで過剰発現する組換え細胞系列との比較は、スクリーニング系および解析系として使用できる。上記に説明する方法によって得られる細胞は、本明細書の以下に言及するスクリーニング法のために使用することもできる。

#### 【0044】

さらに、本発明は本発明によるポリヌクレオチドにコードされる、または上述の方法により得られる、または上述の方法によって産生される細胞からの、変異型hPXRタンパク質ならびにその断片に関連する。この状況において、本発明による変異型hPXRタンパク質はまた、当技術分野において既知の従来法によってさらに改変され得ることもまた理解される。本発明による変異型hPXRタンパク質の提供により、それらの生物学的活性またはその阻害に関連する部分を決定することもまた可能である。

#### 【0045】

本発明はさらに、本発明による変異型hPXRタンパク質を特異的に認識する抗体に関連する。好都合にも、この抗体は上記に定義される一つ又は複数のアミノ酸置換を含むエピトープを特異的に認識する。

#### 【0046】

本発明の変異型hPXRタンパク質に対する抗体は、精製した本発明によるタンパク質またはそれに由来する(合成による)断片を抗原として用いた既知の方法により調製できる。例えば、コフラー(Kohler)およびミルシュタイン(Milstein)、Nature 256(1975)、495にて、またガルフル(Galfre)、Meth.Enzymol. 73(

1981), 3にて最初に記述された、免疫化した哺乳動物に由来する脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞との融合を含む技術により、モノクローナル抗体が調製できる。抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または合成抗体、またFab、Fv、またはscFv断片等のような抗体断片が可能である。さらに、前記のポリペプチドに対する抗体またはその断片は、例えば、ハーロウ (Harlow) およびレーン (Lane) の「抗体、実験マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual) 」, CHS Press, Cold Spring Harbor, 1988に記載の方法を使用することにより得られる。これらの抗体は例えば、本発明の変異型hPXRタンパク質の免疫沈降法および免疫学的局在決定に、または例えばトランスジェニック生物における、そのような変異型hPXRタンパク質の存在のモニタリングに、および本発明によるタンパク質と相互作用する化合物の同定に使用できる。例えば、BIAコアシステムにて利用されるような表面プラズモン共鳴は、本発明のタンパク質のエピトープに結合するファージ抗体の効率を増加するために用いることができる (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7(1996), 97~105 ; Malmborg, J. Immunol. Methods 183(1995), 7~13)。

#### 【0047】

さらに、本発明は、上述の任意のポリヌクレオチドまたはその一部の相補鎖を表すまたは含むゆえに、上述のヌクレオチド置換、欠失および付加により特定される、対応する野生型hPXR遺伝子のヌクレオチド配列と比較して、少なくとも一つのヌクレオチドの相違を含む核酸分子に関連する。デオキシリボ核酸またはリボ核酸のいずれかがそのような分子でありうる。そのような分子は例えば、アンチセンスRNAを含む。これらの分子はさらに、転写されたときに、本発明によるポリヌクレオチドの転写産物を特異的に切断するリボザイムを産生するような、リボザイムをコードする配列に連結することが可能である。

#### 【0048】

さらに、本発明は、本発明による核酸分子を含むベクターに関連する。そのようなベクターの例は上記に記載される。好ましくは、ベクター中に存在する核酸分子は、原核宿主細胞または真核宿主細胞において発現させる制御要素に機能的に連結される；上記を参照のこと。

## 【0049】

本発明はまた、生殖細胞、胚細胞、幹細胞または卵、またはそこから由来する細胞への本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの導入を含む、トランスジェニック非ヒト動物、好ましくはトランスジェニックマウスの産生方法に関連する。非ヒト動物は以下に記載の本発明の方法に従って使用でき、非トランスジェニック健常動物であること、または疾病、好ましくはhPXR遺伝子における少なくとも一つの突然変異によって生じる疾病を有することが可能である。そのようなトランスジェニック動物は、それらのタンパク質または少なくともそれらの機能的ドメインは高等真核生物種間、特に哺乳動物間においては保存されているため、例えば上述の変異型hPXRタンパク質の変異形態に関連する、薬物の薬理学的研究に非常に適している。トランスジェニック胚の産生およびそれらのスクリーニングは、例えばA.L.ジョイナー (Joyner) 編、「遺伝子ターゲティング、実践アプローチ (Gene Targeting, A Practical Approach)」(1993), オックスフォード大学出版 (Oxford University Press) で記載の通りに実施できる。胚のDNAは例えば適切なプローブを用いたサザンブロット法を使用して解析できる。

## 【0050】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む、または上述の方法により得られる、好ましくはポリヌクレオチドまたはベクターが安定して非ヒト動物のゲノムに組み込まれる、好ましくは該ポリヌクレオチドまたはベクターの存在が本発明の変異型hPXR遺伝子の発現を導くような、トランスジェニックマウス、ラット、ハムスター、イヌ、サル、ウサギ、ブタ、線虫 (C.elegans) およびシビレイ等の魚類のようなトランスジェニック非ヒト動物にも関連する。この動物は、変異型hPXR遺伝子の同じまたは異なるポリヌクレオチドの一つまたはそれ以上のコピーをもち得る。この動物は、薬物耐容性用の研究モデルとしての有益性を含む、多大な有益性を持ち、ゆえに、細胞内の薬物代謝の欠損または不全によって生じる疾患の療法、治療等の開発において新規の、かつ価値のある動物を与える。したがって、この場合は、哺乳動物は好ましくはマウスまたはラットのような実験動物である。

## 【0051】

好ましくは、本発明のトランスジェニック非ヒト動物はさらに、少なくとも一つのCYP3A4遺伝子および/またはCYP3A7遺伝子の不活性化野生型対立遺伝子を含む。この態様は、例えばhPXRタンパク質の様々な変異形態の相互作用の研究を可能にする。トランスジェニック動物の成長および/または一生のある段階において、hPXR遺伝子の発現または機能を不活性化することが望ましい可能性もある。例えば、hPXR遺伝子のRNA転写産物に対する例えばアンチセンスまたはリボザイムの発現を促進させる、組織特異的な、発生上の、および/または細胞制御された、および/または誘導可能なプロモーターの使用により、これが達成されうる。同様に上記も参照のこと。適切な誘導可能な系は、例えば、ゴッセン (Gossen) およびビュヤード (Bujard) (Proc.Nat.I.Acad.Sci. 89 USA(1992), 5547~5551)、およびゴッセン (Gossen) ら、(Trends Biotech. 12(1994), 58~62) に記載のテトラサイクリン制御の遺伝子発現である。同様に、変異型hPXR遺伝子の発現は、そのような制御要素により制御できる。

#### 【0052】

本発明の変異型hPXRのポリヌクレオチドおよびタンパク質およびベクターを用い、インビボまたはインビトロにおいて、患者のhPXR遺伝子における特定の突然変異および影響を受けた表現型に関して、薬物の効能についての研究を行うことが現在可能である。さらに、本発明の変異型hPXRタンパク質は、薬物の薬理学的プロフィールの決定に、および、例えば癌の治療についてより有効性の高い可能性のあるさらなる薬物の同定および調製に、特に上述のもののような、各々の突然変異によって生じるある種の表現型の改善に使用できる。

#### 【0053】

ゆえに、本発明の特別な目的は、治療を受けるべき患者の、影響を受けた表現型と共分離するhPXR遺伝子の変異形態の多型を考慮した、化学療法が効果的な疾患の治療のための、薬物/プロドラッグの選択および薬学的組成物の製剤に関わる。これにより、例えば、患者の一部におけるそれらの副作用および/または、疾患の同じまたは異なる表現型に関するそれらの不確実な薬理学的プロフィールによって、例えば癌には適当ではないと従来考えられていた安全かつ安価な薬物の適用がなされる。本明細書に記載の方法および手段は、例えば推奨用量の改善

に使用でき、また考慮される患者群に依存する必要投与量の調整を処方者に予想させる。

【0054】

さらなる態様において、本発明は、以下の段階を含む、hPXR遺伝子またはその遺伝子産物の分子変異の活性を調節できるhPXR阻害剤を同定および獲得する方法に関連する：

(a) 変異型hPXRタンパク質または本発明のポリヌクレオチドを含む分子変異型遺伝子を発現する細胞を、薬物代謝に応答して検出可能なシグナルを提供できる成分の存在下において、CYP3A4媒介性またはCYP3A7媒介性の薬物代謝を可能にする条件下でスクリーニングされる化合物と接触させる段階；および

(b) シグナルの存在または増加が推定上の阻害剤について示唆するような、シグナルの有無、または代謝薬物により生み出されたシグナルの増加を検出する段階。

【0055】

本発明の方法における「化合物」という用語は、単独の物質、または同一となり得るまたはなり得ない、複数の物質を含む。

【0056】

化合物は、化学的に合成されうる、または微生物発酵を介して産生されうるが、また、例えば植物、動物または微生物由来の、例えば細胞抽出物のような試料にも含まれ得る。さらに、化合物は当技術分野において既知の可能性があるが、各々阻害剤として有用であることは従来知られていない可能性がある。複数の化合物を、例えば培養培地に加えることができ、または本発明の細胞もしくは非ヒト動物に注射することができる。

【0057】

化合物を含む試料が本発明の方法において同定される場合、その後、化合物を含むと同定された元の当該試料から化合物を単離すること、または、例えば複数の異なる化合物を含む場合、試料当たりの異なる物質数を減少するために、元の試料をさらに小分別し、元の試料の小分別を用いた方法を繰り返すことのいずれかが可能である。その後、例えば本明細書または文献（例えば、(13)およびレ

ーマン (Lehmann)、J Clin Invest 102(1998), 1016~23) に記載の方法により、この試料または化合物が望ましい特性を示すかどうかを決定することができる。試料の複雑性によって、上述の段階を数回、好ましくは本発明の方法に従って同定された試料に限られた数のまたは唯一の物質のみを含むまで、実施することができる。好ましくは上記試料は、同様の化学的および/または物理的特性の物質を含み、最も好ましくは該物質は同一である。本発明の方法は、例えば先行技術に記載の他の細胞に基づいた試験法に従って、または本明細書に記載の方法を使用および改変することにより、当業者により容易に実施および設計できる。さらに、本発明の方法を実施するために、例えば必要に応じてある種の化合物をCYP3A4タンパク質またはCYP3A7タンパク質の基質となる前駆体に引き続き転換する酵素のように、さらなるどの化合物および/またはどの酵素が使用できるかというのを、当業者は容易に認識すると考えられる。本発明の方法のそのような適用は十分当業者の技術内にあり、不適当な実験を用いずに実施できるものである。

#### 【0058】

本発明に従って使用できる適した試験法は、例えば、HepG2細胞におけるキメラCYP3A4遺伝子を用いたトランスフェクションアッセイを説明する、ハシモト (Hashimoto)、Eur J Biochem 218(1993), 585~95に記載されている。同様に、変異型hPXR遺伝子は、HepG2細胞において発現または共発現することができ、それらの転写活性、およびCYP3A4またはCYP3A7の触媒特性について分析できる。そのような試験法はまた、ステロイド (テストステロン、プロゲステロン、アンドロステンジオン、コルチソール、17 $\beta$ -エストラジオール、17 $\beta$ -エチニルエストラジオール)、抗生物質 (エリスロマイシン)、免疫抑制剤 (シクロスポリンA)、ベンゾジアゼピン (ミダゾラム)、ベンゾチアゼピン誘導体 (ジルチアゼム、トリアゾラム)、およびニフェジピンのようなその基質に対する、CYP3A4およびCYP3A7の触媒特性の研究にも使用できる。特に、そのような試験は、各々の変異型CYP3A4遺伝子、変異型CYP3A7遺伝子および/またはhPXR遺伝子をもつ個体において、与えられた薬剤が相互作用するかどうかの予測を加えるのに有用である。上記に記載の本発明の方法に従って使用できる、適した発現系は、(22)におい

てもまた記述されている。さらに、相当する野生型遺伝子産物と比較した、変異型hPXR遺伝子の遺伝子産物の安定性、結合特性および触媒活性の研究のため、酵母菌のようなヘテロ接合体発現系が使用できる。前述のように、分子変異型hPXR遺伝子およびそれらの遺伝子産物は、特に上記に記載の方法において使用される場合、薬剤代謝の薬理学的研究および毒物学的研究に使用できる。本発明の方法に従って試験されるべき好ましい薬剤は、上記に記載の薬剤を含み、ニフェジピン、エリスロマイシン、トロレアンドマイシン、キニジン、シクロスポリンA、17-エチニルエストラジオール、リドカイン、ジルチアゼム、デキサメタゾン、RU486を含むが限定はしない。上記も参照のこと。

#### 【0059】

本発明に従って使用されうる化合物はペプチド、タンパク質、核酸、抗体、小有機化合物、リガンド、ペプチド模倣物、PNAなどを含む。化合物は、上記記載物からの既知薬物の機能的誘導体または類似体であることも可能である。化学的誘導体および類似体の調製方法は当業者には既知であり、例えばベイルス테인 (Beilstein)、「有機化学ハンドブック (Handbook of Organic Chemistry)」スプリングーエディションニューヨーク社 (Springer edition New York Inc.)、5番街175、New York, N.Y. 10010 U.S.A.、および「有機合成 (Organic Synthesis)」ウィリー (Wiley) New York, USAに記載されている。さらに、誘導体および類似体を、当技術分野において既知の、または記載の方法に従い、その効果について試験することができる。さらに、例えば、以下に記載の方法に従い、ペプチド模倣物および/または適切な薬物誘導体および類似体のコンピューター支援の設計が使用できる。そのような類似体は、基礎として既知のCYP3A4およびCYP3A7の基質ならびに/または阻害剤ならびに/または調節剤の構造を有する分子を含む；以下を参照のこと。

#### 【0060】

相補的な構造モチーフのコンピューター支援探索による、推定上の阻害剤と本発明のhPXRタンパク質との相互作用部位の同定のために、適切なコンピュータープログラムを使用できる (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114~120)。タンパク質およびペプチドのコンピューター支援の設計のための、さらなる適切な

コンピューターシステムは、例えばベリー (Berry)、Biochem.Soc.Trans. 22(1994), 1033~1036; ウォダック (Wodak)、Ann.N.Y.Acad.Sci. 501(1987), 1~13; パド (Pado)、Biochemistry 25(1986), 5987~5991のような、先行技術に記載されている。上述のコンピューター解析から得られる結果は、例えば既知の阻害剤の最適化のために、本発明の方法と組合わせて使用できる。適切なペプチド模倣物および他の阻害剤もまた、例えば本明細書に記載の方法に従う、連続した化学的改変およびその結果生じた化合物の試験によって、ペプチド模倣物コンビナトリアルライブラリを合成することにより同定できる。ペプチド模倣物コンビナトリアルライブラリの作製および使用の方法は、例えばオストレシュ (Ostresh)、Methods in Enzymology 267(1996), 220~234、およびドナー (Dorner)、Bioorg.Med.Chem.4(1996), 709~715のような先行技術に記載されている。さらに、本発明の阻害剤およびhPXRタンパク質の三次元および/または結晶構造は、ペプチド模倣物薬物の設計に使用できる (Rose, Biochemistry 35(1996), 12933~12944; Rutenberg, Bioorg.Med.Chem. 4(1996), 1545~1558)。

#### 【0061】

要約すると、本発明は、例えば、しばしば改変活性または薬物代謝レベルまたは感受性のある表現型を生じる、CYP3A4遺伝子またはCYP3A7遺伝子の多機能により化学療法が複雑化する癌のような、疾患の特殊な形態の治療のために、特定の投与量において使用できる化合物を同定および獲得する方法を提供する。

#### 【0062】

本発明の方法の好ましい態様において、上記の細胞は本発明の細胞、または本発明の方法によって得られる細胞、または上述のトランスジェニック非ヒト動物に含まれる細胞である。

#### 【0063】

さらなる態様において本発明は、以下の段階を含む、hPXR遺伝子またはその遺伝子産物の分子変異の活性を調節できるhPXR阻害剤の同定および獲得の方法に関する：

(a) 本発明の変異型hPXRタンパク質を、hPXRタンパク質により結合されることが知られる第一の分子に接触させ、タンパク質および第一の分子の第一の複合体

を形成する段階；

(b) 第一の複合体をスクリーニングされる化合物と接触させる段階；および

(c) 化合物が第一の分子を第一の化合物から置換するかどうかを測定する段階

。

#### 【0064】

好都合なことに、この方法における測定段階は、タンパク質および阻害剤候補との第二の複合体の形成の測定を含む。好ましくは、この測定段階は該タンパク質に結合しない第一の分子の量の測定を含む。

#### 【0065】

上述の方法の特に好ましい態様において、第一の分子は、ニフェジピン、リファンピシンまたはコルチコステロンである。さらに、本発明の方法において第一の分子は、例えば放射線標識または蛍光標識を用いて標識されることが好ましい

。

#### 【0066】

よりさらなる態様において本発明は、以下の段階を含む、分子変異型hPXR遺伝子の存在に関連する疾病、またはそのような疾病への感受性の診断方法に関連する：

(a) 被験者からの試料における本発明のポリヌクレオチドの存在を決定する段階；および/または

(b) 例えば本発明の抗体を用いて、hPXRタンパク質の変異形態の存在を決定する段階。

#### 【0067】

本発明のこの態様に従い、疾病またはそのような疾病への感受性の状態を試験する方法は、例えばサザンプロット法またはノーザンプロット法またはインサイチュ解析の形態において、本発明のポリヌクレオチドまたは核酸分子の使用により達成され得る。核酸配列はいずれかの遺伝子のコード領域または非コード領域、例えばイントロンにハイブリダイズできる。本発明の方法において相補的配列が使用される場合、核酸分子はノーザンプロット法において再度使用できる。さらにこの試験は、例えば遺伝子の転写の実際の遮断と共に行うことができ、ゆ

えに治療上の関連性をもつことが期待される。さらに、プライマーまたはオリゴヌクレオチドも上述のhPXR遺伝子または対応するmRNAの一つへのハイブリダイゼーションに使用できる。ハイブリダイゼーションに使用される核酸は、当然、例えば放射性マーカ―または他のマーカ―を取りこむまたは付着することにより好都合に標識され得る。そのようなマーカ―は当技術分野において既知である。核酸分子の標識は従来法により達成できる。

#### 【0068】

さらに、変異型hPXR遺伝子の存在または発現は、対応する核酸配列のいずれかに特異的にハイブリダイズするプライマー対の使用により、および標準的な手順に従ったPCR反応の実行により試験できる。上述のプロ―ブまたはプライマーの特異的なハイブリダイゼーションは、好ましくはストリンジ―ントなハイブリダイゼーション条件にて生じる。「ストリンジ―ントなハイブリダイゼーション条件」という用語は当技術分野にてよく知られている；例えばサムブルックら、「分子クローニ―ング、実験マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」第2版、CHS出版コールドスプリングハーバー、1989；「核酸ハイブリダイゼーション、実践アプローチ (Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach)」ハムス (Hames) およびヒギンズ (Higgins) 編、IRL出版、Oxford、1985を参照のこと。さらに、被験者から得られたmRNA、cRNA、cDNAまたはゲノムDNAは、hPXR遺伝子の突然変異特有のフィンガ―プリントとなり得る突然変異を同定するために配列決定できる。本発明はさらに、被験者から得られたDNAまたはRNAのRFLPによってそのようなフィンガ―プリントを検出できる可能性があり、当技術分野において既知の方法を用いる分析に先立って、DNAまたはRNAを任意に増幅できるような方法を含む。RNAフィンガ―プリントは、例えば、適切なRNA酵素、例えばリボヌクレアーゼ $T_1$ 、またはリボヌクレアーゼ $T_2$ などまたはリボザイムを用いて被験者から得られたRNA試料を切断すること、および、例えば上述のように、RNA断片の電気泳動による分離および検出を行うことにより実行できる。

#### 【0069】

本発明の上述の態様のさらなる改変は、この開示から、いかなる不適当な実験もなく、当業者により容易に工夫することができる；例えば実施例を参照のこと

。本発明の付加的な態様は、本発明の抗体またはその断片の使用により、決定が達成されるような方法に関連する。本発明の方法にて使用される抗体は、ヒスチジンフラッグまたはビオチン分子のような、検出可能なタグを用いて標識することができる。

【0070】

本発明の好ましい態様において、上記に説明した方法はPCR法、リガーゼ連鎖反応法、制限酵素切断法、直接配列決定法、核酸増幅技術、ハイブリダイゼーション技術または免疫測定法（Sambrookら、上記引用文中「CSHクローニング（CSH cloning）」、HarlowおよびLane 上記引用文中「CSH抗体（CSH antibodies）」）を含む。

【0071】

本発明の方法の好ましい態様において、上記疾病は癌である。

【0072】

上述の方法のさらなる態様において、本発明の方法の全ての適用に一致して、hPXR遺伝子における変異をなくすため、または軽減するための被験者への薬物の投与を含むさらなる段階は、CYP3A4遺伝子またはCYP3A7遺伝子により生じる表現型反応による臨床徴候の発症以前に、所定の疾患の治療を許容する。

【0073】

本発明の方法の好ましい態様において、本薬物はCYP3A4の基質のような化学療法薬：パクリタキセル（Eur J Drug Metab Pharmacokinet 23(1998), 417~24）、タモキシフェンおよびトレミフェン（Drug Metab Dispos 27(1999), 681~8; Clin Pharmacol Ther 64(1998), 648~54; Clin Pharmacol Ther 57(1995), 628~35）、トロホスファミド（trofosfamide）（Cancer Chemother Pharmacol 44(1999), 327~334）、シクロホスファミドおよびイフォスファミド（Drug Metab Dispos 27(1999), 655~66; Cancer Res 58(1998), 4391~401; Br J Clin Pharmacol 40(1995), 523~30）、タキソテール（Pharmacogenetics 8(1998), 391~401; Clarke, Clin Pharmacokinet 36(1999), 99~114）である。

【0074】

上述の方法のもう一つの好ましい態様において、本方法はさらに以下を細胞内

へ導入する段階を含む

- (i) 機能的および発現可能な野生型hPXR遺伝子、または
- (ii) 本発明の核酸分子またはベクター。

【0075】

本状況において、および本明細書を通して使用されるように、「機能的」hPXR遺伝子とは、コードされるタンパク質が野生型CYP3A4タンパク質および野生型CYP3A7タンパク質の一次構造コンフォメーションの一部または全部を有する、即ち、薬物を代謝し、かつhPXR遺伝子をそれぞれ制御する生物学的特性を所有する遺伝子を意味する。本発明のこの態様は、特にヒトにおける癌の治療に適している。変異型CYP3A4遺伝子および/または変異型hPXR遺伝子の発現の検出は、発現が疾患の対応する表現型の発生または維持と相関するという結論を成立させると考えられる。したがって、発現レベルを低レベルにまで下げため、またはそれをなくすため、ある段階が適用される。これは、例えば、リボザイム、アンチセンス核酸分子、細胞内抗体または上述のこれらのhPXRタンパク質の変異形態に対する阻害剤の使用によるような、生物学的方法による、突然変異遺伝子の発現の少なくとも部分的な除去により行うことができる。さらに、対応する突然変異タンパク質および遺伝子の発現レベルを下げる製剤が開発できる。

【0076】

さらなる態様において本発明は、上述の方法の任意の一つの段階を含み、段階(b)において同定される化合物またはその誘導体またはその類似体を、薬学的に許容される形態に合成および/または製剤化するような、薬学的組成物を産生する方法に関連する。本発明の方法に従って同定される治療に有用な化合物は、上記にて議論されるように製剤、および患者への投与をすることができる。当業者により適切であると決定される使用および治療用量については以下を参照のこと。

【0077】

さらに、本発明は上述の方法の段階を含む、薬学的組成物の調製方法、および薬物またはプロドラッグの治療的適用に適した形態での製剤方法、および本発明の方法において診断された被験者における疾病の予防または改善の方法に関連す

る。

#### 【0078】

薬物またはプロドラッグはそれらのインビボにおける投与後、排出または代謝のいずれかにより排除されるために、一つまたは複数の活性または不活性代謝産物へ代謝される (Meyer, J. Pharmacokinet. Biopharm. 24(1996), 449~459)。ゆえに、本発明の方法に従って同定および獲得された実際の化合物または阻害剤を使用する以外に、患者において活性型に転換される、プロドラッグとしての対応する製剤を用いることができる。プロドラッグおよび薬物の投与についてとられる可能性のある予防手段は、文献に記載されている；概説については、オザマ (Ozama)、J.Toxicol.Sci. 21(1996), 323~329)を参照のこと。

#### 【0079】

本発明の方法の好ましい態様において、薬物またはプロドラッグは、本明細書前述にて定義されるような薬物の誘導体である。

#### 【0080】

なおさらなる態様において、本発明は、本明細書前述に記載の方法により同定または獲得される阻害剤に関連する。好ましくは、阻害剤は本発明の変異型hPXRタンパク質に特異的に結合する。本発明の抗体、核酸分子および阻害剤は好ましくは、天然のリガンドまたは本発明のhPXRタンパク質の結合パートナーの結合特異性と少なくとも実質的に同一の特異性を有する。抗体または阻害剤は、本発明のhPXRタンパク質に対し、少なくとも $10^5 \text{ M}^{-1}$ の、好ましくは $10^7 \text{ M}^{-1}$ より高い、および有利には、hPXR活性が抑制されるべき場合に $10^{10} \text{ M}^{-1}$ までの結合親和性をもち得る。したがって、好ましい態様においては、本発明の抑制抗体または阻害剤は、少なくとも約 $10^{-7} \text{ M}$ の、好ましくは少なくとも約 $10^{-9} \text{ M}$ の、および最も好ましくは少なくとも約 $10^{-11} \text{ M}$ の親和性をもつ。

#### 【0081】

さらに、本発明は、本発明のポリヌクレオチドの検出のための、および/または対応する個々のhPXR対立遺伝子の遺伝形質決定のための、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの使用に関連する。好ましくは、このオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、先に記載の本発明のポリヌクレオチドまたは核酸

分子である。

【0082】

特定の好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチド長～50ヌクレオチド長、好ましくは20ヌクレオチド長～40ヌクレオチド長、より好ましくは20ヌクレオチド長～30ヌクレオチド長であり、配列番号：1～165の、またはこれらの任意の一つの相補的配列の、任意の一つのヌクレオチド配列を含む。

【0083】

したがって、なおさらなる態様において、本発明は上記に定義されるようなオリゴヌクレオチドからなるプライマーまたはプローブに関連する。この状況において、「～からなる」という用語は、上述のヌクレオチド配列、および本発明のプライマーまたはプローブのために使用されるヌクレオチド配列が、その5'末端および/または3'末端にすぐ隣接したhPXR遺伝子のさらなるヌクレオチド配列を全くもたないことを意味する。しかし、標識のような他の成分、例えばビオチン分子、ヒスチジンフラッグ、抗体断片、金コロイド等、hPXR遺伝子に対応しないヌクレオチド配列は、本発明のプライマーおよびプローブ中に存在できる。さらに、上述の特定のヌクレオチド配列を使用すること、およびそれらを、これらの付加的なヌクレオチド配列が核酸以外の成分と共に散在させられるような、または核酸がhPXR遺伝子のヌクレオチド配列に対応しないような、hPXR遺伝子に由来する他のヌクレオチド配列と組合せることも、また可能である。その上さらに、例えば、当技術分野で周知のチオリン酸バックボーン(thio-phosphate-backbone)および/または塩基類似体によってオリゴヌクレオチドの改変が可能であることは当業者には明らかである(Flanagan, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96(1999), 3513~8; Witters, Breast Cancer Res.Treat. 53(1999), 41~50; Hawley, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 9(1999), 61~9; Peng Ho, Brain Res.Mol.Brain Res. 62(1998), 1~11; Spiller, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 8(1998), 281~93; Zhang, J.Pharmacol.Exp.Ther. 278(1996), 971~9; Shoji, Antimicrob.Agents Chemother. 40(1996), 1670~5; Crooke, J.Pharmacol.Exp.Ther. 277(1996), 923~37)。

【0084】

さらに、本発明は、本発明の変異型hPXRタンパク質の検出、本発明のポリヌクレオチドを含む分子変異型hPXR遺伝子の発現、および/または本発明のポリヌクレオチドを含むhPXR対立遺伝子の識別のため、hPXR遺伝子の遺伝子産物に特異的に結合できる抗体または物質の使用に関連する。

#### 【0085】

さらに、本発明は、組成物、好ましくは本発明の抗体、核酸分子、ベクターまたは阻害剤、および薬学的に許容される担体を任意に含む薬学的組成物に関連する。例えば、阻害剤または薬学的に許容されるそれらの塩類を含む、これらの薬学的組成物は、薬物投与に従来使用される任意の経路、例えば経口、局所的、腸管外、または吸入により、好都合に投与できる。許容できる塩類はアセテート、メチルエステル、HCl、スルフェート、および塩化物などを含む。化合物は、従来の手順に従い、薬物を標準の薬学的担体と組合せることにより調製される従来の剤形にて投与できる。これらの手順は、望ましい調製物に適切な、成分の混合、顆粒化および圧縮または溶解に関わり得る。薬学的に許容される担体または希釈剤の形態および特性は、組合せられる活性成分の量、投与経路、および他の既知の変数により決定されることは理解されるところと考えられる。担体は製剤の他の成分と適合性があるという意味で、「許容される」ものでなければならず、そのレシピエントに対し有害であってはならない。使用される薬学的担体は、例えば、固体または液体のいずれかが可能である。固体担体の例は、ラクトース、カオリン (terra alba)、ショ糖、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、ステアリン酸マグネシウム、およびステアリン酸などが可能である。液体担体の例は、生理的リン酸緩衝液、シロップ、ピーナッツオイルおよびオリーブオイルのようなオイル、水、乳剤、様々な種類の湿潤剤、および滅菌溶液などである。同様に、担体または希釈剤は、モノステアリン酸グリセリンまたはジステアリン酸グリセリンのような、当技術分野において既知の遅効性物質を、単独で、またはワックスと共に含み得る。

#### 【0086】

用法は、主治医および他の臨床因子により決定され、好ましくは上述のいずれか一つの方法に従う。医学分野においてよく知られるように、ある患者のための

用量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、一般健康状態、ならびに同時に投与される他の薬物を含む、多くの因子に依存する。進行を定期的な評価によりモニタリングできる。

【0087】

さらに、本発明によるhPXR遺伝子の突然変異型をコードするRNAに特異的にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む、または突然変異型hPXRタンパク質を特異的に認識するが、機能的な野生型は認識しないもしくは実質的に認識しない抗体を含む薬学的組成物の使用は、細胞における突然変異型の濃度を減少させるべきである場合に考えられる。

【0088】

本発明により、本発明に従い、特定の薬物の選択、投与計画および対応する治療されるべき患者を決定することができる。誤った薬物が誤った患者に対して誤った投与量で処方されることを回避するような情報と共に、考慮される患者群に依存する投与量の調整を処方者に予想させるように、推奨用量は製品のラベルにて示される。

【0089】

さらに本発明は、先に記載の本発明のポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、変異型hPXRタンパク質、抗体、阻害剤、核酸分子または対応するベクターのうちいずれか一つ、および適した検出方法を随意に含む、診断用組成物または診断キットに関連する。

【0090】

本発明のキットは、選択マーカーならびに、トランスジェニック細胞およびトランスジェニック動物の作製に適した選択培地の構成成分のような材料を更に含み得る。本発明のキットを本発明の方法の実施のために好都合に使用でき、特に、例えば診断分野のような様々な適用において、または研究手段として、使用できる。本発明のキットの一部はバイアルに個包装でき、または容器もしくは複数容器ユニット中にて組合せることができる。キットの製造は好ましくは、当業者に既知の標準の手順に従う。キットまたは診断用組成物は、例えば放射性免疫測定法もしくは酵素免疫測定法のような免疫測定法、または好ましくは、本明細書

上記および実施例に記載の核酸ハイブリダイゼーションおよび/または核酸増幅技術を使用する、上述の本発明の方法のいずれか一つに従い、hPXR遺伝子の突然変異形態の発現の検出法に使用できる。

#### 【0091】

いくつかの遺伝子変化は、変化したタンパク質のコンフォメーション状態を変化させる。例えば、ある変異型hPXRタンパク質は、薬物代謝および転写開始の促進能力を大きく低下させる三次構造をそれぞれ有していてもよい。突然変異タンパク質の正常な、または制御されたコンフォメーションを回復することは、困難ではあるが、これらの分子欠損を修正するのに非常に的確かつ特異的な方法である。ゆえに薬理的な操作においては、タンパク質の野生型のコンフォメーションの回復を目指すことができる。そのため、本発明のポリヌクレオチドおよびコードされたタンパク質は、hPXRの遺伝子またはタンパク質の野生型の機能を活性化できる分子を設計および/または同定するために使用することもできる。

#### 【0092】

その他の態様において、本発明は本明細書で前述した方法により診断される疾病の治療または予防のための、薬学的組成物の調製のための薬物またはプロドラッグの使用に関連する。

#### 【0093】

さらに、本発明は、本発明の方法により診断される疾病を治療、予防および/または遅延する薬学的組成物を調製するための、機能的および発現可能な野生型hPXRタンパク質をコードする核酸配列の有効用量の使用に関連する。機能的および発現可能なhPXRタンパク質をコードする遺伝子は細胞に導入され、関心対象のタンパク質が産生される。エクスピボ法またはインスピボ法における治療遺伝子の細胞への導入に基づく遺伝子治療は、遺伝子転移の最も重要な適用の一つである。インビトロまたはインビボの遺伝子治療に適したベクターおよび方法は、文献に記載されており、当業者には既知である；例えば、ジョルダーノ (Giordano), Nature Medicine 2(1996), 534~539；シェイパー (Schaper), Circ.Res.79(1996), 911~919；アンダーソン (Anderson), Science 256(1992), 808~813；イスナー (Isner), Lancet 348(1996), 370~374；ムルホーサー (Muhlhauser)

r), Circ.Res.77(1995), 1077~1086; ワン (Wang), Nature Medicine 2(1996), 714~716; 国際公開公報第94/29469号; 国際公開公報第97/00957号またはシェイパー (Schaper), Current Opinion in Biotechnology 7(1996), 635~640、およびそこに引用される文献を参照のこと。遺伝子は細胞への直接導入、またはリポソームもしくはウイルスベクター (例えばアデノウイルス、レトロウイルス) を介した細胞への導入のために設計できる。好ましくは、この細胞は生殖系列細胞、胚細胞、もしくは卵細胞またはそれらに由来するものであり、最も好ましくは、この細胞は幹細胞である。

#### 【0094】

上記から明らかなように、本発明の使用において、特定の細胞に対しhPXRタンパク質を発現および/またはターゲティングさせる制御要素に核酸配列が機能的に連結されることが好ましい。本発明に従って使用できる、適した遺伝子導入系は、リポソーム、受容体介在の導入系、裸のDNA、ならびにヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス、その他のウイルスベクターを含み得る。遺伝子治療のための、身体の特定位点への核酸の導入は、ウィリアムス (Williams) (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88(1991), 2726~2729) に記載のバイオリスティック導入系を使用して達成することもできる。組換えDNAにより細胞をトランスフェクションする標準法は、分子生物学の当業者には既知である。例えば、国際公開公報第94/29469号; 上記も参照のこと。遺伝子治療は、本発明の組換えDNA分子もしくはベクターの患者への直接投与により、または本発明のポリヌクレオチドもしくはベクターによりエキソビポで細胞をトランスフェクションすることにより、およびトランスフェクションされた細胞を患者に注入することにより実施できる。

#### 【0095】

本発明の使用および方法の好ましい態様において、上記疾病は癌である。

#### 【0096】

これらのおよび他の態様は、本発明の説明および実施例により開示され、または明らかであり、含まれる。本発明に従って使用される方法、用途および化合物のいずれか一つに関わるさらなる文献は、例えば電子デバイスを用いて公共のラ

イブライリから検索できる。例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>のような、インターネット上で利用可能な公共データベース「メドライン (Medline)」が使用できる。さらなるデータベースおよびアドレス、例えば<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>、<http://www.infobiogen.fr/>、[http://www.fmi.ch/biology/research\\_tools.html](http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html)、<http://www.tigr.org/>が当業者に知られており、また例えば<http://www.lycos.com>を使用して得ることもできる。バイオテクノロジーにおける特許情報の概説ならびに、遡及的探索および最新の知見の認識に有用な特許の関連情報源の通覧は、バークス (Berks), TIBTECH 12(1994), 352~364により与えられている。

#### 【0097】

本発明の薬学的組成物および診断用組成物、使用、方法は、これまで変異型hPXR遺伝子に関連するまたは依存することが知られていない、あらゆる種類の疾患の診断および治療に使用できる。本発明の組成物、方法および使用は、ヒトにおいて望ましく使用することができるが一方、本明細書に記載の方法および使用には動物の治療もまた含まれる。

#### 【0098】

単なる説明のために役立ちかつ本発明の特許請求の範囲を制限すると解釈されない、以下の実施例に関して、本発明を説明する。

#### 【0099】

##### 実施例

実施例1：hPXRのコード領域の増幅のためのゲノム構成およびオリゴヌクレオチド

2つの近傍エクソンに位置するオリゴヌクレオチドを用いて作製されたPCR断片の配列決定法により、およびhPXRを含有するBAC (Genome Systems GS21908) の直接配列決定法により、hPXRのゲノム構成を決定した。得られたゲノム配列およびゲンバンクcDNA配列 (gi3769538、gi3769536、gi5852062、gi5852066、gi3511137) の間の比較により、遺伝子が10個のエクソンおよび9個のイントロンから成り、少なくとも20 kbのゲノムDNAに及ぶことが明らかになった。BAC GS21908およびGS21907の制限酵素地図作製に引き続き、その遺伝子に由来する幾つかのプ

ロープとのハイブリダイゼーションに基づき、イントロン1bのおおよその大きさは、>7 kbと評価される(図3、表1および表2)。エキソンおよびイントロンの大きさ、およびエキソンイントロン境界における配列は、表2にて与えられる。

#### 【0100】

配列および遺伝子発現解析により、エキソン1aおよび1bがhPXR転写産物の代替の5'末端として使用されることが明らかになった(Bertilsson, Proc Natl Acad Sci USA 95(1998), 12208~13)。ゆえに、イントロン1aは3'コンセンサススプライス部位を欠く(非表示)。2個のエキソンは、hPXRが転写される組織において異なった様式で発現される。エキソン1aは肝臓および小腸の両方において発現される一方、エキソン1bは肝臓においてのみ発現される(図3B)。

#### 【0101】

実施例2：ゲノムDNAの単離、hPXR遺伝子断片の増幅、精製および配列決定

標準法を用いて、白人または黒人から得られた血液試料または肝臓試料からゲノムDNAを単離した。PCR法によるhPXR遺伝子断片の増幅条件は表3にて各々与えられる。単位複製配列(amplicon)の完全な配列は表4にて与えられる。単位複製配列の質は定期的に、アガロースゲル電気泳動により検査を行った。断片はその後、そうしなければ、引き続き行う配列決定反応を阻害する可能性のある、PCRの全ての成分を除去する、PCR精製カラム(キアゲン)を通して精製された。

#### 【0102】

配列決定反応はダイターミネーター法を用いて実施し、試料をその後ポリアクリルアミドゲル(パーキンエルマー377および3700配列決定機)上にて分離した。結果およびヘテロ接合体の検出の高い正確性を確認するため、両鎖を常法により配列決定した。配列をその質について視覚的に検査し、その後PHRED/PHRAP/POLYPHRED/CONSEDソフトウェアパッケージ(ワシントン大学、シアトル、USA)を用いて、多型の存在について分析した。

#### 【0103】

実施例3：hPXR遺伝子における多型

hPXRのコード領域、5'および3'UTRの一部および、その遺伝子のエキソンに近接する幾つかのイントロン配列を、ゲノムDNAからPCR法により増幅し、配列決定

した(表3)。300~418例の白人染色体、および54~74例の黒人染色体について、スクリーニングを実施した(表4および表5)。総じて、スクリーニングした試料において28個の変異が発見された(表4および表5)。9個の変異は白人においてのみ認められ、14個は黒人に特有であり、5個のみが両人種群に共通であった。13個の変異はタンパク質コード領域内に位置しており、8個は近接イントロン配列内、7個は5'または3'UTR内にある。タンパク質コード領域に認められた13個の変異のうち、6個はhPXRタンパク質配列に影響を与える一方、7個はサイレントである(表4および表5)。3個のタンパク質変異(E18K、P27SおよびG36R)はエキソン2内に位置する。それらのうち2つ(E18KおよびP27S)は黒人において特有のものとして同定された。最も頻度の高いタンパク質多型(P27S)は、黒人染色体の14.9%にて生じる。G36R変異は、白人においてのみ認められ、3%の対立遺伝子頻度をもつ。白人の0.5%はV140M変異に対してヘテロ接合であり、黒人の2.7%はD163G変異に対してヘテロ接合である。黒人の3.1%はA370T変異に対してヘテロ接合である。保存されたスプライス部位(AGおよびGT)内には突然変異は検出されなかった。総じて、大多数の白人および黒人において認められたhPXRのタンパク質コード配列は、分析された全ての試料において1つのAがGにより置換されている112位を例外として、報告されたcDNA配列(gi3769538)と一致する。

#### 【0104】

##### 実施例4：hPXRタンパク質変異の機能的特徴付け

以下において、本発明者らはミスセンスhPXR突然変異の、hPXRタンパク質の発現および活性に対する効果を調べた。本発明者らはまた、hPXRのリガンド結合ドメインからの37個のアミノ酸の欠失を導く、エキソン5内の潜在のスプライス受容部位に由来する、hPXR-2スプライス変異の効果を調べた(Dotzlaw, Clin Cancer Res 5(1999), 2103~7)。この目的のために、本発明者らは、6つ全てのhPXRタンパク質変異について、およびhPXR-2欠失変異についての真核細胞発現プラスミドを構築した。「野生型」構築物によりコードされたタンパク質の配列は、ほとんどの白人および黒人に認められたものと同一である。これらのプラスミドを用いて一過的にトランスフェクションしたCOS-1細胞のウェスタンブロット法による解析は、全ての変異が同様の量のタンパク質の発現に影響を与えることを示

した(図5)。変異タンパク質の見掛けの大きさは、47~48 kDの見掛けの分子量を示したE18K変異を例外として、計算されたhPXRの分子量(49.7 kD)およびhPXR-2の分子量(45.7 kD)に一致していた(図5)。

#### 【0105】

タンパク質変異の機能的重要性を、LS174T細胞において調べた。最初にLS174T細胞に、野生型hPXRまたは変異型hPXR発現プラスミドと、hPXR依存性プロモーターレポーター遺伝子プラスミドpGL3(DR3)<sub>3</sub>TK(-105)とを共に、コトランスフェクションした。プラスミドは、最小チミジンキナーゼプロモーターおよびルシフェラーゼの上流に挿入された、hPXR反応要素であることが示された(Kliewer, Cell(1998), 73~82)、CYP3A23プロモーターのDR3モチーフの3つのコピーを含む。ヒトhPXRの既知の活性化物質である(Blumberg, Genes Dev(1998), 3195~3205; Lehmann, J Clin Invest(1998), 1016~1023)、生体異物リファンピシンで細胞を処理した。図6Aは変異E18K、変異P27Sおよび変異G36Rが、本試験法において、リファンピシン処理に続き、野生型hPXRと同様の効率でレポーター遺伝子の転写を刺激したことを示す。対照的に、V140M変異、D163G変異およびhPXR-2変異において、hPXRを介する転写活性は阻害された。リファンピシンによる処理によって、V140M変異およびD163G変異は野生型の活性の50%のみを示す一方、hPXR-2は約25%のみの活性を有した(図6A)。A370Tもまた、リファンピシン処理後、わずかに阻害された転写活性を示したが、一連の該実験においてこの減少は有意ではなく、さらなる実験により、または他の試験系により確認する必要がある(図6A)。図6Bにて要約されるように、付加的なhPXR活性化物質の非存在下において、変異E18K、変異P27Sおよび変異G36Rは、野生型hPXRよりも低い基礎活性を示した一方、V140MおよびA370Tは増強された基礎活性(各々130%または207%)を示した。対照的に、D163GおよびhPXR-2は著しく低減された基礎活性(野生型の約10%)を示した。変異の基礎活性の変化は活性化物質依存性の活性とは独立である。V140MおよびA370Tはより高い基礎活性を有したが、突然変異hPXRの活性化に対する活性は低いまたは同等であった一方、D163GおよびhPXR-2はいずれもより低い基礎活性、および活性化に対する低い活性を有した。

#### 【0106】

【表1】 hPXR遺伝子の構造およびエキソン/イントロン境界を決定するために使用されたオリゴヌクレオチド

名称	位置	配列 (5' - 3')
hPXR1F	エキソン 4	TCATGTCCGACGAGGCCG
hPXR4F	エキソン 5/6	CCCACATGGCTGACATGT
hPXR5F	エキソン 7	CCCATCGAGGACCAGATC
hPXR6R	エキソン 7	GTCTTCCAAGCAGTAGGA
hPXR7R	エキソン 8	CAGCATGGGCTCCAGTAG
hPXR10R	エキソン 9a	CCTGTGATGCCGAACAAC
hPXR11F	エキソン 9	CATTGAATGCAATCGGCC
hPXR12R	エキソン 9a	GCTCTTGGCAGTGTCCAT
hPXR15F	エキソン 2	GGAAAGCCCAGTGTCAAC
hPXR16F	エキソン 3	CCATGAAACGCAACGCC
hPXR18R	エキソン 2	CCTTGCATCCTTCACATG
hPXR19R	エキソン 3	CATGCCGCTCTCCAGGCA
hPXR20R	エキソン 4	CGGCCTCGTCGGACATGA
hPXR21R	エキソン 5/6	ACATGTCAGCCATGTGGG
hPXR47F	エキソン 1b	CAAGCCAAGTGTTCACAGTG
hPXR48R	エキソン 1b	CACTGTGAACACTTGGCTTG
hPXR52F	エキソン 1a	CAAGGACAGCAGCATGACAGTCAC
hPXR54R	エキソン 1a	AGCCAACCTCAGCCGCAGC

【0107】

50ngのゲノムDNAを、1×PCR緩衝液(Q=キアゲン社、カタログ番号1005479またはB2=ベーリンガー社(現口シュ社)伸長テンプレート(Expand Long Template)PCR緩衝液ナンバー2、カタログ番号1742655)、0.25 μMの各オリゴヌクレオチド、200 μMのdNTP、および1UのTaqポリメラーゼ(キアゲン社)を含む反応混合物(総量30または50 μl)に加えた。ロボサイクラーグラジエント96(RoboCycler Gradient 96)(ストラタジーン(Stratagene)社)において増幅を実施し、94 で2分間の最初の変性段階を行い、続けて、変性(40秒、94)、アニーリング(45秒、56~60)、および伸長(60~150秒、72)の増幅サイクルを32サイクル行った。これに続き、72にて5分間の最終伸長段階を行った。すべての配列決定反応は、製造者の使用説明書に従い、ダイターミネーター-DNAシークエ

ンシングキット（パーキンエルマー社、カタログ番号4303154）を用い、GeneAmp PCRシステム9700（パーキンエルマー社）において実施した。

【0108】

【表2】 hPXR遺伝子\*のエキソンイントロン構成

エキソン番号	エキソンサイズ <sup>°</sup> (bp)	エキソン-イントロン接合部における配列		イントロンサイズ <sup>°</sup> (kb)
		5' スプライス部位	3' スプライス部位	
1a	≥222	AAGCAG gtatgg....	-	0.403
1b	144	AAACCA gtgagt....	....ttctag TCCAAG	≥7.0
2	219	TTTCAG gtagag....	....tcacag GAGGGC	~ 2.7
3	134	AGGAGA gtgagc....	....ctgcag TGATCA	~ 1.2
4	188	TTCCGG gtagga....	....tcttag CTGCCA	~ 1.0
5	275	CTTCAG gtagga....	....tgccag GGACTT	~ 1.9
6	143	CTGCAG gtgccc....	....ccacag GTGGCT	0.201
7	117	CCCCAG gtgagg....	....ctccag ACCGCC	0.286
8	106	TCATAG gtgagc....	....atgcag GTTCTT	~ 1.3
9	≥1418			

\*エキソン配列は大文字で、イントロン配列は小文字で示される。3' スプライス部位は、hPXR転写産物におけるエキソン1aおよびエキソン1bの代替使用により、イントロン1においては示されない。

【0109】

【表3】 hPXR多型スクリーニング：オリゴヌクレオチド配列、増幅条件および断片サイズ

エクソン	上流オリゴヌクレオチド		下流オリゴヌクレオチド		アニーリング温度 (°C)	緩衝液	産物サイズ (bp)
	名称	配列 (5'-3')	名称	配列 (5'-3')			
1a	HPXR57F	TCAAAGTGTGGACTTGGGAC	HPXR58R	CCCACATATGATGCTGACCTC	53	B2	460
1b	HPXR82F	CACATACACCAGCTCCCTG	HPXR60R	CCACATGCAGGCAAGACTC	58	Q	345
2	HPXR41F	CTGAGGCCCTCTACACATC	HPXR40R	AGGCCCTGAGATGTTACC	55	Q	345
3	HPXR53F	CTGGGACGCAAAGGCTAGTG	HPXR46R	CCTGTTGCACACGGACAC	57	Q*	417
4	HPXR81F	TAAACGGCTTCTGCTGCCTTG	HPXR80R	AGCTCTCCAAATCTACCCCTC	58	Q	423
5	HPXR32F	CTGAGTTGGGACCTGTCT	HPXR35R	CCAGGCCCTTTGAACTC	58	B2	415
6&7	HPXR36F	CTGCTGGTGCCGGCCTGT	HPXR33R	GACTGGGACCTTCCCTGG	60	B2	598
8	HPXR34F	GAGCAATGCCCTGACTCT	HPXR26R	CCCTCTGGCCATGAAGTC	60	B2	271
9	HPXR30F	TGCTTGTGCAGCCTCAGA	HPXR12R	GCTCTTGGCAGTGTCAT	60	B2	324

## 【0110】

50ngのゲノムDNAを、1×PCR緩衝液 (Q=キアゲン社、カタログ番号1005479またはB2=ベーリンガー社 (現口シュ社) 伸長テンプレート(Expand Long Template

)PCR緩衝液ナンバー2, カタログ番号1742655)、0.25  $\mu$ Mの各オリゴヌクレオチド、200  $\mu$ MのdNTP、および1UのTaqポリメラーゼ(キアゲン社)を含む反応混合物(総量30または50  $\mu$ l)に加えた。ロボサイクラーグラジエント96(RoboCycler Gradient 96)(ストラタジーン(Stratagene)社)において増幅を実施し、94 で2分間の最初の変性段階を行い、続けて、変性(40秒、94 )、アニーリング(45秒、上記)、および伸長(60秒、72 )の増幅サイクルを32~34サイクル行った。これに続き、72 にて5分間の最終伸長段階を行った。すべての配列決定反応は、製造者の使用説明書に従い、ダイターミネーターDNAシーケンシングキット(パーキンエルマー社、カタログ番号4303154)を用い、GeneAmp PCRシステム9700(パーキンエルマー社)において実施した。\*5% DMSOを添加したHot Star Taq Qiagen。

【0111】

【表4】 異なる集団におけるhPXR変異の位置、配列状況、および頻度

hPXR 変異	変異	参照(5'-3')変異対立配列	遺伝的 要素	予測され る効果	白人				黒人			
					染色体 (N)	遺伝子型頻度 (%)		変異対立 遺伝子 頻度 (%)	染色体 (N)	遺伝子型頻度 (%)		変異対立 遺伝子 頻度 (%)
						ハテロ接合	ホテロ接合			ハテロ接合	ホテロ接合	
M20	c.1-201G>A	ATCTCGGCCTC	ATCTCAGCCTC 5'UTR (Ex1a)		300	0.0	0.0	0.0	56	3.6	0.0	1.8
M1	c.1-131C>A	CTGAACAAGGC	CTGAAAAGGC 5'UTR (Ex1a)		300	50.7	35.3	60.7	56	14.3	0.0	7.1
M21	c.1-57G>T	CCAGGGGAGAA	CCAGGTGAGAA 5'UTR (Ex1a)		300	0.0	0.0	0.0	56	3.6	0.0	1.8
M2	c.1- 100T>G*	GACTGTGGGAG	GACTGGGGGAG イントロン 1b		300	1.3	0.0	0.7	60	0.0	0.0	0.0
M3	c.1-20delC*	CCCCCCTGAGG	CCCCC-TGAGG 5'UTR (Ex1b)		300	50.0	36.0	61.0	60	63.3	33.3	65.0
M6	c.1-42T>C	TTCTCTGTGGT	TTCTCCGTGGT イントロン 1b		300	0.0	0.0	0.0	74	10.8	0.0	5.4
M5	c.52G>A	ACTGTGAGGAC	ACTGTAAGGAC エキソン 2	E18K	300	0.0	0.0	0.0	74	2.7	0.0	1.4
M7	c.79C>T	GAAAGCCAGT	GAAAGTCCAGT エキソン 2	P27S	300	0.0	0.0	0.0	74	24.3	2.7	14.9
M4	c.106G>A	AAGTCGGAGGT	AAGTCAGAGGT エキソン 2	G36R	300	6.0	0.0	3.0	74	0.0	0.0	0.0
M22	c.198- 29C>T	TGCATCCCCCC	TGCATTTCCCCC イントロン 2		300	0.0	0.0	0.0	62	2.7	0.0	11.3
M8	c.225G>C	CGGCTGAGGTG	CGGCTCAGGTG エキソン 3	silent	300	0.7	0.0	0.3	62	0.0	0.0	0.0
M23	c.315C>T	GAGAGCGGCAT	GAGAGTGGCAT エキソン 3	silent	300	0.0	0.0	0.0	62	12.9	0.0	6.5

M9	c.331+72T> G	GTGTGTGGCATG	GTGTGGGCATG	300	14.7	0.0	7.3	62	48.4	3.2	27.4
M10	c.418G>A	TGGGAGTGCAG	TGGGAATGCAG	418	0.5	0.0	0.2	74	0.0	0.0	0.0
M11	c.488A>G	CTTTGACACTA	CTTTGGCACTA	418	0.0	0.0	0.0	74	2.7	0.0	1.4
M12	c.492T>C	GACACTACCTT	GACACCACCTT	418	0.0	0.0	0.0	74	18.9	0.0	9.5
M13	c.543C>T	AGTGGCTGCCA	AGTGGTTGCCA	300	2.0	0.0	1.0	54	0.0	0.0	0.0
M14	c.696C>T	AGTGGCCGGAA	AGTGGTGGGAA	300	3.3	0.7	2.3	54	0.0	0.0	0.0
M24	c.834G>A	AAGGGGCCCGC	AAGGGAGCCGC	370	0.0	0.0	0.0	56	7.1	0.0	3.6
M15	c.937+99G> A	TGGCAGGGCAG	TGGCAAGGCAG	370	0.5	0.0	0.3	62	0.0	0.0	0.0
M16	c.938- 73A>G	ACAAGATATTG	ACAAGGTATTG	370	0.5	0.0	0.3	56	3.6	0.0	1.8
M17	c.938- 17C>T	TCCATCCTGTT	TCCATTCTGTT	370	33.0	3.8	20.3	56	64.3	14.3	46.4
M25	c.984C>T	CACTACATGCT	CACTATATGCT	370	0.0	0.0	0.0	56	3.6	0.0	1.8
M26	c.1054+36C >T	CCCCCAGCCT	CCCCTAGCCT	370	0.0	0.0	0.0	56	3.6	0.0	1.8
M27	c.1108G>A	AATTGGCCATT	AATTCACCAAT	312	0.0	0.0	0.0	64	3.1	0.0	1.6
M18	c.1160+43G >A	GTGAGGGAGCC	GTGAGAGAGCC	312	0.6	0.0	0.3	64	0.0	0.0	0.0
M19	c.1308G>A	TGAGCGGCTGC	TGAGCAGCTGC	300	0.7	0.0	0.3	64	0.0	0.0	0.0
M28	c.1320G>A	CTTGGGTGACA	CTTGGATGACA	300	0.0	0.0	0.0	60	10.0	3.3	8.3

## 【0112】

変異(第2列)の命名法はアントナラキス(Antonarakis)および命名法審議会(Nomenclature Working Group)(Antonarakis, Hum Mutat 11(1998), 1~3)

に基づく。cDNA (gi3769538) の280位にCをもつCTGを翻訳開始部位として+1と番号付ける。+1の5'に位置するヌクレオチドを-1と番号付ける。イントロンに位置するSNPは、本報告において定義されたエキソンのヌクレオチド位置の上流(+)または下流(-)のヌクレオチド番号により示される(表1)。28個の変異が同定された。変異位置は太字にて示す。1 bpの欠失は斜線により示す。分析された試料数はN/2である。N = 分析された染色体数。Ex = エキソン; \*参照配列はgi3769536である。開始コドンATGのA(+1)は、cDNAの60位におけるものである。

【0113】

【表5】 hPXRの遺伝子変異

位置	野生型配列 (5'-3')	突然変異型配列 (5'-3')
エキソン 1a	F: ATCTC <u>G</u> GCCTC R: GAGGC <u>C</u> GAGAT	F: ATCTC <u>A</u> GCCTC R: GAGGC <u>T</u> GAGAT
エキソン 1a	F: CTGAA <u>C</u> AAGGC R: GCCTT <u>G</u> TTCAG	F: CTGAA <u>A</u> AAGGC R: GCCTT <u>T</u> TTCAG
エキソン 1a	F: CCAGG <u>G</u> GAGAA R: TTCTC <u>C</u> CTGG	F: CCAGG <u>T</u> GAGAA R: TTCTC <u>A</u> CTGG
イントロン 1a	F: GACTG <u>T</u> GGGAG R: CTCCC <u>A</u> CAGTC	F: GACTG <u>G</u> GGGAG R: CTCCC <u>C</u> CAGTC
エキソン 1b	F: CCCCC <u>C</u> TGAGG R: CCTCA <u>G</u> GGGGG	F: CCCCC <u>-</u> TGAGG R: CCTCA <u>-</u> GGGGG
イントロン 1b	F: TTCTC <u>T</u> GTGGT R: ACCAC <u>A</u> GAGAA	F: TTCTC <u>C</u> GTGGT R: ACCAC <u>G</u> GAGAA
エキソン 2	F: ACTGT <u>G</u> AGGAC R: GTCCT <u>C</u> ACAGT	F: ACTGT <u>A</u> AGGAC R: GTCCT <u>T</u> ACAGT
エキソン 2	F: GAAAG <u>C</u> CCAGT R: ACTGG <u>G</u> CCTTTC	F: GAAAG <u>T</u> CCAGT R: ACTGG <u>A</u> CCTTTC
エキソン 2	F: AAGTC <u>G</u> GAGGT R: ACCTC <u>C</u> GACTT	F: AAGTC <u>A</u> GAGGT R: ACCTC <u>T</u> GACTT

イントロ 2	F: TGCAT <u>C</u> CCCCC R: GGGGG <u>G</u> ATGCA	F: TGCAT <u>T</u> CCCCC R: GGGGG <u>A</u> ATGCA
エキソ 3	F: CGGCT <u>G</u> AGGTG R: CACCT <u>C</u> AGCCG	F: CGGCT <u>C</u> AGGTG R: CACCT <u>G</u> AGCCG
エキソ 3	F: GAGAG <u>C</u> GGCAT R: ATGCC <u>G</u> CTCTC	F: GAGAG <u>T</u> GGCAT R: ATGCC <u>A</u> CTCTC
イントロ 3	F: GTGT <u>G</u> TGCATG R: CATGC <u>A</u> CACAC	F: GTGT <u>G</u> GCATG R: CATGCC <u>C</u> CACAC
エキソ 4	F: TGGG <u>A</u> TGCAG R: CTGC <u>A</u> TCCCA	F: TGGG <u>A</u> ATGCAG R: CTGC <u>A</u> TCCCA
エキソ 4	F: CTTT <u>G</u> ACACTA R: TAGT <u>G</u> TCAAAG	F: CTTT <u>G</u> CACTA R: TAGT <u>G</u> C <del>C</del> AAAG
エキソ 4	F: GACAC <u>T</u> ACCTT R: AAGG <u>T</u> AGTGTC	F: GACAC <u>C</u> ACCTT R: AAGG <u>T</u> GGTGTC
エキソ 5	F: AGTGG <u>C</u> TGCCA R: TCGC <u>A</u> GCCACT	F: AGTGG <u>T</u> TGCCA R: TCGC <u>A</u> CCACT
エキソ 5	F: AGTGG <u>C</u> GGGAA R: TTCCC <u>G</u> CCACT	F: AGTGG <u>T</u> GGGAA R: TTCCC <u>A</u> CCACT
エキソ 6	F: AAGGG <u>G</u> GCCGC R: GCGG <u>C</u> CCCTT	F: AAGGG <u>A</u> GCCGC R: GCGG <u>T</u> CCCTT
イントロ 6	F: TGGC <u>A</u> GGCAG R: CTGCC <u>C</u> TGCCA	F: TGGC <u>A</u> AGCAG R: CTGCC <u>T</u> TGCCA

イントロ 6	F: ACAAG <u>A</u> TATTG R: CAATA <u>T</u> CTTGT	F: ACAAG <u>G</u> TATTG R: CAATA <u>C</u> CTTGT
イントロ 6	F: TCCAT <u>C</u> CTGTT R: AACAG <u>G</u> ATGGA	F: TCCAT <u>T</u> CTGTT R: AACAG <u>A</u> ATGGA
エキソ 7	F: CACTA <u>C</u> ATGCT R: AGCAT <u>G</u> TAGTG	F: CACTA <u>T</u> ATGCT R: AGCAT <u>A</u> TAGTG
イントロ 7	F: CCCCC <u>C</u> AGCCT R: AGGCT <u>G</u> GGGGG	F: CCCCC <u>T</u> AGCCT R: AGGCT <u>A</u> GGGGG
エキソ 8	F: AATTC <u>G</u> CCATT R: AATGG <u>C</u> GAATT	F: AATTC <u>A</u> CCATT R: AATGG <u>T</u> GAATT
イントロ 8	F: GTGAG <u>G</u> GAGCC R: GGCTC <u>C</u> CTCAC	F: GTGAG <u>A</u> GAGCC R: GGCTC <u>T</u> CTCAC
3'UTR	F: TGAGC <u>G</u> GCTGC R: GCAGC <u>C</u> GCTCA	F: TGAGC <u>A</u> GCTGC R: GCAGC <u>T</u> GCTCA
3'UTR	F: CTTGG <u>G</u> TGACA R: TGTCAC <u>C</u> CAAG	F: CTTGG <u>A</u> TGACA R: TGTCAT <u>T</u> CCAAG

【0114】

参考文献

- (1) Daly, Toxicol Lett 102-103 (1998), 143-7
- (2) Touw, Drug Metabol Drug Interact 14 (1997), 55-82
- (3) Thummel, Annu Rev Pharmacol Toxicol 38 (1998), 389-430
- (4) Cholerton, Trends Pharmacol Sci 13 (1992), 434-9
- (5) Ketter, J Clin Psychopharmacol 15 (1995), 387-98
- (6) Forrester, Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1990), 8306-10
- (7) Paolini, Nature 398 (1999), 760-1
- (8) Westlind, Biochem Biophys Res Commun 259 (1999), 201-5
- (9) Jounaidi, Biochem Biophys Res Commun 221 (1996), 466-70
- (10) Schuetz, Pharmacogenetics 4 (1994), 11-20
- (11) Hunt, Clin Pharmacol Ther 51 (1992), 18-23
- (12) Kashuba, Clin Pharmacol Ther 64 (1998), 269-77
- (13) Peyronneau, Eur J Biochem 218 (1993), 355-61
- (14) Rebbeck, J Natl Cancer Inst 90 (1998), 1225-9
- (15) Felix, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998), 13176-81
- (16) He, Biochemistry 36 (1997), 8831-9
- (17) Szklarz, J Comput Aided Mol Des 11 (1997), 265-72
- (18) Harlow, J Biol Chem 272 (1997), 5396-402
- (19) Wang, Biochemistry 37 (1998), 12536-45
- (20) Harlow, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998), 6636-41
- (21) Domanski, Arch Biochem Biophys 350 (1998), 223-32
- (22) Lehmann, J Clin Invest 102 (1998), 1016-23
- (23) Bertilsson, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998), 12208-13
- (24) Kliewer, Cell 92 (1998), 73-82
- (25) Pascussi, Biochem Biophys Res Commun 260 (1999), 377-81

**【配列表】**

## SEQUENCE LISTING

<110> EPIDAUROS AG

<120> Polymorphisms in the human hPXR gene and their use in diagnostic and therapeutic applications

<130> D 2145 PCT-2

<140>  
<141>

<160> 185

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 1  
tcatgtccga cgaggccg 18

<210> 2  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 2  
cccacatggc tgacatgt 18

<210> 3  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 3  
cccacatgagg accagatc 18

<210> 4  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 4  
 gtcttccaag cagtagga 18

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 5  
 cagcatgggc tccagtag 18

<210> 6  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 6  
 cctgtgatgc cgaacaac 18

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 7  
 cattgaatgc aatcggcc 18

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 8  
 gctcttgca gtgtccat 18

<210> 9  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 9  
 ggaaagccca gtgtcaac 18

<210> 10  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 10  
 ccatgaaacg caacgccc 18

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 11  
 ccttgcaccc ttcacatg 18

<210> 12  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 12  
 catgccgctc tccaggca 18

<210> 13  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 13  
 cggcctcgtc ggacatga 18

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 14  
 acatgtcagc catgtggg 18

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 15  
 caagccaagt gttcacagtg 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 16  
 cactgtgaac acttggcttg 20

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 17  
 caaggacagc agcatgacag tcac 24

<210> 18  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 18  
 agccaactca gccgcagc 18  
  
 <210> 19  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 19  
 aagcaggtat gg 12  
  
 <210> 20  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 20  
 aaaccagtga gt 12  
  
 <210> 21  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 21  
 ttctagtcca ag 12  
  
 <210> 22  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 22

tttcaggtag ag

12

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 23

tcacaggagg gc

12

<210> 24

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 24

aggagagtga gc

12

<210> 25

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 25

ctgcagtgat ca

12

<210> 26

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 26

ttccgggtag ga

12

<210> 27  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 27  
tcctagctgc ca 12

<210> 28  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 28  
cttcaggtag ga 12

<210> 29  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 29  
tgccagggac tt 12

<210> 30  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 30  
ctgcaggtgc cc 12

<210> 31  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial

sequence

<400> 31  
ccacaggtgg ct 12

<210> 32  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 32  
ccccaggtga gg 12

<210> 33  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 33  
ctccagaccg cc 12

<210> 34  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 34  
tcataggtga gc 12

<210> 35  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 35  
atgcaggttc tt 12

<210> 36

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 36  
 tcaagtgctg gacttgggac 20  
  
  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 37  
 cccactatga tgctgacctc 20  
  
  
 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 38  
 cacatacaac cagctccctg 20  
  
  
 <210> 39  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 39  
 ccacatgcag gcaagactc 19  
  
  
 <210> 40  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 40  
 ctgaggcctc tacacatc 18

<210> 41  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 41  
 aggccctgag atggtacc 18

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 42  
 ctgggacgca aaggctagtg 20

<210> 43  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 43  
 cctggtgcac acggacac 18

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 44  
 taacggcttc tgctgccttg 20

<210> 45  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 45  
 agctctccaa atctaccctc 20  
  
  
 <210> 46  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 46  
 ctgagttggg acctgtct 18  
  
  
 <210> 47  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 47  
 ccaggccctt tgaacctc 18  
  
  
 <210> 48  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 48  
 ctgctggtgc cggcctgt 18  
  
  
 <210> 49  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 49  
gactgggacc ttcctgg 18

<210> 50  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 50  
gagcaatgcc ctgactct 18

<210> 51  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 51  
ccctctggcc atgaagtc 18

<210> 52  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 52  
tgcttgtagc gcctcaga 18

<210> 53  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 53  
gctcttgtagc gtgtccat 18

<210> 54  
<211> 11  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 54  
atctcggcct c 11

<210> 55  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 55  
gaggccgaga t 11

<210> 56  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 56  
atctcagcct c 11

<210> 57  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 57  
gaggctgaga t 11

<210> 58  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 58

ctgaacaagg c 11

<210> 59  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 59  
gccttgttca g 11

<210> 60  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 60  
ctgaaaaagg c 11

<210> 61  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 61  
gcctttttca g 11

<210> 62  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 62  
ccaggggaga a 11

<210> 63  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 63  
ttctcccctg g 11

<210> 64  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 64  
ccaggtgaga a 11

<210> 65  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 65  
ttctcacctg g 11

<210> 66  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 66  
gactgtggga g 11

<210> 67  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 67  
ctcccacagt c 11

<210> 68  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 68  
 gactggggga g 11  
  
 <210> 69  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 69  
 ctccccagt c 11  
  
 <210> 70  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 70  
 cccccctgag g 11  
  
 <210> 71  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 71  
 cctcaggggg g 11  
  
 <210> 72  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 72  
 ccccctgagg 10

<210> 73  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 73  
 cctcaggggg 10

<210> 74  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 74  
 ttctctgtgg t 11

<210> 75  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 75  
 accacagaga a 11

<210> 76  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 76  
 ttctccgtgg t 11

<210> 77  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 77  
 accacggaga a 11

<210> 78  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 78  
 actgtgagga c 11

<210> 79  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 79  
 gtcctcacag t 11

<210> 80  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 80  
 actgtaagga c 11

<210> 81  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 81  
gtccttacag t 11

<210> 82  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 82  
gaaagcccag t 11

<210> 83  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 83  
actgggcttt c 11

<210> 84  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 84  
gaaagtccag t 11

<210> 85  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 85  
actggacttt c 11

<210> 86  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 86  
aagtcggagg t 11

<210> 87  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 87  
acctccgact t 11

<210> 88  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 88  
aagtcagagg t 11

<210> 89  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 89  
acctctgact t 11

<210> 90  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial

sequence

<400> 90  
tgcattcccc c 11

<210> 91  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 91  
gggggggatgc a 11

<210> 92  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 92  
tgcattcccc c 11

<210> 93  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 93  
gggggaatgc a 11

<210> 94  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 94  
cggctgaggt g 11

<210> 95

<211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 95  
 cacctcagcc g 11

<210> 96  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 96  
 cggctcaggt g 11

<210> 97  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 97  
 cacctgagcc g 11

<210> 98  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 98  
 gagagcggca t 11

<210> 99  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 99  
atgccgctct c 11

<210> 100  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 100  
gagagtggca t 11

<210> 101  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 101  
atgccactct c 11

<210> 102  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 102  
gtgtgtgcat g 11

<210> 103  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 103  
catgcacaca c 11

<210> 104  
<211> 11

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 104  
 gtgtgggcat g 11  
  
 <210> 105  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 105  
 catgcccaca c 11  
  
 <210> 106  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 106  
 tgggagtgca g 11  
  
 <210> 107  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 107  
 ctgcactccc a 11  
  
 <210> 108  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 108  
tggaatgca g 11

<210> 109  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 109  
ctgcattccc a 11

<210> 110  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 110  
ctttgacact a 11

<210> 111  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 111  
tagtgtcaaa g 11

<210> 112  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 112  
ctttggcact a 11

<210> 113  
<211> 11  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
 <400> 113  
 tagtgccaaa g 11

<210> 114  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
 <400> 114  
 gacactacct t 11

<210> 115  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
 <400> 115  
 aaggtagtgt c 11

<210> 116  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
 <400> 116  
 gacaccacct t 11

<210> 117  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
 <400> 117

aaggtggtgt c 11

<210> 118  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 118  
agtggctgcg a 11

<210> 119  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 119  
tcgcagccac t 11

<210> 120  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 120  
agtggttgcg a 11

<210> 121  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 121  
tcgcaaccac t 11

<210> 122  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 122  
agtggcggga a 11

<210> 123  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 123  
ttccgccac t 11

<210> 124  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 124  
agtggtgga a 11

<210> 125  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 125  
ttccaccac t 11

<210> 126  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 126  
aagggggccg c 11

<210> 127  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 127  
 gcggcccct t 11

<210> 128  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 128  
 aagggagccg c 11

<210> 129  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 129  
 gcggctccct t 11

<210> 130  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 130  
 tggcagggca g 11

<210> 131  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 131  
 ctgccctgcc a 11

<210> 132  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 132  
 tggcaaggca g 11

<210> 133  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 133  
 ctgccttgcc a 11

<210> 134  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 134  
 acaagatatt g 11

<210> 135  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 135  
 caatatcttg t 11

<210> 136  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 136  
acaaggatt g 11

<210> 137  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 137  
caataccttg t 11

<210> 138  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 138  
tccatcctgt t 11

<210> 139  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 139  
aacaggatgg a 11

<210> 140  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 140  
tccattctgt t 11

<210> 141  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 141  
aacagaatgg a 11

<210> 142  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 142  
cactacatgc t 11

<210> 143  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 143  
agcatgtagt g 11

<210> 144  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial sequence

<400> 144  
cactatatgc t 11

<210> 145  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 145  
 agcatatagt g 11

<210> 146  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 146  
 cccccagcc t 11

<210> 147  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 147  
 aggctggggg g 11

<210> 148  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 148  
 cccctagcc t 11

<210> 149  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial

sequence

<400> 149  
aggctagggg g 11

<210> 150  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 150  
aattcgccat t 11

<210> 151  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 151  
aatggcgaat t 11

<210> 152  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 152  
aattcaccat t 11

<210> 153  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 153  
aatggtgaat t 11

<210> 154

<211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 154  
 gtgagggagc c 11

<210> 155  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 155  
 ggctccctca c 11

<210> 156  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 156  
 gtgagagagc c 11

<210> 157  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence  
  
 <400> 157  
 ggctctctca c 11

<210> 158  
 <211> 11  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: artificial  
 sequence

<400> 158  
tgagcggctg c 11

<210> 159  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 159  
gcagccgctc a 11

<210> 160  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 160  
tgagcagctg c 11

<210> 161  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 161  
gcagctgctc a 11

<210> 162  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: artificial  
sequence

<400> 162  
cttgggtgac a 11

<210> 163  
<211> 11

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificial
sequence

<400> 163
tgtcacccaa g 11

<210> 164
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificial
sequence

<400> 164
cttggatgac a 11

<210> 165
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificial
sequence

<400> 165
tgtcatccaa g 11

<210> 166
<211> 345
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (83)..(277)

<400> 166
ctgaggcctc tacacatccc tgcaccgtct ttccattctc tgtggttttc tcatttctag 60

tccaagaggc ccagaagcaa ac ctg gag gtg aga ccc aaa gaa agc tgg aac 112
Leu Glu Val Arg Pro Lys Glu Ser Trp Asn
1 5 10

cat gct gac ttt gta cac tgt aag gac aca gag tct gtt cct gga aag 160
His Ala Asp Phe Val His Cys Lys Asp Thr Glu Ser Val Pro Gly Lys
15 20 25

ccc agt gtc aac gca gat gag gaa gtc gga ggt ccc caa atc tgc cgt 208
Pro Ser Val Asn Ala Asp Glu Glu Val Gly Gly Pro Gln Ile Cys Arg

```

```

          30          35          40
gta tgt ggg gac aag gcc act ggc tat cac ttc aat gtc atg aca tgt 256
Val Cys Gly Asp Lys Ala Thr Gly Tyr His Phe Asn Val Met Thr Cys
          45          50          55

gaa gga tgc aag ggc ttt ttc aggtagagtt acccatcagc cttcacccac 307
Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe
          60          65

gtgccaccac tgaccactg ggtaacatct cagggcct 345

<210> 167
<211> 65
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 167
Leu Glu Val Arg Pro Lys Glu Ser Trp Asn His Ala Asp Phe Val His
   1          5          10          15
Cys Lys Asp Thr Glu Ser Val Pro Gly Lys Pro Ser Val Asn Ala Asp
          20          25          30
Glu Glu Val Gly Gly Pro Gln Ile Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala
          35          40          45
Thr Gly Tyr His Phe Asn Val Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe
          50          55          60
Phe
  65

<210> 168
<211> 345
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (83)..(277)

<400> 168
ctgaggcctc tacacatccc tgtccagtct tttcattctc tgtggttttc tcatttctag 60

tccaagagggc ccagaagcaa ac ctg gag gtg aga ccc aaa gaa agc tgg aac 112
          Leu Glu Val Arg Pro Lys Glu Ser Trp Asn
          1          5          10
cat gct gac ttt gta cac tgt gag gac aca gag tct gtt cct gga aag 160
His Ala Asp Phe Val His Cys Glu Asp Thr Glu Ser Val Pro Gly Lys
          15          20          25
tcc agt gtc aac gca gat gag gaa gtc gga ggt ccc caa atc tgc cgt 208
Ser Ser Val Asn Ala Asp Glu Glu Val Gly Gly Pro Gln Ile Cys Arg
          30          35          40

```



gta tgt ggg gac aag gcc act ggc tat cac ttc aat gtc atg aca tgt 256  
 Val Cys Gly Asp Lys Ala Thr Gly Tyr His Phe Asn Val Met Thr Cys  
           45                          50                          55

gaa gga tgc aag ggc ttt ttc aggtagagtt acccatcagc cttcaccac 307  
 Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe  
           60                          65

gtgccaccac tgaccactg ggtaacatct cagggect 345

<210> 171  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 171  
 Leu Glu Val Arg Pro Lys Glu Ser Trp Asn His Ala Asp Phe Val His  
   1                          5                          10                          15  
 Cys Glu Asp Thr Glu Ser Val Pro Gly Lys Pro Ser Val Asn Ala Asp  
                           20                          25                          30  
 Glu Glu Val Arg Gly Pro Gln Ile Cys Arg Val Cys Gly Asp Lys Ala  
                           35                          40                          45  
 Thr Gly Tyr His Phe Asn Val Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe  
   50                          55                          60  
 Phe  
   65

<210> 172  
 <211> 423  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (105)..(290)

<400> 172  
 taacggcttc tgctgccttg agagggttac acagtggctc tccagggggc tggaggctca 60  
 ccagggggcac gtgtgcctga gccagcctca ctgtccctgc agtg atc atg tcc gac 116  
   Ile Met Ser Asp  
   1

gag gcc gtg gag gag agg cgg gcc ttg atc aag cgg aag aaa agt gaa 164  
 Glu Ala Val Glu Glu Arg Arg Ala Leu Ile Lys Arg Lys Lys Ser Glu  
   5                          10                          15                          20

cgg aca ggg act cag cca ctg gga atg cag ggg ctg aca gag gag cag 212  
 Arg Thr Gly Thr Gln Pro Leu Gly Met Gln Gly Leu Thr Glu Glu Gln  
                           25                          30                          35

cgg atg atg atc agg gag ctg atg gac gct cag atg aaa acc ttt gac 260

Arg Met Met Ile Arg Glu Leu Met Asp Ala Gln Met Lys Thr Phe Asp  
 40 45 50

act acc ttc tcc cat ttc aag aat ttc cgg gtaggaggaa ctgcacagtg 310  
 Thr Thr Phe Ser His Phe Lys Asn Phe Arg  
 55 60

acccgaggtg tcaactgccat cttcattctc acatagaaac tgaggttccc caaggataag 370

aaacttatac aaggtcacag ctaatcagtg gtggagggta gatttggaga gct 423

<210> 173  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 173  
 Ile Met Ser Asp Glu Ala Val Glu Glu Arg Arg Ala Leu Ile Lys Arg  
 1 5 10 15

Lys Lys Ser Glu Arg Thr Gly Thr Gln Pro Leu Gly Met Gln Gly Leu  
 20 25 30

Thr Glu Glu Gln Arg Met Met Ile Arg Glu Leu Met Asp Ala Gln Met  
 35 40 45

Lys Thr Phe Asp Thr Thr Phe Ser His Phe Lys Asn Phe Arg  
 50 55 60

<210> 174  
 <211> 423  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (105)..(290)

<400> 174  
 taacggcttc tgctgccttg agaggggttac acagtggctc tccagggggc tggaggctca 60

ccagggggcac gtgtgcctga gccagcctca ctgtccctgc agtg atc atg tcc gac 116  
 Ile Met Ser Asp  
 1

gag gcc gtg gag gag agg cgg gcc ttg atc aag cgg aag aaa agt gaa 164  
 Glu Ala Val Glu Glu Arg Arg Ala Leu Ile Lys Arg Lys Lys Ser Glu  
 5 10 15 20

cgg aca ggg act cag cca ctg gga gtg cag ggg ctg aca gag gag cag 212  
 Arg Thr Gly Thr Gln Pro Leu Gly Val Gln Gly Leu Thr Glu Glu Gln  
 25 30 35

cgg atg atg atc agg gag ctg atg gac gct cag atg aaa acc ttt ggc 260  
 Arg Met Met Ile Arg Glu Leu Met Asp Ala Gln Met Lys Thr Phe Gly  
 40 45 50

act acc ttc tcc cat ttc aag aat ttc cgg gtaggaggaa ctgcacagtg 310  
 Thr Thr Phe Ser His Phe Lys Asn Phe Arg  
           55                          60

acccgaggtg tcaactgccat cttcattctc acatagaaac tgagggtccc caaggataag 370

aaacttatac aaggtcacag ctaatcagtg gtggagggta gatttggaga gct 423

<210> 175  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 175  
 Ile Met Ser Asp Glu Ala Val Glu Glu Arg Arg Ala Leu Ile Lys Arg  
       1                  5                  10                  15

Lys Lys Ser Glu Arg Thr Gly Thr Gln Pro Leu Gly Val Gln Gly Leu  
                   20                  25                  30

Thr Glu Glu Gln Arg Met Met Ile Arg Glu Leu Met Asp Ala Gln Met  
           35                          40                  45

Lys Thr Phe Gly Thr Thr Phe Ser His Phe Lys Asn Phe Arg  
       50                          55                  60

<210> 176  
 <211> 271  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (80)..(181)

<400> 176  
 gagcaatgcc ctgactctgg gctggactga gcttgtcttt gcccacatgat cttgcaccac 60

acctccctcc cctccagac cgc cca ggt gtg ctg cag cac cgc gtg gtg gac 112  
                           Arg Pro Gly Val Leu Gln His Arg Val Val Asp  
                           1                          5                          10

cag ctg cag gag caa ttc acc att act ctg aag tcc tac att gaa tgc 160  
 Gln Leu Gln Glu Gln Phe Thr Ile Thr Leu Lys Ser Tyr Ile Glu Cys  
                   15                          20                          25

aat cgg ccc cag cct gct cat aggtgagcac agcagggggt gaggaccctg 211  
 Asn Arg Pro Gln Pro Ala His  
           30

gaggtgatg tgaggagacc gaggttcagg gaaattgccc aagacttcat ggccagaggg 271

<210> 177  
 <211> 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 177

Arg Pro Gly Val Leu Gln His Arg Val Val Asp Gln Leu Gln Glu Gln  
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Thr Leu Lys Ser Tyr Ile Glu Cys Asn Arg Pro Gln Pro  
 20 25 30

Ala His

&lt;210&gt; 178

&lt;211&gt; 962

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; r=g or a, m=c or a, k=g or t, n=c or deleted

&lt;400&gt; 178

```
tcaagtgctg gacttgggac ttaggagggg caatggagcc gcttagtgcc tacatctgac 60
ttggactgaa atataggtga gagacaagat tgtctcatat cgggggaaat cataacctat 120
gactaggacg ggaagaggaa gcactgcctt tacttcagtg ggaatcterg cctcagcctg 180
caagccaagt gtccacagtg aaaaaagcaa gagaataagc taatactcct gtcctgaama 240
aggcagcggc tccttggtaa agctactcct tgatcgatcc tttgcaccgg attggtcaaa 300
gtggaaccca ggkgagaagt cggagcaaag aacttaccac caagcaggta tgggttttct 360
ttctttctct tttgctgggg gctgaccgcc ctccagctcc agccaaaaga tgtgtgtgaa 420
cacaaatata ccttctgttt gaggtcagca tcatagtggg tcgtgaaatca tgttggcctt 480
gctgtgtct cctcatttct agggtgaaaa aaaaaagca tgaaaacaat cacttaagt 540
tgagcccat tactgatgct ctctggtcct gcactagcct cctagaaaaa tcaccacagc 600
cttaactact gcatgagtta ccacaagtca cacatacaac cagctccctg ttacagggct 660
ggagtccctg gaccacaggaa ataccacctc caaggactgk gggagctggg gactatggga 720
actgggatca actcagtcct gattcctttt ggcttctggt gttagtgtg gacagccccc 780
tgaggccaag gacagcagca tgacagtac caggactcac cacttcaagg aggggtccct 840
cagagcacct gccatacccc tgcacagtgc tgcggctgag ttggcttcaa accagtgagt 900
tttctacctc tactattgaa agggcacctt gtcccacaga accgagtctt gcctgcatgt 960
gg 962
```

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; y=c or t, r=g or a

&lt;400&gt; 179

```
ctgaggcctc tacacatccc tgtccagtct tttcattctc ygtggttttc tcattttctag 60
tccaagaggg ccagaagcaa acctggaggt gagaccctaaa gaaagctgga accatgctga 120
ctttgtacac tgtraggaca cagagtctgt tcctggaaaag yccagtgtca acgcagatga 180
ggaagtcrga ggtcccaaaa tctgccgtgt atgtggggac aaggccactg gctatcactt 240
caatgtcatg acatgtgaag gatgcaaggg ctttttcagg tagagttacc catcagcctt 300
caccacagtg ccaccactga cccactgggt aacatctcag ggcct 345
```

<210> 180  
 <211> 417  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> y=c or t, s=g or c, k=g or t

<400> 180  
 ctgggacgca aaggctagtg tccccctccc cgagtcggta ggggctgggg agggaggtgg 60  
 tatggcccgg agccccaggc cgagggcccg ggcacccgtg catyccccct tctgctcccc 120  
 attctctcac aggagggcca tgaaacgcaa cgcccggcts aggtgcccct tccggaaggg 180  
 cgcctgcgag atcacccgga agacccggcg acagtgccag gcctgccgcc tgcgcaagtg 240  
 cctggagagy ggcatgaaga aggagagtga gcagtgggcg cgcgggcggg ccggcgccgg 300  
 ggtgcacggc tctgagtaag gacgtgccgt ggggtgkkgc atgcttgtgt ggagatgccc 360  
 cccagtggtg cgcgtgaaca cacgtgcaca tgtgagctgg tgtccgtgtg caacagg 417

<210> 181  
 <211> 423  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> r=g or a, y=c or t

<400> 181  
 taacggcttc tgctgccttg agagggttac acagtggctc tccagggggc tggaggtcca 60  
 ccaggggcac gtgtgcctga gccagcctca ctgtccctgc agtgatcatg tccgacgagg 120  
 ccgtggagga gagggggccc ttgatcaagc ggaagaaaag tgaacggaca gggactcagc 180  
 cactgggart gcaggggctg acagaggagc agcggatgat gatcaggag ctgatggagc 240  
 ctcagatgaa aacctttgrc acyaccttct cccatttcaa gaatttccgg ttaggagggaa 300  
 ctgcacagtg acccgaggtg tcaactgcat cttcattctc acatagaaac tgaggttccc 360  
 caaggataag aaacttatac aaggtcacag ctaatcagtg gtggagggta gatttggaga 420  
 gct 423

<210> 182  
 <211> 415  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> y=c or t

<400> 182  
 ctgagttggg acctgtctat gaaagcacat gctgtctctc ctctgtccac ctctctggcat 60  
 gtgtccttagc tgccaggggt gcttagcagt ggytgcgagt tgccagagtc tctgcaggcc 120  
 ccatcgaggg aagaagctgc caagtggagc caggtccgga aagatctgtg ctctttgag 180  
 gtctctctgc agctgcgggg ggaggatggc agtgtctgga actacaaacc cccagccgac 240  
 agtgygggga aagagatctt ctccctgctg cccacatgg ctgacatgtc aacctacatg 300  
 ttcaaaggca tcatcagctt tgccaaagtc atctctact tcaggtagga catggagact 360  
 ggggtggttg gtgtggaaaa gaactggaag tggccaggag gttcaaaggg cctgg 415

<210> 183  
 <211> 598  
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> r=g or a, y=c or t

<400> 183

```
ctgctggtgc cggcctgtgg gctgcctccc agggagctgt cctcccctcc ccatecttgc 60
tgccaggac ttgccatcg aggaccagat ctccctgctg aagggrgccc ctttcgagct 120
gtgtcaactg agattcaaca cagtgttcaa cgcgagact ggaacctggg agtgtggccc 180
gctgtcctac tgcttgaag aactgcagg tgcggagag agcctgcctg ccctggcaga 240
gggagggaaa cactgcagtt atgggaggaa gggagctacg ccaggatatg caggttctgg 300
gatggcargg caggaagatg gaatggtgga aaacaagrta ttggtgaggg atgattagat 360
cttggtcagc ttgctgagaa gctgcccctc catyctgtta ccatccacag gtggcttcca 420
gcaacttcta ctggagccca tgctgaaatt ccactayatg ctgaagaagc tgcagctgca 480
tgaggaggag tatgtgctga tgcaggccat ctccctcttc tcccagggtg aggatctccc 540
ctaggctgcc tgacatcccc ccyagcctta tctgcccctc ccaggaagg tcccagtc 598
```

<210> 184

<211> 271

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> r=g or a

<400> 184

```
gagcaatgcc ctgactctgg gctggactga gcttgtcttt gcccctatgat cttgcaccac 60
acctcccctcc cctccagacc gccaggtgt gctgcagcac cgctggtgg accagctgca 120
ggagcaattc rccattactc tgaagtccta cattgaatgc aatcggcccc agcctgctca 180
taggtgagca cagcaggggg tgaggaccgg tgagggtgat gtgagrgagc cgaggttcag 240
ggaaattgcc caagacttca tggccagagg g 271
```

<210> 185

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> r=g or a

<400> 185

```
tgcttgtgca gccctcagagc agccctgagg cttgtgggtc agggcgggct gcaccacaaa 60
tcttttctct ggtggcatg caggttcttg ttctgaaga tcatggctat gctcaccgag 120
ctccgcagca tcaatgctca gcacaccag cggtgctgc gcatccagga catacacc 180
tttgctacgc cctcatgca ggagttgttc ggcatcacag gtatctgagc rgctgccctt 240
ggrtgacacc tccgagaggc agccagacc agagccctct gagccgccac tcccgggcca 300
agacagatgg aactgcca ggc 324
```

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 遺伝子構成における差異は、薬物治療の有効性および安全性に影響を与える。

【図 2】 hPXRによるCYP3A4の最新の制御モデル。

【図 3】 A)hPXR遺伝子の構造。コード領域は黒長方形にて示され、非コード5'および3'非翻訳領域は斜線を施した長方形にて示される。矢先は遺伝子のコード領域のスクリーニングに使用されたオリゴヌクレオチドの位置を表す。DBDおよびLBDと表示された水平な線は、DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメイ

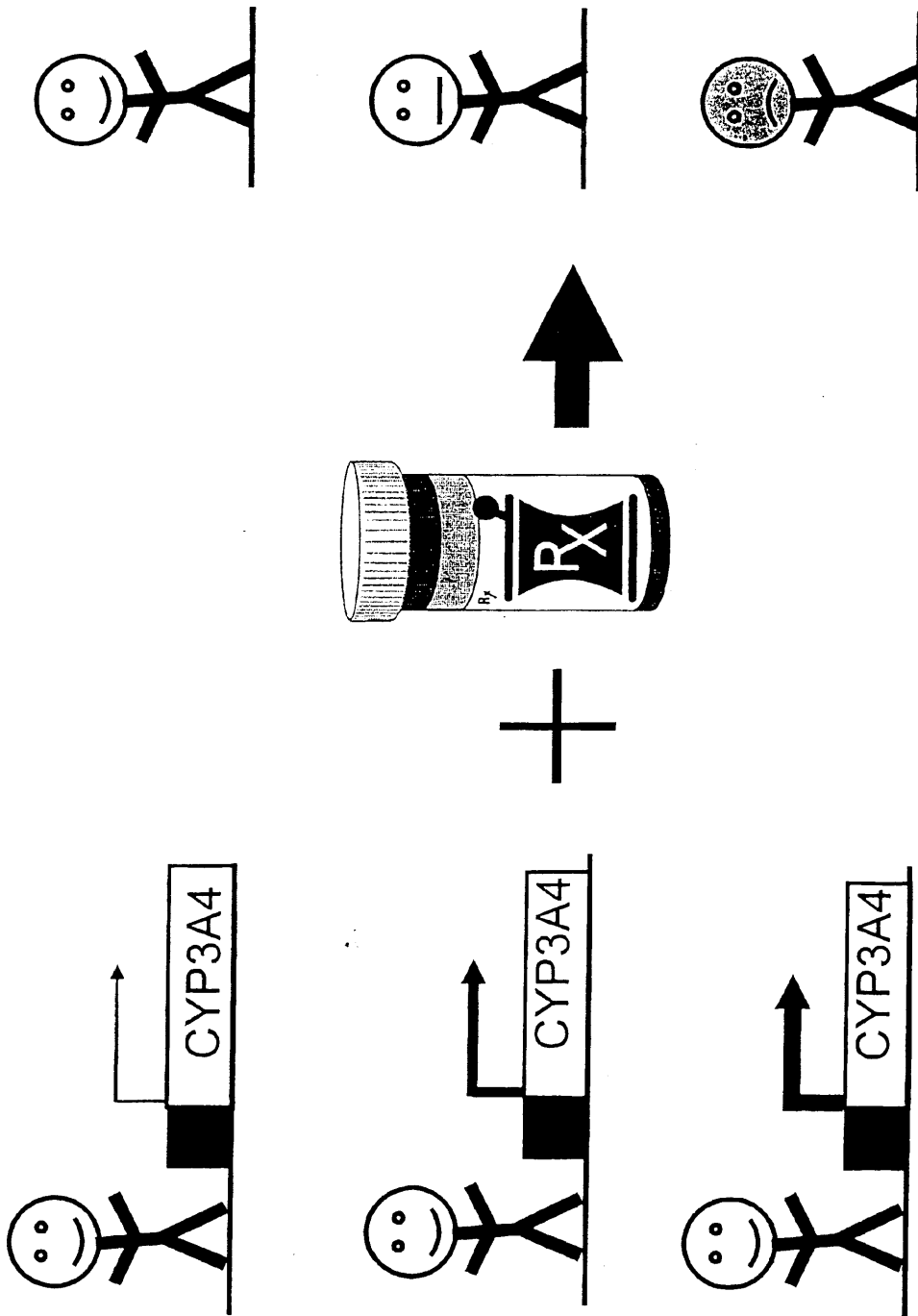
ンの位置を各々示す。下の水平な線は、ApaI (A)、BglII (B)、EcoRI (E)、EcoRV (E V)、HindIII (H) および XbaI (X) についての制限酵素切断部位を含む、ヒトゲノム BAC クローン GS21907 および GS21908 を示す。B) 組織由来の cDNA の PCR 増幅によって調べられたような、肝臓および腸管における hPXR のエキソン 1a およびエキソン 1b の異なる発現。増幅に使用されたプライマーはアガロースゲル電気泳動像の下に、およびエキソン 1a、1b および 2 における矢印によって示される。

【図 4】 hPXR 遺伝子におけるゲノム配列および多型。増幅および配列決定に使用されたプライマー (表 3)、およびスプライス部位には下線が引いてある。太線の下線は多型部位であり、矢印によって分けられた、野生型塩基および変異型塩基として示される。

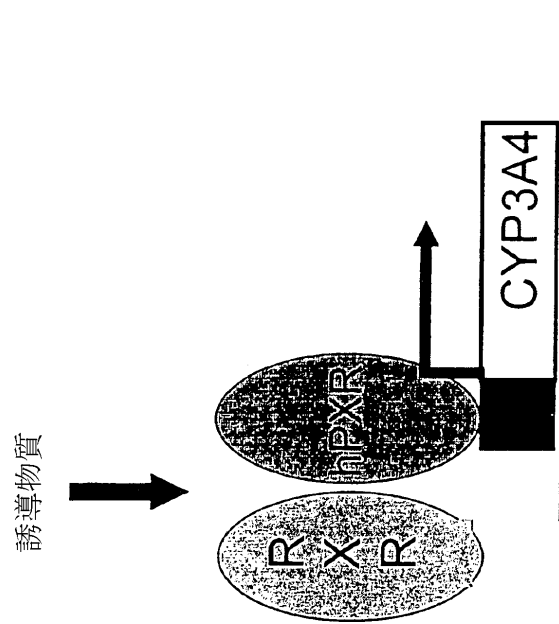
【図 5】 野生型または変異型 hPXR タンパク質について、5  $\mu$ g の発現プラスミドを用いて一過的にトランスフェクションした、COS-1 細胞の総細胞タンパク質のウェスタンブロット法による解析。タンパク質量は、細胞にコトランスフェクションされた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により評価される、トランスフェクション効率に従って調節した。ブロットは hPXR 特異的な抗体を用いてプローブした。分子量マーカー (kD) は左側に示される。

【図 6】 示されるように、プロモーター人工 hPXR 依存性レポーター遺伝子 pGL3(DR3)3Tk(-105)、pCMV、および hPXR 変異についての発現プラスミドを用いて LS174T 細胞をコトランスフェクションした。10  $\mu$ M のリファンピシンまたは 0.1% の DMSO で細胞を 42 時間処理し、その後収集し、ルシフェラーゼ活性および  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性について分析した。データは平均値  $\pm$  SD (標準偏差) として示してある。DMSO のみの存在下における各 hPXR 変異の活性は 1 (A、B) または 100% (C) とした。A) 10  $\mu$ M のリファンピシン処理後の hPXR 変異の効果。B) 外因性誘導物質の非存在下における hPXR 変異の効果。

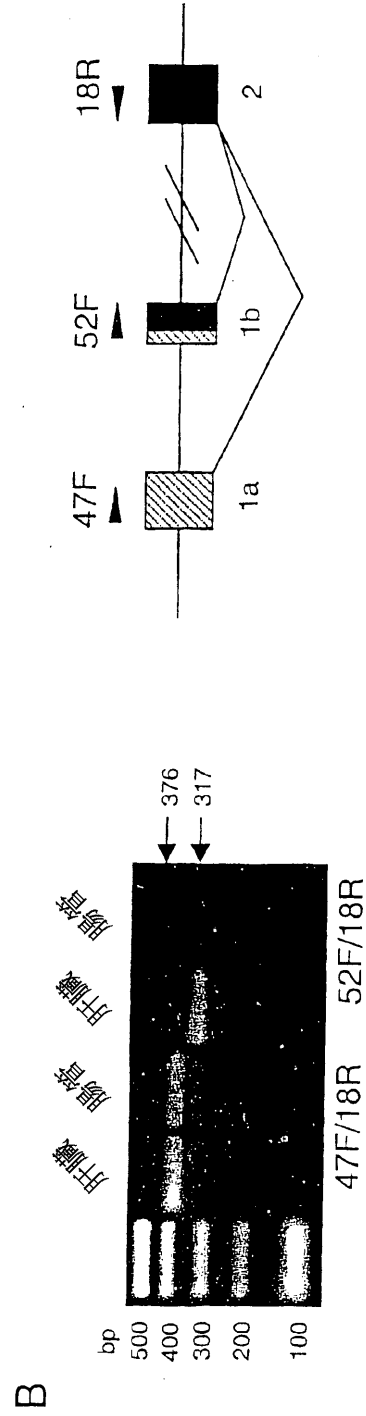
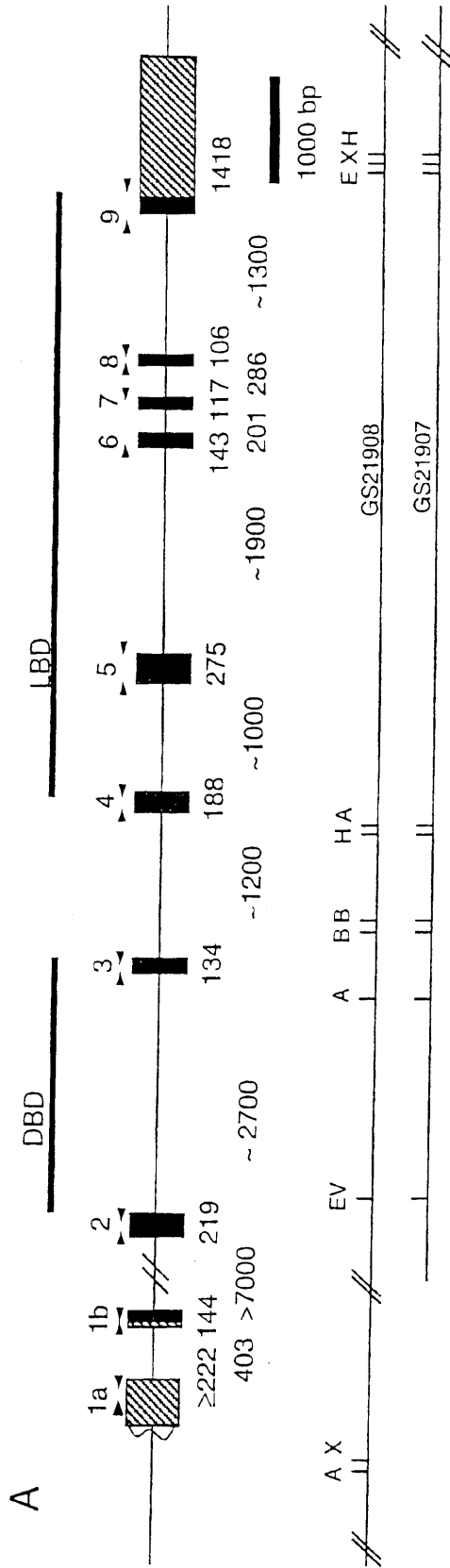
【图1】



【圖2】



【図3】



## 【図4】

エキソン1a及びエキソン1b

TCAAGTGCTGGACTTGGGACTTAGGAGGGGCAATGGAGCCGCTTAGTGCCTACATCTGACTTGGAC  
TGAAATATAGGTGAGAGACAAGATTGTCTCATATCCGGGAAATCATAACCTATGACTAGGA  
CGGAAGAGGAAGCACTGCCTTTACTTCAGTGGGAATCTCG→AGCCTCAGCCTGCAAGCCA  
AGTGTTCACAGTGAAAAAAGCAAGAGAATAAGCTAATACTCCTGTCCTGAAC→AAAGGCAGC  
GGCTCCTTGGTAAAGCTACTCCTTGATCGATCCTTTGCACCCGATTGTTCAAAGTGGACCCCA  
GGG→TGAGAAGTCGGAGCAAAGAACTTACCACCAAGCAGGTATGGTTTTCTTTCTTTCTTT  
TGCTGGGGGCTGACCGCCCTCAGCTCCAGCCAAAAGATGTGTGTGAACACAAATATACCTTCTGT  
TTGAGGTCAGCATCATAGTGGGTCGTGAATCATGTTGGCCTTGCTGCTGTCTCCTCATTTCTAGGGT  
GAAAAAAGCATGAAAACAATCACTTAATGTTGAGCCCCATTACTGATGCTCTCTGGTCCCTG  
CACTAGCCTCCTAGAAAATCACACAGCCTTAACTACTGCATGAGTTACCACAAGTCACACATAC  
AACCAGCTCCCTGTTACAGGGCTGGAGTCCCTGGACCCAGGAAATACCACCTCCAAGGACTGT→G  
GGGAGCTGGGGACTTGGGAAGTGGGATCAACTCAGTCTGATTCTTTTGGCCTGCTGGGTTAG  
TGCTGGCAGCCCTCC→TGAGGCCAAGGACAGCAGCATGACAGTACCAGGATCACCACCT  
CAAGGAGGGTCCCTCAGAGCACCTGCCATACCCCTGCACAGTGCTGCGGCTGAGTTGGCTT  
CAAACCAGTGAGTTTTCTACCTCTACTATTGAAAGGGCACCTTGTCCACAGAACCAGTCTTGCC  
TGCATGTGG

エキソン2

CTGAGGCCCTCTACACATCCCTGTCCAGTCTTTTCATTCTCT→CGTGGTTTTCTCATTTCTAGTCCAA  
GAGGCCCAGAAGCAAACCTGGAGGTGAGACCCAAAGAAAGCTGGAACCATGCTGACTTTGTA  
CACTGTG→AAGGACACAGAGTCTGTTCCCTGGAAAGC→TCCAGTGTCAACGCAGATGAGGAA  
GTCG→AGAGGTCCCCAAATCTGCCGTGTATGTGGGGACAAGGCCACTGGCTATCACTTCAAT  
GTCATGACATGTGAAGGATGCAAGGGCTTTTTCAGGTAGAGTTACCCATCAGCCTCACCCACG  
TGCCACCACTGACCCACTGGGTAACATCTCAGGGCT

エキソン3

CTGGGACGCAAAGGCTAGTGTCCCCCTCCCCGAGTCGGTAGGGGCTGGGGAGGGAGGTGGTATGG  
CCCGAGCCCCAGGCCGAGGGCCCGGGCACCCGTGCATC→TCCCCCTTCTGCTCCCCATTCTCTCA  
CAGGAGGGCCATGAAACGCAACGCCCGGCTG→CAGGTGCCCTTCCGGAAGGGCGCCTGCG  
AGATCACCCGGAAGACCCGGCGACAGTGCCAGGCCTGCCGCTGCGCAAGTGCCTGGAGAG  
C→TGGCATGAAGAAGGAGAGTGAGCAGTGGGCGCGGGGCGGGCCGGCGCCGGGGTGCACGGC  
TCTGAGTAAGGACGTGCCGTGGGTGTGT→GGCATGCTTGTGTGGAGATGCGCGCCGAGTGTGCGC  
GTGAACACACGTGCACATGTGAGCTGGTGTCCGTGTGCAACAGG

エキソン4

TAACGGCTTCTGCTGCCCTTGAGAGGGTTACACAGTGGCTCTCCAGGGGGCTGGAGGCTCACCAAGG  
GCACGTGTGCTGAGCCAGCCTCACTGTCCCTGCA→GTGATCATGTCCGACGAGGCCGTGGAGGA  
GAGGCCGGCCTTGATCAAGCGGAAGAAAAGTGAACGGACAGGGACTCAGCCACTGGGAG→A  
TGCAGGGGCTGACAGAGGAGCAGCGGATGATGATCAGGGAGCTGATGGACGCTCAGATGAA  
AACCTTTGA→GCACCT→CACCTTCTCCATTTCAAGAATTTCCGGGTAGGAGGAACTGCACAGT  
GACCCGAGGTGCACTGCCATCTTCACTTCTACATAGAAACTGAGGTTCCTCAAGGATAAGAACT  
TATACAAGGTACAGCTAATCAGTGGTGGAGGGTAGATTTGGAGAGCT

エキソン5

CTGAGTTGGGACCTGTCTATGAAAGCACATGCTGTCTCTCCTCTGTCCACCTCCTGGCATGTGTCT  
AGCTGCCAGGGGTGCTTAGCAGTGGC→TTGCGAGTTGCCAGAGTCTCTGCAGGCCCCATCG  
AGGGAAGAAGCTGCCAAGTGGAGCCAGGTCCGAAAGATCTGTGCTCTTTGAAGGTCTCTCT  
GCAGCTGCGGGGGAGGATGGCAGTGTCTGGAACACAAACCCCGAGCCGACAGTGGC→TG  
GGAAAGAGATCTTCTCCCTGCTGCCCCACATGGCTGACATGTCAACCTACATGTTCAAAGGC  
ATCATCAGCTTTGCCAAAGTCATCTCCTACTCAGGTAGGACATGGAGACTGGGTGGTTGGGTG  
TGAAAAGAAGTGGAAAGTGGCCAGGAGTTCAAAGGGCCTGG

【図4-1】

SEQ ID NO: 6及び7

CTGCTGGTGCCGGCCTGTGGGCTGCCTCCCAGGGAGCTGTCTCCCTCCCCATCCTTGCTGCCAGG  
GACTTGCCCATCGAGGACCAGATCTCCCTGCTGAAGGGG→AGCCGCTTTCGAGCTGTGTCAA  
CTGAGATTCAACACAGTGTTC AACCGGAGACTGGAACCTGGGAGTGTGGCCGGCTGTCCTA  
CTGCTTGGGAAGACACTGCAGGTGCCCGAGAGAGCCTGCCTGCCCTGGCAGAGGGAGGGAAACAC  
TGCAGTTATGGGAGGAAGGGAGCTACGCCAGGATATGCAGGTTCTGGGATGGCAG→AGGCAGGA  
AGATGGAATGGTGGAAAACAAGA→GTATTGGTGAGGGATGATTAGATCTTGGTCAGCTTGCTGAG  
AAGCTGCCCTCCATC→TCTGTTACCATCCACAGGTGGCTTCCAGCAACTTCTACTGGAGCCCA  
TGCTGAAATTCCATAC→TATGCTGAAGAAGCTGCAGCTGCATGAGGAGGAGTATGTGCTGA  
TGCAGGCCATCTCCCTCTTCTCCCCAGGTGAGGATCTCCCTAGGCTGCCTGACATCCCCCC→  
TAGCCTTATCTGCCCTCCCCAGGGAAGGTCCCAGTC

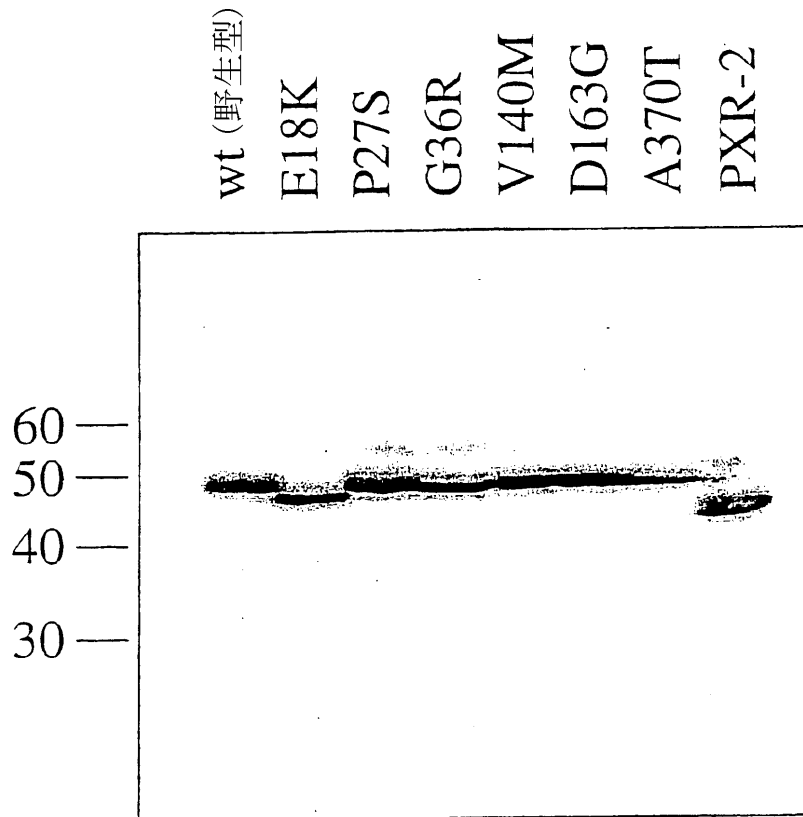
SEQ ID NO: 8

GAGCAATGCCCTGACTCTGGGCTGGACTGAGCTTGTCTTTGCCCATGATCTTGACCACACCTCCC  
TCCCCTCAGACCGCCAGGTGTGCTGCAGCACCGCGTGGTGACCAGCTGCAGGAGCAATT  
CG→ACCATTACTCTGAAGTCCTACATTGAATGCAATCGGCCCCAGCCTGCTCATAGGTGAGC  
ACAGCAGGGGTGAGGACCCGTGAGGGTGATGTGAGG→AGAGCCGAGGTTCAAGGAAATTGCC  
AAGACTTCATGGCCAGAGGG

SEQ ID NO: 9

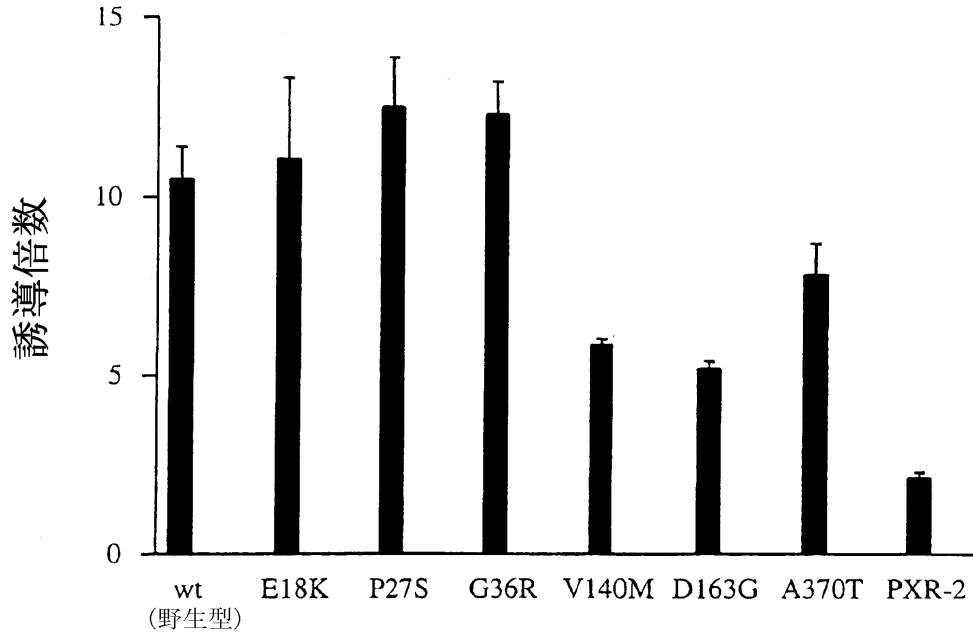
TGCTTGTGCAGCCTCAGAGCAGCCCTGAGGCTTGTGGGTCAAGGCGGGCTGCACCCACAATCTTTT  
CTCTGGCTGGCATGCAGGTTCTTGTTCCCTGAAGATCATGGCTATGCTCACCGAGCTCCGCAGC  
ATCAATGCTCAGCACACCCAGCGGCTGCTGCGCATCCAGGACATACACCCCTTTGCTACGCC  
CCTCATGCAGGAGTTGTTTCGGCATCACAGGTAGCTGAGCG→AGCTGCCCTTGGG→ATGACA  
CCTCCGAGAGGCAGCCAGACCCAGAGCCCTCTGAGCCGCACTCCCGGGCCAAGACAGATG  
GACACTGCCAAGAGC

【図5】

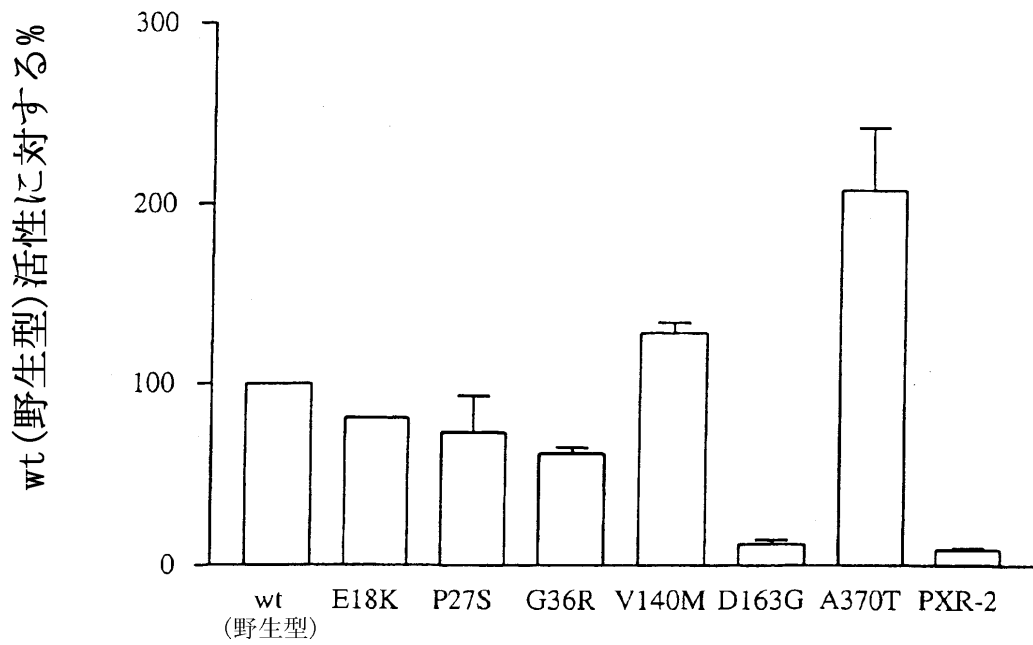


【図6】

A



B





号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する)のイントロン6の-73位もしくは-17位に対応する位置、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1333位で終了する)のイントロン7の+36位に対応する位置、またはhPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン8が位置1439で終了する)のイントロン8の+43位に対応する位置に、ヌクレオチド置換、ヌクレオチド欠失、付加的なヌクレオチドまたはヌクレオチド欠失およびヌクレオチド置換をもつポリヌクレオチド；

(d)hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける)の-201位、-131位、52位、106位、418位、834位、1108位、1308位あるいは1320位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン6が1216位で終了する)のイントロン6の+99位に対応する位置、またはhPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン8が1439位で終了する)のイントロン8の+43位に対応する位置に1つのAをもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける)の-57位、79位、315位、543位、696位あるいは984位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が477位から開始する)のイントロン2の-29位に対応する位置、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する)のイントロン6の-17位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1333位で終了する)のイントロン7の+36位に対応する位置に1つのTをもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける)の-20位に対応する位置に1つの欠失をもつポリヌクレオチド、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける)の-42位、225位あるいは492位に対応する位置に1つのCをもつポリヌクレオチド、またはhPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769538、280位におけるCTG翻訳開始部位のCを+1と番号付ける)の488位に対応する位置、hPXR遺伝子(アクセッション番号：gi3769536、60位における開始コドンATGのAを+1と番号付ける)の-100位に対応する位置、hPXR遺

伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン3が610位で終了する）のイントロン3の+72位に対応する位置、もしくはhPXR遺伝子（アクセッション番号：gi3769538、エキソン7が1217位から開始する）のイントロン6の-73位に対応する位置に1つのGをもつポリヌクレオチド；

(e)hPXRポリペプチド（アクセッション番号：gi3769538、開始コドンCTGにおけるCが位置280位）の18位、27位、36位、140位、163位または370位におけるアミノ酸置換を含む、該hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；および

(f)hPXRポリペプチド（アクセッション番号：gi3769538）の18位におけるEからKへの、27位におけるPからSへの、36位におけるGからRへの、140位におけるVからMへの、163位におけるDからGへの、または370位におけるAからTへのアミノ酸置換を含む、該hPXRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項2】 変異型hPXRタンパク質またはその断片をコードする、請求項1記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】 ヌクレオチドの欠失、付加および/または置換が、対応する野生型遺伝子と比較して、hPXR遺伝子の発現を変化させる、請求項1または2記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項5】 ポリヌクレオチドが、原核細胞または真核細胞で発現を誘導する発現制御配列に機能的に連結される、請求項4記載のベクター。

【請求項6】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項4もしくは5記載のベクターを用いて遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項7】 以下の段階を含む、分子変異型hPXRタンパク質またはその断片を生産する方法：

(a)請求項6記載の宿主細胞を培養する段階；および

(b)該タンパク質または断片を培養物から回収する段階。

【請求項8】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項4もしくは5のベクターを用いて細胞を遺伝子操作する段階を含む、分子変異型hPXR遺伝子を発現することが可能な細胞を生産する方法。

【請求項9】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドにコードされる、または請求項7記載の方法により得られる、または請求項8記載の方法により生産される細胞から得られる、hPXRタンパク質またはその断片。

【請求項10】 請求項9記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項11】 請求項1から3のいずれか一項において定義されるような、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含むエピトープを特異的に認識する、請求項10記載の抗体。

【請求項12】 請求項1から3のいずれか一項記載の少なくとも一つのポリヌクレオチドまたは、請求項4もしくは5記載のベクターを含むトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項13】 少なくとも1つのhPXR遺伝子の不活性化された野生型対立遺伝子をさらに含む、請求項12記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項14】 マウスまたはラットである、請求項12または13記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項15】 以下の段階を含む、hPXR遺伝子の分子変異またはその遺伝子産物の活性を調節できる、hPXR阻害剤を同定および獲得する方法：

(a) 請求項9記載のタンパク質、または請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む分子変異型hPXR遺伝子を発現する細胞を、薬剤の代謝に応答して検出可能なシグナルを提供できる構成成分の存在下において、CYP3A4またはCYP3A7を介した薬剤代謝を許容する条件下で、スクリーニングされる化合物と接触させる段階、および

(b) シグナルの存在または増加が推定上の阻害剤を示唆するような、シグナルの存在または不在、または薬剤代謝によって生じるシグナルの増加を検出する段階

。

【請求項16】 細胞が、請求項8記載の方法によって得られる、または請求項12から14のいずれか一項記載のトランスジェニック非ヒト動物に含まれる、請求項6記載の細胞である、請求項15記載の方法。

【請求項17】 以下の段階を含む、hPXR遺伝子の分子変異またはその遺伝子産物の活性を調節することが可能なhPXR阻害剤を同定および獲得する方法：

(a)hPXRタンパク質に結合し、該タンパク質と第一の分子との第一の複合体が形成されることが知られている第一の分子と、請求項9記載のタンパク質とを接触させる段階；

(b)該第一の複合体とスクリーニングされる化合物とを接触させる段階；および

(c)該化合物が、該第一の分子を該第一の複合体から置換するかどうかを測定する段階。

【請求項18】 測定段階が、タンパク質および化合物の第二の複合体の形成を測定する段階を含む、請求項17記載の方法。

【請求項19】 測定段階が、タンパク質に結合しない第一分子の量を測定する段階を含む、請求項17または18記載の方法。

【請求項20】 第一の分子がニフェジピン、リファンピシンまたはコルチコステロンである、請求項17から19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】 第一の分子が標識される、請求項17から20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】 以下の段階を含む、hPXR遺伝子の分子変異の存在に関連する障害、またはそのような障害への感受性を診断する方法：

(a)被験者からの試料における請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドの存在を決定する段階；および/または

(b)請求項9記載のタンパク質の存在を決定する段階。

【請求項23】 障害が癌である、請求項22記載の方法。

【請求項24】 PCR法、リガーゼ連鎖反応法、制限酵素切断法、直接配列決定法、核酸増幅技術、ハイブリダイゼーション技術または免疫学的検定法を含む、請求項22または23記載の方法。

【請求項25】 障害をなくすまたは軽減するため、被験者に薬物を投与する段階をさらに含む、請求項22から24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】 機能的および発現可能な野生型hPXR遺伝子を細胞に導入する段階をさらに含む、請求項22から25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】 請求項15から21のいずれか一項記載の方法における段階および以下の段階を含む薬学的組成物を生産する方法：

(c)段階(b)において同定および獲得される化合物を薬学的に許容される形態に合成および/または製剤化する段階。

【請求項28】 化合物が、治療的適用に適した形態であり、かつ請求項22もしくは23記載の方法において診断された被験者の障害を予防または改善する薬剤またはプロドラッグである、請求項27記載の方法。

【請求項29】 化合物薬剤またはプロドラッグが、請求項25において定義されるような薬物の誘導体である、請求項27または28記載の方法。

【請求項30】 請求項15から21のいずれか一項記載の方法により同定される、または得られる阻害剤。

【請求項31】 請求項9記載のタンパク質に特異的に結合する請求項30記載の阻害剤。

【請求項32】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドの検出のための、および/または個々のhPXR対立遺伝子の遺伝子型決定のための、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの使用。

【請求項33】 オリゴヌクレオチドが約15~50ヌクレオチド長であり、配列番号：1~165のいずれか一つのヌクレオチド配列、または相補的配列を含む、請求項32記載の使用。

【請求項34】 請求項33において定義されるようなオリゴヌクレオチドを含むプライマーまたはプローブ。

【請求項35】 請求項9記載のタンパク質、請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む分子変異型hPXR遺伝子の発現を検出するための、および/または請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含むhPXR対立遺伝子を識別するための、抗体の使用。

【請求項36】 請求項1から3のいずれか一項記載のポリヌクレオチド、請求項4もしくは5記載のベクター、請求項6記載の宿主細胞もしくは請求項8記載の方法により得られる宿主細胞、請求項9記載のタンパク質、請求項10もしくは11記載の抗体、請求項30記載の阻害剤、または請求項34記載のプライマーもしくはプローブを含む組成物。

【請求項37】 診断用組成物または薬学的組成物である、請求項36記載の

組成物。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/08827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12P19/34 C12N9/02 C07K16/18 C12N15/53 A61K38/17 A61P35/00 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOTZLAW H ET AL.,: "The human organ receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 5, August 1999 (1999-08), pages 2103-2107, XP000929536 the whole document	1-43
X	LEHMANN J M ET AL.,: "The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions." JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 102, 1 September 1998 (1998-09-01), page 1016-1023 XP000909297 cited in the application the whole document	1-3,12, 35-37
	--- -/-- ---	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
° Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>1 February 2001</b>		Date of mailing of the international search report <b>05.06.01</b>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Mateo Rosell, A.M.</b>

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/08827
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERTILSSON G. ET AL.,: "Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction" PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., vol. 95(21), 1998, page 12208-12213 XP002921167 cited in the application the whole document	1-3,12, 35-37
X	--- KIEWER S A ET AL: "AN ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR ACTIVATED BY PREGNANES DEFINES A NOVEL STEROID SIGNALING PATHWAY" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 92, 9 January 1998 (1998-01-09), pages 73-82, XP000918927 ISSN: 0092-8674 the whole document	1-3,12, 35-37
A	--- PASCUSI J-M ET AL.,: "Evidence for the presence of a functional Pregnane X Receptor response element in the CYP3A7 promoter gene." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 260, 5 July 1999 (1999-07-05), page 377-381 XP000907111 cited in the application the whole document	1-3,12, 20
A	--- ZHANG HE ET AL: "Rat pregnane X receptor: Molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 368, no. 1, 1 August 1999 (1999-08-01), pages 14-22, XP000933837 ISSN: 0003-9861 the whole document	1-3,12, 20
P,X	--- WO 99 48915 A (GLAXO GROUP LTD ;KIEWER STEVEN ANTHONY (US); WILLSON TIMOTHY MARK) 30 September 1999 (1999-09-30) the whole document	1-43
P,X	--- JONES STACEY A ET AL: "The pregnane X receptor: A promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution." MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 14, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 27-39, XP000933600 ISSN: 0888-8809 the whole document	1-43
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/08827

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 1 024 193 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD) 2 August 2000 (2000-08-02) the whole document -----	1-43

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/08827**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: **1, 33, 34, 37**  
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:  
**see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210**
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
**1-43 all partially**

**Remark on Protest**

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

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M20 (having a nucleotide substitution at position -201), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

2. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M1 (having a nucleotide substitution at position -131), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

3. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M21 (having a nucleotide substitution at position -57), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

4. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M6 (having a nucleotide substitution at position -42), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

5. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M5 (having a nucleotide substitution at position 52), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

6. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M7 (having a nucleotide substitution at position 79), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

7. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M4 (having a nucleotide substitution at position 106), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

8. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M8 (having a nucleotide substitution at position 225), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

9. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M23 (having a nucleotide substitution at position 315), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

10. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M10 (having a nucleotide substitution at position 418), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 11. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M11 (having a nucleotide substitution at position 488), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 12. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M12 (having a nucleotide substitution at position 492), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 13. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M13 (having a nucleotide substitution at position 543), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 14. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M14 (having a nucleotide substitution at position 696), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 15. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M24 (having a nucleotide substitution at position 834), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 16. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M25 (having a nucleotide substitution at position 984), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 17. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M27 (having a nucleotide substitution at position 1108), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 18. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M19 (having a nucleotide substitution at position 1308), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

## 19. Claims: 1-43 all partially

A molecular variant of the hPXR, the so-called M28 (having a nucleotide substitution at position 1320), its corresponding nucleotide and protein sequences; vectors; host cells; antibodies; transgenic non-human animals; pharmaceutical compositions; probes or oligonucleotides thereof as well as methods of diagnostic or identification of inhibitors capable of modulating the activity of a molecular variant of hPXR.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 1,33,34,37

Present claims 1 and 37 relate to an extremely large number of polynucleotide sequence of which only a small fraction could be unambiguously allocated to the hPXR variants. In fact, a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those sequences successfully allocated with the help of tables 1,3 and 4.

Claims 33 and 34 refer to an inhibitor identified or obtainable by screening compounds which in contact with an hPXR variant would be capable of providing a detectable signal in response to drug metabolization. No such compounds are defined in the application. In consequence the scope of said claim is ambiguous and vague, and its subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 83 and 84 EPC). Therefore, no search can be carried out for such speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the result to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/08827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9948915 A	30-09-1999	AU 3211699 A EP 1066320 A	18-10-1999 10-01-2001
EP 1024193 A	02-08-2000	AU 8356498 A WO 9905292 A JP 11127871 A	16-02-1999 04-02-1999 18-05-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	38/00	A 6 1 K	N 4 C 0 8 4
	39/395		4 C 0 8 5
	45/00		4 C 0 8 6
	48/00	A 6 1 P	4 C 0 8 7
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K	4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/705		
	16/28	C 1 2 N	
C 1 2 N	1/15		
	1/19		
	1/21	C 1 2 P	C
	5/10	C 1 2 Q	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	Z
C 1 2 Q	1/68		Z
G 0 1 N	33/15		M
	33/50		
	33/53	C 1 2 N	Z N A A
	33/566		A
		A 6 1 K	

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA11 BB50 DA12  
DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 AA12 BA63 CA05  
CA06 CA09 DA02 DA11 DA12  
EA04 GA11 HA12 HA15 HA17  
4B063 QA17 QA19 QA20 QQ08 QQ43  
QR08 QR32 QR42 QR56 QS25  
QS34 QX02  
4B064 AG20 BA14 CA02 CA05 CA06  
CA10 CA19 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X  
AA93Y AB01 BA02 CA24  
CA44 CA46  
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01  
BA44 CA53 CA59 CA62 NA14  
ZB212 ZB262  
4C085 AA13 AA14 BB11 BB41 CC32  
EE01  
4C086 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04  
NA14 ZB21 ZB26  
4C087 AA02 BC83 NA14 ZB21 ZB26  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
CA40 CA42 DA50 DA75 EA28  
EA51 FA72 FA74 HA05

专利名称(译)	人hPXP基因的多态性及其在诊断和治疗应用中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003509064A</a>	公开(公告)日	2003-03-11
申请号	JP2001523797	申请日	2000-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	外延道洛生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	埃皮达鲁斯生物科技股份有限公司		
[标]发明人	ウォナウスキレシエク ハスタートエリザベス		
发明人	ウォナウスキ レシエク ハスタート エリザベス		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/56 A61K35/76 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/40 C12N1/15 C12N1 /19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/02 C12N15/09 C12N15/53 C12P19/34 C12P21/02 C12Q1/68 C12Q1 /6883 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K14/70567 A01K2217/05 C12N9/0077 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
FI分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/56 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48 /00 A61P35/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA63 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024 /HA12 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064 /AG20 4B064/BA14 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084 /AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/CC32 4C085 /EE01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/NA14 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA42 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/HA05		
优先权	1999118120 1999-09-10 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

描述了用于诊断和治疗表型光谱的通用工具和方法，以及与hPXR基因的各种形式的遗传异常表达和/或功能相关的重叠临床特征。特别地，提供了与例如药物的新陈代谢和/或敏感性不足相关的分子变体hPXR基因的多核苷酸，以及包含此类多核苷酸的载体。进一步描述了含有此类多核苷酸或载体的宿主细胞，及其在制备突变型hPXR蛋白中的用途。另外，提供了包含突变型hPXR蛋白的转基因非人类动物个体，以及特异性识别此类蛋白的抗体，以及上述的多核苷酸或载体。还描述了鉴定和获得用于治疗与hPXR基因多功能相关的疾病的抑制剂，以及诊断此类疾病的状态的方法。提供了包含上述多核苷酸，载体，蛋白质，抗体和根据上述方法的抑制剂的药物和诊断组合物。该组合物对于使用作为hPXR基因产物的底物，抑制剂或调节剂的药物来诊断和治疗各种疾病特别有用。

名称	位置	配列 (5' - 3')
hPXR1F	エキソン 4	TCATGTCCGACGAGGCCG
hPXR4F	エキソン 5/6	CCCACATGGCTGACATGT
hPXR5F	エキソン 7	CCCATCGAGGACCAGATC
hPXR6R	エキソン 7	GTCTTCCAAGCAGTAGGA
hPXR7R	エキソン 8	CAGCATGGGCTCCAGTAG
hPXR10R	エキソン 9a	CCTGTGATGCCGAACAAC
hPXR11F	エキソン 9	CATTGAATGCAATCGGCC
hPXR12R	エキソン 9a	GCTCTTGGCAGTGTCCAT
hPXR15F	エキソン 2	GGAAAGCCCAGTGTCAAC
hPXR16F	エキソン 3	CCATGAAACGCAACGCC
hPXR18R	エキソン 2	CCTTGCATCCTTCACATG
hPXR19R	エキソン 3	CATGCCGCTCTCCAGGCA
hPXR20R	エキソン 4	CGGCCTCGTCGGACATGA
hPXR21R	エキソン 5/6	ACATGTCAGCCATGTGGG
hPXR47F	エキソン 1b	CAAGCCAAGTGTTACAGTG
hPXR48R	エキソン 1b	CACTGTGAACACTTGGCTTG
hPXR52F	エキソン 1a	CAAGGACAGCAGCATGACAGTCAC
hPXR54R	エキソン 1a	AGCCAACCTCAGCCGCAGC