

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502345

(P2005-502345A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	4 B O 2 4
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 37/00	GO 1 N 33/53	M
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 109 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-525293 (P2003-525293)	(71) 出願人	502083912
(86) (22) 出願日	平成14年9月2日 (2002.9.2)		デコード ジェネティクス イーエッチエフ.
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月3日 (2004.3.3)		アイスランド国 レイキャビク 101
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/003613		スツルルゴーツ 8
(87) 国際公開番号	W02003/021261	(74) 代理人	100095832
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)		弁理士 細田 芳徳
(31) 優先権主張番号	09/947, 991	(72) 発明者	ハコナーソン, ハコン
(32) 優先日	平成13年9月6日 (2001.9.6)		アイスランド国 レイキャビク アイエス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		-109 グルジョタセル 3
		Fターム(参考)	2G045 AA40 BB20 CA12 CB01 DA12
			DA13 DA14 DA36 DA37 FB02
			FB03
			4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA12
			HA08 HA12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患を罹患した患者の薬物感受性を予測する方法

(57) 【要約】

患者から細胞のサンプルを得ること；特異的なサイトカインおよび/またはメディエータでの細胞のインビトロ調節の非存在下および存在下におけるサンプル遺伝子発現プロファイルを得ること；およびサンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較することを含む、ヒト患者において炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測するための方法が開示され、ここでサンプル発現プロファイルと参照プロファイルとの間の類似性が患者における炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 患者から細胞のサンプルを入手すること；
 b) 特異的なモジュレーターでの該細胞のインピトロ調節の非存在下および存在下でサンプルから遺伝子発現プロファイルを得ること；および
 c) サンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較すること

、
 を含み、サンプル発現プロファイルと参照発現プロファイルとの間の類似性が患者の免疫性疾患を処置するための薬物の効力を予測する、ヒト患者において炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測する方法。

10

【請求項 2】

発現プロファイルが、表 1、2A、2B、4A、4Bおよび5A～5Eに挙げられる 1 つ以上の遺伝子に対する発現値を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

発現プロファイルが、表 1、2Aおよび2Bに挙げられる 1 つ以上の遺伝子に対する発現値を含む請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

発現プロファイルが、表 4Aおよび4Bに挙げられる 1 つ以上の遺伝子に対する発現値を含む請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

発現プロファイルが表 5A～5Eに挙げられる 1 つ以上の遺伝子に対する発現値を含む請求項 2 記載の方法。

20

【請求項 6】

サンプルの遺伝子発現プロファイルを得る前に炎症性疾患を処置するための薬物にサンプルを曝すことをさらに含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

炎症性疾患が、喘息、アトピー、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、乾癬、炎症性腸疾患および敗血症からなる群より選ばれるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

アトピーが、鼻炎、結膜炎、皮膚炎および湿疹からなる群より選ばれるアトピー性炎症性疾患である請求項 7 記載の方法。

30

【請求項 9】

薬物が、喘息のための副腎皮質ステロイド、2-アゴニストおよびロイコトリエンアンタゴニスト薬物からなる群より選ばれる薬物のクラスから選ばれるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

薬物が、炎症性疾患状態に対する症状軽減剤および抗炎症性薬物からなる群より選ばれるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

細胞のサンプルが末梢血単核細胞または好中球に由来するものである請求項 1 記載の方法

40

【請求項 12】

サンプルが、滑膜または気道平滑筋からのバイオプシーにより得られる請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

サンプルの遺伝子発現プロファイルが、マイクロアレイに含まれるオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションアッセイを用いて得られる請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

有益な遺伝子に対応するポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なハイブリダイゼーションプローブおよびハイブリダイゼーションを検出するための試薬を含む、

50

請求項 1 3 記載の方法によりヒト患者の炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測する方法。

【請求項 1 5】

サンプルの遺伝子発現プロファイルが、有益な遺伝子のタンパク質産物を検出することにより得られる請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

有益な遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合可能な抗体および抗体結合を検出するための試薬を含む、請求項 1 5 記載の方法によりヒト患者の炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測する方法。

【請求項 1 7】

参照発現プロファイルが喘息を有さない患者に由来する細胞のものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 8】

参照発現プロファイルが炎症性疾患を有さない患者に由来する細胞のものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 9】

細胞が、発現プロファイルが得られる前に薬物候補で処理される請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

- a) 患者から細胞のサンプルを得ること；
- b) 特異的なメディエータでの細胞のインビトロ活性化の非存在下および存在下でサンプルから遺伝子発現プロファイルを得ること；および
- c) サンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較すること

、
を含み、サンプルと参照プロファイルとの間の発現プロファイルにおける類似性がサンプルが得られた患者における糖コルチコイド感受性を示す、喘息患者において糖コルチコイド感受性をスクリーニングする方法。

【請求項 2 1】

- a) 患者から細胞のサンプルを得ること；
- b) 特異的なメディエータでの細胞のインビトロ調節の非存在下および存在下でサンプルに由来する遺伝子発現プロファイルを得ること；および
- c) サンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較すること

、
を含み、サンプルと参照プロファイルとの間の発現プロファイルにおける類似性がロイコトリエンアンタゴニストのヒト喘息患者における効力を予測する、ロイコトリエンアンタゴニストのヒト喘息患者における効力を予測する方法。

【請求項 2 2】

表 1、2A、2B、4A、4Bおよび5A～5Eに記載される 1 つ以上の遺伝子からの遺伝子産物の発現レベルを含む発現プロファイル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、2001年9月6日に提出された米国出願第09/947,991号の一部継続出願である。上記出願の全ての開示が参考として本明細書中に援用される。

【0002】

発明の背景

薬理遺伝学の分野は、遺伝的変異により引き起こされる投薬の効果における差異を測定する。かかる差異は、薬物の治療効果または有害事象における差異により明らかになる。ほとんどの薬物について、非応答者から薬物応答性患者を潜在的に特徴づける遺伝的変異は不明なままである。

【0003】

10

20

30

40

50

発明の要旨

本発明は、喘息および関連する炎症状態の処置に対する患者の応答性を測定する方法に関する。

【0004】

ある態様では、本発明は、患者から細胞のサンプルを得る工程；特異的なメディエータでの細胞のインビトロ調節の非存在下および存在下でのサンプルの遺伝子発現プロファイルを得る工程；およびサンプル発現プロファイルと参照発現プロファイルとの間の類似性が患者における炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測するように、サンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較する工程を含む、ヒト患者における炎症性疾患の処置のための薬物の効力を予測する方法に関する。参照遺伝子発現プロファイルは、表1、2A、2B、4A、4Bおよび5A~5Eに列挙される1つ以上の有益な遺伝子(informative gene)の発現レベルを含みうる。サンプル発現プロファイルと参照発現プロファイルとの間の類似性は、患者における炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測する。特定の態様では、サンプルは、サンプルの遺伝子発現プロファイルを得る前に炎症性疾患を処置するために薬物に曝される。特定の態様では、サンプルは、サンプルの遺伝子発現プロファイルを得る前に炎症性疾患を処置するために薬物に曝される。炎症性疾患は、喘息、アトピー、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、乾癬、炎症性腸疾患(IBD)および敗血症でありうる。アトピー性炎症性疾患は、鼻炎、結膜炎、皮膚炎および湿疹でありうる。薬物は、喘息については、副腎皮質ステロイド、2-アゴニストおよびロイコトリエンアンタゴニストでありうる。さらに、炎症性疾患について、薬物は、炎症性疾患状態のための症状軽減剤または抗炎症性薬物でありうる。ある態様では、細胞のサンプルは、末梢血単核細胞または好中球に由来しうる。特定の態様では、サンプルの遺伝子発現プロファイルは、例えば、マイクロアレイに含まれるオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションアッセイを用いて得られ得る。別の態様では、サンプルの発現プロファイルは、有益な遺伝子のタンパク質産物を検出することにより得られ得る。タンパク質産物の検出は、例えば、上記有益な遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合しうる抗体の使用を含みうる。参照発現プロファイルは、例えば、健康な非アトピー性、非喘息性個体に由来する細胞のものでありうる。別の態様では、参照発現プロファイルは、炎症性疾患を有さない患者に由来する細胞のものでありうる。ある態様では、細胞は、発現プロファイルが得られる前に薬物候補で処理される。

10

20

30

【0005】

さらに別の態様では、本発明は、喘息性患者における糖コルチコイド感受性に関するスクリーニング方法に関し、患者から細胞のサンプルを得る工程；特異的サイトカイン(メディエータ)での細胞のインビトロ活性化の非存在下および存在下でサンプルから遺伝子発現プロファイルを得る工程；およびサンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較する工程を含み、ここで、サンプルと参照プロファイルとの間の発現プロファイルにおける類似性は、サンプルが得られた患者において糖コルチコイド感受性を示す。

【0006】

さらに別の態様では、本発明は、ロイコトリエンアンタゴニストのヒト喘息患者における効力を予測する方法に関し、患者から細胞のサンプルを得る工程；特異的メディエータでの細胞のインビトロ調節の非存在下および存在下でサンプルから遺伝子発現プロファイルを得る工程；およびサンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較する工程を含み、ここで、サンプルと参照プロファイルとの間の発現プロファイルにおける類似性はロイコトリエンアンタゴニストのヒト喘息患者における効力を予測する。

40

【0007】

別の態様では、本発明は、表1、2A、2B、4A、4Bおよび5A~5Eに記載される1つ以上の遺伝子から遺伝子産物の発現レベルを含む発現プロファイルに関する。

【0008】

50

別の態様では、本発明は、モンテルカスト (a.k.a., SINGULAIRTM; Merck, Whitehouse Station, NJ)、ザフィルルカスト (a.k.a., ACCOLATETM, AstraZeneca, Wilmington, DE)、およびジレウトン (a.k.a., ZYFLOTM; Abbott Laboratories, Chicago, IL) を含むロイコトリエンアンタゴニストのヒト喘息患者における効率を予測する方法に関し、患者から細胞のサンプルを得る工程；特異的なメディエータでの細胞のインビトロ調節の非存在下および存在下でサンプルから遺伝子発現プロファイルを得る工程；およびサンプルの遺伝子発現プロファイルと参照遺伝子発現プロファイルとを比較する工程を含み、ここで、サンプルと参照プロファイルとの間の発現プロファイルにおける類似性は、ロイコトリエンアンタゴニストのヒト喘息患者における効力を予測する。

【0009】

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載される方法に従ってヒト患者における炎症性疾患の処置のための薬物の効力を予測するためのキットに関し、予め決定された有益な遺伝子に対応するポリヌクレオチドにハイブリダイズしうるハイブリダイゼーションプローブおよびハイブリダイゼーションを検出するための試薬を含有する。別の態様では、本発明は、本明細書中に記載される方法に従ってヒト患者における炎症性疾患を処置するための薬物の効力を予測するためのキットに関し、予め選択された有益な遺伝子のタンパク質産物に特異的に結合しうる抗体および抗体結合を検出するための試薬を含有する。

【0010】

特許または出願ファイルは、少なくとも1つのカラーの図面を含む。カラー図面を有する本特許または特許出願の公報のコピーは、請求および必要な料金の支払いにより特許庁により提供される。

【0011】

本発明の前述および他の目的、特徴および利点は、付随する図面に示されるように、以下の本発明の好ましい態様のより詳細な記載から明らかである。

【0012】

発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様の記載が続く。

【0013】

本発明は、喘息患者における薬物処置の効力を予測する方法および炎症性疾患の処置において有用な薬物候補のスクリーニング方法に関する。喘息を処置するための現在の方法は、副腎皮質ステロイド、2-アゴニストまたはロイコトリエンアンタゴニストの使用を含む。喘息は数年間これらの方法により処置され、喘息患者の有意な画分は処置に対して耐性である。喘息の処置方法に関連する危険性があるので、処置にตอบสนองする患者の同定は重要である。本明細書中に記載される方法は、非応答患者と比べて応答患者において差次的に発現される遺伝子を同定するために使用され、それにより、処置にตอบสนองする患者の好都合な決定が可能になる。患者サンプルから得られる培養細胞において活性化する方法、および上記培養細胞を薬物スクリーニングおよび発現プロファイルの入手に利用する方法が本明細書中に記載される。

【0014】

喘息、または可逆性閉塞性気道疾患 (ROAD) は、肺の気道が狭くなるか、または完全に遮断される状態であり、正常な呼吸が妨害され、より重篤な健康問題に至る可能性がある。正常な気道は、アレルゲンまたは刺激物にตอบสนองして狭窄する可能性を有するが、喘息の気道は、過敏または過反応性である。刺激にตอบสนองして、気道は、以下：気道の周囲の筋肉の収縮；気道の炎症および膨潤；または気道をふさぐ粘液産生の増大のいずれか1つによりふさがれる。気道が一旦ふさがれると、そこに空気を無理矢理通そうとする試みがより多くなされ、その結果、呼吸が困難になる。ふさがれた気道から吐き出すことが困難であるので、過剰な古い空気が各々の呼吸後に肺に残る。この古い空気の蓄積は、各々の新たな呼吸で得られ得る新鮮な空気の量を減らし、全身に利用可能な酸素が減るだけでなく、肺内の高濃度の二酸化炭素が血流を酸性にする。喘息が未処置のままである場合、血液中のこの酸性度は、毒性レベルに上昇しうる。

10

20

30

40

50

【0015】

喘息は、呼吸における困難さを引き起こし、より重篤な問題に至り得、喘息に関連する肺閉塞は、自発的または投薬により可逆的である。喘息患者は、炎症および喘息症状を減らすために副腎皮質ステロイド、気管支拡張剤およびロイコトリエンアンタゴニスト等の抗炎症性薬剤を服用ししうる。

【0016】

副腎皮質ステロイドは、「ステロイド」とも呼ばれる。このタイプの薬剤は、能力を増大させるためにいくらかの運動選手により誤用されるアナボリックステロイドとは関係がない。むしろ、副腎皮質ステロイドは、1948年以来、喘息およびアレルギーのための処置として使用されている。それらは、気道炎症および気管支の膨潤を減少させる；気管支の管壁細胞による粘液産生を減少させる；気道における過剰反応（過敏症）の連鎖を減少させる；他の薬物への気道平滑筋の応答を補助する。副腎皮質ステロイドは、吸入器の使用による、局所、経口、または注射による等の種々の経路で投与されうる。局所調製物（または皮膚または気管支の管壁等の特定の表面領域への）は、クリームまたはスプレー（吸入器）として適用されうる。副腎皮質ステロイド吸入器は、日周で中程度または重篤な喘息症状を有する患者に勧められる。経口用副腎皮質ステロイドおよび注射用副腎皮質ステロイドは、一般に重篤な喘息症状を有する患者にのみ処方される。

10

【0017】

副腎皮質ステロイドの使用は、数年間で一般的になっているが、それらは常に効果的であるわけではなく、重大な副作用が起こる。いくらかの人々は、副腎皮質ステロイド吸入器の使用から嘔声および驚口瘡（口および喉の真菌感染）の小さな副作用を経験する。また、吸入用副腎皮質ステロイドの長期間の使用は、子供の成長速度の減少に関係づけられている。経口用副腎皮質ステロイドは、吸入用副腎皮質ステロイドよりも大きな副作用を有しうる。経口用副腎皮質ステロイドは、他の処置が正常な肺機能の回復に失敗し、非管理の喘息の危険性がステロイドの副作用よりも大きい場合にのみ長期間処方されている。例えば、プレドニゾン、最も一般的に処方される副腎皮質ステロイドの1つは、体重増加、食欲増加、月経不順および痙攣、胸やけ、および消化不良の副作用の可能性を導きうる。いくらかの患者は、コルチゾンタブレットの用量が減少した場合に活動力の減少、食欲減少、重篤な筋肉痛または関節痛を経験する。長期間の経口副腎皮質ステロイドの使用は、潰瘍、体重増加、白内障、脆い骨および皮膚、高血圧、血糖値の上昇、容易な挫傷および子供の成長の減少等の副作用を引き起こしうる。かかる副作用は、喘息患者における副腎皮質ステロイド治療の効力を正確に評価する必要を指摘する。

20

30

【0018】

気管支拡張剤（「2-アゴニスト」とも呼ばれる）は、喘息症状を直ちに軽減するための短期間の「救助」薬剤としてしばしば使用される非ステロイド性抗炎症薬剤である。気管支拡張剤としては、アルブテロール、ビトルテロール、プルブテロールおよびテルブタリンが挙げられる。さらに、サルメテロールは、喘息を管理するために抗炎症剤とともに長期間基礎での使用が意図される長期間作用する2-アゴニストである。サルメテロールを使用する患者は、気分が良くても症状を予防するために日周基礎で薬剤を服用すべきである。散発的に効果的ではあるが、気管支拡張剤は重篤な喘息の症例では典型的には有用ではない。

40

【0019】

気道炎症の原因に関連する細胞の多くは、「ロイコトリエン」と呼ばれる体内のシグナル伝達分子を産生することが知られている。ロイコトリエンは、気道平滑筋の収縮を担い、肺の血管から液体の漏出を増大させ、さらに気道に他の炎症細胞を攻撃させることにより炎症を促進させる。経口用抗ロイコトリエン薬剤は、アレルギー疾患を代表する炎症応答と戦闘するように導入されている。これらの薬物は、慢性喘息の処置に使用される。最近のデータは、処方される抗ロイコトリエン薬剤が喘息を有する多くの患者にとって有益でありうるが、有意な数の患者が抗ロイコトリエン薬物に応答しないことを示している。

【0020】

50

本発明は、喘息等の炎症性状態を処置するために使用される薬物の処置結果を決定する方法に関する。この方法は、患者から得られたサンプル中において差次的に発現される遺伝子の同定により、研究下での薬物の臨床応答性に関連する。本明細書中で「有益な遺伝子」と呼ばれる特定の遺伝子は、疾患状態（例えば、喘息）を模倣するように誘導された細胞、または喘息または他の炎症性疾患を有すると診断された患者由来の組織サンプルにおいて同定される。有益な遺伝子は、例えば、誘導された遺伝子発現に対する非誘導細胞との比を決定し、不定の薬物感受性を有する患者間で結果を比較することにより同定される。あるいは、有益な遺伝子は、疾患における遺伝子発現対正常組織サンプルの比に基づいて同定され得、または薬物応答性を同定するために使用される有益な遺伝子の場合には、有益な遺伝子は、薬物に曝された細胞対薬剤に曝されていない細胞における遺伝子発現の比により同定され、認定される被験体において、薬物に対して応答する者対薬物に反応しない者として同定される。1.0の比は、上記遺伝子が両方のサンプルにおいて同じレベルで発現されることを示す。1より大きい比は、正常細胞または非誘導細胞を越える発現の増大を示し、一方、1より小さい比は、正常または非誘導細胞と比べて発現の減少を示す。

10

20

30

40

50

【0021】

サブセットまたは全ての有益な遺伝子は、応答患者対非応答患者に関する「発現プロファイル」を作成するために遺伝子発現についてアッセイされる。本明細書中で使用される「発現プロファイル」は、1つ以上の時間点の細胞の所定のサンプルにおける1つ以上の有益な遺伝子の、遺伝子発現のレベルまたは量をいう。「参照」発現プロファイルは、発現プロファイルが特定の条件の特徴を示すように特定の条件下で有益な遺伝子の特定のセットのプロファイルである。例えば、表1、2A、2B、4A、4Bおよび5A~5Eに示される有益な遺伝子の発現を定量的に記載する参照発現プロファイルは、薬物処置応答性に関する参照発現プロファイルとして使用される。ある態様では、発現プロファイルは、差次的発現を示す50個の有益な遺伝子からなり、高い正確性をもって薬物に対する応答性を予測するのに十分な能力を提供する。他の態様は、例えば、約5個の有益な遺伝子、約25個の有益な遺伝子、約100個の有益な遺伝子、または約5~約400個の有益な遺伝子の範囲のいずれかの数の遺伝子を含む発現プロファイルを含みうる。発現プロファイルにおいて使用される有益な遺伝子は、正常細胞よりも増大した発現または正常細胞に対して減少した発現を示す遺伝子でありうる。発現プロファイルを作成するために使用される有益な遺伝子の特定のセットは、例えば、最も大きな程度の差次的発現を示す遺伝子でありうるか、またはそれらは、ある程度の差次的発現を示す遺伝子のいずれかのセットであり得、薬物に対する応答性を正確に予測するのに十分な能力を提供する。選択される遺伝子は、正常細胞と比べて疾患、薬物応答性、または薬物感受性である細胞において差次的に発現されることが決定され、薬物に対する応答を予測する能力を付与するものである。患者由来の組織サンプルとこれらの参照発現プロファイルとを比較することにより、特定の疾患に対する患者の感受性、薬物-応答性、または薬物耐性が決定される。

【0022】

発現プロファイルの作成は、有益な遺伝子からの発現を定量する方法およびスクリーニング対象の有益な遺伝子の決定の両方を必要とする。本発明は、細胞における遺伝子産物の発現レベルに影響する個体における特異的な変化のスクリーニングを記載する。本明細書中で使用される「遺伝子産物」は、特定の遺伝子座位に由来する転写または翻訳産物である。「遺伝子座位」は、コード配列および調節、隣接およびイントロン配列を含む。発現プロファイルは、細胞に存在する有益な遺伝子から生じる遺伝子産物のレベルの記述である。細胞のサンプルに由来するいくつかの遺伝子産物の発現レベルを迅速に決定する方法が当業者に現在利用可能である。例えば、数千の遺伝子のmRNA産物に相補的な短いオリゴヌクレオチドが、固相に化学的付着され（例えば、「遺伝子チップ」）、「マイクロアレイ」が作製される。遺伝子チップの具体例としては、Hu95GeneFL(Affymetrix, Santa Clara, CA)および6800ヒトDNA遺伝子チップ(Affymetrix, Santa Clara, CA)が挙げられる。かかるマイクロアレイは、マイクロアレイ(Affymetrix, Santa Clara, CA)にハイブ

リダイズしうる mRNA 分子の相対量を決定するために使用されうる。このハイブリダイゼーションアッセイは、細胞サンプルにおける遺伝子発現の迅速な決定を可能にする。あるいは、タンパク質遺伝子発現産物を検出するための種々のイムノアッセイの方法が当業者に知られている。かかる方法は、例えば、特定の有益な遺伝子の遺伝子産物に特異的な抱合型抗体によるものでありうる。

【0023】

有益な遺伝子は、例えば、データベーススクリーニングにより特定の特徴、例えば、糖コルチコイド感受性 (GC-S) または糖コルチコイド耐性 (GC-R) を有すると同定された個体から得られたサンプル中で同定されうる。さらに、培養細胞において同定された有益な遺伝子は、特定の薬物処置に対して応答性であるかまたは非応答性である既知の喘息患者のサンプルから発現プロファイルを得ることにより確認されうる。患者からサンプルを得ることおよびサンプルが得られた個体の家系および病歴について特定のデータベースを検索することの組み合わせの例は、本明細書中ではアイスランドの遺伝的に単離された集団について記載される。

10

【0024】

アイスランドの集団は、特定の障害に関連する遺伝子エレメントを同定するための独自の機会を提供する。独自の機会は、少なくとも3つの状態：1) アイスランドの集団は遺伝的に単離されている；2) 詳細な家系の記録が入手可能である；および3) 詳細な医療記録が1915年の日付まで遡って保存されているために利用可能である。応答対非応答性患者における差次的に発現された遺伝子の同定は、患者の過去の家系および個体に由来するサンプルから得られたデータに加えて近親者の医療記録の調査後に起こる。

20

【0025】

家系および医療記録の調査は、特定の特徴を示す家族歴を有する現代の個体を同定する。例えば、個体は、喘息であり、特定の喘息薬物処置に対して応答することが見出され得、家系のデータベースの調査は、本当に個体の近親者が、集団の残りよりも平均して、同じ特徴を示すことが確認されうる。従って、問題の個体が同様に応答性および非応答性患者を同定するために使用されうる遺伝的決定因子を有するようであるという不確かな結論が引き出されうる。この個体から得られたサンプルは、他のかかる個体から得られたサンプルと合わせて、続いて参照発現プロファイルを作成するために使用される有益な遺伝子を同定するために上記方法のいずれかにより遺伝子型が決定される。

30

【0026】

有益な遺伝子はまた、患者サンプルに由来する細胞においてエキソピボで同定されうる。例えば、組織サンプルは患者から得られ得、このサンプルに由来する細胞はインビトロで培養されうる。細胞は、サイトカイン、例えば、腫瘍壊死因子 (本明細書中以降、「TNF」) およびインターロイキン 1- (本明細書中以降、「IL-1」)、または他のメディエータ、例えば、ロイコトリエンレセプターアゴニスト、例えば、LTD₄等の存在下または非存在下で培養されうる。本明細書中で使用される「メディエータ」は、特定の事象の分子シグナルをいう。サイトカインは、その細胞自身の機能 (自己分泌効果) または隣接細胞の機能 (パラ分泌効果) を変化させる目的で細胞により分泌される低分子量の薬理的に活性なタンパク質であるメディエータのクラスの例である。ある場合には、サイトカインは循環に入り、全身的に1つ以上の効果を有する。有益な遺伝子の発現プロファイルは、サイトカインまたは他のメディエータの存在および/または非存在下でのサンプル由来細胞から得られ得、そのプロファイルは、薬物処置に対する感受性または耐性を決定するための参照発現プロファイルと比較されうる。さらに、発現プロファイルを得る前に、細胞は薬物自身の存在下または非存在下で培養されうる。

40

【0027】

有益な遺伝子が一旦同定されると、有益な遺伝子の多型バリエーションが決定され、多型バリエーションがサンプル中に存在する (例えば、ハイブリダイゼーションアッセイまたは特定の多型バリエーションの遺伝子産物に特異的な抗体を用いるイムノ検出アッセイにより) ことに基づいて患者サンプルにおける障害を検出する方法に使用されうる。

50

【0028】

あるいは、上記のアプローチは、培養細胞中で同定される有益な遺伝子の有用性を確認するために使用されうる。一旦同定されると、有益な遺伝子は、より遺伝的に多様な集団におけるその予測される能力に関して確認され得、アイスランドなどの遺伝的に単離された集団に加えて、集団におけるこれらの有益な遺伝子の予測能力の有用性が確実になる。

【0029】

アイスランドの集団の「遺伝的単離」は、個体間の低い程度の対立遺伝子変化を意味する。この環境は、集団における差異をスクリーニングすることにおいてバックグラウンドを減少させる。「遺伝的に多様な」集団において、同じ特徴に寄与しうる多くの差異が個体間に現れる。例えば、喘息薬物処置に反応する個体の調査は、非反応性抗体に関して有限ではあるが数多くの遺伝的差異を生じうる。しかし、遺伝的に多様な集団において、これらの遺伝的差異の大多数は、集団の多様性のために検出された「アーチファクト」またはバックグラウンド「ノイズシグナル」である。遺伝的に単離された集団については、より少ない差異が2つのグループ間で見出されることが予測され得、発見される差異が問題の特徴（この場合、喘息薬物処置に対する反応性）に直接関係するようである高い可能性を提供する。一旦、遺伝的に単離された環境において決定されると、有益な遺伝子の有用性および有益な遺伝子に基づく発現プロファイルは、遺伝的に多様な集団におけるより一般的な使用のために確認されうる。

【0030】

TNF およびIL-1 のレベルの上昇は、喘息および他の炎症性疾患（アトピー（例えば、鼻炎、結膜炎、皮膚炎、湿疹）、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、乾癬、IBDおよび敗血症を含むがこれらに限定されない）の特徴であるので、これらのサイトカインの細胞レベルの上昇を示す細胞は、関連する炎症性疾患に対する薬物効力を決定するために使用されうる。本明細書中で使用される「効力」は、効果的でない（非反応）から完全に効果的であるまでの有効性の範囲、および2つの極端間の程度を記述する。本発明は、一部では、喘息または関連する炎症性状態を有する患者から単離された活性化された末梢血単核（PBM）細胞または好中球の遺伝子発現プロファイルと活性化された対照（非喘息）PBM細胞または好中球の遺伝子発現プロファイルとを比較することに関する。本明細書中で使用される「活性化」は、サイトカインまたは喘息もしくは関連する炎症性疾患疾患の他のメディエータで細胞を処理することをいう。かかる活性化は、TNF およびIL-1 等のサイトカインの上昇したレベルにより達成されうる。患者サンプルに由来する活性化された細胞は、薬物候補をスクリーニングするため、ならびに喘息および他の炎症性疾患を診断するのに有用なサンプルおよび参照発現プロファイルを提供するために使用されうる。

【0031】

TNF およびIL-1 の細胞レベルは、当該分野で公知の種々の方法により増大されうる。例えば、PBM細胞、好中球、滑膜細胞または気道平滑筋（ASM）細胞等の培養中で増殖した哺乳動物細胞は、これらのサイトカインが細胞に取り込まれるように単離され、精製されたTNF およびIL-1 に曝されうる（典型的には、培養物中5 ng/mLの濃度のTNF および1 ng/mLの濃度のIL-1 の約4時間の曝露は、培養細胞において喘息誘発（pro-asthma）様症状を生じる）。培養物中で増殖した細胞のサイトカインの発現のための他の方法（例えば、発現ベクターにクローン化された遺伝子のトランスフェクション）は、当該分野で公知である。

【0032】

本明細書中に記載される細胞において誘導される炎症誘発様症状により模倣されるように、TNF関連症状または疾患としては、炎症性疾患または障害、感染、神経変性疾患、悪性症状、悪液質症候群および所定の型の肝炎が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

炎症性疾患または障害としては、限定されないが、慢性関節リウマチ（RA）、若年性慢性関節炎（JCA）、乾癬、対宿主性移植片病（GVHD）、強皮症、糖尿病、アレルギー等の急性および慢性免疫性および自己免疫性症状；限定されないが、腎移植、心臓移植、骨髄移

10

20

30

40

50

植、肝移植、膵臓移植、小腸移植、肺移植および皮膚移植等の同種間移植に関連する喘息、急性または慢性免疫疾患；限定されないが、サルコイドーシス、慢性炎症性腸疾患、潰瘍性結腸炎、およびクローン症状または病等の慢性炎症性症状；限定されないが、汎発性血管内凝固、アテローム動脈硬化症、川崎病および限定されないが、結節性多発性動脈炎、ヴェーゲナー肉芽腫、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、巨細胞性動脈炎および腎臓の顕微的脈管炎等の脈管炎症候群等の脈管炎症性症状；慢性活性肝炎；シェーグレン病；乾癬性関節炎；腸疾患に基づく関節炎；反応性関節炎および炎症性腸疾患に関連する関節炎；およびブドウ膜炎が挙げられるがこれらに限定されない。

【0034】

感染としては、敗血症症候群、悪液質（例えば、TNF 媒介性影響）、循環虚脱ならびに急性および慢性細菌感染、急性および慢性寄生生物性および/または感染性疾患、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）等の細菌、ウイルスまたは真菌に由来するショック、後天性免疫不全症候群（AIDS）（悪液質、自己免疫障害、エイズ痴呆複合症および感染を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0035】

神経変性疾患としては、多発性硬化症および急性横断脊髄炎等の脱髄性疾患が挙げられるがこれらに限定されない。

【0036】

悪性症状は、TNF 分泌腫瘍または例えば、白血病（急性、慢性骨髄性、慢性リンパ性および/または脊髄形成異常症候群）およびリンパ腫（悪性リンパ腫（バーキットリンパ腫または菌状息肉腫）等のホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫）等のTNF に関連する他の悪性疾患に関する。

20

【0037】

悪液質症候群および他の症状および過剰のTNF に関連する疾患としては、癌の悪液質、寄生生物性疾患および心不全が挙げられるがこれらに限定されない。

【0038】

上昇したレベルTNF はまた、アルコール誘導性肝炎および他の型の慢性肝炎を含むがこれらに限定されない所定の型の肝炎に関連する。

【0039】

当業者は、本明細書中に記載される方法を利用するのに必要な試薬はキットに含まれうることを認識する。記載されるような試薬は、市販されているか（例えば、緩衝溶液、化学試薬）、または当該分野で公知の方法により作製される（例えば、オリゴヌクレオチド、抗体、検出のためのリガンド）。従って、当業者は、キットが適切な区画に、例えば、本明細書中に記載される方法の実施を可能にするために必要な全ての試薬、プローブ、および材料を含んで作製されうることを認識する。

30

【0040】

本発明を、以下の非限定的な実施例に関してさらに記載する。本明細書に引用される全ての特許、特許出願、および全ての他の刊行物およびウェブサイトの教示は、参照により全体として取り込まれる。

【実施例】

40

【0041】

実施例1 . ヒト患者における発現プロファイルの予測値

喘息は、変動する表現型を有する一般的な複合疾患である。喘息の基礎となる細胞および分子機構はほとんどわからないままであるが、多面発現性サイトカイン、IL-1 およびTNF の増加したレベルが、喘息の病態生理学および様々な他の炎症性障害に関係している (Broide, D.ら、1992, J. Allergy Clin. Immunol. 89:958-967; Arend, W., 2001, Arthritis Rheum 45:101-106)。

【0042】

一般母集団において一般的であり、薬物に対して変動する反応と共に、強いが複雑である遺伝子の成分を有することが示されている喘息などの疾患が、薬理遺伝子研究のための理

50

想の候補疾患標的を有することが広く受けいれられている。後者は、個々の特定の治療の最適化ならびに薬物開発のための新規標的の提供において非常に有望である。現在使用されている薬物は全ての患者に有効ではなく、患者の高い割合において症状の再発が生じ、時々激しい有害な副作用を有するので、喘息患者の改良された、好ましくは予防的治療が所望される。DNAマイクロアレイを用いる単一アッセイにおける数千の遺伝子の発現レベルを解析する能力は、複数の分子遺伝子経路の強力な同時スクリーニングを可能にし、薬物に応じて個体の変動を決定する酵素、キナーゼ、イオンチャンネル、および他のシグナル伝達因子をコードする遺伝子における種々の発現を解析しうる。

【0043】

したがって、高密度DNAマイクロアレイ解析を用いて、GC-SおよびGC-R喘息患者から新しく単離したPBM細胞のmRNA発現における差異を同定した。mRNAをベースライン(T0)でならびにIL-1 およびTNF の組み合わせられた効果に対して試験した。さらに、GCの応答に寄与しうるこれらの遺伝子をさらに解明するための試みにおいて、本発明者らは、IL-1 およびTNF により活性化される細胞における変化した遺伝子発現に対するGC処置の効果を試験した。この戦略を使用するための原理は、2つのよく確立された概念に基づいた。第1に、喘息の症状は、IL-1 およびTNF の作用を介して機械的に導かれる。第2に、糖コルチコイドは、プロ炎症性サイトカインにより調節される遺伝子の発現を変更することにより喘息患者において作用する。この結果は、1)調査した12,600個の遺伝子のうち、ナイーブベイジアン分類(naive Bayesian classifier)に基づくアルゴリズムにより選択された50個の遺伝子は、トレインされた(trained)14GC-Rおよび14GC-S患者の正しいGC-R表現型を82%の精度で予測した；2)26GC-R喘息患者の第2コホートが試験された場合、分類の予測精度は86%であった、ならびに；3)選択された遺伝子間に、GC応答の調節に潜在的に関連する数個の細胞シグナル伝達分子、転写因子およびプロ炎症性分子があったことを説明する新しい証拠を提供する。これは、高い精度で喘息患者における糖コルチコイドに対する応答を予測するのに十分な能力を提供するGC-RとGC-S患者とを識別する新しく単離されたPBM細胞における遺伝子発現プロフィールを用いる第1の証明である。

【0044】

方法および材料

患者。研究した患者母集団は、アイスランドの国立大学病院のアレルギー/免疫学部門の開業アレルギー専門医の私立診療所および外来患者診療所から選択した。全1185人の患者記録を表現型情報について選抜し、患者の家族関係を決定するためにアイスランド家系データベースに関して分析した。吸入糖コルチコイド医薬品を使用している喘息の診断を保有する患者を、さらに評価した。18~70歳の54人の患者を、最初にランダムに補充して参加させ、2つのコホートに分けた。第1コホートは、喘息またはアトピーの徴候を持たず、吸入GCまたはいずれの他の医薬品も使用していない14人の対照被験体と共に14人のGC-Sおよび14人のGC-R患者からなった。26人のさらなる患者をまた集め、予測分類のための第2コホートとして使用した。続いてこの研究を96人の患者(60人のGC-Sおよび36人のGC-R)を含むように拡張し、そのうち88人は、3個のインビトロ治療条件(ベースライン、GCの不在または存在下におけるIL-1 /TNF)を全て完了した。続いて各コホートを等しい大きさの2個のサブコホートにランダムに分けた。ランダムな分割を10回行って、トレーニングセットにおいてGC-S患者からGC-R患者を検出する最も有益な(informative)遺伝子を、等しい大きさの独立した患者セットに対する予測変数(predictor)として用いた。患者に、2-アドレナリン作動性薬物およびロイコトリエンアンタゴニストを短い作用および長い作用の両方で使用した。全薬物の医薬品投与を、2週間変化せずに保ち、患者はPBM細胞発現研究のための血液の提供の前に最小4週間経口GCを絶たなければならなかった。発現アレイ研究を知らない1人の医者が、全患者を表現型分類した。身体検査の完了、薬物応答表現型の確認、および研究における彼/彼女の参加を認可するインフォームド Consentの際に、患者に研究のための血液試料の提供を頼んだ。対照被験体においては試験を行わなかった。40nlのEDTA血液を集め、以下に記載した実験研究のために、残りの血液から末梢血液単核(PBM)細胞を単離した。

10

20

30

40

50

【0045】

研究包含基準。患者が研究に入るために満たさなければならない基準は、以下を含む：
喘息は、アレルギー専門医/肺専門医により診断された。アイスランドにおいて喘息を診断するために使用したアプローチは、NHLBおよび米国胸部学会により概略を述べられた診断喘息基準のもの（国立衛生研究所。1997。喘息の診断および治療技術のためのガイドライン：Expert Panel Report 2, 1997年7月, U.S. Government Printing Office, Washington, DC. NIH Publication No.97-4051; American Thoracic Society. Standardization of Spirometry, 1994(改訂), Am J. Resp. Crit. Care. Med. 1995, 152:1107-1136)と一致し、ならびに任意の以下の測定を含む：

2年より多く咳および喘鳴音の再発症状を有し、気管支拡張療法に対する臨床応答（気管支拡張後、1秒当たりの努力呼気肺活量(FEV1)において>15%増加が測定される）を示す患者

気管支拡張療法前にベースラインで減少したFEV1(FEV1<80)を有し、気管支拡張療法後にFEV1において>15%改善を示す患者

咳および喘鳴音の再発症状を有し、ATSガイドラインに従って行なったメタコリンチャレンジ試験に対し、メタコリン濃度<8mgでFEV1において>20%低下を生じる患者

メタコリンチャレンジ試験をFEV1>70を有する患者において得た。さらに、アイスランドにおいて12個の最も一般的な空気アレルギーに対する皮膚試験および総IgEレベルを得、鼻炎の病歴および臨床徴候を記録した。GCに対する臨床応答を決定した同じアレルギー専門医により全患者を再調査した。

【0046】

吸入糖コルチコイドに対する応答。糖コルチコイド感受性(GC-S)または糖コルチコイド耐性(GC-R)のいずれかとして患者を分類した。以下の基準の任意の2つ以上の組み合わせは、GC-S患者における糖コルチコイド応答を規定した(Barnes, P.ら、Am. J. Resp. Crit. Care. Med., 1998. 157:S1-S53)：

推奨される治療用量（1000mgまでのFluticasone；800mgまでのBudesonide；または1000mgまでのBeclomethasone、これらが患者によって使用された3個の吸入GC薬物であった）で吸入GCを摂取した場合の喘息症状（咳および喘鳴音）の良好な管理。

8週間以上の治療用量の吸入GC後、改善された運動耐性および/またはより少ない憎悪。

8週間以上の吸入GC後、改善された最大流量および/または肺活量測定値。

8週間以上の吸入GC療法後、標準の質問事項に対する患者の返答により判断した生活/満足のいく状態の改善された質。

【0047】

GC-R患者は、治療用量で吸入GCを用いた場合、上記測定における改善を経験しなかった。GC-R患者に1日当たり>2,000mgの吸入Fluticasone（または等価の用量のBudesonideもしくはBeclomethasone）を試みた。研究した全GC-R患者は、GC療法に対して穏やかであるかまたは激しい耐性を有した。GC-RおよびGC-S患者をランダムに10回各々2つのコホートに分け、ここで1つのセットをトレーニングのために使用し、他の患者セットを、独立したセットのための予測変数を作製するために使用した。

【0048】

研究排除基準。研究排除基準を、以下に概略を述べる：

効力の評価または有害な効果の発生を妨げうる療法は、以下を含む：

他の調査薬物

同時医薬（2-アドレナリン作動性アゴニストまたは抗ロイコトリエン薬物以外）。

効力の評価または有害な効果の発生を妨げうる疾患または状態は、以下を含む：

妊娠または乳汁分泌期

過去における喘息薬物に対する過敏症または激しい有害な経験

アスピリン感受性喘息

職業喘息

研究薬物またはその成分に対する感受性

10

20

30

40

50

医薬に対するコンプライアンスが疑問である。

【0049】

患者保護測定/インフォームドコンセント手順。登録した96人の喘息患者は、研究基準を満たす1185人の喘息患者のリストからランダムに選択した。患者の返答-および参加率は、95%を超えた。全患者は、インフォームドコンセントにサインし、血液試料を提供し、質問事項および適切な表現型に必要な全試験を完了した。この研究は、アイスランドデータ保護委員会および国立生命倫理委員会により承認された。続いて、アイスランドのデータ保護委員会は、患者およびその家族のメンバーについて個人の情報を暗号化した(Gulcher, J.およびStefansson, K. Clin. Chem. Lab. Med. 1998, 36:523-527)。全血液およびDNA試料もまた患者のプライバシーの保護のためにコード化した。

10

【0050】

遺伝子マイクロアレイ発現の評価。96人の喘息患者を研究包含基準にしたがって補充した。上記臨床および実験パラメーターの両方を計算に取り入れる関数をスコアすることにより、GC応答を測定した。PBM細胞(PBMC)を、標準化Ficoll法により単離した。PBMCをカウントし、FITC-コンジュゲート抗CD3モノクローナル抗体(mAb)、PE-コンジュゲート抗CD19 mAb、およびFITC-コンジュゲート抗CD14mAbで染色し、フローサイトメトリーにより調査して、各細胞型の相対寄与を決定した。次いで、細胞を、1条件当たり約 6×10^6 細胞を有する3つの処置条件に分けた(ベースライン、IL-1 / TNF 処置およびGCの存在下でのIL-1 / TNF 処置)。その後、12,600個のDNAオリゴヌクレオチドを含むヒトHu95-A遺伝子チップ(Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用する遺伝子マイクロアレイ技術を用いて、単離したPBMC中で複数の遺伝子mRNA発現を試験した。簡単には、あわされたIL-1 (1ng/mL)およびTNF (5ng/mL)に、またはDEX(10^{-6} M)を用いた1時間の前処理の不在下および存在下で培地のみに4時間細胞を曝露し、RPMI-1640培地中で5%CO₂ / 95%空気の加湿雰囲気にて37°Cで維持した。細胞のインキュベーション後、マイクロアレイ発現解析のために使用した全RNAを抽出し、製造者により推奨される市販の試薬を用いて精製した。全RNAをTrizolを用いて抽出し、QiagenRNAEASYスピナラム(Qiagen GmbH, Germany)を用いて精製した。約5μgのRNAを第1および第2鎖cDNA合成に使用した。沈殿後、当該分野で公知の方法によりcDNAをcRNAに転写した。続いて、ピオチン標識cRNAを、製造業者にしたがってAffymetrix遺伝子チップ(Affymetrix, Santa Clara, CA)に一晩ハイブリダイズした。高ストリンジェンシー洗浄により、非結合プローブを除去した。ハイブリダイズしたチップをストレプトアビジン-PE複合体を用いて発達させ、スキャンした。次いで、スキャンした画像をAffymetrixソフトウェアを用いて解析し、市販のソフトウェアプログラムを用いてデータを調査した(Asher B. J. Mol. Graph Model. 2000, 18:79-82)。AvDiff値をAffymetrixソフトウェア出力により規定した。未処理PBMCのものを超えるサイトカインで処理したPBMCに由来するRNAのAvDiff値の比率としてフォールド変化(Fold change)を規定した。Affymetrix遺伝子チップに由来するmRNA発現値を数個の遺伝子に関連づけるために速度論PCRを使用した。

20

30

【0051】

発現データセットの正規化。全遺伝子に対する未処理の発現データを、チップの整えた(trimmed)平均(98%)発現値に正規化し、全チップに対する正規化した発現値を500にセットした(Hu, J.ら、2000. Ann. N.Y. Acad. Sci., 919:9-15)。遺伝子を、試料の様々な処理の間に安定であることを見出した20個の対照(ハウスキーピング)遺伝子のセットに対してまた正規化した。この分析は、PBM細胞において発現した全遺伝子、より具体的にはインビトロサイトカイン刺激により有意にアップレギュレートまたはダウンレギュレートされ、続いて糖コルチコイド処置により逆転した全遺伝子に焦点を当てた。次いで、予測分類をこれらの遺伝子に適用した。3つの別々のアプローチを予測遺伝子シグナルを探すために用いた: 1)ベースライン発現値のみ; 2)サイトカインへのインビトロ曝露に反応する発現値; ならびに3)GC前処理の存在下でサイトカインに反応する発現値。選択バイアス(selection bias)に対する可能性を最小にするために、独立セットに対しておよび交差検証法(cross validation)法を用いて両方で予測を行なった(Ambroise, C. およびMcLachl

40

50

an, G., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:6652-6566)。

【 0 0 5 2 】

ナイーブベイジアン分類による薬物応答表現型の分類。ナイーブベイジアン分類(前に情報を与えたものとは異なる)(Duda, R.およびHart, P., Pattern Classification and Scene Analysis. 1973, New York: John Wiley)を適用し、薬物応答表現型の分類が少数の有益な遺伝子についての発現値により達成されるかどうかを試験した。表現型間の識別に関連性があると思われる遺伝子を選択することにより分類がトレインされる(Kellner, A.ら、DNAアレイ発現データのベイジアン分類。Technical report, Department of Computer Science and Engineering, University of Washington, August, 2000)。新しいケースが分類に存在する場合、遺伝子 g について観察された帰属(attribute)値 x_g は、与えられたケースが糖コルチコイド感受性である見込み：

10

【 数 1 】

$$\frac{P(x_g / GCS)}{P(x_g / GCR)}$$

を生じる。分類(「ナイーブ」仮定の独立下)における全遺伝子の確率の結合は、全見込み：

【 数 2 】

$$\frac{P(GCS)}{P(GCR)} = \prod_g \frac{P(x_g / GCS)}{P(x_g / GCR)}$$

20

を与える。帰属、すなわち AvDiff 値またはフォールド変化は、各遺伝子に対するトレーニングセットにおいて表現型を最適に分ける閾値を選択することにより2つのカテゴリー(低、高)に分けられる。確率 $P(x | C)$ を、帰属値 x を用いてトレーニングケースの表現型 C の分数として計算した。確率ゼロによる特異性を避けるために、ラプラス推定を使用した。すなわちさらなるケースの各表現型を、各帰属カテゴリーに加えた。

【 0 0 5 3 】

表現型予測のために使用される遺伝子を、遺伝子スコアとしてそれぞれ表現型 GC-S および GC-R を有するトレーニングケースに関して

30

【 数 3 】

$$\frac{P(x_g | GCS)}{P(x_g | GCR)}$$

の平均を使用して表現型間を分離する能力により選択した。最も高い全スコアを有する n 遺伝子(すなわち、表現型 GC-S および GC-R に対するスコアの和)を、分類において用いた。帰属として、ベースラインおよびサイトカイン導入間のフォールド変化値を使用した。擬似フォールド変化値を避けるために、全個体についてベースラインおよびサイトカイン導入に対して AvgDiff 値 > 70 を有する遺伝子のみを考慮に入れた。

40

【 0 0 5 4 】

Golub らにより記載された加重投票(weighted voting)法を用いる独立した患者セットの予測。GCS および GC-R 患者コホートを、それぞれランダムに2つのコホートに分けた。ランダム分割手順を各回別の解析を用いて10回行なった。遺伝子を選択することによる以前記載したもの(Golub, T.ら、1999., Science, 286:531-537)と同様の加重投票アルゴリズムを使用する第1のコホートに対する予測器は、GC 応答者の非応答者からの識別に最も関連すると思われる。加重投票アルゴリズムは、トレーニングセットにおいて得られる「有益な」遺伝子の加重一次結合を作製し、新規試料のための分類スキームを提供する。アルゴリズムの簡単な説明を以下にする。トレーニングセットにおける2つのクラス(耐性および感受性)のそれぞれに対して平均(μ)および標準偏差(σ)を最初に計算する。次い

50

で、2つのクラス間のユークリッド距離を各遺伝子(x)について

【数4】

$$ED_X = \sqrt{(\mu_R - \mu_S)^2}$$

のように計算する。各クラスの分散は、クラス平方内の標準偏差に等しく、 $V_{RS} = \sigma^2$ である。次に、ほとんどの有益な遺伝子を選択するためおよび各遺伝子に対する加重の計算のために使用した測定基準は、以下のように計算される： $M_X = (ED^2_X) / (V_S + V_R)$ 。試験試料Yのクラスを予測するために、各遺伝子Xは、各クラスに対して票を投じる：

【数5】

$$W_{XR} = M_X \sqrt{(Y - \mu_R)^2} \text{ および } W_{XS} = M_X \sqrt{(Y - \mu_S)^2}$$

試験Yの最終クラスは、(W_{XR})および(W_{XS})の小さい方により見出される。したがって、各遺伝子は、その測定基準に基づく票およびそのシグナルが最も近いクラスを有する。最後に最も小さい票を有するクラスが予測クラスであり、例えば、試験試料が測定時に使用しているユークリッド距離に最も近いクラスが予測クラスである。次いで、薬物応答の正確な予測が、以前記載されたような市販のソフトウェア(Shipp, M.ら、2002. Nat. Med. 8:68-74; Golub, T.ら、1999., Science, 286:531-537)を使用して、予め情報のない独立したコホートに対する遺伝子のこの限定的なセットの発現値により達成されうるかどうか

【0055】

k-至近隣接(Nearest Neighbor)アルゴリズムを使用する独立した患者セットの予測。k-至近隣接(k-NN)アルゴリズム(Cover, T.ら、1967. IT, 13:21-27)をまた行って、トレーニングセット中の「発現」スペースにおけるk「至近隣接」標準化試料に対する試料のユークリッド距離を計算することにより、試料のクラスを予測した。近隣のクラス帰属関係を調査し、トレーニングセットにおける各クラスの集団について調整した後、新しい試料を隣接間の最も大きな相対母集団を示すクラスに割り当てる。マーカー遺伝子選択プロセスを、標的クラスにより高度に相関する特徴にのみk-NNアルゴリズムを提供することにより行った。予測変数における使用のための遺伝子を選択するために、全遺伝子を個々に試験し、遺伝子単独における情報を用いて1つのクラスを他のクラスから識別する能力をランク付けした。各遺伝子および各クラスに対して、遺伝子に対する遺伝子発現レベルにおける全ての可能なカットオフ点は、カットオフより上または下のいずれかのクラス帰属関係を予測するとみなされる。遺伝子を、クラスの最良の予測点を基礎としてスコアした。スコア関数は、このクラス対全ての他のものに関する予測対実際のクラス帰属関係の超幾何試験(Fisher正確試験)に対するp-値の負の対数である。

【0056】

一点除外交差検証法(Leave One Out Cross Validation)(L00CV)を使用する予測。患者の独立セットにおけるボンフィルメーション(vonfirmation)に加えて、GC応答者を非応答者から最良に分離した遺伝子を選択し、交差検証法により試験し、ここで一人の患者をデータセットから除外し、次いで残りの患者に基づく全遺伝子から新しい予測変数を作製した。次いで、新しい予測変数を使用して、排除した試料を予測した。遺伝子選択基準を前記のように決定し、ベースラインまたはサイトカインおよびGCへのインビトロ曝露への応答における発現値に適用した。

【0057】

試薬。cDNA Hu95遺伝子マイクロアレイチップおよびスキャナーおよびコンピューター解析ソフトウェアを含む解析システムを、Affymetrix, CAから購入した。RPM-1640培地をGibco BRL (Gaithersburg, MD) から得た。R&Dシステム(Minneapolis, MN)からIL-1 およびTNF を得た。DEXをSigma(St Louis, MO)から購入した。

【0058】

10

20

30

40

50

結果

患者の特徴。1185人の患者を含み、その500人より多くが吸入糖コルチコイドを用いている利用できる家族クラスターから、登録患者をランダムに選択した。この研究のために補充された96人の患者のうち60人を糖コルチコイド感受性であると決定し、36人を糖コルチコイド耐性であると決定した。各群を2つのコホートに分けた。第1のコホートは、46人の患者を含み(トレーニングセット)、その30人はGC-Sであり、18人はGC-Rであった。さらなる46人の患者を独立セットと命名し、また30人のGC-S患者および18人のGC-R患者を含んだ。GC-R群における吸入糖コルチコイドの平均持続用量は、約1,600mg/日(1,000~2,000の範囲)であった。対照的に、GC-S患者は、吸入GCの断続するかまたは低用量の療法(800mg/日のFluticasoneまたは同等薬物)のみを必要とした。アトピー状態と共に人口統計情報、肺機能およびメタコリンチャレンジ値を表3に示す。GC-S患者と比較した場合、喘息重篤度レベルがGC-R群においてより高いことが議論されうる一方、肺機能試験結果は、GC-R患者においてわずかにのみ低いことが注目される。表3に示されるように、雄/雌の比率およびアトピー状態はGC-R群においてより低く、一方平均年齢はより高かった。さらに、54%のGC-S患者および31%のGC-R患者は、1つ以上の空気アレルゲンに対して皮膚試験陽性であった。2つの群の間のT細胞、B細胞および単球の比において差異は観察されなかった。

10

【0059】

遺伝子スコア選択遺伝子を用いるベイジアン分類の性能。この研究は、GC-R喘息患者が、ナイーブベイジアン分類を用いて、GC応答性である患者において得られるものとは異なる白血球における特異的遺伝子発現プロファイルにより同定されうるかどうかを調査した。分類をトレインして、存在すると定義され、AvgDiff発現値>70を有したAffymetrix12,600 Hu95遺伝子チップに由来する全遺伝子を用いてGC-RおよびGC-S患者群間を最良に予測した遺伝子を選択した。後者の必要条件は、遺伝子の総数を5,011に減少した。したがって、分類は、ベースライン(BL)でまたはサイトカインもしくはGC処理に対する応答のいずれかでのAvgDiffまたはフォールド変化発現値において2群間の差異を説明する遺伝子を同定する目的で5,011個の遺伝子をトレインした。50個の遺伝子のサイトカイン処置に対する応答におけるフォールド変化mRNA発現値は、14GC-Rおよび14GC-S患者のランダムに選択されたサブグループを82%の精度で識別した。ベースライン発現値もGCに反応するフォールド変化発現も、2つの患者群間を識別する分類の能力を改善しなかった。薬物応答表現型の予測を、「交差検証法から1つを除外する」(LOOCV)方法により行い、ここで各トレーニングケースが順番に除外され、残っているトレーニングケースのみトレインした分類により予測される。次いで、正しく予測された除外されたトレーニングケースの百分率を、以前見られなかったケースの分類精度の推定値として得た。図1に見られるように、14人のGC-S患者のうち12人、14人のGC-R患者のうち11人を正しく予測した。さらに、分類を患者の全てについてトレインした場合、LOOCV法を用いる正しいGC応答表現型を決定する予測精度は、本質的に変更しないかまたは81%であった(図2)。

20

30

【0060】

これらの50個の遺伝子が薬物応答表現型間で高精度にて識別されたので、それらはそれ自身の群内の個体に対する薬物応答表現型を予測するより強い能力を潜在的に有するであろう。したがって、これらの遺伝子が、分類をトレインするために使用しなかった患者の別のコホートの薬物応答表現型を予測する能力を調査した。図3に示されるように、分類が40GC-S対GC-R患者上でトレインされ、次いで独立した患者セットを予測するために使用された場合、得られた予測精度は86%に上がった。

40

【0061】

50個の遺伝子は、GC応答者および非応答者間を識別する予測能力に寄与した。これらの遺伝子を、表1、2Aおよび2Bに分類別に示す。未知のGC応答プロファイルを有する14人の対照被験体のデータもまた含まれる。示されるように、対照群におけるmRNA発現のパターンは、GC-S患者のものに匹敵した。一般の喘息患者の90%までがGC応答者であるので、これは驚くことではない。各カテゴリーにおける遺伝子(特にCAM/ECM、細胞シグナル伝達/

50

代謝分子、転写因子およびEST)は、GenBank寄託番号、およびサイトカインにตอบสนองして変化するmRNA発現の平均フォールド変化のそれぞれの大きさにより同定される。

【0062】

GC応答者および非応答者の間を最も正確に識別する遺伝子シグナルが捕捉されたことを確実にするために、群を96人の患者(60GC-Sおよび36GC-R)に拡大し、交差検証法有りおよび無しでGC-SおよびGC-R患者の両方のランダムに分けたコホートに加重投票およびk-NNアルゴリズムを適用した。

【0063】

表1、2Aおよび2Bにおける遺伝子は別として、表4に示す15個のさらなる遺伝子は、独立したセットに対する予測精度を86%に増加し、GC応答者を非応答者から識別する精度は、全患者において交差検証法を用いて89%に達した。

10

【0064】

考察

薬物治療が医学の主要部のままである一方、多くの場合、所定の薬物は、患者の大多数においてほとんどもしくは全く効果を有さないか、または予測できなかったひどい副作用が生じる。患者に対してこれは危険でかつ潜在的に生活の脅威となる状態を示し、社会レベルで、有害な薬物反応は、疾患および死亡を導く原因を示す。遺伝子変動は、しばしば不十分な応答および副作用の基礎となる。実際、限定されないが、Dicumarol、WarfarinまたはIsoniazidにตอบสนองしてこれらの薬物の迅速な加速対遅い加速を与えるCytP450遺伝子における多形により患者変動性を含むかかる相関のいくつかの例がすでに存在する。これらの遺伝子変動が、これらの遺伝子の制御機能における差異において反映されうると過程すれば、これらの遺伝子のmRNAおよび/またはタンパク質発現における変動性が予測されるであろう。薬理ゲノム学(Pharmacogenomics)は、効力および安全性の両問題を扱う薬物に対する応答を正確に予測する個体の遺伝子の組立(makeup)間における変動の輪郭をすぐに描きうる見込みを有する。この関係において、DNAマイクロアレイ技術により単一アッセイにおいて数千の遺伝子の発現レベルを解析する能力は、複数の分子遺伝子経路の強力なスクリーニングを同時に提供する。したがって、高スループット遺伝子アレイアッセイは、薬物にตอบสนองする個体の変動を決定する種々の酵素、キナーゼ、イオンチャンネル、および他の細胞シグナル伝達分子をコードする遺伝子における差示的発現を同定する可能性を有する。

20

30

【0065】

これらの問題に取り組むために、本研究は、高密度DNAマイクロアレイ解析を用いてGC-RおよびGC-S喘息患者から単離された新しく単離されたPBMCにおける遺伝子発現における差異を調査した。結果は、糖コルチコイド感受性が86%の精度で予測されうること示す。

【0066】

糖コルチコイド(GC)は喘息療法に利用可能な最も有効な薬物であることが広く認められている。感受性である個体において、吸入GCは、血漿中に見出される濃度にてPBMC内で転写を活性化する比較的低い能力を有することが示されており、その作用は肺内で主に生じると考えられている。この知見は低いかまたは断続した投与での限られた全身性副作用に一致し、一方、気道におけるAP-1およびNF-kBなどのトランス-抑制転写因子活性に対するGCの相対能力はその相対臨床効力に一致する。対照的に、GC耐性は、プレゾニドンなどの延長した過程の高用量(>1mg/kg/日)経口糖コルチコイドに対する応答の欠如により規定された。喘息を有するほとんどの患者が吸入GCを用いて治療されているので、GC-依存/耐性喘息に言及する新しい定義は、薬物の使用における吸入経路を考慮して明らかになる(Leung,D.およびChrousos, G., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2000. 162:1-3)。これらの論点の観点から、吸入GCの高い用量(すなわち、>2000mg/日)に不完全にตอบสนองする条件としてGC耐性喘息を規定するための推薦に従った(Gagliardo,R.ら、Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2000. 162:7-13)。高レベルのGC-依存を有する患者対GC耐性喘息を有する患者の間の明確な分離が臨床的にいつも可能であるというわけではないが、これらの群の両方が、健康管理システムに対して非常に高価であるという難しい臨床問題を示すことは疑

40

50

いない。ステロイドに対する最適状態に及ばない応答は、持続性の気道障害と共に深刻な有害な影響を伴う高用量GC療法の延長された過程をしばしば導く。GC耐性喘息を罹患している患者は、高用量のGCでの持続性治療にもかかわらず、気道の進行性の炎症を示す。これは、表3における低いメタコリン濃度の値により反映されるように、本発明者らのGC-R患者において検出された高度の気道過応答性に一致する。

【0067】

最初の近似として病理生物学プロセスが喘息に関与すると過程すると、GC無感受性およびGC依存喘息を同じ病原性プロセスの一部としてみなすことは妥当である。したがって、GC-耐性/依存性喘息に寄与する機構の潜在的不均一性および複雑さならびに慢性喘息の自然病歴におけるその潜在的影響の観点から、GC耐性特性に関して、穏やか～厳しいGC-耐性を有する本発明者らのGC依存研究患者の遺伝子発現プロファイルにおいて差異が見られなかったことは注目すべきである。

10

【0068】

この研究において、予測能力を提供する遺伝子を同定するための遺伝子スコアアプローチを使用した。表1に示されるように、選択した40個の遺伝子は、2つの群の間のmRNA発現のシグナル強度において異なり、吸入糖コルチコイドに対する患者応答表現型に強く関連した。さらに、図1に示されるように、14人のGC-S患者および14人のGC-R患者のサブセットについてベイジアン分類をトレインする場合、これら2つの患者群の間を識別する分類の予測精度は82%であった。分類を40でトレインした場合、残りの独立した患者を予測する分類の精度は、高く86%であった(図2)。したがって、分類をトレインするために使用した患者の数をほぼ2倍にすることにより、研究の予測能力はさらに増加した。後者の観察は、2つの重要な関係を有する：1)分類の予測精度は、さらなる患者が含まれる場合さらに改善されうることを示唆する；ならびに2)14人のGC-S患者および14人のGC-R患者の開始データセットに適用する場合、ナイーブベイジアン分類を用いるアプローチは、80%を超える精度でGC-RおよびGC-S喘息患者の遺伝子発現プロファイルを予測する十分な能力を提供する。これらの遺伝子間には、多数のサイトカイン/ケモカイン-関連遺伝子、転写因子および細胞シグナル伝達分子遺伝子であることに注目すべきである(表1、2Aおよび2B)。疑いなくこれらの遺伝子の多くが、それ自体が喘息から独立したGC応答性の決定的な調節遺伝子であることがわかりうる。

20

【0069】

糖コルチコイド感受性および糖コルチコイド応答性喘息の間の識別における予測能力を有する遺伝子を、表1に挙げる。サイトカインを用いる刺激後のフォールド変化mRNA発現値を用いて糖コルチコイド応答性(GC-R)喘息および糖コルチコイド感受性(GC-S)喘息の間を最も正確に識別する40個の遺伝子を示す。値を群に対して平均±SEMとして表した。GC応答状態がわからない14人の非喘息(対照)被験体における匹敵する値もまた示す。これらの遺伝子を含む発現プロファイルは、GC-RおよびGC-S患者を80%を超える精度で予測する。

30

【0070】**【表1-1】**

表 1. 有益な遺伝子の RNA 発現における平均フォールド変化

<u>遺伝子</u> <u>カテゴリー</u>	<u>名称/</u> <u>GenBank</u>	<u>GCR</u> <u>平均</u> <u>±sem</u>	<u>GCS</u> <u>平均/</u> <u>±sem</u>	<u>対照</u> <u>平均/</u> <u>±sem</u>	<u>PV</u>
<u>転写因子</u>					
ジンクフィンガー タンパク質 267	ZNF267/X78925	3.05±0.45	5.41±0.99	3.76±0.30	0.94
ジンクフィンガー タンパク質 189	ZNF189/ AF025770	2.98±0.38	4.12±0.61	2.92±0.44	0.88
インターフェロン- 刺激遺伝子因子 3	ISGF-3/M97935	1.50±0.80	4.38±0.78	2.28±0.59	0.82
N-myc および STAT 相互作用因子 (interactor)	Nmi/U32849	2.28±0.25	1.41±0.20	1.50±0.09	0.81
ジンクフィンガー ヘリカーゼ	ZFH/U91543	-1.39±0.20	-2.04±0.11	-1.25±0.19	0.79
ジンクフィンガー タンパク質 145	ZNF145/AF060568	-3.23±0.88	-7.79±2.59	-5.94±1.65	0.71
インターフェロン- 誘導ロイシンジッ パータンパク質	IFP35/U72882	2.66±0.39	3.56±0.27	2.70±0.30	0.69
C 末端結合タンパク 質	CtBP/U37408	-1.36 ±0.20	-1.73 ±0.30	-1.43 ±0.09	0.64
<u>細胞</u> <u>シグナル伝達/代謝</u>					
PDGF レセプターβ 様腫瘍抑制サプレッ サー	PRLTS/D37965	0.51±0.41	2.99±0.58	0.67±0.48	0.94
ステロールキャリア アタンパク質-X; ステロールキャリア アタンパク質-2	SCP-X; SCP-2/ U11313	-2.44 ±0.20	-1.61 ±0.35	-1.86 ±0.11	0.94
G タンパク結合レセ プター遺伝子	GPRG/L42324	4.14±1.35	8.46±3.50	3.85±1.16	0.94
核因子 κB サブユ ニット	NFκB/M58603	4.10±0.26	2.68±0.25	3.12±0.19	0.93
同種移植片炎症因 子 1	AIF1/U49392	-4.48±0.49	-2.24±0.54	-4.54±0.50	0.88
c-syn プロトオン コジーン	FYN/M14333	1.87±0.09	1.55±0.11	1.74±0.04	0.86
小核リボ核蛋白ボ リペプチド A	SNRPA/M60784	-1.75±0.10	-3.76±1.34	-1.80±0.09	0.86

10

20

30

40

<u>遺伝子</u> <u>カテゴリー</u>	<u>名称/</u> <u>GenBank</u>	<u>GCR</u> <u>平均</u> <u>±sem</u>	<u>GCS</u> <u>平均/</u> <u>±sem</u>	<u>対照</u> <u>平均/</u> <u>±sem</u>	<u>PV</u>
2'5' オリゴアデニ レートシンテター ゼ	none/M87434	2.69±0.35	4.52±0.59	2.56±0.49	0.81
Rab GTPase 活性化 タンパク質 1	HSRANGAP1/ X82260	2.42±0.13	1.89±0.25	1.94±0.31	0.79
血管作用性腸管ペ プチドレセプター1	VIPR1/X77777	-3.76±0.52	- 11.65±2.37	-6.24±1.02	0.79
NADH-ニコチンデ ヒドロゲナーゼ 51 kDa サブユニット	NDUFV1/ AF053070	-1.54±0.10	-1.89±0.31	-1.61±0.16	0.79
SH3BGR 様タンパク 質	SH3BGR/ AF042081	-2.04±0.20	-1.22±0.29	-1.88±0.09	0.75
SRC キナーゼ関連リ ン蛋白 55K	SKAP55/Y11215	-6.59±0.48	- 12.60±2.29	-13.36 ±5.40	0.71
レチナール短鎖デ ヒドロゲナーゼ/ レダクターゼ	retSDR1/AF061741	-0.61±0.36	0.24±0.40	0.33±0.70	0.71
NAD (H)-特異的イ ソシトレート デヒドロゲナーゼ g	none/Z68907	-1.58±0.05	-1.67±0.30	-1.60±0.06	0.71
リソソーム関連膜 糖蛋白	DCLAMP/ AB013924	70.09 ±11.70	128.82 ±24.64	96.54 ±13.97	0.69
アリールカーボン レセプター	AHR/L19872	-1.96±0.38	-0.82±0.37	-0.24±0.45	0.69
Ser/Thr キナーゼ 10	lok/AB013924	-1.49±0.06	-1.47±0.23	-1.60±0.08	0.64
ドッキングタンパク 質 2	DOK2/AF034970	-2.08±0.09	-2.24±0.54	-2.55±0.16	0.64
Ecto-5-prime-スク レオチダーゼ	CD73/X55740	-2.38±0.20	-4.22±0.89	-3.16±0.94	0.64
シグナル誘導増殖 関連遺伝子 1	SIP1/AB005666	-1.68±0.29	-2.76±0.51	-1.85±0.15	0.57
リン脂質スクラン ブルアーゼ	hMmTRA1b/ AB006746	3.80±0.52	6.66±0.82	3.94±0.44	0.56
<i>Misc</i>					
IgE α の Fc 断片	FCRER1A/X06948	-17.64±1.55	- 10.44±2.36	-16.43 ±4.08	0.94
ヒストンステムル ープ結合タンパク 質	SLBP/U75679	1.07±0.17	1.21±0.31	0.69±0.36	0.94

10

20

30

【表 1 - 3】

<u>遺伝子</u> <u>カテゴリー</u>	<u>名称/</u> <u>GenBank</u>	<u>GCR</u> <u>平均</u> <u>±sem</u>	<u>GCS</u> <u>平均/</u> <u>±sem</u>	<u>対照</u> <u>平均/</u> <u>±sem</u>	<u>PV</u>
インターフェロン 誘導タンパク質 56	IFI56/M24594	10.63±2.73	23.63±3.73	10.09±2.24	0.88
ニューロバシー標 的エステラーゼ	NTE/AJ004832	-1.42±0.25	-2.34±0.13	-1.37±0.24	0.86
インターフェロン 誘導タンパク質 41	IFP41/L22342	1.32±1.32	2.38±0.23	1.44±0.34	0.75
ポリ A 結合 タンパク質 II	PAPB2/AF026029	-1.36±0.06	-2.02±0.24	0.68±0.31	0.71
ガレクチン 2	GaI2/AL022315	-56.71±7.96	- 23.46±5.90	-44.87 ±8.65	0.69
アクチン関連タン パク質複合体 2/3 サブユニット 2	ARPC2/U50531	-2.79±0.65	-7.05±1.37	-3.25±1.36	0.57
CD1c 胸腺抗原	CD1c/M28827	-5.11±0.62	-3.56±0.34	-4.73±0.74	0.56
<i>cDNA</i>					
クローン 24538 mRNA	無し/AF055030	0.84±0.28	1.52±0.24	1.42±0.11	0.94

40

50

【 0 0 7 1 】

表2Aおよび2Bは、IL-1 / TNF 療法によりアップレギュレートまたはダウンレギュレートし、GCを用いる前処理により少なくとも部分的に逆転し、サイトカインを用いた処置後に生じた発現値を用いて糖コルチコイド感受性を最も正確に予測した45個の遺伝子を含む。表2Aは、DEXの存在下にIL-1 / TNF を用いて処理した細胞における発現レベルを示し、表2Bは、IL-1 / TNF のみを用いて処理した細胞の発現レベルを示す。

【 0 0 7 2 】

【 表 2 - 1 】

表 2A. IL-1 β /TNF α によりアップレギュレートされ、DEXにより抑制される遺伝子

IL1/TNF α 処置: DEX有り

遺伝子カテゴリ	名称/ GenBank	GCR 平均 \pm sem	GCS 平均/ \pm sem	P-値
炎症性細胞調節剤				

10

【 表 2 - 2 】

遺伝子カテゴリ	名称/ GenBank	GCR 平均 \pm sem	GCS 平均/ \pm sem	P-値
インターフェロン誘導性 56 Kd	IFI56/ M24594	-816 \pm 91	-1920 \pm 240	<0.0001
インターロイキン 1 β	IL1B/ M15330	-3792 \pm 501	1605 \pm 1339	0
インターフェロン γ 処置誘導性 mRNA	IFNIND/ M26683	-12235 \pm 955	-5432 \pm 1553	0
CD6 抗原	CD6/ X60992	-1128 \pm 192	58 \pm 265	0.001
インターフェロン調節因子 7B	IRF7/ U53831	-908 \pm 91	-876 \pm 175	0.863
TNF α レセプター関連 因子 1	EB16/ U19261	-2061 \pm 185	-1419 \pm 109	0.0133
TNF α レセプター	CD120b/ M32315	-3321 \pm 520	-1283 \pm 407	0.006
TNF α レセプタースーパーファミ リ	WSL/ Y09392	-3321 \pm 506	-1591 \pm 402	0.0185
白血球表面アミノペプチダーゼ N	CD13/ M22324	-983 \pm 122	-247 \pm 106	0
サイトカイン(GRO- γ)	SCYB3/ M36821	-2135 \pm 345	-672 \pm 59	0.001
インターフェロン誘導性ペプチド(6- 16)遺伝子	16-jun/ U22970	-1233 \pm 151	-2094 \pm 424	0.041
サイトカイン(GRO- β)	SCYB2/ M36820	-2934 \pm 374	-1116 \pm 384	0.003
インターフェロン- β -2a	IL6/ X04430	-7784 \pm 683	-4493 \pm 788	0.002
OX40 細胞表面抗原	OX40/ S76792	-600 \pm 103	-230 \pm 47	0
単球/マクロファージ 1g 関連レセプ ター	MTR10/ AF004231	-626 \pm 73	-238 \pm 57	0

20

30

40

【 表 2 - 3 】

<u>遺伝子カテゴリー</u>	<u>名称/ GenBank</u>	<u>GCR 平均 ±sem</u>	<u>GCS 平均/ ±sem</u>	<u>P-値</u>
小誘導性サイトカインサブファミリー C2	SCVC2/ D63789	-417±80	-118±76	0.0156
インターロイキン-1 レセプターアンタゴニスト	IL1RA/ X52015	-10750±966	-5445±1457	0.004
ウロキナーゼ型プラスミノーゲンレセプター	CD87/ U09937	-3834±530	-1504±272	0.002
活性化 mRNA	Act-2/ J04130	-4202±494	-1333±572	0.001
マクロファージ遊走阻止因子	MIF/ L19686	-1222±383	-170±238	0.0365
単球分泌タンパク質	JE/ M28225	-7380±860	-4302±960	0.0331
インターフェロン刺激遺伝子 HEM45	HEM45/ U88964	-1600±367	-424±368	0.039
膜糖蛋白 4F2 抗原重鎖	CD98/ J02939	-687±115	-301±124	0.0374
インターフェロン誘導タンパク質 p78	p78/ M33882	-3547±345	-1491±346	0
CD44 イソ型 RC	CD44/ AF098641	-1886±170	-1019±134	0.001
インターフェロン-誘導 17-kDa/15-kDa タンパク質	ISG15/ M13755	-5244±677	-2526±611	0.008
<u>細胞シグナル伝達/代謝</u>				
プラスミノーゲン活性化阻害剤 2	PAI-2/ Y00630	-7538±623	-2683±648	<0.0001
PROS-27	PROS-27/ X59417	-2771±318	-361±402	0
サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 1A	p21/ U03106	-2463±315	-885±151	0

10

20

【表 2 - 4】

30

<u>遺伝子カテゴリー</u>	<u>名称/ GenBank</u>	<u>GCR 平均 ±sem</u>	<u>GCS 平均/ ±sem</u>	<u>P-値</u>
リンパ球 G0/G1 スイッチ遺伝子	G0S2/ M69199	-3788±420	-1657±275	0
hpast	HPAST/ AF001434	-1532±187	-675±139	0.002
アポトーシスインヒビター/AP ホモ ログ B (MIHB)	AP11/ U37547	-722±315	-342±151	0.002
インスリン誘導タンパク質 1	INSIG1/ U96876	-2778±273	-1797±204	0.0117
pim-1 オンコジーン	pim-1/ M16750	-1937±245	-1197±152	0.0205
サイクリック AMP 応答エレメントモ ジュレーター	CREM/ S68134	-2225±238	-1435±149	0.0207
グルコーストランスポーター様タン パク質-111	GLUT3/ M20681	-3564±801	-1422±512	0.0366
ヒトシクロオキシゲナーゼ-2	hCox-2/ U04636	-1731±222	-2333±389	0.167
<u>CAM/ECM 分子</u>				
HB14	CD83/ Z11697	-4434±73	-2492±78	0
接着分子ニンジュリン	NINJ1/ U91512	-1977±315	-472±249	0.001
マトロプロテイナーゼ 1 の組織イン ヒビター	TIMP1/ D11139	-4723±500	-2237±483	0.002
エラスターゼ特異的プロテイナーゼ インヒビター	ELAFIN/ L10343	-1448±462	-292±199	0.0449
<u>転写因子</u>				
Nef-関連因子 1β	Naf1beta/ AJ011896	-1523±467	126±512	0.0268
甲状腺レセプター相互作用因子	TRIP14/ L40387	-635±67	-798±83	0.1357

10

20

【表 2 - 5】

30

<u>遺伝子カテゴリー</u>	<u>名称/ GenBank</u>	<u>GCR 平均 ±sem</u>	<u>GCS 平均/ ±sem</u>	<u>P-値</u>
基礎ヘリックス-ループ-ヘリックス 転写因子	Musculin/ AF087036	-1867±177	-1209±116	0.006
p50-NFκβ	P50-NF-κB/ S76638	-890±174	-321±105	0.0122

表 2B. IL-1/TNF αによりアップレギュレートされ、DEXにより抑制される遺伝子

IL1/TNF α処置: DEX 無し

<u>遺伝子カテゴリー</u>	<u>名称/ GenBank</u>	<u>GCR 平均 ±sem</u>	<u>GCS 平均/ ±sem</u>	<u>P-値</u>
<u>炎症性細胞調節剤</u>				
インターフェロン誘導性 56 Kd	IF156/ M24594	1283±215	3370±372	<0.0001
インターロイキン 1β	IL1B/ M15330	9905±1021	595±1430	<0.0001
インターフェロン γ 処置誘導性 mRNA	IFNIND/ M26683	17349±784	11063±998	<0.0001
CD6 抗原	CD6/ X60992	2472±179	806±195	<0.0001
インターフェロン調節因子 7B	IRF7/ U53831	1413±129	3074±187	<0.0001
TNF α レセプター関連因子 1	EB16/ U19261	5191±188	3643±267	0
TNF α レセプター	CD120b/ M32315	6742±513	3453±877	0
TNF α レセプタースーパーファミ リー	WSL/ Y09392	6560±462	3452±626	0
白血球表面アミノペプチダーゼ N	CD13/ M22324	2988±304	1523±184	0.001
サイトカイン (GRO-γ)	SCYB3/ M36821	3228±392	1431±284	0.001

10

20

【表 2 - 6】

30

遺伝子カテゴリー	名称/ GenBank	GCR 平均 ±sem	GCS 平均/ ±sem	P-値
インターフェロン誘導性ペプチド (6-16) 遺伝子	16-jun/ U22970	1870±317	3656±362	0.002
サイトカイン(GRO-β)	SCYB2/ M36820	5431±653	2267±509	0.002
インターフェロン-β-2a	IL6/ X04430	12870±630	9257±863	0.002
OX40 細胞表面抗原	OX40/ S76792	1157±88	588±28	0.002
単球/マクロファージ Ig 関連レセ プター	MIR10/ AF004231	1492±147	780±157	0.003
小誘導性サイトカインサブファミ リー C2	SCYC2/ D63789	483±115	28±90	0.006
インターロイキン-1 レセプター アンタゴニスト	IL1RA/ X52015	13395±1481	8202±1598	0.0168
ウロキナーゼ型プラスミノーゲン レセプター	CD87/ U09937	4180±663	2054±414	0.0197
活性化 mRNA	Act-2/ J04130	8697±1013	3900±1860	0.026
マクロファージ遊走阻止因子	MTF/ L19686	2250±705	296±356	0.0271
単球分泌タンパク質	JE/ M28225	9970±999	6785±534	0.0369
インターフェロン刺激遺伝子 HEM45	HEM45/ U88964	6801±713	4768±553	0.0474
膜糖蛋白 4F2 抗原重鎖	CD98/ J02939	3073±194	2472±243	0.0662
インターフェロン誘導タンパク質 p78	p78/ M33882	7155±826	5241±503	0.0777
CD44 イソ型 RC	CD44/ AF098641	3651±264	3121±195	0.0962
インターフェロン-誘導 17- kDa/15-kDa タンパク質	ISG15/ M13755	8821±1574	6128±993	0.1801
<i>細胞シグナル伝達/代謝</i>				
プラスミノーゲン活性化阻害剤 2	PAI-2/ Y00630	9427±717	5832±531	0.001

10

20

【表 2 - 7】

30

<u>遺伝子カテゴリー</u>	<u>名称/ GenBank</u>	<u>GCR 平均 ±sem</u>	<u>GCS 平均/ ±sem</u>	<u>P-値</u>
PROS-27	PROS-27/ X59417	5853±316	3557±443	0
サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 1A	p21/ U03106	3544±492	1975±261	0.0123
リンパ球 G0/G1 スイッチ遺伝子	GOS2/ M69199	1403±737	1347±548	0.9539
Hpast	HPAST/ AF001434	2370±263	1545±272	0.0418
アポトーシス/AP ホモログ B (MIHB)	AP11/ U37547	1826±137	1885±150	0.7754
インスリン誘導タンパク質 1	INSIG1/ U96876	4414±353	3201±285	0.0175
pim-1 オンコジーン	pim-1/ M16750	2347±411	1947±511	0.5462
サイクリック AMP 応答エレメント 調節剤	CREM/ S68134	4875±216	4613±411	0.541
グルコーストランスポーター様タ ンパク質-111	GLUT3/ M20681	5396±930	2914±713	0.0476
ヒトシクロオキシゲナーゼ-2	hCox-2/ U04636	1735±302	2683±513	0.1195
<u>CAM/ECM 分子</u>				
HB14	CD83/ Z11697	5991±138	2892±150	<0.0001
接着分子ニンジュリン	NINJ1/ U91512	4607±401	2359±264	0
メタロプロテイナーゼ 1 の組織 インヒビター	TIMP1/ D11139	9451±1006	5574±611	0.005
エラスターゼ特異的プロテイナー ゼインヒビター	ELAFIN/ L10343	2744±768	577±174	0.0166
<u>転写因子</u>				
Nef-関連因子 1β	Naf1beta / AJ011896	6890±505	3412±314	<0.0001
甲状腺レセプター相互作用因子	TRIP14/ L40387	1046±130	1488±167	0.0452

10

20

30

【表 2 - 8】

<u>遺伝子カテゴリー</u>	<u>名称/ GenBank</u>	<u>GCR 平均 ±sem</u>	<u>GCS 平均/ ±sem</u>	<u>P-値</u>
基礎ヘリックスループ-ヘリク ス転写因子	Musculin / AF087036	2832±297	2145±109	0.0489
p50-NFκB	P50-NF- κB/ S76638	2394±169	1995±206	0.1487

【0073】

表 3 に示されるように、雄 / 雌の比率およびアトピー状態は、GC-R群においてより低く、一方平均年齢はより高かった。いくつかの研究は、X染色体と喘息表現型との間の関連を報告しているが(Kauppi P.ら、Eur. J. Hum. Genet. 2000.10:788-92;Heinzmann A.ら、Hum. Mol. Genet. 2000.9.549-59; Ahmed S.ら、Exp. Clin. Immunogenet.2000.17:18-22)、広範な疫学研究は、かかる関連がGC-R表現型と喘息との間に存在するのかどうかを確認するために必要である。同様に、この研究においてGC-R患者の31%と比較してGC-S患者の54%が1つ以上の空気アレルゲンに対して皮膚試験陽性であった。さらに、平均総IgEレベルは、GC-S群においてより高かった。陽性皮膚試験または増加したIgEレベルにより決定した場合、アイスランドにおける喘息患者の約50%がアトピーであるのと比較して(The European Community Respiratory Health Survey Group. Am. J. Resp. Crit. CareMed.1997.156:1773-1780)、いくつかのヨーロッパの国および米国の地域のいくつかにおいて患

40

50

者の約70%がアトピーである(Eggleston P. および Bush R., J. Allergy Clin. Immunol. 2001 107:S403-5)。アトピー喘息患者が、非アトピー患者と比較してGC-R喘息をより有しにくいかどうかを決定することが残っている。この結果におけるこれらの変動性に由来する障害が除外され得ないが、患者の年齢、性別またはアトピー状態の予測能力は、研究下における遺伝子から発達した能力と比較してより低かった(および統計的に有意でない)。

【0074】

これらの結果は、GC-耐性の発達に寄与するメカニズムを解明するための基礎を提供し、新規治療アプローチの開発を可能にしよう。例えば、当業者は、アイスランド家系データベースを用いてGC-RおよびGC-Sクラスターに関する患者における連鎖研究を行おう。GC-応答性の臨床測定に基づいて大きな家系図にGC-RおよびGC-S喘息を有する患者を関連づけることにより、ゲノム全体の連鎖解析が行なわれよう。第2に、DNAアレイ技術を用いて患者の大きなコホートにおけるGC-R対GC-S喘息を予測するmRNA発現プロファイルを探すことにより、当業者は、患者が糖コルチコイドを摂取しているかどうかまたは臨床応答が発現プロファイルのみに基づいて決定されたかどうかに関係なく、未知のGCプロファイルを有する患者を高い精度でGC-SおよびGC-R患者に分類しよう(例えば、応答者対非応答者の発現プロファイリングにそれぞれ類似するかどうか)。

【0075】

表3. 糖コルチコイド感受性(GC-S)およびGC-耐性(R)患者における人口統計、肺機能、メタコリンチャレンジおよび総IgE値。示された値は、群に対する平均 \pm SEである。

【0076】

【表3】

表3.

特性	GC-S	<喘息>	GC-R
n	61		35
平均年齢 (yr)	43 \pm 16		54 \pm 19
性別比 (M/F)	30/70		20/80
平均用量 GC (μ g/日)	450 (200-800)		1,610 (1,000-2000)
FVC (% 予測) リットル	84 \pm 19 3.8 \pm 1.0		75 \pm 15 2.2 \pm 0.8
FEV1 (% 予測) リットル	82 \pm 20 3.2 \pm 1.0		81 \pm 8 3.3 \pm 0.3
FEV1/FVC 比	70 \pm 10		72 \pm 12
陽性皮膚試験	54%		31%
MCh チャレンジ(mg/L)	3.4 \pm 1.2		0.7 \pm 1.1
総 IgE (IU/L)	78		38

【0077】

GC応答者を非応答者から最も正確に識別する遺伝子シグナルが捕捉されることを確認するために、研究を96人の患者(60人のGC-Sおよび36人のGC-R)を含むように拡張し、GC-SおよびGC-R患者のランダムに分けたコホートを交差検証法有りおよび無しで解析した。

【0078】

結果は、表1、2Aおよび2Bに列挙された遺伝子は別として、分割コホートを用いて同定した表4Aに列挙された15個のさらなる遺伝子、および交差検証法による表4Bに列挙された4個の遺伝子は、独立セットおよび交差検証法に対して予測精度をそれぞれ86%および89%に増加したことを結果は示す。これらの遺伝子は、免疫機能、シグナル変換プロセスおよびアポトーシスにおいて重要な役割をはたし、その全ては、喘息における糖コルチコイド応答の機構に高度に関連する機能である。

【0079】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4A

導入 独立 GenBank	平均 耐性	StdDev	平均 感受性	StdDev
Z11697	1.8724782	0.33308947	1.58067	0.37548256
AI950382	1.3549194	0.22042978	1.030298	0.2444671
L78440	1.5259613	0.30956995	1.0863237	0.34783307
U19261	1.7525064	0.4171106	1.3473015	0.3836438
M80244	1.9161059	0.56795007	1.1932454	0.40928963
AB023205	2.1412642	0.9683697	1.55956	0.7753593
M58603	1.6857204	0.40931362	1.2413435	0.41113004
L05424	1.8005482	0.49951264	1.3440721	0.3783
R38263	1.4709008	0.3948905	1.2489537	0.32604253
L03411	1.2816724	0.18822539	1.1264083	0.25873253
D63789	1.6949914	0.78736067	1.2824732	0.57320374
X52425	1.4263631	0.3121133	1.1701844	0.32265002
L11329	1.6712576	0.45524144	1.2668103	0.39379898
U48807	2.149289	1.1046098	1.4393674	0.74329394
D79991	1.2781677	0.26072037	1.1245298	0.2646311

表 4B

導入クロス
バリデーション

GenBank	平均 耐性	StdDev	平均 感受性	StdDev
AB009010	0.7325509	0.3312249	1.4231814	0.5362498
L78440	1.575848	0.33741876	1.1237841	0.30317423
U43185	2.1323266	0.40701827	1.4901624	0.52416813
AB020630	1.6486217	0.2412822	1.2882963	0.31817988

10

20

【0080】

実施例 2 .

約80%の予測精度を示す遺伝子は別として、多数の遺伝子が2つの患者群間で差次的に発現されることを見出した。その内、表5A~Eに列挙される遺伝子は、見出された予測シグナルに寄与した。これらの遺伝子を、実験セットアップの生物学的アプローチを適用することにより同定した(すなわち、IL-1 / TNF によりアップレギュレートまたはダウンレギュレートされ、かつ少なくともGCにより部分的に逆転した遺伝子)。糖コルチコイド予測に関する表5A~5Eにおける遺伝子の最大値は、これらの遺伝子が患者のより大きなコホートにおいて確認された場合にわかるであろう。

【0081】

【表 5 - 1】

30

表 5A.

	ベースライン発現値				
	GC 耐性		GC 感受性		P 値
	(n=30)		(n=66)		
遺伝子 (Genbank, マップ)	平均	SEM	平均	SEM	P 値
パーフォリン 1 (M28393, 10q22)	6085.97	417.13412	5250.672	208.2762	0.026
腫瘍壊死因子 レセプター 2 (75kD) (M32315, 1p36.3- p36.2)	4043.2695	172.13469	3606.906	126.01189	0.047
LPS-誘導 TNF- α 因子 (AF010312, 16p13.3-p12)	4149.5264	339.81314	3394.3865	152.35988	0.018
デフェンシン (L12691, 8)	15084.323	1903.8826	10559.057	1213.1726	0.045
K1AA0542 タンパク質 (AB011114, 22q12.2)	4974.1274	1201.7789	8108.8516	872.0196	0.004
β 2-ミクログロブリン (S82297, 15q21- q22.2)	14026.682	3886.1045	28540.09	3071.3684	0.023
グランザイム B 前駆体 (M57888, 14q11.2)	3153.3257	372.53757	2298.1396	185.16092	0.01
サイモシン, β 4 (M17733, Xq21.3-q22)	21235.469	2459.579	28695.383	2114.4946	0.042
HLA クラス I 重鎖 (X58536, 6p21.3)	23571.922	2747.8547	31607.03	2214.8435	0.042
伸長因子 EF-1- α (J04617, 6q14)	18835.99	3337.1677	30409.002	2609.5315	0.034
EST (A1526078, 20q13.3)	18714.736	1704.359	24808.363	1547.6501	0.043
CD98 (M80244, 16q24.3)	798.8602	93.80168	642.308	47.76093	ns**
核因子 κ -B DNA 結合サブユニット (M58603, 4q24)	1118.8152	131.4039	1171.212	94.15151	ns**
シグナルトランスデュ ーサーおよび 転写 4 のアクチベータ ー (L178440, 2q32.2- q32.3)	2115.2861	177.11328	2072.295	94.97464	ns**

10

20

【表 5 - 2】

Nef-関連因子 1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	2744.2788	242.81891	2588.429	162.65399	ns**
CD44 抗原 (U05424, 11p13)	1856.1018	95.87001	1778.6385	104.54533	ns**
(2'-5')オリゴアデニレートシンテターゼ (AJ225089, 12q24.2)	337.42038	18.820648	383.4079	54.559353	ns**
インターフェロン調節因子 7 イソ型 a (U53831, 11p15.5)	820.22296	40.891983	803.94714	37.65985	ns**
インターフェロン誘導性タンパク質 p78 (M33882, 21q22.3)	692.43274	53.86486	769.75037	61.446373	ns**
インターフェロン誘導性 1-8U 遺伝子 (X57352, 11)	10073.882	1202.4331	10348.615	847.59143	ns**
インターフェロン刺激遺伝子 (20kD) (U88964, 15q26)	2559.649	120.11462	2733.2332	64.77266	ns**
インターフェロン-刺激タンパク質, 15 kDa (M13755, 1)	2001.0354	107.30703	2131.9282	121.11149	ns**
CD44 イソ型 RC (AF098641, 11p13)	1635.3041	92.87121	1546.3922	101.99627	ns**
CD83 抗原 (Z11697, 6p23)	4003.7795	509.4784	2995.624	343.3428	ns**
インターフェロン刺激応答エレメント (U22970, 1p36)	1222.6351	87.984886	1198.6647	74.25269	ns**
TNF レセプター-関連因子 1 (U19621, 9q33-q34)	1024.6047	76.8937	970.14984	68.22721	ns**
接着分子 ニンジュリン 1 (U01512, 9q22)	952.9832	108.31899	819.72675	72.15633	ns**
TNF レセプター-関連因子 1 (U19261, 9q33-q34)	602.10754	55.548782	552.6948	36.47862	ns**
転写因子 ISGF-3 (M97936, 2q32.2)	1047.2883	84.6747	1043.8727	51.559406	ns**
インターロイキン 7 レセプター (AF043129, 5p13)	1293.5005	221.00233	1776.9689	196.31573	ns**
インターロイキン 8 (M28130, 4q13-q21)	9098.902	881.07416	7048.5723	759.5493	ns**
GRO2 オンコジーン (M36820, 4q21)	3172.951	401.67627	2370.0527	298.47812	ns**
テトラトリコペプチドリピート 1 を有する インターフェロン-誘導タンパク質 M24594, 10q25-q26)	242.70598	46.875942	299.46494	47.465668	ns**
テトラトリコペプチドリピート 4 を有する					

10

20

30

【表 5 - 3】

インターフェロン-誘導タンパク質 (AF026939, 10q24)	335.2246	98.50067	348.74557	38.996685	ns**
マクロファージコロニー刺激因子1 (M37435, 1p21-p13)	3976.1692	148.23972	4297.3677	118.11726	ns**
Ras インヒビター (M37190, 20)	103.64886	51.292507	117.76897	47.070602	ns**
小誘導性サイトカイン A2 (M28225, 17q11.2-q21.2)	176.61205	47.855843	356.2777	170.02516	ns**
シクロオキシゲナーゼ-2 (U04636, 1q25.2-q25.3)	1282.8784	245.26799	976.03503	140.18762	ns**
トランスフォーミング増殖因子, β レセプター-II (70-80kD) (D50683, 3p22)	665.96454	39.320732	684.6929	31.560013	ns**
サイクリック AMP-応答エレメントモジュレーター β イソ型 (S68134, 10p12.2-p11.1)	571.4737	76.16772	583.9707	86.563515	ns**
インターロイキン1 レセプターアンタゴニスト (X52015, 2q14.2)	2650.151	386.6683	2049.2832	280.7141	ns**
インターロイキン6 (X04430, 7p21)	218.93637	79.35666	372.81815	181.83186	ns**
Nef-関連因子1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	1628.6475	86.34723	1530.4146	92.62164	ns**
小誘導性サイトカイン A7 (X72308, 17q11.2-q12)	121.53884	8.26777	149.0766	20.418268	ns**
小誘導性サイトカイン A2 (M26683, 17q11.2-q21.1)	227.42393	82.810646	527.6503	265.94244	ns**

10

20

表 5B.

遺伝子	IL-1/TNF-誘導発現値				
	GC 耐性 (n=30)		GC 感受性 (n=66)		P 値
	平均	SEM	平均	SEM	
パーフォリン 1	5614.334	394.1253	4072.83	214.3326	< 0.0001
腫瘍壊死因子 レセプター 2 (75kD) (M32315, 1p36.3-p36.2)	10050.87	586.6837	7283.63	440.3941	0.0004
LPS-誘導 TNF- α 因子 (AF010312, 16p13.3-p12)	5459.401	351.0782	4387.12	170.5484	0.001
デフェンシン (L12691, 8)	8846.362	1376.016	4290.63	844.5093	0.009
KIAA0542 タンパク質 (AB01114, 22q12.2)	2017.074	946.1356	8857.14	1124.027	0.01
β 2-ミクログロブリン					

30

【表 5 - 4】

(S82297, 15q21-q22.2)	6333.009	3069.832	28707	3191.635	0.01
グランザイム B 前駆体 (m57888, 14q11.2)	1746.806	232.9423	957.865	111.5382	0.016
サイモシン, $\beta 4$ (m17733, Xq21.3-q22)	18450.77	2309.75	31440.1	2229.507	0.02
HLA クラス I 重鎖 (X58536, 6p21.3)	17262.1	2654.092	34519.5	2601.363	0.02
伸長因子 EF-1- α (J04617, 6q14)	15154.59	2826.921	35443.6	2869.217	0.03
EST (A1526078, 20q13.3)	15054.68	1528.611	25434.4	1606.93	0.03
CD98 (M30244, 16q24.3)	5682.373	365.3485	4127.05	234.5741	< 0.0001
核因子 κ -B DNA 結合サブ ユニット (M58603, 4q24)	7222.51	338.3345	5655.56	215.4376	< 0.0001
シグナルトランスデューサ および 転写 4 のアクチベーター (178440, 2q32.2-q32.3)	7142.53	347.9236	5567.9	216.9498	< 0.0001
Nef-関連因子 1 (AJ011896, 5q32.3-q33.1)	10042.95	525.3091	8829.79	312.5778	< 0.0001
CD44 抗原 (L05424, 11p13)	6209.805	263.4941	5019.8	163.5661	< 0.0001
(2'-5')オリゴアデニレ ートシンテターゼ (AJ225089, 12q24.2)	3611.673	259.3965	1756.89	225.7237	< 0.0001
インターフェロン調節因子 7 イソ型 a (U53831, 11p15.5)	2841.19	237.6626	1681.36	160.3967	< 0.0001
インターフェロン誘導性タ ンパク質 p78 (M33882, 21q22.3)	4426.94	533.6766	1780.97	325.196	< 0.0001
インターフェロン誘導性 1-8U 遺伝子 (X57352, 11)	5763.147	1332.153	4255.33	398.2605	< 0.0001
インターフェロン刺激遺伝 子 (20kd) (U88964, 15q26)	6082.724	624.8853	4290.37	330.7253	< 0.0001
インターフェロン-刺激タ ンパク質, 15 kDa (M13755, 1)	10922.46	1395.841	4956.73	622.4254	< 0.0001
CD44 イソ型 RC (AF09861, 11p13)	5146.13	287.7974	3879.53	144.6777	< 0.0001
CD83 抗原 (Z11697, 6p23)	9242.953	350.8769	7918.24	339.6289	< 0.0001
インターフェロン刺激応答 エレメント (U22970, 1p36)	3203.982	495.8736	1631.66	281.1401	0.0001
TNF レセプター-関連因子 1 (U19261, 9q33-q34)	5005.59	208.4321	4098.21	179.4619	0.0002
接着分子ニンジュリン 1 (U91512, 9q22)	3715.181	268.8716	3157.01	122.5063	0.0003
TNF レセプター-関連因子 1 (U19261, 9q33-q34)	2364.498	96.09024	2096.81	78.13522	0.0007
転写因子 ISGF-3					

10

20

30

【表 5 - 5】

(M97936, 2q32.2)	1760.116	279.2687	1217.01	143.1016	0.014
インターロイキン7レセプター (AF043129, 5p13)	2027.312	184.3109	2307.75	174.5007	0.02
インターロイキン8 (M28130, 4q13-q21)	13608.48	1609.251	17969.3	1448.031	0.02
GRO2 オンコジーン (M35820, 4q21)	6961.234	707.7638	5737.08	415.0885	0.001
テトラトコペプチドレピート1 を有するインターフェロン- 誘導タンパク質 (M24594, 10q25-q26)	1572.879	319.6902	713.604	178.921	0.009
テトラトコペプチドレピート4を有 するインターフェロン-誘導タンパク質 (AF026939, 10q24)	1759.121	304.6315	828.759	214.6707	0.005
マクロファージコロニー刺激因子1 (m37435, 1p21-p13)	3364.842	117.2874	4029.78	110.6731	0.04
Ras インヒビター (m37190, 20)	1611.356	177.1993	860.944	120.8235	0.0003
小誘導性サイトカインA2 (M28225, 17q11.2-q21.1)	10048.81	755.9874	8072.22	495.8341	0.007
シクロオキシゲナーゼ-2 U04636, 1q25.2-q25.3)	3765.675	255.1504	2568.34	233.2174	< 0.0001
トランスフォーミング増殖因子、βレ セプターII(70-80kD) (D50683, 3p22)	740.8099	79.60563	844.935	86.39076	0.04
サイクリックAMP-応答 エレメントモジュレーターβ イソ型 (S681634, 10p12.1-p11.1)	6531.873	386.0808	5686.2	268.2961	0.017
インターロイキン1レセプターアンタゴニスト (X52015, 2q14.2)	13211.16	1126.502	9535.15	642.7608	< 0.0001
インターロイキン6 (X04430, 7p21)	13482.49	852.9056	10099.2	625.5049	< 0.0001
Nef-関連因子1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	5100.91	671.4467	4788.67	294.8366	0.004
小誘導性サイトカインA7 (X72308, 17q11.2-q12)	766.0895	165.4574	686.035	91.85867	0.02
小誘導性サイトカインA2 (M26683, 17q11.2-q21.1)	17108.01	1043.492	12566.7	742.7468	0.003

10

20

表 5C.

	GC 有りでの L-1/TNF-誘導発現値				
	GC 耐性		GC 感受性		
	(n=30)		(n=66)		P 値
平均	SEM	平均	SEM		
遺伝子(Genbank, マップ)					
パーフォリン 1 (M28393, 10q22)	5932.6836	324.4973	4613.415	214.7653	0.0007
腫瘍壊死因子 レセプター 2 (75kD) (M32315, 1p36.3-p36.2)	7508.2896	451.0622	6416.635	365.9207	0.0731
LPS-誘導 TNF-α					

30

【表 5 - 6】

因子 (AF010312, 16p13.3-p12)	5786.222	306.7707	4946.478	171.3137	0.0127
フェレシリン (L12691, 8)	11441.772	1372.689	7818.661	922.0382	0.0251
KIAA0542 タンパク質 (AB011114, 22q12.2)	5714.3643	1558.592	9333.106	1256.301	0.0201
β 2-ミクログロブリン (S82297, 15q21-q22.2)	13301.895	2780.221	30811.06	3742.183	0.0027
グランザイム B 前駆体 (M57888, 14q11.2)	1877.4227	216.4729	1227.949	107.5656	0.003
サイモシン, β 4 (M17733, Xq21.3-q22)	19120.795	1911.539	26315.6	1943.828	0.019
HLA クラス I 重鎖 (X58536, 6p21.3)	22299.861	2913.894	34067.19	3096.341	0.0145
伸長因子 EF-1- α (J04617, 6q14)	18670.865	3364.731	33042.49	3553.801	0.0015
EST (AI526078, 20q13.3)	17650.287	1587.158	25903.59	1771.242	0.0032
CD98 (M80244, 16q24.3)	5768.97	406.1578	4463.957	177.7024	0.0011
核因子 κ -B DNA 結合 サイト (M58603, 4q24)	6144.28	307.2589	5010.971	179.1457	0.0012
シグナルトランスフェラーゼおよび転写 4 のアガチヘター (L78440, 2q32.2-q32.3)	6800.764	284.0342	5744.643	184.6763	0.0021
NeF-関連因子 1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	9655.332	495.7066	8075.491	259.7791	0.0026
CD44 抗原 (L05424, 11p13)	4486.082	168.28	3818.656	133.3167	0.0042
(2'-5')オリゴアデニレートシンターゼ (AJ225089, 12q24.2)	1667.9843	164.3503	1064.525	130.1923	0.0054
インターフェロン調節因子 7 イソ型 a (U53831, 11p15.5)	2292.962	205.8358	1611.122	146.0624	0.007
インターフェロン誘導性タンパク質 p78 (M33882, 21q22.3)	2946.7205	383.2516	1801.234	251.7923	0.0099
インターフェロン誘導性 1-80 遺伝子 (X57352, 11)	8983.514	1053.469	6070.849	616.6636	0.0109
インターフェロン刺激遺伝子 (20kD) (U88964, 15q26)	6519.748	401.4738	5387.727	239.7823	0.012
インターフェロン-刺激タンパク質, 15 kDa (m13755, 1)	6071.2886	915.0679	3757.143	548.3279	0.021
CD44 イソ型 RC (AF098641, 11p13)	3719.6047	178.2906	3236.746	115.0394	0.0225
CD83 抗原 (Z11697, 6p23)	4931.093	295.5049	4274.713	230.1791	0.0354
インターフェロン刺激応答エレメント (U22970, 1p36)	2737.275	346.7752	1615.407	174.2281	0.011
TNF レセプター-関連因子 1 (U19621, 9q33-	3581.1409	185.2364	2935.34	116.3565	0.0027

10

20

30

【表 5 - 7】

q34)					
接着分子 ニンジュリン1 (U01512, 9q22)	3173.9238	222.309	2405.162	110.9695	0.0008
TNF レセプター関連因子 1 (U19261, 9q33-q34)	1790.2013	89.11578	1506.127	60.22232	0.0085
転写因子 ISGF-3 (M97936, 2q32.2)	1490.314	178.5814	1048.989	102.7824	0.0212
インターロイキン-7 レ セプター (AF043129, 5p13)	3344.87	271.804	4565.661	279.8599	0.0057
インターロイキン 8 (M28130, 4q13-q21)	12848.457	926.3713	14222.37	992.1271	ns**
GRO2 オンコジーン (M36820, 4q21)	5052.562	564.9373	4225.244	349.2652	ns**
テトラトリコペプチドリ ピート1を有するインタ ーフェロン-誘導タンパ ク質 (M24594, 10q25-q26)	1094.8508	209.4019	672.1904	127.6253	ns**
テトラトリコペプチドリ ピート4を有するインタ ーフェロン-誘導タンパ ク質 (AF026939, 10q24)	1109.5538	162.5891	743.2253	123.5186	ns**
マクロファージコロニー 刺激因子1 (M37435, 1p21-p13)	3624.9211	172.8444	3983.53	132.856	ns**
Ras インヒビター (M37190, 20)	1615.0812	183.4838	1285.366	118.4882	ns**
小誘導性サイトカイン A2 (M28225, 17q11.2- q21.2)	3485.5967	409.9117	2908.787	418.8578	ns**
シクロオキシゲナーゼ-2 (U04636, 1q25.2-q25.3)	1004.8341	151.2995	1012.272	148.0441	ns**
トランスフォーミング増殖因子, βレプター II (70-80kD) (D50683, 3p22)	998.71014	94.93384	1135.562	93.18079	ns**
サイクリック AMP-応答 エレメント調節剤 βイソ型 (S68134, 10p12.2-p11.1)	4027.2566	290.9312	4019.365	190.1472	ns**
インターロイキン1レセプターアソシ エイト (X52015, 2q14.2)	4454.89	509.2246	3887.395	543.3725	ns**
インターロイキン 6 (X04430, 7p21)	6479.466	737.0165	5473.95	617.1881	ns**
Nef-関連因子1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	5710.245	619.1145	5202.576	322.5588	ns**
小誘導性サイトカイン A7 (X72308, 17q11.2-q12)	283.77304	23.31367	334.6954	61.4575	ns**
小誘導性サイトカイン A2 (M26683, 17q11.2- q21.1)	5850.6055	630.0103	4954.649	646.567	ns**

10

20

30

【表 5 - 8】

表 5D.

Genbank	セット1/2	系統	共通	説明	マップ
AL049963	40456_at			供給源: <i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp564A132 (クローン DKFZp564A132 由来)	4
S68134	32066_g_at	CREM		CREM-β	10p12.1-p11.1
M58603	1378_g_at	KBF1		ヒト核因子 κ-B DNA 結合サブユニット (NF-κβ) mRNA, 完全な cds	4q24
M13755	1107_s_at	ISG15		17-kDa タンパク質	1
L31584	1097_s_at	EBI1	BLR2 CMKBR7	供給源: ヒト G 蛋白-結合レセプター (EBI 1) 遺伝子エクソン 3	17q12-q21.2
AF022375	36100_at	VEGFA		<i>H. sapiens</i> 血管内皮増殖因子 mRNA, 完全な cds.	6p12
M58603	1377_at	KBF1		ヒト核因子 κ-B DNA 結合サブユニット (NF-κβ) mRNA, 完全な cds	4q24
M58603	38438_at	KBF1		ヒト核因子 κ-B DNA 結合サブユニット (NF-κβ) mRNA, 完全な cds	4q24
U88964	33304_at	HEM45		低レベルエストロゲン調節; 抗-βグロブリン血清により検出された ORF に由来	15q26
L08177	931_at	EBI2		エプスタイン・バーウイルス誘導遺伝子 2 (リンパ球-特異的 G 蛋白-結合レセプター)	13
D67031	33102_at	ADDL		供給源: アデュージン (adducin) 様タンパク質に対する <i>H. sapiens</i> ADDL mRNA, 完全な cds.	10q24.2-q24.3
AL021977	36711_at	HS506A	DKFZP586A1024	C22orf5	22q12
V01512	1916_s_at	c-fos		供給源: ヒト細胞オンコジーン c-fos (完全な配列).	14q24.3
X59417	36122_at	IOTA	PROS27	供給源: <i>H. sapiens</i> PROS-27 mRNA	14q13
		HH			
		BASELINE			
		Rest ()*S			
Genbank	系統	共通		説明	マップ
X02910	1852_at	TNFA	DIF TNFSF2	腫瘍壊死因子	6p21.3
M15330	39402_at	IL1B		供給源: ヒトインターロイキン 1-β (IL1B) mRNA, 完全な cds	2q14
J04130	36674_at	MIP-1-BETA		SCYA4, MIP1B	17q21
M28130	1369_s_at	IL8		供給源: ヒトインターロイキン 8 (IL8) 遺伝子, 完全な cds	4q13-q21
D90144	36103_at	MIP1A	SCYA3	MIP1A	17q11-q21
S81914	1237_at	IEX-1		放射誘導性極初期遺伝子	6p21.3
L11329	1292_at	PAC-1	PAC1	PAC-1; 推定	2q11
M57888	32370_at	CSPB	CTLA1 CCPI	供給源: ヒト (クローン λ B34)	14q11.2
		CGL-1	CSP-B	細胞傷害性 T-リンパ球-関連セリンエステラーゼ 1 (CTLA1) 遺伝子完全な cds	

10

20

30

【表 5 - 9】

M16441	259_s_at	TNFSF1 TNFB LT	リンフトキシン	6p21.3
X68277	1005_at	CL 100	供給源: タンパク質チロシンホスファターゼに対する <i>H. sapiens</i> CL100mRNA	5q34
X78992	32588_s_at	ERF2 TIS11D	供給源: <i>H. sapiens</i> ERF-2 mRNA	2
L12691	31506_s_at	DEF3 HNP-3	デフェンシン	8
Z11697	37536_at	CD83	鉗合小網細胞、ランゲルハンス細胞および活性化リンパ球により発現された細胞表面分子。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー	6p23
M69199	38326_at	GOS2	供給源: ヒト GOS2 タンパク質遺伝子, 完全な cds	1q32.2-q41
M17017	35372_r_at	MDNCF SCYB8 IL8	IL8	4q13-q21
U09937	189_s_at	URKR UPAR CD87	供給源: ヒトウロキナーゼ型プラスミノージェンレセプター, エキソン7	19q13
U27467	2002_s_at	BCL2L5 BFL1 GRS HBPA1	Bcl-2 関連; マウス造血特異的初期応答タンパク質に類似, Swiss-Prot 寄託番号 Q07440; マウストランスフォーミングタンパク質 Bcl-2-β に類似, Swiss-Prot 寄託番号 P10418; 方法: 概念翻訳	15q24.3
AL022315	37456_at	dJ1177I5.1	予測エキソンマッチによりサポート: ESTs: Em:AA316883	22q13.1
M59465	595_at	TNFAIP2 A20	腫瘍壊死因子 α 誘導タンパク質	6
U04636	1069_at	hCox-2	供給源: <i>H. sapiens</i> シクロオキシゲナーゼ-2 (hCox-2) 遺伝子, 完全な cds	1q25.2-q25.3

10

表 5E.

Genbank	共通	産物	キーワード	Custom Field 2
AL049963				D4S1572
S68134	CREM	サイクリック AMP-応答性エレメント モジュレーター		D10S208
		β イソ型		
M58603	KBF1	核因子 κ-B DNA 結合サブユニット	核因子 κ-B DNA	D4S1572
			結合サブユニット	
M13755	ISG15	インターフェロン-刺激タンパク質, 15 kDa	インターフェロン; インターフェロン-	D8S264
			誘導タンパク質	
L31584	EBI1 BLR2 CMKBR7	ケモカイン (C-C モチーフ) レセプター-7	G 蛋白-結合レセプター	#N/A
AF022375	VEGFA	血管内皮増殖因子		D6S282
M58603	KBF1	核因子 κ-B DNA 結合サブユニット	核因子 κ-B DNA 結合サブユニット	D4S1572
M58603	KBF1	B 細胞 1 における κ 軽ポリペプチド遺伝子エンハンサー	核因子 κ-B DNA 結合サブユニット	D4S1572

20

30

【表 5 - 10】

		一の核因子 (p105)		
U88964	HEM45	インターフェロン刺激遺伝子 20kD		#N/A
L08177	EBI2	エプスタイン・バルウイルス誘導遺伝子 2 (リンパ球-特異的 G 蛋白-結合レセプター)		D13S1298
D67031	ADDL	アデューシン 3, イソ型 a	アデューシン様タンパク質; ADDL	D10S597
AL021977	HS506A	染色体 22 オープンリーディングフレーム 5	HTG; CpG 島; MAFK	#N/A
	DKFZP586A1024			
V01512	c-fos	v-fos FBJ 系 ¹ 骨肉腫 ² 対 ³ コジーン ⁴ ホモ ⁵	オンコジーン	#N/A
X59417	IOTA PROS27	前体部 P27K タンパク質	PROS-27 遺伝子; 前体部コンセンサス; 前体部タンパク質; RNA-結合タンパク質	#N/A
Genbank	共通	産物	キーワード	Custom Field 2
X02910	TNFA DIF TNFSF2	腫瘍壊死因子 (カケクチン)	シグナルペプチド; 腫瘍壊死因子	#N/A
M15330	IL1B	インターロイキン 1β	インターロイキン-1β	D2S160
J04130	MIP-1-BETA	小誘導性サイトカイン A4 (マウス Mip-1β に相同)	act2 遺伝子; 免疫活性化遺伝子	D17S933
M28130	IL8	インターロイキン 8	インターロイキン 8	#N/A
D90144	MIPα SCYA3	小誘導性サイトカイン A3 (マウス Mip-1α に相同)	LD78; LD78 α; サイトカイン; 誘導遺伝子ファミリー; 分泌ペプチド	#N/A
S81914	IEX-1	極初期応答 3		D6S1660
L11329	PAC-1 PAC1	タンパク質チロシンホスファターゼ	タンパク質チロシンホスファターゼ ¹ ; チロシンホスファターゼ ²	D2S2264
M57888	CSPB CTLA1 CCP1 CGL-1 CSP-B	グランザイム B 前駆体	細胞傷害性 T-リンパ球-関連セリンエステラーゼ 1	#N/A
M16441	TNFSF1 TNFB LT	リンフォトキシン α 前駆体	リンフォトキシン; 腫瘍壊死因子	#N/A
X68277	CL 100	タンパク質チロシンホスファターゼ	チロシンホスファターゼ	#N/A
X78992	ERF2 TIS11D	酪酸応答因子 2 (EGF-応答因子 2)	ERF-2 遺伝子	D2S2259
L12691	DEF3 HNP-3	デフェンシン, α3, 好中球-特異的		#N/A
Z11697	CD83	CD83 抗原 (活性化 B リンパ球, 免疫グロブリン スーパーファミリー)	IB15 遺伝子; 免疫グロブリン スーパーファミリー	D6S259
M69199	GOS2	推定リンパ球 G0/G1 スイッチ遺伝子	GOS2 タンパク質	#N/A
M17017	MDNCF SCYB8 IL8	インターロイキン 8	β-トロンボグロブリン	D4S3042
U09937	URKR UPAR CD87	プラスミノーゲンアクチベーター, ウロキナーゼレセプター		#N/A
U27467	BCL2L5 BFL1 GRS	BCL2 関連タンパク質 A1		D15S1005

10

20

30

【表 5 - 1 1】

	HBPA1			
AL022315	dJ117715.1	レクチン, ガラクトシド-結合, 可溶性, 2 (ガレクチン 2)	HTG; CpG 島; ガレクチン; レクチン LGALS2; MSE55	#N/A
M59465	TNFAIP2 A20	腫瘍壊死因子, α-誘導タンパク質 3		#N/A
U04636	hCox-2	シクロオキシゲナーゼ-2		#N/A

【0082】

40

本発明をその好ましい態様を参照して詳細に示し、記載したが、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲を逸脱することなく、形態および詳細において種々の変更がなされることが当業者により理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】図 1 は、14 の糖コルチコイド耐性 (GC-R) および 14 の糖コルチコイド感受性患者の薬物応答表現型の予測におけるナイーブベイジアン分類の予測の正確性を示す代表的なベイジアンマトリックスプロットである。

【図 2】図 2 は、54 名の全ての患者が分類のトレーニングに含まれた場合の GC-R および GC-S 患者の薬物応答表現型の予測におけるナイーブベイジアン分類の予測の正確性を示す代

50

表的なベイジアンマトリックスプロットである。

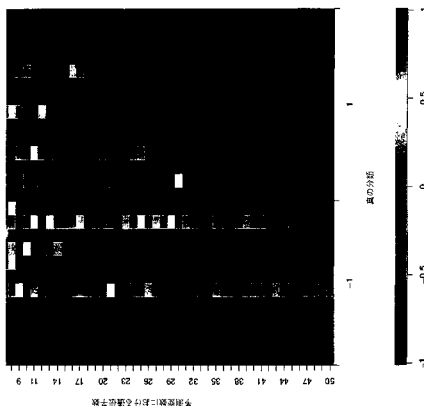
【図3】図3は、遺伝子選択のプロセスまたは分類のトレーニングにおいて使用されない14名のGC-R患者の独立したコホートの薬物応答表現型の予測におけるナイーブベイジアン分類の予測の正確性を示す代表的なベイジアンマトリックスプロットである。

【図4】図4は、88名の患者において調査した15遺伝子(表5参照)の差次的発現を示す代表的なマトリックスプロットである。上記に挙げられた遺伝子に加えて、その全てが予測されるウェイトを保有する、これらの15の遺伝子は、トレーニングセットに関する誘導時間点を用いて非応答者からGC応答者のコホートを最も正確に区別した。合わせて、これらの遺伝子は、86%の正確性で等しいサイズの独立した患者コホートの正確なGC応答表現型を予測した。

【図5】図5は、「一点除外交差検証法」(L00CV)法を用いた12名のロイコトリエン感受性(LT-S)および12名のロイコトリエン耐性(LT-R)患者のコホートの薬物応答表現型の予測におけるナイーブベイジアン分類の予測の正確性を示すプロットである。選択された12遺伝子は、90%より高い正確性で正確な薬物応答表現型を予測した。

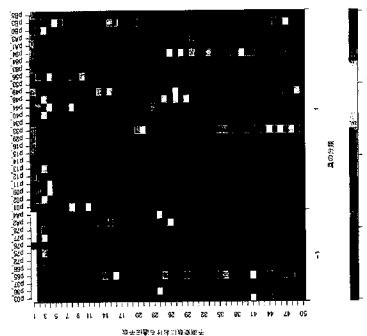
【図1】

Fig.1



【図2】

Fig.2



【 図 3 】

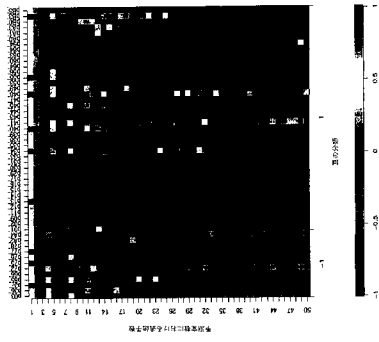


Fig. 3

【 図 4 】

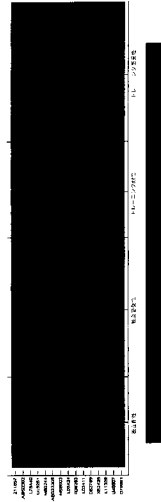


Fig. 4

【 図 5 】

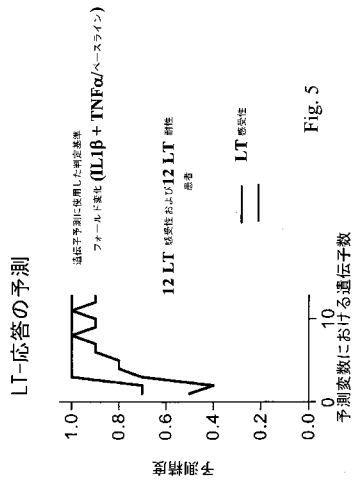


Fig. 5

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/021261 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/50
- (21) International Application Number: PCT/IB02/03613
- (22) International Filing Date: 2 September 2002 (02.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/947,991 6 September 2001 (06.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/947,991 (CIP) US Filed on 6 September 2001 (06.09.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): DECODE GENETICS EHF. [IS/IS]; Storigotu 8, IS-101 Reykjavik (IS).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): HAKONARSON, Hakon [IS/IS]; Grjotasei 3, IS-109 Reykjavik (IS).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:** without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/021261 A2

(54) Title: METHODS FOR PREDICTING DRUG SENSITIVITY IN PATIENTS AFFLICTED WITH AN INFLAMMATORY DISEASE

(57) Abstract: Methods are disclosed for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient, including: obtaining a sample of cells from the patient; obtaining a gene expression profile of the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells with specific cytokines and/or mediators; and comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile, wherein similarities between the sample expression profile and the reference expression profile predicts the efficacy of the drug for treating the inflammatory disease in the patient.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-1-

METHODS FOR PREDICTING DRUG SENSITIVITY IN PATIENTS
AFFLICTED WITH AN INFLAMMATORY DISEASE

RELATED APPLICATION

This application is a continuation-in-part of U.S. Application No.
5 09/947,991, filed September 6, 2001. The entire teachings of the above application
are incorporated herein by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The field of pharmacogenomics measures differences in the effect of
medications that are caused by genetic variations. Such differences are manifested
10 by differences in the therapeutic effects or adverse events of drugs. For most drugs,
the genetic variations that potentially characterize drug-responsive patients from
non-responders remain unknown.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for determining a patient's
15 responsiveness to treatment for asthma and related inflammatory conditions.

In one embodiment, the invention is directed to a method for predicting the
efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient,
comprising: obtaining a sample of cells from the patient; obtaining a gene expression
profile of the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells
20 with specific mediators; and comparing the gene expression profile of the sample
with a reference gene expression profile, such that similarities between the sample
expression profile and the reference expression profile predicts the efficacy of the
drug for treating the inflammatory disease in the patient. The reference gene
expression profile can comprise expression levels of one or more informative genes
25 listed in Tables 1, 2A, 2B, 4A, 4B and 5A-5E. The similarity between the sample

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-2-

expression profile and the reference expression profile predicts the efficacy of the drug for treating the inflammatory disease in the patient. In a particular embodiment, the sample is exposed to the drug for treating the inflammatory disease prior to obtaining the gene expression profile of the sample. In a particular

5 embodiment, the sample is exposed to the drug for treating the inflammatory disease prior to obtaining the gene expression profile of the sample. The inflammatory disease can be asthma, atopy, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, psoriasis, inflammatory bowel disease (IBD) and sepsis. The atopic inflammatory disease can be rhinitis, conjunctivitis, dermatitis and eczema. Drugs can be

10 corticosteroids, β 2-agonists and leukotriene antagonists for asthma. In addition, for inflammatory diseases, the drug can be a symptom reliever or anti-inflammatory drug for an inflammatory disease condition. In one embodiment, the sample of cells can be derived from peripheral blood mononuclear cells or neutrophils. In a particular embodiment, the gene expression profile of the sample can be obtained

15 using a hybridization assay to oligonucleotides contained in, for example, a microarray. In another embodiment, the expression profile of the sample can be obtained by detecting the protein product of informative genes. The detection of protein products can include the use of, for example, antibodies capable of specifically binding protein products of the informative genes. The reference

20 expression profile can be, for example, that of cells derived from healthy, non-atopic, non-asthmatic individuals. In another embodiment, the reference expression profile can be that of cells derived from patients that do not have an inflammatory disease. In one embodiment, the cells are treated with the drug candidate before the expression profile is obtained.

25 In yet another embodiment, the invention is directed to a method of screening for glucocorticoid sensitivity in an asthmatic patient including: obtaining a sample of cells from the patient; obtaining a gene expression profile from the sample in the absence and presence of *in vitro* activation of the cells with specific cytokines (mediators); and comparing the gene expression profile of the sample with a

30 reference gene expression profile, wherein similarity in expression profiles between the sample and reference profiles indicates glucocorticoid sensitivity in the patient from whom the sample was obtained.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-3-

In yet another embodiment, the invention is directed to a method for predicting efficacy in a human asthmatic patient of leukotriene antagonists, including: obtaining a sample of cells from the patient; obtaining a gene expression profile from the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells with specific mediators; and comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile, wherein similarity in expression profiles between the sample and reference profiles predicts the efficacy in the human asthmatic patient of leukotriene antagonists.

In another embodiment, the invention is directed to an expression profile comprising expression levels of gene products from one or more genes described in Tables 1, 2A, 2B, 4A, 4B and 5A-5E.

In another embodiment, the invention is directed to a method for predicting the efficacy in a human asthma patient of leukotriene antagonists including, but not limited to, montelukast (a.k.a., SINGULAIR™; Merck, Whitehouse Station, NJ), zafirlukast (a.k.a., ACCOLATE™, AstraZeneca, Wilmington, DE), and zileuton (a.k.a., ZYFLO™; Abbott Laboratories, Chicago, IL), comprising: obtaining a sample of cells from the patient; obtaining a gene expression profile from the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells with specific mediators; and comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile, wherein similarity in expression profiles between the sample and reference profiles predicts the efficacy in the human asthmatic patient of leukotriene antagonists.

In another embodiment, the invention is directed to a kit for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient according to the methods described herein comprising hybridization probes capable of hybridizing to polynucleotides corresponding to pre-determined informative genes and reagents for detecting hybridization. In a different embodiment, the invention is directed to a kit for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient according to the methods described herein comprising antibodies capable of specifically binding protein products of pre-selected informative genes and reagents for detecting antibody binding.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-4-

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The patent or application file contains at least one drawing executed in color. Copies of this patent or patent application publication with color drawings will be provided by the Office upon request and payment of the necessary fee.

5 The foregoing and other objects, features and advantages of the invention will be apparent from the following more particular description of preferred embodiments of the invention, as illustrated in the accompanying drawings.

FIG. 1 is a representative Bayesian matrix plot demonstrating the predictive accuracy of a naïve Bayesian classifier in predicting drug response phenotypes of 14
10 glucocorticoid resistant (GC-R) and 14 glucocorticoid sensitive (GC-S) patients. The 50 genes predicted the correct drug response phenotype with 82% accuracy.

FIG. 2 is a representative Bayesian matrix plot demonstrating predictive accuracy of a naïve Bayesian classifier in predicting drug response phenotype of GC-R and GC-S patients when all 54 patients were included in training the classifier.
15 Fifty genes were selected that predicted the correct drug response phenotype with 81% accuracy.

FIG. 3 is a representative Bayesian matrix plot demonstrating the predictive accuracy of a naïve Bayesian classifier in predicting a drug response phenotype of an independent cohort of 14 GC-R patients that were not used in the process of gene
20 selection or in training of the classifier. The 50 genes selected predicted the correct drug response phenotype with 86% accuracy.

FIG. 4 is a representative matrix plot showing the differential expression of 15 genes (see Table 5) that were examined in 88 patients. In addition to the genes listed above, all of which carry a predicted weight, these 15 genes most accurately
25 differentiated a cohort of GC responders from non-responders using the induction time point for the training set. Together, these genes predicted the correct GC response phenotype of an independent patient cohort of equal size with 86% accuracy.

FIG. 5 is a plot demonstrating predictive accuracy of a naïve Bayesian
30 classifier in predicting the drug response phenotype of a cohort of 12 Leukotriene Sensitive (LT-S) and 12 Leukotriene Resistant (LT-R) patients using the "leave one

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-5-

out cross validation" (LOOCV) method. The 12 genes selected predicted the correct drug response phenotype with over 90% accuracy.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A description of preferred embodiments of the invention follows.

5 The present invention is directed to methods for predicting efficacy of drug treatment in asthma patients and to methods for screening drug candidates useful in treating inflammatory diseases. Current methods of treating asthma involve the use of corticosteroids, β 2-agonists or leukotriene antagonists. Although asthma has been treated by these methods for several years, a significant fraction of asthma patients
10 are resistant to treatment. As there are risks associated with methods for treating asthma, identification of patients that will be responsive to treatment is important. Methods described herein are used to identify genes that are differentially expressed in responsive patients when compared to non-responsive patients, thereby allowing for a convenient determination of patients that are responsive to treatment.
15 Described herein are methods for activating in cultured cells obtained from patient samples and methods for utilizing said cultured cells for drug screening and obtaining expression profiles.

Asthma, or Reversible Obstructive Airway Disease (ROAD), is a condition in which the airways of the lungs become either narrowed or completely blocked,
20 impeding normal breathing and leading to potentially more severe health problems. Although normal airways have the potential for constricting in response to allergens or irritants, the asthmatic's airways are oversensitive or hyper-reactive. In response to stimuli, the airways may become obstructed by one of the following: constriction of the muscles surrounding the airway; inflammation and swelling of the airway; or
25 increased mucus production that clogs the airway. Once the airways have become obstructed, it takes more effort to force air through them, so that breathing becomes labored. Because exhaling through the obstructed airways is difficult, too much stale air remains in the lungs after each breath. This accumulation of stale air decreases the amount of fresh air that can be taken in with each new breath, so not
30 only is there less oxygen available for the whole body, the high concentration of

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-6-

carbon dioxide in the lungs causes the blood supply to become acidic as well. This acidity in the blood may rise to toxic levels if the asthma remains untreated.

Although asthma creates difficulties in breathing and can lead to more serious problems, the lung obstruction associated with asthma is reversible, either
5 spontaneously or with medication. Asthmatics can take anti-inflammatory agents such as corticosteroids, bronchodilators and leukotriene antagonists to reduce inflammation and asthma symptoms.

Corticosteroids are sometimes also referred to as "steroids." This type of medication is not related to the anabolic steroids that are misused by some athletes to
10 increase performance. Rather, corticosteroids have been used as a treatment for asthma and allergies since 1948. They decrease airway inflammation and swelling in the bronchial tubes; reduce mucus production by the cells lining the bronchial tubes; decrease the chain of overreaction (hyper-reactivity) in the airways; and help the airway smooth muscle respond to other medications. Corticosteroids can be
15 administered in a variety of ways, such as through the use of an inhaler, topically, orally, or through injection. Topical preparations (on specific surface areas such as skin or the lining of the bronchial tubes) may be applied as creams or sprays (inhalers). Corticosteroid inhalers are recommended for patients with daily, moderate or severe asthma symptoms. Oral corticosteroids and injected
20 corticosteroids are generally only prescribed for those with severe asthma symptoms.

Although the use of corticosteroids has been commonplace for several years, they are not always effective and significant side effects do occur. Some people experience minor side effects of hoarseness and thrush (a fungal infection of the mouth and throat) from using corticosteroid inhalers. Also, long-term use of inhaled
25 corticosteroids has been implicated in reduced growth velocity in children. Oral corticosteroids can have more side effects than inhaled corticosteroids. Oral corticosteroids are prescribed for long durations only when other treatments have failed to restore normal lung function and the risks of uncontrolled asthma are greater than the side effects of the steroids. For example, prednisone, one of the
30 most commonly prescribed corticosteroids, can lead to possible side effects of weight gain, increased appetite, menstrual irregularities and cramps, heartburn, and indigestion. Some patients experience side effects such as loss of energy, poor

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-7-

appetite, and severe muscle aches or joint pains when their dosage of cortisone tablets is decreased. Long-term oral corticosteroid use may cause side effects such as ulcers, weight gain, cataracts, weakened bones and skin, high blood pressure, elevated blood sugar, easy bruising and decreased growth in children. Such side effects indicate a need to accurately assess the efficacy of corticosteroid treatment in asthmatic patients.

Bronchodilators, also called " β 2-agonists", are non-steroidal anti-inflammatory medications often used as short-term "rescue" medications to immediately relieve asthma symptoms. Bronchodilators include albuterol, bitolterol, pirbuterol and terbutaline. Additionally, salmeterol is a long-acting β 2-agonist that is intended to be used on a long-term basis, along with an anti-inflammatory medication, for controlling asthma. Those using salmeterol should take the medication on a daily basis, even if they are feeling fine, as it prevents symptoms. Although sporadically effective, bronchodilators are not typically useful in cases of severe asthma.

Many of the cells involved in causing airway inflammation are known to produce signaling molecules within the body called "leukotrienes." Leukotrienes are responsible for causing the contraction of the airway smooth muscle, increasing leakage of fluid from blood vessels in the lung, and further promoting inflammation by attracting other inflammatory cells into the airways. Oral anti-leukotriene medications have been introduced to fight the inflammatory response typical of allergic disease. These drugs are used in the treatment of chronic asthma. Recent data demonstrates that prescribed anti-leukotriene medications can be beneficial for many patients with asthma, however, a significant number of patients do not respond to anti-leukotriene drugs.

The present invention relates to methods for determining the treatment outcome of drugs used to treat inflammatory conditions such as asthma. The methods rely on the identification of genes that are differentially expressed in samples obtained from patients and are associated with clinical responsiveness to the drug under study. The particular genes, herein referred to as "informative genes," are identified in cells that have been induced to mimic the disease condition (e.g., asthma), or in tissue samples from patients diagnosed with asthma or other

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-8-

inflammatory diseases. Informative genes can be identified, for example, by determining the ratio of gene expression in induced versus uninduced cells and comparing the results between patients with variable drug sensitivity. Alternatively, informative genes can be identified based on the ratio of gene expression in disease

5 versus normal tissue samples, or, in the case of informative genes used to identify drug responsiveness, informative genes can be identified by the ratio of gene expression in cells exposed to the drug versus cells not exposed to the drug, in subjects who qualify as responders versus non-responders to the drug. A ratio of 1.0 would indicate the gene is expressed at the same level in both samples. Ratios

10 greater than one indicate increased expression over normal or uninduced cells, whereas ratios less than one indicate reduced expression relative to normal or uninduced cells.

A subset or all informative genes can be assayed for gene expression in order to generate an "expression profile" for responsive versus non-responsive patients.

15 As used herein, an "expression profile" refers to the level or amount of gene expression of one or more informative genes in a given sample of cells at one or more time points. A "reference" expression profile is a profile of a particular set of informative genes under particular conditions such that the expression profile is characteristic of a particular condition. For example, a reference expression profile

20 that quantitatively describes the expression of the informative genes listed in Tables 1, 2A, 2B, 4A, 4B and 5A-5E can be used as a reference expression profile for drug treatment responsiveness. In one embodiment, expression profiles are comprised of the fifty informative genes that exhibit differential expression, and provide sufficient power to predict the responsiveness to the drug with high accuracy. Other

25 embodiments can include, for example, expression profiles containing about 5 informative genes, about 25 informative genes, about 100 informative genes, or any number of genes in the range of about 5 to about 400 informative genes. The informative genes that are used in expression profiles can be genes that exhibit increased expression over normal cells or decreased expression versus normal cells.

30 The particular set of informative genes used to create an expression profile can be, for example, the genes that exhibit the greatest degree of differential expression, or they can be any set of genes that exhibit some degree of differential expression and

provide sufficient power to accurately predict the responsiveness to the drug. The genes selected are those that have been determined to be differentially expressed in either a disease, drug-responsiveness, or drug-sensitive cell relative to a normal cell and confer power to predict the response to the drug. By comparing tissue samples
5 from patients with these reference expression profiles, the patient's susceptibility to a particular disease, drug-responsiveness, or drug-resistance can be determined.

The generation of an expression profile requires both a method for quantitating the expression from informative genes and a determination of the informative genes to be screened. The present invention describes screening specific
10 changes in individuals that affect the expression levels of gene products in cells. As used herein, "gene products" are transcription or translation products that are derived from a specific gene locus. The "gene locus" includes coding sequences as well as regulatory, flanking and intron sequences. Expression profiles are descriptive of the level of gene products that result from informative genes present in cells. Methods
15 are currently available to one of skill in the art to quickly determine the expression level of several gene products from a sample of cells. For example, short oligonucleotides complementary to mRNA products of several thousand genes can be chemically attached to a solid support, *e.g.*, a "gene chip," to create a "microarray." Specific examples of gene chips include Hu95GeneFL (Affymetrix,
20 Santa Clara, CA) and the 6800 human DNA gene chip (Affymetrix, Santa Clara, CA). Such microarrays can be used to determine the relative amount of mRNA molecules that can hybridize to the microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA): This hybridization assay allows for a rapid determination of gene expression in a cell sample. Alternatively, methods are known to one of skill in the art for a variety of
25 immunoassays to detect protein gene expression products. Such methods can rely, for example, on conjugated antibodies specific for gene products of particular informative genes.

Informative genes can be identified, for example, in samples obtained from individuals identified through database screening to have a particular trait, *e.g.*,
30 glucocorticoid sensitivity (GC-S) or glucocorticoid resistance (GC-R). In addition, informative genes identified in cultured cells can be verified by obtaining expression profiles from samples of known asthma patients that are either responsive or non-

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-10-

responsive to a particular drug treatment. An example of a combination of obtaining samples from patients and searching particular databases for the genealogical and medical history of the individual from whom the sample was obtained is herein described for the genetically isolated population of Iceland.

5 The population of Iceland offers a unique opportunity to identify genetic elements associated with particular disorders. The unique opportunity is available due to at least three conditions: 1) the Icelandic population is genetically isolated; 2) detailed genealogical records are available; and 3) detailed medical records have been kept dating back to 1915. The identification of differentially expressed genes
10 in responsive versus non-responsive patients would occur after an examination of a patient's genealogical past as well as the medical records of close relatives in addition to data obtained from samples derived from the individual.

An examination of genealogical and medical records identifies modern day individuals with a family history of exhibiting a particular trait. For example,
15 individuals can be found that are asthmatic and that respond to a particular asthma drug treatment, and an examination of a genealogical database might confirm that indeed the individual's close relatives exhibit the same traits, on average, more than the rest of the population. Thus, a tentative conclusion can be drawn that the individual in question likely has genetic determinants that could be used to identify
20 responsive and non-responsive patients. Samples obtained from this individual, combined with samples obtained from other such individuals, are genotyped by any of the methods described above in order to identify informative genes that can subsequently be used to generate reference expression profiles.

Informative genes can also be identified *ex vivo* in cells derived from patient
25 samples. For example, a tissue sample can be obtained from a patient and cells derived from this sample can be cultured *in vitro*. The cells can be cultured in the presence or absence of cytokines, *e.g.*, tumor necrosis factor alpha (hereinafter, "TNF α ") and interleukin 1-beta (hereinafter, "IL-1 β "), or other mediators such as, for example, leukotriene receptor agonists, *e.g.*, LTD₄. As used herein, "mediator"
30 refers to a molecular signal for a particular event. Cytokines are an example of a class of mediators that are low molecular weight, pharmacologically active proteins that are secreted by one cell for the purpose of altering either its own functions

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-11-

(autocrine effect) or those of adjacent cells (paracrine effect). In some instances, cytokines enter the circulation and have one or more of their effects systemically. Expression profiles of informative genes can be obtained from sample-derived cells in the presence and/or absence of cytokines or other mediators, and these profiles
5 can be compared to reference expression profiles to determine sensitivity or resistance to drug treatment. Additionally, cells can be cultured in the presence or absence of the drug itself prior to obtaining the expression profile.

Once informative genes have been identified, polymorphic variants of informative genes can be determined and used in methods for detecting disorders in
10 patient samples based on which polymorphic variant is present in the sample (*e.g.*, through hybridization assays or immune detection assays using antibodies specific for gene products of particular polymorphic variants).

Alternatively, the approach described above can be used to verify the utility of informative genes identified in cultured cells. Once identified, informative genes
15 could be verified as to their predictive ability in more genetically diverse populations, thus ensuring the utility of the predictive power of these informative genes in populations in addition to the genetically isolated population of, *e.g.*, Iceland.

The "genetic isolation" of the Icelandic population implies a low degree of
20 allelic variation among individuals. This circumstance reduces the background in screening for differences in a population. In "genetically diverse" populations, many differences appear between individuals that might contribute to the same trait. For example, an examination of individuals responsive for asthma drug treatment might produce a finite yet large number of genetic differences with respect to non-
25 responsive individuals. However, in a genetically diverse population, a great majority of these genetic differences are "artifactual" or background "noise signals" detected because of the diversity of the population. For a genetically isolated population, fewer differences would be expected to be found between the two groups, providing a higher probability that the differences that are discovered are
30 likely to be directly related to the trait in question, in this case, responsiveness to asthma drug treatment. Once determined in a genetically isolated environment, the

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-12-

utility of informative genes and expression profiles based on those informative genes can be verified for more general use in a genetically diverse population.

As elevated levels of both TNF α and IL-1 β are characteristic of asthma and other inflammatory diseases (including, but not limited to, atopy (*e.g.*, rhinitis, 5 conjunctivitis, dermatitis, eczema), rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, psoriasis, IBD and sepsis), cells exhibiting elevated cellular levels of these cytokines can be used to determine drug efficacy for related inflammatory diseases. As used herein, "efficacy" describes a range of effectiveness from non-effective (non-responsive) to completely effective, and degrees between the two extremes. The 10 present invention is directed in part to comparing gene expression profiles of activated peripheral blood mononuclear (PBM) cells or neutrophils isolated from patients with asthma or related inflammatory conditions to gene expression profiles of activated control (non-asthmatic) PBM cells or neutrophils. As used herein, "activated" refers to treating cells with cytokines or other mediators of asthma or 15 related inflammatory diseases. Such activation can be achieved by elevating levels of cytokines such as TNF α and IL-1 β . Activated cells derived from patient samples can be used to screen for drug candidates as well as provide for sample and reference expression profiles useful in diagnosing asthma and other inflammatory diseases.

The cellular levels of TNF α and IL-1 β can be increased by a variety of 20 methods known in the art. For example, mammalian cells, such as PBM cells, neutrophils, synovial cells or airway smooth muscle (ASM) cells, grown in culture can be exposed to isolated and purified TNF α and IL-1 β such that these cytokines are taken up by the cells (typically, exposure of about 4 hours of TNF α at a concentration of 5 ng/mL and IL-1 β at a concentration of 1 ng/mL in culture will 25 produce pro-asthma like symptoms in cultured cells). Other methods for expression of cytokines in cells grown in culture, *e.g.*, by transfection of genes cloned into expression vectors, are known in the art.

TNF-related pathologies or diseases, as would be mimicked by the pro-inflammatory like conditions induced in the cells described herein, include, but are 30 not limited to, inflammatory diseases or disorders, infections, neurodegenerative diseases, malignant pathologies, cachectic syndromes and certain forms of hepatitis.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-13-

Inflammatory diseases or disorders, include, but are not limited to, acute and chronic immune and autoimmune pathologies, such as, but not limited to, rheumatoid arthritis (RA), juvenile chronic arthritis (JCA), psoriasis, graft versus host disease (GVHD), scleroderma, diabetes mellitus, allergy; asthma, acute or
5 chronic immune disease associated with an allogenic transplantation, such as, but not limited to, renal transplantation, cardiac transplantation, bone marrow transplantation, liver transplantation, pancreatic transplantation, small intestine transplantation, lung transplantation and skin transplantation; chronic inflammatory pathologies such as, but not limited to, sarcoidosis, chronic inflammatory bowel
10 disease, ulcerative colitis, and Crohn's pathology or disease; vascular inflammatory pathologies, such as, but not limited to, disseminated intravascular coagulation, atherosclerosis, Kawasaki's pathology and vasculitis syndromes, such as, but not limited to, polyarteritis nodosa, Wegener's granulomatosis, Henoch-Schönlein purpura, giant cell arthritis and microscopic vasculitis of the kidneys; chronic active
15 hepatitis; Sjögren's syndrome; psoriatic arthritis; enteropathic arthritis; reactive arthritis and arthritis associated with inflammatory bowel disease; and uveitis.

Infections include, but are not limited to, sepsis syndrome, cachexia (e.g., TNF α -mediated effects), circulatory collapse and shock resulting from acute or chronic bacterial infection, acute and chronic parasitic and/or infectious diseases,
20 bacterial, viral or fungal, such as a human immunodeficiency virus (HIV), acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (including symptoms of cachexia, autoimmune disorders, AIDS dementia complex and infections).

Neurodegenerative diseases include, but are not limited to, demyelinating diseases, such as multiple sclerosis and acute transverse myelitis.

25 Malignant pathologies are associated with TNF α -secreting tumors or other malignancies involving TNF α , such as, for example, leukemias (acute, chronic myelocytic, chronic lymphocytic and/or myelodysplastic syndrome) and lymphomas (Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas, such as malignant lymphomas (Burkitt's lymphoma or Mycosis fungoides)).

30 Cachectic syndromes and other pathologies and diseases involving excess TNF α , include, but not limited to, cachexia of cancer, parasitic disease and heart failure.

Elevated levels of TNF α are also associated with certain types of hepatitis, including, but not limited to, alcohol-induced hepatitis and other forms of chronic hepatitis.

One of skill in the art will recognize that reagents necessary to utilize the methods described herein can be contained in a kit. Such reagents as described are either commercially available (*e.g.*, buffered solutions, chemical reagents) or produced by methods known in the art (*e.g.*, oligonucleotides, antibodies, ligands for detection). Thus, one of skill in the art would recognize that a kit can be produced containing in appropriate compartments, for example, all reagents, probes, and materials necessary for to allow for the practice of the methods described herein.

The invention will be further described with reference to the following non-limiting examples. The teachings of all the patents, patent applications and all other publications and websites cited herein are incorporated by reference in their entirety.

EXEMPLIFICATION

Example 1. Predictive value of expression profiles in human patients.

Asthma is a common complex disease with a variable phenotype. While the cellular and molecular mechanisms that underlie asthma remain largely unknown, elevated levels of the pleiotropic cytokines, IL-1 β and TNF α , have been implicated in the pathophysiology of asthma as well as in various other inflammatory disorders (Broide, D. *et al.*, 1992, *J. Allergy Clin. Immunol.* 89:958-967; Arend, W., 2001, *Arthritis Rheum.* 45:101-106).

It has been widely accepted that diseases such as asthma that are common in the general population and have been demonstrated to have a strong, but complex, genetic component together with variable responsiveness to drugs, present ideal candidate disease targets for pharmacogenetic research. The latter holds great promise in optimization of individual specific therapy as well as providing new targets for drug development. Improved, preferably prophylactic, treatment of asthma patients is desired because the drugs now used are not effective in all patients, allow recurrence of the symptoms in a high percentage of patients, and sometimes have severe adverse side effects. The ability to analyze the expression

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-15-

level of thousands of genes in a single assay, using DNA microarrays, allows for a powerful screen of multiple molecular gene pathways, simultaneously, that may elucidate differential expression in genes encoding enzymes, kinases, ion channels, and other signaling molecules that determine individual's variation in response to drugs.

Accordingly, using high-density DNA microarray analysis, differences in mRNA expression of PBM cells freshly isolated from GC-S and GC-R asthmatics were identified. The mRNAs were examined at baseline (T0) and to the combined effects of IL-1 β and TNF α . Moreover, in an attempt to further elucidate those genes that may contribute to responsiveness of GC, we examined the effects of GC treatment on altered gene expression in cells that were activated by IL-1 β and TNF α . The rationale for using this strategy was based on two well-established concepts. First, the symptoms of asthma are mechanistically channeled through the actions of IL-1 β and TNF α . Second, glucocorticoids act in asthmatics by altering the expression of genes that are modulated by pro-inflammatory cytokines. The results provide new evidence demonstrating: 1) of 12,600 genes examined, 50 genes selected by algorithms based on the naïve Bayesian classifier predicted the correct GC-R phenotype of the 14 GC-R and 14 GC-S patients that it was trained on with 82% accuracy; 2) when a second cohort of 26 GC-R asthmatics was tested, the predictive accuracy of the classifier was 86%, and; 3) among the genes selected there were several cell signaling molecules, transcription factors and pro-inflammatory molecules potentially associated with regulation of GC responsiveness. This is the first demonstration using gene expression profiles in freshly isolated PBM cells that differentiate between GC-R and GC-S patients that provide sufficient power to predict response to glucocorticoids in asthmatics with high accuracy.

Methods and Materials

Patients. The patient population studied was selected from the private and outpatients clinics of practicing allergists at the Allergy/Immunology Division of the National University Hospital of Iceland. A total of 1185 patient records were screened for phenotypic information and analyzed with respect to the Icelandic

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-16-

Genealogy Database to determine the family connections of the patients. Patients carrying a diagnosis of asthma who were using inhaled glucocorticoid medications were evaluated further. Fifty-four patients age 18-70 years were initially randomly recruited to participate and were divided into two cohorts. The first cohort consisted of 14 GC-S and 14 GC-R patients, together with 14 control subjects who had no evidence of asthma or atopy and were not using inhaled GC or any other medications. Twenty-six additional patients were also collected and used as a second cohort for the predictive classifier. The study was subsequently expanded to include 96 patients (60 GC-S and 36 GC-R), of whom, 88 completed all 3 *in vitro* treatment conditions (baseline, IL-1 β /TNF α in the absence and presence of GC). Each cohort was subsequently randomly split into two subcohorts of equal size. A random split was performed 10 times and the most informative genes that detected GC-R from GC-S patients in the training set were used as predictors for the independent patient set of equal size. Patients were allowed to use both short and long acting β 2-adrenergic drugs as well as leukotriene antagonists. Medication doses of all drugs were kept unchanged for 2 weeks and the patients had to be off oral GC for minimum of 4 weeks prior to their donation of blood for the PBM cell expression studies. A single physician, who was blinded to the expression array studies, phenotyped all patients. Upon completion of physical examination, confirmation of drug response phenotypes and informed consent authorizing his/her participation in the study, the patients were asked to donate a blood sample for the study. No tests were performed in control subjects. Forty milliliters of EDTA blood was collected and peripheral blood mononuclear (PBM) cells were isolated from the rest of the blood for the experimental studies described below.

25 *Study Inclusion Criteria.* The criteria the patients had to fulfill to enter the study, included the following:

Asthma diagnosed by an allergist/pulmonologist. The approach used to diagnose asthma in Iceland concurs with that of the diagnostic asthma criteria outlined by the NHLB and the American Thoracic Society (National Institutes of Health, 1997, Guidelines for the Diagnosis and Management of

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-17-

Asthma: Expert Panel Report 2, July 1997, U.S. Government Printing Office, Washington, DC. NIH Publication No. 97-4051; American Thoracic Society. Standardization of Spirometry, 1994 (update), *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* 1995, 152:1107-1136) and include any of the following measures:

5 Patient having recurrent symptoms of cough and wheezing for more than 2 years and demonstrating clinical response to bronchodilator therapy (as measured by >15% increase in Forced Expiratory Volume in 1 second (FEV1) following bronchodilator)

10 Patient having reduced FEV1 (FEV1<80) at baseline prior to bronchodilator therapy and showing >15% improvement in FEV1 following bronchodilator therapy

15 Patient having recurrent symptoms of cough and wheezing and on methacholine challenge test, performed in accordance to ATS guidelines, there occurs >20% drop in FEV1 at methacholine concentrations <8 mg/L

20 Methacholine challenge test were obtained in patients with FEV1 >70. In addition, skin tests to the 12 most common aeroallergens in Iceland and total IgE levels were obtained and history and clinical evidence of rhinitis were recorded. All patients were re-examined by the same allergist who determined the clinical response to GC.

Response to inhaled glucocorticoids. Patients were categorized as either glucocorticoid sensitive (GC-S) or glucocorticoid-resistant (GC-R). Any two or more combinations of the following criteria defined glucocorticoid response in GC-S patients (Barnes, P. *et al. Am. J. Resp. Crit. Care. Med.*, 1998. 157:S1-S53):

25 Good control of asthma symptoms (cough and wheezing) when taking inhaled GC in recommended therapeutic doses (up to 1000 mg of Fluticasone; up to 800 mg of Budesonide; or up to 1000 mg of Beclomethasone, which were the 3 inhaled GC drugs used by the patients).

30 Improved exercise tolerance and/or fewer exacerbations following 8 or more weeks of therapeutic doses of inhaled GC.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-18-

Improved peak flows and/or spirometry values after 8 or more weeks of inhaled GC.

Improved quality of life/well being as judged by the patient response to a standard questionnaire, after 8 or more weeks of inhaled GC therapy.

- 5 GC-R patients did not experience improvement in the above measures when using inhaled GC in therapeutic doses. The GC-R patients had been tried on >2,000 mg of inhaled Fluticasone (or equivalent dose of Budesonide or Beclomethasone) per day. All GC-R patients studied had either moderate or severe resistance to GC therapy. The GC-R and GC-S patients were randomly split 10 times into two
- 10 cohorts each, wherein one set was used for training and the other patient set was used to generate predictors for an independent set.

Study Exclusion Criteria. The study exclusion criteria are outlined below:

Therapies, which could interfere with evaluation of efficacy or the incidence of adverse effects, including:

- 15 Other investigational drugs
Concurrent medication (other than β 2-adrenergic agonist or anti-leukotriene drugs).

Diseases or conditions that could interfere with the evaluation of efficacy or the incidence of adverse effects, including:

- 20 Pregnancy or lactation
Hypersensitivity or serious adverse experiences to asthma drugs in the past
Aspirin sensitive asthma
Occupational asthma
- 25 Sensitivity to the study drug or its components
Compliance to medication is of question

Patient protection measures/Informed consent procedures. The 96 asthmatic patients enrolled were randomly selected from the list of 1185 asthmatic patients

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-19-

who fulfilled the study criteria. The response- and participation rate of the patients exceeded 95%. All patients signed an informed consent, donated blood samples, and completed a questionnaire and all tests necessary for proper phenotyping. The study was approved by the Icelandic Data Protection Commission and the National Bioethics Committee. The Data Protection Commission of Iceland subsequently encrypted personal information about the patients and their family members (Gulcher, J. and Stefansson, K. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998, 36:523-527). All blood and DNA samples were also coded for protection of patient's privacy.

Assessment of gene microarray expression. Ninety-six asthma patients were recruited in accordance with the study inclusion criteria. GC responsiveness was measured by scoring functions taking into account both clinical and laboratory parameters as described above. PBM cells (PBMCs) were isolated by the standardized Ficoll method. PBMCs were counted, and stained with FITC-conjugated anti-CD3 monoclonal antibodies (mAb), PE-conjugated anti-CD19 mAb, and FITC-conjugated anti-CD14 mAb and examined by flow cytometry to determine the relative contributions of each cell type. The cells were then divided into 3 treatment conditions (baseline, IL-1 β /TNF α treatment and IL-1 β /TNF α in the presence of GC treatment) with approximately 6 million cells per condition. Thereafter, multiple gene mRNA expression was examined in isolated PBMCs with gene microarray technology, using the human Hu95-A gene chip containing 12,600 DNA oligonucleotides (Affymetrix, Santa Clara, CA). In brief, cells were exposed for 4 hr to IL-1 β (1 ng/mL) and TNF α (5 ng/mL) combined, or to media alone in the absence and presence of 1 hr pre-treatment with DEX (10⁻⁶ M), and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air in RMPL-1640 media. Following incubation of cells, total RNA used for the microarray expression analysis was extracted and purified using commercially available reagents recommended by the manufacturer. Total RNA was extracted using Trizol and purified with Qiagen RNeasy spin columns (Qiagen GmbH, Germany). Approximately 5 μ g of RNA were used for first and second strand cDNA synthesis. After precipitation, cDNAs were transcribed to cRNAs by methods known in the art. The biotinylated cRNA

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-20-

was subsequently hybridized to the Affymetrix gene chips overnight according to the manufacturer (Affymetrix, Santa Clara, CA). Non-bound probes were removed by high-stringency washing. The hybridized chips were developed using a Streptavidin-PE complex and scanned. The scanned images were then analysed with Affymetrix software and the data was examined using commercially available software programs (Asher B. *J. Mol. Graph Model.* 2000, 18:79-82). AvDiff values were defined by the Affymetrix software output. Fold change is defined as the ratio of AvDiff values of RNA derived from PBMCs treated with cytokines over that of untreated PBMCs. Kinetic PCR was used to correlate the mRNA expression values from the Affymetrix gene chips for several genes.

Normalization of the expression data set. The raw expression data for all genes were normalized to the trimmed mean (98%) expression values of the chip and the normalized expression value for all chips were set at 500 (Hu, J. *et al.*, 2000. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 919:9-15). The genes were also normalized to a set of 20 control (housekeeping) genes that were found to be stable during the various treatments of the samples. The analysis focused on all the genes that were expressed in the PBM cells, and, more specifically, on all genes that were significantly upregulated or downregulated by the *in vitro* cytokine stimulation and were subsequently reversed by glucocorticoid treatment. A predictive classifier was then applied to these genes.

Three separate approaches were taken to search for predictive gene signals: 1) baseline expression values alone; 2) expression values in response to *in vitro* exposure to cytokines; and 3) expression values in response to cytokines in the presence of GC pre-treatment. To minimize the potential for selection bias, predictions were made for both an independent set and with the cross validation method (Ambrose, C. and McLachlan, G., 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6562-6566).

Classification of drug response phenotypes by naïve Bayesian classifier. A naïve Bayesian classifier (with non-informative prior) (Duda, R. and Hart, P., *Pattern Classification and Scene Analysis.* 1973, New York: John Wiley) was applied to test

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-21-

if the classification of drug response phenotypes can be achieved by expression values for a few informative genes. The classifier is trained by selecting those genes that are deemed relevant in distinguishing between phenotypes (Kellner, A. *et al.*, Bayesian classification of DNA array expression data. Technical report, Department of Computer Science and Engineering, University of Washington, August, 2000).

When a new case is presented to the classifier, the observed attribute value x_g for gene g results in the odds that the presented case is glucocorticoid sensitive:

$$\frac{P(x_g | GCS)}{P(x_g | GCR)}$$

Combining the probabilities of all genes in the classifier (under the "naïve" assumption of independence) gives the total odds:

$$\frac{P(GCS)}{P(GCR)} = \prod_g \frac{P(x_g | GCS)}{P(x_g | GCR)}$$

The attributes, namely AvDiff values or fold changes, were divided into two categories (low, high) by choosing a threshold value that optimally separates phenotypes in the training set for each gene. The probability, $P(x | C)$, was taken as the fraction of training cases of phenotype C with attribute value x . To avoid singularities due to probabilities of zero, a Laplace estimator was used, *i.e.*, an additional case of each phenotype was added to each attribute category.

The genes used for phenotype prediction were selected by their power to separate between the phenotypes using the average of $\frac{P(x_g | GCS)}{P(x_g | GCR)}$

over training cases with phenotypes $GC-S$ and $GC-R$, respectively, as gene score.

The n genes with the highest total score (*i.e.*, sum of scores for phenotype $GC-S$ and $GC-R$) were used in the classifier. As attributes, the fold change value between baseline and cytokine induction was used. To avoid spurious fold change values, only genes with AvgDiff values >70 for baseline and cytokine induction for all individuals were considered.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-22-

Prediction of an independent patient set using the weighted voting method described by Golub et al. The GCS and GC-R patient cohorts were each randomly split into two cohorts. The random split procedure was performed 10 times with separate analyses each time. A predictor for the first cohort using a weighted voting

5 algorithm similar to that described previously (Golub, T. et al., 1999., *Science*, 286:531-537) by selecting genes that are deemed most relevant in distinguishing GC responders from non-responders. The weighted voting algorithm makes a weighted linear combination of relevant "informative" genes obtained in the training set to provide a classification scheme for new samples. A brief description of the

10 algorithm follows. The mean (μ) and standard deviation (ϵ) for each of the two classes (Resistant and Sensitive) in the training set is first calculated. The Euclidean distance between the two classes is then calculated for each gene (x) such that $ED_x = \sqrt{(\mu_R - \mu_S)^2}$. The variance of each class is equal to the standard deviation within that class squared, $V_{R,S} = \epsilon^2$. Next, the metric used to choose the most informative

15 genes and for the calculation of weight, for each gene, is calculated as follows: $Mx = (ED_x^2)/(V_S + V_R)$. To predict the class of a test sample Y , each gene X casts a vote for each class: $W_{XR} = M_x \sqrt{(Y - \mu_R)^2}$ and $W_{XS} = M_x \sqrt{(Y - \mu_S)^2}$. The final class of test Y is found by the lesser of $(\sum W_{XR})$ and $(\sum W_{XS})$. Thus, each gene has a vote based on its metric and the class to which its signal is closest. The class with the smallest vote at

20 the end is the predicted class, e.g., the class the test sample is closest to using the Euclidean distance as the measure, is the predicted class. It was then determined whether an accurate prediction of drug response can be achieved by expression values of this limited set of genes for the independent cohort with no prior information using commercially available software as described previously (Shipp,

25 M. et al., 2002. *Nat. Med.*, 8:68-74; Golub, T. et al., 1999., *Science*, 286:531-537).

Prediction of an independent patient set using the k-Nearest Neighbor algorithm. The k-Nearest Neighbor (k-NN) algorithm (Cover, T. et al., 1967. *IT*, 13:21-27) was also implemented to predict the class of a sample by calculating the Euclidean distance of the sample to the k "nearest neighbor" standardized samples in

30 "expression" space in the training set. The class memberships of the neighbors are

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-23-

examined, and the new sample is assigned to the class showing the largest relative proportion among the neighbors after adjusting for the proportion of each class in the training set. The marker gene selection process was performed by feeding the k -NN algorithm only the features with higher correlation to the target class. To select
5 genes for use in the predictor, all genes were examined individually and ranked on their ability to discriminate one class from the other using the information on that gene alone. For each gene and each class, all possible cutoff points on gene expression levels for that gene are considered to predict class membership either above or below that cutoff. Genes were scored on the basis of the best prediction
10 point for that class. The score function is the negative logarithm of the p -value for a hypergeometric test (Fisher's exact test) of predicted versus actual class membership for this class versus all others.

Prediction using Leave One Out Cross Validation (LOOCV). In addition to confirmation in an independent set of patients, the genes that best separated GC
15 responders from non-responders were selected and tested by cross-validation, wherein one patient was excluded from the data set and then a new predictor was generated from all the genes based on the remaining patients. The new predictor was then used to predict the excluded sample. The gene selection criteria was determined as described above and applied to expression values at baseline or in
20 response to *in vitro* exposure to cytokines and GC.

Reagents. The cDNA Hu95 gene microarray chips and analysis system, including scanner and computer analysis software, were purchased from Affymetrix, CA. The RPM-1640 medium was obtained from Gibco BRL (Gaithersburg, MD). IL-1 β and TNF α were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). DEX was purchased
25 from Sigma (St Louis, MO).

RESULTS

Characteristics of patients. The patients enrolled were randomly selected from the available family clusters, which included 1185 patients, of whom over 500 were

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-24-

using inhaled glucocorticoids. Of the 96 patients recruited for the study, 60 were determined to be glucocorticoid sensitive and 36 were determined to be glucocorticoid resistant. Each group was split into two cohorts. The first cohort included 46 patients (training set), of whom 30 were GC-S and 18 were GC-R. The additional 46 patients were designated as the independent set, and also included 30 GC-S patients and 18 GC-R patients. The mean maintenance dose of inhaled glucocorticoids in the GC-R group was ~1,600 mg/day (range 1,000-2,000). In contrast, the GC-S patients required only intermittent or low-dose therapy (≤ 800 mg/day of Fluticasone or equivalent drug) of inhaled GC. Demographic information, lung function and methacholine challenge values together with atopy status are presented in Table 3. It should be noted that while the argument could be made that the asthma severity level was higher in the GC-R group, the lung function tests results were only slightly lower in the GC-R patients as compared to the GC-S patients. As shown in Table 3, the ratio of males/females and the atopy status were lower in the GC-R group, whereas the mean age was higher. Moreover, 54% GC-S and 31% of the GC-R patients were skin test positive to one or more aeroallergens. No differences were observed in the ratio of T cells, B cells and monocytes between the two groups.

Performance of the Bayesian classifier with gene score selected genes. This study examined whether GC-R asthmatic patients can be identified by specific gene expression profiles in white blood cells, which are different from those obtained in patients who are GC-responders, using a naive Bayesian classifier. The classifier was trained to select genes that best predicted between the GC-R and GC-S patient groups using all genes from the Affymetrix 12,600 Hu95 gene chip that were defined as being present and had an AvgDiff expression values >70 . The latter requirement reduced the total number of genes to 5,011. Thus, the classifier was trained on 5,011 genes with the goal of identifying genes that demonstrated differences between the two groups in either their AvgDiff or fold change expression values at baseline (BL) or in response to cytokine or GC treatment. Fold change mRNA expression values in response to cytokine treatment of 50 genes distinguished a randomly selected

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-25-

subgroup of 14 GC-R and 14 GC-S patients with 82% accuracy. Neither baseline expression values nor fold change expression in response to GC improved the classifier's ability to discriminate between the two patient groups. The prediction of the drug response phenotype was done by the "leave-one-out cross validation" (LOOCV) method, wherein each training case is left out in turn and predicted by a classifier trained on the remaining training cases only. The percentage of the left-out training cases that were predicted correctly is then taken as an estimate of the classifier's accuracy for previously unseen cases. As shown in FIG. 1, 12 of the 14 GC-S and 11 of the 14 GC-R patients are correctly predicted. Moreover, when the classifier was trained on all of the patients, its predictive accuracy of determining the correct GC-response phenotype using the LOOCV method was essentially unchanged or 81% (FIG. 2).

Since these 50 genes discriminated between the drug response phenotypes with high accuracy, they may potentially have stronger power to predict the drug response phenotype for individuals within the group itself. Thus, the ability of these genes to predict the drug response phenotype of a separate cohort of patients that was not used to train the classifier was examined. As shown in FIG. 3, when the classifier was trained on the 40 GC-S versus GC-R patients, and then used to predict the an independent patient set, the predictive accuracy obtained rose to 86%.

Fifty genes contributed to the predictive power that discriminated between GC responders and non-responders. These genes are categorically displayed in Tables 1, 2A and 2B. Data on 14 control subjects with unknown GC-response profile is also included. As shown, the pattern of mRNA expression in the control group was comparable to that of the GC-S patients. This is not surprising since up to 90% of asthma patients in general are GC-responders. The genes in each category (notably CAM/ECMs, cell signaling/metabolism molecules, transcription factors and ESTs) are identified by their GenBank accession numbers, and their respective magnitudes of mean fold change of altered mRNA expression in response to cytokines.

To ensure that the gene signals that most accurately discriminate between GC responders and non-responders were captured, the groups were expanded to 96

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-26-

patients (60 GC-S and 36 GC-R) and the weighted voting and k-NN algorithms were applied to both randomly split cohorts of GC-S and GC-R patients with and without cross validation.

- Apart from the genes in Tables 1, 2A and 2B, 15 additional genes shown in
- 5 Table 4 increased the predictive accuracy for the independent set to 86%, and the accuracy of discriminating GC responders from non-responders amounted to 89% with cross validation in all patients.

DISCUSSION

- While drug treatment remains a mainstay of medicine, in most cases a given
- 10 drug has little or no effect in the majority of patients, or unforeseen serious side effects occur. For the patient this represents a dangerous and potentially life-threatening situation and, at the societal level, adverse drug reactions represent a leading cause of disease and death. Genetic variation often underlies poor response or side effects. Indeed, there already exist several examples of such correlation,
- 15 including but not limited to patients variability in response to Dicumarol, Warfarin or Isoniazid due to polymorphisms in the Cyt P450 gene that confer rapid versus slow acetylating of these drugs. Given that these genetic variations may be reflected in differences in regulatory functions of these genes, variability in the mRNAs and/or protein expressions of these genes would be expected. Pharmacogenomics
- 20 holds the promise that one may soon be able to profile variations between individuals' genetic makeup that accurately predict responses to drugs, addressing both efficacy and safety issues. In this connection, the ability to analyze the expression levels of thousands of genes in a single assay by DNA microarray technology provides a powerful screen of multiple molecular gene pathways,
- 25 simultaneously. Thus, high-throughput gene array assay has the potential of identifying differential expression in genes encoding for various enzymes, kinases, ion channels, and other cell signaling molecules that determine individual's variation in response to drugs.

- To address these issues, this study examined differences in gene expression
- 30 in freshly isolated PBMCs isolated from GC-R and GC-S asthmatic patients, using

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-27-

high-density DNA microarray analysis. The results demonstrate that glucocorticoid sensitivity can be predicted with 86% accuracy.

It is widely accepted that glucocorticoids (GCs) are the most effective drugs available in asthma therapy. In individuals who are sensitive, inhaled GC has been shown to have a relatively low capacity to activate transcription within PBMCs at concentrations found in plasma and their action is thought to mainly occur within the lung. This finding is in agreement with the restricted systemic side effects at low or intermittent doses, whereas the relative abilities of GC to trans-repress transcription factor activities, such as AP-1 and NF- κ B, in the airways is in agreement with their relative clinical efficacy. In contrast, GC-resistance has been defined by the lack of a response to a prolonged course of high dose (>1 mg/kg/day) oral glucocorticoid such as prednisone. Since most patients with asthma are being treated with inhaled GC, a new definition referring to GC-dependent/resistant asthma has emerged taking into account the inhalation route in the use of the drug (Leung, D. and Chrousos, G., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2000. 162:1-3). In light of these issues, a recommendation to define GC-resistant asthma as a condition where there is incomplete response to high doses of inhaled GC (*i.e.*, >2,000 mg/day) was followed (Gagliardo, R. *et al.*, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 2000. 162:7-13). While clear separation between patients with high level of GC-dependent versus GC-resistant asthma is not always possible clinically, there is no doubt that both of these groups present a challenging clinical problem that is highly costly to the health care system. Sub-optimal responses to steroids often lead to prolonged courses of high-dose GC therapy accompanied by serious adverse effects together with persistent airway compromise. Patients with GC-resistant asthma present an ongoing inflammation of the airways despite persistent treatment with high doses of GC. This would be consistent with the high degree of airway hyperresponsiveness detected in our GC-R patients as reflected by the low methacholine concentration values in Table 3.

Given the pathobiologic processes involved in asthma, as a first approximation, it is reasonable to consider GC-insensitive and GC-dependent asthma as a part of the same pathogenic process. Thus, in view of potential heterogeneity and complexity of mechanisms contributing to GC-resistant/dependent

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-28-

asthma and its potential impact on the natural history of chronic asthma, it is noteworthy that no differences in the gene expression profiles of our GC-dependent study patients with moderate to severe GC-resistance, with respect to their GC resistant trait, were found.

5 In this study, a gene-scoring approach to identify genes that provide predictive power was used. As shown in Table 1, the 40 genes selected differed in their signal intensities of mRNA expression between the two groups and correlated strongly with the patients response phenotypes to inhaled glucocorticoids. Moreover, as shown in FIG. 1, when a Bayesian classifier was trained on a subset of
10 14 GC-S and 14 GC-R patients the predictive accuracy of the classifier to discriminate between these two patient groups was 82%. When the classifier was trained on 40, the accuracy of the classifier to predict the remaining independent patients was as high as 86% (FIG. 2). Thus, by almost doubling the number of patients that were used to train the classifier, the predictive power of the study
15 increased further. The latter observation has two important implications: 1) it suggests that the predictive accuracy of the classifier might improve further if additional patients are included; and 2) the approach using the naïve Bayesian classifier when applied to the initial data set of 14 GC-S and 14 GC-R patients, provided sufficient power to predict gene expression profiles of GC-R and GC-S
20 asthmatics with over 80% accuracy. It is noteworthy that among these genes are numerous cytokine/chemokine-related genes, transcription factors and cell signaling molecule genes (Tables 1, 2A and 2B). No doubt many of these genes may turn out to be critical regulatory genes of GC responsiveness independent of asthma *per se*.

Genes with predictive power in discriminating between glucocorticoid
25 sensitive and glucocorticoid responsive asthmatics are listed in Table 1. The 40 genes that most accurately discriminate between glucocorticoid-responsive (GC-R) and glucocorticoid-sensitive (GC-S) asthmatics using fold change mRNA expression values following stimulation with cytokines are shown. The values expressed as mean \pm SEM for the groups. Also shown are comparable values in 14 non-asthmatic
30 (control) subjects with unknown GC-response status. Expression profiles including these genes predict GC-R and GC-S patients with over 80% accuracy.

Table 1. Mean Fold change in RNA Expression of Informative Genes

	<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>Control mean/ ±sem</i>	<i>PV</i>
	<i>Transcription Factors</i>					
5	Zinc finger Protein 267	ZNF267/X78925	3.05±0.45	5.41±0.99	3.76±0.30	0.94
	Zinc finger Protein 189	ZNF189/AF025770	2.98±0.38	4.12±0.61	2.92±0.44	0.88
10	Interferon-stimulated gene factor 3	ISGF-3/M97935	1.50±0.80	4.38±0.78	2.28±0.59	0.82
	N-myc and STAT interactor	Nmi/U32849	2.28±0.25	1.41±0.20	1.50±0.09	0.81
	Zinc finger helicase	ZFH/U91543	-1.39±0.20	-2.04±0.11	-1.25±0.19	0.79
15	Zinc finger Protein 145	ZNF145/AF060568	-3.23±0.88	-7.79±2.59	-5.94±1.65	0.71
	Interferon-induced leucine zipper protein	IFP35/U72882	2.66±0.39	3.56±0.27	2.70±0.30	0.69
20	C terminal binding protein	CtBP/U37408	-1.36±0.20	-1.73±0.30	-1.43±0.09	0.64
	<i>Cell signaling/metabolism</i>					
	PDGF receptor beta-like tumor suppressor	PRLTS/D37965	0.51±0.41	2.99±0.58	0.67±0.48	0.94
25	Sterol carrier protein-X; sterol carrier protein-2	SCP-X; SCP-2/U11313	-2.44±0.20	-1.61±0.35	-1.86±0.11	0.94
	G protein-linked receptor gene	GPRG/L42324	4.14±1.35	8.46±3.50	3.85±1.16	0.94
30	Nuclear Factor kappa B subunit	NFkB/M58603	4.10±0.26	2.68±0.25	3.12±0.19	0.93
	Allograft inflammatory factor 1	AIFI/U49392	-4.48±0.49	-2.24±0.54	-4.54±0.50	0.88
	c-syn protooncogene	FYN/M14333	1.87±0.09	1.55±0.11	1.74±0.04	0.86
35	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	SNRPA/M60784	-1.75±0.10	-3.76±1.34	-1.80±0.09	0.86

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-30-

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>Control mean/ ±sem</i>	<i>PV</i>	
	2'5' Oligoadenylate synthetase	none/M87434	2.69±0.35	4.52±0.59	2.56±0.49	0.81
	Rab GTPase activating protein 1	HSRANGAP1/ X82260	2.42±0.13	1.89±0.25	1.94±0.31	0.79
5	Vasoactive intestinal peptide receptor 1	VIPR1/X77777	-3.76±0.52	-11.65±2.37	-6.24±1.02	0.79
	NADH-ubiquinone dehydrogenase 51 kDa subunit	NDUFV1/ AF053070	-1.54±0.10	-1.89±0.31	-1.61±0.16	0.79
10	SH3BGR-like protein	SH3BGR1/ AF042081	-2.04±0.20	-1.22±0.29	-1.88±0.09	0.75
	SRC Kinase associated phosphoprotein 55K	SKAP55/Y11215	-6.59±0.48	-12.60±2.29	-13.36±5.40	0.71
15	Retinal short-chain dehydrogenase/reductase	retSDR1/AF061741	-0.61±0.36	0.24±0.40	0.33±0.70	0.71
20	NAD (H)-specific isocitrate dehydrogenase g	none/Z68907	-1.58±0.05	-1.67±0.30	-1.60±0.06	0.71
	Lysosome-associated membrane glycoprotein	DCLAMP/ AB013924	70.09±11.70	128.82±24.64	96.54±13.97	0.69
	Aryl carbon receptor	AHR/L19872	-1.96±0.38	-0.82±0.37	-0.24±0.45	0.69
25	Ser/Thr kinase 10	lok/AB013924	-1.49±0.06	-1.47±0.23	-1.60±0.08	0.64
	Docking protein 2	DOK2/AF034970	-2.08±0.09	-2.24±0.54	-2.55±0.16	0.64
	Ecto-5-prime-nucleotidase	CD73/X55740	-2.38±0.20	-4.22±0.89	-3.16±0.94	0.64
30	Signal-induced proliferation-associated gene 1	SIPA1/AB005666	-1.68±0.29	-2.76±0.51	-1.85±0.15	0.57
	Phospholipid Scramblease	hMmTRA1b/ AB006746	3.80±0.52	6.66±0.82	3.94±0.44	0.56
	<i>Misc</i>					
35	Fc fragment of IgEalpha	FCRER1A/X06948	-17.64±1.55	-10.44±2.36	-16.43±4.08	0.94
	Histone stem-loop binding protein	SLBP/U75679	1.07±0.17	1.21±0.31	0.69±0.36	0.94

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-31-

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>Control mean/ ±sem</i>	<i>PV</i>
Interferon induced protein 56	IF156/M24594	10.63±2.73	23.63±3.73	10.09±2.24	0.88
Neuropathy target esterase	NTE/AJ004832	-1.42±0.25	-2.34±0.13	-1.37±0.24	0.86
5 Interferon induced protein 41	IFP41/L22342	1.32±1.32	2.38±0.23	1.44±0.34	0.75
Poly A binding protein II	PAPB2/AF026029	-1.36±0.06	-2.02±0.24	0.68±0.31	0.71
Galectin 2	Gal2/AL022315	-56.71±7.96	23.46±5.90	-44.87±8.65	0.69
10 Actin related protein complex 2/3 subunit 2	ARPC2/U50531	-2.79±0.65	-7.05±1.37	-3.25±1.36	0.57
CD1c Thymocyte antigen	CD1c/M28827	-5.11±0.62	-3.56±0.34	-4.73±0.74	0.56
15 <i>cDNA</i>					
clone 24538 mRNA	none/AF055030	0.84±0.28	1.52±0.24	1.42±0.11	0.94

Tables 2A and 2B include 45 genes that were either upregulated or downregulated by IL-1 β /TNF α therapy and were reversed, at least in part, by pre-treatment with GC, and that most accurately predicted glucocorticoid sensitivity using expression values generated following treatment with cytokines. Table 2A shows expression levels in cells treated with IL-1 β /TNF α in the presence of DEX and Table 2B shows expression levels of cells treated with IL-1 β /TNF α alone.

Table 2A. Genes upregulated by IL-1 β /TNF α and repressed by DEXIL1/TNF α treatment: With DEX

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>P- value</i>
<i>Inflammatory cell regulators</i>				

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-32-

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>P- value</i>	
	Interferon-inducible 56 Kd	IFI56/ M24594	-816±91	-1920±240	<0.0001
	Interleukin 1β	IL1B/ M15330	-3792±501	1605±1339	0
	Interferon gamma treatment inducible mRNA	IFNIND/ M26683	-	-	0
5	CD6 antigen	CD6/ X60992	-1128±192	58±265	0.001
	Interferon regulatory factor 7B	IRF7/ U53831	-908±91	-876±175	0.863
	TNFα receptor associated factor 1	EB16/ U19261	-2061±185	-1419±109	0.0133
	TNFα receptor	CD120b/ M32315	-3321±520	-1283±407	0.006
10	TNFα receptor superfamily	WSL/ Y09392	-3321±506	-1591±402	0.0185
	Leukocyte surface aminopeptidase N	CD13/ M22324	-983±122	-247±106	0
	Cytokine (GRO-γ)	SCYB3/ M36821	-2135±345	-672±59	0.001
	Interferon-inducible peptide (6-16) gene	I6-jun/ U22970	-1233±151	-2094±424	0.041
	Cytokine (GRO-β)	SCYB2/ M36820	-2934±374	-1116±384	0.003
15	Interferon-β-2a	IL6/ X04430	-7784±683	-4493±788	0.002
	OX40 cell surface antigen	OX40/ S76792	-600±103	-230±47	0
	Monocyte/macrophage Ig-related receptor	MIR10/ AF004231	-626±73	-238±57	0

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-33-

	<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>P- value</i>
	Small inducible cytokine subfamily C2	SCYC2/ D63789	-417±80	-118±76	0.0156
	Interleukin-1 receptor antagonist	IL1RA/ XS2015	10750±966	5445±1457	0.004
	Urokinase-type plasminogen receptor	CD87/ U09937	-3834±530	-1504±272	0.002
	Activation mRNA	Act-2/ J04130	-4202±494	-1333±572	0.001
5	Macrophage migration inhibitory factor	MIF/ L19686	-1222±383	-170±238	0.0365
	Monocyte secretory protein	JE/ M28225	-7380±860	-4302±960	0.0331
	Interferon stimulated gene HEM45	HEM45/ U88964	-1600±367	-424±368	0.039
	Membrane glycoprotein 4F2 antigen heavy chain	CD98/ J02939	-687±115	-301±124	0.0374
10	Interferon induced protein p78	p78/ M33882	-3547±345	-1491±346	0
	CD44 isoform RC	CD44/ AF098641	-1886±170	-1019±134	0.001
	Interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein	ISG15/ M13755	-5244±677	-2526±611	0.008
	<i>Cell Signaling/Metabolism</i>				
15	Plasminogen activator-inhibitor 2	PAI-2/ Y00630	-7538±623	-2683±648	<0.0001
	PROS-27	PROS-27/ XS9417	-2771±318	-361±402	0
	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	p21/ U03106	-2463±315	-885±151	0

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-34-

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>P- value</i>
Lymphocyte G0/G1 switch gene	GOS2/ M69199	-3788±420	-1657±275	0
Hpast	HPAST/ AF001434	-1532±187	-675±139	0.002
Apoptosis inhibitor/AP homolog B (MIHB)	AP11/ U37547	-722±315	-342±151	0.002
5 Insulin induced protein 1	INSIG1/ U96876	-2778±273	-1797±204	0.0117
pim-1 oncogene	pim-1/ M16750	-1937±245	-1197±152	0.0205
Cyclic AMP-responsive element modulator	CREM/ S68134	-2225±238	-1435±149	0.0207
Glucose transporter-like protein-III	GLUT3/ M20681	-3564±801	-1422±512	0.0366
10 Human cyclooxygenase-2	hCox-2/ U04636	-1731±222	-2333±389	0.167
<i>CAM/ECM molecules</i>				
HB14	CD83/ Z11697	-4434±73	-2492±78	0
Adhesion molecule ninjurin	NINJ1/ U91512	-1977±315	-472±249	0.001
Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	TIMP1/ D11139	-4723±500	-2237±483	0.002
15 Elastase specific proteinase inhibitor	ELAFIN/ L10343	-1448±462	-292±199	0.0449
<i>Transcription Factors</i>				
Nef-associated factor 1β	Naf1beta/ AJ011896	-1523±467	126±512	0.0268
Thyroid receptor interactor	TRIP14/ L40387	-635±67	-798±83	0.1357

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-35-

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR</i>	<i>GCS</i>	<i>P- value</i>
		mean ±sem	mean/ ±sem	
Basic helix-loop-helix transcription factor	Musculin/ AF087036	-1867±177	-1209±116	0.006
p50-NFκB	P50-NF- κB/ S76638	-890±174	-321±105	0.0122

Table 2B. Genes upregulated by IL-1/TNF-α and repressed by DEX

5 IL1/TNFα treatment: Without DEX

	<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR</i>	<i>GCS</i>	<i>P-value</i>
			mean ±sem	mean/ ±sem	
	<i>Inflammatory cell regulators</i>				
	Interferon-inducible 56 Kd	IFI56/ M24594	1283±215	3370±372	<0.0001
	Interleukin 1β	IL1B/ M15330	9905±1021	595±1430	<0.0001
10	Interferon gamma treatment inducible mRNA	IFNIND/ M26683	17349±784	11063±998	<0.0001
	CD6 antigen	CD6/ X60992	2472±179	806±195	<0.0001
	Interferon regulatory factor 7B	IRF7/ U53831	1413±129	3074±187	<0.0001
	TNFα receptor associated factor 1	EB16/ U19261	5191±188	3643±267	0
15	TNFα receptor	CD120b/ M32315	6742±513	3453±877	0
	TNFα receptor superfamily	WSL/ Y09392	6560±462	3452±626	0
	Leukocyte surface aminopeptidase N	CD13/ M22324	2988±304	1523±184	0.001
	Cytokine (GRO-γ)	SCYB3/ M36821	3228±392	1431±284	0.001

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-36-

	<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>P-value</i>
	Interferon-inducible peptide (6-16) gene	16-jun/ U22970	1870±317	3656±362	0.002
	Cytokine (GRO-β)	SCYB2/ M36820	5431±653	2267±509	0.002
	Interferon-β-2a	IL6/ X04430	12870±630	9257±863	0.002
5	OX40 cell surface antigen	OX40/ S76792	1157±88	588±28	0.002
	Monocyte/macrophage Ig-related receptor	MIR10/ AF004231	1492±147	780±157	0.003
	Small inducible cytokine subfamily C2	SCYC2/ D63789	483±115	28±90	0.006
10	Interleukin-1 receptor antagonist	IL1RA/ X52015	13395±1481	8202±1598	0.0168
	Urokinase-type plasminogen receptor	CD87/ U09937	4180±663	2054±414	0.0197
	Activation mRNA	Act-2/ J04130	8697±1013	3900±1860	0.026
	Macrophage migration inhibitory factor	MIF/ L19686	2250±705	296±356	0.0271
15	Monocyte secretory protein	JE/ M28225	9970±999	6785±534	0.0369
-	Interferon stimulated gene HEM45	HEM45/ U88964	6801±713	4768±553	0.0474
	Membrane glycoprotein 4F2 antigen heavy chain	CD98/ J02939	3073±194	2472±243	0.0662
	Interferon induced protein p78	p78/ M33882	7155±826	5241±503	0.0777
20	CD44 isoform RC	CD44/ AF098641	3651±264	3121±195	0.0962
	Interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein	ISG15/ M13755	8821±1574	6128±993	0.1801
	<i>Cell Signaling/Metabolism</i>				
	Plasminogen activator-inhibitor 2	PAI-2/ Y00630	9427±717	5832±531	0.001

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-37-

	<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GCR mean ±sem</i>	<i>GCS mean/ ±sem</i>	<i>P-value</i>
	PROS-27	PROS-27/ X59417	5853±316	3557±443	0
	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	p21/ U03106	3544±492	1975±261	0.0123
	Lymphocyte G0/G1 switch gene	G0S2/ M69199	1403±737	1347±548	0.9539
	Hpast	HPAST/ AF00143 4	2370±263	1545±272	0.0418
5	Apoptosis inhibitor/AP homolog B (MHB)	AP11/ U37547	1826±137	1885±150	0.7754
	Insulin induced protein 1	INSIG1/ U96876	4414±353	3201±285	0.0175
	pim-1 oncogene	pim-1/ M16750	2347±411	1947±511	0.5462
10	Cyclic AMP-responsive element modulator	CREM/ S68134	4875±216	4613±411	0.541
	Glucose transporter-like protein-III	GLUT3/ M20681	5396±930	2914±713	0.0476
	Human cyclooxygenase-2	hCox-2/ U04636	1735±302	2683±513	0.1195
	<i>CAM/ECM molecules</i>				
	HB14	CD83/ Z11697	5991±138	2892±150	<0.0001
15	Adhesion molecule ninjurin	NIN1/ U91512	4607±401	2359±264	0
	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	TIMP1/ D11139	9451±1006	5574±611	0.005
	Elastase specific proteinase inhibitor	ELAFIN/ L10343	2744±768	577±174	0.0166
	<i>Transcription Factors</i>				
20	Nef-associated factor 1β	Naf1beta/ AJ011896	6890±505	3412±314	<0.0001
	Thyroid receptor interactor	TRIP14/ L40387	1046±130	1488±167	0.0452

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-38-

<i>Gene Category</i>	<i>Name/ GenBank</i>	<i>GC-R mean ±sem</i>	<i>GC-S mean/ ±sem</i>	<i>P-value</i>
Basic helix-loop-helix transcription factor	Musculin/ AF087036	2832±297	2145±109	0.0489
p50-NFκβ	P50-NF- κB/ S76638	2394±169	1995±206	0.1487

As shown in Table 3, the ratio of males/females and the atopy status were
 5 lower in the GC-R group, whereas the mean age was higher. While several studies
 have reported association between the X chromosome and the asthma phenotype
 (Kauppi P. *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* 2000. 10:788-92; Heinzmann A. *et al.*, *Hum.*
Mol. Genet. 2000. 9:549-59; Ahmed S. *et al.*, *Exp. Clin. Immunogenet.* 2000. 17:18-
 22), extended epidemiological studies are needed to confirm if such an association
 10 exists between the GC-R phenotype and asthma. Likewise, 54% of the GC-S
 patients in this study were skin test positive to one or more aeroallergens compared
 to 31% of the GC-R patients. In addition, the average total IgE levels were higher in
 the GC-S group. About 70% of patients in some European countries and areas of the
 United States are atopic (Eggleston P. and Bush R., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001
 15 107:S403-5) compared to about 50% of asthmatics in Iceland, as determined by
 positive skin tests or elevated IgE levels (The European Community Respiratory
 Health Survey Group. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1997. 156:1773-1780).
 Whether atopic asthmatic patients are less likely to have GC-R asthma compared to
 non-atopic patients remains to be determined. While interference from these
 20 variables on the results cannot be excluded, the predictive power of the patient's age,
 sex or atopy status was lower (and not statistically significant) when compared to the
 power developed from the genes under study.

These results provide the basis for unraveling the mechanisms that contribute
 to the development of GC-resistance, and can allow for the development of new
 25 therapeutic approaches. For example, one of skill in the art can perform linkage
 studies on patients for GC-R and GC-S clusters using the Icelandic Genealogy
 Database. By linking patients with GC-R and GC-S asthma into large family

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-39-

pedigrees based on clinical measures of GC-responsiveness, a genome-wide linkage analysis can be performed. Secondly, by searching for mRNAs expression profiles that predict GC-R versus GC-S asthma in a larger cohort of patients using DNA array technology, one of skill in the art can categorize patients with unknown GC profile into GC-S and GC-R patients with high accuracy independent of whether the patient has been taking glucocorticoids or whether the clinical response has been determined based on the expression profile alone (e.g., if similar to the expression profiling of responders versus non-responders, respectively).

Table 3. Demographic, lung function, metacholine challenge and total IgE values in glucocorticoid-sensitive (GC-S) and GC-resistant(R) patients. Values expressed are mean +/- SE for the groups.

Table 3.

<i>Characteristics</i>	<i>GC-S</i>	<i><Asthma></i>	<i>GC-R</i>
n	61		35
Mean age (yr)	43 ± 16		54 ± 19
Sex ratio (M/F)	30/70		20/80
Mean dose GC (µg/day)	450 (200-800)		1,610 (1,000-2000)
FVC (% predicted) liters	84 ± 19 3.8 ± 1.0		75 ± 15 2.2 ± 0.8
FEV1 (% predicted) liters	82 ± 20 3.2 ± 1.0		81 ± 8 3.3 ± 0.3
FEV1/FVC ratio	70 ± 10		72 ± 12
Positive skin tests	54%		31%
MCh challenge (mg/L)	3.4 ± 1.2		0.7 ± 1.1
Total IgE (IU/L)	78		38

To ensure that the gene signals that most accurately discriminate GC responders from non-responders are captured, the study was expanded to include 96

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-40-

patients (60 GC-S and 36 GC-R) and randomly split cohorts of GC-S and GC-R patients with and without cross validation were analyzed.

The results demonstrate that apart from genes listed in Tables 1, 2A and 2B, 15 additional genes, listed in Table 4A, were identified with the split cohort method and 4 genes, listed in Table 4B, by the cross validation method, which increased the predictive accuracy to 86% and 89% for the independent set and cross validation method, respectively. These genes play a key role in immune function, signal transduction processes and in apoptosis, all of which are highly relevant functions to the mechanisms of glucocorticoid responsiveness in asthma.

10 Table 4A

Induction Independent GenBank	Mean	StdDev	Mean	StdDev
	Resistant		Sensitive	
Z11697	1.8724782	0.33308947	1.58067	0.37548256
A1950382	1.3549194	0.22042978	1.030298	0.2444671
L78440	1.5259613	0.30956995	1.0863237	0.34783307
U19261	1.7525064	0.41711106	1.3473015	0.3836438
M80244	1.9161059	0.56795007	1.1932454	0.40928963
AB023205	2.1412642	0.9683697	1.55956	0.7753593
M58603	1.6857204	0.40931362	1.2413435	0.41113004
L05424	1.8005482	0.49951264	1.3440721	0.3783
R38263	1.4709008	0.3948905	1.2489537	0.32604253
L03411	1.2816724	0.18822539	1.1264083	0.25873253
D63789	1.6949914	0.78736067	1.2824732	0.57320374
X52425	1.4263631	0.3121133	1.1701844	0.32265002
L11329	1.6712576	0.45524144	1.2668103	0.39379898
U48807	2.149289	1.1046098	1.4393674	0.74329394
D79991	1.2781677	0.26072037	1.1245298	0.2646311

30 Table 4B

Induction Cross Validation GenBank	Mean	StdDev	Mean	StdDev
	Resistant		Sensitive	
AB009010	0.7325509	0.3312249	1.4231814	0.5362498
L78440	1.575848	0.33741876	1.1237841	0.30317423
U43185	2.1323266	0.40701827	1.4901624	0.52416813
AB020630	1.6486217	0.2412822	1.2882963	0.31817988

Example 2.

Apart from genes that demonstrated predictive accuracy in the around 80%, a large number of genes were found to be differentially expressed between the two

patient groups. Of those, the genes listed in Tables 5A-E contributed to the predictive signal that was found. These genes were identified by applying the biological approach of the experimental set up (*i.e.*, genes upregulated or downregulated by IL-1 β /TNF α and reversed, at least in part by GC). The ultimate value of the genes in Tables 5A-5E with respect to glucocorticoid prediction will be known when these genes have been validated in a larger cohort of patients.

Table 5A.

	BASELINE EXPRESSION VALUES					
	GC resistant		GC sensitive		P value	
	(n=30)		(n=66)			
MEAN	SEM	MEAN	SEM			
10	Perforin 1 (M28393, 10q22)	6085.97	417.13412	5250.672	208.2762	0.026
	Tumor necrosis factor receptor 2 (75KD) (M32315, 1p36.3-p36.2)	4043.2695	172.13469	3606.906	126.01189	0.047
15	LPS-induced TNF-alpha factor (AF010312, 16p13.3-p12)	4149.5264	339.81314	3394.3865	152.35988	0.018
	Defensin (L12691, 8)	15084.323	1903.8826	10559.057	1213.1726	0.045
	KIAA0542 protein (AB011114, 22q12.2)	4974.1274	1201.7789	8108.8516	872.0196	0.004
20	Beta 2-microglobulin (S82297, 15q21-q22.2)	14026.682	3886.1045	28540.09	3071.3684	0.023
	Granzyme B precursor (M57888, 14q11.2)	3153.3257	372.53757	2298.1396	185.16092	0.01
25	Thymosin, beta 4 (M17733, Xq21.3-q22)	21235.469	2459.579	28695.383	2114.4946	0.042
	HLA class I heavy chain (X58536, 6p21.3)	23571.922	2747.8547	31607.03	2214.8435	0.042
30	Elongation factor EF-1-alpha (J04617, 6q14)	18835.99	3337.1677	30409.002	2609.5315	0.034
	EST (AI526078, 20q13.3)	18714.736	1704.359	24808.363	1547.6501	0.043
	CD98 (M80244, 16q24.3)	798.8602	93.80168	642.308	47.76093	ns**
35	Nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (M58603, 4q24)	1118.8152	131.4039	1171.212	94.15151	ns**
40	Signal transducer and activator of transcription 4 (L78440, 2q32.2-q32.3)	2115.2861	177.11328	2072.295	94.97464	ns**

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-42-

	Nef-associated factor 1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	2744.2788	242.81891	2588.429	162.65399	ns**
	CD44 antigen (L05424, 11p13)	1856.1018	95.87001	1778.6385	104.54533	ns**
5	(2'-5')oligoadenylate synthetase (AJ225089, 12q24.2)	337.42038	18.820648	383.4079	54.559353	ns**
10	Interferon regulatory factor 7 isoform a (U53831, 11p15.5)	820.22296	40.891983	803.94714	37.65985	ns**
	Interferon-inducible protein p78 (M33882, 21q22.3)	692.43274	53.86486	769.75037	61.446373	ns**
15	interferon inducible 1-8U gene (X57352, 11)	10073.882	1202.4331	10348.615	847.59143	ns**
	Interferon stimulated gene (20kD) (U88964, 15q26)	2559.649	120.11462	2733.2332	64.77266	ns**
20	Interferon-stimulated protein, 15 kDa (m13755, 1)	2001.0354	107.30703	2131.9282	121.11149	ns**
	CD44 isoform RC (AF098641, 11p13)	1635.3041	92.87121	1546.3922	101.99627	ns**
25	CD83 antigen (Z11697, 6p23)	4003.7795	509.4784	2995.624	343.3428	ns**
	Interferon stimutable response element (U22970, 1p36)	1222.6351	87.984886	1198.6647	74.25269	ns**
30	TNF receptor-associated factor 1 (U19621, 9q33-q34)	1024.6047	76.8937	970.14984	68.22721	ns**
	Adhesion molecule nimburin 1 (U01512, 9q22)	952.9832	108.31899	819.72675	72.15633	ns**
35	TNF receptor-associated factor 1 (U19261, 9q33-q34)	602.10754	55.548782	552.6948	36.47862	ns**
	Transcription factor ISGF-3 (M97936, 2q32.2)	1047.2883	84.6747	1043.8727	51.559406	ns**
40	interleukin-7 receptor (AF043129, 5p13)	1293.5005	221.00233	1776.9689	196.31573	ns**
	Interleukin 8 (M28130, 4q13-q21)	9098.902	881.07416	7048.5723	759.5493	ns**
45	GRO2 oncogene (M36820, 4q21)	3172.951	401.67627	2370.0527	298.47812	ns**
	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (M24594, 10q25-q26)	242.70598	46.875942	299.46494	47.465668	ns**
50	interferon-induced protein					

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-43-

	with tetratricopeptide repeats 4 (AF026939, 10q24)	335.2246	98.50067	348.74557	38.996685	ns**
5	Macrophage colony stimulating factor 1 (M37435, 1p21-p13)	3976.1692	148.23972	4297.3677	118.11726	ns**
	Ras inhibitor (M37190, 20)	103.64886	51.292507	117.76897	47.070602	ns**
10	Small inducible cytokine A2 (M28225, 17q11.2-q21.2)	176.61205	47.855843	356.2777	170.02516	ns**
	Cyclooxygenase-2 (U04636, 1q25.2-q25.3)	1282.8784	245.26799	976.03503	140.18762	ns**
15	Transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD) (D50683, 3p22)	665.96454	39.320732	684.6929	31.560013	ns**
20	Cyclic AMP-responsive element modulator beta isoform (S68134, 10p12.2-p11.1)	571.4737	76.16772	583.9707	86.563515	ns**
25	Interleukin 1 receptor antagonist (X52015, 2q14.2)	2650.151	386.6683	2049.2832	280.7141	ns**
	Interleukin 6 (X04430, 7p21)	218.93637	79.35666	372.81815	181.83186	ns**
30	NF-associated factor 1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	1628.6475	86.34723	1530.4146	92.62164	ns**
	Small inducible cytokine A7 (X72308, 17q11.2-q12)	121.53884	8.26777	149.0766	20.418268	ns**
35	Small inducible cytokine A2 (M26683, 17q11.2-q21.1)	227.42393	82.810646	527.6503	265.94244	ns**

Table 5B.

IL-1/TNF-INDUCED EXPRESSION VALUES						
		GC resistant (n=30)		GC sensitive (n=66)		
Gene	MEAN	SEM	MEAN	SEM	P value	
40	Perforin 1	5614.334	394.1253	4072.83	214.3326	< 0.0001
	Tumor necrosis factor receptor 2 (75kD) (M32315, 1p36.3-p36.2)	10050.87	586.6837	7283.63	440.3941	0.0004
45	LPS-induced TNF-alpha factor (AF010312, 16p13.3-p12)	5459.401	351.0782	4387.12	170.5484	0.001
	Defensin (L12691, 8)	8846.362	1376.016	4290.63	844.5093	0.009
	KIAA0542 protein (AB01114, 22q12.2)	2017.074	946.1356	8857.14	1124.027	0.01
50	Beta 2-microglobulin					

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-44-

	(S82297, 15q21-q22.2)	6333.009	3069.832	28707	3191.635	0.01
	Granzyme B precursor (m57888, 14q11.2)	1746.806	232.9423	957.865	111.5382	0.016
5	Thymosin, beta 4 (m17733, Xq21.3-q22)	18450.77	2309.75	31440.1	2229.507	0.02
	HLA class I heavy chain (X58536, 6p21.3)	17262.1	2654.092	34519.5	2601.363	0.02
	Elongation factor EF-1-alpha (J04617, 6q14)	15154.59	2826.921	35443.6	2869.217	0.03
10	EST (AI526078, 20q13.3)	15054.68	1528.611	25434.4	1606.93	0.03
	CD98 (M80244, 16q24.3)	5682.373	365.3485	4127.05	234.5741	< 0.0001
	Nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (M58603, 4q24)	7222.51	338.3345	5655.56	215.4376	< 0.0001
15	Signal transducer and activator of transcription 4 (I78440, 2q32.2-q32.3)	7142.53	347.9236	5567.9	216.9498	< 0.0001
	NF-associated factor 1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	10042.95	525.3091	8829.79	312.5778	< 0.0001
20	CD44 antigen (L05424, 11p13)	6209.805	263.4941	5019.8	163.5661	< 0.0001
	(2'-5')oligoadenylate synthetase (AJ225089, 12q24.2)	3611.673	259.3965	1756.89	225.7237	< 0.0001
25	Interferon regulatory factor 7 isoform a (U53831, 11p15.5)	2841.19	237.6626	1681.36	160.3967	< 0.0001
	Interferon-inducible protein p78 (M33882, 21q22.3)	4426.94	533.6766	1780.97	325.196	< 0.0001
30	interferon inducible 1-8U gene (X57352, 11)	5763.147	1332.153	4255.33	398.2605	< 0.0001
	Interferon stimulated gene (20kD) (U88964, 15q26)	6082.724	624.8853	4290.37	330.7253	< 0.0001
35	Interferon-stimulated protein, 15 kDa (M13755, 1)	10922.46	1395.841	4956.73	622.4254	< 0.0001
	CD44 isoform RC (AF09861, 11p13)	5146.13	287.7974	3879.53	144.6777	< 0.0001
40	CD83 antigen (Z11697, 6p23)	9242.953	350.8769	7918.24	339.6289	< 0.0001
	Interferon stimutable response element (U22970, 1p36)	3203.982	495.8736	1631.66	281.1401	0.0001
45	TNF receptor-associated factor 1 (U19261, 9q33-q34)	5005.59	208.4321	4098.21	179.4619	0.0002
	Adhesion molecule ninjurin 1 (U91512, 9q22)	3715.181	268.8716	3157.01	122.5063	0.0003
50	TNF receptor-associated factor 1 (U19261, 9q33-q34)	2364.498	96.09024	2096.81	78.13522	0.0007
	Transcription factor ISGF-3					

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-45-

	(M97936, 2q32.2)	1760.116	279.2687	1217.01	143.1016	0.014
	interleukin-7 receptor (AF043129, 5p13)	2027.312	184.3109	2307.75	174.5007	0.02
5	Interleukin 8 (M28130, 4q13- q21)	13608.48	1609.251	17969.3	1448.031	0.02
	GRO2 oncogene (M35820, 4q21)	6961.234	707.7638	5737.08	415.0885	0.001
10	Interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 1 (M24594, 10q25-q26)	1572.879	319.6902	713.604	178.921	0.009
	interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 4 (AF026939, 10q24)	1759.121	304.6315	828.759	214.6707	0.005
15	Macrophage colony stimulating factor 1 (m37435, 1p21-p13)	3364.842	117.2874	4029.78	110.6731	0.04
	Ras inhibitor (m37190, 20)	1611.356	177.1993	860.944	120.8235	0.0003
20	Small inducible cytokine A2 (M28225, 17q11.2-q21.1)	10048.81	755.9874	8072.22	495.8341	0.007
	Cyclooxygenase-2 (U04636, 1q25.2-q25.3)	3765.675	255.1504	2568.34	233.2174	< 0.0001
25	Transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD) (D50683, 3p22)	740.8099	79.60563	844.935	86.39076	0.04
30	Cyclic AMP-responsive element modulator beta isoform (S681634, 10p12.1-p11.1)	6531.873	386.0808	5686.2	268.2961	0.017
	Interleukin 1 receptor antagonist (X52015, 2q14.2)	13211.16	1126.502	9535.15	642.7608	< 0.0001
	Interleukin 6 (X04430, 7p21)	13482.49	852.9056	10099.2	625.5049	< 0.0001
35	Nf- κ B-associated factor 1 (A1011896, 5q32-q33.1)	5100.91	671.4467	4788.67	294.8366	0.004
	Small inducible cytokine A7 (X72308, 17q11.2-q12)	766.0895	165.4574	686.035	91.85867	0.02
40	Small inducible cytokine A2 (M26683, 17q11.2-q21.1)	17108.01	1043.492	12566.7	742.7468	0.003

Table 5C.

		L-1/TNF-INDUCED EXPRESSION VALUES WITH GC				
		GC resistant (n=30)		GC sensitive (n=66)		P value
Gene (Genbank, Map)		MEAN	SEM	MEAN	SEM	
45	Perforin 1 (M28393, 10q22)	5932.6836	324.4973	4613.415	214.7653	0.0007
	Tumor necrosis factor receptor 2 (75kD) (M32315, 1p36.3-p36.2)	7508.2896	451.0622	6416.635	365.9207	0.0731
	LPS-induced TNF- α					

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-46-

	Factor (AF010312, 16p13.3-p12)	5786.222	306.7707	4946.478	171.3137	0.0127
	Defensin (L12691, 8)	11441.772	1372.689	7818.661	922.0382	0.0251
5	KIAA0542 protein (AB011114, 22q12.2)	5714.3643	1558.592	9333.106	1256.301	0.0201
	Beta 2-microglobulin (S82297, 15q21-q22.2)	13301.895	2780.221	30811.06	3742.183	0.0027
10	Granzyme B precursor (M57888, 14q11.2)	1877.4227	216.4729	1227.949	107.5656	0.003
	Thymosin, beta 4 (M17733, Xq21.3-q22)	19120.795	1911.539	26315.6	1943.828	0.019
	HLA class I heavy chain (X58536, 6p21.3)	22299.861	2913.894	34067.19	3096.341	0.0145
15	Elongation factor EF-1-alpha (J04617, 6q14)	18670.865	3364.731	33042.49	3553.801	0.0915
	EST (AIS26078, 20q13.3)	17650.287	1587.158	25903.59	1771.242	0.0032
	CD98 (M80244, 16q24.3)	5768.97	406.1578	4463.957	177.7024	0.0011
20	Nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (M58603, 4q24)	6144.28	307.2589	5010.971	179.1457	0.0012
25	Signal transducer and activator of transcription 4 (L78440, 2q32.2-q32.3)	6800.764	284.0342	5744.643	184.6763	0.0021
	NF-associated factor 1 (AJ011896, 5q32-q33.1)	9655.332	495.7066	8075.491	259.7791	0.0026
	CD44 antigen (L05424, 11p13)	4486.082	168.28	3818.656	133.3167	0.0042
30	(2'-5')oligoadenylate synthetase (AJ225089, 12q24.2)	1667.9843	164.3503	1064.525	130.1923	0.0054
35	Interferon regulatory factor 7 isoform a (U53831, 11p15.5)	2292.962	205.8358	1611.122	146.0624	0.007
	Interferon-inducible protein p78 (M33882, 21q22.3)	2946.7205	383.2516	1801.234	251.7923	0.0099
40	interferon inducible 1-8U gene (X57352, 11)	8983.514	1053.469	6070.849	616.6636	0.0109
	Interferon stimulated gene (20kD) (U88964, 15q26)	6519.748	401.4738	5387.727	239.7823	0.012
45	Interferon-stimulated protein, 15 kDa (m13755, 1)	6071.2886	915.0679	3757.143	548.3279	0.021
	CD44 isoform RC (AF098641, 11p13)	3719.6047	178.2906	3236.746	115.0394	0.0225
	CD83 antigen (Z11697, 6p23)	4931.093	295.5049	4274.713	230.1791	0.0354
50	Interferon stimutable response element (U22970, 1p36)	2737.275	346.7752	1615.407	174.2281	0.011
	TNF receptor-associated factor 1 (U19621, 9q33)	3581.1409	185.2364	2935.34	116.3565	0.0027

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-47-

	q34)					
	Adhesion molecule integrin 1 (U01512, 9q22)	3173.9238	222.309	2405.162	110.9695	0.0008
5	TNF receptor-associated factor 1 (U19261, 9q33- q34)	1790.2013	89.11578	1506.127	60.22232	0.0085
	Transcription factor ISGF-3 (M97936, 2q32.2)	1490.314	178.5814	1048.989	102.7824	0.0212
10	interleukin-7 receptor (AF043129, 5p13)	3344.87	271.804	4565.661	279.8599	0.0057
	interleukin 8 (M28130, 4q13-q21)	12848.457	926.3713	14222.37	992.1271	ns**
	GRO2 oncogene (M36820, 4q21)	5052.562	564.9373	4225.244	349.2652	ns**
15	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (M24594, 10q25- q26)	1094.8508	209.4019	672.1904	127.6253	ns**
20	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4 (AF026939, 10q24)	1109.5538	162.5891	743.2253	123.5186	ns**
25	Macrophage colony stimulating factor 1 (M37435, 1p21-p13)	3624.9211	172.8444	3983.53	132.856	ns**
	Ras inhibitor (M37190, 20)	1615.0812	183.4838	1285.366	118.4882	ns**
30	Small inducible cytokine A2 (M28225, 17q11.2-q21.2)	3485.5967	409.9117	2908.787	418.8578	ns**
	Cyclooxygenase-2 (U04636, 1q25.2-q25.3)	1004.8341	151.2995	1012.272	148.0441	ns**
35	Transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD) (D50683, 3p22)	998.71014	94.93384	1135.562	93.18079	ns**
	Cyclic AMP-responsive element modulator beta isoform (S68134, 10p12.2-p11.1)	4027.2566	290.9312	4019.365	190.1472	ns**
40	Interleukin 1 receptor antagonist (X52015, 2q14.2)	4454.89	509.2246	3887.395	543.3725	ns**
	Interleukin 6 (X04430, 7p21)	6479.466	737.0165	5473.95	617.1881	ns**
45	Nef-associated factor 1 (A2011896, 5q32-q33.1)	5710.245	619.1145	5202.576	322.5588	ns**
	Small inducible cytokine A7 (X72308, 17q11.2-q12)	283.77304	23.31367	334.6954	61.4575	ns**
50	Small inducible cytokine A2 (M26683, 17q11.2-q21.1)	5850.6055	630.0103	4954.649	646.567	ns**

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-48-

Table 5D.

Genbank	Systematic	Common	Description	Map	
AL049963	40456_at		Source: <i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp564A132 (from clone DKFZp564A132)	4	
5	S68134	32066_g_at	CREM	CREM- β	10p12.1-p11.1
	M58603	1378_g_at	KBF1	Human nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF- κ B) mRNA, complete cds	4q24
	M13755	1107_s_at	ISG15	17-kDa protein	1
	L31584	1097_s_at	EBI1 BLR2 CMKBR7	Source: Human G-protein-coupled receptor (EBI 1) gene exon 3	17q12-q21.2
10	AF022375	36100_at	VEGFA	<i>H. sapiens</i> vascular endothelial growth factor: mRNA, complete cds.	6p12
	M58603	1377_at	KBF1	Human nuclear factor kappa-B DNA binding subunit(NF- κ B) mRNA, complete cds	4q24
	M58603	38438_at	KBF1	Human nuclear factor kappa-B DNA binding subunit (NF- κ B) mRNA, complete cds	4q24
	U88964	33304_at	HBM45	low level estrogen- modulated; deduced ORF detected by anti-peptide antisera	15q26
	L08177	931_at	EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	13
15	D67031	33102_at	ADDL	Source: <i>H. sapiens</i> ADDL mRNA for adducin-like protein, complete cds.	10q24.2-q24.3
	AL021977	36711_at	HSS06A DKFZP586A1024	C22orf5	22q12
	V01512	1916_s_at	c-fos	Source: Human cellular oncogene c-fos (complete sequence).	14q24.3
	X59417	36122_at	JOTA PROS27	Source: <i>H.sapiens</i> PROS-27 mRNA	14q13
		HH BASELINE			
		Rest (*)S			
20	Genbank	Systematic	Common	Description	Map
	X02910	1852_at	TNFA DIF TNFSF2	Tumor necrosis factor	6p21.3
	M15330	39402_at	IL1B	Source: Human interleukin 1- β (IL1B) mRNA, complete cds	2q14
	J04130	36674_at	MIP-1-BETA	SCYA4, MIP1B	17q21
	M28130	1369_s_at	IL8	Source: Human interleukin 8 (IL8) gene, complete cds	4q13-q21
25	D90144	36103_at	MIPA SCYA3	MIP1A	17q11-q21
	S81914	1237_at	IEX-1	radiation-inducible immediate-early gene	6p21.3
	L11329	1292_at	PAC-1 PAC1	PAC-1, putative	2q11
	M57888	32370_at	CSPB CTLA1 CCPI	Source: Human (clone lambda B34)	14q11.2
			CGL-1 CSP-B	cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1 (CTLA1) gene complete cds	

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-49-

	M16441	259_s_at	TNFSF1 TNFB LT	lymphotoxin	6p21.3
	X68277	1005_at	CL 100	Source: <i>H. sapiens</i> CL 100 mRNA for protein tyrosine phosphatase	5q34
	X78992	32588_s_at	ERF2 TIS11D	Source: <i>H. sapiens</i> ERF-2 mRNA	2
	L12691	31506_s_at	DEF3 HNP-3	defensin	8
5	Z11697	37536_at	CD83	a cell-surface molecule expressed by interdigitating reticulum cells, Langerhans cells and activated lymphocytes. A member of immunoglobulin superfamily	6p23
	M69199	38326_at	G0S2	Source: Human G0S2 protein gene, complete cds	1q32.2-q41
	M17017	35372_r_at	MDNCF SCYB8 IL8	IL8	4q13-q21
	U09937	189_s_at	URKR UPAR CD87	Source: Human urokinase-type plasminogen receptor, exon 7	19q13
	U27467	2002_s_at	BCL2L5 BFL1 GRS HBPA1	Bcl-2 related; similar to mouse hemopoietic-specific early-response protein, Swiss-Prot Accession Number Q07440; similar to mouse transforming protein Bcl-2- β , Swiss-Prot Accession Number P10418; Method: conceptual translation	15q24.3
10	A1022315	37456_at	dJ117715.1	supported by predicted exons match: ESTs: Em:AA316883	22q13.1
	M59465	595_at	TNFAIP2 A20	tumor necrosis factor alpha inducible protein	6
	U04636	1069_at	hCox-2	Source: <i>H. sapiens</i> cyclooxygenase-2 (hCox-2) gene, complete cds	1q25.2-q25.3

Table SE.

15	Genbank	Common	Product	Keywords	Custom Field 2
	AL049963				D4S1572
	S68134	CREM	cyclic AMP-responsive element modulator		D10S208
	M58603	KBF1	nuclear factor kappa-B DNA binding subunit	nuclear factor kappa-B DNA binding subunit	D4S1572
	M13755	ISG15	interferon-stimulated protein, 15 kDa	interferon; interferon-inducible protein	D8S264
20	L31584	EB11 BLR2 CMKBR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	G protein-coupled receptor	#N/A
	AF022375	VEGFA	vascular endothelial growth factor		D6S282
	M58603	KBF1	nuclear factor kappa-B DNA binding subunit	nuclear factor kappa-B DNA binding subunit	D4S1572
	M58603	KBF1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in	nuclear factor kappa-B DNA binding subunit	D4S1572

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-50-

		B-cells 1 (p105)		
	U88964	HEM45	interferon stimulated gene 20kD	#N/A
25	L08177	EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)	D13S1298
	D67031	ADDL	adducin 3, isoform a	adducin-like protein; ADDL D10S597
	AL021977	HS506A	chromosome 22 open reading frame 5	HTG; CpG island; MAFF #N/A
		DKFZP586A1024		
	V01512	v-fos	v-fos FBI murine osteosarcoma viral oncogene homolog	oncogene #N/A
	X59417	IOTA PROS27	prosomal P27K protein	PROS-27 gene; prosomal consensus; prosomal protein; RNA-binding protein #N/A
30	Genbank	Common	Product	Keywords Custom Field 2
	X02910	TNFA DIF TNFSF2	tumor necrosis factor (cachectin)	signal peptide; tumor necrosis factor #N/A
	M15330	IL1B	interleukin 1β	interleukin-1β D2S160
	J04130	MIP-1-BEFA	small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1β)	act2 gene; immune activation gene D17S933
	M28130	IL8	interleukin 8	interleukin 8 #N/A
35	D90144	MIPA SCYA3	small inducible cytokine A3 (homologous to mouse Mip-1α)	LD78; LD78 alpha; cytokine; inducible gene family; secreted peptide #N/A
	S81914	IEX-1	immediate early response 3	D6S1660
	L11329	PAC-1 PAC1	protein tyrosine phosphatase	protein-tyrosine phosphatase; tyrosine phosphatase D2S2264
	M57888	CSPB CTLA1 CCP1 CGL-1 CSP-B	granzyme B precursor	cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1 #N/A
	M16441	TNFSF1 TNFB LT	lymphotoxin alpha precursor	lymphotoxin; tumor necrosis factor #N/A
40	X68277	CL 100	protein-tyrosine phosphatase	tyrosine phosphatase #N/A
	X78992	ERF2 TIS11D	butyrate response factor 2 (EGF-response factor 2)	ERF-2 gene D2S2259
	L12691	DEF3 HNP-3	defensin, alpha 3, neutrophil-specific	#N/A
	Z11697	CD83	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	HB15 gene; immunoglobulin superfamily D6S259
	M69199	G0S2	putative lymphocyte G0/G1 switch gene	G0S2 protein #N/A
45	M17017	MDNCF SCYB8 IL8	interleukin 8	beta-thromboglobulin D4S3042
	J09937	URKR UPAR CD87	plasminogen activator, urokinase receptor	#N/A
	U27467	BCL2L5 BFL1 GRS	BCL2-related protein A1	D15S1005

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-51-

	HBPA1			
AL022315	dJ117715.1	lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2)	HTG; CpG island; galectin; lectin LGALS2; MSE55	#N/A
M59465	TNFA1P2 A20	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3		#N/A
50 U04636	hCox-2	cyclooxygenase-2		#N/A

While this invention has been particularly shown and described with references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the scope of the invention encompassed by the appended claims.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-52-

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient, comprising:
 - 5 a) obtaining a sample of cells from the patient;
 - b) obtaining a gene expression profile from the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells with specific mediators; and
 - 10 c) comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile,wherein similarity between the sample expression profile and the reference expression profile predicts the efficacy of the drug for treating the inflammatory disease in the patient.
2. The method of Claim 1, wherein the expression profile comprises expression values for one or more genes listed in Tables 1, 2A, 2B, 4A, 4B and 5A-5E.
3. The method of Claim 2, wherein the expression profile comprises expression values for one or more genes listed in Tables 1, 2A and 2B.
4. The method of Claim 2, wherein the expression profile comprises expression values for one or more genes listed in Tables 4A and 4B.
- 20 5. The method of Claim 2, wherein the expression profile comprises expression values for one or more genes listed in Tables 5A-5E.
6. The method of Claim 1, further comprising exposing the sample to the drug for treating the inflammatory disease prior to obtaining the gene expression profile of the sample.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-53-

7. The method of Claim 1, wherein the inflammatory disease is selected from the group consisting of: asthma, atopy, rheumatoid arthritis, juvenile chronic arthritis, psoriasis, inflammatory bowel disease and sepsis.
8. The method of Claim 7, wherein atopy is an atopic inflammatory disease
- 5 12. The method of Claim 1, wherein the sample is obtained via biopsy from synovial membrane or airway smooth muscle.
9. The method of Claim 1, wherein the drug is selected from a class of drugs selected from the group consisting of: corticosteroids, β 2-agonists and leukotriene antagonists for asthma.
- 10 10. The method of Claim 1, wherein the drug is selected from the group consisting of symptom relievers and anti-inflammatory drugs for an inflammatory disease condition.
11. The method of Claim 1, wherein the sample of cells is derived from peripheral blood mononuclear cells or neutrophils.
- 15 13. The method of Claim 1, wherein the gene expression profile of the sample is obtained using a hybridization assay to oligonucleotides contained in a microarray.
- 20 14. A method for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient according to the method of Claim 13 comprising hybridization probes capable of hybridizing to polynucleotides corresponding to the informative genes and reagents for detecting hybridization.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-54-

15. The method of Claim 1, wherein the gene expression profile of the sample is obtained by detecting the protein products of the informative genes.
16. A method for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient according to the method of Claim 15 comprising antibodies capable of specifically binding protein products of the informative genes and reagents for detecting antibody binding.
17. The method of Claim 1, wherein the reference expression profile is that of cells derived from patients that do not have asthma.
18. The method of Claim 1, wherein the reference expression profile is that of cells derived from patients that do not have an inflammatory disease.
19. The method of Claim 1, wherein the cells are treated with the drug candidate before the expression profile is obtained.
20. A method of screening for glucocorticoid sensitivity in an asthma patient comprising:
- 15 a) obtaining a sample of cells from the patient;
- b) obtaining a gene expression profile from the sample in the absence and presence of *in vitro* activation of the cells with specific mediators; and
- 20 c) comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile,
- wherein similarity in expression profiles between the sample and reference profiles indicates glucocorticoid sensitivity in the patient from whom the sample was obtained.
21. A method for predicting efficacy in a human asthmatic patient of leukotriene antagonists, comprising:
- 25

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

-55-

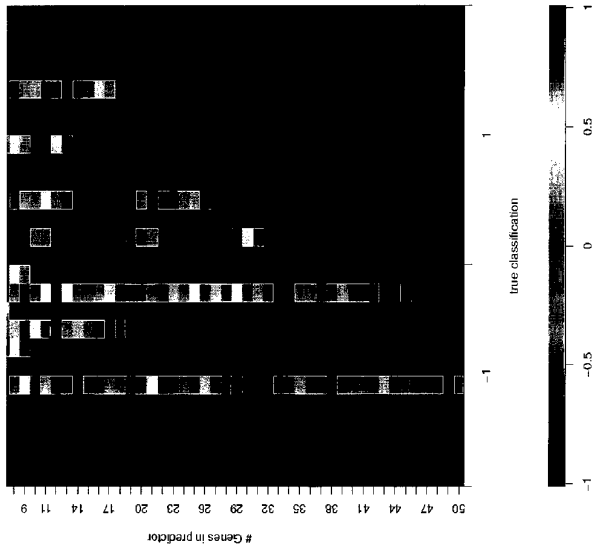
- a) obtaining a sample of cells from the patient;
 - b) obtaining a gene expression profile from the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells with specific mediators; and
 - 5 c) comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile,
wherein similarity in expression profiles between the sample and reference profiles predicts the efficacy in the human asthmatic patient of leukotriene antagonists.
- 10 22. An expression profile comprising expression levels of gene products from one or more genes described in Tables 1, 2A, 2B, 4A, 4B and 5A-5E.

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

1/5

Fig. 1



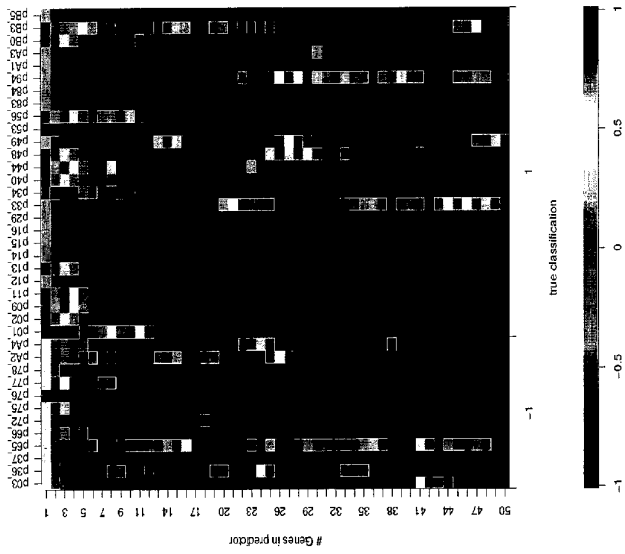
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

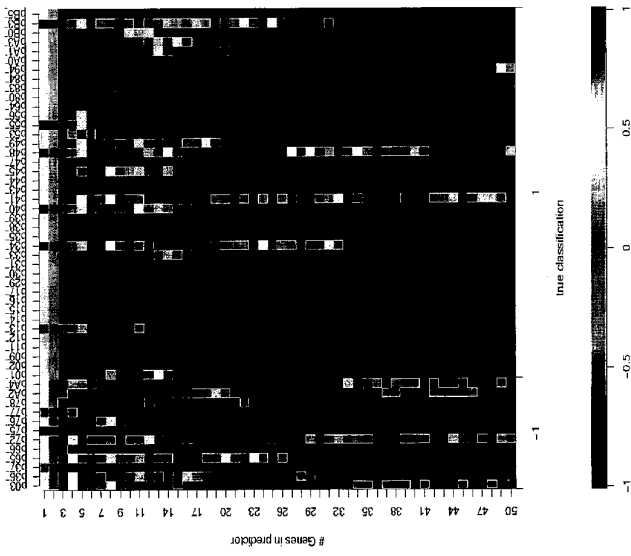
2/5

Fig. 2



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 3



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

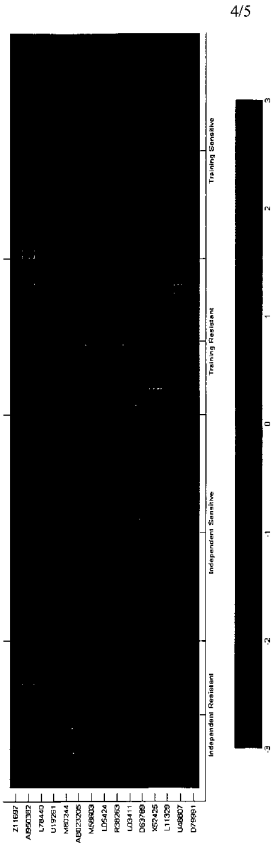


Fig. 4

WO 03/021261

PCT/IB02/03613

Prediction of LT-responsiveness

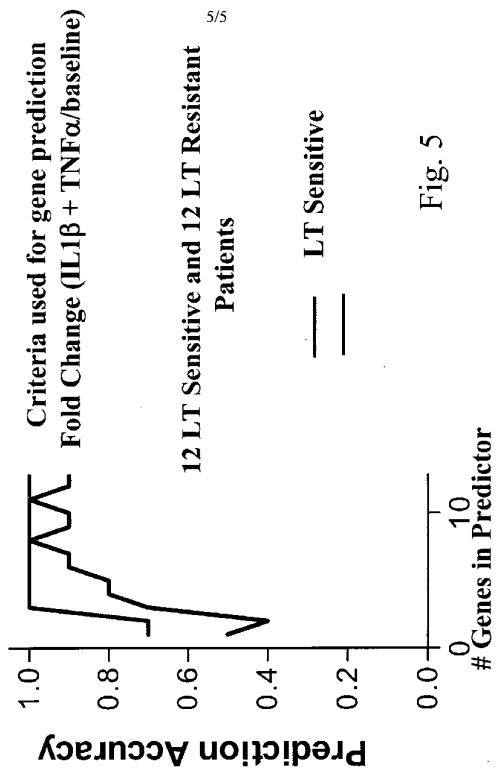


Fig. 5

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/021261 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/50, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/IB02/03613
- (22) International Filing Date: 2 September 2002 (02.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/947,991 6 September 2001 (06.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/947,991 (CIP) US Filed on 6 September 2001 (06.09.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): DECODE GENETICS EHF. [IS/IS]; Sturlugotu 8, 1S-101 Reykjavik (IS).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): HAKONARSON, Hakon [IS/IS]; Grjetasel 3, 1S-109 Reykjavik (IS).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 20 November 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/021261 A3

(54) Title: METHODS FOR PREDICTING DRUG SENSITIVITY IN PATIENTS AFFLICTED WITH AN INFLAMMATORY DISEASE

(57) Abstract: Methods are disclosed for predicting the efficacy of a drug for treating an inflammatory disease in a human patient, including: obtaining a sample of cells from the patient; obtaining a gene expression profile of the sample in the absence and presence of *in vitro* modulation of the cells with specific cytokines and/or mediators; and comparing the gene expression profile of the sample with a reference gene expression profile, wherein similarities between the sample expression profile and the reference expression profile predicts the efficacy of the drug for treating the inflammatory disease in the patient.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IB 02/03613
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N 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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CLARKE P A ET AL: "GENE EXPRESSION PROFILING OF HUMAN COLON CANCER CELLS FOLLOWING INHIBITION OF SIGNAL TRANSDUCTION BY 17-ALLYLAMINO-17-DEMETHOXYGELDANAMYCIN, AN INHIBITOR OF THE HSP90 MOLECULAR CHAPERONE" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 19, no. 36, 24 August 2000 (2000-08-24), pages 4125-4133, XP001094984 ISSN: 0950-9232 the whole document --- -/--	1-3,6-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 May 2003	27.08.03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hinchliffe, P	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IB 02/03613
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HEYINICK K ET AL: "The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-kappaB activation at the level of TRAF6" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 442, no. 2-3, 15 January 1999 (1999-01-15), pages 147-150, XP004259055 ISSN: 0014-5793 the whole document ---</p>	1-3,6-21
Y	<p>KHOO C ET AL: "DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CYSTEINE-RICH INTESTINAL PROTEIN IN LIVER AND INTESTINE IN CCL4-INDUCED INFLAMMATION" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, BETHESDA, MD, US, vol. 270, no. 4Pt1, April 1996 (1996-04), pages 6613-6618, XP008014444 ISSN: 0002-9513 the whole document ---</p>	1-3,6-21
Y	<p>SABAN MARCIA R ET AL: "Time course of LPS-induced gene expression in a mouse model of genitourinary inflammation." PHYSIOLOGICAL GENOMICS, vol. 5, June 2001 (2001-06), pages 147-160, XP002240639 June, 2001 ISSN: 1094-8341 the whole document ---</p>	1-3,6-21
Y	<p>SUTHERLAND A: "Gene expression analysis in immunomodulatory and inflammatory model systems using Affymetrix GeneChip expression arrays." CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 24, no. 12, 2000, page 975 XP002240640 7th International Congress of Cell Biology; Gold Coast, Queensland, Australia; September 24-28, 2000 ISSN: 1065-6995 the whole document ---</p>	1-3,6-21
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/IB 02/03613

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	<p>GALON JEROME ET AL: "Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells." FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 61-71, XP002240642 January, 2002 ISSN: 0892-6638 the whole document -----</p>	1-3,6-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IB 02/03613
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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 22 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	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:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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, 2, 3, 6-19, 20, 21 (all partially)
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB 02/03613

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1,2,3,6-19,20,21 (all partially)

The methods relate to predicting the effect of a drug on inflammatory conditions in humans by assaying its effects on a range of genes in a sample obtained from the patient treated. The method is practiced upon one or more genes so in its simplest embodiment the level of znf267 (first protein given in table 1) is assayed in a sample and compared with a "normal".

2. Claims: 4,5

These claims refer to genes found in tables 4a,4b and 5a, 5b respectively. The same arguments made above apply here.

International Application No. PCT/IB 02/03613

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.1

Although claims 1-22 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 22

Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
	C 1 2 N 15/00 F	
	C 1 2 N 15/00 A	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR42
 QR50 QR55 QR66 QR72 QR77 QR82 QS03 QS34 QS36 QS39
 QX01

专利名称(译)	预测患有炎症疾病的患者的药物敏感性的方法		
公开(公告)号	JP2005502345A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003525293	申请日	2002-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	解码遗传学私营有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	解码遗传学E. 蚀刻F.		
[标]发明人	ハコナーソンハコン		
发明人	ハコナーソン,ハコン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6809 G01N33/5047 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CA12 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
优先权	09/947991 2001-09-06 US		
其他公开文献	JP2005502345A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

从患者获得细胞样品;在不存在和存在具有特定细胞因子和/或介质的细胞的体外调节的情况下获得样品基因表达谱;和进行比较的基因表达图谱与参考基因表达模式的样品中,公开了一种用于预测在人类患者中治疗炎症性疾病的药物的功效的方法,参见其中所述样品表达谱配置文件之间的相似预测药物治疗患者炎症性疾病的功效。

$$P(x_1 | GCS)$$

$$P(x_1 | GCR)$$