

(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2004-511217

(P2004-511217A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
<b>G O 1 N 27/62</b>	G O 1 N 27/62	V
<b>G O 1 N 33/53</b>	G O 1 N 33/53	M
<b>G O 1 N 37/00</b>	G O 1 N 37/00	1 O 2

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 76 頁)

(21) 出願番号	特願2002-506246 (P2002-506246)	(71) 出願人	500247105 エビゲノミクス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成13年6月29日 (2001.6.29)		ドイツ国、デー-10435 ベルリン、 カスタニーンアレー 24
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月27日 (2002.12.27)	(74) 代理人	100093735 弁理士 荒井 鐘司
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/001501	(74) 代理人	100105429 弁理士 河野 尚孝
(87) 国際公開番号	W02002/000932	(74) 代理人	100108143 弁理士 嶋崎 英一郎
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)	(72) 発明者	オレク, アレクサンダ ドイツ国、10115 ベルリン、シュロ ーデルシュトラッセ 13
(31) 優先権主張番号	100 32 529.7		
(32) 優先日	平成12年6月30日 (2000.6.30)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織適合性の重複体内の遺伝的・主要パラメーターによる診断

## (57) 【要約】

本発明は組織適合性の重複体 (MHC) 内の遺伝的、後天的、主要パラメーターによる診断のための、核酸、オリゴヌクレオチッド、PNA-オリゴマー及び診断方法に関する。

【解決手段】 組織適合性の重複体 (MHC) 内の遺伝的、後天的パラメーターの診断のために、核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

SEQ ID - NO : 1 または SEQ ID - NO : 2 に適合する、化学処理されたゲノム DNA の相補的または同一の、少なくとも 20 塩基対長の一つの断片を含む組織適合性の大複合体 (MHC) 内の遺伝的パラメーターの一組の診断のための核酸。

## 【請求項 2】

SEQ ID - NO : 1 または SEQ ID - NO : 2 に適合する、塩基配列の少なくとも一つの CpG ジヌクレオチッドを含む断片に対して、相補的または同一の、少なくとも 13 ヌクレオチッド長を有する、少なくとも一つの塩基配列を、その都度含む、予め、処理されたゲノム DNA 中のシトシンのメチル化状態の検査のためのオリゴヌクレオチッド。 10

## 【請求項 3】

CpG ジヌクレオチッドのシトシンが 13 mers の 5' - 末端の 5 . - 9 . ヌクレオチッドであることを特徴とする請求項 2 に記載のオリゴヌクレオチッド。

## 【請求項 4】

SEQ ID - NO : 1 または SEQ ID - NO : 2 の一つの CpG ジヌクレオチッド毎に一つのヌクレオチッドが存在することを特徴とする請求項 2 に記載のオリゴヌクレオチッドの一組。

## 【請求項 5】

SEQ ID - NO : 1 または SEQ ID - NO : 2 に適合する、塩基配列の少なくとも一つの CpG ジヌクレオチッドを含む断片に対して、相補的または同一の、少なくとも 9 ヌクレオチッド長を有する、少なくとも一つの PNA 塩基配列を含む、予め、化学処理されたゲノム DNA 中のシトシンのメチル化状態の検査のための PNA (ペプチッド核酸) オリゴマー。 20

## 【請求項 6】

CpG ジヌクレオチッドのシトシンが 9 mers の 5' - 末端の 4 . - 6 . ヌクレオチッドであることを特徴とする請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチッド。

## 【請求項 7】

SEQ ID - NO : 1 または SEQ ID - NO : 2 に適合する一つの塩基配列の CpG ジヌクレオチッド毎に一つのオリゴヌクレオチッドが存在することを特徴とする請求項 5 に記載の PNA - オリゴマーの一組。 30

## 【請求項 8】

請求項 2 乃至 7 の何れか 1 項に記載の、少なくとも 10 個のオリゴヌクレオチッドまたは PNA 配列を含む、シトシンのメチル化状態の検査のためのオリゴマーソンの一組及び / または化学的前処理されたゲノム DNA 中の単一多形性ヌクレオチッドの一組。

## 【請求項 9】

固相の一定の位置に結合していることを特徴とする請求項 2 乃至 8 の何れか 1 項に記載の、異なるオリゴヌクレオチッド及び / または PNA - オリゴマー配列の配置。

## 【請求項 10】

直角または六角形の格子形で、平坦な固相上に、配置されていることを特徴とする請求項 9 に記載の、異なるオリゴヌクレオチッド及び / または PNA - オリゴマー配列の配置。 40

## 【請求項 11】

その配列がその都度、少なくとも、SEQ ID - NO : 1 または SEQ ID - NO : 2 に適合する塩基配列の 18 塩基対長の塩基配列の断片に、順または逆相補的である、少なくとも二つのオリゴヌクレオチッドを含むプライマーオリゴヌクレオチッドの一組。

## 【請求項 12】

CpG ジヌクレオチッドを含まないことを特徴とする請求項 11 に記載のプライマーオリゴヌクレオチッドの一組。

## 【請求項 13】

少なくとも、一つのプライマーが一つの固相に結合することを特徴とする請求項 11 または 12 の何れか 1 項に記載のプライマーオリゴヌクレオチッドの一組。 50

## 【請求項 14】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、自己免疫性疾患の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 15】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、リウマチ性関節炎の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 16】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、糖尿病の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。 10

## 【請求項 17】

糖尿病において、タイプI糖尿病またはインスリン依存型糖尿病( IDDM )が問題であることを特徴とする、請求項16に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 18】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、遺伝性の血色素症の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。 20

## 【請求項 19】

遺伝的血色素症において、遺伝子血色素症( GH )またはマイルドタイプ血色素症が問題であることを特徴とする、請求項18に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 20】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、精神分裂症の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 21】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、多発性硬化症の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。 30

## 【請求項 22】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、Systemischer Lupus 紅斑症の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 23】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、サルコイド症の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。 40

## 【請求項 24】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、胆嚢硬変症の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 25】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、筋炎の診断のために、請求項1乃至13の何れか1項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを使用すること。

## 【請求項 26】

MHC内のメチル化サンプルの解析により、乾癬の診断のために、請求項1乃至13の何 50

れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 2 7】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、腎炎の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 2 8】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、癌の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 2 9】

癌の種類において、頸部および頭部のガンが問題であることを特徴とする、請求項 2 8 に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 0】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、I g A 腎障害の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 1】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、高血圧症の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 2】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、ベーチェット病の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 3】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、ゲー - ホイプナー - ヘルター - タイゼン - 病 ( Z o e l i a k i e ) の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 4】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、筋無力症の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 5】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、脊椎関節炎の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 6】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、結核の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 7】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、心筋肥大症の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 8】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、バセドウ氏病の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 3 9】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、若年性リュウマチ性関節炎の診断のために、

10

20

30

40

50

請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 4 0】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、癩癩の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 4 1】

癩癩において特発性全身性癩癩または若年性筋痙攣性癩癩が問題であることを特徴とする、請求項 4 0 に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

10

【請求項 4 2】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、タカヤス ( T a k a y a s u ) - 病の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 4 3】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、多発性免疫不全症の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 4 4】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、レブラ感受性体質の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

20

【請求項 4 5】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、マラリア感受性体質の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

【請求項 4 6】

M H C 内のメチル化サンプルの解析により、リーシュマニア感受性体質の診断のために、請求項 1 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載の核酸、オリゴヌクレオチッドまたは P N A - オリゴマーを使用すること。

30

【請求項 4 7】

M H C 内の遺伝的パラメーターによる診断のために請求項 1 に記載の核酸を使用すること。

【請求項 4 8】

下記各段階よりなることを特徴とする、M H C 内の遺伝的パラメーターにより、シトシンのメチル化の解析により、請求項 1 乃至 4 7 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチッドまたは P N A オリゴマーの組で行う、診断方法。

a) ゲノム D N A 試料において、化学処理により、5 - 位置の非メチル化シトシン塩基をウラシルに変換する。

b) この化学前処理されたゲノム D N A を請求項 1 1 または 1 2 記載のプライマーオリゴヌクレオチッドの組及びポリメラーゼを使用し、増幅して断片とする。

40

c) 請求項 2 乃至 8 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチッドまたは P N A ゾンデの組によって、増幅産物をハイブリッド化する。

d) ハイブリッド化された増幅産物を検出し、映像化する。

【請求項 4 9】

各々が 1 0 0 ~ 2 , 0 0 0 の塩基対長である、異なる、1 0 を超える断片が増幅されることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

重亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩の 1 種の溶液による化学処理を実施することを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

50

## 【請求項 5 1】

ポリメラーゼが耐熱性 DNA - ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 4 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により行なわれることを特徴とする請求項 4 8 乃至 5 1 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

増幅産物に付加される標識は、一つのオリゴヌクレオチッド配列が存在する固相の各位置を確認することができるものであることを特徴とする請求項 4 8 乃至 5 2 の何れか 1 項に記載の方法。

10

## 【請求項 5 4】

請求項 9 または 1 0 に記載の配置を使用し、固相表面がシリカ、ガラス、ポリスチロール、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

## 【請求項 5 5】

多くの DNA - 断片の増幅が一つの反応器中で行なわれることを特徴とする請求項 4 8 乃至 5 4 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

増幅産物の標識がフルオレスセンスによる標識であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

20

## 【請求項 5 7】

増幅産物の標識が放射性核種による標識であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

増幅産物の標識が質量分析計で実証される、標準的質量の、除去可能な分子断片であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

増幅産物または増幅産物の断片が質量分析計で実証されることを特徴とする請求項 4 8 、 4 9 または 5 3 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6 0】

質量分析計での検知能力の更なる改善のために、生成された各断片が、陽または陰荷電を示すことを特徴とする請求項 5 8 または 5 9 の何れか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 6 1】

マトリックス補助レーザー脱離 / イオン化質量分析 (MALDI) または電子散布質量分析 (ESI) による検知が行なわれ、映像化されることを特徴とする請求項 5 8 乃至 6 0 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

ゲノム DNA が DNA 試料から得られ、DNA の供給源が例えば、細胞列、生検、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液 ; パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織 ; 組織の顕微鏡スライドガラス及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせであることを特徴とする請求項 4 8 乃至 6 1 の何れか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 6 3】

異常が MHC 内のメチル化サンプルと関連するものである、請求項 4 8 乃至 6 2 の何れか 1 項に記載の、患者または健常者個人に発生した異常に対する診断及び / または予備診断方法。

## 【請求項 6 4】

MHC 内の遺伝的パラメーターを診断することを特徴とする請求項 4 8 乃至 6 3 の何れか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

50

重亜硫酸塩を含む反応剤、請求項 1 1 または 1 2 に記載の増幅産物製造のためのプライマー 1 式、請求項 2 乃至 8 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチッド及び/または P N A - オリゴマー及び請求項 4 8 乃至 6 3 の何れか 1 項に記載の方法の実施及び評価用の手引書からなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は組織適合性の大複合体 ( M H C ) 内の遺伝的主要パラメーターによる診断のための核酸、オリゴヌクレオチッド、P N A - オリゴマー及び方法に関する。

【0002】

10  
 昨年の方法開発後の分子生物学で成功した研究段階は、遺伝子自体、R N A における遺伝子の翻訳及びそれから生成する蛋白質である。個々の開発経過における何時、どの遺伝子が評価されたか、いかにして特定の細胞及び組織の特定の遺伝子の活性化及び阻害が制御されるかは、遺伝子またはゲノムのメチル化の程度及び特性に相関する。その限りでは、個々の遺伝子またはゲノムの変化したメチル化サンプルにおける病原状態が表現される。

【0003】

組織適合性の大複合体 ( M H C ) は免疫的及び非免疫的機能を有する遺伝子グループであり、全ての脊椎動物に見られる [ " B o t h m a n & b i r d & b e a s t " : c o m p a r a t i v e o r g a n i z a t i o n o f M H C g e n e s . 1 9 9 5 、 T r o w s d a l e J 、 I m m u n o g e n e t i c s ; 4 1 : 1 ~ 1 7 ; 組織適合性大複合体についての将来の展望。

20  
 1 9 9 7 、 G r u e n J R a n d W e i s s m a n S M 、 B l o o d ; 9 0 : 4 2 5 2 ~ 4 2 6 5 ] 。人間の場合には、それは染色体 6 ( 6 p 2 1 . 3 ) の短いアーム上で 3 , 6 0 0 , 0 0 0 塩基対の範囲まで広がり、本質的に免疫応答に参与する。それは完全に配列されており、多角形で、人間の全ゲノム中で最高の遺伝子密度を示す。それで、染色体 6 全体としては、見積数として 3 , 5 0 0 遺伝子、2 2 4 の同定遺伝子坐が M H C に加算される。これはその大きさに基づいて期待されるように、3 倍の数の遺伝子が M H C の領域に局在することを意味する。M H C はクラス 1、2 及び 3 の、3 つに区分される。クラス 1 の全遺伝子は 3 ~ 6 k b の大きさである。それらは細胞毎に存在し、移植抗原と呼ばれる。即ち、異組織に対する拒絶作用をその役割とする。クラス 2 の遺伝子は 4 ~ 1 1 k b の大きさである。その遺伝子産物は細胞間の、免疫応答に必要な相互作用に参与する 30  
 。クラス 3 の遺伝子は最高の遺伝子密度を示す。ここでは、遺伝子は局在し、免疫システムには含まれず、血清の成分として抗体抗原複合体と相互作用をする相補因子として働く。

【0004】

M H C 分子の第一の免疫学的機能は、抗原蛋白質が細胞表面に結合する。これはリンパ球の特殊な T - 細胞受容体の抗原を認識する役を演じる。T - 細胞の意義は、これが細胞内感染及び腫瘍と密接に関連することである。M H C 分子は免疫応答の調節で中心的役割を演じるので、多分、疾病に対しての制御及びそれに対する感受性に決定的影響力を有するであろう。M H C は以下の遺伝的疾患及びその他の多くの疾病に相関があると見なされている。即ち、リュウマチ性関節炎 [ 東フランスにおける、H L A - D M 遺伝子とリュウマチ性関節炎との関連。2 0 0 0 、 T o u s s i r o t E e t a l . 、 H u m I m m u n o l ; 6 1 ( 3 ) : 3 0 3 ~ 3 0 8 ] 、糖尿病 [ ヒト組織適合性白血球抗原 ( H L A ) - D Q 分子の糖尿病の進行への影響の生体内での証明。2 0 0 0 、 W e n e t a l . 、 J E x p M e d ; 1 9 1 ( 1 ) : 9 7 ~ 1 0 4 ] 、特殊タイプ I 糖尿病 [ タイプ I 糖尿病の原因。1 9 9 9 、 C h o w d h u r y T A 、 M i j o v i c C H 、 B a r n e t t A H 、 B a i l l i e r e s C l i n E n d o c r i n o l M e t b . ; 1 3 ( 2 ) : 1 8 1 ~ 1 9 5 ] 、及びインスリン依存型糖尿病 ( I D D M ) [ 先天性ハプロタイプ類遺伝性マップによるインスリン依存型糖尿病のための新感受性坐の同定。1 9 9 5 、 I k e g a m i H 、 M a k i n o S 、 Y a m o t o E 、 k a w a g u c h i Y 、 U e d a H 、 S a k a m o t o T 、 T a k e k a w a K 、 O g i h a r a T 、 J C l i n I 40  
 50

nvest. ; 96 (4) : 1936 ~ 1942 ]、遺伝性血色素症 [ 新世紀の血色素症。2000、Powell LW et al. , J Hepatol ; 32 (1 Suppl) : 48 ~ 62 ]、特殊遺伝性血色素症 (GH) [ HFE codon 63 / 282 (H63D / C282Y) ドイツの遺伝性血色素症患者の二形性。1998、Gottschalk R、Seidl C、Löffler T、Seifried E、Hoelzer D、Kaltwasser JP、Tissue Antigens ; 51 (3) : 270 ~ 275 ] 及びマイルド型血色素症。[ 711人の血色素症発端者におけるHFE突然変異の解析 : マイルド型血色素症におけるS65Cについての推測の証明。1999、Mura C、Raguenes O、Ferec C、Blood ; 93 (8) : 2502 ~ 2505 ]、精神分裂症 [ 精神分裂症、リュウマチ性関節炎及び自然抵抗性遺伝子。1997、Rubinstein G、Schizophr Res ; 25 (3) : 177 ~ 181 ]、HIV [ ヒト免疫不全タイプIウィルス (HIV - 1) Vpu蛋白が組織適合性大複合体 (MHC) のクラスI分子の生合成の初期段階を妨害する。1997、Kerkau T et al. , Exp Med ; 185 (7) : 1295 ~ 1305 ]、筋炎 [ ヒト組織適合性大複合体における細胞内封入体筋炎への感受性の候補領域の地図。1999、Kok CC et al. Immunogenetics ; 49 (6) : 508 ~ 516 ]、乾癬 [ HLA - C末端小粒60 - kb間隔の乾癬感受性PSORS1座の位置確認。2000 ; Nair RP et al. , Am J Hum Genet Jun ; 66 (6) : 1833 ~ 1844 ]、システムLupus紅斑症 [ システムルーパス紅斑症の遺伝子。1999、Lindqvist AK、Alarcon - Riquelme M E ; Scand J Immunol ; 50 (6) : 562 ~ 571 ]、IgA腎炎 [ IgA腎炎の進行遺伝因子の証明。2000、Hsu SI et al. , Kidney Int ; 57 (5) : 1818 ~ 1835 . Review ]、高血圧症 [ 組織適合性大複合体の内部または近傍に存在する染色体6の遺伝子の高血圧症の進行に及ぼす影響。2000、Vidan - Jeras B et al. , Pflugers Arch ; 439 (3 Suppl) : R60 ~ 62 ]、ベーチェット病 [ ベーチェット病の、組織適合性大複合体における臨界的領域は、精製マイクロサテライト図を使用する結合解析によって、HLA - Bの動原体切片46 kbまで減らされた。1999、Ota M et al. , Am J Hum Genet ; 64 (5) : 1406 ~ 1410 ]、ゲー - ホイプナー - ヘルター - タイゼン - 病 [ CTLA - 4多形遺伝子はセリアック病の疾病素因と関連する。1998、Djilali Saiah I et al. , Gut ; 43 (2) : 187 ~ 189 ]、筋無力症、脊椎関節炎 [ 脊椎関節炎の遺伝子。1998、Wordsworth P. , Rheum Dis Clin North Am ; 24 (4) : 845 ~ 863 . Review ]、結核 [ 特殊T細胞の結核患者及び健康なドナーにおけるマイコバクテリウムツベルクロシスへの応答。1998、Ulrichs T et al. , Eur J Immunol ; 28 (12) : 3949 ~ 3958 ]、心筋肥大症 [ 心筋トロポニンI遺伝子の突然変異が心筋肥大症と関連する。1997、Kimura A. , Nat. Genet. 16 (4) : 379 ~ 382 ]、バセドウ氏病 [ グレーヴス病におけるヨード化物、サイトカイン及びTSH - 受容体表現。1996、Schuppert et al. , Exp Clin Endocrinol Diabetes . 104 (Suppl 4 : 68 ~ 74) ]、若年性リュウマチ性関節炎 [ pauciarticular - onset若年性リュウマチ性関節炎におけるHLA及びT細胞多形受容体。1991、Nepom BS、Arthritis Rheum. 34 (10) : 1260 ~ 1267 ]、癩癩、特発性全身性癩癩 [ 表現型スペクトルはヒトの癩癩感受性遺伝子EJM1に関連する。1995、Sander T、Ann Neurol ; 38 (2) : 210 ~ 217 ]、若年性筋痙攣性癩癩 [ 染色体6の癩癩感受性EJM1遺伝子座の精製地図。1997、Sander T、Neurology . 49 (3) : 842 ~ 847 ]、タカヤス - 病、多発性免疫不全症 [ 8 . 1 遺伝性ハプロタイプ (A1、B8、DR3) の多発性免疫不全症との関連についての遺伝的ベース。1999、Price P、Immunol Rev . 167 : 257 ~ 274 ]、頭部及び頸部の癌 [ 腫瘍の懐死因子多形マイクロサテライトの

頭部及び頸部の癌への影響。1998; ヒトのレブラ感受性。1996; Lagrange PH et al., *Acta Leprol*; 10(1): 11~27]、Malaria [マラリア及び他の感染症に対する遺伝的感受性: MHCから全ゲノムまで。1996; Hill AV, *Parasitology*; 112 Supplement: 75~84、ヒト個体群におけるマラリアに対する感受性/抵抗性の研究における遺伝的流行病。1999; Abel L, *Bull Soc Pathol Exot*; 92(4): 256~60]、リュウシュマニア [病原体の中間マクロファージへの宿主抵抗性または感受性の遺伝学: 北東ブラジルにおける結核、レブラ、リュウシュマニア家族の複数例の研究。1998; Blackwell JM, *Int J Parasitol*; 28(1): 21~28]、類肉種症 [類肉腫における多形性TAP1及びTAP2の抗原処理されたコード化MHCの解析。1999; Foley PJ et al., *Am J Respir Crit Care Med*; 160(3): 1009~1014]、多発性硬化症 [サルジニア島のヒト集団におけるDRB1-DQA1-DQB1遺伝子座及び多発性硬化症の疾病素因。1998; Marrosu MG et al., *Hum Mol Genet*; 7(8): 1235~1237]、原発性胆嚢硬変症 [原発性胆嚢硬化症の遺伝的感受性。1999; Agarwal K et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol*. Jun; 11(6): 603~606]、腎炎 [狼蒼腎炎への遺伝的感受性。1998; Tsao BP, *Lupus*; 7(9): 585~590]及びその他の多くの疾病が関連する。

#### 【0005】

MHC遺伝子の転写に負の影響を与える表現がCpGジヌクレオチッドのメチル化に結びつくことを実証する研究がある。転写因子が直接DNAに付加され得ないか、または、間接に、メチル化CpGに結合する抑制分子に付加される。[いかにしてしてメチル化が転写を抑制するか。1997; Kass SU et al., *Trends Genet*; 11: 444~449]。

#### 【0006】

多くの成果が免疫学的疾病とメチル化の間の関連性を裏付けている。HLA-DR抗原の表現とHLA-DR遺伝子のメチル化の間の関連はシステムルーパス紅斑症 これは全身性自発免疫疾病の1種であるが について研究されている [ヒトの組織適合性白血球抗原-DRの僅少の表現は、システムルーパス紅斑病患者のB細胞の組織適合性白血球抗原 遺伝子の領域と関連する。1985; Sano H et al., *J Clin Invest*, 76(4): 1314~1322]。DNAメチル化の異常型MHCクラスII遺伝子表現への関与は、MHCクラスII欠損症候の患者について研究された。[MHCクラスII欠損症候: 5-アザデオキシシチジンへの応答レベルの異質性。1990; Lambert M et al., *Res Immunol*. 141(2): 129~140]。MHC遺伝子の調整の証明は後成説のメカニズムの一つによって行われる [クラスII転移活性因子プロモーターIVのメチル化: MHCクラスII遺伝子制御の新規なメカニズム。2000; Morris AC et al., *J Immunol*; 164(8): 4143~4149]。転写因子がクラスII転移活性因子(CIITA)プロモーターに結合しないときは、MHC遺伝子の表現は阻害される。阻害はpIVプロモーター中のCpGジヌクレオチッドのメチル化に基づいて行なわれる。それに対して、CIITA遺伝子の再表現のメチル化の阻害が行なわれる。その他に、転移性の移入の試験で、表現はメチル化pIVDNAによっては刺激されない。この結果はCIITAの後成性調整を裏付けし、この後成性調整が理論的にMHCクラスIIの遺伝子であるという結論に導く。

#### 【0007】

5-メチルシトシンは真核生物の細胞のDNAでは最も頻繁に共有変換される塩基である。これは遺伝子印刷及び腫瘍発生時に一つの役割を演じる。遺伝情報の構成部分としての5-メチルシトシンの同定はそれ故、興味あるものである。5-メチルシトシンはシトシンと同じ塩基対挙動を示すので、配列によってはこれを同定することはできない。更に、

PCR増幅では、5 - メチルシトシンが有する後成説の情報が完全に失われる。

【0008】

比較的新しく、そうこうするうちに最も頻繁に使用される、DNAの5 - メチルシトシンに関する研究は、重亜硫酸塩とシトシンとの特殊反応に基づいている。このシトシンはそれに続くアルカリ加水分解反応で、ウラシルに変換され、このウラシルはその塩基対挙動がチミジンのそれに相当する。それに対して、5 - メチルシトシンはこの条件下では変換されない。最初のDNAは変化しないので、最初に、そのハイブリッド化挙動によってはシトシンと区別できないメチルシトシンは、今や、通常の分子生物学的技法によって、唯一残っているシトシンとして、例えば、増幅及びハイブリッド化または配列によって証明される。これらの全ての技法は、今や完全に利用されている塩基対に基づくものである。感度に間する現在の技術水準は研究対象のDNAをアガロースマトリックスに封入する方法によって規定されている。それによってDNA（重亜硫酸塩は単鎖のDNAのみと反応する）の浸透と再生は阻害され、全ての沈殿プロセスと精製プロセスの替わりとして、迅速な透析が行なわれる（Olek A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064 ~ 5066）。この方法によって、個々の細胞が研究でき、方法のポテンシャルを具体的に説明される。勿論、これまでも、約3,000の塩基対長の各領域が研究されているが、数千に及ぶ細胞のグローバルな研究は可能ではない。勿論、この方法は微量の試料からの非常に小さい断片では信頼性のある解析はできない。浸透防止をしてもマトリックスを通して試料が失われる。

10

20

【0009】

その他の、公知の5 - メチルシトシン証明法に関する概観は下記の概観刊行物から知ることができる。Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbass, H., Nucl. Acids Res. 1998, 26, 2255。

【0010】

重亜硫酸塩の技法はこれまで、ほんの僅かの例外が研究に使用されていた〔（例えば、Zechnigk, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94 ~ 98〕。

しかし、常に、既知の遺伝子の短く、特殊な断片で、重亜硫酸処理の後、増幅され完全に配列されるか〔Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275 ~ 276〕または個々のシトシン位置をプライマー - 伸長 - 反応〔Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529 ~ 2531, WO - 特許9500669〕または一つの酵素断片〔Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532 ~ 2534〕で実証された。それについてはハイブリッド化による実証が発表されている〔Olek et al., WO99 28498〕。

30

40

【0011】

個々の遺伝子のメチル化の実証のための重亜硫酸塩技法の使用に関するその他の刊行物は以下のものである。：Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassay 16, 431; Zeschnik, M et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO97 46705, WO95 15373 und WO45560。

【0012】

マトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)は分子生物学上の解析のために非常に有用である〔Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988)、分子状蛋白質のレーザー脱離イオン化は10,000ダルトンを超える。Anal. Chem. 60: 2299 ~ 2301〕。ある分析体は光吸収マトリック

50

スに埋め込まれる。短いレーザーパルスでマトリックスが蒸発し、被分析分子は分解せずにガス相に送られる。マトリックス分子との衝突によって被分析分子のイオン型が達成される。設定された電圧でイオンは飛行管へと加速される。イオンはその質量の差により、異なる強さで加速される。より小さいイオンはより大きいイオンよりも早く検出器に到達する。

【0013】

MALDI-TOF分光分析はペプチッド及び蛋白質の分析に優れている。核酸の分析にはDNA及びマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析よりやや困難である [Gut、I. G. und Beck、S. (1995)]。DNA及びマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析。[分子生物学：現在の技術革新及び将来の動向1：147～157.]。核酸分析には、ペプチッド分析に比較して感度が約100倍悪く、断片の大きさが増加するにしたがって、感度は不釣合いに減少する。骨格に負電荷を帯びている核酸分析では、マトリックスによるイオン化プロセスが本質的に非効率である。MALDI-TOF分光分析では、マトリックスの選択が重要な役割をする。ペプチッドの脱離では、非常に細かい結晶を与える、幾つかの非常に有用なマトリックスが発見された。DNAについては、使用しても感度差が減少しない、幾つかのマトリックスがある。感度差は、DNAをペプチッド類似物に化学変換することにより減少させ得る。通常骨格のホスフェートがチオホスフェートによって置換される、ホスホロチオエイト核酸は、簡単なアルキル化剤により荷電していないDNAに変換される [Gut、I. G. und Beck、S. (1995)、選択的DNAのアルキル化方法及び質量分析による検出。Nucleic Acids Res. 23：1367～1373]。"Charge tag"がこの変換されたDNAに結合した結果得られる感度の上昇程度はペプチッドに結合した結果得られる程度に匹敵する。この"charge tagging"の更なる利点は、非変換基質の検出を著しく困難にする不純物の分析安定性を高めるということである。

【0014】

ゲノムDNAは標準的方法により、細胞、組織または他の試験試料から得られる。この標準的方法はフリッチェアンドマニアティス発行の、分子クローン：A Laboratory Manual、1989のような文献に記載されている。

【0015】

本発明の課題は、シトシンメチル化のためのオリゴヌクレオチッド及び/またはPNA-オリゴマーであり、及びMHC内の遺伝的、後天的パラメーターによる診断に好適な方法を用意することにある。

【0016】

本発明の課題は、SEQID-NO：1またはSEQID-NO：2に適合する、化学処理されたゲノムDNAの相補的または同一の、少なくとも20塩基対の長さの一つの断片を含む組織適合性的大複合体(MHC)内の遺伝的パラメーターの一組の診断のための核酸によって解決する。

【0017】

本発明の対象は、SEQID-NO：1またはSEQID-NO：2に適合する、塩基配列の少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含む断片に対して、相補的または同一の、少なくとも13ヌクレオチッド長さを有する、少なくとも一つの塩基配列を、その都度含む、予め、処理されたゲノムDNA中のシトシンのメチル化状態の検査のためのオリゴヌクレオチッドである。

【0018】

その際、CpGジヌクレオチッドのシトシンが13mersの5'-末端の5'-9'-ヌクレオチッドであることが好ましい。

【0019】

更に、本発明においてはSEQID-NO：1またはSEQID-NO：2の一つのCpGジヌクレオチッド毎に一つのヌクレオチッドが存在することが好ましい。

【0020】

10

20

30

40

50

本発明の対象は、SEQ ID - NO : 1またはSEQ ID - NO : 2に適合する、塩基配列の少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含む断片に対して、相補的または同一の、少なくとも9ヌクレオチッド長を有する、少なくとも一つのPNA塩基配列を含む、予め、化学処理されたゲノムDNA中のシトシンのメチル化状態の検査のためのPNA(ペプチッド核酸)オリゴマーである。

【0021】

本発明においては、CpGジヌクレオチッドのシトシンが9mersの5'-末端の4'-6'-ヌクレオチッドであることが好ましい。

【0022】

更に本発明においては、SEQ ID - NO : 1またはSEQ ID - NO : 2に適合する一つの塩基配列のCpGジヌクレオチッド毎に一つのオリゴヌクレオチッドが存在することが好ましい。

10

【0023】

本発明の対象は、少なくとも10個の本発明のオリゴヌクレオチッドまたはPNA配列を含む、シトシンのメチル化状態の検査のためのオリゴマーソンの一組及び/または化学的前処理されたゲノムDNA中の単一多形性ヌクレオチッドの一組である。

【0024】

本発明の対象は、固相の一定の位置に結合している本発明の、異なるオリゴヌクレオチッド及び/またはPNA-オリゴマー配列の配置であって、好ましくは、直角または六角形の格子形で、平坦な固相上に、配置されている、異なるオリゴヌクレオチッド及び/またはPNA-オリゴマー配列の配置である。

20

【0025】

本発明の対象は、その配列がその都度少なくとも、SEQ ID - NO : 1またはSEQ ID - NO : 2に適合する塩基配列の18塩基対長の塩基配列の断片に順または逆相補的であって、少なくとも二つのオリゴヌクレオチッドを含むプライマーオリゴヌクレオチッドの一組であって、好ましくは、CpGジヌクレオチッドを含まないこと、更に好ましくは、少なくとも一つのプライマーが一つの固相に結合するプライマーオリゴヌクレオチッドの一組。

【0026】

本発明の特に好ましい対象は、MHC内のメチル化サンプルの解析により、本発明の核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを、以下に列挙する諸疾病、諸症等の診断のために使用することである。自己免疫性疾病の診断のために使用すること。リウマチ性関節炎の診断のために使用すること。糖尿病の診断のために使用すること。糖尿病において、タイプI糖尿病またはインスリン依存型糖尿病(IDDM)の診断のために使用すること。遺伝性の血色素症の診断のために使用すること。遺伝的血色素症において、遺伝子血色素症(GH)またはマイルドタイプ血色素症の診断のために使用すること。精神分裂症の診断のために使用すること。多発性硬化症の診断のために使用すること。Systemischem Lupus紅斑症の診断のために使用すること。サルコイド症の診断のために使用すること。胆嚢硬変症の診断のために使用すること。筋炎の診断のために使用すること。乾癬の診断のために使用すること。腎炎の診断のために使用すること。癌の診断のために使用すること。癌の種類において、頸部および頭部のガンの診断のために使用すること。IgA腎障害の診断のために使用すること。高血圧症の診断のために使用すること。ベーチェット病の診断のために使用すること。ゲー-ホイプナー-ヘルター-タイゼン-病(Zoeliale)の診断のために使用すること。筋無力症の診断のために使用すること。

30

40

脊椎関節炎の診断のために使用すること。結核の診断のために使用すること。

心筋肥大症の診断のために使用すること。パセドウ氏病の診断のために使用すること。若年性リウマチ性関節炎の診断のために使用すること。癩癧の診断のために使用すること。癩癧において特発性全身性癩癧または若年性筋痙攣性癩癧の診断のために使用すること。タカヤス(Takayas) - 病の診断のために使用すること。多発性免疫不全症の

50

診断のために使用すること。レブラ感受性体質の診断のために使用すること。マラリア感受性体質の診断のために使用すること。リーシュマニア感受性体質の診断のために使用すること。

【0027】

本発明の更なる対象は、SEQID-NO:1またはSEQID-NO:2に適合する核酸をMHC内の遺伝的に重要なパラメーターの診断のために使用することである。

【0028】

本発明の更なる対象は、MHC内の遺伝的に重要なパラメーターの診断方法であって、シトシンのメチル化の解析により、オリゴヌクレオチッドまたはPNAオリゴマーの組で行う、請求項1乃至47の何れか1項に記載の診断方法において、下記の各段階からなることを特徴とするものである。

10

a) ゲノムDNA試料において、化学処理により、5-位置の非メチル化シトシン塩基をウラシルに変換する。

b) この化学前処理されたゲノムDNAを請求項11または12記載のプライマーオリゴヌクレオチッドの組及びポリメラーゼを使用し、増幅して断片とする。

c) 請求項2乃至8の何れか1項に記載のオリゴヌクレオチッドまたはPNAゾンデの組によって、増幅産物をハイブリッド化する。

d) ハイブリッド化された増幅産物を検出し、映像化する。

【0029】

本発明においては、好ましくは、各々が100~2,000の塩基対長さである、異なる、10を超える断片が増幅され、更に好ましくは、重亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩の1種の溶液による化学処理が行なわれ、特に好ましくは、ポリメラーゼが耐熱性DNA-ポリメラーゼであることである。

20

【0030】

本発明においては、増幅がポリメラーゼ鎖反応(PCR)により行なわれることが好ましく、更に好ましくは、増幅産物に付加される標識は、一つのオリゴヌクレオチッド配列が存在する固相の各位置を確認可能であり、更に、本発明の配置を使用し、固相表面がシリカ、ガラス、ポリスチロール、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなることが特に好ましい。

【0031】

多くのDNA-断片の増幅が一つの反応器中で行なわれることが好ましく、増幅産物の標識がフルオレスセンスによる標識であることがまた好ましく、増幅産物の標識が放射性核種標識であることが更に好ましく、増幅産物の標識が質量分析計で実証される、標準的質量の、除去可能な分子断片であることがまた好ましく、増幅産物または増幅産物の断片が質量分析計で実証されることが本発明では特に好ましく、質量分析計での検知能力の更なる改善のために、生成された各断片が、陽または陰に荷電していることが、本発明では有益である。

30

【0032】

本発明においてはマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI)または電子散布質量分析(ESI)による検知が行なわれ、映像化されることが、極めて、特に好ましい。

40

【0033】

本発明の方法においては、ゲノムDNAがDNA試料から得られ、DNAの供給源が例えば、細胞列、生検、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液;パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織;組織の顕微鏡スライドガラス及びこれらから得られる全ての可能な組み合わせであることが好ましい。

【0034】

本発明の方法においては、異常がMHC内のメチル化サンプルと関連する、患者または健康者個人に発生した異常に対する診断及び/または予備診断方法が好ましい。

【0035】

50

本発明の対象は、MHC内の遺伝的パラメーターを診断する本発明の方法を使用することである。

【0036】

本発明の更なる対象は、重亜硫酸塩を含む反応剤、本発明の増幅産物製造のための本発明のプライマー1式、オリゴヌクレオチッド及び/またはPNA-オリゴマー及び本発明の方法の実施及び評価用の手引書からなるキットである。

【0037】

本発明は、化学的前処理されたゲノムDNA (SEQ ID-NO: 1またはSEQ ID-NO: 2)中の、シトシンのメチル化状態の検査のために使用される、少なくとも10オリゴマーゾンデ(オリゴヌクレオチッド及び/またはPNA-オリゴマー)からなる一組を含み、このゾンデによって、組織適合性の複合体(MHC)内の遺伝的、後天的パラメーターの診断が可能になる。更に、この方法では、診断のためにMHC内の遺伝的、後天的パラメーターが決定される。

10

【0038】

前記化学的前処理されたDNAから得られる、SEQ ID-NO: 1またはSEQ ID-NO: 2からなる少なくとも20塩基対長の断片が診断に使用される。この断片の検出には13個のヌクレオチッドからなる相補的または同一のオリゴヌクレオチッド使用されるか、または、9個のヌクレオチッドからなる相補的または同一のPNAオリゴマーが使用される。

【0039】

オリゴヌクレオチッドもPNA-オリゴマーも共に、少なくとも一つのCpGジヌクレオチッドを含む。CpGジヌクレオチッドに対応するシトシンはオリゴヌクレオチッドの5'-末端から得られる5~9のヌクレオチッドとみなされる。それとは逆に、CpGジヌクレオチッドのシトシンは、PNAオリゴマーの5'-末端から得られる4~6ヌクレオチッドとみなされる。オリゴヌクレオチッドまたはPNAオリゴマーのその都度の一組には、CpGジヌクレオチッド毎に、SEQ ID-NO: 1またはSEQ ID-NO: 2からなる一つのオリゴヌクレオチッドが存在することが重要である。

20

【0040】

更にこの関係で重要なのは、MHC内の遺伝的パラメーターの診断のために、個々のCpGジヌクレオチッドではなくて、配列内にある多数のCpGジヌクレオチッドを解析しなければならぬことである。特に好ましい本発明の変形は配列内の全てのCpGジヌクレオチッドを研究することである。

30

【0041】

好ましい本発明の方法の変形はオリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーを固相の一定の位置に結合させることである。

【0042】

複数の増幅産物が直角または六角形の格子形固相平面上にあることが好ましい。

【0043】

本発明においては、核酸、オリゴヌクレオチッドまたはPNA-オリゴマーが、MHC内のメチル化サンプルの解析による以下に列挙する諸病の診断に優先的に使用される。リュウマチ性関節炎、糖尿病、遺伝性の血色素症、精神分裂症、多発性硬化症、Systemischer Lupus紅斑症、サルコイド症、胆嚢硬変症、筋炎、乾癬、腎炎、癌、特に、頸部及び頭部のガン、IgA腎障害、高血圧症、ベーチェット病、ゲー-ホイブナー-ヘルター-タイゼン-病(Zoeliakie)、筋無力症、脊椎関節炎、結核、心筋肥大症、パセドウ氏病、若年性リュウマチ性関節炎、癲癇、癲癇において特発性全身性癲癇または若年性筋痙攣性癲癇、タカヤス(Takayasu)-病、多発性免疫不全症、レブラ感受性体質、マラリア感受性体質、リーシュマニア感受性体質。

40

【0044】

SEQ ID-NO: 1またはSEQ ID-NO: 2に適合する、最初にリストアップされた核酸が、組織適合性の複合体(MHC)内の遺伝的、後天的パラメーターの診断のた

50

めに使用される。

【0045】

更に、本発明には、MHC内の、重要な、遺伝的パラメーターが、シトシンのメチル化及びゲノムDNA - 試料中の単一多形性ヌクレオチドの解析による、診断のために使用される方法が含まれる。それについては、下記の段階で述べる。

【0046】

最初の段階で、5' - 位置がメチル化されないシトシン塩基が、シトシンに類似しないハイブリッド化挙動を示す、ウラシル、チミンまたは他の塩基に変換されるように、化学処理される。

【0047】

解析されるゲノムDNAは例えば、通常のDNA供給源の、細胞列、生検、血液、喀痰、便、尿、脳脊髄液；パラフィン埋め込み組織、例えば、眼、腸、腎臓、脳、心臓、前立腺、肺、乳房または肝臓の組織；組織の顕微鏡スライドガラス及びこれら全ての可能な組合わせから得られる。

【0048】

上述のゲノムDNAは重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）処理され、次いで、アルカリ加水分解されて、非メチル化シトシン核塩基がウラシルに変換される。

【0049】

第二段階では、化学的に全処理されたゲノムDNA断片がプライマーオリゴヌクレオチドの使用下に増幅される。

【0050】

好ましくは100～2,000の塩基対長であって、10種以上の断片が増幅される。

【0051】

本発明の方法の好ましい変形では、増幅はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により行なわれ、その際、耐熱性DNAポリメラーゼが使用されることが好ましい。

【0052】

本発明においては、多数のDNA - 断片の増幅が一つの反応器中で行われることが好ましい。

【0053】

本発明の好ましい変形の一つでは、その配列がその都度、SEQID - NO : 1またはSEQID - NO : 2に適合する塩基配列の、少なくとも18塩基対長の断片に相補的であるかまたは同一である配列の、少なくとも2個のオリゴヌクレオチドを含むプライマーオリゴヌクレオチドの一组である。プライマーオリゴヌクレオチドは、好ましくは、CpGジヌクレオチドを含まない。

【0054】

本発明においては、少なくとも一つのプライマーが固相に結合することが好ましい。

【0055】

更に、本発明においては、複数のオリゴヌクレオチド及び/またはPNA - オリゴマー配列が直角または六角形の格子状の固相上に配置されることが好ましい。

【0056】

本発明においては、固相表面がシリカ、ガラス、ポリスチロール、アルミニウム、銅、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなることが好ましい。

【0057】

第3段階では、少なくとも、10個のオリゴヌクレオチドまたはPNA - オリゴマーゾンの組で、増幅産物がハイブリッド化される。

【0058】

前記オリゴヌクレオチドは、最初に記載された塩基配列の、少なくとも一つのCpGジヌクレオチドを含む、断片に対して相補的であるか、または同一の、13ヌクレオチド長の少なくとも一つの塩基配列を含む。CpGジヌクレオチドのシトシンは13me

10

20

30

40

50

r s の 5 ' 末端から得られる 5 ~ 9 ヌクレオチッドであるとみなされる。C p G ジヌクレオチッド毎に一つのオリゴヌクレオチッドが存在する。

【 0 0 5 9 】

前記 P N A - オリゴマーは 9 ヌクレオチッド長の塩基配列を少なくとも一つ含み、それは、S E Q I D - N O : 1 または S E Q I D - N O : 2 に適合し塩基配列の、少なくとも一つの C p G ジヌクレオチッドを含む、断片に対して相補的であるか、または同一である。C p G ジヌクレオチッドのシトシンは 9 m e r s の 5 ' - 末端から得られる 4 ~ 6 ヌクレオチッドであるとみなされる。C p G ジヌクレオチッド毎に一つのオリゴヌクレオチッドが存在する。

【 0 0 6 0 】

第 4 段階ではハイブリッド化されない増幅産物が除去される。

【 0 0 6 1 】

最終段階ではハイブリッド化された増幅産物が検出される。

【 0 0 6 2 】

本発明においては、オリゴヌクレオチッド配列が存在する、固相の各位置で増幅産物に付加される標識は同定が可能であることが好ましい。

【 0 0 6 3 】

本発明においては、増幅産物の標識はフルオレスセンス標識であることが好ましい。

【 0 0 6 4 】

本発明においては、増幅産物の標識は放射性核種の標識であることが好ましい。

【 0 0 6 5 】

本発明においては、増幅産物の標識が質量分析計で実証される、標準的質量の、除去可能な分子断片であることが好ましい。

【 0 0 6 6 】

本発明においては、増幅産物、増幅産物の断片または増幅産物に相補的な断片が質量分析計で実証されることが好ましい。

【 0 0 6 7 】

本発明においては、質量分析計での検知能力の更なる改善のために、生成された各断片が、陽または陰荷電を示すことが好ましい。

【 0 0 6 8 】

本発明においては、マトリックス補助レーザー脱離 / イオン化質量分析 ( M A L D I ) または電子散布質量分析 ( E S I ) による検知が行なわれ、映像化されることが好ましい。

【 0 0 6 9 】

本発明においては、患者または健常者各個人に発生した異常に対する診断及び / または予備診断方法で、その際、この異常が M H C 内の重要な、遺伝的パラメーターと関連があるものであることが好ましい。

【 0 0 7 0 】

本発明においては、M H C 内の遺伝的、主要パラメーターを診断する方法の使用が好ましい。

【 0 0 7 1 】

本発明の対象は、重亜硫酸塩を含む反応剤、増幅産物製造のための、その配列が、少なくとも 1 個の 1 8 塩基対長の、S E Q I D - N O : 1 または S E Q I D - N O : 2 に適合する塩基配列の断片であるか、または、それに相補的である、増幅産物製造用の、少なくとも 2 個のオリゴヌクレオチッドを含むプライマーオリゴヌクレオチッド 1 式、オリゴヌクレオチッド及び / または P N A - オリゴマー及び本発明の方法の実施及び評価用の手引書からなるキットである。

【 0 0 7 2 】

下記の例はメチル化による特定の C G - 位置を調べる H L A - A 遺伝子断片に関するものである。

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

第1段階では、重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）の使用、並びに次ぎのアルカリ加水分解によってゲノム配列が変化する。この変化したDNAは、メチル化したシトシンを証明するのに使用される。この場合は、鎖長3201のHLA-A遺伝子ノシトシンが調べられる。そのために、特殊プライマーTTTGGTTTGTATTTAGATTTGG及びAAAATAAATCTCTCTAATCTCTCの鎖長874の特定断片によって増幅される。この増幅産物は、例えば、TAGGTCGTTTATAのような、これに先だって、固相に結合オリゴヌクレオチッドをハイブリッド化する、試料として使用される。その際、証明すべきシトシンは増幅産物の487の位置に存在する。ハイブリッド化により生成した産物は、増幅に使用される、Cy3及びCy5フルオレスセンス標識化プライマーによって証明される。重亜硫酸塩で処理されたDNAのみが、この位置にメチル化シトシンを有し、増幅されたDNAのハイブリッド化がオリゴヌクレオチッドによってなされる。このようにして、その都度調べられるシトシンのメチル化状態がハイブリッド化産物を経て決定される。

10

【0074】

以下の実施例により本発明を詳細に説明する。

【0075】

実施例1：MHC中に存在するDAXX遺伝子のメチル化解析の実施。

図1はメチル化における特定のCG-位置が調べられる遺伝子DAXXの断片に関する。第1段階では、ゲノム配列が重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）の使用して処理され、塩基の5-位置のメチル化シトシンは全て変化しない。5-位置のメチル化シトシンが変化しないのに対して、塩基対の挙動に関して異なる塩基が生成する。重亜硫酸塩が反応に使用されると、メチル化されないシトシン塩基に付加反応が起こる。そのためには、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤が必要である。これに続くアルカリ加水分解は非メチル化核塩基をウラシルに変える。この変化したDNAはメチル化シトシンを証明するのに使われる。反応の第2段階では、処理されたDNA試料が水または水性溶液で希釈される。それに続いてDNAの脱亜硫酸化が優先的に行なわれる。反応の第3段階では、DNA試料がポリメラーゼ連鎖反応で、好ましくは耐熱性ポリメラーゼを使用して増幅される。この場合、DAXX遺伝子のシトシンが調べられる。それには、特殊なプライマーオリゴヌクレオチッドTTAGGTTTGTATTTAGAG及びCCCTAACCTCTCTAATACTCTCAで、880bp長の特定の断片が増幅される。この増幅産物は予め固相に結合しているオリゴヌクレオチッドに、例えば、TAAAGAGGCGGATTAAGTTのような二重構造の形成下、ハイブリッド化する試料として使用され、その際、増幅産物の142位置に証明すべきシトシンが存在する。ハイブリッド化により生成した産物は、増幅に使用される、Cy3及びCy5フルオレスセンス標識化プライマーオリゴヌクレオチッドによって証明される。重亜硫酸塩で処理されたDNAのみが、この位置にメチル化シトシンを有し、増幅されたDNAのハイブリッド化がオリゴヌクレオチッドによってなされる。このようにして、その都度調べられるシトシンのメチル化状態がハイブリッド化産物を経て決定される。この場合、オリゴマーで非メチル化状態が証明される。

20

30

【0076】

実施例2：MHC中に存在するRXRB遺伝子のメチル化解析の実施。

図2はメチル化における特定のCG-位置が調べられる遺伝子RXRBの断片に関する。

【0077】

第1段階で、ゲノム配列が重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）の使用して処理され、塩基の5-位置のメチル化シトシンは全て変化しない。5-位置のメチル化シトシンが変化しないのに対して、塩基対の挙動に関して異なる塩基が生成する。重亜硫酸塩が反応に使用されると、メチル化されないシトシン塩基に付加反応が起こる。そのためには、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤が必要である。これに続くアルカリ加水分解は非メチル化核塩基をウラシルに変える。この変化したDNAはメチル化シトシンを証明するのに使われる。反応の第2段階では、処理されたDNA試料が水または水性溶液で希釈され

40

50

る。それに続いてDNAの脱亜硫酸化が優先的に行なわれる。反応の第3段階では、DNA試料がポリメラーゼ連鎖反応で、好ましくは耐熱性ポリメラーゼを使用して増幅される。この場合、RXRB遺伝子のシトシンが調べられる。それには、特殊なプライマーオリゴヌクレオチッドA T A T T G G T A A A G G T A T T A G G G及びA C T T A A C T C A A C T C T A T A C C T A Cで、385bp長の特定の断片が増幅される。この増幅産物は予め固相に結合しているオリゴヌクレオチッドに、例えば、A G G T G G A A C G G G A A T T T T Tのような二重構造の形成下、ハイブリッド化する試料として使用され、その際、増幅産物の33位置に証明すべきシトシンが存在する。ハイブリッド化により生成した産物は、増幅に使用される、Cy3及びCy5フルオレスセンス標識化プライマーオリゴヌクレオチッドによって証明される。重亜硫酸塩で処理されたDNAのみが、この位置にメチル化シトシンを有し、増幅されたDNAのハイブリッド化がオリゴヌクレオチッドによってなされる。このようにして、その都度調べられるシトシンのメチル化状態がハイブリッド化産物を経て決定される。この場合、オリゴマー写像Aが非メチル化状態がオリゴマー写像Bで部分的にメチル化された状態が証明される。

10

【0078】

実施例3：MHC中に存在するBAT5遺伝子のメチル化解析の実施。

図2はメチル化における特定のCG-位置が調べられる遺伝子BAT5の断片に関する。

【0079】

第1段階で、ゲノム配列が重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）の使用して処理され、塩基の5-位置のメチル化シトシンは全て変化しない。5-位置のメチル化シトシンが変化しないのに対して、塩基対の挙動に関して異なる塩基が生成する。重亜硫酸塩が反応に使用されると、メチル化されないシトシン塩基に付加反応が起こる。そのためには、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤が必要である。これに続くアルカリ加水分解は非メチル化核塩基をウラシルに変える。この変化したDNAはメチル化シトシンを証明するのに使われる。反応の第2段階では、処理されたDNA試料が水または水性溶液で希釈される。それに続いてDNAの脱亜硫酸化が優先的に行なわれる。反応の第3段階では、DNA試料がポリメラーゼ連鎖反応で、好ましくは耐熱性ポリメラーゼを使用して増幅される。この場合、BAT5遺伝子のシトシンが調べられる。それには、特殊なプライマーオリゴヌクレオチッドA G A A G A G A A T G T G G G T A G G A及びA A A A C C T A C T T A T C A A A C C A A Tで、539bp長の特定の断片が増幅される。この増幅産物は

20

30

予め固相に結合しているオリゴヌクレオチッドに、例えば、i) T G A G A A A G C G G T A A A G A G  
またはii) A T T T A A G G C G A G G G T A A Aのような二重構造の形成下、ハイブリッド化する試料として使用され、その際、増幅産物の211位置のオリゴマーT G A G A A A G C G G T A A A G A Gまたは増幅産物の431位置のオリゴマーA T T T A A G G C G A G G G T A A Aに証明すべきシトシンが存在する。ハイブリッド化により生成した産物は、増幅に使用される、Cy3及びCy5フルオレスセンス標識化プライマーオリゴヌクレオチッドによって証明される。重亜硫酸塩で処理されたDNAのみが、この位置にメチル化シトシンを有し、増幅されたDNAのハイブリッド化がオリゴヌクレオチッドによってなされる。このようにして、その都度調べられるシトシンのメチル化状態がハイブリッド化産物を経て決定される。この場合、両オリゴマーのうち、写像Aで部分的にメチル化された状態が証明され、写像Bで非メチル化状態がそれぞれ証明される。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

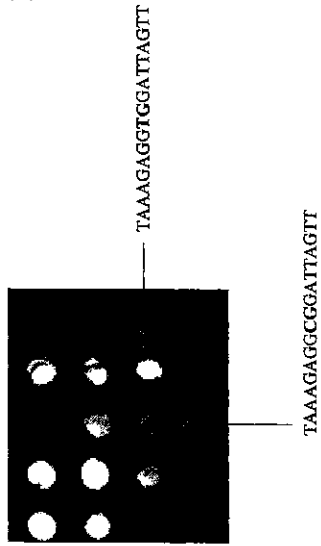
メチル化における特定のCG-位置が調べられる遺伝子DAXXの断片に関する。

【図2】

Aはメチル化における特定のCG-位置が調べられる遺伝子RXRBの断片である。

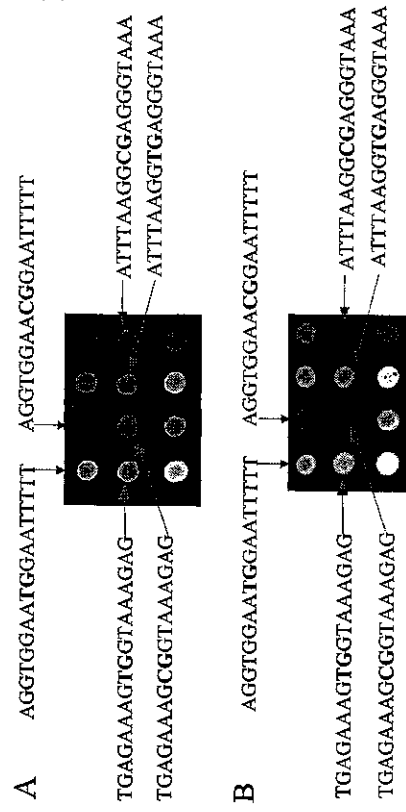
Bはメチル化における特定のCG-位置が調べられる遺伝子BAT5の断片である。

【 図 1 】



DAXX: TAAAGAGGCGGATTAGTT / TAAAGAGGCGGATTAGTT

【 図 2 】



RXRB : AGGTGGAACCGGAATTTT / AGGTGGAATGGAATTTT  
 BAT5 (i) : TGAGAAAAGCGGTTAAAGAG / TGAGAAAAGTGGTAAAGAG  
 BAT5 (ii) : ATTTAAGCGCGGTTAAA / ATTTAAGGTGAGGGTAAA

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/00932 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68, G01N 33/50, C12N 15/11, A61K 31/70
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01501
- (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 2001 (29.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 32 529 7 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE
- (71) Anmelder für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von USA: FPG/ENOMICS AG (13-933), Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder: und
- (73) Erfinder/anmelder nur für USA: OLEK, Alexander [DE/DE], Schöndersstrasse 13, 10115 Berlin (DE); PIEPFENROCK, Christian [DE/DE], Schwarzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE); BERLIN, Kurt [DE/DE], Marienfelderweg 4, 14822 Stahnsdorf (DL).
- (74) Anwalt: SCHURERT, Klemens, Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GR, GT, GU, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), arabisches Patent (AE, AG, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NF, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: DIAGNOSIS OF KNOWN GENETIC PARAMETERS WITHIN THE MHC

(54) Bezeichnung: DIAGNOSE VON BEDEUTENDEN GENETISCHEN PARAMETERN INNERHALB DES MHC

(57) Abstract: The invention relates to nuclear acids to diagnose a set of genetic parameters in the Major Histocompatibility Complex (MHC), comprising a reversibly complementary or identical piece of at least 20 base pairs of a chemically pre-treated genomic DNA, in addition to a set of oligomer probes (oligonucleotides and/or PNC oligomers) which are used to detect cytosine methylation substances in nucleic acids. Said probes are especially suitable for the diagnosis of genetic parameters within the MHC.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt Nukleinsäuren zur Diagnose von einem Satz genetischer Parameter innerhalb des Major Histocompatibility Complex (MHC), umfassend einen mindestens 20 Basenpaare langen revers komplementären oder identischen Abschnitt einer chemisch vorbehandelten genomischen DNA sowie einen Satz Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA Oligomere), die zur Detektion des Cytosin Methylierungszustandes in Nukleinsäuren dienen. Diese Sonden sind für die Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC besonders geeignet.

WO 02/00932 A2

WO 02/00932

PCT/001/01501

1

**Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb  
des MHC**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, Oligonukleotide, PNA-Oligomere und ein Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des Major Histocompatibility Complex (MHC).
- 10 Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.
- 20

- Der Major Histocompatibility Complex (MHC) beschreibt eine Gruppe von Genen mit immunologischen und nicht-immunologischen Funktionen und wird bei allen Vertebraten
- 25 gefunden ("Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes. 1995, Trowsdale J, Immunogenetics; 41: 1-17; Evolving views of the major histocompatibility complex. 1997, Gruen JR and Weissman SM, Blood; 90: 4252-4265). Beim Menschen erstreckt er sich über einen Bereich
- 30 von 3,6 Millionen Basenpaaren auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.3) und ist wesentlich an der Immunantwort beteiligt. Er ist komplett sequenziert, hoch polymorph und weist die höchste Gendichte im ganzen menschlichen Genom auf. So werden von den insgesamt auf Chromosom
- 35 6 geschätzten 3500 Genen 224 identifizierte Genloci dem MHC zugerechnet, was bedeutet, dass 3 mal so viele Gene

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

2

in der Region des MHC lokalisiert sind wie aufgrund seiner Größe zu erwarten wäre. Der MHC wird unterteilt in die drei Regionen: Klasse 1, 2 und 3. Alle Gene der Klasse 1 sind zwischen 3 und 6 kb groß. Sie sind auf jeder Zelle vorhanden und werden als Transplantationsantigene bezeichnet, d.h. sie sind verantwortlich für die Abstoßung von fremdem Gewebe. Die Gene der Klasse 2 sind zwischen 4 und 11 kb groß. Die Genprodukte sind an der Wechselwirkung zwischen Zellen, die für die Immunantwort benötigt werden, beteiligt. Die Klasse 3 weist die höchste Gendichte auf. Hier sind sowohl Gene lokalisiert, die nicht im Immunsystem involviert sind als auch die Komplementfaktoren, die als Komponenten des Serums mit Antikörper-Antigen Komplexen interagieren.

Die primäre immunologische Funktion der MHC Moleküle besteht darin, antigene Peptide auf den Oberflächen von Zellen zu binden; dies dient zur Erkennung von Antigen spezifischen T-Zell Rezeptoren von Lymphocyten. Die Bedeutung der T-Zellen steht in engem Zusammenhang mit intrazellulären Infekten und Tumoren. Da MHC Moleküle eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen, haben sie wahrscheinlich auch einen entscheidenden Anteil an der Kontrolle und Suszeptibilität von Erkrankungen. Es wird angenommen, dass der MHC mit genetischen Erkrankungen wie rheumatischer Arthritis (The association of HLA-DM genes with rheumatoid arthritis in Eastern France. 2000, Toussiro E et al., Hum Immunol; 61(3):303-308 ), Diabetes (In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. 2000, Wen L et al., J Exp Med; 191(1):97-104), speziell Typ I Diabetes (The aetiology of Type I diabetes. 1999, Chowdhury TA, Mijovic CH, Barnett AH, Baillieres Clin Endocrinol Metab.; 13(2): 181-195), und Insulin abhängige Diabetes mellitus (IDDM) (Identification of a new susceptibility locus for insu-

WO 02/00932

PCT/00/01501

3

- lin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype  
congenic mapping. 1995, Ikegami H, Makino S, Yamoto E,  
Kawaguchi Y, Ueda H, Sakamoto T, Takekawa K, Ogiwara T, J  
Clin Invest.; 96(4):1936-1942), hereditärer Hämochroma-  
5 tose ( Haemochromatosis in the new millennium. 2000, Pow-  
ell LW et al., J Hepatol;32(1 Suppl):48-62), speziell die  
genetische Hämochromatose (GH) (HFE codon 63/292  
(H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic  
hemochromatosis. 1998, Gottschalk R, Seidl C, Löffler T,  
10 Seifried E, Hoelzer D, Kaltwasser JP, Tissue Anti-  
gens;51(3):270-275) und die milde Form der Hämochromatose  
(HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands:  
evidence for S65C implication in mild form of hemochroma-  
tosis. 1999, Mura C, Ragueneis O, Ferec C, Blood;  
15 93(8):2502-2505), Schizophrenie (Schizophrenia, rheuma-  
toid arthritis and natural resistance genes. 1997, Rubin-  
stein G, Schizophr Res; 25(3):177-181), HIV (The human  
immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein inter-  
feres with an early step in the biosynthesis of major  
20 histocompatibility complex (MHC) class I molecules. 1997,  
Kerkau T et al., Exp Med; 185(7):1295-1305), Myositis  
(Mapping of a candidate region for susceptibility to in-  
clusion body myositis in the human major histocompatibil-  
ity complex. 1999, Kok CC et al. Immunogenetics;  
25 49(6):508-516), Psoriasis (Localization of Psoriasis-  
Susceptibility Locus PSORS1 to a 60-kb Interval Telomeric  
to HLA-C. 2000; Nair RP et al., Am J Hum Genet Jun;  
66(6):1833-1844), Systemischem Lupus Erythematoses (The  
genetics of systemic lupus erythematoses. 1999, Lindqvist  
30 AK, Alarcon-Riquelme ME; Scand J Immunol; 50(6):562-571),  
IgA Nephropathie (Evidence for genetic factors in the de-  
velopment and progression of IgA nephropathy. 2000, Hsu  
SI et al., Kidney Int; 57(5):1818-1835.Review), Blu-  
thochdruck (Possible influence of genes located on chro-  
35 mosome 6 within or near to the major histocompatibility  
complex on development of essential hypertension. 2000,

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

4

- Vidan-Jeras B et al., *Pflugers Arch*; 439(3 Suppl):R60-62), Behcets Krankheit (The critical region for Behcet disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46-kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsatellite mapping. 1999, Ota M et al., *Am J Hum Genet*; 64(5):1406-1410), Gee-Reubner-Herter-Thayesen-Krankheit (CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. 1998, Djilali-Saiah I et al., *Gut*; 43(2):187-189), Myasthenia gravis, Spondylarthropathia (Genes in the spondyloarthropathies. 1998, Wordsworth P., *Rheum Dis Clin North Am*; 24(4):845-863. Review), Tuberkulose (Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. 1998, Ulrichs T et al., *Eur J Immunol*; 28(12):3949-3958), hypertrophe Kardiomyopathie (Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. 1997, Kimura A., *Nat. Genet.* 16(4):379-382), Basedow-Krankheit (Iodide, cytokines and TSH-receptor expression in Graves' disease. 1996, Schuppert et al., *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 104(Suppl 4):68-74), juvenile rheumatische Arthritis (HLA and T cell receptor polymorphisms in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. 1991, Nepom BS, *Arthritis Rheum.* 34(10):1260-1267), Epilepsie, idiopathische generalisierte Epilepsie (The phenotypic spectrum related to the human epilepsy susceptibility gene EJM1. 1995, Sander T, *Ann Neurol*;38(2):210-217), juvenile myoklonische Epilepsie (Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. 1997, Sander T, *Neurology.* 49(3):842-847), Takayasu-Krankheit, multiple immunopathologische Krankheiten (The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1,B8,DR3) with multiple immunopathological diseases. 1999, Price P, *Immunol Rev.* 167: 257-274), Kopf- und Halskrebs (Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

5

- and neck cancer. 1998; susceptibility to leprosy in humans. 1996; Lagrange PH et al., *Acta Leprol*;10(1):11-27), Malaria (Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases: from the MHC to the whole genome. 1996; Hill AV, *Parasitology*;112 Suppl: 75-84, Genetic epidemiology in the study of susceptibility/resistance to malaria in the human population. 1999; Abel L, *Bull Soc Pathol Exot*;92(4):256-60), Leishmania (Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. 1998; Blackwell JM, *Int J Parasitol*;28(1):21-28), Sarkoidose (Analysis of MHC encoded antigen-processing genes TAP1 and TAP2 polymorphisms in sarcoidosis. 1999; Foley PJ et al., *Am J Respir Crit Care Med*;160(3):1009-1014), Multiple Sklerose (DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. 1998; Marrosu MG et al., *Hum Mol Genet*; 7(8):1235-1237), primäre Gallenzirrhose (Genetic susceptibility to primary biliary cirrhosis. 1999; Agarwal K et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol. Jun*;11(6):603-606), Nephritis (Genetic susceptibility to lupus nephritis. 1998; Tsao BP, *Lupus*; 7(9):585-590) und vielen anderen Erkrankungen in Zusammenhang steht.
- 25 Es gibt Untersuchungen, die belegen, dass die Expression von MHC Genen an die Methylierung von CpG Dinukleotiden gekoppelt ist, was die Transkription negativ beeinflussen kann. Entweder direkt, indem sich die Transkriptionsfaktoren nicht an die DNA anlagern können oder indirekt, durch Repressormoleküle, die an methylierte CpGs binden (How does DNA methylation repress transcription?, 1997; Kass SU et al., *Trends Genet*; 11:444-449).
- 30
- 35 Verschiedene Ergebnisse belegen den Zusammenhang zwischen immunologischen Erkrankungen und Methylierung. Die Bezie-

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

6

hung zwischen der Expression von HLA-DR Antigenen und der Methylierung des Gens HLA-DR alpha wurde bei systemischem Lupus erythematosus, einer generalisierten Autoimmunerkrankung, untersucht (Low expression of human histocompatibility leukocyte antigen-DR is associated with hypermethylation of human histocompatibility leukocyte antigen-DR alpha gene regions in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. 1985; Sano H et al., J Clin Invest, 76(4):1314-1322). Die Beteiligung der DNA Methylierung an der aberranten MHC class II Genexpression wurde bei Patienten mit MHC class II Defizienz Syndrome untersucht (The MHC class II deficiency syndrome: heterogeneity at the level of the response to 5-azadeoxycytidine. 1990; Lambert M et al., Res Immunol. 141(2):129-140). Ein Beweis für die Regulierung von MHC Genen wurde anhand eines epigenetischen Mechanismus erbracht (Methylation of class II trans-activator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. 2000; Morris AC et. al., J Immunol; 164(8):4143-4149). Die Expression von MHC-Genen wird inhibiert, wenn Transkriptionsfaktoren nicht an den class 2 trans activator (CIITA) Promotor binden. Die Inhibierung basiert hier auf der Methylierung der CpG Dinukleotide in dem pIV Promotor, dagegen führt die Inhibierung der Methylierung zu einer Re-Expression der CIITA Gene. Außerdem konnte die Expression in einem transienten Transfektionsversuch nicht durch methylierte pIV DNA stimuliert werden. Diese Ergebnisse belegen eine epigenetische Regulierung von CIITA und lassen weiterhin den Schluß zu, dass diese epigenetische Kontrolle prinzipiell für Gene der MHC Klasse II gilt.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil

genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlererweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

8

auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

- 5 Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2255.
- 10 Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnik, M. et al., *Eur. J. Hum. Gen.* 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., *Nat. Genet.* 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 26498).
- 25 Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), *Bioassays* 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), *Human Molecular Genetics* 6, 387; Teil, R. et al. (1994), *Nucl. Acids Res.* 22, 695; Martin, V. et al. (1995), *Gene* 157, 261; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.
- 30 Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungs-

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

9

- fähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.
- MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlererweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

10

durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die

5 Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte

10 Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie

15 Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere zur Detektion von Cytosin-

20 Methylierungen und ein Verfahren bereitzustellen, welches sich zur Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des MHC besonders eignet.

Die Aufgabe wird gelöst durch Nukleinsäuren zur Diagnose von einem Satz genetischer Parameter innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC), umfassend einen mindestens 20 Basenpaare langen revers komplementären oder

25 identischen Abschnitt der chemisch vorbehandelten genomischen DNA gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2.

30 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Oligonukleotide zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in vorbehandelter genomischer DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von

35 mindestens 13 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

11

- ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält.
- Dabei ist bevorzugt, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 5. - 9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13 mers ist.
- Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonukleotid vorhanden ist.
- Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomere zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens eine PNA Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält.
- Erfindungsgemäß bevorzugt ist hierbei, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 4. - 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9 mers ist.
- Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass für jedes der CpG Dinukleotide aus einer Basensequenz gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonukleotid vorhanden ist.
- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 10 der erfindungsgemäßen Oligonukleotid oder PNA Sequenzen.
- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Anordnung von unterschiedlichen erfindungsgemäßen Oligo-

nukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen, wobei diese an definierte Stellen einer Festphase gebunden sind. Bevorzugt ist dabei, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einem 10 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 entsprechen oder revers komplementär zu ihnen sind. Bevorzugt ist erfindungsgemäß dabei, dass diese kein CpG Dinukleotid enthalten. Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.

Ein weiterer besonders bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere zur Diagnose von Autoimmunerkrankungen, zur Diagnose von rheumatischer Arthritis, zur Diagnose von Diabetes, besonders bevorzugt zur Diagnose der Diabetes vom Typ I Diabetes oder von Insulin abhängiger Diabetes mellitus (IDDM), zur Diagnose von hereditärer Hämochromatose, besonders bevorzugt zur Diagnose von genetischer Hämochromatose (GH) oder der milden Form der Hämochromatose, zur Diagnose von Schizophrenie, zur Diagnose von Multipler Sklerose, zur Diagnose von Systemischem Lupus Erythematoses, zur Diagnose von Sarkoidose, zur Diagnose von primärer Gallenzyrrose, zur Diagnose von Myositis, zur Diagnose von Psoriasis, zur Diagnose von Nephritis, zur Diagnose von Krebs, insbesondere von Hals- oder Kopfkrebs, zur Diagnose von IgA Nephropathie, zur Diagnose von Bluthochdruck, zur Diagnose von Behcets Krankheit, zur Diagnose von der Geubner-Herter-Thaysen-Krankheit (Zöliakie), zur Diagnose von Myasthenia gravis, zur Diagnose von Spondylarthro-

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

13

pathia, zur Diagnose von Tuberkulose, zur Diagnose von hypertropher Kardiomyopathie, zur Diagnose von der Basedow-Krankheit, zur Diagnose von juveniler rheumatischer Arthritis, zur Diagnose von Epilepsie, bevorzugt der idiopathischen generalisierten Epilepsie oder der juvenilen myoklonischen Epilepsie, zur Diagnose von der Takayasu-Krankheit, zur Diagnose von multiplen immunopathologischen Krankheiten, zur Diagnose für die Suszeptibilität für Lepra, zur Diagnose für die Suszeptibilität für Malaria und/oder zur Diagnose für die Suszeptibilität für Leishmania durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.

Ein weiterer Gegenstand ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 für die Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen in Sätzen von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:

- a) in einer genomischen DNA Probe wandelt man durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymidin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um;
- b) aus dieser chemisch vorbehandelten genomischen DNA amplifiziert man Fragmente unter Verwendung von Sätzen von erfindungsgemäßen Primeroligonukleotiden und einer Polymerase;
- c) man hybridisiert die Amplifikate an einen Satz von erfindungsgemäßen Oligonukleotid oder PNA Sonden;

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

14

d) man detektiert und visualisiert die hybridisierten Amplifikate.

5 Bevorzugt ist erfindungsgemäß dabei, dass mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert werden, die 100 -  
2000 Basenpaare lang sind. Weiterhin ist bevorzugt, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt. Be-  
10 sondern bevorzugt ist auch, dass die Polymerase eine hitzebeständige DNA-Polymerase ist.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird. Bevorzugt ist auch, dass die an den  
15 Amplifikaten angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind. Weiterhin ist besonders erfindungsgemäß bevorzugt, dass man eine erfindungsgemäße Anordnung verwendet und dass die Festphasenoberfläche aus  
20 Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

Weiterhin ist bevorzugt, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird. Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind. Weiterhin ist bevorzugt, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind. Bevorzugt ist auch, dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfrag-  
30 mente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Besonders bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass die Amplifikate oder Fragmente der Amplifikate im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Hierzu ist es erfindungsgemäß vorteilhaft, dass  
35 zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

15

erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

- 5 Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugt ist es, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
- 10 Bevorzugt ist das Verfahren, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Biopsien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere,
- 15 Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.
- Bevorzugt ist auch ein Verfahren, zur Diagnose und/oder
- 20 Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mit Methylierungsmustern innerhalb des MHC in Zusammenhang stehen.
- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Ver-
- 25 wendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei man bedeutende genetische Parameter innerhalb des MHC diagnostiziert.
- Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden
- 30 Erfindung ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, Sätze von erfindungsgemäßen Primern zur Herstellung der erfindungsgemäßen Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung eines erfindungsgemäßen
- 35 Verfahrens.

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

16

Die vorliegende Erfindung beschreibt also einen Satz von mindestens 10 Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA (SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2) dienen. Mit diesen Sonden ist die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC) möglich. Ferner wird ein Verfahren beschrieben, das für die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des MHC bestimmt ist.

Aus der vorgenannten chemisch vorbehandelten DNA werden mindestens 20 Basenpaare lange Abschnitte aus SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 für die Diagnose benutzt. Als Detektoren für diese Abschnitte werden entweder revers komplementäre bzw. identische Oligonukleotide mit einer Länge von 13 Nukleotiden verwendet oder aber revers komplementäre bzw. identische PNA Oligomere mit einer Länge von 9 Nukleotiden.

Sowohl die Oligonukleotide als auch die PNA-Oligomere enthalten mindestens ein CpG Dinukleotid. Das Cytosin des entsprechenden CpG Dinukleotids ist vom 5'-Ende des Oligonukleotids aus gesehen das 5. - 9. Nukleotid. Das Cytosin des CpG Dinukleotids hingegen ist vom 5'-Ende des PNA Oligomers aus betrachtet das 4. - 6. Nukleotid. Entscheidend ist, dass im jeweiligen Satz von Oligonukleotiden oder PNA Oligomeren für jedes der CpG Dinukleotide ein Oligonukleotid aus SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 vorhanden ist.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang ferner, dass man zur Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC nicht einzelne CpG Dinukleotide, sondern die Mehrzahl der in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide analysieren muss. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfah-

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

17

rens sind alle in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide zu untersuchen.

5 In einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden.

10 Bevorzugt sind unterschiedliche Amplifikate auf der ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet.

15 Die Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere werden vorzugsweise zur Diagnose von rheumatischer Arthritis, Diabetes, hereditärer Hämochromatose, Schizophrenie, Multipler Sklerose, Systemischem Lupus Erythematoses, Sarkoidose, Zirrhose, Myositis, Psoriasis, Nephritis, Krebs, insbesondere Hals- oder Kopfkrebs, IgA Nephropathie, Bluthochdruck, Behcets Krankheit, Gee-Heubner-Herter-Thaysen-Krankheit, Myasthenia gravis, Spondylarthropathia, Tuberkulose, hypertropher Kardiomyopathie, Basedow-Krankheit, juveniler chronischer Arthritis, Epilepsie, idiopathischer generalisierter Epilepsie oder von juveniler myoklonischer Epilepsie, der Takayasu-Krankheit, multiplen immunopathologischen Krankheiten, 25 für die Suszeptibilität von Lepra, für die Suszeptibilität von Malaria und/oder für die Suszeptibilität von Leishmania durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC verwendet.

30 Auch die im Anhang aufgelisteten Nukleinsäuren gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 werden vorzugsweise verwendet für die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC) verwendet.

35

Ferner wird ein Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben beschrieben. Dazu geht man in folgenden Schritten vor:

Im ersten Verfahrensschritt wird eine genomische DNA Probe derart chemisch behandelt, dass an der 5'-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base verwandelt werden.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Bevorzugt wird dazu die oben beschriebene Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse verwendet, die zu einer Umwandlung nicht methylierter Cytosin-Nukleobasen in Uracil führt.

Im zweiten Verfahrensschritt werden aus der chemisch vorbehandelten genomischen DNA Fragmente unter Verwendung von Primeroligonukleotiden amplifiziert.

Bevorzugt werden mehr als 10 unterschiedliche Fragmente amplifiziert, die 100 - 2000 Basenpaare lang sind.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

19

(PCR) durch, wobei vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet wird.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

10 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens umfasst der Satz von Primeroligonukleotiden mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils revers komplementär oder identisch zu einem mindestens 18 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 sind. Die Primeroligonukleotide sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass sie kein CpG Dinukleotid  
15 enthalten.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.  
20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.  
25

Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

30 Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man die Amplifikate an einen Satz von mind. 10 Oligonukleotid oder PNA-Oligomer Sonden.

Die genannten Oligonukleotide umfassen mindestens eine  
35 Basensequenz mit einer Länge von 13 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

20

im Anhang aufgeführten Basensequenzen ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des CpG Dinukleotids ist das 5. bis 9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13 mers aus betrachtet. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oligonukleotid vorhanden.

Die genannten PNA-Oligomere umfassen mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von 9 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des CpG Dinukleotids ist das 4. bis 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9 mers aus gesehen. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oligonukleotid vorhanden.

Im vierten Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

Im letzten Verfahrensschritt detektiert man die hybridisierten Amplifikate.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen werden.  
5

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.  
10

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.  
15

Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mit bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC in Zusammenhang stehen.  
20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Verwendung eines Verfahrens zur Diagnose bedeutender genetischer Parameter innerhalb des MHC.  
25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, einen Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einen 18 Basenpaaren langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 entsprechen oder zu ihnen komplementär sind zur Herstellung der Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung des beschriebenen Verfahrens.  
30  
35

WO 02/00932

PCT/001/01501

22

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment des Gens HLA-A, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

5

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse umgewandelt. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im vorliegenden Fall werden die Cytosine des Gens HLA-A der Länge 3201 untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primern TTTGGTTTGATTAGATTGG und AATAAACTCCTAACTACTC ein definiertes Fragment der Länge 874 amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenem Oligonukleotid hybridisiert, beispielsweise TAGGTCGTTTATA, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 487 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primern, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt.

15

20

25

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

30

Beispiel 1: Durchführung der Methylierungsanalyse des in dem MHC lokalisierten Gens DAXX  
Das folgende Beispiel (Fig 1) bezieht sich auf ein Fragment des Gens DAXX, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

35

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nucleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschließend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Fall werden Cytosine des Gens DAXX untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden TTAGGTTTGGTTTGTGATGAG und CCCTAACTCCTCTAAACCTCA ein definiertes Fragment der Länge 880 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise TAAAGAGCCGATFACTT, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 142 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden

WO 02/00932

PCT/001/01501

24

Cytosins über das Hybridisierungsprodukt. Im vorliegenden Fall wird für das Oligomer ein nicht methylierter Status nachgewiesen.

5

Beispiel 2: Durchführung der Methylierungsanalyse des in dem MHC lokalisierten Gens RXRB

Das folgende Beispiel (Fig 2) bezieht sich auf ein Fragment des Gens RXRB, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

10

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Fall werden Cytosine des Gens RXRB untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden ATATTCGTAAGGTATTAGGG und ACTTAACTCAACTCTTACCTAC ein definiertes Fragment der Länge 385 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes

20

25

30

35

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

25

Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise AGGTGGACGGAAATTTT, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 33 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt. Im vorliegenden Fall wird für das Oligomer in Abbildung A ein nicht methylierter Status und in Abbildung B ein teilweise methylierter Status nachgewiesen.

Beispiel 3: Durchführung der Methylierungsanalyse des in dem MHC lokalisierten Gens BAT5

Das folgende Beispiel (Fig 2) bezieht sich auf ein Fragment des Gens BAT5, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu,

methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten

5 Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Fall werden Cytosine des Gens *BAT5* untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden *AGAGAGAAATGTGGGTAGGA* und

10 *AAAACCTACTTATCAAACCAAT* ein definiertes Fragment der Länge 539 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an vorher an einer Festphase gebundene Oligonukleotide unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise i) *TGAGAAAGCGGTAAAGAG* oder ii)

15 *ATTTAAGGCGAGGTAAA*, wobei sich das nachzuweisende Cytosin für das Oligomer *TGAGAAAGCGGTAAAGAG* an Position 211 oder für das Oligomer *ATTTAAGGCGAGGTAAA* an Position 431 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten

20 Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet

25 der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt. Im vorliegenden Fall werden für beide Oligomere in Abbildung A jeweils ein teilweise methylierter Status und in Abbildung B jeweils ein nicht methylierter Status nachgewiesen.

30

## Patentansprüche

- 5 1. Nucleinsäuren zur Diagnose von einem Satz genetischer Parameter innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC), umfassend einen mindestens 20 Basenpaare langen revers komplementären oder identischen Abschnitt der chemisch vorbehandelten genomischen DNA gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2.
- 10 2. Oligonukleotide zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in vorbehandelter genomischer DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 13 Nucleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinucleotid enthält.
- 15 3. Oligonucleotid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytosin des CpG Dinucleotids das 5. - 9. Nucleotid vom 5'-Ende des 13 mers ist.
- 20 4. Satz von Oligonucleotiden nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass für jedes der CpG Dinucleotide aus einer der SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonucleotid vorhanden ist.
- 25 5. PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomere zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens eine PNA Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nucleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinucleotid enthält.
- 30
- 35

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

28

6. PNA Oligomer nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 4. - 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9 mers ist.
- 5 7. Satz von PNA Oligomeren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass für jedes der CpG Dinukleotide aus einer Basensequenz gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonukleotid vorhanden ist.
- 10 8. Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 10 der Oligonukleotid oder PNA Sequenzen der Ansprüche 2 bis 7.
- 15 9. Anordnung von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass diese an definierte Stellen einer Festphase gebunden sind.
- 20 10. Anordnung von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 25 11. Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einem 18 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 entsprechen oder revers komplementär zu ihnen sind.
- 30 12. Satz von Primeroligonukleotiden nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass diese kein CpG Dinukleotid
- 35 enthalten.

WO 02/00932

PCT/001/01501

29

13. Satz von Primeroligonukleotiden nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 5 14. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Autoimmunerkrankungen durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10 15. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von rheumatischer Arthritis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15 16. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Diabetes durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20 17. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Diabetes um Typ I Diabetes oder um Insulin abhängige Diabetes mellitus (IDDM) handelt.
- 25 18. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von hereditärer Hämochromatose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30 19. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der hereditären Hämochromatose um genetische Hämochromatose (GH) oder die milde Form der Hämochromatose handelt.
- 35

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

30

20. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Schizophrenie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 5
21. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Multipler Sklerose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10
22. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Systemischem Lupus Erythematoses durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15
23. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Sarkoidose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20
24. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von primärer Gallenzirrhose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25
25. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Myositis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30
26. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Psoriasis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

31 :

27. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Nephritis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 5
28. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Krebs durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10
29. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Krebsarten um Hals- oder Kopfkrebs handelt.
- 15
30. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von IGA Nephropathie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20
31. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Bluthochdruck durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25
32. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Behcets Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30
33. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von der Gee-Heubner-Herter-Thaysen-Krankheit (Zöliakie) durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35

34. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Myasthenia gravis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 5
35. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Spondylarthropathia durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10
36. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Tuberkulose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15
37. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von hypertropher Kardiomyopathie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20
38. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von der Basedow-Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25
39. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von juveniler rheumatischer Arthritis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30
40. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Epilepsie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35

41. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Epilepsie um idiopathische generalisierte Epilepsie oder um juvenile myoklonische Epilepsie handelt.
42. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von der Takayasu-Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
43. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von multiplen immunopathologischen Krankheiten durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
44. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose für die Suszeptibilität für Lepra durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
45. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose für die Suszeptibilität für Malaria durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
46. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose für die Suszeptibilität für Leishmania durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
47. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 für die Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC.

48. Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen in Sätzen von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:
- 5
- a) in einer genomischen DNA Probe wandelt man durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um;
- 10
- b) aus dieser chemisch vorbehandelten genomischen DNA amplifiziert man Fragmente unter Verwendung von Sätzen von Primeroligonukleotiden gemäß Anspruch 11 oder 12 und einer Polymerase;
- 15
- c) man hybridisiert die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotid oder PNA Sonden der Ansprüche 2 bis 8;
- 20
- d) man detektiert und visualisiert die hybridisierten Amplifikate.
- 25 49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert werden, die 100 - 2000 Basenpaare lang sind.
- 30 50. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt.
- 35 51. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase eine hitzebeständige DNA-Polymerase ist.

52. Verfahren nach einem der Ansprüche 48 bis 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.
- 5
53. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 52, dadurch gekennzeichnet, dass die an den Amplifikaten angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.
- 10
54. Verfahren nach Ansprüchen 53, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Anordnung gemäß Anspruch 9 oder 10 verwendet und dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
- 15
55. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 54, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.
- 20
56. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 25
57. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.
- 30
58. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 35

59. Verfahren nach einem der Ansprüche 48, 49 oder 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate oder Fragmente der Amplifikate im Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 5
60. Verfahren nach Anspruch 58 oder 59, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 10
61. Verfahren nach einem der Ansprüche 58 bis 60, dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion mittels Matrix-assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
- 15
62. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche 48 bis 61, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Biopsien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.
- 20
63. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche 48 bis 62 zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mit Methylierungsmustern innerhalb des MHC in Zusammenhang stehen.
- 25
64. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 48 bis 63, dadurch gekennzeichnet, dass man bedeuten-
- 30
- 35

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

37 :

de genetische Parameter innerhalb des MHC diagnostiziert.

- 5 65. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, Sätze von Primern gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Herstellung der Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere gemäß einem der Ansprüche 2 bis 8 sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 48 bis 63.

10

WO 02/00932

PCT/IB01/01501

1/2

Fig 1

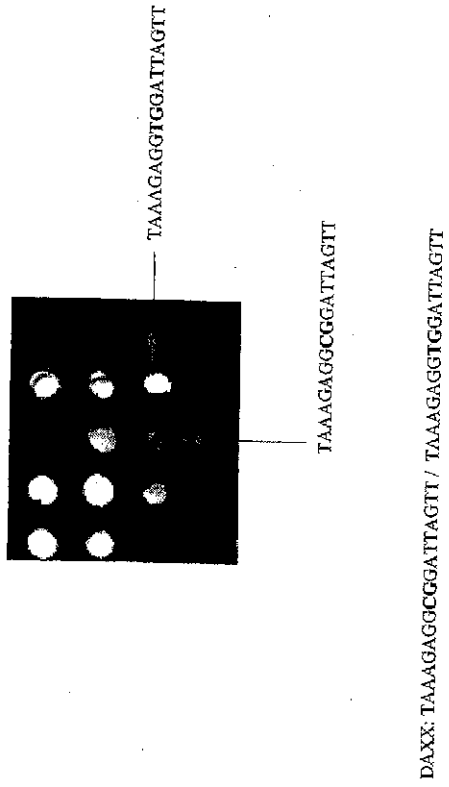
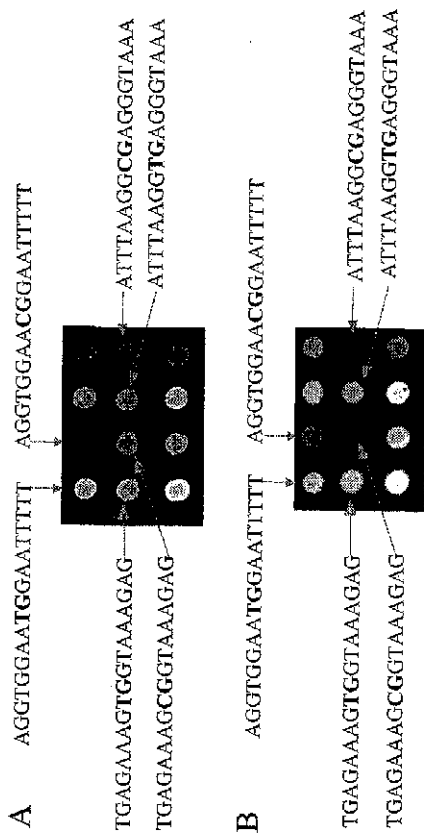


Fig 2



RXRβ : AGGTGGAACGGAAATTTT / AGGTGGAATGGAAATTTT  
 BAT5 (β) : TGAGAAAGCGGTAAAGAG / TGAGAAAGTGGTAAAGAG  
 BAT5 (α) : ATTTAAGCGGAGGGTAAA / ATTTAAGGTGAGGGTAAA

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/000932 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Akteuzeichen: PCT/IB01/01501
- (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juni 2001 (29.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 52 5297 (30. Juni 2000 (30.06.2000) DE)
- (71) Anmelder für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von (53): EPGENOMICS AG, Ditzdelle, Kastanienallee 34, 10455 Berlin (DE)
- (72) Erfinder: und
- (73) Erfinder/Amelder (amt für US): OLEK, Alexander (DE/DE); Schäferstrasse 3, 10115 Berlin (DE); PIEPENBROCK, Christian (DE/DE); Schwarzschloßstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE); BERLIN, Kurt (DE/DE); Marienkirchweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE)
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Pflanzstraße 5, 101178 Berlin Mitte (DE)
- (53) Bestimmungsstaaten (national): AR, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
- (54) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Veröffentlichlich: mit internationalen Recherchenbericht mit dem Sequenzprotokoll der Beschreibung in elektronischer Form gleichzeitig; auf Antrag vom internationalen Büro erhältlich
- (58) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 4. September 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen



(54) Title: DIAGNOSIS OF KNOWN GENETIC PARAMETERS WITHIN THE MHC

(54) Bezeichnung: DIAGNOSE VON BEDEUTENDEN GENETISCHEN PARAMETERN INNERHALB DES MHC

(57) Abstract: The inventor relates to nuclear acids to diagnose a set of genetic parameters in the Major Histocompatibility Complex (MHC), comprising a reversibly complementary or identical piece of at least 20 base pairs of a chemically site-treated genomic DNA, in addition to a set of oligomer probes (oligonucleotides and/or PNO oligomers) which are used to detect cytosine methylation substances in nucleic acids. Said probes are especially suitable for the diagnosis of genetic parameters within the MHC.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt Nucleinsäuren zur Diagnose von einem Satz genetischer Parameter innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC), umfassend eine mindestens 20 Basenpaare lange revers-komplementäre oder identische Abschnitt einer chemisch verhandelten genomischen DNA sowie einen Satz Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere), die zur Detektion des Cytosin-Methylierungsstatus in Nucleinsäuren dienen. Diese Sonden sind für die Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC besonders geeignet.

WO 02/000932 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/JP 01/01591
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Manner of documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documents searched other than in patent 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)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 29 January 1990 (1990-01-29) retrieved from EMBL Database accession no. X17093 XP00222757 abstract	1
Y	DATABASE EMBL [Online] 18 January 2000 (2000-01-18) retrieved from EMBL Database accession no. L76290 XP00222758 abstract	2-4, 8-65
Y	NO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER, WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document	2-4, 8-65
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document disclosing the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"B" earlier document published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) in which is cited to establish the publication date of another claim 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 of priority date and not in conflict with the application but cited to establish the principle or theory underlying the invention		
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or can only 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 28 November 2002		Date of mailing of the international search report 28 03 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5516, Patentstr. 2 NL 2280 HV Rijswijk NL: (31-70) 340-2000, Fax: 31 351 501 00 Fax: (31-70) 340-0216		Authorized officer Bradbrook, D

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In  
 ternational Application No  
 PCT/IB 01/01501

C. (Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HIENEYER C N ET AL: "DNA MICROARRAYS**"            ANGEWANDTE CHEMIE, VCH            VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE,            vol. 38, no. 19, 1999, pages 3039-3043,            XP000961724            ISSN: 0044-8249            the whole document</p>	9,10, 13-65
A	<p>REIR ET AL: "Identifying 5-methylcytosine            and related modifications in DNA genomes"            NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY            PRESS, SURREY, GB,            vol. 26, no. 10, 1998, pages 2255-2264,            XP002143106            ISSN: 0305-1048            page 2258, column 2, paragraph 2 -page            2261, column 2, paragraph 1; figure 2</p>	2-4,8-65
A	<p>FISZER DOROTA ET AL: "Major            histocompatibility complex expression on            human, male germ cells: A review."            AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE            IMMUNOLOGY,            vol. 40, no. 3, 1998, pages 172-176,            XP009061931            ISSN: 1046-7408            page 174, column 2, paragraph 4 -page 175,            column 2, paragraph 2</p>	1-4,8-65
A	<p>CHENG N C ET AL: "Lack of class I HLA            expression in neuroblastoma is associated            with high N-myc expression and            hypomethylation due to loss of the NEMO-1            locus."            ONCOGENE,            vol. 13, no. 8, 1996, pages 1737-1744,            XP009001932            ISSN: 0950-9232            page 1737, column 2, paragraph 3 -page            1738, column 1, paragraph 1            Discussion</p>	1-4,8-65
A	<p>GRUEN JEFFREY R ET AL: "Evolving views of            the major histocompatibility complex."            BLOOD,            vol. 90, no. 11,            1 December 1997 (1997-12-01), pages            4252-4265, XP002222756            ISSN: 0006-4971            the whole document</p>	1-4,8-65

Form PCT/IB 01/01 (continued on separate sheets) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/18 81/01561

<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 5-7 (in full) ; 2-4, 8-65 (partly) 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: <b>See supplementary sheet (Further information Continued from PCT/ISA/210)</b>
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted to accord with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
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 (in full) ; 2-4, 8-65 (partly)
<b>Remark on Protest</b>	<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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB01/01501

Continuation of Box I.2

Claims: 5-7 (in full); 2-4, 8-65 (in part)

Claims 2 and 5 relate respectively to oligonucleotides and PNA oligomers comprising respectively at least one base sequence with a length of at least 13 or 9 nucleotides which are reversibly complementary or identical to a piece of the base sequences as per SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, said piece containing at least one CpG dinucleotide. Claim 11 relates to a set of primer oligonucleotides comprising two oligonucleotides whose sequences correspond respectively to a piece of the base sequence as per SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2, said piece comprising at least 18 base pairs, or are reversibly complementary thereto. Claims 3, 4, 6-10, 12-46 and 48-65 relate back to these sequences.

SEQ ID NOs: 1 and 2 each have a length of 349980 bases and comprise an undefined number of CpG dinucleotides. Claims 2-46 and 48-65 thus relate to a very large number of possibilities.

Furthermore, Claims 4, 7-13 and 48-65 relate to sets of oligomers and the use thereof in methods. The sets comprise a combination of two or more of the claimed oligomers and thus relate to an even larger number of possible embodiments.

In sum, the current Claims 2-46 and 48-65 relate to a disproportionately large number of possible products/methods of which only a small number can be considered to be supported by the description (PCT Article 6) or disclosed in the application (PCT Article 5).

Claim 47 relates to the use of the nucleic acids as per Claim 1 (i.e. an identical or reversibly complementary DNA piece as per SEQ ID NO:1 or 2, said piece comprising at least 20 base pairs) for the diagnosis of important genetic parameters within the MHC. Since it is unclear how all the embodiments comprised by the claims could be used, Claim 47 lacks the requisite support in the description.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB01/01501

In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore the search was directed to the parts of the claims that appear to be supported or disclosed in the above sense, that is Claim 1, and the parts relating to the oligonucleotide probes and primers which are used in the examples, i.e. Claims 2-4 and 8-65 (all in part).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB01/01501

## 1. Claims: 1 (in full); 2-4, 8-65 (in part)

Oligonucleotide probe TAGGTCGTTTATA; set of oligonucleotide probes comprising the probe; oligonucleotide primer pair TTTGGTTTTGATTTAGATTTGG and AAATAAAGTCTCTAACTACTC; set of oligonucleotide primers comprising the primer pair; use of the probe or the primer pair or the sets in a method for the diagnosis of genetic parameters in the MHC by analysis of cytosine methylations in the HLA-A gene.

## 2. Claims: 1 (in full); 2-4, 8-65 (in part)

Oligonucleotide probes TAAAGAGGCGGATTAGTT and TAAAGAGGTGGATTAGTT; set of oligonucleotide probes comprising the two probes; oligonucleotide primer pair TTAGGTTTTGGTTTGTGATGAG and CCCTAACTCCTCTAACTCA; set of oligonucleotide primers comprising the primer pair; use of the probe or the primer pair or the sets in a method for the diagnosis of genetic parameters in the MHC by analysis of cytosine methylations in the DAXX gene.

## 3. Claims: 1 (in full); 2-4, 8-65 (in part)

Oligonucleotide probes AGGTGGAACGGAAATTTT and AGGTGGAATGGAATTTT; set of oligonucleotide probes comprising the two probes; oligonucleotide primer pair ATATTGGTAAAGGTATTAGG and ACTTAACTCAACTCTATACCTAC; set of oligonucleotide primers comprising the primer pair; use of the probe or the primer pair or the sets in a method for the diagnosis of genetic parameters in the MHC by analysis of cytosine methylations in the RXXB gene.

## 4. Claims: 1 (in full); 2-4, 8-65 (in part)

Oligonucleotide probe pairs TGAGAAAG(C/T)GGTAAAGAG and ATTTAAGG(C/T)GACGGTAAA; set of oligonucleotide probes comprising one or both probe pairs; oligonucleotide primer pair

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/IB01/01501
---

AGAAGAGAATGTGGGTAGGA and  
AAAACCTACTTATCAAACCAAT; set of oligonucleotide primers  
comprising the primer pair; use of one or two probe pairs or the  
primer pair or the set in a method for the diagnosis of genetic  
parameters in the MHC via analysis of cytosine methylations in the  
BAT5 gene.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP 01/01501

Patent document class in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9928498	A	10-06-1999	
		DE 19754482 A	01-07-1999
		AT 217348 T	15-05-2002
		AU 753368 B	17-10-2002
		AU 2408599 A	16-06-1999
		CA 2310384 A	10-06-1999
		CH 1283235 T	07-02-2001
		DE 59804098 D	13-06-2002
		DK 1034309 T	26-08-2002
		EP 1034309 A	13-09-2000
		ES 2173659 T	16-10-2002
		FU 0100424 A	28-06-2001
		JP 2001525181 T	11-12-2001
		KZ 504506 A	25-10-2002
		PL 341681 A	23-04-2001
		PT 1034309 T	31-10-2002
		SI 1034309 T	31-08-2002
		US 6214556 B	10-04-2001

From PCT/JP01/01501 (International Search Report)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Inte. des Aktenzeichens PCT/IB 01/01501
<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C12Q1/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Fachrichtung: Molekularbiologie (Klassifikationsystem nach Klassifikationsymbolen) IPK 7 C12Q		
Fachgebiete aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Vorfindschülsen, soweit diese nicht die rechnerischen Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegrie)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Aktenzeich. Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! 29. Januar 1990 (1990-01-29) retrieved from EMBL Database accession no. X17093 XP00222757 Zusammenfassung	1
Y	--- DATABASE EMBL 'Online! 18. Januar 2000 (2000-01-18) retrieved from EMBL Database accession no. L76290 XP00222758 Zusammenfassung	2-4, 8-65
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) das ganze Dokument	2-4, 8-65
---		
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Field C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Eine Abzweig-Patentfamilie
* Personelle Kategorien von angenommenen Veröffentlichungen: *1* Veröffentlichung, die dem allgemeinen Stand der Technik defektor, aber nicht als Besondere offenbart, nicht ist *2* Abzweig-Dokument, das nicht erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *3* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zwischenherauszusetzen zu lassen, oder durch die das Vorfindungsergebnis eines anderen in Betracht kommenden gemeinsamen Veröffentlichungsbegriff werden soll, oder die das einen anderen Besonderegrund ergebnis zu sein ausgedrückt *4* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung eines Erfinders, die in einem oder mehreren Medien an bezogen *5* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem Besondere: "Internationalen Veröffentlichung" ist		
*6* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und in der Anmeldung nicht enthalten ist, sondern nur zum Vorfinden der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der zugrundeliegenden Theorie angeht *7* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsberechtigter Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Veröffentlichung die beanspruchte Erfindung ist *8* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschlusdatum des internationalen Recherchens 28. 03. 03
Name und Postanschrift der internationalen Rechercheurbehörde Europäisches Patentamt, P.O. 2818 Patentlaan 2 NL - 2200 RB Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 81 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-2016		Bevollmächtigter Bevollmächtigter Bradbrook, D

Formular PCT/IB/210 (Jan. 2002) (A1) (en)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Inter loc AMenzelchen PCT/18 01/01501
C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, abmilderndlich unter Angabe der in Betracht kommenden I.C.:	Einw. Anspruch Nr.
A	NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE. Bd. 38, Nr. 19, 1999, Seiten 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 das ganze Dokument	9, 10, 13-65
A	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264. XP002143106 ISSN: 0305-1048 Seite 2258, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 2261, Spalte 2, Absatz 1; Abbildung 2	2-4, 8-65
A	FISZER DOROTA ET AL: "Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: A review." AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY, Bd. 40, Nr. 3, 1998, Seiten 172-176, XP009001931 ISSN: 1046-7408 Seite 174, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 175, Spalte 2, Absatz 2	1-4, 8-65
A	CHENG N C ET AL: "Lack of class I HLA expression in neuroblastoma is associated with high N-myc expression and hypomethylation due to loss of the MEMO-1 locus." ONCOGENE, Bd. 13, Nr. 8, 1996, Seiten 1737-1744, XP009001932 ISSN: 0950-9232 Seite 1737, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 1738, Spalte 1, Absatz 1 Discussion	1-4, 8-65
A	GRUEN JEFFREY R ET AL: "Evolving views of the major histocompatibility complex." BLOOD, Bd. 90, Nr. 11, 1. Dezember 1997 (1997-12-01), Seiten 4252-4266, XP00222756 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument	1-4, 8-65

-----PCT/18/01/01501 (15/412) (15/412) (15/412) (15/412)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		1 Anzahl Ansprüche PCT/IB 01/01501
<b>Teil I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)</b>		
Gemäß Artikel 17(2)(a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:		
1.	<input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. <b>5-7(komplett); 2-4, 8-65 (teilweise)</b> weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/>	Ansprüche Nr. _____ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4(a) abgefaßt sind.
<b>Teil II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)</b>		
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß die internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:		
1.	<input type="checkbox"/>	Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.	<input type="checkbox"/>	Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche eines neuen Arbeitsstadiums durchgeführt worden konnte, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierten Ansprüche, für die die Behörde nicht zur Zahlung eines solchen Gebührens befugt ist.
3.	<input type="checkbox"/>	Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung, dies ist in folgenden Ansprüchen erfolgt: <b>1(komplett); 2-4, 8-65 (teilweise)</b>
<b>Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs</b>		
	<input type="checkbox"/>	Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
	<input type="checkbox"/>	Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Abkommen PCT/81.01501

WEITERE ANGABEN	PCT/SA 210
<p>Fortsetzung von Feld I.2</p> <p>Ansprüche Nr.: 5-7(komplett);2-4,8-65(teilweise)</p> <p>Die Ansprüche 2 und 5 beziehen sich auf Oligonukleotide bzw PNA-Oligomere umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 13 bzw 9 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäss SEQ ID NO.1 oder SEQ ID NO.2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Der Anspruch 11 bezieht sich auf einen Satz von Primeroligonukleotiden umfassend zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einem 18 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenz gemäss SEQ ID NO.1 oder SEQ ID NO.2 entsprechen oder revers komplementär zu ihnen sind. Ansprüche 3,4,6-10,12-46 und 48-65 beziehen sich auf diese Sequenzen zurück.</p> <p>SEQ ID Nos 1 und 2 haben jeweils eine Länge von 349986 Basen, und umfassen eine undefinierte Zahl von CpG Dinukleotiden. Dadurch beziehen sich Ansprüche 2-46 und 48-65 auf eine sehr grösse Zahl von Möglichkeiten.</p> <p>Weiterhin beziehen sich Ansprüche 4, 7-13 und 48-65 auf Sätze von Oligomeren und ihrer Verwendung in Verfahren. Die Sätze umfassen eine Kombination von zwei oder mehr von den beanspruchten Oligomeren, und beziehen sich dadurch auf eine noch grössere Zahl von möglichen Ausführungsformen.</p> <p>Zusammenfassend beziehen sich die geltenden Patentansprüche 2-46 und 48-65 auf eine unverhältnismässig große Zahl von möglichen Produkte/Verfahren, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann.</p> <p>Anspruch 47 bezieht sich auf die Verwendung der Nukleinsäuren gemäss Anspruch 1 (d.h. einen mindestens 20 Basenpaare langen identischen oder revers-komplementären Abschnitt der DNA gemäss SEQ ID NO.1 oder 2) für die Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC. Da unklar ist, wie alle Ausführungsformen, welche von dem Anspruch umfasst sind, benutzt werden könnten, fehlt Anspruch 47 die notwendige Stütze in der Beschreibung.</p> <p>Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche beschränkt, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich Anspruch 1, und die Teile betreffend die Oligonukleotid-Sonden und Primer, welche in den Beispielen benutzt werden, d.h. Ansprüche 2-4 und 8-65 (alle teilweise).</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In</p>	

Internationales Aktenzeichen PCT/8 01 01501

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA 210
<p>seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.</p>	

Internationales Abkürzungen-PCT/B 01 01501

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
1. Ansprüche: 1(komplett);2-4,8-65 (teilweise)	<p>Oligonukleotid-Sonde TAGTCSTTTATA; Satz von Oligonukleotid-Sonden umfassend die Sonde; Oligonukleotide-Primer-Paar TTGGTTTTGATTAGATTGG und AAATAACICIGIAACIACIC; Satz von Oligonukleotid-Primern umfassend das Primer-Paar; Verwendung der Sonde oder des Primer-Paares oder der Sätze in einem Verfahren zur Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen im HLA-A-Gen.</p>
2. Ansprüche: 1(komplett);2-4,8-65 (teilweise)	<p>Oligonukleotid-Sonden TAAAGAGGCGGATTAGTT und TAAAGAGGCGGATTAGTT; Satz von Oligonukleotid-Sonden umfassend die zwei Sonden; Oligonukleotide-Primer-Paar TTAGTTTTGGTTTTGATTAGAG und CCTAACTCCTCAAACCTCA; Satz von Oligonukleotid-Primern umfassend das Primer-Paar; Verwendung der Sonde oder des Primer-Paares oder der Sätze in einem Verfahren zur Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen im DAXX-Gen.</p>
3. Ansprüche: 1(komplett);2-4,8-65 (teilweise)	<p>Oligonukleotid-Sonden AGGTGGAAACGGAATTTT und AGGTGGAAACGGAATTTT; Satz von Oligonukleotid-Sonden umfassend die zwei Sonden; Oligonukleotide-Primer-Paar ATATTGGTAAAGGATTAGGG und ACTTAACTCAACTCTATACCTAC; Satz von Oligonukleotid-Primern umfassend das Primer-Paar; Verwendung der Sonde oder des Primer-Paares oder der Sätze in einem Verfahren zur Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen im RRRB-Gen.</p>
4. Ansprüche: 1(komplett);2-4,8-65 (teilweise)	<p>Oligonukleotid-Sonden-Paare TGAGAAAG(C/T)GGTAAAGG und ATTAAAG(C/T)GAGGTTAA; Satz von Oligonukleotid-Sonden umfassend ein oder beide Sonden-Paare; Oligonukleotide-Primer-Paar AGAAGAGATTGGGTAGGA und AAACCTACTTATCAACCAAT; Satz von Oligonukleotid-Primern umfassend das Primer-Paar; Verwendung der ein oder zwei Sonden-Paare oder des Primer-Paares oder der Sätze in einem Verfahren zur Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen im BAT5-Gen.</p>

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern : Abkürzungen  
PCT/IB 01/01501

Int. Recherchebericht zugehöriges Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9928498 A	10-06-1999	DE 19754482 A	01-07-1999
		AT 217348 T	15-05-2002
		AU 753368 B	17-10-2002
		AU 2408599 A	16-06-1999
		CA 2310384 A	10-06-1999
		CN 1283235 T	07-02-2001
		DE 59804090 D	13-06-2002
		DK 1034309 T	26-03-2002
		EP 1034309 A	13-09-2000
		ES 2173669 T	16-10-2002
		HU 0106424 A	28-06-2001
		JP 2001525181 T	11-12-2001
		NZ 504586 A	25-10-2002
		PL 341681 A	23-04-2001
		PT 1034309 T	31-10-2002
		SI 1034309 T	31-08-2002
		US 6214556 B	10-04-2001

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,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,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ピーベンブロック, クリスチン

ドイツ国、10115 ベルリン、シュワルツコッペフシュトラッセ 7 ベー

(72)発明者 ベルリン, クルト

ドイツ国、14532 スターンスドルフ、マリーンケーフェルヴェーク 4

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 HA11

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ42 QR08 QR42 QR62 QS25 QS36 QX02

专利名称(译)	遗传关键参数诊断组织相容性大复杂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004511217A</a>	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002506246	申请日	2001-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	オレクアレクサンダ ピーペンブロッククリスチン ベルリンクルト		
发明人	オレク,アレクサンダ ピーペンブロック,クリスチン ベルリン,クルト		
IPC分类号	G01N27/62 C07K14/47 C07K14/82 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C07K14/82 C07K14/4703 C12Q1/6883 C12Q2600/154		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N27/62.V G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	10032529 2000-06-30 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于通过组织相容性大复合体 (MHC) 内的遗传, 获得的, 主要参数进行诊断的核酸, 寡核苷酸, PNA-低聚物和诊断方法。核酸, 寡核苷酸或PNA寡聚体用于诊断组织相容性大复合体 (MHC) 内遗传和获得性参数的用途。

19)

J P 2004- 511217 A 2

