

(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2004-533808

(P2004-533808A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/45	A 6 1 K 48/00		4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 3/04		4 B O 2 9
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 35/00		4 B O 5 0
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 39/02		4 B O 6 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 88 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-555273 (P2002-555273)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月3日 (2002.1.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月7日 (2003.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2002/000003
 (87) 国際公開番号 W02002/053770
 (87) 国際公開日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (31) 優先権主張番号 101 00 238.6
 (32) 優先日 平成13年1月5日 (2001.1.5)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 503244871
 メディツィーニッシュ・ホーホシューレ・
 ハノーバー
 ドイツ連邦共和国、デー-30625 ハ
 ノーバー、カール-ノイベルグ-シュトラ
 ーセ 1
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊

最終頁に続く

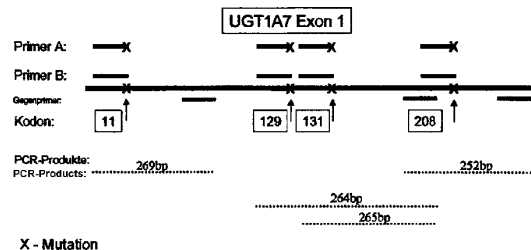
(54) 【発明の名称】 癌疾患及び炎症性腸疾患の潜在的危険性を予測する方法及びその方法による試験

(57) 【要約】

【課題】 癌疾患及び炎症性腸疾患の潜在的危険性を予測する方法及びその方法による試験

【解決手段】 癌疾患及び炎症性腸疾患の潜在的危険性を予測する方法及び/又はそれを診断する方法において、DNA試料を多型UGT1A7対立遺伝子の存在に関して試験する。突然変異が陽性であることは、癌疾患に対する感受性が陽性であることの指標と見なされる。同様に炎症性腸疾患に対する感受性の予測も行うことができる。この方法の場合に、DNA試料によりエクソン1をPCR増幅し、続いて配列を分析し、決定した配列を野生型の配列及び多型対立遺伝子の配列と比較する。突然変異の存在又は不在は自動化蛍光色素配列決定法を用いた該当するcDNAの配列決定により検査される。組み換えUGT1A7酵素は治療の目的でも使用される。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

検査すべき人物の DNA 試料を、コドン 11、129、131 及び / 又は 208 に突然変異を有する多型の UGT1A7 対立遺伝子の存在に関して試験することを特徴とする、1 種及び / 又は複数種の癌疾患又は炎症性腸疾患を遺伝的素因によって診断し、それらの潜在的危険性を予測する方法。

【請求項 2】

コドン 11 及び 208 の突然変異が陽性であることを、癌疾患、特に、大腸癌、膵臓癌、肝臓癌、胃癌、及び食道癌の感受性が陽性である指標として評価することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

陽性と評価された突然変異が、W208R の置換、及びコドン 11 の CCC から CCA へのサイレント突然変異であることを検査することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

コドン 11、129、131 及び 208 の突然変異が陽性であることを、炎症性腸疾患及び癌疾患の感受性が陽性である指標として評価することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

陽性と評価された突然変異が N129K、R131K 及び 208R、並びにコドン 11 の CCC から CCA へのサイレント突然変異であることを検査することを特徴とする、請求項 4 記載の方法。

20

【請求項 6】

ゲノム DNA、好ましくはリンパ球のゲノム DNA を試料として使用することを特徴とする、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

血液試料からゲノムデオキシリボ核酸を、カラムクロマトグラフィー法及び化学的分離法を用いて単離することを特徴とする、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

DNA 試料を用いて UGT1A7 (約 855 塩基対) のエキソン 1 を PCR によって増幅し、続いて配列分析を行い、決定された配列を UGT1A7 の野生型対立遺伝子及び多型対立遺伝子と比較することを特徴とする、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 9】

DNA 試料に対して、コドン 11、129 / 131 又は 208 の周囲の該突然変異した DNA 領域の上流の 1 部及び下流の 1 部と結合する特異的なプライマーペアを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応で、野生型対立遺伝子又は多型対立遺伝子の相当するフラグメントと同等の cDNA フラグメントを作成し、コドン 11、129、131 及び / 又は 208 における突然変異の存在を、配列決定技術及び / 又はハイブリダイゼーション技術によって検出することを特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

前記プライマーペアは、コドン 11、コドン 129 / 131 並びにコドン 208 の上流及び下流のそれぞれ約 50 個の塩基対と結合し、それにより約 100 ~ 150 個の塩基対のサイズの cDNA フラグメントが形成されることを特徴とする、請求項 9 記載の方法。

40

【請求項 11】

野生型対立遺伝子にそれぞれ相応する cDNA フラグメントを用いた一本鎖コンフォメーション多型性分析 (SSCP) により、該コドンの突然変異の存在を検出し、その際、野生型対立遺伝子と多型対立遺伝子とを、好ましくはゲル電気泳動により、さらに好ましくは温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) により識別することを特徴とする、請求項 8 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

自動化蛍光色素配列決定法を用い、突然変異の存在又は不在を、該 cDNA の配列を決定

50

することによって検査することを特徴とする、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

多型の塩基置換の 3' 末端と結合するプライマー配列を用いたポリメラーゼ連鎖反応によって多型の存在を検出することを特徴とする、請求項 8 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

野生型配列又は多型配列と相補的なオリゴヌクレオチド、及び対応する対応プライマー（アンチセンスプライマー）を用いて P C R 技術によって突然変異の存在を検出することを特徴とする、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

定量的 T a q m a n - P C R を使用することを特徴とする、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

蛍光色素又は酵素マーカーを有する P C R 接合体を検出することを特徴とする、請求項 1 4 又は 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

固定キャリア上に、結果を読み取るために準備された配置又は順序で並んだ請求項 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法に必要な遺伝子検出試薬、即ち、必要なプライマー又は c D N A、を有する試験装置において、請求項 8 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法により準備され且つ付加的に標識化された、検査すべき個体の 1 つ又は複数の D N A 試料を試験装置と接触させて検出試薬の 1 つと結合させ、この位置についてマーカーを用いて検出する試験装置。

【請求項 1 8】

蛍光色素又は放射性同位体によって標識化することを特徴とする、請求項 1 7 記載の試験装置。

【請求項 1 9】

複数の U G T 1 A 7 多型のコンビネーション分析用の検出試薬と一緒に試験装置に固定されていることを特徴とする、請求項 1 7 又は 1 8 記載の試験装置。

【請求項 2 0】

結果を読み取るための固定キャリア上に、検出試薬の分類のための表示又は印字が設けられていることを特徴とする、請求項 1 7 から 1 9 のいずれか 1 項に記載の試験装置。

【請求項 2 1】

コードされた多型 U G T イソ型の製造のための、多型 U G T 1 A 7 * 2 遺伝子、U G T 1 A 7 * 3 遺伝子、及び U G T 1 A 7 * 4 遺伝子の使用。

【請求項 2 2】

腫瘍治療薬の代謝の特性決定のため並びに潜在的 U G T 1 A 7 基質の毒性及び / 又は発癌性の検査のための請求項 2 1 記載の U G T イソ型の使用。

【請求項 2 3】

U G T 1 A 多型、特に U G T 1 A 7 * 2 又は U G T 1 A 7 * 4 のタイプの多型の場合に、治療用遺伝子治療薬の製造のための U G T 1 A 野生型遺伝子又はその遺伝子フラグメントの使用。

【請求項 2 4】

治療目的のための組み換え U G T 1 A 7 酵素の使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、癌疾患及び炎症性腸疾患の潜在的危険性を予測する方法及びその疾患を診断する方法に関する。第一に、本発明は結腸直腸癌の潜在的危険性を評価するための方法に関する。さらに、本発明は検査すべき個体の D N A 試料を診断するための試験、並びに、薬剤、特に腫瘍治療剤の代謝特性を決定するための U G T 1 A 7 遺伝子の新規の多型の使用に関する。

10

20

30

40

50

【0002】

【従来の技術】

現在、癌に対する危険性は遺伝的素因及び発癌性物質にさらされることを含む環境の影響により決定されると考えられている。

【0003】

従って、発癌性物質代謝酵素の遺伝的多型性と発癌との間に関係があることがすでに予想されていた。しかしながら、代謝は解毒作用とは同一視されないために、統計的に確認された具体的な関係を見出すことは困難である。従って、癌の危険性を予測するためには、一般に、遺伝的変異を確認することでは不十分であり、この変異が代謝に明らかに不利な結果を引き起こすことを確認する必要がある。

10

【0004】

このような関係を探し出す際の他の問題は、ヒトの代謝が極めて複雑であり、莫大な量の物質、中でも代謝産物、タンパク質及びさらには酵素が癌の危険性に対するマーカーとして挙げられることにある。これは、主要国で最も頻発する癌腫である結腸又は結腸直腸癌(CRC)にも当てはまる。ヒトの腸は大きな器官であり、これは多様な身体プロセスによって、また栄養によって影響を受ける。従って、一般に遺伝的素因による明瞭な危険性評価が可能であるかどうかは明確ではない。

【0005】

腸内での代謝には多種の酵素が関与しており、この中には外来物質を代謝する酵素がある。

20

ヒトのウリジン二リン酸(UDP)-5-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)は、多様な物質のグルクロニド化を行う大きな酵素クラスである。このスーパーファミリーの中で、特別な課題を有する3つのファミリーのUGT1、UGT2及びUGT8が同定されている。UGT1ファミリーの酵素の中だけでも、多様なイソ型が識別されている。肝臓中では、最近の10年間に5種のファミリー、1AUGTイソ型(UGT1A1、1A3、1A4、1A6及び1A9)が発見されてクローニングされ、その中のビリルビン-UGTイソ型がUGT1A1である。胆管(UGT1A10)、胃(UGT1A7)及び結腸(UGT1A8)から、3種の肝臓外UGT1A遺伝子産物を単離することができた。

【0006】

ヒトUGT1A7遺伝子によりコードされるタンパク質は、グルクロニド化により人体の多数の内因性及び外因性化合物(生体異物、即ち、工業的起源の難分解性化合物)の解毒に用いられる。これは、ヒトのいわゆるフェーズ2-代謝、たとえばアセチル化、硫酸化及びグルクロニド化におけるタンパク質である。1996年に初めて、転写物として記載されたUGT1A7が、発癌物質と見なされている多環式炭化水素及び複素環式アミンを解毒することが証明された。

30

【0007】

WO 00/06776では、UGT2B活性を変更するヒトのUGTB4遺伝子、UGT2B7遺伝子及びUGT2B15遺伝子の遺伝的多型の同定を開示している。UGT2酵素は、特にステロイド代謝に関与している。多型UGT2配列を含む核酸を用いて、患者のUGT2B基質に対する代謝、考えられる作用物質と作用物質の相互作用、及び不利な作用物質/副作用の変化、並びに環境的被毒又は職業的被毒に起因する疾患が試験された。この核酸を用いて、作用物質代謝に関する動物モデル、細胞モデル及びインビトロモデルが確立された。

40

【0008】

WO 99/57322では、ヒトのUGT1遺伝子における遺伝的多型が同定された。この多型は、UGT1依存性の作用物質代謝を変化させる。この場合も、多型配列はUGT1B基質に対する代謝、考えられる作用物質と作用物質の相互作用、及び不利な作用物質/副作用の変化、並びに環境的被毒又は職業的被毒に起因する疾患が試験された。この核酸を用いて、同様に作用物質代謝に関する動物モデル、細胞モデル及びインビトロモデル

50

が確立された。

【0009】

さらに、ヒトのUGT1A7遺伝子の遺伝的変異と機能的変異の因果関係は、C. Guillemette, J. K. Ritter, D. J. Auyeung, F. K. Kessler, D. E. Housman著、“Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene”, *Pharmacogenetics*, 2000, 10: 629-644に既に記載されている。この場合に、肺における発癌性生成物の解毒及び排泄の際にUGT1A7の考えられ得る役割も議論されている。UGT1A7は肺において試験されているが、ヒトの大腸においては試験されていない。

10

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明の課題は、発癌の危険性、特に結腸癌（結腸直腸癌、CRC）の危険性と遺伝的素因との間の具体的な関係を見出し、且つこの素因の検出のための試験を提供することである。

【0011】

これは、UGT1A7*2、UGT1A7*3、及びUGT1A7*4と表され、結腸直腸癌（CRC）の発生、さらには特定の炎症性腸疾患（IBD、inflammatory bowel disease；クローン病）の発生と統計的に驚くべき関連性を有し、また、膵臓癌、肝臓癌、胃癌及び食道癌と関連している可能性がある、新規の多型UGT1A7対立遺伝子を見出すことにより達成される。この結果は、UGT1A7が大腸中で、つまり疾患領域内では発現されない点で意外である。遺伝的素因が該当器官内での発現に依存するのではなく、空間的に離れても可能であることは、今までの試験では発見されていないことであり、驚くべきことであった。このことから、遺伝的変異が広範囲な効果を有し、器官に特異的な効果だけを有するのではないことが判明した。これは本願明細書において初めて指摘されるものである。

20

【0012】

遺伝的多型とは、生殖系列における突然変異であり、腫瘍の体細胞における突然変異ではない。基本的な分析は、腫瘍（CRC）、炎症性腸疾患（IBD）を有する患者とこれらの疾患のない対照者のリンパ球からゲノムDNAを採取して行う。全部で111人の個体の分析により、個々のコドンに関する多型が相互に独立して生じるのではなく、組合わさって遺伝的に伝達されるという結果が得られた。

30

【0013】

UGT1A7*2は、ポジション3でCがAに置換されている（CCCがCCAになっている）コドン11のサイレント突然変異を特徴とする。この突然変異は小胞体のシグナルペプチドドメイン内に含まれる。これと関連しているのは、コドン208の第2の突然変異、即ち、W208RのTからCへの置換であり、この突然変異は、芳香族トリプトファンの正に帯電したアルギニン基への非保存的置換を引き起こす。コドン208のこの多型は、UGT1A7-10の第1のエキソン中だけでなく、UGT1A7ファミリーのすべてのメンバーにおいて保存されている配列範囲に含まれる。アミノ酸206と209との間にRV-N-配列モチーフが存在することは、全てのUGT1A-タンパク質と共通である。UGT1A7におけるこのW208Rの置換は、UGT1A8及びUGT1A9の野生型配列を表す。本出願人の調査は、コドン11及びコドン208での多型が個別に生じるのではないことを示した（111人の個体に関する試験において）。ヘテロ接合した個体の2つのポジションでの特性決定から、及び、コドン11又はコドン208が個々にホモ接合した形が見られないという事実から、UGT1A7*2における2つの交換が存在することが容易に推測できる。

40

50

【0014】

UGT1A7*3は2つの突然変異を含む。第1の突然変異はコドン129におけるTからGへの置換であり、これはアスパラギンからリシンへの保存的なコドン置換である(N129K)。第2の突然変異は、コドン131におけるポジション1のCからAへの置換、及びポジション2のGからAへの置換の2箇所であり、これはアルギニンからリシンへの置換が生じる(R131K)。この多型は、同様にUGTタンパク質の著しく保存性の高い配列に影響を及ぼす。全てのUGT1A7タンパク質中に存在するロイシン-127に後続して、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4及びUGT1A5中のLHN-L-モチーフ(アミノ酸128~133)が保存されている。アミノ酸ポジション128~134で、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9及びUGT1A10中のF-D-KLV-アミノ酸モチーフが保存されている。N129K多型及びR131K多型の分析は、これらの置換が相互に無関係に起こってはいないことを示した。ホモ接合したUGT1A7*3-対立遺伝子を同定することができ、これはN129K/R131K-突然変異が個々の対立遺伝子上で同定することができ、UGT1A7*2とは無関係に生じることが示された。UGT1A7のN129/R131K-多型は、UGT1A9のこのコドンの野生型配列に一致し、このことからさらに、3塩基対-突然変異がハプロタイプとして遺伝的に伝えられていることが容易に推測される。

10

【0015】

第3の対立遺伝子のUGT1A7*4は、UGT1A7*2及びUGT1A7*3において観察された全ての変異型と結びつく。コドン11、129、131及び208のホモ接合した突然変異を有する個体が確認され、これは全ての4種の多型が唯一の対立遺伝子上に存在することを示している。コドン11、129、131又は208での多型は個別にヘテロ接合又はホモ接合を生じることが注目すべきである。この観察は、上記したように、コドン11及び208の多型及びコドン129の多型がコドン131と共にハプロタイプとして遺伝的に伝えられるという想定を支持している。

20

【0016】

この結果に基づいて、前記の課題は本発明において、検査すべき人物のDNA試料を、コドン11、129、131及び/又は208に突然変異を有する多型のUGT1A/-対立遺伝子が存在するかどうかによって試験する、癌疾患又は炎症性腸疾患の潜在的危険性を予測する方法及び/又は癌疾患又は炎症性腸疾患を診断する方法により解決される。

30

【0017】

この場合に、特にコドン11及びコドン208の突然変異が陽性であることを、癌疾患、特に結腸直腸癌又は結腸癌(CRC)に対する感受性が陽性である指標として評価する。このための試験方法を次に記載する。本発明の実施態様の場合には、さらに、陽性と評価された突然変異が、W208Rの置換、及びコドン11のCCCからCCAへのサイレント突然変異であることを検査する。

【0018】

さらに、本発明において、4つのコドン11、129/131及び208の全ての突然変異が陽性であることを、炎症性腸疾患、つまり特に“inflammatory bowel disease”(IBD)及び潰瘍性大腸炎の概念に含まれる疾患、及び癌疾患、特にCRCに対する感受性の指標として評価する。これに基づく試験で、陽性として評価された突然変異がN129K、R131K及びW208R並びにコドン11のCCCからCCAへのサイレント突然変異であることを検査することもできる。

40

【0019】

UGT1A7多型と、結腸直腸癌および結腸発癌物質の危険因子を形成する炎症性腸疾患との関連性が確認されたことから、腫瘍疾患に対する潜在的危険性を同定するために前記マーカーを使用することが可能である。この場合に、多型を検出することができる解毒酵素はヒトの器官内で広範囲な機能を担っているため、ここに示された結腸直腸癌の他に、胃腸管、呼吸器系、造血及び生殖器及び生殖腺の癌疾患にもおそらく関連がある。

【0020】

50

本発明の利点は、患者を早期に、相応するハイリスクグループに分類して予防治療を実施することができ、これが早期発見の改善につながる点にある。

【0021】

本発明の他の利点はこの方法が診断のためにも適用できることである。診断を改善することによって、患者の状態に関してより迅速且つ明確な診断を得ることができ、目標を定めて治療することができる。早期発見及び早期治療は、癌疾患の場合に特に重要となる。CRCは早期に発見された場合には、たいていが回避可能であるか、治癒可能である。

【0022】

検査には、リンパ球のゲノムDNAを使用するのが好ましい。このゲノムDNAは発端者の血液試料からカラムクロマトグラフィー法及び化学的処理により単離することができる。検査すべき人物の遺伝的素因を表現するこのゲノムDNAは、他の全ての遺伝子試験ストラテジーの基礎をなしている。

10

【0023】

一般的には、得られた患者のDNAを最初にポリメラーゼ連鎖反応で増幅する。本発明の第1の実施態様の場合には、UGT1A7遺伝子(約855塩基対)の全体のエキソン1をPCRによって増幅することができ、これに続いて配列分析を行う。決定された配列を適切な方法で評価する。即ち、野生型配列及びこの方法にとって適切なUGT1A7対立遺伝子のUGT1A7*2、UGT1A7*3及びUGT1A7*4の配列と比較することができる。

【0024】

他の実施態様の場合には、検査する突然変異に関する情報を提供するcDNAフラグメントだけを増幅する。従って、DNA試料を、コドン11、129/131又は208の周囲の該当する突然変異したDNA領域の上流の1つ及び下流の1つとそれぞれ結合する特異的なプライマーペアで処理し、ポリメラーゼ連鎖反応で、野生型対立遺伝子又は多型対立遺伝子の相当するフラグメントと同等のcDNAフラグメントを作成し、コドン11、129、131及び/又は208の突然変異の存在を配列決定技術及び/又はハイブリダイゼーション技術で検出するのが好適である。

20

【0025】

コドン11、コドン129/131並びにコドン208の上流及び下流のそれぞれ約50塩基対と結合するプライマーペアを使用するのが好ましく、それにより、約100~150塩基対のサイズのcDNA断片が得られる。

30

【0026】

多型の検出は、配列決定法及び/又はハイブリダイゼーション法を用いて多様な方法で行うことができる。この場合に、当業者が公知の方法の中から適切に選択することは基本的に自由である。

【0027】

特に、検査する多型は、先行するPCRで得られた患者のcDNAフラグメントと野生型対立遺伝子の、それぞれ相応するcDNAフラグメントとから二本鎖を得る完全な再結合を検出することによる一本鎖コンフォメーション多型分析(SSCP)により検査することができる。この基本原理は、変異したDNA配列は野生型配列と完全に一致する二本鎖を形成することができないという事実に基づいている。これは、スクリーニング検査においてゲル電気泳動によって判明し、突然変異の存在を示す。この方法を改良し、多型のcDNAフラグメントの検出を温度勾配ゲル電気泳動(TGGE)によって行うことができる。

40

【0028】

また、突然変異の存在又は不在は、自動化蛍光色素配列決定法によって該当するcDNAの配列を決定することにより検査することが好ましい。

【0029】

他の検出方法は、純粋なPCRをベースとするストラテジー(amplification refractory mutation System、増幅耐性突然変異システ

50

ム)において、多型の塩基置換の3'末端で結合する特異的なプライマー配列によって多型の存在を検出する方法である。同時に、この方法はヘテロ接合及びホモ接合したキャリアを区別するように変更することができる。自動化可能な試験キットシステムとしてのこの方法の実施例は、後に実施例として記載する。プライマーとして、一方は野生型配列、他方は多型配列と結合するオリゴヌクレオチド、並びに対応する対応プライマー(アンチセンスプライマー)を使用する。これにより、プライマーにコードされた野生型又は多型の対立遺伝子が存在する場合にのみ、PCR産物が生じる。対照として、所定の多型を有する所定のcDNAを使用する。この方法は、たとえば定量的Taqman-PCRの使用下で自動化することが可能である。

【0030】

10

このPCR接合体は通常のように蛍光色素又は酵素マーカで検出することができる。当業者は適当な方法を選択することができ、これについては特に記載する必要はない。

【0031】

本発明はさらに、本発明による方法を実施するための試験キットもしくは試験装置も提供するものである。

【0032】

本発明の試験装置は、基本的に、少なくともこの方法に必要な遺伝子検出試薬、即ち、必要なプライマー又はcDNAを、固定キャリア上で、この結果を読みとるために準備された配置又は順序で並んで有しており、この場合に、検査すべき個体の、準備され且つ付加的に標識されたDNA試料をテスト装置と接触させて検出試薬の1つと結合させ、この位置についてマーカを検出するようになされている。この場合に、発端者DNAの標識は蛍光色素又は放射性同位体で行うことができる。

20

【0033】

数種のUGT1A7多型を組み合わせ分析(この分析はいずれにせよ有利である)するために、このために必要な検出試薬、即ち、たとえば異なるコドン11、129/131及び208に対するプライマー又は野生型対立遺伝子及びUGT1A7*2/3/4-対立遺伝子のDNAフラグメントを、選択されたストラテジーに応じて、試験装置上に、たとえば遺伝子チップ上に一緒に固定することができる。

【0034】

この結果の読みとりを容易にするために、固定キャリア上に、検出試薬の分類のための表示又は印字が設けられているのが好ましい。

30

【0035】

全てのUGT1A7多型を組み合わせ分析は、遺伝子チップ技術を利用して行うことができる。この場合、例えば固定相中に多型および野生型のオリゴヌクレオチド配列を固定することができる。発端者DNAから対応するオリゴヌクレオチドをPCRにより増幅し、蛍光色素、放射性同位体又は他の接合体により標識する。続いてハイブリダイゼーション反応により、遺伝子アレイ上で対応するオリゴヌクレオチドを同定し、多型の存在を決定する。アレイをベースとする試験ストラテジーは、多様な実施が可能であり、当業者はこの方法に適合させることができる。

【0036】

40

本発明の他の態様の場合には、多型のUGT1A7*2遺伝子、UGT1A7*3遺伝子及びUGT1A7*4遺伝子をそれらが属するUGTイソ型の製造のために使用することができる。この同定された多型は組み換えタンパク質として発現し、たとえば腫瘍の治療の代謝による特性決定のために使用でき、この物質の代謝の予想を可能にする。同様に、UGT1A7の全ての多型は、潜在的な変異原物質又は発癌物質の毒性又は発癌能力に関する予想を行う目的で、これらの物質の代謝を調査するために用いることができる。このために、異種発現系中で、バクテリア中で、真核細胞培地中で及び多型の対立遺伝子の発現及び引き続くその使用が、接触分析用の酵素調製物として用いられる。一連の異なる多型タンパク質を含んだ試験キットは、この場合に簡単なインビトロ分析を可能にする。

【0037】

50

結腸癌及び炎症性腸疾患のための感受性マーカーの同定を、原則として遺伝子治療ストラテジーのために使用することも可能である。基本的な遺伝子治療による使用の可能性は、今日では当業者に既に公知であるため、多様な変法が開示されている。腫瘍治療において UGT1A7 単独での使用又はこの酵素ファミリーの他の同種のメンバーと組み合わせた使用は、特定の遺伝子会合の使用である。

【0038】

従って、本発明は、タイプ UGT1A7*2、UGT1A7*3 及び UGT1A7*4 の UGT1A7 多型の場合に治療を行うための遺伝子治療薬を製造するための、UGT1A7 遺伝子又は UGT1A7 遺伝子フラグメントの使用でもある。

【0039】

従って、本発明の実施態様の場合には、腫瘍治療において又は潜在的危険性のある場合での腫瘍予防において、UGT1Aファミリーの遺伝子の組み換えタンパク質の経口又は腸管外使用が考えられる。UGT1A7 cDNA 又は同族の UGT1A7 cDNA をヒト細胞及び腫瘍細胞に送達するために、ベクターを使用することができ、このベクターは当業者にとって基本的に公知であり、このベクターはその専門知識を用いて選択することができる。これは胚組織又は胎児組織を含めた目的組織内でタンパク質を発現させ、この組織で前駆細胞を変更するための遺伝子治療による UGT1A7 医薬を使用することができる。

10

【0040】

UGT1A-cDNA の送達は、たとえば器官特異性のプロモータを備えた腸管外ベクターにより、UGT1A cDNA の筋肉内注射により、又はリポソームでパッケージングした cDNA を消化管を介して行うことができる。当業者は、専門知識の範囲内で適当なデリバリーシステムを選択することができる。

20

【0041】

次に、実施例及び図面を用いて本発明を詳細に説明する。

【0042】

【実施例】

実施例 1 試験例

一方が野生型配列、他方が多型配列と結合するオリゴヌクレオチド(プライマー)、並びに対応する対応プライマー(アンチセンスプライマー)を使用する。これにより、プライマーにコードされた野生型又は多型の対立遺伝子が存在する場合にのみ、PCR産物が生じる。この原理を図1に示す。対照として、所定の多型を有する所定のcDNAを使用する。

30

【0043】

使用したプライマーを表1に示す。

【0044】

【表1】

表 1

多型	プライマー種	配列	産物サイズ
コドン11	A	gggtggactggcctccttcca	269 bp
	B	gggtggactggcctccttccc	
	リバーズ	ggcaaaaaccatgaactcccg	
コドン129	A	ttttttcaaattgcaggagttgtttaag	264 bp
	B	ttttttcaaattgcaggagttgtttaat	
コドン131	A	aaattgcaggagttgtttaaggacaa	271 bp
	B	aaattgcaggagttgtttaatgaccg	
	リバーズ	ttctaagacattttgaaaaataggg	
コドン208	A	gacgccatgactttcaaggagagagtac	252 bp
	B	gacgccatgactttcaaggagagagtat	
	リバーズ	tgctttccctgatgacagttgatacc	

10

このプライマーを自動化された定量的PCRで使用する場合に、蛍光色素、酵素マーカ―
又はDNA用の他の標識システムとの接合体を製造し、この診断のために利用する。この
標識手段は一般に公知であり、ここでは特に記載しない。

20

【0045】

この試験システムを用いて、ホモ接合およびヘテロ接合の突然変異の存在を特異的に検出
した結果が得られた。この結果を表2に示した。

【0046】

【表2】

表 2

コドン	プライマー	対 照		結 果					
		UGT1A7*1	UGT1A7*4	UGT1A7*1	UGT1A7*2	UGT1A7*3	UGT1A7*2/ UGT1A7*3	UGT1A7*2/ UGT1A7*3	UGT1A7*3/ UGT1A7*4
11	A	-	+	+	-	-	+	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	+	+
129	A	-	+	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	+	-
131	A	-	+	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	+	-
208	A	-	+	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	+	+

UGT1A7*2対立遺伝子(コドン11及び208)並びにUGT1A7*4対立遺伝子(コドン11、129、131、208)の存在は結腸直腸癌と関連しており、UGT1A7*4対立遺伝子の存在は炎症性腸疾患と関連しているため、3つの全ての多型遺伝子の位置11、129/131及び208について、この分析を使用することは、極めて重要である。従って、この遺伝子分析は、試験キットを用いて同定された位置に関する分析と組み合わせられることが好ましい。

【0047】

111人の発端者に関する一連の試験：

1999年にハノーバー医科大学の胃腸学及び肝臓学の機関において111人の患者から試料を集めた。

【0048】

調査したグループは次のとおりである。

10

20

30

40

50

【0049】

a) 対照グループ (n = 54、44.32 ± 15.65 才、男性 31 人 / 女性 23 人) を、腹部超音波及び内視鏡 (上部又は下部) により除外して前記の癌疾患に関する所見を有していない患者として定義した。

【0050】

b) 結腸直腸癌患者 (n = 26、62.15 ± 11.65 才、男性 15 人 / 女性 11 人) は、アムステルダム II - 基準に従って除外することにより確認された結腸直腸癌を患っている。

【0051】

c) 炎症性腸疾患 (IBD) (n = 31、36.74 ± 11.79 才、男性 14 人 / 女性 16 人) の例は、潰瘍性大腸炎 (n = 14、35.07 ± 13.86 才、男性 9 人 / 女性 5 人) 及びクローン病 (n = 17、38.12 ± 10.00 才、男性 5 人 / 女性 12 人) を有する。潰瘍性大腸炎及びクローン病の診断は上部及び下部の内視鏡の診断に基づき、かつ腸管バイオプシーにより組織学的に確認した。

【0052】

ゲノム DNA :

ゲノム DNA は製造元の推奨法により Quia Amp (R) システムを用いて完全血試料から調製した (Quia Gen, Hilden, Deutschland)。濃度データをスペクトル分析により 260 及び 280 nm で測定し、この試料を Tris / EDTA 緩衝液 (pH 8.0) 10 mM 中、4 で次の試験まで貯蔵した。

【0053】

UGT1A7 エキソン 1 配列の分析 :

UGT1A7 エキソン 1 の配列をポリメラーゼ連鎖反応で増幅した。フォワードプライマーは、UGT1A7 (5' - gcggcctcgcagccacttactatattataggagct - 3') (GenBank 受入番号 U39570) の ATG 開始コドンの上流の塩基対 61 ~ 38 を用いた。対応するプライマーは、UGT1A7 エキソン 1 の配列 (5' - gcggatataccataggcactggcctttccctgatgaca - 3') (GenBank 受入番号 U89507) の塩基対 855 から 829 を用いた。UGT1A7 - 10 エキソン 1 の配列は 93% の相同性を示していたため、増幅の特異性を達成するためにはオープンリーディングフレーム外に上流プライマーを局在させることが必要であった。916 塩基対のサイズの産物を、KCl 10 mM、Tris-HCl (pH 8.8) 20 mM、硫酸アンモニウム 10 mM、硫酸マグネシウム 2 mM、1% Triton X 100、各 0.2 mM の dNTP、ゲノム DNA 20 ng、プライマー 2 μM、及び VENT (exo) DNA - ポリメラーゼ 5 ユニットを含む 100 μl の溶液中で増幅した。Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400 システムを用い、開始時に 94 で 3 分間、次いで 94 で 3 秒間、57 で 30 秒間、そして 72 で 30 秒間を 30 サイクルに渡って運転した。2% アガロースゲルを用いた電気泳動でこの産物を可視化し、Quia Quick (R) カラムを用いて製造元 (Quia Gen, Hilden, Deutschland) の指示に従って精製した。PCR 産物の配列を自動化蛍光色素配列決定法により 2 つの鎖に関して決定した (MWG - Biotech, Ebersbach, Deutschland)。この配列データを、PC - Gene - software - package (Oxford Molecular, Campbell, CA, U.S.A.) で分析した。クラスカル - ワリス試験 (Kruskal - Wallis - Test) に従って統計学的分析を行った。

【0054】

GenBank (ジーンバンク) 受入番号 : UGT1A7 * 1 : U89507 ; UGT1A7 * 2 : AF2969226 ; UGT1A7 * 3 : AF292627, UGT1A7 * 4 : AF292627

次に、図面を用いて本発明を詳細に説明する。それぞれの図は次のものを示す。

【0055】

図1はUGT1A7多型診断を表す。同定された多型の周囲の領域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。この際、特異的なプライマーペアを使用した。このプライマーペアは、コドン11、コドン129/131並びにコドン208の上流及び下流の約50塩基対と結合する。このPCRによって、100~150bpのサイズの相補的デオキシリボ核酸フラグメント(cDNA)が作成され、これは野生型対立遺伝子に一致するか、又は同定された多型を有している。

【0056】

図2は図3に定義されたような多型UGT1A7対立遺伝子の罹患率の分析を示す。定義された多型UGT1A7対立遺伝子をベースとするこの分析は、UGT1A7*4及びUGT1A7*2と結腸直腸癌(CRC)との明らかな関係を示し、対照グループ(NC)の場合ではこの対立遺伝子のわずかな存在を示す。これとは反対に、炎症性腸疾患(IBD)はUGT1A7*4の存在だけが関連している。CRCでもIBDでも、UGT1A7*3対立遺伝子との明らかな関係は見られなかった。しかしながらUGT1A7*3/UGT1A7*4ヘテロ接合体と、CRC及びIBDとの関連は明らかであった。統計的に明らかな比較を*で表した。UGT1A7*2はコドン11のCCAとW208R突然変異との組み合わせとして定義される。これは、2つの突然変異が常に組み合わせられており、コドン11又はコドン208のヘテロ接合又はホモ接合が個別に同定できないという観察に基づいている。UGT1A7*2はホモ接合対立遺伝子として検出されなかった。UGT1A7*3は、N129K及びR131Kの組み合わせによってだけ定義された。これらの患者はN129K並びにR131に対してホモ接合又はヘテロ接合であった。ヘテロ接合UGT1A7*4は、ヘテロ接合UGT1A7*2/UGT1A7*3の結合を表すこともできる。

【0057】

図3に、ヒトUGT1A7エキソン1配列中に同定された3つの多型サイトを図式的に示した。コドン11の突然変異CCC/Aはサイレントである。コドン129、131及び208の突然変異はアミノ酸の置換を生じる。この配列分析は、UGT1A7*2、UGT1A7*3及びUGT1A7*4に帰属する3つの異なる多型の存在を示した。コドン11及び208(UGT1A7*2)の置換、並びにコドン120及び131(UGT1A7*3)の多型は、独立して存在しない。

【0058】

図4は、コドン11の周辺領域と比較して、ポジション129/131及びポジション208の同定された多型が、保存性が高い配列領域内にあることを示す。N129K/R131K多型はこのポジションでのUGT1A9の野生型配列を表す。W208RはこのポジションでのUGT1A8及びUGT1A9の野生型配列を表す。

【0059】

図5は、W208R突然変異と結腸直腸癌疾患並びに炎症性腸疾患との関係が統計的に極めて明白であることを示す。コドン208の突然変異(W208R)は、標準対照が22%しか出現していないのに対して、結腸直腸癌の患者では73%、炎症性腸疾患の患者では61%出現していた。UGT1A7*2対立遺伝子については、結腸直腸癌(7%に対して19%)との明らかな関係を示したが、炎症性腸疾患とは明らかな関係を示さなかった。UGT1A7*4対立遺伝子は、結腸直腸癌に対しても、炎症性腸疾患に対しても明らかな関係を示したが、UGT1A7*3に対しては明らかな関係を示さなかった(低い有意水準)。CRC患者(73%)の場合に、標準対照(22%)と比較したW208R突然変異の存在の統計的有意性は極めて高かった($p < 0.0001$)。この場合にヘテロ接合(15%に対して50%、 $p < 0.001$)及びホモ接合(7%に対して23%、 $p < 0.02$)のW208R突然変異が考慮された。この関係は、61%のW208R突然変異($p < 0.0001$)を示したIBD患者に対しては同様に明らかであるが、35%のヘテロ接合及び26%のホモ接合の個体においては低い。標準対照の場合に22%までのW208R突然変異の出現率の場合には、さらに血液試料採取時点での腫瘍のない状

10

20

30

40

50

態が後のCRCの発生を排除しないことに考慮すべきである。

【0060】

*の符号は、標準対照に対する有意水準を示す(Kruskal Wallis Test)。次に省略記号を説明する：n.s.は明らかでないことを示す。NCは標準対照を示す。CRCは結腸直腸癌(colorectal carcinoma)を示す。IBDは炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease)を示す。

【0061】

【配列表】

<110> Medizinische Hochschule Hannover

10

<120> Verfahren zur Vorhersage des Gefardungspotentials f・Karzinomerk
rankungen und entz・dliche Darmerkrankungen und zugehörige Tests

<130> 3096-001 PCT-1

20

<140> W0 02/053770

<141> 2002-01-03

<160> 21

30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gcggctcgcag ccacttacta tattatagga gct

33

10

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 2

gcggataatcc ataggcatgg ctttcctga tgaca

35

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gggiggactg gcctccttcc a

21

10

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 4

gggiggactg gcctccttcc c

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggcaaaaacc atgaactccc g

21

10

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 6

ttttttcaa attgcaggag ttgtttaag

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ttttttcaa attgcaggag ttgtttaat

30

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 8

aaattgcagg agttgttta aggacaa

27

20

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aaattgcagg agttgttta atgaccg

27

<210> 10

10

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ttctaagaca ttttgaaaa aataggg

27

20

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gacgccaatga ctccaagga gagagtac

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gacgccaatga ctccaagga gagagtat

28

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

20

<400> 13

tggctttccc tgaigacagt tgatacc

27

<210> 14

<211> 530

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ala Arg Ala Gly Trp Thr Gly Leu Leu Pro Leu Tyr Val Cys Leu
1 5 10 15

20

Leu Leu Thr Cys Gly Phe Ala Lys Ala Gly Lys Leu Leu Val Val Pro
 20 25 30

Met Asp Gly Ser His Trp Phe Thr Met Gln Ser Val Val Glu Lys Leu
 35 40 45

Ile Leu Arg Gly His Glu Val Val Val Val Met Pro Glu Val Ser Trp
 50 55 60

Gln Leu Gly Arg Ser Leu Asn Cys Thr Val Lys Thr Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80

Tyr Thr Leu Glu Asp Gln Asp Arg Glu Phe Met Val Phe Ala Asp Ala
 85 90 95

10

Arg Trp Thr Ala Pro Leu Arg Ser Ala Phe Ser Leu Leu Thr Ser Ser
 100 105 110

Ser Asn Gly Ile Phe Asp Leu Phe Phe Ser Asn Cys Arg Ser Leu Phe
 115 120 125

20

Asn Asp Arg Lys Leu Val Glu Tyr Leu Lys Glu Ser Cys Phe Asp Ala
 130 135 140

Val Phe Leu Asp Pro Phe Asp Ala Cys Gly Leu Ile Val Ala Lys Tyr
 145 150 155 160

Phe Ser Leu Pro Ser Val Val Phe Ala Arg Gly Ile Phe Cys His Tyr
 165 170 175

Leu Glu Glu Gly Ala Gln Cys Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Val Pro Arg
 180 185 190

Leu Leu Leu Gly Phe Ser Asp Ala Met Thr Phe Lys Glu Arg Val Trp
 195 200 205

10

Asn His Ile Met His Leu Glu Glu His Leu Phe Cys Pro Tyr Phe Phe
 210 215 220

Lys Asn Val Leu Glu Ile Ala Ser Glu Ile Leu Gln Thr Pro Val Thr
 225 230 235 240

20

Ala Tyr Asp Leu Tyr Ser His Thr Ser Ile Trp Leu Leu Arg Thr Asp
 245 250 255

Phe Val Leu Glu Tyr Pro Lys Pro Val Met Pro Asn Met Ile Phe Ile
 260 265 270

Gly Gly Ile Asn Cys His Gln Gly Lys Pro Val Pro Met Glu Phe Glu
 275 280 285

Ala Tyr Ile Asn Ala Ser Gly Glu His Gly Ile Val Val Phe Ser Leu
 290 295 300

Gly Ser Met Val Ser Glu Ile Pro Glu Lys Lys Ala Met Ala Ile Ala
 305 310 315 320

10

Asp Ala Leu Gly Lys Ile Pro Gln Thr Val Leu Trp Arg Tyr Thr Gly
 325 330 335

Thr Arg Pro Ser Asn Leu Ala Asn Asn Thr Ile Leu Val Lys Trp Leu
 340 345 350

Pro Gln Asn Asp Leu Leu Gly His Pro Met Thr Arg Ala Phe Ile Thr
 355 360 365

20

His Ala Gly Ser His Gly Val Tyr Glu Ser Ile Cys Asn Gly Val Pro
 370 375 380

Met Val Met Met Pro Leu Phe Gly Asp Gln Met Asp Asn Ala Lys Arg

Lys Cys Leu Gly Lys Lys Gly Arg Val Lys Lys Ala His Lys Ser Lys
 515 520 525

Thr His
 530

<210> 15

<211> 530

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ala Arg Ala Gly Trp Thr Gly Leu Leu Pro Leu Tyr Val Cys Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Cys Gly Phe Ala Lys Ala Gly Lys Leu Leu Val Val Pro
 20 25 30

10

20

Met Asp Gly Ser His Trp Phe Thr Met Gln Ser Val Val Glu Lys Leu
 35 40 45

Ile Leu Arg Gly His Glu Val Val Val Val Met Pro Glu Val Ser Trp
 50 55 60

Gln Leu Gly Arg Ser Leu Asn Cys Thr Val Lys Thr Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80

10

Tyr Thr Leu Glu Asp Gln Asp Arg Glu Phe Met Val Phe Ala Asp Ala
 85 90 95

Arg Trp Thr Ala Pro Leu Arg Ser Ala Phe Ser Leu Leu Thr Ser Ser
 100 105 110

20

Ser Asn Gly Ile Phe Asp Leu Phe Phe Ser Asn Cys Arg Ser Leu Phe
 115 120 125

Asn Asp Arg Lys Leu Val Glu Tyr Leu Lys Glu Ser Cys Phe Asp Ala
 130 135 140

Val Phe Leu Asp Pro Phe Asp Ala Cys Gly Leu Ile Val Ala Lys Tyr
145 150 155 160

Phe Ser Leu Pro Ser Val Val Phe Ala Arg Gly Ile Phe Cys His Tyr
 165 170 175

Leu Glu Glu Gly Ala Gln Cys Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Val Pro Arg
 180 185 190

Leu Leu Leu Gly Phe Ser Asp Ala Met Thr Phe Lys Glu Arg Val Arg
 195 200 205

Asn His Ile Met His Leu Glu Glu His Leu Phe Cys Pro Tyr Phe Phe
 210 215 220

Lys Asn Val Leu Glu Ile Ala Ser Glu Ile Leu Gln Thr Pro Val Thr
225 230 235 240

Ala Tyr Asp Leu Tyr Ser His Thr Ser Ile Trp Leu Leu Arg Thr Asp
 245 250 255

Phe Val Leu Glu Tyr Pro Lys Pro Val Met Pro Asn Met Ile Phe Ile

10

20

260

265

270

Gly Gly Ile Asn Cys His Gln Gly Lys Pro Val Pro Met Glu Phe Glu
275 280 285

Ala Tyr Ile Asn Ala Ser Gly Glu His Gly Ile Val Val Phe Ser Leu
290 295 300

Gly Ser Met Val Ser Glu Ile Pro Glu Lys Lys Ala Met Ala Ile Ala
305 310 315 320

Asp Ala Leu Gly Lys Ile Pro Gln Thr Val Leu Trp Arg Tyr Thr Gly
325 330 335

Thr Arg Pro Ser Asn Leu Ala Asn Asn Thr Ile Leu Val Lys Trp Leu
340 345 350

Pro Gln Asn Asp Leu Leu Gly His Pro Met Thr Arg Ala Phe Ile Thr
355 360 365

His Ala Gly Ser His Gly Val Tyr Glu Ser Ile Cys Asn Gly Val Pro
370 375 380

10

20

Met Val Met Met Pro Leu Phe Gly Asp Gln Met Asp Asn Ala Lys Arg
385 390 395 400

Met Glu Thr Lys Gly Ala Gly Val Thr Leu Asn Ala Leu Glu Met Thr
405 410 415

Ser Glu Asp Leu Glu Asn Ala Leu Lys Ala Val Ile Asn Asp Lys Ser
420 425 430

Phe Lys Glu Asn Ile Met Arg Leu Ser Ser Leu His Lys Asp Arg Pro
435 440 445

Val Glu Pro Leu Asp Leu Ala Val Phe Trp Val Glu Phe Val Met Arg
450 455 460

His Lys Gly Ala Pro His Leu Arg Pro Ala Ala His Asp Leu Thr Trp
465 470 475 480

Tyr Gln Tyr His Ser Leu Asp Val Ile Gly Phe Leu Leu Ala Val Val
485 490 495

10

20

Leu Thr Val Ala Phe Ile Thr Phe Lys Cys Cys Ala Tyr Gly Tyr Arg
500 505 510

Lys Cys Leu Gly Lys Lys Gly Arg Val Lys Lys Ala His Lys Ser Lys
515 520 525

Thr His
530

10

<210> 16

<211> 530

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 16

Met Ala Arg Ala Gly Trp Thr Gly Leu Leu Pro Leu Tyr Val Cys Leu
1 5 10 15

Leu Leu Thr Cys Gly Phe Ala Lys Ala Gly Lys Leu Leu Val Val Pro
20 25 30

Met Asp Gly Ser His Trp Phe Thr Met Gln Ser Val Val Glu Lys Leu
35 40 45

Ile Leu Arg Gly His Glu Val Val Val Val Met Pro Glu Val Ser Trp
50 55 60

10

Gln Leu Gly Arg Ser Leu Asn Cys Thr Val Lys Thr Tyr Ser Thr Ser
65 70 75 80

Tyr Thr Leu Glu Asp Gln Asp Arg Glu Phe Met Val Phe Ala Asp Ala
85 90 95

Arg Trp Thr Ala Pro Leu Arg Ser Ala Phe Ser Leu Leu Thr Ser Ser
100 105 110

20

Ser Asn Gly Ile Phe Asp Leu Phe Phe Ser Asn Cys Arg Ser Leu Phe
115 120 125

Lys Asp Lys Lys Leu Val Glu Tyr Leu Lys Glu Ser Cys Phe Asp Ala

130

135

140

Val Phe Leu Asp Pro Phe Asp Ala Cys Gly Leu Ile Val Ala Lys Tyr
 145 150 155 160

Phe Ser Leu Pro Ser Val Val Phe Ala Arg Gly Ile Phe Cys His Tyr
 165 170 175

Leu Glu Glu Gly Ala Gln Cys Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Val Pro Arg
 180 185 190

Leu Leu Leu Gly Phe Ser Asp Ala Met Thr Phe Lys Glu Arg Val Trp
 195 200 205

Asn His Ile Met His Leu Glu Glu His Leu Phe Cys Pro Tyr Phe Phe
 210 215 220

Lys Asn Val Leu Glu Ile Ala Ser Glu Ile Leu Gln Thr Pro Val Thr
 225 230 235 240

Ala Tyr Asp Leu Tyr Ser His Thr Ser Ile Trp Leu Leu Arg Thr Asp
 245 250 255

10

20

Phe Val Leu Glu Tyr Pro Lys Pro Val Met Pro Asn Met Ile Phe Ile
 260 265 270

Gly Gly Ile Asn Cys His Gln Gly Lys Pro Val Pro Met Glu Phe Glu
 275 280 285

Ala Tyr Ile Asn Ala Ser Gly Glu His Gly Ile Val Val Phe Ser Leu
 290 295 300

10

Gly Ser Met Val Ser Glu Ile Pro Glu Lys Lys Ala Met Ala Ile Ala
 305 310 315 320

Asp Ala Leu Gly Lys Ile Pro Gln Thr Val Leu Trp Arg Tyr Thr Gly
 325 330 335

20

Thr Arg Pro Ser Asn Leu Ala Asn Asn Thr Ile Leu Val Lys Trp Leu
 340 345 350

Pro Gln Asn Asp Leu Leu Gly His Pro Met Thr Arg Ala Phe Ile Thr
 355 360 365

His Ala Gly Ser His Gly Val Tyr Glu Ser Ile Cys Asn Gly Val Pro
 370 375 380

Met Val Met Met Pro Leu Phe Gly Asp Gln Met Asp Asn Ala Lys Arg
 385 390 395 400

Met Glu Thr Lys Gly Ala Gly Val Thr Leu Asn Ala Leu Glu Met Thr
 405 410 415

10

Ser Glu Asp Leu Glu Asn Ala Leu Lys Ala Val Ile Asn Asp Lys Ser
 420 425 430

Phe Lys Glu Asn Ile Met Arg Leu Ser Ser Leu His Lys Asp Arg Pro
 435 440 445

20

Val Glu Pro Leu Asp Leu Ala Val Phe Trp Val Glu Phe Val Met Arg
 450 455 460

His Lys Gly Ala Pro His Leu Arg Pro Ala Ala His Asp Leu Thr Trp
 465 470 475 480

Tyr Gln Tyr His Ser Leu Asp Val Ile Gly Phe Leu Leu Ala Val Val
 485 490 495

Leu Thr Val Ala Phe Ile Thr Phe Lys Cys Cys Ala Tyr Gly Tyr Arg
 500 505 510

Lys Cys Leu Gly Lys Lys Gly Arg Val Lys Lys Ala His Lys Ser Lys
 515 520 525

10

Thr His
 530

<210> 17

<211> 530

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Arg Ala Gly Trp Thr Gly Leu Leu Pro Leu Tyr Val Cys Leu

1 5 10 15

 Leu Leu Thr Cys Gly Phe Ala Lys Ala Gly Lys Leu Leu Val Val Pro
 20 25 30

 Met Asp Gly Ser His Trp Phe Thr Met Gln Ser Val Val Glu Lys Leu
 35 40 45

 Ile Leu Arg Gly His Glu Val Val Val Val Met Pro Glu Val Ser Trp
 50 55 60

 Gln Leu Gly Arg Ser Leu Asn Cys Thr Val Lys Thr Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80

 Tyr Thr Leu Glu Asp Gln Asp Arg Glu Phe Met Val Phe Ala Asp Ala
 85 90 95

 Arg Trp Thr Ala Pro Leu Arg Ser Ala Phe Ser Leu Leu Thr Ser Ser
 100 105 110

 Ser Asn Gly Ile Phe Asp Leu Phe Phe Ser Asn Cys Arg Ser Leu Phe
 115 120 125

10

20

Lys Asp Lys Lys Leu Val Glu Tyr Leu Lys Glu Ser Cys Phe Asp Ala
 130 135 140

Val Phe Leu Asp Pro Phe Asp Ala Cys Gly Leu Ile Val Ala Lys Tyr
 145 150 155 160

Phe Ser Leu Pro Ser Val Val Phe Ala Arg Gly Ile Phe Cys His Tyr
 165 170 175

10

Leu Glu Glu Gly Ala Gln Cys Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Val Pro Arg
 180 185 190

Leu Leu Leu Gly Phe Ser Asp Ala Met Thr Phe Lys Glu Arg Val Arg
 195 200 205

20

Asn His Ile Met His Leu Glu Glu His Leu Phe Cys Pro Tyr Phe Phe
 210 215 220

Lys Asn Val Leu Glu Ile Ala Ser Glu Ile Leu Gln Thr Pro Val Thr
 225 230 235 240

Ala Tyr Asp Leu Tyr Ser His Thr Ser Ile Trp Leu Leu Arg Thr Asp
 245 250 255

Phe Val Leu Glu Tyr Pro Lys Pro Val Met Pro Asn Met Ile Phe Ile
 260 265 270

Gly Gly Ile Asn Cys His Gln Gly Lys Pro Val Pro Met Glu Phe Glu
 275 280 285

10

Ala Tyr Ile Asn Ala Ser Gly Glu His Gly Ile Val Val Phe Ser Leu
 290 295 300

Gly Ser Met Val Ser Glu Ile Pro Glu Lys Lys Ala Met Ala Ile Ala
 305 310 315 320

20

Asp Ala Leu Gly Lys Ile Pro Gln Thr Val Leu Trp Arg Tyr Thr Gly
 325 330 335

Thr Arg Pro Ser Asn Leu Ala Asn Asn Thr Ile Leu Val Lys Trp Leu
 340 345 350

Pro Gln Asn Asp Leu Leu Gly His Pro Met Thr Arg Ala Phe Ile Thr
355 360 365

His Ala Gly Ser His Gly Val Tyr Glu Ser Ile Cys Asn Gly Val Pro
370 375 380

Met Val Met Met Pro Leu Phe Gly Asp Gln Met Asp Asn Ala Lys Arg
385 390 395 400

10

Met Glu Thr Lys Gly Ala Gly Val Thr Leu Asn Ala Leu Glu Met Thr
405 410 415

Ser Glu Asp Leu Glu Asn Ala Leu Lys Ala Val Ile Asn Asp Lys Ser
420 425 430

Phe Lys Glu Asn Ile Met Arg Leu Ser Ser Leu His Lys Asp Arg Pro
435 440 445

20

Val Glu Pro Leu Asp Leu Ala Val Phe Trp Val Glu Phe Val Met Arg
450 455 460

His Lys Gly Ala Pro His Leu Arg Pro Ala Ala His Asp Leu Thr Trp

<400> 18

atggctcgtg cagggaggac tggcctcctt cccctataig tggctctact gctgacctgt 60
ggctttgcca aggcaggaa gctgctggta gtcaccaatgg atggagcca ctggttcacc 120
atgcagtcgg tggaggagaa actcatcctc agggggcatg aggtggctgt agtcatgcca 180
gaggtagatt ggcaactggg aagatcacig aattgcacag tgaagactta ctcaacctca 240
tacactcggg aggatcagga ccgggagttc atggtttttg ccgatgctcg ctggacggca 300
ccattgcgaa gtgcatttc tctattaaca agttcatcca atggtatitt tgacttattt 360
tttcaaatt gcaggagitt gtttaatgac cgaaaattag tagaatactt aaaggagagt 420
tgtttgaig cagtgtttct cgatcctttt gatgcctgig gcttaattgt tgccaaatat 480
tttccctcc cctcgtggt cttcggcagg ggaatatttt gccactatct tgaagaaggt 540
gcacagtgcc ctgctcctct ttctatgtc ccagacttc tcttagggtt ctgagcgcc 600
atgactttca aggagagagt atggaaccac atcaigcact tggaggaaca tttattttgc 660
ccctatttt tcaaaaagt cttagaaata gcctctgaaa ttctcaaac ccctgtcag 720
gcatatgac tctacagcca cacatcaatt tggttgttc gaactgactt tgtttggag 780
tatccaaac ccgtgatgcc caatatgac ttcatggig gtatcaacig tcatcagga 840

10

20

aagccagtc ctatggaatt tgaagcctac attaatgctt ciggagaaca tggaattgtg 900
gttttctctt tgggatcaat ggtctcagaa attccagaga agaaagctat ggcaattgct 960
gatgcittgg gcaaaatccc tcagacagtc ctgtggcggg acactggaac ccgaccatcg 1020
aatcttgcga acaacacgat acttgittaag tggctacccc aaaacgatct gcttggtcac 1080
ccgatgacc gtgctttiat cacccatgct ggttcccatg gtgtttaiga aagcataigc 1140
aatggcgttc ccatgggat gatgcccttg tttggatgc agatggacaa tgcaaagcgc 1200
atggagacta agggagctgg agtgacctg aatgctctgg aatgacttc tgaagattta 1260
gaaaatgctc taaaagcagt catcaatgac aaaagtcca aggagaacat catgcgcctc 1320
tccagccttc acaaggaccg cccggaggag ccgctggacc tggccgtgtt ctgggtggag 1380
tttgtatga ggcacaaggc cgcgccacac ctgcgccccg cagcccacga cctcacctgg 1440
taccagtacc attccttggc cgtgattggt ttctcttgg ccgtcgtgct gacagtggcc 1500
ttcatcacct ttaaatgttg tgcattggc taccggaat gcttggggaa aaaaggcga 1560
gtaagaaag cccacaaatc caagacccat tga 1593

10

20

<211> 1593

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atggctcgtg cagggaggac tggcctcctt ccactataig tgtgtctact gctgacctgt	60	
ggcittgccca aggcaggaa gctgctggta gtgcccaigg atgggagcca ctggttcacc	120	
atgcagtcgg tggiggagaa actcatcctc agggggcaig aggtggtcgt agtcatgccca	180	
gaggtagatt ggcaactggg aagatcacig aatgcacag tgaagactta ctcaacctca	240	
tacactcigg aggatcagga ccgggagttc atggittitg ccgatgctcg ctggacggca	300	
ccattgcgaa gtgcattttc tctattaaca agttcatcca atggtatttt tgacttattt	360	
tittcaaait gcaggagitt gtttaatgac cgaaaattag tagaatactt aaaggagagt	420	
tgtttgatg cagtitttct cgatcctttt gatgcctgtg gcttaatigt tgccaaatat	480	
ttcctctcc cctctgttgg cttgccagg ggaatatttt gccactatct tgaagaaggt	540	
gcacagtgcc ctgcctctt ttcctatgtc ccagacttc tcttaggtt ctgagacgcc	600	

10

20

atgacittca aggagagagt acggaaccac atcaatgcaat tggaggaaca tttattttgc 660
ccctattttt tcaaaaatgt cttagaaata gccctcgtaaa ttciccaaac ccctgtcagc 720
gcatatgata tctacagcca cacatcaatt tggttgttgc gaactgacit tgttttggag 780
tatcccaaac ccgtgatgcc caatatgata ttcattggig giatcaactg tcatcagggg 840
aagccagtgc ctaiggaatt tgaagcctac attaatgctt ctggagaaca tggaaattgtg 900
gttttctctt tgggatcaat ggtctcagaa attccagaga agaaagctat ggcaattgct 960
gatgctttgg gcaaaatccc tcagacagtc ctgtggcggg acactggaac ccgaccatcg 1020
aatcttgcga acaacacgat actigttaag tggctacccc aaaacgatct gcttggtcac 1080
ccgatgacce gtgccittat cacccatgct ggttcccatg gtgtttatga aagcatatgc 1140
aatggcgttc ccatggatgat gatgcccttg tttggatgac agatggacaa tgcaaagcgc 1200
atggagacta agggagctgg agtgaccctg aatgctctgg aaatgacttc tgaagattta 1260
gaaaatgctc taaaagcagt catcaatgac aaaagtcca aggagaacat catgcgcctc 1320
tccagccttc acaaggaccg cccgggtggag ccgciggacc tggccgtgtt ctgggtggag 1380
tttgaiga ggacaaaggg cgcgccacac ctgcgccccg cagcccacga cctcaccitg 1440
taccagtacc attccttggg cgtgattggt ttcctcttgg ccgtcgtgct gacagtggcc 1500

10

20

ttcatcacct ttaaatgttg tgcittatggc taccggaat gcttggggaa aaaaggcga 1560

gtaagaag cccacaaatc caagacccat tga 1593

<210> 20

<211> 1593

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 20

atggctcgtg caggtggac tggcctcctt ccctataatg tgtgictact gctgaccigt 60

ggcittgcca aggcaggaa gctgctggta gtgccatgg atggagcca ctggttacc 120

atgcagtcgg tggiggagaa actcatcctc agggggcaig aggtggctgt agtcatgcca 180

gaggigagt ggcaactggg aagatcactg aatgacacag tgaagactta ctcaaccica 240

tacactcgg aggatcagga ccggagttc atggttttg ccgatgctcg ctggacggca 300

ccatgcgaa gtgcatttc tctattaaca agttcatcca atggtatitit tgactititit 360

20

ttttcaaatt gcaggagatt gtttaaggac aaaaaattag tagaatactt aaaggagagt 420
 tgttttgatg cagtgtttct cgaicctttt gatgcctgtg gcttaattgt tgccaaatat 480
 ttctccctcc cctctgtggt cttcgcagg ggaatatttt gccactatct tgaagaaggt 540
 gcacagtgcc cgtctcctt ttccatgtc cccagacttc tcttagggtt ctacagacgc 600
 atgactttca aggagagagt atggaaccac atcatgcact tggaggaaca tttattttgc 660
 ccctattttt tcaaaaatgt cttagaaata gccctcgtaaa ttctccaaac ccctgtcagc 720
 gcatatgac tctacagcca cacatcaatt tggttgttgc gaactgactt tgttttgag 780
 tatcccaaac ccgigtatcc caatatgac ttcatgtgtg gtatcaactg tcatcagga 840
 aagccagtgc ctatggaatt tgaagcctac attaatgctt ctggagaaca tggaaattgt 900
 gttttctctt tgggatcaat ggtctcagaa attccagaga agaaagctat ggcaattgct 960
 gatgcttigg gcaaaatccc tcagacagtc ctgtggcggg acactggaac ccgaccatcg 1020
 aatcttgcga acaacacgat acttgttaag tggctacccc aaaacgatct gcttggtcac 1080
 ccgatgacc gtgcctttat caccatgct ggttcccaig ggtttatga aagcataatg 1140
 aatggcgttc ccatggtgat gatgcccttg ttgggtgac agatggacaa tgcaaagcgc 1200
 atggagacta agggagctgg agtgaccctg aatgctctgg aaatgacttc tgaagattta 1260

10

20

gaaaatgctc taaaagcagt catcaatgac aaaagtttca aggagaacat catgcgcctc 1320
 tccagccttc acaaggaccg cccggiggag ccgctggacc tggccgtgtt cgggtggag 1380
 ttigtgaiga ggcacaaggc cgcgccacac ctgcgccccg cagcccacga cctcaccigg 1440
 taccagtacc attccttggg cgtgattggt ttccctctgg ccgctgtgct gacagtggcc 1500
 ttcatcacct ttaaatgttg tgcctatggc taccggaat gcttggggaa aaaagggcga 1560
 gttagaagaa cccacaaatc caagacccat tga 1593

10

<210> 21

<211> 1593

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 21

atggctcgtc cagggtggac tggcctcctt ccactataig tgtgtctact gctgacctgt 60
 ggctttgcca aggcaggaa gctgctggta gtgccatgg atgggagcca ctggttcacc 120

aigcagtcgg tggiggagaa actcatcctc agggggcatg aggtggtcgt agtcatgcca	180	
gaggigagtt ggcaactggg aagatcactg aatigcacag tgaagacita ctcaaccica	240	
tacacictgg aggatcagga cggggagtic atggtttttg ccgatgctcg ciggacggca	300	
ccattgcgaa gtcattttc tctattaaca agttcatcca atggtatitt tgacttattt	360	
tttcaaatt gcaggagitt gtttaaggac aaaaaattag tagaatactt aaaggagagt	420	
tgtttgaig cagtgtttct cgaicctitt gatgcctgtg gcittaattgt tgccaaatat	480	10
tttccctcc cctctgtggt cttcgccagg ggaatatttt gccactatct tgaagaaggt	540	
gcacagtgcc ctgctcctct ttctatgic ccagacttc tcttagggtt ctacagacgc	600	
atgactttca aggagagagt acggaaccac atcatgcact tggaggaaca tttattttgc	660	
ccctattttt tcaaaaatgt cttagaaata gccctgaaa ttctccaaac ccctgtcagc	720	
gcatatgac tctacagcca cacatcaatt tggttgtgc gaactgactt tgttttggag	780	20
tatcccaaac ccgtgatgcc caatatgac ttcatgtgtg gtatcaactg tcatcagga	840	
aagccagtc ctatggaatt tgaagcctac attaatgctt ciggagaaca tggaaattgt	900	
gttttcttt tgggatcaat ggtctcagaa attccagaga agaaagctat ggcaattgct	960	
gatgctttgg gcaaaatccc tcagacagtc ctgtggcgtt acactggaac ccgaccaicg	1020	
aatcttgca acaacacgat acttgtaag tggctacccc aaaacgatct gcttggtcac	1080	30
ccgatgacc gtgccittat cacccatgct ggttcccaig gtgtttatga aagcataigc	1140	
aatggcgtc ccatggtgat gatgcccttg ttgggtgac agatggacaa tgcaaagcgc	1200	
atggagacta agggagctgg agtgaccctg aatgctctgg aaatgactc tgaagattta	1260	
gaaaatgctc taaaagcagt catcaatgac aaaagtcca aggagaacat catgcgcctc	1320	
tccagcctc acaaggaccg cccggtggag ccgctggacc tggccgtgtt cgggtggag	1380	40
tttligaiga ggcacaaggg cgcgccacac ctgcgccccg cagcccacga cctcaccigg	1440	
taccagtacc attccttggc cgtgattggt ttccctctgg ccgtcgtgct gacagtggcc	1500	
ttcatcacti ttaaatgttg tgcittatggc taccggaat gcttggggaa aaaagggcga	1560	
gtaagaaag cccacaaatc caagacccat tga	1593	

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はUGT1A7多型診断を図式的に示す図。

【図2】

図2はUGT1A7*2及びUGT1A7*4とNC、CRC及びIBDとの関連を示す。

【図3】

図3はヒトUGT1A7エクソン1配列の多型位置(サイト)を示す。

【図4】

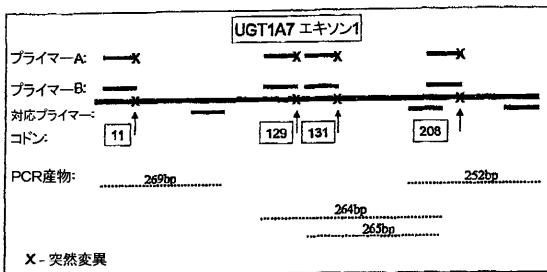
図4はコドン11、129、131及び208の周辺領域の比較を示す。

【図5】

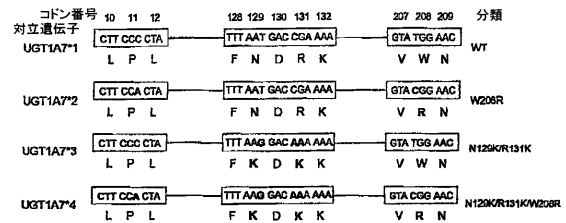
図5はW208R突然変異と結腸直腸癌及び炎症性腸疾患との関連を示す。

10

【図1】



【図3】



【図2】

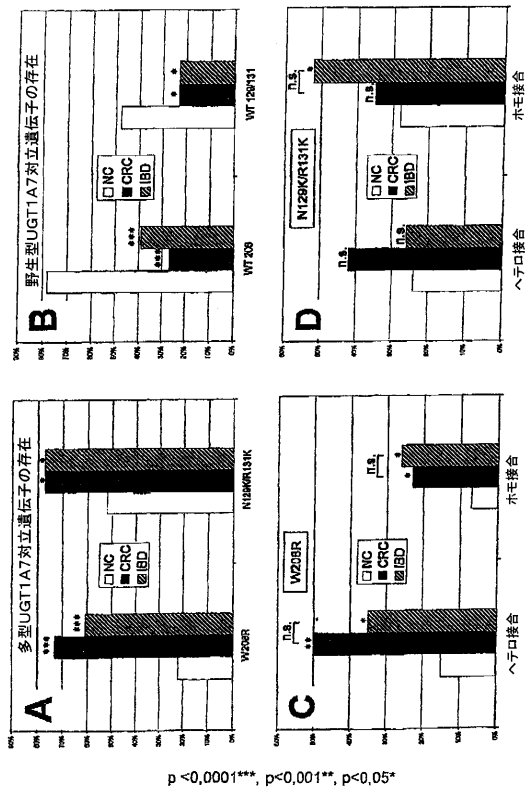
対立遺伝子		NC	CRC	IBD
UGT1A7*1	野生型	48%	4%	6%
UGT1A7*2	+/+	0%	0%	0%
UGT1A7*2	+/-	5%	19%*	3%
UGT1A7*3	+/+	16%	0%	10%
UGT1A7*3	+/-	18%	23%	10%
UGT1A7*4	+/+	7%	23%*	26%*
UGT1A7*4	+/-	3%	19%*	16%*
UGT1A7*3/UGT1A7*4	複合ヘテロ接合	3%	12%	16%*
UGT1A7*4 (+/+) and UGT1A7*3/UGT1A7*4		10%	35%*	50%*

【図4】

アミノ酸番号	aa 7 - 15	aa 127 - 134	aa 205 - 213
UGT1A1	GGRP-LVLG	LLHNKELM	QRVKNMLIA
UGT1A3	VPLPWLATG	LLHNEALI	QRVKNMLYP
UGT1A4	VPLPQIATG	LLHNEALI	QRVKNMLYP
UGT1A5	VPLPRIATG	LLHNEALI	QRVKNMLYP
UGT1A6	RSEFORISAG	LLQDRDTL	QRVANFLVN
UGT1A7	TGLLPLVVC	LFNDRKLV	ERVVNHIMH
UGT1A8	TSEPLICVS	LFNDRKLV	ERVVNHIMH
UGT1A9	TSEPLICVC	LFKDKKLV	ERVVNHIMH
UGT1A10	DQPRSEMCV	LFNDRKLV	ERVVNHIVH

UGT1A7 多型: N129K/R131K W208R

【 図 5 】



【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
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

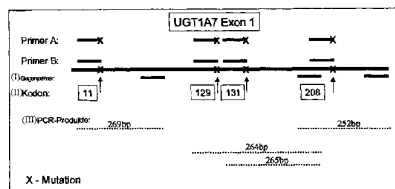
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053770 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00003
- (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Januar 2002 (03.01.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101/00 238.6 5. Januar 2001 (05.01.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER [DE/DE]; Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MANN, Michael [DE/DE]; Sonnenallee 23, 30916 Isernhagen (DE); STRASSBURG, Christian [DE/DE]; Drachenfeld 79, 30627 Hannover (DE).
- (74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Gramm, Lins & Partner GbR, Freundallee 13, 30173 Hannover (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BK, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DE (Gebietsmuster), DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PREDICTION OF THE RISK POTENTIAL FOR CANCEROUS DISEASES AND INFLAMMATORY INTESTINAL DISEASES AND CORRESPONDING TESTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VORHERSAGE DES GEFÄHRDUNGSPOTENTIALS FÜR KARZINOMERKRANKUNGEN UND ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN UND ZUGEHÖRIGE TESTS



(I)- COUNTER PRIMER
(II)- CODON
(III)- PCR PRODUCTS



WO 02/053770 A2

(57) Abstract: The invention relates to a method for the prediction of the risk potential and/or diagnosis of cancerous diseases or inflammatory intestinal diseases, whereby a DNA sample is tested for the presence of polymorphic UGT1A7 allele. A positive result for a mutation is a positive indication of a sensitivity to cancerous diseases. A prediction of sensitivity to an inflammatory intestinal disease can similarly be made. A PCR amplification of the exon 1, by means of the DNA sample with subsequent sequence analysis is carried out in the method and the determined sequence compared with that of the wild type and the polymorphic allele. The presence or lack of mutations is monitored by means of sequencing the corresponding cDNA using automated fluorescent dye sequencing. The test arrangement for said method requires genetic detection reagents, namely the required primer or cDNAs, on a stationary support in a pre-prepared arrangement or sequence for reading off the results. The recombinant UGT1A7 enzymes are also used for therapeutic purposes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/053770 A2 

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, 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, GQ, GW, ML, MR, NI, 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.

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— *Inwieweit der Berechtigte des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten*
Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

(57) Zusammenfassung: Bei dem Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials und/oder Diagnose von Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen wird eine DNA-Probe auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A7-Allele getestet. Ein positives Ergebnis für eine Mutation gilt als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomerkrankungen. Ebenso kann eine Vorhersage über eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung gemacht werden. Bei dem Verfahren wird durch die DNA-Probe eine PCR-Amplifikation des Exons 1 mit anschließender Sequenzanalyse durchgeführt und die ermittelte Sequenz mit der des Wildtyps und der polymorphen Allele verglichen. Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen wird durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoff-Isosquenzierung überprüft. Die Testanordnung für dieses Verfahren erfordert genetische Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge. Die rekombinanten UGT1A7-Linzyne werden auch für therapeutische Zwecke verwendet.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 1 -

Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für Karzinomerkrankungen und entzündliche Darmerkrankungen und zugehörige Tests

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für Karzinomerkrankungen und entzündliche Darmerkrankungen und zur Diagnose dieser Erkrankungen. In erster Linie betrifft die Erfindung ein Verfahren für die Gefährdungspotential-Abschätzung für Kolorektalkarzinome. Ferner betrifft die Erfindung Tests für die Diagnostik an DNA-Proben eines zu untersuchenden Individuums sowie die Verwendung neuer polymorpher Formen des UGT1A7-Gens für die metabolische Charakterisierung von Medikamenten, insbesondere von Tumortheraeutika.

- 10 Man vermutet heute, dass das Risiko für Krebs durch eine genetische Prädisposition und durch Umwelteinflüsse einschließlich dem Ausgesetztsein gegenüber krebserregenden Substanzen bestimmt wird.

- 15 Es wurde daher schon häufiger ein Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen karzinogenmetabolisierender Enzyme und einer Krebsentstehung vermutet. Konkrete, statistisch bestätigte Zusammenhänge sind jedoch schwer zu finden, da die Metabolisierung nicht mit einer Detoxifizierung gleichgesetzt werden kann. Für eine Krebsrisiko-Vorhersage genügt es daher nicht, überhaupt genetische Abwandlungen festzustellen, sondern es muss bekannt sein, dass die Veränderung zu deutlich negativen Folgen im Metabolismus führt.

- 20 25 Ein weiteres Problem beim Auffinden eines solchen Zusammenhangs besteht darin, dass der menschliche Stoffwechsel sehr komplex ist und eine Unzahl von Substanzen, darunter Stoffwechselprodukte, Proteine und gerade auch Enzyme als Marker für ein Krebsrisiko in Frage kommen könnten. Dies gilt auch für das Kolon- oder kolorektale Karzinom (CRC), eine der häufigsten Krebsarten der westlichen Welt. Der menschliche Darm ist ein großes Organ, das durch vielerlei Körperprozesse und auch die Ernährung beeinflusst wird. Es musste daher fraglich sein, ob überhaupt eine eindeutige Risikoabschätzung aufgrund einer genetischen Veranlagung möglich ist.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 2 -

Am Stoffwechsel im Darm sind eine Vielzahl von Enzymklassen beteiligt, darunter solche, die für die Verstoffwechslung von Fremdstoffen zuständig sind.

Die humane Uridindiphosphat(UDP)-5'-Glucuronosyltransferase (UGT) ist eine große Enzymklasse, die die Glukuronidierung zahlreicher Substrate bewirkt. Innerhalb dieser Superfamilie sind drei Familien mit besonderen Aufgaben identifiziert worden, UGT1, UGT2 und UGT8. Allein unter den Enzymen der Familie UGT1 unterscheidet man zahlreiche Isoformen. In der Leber wurden in den letzten 10 Jahren 5 Familie 1A UGT-Isoformen (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6 und 1A9) entdeckt und kloniert, darunter die Bilirubin-UGT-Isoform UGT1A1. Drei extrahepatische UGT1A- Genprodukte konnten aus Gallenwegen (UGT1A10), Magen (UGT1A7) und Kolon (UGT1A8) isoliert werden.

Die am menschlichen UGT1A7-Genort kodierten Proteine dienen durch die Glukuronidierung der Entgiftung einer Vielzahl endogener und exogener (xenobiotischer, d.h. schwer abbaubarer Verbindungen technischen Ursprungs) Verbindungen des menschlichen Körpers. Es sind Proteine des sogenannten Phase 2-Stoffwechsels des Menschen, der zum Beispiel die Acetylierung, Sulfatierung und Glukuronidierung umfasst. Für das 1996 erstmalig als Transkript beschriebene UGT1A7 konnte eine Detoxifikation von polycyclischen Kohlenwasserstoffen und heterozyklischen Aminen demonstriert werden. Diese Substanzen gelten auch als karzinogen.

In der WO 00/06776, ist die Identifizierung genetischer Polymorphismen in menschlichen UGT2B4-, UGT2B7- und UGT2B15-Genen offenbart, die die UGT2B-Aktivität ändern. UGT2-Enzyme sind u.a. bei der Steroid-Metabolisierung beteiligt. Nukleinsäuren, die die polymorphe UGT2-Sequenzen enthalten, wurden verwendet, um Patienten auf einen geänderten Metabolismus für UGT2B-Substrate, mögliche Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen und nachteilige Wirkungen/Nebenwirkungen, sowie auf Krankheiten, die von der Exposition gegenüber Umwelt- oder berufsbedingten Giften herrühren, durchzutesten. Mit Hilfe der Nukleinsäuren wurde Tier-, Zell- und in vitro Modelle für Wirkstoffmetabolismen etabliert.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 3 -

In der WO 99/57322 wurden genetische Polymorphismen im menschlichen UGT1 Gen identifiziert, welche den UGT1-abhängigen Wirkstoffmetabolismus verändern. Auch hier wurden die polymorphen Sequenzen verwendet, um Patienten auf einen geänderten Metabolismus für UGT1-Substrate, mögliche Wirkstoff-Wirkstoff-
5 Wechselwirkungen und nachteilige Wirkungen/Nebenwirkungen, sowie auf Krankheiten, die von der Exposition gegenüber Umwelt- oder berufsbedingten Giften herrühren, durchzutesten. Mit Hilfe der Nukleinsäuren wurden wiederum Tier-, Zell und in vitro-Modelle für Wirkstoffmetabolismen etabliert.

10 Es wurden des weiteren bereits funktionale Konsequenzen einer genetischen Veränderung des menschlichen UGT1A7-Gens beschrieben in "C. Guillemette, J. K. Ritter, D. J. Auyeung, F. K. Kessler, D. E. Housman; „Struktural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene“, Pharmacogenetics, 2000,
15 10:629-644". Dabei wird auch die mögliche Rolle von UGT1A7 bei der Entgiftung und Eliminierung von karzinogenen Produkten in der Lunge diskutiert. UGT1A7 wird in der Lunge exprimiert, nicht jedoch im menschlichen Dickdarm.

Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, einen konkreten Zusammenhang
20 zwischen einem Krebsrisiko, insbesondere für Kolonkarzinom (Kolonkarzinom, CRC) und genetischen Dispositionen zu finden und einen Test für den Nachweis dieser Disposition zur Verfügung zu stellen.

Dies gelang durch das Auffinden neuer polymorpher UGT1A7-Allele, die mit
25 UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4 bezeichnet wurden und die mit statistisch erstaunlicher Relevanz mit dem Auftreten eines Kolorektalkarzinoms (CRC) und darüberhinaus mit bestimmten entzündlichen Darmerkrankungen (IBD, inflammatory bowel disease; Morbus Crohn) sowie den Krebsarten Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Magen- und Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht werden können. Dieses
30 Ergebnis ist insofern überraschend, als UGT1A7 nicht im Dickdarm, d.h. nicht in der erkrankten Region exprimiert wird. Es ist erstaunlich und bei bisherigen Untersuchungen noch nicht so gefunden worden, dass eine genetische Prädisposition nicht von einer Expression im betroffenen Organ abhängt, sondern auch räumlich getrennt möglich ist. Hieraus ergibt sich, dass die genetische

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 4 -

Modifikation einen globalen und nicht nur einen organspezifischen Effekt besitzen muss. Ein solcher Zusammenhang konnte hier erstmals aufgezeigt werden.

Bei den genetischen Polymorphismen handelt es sich um solche der Keimbahn und nicht um somatische Mutationen des Tumors. Die zugrundeliegenden Analysen erfolgten an genomischer DNA aus Lymphozyten von Patienten mit Tumoren (CRC), entzündlicher Darmerkrankung (IBD) und Referenzpersonen, die diese Erkrankungen nicht aufwiesen. Die Analyse von insgesamt 111 Individuen kommt zu dem Ergebnis, dass die Polymorphismen an den einzelnen Kodons nicht unabhängig voneinander auftreten sondern nur kombiniert vererbt werden können.

UGT1A7*2 ist durch eine stille Mutation an Kodon 11 mit einem Austausch von C zu A an Position 3 (CCC zu CCA) gekennzeichnet. Diese Mutation fällt in die Signal-Peptid-Domäne des endoplasmatischen Retikulums. Hiermit verbunden ist eine zweite Mutation an Kodon 208, und zwar W208R, ein Austausch T zu C, der zu einer nicht-konservativen Substitution eines aromatischen Tryptophans zu einem positiv geladenen Arginin-Rest führt. Der Polymorphismus an Kodon 208 fällt in einen Sequenzbereich, der nicht nur in den ersten Exons von UGT1A7-10, sondern in allen Mitgliedern der UGT1A7-Familie konserviert ist. Die Anwesenheit eines RV-N-Sequenzmotivs zwischen Aminosäuren 206 und 209 ist allen UGT1A-Proteinen gemeinsam. Der W208R-Austausch in UGT1A7 repräsentiert die Wildtyp-Sequenz von UGT1A8 und UGT1A9. Die Untersuchungen der Anmelder zeigen, dass die Polymorphismen an Kodon 11 und an Kodon 208 nicht einzeln auftreten (bei einer Studie an 111 Personen). Die Charakterisierung an beiden Positionen heterozygoter Individuen und die Tatsache, dass keine individuell homozygoten Muster an Kodon 11 oder an Kodon 208 gefunden werden konnten, legen nahe, dass sich beide Austausche auf dem UGT1A7*2-Allel befinden.

UGT1A7*3 umfasst zwei Mutationen. Die erste ist ein T zu G-Tausch an Kodon 129, was einen konservativen Kodon-Austausch von Asparagin zu Lysin ergibt (N129K). Die zweite zeigt sich an Kodon 131 in einem doppelten Austausch von C zu A an Position 1 und G zu A an Position 2 des Kodons, was zu einem Arginin-zu-Lysin-Austausch führt (R131K). Dieser Polymorphismus beeinflusst ebenfalls stark konservierte Sequenzen des UGT-Proteins. Auf Leucin-127 folgend, das in allen

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 5 -

UGT1A7-Proteinen anwesend ist, ist ein LHN-L-Motiv (Aminosäuren 128-133) in UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4 und UGT1A5 konserviert. An Aminosäureposition 128-134 ist in UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 und UGT1A10 ein F-D-KLV-Aminosäuremotiv konserviert. Die Analyse der N129K- und R131K-Polymorphismen zeigte, dass diese Austausche nicht unabhängig voneinander auftreten. Es konnten homozygote UGT1A7*3-Allele identifiziert werden, was zeigt, dass die N129K/R131K-Mutationen auf einem einzelnen Allel identifiziert werden können, das unabhängig von UGT1A7*2 auftritt. Der N129/R131K-Polymorphismus von UGT1A7 entspricht der Wildtyp-Sequenz von UGT1A9 an diesen Kodons, was weiterhin nahelegt, dass die 3-Basenpaar-Mutationen als ein Haplotyp vererbt werden.

Das dritte Allel, UGT1A7*4, verbindet alle Veränderungen, die in UGT1A7*2 und UGT1A7*3 beobachtet werden. Es wurden Individuen mit homozygoten Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und 208 festgestellt, was anzeigt, dass alle 4 Polymorphismen auf einem einzelnen Allel vorkommen können. Es ist bemerkenswert, dass die Polymorphismen an den Kodons 11, 129, 131 oder 208 einzeln heterozygot oder homozygot auftraten. Diese Beobachtung stützt auch wie oben ausgeführt die Annahme, dass die Polymorphismen an Kodons 11 und 208 und ebenfalls an Kodon 129 mit Kodon 131 als Haplotypen vererbt werden.

Auf Basis dieser Ergebnisse wird die Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen und/oder für die Diagnose von Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen gelöst, bei welchem eine DNA-Probe einer zu untersuchenden Person auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A-Allele, die Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 umfassen, getestet wird.

Dabei wird insbesondere ein positives Ergebnis für eine Mutation an Kodon 11 und Kodon 208 als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomerkrankungen, speziell für das Kolorektalkarzinom oder Kolonkarzinom (CRC) gewertet. Testmöglichkeiten hierfür sind nachfolgend angegeben. In Weiterbildung der Erfindung ist vorgesehen, dass zusätzlich überprüft wird, dass die als positiv

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 6 -

gewerteten Mutationen ein W208R-Austausch und eine stille Mutation CCC zu CCA des Kodons 11 sind.

5 Ferner wird gemäß dieser Erfindung ein positives Ergebnis für eine Mutation an allen vier Kodons 11, 129/131 und 208 als Anzeichen für eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung, nämlich insbesondere die unter dem Begriff "inflammatory bowel disease" (IBD) und Colitis ulcerosa gefassten Erkrankungen, und eine Karzinomerkrankung, speziell CRC, gewertet. In zugehörigen Tests kann vorgesehen sein, dass überprüft wird, dass die positiv gewerteten Mutationen
10 N129K, R131K und W208R sowie die stille Mutation CCC zu CCA an Kodon 11 sind.

Der identifizierte Zusammenhang von UGT1A7-Polymorphismen und dem kolorektalen Karzinom sowie den entzündlichen Darmerkrankungen, die ihrerseits
15 einen Risikofaktor der Kolonkarzinogenese bilden, ermöglichen den Einsatz der hier beschriebenen Marker zur Identifizierung von Risikopatienten für Tumorerkrankungen. Da die Detoxifikationsenzyme, an denen hier Polymorphismen nachgewiesen wurden, eine globale Funktion im menschlichen Organismus ausüben, ist eine Relevanz über das hier dargestellte kolorektale Karzinom
20 hinausgehend auch für andere Krebserkrankungen des Gastrointestinaltraktes, des Atemwegsystems, der Blutbildung und der Geschlechtsorgane und -drüsen wahrscheinlich.

Ein Vorteil der Erfindung besteht darin, dass Patienten frühzeitig in entsprechende
25 Risikogruppen eingeteilt und einer präventiven Behandlung zugeführt werden können, was zu einer Verbesserung der Früherkennung führt.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, dass das Verfahren auch für die Diagnose angewandt werden kann. Eine Verbesserung der Diagnose ist eine Möglichkeit noch
30 schneller einen klaren Befund über den Zustand der Patienten zu erhalten und dementsprechend frühzeitiger und zielgerichteter zu therapieren. Ein frühzeitiges erkennen und sofortige Therapie sind gerade bei Karzinomerkrankungen von entscheidender Bedeutung. Das CRC ist bei früher Erkennung in den meisten Fällen vermeidbar oder heilbar.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 7 -

Für eine Untersuchung wird vorzugsweise genomische DNA aus Lymphozyten verwendet. Die genomische DNA kann aus einer Blutprobe des Probanden mittels säulenchromatographischer Verfahren und chemischer Aufbereitung isoliert werden. Diese genomische DNA, die das Erbgut der zu untersuchenden Person repräsentiert, bildet die Grundlage aller weiteren genetischen Teststrategien.

Zunächst ist allgemein vorgesehen, dass die gewonnene Patienten-DNA mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird.

10 Hierfür kann in einer ersten Ausführungsform der Erfindung eine PCR-Amplifikation des gesamten Exons 1 des UGT1A7-Gens (ca. 855 Basenpaare) erfolgen, woran sich eine Sequenzanalyse anschließt. Die ermittelte Sequenz kann in geeigneter Weise ausgewertet, d.h. mit der Sequenz des Wildtyps und der für dieses Verfahren relevanten UGT1A7-Allele UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4 verglichen werden.

15 Gemäß einer anderen Ausführungsform werden nur gerade solche cDNA-Fragmente amplifiziert, die Aufschluss über die gesuchten Mutationen geben sollen. Vorzugsweise wird daher die DNA-Probe mit Hilfe spezifischer Primerpaare behandelt, von denen jeweils eines stromaufwärts und eines stromabwärts der relevanten mutierten DNA-Bereiche um die Kodons 11, 129/131 oder 208 binden, und in einer Polymerasekettenreaktion werden cDNA-Fragmente erzeugt, die entsprechenden Fragmenten des Wildtyp-Allels oder der polymorphen Allele gleichen, wobei das Vorliegen von Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 nachfolgend mit Hilfe von Sequenzierungs- und/oder

20
25 Hybridisierungstechniken detektiert wird.

Vorzugsweise werden solche Primerpaare verwendet, die jeweils ca. 50 Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts des Kodons 11, des Kodons 129/131 sowie des Kodons 208 binden, wodurch etwa 100 bis 150 Basenpaare große cDNA-Fragmente erhalten werden.

Die Detektion der Polymorphismen kann mit Sequenzierungs- und/oder Hybridisierungsverfahren auf verschiedene Weise erfolgen. Der Fachmann ist hier grundsätzlich frei, aus den ihm bekannten Verfahren geeignete auszuwählen.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 8 -

Unter anderem können die gesuchten Polymorphismen durch Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP) untersucht werden, indem die vollständige Rekombination eines mit der vorausgegangenen PCR erhaltenen Patienten-cDNA-Fragments mit einem jeweils entsprechenden cDNA-Fragment des Wildtyp-Allels zu Doppelsträngen detektiert wird. Das zugrundeliegende Prinzip beruht auf der Tatsache, dass eine variierte DNA-Sequenz nicht in der Lage ist komplett kongruente Doppelstränge mit der Wildtyp-Sequenz zu bilden. Dies kann für die Screening-Untersuchung gelelektrophoretisch dargestellt werden und zeigt die Existenz einer Mutation an. In einer Abwandlung dieser Methodik kann die Detektion der polymorphen cDNA-Fragmente durch Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) erfolgen.

Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen würde vorzugsweise durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung überprüft.

Eine weitere Detektionsmöglichkeit besteht darin, dass in einer rein PCR-basierten Strategie (amplification refractory mutation system, System der amplifizierungsresistenten Mutation) durch spezifische Primersequenzen, die an ihrem 3'-Terminus an den Basenaustausch des Polymorphismus binden, die Präsenz eines Polymorphismus dargestellt wird. Zugleich kann diese Methode modifiziert werden, heterozygote und homozygote Träger zu diskriminieren. Ein Ausführungsbeispiel dieser Methode als automatisierbares Testkit-System ist nachfolgend als Beispiel angegeben. Als Primer werden Oligonukleotide verwendet, die einerseits die Wildtyp-Sequenz und andererseits die polymorphe Sequenz binden, sowie korrespondierende Gegenprimer (anti sense Primer). Mit diesen entsteht immer nur dann ein PCR-Produkt, wenn der auf dem Primer kodierte Wildtyp oder das Primerkodierte polymorphe Allel vorliegt. Als Kontrollen werden definierte cDNAs eingesetzt, die die definierten Polymorphismen enthalten. Die Methode ist beispielsweise unter Einsatz der quantitativen Taqman-PCR automatisierbar.

Die PCR-Konjugate können auf übliche Weise mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzym-Markern nachgewiesen werden. Dem Fachmann stehen hierfür genügend

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 9 -

geeignete Techniken zur Auswahl, die hier nicht gesondert beschrieben werden müssen.

Die Erfindung umfasst auch Testkits bzw. Testanordnungen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die zu dieser Erfindung gehörige Testanordnung umfasst grundsätzlich zumindest die für das Verfahren erforderlichen genetischen Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge, wobei vorgesehen ist, dass die vorbereiteten und zusätzlich markierten DNA-Proben des zu untersuchenden Individuums in Kontakt mit der Testanordnung gebracht werden, an einem der Nachweisreagenzien binden und mit Hilfe des Markers an diesem Ort detektiert werden. Dabei kann die Markierung der Probanden-DNA durch Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope erfolgen.

Für eine Kombinationsanalyse mehrerer UGT1A7-Polymorphismen, die in jedem Fall zweckmäßig ist, können die hierfür erforderlichen verschiedenen Nachweisreagenzien, d.h. z.B. die Primer für die verschiedenen Kodons 11, 129/131 und 208 oder die DNA-Fragmente von Wildtyp- und UGT1A7*2/3/4-Allele, je nach gewählter Strategie, gemeinsam auf einer Testanordnung, z.B. auf einem Genchip, immobilisiert sein.

Um das Ablesen des Ergebnisses zu erleichtern, ist es vorteilhaft, wenn auf dem stationären Träger eine Beschriftung oder ein Aufdruck in Zuordnung zu den Nachweisreagenzien angeordnet ist.

Die Kombinationsanalyse aller UGT1A7-Polymorphismen kann über eine Genchiptechnik erfolgen. Dabei kann beispielsweise in der stationären Phase die Oligonukleotid-Sequenz der Polymorphismen sowie des Wildtyps immobilisiert sein. Von der Probanden-DNA werden korrespondierende Oligonukleotide durch PCR amplifiziert und durch Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktive Isotope oder andere Konjugate markiert. Die nachfolgende Hybridisierungsreaktion identifiziert das korrespondierende Oligonukleotid auf dem Gen-Array und determiniert die Existenz

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 10 -

eines Polymorphismus. Verschiedene Ausführungen einer Array-basierten Teststrategie sind möglich und können vom Fachmann an dieses Verfahren angepasst werden.

- 5 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung können die polymorphen UGT1A7*2-, UGT1A7*3- und UGT1A7*4-Gene für die Herstellung zugehöriger UGT-Isotypen verwendet werden. Die identifizierten Polymorphismen können als rekombinante Proteine exprimiert und beispielsweise für die metabolische Charakterisierung von Tumortheraeutike eingesetzt werden, um eine Vorhersage des Metabolismus dieser Substanzen zu ermöglichen. Ebenso können alle Polymorphismen von
- 10 UGT1A7 dazu dienen, den Metabolismus von potentiell mutagenen oder krebserzeugenden Substanzen zu untersuchen, mit dem Ziel, Voraussagen über deren Giftigkeit oder karzinogenetische Potenz zu machen. Hierzu dient die Expression der polymorphen Allele in heterologen Expressionssystemen, in
- 15 Bakterien, Eukaryotenzellkulturen und ihr nachfolgender Einsatz als Enzympräparation für katalytische Analysen. Testkits, die eine Serie verschiedener Polymorphismen-Proteine beinhalten, ermöglichen hier eine einfache in vitro Analyse.
- 20 Die Identifikation von Suszeptibilitätsmarkern für das Kolonkarzinom und entzündliche Darmerkrankungen ermöglicht prinzipiell deren Einsatz für gentherapeutische Strategien. Grundsätzliche gentherapeutische Anwendungsmöglichkeiten sind dem Fachmann heute bereits bekannt, so dass verschiedene Umsetzungsmöglichkeiten offenstehen. Der Einsatz von UGT1A7
- 25 alleine oder in Kombination mit anderen homologen Mitgliedern dieser Enzymfamilie in der Tumorthherapie ist eine Anwendung der definierten genetischen Assoziation.

Die Erfindung umfasst daher auch die Verwendung von UGT1A7-Genen oder -genfragmenten für die Herstellung eines gentherapeutischen Arzneimittels zur

30 Behandlung bei UGT1A7-Polymorphismen des Typs UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4.

In Weiterbildung der Erfindung ist daher der orale oder parenterale Einsatz des rekombinanten Proteins von Genen der UGT1A-Familie in der Tumorthherapie oder

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 11 -

in der Tumoprävention bei Risikopatienten vorgesehen. Für den Transport von UGT1A7 cDNA oder homologer UGT1A cDNAs in humane Zellen und Tumorzellen können Vektoren verwendet werden, die dem Fachmann grundsätzlich bekannt sind und die er mit seinem fachmännischen Wissen auswählen kann. Dies führt zur

5 Expression des Proteins im Zielgewebe einschließlich von embryonalem oder fetalem Gewebe, wo das gentherapeutische UGT1A7-Arzneimittel für die Modifikation von Vorläuferzellen verwendet werden kann.

Der Transport der UGT1A-cDNA kann beispielsweise durch parenterale Vektoren mit organspezifischen Promotoren, durch die intramuskuläre Injektion von UGT1A

10 cDNA oder durch liposomverpackte cDNA über den Gastrointestinaltrakt erfolgen. Der Fachmann kann geeignete Delivery-Systeme im Rahmen seines Fachwissens aussuchen.

15 Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und Figuren näher erläutert.

BEISPIEL 1 - Testbeispiel

Es werden Oligonukleotide (Primer) verwendet, die einerseits die Wildtyp-Sequenz

20 und andererseits die polymorphen Sequenzen binden sowie korrespondierende Gegenprimer (anti sense Primer). Mit diesen entsteht immer nur dann ein PCR-Produkt, wenn der auf dem Primer kodierte Wildtyp oder das primerkodierte polymorphe Allel vorliegt. Das Prinzip ist in Figur 1 dargestellt. Als Kontrollen werden definierte cDNAs eingesetzt, die die definierten Polymorphismen enthalten.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 12 -

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

5

Polymorphismus	Primer Art	Sequenz	Produktgröße
Kodon 11	A	<u>gggtggactgcctcctcca</u>	269 bp
	B	<u>gggtggactgcctcctccc</u>	
	reverse	<u>ggcaaaaacctgaactccc</u>	
Kodon 129	A	<u>tttttcaattgcaggagttgittaag</u>	264 bp
	B	<u>tttttcaattgcaggagttgittaat</u>	
Kodon 131	A	<u>aaattgcaggagttgittaaggaca</u>	271 bp
	B	<u>aaattgcaggagttgittaagaccg</u>	
	reverse	<u>ttctaagacattttgaaaaatagg</u>	
Kodon 208	A	<u>gacgccatgacttcaaggagagactae</u>	252 bp
	B	<u>gacgccatgacttcaaggagagagtat</u>	
	reverse	<u>tgctttccctgatgacagtgatacc</u>	

Beim Einsatz dieser Primer in der automatisierten, quantitativen PCR werden Konjugate mit Fluoreszenzfarbstoffen, enzymatischen Markern oder anderen

10 Markierungssystemen für DNA hergestellt und für diese Diagnostik genutzt. Die Markierungsmittel sind allgemein bekannt und werden hier nicht gesondert beschrieben.

Mit Hilfe dieses Testsystems wurden Ergebnisse gefunden, die spezifisch das Vorliegen homo- sowie heterozygoter Mutationen detektieren. Die Ergebnisse sind

15 in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 13 -

Kodon	Primer	Kontrollen		Ergebnisse				
		UGT1A7*1	UGT1A7*4	UGT1A7*2	UGT1A7*3	UGT1A7*2/ UGT1A7*1	UGT1A7*2/ UGT1A7*3	UGT1A7*3/ UGT1A7*4
11	A	-	+	+	-	+	+	+
	B	+	-	-	+	+	+	+
129	A	-	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	-
131	A	-	+	-	+	-	+	+
	B	+	-	+	-	+	+	-
208	A	-	+	+	-	+	+	+
	B	+	-	-	+	+	+	+

Die Anwendung dieser Analysen für alle drei polymorphen Genorte 11, 129/131 und 208 ist deshalb von großer Bedeutung, da das Vorliegen des UGT1A7*2-Allels (Kodon 11 und 208) sowie des UGT1A7*4-Allels (Kodon 11, 129, 131, 208) mit dem kolorektalen Karzinom, aber nur das Vorliegen des UGT1A7*4 Allels mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind. Die genetische Analyse besteht daher zweckmäßigerweise aus der Kombination der Analysen an den identifizierten Orten im Sinne eines Testkits.

10

Testreihe an 111 Probanden

Die Proben wurden von 111 Patienten des Instituts für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover im Jahr 1999 gesammelt.

15

Die folgenden Gruppen wurden untersucht:

- a) Die Kontrollgruppe (n = 54, 44,32 ± 15,65 Jahre, 31 männlich/23 weiblich) wurde definiert als Patienten die keinen Befund auf vorhergehende Krebserkrankungen hatten, ausgeschlossen durch abdominalen Ultraschall und Endoskopie (obere und untere).
- b) Kolorektalkrebs-Patienten (n = 26, 62,15 ± 11,25 Jahre, 15 männlich / 11 weiblich) litten an Kolorektalkarzinom, wie durch Ausschluss nach den Amsterdamm II-Kriterien bestätigt.
- c) Die Beispiele für entzündliche Darmerkrankungen (IBD) (n = 31, 36,74 ± 11,79 Jahre, 14 männlich / 16 weiblich) umfassten Patienten mit Colitis ulcerosa (n = 14,

25

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 14 -

35,07 ± 13,86 Jahre, 9 männlich / 5 weiblich) und Morbus Crohn (n = 17, 38,12 ± 10,00 Jahre 5 männlich / 12 weiblich). Die Diagnosen der Colitis ulcerosa und von Morbus Crohn basieren auf Befunden oberer und unterer Endoskope und wurden histologisch durch intestinale Biopsien bestätigt.

5

Genomische DNA: Die genomische DNA wurde aus Vollblutproben mit Hilfe des QuiaAmp® Systems nach den Empfehlungen des Herstellers präpariert (Quiagen, Hilden, Deutschland). Konzentrationsdaten wurden spektrophotometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt, und die Proben wurden in 10 mM Tris/EDTA- Puffer (pH 8,0) bei 4 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

10

Analyse der UGT1A7 Exon1 Sequenz: Die UGT1A7 Exon 1-Sequenz wurde mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Der Forward-Primer war von Basenpaar 61 bis 38 stromaufwärts des ATG-Startkodons (GenBank Zugangsnummer U39570) von UGT1A7 (5'-gctgctcgagccactactatattaggagct-3'). Der Gegenprimer lag zwischen Basenpaar 855 und 829 (GenBank Zugangsnummer U89507) der UGT1A7 Exon1-Sequenz (5'-gcggatatccataggcactggcttccctgatgaca-3'). Die Lokalisierung des stromaufwärtigen Primers außerhalb des offenen Leserahmens war erforderlich um die Spezifität der Amplifikation zu erreichen, da die Exon1-Sequenz von UGT1A7-10 Homologien von 93 % besitzt. Ein 916 Basenpaare großes Produkt wurde in einem Volumen von 100 µl, enthaltend 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumsulfat, 1 % Triton X-100, 0,2 mM je dNTP, 20 ng genomische DNA, 2 µM Primer und 5 Einheiten VENT (exo-)DNA-Polymerase (NEB, Beverly, MA) amplifiziert. Nach einem heißen Start bei 94 °C für 3 Minuten wurden 30 Zyklen bei 94 °C über 3 Sekunden, bei 57 °C für 30 Sekunden und bei 72 °C für 30 Sekunden auf einem Perkin Elmer Gene Amp PCR 2400 System gefahren. Die Produkte wurden in einer Elektrophorese mit 2% Agarosegel sichtbar gemacht und mit QuiaQuick® Säulen gemäß den Angaben des Herstellers (Quiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden an beiden Strängen mit automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung bestimmt (MWG-Biotech, Ebersbach, Deutschland). Die Sequenzdaten wurden mit dem PC-Gene-software-package (Oxford Molecular, Campbell, CA, U.S.A.) analysiert. Die statistische Analyse wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet.

15

20

25

30

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 15 -

GenBank Accession Numbers: UGT1A7*1: U89507; UGT1A7*2: AF2969226;
UGT1A7*3: AF292627, UGT1A7*4 AF292627

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Figuren näher erläutert, wobei im
5 Einzelnen zeigen:

- Figur 1 die graphische Darstellung der UGT1A7-Polymorphismus-Diagnostik;
- Figur 2 Assoziation von UGT1A7*2 und UGT1A7*4 mit NC, CRC und IBD;
- Figur 3 3 polymorphe Orte(Sites) der menschlichen UGT1A7 Exon 1 Sequenz;
- 10 Figur 4 Vergleich der Regionen um das Kodon 11, 129, 131 und 208;
- Figur 5 Assoziationen zwischen der W208R Mutation und dem kolorektalem
Karzinom und entzündlichem Darmerkrankungen.

Figur 1 zeigt eine UGT1A7-Polymorphismus-Diagnostik, bei der die Region um die
15 identifizierten Polymorphismen durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert
wird. Dabei werden spezifische Primerpaare verwendet, die zirka 50 Basenpaare
stromaufwärts und stromabwärts des Kodons 11, des Kodons 129/131 sowie des
Kodons 208 binden. Bei dieser PCR werden 100 bis 150 bp große komplementäre
Desoxyribonukleinsäure-Fragmente (cDNAs) erzeugt, die dem Wildtyp-Allel
20 entsprechen oder die identifizierten Polymorphismen tragen.

Figur 2 zeigt die Analyse der Prävalenz der polymorphen UGT1A7-Allelen wie in
Figur 3 definiert. Diese Analyse, die auf den definierten polymorphen UGT1A7-Allelen
basiert zeigt eine signifikante Assoziation von UGT1A7*4 und UGT1A7*2 mit
25 kolorektalem Krebs (CRC) und dem geringen Vorkommen von diesen Allelen in der
normalen Kontrollgruppe (NC). Im Gegensatz dazu sind entzündliche
Darmerkrankungen (IBD) nur mit der Anwesenheit von UGT1A7*4 assoziiert.
Weder für CRC noch für IBD wurde eine signifikante Assoziation mit dem
UGT1A7*3-Allel gefunden. Die Assoziation von Verbindungen der heterozygoten
30 UGT1A7*3/UGT1A7*4-Individuen mit CRC und IBD war jedoch signifikant.
Statistisch signifikante Vergleiche sind durch * angezeigt. UGT1A7*2 ist definiert als
eine Kombination von CCA an Kodon 11 und der W208R-Mutation. Dies beruht auf
der Beobachtung, dass die zwei Mutationen immer kombiniert und nicht individuell
heterozygot oder homozygot entweder an Kodon 11 oder Kodon 208 identifiziert

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 16 -

werden. UGT1A7*2 wurde nicht als homozygotes Allel detektiert. UGT1A7*3 ist nur durch die Kombination von N129K und R131K definiert. Diese Patienten waren entweder homozygot oder heterozygot sowohl für N129K als auch R131K. Das heterozygote UGT1A7*4 kann alternativ die Verbindung heterozygot UGT1A7*2/UGT1A7*3 repräsentieren.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der 3 polymorphen Sites, die in der menschlichen UGT1A7 Exon 1 Sequenz identifiziert wurden. Die Mutation CCC/A an Kodon 11 ist still. An Kodon 129, 131 und 208 führen die Mutationen zu Aminosäuresubstitutionen. Die Sequenzanalyse hat die Anwesenheit von 3 verschiedenen Polymorphismen aufgezeigt, die UGT1A7*2, UGT1A7*3 und UGT1A7*4 zugeordnet wurden. Der Austausch an Kodon 11 und 208 (UGT1A7*2) sowie die Polymorphismen an Kodon 129 und 131 (UGT1A7*3) kamen nicht einzeln vor.

Figur 4 zeigt, dass verglichen mit der Region um das Kodon 11 die identifizierten Polymorphismen an Position 129/131 und Position 208 in hochkonservierte Sequenzbereiche fallen. Der N129K/R131K Polymorphismus repräsentiert die Wildtyp-Sequenz von UGT1A9 in dieser Position. W208R repräsentiert die Wildtyp-Sequenz von UGT1A8 und UGT1A9 an dieser Position.

Figur 5 zeigt, dass die Assoziation von W208R-Mutationen mit Kolorektalkarzinomkrankungen und entzündlichen Darmerkrankungen hochgradig statistisch signifikant ist. Während Mutationen an Kodon 208 (W208R) nur in 22 % der Normalkontrollen auftreten, finden diese sich in 73 % der Patienten mit kolorektalen Karzinomen und in 61 % der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen. Für das UGT1A7*2-Allel zeigte sich eine signifikante Assoziation mit dem kolorektalen Karzinom (19 % gegenüber 7 %) aber nicht mit entzündlichen Darmerkrankungen. Das UGT1A7*4-Allel war signifikant mit dem kolorektalen Karzinom sowie auch mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert, während sich für UGT1A7*3 keine signifikante Assoziation zeigte (niedrige Signifikanzlevel). Die statistische Signifikanz für die Anwesenheit von W208R-Mutationen in CRC-Patienten (73%) gegenüber Normalkontrollen (22%) war sehr hoch ($p < 0,0001$) Hierbei wurden heterozygote (50% gegenüber 15%, $p < 0,001$)

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 17 -

und homozygote (23 % gegenüber 7 %, $p < 0,02$) W208R-Mutationen berücksichtigt. Die Assoziation war niedriger, jedoch ebenfalls signifikant für IBD-patienten, die 61 % W208R-Mutationen ($p < 0,0001$) zeigte, in 35 % heterozygoten und 26 % homozygoten Individuen. Bei dem Auftreten der W208R-Mutationen zu 5 22% bei den Normalkontrollen ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass ein tumorfreier Zustand zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme die spätere Entwicklung von CRC nicht ausschließt.

Der * zeigt signifikante Level gegenüber den Normalenkontrollen (Kruskal Wallis 10 Test). Im Folgenden bedeuten: n.s. - nicht signifikant, NC - Normalkontrollen; CRC – kolorektales Karzinom (colorectal carcinoma) und IBD – entzündliche Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease).

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 18 -

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials für und/oder die Diagnose von Karzinomerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen aufgrund genetischer Disposition, dadurch gekennzeichnet, dass eine DNA-Probe einer zu untersuchenden Person auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A7-Allele, die Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 umfassen, getestet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein positives Ergebnis für eine Mutation an Kodon 11 und 208 als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomerkrankungen, insbesondere für Dickdarm-, Bauchspeicheldrüsen-, Leber-, Magen- und Speiseröhrenkrebs gewertet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei überprüft wird, dass die als positiv gewerteten Mutationen ein W208R-Austausch und eine stille Mutation CCC zu CCA des Kodons 11 sind.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei ein positives Ergebnis für eine Mutation an Kodon 11, 129, 131 und 208 als Anzeichen für eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung und eine Karzinomerkrankung gewertet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei überprüft wird, dass die als positiv bewerteten Mutationen N129K, R131K und I208R sowie die stille Mutation CCC zu CCA an Kodon 11 sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass für die Probe genomische DNA, vorzugsweise aus Lymphozyten, verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die genomische Desoxyribonukleinsäure aus einer Blutprobe mittels säulenchromatographischer Verfahren und chemischer Aufbereitung isoliert wird.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 19 -

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mit der DNA-Probe eine PCR-Amplifikation des Exons 1 von UGT1A7 (ca. 855 Basenpaare) mit anschließender Sequenzanalyse durchgeführt wird und die ermittelte Sequenz mit der des Wildtyps und der polymorphen Allele von UGT1A7 verglichen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zu der DNA-Probe mit Hilfe spezifischer Primerpaare, von denen jeweils eines stromaufwärts und eines stromabwärts der relevanten mutierten DNA-Bereiche um die Kodons 11, 129/131 oder 208 binden, in einer Polymerasekettenreaktion cDNA-Fragmente erzeugt werden, die entsprechenden Fragmente des Wildtyp-Allels oder der polymorphen Allele gleichen, und dass das Vorliegen von Mutationen an den Kodons 11, 129, 131 und/oder 208 mit Hilfe von Sequenzierungs- und/oder Hybridisierungstechniken detektiert wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Primerpaare jeweils ca. 50 Basenpaare stromaufwärts und stromabwärts des Kodons 11, des Kodons 129/131 sowie des Kodons 208 binden, wodurch etwa 100 bis 150 Basenpaare große cDNA-Fragmente gebildet werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorliegen von Mutationen an den relevanten Kodons durch Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP) mit einem jeweils entsprechenden cDNA-Fragment des Wildtyp-Allels detektiert wird, wobei Wildtyp- und polymorphe Allele vorzugsweise gelelektrophoretisch, weiter vorzugsweise mit Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE), unterschieden werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung überprüft wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass mit einer Polymerasekettenreaktion mit Hilfe von Primer-Sequenzen, die an

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

- 20 -

ihrem 3'-Terminus an den Basentausch des Polymorphismus binden, das Vorhandensein eines Polymorphismus nachgewiesen wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Vorliegen von Mutationen mit Hilfe homologer Oligonucleotide mit der Wildtyp- oder der Polymorphismus-Sequenz und korrespondierenden Gegenprimern (anti sense primern) mit einer PCR-Technik nachgewiesen wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine quantitative Taqman-PCR verwendet wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die PCR-Konjugate mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzym-Markern nachgewiesen werden.
17. Testanordnung, umfassend die gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 erforderlichen genetischen Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge, wobei die gemäß in einem der Ansprüche 8 bis 10 vorbereitete(n) und zusätzlich markierte(n) DNA-Probe(n) eines zu untersuchenden Individuums bei Inkontaktbringen mit der Testanordnung an einem der Nachweisreagenzien bindet/binden und mit Hilfe des Markers an diesem Ort detektiert wird/werden.
18. Testanordnung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope erfolgt.
19. Testanordnung nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweisreagenzien für eine Kombinationsanalyse mehrerer UGT1A7-Polymorphismen gemeinsam auf einer Testanordnung immobilisiert sind.
20. Testanordnung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem stationären Träger für das Ablesen des Ergebnisses eine

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

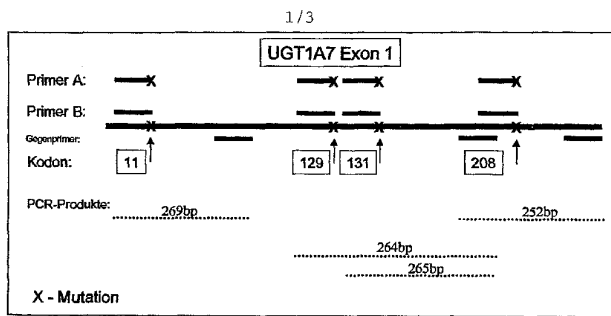
- 21 -

Beschriftung oder ein Aufdruck in Zuordnung zu den Nachweisreagenzien angeordnet ist.

21. Verwendung von polymorphen UGT1A7*2-, UGT1A7*3- und UGT1A7*4-Gene
5 für die Herstellung der von ihnen kodierten polymorphen UGT-Isoformen.
22. Verwendung der UGT-Isoformen nach Anspruch 21 für die metabolische
Charakterisierung von Tumorthapeutika sowie zur Untersuchung der Toxizität
und/oder Karzinogenität potentieller UGT1A7-Substrate.
10
23. Verwendung von UGT1A-Wildtyp-Genen oder -genfragmenten für die
Herstellung eines gentherapeutischen Arzneimittels zur Behandlung bei
UGT1A-Polymorphismen, insbesondere solchen des Typs UGT1A7*2 oder
UGT1A7*4.
15
24. Verwendung von rekombinanten UGT1A7-Enzymen für therapeutische Zwecke.

WO 02/053770

PCT/DE02/00003



Figur 1

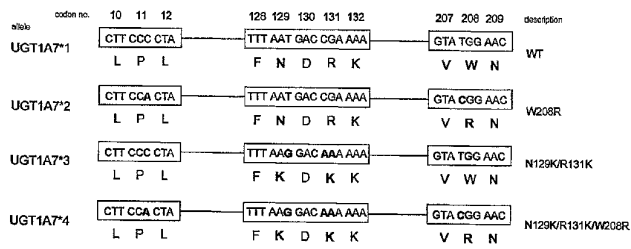
Allele		NC	CRC	IBD
UGT1A7*1	wildtype	48%	4%	6%
UGT1A7*2	+/+	0%	0%	0%
UGT1A7*2	+/-	5%	19%*	3%
UGT1A7*3	+/+	16%	0%	10%
UGT1A7*3	+/-	18%	23%	10%
UGT1A7*4	+/+	7%	23%*	26%*
UGT1A7*4	+/-	3%	19%*	16%*
UGT1A7*3/UGT1A7*4	compound heterozygous	3%	12%	16%*
UGT1A7*4 (+/+) and UGT1A7*3/UGT1A7*4		10%	35%*	50%*

Figur 2

WO 02/053770

PCT/DE02/00003

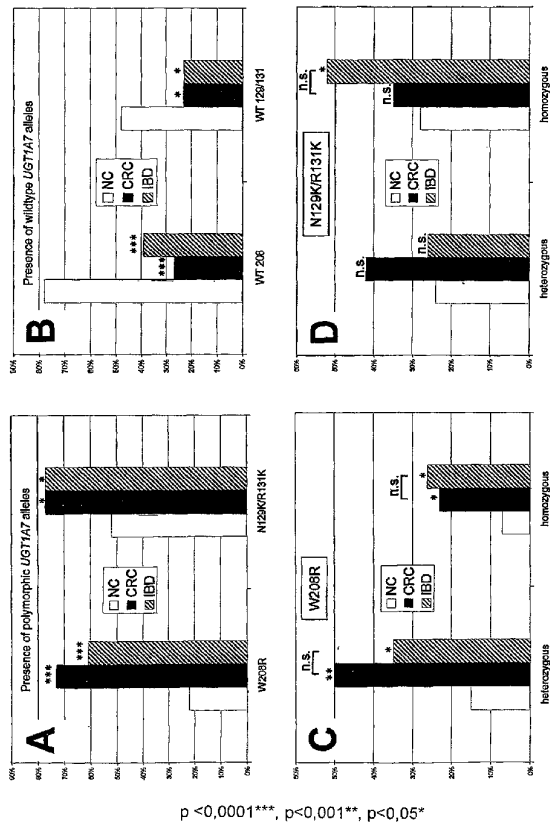
2/3



Figur 3

aminoacid no.	aa 7 - 15	aa 127 - 134	aa 205 - 213
UGT1A1	GGRP-LVLG---	LLHNKELM---	QRVKNMLIA-
UGT1A3	VPLPWLATG---	LLHNEALI---	QRVKNMLYP-
UGT1A4	VPLPQLATG---	LLHNEALI---	QRVKNMLYP-
UGT1A5	VPLPRLATG---	LLHNEALI---	QRVKNMLYP-
UGT1A6	RSFQRISAG---	LLQDRDTL---	QRVANFLVN-
UGT1A7	TGLLPYVVC---	LFNDRKLV---	ERVVNHIMH-
UGT1A8	TSPILCVS---	LFNDRKLV---	ERVVNHIMH-
UGT1A9	TSPILCVS---	LFKDKKLV---	ERVVNHIMH-
UGT1A10	DQPRSEMCV---	LFNDRKLV---	ERVVNHIVH-
UGT1A7 polymorphisms:		N129K/R131K	W208R

Figur 4



p < 0,0001***, p < 0,001**, p < 0,05*

Figure 5

【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
11. Juli 2002 (11.07.2002)

PCT

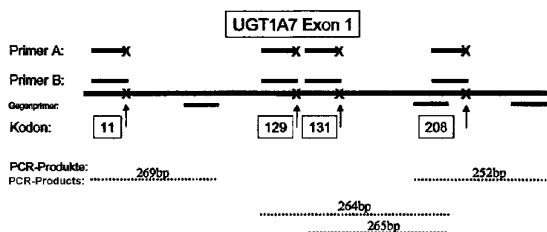
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/053770 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (72) Erfinder; und
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00003
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MANN'S, Michael [DE/DE]; Sonnenallee 23, 30916 Isernhagen (DE); STRASSBURG, Christian [DE/DE]; Drachenfeld 79, 30627 Hannover (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Januar 2002 (03.01.2002)
- (74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Gramm, Lins & Partner GbR, Freudenalle 13, 30173 Hannover (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 00 238.6 5. Januar 2001 (05.01.2001) DE
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (Gebrauchsmuster), DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER [DE/DE]; Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE PREDICTION OF THE RISK POTENTIAL FOR CANCEROUS DISEASES AND INFLAMMATORY INTESTINAL DISEASES AND CORRESPONDING TESTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VORHERSAGH DES GEFÄHRDUNGSPOTENTIALS FÜR KARZINOMERKRANKUNGEN UND ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN UND ZUGEHÖRIGE TESTS



X - Mutation

(57) Abstract: The invention relates to a method for the prediction of the risk potential and/or diagnosis of cancerous diseases or inflammatory intestinal diseases, whereby a DNA sample is tested for the presence of polymorphic UGT1A7 allele. A positive result for a mutation is a positive indication of a sensitivity to cancerous diseases. A prediction of sensitivity to an inflammatory intestinal disease can similarly be made. A PCR amplification of the exon 1, by means of the DNA sample with subsequent sequence analysis is carried out in the method and the determined sequence compared with that of the wild type and the polymorphic allele. The presence or lack of mutations is monitored by means of sequencing the corresponding cDNA using automated fluorescent dye sequencing. The test arrangement for said method requires genetic detection reagents, namely the required primer or cDNAs, on a stationary support in a pre-prepared arrangement or sequence for reading off the results. The recombinant UGT1A7 enzymes are also used for therapeutic purposes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/053770 A3

WO 02/053770 A3 

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, 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, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:
mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 24. Juli 2003

Erklärungen gemäß Regel 4.17:
hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle Bestimmungsstaaten

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.

(57) Zusammenfassung: Bei dem Verfahren zur Vorhersage des Gefährdungspotentials und/oder Diagnose von Karzinomkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen wird eine DNA-Probe auf das Vorhandensein polymorpher UGT1A7-Allele getestet. Ein positives Ergebnis für eine Mutation gilt als positives Anzeichen für eine Sensibilität für Karzinomkrankungen. Ebenso kann eine Vorhersage über eine Sensibilität für eine entzündliche Darmerkrankung gemacht werden. Bei dem Verfahren wird durch die DNA-Probe eine PCR-Amplifikation des Exons 1 mit anschließender Sequenzanalyse durchgeführt und die ermittelte Sequenz mit der des Wildtyps und der polymorphen Allele verglichen. Das Vorliegen oder Nichtvorliegen von Mutationen wird durch Sequenzieren der betreffenden cDNA mittels automatisierter Fluoreszenzfarbstoffsequenzierung überprüft. Die Testanordnung für dieses Verfahren erfordert genetische Nachweisreagenzien, nämlich die erforderlichen Primer oder cDNAs, auf einem stationären Träger in einer für das Ablesen des Ergebnisses vorbereiteten Anordnung oder Reihenfolge. Die rekombinanten UGT1A7-Enzyme werden auch für therapeutische Zwecke verwendet.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte PCT/DE	application No 02/00003
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q C07K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	STRASSBURG CHRISTIAN P ET AL: "Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon: Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 15, 10 April 1998 (1998-04-10), pages 8719-8726, XP002228325 ISSN: 0021-9258 page 8720, paragraph 2 -/--	17-24	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.			
* Special categories of cited documents:			
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*S* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search 30 January 2003		Date of mailing of the international search report 12/02/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6018 Patentlaan 2 NL - 2200 PV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Burkhardt, P	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter- PCT/DE 02/00003	lication No
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	STRASSBURG CHRISTIAN P ET AL: "Differential down-regulation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 14, 1997, pages 2979-2985, XP001121773 ISSN: 0008-5472 page 2980, column 2 ---	17-24	
X	WO 99 57322 A (AXYS PHARM INC) 11 November 1999 (1999-11-11)	17-24	
Y	page 4, line 26 -page 6, line 12; tables ---	1-16	
X	GUILLEMETTE C ET AL: "STRUCTURAL HETEROGENEITY AT THE UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE 1 LOCUS: FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF THREE NOVEL MISSENSE MUTATIONS IN THE HUMAN UGT1A7 GENE" PHARMACOGENETICS, CHAPMAN & HALL, LONDON, GB, vol. 10, no. 7, October 2000 (2000-10), pages 629-644, XP009001331 ISSN: 0960-314X cited in the application	17-24	
Y	the whole document ---	1-16	
Y	TUKEY R H ET AL: "HUMAN UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASES: METABOLISM, EXPRESSION, AND DISEASE" ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY, ANNUAL REVIEW INC., PALO ALTO, CA, US, vol. 40, 2000, pages 581-616, 2PAGES, XP009003008 ISSN: 0362-1642 page 603, paragraph 2 -page 605, last paragraph ---	1-16	
A	WO 00 06776 A (MILLER ANDREW ;PENNY LAURA (US); RIEDY MICHAEL (US); AXYS PHARM IN) 10 February 2000 (2000-02-10) the whole document ---	1-24	
	-/--		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Classification No. PCT/DE 02/00003
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	VOGEL A ET AL: "Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene." GASTROENTEROLOGY. UNITED STATES NOV 2001, vol. 121, no. 5, November 2001 (2001-11), pages 1136-1144, XP001119046 ISSN: 0016-5085 the whole document	1-24
T	STRASSBURG C P ET AL: "Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer." GUT, vol. 50, no. 6, June 2002 (2002-06), pages 851-856, XP009003528 June, 2002 ISSN: 0017-5749 the whole document	1-24
T	VOGEL A ET AL: "Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in proximal digestive tract cancer." ZEITSCHRIFT FUER GASTROENTEROLOGIE, vol. 40, no. 7, 2002, pages 497-502, XP001121594 ISSN: 0044-2771 the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Inter Application No PC1/DE 02/00003	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9957322	A	11-11-1999	AU 3879299	A	23-11-1999
			EP 1084271	A2	21-03-2001
			WO 9957322	A2	11-11-1999
			US 2002061518	A1	23-05-2002
WO 0006776	A	10-02-2000	AU 5225699	A	21-02-2000
			CA 2334957	A1	10-02-2000
			EP 1100968	A1	23-05-2001
			JP 2002521067	T	16-07-2002
			WO 0006776	A1	10-02-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Intern PCT/DE 02/00003
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE		
Researchierter Mindestprüfzettel (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q C07K		
Researchierte aber nicht zum Mindestprüfzettel gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
X	STRASSBURG CHRISTIAN P ET AL: "Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon: Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 273, Nr. 15, 10. April 1998 (1998-04-10), Seiten 8719-8726, XP002228325 ISSN: 0021-9258 Seite 8720, Absatz 2 ----- -/-	17-24
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelsfrei erschließen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf offenkundiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
30. Januar 2003		12/02/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Burkhardt, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Intern PC1/UL 02/00003	s Aktienzeichen
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
X	STRASSBURG CHRISTIAN P ET AL: "Differential down-regulation of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus is an early event in human liver and biliary cancer." CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 14, 1997, Seiten 2979-2985, XP001121773 ISSN: 0008-5472 Seite 2980, Spalte 2 ---	17-24	
X	WO 99 57322 A (AXYS PHARM INC) 11. November 1999 (1999-11-11) ---	17-24	
Y	Seite 4, Zeile 26 -Seite 6, Zeile 12; Tabellen ---	1-16	
X	GUILLEMETTE C ET AL: "STRUCTURAL HETEROGENEITY AT THE UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE 1 LOCUS: FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF THREE NOVEL MISSENSE MUTATIONS IN THE HUMAN UGT1A7 GENE" PHARMACOGENETICS, CHAPMAN & HALL, LONDON, GB, Bd. 10, Nr. 7, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 629-644, XP009001331 ISSN: 0960-314X in der Anmeldung erwähnt ---	17-24	
Y	das ganze Dokument ---	1-16	
Y	TUKEY R H ET AL: "HUMAN UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASES: METABOLISM, EXPRESSION, AND DISEASE" ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY, ANNUAL REVIEW INC., PALO ALTO, CA, US, Bd. 40, 2000, Seiten 581-616, 2PAGES, XP009003008 ISSN: 0362-1642 Seite 603, Absatz 2 -Seite 605, letzter Absatz ---	1-16	
A	WO 00 06776 A (MILLER ANDREW ;PENNY LAURA (US); RIEDY MICHAEL (US); AXYS PHARM IN) 10. Februar 2000 (2000-02-10) das ganze Dokument ---	1-24	
	-/--		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Intern PCT/DE 02/00003	Aktenzeichen
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN			
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Blatt, Anspruch Nr.	
P,X	VOGEL A ET AL: "Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene." GASTROENTEROLOGY. UNITED STATES NOV 2001, Bd. 121, Nr. 5, November 2001 (2001-11), Seiten 1136-1144, XP001119046 ISSN: 0016-5085 das ganze Dokument	1-24	
T	STRASSBURG C P ET AL: "Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer." GUT, Bd. 50, Nr. 6, Juni 2002 (2002-06), Seiten 851-856, XP009003528 June, 2002 ISSN: 0017-5749 das ganze Dokument	1-24	
T	VOGEL A ET AL: "Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in proximal digestive tract cancer." ZEITSCHRIFT FUER GASTROENTEROLOGIE, Bd. 40, Nr. 7, 2002, Seiten 497-502, XP001121594 ISSN: 0044-2771 das ganze Dokument	1-24	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT			Intern: Aktenzeichen PCT/DE 02/00003	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 9957322 A	11-11-1999	AU 3879299 A	23-11-1999	
		EP 1084271 A2	21-03-2001	
		WO 9957322 A2	11-11-1999	
		US 2002061518 A1	23-05-2002	
WO 0006776 A	10-02-2000	AU 5225699 A	21-02-2000	
		CA 2334957 A1	10-02-2000	
		EP 1100968 A1	23-05-2001	
		JP 2002521067 T	16-07-2002	
		WO 0006776 A1	10-02-2000	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 39/02	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/34	Z
C 1 2 M 1/34	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 27/447	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/60	Z
G 0 1 N 33/58	A 6 1 K 37/52	
G 0 1 N 33/60	G 0 1 N 27/26	3 1 5 Z
// C 1 2 N 9/10	C 1 2 N 9/10	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,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,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 マンス、ミヒャエル

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 9 1 6 イサーンハーゲン、ゾンネンアレー 2 3

(72)発明者 ストラスブルグ、クリスチャン

ドイツ連邦共和国、デー - 3 0 6 2 7 ハノーバー、ドラチェンフェルト 7 9

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BA11 CA25 DA12 DA13 DA14 DA77 DA78 FB02
 FB05 FB06 FB08 FB12
 4B024 AA01 AA11 AA19 BA10 CA03 CA04 CA09 CA20 GA11 HA11
 HA13 HA14 HA17 HA19
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC08 FA12 FA15
 4B050 CC01 DD11 EE01 LL01 LL03 LL05
 4B063 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ26 QQ43 QR08 QR32 QR35
 QR40 QR42 QR56 QR62 QR84 QS16 QS25 QS31 QS34 QS36
 QX01 QX02
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 CA53 DC25 MA52 NA10 ZA662
 ZB262 ZC192 ZC372

专利名称(译)	预测癌症疾病和炎症性肠病的潜在风险的方法和通过该方法测试		
公开(公告)号	JP2004533808A	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2002555273	申请日	2002-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	MEDI梓丹麦喃嗜学派汉诺威		
[标]发明人	マンスミヒヤエル ストラスブルグクリスチャン		
发明人	マンス、ミヒヤエル ストラスブルグ、クリスチャン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/45 A61K48/00 A61P3/04 A61P35/00 A61P39/02 A61P43/00 C07K14/47 C12M1/00 C12M1/34 C12N9/10 C12N15/09 C12Q1/48 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N27/447 G01N33/566 G01N33/58 G01N33/60		
CPC分类号	C07K14/47 C12Q1/6886 C12Q2600/156 C12Q2600/172		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K48/00 A61P3/04 A61P35/00 A61P39/02 A61P43/00.111 C12M1/00.A C12M1/34.Z C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A G01N33/60.Z A61K37/52 G01N27/26.315.Z C12N9/10		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BA11 2G045/CA25 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA77 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/BA10 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA12 4B029/FA15 4B050/CC01 4B050/DD11 4B050/EE01 4B050/LL01 4B050/LL03 4B050/LL05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS31 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC25 4C084/MA52 4C084/NA10 4C084/ZA662 4C084/ZB262 4C084/ZC192 4C084/ZC372		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	10100238 2001-01-05 DE		
其他公开文献	JP4274796B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：预测癌症和炎症性肠病的潜在风险并通过该方法进行测试 在预测和/或诊断癌症和炎症性肠病的潜在风险的方法中，测试DNA样本中是否存在多态性UGT1A7等位基因。阳性突变被认为是对癌症疾病阳性敏感性的指标。同样，可以预测对炎症性肠病的易感性。在这种方法中，外显子1用DNA样品进行PCR扩增，然后进行序列分析，并将确定的序列与野生型序列和多态性等位基因序列进行比较。通过使用自动化荧光染料测序对目的cDNA进行测序，可以检查突变的存在与否。重组UGT1A7酶也用于治疗目的。[选型图]图1

多型	プライマー種	配列	産物サイズ
コドン11	A	gggtggactggcctcctcca	269 bp
	B	gggtggactggcctcctcce	
	リバーズ	ggcaaaaacctgaactccg	
コドン129	A	tttttcaattgcaggattgittaag	264 bp
	B	tttttcaattgcaggattgittaaf	
コドン131	A	aaattgcaggattgittaaggaaa	271 bp
	B	aaattgcaggattgittaatgaccg	
	リバーズ	ttctaagacattttgaaaaatagg	
コドン208	A	gacgcatgacttcaaggagagatc	252 bp
	B	gacgcatgacttcaaggagagatf	
	リバーズ	tggtttccctgatgacagttgatacc	