

申請日期	87.5.29
案 號	87108415
類 別	C120 1/68

公告本

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	中 文	發炎性疾病之預測
	英 文	PREDICTION OF INFLAMMATORY DISEASE
二、發明人	姓 名	(1)高登 W. 達夫 (2)安吉拉·寇克斯 (3)尼可拉 J. 坎普 (4)法蘭西斯科 S. 喬威尼
	國 籍	英 國
三、申請人	住、居所	(1)英國南約克夏郡雪菲爾·艾希嘉德路18號 (2)英國雪菲爾·克魯克斯·墨爾鉢路2號 (3)英國雪菲爾·席爾斯保羅·溫雅路26號 (4)英國雪菲爾·藍摩爾·特尼路3號
	姓 名 (名稱)	英國雪菲爾大學
	國 籍	英 國
	住、居所 (事務所)	英國雪菲爾·棕櫚石大道2/4號
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

承辦人代碼：
大 類：
I P C分類：

B6

英 國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☒無主張優先權
1997,5,29 GB97/11040.7

有關微生物已寄存於： _____，寄存日期： _____，寄存號碼： _____

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

背景

1.發明領域

本發明係關於辨識對免疫發炎病症或由IL-1生物活性調制病症之敏感性之方法及套件組。特別該方法包括檢測至少一個IL-1單套型之對偶基因如IL-1(44112332)單套型或IL-1(33221461)單套型。其關聯發炎病症例如冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚，潰瘍性結腸炎，糖尿病性視網膜病變，牙周病，幼年型慢性關節炎特別慢性虹膜睫狀體炎，乾癬，DR3/4病人之胰島素依賴型糖尿病，氣喘，慢性發炎性肝病，慢性發炎性肺病，肺纖維硬變，肝硬化以及急性及慢性中樞神經系統、心臟血管系統、胃腸系統、肌肉骨骼系統、內分泌系統、皮膚及關聯組織、免疫系統、肝膽系統或身體任何部位可能發生IL基因產物關聯”免疫發炎”成分而與誘發因子無關之發炎病，例如傳染劑，創傷，腫瘤，自體免疫病，特發性疾病，生物毒素及毒劑，及其他含有IL-1位置基因成分之疾病。

2.背景說明

基因試驗(也稱作基因篩檢，基因定型或分子診斷)可廣義定義為試驗病人核酸之分析容量決定病人是否含有可引起或增加對該疾病狀態易感性之突變(或對偶基因或多形性變化)或與引起該疾病狀態之基因呈”聯結不平衡”。

聯結不平衡表示特定對偶基因比預期出現機率更頻繁出現之傾向。若任何特定成組對偶基因(或單套型)之頻率

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

為其個別族群頻率之乘積，則於特定位置之對偶基因為平衡。不平衡的起因經常未明。可能由於選擇某種對偶基因組合，或剛混合基因非均質族群。此外，以與疾病基因極為緊密聯結的標記為例，若最近的過去出現疾病突變則預期對偶基因(或成組聯結對偶基因)與疾病基因關聯，故該小區染色體經由重組達成平衡經過的時間尚不足。

早期檢測容易發生基因病可獲得醫療的最佳機會。早期基因診斷經由監督及於發生臨床可檢測病情之前早期醫療可改善病人預後。當患有類似症狀病人接受治療時的成功度不等，複雜的基因試驗可區別個別病人的微小或無法檢測的差異，結果導致更為適當的個別資料。早期醫療包括基因治療或使用IL-1調制劑治療。隨著基因試驗的發展，今日已可識別指示傾向於發病的基因變異，即使該病屬於多基因來源亦如此。可藉基因生物學方法診斷的疾病數目隨著對多重因素病症的基因基礎的瞭解增加而持續增長(例如參考美國專利4,582,788；5,110,920；4,801,531；4,666,828及5,268,267)

IL-1基因簇

IL-1基因簇係位於人類染色體2之長臂(2q13)且含有至少430 Kb區內IL-1 α (IL1A)，IL-1 β (IL1B)及IL-1受體拮抗劑(IL1RN)之基因(Nicklin等，GenoMICS 19：382-4(1994))。促效劑分子IL-1 α 及IL-1 β 具強力發炎前活性出現於多種發炎串級的頭端。其作用經常透過誘發其他細胞激素如IL-6及IL-8，結果導致活化及召集白血球至受傷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(3)

組織，局部產生血管活性劑，腦部發燒反應及肝臟急性期反應。全部三種IL-1分子聯結至第一型及第二型IL-1受體，但僅有第一型受體可傳導信號至細胞內部。相反地，第二型受體遮蔽不接觸細胞膜而作為誘餌受體。因此受體拮抗劑及第二型受體的作用皆為抗發炎。

不當產生IL-1顯然對多種自體免疫病及發炎病的病理上扮演中心角色，包括類風濕性關節炎，發炎性腸病症，乾癬及其他。此外IL-1產率有個體差異，某些變化可由IL-1基因位置的基因差異說明(Molvig等，Scand. J.Immunol.27：705-16(1988)；Pociot等，Eur. J. Clin. Invest.22：396-402(1992))。如此IL-1為對發炎病之基因易感性的決定部分之合理候選者，發炎病大半具有多重病因與多基因成分。

某些來自IL-1基因簇之對偶基因已知關聯特定疾病狀態。例如發明人顯示IL1RN對偶基因2關聯冠狀動脈病，鬆骨病(美國專利申請案08/813,416, 08/628,282)，糖尿病性腎病變(Blakemore等，Hum. Genet. 97(3)：369-74(1996))，簇狀禿髮(Cork等，J.Invest.Dermatol. 104(5 Supp.)：15S-16S(1995))，格雷夫氏病(Blakemore等，J.Clin. Endocrinol. 80(1)：111-5(1995))，系統性紅斑性狼瘡(Blakemore等，Arthritis Rheum.37：1380-85(1994))，硬化性苔蘚(Clay等，Hum.Genet.94：407-10(1994))及潰瘍性結腸炎(Mansfield等，Gastroenterol.106(3)：637-42(1994))。IL1RN簇對偶基因1關聯糖尿病性視網膜病變(英國專利

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

申請案9618960.0)。同理發明人顯示得自標記-889之IL1A對偶基因2及得自標記+3953之IL1B(TaqI)對偶基因2關聯牙周病(U.S. S/N 08/510,696)。得自標記-889之IL1A對偶基因2也關聯幼年性慢性關節炎，特別慢性虹膜睫狀體炎(McDowell等，Arthritis Rheum. 38：221-28(1995))。得自標記+3953之IL1B(TaqI)對偶基因2也關聯DR3/4病人之乾癬及胰島素依賴型糖尿病(di Giovine等，Cytokine 7：606(1995)；Pociot等，Eur J.Clin. Invest. 22，396-402(1992))。

發明概述

本發明提供一種早期檢測容易出現發炎病症之新穎方法。也提供早期決定該傾向之套件組及識別與該病關聯或與單套型聯結(於聯結不平衡時)關聯的額外對偶基因。

預測IL-1生物活性調制病(此處稱作發炎病症)風險增高之方法包含檢測存在有一或多個IL-1單套型對偶基因；或另外檢測完整單套型。IL-1單套型可為IL-1(44112332)單套型，IL-1(33441461)單套型或得自此區之單套型。較佳單套型為IL-1(44112332)單套型。含有一或多個IL-1單套型之對偶基因指示對多種發炎病症之風險增高。包括但非限於冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚，潰瘍性結腸炎，牙周病，幼年型慢性關節炎特別慢性虹膜睫狀體炎，乾癬，DR3/4病人之胰島素依賴型糖尿病，糖尿病性腎病變及其他含有IL-1位置基因成分之疾病。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (5)

特別 IL-1(44112332)單套型關聯下列疾病：冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚及潰瘍性結腸炎。IL-1(33221461)單套型關聯下列疾病：牙周病，幼年型慢性關節炎，乾癬，胰島素依賴型糖尿病及糖尿病性視網膜病變。

另一具體例中本發明說明如下：由病人分離核酸，識別一或多個存在於IL-1基因簇之對偶基因，及比較一或多個對偶基因與對照樣本。對照樣本含有至少一個得自IL-1單套型之對偶基因。如此對照樣本含有一或多個下列得自IL-1(44112332)單套型之對偶基因：

222/223標記之對偶基因4	(*132 mu PCR產物)
gz5/gz6標記之對偶基因4	(*91 mu PCR產物)，
-889標記之對偶基因1	(含有一個NcoI位置)，
+3953標記之對偶基因1	(含有兩個TaqI位置)，
-511標記之對偶基因2	(含有一個Bsu36I位置)，
gaat.p33330標記之對偶基因3	(*197 mu PCR產物)，
Y31標記之對偶基因3	(*160 mu PCR產物)，
VNTR標記之對偶基因2	(240 bp PCR產物)。

*小星號標記PCR產物大小係以遷移率單位表示，該單位大小接近鹼基對(bp)但可隨測定方法而異，如業界人士容易確定。標記位置於表1可知。

對照樣本也含有下列對偶基因，其可為IL-1(44112332)單套型部分：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

IL1RN基因之1731標記之對偶基因2 (A於位置1731)，
 IL1RN基因之1812標記之對偶基因2 (A於位置1812)，
 IL1RN基因之1868標記之對偶基因2 (G於位置1868)，
 IL1RN基因之1887標記之對偶基因2 (C於位置1887)，
 IL1RN基因之8006標記之對偶基因2 (一個HpaII或MspI位置)，
 IL1RN基因之8061標記之對偶基因2 (缺一個MwoI位置)，
 IL1RN基因之9589標記之對偶基因2 (含有一個SspI位置)。

標記位置係指Clay等或Gausch等指示。

對照樣本也含有下列得自IL-1(33221461)單套型之對偶基因：

222/223標記之對偶基因3	(*130 mu PCR產物)
gz5/gz6標記之對偶基因3	(*88 mu PCR產物)，
-889標記之對偶基因2	(缺一個NcoI位置)，
+3953標記之對偶基因2	(含有一個TaqI位置)，
-511標記之對偶基因1	(缺一個Bsu36I位置)，
gaat.p33330標記之對偶基因4	(*201 mu PCR產物)，
Y31標記之對偶基因6	(*166 mu PCR產物)，
VNTR標記之對偶基因1	(412 bp PCR產物)。

由病人鑑別之對偶基因與對照樣本之類似性指示病人易罹患發炎病。對照樣本亦可為由多個前述對偶基因組成之對偶基因梯，也可含有得自前述標記之額外對偶基因。可有多個對照樣本，各含不同對偶基因或對偶基因集合。

本發明之另一具體例為檢測可預測發炎病之對偶基因之套件組。套件組通常包括至少一個與IL-1基因族之一個

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(7)

DNA序列互補的寡核苷酸及對照樣本。對照樣本含有前述已知關聯發炎病之對偶基因。對照樣本也含有經由擴增對偶基因生產的實際PCR產物，或另外可含有得自攜帶IL-1單套型個體之基因組或精選殖的DNA。

套件組也包括DNA取樣裝置，DNA純化裝置及PCR化學劑。又寡核苷酸可含有可檢測標記。下列寡核苷酸可存在於套件組用於該等方法：

ATGTATAGAATTCCATTCCTG	(序列識別編號1),
TAAAATCAAGTGTTGATGTAG	(序列識別編號2),
GGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCG	(序列識別編號3),
TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT	(序列識別編號4),
TGTTCTACCACCTGAACTAGG	(序列識別編號5),
TTACATATGAGCCTTCCATG	(序列識別編號6),
CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA	(序列識別編號7),
GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG	(序列識別編號8),
TGGCATTGATCTGGTTCATC	(序列識別編號9),
GTTTAGGAATCTTCCCACCTT	(序列識別編號10),
GAGGCGTGAGAATCTCAAGA	(序列識別編號11),
GTGTCCTCAAGTGGATCTGG	(序列識別編號12),
GGGCAACAGAGCAATGTTTCT	(序列識別編號13),
CAGTGTGTCAGTGTACTGTT	(序列識別編號14),
CTCAGCAACACTCCTAT	(序列識別編號15),
TCCTGGTCTGCAGGTAA	(序列識別編號16),
TTACGCAGATAAGAACCAGTTTGG	(序列識別編號17),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

TTTCCTGGACGCTTGCTCACCAG (序列識別編號18),
 TTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTAGC (序列識別編號19),
 CACCAGACTTGACACAGGACAGGCACATC (序列識別編號20),
 CGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAG (序列識別編號21),
 ACACAGGAAGGTGCCAAGCA (序列識別編號22),
 TGCAGACAGACGGGCAAAGT (序列識別編號23),
 TTGTGGGGACCAGGGGAGAT (序列識別編號24),及
 AGCCTGGCACTCTGCTGAAT (序列識別編號25)。

本發明之另一具體例提供一種識別與一或多種IL-1單套型對偶基因如IL-1(44112332)單套型對偶基因關聯之發炎病症之識別方法。該方法包括集合第一組不含特定發炎病，集合第二組含發炎病病人及決定第一組及第二組於IL-1基因簇之基因型。若IL-1單套型對偶基因於第二組比第一組過度表現，則識別為關聯發炎病。

本發明之另一具體例提供一種識別與IL-1單套型如IL-1(44112332)單套型呈聯結不平衡之額外對偶基因之方法。得自IL-1基因簇之額外對偶基因可藉DNA此區之序列或限剪酶分析識別。然後經由決定兩個位置之基因型建立聯結不平衡，及比較觀察得及預期之單套型頻率，此處於無關聯之無效假設下預期頻率為個別對偶基因頻率之乘積。此種比較可使用Xie及Ott之E.H.程式(人類基因聯結手冊，1994年約翰霍普金大學出版社，188-98頁)進行。

本發明之又另一具體例為包含得自本文所述標記之對偶基因之對偶基因梯。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(9)

本發明之其他具體例及優點部分陳述於後文及部分由後文說明將顯然易明或可經由實施本發明習得。

圖式之說明

第1圖說明IL-1基因簇之8個標記及其約略位置。

第2圖說明聯結不平衡與物理距離間之交互關係。

詳細說明

如此處具體廣義說明，本發明係針對檢測至少一種IL-1單套型包括IL-1(44112332)單套型或IL-1(33221461)單套型之對偶基因，其關聯發炎病症之方法。

此處使用”標記”一詞表示於基因組具有個體間序列變化之特定位置。例如此處敘述至少8個標記：222/223，gz5/gz6，-889，+3953，-511，gaat.p33330，Y31及VNTR標記。

“對偶基因”一詞表示於特定標記出現的不同序列變異株。例如於VNTR標記至少有5個對偶基因，1至5及於-889標記至少有2個對偶基因。序列變異株可為單一或多鹼基變化包括插入、刪除或取代或可為序列重複數目改變等。

“聯結不平衡”一詞表示共同遺傳兩個對偶基因其頻率高於特定對照族群之各個對偶基因分別出現頻率。分別遺傳的兩個對偶基因之預期出現頻率為第一對偶基因頻率乘第二對偶基因頻率。以預期頻率同時出現之對偶基因稱作”聯結平衡”。

“單套型”一詞表示同時呈一組遺傳的對偶基因集合(為聯結不平衡)。如此處使用單套型定義為包括以統計學

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

顯著程度 ($P_{\text{corr}} \leq 0.05$) 出現的單套型。

如此處使用 ”一個 IL-1 單套型” 表示 IL-1 位置的任何單套型。至少包括此處所述 IL-1(44112332) 及 (33221461) 單套型。

如此處使用 ”IL-1(44112332) 單套型” 一詞表示至少由下列組成之單套型：

IL1A 之 222/223 標記之對偶基因 4；

IL1A 之 gz5/gz6 標記之對偶基因 4；

IL1A 之 -889 標記之對偶基因 1；

IL1B 之 +3953 標記之對偶基因 1；

IL1B 之 -511 標記之對偶基因 2；

gaat.p33330 標記之對偶基因 3；

Y31 標記之對偶基因 3；及

IL1RN 之 VNTR 標記之對偶基因 2。

“IL-1(44112332) 單套型” 一詞也包括任何與此對偶基因集合呈聯結不平衡之任何額外對偶基因。例如 IL-1(44112332) 單套型也含有下列對偶基因：

IL1RN 基因之 1731 標記之對偶基因 2 (A 於位置 1731)，

IL1RN 基因之 1812 標記之對偶基因 2 (A 於位置 1812)，

IL1RN 基因之 1868 標記之對偶基因 2 (G 於位置 1868)，

IL1RN 基因之 1887 標記之對偶基因 2 (C 於位置 1887)，

IL1RN 基因之 8006 標記之對偶基因 2 (含有一個 HpaII 或 MspI 位置)，

IL1RN 基因之 8061 標記之對偶基因 2 (缺一個 MwoI 位

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

置)，及

IL1RN基因之9589標記之對偶基因2（含有一個 SspI 位置）。

如此處使用”IL-1(33221461)單套型”表示至少由下列組成之單套型：

IL1A之222/223標記之對偶基因3；

IL1A之gz5/gz6標記之對偶基因3；

IL1A之-889標記之對偶基因2；

IL1B之+3953標記之對偶基因2；

IL1B之-511標記之對偶基因1；

gaat.p33330標記之對偶基因4；

Y31標記之對偶基因6；及

IL1RN之VNTR標記之對偶基因1。

“IL-1(33221461)單套型”也包括任何於此對偶基因集合呈聯結不平衡之額外對偶基因。

此處使用”發炎病”或”發炎病症”一詞表示IL-1單套型遺傳關聯疾病。除習知發炎病外該術語包括非傳統視為發炎情況但含有發炎成分或由IL-1基因簇所調制之疾病，包括某些傳染病，某些代謝病症及某些腫瘤生長、散佈及控制態樣。發炎病症包括但非限於冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚，潰瘍性結腸炎，糖尿病性視網膜病變，牙周病，幼年型慢性關節炎特別慢性虹膜睫狀體炎，乾癬，DR3/4病人之胰島素依賴型糖尿病及其他含有IL-1位置

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (12)

基因成分之疾病。

如此處使用”檢測對偶基因”過程敘述為”決定基因型、決定或識別對偶基因或多形性”或任何類似術語。實際檢測的對偶基因可能為疾病引起變異或與疾病引起變異呈聯結不平衡之變異。表現於病人之基因組DNA，但也可由此區轉路或轉譯的RNA或蛋白質序列測得。

此處使用”IL-1基因簇”或”IL-1位置”或”IL-1基因族”等詞包括全部染色體2上位於或接近2q13的核酸，包括IL1A、IL1B及IL1RN基因及任何其他聯結序列。

疾病”傾向”、”好發”或”易感性”表示發現某些對偶基因與特定疾病狀態關聯。如此於該個體比較健康個體更過度呈現，表示該等個體有出現該病或出現更嚴重形或特定疾病類型小集合之高風險。

“小星號標記”表示其對偶基因包含不同數目短重複(<5 bp)序列之標記。

“VNTR標記”表示其對偶基因包含不同數目中長重複序列。得自IL1RN基因之插入序列2之特定VNTR標記說明於此。

“雙對偶基因標記”表示僅有兩個已知對偶基因之標記。

IL-1基因簇之細胞激素於免疫及發炎反應以及多種發炎病扮演中心要角。IL-1基因簇之聯結不平衡程度經研究發現跨越約400 Kb該區伸展範圍於95%可靠度為統計學顯著。先前未辨識之IL-1(44112332)單套型及IL-1(33221461)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

單套型出現於健康族群。整個IL-1(44112332)單套型以增高頻率出現於患糖尿病性腎病變病人。

本發明係經由決定病人於IL-1基因簇DNA的基因型預測病人是否有發炎病傾向或好發之方法。病人的基因型比較對照樣本其含有一或多個得自IL-1單套型如IL-1(44112332)單套型或IL-1(33221461)單套型之對偶基因。

對偶基因包括：

- | | |
|---------------------|------------------|
| 222/223標記之對偶基因4 | (*132 mu PCR產物) |
| gz5/gz6標記之對偶基因4 | (*91 mu PCR產物)， |
| -889標記之對偶基因1 | (含有一個NcoI位置)， |
| +3953標記之對偶基因1 | (含有兩個TaqI位置)， |
| -511標記之對偶基因2 | (含有一個Bsu36I位置)， |
| gaat.p33330標記之對偶基因3 | (*197 mu PCR產物)， |
| Y31標記之對偶基因3 | (*160 mu PCR產物)， |
| VNTR標記之對偶基因2 | (240 bp PCR產物)。 |

*小星號標記PCR產物大小係以遷移率單位表示，該單位大小接近鹼基對(bp)但可隨測定方法而異，如業界人士容易確定。

對照樣本也含有下列對偶基因，其可為IL-1(44112332)單套型部分：

- | | |
|----------------------|-------------|
| IL1RN基因之1731標記之對偶基因2 | (A於位置1731)， |
| IL1RN基因之1812標記之對偶基因2 | (A於位置1812)， |
| IL1RN基因之1868標記之對偶基因2 | (G於位置1868)， |
| IL1RN基因之1887標記之對偶基因2 | (C於位置1887)， |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (14)

IL1RN基因之8006標記之對偶基因2 (一個HpaII或MspI位置),

IL1RN基因之8061標記之對偶基因2 (缺一個MwoI位置),

IL1RN基因之9589標記之對偶基因2 (含有一個SspI位置)。

對照樣本也含有下列得自 IL-1(33221461)單套型之對偶基因：

222/223標記之對偶基因3 (*130 mu PCR產物)

gz5/gz6標記之對偶基因3 (*88 mu PCR產物),

-889標記之對偶基因2 (缺一個NcoI位置),

+3953標記之對偶基因2 (含有一個TaqI位置),

-511標記之對偶基因1 (缺一個Bsu36I位置),

gaat.p33330標記之對偶基因4 (*201 mu PCR產物),

Y31標記之對偶基因6 (*166 mu PCR產物),

VNTR標記之對偶基因1 (412 bp PCR產物)。

此等對偶基因已知關聯多種發炎病症例如冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚，潰瘍性結腸炎，牙周病，幼年型慢性關節炎特別慢性虹膜睫狀體炎，乾癬，DR3/4病人之胰島素依賴型糖尿病，糖尿病性腎病變及其他含有IL-1位置基因成分之疾病。

識別疾病關聯單套型(聯結不平衡之對偶基因集合)使研究學者開始決定哪個對偶基因為病因，而非單純關聯致病對偶基因。此種資訊可用於設計理性處理辦法包括基因治療及使用多種可調制由IL-1基因簇產生之蛋白質活性之治療。多重突變也可能個別促成複雜來源的疾病狀態。如

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (16)

株特異性抗原決定部位可使用單株抗體檢測。同理若存在於藉業界已知技術加工的RNA則可檢測對偶基因。

本發明之另一具體例係針對檢測病人之發炎病傾向之診斷套件組。套件組可用於出現症狀前或後或出生前。診斷套件組包含一或多種寡核苷酸其可雜交得自IL-1基因簇之核酸。多種檢定分析格式可用於使用所提供的寡核苷酸決定基因型。最常見格式包括核苷酸結合例如結合至過濾膜，珠或微力價平板等。該等技術也包括打墨點，RNA墨點，DNA墨點，PCR，RFLP等。

寡核苷酸可為多種天然及合成組合物例如合成寡核苷酸，限剪片段，cDNA，合成DNA等。檢定分析也使用加標記寡核苷酸而於檢定分析容易識別。可使用之標記範例包括放射性標記，酶，螢光化合物，鏈絲菌抗生物素，抗生物素，生物素，磁性部分，金屬結合部分，抗原或抗體部分等。寡核苷酸包括下列：

ATGTATAGAATTCCATTCCTG	(序列識別編號1),
TAAAATCAAGTGTTGATGTAG	(序列識別編號2),
GGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCG	(序列識別編號3),
TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT	(序列識別編號4),
TGTTCTACCACCTGAACTAGG	(序列識別編號5),
TTACATATGAGCCTTCCATG	(序列識別編號6),
CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA	(序列識別編號7),
GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG	(序列識別編號8),
TGGCATTGATCTGGTTCATC	(序列識別編號9),

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (17)

GTTTAGGAATCTTCCCCTT (序列識別編號10),
 GAGGCGTGAGAATCTCAAGA (序列識別編號11),
 GTGTCCTCAAGTGGATCTGG (序列識別編號12),
 GGGCAACAGAGCAATGTTTCT (序列識別編號13),
 CAGTGTGTCAGTGTACTGTT (序列識別編號14),
 CTCAGCAACACTCCTAT (序列識別編號15),
 TCCTGGTCTGCAGGTAA (序列識別編號16),
 TTACGCAGATAAGAACCAGTTTGG (序列識別編號17),
 TTTCTGGACGCTTGCTCACCAG (序列識別編號18),
 TTCTATCTGAGGAACAACCACTAGTAGC (序列識別編號19),
 CACCAGACTTGACACAGGACAGGCACATC (序列識別編號20),
 CGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAG (序列識別編號21),
 ACACAGGAAGGTGCCAAGCA (序列識別編號22),
 TGCAGACAGACGGGCAAAGT (序列識別編號23),
 TTGTGGGGACCAGGGGAGAT (序列識別編號24),及
 AGCCTGGCACTCTGCTGAAT (序列識別編號25)。

套件組也包括DNA取樣裝置如AmpliCard™(謝菲爾大學，英國謝菲爾S10 2JF；Tarlow JW等，J. Invest. Dermatol.103:387-389(1994))等；DNA純化裝置如使用SDS進行細胞溶解接著進行蛋白酶K消化，Nucleon套件組等；及PCR反應劑如10X反應緩衝液，熱穩定聚合酶，dNTP等。

本發明之另一具體例提供識別具有IL-1單套型如IL-1(44112332)單套型聯結之額外對偶基因之方法。得自IL-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (18)

1基因簇之額外對偶基因可藉此區DNA之序列分析識別。另外額外對偶基因可藉限剪酶分析識別(識別新穎標記之方法參見McDowell等, Br.J.Rheumatol.32(Supp1): 182(1983); Wilson等, Hum.Molec.Genet.1(5): 535(1992); di Giovine等, Hum.Molec.Genet.1(6): 450(1992); 發明人之報告Clay等, Human Genetics 97(6): 723-26(1996))。得自IL-1(44112332)單套型攜帶者之IL-1基因簇DNA之決定序列或限剪酶分析, 及於非攜帶者個體比較識別額外對偶基因可能存在於單套型。此外可能實例3或藉家族研究建立聯結不平衡。

本發明亦係針對識別額外發炎病症之方法, 該等病症係於得自IL-1之單套型對偶基因關聯。決定有病及無病各組病人之基因型及比較。藉此方式顯示單套型關聯新發炎病症。

下列實例示例說明本發明之具體例但絕非限制本發明之範圍。

實例1 決定基因型

全部人類個體皆為得自謝菲爾之無關係白種健康供血者(n=112)。個體於表1指示位置決定基因型。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (19)

表1. 用於單套型研究之標記

標記	基因	參考文獻
222/223	IL1A	Todd & Naylor, Nucleic Acids Res. 19: 3756 (1991)
gz5/gz6	IL1A	Zuliani, et al., Am. J. Hum. Genet. 46: 963-69 (1990)
-889	IL1A	McDowell, et al., Arth. & Rheum. 38: 221-8 (1995)
+3953	IL1B	Di Giovine, et al., Cytokine 7(6): 606 (1995)
-511	IL1B	Di Giovine, Hum. Molec. Genet. 1(6): 450 (1992)
gaat.p33330	IL1B與IL1RN間	Murray, et al., Coop. Hum. Link. Center, unpublished
Y31	IL1B與IL1RN間	Spurr, et al., Cytogenet. & Cell Genet. 73:255-73 (1996)
VNTR	IL1RN	Tarlow, et al., Hum. Genet. 91:403-4 (1993)

用於標記之PCR擴增之引子序列及螢光標記示於表2

。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (20)

表2 基因型之引子序列及螢光標記

標記	螢光標記	引子序列	
222/223	HEX	ATGTATAGAATTCCATTCCTG	(序列識別編號1)
		TAAAATCAAGTGTTGATGTAG	(序列識別編號2)
gz5/gz6	FAM	GGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCG	(序列識別編號3)
		TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT	(序列識別編號4)
-889	NONE	TGTTCTACCACCTGAAGTAGG	(序列識別編號5)
		TTACATATGAGCCTTCCATG	(序列識別編號6)
+3953	NONE	CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA	(序列識別編號7)
		GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG	(序列識別編號8)
-511	NONE	TGGCATTGATCTGGTTCATC	(序列識別編號9)
		GTTTAGGAATCTTCCCACTT	(序列識別編號10)
Gat.p 33330	FAM	GAGGCGTGAGAATCTCAAGA	(序列識別編號11)
		GTGTCCTCAAGTGGATCTGG	(序列識別編號12)
Y31	HEX	GGGCAACAGAGCAATGTTTCT	(序列識別編號13)
		CAGTGTGTCAGTGTACTGTT	(序列識別編號14)
VNTR	NONE	CTCAGCAACACTCCTAT	(序列識別編號15)
		TCCTGGTCTGCAGGTAA	(序列識別編號16)

反應條件如表3所述。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (21)

表3. 反應條件

標記	條件
222/223	50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl ₂ , 200 : mM dNTPs, 25 ng 引子, 50ng 模版, 0.004% W-1 (Gibco-BRL) 0.2u Taq, PCR進行94℃ 1秒, 55℃ 1秒, 72℃ 1秒之週期共30週期
gz5/gz6	每一標記222/223, 但加入一單位Perfect Match (StrataGene)
-889	每一標記222/223, 但PCR於96℃ 1秒進行1週期, 進行94℃ 1秒, 46℃ 1秒, 72℃ 1秒之週期40週期及72℃ 4秒之一週期, 產物使用NcoI割裂供分析
+3953	每一標記222/223, 但PCR係於67.5℃ 進行35週期伴以環化接合, 產物以TaqI割裂供分析
-511	每一標記222/223, 但PCR進行於95℃ 2秒之1週期, 95℃ 1秒, 53℃ 1秒, 74℃ 1秒之35週期, 及74℃ 4秒之1週期, 產物以AvaI及Bsu36I割裂供分析
gaat.p33330	每一標記222/223
Y31	每一標記222/223
VNTR	每一標記222/223, 但使用1.7mM MgCl ₂ , 於96℃ 1秒1週期; 94℃ 1秒, 60℃ 1秒, 70℃ 1秒30週期及於70℃ 2秒1週期

222/223、gz5/gz6、gaat.p33330及Y31 PCR產物藉瓊脂糖凝膠電泳檢定，及於PCR產物根據(乙塞典(ethidium)染色強度匯集。2 μ l匯集物於ABI 373A自動定序列儀上分析，對偶基因尺寸係使用Genescan及Genotyper體測定。對偶基因使用簡單電腦程式加上全球密碼且照大小順序編號。

-889 PCR產物使用NcoI消化，所得片段於8%PAGE決定大小。對偶基因1可產生83及16 bp片段。對偶基因2可產生一個99 bp片段。

+3953 PCR產物使用限剪酶TaqI消化。對偶基因1產生97、85及12 bp片段及對偶基因2產生182及12 bp片段。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (22)

-511PCR產物使用AvaI及Bsu36I消化及各片段藉8%PAGE決定大小。對偶基因1使用AvaI消化時產生190及114 bp片段，而使用Bsu36I消化時產生304 bp片段。對偶基因2使用AvaI消化時產生304 bp片段及使用Bsu36I消化時產生190及114 bp片段。

VNTR PCR產物於2%瓊脂糖凝膠於90 V電泳45分鐘。對偶基因1有4個重複本及PCR產物為412 bp，對偶基因2有2個重複本及PCR產物為240 bp，對偶基因3有3個重複本及PCR產物為326 bp，對偶基因4有4個重複本及PCR產物為498 bp，對偶基因5有6個重複本及PCR產物為584 bp。

基因間距離係由基於得自IL-1基因簇(Nicklin等，Genomics 19：382-4(1994)；Nothwang等，Genomics(付梓中))跨距之相關PAC純株之插子大小估計決定。基因內距離係由得自GENBANK資料庫之相關核苷酸序列決定。

實例2 估計聯結不平衡之方法

由於此處研究的4個標記為多重對偶基因，進行初步分析決定促成最大不平衡之成對位置間之對偶基因組合，俾使對偶基因結合成雙對偶基因系統之組時不平衡不會被遮蔽。Xie及Ott之E.H.程式(Handbook of Human Genetic Linkage,1994,John Hopkins University Press,188-98)，(併述於此以供參考)用於估計 H_0 (無聯結)及 H_1 (許可對偶基因聯結)下之單套型頻率。發現煩瑣的對偶基因分組策略具有若干優於常用方法之優點，幾乎可於全部檢視之成對標

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (23)

記組合檢知不平衡，不平衡與物理距離間有良好交互關係。

特別 Xie 及 Ott 之 E.H. 程式用於決定成對對偶基因組合間之不平衡之最大可能估值 (D_{ij})，此處 $D_{ij}=h_{ij}-p_iq_j$ 為於位置 1 之對偶基因 i 頻率及於位置 2 之對偶基因 j 頻率及 h_{ij} 為單套型 ij 頻率。程式計算於 H_0 (無關聯) 下單套型頻率 (因此對偶基因頻率) 之最大可能值及於 H_1 (許可對偶基因關聯) 下單套型頻率之最大可能值。

對大於兩個對偶基因之標記，E.H. 對對偶基因之頻率之估值與直接由樣本族群估計對偶基因頻率之交互關係不良，因此 D_{ij} 估值並不可靠。因此需要將多對偶基因標記分組成雙對偶基因系統。以雙對偶基因格式分析標記具有額外優點，標記 D 、 p_j 及 q_j 可簡化為 D 、 p 及 q ，此處 p 及 q 定義為於兩個位置較罕見之對偶基因頻率 (故未喪失普遍性 $p \leq q \leq 0.5$)，及 D 為對偶基因間不平衡估值。

雙對偶基因系統下，使用 Hill 方程式決定的次冪也更簡化 (Hill, Heredity, 33: 229-39(1974))。此外記號 D 變成可告知訊息，故 $^D > 0$ 表示於兩個位置之較罕見對偶基因關聯，及 $^D < 0$ 表示於一個位置之罕見對偶基因關聯於另一位置的常見對偶基因。

因對偶基因分組方法影響檢測不平衡之次冪 (Zourous 等, Genet. 85, 543-50(1997); Weir 等, Genet. 88, 633-42(1976))，進行初步分析確保分組不會遮蔽對偶基因小集合間之不平衡。此分析中對各個單套型計算 $\delta_{ij} = (O'_{ij} - E_{ij}) / \sqrt{E_{ij}}$ ，此

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (24)

處 E_{ij} 為單套型 ij 假設方程式之預測值 ($E_{ij} = 2n p_i q_j$ ，此處 n = 研究個體數)，及 O'_{ij} 為如下測得觀察得單套型計算值之基本估值。全部可明顯切割之基因型為計算的單套型。各個雙雜接合子 ($i_1 i_2 / j_1 j_2$) 可分割成兩個可能的單套型集合 [$i_1 j_1$ ， $i_2 j_2$] 或 [$i_1 j_2$ ， $i_2 j_1$]。使用單套型頻率作為明確單套型計數估值，各集合機率經計算及用作”部分”計數。藉此方式含混基因型亦為計數的單套型，總數(含混加明確)構成 δ_{ij} 使用的 O'_{ij} 。一旦確定， δ_{ij} 大小及記號用來決定何種對偶基因組合顯示與無關聯無效假說之最大偏差。此種資訊用來於多對偶基因位置將對偶基因分組為雙對偶基因系統而可有效使用 E.H. 程式。

為了比較不同成對位置組合間之不平衡程度，計算與頻率無關的不平衡測量值 ($\sim D$ ，於特定指示之最大可能不平衡比例)，此處 $\sim D = \hat{D} / |D_{\max}|$ (Thompson 等, Am. J. Hum. Genet. 42, 113-24 (1988))。P 與 q 之關係為 $p \leq q \leq 0.5$ ，因此可寫成 $-pq \leq D \leq p(1-q)$ 故當 $\hat{D} < 0$ 時， $D_{\max} = -pq$ 及當 $\hat{D} > 0$ 時， $D_{\max} = p(1-q)$ 。E.H. 程式輸出包括於 H_0 及 H_1 下最大可能參數值之對數機率，因 $-2 \ln(L_0/L_1) \sim X^2_1$ 此處 L_0 及 L_1 為 H_0 及 H_1 下之機率，故可對各試驗決定 p 值。

於 H_0 下 $\hat{D}$ 之非症候性變異： $D=0$ 及 H_1 使用 Hill (Heredity 33: 229-39 (1974)) 對基因型資料之方程式計算。使用此等值，可算出成對比較的次羈。

由前述 δ_{ij} 初步分析識別含全部 8 個位置之常見單套型，且一旦於多對偶基因位置的對偶基因已經分組時由不平

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (25)

衡的大小及記號證實。由此對偶置促成最大不平衡之該組的對偶基因已經於單套型識別。為了估計該族群的單套型頻率，測定該族群內帶有至少一套相關對偶基因之攜帶比率。此比率不表示真正單套型因其相位位置。蒙地卡羅模擬技術用來對此等組合攜帶假定並無關聯由模擬無效分布測試顯著偏差。

實例3 於IL-1基因簇之聯結不平衡之估計

於IL-1基因內及周圍多個雙對偶基因及多對偶基因標記已經識別。但標記間的聯結不平衡程度，及一般族群的多標記單套型的普及率至今為止尚未識別。

第1圖顯示本研究使用8個標記位置的相對位置。得自212位無關健康志願者之DNA樣本對各個標記決定基因型，所得對偶基因頻率估值示於表4。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (26)

表4 標記對偶基因頻率估值

222/223	頻率	gz5/gz6	頻率	-889	頻率	+3953	頻率
1(126bp)	0.005	1(79bp)	0.003	1(NcoI)	0.714	1(2TaqI)	0.812
2(128bp)	0.018	2(82bp)	0.005	2	0.286	2	0.188
3(130bp)	0.378	3(88bp)	0.676				
4(132bp)	0.299	4(91bp)	0.316				
5(134bp)	0.016						
6(136bp)	0.208						
7(138bp)	0.055						
8(140bp)	0.003						
9(142bp)	0.010						
10(144bp)	0.008						
*總數	384		392		398		398
-511	頻率	gaat.p33330	頻率	Y31	頻率	VNTR	頻率
1	0.618	1(189bp)	0.658	1(148bp)	0.092	1	0.744
2(Bsu36I)	0.382	2(193bp)	0.002	2(158bp)	0.008	2	0.256
		3(197bp)	0.255	3(160bp)	0.454		
		4(201bp)	0.084	4(162bp)	0.062		
				5(164bp)	0.003		
				6(166bp)	0.122		
				7(168bp)	0.035		
				8(170bp)	0.030		
				9(172bp)	0.095		
				10(174bp)	0.087		
				11(176bp)	0.003		
				12(178bp)	0.011		
	398		404		370		398

*分析染色體數目

註-對偶基因名稱(及大小)係以粗體字表示。

為了決定成對位置組合之聯結不平衡，使用 Xie 及 Ott 電腦程式。發現此程式當用於雙對偶基因系統時最有效，故以最適當方式分組供成對比較，故不會遮蔽對偶基因小集合間之不平衡。

表5中成對位置間之不平衡表示為 $\sim D$ ， $\wedge D$ 對其最大值 $D_{\max}$ 之比，且與位置間之物理距離估值以千鹼基對表示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (27)

表5 標記間之不平衡($\sim D = \hat{D} / |D_{\max}|$ 及物理距離

	222/223	gz5/gz6	-889	+3953
222/223	-	+0.872	+0.829	+0.710
gz5/gz6	2.5	-	0.889	-0.695
-889	7	4.5	-	+0.804
+3953	55	55	50	-
-511	60	60	55	4.5
gatt.p33330	260	260	255	205
Y31	310	310	305	255
VNTR	380	380	375	325
	-511	gatt.p33330	Y31	VNTR
222/223	+0.535	+0.433	+0.364	-0.499
gz5/gz6	+0.540	+0.517	-0.503	+0.286
-889	-0.264	+0.337	+0.318	-0.207
+3953	-0.617	+0.409	-0.475	-0.439
-511	-	+0.691	-0.456	+0.448
gatt.p33330	220	-	+0.639	+0.442
Y31	250	50	-	-0.765
VNTR	320	120	70	-

註-不平衡值顯示於右上角，物理距離估值以Kb表示顯示於左下角。
。基因間距離表示至最接近的5Kb。

表6顯示對各位置組合檢測50% $D_{\max}$ 之次羈，及各對應D之p值。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (28)

表6 檢測50% $D_{\max}$ 次累及 $-2\ln(L_0L_1)$ 之p值

	222/223	gz5/gz6	-889	+3953
222/223	-	$\sim 100(+)$	$\sim 100(+)$	98(+)
gz5/gz6	$<1 \times 10^{-10}$	-	87(-)	60(-)
-889	$<1 \times 10^{-10}$	$\sim 3 \times 10^{-8}$	-	$\sim 100(+)$
+3953	$\sim 1 \times 10^{-7}$	$*\sim 9 \times 10^{-3}$	$<1 \times 10^{-10}$	-
-511	$\sim 9 \times 10^{-10}$	$\sim 4 \times 10^{-10}$	$*\sim 9.4 \times 10^{-2}$	$*\sim 2.6 \times 10^{-2}$
gatt.p33330	$\sim 9 \times 10^{-8}$	$\sim 2 \times 10^{-9}$	$*\sim 1.7 \times 10^{-2}$	$\sim 5 \times 10^{-4}$
Y31	$\sim 1 \times 10^{-4}$	$\sim 4 \times 10^{-4}$	$\sim 6 \times 10^{-4}$	$\sim 1 \times 10^{-7}$
	222/223	gz5/gz6	-889	+3953
VNTR	$\sim 1 \times 10^{-3}$	$\sim 1 \times 10^{-3}$	$*\sim 3 \times 10^{-1}$	$*\sim 1.2 \times 10^{-1}$
	-511	gatt.p33330	Y31	VNTR
222/223	$\sim 100(+)$	$\sim 100(+)$	$\sim 100(+)$	93(-)
gz5/gz6	$\sim 100(+)$	$\sim 100(+)$	98(-)	$\sim 100(+)$
-889	96(-)	89(+)	$\sim 100(+)$	78(-)
+3953	79(-)	97(+)	$\sim 100(+)$	52(-)
-511	-	$\sim 100(+)$	$\sim 100(+)$	$\sim 100(+)$
gatt.p33330	$<1 \times 10^{-10}$	-	49(+)	$\sim 100(+)$
Y31	$\sim 2 \times 10^{-4}$	$*\sim 7 \times 10^{-3}$	-	89(-)
VNTR	$\sim 8 \times 10^{-6}$	$\sim 1 \times 10^{-9}$	2×10^{-7}	-

註-次累顯示於右上角而不平衡記號顯示於括弧；逐點p值(未經校正)顯示於左下角。對 $p=0.05$ 之總顯著長度而言，逐點顯著程度對28次比較為0.0018。

*於 $p=0.0018$ 之閾值不顯著

於大部分位置組合測得顯著聯結不平衡($p_{\text{corr}} < 0.05$)而僅有少數例如。包括VNTR與較遠的雙對偶基因標記+3953與-889間之比較，其中不平衡為負向，結果次累下降(表6)。不平衡 $\sim D$ 與物理距離間之交互關係為 $r = -0.752(p < 0.0001, \text{一次加尾})$ (第2圖)。

為了比較多對偶基因標記的不同分組方法，對全部涉及222/223之比較使用兩種額外分組策略計算 $\sim D$ 。第一策略為”常見對偶基因相對於其餘”之方法，第二種策略為基於對偶基因大小分組，使用對偶基因頻率相對於大小之雙

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (29)

模組分布，對全部檢視之多對偶基因標記皆觀察大小。分析結果顯示於表7，此處比較三種分組方法之 $\sim D$ 值。

表7 於多對偶基因標記位置分組對偶基因之三種方法之 $\sim D$ 值

	δ_{ij}	常見相對於其餘	對偶基因大小
gz5/gz6	0.87	0.79	0.77
-899	0.83	0.81	0.98
+3953	0.71	0.74	0.77
-511	0.54	*0.15	0.61
gatt.p33330	0.43	*0.03	0.53
Y31	0.36	*0.12	0.16
VNTR	0.5	0.48	*0.04

註-對222/223與其餘標記間之不平衡列舉數值。

*指示於 $p=0.05$ 不顯著，甚至於對多次試驗校正前亦如此。

使用此等其他分組策略於若干例無法測得不平衡，值得注意者為222/223與-511及gaat.p33330於常見相對於其餘方法，222/223與Y31於常見相對於其餘及對偶基因大小方法及222/223與VNTR於對偶基因大小方法。

經由測定 δ_{ij} ，檢視多個對偶基因位置中哪個對偶基因促成最大不平衡，顯示存在有兩個單套型含有全部八個位置之對偶基因。可經由檢視單套型頻率及分組後所得不平衡值證實。第一單套型：對偶基因44112332(以染色體順序表示，參考第1圖)最常見(攜帶者34/198)，比預期值更常見7倍(預期值=4.5/198)($p<0.000001$)。第二單套型：對偶基因33221461(攜帶者2/206)，比預期值更常見4倍(預期值=0.5/206)，但非統計學顯著(p 約0.106)。但檢視更大樣本可輔助本發現之統計學意義。

資訊指示聯結不平衡之顯著程度存在於跨越染色體2q13約400 Kb伸長。如預期，不平衡對IL-1 α 基因之3個

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (30)

標記皆明顯，但若干分隔更遠的標記(-899/+3953； $\sim D=+0.804$ ，物理距離=50 Kb)間也顯著(表6)。但於簇之極末端間 $\sim D$ 顯著消失。於IL-1 β 基因獲得 $\sim D$ 中等值(+3953/-511； $\sim D=-0.617$)，但當對多次比較校正時無意義，可能反應出當不平衡為負向時次羈減少(Thompson等，Am J. Hum. Genet.42：113-24(1988))。

整體而言物理距離與聯結不平衡間有良好交互關係(第2圖)； $r=-0.752$ 。 r 本身的可靠度與物理距離及 $\sim D$ 之估值可靠度有部分關係。於短距離，物理距離準確，原因為係由已知DNA序列測定；但較常範圍的估值較不準確。次羈可嘗試作為 $\sim D$ 可靠度指標，原因為若次羈低則表示樣本大小過小，使用低樣本大小時 $\sim D$ 估值不可靠。

繁複分組策略成功率示於表7，顯示若干例其中特定位置間之不平衡顯著較低，或當使用其他常用分組方法時無法檢測。此處使用分組策略之缺點為其相當煩瑣，原因為用於分組的資訊係基於單套型”觀察值”之粗略估值(參見實例2)。對於更佳多形性之標記而言，雜接合程度較高表示 δ_{ij} ，估值較不準確，原因為有較高比例之含混單套型故。雖有此等缺點小心考慮 δ_{ij} ，符號之大小及對偶基因頻率。

於夠大研究中，經由單純考慮分組時明確的單套型可簡化方法。 δ_{ij} 之測定係使用先前已知分組多對偶基因標記之最大量，此乃為何幾乎全部成對標記組合皆檢測得不平衡的理由。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (31)

兩個單套型含有全部八個標記及其他較短的單套型特定令人感興趣，原因為可能IL-1基因對偶基因之特定組合協調發揮作用而決定整體發炎表現型。瞭解哪個標記處於強力聯結不平衡，不僅可更合理的設計基因研究，同時也可提供疾病機制線索。

額外對偶基因亦屬IL-1(44112332)單套型之一部分。發明人先前顯示五種新穎標記關聯IL1RN基因之VNTR標記之對偶基因2(Clay等，Hum. Genet. 97：723-6(1996))。可能五個對偶基因處於聯結不平衡，但尚未進行統計分析證實。因此il-1(44112332)單套型也包括五個標記。

同理 Guasch發現IL1RN之三個額外對偶基因(Guasch等，Cytokine 8：598-602(1997))其以相等頻率出現於小樣本(12人)。Guasch對偶基因之一(MspI對偶基因)為Clay研究之8006對偶基因。因此Guasch之額外兩個對偶基因(MwoI及SspI對偶基因)可能為此處發現之IL-1(44112332)對偶基因之一部分。但需如此處所述證實，原因為樣本大小極小可能導致誤導性的結果。

Guasch也研究IL1B基因的三個對偶基因。對偶基因為對偶基因5887其可能對應於此處所述IL1B位置+3953之Taq對偶基因，及5810(BsoFI)對偶基因及1903(AluI)對偶基因。三個對偶基因據稱為”不良聯結不平衡”，但真正使用較大樣本準確決定基因型指出AluI對偶基因也屬於IL-1(44112332)單套型之一部分，原因為TaqI及AluI對偶基因之對偶基因頻率類似(0.78/0.22相對於0.74/0.26)。但聯結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (32)

不平衡比 Guasch 所述 IL1RN 對偶基因微弱。

因此除此處識別之對偶基因外，IL-1(44112332)單套型也含有下列對偶基因：

IL1RN 基因之 1731 標記之對偶基因 2 (A 於位置 1731),
 IL1RN 基因之 1812 標記之對偶基因 2 (A 於位置 1812),
 IL1RN 基因之 1868 標記之對偶基因 2 (G 於位置 1868),
 IL1RN 基因之 1887 標記之對偶基因 2 (C 於位置 1887),
 IL1RN 基因之 8006 標記之對偶基因 2 (一個 HpaII 或 MspI 位置),
 IL1RN 基因之 8061 標記之對偶基因 2 (缺一 MwoI 位置),
 IL1RN 基因之 9589 標記之對偶基因 2 (含有一個 SspI 位置)。

此外下列 PCR 引子可用於擴增此等對偶基因：

TTACGCAGATAAGAACCAGTTTGG (序列識別編號 17),
 TTTCCTGGACGCTTGCTCACCAG (序列識別編號 18),
 (用於 1731、1821、1868 及 1887)
 TTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTAGC (序列識別編號 19),
 CACCAGACTTGACACAGGACAGGCACATC (序列識別編號 20),
 (用於 8006)
 CGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAG (序列識別編號 21),
 (與序列識別編號 20 用於 SEQ 8006)
 ACACAGGAAGGTGCCAAGCA (序列識別編號 22),
 TGCAGACAGACGGGCAAAGT (序列識別編號 23),
 (用於 8006 及 9589)
 TTGTGGGGACCAGGGGAGAT (序列識別編號 24), 及
 AGCCTGGCACTCTGCTGAAT (序列識別編號 25)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (33)

(用於9589)

實例4 IL-1(44112332)單套型關聯糖尿病性腎病變

存在有此處所述之兩個單套型於健康及生病族群研究判定單套型是否關聯發炎病。81位非胰島素依賴型糖尿病(NIDDM)病人患有腎病變與198位實例3人種上匹配健康個體及147位未患腎病變之NIDDM病人比較。基因型的決定係如實例1進行。

IL-1(44112332)單套型由24/79 NIDDM腎病變病人及25/141 NIDDM未患腎病變病人攜帶。但第二單套型(33221461)未見於腎病變病人(0/81)。IL-1(44112332)單套型比較健康對照組(24/79相對於34/198； $p=0.015$)及未患腎病變之NIDDM組(24/79相對於25/141； $p=0.03$)，於病人組顯著過度表現。因此該單套型關聯發炎病。

實例5 IL-1單套型關聯發炎病

本例為先兆實例。其他疾病如實例4檢視。IL-1(44112332)單套型發現關聯冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚及潰瘍性結腸炎。

同理IL-1(33221461)單套型關聯牙周病，幼年型慢性關節炎，乾癬，胰島素依賴型糖尿病及糖尿病性視網膜病變。

實例6 新穎標記聯結IL-1單套型

本例為先兆實例。額外標記藉2q13-14區之序列及限制酶分析識別。新標記以實例2及3所述方式識別屬於IL-1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (34)

單套型。

實例7 IL-1(44112332)單套型用於預測疾病易感性

本例為先兆實例。患有潰瘍性結腸炎家族病史病人測量基因型存在有IL-1(44112332)單套型。基因型的決定係如實例1進行且測知病人攜帶一或多個單套型對偶基因。如此病人使用IL-1拮抗劑處理預防疾病。

第二位患有家族型冠狀動脈病病史的病人於IL-1基因簇決定基因型。發現病人攜帶一或多個IL-1(44112332)單套型對偶基因，且與VNTR對偶基因2同質接合。如此病人比一般族群發生冠狀動脈病的機率高5.4倍故積極處理預防疾病。

實例8 額外單套型具有統計學意義

本例為先兆實例。額外400個染色體遵照實例1決定基因型，遵照實例2決定聯結不平衡。發現IL-1(33221461)單套型比預期值更常見4倍(p約0.05)。

以類似方式決定下列標記存在於IL-1(44112332)單套型(p<<0.05)。

IL1RN基因之1731標記之對偶基因2，

IL1RN基因之1812標記之對偶基因2

IL1RN基因之1868標記之對偶基因2

IL1RN基因之1887標記之對偶基因2

IL1RN基因之8006標記之對偶基因2

IL1RN基因之8061標記之對偶基因2

IL1RN基因之9589標記之對偶基因2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (35)

此處引述之文獻皆併述於此以供參考且個別列舉於此處方便參考：

美國專利4,582,788

美國專利4,666,828

美國專利4,801,531

美國專利5,110,920

美國專利5,268,267

美國專利申請案08/813,416

美國專利申請案08/628,282

英國專利申請案9618960.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

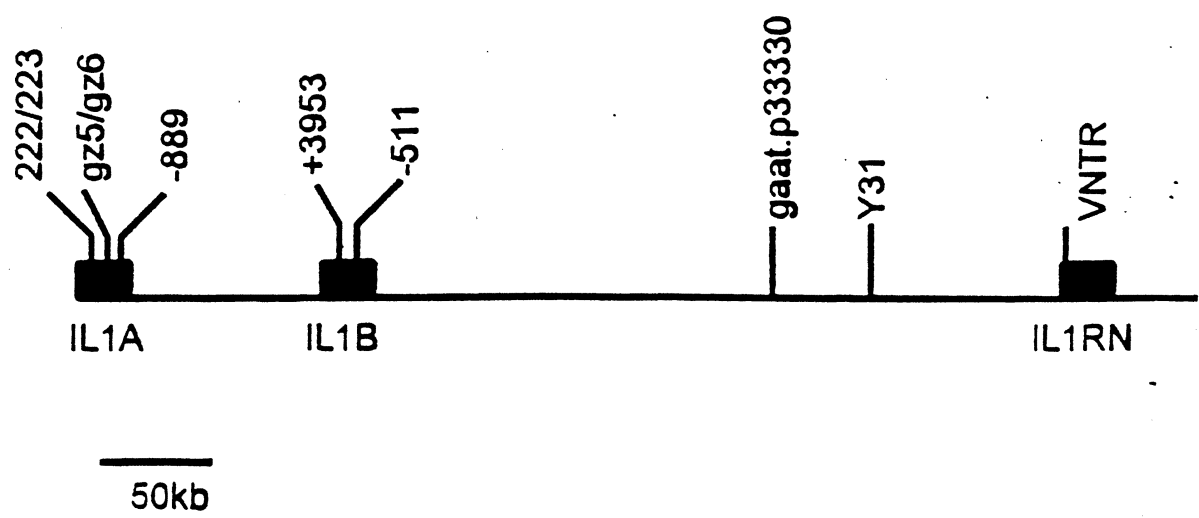
訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：發炎性疾病之預測)

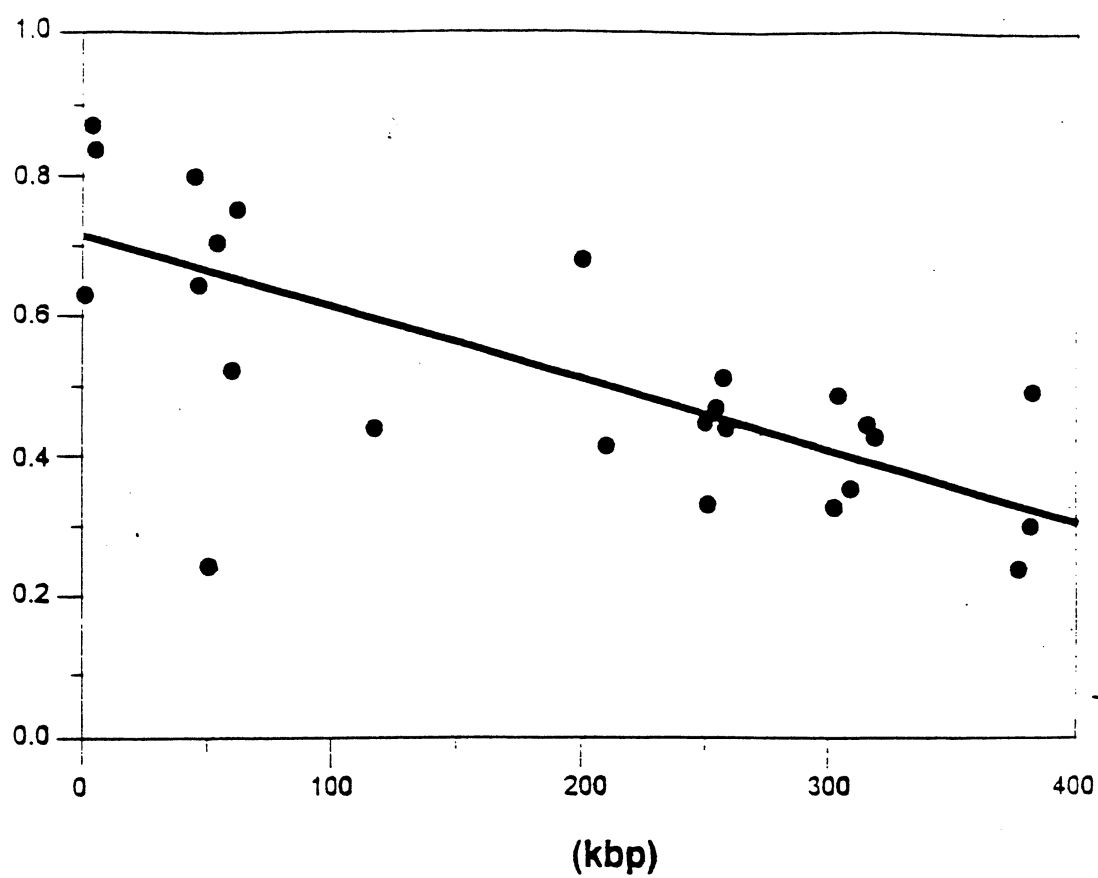
揭示檢測病人對發炎病症之易感性之方法、檢定分析及套件組，發炎病症例如冠狀動脈病，鬆骨病，糖尿病性腎病變，簇狀禿髮，格雷夫氏病，系統性紅斑性狼瘡，硬化性苔蘚，潰瘍性結腸炎，糖尿病性視網膜病變，牙周病，幼年型慢性關節炎特別慢性虹膜睫狀體炎，乾癬，胰島素依賴型糖尿病及其他含有IL-1基因成分之疾病。該方法包含由病人獲得生物樣本及測定是否存在有與發炎病症關聯的IL-1基因簇之特殊單套型。檢測單套型之至少一個對偶基因指示對發炎病症的易感性。

英文發明摘要(發明之名稱：PREDICTION OF INFLAMMATORY DISEASE)

Methods, assays and kits are disclosed for detecting a patient's susceptibility to an inflammatory disorder such as coronary artery disease, osteoporosis, nephropathy in diabetes mellitus, alopecia areata, Graves disease, systemic lupus erythamatosus, lichen sclerosis, ulcerative colitis, diabetic retinopathy, periodontal disease, juvenile chronic arthritis particularly chronic iridocyclitis, psoriasis, insulin dependent diabetes and other diseases with an IL-1 genetic component. The methods comprise obtaining a biological sample from a patient and determining the presence or absence of a particular haplotype from the IL-1 gene cluster that is associated with an inflammatory disorder. Detection of at least one of the alleles in the haplotype indicates a susceptibility for the inflammatory disorder.



第 1 圖



第 2 圖

$r = 0.725, p < 0.0001,$

五、發明說明 (15)

此若變異為加成性或協同性，則檢測變異可指示疾病又更高。此外，存在有呈聯結不平衡之疾病關聯對偶基因將可診斷試驗多於一個對偶基因，有助於消除偽陽性結果的可能。

決定特定對偶基因是否存在之技術可為基於大小或順序例如限剪片段長度多形性(RFLP)，決定核酸序列或雜交之核酸技術。

此等技術也包含於分析前擴增核酸之步驟。擴增技術為業界人士已知包括選殖，聚合酶連鎖反應(PCR)，特定對偶基因之聚合酶連鎖反應(PASA)，聚合酶連鎖接合，窩藏聚合酶連鎖反應等。擴張產物可以多種方式檢定分析，包括尺寸分析，限剪消化接著尺寸分析，檢測反應產物加特定標籤之寡核苷酸引子，對偶基因特異性寡核苷酸(ASO)雜交，決定順序，雜交等。

以PCR為基礎之偵測技術手段同時包括多個標記多重擴增。例如業界眾所周知者，選擇PCR引子產生大小不會重疊而可同時分析之PCR產物。另外，可使用加不同標記的引子擴增不同標記因而可檢測。分析多重標記之手段包括以不同的螢光探針對各標記加標記。然後於基於螢光的自動化決定序列儀分析PCR產物。當然基於雜交的檢測可差異檢測樣本內之多種PCR產物。其他技術為業界已知許可多重分析多個標記。

若特定對偶基因可產生具有一個胺基酸變異株之蛋白質，則對偶基因檢測技術可基於蛋白質。例如胺基酸變異

六、申請專利範圍

第87108415號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：94年1月

1. 一種檢測個體是否罹患或傾向於發展出與IL-1發炎性單套型相關之疾病或病況的方法，其包含：檢測一或多個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因：IL-1A之222/223標記之對偶基因4；IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4；IL-1A之-889標記之對偶基因1；IL-1B之+3954標記之對偶基因1；IL-1B之-511標記之對偶基因2；gaat.p33330標記之對偶基因3；Y31標記之對偶基因3；IL-1A之222/223標記之對偶基因3；IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3；IL-1A之-889標記之對偶基因2；IL-1B之+3954標記之對偶基因2；IL-1B之-511標記之對偶基因1；gaat.p33330標記之對偶基因4；Y31標記之對偶基因6；IL-1RN之VNTR標記之對偶基因1；其中該一或多個對偶基因之存在顯示出個體係傾向於發展出或已患有該疾病或病況。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該病況之疾病係選自於由下列所組成之群組中：發炎疾病、退化性疾病、免疫失調、感染症、創傷引發的疾病以及癌症。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該檢測步驟係選自於由下列所組成之群組中：
 - a) 對偶基因專一性寡核苷酸雜交；
 - b) 尺寸分析；
 - c) 定序；

六、申請專利範圍

- d) 雜交；
 - e) 5'核酸酶消化；
 - f) 單股構形多形性；
 - g) 對偶基因專一性雜交；
 - h) 引子專一性延伸；及
 - i) 寡核苷酸聯結分析。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中在檢測前或與檢測同時進行核酸樣本之擴增步驟。
5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中該擴增步驟應用一選自於由序列識別編號1-25所組成之群組中的引子：

ATGTATAGAATTCCATTCCTG	(序列識別編號1),
TAAAATCAAGTGTTGATGTAG	(序列識別編號2),
GGGATTACAGGCGTGAGCCACCGCG	(序列識別編號3),
TTAGTATTGCTGGTAGTATTCATAT	(序列識別編號4),
TGTTCTACCACCTGAACTAGG	(序列識別編號5),
TTACATATGAGCCTTCCATG	(序列識別編號6),
CTCAGGTGTCCTCGAAGAAATCAAA	(序列識別編號7),
GCTTTTTTGCTGTGAGTCCCG	(序列識別編號8),
TGGCATTGATCTGGTTCATC	(序列識別編號9),
GTTTAGGAATCTTCCCCTT	(序列識別編號10),
GAGGCGTGAGAATCTCAAGA	(序列識別編號11),
GTGTCCTCAAGTGGATCTGG	(序列識別編號12),
GGGCAACAGAGCAATGTTTCT	(序列識別編號13),
CAGTGTGTCAGTGTACTGTT	(序列識別編號14),

六、申請專利範圍

CTCAGCAACACTCCTAT	(序列識別編號15),
TCCTGGTCTGCAGGTAA	(序列識別編號16),
TTACGCAGATAAGAACCAGTTTGG	(序列識別編號17),
TTTCCTGGACGCTTGCTCACCAG	(序列識別編號18),
TTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTAGC	(序列識別編號19),
CACCAGACTTGACACAGGACAGGCACATC	(序列識別編號20),
CGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAG	(序列識別編號21),
ACACAGGAAGGTGCCAAGCA	(序列識別編號22),
TGCAGACAGACGGGCAAAGT	(序列識別編號23),
TTGTGGGGACCAGGGGAGAT	(序列識別編號24),及
AGCCTGGCACTCTGCTGAAT	(序列識別編號25)。

6. 如申請專利範圍第3項之方法，其中在該尺寸分析之前進行一限制酶消化反應。
7. 一種偵測個體是否罹患或傾向於發展出心血管疾病之方法，其包含偵測一或多個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因：IL-1A之222/223標記之對偶基因4；IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4；IL-1A之-889標記之對偶基因1；IL-1B之+3954標記之對偶基因1；IL-1B之-511標記之對偶基因2；gaat.p33330標記之對偶基因3；Y31標記之對偶基因3；IL-1A之222/223標記之對偶基因3；IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3；IL-1A之-889標記之對偶基因2；IL-1B之+3954標記之對偶基因2；IL-1B之-511標記之對偶基因1；gaat.p33330標記之對偶基因4；Y31標記之對偶基因6；IL-1RN之VNTR標記之

六、申請專利範圍

對偶基因1；其中該一或多個對偶基因之存在顯示出該個體傾向於發展出或已罹患心血管疾病。

8. 一種偵測個體是否罹患或傾向於發生骨質疏鬆症之方法，其包含偵測一或多個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因：IL-1A之222/223標記之對偶基因4； IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4； IL-1A之-889標記之對偶基因1； IL-1B之+3954標記之對偶基因1； IL-1B之-511標記之對偶基因2； gaat.p33330標記之對偶基因3； Y31標記之對偶基因3； IL-1A之222/223標記之對偶基因3； IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3； IL-1A之-889標記之對偶基因2； IL-1B之+3954標記之對偶基因2； IL-1B之-511標記之對偶基因1； gaat.p33330標記之對偶基因4； Y31標記之對偶基因6； IL-1RN之VNTR標記之對偶基因1； 其中該一或多個對偶基因之存在顯示出該個體傾向於發展出或已罹患骨質疏鬆症。
9. 一種套組，其包含一用於偵測一或多個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因之偵測用技術手段：IL-1A之222/223標記之對偶基因4； IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4； IL-1A之-889標記之對偶基因1； IL-1B之+3954標記之對偶基因1； IL-1B之-511標記之對偶基因2； gaat.p33330標記之對偶基因3； Y31標記之對偶基因3； IL-1A之222/223標記之對偶基因3； IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3； IL-1A之-889標記之對偶基因2； IL-1B之+3954標記之對偶基因2； IL-1B之-511標記之對偶基因1

六、申請專利範圍

； gaat.p33330標記之對偶基因4； Y31標記之對偶基因6
； IL-1RN之VNTR標記之對偶基因1。

10. 一種套組，其包含一用於偵測至少兩個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因之偵測用技術手段： IL-1RN之1731標記之對偶基因2； IL-1RN之1812標記之對偶基因2； IL-1RN之1868標記之對偶基因2； IL-1RN之1887標記之對偶基因2； IL-1RN之8006標記之對偶基因2； IL-1RN之8061標記之對偶基因2； IL-1RN之9589標記之對偶基因2； IL-1A之222/223標記之對偶基因4； IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4； IL-1A之-889標記之對偶基因1； IL-1B之+3954標記之對偶基因1； IL-1B之-511標記之對偶基因2； gaat.p33330標記之對偶基因3； Y31標記之對偶基因3； IL-1A之222/223標記之對偶基因3； IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3； IL-1A之-889標記之對偶基因2； IL-1B之+3954標記之對偶基因2； IL-1B之-511標記之對偶基因1； gaat.p33330標記之對偶基因4； Y31標記之對偶基因6； IL-1RN之VNTR標記之對偶基因2； IL-1RN之VNTR標記之對偶基因1。

11. 如申請專利範圍第9或10項之套組，其中該偵測用技術手段係選自於由下列所組成之群組中：

- a) 對偶基因專一性寡核苷酸雜交；
- b) 尺寸分析；
- c) 定序；
- d) 雜交；

六、申請專利範圍

- e) 5' 核酸酶消化；
- f) 單股構形多形性
- g) 對偶基因專一性雜交；
- h) 引子專一性延伸；及
- i) 寡核苷酸聯結分析。

12. 如申請專利範圍第9項之套組，其更包含一用於偵測IL-1RN之VNTR標記之對偶基因2之技術手段。

13. 一種套組，其包含一經分離的核酸分子，該核酸分子係與一個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因雜交：
IL-1RN之1731標記之對偶基因2；IL-1RN之1812標記之對偶基因2；IL-1RN之1868標記之對偶基因2；IL-1RN之1887標記之對偶基因2；IL-1RN之8006標記之對偶基因2；IL-1RN之8061標記之對偶基因2；IL-1RN之9589標記之對偶基因2；IL-1A之222/223標記之對偶基因4；IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4；IL-1A之-889標記之對偶基因1；IL-1B之+3954標記之對偶基因1；IL-1B之-511標記之對偶基因2；gaat.p33330標記之對偶基因3；Y31標記之對偶基因3；IL-1A之222/223標記之對偶基因3；IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3；IL-1A之-889標記之對偶基因2；IL-1B之+3954標記之對偶基因2；IL-1B之-511標記之對偶基因1；gaat.p33330標記之對偶基因4；Y31標記之對偶基因6；IL-1RN之VNTR標記之對偶基因2；IL-1RN之VNTR標記之對偶基因1；其中該核酸分子係擇自由下列構成之群組：

六、申請專利範圍

一核酸分子，其包含有擇自如申請專利範圍第5項所述之序列辨識編號第1至25號所構成之群組之任一核苷酸序列；以及

一核酸分子，其包含互補於擇自序列辨識編號第1至25號所構成之群組中任一核苷酸序列之核苷酸序列。

14. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1RN之1731標記之對偶基因2的核苷酸雜交。

15. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1RN之1812標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

16. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1RN之1868標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

17. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1RN之1887標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

18. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1RN之8006標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

19. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1RN之8061標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

20. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分

六、申請專利範圍

子係與對應於IL-1RN之9589標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

21. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1A之222/223標記之對偶基因4或IL-1A之222/223標記之對偶基因3之核苷酸雜交。

22. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因4或IL-1A之gz5/gz6標記之對偶基因3之核苷酸雜交。

23. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1A之-889標記之對偶基因1或IL-1A之-889標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

24. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1B之+3945標記之對偶基因1或IL-1B之+3945標記之對偶基因2之核苷酸雜交。

25. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於IL-1B之-511標記之對偶基因2或IL-1B之-511標記之對偶基因1之核苷酸雜交。

26. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於gaat.p33330標記之對偶基因3或gaat.p33330標記之對偶基因4之核苷酸雜交。

27. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分子係與對應於Y31標記之對偶基因3或Y31標記之對偶基因6之核苷酸雜交。

28. 如申請專利範圍第13項之套組，其中該經分離的核酸分

六、申請專利範圍

子係與對應於 IL-1RN 之 VNTR 標記之對偶基因 2 或 IL-1RN 之 VNTR 標記之對偶基因 1 之核苷酸雜交。

29. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其更包含有偵測一或多個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因：IL-1RN 之 1731 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1812 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1868 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1887 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 8006 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 8061 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 9589 標記之對偶基因 2。
30. 如申請專利範圍第 7 或 8 項之方法，其更包括偵測一或多個選自於由下列所組成之群組中的對偶基因：IL-1RN 之 VNTR 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1731 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1812 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1868 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 1887 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 8006 標記之對偶基因 2；IL-1RN 之 8061 標記之對偶基因 2；及 IL-1RN 之 9589 標記之對偶基因 2。