

(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2004-533830

(P2004-533830A)

(43) 公表日 平成16年11月11日(2004.11.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B O 2 4
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 131 頁) 最終頁に続く

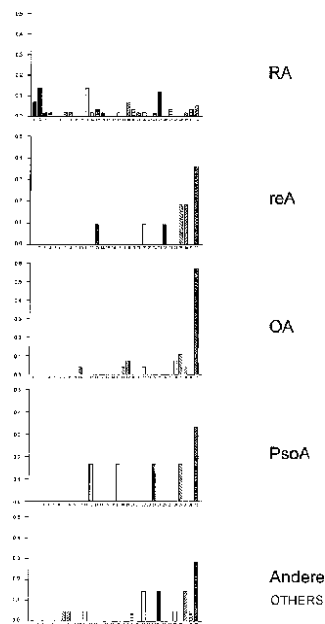
(21) 出願番号 特願2003-500290 (P2003-500290)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月30日 (2002.5.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月28日 (2003.11.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2002/002010
 (87) 国際公開番号 W02002/097125
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)
 (31) 優先権主張番号 101 27 572.2
 (32) 優先日 平成13年5月30日 (2001.5.30)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 503438012
 オリゲネ ゲー エム ベー ハー
 O L I G E N E G M B H
 ドイツ連邦共和国, ベルリン D-101
 17, シューマンシュトラッセ 20/2
 1
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
 (72) 発明者 ホイブル トーマス
 ドイツ連邦共和国, エアクネル D-15
 537, アム シュッツエンヴェルトヒェ
 ン 59
 (72) 発明者 ウンゲテューム ウテ
 ドイツ連邦共和国, ベルリン D-101
 15, ショセーシュトラッセ 93
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性炎症性関節疾患のための診断、分子決定、及び治療開発のためのツール

(57) 【要約】

本発明は、慢性炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患の治療の診断、分子決定及び治療の開発のためのツールに関する。本発明によると、ゲノムデータ(ジェノミクス)、プロテオームデータ(プロテオミクス)及びイムノームデータ(イムノミクス)を、慢性関節疾患の分析及び治療の開発に使用する。本発明は、炎症及び非炎症リウマチ性関節炎、自己免疫疾患及び感染性疾患を特徴付けるための遺伝子配列並びに由来するmRNA及びタンパク質、更に由来するタンパク質に特異的な性質を有する抗体の使用に基づく。未だに解明されない慢性炎症性関節疾患の重大な病因は、検査を実施することによって解明され得る。更に、前記関節疾患の分類、予後の評価、及び治療の最適化のために解明アルゴリズムが作成され得、そして医薬のための、治療及び攻撃するポイントについての新規のストラテジーを作成し得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトにおける慢性炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患のための診断、分子決定及び治療開発についてのツールであって、表 1 に記載される単一遺伝子の配列、選択された遺伝子の配列、又は遺伝子の全体の配列、及び表 2 に記載されるタンパク質をコードする遺伝子の配列の使用の元で実現される、前記ツール。

【請求項 2】

前記ツールが、表 1 に記載される遺伝子又は表 2 に記載されるタンパク質をコードする遺伝子とその配列において同一であるか、又はタンパク質コード領域において、それぞれ少なくとも 80% の配列同一性を有する遺伝子配列を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のツール。

10

【請求項 3】

前記ツールが、表 1 に記載される遺伝子及び請求項 2 に包含される遺伝子とその配列において同一であるか、又は、前記遺伝子のそれぞれの部分と少なくとも 80% の配列同一性を有する配列部分若しくは部分配列を含むことを特徴とする、請求項 1 及び 2 に記載のツール。

【請求項 4】

前記ツールが、

4.1. (マイクロ)アレイハイブリダーゼーションのハイスループット方法

4.2. (半)定量化のためにポリメラーゼ連鎖反応の技術を使用するハイスループット方法

20

の使用に基づくことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 に記載のツール。

【請求項 5】

前記ツールが、標識された患者サンプル、及び第二の異なる標識をされたコントロールサンプルの使用に基づき、前記コントロールサンプルは、患者サンプルと共に(マイクロ)アレイへ、比較二重ハイブリダーゼーション(比較赤/緑ハイブリダイゼーション)のために使用されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 に記載のツール。

【請求項 6】

前記ツールが、請求項 1 ~ 3 における前記遺伝子配列より推定される、単一のタンパク質若しくはペプチド、選択されたタンパク質若しくはペプチド又はタンパク質若しくはペプチド全体の使用に基づくことを特徴とする、診断目的のための請求項 1 ~ 5 に記載のツール。

30

【請求項 7】

前記ツールが、表 2 に記載される、単一のタンパク質、選択されたタンパク質又はタンパク質の全体の使用に基づくことを特徴とする、請求項 6 に記載のツール。

【請求項 8】

前記ツールが、表 1 に記載される、単一のタンパク質、選択されたタンパク質、又はタンパク質の全体の部分配列の使用に基づくことを特徴とする、請求項 6 及び 7 に記載のツール。

【請求項 9】

前記ツールが、表 1 において推定されるタンパク質若しくは表 2 に記載されるタンパク質とその配列において同一であるか、若しくはそれぞれ少なくとも 80% の配列同一性を有するタンパク質又は部分タンパク質配列を含むことを特徴とする、請求項 6 ~ 8 に記載のツール。

40

【請求項 10】

前記ツールが、

10.1. タンパク質発現の分析におけるハイスループット方法(高解像度、二次元タンパク質ゲル電気泳動、MALDI 技術)

10.2. ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断ツールとしての自己抗体をスクリーニングするように設計された、タンパク質スポットィ

50

ング技術（タンパク質アレイ）におけるハイスルーブット方法

10.3. ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断ツールとしての自己反応性T細胞をスクリーニングするように設計された、タンパク質スポットティング技術（タンパク質アレイ）におけるハイスルーブット方法

10.4. ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断ツールとしての自己反応性T細胞をスクリーニングするように設計された、タンパク質スポットティング技術における非ハイスルーブット方法

の使用に基づくことを特徴とする、請求項6～9に記載のツール。

【請求項11】

前記ツールが、請求項6～9において特定されるタンパク質又は部分配列に特異的な抗体の使用に基づくことを特徴とする、請求項6～9に記載のツール。 10

【請求項12】

前記ツールが、動物実験における分析のため、又は炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患を有する動物における診断のための、別の種の対応する相同配列の使用に基づくことを特徴とする、請求項1～11に記載のツール。

【請求項13】

請求項1～3に記載の前記遺伝子又はこれらの遺伝子の調節配列（プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、調節配列に更に結合するための特異的配列）における遺伝的変化（変異）を検出するための診断ツールとしての、請求項6～11に記載のツール。

【請求項14】

表2に記載されるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらの遺伝子の調節配列（プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、調節配列に更に結合するための特異的配列）における遺伝的変化（変異）を検出するための、請求項6～11及び13に記載のツール。 20

【請求項15】

前記ツールが、請求項1～3に記載される前記遺伝子若しくはDNA配列、又はそれぞれ推定されるタンパク質又はペプチド、及び請求項6～9に記載される前記タンパク質配列及び部分タンパク質配列、又はそれらの対応するコード遺伝子配列の使用の元で実現される、ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患の分子決定のための、請求項1～5に記載のツール。

【請求項16】

前記ツールが、請求項1～3に記載される前記遺伝子若しくはDNA配列、又はそれぞれ推定されるタンパク質若しくはペプチドを使用する、ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患の治療の選択のための、請求項1～5に記載のツール。 30

【請求項17】

前記ツールが、請求項1～3に記載される前記遺伝子若しくはDNA配列、又はそれぞれ推定されるタンパク質又はペプチドを使用する、ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患の治療の進行/制御をモニターするための、請求項1～5に記載のツール。

【請求項18】

前記ツールが、請求項1～3に記載の前記遺伝子又は遺伝子配列の発現への直接的又は非直接的な影響を含む、治療コンセプトを開発するための分子ツールとしての、請求項1～5に記載のツール。 40

【請求項19】

前記ツールが、請求項6～9に記載される前記タンパク質又は部分タンパク質配列の発現への直接的又は非直接的な影響を含む、治療コンセプトを開発するための、請求項1～5及び18に記載のツール。

【請求項20】

前記ツールが、請求項8～11に記載される前記タンパク質又は部分タンパク質配列に対する自己反応性T細胞への直接的又は非直接的な影響を含む、治療コンセプトを開発するための、請求項1～5及び18～19に記載のツール。 50

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 3 に記載の前記遺伝子配列から推定されるタンパク質の生物学的作用に影響するための、請求項 1 ~ 5 及び 18 ~ 20 に記載のツール。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 3 に記載の遺伝子、及びそれぞれ推定されるタンパク質に関連する直接的分子調節回路 / 経路に影響するための、請求項 1 ~ 5 及び 18 ~ 21 に記載のツール。

【請求項 2 3】

前記遺伝子及び配列、並びにその調節機構を、治療コンセプト、治療効果、治療の最適化若しくは疾患予後の認識又は予期の目的で使用する解釈アルゴリズムの設計及び使用に基づく治療コンセプトの開発のための、請求項 1 ~ 5 及び 18 ~ 22 に記載のツール。

10

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 3 及び 6 ~ 9 に記載の遺伝子、遺伝子配列、遺伝子若しくは遺伝子配列の調節、又はタンパク質、タンパク質配列、融合タンパク質を使用するか、あるいは請求項 10 ~ 14 に記載の抗体若しくは自己反応性 T 細胞を使用することで、生物学的に活性な薬物（生物製剤）を開発するための、請求項 1 ~ 5 及び 18 ~ 22 に記載のツール。

【請求項 2 5】

比較的タンパク質特異的な結合行動をとる異なる抗体又は分子を含む、分子ツールとしてのアレイであって、前記アレイが、表 1 における遺伝子から推定されるタンパク質の全体若しくは選択されたタンパク質を検出するために、又は表 2 におけるタンパク質の全体若しくは選択されたタンパク質を検出するために意図される、前記アレイ。

20

【請求項 2 6】

2 6 . 1 . 医学診断における、血液サンプル又は組織サンプルの分析

2 6 . 2 実施例 1 に記載の分析における使用

2 6 . 3 . 実施例 2 に記載の治療コンセプトにおける使用

のための、請求項 1 ~ 2 4 に記載のツールの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断、分子決定 (molecular definition)、及び治療開発のためのツールに関する。これらのツールは、慢性関節疾患についての分析及び治療開発における、ゲノムデータ [ゲノミクス (genomics)]、プロテオミクス (proteomic) データ [プロテオミクス (proteomics)] 及び免疫データ [イムノミクス (immunomics)] に基づく。本発明は、炎症性リウマチ様関節疾患及び非炎症性リウマチ様関節疾患、自己免疫疾患及び感染性疾患を特徴付ける、遺伝子配列並びに推定される mRNA 及びタンパク質の使用、並びにその推定されるタンパク質に特異的な抗体の使用の両方に基づく。研究を開始することにより、今までに解明されていない慢性炎症性関節疾患の病原学的に重要な病因を推論し得る。更に、これらの関節疾患の分類、予後の評価及び治療の最適化についての解釈アルゴリズムを構築し得、そして更に、新規の治療のストラテジー及び治療の標的についての結論を引き出し得る。

30

40

【背景技術】

【0002】

[先行技術の概要]

(技術問題)

慢性炎症性関節疾患の病因は、未だに解明されていない。慢性関節リウマチ (RA - 実施例の下略語の一覧表を参照のこと) は、これらの疾患についての典型的な例である。疾患の主な進行は、滑膜において起こり、これが炎症によって変化して慢性の関節の病変を引き起こす。観察された臨床写真は、非常に異質であり、破壊性の滑膜炎の共通の症状を示すいくつかの実体直面することを示唆する。これらの疾患はまた、全身性の疾患として理解されるべきであり、これは血液中において多数の変化が観察され、そしてしばしば

50

重篤な組織徴候が起こる。

【0003】

炎症カスケードにおける、調節不全が原因の過敏性炎症活性は、主な病原性の機構として議論される。更に、自己免疫反応が記載され、これは病原性プロセスにおける特異的な体液性免疫機構及び細胞介在性免疫機構の役割を示唆する。しかし、酵素学的な組織破壊、細胞及び組織の増殖又は再生のような他の機構もまた議論され、これらの因子もまた、病原における重大な役割を潜在的に果たす。

【0004】

これらの病原の機構がただ一つの、排他的に関連するものであるかどうかは、今までは最終的な決定が可能でなかった。そのうえ、どのようなパラメータが同時にこれら全ての変化を含むが未知である。この不十分な病因の理解の結果、多数の治療が可能であるが、その主な例は、一つの主な治療コンセプトのみに従う：

【0005】

過敏性炎症の共通の症状に焦点を合わせると、このように現在の治療は、炎症を抑制することを目的とする。いわゆる基礎治療は、免疫調整及び疾患を変更するという特徴を示す。これらの治療は、細胞の代謝及び細胞の活性の基礎の機構を阻害する（例えば、メトトレキサート、アザチオプリン）。しかし、関節疾患におけるこれらの治療の分子機構の包括的な原理は、完全には理解されていない。その結果、個々の場合における異なる様式及び特異的な様式において、単一の基礎治療の治療効果を制御するようなそれぞれのパラメータが不足する。

【0006】

（先行のツール）

関節疾患を有する患者は、現今では臨床ルーチンにおいて、以下の診断基準に従って評価される：疾患の進行の報告（既往歴）、臨床写真（関節、組織徴候において観察される疾患のパターン）、炎症のパラメータ（血清の電気泳動、沈降速度、及びC-反応性プロテインにおいて観察される非特異的炎症のパラメータ）、自己免疫のパラメータ（リウマチ様因子、抗核抗体、及び抗Ro、抗La、抗U1RNP、抗Sm、抗ヒストン、抗Sc170、抗セントロメア、抗dsDNA、抗リン脂質抗体のようないくつかの特異的自己抗体）、HLAマーカーに基づく遺伝的素因（DR4、B27、DR3）、イメージ作成（関節のX線写真における破壊的変質）、実験室的診断のルーチンパラメータによる伸展した組織の診断（肝臓酵素、筋肉酵素、腎臓保持値）、並びに都合のよい場合、超音波、放射線及び磁気共鳴トポグラフィーのさらなる技術。これらは、予測されるべき疾患の攻撃性に関するか、又は個々の患者における基礎治療が成功するという具体的な期待値に関する、非常に限られた断言的な事項にのみ従う。更に現今では、診断の判断基準は、ほとんどの通常の関節炎疾患、RAにおける徴候の多様性を十分に分類するように設計されていない（1）（実施例の下引用文献を参照のこと）。特に疾患の初期段階において、診断は困難でかつ不確定である。しかし、疾患を患いちょうど1年すると、多くの患者は、取り返しのつかない関節の病変をすでに被っている。初期段階の関節炎の研究により、より初期に診断を確定すること、そして続いて適切な治療を受けることにより、疾患の長期的な発達に関する根本的な改善が生じるということが既知である。従って、臨床写真を超える分子的特長を統合した新規の方法及び診断基準が非常に必要とされる。

【0007】

また、治療的な成功の進行をモニターすることは、今まで上記に記載される診断の方法によって為されてきた。これらの多くのパラメータが、非常にゆっくりとしか変化しない。選択された治療が効果的な場合、結論を出す目的では、これらのパラメータの観察には数週間から多くの月日を必要とする。改善が不十分であること及び疾患が進行していることが原因で、しばしば治療は変更されなければならない。一般に、疾患の治療は、現在可能な治療を用いることによって是不可能である。

【0008】

（実験的なアプローチ）

10

20

30

40

50

特に R A の診断を改善する目的で確立されているツールを超える、多くの実験的なアプローチが存在している。

【0009】

これらのアプローチは、鍵となるタンパク質を探ることに関する。すなわちこの鍵となるタンパク質は、1) 中央部分における炎症の進行を維持するか又は阻害する、2) 軟骨及び骨マトリクスの酵素的破壊に確実に関与するか、又は原因である酵素を阻害する、あるいは3) 再生プロセス及び修復プロセスを誘導し得るか、又はそのアンタゴニストを阻害する。ここで、例えば、炎症に介在するサイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) - 及びインターロイキン (IL) - 1 の役割は必須であり、従って、それぞれの治療的アプローチを臨床的使用へ導入している。TNF - を阻害することは、通常ツールによつては十分に影響しない R A を多くの場合において改善させ得るが、しかしこれらの陽性の結果は、疾患の治癒を引き起こさない。部分的には、この阻害は、感染又は敗血性の合併症さえ生じ、そしてそれにも関わらず関節炎の十分な制御は為されないというほど強力である。これは、炎症の TNF - 介在経路が、少なくとも唯一の疾患の中心部の病原性機構ではないということを示唆する。2つの前述のサイトカインの他に、関節炎の病原における他の多くのシグナル物質の役割は研究中である。加えて、治療的な介入は、対応する細胞内シグナル経路にますます焦点をあわせている。

10

【0010】

更に、マトリックスメタロプロテアーゼ及びカテプシンは、骨及び軟骨の酵素的破壊の中心である。

20

再生機構の研究は、ちょうど調査の始まりである。始めに、トランスフォーミング増殖因子 (TGF) - ファミリーに属するシグナル物質に言及しなければならない。これらの多くは、ロコモーター系の発達に重大な役割を果たす。滑膜組織及び軟骨に対する最初の研究は、このグループの増殖因子及びモルフォゲンのメンバーは、成体の滑膜組織においてもまた産生されるということを示す。炎症性関節疾患について本発明者らは、自身の研究において、いくつかのこれらの因子は明らかに相対的な減少を示すということを示し得た。更に、骨形態形成タンパク質 (BMP) - 7 について、発達する人工軟骨組織への細胞侵襲が抑制されることが示され得た (2)。

【0011】

上述の多くの因子及び酵素は、変形性関節症又は反応性関節炎疾患のような他の関節疾患においてもまた見出され、それゆえそれらに関しては、特定の診断パラメータを構成しない。

30

【0012】

実験的なアプローチはまた、自己反応性 T 細胞及び自己反応性 B 細胞は R A において生じ、従って R A は自己免疫疾患の群に分類されるという事実にも焦点を合わせている。この分類は、いわゆるリウマチ様因子、直接免疫グロブリン G に指向する自己抗体の発見にさかのぼる。しかし、リウマチ様因子は、R A 患者のたった約 3 分の 2 にしか起こらず、しかしまた、他のリウマチ様疾患及び非リウマチ様疾患、及び健康な集団の 5% (しかも高齢者には高い割合) においてさえも存在する。リウマチ様因子の発生は見かけ上、特定の病理学的状態下の身体の生理学的な反応 (例えば、細菌性心内膜炎) である。IgG に特異性を有する自己反応性 B 細胞は、見かけ上集団の大部分に存在し、異なる機構によって活性化され得る。用語「リウマチ様因子」は、R A についての診断的意味及び予後的意味しか持たないが、それにもかかわらず維持されている。

40

【0013】

しかし、同じ特徴はまた、R A において既知であるほぼ全ての自己抗体に対して定性的に適用される：陽性の患者の頻度は、100% よりも有意に低く、そして部分特異的な疾患もまた、100% よりも有意に低い。従って、疾患パターン、炎症の強度及び間欠的特長に関する、判断された R A の臨床的異質性は、免疫学的な調節不全プロセスの異質性と同時である。この臨床的異質性及び免疫学的異質性はまた、「慢性関節リウマチ」とは、異なる疾患の実体について一般的な用語である、という推測を支持する。このことについて

50

典型的な例は、RF陽性及びRF陰性(RF-リウマチ様因子)RA間の相違であり、ここで前者は、より重度の破壊的な素質及び全身性の体液活性を有するとされている。用語「血清陰性の」とは、どんな自己抗体も存在しないとさえ誤って意味される。しかし、リウマチ様因子も他の公知の自己反応性のものも、RA又はその推定される派生型若しくは進化型のうちの1つの発生についての病因学的な原因として確認され得ていなかった。

【0014】

自己抗体は、その主要メンバーとして全身性エリテマトーデス(SLE)を有する膠原病のような、他のリウマチ様自己免疫疾患の場合における診断的な分類のために用いられる。これらの自己抗体の初期の病原性は、絶えずそして繰り返し議論されている。疾患の断続的な発症及び引き続く免疫複合体の形成の間における、予測外で過剰な自己抗原の放出及び補体の活性化と組み合わせ、高力価の自己抗体疾患は組織病変、特に腎臓、及び血管炎特徴と関連があることが確実である。しかし、RAにおける自己反応性B細胞及びT細胞の役割は、決定していない。代わりに、新規な自己抗原が、RAにおける自己反応性免疫応答の標的として常に記載される。いくつかのこれらの抗原は、その生化学的特徴及び抗原性特徴の観点から十分に特徴づけられるが、しかし他のものは、わずかなパラメータの観点においてのみ理解される。いくつかのこれらの自己抗体は、その発見について非常に有望であった。なぜなら、B細胞応答及び/又はT細胞応答は、RAについて高度に特異的であるようだからである。しかし、これらの抗体における興味は、同じ自己反応物が他の自己免疫疾患においてまた検出された場合に、いつも急速に失われた。一方、多数のT細胞関連自己反応物がRAについて発見されたが、しかしこれらのうち非常に少数のもののみがRAについて特異的である。

10

20

【0015】

(ヒートショックプロテイン)

RAは、感染性疾患を構成するとすぐに考えられてきた。従って、外因性の抗原供給源の多様性(多くの場合、微生物起源又はウイルス起源)は、自己反応のトリガーとして作用する潜在的病原体を検出する目的で研究された。潜在的なRA誘導物質の1つは、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)である。なぜなら、これは動物モデルにおいて、特定の局面においてヒトRAと同様な疾患であるアジュバント関節炎を誘導するからである。この実験的な疾患はまた、ミコバクテリアヒートショックプロテイン65(mt-Hsp65)又はこの抗原について特異的であるT細胞によって誘導され得た。ヒートショックプロテインは、天然のタンパク質が正しい3次構造をとるのを助け、それによって3次構造及び4次構造を作製する。mt-Hsp65は、哺乳動物種における基本的なHsp60と相同である。RA患者の滑液におけるmt-Hsp65特異的T細胞及び抗体についての報告は、非常に相同なヒトHsp60は、RA患者において抗原として認識されるということを示唆した。しかしこれらの抗体は、RAに特異的ではない。すなわち、これらはまた、ライター症候群、SLE及び活性な結核を有する患者において生じるが、しかしまた正常なヒトにおいても生じる。

30

【0016】

mt-Hsp65に対する反応性はRAにおいて優勢に役割を果たしているようにはみえないが、にもかかわらずヒトHsp60は、RAの病原性において重要であり得る。すなわち、そのアミノ酸配列において、ヒトHsp60(11~22のアミノ酸の領域において)は、サイトケラチン及びHsp90のようなタンパク質と同一性を有する。従って、自己反応性T細胞又はこれらのタンパク質に対する抗体は、自然発生する(しかし厳密に調節される)Hsp60反応性から生じると考えられる。

40

【0017】

(DnaJ)

DnaJすなわち哺乳動物Hsp70と同一性を有する細菌性ストレスタンパク質は、「共有エピトープ(Shared Epitope)」との名称でより公知であるアミノ酸配列QKRAAを供給し、これはRAの素因を与える(3)。このエピトープはまた、プロテインgp110において生じ、これはエプスタイン・バールウイルス(EBV)によってコードされ

50

る。DnaJは、RA条件下では自己反応性T細胞の標的であるが、正常な被験者においては標的ではない(4)。共有エピトープがRA素因を与える方法はまだ未知であるが、1つの考え得る機構は、非MHCタンパク質からの共有エピトープペプチドの産生、そして続くMHCクラスII分子上での提示であり得、それにより外来(EBV-gp110)及び自己(MHCクラスII)に対して免疫反応の応答を誘導する。

【0018】

(EBVコード核抗原)

エプスタイン・バールウイルス(EBV)は、RA患者の滑液においてつい最近検出が可能になったにも関わらず、RAを引き起こすとすぐに考えられてきた。EBVコード核抗原(EBNA-1)に対する抗体は、RAに罹患する患者における滑膜中皮細胞由来のp62タンパク質に強い反応性を示した。EBNA-1は、グリシン-アラニンリッチな繰り返し配列(IR-3)を含有し、これはRA、SLE、全身性硬化症(SSc)及び感染性単核細胞症に罹患する患者において自己抗体によって認識されるが、また正常な個体においてもしばしば認識される。EBNA-1は、典型的にはIR-3配列を介して、多くのヒトタンパク質と交差反応性を示す。これらの中で、重要な例はp62及びp542であり、ここで後者は感染性単核細胞症を有する患者由来の抗体によって主に認識されるが、またRA患者由来の抗体によっても認識される。P542は、「Rally」と命名されたマウスhnRNPとの高い配列同一性及びヒトhnRNP C2との配列類似性のために、hnRNPの71kの成分として最近同定された。

10

【0019】

(Sa抗原;フィラグリン、シトルリン化ペプチド/タンパク質)

Sa抗原(5)及びフィラグリンは、最近発見された2つの抗原である。これらは、炎症を起こした関節には存在しないが、高いRA特異的免疫応答のために注目を集めている。Sa抗原は、ヒト脾臓及び胎盤に由来する50kのタンパク質である。Sa特異的抗体は、43%のRA患者に生じ、そして78%~99%の疾患特異性を有する。フィラグリンは42kのタンパク質である。これは交差結合介在フィラメント、特にサイトケラチンの原因であり、そして内皮に存在する。フィラグリン特異的抗体は、遥か以前に記載された、「抗核周囲因子」、及びいわゆる抗ケラチン抗体と明らかに同じである。抗フィラグリン抗体によって認識されるエピトープの主な決定基は、翻訳後修飾されたアルギニンであるシトルリンである(6、7)。これらの抗体の感受性は、36%と91%との間であり、そして特異性は66%と100%との間である。フィラグリンは関節外にのみ生じるが、一方シトルリンはまた、滑膜細胞においても首尾よく検出されている。

20

30

【0020】

(コラーゲンII)

コラーゲンタイプIIは、関節軟骨の主要な成分であり、それゆえにRAについての自己抗原であるように考えられる。従って、多くの研究が、コラーゲン特異的免疫応答の役割について扱った。ウシコラーゲンタイプIIと反応するマウスT細胞はエピトープに特異的であり、このエピトープはまた、ヒトコラーゲンIIにおいても起こり、そして更に、コラーゲン誘導関節炎に罹患しているマウス由来の重要なT細胞エピトープと重複している。コラーゲンタイプIIは、細胞外マトリクスの成分であり、これは同一のトロポコラーゲンサブユニットから三重らせんを産生する。このサブユニット自体は更に大きなプロコラーゲンから産生される。コラーゲンに特異性を有するB細胞は、より言われている様式でRA患者の炎症を起こしている関節において生じるようである。コラーゲンIIに特異的なT細胞は、健康な個体と同様、RA患者においてよく生じる。

40

【0021】

コラーゲンの反応性は、RAにおける経口耐性の研究の範囲で特に注目された。動物モデルにおいて経口耐性は、(自己免疫)炎症の部分において生じる抗原によって誘導され得るが、炎症プロセスそれ自体には必ずしも関係がない。このような抗原が経口的に与えられた場合、与えられた抗原に特異性を有するT細胞は明らかに耐性を示し、次いで別の場所、すなわち炎症を起こした関節において、例えば、IL-10及びTGF- β のような

50

抑制因子を介していわゆる傍観者抑制 (Bystander-Suppression) を産生し得る。このようにコラーゲンIIに特異的なT細胞は、RAにおいて炎症を下方調節すると期待された。しかし、経口耐性の3回のプラセボ検証二重盲検では、コラーゲンIIが与えられた場合に疾患の活性の有意な改善が明らかにされなかった。同様の結果は、Hsp65 (Subreum)由来のペプチドを用いる臨床研究についてもまたあてはまる。

【0022】

(軟骨細胞抗原65 (CH65))

軟骨細胞の膜は、RA患者及び関節炎患者における自己反応性T細胞の標的であると報告され(8)、これに対して正常なドナーのT細胞は、このような反応を示さない。更に、軟骨細胞膜は、RA患者の70%において自己抗体によって認識される。この各々の抗原は、軟骨特異的なCH65であり、これは、ミコバクテリアHsp65及び特定のサイトケラチンと配列類似性を示す。CH65は、Hspと類似であるが同一ではないグリシンの高い割合を示す。この配列はケラチンの配列と類似であるが、それにもかかわらずこの配列は完全にはケラチンの代表ではない。このような類似性のために、ヒト/ミコバクテリアHspと他のタンパク質との間の分子相同性の考えに至るようになる。しかし、CH65、サイトケラチン、又はHsp65に特異的なモノクローナル抗体との間に交差反応性は見出されなかった。T細胞の反応性は、精製されていない軟骨細胞膜に対してのみ研究された。

10

【0023】

(HC gp39)

滑液において多くの抗原が生じる。これらは患者及び対照のわずかな群においてのみ試験された。1つの例としては、重要な産物であるヒト軟骨糖タンパク質 (HC gp39) であり、これは、関節の軟骨細胞、滑膜細胞、分化最終段階のマクロファージ、及び好中球によって分泌される。破壊的な関節疾患を有する患者におけるgp39のレベルは、健康な個体と比較して血清及び滑液において増加している。増加した力価は変形性関節症の場合にのみ生じるのではなく、結腸直腸の癌腫、アルコールで誘導された肝硬変及び乳癌の場合においても生じることが後に示された。gp39は、組織の再構成及び細胞外マトリクスの分解において役割を果たすだけでなく、RAにおける自己反応性T細胞の標的でもある。従って、gp39配列由来のペプチドが、HLA-DR4 (DRB1*0401)に結合するか、そしてT細胞を刺激するか否かもまた試験された。gp39反応性T細胞は、18人のRA患者のうちの8人、そして11人の健康な個体のうちの3人において検出された。動物モデルにおいて、Balb/cマウスの免疫化は、断続的に発症する慢性関節炎を誘導する。この慢性関節炎は、gp39の経鼻投与によって再び治癒し得た。

20

30

【0024】

(リウマチ様因子)

RAにおける最も公知な自己抗原は、同時に細胞特異的ではなく、ほぼ広範に生じ得る。これは、さらなる抗体の標的としての免疫グロブリンG (IgG)、すなわちいわゆるリウマチ様因子 (RF) である。リウマチ様因子は、まだ唯一の血清学的パラメータであり、米国リウマチ学会 (American College of Rheumatology) の診断基準 (ACR診断基準) に包含されている。RAについてのRFの病理学的な関連は、まだ議論の余地がある。なぜならRFは、SLE、シェーグレン症候群、心内膜炎、肝臓疾患を有する患者、そして健康なヒトにでさえ生じるからである。RFの力価と、臨床的若しくは血清学的なRAの活性、又は関節破壊の程度とは厳密には相関していない。

40

【0025】

(hnRNP A2プロテイン (RA33))

ヒト核リボヌクレオタンパク質 (hnRNP) に属するA2プロテインは、広範に分布するタンパク質であり、RA33自己抗原として初めに記載された。以下に、A2成分との同一性、並びにSLE、混合膠原病 (混合結合組織病; MCTD) 及び他の疾患に罹患している患者由来の血清との反応性の両方を示す。A2は、多くの他の因子との複合体として存在し、共に核中のhnRNPとなる。A2の正確な機能は未知であるが、ヒト核リボ

50

核酸 (h n R N A) をスプライシングする機能が考えられる。従って、A 2 は、2 つの R N A 結合ドメイン及び核インポート/エクスポートシグナルを提供する。R A 及び S L E における抗体は、R N A 結合ドメインの間の領域に指向し、M C T D 患者 (混合結合組織病) における抗体は両方の R N A 結合ドメインから成る不連続なエピトープを認識する。免疫系がどのように A 2 と接触するかは、未だ明らかではない。しかし人体模型の観点から、h n R N P は R A についての良好な候補抗原である。しかし今のところ、A 2 (特定の状況下で) は、例えば炎症の経過における細胞減少の間に細胞表面に到達する、ということのみ推測し得る。

【0026】

(カルパスタチン)

カルパスタチンは、72k の分子量及びカルパインについての4つの抑制ドメインを有する、広範に存在する細胞質タンパク質である。カルパインは、リウマチ様疾患における関節破壊に関すると考えられているシステインプロテアーゼのファミリーを包含する。カルパインは細胞質において生じ、その活性化はカルシウムイオンによって、及びその抑制はカルパスタチンによって厳密に調節される。細胞活性化の後、カルパスタチンはまた、細胞外で生じ、そして従って抗体へ接近可能である。カルパスタチンは、R A、S L E、多発性筋炎/皮膚筋炎 (P M / D M)、M C T D、活性化関節炎及び静脈血栓症に罹患している患者において、自己抗体によって認識される。カルパスタチン欠乏症ラットの動物モデルにおいて、関節炎の症状は誘導され得なかった。カルパスタチン、カルパイン及びカルパスタチン特異的抗体は、R A 患者及び O A 患者の炎症を起こした関節において存在し、従って、これらの疾患の病原性に関し得る。

10

20

【0027】

(カルレティキュリン)

カルレティキュリンは、小胞体 (E R) の広範に存在するタンパク質である。これは、特定の条件下で、核、細胞質及び細胞表面においても生じる。これは、高度に保存された C a ⁺⁺ 結合タンパク質を構成する。カルレティキュリンは、多くの異なる自己免疫疾患又は炎症起源、主に S L E 及びオンコセルカ症、また R A における自己抗体の標的である。更に、R A 関連ハプロタイプ D R 4 D w 4 / D R 5 3 は、カルレティキュリン由来のペプチドと結合する。

【0028】

(B i P (重鎖結合タンパク質))

R A の人体模型についてさらなる有望な標的抗原は、広範に存在する B i P (結合タンパク質) である。これは、免疫グロブリンの重鎖と相互作用するので、重鎖結合タンパク質として初めに記載された。B i P それ自体は、常在性 E R タンパク質であり、正常状態下ではこのタンパク質が輸出されるのを阻害するペプチド配列を有する。一方で、B i P はいわゆる分子シャペロンであり、その役割において小胞体 (E R) 中に導入され、そして分泌経路に入るほとんどのタンパク質と相互作用する、ということが明らかになった。この基本的な特徴を超えて、B i P は、重金属イオン、又は細胞におけるカルシウムイオンのレベル若しくはタンパク質生合成の統合性に影響を与える物質のようなストレス因子の影響下で、過剰発現する。これらの状況下では、B i P は核中で、また細胞表面上でさえ

30

40

【0029】

B i P は、66% の R A 患者において、自己反応性抗体及び T 細胞の標的である。すなわち B i P は、R A の状況において p 6 8 として初めに記載された。これらの自己抗体の疾患特異性は 99% であり、従って非常に高い。この抗原は O - グリコシル化され、そしてこの修飾は、モノ - O - G l c N a c が多くの他のタンパク質に有するような調節機能を有し得ると考えられる。これらのタンパク質において、O - G l c N a c から O - リン酸修飾への切り換えは、活性化状態の変化又は細胞成分の変化と組み合わせられる。同様の様式で、E R から核又は細胞表面への B i P のストレス誘導変化は、病原性の関連であり得る。細胞表面上における B i P の存在は、これはむしろ代表的でないが、警告のシグ

50

ナル、又は他の細胞、そしてまた免疫系の細胞について活性化のシグナルとして役割を果たし得る。RAにおいてこのような活性化は、局所的な感染によってか、又はそうでなければ、炎症によって悪化した組織によって生じる。細胞損傷又は組織損傷の結果、BiPは損傷した細胞の表面に到達し、次いでここで自己反応性T細胞の標的となる。これらのBiP反応性T細胞はまた自然状態下で生じ、次いでこの条件下では、誘導条件が中止したあとにT細胞は調節性T細胞によって下方調節されるという手がかりが存在する。この調節性細胞は抗原特異的及びHLA限定的である。それによって、調節性T細胞のHLA限定性は、エフェクターT細胞のHLA限定性とは明らかに区別され、特異的に抑制させる。この意味において、エピトープO-GlcNAcは、再び重要な役割を有し得る。すなわち、このエピトープが自己抗体応答の標的であるだけでなく、T細胞応答の標的でもある、と非常に考えられる。

【0030】

(p205)

滑液から単離され、しかしその機能はこの区切りを大きく超える、さらなるタンパク質は、p205抗原である。これはRA患者における自己反応性T細胞の標的である。p205はまた、滑膜において発現し、そしておそらく、RAにおける全てで、滑液によってか、又はレクチンフィットヘマグルチニン(PHA)によって得られ得る増殖速度に部分的に達する最も高いT細胞刺激能を有する抗原を構成する。p205抗原の機能は、まだ未知である。しかし、p205は、11個のアミノ酸の配列を含み、この配列はIgG由来の部分、すなわち、定常ドメイン C_H2 と C_H3 との間の領域内であって、リウマチ様因子の結合が生じる領域と同一である。p205のこの領域は、モノクローナルリウマチ様因子によって結合され、そしてまた自己反応性T細胞によって認識されることの両方である。更にp205特異的T細胞は、同属の抗原によって刺激される場合、B細胞のリウマチ様因子分泌を助ける効果を有する。従って、ここで最初に、T細胞反応性を有し、そして更に親和性の成熟においてIgG特異的B細胞を支持し得る抗原が発見されたと考えられるべきである。このことと比較して、完全なIgG又はIgGフラグメントに対するT細胞反応性は、まだ発見されていない。おそらくp205のアミノ酸配列は、IgGのプロセシング中にインビボで産生されないか又は十分に産生されないペプチドを構成し得る。従って、p205に対する自己反応性が、RAにおけるリウマチ様因子の産生を誘導するとおそられる。

【0031】

このRA関連自己反応物のまとめは、多くの異なる自己抗原がRAのプロセスの間に免疫系の標的になることを示す。程度は異なれ、これらの自己抗原はまた、他のリウマチ様疾患及び非リウマチ様疾患の場合において、及び健康な状態でさえ、免疫系の標的となる。すなわち、現在の知識に従って、自己反応性はそれ自体では、初期段階又はその経過における、RAの診断の改善又はそれぞれの治療のモニタリングの改善に適さない、と言わざるを得ない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

[本発明の特徴]

本発明は、慢性炎症性関節疾患の診断及び治療を改善並びに支持する目的を有する。

【課題を解決するための手段】

【0033】

この目的は、「慢性炎症性関節疾患並びに他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断、分子決定、及び治療開発のためのツール」を提供することによって達成される。これらのツールを以下に記載する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

DNAアレイ又はタンパク質アレイ技術のようなハイスループット方法は、多くの異なる

10

20

30

40

50

パラメータの同時検出を可能にする(9)。遺伝子発現は、標識されたRNAサンプル又はcDNAサンプルのハイブリダイゼーションを介したDNAアレイによってmRNAレベルで、及び選択したタンパク質特異的抗体を含むアレイによってタンパク質レベルで分析し得る(10)。更に、免疫学的な反応は、選択された抗原を含むアレイによって利用され得る。

【0035】

最初に、疾患に関係があり、そして従って評価のために使用される遺伝子及びタンパク質を、決定することが必要である。

【0036】

本発明によるツールは、炎症性関節疾患の診断及び治療開発のために設計されたものであるが、これらはこのような規定されたパラメータの選択に基づく(表1及び表2)。ここで与えられる遺伝子をアレイ方法による遺伝子発現分析に使用することは、基本的に新規の診断アプローチを可能にする。

10

【0037】

関節疾患における特異的なmRNA発現パターンの決定を意図したDNAアレイでは、表1に与えられる遺伝子は、表2に記載されるタンパク質をコードする遺伝子の全てと同様に、その全体が使用され得る。更に、表1に与えられた遺伝子、又は個々の遺伝子の部分配列、又は選択された遺伝子/部分配列、及び表2に記載されるタンパク質をコードする遺伝子、又は個々の遺伝子/部分配列の部分配列、又は選択された遺伝子/部分配列を使用し得る。

20

【0038】

自己免疫反応の特徴づけのために、表2に記載されるタンパク質、及び表1に与えられる遺伝子によってコードされるタンパク質が、その全体において使用され得る。更に、これらのタンパク質から限定して選ばれたもの、タンパク質の選択された部分(オリゴペプチド又はポリペプチドの形態で)、又はそれらの改変された形態が使用され得る。タンパク質レベルでは、翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、リン酸化など)もまた、特に考慮しなければならない。この翻訳後修飾は、リウマチ様疾患の間の区別について関連がある。タンパク質、部分タンパク質配列並びに改変タンパク質及び改変部分タンパク質配列は、(個々に、群で、又は全体で)担体マトリクス上に付着する。これは、これらの1つ又はいくつかの成分に対するこれらの反応性について、患者の抗体を試験するために適する。その結果、患者についての反応性又は非反応性のプロフィールを得る。先行技術の診断法とここで示した診断的アプローチとの間の重大な差異は、先行技術においては、それぞれの場合1つの単一の自己反応性の決定及び分析であり、そして本発明に従うと、複数の自己反応性の決定及び分析であることである。本発明は、いくつかの自己反応性(これは単独で考える場合、動かされない)を1つ以上のプロフィールに統合すると、差異の検出が可能になる、という予測外の発見を使用する。なぜならこのアプローチは、100%の場合、RAと非RA(すなわち、他のリウマチ様疾患及び非リウマチ様疾患並びに健康状態)との間を、例えば区別し得るからである。異なるプロフィールへの分類は、適切なアルゴリズムを介して、最適な形態においては自己学習アルゴリズムを介して達成される。これはまた、後の発見を取り入れ得る。

30

40

【0039】

タンパク質発現パターンの決定のために、アレイシステムがタンパク質特異的抗体から開発された。サンプルのタンパク質抽出物由来のタンパク質を標識することによって、これらのタンパク質を、アレイ上の対応する抗体へ特異的に結合させた後、定量的に決定し得る(10)。従ってアレイは、本発明の意味において分子ツールとして定義される。これは、比較可能なタンパク質結合行動を有し、表1の遺伝子から推定される全てのタンパク質若しくは選択されたタンパク質の決定のため、又は表2由来の全てのタンパク質若しくは選択されたタンパク質の決定のために設計された、異なる抗体又は分子から構成される。

【0040】

50

診断手順は、異なるアレイ分析について滑膜組織、滑液、血液細胞、血清又は血漿由来のバイオプシーを使用する。この手順において、液体サンプルにおいて体液性自己反応が、血液又は滑膜組織細胞において細胞性自己反応が分析され得る。タンパク質発現が全ての上記のサンプルにおいて、mRNAレベルでの遺伝子発現が滑膜組織、滑液の細胞又は血液細胞において、分析され得る。

【0041】

DNAアレイによる分析のために、組織から、又は血液又は滑液由来の細胞サンプルからRNAが抽出される。DNAアレイハイブリダイゼーションのためのサンプルは、誘導されたcDNA又はcRNAを増幅(12)及び標識する(13)ための標準的プロトコールを使用することで準備される。

10

【0042】

表中に記載される遺伝子は、その公知の配列を介して(GeneBank受入番号を参照のこと。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、基礎を提供し、これから全ての遺伝子についてその特異的なプローブが得られる。これらのプローブは、特異的なプリント手順(14)又は固相上のフォトリソグラフィーにおけるような部位特異的な合成(15、16)のいずれかによって、アレイに結合する。

【0043】

アレイ上の標識されたサンプルがハイブリダイズすることで、部位特異的結合又は遺伝子特異的結合を介して定量的なシグナルを提供し、その結果、これらのシグナルは発現プロフィール/発現パターンへと翻訳され得る。これらのパターンは、組織学的な特徴及び分類を含む、確立された評価の方法と相関する。変形性関節症、乾癬関連関節炎、反応性関節炎疾患及び他の、部分的にまた区別されない関節炎疾患のような異なる関節疾患との更なる比較によって、これは、それぞれの発現プロフィールに従って患者を異なる群へ分けることを可能にする。

20

【0044】

(アプローチの新規性)

関節疾患の評価及び分類を可能にする、アレイ分析について信頼できるパラメータを定義する目的で、広範な比較研究を行った。この目的のために、異なる関節疾患を考慮に入れ、そして部分的に互いに補完しあう異なる方法の新規な組み合わせを選択した。

【0045】

従って、RA、変形性関節症及び健康な関節由来の滑膜組織を分析した。遺伝子発現の異なる分析を達成する目的で、始めに「提示差異分析(representational difference analysis)」(17、18)が実行された。この技術は、たとえその配列がまだ未知である場合でさえ、サンプル中に存在する全てのmRNAを包含するという利点を提供する。欠点として、最も強く示された発現の差異が集中的に選択されることになる。それに対して補完的に、本発明者らは、2つの異なるDNAアレイハイブリダイゼーションの方法によって遺伝子発現を試験した。一方はcDNAフィルターアレイ(19)、他方はオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(米国特許第5,445,934号;同第5,744,305号;同第5,700,637号;及び同第5,945,334号、並びに更に欧州特許第619321号及び同第373203号)である。これらのマイクロアレイは、現在の知識の段階に従うと、ほぼ全ての公知のヒト遺伝子を考慮し、そしてそれら個々の遺伝子それぞれについて組織サンプル間での発現の比較分析を実行することが可能である。最後に、選択された遺伝子について異なる遺伝子発現は、半定量的ポリメラーゼ連鎖反応(PCR、リアルタイムPCR)を用いてより大きなサンプルにおいて確認された。

30

40

【0046】

更に、組織は組織学的に特徴付けられ、そして、組織学的な分類に従って、提示的差異遺伝子発現パターンとまた比較した。表1において与えられる遺伝子は、異なる慢性関節疾患間での比較、及び正常な滑膜組織との比較の両方で、異なって発現される遺伝子として同定された。従って、これらの遺伝子は、慢性関節疾患の特徴づけのために重要である。

【0047】

50

従って、関連のある遺伝子を同定するために使用される選択されたアプローチにおいて、新規性がまた存在する。そのうえ同定された遺伝子の一覧表は、大部分の遺伝子は、従来は炎症性リウマチ様関節疾患と関連がなかったことを示し、そして慢性関節疾患の診断、病態生理学の研究、及び治療についての新規な評価判断基準をもまた示す。

【0048】

本発明の特徴は開示され、そして特許請求の範囲の要素により、及び発明の詳細な説明により特定され、その結果、単一の特徴及びいくつかの特徴の組み合わせの形式の両方が好適態様を構成し、本発明についての法的な保護は、本明細書によって適用される。これらの特徴は、公知の要素、すなわち、表1に記載される遺伝子又は部分配列並びに表2に記載されるタンパク質をコードする遺伝子及び部分配列、並びに新規な要素、すなわちパラメータ(表1及び表2)の規定された選択の使用に基づく新規なツールから構成される。ここで、これらの組み合わせにより、本発明によるツールが導かれ、そして、アレイ方法における遺伝子発現分析について記載された遺伝子の使用のもとで、炎症性関節疾患における診断及び治療開発の基礎的な新規のアプローチを、可能にする。

10

【0049】

本発明によるツールは、(マイクロ)アレイハイブリダイゼーションのハイスループット方法及び/又は(半)定量的のためのポリメラーゼ連鎖反応の技術を使用したハイスループット方法の使用に基づく。

【0050】

これらは患者由来の標識されたサンプルの使用、そして第2の異なる標識をされたコントロールサンプルの使用に基づくということにおいて、更に特徴付けられる。コントロールサンプルは患者サンプルと共に(マイクロ)アレイへの比較二重ハイブリダイゼーション(比較赤/緑ハイブリダイゼーション)のために使用される。このサンプルはまた、別々のアレイ上で分析、その後比較され得る。

20

【0051】

本発明に従って、以下の使用に基づく、診断目的のツールが存在する；請求項1～3に記載される遺伝子配列から推定される、個々のタンパク質又はペプチド、選択されたタンパク質又はペプチド、又はタンパク質又はペプチドの全体、表2に記載される全てのタンパク質の、個々のタンパク質、選択されたタンパク質、及び表1に記載される個々のタンパク質、選択されたタンパク質、又は全てのタンパク質由来の部分配列。

30

【0052】

これらは、タンパク質又は部分タンパク質配列を含み、これは、表1の推定されるタンパク質の配列と、若しくは表2に記載されるタンパク質の配列と同一である配列を有するか、又はそれぞれ少なくとも80%の配列同一性を示す。これらは更に、以下の使用に基づくことによって特徴付けられる；

タンパク質発現の分析における、ハイスループット方法(高解像度二次元タンパク質ゲル電気泳動、MALDI技術)、

ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断ツールとして、自己抗体についてスクリーニングするように設計されたタンパク質スポットティング技術の分野におけるハイスループット方法(タンパク質アレイ)、

40

ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断ツールとして、自己反応性T細胞についてスクリーニングするように設計されたタンパク質スポットティング技術の分野におけるハイスループット方法(タンパク質アレイ)、及び

ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての診断ツールとして、自己反応性T細胞についてスクリーニングするように設計されたタンパク質スポットティング技術の分野における非ハイスループット方法。

【0053】

本発明によるツールは、更に以下の使用に基づく；

請求項6～9に記載されたタンパク質又は部分配列について特異的である抗体、及び

50

動物実験における分析について、又は炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患に罹患している動物における診断について、それぞれ別の種の相同配列。

【0054】

本発明によるツールは、以下において遺伝的变化(変異)の検出するための診断手段として有用である；

請求項1～3に記載される遺伝子の調節配列(プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、調節因子に更に結合するための特異的配列)又はその遺伝子において、及び

表2に記載されるタンパク質をコードする遺伝子の調節配列(プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、調節因子に更に結合するための特異的配列)又はその遺伝子において

。

10

【0055】

更に、これらのツールは、ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患の分子定義の手段であり、それに関して請求項1～3に記載される遺伝子、DNA配列又は推定対応タンパク質若しくはペプチド、及び請求項6～9からのタンパク質及び部分タンパク質配列又はそれぞれコードする遺伝子配列を使用するとして適切である。

【0056】

本発明によるツールは更に以下を使用する；

ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患についての治療の選択であり、それに関して請求項1～3に記載される遺伝子、DNA配列又は推定対応タンパク質若しくはペプチドを使用する選択、

20

ヒトにおける炎症性関節疾患及び他の炎症、感染又は腫瘍疾患における進行/治療的成功のモニタリングであり、それに関して請求項1～3に記載される遺伝子、DNA配列又は推定対応タンパク質若しくはペプチドを使用するモニタリング、

治療コンセプトの開発についての分子手段であり、これは請求項1～3に記載される遺伝子若しくは遺伝子配列の発現に対する直接的又は間接的な影響を含み、

治療コンセプトの開発であり、これは、請求項6～9に記載されるタンパク質若しくは部分タンパク質配列の発現に対する直接的又は間接的な影響を含み、

治療コンセプトの開発であり、これは、請求項8～11に記載されるタンパク質若しくは部分タンパク質配列に対して指向する自己反応性T細胞に対する直接的又は間接的な影響を含み、

30

請求項1～3に記載される遺伝子配列から推定されるタンパク質の生物学的な効果に対する影響、

直接的分子調節経路/回路に対する影響であり、ここで、請求項1～3に記載される遺伝子及びそれらの推定されるタンパク質が関係し、

解釈アルゴリズムの作製及び使用を含む治療コンセプトの開発であり、これに関して、治療コンセプト、治療効果、治療の最適化若しくは疾患予後判定を認識又は予測する目的で、記載される遺伝子及び配列並びにその調節機構を使用し、及び

遺伝子、遺伝子配列、遺伝子若しくは遺伝子配列の調節の使用下、又は請求項1～3及び6～9に記載されるタンパク質、タンパク質配列、融合タンパク質の使用下、あるいは請求項10～14に記載される抗体又は自己反応性T細胞の使用下における、生物学的に活性化薬物(生物製剤)の開発。

40

【0057】

クレームされた本発明によるツールの使用は、以下において見出されるべきである；

医学的診断における血液サンプル又は組織サンプルの分析、

実施例1に従う分析論における応用、及び

実施例2に従う治療コンセプトについての応用。

【0058】

[材料及び方法]

(患者及び組織アサーベーション(asservation))

全ての患者を、RA(1)及びOA(20)についてのACR診断基準に従って選択した

50

。滑膜組織は、ペニシリン及びストレプトマイシン（それぞれ100U/ml）を添加したRPMI培地（RPMI-1640培地を希釈した、従来の細胞培養培地；Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519-524, 1967）中で、手術室から実験室へ直ちに輸送した。滑膜を準備した後、このサンプルを直ちに液体窒素中で衝撃冷凍（shock frozen）した。このサンプルを、使用まで-80で貯蔵した。提示差異分析（Representational Difference Analysis；RDA）、ユニジェン（Unigene）フィルターアレイ（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>）へのハイブリダイゼーション及びアフィメトリックス（Affymetrix）アレイへのハイブリダイゼーションについてのサンプルとして、発明者らは、正常ドナー（ND）、変形性関節症（OA）及び慢性関節リウマチ（RA）由来の滑膜組織サンプルを使用した。

10

【0059】

(RNAの単離)

RNAを抽出するために、サンプルをホモジナイズした。50mg未満の量の組織を、乳鉢及び乳棒によって、液体窒素で冷却されている間に粉末に破碎し、続いてグアニジン-イソシオチアネート含有溶液（Qiagen, Hilden, Germany, www.qiagen.com/literature/handbooks/rna/rny96/1019545_PREHB_RNY96_prot2.pdfより購入したRLTバッファー）に溶解した。より多量の組織を、組織ホモジナイザー（IKA-Ultra-Turrax T 25；Jahnke & Kunkel, Staufen）によって氷冷したグアニジン-イソシオチアネート含有溶液（Qiagen, Hilden, Germanyから購入したRLTバッファー）中で破碎した。RNAの単離は、Chomczynskiに従うフェノール-クロロホルム抽出（21）を使用する改変プロトコールによって行い、続いてQIAGEN-RNeasy-Kitによって水相からRNAを直ちに単離した（製造者プロトコール：<http://www.qiagen.com/literature/rnalit.asp#mini>を参照のこと）。このキットを、製造者プロトコールに従って使用した。このRNAを、30~100µlのRNAアーゼを含まない水に溶出した。

20

【0060】

品質のコントロールのため、光学密度（OD）を260nm（OD260）で測定し、OD260/OD280nmの比を決定し、そして1%アガロース上でゲル電気泳動を実行した。必要な場合、DNA混入を、ゲル中では、又は第1鎖合成の後に、グリセロール-アルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）についてのイントロンプライマーを使用するPCRにおけるいずれかで、検出し得た。これらの例外的な場合において、本発明者らは、DNAアーゼで消化し、それによりQIAGENプロトコールの指示に続いた。

30

【0061】

(第1鎖合成)

cDNAの合成を、Invitrogen/Life Technologies（Karlsruhe, Germany；<http://www.invitrogen.com>）より購入した5×反応バッファーを含む、Superscript II 逆転写酵素（RT）の使用下で実行した。使用したRNAの量は、半定量的PCRについて3~5µgであり、20µgの最終量におけるアレイハイブリダイゼーション及びRDAについて10~20µgであった。cDNAへの転写のための反応混合物には、以下の成分が含まれた：500ngの各プライマーオリゴヌクレオチド[Oligo(dT)₁₂₋₁₈；T7-Oligo(dT)₂₄]、50mMトリスpH8.3、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mMジチオスレイトール、最終濃度1mMの各ヌクレオチドを有するデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）混合物、40U RNAアーゼインヒビター及び20U SperscriptTM II RT。インキュベーション時間は1.5時間で、続いて72で15分間サンプルを加熱することによって酵素を非活化した。

40

【0062】

(第2鎖合成)

以下の成分を、ピペティングによってcDNAに添加した：90µl水性デスト（aqua dest.）、30µl 5×第2鎖バッファー[500mM KCl、50mM酢酸アンモニウム、25mM MgCl₂、0.75mM -ニコチンアミド-アデニン-ジヌク

50

レオチド (- N A D) 及び 0 . 2 5 m g / m l のウシ血清アルブミン (B S A)]、3 μ l の 1 0 m M d N T P 溶液並びに以下の活性及び量の酵素溶液：1 μ l E . c o l i リガーゼ (1 0 U / μ l)、4 μ l D N A ポリメラーゼ I (1 0 U / μ l) 及び 1 μ l R N アーゼ H (2 U / μ l) (Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe, Germany)。インキュベーション時間は、1 6 の温度で 2 時間であった。2 μ l の T 4 D N A ポリメラーゼ (5 U / μ l) を添加した後、インキュベーションを 1 6 で 3 0 分更に続けた。

【 0 0 6 3 】

(減算ハイブリダイゼーション及び R D A)

P C R 抑制減算ハイブリダイゼーション (Suppression Subtractive Hybridisation ; S S H) (2 2) を、P C R セレクトキット (Clontech, Palo Alto, USA ; <http://www.clontech.com/pcr-select/index.shtml>) の製造者指示に従って実行した。二重鎖 c D N A の消化を、Rhodopseudomonas sphaeroides 由来の制限酵素 R s a I を用いて達成した。R D A (1 8) のために、二重鎖 c D N A を Diplococcus pneumoniae 由来の制限酵素 D P N I I (1 0 0 μ l 中における 2 0 U) を用いて切断した。次いで、アダプタープライマー (R B g l 1 2、R B g l 2 4) への連結を実行し、続いて公表されているプロトコール (1 7、1 8) に従って増幅した。減算の第 2 ラウンドにおいて、さらなるアダプターオリゴヌクレオチド [J B g l 1 2 及び J B g l 2 4 又は N B g l 1 2 及び N B g l 2 4 (1 8)] への連結によって、D P N I I を用いたさらなる制限消化の後に、テスター - アンプリコン (tester-amplificaon) を得た。

10

20

ハイブリダイゼーションの後、テスターに属する配列を、P C R によって選択的に増幅し、それによって両方の方法における減算産物に蓄積した。

【 0 0 6 4 】

(減算サンプルの記述)

R D A プロトコールを、R A、O A 及び正常組織ドナー由来のサンプルにおいて弱く発現される遺伝子と顕著に発現される遺伝子の両方の遺伝子を同定し得るように、改変した。この手順において：

1 O A 組織においてよりも R A 組織においてより強く発現する配列を得る目的で O A (ドライバー) を、R A (テスター) から減算した。

2 N D サンプルにおいてよりも R A サンプルにおいてより弱く発現する配列を得る目的で R A (ドライバー) を、N D (テスター) から減算した。

30

3 N D 組織においてよりも O A 組織においてより強く発現した配列を得る目的で N D (ドライバー) を、O A (テスター) から減算した。

【 0 0 6 5 】

(減算ライブラリークローニングの実行、配列決定及びデータベースとの比較)

S S H サンプルの減算産物を、p C R I I ベクター (T A - クローニングキット ; Invitrogen, Heidelberg, Germany ; <http://invitrogen.com>) へクローニングした。R D A 由来の減算産物を、p Bluescript KS⁺ II ベクター (Stratagene, La Jolla, USA ; <http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm>) へクローニングした。このベクターは、Bacillus amyloliquefaciens 由来の制限酵素 B a m H I を用いてあらかじめ切断し、ついで脱リン酸化及び精製しておいた。およそ 1 5 0 のクローンを単離し、そして配列を A B I 3 7 7 シークエンサー (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany ; <http://home.appliedbiosystems.com>) を用いて決定した。配列決定を、T 7 プライマーを使用して、製造者の Dye Terminator Chemistry プロトコールに従って実行した。

40

ベクター配列を除去した後、配列の比較分析を Gene bank 及び N C B I - データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の使用のもとで実行した。

【 0 0 6 6 】

(マイクロアレイハイブリダイゼーション)

2 つの異なるチップ技術を使用した：1) ユニジーン (UNIGENE) ライブラリー (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) の c D N A クローンの P C R 産物がスポットされてい

50

るフィルターの使用。ここで、ハイブリダイゼーションを、オリゴ[d T (1 2 - 1 8)]を用いて第1鎖合成した後に³³P標識cDNAサンプルを用いて65℃で実行した(23、24)。2)アフィメトリックス(Affymetrix)(Affymetrix Inc., Santa Clara, USA; www.affymetrix.com)より購入したマイクロアレイ(HU95A、HU95B、HU95C、HU95D及びHU95E)を用いてハイブリダイゼーションを実行した。これらのアレイはオリゴヌクレオチドのアレイであり、この塩基配列は、12,000個の公知の遺伝子及び24,000個の発現配列タグ(EST)エントリーに由来する。標識されたサンプルの合成を、製造者技術マニュアル(Affymetrix Inc., Santa Clara, USA)に従って行った。

【0067】

蛍光標識されたサンプルを、T7ポリメラーゼ結合部位を含むオリゴdT₂₄プライマーを用いた転写の後に合成した。標識反応を、T7 RNAポリメラーゼ及びピオチン化dNTPの使用のもとで、製造者プロトコル(ENZO-Biochem, New York, USA; http://www.enzo.com/entrance.html)に従って実行した。

【0068】

両方のチップ分析において、試験されるべきサンプル及び参照サンプルを、別々のフィルターにハイブリダイゼーションした。シグナル強度の比較を、標準化の後に実行した。

【0069】

(チップ結果の評価 - 決定マトリクス)

シグナル強度の評価を、標準化した後に、それぞれのアレイについて開発されたソフトウェアを用いて、そしてTukey's Biweight Method(<http://methworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>)に従ってそれぞれのサンプルについて強度値を決定することで実行した。

【0070】

ユニジェンフィルターアレイの評価のために、Max-Planck-Institute for Molecular Genetics at Berlin-Dahlemで(<http://algorithms.molgen.mpg.de/>)で、アルゴリズムが開発された。アフィメトリックスから購入のチップの場合、製造者の標準パラメータ又は必須条件を含むMicroArraySuite 5.0ソフトウェア(<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/mas.affx>)を使用した。

【0071】

アフィメトリックスアレイの評価について、標的強度を100、及びデータを標準化するために標準化因子を1と設定し、そしてそれぞれのサンプルについてのスケール因子を計算した。比較スケール因子(因子は4未満)を有するチップは、比較分析に含まれていた。遺伝子の検出のための決定基準(検出p値)を0.05未満に調節した。それぞれのアレイについての比較分析を、アフィメトリックスから購入のDMT3.0ソフトウェア(<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/dmt.affx>)の使用のもとで実行した。

【0072】

それによって、完全一致との間並びに完全一致及び不一致との間の強度の差異を、Wilcoxon-test(<http://faculty.vassar.edu/lowry/wilcoxon.html>)を用いて計算し、そして決定基準カットオフ(値は0.04未満)と比較した。それぞれのチップの比較についての結果の特定化において、Change-Call(増加、わずかな増加、変化無し、減少)及び変化の因子についての基準であるシグナルログ比(Signal Log Ratio)を示した(ロガリズム形式の因子)。

【0073】

(決定基準)

比較分析を、それぞれの場合において全てのサンプルについて実行した(全てのサンプルを他の群の全てのサンプルと比較:ND、OA、RA)。

【0074】

ユニジェンフィルターハイブリダイゼーションの場合、少なくとも4つの比較のうち3つ

10

20

30

40

50

について2よりも大きいシグナル相違、及びp値が0.01未満の検出シグナルを、計算に入れた。

【0075】

アフィメトリックスから購入したアレイについての進行は以下のものである：それぞれのRAサンプルを、増加発現及び減少発現の両方において、それぞれのOAサンプルと比較した。これらの比較のうち80%で調節因子が2よりも大きく（シグナルログ比は1よりも大きい）、「増加」又は「減少」の方向の偏差を示した遺伝子を、候補遺伝子として選択した。U95Aチップの場合、選択基準を、調節因子の3よりも大きいものであるべきと決定した。

【0076】

（半定量的PCR）

本発明者らは、検出された配列領域から開始することによって、類似のアニーリング温度及び産物の長さのプライマーを選択した。プライマー探索のために、DNASTAR Primer Selectソフトウェア（DNASTAR Inc., Madison, USA; <http://www.dnastar.com/>）を使用した。プライマー合成を、Gibco-Life Technologies（Karlsruhe, Germany）で行った。PCR産物の半定量的PCRのために、リアルタイムPCRシステムGeneAmp 5700及びSybr-Green-PCR-Coreキット（Applied Biosystems, Weiterstedt, Germany; <http://europe.appliedbiosystems.com/>）を使用した。

【0077】

cDNAの量を、GAPDH特異的プライマーについてのリアルタイム増幅結果によって全てのサンプルについて調整した。いくつかのさらなる遺伝子のPCR産物の定量化を、内部標準としてGAPDH特異的産物と比較して行った。コントロールとして、第2のハウスキーピング遺伝子として - アクチンを増幅し、そして全てのサンプルと共に並行して分析した。

【0078】

遺伝子の学名	受入番号	プライマー位置	産物の長さ(bp)
VDUP1	NM006472	665...684 / 863...840	199
TIMP4	U76456	143...159 / 336...317	194
GPX3	NM002084	424...443 / 528...510	105
アクチン	X00351-	654...675 / 841...819	188
MMP1	X05231	874...895 / 1080...1057	207
MMP3	X05232	973...996 / 1157...1136	185
LTBP4	M22490	511...534 / 760...737	250
GADD45	M60974	457...475 / 573...557	116
CLU	NM001831	1384...1404 / 1509...1489	126
Cal2	NM001218	930...949 / 1049...1031	196

【0079】

（免疫組織化学）

滑膜のサンプルを、組織病理学的な評価に使用した。その結果、6µmの強さ（strength）を有する凍結切片を準備し、風乾し、次いでアセトン及びメタノールの1:1混合物で固定した。標準的なプロトコールに従ってヘマトキシリン染色を実行し、そして組織病理学的評価の判断基準（25）に従って分類した。

【0080】

（イムノオーム分析の方法及び結果）

T細胞及びB細胞レベルの自己反応パターン（「イムノオーム（immunome）」）を決定した。これはRAに特異的であり、そして従って、この疾患を他のリウマチ様疾患又は非リウマチ様疾患とを区別する。RA特異的イムノオームについての知識は、現在可能であるよりも、関節疾患をRAとしてより初期に、より安全に認識するか、又は関節炎がRAではないことを示す診断ツールの開発のために非常に重要である。ここで再び、取り返しのつかない関節損傷及び骨損傷が生じる前に、適切な薬物によってRAを制御可能である。

10

20

30

40

50

【0081】

この目的において、プロテオミクスの技術を、高解像度2D電気泳動によって組織特異的なタンパク質パターンを作成する目的で使用した。これらを、公知の自己反応及び未知の自己反応についてのイムノミクス技術によって、スクリーニングした。有用な感受性及び特異性を有するタンパク質スポットを、シーケンス及びMALDI-TOF(26)によって同定した。次いでこれらのタンパク質を、同じコホートにおけるT細胞の自己反応性についてスクリーニングした。

【0082】

本発明に従って、自己反応性パターンは確立され、これらは完全にRAについて特異的である。この分析において、単一の自己反応性は、この特異性を明らかにしていないという10
ことは非常に重要である。これは、いくつかの自己反応性の組み合わせによってのみ達成される。このようなパターンは、RAに罹患している患者を、別のリウマチ様疾患又は非リウマチ様疾患に罹患している患者から疑いようもなく区別するが、自己抗原シトルリン化ペプチド(Cit)、IgG、BiP(重鎖結合タンパク質)、カルパスタチン(Calp)、RA33(hnRNP A2)及びカルレティキュリン(Calr)を含む。表は、これらの5つの自己反応物(RF、Cit、BiP、RA33及びCalp)並びに2つの可能な状態である「陽性」及び「陰性」の全ての可能な組み合わせを示す。ハイライトされたパターン(統計学的に関連があるのはpが0.01未満、Whitney U
試験; <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>)は、RAにおいてのみ発現した。20
図1は、RA及びコントロールコホートの両方について全ての可能な組み合わせについての感受性を示す。RA特異的なパターンは、表1と同様の様式でハイライトされ、そして個々のパラメータについて4倍及び5倍陽性であるパターンを主に含む。これらの自己反応性プロフィールの組み合わせは、RAにおいてのみ生じるが、54%の特異性の収率である。

【0083】

3つの自己反応の独占的な(exclusive)RA発現パターンは、IgG、Cit並びにBiP(RF+Cit+BiP+及びRF-Cit+BiP+)に対して指向し、43%の総感受性をもたらす。4つの自己反応のRA独占的なパターンは、IgG、Cit、BiP及びRA33(RF+Cit+BiP+RA33+、RF+Cit+BiP-RA33+及びRF+Cit+BiP+RA33-)に対して指向し、総感受性は40%を示す。30
6つのパターンの分析において、60%の感受性が達成された。

【0084】

第1の研究に従って、これらのパターンはまた、初期RAを有する患者に関連がある。さらなる候補抗原は、すでに特徴付けされており、Sa抗原(5)を含む。このSa抗原は、
-エノラーゼ及びシトルリン化ビメンチンからおそらく構成される。

【0085】

RAのイムノオームの同定は、診断的なだけでなく、病理学的な関連性でもある。初期RAの駆動の原因であるT細胞の自己反応性が確認された場合、治療のためのプロトコールを開発することが可能であるようであり、これは特異的な有効性を示す。

【0086】

【数1】

10

20

30

40

	RF	Citrullin	BiP	Calpastatin	RA33
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
3	+	+	-	+	+
4	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	+	+	-	+
7	+	-	-	+	+
8	-	-	+	+	+
9	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-
11	+	+	-	+	-
12	-	+	-	+	+
13	+	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+
15	-	+	+	-	+
16	+	-	+	-	+
17	-	-	+	+	-
18	-	-	-	+	+
19	-	+	-	+	-
20	+	-	-	+	-
21	+	-	-	-	+
22	-	-	+	-	+
23	+	-	+	-	-
24	-	+	+	-	-
25	+	+	-	-	-
26	-	+	-	-	+
27	-	-	-	+	-
28	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	+
30	-	+	-	-	-
31	+	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-

10

20

30

【0087】

IgG (RF)、シトルリン、BiP、カルパスタチン及びRA33に対して指向する自己反応の全ての32個の5倍の組み合わせを示す。図1のように、RA特異的な組み合わせを色付きでハイライトした。

40

【0088】

(利点)

複合分子パターンを網羅する。これらのパターンを、数学的な計算モデルによって群及び適正なスケールに分類し得る。例えば、疾患の持続時間、臨床的疾患活性(疾患活性スコア(Ref.))、C反応性プロテインの増加又は沈降速度によって決定される炎症活性、放射線学的な関節破壊及び薬物の特異的な影響等とのそれぞれの関連について導き出せる分類及び知識は、アレイ分析から以下の結論を引き出せることが可能である: 特定の疾患及び分子学的に分類されるべきサブグループへの臨床理解の割り当て、疾患活性及び期待されるべき進歩の評価(予後評価)、異なる治療形式の見通し、適切な治療アプローチについて推薦(例えば、レフルノミドの代わりにメトトレキサート、又はメトトレキサ-

50

ト単体の代わりにスルファサラジン及びメトトレキサートの組み合わせ)並びに、最後に、治療的成功のモニタリング。

【0089】

医薬的治療の規定された測定の前及び間に使用することによって、使用した遺伝子のどちらが薬物によって影響されたのかを決定し得る。その結果、薬物が疾患に典型的な様式において変化する遺伝子発現にどのように影響を与えるかを測定する。これにより、どの疾患関連分子の変化が、依然治療の抵抗において妥当であるかを結論付け得る。これらの病理学的に活性化された遺伝子の機能についての知識により、関節疾患の病理学的なプロセスを解明し、そして新規の治療コンセプトを推定することが主に可能になる。

【0090】

(遺伝子の組み合わせ)

《表1》

受入番号	ユニジーン コード化	遺伝子名称	方法	レギュレ ーション	
X57809	Hs. 181125		RDA, アフィメトリクス	RA>OA	
X58141			RDA	RA>OA	
X63527	Hs. 252723	リボソームタンパク質L19	RDA	RA>OA	
U10362	Hs. 75864	染色体5オープンリーディングフレ ーム8	RDA	RA>OA	10
M80244	Hs. 184601	NM_003486	RDA	RA>OA	
M24594	Hs. 20315	テトラトリコペプチドリピートを 有するインターフェロンにより誘 導されるタンパク質1	RDA	OA>RA	
U01244	Hs. 79732	フィブリン1アイソフォームC 前駆体NM_006485	RDA	RA>OA	20
X02761	Hs. 287820	フィブロネクチン1,アイソフォー ム1 プレプロタンパク質	RDA	RA>OA, OA>NS	
L01124	Hs. 165590	リボソームタンパク質S13	RDA	NS>RA	
M65062	Hs. 107169	インシュリン様成長因子結合タン パク質5	RDA		
M15330	Hs. 126256	インターロイキン1, β			
L13210	Hs. 79339	ガラクチン3 結合タンパク質	RDA		30
X05232	Hs. 83326	マトリクスメタロプロテイナーゼ3 プレプロタンパク質		RA>NS, OA	
M22490	Hs. 68879	骨形成タンパク質4	RDA, アフィメトリクス	NS>RA	
AL034397			RDA	OA>NS	
M22806			RDA	OA>NS	
X06256	Hs. 149609	インテグリン α 5 前駆体	ユニジーン	NS>RA	
L49169	Hs. 75678	FBJ マウス骨肉腫ウイルス性癌遺 伝子ホモログB	ユニジーン	NS>RA	40

AB002409	Hs. 57907	スモール誘導性サイトカインサブファミリーA(Cys-Cys), メンバー21	ユニジーン	RA)NS	
X03473	Hs. 226117	H1ヒストンファミリー, メンバー0	RDA	OA)NS	
M92843	Hs. 343586	ジンクフィンガータンパク質36, C3Hタイプ, ホモログ(マウス)	ユニジーン	NS)RA	
M21121	Hs. 241392	スモール誘導性サイトカインA5 (RANTES)	アフィメトリクス	RA)OA	10
U05259			アフィメトリクス	RA)OA	
U80114	Hs. 247987		アフィメトリクス	RA)OA	
U81234	Hs. 164021	スモール誘導性サイトカインサブファミリーB(Cys-X-Cys), メンバー6(顆粒球chemotac	アフィメトリクス	RA)OA	
D11086	Hs. 84	インターロイキン2レセプター, γ 鎖, 前駆体	アフィメトリクス	RA)OA	20
X97267			アフィメトリクス	RA)OA	
U23852			アフィメトリクス	RA)OA	
AA522530	Hs. 111244	RTP801	アフィメトリクス	RA)OA	
AF037335	Hs. 5338	炭酸脱水酵素XII前駆体	アフィメトリクス	RA)OA	
U97145	Hs. 19317	GDNFファミリーレセプター α 2	アフィメトリクス	RA)OA	
AA919102	Hs. 95327	CD3D抗原, デルタポリペプチド (TiT3複合体)	アフィメトリクス	RA)OA	30
M63928	Hs. 180841	CD27抗原	アフィメトリクス	RA)OA	
Z49194	Hs. 2407	POUドメイン, クラス2, 関連因子1	アフィメトリクス	RA)OA	
AL031983			アフィメトリクス	RA)OA	
D15050	Hs. 232068		アフィメトリクス	RA)OA	
X92997	Hs. 342651		アフィメトリクス	RA)OA	
J03910			アフィメトリクス	RA)OA	
J04132	Hs. 97087	T細胞レセプターゼータ鎖前駆体	アフィメトリクス	RA)OA	40
M55153	Hs. 8265	トランスグルタミナーゼ2(Cポリペ	アフィメトリクス	RA)OA	

プチド, タンパク質-グルタミン- γ
-グルタミルトランスフェラーゼ)

M12959	Hs. 74647		アフィメトリクス	RA>OA	
AF031815	Hs. 89230	カリウム中間体	アフィメトリクス	RA>OA	
L31584			アフィメトリクス	RA>OA	
X54489			アフィメトリクス	RA>OA	
AF043129			アフィメトリクス	RA>OA	10
X59871	Hs. 169294	転写因子7(T細胞特異的, HMGボックス)	アフィメトリクス	RA>OA	
AI743134	Hs. 21858	トリヌクレオチドリピート含有3	アフィメトリクス	RA>OA	
Y13323	Hs. 145296	ディスインテグリンプロテアーゼ	アフィメトリクス	RA>OA	
U77735	Hs. 80205	p16-2癌遺伝子	アフィメトリクス	RA, OA>NS	
U58515	Hs. 154138	キチナーゼ3様2	アフィメトリクス	RA, OA>NS	
M17016	Hs. 1051	グランザイムB前駆体	アフィメトリクス	RA>OA	20
X03066	Hs. 1802	主要組織適合複合体, クラスII, D0 β	アフィメトリクス	RA, OA>NS	
M28170	Hs. 96023	CD19抗原	アフィメトリクス	RA, OA>NS	
L24564	Hs. 1027	糖尿病に関連するRas関連遺伝子	アフィメトリクス	NS>RA	
M68840	Hs. 183109	モノアミノオキシダーゼA	アフィメトリクス	NS>RA	
U76456	Hs. 190787	メタロプロテイナーゼ4前駆体の 組織インヒビター	アフィメトリクス	OA>RA	30
D13814	Hs. 89472	アンギオテンシンレセプター1 NM_004835	アフィメトリクス	NS>RA	
AA420624	Hs. 183109	モノアミノオキシダーゼA	アフィメトリクス	OA>RA	
X51757	Hs. 3268	熱ショック70kDタンパク質6 (HSP70B')	アフィメトリクス	NS>RA	
U29344	Hs. 83190	脂肪酸シクターゼ	アフィメトリクス	NS>RA	
L19871	Hs. 460	活性化転写因子 (ATF) 3 ロングアイソフォームNM_004024	アフィメトリクス	NS>RA	40

J02611	Hs. 75736	アポリポタンパク質D前駆体	アフィメトリクス	NS>RA	
M12272	Hs. 2523	1級アルコール脱水素酵素, γサブユニット	アフィメトリクス	NS>RA	
L34041	Hs. 348601	グリセロール-3-リン酸脱水素 酵素1(可溶性)	アフィメトリクス	NS>RA	
L12760	Hs. 1872	フォスフォエノールピルビン酸 カルボキシキナーゼ1(可溶性)	アフィメトリクス	OA>RA	
M63978			アフィメトリクス	RA>OA	10
S95936	Hs. 284176	トランスフェリン前駆体	アフィメトリクス	NS>RA	
U42031	Hs. 7557	FK506-結合タンパク質5	アフィメトリクス	NS>RA	
Z97171			アフィメトリクス	NS>RA	
S69790			アフィメトリクス	NS>RA	
U41843	Hs. 295362	DR1関連タンパク質1 (ネガティブ補因子2α)	アフィメトリクス	OA, NS>RA	20
AL049653			アフィメトリクス	NS>RA	
M31682	Hs. 1735	インヒピンβBサブユニット前駆体	アフィメトリクス	NS>RA	
AF009767	Hs. 132898	脂肪酸不飽和化酵素1	アフィメトリクス	NS>RA, OA	
X02910	Hs. 241570	腫瘍壊死因子(カケクチン)			
AB023152	Hs. 12183		アフィメトリクス	NS>RA, OA	
U37283	Hs. 300946	ミクロフィブリル関連糖タンパク 質-2	アフィメトリクス	OA, NS>RA	30
X05451	Hs. 158295		アフィメトリクス	OA, NS>RA	
W26480	Hs. 132898	脂肪酸不飽和化酵素1	アフィメトリクス	NS>RA	
D14874	Hs. 394	アドレノメジュリン	アフィメトリクス	RA>NS	
M12174	Hs. 204354	rasホモログ遺伝子ファミリー, メンバーB	アフィメトリクス	NS>RA	
M60974	Hs. 80409	成長停止及びDNA損傷誘発, α	アフィメトリクス	NS>RA	
S62138			アフィメトリクス	NS>RA	40
X16706	Hs. 301612	FOS様抗原2	アフィメトリクス	NS>RA	

X56667	Hs. 106857	カルピンジン2,完全長タンパク質 アイソフォームNM_007087	アフィメトリクス	NS>RA	
H15814			アフィメトリクス	NS>RA	
AL021977			アフィメトリクス	NS>RA	
U80055			アフィメトリクス	NS>RA	
U09564	Hs. 75761	SFRSタンパク質キナーゼ1	アフィメトリクス	RA>OA	
U14407	Hs. 168132	インターロイキン15	アフィメトリクス	RA>OA	10
U27185	Hs. 82547	レチノイン酸レセプターレスポン ダ(タザロテン誘導)1	アフィメトリクス	RA>OA	
Z35278	Hs. 170019	ラント関連転写因子3	アフィメトリクス	RA>OA	
M12886	Hs. 303157		アフィメトリクス	RA>OA	
L05424			アフィメトリクス	RA>OA	
L09230	Hs. 301921	ケモカイン(C-Cモチーフ) レセプター1	アフィメトリクス	RA>OA	20
L22075	Hs. 1666	グアニンヌクレオチド結合タン パク質(Gタンパク質), α 13	アフィメトリクス	RA>OA	
M28130			アフィメトリクス	RA>OA	
M29696	Hs. 237868	インターロイキン7レセプター	アフィメトリクス	RA>OA	
M31165	Hs. 29352	腫瘍壊死因子, α -誘導 タンパク質6	アフィメトリクス	RA>OA	
M16038	Hs. 80887	v-yes-1 ヤマグチ肉腫ウイルス 関連癌遺伝子ホモログ	アフィメトリクス	RA>OA	30
X83490			アフィメトリクス	RA>OA	
D13666	Hs. 136348	骨芽細胞特異的因子2 (ファシクリンI様)	アフィメトリクス	RA>OA	
L10717	Hs. 211576	IL2誘発T細胞キナーゼ	アフィメトリクス	RA>OA	
X04500	Hs. 126256	インターロイキン1, β	アフィメトリクス	RA>OA	
U24153	Hs. 30692	p21(CDKN1A)-活性化キナーゼ2	アフィメトリクス	RA>OA	40
M32315	Hs. 256278	腫瘍壊死因子レセプター2(75kD)	アフィメトリクス	RA>OA	

U51903	Hs. 78993	GTPアーゼ活性化タンパク質を含む IQモチーフ2	アフィメトリクス	RA)OA	
AF002700	Hs. 19317	GDNFファミリーレセプター α 2	アフィメトリクス	RA)OA	
U37518	Hs. 83429	腫瘍壊死因子(リガンド)上位ファミ リリー, メンバー10	アフィメトリクス	RA)OA	
HG1103-HT1103			アフィメトリクス	RA)OA	
HG3521-HT3715			アフィメトリクス	RA)OA	10
AF024710			アフィメトリクス	RA)OA	
U01134	Hs. 138671	fms関連チロシンキナーゼ1 (血管内皮成長因子)	アフィメトリクス	RA)OA	
U27467	Hs. 227817	BCL2関連タンパク質 A1	アフィメトリクス	RA)OA	
M79321	Hs. 80887	v-yes-1ヤマガチ肉腫ウイルス関連 癌遺伝子ホモログ	アフィメトリクス	RA)OA	
J04765	Hs. 313	分泌されたリンタンパク質1 (オステオポンチン, 骨シアロ タンパク質I, 初期T-リンパ球	アフィメトリクス	RA)OA	20
M21154	Hs. 262476	S-アデノシルメチオニン 脱炭酸酵素1前駆体	アフィメトリクス	RA)OA	
AF098641	Hs. 306278		アフィメトリクス	RA)OA	
D63789	Hs. 174228	スモール誘導性サイトカイン サブファミリーC, メンバー2	アフィメトリクス	RA)OA	30
S68134	Hs. 351252	cAMP応答配列モジュレータ	アフィメトリクス	RA)OA	
AB014515	Hs. 323712	KIAA0615遺伝子プロダクト	アフィメトリクス	RA)OA	
AI800499	Hs. 161002		アフィメトリクス	RA)OA	
Y13710	Hs. 16530	スモール誘導性サイトカイン サブファミリーA(Cys-Cys), メンバー18, 肺性及びactivat	アフィメトリクス	RA)OA	
AJ011915	Hs. 184376	シナプトソーム関連タンパク質, 23kD	アフィメトリクス	RA)OA	40

AF030339	Hs. 286229	プレキシシンC1	アフィメトリクス	RA)OA	
X17042	Hs. 1908	プロテオグリカン1,分泌顆粒	アフィメトリクス	RA)OA	
AF059214	Hs. 194687	コレステロール25ヒドロキシラーゼ	アフィメトリクス	RA)OA	
D42043	Hs. 79123		アフィメトリクス	RA)OA	
M24283	Hs. 168383	細胞間接着分子1前駆体	アフィメトリクス	RA)OA	
AF042729	Hs. 171776	イノシトール(myo)-1(又は4)- モノホスファターゼ1	アフィメトリクス	RA)OA	
M64595	Hs. 173466	ras関連C3ポツリヌス毒素基質2	アフィメトリクス	RA)OA	10
AA868382	Hs. 198253	主要組織適合複合体,クラスII, DQ α 1	アフィメトリクス	RA)OA	
AB006746	Hs. 198282	リン脂質スクランブラーゼ1	アフィメトリクス	RA)OA	
X00437	Hs. 303157		アフィメトリクス	RA)OA	
M59287			アフィメトリクス	RA)OA	
AA725102	Hs. 51305	v-maf 筋腱膜繊維肉腫癌遺伝子 ホモログF(鳥類)	アフィメトリクス	RA)OA	20
M97935	Hs. 21486	シグナルトランスデューサ及び アクチベータオプトランス クリプション(STAT)1, 91kD	アフィメトリクス	RA)OA	
X54134	Hs. 31137	タンパク質チロシン ホスファターゼ,レセプタータイプ,E	アフィメトリクス	RA)OA	
U89942	Hs. 83354	リシルオキシダーゼ様2	アフィメトリクス	RA)OA	30
AF099935	Hs. 17839	TNF-誘導タンパク質	アフィメトリクス	RA)OA	
M93056			アフィメトリクス	RA)OA	
M97936			アフィメトリクス	RA)OA	
AI887421	Hs. 82547	レチノイン酸レセプター レスポンド(タザロテン誘導)1	アフィメトリクス	RA)OA	
D50532	Hs. 54403	マクロファージレクチン2 (カルシウム依存)	アフィメトリクス	RA)OA	40
AI813532	Hs. 256278	腫瘍壊死因子レセプター2(75kD)	アフィメトリクス	RA)OA	

U02020	Hs. 239138	プレ-B細胞コロニー促進因子	アフィメトリクス	RA>OA	
X05276	Hs. 250641	トロポミオシン 4	アフィメトリクス	RA>OA	
AF006516	Hs. 24752	スペクトリン SH3ドメイン結合タンパク質1	アフィメトリクス	RA>OA	
AB018301	Hs. 22039		アフィメトリクス	RA>OA	
AB010812	Hs. 22900	核因子(赤血球由来 2)様3	アフィメトリクス	RA>OA	
AF052124	Hs. 313	分泌リンタンパク質1(オステオポンチン, 骨シアロタンパク質I, 初期T-リンパ球	アフィメトリクス	RA>OA	10
AB008775	Hs. 104624	アクアポリン9	アフィメトリクス	RA>OA	
AF024714	Hs. 105115	アブセントインメラノーマ 2	アフィメトリクス	RA>OA	
M28696	Hs. 278443	IgGのFcフラグメント, 低親和性 IIb, (CD32)のレセプター	アフィメトリクス	RA>OA	
X62573			アフィメトリクス	RA>OA	20
X07834	Hs. 318885	スーパーオキシドジスムターゼ2, ミトコンドリア	アフィメトリクス	RA>OA	
AL050267	Hs. 23889	DKFZP564A032タンパク質	アフィメトリクス	RA>OA	
U83461	Hs. 24030	ソルートキャリアファミリー31 (銅トランスポーター), メンバー2	アフィメトリクス	RA>OA	
AB018285	Hs. 321707		アフィメトリクス	RA>OA	
AF007875	Hs. 5085	ドリチルホスフェートマンノシルトランスフェラーゼポリペプチド1	アフィメトリクス	RA>OA	30
X78686	Hs. 89714	スモール誘導性サイトカインサブファミリーB(Cys-X-Cys), メンバー5 (上皮由来)	アフィメトリクス	RA>OA	
AF053712	Hs. 115770		アフィメトリクス	RA>OA	
AF006083	Hs. 5321	ARP3 アクチン関連タンパク質3 ホモログ	アフィメトリクス	RA>OA	40
AL050025	Hs. 5344	アダプター関連タンパク質複合体1,	アフィメトリクス	RA>OA	

		γ 1サブユニット			
M17017	Hs. 624	インターロイキン8	アフィメトリクス	RA)OA	
AI651024	Hs. 15780		アフィメトリクス	RA)OA	
AF038172			アフィメトリクス	RA)OA	
M55542	Hs. 62661	グアニレート結合タンパク質1, インターフェロン誘導性, 67kD	アフィメトリクス	RA)OA	
U11276	Hs. 169824	キラー細胞レクチン様レセプター サブファミリーB, メンバー1	アフィメトリクス	RA)OA	10
Z19585	Hs. 75774	トロンボスポンジン4	アフィメトリクス	OA)RA	
L27560			アフィメトリクス	OA)RA	
M98539			アフィメトリクス	OA)RA	
J00153			アフィメトリクス	OA)RA	
M25079	Hs. 155376	ヘモグロビン, β	アフィメトリクス	OA)RA	
M80482	Hs. 170414	ペアード塩基性アミノ酸切断 システム4	アフィメトリクス	OA)RA	20
L48215	Hs. 155376	ヘモグロビン, β	アフィメトリクス	OA)RA	
AA524547	Hs. 160318	ホスホレマン, アイソフォームb 前駆体 NM_005031	アフィメトリクス	OA)RA	
AL038340			アフィメトリクス	OA)RA	
AI381790	Hs. 74120	アディポーススペシフィック2	アフィメトリクス	OA)RA	
X00129	Hs. 76461	レチノール結合タンパク質4, プラズマ前駆体	アフィメトリクス	OA)RA	30
U66619	Hs. 71622	SWI	アフィメトリクス	OA)RA	
M30038	Hs. 334455	α トリプターゼ I前駆体	アフィメトリクス	OA)RA	
U13666	Hs. 184907	Gタンパク質共役型レセプター1	アフィメトリクス	OA)RA	
L05144	Hs. 1872	ホスホエノールピルビン酸 カルボキシキナーゼ1(可溶性)	アフィメトリクス	OA)RA	
U39447	Hs. 198241	銅含有アミノキシダーゼ3前駆体	アフィメトリクス	OA)RA	40
AL049313			アフィメトリクス	OA)RA	

AL050125			アフィメトリクス	0A>RA	
D12485			アフィメトリクス	0A>RA	
X78416	Hs. 3155	カゼイン, α	アフィメトリクス	0A>RA	
AB028998	Hs. 6147		アフィメトリクス	0A>RA	
AB020629	Hs. 38095	ATP-結合カセット, サブファミリー Aメンバー8	アフィメトリクス	0A>RA	
X03350	Hs. 4	1級アルコール脱水素酵素, β サブユニット	アフィメトリクス	0A>RA	10
AJ224677	Hs. 7122	スクラピー応答タンパク質1	アフィメトリクス	0A>RA	
AB018317	Hs. 22201		アフィメトリクス	0A>RA	
AF009314			アフィメトリクス	0A>RA	
L77730			アフィメトリクス	0A>RA	
D76435	Hs. 41154	Zicファミリーメンバー1 (オッドペアードホモログ, ショウジョウバエ)	アフィメトリクス	0A>RA	20
W28828	Hs. 133988		アフィメトリクス	0A>RA	
M73720			アフィメトリクス	0A>RA	
M55150	Hs. 73875	フマリルアセトアセターゼ	アフィメトリクス	0A>RA	
U13616	Hs. 75893	アンキリン3, アイソフォーム2NM_020987	アフィメトリクス	0A>RA	
AB005293	Hs. 103253	ペリリピン	アフィメトリクス	0A>RA	30
L07765	Hs. 76688	カルボキシシルエステラーゼ1(単球	アフィメトリクス	0A>RA	
X82209	Hs. 268515	髄膜種1	アフィメトリクス	0A>RA	
J03507	Hs. 78065	補体成分7前駆体	アフィメトリクス	0A>RA	
AF013570	Hs. 78344	平滑筋ミオシン重鎖11, アイソフォームSM1 NM_022870	アフィメトリクス	0A>RA	
U70370	Hs. 84136	ペアード様ホメオドメイン 転写因子1	アフィメトリクス	0A>RA	40
U75744	Hs. 88646	デオキシリボヌクレアーゼ I様3	アフィメトリクス	0A>RA	

M60278	Hs. 799	ジフテリアトキシンレセプター (ヘパリン結合上皮成長因子様 growth f	アフィメトリクス	0A)RA	
AF042166	Hs. 81008	フィラミン B, β (アクチン結合タンパク質278)	アフィメトリクス	0A)RA	
J00123			アフィメトリクス	0A)RA	
AI207842	Hs. 8272	プロスタグランジンD2シンターゼ (21kD, 脳)	アフィメトリクス	0A)RA	10
AA128249	Hs. 83213	脂肪酸結合タンパク質 4, 脂肪細胞	アフィメトリクス	0A)RA	
AA152406	Hs. 114346	チトクローム c オキシダーゼ サブユニットVIIaポリペプチド1 (筋肉)前駆体	アフィメトリクス	0A)RA	
AF093118	Hs. 11494	フィブリン 5	アフィメトリクス	0A)RA	
L38486	Hs. 296049		アフィメトリクス	0A)RA	
U66689			アフィメトリクス	0A)RA	20
AF049884	Hs. 350266	Arg	アフィメトリクス	0A)RA	
AB011089	Hs. 12372	トライパータイトモチーフ タンパク質 TRIM2	アフィメトリクス	0A)RA	
AF060568			アフィメトリクス	0A)RA	
AF059293	Hs. 114948	サイトカインレセプター様因子1	アフィメトリクス	0A)RA	
AC003107	Hs. 1584	軟骨オリゴメリックマトリックス タンパク質前駆体	アフィメトリクス	0A)RA	30
J05037	Hs. 76751	セリン脱水酵素	アフィメトリクス	0A)RA	
D45371	Hs. 80485	アディポースモースト アバンダント遺伝子トランスクリプト1	アフィメトリクス	0A)RA	
U78190			アフィメトリクス	0A)RA	
U24578	Hs. 444	セリン	アフィメトリクス	0A)RA	
M15856	Hs. 180878	リポタンパク質リパーゼ前駆体	アフィメトリクス	0A)RA	
AF055033	Hs. 107169	インシュリン様成長因子結合 タンパク質 5	アフィメトリクス	0A)RA	40

AA976838	Hs. 268571	アポリポプロテインC-I前駆体	アフィメトリクス	OA>RA	
L13698	Hs. 65029	成長停止特異的 1	アフィメトリクス	OA>RA	
AB020316	Hs. 134015	ウロニル-2-スルホ トランスフェラーゼ	アフィメトリクス	OA>RA	
U32324	Hs. 64310	インターロイキン11レセプター, α	アフィメトリクス	OA>RA	
S67070	Hs. 78846	熱ショック27kDタンパク質2	アフィメトリクス	OA>RA	
M12529	Hs. 169401	アポリポタンパク質E	アフィメトリクス	OA>RA	10
D50495	Hs. 80598	転写伸長因子 A(SII), 2	アフィメトリクス	OA>RA	
D00632	Hs. 336920	プラズマグルタチオン ペルオキシダーゼ3前駆体	アフィメトリクス	OA>RA	
AI760613	Hs. 29283		アフィメトリクス	RA>OA	
AW014646	Hs. 303157		アフィメトリクス	RA>OA	
W74027	Hs. 132906	19A24タンパク質	アフィメトリクス	RA>OA	
W72338	Hs. 23703		アフィメトリクス	RA>OA	20
AI805006	Hs. 8882		アフィメトリクス	RA>OA	
W67655			アフィメトリクス	RA>OA	
AA631460	Hs. 285814		アフィメトリクス	RA>OA	
AI741321	Hs. 10760	アスポリン(LRRクラス1)	アフィメトリクス	RA>OA	
AI983115	Hs. 132781	クラスI サイトカインレセプター	アフィメトリクス	RA>OA	
AI535730	Hs. 262958		アフィメトリクス	RA>OA	
AA977937	Hs. 102308	カリウム内向き整流チャネル, サブファミリーJ, メンバー8	アフィメトリクス	RA>OA	30
AA447232	Hs. 334838		アフィメトリクス	RA>OA	
AI720806	Hs. 49943		アフィメトリクス	RA>OA	
W23237	Hs. 296162		アフィメトリクス	RA>OA	
AI762695	Hs. 146381	RNA結合モチーフタンパク質, X染色体	アフィメトリクス	RA>OA	
AI653211	Hs. 96657		アフィメトリクス	RA>OA	40
AA633405	Hs. 1101	POUドメイン, クラス2, 転写因子2	アフィメトリクス	RA>OA	

N78018	Hs. 267566	仮想タンパク質 FLJ20371	アフィメトリクス	RA)OA	
AI625959	Hs. 112242		アフィメトリクス	RA)OA	
T66196	Hs. 111554	ADP-リボシル化因子様7	アフィメトリクス	RA)OA	
AI697841	Hs. 20450	BCM様メンブレンタンパク質前駆体 NM_014036	アフィメトリクス	RA)OA	
AA569128	Hs. 283021	クロライド細胞内チャネル5	アフィメトリクス	OA)RA	
R53594	Hs. 260164		アフィメトリクス	OA)RA	10
AI970898	Hs. 234898		アフィメトリクス	OA)RA	
AI972390	Hs. 348493		アフィメトリクス	OA)RA	
N23769	Hs. 26691		アフィメトリクス	OA)RA	
AI806324	Hs. 28625		アフィメトリクス	OA)RA	
N28741	Hs. 75354		アフィメトリクス	OA)RA	
AL040912	Hs. 31595	希突起膠細胞 膜貫通タンパク質	アフィメトリクス	OA)RA	
AI681917	Hs. 3321		アフィメトリクス	OA)RA	20
AW006235	Hs. 41502	仮想タンパク質 FLJ21276	アフィメトリクス	OA)RA	
W73819	Hs. 352100		アフィメトリクス	OA)RA	
T77033	Hs. 182364		アフィメトリクス	OA)RA	
AW015787	Hs. 237731		アフィメトリクス	OA)RA	
N30858	Hs. 44234	トリガーレセプター 骨髄細胞上発現2	アフィメトリクス	OA)RA	
AI810669	Hs. 44829		アフィメトリクス	OA)RA	30
N49922	Hs. 1787	プロテオリピドタンパク質1 (ペリツェーウス-メルツパッヒャー病, 痙性対麻痺2, uncomp	アフィメトリクス	OA)RA	
AA082546	Hs. 48516		アフィメトリクス	OA)RA	
AI694320	Hs. 6295		アフィメトリクス	OA)RA	
AI632283	Hs. 47448		アフィメトリクス	OA)RA	
AA039324	Hs. 201925		アフィメトリクス	OA)RA	40
AA877186	Hs. 90250		アフィメトリクス	OA)RA	

R42166	Hs. 94000		アフィメトリクス	0A)RA	
AI631882	Hs. 6510	チロトロピン-放出ホルモン分解 エクトエンザイム	アフィメトリクス	0A)RA	
W68636	Hs. 168640	強直症, プログレシブホモログ NM_054027 強直症, プログレシブホモログ	アフィメトリクス	0A)RA	
AA700227	Hs. 10119		アフィメトリクス	0A)RA	
AI948584	Hs. 350495		アフィメトリクス	0A)RA	10
AI678080	Hs. 141693		アフィメトリクス	0A)RA	
AI732274	Hs. 11006		アフィメトリクス	0A)RA	
AI341383	Hs. 349764		アフィメトリクス	0A)RA	
Z99386	Hs. 173638		アフィメトリクス	0A)RA	
W95023	Hs. 173933		アフィメトリクス	0A)RA	
AI860775	Hs. 98506		アフィメトリクス	0A)RA	
AA464846	Hs. 103262		アフィメトリクス	0A)RA	20
AI751698	Hs. 184907	Gタンパク質共役型レセプター1	アフィメトリクス	0A)RA	
AA545730	Hs. 293821		アフィメトリクス	0A)RA	
AA181060	Hs. 349283		アフィメトリクス	0A)RA	
AA195184			アフィメトリクス	0A)RA	
AI680541	Hs. 23767	仮想タンパク質 FLJ12666	アフィメトリクス	0A)RA	
AI659533	Hs. 348490		アフィメトリクス	0A)RA	
AI750575	Hs. 173933		アフィメトリクス	0A)RA	30
AI870335	Hs. 32450		アフィメトリクス	0A)RA	
AA160945	Hs. 14479		アフィメトリクス	0A)RA	
AI936699	Hs. 193784		アフィメトリクス	0A)RA	
AI130027	Hs. 293539		アフィメトリクス	0A)RA	
AA081093	Hs. 68055		アフィメトリクス	0A)RA	
AA142913	Hs. 71721		アフィメトリクス	0A)RA	
AI984000	Hs. 37482	ノンクラスリンコートタンパク質 ゼータ-COPに関するCOPZ2	アフィメトリクス	0A)RA	40

AI864898	Hs. 43125		アフィメトリクス	0A>RA	
AI670876	Hs. 44276	ヘモポックスC10	アフィメトリクス	0A>RA	
AA541787	Hs. 23837		アフィメトリクス	0A>RA	
AA775711	Hs. 348392		アフィメトリクス	0A>RA	
AI659927	Hs. 6634		アフィメトリクス	0A>RA	
AI084224	Hs. 53542		アフィメトリクス	0A>RA	
AI123555	Hs. 81796		アフィメトリクス	0A>RA	10
W73230	Hs. 7913		アフィメトリクス	0A>RA	
W27376	Hs. 8395	仮想タンパク質 FLJ10781	アフィメトリクス	0A>RA	
AW022607	Hs. 12482	グリセロンホスフェート 0-アシル トランスフェラーゼ	アフィメトリクス	0A>RA	
W70242	Hs. 58086		アフィメトリクス	0A>RA	
W25528	Hs. 89319		アフィメトリクス	0A>RA	
AA947123	Hs. 8861		アフィメトリクス	0A>RA	20
AA528821	Hs. 235857		アフィメトリクス	0A>RA	
AA131648	Hs. 23767	仮想タンパク質 FLJ12666	アフィメトリクス	0A>RA	
R12398	Hs. 21075	GTF2I リピートドメイン-含有1, アイソフォーム1 NM_005685	アフィメトリクス	0A>RA	
W52683	Hs. 107260	仮想タンパク質 DKFZp586H0623	アフィメトリクス	0A>RA	
W72194	Hs. 108924	ボンシン NM_015385	アフィメトリクス	0A>RA	
AA885516	Hs. 104627		アフィメトリクス	0A>RA	30
W68796	Hs. 237731		アフィメトリクス	0A>RA	
AI879337	Hs. 323432	哺乳類イノシトールヘキサキス ホスフェートキナーゼ2	アフィメトリクス	0A>RA	
W45581	Hs. 23133		アフィメトリクス	0A>RA	
N98637	Hs. 7759		アフィメトリクス	0A>RA	
AI809953	Hs. 123933		アフィメトリクス	0A>RA	
T68423	Hs. 11873		アフィメトリクス	0A>RA	40
AL044670	Hs. 182364		アフィメトリクス	0A>RA	

AA779895	Hs. 19339		アフィメトリクス	OA>RA	
AI719167	Hs. 12731		アフィメトリクス	OA>RA	
T99215	Hs. 168640	強直症, プログレシブホモログ	アフィメトリクス	OA>RA	
		NM_054027 強直症, ログレシブホモログ			
AA534296	Hs. 20953		アフィメトリクス	OA>RA	
AI819043	Hs. 21342		アフィメトリクス	OA>RA	
AI762879	Hs. 86437		アフィメトリクス	RA>OA	10
W61000	Hs. 238730		アフィメトリクス	RA>OA	
AL043192	Hs. 103378		アフィメトリクス	RA>OA	
AI741313	Hs. 103657		アフィメトリクス	RA>OA	
AI031674	Hs. 236494	ras関連GTP-結合タンパク質	アフィメトリクス	RA>OA	
AA670193			アフィメトリクス	RA>OA	
AW005250	Hs. 238936		アフィメトリクス	RA>OA	
AA682496	Hs. 270737	腫瘍壊死因子(リガンド)	アフィメトリクス	RA>OA	20
		上位ファミリー, メンバー13b			
AI128225	Hs. 914		アフィメトリクス	RA>OA	
AW026543	Hs. 238936		アフィメトリクス	RA>OA	
AI991095	Hs. 293441		アフィメトリクス	RA>OA	
AI872510	Hs. 181125		アフィメトリクス	RA>OA	
AI828404	Hs. 300697		アフィメトリクス	RA>OA	
AI807353	Hs. 237868	インターロイキン7レセプター	アフィメトリクス	RA>OA	30
AL048481	Hs. 11571		アフィメトリクス	RA>OA	
AW014626	Hs. 10949		アフィメトリクス	RA>OA	
AI400414			アフィメトリクス	RA>OA	
AI655112	Hs. 16179	仮想タンパク質 FLJ23467	アフィメトリクス	RA>OA	
AI936345	Hs. 95549	仮想タンパク質	アフィメトリクス	RA>OA	
AI961907	Hs. 179573	α 2タイプI コラーゲン	アフィメトリクス	RA>OA	
		プレプロタンパク質			40
AI743730	Hs. 30822	仮想タンパク質 FLJ11110	アフィメトリクス	RA>OA	

AI990512	Hs. 34192		アフィメトリクス	RA)OA	
AI741715	Hs. 1466	グリセロールキナーゼ	アフィメトリクス	RA)OA	
T66305	Hs. 12920	仮想タンパク質 FLJ20668	アフィメトリクス	RA)OA	
AA424160	Hs. 165909		アフィメトリクス	RA)OA	
AI075407	Hs. 296083		アフィメトリクス	RA)OA	
AA811088	Hs. 24143	WASP-相互作用タンパク質	アフィメトリクス	RA)OA	
AI978918	Hs. 179608	レチノール脱水素酵素ホモログ	アフィメトリクス	RA)OA	10
AA740831	Hs. 193514		アフィメトリクス	RA)OA	
W84421	Hs. 349096		アフィメトリクス	RA)OA	
AA233208	Hs. 91165	仮想タンパク質	アフィメトリクス	RA)OA	
AA886976	Hs. 95821	破骨細胞刺激因子1	アフィメトリクス	RA)OA	
AA864400	Hs. 71215	ドッキングタンパク質2, 56kD	アフィメトリクス	RA)OA	
AI073984	Hs. 14453	インターフェロン共通配列結合 タンパク質1	アフィメトリクス	RA)OA	20
AI983633	Hs. 179573	α 2タイプI コラーゲン プレプロタンパク質	アフィメトリクス	RA)OA	
AI564488	Hs. 300697		アフィメトリクス	RA)OA	
AI655781	Hs. 237868	インターロイキン7レセプター	アフィメトリクス	RA)OA	
AA814195	Hs. 184465	仮想タンパク質 FLJ11259	アフィメトリクス	RA)OA	
AI916783	Hs. 234149	仮想タンパク質 FLJ20647	アフィメトリクス	RA)OA	
AA829355	Hs. 267993	仮想タンパク質 FLJ10143	アフィメトリクス	RA)OA	30
N66595	Hs. 24283		アフィメトリクス	RA)OA	
AA165400	Hs. 10927		アフィメトリクス	RA)OA	
AI478759	Hs. 234149	仮想タンパク質 FLJ20647	アフィメトリクス	RA)OA	
AI655719	Hs. 2157	Wiskott-Aldrichシンドローム タンパク質	アフィメトリクス	RA)OA	
N63815	Hs. 110121	SEC7ホモログ	アフィメトリクス	RA)OA	
AW001184	Hs. 44672	仮想タンパク質 FLJ10470	アフィメトリクス	RA)OA	40
N21390	Hs. 5888		アフィメトリクス	RA)OA	

AA587944	Hs. 259737	FN5タンパク質	アフィメトリクス	RA)OA	
AI951459	Hs. 7337	仮想タンパク質 FLJ10936	アフィメトリクス	RA)OA	
AA464464	Hs. 10949		アフィメトリクス	RA)OA	
AI692538	Hs. 11135		アフィメトリクス	RA)OA	
AI817147	Hs. 181301	カテプシンS	アフィメトリクス	RA)OA	
AI263085	Hs. 17914	CD20様前駆体	アフィメトリクス	RA)OA	
W58252	Hs. 182793	ゴルジ体リンタンパク質2	アフィメトリクス	RA)OA	10
AA056180	Hs. 70704		アフィメトリクス	RA)OA	
AA224174	Hs. 111099		アフィメトリクス	OA)RA	
AI571452	Hs. 11169	遺伝子33	アフィメトリクス	OA)RA	
AA155952	Hs. 349303		アフィメトリクス	OA)RA	
W68504	Hs. 191098		アフィメトリクス	OA)RA	
AI200456	Hs. 48516		アフィメトリクス	OA)RA	
AW003093	Hs. 349764		アフィメトリクス	OA)RA	20
AI190027	Hs. 38034		アフィメトリクス	OA)RA	
R52934	Hs. 8562	仮想タンパク質 FLJ20374	アフィメトリクス	OA)RA	
W44633	Hs. 301296		アフィメトリクス	OA)RA	
AW024474	Hs. 44276	ヘモボックスC10	アフィメトリクス	OA)RA	
AI806502	Hs. 334800		アフィメトリクス	OA)RA	
AI492370	Hs. 105606	仮想タンパク質 FLJ20512	アフィメトリクス	OA)RA	
AW021179	Hs. 90443	NADH 脱水素酵素(ユビキノン) Fe-Sタンパク質 8 (23kD) (NADH-コエンザイムQ レダクターゼ)	アフィメトリクス	OA)RA	30
AI679110	Hs. 323067		アフィメトリクス	OA)RA	
R85633			アフィメトリクス	OA)RA	
N91161	Hs. 117176	ポリ(A)-結合タンパク質,ヌクレオ1	アフィメトリクス	OA)RA	
AW020657			アフィメトリクス	OA)RA	
AI871043	Hs. 173233	仮想タンパク質 FLJ10970	アフィメトリクス	OA)RA	40
N39237	Hs. 44977		アフィメトリクス	OA)RA	

AI949833	Hs. 21914		アフィメトリクス	0A)RA	
AA679297	Hs. 109494	機能未知の分泌タンパク質	アフィメトリクス	0A)RA	
AI962647	Hs. 182364		アフィメトリクス	0A)RA	
AL037611	Hs. 285902		アフィメトリクス	0A)RA	
AI871278	Hs. 301804		アフィメトリクス	0A)RA	
AI357650	Hs. 28847	AD026タンパク質	アフィメトリクス	0A)RA	
AI149793	Hs. 38034		アフィメトリクス	0A)RA	10
AI797684	Hs. 39619	仮想タンパク質 LOC57333	アフィメトリクス	0A)RA	
R52250	Hs. 348297		アフィメトリクス	0A)RA	
AI669738	Hs. 128856	CSR1タンパク質	アフィメトリクス	0A)RA	
AA058770	Hs. 18987		アフィメトリクス	0A)RA	
AI039005	Hs. 164680		アフィメトリクス	0A)RA	
AI936560	Hs. 6136		アフィメトリクス	0A)RA	
AA521373	Hs. 9469	プレクストリン相同ドメイン-含有, ファミリー A(ホスホイノシチド 結合特異的	アフィメトリクス	0A)RA	20
HI5888	Hs. 27621	semaドメイン, トロンボスポンジン 7回リピート(タイプ1及びタイプ1様), トランスメンブレン	アフィメトリクス	0A)RA	
AI333793	Hs. 337062		アフィメトリクス	0A)RA	
AA523172	Hs. 103135		アフィメトリクス	0A)RA	30
AI860960	Hs. 352081		アフィメトリクス	0A)RA	
AI355848	Hs. 35841	核因子 I	アフィメトリクス	0A)RA	
AI982754	Hs. 75106	クラステリン(補体溶解インヒビ ター, SP-40, 40, 硫酸化糖タンパク 質2, testos	アフィメトリクス	0A)RA	
AI800218	Hs. 289019	潜在性形質転換成長因子β 結合タンパク質 3	アフィメトリクス	0A)RA	40
AW016356	Hs. 126857		アフィメトリクス	0A)RA	

AA968552	Hs. 25523		アフィメトリクス	OA>RA	
AI634557	Hs. 28107		アフィメトリクス	OA>RA	
AW025494	Hs. 95867	仮想タンパク質 EST00098	アフィメトリクス	OA>RA	
AA628405	Hs. 339352		アフィメトリクス	OA>RA	
AI810399	Hs. 55940		アフィメトリクス	OA>RA	
AA029735	Hs. 159993		アフィメトリクス	OA>RA	
AA723927	Hs. 209569		アフィメトリクス	OA>RA	10
AI799784	Hs. 49696		アフィメトリクス	OA>RA	
AI817330	Hs. 110477	ドリチルホスフェートマンノシル トランスフェラーゼポリペプチド3	アフィメトリクス	OA>RA	
AI990803	Hs. 293782		アフィメトリクス	OA>RA	
AA034418	Hs. 30627		アフィメトリクス	OA>RA	
AA115295	Hs. 284208	DKFZP434N161タンパク質	アフィメトリクス	OA>RA	
AI673281	Hs. 181444	仮想タンパク質	アフィメトリクス	OA>RA	20
W63805	Hs. 84344	CGI-135タンパク質	アフィメトリクス	OA>RA	
AA427597		TGFs-誘導性初期成長レスポンス2	ユニジーン	NS>RA	
AA806239		IG- α 2-C 領域	ユニジーン	RA>NS	
AB014518		KIAA0618	ユニジーン	RA>NS	
AB021871		AK1	RDA, ユニジーン	RA>OA, RA>NS	
AF 000984		DBY altern トランスクリプト2	アフィメトリクス	NS>RA	30
AF 001691		角化エンベロープ前駆体	アフィメトリクス	NS>RA	
AF005058		CXC			
AF0605668		白血病亜鉛フィンガー PLZF	アフィメトリクス	OA>RA	
AF068293		HDCMB07P/PCM-1	ユニジーン	RA>NS	
AF105036		GKLF	RDA	OA>NS	
AF182035		α アクチン	RDA	OA>NS	
AF182035		ミオシン軽鎖	RDA	OA>NS	40
AF216292		BIP			

AF218004	CSNK1A1	ユニジーン	RA>NS	
AJ000542	ナチュラルキラー細胞レセプター p58	RDA	RA>OA	
J05008	EDN1	アフィメトリクス	NS>RA	
L08187	サイトカインレセプター EBI 3	RDA	RA>OA	
L31581	EBI1/CCR7	アフィメトリクス	RA>NS	
L37036	ENA-78	アフィメトリクス	RA>OA	10
M10988	TNF μ			
M19997	伸長因子2	RDA	RA>OA	
M29469	Ig 再配列 k鎖(VJ 領域)	RDA,	RA>OA	
		アフィメトリクス		
M31164	TSG6	RDA, ユニジーン	RA>OA, RA>NS	
M83248	OSTP(オステオポンチン)	RDA,	RA>OA	20
		アフィメトリクス		
NM_002450	メタロメチオネイン	ユニジーン	NS>RA	
NM_003573	TGFs-BP4	ユニジーン	RA>NS	
NM_000362	TIMP-3	RDA	NS>RA	
NM_000396	カテプシンK	RDA	RA>OA, OA>NS	
NM_0006091	SDF1	RDA	OA>NS	30
NM_001908	カテプシンB	RDA	OA>NS	
NM_002084	グルタチオンペルオキシダーゼ3	RDA	NS>RA	
NM_002229	Jun B	ユニジーン	NS>RA	
NM_002989	SLC	ユニジーン	RA>NS	
NM_003966	SEMA5A	RDA	RA>OA	
NM_004039	アネキシン II	RDA	RA>OA, OA>NS	40
NM_005368	ミオグロビン	RDA	OA>NS	

NM_006472	VDUP1	RDA, ユニジーン	NS>RA	
NM_007016	マイシンライトポリペプチド2	RDA	OA>NS	
NM_015675	GADD45B/MYD118	RDA, ユニジーン	NS>RA	
R75775	EGR1	ユニジーン	NS>RA	
U070136	メガカリオサイト刺激因子	RDA, ユニジーン	NS>RA	
U34690	COR01A/ p57	ユニジーン	RA>NS	
U93569	L1エレメント	RDA, ユニジーン	RA>OA; RA>NS	10
X03754	SCYA3(MIP a) /GOS19	ユニジーン	RA>NS	
X0523	MMP1			
X14723	クラストリン / SP40	RDA, ユニジーン	NS>RA	
X15332	コラーゲンIII a1	RDA, ユニジーン	RA>OA	
X54629	c-myc	RDA, ユニジーン	NS>RA	
X54629	pHL-1 遺伝子	RDA	NS>RA	20
X58122	ネブリン	RDA	OA>NS	
X62996	ミトコンドリア mRNA	RDA	OA>NS	
X63596	TRE-2	RDA	RA>OA	
X65968	PMP22	ユニジーン	RA>NS	
X88971	HLA DRB1	RDA	RA>OA	
X94771	EMP3	ユニジーン	RA>NS	
XM 008868	潜在性形質転換成長因子β 結合タンパク質 LTBP4	RDA, ユニジーン	NS>RA	30
XM_031289	インターロイキン8	=アフィメトリクス	RA>OA	
XM012651	コラーゲンI a1	RDA	RA>OA	

【0091】

(タンパク質の組み合わせ)

《表2》

タンパク質

受入番号の例

78 kDa グルコース調節タンパク質前駆体(GRP78)(イムノグロブリン重鎖結合タンパク質)(BIP)(小胞体ルーメンCa ²⁺ 結合タンパク質grp78)	P11021	
シトルリニルト(Citrullinierte) ペプチド[アルギニンの脱イミン型(シトルリン)含有ペプチド]		
Sa-抗原		
RA33 / ヘテロジニアス核リボヌクレオプロテイン A2/B1 (hnRNP A2/ hnRNP B1)	P22626	10
カルパインインヒビター(カルパスタチン)(精液BS-17 成分)	P20810	
カルレチクリン前駆体(CRP55)(カルレグリン)(HACBP)(ERp60)	P27797	
滑膜刺激タンパク質 P205	P80697	
フィラグリン前駆体	P20930	
フィブリン		
フィブリノーゲン α/α -E 鎖前駆体 [含有: フィブリノペプチド A]	P02671	20
フィブリノーゲン β 鎖前駆体 [含有: フィブリノペプチド B]	P02675	
フィブリノーゲン γ 鎖前駆体(PR02061)	P02679	
DnaJ		
Ig γ -1 鎖C 領域	P01857	
Ig γ -2 鎖C 領域	P01859	
Ig γ -3 鎖C 領域(重鎖疾病タンパク質)(HDC)	P01860	
Ig γ -4 鎖C 領域	P01861	30
60 kDa 熱ショックタンパク質, ミトコンドリア前駆体(Hsp60)(60 kDa シャペロニン)(CPN60)(熱ショックタンパク質60)(HSP-60)(ミトコンドリアマトリックスタンパク質 P1)(P60 リンパ球タンパク質)(HuCHA60)	P10809	
EBNA-1 核タンパク質	P03211	
IR-3, 内部リピート領域(in EBNA-1 例えばタンパク質)		
キチナーゼ-3 様タンパク質1前駆体(軟骨糖タンパク質-39)(GP-39)(39 kDa 滑膜タンパク質)(YKL-40)	P36222	40

コラーゲン α 1(II) 鎖前駆体 [含有:コンドロカルシン]	P02458	
CH65, 軟骨細胞抗遺伝子65		
コラーゲン結合タンパク質2前駆体(コリジン2) (RA関連抗原 RA-A47)	P50454	
47 kDa 熱ショックタンパク質前駆体(コラーゲン結合タンパク質1) (コリジン1)	P29043	
キチナーゼ3様タンパク質2前駆体(YKL-39) (軟骨細胞タンパク質 39)	Q15782	
キチナーゼ3様タンパク質2前駆体(YKL-39) (軟骨細胞タンパク質 39)	Q15783	10
キチナーゼ3様タンパク質2前駆体(YKL-39) (軟骨細胞タンパク質 39)	Q15749	
フルクトースビスホスフェートアルドラーゼA(筋肉タイプアルドラーゼ) (肺癌抗原 NY-LU-1)	P04075	
プロテオグリカン-リンクタンパク質前駆体(軟骨リンクタンパク質) (LP)	P10915	
マトリクスメタロプロテイナーゼ-19前駆体(MMP-19) (マトリクスメタロプロテイナーゼ RAS1)	Q99542	
MMP-19(マトリクスメタロプロテイナーゼ)	CAA63299	20
アグリカンコアタンパク質前駆体(軟骨特異的プロテオグリカンコアタンパク質) (CSPCP) (コンドロイチンサルフェートプロテオグリカンコアタンパク質1)	P16112	
エズリン(p81) (サイトピリン) (ピリン2)	P15311	
ラジキシン	P35241	
モエシン(メンブレンオーガナイジングエクステンションスパイクタンパク質)	P26038	

【実施例】

【0092】

以下、実施例によって本発明を説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

《実施例1：臨床診断における使用》

関節の症状を4ヶ月間有する患者は、不斉腫脹、並びに手指の2つの近位の関節及び1つの中間の関節、及び右手首関節における痛みを患っている。朝の硬直は、およそ30分間持続する。放射線写真は、足の指の1つの近位関節において初期のびらん性の変異を示す。C反応性プロテインは、正常の範囲であり、沈降速度はわずかに上昇していて、リウマチ様因子及びHLA-D R4は陰性である。炎症性リウマチ様疾患に関して家族の病歴は存在しない。

【0093】

外来通院の面会の間、右手首関節由来の滑膜バイオプシーを、侵襲性が最低の関節鏡検査によって単離した。各々約10mgの重量を有する4つのサンプルのうち、わずかなサンプルを以下の組織学的な評価のためにホルマリン中で固定する。残りのサンプルを、RNA溶解バッファー中に導入し、破碎し、そしてRNAを標準的なプロトコールに従って抽出する。cDNAへの(逆)転写の後、cDNAの転写物を含むビオチン標識cRNAへのインビトロ転写を実行する。このcRNAを断片化し、次いでDNAアレイへのハイブリダイゼーションに使用する。

【0094】

このアレイは、例えば、アフィメトリックスのようなDNAアレイを生産する営利企業に

30

40

50

よって生産される。ここで、適切なオリゴヌクレオチドを、表1の配列から、及び表2のタンパク質をコードする遺伝子配列から推定し、その結果これらのオリゴヌクレオチドを、それぞれのcRNA配列への特異的なハイブリダイゼーションのために可能にする。これらの配列は、オリゴヌクレオチドとして合成され次いでアレイ担体上に印字されるか、又はこれらは例えば、フォトリソグラフ法によって、直接的に担体上に合成されるかのいずれかである。

【0095】

ハイブリダイゼーションを、製造者プロトコールの指示に従って実行する。DNAアレイを、スキャナによって読み取る。光学情報の発現シグナルへの翻訳を、例えば、アフィメトリックスから購入の「Micro-Array Suite」のような標準的なソフトウェアを使用することによって行う。ここで、表1及び表2に記載される遺伝子又はタンパク質のRNA発現率のシグナルを得た。関節疾患について診断的な評価及び治療開発のために新規に規定された選択の遺伝子から始めて、臨床的及び組織学的に特徴付けられた組織サンプルを分類し、そして予備試験の間のクラスター分析の後、階層的な様式で互いに関連付けた。臨床的知見と比較関連することで、この分類分けを、特に疾患の型（関節症、反応性関節症、慢性関節リウマチ、慢性関節リウマチのサブグループ）、疾患の活性、及び従って予後、及び適用された薬物によって病理学的に変化した、遺伝子発現に影響する可能性に依存して行った。次いで、上記の患者のシグナルデータを、このデータベースと比較する。その結果、これらの群の1つへの割り当てが可能になり、そして対応する臨床的な関連性についての情報が得られる。従って、個々の患者における診断、活性、予後及び治療的選択肢に関する証拠を得る。

10

20

【0096】

《実施例2：治療の評価についての使用》

慢性な関節の炎症に5年間罹患していて、慢性関節リウマチと診断された患者は、毎週15mgのメトトレキサートを使用するという現在の基礎治療にも関わらず、いくつかの手指の関節において進行性の特異的放射線学的変異を示し、いくつかの手指の関節、左ひじの関節及び右足首関節において痛み及び腫れを伴っている。外来通院の面会の間、左ひじ関節由来の滑膜バイオプシーを、侵襲性が最低の関節鏡検査によって単離した。総重量が約30mgのいくつかのサンプルを、溶解バッファーに導入し、破碎し、そしてRNAを抽出した。サンプルの準備を、実施例1と同様の様式で行った。実施例1におけるような同じDNAチップを、分析のために使用する。ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイゼーションの結果の画像データファイルへの転換、及び試験したそれぞれの遺伝子についてこの結果のシグナル情報への翻訳、規定された発現パターンへの割り当てを行う。これらのパターンを、予備試験において決定し、その結果、本明細書中において新規に規定された表1及び表2由来の遺伝子の規定された選択を使用した。その結果、サンプルの発現プロファイルの変化を、それぞれの関節疾患に依存して分析した。それぞれの疾患は、規定された濃度で投与された規定された薬物によって影響される。このプロファイルを階層的に分類し、それによって、使用した薬物及び適用された用量との関連性を考慮した。患者サンプルをこれらの規定された発現パターンと比較する場合、特異的なパターンへの割り当て及びそれと結びついた治療の有効性についての情報により、適用された薬物であるメトトレキサートがより高い用量で有効であるか、又はその活性プロファイルが、個々の場合における病理学的な変化に影響を与えるのに最も適する薬物に変更することが合理的であるか否かを推測可能になる。

30

40

【0097】

《実施例3：RAにおける自己反応性プロファイル》

RAは、自己抗体の産生に関して他のリウマチ様疾患及び他の炎症性疾患とは異なる。そのため、RAと非RAとの間の区別は、1つの抗体反応性によるのではなく、いくつかの自己反応性の異なるプロファイルによって提供される。従って、RA特異的な自己反応性プロファイルの決定に基づいて、救済（save）診断を得ること、治療的進行を制御すること、及び予防検査を実行することが可能である。

50

【0098】

抗体は、抗原に対して、すなわちより正確には、エピトープに対して指向する。エピトープは、特異的な抗体-抗原-反応の間に、パラトープによって結合される。エピトープは、抗原の領域として定義され、これは抗体と(すなわちそのパラトープと)特異的に相互作用する。一般にエピトープは、タンパク質のペプチド配列として理解され、ここでこのペプチド配列は、およそ16~20個のアミノ酸を含む。この配列は、連続的(連続的エピトープ)又は分断的(非連続的エピトープ)であり得る。しかし典型的に、抗体と抗原との間の特異的相互作用に必要でかつ十分な、たった数個のアミノ酸、まれな場合においてはたった1個のアミノ酸が存在する。一方で、核酸でさえ抗原として作用するということが公知である。リン酸化、アシル化、グリコシル化、メチル化、脱イミン化などのような翻訳後修飾が特に重要であるとますます考えられている。これらの修飾はしばしば調節機能を有するため、特に病理学的な状態下でこれらは抗原の標的構造として特に興味深いようである。いくつかのRA関連自己抗原に関して、特異的な翻訳後修飾が自己抗原についてのエピトープを産生するということがすでに示されているので、これらの構造が試験系において現実化されることに特に注意を払うべきである。

10

【0099】

表2に列挙されるタンパク質は、RA関連自己抗体として記載された。しかし、これらの多数の単一の成分の関連性は、RAの診断については低いか、又は明らかではない。表1に列挙される、mRNAレベルで過剰発現している遺伝子に同様のことが適用される。これらの成分はそれ自体では、RAの診断を著しく改善させることには適さない。表1及び表2において列挙される大部分のタンパク質は、このそれぞれの目的についての特許として適用されていない。少数のタンパク質のみが、RAについての関連性が仮定されるという特徴を有する。これは、例えばタンパク質BiP(重鎖結合タンパク質)であり、RAにおける免疫反応の標的となる。ここで、例えばグリコシル化の形態における翻訳後修飾は考慮に入れる必要がある。なぜならこの修飾は、エピトープの成分であり、これらのエピトープは、RAにおける自己抗体の認識のため、及びRA自己抗体と非RA自己抗体との間の区別のため両方に必要だからである。更に、アルギニンからシトルリンへ翻訳後に形質転換したアミノ酸は、RA関連自己抗体のための必須エピトープとして記載されている(6)。RAの診断についての同様な高い重要性は、Sa抗原(5)、RA33抗原及びカルパスタチンについて有効である。

20

30

【0100】

それにも関わらず、これらの成分はそれ自体では、RAの明確な診断について、又は治療のモニタリングについてさえ、考慮することは適切ではない。本発明に従って記載された新規なアプローチは、RAのイムノオームについていう。RAのイムノオームは、RAにおいて存在する自己反応性抗体の全体、及び自己抗原の全体又はその自己抗原によって認識される自己エピトープを含む。予想外に、RA関連自己抗体の組み合わせを分析することによって疾患を明らかにRAとして始めて診断し得ることを見出すことが可能であった。自己抗原の異なるパターンが存在し、これは独占的にRAにおいて生じるということを、初めて示すことが可能であった。これらのパターンはまた、このような自己抗原又は自己反応物を含み、これはそれ自体ではRAについて重要でないと思われる。他の群のそれぞれの最初のアプローチは、強調されているにも関わらずこの知見を導かなかつたので、8つの異なるヒト自己免疫疾患由来のもっとも重要な自己抗原が使用されたことは更に驚くことである(11)。自己抗原を使用し、別のリウマチ様疾患、全身性エリテマトーデス(SLE)について関連するアプローチについて、同様のことが適用される。明らかに、すでに確立されているアプローチと本明細書中に記載されるアプローチとの間の本質的な差異は、一方は分析の型に基づき(多変量の)、他方では自己抗原の比較に基づく。著しく多量のRA関連自己反応物のみが、明らかな診断を可能にする。従って、RA関連自己抗体及び自己抗原の全体は、他の技術(タンパク質アレイ技術(27)、データプロセッシング)と共に他の用途の間でRAの診断及び分類の手段として使用され得る情報を構成する。当業者でさえ、類似性の推論によってこのような使用程度を結論付けることができ

40

50

なかった。R Aのイムノオーム及びまたR Aイムノオームのほんの一部を、他の疾患又は健康な状態からR Aを明らかに区別するために使用し得る。予想外の発明の市販利用は更に、ハイスループット技術の現在可能であるか又は開発中の可能性によってのみ、可能になる。これは特に自己反応性の複数パラメータ分析についていう。なぜなら、この場所において、患者由来の非常に小さい大きさのサンプルの使用のもとで複数の並行分析を実行するのに必要だからである。

【0101】

表2において与えられる成分のタンパク質若しくは部分タンパク質配列、又は表1において与えられる遺伝子によってコードされるタンパク質及び部分タンパク質配列は、R Aと非R Aとの間を区別するために潜在的に必要である翻訳後修飾を含むが、これらは自己反応性プロファイルの産生のために合成及び提供される。この合成は、分子生物学に基づく任意で公知のアプローチによってか、又はタンパク質化学の任意のアプローチによってなされる。更に、当該分野の状態に従う、部分的に人工の合成(インビトロ翻訳)又は人工の合成は、前記のタンパク質又は部分タンパク質配列を産生するのに適切である。

10

【0102】

(タンパク質アレイ/ペプチドアレイ(28))

表2又は表1に従うタンパク質又は部分タンパク質配列を、個々の自己反応性を決定するために適切な試験選択肢を作成する目的で、その全体か、又は臨床写真の免疫的な区別について適切なそれぞれの選択部分としてのみを使用した。これは、特にシトルリン、BiP、p205、IgG、カルパスタチン、RA33、Sa抗原及びカルレティキュリンの選択についていう。この目的のために、タンパク質を、空間的な解像度を許容する位置で担体マトリクスに適用する。固定化された各タンパク質、ペプチド、修飾タンパク質又は修飾ペプチドの位置及び同一性が分かっている。マイクロ形式は、ヒト血清のマイクロリットル以下の範囲における、何千もの異なる抗原及び/又は自己抗原(タンパク質/ペプチド)の並行検出を可能にする。好ましい選択肢は、タンパク質アレイ、高密度フィルター、高密度ガラス担体又は高密度方法によって産生される別のマトリクスの調製であり、ここで、被膜されるか又は被膜されない形態におけるマトリクスは、タンパク質又は部分タンパク質配列へ結合する。例えば、タンパク質若しくは部分タンパク質配列は、誘導体化されるか又は被膜/活性化されたガラス担体上に印字され得るか、あるいはこの適用は、キャピラリー様式で、インクジェット方法によるか、又は写真平板マスク若しくはデジタルマイクロ反射材の使用のもとでアレイへ直接合成することによって達成される。ガラス担体の代わりに、メンブレン又はフィルター、ポリスチレンマトリクス、ナノウェルプレート及び微粒子を使用し得る(29)。

20

30

【0103】

タンパク質アレイを、適切に希釈した患者血清又は同様の患者の関節浸出液と共にインキュベートする。このインキュベーションの間に、1つ又はいくつかのタンパク質成分について特異性を有する、存在する可能性のある抗体は、これらのタンパク質抗原に結合し得る。これは、残存する遊離した抗体及び血清成分を除去する目的で洗浄工程に続く。次いで、このサンプルを、二次抗体と共にインキュベートする。これは、一次抗体が結合することによって成功的な抗原-抗体-反応を示すため、及び適切な標識を導入するための両方に適切である。この標識は、視覚化及び定量化を可能にする、共有結合する蛍光染色剤、又は前駆物質から染色剤を産生し得る共有結合する酵素である。これは、残存する遊離した二次抗体を除去する目的で、さらなる洗浄工程に続く。

40

【0104】

(懸濁液アレイ(30))

懸濁液アレイは、マトリクスとしてプラスチック粒子を使用し、ここで、プラスチック粒子は、前記タンパク質で被膜されている。これは、特異的なタンパク質に結合した粒子の光学的な特徴が、別のタンパク質に結合した粒子の光学的な特徴とは異なるようにされている。イムノオーム分析は、患者血清又は他の体液と共にインキュベーションすることによって、類似の様式で実行する。適切な二次抗体との抗体反応によって、さらなる光学的

50

(蛍光)シグナルを、直接的か又は再び間接的に産生する。次いで、この分析を、マルチカラー蛍光活性化細胞(FAC)スキャンにおいて実行する。

【0105】

(時間分解タンパク質アレイ(31))

表1及び表2由来の異なるタンパク質又は部分タンパク質配列を、ポリスチレン表面に結合させる。患者血清由来の、分析されるべき抗体を、活性なビオチン-エステルを使用することによってビオチン化する。代わりに、ヒト抗体に特異的であるビオチン化二次抗体もまた、使用し得る。これは、ビオチン化の効率が異なる結果生じる患者間偏差をさけるためである。次いで患者抗体を、タンパク質結合ポリスチレン表面と共にインキュベートする。引き続き洗浄工程の後、ストレプトアビジンによって検出を行う。ストレプトアビジンは、蛍光ユーロピウム複合体と結合する。次いで、洗浄工程及び乾燥工程の後、レーザー励起、時間分解固相蛍光分析によって評価を行う。

10

【0106】

(データパターン及び複数因子分析)

パラメータ(例えば、表1及び表2に列挙されるタンパク質/自己抗原について得られる自己反応;例えば、自己反応性RF/シトルリン/BiP/カルパスタチン/カルレティキュリン/RA33)を、可能な限り完全に決定する。6のうち2よりも多くの欠測値を有する個々の患者のデータパターンを、分析から前もって除外した。

【0107】

免疫検出系の解釈によって、各患者及び各自己反応性について陰性又は陽性の結果を産生する。代替の選択肢は、連続値(タンパク質アレイ、ELISA)であり、これは、人工的に(数学的に)か、又はコントロール群関連カットオフによって(適切なコントロール群における分析、例えば、年齢及び性別の一致した健康なコントロール又は別の疾患に罹患するコントロール患者)のいずれかで、陽性又は陰性に分ける。各データパターンを分析し、そしてCLASSIF1プログラムシステム(32)によって分類する。

20

【0108】

最初の工程において、各臨床的診断カテゴリーの三重マトリクス(triple-matrix)特徴を、第1の参照分類マスクへ入力する。次いで各患者は、患者マスクと臨床的参照マスクとの間の位置同一性の、最も高い程度に従って分類される。

【0109】

第2の工程において、これらのデータカラムは除去された。これは、三重マトリクス文字「0」を全ての参照マスクに表示する。なぜなら、参照マスクは、疾患間の差異を考慮していないからである。

30

【0110】

第3の工程において、CLASSIF1-アルゴリズムは、分類プロセスからの全ての順列における、個々のパラメータ又は2つのパラメータの組み合わせのいずれかを一過的に除去する。次いで、総合データセットを再分類する。パラメータは、一過性の除去によって分類結果に影響を与えるが、これは参考になる。なぜなら、明らかに重要な情報は失われていないからである。各パラメータの情報内容は、アルゴリズムによって断続的に提供され、演算の後に再導入され、そして次のパラメータ又は次のパラメータの対が、一過的に抽出され、そして類似の様式で分析される。断続的な除去及び再導入は、全てのパラメータの情報内容が、単独で又はさらなるパラメータとの組み合わせのいずれかで明らかになるまで、行われる。情報的なパラメータの残りの配列は、それぞれの臨床的予測カテゴリーについての参照分類マスクを構成する。

40

【0111】

第4の工程において、百分位数カットオフ値の10/90%、15/85%、20/80%、25/75%及び30/70%で分類することによって、分類を最適化した。後にこれらの対の値を選択することにより、最良の識別性質が示される。最良の分類の結果は、典型的には10/90%と25/75%との間の百分位数対の範囲に達する。乱雑マトリクス(Confusion Matrix)における陰性及び陽性の予測値は、参照サンプルが及び試験さ

50

れるべきサンプルが、どのように良好に使用パターンによって識別されるかについての情報を提供する。

【0112】

加えて、各患者のデータパターンを、複数因子分析に供する。5つのパラメータパターンについての複数因子を、全ての可能な組み合わせにおいて、異なるパラメータの乗算又は除算によって得て、続いてRA参照群の平均値に対する5つのデータカラムの標準化をした。続いて、他の患者群（例えば、OA、reA、PsoA、他）の各パラメータを、それぞれの患者群のパラメータの平均値が参照値（RA）との比較において増加している場合に乗算し、又は、値が減少している場合に除算することのいずれかによって決定した。

【0113】

複数因子データベースは、測定されたパラメータ（RF/シトルリン/BiP/カルパスタチン/カルレティキュリン/RA33）を包含する。26個の複数因子を、CLASSIF1アルゴリズムを介して分類した。それにより、各データベースカラムの全ての形状が、「-」（参照患者[RA]の値分配の低い百分位数よりも小さい）、「0」（低い百分位数と高い百分位数との間）又は「+」（高い百分位数よりも大きい）の三重マトリクス文字のいずれかに変化した。データベースカラムの変化の後、乱雑マトリクスが、臨床診断とコンピュータ分類との間に確立される。

10

【0114】

この乱雑マトリクスの対角値は、参照サンプルの特異性及び試験されるべきサンプルの感受性を示す。これらは引き続き反復学習過程の間、更に最適化される。最適化された分類は、全てのサンプルが正しく分類された場合に達成される。これは、乱雑マトリクスの対角数が100%に達し、そして非対角分野の値が0%の場合である。この学習過程は、非情動的パラメータを除去し、従って識別するパラメータを蓄積することに役立つ。

20

【0115】

（略号リスト）

ACR	米国リウマチ学会	
BIP	結合タンパク質, 重鎖結合タンパク質	
BSA	ウシ血清アルブミン	
Calp	カルパスタチン	
Calr	カルレチクリン	
cDNA	相補的DNA, コピーDNA	
CH	軟骨細胞抗原	10
Cit	シトルリン化ペプチド	
CrP	C反応性タンパク質	
DNA	デオキシリボ核酸	
DPNII	<i>Diplococcus pneumoniae</i> 由来	
dNTP	デオキシヌクレオチド三リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTPの 等モル混合物)	
dNTP	デオキシヌクレオチド三リン酸	20
EBNA-1	エプスタインバールウイルス核抗原-1	
EBV	エプスタインバールウイルス	
ER	小胞体	
FACS	蛍光活性化細胞ソーティング	
GAPDH	グリセロール-アルデヒド-リン酸脱水素酵素	
HC	ヒト軟骨	
HC gp39	ヒト軟骨糖タンパク質39	30
HLA-system	組織適合性抗原 (HLA - ヒトリンパ球抗原)	
HLA-DR4	HLA 特性, RAとの増強された関係を阻害する	
hnRNP	ヘテロジ-ニアスリボヌクレオプロテイン (RA33)	
Hsp	熱ショックタンパク質	
Ig	免疫グロブリン	
IgG	免疫グロブリンG	
IL-	インターロイキン	40
IR-3	内部リピート領域3	

MCTD	混合結合組織病(混合性膠原病)	
MHC-	主要組織適合複合体	
MMP	マトリクスメタロプロテイナーゼ	
mRNA	メッセンジャーリボ核酸	
NAD	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド	
NCBI	国立バイオテクノロジー情報センター	
ND	正常ドナー	10
OA	変形性関節症	
O-GlcNAc	O-N-アセチルグルコサミン	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	
PHA	フィトヘマグルチニン	
PM/DM	多発性筋炎/皮膚筋炎	
PsoA	乾癬関連関節炎	
RA	慢性関節リウマチ	20
RA-A47	関節炎関連抗原	
RA33	hnRNP A2	
RDA	提示差異分析	
reA	反応性関節炎	
RF	関節炎因子	
RNA	リボ核酸	
RPMI	市販されている通常の細胞培養培地, 希釈 RPMI1640培地;(Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519-524, 1967)	30
RsaI	Rhodopseudomonas sphaeroides由来のDNA制限酵素 RsaI	
RT	リバーストランスクリプターゼ(RT)	
Sa-antigen	ヒト脾臓及び胎盤由来の50k-タンパク質	
SLE	全身性エリテマトーデス	
SSH	抑制減算ハイブリダイゼーション	40
TGF	形質転換成長因子	
ユニジーン	ユニジーンは、遺伝子配向性クラスターの非冗長的セットへの ジーンバンク配列の自動的分割のための実験系である。	
YKL-39	ヒト軟骨関連タンパク質	

1. Arnett, F.C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, and et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315.
2. Kaps, C., C. Bramlage, H. Smolian, A. Haisch, U. Ungethum, G. R. Burmester, M. Sittlinger, G. Gross, and T. Haupl. 2002. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 46:149.
3. Roudier, J., G. Rhodes, J. Petersen, J. H. Vaughan, and D. A. Carson. 1988. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27:367. 10
4. Albani, S., E.C. Keystone, J. L. Nelson, W. E. Ollier, A. LaCava, A.C. Montemayor, D. A. Weber, C. Montecucco, A. Martini, and D. A. Carson. 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1:448.
5. Despres, N., G. Boire, F. J. Lopez-Longo, and H. A. Menard. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21:1027.
6. Schellekens, G. A., B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273. 20
7. Girbal-Neuhauser, E., J. J. Durieux, M. Arnaud, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessiere, C. Jolivet-Reynaud, M. Jolivet, and G. Serrere. 1999. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162:585.
8. Alsalameh, S., J. Mollenhauer, N. Hain, K. P. Stock, J. R. Kalden, and G. R. Burmester. 1990. Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis Rheum* 33:1477. 30
9. DeRisi, J., L. Penland, P. O. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y. A. Su, and J. M. Trent. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457.
10. Haab, B. B., M. J. Dunham, and P. O. Brown. 2001. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2:RESEARCH0004.
11. Robinson, W. H., C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M.C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriner, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S. Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, and P. J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8:295. 40
12. Eberwine, J. 1996. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* 20:584.
13. Cook, A. F., E. Vuocolo, and C. L. Brakel. 1988. Synthesis and hybridization of a series of biotinylated oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 16:4077.
14. Okamoto, T., T. Suzuki, and N. Yamamoto. 2000. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol* 18:438.
15. Fodor, S. P., J. L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, and D. Solas. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:76 50

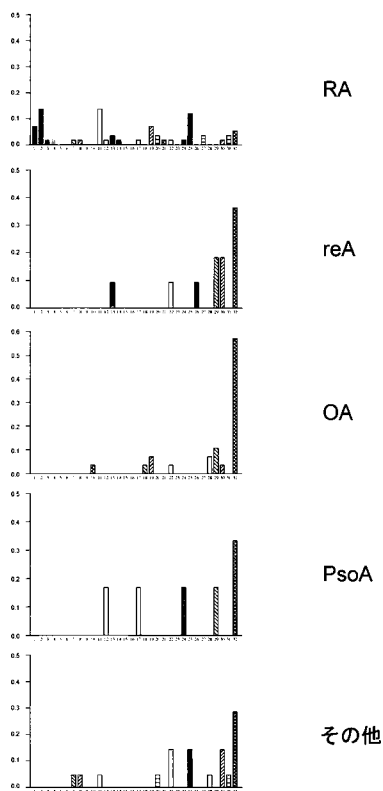
- 7.
16. Barone, A. D., J. E. Beecher, P. A. Bury, C. Chen, T. Doede, J. A. Fidanza, and G. H. McGall. 2001. Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20:525.
17. Hubank, M., and D. G. Schatz. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22:5640.
18. Lisitsyn, N., and M. Wigler. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259:946.
19. Bussow, K., E. Nordhoff, C. Lubbert, H. Lehrach, and G. Walter. 2000. A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65:1. 10
20. Altman, R., G. Alarcon, D. Appelrouth, D. Bloch, D. Borenstein, K. Brandt, C. Brown, T. D. Cooke, W. Daniel, D. Feldman, and et al. 1991. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 34:505.
21. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156.
22. Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025. 20
23. Gress, T. M., J. D. Hoheisel, G. G. Lennon, G. Zehetner, and H. Lehrach. 1992. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 3:609.
24. Lennon, G. G., and H. Lehrach. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 7:314.
25. Krenn, V., A. Konig, F. Hensel, C. Berek, M. M. SoutoCarneiro, W. Haedicke, Y. Wang, H. Vollmers, and H. K. Muller-Hermelink. 1999. Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated IgVL/lambda genes. *Clin Exp Immunol* 115:168. 30
26. Leushner, J. 2001. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 1:11.
27. MacBeath, G., and S. L. Schreiber. 2000. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289:1760.
28. Walter, G., K. Bussow, D. Cahill, A. Lueking, and H. Lehrach. 2000. Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Microbiol* 3:298.
29. Spiro, A., M. Lowe, and D. Brown. 2000. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 66:4258. 40
30. Nolan, J. P., and F. F. Mandy. 2001. Suspension array technology: new tools for gene and protein analysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:1241.
31. Madersbacher, S., and P. Berger. 2000. Antibodies and immunoassays. *methods* 21:41.
32. Valet, G., M. Valet, D. Tschöpe, H. Gabriel, G. Rothe, W. Kellermann, and H. Kahle. 1993. White cell and thrombocyte disorders. Standardized, self-learning flow cytometric list mode data classification with the CLASSIF1 program system. *Ann N Y Acad Sci* 677:233.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 7 】

【図1】図1は、RA33、RF、シトルリン、BiP及びカルパスタチンに関する自己反応パターンである。IgG(RF)、シトルリン、BiP、カルパスタチン、RA33及びカルパスタチンに対する自己反応と、疾患実体RA(慢性関節リウマチ)、reA(反応性関節炎)、OA(変形性関節症)、PsoA(乾癬関連関節炎)及び他のためのカルパスタチンにおける32個全ての可能な組み合わせを示す。

【図1】



【国際公開パンフレット】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/097125 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/D102/02010
- (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Mai 2002 (30.05.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 27 572.2 30. Mai 2001 (30.05.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PATHOARRAY GMBH [DE/DE]; Pine Private Equity, Jägerstrasse 51, 10117 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AF, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PE, PG, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÄUPL, Thomas [DE/DE]; Am Schlösschenwäldchen 59, 15537 Lärker (DE); UNGETHÜM, Ute [DE/DE]; Chausseestrasse 93, 10115 Berlin (DE); BLÄSS, Stefan [DE/DE]; Furkastrasse 74, 12107 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, 10315 Berlin (DE).

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

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

(54) Title: TOOLS FOR THE DIAGNOSIS, MOLECULAR DEFINITION AND DEVELOPMENT OF TREATMENT OF CHRONIC INFLAMMATORY JOINT DISEASES

(54) Bezeichnung: WERKZEUGE ZUR DIAGNOSTIK, MOLEKULAREN DEFINITION UND THERAPIENTWICKLUNG CHRONISCHER ENTZÜNDLICHER GELENKERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to tools for the diagnosis, molecular definition and development of treatment of chronic inflammatory joint diseases and other inflammatory, infectious or tumorous diseases. According to the invention, genome data (genomics), proteome data (proteomics) and immunome data (immunomics) are used in the analysis and development of treatment of chronic joint diseases. The invention is based on the use of gene sequences and derived mRNAs and proteins, in addition to antibodies having a specific nature for the derived proteins, for characterising inflammatory and non-inflammatory rheumatic joint diseases, auto-immune diseases and infectious diseases. Biologically significant pathogenicity principles of chronic inflammatory joint diseases which have been unclear until now can be derived from the examinations carried out. Furthermore, interpretation algorithms can be created for the classification, prognosis evaluation and treatment optimisation of said joint diseases, and new strategies for treatment and points of attack for medicaments can be derived.

WO 02/097125 A2

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser Gelenkerkrankungen aufgebaut und neue Therapiestrategien und Angriffspunkte für Medikamente abgeleitet werden.

Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung
chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser
10 Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und
Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen
Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie
abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine
zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen
15 Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den
Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten
chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können
Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser
Gelenkerkrankungen aufgebaut und neue Therapiestrategien und Angriffspunkte für Medikamente
20 abgeleitet werden.

Charakteristik des bekannten Standes

Problemstellung

Chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen sind ätiologisch nicht geklärt. Die rheumatoide Arthritis
25 (RA - Abkürzungsverzeichnis hinter den Beispielen) ist der klassische Vertreter dieser Erkrankungen.
Wesentliche Krankheitsabläufe finden in der entzündlich veränderten Synovialmembran statt und
führen zur chronischen Gelenkschädigung. Das klinische Erscheinungsbild präsentiert sich sehr
heterogen und legt nahe, dass es sich um verschiedene Entitäten mit dem gemeinsamen Symptom der
destruktiven Synovitis handelt. Diese Erkrankungen sind auch als systemische Erkrankungen zu
30 verstehen, bei denen zahlreiche Veränderungen im Blut beobachtet werden und mitunter
schwerwiegende Organmanifestationen auftreten können.

Überschießende Entzündungsaktivitäten durch Fehlregulationen in der Entzündungskaskade werden
als hauptverantwortliche Pathomechanismen diskutiert. Ferner werden Autoimmunreaktionen
beschrieben, die eine Beteiligung des spezifischen humoralen und zellulären Immunsystems am
35 Krankheitsprozeß nahelegen. Es werden jedoch auch andere Mechanismen wie enzymatische
Gewebezerstörung, Zell- und Gewebeproliferation oder Regeneration diskutiert, die in der
Pathogenese ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnten.

WO 02/097125

2

PCT/DE02/02010

Ob diese genannten Pathomechanismen die einzigen und alleinrelevanten sind, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Auch ist unbekannt, welche Parameter all diese Veränderungen gleichzeitig erfassen können. Als Folge des ungenügenden pathophysiologischen Verständnisses existieren zwar viele Medikamente, die Hauptvertreter verfolgen jedoch nur ein wesentliches
5 Therapiekonzept:

Orientierend an dem gemeinsamen Symptom der überschießenden Entzündung zielt die aktuelle Therapie nämlich auf die Unterdrückung der Entzündung ab. So genannte Basistherapien besitzen immunmodulatorischen und krankheitsmodifizierenden Charakter. Sie greifen in Grundmechanismen des Zellstoffwechsels und der Zellaktivität ein (z.B. Methotrexat, Azathioprin). Die umfassenden
10 Prinzipien der molekularen Wirkungsweise dieser Therapien bei den Gelenkerkrankungen sind jedoch nur unzureichend bekannt. Deshalb fehlen auch entsprechende Parameter, um die Therapieeffizienz einzelner Basistherapien differentiell und spezifisch im Individualfall zu kontrollieren.

Bisherige Werkzeuge

- Patienten mit Gelenkentzündung werden im klinischen Alltag heute nach folgenden Kriterien
15 beurteilt: berichteter Krankheitsverlauf (Anamnese), klinische Untersuchung (Befallsmuster der Gelenke, Organbefall), Entzündungsparameter (unspezifische Entzündungshinweise aus der Serumelektrophorese, der Blutsenkung und dem C-reaktiven Protein), Autoimmunparameter (Rheumafaktor, antinukleäre Antikörper und wenige spezielle Autoantikörper wie anti-Ro, -La, -
U1RNP, -Sm, -Histon, -Scl70, -Centromer, -dsDNA, -Phospholipid-Antikörper), genetische
20 Disposition über HLA-Marker (DR4, B27, DR3), Bildgebung (destruktive Veränderungen in den Röntgenbefunden der Gelenke), erweiterte Organdiagnostik durch Routineparameter der Labordiagnostik (Leberenzyme, Muskelenzyme, Nierenretentionswerte) und ggf. weiterführende sonographische, radiologische und magnetresonanztomographische Techniken. Diese liefern nur sehr
eingeschränkt Aussagen über die prognostisch zu erwartende Aggressivität der Erkrankung oder die
25 konkrete Erfolgsaussicht eines Basistherapeutikums im individuellen Krankheitsfall. Zudem sind die Diagnosekriterien heute nicht darauf ausgelegt, die Vielfalt der Erscheinungsformen innerhalb der häufigsten Arthritis-Erkrankung, der RA, ausreichend zu klassifizieren (1 - Referenzen hinter den
Beispielen). Insbesondere in der Frühphase der Erkrankung ist die Diagnosedstellung schwierig und
unsicher. Aber bereits nach einem Jahr Krankheitsdauer sind bei der Mehrzahl der Patienten
30 irreversible Gelenkschädigungen eingetreten. Aus Früh-Arthritis-Studien ist bekannt, dass eine frühere Sicherung der Diagnose, gefolgt von einer adäquaten Therapie, entscheidende Verbesserungen in der langfristigen Entwicklung der Erkrankung mit sich bringt. Es werden deshalb dringend neue
Methoden und Kriterien benötigt, die über das klinische Bild hinausgehend molekulare Merkmale
integrieren.
- 35 Auch die Verlaufskontrolle für den Therapie-Erfolg wird bislang mit Hilfe von oben genannten Methoden der Diagnostik durchgeführt. Viele dieser Parameter verändern sich nur sehr langsam. Sie

WO 02/097125

3

PCT/DE02/02010

erfordern viele Wochen bis Monate Verlaufsbeobachtung, um die Aussage zu treffen, ob das gewählte Medikament wirksam ist. Nicht selten muss wegen mangelhafter Besserung und Progredienz der Erkrankung auf ein anderes Medikament umgestellt werden. Grundsätzlich ist eine Heilung der Erkrankungen mit den derzeit verfügbaren Medikamenten nicht möglich.

5 Experimentelle Ansätze

Über die etablierten Werkzeuge hinaus gibt es zahlreiche experimentelle Ansätze, die Diagnostik insbesondere der RA zu verbessern.

- Dies betrifft die Suche nach Schlüsselproteinen, die 1.) den Entzündungsablauf in einer zentralen Position aufrechterhalten bzw. verhindern können, die 2.) maßgeblich an der enzymatischen Zerstörung der Knorpel- und Knochenmatrix beteiligt sind bzw. diese Enzyme inhibieren oder die 3.) regenerative und reparative Prozesse induzieren bzw. deren Gegenspieler inhibieren können. So zeigt sich die Rolle der entzündungsvermittelnden Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF-) alpha und Interleukin (IL-) 1 beta als wesentlich und hat entsprechende Therapieansätze in die klinische Anwendung gebracht. Obgleich eine Hemmung von TNF-alpha in vielen Fällen eine mit herkömmlichen Mitteln nicht ausreichend beeinflussbare RA lindern kann, führen die Erfolge dennoch nicht zu einer Heilung der Erkrankung. Zum Teil ist die Hemmung so stark, dass Infektionen oder gar septische Komplikationen entstehen und dennoch keine ausreichende Kontrolle der Arthritis erreicht wird. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass der TNF-alpha-Entzündungsweg zumindest nicht der einzige zentrale Pathomechanismus der Erkrankung sein kann. Neben den beiden genannten Zytokinen wird die Rolle zahlreicher weiterer Botenstoffe in der Pathogenese der Arthritis erforscht. Zudem treten die angeschlossenen intrazellulären Signalwege zunehmend in das Blickfeld therapeutischer Interventionsmöglichkeiten.

Ferner stehen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsine im Mittelpunkt der enzymatischen Zerstörung von Knorpel und Knochen.

- 25 Untersuchungen zu regenerativen Mechanismen stehen erst am Anfang der Erforschung. Vorrangig sind hier Botenstoffe aus der Transforming Growth Faktor (TGF-) beta-Familie zu benennen. Eine Vielzahl dieser Vertreter spielt eine große Rolle in der Entwicklung des Bewegungsapparates. Erste Untersuchungen an Synovialgewebe und Knorpel haben gezeigt, dass Vertreter dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren und Morphogenen auch im erwachsenen Synovialgewebe produziert werden. Bei entzündlichen Gelenkerkrankungen konnte in eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass einzelne dieser Faktoren offensichtlich relativ erniedrigt sind. Ferner konnte für Bone Morphogenetic Protein (BMP-) 7 gezeigt werden, dass die zelluläre Invasion in sich formierendes künstliches Knorpelgewebe unterdrückt wird (2).

WO 02/097125

PCT/DE02/02010

4

Viele der genannten Faktoren und Enzyme sind auch bei anderen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis oder den reaktiven Arthritiden zu finden und stellen für sich betrachtet keinen diagnostisch wegweisenden Parameter dar.

- Die experimentellen Ansätze zielen auch darauf ab, dass bei der RA autoreaktive T- und B-Zellen auftreten und die Erkrankung zu den Autoimmunerkrankungen gezählt wird. Dies geht zurück auf die Entdeckung des sogenannten Rheumafaktors, eines Autoantikörpers, der gegen Immunglobulin G gerichtet ist. Rheumafaktoren treten jedoch nur bei etwa zwei Drittel der RA-Patienten auf, dafür aber auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen und sogar in bis zu 5% der Gesunden (mit zunehmendem Lebensalter noch deutlich darüber). Das Auftreten von Rheumafaktoren scheint unter bestimmten pathologischen Gegebenheiten, wie z.B. der bakteriellen Endokarditis, eine physiologische Reaktion des Körpers zu sein. Autoreaktive B-Zellen mit Spezifität für IgG liegen offenbar bei einem Großteil der Bevölkerung vor und können durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Der Begriff "Rheumafaktor" ist dennoch erhalten geblieben, weil sich lediglich für die RA eine diagnostische und prognostische Bedeutung ergibt.
- 15 Gleiche Charakteristika gelten aber qualitativ für nahezu alle bislang bekannten Autoantikörper bei der RA: eine Frequenz der positiven Patienten liegt deutlich unter 100% und die Krankheitsspezifität teilweise ebenfalls deutlich unter 100%. Der klinisch ausgeprägten Heterogenität der RA in Befallsmuster, Intensität der Entzündung und schubweisem Verlauf steht somit eine Heterogenität der immunologisch fehlregulierten Prozesse gegenüber. Diese klinische und immunologische Heterogenität unterstützt ebenfalls die Vermutung, dass die "rheumatoide Arthritis" ein Sammelbegriff für unterschiedliche Krankheitsentitäten sein könnte. Als Paradebeispiel dient hier die Unterscheidung in RF-positive und -negative (RF – Rheumafaktoren) RA, wobei der ersteren Form ein schwererer Verlauf mit höherem Destruktionspotential und systemischer humoraler Aktivität nachgesagt wird. Der Begriff seronegativ impliziert fälschlicherweise sogar das Fehlen jeglicher Autoantikörper. Aber weder für den Rheumafaktor noch für irgendeine der bekannten Autoreaktivitäten konnte bislang eine Ursächlichkeit für die Entstehung der RA oder einer ihrer postulierten Untergruppen oder Verlaufsformen nachgewiesen werden.

- Autoantikörper werden bei anderen rheumatischen Autoimmunerkrankungen wie den Kollagenosen mit dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) als Hauptvertreter zur diagnostischen Einteilung verwendet. Eine primäre Pathogenität dieser Autoantikörper wird immer wieder diskutiert. Sicher ist bei hohem Autoantikörper-Titer in Verbindung mit einer unkontrollierten überschießenden Freisetzung von Autoantigenen im Krankheitsschub die daraus folgende Immunkomplexbildung und Komplementaktivierung mit Organschädigungen insbesondere der Niere und vaskulitischen Merkmalen assoziiert. Die Bedeutung autoreaktiver B- und T-Zellen für die RA ist jedoch ungeklärt. Stattdessen werden immer neue Autoantigene als Ziele einer autoreaktiven Immunantwort bei der RA beschrieben. Einige dieser Antigene sind biochemisch und in Bezug auf ihre Antigenität gut charakterisiert, von anderen hingegen sind erst wenige Parameter bekannt. Für ihre Entdecker waren

WO 02/097125

5

PCT/DE02/02010

einige Autoantikörper sehr vielversprechend, weil B- und/oder T-Zell-Antwort scheinbar hoch RA-spezifisch waren. Das Interesse an diesen Antikörpern nahm aber dann immer schnell ab, wenn dieselben Autoaktivitäten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden konnten. Mittlerweile sind zahlreiche T-zelluläre Autoaktivitäten bei der RA charakterisiert, von denen nur die wenigsten RA-spezifisch sind.

Heatshock Proteine

Die RA wurde früh in den Verdacht gebracht, eine Infektionserkrankung zu sein. Es wurden daher diverse xenogene – meist mikrobielle und virale – Antigenquellen untersucht, um potentielle Erreger als Trigger für Autoaktivität nachzuweisen. Eines der potentiell RA-induzierenden Agenzien war *Mycobacterium tuberculosis*, weil es im Tiermodell die Adjuvans-Arthritis induziert, eine Erkrankung, die in gewissen Aspekten der menschlichen RA ähnelt. Diese experimentelle Erkrankung konnte auch ausgelöst werden durch mykobakterielles Heatshockprotein 65 (mt-Hsp65) oder mit T-Zellen, die für dieses Antigen spezifisch sind. Heatshockproteine helfen natürlichen Proteinen bei der korrekten Faltung und erzeugen Tertiär- und Quartärstrukturen. mt-Hsp65 ist homolog zu dem essentiellen Hsp60 bei Säugern. Berichte über mt-Hsp65-spezifische T-Zellen und Antikörper in Synovialflüssigkeit von RA-Patienten legten nahe, dass das stark homologe humane Hsp60 als Autoantigen bei RA-Patienten erkannt würde. Jedoch sind diese Antikörper nicht RA-spezifisch: Sie treten auch bei Patienten mit Reiter-Syndrom, SLE und aktiver Tuberculose, wie auch bei Gesunden auf.

Obwohl die Reaktivität gegen mt-Hsp65 bei der RA keine dominante Rolle zu spielen scheint, könnte humanes Hsp60 dennoch in der Pathogenese der RA bedeutsam sein: In seiner Aminosäuresequenz besitzt humanes Hsp60 eine Identität über Bereiche von 11 bis 22 Aminosäuren mit Proteinen wie Cytokeratin und Hsp90. Es ist daher denkbar, dass autoreaktive T-Zellen oder Antikörper gegen diese Proteine ursprünglich von einer natürlich auftretenden – aber strikt regulierten – Hsp60-Reaktivität herrühren.

Dna J

Dna J, das bakterielle Stressprotein mit Homologie zu dem Säuger-Hsp70, weist die Aminosäuresequenz QKRAA auf, bekannter unter dem Namen *Shared Epitope*, welches für die RA prädisponiert (3). Dieses Epitop kommt ebenfalls in dem Epstein-Barr-Virus (EBV)-kodierte Protein gp110 vor. Dna J ist das Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA, nicht aber bei Gesunden (4). Obwohl noch unbekannt ist, wie Shared Epitope für die RA prädisponiert, ist ein denkbarer Mechanismus die Erzeugung des Shared Epitope-Peptides aus Nicht-MHC-Proteinen und deren anschließenden Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen unter Auslösung einer Immunantwort gegen Fremd (EBV-gp110) und Selbst (MHC Klasse II).

WO 02/097125

6

PCT/DE02/02010

EBV-codiertes nukleäres Antigen

Epstein-Barr-Virus (EBV) ist schon früh in den Verdacht geraten, die RA auszulösen, obwohl es erst
jüngst in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen werden konnte. Ein Antikörper,
gerichtet gegen das EBV-kodierte nukleäre Antigen (EBNA-1), zeigte starke Reaktivität mit einem
5 p62-Protein aus synovialen Deckzellen bei Patienten mit RA. EBNA-1 beinhaltet eine Glycin-Alanin-
reiche Repeat-Sequenz (IR-3), die von Autoantikörpern bei Patienten mit RA, SLE, systemischer
Sklerose (SSc) und infektiöser Mononucleose sowie bei gesunden Individuen mit vergleichbaren
Häufigkeiten erkannt werden. EBNA-1 weist Kreuzreaktivität mit zahlreichen humanen Proteinen auf,
typischerweise über die IR-3-Sequenz. Darunter sind im wesentlichen p62 und p542, wobei das
10 letztere hauptsächlich von Antikörpern aus Patienten mit infektiöser Mononucleose, aber auch aus
RA-Patienten erkannt wird. p542 wurde jüngst als 71k-Komponente von hnRNPs identifiziert
aufgrund seiner hohen Sequenzidentität mit dem Maus-hnRNP namens Raly und Ähnlichkeiten mit
dem humanen hnRNP C2.

Sa-Antigen; Filaggrin, citrullinierte Peptide/Proteine

Das Sa-Antigen (5), wie auch Filaggrin sind zwei seit neuerem bekannte Antigene, die nicht im
entzündeten Gelenk vorkommen, aber die Aufmerksamkeit wegen der sehr RA-spezifischen
Immunantwort auf sich zogen. Das Sa-Antigen ist ein 50k-Protein aus humaner Milz und Placenta. Sa-
spezifische Antikörper kommen bei 43% der RA-Patienten vor und haben eine Krankheitsspezifität
von 78% bis 99%. Filaggrin ist ein 42k-Protein, das intermediäre Filamente, insbesondere Cytokeratin,
20 vernetzt und im Endothel vorkommt. Filaggrin-spezifische Antikörper scheinen die gleichen zu sein,
wie der lange zuvor beschriebene "Antiperinukleäre Faktor" und die sogenannten Antikeratin-
Antikörper. Die Hauptdeterminante des oder der Epitope, die von Anti-Filaggrin-Antikörpern erkannt
werden, ist Citrullin, ein posttranslational modifiziertes Arginin (6, 7). Die Sensitivität dieser
Antikörper liegt zwischen 36% und 91% und die Spezifität zwischen 66% und 100%. Obwohl
25 Filaggrin nur extra-artikulär vorkommt, konnte Citrullin mittlerweile auch in Synovialzellen
nachgewiesen werden.

Collagen II

Collagen Typ II ist eine wesentliche Komponente des Gelenkknorpels und erscheint daher
prädisponiert als Autoantigen für die RA. Folgerichtig haben sich viele Studien mit der Rolle der
30 Collagen-spezifischen Immunantwort beschäftigt. Maus-T-Zellen, die mit bovinem Collagen Typ II
reagieren, sind spezifisch für ein Epitop, das auch in humanem Collagen II vorkommt und darüber
hinaus auch mit einem wichtigen T-Zell-Epitop aus Mäusen mit Collagen-induzierter Arthritis
überlappt. Collagen Typ II ist eine Komponente der extrazellulären Matrix, die Tripelhelices aus
identischen Tropocollagen-Untereinheiten ausbildet, die wiederum aus dem noch größeren
35 Procollagen prozessiert werden. B-Zellen mit Spezifität für Collagen scheinen in den entzündeten

WO 02/097125

PCT/DE02/02010

7

Gelenken von Patienten mit RA vermehrt aufzutreten. Collagen II-spezifische T-Zellen treten sowohl bei RA-Patienten wie auch bei Gesunden auf.

Besonderes Interesse galt der Collagen-Reaktivität im Rahmen der oralen Toleranz-Studien bei RA. Orale Toleranz kann im Tiermodell durch Antigene erzeugt werden, die in dem Kompartiment der (autoimmunen) Entzündung vorkommen, aber nicht notwendigerweise selbst in das Entzündungsgeschehen involviert sind. Wird ein solches Antigen oral appliziert, werden offenbar T-Zellen mit Spezifität für das gefütterte Antigen toleriert und können dann an anderem Ort, dem entzündeten Gelenk, über suppressive Faktoren, z.B. IL-10 und TGF- β , die sogenannte Bystander-Suppression erzeugen. Derart Collagen II-spezifische T-Zellen sollten die Entzündung bei RA heruntermodulieren. Jedoch haben drei Placebo-kontrollierte Doppelblindstudien zu oraler Toleranz durch die Applikation von Collagen II keine bemerkenswerte Verbesserung der Krankheitsaktivität ergeben. Ähnliches gilt bislang für die klinischen Studien mit Peptiden aus Hsp65 (Subreum).

Chondrozyten Antigen 65 (CH65)

Chondrozytenmembranen wurden als Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA- und Arthrose-Patienten beschrieben (8), wohingegen T-Zellen normaler Spender nicht reagierten. Darüber hinaus werden Chondrozytenmembranen bei 70% der RA-Patienten von Autoantikörpern erkannt. Antigen ist das knorpelspezifische CH65, welches eine Sequenzähnlichkeit zu mykobakteriellem Hsp65 und bestimmten Cytokeratinen aufweist. CH65 besitzt einen hohen Anteil an Glycin - ähnlich wie, aber nicht identisch mit Hsps. Die Sequenzen ähneln zwar denen von Cytokeratinen, sind aber dennoch völlig untypisch für diese. Solche Ähnlichkeiten verlocken zu der Annahme eines molekularen Mimikry zwischen mykobakteriellen und humanen Hsps mit anderen Proteinen. Dennoch findet sich keinerlei Kreuzreaktivität zwischen monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für CH65, Cytokeratin oder Hsp65. T-Zell-Reaktivität wurde nur gegen ungereinigte Chondrozytenmembranen untersucht.

HC gp39

In der Synovialflüssigkeit treten viele Autoantigene auf, die nur bei kleinen Patienten- und Kontroll-Kohorten getestet wurden. Ein Beispiel ist das Human Cartilage Glycoprotein (HC gp39), ein wichtiges Produkt, das von artikulären Chondrozyten, Synovialzellen, Makrophagen später Differenzierungsstadien und Neutrophilen sezerniert wird. Der gp39-Spiegel ist bei Patienten mit degenerativer Gelenkerkrankung verglichen mit Gesunden in Serum und Synovialflüssigkeit erhöht. Später wurde gezeigt, dass ein erhöhter Titer nicht nur bei Osteoarthritis, sondern auch bei kolorektalem Karzinom, alkoholbedingter Leberzirrhose und Brustkrebs auftritt. gp39 hat nicht nur eine Bedeutung bei dem Umbau von Gewebe und der Degradation der extrazellulären Matrix, sondern es ist auch Ziel autoreaktiver T-Zellen bei der RA. Demzufolge sind auch Peptide aus der gp39-Sequenz daraufhin getestet worden, HLA-DR4 (DRB1*0401) zu binden und T-Zellen zu stimulieren. gp39-reaktive T-Zellen konnten bei 8 von 18 RA-Patienten und 3 von 11 Gesunden nachgewiesen

WO 02/097125

8

PCT/DE02/02010

werden. Im Tiernmodell führt eine Immunisierung von Balb/c-Mäusen zu einer chronischen Arthritis mit Schüben, die wiederum mit nasaler Applikation des gp39 kuriert werden konnte.

Rheumafaktor

Das bestbekannte Autoantigen der RA ist zugleich nicht gewebespezifisch, sondern kann nahezu ubiquitär auftreten. Es ist das Immunglobulin G (IgG) als das Ziel weiterer Antikörper, der sogenannten Rheumafaktoren (RF). Der Rheumafaktor ist nach wie vor der einzige serologische Parameter, der in den American College of Rheumatology (ACR)-Kriterien enthalten ist. Die pathologische Relevanz der RF für die RA wird immer noch kontrovers diskutiert, weil RF auch bei Patienten mit SLE, Sjögren Syndrom, Endokarditis, Lebererkrankungen und sogar bei Gesunden vorkommen. Der RF-Titer ist nicht streng mit klinischer oder serologischer Aktivität der RA oder der Gelenkzerstörung korreliert.

hnRNP A2-Protein (RA33)

Das A2-Protein von humanen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) ist ein ubiquitäres Protein, das ursprünglich als RA33 Autoantigen beschrieben wurde. Nachfolgend wurde dessen Identität mit der A2-Komponente gezeigt wie auch die Reaktivität mit Seren von Patienten mit SLE, Mischkollagenosen (Mixed Connective Tissue Disease; MCTD) und anderen. A2 ist mit zahlreichen anderen Faktoren komplexiert, die zusammengesetzt die hnRNPs im Zellkern ausmachen. Die exakte Funktion des A2 ist unbekannt, jedoch nimmt man eine Funktion beim Splicing der humanen nukleären Ribonukleinsäure (hnRNA) an. Daher hat A2 auch zwei RNA-Bindungsdomänen sowie ein Kernimport/-export-Signal. Antikörper bei RA und SLE richten sich gegen die Region zwischen den RNA-Bindungsdomänen, während die von MCTD-Patienten (Mixed Connective Tissue Disease – Mischkollagenose) ein diskontinuierliches Epitop erkennen, das sich aus beiden RNA-Bindungsdomänen zusammensetzt. Es ist noch nicht klar, wie das Immunsystem mit A2 in Kontakt kommt. Aus Sicht des Homunculus sind jedoch hnRNPs gute Kandidaten-Antigene für die RA. Bislang lässt sich aber nur spekulieren, dass unter bestimmten Umständen A2 an die Zelloberfläche gelangt, so z.B. beim Zerfall von Zellen im Rahmen einer Entzündung.

Calpastatin

Calpastatin ist ein ubiquitäres zytoplasmatisches Protein mit einer molekularen Masse von 72k und vier inhibitorischen Domänen für Calpaine. Calpaine umfassen eine Familie von Cystein-Proteasen, die unter dem Verdacht stehen, an der Gelenkzerstörung bei rheumatischen Erkrankungen beteiligt zu sein. Calpaine kommen zytoplasmatisch vor und sind stringent reguliert durch Calciumionen für die Aktivierung und durch Calpastatin für die Inhibition. Nach Aktivierung von Zellen kommt Calpastatin auch extrazellulär vor und ist derart für Antikörper zugänglich. Calpastatin wird durch Autoantikörper erkannt bei Patienten mit RA, SLE, Polymyositis/Dermatomyositis (PM/DM), MCTD, aktivierter Arthrose und venöser Thrombose. Im Tiernmodell an Calpastatin-defizienten Ratten lassen sich keine

WO 02/097125

PCT/DE02/02010

9

Symptome einer Arthritis auslösen. Calpastatin, Calpaine und Calpastatin-spezifische Antikörper kommen in den entzündeten Gelenken von RA- und OA-Patienten vor und können daher in die Pathogenese dieser Erkrankungen involviert sein.

Calreticulin

- 5 Calreticulin ist ein ubiquitäres Protein des endoplasmatischen Reticulum (ER), welches unter bestimmten Bedingungen auch im Zellkern, dem Zytoplasma und auf der Zelloberfläche vorkommt. Es ist ein hoch konserviertes Ca^{++} -bindendes Protein. Calreticulin ist das Ziel von Autoantikörpern bei verschiedenen Erkrankungen autoimmunen oder entzündlichen Ursprungs, im wesentlichen bei SLE und Onchozerkose, aber auch bei RA. Schließlich bindet der RA-assoziierte Haplotyp DR4Dw4/DR53
10 ein Peptid aus Calreticulin.

BiP (Heavy Chain Binding Protein)

- Ein weiteres vielversprechendes Zielantigen für den Homunculus der RA ist das ubiquitäre BiP (Binding Protein), das ursprünglich als Heavy Chain Binding Protein beschrieben wurde, da es mit den schweren Ketten von Immunglobulinen interagiert. BiP ist selbst ein residentes ER-Protein und besitzt
15 eine Peptidsequenz, die dafür sorgt, dass es normalerweise nicht exportiert wird. Mittlerweile ist bekannt, dass BiP ein sogenanntes molekulares Chaperon (Anstands dame) ist und als solches mit den meisten Proteinen interagiert, die in das endoplasmatische Reticulum (ER) befördert werden und den sekretorischen Weg beschreiten. Über diese essentielle Funktionalität hinaus wird BiP durch Stressfaktoren wie Schwermetallionen oder Agenzien, die den Calciumionen-Haushalt der Zelle oder
20 die Integrität der Proteinbiosynthese beeinflussen, überexprimiert. Es kann unter diesen Bedingungen dann sogar im Zellkern, aber auch auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

- BiP ist das Ziel autoreaktiver Antikörper und T-Zellen bei 66% der RA-Patienten und ursprünglich vor dem Hintergrund der RA als p68 beschrieben. Die Krankheitspezifität dieser Autoantikörper liegt mit
25 99% extrem hoch. Das Antigen ist O-glykosyliert, und es wird spekuliert, dass diese Modifikation eine regulatorische Funktion wie Mono-O-GlcNAc bei vielen anderen Proteinen haben könnte. In diesen Proteinen ist der Schalter von der O-GlcNAc zur O-Phosphat-Modifikation mit einem Wechsel des Aktivierungszustandes oder des zellulären Kompartments gekoppelt. Ähnlich könnte ein stressinduzierter Shift des BiP von ER zu Kern oder Zelloberfläche von pathogenetischer Bedeutung sein. Die eher unnatürliche Präsenz von BiP auf der Zelloberfläche könnte als Alarm- und
30 Aktivierungssignal für andere Zellen gelten, so auch für Zellen des Immunsystems. Bei der RA könnte eine solche Aktivierung durch eine lokale Infektion oder durch anderweitig entzündlich beschädigtes Gewebe geschehen. BiP könnte durch Zell- oder Gewebebeschädigung auf die Oberfläche geschädigter Zellen gelangen und dort dann Ziel autoreaktiver T-Zellen werden. Es gibt Anzeichen dafür, dass diese BiP-reaktiven T-Zellen auch natürlicherweise vorkommen, welche nach Abklingen
35 der verursachenden Bedingungen durch regulatorische T-Zellen wieder herunterreguliert werden. Diese regulatorischen Zellen sind antigenspezifisch und HLA-restringiert. Dabei ist offenbar die HLA-

WO 02/097125

10

PCT/DE02/02010

Restriktion der regulatorischen T-Zellen unterschieden von der HLA-Restriktion der Effektor-T-Zellen und lässt sich spezifisch inhibieren. Hier könnte insbesondere auch wieder das Epitop O-GlcNAc eine besondere Rolle spielen: Es ist gut denkbar, dass dieses Epitop nicht nur Ziel der Autoantikörper- sondern auch der T-Zell-Antwort ist.

5 p205

Ein weiteres Protein, das aus Synovialflüssigkeit isoliert wurde, dessen Funktion jedoch weit über dieses Kompartiment hinaus geht, ist das p205-Antigen. Es ist Ziel autoreaktiver T-Zellen bei RA-Patienten. p205 wird auch in der Synovialmembran exprimiert und ist wahrscheinlich dasjenige Antigen mit der höchsten T-Zell-stimulatorischen Kapazität bei der RA überhaupt und erreicht teilweise sogar die Proliferationsrate, die mit Synovialflüssigkeit oder gar mit dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA) erzielt werden kann. Die Funktion des p205-Antigens ist noch unbekannt. Es besitzt jedoch eine 11 Aminosäuren lange Sequenz, die identisch mit einem Bereich aus IgG ist, nämlich in der Region zwischen den konstanten Domänen C_H2 und C_H3, einem Bereich, in dem Rheumafaktoren binden. Dieser Bereich des p205 wird sowohl von monoklonalen Rheumafaktoren gebunden als auch von autoreaktiven T-Zellen erkannt. Ferner leisten p205-spezifische T-Zellen bei Stimulation mit cognatem Antigen B-Zell-Hilfe zur Sekretion von Rheumafaktoren. Es ist daher anzunehmen, dass hiermit erstmalig ein Antigen gefunden ist, das T-Zell-Reaktivität aufweist und darüber hinaus in der Lage ist, B-Zellen mit Spezifität für IgG Hilfe zur Affinitätsreifung zu geben. Im Gegensatz dazu konnte eine T-Zell-Reaktivität gegen intaktes IgG oder IgG-Fragmente bislang nicht gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Aminosäuresequenz des p205 um ein Peptid, das *in vivo* bei der Prozessierung von IgG offenbar nicht oder in nicht ausreichenden Mengen entsteht. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass Autoreaktivität gegen p205 die Produktion von Rheumafaktoren bei der RA induziert.

Diese Zusammenstellung RA-assoziiierter Autoreaktivitäten zeigt, dass viele verschiedene Autoantigene im Verlauf der RA zum Ziel des Immunsystems werden. Diese werden in mehr oder weniger starkem Ausmaß auch bei anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen, bis hin zum gesunden Zustand, Ziel des Immunsystems. Es bleibt somit festzustellen, dass nach dem Stand der Technik keine Autoreaktivität für sich alleine genommen geeignet ist, die Diagnostik der RA, weder in den Frühstadien noch im Verlauf oder für das Monitoring von Therapie, zu verbessern.

30

Das Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, chronisch entzündliche Gelenkerkrankungen besser erkennbar und behandelbar zu machen. Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der nachfolgend beschriebenen "Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung bei

WO 02/097125

11

PCT/DE02/02010

chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen" und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen gelöst.

5 High-Throughput Verfahren wie DNA-Array- oder Protein-Array-Technologie ermöglichen die gleichzeitige Bestimmung einer großen Anzahl verschiedener Parameter (9). Es können Gen-Expressionen bestimmt werden auf mRNA-Ebene mittels DNA-Arrays durch Hybridisierung von markierten RNA oder cDNA-Proben und auf Protein-Ebene mittels Arrays von ausgewählten Protein-spezifischen Antikörpern (10). Ferner können Immunreaktivitäten mittels Arrays von ausgewählten Antigenen erfasst werden (11).

10 Zunächst ist erforderlich, die Gene und Proteine zu definieren, die für die Erkrankung relevant sind und zur Beurteilung herangezogen werden.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge zur Diagnostik und Therapie-Entwicklung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen beruhen auf der Verwendung einer solchen definierten Auswahl von Parametern (Tabelle 1 und 2). Unter Verwendung dieser hier genannten Gene zur Genexpressionsanalytik im Array-Verfahren wird eine grundsätzlich neue Diagnostik ermöglicht.

15 Für DNA-Arrays zur Bestimmung spezifischer mRNA-Expressionsmuster bei Arthritiden können die in Tabelle 1 benannten Gene in ihrer Gesamtheit verwendet werden, sowie solche Gene in ihrer Gesamtheit, die für die Proteine, die in Tabelle 2 benannt sind, kodieren; darüber hinaus sind auch Gene oder Teilsequenzen einzelner oder einer Auswahl der in Tabelle 1 genannten Gene nutzbar, oder Teilsequenzen sowie Gene oder Teilsequenzen einzelner oder einer Auswahl der Gene oder
20 Teilsequenzen, die die in Tabelle 2 genannten Proteinen kodieren.

Für die Charakterisierung der Autoimmunreaktivitäten können die in Tabelle 2 benannten Proteine in ihrer Gesamtheit verwendet werden, sowie solche Proteine, die von den in Tabelle 1 benannten Genen kodiert werden. Ferner können auch eine reduzierte Auswahl dieser Proteine, ausgewählte Teile der Proteine in Form von Oligo- oder Polypeptiden oder auch Modifikationen derselben zum Einsatz
25 kommen. Auf Protein-Ebene sind insbesondere auch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung etc.) zu berücksichtigen, die für eine Diskriminierung zwischen rheumatischen Erkrankungen relevant sein können. Die Proteine, Protein-Teilsequenzen sowie modifizierte Proteine und Protein-Teilsequenzen werden zusammen oder einzeln oder in Gruppen auf eine Trägermatrix aufgebracht, die geeignet ist, Patienten-Antikörper auf ihre Reaktivität gegenüber
30 einer oder mehrerer dieser Komponenten zu bestimmen. In der Folge ergibt sich für einen Patienten ein Profil von Reaktivitäten und Nicht-Reaktivitäten. Der gravierende Unterschied zwischen der Diagnostik nach dem Stand der Technik und der hier dargestellten ist die Ermittlung und Analyse jeweils einzelner Autoreaktivitäten bei dem Stand der Technik und der Ermittlung und Analyse einer Vielzahl von Autoreaktivitäten nach der Erfindung. Die Erfindung macht sich die unerwartete
35 Entdeckung zu Nutze, dass die Zusammenfassung mehrerer - für sich genommen ungeeigneter Autoreaktivitäten - zu einem oder mehreren Profilen, die beispielsweise eine RA in 100% der Fälle

WO 02/097125

12

PCT/DE02/02010

von einer Nicht-RA (also anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen wie auch von dem gesunden Zustand) diskriminieren können. Die Zuordnung zu diskriminatorisch wirksamen Profilen erfolgt über einen geeigneten Algorithmus, optimal über einen selbst-lernenden, der in der Lage ist, auch zu einem späteren Zeitpunkt gewonnene Erkenntnisse einfließen zu lassen.

- 5 Für die Bestimmung von Proteinexpressionsmustern wurden Array-Systeme entwickelt aus proteinspezifischen Antikörpern. Durch Markierung der Proteine aus einem Proteinextrakt einer Probe können diese quantitativ nach spezifischer Bindung an ihren Antikörper auf dem Array nachgewiesen werden (10). Dementsprechend wird als molekulares Werkzeug im Sinne der Erfindung ein Array definiert, der aus verschiedenen Antikörpern oder Molekülen mit vergleichbarem proteinspezifischen
- 10 Bindungsverhalten besteht, die zum Nachweis aller oder einer Auswahl der von den Genen der Tabelle 1 abgeleiteten Proteine oder aller bzw. einer Auswahl der Proteine der Tabelle 2 dienen können.

- Für die Diagnostik werden Biopsien aus dem Synovialgewebe, Synovialflüssigkeit, Blutzellen und auch Serum bzw. Plasma für die unterschiedlichen Array-Untersuchungen verwendet. Dabei können
- 15 die humoralen Autoreaktivitäten in den flüssigen Proben, die zellulären mit Blut- oder Synovialgewebszellen untersucht werden. Die Proteinexpression lässt sich in allen genannten Proben untersuchen, die Genexpression auf mRNA-Ebene im Synovialgewebe, in Zellen in der Synovialflüssigkeit oder in Blutzellen.

- Für die Untersuchung mittels DNA-Arrays wird aus dem Gewebe oder den Zellproben aus Blut bzw.
- 20 Synovialflüssigkeit die RNA extrahiert. Unter Verwendung etablierter Protokolle für die Amplifikation (12) und die Markierung der abgeleiteten cDNA bzw. cRNA (13) wird eine Probe für eine DNA-Array-Hybridisierung hergestellt.

- Die in der Tabelle genannten Gene liefern mit ihrer bekannten Sequenz (siehe Accession-Nummer GeneBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die Vorlage, um für jedes Gen spezifische Sonden
- 25 abzuleiten. Diese Sonden werden in einem Array zusammengestellt, entweder durch Auftragen der fertigen Sonden über spezifische Druckverfahren (14) oder durch ortsspezifische Synthese wie bei der Photolithographie auf eine Festphase (15, 16).

- Die Hybridisierung der markierten Probe auf dem Array liefert über die orts- und genspezifische Bindung quantitative Signale, die in ein Expressionsprofil /-muster übersetzt werden können. Die
- 30 Muster werden mit verschiedenen etablierten Methoden der Beurteilung korreliert, einschließlich der histologischen Merkmale und der Klassifikation. Durch zusätzlichen Vergleich mit verschiedenen Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis, der Psoriasisarthritis, reaktiven Arthritiden oder anderen z.B. auch undifferenzierten Arthritiden erlaubt dies eine Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen gemäß dem jeweils entsprechenden Expressionsprofil.

Neuartigkeit des Ansatzes

Um zuverlässige Parameter für die Array-Untersuchung zu definieren, die eine Gruppierung und Beurteilung der Gelenkerkrankungen zulassen, wurden umfangreiche Vergleichsuntersuchungen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Gelenkerkrankungen herangezogen und eine bislang
5 erstmalig verwendete Kombination von verschiedenen, sich zum Teil ergänzenden Methoden gewählt.

So wurde Synovialgewebe von RA, Osteoarthritis und normalen Gelenken untersucht. Zur differentiellen Genexpressionsanalyse wurde zunächst die "representational difference analysis" (17, 18) durchgeführt. Sie besitzt den Vorteil, dass alle in der Probe vorhandenen mRNAs berücksichtigt werden, auch dann, wenn ihre Sequenz bislang noch unbekannt ist. Der Nachteil besteht in einer
10 starken Selektion der ausgeprägtesten Expressionsunterschiede. Ergänzend dazu wurde deshalb zusätzlich die Genexpression mittels zwei verschiedener Methoden der DNA-Array-Hybridisierung durchgeführt, zum einen auf cDNA Filter-Arrays (19), zum anderen auf Oligonucleotid Mikro-Arrays (U.S. Patente Nr. 5,445,934; 5,744,305; 5,700,637 und 5,945,334 sowie EP 619321 und 373203). Diese ermöglichen es nach dem heutigen Kenntnisstand, weitgehend alle bekannten humanen Gene zu
15 berücksichtigen und für jedes dieser Gene individuell die Expression vergleichend zwischen den Gewebeprobe darzustellen. Schließlich wurde mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion (PCR) (real-time PCR) die differentielle Genexpression für ausgewählte Gene an einem größeren Probenkollektiv verifiziert.

Außerdem wurden Gewebe histologisch charakterisiert und entsprechend der histologischen
20 Einteilung auch mit dem zugehörigen differentiellen Genexpressionsmuster verglichen. Es wurden die in der Tabelle 1 aufgeführten Gene als differentiell exprimierte Gene sowohl zwischen den verschiedenen chronischen Gelenkerkrankungen und auch gegenüber normalem Synovialgewebe identifiziert. Damit sind diese Gene bedeutsam für die Charakterisierung der chronischen Gelenkerkrankungen.

Es besteht somit auch eine Neuartigkeit im gewählten Ansatz, die relevanten Gene zu identifizieren. Zum anderen zeigte die Liste der gefundenen Gene, dass die meisten bislang noch nicht mit entzündlich-rheumatischen Gelenkerkrankungen in Verbindung gebracht wurden und ebenfalls
25 neuartige Bewertungskriterien für die Diagnostik, die Erforschung der Pathophysiologie und die Behandlung der chronischen Gelenkerkrankungen liefern.

Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte
30 Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Diese Merkmale setzen sich aus bekannten Elementen – den in Tabelle 1 benannten Genen oder Teilsequenzen sowie solchen Genen oder Teilsequenzen, die für die Proteine, die in Tabelle 2 benannt sind, kodieren – und neuen
35 Elementen – den neuen Werkzeugen, die auf der Verwendung einer definierten Auswahl von Parametern (Tabelle 1 und 2) beruhen – zusammen, die in ihrer Kombination zu den

WO 02/097125

14

PCT/DE02/02010

erfindungsgemäßen Werkzeugen führen und unter Verwendung der genannten Gene zur Genexpressionsanalytik im Array-Verfahren eine grundsätzlich neue Diagnostik und Therapie-Entwicklung bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ermöglichen.

5 Die erfindungsgemäßen Werkzeuge beruhen auf der Verwendung eines High-Throughput Verfahrens der (Micro-) Array-Hybridisierung und / oder eines High-Throughput Verfahrens mit Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion zur (Semi-) Quantifizierung.

10 Sie sind des weiteren dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einer markierten Patientenprobe und einer zweiten unterschiedlich markierten Kontrollprobe zur vergleichenden Doppel-Hybridisierung an einen (Micro-) Array zusammen mit der Patientenprobe (rot/grün Vergleichs-Hybridisierung) beruhen. Es können die Proben auch auf getrennten Arrays untersucht werden und danach miteinander verglichen werden.

Erfindungsgemäß handelt es sich um Werkzeuge für diagnostische Zwecke, die auf der Verwendung
- einzelner, einer Auswahl oder aller aus den Gensequenzen in Anspruch 1 bis 3 abgeleiteten Proteine bzw. Peptide

15 - einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind sowie

- von Teilsequenzen einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 1 genannt sind

beruhen.

20 Sie beziehen Proteine oder Protein-Teilsequenzen ein, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 abgeleiteten Proteinen oder den in der Tabelle 2 genannten Proteinen sind oder mindestens 80% Sequenzidentität besitzen. Des weiteren sind sie dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von

25 - High-Throughput Verfahren in der Protein-Expressionsanalytik (hochauflösende, zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese, MALDI-Techniken)

- High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von Autoantikörpern als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

30 - High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen sowie

- Nicht-High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen

WO 02/097125

15

PCT/DE02/02010

beruhen.

Ferner beruhen die erfindungsgemäßen Werkzeuge auf der Verwendung

- von Antikörpern, die spezifisch für Proteine oder Teilsequenzen sind, die unter den Ansprüchen 6 bis 9 aufgeführt sind sowie

- 5 - der entsprechenden homologen Sequenzen einer anderen Spezies zur Analytik in Tierexperimenten oder zur Diagnostik bei Tieren mit entzündlichen Gelenkerkrankungen und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen.

Die erfindungsgemäßen Werkzeuge eignen sich als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen)

- 10 - in den unter Anspruch 1 bis 3 genannten Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren) sowie
- in den Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren), die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren.

- 15 Ferner eignen sie sich als Werkzeuge zur molekularen Definition entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide sowie der Proteine und Protein-Teilsequenzen aus Anspruch 6 bis 9 oder den dafür codierenden Gensequenzen.

- 20 Die erfindungsgemäßen Werkzeuge werden des weiteren eingesetzt
- zum Therapie-Entscheid entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide

- 25 - zur Verlaufskontrolle/Therapiekontrolle entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide

- als molekulare Werkzeuge zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene oder Gensequenzen beinhalten

- 30 - zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 6 bis 9 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen zum Inhalt haben

- zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung autoreaktiver T-Zellen, gerichtet gegen die in Anspruch 8 bis 11 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen, beinhalten

WO 02/097125

16

PCT/DE02/02010

- zur Beeinflussung der biologischen Wirkung der aus den in Anspruch 1 bis 3 benannten Gensequenzen abgeleiteten Proteine
 - zur Beeinflussung der unmittelbaren molekularen Regelkreise, in die die in Anspruch 1 bis 3 benannten Gene und davon abgeleiteten Proteine eingebunden sind
 - 5 - zur Entwicklung von Therapiekonzepten unter Design und Verwendung von Interpretationsalgorithmen, die die genannten Gene und Sequenzen und deren Regulationsmechanismen verwenden, um Therapiekonzepte, -wirkungen, -optimierungen oder Krankheitsprognosen erkennen zu lassen oder vorausszusagen sowie
 - zur Entwicklung von biologisch wirksamen Medikamenten (Biologicals) unter Verwendung von
 - 10 Genen, Gensequenzen, Regulation von Genen oder Gensequenzen, oder unter Verwendung von Proteinen, Proteinsequenzen, Fusionsproteinen nach Ansprüchen 1 bis 3 und 6 bis 9 oder unter Verwendung von Antikörpern oder autoreaktiven T-Zellen nach den Ansprüchen 10 bis 14.
- Die erfindungsgemäße Verwendung der beanspruchten Werkzeuge liegt in der
- Untersuchung von Blutproben oder Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik
 - 15 - Anwendung in der Analytik nach Beispiel 1 sowie in der
 - Anwendung für Therapiekonzepte nach Beispiel 2.

Material und Methoden

Patienten und Gewebeasservierung

- 20 Alle Patienten wurden nach den ACR-Kriterien für RA (1) und OA (20) ausgewählt. Synovialgewebe wurde in RPMI-Medium (RPMI – handelsübliches Zellkulturmedium, Verdünnungsmedium RPMI 1640; Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519 - 524, 1967), unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin (je 100U/ml), vom Operationssaal direkt ins Labor gebracht. Nach Präparation der Synovialmembran wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der
 - 25 Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80°C. Es wurden für die Representational Difference Analysis (RDA), die Hybridisierungen auf Unigene Filter-Arrays (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) und die Hybridisierung auf Affymetrix Arrays Normalspender (ND), Osteoarthritis (OA) und rheumatoide Arthritis Synovialgewebeproben verwendet.
 - 30 *RNA-Isolation*
- Zur RNA-Gewinnung wurden die Proben homogenisiert: Gewebemengen <50mg wurden mit Mörser und Pistill unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und anschließend in

WO 02/097125

17

PCT/DE02/02010

- Guanidinium-Isothiocyanat enthaltender Lösung (RLT-Puffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland – www.qiagen.com/literature/handbooks/ma/my96/1019545_PREHB_RNY96_prot2.pdf) lysiert. Größere Gewebemengen wurden mit einem Gewebe-Homogenisator; IKA-Ultra-Turrax T 25 (Jahnke & Kunkel, Staufen) in eiskalter Guanidinium-Isothiocyanat enthaltender Lösung (RLT-Puffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) zerkleinert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit einem modifizierten Protokoll, das die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski (21) nutzt und anschließend aus der wässrigen Phase sofort die RNA mittels QIAGEN-RNeasy-Kit (Handbuch des Herstellers <http://www.qiagen.com/literature/rnalit.asp#mini>) extrahiert. Der Kit wurde gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt. Die RNA wurde in 30-100µl RNase-freies Wasser eluiert.
- 5
- 10 Zur Qualitätskontrolle wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD₂₆₀) gemessen, das Verhältnis OD₂₆₀/OD_{280nm} bestimmt und eine Gelelektrophorese in 1%-iger Agarose durchgeführt. DNA-Kontaminationen konnten gegebenenfalls entweder im Gel detektiert oder nach Erststrangsynthese in einer PCR mit einem Intron-Primer für Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen werden. In diesen Ausnahmefällen wurde zusätzlich mit DNase verdaut, entsprechend dem Protokoll von QIAGEN.
- 15

Erststrangsynthese

- Für die cDNA-Synthese wurde Superscript II Reverse Transcriptase (RT), einschließlich des 5-fach-Reaktionspuffers von Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland <http://www.invitrogen.com>) verwendet. Die eingesetzten RNA-Mengen betragen 3-5µg für die semiquantitative PCR sowie 10-20µg für die RDA und die Array-Hybridisierungen in einem Endvolumen von 20µl. Der Reaktionsansatz für die Umschreibung in cDNA enthielt folgende Komponenten: 500ng des jeweiligen Oligonukleotids (Oligo(dT)₁₂₋₁₈; T7-Oligo (dT)₃₀) als Primer, 50 mM Tris, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, deoxy-Nukleotid-Triphosphat (dNTP) Mischung mit jedem Nukleotid in 1mM Endkonzentration, 40U RNase-Inhibitor and 20U Superscript™II RT. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde und 30min., und im Anschluss daran erfolgte die Inaktivierung der Enzyme durch 15min. Erhitzen auf 72°C.
- 20
- 25

Zweitstrangsynthese

- Zur cDNA wurden 90µl Aqua dest. pipettiert, 30µl 5fach-Zweitstrangpuffer folgender Zusammensetzung: 500mM KCl, 50mM Ammoniumacetat, 25mM MgCl₂, 0,75mM beta-Nikotinamid-Adenen Dinukleotid (β-NAD) und 0,25mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA) sowie 3µl einer 10mM dNTP-Lösung und Enzymlösung folgender Aktivitäten und Mengen: 1µl E.coli Ligase (10U/µl), 4µl DNA Polymerase I (10U/µl) und 1µl RNaseH (2U/µl)(Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Die Inkubation betrug 2 Stunden bei einer Temperatur von 16°C. Nach Zusatz von 2µl einer T4-DNA-Polymerase (5U/µl) wurde für weitere 30 min. bei 16°C inkubiert.
- 30

WO 02/097125

18

PCT/DE02/02010

Subtraktive Hybridisierung und RDA

Die PCR Suppression Subtractive Hybridization (SSH) (22) wurde nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers des PCR Select Kits (Clontech, Paltto Alto, USA <http://www.clontech.com/pcr-select/index.shtml>) durchgeführt. Der Verdau der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit dem Restriktionsenzym RsaI von *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Für die RDA (18) wurde die doppelsträngige cDNA mit dem Restriktionsenzym DPNII –von *Diplococcus pneumoniae* (20U in 100µl) geschnitten. Anschließend wurde an Adapterprimer (RBgl12, RBgl24) ligiert und amplifiziert gemäß publizierten Protokollen (17, 18). Das Tester-Amplikon wurde nach erneutem Restriktionsverdau mit DPNII durch Ligation an ein weiteres Adapter-Oligonukleotid erhalten (JBgl12 und JBgl24 bzw. NBgl 12 und NBgl24(18)) in der zweiten Subtraktionsrunde.

Nach der Hybridisierung wurden bei beiden Methoden die sich vom Tester ableitenden Sequenzen selektiv über PCR amplifiziert und dadurch im Subtraktionsprodukt angereichert.

Beschreibung der Subtraktionsansätze

Die RDA-Protokolle wurden so variiert, dass es möglich war, sowohl geringer wie auch verstärkt exprimierte Gene in den Proben von RA, OA und Normalspendergeweben zu identifizieren.

Dabei wurde:

- 1 OA (Driver) subtrahiert von RA (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die stärker in RA als in OA-Geweben exprimiert sind
- 2 RA (Driver) subtrahiert von ND (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die in RA geringer exprimiert sind als in ND-Proben
- 3 ND (Driver) subtrahiert von OA (Tester), um Sequenzen zu erhalten, die stärker in OA als in ND-Geweben exprimiert sind

Herstellung der Subtraktionsbanken- Klonierung, Sequenzierung und Datenbankvergleiche

Die Subtraktionsprodukte des SSH-Ansatzes wurden in einen pCRII vector (TA-Cloning Kit; Invitrogen, Heidelberg, Germany <http://www.invitrogen.com>) kloniert. Die Subtraktionsprodukte aus der RDA wurden in einen pBluescript KS^{II} vector (Stratagene, La Jolla, USA <http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm>) kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym BamHI von *Bacillus amyloliquefaciens* geschnitten und anschließend dephosphoryliert und gereinigt wurde. Etwa 150 Klone wurden isoliert und sequenziert unter Verwendung eines ABI 377 Sequenzier-Gerätes (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany <http://home.appliedbiosystems.com>). Sequenziert wurde nach dem Dye Terminator Chemistry Protokoll des Herstellers unter Verwendung eines T7-Primers.

Die Sequenzvergleiche erfolgten nach Eliminierung der Vektorsequenzen unter Nutzung der Genebank und NCBI-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

WO 02/097125

19

PCT/DE02/02010

Microarray-Hybridisierung

Es wurden zwei verschiedene Chiptechnologien eingesetzt: 1.) Es wurden Filter benutzt, auf denen PCR-Produkte von cDNA-Klonen der UNIGENE Bibliothek (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) gespottet waren. Die Hybridisierung erfolgte dabei bei 65°C mit ³²P-markierten cDNA-Proben nach Erststrangsynthese mit Oligo(dT₍₁₂₋₁₈₎)(23, 24). 2.) Es erfolgten mit MicroArrays (HU95A; HU95B, HU95C, HU95D und HU95E) der Firma Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA www.affymetrix.com) Hybridisierungen, bei denen es sich um Oligonucleotid-Arrays handelt, deren Basenfolge sich von 12.000 bekannten Genen und 24.000 Expressed Sequence Tag (EST-) Einträgen ableitet. Die Synthese der markierten Proben erfolgte entsprechend dem technischen Manual des Herstellers (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA).

Die fluoreszenz-markierte Probe wird synthetisiert nach Umschreibung mit einem Oligo-dT₂₄-Primer, der eine T7-Polymerase-Bindungsstelle besitzt. Die Markierungsreaktion erfolgte mit T7-RNA-Polymerase und biotinylierten dNTPs entsprechend dem Hersteller-Protokoll (ENZO-Biochem, New York, USA, <http://www.enzo.com/entrance.html>).

In beiden Chip-Analysen wurden die zu testende Probe und die Referenzprobe auf separaten Filtern hybridisiert. Der Vergleich der Signal-Intensitäten erfolgte nach Normalisierung.

Auswertung der Chipergebnisse- Entscheidungsmatrix

Auswertung der Signal-Intensitäten erfolgte mit der für den entsprechenden Array entwickelten Software nach Normalisierung und Ermitteln eines Intensitätswertes für die entsprechende Probe gemäß der Tukey's Biweight Methode (<http://mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html>).

Für die Auswertung der Unigene-Filterarrays wurde der Algorithmus am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem entwickelt (<http://algorithmics.molgen.mpg.de/>), für die Chips der Firma Affymetrix wurde die MicroArraySuite 5.0 Software (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/mas.affx>) einschließlich der Standardeinstellungen bzw. Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

Für die Auswertung der Affymetrix-Arrays wurde für die Normalisierung der Daten die Target Intensität auf 100 und der Normalisierungsfaktor auf 1 gesetzt und der Skalierungsfaktor für jede Probe errechnet. Chips mit vergleichbaren Skalierungsfaktoren (Faktor < 4) wurden in die Vergleichsanalysen einbezogen. Entscheidungskriterium für den Nachweis eines Gens (Detection p Value) wurde auf < 0.05 eingestellt. Unter Nutzung der DMT 3.0 Software (<http://www.affymetrix.com/products/software/specific/dmt.affx>) von Affymetrix wurden die Vergleichsanalysen für die entsprechenden Arrays durchgeführt.

Dabei werden im Wilcoxon-Test (<http://faculty.vassar.edu/lowry/wilcoxon.html>) die Differenzen zwischen den Perfekt Matches und den Perfekt- und Mismatch-Intensitäten berechnet und mit dem Entscheidungskriterium Cut-Off (γ -Wert < 0.04) verglichen. In der Ausgabe der Ergebnisse für den

WO 02/097125

20

PCT/DE02/02010

Vergleich der jeweiligen Chips wird ein Change- Call (erhöht, marginal erhöht, keine Änderung oder erniedrigt) sowie das Signal Log Ratio, ein Maß für den Faktor der Änderung angegeben (logarithmierter Faktor).

Entscheidungskriterium:

- 5 Es wurden jeweils für alle Proben die Vergleichsanalysen (jede Probe gegen jede der anderen Gruppe: ND, OA, RA) durchgeführt.

Für die Unigene-Filterhybridisierungen wurde ein Signalunterschied >2 für mindestens 3 von 4 Vergleichen und ein Detektionssignal mit einem p-Wert <0,01 berücksichtigt.

- 10 Für die Arrays der Firma Affymetrix wurde wie folgt verfahren: Jede RA-Probe wurde mit jeder der OA-Proben sowohl in Richtung erhöhter, wie auch erniedrigter Expression verglichen. Gene, die in 80% dieser Vergleiche eine Auslenkung im Sinne „erhöht“ bzw. „erniedrigt“ anzeigten bei einem Regulationsfaktor > 2 (Signal Log Ratio >1), wurden als Kandidatengene ausgewählt. Im U95A Chip wurde das Auswahlkriterium auf einen Regulationsfaktor >3 gesetzt.

Semiquantitative PCR

- 15 Aus den detektierten Sequenzbereichen wurden Primer ausgewählt, die eine vergleichbare Annealingtemperatur und Produktlänge aufwiesen. Zur Primersuche wurde die DNASTAR Primer Select Software (DNASTAR Inc., Madison, USA <http://www.dnastar.com/>) verwendet. Die Primersynthese erfolgte bei Gibco-Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland). Für die Semiquantifizierung der PCR-Produkte wurde das real time PCR-System GeneAmp 5700 und der
- 20 Sybr-Green-PCR-Core Kit (Applied Biosystem, Weiterstedt, Germany; <http://europe.appliedbiosystems.com/>) eingesetzt.

Die cDNA-Mengen wurden für alle Proben anhand der real-time-Amplifikationsergebnisse für GAPDH-spezifische Primer aufeinander abgestimmt. Die Quantifizierung der PCR-Produkte verschiedener weiterer Gene erfolgte in Relation zum GAPDH-spezifischen Produkt als internem

- 25 Standard. Zur Kontrolle wurde für alle Proben B-Actin amplifiziert und als zweites Haushaltsgen mitbestimmt.

Genbezeichnung	AccNr	Primer-Lokalisation	Produktlänge (bp)
VDUP1	NM006472	665...684 / 863...840	199
TIMP4	U76456	143...159 / 336...317	194
GPX3	NM002084	424...443 / 528...510	105
β Actin	X00351-	654...675 / 841...819	188
MMP1	X05231	874...895 / 1080...1057	207
MMP3	X05232	973...996 / 1157...1136	185

WO 02/097125

21

PCT/DE02/02010

LITBP4	M22490	511...534 / 760...737	250
GADD45	M60974	457...475 / 573...557	116
CLU	NM001831	1384...1404 / 1509...1489	126
Cal2	NM001218	930...949 / 1 049...1031	196

Immunhistochemie

Eine Probe der Synovialmembran wurde für die histopathologische Beurteilung verwendet. Dazu wurden Kryoschnitte in einer Dicke von 6 µm angefertigt, luftgetrocknet und anschließend in einem 1:1 Gemisch aus Aceton und Methanol fixiert. Die Hämatoxylinfärbung wurde nach Standardprotokollen durchgeführt und nach histopathologischen Beurteilungskriterien unterteilt (25).

Methoden und Ergebnisse zur Immunom-Analyse

Um Autoreaktivitätsmuster auf dem T- und B-Zell-Level zu bestimmen (das Immunom), die spezifisch für die RA sind und die somit die Erkrankung von anderen rheumatischen und nicht-rheumatischen Erkrankungen diskriminiert. Die Kenntnis des RA-spezifischen Immunoms ist von herausragender Bedeutung, um diagnostische Werkzeuge zu entwickeln, die eine Arthritis sehr viel früher und sicherer als eine RA diagnostizieren bzw. als eine RA ausschließen als bislang möglich. Dieses wiederum erlaubt es, die RA medikamentös unter Kontrolle zu halten, bevor irreversible Gelenk- und Knochenschädigungen eingetreten sind.

Dazu wurden die Techniken der Proteomics eingesetzt, um durch hochauflösende 2D-Gelelektrophorese gewebespezifische Protein-Muster zu erzeugen. Diese wurden durch Techniken der Immunomics nach bekannten und unbekanntem Autoreaktivitäten gescreent. Proteinspots mit einer nutzbaren Sensitivität und Spezifität werden durch Sequenzierung und MALDI-TOF (26) identifiziert. Diese Proteine werden anschließend auf T-Zell-Autoreaktivität in derselben Kohorte gescreent.

Erfindungsgemäß sind Autoreaktivitätsmuster etabliert worden, die absolut RA-spezifisch sind. Bei dieser Analyse ist von großer Bedeutung, dass keine einzelne Autoreaktivität diese Spezifität erzielt hat. Dies wird erst durch die Kombination mehrerer Autoreaktivitäten erreicht. Solche Muster, die einen Patienten mit RA eindeutig unterscheiden von einem mit einer anderen rheumatischen oder nicht-rheumatischen Erkrankung, umfassen die Autoantigene citrullinierte Peptide (Cit), IgG, BiP (Heavy Chain Binding Protein), Calpastatin (Calp), RA33 (hnRNP A2) und Calreticulin (Calr). Die Tabelle zeigt alle möglichen Kombinationen von fünf dieser Autoreaktivitäten (RF, Cit, BiP, RA33 und Calp) sowie die beiden möglichen Zustände "positiv" und "negativ". Die hervorgehobenen Muster sind (statistisch signifikant, $p < 0.01$, Whitney U Test, <http://faculty.vassar.edu/lowry/tutest.html>) ausschließlich bei der RA exprimiert. Fig. 1 zeigt die Sensitivitäten aller möglicher Kombinationen für die RA sowie die Kontroll-Kohorten. Die RA-spezifischen Muster sind analog zu Tabelle 1 hervorgehoben und umfassen im wesentlichen diejenigen, die 4- und 5-fach positiv für die

WO 02/097125

22

PCT/DE02/02010

Einzelparameter sind. Die Kombination derjenigen Autoreaktivitätsprofile, die ausschließlich bei der RA auftreten, ergibt eine Sensitivität von 54%.

5 RA-exklusiv exprimierte Muster der drei Autoreaktivitäten, gerichtet gegen IgG, Cit und BiP (RF+Cit+BiP+ and RF-Cit+BiP+) ergeben eine Gesamtsensitivität von 43%. RA-exklusive Muster der vier Autoreaktivitäten, gerichtet gegen IgG, Cit, BiP und RA33 (RF+Cit+BiP+RA33+, RF+Cit+BiP-RA33+ and RF+Cit+BiP+RA33-) weisen eine Gesamtsensitivität von 40% auf. Bei der Analyse von sechs Mustern wird eine Sensitivität von 60% erzielt.

10 Ersten Untersuchungen zufolge sind diese Muster auch bei Patienten mit früher RA relevant. Weitere Kandidaten-Antigene, die bereits charakterisiert sind, umfassen das Sa-Antigen(5), das vermutlich aus α -Enolase und citrulliniertem Vimentin besteht.

Die Identifikation des Immunoms der RA ist nicht nur von diagnostischer, sondern auch von pathogenetischer Relevanz. Wenn diejenigen T-zellulären Autoreaktivitäten, die die frühe RA treiben, identifiziert sind, erscheint es möglich, spezifisch wirksame Therapie-Protokolle zu entwickeln.

	RF	Citrullin	BiP	Calpastatin	RA33
1	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	-	+	+	-	-
4	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	-	-	+	+
8	-	-	+	+	+
9	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-
11	+	+	-	+	-
12	-	+	-	+	+
13	+	+	+	-	-
14	+	+	-	-	+
15	-	+	+	-	+
16	+	-	+	-	+
17	-	-	+	+	-
18	-	-	-	+	+
19	-	+	-	+	-
20	+	-	-	+	-
21	+	-	-	-	+
22	-	-	+	-	+
23	+	-	+	-	-
24	-	+	+	-	-
25	+	+	-	-	-
26	-	+	-	-	+
27	-	-	-	+	-

WO 02/097125

23

PCT/DE02/02010

	RF	Citrullin	BiP	Calpastatin	RA33
28	-	-	+	-	-
29	-	-	-	-	+
30	-	+	-	-	-
31	+	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-

Tab. 1 Autoreaktivitätsmuster mit RF, Citrullin, BiP, Calpastatin und RA33

Dargestellt sind alle 32 möglichen Fünffach-Kombinationen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, BiP, Calpastatin und RA33. Die RA-spezifischen Kombinationen sind analog

5 Figur 1 farbig unterlegt.

Nutzen

Es werden komplexe molekulare Muster erfasst. Diese können durch mathematische Berechnungsmodelle in Gruppen und Verwandtschaftsgrade eingeteilt werden. Die daraus ableitbare Einteilung und das Wissen über die Assoziation z.B. mit der Dauer der Erkrankung, der klinischen Krankheitsaktivität (Disease Activity Score (Ref.)), der Entzündungsaktivität gemessen an der Erhöhung des C reaktiven Proteins oder Blutsenkung, der radiologischen Gelenkerstörung und dem spezifischen Medikamenteneinfluss lassen folgende Rückschlüsse aus der Array-Analyse ziehen: Zuordnung des Krankheitsbildes zu einer definierten Diagnose und zu einer molekular abgrenzbaren Untergruppe, Beurteilung der Krankheitsaktivität und der zu erwartenden Progredienz (Prognoseabschätzung), Erfolgsaussichten der verschiedenen Therapieformen, Empfehlung zum therapeutischen Vorgehen (z.B. Methotrexat statt Leflunomid oder Kombination Sulfasalazin mit Methotrexat statt Methotrexat allein) und schließlich Überwachung des Therapieerfolges.

Durch Einsatz vor und während definierter medikamentöser Behandlungsmaßnahmen kann erfasst werden, welche der verwendeten Gene durch das Medikament beeinflusst werden. Es wird damit gemessen, wie das Medikament die für die Krankheit typischerweise veränderte Genexpression beeinflusst. Daraus lassen sich ablesen, welche krankheitsassoziierten molekularen Veränderungen trotz Therapie immer noch aktiv sind. Aus der Kenntnis über die Funktion dieser pathologisch aktiven Gene lassen sich prinzipiell pathophysiologische Abläufe der Gelenkerkrankungen erschließen und neue Therapiekonzepte ableiten.

WO 02/097125

24

PCT/DE02/02010

*Zusammenstellung der Gene**Tabelle 1:*

Accession Nummer	Unigene Kodierung	Gen Name	Methode	Regulation
X57809	Hs.181125		RDA, Affymetrix	RA>OA
X58141			RDA	RA>OA
X63527	Hs.252723	ribosomal protein L19	RDA	RA>OA
U10362	Hs.75864	chromosome 5 open reading frame 8	RDA	RA>OA
M80244	Hs.184601	NM_003486	RDA	RA>OA
M24594	Hs.20315	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	RDA	OA>RA
U01244	Hs.79732	fibulin 1 isoform C precursor NM_006485	RDA	RA>OA
X02761	Hs.287820	fibronectin 1, isoform 1 preproprotein	RDA	RA>OA, OA>NS, NS>RA
L01124	Hs.165590	ribosomal protein S13	RDA	NS>RA
M65062	Hs.107169	insulin-like growth factor binding protein 5	RDA	
M15330	Hs.126256	interleukin 1, beta	RDA	
L13210	Hs.79339	galectin 3 binding protein	RDA	
X05232	Hs.83326	matrix metalloproteinase 3 preproprotein	RDA	RA>NS, OA
M22490	Hs.68879	bone morphogenetic protein 4	RDA, Affymetrix	NS>RA
AL034397			RDA	OA>NS
M22806			RDA	OA>NS
X06256	Hs.149609	integrin alpha 5 precursor	Unigene	NS>RA
L49169	Hs.75678	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Unigene	NS>RA
AB002409	Hs.57907	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 21	Unigene	RA>NS
X03473	Hs.226117	H1 histone family, member 0	RDA	OA>NS
M92843	Hs.343586	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	Unigene	NS>RA
M21121	Hs.241392	small inducible cytokine A5 (RANTES)	Affymetrix	RA>OA
U05259			Affymetrix	RA>OA
U80114	Hs.247987		Affymetrix	RA>OA
U81234	Hs.164021	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 6 (granulocyte chemotac	Affymetrix	RA>OA
D11086	Hs.84	interleukin 2 receptor, gamma chain precursor	Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125		25		PCT/DE02/02010	
			gamma chain, precursor		
X97267				Affymetrix	RA>OA
U23852				Affymetrix	RA>OA
AA522530	Hs.111244	RTP801		Affymetrix	RA>OA
AF037335	Hs.5338	carbonic anhydrase XII precursor		Affymetrix	RA>OA
U97145	Hs.19317	GDNF family receptor alpha 2		Affymetrix	RA>OA
AA919102	Hs.95327	CD3D antigen, delta polypeptide (TiT3 complex)		Affymetrix	RA>OA
M63928	Hs.180841	CD27 antigen		Affymetrix	RA>OA
Z49194	Hs.2407	POU domain, class 2, associating factor 1		Affymetrix	RA>OA
AL031983				Affymetrix	RA>OA
D15050	Hs.232068			Affymetrix	RA>OA
X92997	Hs.342651			Affymetrix	RA>OA
J03910				Affymetrix	RA>OA
J04132	Hs.97087	T-cell receptor zeta chain precursor		Affymetrix	RA>OA
M55153	Hs.8265	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)		Affymetrix	RA>OA
M12959	Hs.74647			Affymetrix	RA>OA
AF031815	Hs.89230	potassium intermediate		Affymetrix	RA>OA
L31584				Affymetrix	RA>OA
X54489				Affymetrix	RA>OA
AF043129				Affymetrix	RA>OA
X59871	Hs.169294	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)		Affymetrix	RA>OA
AI743134	Hs.21858	trinucleotide repeat containing 3		Affymetrix	RA>OA
Y13323	Hs.145296	disintegrin protease		Affymetrix	RA>OA
U77735	Hs.80205	pim-2 oncogene		Affymetrix	RA,OA>NS
U58515	Hs.154138	chitinase 3-like 2		Affymetrix	RA,OA>NS
M17016	Hs.1051	granzyme B precursor		Affymetrix	RA>OA
X03066	Hs.1802	major histocompatibility complex, class II, DO beta		Affymetrix	RA,OA>NS
M28170	Hs.96023	CD19 antigen		Affymetrix	RA,OA>NS
L24564	Hs.1027	Ras-related associated with diabetes		Affymetrix	NS>RA
M68840	Hs.183109	monoamine oxidase A		Affymetrix	NS>RA
U76456	Hs.190787	tissue inhibitor of metalloproteinase 4 precursor		Affymetrix	OA>RA
D13814	Hs.89472	angiotensin receptor 1 NM_004835		Affymetrix	NS>RA
AA420624	Hs.183109	monoamine oxidase A		Affymetrix	OA>RA
X51757	Hs.3268	heat shock 70kD protein 6 (HSP70B)		Affymetrix	NS>RA

WO 02/097125		26	PCT/DE02/02010	
U29344	Hs.83190	fatty acid synthase	Affymetrix	NS>RA
L19871	Hs.460	activating transcription factor 3 long isoform NM_004024	Affymetrix	NS>RA
J02611	Hs.75736	apolipoprotein D precursor	Affymetrix	NS>RA
M12272	Hs.2523	class I alcohol dehydrogenase, gamma subunit	Affymetrix	NS>RA
L34041	Hs.348601	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Affymetrix	NS>RA
L12760	Hs.1872	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	Affymetrix	OA>RA
M63978			Affymetrix	RA>OA
S95936	Hs.284176	transferrin precursor	Affymetrix	NS>RA
U42031	Hs.7557	FK506-binding protein 5	Affymetrix	NS>RA
Z97171			Affymetrix	NS>RA
S69790			Affymetrix	NS>RA
U41843	Hs.295362	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)	Affymetrix	OA,NS>RA
AL049653			Affymetrix	NS>RA
M31682	Hs.1735	inhibin beta B subunit precursor	Affymetrix	NS>RA
AF009767	Hs.132898	fatty acid desaturase 1	Affymetrix	NS>RA,OA
X02910	Hs.241570	tumor necrosis factor (cachectin)	Affymetrix	NS>RA,OA
AB023152	Hs.12183		Affymetrix	NS>RA,OA
U37283	Hs.300946	Microfibril-associated glycoprotein-2	Affymetrix	OA,NS>RA
X05451	Hs.158295		Affymetrix	OA,NS>RA
W26480	Hs.132898	fatty acid desaturase 1	Affymetrix	NS>RA
D14874	Hs.394	adrenomedullin	Affymetrix	RA>NS
M12174	Hs.204354	ras homolog gene family, member B	Affymetrix	NS>RA
M60974	Hs.80409	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Affymetrix	NS>RA
S62138			Affymetrix	NS>RA
X16706	Hs.301612	FOS-like antigen 2	Affymetrix	NS>RA
X56667	Hs.106857	calbindin 2, full length protein isoform NM_007087	Affymetrix	NS>RA
H15814			Affymetrix	NS>RA
AL021977			Affymetrix	NS>RA
U80055			Affymetrix	NS>RA
U09564	Hs.75761	SFRS protein kinase 1	Affymetrix	RA>OA
U14407	Hs.168132	interleukin 15	Affymetrix	RA>OA
U27185	Hs.82547	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Affymetrix	RA>OA
Z35278	Hs.170019	runx-related transcription factor 3	Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125		27	PCT/DE02/02010	
M12886	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
L05424			Affymetrix	RA>OA
L09230	Hs.301921	chemokine (C-C motif) receptor 1	Affymetrix	RA>OA
L22075	Hs.1666	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13	Affymetrix	RA>OA
M28130			Affymetrix	RA>OA
M29696	Hs.237868	interleukin 7 receptor	Affymetrix	RA>OA
M31165	Hs.29352	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Affymetrix	RA>OA
M16038	Hs.80887	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	Affymetrix	RA>OA
X83490			Affymetrix	RA>OA
D13666	Hs.136348	osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	Affymetrix	RA>OA
L10717	Hs.211576	IL2-inducible T-cell kinase	Affymetrix	RA>OA
X04500	Hs.126256	interleukin 1, beta	Affymetrix	RA>OA
U24153	Hs.30692	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2	Affymetrix	RA>OA
M32315	Hs.256278	tumor necrosis factor receptor 2 (75kD)	Affymetrix	RA>OA
U51903	Hs.78993	IQ motif containing GTPase activating protein 2	Affymetrix	RA>OA
AF002700	Hs.19317	GDNF family receptor alpha 2	Affymetrix	RA>OA
U37518	Hs.83429	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Affymetrix	RA>OA
HG1103-HT1103			Affymetrix	RA>OA
HG3521-HT3715			Affymetrix	RA>OA
AF024710			Affymetrix	RA>OA
U01134	Hs.138671	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor BCL2-related protein A1	Affymetrix	RA>OA
U27467	Hs.227817	v-yes-1 Yamaguchi	Affymetrix	RA>OA
M79321	Hs.80887	sarcoma viral related oncogene homolog	Affymetrix	RA>OA
J04765	Hs.313	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein 1, early T- lymphocyte	Affymetrix	RA>OA
M21154	Hs.262476	S-adenosylmethionine decarboxylase 1 precursor	Affymetrix	RA>OA
AF098641	Hs.306278		Affymetrix	RA>OA
D63789	Hs.174228	small inducible cytokine subfamily C member 2	Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125		28		PCT/DE02/02010	
			subfamily C, member 2		
S68134	Hs.351252	cAMP responsive element modulator	Affymetrix	RA>OA	
AB014515	Hs.323712	KIAA0615 gene product	Affymetrix	RA>OA	
AI800499	Hs.161002		Affymetrix	RA>OA	
Y13710	Hs.16530	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 18, pulmonary and activat	Affymetrix	RA>OA	
AJ011915	Hs.184376	synaptosomal-associated protein, 23kD	Affymetrix	RA>OA	
AF030339	Hs.286229	plexin C1	Affymetrix	RA>OA	
X17042	Hs.1908	proteoglycan 1, secretory granule	Affymetrix	RA>OA	
AF059214	Hs.194687	cholesterol 25-hydroxylase	Affymetrix	RA>OA	
D42043	Hs.79123		Affymetrix	RA>OA	
M24283	Hs.168383	intercellular adhesion molecule 1 precursor	Affymetrix	RA>OA	
AF042729	Hs.171776	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	Affymetrix	RA>OA	
M64595	Hs.173466	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	Affymetrix	RA>OA	
AA868382	Hs.198253	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Affymetrix	RA>OA	
AB006746	Hs.198282	phospholipid scramblase 1	Affymetrix	RA>OA	
X00437	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA	
M59287			Affymetrix	RA>OA	
AA725102	Hs.51305	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	Affymetrix	RA>OA	
M97935	Hs.21486	signal transducer and activator of transcription 1, 91kD	Affymetrix	RA>OA	
X54134	Hs.31137	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	Affymetrix	RA>OA	
U89942	Hs.83354	lysyl oxidase-like 2	Affymetrix	RA>OA	
AF099935	Hs.17839	TNF-induced protein	Affymetrix	RA>OA	
M93056			Affymetrix	RA>OA	
M97936			Affymetrix	RA>OA	
AI887421	Hs.82547	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Affymetrix	RA>OA	
D50532	Hs.54403	macrophage lectin 2 (calcium dependent)	Affymetrix	RA>OA	
AI813532	Hs.256278	tumor necrosis factor receptor 2 (75kD)	Affymetrix	RA>OA	

WO 02/097125		29	PCT/DE02/02010	
U02020	Hs.239138	pre-B-cell colony-enhancing factor	Affymetrix	RA>OA
X05276	Hs.250641	tropomyosin 4	Affymetrix	RA>OA
AF006516	Hs.24752	spectrin SH3 domain binding protein 1	Affymetrix	RA>OA
AB018301	Hs.22039	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3	Affymetrix	RA>OA
AB010812	Hs.22900	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte aquaporin 9	Affymetrix	RA>OA
AF052124	Hs.313	absent in melanoma 2	Affymetrix	RA>OA
AB008775	Hs.104624	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)	Affymetrix	RA>OA
AF024714	Hs.105115		Affymetrix	RA>OA
M28696	Hs.278443		Affymetrix	RA>OA
X62573		superoxide dismutase 2, mitochondrial	Affymetrix	RA>OA
X07834	Hs.318885		Affymetrix	RA>OA
AL050267	Hs.23889	DKFZP564A032 protein	Affymetrix	RA>OA
U83461	Hs.24030	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2	Affymetrix	RA>OA
AB018285	Hs.321707	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1	Affymetrix	RA>OA
AF007875	Hs.5085		Affymetrix	RA>OA
X78686	Hs.89714	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived n	Affymetrix	RA>OA
AF053712	Hs.115770	ARP3 actin-related protein 3 homolog	Affymetrix	RA>OA
AF006083	Hs.5321		Affymetrix	RA>OA
AL050025	Hs.5344	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	Affymetrix	RA>OA
M17017	Hs.624	interleukin 8	Affymetrix	RA>OA
AI651024	Hs.15780		Affymetrix	RA>OA
AF038172			Affymetrix	RA>OA
M55542	Hs.62661	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD	Affymetrix	RA>OA
U11276	Hs.169824	killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	Affymetrix	RA>OA
Z19585	Hs.75774	thrombospondin 4	Affymetrix	OA>RA
L27560			Affymetrix	OA>RA
M98539			Affymetrix	OA>RA
J00153			Affymetrix	OA>RA

WO 02/097125		30		PCT/DE02/02010	
M25079	Hs.155376	hemoglobin, beta	Affymetrix	OA>RA	
M80482	Hs.170414	paired basic amino acid cleaving system 4	Affymetrix	OA>RA	
L48215	Hs.155376	hemoglobin, beta	Affymetrix	OA>RA	
AA524547	Hs.160318	phospholemman, isoform b precursor NM_005031	Affymetrix	OA>RA	
AL038340			Affymetrix	OA>RA	
AI381790	Hs.74120	adipose specific 2	Affymetrix	OA>RA	
X00129	Hs.76461	retinol-binding protein 4, plasma precursor	Affymetrix	OA>RA	
U66619	Hs.71622	SWI	Affymetrix	OA>RA	
M30038	Hs.334455	alpha tryptase I precursor	Affymetrix	OA>RA	
U13666	Hs.184907	G protein-coupled receptor 1	Affymetrix	OA>RA	
L05144	Hs.1872	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	Affymetrix	OA>RA	
U39447	Hs.198241	copper containing amine oxidase 3 precursor	Affymetrix	OA>RA	
AL049313			Affymetrix	OA>RA	
AL050125			Affymetrix	OA>RA	
D12485			Affymetrix	OA>RA	
X78416	Hs.3155	casein, alpha	Affymetrix	OA>RA	
AB028998	Hs.6147		Affymetrix	OA>RA	
AB020629	Hs.38095	ATP-binding cassette, sub-family A member 8	Affymetrix	OA>RA	
X03350	Hs.4	class I alcohol dehydrogenase, beta subunit	Affymetrix	OA>RA	
AJ224677	Hs.7122	scrapie responsive protein 1	Affymetrix	OA>RA	
AB018317	Hs.22201		Affymetrix	OA>RA	
AF009314			Affymetrix	OA>RA	
L77730			Affymetrix	OA>RA	
D76435	Hs.41154	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	Affymetrix	OA>RA	
W28828	Hs.133988		Affymetrix	OA>RA	
M73720			Affymetrix	OA>RA	
M55150	Hs.73875	fumarylacetoacetase	Affymetrix	OA>RA	
U13616	Hs.75893	ankyrin 3, isoform 2 NM_020987	Affymetrix	OA>RA	
AB005293	Hs.103253	perilipin	Affymetrix	OA>RA	
L07765	Hs.76688	carboxylesterase 1 (monocyte	Affymetrix	OA>RA	
X82209	Hs.268515	meningioma 1	Affymetrix	OA>RA	
J03507	Hs.78065	complement component 7 precursor	Affymetrix	OA>RA	
AF013570	Hs.78344	smooth muscle myosin heavy chain 11, isoform SM1 NM_022870	Affymetrix	OA>RA	
U70370	Hs.84136	paired-like homeodomain transcription factor 1	Affymetrix	OA>RA	

WO 02/097125

31

PCT/DE02/02010

		transcription factor 1		
U75744	Hs.88646	deoxyribonuclease I-like 3	Affymetrix	OA>RA
M60278	Hs.799	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor- like growth f	Affymetrix	OA>RA
AF042166	Hs.81008	filamin B, beta (actin binding protein 278)	Affymetrix	OA>RA
J00123			Affymetrix	OA>RA
AI207842	Hs.8272	prostaglandin D2 synthase (21kD, brain)	Affymetrix	OA>RA
AA128249	Hs.83213	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Affymetrix	OA>RA
AA152406	Hs.114346	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle) precursor	Affymetrix	OA>RA
AF093118	Hs.11494	fibulin 5	Affymetrix	OA>RA
L38486	Hs.296049		Affymetrix	OA>RA
U66689			Affymetrix	OA>RA
AF049884	Hs.350266	Arg	Affymetrix	OA>RA
AB011089	Hs.12372	tripartite motif protein TRIM2	Affymetrix	OA>RA
AF060568			Affymetrix	OA>RA
AF059293	Hs.114948	cytokine receptor-like factor 1	Affymetrix	OA>RA
AC003107	Hs.1584	cartilage oligomeric matrix protein presursor	Affymetrix	OA>RA
J05037	Hs.76751	serine dehydratase	Affymetrix	OA>RA
D45371	Hs.80485	adipose most abundant gene transcript 1	Affymetrix	OA>RA
U78190			Affymetrix	OA>RA
U24578	Hs.444	serine	Affymetrix	OA>RA
M15856	Hs.180878	lipoprotein lipase precursor	Affymetrix	OA>RA
AF055033	Hs.107169	insulin-like growth factor binding protein 5	Affymetrix	OA>RA
AA976838	Hs.268571	apolipoprotein C-1 precursor	Affymetrix	OA>RA
L13698	Hs.65029	growth arrest-specific 1	Affymetrix	OA>RA
AB020316	Hs.134015	uronyl-2-sulfotransferase	Affymetrix	OA>RA
U32324	Hs.64310	interleukin 11 receptor, alpha	Affymetrix	OA>RA
S67070	Hs.78846	heat shock 27kD protein 2	Affymetrix	OA>RA
M12529	Hs.169401	apolipoprotein E	Affymetrix	OA>RA
D50495	Hs.80598	transcription elongation factor A (SII), 2	Affymetrix	OA>RA
D00632	Hs.336920	plasma glutathione peroxidase 3 precursor	Affymetrix	OA>RA
AI760613	Hs.29283		Affymetrix	RA>OA
AW014646	Hs.303157		Affymetrix	RA>OA
W74027	Hs.132906	19A24 protein	Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125		32	PCT/DE02/02010	
W72338	Hs.23703		Affymetrix	RA>OA
AI805006	Hs.8882		Affymetrix	RA>OA
W67655			Affymetrix	RA>OA
AA631460	Hs.285814		Affymetrix	RA>OA
AI741321	Hs.10760	asporin (LRR class 1)	Affymetrix	RA>OA
AI983115	Hs.132781	class I cytokine receptor	Affymetrix	RA>OA
AI535730	Hs.262958		Affymetrix	RA>OA
AA977937	Hs.102308	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8	Affymetrix	RA>OA
AA447232	Hs.334838		Affymetrix	RA>OA
AI720806	Hs.49943		Affymetrix	RA>OA
W23237	Hs.296162		Affymetrix	RA>OA
AI762695	Hs.146381	RNA binding motif protein, X chromosome	Affymetrix	RA>OA
AI653211	Hs.96657		Affymetrix	RA>OA
AA633405	Hs.1101	POU domain, class 2, transcription factor 2	Affymetrix	RA>OA
N78018	Hs.267566	hypothetical protein FLJ20371	Affymetrix	RA>OA
AI625959	Hs.112242		Affymetrix	RA>OA
T66196	Hs.111554	ADP-ribosylation factor-like 7	Affymetrix	RA>OA
AI697841	Hs.20450	BCM-like membrane protein precursor NM_014036	Affymetrix	RA>OA
AA569128	Hs.283021	chloride intracellular channel 5	Affymetrix	OA>RA
R53594	Hs.260164		Affymetrix	OA>RA
AI970898	Hs.234898		Affymetrix	OA>RA
AI972390	Hs.348493		Affymetrix	OA>RA
N23769	Hs.26691		Affymetrix	OA>RA
AI806324	Hs.28625		Affymetrix	OA>RA
N28741	Hs.75354		Affymetrix	OA>RA
AL040912	Hs.31595	oligodendrocyte transmembrane protein	Affymetrix	OA>RA
AI681917	Hs.3321		Affymetrix	OA>RA
AW006235	Hs.41502	hypothetical protein FLJ21276	Affymetrix	OA>RA
W73819	Hs.352100		Affymetrix	OA>RA
T77033	Hs.182364		Affymetrix	OA>RA
AW015787	Hs.237731		Affymetrix	OA>RA
N30858	Hs.44234	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	Affymetrix	OA>RA
AI810669	Hs.44829		Affymetrix	OA>RA
N49922	Hs.1787	proteolipid protein1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomp	Affymetrix	OA>RA
AA082546	Hs.48516		Affymetrix	OA>RA

WO 02/097125		33	PCT/DE02/02010	
AI694320	Hs.6295		Affymetrix	OA>RA
AI632283	Hs.47448		Affymetrix	OA>RA
AA039324	Hs.201925		Affymetrix	OA>RA
AA877186	Hs.90250		Affymetrix	OA>RA
R42166	Hs.94000		Affymetrix	OA>RA
AI631882	Hs.6510	thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme	Affymetrix	OA>RA
W68636	Hs.168640	ankylosis, progressive homolog NM_054027	Affymetrix	OA>RA
		ankylosis, progressive homolog		
AA700227	Hs.10119		Affymetrix	OA>RA
AI948584	Hs.350495		Affymetrix	OA>RA
AI678080	Hs.141693		Affymetrix	OA>RA
AI732274	Hs.11006		Affymetrix	OA>RA
AI341383	Hs.349764		Affymetrix	OA>RA
Z99386	Hs.173638		Affymetrix	OA>RA
W95023	Hs.173933		Affymetrix	OA>RA
AI860775	Hs.98506		Affymetrix	OA>RA
AA464846	Hs.103262		Affymetrix	OA>RA
AI751698	Hs.184907	G protein-coupled receptor 1	Affymetrix	OA>RA
AA545730	Hs.293821		Affymetrix	OA>RA
AA181060	Hs.349283		Affymetrix	OA>RA
AA195184			Affymetrix	OA>RA
AI680541	Hs.23767	hypothetical protein FLJ12666	Affymetrix	OA>RA
AI659533	Hs.348490		Affymetrix	OA>RA
AI750575	Hs.173933		Affymetrix	OA>RA
AI870335	Hs.32450		Affymetrix	OA>RA
AA160945	Hs.14479		Affymetrix	OA>RA
AI936699	Hs.193784		Affymetrix	OA>RA
AI130027	Hs.293539		Affymetrix	OA>RA
AA081093	Hs.68055		Affymetrix	OA>RA
AA142913	Hs.71721		Affymetrix	OA>RA
AI984000	Hs.37482	COPZ2 for nonclathrin coat protein zeta-COP	Affymetrix	OA>RA
AI864898	Hs.43125		Affymetrix	OA>RA
AI670876	Hs.44276	homeo box C10	Affymetrix	OA>RA
AA541787	Hs.23837		Affymetrix	OA>RA
AA775711	Hs.348392		Affymetrix	OA>RA
AI659927	Hs.6634		Affymetrix	OA>RA
AI084224	Hs.53542		Affymetrix	OA>RA
AI123555	Hs.81796		Affymetrix	OA>RA
W73230	Hs.7913		Affymetrix	OA>RA
W27376	Hs.8395	hypothetical protein FLJ10781	Affymetrix	OA>RA
AW022607	Hs.12482	glyceronephosphate O-acyltransferase	Affymetrix	OA>RA
W70242	Hs.58086		Affymetrix	OA>RA

WO 02/097125		34	PCT/DE02/02010	
W25528	Hs.89319		Affymetrix	OA>RA
AA947123	Hs.8861		Affymetrix	OA>RA
AA528821	Hs.235857		Affymetrix	OA>RA
AA131648	Hs.23767	hypothetical protein FLJ12666	Affymetrix	OA>RA
R12398	Hs.21075	GTF2I repeat domain- containing 1, isoform 1 NM_005685	Affymetrix	OA>RA
W52683	Hs.107260	hypothetical protein DKFZp586H0623	Affymetrix	OA>RA
W72194	Hs.108924	ponsin NM_015385	Affymetrix	OA>RA
AA885516	Hs.104627		Affymetrix	OA>RA
W68796	Hs.237731		Affymetrix	OA>RA
AI879337	Hs.323432	mammalian inositol hexakisphosphate kinase 2	Affymetrix	OA>RA
W45581	Hs.23133		Affymetrix	OA>RA
N98637	Hs.7759		Affymetrix	OA>RA
AI809953	Hs.123933		Affymetrix	OA>RA
T68423	Hs.11873		Affymetrix	OA>RA
AL044670	Hs.182364		Affymetrix	OA>RA
AA779895	Hs.19339		Affymetrix	OA>RA
AI719167	Hs.12731		Affymetrix	OA>RA
T99215	Hs.168640	ankylosis, progressive homolog NM_054027 ankylosis, progressive homolog	Affymetrix	OA>RA
AA534296	Hs.20953		Affymetrix	OA>RA
AI819043	Hs.21342		Affymetrix	OA>RA
AI762879	Hs.86437		Affymetrix	RA>OA
W61000	Hs.238730		Affymetrix	RA>OA
AL043192	Hs.103378		Affymetrix	RA>OA
AI741313	Hs.103657		Affymetrix	RA>OA
AI031674	Hs.236494	ras-related GTP-binding protein	Affymetrix	RA>OA
AA670193			Affymetrix	RA>OA
AW005250	Hs.238936		Affymetrix	RA>OA
AA682496	Hs.270737	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	Affymetrix	RA>OA
AI128225	Hs.914		Affymetrix	RA>OA
AW026543	Hs.238936		Affymetrix	RA>OA
AI991095	Hs.293441		Affymetrix	RA>OA
AI872510	Hs.181125		Affymetrix	RA>OA
AI828404	Hs.300697		Affymetrix	RA>OA
AI807353	Hs.237868	interleukin 7 receptor	Affymetrix	RA>OA
AL048481	Hs.11571		Affymetrix	RA>OA
AW014626	Hs.10949		Affymetrix	RA>OA
AI400414			Affymetrix	RA>OA
AI655112	Hs.16179	hypothetical protein FLJ23467	Affymetrix	RA>OA
AI936345	Hs.95549	hypothetical protein	Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125		35	PCT/DE02/02010	
AI961907	Hs.179573	alpha 2 type I collagen preproprotein	Affymetrix	RA>OA
AI743730	Hs.30822	hypothetical protein FLJ11110	Affymetrix	RA>OA
AI990512	Hs.34192		Affymetrix	RA>OA
AI741715	Hs.1466	glycerol kinase	Affymetrix	RA>OA
T66305	Hs.12920	hypothetical protein FLJ20668	Affymetrix	RA>OA
AA424160	Hs.165909		Affymetrix	RA>OA
AI075407	Hs.296083		Affymetrix	RA>OA
AA811088	Hs.24143	WASP-interacting protein	Affymetrix	RA>OA
AI978918	Hs.179608	retinol dehydrogenase homolog	Affymetrix	RA>OA
AA740831	Hs.193514		Affymetrix	RA>OA
W84421	Hs.349096		Affymetrix	RA>OA
AA233208	Hs.91165	hypothetical protein	Affymetrix	RA>OA
AA886976	Hs.95821	osteoclast stimulating factor 1	Affymetrix	RA>OA
AA864400	Hs.71215	docking protein 2, 56kD	Affymetrix	RA>OA
AI073984	Hs.14453	interferon consensus sequence binding protein 1	Affymetrix	RA>OA
AI983633	Hs.179573	alpha 2 type I collagen preproprotein	Affymetrix	RA>OA
AI564488	Hs.300697		Affymetrix	RA>OA
AI655781	Hs.237868	interleukin 7 receptor	Affymetrix	RA>OA
AA814195	Hs.184465	hypothetical protein FLJ11259	Affymetrix	RA>OA
AI916783	Hs.234149	hypothetical protein FLJ20647	Affymetrix	RA>OA
AA829355	Hs.267993	hypothetical protein FLJ10143	Affymetrix	RA>OA
N66595	Hs.24283		Affymetrix	RA>OA
AA165400	Hs.10927		Affymetrix	RA>OA
AI478759	Hs.234149	hypothetical protein FLJ20647	Affymetrix	RA>OA
AI655719	Hs.2157	Wiskott-Aldrich syndrome protein	Affymetrix	RA>OA
N63815	Hs.110121	SEC7 homolog	Affymetrix	RA>OA
AW001184	Hs.44672	hypothetical protein FLJ10470	Affymetrix	RA>OA
N21390	Hs.5888		Affymetrix	RA>OA
AA587944	Hs.259737	FN5 protein	Affymetrix	RA>OA
AI951459	Hs.7337	hypothetical protein FLJ10936	Affymetrix	RA>OA
AA464464	Hs.10949		Affymetrix	RA>OA
AI692538	Hs.11135		Affymetrix	RA>OA
AI817147	Hs.181301	cathepsin S	Affymetrix	RA>OA
AI263085	Hs.17914	CD20-like precursor	Affymetrix	RA>OA
W58252	Hs.182793	golgi phosphoprotein 2	Affymetrix	RA>OA
AA056180	Hs.70704		Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125		36	PCT/DE02/02010	
AA224174	Hs.111099		Affymetrix	OA>RA
AI571452	Hs.11169	Gene 33	Affymetrix	OA>RA
AA155952	Hs.349303		Affymetrix	OA>RA
W68504	Hs.191098		Affymetrix	OA>RA
AI200456	Hs.48516		Affymetrix	OA>RA
AW003093	Hs.349764		Affymetrix	OA>RA
AI190027	Hs.38034		Affymetrix	OA>RA
R52934	Hs.8562	hypothetical protein FLJ20374	Affymetrix	OA>RA
W44633	Hs.301296		Affymetrix	OA>RA
AW024474	Hs.44276	homeo box C10	Affymetrix	OA>RA
AI806502	Hs.334800		Affymetrix	OA>RA
AI492370	Hs.105606	hypothetical protein FLJ20512	Affymetrix	OA>RA
AW021179	Hs.90443	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 (23kD) (NADH- coenzyme Q reductase	Affymetrix	OA>RA
AI679110	Hs.323067		Affymetrix	OA>RA
R85633			Affymetrix	OA>RA
N91161	Hs.117176	poly(A)-binding protein, nuclear 1	Affymetrix	OA>RA
AW020657			Affymetrix	OA>RA
AI871043	Hs.173233	hypothetical protein FLJ10970	Affymetrix	OA>RA
N39237	Hs.44977		Affymetrix	OA>RA
AI949833	Hs.21914		Affymetrix	OA>RA
AA679297	Hs.109494	secreted protein of unknown function	Affymetrix	OA>RA
AI962647	Hs.182364		Affymetrix	OA>RA
AL037611	Hs.285902		Affymetrix	OA>RA
AI871278	Hs.301804		Affymetrix	OA>RA
AI357650	Hs.28847	AD026 protein	Affymetrix	OA>RA
AI149793	Hs.38034		Affymetrix	OA>RA
AI797684	Hs.39619	hypothetical protein LOC57333	Affymetrix	OA>RA
R52250	Hs.348297		Affymetrix	OA>RA
AI669738	Hs.128856	CSR1 protein	Affymetrix	OA>RA
AA058770	Hs.18987		Affymetrix	OA>RA
AI039005	Hs.164680		Affymetrix	OA>RA
AI936560	Hs.6136		Affymetrix	OA>RA
AA521373	Hs.9469	pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specif	Affymetrix	OA>RA
HI15888	Hs.27621	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembran	Affymetrix	OA>RA
AI333793	Hs.337062		Affymetrix	OA>RA
AA523172	Hs.103135		Affymetrix	OA>RA

WO 02/097125		37	PCT/DE02/02010	
A1860960	Hs.352081	nuclear factor I	Affymetrix	OA>RA
A1355848	Hs.35841		Affymetrix	OA>RA
A1982754	Hs.75106	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testos	Affymetrix	OA>RA
A1800218	Hs.289019	latent transforming growth factor beta binding protein 3	Affymetrix	OA>RA
AW016356	Hs.126857		Affymetrix	OA>RA
AA968552	Hs.25523		Affymetrix	OA>RA
A1634557	Hs.28107		Affymetrix	OA>RA
AW025494	Hs.95867	hypothetical protein EST00098	Affymetrix	OA>RA
AA628405	Hs.339352		Affymetrix	OA>RA
A1810399	Hs.55940		Affymetrix	OA>RA
AA029735	Hs.159993		Affymetrix	OA>RA
AA723927	Hs.209569		Affymetrix	OA>RA
A1799784	Hs.49696		Affymetrix	OA>RA
A1817330	Hs.110477	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3	Affymetrix	OA>RA
A1990803	Hs.293782		Affymetrix	OA>RA
AA034418	Hs.30627		Affymetrix	OA>RA
AA115295	Hs.284208	DKFZP434N161 protein	Affymetrix	OA>RA
A1673281	Hs.181444	hypothetical protein	Affymetrix	OA>RA
W63805	Hs.84344	CGI-135 protein	Affymetrix	OA>RA
AA427597		TGFβ-induc early growth response 2	Unigene	NS>RA
AA806239		IG-ALPHA2-C REGION	Unigene	RA>NS
AB014518		KIAA0618	Unigene	RA>NS
AB021871		AK1	RDA, Unigene	RA>OA, RA>NS
AF 000984		DBY altern transcript 2	Affymetrix	NS>RA
AF 001691		cornified envelope precursor	Affymetrix	NS>RA
AF005058		CXC		
AF0605668		leukemia zink finger PLZF	Affymetrix	OA>RA
AF068293		HDCMB07P/PCM-1	Unigene	RA>NS
AF105036		GKLF	RDA	OA>NS
AF182035		a Actin	RDA	OA>NS
AF182035		myosin light chain	RDA	OA>NS
AF216292		BIP		
AF218004		CSNK1A1	Unigene	RA>NS
AJ000542		natural killer cell receptor p58	RDA	RA>OA
J05008		EDN1	Affymetrix	NS>RA
L08187		cytokine receptor EBI 3	RDA	RA>OA
L31581		EBI1/CCR7	Affy	RA>NS
L37036		ENA-78	=Affymetrix	RA>OA

WO 02/097125	38	PCT/DE02/02010
M10988	TNF μ	
M19997	elongation factor 2	RDA RA>OA
M29469	Ig rearranged k chain (VJ regions)	RDA, Affymetrix RA>OA
M31164	TSG6	RDA, Unigene RA>OA, RA>NS
M83248	OSTP (Osteopontin)	RDA, Affymetrix RA>OA
NM_002450	Metallomethionein	Unigene NS>RA
NM_003573	TGF β -BP4	Unigene RA>NS
NM_000362	TIMP-3	RDA NS>RA
NM_000396	Cathepsin K	RDA RA>OA, OA>NS
NM_0006091	SDF1	RDA OA>NS
NM_001908	Cathepsin B	RDA OA>NS
NM_002084	glutathion peroxidase 3	RDA NS>RA
NM_002229	Jun B	Unigene NS>RA
NM_002989	SLC	Unigene RA>NS
NM_003966	SEMA5A	RDA RA>OA
NM_004039	Annexin II	RDA RA>OA, OA>NS
NM_005368	Myoglobin	RDA OA>NS
NM_006472	VDUP1	RDA, Unigene NS>RA
NM_007016	Mysin light polypeptid2	RDA OA>NS
NM_015675	GADD45B/MYD118	RDA, Unigene NS>RA
R75775	EGR1	Unigene NS>RA
U070136	megakaryocyte stimulating factor	RDA, Unigene NS>RA
U34690	CORO1A/ p57	Unigene RA>NS
U93569	L1 element	RDA, Unigene RA>OA; RA>NS
X03754	SCYA3 (MIP a) /GOS19	Unigene RA>NS
X0523	MMP1	
X14723	Clustrin / SP40	RDA, Unigene NS>RA
X15332	collagen III a1	RDA, Unigene RA>OA
X54629	c-myc	RDA, Unigene NS>RA
X54629	pHL-1 gene	RDA NS>RA
X58122	Nebulin	RDA OA>NS
X62996	mitochondrial mRNA	RDA OA>NS
X63596	TRE-2	RDA RA>OA
X65968	PMP22	Unigene RA>NS
X88971	HLA DRB1	RDA RA>OA
X94771	EMP3	Unigene RA>NS
XM 008868	latent transforming growth factor beta binding prot. LTBP4	RDA, Unigene NS>RA
XM_031289	interleukin 8	=Affymetrix RA>OA
XM012651	collagen I a1	RDA RA>OA

WO 02/097125

39

PCT/DE02/02010

Zusammenstellung der Proteine**Tabelle 2:**

Protein	Beispiel für Accession
78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Immunoglobulin heavy chain binding protein) (BIP) (Endoplasmic reticulum luminal Ca ²⁺ binding protein grp78)	P11021
Citrullinierte Peptide (d.h. Peptide, die die deiminierte Form der Aminosäure Arginin [Citrullin] beinhalten)	
Sa-Antigen	
RA33 / Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2 / hnRNP B1)	P22626
Calpain inhibitor (Calpastatin) (Sperm BS-17 component)	P20810
Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60)	P27797
Synovial stimulatory protein P205	P80697
Filaggrin precursor	P20930
Fibrin	
Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor [Contains: Fibrinopeptide A]	P02671
Fibrinogen beta chain precursor [Contains: Fibrinopeptide B]	P02675
Fibrinogen gamma chain precursor (PRO2061)	P02679
DnaJ	
Ig gamma-1 chain C region	P01857
Ig gamma-2 chain C region	P01859
Ig gamma-3 chain C region (Heavy chain disease protein) (HDC)	P01860
Ig gamma-4 chain C region	P01861
60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein) (HuCHA60)	P10809
EBNA-1 NUCLEAR PROTEIN	P03211
IR-3, Internal Repeat Region (in EBNA-1 u.a. Proteinen)	
Chitinase-3 like protein 1 precursor (Cartilage glycoprotein-39) (GP-39) (39 kDa synovial protein) (YKL-40)	P36222
Collagen alpha 1(II) chain precursor [Contains: Chondrocalcin]	P02458
CH65, Chondrocyte Antigen 65	
Collagen-binding protein 2 precursor (Colligin 2) (Rheumatoid arthritis related antigen RA-A47)	P50454
47 kDa heat shock protein precursor (Collagen-binding protein 1) (Colligin 1)	P29043
Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39)	Q15782
Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39)	Q15783

WO 02/097125

40

PCT/DE02/02010

Chitinase 3-like protein 2 precursor (YKL-39) (Chondrocyte protein 39)	Q15749
Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase) (Lung cancer antigen NY-LU-1)	P04075
Proteoglycan link protein precursor (Cartilage link protein) (LP)	P10915
Matrix metalloproteinase-19 precursor (MMP-19) (Matrix metalloproteinase RASI)	Q99542
MMP-19 (matrix metalloproteinase)	CAA63299
Aggrecan core protein precursor (Cartilage-specific proteoglycan core protein) (CSPCP) (Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 1)	P16112
Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin 2)	P15311
Radixin	P35241
Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	P26038

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

5

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Anwendung in der klinischen Diagnostik

Ein Patient mit Gelenksbeschwerden seit 4 Monaten hat asymmetrische Schwellungen und Schmerzhaftigkeit in 2 Fingergrund- und 1 Fingermittelgelenk sowie dem rechten Handgelenk. Die Morgensteifigkeit beträgt ca 30 Minuten. Radiologisch zeigen sich beginnende erosive Veränderungen in einem Zehengrundgelenk. Das C-reaktive Protein ist im Normbereich, die Senkung leicht erhöht, der Rheumafaktor und HLA-DR4 negativ. Es besteht keine familiäre Vorbelastung hinsichtlich einer entzündlich rheumatischen Erkrankung.

Es erfolgt eine ambulante Vorstellung zur minimalinvasiven arthroskopischen Entnahme einer Synovialisbiopsie am rechten Handgelenk. Von 4 Gewebeproben mit je ca 10mg Gewicht wird eine kleine Probe in Formalin fixiert für die nachfolgende histologische Beurteilung. Die verbleibenden Gewebestücke werden in RNA-Lysepuffer aufgenommen, zerkleinert und die RNA nach Standardprotokoll extrahiert. Nach Umschreibung in cDNA erfolgt die in vitro Transkription in eine Biotin-markierte cRNA als Abschrift der cDNA. Die cRNA wird fragmentiert und eingesetzt für die Hybridisierung auf dem DNA-Array.

Der Array wird von einem kommerziellen Anbieter für die Fertigung von DNA-Arrays wie z.B. Affymetrix hergestellt. Dort werden aus den Sequenzen in der Tabelle 1 und den für die Proteine in Tabelle 2 kodierenden Gensequenzen geeignete Oligo-Nucleotide bestimmt, die eine spezifische Hybridisierung mit den jeweiligen cRNA-Sequenzen ermöglichen. Diese Sequenzen werden entweder

WO 02/097125

41

PCT/DE02/02010

als Oligonucleotide synthetisiert und auf einen Array-Träger gedruckt oder direkt z.B. mit photolithographischen Verfahren auf dem Träger synthetisiert.

Die Hybridisierung erfolgt nach vorgegebenem Protokoll des Herstellers. Der DNA-Array wird mit einem Scanner ausgelesen. Die Übersetzung der Bildinformation in Expressions-Signale erfolgt über Standard-Software wie z.B. „Micro-Array Suite“ von Affymetrix. Es liegen nun die Signale zur RNA-Expressionsstärke der in Tabelle 1 und 2 genannten Gene bzw. Proteine vor. Auf der Basis dieser hier neu definierten Auswahl von Genen für die diagnostische Beurteilung und Therapieentwicklung bei Gelenkerkrankungen wurden in Vorversuchen klinisch und histologisch charakterisierte Gewebeproben nach Clusteranalyse hierarchisch zueinander eingeteilt. Durch die vergleichende Assoziation mit klinischen Befunden wurde diese Einteilung insbesondere in Abhängigkeit von der Form der Erkrankung (Arthrose, reaktive Arthritis, rheumatoide Arthritis, Untergruppen der rheumatoiden Arthritis), der Aktivität der Erkrankung und damit der Prognose sowie der Beeinflussbarkeit der pathologisch veränderten Genexpression durch ein gegebenes Medikament getroffen. Die Signalwerte des oben genannten Patienten werden nun mit dieser Datenbank verglichen. Dadurch kann eine Zuordnung zu einer dieser Gruppen erfolgen und auf die dazugehörigen klinischen Assoziationen rückgeschlossen werden. Es ergeben sich somit Aussagen zu der Diagnose, der Aktivität, der Prognose und den Therapieoptionen im individuellen Krankheitsfall.

Beispiel 2: Anwendung für Therapiebeurteilung

Ein Patient mit chronischer Gelenkentzündung seit 5 Jahren und der Diagnose rheumatoide Arthritis hat fortschreitende spezifische radiologische Veränderungen in mehreren Fingergelenken, begleitet von Schmerzen und Schwellungen in mehreren Fingergelenken, dem linken Ellbogengelenk und dem rechten Sprunggelenk trotz aktueller Basistherapie mit 15mg Methotrexat pro Woche. Es erfolgt eine ambulante Vorstellung zur minimalinvasiven arthroskopischen Entnahme einer Synovialisbiopsie am linken Ellbogengelenk. Mehrere Proben von ca 30mg Gesamtgewicht werden in Lysepuffer aufgenommen, zerkleinert und die RNA extrahiert. Die Aufarbeitung der Probe erfolgt vergleichbar zu dem Vorgehen in Beispiel 1. Es wird der gleiche DNA-Chip wie in Beispiel 1 zur Analyse verwendet. Nach Hybridisierung, Auslesen des Hybridisierungsergebnisses in eine Bilddatei und Übersetzen in eine Signalinformation für jedes der untersuchten Gene erfolgt eine Zuordnung zu definierten Expressionsmustern. Diese wurden in Vorversuchen festgelegt unter Verwendung der hier neu definierten Auswahl von Genen aus Tabelle 1 und 2. Dabei wurde die Veränderung des Expressionsprofils einer Probe in Abhängigkeit von der zugehörigen Gelenkerkrankung unter Einfluss definierter Medikamente mit definierten Konzentrationen analysiert. Die Profile wurden hierarchisch eingeteilt unter Berücksichtigung der Assoziation zu den verwendeten Medikamenten und der verwendeten Dosis. Wird mit diesen definierten Expressionsmustern die Patientenprobe verglichen, wird anhand der Zuordnung zu einem bestimmten Muster und den damit assoziierten Wirksamkeitsaussagen eine Abschätzung möglich, ob das gegebene Medikament Methotrexat mit

einer höheren Dosierung erfolgreich sein könnte, oder ob eine Umstellung erfolgen sollte auf ein Medikament, dessen Wirkungsprofil am besten die pathologischen Veränderungen in diesem individuellen Fall zu beeinflussen vermag.

Beispiel 3: Autoreaktivitätsprofile bei der RA

5 Die RA unterscheidet sich von anderen rheumatischen sowie von anderen entzündlichen Erkrankungen durch die Ausbildung von Autoantikörpern. Dabei wird eine Diskriminierung zwischen RA und nicht-RA nicht durch eine Antikörper-Reaktivität gewährleistet, sondern durch verschiedene Profile unterschiedlicher Autoreaktivitäten. Es ist somit möglich, über die Bestimmung der RA-spezifischen Autoreaktivitätsprofile eine gesicherte Diagnostik zu erstellen, Therapieverläufe zu
10 kontrollieren und Vorsorgeuntersuchungen durchzuführen.

Antikörper richten sich gegen Antigene oder spezifischer gegen Epitope, die bei einer spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktion von den Paratopen gebunden werden. Epitop ist per Definition der Bereich eines Antigens, der mit einem Antikörper spezifisch (d.h. mit dessen Paratop) in Wechselwirkung tritt. Üblicherweise versteht man hierunter eine 16 bis 20 Aminosäuren große
15 Peptidsequenz eines Proteins. Diese Sequenz kann konsekutiv (kontinuierliches Epitop) oder unterbrochen (diskontinuierliches Epitop) sein. Typischerweise sind jedoch für die spezifische Wechselwirkung von Antikörper und Antigen aber nur wenige Aminosäuren, in seltenen Fällen auch nur eine einzige Aminosäure, notwendig und hinreichend. Zwischenzeitlich ist bekannt, dass selbst Nukleinsäuren als Antigen fungieren können. Besondere Bedeutung gewinnen zunehmend
20 posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Acylierung, Glykosylierung, Methylierung, Deiminierung u.a.. Da diese Modifikationen oftmals regulatorische Funktion aufweisen, scheinen diese in besonderer Weise Zielstruktur von Antikörpern zu sein, insbesondere unter pathologischen Bedingungen. Da bei einigen RA-assoziierten Autoantigenen schon gezeigt wurde, dass bestimmte posttranslationale Modifikationen Epitope für Autoantikörper bilden, muss besonderes
25 Augenmerk darauf gelegt werden, dass diese Strukturen für das Testsystem realisiert werden.

Die in Tabelle 2 gelisteten Proteine sind als RA-assoziierte Autoantigene beschrieben. Die Relevanz der meisten dieser Einzelkomponenten für die Diagnostik der RA ist jedoch gering bzw. nicht ersichtlich. Das gleiche gilt für die auf mRNA-Ebene überexprimierten Gene, die in Tabelle 1 gelistet sind. Für sich genommen sind diese Komponenten nicht geeignet, die RA-Diagnostik wesentlich zu
30 verbessern. Dies zeigt sich daran, dass praktisch die Mehrheit der in Tabelle 1 und 2 gelisteten Proteine nicht für diese Zwecke zum Patent angemeldet ist. Lediglich einige wenige Proteine sind derart charakteristisch, dass eine Relevanz für die RA angenommen wurde. Dies betrifft z.B. das BiP (Heavy Chain Binding Protein), das Ziel einer Immunreaktion bei der RA ist. Hier ist beispielsweise eine posttranslationale Modifikation in Form einer Glykosylierung zu berücksichtigen, da diese
35 Bestandteil von Epitopen ist, die sowohl für die Erkennung von Autoantikörpern aus RA als auch für die Unterscheidung zwischen RA- und nicht-RA-Autoantikörpern erforderlich ist. Des Weiteren wurde

WO 02/097125

43

PCT/DE02/02010

die posttranslational von Arginin in Citrullin umgewandelte Aminosäure als wesentliches Epitop für RA-assoziierte Autoantikörper beschrieben(6). Eine ähnlich hohe Bedeutung für die RA-Diagnostik weisen das Sa-Antigen (5), das RA33-Antigen, und das Calpastatin auf.

Dennoch waren diese Komponenten für sich genommen nicht geeignet, eine eindeutige
5 Diagnosestellung der RA oder gar ein Therapiemonitoring zu ermöglichen. Der hier erfindungsgemäß dargestellte neue Ansatz bezieht sich auf das Immunom der RA. Das Immunom der RA umfasst die Gesamtheit der autoreaktiven Antikörper, die in der RA auftreten sowie die Gesamtheit der von diesen erkannten Autoantigene bzw. Auto-Epitope. Unerwarteterweise konnte festgestellt werden, dass es
10 erstmalig möglich ist, durch Betrachtung der Kombination RA-assoziiierter Autoantikörper eine Erkrankung eindeutig als RA zu definieren. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass unterschiedliche Muster von Autoantikörpern existieren, die ausschließlich bei der RA auftreten. Diese Muster beziehen auch solche Autoantigene bzw. Autoreaktivitäten mit ein, die für sich genommen unbedeutend für die RA erschienen. Dies ist umso überraschender, als erste Schritte in diese Richtung
15 von anderen Gruppen nicht zu diesem Ergebnis geführt haben, obwohl betont wird, dass die wichtigsten Autoantigene von acht verschiedenen Autoimmunerkrankungen des Menschen zum Einsatz kamen (11). Das gleiche trifft für einen Ansatz zu, in dem Autoantigene eingesetzt wurden, die für eine andere rheumatische Erkrankung, den systemischen Lupus erythematoses (SLE), relevant sind. Offenbar besteht der wesentliche Unterschied zwischen bereits publizierten Ansätzen und dem hier beschriebenen zum einen in der Art der Analyse (multivariant), zum anderen in der Komposition
20 der Autoantigene. Erst eine genügend hohe Anzahl von RA-relevanten Autoreaktivitäten ermöglicht eine eindeutige Diagnosestellung. Somit stellt also die Gesamtheit der RA-assoziierten Autoantikörper und Autoantigene eine Information dar, die – zusammen mit anderen Techniken (ProteinArray-Technologie (27), Datenverarbeitung) – u.a. als Werkzeug für die Diagnostik und Klassifizierung der RA nutzbar gemacht werden kann. Auch ein Experte auf diesem Gebiet hätte durch Analogieschlüsse
25 nicht auf diesen Nutzungsgrad kommen können. Das Immunom der RA oder auch bereits Teilmengen des Immunoms der RA können dazu genutzt werden, die RA eindeutig von anderen Erkrankungen oder dem gesunden Zustand abzugrenzen. Eine wirtschaftliche Nutzung der unerwarteten Erfindung ist darüber hinaus auch erst durch die in der heutigen Zeit vorhandenen oder noch in der Entwicklung befindlichen Möglichkeiten der High-Throughput-Technologien möglich. Dies bezieht sich
30 insbesondere auf die Multiparameter-Analyse von Autoreaktivitäten, da es hier erforderlich ist, eine Vielzahl von Untersuchungen parallel und unter Einsatz kleinster Patienten-Probenmengen durchzuführen.

Proteine oder Protein-Teilsequenzen der in Tab. 2 aufgeführten Komponenten oder Proteine und Protein-Teilsequenzen, die von den in Tab. 1 aufgeführten Genen kodiert werden, inclusive der ggf.
35 für die Diskriminierung von RA und nicht-RA erforderlichen posttranslationalen Modifikationen, werden synthetisiert und für die Erstellung von Autoreaktivitätsprofilen bereitgestellt. Die Synthese kann durch einen beliebigen molekularbiologischen an sich bekannten Ansatz erfolgen oder aber

WO 02/097125

44

PCT/DE02/02010

durch einen beliebigen proteinchemischen Ansatz. Darüber hinaus ist auch die halbarteifizielle (in vitro-Translation) oder arteifizielle Synthese nach dem Stand der Technik geeignet, die genannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen herzustellen.

ProteinArray / PeptidArray (28)

- 5 Proteine oder Proteinteilsequenzen gemäß Tabelle 2 oder 1 werden alle oder nur eine für die immunomische Diskriminierung von Krankheitsbildern nützliche Auswahl dieser dazu verwendet, eine Testmöglichkeit zu erstellen, die geeignet ist, den Autoreaktivitätsstatus eines Individuums zu bestimmen. Dies betrifft insbesondere die Auswahl von Citrullin, BiP, p205, IgG, Calpastatin, RA33, Sa-Antigen und Calreticulin. Hierzu werden die Proteine getrennt in räumlich auflösbaren Positionen auf eine Trägermatrix nach bekanntem aufgebracht. Position und Identität eines jeden immobilisierten Proteins, Peptids, modifizierten Proteins oder modifizierten Peptids sind bekannt. Das Microformat erlaubt den parallelen Nachweis von tausenden unterschiedlichen Antigenen und/oder Autoantigenen (Proteinen / Peptiden) im Submikroliter-Bereich von Humansenen. Bevorzugt ist die Erstellung eines ProteinArray, eines Hochdichte-Filters oder eines Hoch-Dichte Glasträgers oder einer anderen im Hochdichte-Verfahren hergestellten Matrix, die beschichtet oder unbeschichtet mit den Proteinen bzw. Protein-Teilsequenzen gekoppelt wird. Beispielsweise können Proteine oder Protein-Teilsequenzen auf derivatisierte oder beschichtete/aktivierte Glasträger aufgestempelt werden, oder aber der Auftrag erfolgt im Ink Jet-Verfahren, kapillar oder durch direkte Synthese auf den Array unter Verwendung von photolithographischen Masken oder von digitalen Mikrospiegeln. Anstelle von Glasträgern können auch Membranen und Filter, Polystyren-Matrices, Nanowell-Platten sowie Micropartikel Verwendung finden (29).

- Der ProteinArray wird mit einer geeigneten Verdünnung von Patientenserum oder auch von Patienten-Gelenkergüssen inkubiert. Während dieser Inkubation können etwaig vorhandene Antikörper mit Spezifität für eine oder mehrere Protein-Komponenten an diese Protein-Antigene binden. Anschließend erfolgt ein Waschschrift, um ungebundene Antikörper und Serum-Komponenten zu entfernen. Anschließend erfolgt Inkubation mit einem Zweitantikörper, der zum einen geeignet ist, eine erfolgte Antigen-Antikörper-Reaktion über Bindung des Erstantikörpers zu markieren und zum anderen eine geeignete Markierung, die eine Visualisierung und Quantifizierung erlaubt, geeigneterweise einen kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff oder einem kovalent gekoppeltem Enzym, das aus einem Vorläufer einen Farbstoff bilden kann. Anschließend erfolgt ein weiterer Waschschrift, um überschüssigen Zweitantikörper zu entfernen.

SuspensionsArray (30)

- Der SuspensionsArray verwendet als Matrix Plastik-Partikel, die mit den genannten Proteinen beschichtet werden. Dabei unterscheiden sich die optischen Eigenschaften der Partikel, die mit einem bestimmten Protein gekoppelt sind, von denen, die mit einem anderen Protein gekoppelt sind. Die immunomische Bestimmung erfolgt analog durch Inkubation mit Patientenserum oder anderen

WO 02/097125

PCT/DE02/02010

45

Körperflüssigkeiten. Über die Antikörperbindung wird direkt oder wieder indirekt durch einen geeigneten Zweitantikörper ein weiteres optisches (fluoreszierendes) Signal gesetzt. Die Analyse erfolgt dann in einem Vielfarben-Fluorescence Activated Cell (FAC-) Scan.

Zeitaufgelöste ProteinArrays (31)

- 5 Eine Polystyren-Oberfläche wird mit verschiedenen Proteinen oder Protein-Teilsequenzen aus Tabellen 1 und 2 gekoppelt. Die zu analysierenden Antikörper der Patientenseren werden biotinyliert unter Verwendung eines aktiven Biotin-Esters. Alternativ können zur Vermeidung von Inter-Patienten-Schwankungen durch unterschiedliche Biotinylierungseffizienz auch biotinylierte Sekundäntikörper verwendet werden, die spezifisch für humane Antikörper sind. Patienten-
10 Antikörper werden dann mit den Protein-gekoppelten Polystyren-Oberflächen inkubiert. Nach anschließendem Waschschritt erfolgt Detektion mittels Streptavidin, das mit einem fluoreszierenden Europium-Chelat gekoppelt ist. Der Nachweis erfolgt nach einem Wasch- und Trocknungsschritt mittels laserangeregter, zeitaufgelöster Festphasenfluoreszenzanalyse.

Daten-Muster und multifaktorielle Analyse

- 15 Parameter (z.B. die Autoreaktivitäten, die sich aus den in Tabelle 1 und 2 gelisteten Proteinen / Autoantigenen ergeben; z.B. die Autoreaktivitäten RF/ citrullin/ BIP/ Calpastatin/ Calreticulin/ RA33) werden so vollständig wie möglich bestimmt. Daten-Muster einzelner Patienten mit mehr als zwei aus sechs Missing Values werden a-priori von der Analyse ausgeschlossen.

- Die Auswertung des Immundetektionssystems liefert für jeden Patienten und jede Autoreaktivität
20 entweder ein negatives oder ein positives Ergebnis. Alternativ sind auch kontinuierliche Werte (ProteinArray, ELISA) möglich, die entweder artefiziell (mathematisch) oder über einen kontrollgruppenbezogenen (Analyse gegen geeignete Kontrollgruppe, z.B. age- und sex-matched gesunde Kontrollen oder Kontroll-Patienten mit einer anderen Erkrankung) Cut Off in positiv und negativ unterteilt werden. Jedes Daten-Muster wird mit dem CLASSIFI Programm-System(32)
25 analysiert und klassifiziert.

In einem ersten Schritt werden Tripel-Matrix-Charaktere einer jeden klinischen Diagnose-Kategorie in die erste Referenz-Klassifizierungsmaske eingegeben. Jeder Patient wird dann gemäß der höchsten Positionsübereinstimmung zwischen der Patienten-Maske und einer klinischen Referenz-Maske klassifiziert.

- 30 In einem zweiten Schritt werden diejenigen Daten-Spalten eliminiert, die den Tripel-Matrix-Charakter "0" für alle Referenz-Masken aufweisen, da diese nicht in der Lage sind, zwischen den Krankheits-Entitäten zu diskriminieren.

- In einem dritten Schritt eliminiert der CLASSIFI-Algorithmus vorübergehend entweder einzelne Parameter oder Kombinationen von zwei Parametern in allen Permutationen aus dem
35 Klassifikationsprozess. Das gesamte Datenset wird dann reklassifiziert. Parameter, die durch ihr

- vorübergehendes Entfernen das Klassifikationsergebnis beeinträchtigen, sind informativ, da offenbar keine essentielle Information verloren geht. Der Informationsgehalt eines jeden Parameters wird zwischenzeitlich durch den Algorithmus bereitgehalten, nach der Operation wieder eingesetzt und der nächste Parameter bzw. das nächste Parameterpaar zeitweise extrahiert und analog analysiert. Das
- 5 zeitweise Entfernen und Wiedereinsetzen wird so lange durchgeführt, bis der Informationsgehalt aller Parameter, entweder einzeln oder in Kombination, bekannt ist. Parameter, die sich als unformativ entweder einzeln oder in Kombination mit einem weiteren Parameter erwiesen haben, werden eliminiert. Die verbleibende Sequenz informativer Parameter bildet die Referenz-Klassifikations-Maske für die jeweilige klinische Prediktionskategorie.
- 10 In einem vierten Schritt wird die Klassifizierung optimiert durch Klassifizierung der Percentil-Schwellenwerte 10/90%, 15/85%, 20/80%, 25/75% und 30/70% mit anschließender Auswahl des am besten diskriminierenden Paares. Die besten Klassifikationsergebnisse werden typischerweise zwischen den 10/90% und 25/75% Perzentilenpaaren erzielt. Negative und positive prädiktive Werte in einer Confusion Matrix liefern Informationen darüber, wie gut Referenz- und zu testende Proben durch das
- 15 oder die verwendeten Muster diskriminiert werden.
- Zusätzlich werden die Daten-Muster eines jeden Patienten einer multifaktoriellen Analyse unterzogen. Die Multifaktoren für fünf Parameter-Muster wurden durch Multiplikation oder Division der verschiedenen Parameter in allen möglichen Kombinationen erhalten, gefolgt von Standardisierung der fünf Daten-Spalten gegenüber den Mittelwerten der RA-Referenz-Gruppe. Anschließend wurden
- 20 die Mittelwerte für jeden Parameter der übrigen Patienten-Gruppen (z.B. OA, reA, PsoA, andere) ermittelt. Multifaktoren aller Parameter-Permutationen wurden entweder durch Multiplikation ermittelt, wenn der Parameter-Mittelwert der betreffenden Patientengruppe gegenüber dem Referenzwert (RA) erhöht war, oder durch Division, wenn der Wert erniedrigt war.
- Die multifaktorielle Datenbank beinhaltet die gemessenen Parameter (RF/ Citrullin/ BiP/ Calpastatin/ Calreticulin/ RA33). 26 Multifaktoren wurden durch den CLASSIF1-Algorithmus klassifiziert. Hierfür
- 25 wurden alle Zahlen einer jeden Datenbank-Spalte entweder in - (kleiner als die untere Perzentile der Werteverteilung der Referenzpatienten [RA]), 0 (zwischen unterer und oberer Perzentile) oder + (größer als die obere Perzentile) Tripel-Matrix-Charaktere transformiert. Im Anschluss an die Transformation der Datenbank-Spalten wird eine Confusion Matrix zwischen klinischer Diagnose und
- 30 Computer-Klassifikation etabliert.
- Die Diagonalwerte dieser Confusion Matrix repräsentieren die Spezifität der Referenzproben und die Sensitivität für die zu testenden Proben. Diese werden während des anschließenden iterativen Lernprozesses weiter optimiert. Eine optimale Klassifizierung ist erreicht, wenn alle Proben korrekt klassifiziert sind, wenn also alle Diagonalwerte der Confusion Matrix 100% erreichen und die Werte
- 35 der nicht diagonalen Felder 0% sind. Der Lernprozess dient der Eliminierung nicht-informativer Parameter und somit einer Anreicherung der diskriminierenden Parameter.

Legende zur Figur**Figur 1: Autoreaktivitätsmuster mit RA33, RF, Citrullin, BiP und Calpastatin**

- 5 Dargestellt sind alle 32 möglichen Kombinationen der Autoreaktivitäten gegen IgG (RF), Citrullin, BiP, Calpastatin, RA33 und Calpastatin für die Krankheitsentitäten RA (rheumatoide Arthritis), reA (reaktive Arthritis), OA (Osteoarthritis), PsoA (Psoriasis-assoziierte Arthritis) und andere.

10

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatologie
BiP	Binding Protein, Heavy Chain Binding Protein
15 BSA	Rinder-Serum-Albumin (Bovine serum albumin)
Calp	Calpastatin
Calr	Calreticulin
Calp	Calpastatin
cDNA	complementary DNA, copy DNA
20 CH	Chondrocyte Antigen
Cit	citrullinierte Peptide
CrP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DPNII	von Diplococcus pneumoniae
25 dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate (equimolare Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat
EBNA-1	Epstein Barr Virus Nuclear Antigen-1
EBV	Epstein-Barr-Virus
30 ER	endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
HC	Human Cartilage

WO 02/097125	48	PCT/DE02/02010
HC gp39	Human Cartilage Glycoprotein 39	
HLA-System	Histokompatibilitäts-Antigene (HLA – human leucocyte antigen)	
HLA-DR4	HLA-Merkmal, das eine erhöhte Assoziation mit einer rheumatoiden Arthritis aufweist	
5 hnRNP	heterogenous ribonucleoprotein (RA33)	
Hsp	Heatshock Protein	
Ig	Immunglobulin	
IgG	Immunglobulin G	
IL-	Interleukin	
10 IR-3	Internal Repeat Region 3	
MCTD	Mixed Connective Tissue Disease (Mischkollagenose)	
MHC-	Major Histocompatibilitäts Komplex	
MMP	Matrix Metalloproteinase	
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure	
15 NAD	Nikotinamidadenindinukleotid	
NCBI	National Center for Biotechnology Information	
ND	Normal Donor (Normalspender)	
OA	Osteoarthritis	
O-GlcNAc	O-N-Acetylglucosamin	
20 PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
PHA	Phytohemagglutinin	
PM/DM	Polymyositis / Dermatomyositis	
PsoA	Psoriasis-assoziierte Arthritis	
RA	Rheumatoide Arthritis	
25 RA-A47	Arthritis-related antigen	
RA33	hnRNP A2	
RDA	Representational Difference Analysis	
reA	reaktive Arthritis	
RF	Rheumafaktoren	
30 RNA	Ribonucleinsäure	
RPMI	handelsübliches Zellkulturmedium, Verdünnungsmedium RPMI 1640; Moore, G. E. et al., J. Am. Assoc. 199, 519 - 524, 1967)	
RsaI	DNA-Restriktionsenzym RsaI von Rhodopseudomonas sphaeroides	
RT	Reverse Transcriptase (RT)	

WO 02/097125

49

PCT/DE02/02010

Sa-Antigen	50k-Protein aus humaner Milz und Placenta
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
TGF	transforming growth factor
5 UNIGENE	UniGene ist ein experimentelles System zur automatischen Partitionierung der GenBank Sequenzen in ein nicht-redundantes Set an genorientierten Clustern.
YKL-39	human cartilage-related protein

10

Referenzen

1. Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra, and et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315.
2. Kaps, C., C. Bramlage, H. Smolian, A. Haisch, U. Ungethum, G. R. Burmester, M. Sittlinger, G. Gross, and T. Haupl. 2002. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum* 46:149.
3. Roudier, J., G. Rhodes, J. Petersen, J. H. Vaughan, and D. A. Carson. 1988. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 27:367.
4. Albani, S., E. C. Keystone, J. L. Nelson, W. E. Ollier, A. La Cava, A. C. Montemayor, D. A. Weber, C. Montecucco, A. Martini, and D. A. Carson. 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1:448.
5. Despres, N., G. Boire, F. J. Lopez-Longo, and H. A. Menard. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21:1027.
6. Schellekens, G. A., B. A. de Jong, F. H. van den Hoogen, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101:273.
7. Girbal-Neuhauser, E., J. J. Durieux, M. Arnaud, P. Dalbon, M. Sebbag, C. Vincent, M. Simon, T. Senshu, C. Masson-Bessiere, C. Jolivet-Reynaud, M. Jolivet, and G. Serre. 1999. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162:583.
8. Alsalameh, S., J. Mollenhauer, N. Hain, K. P. Stock, J. R. Kalden, and G. R. Burmester. 1990. Cellular immune response toward human articular chondrocytes. T cell reactivities against chondrocyte and fibroblast membranes in destructive joint diseases. *Arthritis Rheum* 33:1477.
9. DeRisi, J., L. Penland, P. O. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y. A. Su, and J. M. Trent. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457.
10. Haab, B. B., M. J. Dunham, and P. O. Brown. 2001. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2:RESEARCH0004.
11. Robinson, W. H., C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriner, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S.

WO 02/097125

50

PCT/DE02/02010

- Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, and P. J. Utz. 2002. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* 8:295.
12. Eberwine, J. 1996. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* 20:584.
13. Cook, A. F., E. Vuocolo, and C. L. Brakel. 1988. Synthesis and hybridization of a series of biotinylated oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 16:4077.
14. Okamoto, T., T. Suzuki, and N. Yamamoto. 2000. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol* 18:438.
15. Fodor, S. P., J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, and D. Solas. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767.
16. Barone, A. D., J. E. Beecher, P. A. Bury, C. Chen, T. Doede, J. A. Fidanza, and G. H. McGall. 2001. Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20:525.
17. Hubank, M., and D. G. Schatz. 1994. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22:5640.
18. Lisitsyn, N., and M. Wigler. 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259:946.
19. Bussow, K., E. Nordhoff, C. Lubbert, H. Lehrach, and G. Walter. 2000. A human cDNA library for high-throughput protein expression screening. *Genomics* 65:1.
20. Altman, R., G. Alarcon, D. Appelrouth, D. Bloch, D. Borenstein, K. Brandt, C. Brown, T. D. Cooke, W. Daniel, D. Feldman, and et al. 1991. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 34:505.
21. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156.
22. Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6025.
23. Gress, T. M., J. D. Hoheisel, G. G. Lennon, G. Zehetner, and H. Lehrach. 1992. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 3:609.
24. Lennon, G. G., and H. Lehrach. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 7:314.
25. Krenn, V., A. Konig, F. Hensel, C. Berek, M. M. Souto Carneiro, W. Haedicke, Y. Wang, H. Vollmers, and H. K. Muller-Hermelink. 1999. Molecular analysis of rheumatoid factor (RF)-negative B cell hybridomas from rheumatoid synovial tissue: evidence for an antigen-induced stimulation with selection of high mutated IgVH and low mutated IgVL/lambda genes. *Clin Exp Immunol* 115:168.
26. Leushner, J. 2001. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging platform for genomics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 1:11.
27. MacBeath, G., and S. L. Schreiber. 2000. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289:1760.
28. Walter, G., K. Bussow, D. Cahill, A. Lueking, and H. Lehrach. 2000. Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening. *Curr Opin Microbiol* 3:298.
29. Spiro, A., M. Lowe, and D. Brown. 2000. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 66:4238.
30. Nolan, J. P., and F. F. Mandy. 2001. Suspension array technology: new tools for gene and protein analysis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47:1241.
31. Madersbacher, S., and P. Berger. 2000. Antibodies and immunoassays. *Methods* 21:41.
32. Valet, G., M. Valet, D. Tschöpe, H. Gabriel, G. Rothe, W. Kellermann, and H. Kahle. 1993. White cell and thrombocyte disorders. Standardized, self-learning flow cytometric list mode data classification with the CLASSIF1 program system. *Ann N Y Acad Sci* 677:233.

55

WO 02/097125

51

PCT/DE02/02010

Patentansprüche

1. Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der Sequenzen einzelner Gene, einer Auswahl von
5 Genen oder aller Gene, die in der Tabelle 1 genannt sind, sowie der Gene, die für die Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind, codieren.
2. Werkzeuge nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie Gensequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 genannten Genen bzw. zu den Genen, die für die in der
10 Tabelle 2 genannten Proteine codieren, sind oder mindestens 80% Sequenzidentität in den Proteinkodierenden Abschnitten besitzen.
3. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie Sequenzabschnitte oder Teilsequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch sind zu den in der Tabelle 1 genannten und
15 unter Anspruch 2 fallenden Gene oder eine Sequenzidentität von mindestens 80% zu den entsprechenden Abschnitten der genannten Gene besitzen.
4. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung eines
20 4.1. High-Throughput Verfahrens der (Micro-) Array-Hybridisierung
4.2. High-Throughput Verfahrens mit Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion zur (Semi-) Quantifizierung
beruhen.
- 25 5. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einer markierten Patientenprobe und einer zweiten unterschiedlich markierten Kontrollprobe zur vergleichenden Doppel-Hybridisierung an einen (Micro-) Array zusammen mit der Patientenprobe (rot/grün Vergleichs-Hybridisierung) beruhen.
- 30 6. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 für diagnostische Zwecke, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einzelner, einer Auswahl oder aller aus den Gensequenzen in Anspruch 1 bis 3 abgeleiteten Proteine bzw. Peptide beruhen.
- 35 7. Werkzeuge nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 2 genannt sind, beruhen.

WO 02/097125

52

PCT/DE02/02010

8. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von Teilsequenzen einzelner Proteine, einer Auswahl von Proteinen oder aller Proteine, die in der Tabelle 1 genannt sind, beruhen.
- 5
9. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie Proteine oder Protein-Teilsequenzen einbeziehen, die in ihrer Sequenz identisch zu den in der Tabelle 1 abgeleiteten Proteinen oder den in der Tabelle 2 genannten Proteinen sind oder mindestens 80% Sequenzidentität besitzen.
- 10
10. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von
- 10.1. High-Throughput Verfahren in der Protein-Expressionsanalytik (hochauflösende, zweidimensionale Protein-Gelelektrophorese, MALDI-Techniken)
- 15 10.2. High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von Autoantikörpern als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen
- 10.3. High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik (Protein Arrays) zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen
- 20 10.4. Nicht-High-Throughput Verfahren in der Protein-Spotting Technik zum Screening von autoreaktiven T-Zellen als diagnostisches Werkzeug für entzündliche Gelenkerkrankungen und andere entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen beim Menschen beruhen.
- 25
11. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für Proteine oder Teilsequenzen sind, die unter den Ansprüchen 6 bis 9 aufgeführt sind, beruhen.
- 30
12. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf der Verwendung der entsprechenden homologen Sequenzen einer anderen Spezies zur Analytik in Tierexperimenten oder zur Diagnostik bei Tieren mit entzündlichen Gelenkerkrankungen und anderen entzündlichen, infektiösen oder tumorösen Erkrankungen beruhen.
- 35
13. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 11 als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen) in den unter Anspruch 1 bis 3 genannten Genen oder deren

WO 02/097125

53

PCT/DE02/02010

Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren).

- 5 14. Werkzeuge nach den Ansprüchen 6 bis 11 und 13 zum Nachweis genetischer Veränderungen (Mutationen) in den Genen oder deren Regulationssequenzen (Promotor, Enhancer, Silencer, spezifische Sequenzen für die Bindung weiterer regulatorischer Faktoren), die für die in der Tabelle 2 genannten Proteine codieren.
- 10 15. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur molekularen Definition entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide sowie der Proteine und Protein-Teilsequenzen aus Anspruch 6 bis 9 oder den dafür codierenden Gensequenzen.
- 15 16. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zum Therapie-Entscheid entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide.
- 20 17. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 zur Verlaufskontrolle/Therapiekontrolle entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen beim Menschen unter Verwendung der in Anspruch 1-3 benannten Gene, DNA-Sequenzen oder davon abgeleitete Proteine oder Peptide.
- 25 18. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 als molekulare Werkzeuge zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 1-3 benannten Gene oder Gensequenzen beinhalten.
- 30 19. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der Expression der in Anspruch 6 bis 9 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen beinhalten.
- 35 20. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 19 zur Entwicklung von Therapiekonzepten, die die direkte oder indirekte Beeinflussung der autoreaktiver T-Zellen, gerichtet gegen die in Anspruch 8-11 benannten Proteine oder Protein-Teilsequenzen, beinhalten.

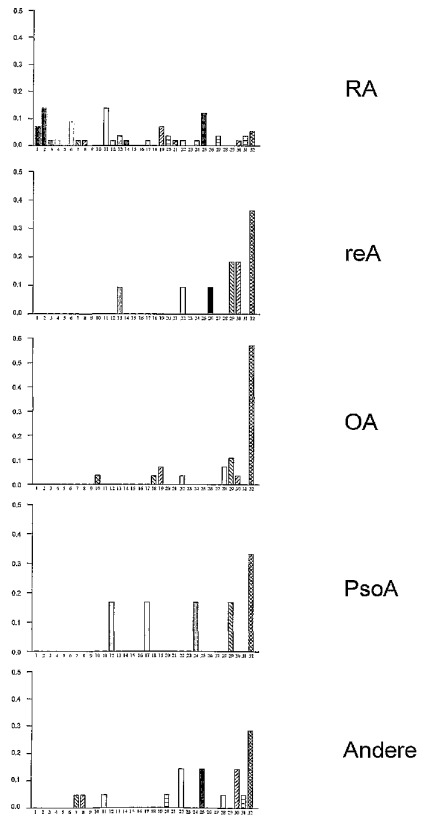
21. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 20 zur Beeinflussung der biologischen Wirkung der aus den in Anspruch 1-3 benannten Gensequenzen abgeleiteten Proteine.
22. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 21 zur Beeinflussung der unmittelbaren molekularen Regelkreise, in die die in Anspruch 1-3 benannten Gene und davon abgeleiteten Proteine eingebunden sind.
23. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 22 zur Entwicklung von Therapiekonzepten unter Design und Verwendung von Interpretationsalgorithmen, die die genannten Gene und Sequenzen und deren Regulationsmechanismen verwenden, um Therapiekonzepte, -wirkungen, -optimierungen oder Krankheitsprognosen erkennen zu lassen oder vorauszusagen.
24. Werkzeuge nach den Ansprüchen 1 bis 5 und 18 bis 22 zur Entwicklung von biologisch wirksamen Medikamenten (Biologicals) unter Verwendung von Genen, Gensequenzen, Regulation von Genen oder Gensequenzen, oder unter Verwendung von Proteinen, Proteinsequenzen, Fusionsproteinen nach Ansprüchen 1 bis 3 und 6 bis 9 oder unter Verwendung von Antikörpern oder autoreaktiven T-Zellen nach den Ansprüchen 10-14.
25. Array als molekulares Werkzeug, bestehend aus verschiedenen Antikörpern oder Molekülen mit vergleichbarem proteinspezifischen Bindungsverhalten, die zum Nachweis aller oder einer Auswahl der von den Genen der Tabelle 1 abgeleiteten Proteine oder aller bzw. einer Auswahl der Proteine der Tabelle 2 dienen.
26. Verwendung von Werkzeugen nach den Ansprüchen 1 bis 24 zur
- 26.1. Untersuchung von Blutproben oder Gewebeproben in der medizinischen Diagnostik
- 26.2. Anwendung in der Analytik nach Beispiel 1
- 26.3. Anwendung für für Therapiekonzepte nach Beispiel 2.

WO 02/097125

PCT/DE02/02010

Figur 1

1/1



【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Dezember 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/097125 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68, (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): OLIGENE GMBH (DE/DE); Schemanstrasse 20/21, 10117 Berlin (DE).
G01N 33/564

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02010

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Mai 2002 (30.05.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 101 27 572.2 30. Mai 2001 (30.05.2001) DE

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÄUPL, Thomas (DE/DE); Am Schützenwäldchen 59, 15357 Erkner (DE);
UNGETHÜM, Ute (DE/DE); Chausseestrasse 93, 10115 Berlin (DE);
BLÄSS, Stefan (DE/DE); Farkastrasse 74, 12107 Berlin (DE).

(74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, 10315 Berlin (DE).

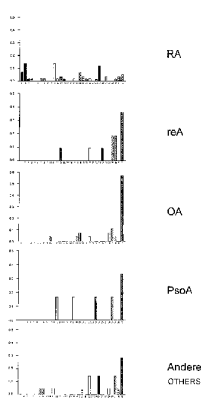
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: TOOLS FOR THE DIAGNOSIS, MOLECULAR DEFINITION AND DEVELOPMENT OF TREATMENT OF CHRONIC INFLAMMATORY JOINT DISEASES

(54) Bezeichnung: WERKZEUGE ZUR DIAGNOSTIK, MOLEKULAREN DEFINITION UND THERAPIENTWICKLUNG CHRONISCHER ENTZÜNDLICHER GELENKERKRANKUNGEN



WO 02/097125 A3



(57) Abstract: The invention relates to tools for the diagnosis, molecular definition and development of treatment of chronic inflammatory joint diseases and other inflammatory, infectious or tumorous diseases. According to the invention, genome data (genomics), proteome data (proteomics) and immunome data (immunomics) are used in the analysis and development of treatment of chronic joint diseases. The invention is based on the use of gene sequences and derived mRNAs and proteins, in addition to antibodies having a specific nature for the derived proteins, for characterising inflammatory and non-inflammatory rheumatic joint diseases, auto-immune diseases and infectious diseases. Etiologically significant pathogenicity principles of chronic inflammatory joint diseases which have been unclear until now can be derived from the examinations carried out. Furthermore, interpretation algorithms can be created for the classification, prognosis evaluation and treatment optimisation of said joint diseases, and new strategies for treatment and points of attack for medicaments can be derived.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Werkzeuge zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapie-Entwicklung chronischer entzündlicher Gelenkerkrankungen und anderer entzündlicher, infektiöser oder tumoröser Erkrankungen auf der Grundlage von Genomdaten (Genomics), Proteomdaten (Proteomics) und Immunomdaten (Immunomics) in der Analyse und Therapie-Entwicklung bei chronischen Gelenkerkrankungen. Die Erfindung beruht auf der Verwendung von Gensequenzen sowie abgeleiteten mRNAs und Proteinen sowie auf Antikörpern mit Spezifität für die abgeleiteten Proteine zur Charakterisierung von entzündlich-rheumatischen und nicht-entzündlichen rheumatischen Gelenkerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Infektionserkrankungen. Aus den Untersuchungen können ätiologisch bedeutsame Pathogenitätsprinzipien der bislang ungeklärten chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen abgeleitet werden. Ferner können Interpretationsalgorithmen zur Klassifikation, Prognosebeurteilung und Therapieoptimierung dieser

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/097125 A3



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

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
 — vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), europäisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**Recherchenberichts:** 18. September 2003

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

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/02010
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/564 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 G01N 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) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BLÄSS S ET AL: "The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. A new viewpoint of immunopathogenesis in rheumatoid arthritis and therapeutic consequences!" ZEITSCHRIFT FÜR RHEUMATOLOGIE. GERMANY FEB 2001, vol. 60, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 1-16, XP002244651 ISSN: 0340-1855	1-3,6-9, 11-24,26
Y	abstract page 5 -page 13 tables 1,3 figure 2 --- -/--	4,5,10, 25
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 June 2003		11/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentstr. 2 NL - 2200 LV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2340, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Madlener, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/02010
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 47925 A (OXFORD GLYCOSCIENCES UK LTD ;PAREKH RAJESH BHIKHU (GB); PATEL THAK) 23 September 1999 (1999-09-23) abstract page 3, paragraph 2 -page 4, paragraph 2 claims 1-48	1-26
Y	EP 0 378 732 A (ACRAF) 25 July 1990 (1990-07-25) abstract claims 1-25	1-26
Y	US 6 100 098 A (NEWKIRK MARIANNA M) 8 August 2000 (2000-08-08) abstract claims 1,2	1-26
Y	HELLER R A ET AL: "Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, no. 94, pages 2150-2155, XP002076789 ISSN: 0027-8424 the whole document	4,5
Y	ZANDERS E D ET AL: "Analysis of immune system gene expression in small rheumatoid arthritis biopsies using a combination of subtractive hybridization and high-density cDNA arrays." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. NETHERLANDS 13 JAN 2000, vol. 233, no. 1-2, 13 January 2000 (2000-01-13), pages 131-140, XP004188252 ISSN: 0022-1759 the whole document	4,5
Y	JOOS T O ET AL: "A MICROARRAY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR AUTOIMMUNE DIAGNOSTICS" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, vol. 21, 2000, pages 2641-2650, XP001053250 ISSN: 0173-0835 abstract	10,25
	--- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/02010
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEHEUS L ET AL: "Multicenter validation of recombinant, natural and synthetic antigens used in a single multiparameter assay for the detection of specific anti-nuclear autoantibodies in connective tissue disorders." CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY. ITALY 1999 MAR-APR, vol. 17, no. 2, March 1999 (1999-03), pages 205-214, XP009012457 ISSN: 0392-856X the whole document	1-26
P, Y	WO 02 33415 A (BIO RAD LABORATORIES) 25 April 2002 (2002-04-25) abstract claims 1-16	1-26
P, Y	ROBINSON WILLIAM H ET AL: "Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses." NATURE MEDICINE. UNITED STATES MAR 2002, vol. 8, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 295-301, XP002244653 ISSN: 1078-8956 the whole document	1-26
P, X	ROBINSON WILLIAM H ET AL: "Proteomics technologies for the study of autoimmune disease." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. UNITED STATES APR 2002, vol. 46, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 885-893, XP002244654 ISSN: 0004-3591 the whole document	1-26
P, Y	HUEBER WOLFGANG ET AL: "Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease." ARTHRITIS RESEARCH. ENGLAND 2002, vol. 4, no. 5, 2002, pages 290-295, XP009012451 ISSN: 1465-9905 the whole document	1-26
P, Y	VAN BOEKEL MARTINUS A M ET AL: "Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value." ARTHRITIS RESEARCH. ENGLAND 2002, vol. 4, no. 2, 2002, pages 87-93, XP009012450 ISSN: 1465-9905 the whole document	1-26
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DE 02/02010
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MÉNARD H A ET AL: "Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system." ARTHRITIS RESEARCH. ENGLAND 2000, vol. 2, no. 6, 2000, pages 429-432, XP002244655 ISSN: 1465-9905 the whole document	1-26
A	HAAB B B ET AL: "Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions." GENOME BIOLOGY ENGLAND 2001, vol. 2, no. 2, 2001, page RESEARCH0004 XP001147826 ISSN: 1465-6914 the whole document	1-26
A	PEDERSON T: "The immunome." MOLECULAR IMMUNOLOGY. ENGLAND 1999 OCT-NOV, vol. 36, no. 15-16, October 1999 (1999-10), pages 1127-1128, XP002244656 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-26
A	JONGENEEL V: "Towards a cancer immunome database." CANCER IMMUNITY 'ELECTRONIC RESOURCE!: A JOURNAL OF THE ACADEMY OF CANCER IMMUNOLOGY. UNITED STATES 30 MAR 2001, vol. 1, 30 March 2001 (2001-03-30), page 3 XP002244657 ISSN: 1424-9634 the whole document	1-26
A	KHAN J ET AL: "DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. NETHERLANDS 25 MAR 1999, vol. 1423, no. 2, 25 March 1999 (1999-03-25), pages M17-M28, XP002244658 ISSN: 0006-3002 the whole document	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/02010
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MENDOZA L G ET AL: "High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." BIOTECHNIQUES. UNITED STATES OCT 1999, vol. 27, no. 4, October 1999 (1999-10), pages 778-780, 782 - 786, 788, XP000992893 ISSN: 0736-6205 the whole document	1-26
A	BORREBAECK C A K: "Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 379-382, XP004215165 ISSN: 0167-5699 the whole document	1-26
E	WO 02 084249 A (STEINMAN LAWRENCE ;UNIV LELAND STANFORD JUNIOR (US); GARREN HIDEKI) 24 October 2002 (2002-10-24) abstract claims 1-37	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/DE 02/02010
--

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(d) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-26 (partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 02/02010

Continuation of Box I.2

Claims: 1-26 (partially)

The current Claims 1-26 relate to a disproportionately large number of possible devices ("tools"). In fact, they encompass so many possible permutations that they appear too broadly worded (PCT Article 6) to the extent that it is impossible to conduct a meaningful search of the entire scope of protection sought.

Therefore, the search was directed to the parts of the claims that can be considered clear in the above sense, that is to devices for the diagnosis, molecular definition and development of treatment for rheumatoid arthritis (RA) (cf. page 42, lines 5-6) in humans using the sequences of the gene RF/IgG, Cit (citrullinated peptide), BiP (heavy chain binding protein), calpastatin (calp) and RA33 (=hnRNP A2) (cf. page 21, line 20 – page 23; page 42, line 26 – page 43, line 3).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 02/02010

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9947925	A	23-09-1999	AU 756588 B2	16-01-2003
			AU 2942999 A	11-10-1999
			CA 2323238 A1	23-09-1999
			CN 1300367 T	20-06-2001
			EP 1062509 A2	27-12-2000
			WO 9947925 A2	23-09-1999
			JP 2002507723 T	12-03-2002
			ZA 9902079 A	10-10-2000
EP 0378732	A	25-07-1990	EP 0378732 A1	25-07-1990
			DE 378732 T1	02-05-1991
			EP 0585960 A2	09-03-1994
			GR 90300168 T1	27-09-1991
			US 5047509 A	10-09-1991
			US 5284750 A	08-02-1994
			US 5258312 A	02-11-1993
US 6100098	A	08-08-2000	NONE	
WO 0233415	A	25-04-2002	AU 9688301 A	29-04-2002
			WO 0233415 A2	25-04-2002
WO 02084249	A	24-10-2002	WO 02084249 A2	24-10-2002
			US 2003003516 A1	02-01-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02/02010
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68 G01N33/564		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfgebiet (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfgebiet gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank, und evtl. verwendete Suchbegriffe) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BLÄSS S ET AL: "The immunologic humunculus in rheumatoid arthritis. A new viewpoint of immunopathogenesis in rheumatoid arthritis and therapeutic consequences!" ZEITSCHRIFT FÜR RHEUMATOLOGIE. GERMANY FEB 2001, Bd. 60, Nr. 1, Februar 2001 (2001-02), Seiten 1-16, XP002244651 ISSN: 0340-1855	1-3, 6-9, 11-24, 26
Y	Zusammenfassung Seite 5 -Seite 13 Tabellen 1, 3 Abbildung 2	4, 5, 10, 25
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ** Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* Dieses Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *F* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung bestritten werden soll oder die aus einem anderen, besonderen Grund angegeben ist (wie ausgefüllt) *G* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *H* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *I* Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *J* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
30. Juni 2003		11/07/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Madtner, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 02/02010

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 47925 A (OXFORD GLYCOSCIENCES UK LTD ;PAREKH RAJESH BHIKHU (GB); PATEL THAK) 23. September 1999 (1999-09-23) Zusammenfassung Seite 3, Absatz 2 -Seite 4, Absatz 2 Ansprüche 1-48 ---	1-26
Y	EP 0 378 732 A (ACRAF) 25. Juli 1990 (1990-07-25) Zusammenfassung Ansprüche 1-25 ---	1-26
Y	US 6 100 098 A (NEWKIRK MARIANNA M) 8. August 2000 (2000-08-08) Zusammenfassung Ansprüche 1,2 ---	1-26
Y	HELLER R A ET AL: "Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, Nr. 94, Seiten 2150-2155, XP002076789 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ---	4,5
Y	ZANDERS E D ET AL: "Analysis of immune system gene expression in small rheumatoid arthritis biopsies using a combination of subtractive hybridization and high-density cDNA arrays." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. NETHERLANDS 13 JAN 2000, Bd. 233, Nr. 1-2, 13. Januar 2000 (2000-01-13), Seiten 131-140, XP004188252 ISSN: 0022-1759 das ganze Dokument ---	4,5
Y	JOOS T O ET AL: "A MICROARRAY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR AUTOIMMUNE DIAGNOSTICS" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, Bd. 21, 2000, Seiten 2641-2650, XP001053250 ISSN: 0173-0835 Zusammenfassung --- -/-	10,25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02/02010
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MEHEUS L ET AL: "Multicenter validation of recombinant, natural and synthetic antigens used in a single multiparameter assay for the detection of specific anti-nuclear autoantibodies in connective tissue disorders." CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY. ITALY 1999 MAR-APR, Bd. 17, Nr. 2, März 1999 (1999-03), Seiten 205-214, XP009012457 ISSN: 0392-856X das ganze Dokument	1-26
P,Y	WO 02 33415 A (BIO RAD LABORATORIES) 25. April 2002 (2002-04-25) Zusammenfassung Ansprüche 1-16	1-26
P,Y	ROBINSON WILLIAM H ET AL: "Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses." NATURE MEDICINE. UNITED STATES MAR 2002, Bd. 8, Nr. 3, März 2002 (2002-03), Seiten 295-301, XP002244653 ISSN: 1078-8956 das ganze Dokument	1-26
P,X	ROBINSON WILLIAM H ET AL: "Proteomics technologies for the study of autoimmune disease." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. UNITED STATES APR 2002, Bd. 46, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 885-893, XP002244654 ISSN: 0004-3591 das ganze Dokument	1-26
P,Y	HUEBER WOLFGANG ET AL: "Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease." ARTHRITIS RESEARCH. ENGLAND 2002, Bd. 4, Nr. 5, 2002, Seiten 290-295, XP009012451 ISSN: 1465-9905 das ganze Dokument	1-26
P,Y	VAN BOEKEL MARTINUS A M ET AL: "Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value." ARTHRITIS RESEARCH. ENGLAND 2002, Bd. 4, Nr. 2, 2002, Seiten 87-93, XP009012450 ISSN: 1465-9905 das ganze Dokument	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Altzeichen PCT/DE 02/02010
C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MÉNARD H A ET AL: "Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system." ARTHRITIS RESEARCH. ENGLAND 2000, Bd. 2, Nr. 6, 2000, Seiten 429-432, XP002244655 ISSN: 1465-9905 das ganze Dokument ---	1-26
A	HAAB B B ET AL: "Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions." GENOME BIOLOGY ENGLAND 2001, Bd. 2, Nr. 2, 2001, Seite RESEARCH0004 XP001147826 ISSN: 1465-6914 das ganze Dokument ---	1-26
A	PEDERSON T: "The immune." MOLECULAR IMMUNOLOGY. ENGLAND 1999 OCT-NOV, Bd. 36, Nr. 15-16, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 1127-1128, XP002244656 ISSN: 0161-5890 das ganze Dokument ---	1-26
A	JONGENEEL V: "Towards a cancer immune database." CANCER IMMUNITY 'ELECTRONIC RESOURCE': A JOURNAL OF THE ACADEMY OF CANCER IMMUNOLOGY. UNITED STATES 30 MAR 2001, Bd. 1, 30. März 2001 (2001-03-30), Seite 3 XP002244657 ISSN: 1424-9634 das ganze Dokument ---	1-26
A	KHAN J ET AL: "DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. NETHERLANDS 25 MAR 1999, Bd. 1423, Nr. 2, 25. März 1999 (1999-03-25), Seiten M17-M28, XP002244658 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument --- -/--	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02/02010
C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag Nr.
A	MENDOZA L G ET AL: "High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)." BIOTECHNIQUES, UNITED STATES OCT 1999, Bd. 27, Nr. 4, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 778-780, 782 - 786, 788, XP000992893 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument	1-26
A	BORREBAECK C A K: "Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 21, Nr. 8, 1. August 2000 (2000-08-01), Seiten 379-382, XP004215165 ISSN: 0167-5699 das ganze Dokument	1-26
E	WO 02 084249 A (STEINMAN LAWRENCE ;UNIV LELAND STANFORD JUNIOR (US); GARREN HIDEKI) 24. Oktober 2002 (2002-10-24) Zusammenfassung Ansprüche 1-37	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkommen
PCT/DE 02/02010

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. Ansprüche Nr. 1-26 (partially)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) aufgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitslichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02 02010

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-26 (partially)

Die geltenden Patentansprüche 1-26 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Vorrichtungen ("Werkzeuge"). In der Tat umfassen sie so viele mögliche Permutationen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße als zu weitläufig gefasst erscheinen, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar gefasst erscheinen, nämlich auf Vorrichtungen zur Diagnostik, molekularen Definition und Therapieentwicklung rheumatoider Arthritis (RA) (vgl. S. 42, Zeilen 5-6) beim Menschen unter Verwendung der Sequenzen der Gene RF/IgG, Cit (citruillinierte Peptide), BiP (heavy chain binding protein), Calpastatin (calp) und RA33 (=hnRNP A2) (vgl. S. 21, Z. 20 - S. 23; S. 42, Z. 26 - S. 43, Z. 3).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
 Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/DE 02/02010

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9947925 A	23-09-1999	AU 756588 B2	16-01-2003
		AU 2942999 A	11-10-1999
		CA 2323238 A1	23-09-1999
		CN 1300367 T	20-06-2001
		EP 1062509 A2	27-12-2000
		WO 9947925 A2	23-09-1999
		JP 2002507723 T	12-03-2002
		ZA 9902079 A	10-10-2000
EP 0378732 A	25-07-1990	EP 0378732 A1	25-07-1990
		DE 378732 T1	02-05-1991
		EP 0585960 A2	09-03-1994
		GR 90300168 T1	27-09-1991
		US 5047509 A	10-09-1991
		US 5284750 A	08-02-1994
		US 5258312 A	02-11-1993
US 6100098 A	08-08-2000	KEINE	
WO 0233415 A	25-04-2002	AU 9688301 A	29-04-2002
		WO 0233415 A2	25-04-2002
WO 02084249 A	24-10-2002	WO 02084249 A2	24-10-2002
		US 2003003516 A1	02-01-2003

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	F

(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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ブレス シュテファン

ドイツ連邦共和国, ベルリン D - 1 2 1 0 7, フルカシュトラッセ 7 4

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA11 AA12 AA13 CA09 HA12
 4B063 QA08 QA17 QA19 QQ02 QQ43 QQ48 QQ53 QQ58 QQ79 QR08
 QR32 QR55 QR62 QR82 QS25 QS33 QS34 QS39

专利名称(译)	用于慢性炎性关节疾病的诊断，分子测定和治疗开发的工具		
公开(公告)号	JP2004533830A	公开(公告)日	2004-11-11
申请号	JP2003500290	申请日	2002-05-30
申请(专利权)人(译)	傲锐东大门的Em-基于硬		
[标]发明人	ホイプル トーマス ウンゲテューム ウテ プレス シュテファン		
发明人	ホイプル トーマス ウンゲテューム ウテ プレス シュテファン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K48/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA08 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ48 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39		
代理人(译)	森田健一		
优先权	10127572 2001-05-30 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

慢性炎性关节疾病的诊断，分子定义和治疗开发的工具，也用于人类的其他炎性疾病，感染和肿瘤，其使用约500种所列基因中的一种或多种的序列或编码约40种所列蛋白中的任何一种的基因。。对于包含抗体或具有相似特异性蛋白质结合特性的分子的阵列，还包括独立权利要求，用于检测至少一种特定蛋白质。

