

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 508081

(P2003 - 508081A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z 4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
	33/566		33/566
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 34数)

(21)出願番号 特願2001 - 521775(P2001 - 521775)

(86)(22)出願日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月7日(2002.3.7)

(86)国際出願番号 PCT/CA00/01043

(87)国際公開番号 W001/018240

(87)国際公開日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(31)優先権主張番号 2,282,062

(32)優先日 平成11年9月8日(1999.9.8)

(33)優先権主張国 カナダ(CA)

(31)優先権主張番号 60/160,618

(32)優先日 平成11年10月20日(1999.10.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ・コロンビア
カナダ、ブイ6ティ・1ゼット3、ブリティッシュ・コロンビア、バンクーバー、ヘルス・サイエンス・モール2194番、アイアールシー・ルーム331

(72)発明者 ケOWN, ポール
カナダ国 ブイ5ゼット 1エム9 ブリティッシュ コロンビア、バンクーバー、ウエスト 12ティーエイチ アヴェニュー 855、バンクーバー ジェネラル ホスピタル、イムノロジー ラボラトリー

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 2名)

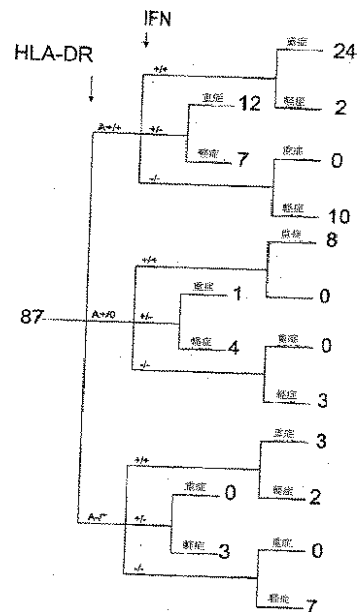
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 自己免疫疾患における診断および治療方法

(57)【要約】

ある態様では、本発明は診断方法を提供する。該診断方法は、インターフェロン 遺伝子を有している関節炎のリスクのある患者を特定するステップを含み得る。該患者を検査してインターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の多型を解析することも可能である。該多型は、第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在する場合もあり、該ジヌクレオチド反復領域の少なくとも一部はインターフェロン 遺伝子のヌクレオチド1349~1373内に位置している場合もある。

該方法は、126bpの対立遺伝子と122bpの対立遺伝子などの対立遺伝子が同定することができるように実施することができる。これについては、本明細書中でさらに詳細に説明する。該多型は、インターフェロン 遺伝子の第1イントロンの一部に存在するCA反復配列の数が相違することに基づいて識別できる。本発明はまた、HLA-DRB1タンパク質などのHLAタンパク質(または遺伝子)の多型について患者を検査することを含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の：

- a) インターフェロン 遺伝子を有している関節炎のリスクのある患者を特定し；
- b) 該患者を検査してインターフェロン 遺伝子内の多型を解析すること；
を含む、診断方法。

【請求項2】 上記多型が第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在し、請求項1記載の方法。

【請求項3】 上記長さの異なるジヌクレオチド反復領域の少なくとも一部は、インターフェロン 遺伝子のヌクレオチド1349～1373位内に位置している、請求項2記載の方法。

【請求項4】 上記多型の解析により、126bpの対立遺伝子と122bpの対立遺伝子からなる群より選択される対立遺伝子を同定することが可能である、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】 上記多型の解析により、インターフェロン 遺伝子の第1イントロンの一部分に様々な数のCA反復配列を有する対立遺伝子を解明することが可能である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 関節炎が慢性関節リウマチである、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 患者が白色人種である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 関節炎のリスクのある患者を特定するステップが、慢性関節リウマチを患っている患者を診断することを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 関節炎のリスクのある患者を特定するステップが、関節の侵食、赤血球沈降速度の上昇、C-反応性タンパク質、多関節疾患、関節の変形、肋軟骨下侵食の放射線学的証拠、関節外の関節炎、およブリウマチ因子の存在からなる群より選択される徴候のある患者を診断することを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 上記多型の解析が、長さの異なるジヌクレオチド反復領域を増幅させることを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 関節炎のリスクのある患者を診断するための、インターフェロン 遺伝子の対立遺伝子の使用。

【請求項12】 対立遺伝子が、インターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域を含む対立遺伝子からなる群より選択されたものである、請求項11記載の対立遺伝子の使用。

【請求項13】 長さの異なるジヌクレオチド反復領域が、様々な数のCA反復配列を含む、請求項12記載の対立遺伝子の使用。

【請求項14】 対立遺伝子が、126bpの対立遺伝子および122bpの対立遺伝子からなる群より選択される、請求項11、12または13記載の対立遺伝子の使用。

【請求項15】 患者を検査してインターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の多型を解析することを含む、インターフェロン 遺伝子を有する患者の関節炎への罹患性を診断する方法。

【請求項16】 患者を検査してインターフェロン 遺伝子の多型を解析し、そして、該患者が関節炎のリスクがあること示唆する多型である場合には該患者に関節炎に対する治療を行うことを含む、インターフェロン 遺伝子を有する患者を治療する方法。

【請求項17】 上記多型が第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在する、請求項16記載の方法。

【請求項18】 患者を検査してHLA遺伝子内の多型を解析することをさらに含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 HLA遺伝子がHLA-DRB1遺伝子座を含んでいる、請求項18記載の方法。

【請求項20】 患者を検査してHLAタンパク質の配列の一部を解析することをさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項21】 HLAタンパク質がクラスIIタンパク質である、請求項20記載の方法。

【請求項22】 HLAタンパク質がHLA-DRB1タンパク質である、請求項20記載の方法。

【請求項23】 上記配列の一部が71位のアミノ酸である、請求項22記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の技術分野**

本発明は、薬理遺伝学の分野、特に診断マーカーとしての対立遺伝子の利用に関する。

【0002】**発明の背景**

慢性関節リウマチは、慢性的多関節疾患であり、原因および予後も様々である(Combeら、1995, Br. J. Rheumatol. 34: 529)。その臨床所見は、やや長期に渡る障害を有する軽症の非変形性関節症から重篤な関節が全く機能しなくなる侵食性関節破壊にまで渡っており、重篤な侵食性関節破壊は従来の疾患改変剤には不応である場合がある(Schiff、1997, Am. J. Med. 102 (suppl 1A): 11S-15S)。疾患の進行の予測は不明確であり、個体群統計学的因子、臨床的因子、および実験室レベルの因子の組み合わせに基づく場合が多い。これには、社会経済学的な立場および教育水準の低さ、初期疾患活性の重篤さ、全身症状および関節外の徴候、関節侵食の出現の早さ、赤血球沈降速度の上昇、C-反応性タンパク質、およびリウマチ因子の存在などが含まれる。主要組織適合性複合体(MHC)クラスII領域における遺伝子座と疾患の罹患性および重篤度との間に遺伝学的関係があるということが疫学的に証明されている(Reveille, 1998, Curr. Op. Rheumatol. 10: 187; Nepomら、1996, J. Rheumatol. 23 (suppl 44): 5; WeyandおよびGoronzy, 1995, Curr. Op. Rheumatol. 7: 206)。

【0003】

インターフェロン は34 Kdのホモ二量体ペプチドである。IFN は、一定の活性化条件下にあるTリンパ球から、およびNK細胞から分泌され得る(Boehm, U.,ら、1997)。IFN は、単核貪食細胞、内皮細胞およびNK細胞を含む標的細胞にある細胞表面受容体に結合し、刺激または遺伝子の抑制を介した免疫応答の協調的制御および発現において重要な役割を担っていると考えられる(Farrar, M. A.ら、1993; Revel, M.ら、1986)。IFN は、T細胞により産生され、炎症性滑膜に浸潤し、関節部分へと分泌され得るが、該ペプチドの関節炎における関節損傷の進行

における役割は未だ論争的である(Feldmann, M.ら、1996)。

【0004】

IFN は、ヒトでは第12染色体上の12q24に位置付けられている遺伝子によってコードされている。該遺伝子の既知配列は、3つの介在領域を有する4つのエキソンで構成されている。ヒトおよびヒトより下等な霊長類では、この遺伝子の第1イントロン内の1349～1373位の間には長さの異なる(variable length)ジヌクレオチド反復配列多型があることが記載されている。このマイクロサテライト領域で報告されている対立遺伝子の数は、その解析に用いられる検出方法によって様々なようである(Ruiz-Linares A, 1993; Awata, T.ら、1994; Pravica, V.ら、1998)。

【0005】

ヒト白血球抗原(HLA)は、免疫系における細胞間相互作用に関与している多型性細胞表面タンパク質のファミリーである。HLA遺伝子は、主要組織適合性複合体(MHC)の一部をなしている。HLAタンパク質は、HLA-A、-B、-DR、-DQおよび-DPタンパク質と記載される。HLA-A、-Bおよび-Cタンパク質はクラスIHLAタンパク質と呼ばれ、HLA-DR、-DQおよび-DPタンパク質は、クラスIIタンパク質と呼ばれる。これらは、鎖と高多型性の鎖の2つのポリペプチド鎖で構成されている。

【0006】

クラスII HLAタンパク質はマクロファージ、B細胞および活性化T細胞の細胞表面に発現され、ヘルパーTリンパ球への結合および抗原提示に関与していると考えられている(GilesおよびCapra, 1985, Adv. Immunol. 37:1参照のこと)。クラスII DP、DQおよびDR遺伝子はMHCの離れた領域に位置している(Trowsdaleら、1985, Immunol. Rev. 85:5)。DR領域において、DRA遺伝子座は鎖をコードし、5つの異なるDRB遺伝子座が、鎖: DRB1、DRB2(現在はDRB6として知られている)、DRB3、DRB4およびDRB5をコードしている。

【0007】

クラスIIタンパク質の遺伝子は多くの既知のハプロタイプ(同じ染色体上の複数の遺伝子座における特定の対立遺伝子の組み合わせ;例えば、Dupont, 1989,

Hum. Immunol. 26:3参照のこと)に分類されてきた。それには、慢性関節リウマチに関連するDR4ハプロタイプなどがある。最も密接に慢性関節リウマチの素因と関係するのはDR4ハプロタイプのどの遺伝子座であるのかを決定するために尽力されてきた(Zanelliら、1998, Immunogenetics 48: 394-401)。DRB1がコードするペプチドの70~74位のアミノ酸で「共通のエピトープ」であるQ(K/R)RAAを含む、遺伝子座の複雑な相互関係は、様々な状態の慢性関節リウマチに関与すると考えられている。該共通のエピトープは、重篤な慢性関節リウマチに関連しているとされてきたが(Gregersonら、1987, Arthritis Rheum 30: 1205-1213; Williamsら、1993, DNA and Cell Biology 12(5): 425-434)、これは正常な個体群に認められることが多く、これを疾患の予後の積極的な指標として使用することは避けるべきであることが示唆されてきた(Khani-Hanjaniら、1998, Abstract 293, Poster Session B, American College of Rheumatology 62nd National Meeting)。DRB1のこの共通のエピトープ内の特定の残基の役割は調べられている(Zanelliら、1997, J. Immunol. 158: 3545-3551; Wucherpfennigら、1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92:11935-11939)。

【0008】

発明の概要

ある態様では、本発明は診断方法を提供する。該診断方法は、インターフェロン 遺伝子を有している関節炎のリスクのある患者を特定するステップを含み得る。該患者を検査してインターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の多型を解析することも可能である。該多型は、第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在する場合もあり、該ジヌクレオチド反復領域の少なくとも一部はインターフェロン 遺伝子のヌクレオチド1349~1373内に位置している場合もある。該方法は、126bpの対立遺伝子と122bpの対立遺伝子などの対立遺伝子が同定することができるように実施することができる。これについては、本明細書中でさらに詳細に説明する。該多型は、インターフェロン 遺伝子の第1イントロンの一部に存在するCA反復配列の数が相違することに基づいて識別できる。該多型を解析するために、長さの異なるジヌクレオチド反復配列を含む領域などの、第1イントロンのある領域を増幅してもよい。

【0009】

本明細書中に記載するようなインターフェロン 遺伝子の対立遺伝子の使用は、患者の特定の臨床結果の可能性に関する予後の情報を提供し得、そしてその結果、それを治療の処方の変更を利用することができる。特に、126bpの対立遺伝子などの相対的に重篤な疾患に関連する対立遺伝子の存在は、積極的な治療を疾患の進行の比較的早期に実施するべきであることを示す指標とすることができる。

【0010】

ある態様では、本発明は、インターフェロン 対立遺伝子のリスクの高低を特定することを含む。他の態様では、本発明は、IFN遺伝子座に関連するHLA遺伝子座の使用を含む、患者の識別のさらなる改良を含む。

【0011】

詳細な説明

一態様においては、本発明は、126bpおよび122bpと記した2つの対立遺伝子と関節炎の特定病状の存在との間の相関を開示する。126bpの対立遺伝子の存在と重症慢性関節リウマチとの間には正の相関がある。122bpの対立遺伝子の存在と重症慢性関節リウマチとの間には負の相関がある。それぞれの対立遺伝子について、相対的に軽症慢性関節リウマチと対応する逆の相関がある。本発明の一態様は、従って、特定の患者における疾患の重症度の予測および治療計画の選択を含む、関節症疾患の診断のための遺伝薬理学的方法を提供する。

【0012】

他の態様においては、本発明は、122bp、124bpおよび126bpの対立遺伝子に対応する部分DNA配列の実施形態を開示する。122bpなどの特定のPCR断片長を共有する対立遺伝子は、他の全ての点については同一である必要がない。事実上、特定のPCR増幅断片のサイズにより特徴付けられる対立遺伝子の「ファミリー」であってもよい。目的の対立遺伝子の個々の実施形態の配列を決定して、下記の配列情報（ここに「N」は、関連する位置における塩基を一義的に同定できなかったことを示す）を得た。

【0013】

122bp断片部分配列：

AACCACAAATNCAATNCTCACACACACACACACACACACACCC
 NNANATTTTGGAAACNANCTTTAAANCCNCNNAAAAAAAAAANNCCCN
 ANAGNANGGT

124bp断片部分配列：

AAAACCACAAAATTCAAATNCNCACACACACACACACACACACAC
 ACNCCCANATTTTGGNNAANANNCTTTTAAACCCCTNAAAAAAAAAN
 CCCCANANGNGAGNGGGGAT

126bp断片部分配列：

AAANCCACAAATTCAAATNCACACACACACACACACACACACACA
 CACCCACANATTTTGGAAACNANCTTTAAANCCCCNAAAAAAAAA
 ACCCCAANAGGGGANGGGGATN

【0014】

種々の対立遺伝子が、その断片のサイズによって、以下の通り、様々な数のCA反復配列を有することが見出されている：

120bpの対立遺伝子：11CA反復配列

122bpの対立遺伝子：12CA反復配列

124bpの対立遺伝子：13CA反復配列

126bpの対立遺伝子：14CA反復配列

128bpの対立遺伝子：15CA反復配列

130bpの対立遺伝子：16CA反復配列。

【0015】

Hutchinsonら (Hutchinsonら, 1999, Transplant Proc., 31(1-2):734) は、122bp断片を含有する対立遺伝子は高レベルのIFN- γ 産生と関連するが、126bpの対立遺伝子を含む他の対立遺伝子は低レベルのIFN- γ 産生と関連することを指摘している。従って、一態様においては、本発明は、低レベルのIFN- γ 産生に関連

するIFN- γ 対立遺伝子を同定し、その対立遺伝子を有する患者が重症慢性関節リウマチを患う確率が高いという指標を提供する遺伝子型決定アッセイを提供する。逆に、本発明は、高レベルのIFN- γ 産生に関連するIFN- γ 対立遺伝子を同定し、そのような対立遺伝子を有する患者が重症慢性関節リウマチを患う確率が低いという指標を提供する遺伝子型決定アッセイを提供する。

【0016】

本発明は、医療従事者にRAを患っていると診断された患者などの関節炎のリスクがあると判定された患者に利用することができる。患者は、例えば、性別、年齢、社会経済的因子または家族歴などの疫学判定基準に基づいて関節炎のリスクがあると特定することができ、それに基づいて、その患者が他の人より関節炎を患う確率が高いというアセスメントをすることができる。医師は典型的には、症候群、治療歴、物理的試験、X線、およびリウマチ因子または確立されたHLAなどの遺伝子マーカーに対する試験の全体パターンに基づいてRAを診断する。RAのリスクのある患者の典型的な症候群には、一般的な疲労、痛み (soreness)、硬直とうずき (aching) が挙げられ、典型的には痛みと腫れが、身体の両側の同じ関節に起こり、かつ手または足、特に手首および多くの手関節において始まる。他の診断徴候には、リウマチ小結節が挙げられる。関節炎のリスクのある患者の診断はまた、次のような徴候：関節侵食、赤血球沈降速度の増加、C反応性タンパク質、多関節疾患、関節変形、軟骨下侵食の放射線医学的証拠、関節外関節炎またはリウマチ因子の存在などを特定することを含んでもよい。患者は、DMARD (疾患修飾抗リウマチ薬物) またはその他の関節炎治療薬に対する不十分な応答などの、1以上の関節炎治療に対する不十分な応答によって、リスクがあると同定することができる。

【0017】

一態様においては、本発明はインターフェロン γ 遺伝子を有する患者を治療する方法であって、患者を検査してインターフェロン γ 遺伝子の多型を解析し；そして、該患者が関節炎のリスクのある多型である場合、患者に関節炎についての治療を行うことを含む、上記方法を提供する。インターフェロン γ 遺伝子の多型はその第1イントロン内のジヌクレオチド反復領域長にあってもよい。本発明の

リスクの高い対立遺伝子の存在を、例えば、関節炎またはより重症の型の関節炎に対する罹患性の指標であると考えてもよい。

【0018】

本発明の様々な態様に従って、患者を関節炎について治療することができる。例えば、患者のRAに関する治療は、患者に有効量の医薬品を投与することであってもよい。医薬品の有効量とは、治療に有効な量または予防に有効な量であってもよい。「治療に有効な量」は、RAの兆しおよび徴候を軽減しかつRAの構造的損傷を遅延させるなどの所望の治療結果を達成するための、用量および必要な時間の有効な量を意味する。治療薬の治療に有効な量は、個人の病状、年齢、性別、および体重などの因子、ならびに個人に所望の応答を誘発する治療薬の能力に変動し得る。投与計画は、最適な治療応答を与えるように調整することができる。治療に有効な量はまた、典型的には、治療上有益な効果が治療薬の有毒もしくは有害な影響を上回る量でもある。「予防に有効な量」は、RAの兆しおよび徴候を軽減しかつRAの構造的損傷を遅延させるなどの所望の予防結果を達成するために、必要な時間に渡って有効な用量を意味する。予防の用量は疾患に先立ってまたはその初期段階に使用してもよく、そして予防に有効な量は治療に有効な量より多い場合も少ない場合もある。

【0019】

関節炎を治療するための医薬品は、例えば、軽症から重症にわたる活性な慢性関節リウマチの患者を治療するためのFDA認可薬であり、RAの兆しおよび徴候を軽減しかつRAの構造的損傷を遅延させる薬物などが挙げられる。そのような薬物は、例えば：非ステロイド抗炎症薬（NSAID）、セレコキシブ（celecoxib）（Celebrex）もしくはロフェコキシブ（rofecoxib）（Vioxx）などのCOX-2インヒビター、サリチル酸塩、糖質コルチコイド、インフリキシマブ（infliximab）（Remicade）などのTNFインヒビター、レフルノミド（leflunomide）（Arava）などのDMARD、シクロスポリン、ミコフェノラートモフェチル（mycophenolate mofetil）（Cellcept）、抗TNF抗体（米国特許第5,698,195号に記載）、メトトレキサート、またはTNF受容体の可溶化型（Immunex Corp. of Seattle, Washington, USA が市販するENBREL（TM）など）もしくはIL-1受容体の可溶性型などが挙げられる

。

【0020】

一態様においては、本発明はIFN- 核酸の遺伝子治療における利用に関する。IFN- 核酸を治療上許容される遺伝子治療用ベクターにより送達して、患者のIFN- 対立遺伝子プロフィールを改変することができる。例えば、遺伝子治療を利用して、リスクの高いIFN- 対立遺伝子をリスクの低いIFN- 対立遺伝子で置き換えることもできる。

【0021】

遺伝子治療用ベクターは、例えば、アデノ随伴ベクター(AAV)であってもよい。そのようなベクターは、例えば：5'逆方向末端反復配列(ITR)；筋特異的エンハンサーを含むCMVエンハンサー-プロモーターなどのプロモーター；イントロン；3'-非翻訳領域(3'-UTR)；SV40ポリアデニル化シグナルなどのポリアデニル化シグナル：および3'-ITRを含んでいてもよい。遺伝子治療用ベクターの投与量は、治療される被験者の症状とサイズならびに治療薬の剤形、治療の頻度および投与経路に大きく依存しうる。用量、剤形、および頻度を含む継続的治療計画は、最初の応答と臨床的判断を手引きとすることができる。組織の間質空間中へ注入する非経口経路が好ましいが、特定の投与においては、エアロゾル製剤の吸入などの他の非経口経路を要する場合がある。数例の処方においては、水性担体中に遺伝子および遺伝子送達系を含む製剤を組織に適当な量だけ注入する。組織標的が特定の組織(例えば筋または肝組織)であっても、または複数組織の組合せ(例えば筋および肝組織)であってもよい。組織標的の例は、肝、骨格筋、心筋、脂肪蓄積組織、腎、肺、血管内皮、上皮の細胞および/または造血細胞が挙げられる。本発明の核酸は、DNAの直接注入、受容体を介するDNA取込み、ウイルスを介するトランスフェクションもしくは非ウイルストランスフェクションおよび脂質に基づくトランスフェクションなどの方法を使って細胞にin vivoで送達してもよく、これらの方法は全て遺伝子治療用ベクターを利用してよい。直接注入はDNAをそのまま細胞内にin vivoで導入するのに利用されている(例えば、Ac sadiら, (1991) Nature 332:815-818; Wolffら, (1990) Science 247:1465-1468を参照)。DNAを細胞内にin vivoで注入するための送達装置(例えば「遺伝子銃

」) を使ってもよい。そのような装置は市販(例えば、BioRadから)されている。そのままのDNAはまた、DNAをポリリシンなどのカチオンと複合体化し、細胞表面受容体に対するリガンドと結合させることによって細胞内に導入してもよい(例えば、Wu,G.およびWu,C.H. (1988) J. Biol. Chem. 263:14621; Wilsonら, (1992) J. Biol. Chem. 267:963-967; ならびに米国特許第5,166,320号を参照)。DNA-リガンド複合体の受容体への結合は、受容体を介するエンドサイトーシスによるDNAの取込みを容易にする。エンドソームを破壊してそれにより物質を細胞質中に放出するアデノウイルスカプシドと連結したDNA-リガンド複合体を利用して、細胞内リソソームによる複合体の分解を回避することができる(例えば、Curielら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850; Cristianoら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126)。遺伝子治療用ベクターとして利用する欠損レトロウイルスはよく特性解析されている(総説には、Miller,A.D. (1990) Blood 76:271を参照)。組換えレトロウイルスを作製し、そのウイルスを用いて細胞をin vitroまたはin vivoで感染させる手法は、「分子生物学の最近の протокол (Current Protocols in Molecular Biology)」, Ausubel,F.M.ら(編), Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14およびその他の標準的実験マニュアルに記載されている。適当なレトロウイルスの例はpLJ、pZIP、pWEおよびpEMが挙げられ、これらは当技術分野では公知である。適当なパッケージングウイルス系の例はp i.Crip、p i.Cre、p i.2およびp i.Amが挙げられる。レトロウイルスは、様々な遺伝子を上皮細胞、内皮細胞、リンパ球、筋芽細胞、肝細胞、骨髄細胞などの多くの異なる細胞型中にin vitroおよび/またはin vivoで導入するために利用されている(例えば、Eglitisら, (1985) Science 230:1395-1398; DanosおよびMulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilsonら, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentanoら, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huberら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferryら, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhuryら, (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechemら, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kayら, (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Daiら, (1992) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 89:10892-10895 ; Hwuら, (1993) J. Immunol. 150:4104-4115 ; 米国特許第4,868,116号 ; 米国特許第4,980,286号 ; PCT出願WO 89/07136 ; PCT出願WO 89/02468 ; PCT出願WO 89/05345 ; およびPCT出願WO 92/07573)を参照)。

【0022】

遺伝子治療用ベクターとして利用するために、アデノウイルスのゲノムを遺伝子操作してIFN-核酸を含むが正常な溶解性ウイルスの生活環における複製能力が不活性化されるようにしてもよい。例えば、Berknerら, (1988) BioTechniques 6:616 ; Rosenfeldら, (1991) Science 252:431-434 ; およびRosenfeldら, (1992) Cell 68:143-155を参照のこと。アデノウイルス株Ad5型dl324または他のアデノウイルス株(例えばAd2、Ad3、Ad7など)が当技術分野では公知である。組換えアデノウイルスは、有効な遺伝子送達ビヒクルであるために細胞分裂を必要としない点が有利であって、広範囲の細胞型、例えば気道上皮(Rosenfeldら, (1992)、前掲)、内皮細胞(Lemarchandら, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6482-6486)、肝細胞(HerzおよびGerard (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816) および筋細胞(Quantinら, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584)に感染させるのに利用することができる。

【0023】

アデノ随伴ウイルス(AAV)を、遺伝子治療目的のDNAを送達する遺伝子治療用ベクターとして利用することができる。AAVは天然の欠損ウイルスであって、効率的な複製および増殖性生活環をするためのヘルパーウイルスとしてアデノウイルスまたはヘルペスウイルスなどの他のウイルスを必要とする(Muzyczkaら, Curr. Topics in Micro. and Immunol. (1992) 158:97-129)。AAVを利用してDNAを非分裂細胞に組み込むことができる(例えば、Flotteら, (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356 ; Samulskiら, (1989) J. Virol. 63:3822-3828 ; およびMcLaughlinら, (1989) J. Virol. 62:1963-1973を参照)。Tratschinら, (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260に記載されているようなAAVベクターを利用してDNAを細胞に導入してもよい(例えば、Hermonatら, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 ; Tratschinら, (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 ; Wondisfordら, (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39 ; Tratschinら,

(1984) J. Virol. 51:611-619 ; およびFlotteら, (1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790を参照)。レンチウイルス遺伝子治療用ベクターも本発明の使用に適応可能である。

【0024】

遺伝子治療の一般的な方法は当業界で周知である。例えば、Andersonらによる米国特許第5,399,346号（本明細書に参照により組み入れる）を参照。遺伝子材料を送達するための生体適合性カプセルは、BaetgeらによるPCT出願W095/05452に記載されている。造血細胞への遺伝子導入の方法もまた既に報じられている（Clapp, D.W.ら, Blood 78:1132-1139 (1991) ; Anderson, Science 288:627-9 (2000) ; およびCavazzana-Calvoら, Science 288:669-72 (2000)を参照、これらは全て本明細書に参照により組み入れられる）。

【0025】

実施例1

重症慢性関節リウマチの成人白人患者48人と軽症慢性関節リウマチの患者39人を、ある病院の患者集団から逐次的に選択した。関節炎の徴候をもたない患者50人を対照比較群として選択した。重症慢性関節リウマチの患者の年齢は 58 ± 12 歳で、女性が多く、かつ平均病歴は 19 ± 12 年であった。これらの患者の全ては、関節変形および軟骨下侵食の放射線医学的所見を伴う臨床的に重症の多関節疾患を有していた。これらの患者の75%は、乾燥症候群と異なる関節外症状を有していた。重症慢性関節リウマチの患者の87%はリウマチ因子陽性であった。かかる全ての患者は、通常の疾患修飾抗リウマチ薬（DMRDS）を用いた治療に対して好ましい応答はなく、平均26ヶ月間のシクロスポリン治療が継続されていた。

【0026】

軽症疾患の患者の年齢は 61 ± 13 年で、女性が多く、かつ平均病歴は 12 ± 7 年であった。これらの患者の全ては臨床的に軽症の疾患を有し、平均90ヶ月間、抗マラリア薬（antimalarial）だけで管理され、以前もしくは現在、DMRDSの使用はなかった。これらの患者の26%だけが関節変形を有し、かつ36%が乾燥症候群と異なる関節外症状を有していた。かかる患者の34%がリウマチ因子陽性であった。

【0027】

末梢血を患者および対照被験者から採取し、ゲノムDNAをプロテイナーゼKで消化することにより抽出し、塩析した。IFN- (12q24.12) ミクロサテライト多型の分子型決定を、PCRに続いてDNAシーケンサーと遺伝子解析ソフトウェアを用いて実施した。遺伝子座またはグループ特異的な増幅を、次の5'および3'オリゴヌクレオチド増幅プライマーを用いて実施した：

5'6FAMAG ACA TTC ACA ATT GAT TTT ATT CTT AC3'

5'CCT TCC TGT AGG GTA TTA TTA TAC G3'。

【0028】

特異性を増強するためにアニーリング温度の高いプライマーを設計した。両方のプライマーを、Perkin-Elmer-ABI-PRISMから取得し、フォワードプライマーの5'末端に蛍光標識を付した。

【0029】

ゲノムDNA (100ng) を、それぞれのオリゴヌクレオチド50pmol、各dNTP100uM、MgCl₂1.5mMおよびTAQポリメラーゼ0.8uを用いて、Perkin Elmer PCRサイクラーで増幅させた。サイクリング条件は、95 5分間の高温で開始し、続いて95 45秒間 (変性) と62 1分間 (アニーリングと伸長) で32サイクル、そして、最終サイクルは62 5分間の最終伸長とした。正の増幅を検出するために増幅産物を1.5%アガロースゲル上で泳動し、次いで377DNAシーケンサー (ABI-PRISM) 上の長距離泳動用ゲルで泳動し、データを377コレクションソフトウェアを用いて回収し、Genescan 2.0.2ソフトウェアと、サイズ標準としてGenescan-500 ROXを用いてサイズ分析を実施した (ABI-PRISM)。

【0030】

表1に示したように、患者および対照中に、120bp~130bp長の範囲に、全部で6種の対立遺伝子を確認した。

【0031】

【表1】

表1: IFN- γ 遺伝子の第1イントロン内のそれぞれの対立遺伝子を発現する被験者の比率。対照 (n=50)、重症RAの患者 (n=48)、軽症RAの患者 (n=39)。

IFN- γ 対立遺伝子 (サイズ)	対照		重症RA		軽症RA			OR ^b	p ^b
	%	%	OR ^a	p ^a	%	OR ^a	p ^a		
A2 (130bp)	0	6	7.77	NS	0	-	-	6.08	NS
A3 (128bp)	16	15	0.90	NS	15	0.95	NS	0.94	NS
A4 (126bp)	12	73	19.74	p<0.0001	21	1.89	NS	10.43	p<0.0001
A5 (124bp)	68	77	1.58	NS	67	0.94	NS	1.68	NS
A6 (122bp)	68	6	0.019	p<0.0001	64	0.50	NS	0.037	p<0.0001
A7 (120bp)	0	0	-	-	3	3.93	NS	0.27	NS

^a 対照と比較した重症または軽症RA

^b 軽症RAと比較した重症

NS: 統計的に有意でない

OR: オッズ比

正常な被験者における多型の頻度は、130bpおよび120bpの対立遺伝子における0%から、122bpの対立遺伝子における68%までの範囲に及んでいた。遺伝子型頻度は、Hardy-Weinberg平衡による期待値から逸脱しなかった。本実施例で同定した対立遺伝子は、Ruiz-Linaresが初めて報じた122-134bpの範囲にある対立遺伝子 (Ruiz-Linares, 1994 Hum. Mol. Genet. 2(9):1508) と長さが密接に対応するようである。これらの対立遺伝子は、例えば、被験者の起源の人種および特性解析の手法に依存して変動しうる (例えば、Awata, T.ら, 1994 Diabetologia 37:1159)。幾つかの集団では、128bpの中間体多型を含むCA反復配列を少なくとも11-15個包含する6-8個の対立遺伝子がこの部位に存在しうる。

【0032】

本実施例に示したように、重症慢性関節リウマチの患者は2つの対立遺伝子の頻度が有意に異なる。126bpの対立遺伝子は、重症慢性関節リウマチの患者に73%存在し、軽症慢性関節リウマチの患者の21% (OR:10.43, p<0.0001) および正常の被験者の12% (OR:19.74, p<0.0001) と比較される。対照的に、122bpの対立遺伝子は、重症慢性関節リウマチの患者にわずか6%存在し、軽症慢性関節リウマチの患者の64% (OR:0.037, p<0.0001) および正常の被験者の68% (OR:0.019, p<0.0001) と比較された。他のマイクロサテライト多型の頻度の有意差は、個体の3グループの間には認められなかった。

【0033】

表2は、126bpの対立遺伝子と122bpの対立遺伝子の発現によって4つのカテゴリ

ーに被験者をグループ別けした結果を示す。重症慢性関節リウマチの患者のほとんど4分の3 (73%) は126bpの対立遺伝子を発現し122bpの対立遺伝子を発現しておらず、軽症慢性関節リウマチの患者の10% (OR:23.56、 $p<0.0001$) および正常な被験者の4% (OR:60.62、 $p<0.0001$) と比較される。対照的に、重症慢性関節リウマチの患者のわずか6%のみが122bpの対立遺伝子を発現して126bpの対立遺伝子を発現しておらず、軽症慢性関節リウマチの患者の54% (OR:0.057、 $p<0.0001$) および正常な被験者の70% (OR:0.029、 $p<0.0001$) と比較される。重症疾患のいずれの患者も126bpと122bpの対立遺伝子を共通して発現せず、軽症の疾患の患者の10% (OR:0.081、 $p=NS$)、および正常な被験者の8% (OR:0.11、 $p=NS$) が共通して発現しているのと比較される。

【0034】

【表2】

表2: IFN- γ 遺伝子の第1イントロン中に126bpの対立遺伝子を発現している、122bpの対立遺伝子を発現している、両方の対立遺伝子を発現している、またはいずれも発現していない被験者の比率。対照 (n=50)、重症RAの患者 (n=48)、軽症RAの患者 (n=39)。

カテゴリー	対照		重症RA		軽症RA			OR ^b	p ^b
	%	%	OR ^a	p ^a	%	OR ^a	p ^a		
126bpの対立遺伝子	4	73	60.62	<0.0001	10	2.74	NS	23.56	<0.0001
122bpの対立遺伝子	70	6	0.029	<0.0001	54	0.50	NS	0.057	<0.0001
両方	8	0	0.11	NS	10	1.31	NS	0.081	NS
いずれも発現せず	18	21	1.20	NS	26	1.57	NS	0.76	NS

^a 対照と比較して

^b 軽症と比較した重症

NS: 統計的に有意でない

OR: オッズ比

【表3】

表3: HLA-DR、IFN-gおよび臨床測定値の重症疾患のオッズに対する影響についてのロジスチック回帰の結果。オッズ比および χ^2 平方統計学は限界的である(すなわち、全ての他の因子に対して調節されている)。ここで、オッズ比は、潜在的な軽症および重症RAの罹患率よりも、観察した患者の分布を反映する。対照(n=50)、重症RAの患者(n=48)、軽症RAの患者(n=39)。

因子	d. f.	重症 対 対照 χ^2	重症 対 軽症 χ^2	重症 対 軽症 χ^2
HLA-DR	3	11.23*	13.94**	10.66*
IFN- γ	3	65.88**	43.91***	28.09***
RF	2	-	-	9.33**
年齢	1	-	-	0.46
期間	1	-	-	6.57*
性別	1	-	-	3.84**

因子	影響	O. R.	O. R.	O. R.
HLA-DR	H 対 L	23.95*	14.55	48.27
	B 対 L	7.23	0.43	0.63
	N 対 L	2.10	2.15	2.52
IFN- γ	H 対 L	327.09***	107.57**	278.02**
	B 対 L	0.03	0.00	0.00
	N 対 L	19.26***	5.13*	9.95
RF	NA 対 負			2.10
	正 対 負			25.07*
年齢	10年			0.77
期間	10年			4.71*
性別	m 対 f			11.16

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ レベル; *** $p < 0.001$ レベル。

HLA DR: H=QKRRR/QRRAA, L=DERAA, B=両方、N=いずれも発現せず。

IFN-g: H=126bp対立遺伝子; L=122bp対立遺伝子; B=両方、N=いずれも発現せず。

これらの顕著な結果を、同じ臨床および研究室判定基準により選択した次の別個の重症RAの12患者のグループについて確認した。これらの患者の75%は126bpの対立遺伝子をそして8%は122bpの対立遺伝子を発現した; 重症RAの全ての患者と一緒にしても(n=60)、患者頻度は表1および2に示したのと変わらなかった。

【0035】

ロジスチック回帰を用いてIFN- 多型、HLA DR-B1遺伝子型(WaylandおよびGorony, 1997, J. Mol. Med. 75:772)およびその他の予後因子の影響を検証した。結果を表3に示す。IFN- 126bpの対立遺伝子の遺伝は、HLA-DRB1多型を考慮した後も重症RAの存在と強く関連しているが、IFN- 122bp多型の所持は重症の疾患の存在と高度に負に関連している。IFN- 対立遺伝子と重症RAとの関連性は、最も強く関連するMHCクラスII対立遺伝子または性別、発症年齢、病歴、またはリウマチ因子陽性などの他の臨床予測因子について認められるよりかなり高い。

【0036】

本発明の一態様に従って、IFN- 対立遺伝子の存在の診断試験を、徴候の無い個体について実施し、その個体の慢性関節リウマチに対する罹患性を評価することができる。上記試験を利用して、関節炎の徴候を示す個体の該疾患の重症形態への進行の可能性を評価してもよい。これらの本発明の態様に従って、表3で説明したように、126bpの対立遺伝子の存在は、関節炎の該疾患の重症型への進行の罹患性の増加を含む慢性関節リウマチの罹患性の増加の兆しであると考えてもよい。

【0037】

複数の実施形態においては、IFN- 対立遺伝子がホモ接合性であるかまたはヘテロ接合性であるかを決定するために診断試験を利用してよく、例えば、例示の実施形態においては、重症慢性関節リウマチの患者の10%(6/60)は126bpの対立遺伝子はホモ接合性であり、軽症疾患の患者の3%(1/39)および正常な対照の0%(0/50)と比較される。対照的に、重症慢性関節リウマチの患者60人のいずれも122bpの対立遺伝子はホモ接合性でなく、軽症疾患の患者の8%(3/39)および正常な対照の14%(7/50)と比較される。

【0038】

実施例2

図1、2および3に示したように、患者87人を、HLA-DRB1対立遺伝子に基づき、位置71のアミノ酸の電荷、すなわち正(「+」、すなわち、リシン(K)、アルギニン(R)もしくはヒスチジン(H))、負(「-」、すなわち、グルタミン酸(E)もしくはアルパラギン酸(D))または中性(「0」、残りのアミノ酸)に基づいて、3グループに別けた。図2は、重症RAの患者の両方の対立遺伝子に対するHLA-DRB1 70~74位のアミノ酸配列を示す。図3は、軽症RAの患者の両方の対立遺伝子に対するHLA-DRB1 70~74位のアミノ酸配列を示す。図1のチャートにおいては、個体をそのHLA-DRB1配列に基づいて次の3グループに別けた：

- i) A+/+の個体は71位にて正電荷アミノ酸についてホモ接合性である；
- ii) A+/0の個体はヘテロ接合性であって、正電荷アミノ酸の対立遺伝子および中性アミノ酸の対立遺伝子を有する；および

iii) A-/*の個体は71位にて少なくとも1コピーの負電荷アミノ酸の対立遺伝子を有する。

【0039】

図1のチャートのIFN- 対立遺伝子については、「+」はリスクの高い対立遺伝子を示すが、「-」はリスクの低い対立遺伝子を示す。例えば、リスクの高い対立遺伝子についてホモ接合性である個体は「+/+」と記したツリーの枝にグループ分けされる。

【0040】

リスク分析チャートは、例えば、HLA-DRB1の位置71にて正電荷アミノ酸のホモ接合性でかつリスクの高いIFN対立遺伝子のホモ接合性である患者は、26事例のうち24事例において重症RAを患うが、少なくとも1つの負電荷アミノ酸のHLA-DRB1対立遺伝子（「-/*」で示す）を有し、リスクの低いIFN対立遺伝子（「-/-」）についてホモ接合性である患者は、7事例のうち7事例において軽症RAであることを示す。

【0041】

本発明の様々な実施形態を本明細書に開示したが、多くの改善と改変が本発明の範囲内で当業者の通常的一般知識によって行われうる。そのような改変は、実質的に同じ方法で同じ結果を達成するための、本発明のいずれかの態様に対する公知の同一物の置換を含む。数値の範囲は、その範囲を規定する数字を含む。請求項において、用語「含む」は広い目的の用語として使われ、実質的に、句「含むが限定されるものでない」と同一である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はリスク分析ツリーであって、RAの重症度（重症または軽症の疾患）と患者のIFN-（「IFN」と記した矢印により示す）およびHLA-DRB1（「HLA」と記した矢印により示す）遺伝子型との間の関連性を表す。

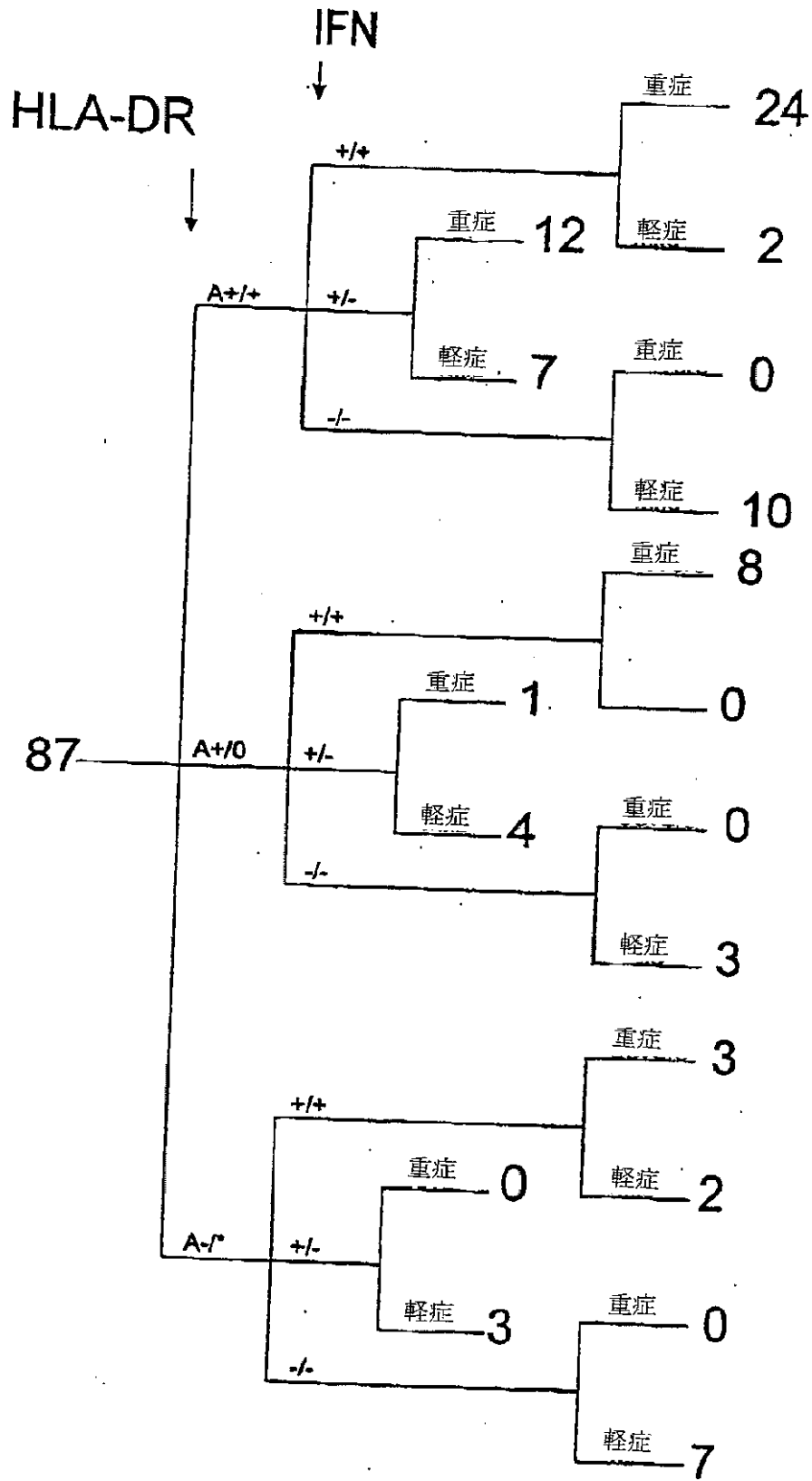
【図2】

図2は重症RAの患者の両対立遺伝子に対するHLA-DRB1 70～74位のアミノ酸配列を表す。

【図3】

図3は軽症RAの患者の両対立遺伝子に対するHLA-DRB1 70～74位のアミノ酸配列を表す。

【图1】



【図2】

コード No.	対立遺伝子1					対立遺伝子2				
	70	71	72	73	74	70	71	72	73	74
01S	Q	K	R	A	A	Q	R	R	A	A
02S	Q	K	R	G	R	Q	K	R	A	A
03S	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
04S	Q	K	R	A	A	Q	K	R	A	A
06S	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
07S	Q	K	R	G	R	D	E	R	A	A
08S	Q	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
09S	D	E	R	A	A	Q	R	R	A	A
11S	D	R	R	A	A	Q	K	R	A	A
12S	Q	A	R	A	A	Q	R	R	A	A
13S	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
15S	Q	K	R	A	A	Q	R	R	A	E
16S	Q	R	R	A	A	Q	A	R	A	A
17S	Q	R	R	A	A	Q	R	R	A	A
18S	Q	R	R	A	A	D	R	R	A	A
19S	Q	K	R	A	A	Q	R	R	A	A
20S	Q	R	R	A	A	D	R	R	A	L
21S	Q	K	R	A	A	R	R	R	A	A
22S	Q	R	R	A	A	Q	K	R	A	A
23S	Q	K	R	A	A	D	R	R	A	A
24S	Q	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
25S	Q	R	R	A	A	Q	R	R	A	A
26S	Q	A	R	A	A	Q	R	R	A	A
27S	Q	K	R	A	A	Q	K	R	A	A
28S	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
29S	Q	K	R	A	A	Q	K	R	A	A
30S	Q	R	R	A	A	Q	A	R	A	A
31S	Q	R	R	A	A	Q	A	R	A	A
32S	Q	A	R	A	A	Q	K	R	G	R
33S	Q	K	R	G	R	Q	R	R	A	A
34S	Q	K	R	A	A	R	R	R	A	E
36S	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
37S	Q	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
39S	Q	K	R	G	R	Q	R	R	A	A
40S	D	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
41S	Q	A	R	A	A	Q	K	R	A	A
42S	D	R	R	A	A	Q	R	R	A	A
43S	Q	K	R	G	R	Q	R	R	A	A
44S	Q	A	R	A	A	Q	K	R	A	A
46S	Q	K	R	A	A	Q	R	R	A	A
49S	Q	K	R	G	R	D	R	R	A	A
50S	Q	R	R	A	A	Q	K	R	A	A
51S	D	E	R	A	A	Q	K	R	A	A
54S	Q	K	R	G	R	Q	K	R	A	A
55S	Q	K	R	A	A	Q	K	R	G	R
56S	Q	K	R	A	A	Q	K	R	A	A
57S	Q	A	R	A	A	D	R	R	A	A
58S	Q	K	R	G	R	D	R	R	G	Q

【図3】

コード No.	対立遺伝子 1					対立遺伝子 2				
	70	71	72	73	74	70	71	72	73	74
01M	D	K	R	A	A	Q	R	R	A	A
02M	D	R	R	A	L	Q	K	R	A	A
03M	Q	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
04M	Q	K	R	G	R	D	R	R	G	Q
05M	Q	K	R	G	R	D	E	R	A	A
07M	Q	A	R	A	A	R	R	R	A	E
08M	Q	A	R	A	A	Q	A	R	A	A
09M	D	E	R	A	A	R	R	R	A	A
10M	Q	R	R	A	A	Q	R	R	A	A
11M	Q	K	R	G	R	Q	K	R	A	A
12M	D	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
13M	Q	A	R	A	A	D	E	R	A	A
14M	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
15M	D	E	R	A	A	Q	K	R	A	A
17M	Q	A	R	A	A	Q	K	R	A	A
18M	Q	A	R	A	A	Q	K	R	G	R
19M	Q	R	R	A	A	Q	R	R	A	A
20M	Q	R	R	A	A	D	E	R	A	A
21M	D	E	R	A	A	D	R	R	G	Q
23M	Q	K	R	G	R	D	E	R	A	A
24M	Q	R	R	A	A	D	E	R	A	A
25M	Q	A	R	A	A	D	R	R	A	A
26M	Q	K	R	A	A	Q	K	R	A	A
27M	D	R	R	A	L	D	E	R	A	A
28M	Q	K	R	A	A	R	R	R	A	A
30M	Q	K	R	A	A	Q	R	R	A	A
31M	D	R	R	A	L	D	R	R	A	L
33M	Q	R	R	A	A	D	R	R	G	Q
34M	Q	K	R	G	R	D	E	R	A	A
36M	Q	A	R	A	A	D	E	R	A	A
38M	D	E	R	A	A	D	R	R	G	Q
39M	R	R	R	A	E	Q	R	R	A	A
40M	Q	R	R	A	A	Q	A	R	A	A
41M	Q	R	R	A	A	R	R	R	A	E
44M	D	R	R	A	A	Q	K	R	G	R
45M	Q	R	R	A	A	Q	A	R	A	A
46M	Q	K	R	G	R	D	R	R	A	A
47M	Q	K	R	A	A	D	R	R	G	Q
50M	D	R	R	A	A	Q	A	R	A	A

【手続補正書】**【提出日】**平成14年5月28日(2002.5.28)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】** 以下の：

a) インターフェロン 遺伝子を有している関節炎のリスクのある患者を特定し；

b) 該患者を検査してインターフェロン 遺伝子内の多型を解析すること；
を含む、診断方法。

【請求項2】 上記多型が第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 上記長さの異なるジヌクレオチド反復領域の少なくとも一部は、インターフェロン 遺伝子のヌクレオチド1349～1373位内に位置している、請求項2記載の方法。

【請求項4】 上記多型の解析により、126bpの対立遺伝子と122bpの対立遺伝子からなる群より選択される対立遺伝子を同定することが可能である、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】 上記多型の解析により、インターフェロン 遺伝子の第1イントロンの一部分に様々な数のCA反復配列を有する対立遺伝子を解明することが可能である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 関節炎が慢性関節リウマチである、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 患者が白色人種である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 関節炎のリスクのある患者を特定するステップが、慢性関節

リウマチを患っている患者を診断することを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 関節炎のリスクのある患者を特定するステップが、関節の侵食、赤血球沈降速度の上昇、C-反応性タンパク質、多関節疾患、関節の変形、肋軟骨下侵食の放射線学的証拠、関節外の関節炎、およびリウマチ因子の存在からなる群より選択される徴候のある患者を診断することを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】 上記多型の解析が、長さの異なるジヌクレオチド反復領域を増幅させることを含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 関節炎のリスクのある患者を診断するための、インターフェロン 遺伝子の対立遺伝子の使用。

【請求項12】 対立遺伝子が、インターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域を含む対立遺伝子からなる群より選択されたものである、請求項11記載の対立遺伝子の使用。

【請求項13】 長さの異なるジヌクレオチド反復領域が、様々な数のCA反復配列を含む、請求項12記載の対立遺伝子の使用。

【請求項14】 対立遺伝子が、126bpの対立遺伝子および122bpの対立遺伝子からなる群より選択される、請求項11、12または13記載の対立遺伝子の使用。

【請求項15】 患者を検査してインターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の多型を解析することを含む、インターフェロン 遺伝子を有する患者の関節炎への罹患性を診断する方法。

【請求項16】 患者を検査してインターフェロン 遺伝子の多型を解析し、そして、該患者が関節炎のリスクがあること示唆する多型である場合には該患者に関節炎に対する治療を行うことを含む、インターフェロン 遺伝子を有する患者を治療する方法。

【請求項17】 上記多型が第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在する、請求項16記載の方法。

【請求項18】 患者を検査してHLA遺伝子内の多型を解析することをさら

に含む、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 HLA遺伝子がHLA-DRB1遺伝子座を含んでいる、請求項18記載の方法。

【請求項20】 患者を検査してHLAタンパク質の配列の一部を解析することをさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項21】 HLAタンパク質がクラスIIタンパク質である、請求項20記載の方法。

【請求項22】 HLAタンパク質がHLA-DRB1タンパク質である、請求項20記載の方法。

【請求項23】 上記配列の一部が71位のアミノ酸である、請求項22記載の方法。

【請求項24】 以下の：

- a) インターフェロン 遺伝子を有している関節炎のリスクのある患者を特定し；
- b) 該患者から組織サンプルを得て；
- c) 該組織サンプルを検査してインターフェロン 遺伝子内の多型を解析すること；

を含む、診断方法。

【請求項25】 上記多型が第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域内に存在する、請求項24記載の方法。

【請求項26】 上記長さの異なるジヌクレオチド反復領域の少なくとも一部は、インターフェロン 遺伝子のヌクレオチド1349～1373位内に位置している、請求項25記載の方法。

【請求項27】 上記多型の解析により、126bpの対立遺伝子と122bpの対立遺伝子からなる群より選択される対立遺伝子を同定することが可能である、請求項24、25または26に記載の方法。

【請求項28】 上記多型の解析により、インターフェロン 遺伝子の第1イントロンの一部分に様々な数のCA反復配列を有する対立遺伝子を解明することが可能である、請求項24～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】 関節炎が慢性関節リウマチである、請求項24～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】 患者が白色人種である、請求項24～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】 関節炎のリスクのある患者を特定するステップが、慢性関節リウマチを患っている患者を診断することを含む、請求項24～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】 関節炎のリスクのある患者を特定するステップが、関節の侵食、赤血球沈降速度の上昇、C-反応性タンパク質、多関節疾患、関節の変形、肋軟骨下侵食の放射線学的証拠、関節外の関節炎、およびリウマチ因子の存在からなる群より選択される徴候のある患者を診断することを含む、請求項24～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】 上記多型の解析が、長さの異なるジヌクレオチド反復領域を増幅させることを含む、請求項24～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】 患者から得た組織サンプルを検査して関節炎のリスクのある該患者を診断するための、インターフェロン 遺伝子の対立遺伝子の使用。

【請求項35】 対立遺伝子が、インターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の長さの異なるジヌクレオチド反復領域を含む対立遺伝子からなる群より選択されたものである、請求項34記載の対立遺伝子の使用。

【請求項36】 長さの異なるジヌクレオチド反復領域が、様々な数のCA反復配列を含む、請求項35記載の対立遺伝子の使用。

【請求項37】 対立遺伝子が、126bpの対立遺伝子および122bpの対立遺伝子からなる群より選択される、請求項34、35または36記載の対立遺伝子の使用。

【請求項38】 患者から得た組織サンプルを検査してインターフェロン 遺伝子の第1イントロン内の多型を解析することを含む、インターフェロン 遺伝子を有する患者の関節炎への罹患性を診断する方法。

【請求項39】 a) 126bpの対立遺伝子が配列番号3の14個のCA反復配列を有しており、b) 122bpの対立遺伝子が配列番号1の12個のCA反復配列を有し

ている、請求項27記載の方法。

【請求項40】 a) 126bpの対立遺伝子が配列番号3の14個のCA反復配列を有しており、b) 122bpの対立遺伝子が配列番号1の12個のCA反復配列を有している、請求項37記載の対立遺伝子の使用。

【請求項41】 c) 126bpの対立遺伝子が配列番号3の14個のCA反復配列を有しており、d) 122bpの対立遺伝子が配列番号1の12個のCA反復配列を有している、請求項4記載の方法。

【請求項42】 c) 126bpの対立遺伝子が配列番号3の14個のCA反復配列を有しており、d) 122bpの対立遺伝子が配列番号1の12個のCA反復配列を有している、請求項14記載の対立遺伝子の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/CA 00/01043
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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KHANI-HANJANI, A. ET AL.: "Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis" LANCET, vol. 356, 2 September 2000 (2000-09-02), page 820-825 XP002172553 page 823, right-hand column, paragraph 2	1-23
A	RUIZ-LINARES, A.: "Dinucleotide repeat polymorphism in the interferon-gamma (INFG) gene" HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 2, no. 9, 1993, page 1508 XP002172554 the whole document	1-23
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 July 2001		Date of mailing of the international search report 06/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mata Vicente, T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CA 00/01043

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOLKENTIN, J. ET AL.: "Molecular analysis of HLA-DRbeta and DQbeta polymorphism in Chinese with rheumatoid arthritis" ANNALS RHEUM. DIS., vol. 52, 1993, pages 610-612, XP001010295 page 610, right-hand column, paragraph 3 -----	18-23

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

As far as an "in vivo" method is concerned, claims 1-15 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body and the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 16-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 2,303,504
 (32)優先日 平成12年4月10日(2000.4.10)
 (33)優先権主張国 カナダ(CA)
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
- (72)発明者 カニ - ハンジャニ, アバス
 カナダ国 ブイ5ゼット 1エム9 プリ
 ティッシュ コロンビア,バンクーバー,
 ウェスト 12ティーエイチ アヴェニュー
 855,バンクーバー ジェネラル ホス
 ピタル,イムノロジー ラボラトリー
- (72)発明者 ホアー,デービッド
 カナダ国 ブイ5ゼット 1エム9 プリ
 ティッシュ コロンビア,バンクーバー,
 ウェスト 12ティーエイチ アヴェニュー
 855,バンクーバー ジェネラル ホス
 ピタル,イムノロジー ラボラトリー
- Fターム(参考) 4B024 AA11 CA03 CA20 HA11
 4B063 QA12 QA19 QQ03 QQ47 QQ57
 QQ79 QR62 QR66 QS34 QS36

专利名称(译)	自身免疫性疾病的诊断和治疗方法		
公开(公告)号	JP2003508081A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2001521775	申请日	2000-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	英属哥伦比亚大学		
申请(专利权)人(译)	不列颠哥伦比亚大学		
[标]发明人	ケオウンポール カニハンジャニアバス ホアーデービッド		
发明人	ケオウン,ポール カニ-ハンジャニ,アバス ホアー,デービッド		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q1/6881 C12Q2600/112 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA03 4B024/CA20 4B024/HA11 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ47 4B063/QQ57 4B063/QQ79 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS34 4B063/QS36		
优先权	2282062 1999-09-08 CA 60/160618 1999-10-20 US 2303504 2000-04-10 CA		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一方面,本发明提供了一种诊断方法。该诊断方法可以包括鉴定携带干扰素 γ 基因的患有关节炎风险的患者。还可以检查患者干扰素 γ 基因第一个内含子内的多态性。多态性可以在第一内含子内不同长度的二核苷酸重复区域内,其至少一部分位于干扰素 γ 基因的核苷酸1349-1373内。在某些情况下,可以进行该方法使得可以鉴定等位基因,例如126bp和122bp等位基因。这将在本文中更详细地描述。可以基于在干扰素 γ 基因的第一内含子的一部分中存在的CA重复序列的数目的差异来识别多态性。本发明还包括筛选患者HLA蛋白(或基因)多态性,例如HLA-DRB1蛋白。

