

(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2004-513651

(P2004-513651A)

(43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 91 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-543022 (P2002-543022)	(71) 出願人	500452293 ビオメリオークス エス. ア. B I O M E R I E U X S. A. フランス、エフ-69280 マーシー レトワール、シャマン デ ロルム (番 地なし)
(86) (22) 出願日	平成13年11月16日 (2001.11.16)	(74) 代理人	100066865 弁理士 小川 信一
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月16日 (2003.5.16)	(74) 代理人	100066854 弁理士 野口 賢照
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/003599	(74) 代理人	100066885 弁理士 斎下 和彦
(87) 国際公開番号	W02002/040711	(72) 発明者	ムガン, ブリュノ フランス、エフ-69003 リヨン、リ ュ ラマルタン、29
(87) 国際公開日	平成14年5月23日 (2002.5.23)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	00/14896		
(32) 優先日	平成12年11月17日 (2000.11.17)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

(54) 【発明の名称】 インスリン依存糖尿病に対する患者の体質分析方法、装置とプライマの組

(57) 【要約】

【課題】 インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因分析方法、実施に適した装置およびかかる方法に適した増幅プライマの組。

【解決手段】 疾患に対する患者の感受性に固有の少なくとも一つのプローブ、前記疾患に対する前記患者の防御性に固有の少なくとも一つのプローブ、と前記疾患に対する前記患者の中立に固有の少なくとも一つのプローブ、のように選択されたプローブを同時に存在させて、対象の少なくとも一つの多形性領域の増幅から得られた、少なくとも一つのアンプリコン型を含む液体標本を所望の疾患に関連づけ、また実現された交雑を発現させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己免疫疾患の患者の遺伝的素因の分析方法において、

- ・疾患に対する患者の感受性に固有の少なくとも1つのプローブ、
- ・前記疾患に対する前記患者の防御性に固有の少なくとも1つのプローブ、と
- ・前記疾患に対する前記患者の中立性に固有の少なくとも1つのプローブ、

のように選択されたプローブを同時に存在させて、対象の少なくとも1つの多形性領域の増幅から得られた、少なくとも1つのアンプリコン型を含む液体標本を所望の疾患に関連づけることをもってなり、

また実現された交雑を明らかにすることをもってなる方法。

10

【請求項2】

自己免疫疾患がインスリン依存糖尿病である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

インスリン依存糖尿病の検出に用いたプローブが次のように定義される：

- ・感受性についてHLA-DQB1*0201とHLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0302対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、
- ・防御性についてHLA-DQB1*0301、HLA-DQB1*0602とHLA-DQB1*0603対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、および
- ・中立性についてインスリン依存糖尿病に関連する他の対立遺伝子に固有な少なくとも1つのプローブ、であることを特徴とする、請求項1または2のいずれか1つに記載の方法。

20

【請求項4】

インスリン依存糖尿病の検出に用いたプローブが次のように定義される：

- ・感受性についてHLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202、HLA-DQB1*0203、HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、
- ・防御性についてHLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*03032、HLA-DQB1*03033、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0308、HLA-DQB1*0309、HLA-DQB1*0310、HLA-DQB1*0602、HLA-DQB1*0603、HLA-DQB1*0608、HLA-DQB1*0610、HLA-DQB1*06111、HLA-DQB1*06112、HLA-DQB1*0612、HLA-DQB1*0613、HLA-DQB1*0614とHLA-DQB1*0616対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、および
- ・中立性についてHLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0401、HLA-DQB1*0402、HLA-DQB1*05011、HLA-DQB1*05012、HLA-DQB1*0502、HLA-DQB1*05031、HLA-DQB1*05032、HLA-DQB1*06011、HLA-DQB1*06012、HLA-DQB1*06013、HLA-DQB1*06051、HLA-DQB1*06052、HLA-DQB1*0606、HLA-DQB1*0609、HLA-DQB1*06112と、HLA-DQB1*00612対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブであることを特徴とする、請求項1から3のいずれか1つに記載の方法。

30

40

【請求項5】

インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブが次のように定義される：

- ・HLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0203対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有のプ

50

ローブであることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 6】

インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブが下記の配列から取られた連続する少なくとも 10 個の (10) アミノ酸で構成される：

- ・ SEQ ID NO 5 (T C T T g T g A g C A g A A g C)、および
- ・ SEQ ID NO 6 (C C g C C T g C C g C C g A)、

であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブが次のように定義される：

- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 4 と H L A - D Q B 1 * 0 3 0 9 対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 3 2、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 3 3、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 6、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 9 と H L A - D Q B 1 * 0 3 1 0 対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 8、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 3、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 8、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 0、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 3、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 4 と H L A - D Q B 1 * 0 6 1 6 対立遺伝子に固有のプローブ、

であることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブが下記の配列から取られた連続する少なくとも 10 個の (10) アミノ酸で構成される：

- ・ SEQ ID NO 7 (A g g g g A C C C g g g C g g A)、
- ・ SEQ ID NO 8 (g A C g T g g A g g T g T A C C)、および
- ・ SEQ ID NO 9 (g C C g C C T g A C g C C g)、

であることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブが次のように定義される：

- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 6、H L A - D Q B 1 * 0 4 0 1 と H L A - D Q B 1 * 0 4 0 2 対立遺伝子に固有のプローブ、
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 5 0 2、H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 1 と H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 2 対立遺伝子に固有のプローブ、
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 2 と H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 3 対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 1、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 6、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 9、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 2 と H L A - D Q B 1 * 0 6 1 2 対立遺伝子に固有のプローブ、

であることを特徴とする、請求項 1 から 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブが下記の配列から取られた連続する少なくとも 10 個の (10) アミノ酸で構成される：

- ・ SEQ ID NO 10 (g g g g C C C g g g C g T C)、
- ・ SEQ ID NO 11 (A g g A g g A C g T g C g C)、
- ・ SEQ ID NO 12 (T C T T g T A A C C A g A T A C)、および
- ・ SEQ ID NO 13 (g g T g g A C A C C g T A T g C A g)、

であることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

すべてのHLA-DQB1対立遺伝子の検出を可能にするために、HLA-DQB1遺伝子全体と交雑することができる、少なくとも1つの正の対照プローブが使用されることを特徴とする、請求項4から10のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 2】

同一のプローブの塩基の最大38.89%、好適には最大20%がイノシンなどの、少なくとも1つの類似の塩基によって置換されることを特徴とする、請求項6、8、10または11のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 3】

予め、HLA-DQB1に関連する1つまたは複数の対象多形領域の少なくとも1つの増幅が実施されることを特徴とする、請求項1から12のいずれか1つに記載の方法。 10

【請求項 1 4】

アンプリコンも同じくビオチン化されるように、増幅プライマはビオチン化されることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 5】

増幅に先立って、好適にはかさぶた班の形で、採取された生物標本は核酸を抽出するために処理されることを特徴とする、請求項13または14のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 6】

核酸の抽出が、続く増幅の前に使用されるトリホスフィト・デオキシリボヌクレオチド(dNPT)をすでに含んでいる反応混合物内で実施され、その後保温されることを特徴とする、請求項15に記載の方法。 20

【請求項 1 7】

反応混合物の中にトリホスフィト・デオキシリボヌクレオチド(dNPT)を添加し、それが後に増幅の際にも使用されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項 1 8】

固有プローブのそれぞれのタイプが、他のプローブとは独立して、微小滴定プレートのプイ(puits)などの、独立した室内に固定されることを特徴とする、請求項1から17のいずれか1つに記載の方法を実施するための装置。

【請求項 1 9】

インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性を検出するために使用されるそれぞれのタイプのプローブがこの感受性とこの防御性を検出するために使用される他のプローブとは独立して、微小滴定プレートのプイなどの、独立した室内に固定され、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用異なるタイプのプローブのすべてまたは一部が微小滴定プレートの少なくとも1つのプイ内に固定されることを特徴とする、請求項18に記載の装置。 30

【請求項 2 0】

少なくとも2つのタイプの異なる固有プローブが、その間に相互作用なしに、微小滴定プレートの同じプイなどの、独立した同じ室内に固定されることを特徴とする、請求項18または19のいずれか1つに記載の装置。

【請求項 2 1】

インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性または中立性を検出するために使用されるプローブのタイプの全体が微小滴定プレートのプイなどの、唯一かつ同一の室内に固定されることを特徴とする、請求項18または19のいずれか1つに記載の装置。 40

【請求項 2 2】

例えば、ペルオキシダーゼによって、酵素反応を利用する非局所的比色発現であることを特徴とする、請求項18または19のいずれか1つに記載の装置で実現される交雑発現方法。

【請求項 2 3】

例えば、蛍光または放射能による、それぞれのタイプのプローブとアンプリコンの間に実現された交雑の局所的発現であることを特徴とする、請求項19から21のいずれか1つ 50

に記載の装置で実現される交雑発現方法。

【請求項 24】

プライマSEQ ID NO2と組み合わせてプライマSEQ ID NO1を使用することをもってなる、インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析方法において使用するためのHLA-DQB1遺伝子に対応する配列の増幅を可能にするプライマ。

【請求項 25】

5'のピオチン化物であることを特徴とする、請求項25に記載のプライマ。

【請求項 26】

インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析のために、HLA-DQB1遺伝子に対応する配列の交雑を可能にする捕捉プローブであって、プローブの5'に位置するアミノまたはピオチン分岐を介して微小滴定プレートのピの底、またはビードの上に固定されることを特徴とする、プローブ。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はインスリン依存糖尿病と呼ばれる少なくとも1つの疾患に対する患者の遺伝的素因の分析方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

タイプ1の糖尿病（またはインスリン依存糖尿病）は遺伝的素因のある個体において発生する自己免疫過程の所産として、膵臓内でインスリンを生産するランゲルハンス細胞の消失を特徴とする疾患である。環境要因と並んで、素因の遺伝的成分が認められる。

20

【0003】

【従来技術】

それぞれの個体は祖先から受け継いだ、固有の全遺伝形質を有する。この特定の遺伝的背景が時として一部の疾患の発現および/または進展に活発に関与することがある：病原要因による感染（例えば、AIDSウイルス）、自己免疫疾患（例えば、リウマチ）。HLA抗原（Human Leukocyte Antigens）を暗号化する遺伝子をはじめとする組織適合性大複合体（CMH）の遺伝子は下記のような自己免疫病理の進展に主要な役割を果たす：

30

・臓器に固有でない病理、例えば、リウマチ性多発関節炎（Lawrence, 1970; Stastny, 1978; Khan, 1979; Stastny, 1983; Gegerssen, 1986; Gegerssen, 1987; Stastny, 1988; Todd, 1988; Wordsworth, 1989; Nepom, 1989; Hiraiwa, 1990; Nepom, 1991）または強直性脊椎炎（Brewerton, 1973; Schlosstein, 1973; Benjamin, 1990）、または

・臓器固有、より詳細にはインスリン依存糖尿病に組み合わされた膵臓などの内分泌腺（Komulainen, 1999; Kulmala, 2000）。

【0004】

インスリン依存糖尿病になりやすい遺伝成分の大きな部分はHLA遺伝子座（IDDM1）、そしてもっと詳細にはHLA-DQB1遺伝子に結合された主要なマーカに結びつけることができる。文献のデータは現在、感受性対立遺伝子（S対立遺伝子）、保護対立遺伝子（P対立遺伝子）、中立対立遺伝子（N対立遺伝子）などの国際命名法に記載の（45）のHLA-DQB1対立遺伝子の中でもっとも一般的なものの考察を可能にする（www.anthonynolan.com/HIG/seq/nuc; 2000年10月）。これは主として白人の母の集団について有効性が確認されたデータである。今のところ、分子レベルの説明はHLA-DQタンパク質の鎖のアミノ酸57の領域に見られる多形現象にある（Todd et al., 1988）。後述の表1は位置57にあるこのアミノ酸の種類に応じたインスリン依存糖尿病の状態をまとめたものである：

40

50

【表 1】

インスリン依存 糖尿病の状態	HLA-DQB1*対立遺伝子	位置57のアミノ酸
S	02 0302	アラニン(A)
P	0301 0602 0603	アスパラギン酸(D)
N	その他	バリン(V)又はセリン(S)

表 1 : 位置 57 のアミノ酸の種類に応じたインスリン依存糖尿病の状態

10

【0005】

それぞれの遺伝子型は2つの対立遺伝子の組み合わせに対応する。したがって、それぞれの標本にタイプ1の糖尿病の素因の遺伝子型が対応する：SS、PP、NN、SP、SNまたはNP。この分子レベルの説明は遺伝子型が、一般的に効果用量と呼ばれるゼロ、1つ、または2つの感受性対立遺伝子を含んでいるとき病気の段階的重さの所見とも整合する。

【0006】

現在、インスリン依存糖尿病に関して、Cinekらの論文がある、“Screening for the IDDM high-risk genotype. A rapid microtitre plate method using serum as source of DNA”, Tissue Antigens, 2000, 56, 4, 344-349。この刊行物はインスリン依存糖尿病への遺伝的素因分析試験開発の利益を強調している。このチームは関係する対立遺伝子に関して完全な技法によって血清から開始する手法を選択した(いくつかのHLA-DQB1対立遺伝子だけでなくいくつかのHLA-DQA1対立遺伝子といくつかのHLA-DRB1*04対立遺伝子)。

20

【0007】

血清の使用はかさぶた班から開始する手順よりも便利ではない。くわえて、彼らの技法は下記の点で複雑である：

- ・彼らはHLA-DQB1対立遺伝子とHLA-DQA対立遺伝子の、ついでHLA-DRB1*04対立遺伝子の2段階で分析を実施している、
- ・彼らは63℃の交雑温度、63℃ついで18から25℃の洗浄温度での捕捉プローブ固定およびストレプトタビジン・ペルオキシダーゼ、(SPDO)による2段階の発見のための複雑な技術を使用している。

30

同様に、この技法は用量効果の検出が全く不可能であるが、それはインスリン依存糖尿病への患者の遺伝的素因に大きな影響をもっている。

【0008】

最後に、これらの試験は輸血センターや特定の専門病院などのHLA遺伝子研究を専門とするセンターでしか実施できない。したがって、この同定には標本の輸送と、かなり重い技術の使用が必要である。したがって、次のようなマイナスの結果が数多くある：

40

- ・標本紛失のおそれ
- ・この同定に時間がかかる
- ・前記同定のコストが比較的高い
- ・役務供与に対する依頼者の監視がない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

請求された分析方法は実施面でもっと簡易化され、アンプリコン(amplicons)の調製後、2時間未満と、もっと迅速で、コストが低い。

このため、本発明は自己免疫疾患の患者の遺伝的素因の分析方法において、

- ・疾患に対する患者の感受性に固有の少なくとも1つのプローブ、

50

・前記疾患に対する前記患者の防御性に固有の少なくとも1つのプローブ、と
 ・前記疾患に対する前記患者の中立に固有の少なくとも1つのプローブ、
 のように選択されたプローブを同時に存在させて、対象の少なくとも1つの多形性領域の
 増幅から得られた、少なくとも1つのアンプリコン型を含む液体標本を所望の疾患に関連
 づけることをもってなり、
 また実現された交雑を明らかにすることをもってなる方法に関するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

有利には、この方法はインスリン依存糖尿病への患者の遺伝的素因の分析を可能にする。
 変型実施態様によれば、インスリン依存糖尿病の検出に用いたプローブは次のように定義
 される：

10

・感受性についてHLA-DQB1*0201とHLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0302対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、
 ・防御性についてHLA-DQB1*0301、HLA-DQB1*0602とHLA-DQB1*0603対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、および
 ・中立性についてインスリン依存糖尿病に関連する他の対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ。

【0011】

変型実施態様によれば、インスリン依存糖尿病の検出に用いたプローブは次のように定義
 される：

20

・感受性についてHLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202、HLA-DQB1*0203、HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、
 ・防御性についてHLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*03032、HLA-DQB1*03033、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0308、HLA-DQB1*0309、HLA-DQB1*0310、HLA-DQB1*0602、HLA-DQB1*0603、HLA-DQB1*0608、HLA-DQB1*0610、HLA-DQB1*0611、HLA-DQB1*06111、HLA-DQB1*06112、HLA-DQB1*0612、HLA-DQB1*0613、HLA-DQB1*0614とHLA-DQB1*0616対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、および
 ・中立性についてHLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0401、HLA-DQB1*0402、HLA-DQB1*05011、HLA-DQB1*05012、HLA-DQB1*0502、HLA-DQB1*05031、HLA-DQB1*05032、HLA-DQB1*06011、HLA-DQB1*06012、HLA-DQB1*06013、HLA-DQB1*06051、HLA-DQB1*06052、HLA-DQB1*0606、HLA-DQB1*0609、HLA-DQB1*06112と、HLA-DQB1*00612対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ。

30

【0012】

より詳細には、上述のすべての変型において、インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブは次のように定義される：

40

・HLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0203対立遺伝子に固有のプローブ、および
 ・HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有のプローブ。

この最後の場合について、インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブは下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)アミノ酸で構成される：

50

- ・ SEQ ID NO5 (T C T T g T g A g C A g A A g C)、および
- ・ SEQ ID NO6 (C C g C C T g C C g C C g A)。

【0013】

より詳細には、上述のすべての変型において、インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブは次のように定義される：

- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 4 と H L A - D Q B 1 * 0 3 0 9 対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 3 2、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 3 3、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 6、H L A - D Q B 1 * 0 3 0 9 と H L A - D Q B 1 * 0 3 1 0 対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 8、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 3、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 8、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 0、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 3、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 4 と H L A - D Q B 1 * 0 6 1 6 対立遺伝子に固有のプローブ。

10

この最後の場について、インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブは下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)アミノ酸で構成される：

- ・ SEQ ID NO7 (A g g g g A C C C g g g C g g A)
- ・ SEQ ID NO8 (g A C g T g g A g g T g A C C)、および
- ・ SEQ ID NO9 (g C C g C C T g A C g C C g)。

20

【0014】

より詳細には、上述のすべての変型において、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブは次のように定義される：

- ・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 6、H L A - D Q B 1 * 0 4 0 1 と H L A - D Q B 1 * 0 4 0 2 対立遺伝子に固有のプローブ、
 - ・ H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 2、H L A - D Q B 1 * 0 5 0 2、H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 1 と H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 2 対立遺伝子に固有のプローブ、
 - ・ H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 1、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 2 と H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 3 対立遺伝子に固有のプローブ、
- および
- ・ H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 1、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 2、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 6、H L A - D Q B 1 * 0 6 0 9、H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 2 と H L A - D Q B 1 * 0 6 1 2 対立遺伝子に固有のプローブ。

30

この最後の場について、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブは下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)アミノ酸で構成される：

- ・ SEQ ID NO10 (g g g g C C C g g g C g T C)、
- ・ SEQ ID NO11 (A g g A g g A C g T g C g C)、
- ・ SEQ ID NO12 (T C T T g T A A C C A g A T A C)、および
- ・ SEQ ID NO13 (g g T g g A C A C C g T A T g C A g)。

40

【0015】

すべての例において、すべてのH L A - D Q B 1 対立遺伝子の検出を可能にするために、H L A - D Q B 1 遺伝子全体と交雑することができる、少なくとも1つの正の対照プローブが使用された。

くわえて、同一のプローブの塩基の最大38.89%、好適には最大20%がイノシンなどの、少なくとも1つの類似の塩基によって置換される。かかる数値は、1999年6月20日と2000年12月6日付けの優先権の下に番号P C T F R 0 0 / 0 1 3 8 5 で出願人が出願した、先立つ特許出願から演繹できる。類似の塩基の定義は明細書の続きに記

50

載されている。

【0016】

上述のような、自己免疫疾患の患者の遺伝的素因の分析方法に先立って、HLA-DQB1に関連する1つまたは複数の対象多形領域の少なくとも増幅が実施される。

好適には、アンプリコンも同じくピオチン化されるように、増幅プライマはピオチン化される。増幅に先立って、好適にはかさぶた班の形で、採取された生物標本は核酸を抽出するために処理される。

この核酸の抽出は、続いて増幅の前に使用されるトリホスフィト・デオキシリボヌクレオチド(dNPT)をすでに含んでいる反応混合物内で実施され、その後保温される。

この最後の場合、保温の後、反応混合物の中にトリホスフィト・デオキシリボヌクレオチド(dNPT)を添加し、これは後に増幅の際にも使用される。 10

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明は、その第1の変型実施態様によれば、固有プローブのそれぞれのタイプが、他のプローブとは独立して、微小滴定プレートのパイなどの、独立した室内に固定される、上述のような方法の実施を可能にする装置にも関するものである。

【0018】

第2の変型実施態様によれば、インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性を検出するために使用されるそれぞれのタイプのプローブはこの感受性とこの防御性を検出するために使用される他のプローブとは独立して、微小滴定プレートのパイなどの、独立した室内に固定され、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用異なるタイプのプローブのすべてまたは一部は微小滴定プレートの少なくとも1つのパイ内に固定される。 20

【0019】

第3の変型実施態様によれば、少なくとも2つのタイプの異なる固有プローブが、その間に相互作用なしに、微小滴定プレートの同じパイなどの、独立した同じ室内に固定される。

【0020】

第四の変型実施態様によれば、インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性または中立性を検出するために使用されるプローブのタイプの全体が微小滴定プレートのパイなどの、唯一かつ同一の室内に固定される。 30

微小滴定プレートの同じパイなどの1つの室が、感受性または防御性の検出に使用されるプローブのタイプを1つしか含んでいない場合、装置によって実現された交雑を明らかにする方法は、酵素反応を利用する非局所的比色検出によって実施される。例えば、これはそれぞれのタイプのプローブとペロキシダーゼの間に実現された交雑の検出とすることができる。

微小滴定プレートの同じパイなどの1つの室が、感受性または防御性の検出に使用される少なくとも2つのプローブのタイプを含んでいる場合、装置によって実現された交雑を明らかにする方法は、局所的比色検出によって実施される。例えば、これは蛍光または放射能によるそれぞれのタイプのプローブとアンプリコンの間に実現された交雑の検出とすることができる。 40

【0021】

本発明は最後に、プライマSEQ ID NO2と組み合わせてプライマSEQ ID NO1を使用することをもってなる、インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析方法において使用するためのHLADQB1遺伝子に対応する配列の増幅を可能にするプライマの組に関するものである。

好適にはプライマは5'のピオチン化物である。

くわえて、インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析のために、HLA-DQB1遺伝子に対応する配列の交雑を可能にする捕捉プローブはプローブ5'に位置するアミノまたはピオチン分岐を介して微小滴定プレートのパイの底、またはビードの上に固 50

定される。

上述の例は説明のための例としてあげたものであり、非制限的である。それらは本発明の理解を助けるものである。

【0022】

本発明は迅速で安価な遺伝疾患検出方法に関するものである。この新規な技術はすべての遺伝病に、とくにリウマチ性多発関節炎、関節強直脊椎関節炎、インスリン依存糖尿病およびその他の自己免疫疾患、例えば、リウマチの診察の際に認められる膠原病（狼瘡、硬皮、・・・）にも使用できる。

これは少なくとも1つの遺伝子の同時分析を可能にする分子生物学の技法による、特定の疾患に対する個体の遺伝的素因の分析のための方法である。この方法は、1つまたは複数の遺伝子に結びつけられる、1つの疾患あるいは関連がある疾患全体についての個体の遺伝的素因の分析に有利に適用することができる。この方法は特定の自己免疫疾患、すなわち1つの臓器、この場合には膵臓に関連がある、インスリン依存糖尿病に対する個体の遺伝的素因の分析に応用できる。

10

【0023】

この方法の利点は、（診断、予測および治療方針などの）臨床的に意味のある関連情報の完全な全体を、多重であるが単一の試験によって、一段階で得られることにある。この方法は複数の過程に分けられる：

- 1) 個体の生物学的採取標本から核酸を抽出、
- 2) 病理に対する遺伝的素因に関連する多形性が指摘された対象領域の増幅、および
- 3) 所与の対立遺伝子または対立遺伝子群の正確な分析を可能にする分子プローブの組を使用する交雑反応全体を用いる、アンプリコンの同時分析。

20

【I - 定義】

【0024】

「室」とは：

- ・第1の場合、その液体、または存在する場合、隣接する1つまたは複数の室の領域に存在する別の液体の、他の分画との相互作用なしにある液体のある量、
 - ・第2の場合、その、あるいはそれらの液体のそれぞれがその液体、または存在する場合、隣接する1つまたは複数の室の領域に存在する別の液体の、他の分画との相互作用なしに同じ液体の、あるいは異なる液体の、複数の同一または相互に異なる量、
- の受納を可能にする、平坦または凹型の、すなわち陥凹を形成するいっさいの個体の媒体を意味するものとする。

30

【0025】

第1の場合の数百マイクロリットルから第2の場合の0.5ナノリットルに至ることがある液体の量のこれらの保持を実現を可能にする装置、ならびにかかる装置が利用する方法と装置によって方法と共に実現される媒体は番号FR00/14691で、出願人によって2000年11月15日出願された特許出願にすでに詳しく記載されている。

【0026】

第2の場合、単一の室に配分された液体の異なる量はきわめて少量で、一般的に1マイクロリットル未満で、前記室の表面にスポットを形成する。1滴当たりの溶液の量は0.5ナノリットルから1マイクロリットルの間に、好適には1ナノリットルから200ナノリットルの間に含まれる。

40

【0027】

上述の定義に用いられた、「固体媒体」という用語は、分析物、この場合には核酸をその上に固定できるすべての材料を含む。化学的修飾の有無を問わず天然、合成材料を固体媒体として用いることができる、とくに高分子、例えば、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリアクリル、ポリアミドあるいは芳香族ビニルモノマー系のコポリマー、
- 不飽和または - 不飽和酸のアルキルエステル、不飽和カルボキシル酸エステル、塩化ビニリデン、ジエンまたはニトリル基内に存在する化合物（アクリロニトリル）；塩化ビニルとプロピレンのポリマー、塩化ビニルと酢酸ビニルのポリマー、スチレンまたは

50

スチレン置換誘導体系のコポリマー；ナイロン、ニトロセルローズなどの合成繊維；珪素、ガラス、セラミック、石英などの無機材料；ラテックス；磁気粒子；金属誘導体、などを使用することができる。

【0028】

本発明による媒体は、非限定的に、微小滴定プレート、ホイル、管、パイ、粒子あるいはシリカまたは珪素の、通常「ウェハ」と呼ばれる、タブレットなどの平坦な媒体の形を取ることができる。好適には媒体の少なくとも一部は珪素のウェハあるいは微小滴定プレートのパイの底のように平坦である。好適には、この室は微小滴定プレートのパイで構成される。

【0029】

固体媒体は用途分野と1つまたは複数の分析物を含む溶液の種類に応じて親水性および/または疎水性とする。例えば、貯蔵には親水性区域が用いられ、前記親水性区域は疎水性区域で限定して、スポットの直径を管理しやすくする。

【0030】

「交雑検出」はマーキング反応体によって標識をつけたポリヌクレオチドの使用を意味するものとする。マーキング反応体とは、検出可能な信号を直接または間接に発生するトレーサーを意味する。これらのトレーサーには次のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：

- ・ 酵素、例えば、比色、蛍光、発光によって、付加された、適切な基質の存在の元に検出可能な信号を発生する西洋わさびのペロキシダーゼ、アルカリン・フォスフェターゼ、
- ガラクトシダーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デジドロゲナーゼ、あるいは
- ・ 発色団、例えば、蛍光、発光、着色化合物、あるいは
- ・ 電子顕微鏡で、あるいは伝導性、電流、電圧あるいはインピーダンス測定などのそれらの電気特性によって検出できる電子密度の基、あるいは
- ・ 回折、表面プラズモン共鳴、接触角度変動などの光学的方法または原子力の分光測光、トンネル効果などの物理的方法によって検出可能な基、または
- ・ 放射性分子、例えば、³²P、³⁵Sまたは¹²⁵I。

好適には、トレーサーは立体化学的占有空間が小さい蛍光化合物、例えば、フルオレセイン、ダンシル、IR (Li-COR Inc, Lincoln NE, USA)、Cy5とCy3 (Randolph J. Bandal, Nucleic Acids Res., 25(14), p2923-2929, 1997)型の発色団およびそれらの誘導体である。立体化学的占有空間が小さいとは、分子量が1000g/モル未満であることを意味する。

【0031】

必要ならば前処理した、標的核酸と、さらに官能化したポリヌクレオチドを発生し、マーキング反応体でこのポリヌクレオチドを標識付けし、ついで前記標識付けしたポリヌクレオチドを検出するように官能化したヌクレオチドとの接触が行われる標的内のこの標的核酸の検出方法。

前処理とは標的核酸に手を食われることを可能にする標本処理の異なる過程、例えば、溶解、流動化、濃縮を意味する。

【0032】

「中立性についてインスリン依存糖尿病に関連づけられた他の対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ」はHLA-DQB1を構成する対立遺伝子、インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性の対立遺伝子を構成すると定義されなかった対立遺伝子の全体または一部に固有の少なくとも1つのプローブを意味するものとする。一般的に、認識された対立遺伝子の有病率に応じてプローブを選択する；したがって、ある対立遺伝子が優勢であるほど、それは中立性の固有プローブの領域に含められる。

それはまた、単独に、あるいは先述のプローブの少なくとも1つとの組み合わせにおいて、HLA-DR3および/またはHLA-DR4を構成する対立遺伝子の全体または一部の少なくとも1つの固有プローブとすることができる。したがって、数多くの論文が影響

10

20

30

40

50

を持ち得るこれらのハロタイプを明らかにしている。

- ・ Park Y. S. , She J. X. , Noble J. A. , Erlich H. A. & Einsenbarth G. S. , Tissue Antigens 2001 : 57 : 185 - 191 : " Transcracial evidence for the influence of the homologous HLA DR - DQ haplotype on transmission of HLA DR4 haplotypes to diabetic children " ,
- ・ Kockum I. , Sanjeevi C. B. , Eastman S. , Landin - Olsson M. , Dahlquist G. , Lernmark A , et al. , European Journal of Immunogenetics 2006 , 361 - 372 : " Complex interaction between HLA DR and DQ in conferring risk for childhood type 1 diabetes " , 10
- ・ Undlien D. E. , Kockum I. , Ronningen K. S. , Lowe R. , Sanjeevi C. B. , Graham J. , Lie B. A. , Akselsen H. E. , Lernmark A. and Thorsby E. , Tissue Antigens 1999 : 54 , 543 - 551 : " HLA associations in type 1 diabetes among patients not carrying high - risk DR3 - DQ2 or DR4 - DQ8 haplotypes " , 20
- ・ Donner H. , Seidl C. , Van der Auwera B. , Braun J. , Siegmund T. , Herwig J. , Weets I. , The Belgian Diabetes Registry , Usadel K. H. & Badenhoop K. , Tissue Antigens 2000 : 55 : 271 - 274 : " HLA - DRB1*04 and susceptibility to type 1 diabetes mellitus in a German / Belgian family and German case - control study " ,
- ・ Redondo M. J. , Kawasaki E. , Mulgrew C. L. , Noble J. A. , Erlich H. A. , Freed B. M. , Lie B. A. , Thorsby E. , Einsenbarth G. S. , Undlien D. E. , Kockum I. & Ronningen K. S. , The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism , 2000 : Vol. 55 , No 10 : 3793 - 3797 : " DR - and DQ - Associated Protection from Type 1A Diabetes : Comparison of DRB1*1401 and DQA1*0102 - DQB1*0602 " . 30

【0033】

「増幅」は母体の役割を果たす標的核酸に作用する酵素増幅反応によって官能基化したポリヌクレオチドが発生することを意味する。一方ではLewisの論文(1992. Genetic Engineering News, 12, p. 1 - 9)、他方ではAbramson & Myersの論文(1993. Curr. Opin. Biotechnol., 4, p. 41 - 47)が標的増幅の実例を示している。酵素増幅技法は例えば、NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)、TMA (Transcription Mediated Amplification)、RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)、PCR (Polymerase Chain Reaction)、SDA (Strand Displacement Amplification)あるいはLCR (Ligase Chain Reaction)技法の中から選択することができる。 40

【0034】

「類似塩基」とは一般的にポリヌクレオチド内に組み込まれた修飾されたヌクレオチドを意味するものとする。ポリヌクレオチドは、場合によって、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド、例えば、イノシン、メチル-5-デオキシシチジン、ジメチルアミノ-5-デオキシウリジン、デオキシウリジン、ジアミノ-2,6-プリン、ボウロモ-5-デオキシウリジン、ネブラリンあるいは交雑を可能にする他のいっさいの修飾塩基などの、修飾塩基を含む少なくとも1つのヌクレオチドを含む少なくとも2つのデオシキリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの連鎖で構成される。これらのポリヌクレオチドは下記の領域で修飾することもできる：

・ヌクレオチド間結合、例えば、ホスホロチオエート、H-ホスホネート、アルキル-ホスホネート、あるいは

・骨格、例えば、オリゴヌクレオチド(FR-A-2.607.507)あるいはPNA(M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, p 1895-1897, 1992)あるいは2'-アルキル・リボース。

これらの修飾のそれぞれは組み合わせることもできる。ポリヌクレオチドはオリゴヌクレオチド、天然核酸またはその断片の1つ、例えば、DNA、ロボソームRNA、メッセンジャーRNA、転位RNA、酵素増幅技法によって得られた核酸とすることができる。

【II - 標本の配分】

【0035】

1) デオシキリボ核酸(DNA)抽出：

A - 全血液標本から

EDTA(テトラ酢酸エチレン・ジアミン)、クエン酸塩またはヘパリンなどの抗凝血剤上に採取した全血液標本からのDNA抽出の従来のような手順を使用することができる。例えば、フェノール抽出過程による、あるいは赤色細胞の、ついで白色細胞の溶解の過程(Kimura et al., 1992)による手順とすることができる。

実際には、1つの実施態様によれば、この抽出は全く従来通りに実現される。事実、あとからポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの増幅法によって増幅できる試料を得ることができる任意のDNA抽出手法を用いることができる。細胞を溶解、核酸を抽出ついで精製するこれらの技法は通常遺伝子分析に推奨されるもの、あるいはQIAGEN S.A.のQIAmp Blood Kit(登録商標)などの市販の物質を使用する迅速な

【0036】

B - 乾燥血液班から

乾燥血液班からの様々なDNA抽出手法は文献に記載されている。

まず第1の技法はJinks et al., Hum. Genet. 1989, 81: 363-366のものである。これはSchleicher & Schuell no. 903の紙の上に血液を付着させることから成る。血液班は数時間の間18から25の間の温度で乾燥される。直径3mm4つのタブレットを打ち抜き、1.5mlの管内に置いて、30 μ lのメタノールを加えて固定し、ついで蒸発を実施する。つづいて60 μ lの水を加え、15分間煮沸する。15分間10,000gで遠心分離する。最後に、次の過程、PCRによる増幅のために上澄みを採用する。

【0037】

第2の技法はHezard et al., Thrombosis Research, 1997, 88, 1, 59-66のものである。EDTA(テトラ酢酸エチレン・ジアミン)、クエン酸塩またはヘパリンの上に血液を採集し、濾紙(Guthrie)上にそれを付着させる。直径1ミリのタブレットを50 μ lの反応混合物内に直接置いて、つぎに増幅する。94 $^{\circ}$ Cで15分間保温する。そして最後にTaqポリメラーゼを添加し、PCRで増幅する。

【0038】

最後に、2000年から、Molecular Innovations Inc.社は

10

20

30

40

50

、第3の技法として、増幅管の内部自体に位置づけられる、DNA抽出システムを市販している (X t r a A m p (登録商標) E x t r a c t i o n S y s t e m , M o l e c u l a r I n n o v a t i o n s I n c . R e f . 6 6 0) 。血液班からDNAを抽出するために、この製品を評価した。血液はS c h l e i c h e r & S c h u e l l 紙 r e f . 3 2 2 1 8 7 の上に付着させたE D T AまたはA C Dから採取した。直径3 m m タブレットを75 μ l のL y i s B u f f e r を含む1.5 m l のマイクロ管内に置いた。18から25 の温度で10分間保温する。ついで、12,000 g で5分間遠心分離する。ついで上澄みを採取し、X t r a A m p (登録商標) 内にそれを移す。数回吸引、吐出し、ついで上澄みを取り除く。200 μ l のW a s h B u f f e r で3回線 10
上する。その後、PCRによる増幅のための45 μ l の反応混合物と5 μ l のA m p E n h a n c e B u f f e r を添加する。最後に、通常増幅プログラムに3サイクルを加えて増幅する。

【0039】

上述の3つの手順で、H L A - D Q B 1 の増幅とともに、およそ50%のケースについて、本発明に従って開発されたE L O S A (E n z y m e L i n k e d O l i g o S o r b e n t A s s a y) 試験で利用可能な優れた結果が認められた。このE L O S 技法は出願人の特許E P - B - 0 , 4 8 6 , 6 6 1 および論文F . M a l l e t e t a l . , J o u r n a l o f C l i n i c a l M i c r o b i o l o g y , J u n e 1 9 9 3 , p . 1 4 4 4 - 1 4 4 9 に記載されている。

【0040】

それにもかかわらず、血液班からの抽出手順、堅牢で日常的な分析用途のために不可欠な手順を開発した方がよい。したがって、下記を以て成る第4の技法が出願人によって開発された：

- ・ S c h l e i c h e r & S c h u e l l 紙 N o . 9 0 3 (r e f . 3 2 2 1 8 7) の上に付着させたE D T A 上の血液採集
- ・ S c h l e i c h e r & S c h u e l l パンチによる血液班の打ち抜き (直径3ミリのタブレット)
- ・ 血液班の都度、5分間H C l 0.25 N によるパンチの除染 (D N A 除去)
- ・ タブレットを0.5 m l のP C R 管内に置く
- ・ 10倍に濃縮した (10x) 増幅緩衝液5 μ l 、0.5 μ l のd N T P (200 m M) 30
混合物とH 2 O q s q 50 μ l を含む反応混合物50 μ l を添加
- ・ 100 で15分間保温 (サーマサイクラーの使用が推奨される)
- ・ タブレット取り出し
- ・ 従来の水切り遠心分離器による1,000 g で短時間遠心分離
- ・ 増幅反応のために25 μ l の上澄みを採取

【0041】

意外なことに、それぞれのタブレットの上に存在する血液を取り込んだ反応媒質はデオシキリボヌクレオチド・トリフォスフェート (d N T P) 、すなわちd A T P 、d C T P 、d G T P とd T T P を含んでいる。これは当業者が高温からむしろ保護しようとする生物分子である。しかるに、出願人によって開発された手順では、前記反応媒質はつぎに15 40
分間100 の温度にかけられる。出願人の技法によって抽出された核酸でつぎに得られた増幅結果は先に述べた3つの技法で得られたものよりはるかに効果的である。

【0042】

2) H L A - D Q B 1 アンプリコンの調製

すべての例において、使用されたプライマは文献に記載のプライマである (X I t h H L A W o r k s h o p P r i m e r s ; K i m u r a , 1 9 9 2) 。下の表2はH L A - D Q B 1 遺伝子に対応する対象遺伝子座の増幅を可能にする2つのプライマを示している。したがって、これら2つのプライマはこの遺伝子を縁取っている。

【表2】

配列番号	配列 (5'>3')	科学的呼称
SEQ ID NO1	CATgTgCTACTTCACCAACgg	DQBAMP-A
SEQ ID NO2	CTggTAgTTgTgTCTgCACAC	DQBAMP-B

表 2 : H L A - D Q B 1 の増幅のためのプライマ

【 0 0 4 3 】

A - 全血液標本から

反応混合物は下記の各種の成分を含んでいる：

- ・緩衝液 10 X (Perkin Elmer , ref . N 8 0 8 - 0 1 7 1)
5 μ l
- ・ d N T P s 2 0 0 m M (P h a r m a c i a , r e f . 2 7 - 2 0 9 4) 0
. 5 μ l (最終 0 . 2 m M)
- ・プライマ混合物 (それぞれ 3 0 μ M) 0 . 5 μ l (最終 0 . 3 m M)
- ・ Taq ポリメラーゼ (Ampli Taq ,
Perkin Elmer , ref . N 8 0 8 - 0 1 7 1 , 5 U / μ l) 0 .
3 μ l (1 . 5 U)
- ・ DNA (約 1 0 0 n g / μ l) 5 μ l (約 5 0 0 n g)、 20
および
- ・ H₂ O q . s . p . 5 0 μ l

くわえて、増幅プログラムは下記の通りである：

- ・ 9 5 で 2 分、ついで
- ・ 連続 3 5 サイクル、各サイクルごとに次の過程：
9 5 で 3 0 秒
5 5 で 3 0 秒
7 2 で 3 0 秒
- ・ 7 2 で 7 分

ついで、反応生成物を保存したいときは、得られたばかりのアンプリコンを含む管を 9 30
の温度に維持する。

【 0 0 4 4 】

B - 乾燥血液班から

反応混合物は下記の各種の成分を含んでいる：

- ・緩衝液 10 X (Perkin Elmer , ref . 2 7 - 2 0 9 4) 5
 μ l
- ・ d N T P s 2 0 0 m M (P h a r m a c i a , r e f . N 8 0 8 - 0 1 7 1)
0 . 5 μ l
- ・プライマ混合物 (それぞれ 3 0 μ M) 0 . 5 μ l (最終 0 . 3 m M) 40
- ・ Taq ポリメラーゼ (Ampli Taq ,
Perkin Elmer , ref . N 8 0 8 - 0 1 7 1 , 5 U / μ l) 0 .
3 μ l (1 . 5 U)
- ・ DNA (約 1 0 0 n g / μ l) 2 5 μ l、および
- ・ H₂ O q . s . p . 5 0 μ l

くわえて、増幅プログラムは下記の通りである：

- ・ 9 5 で 2 分、ついで
- ・ 連続 3 5 サイクル、各サイクルごとに次の過程：
9 5 で 3 0 秒
5 5 で 3 0 秒

72 で30秒

・72 で7分

ついで、反応生成物を保存したいときは、得られたばかりのアンプリコンを含む管を9の温度に維持する。

【 I I I - 本発明によって得られたアンプリコンの分析】

【 0 0 4 5】

1°) インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析装置

E L O S A 試験の原理にもとづく装置は比色検出のためにペロキシダーゼ (P O D) に結合された検出プローブを備えた、微小滴定プレートから延伸した8つのブイのパレットの形で、H L A - D Q B 1 マーカの分析のために実現された。

A - 捕捉プローブ

これら8つのブイのそれぞれの中に、捕捉の固有プローブを使用した。これらのプローブは実際は、出願人によって出願された特許 U S - A - 5 , 5 1 0 , 0 8 4 および E P - B - 0 . 5 4 9 . 7 7 6 に記載のような、5' でアミン化された分岐を有する合成オリゴヌクレオチドである。特殊な構造のこの5' でアミン化された分岐がプレートの底でプローブの固定を可能にする。したがって、以下に指定しない場合でも、使用したプローブの5' 末端が、この分岐を有するものとする。

【 0 0 4 6】

ブイの部位での捕捉プローブの配分は表3に示した、他方で表3のそれぞれの捕捉プローブについて可能な標的対立遺伝子は下記の表4に示した。

【表3】

配列番号	配列 (5'>3')	bioMerieux の呼称
SEQ ID NO3	CgCTTCgACAgCgACgTgggg	C+
SEQ ID NO4	TATgAAACTTATggggATAC	C-
SEQ ID NO5	TCTTgTgAgCAgAAgC.	26c
SEQ ID NO6	CCgCCTgCCgCCgA	57f
SEQ ID NO7	AggggACCCgggCggA	70b
SEQ ID NO8	gACgTggAggTgTACC	45a
SEQ ID NO9	gCCgCCTgACgCCg	57e
SEQ ID NO10	ggggCCGgggCgTC	70a
SEQ ID NO11	AggAggACgTgCgC	37b
SEQ ID NO12	TCTTgTAACCAgATAC	26b
SEQ ID NO13	ggTggACACCgTATgCAg	70c

表3：ブイの部位での捕捉プローブの配分

【表4】

配列番号	HLA-DQB1*特異性	感受性／疾患
SEQ ID NO3	すべて	なし
SEQ ID NO4	なし	なし
SEQ ID NO5	0201,0202,0203	感受性
SEQ ID NO6	0302,0304,0305,0307,0308	感受性
SEQ ID NO7	0602,0603,0608,0610,06111,06112, 0612,0613,0614,0616,0308	防御性
SEQ ID NO8	03011,03012,0304,0309	防御性
SEQ ID NO9	03011,03012,03032,03033,0306, 0309,0310	防御性
SEQ ID NO10	05011,05012,0502,05031,05032	中立性
SEQ ID NO11	06011,06012,06013	中立性
SEQ ID NO12	06051,06052,0606,0609,06112, 0612	中立性
SEQ ID NO13	0306,0401,0422	中立性

10

20

表 4：それぞれの捕捉プローブについて可能な標的対立遺伝子

【0047】

表 3 において、 $PI C +$ は $HLA - DQB1 *$ 遺伝子のすべての対立遺伝子の検出を可能にする正の対照 (SEQ ID NO3) を含んでいて、そのため増幅が表 1 に記載の SEQ ID NO1 と SEQ ID NO2 プライマの間に含まれる対象領域に正しく関わるように制御することが可能になる。負の対照 (SEQ ID NO4) は診断目標がなく、特定の規格を満たすためだけに存在する。この配列は HLA に全く固有ではなく、 HLA 遺伝子に見つけれない偶然的配列に対応する。

30

【0048】

SEQ ID NO5 と SEQ ID NO13 の間に含まれる他のプローブは、反対に、病気に対する、もっと正確にはインスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の診断目的を有する。

ここで分かるように、SEQ ID NO5 のプローブは病気に対する、すなわちインスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するプローブである。それはこの疾患に対するこの感受性の重要な対立遺伝子、すなわち $HLA - DQB1 * 0201$ と $HLA - DQB1 * 0202$ 対立遺伝子に固有である。これらの重要な対立遺伝子は表 4 では太字で示した。同様に、SEQ ID NO6 プローブもインスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するプローブである。それはこの疾患に対するこの感受性の重要な対立遺伝子、すなわち $HLA - DQB1 * 0302$ 対立遺伝子に固有である。

40

【0049】

SEQ ID NO7 プローブは病気に対する、すなわちインスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するプローブである。それはこの疾患に対するこの防御性の重要な対立遺伝子、すなわち $HLA - DQB1 * 0602$ と $HLA - DQB1 * 0603$ 対立遺伝子に固有である。

同様に、SEQ ID NO8 プローブもインスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するプローブである。それはこの疾患に対するこの防御性の重要な対立遺伝子、すなわちその形 $HLA - DQB1 * 03011$ と $HLA - DQB1 * 03012$ とを問わず、 $HLA - DQB1 * 0301$ 対立遺伝子に固有である。

50

【0050】

SEQ ID NO9プローブもインスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するプローブである、なぜならそれも、その形HLA-DQB1*03011とHLA-DQB1*03012とを問わず、HLA-DQB1*0301対立遺伝子の検出を可能にするからである。このプローブの利点は、かなり頻繁で、位置57の領域でのその配列に関して防御性的でなければならないHLA-DQB1*HLA-DQB1:03032遺伝子の検出を可能にすることである。

ここで、一方がインスリン依存糖尿病に対する感受性で他方が防御性である、2つのプローブSEQ ID NO6とSEQ ID NO7はHLA-DQB1*0308対立遺伝子の検出を可能にする。なお、この対立遺伝子はきわめてまれである。したがって、それを見つける確率はきわめて小さく、HLA-DQB1*0308同型接合体とHLA-DQB1*0308にぶつかる確率はほとんどゼロである。同様に、同じ推論を一方のインスリン依存糖尿病に対する感受性で他方が防御性である、2つのプローブSEQ ID NO6とSEQ ID NO8に適用することができる。それらは両者共にHLA-DQB1*0304対立遺伝子の検出を可能にする。

この2つの場合において、2つのプローブが、一方が感受性を他方が防御性を、検出するのに何の問題もない、なぜなら有病率があまりにも低いからである。

【0051】

B - 検出プローブ

これはペロキシダーゼ(POD)に結合された、5'にアミン化された分岐を備えたオリゴヌクレオチドである。表5はその構造を明らかにしている。

【表5】

配列番号	配列(5'>3')	bioMerieuxの呼称
SEQ ID NO14	TggAACAgCCAgAAggA	D4-POD

表5：使用した捕捉プローブに適合した検出プローブ

もちろん、この検出プローブは表3と4に示したSEQ ID NO3とSEQ ID NO5からSEQ ID NO13の捕捉プローブに掛かる可能性のある標的アンプリコン全体と相補的になるように選択される。

【0052】

C - 操作法：

第1に、標的調製は次の過程から成る：

- ・アンプリコン全体(50μl)を1.5mlのマイクロ管内に移す
- ・試薬R2(NaOH 2N)5μlを添加
- ・十分均質化する
- ・18 から25 の間に含まれる温度で5分間保温する
- ・後述の成分の交雑緩衝液1mlを添加
- ・後述の成分の、検出プローブ50μlを添加、そして
- ・十分均質化する。

交雑緩衝液の成分は：

- ・pH6.8の燐酸ナトリウム0.1M
- ・0.5M NaCl, 2%(p/v)ポリエチレングリコール4000
- ・0.65%(p/v)tween20、0.1%(p/v)ゼラチン
- ・サケの精子の音波処理DNA0.14g/L
- ・BND(農薬またはプロモ・ニトロ・ジオクサン)0.2g/L、および
- ・0.01g/Lのシプロフロキサシン。

SEQ ID NO14(D4-POD)検出プローブは0.5%(p/v)ウシの血清アルブミンと0.5%(p/v)フェノールの存在の元でpH7.0の5mMホスフェー

10

20

30

40

50

ト緩衝液に希釈される。

【0053】

第2に、標的の交雑は次のように実現される：

- ・バレットR1の8つのプイのそれぞれの中に、混合物100 μ lを配分する
- ・自己接着ホイルで覆う、そして
- ・37 (37 \pm 1) で1時間保温

【0054】

第3に、交雑しなかった標的がある場合にそれを除去することを可能にし、H₂Oで1/20に希釈したColor0洗浄緩衝液500 μ lで3回洗浄することをもってなる洗浄。
<<Color0>>は1% (p/v) tween20を添加したPBSを20倍濃縮した溶液を意味するものとする。

10

【0055】

第4に、検出はどの捕捉プローブが標的オリゴヌクレオチドを交雑したかを決定することを目的とする。それは次の仕方で実現される：

- ・プイのそれぞれの中に、即時調合した基質の溶液100 μ lを添加 - 5 μ lのColor2内にColor1の1タブレット
- ・暗闇で、18 から25 の温度で20分間保温
- ・Color1を50 μ l添加、そして
- ・492nmでの吸収を読み取る。

<<Color1>>はO-フェニレンジアミン・ジヒドロクロライド(OPD)を意味するものとする；<<Color2>>は0.1M燐酸ナトリウム、0.05Mコハク酸、0.03% H₂O₂を意味するものとする、また<<Color3>>は1.8N H₂SO₄を意味するものとする。

20

【0056】

第5に、解釈は前章で確立された検出に応じてインスリン依存糖尿病に対する患者の真の遺伝的素因の決定を可能にする。この検証は：

- ・一方では、光学密度(D.O.)が0.8を超えなければならない、正の対照SEQ ID NO3 (C+)の陽性を検証し、D.O.が0.05未満でなければならない負の対照SEQ ID NO4 (C-)の陰性を検証し、
 - ・他方で、プローブSEQ ID NO5からSEQ ID NO13によって同定された2つの対立遺伝子に対応する遺伝子型を決定する、
- ことを提案している。

30

【0057】

上述の場合、ペロキシダーゼは適切な基質、例えば、OPDが存在するときにオリゴヌクレオチドとの交雑が実現されたかをそれぞれのプローブについて明らかにすることができる酵素である。この基質は可溶性なので、信号の延長があるだろう。この場合、ある患者が同型接合体であるか異型接合体であるかを、あるいはその対立遺伝子がインスリン依存糖尿病に対して感受性、防御性および/または中立性であるかを決定するためには、室によって、あるいはもっと容易には、プイによって捕捉プローブを埋め込まなければならない。これはインスリン依存糖尿病に対して感受性(SEQ ID NO5と6)あるいは防御(SEQ ID NO7, 8と9)が関わるプローブについて言える。一方、この疾患に対して中性(SEQ ID NO10, 11, 12と13)が関与するプローブについて、それらをまとめることは全く可能である。

40

これが当てはまらないのは、使用した基質が沈殿性であるか、検出プローブ(SEQ ID NO14)が蛍光性である場合である。これらの場合、感受性(SEQ ID NO5と6)あるいは防御(SEQ ID NO7, 8と9)のプローブであっても、同一の室内またはプイ内に複数個のプローブを埋め込むことができる。実際、もっともコンパクトな配置において、感受性、防御または中立のすべてのプローブは同一の室内またはプイ内にあってもよく、それは捕捉オリゴヌクレオチドのプロットの重なりなしに異なるタイプのプローブをまとめることができる操作員の容易さだけに依存する。先に明らかにしたご

50

とく、かかる媒体を実現することができる、かかる装置は番号 F R 0 0 / 1 4 6 9 1 で出願人が 2 0 0 0 年 1 1 月 1 5 日に出願した特許出願にすでに詳しく記載されている。

【 0 0 5 8 】

2°) 本発明による分析事例 :

A - 第 1 の標本 :

以下の表 6 はそれぞれのパイに第 1 の被験患者の標本の分画を入れたバレット R 1 で得られた結果を示している。

【 表 6 】

バレットR1	D.O. × 1000	+ / -
SEQ ID NO3(C+)	>2500	+
SEQ ID NO4(C-)	0	-
SEQ ID NO5(S)	1245	+
SEQ ID NO6(S)	126	+
SEQ ID NO7(P)	7	-
SEQ ID NO8(P)	9	-
SEQ ID NO9(P)	1	-
SEQ ID NO10, 13(N)	8	-

10

20

表 6 : 第 1 の標本についてバレット R 1 で得られた結果

【 0 0 5 9 】

分析は下記の通りである :

- S E Q I D N O 3 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 遺伝子の増幅と交雑試験は正確に機能した、

- S E Q I D N O 5 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 * 0 2 0 1 または H L A - D Q B 1 * 0 2 0 2 または H L A - D Q B 1 * 0 2 0 3 対立遺伝子は存在する、

- S E Q I D N O 6 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 * 0 3 0 2 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 4 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 5 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 7 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 8 対立遺伝子は存在する、および

- 他のプローブは陰性である。

結論として、この患者はインスリン依存糖尿病に対する感受性の 2 つの対立遺伝子を有する確率が高い。高い確率とは感受性の H L A - D Q B 1 * 0 3 0 2 対立遺伝子の罹患率が中立性の対立遺伝子である H L A - D Q B 1 * 0 3 0 4 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 5 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 7 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 8 対立遺伝子のそれよりはるかに高いことを意味するものとする。

40

これら 2 つの H L A - D Q B 1 は遺伝子レベルで同定された、この第 1 の標本の H L A 類型化は実際 :

- H L A - D Q B 1 * 0 2 、 および

- H L A - D Q B 1 * 0 3 0 2 、 である。

【 0 0 6 0 】

B - 第 2 の標本

以下の表 7 はそれぞれのパイに第 2 の被験患者の標本の分画を入れたバレット R 1 で得られた結果を示している。

【 表 7 】

バレットR1	D.O. × 1000	+/-
SEQ ID NO3(C+)	1685	+
SEQ ID NO4(C-)	5	-
SEQ ID NO5(S)	708	+
SEQ ID NO6(S)	22	-
SEQ ID NO7(P)	7	-
SEQ ID NO8(P)	143	+
SEQ ID NO9(P)	41	-
SEQ ID NO10, 13(N)	11	-

10

表 7 : 第 2 の標本についてバレット R 1 で得られた結果

【 0 0 6 1 】

分析は下記の通りである :

- SEQ ID NO3 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 遺伝子の増幅と交雑試験は正確に機能した、
- SEQ ID NO5 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 * 0 2 0 1 または H L A - D Q B 1 * 0 2 0 2 または H L A - D Q B 1 * 0 2 0 3 対立遺伝子は存在する、
- SEQ ID NO8 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 1 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 2 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 4 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 9 対立遺伝子は存在する、および
- 他のプローブは陰性である。

結論として、この患者はインスリン依存糖尿病に対する感受性の対立遺伝子と防御対立遺伝子を有する確率が高い。高い確率とは感受性の H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 1 および H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1 2 対立遺伝子の罹患率が中立性の対立遺伝子である H L A - D Q B 1 * 0 3 0 4 または H L A - D Q B 1 * 0 3 0 9 対立遺伝子のそれよりはるかに高いことを意味するものとする。

これら 2 つの H L A - D Q B 1 は遺伝子レベルで同定された、この第一の標本の H L A 類型化は実際 :

- H L A - D Q B 1 * 0 2、および
- H L A - D Q B 1 * 0 3 0 1、である。

【 0 0 6 2 】

C - 第 3 の標本

以下の表 8 はそれぞれのプイに第 2 の被験患者の標本の分画を入れたバレット R 1 で得られた結果を示している。

40

【 表 8 】

バレットR1	D.O. × 1000	+/-
SEQ ID NO3(C+)	>2500	+
SEQ ID NO4(C-)	0	-
SEQ ID NO5(S)	1790	+
SEQ ID NO6(S)	27	-
SEQ ID NO7(P)	31	-
SEQ ID NO8(P)	19	-
SEQ ID NO9(P)	15	-
SEQ ID NO10, 13(N)	829	+

10

表 8 : 第 3 の標本についてバレット R 1 で得られた結果

【 0 0 6 3 】

分析は下記の通りである :

- SEQ ID NO3 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 遺伝子の増幅と交雑試験は正確に機能した、

20

- SEQ ID NO5 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 * 0 2 0 1 または H L A - D Q B 1 * 0 2 0 2 または H L A - D Q B 1 * 0 2 0 3 対立遺伝子は存在する、

- SEQ ID NO10 から 13 プローブは陽性である : H L A - D Q B 1 * 0 3 0 6 または H L A - D Q B 1 * 0 4 0 1 または H L A - D Q B 1 * 0 4 0 2 または H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 1 または H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 2 または H L A - D Q B 1 * 0 5 0 2 2 または H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 1 または H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 2 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 1 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 2 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 3 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 1 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 2 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 6 または H L A - D Q B 1 * 0 6 0 9 または H L A -

30

D Q B 1 * 0 6 1 1 2 または H L A - D Q B 1 * 0 6 1 2 対立遺伝子は存在する、および
- 他のプローブは陰性である。

結論として、この患者はインスリン依存糖尿病に対する感受性の対立遺伝子と中立性対立遺伝子を有する確率が高い。中立性対立遺伝子があると分かった時点から、本発明による分析の枠内でより正確にそれを決定する重要性はわずかしくない。

これら 2 つの H L A - D Q B 1 は遺伝子レベルで同定された、この第一の { ママ } 標本の H L A 類型化は実際 :

- H L A - D Q B 1 * 0 2、および

- H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1、である。

40

【 0 0 6 4 】

【 I V - 本発明を改善するための他の非制限的手法 】

1°) ビオチン化プライマとの P C R アンプリコンの使用 :

A - ビオチン化プライマ :

5' へのビオチン化プライマの組み込みによってビオチン化 P C R アンプリコンと共にインスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析装置 (第 I I I 章、 1°)) のために使用した捕捉固有プローブの組を利用することも可能である、下記の表 9 参照。

【 表 9 】

配列番号	配列 (5'>3')	科学的呼称
ビチオン-SEQ ID NO1	ビチオン-CATGTGCTACTTCACCAACGG	DQBAMP-A-ビチオン
ビチオン-SEQ ID NO2	ビチオン-CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC	DQBAMP-B-ビチオン

表 9 : H L A - D Q B 1 遺伝子増幅のためのビオチン化プライマ
増幅条件は上述のものと同じであるが、操作法は異なっている。

【 0 0 6 5 】

B - ビオチン化プライマでの操作法

第 1 に、標的調製は次の過程から成る：

- ・ アンプリコン全体 (5 0 μ l) を 1 . 5 m l のマイクロ管内に移す
- ・ 試薬 N a O H 2 N の 5 μ l を添加
- ・ 十分均質化する
- ・ 1 8 から 2 5 の間に含まれる温度で 5 分間保温する
- ・ 上述の成分の交雑緩衝液 1 m l を添加、そして
- ・ 十分均質化する。

交雑緩衝液の成分は：

- ・ p H 6 . 8 の 燐 酸 ナ ト リ ウ ム 0 . 1 M
- ・ 0 . 5 M N a C l , 2 % (p / v) ポリエチレングリコール 4 0 0 0
- ・ 0 . 6 5 % (p / v) t w e e n 2 0 , 0 . 1 % (p / v) ゼラチン
- ・ サケの精子の音波処理 DNA 0 . 1 4 g / L
- ・ B N D (農薬またはプロモ・ニトロ・ジオクサン) 0 . 2 g / L 、 および
- ・ 0 . 0 1 g / L の シ プ ロ フ ロ ク サ シ ン 。

SEQ ID NO 1 4 (D 4 - P O D) 検出プローブは 0 . 5 % (p / v) ウシの血清
アルブミンと 0 . 5 % (p / v) フェノールの存在の元で p H 7 . 6 の 5 m M ホスフェー
ト緩衝液に希釈される。

【 0 0 6 6 】

第 2 に、標的の交雑は次のように実現される：

- ・ バレット R 1 の 8 つのプイのそれぞれの中に、混合物 1 0 0 μ l を配分する
- ・ 自己接着ホイルで覆う、そして
- ・ 3 7 (3 7 ± 1) で 1 時間保温

【 0 0 6 7 】

第 3 に、交雑しなかった標的がある場合にそれを除去することを可能にし、H 2 O で 1 /
2 0 に希釈した C o l o r 0 洗浄緩衝液 5 0 0 μ l で 3 回洗浄することをもってなる洗
浄。

【 0 0 6 8 】

第 4 に、検出はどの捕捉プローブが標的オリゴヌクレオチドを交雑したかを決定すること
を目的とする。それは次の仕方で実現される：

- ・ 7 . 2 の p H で、0 . 1 % T w e e n 2 0 , 0 . 0 2 % ウシの血清アルブミンとともに
P B S 緩衝液内に 1 / 1 0 , 0 0 0 に希釈したペロキシダーゼ (S P O D 、 R o c h e 、
r e f . 1 0 8 9 1 5 3) に結合したストレプトアビジン結合溶液 1 0 0 μ l を添加
- ・ 暗闇で、1 8 から 2 5 の温度で 3 0 分間保温
- ・ 洗浄緩衝液 5 0 0 μ l で 3 回洗浄 - C o l o r 0 , H 2 O 内に 1 / 2 0 に希釈、
- ・ プイのそれぞれの中に、即時調合した基質 1 0 0 μ l を添加 - 5 m l の C o l o r 2 内
に C o l o r 1 の 1 タブレット
- ・ 暗闇で、1 8 から 2 5 の温度で 2 0 分間保温
- ・ C o l o r 1 を 5 0 μ l 添加、そして
- ・ 4 9 2 n m での吸収を読み取る。

<< C o l o r 0 , >>、<< C o l o r 1 >>、<< C o l o r 2 >> と << C o l o 50

10

20

30

40

50

r 3 > > は前節に記載のものと同一である。

【0069】

第5に、解釈は前章で確立された検出に応じてインスリン依存糖尿病に対する患者の真の遺伝的素因の決定を可能にする。この検証は：

- ・一方では、光学密度(D.O.)が0.8を超えなければならない、正の対照SEQ ID NO 3(C+)の陽性を検証し、D.O.が0.05未満でなければならない負の対照SEQ ID NO 4(C-)の陰性を検証し)、
 - ・他方で、プローブSEQ ID NO 5からSEQ ID NO 13によって同定された2つの対立遺伝子に対応する遺伝子型を決定する、
- ことを提案している。

10

この手順は追加の過程があるので、長く、やや複雑であるが弱いプローブ、とくにSEQ ID NO 6についてより強い信号が認められる。

【0070】

ところで、以下の表10はビオチン化および非ビオチン化アンプリコンの間に認められる結果の差を示している。

【表10】

プローブ	非ビオチン化アンプリコン	ビオチン化アンプリコン
SEQ ID NO3(C+)	>2500	>2500
SEQ ID NO4(C-)	0	0
SEQ ID NO5(S)	1	14
SEQ ID NO6(S)	134	324
SEQ ID NO7(P)	15	54
SEQ ID NO8(P)	11	34
SEQ ID NO9(P)	19	35
SEQ ID NO10, 13(N)	603	1322

20

30

表10：HLA-DQB1*0302/0605異型接合体系列で得られたDO(x1000)の値

ここで、先述のごとく、プレートの底で検出プローブの固定を可能にする、5'でアミン化された分岐は、ビオチン化アンプリコンについてはもはや使用されていないが、それは捕捉されたアンプリコンの上に存在するビオチンに固定できるようになるペロキシダーゼに組み合わされたストレプトタビジン共役溶液が用いられるからである。

【0071】

2°) ビード上に吸収された捕捉プローブの使用

例えば、SEQ ID NO 6のプローブが存在するパイに固有の信号を増加させるために、直径0.1mmのポリスチレンのビード100μlの懸濁によって、<コーティング>とも呼ばれる被覆を用いることが可能である。これらのビードはPolysciences社(Warrington(PA)USA-ref.:00876)からのものであり、5'にビオチン化された形で調製されたSEQ ID NO 6の捕捉の固有オリゴヌクレオチドによって感作されたSigma社(Saint-Louis(MO)USA-ref.:A9275)によって製造されたアビジン分子によって被覆されている。この場合、ビオチンが存在するので、SEQ ID NO 6捕捉固有オリゴヌクレオチドは連結分岐を持たない。

40

【0072】

A - ビードの調製

1 - アビジン被覆ビードの調製

50

適切な仕方として：

- ・ 9.3 の pH で 50 mM ホウ酸塩緩衝液 100 μ l 内に、5 mg/ml の濃度にアビジン溶液 2.5 μ l を希釈、
- ・ ビードの懸濁 7.4 μ l を添加、そして
- ・ 37 の温度で 30 分間保温する。

2 - アビジンで被覆され、捕捉プローブを担持するビードの調製

さらに：

- ・ ビオチニル化 SEQ ID NO 6 プローブの $5 \cdot 10^{15}$ 分子を添加、
- ・ 37 の温度で 30 分間保温、しなければならない。

【0073】

B - アビジンで被覆され、捕捉プローブを担持するビードによる被覆

被覆緩衝液 (3X PBS) 内で 1/10 の、感作されたビードの懸濁の希釈は、つぎに
 プイ当たり 100 μ l の割合で使用される。アミン化されたプローブに使用された被覆条件、すなわち温度 37 で 2 時間または 18 から 25 の間に含まれる温度で 15 時間は、
 プイの底への固定に対しても変わらないままである。

この方法は、特定のプイ、例えば、配列 SEQ ID NO 6 のプローブが存在するプイ内の信号を増加させること、したがって、当該プイの分析を容易にすることも可能にする。
 さらに、HLA-DQB1*0302 異型体系列で、SEQ ID NO 6 プローブについて得られた D.O. ($\times 1000$) の値が与える結果は次の通りである：

- ・ ビードなし：172、および
- ・ ビードあり：689

【0074】

3°) インスリン依存糖尿病に対して中立の対立遺伝子の固有捕捉プローブのための単独のプイの使用

捕捉のオリゴヌクレオチドに対する標的オリゴヌクレオチド交雑の検出を実施するためのペロキシダーゼの使用の場合、インスリン依存糖尿病に対する <<対立遺伝子の中立性>> の決定のために単独のプイを用いることができる。このときは、それぞれが個別に、優れた特異性を有する 4 つの捕捉の固有プローブ (SEQ ID NO 10 から 13) 全体が含まれる。

先に述べたごとく、例えば、96 プイ形式の、微小滴定プレートの同じプイの底への多重貯蔵法の開発は、単独各唯一のプイ内への上述の 4 つのプローブのための別個の貯蔵を実現することを可能にする。

【0075】

4°) インスリン依存糖尿病に関係する対立遺伝子全体に固有の捕捉プローブのための単独のプイの使用

微小滴定プレートの 1 つのプイの底の多重貯蔵法の開発は、同一のプイ内に、表 3 と 4 に先に述べた、捕捉非固有 (SEQ ID NO 3 と 4) と固有 (SEQ ID NO 5 と 13) の 11 のプローブの貯蔵を可能にする。単一のプイ内でのアンプリコンの交雑過程の実現は、様々な長所がある：

- ・ 試験の安全性の長所、11 個のプローブが誤った陰性のリスクなしに標本のすべてのアンプリコンに同時に会うことができるから、
 - ・ 試験感受性の長所、なぜなら 11 個のプローブが標本のアンプリコン全体に出会うから
 - ・ 大規模な試験を実施できる長所、ならびにプレート当たり 96 も標本を処理できる長所
- 、これは追跡用途分野にはとくに有利である。

上述のごとく、他方でこの手法はプイの底の特異的交雑の局所的な発現を必要とする。例として、蛍光性の、あるいは蛍光マーカで発現できる分子を取り込んだアンプリコン検出のために蛍光を用いることが可能である。

同じ 1 つのプイ内の複数の貯蔵の利用の実施可能性試験も、比色発現によって、実施した。

【0076】

10

20

30

40

50

A - 貯蔵 :

被覆緩衝液またはコーティング (P B S 3 X) n a i n o 4 0 0 - 1 0 0 0 p モル / m l で、1 および 5 μ l の貯蔵で、捕捉の固有プローブ (アミン化バージョンの場合、S E Q I D N O 1 0 から 1 3) の 4 つの手動貯蔵試験。37 で 1 5 分から 2 時間の間、あるいは 1 8 から 2 5 の間に含まれる温度で 1 5 時間保温する。

B - 洗浄 :

希釈 C o l o r 0 で実施する。

C - 標的の調製 :

P C R アンプリコンは前節 (I I I - 1°) - C) に記載のごとく調製した。

増幅管内で、次の過程を実施する :

- ・ 1 μ l の 2 N N a O H を展開してアンプリコン 5 0 μ l の変性、
- ・ 1 8 から 2 5 の間に含まれる温度で 5 分間保温、
- ・ 交雑緩衝液 4 0 μ l の添加 (S S P E 1 5 X , 2 % P E G 4 0 0 0 、 1 . 5 % t w e e n 2 0 , 0 . 2 2 % ゼラチン、0 . 0 3 2 % 音波処理 DNA 、農薬)
- ・ 共役溶液 D 4 - P O D を 6 μ l 添加 (5 0 p モル / m l ; 燐酸緩衝液 5 m M p H 7 . 0 - 0 . 5 % (p / v) A S B - 0 . 5 % (p / v) フェノール) 。

D - 交雑 :

反応混合物全量を 4 つの貯蔵で感作したパイ内に移し、37 から \pm 1 の温度で 1 時間保温する。

E - 洗浄 :

希釈 C o l o r 0 で実施する。

F - 発現 :

下記の過程を実施する :

- ・ 基質溶液 1 0 0 μ l (C o l o r 2 内に希釈した C o l o r 1) を添加
- ・ 暗闇で、1 8 と 2 5 の間に含まれる温度で 2 0 分間、攪拌せずに現像
- ・ 陽性のプローブの場所の発色出現を観察、
- ・ C o l o r 3 を 5 0 μ l 添加して信号を定量化
- ・ 静かに攪拌して均質化、そして
- ・ 4 9 2 n m で読み取る。

必要に応じて本明細書に組み込まれる参考文献

B e n j a m i n , 1 9 9 0 :

B e n j a m i n R , P a r h a m P , I m m u n o l o g y T o d a y , 1 9 9 0 , 1 1 , 1 3 7 - 1 4 2 , G u i l t b y a s s o c i a t i o n : H L A - B 2 7 a n d a n k y l o s i n g s p o n d y l i t i s

B r e w e r t o n , 1 9 7 3 :

B r e w e r t o n D A , C a f f r e y M , H a r t F D e t a l , L a n c e t , 1 9 7 3 , 1 , 9 0 4 - 9 0 7 . A n k y l o s i n g s p o n d y l i t i s a n d H L - A 2 7 .

G r e g e r s e n , 1 9 8 6 :

G r e g e r s e n P K , S h e n M , S o n g Q L , M e r r y m a n P , D e g a r S , S e k i T , M a c c a r i J , G o l d b e r g D , M u r p h y H , S c h w e n z e r J , W a n g C Y , W i n c h e s t e r R J , N e p o m G T , S i l v e r J , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 9 8 6 , 8 3 , 2 6 4 2 - 2 6 4 6 . M o l e c u l a r d i v e r s i t y o f H L A - D R 4 h a p l o t y p e s .

G r e g e r s e n , 1 9 8 7 :

G r e g e r s e n P K , S i l v e r J , W i n c h e s t e r R J , A r t h r i t i s R h e u m . , 1 9 8 7 , 3 0 , 1 2 0 5 - 1 2 1 3 . T h e s h a r d e p o t i p e h y p o t h e s i s . A n a p p r o a c h t o u n d e r s t a n d i n g t h e m o l e c u l a r g e n e t i c s o f s u s c e

10

20

30

40

50

ptibility to rheumatoid arthritis .

Hiraiwa , 1990 :

Hiraiwa A , Yamanaka K , Kwok WW , Mickelson E M , Masewicz S , Hansen JA , Radka SF , Nepom GT , Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 1990 , 87 , 8051 - 8055 . Structural requirements for recognition of the HLA - Dw14 class II epitope : a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis .

Khan , 1979 :

Kahn MA , Kushner I , Ballou SP et al , Lancet , 1979 , 1 , 921 - 922 , Familial rheumatoid arthritis and HLA - DRW4 .

Komulainen , 1999 :

Komulainen J , Kulmara P , Savola K , Lounamaa R , Ilonen J , Reijonen H , Knip M , Akerblom HK ; Diabetes Care 1999 , vol 22 , n 12 , 1950 - 1955

Kulmala , 2000

Kulmara P , Savola K , Reijonen H , Veijola R , Vahas P , Karjalainen J , Tuomiletho - Wolf E , Ilonen J , Tuomiletho J , Akerblom HK , Knip M ; Diabetes 2000 , vol 49 , 48 - 58

Lawrence , 1970 :

Lawrence j , Ann . Rheum . Dis . , 1970 , 29 , 357 - 379

Nepom , 1989

Nepom GT , Byers P , Seyfried C , Healey LA , Wilske KR , Stage D , Nepom BS , Arthritis Rheum . 1989 , 32 , 15 - 21 . HLA genes associated with rheumatoid arthritis . Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes .

Nepom , 1991 :

Nepom GT , Elich H , Annu . Rev . Immunol . , 1991 , 9 , 493 - 525 . MHC class - II molecules and autoimmunity .

Schlosstein , 1973 :

Schlosstein L , Terasaki PI , Bluestone R , Pearson CM , N . Engl . J . Med . , 1973 , 288 , 704 - 706 . High association of a HL - A antigen , w27 , with ankylosing spondylitis

Stastny , 1978 :

Stastny P , N . Engl . J . Med . , 1978 , 298 , 869 - 871 . Association of the B - cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis .

Stastny , 1983 :

Stastny P , Ball EJ , Dry PJ Nunez G , Immunol . Rev . , 1983 , 70 , 113 - 154 . The human immune response region (HLA - D) and disease suscept

10

20

30

40

50

ibility .

Stastny , 1988 :

Stastny P , Ball , E , Kahn M , Olsen N , Pincus T
, Gao , X , Br , J . Rheumatol . , 1988 , 27 , 132 - 138 . H
LA - GR4 and other genetic markers in rheu
matoid arthritis .

Todd , 1988 :

Todd JA , Acha - Orbea H , Bell JI , Chao N , Fron
ek Z , Jacob CO , McDermott M , Sinha AA , Timme
rman L , McDevitt HO , Science , 1988 , 240 , 1003 10
- 1009

Wordsworth , 1989 :

Wordsworth BP , Lanchbury JS , Sakkas LI , Wel
sh KI , Panayi GS , Bell JI , Proc . Natl . Acad . S
ci . USA , 1989 , 86 , 10049 - 10053

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
23 mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/40711 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68 (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/03599
- (22) Date de dépôt international : 16 novembre 2001 (16.11.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 00/14896 17 novembre 2000 (17.11.2000) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIOMERIEUX S.A. [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marey l'Étoile (FR).
- (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : MOUGIN, Bruno [FR/FR]; 29, rue Lamartine, F-69003 Lyon (FR).
- (74) Mandataire : BONNEAU, Gérard; Cabinet Bonneau, Les Taissonnières HB3, 1681, route des Dolines, F-06560 Sophia Antipolis (FR).
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR ANALYSING A PATIENT'S PREDISPOSITION TO INSULIN-DEPENDENT DIABETES, DEVICE AND SET OF PRIMERS

(54) Titre : PROCÉDE D'ANALYSE DE LA PREDISPOSITION D'UN PATIENT AU DIABÈTE INSULINO-DÉPENDANT, DISPOSITIF ET JEU D'AMORCES

(57) Abstract: The invention concerns a method for analysing a patient's genetic predisposition to insulin-dependent diabetes. The invention also concerns a device designed to implement said method and a set of amplifying primers adapted thereto. The method consists in placing a liquid sample containing at least one type of amplicons, derived from amplification of at least a polymorphic region of interest related to the searched disease, in the simultaneous presence of probes selected as follows: at least a probe specific of the patient's susceptibility to the disease, at least a probe specific of said patient's protection against said disease, and at least a probe specific of said patient's neutrality to said disease; and in revealing the hybridisation's produced. The invention is in particular applicable in the field of diagnosis.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant. Elle consiste également en un dispositif adapté à la mise en oeuvre et un jeu d'amorces d'amplification adapté à un tel procédé. Le procédé consiste à mettre un échantillon liquide contenant au moins un type d'amplicons, issus de l'amplification d'au moins une région polymorphe d'intérêt en rapport avec la maladie recherchée, en présence simultanément de sondes choisies de la façon suivante: au moins une sonde spécifique de la susceptibilité du patient vis-à-vis de la maladie; au moins une sonde spécifique de la protection dudit patient vis-à-vis de ladite maladie; et au moins une sonde spécifique de la neutralité dudit patient vis-à-vis de ladite maladie; et consistant à révéler les hybridations réalisées. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic.

WO 02/40711 A1

PROCEDE D'ANALYSE DE LA PREDISPOSITION D'UN PATENT AU DIABETE
INSULINO-DEPENDANT, DISPOSITIF ET JEU D'AMORCES

5

DESCRIPTION

La présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à au moins une maladie appelée le diabète insulino-dépendant.

10 Le diabète de type 1 (ou diabète insulino-dépendant) est une maladie caractérisée par la disparition des cellules β de Langerhans productrices d'insuline dans le pancréas, résultant d'un processus auto-immun qui se développe chez les individus génétiquement prédisposés. A côté de facteurs environnementaux, une composante génétique de prédisposition est observée.

15 Chaque individu dispose d'un patrimoine génétique propre, hérité de ses ascendants. Ce contexte génétique particulier peut parfois activement participer à l'apparition et/ou au développement de certaines affections : infections par un agent pathogène (virus du SIDA par exemple), maladies autoimmunes (maladies rhumatismales par exemple). Les gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité
20 (CMH) notamment les gènes codant pour les antigènes HLA (Human Leukocyte Antigens), jouent un rôle prépondérant dans le développement des pathologies autoimmunes :

- non spécifiques d'organes, par exemple articulaires comme la polyarthrite rhumatoïde (Lawrence, 1970 ; Stastny, 1978 ; Khan, 1979 ; Stastny, 1983 ;
25 Gregersen, 1986 ; Gregersen, 1987 ; Stastny, 1988 ; Todd, 1988 ; Wordsworth, 1989 ; Nepom, 1989 ; Hiraiwa, 1990 ; Nepom, 1991) ou la spondylarthrite ankylosante (Brewerton, 1973 ; Schlosstein, 1973 ; Benjamin, 1990), ou
- spécifiques d'organes et plus précisément de glandes endocrines comme le pancréas associé au diabète insulino-dépendant (Komulainen, 1999 ; Kulmala, 2000).

30 Une partie importante de la composante génétique de la susceptibilité au diabète insulino-dépendant a pu être associée au marqueur principal lié au locus HLA

(IDDM1), et plus particulièrement aux gènes HLA-DQB1. Les données de la littérature permettent actuellement de considérer les allèles les plus courants parmi les quarante-cinq (45) allèles HLA-DQB1 décrits dans la nomenclature internationale, comme allèles de susceptibilité (allèles S), allèles de protection (allèles P), allèles neutres (allèles N) (www.anthonynolan.com/HIG/seq/nuc; octobre 2000). Il s'agit essentiellement de données validées pour des populations caucasiennes. Pour le moment, l'explication moléculaire réside dans le polymorphisme observé au niveau de l'acide aminé 57 de la chaîne β de la protéine HLA-DQ (Todd et al., 1988). Le tableau 1 ci-dessous résume le statut du diabète insulino-dépendant en fonction de la nature de cet acide aminé en position 57.

Statut diabète insulino-dépendant	Allèles HLA-DQB1*	Acide aminé en position 57
S	02 0302	Alanine (A)
P	0301 0602 0603	Acide aspartique (D)
N	Autres	Valine (V) ou Sérine (S)

Tableau 1 : Statut du diabète insulino-dépendant en fonction de la nature de l'acide aminé en position 57

15

Chaque génotype correspond à une combinaison de deux allèles. Ainsi, à chaque échantillon correspond un génotype de prédisposition au diabète de type 1 : SS, PP, NN, SP, SN ou NP. Cette explication moléculaire est également cohérente avec l'observation d'une sévérité graduelle de la maladie lorsque le génotype comprend aucun, un ou deux allèles de susceptibilité, communément appelée effet dose.

20

Actuellement en ce qui concerne le diabète insulino-dépendant, un article de Cinek et al. « Screening for the IDDM high-risk genotype. A rapid microtitre plate method using serum as source of DNA », *Tissue Antigens*, 2000, 56, 4, 344-349. Cette publication souligne l'intérêt de développer un test d'analyse de prédisposition

25

*génétiq ue au diabète insulino-dépendant. Cette équipe a choisi une approche à partir de sérum avec une technique qui est complète vis-à-vis des allèles concernés (quelques allèles HLA-DQB1 mais aussi quelques allèles HLA-DQA1 et quelques allèles HLA-DRB1*04).*

5 L'utilisation de sérum est beaucoup moins pratique qu'un protocole à partir d'une tache de sang séché. De plus, leur technique est complexe puisque :

- ils réalisent une analyse en deux temps des allèles HLA-DQB1 et HLA-DQA, puis des allèles HLA-DRB1*04,
- ils utilisent une technologie compliquée pour l'immobilisation des sondes de capture, avec une température d'hybridation à 63°C, des lavages à 63°C puis de 18 à 10 25°C et révélation en deux temps avec streptavidine peroxydase (SPOD).

De même, cette technique ne permet absolument pas de détecter l'effet dose qui a pourtant une influence considérable sur la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant.

15 Enfin, ces tests ne peuvent être effectués que par les centres spécialisés dans l'étude des gènes HLA, tels les centres de transfusions sanguines ou certains hôpitaux spécialisés. Cette identification nécessite donc l'envoi d'un échantillon et l'utilisation d'une technologie assez lourde. Les conséquences négatives sont donc nombreuses, telles que :

- les risques de perte de l'échantillon,
- la longue durée de cette identification,
- le coût relativement élevé de ladite identification, et
- l'absence de contrôle par le demandeur sur le prestataire de services.

20 Le procédé d'analyse revendiqué permet une analyse simplifiée sur le plan pratique, plus rapide, moins de deux heures, après préparation des amplicons, et peu onéreuse.

25 A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à une maladie auto-immune, consistant à mettre 30 un échantillon liquide contenant au moins un type d'amplicons, issus de l'amplification

d'au moins une région polymorphe d'intérêt en rapport avec la maladie recherchée, en présence simultanément de sondes choisies de la façon suivante :

- au moins une sonde spécifique de la susceptibilité du patient vis-à-vis de la maladie,
- au moins une sonde spécifique de la protection dudit patient vis-à-vis de ladite maladie, et
- au moins une sonde spécifique de la neutralité dudit patient vis-à-vis de ladite maladie,

et consistant à révéler les hybridations réalisées.

Préférentiellement, ce procédé permet l'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à un diabète insulino-dépendant.

Selon une variante de réalisation, les sondes utilisées pour détecter le diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0201 et HLA-DQB1*0202 et HLA-DQB1*0302 pour la susceptibilité,
- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0301, HLA-DQB1*0602 et HLA-DQB1*0603 pour la protection, et
- au moins une sonde spécifique des autres allèles associés au diabète insulino-dépendant pour la neutralité.

Selon une variante de réalisation, les sondes utilisées pour détecter le diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0201, HLA-DQB1*0202, HLA-DQB1*0203, HLA-DQB1*0302, HLA-DQB1*0304, HLA-DQB1*0305, HLA-DQB1*0307 et HLA-DQB1*0308 pour la susceptibilité,
- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*03011, HLA-DQB1*03012, HLA-DQB1*03032, HLA-DQB1*03033, HLA-DQB1*0304, HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0308, HLA-DQB1*0309, HLA-DQB1*0310, HLA-DQB1*0602, HLA-DQB1*0603, HLA-DQB1*0608, HLA-DQB1*0610, HLA-DQB1*06111, HLA-DQB1*06112, HLA-DQB1*0612, HLA-DQB1*0613, HLA-DQB1*0614 et HLA-DQB1*0616 pour la protection, et

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

5

- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0401, HLA-DQB1*0402, HLA-DQB1*05011, HLA-DQB1*05012, HLA-DQB1*0502, HLA-DQB1*05031, HLA-DQB1*05032, HLA-DQB1*06011, HLA-DQB1*06012, HLA-DQB1*06013, HLA-DQB1*06051, HLA-DQB1*06052, HLA-DQB1*0606, HLA-DQB1*0609, HLA-DQB1*06112 et HLA-DQB1*0612 pour la neutralité.

Plus précisément et dans toutes les variantes précédemment citées, les sondes utilisées pour détecter la susceptibilité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0201, HLA-DQB1*0202 et HLA-DQB1*0203, et
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0302, HLA-DQB1*0304, HLA-DQB1*0305, HLA-DQB1*0307 et HLA-DQB1*0308.

Selon ce dernier cas, les sondes utilisées pour détecter la susceptibilité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont constituées d'au moins dix (10) acides aminés successifs pris dans les séquences suivantes :

- SEQ ID NO 5 (TCTTgTgAgCAgAAgC), et
- SEQ ID NO 6 (CCgCCTgCCgCCgA).

Plus précisément et dans toutes les variantes précédemment citées, les sondes utilisées pour détecter la protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*03011, HLA-DQB1*03012, HLA-DQB1*0304 et HLA-DQB1*0309,
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*03011, HLA-DQB1*03012, HLA-DQB1*03032, HLA-DQB1*03033, HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0309 et HLA-DQB1*0310, et
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0308, HLA-DQB1*0602, HLA-DQB1*0603, HLA-DQB1*0608, HLA-DQB1*0610, HLA-DQB1*06111, HLA-DQB1*06112, HLA-DQB1*0612, HLA-DQB1*0613, HLA-DQB1*0614 et HLA-DQB1*0616.

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

6

Selon ce dernier cas, les sondes utilisées pour détecter la protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont constituées d'au moins dix (10) acides aminés successifs pris dans les séquences suivants :

- SEQ ID NO 7 (AggggACCCgggCggA),
- 5 • SEQ ID NO 8 (gACgTggAggTgTACC), et
- SEQ ID NO 9 (gCCgCCTgACgCCg).

Plus précisément et dans toutes les variantes précédemment citées, les sondes utilisées pour détecter la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- 10 • une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0401 et HLA-DQB1*0402,
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*05011, HLA-DQB1*05012, HLA-DQB1*0502, HLA-DQB1*05031 et HLA-DQB1*05032,
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*06011, HLA-DQB1*06012 et HLA-DQB1*06013, et
- 15 • une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*06051, HLA-DQB1*06052, HLA-DQB1*0606, HLA-DQB1*0609, HLA-DQB1*06112 et HLA-DQB1*0612.

Selon ce dernier cas, les sondes utilisées pour détecter la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont constituées d'au moins dix (10) acides aminés successifs pris dans les séquences suivants :

- 20 • SEQ ID NO 10 (ggggCCCgggCgTC),
- SEQ ID NO 11 (AggAggACgTgCgC),
- SEQ ID NO 12 (TCTTgTAACCAgATAC), et
- SEQ ID NO 13 (ggTggACACCgTATgCAg).

25 Dans tous les cas de figure, au moins une sonde de contrôle positif, capable de s'hybrider avec l'ensemble des gènes HLA-DQB1, est utilisée pour permettre la détection de tous les allèles HLA-DQB1.

De plus, au plus 38,89 %, préférentiellement au plus 20 %, des bases d'une même sonde sont remplacées par au moins une base analogue, telle que l'inosine. De
30 telles valeurs sont déductibles d'une précédente demande de brevet déposée par la

demanderesse sous le numéro PCTFR00/01385 sous priorité des 20 juin 1999 et 6 décembre 2000. Une définition d'une base analogue est donnée dans la suite de la description.

5 Préalablement au procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à une maladie auto-immune, tel que décrit ci-dessus, au moins une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt associées au HLA-DQB1 est effectuée.

Préférentiellement, les amorces d'amplification sont biotinylées, de sorte que les amplicons sont également biotinylés.

10 Préalablement à l'amplification, l'échantillon biologique prélevé, préférentiellement sous forme de tache de sang séché, est traité en vue de l'extraction des acides nucléiques.

Cette extraction des acides nucléiques s'effectue dans un mélange réactionnel contenant déjà les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), qui seront ensuite utilisés lors de l'amplification, et ce préalablement à l'incubation.

15 Dans ce dernier cas, après l'incubation, on ajoute dans le mélange réactionnel, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), qui seront également utilisés lors de l'amplification ultérieure.

20 L'invention concerne également un dispositif permettant la mise en œuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus, où selon une première variante de réalisation, chaque type de sondes spécifiques est fixé dans un compartiment indépendant, tel qu'un puits d'une plaque de microtitration, indépendamment des autres sondes.

25 Selon une deuxième variante de réalisation, chaque type de sondes utilisées pour détecter la susceptibilité ou la protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant est fixé dans un compartiment indépendant, tel qu'un puits d'une plaque de microtitration, indépendamment des autres sondes utilisées pour détecter cette susceptibilité ou cette protection, et toute ou partie des différents types de sondes utilisées pour détecter la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant est fixée dans au moins un puits d'une plaque de microtitration.

Selon une troisième variante de réalisation, au moins deux types de sondes spécifiques différentes sont fixés dans un même compartiment indépendant, tel qu'un même puits d'une plaque de microtitration, sans interaction entre elles.

5 Selon une quatrième variante de réalisation, l'ensemble des types de sondes utilisées pour détecter la susceptibilité ou la protection ou la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant est fixé dans un seul et même compartiment, tel qu'un puits d'une plaque de microtitration.

Dans le cas où un compartiment, tel qu'un même puits d'une plaque de microtitration, ne contient qu'un seul type de sondes utilisées pour détecter la susceptibilité ou la protection, le procédé de révélation des hybridations réalisées avec le dispositif s'effectue par une révélation colorimétrique non localisée mettant en jeu une réaction enzymatique. Par exemple, il peut s'agir d'une révélation des hybridations réalisées entre chaque type de sonde et les amplicons par la peroxydase.

10 Dans le cas où un compartiment, tel qu'un même puits d'une plaque de microtitration, contient au moins deux types de sondes utilisées pour détecter la susceptibilité ou la protection, le procédé de révélation des hybridations réalisées avec un dispositif s'effectue par une révélation localisée. Par exemple, il peut s'agir d'une révélation des hybridations réalisées entre chaque type de sonde et les amplicons par fluorescence ou radioactivité.

15 L'invention concerne enfin un jeu d'amorces permettant l'amplification d'une séquence correspondant au gène HLADQB1 en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant, qui consiste à utiliser une amorce SEQ ID NO 1 en combinaison avec une amorce SEQ ID NO 2.

20 Préférentiellement, les amorces sont biotinylées en 5'.

De plus, les sondes de capture permettant l'hybridation de séquences correspondant au gène HLA-DQB1, en vue de l'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant, sont fixées au fond d'un puits de plaque de microtitration ou sur une bille par l'intermédiaire d'un bras aminé ou de biotine situé(e) en position 5' des sondes.

30

Les exemples ci-joints sont donnés à titre d'exemple explicatif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

5 La présente invention concerne un procédé de détection de maladies génétiques qui est rapide et d'un faible coût. Cette nouvelle technologie peut être utilisée avec toutes les maladies génétiques et particulièrement avec la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, le diabète insulino-dépendant et d'autres maladies auto-immunes, telles que les connectivites (lupus, sclérodermie, ...) également rencontrées lors de consultation de rhumatologie.

10

Il s'agit d'un procédé dédié à l'analyse de prédispositions génétiques d'un individu à certaines maladies, par une technique de biologie moléculaire permettant l'analyse simultanée d'au moins un gène. Ce procédé peut être avantageusement appliqué à l'analyse des prédispositions génétiques d'un individu, pour une maladie ou 15 un ensemble de maladies apparentées, associée(s) à un ou plusieurs gènes. Ce procédé peut être appliqué à l'analyse des prédispositions génétiques d'un individu à certaines maladies auto-immunes, c'est-à-dire le diabète insulino-dépendant, relatif à un organe, dans le cas présent le pancréas.

20

L'intérêt de ce procédé est d'obtenir en une étape, avec un test multiple mais unique, un ensemble complet d'informations pertinentes d'intérêt clinique (diagnostique, pronostique et d'orientation thérapeutique). Le procédé se décompose en plusieurs étapes :

- 1) extraction d'acides nucléiques à partir d'un prélèvement biologique de l'individu,
- 25 2) amplification des régions d'intérêt, pour lesquelles un polymorphisme associé à une prédisposition génétique à une pathologie a été décrit, et
- 3) analyse simultanée des amplicons, utilisant un ensemble de réactions d'hybridation mettant en œuvre un jeu de sondes moléculaires permettant l'analyse précise d'allèles ou de groupes d'allèles donnés.

30

I - Définitions :

Par compartiment, il faut comprendre tout support solide plan ou concave, c'est-à-dire formant cuvette, permettant de recevoir soit :

- dans un premier cas, une quantité d'un liquide sans que ce liquide n'ait d'interaction avec d'autres aliquotes de ce liquide ou d'autres liquides présents au niveau d'éventuel(s) compartiment(s) adjacent(s),
- dans un second cas, plusieurs quantités égales ou différentes entre elles d'un même liquide ou de liquides différents sans que chacun de ce ou ces liquides n'ait d'interaction avec d'autres aliquotes de ce liquide ou d'autres liquides présents au niveau d'éventuel(s) compartiment(s) adjacent(s).

Un dispositif permettant de réaliser ces dépôts de quantités de liquide(s), qui peuvent aller de quelques centaines de microlitre, dans le premier cas, à 0,5 nanolitre, dans le second cas, ainsi que le procédé mis en œuvre par un tel dispositif et les supports réalisés avec le procédé par le dispositif sont déjà bien décrits dans une demande de brevet déposée le 15 novembre 2000 par la demanderesse, sous le numéro FR00/14691.

Dans le second cas, les différentes quantités de liquide(s) réparties sur un seul compartiment sont de très faibles volumes, généralement inférieurs au microlitre et forment des spots à la surface dudit compartiment. Le volume de solution par goutte est compris entre 0,5 nanolitre et 1 microlitre, préférentiellement 1 nanolitre et 200 nanolitres.

Le terme support solide, tel qu'utilisé dans la définition précédente, inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un analyte, et dans notre cas un acide nucléique. Des matériaux naturels, de synthèse, modifiés ou non chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment des polymères tels que polychlorure de vinyle, polyéthylène, polystyrène, polyacrylate, polyamide, ou copolymères à base de monomères vinyl aromatiques, alkylesters d'acides α -insaturés ou β -insaturés, esters d'acides carboxyliques insaturés, chlorure de vinylidène, diènes ou composés présentant des fonctions nitriles (acrylonitrile) ; des polymères de chlorure de vinyle et de propylène, polymère de chlorure de vinyle et acétate de vinyle, copolymères à base de styrènes ou dérivés substitués du styrène ; des fibres synthétiques telles que le nylon, la nitrocellulose ; des matériaux inorganiques tels que

la silice, le verre, la céramique, le quartz ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques.

Le support solide selon l'invention peut être, sans limitation, sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une feuille, d'un tube, d'un puits, de particules ou d'un support plan comme une pastille, généralement appelée « wafer », de silice ou silicium. Préférentiellement, au moins une partie du support est plan comme un wafer de silicium ou le fond d'un puits d'une plaque de microtitration. Préférentiellement, ce compartiment est constitué par un puits de plaque de microtitration.

Le support solide est hydrophile *et/ou* hydrophobe en fonction des applications et de la nature de la solution contenant le ou les analytes. Par exemple, des zones hydrophiles sont utilisées pour le dépôt, lesdites zones hydrophiles étant délimitées par des zones hydrophobes ce qui permet de mieux contrôler le diamètre des spots

Par révélation d'une hybridation, il faut comprendre que l'on utilise un polynucléotide marqué par un réactif de marquage. Par réactif de marquage, on entend un traceur générant directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces traceurs suit :

- les enzymes, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la β -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, qui produisent un signal détectable en présence d'un substrat adapté, qui est ajouté, par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, ou
- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants, ou
- les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou par leur propriété électrique comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, les mesures d'impédance, ou
- les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, ou
- les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I .

De préférence, le traceur est un composé fluorescent de faible encombrement stérique comme la fluorescéine, le dansyl, les chromophores du type IR (Li-COR Inc, Lincoln NE, USA), Cy5 et Cy3 (Randolph J.B. and al, Nucleic Acids Res., 25(14),

p2923-2929, 1997) et leurs dérivés. Par faible encombrement stérique, on entend un poids moléculaire inférieur à 1000 g/mole.

Le procédé de détection d'un acide nucléique cible dans un échantillon dans lequel on met en contact cet acide nucléique cible, éventuellement prétraité, avec en outre le nucléotide fonctionnalisé de manière à générer un polynucléotide fonctionnalisé, et à marquer ledit polynucléotide avec le réactif de marquage puis à détecter ledit polynucléotide marqué.

Par prétraitement, on entend les différentes étapes de traitement de l'échantillon pour rendre accessible l'acide nucléique cible, comme par exemple, la lyse, la fluidification, la concentration.

Par « au moins une sonde spécifique des autres allèles associés au diabète insulino-dépendant pour la neutralité », il faut comprendre au moins une sonde spécifique de tout ou partie des allèles constituant le HLA-DQB1, allèles qui n'ont pas été définis comme constituant des allèles de susceptibilité ou de protection au diabète insulino-dépendant. Généralement, on choisit les sondes en fonction de la prévalence des allèles reconnus ; ainsi plus un allèle est prévalent et plus on l'implique au niveau des sondes spécifiques de neutralité.

Il peut également s'agir, seul ou en combinaison avec au moins l'une des sondes qui précèdent, d'au moins une sonde spécifique de tout ou partie des allèles constituant le HLA-DR3 et/ou le HLA-DR4. Ainsi de nombreux articles mettent en évidence ces haplotypes peuvent avoir un impact :

- Park Y.S., She J.X., Noble J.A., Erlich H.A. et Einsenbarth G.S., *Tissue Antigens* 2001 : 57 : 185-191 : « Transracial evidence for the influence of the homologous HLA DR-DQ haplotype on transmission of HLA DR4 haplotypes to diabetic children »,
- Kockum I., Sanjeevi C.B., Eastman S., Landin-Olsson M., Dahlquist G., Lernmark A. *et al.*, *European Journal of Immunogenetics* 26, 361-372 : « Complex interaction between HLA DR and DQ in conferring risk for childhood type 1 diabetes »,
- Undlien D.E., Kockum I., Ronningen K.S., Lowe R., Sanjeevi C.B., Graham J., Lie B.A., Akselsen H.E., Lernmark A. and Thorsby E., *Tissue Antigens* 1999 : 54, 543-

551 : « HLA associations in type 1 diabetes among patients not carrying high-risk DR3-DQ2 or DR4-DQ8 haplotypes »,

- Donner H., Seidl C., Van der Auwera B., Braun J., Siegmund T., Herwig J., Weets I., The Belgian Diabetes Registry, Usadel K.H. et Badenhoop K., Tissue Antigens 2000 : 55 : 271-274 : « HLA-DRB1*04 and susceptibility to type 1 diabetes mellitus in a German/Belgian family and German case-control study »,
- Redondo M.J., Kawasaki E., Mulgrew C.L., Noble J.A., Erlich H.A., Freed B.M., Lie B.A., Thorsby E., Einsenbarth G.S., Undlien D.E., Kockum I. et Ronningen K.S., The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000 : Vol.55, No 10 : 3793-3797 : « DR- and DQ-Associated Protection from Type 1A Diabetes : Comparison of DRB1*1401 and DQA1*0102-DQB1*0602 ».

Par amplification, il faut comprendre que les polynucléotides fonctionnalisés sont générés par une réaction d'amplification enzymatique qui agit sur l'acide nucléique cible qui sert de matrice. Les articles de Lewis (1992. Genetic Engineering News, 12, p. 1-9) d'une part, et d'Abramson et Myers (1993. Curr. Opin. Biotechnol., 4, p. 41-47), d'autre part, donnent des exemples d'amplification de cible. La technique d'amplification enzymatique est par exemple choisie parmi les techniques NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), TMA (Transcription Mediated Amplification) RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction), PCR (Polymerase Chain Reaction), SDA (Strand Displacement Amplification) ou LCR (Ligase Chain Reaction).

Par base analogue, il faut comprendre un nucléotide modifié qui est généralement incorporé dans un polynucléotide. Un polynucléotide est constitué d'un enchaînement d'au moins deux désoxyribonucléotides ou ribonucléotides comprenant éventuellement au moins un nucléotide modifié, par exemple au moins un nucléotide comportant une base modifiée, tel que l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine, la nébularine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Ce polynucléotide peut aussi être modifié au niveau :

- de la liaison internucléotidique, comme par exemple les phosphorothioates, les H-phosphonates, les alkyl-phosphonates, ou

- du squelette, comme par exemple les α -oligonucléotides (FR-A-2.607.507) ou les PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, p1895-1897, 1992 ou les 2' O-alkyl ribose.

Chacune de ces modifications peut être prise en combinaison. Le polynucléotide peut être un oligonucléotide, un acide nucléique naturel ou un de ses fragments comme un ADN, un ARN ribosomique, un ARN messenger, un ARN de transfert, un acide nucléique obtenu par une technique d'amplification enzymatique.

II - Préparations de l'échantillon :

10

1°) Extraction d'acides désoxyribonucléiques (ADN) :

A - A partir d'un échantillon de sang total :

Les différents protocoles classiques d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang total prélevé sur un anticoagulant, comme EDTA (Éthylène diamine tétraacétique) ou citrate ou héparine, peuvent être utilisés. Ainsi, il peut s'agir d'un protocole avec une étape d'extraction au phénol ou avec étapes de lyses des cellules rouges puis des cellules blanches (Kimura *et al.*, 1992).

En pratique et selon un mode de réalisation, cette extraction est réalisée de manière tout à fait classique. En fait, on peut utiliser n'importe quelle technique d'extraction d'ADN, permettant d'obtenir du matériel susceptible d'être ultérieurement amplifié par un procédé d'amplification comme la Polymerase Chain Reaction (PCR). Ces techniques de lyse des cellules, avec extraction puis purification des acides nucléiques sont habituellement celles recommandées pour des analyses génétiques ou des techniques rapides utilisant des produits commerciaux, telles que QIAmp Blood Kit (Marque déposée) de QIAGEN S.A.

25

B - A partir de taches de sang séché :

Différents protocoles d'extraction d'ADN à partir de sang séché sont décrits dans la littérature.

30

Il y a tout d'abord une première **technique de Jinks et al.**, Hum. Genet. 1989, 81 : 363-366. Celle-ci consiste à déposer du sang sur du papier Schleicher & Schuell no. 903. Les taches sont séchées à une température comprise entre 18 et 25°C, pendant plusieurs heures. On découpe quatre pastilles de 3 mm de diamètre, et on les place dans un tube de 1,5 ml et on fixe par addition de 30 µl de méthanol, puis on effectue une évaporation. Ensuite on ajoute 60 µl d'eau et on porte à ébullition pendant 15 minutes. Après un centrifuge 15 minutes à 10.000 g. Enfin on prélève le surnageant pour l'étape suivante, l'amplification par PCR.

La deuxième **technique** est celle de **Hezard et al.**, Thrombosis Research, 1997, 88, 1, 59-66. On collecte le sang sur EDTA ou sur citrate ou sur héparine, et on le dépose sur un papier filtre (Guthrie). Une pastille de 1 mm de diamètre est directement placée dans 50 µl de mélange réactionnel pour l'amplification subséquente. On incube 15 minutes à 94°C. Et enfin on additionne de la Taq polymérase, puis on amplifie par PCR.

Enfin, depuis cette année 2000, la société **Molecular Innovations Inc.** commercialise un système d'extraction d'ADN, qui constitue la troisième **technique**, situé à l'intérieur même du tube d'amplification (Xtra Amp (marque déposée) Extraction System, Molecular Innovations Inc. Réf. 660). Nous avons évalué ce produit, en vue d'extraire l'ADN à partir de tache de sang. Le sang est collecté sur EDTA ou ACD, déposé sur papier Schleicher & Schuell réf. 322187. Une pastille de 3 mm de diamètre est placée dans un microtube de 1,5 ml contenant 75 µl de Lysis Buffer. On incube 10 minutes à une température comprise entre 18 et 25°C. Puis, on centrifuge 5 minutes à 12.000 g. On prélève ensuite le surnageant et on le transfère dans un tube Xtra Amp (marque déposée). On aspire et refoule plusieurs fois puis on élimine le surnageant. On lave trois fois avec 200 µl de Wash Buffer. Après on ajoute 45 µl de mélange réactionnel pour l'amplification PCR et 5 µl de Amp Enhance Buffer. Enfin on procède à l'amplification en ajoutant trois cycles au programme d'amplification habituel.

Avec les trois protocoles décrits ci-dessus, nous avons observé une amplification du HLA-DQB1, avec de bons résultats exploitables pour le test ELOSA

(Enzyme Linked OligoSorbent Assay) mis au point selon la présente invention, dans environ 50% des cas. Cette technique ELOSA est bien décrite dans le brevet EP-B-0.486.661 de la demanderesse ou dans l'article de F. Mallet *et al.*, *Journal of Clinical Microbiology*, June 1993, p.1444-1449.

5

Néanmoins, il convient de développer un protocole d'extraction à partir de taches de sang, protocole qui soit robuste et indispensable pour les applications d'analyse en routine. Une quatrième technique a donc été développée par la demanderesse qui consiste à :

- 10
- collecter le sang sur EDTA, déposé sur papier Schleicher & Schuell no. 903 (réf. 322187),
 - découper la tache de sang à l'aide de la poinçonneuse de Schleicher & Schuell (pastille de 3 mm de diamètre),
 - décontaminer la poinçonneuse à l'aide d'HCl 0,25 N pendant 5 minutes

15

 - (dépurination de l'ADN), après chaque tache de sang,
 - placer la pastille dans un tube PCR de 0.5 ml,
 - ajouter 50 µl d'un mélange réactionnel contenant 5 µl de tampon d'amplification dix fois concentré (10 X), 0,5 µl de mélange de dNTP (200 mM) et H₂O qsp 50µl,
 - incuber 15 minutes à 100°C (recommandé d'utiliser un thermocycleur),

20

 - retirer la pastille,
 - centrifuger brièvement à 1.000 g par une centrifugeuse de paillasse classique, et
 - prélever 25 µl de surnageant pour la réaction d'amplification.

De manière surprenante, le milieu réactionnel qui vient reprendre le sang présent sur chaque pastille contient les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), c'est-à-dire les dATP, dCTP, dGTP et dTTP. Il s'agit de molécules biologiques que l'homme du métier cherche plutôt à protéger de températures élevées. Or il s'avère que dans le protocole mis au point par la demanderesse, ledit milieu réactionnel subit ensuite une température de 100°C pendant 15 minutes. Les résultats d'amplification qui sont obtenus par la suite avec les acides nucléiques extraits selon notre technique sont

25

30

beaucoup plus efficaces que ceux obtenus avec les trois premières techniques exposées.

2°) Préparation des amplicons HLA-DQB1 :

Dans tous les cas de figure, les amorces utilisées sont des amorces décrites dans la littérature (XIth HLA Workshop Primers ; Kimura, 1992). Le tableau 2 ci-dessous expose les deux amorces qui permettent l'amplification du locus d'intérêt correspondant au gène HLA-DQB1. Ces deux amorces encadrent donc ce gène.

N° de séquence	Séquence (5' > 3')	Appellation scientifique
SEQ ID NO 1	CATgTgCTACTTCACCAACgg	DQBAMP-A
SEQ ID NO 2	CTggTAGTTgTgTCTgCACAC	DQBAMP-B

10 Tableau 2 : Amorces pour amplifier le gène HLA-DQB1

A - A partir d'un échantillon de sang total :

Le mélange réactionnel contient les différents constituants suivants :

- tampon 10X (Perkin Elmer, réf. N 808-0171)..... 5 µl,
- 15 • dNTPs 200 mM (Pharmacia, réf. 27-2094)..... 0,5 µl (0,2 mM final),
- mélange d'amorces (30 µM de chaque)..... 0,5 µl (0,3 µM final),
- Taq Polymerase(AmpliTaq, Perkin Elmer,
réf. N 808-0171, 5U/µl)..... 0,3 µl (1,5 U),
- ADN (environ 100 ng/µl)..... 5 µl (environ 500 ng), et
- 20 • H₂O..... q.s.p. 50 µl.

De plus, le programme d'amplification est le suivant :

- 2 minutes à 95 °C, puis
- 35 cycles successifs avec pour chaque cycle les étapes suivantes :
 - 25 ■ 30 secondes à 95 °C,
 - 30 secondes à 55 °C, et
 - 30 secondes à 72 °C,
- 7 minutes à 72 °C.

Ensuite, si l'on veut conserver le produit de réaction, on maintient le tube contenant les amplicons qui viennent d'être obtenus à la température de 9°C.

B - A partir de taches de sang séché :

Le mélange réactionnel contient les différents constituants suivants :

- tampon 10X (Perkin Elmer, réf. 27-2094)..... 5 µl,
- 5 • dNTPs 200 mM (Pharmacia, réf. N 808-0171)..... 0,5 µl,
- mélange d'amorces (30 µM de chaque)..... 0,5 µl (0,3 µM final),
- Taq Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer,
réf. N 808-0171, 5U/µl)..... 0,3 µl (1,5 U),
- ADN..... 25 µl, et
- 10 • H₂O..... q.s.p. 50 µl.

De plus, le programme d'amplification est le suivant :

- 2 minutes à 95 °C, puis
- 35 cycles successifs avec pour chaque cycle les étapes suivantes :
 - 30 secondes à 95 °C,
 - 15 ■ 30 secondes à 55 °C, et
 - 30 secondes à 72 °C,
- 7 minutes à 72 °C.

Ensuite, si l'on veut conserver le produit de réaction, on maintient le tube contenant les amplicons qui viennent d'être obtenus à la température de 9°C.

20

III - Analyse des amplicons obtenus selon l'invention :**1°) Dispositif d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant :**

25

Un dispositif basé sur le principe du test ELOSA a été réalisé pour l'analyse du marqueur HLA-DQB1, sous la forme d'une barrette de huit puits tirée d'une plaque de microtitration, avec une sonde de détection couplée à la peroxydase (POD) pour la révélation colorimétrique.

30

A - Sondes de capture :

Dans chacun de ces huit puits des sondes spécifiques de capture ont été utilisées. Ces sondes sont en fait des oligonucléotides synthétisés avec un bras aminé en 5', telles que décrites dans les brevets US-A-5,510,084 et EP-B-0.549.776 déposés par la Demanderesse. C'est ce bras aminé en 5', de structure particulière, qui autorise la fixation des sondes en fond de plaque. Il faut donc comprendre que l'extrémité 5' des sondes utilisées possèdent ce bras, même s'il n'est pas précisé par la suite.

La répartition des sondes de capture au niveau des puits est précisée en tableau 3, alors que les allèles cibles possibles pour chaque sonde de capture du tableau 3 sont précisés dans le tableau 4 ci-dessous.

N° de séquence	Séquence (5' > 3')	Appellation bioMérieux
SEQ ID NO 3	CgCTTCgACAgCgACgTgggg	C+
SEQ ID NO 4	TATgAAACTTATggggATAC	C-
SEQ ID NO 5	TCTTgTgAgCAgAAgC	26c
SEQ ID NO 6	CCgCCTgCCgCCgA	57f
SEQ ID NO 7	AggggACCCgggCggA	70b
SEQ ID NO 8	gACgTggAggTgTACC	45a
SEQ ID NO 9	gCCgCCTgACgCCg	57e
SEQ ID NO 10	ggggCCgggCgTC	70a
SEQ ID NO 11	AggAggACgTgCgC	37b
SEQ ID NO 12	TCTTgTAACCAgATAC	26b
SEQ ID NO 13	ggTggACACCgTATgCAg	70c

Tableau 3 : Répartition des sondes de capture au niveau des puits

N° de séquence	Spécificité HLA-DQB1*	Sensibilité / maladie
SEQ ID NO 3	Tous	Néant
SEQ ID NO 4	Aucun	Néant
SEQ ID NO 5	0201, 0202, 0203	Susceptibilité
SEQ ID NO 6	0302, 0304, 0305, 0307, 0308	Susceptibilité
SEQ ID NO 7	0602, 0603, 0608, 0610, 06111, 06112, 0612, 0613, 0614, 0616, 0308	Protection
SEQ ID NO 8	03011, 03012, 0304, 0309	Protection
SEQ ID NO 9	03011, 03012, 03032, 03033, 0306, 0309, 0310	Protection
SEQ ID NO 10	05011, 05012, 0502, 05031, 05032	Neutralité
SEQ ID NO 11	06011, 06012, 06013	Neutralité
SEQ ID NO 12	06051, 06052, 0606, 0609, 06112, 0612	Neutralité
SEQ ID NO 13	0306, 0401, 0402	Neutralité

Tableau 4 : Allèles cibles possibles pour chaque sonde de capture

- 5 Dans le tableau 3, le puits C+ comporte un contrôle positif (SEQ ID NO 3), qui autorise la détection de tous les allèles du gène HLA-DQB1*, ce qui permet de contrôler que l'amplification a bien concerné la région d'intérêt comprise entre les amorces SEQ ID NO 1 et SEQ ID NO 2 décrites dans le tableau 1. Le contrôle négatif (SEQ ID NO 4) n'a pas d'objectif diagnostic, il n'est présent que pour répondre à
- 10 certaines normes. Cette séquence n'est absolument pas spécifique du HLA, et correspond à une séquence aléatoire non retrouvée chez les gènes HLA.

Les autres sondes, comprises entre SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 13, ont par contre un but diagnostique de la prédisposition génétique d'un patient à une maladie, et plus précisément au diabète insulino-dépendant.

5 On remarque que la sonde SEQ ID NO 5 est une sonde qui détecte une susceptibilité à la maladie, c'est-à-dire au diabète insulino-dépendant. Elle est spécifique des allèles importants de cette susceptibilité à cette maladie, à savoir les allèles HLA-DQB1*0201 et HLA-DQB1*0202. Ces allèles importants sont représentés en gras dans le tableau 4.

10 De même, la sonde SEQ ID NO 6 est une sonde qui détecte également une susceptibilité au diabète insulino-dépendant. Elle est spécifique d'un allèle important de cette susceptibilité à cette maladie, à savoir l'allèle HLA-DQB1*0302.

La sonde SEQ ID NO 7 est une sonde qui détecte une protection contre la maladie, c'est-à-dire au diabète insulino-dépendant. Elle est spécifique des allèles importants de cette protection à cette maladie, à savoir les allèles HLA-DQB1*0602 et HLA-DQB1*0603.

De même, la sonde SEQ ID NO 8 est une sonde qui détecte également une protection contre le diabète insulino-dépendant. Elle est spécifique d'un allèle important de cette protection à cette maladie, à savoir l'allèle HLA-DQB1*0301, que celui-ci soit sous sa forme HLA-DQB1*03011 et HLA-DQB1*03012.

La sonde SEQ ID NO 9 est une sonde qui détecte aussi une protection contre le diabète insulino-dépendant, puisqu'elle permet également de détecter l'allèle HLA-DQB1*0301, que celui-ci soit sous sa forme HLA-DQB1*03011 ou HLA-DQB1*03012. L'intérêt de cette sonde est de permettre la détection de l'allèle HLA-DQB1*03032, qui est assez fréquent et doit être protecteur au regard de sa séquence au niveau de la position 57.

A noter que les deux sondes SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 7, l'une de susceptibilité et l'autre de protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant, permettent de détecter l'allèle HLA-DQB1*0308. Il convient de préciser que cet allèle est très rare. Les chances de le trouver sont donc infimes et les chances de tomber sur

un homozygote HLA-DQB1*0308 et HLA-DQB1*0308 sont quasi nulles. De même on peut appliquer le même raisonnement pour les deux sondes SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8, l'une de susceptibilité et l'autre de protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant. Elles permettent toutes les deux de détecter l'allèle HLA-DQB1*0304. Cet

5 allèle est également très rare.

Dans ces deux cas, il n'y a aucun problème à ce que deux sondes, l'une de susceptibilité et l'autre de protection, puissent les détecter, car la prévalence est trop faible.

10 **B - Sondes de détection :**

Il s'agit d'un oligonucléotide avec bras aminé en 5', couplée à la peroxydase (POD). Le tableau 5 précise sa structure.

N° de séquence	Séquence (5' > 3')	Appellation bioMérieux
SEQ ID NO 14	TggAACAgCCAgAAggA	D4-POD

15 **Tableau 5 :** Sonde de détection adaptée aux sondes de capture utilisées

Bien entendu cette sonde de détection est choisie pour être complémentaire de l'ensemble des amplicons cibles pouvant être accrochés par les sondes de capture SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 5 à SEQ ID NO 13 présentées aux tableaux 3 et 4.

20

C - Mode opératoire :

Premièrement, la **préparation des cibles** consiste à :

- transférer la totalité des amplicons (50 µl) dans un microtube de 1,5 ml,
- ajouter 5 µl de réactif R2 (NaOH 2N),
- 25 • bien homogénéiser,
- incuber pendant 5 minutes à une température comprise entre 18 à 25°C,
- ajouter 1 ml de tampon d'hybridation, dont la constitution est précisée ci-après,
- ajouter 50 µl de sonde de détection, dont la constitution est précisée ci-après, et

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

23

- bien homogénéiser.

Le tampon d'hybridation est constitué de :

- 0,1 M phosphate de sodium pH 6,8,
- 0,5 M NaCl, 2% (p/v) polyethylene glycol 4000,
- 5 • 0,65% (p/v) tween 20, 0,1% (p/v) gélatine,
- 0,14 g/L d'ADN soniqué de sperme de saumon,
- 0,2 g/L de BND (biocide ou Bromo-Nitro-Dioxane), et
- 0,01 g/L de ciprofloxacine.

10 La sonde de détection SEQ ID NO 14 (D4-POD) est diluée en tampon phosphate 5 mM à un pH de 7,0, en présence de 0,5% (p/v) albumine sérique bovine et 0,5% (p/v) phénol.

Deuxièmement, l'hybridation des cibles est réalisée de la manière suivante :

- répartir 100 µl du mélange, dans chacun des huit puits de la barrette R1,
- 15 • recouvrir d'une feuille autocollante, et
- incuber pendant 1 heure à 37°C (37 ± 1°C).

Troisièmement, le lavage qui permet d'éliminer les cibles éventuelles qui ne se sont pas hybridées, et consiste à laver trois fois avec 500 µl de tampon de lavage Color 0, dilué au 1/20 en H₂O. Par « Color 0 », il faut comprendre une solution vingt (20) fois concentré de PBS, auquel on a ajouté 1 % (p/v) tween 20.

Quatrièmement, la révélation a pour objet de déterminer quelles sondes de capture ont hybridées un oligonucléotide cible. Elle est réalisée de la façon suivante :

- 25 • ajouter 100 µl de solution de substrat préparé extemporanément - 1 pastille de Color 1 dans 5 ml de Color 2, dans chacun des puits,
- incuber pendant 20 minutes à une température de 18 à 25°C, à l'obscurité,
- ajouter 50 µl de Color 3, et
- lire l'absorbance à 492 nm.

Par « Color 1 », il faut comprendre O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) ; par « Color 2 », il faut comprendre 0,1 M phosphate de sodium, 0,05 M acide citrique, 0,03% H₂O₂, et par « Color 3 », il faut comprendre 1,8 N H₂SO₄.

5 Cinquièmement, l'interprétation permet en fonction la révélation qui a été établie au chapitre précédent de déterminer la réelle prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant. Cette vérification propose de :

- d'une part, vérifier la positivité du contrôle positif SEQ ID NO 3 (C+), où la Densité Optique (D.O.) doit être supérieure à 0,8, et vérifier la négativité du contrôle négatif SEQ ID NO 4 (C-), où la D.O. doit être inférieure à 0,05),
- 10 • d'autre part, déterminer le génotype correspondant aux deux allèles identifiés à l'aide des sondes SEQ ID NO 5 à SEQ ID NO 13.

Dans le cas cité ci-dessus, la peroxydase est une enzyme qui permet de révéler
15 pour chaque sonde si l'hybridation avec un oligonucléotide s'est réalisée si elle est en présence d'un substrat adéquat, l'OPD par exemple. Du fait que ce substrat est soluble, il y aura extension du signal. Dans ce cas, il faut, pour pouvoir déterminer si un patient est homozygote ou hétérozygote ou si ses allèles sont susceptibles, protecteurs et/ou neutre vis-à-vis du diabète insulino-dépendant, implanter un sonde de capture par
20 compartiment ou, de manière plus aisée, par puits. Ceci est vrai pour les sondes concernées par la susceptibilité (SEQ ID NO 5 et 6) ou par la protection (SEQ ID NO 7, 8 et 9) vis-à-vis du diabète insulino-dépendant. Alors que pour les sondes concernées par la neutralité (SEQ ID NO 10, 11, 12 et 13) vis-à-vis de cette maladie, il est tout à fait possible de les regrouper.

25 Ceci n'est pas vrai si le substrat utilisé est précipitant ou si la sonde de détection (SEQ ID NO 14) est fluorescente. Dans ces cas, plusieurs sondes peuvent être implantées dans un compartiment ou un puits identique, même si ce sont des sondes de susceptibilité (SEQ ID NO 5 et 6) et/ou de protection (SEQ ID NO 7, 8 et 9). En fait, dans sa configuration la plus compacte, toutes les sondes de susceptibilité, de protection
30 et de neutralité peuvent être dans le même compartiment ou puits, cela ne dépend que de la facilité avec laquelle l'opérateur est capable de grouper les différents types de

sondes, sans qu'il y ait de chevauchement entre les plots d'oligonucléotides de capture. Comme précisé précédemment, un tel dispositif permettant de réaliser de tels supports est déjà bien décrit dans une demande de brevet déposée le 15 novembre 2000 par la demanderesse, sous le numéro FR00/14691.

5

2°) Exemples d'analyses selon l'invention :

A - Premier échantillon :

Le tableau 6 qui suit présente les résultats obtenus avec une barrette R1 où
10 chaque puits a reçu un aliquote d'un échantillon d'un premier patient à tester.

Barrette R1	D. O. x 1000	+ / -
SEQ ID NO 3 (C+)	> 2500	+
SEQ ID NO 4 (C-)	0	-
SEQ ID NO 5 (S)	1245	+
SEQ ID NO 6 (S)	126	+
SEQ ID NO 7 (P)	7	-
SEQ ID NO 8 (P)	9	-
SEQ ID NO 9 (P)	1	-
SEQ ID NO 10 à 13 (N)	8	-

Tableau 6 : Résultats obtenus avec la barrette R1 pour le premier échantillon

15

L'analyse est la suivante : .

- la sonde SEQ ID NO 3 est positive : l'amplification du gène HLA-DQB1 et le test d'hybridation ont correctement fonctionné,
- la sonde SEQ ID NO 5 est positive : un allèle HLA-DQB1*0201 ou HLA-DQB1*0202 ou HLA-DQB1*0203 est présent,

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

26

- la sonde SEQ ID NO 6 est positive : un allèle HLA-DQB1*0302 ou HLA-DQB1*0304 ou HLA-DQB1*0305 ou HLA-DQB1*0307 ou HLA-DQB1*0308 est présent, et

- les autres sondes sont négatives.

5 En conclusion, il y a de forte chance que ce patient ait deux allèles de susceptibilité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant. Par forte chance, il faut comprendre que la prévalence de l'allèle HLA-DQB1*0302 de susceptibilité est bien plus importante que celle des allèles HLA-DQB1*0304 ou HLA-DQB1*0305 ou HLA-DQB1*0307 ou HLA-DQB1*0308, qui sont des allèles de neutralité.

10 Ces deux allèles HLA-DQB1 ont été identifiés au niveau générique, le typage HLA de ce premier échantillon est en fait :

- HLA-DQB1*02, et

- HLA-DQB1*0302.

B - Deuxième échantillon :

15 Le tableau 7 qui suit présente les résultats obtenus avec une barrette R1 où chaque puits a reçu un aliquote d'un échantillon d'un deuxième patient à tester.

Barrette R1	D. O. x 1000	+ / -
SEQ ID NO 3 (C+)	1685	+
SEQ ID NO 4 (C-)	5	-
SEQ ID NO 5 (S)	708	+
SEQ ID NO 6 (S)	22	-
SEQ ID NO 7 (P)	7	-
SEQ ID NO 8 (P)	143	+
SEQ ID NO 9 (P)	41	-
SEQ ID NO 10 à 13 (N)	11	-

Tableau 7 : Résultats obtenus avec la barrette R1 pour le deuxième échantillon

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

27

L'analyse est la suivante :

- la sonde SEQ ID NO 3 est positive : l'amplification du gène HLA-DQB1 et le test d'hybridation ont correctement fonctionné,
- la sonde SEQ ID NO 5 est positive : un allèle HLA-DQB1*0201 ou HLA-DQB1*0202 ou HLA-DQB1*0203 est présent,
- la sonde SEQ ID NO 8 est positive : un allèle HLA-DQB1*03011 ou HLA-DQB1*03012 ou HLA-DQB1*0304 ou HLA-DQB1*0309 est présent, et
- les autres sondes sont négatives.

En conclusion, il y a de forte chance que ce patient ait un allèle de susceptibilité et un allèle de protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant. Par forte chance, il faut comprendre que la prévalence des allèles HLA-DQB1*03011 et HLA-DQB1*03012 de susceptibilité est bien plus importante que celle des allèles HLA-DQB1*0304 ou HLA-DQB1*0309, qui sont des allèles de neutralité.

Ces deux allèles HLA-DQB1 ont été identifiés au niveau générique, le typage

HLA de ce premier échantillon est en fait :

- HLA-DQB1*02, et
- HLA-DQB1*0301.

C - Troisième échantillon :

Le tableau 8 qui suit présente les résultats obtenus avec une barrette R1 où chaque puits a reçu un aliquote d'un échantillon d'un troisième patient à tester.

Barrette R1	D. O. x 1000	+ / -
SEQ ID NO 3 (C+)	> 2500	+
SEQ ID NO 4 (C-)	0	-
SEQ ID NO 5 (S)	1790	+
SEQ ID NO 6 (S)	27	-
SEQ ID NO 7 (P)	31	-
SEQ ID NO 8 (P)	19	-
SEQ ID NO 9 (P)	15	-
SEQ ID NO 10 à 13 (N)	829	+

Tableau 8 : Résultats obtenus avec la barrette R1 pour le troisième échantillon

- 5 L'analyse est la suivante :
- la sonde SEQ ID NO 3 est positive : l'amplification du gène HLA-DQB1 et le test d'hybridation ont correctement fonctionné,
 - la sonde SEQ ID NO 5 est positive : un allèle HLA-DQB1*0201 ou HLA-DQB1*0202 ou HLA-DQB1*0203 est présent,
 - 10 - les sondes SEQ ID NO 10 à 13 sont positives : un allèle HLA-DQB1*0306 ou HLA-DQB1*0401 ou HLA-DQB1*0402 ou HLA-DQB1*05011 ou HLA-DQB1*05012 ou HLA-DQB1*0502 ou HLA-DQB1*05031 ou HLA-DQB1*05032 ou HLA-DQB1*06011 ou HLA-DQB1*06012 ou HLA-DQB1*06013 ou HLA-DQB1*06051 ou HLA-DQB1*06052 ou HLA-DQB1*0606 ou HLA-DQB1*0609 ou HLA-DQB1*06112 ou HLA-DQB1*0612 est présent, et
 - 15 - les autres sondes sont négatives.

En conclusion, il est certain que ce patient a un allèle de susceptibilité et un allèle de neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant. A partir du moment où l'on sait qu'il y a un allèle de neutralité, il n'y a que peu d'importance à le déterminer plus

20 précisément dans le cadre de l'analyse selon la présente invention.

Ces deux allèles HLA-DQB1 ont été identifiés au niveau générique, le typage HLA de ce premier échantillon est en fait :

- HLA-DQB1*02, et
- HLA-DQB1*0501.

5

IV - Autres approches non limitatives pour améliorer de l'invention :

1°) Utilisation d'amplicons PCR avec amorces biotinylées :

10

A - Amorces biotinylées :

Il est également possible d'exploiter le jeu de sondes spécifiques de capture utilisé pour le dispositif d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant (Chapitre III, 1°), avec des amplicons PCR biotinylés par incorporation d'amorces biotinylées en 5', voir le tableau 9 ci-dessous.

15

N° de séquence	Séquence (5' > 3')	Appellation scientifique
Biotine-SEQ ID NO 1	Biotine-CATGTGCTACTTCACCAACGG	DQBAMP-A-Biotine
Biotine-SEQ ID NO 2	Biotine-CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC	DQBAMP-B-Biotine

Tableau 9 : Amorces biotinylées pour amplifier le gène HLA-DQB1

Si les conditions d'amplification sont identiques à celles décrites plus haut, le mode opératoire est lui différent.

20

B - Mode opératoire avec des amplicons biotinylés :

Premièrement, la **préparation des cibles** consiste à :

- transférer la totalité des amplicons (50 µl) dans un microtube de 1,5 ml,
- ajouter 5 µl de réactif NaOH à 2N,
- bien homogénéiser,
- incuber pendant 5 minutes à une température comprise entre 18 à 25°C,

25

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

30

- ajouter 1 ml de tampon d'hybridation, dont la constitution a déjà été précisée ci-dessus, et
- bien homogénéiser.

Le tampon d'hybridation est constitué de :

- 5 • 0,1 M phosphate de sodium pH 6,8,
- 0,5 M NaCl, 2% (p/v) polyethylene glycol 4000,
- 0,65% (p/v) tween 20, 0,1% (p/v) gélatine,
- 0,14g/L d'ADN soniqué de sperme de saumon,
- 0,2 g/L de BND (biocide ou Bromo-Nitro-Dioxane), et
- 10 • 0,01 g/L de ciprofloxacine.

La sonde de détection SEQ ID NO 14 (D4-POD) est diluée en tampon phosphate 5 mM à un pH de 7,0, en présence de 0,5% (p/v) albumine sérique bovine et 0,5% (p/v) phénol.

15 Deuxièmement, l'hybridation des cibles est réalisée de la manière suivante :

- répartir 100 µl du mélange, dans chacun des huit puits de la barrette R1,
- recouvrir d'une feuille autocollante, et
- incubé pendant 1 heure à 37°C (37 ± 1°C).

20 Troisièmement, le lavage qui permet d'éliminer les cibles éventuelles qui ne se sont pas hybridées, et consiste à laver trois fois avec 500 µl de tampon de lavage Color 0, dilué au 1/20 en H₂O.

25 Quatrièmement, la révélation a pour objet de déterminer quelles sondes de capture ont hybridées un oligonucléotide cible. Elle est réalisée de la façon suivante :

- ajouter 100 µl de solution de conjugué Streptavidine couplée à la peroxydase (SPOD, Roche, réf. 1089153) dilué au 1/10.000 en tampon PBS avec 0,1% Tween 20, 0,02% Albumine Sérique Bovine, à un pH de 7,2,
- incubé pendant 30 minutes à une température comprise entre 18 et 25°C, à l'obscurité,
- 30

- laver trois fois avec 500 µl de tampon de lavage - Color 0 , dilué au 1/20^{ème} en H₂O,
- ajouter 100 µl de substrat préparé extemporanément - 1 pastille de Color 1 dans 5 ml de Color 2, dans chacun des puits
- incuber pendant 20 minutes à une température comprise entre 18 et 25°C, à l'obscurité,
- ajouter 50 µl de Color 3, et
- lire l'absorbance à 492 nm.

Les « Color 0 », « Color 1 », « Color 2 » et « Color 3 » sont identiques à ceux décrits dans la paragraphe précédent.

Cinquièmement, l'interprétation permet en fonction la révélation qui a été établie au chapitre précédent de déterminer la réelle prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant. Cette vérification propose de :

- d'une part, vérifier la positivité du contrôle positif SEQ ID NO 3 (C+), où la Densité Optique (D.O.) doit être supérieure à 0,8, et vérifier la négativité du contrôle négatif SEQ ID NO 4 (C-), où la D.O. doit être inférieure à 0,05),
- d'autre part, déterminer le génotype correspondant aux deux allèles identifiés à l'aide des sondes SEQ ID NO 5 à SEQ ID NO 13.

Ce protocole est plus long et un peu plus complexe, puisqu'il y a une étape supplémentaire, mais des signaux plus intenses sont observés pour les sondes faibles, notamment pour SEQ ID NO 6.

Le tableau 10 ci-dessous montre bien d'ailleurs les différences de résultats obtenus entre les amplicons biotinylés et non biotinylés.

Sondes	Amplicons non biotinylés	Aplicons biotinylés
SEQ ID NO 3 (C +)	> 2500	> 2500
SEQ ID NO 4 (C -)	0	0
SEQ ID NO 5 (S)	1	14
SEQ ID NO 6 (S)	134	324
SEQ ID NO 7 (P)	15	54
SEQ ID NO 8 (P)	11	34
SEQ ID NO 9 (P)	19	35
SEQ ID NO 10 à 13 (N)	603	1322

Figure 10 : Valeurs de DO (x1000) obtenues avec une lignée hétérozygote HLA-DQB1*0302 / 0605

5

A noter qu'il n'y a plus d'utilisation, pour les amplicons biotinylés, de bras aminé en 5', qui autorise la fixation des sondes de détection en fond de plaque, comme précédemment décrit, puisque l'on utilise de la Streptavidine associée à la Péroxydase, qui va pouvoir se fixer à la Biotine présente sur les amplicons qui sont capturés.

10

2°) Utilisation de sondes de capture adsorbées sur des billes :

Afin d'augmenter les signaux spécifiques pour le puits où est présent, par exemple, la sonde de séquence SEQ ID NO 6, il est possible d'utiliser un revêtement, aussi appelé « coating », avec une suspension de 100 µl de billes de polystyrène de 0,1 mm de diamètre. Ces billes proviennent de la société Polysciences (Warrington (PA) aux Etats-Unis d'Amérique - réf. : 00876), elles sont recouvertes par des molécules d'avidine fabriquées par la société Sigma (Saint-Louis (MO) aux Etats-Unis d'Amérique - réf. : A9275), sensibilisées par l'oligonucléotide spécifique de capture SEQ ID NO 6, préparé sous forme biotinylée en 5'. Dans ce cas, du fait de la présence

20

de la biotine, l'oligonucléotide spécifique de capture SEQ ID NO6 ne comporte pas de bras de liaison.

A - Préparation des billes :

5 **1. Préparation des billes revêtues d'avidine :**

Il convient de :

- diluer 2,5 µl de solution d'avidine à la concentration de 5 mg/ml, dans 100 µl de tampon de borate 50 mM à pH de 9,3,
- ajouter 7,4 µl de suspension de billes, et
- 10 • incuber pendant 30 minutes à la température de 37°C.

2. Préparation des billes revêtues d'avidine et portant des sondes de capture :

Il faut en plus :

- ajouter $5 \cdot 10^{15}$ molécules de sonde SEQ ID NO 6 biotinylée, et
- 15 • incuber pendant 30 minutes à la température de 37°C.

B - Revêtement avec les billes revêtues d'avidine et portant des sondes de capture :

20 Une dilution de la suspension de billes sensibilisées, au 1/10 en tampon derevêtement (3X PBS), est ensuite utilisée, à raison de 100 µl par puits. Les conditions de revêtement utilisées pour des sondes aminées, c'est-à-dire 2 heures à une température de 37°C ou 15 heures à une température comprise entre 18 et 25°C, restent inchangées par rapport à la fixation en fond de puits.

25 Ce procédé permet également d'augmenter les signaux dans certains puits, par exemple, où est présent la sonde de séquence SEQ ID NO 6, et ainsi de faciliter l'analyse du puits concerné. D'ailleurs les valeurs de D.O. (x 1000) obtenues pour la sonde SEQ ID NO 6, avec une lignée homozygote HLA-DQB1*0302, donne les résultats suivants :

- sans billes : 172, et
- avec billes : 689.

30

3°) Utilisation d'un seul puits pour les sondes de captures spécifiques des allèles.

de neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant.

Mais dans le cas de l'utilisation de la Péroxydase pour effectuer la révélation des hybridation d'oligonucléotides cibles sur les oligonucléotides de capture, le puits unique peut être utilisé pour la détermination de « neutralité des allèles » vis-à-vis du diabète insulino-dépendant. Il comprend alors un ensemble de quatre sondes spécifiques de capture (SEQ ID NO 10 à 13) qui chacune individuellement, possède une bonne spécificité.

Comme évoqué précédemment, le développement d'un procédé de dépôts multiples au fond d'un même puits d'une plaque de microtitration, par exemple en format quatre-vingt-seize (96) puits, permet de réaliser le dépôt séparé pour les quatre sondes ci-dessus mentionnées dans un seul et unique puits.

4°) Utilisation d'un seul puits pour les sondes de captures spécifiques de l'ensemble des allèles concernés par le diabète insulino-dépendant ;

Le développement d'un procédé de dépôts multiples au fond d'un puits, d'une plaque de microtitration, permet le dépôt des onze (11) sondes non spécifiques (SEQ ID NO 3 et 4) et spécifiques (SEQ ID NO 5 à 13) de capture, décrites précédemment dans les tableaux 3 et 4, dans un même puits. La réalisation de l'étape d'hybridation des amplicons en un puits unique, apporte différents avantages :

- avantage de sécurité pour le test, puisque les onze (11) sondes rencontrent simultanément tous les amplicons de l'échantillon avec absence de risque de faux négatif,
- avantage de sensibilité pour le test, car les onze (11) sondes rencontrent la totalité des amplicons de l'échantillon, et
- avantage de pouvoir réaliser des grandes séries de test avec la possibilité de traiter quatre-vingt-seize (96) échantillons par plaque, ce qui est particulièrement intéressant pour les applications de dépistage.

Comme évoqué précédemment, cette approche nécessite par contre une révélation ponctuelle des hybridations spécifiques au fond des puits. A titre d'exemple, il est possible d'utiliser la fluorescence pour la détection d'amplicons ayant incorporer une molécule fluorescente ou révélabale à l'aide d'un marqueur fluorescent.

5

Des essais de faisabilité d'exploitation de plusieurs dépôts en un même puits, ont également été réalisés, avec une révélation colorimétrique.

A - Dépôts :

Les essais avec quatre (4) dépôts manuels, de sondes spécifiques de capture (SEQ ID NO 10 à 13, en version aminée), avec des dépôts de 1 et 5 μ l, à 400-1000 pmoles/ml en tampon de revêtement ou coating (PBS 3X). On incube entre 15 minutes et 2 heures à la température de 37°C, ou pendant 15 heures à une température comprise entre 18 et 25°C.

10

B - Lavage :

Il s'effectue par Color 0 dilué.

15

C - Préparation des cibles :

Les amplicons PCR sont préparés comme décrit au paragraphe précédent (III - 1°) - C).

Dans le tube d'amplification, on effectue les étapes suivantes :

20

- dénaturation des 50 μ l d'amplicons par addition de 1 μ l de 2N NaOH,
- incubation pendant 5 minutes à une température comprise entre 18 et 25°C,
- addition de 40 μ l de tampon d'hybridation (SSPE 15X, 2% PEG 4000, 1,5% tween 20, 0,22% gélatine, 0,032% ADN soniqué, biocides),
- addition de 6 μ l de solution de conjugué D4-POD (50 pmoles/ml ; tampon phosphate 5 mM pH 7.0 - 0,5% (p/v) ASB - 0,5% (p/v) phénol).

25

D - Hybridation :

On transfère la totalité du mélange réactionnel dans un puits sensibilisé avec les quatre (4) dépôts et on incube pendant une heure à la température de 37°C à \pm 1°C.

E - Lavage :

Il s'effectue par Color 0 dilué.

30

F - Révélation :

On effectue les étapes successives suivantes :

- addition de 100 μ l de solution de substrat (Color 1 dilué en Color 2),
- développement sans perturbation, pendant 20 minutes, à une température comprise entre 18 et 25°C, à l'obscurité,
- 5 • observer l'apparition de coloration à l'endroit de la sonde positive,
- pour quantifier le signal, addition de 50 μ l de Color 3,
- homogénéiser en agitant doucement, et
- lire à 492 nm.

**Références bibliographiques incorporées à la présente description,
en tant que de besoin**

Benjamin, 1990 :

- 5 Benjamin R, Parham P, Immunology Today, 1990, 11, 137-142, Guilt by association :
HLA-B27 and ankylosing spondylitis

Brewerton, 1973 :

- 10 Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD et al, Lancet, 1973, 1, 904-907. Ankylosing
spondylitis and HL-A27.

Gregersen, 1986 :

- 15 Gregersen PK, Shen M, Song QL, Merryman P, Degar S, Seki T, Maccari J, Goldberg
D, Murphy H, Schwenzler J, Wang CY, Winchester RJ, Nepom GT, Silver J, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 1986, 83, 2642-2646. Molecular diversity of HLA-DR4 haplotypes.

Gregersen, 1987 :

- 20 Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ, Arthritis Rheum., 1987, 30, 1205-1213. The
shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of
susceptibility to rheumatoid arthritis.

Hiraiwa, 1990 :

- 25 Hiraiwa A, Yamanaka K, Kwok WW, Mickelson EM, Masewicz S, Hansen JA, Radka
SF, Nepom GT, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 8051-8055. Structural
requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope : a key HLA
determinant associated with rheumatoid arthritis.

Khan, 1979 :

- 30 Khan MA, Kushner I, Ballou SP et al, Lancet, 1979, 1, 921-922, Familial rheumatoid
arthritis and HLA-DRW4.

Komulainen, 1999

Komulainen J, Kulmala P, Savola K, Lounamaa R, Ilonen J, Reijonen H, Knip M, Akerblom HK; Diabetes Care 1999, vol 22, n°12, 1950-1955

5 Kulmala, 2000

Kulmala P, Savola K, Reijonen H, Veijola R, Vahasalo P, Karjalainen J, Tuomiletho-Wolf E, Ilonen J, Tuomiletho J, Akerblom HK, Knip M; Diabetes 2000, vol 49, 48-58

Lawrence, 1970 :

10 Lawrence J, Ann. Rheum. Dis., 1970, 29, 357-379

Nepom, 1989 :

15 Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D, Nepom BS, Arthritis Rheum. 1989, 32, 15-21. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes.

Nepom, 1991 :

20 Nepom GT, Erlich H, Annu. Rev. Immunol., 1991, 9, 493-525. MHC class-II molecules and autoimmunity.

Schlosstein, 1973 :

Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM, N. Engl. J. Med., 1973, 288, 704-706. High association of a HL-A antigen, w27, with ankylosing spondylitis

25 Stastny, 1978 :

Stastny P, N. Engl. J. Med., 1978, 298, 869-871. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis.

Stastny, 1983 :

30 Stastny P, Ball EJ, Dry PJ, Nunez G, Immunol. Rev., 1983, 70, 113-154. The human immune response region (HLA-D) and disease susceptibility.

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

39

Stastny, 1988 :

Stastny P, Ball E, Kahn M, Olsen N, Pincus T, Gao X, Br. J. Rheumatol., 1988, 27, 132-138. HLA-DR4 and other genetic markers in rheumatoid arthritis.

5

Todd, 1988 :

Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, McDevitt HO, Science, 1988, 240, 1003-1009

10

Wordsworth, 1989 :

Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 10049-10053

REVENDICATIONS

1. Procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient à une maladie auto-immune, consistant à mettre un échantillon liquide contenant au moins un type d'amplicons, issus de l'amplification d'au moins une région polymorphe d'intérêt en rapport avec la maladie recherchée, en présence simultanément de sondes choisies de la façon suivante :
- au moins une sonde spécifique de la susceptibilité du patient vis-à-vis de la maladie,
 - au moins une sonde spécifique de la protection dudit patient vis-à-vis de ladite maladie, et
 - au moins une sonde spécifique de la neutralité dudit patient vis-à-vis de ladite maladie,
- et consistant à révéler les hybridations réalisées.
2. Procédé, selon la revendication 1, dans lequel la maladie auto-immune est un diabète insulino-dépendant.
3. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter le diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :
- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0201 et HLA-DQB1*0202 et HLA-DQB1*0302 pour la susceptibilité,
 - au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0301, HLA-DQB1*0602 et HLA-DQB1*0603 pour la protection, et
 - au moins une sonde spécifique des autres allèles associés au diabète insulino-dépendant pour la neutralité.
4. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter le diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0201, HLA-DQB1*0202, HLA-DQB1*0203, HLA-DQB1*0302, HLA-DQB1*0304, HLA-DQB1*0305, HLA-DQB1*0307 et HLA-DQB1*0308 pour la susceptibilité,
- 5 • au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*03011, HLA-DQB1*03012, HLA-DQB1*03032, HLA-DQB1*03033, HLA-DQB1*0304, HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0308, HLA-DQB1*0309, HLA-DQB1*0310, HLA-DQB1*0602, HLA-DQB1*0603, HLA-DQB1*0608, HLA-DQB1*0610, HLA-DQB1*06111, HLA-DQB1*06112, HLA-DQB1*0612, HLA-DQB1*0613, HLA-DQB1*0614 et HLA-DQB1*0616 pour la protection, et
- 10 • au moins une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0401, HLA-DQB1*0402, HLA-DQB1*05011, HLA-DQB1*05012, HLA-DQB1*0502, HLA-DQB1*05031, HLA-DQB1*05032, HLA-DQB1*06011, HLA-DQB1*06012, HLA-DQB1*06013, HLA-DQB1*06051, HLA-DQB1*06052, HLA-DQB1*0606, HLA-DQB1*0609, HLA-DQB1*06112 et HLA-DQB1*0612 pour la neutralité.

15

5. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter la susceptibilité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0201, HLA-DQB1*0202 et HLA-DQB1*0203, et
- 20 • une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0302, HLA-DQB1*0304, HLA-DQB1*0305, HLA-DQB1*0307 et HLA-DQB1*0308.

6. Procédé, selon la revendication 5, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter la susceptibilité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont constituées d'au moins dix (10) acides aminés successifs pris dans les séquences suivantes :

- SEQ ID NO 5 (TCTTgTgAgCAgAAgC), et
- 25 • SEQ ID NO 6 (CCgCCTgCCgCCgA).

7. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter la protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- 5 • une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*03011, HLA-DQB1*03012, HLA-DQB1*0304 et HLA-DQB1*0309,
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*03011, HLA-DQB1*03012, HLA-DQB1*03032, HLA-DQB1*03033, HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0309 et DQB1*0310, et
- 10 • une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0308, HLA-DQB1*0602, HLA-DQB1*0603, HLA-DQB1*0608, HLA-DQB1*0610, HLA-DQB1*06111, HLA-DQB1*06112, HLA-DQB1*0612, HLA-DQB1*0613, HLA-DQB1*0614 et HLA-DQB1*0616.

8. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter la protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont constituées d'au moins dix (10) acides aminés successifs pris dans les séquences suivants :

- 15 • SEQ ID NO 7 (AggggACCCgggCggA),
- SEQ ID NO 8 (gACgTggAggTgTACC), et
- 20 • SEQ ID NO 9 (gCCgCCTgACgCCg).

9. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont définies comme suit :

- 25 • une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*0306, HLA-DQB1*0401 et HLA-DQB1*0402,
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*05011, HLA-DQB1*05012, HLA-DQB1*0502, HLA-DQB1*05031 et HLA-DQB1*05032,
- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*06011, HLA-DQB1*06012 et HLA-DQB1*06013, et

- une sonde spécifique des allèles HLA-DQB1*06051, HLA-DQB1*06052, HLA-DQB1*0606, HLA-DQB1*0609, HLA-DQB1*06112 et HLA-DQB1*0612.

10. Procédé, selon la revendication 9, caractérisé en ce que les sondes utilisées pour détecter la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant sont constituées d'au moins dix (10) acides aminés successifs pris dans les séquences suivants :

- SEQ ID NO 10 (ggggCCCgggCgTC),
- SEQ ID NO 11 (AggAggACgTgCgC),
- SEQ ID NO 12 (TCTTgTAACCAgATAC), et
- SEQ ID NO 13 (ggTggACACCgTATgCAg).

11. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 4 à 10, caractérisé en ce qu'au moins une sonde de contrôle positif, capable de s'hybrider avec l'ensemble des gènes HLA-DQB1, est utilisée pour permettre la détection de tous les allèles HLA-DQB1.

12. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 6, 8, 10 ou 11, caractérisé en ce qu'au plus 38,89 %, préférentiellement au plus 20 %, des bases d'une même sonde est remplacée par au moins une base analogue, telle que l'inosine.

13. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que, préalablement, au moins une amplification de la ou des régions polymorphes d'intérêt associées au HLA-DQB1 est effectuée.

14. Procédé, selon la revendication 13, caractérisé en ce que, les amorces d'amplification sont biotinylées, de sorte que les amplicons sont également biotinylés.

15. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que, préalablement à l'amplification, l'échantillon biologique prélevé, préférentiellement sous forme de tache de sang séché, est traité en vue de l'extraction des acides nucléiques.

16. Procédé, selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'extraction des acides nucléiques s'effectue dans un mélange réactionnel contenant déjà les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), qui seront ensuite utilisés lors de l'amplification, et ce préalablement à l'incubation.

17. Procédé, selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'après l'incubation, on ajoute dans le mélange réactionnel, des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), qui seront également utilisés lors de l'amplification ultérieure.

18. Dispositif permettant la mise en œuvre d'un procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que chaque type de sondes spécifiques est fixé dans un compartiment indépendant, tel qu'un puits d'une plaque de microtitration, indépendamment des autres sondes.

19. Dispositif, selon la revendication 18, caractérisé en ce que chaque type de sondes utilisées pour détecter la susceptibilité ou la protection vis-à-vis du diabète insulino-dépendant est fixé dans un compartiment indépendant, tel qu'un puits d'une plaque de microtitration, indépendamment des autres sondes utilisées pour détecter cette susceptibilité ou cette protection, et que toute ou partie des différents types de sondes utilisées pour détecter la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant est fixée dans au moins un puits d'une plaque de microtitration.

20. Dispositif, selon l'une quelconque des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce qu'au moins deux types de sondes spécifiques différentes sont fixés dans un même compartiment indépendant, tel qu'un même puits d'une plaque de microtitration, sans interaction entre elles.

21. Dispositif, selon l'une quelconque des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que l'ensemble des types de sondes utilisées pour détecter la susceptibilité ou la

protection ou la neutralité vis-à-vis du diabète insulino-dépendant est fixé dans un seul et même compartiment, tel qu'un puits d'une plaque de microtitration.

22. Procédé de révélation des hybridations réalisées avec un dispositif, selon
5 l'une quelconque des revendications 18 ou 20, caractérisé en ce que la révélation est une révélation colorimétrique non localisée mettant en jeu une réaction enzymatique, par exemple avec la peroxydase.

23. Procédé de révélation des hybridations réalisées avec un dispositif, selon
10 l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisé en ce que la révélation est une révélation localisée des hybridations réalisées entre chaque type de sonde et les amplicons, par exemple par fluorescence ou radioactivité.

24. Amorces permettant l'amplification d'une séquence correspondant au gène
15 HLA-DQB1 en vue de son utilisation dans un procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au diabète insulino-dépendant, qui utilise une amorce SEQ ID NO 1 en combinaison avec une amorce SEQ ID NO 2.

25. Amorces, selon la revendication 24, caractérisées par le fait qu'elles sont
20 biotinyllées en 5'.

26. Sondes de capture permettant l'hybridation de séquences correspondant au
gène HLA-DQB1 en vue de l'analyse de la prédisposition génétique d'un patient au
diabète insulino-dépendant, qui sont fixées au fond d'un puits de plaque de
25 microtitration ou sur une bille par l'intermédiaire d'un bras aminé ou de biotine situé(e)
en position 5' des sondes.

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

1

Liste de séquences

5 LISTE DE SEQUENCES
 <110> biomérieux S.A.

10 <120> Procédé d'analyse de la prédisposition génétique d'un
 patient au diabète insulino-dépendant, dispositif
 adapté à sa mise en oeuvre et jeu d'amorces
 d'amplification adapté à un tel procédé

15 <130> HLADID
 <140>
 <141>

20 <160> 14
 <170> Patentin Ver. 2.1

25 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 1
 catgtgctac ttaccanag g 21

35 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 2
 ctggtagttg tgtctgcaca c 21

45 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 3
 cgcttcgaca gcgacgtggg g 21

55 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 taigaaactt atgggatac 20

<210> 5

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

2

	<211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
5	<400> 5 tctgtgagc agaagc	16
10	<210> 6 <211> 14 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 6 cegcctgcgc caga	14
20	<210> 7 <211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 7 aggggaccgc ggcgga	16
30	<210> 8 <211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
35	<400> 8 gacgtggagg tgtacc	16
40	<210> 9 <211> 14 <212> ADN <213> Homo sapiens	
45	<400> 9 gcccctgac gccg	14
50	<210> 10 <211> 14 <212> ADN <213> Homo sapiens	
55	<400> 10 ggggcccagg cgtc	14
60	<210> 11 <211> 14 <212> ADN <213> Homo sapiens	
60	<400> 11 aggagacct ggcg	14

WO 02/40711

PCT/FR01/03599

3

5	<210> 12 <211> 16 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 12 tcttgaacc agatac	16
10	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 13 ggtggacacc giatgcag	18
20	<210> 14 <211> 17 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 14 tggancagcc agaagga	17

【手続補正書】

【提出日】平成14年11月27日(2002.11.27)

【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】

自己免疫疾患の患者の遺伝的素因の分析方法において、

- ・感受性についてHLA-DQB1*0201とHLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0302対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、
- ・防御性についてHLA-DQB1*0301、HLA-DQB1*0602とHLA-DQB1*0603対立遺伝子に固有な少なくとも1つのプローブ、および
- ・中立性についてインスリン依存糖尿病に関連する他の対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、

のように選択されたプローブを同時に存在させて、対象の少なくとも1つの多形性領域の増幅から得られた、少なくとも1つのアンプリコン型を含む液体標本を所望の疾患、すなわちインスリン依存糖尿病に関連づけることをもってなる方法。

【請求項2】

インスリン依存糖尿病の検出に用いたプローブが次のように定義される：

- ・感受性についてHLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202、HLA-DQB1*0203、HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、
- ・防御性についてHLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*03032、HLA-DQB1*03033、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0308、HLA-DQB1*0309、HLA-DQB1*0310、HLA-DQB1*0602、HLA-DQB1*0603、HLA-DQB1*0608、HLA-DQB1*0610、HLA-DQB1*06111、HLA-DQB1*06112、HLA-DQB1*0612、HLA-DQB1*0613、HLA-DQB1*0614とHLA-DQB1*0616対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブ、および
- ・中立性についてHLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0401、HLA-DQB1*0402、HLA-DQB1*05011、HLA-DQB1*05012、HLA-DQB1*0502、HLA-DQB1*05031、HLA-DQB1*05032、HLA-DQB1*06011、HLA-DQB1*06012、HLA-DQB1*06013、HLA-DQB1*06051、HLA-DQB1*06052、HLA-DQB1*0606、HLA-DQB1*0609、HLA-DQB1*06112と、HLA-DQB1*00612対立遺伝子に固有の少なくとも1つのプローブであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブが次のように定義される：

- ・HLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0203対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有のプローブであることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブが下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)アミノ酸で構成される:

- ・SEQ ID NO5 (TCTTgTgAgCAgAAgC)、および
- ・SEQ ID NO6 (CCgCCTgCCgCCgA)、

であることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブが次のように定義される:

- ・HLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*0304とHLA-DQB1*0309対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*03032、HLA-DQB1*03033、HLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0309とHLA-DQB1*0310対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*0308、HLA-DQB1*0602、HLA-DQB1*0603、HLA-DQB1*0608、HLA-DQB1*0610、HLA-DQB1*06111、HLA-DQB1*06112、HLA-DQB1*0612、HLA-DQB1*0613、HLA-DQB1*0614とHLA-DQB1*0616対立遺伝子に固有のプローブ、

であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】

インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブが下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)アミノ酸で構成される:

- ・SEQ ID NO7 (AggggACCCgggCggA)、
- ・SEQ ID NO8 (gACgTggAggTgTACC)、および
- ・SEQ ID NO9 (gCCgCCTgACgCCg)、

であることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブが次のように定義される:

- ・HLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0401とHLA-DQB1*0402対立遺伝子に固有のプローブ、
- ・HLA-DQB1*05011、HLA-DQB1*05012、HLA-DQB1*0502、HLA-DQB1*05031とHLA-DQB1*05032対立遺伝子に固有のプローブ、
- ・HLA-DQB1*06011、HLA-DQB1*06012とHLA-DQB1*06013対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*06051、HLA-DQB1*06052、HLA-DQB1*0606、HLA-DQB1*0609、HLA-DQB1*06112とHLA-DQB1*0612対立遺伝子に固有のプローブ、

であることを特徴とする、請求項1から6のいずれか1つに記載の方法。

【請求項8】

インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブが下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)アミノ酸で構成される:

- ・SEQ ID NO10 (ggggCCCgggCgTC)、
- ・SEQ ID NO11 (AggAggACgTgCgC)、
- ・SEQ ID NO12 (TCTTgTAACCAgATAC)、および
- ・SEQ ID NO13 (ggTggACACCgTATgCAG)、

であることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

すべてのHLA-DQB1対立遺伝子の検出を可能にするために、HLA-DQB1遺伝

子全体と交雑することができる、少なくとも1つの正の対照プローブが使用されることを特徴とする、請求項2から8のいずれか1つに記載の方法。

【請求項10】

同一のプローブの塩基の最大38.89%、好適には最大20%がイノシンなどの、少なくとも1つの類似の塩基によって置換されることを特徴とする、請求項4、6、8または9のいずれか1つに記載の方法。

【請求項11】

予め、HLA-DQB1に関連する1つまたは複数の対象多形領域の少なくとも1つの増幅が実施されることを特徴とする、請求項1から10のいずれか1つに記載の方法。

【請求項12】

アンプリコンも同じくピオチン化されるように、増幅プライマはピオチン化されることを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

増幅に先立って、好適にはかさぶた班の形で、採取された生物標本は核酸を抽出するために処理されることを特徴とする、請求項11または12のいずれか1つに記載の方法。

【請求項14】

核酸の抽出が、続く増幅の前に使用されるトリホスフィト・デオキシリボヌクレオチド(dNPT)をすでに含んでいる反応混合物内で実施され、その後保温されることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

反応混合物の中にトリホスフィト・デオキシリボヌクレオチド(dNPT)を添加し、それが後に増幅の際にも使用されることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

固有プローブのそれぞれのタイプが、他のプローブとは独立して、微小滴定プレートのパイ(puits)などの、独立した室内に固定されることを特徴とする、請求項1から15のいずれか1つに記載の方法を実施するための装置。

【請求項17】

インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性を検出するために使用されるそれぞれのタイプのプローブがこの感受性とこの防御性を検出するために使用される他のプローブとは独立して、微小滴定プレートのパイなどの、独立した室内に固定され、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用異なるタイプのプローブのすべてまたは一部が微小滴定プレートの少なくとも1つのパイ内に固定されることを特徴とする、請求項16に記載の装置。

【請求項18】

少なくとも2つのタイプの異なる固有プローブが、その間に相互作用なしに、微小滴定プレートの同じパイなどの、独立した同じ室内に固定されることを特徴とする、請求項16または17に記載の装置。

【請求項19】

インスリン依存糖尿病に対する感受性または防御性または中立性を検出するために使用されるプローブのタイプの全体が微小滴定プレートのパイなどの、唯一かつ同一の室内に固定されることを特徴とする、請求項16または17に記載の装置。

【請求項20】

例えば、ペルオキシダーゼによって、酵素反応を利用する非局所的比色発現であることを特徴とする、請求項16または18に記載の装置で実現される交雑発現方法。

【請求項21】

例えば、蛍光または放射能による、それぞれのタイプのプローブとアンプリコンの間に実現された交雑の局所的発現であることを特徴とする、請求項17から19のいずれか1つに記載の装置で実現される交雑発現方法。

【請求項22】

プライマSEQ ID NO2と組み合わせてプライマSEQ ID NO1を使用する

ことをもってなる、インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析方法において使用するためのHLA-DQB1遺伝子に対応する配列の増幅を可能にするプライマ。

【請求項23】

5'のビオチン化物であることを特徴とする、請求項22に記載のプライマ。

【請求項24】

インスリン依存糖尿病に対する患者の遺伝的素因の分析のために、HLA-DQB1遺伝子に対応する配列の交雑を可能にする捕捉プローブであって、プローブの5'に位置するアミノまたはビオチン分岐を介して微小滴定プレートのプイの底、またはビードの上に固定されることを特徴とする、プローブ。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

より詳細には、上述のすべての変型において、インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブは次のように定義される：

- ・HLA-DQB1*0201、HLA-DQB1*0202とHLA-DQB1*0203対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0304、HLA-DQB1*0305、HLA-DQB1*0307とHLA-DQB1*0308対立遺伝子に固有のプローブ。

この最後の場合について、インスリン依存糖尿病に対する感受性を検出するために使用されたプローブは下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)ヌクレオチドで構成される：

- ・SEQ ID NO5 (TCTTgTgAgCAgAAgC)、および
- ・SEQ ID NO6 (CCgCCTgCCgCCgA)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

より詳細には、上述のすべての変型において、インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブは次のように定義される：

- ・HLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*0304とHLA-DQB1*0309対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*03011、HLA-DQB1*03012、HLA-DQB1*03032、HLA-DQB1*03033、HLA-DQB1*0306、HLA-DQB1*0309とHLA-DQB1*0310対立遺伝子に固有のプローブ、および
- ・HLA-DQB1*0308、HLA-DQB1*0602、HLA-DQB1*0603、HLA-DQB1*0608、HLA-DQB1*0610、HLA-DQB1*06111、HLA-DQB1*06112、HLA-DQB1*0612、HLA-DQB1*0613、HLA-DQB1*0614とHLA-DQB1*0616対立遺伝子に固有のプローブ。

この最後の場合について、インスリン依存糖尿病に対する防御性を検出するために使用されたプローブは下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)ヌクレオチドで構成される：

- ・SEQ ID NO7 (AggggACCCgggCggA)
- ・SEQ ID NO8 (gACgTggAggTgACC)、および

・ S E Q I D N O 9 (g C C g C C T g A C g C C g) 。

【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 1 4

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 1 4 】

より詳細には、上述のすべての変型において、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブは次のように定義される：

・ H L A - D Q B 1 * 0 3 0 6 、 H L A - D Q B 1 * 0 4 0 1 と H L A - D Q B 1 * 0 4 0 2 対立遺伝子に固有のプローブ、

・ H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 1 、 H L A - D Q B 1 * 0 5 0 1 2 、 H L A - D Q B 1 * 0 5 0 2 、 H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 1 と H L A - D Q B 1 * 0 5 0 3 2 対立遺伝子に固有のプローブ、

・ H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 1 、 H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 2 と H L A - D Q B 1 * 0 6 0 1 3 対立遺伝子に固有のプローブ、

および

・ H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 1 、 H L A - D Q B 1 * 0 6 0 5 2 、 H L A - D Q B 1 * 0 6 0 6 、 H L A - D Q B 1 * 0 6 0 9 、 H L A - D Q B 1 * 0 6 1 1 2 と H L A - D Q B 1 * 0 6 1 2 対立遺伝子に固有のプローブ。

この最後の場について、インスリン依存糖尿病に対する中立性を検出するために使用されたプローブは下記の配列から取られた連続する少なくとも10個の(10)ヌクレオチドで構成される：

・ S E Q I D N O 1 0 (g g g g C C C g g g C g T C) 、

・ S E Q I D N O 1 1 (A g g A g g A C g T g C g C) 、

・ S E Q I D N O 1 2 (T C T T g T A A C C A g A T A C) 、 および

・ S E Q I D N O 1 3 (g g T g g A C A C C g T A T g C A g) 。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor	Application No
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		PCT/FR 01/03599	
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, MEDLINE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	FR 2 749 308 A (BIO MERIEUX) 5 December 1997 (1997-12-05) the whole document	1-14, 18, 19, 21-26	
X	SJOROOS M ET AL: "Triple-Label Hybridization Assay for Type-1 Diabetes-Related HLA Alleles." BIOTECHNIQUES, vol. 18, no. 5, 1995, pages 870-877, XP002177468 ISSN: 0736-6205	1-3, 7, 11, 13-15	
Y	the whole document	16, 17	
-/--			
<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 principles 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 26 March 2002		Date of mailing of the international search report 03/04/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 545-2040, Tx. 31 651 eps nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Reuter, U	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int PCT/FR 01/03599	Location No
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	HEZARD NATHALIE ET AL: "Factor V Leiden: Detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position." THROMBOSIS RESEARCH, vol. 88, no. 1, 1997, pages 59-66, XP001024079 ISSN: 0049-3848 cited in the application the whole document	16,17	
X	WO 98 37237 A (HOWARD SHARON ;GERSUK VIVIAN H (US); SAIGENE CORP (US); U REN JACK) 27 August 1998 (1998-08-27) page 2-3 page 18-19 page 25-26	1-5,7, 13,26	
X	TANG ET AL: "Primers and probes for HLA class II typing" THIRTEENTH INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP, 'Online! 4 April 2000 (2000-04-04), XP002177469 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.ihwg.org/protocols/ppclass ii3.pdf> 'retrieved on 2001-09-07! page 59-65 page 1-4 page 20-21	1-12,26	
X	KOMULAINEN ET AL: "Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1" DIABETES CARE, vol. 22, no. 12, December 1999 (1999-12), page 1950-1955 XP002177470 cited in the application the whole document	1-3,5,7, 13,14,26	
A	WO 92 11389 A (HOFFMANN LA ROCHE) 9 July 1992 (1992-07-09) the whole document	1-26	
A	BODMER J & ET AL: "Nomenclature for factors of the HLA system, 1998." TISSUE ANTIGENS, vol. 53, no. 4 PART 2, April 1998 (1998-04), pages 407-446, XP002177471 ISSN: 0001-2815 page 407-409 page 438-440	1-26	
	-/-		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor PCT/FR 01/03599
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATEL P ET AL: "Rapid HLA typing by multiplex amplification refractory mutation system." JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY (LONDON), vol. 46, no. 12, 1993, pages 1105-1108, XP001024211 ISSN: 0021-9746 the whole document	1-26
A	TISCH ROLAND ET AL: "Insulin-dependent diabetes mellitus." CELL, vol. 85, no. 3, 1996, pages 291-297, XP002177472 ISSN: 0092-8674 table 2	1-26
A	NOBLE JANELLE A ET AL: "The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: Molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 59, no. 5, 1996, pages 1134-1148, XP001024212 ISSN: 0002-9297 the whole document	1-26
A	WO 98 28444 A (UNIV CHICAGO) 2 July 1998 (1998-07-02) example 8	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

Int. Application No.
 PCT/FR 01/03599

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2749308	A	05-12-1997	FR 2749308 A1 05-12-1997
			EP 0910667 A1 28-04-1999
			WO 9746700 A1 11-12-1997
			JP 2000511430 T 05-09-2000
WO 9837237	A	27-08-1998	AU 6435898 A 09-09-1998
			EP 1025261 A1 09-08-2000
			JP 2001512326 T 21-08-2001
			WO 9837237 A1 27-08-1998
			US 6319671 B1 20-11-2001
WO 9211389	A	09-07-1992	AT 150796 T 15-04-1997
			AU 656549 B2 09-02-1995
			AU 9136891 A 22-07-1992
			CA 2075052 A1 22-06-1992
			DE 69125368 D1 30-04-1997
			DE 69125368 T2 09-10-1997
			DK 515660 T3 28-07-1997
			EP 0515660 A1 02-12-1992
			ES 2101083 T3 01-07-1997
			GR 3023863 T3 30-09-1997
			JP 3228738 B2 12-11-2001
			WO 9211389 A1 09-07-1992
			WO 9828444
EP 0951569 A2 27-10-1999			
WO 9828444 A2 02-07-1998			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		De PCT/FR 01/03599
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 749 308 A (BIO MERIEUX) 5 décembre 1997 (1997-12-05) le document en entier	1-14, 18, 19, 21-26
X	SJOROOS M ET AL: "Triple-Label Hybridization Assay for Type-1 Diabetes-Related HLA Alleles." BIOTECHNIQUES, vol. 18, no. 5, 1995, pages 870-877, XP002177468 ISSN: 0736-6205	1-3, 7, 11, 13-15
Y	le document en entier -- -/--	16, 17
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		**T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et l'apportant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent: l'inven non revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)		**Y* document particulièrement pertinent: l'inven non revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*B* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26 mars 2002	03/04/2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Reuter, U	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		De <u> </u> internationale No PCT/FR 01/03599
C-(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	HEZARD NATHALIE ET AL: "Factor V Leiden: Detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position." THROMBOSIS RESEARCH, vol. 88, no. 1, 1997, pages 59-66, XP001024079 ISSN: 0049-3848 cité dans la demande le document en entier	16,17
X	WO 98 37237 A (HOWARD SHARON ;GERSUK VIVIAN H (US); SAIGENE CORP (US); U REN JACK) 27 août 1998 (1998-08-27) page 2-3 page 18-19 page 25-26	1-5,7, 13,26
X	TANG ET AL: "Primers and probes for HLA class II typing" THIRTEENTH INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP, 'en ligne! 4 avril 2000 (2000-04-04), XP002177469 Extrait de l'Internet: <URL:http://www.ihwg.org/protocols/ppclass113.pdf> 'extrait le 2001-09-07! page 59-65 page 1-4 page 20-21	1-12,26
X	KOMULAINEN ET AL: "Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1" DIABETES CARE, vol. 22, no. 12, décembre 1999 (1999-12), page 1950-1955 XP002177470 cité dans la demande le document en entier	1-3,5,7, 13,14,26
A	WO 92 11389 A (HOFFMANN LA ROCHE) 9 juillet 1992 (1992-07-09) le document en entier	1-26
A	BODMER J G ET AL: "Nomenclature for factors of the HLA system, 1998." TISSUE ANTIGENS, vol. 53, no. 4 PART 2, avril 1999 (1999-04), pages 407-446, XP002177471 ISSN: 0001-2815 page 407-409 page 438-440	1-26

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		De PCT/FR 01/03599
C-(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATEL P ET AL: "Rapid HLA typing by multiplex amplification refractory mutation system." JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY (LONDON), vol. 46, no. 12, 1993, pages 1105-1108, XP001024211 ISSN: 0021-9746 le document en entier	1-26
A	TISCH ROLAND ET AL: "Insulin-dependent diabetes mellitus." CELL, vol. 85, no. 3, 1996, pages 291-297, XP002177472 ISSN: 0092-8674 tableau 2	1-26
A	NOBLE JANELLE A ET AL: "The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: Molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 59, no. 5, 1996, pages 1134-1148, XP001024212 ISSN: 0002-9297 le document en entier	1-26
A	WO 98 28444 A (UNIV CHICAGO) 2 juillet 1998 (1998-07-02) exemple 8	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

No nationale No
PCT/FR 01/03599

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
FR 2749308	A	05-12-1997	FR 2749308 A1	05-12-1997
			EP 0910667 A1	28-04-1999
			WO 9746700 A1	11-12-1997
			JP 2000511430 T	05-09-2000
WO 9837237	A	27-08-1998	AU 6435898 A	09-09-1998
			EP 1025261 A1	09-08-2000
			JP 2001512326 T	21-08-2001
			WO 9837237 A1	27-08-1998
			US 6319671 B1	20-11-2001
WO 9211389	A	09-07-1992	AT 150796 T	15-04-1997
			AU 656549 B2	09-02-1995
			AU 9136891 A	22-07-1992
			CA 2075052 A1	22-06-1992
			DE 69125368 D1	30-04-1997
			DE 69125368 T2	09-10-1997
			DK 515660 T3	28-07-1997
			EP 0515660 A1	02-12-1992
			ES 2101083 T3	01-07-1997
			GR 3023863 T3	30-09-1997
			JP 3228738 B2	12-11-2001
			WO 9211389 A1	09-07-1992
			WO 9828444	A
EP 0951569 A2	27-10-1999			
WO 9828444 A2	02-07-1998			

フロントページの続き

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

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA05 CA09 HA14 HA19
 4B029 AA07 FA12
 4B063 QA13 QA19 QQ42 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
 QX07

专利名称(译)	胰岛素依赖型糖尿病患者的体质分析方法，装置和引物		
公开(公告)号	JP2004513651A	公开(公告)日	2004-05-13
申请号	JP2002543022	申请日	2001-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	比奥梅里奥克斯上课.A.		
[标]发明人	ムガンブリユノ		
发明人	ムガン,ブリユノ		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6806 C12Q1/6881 C12Q1/6883 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6806 C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/166 C12Q2600/172		
FI分类号	C12Q1/68.A C12M1/00.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07		
代理人(译)	小川真一		
优先权	2000014896 2000-11-17 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于测试受试者对胰岛素依赖性糖尿病的易感性的方法。它还涉及适合于实施该方法的装置，以及用于扩增这种方法的一组引物。该方法包括获取含有至少一种扩增子的液体样品，所述扩增子通过扩增至少一个与之相关的多态性区域而产生。所述疾病，并且以下列方式添加至少一种针对受试者对疾病的易感性特异性的探针，至少一种特异于所述受试者对所述疾病的保护作用的探针，以及至少一种探针。具体地说，所述受试者的中性状态相对于所述疾病的易感性，并且包括可视化形成的任何杂种。本发明特别适用于诊断领域。

インスリン依存 糖尿病の状態	HLA-DQB1*対立遺伝子	位置57のアミノ酸
S	02 0302	アラニン(A)
P	0301 0602 0603	アスパラギン酸(D)
N	その他	バリン(V)又はセリン(S)