

(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2005-514932

(P2005-514932A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/573</b>	A 6 1 K 31/573	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 P 29/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-560515 (P2003-560515)	(71) 出願人	503252599
(86) (22) 出願日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		サイトカイン・ファーマサイエンス・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月18日 (2004.8.18)		CYTOKINE PHARMASCIENCES, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/041051		アメリカ合衆国、ペンシルベニア 19406、キング・オブ・プラシア、サウス・ワナー・ロード 150、スイート 420、ウォールナッツ・ヒル・プラザ
(87) 国際公開番号	W02003/060468	(74) 代理人	100078662
(87) 国際公開日	平成15年7月24日 (2003.7.24)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	60/341,832	(74) 代理人	100075225
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		弁理士 篠田 文雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症疾患におけるマクロファージ遊走阻害因子 (M I F) プロモーター多型

## (57) 【要約】

本明細書に記載したのは、遺伝子リポーターアッセイにおいてマクロファージ阻害因子 (M I F) プロモーターの活性に機能的に影響を及ぼすヒト M i f 遺伝子の - 8 1 7 位における新規 C A T T - テトラヌクレオチド反復多型である。5、6、7、または 8 - C A T T 反復単位を含む 4 つの遺伝子型を記載する。これらの中で、5 - C A T T 対立遺伝子は、最も低いレベルの基礎および刺激 M I F プロモーター活性をインビトロで示す。発現の低い 5 - C A T T 反復対立遺伝子の存在は、関節リウマチ患者の集団における疾患重症度の低さと相関していた。ヒト M i f 遺伝子の - 8 1 7 位におけるこの C A T T - テトラヌクレオチド反復多型を検出するための、および、重度の炎症疾患に対する素因を評価するために同物を使用するための、方法、組成物および装置も開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

非感染性炎症疾患の重症度、または、非感染性炎症疾患の重症度に対する素因を診断する方法であって、前記方法が、MIFポリペプチド発現の増加または減少に相関したヒトMifプロモーターにおける多型を検出することを含み、前記多型の検出が、前記疾患の重症度または前記疾患の重症度に対する素因の指標である、前記方法。

## 【請求項2】

非感染性炎症疾患が、自己免疫、関節リウマチ、および移植片対宿主疾患からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

ヒトMifプロモーターにおける多型が、ヒトMif遺伝子の-817位におけるCATT-テトラヌクレオチド反復多型である、請求項2記載の方法。

## 【請求項4】

ヒトMif遺伝子の-817位におけるCATT-テトラヌクレオチド反復多型が、5、6、7、および8反復単位からなる群より選択され、少なくとも1つの対立遺伝子における5反復単位の存在が、低い疾患重症度の存在または素因を示す、請求項3記載の方法。

## 【請求項5】

PCR技術を使用してMifプロモーターを増幅することを含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項6】

ヒトMifプロモーターの領域を増幅するように選択されたPCRプライマーセットであって、前記PCRプライマーセットが、(i)MIF-F(-1024)およびMIF-R(-421);(ii)MIF-F(-441)およびMIF-R(+4);(iii)MIF-F(-13)およびMIF-R(+395);および(iv)MIF-F(+379)およびMIF-R(+1043)からなる群より選択される、前記PCRプライマーセット。

## 【請求項7】

請求項6記載のプライマーセットを使用することを含む、ヒトMifプロモーター領域における多型を検出する方法。

## 【請求項8】

請求項6記載のPCRプライマーセットを含む製造品。

## 【請求項9】

ヒトMifプロモーターを含む単離した核酸分子。

## 【請求項10】

ゲノムDNA断片である、請求項9記載の単離した核酸分子。

## 【請求項11】

ゲノムDNA断片が、ヒト被験者のDNA試料から増幅されている、請求項10記載の単離した核酸分子。

## 【請求項12】

ヒトMif遺伝子の-817位におけるCATT-テトラヌクレオチド反復多型を含むヒトMifプロモーターの一部を含む、請求項9記載の単離した核酸分子。

## 【請求項13】

ヒト被験者において、MIFポリペプチド発現の増加または減少と相関するヒトMifプロモーターの多型を検出することであって、前記多型の検出が、疾患の重症度または前記疾患の重症度に対する素因の指標であり；  
前記ヒト被験者を処置して、炎症疾患の重症度を予防もしくは低下、または、前記炎症疾患の発症を遅延させること、  
を含む、非感染性炎症疾患の重症度または非感染性炎症疾患の重症度に対する素因について個体をスクリーニングすることを含む、炎症疾患治療の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 14】

M I F 阻害剤、抗 T N F 抗体、抗 I L 1 抗体、および抗 I F N - 抗体、I L - 1 R A、ステロイド、グルココルチコイド、および I L - 1 0 からなる群より選択される少なくとも 1 つの薬剤の有効量を投与することによりヒト被験者を処置することを含む、請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

炎症疾患が関節リウマチであり、ヒト M i f プロモーターの多型が、ヒト M i f 遺伝子の - 8 1 7 位における C A T T - テトラヌクレオチド反復多型である、請求項 14 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2001年12月21日に提出された米国仮特許出願番号第60/341,832号の優先権を主張する。その仮出願の全体を参照して本明細書に取り込む。

## 【0002】

発明の背景

発明の分野

本発明は、マクロファージ遊走阻害因子(M I F)をコードする遺伝子のプロモーターにおける機能的多型に基づいた診断法および装置に関する。より具体的には、本発明は、このプロモーター多型の存在についてスクリーニングすることにより、特定の疾患状態に対する素因を診断する方法に関する。本発明はまた、多型についてスクリーニングする装置、多型を含むM I F 遺伝子、およびそのためのプローブに関する。

20

## 【背景技術】

## 【0003】

技術の背景

多くの実験研究により、マクロファージ遊走阻害因子(M I F)は免疫系内のグルココルチコイド作用の生理的対抗調節因子として機能するという概念がもたらされた。この役割では、サイトカインカスケード内のM I Fの位置は、内因性グルココルチコイドと協奏的に作用して、炎症応答のセット点および大きさを制御することである(1)。M I Fはまた、関節リウマチ(2)、敗血症(3、4)、急性呼吸窮迫症候群(5)、および糸球体腎炎(6)などの炎症疾患において、いくつかの直接的で炎症誘発性の役割を有する。

30

## 【0004】

M I Fは、元々、腹膜マクロファージの遊走を阻害するTリンパ球由来因子として30年前から記載されていたが(7)、現在では、マクロファージ自体を含むいくつかの他の細胞型がM I Fの重要な起源であることが知られている(8)。M I Fレベルは、関節リウマチ患者の血清および滑液で上昇しており(2、9)、滑膜関節内ではM I F免疫染色は、滑膜裏打ちC D 1 4 +マクロファージおよび線維芽細胞様の滑膜細胞に局在できる。放出時に、M I Fは、サイトカイン発現(T N F (8、10)、I L - 1、I L - 2 (11)、I L - 6 (8、12)、I L - 8 (13)およびI F N (11、14))、一酸化窒素放出(15)、マトリックスメタロプロテイナーゼ(M M P)発現(16、17)、およびシクロオキシゲナーゼ-2(C o x - 2)経路(18)の誘導を活性化または促進することにより、直接的に炎症誘発性である。M I Fが、p 4 4 / p 4 2 (E R K - 1 2) M A P キナーゼ経路の持続活性化を誘導する能力(18)およびp 5 3 依存的アポトーシスを阻害する能力により(19、20)、このメディエーターが、リウマチパングの開始に鍵となる役割を果たし得ることが示唆される。

40

## 【0005】

Bucalaらの米国特許第6,030,615号は、(a)約12.5kDaの分子量を有するM I F ポリペプチドに結合する抗体などのM I F 阻害剤の有効量を(b)抗 T N F、抗 I L - 1、抗 I F N -、I L - 1 R A、ステロイド、グルココルチコイド、またはI L - 1 0 と組み合わせて投与することを含む、サイトカインにより媒介される毒性により

50

引き起こされる疾患を処置する組合せ法を開示している。

【0006】

免疫応答遺伝子の多型が、一部のヒト自己免疫/炎症疾患の病因発生に寄与するという概念は、過去数年間におよんで関心が高まっている。現在では、非常に僅かな遺伝子多型が機能的に重要であることが示され、特定の疾患状態において予測価値があることが示されている。以前に規定された例には、マラリアおよび虚血性心疾患において特定の予測意義があることが示されたそれぞれTNF およびIL-1raの多型が含まれる(24、25)。同様に、TNF およびIL- の多くの多型は、関節リウマチの重症度に関連していると報告されている(26~28)。

【0007】

発明の要約

本発明は、一部、Mifプロモーターの-817位に位置するテトラ-ヌクレオチドCATT反復からなる、ヒトMif遺伝子の新規多型の同定に基づく。本明細書に開示したように、このプロモーター多型は、インビトロで機能的に重要であり、関節リウマチ患者集団の解析により、このCATT反復は疾患重症度に関連していることが示される。

【0008】

それ故、本発明の1つの目的は、ヒトMifプロモーターの遺伝子型を決定することを含む、診断法を提供することである。

【0009】

本発明の別の目的は、ヒトMifプロモーターの遺伝子型を決定する手段を含む、診断手段を提供することである。

【0010】

従って、本発明は、MIFポリペプチド発現の増加または減少に関連したヒトMifプロモーターの多型を検出することを含む、非感染性炎症疾患の重症度、または、非感染性炎症疾患の重症度に対する素因を診断する方法に関する。この方法では、非感染性炎症疾患は、例えば、自己免疫、移植片対宿主疾患、または好ましくは関節リウマチであり、好ましくは、多型の検出は、疾患の重症度または疾患の重症度に対する素因の指標となる。好ましくは、MIFポリペプチド発現の増加または減少に関連したヒトMifプロモーターのこの多型は、5、6、7、および8反復単位からなる群より選択された、ヒトMif遺伝子の-817位におけるCATT-テトラヌクレオチド反復多型であり、5反復単位の存在により、低い疾患重症度の発生または素因が示される。

【0011】

本発明の診断法は、好ましくは、PCR技術を使用したMifプロモーターを増幅するステップを含む。この目的のために、本発明は、ヒトMifプロモーターの領域を増幅するように選択されたPCRプライマーセットを提供する。例えば、PCRプライマーセットは、下の表1に示すように、(i)MIF-F(-1024)およびMIF-R(-421); (ii)MIF-F(-441)およびMIF-R(+4); (iii)MIF-F(-13)およびMIF-R(+395); および(iv)MIF-F(+379)およびMIF-R(+1043)からなる群より選択し得る。本発明はまた、ヒトMifプロモーター領域の多型を検出するために本発明のプライマーセットを使用する方法、および、本発明のPCRプライマーセットを含む製造品(診断キットなど)に関する。

【0012】

本発明はさらに、-817位のCATT-テトラヌクレオチドが5、6、7、または8回繰り返されている、ヒトMifプロモーター配列を含む核酸分子に関する。好ましくは、核酸分子は、単離DNA分子、特にヒト被験者のDNA試料から増幅した単離ゲノムDNA断片である。好ましい実施形態において、本発明の単離核酸分子は、ヒトMif遺伝子の-817位にCATT-テトラヌクレオチド反復多型を含む、ヒトMifプロモーターの一部を含む。

【0013】

本発明の別の態様は、非感染性炎症疾患の重症度、または、非感染性炎症疾患の重症度

10

20

30

40

50

に対する素因について個体をスクリーニングすることを含む、炎症疾患療法に関する。この方法は、ヒト被験者において、MIFポリペプチド発現の増加または減少に関連したヒトMifプロモーターの多型を検出することを含み、多型の検出は、疾患の重症度または疾患の重症度に対する素因の指標である。炎症疾患療法のこの方法はさらに、ヒト被験者を処置して、炎症疾患の重症度を予防または低下するか、または、炎症疾患の発症を遅延させることを含む。例えば、療法は、MIF阻害剤、抗TNF抗体、抗IL1抗体、および抗IFN-抗体、IL-1RA、ステロイド、グルココルチコイド、およびIL-10からなる群より選択された少なくとも1つの薬剤の有効量を投与することにより、ヒト被験者を処置することを含み得る。

#### 【0014】

炎症疾患療法の本発明の方法の好ましい実施形態において、炎症疾患は関節リウマチであり、ヒトMifプロモーターの多型は、ヒトMif遺伝子の-817位のCATT-テトラヌクレオチド反復多型である。

#### 【0015】

発明の詳細な説明

本明細書で同定された新規Mif遺伝子多型は、MIFプロモーター活性減少に関連しており、ホモ接合状態におけるこの遺伝子型の存在は、重度の関節リウマチのリスクの低下に関連しているようである。

#### 【0016】

MIFは、TNF分泌を促進し、マクロファージからのIFNにより誘導される一酸化窒素分泌を増強することが示された(8)。さらに、MIFは、マクロファージ(8)、T細胞(11)および線維芽細胞活性化(18)の重要な自己分泌調節因子である。これらのデータにより、関節リウマチなどの慢性炎症容態におけるMIFの可能性ある役割が数多く調査されてきた。

#### 【0017】

MIFタンパク質レベルは、関節リウマチ患者の血清中に高レベルで循環しており、細胞のMIF発現は、滑膜内で増強している(2、9)。関節リウマチ患者から得られた培養した滑膜線維芽細胞は、培養液中に有意な量のMIFを自発的に分泌し、分泌は、炎症誘発性刺激後にさらに増加する(2)。リウマチ滑膜線維芽細胞のMIFによる刺激により、マトリックスメタロプロテナーゼの発現は増加し、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)およびCOX-2発現が誘導される。滑膜細胞培養液におけるMIF活性の免疫中和もまた、COX-2およびPLA<sub>2</sub>mRNAのIL-1誘導性発現を阻害することが示された(29)。中和抗MIF抗体の投与もまた、マウスにおけるII型コラーゲン誘導性関節炎の開始を遅延し、その重症度を減少させ(30)、ラットにおけるアジュバント誘導性関節炎の発達を大いに阻害する(31)。従って、炎症関節炎の病理発生においてMIFが関与している証拠はかなりある。

#### 【0018】

本明細書に開示したのは、発現の低い5-CATT対立遺伝子に関するホモ接合性である患者と、より悪性の低い関節リウマチ疾患である患者との間の有意な関連である。重度な関節リウマチに罹患する僅か79中1名(1.2%)の患者がこの遺伝子型を遺伝し、これに対し、より軽度の非進行的な疾患の患者は101105(9.5%)である。これにより、MIFの低い発現に対する遺伝子的素因は、持続的な炎症および/または関節破壊に対して保護することが示唆される。現在では、どの転写因子が多型領域の転写効果の変調に関与し得るか不明であるが、5-CATT対立遺伝子は、血清およびフォルスコリン刺激の両方に対してインビトロで応答の減少、ならびに、基礎活性の減少を示す。CATT反復エレメントはまた、ヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)のプロモーターに存在し、プロモーター活性に必要とされる(32、33)。核因子YY1<sup>34</sup>、より近年では因子AP-1およびSP-1は、GM-CSFプロモーターのこの領域と複合体を形成できることが示された(35)。これらの同じ因子のいずれがMIFのCATT反復の活性に影響を及ぼすかがまた引き続き決定され続けている。

10

20

30

40

50

## 【0019】

M i f 遺伝子内の C A T T 反復領域は、数個の推定 P i t - 1 転写因子結合部位を含む。P i t - 1 は、プロラクチンおよび成長ホルモンなどの下垂体ホルモンの発現に必須である下垂体特異的転写因子である(36)。脳下垂体前葉は、げっ歯類において重要な M I F 源であり(3)、生理的または感染性ストレスに応答して M I F を分泌する(37)。コルチコトロピン放出因子(C R F)もまた、培養下垂体細胞における M I F 発現の強力な誘導因子であることが示された。ラット下垂体細胞および下垂体細胞株 A t T - 2 0 を使用してネズミ M I F 遺伝子 - プロモーターの近年の機能的解析により、C R F 誘導性遺伝子発現は、c A M P 応答エレメント結合タンパク質に依存していることが実証された(38)。興味深いことに、関節リウマチに対する C R F 遺伝子座の連鎖の報告が近年文献に出現しており、視床下部下垂体 - 副腎(H P A)軸は、一部の患者の関節リウマチの病理発生に役割を果たし得るといふいくつかの証拠がある。活動性関節リウマチ患者は、正常な下垂体および副腎機能にも関わらず異常に低い日周のコルチゾールレベルを有することが示され、視床下部レベルでの欠陥が示唆される(40)。M I F が、免疫系内のグルココルチコイド作用を対抗調節する能力を考えると(Bucalaにより総説(1))、脳下垂体前葉による M I F 発現は、関節リウマチなどの炎症疾患の発達に重要であり得る。

10

## 【0020】

これらの研究開始以来、M i f 遺伝子プロモーターにおける - 1 7 3 \* G / C 単一ヌクレオチド多型(S N P)がDonnらにより報告されており(41)、全身開始若年型特発性関節炎(全身開始 J I A)に関連していることが示された。少なくとも1つの1 7 3 \* C 対立遺伝子の保有は、全身開始 J I A 患者の36.8%で見られ、これに対し正常個体群では20.3%で見られた(41)。しかし、遺伝子発現に対するこのS N Pの効果に関する情報は無い。本発明者らによる予備解析により、1 7 3 \* C 対立遺伝子は、本関連データまたはプロモーターアッセイの結果を説明できず；実際に、1 7 3 \* C 対立遺伝子と5 - C A A T 対立遺伝子の間の正の連鎖不均衡の証拠はない(データは示していない)。

20

## 【0021】

T N F は、関節リウマチにおいて重要なエフェクターサイトカインであると考えられ、抗T N F 療法が、この疾患の処置において高い効力があるとして出現した(42)。注記すべきことに、M I F と T N F の間に密接な関係がある。M I F は、T N F 発現の重要な上流調節因子として作用するようである。M I F は、マクロファージからのT N F の分布を促進し、マクロファージT N F 産生を抑制するグルココルチコイドの能力を無効にする(43)。M I F の免疫中和もまた、T N F の循環レベルを減少させる(3)。臨床設定では、M I F 多型の解析により、特に炎症疾患、およびより具体的には関節リウマチ疾患における疾患重症度の予測因子が提供され、介入療法の選択を支援できる。本明細書のデータはまた、関節リウマチおよびおそらく他の炎症疾患における治療標的としてM I F の潜在的重要性を再確認する。

30

## 【0022】

## 実験

## 材料および方法

患者：D N A 試料は、ウィチタリウマチ疾患データバンク(Wichita Rheumatic Disease Data Bank)から入手し、1974年以来リウマチ学的診療をフォローしてきた白人患者を代表するものであった。関節リウマチ患者を、以下の基準を使用して2群に分けた：A)重度(n = 79)；平均発症年齢55歳、平均疾患持続期間13年間、平均Larsenスコア4.0、平均R F 力価339.24、および平均H A Qスコア1.36。B)軽度(n = 105)；平均発症年齢45歳、平均疾患持続期間15年間、平均Larsenスコア1.0、平均R F 力価362.84、および平均H A Qスコア0.93。健康な白人試験志願者は、正常な対照群として使用するゲノムD N Aを提供した(n = 159)。

40

## 【0023】

D N A 抽出：D N A は、G N o m e キット(Bio101 Inc.、CA、米国)を使用して全血から、Pure Geneキット(登録商標)(Gentra Systems Inc.、MN、米国)を使用して口内

50

をブラシしたものから抽出した。

【0024】

Mif遺伝子シーケンスおよび多型解析：Mif遺伝子（GenBankアクセッション番号：L19686、その全体を参照として本明細書に取り込む）は、染色体22q11.2に位置している（44）。遺伝子は2167bp長であり、189bpと95bpの2つのイントロンにより離された3つのエクソンを有する。4セットのプライマーを使用して全遺伝子を網羅した（表1、以下）。

【0025】

【表1】

表1 Mif遺伝子のPCRにおけるプライマー配列および条件					
PCR セット	プライマー 位置	プライマー配列 (5'-3')	アニーリング 温度(°C)	特殊条件	PCR 産物 サイズ
セット 1	MIF-F (-1074)	TGCAGGAACCAATACCCATAGG (配列番号:1)	58.1		654 bp
	MIF-R (-421)	TGCGTGAGCTTGTGTGTTTGTGAG (配列番号:2)			
セット 2	MIF-F (-441)	TCAAACACACAAGCTCACGCA (配列番号:3)	60.8	10% DMSO	445 bp
	MIF-R (+4)	TGGTCCCGCCTTTTGTG (配列番号:4)			
セット 3	MIF-F (-13)	CACAAAAGGCGGGACCACA (配列番号:5)	62.3	1.25mM dNTP における25%7- DeazaGTP	408 bp
	MIF-R (+395)	ACTGCGAGGAAAGGGCG (配列番号:6)			
セット 4	MIF-F (+379)	CGCCCTTTCCTCGCAGT (配列番号:7)		10% DMSO	665 bp
	MIF-R (+1043)	TAGAATGGAAAGACACTGGG (配列番号:8)			

【0026】

PCR反応は、1×PCR緩衝液II（パーキンエルマー、CA、米国）、20ngのDNA、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>、20pmolの各々の正および逆プライマー、および0.5単位のAmplitaq Gold（登録商標）ポリメラーゼ（パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ、CA、米国）から構成された。dNTPは、セット3を除いて0.2mMの濃度で使用し、セット3の0.2mM dNTPは、20μlのPCR反応で0.05mMの7-DeazaGTPを有していた。PCR条件は以下の通りであった：95 / 12分間、その後、95 / 30秒間、アニーリング温度（表1） / 30秒間、72 / 60秒間を40サイクル、および72 / 10分間。PCR産物は、臭化エチジウムで染色した1%アガロースゲルを使用して分離した。

【0027】

6名の正常対照および6名の関節リウマチ患者からのPCR産物を、BigDye Terminator（登録商標）サイクルシーケンスレディ反応キット（パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ）を使用してシーケンスした。4つの全てのプライマーセットからの配列を編集して全Mif遺伝子を提示し、関節リウマチ群と正常対照の間の差異を解析するために比較した。

【0028】

CAT反復多型についての迅速なスクリーニング：セット1（配列番号1）からの正プライマーを、逆プライマーMIF-R-728（5'-AATGGTA AACTCGGGGAC-3'；配列番号9）と共に使用した。逆プライマーはTETで蛍光標識して、

10

20

30

40

50

キャピラリー電気泳動を使用したPCR産物の検出を可能とした(45)。

【0029】

PCR条件は、10 $\mu$ lのPCR反応中の、1 $\times$ PCR緩衝液II、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、0.75 $\mu$ Mの各プライマー、1ng DNA、0.05 $\mu$ l Ampli Taq Gold(登録商標)ポリメラーゼであった。使用したPCRサイクリング条件は、53.8 / 30秒間というアニーリング条件を除いて前記と同じであった。1 $\mu$ lの希釈PCR産物を、0.5 $\mu$ lのGS-500TAMRAサイズ標準(パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ)を含む12 $\mu$ lの脱イオン化ホルムアミドに加えた。試料を、ABI310ジェネティックアナライザー(パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ)を使用して分離する前に変性した。以前に完全にシーケンスしておいたホモ接合性個体からのDNA試料を、キャピラリー電気泳動により得られた反復サイズの対照として使用した。

10

【0030】

MIFプロモータークローニングおよびリポーターアッセイ: 5、6、7、または8-CATTテトラヌクレオチド反復多型を含む一次スクリーニングから得られたゲノムDNAを、pCR2.1-TOPOベクター(インビトロゲン、CA、米国)に初回クローニングするためのPCR鋳型として使用した。以下のプライマーを使用して、MIFコード配列の上流ランニング領域とエキソンIの最初の102bpの1071~1087bpを示す1173~1189bpのPCR産物を作製した(図1参照)。

正プライマー: 5' - CTCGAGCTGCAGGAACCAATACCCAT - 3' (配列番号10);

逆プライマー: 5' - AAGCTTGGCATGATGGCAGGAAGGACC - 3' (配列番号12)。

20

【0031】

完全なシーケンス後、プロモーター領域を、pCR2.1ベクターから切り出し、pGL3-基礎ルシフェラーゼベクター(プロメガ、WI、米国)のXhoI/HindIII部位にクローニングした。このベクターは、真核エンハンサーまたはプロモーターエレメントの非存在下で改変型のホタルルシフェラーゼをコードするcDNAを含む。5、6、7、または8-CATT多型を含む、MIFプロモーターにより直接調節されるルシフェラーゼ構築物を作成した。一過性トランスフェクションを、製造業者の指示に従って、6ウェルプレートの1ウェルあたり、3 $\mu$ lのFugene6(Roche、NJ、米国)および1 $\mu$ gのDNAを使用して実施した。使用した細胞系には、Cos-7(サル腎臓線維芽細胞)、A549(ヒト肺上皮細胞)、およびCCD-19LU(初代ヒト肺線維芽細胞)が含まれていた。データは、ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼプロモーター(PRL-TKベクター-プロメガ、WI、米国)により調節されるウミシイタケルシフェラーゼの内部対照に対して標準化した。その後、各トランスフェクションは、200ngのPRL-TK対照ベクターDNAと組み合わせた800ngの試験DNA(MIF-プロモーター調節ルシフェラーゼ遺伝子)から構成された。ルシフェラーゼアッセイは、TD-20/20ルミノメーター(Turner Designs、CA、米国)および二重ルシフェラーゼリポーターシステム(プロメガ、WI、米国)を使用して測定した。基礎プロモーター活性は、トランスフェクションの36時間後にルシフェラーゼ活性を測定することにより決定した。いくつかの場合では、細胞を、プロモーター活性の測定前に、最後の20時間の培養で刺激した。

30

40

【0032】

遺伝子型および統計解析: データは、Genotyper(登録商標)2.1ソフトウェア(パーキンエルマー・アプライド・バイオシステムズ、CA、米国)を使用して解析した。遺伝子型と疾患状態(正常、軽度、または重度)の間関係は、カイ二乗検定およびフィッシャーの直接確率検定を使用して調べた。遺伝子リポーターアッセイは二重に3~10回繰り返した。データは平均 $\pm$ STDEVとして提示し、ノンパラメトリック・マンホイットニーU検定により比較した。有意性はP<0.05として定義した。

50

## 【0033】

## 結果

Mifプロモーターにおけるマイクロサテライト反復の同定

6名の正常な試験志願者および6名のリウマチ患者からのゲノムDNAを、Mif遺伝子の完全なシーケンスに使用した。この遺伝子のGC含量が高いために、解析は4つの区画で実施した。12の全ての配列のアラインメントにより、-817位における上流プロモーター領域におけるテトラ-ヌクレオチドCATT反復多型が同定された(図1)。配列に5、6、7、または8-CATT反復対立遺伝子を有する個体を見出した。7-CATTホモ接合体は正常個体群には全く見出されず、8-CATTホモ接合体は試験したいずれの個体群にも見出されなかったが、個体はこれらの対立遺伝子にヘテロ接合体またはホモ接合体であった。

## 【0034】

プロモーター多型の迅速なスクリーニングのために、テトラヌクレオチド反復単位に近いある蛍光標識逆プライマーを、より小さなPCR断片を増幅するために設計した(340~352bp)。その後、この断片は、ABI310ジェネティックアナライザーでのキャピラリー電気泳動を使用して解析した。以前にシーケンスした個体のDNAを鋳型として使用し対照DNA断片を作成し、ABI310アナライザーで観察された断片サイズを、試験試料中のCATT反復数と関連させた。従って、4つのPCR産物サイズは、340、344、348、および352bp長であり、これらはそれぞれ、5、6、7、および8のCATT反復に対応した。観察された遺伝子型は：5,5；5,6；5,7；6,6；6,7；7,7；5,8；および6,8であった。8,8遺伝子型は、正常(n=159)または患者(n=184)個体群では見られず；7,7遺伝子型は正常個体群では見られなかったが、関節リウマチ群内の1名の患者では観察された。

## 【0035】

正常対照および関節リウマチ患者におけるMif対立遺伝子の分布

正常対照、軽度関節リウマチ、および重度関節リウマチ患者における各種Mif対立遺伝子の分布を以下の表2に示す。

## 【0036】

## 【表2】

表2: MIF遺伝子型の分布および正常および関節リウマチ(RA)個体群における5-CATT対立遺伝子の頻度

個体群	MIF-遺伝子型								5-CATT対立遺伝子の頻度	
	5,5	6,6	7,7	5,6	5,7	6,7	5,8	6,8	5,5又は5,X対立遺伝子	X,X対立遺伝子
正常 (n=159)	8 (5.03%)	53 (33.33%)	0	61 (38.36%)	10 (6.3%)	25 (15.72%)	1 (0.63%)	1 (0.63%)	80 (50.31%)	79 (49.69%)
ウイッチ 軽度RA (n=105)	10 (9.52%)	49 (46.67%)	1 (0.95%)	23 (21.91%)	8 (7.62%)	14 (13.33%)	0	0	41 (39.05%)	64 (60.95%)
ウイッチ 重度RA (n=79)	1 (1.27%)	40 (50.63%)	0	20 (25.31%)	4 (5.06%)	13 (16.46%)	0	1 (1.27%)	25 (31.65%)	54 (68.35%)

## 【0037】

正常対照ではHardy-Weinberg平衡からの偏差はなかった( $p = 0.69$ )。5、6、7、および8対立遺伝子の頻度は、それぞれ、0.277、0.607、0.11、および0.006であることが判明した。

## 【0038】

少なくとも1つの5-CATT対立遺伝子を有する個体の数は、正常個体群の50.31%から、重度な関節リウマチ個体群の31.65%まで減少する(表2)。重度の関節リウマチ患者と対照の間の差異は統計学的に有意である( $p < 0.02$ )。この研究で解

析した事例および対照は、地理的および民族的起源に密接に適合しておらず、従って、データは幾分注意して解釈しなければならない。それ故、軽度関節リウマチ個体群と重度関節リウマチ個体群の間の特異的遺伝子型の比較を、表 2 に示したように実施した。5,5 遺伝子型が、軽度関節リウマチ患者の 9.5% に観察されるが、重度疾患の患者では 1.3% まで有意に減少している (フィッシャーの直接確立検定によると  $p = 0.0252$ )。これらのデータにより、ホモ接合性 5 - C A T T 対立遺伝子は、重度疾患への進行に保護的であることが示される。

**【0039】**

M I F プロモーター活性に対する C A T T 反復多型の効果

C A T T 反復多型が、M I F 発現の機能的調節に関連しているかどうかを調べるために、遺伝子リポーターアッセイを開発し、インビトロで規定の条件下で試験した。遺伝子リポーターアッセイは、転写調節を研究するために、または、転写因子をモニタリングするための計測値として幅広く使用されている (21、22)。

10

**【0040】**

M i f プロモーター調節ルシフェラーゼ構築物の C o s - 7 細胞、A 5 4 9 細胞、および C C D - 1 9 L u 細胞へのトランスフェクションは、対照ベクター (p G L 3 - 基礎) と比べた場合に、高いルシフェラーゼ産生により示されるように、強力な基礎プロモーター活性を伴っていた (図 2、データは示していない)。プロモーター活性は、フォルスコリン (C A M P 合成の誘導因子、23) および血清刺激 (図 3)、ならびに、ホルボールエステル刺激 (データは示していない) により増加した。一般に、基礎プロモーター活性は、負 (空の p G L 3 ベクター) および正 (p R L - T K) 対照と比べた場合に、試験した各細胞系で高く、これらのデータは、これらの細胞系で観察された高いレベルの内因性 M I F タンパク質発現と関連しているようであった (データは示していない)。注記すべきことには、試験した各細胞系では、5 - C A T T 反復 M I F プロモーター構築物は、6、7、または 8 - C A T T 反復プロモーター構築物と比較した場合に有意に低い転写活性を示した。

20

**【0041】**

## 【表 3】

## 参考文献

1. Bucala, "MIF Rediscovered: Cytokine, Pituitary Hormone, and Glucocorticoid-Induced Regulator of the Immune Response", *FASEB Journal*, 10, 1607-1613 (1996).
2. Leech, et al. "Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rheumatoid Arthritis: Evidence of Proinflammatory Function and Regulation by Glucocorticoids", *Arthritis Rheum.*, 42, 1601-1608 (1999). 10
3. Bernhagen, et al., "MIF is a Pituitary-Derived Cytokine that Potentiates Lethal Endotoxemia", *Nature*, 365, 756-759 (1993).
4. Bernhagen, et al., "The Emerging Role of MIF in Septic Shock and Infection", *Biotherapy*, 1995; 8, 123-127 (1995).
5. Donnelly, et al., "Macrophage Migration Inhibitory Factor and Acute Lung Injury", *Chest*, 1999; 116, 111S (1999). 20
6. Yang, et al., "Reversal of Established Rat Crescentic Glomerulonephritis by Blockade of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Potential Role of MIF in Regulating Glucocorticoid Production", *Molecular Medicine*, 4, 413-424 (1998).
7. David, "Delayed Hypersensitivity in vitro: Its Mediation by Cell-Free Substances Formed by Lymphoid Cell-Antigen Interaction", *Proc Natl Acad Sci USA*, 56, 72-77 (1996). 30
8. Calandra, et al., "Macrophage is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage-Migration Inhibitory Factor", *J. Exp. Med.*, 179, 1895-1902 (1994).
9. Onodera, et al., "High Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Synovial Tissues of Rheumatoid Joints", *Cytokine*, 11, 163-167 (1999).
10. Calandra, et al., "Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*; 6, 164-170 (2000). 40

11. Bacher, et al., "An Essential Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in T-cell Activation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7849-7854 (1996).
12. Satoskar, et al., "Migration-Inhibitory Factor Gene-Deficient Mice are Susceptible to Cutaneous *Leishmania Major* Infection", *Infect. Immun.*; 69, 906-911 (2001).
13. Benigni, et al., "The Proinflammatory Mediator Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Glucose Catabolism in Muscle", *J. Clin. Invest.*, 2000; 106, 1291-1300 (2000). 10
14. Abe, et al., "Regulation of the CTL Response by Macrophage Migration Inhibitory Factor", *J. Immunol.*; 166, 747-753 (2001).
15. Benihagen, et al., "Purification and Characterization of the Cytokine Macrophage- Migration Inhibitory Factor (MIF)", *FASEB Journal*, 8, A1417 (1994). 20
16. Onodera, et al., "Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-Regulates Expression of Matrix Metalloproteinases in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis", *J. Biol. Chem.*, 275, 444-450 (2000).
17. Meyer-Siegler, et al., "Macrophage Migration Inhibitory Factor Increases MMP-2 Activity in DU-145 Prostate Cells", *Cytokine*, 12, 914-921 (2000).
18. Mitchell, et al., "Sustained Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). Regulatory Role in Cell Proliferation and Glucocorticoid Action", *J. Biol. Chem.*; 274, 18100-18106 (1999). 30
19. Hudson, et al., "A Proinflammatory Cytokine Inhibits p53 Tumor Suppressor Activity", *J. Exp. Med.*, 190: 1375-1382 (1999).
20. Mitchel, et al., "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Sustains Macrophage Proinflammatory Function by Inhibiting p53: Regulatory Role in the Innate Immune Response", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (In press). 40
21. Alam, et al., "Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription", *Anal. Biochem.*, 188, 245-254 (1990).

22. Naylor, et al., "Reporter Gene Technology: the Future Looks Bright, *Biochem Pharmacol.*, 58, 749-757 (1999).
23. Seamon, et al., "Forskolin: A Unique Diterpene Activator of Cyclic AMP-Generating Systems", *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 7, 201-224 (1981).
24. McGuire, et al., "Variation in the TNF- $\alpha$  Promoter Region Associated with Susceptibility to Cerebral Malaria", *Nature*, 371, 508-510 (1994).
25. Francis, et al. "Interleukin- I Receptor Antagonist Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease", *Circulation*, 99, 861-866 (1999). 10
26. Buchs, et al., "IL- I  $\beta$  and IL- I Ra Gene Polymorphisms and Disease Severity in Rheumatoid Arthritis: Interaction with Their Plasma Levels", *Genes Immun.*, 2, 222-228 (2001).
27. Mu, et al., "Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Microsatellite Polymorphism is Associated with Rheumatoid Arthritis Severity Through an Interaction with the HLA-DRB1 Shared Epitope", *Arthritis Rheum.*, 42, 438-442 (1999). 20
28. van Krugten, et al., "Association of the TNF +489 Polymorphism with Susceptibility and Radiographic Damage in Rheumatoid Arthritis", *Genes Immun.*, 1, 91-96 (1999).
29. Sampey, et al., "Regulation of Synoviocyte Phospholipase A2 and Cyclooxygenase 2 by Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Arthritis Rheum.*, 44, 1273-1280 (2001).
30. Mikulowska, et al., "Macrophage Migration Inhibitory Factor is Involved in the Pathogenesis of Coliagen Type 11-Induced Arthritis in Mice", *J. Immunol.*, 158, 5514-5517 (1997). 30
31. Leech, et al., "Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor by Endogenous Glucocorticoids in Rat Adjuvant-Induced Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 43, 827-833 (2000).
32. Nimer, et al., "The Repeated Sequence CATT(A/T) is Required for Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Promoter Activity", *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6084-6088 (1990). 40

33. Nimer, et al., "Adjacent, Cooperative Elements Form a Strong, Constitutive Enhancer in the Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene", *Blood*, 87, 3694-3703 (1996).

34. Ye, et al., "Identification of a DNA Binding Site for the Nuclear Factor YY1 in the Human GM-CSF Core Promoter", *Nucleic Acids Res.*, 22, 5672-5678 (1994).

35. Ye, et al., "Characterization of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene Promoter: An AP I Complex and an Spl - Related Complex Transactivate the Promoter Activity that is Suppressed by a YYI Complex", *Mol. Cell Biol.*, 16, 157-167 (1996). 10

36. Cohen, et al., "Role of Pit- I in the Gene Expression of Growth Hormone, Prolactin, and Thyrotropin", *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 25, 523-540 (1996).

37. Calandra, et al., "MIF as a Glucocorticoid-Induced Modulator of Cytokine Production", *Nature*, 377, 68-71 (1995). 20

38. Waeber, et al., "Transcriptional Activation of the Macrophage Migration-Inhibitory Factor Gene by the Corticotropin-Releasing Factor is Mediated by the Cyclic Adenosine 3',5'- Monophosphate Responsive Element-Binding Protein CREB in Pituitary Cells", *Mol. Endocrinol*, 12, 698-705 (1998).

39. Baerwald, et al., "Corticotropin Releasing Hormone (CRH) Promoter Polymorphisms in Various Ethnic Groups of Patients with Rheumatoid Arthritis", *Z. Rheumatol.*, 59, 29-34 (2000). 30

40. Chikanza, et al., "Defective Hypothalamic Response to Immune and Inflammatory Stimuli in Patients with Rheumatoid Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 35, 1281-1288 (1992).

41. Donn, et al., "A Novel 5'-Flanking Region Polymorphism of Macrophage Migration Inhibitory Factor is Associated with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 44, 1782-1785 (2001). 40

42. Feldmann, et al., "Anti-TNF Alpha Therapy of Rheumatoid Arthritis: What Have We Learned?", *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 163-196 (2001).

43. Calandra, et al., "MIF, a Previously Unrecognized Macrophage Cytokine, Induces Macrophages to Secrete TNF- $\alpha$  and Overcomes Dexamethasone-Suppression of TNF Secretion", *Clinical Research*, 42, A138 (1994).

44. Paralkar, et al., "Cloning the Human Gene for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)", *Genomics*, 19: 48-51 (1994).

45. Tsuda, et al., "Separation of Nucleotides by High-Voltage Capillary Electrophoresis", *J. Appl. Biochem.*, 5, 330-336 (1983).

10

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載されたすべての特許、特許出願及び刊行物は、全てを参照することで本明細書に取り込まれる。先行技術を、明りょう性と理解を目的として詳細に記載しているが、形態や細部における各種変化を本発明及び添付の特許請求の範囲の真の範囲から離れることなく成すことができることは、当業者が本開示を読むことで理解されるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

20

【 0 0 4 3 】

【 図 1 】 図 1 は、ヒト M i f プロモーター領域の図解を示す。推定転写因子結合部位および目的の領域を囲んでいる。多型 C A T T 反復領域 ( - 8 1 7 ~ - 7 9 7 / - 7 8 5 ) は、影が無いことにより示される。

【 図 2 】 図 2 は、C o s - 7 細胞におけるヒト M i f プロモーター多型変異体の基礎転写活性を示す。M I F プロモーター活性は、結果が相対光単位 ( R L U ) として表現される二重ルシフェラーゼアッセイにより決定された。C o s - 7 細胞を、8 0 0 n g の試験 D N A ベクター : p G L 3 - 基礎 ( 陰性対照 )、p M I F - 5、p M I F - 6、p M I F - 7、または p M I F - 8 ( 5、6、7、または 8 - C A T T 反復多型特異的 M I F プロモーター - ルシフェラーゼ構築物 ) および 2 0 0 n g の対照 p R L T K ベクターで一過性にコトランスフェクトした。4 8 時間後に、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を、二重ルシフェラーゼキット ( プロメガ ) および T D 2 0 / 2 0 ルミノメーターを使用してウミシイタケの活性に対して決定した。データは、各々二重に実施した 4 回の個々の実験の平均  $\pm$  S T D E V を示す。\* は、p M I F - 5 構築物の活性に対して  $P < 0 . 0 3$  であることを示す。

30

【 図 3 】 図 3 は、C o s - 7 細胞における血清およびフォルスコリン ( forskolin ) 刺激に対する M i f プロモーター応答に対する、C A T T - 反復多型変異の効果を示す。M I F プロモーター活性は、結果が相対光単位 ( R L U ) として表現される二重ルシフェラーゼアッセイにより決定された。C o s - 7 細胞を、8 0 0 n g の試験 D N A ベクター : p G L - 3 基礎 ( 陰性対照 )、p M I F - 5、p M I F - 6、p M I F - 7、または p M I F - 8 ( 5、6、7、または 8 - C A T T 反復多型特異的 M I F プロモーター - ルシフェラーゼ構築物 ) および 2 0 0 n g の対照 p R L T K ベクターで一過的にコトランスフェクトした。2 4 時間のトランスフェクト後、細胞を P B S 中で洗浄し、その後、血清非含有培地中で一晚培養した。その後、細胞を非刺激のまま ( 血清枯渇 ) または 2 % ウシ胎児血清 ( F C S ) または 1  $\mu$  M フォルスコリン ( 「 1  $\mu$  M の F S K 」 ) で処理した。さらに 1 2 時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を図 2 のように決定した。データは、各々二重に実施した 4 回の個々の実験の平均  $\pm$  S T D E V を示す。\* は、p M I F - 5 構築物の活性に対して  $P < 0 . 0 3$  であることを示す。

40

【 図 1 】

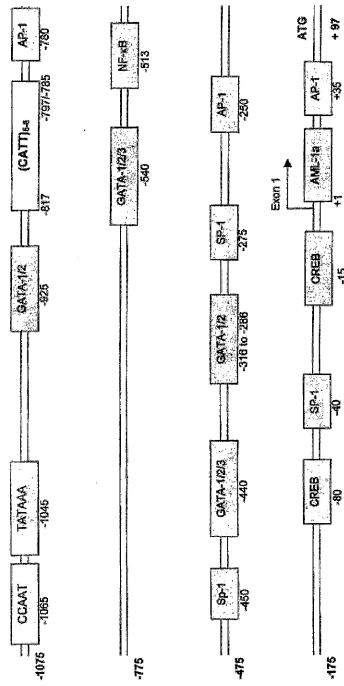
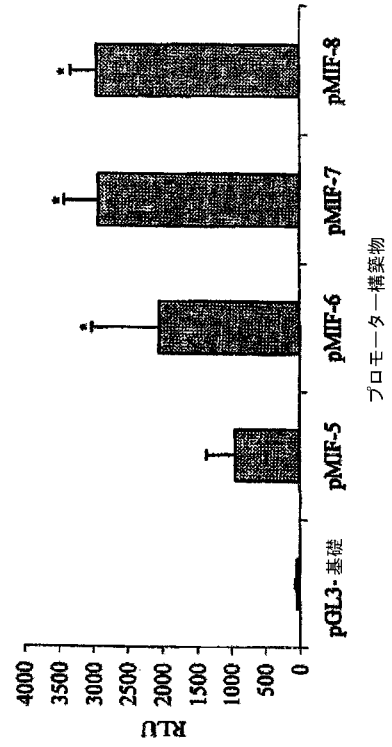


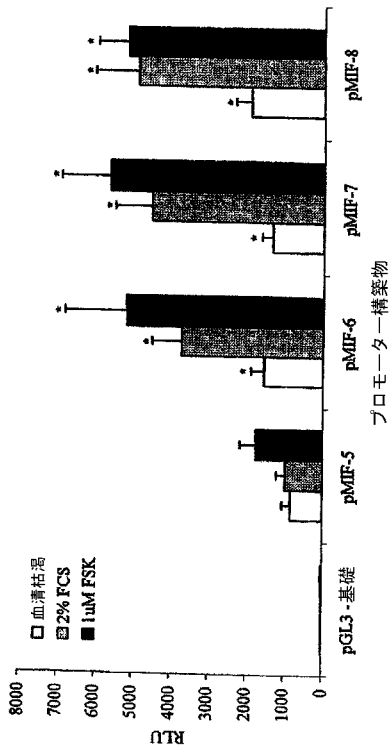
FIG. 1

【 図 2 】



プロモーター構築物

【 図 3 】



プロモーター構築物

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/41051
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C07H 21/04; C12P 19/34		
US CL : 435/6, 91.1, 91.2 ; 536/23.1, 24.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 435/6, 91.1, 91.2 ; 536/23.1, 24.1		
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 practicable, search terms used)		
STN: Medline Biosis Caplus		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PARALKAR et al. Cloning the Human Gene for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), Genomics, January 1994, Vol. 19, pages 48-51, entire document.	6, 8-12
A,P	ROGER et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4, Nature, 27 December 2001, Vol. 414, pages 920-924, especially pg. 920.	1-5, 13-15
Y	BUCALA, R. MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response, Faseb, December 1996, Vol. 10, pages 1607-1613, entire document.	1-5, 7, and 13-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 26 June 2003 (26.06.2003)		Date of mailing of the international search report <b>15 AUG 2003</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Gary Benzion <i>Hella Callan for</i> Telephone No. 703-308-1119

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	

(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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ボー, ジョン・エイ  
イギリス国、スタッフォード エスティー 17 0 ジェイエフ、トリントン・アベニュー 5 9
- (72) 発明者 ブカラ, リチャード  
アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 8 0 7、コス・コブ、ベネンソン・ドライブ 2 2
- (72) 発明者 チトニス, スミタ  
アメリカ合衆国、ニューヨーク 1 1 0 2 1、グレート・ネック、サウス・ミドル・ネック・ロード 1 6 0、アパートメント 2 エル
- (72) 発明者 ドネリー, シェーマス・シー  
アイルランド国、カウンティ・ダブリン、マウント・マリオン、フォスター・アベニュー 1 2
- (72) 発明者 グレガーセン, ピーター・ケイ  
アメリカ合衆国、ニューヨーク 1 0 5 3 8、ラーチモント、ローカスト・アベニュー 6
- (72) 発明者 モンテイロ, ジョアニータ  
アメリカ合衆国、ペンシルベニア 1 9 1 2 8、フィラデルフィア、ヘンリー・アベニュー 7 9  
0 1、アパートメント シー 3 0 7

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA11  
4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ42 QR08 QR62 QS25 QS36 QX02  
4C084 AA17 DA12 DA13 NA14 ZB11 ZB15  
4C085 AA13 BB17 CC21 DD88 EE01  
4C086 AA01 DA10 ZB11 ZB15 ZC78

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005514932A5</a>	公开(公告)日	2006-02-09
申请号	JP2003560515	申请日	2002-12-23
申请(专利权)人(译)	细胞因子医药科学公司		
[标]发明人	ポージョンエイ ブカラリチャード チトニススミタ ドネリーシェーマスシー グレガーセンピーターケイ モンテイロジョアニータ		
发明人	ポー,ジョン・エイ ブカラ,リチャード チトニス,スミタ ドネリー,シェーマス・シー グレガーセン,ピーター・ケイ モンテイロ,ジョアニータ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/573 A61K39/395 A61K45/00 A61P29/00 A61P43/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 A61K38/00		
CPC分类号	A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/156 A61K31/56 A61K38/1709 A61K38/2066 C07K16/241 C07K16/245 C07K16/249 C07K2317/76 C12Q2600/112		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/573 A61K39/395.D A61K45/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P43/00.105 C12Q1/68.Z G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/DA12 4C084/DA13 4C084/NA14 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C085/AA13 4C085/BB17 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/DA10 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZC78		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	60/341832 2001-12-21 US		
其他公开文献	JP2005514932A JP4625257B2		

#### 摘要(译)

本文描述了在人Mif基因的-817位上的新型CATT-四核苷酸重复多态性，其在基因报道分子测定中功能性地影响巨噬细胞抑制因子(MIF)启动子的活性。描述了四种基因型，包括5,6,7或8-CATT重复单元。其中，5-CATT等位基因在体外表现出最低水平的基础和刺激性MIF启动子活性。低表达5-CATT重复等位基因的存在与类风湿性关节炎患者群体中的低疾病严重性相关。用于在人Mif基因的-817位检测该CATT-四核苷酸重复多态性的方法，组合物和装置，以及用于评估对严重炎症性疾病的易感性的方法，组合物和装置披露。

