

(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2004-528837

(P2004-528837A)

(43) 公表日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(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	Z N A A 2 G O 4 5
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00	2 G O 5 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 2 9
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78	C 4 B O 6 3
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 213 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-575314 (P2002-575314)	(71) 出願人	500247105 エビゲノミクス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成14年3月26日 (2002.3.26)		ドイツ国、デー－10435 ベルリン、
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月26日 (2003.9.26)		カスターニーンアレー 24
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/003401	(74) 代理人	100093735
(87) 国際公開番号	W02002/077272		弁理士 荒井 鐘司
(87) 国際公開日	平成14年10月3日 (2002.10.3)	(74) 代理人	100105429
(31) 優先権主張番号	60/278,333		弁理士 河野 尚孝
(32) 優先日	平成13年3月26日 (2001.3.26)	(74) 代理人	100108143
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 嶋崎 英一郎
		(72) 発明者	アードルヤン、ペーター
			ドイツ国、10437 ベルリン、デュン
			カーシュトラ－セ 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造血細胞の増殖異常の解析のための方法及び核酸

(57) 【要約】

特定の対象遺伝子群の、少なくとも一つ及び／またはそれらの規制領域に関連する造血細胞の増殖異常の検知及び差別化方法であって、標的核酸内のメチル化または非メチル化 CpG ジヌクレオチッドの識別をする、少なくとも一種の試薬または一連の試薬によって、前記対象から得られた、生物学的試料における標的核酸に接触することからなる方法。正常な造血細胞と増殖異常の造血細胞を識別する前記方法。急性リンパ球性白血病と急性骨髄性白血病を識別する前々記方法及び前記方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象中の ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYCex3 からなる群の、少なくとも一つの遺伝子及び/またはそれらの規制領域に関連する造血細胞の増殖異常の検知及び差別化方法であって、標的核酸内のメチル化または非メチル化 CpG ジヌクレオチッドの識別をする、少なくとも一種の試薬または一連の試薬によって、前記対象から得られた、生物学的試料における標的核酸に接触することからなる方法。

10

【請求項 2】

正常な造血細胞と増殖異常の造血細胞を識別する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

急性リンパ性白血病と急性骨髄性白血病を識別する請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

CDKN1A、CDK4、AR が健康な造血細胞と増殖異常の造血細胞を識別することを使用される請求項 1 または 2 に記載の方法の使用。

【請求項 5】

N33、EGR4、CDKN1A、SDC4、MPL、TP73、BAK1、CSNK2B、ARHI、CASP10 が急性リンパ性白血病及と急性骨髄性白血病を識別することを使用される請求項 1 または 3 に記載の方法の使用。

【請求項 6】

下記の各ステップからなる請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の方法。

30

ゲノム DNA 含有の生物学的試料を得、ゲノム DNA を抽出し、5 位置が非メチル化であるゲノム DNA 試料中のシトシン塩基を処理して、その塩基対挙動がシトシンに類似していないウラシルまたは他の塩基に変換し、前以って処理されたゲノム DNA の断片を増幅し、一つ以上のシトシン位置のメチル化状態を同定する。

【請求項 7】

試薬が重亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩の溶液であることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって行なわれることを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

増幅が耐熱性 DNA ポリメラーゼによって行なわれることを特徴とする、請求項 6 ~ 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

100 ~ 2000 塩基対の長さを有する、10 以上の異なる断片が増幅されることを特徴とする、請求項 6 ~ 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

増殖ステップが、SEQ ID No. : 387 ~ SEQ ID No. : 534 からなるプライマーオリゴヌクレオチッドの集合を使用して実施される、請求項 6 ~ 10 の何れか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

幾つかの DNA 切片の増幅が一つの反応器を使用して実施されることを特徴とする、請求項 6 ~ 1 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

増幅ステップが、特に健全な及び/または病んだ造血細胞に関連する DNA を、造血細胞の特殊なゲノムメチル化状態に基づき、バックグラウンド DNA に対して、優先的に増幅するものであることを特徴とする、請求項 6 ~ 1 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

少なくとも一つの遺伝子及び/または、 A B L 1、 A B L 1、 A P A F 1、 A P C、 A R、 A R H I、 B A K 1、 B A X、 B C L 2、 C A S P 1 0、 C A S P 8、 C A S P 9、 C 10
C N D 2、 C D C 2、 C D C 2 5 A、 C D H 1、 C D H 3、 C D K 4、 C D K N 1 A、 C
D K N 1 B、 (p 2 7 K i p 1)、 C D K N 1 C、 C D K N 2 a、 C D K N 2 B、 C S N K 2
B、 D A P K 1、 E G R 4、 E L K 1、 E S R 1、 F O S、 G P I b beta、 G P R 3 7、
G S K 3 β、 G S T P 1、 H I C - 1、 H O X A 5、 I G F 2、 M D R 1、 M G M T、 M
L H 1、 M O S、 H u m o s、 M P L、 M Y C、 M Y C L 1、 M Y O D 1、 N 3 3、 P I T X
2、 P M L、 P M S 2、 P R A M E、 P T E N、 R B 1、 R B L 2、 S D C 4、 S F N、
T C L 1 A、 T G F B R 2、 T P 7 3、 W T 1、 N - M Y C、 L - M Y C、 C - A B L、 E
L K 1、 T u b u l i n、 C S F 1、 C D 1 R 3、 C S N K 2 B、 M e 4 9 1 / T D 6 3、 A R
、 C D K 4、 H u m o s、 C D C 2 5 A、 C M Y C e x 3 からなる群の、それらの規制領域内の
メチル化状態が、各増幅産物のオリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸 (P N A) 20
オリゴマーのハイブリッド化によって検知されることを特徴とする、請求項 6 ~ 1 3 の何れ
か 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

オリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸 (P N A) オリゴマーが、 S E Q I D N o . : 5 3 5 ~ S E Q I D N o . : 1 2 5 8 の群から得られることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

増幅産物がラベルされることを特徴とする、請求項 6 ~ 1 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

増幅産物のラベルが蛍光ラベルであることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。 30

【請求項 1 8】

増幅産物のラベルが放射性核種であることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

増幅産物のラベルが質量分析計で検出可能な、代表的な質量を有する検知可能な、分子断片であることを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

増幅産物または増幅物の断片ラベルが質量分析計で検出されることを特徴とする請求項 6 ~ 1 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

生産された断片が、単一の正または負の正味電荷を有することを特徴とする請求項 1 9 ま 40
たは 2 0 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

マトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析 (M A L D I) または電子放散質量分析 (E S I) によって、検知が実施され、視覚化されることを特徴とする請求項 1 9 ~ 2 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

下記のステップからなる請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の方法。

- a) ゲノム DNA 含有の生物学的試料を得、
- b) ゲノム DNA を抽出し、
- c) 少なくとも一つまたはそれ以上の、下記の遺伝子の C p G からなるゲノム DNA を一つ 50

またはそれ以上のメチル化感受性制限酵素によって消化すること、

ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYCex3

d) 消化ステップc) で生成するDNAの検知。

【請求項24】

DNA消化物がステップd) に先立ち増幅される請求項23に記載の方法。

【請求項25】

増幅がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって行なわれることを特徴とする請求項24に記載の方法。

【請求項26】

一つ以上のDNA断片の増幅が一つの反応器中で行なわれることを特徴とする請求項24及び/または25に記載の方法。

【請求項27】

ポリメラーゼが耐熱性DNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項24～26の何れか1項に記載の方法。

【請求項28】

SEQ ID No. : 95～SEQ ID No. : 386及びそれに相補的な配列からなる群より得られた配列の一つを有する、前処理されたゲノムDNAの分離核酸。

【請求項29】

特に一つのオリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸(PNA)オリゴマーであるオリゴマー、であって、請求項28記載のSEQ ID No. : 95～SEQ ID No. : 386の配列の一つである、前処理されたゲノムDNAに、ハイブリッド化するかまたは同じである、少なくとも、10ヌクレオチッドの塩基配列の一つからなる、オリゴマー。

【請求項30】

塩基配列が少なくとも一つのCpGまたはTpGジヌクレオチッド配列を含む請求項29に記載のオリゴヌクレオチッド。

【請求項31】

少なくとも一つのCpGまたはTpGジヌクレオチッドのシトシンがオリゴマーのほぼ中央3番目に存在することを特徴とする請求項30に記載のオリゴヌクレオチッド。

【請求項32】

特に一つのオリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸(PNA)オリゴマーである、オリゴマーが、SEQ ID No. : 535～SEQ ID No. : 1258からなる群から得られる配列の一つである。

【請求項33】

請求項29～32の何れか1項に記載の、少なくとも二つのオリゴヌクレオチッドからなるオリゴヌクレオチッドの集合。

【請求項34】

SEQ ID No. : 1245、1245、1246、1246、1247、1247、1248、1248、1249、1249、1250、1250、1251、1251、1252、1252、1253、1253、1254、1254、1255、1255、1256、1256、1257、1257、1258、1258である少なくとも二つのオ

リゴヌクレオチッドからなるオリゴヌクレオチッドの集合。

【請求項 35】

SEQ ID No: 88 ~ 94 である群から得られる一つ以上の分離された核酸。

【請求項 36】

SEQ ID No: 1211 ~ 1231、1231、1232、1232、1233、1233、1234、1234、1235、1235、1236、1236、1237、1237、1238、1238、1239、1393、1240、1240、1241、1241、1242、1242、1243、1243、1244、1244 である少なくとも二つのオリゴヌクレオチッドからなるオリゴヌクレオチッドの集合。

【請求項 37】

SEQ ID No: 74 ~ 87 である群から得られる一つ以上の分離された核酸。

【請求項 38】

SEQ ID No.: 1 ~ SEQ ID No.: 73 及びそれに相補的な配列の一つ以上に含まれる全ての CpG ジヌクレオチッドのメチル化状態を検知するための、オリゴマーからなる、請求項 33 ~ 35 及び請求項 37 の何れか 1 項に記載のオリゴマー、ペプチッド核酸 (PNA) オリゴマー及び / または分離された核酸の集合。

【請求項 39】

SEQ ID No.: 1 ~ SEQ ID No.: 73 及びそれに相補的な配列のシトシンのメチル化状態及び / または単一、多形性、ヌクレオチッド (SNPs) の決定のための試料として、請求項 29 ~ 34 及び請求項 36 の何れか 1 項に記載の、オリゴマーまたはペ

10

20

【請求項 40】

健全な造血細胞と増殖異常の造血細胞の差別化のための、請求項 34 記載のオリゴヌクレオチッドまたは請求項 35 記載の核酸の集合の使用。

【請求項 41】

急性リンパ性白血病と急性骨髄性白血病の差別化のための、請求項 36 記載のオリゴヌクレオチッドまたは請求項 37 記載の核酸の集合の使用。

【請求項 42】

請求項 28 記載の SEQ ID No.: 95 ~ SEQ ID No.: 386 の配列の一つ、及び / またはそれに相補的である配列及びその切片の一つである DNA 配列の増幅のためのプライマーオリゴヌクレオチッドとしての、請求項 29 に記載の少なくとも二つのオリ

30

【請求項 43】

対応するゲノム DNA のメチル化状態の決定及び / または単一、多形性、ヌクレオチッド (SNPs) の検知のための請求項 28 に記載の前処理されたゲノム DNA の使用。

【請求項 44】

少なくとも一つのオリゴヌクレオチッドが固相に結合することを特徴とする請求項 33、34 または 36 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸 (PNA) オリゴマーの一つの集合。

【請求項 45】

集合の全てのメンバーが固相に結合することを特徴とする請求項 33、34 または 36 の何れか 1 項に記載のオリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸 (PNA) オリゴマーの一つの集合。

40

【請求項 46】

請求項 33、34 または 36 の何れか 1 項に記載のオリゴマーの少なくとも一つが固相に結合する (ことを特徴とする)、SEQ ID No.: 1 ~ SEQ ID No.: 73 及びそれに相補的な配列の一つが含まれる、CpG ジヌクレオチッドの対応するゲノムメチル化状態に関連する、疾病の解析のための、異なるオリゴマーまたはペプチッド核酸 (PNA) オリゴマー (アレー) の配置を行なう方法。

【請求項 47】

50

請求項 4 4 または 4 5 に記載の、異なるオリゴマーまたはペプチッド核酸 (P N A) オリゴマー (アレー) の配置。

【請求項 4 8】

正方形または六角形格子の、平面固相上に配置されることを特徴とする、請求項 4 7 に記載の異なるオリゴヌクレオチッドオリゴマー配列及び / または P N A オリゴマー配列のアレー。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 4 8 の何れか 1 項に記載の、少なくとも一つの核酸からなる、遺伝子のメチル化状態に関連する造血細胞の増殖異常の解析のための核酸またはペプチッド核酸アレー。

【請求項 5 0】

固相表面がシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼鉄、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなることを特徴とする請求項 4 7 ~ 4 9 の何れか 1 項に記載のアレー。

【請求項 5 1】

請求項 2 9 ~ 3 7 の何れか 1 項に記載の重亜硫酸塩 (= 酸性亜硫酸塩、亜硫酸水素塩) 試薬及びオリゴヌクレオチッド及び / または P N A オリゴマーからなるキット。

【請求項 5 2】

疾病素因の検知、下位部類、診断、予診、処置及び / または造血細胞増殖異常の監視の間の差別化のための、S E Q I D No. : 7 4 ~ S E Q I D No. : 9 4 及び S E Q I D No. : 5 3 5 ~ S E Q I D No. : 1 2 5 8 の配列のオリゴヌクレオチッドまたはペプチッド核酸 (P N A) オリゴマーの使用。

【請求項 5 3】

疾病素因の検知、下位部類、診断、予診、処置及び / または造血細胞増殖異常の監視の間の差別化のための核酸内のシトシンメチル化の解析で使用される、S E Q I D No. : 9 5 ~ S E Q I D No. : 3 8 6 及びそれに相補的な配列の群から得られる配列の一つである D N A 配列。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

腫瘍の種類の予測は腫瘍の診断において、重要な問題の一つであるから、癌におけるほとんど全ての治療法の決定にとって、種類の予測は非常に重要である。

異なる種類の癌及び下位部類の種類の癌に応じて、異なる特別な処置が必要になる。どの治療レジメが使用されるかというような重要な治療法の決定は、それ故に、腫瘍の種類を正確に認識することに、決定的に依存する。現時点における腫瘍の部類は一般的に、形態的、組織病理学的または免疫学的要因、及び単分子マーカー [R.W.McKenna, Clin Chem. 46, 1252 (2000); F.R.Appelbaum, Semin Hematol.36, 401 (1999)] による。しかし、現在使用されている診断方法はいずれも、腫瘍の部類が十分に正確に行なわれてはいない。異なる方法を結合し、個々の病理学者の経験に基づいて部類を修正している。

【背景技術】

【0002】

最近、幾つかのグループがマイクロアレーベースの発現の解析によって、腫瘍部類の正確な決定をすることができることを示した。ゴルブ (Golub) 及びその共同研究者達は、約 7 0 0 0 種の遺伝子の発現レベルを選別し、1 0 ~ 1 0 0 遺伝子間で、急性リンパ芽球性白血病 (A L L) と急性骨髄性白血病 (A M L) を十分に識別できることを示した [T.R.Golub et al., Science 286, 531 (1999)]。同様なアプローチで、アリザデー (Alizadeh) 及びその共同研究者達は、治療及び病気の結果への反応に関し十分に相違点を有する広汎性、大 B 細胞リンパ腫の未だ知られていない下位部類を発見した [A.A.Alizadeh et al., Nature 403, 503 (2000)]。また、包括的な転写の解析は悪性黒色腫のフェノタイプの特徴を予測できることが示された。[M.Bittner et al., Nature 406, 535(2000)]。

【0003】

マイクロアレーベースのメッセンジャー R N A を使用した大スケール解析はメッセンジャ

10

20

30

40

50

ー R N A の不安定性により第一に妨害される [T. Emmert-Buck et al., Am J Pathol. 156, 1109 (2000)]。また、発現は、日常的に、且つ高い信頼度で検出される因子 2 の最小値のみを変化させる [R. J. Lipshutz, S. P. A Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart, Nature Genetics 21, 20 (1999); D. W. Selinger, K. J. Cheung, R. Mei, E. M. Johansson, C. S. Richmond, Nature Biotechnology 18, 1262 (2000)]。更に、試料調製は発現が瞬間的にそれに続いて起こる或引き金を変化させるという事実によって複雑になる。概略の発現への影響が齎す個々の寄与を解決できないこと、及び変化しつつある漸進的性質の計量化の困難さが、データ解析を複雑にしている。

【 0 0 0 4 】

C p G 島内での異常な D N A メチル化はヒト悪性腫瘍において、広範な遺伝子スペクトルの消去または過発現に繋がる [P. A. Jones, Cancer Res 65, 2463 (1996)]。異常なメチル化が、また、或腫瘍の遺伝子のイントロン部分及びコード部分の C p G リッチの規制要素で起こることが示されている [M. F. Chan, G. Liang, P. A. Jones, Curr Top Microbiol Immunol 249, 75 (2000)]。限定ランドマークゲノムスキニングを使用して、コストロ及び共同研究者達は、メチル化のパターンは腫瘍タイプに特異性であることを示すことができた [J. F. Costello et al., Nat Genet 24, 132 (2000)]。著しく特徴的な D N A のメチル化パターンは、乳癌の細胞列で示され得た [T. H. -M. Huang, M. R. Perry, D. E. Laux, Hum Mol Genet 8, 459 (1999)]。大スケールのメッセンジャー R N A 発現を監視することによって、メチル化状態の広範囲のゲノム評価が癌組織の分子指標を示し、それ故に、腫瘍の種類の予測と発見をすることができる。

10

20

【 0 0 0 5 】

白血病は骨髓細胞に発生する悪性の癌であり、骨髓細胞の増殖が制御不能になることが特徴である。白血病の大部分は、骨髓性またはリンパ球性として、進展する細胞タイプによって部類される。両種類とも、急性または慢性である。急性白血病は、骨髓または血液中に、未成熟で機能を喪失した細胞が蓄積する急速に進展する病気である。多くの場合、骨髓はもはや十分な量の正常な赤血球及び白血球及び血小板を造ることができない。赤血球が欠乏する貧血症は実質的に全ての白血病患者におこる。正常な白血球が欠乏すると、感染を防ぐ体の機能が損なわれる。血小板の不足は負傷した場合、出血し易くなる。慢性白血病は、よりゆっくり進展し、過成熟で、機能を備えた多数の細胞を生産する。

【 0 0 0 6 】

2 0 0 1 年の米合衆国における推定 3 1 , 5 0 0 件の新しい白血病患者の内訳は、急性、慢性がほぼ同比率であった。高齢者に多く発症が見られ、過半数が 6 0 歳以上であった。通常、白血病には成人が小児の十倍罹る。白血病は最も普遍的な子供の癌であり、急性リンパ球性白血病（以後 A L L の略語を使用する）は小児白血病の 8 0 % を占める。成人の白血病の最も普遍的タイプは急性骨髓性白血病（以後 A M L の略語を使用する）で、年間推定 1 0 , 0 0 0 人が新たに発症する。今年の急性リンパ球性白血病は約 3 , 5 0 0 件であろう。

30

【 0 0 0 7 】

環境的及びウイルス性の原因に加えて、細胞信号、細胞死、細胞増殖のような細胞経路に各種の遺伝子が関与し、そして細胞老化が白血病の進展に関連すると考えられる。そのような遺伝子の例は、Bcl2、ALL1である。

40

【 0 0 0 8 】

5 - メチルシトシンは最も頻繁に現われる真核生物細胞の D N A における共有塩基変成物である。これは、例えば、転写の規制、遺伝子刷り込み及び腫瘍化である役割を演じる。それ故、遺伝子情報の一成分としての 5 - メチルシトシンの同定は非常に興味ある問題である。しかし、5 - メチルシトシンの位置は、シトシンと同じ塩基対挙動を示すので、配列によっては同定できない。その上、5 - メチルシトシンによって齎される後成的情報は P C R 増幅の間に完全に失われる。

【 0 0 0 9 】

比較的新しく、現時点で最も頻繁に使用されている D N A 中の 5 - メチルシトシンの解析

50

方法は、重亜硫酸塩と、それに続くアルカリ加水分解で塩基対挙動がチミンに一致する、ウラシルに変換されるところのシトシンとの特殊な反応に基づいている。しかし、5 - メチルシトシンはこの条件下で、変換されずに残る。その結果、もとのDNAはそのような方法で変換され、元来、シトシンとはハイブリッド化では区別できないメチルシトシンが、今や、残存シトシンとして、通常の分子生物学的技法、例えば、増幅及びハイブリッド化または配列化によって検出され得る。これら全ての技法は今や完全に利用されている塩基対に基づいている。感受性によって、従来技法は解析されるDNAをアガロースマトリックス中に包含させ、それによって、DNAの拡散及び変性を防ぎ（重亜硫酸塩は単鎖DNAのみと反応する）、全ての沈殿及び精製段階を迅速な透析で置き換える方法によって限定される（Olek A、Oswald J、Walter J. 重亜硫酸塩を基にした、シトシンのメチル化の解析のための、変化し改善された方法。Nucleic Acids Res.1996 Dec 15; 24 (24): 5064~6）。図でその潜在能力が説明される方法を使用して、個々の細胞の解析が可能になる。しかし、現時点では、塩基対長約3,000までの個々の分野が解析されているのみで、数千に亘るメチル化事例について、グローバルな細胞解析を行なうことは不可能である。また、この方法は少量のサンプルからの非常に小さい断片の解析については信頼性がない。この方法では、拡散防止をしているにも拘らず、マトリックスを通して、サンプルが失われる。更に他の5 - メチルシトシンの検出方法の概観は、以下の論文記事から収集できる：Rein、T.、DePamphilis、M.L.、Zorbas、H.、Nucleic Acids Res. 1998、26、2255。

10

【0010】

20

現在のところ、幾つかの例外を除いて[例えば、Zeschnigk M、Lich C、Buiting K、Doerfler W、Horsthemke B. SNRPN遺伝子座における対立遺伝子のメチル化の差異に基づく、アンジェルマン（Angelman）及びプレダー - ウィリー（Prader-Willi）症候群の診断のための、メチル化単一チューブPCR試験。Eur J Hum Genet.1997 Mar-Apr; 5 (2): 94~8]、重亜硫酸塩技法だけが研究に使用された。しかし、常に、既知の遺伝子の短く、特殊な断片は、重亜硫酸塩処理に続いて増幅され、完全に配列化され[Olek A、Walter J.H-19メチル化刷り込みの前移植個体発生。Nat Genet.1997 Nov;17 (3): 275~6] または、個々のシトシン位置が一次伸長反応によって検出される[Gonzalvo ML、Jones PA. メチル化感受性の単鎖ヌクレオチッドプライマー伸長を使用した、特殊サイトにおけるメチル化の差異の迅速な数量化（Ms-SNuPE）。Nucleic Acids Res.1997 Jun 15; 25 (12):2529~31、WO Patent 9500669] または、酵素的に消化される[Xiong Z. Laird PW. COBRA:感受性で、量的なDNAメチル化アッセイ。Nucleic Acids Res.1997 Jun 15; 25 (12):2532~4]。それに加えて、ハイブリッド化による検出も述べられている[Olek et al.、W09928498]。

30

【0011】

個々の遺伝子におけるメチル化検出の重亜硫酸塩技法を扱った刊行物は以下のものである。Grigg G、Clark S.ゲノムDNAにおける残存5 - メチルシトシンの配列化。Bioassays.1994 Jun;16 (6):431~6、431;Zeschnigk M、Schmitz B、Dittrich B、Buiting K、Horsthemke B、Doerfler W. ヒトゲノムにおける刷り込み切片：ゲノム配列によって決められる、Prader-Willi / Angelman 症候群範囲における、異なるDNAメチル化パターン。Hum Mol Genet. 1997 Mar; 6 (3): 387~95; Feil R、Charlton J、Bird AP、Walter J、Reik W. 個々の染色体のメチル化解析：重亜硫酸塩ゲノム配列のための改善されたプロトコル。Nucleic Acids Res.1994 Feb 25; 22 (4): 695~6; Martin V、Ribieras S、Song-Wang X、Rio MC、Dante R.。ゲノム配列が、pS2遺伝子の5'領域におけるDNAの次亜メチル化とヒト乳癌細胞列におけるその発現の間の相関を示す。Gene.1995 May 19; 157 (1~2): 261~4; WO 97 46705、WO 95 15373及びWO 45560。

40

オリゴマーアレー製造の従来技術の概観は1999年1月出版のNature Genetics特別版[Nature Genetics特別版、21巻、1999年1月]、に引用されている文献から得られる。

【0012】

50

蛍光ラベルされたプローブは、しばしば、固定化DNAアレーのスキヤニングに使用される。特殊なプローブの5'-OHへCy3及びCy5染料が簡単に付着するので、蛍光ラベルとしては特に好適である。ハイブリッド化プローブの蛍光物質の検出は、例えば、コンフォカール顕微鏡で行なわれる。Cy3及びCy5染料及び他の多くのものは市販されている。

【0013】

マトリックス補助レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-TOF)は生物分子の分析に非常に有用である[Karas M、Hillenkamp F. 10000 Daltonを越える分子の蛋白質のレーザー脱離イオン化。Anal Chem.1988 Oct 15; 60 (20): 2299~301]。被分析物は吸着性マトリックスに埋め込まれる。マトリックスは短時間のレーザー照射で蒸発し、被分析分子は分解することなく、気化する。被分析物はマトリックス分子との衝突によってイオン化する。電荷をかけてイオンを非電場飛行管へ送りこむ。イオン間の質量差により、イオンは異なる速度に加速される。小さい質量のイオンは大きい質量のイオンより早い時期に検出器に到達する。

10

【0014】

MALDI-TOF質量分析はペプチッド及び蛋白質の分析に非常に好適である。核酸の分析にはやや困難性がある[Gut I G、Beck S.DNA及びマトリックス補助レーザー脱離イオン化質量分析。現時の技術革新及び将来の傾向。1995、1; 147~57]。核酸の感度はペプチッドのそれに比較して、100倍も劣り、断片サイズが増加すると、感度は不均一的に低下する。核酸は骨格に大きな負電荷を有するため、マトリックスによるイオン化プロセスが、かなり非効率になる。MALDI-TOF質量分析においては、マトリックスの選択が重要である。ペプチッドの脱離に関しては、非常に細かい結晶を生じる、幾つかの、効果的なマトリックスが発見された。現在、DNAに対して敏感な幾つかのマトリックスがあるが、感度の差は短縮されない。感度差は、DNAをペプチッドに類似するように、化学変化させることにより、減少させることができる。通常骨格のフォスフェートをチオフォスフェートで置換した、核酸のフォスフォロチオエートが簡単なアルキル化-化学によって、中性荷電DNAに変換され得る[Gut I G、Beck S.選択的DNAアルキル化方法及び質量分析による検出。Nucleic Acids Res.1995 Apr 25; 23 (8): 1367~73]。この変化したDNAへの電荷タグの結合はペプチッドと同等の感度にまで増加する。更に、電荷タグは未変質基質の検出をかなり困難にする不純物、に対する分析安定性を高めさせる。

20

30

【0015】

ゲノムDNAは細胞、組織または他の試験サンプルのDNAから、標準法を使用して得られる。この標準法は、フリッチェアンドマニアティス出版、の分子クローン：実験室マニュアル、1989年、のような参考書に記載されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、著しく大きい遺伝子及びCpGジヌクレオチッドのメチル化解析を並行して行なうのに適した、新規な、マイクロアレーベースのアッセーを提示する。急性リンパ芽球性白血病(ALL)または急性骨髄性白血病(AML)患者から得られた試料は、DNAのメチル化パターンにのみ基づいて部類することができる。

40

【0017】

本発明は、下記の遺伝子群の少なくとも一つである核酸が、関心のあるゲノム配列中のメチル化または非メチル化CpGジヌクレオチッド間の識別が可能な試薬または一連の試薬に接触することを特徴とする、造血細胞の増殖異常の進展に関連する特徴、のための生物学的試料の解析方法を提供する。ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK

50

3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB R2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYCex3。

【0018】

本発明はゲノムDNAの遺伝的及び/または後成的パラメーターを確認する方法を提供する。この方法は改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常、特に、前記異常の下位部類と、この異常の遺伝的疾患素因の改善された同定及びこれらの間の差別化のために使用される。本発明は改善され、告知された患者の処置を許容して、造血細胞の増殖異常の高度に特異的な類別が可能な技術状態の改善を提示する。

10

特に好ましい、本発明の実施態様においては、急性リンパ球性白血病と急性骨髄性白血病の差別化を可能にする方法及び核酸を提供する。

更に、本発明はシトシンのメチル化及び単一多形性核酸の解析が可能である。

好ましい態様において、この方法は以下の各ステップからなる。

本発明の第一ステップでは、ゲノムDNA試料が、細胞列または血液などの給源から分離される。抽出はこの分野の専門家にとって標準的な、界面活性剤による細胞溶解物を使い、超音波及びガラスビーズの旋回力を含む手段で、行なわれる。ゲノムDNA抽出核酸は解析に使用される。

20

好ましい態様においては、DNAは次ぎのステップに先立ち分解される。この方法は、標準的技術の中の一つであり、限定されないが、特に制限エンドヌクレアーゼが使用される。

【0019】

この方法の第二のステップでは、ゲノムDNAサンプルは、5'位置が非メチル化であるシトシンが、ハイブリッド化挙動がシトシンに類似しないウラシル、チミンまたはその他の塩基に変換される方法で処理される。以後これを前処理と称する。

【0020】

前記ゲノムDNAの処理は、好ましくは、重亜硫酸塩（亜硫酸塩、酸性亜硫酸塩）で処理され続いて、アルカリ加水分解によって、非メチル化シトシン核塩基をウラシルまたは塩基対挙動がシトシンに類似しない他の塩基に変換するされる。重亜硫酸塩溶液が反応に使用されれば、非メチル化シトシン塩基に付加される。そして、変性剤または溶剤及びラジカル捕捉剤が加えられなければならない。それに続くアルカリ加水分解は非メチル化シトシン核塩基のウラシルへの変換を促進する。化学的に変換されたDNAはメチル化シトシンの検知に使用される。

30

【0021】

前処理されたDNAの断片が、SEQ ID No. : 387 ~ SEQ ID No. : 534 からなるプライマーオリゴヌクレオチッドの集合を使用し、好ましくは耐熱性ポリメラーゼを使用して増幅される。統計的、現実的に考慮すると、好ましくは、100 ~ 2000塩基対の長さを有する、10以上の異なる断片が増幅される。幾つかのDNA切片の増幅が一つの同一の反応器を使用して実施される。通常、増幅はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって行なわれる。

40

【0022】

本発明の方法は、デザインがこの分野の専門家にとって自明であるような、二者択一的プライマーを使用して実施できる。これらプライマーは、その配列が、各々相互に相補的であるか、または、補遺SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386で特定される塩基配列の、少なくとも18塩基対長の切片と同一である。前記プライマーオリゴヌクレオチッドは、好ましくは、如何なるCpGジヌクレオチッドをも含まないことが特徴である。特に、前記プライマーオリゴヌクレオチッドの配列が、バックグラウンドDNAまたは非関連のDNAの増幅を最小限に抑えることにより、選択的にアニールし、且つ、関

50

与する造血細胞の特殊なDNAを増幅するように、デザインされる方法の実施の態様が好ましい。本発明の内容において、バックグラウンドDNAとは、この場合、関連する組織とは健全な、または、病んだ造血細胞のことであるが、関連する組織特異性メチル化パターンを有さないゲノムDNAを意味する。

【0023】

本発明によれば、増殖中は、少なくとも一つのプライマーオリゴヌクレオチッドが固相に結合することが好ましい。異なるオリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー配列は、正方形または六角形格子の平面固相上に配置され、固相表面はシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼鉄、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなり、ニトロセルロースまたはプラスチックなどの他の物質も使用可能である。

10

【0024】

増幅によって得られた断片は、直接または間接的に検知可能なラベルを帯びることができる。好ましいラベルは、蛍光ラベル、放射性核種、質量分析計で検出可能な、代表的な質量を有する検知可能な、分子断片であり、生産された断片が、質量分析計で、よりよく検知されるように、単一の正または負の正味電荷を有することが好ましい。検知はマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI)または電子放散質量分析(ESI)によって実施され、視覚化される。

【0025】

本発明の第二ステップで得られた増幅産物は引き続き、アレーまたはオリゴヌクレオチッド及び/またはPNA試料にハイブリッド化される。この内容で、ハイブリッド化は下記の方法により行なわれる。ハイブリッド化の間使用される試料の集合は、好ましくは、少なくとも10オリゴヌクレオチッドまたはPNAオリゴマーからなる。このプロセスで、増幅産物は固相に結合する前に、オリゴヌクレオチッドにハイブリッド化する試料となる。特に好ましい態様では、オリゴヌクレオチッドは、SEQ ID No.: 535 ~ SEQ ID No.: 1258の群から得られる。例示で述べられる更に好ましい態様は、オリゴヌクレオチッドは、SEQ ID No.: 1211 ~ SEQ ID No.: 1258の群から得られる。続いて、非ハイブリッド化断片は除去される。前記オリゴヌクレオチッドは、その配列が、相互に相補的であるか、または、補遺で特定される塩基配列の少なくとも一つのCpGまたはTpGジヌクレオチッドを含んでいる切片と同一である。更に好ましい態様において、CpGジヌクレオチッドまたはTpGジヌクレオチッドのシトシンでは、チアミンは、10量体の5'末端から数えて、5番目から9番目のヌクレオチッドである。一つのオリゴヌクレオチッドが各CpGまたはTpGジヌクレオチッドとして存在する。

20

30

【0026】

本発明の方法の第5ステップで、非ハイブリッド化増幅産物が除去される。

【0027】

本発明の最終ステップで、ハイブリッド化増幅産物が検知される。この段階で、増幅産物に付加されたラベルはオリゴヌクレオチッド配列が局在する固相の各位置を同定できることが好ましい。

【0028】

本発明において、好ましい増幅産物のラベルは、蛍光ラベル、放射性核種または質量分析計で検出可能な、代表的な質量を有する検知可能な、分子断片である。質量分析計は、増幅産物、増幅産物の断片または増幅産物へ相補的な試料である。検知はマトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI)または電子放散質量分析(ESI)によって実施され、視覚化される。生産された断片が、質量分析計で、よりよく検知されるように、単一の正または負の正味電荷を有することが好ましい。

40

【0029】

前述の方法はゲノムDNAの遺伝的及び/または後成的パラメーターの確認のために使用されるのが好ましい。

【0030】

50

この方法を実施するために、本発明は、更に、下記に列挙した遺伝子群並びにこれら遺伝子群のシトシンメチル化検知のためのオリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー、の変化したDNAを提供する。ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARRHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYCex3。

本発明は遺伝子的及び後成的パラメーター及び特に、ゲノムDNAのシトシンのメチル化パターンが、特に、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視のために好適であるとの発見に基づいている。更に、本発明は造血細胞の増殖異常の下位部類または造血細胞の増殖異常の素因の検知の間の差別化が可能である。

【0031】

本発明の核酸はゲノム遺伝子の遺伝的及びまたは後成的パラメーターの解析に使用可能である。

この目的は、SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386の配列及びそれに相補的な配列の、前処理されたゲノムDNAの、少なくとも18塩基対長の配列を含む核酸を使用して成し遂げられる。

変化した核酸はこれまで遺伝的及び後成的パラメーターに関連する疾病の確認には結びつかなかった。

【0032】

本発明の目的は、更に、前処理DNAの解析、ゲノムシトシンのメチル化状態、及び、少なくとも10のヌクレオチッド長を有する、SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386の配列の前処理ゲノムDNAにハイブリッド化する、少なくとも、一つの塩基配列を含む、前記オリゴヌクレオチッドの検知を行なうことにある。本発明のオリゴマー試料は、先ず、造血細胞の増殖異常の進展に関連する特徴のための生物学的試料の解析の間に特異的遺伝的、後成的パラメーターの確認を可能にする、重要且つ効果的な材料からなる。前記オリゴヌクレオチッドは改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視及び前記異常の素因の検知を可能にする。更に、これらは造血細胞癌の異なる下位部類の差別化を可能にする。オリゴマーの塩基配列は、好ましくは、少なくとも、一つのCpGまたはTpGジヌクレオチッドを含む。試料は、特に、好ましくはペアリングの性質を有する、PNA(ペプチッド核酸)の形で存在する。特に、CpGジヌクレオチッドのシトシンが13量体の5'末端から5番目から9番目のヌクレオチッドであるような、本発明におけるオリゴヌクレオチッドが好ましい。PNAオリゴマーの場合は、CpGジヌクレオチッドのシトシンが9量体の5'末端から4番目から6番目のヌクレオチッドであるものが好ましい。

【0033】

本発明におけるオリゴマーは、通常、所謂、集合で使用される。これは、SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386の各CpGジヌクレオチッドのための少なくとも一つのオリゴマーを含む。この集合は好ましくは、SEQ ID No. : 535 ~ SEQ ID No. : 1258の各CpGジヌクレオチッドのための少なくとも一つのオリゴマーを含む。更に、SEQ ID No. : 1211 ~ SEQ ID No. : 1258からなる集合が好ましい。

【0034】

本発明におけるオリゴヌクレオチッドの集合の場合は、少なくとも一つのオリゴヌクレオ

チッドが固相に結合することが好ましい。更に一集合内の全てのオリゴヌクレオチッドが固相に結合することが好ましい。

【0035】

更に本発明は、前記ゲノムDNA (SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386 の配列及びそれに相補的な配列の) の処理バージョンを使用して、ゲノムDNAのシトシンメチル化状態の検知を行なうために使用される、少なくとも、10n (オリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー) の集合に関する。これらの試料は、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視をすることができる。特に、これらは造血細胞異常の異なる下位部類の差別化及び前記異常の素因の検知を可能にする。特に、好ましい集合はSEQ ID No. : 74 ~ SEQ ID No. : 1258 からなる。

10

【0036】

オリゴマーの集合は、SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386 の配列の一つである前処理ゲノムDNAを使用した単一、多形性ヌクレオチッド (SNPs) の検出にも使用される。

【0037】

本発明においては、異なるオリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー (所謂、アレー) の配置が、それが同様に固相に結合するという方法で示すところの、本発明によって、有効とされることが好ましい。異なるオリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー配列のアレーは、正方形または六角形格子の平面固相上に配置されるのが特徴である。固相表面は、好ましくは、シリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼鉄、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなる。しかし、ニトロセルロース及び、ペレットまたは樹脂体の形態とされ得るナイロンのようなプラスチックも使用可能である。

20

【0038】

それ故、本発明の更なる主題は、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視、造血細胞癌の異なる下位部類の差別化及び/または前記異常の素因の検知のために、担体物質に固定されたアレーを製造する方法である。前記方法において、本発明における少なくとも一つのオリゴマーは固相に結合する。そのようなアレーを製造する方法は、例えば、固相化学及び耐光保護グループなどを内容とする米国特許公報第5,744,305号から知ることができる。

【0039】

本発明の更なる主題は、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視のためのDNAチップに関する。更にDNAチップは、造血細胞の増殖異常の素因の検知及び造血細胞癌の異なる下位部類の差別化を行なうことができる。DNAチップは、本発明における少なくとも一つの核酸を含む。DNAチップは、例えば、米国特許公報第5,837,832号から知ることができる。

30

【0040】

更に、本発明の主題は、例えば、重亜硫酸塩含有試薬、その配列が各場合ごとに、補遺 (SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386) で特定される塩基配列の18塩基長に相当するか、または、それに相補的である、少なくとも二つのオリゴヌクレオチッドを含む、プライマーオリゴヌクレオチッドの集合、オリゴヌクレオチッド及び/またはPNAオリゴマー、並びに、実施用器具及び前記方法の評価からなるキットである。しかし、キットは本発明の主旨に則って、これまで述べた構成要素の部分のみをも、含むことができる。

40

【0041】

本発明におけるオリゴマーまたはそのアレー並びに本発明のキットは、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視のために使用される。更に、前記発明は、造血細胞癌の異なる下位部類の差別化及び造血細胞の増殖異常の素因の検知にまでその使用が拡大される。本発明においては、その方法は、好ましくは、ゲノムDNA内の、重要な、遺伝的及び/または後成的パラメーターの解析、特に、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の監視、前記異常の素因の検知、前記異常の下位部類の差別化のために使用される

50

。

【 0 0 4 2 】

本発明の方法は、例えば、改善された診断、処置及び造血細胞の増殖異常の進展の監視、前記異常の素因の検知、前記異常の下位部類の差別化のために使用される。

【 0 0 4 3 】

本発明の方法の更なる態様は、前処理なしでの、ゲノムDNAのメチル化状態の解析方法である。方法の第一段階では、ゲノムDNA試料が組織または細胞の供給源から分離されねばならぬ。このような供給源は細胞系、組織学的スライド、体液、または組織埋蔵パラフィンを含む。抽出は、この分野の専門家にとって標準的な手段で、界面活性剤溶液、超音波、及びガラスビーズ旋回流を含む手段によって行なわれる。一度核酸が抽出された、ゲノム二重鎖DNAが解析に使用される。

10

【 0 0 4 4 】

好ましいDNAの態様では、これは従来技術では標準的であるが、処理に先立ち、特に、制限エンドヌクレアーゼによって分割される。第二段階では、DNAは一種以上のメチル化感受性、制限酵素で消化される。消化は制限サイトにおけるDNAの加水分解が、特異的CpGジヌクレオチッドのメチル化状態を伝達するように行なわれる。

【 0 0 4 5 】

第三ステップにおいては、制限断片が増幅される。検知は、従来の標準技術で行なわれ、例えば、以下に限定されないが、ゲル電気泳動分析、ハイブリッド化解析、PCR産物への検知可能なタグの挿入、DNAアレー解析、MALDIまたはESI分析による。

20

【 0 0 4 6 】

特に、技法を修得した監視機の使用によって、CpGマーカー位置fpr、特別なフェノタイプの部類、を決めるために、以下の技法を使用して、そのとき、解析されたところの、データポイントの大きな集合を生成する、多数の患者サンプルについて、上で述べられた分子生物学的技法の一つを使用した、CpG位置のメチル化状態の解析。

【 0 0 4 7 】

部類予測の問題は既に、マイクロアレー遺伝子発現データ[M.P. Brown et al., Proc Natl Acad Sci USA 97, 262 (2000); T Gaasterland S Bekiranov, Nature Genetics 24, 204 (2000)]の解析に使用して成功している。support vector machine (SVM) と呼ばれる、方法を修得した管理機を使用して入力される[V Vapnik, Statistical Learning Theory (Wiley, New York 1998); N.Christianini, J.Shawe-Taylor, An Introduction to Support Vector Machines (Cambridge University Press, Cambridge 2000)]。SVMは練習用試料の二つの部類間の通常の判別が可能である。この場合各試料の調べるCpGサイトのメチル化パターン(CG/TG比)が表示される。SVMのような修得される監視技術はデータラベルで示される従来技術を活用するという利点を有する。更に、SVMは個々のディメンジョン間の高い線型相互依存を計算でき、データのオーバーフィッティングを回避できる[V Vapnik, Statistical Learning Theory (Wiley, New York 1998)]。

30

【 0 0 4 8 】

部類の予測へのCpGサイトの貢献度の定量化のために、我々は先ず、試験試料の部類に対する、これらの判別力にしたがって、二試料tテストを使用して、全てのCpGサイトのランクを決めた。SVMはCpGサイトのランク番号を増加させて、訓練された。予測のエラーが最小になるCpGサイトのランク番号は、特別な部類が互いに選別される番号に依存する。これは一方、潜在的に情報の喪失へ繋がる解析特定のCpG位置を消去するという事実によって説明される。他方、統計的修得理論[V Vapnik, Statistical Learning Theory (Wiley, New York 1998)]によって示唆されるように、試料の限定された番号に関して、我々のCpGサイトの番号では、フリーパラメーターの番号が減少するに従って、部類予測の信頼性は一般に増加する。分類問題の固有の仕事に特有な複雑さは、これら二つの拮抗する効果が平衡し、部類予測が最適の挙動を示す時期を決定する。これは、広範なゲノム解析が部類予測を改善するだけでなく[J.Weston et al., in Advances in neural information processing systems (MIT Press, Cambridge, MA 2001)]、問題の複雑

40

50

さについての情報をも提供する。

【0049】

本発明は患者または各個人の不利益であるか、またはそれに関して発生した事態の診断及び／または予測に関する。本発明における方法によって得られる、患者または各個人のゲノムDNAの重要な遺伝的及び／または後成的パラメーターが、他の遺伝的及び／または後成的パラメーター集合と比較され、この両者間の差異が、患者または各個人の不利益であるか、またはそれに関して発生した事態の診断及び／または予測に、基本的に役立つ。

【0050】

本発明の内容において、ハイブリッド化という語は、二重鎖構造のDNA試料におけるWatson-Crickペアリングのラインに沿った、完全に、相補的な配列に一つのオリゴヌクレオチッドが結合することとして理解される。

10

【0051】

本発明の内容において、遺伝的パラメーターとは、ゲノムDNA及びこれらの規制のために更に必要とされる配列の突然変異及び多形性体である。突然変異を意味するのは、特に、挿入、欠失、ポイント突然変異、逆位、多形性及び特に好ましくはSNPs(単一ヌクレオチッド多形性)である。

【0052】

本発明の内容において、後成的パラメーターとは、特に、シトシンのメチル化及びゲノムDNAに基づく、更に変化したDNA及びこれらの規制のために更に必要とされる配列である。更に、後成的パラメーターは、例えば、直接、前記方法では解析できないが、DNAのメチル化には、これもまた関与する、ヒストンのアセチル化を含む。

20

【0053】

以下に、配列に基礎を置いて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら例示によっては限定されない。

【0054】

SEQ ID No. : 1 ~ SEQ ID No. : 73は5'及び／または以下の遺伝子のゲノムDNAの領域の規制を示す。ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYCex3。これらの配列は遺伝子バンクから得られ、現時点では予測できない、例えば、マイナーな欠失及び多形性に限定されない配列の物質の全ての小さい変化を含む。

30

【0055】

SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386は以下の遺伝子から得られるDNAの前処理された配列を示す。ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、

40

50

Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYCex3。これらの配列は、現時点では予測できない、例えば、マイナーな欠失及び多形性に限定されない、配列の物質の全ての小さい変化を含む。

【0056】

SEQ ID No. : 387 ~ SEQ ID No. : 534 は SEQ ID No. : 95 ~ SEQ ID No. : 386 の前処理された DNA の増幅のためのプライマーオリゴヌクレオチッドの配列を示す。

SEQ ID No. : [&IDOLIGOFIRST] ~ SEQ ID No. : 1258 は SEQ ID No. : 1 ~ SEQ ID No. : 73 のゲノム DNA 内の CpG 位置の解析に 10
有用なオリゴマーの配列を示す。

SEQ ID No. : 1211 ~ SEQ ID No. : 1258 は SEQ ID No. : 1 ~ SEQ ID No. : 73 のゲノム DNA 内の CpG 位置の解析に有用なオリゴマーの配列を示す。

【実施例】

【0057】

実施例 1 及び 2 : デジタルフェノタイプ

下記の実施例において、多重 PCR が急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病患者から採取した試料で行なわれた。各試料は CpG 位置のメチル化状態を推論するために、下記の実施例 1 で述べられる方法で処理され、各試料のメチル化情報は順序正しく纏められ、実施例 2 で詳述されるように解析に使用された。CpG のメチル化状態の両解析方法は、更に、実施例 3 で述べられる。 20

【0058】

実施例 1

17 ALL 試料と 8 AML 試料が全て含まれている。8 人の健常ドナーの B 細胞、抗 CD4 及び抗 CD19 抗体により区分された MACS、がそれぞれ、コントロールとして使用された。11 個の遺伝子がランダムに腫瘍形成に關与する異なる経路を示す遺伝子のパネルから選択された。選択された 11 の遺伝子の内の 2 個の遺伝子が X 染色体上に存在した。81 CpG ジヌクレオチッドの全てがプロモーターの CpG リッチの領域に存在し、これらの遺伝子のイントロン性の、コード化配列はメチル化状態を評価した。 30

【0059】

配列について、ハイブリッド解析で、CpG ジヌクレオチッドのメチル化状態と非メチル化状態を特異的に区別するために、全試料のトータル DNA を重亜硫酸塩処理し、全ての非メチル化シトシンをウラシルに変換し、メチル化シトシンはそのままとする [M. Frommer et al., Proc Natl Acad Sci USA 89, 1827 (1992)]。関心のある領域は蛍光ラベルしたプライマーを使い、PCR で、増幅して、非メチル化 CpG ジヌクレオチッドが TG に転換され、メチル化 CpG サイトはそのまま保持される。プライマーは CpG ジヌクレオチッドを含まない DNA 切片に相補的である。これはメチル化、非メチル化対立遺伝子の双方の増幅を一反応で公平に行なわせる。各試料から得られた全ての PCR 産物は、混合され、スライドガラス上で、各 CpG 位置毎に一对の固定化オリゴヌクレオチッドへ、ハイブリッド化される。これら検知毎のオリゴヌクレオチッドは、当初から非メチル化である (TG) かまたはメチル化である (CG) かの何れかである、CpG サイト周辺の重亜硫酸塩で変換された配列へとハイブリッド化されることが示された。ハイブリッド化条件は、TG または CG の変化体の間の差異で、単一ヌクレオチッドの検知が容易なように、選択された。二つの信号比は蛍光信号の強さの比較に基づき計算された。メチル化の検知感度は、合成的にメチル化度をアップ及びダウンさせた DNA 断片の異なる混合比の混合物を使用して決定された。これら混合物について、一連の実験は、テストされる各 CpG サイトにおけるメチル化度の変化に対応する CG / TG 比の範囲を決定するために行なわれた。 40

【0060】

第一段階で、ゲノムDNAは、プロメガ社のウィザードキットを使用して、細胞試料から分離された。

試料から分離されたゲノムDNAは、重亜硫酸塩溶液（亜硫酸水素塩、酸性亜硫酸塩）を使用して処理される。試料中の全ての非メチル化シトシンはチアミジンに、逆に、試料中の5メチルシトシンは変化しないでそのまま残るように処理される。ゲノムDNAの重亜硫酸塩処理は、A.Olek、J.Oswald、J. Walter、Nucleic Acid Res. 24、5064 (1996)に記載のマイナーな変化によって行なわれた。ゲノムDNAは重亜硫酸塩処理前に、MssI (M B I Fermentas、St.Leon-Rot、Germany) によって処理される。

処理された核酸は、次いで、一反応あたり、8断片をCy5蛍光ラベルプライマーで増幅する多重PCRsによって増幅される。使用されるPCRプライマーは、表1に記載され、PCR条件は以下に記載される。

【0061】

重亜硫酸塩処理された、部類予測及びプライマーの発見に使用される、遺伝子のセンス鎖のPCR増幅は、クラーク及びフロムマー[S.J.Clark、M.Frommer、in Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA、G.R.Taylor ed.(CRC Press Boca Raton 1997)]のガイドラインによって行なわれた。以下の遺伝子のCpGサイトが解析された。ABL1、ABL1、APAF1、APC、AR、ARHI、BAK1、BAX、BCL2、CASP10、CASP8、CASP9、CCND2、CDC2、CDC25A、CDH1、CDH3、CDK4、CDKN1A、CDKN1B、(p27 Kip1)、CDKN1C、CDKN2a、CDKN2B、CSNK2B、DAPK1、EGFR4、ELK1、ESR1、FOS、GPIIb beta、GPR37、GSK3β、GSTP1、HIC-1、HOXA5、IGF2、MDR1、MGMT、MLH1、MOS、Humos、MPL、MYC、MYCL1、MYOD1、N33、PITX2、PML、PMS2、PRAME、PTEN、RB1、RBL2、SDC4、SFN、TCL1A、TGFB R2、TP73、WT1、N-MYC、L-MYC、C-ABL、ELK1、Tubulin、CSF1、CD1R3、CSNK2B、Me491/TD63、AR、CDK4、Humos、CDC25A、CMYC ex3。

【0062】

10 ngのDNAが鋳型DNAとしてPCR反応に使用された。鋳型DNA、12.5 pmolまたは40 pmolの各プライマー（Cy5でラベルされた）、0.5～2 UのTaqポリメラーゼ（HotStar Taq、Qiagen、Hilden、Germany）及び1 mMのdNTPsが酵素を添加された反応緩衝液トータル20 μl中で培養された。酵素活性化（15分、96℃）の後、培養時間と温度の変遷は、95℃、1分に続いて34サイクル[95℃、1分；アニール温度で（補遺の情報参照）45秒；72℃、75秒]及び72℃、10分であった。

【0063】

PCR産物の更なる詳細は表2参照。

各試料からの全PCR産物は、スライドガラス上で、各CpG位置毎に、解析により、一対の固定化オリゴヌクレオチッドへ、ハイブリッド化される。これら検知毎のオリゴヌクレオチッドは、当初から非メチル化である（TG）かまたはメチル化である（CG）かの何れかである、CpGサイト周辺の重亜硫酸塩で変換された配列へとハイブリッド化されることが示された。使用されたハイブリッド化オリゴヌクレオチッドの更なる詳細は表3参照（情報となるもの及びならないもの）。ハイブリッド化の条件は、TGまたはCGの変化体の間の差異で、単一ヌクレオチッドの検知が容易なように、選択された。

【0064】

5'末端C6-amino変性のオリゴヌクレオチッドが4倍還元液で、活性化スライドガラス上にスポット化された[T.R.Golub et al., Science 286、531 (1999)]。解析された各CpG位置について、CpGジヌクレオチッドのメチル化及び非メチル化状態を反映する、二つのオリゴヌクレオチッド、N₍₂₋₁₆₎-CG-N₍₂₋₁₆₎及びN₍₂₋₁₆₎-TG-N₍₂₋₁₆₎がガラスアレー上にスポットされ、固定される。81 CpGサイトを示す、オリゴヌクレオチッドマイクロアレーは、[D.Chen、Z.Yan、D.L.Cole、G.S.Srivatsa、Nucl

eic Acids Res 27, 389 (1999)]に既に述べられたように、11Cy5ラベルPCR断片までの組み合わせによって、ハイブリッド化された。続いて、ハイブリッド化されたスライドの蛍光イメージが、GenePix 4.0.0 マイクロアレイスキャナ (Axon Instruments) を使用して得られた。ハイブリッド実験は各試料毎に少なくとも3回繰り返された。

【0065】

メチル化の検知方法の感度は、合成的にメチル化度をアップ及びダウンさせたDNA断片の異なる混合比の混合物を使用して決定された。これら混合物について、一連の実験は、テストされる各CpGサイトにおけるメチル化度の変化に対応するCG/ TG比の範囲を決定するために行なわれた。図1Bには、例示として、二つのCpG位置が、ヒト因子V E I I I 遺伝子のエクソン14に存在することが示されている。個々のCpGサイトのメチル化度3:0、2:1、1:2及び0:3の混合物が確実に判別され得る。

10

【0066】

現実のデータにおける、メチル化の検知を実証するために、二つのX染色体遺伝子が遺伝子集合に含まれる。女性の二つのX染色体の一つが、メチル化で活性化されたから、男性のそれに比べて、女性のX染色体遺伝子のメチル化度が高いことが期待できる。図2Aで、CpGsは、男性と女性のメチル化レベルの差異の大きさに従って、順位付けされる。期待したように、X染色体遺伝子(ELK1、AR)が女性のメチル化が著しく高いことを示している。これは、この方法が正確にメチル化を検知していることを明確に示している。

統計的解析

20

Support Vector Machines

【0067】

我々の場合、癌の分類の仕事は、患者のメチル化パターンから白血病の亜類型(ALLまたはAML)を予測できる機械を組み立てることから成る。患者の試料毎に、このパターンが平均(各ハイブリッド化実験は最低限度3回反復され、その結果の平均値) $\log[81 \text{ CpG位置のCG/TG比}]$ のベクターとして与えられる。与えられた訓練試料の集合に基づいて、 $X = \{x^i : x^i \in R^n\}$ 既知の診断 $Y = \{y^i y^i \in (ALL, AML)\}$ で、判別関数 f :

$$R^n \otimes \{ALL, AML\},$$

ここで n はCpGsの数、修得されなければならない。訓練集合 $\{X, Y\}$ の分類ミスの数 f は訓練エラーといい、通常は訓練時の練習機によって、最小限度になる。しかし、現実の関心事は練習機の、従来未知の試料についての部類予測能力、所謂、練習機の普遍化性能である。この性能は、通常、独立の試験集合 $\{X^1, Y^1\}$ の分類ミスの数である試験エラーによって評価される。

30

【0068】

良好な普遍化性能を有する練習機の訓練の大きな問題点は、一方で、必須の性質である、データ分配を充分に取り込むことであり、他方でデータの取り込みすぎを回避することである。Support Vector Machines (SVM) は、訓練データを区分し、訓練集合の最も近いポイントへの距離を最大化する線形判別を構成することによって、この問題点の解決を試みる。この超平面を区分する最大マージンは訓練集合の最小包含球の半径の比及び超平面と訓練ポイントの間のマージンを最小にする。これは試験エラーの期待値への所謂半径マージン範囲を最小にすることに対応し、且つ、良好な普遍化性能を約束する [Vapnik V. Statistical Learning Theory. Wiley, New York (1998)]。

40

【0069】

勿論、分類ラベル y^i 、特徴 x^i 間の依存性が線形でなく、訓練集合が超平面で分類できないなどのより複雑な分類問題がある。非線形判別関数を許容するために、インプットスペースが潜在的により高いディメンジョン特徴スペースに写像関数 F :

$$x^i \otimes F(x^i)$$

によって非線形的に写像され得る。その二元公式によるSVM計算法はインプットスパー

50

スの要因間の内的産物にのみ使用するので、カーネル函数 $K(x^i, x^j) = \langle F(x) F(x^j) \rangle$ の知識は SVM を訓練するのに充分である。写像函数 F 及び非線形 SVM がカーネル函数のみを使用した計算で、効果的に訓練できるかを知る必要はない。ここでは、我々は線形カーネル $K(x^i, x^j) = \langle x^i, x^j \rangle$ 及び 2 次線形カーネル $K(x^i, x^j) = (\langle x^i, x^j \rangle + 1)^2$ のみを使用する。次のセクションで、種々の特徴の集合で訓練した SVMs を比較する。これら SVMs の予測性能を評価するために、我々は cross-validation method を使用した [Bishop, C.M. "Neural networks for pattern recognition." Oxford University Press, New York (1995)]。分類に際して、試料がほぼ大きさの同じ 8 群に分けられた。次いで、SVM が一群の試験試料について、他の七群を使用して訓練した後、部類を予測した。ミス分類の数が、試験群の全ての可能な選択について 8 回を超える SVM 計算法で計算された。試験エラーについての信頼性のある評価を得るために、ミス分類の数が、8 群の試料の 50 を超える種々の分割が平均された。

10

特徴の選択

【0070】

我々のメチル化データへ SVM を適用する最も簡単な方法は、各 CpG 位置を分けられたディメンジョンとして使用し、同じ遺伝子から CpG サイトの相互依存については仮定をしないことである。白血病についての下位分類では、線形カーネルで、81 のディメンジョンインพุットスペースで訓練した SVM は、平均試験エラー 16 % であった。2 次カーネルの使用では、その結果に目だった改善はみられなかった。

20

【0071】

この比較的不十分な性能についての明確な説明は、我々は 81 ディメンジョンスペースで僅か 25 データポイント（訓練集合では少ない）のみを有していることである。これらの条件下での、分れた超平面の所見は著しく、決断し難い問題である。マージンを最大化する SVM 技術が、最適の普遍化性能を備えた解決策を見出すには不十分であることが解る。分類に関連する情報を維持する間、インพุットスペースのディメンジョンを減少させることが必要である。少数の CpG 位置だけが、二つの亜類の白血病に結合すると期待され得るから、これが可能である。

【0072】

多分、ディメンジョンを減少させる最もポピュラーな方法は、プリンシプルコンポーネントアナリシス (PCA) である [Bishop, C.M. Neural networks for pattern recognition Oxford University Press, New York (1995)]。集合 X の訓練には、PCA が、最大変化方向に対応する直交ベクターの集合（プリンシプルコンポーネント）を構成する。 X の最初の k プリンシプルコンポーネントへの投影は、 k ディメンジョン直交サブスペースにおいて、2 平均最適画像を与える。この投影は分類情報 Y を明確に使用していないから、PCA は管理されない修得技術である。

30

【0073】

SVM のインพุットスペースのディメンジョンを縮小するために、我々は結合訓練及び試験集合 $\{X, X^1\}$ で行い、両集合を最初の k プリンシプルコンポーネントへ投影した。これは、訓練集合 X へ PCA が行なったものよりも、かなり良好な成績を与え、そしてこれはラベルされない情報が使用されている事実によって正しいと認められる。しかし、 $k=2$ 、5 の普遍性の成績は、特徴選別なしの SVM よりも一層悪かった。この理由は、PCA が、ALL と AML の間の判別にとって重要な特徴を抽出する必要がないことである。この場合、細胞系及び、例えば、分類作業に関与しないサブグループである、患者の主要な組織（図 4、右。第 2 行参照）の間を判別する最も変化に富んだ特徴を先ず選択する。図 6 に示されるように、6 個の特徴が単に、第 9 のプリンシプルコンポーネントに現われる白血病の下位分類に関する情報を与える。第 9 のコンポーネントを含む普遍化性能は、特徴選別なしの SVM よりもはるかに良好である。しかし、訓練集合の分類ラベルを考慮している、管理された特徴選別法は、より信頼性があり、良好な普遍化を与えることが明確に解る。図 4 A は、フィッシャー基準に従ったベスト 20 の CpG のメチル化プロフィールを示す。

40

50

フィッシャー基準及びt試験

【0074】

二つの分類間の選別度を評価する標準的基準にはフィッシャー基準が挙げられる[Bishop、C.M.、"Neural networks for pattern recognition." Oxford University Press、New York(1995)]。我々の場合、k番目のCpGの判別力が、 $(m_k)^{ALL/AML}$ を意味し、 $(s_k)^{ALL/AML}$ は $y_i = ALL / AML$ での全ての $(s_k)^i$ の標準偏差である。フィッシャー基準は2部類が部類変化に比較して、大きく異なるCpGに高いランク付けを与える。非常に類似している基準が、ゴルフとその共同研究者によって、彼等のメッセンジャーRNAの発現データに基づくALL/AMLの分類で使われている[T.R.Golub et al.、Science 286、531 (1999)]。

10

【0075】

これらの判別力によるCpGランクへの他のアプローチは、部類の有意差を計算するために、試験統計を使用することである。ここで、我々は二つの部類の正常な配分を想定し、部類平均間の有意差に従って、[Mendenhall、W.、Sincich、T.、エンジニアリングと科学の統計] CpGsをランク付けするべく二つの試料t試験を使用した。図4(右第1行)は、部類内の変化の大平均差及び小平均差が重要な因子であることから、フィッシャー基準に非常に類似しているランキングを示す。

【0076】

分類性能を改善するために、我々は、フィッシャー基準またはt試験に従って、最高のkランクのCpGsでSVMsを訓練した。図5はフィッシャー基準からのベストの2CpGsで訓練されたSVMを示す。K=2、5でのエラーは図の上部に記載されている。その結果は普遍化性能に、劇的な改善が見られたことを示している。フィッシャー基準を特徴選別に使用したところ、特徴選別なしのSVMの場合の16%に比較して、k=5、CpGs試験エラーは3%にまで減少した。図6は選別ディメンジョンkからの普遍化性能の依存性を示し、フィッシャー基準が、特に、裏付けのある小さいkの良好な普遍化に依存しないディメンジョンを与えることを示す。

20

【0077】

前記二つのCpGランキング法が非常に良好な普遍性を与えたが、これらは幾つかの潜在的な欠陥を有している。一つの欠陥は特徴と部類ラベルの間のたった線形従属性のみを検知できることである。二つのCpGsのシンプルなXORまたはOR結合さえも、完全に間違っている。他の欠陥は重複する特徴が除去されないことである。我々の場合、高いメチル化の可能性を有する同一の遺伝子の幾つかのCpGsが通常存在する。これは、必ず同じ情報を齎すハイランクの特徴の大きな集合となり得る。前記問題点が我々のデータ集合に出現しないという、良好な結果であるが、これらは慎重に考慮されなければならない。

30

逆行消去

【0078】

PCA、フィッシャー基準及びt試験は、現実に分類され、それ故に、フィルター法と呼ばれる、訓練機に依存しない特徴を構築し、ランク付けを行なう[Blum、A.、Langley、P.、訓練機において関与する特徴及び実例の選択。Artificial Intelligence 97、245~271(1997)]。他のアプローチは訓練機自体を特徴選別に使用することである。これらの技術は、ラッパー法(Wrapper Methods)と呼ばれ、機械の普遍化能力にとって重要な特徴の同定を試みる技術である。ここで我々は、シンプルな近似法としての、訓練エラーを低く抑えるために重要な特徴を使用することを提案する。線形カーネルを伴うSVMの場合は、これら特徴は選別超平面の正常ベクターwを調べることによって、容易に同定できる。特徴基準のベクターと正常ベクターの間の角度が小さければ小さいほど、選別のための特徴は益々重要になる。正常ベクターに直交する特徴は判別には全く影響しない。これは、特徴ランキングは正常ベクター $(w_k)^2$ のコンポーネントによって、容易に与えられることを意味する。勿論このランキングは、完全な特徴集合のSVM解法が、我々が前記サブ選別で示した最適なものにほど遠いから、それほど現実的なものではない。単純な帰納は、最小の $(w_k)^2$ を有する特徴が解決にとっては、現実に重要ではなく、特徴集合が

40

50

ら安全に除去できることを想定することである。

【0079】

そして、SVMは縮小した特徴集合で再訓練でき、その方法は特徴集合が空になるまで繰り返される。このような継続的な特徴の移動は、逆行消去と呼ばれる。[Blum, A., Langley, P. 訓練機において関与する特徴及び実例の選択。Artificial Intelligence 97、245～271 (1997)]。我々のデータ集合に示されるCpGランキングは図4Dに示され、フィッシャー基準及びt試験ランキングとはかなり異なる。逆行消去は余分な特徴を除去できるように見える。しかし、図の上方及び図6で示されるように、普遍化成績はフィッシャー基準のそれよりも、良くない。その上、逆行消去は、よりディメンジョン依存するのを見てとれ、コンピューター使用はより経費高になる。次いで、少なくとも、このデータ集合にとって、シンプルなフィッシャー基準は好ましい特徴選別技術であることが言えることを付け加える。

10

【0080】

特徴選別のラッパー法を構築する標準的方法は、各可能な特徴部分集合毎に、訓練機の普遍化性能を評価することである。訓練集合における交差検証は、与えられた特徴集合における機械の普遍化を評価することに使用できる。特徴スペースの徹底的な探索を現実には実行不能にするものは、異なる特徴の組み合わせが、 2^n という巨大な数になり、より効果的に、特徴スペースを帰納的に探索する多数のケースがある(例えば、逆行消去)[Blum, A., Langley, P. 訓練機において関与する特徴及び実例の選択。Artificial Intelligence 97、245～271 (1997)]。

20

【0081】

ここで、我々は、我々のデータ集合における特徴と部類ラベルの間に高度に優れた関係が存在することを示したい。これを実行するために、特徴の二つの組み合わせのスペースを徹底的に探索した。3240からの二つのCpGの組み合わせについて、 $k=2$ CpGs同時、繰り返しなし、全体から $n=81$ CpGs、我々は、SVMの、一つだけ止める、交差確認エラーを2次カーネルで訓練集合について計算した。最小交差確認エラーの全CpGペアから、我々は最小半径マージン比の一つを選択した。このペアは最適特徴の組み合わせと見なされ、試験集合におけるSVMの普遍化性能の評価に使用された。

【0082】

徹底した探索法における平均試験エラーは二つの特徴と2次カーネルの場合におけるフィッシャー基準におけるそれと同じで6%であった。5つの特徴において徹底した計算は既に不可能である。交差検証試行の絶対多数では、徹底した探索とフィッシャー基準により選択されたCpGsは同じであった。若干例では、次善のCpGsが徹底した探索法で選択された。これらの成績はALL/AML判別にとって重要な我々のデータ集合における高度の特徴の組み合わせは存在しないことを明瞭に示した。

30

【0083】

実施例2

実施例1で得られたデータは、病気の、または健全な造血細胞の2部類の間のCpGメチル化度の差異に従って、ランク付けしたマトリックス(図3～8)へとアルゴリズムを使って分類された。最も重要なCpG位置はマトリックスのボトムから急速にトップへと減少する。マトリックスの右側で、個々のCpG位置のp値が示されている。p値はデータ集合のチャンスによって生じる、見取られる分布の確率である。

40

【0084】

前記で議論したように、選択された弁別のために、我々はアルゴリズム(support vector machine、SVM)修得について訓練した。SVM[F Model、P. Adorjan、A. Olek、C. Piepenbrock、癌の分類に基づくDNAメチル化の特徴選別。2001 Jun;17 増補版1:S157～164]は与えられた訓練試料の二部類間の最適判別を構成する。この場合、各試料は調べられるCpGサイトのメチル化パターン(CG/ TG比)によって記述される。SVMは付属の診断で提示される各部類の試料の部分集合について訓練される。診断が訓練時に創出された予測に基づいて、正確に予測されたならば、SVMに示されていない、独立した試験

50

試料は、その際、評価するべく提示された。

【0085】

交差検証法はSVMの予測性能を評価するために使用された[C.M.Bishop, "Neural networks for pattern recognition." Oxford University Press, New York(1995)]。各分類作業について、試料がほぼ同じサイズ毎の8群に細分された。次いで、SVMが、他の7群を使用した訓練の後に、一群の試験試料について部類を予測した。試験群の全ての可能な選択について、SVMアルゴリズムの8回の操作に亘って、ミス分類の数が測定された。試験エラーについて信頼できる評価を得るため、例えば、以前の未知試料のミス分類の確率、ミス分類の数が、8群の試料の10の異なる細分化体に亘って平均された。

【0086】

SVMは、健全なCD19+B細胞及びCD4+T細胞、及びT及びB細胞白血病（両患者の試料及び細胞系から）の間の差異を確認できるように訓練される。試料は最も情報に富んだ二つのCpG位置を使用して、15%試験エラーによって分類される。54CpG位置を試験に供した内容で、試験エラーは、4%まで、著しく減少した。個々のCpGサイトはそれらの、サポートベクターマシンの決定に対する寄与度によってランク付けされる。このマシンは、健全なT及びB細胞、及びALL間の決定は、主としてCDK4遺伝子のイントロン1に存在するCpGサイト及び腫瘍遺伝子c-MOSのコード化配列に基づくこと、だが、他の遺伝子の規制領域に存在するCpGサイトが大きく貢献することを示している（表1及び図2B及び2C）。健全な群に比較して、腫瘍細胞は一貫して、これら特別な、CpGサイトが比較的過メチル化状態にあることを示している。また、分類はALL患者試料及び健全なドナーB及びT細胞の間で、二つのCpG位置を使用して、試験エラーがたった13%で、行なうことができる。この低ディメンジョンの分類は、両者ともALL患者において過メチル化状態にあるところの、CSNK2B及びCDC25Aからの、CpGサイトのメチル化状態に基づいている。試験エラーは、トータル31の分類に使用するCpG位置の数を増加することによって、5%にまで改善できる。

【0087】

次ぎのステップで、我々は、白血病の二つの部類を明らかにすることを試みる。サポートベクターマシンには最初に部類情報が付加された、AML及びALL試料の訓練集合が提示される（両患者の試料及び細胞系から）。予め含まれなかった試料は、そのとき、二つのCpG位置を使用したとき、試験エラーが5%である部類の一つに分類される。この場合の最適CpGサイト数は6と計算され、試験エラーはたったの1%にまで減少する（表1及び図3B）。最も情報に富んだCpGサイトは、CDK4遺伝子のイントロン1及びCSNK2Bのプロモーター領域に存在した。これらサイトの全般的メチル化度はALLがAML細胞よりも再生的に高かった。しかし、この特別な決定に情報を与える、CDK4遺伝子におけるCpGサイトは、ALL及び健全なリンパ球の間を区別する同じ遺伝子におけるそれとは異なる。これは一クラスター内の異なるCpGサイトが、フェノタイプの異なるアスペクトで、潜在的に質問に回答する、異なるCpGサイト内で、情報を与えることができることを示している。

【0088】

幾つかの組織特異性遺伝子のCpG島が細胞系でメチル化される証拠がある[F. Antequera, J. Boyes, A. Bird, Cell 62, 503 (1990)]。前記分類が疾病による特異的变化におけるよりも、細胞系の特異的人為構造に基づくことはあり得ないということが重要である。だから、我々は白血病細胞系を一群とし、先ず白血病試料を他の部類にした。分類は2CpG位置に基づいては試験エラー28%で可能であり、30CpGサイトを使用したとき、12%で可能であった。重要なことは、この区別に最も寄与するCpGサイトは初期の如何なる分類においても、単に、特異的マーカーである細胞系に基づく場合を除いて、情報に富んではいなかったことである。この知見が、我々が健全なT細胞とT-ALL細胞系の間の疾病による特異的メチル化の差異を明らかにすることを可能にさせた。分類は細胞系と非細胞系を区別できない二つのCpG位置に基づけば、試験エラー0%で行なわれる。重要なCpGサイトはc-MOS遺伝子のコード化配列に存在する（表1）。結論は、我々

10

20

30

40

50

の成績は、細胞系の特異的メチル化変化の発生を確認するけれども、これらは腫瘍タイプの分類を妨げないことである。

【0089】

図7は急性リンパ球性白血病と急性骨髄性白血病間の差別化に使用するパネルからの遺伝子の選別の使用を示す。最も重要な二つのCpG位置を使用した時、試験エラーは5%と計算された。この場合のCpGサイトの最適数は計算によれば6であり、試験エラーは1%にまで減少した。最も情報に富んだCpGサイトは、CDK4遺伝子のイントロン1及びCSNK2Bのプロモーター領域に存在した。

これらサイトの全般的メチル化度はALLがAML細胞よりも再生的に高かった。しかし、この特別な決定に情報を与える、CDK4遺伝子におけるCpGサイトは、ALL及び健全なリンパ球の間を区別する同じ遺伝子における、それとは異なる。これは一クラスター内の異なるCpGサイトが、フェノタイプの異なるアスペクトで、潜在的に質問に回答する、異なるCpGサイト内で、情報を与えることができることを示している。

【0090】

図8は急性リンパ球性白血病と急性骨髄性白血病間の差別化に使用するパネルからの遺伝子の二者択一的選別の使用を示す。この場合、試験エラーは16.3%であった。

【0091】

全ての部類の分類の成績は、試験エラー、安全性及び再現性に関して、アッセイに基づくメッセンジャーRNAに比肩し得る。しかし、分類は、メチル化データが現実、ディメンジョンについて、発現プロファイルよりも、多くの情報を含んでいることを示唆して、非常に少なく、ランダムに選択された遺伝子で行なわれた。

【0092】

もっと重要なことは、発現プロファイルで、独立した実験間の比較が最高に魅力的なのに比較して、信号強度が異なるメッセンジャーRNA種の絶対的及び総体的な二つの量に強さに依存することである。信号は一般に、ハウスキーピング遺伝子からの信号に対して較正されるが、メッセンジャーRNAプロファイルは、相変わらず、発現レベルのかすかな変化を検知することはできない[R.J.Lipshutz, S.P.A Fodor, T.R.Gingeras, D.J.Lockhart, Nature Genetics 21, 20 (1999)]。我々のアプローチにおいて、CG/ TG比が内部較正に使用され、かくして、スライドへハイブリッド化されるプローブの量は成績に影響しない。これは成績の比較を著しく改善し、そのため、例えば、複数の研究機関での試験及び今後の研究で必要になる、膨大な個体のスクリーニングを可能にする。

【0093】

実施例3：遺伝子N33(NM-006765)内のCpGサイトのメチル化状態の同定
遺伝子N33の断片(Seq ID No: &[GENEID-2188])がプライマーAAGCCGCTGCCATCC及びTTTCGGCGACGGTAGGを使用してPCR増幅された。得られた断片(548塩基対長)は446位置に情報に富んだCpGを含む。増幅されたDNAは制限エンドヌクレアーゼFauI、認識サイトCCCGC、で酵素処理(消化)された。前記エンドヌクレアーゼによる加水分解は増幅産物の446位置のCpGのメチル化によってブロックされる。酵素被処理物は制御下に使用される。ゲノムDNAはウィザード(wizzard)DNA分離キット(Promega社)を使用して試料から分離される。各試料は、メーカー(New England Biolabs)の推薦に従って、AvaIを使用して、酵素処理(消化)された。

【0094】

10ngのゲノム酵素被処理物は、次いで、PCRプライマーAAGCCGCTGCCATCC及びTTTCGGCGACGGTAGGを使用して増幅される。PCR反応はサーモサイクラー(Eppendorf GmbH)を使用し、10ngのDNA、6ピコモルの各プライマー、200μMの各dNTP、1.5mMのMgCl₂及び1UのHotstartTaq(Qiagen AG)を使って行なわれた。その他の条件はTaqポリメラーゼのメーカーの教えに従って行なった。上記のプライマーを使用して、遺伝子断片は以下の内容のPCRによって増幅された。即ち、最初の変性ステップは96、14分；次いで、30~45サイクル(ステップ

2 : 9 6 、 6 0 秒 ; ステップ 3 : 5 2 、 4 5 秒 ; ステップ 4 : 7 2 、 7 5 秒) 次いで、 7 2 、 1 0 分の最終延長からなる。得られた P C R 産物はアガロースゲル電気泳動法で分析された。

【 0 0 9 5 】

P C R 産物は、サイクルプログラムのステップ 2 からステップ 4 までは 3 4 、 3 7 、 3 9 、 4 2 及び 4 5 回繰り返されるときに、 F a u I で加水分解され、問題の C p G 位置がメチル化されなかった位置で、分離された、 D N A を検知可能である。対照的に、 P C R 産物はサイクルプログラムのステップ 2 からステップ 4 までは 3 9 、 4 2 及び 4 5 回繰り返されるときに、 F a u I で加水分解され、低メチル化度の D N A から分離された時にのみ、 D N A を検知可能である。これらの結果は実施例 2 に記載の C p G メチル化マトリックス解析に組み込まれた。

10

【 0 0 9 6 】

【表 1】

部類1		部類2		テストエラー 2 CpGs	有意性 2 CpGs	最適 CpG 番号	テストエラー 最適 CpGs	有意性 最適 CpGs
健康な-B 健康な-T	13	B-ALL-cl T-ALL-cl ALL	17	15%	1.3E-4	54	4%	3.2E-7
B-ALL-cl T-ALL-cl ALL	17	AML AML-cl	8	5%	3.7E-4	6	1%	5.4E-10
女性-nocl	14	男性-nocl	7	5%	7.4E-4	2	5%	7.4E-4
健康な-T	6	T-ALL-cl	6	0%	2.5E-3	2	0%	2.5E-3
健康な-B 健康な-T	13	AML AML-cl	8	16%	6.9E-3	22	0%	2.3E-6
一次白血病 試料	8	細胞列	17	28%	2.2E-2	30	12%	7.9E-5
健康な-B 健康な-T	13	ALL	5	13%	8.2E-3	31	5%	9.1E-5
健康な-B	7	B-ALL-cl	6	27%	5.5E-2	11	8%	1.8E-3
女性-cl	9	男性-cl	8	52%	5.3E-1	42	40%	1.9E-1
B-ALL-cl	6	T-ALL-cl	6	58%	5.7E-1	70	51%	3.9E-1
健康な-B	7	健康な-T	6	63%	6.8E-1	11	49%	3.8E-1

20

30

【 0 0 9 7 】

表 2 : P C R プライマー及び産物

【表 2 - 1】

40

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
1	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG (SEQ ID NO: 388) TAAAACTATCCCATATAACTCCCAAC (SEQ ID NO: 387)	633
2	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGGGAAATGGAGAAGTGTA (SEQ ID NO: 512) CTACCAATCCCAAATAACC (SEQ ID NO: 511)	524
3	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	AGGGGGATTGAGTGTTAAGT (SEQ ID NO: 392) CCCAAACATAAACACAAAAT (SEQ ID NO: 391)	293
4	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA (SEQ ID NO: 532) ACCCCTAAATAATTATCCT (SEQ ID NO: 531)	460

10

20

【 0 0 9 8 】

【 表 2 - 2 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
5	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGTAGTTGGTTATATGGTGAGG (SEQ ID NO: 395) TCACACTCTTAAAAACCACAAAA (SEQ ID NO: 396)	748
6	Humos (SEQ ID NO: 71)	TGATTGGGAGTAGGTGTGTT (SEQ ID NO: 397) CAAATCTTCCAACCTTCTCAA (SEQ ID NO: 398)	523
7	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TTTAAGTTTGTTTTGTGTTTGGT (SEQ ID NO: 399) TCCTACTCTAAATCCTCCTCAA (SEQ ID NO: 400)	719
8	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TTGGGAGTTTATTGATTTTT (SEQ ID NO: 401) ACAACCTAAAAATTAAATCCAAA (SEQ ID NO: 402)	445
9	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GGTGATAGGAGAATAATGTTGG (SEQ ID NO: 403) TCTCCCAACTACAACCAAAC (SEQ ID NO: 404)	379
10	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	ATTAGGGGTATAGAGGAGTATTGA (SEQ ID NO: 405) CTTACAAACCCACAATAAACA (SEQ ID NO: 406)	883
11	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	GTTTAGAAGTTTAAGATTAG (SEQ ID NO: 407) CAAAAACCTCAACCTCTATCT (SEQ ID NO: 408)	611
12	WT1 (SEQ ID NO: 59)	AAAGGGAAATTAAGTGTTGT (SEQ ID NO: 410) TAACTACCCTCAACTTCCC (SEQ ID NO: 409)	747

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

【 表 2 - 3 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
13	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	AGGTTTGGGTTATTGAGTTT (SEQ ID NO: 411) CATTATTCCTAACTACCTTATATCTC (SEQ ID NO: 412)	491
14	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GGTTGGGAGATTTAATTTTATT (SEQ ID NO: 414) ACCAATCCAAACTTTTCCTT (SEQ ID NO: 413)	967
15	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	AAGTGTTTITAGTTTTTAATGGGTA (SEQ ID NO: 415) CAAACCCAAAACCTCACCTAT (SEQ ID NO: 416)	966
16	ABL1 (SEQ ID NO: 1)	GTTAGGAGGGGGTTAAGG (SEQ ID NO: 417) CCAACCTTCAAACAAATCTCC (SEQ ID NO: 418)	291
17	APC (SEQ ID NO: 4)	TCAACTACCATCAACTTCCTTA (SEQ ID NO: 419) AATTTATTTTITAGTGTTGTAGTGGG (SEQ ID NO: 420)	
18	ARHI (SEQ ID NO: 6)	GTGAGTTTTTGGGGTGTTTA (SEQ ID NO: 421) TCAATCTTACTTTCACACTACATAA (SEQ ID NO: 422)	444
19	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	GTATTTTATGTTAAGGGGGAAA (SEQ ID NO: 423) AAAAACCACAATCCTCCC (SEQ ID NO: 424)	640
20	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTTTGGTATGTAGGTTGGATG (SEQ ID NO: 425) CCTAACCTCCTTCCTTTAACT (SEQ ID NO: 426)	426

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【 表 2 - 4 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
21	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	CAAATAAACCCCTCAACCAATC (SEQ ID NO: 427) TGGAGGGGGTAGGAAAGT (SEQ ID NO: 428)	474
22	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	GGATTAGTGGGAATAGAGGTG (SEQ ID NO: 429) AAACCCAAACTCCTAACTACC (SEQ ID NO: 430)	408
23	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	GTGGGGAGGTAGTTGAAGA (SEQ ID NO: 431) ATACACCCCTAACCCAAAAT (SEQ ID NO: 432)	478
24	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	TTGAAAATTAAGGGTTGAGG (SEQ ID NO: 433) CACCTCTAATAACCAACCA (SEQ ID NO: 434)	598
25	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GGGGTTGGTTGGTTATTAGA (SEQ ID NO: 435) AACCTCTACCCACCTAAAT (SEQ ID NO: 436)	256
26	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	GGTTGGTTGAAGGAATAGAAAT (SEQ ID NO: 437) CCCACTAAACATACCCTTATTC (SEQ ID NO: 438)	708
27	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	AACCTTTCTTCAAATTACAAA (SEQ ID NO: 439) TGATTGGGTTTTAGGGAAATA (SEQ ID NO: 440)	348
28	FOS (SEQ ID NO: 29)	TTTTTGGGGTTTAGTTTGAAT (SEQ ID NO: 441) AACCTTCATCCCCTAACCT (SEQ ID NO: 442)	308

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

【 表 2 - 5 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
29	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	ATTTGGGAAAGAGGGAAAG (SEQ ID NO: 443) TAAAAACTCTAAACCCCATCC (SEQ ID NO: 444)	300
30	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	TGGGTTGGAGAAGAAGTTTA (SEQ ID NO: 445) TCATATTTCCAAAAACACACC (SEQ ID NO: 446)	280
31	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	CCCTTCCCCTTAACTAACT (SEQ ID NO: 447) AATTTGGGTTAGGTTTGA (SEQ ID NO: 448)	364
32	MGMT (SEQ ID NO: 38)	AAGGTTTTAGGGAAGAGTGT (SEQ ID NO: 449) ACCTTTTCCTATCACAAAAATAA (SEQ ID NO: 450)	636
33	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TAAGGGGAGAGGAGGAGTTT (SEQ ID NO: 451) ACCAATTCTCAATCATCTCTTT (SEQ ID NO: 452)	545
34	MOS (SEQ ID NO: 40)	ACCCTACAACAATCCCTCA (SEQ ID NO: 453) TGGTTTTTAGGTTATTGGATT (SEQ ID NO: 454)	343
35	MPL (SEQ ID NO: 42)	TGGGGAGATTGATTTGAGTAT (SEQ ID NO: 455) AATTCCTTCAATAACATACCCTT (SEQ ID NO: 456)	594
36	MYC (SEQ ID NO: 43)	AGAGGGAGTAAAAGAAAATGGT (SEQ ID NO: 457) CCAAATAAACAAAATAACCTCC (SEQ ID NO: 458)	712

10

20

30

40

【 0 1 0 2 】

【 表 2 - 6 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
37	N33 (SEQ ID NO: 46)	TTTAGATTGAGGTTTAGGGT (SEQ ID NO: 459) ATCCATTCTACCTCCTTTTCT (SEQ ID NO: 460)	498
38	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	GATTGAGATTATTTGGGTTT (SEQ ID NO: 461) ACTTAAACCTTCCCTCTCCAC (SEQ ID NO: 462)	561
39	PTEN (SEQ ID NO: 51)	TTTAGGTAGTTATATTGGGTATGTT (SEQ ID NO: 463) TCAACTCTCAAACCTCCATCA (SEQ ID NO: 464)	346
40	RBL2 (SEQ ID NO: 53)	GAAAATGGGTGTGTGTGG (SEQ ID NO: 465) TACAAATAAAAACAAATCCCCT (SEQ ID NO: 466)	112
41	SFN (SEQ ID NO: 55)	GAAGAGAGGAGAGGGAGGTA (SEQ ID NO: 468) CTATCCAACAAACCCAACA (SEQ ID NO: 467)	489
42	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	GTAATTTGAAGAAAGTTGAGGG (SEQ ID NO: 469) CCAACAACCTAAACAAAACCTCT (SEQ ID NO: 470)	296
43	TP73 (SEQ ID NO: 58)	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA (SEQ ID NO: 472) GAAAAACCTCTAAAACTACTCTCC (SEQ ID NO: 471)	607
44	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	GGGGAGGTAGATATTTGGATAA (SEQ ID NO: 473) AACTACACCATTATATTCCCAC (SEQ ID NO: 474)	300

10

20

30

40

【 0 1 0 3 】

【 表 2 - 7 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
45	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	TAAGTGATAAAGGAAGGAAGGA (SEQ ID NO: 475) CCTTCAAACCCCAAACAA (SEQ ID NO: 476)	243
46	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	ATTAGAAGTGAAAGTAATGGAATT (SEQ ID NO: 477) TCAATTTCCAAAAACCAAC (SEQ ID NO: 478)	418
47	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	AGGGGGAATTAAATAGAAAGAG (SEQ ID NO: 479) CAATAAAACCATCCCAAATACT (SEQ ID NO: 480)	662
48	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	AGATATGTTTGGAGATTTTAGGA (SEQ ID NO: 481) AACTCCCCACCTCTAATTCTAT (SEQ ID NO: 482)	674
49	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	AATTAGGGATGGGAAAAGTAGT (SEQ ID NO: 483) AAACATAACAAAATCAAATCCC (SEQ ID NO: 484)	558
50	BAX (SEQ ID NO: 8)	AAATAAATAGAAAAGTAGGTTTGGC (SEQ ID NO: 485) TTCTACCCCTCAATACTTAAAAA (SEQ ID NO: 486)	716
51	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	TCTTCCCAAACAAATAAAAACT (SEQ ID NO: 487) GTTTTGAGGTTAAATGAGTGGT (SEQ ID NO: 488)	468
52	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	AGTGGATTTGGAGTTTAGATGT (SEQ ID NO: 489) AACAAAATAAAAACTTCTCCCA (SEQ ID NO: 490)	431

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

【 表 2 - 8 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
53	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	GGAAGAGTTGTAGGTGGATTAG (SEQ ID NO: 491) CCACATTTTCCCAATAAATACT (SEQ ID NO: 492)	424
54	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	CCACAACACATCAAACCTATAA (SEQ ID NO: 493) TTTGGTGGTAAGTGAGGGT (SEQ ID NO: 494)	491
55	PML (SEQ ID NO: 48)	AATTCCTCCAAACAACTTTTACA (SEQ ID NO: 495) TGGAGAGGAAGTGAGATAGAAG (SEQ ID NO: 496)	459
56	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	AAACCCCAAACAACCTCTAT (SEQ ID NO: 498) GAAGGGGGAAAGTTATTTAGTTA (SEQ ID NO: 497)	392
57	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	CCTAACTACCCTCATTCCTTT (SEQ ID NO: 499) AGTTGGGGAAATTAAGGTTTAG (SEQ ID NO: 500)	269
58	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	TCCTCAACTCTACAAACCTAAAA (SEQ ID NO: 501) GTAGGGGAGGGAAGTAGATGT (SEQ ID NO: 502)	408
59	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	ACTTATTTTCTTTCTCTAAAAAC (SEQ ID NO: 503) TATGGTTTGGTGAGGGTATATT (SEQ ID NO: 504)	489
60	PRAME (SEQ ID NO: 50)	ACCACTCAAAAACAAACCTTTA (SEQ ID NO: 505) ATGGGTATGGTGGTTAAGAGTA (SEQ ID NO: 506)	303

10

20

30

40

【 0 1 0 5 】

【 表 2 - 9 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
61	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTGTAGTTGGTTATATG (SEQ ID NO: 508) AAAAATAACACAATAACTCA (SEQ ID NO: 507)	474
62	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	AGAAGTTGTTTATTGATTGG (SEQ ID NO: 510) AAAATTAAATCCAAACAAAC (SEQ ID NO: 509)	272
63	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGGGAAATGGAGAAGTGTA (SEQ ID NO: 512) CTACCAATCCCAAATAACC (SEQ ID NO: 511)	524
64	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	ATTTATTTTG (SEQ ID NO: 514) ATCCCAAATAAAAAAAAAACAAACCACC (SEQ ID NO: 513)	568
65	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	AAACCCAAAAACTAAAAAA (SEQ ID NO: 515) ATGTTATTTAGGTTTGGGTTATTG (SEQ ID NO: 516)	461
66	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	GAGAATGGGGTGG (SEQ ID NO: 518) TATAAAAAATCACCTAACC (SEQ ID NO: 517)	
67	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	ACCTAAATCA (SEQ ID NO: 519) ATGTGAGTTAGGGATTTTTT (SEQ ID NO: 520)	
68	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	ATTATGGTTGGAATTGTAAT (SEQ ID NO: 522) ACAAAAACAACAAACACCCC (SEQ ID NO: 521)	413

10

20

30

40

【 0 1 0 6 】

【 表 2 - 1 0 】

番号	遺伝子	プライマー	増幅産物 長さ
69	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	GGGAGGAGTATATTTTG (SEQ ID NO: 524) AAAATATCCTC (SEQ ID NO: 523)	368
70	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CTTATATACCCTCCC (SEQ ID NO: 525) GGGTTTAGAGTTAAGATTG (SEQ ID NO: 526)	453
71	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGGAGGAATAAGAAGATGAG (SEQ ID NO: 528) TTCAATCTCAAACTCAACC (SEQ ID NO: 527)	
72	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GAAAAAAAAAAACCCAATAT (SEQ ID NO: 529) ATGGTTTTGTTTAAT (SEQ ID NO: 530)	523
73	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA (SEQ ID NO: 532) ACCCCCTAAATAATTATCCT (SEQ ID NO: 531)	460
74	Humos (SEQ ID NO: 71)	TTTATTGATTGGGAGTAGGT (SEQ ID NO: 534) CTAATTTTACAAACATCCTA (SEQ ID NO: 533)	494

10

20

30

【 0 1 0 7 】

表 3 : ハイブリッド化オリゴヌクレオチッド

【 表 3 - 1 】

番号	遺伝子	オリゴ
1	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGGTCGTTTAAAGG (SEQ ID NO: 535)
2	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGGTTGTTTAAAGG (SEQ ID NO: 536)

40

【 0 1 0 8 】

【 表 3 - 2 】

番号	遺伝子	オリゴ
3	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TTGAAAGACGTGTTTATA (SEQ ID NO: 537)
4	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TTGAAAGATGTGTTTATA (SEQ ID NO: 538)
5	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	AGGTGTAACGGAAGTTAG (SEQ ID NO: 539)
6	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	AGGTGTAATGGAAGTTAG (SEQ ID NO: 540)
7	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TAGTTTTTCGAGGAATTA (SEQ ID NO: 541)
8	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TAGTTTTTTGAGGAATTA (SEQ ID NO: 542)
9	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1235)
10	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTTGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1236)
11	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GAGAGTTGCGGAAAGAGA (SEQ ID NO: 543)
12	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GAGAGTTGTGGAAAGAGA (SEQ ID NO: 544)
13	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGGTTTTTCGTGATAGT (SEQ ID NO: 545)
14	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGGTTTTTGTGATAGT (SEQ ID NO: 546)
15	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TAGGTTAGCGTATTGGGA (SEQ ID NO: 1117)
16	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TAGGTTAGTGTATTGGGA (SEQ ID NO: 1118)
17	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGTGGGAAGCGTATTTAT (SEQ ID NO: 1213)
18	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGTGGGAAGTGTATTTAT (SEQ ID NO: 1214)
19	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	AATAATAACGTTATAGTT (SEQ ID NO: 549)
20	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	AATAATAATGTTATAGTT (SEQ ID NO: 550)
21	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	TTATAGTTCGAGTTTTTT (SEQ ID NO: 1225)

10

20

30

40

【 0 1 0 9 】

【 表 3 - 3 】

番号	遺伝子	オリゴ
22	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	TTATAGTTTGAGTTTTT (SEQ ID NO: 1226)
23	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGAGTTTTTCGGTATATAT (SEQ ID NO: 551)
24	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGAGTTTTTGGTATATAT (SEQ ID NO: 552)
25	AR (SEQ ID NO: 69)	TGTTATTTTCGAGAGAGGT (SEQ ID NO: 553)
26	AR (SEQ ID NO: 69)	TGTTATTTTGAGAGAGGT (SEQ ID NO: 554)
27	AR (SEQ ID NO: 69)	AGAGGTTGCGTTTTAGAG (SEQ ID NO: 555)
28	AR (SEQ ID NO: 69)	AGAGGTTGTGTTTTAGAG (SEQ ID NO: 556)
29	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTCGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1255)
30	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTTGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1256)
31	AR (SEQ ID NO: 69)	GGAGGTTTCGGGGGTTTT (SEQ ID NO: 557)
32	AR (SEQ ID NO: 69)	GGAGGTTTTGGGGGTTTT (SEQ ID NO: 558)
33	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GTATGGGGTCGTAGGAAT (SEQ ID NO: 559)
34	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GTATGGGGTTGTAGGAAT (SEQ ID NO: 560)
35	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGAAGGGTCGTTTAAGGG (SEQ ID NO: 1147)
36	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGAAGGGTTGTTTAAGGG (SEQ ID NO: 1148)
37	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTGGCGTGAGGTA (SEQ ID NO: 563)
38	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTGGTGTGAGGTA (SEQ ID NO: 564)
39	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	AGGATTTTCGATGTAAGG (SEQ ID NO: 565)
40	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	AGGATTTTGTGATGTAAGG (SEQ ID NO: 566)

10

20

30

40

【 0 1 1 0 】

【 表 3 - 4 】

番号	遺伝子	オリゴ
41	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTTACGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 567)
42	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTTATGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 568)
43	Humos (SEQ ID NO: 71)	GAGTTTAACGTAGTAAGG (SEQ ID NO: 1221)
44	Humos (SEQ ID NO: 71)	GAGTTTAATGTAGTAAGG (SEQ ID NO: 1222)
45	Humos (SEQ ID NO: 71)	TATGGAGTTCGGTGGTAA (SEQ ID NO: 569)
46	Humos (SEQ ID NO: 71)	TATGGAGTTTGGTGGTAA (SEQ ID NO: 570)
47	Humos (SEQ ID NO: 71)	TTTATTGTCGTATTGGAG (SEQ ID NO: 571)
48	Humos (SEQ ID NO: 71)	TTTATTGTTGTATTGGAG (SEQ ID NO: 572)
49	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTGTGAACGGTTTGTTT (SEQ ID NO: 573)
50	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTGTGAATGGTTTGTTT (SEQ ID NO: 574)
51	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TTAGATTTCGGGATAGGG (SEQ ID NO: 575)
52	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TTAGATTTTGGGATAGGG (SEQ ID NO: 576)
53	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TATAGTTTCGTTAAGTGT (SEQ ID NO: 577)
54	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TATAGTTTGTGTTAAGTGT (SEQ ID NO: 578)
55	RB1 (SEQ ID NO: 52)	GTGTATTTTCGGTTTGGAG (SEQ ID NO: 579)
56	RB1 (SEQ ID NO: 52)	GTGTATTTTGGTTTGGAG (SEQ ID NO: 580)
57	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TTGGAAGGCGTTTGGATT (SEQ ID NO: 581)
58	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TTGGAAGGTGTTTGGATT (SEQ ID NO: 582)
59	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TGGATTACGTAGGTTT (SEQ ID NO: 583)

10

20

30

40

【 0 1 1 1 】

【 表 3 - 5 】

番号	遺伝子	オリゴ
60	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TGGATTATGTTAGGTTT (SEQ ID NO: 584)
61	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GTGTAGGTCGGTTTGGTT (SEQ ID NO: 1159)
62	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GTGTAGGTTGGTTTGGTT (SEQ ID NO: 1160)
63	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TTGTTATTCGGAGTTGGG (SEQ ID NO: 1163)
64	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TTGTTATTTGGAGTTGGG (SEQ ID NO: 1164)
65	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GGAGAATAGCGAAGATAG (SEQ ID NO: 589)
66	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GGAGAATAGTGAAGATAG (SEQ ID NO: 590)
67	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GAAAGGTCGGTTTGGT (SEQ ID NO: 591)
68	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GAAAGGTTGGTTTGGT (SEQ ID NO: 592)
69	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	TTTGAGAGCGGGTGGGAG (SEQ ID NO: 593)
70	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	TTTGAGAGTGGGTGGGAG (SEQ ID NO: 594)
71	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GTGGGAGCGGAAGTTTGA (SEQ ID NO: 595)
72	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GTGGGAGTGGGAAGTTTGA (SEQ ID NO: 596)
73	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GGTTAGGTCGTAGTATTG (SEQ ID NO: 597)
74	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GGTTAGGTTGTAGTATTG (SEQ ID NO: 598)
75	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	ATGGGTTTCGGTGAGTTT (SEQ ID NO: 599)
76	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	ATGGGTTTGGTGAGTTT (SEQ ID NO: 600)
77	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GGGTTTTTCGGTTGTTTT (SEQ ID NO: 601)
78	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GGGTTTTTGGTTGTTTT (SEQ ID NO: 602)

10

20

30

40

【 0 1 1 2 】

【 表 3 - 6 】

番号	遺伝子	オリゴ
79	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	ATAGTAGTCGGGTGTTGG (SEQ ID NO: 603)
80	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	ATAGTAGTTGGGTGTTGG (SEQ ID NO: 604)
81	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GTGTTAGTCGTTTAGGGT (SEQ ID NO: 605)
82	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GTGTTAGTTGTTTAGGGT (SEQ ID NO: 606)
83	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	TAGTTGTTCGTTTGGGTT (SEQ ID NO: 607)
84	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	TAGTTGTTTGTTTGGGTT (SEQ ID NO: 608)
85	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GGTTATTACGATAAATA (SEQ ID NO: 609)
86	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GGTTATTATGGATAAATA (SEQ ID NO: 610)
87	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	AATTAGGTCGGATAGGAG (SEQ ID NO: 611)
88	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	AATTAGGTTGGATAGGAG (SEQ ID NO: 612)
89	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	AAATTAGTCGGGTGTGGT (SEQ ID NO: 613)
90	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	AAATTAGTTGGGTGTGGT (SEQ ID NO: 614)
91	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TGTGGTGGCGTAAGTTTG (SEQ ID NO: 615)
92	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TGTGGTGGTGTAAGTTTG (SEQ ID NO: 616)
93	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	GGAGTTTTTCGTTTTTAGT (SEQ ID NO: 617)
94	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	GGAGTTTTTGTTTTTAGT (SEQ ID NO: 618)
95	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TAGAATTGCGAGATAGAG (SEQ ID NO: 619)
96	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TAGAATTGTGAGATAGAG (SEQ ID NO: 620)
97	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TAGTGAGACGAGGTTTTT (SEQ ID NO: 621)

10

20

30

40

【 0 1 1 3 】

【 表 3 - 7 】

番号	遺伝子	オリゴ
98	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TAGTGAGATGAGGTTTTT (SEQ ID NO: 622)
99	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TATATTGGCGAAGGTAA (SEQ ID NO: 623)
100	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TATATTGGTGAAGGTAA (SEQ ID NO: 624)
101	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TGTTATATCGGTTAGTTG (SEQ ID NO: 625)
102	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TGTTATATTGGTTAGTTG (SEQ ID NO: 626)
103	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TGTTTGGTCGGGTTTGGG (SEQ ID NO: 627)
104	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TGTTTGGTTGGGTTTGGG (SEQ ID NO: 628)
105	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TTTAGTTTCGATTTTGG (SEQ ID NO: 629)
106	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TTTAGTTTTGATTTTGG (SEQ ID NO: 630)
107	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	TTGAGGGTCGTTAGGTGG (SEQ ID NO: 631)
108	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	TTGAGGGTTGTTAGGTGG (SEQ ID NO: 632)
109	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	TTTAGTTCGGAGTGGGT (SEQ ID NO: 633)
110	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	TTTAGTTTGGAGTGGGT (SEQ ID NO: 634)
111	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	AGTTTAGTCGGTTGGTAT (SEQ ID NO: 635)
112	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	AGTTTAGTTGGTTGGTAT (SEQ ID NO: 636)
113	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	GGGGTTATCGGGGATTGA (SEQ ID NO: 637)
114	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	GGGGTTATTGGGGATTGA (SEQ ID NO: 638)
115	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GTTTGGGTCGCGAGAGTT (SEQ ID NO: 639)
116	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GTTTGGGTTGTGAGAGTT (SEQ ID NO: 640)

10

20

30

40

【 0 1 1 4 】

【 表 3 - 8 】

番号	遺伝子	オリゴ
117	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GGATATTGCGGGTGGTTT (SEQ ID NO: 641)
118	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GGATATTGTGGGTGGTTT (SEQ ID NO: 642)
119	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	TTTGGTTTCGTTGTGGAG (SEQ ID NO: 643)
120	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	TTTGGTTTTGTTGTGGAG (SEQ ID NO: 644)
121	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GGGTTTTGCGGTTGAGGA (SEQ ID NO: 645)
122	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GGGTTTTGTGGTTGAGGA (SEQ ID NO: 646)
123	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	TTTGTTTTTCGTTGAGTAG (SEQ ID NO: 647)
124	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	TTTGTTTTTGTGAGTAG (SEQ ID NO: 648)
125	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	TTTATTTTCGTTTTTGGG (SEQ ID NO: 649)
126	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	TTTATTTTTGTTTTTGGG (SEQ ID NO: 650)
127	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	GAAGGGTTCGTTTTTTAA (SEQ ID NO: 651)
128	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	GAAGGGTTTGTTTTTTAA (SEQ ID NO: 652)
129	APC (SEQ ID NO: 4)	TATTAGAGCGTTTTAAAG (SEQ ID NO: 653)
130	APC (SEQ ID NO: 4)	TATTAGAGTGTTTTAAAG (SEQ ID NO: 654)
131	APC (SEQ ID NO: 4)	GTTTTTTTCGATTGCGGT (SEQ ID NO: 655)
132	APC (SEQ ID NO: 4)	GTTTTTTTTGATTGCGGT (SEQ ID NO: 656)
133	ARHI (SEQ ID NO: 6)	TGTTGTTGCGTAGTAGAA (SEQ ID NO: 657)
134	ARHI (SEQ ID NO: 6)	TGTTGTTGTGTAGTAGAA (SEQ ID NO: 658)
135	ARHI (SEQ ID NO: 6)	GAATTATTCGTAGTTTG (SEQ ID NO: 659)

10

20

30

40

【 0 1 1 5 】

【 表 3 - 9 】

番号	遺伝子	オリゴ
136	ARHI (SEQ ID NO: 6)	GAATTATTTGTAGTTTTG (SEQ ID NO: 660)
137	ARHI (SEQ ID NO: 6)	GATAGTTTCGTTGGGAAG (SEQ ID NO: 661)
138	ARHI (SEQ ID NO: 6)	GATAGTTTGTGTTGGGAAG (SEQ ID NO: 662)
139	ARHI (SEQ ID NO: 6)	TAGAAGAACGAGGTTTGA (SEQ ID NO: 663)
140	ARHI (SEQ ID NO: 6)	TAGAAGAATGAGGTTTGA (SEQ ID NO: 664)
141	ARHI (SEQ ID NO: 6)	TATAGTTGCGTAGGTAGT (SEQ ID NO: 665)
142	ARHI (SEQ ID NO: 6)	TATAGTTGTGTAGGTAGT (SEQ ID NO: 666)
143	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	AGAGGTGTCGTTGGTTTT (SEQ ID NO: 667)
144	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	AGAGGTGTTGTTGGTTTT (SEQ ID NO: 668)
145	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	TAAGTTGTCGTAGAGGGG (SEQ ID NO: 669)
146	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	TAAGTTGTTGTAGAGGGG (SEQ ID NO: 670)
147	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	AGGGGTTACGAGTGGGAT (SEQ ID NO: 671)
148	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	AGGGGTTATGAGTGGGAT (SEQ ID NO: 672)
149	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	TTTTGTTACGGTGGTGGA (SEQ ID NO: 673)
150	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	TTTTGTTATGGTGGTGGA (SEQ ID NO: 674)
151	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	AGTTGGGTCGGGTTAGTT (SEQ ID NO: 675)
152	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	AGTTGGGTTGGGTTAGTT (SEQ ID NO: 676)
153	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTTAATAACGAGAGGGGA (SEQ ID NO: 677)
154	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTTAATAATGAGAGGGGA (SEQ ID NO: 678)

10

20

30

40

【 0 1 1 6 】

【 表 3 - 1 0 】

番号	遺伝子	オリゴ
155	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTAGTTTGC GTTATCGTT (SEQ ID NO: 679)
156	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTAGTTTGT GTTATTGTT (SEQ ID NO: 680)
157	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTTAGAGCG GAGAAGAG (SEQ ID NO: 681)
158	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTTAGAGTG GAGAAGAG (SEQ ID NO: 682)
159	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	GGTAGTTTC GAGGTTTGT (SEQ ID NO: 683)
160	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	GGTAGTTTGT GAGGTTTGT (SEQ ID NO: 684)
161	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGTTTCGAC GTTATTGAG (SEQ ID NO: 685)
162	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGTTTGTAT GTTATTGAG (SEQ ID NO: 686)
163	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGAGGTTGC GGTTTTAAG (SEQ ID NO: 687)
164	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGAGGTTGT GGTTTTAAG (SEQ ID NO: 688)
165	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGTAGCGTC GAGAGGTTG (SEQ ID NO: 689)
166	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGTAGTGTT GAGAGGTTG (SEQ ID NO: 690)
167	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGGGGATTC GGGGTATTT (SEQ ID NO: 691)
168	CDH1 (SEQ ID NO: 16)	AGGGGATTT GGGGTATTT (SEQ ID NO: 692)
169	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	AGGTGTATC GTTTTATA (SEQ ID NO: 693)
170	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	AGGTGTATT GTTTTATA (SEQ ID NO: 694)
171	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	TGGGTTAGC GGTGAGTTA (SEQ ID NO: 695)
172	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	TGGGTTAGT GGTGAGTTA (SEQ ID NO: 696)
173	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	GTTTATTTTC GTGGGAAA (SEQ ID NO: 697)

10

20

30

40

【 0 1 1 7 】

【 表 3 - 1 1 】

番号	遺伝子	オリゴ
174	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	GTTTATTTTGTGGGAAA (SEQ ID NO: 698)
175	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	TTGGAATTCGGTTAGGTT (SEQ ID NO: 699)
176	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	TTGGAATTTGGTTAGGTT (SEQ ID NO: 700)
177	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	AAGAGAAACGTTGGAATA (SEQ ID NO: 701)
178	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	AAGAGAAATGTTGGAATA (SEQ ID NO: 702)
179	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	TTTGATTTCGAGGGGAGT (SEQ ID NO: 703)
180	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	TTTGATTTTGAGGGGAGT (SEQ ID NO: 704)
181	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	GTATTTGGCGGTTGGATT (SEQ ID NO: 705)
182	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	GTATTTGGTGGTTGGATT (SEQ ID NO: 706)
183	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	TATAATTTTCGGGAAAGAA (SEQ ID NO: 707)
184	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	TATAATTTTGGGAAAGAA (SEQ ID NO: 708)
185	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	AGAGTGAACGTATTTAAA (SEQ ID NO: 709)
186	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	AGAGTGAATGTATTTAAA (SEQ ID NO: 710)
187	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GTTATATTCGTTAAGTGT (SEQ ID NO: 711)

10

20

30

40

【 0 1 1 8 】

【 表 3 - 1 2 】

番号	遺伝子	オリゴ
188	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GTTATATTTGTAAAGTGT (SEQ ID NO: 712)
189	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	TAAGTGTTTCGGAGTTAAT (SEQ ID NO: 713)
190	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	TAAGTGTTTGGAGTTAAT (SEQ ID NO: 714)
191	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GTTAGTATCGGAGGAAGA (SEQ ID NO: 715)
192	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GTTAGTATTGGAGGAAGA (SEQ ID NO: 716)
193	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GGAGTTTTTCGGTTGATTG (SEQ ID NO: 717)
194	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GGAGTTTTTGGTTGATTG (SEQ ID NO: 718)
195	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	TTGTTTAACGTATCGAAT (SEQ ID NO: 719)
196	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	TTGTTTAATGTATTGAAT (SEQ ID NO: 720)
197	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	AATAGTTACGGTCGGAGG (SEQ ID NO: 721)
198	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	AATAGTTATGGTTGGAGG (SEQ ID NO: 722)
199	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	ATATTTAGCGAGTAGTGT (SEQ ID NO: 723)
200	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	ATATTTAGTGAGTAGTGT (SEQ ID NO: 724)
201	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	ATAGGGGGCGGAGTTTAA (SEQ ID NO: 725)
202	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	ATAGGGGGTGGAGTTTAA (SEQ ID NO: 726)
203	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	TTATTGTACGGGGTTTAA (SEQ ID NO: 727)
204	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	TTATTGTATGGGGTTTAA (SEQ ID NO: 728)
205	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	TTTAAAGTCGTAGAAGGA (SEQ ID NO: 729)
206	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	TTTAAAGTTGTAGAAGGA (SEQ ID NO: 730)

10

20

30

40

【 0 1 1 9 】

【 表 3 - 1 3 】

番号	遺伝子	オリゴ
207	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	GTTGGAGTCGAGGTTTGA (SEQ ID NO: 731)
208	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	GTTGGAGTTGAGGTTTGA (SEQ ID NO: 732)
209	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	GAAGGGAGCGTATTTTAT (SEQ ID NO: 733)
210	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	GAAGGGAGTGTATTTTAT (SEQ ID NO: 734)
211	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	TTGTTTTTCGGAAATTG (SEQ ID NO: 735)
212	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	TTGTTTTTTGGAAATTG (SEQ ID NO: 736)
213	FOS (SEQ ID NO: 29)	AATGTTTTTCGTACGTAGG (SEQ ID NO: 737)
214	FOS (SEQ ID NO: 29)	AATGTTTTTGTATGTAGG (SEQ ID NO: 738)
215	FOS (SEQ ID NO: 29)	TATATGGTCGAGAAAAAT (SEQ ID NO: 739)
216	FOS (SEQ ID NO: 29)	TATATGGTTGAGAAAAAT (SEQ ID NO: 740)
217	FOS (SEQ ID NO: 29)	TTAGTATCGTAAAGTAG (SEQ ID NO: 741)
218	FOS (SEQ ID NO: 29)	TTAGTATTGTAAAGTAG (SEQ ID NO: 742)
219	FOS (SEQ ID NO: 29)	GTATTGTTTCGAGTTCGAG (SEQ ID NO: 743)
220	FOS (SEQ ID NO: 29)	GTATTGTTTGAGTTTGAG (SEQ ID NO: 744)
221	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	GGTTTTTTCGGTTAGTTG (SEQ ID NO: 745)
222	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	GGTTTTTTTGGTTAGTTG (SEQ ID NO: 746)
223	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	TTTAGGGCGTTTTTTTG (SEQ ID NO: 747)
224	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	TTTAGGGTGTTTTTTTG (SEQ ID NO: 748)
225	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	GTAGTTTTTCGTTATTAGT (SEQ ID NO: 749)

10

20

30

40

【 0 1 2 0 】

【 表 3 - 1 4 】

番号	遺伝子	オリゴ
226	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	GTAGTTTTTGTATTAGT (SEQ ID NO: 750)
227	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	TTAAAACGGCGTATAGGG (SEQ ID NO: 751)
228	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	TTAAAATGGTGTATAGGG (SEQ ID NO: 752)
229	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	AGGAGATTTCGAAAGTTTA (SEQ ID NO: 753)
230	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	AGGAGATTTGAAAGTTTA (SEQ ID NO: 754)
231	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	GGGTTTTACGTGGTTGTT (SEQ ID NO: 755)
232	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	GGGTTTTATGTGGTTGTT (SEQ ID NO: 756)
233	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	TTTAGAGCGTTAGGGTT (SEQ ID NO: 757)
234	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	TTTAGAGTGTAGGGTT (SEQ ID NO: 758)
235	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	AGTTTGAACGATGTAAGA (SEQ ID NO: 759)
236	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	AGTTTGAATGATGTAAGA (SEQ ID NO: 760)
237	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	GGTTATTACGATAATTG (SEQ ID NO: 761)
238	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	GGTTATTATGATAATTG (SEQ ID NO: 762)
239	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	TTGTATGGTCGAGTTTAT (SEQ ID NO: 763)
240	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	TTGTATGGTTGAGTTTAT (SEQ ID NO: 764)
241	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	GATTAGGGCGGGAAATAT (SEQ ID NO: 765)
242	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	GATTAGGGTGGGAAATAT (SEQ ID NO: 766)
243	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	TGGAGTTTACGGAGGTTT (SEQ ID NO: 767)
244	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	TGGAGTTTATGGAGGTTT (SEQ ID NO: 768)

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

【 表 3 - 1 5 】

番号	遺伝子	オリゴ
245	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TAAGGATACGAGTTATAT (SEQ ID NO: 769)
246	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TAAGGATATGAGTTATAT (SEQ ID NO: 770)
247	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TTGGAGAGCGGTTGAGTT (SEQ ID NO: 771)
248	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TTGGAGAGTGGTTGAGTT (SEQ ID NO: 772)
249	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TAGGTTATCGGTGATTGT (SEQ ID NO: 773)
250	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TAGGTTATTGGTGATTGT (SEQ ID NO: 774)
251	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TAGGGGAGCGGTTT TAGG (SEQ ID NO: 775)
252	MGMT (SEQ ID NO: 38)	TAGGGGAGTGGTTT TAGG (SEQ ID NO: 776)
253	MGMT (SEQ ID NO: 38)	AGTAGGATCGGGATT TTT (SEQ ID NO: 777)
254	MGMT (SEQ ID NO: 38)	AGTAGGATTGGGATT TTT (SEQ ID NO: 778)
255	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TTGAGAAGCGTTAAGTAT (SEQ ID NO: 779)
256	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TTGAGAAGTGTTAAGTAT (SEQ ID NO: 780)
257	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TTAGGTAGCGGGTAGTAG (SEQ ID NO: 781)
258	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TTAGGTAGTGGGTAGTAG (SEQ ID NO: 782)
259	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	GTAGTAGTCGTTT TAGGG (SEQ ID NO: 783)
260	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	GTAGTAGTTGTTT TAGGG (SEQ ID NO: 784)
261	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	ATAGTTGTCGTTGAAGGG (SEQ ID NO: 785)
262	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	ATAGTTGTTGTTGAAGGG (SEQ ID NO: 786)
263	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TTGGATGGCGTAAGTTAT (SEQ ID NO: 787)

10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

【 表 3 - 1 6 】

番号	遺伝子	オリゴ
264	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TTGGATGGTGTAAGTTAT (SEQ ID NO: 788)
265	MOS (SEQ ID NO: 40)	AGTAGTTTCGTAGGTAGT (SEQ ID NO: 789)
266	MOS (SEQ ID NO: 40)	AGTAGTTTTGTAGGTAGT (SEQ ID NO: 790)
267	MOS (SEQ ID NO: 40)	GTAAGTCGTTTTGTATAT (SEQ ID NO: 791)
268	MOS (SEQ ID NO: 40)	GTAAGTTGTTTTGTATAT (SEQ ID NO: 792)
269	MOS (SEQ ID NO: 40)	ATGTTAGTCGGTTTTTGG (SEQ ID NO: 793)
270	MOS (SEQ ID NO: 40)	ATGTTAGTTGGTTTTTGG (SEQ ID NO: 794)
271	MPL (SEQ ID NO: 42)	GTGGTGGGCGTTTGTAAT (SEQ ID NO: 795)
272	MPL (SEQ ID NO: 42)	GTGGTGGGTGTTTGTAAT (SEQ ID NO: 796)
273	MPL (SEQ ID NO: 42)	TTTGAGGTCGGGAGTTTA (SEQ ID NO: 797)
274	MPL (SEQ ID NO: 42)	TTTGAGGTTGGGAGTTTA (SEQ ID NO: 798)
275	MPL (SEQ ID NO: 42)	TGTAGTGAGTCGAGATTA (SEQ ID NO: 1227)
276	MPL (SEQ ID NO: 42)	TGTAGTGAGTTGAGATTA (SEQ ID NO: 1228)
277	MPL (SEQ ID NO: 42)	GGTAATAGAGCGAGATTT (SEQ ID NO: 799)
278	MPL (SEQ ID NO: 42)	GGTAATAGAGTGAGATTT (SEQ ID NO: 800)
279	MPL (SEQ ID NO: 42)	TTAAGTAGCGGGTAAGGT (SEQ ID NO: 801)
280	MPL (SEQ ID NO: 42)	TTAAGTAGTGGGTAAGGT (SEQ ID NO: 802)
281	MYC (SEQ ID NO: 43)	TTAGAGTGTTTCGTTGTT (SEQ ID NO: 803)
282	MYC (SEQ ID NO: 43)	TTAGAGTGTTTGTTGTT (SEQ ID NO: 804)

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

【 表 3 - 1 7 】

番号	遺伝子	オリゴ
283	MYC (SEQ ID NO: 43)	TTATAATGCGAGGGTTTG (SEQ ID NO: 805)
284	MYC (SEQ ID NO: 43)	TTATAATGTGAGGGTTTG (SEQ ID NO: 806)
285	MYC (SEQ ID NO: 43)	AGGATTTTCGAGTTGTGT (SEQ ID NO: 807)
286	MYC (SEQ ID NO: 43)	AGGATTTTTGAGTTGTGT (SEQ ID NO: 808)
287	MYC (SEQ ID NO: 43)	AATTTTAGCGAGAGGTAG (SEQ ID NO: 809)
288	MYC (SEQ ID NO: 43)	AATTTAGTGAGAGGTAG (SEQ ID NO: 810)
289	MYC (SEQ ID NO: 43)	TTGTGGGCGTTTTGGGAA (SEQ ID NO: 811)
290	MYC (SEQ ID NO: 43)	TTGTGGGTGTTTTGGGAA (SEQ ID NO: 812)
291	N33 (SEQ ID NO: 46)	TTGGTTCGGGAAAGGTAA (SEQ ID NO: 1211)
292	N33 (SEQ ID NO: 46)	TTGGTTTGGGAAAGGTAA (SEQ ID NO: 1212)
293	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTATTTTCGGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1217)
294	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTATTTTGGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1218)
295	N33 (SEQ ID NO: 46)	GTTTAGTTAGCGGGTTT (SEQ ID NO: 1219)
296	N33 (SEQ ID NO: 46)	GTTTAGTTAGTGGGTTT (SEQ ID NO: 1220)
297	N33 (SEQ ID NO: 46)	ATTTAGTTCGGGGGAGGA (SEQ ID NO: 1215)
298	N33 (SEQ ID NO: 46)	ATTTAGTTTGGGGGAGGA (SEQ ID NO: 1216)
299	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	AGATTATACGTTGTATGT (SEQ ID NO: 813)
300	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	AGATTATATGTTGTATGT (SEQ ID NO: 814)
301	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	TAGGAGTTCGAGATTAGT (SEQ ID NO: 815)

10

20

30

40

【 0 1 2 4 】

【 表 3 - 1 8 】

番号	遺伝子	オリゴ
302	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	TAGGAGTTTGAGATTAGT (SEQ ID NO: 816)
303	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	AAATTAGTCGGGTTTAGT (SEQ ID NO: 817)
304	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	AAATTAGTTGGGTTTAGT (SEQ ID NO: 818)
305	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	GTGGATAGCGTTTGTAAT (SEQ ID NO: 819)
306	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	GTGGATAGTGTTTGTAAT (SEQ ID NO: 820)
307	PTEN (SEQ ID NO: 51)	GGATTTTGCCTTCGTATT (SEQ ID NO: 821)
308	PTEN (SEQ ID NO: 51)	GGATTTTGTGTTTGATT (SEQ ID NO: 822)
309	PTEN (SEQ ID NO: 51)	AGAGTTATCGTTTGTGTT (SEQ ID NO: 823)
310	PTEN (SEQ ID NO: 51)	AGAGTTATTGTTTGTGTT (SEQ ID NO: 824)
311	PTEN (SEQ ID NO: 51)	TGATGTGGCGGGATTTT (SEQ ID NO: 825)
312	PTEN (SEQ ID NO: 51)	TGATGTGGTGGGATTTT (SEQ ID NO: 826)
313	RBL2 (SEQ ID NO: 53)	ATTAGTGTCGTTGTTAAG (SEQ ID NO: 827)
314	RBL2 (SEQ ID NO: 53)	ATTAGTGTTGTTGTTAAG (SEQ ID NO: 828)
315	RBL2 (SEQ ID NO: 53)	AGATTATACGGATAAGGG (SEQ ID NO: 829)
316	RBL2 (SEQ ID NO: 53)	AGATTATATGGATAAGGG (SEQ ID NO: 830)
317	SFN (SEQ ID NO: 55)	ATAGAGTTCGGTATTGGT (SEQ ID NO: 831)
318	SFN (SEQ ID NO: 55)	ATAGAGTTTGGTATTGGT (SEQ ID NO: 832)
319	SFN (SEQ ID NO: 55)	GAGTAGGTCGAACGTTAT (SEQ ID NO: 833)
320	SFN (SEQ ID NO: 55)	GAGTAGGTTGAATGTTAT (SEQ ID NO: 834)

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

【 表 3 - 1 9 】

番号	遺伝子	オリゴ
321	SFN (SEQ ID NO: 55)	AAAAGTAACGAGGAGGGT (SEQ ID NO: 835)
322	SFN (SEQ ID NO: 55)	AAAAGTAATGAGGAGGGT (SEQ ID NO: 836)
323	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	ATTGGAGCGAGGAATT (SEQ ID NO: 837)
324	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	ATTGGAGTGAGGAATT (SEQ ID NO: 838)
325	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	TTGAAAGTCGGTTAAAGT (SEQ ID NO: 839)
326	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	TTGAAAGTTGGTTAAAGT (SEQ ID NO: 840)
327	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	AAAGTTTTTCGGAGGGGT (SEQ ID NO: 841)
328	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	AAAGTTTTTGGAGGGGT (SEQ ID NO: 842)
329	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	GGTAGTTACGAGAGAGTT (SEQ ID NO: 843)
330	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	GGTAGTTATGAGAGAGTT (SEQ ID NO: 844)
331	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TGATTAGCGTAGGTTTG (SEQ ID NO: 845)
332	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TGATTAGTGTAGGTTTG (SEQ ID NO: 846)
333	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTTGGTGCGCGTAGAGAA (SEQ ID NO: 1229)
334	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTTGGTGTGTGTAGAGAA (SEQ ID NO: 1230)
335	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTAGAGTTCGAGTTTATA (SEQ ID NO: 847)
336	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTAGAGTTTGAGTTTATA (SEQ ID NO: 848)
337	TP73 (SEQ ID NO: 58)	GAGTGTTTCGCGTTTGGG (SEQ ID NO: 849)
338	TP73 (SEQ ID NO: 58)	GAGTGTTTGTGTTTGGG (SEQ ID NO: 850)
339	TP73 (SEQ ID NO: 58)	AAGATGTGCGAGTTAGTC (SEQ ID NO: 851)

10

20

30

40

【 0 1 2 6 】

【 表 3 - 2 0 】

番号	遺伝子	オリゴ
340	TP73 (SEQ ID NO: 58)	AAGATGTGTGAGTTAGTC (SEQ ID NO: 852)
341	TP73 (SEQ ID NO: 58)	AAGTTACGGGTTTATTG (SEQ ID NO: 853)
342	TP73 (SEQ ID NO: 58)	AAGTTATGGGTTTATTG (SEQ ID NO: 854)
343	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTAGATTACGGGTTTAT (SEQ ID NO: 855)
344	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTAGATTATGGGTTTAT (SEQ ID NO: 856)
345	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TAAGTAGCGTCGTTATTG (SEQ ID NO: 857)
346	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TAAGTAGTGTGTTATTG (SEQ ID NO: 858)
347	TP73 (SEQ ID NO: 58)	GGAAGTTTCGATGGTTTA (SEQ ID NO: 859)
348	TP73 (SEQ ID NO: 58)	GGAAGTTTTGATGGTTTA (SEQ ID NO: 860)
349	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	ATGAAGAACGGTTAAGGG (SEQ ID NO: 861)
350	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	ATGAAGAATGGTTAAGGG (SEQ ID NO: 862)
351	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	TTAAGTTACGGTTATTAG (SEQ ID NO: 863)
352	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	TTAAGTTATGGTTATTAG (SEQ ID NO: 864)
353	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	TTAGTGTTTCGTTTGGAAT (SEQ ID NO: 865)
354	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	TTAGTGTTTGTTTGGAAT (SEQ ID NO: 866)
355	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	AGGAGTTGCGGTGGGAAT (SEQ ID NO: 867)
356	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	AGGAGTTGTGGTGGGAAT (SEQ ID NO: 868)
357	GSK3B (SEQ ID NO: 32)	GGGTAAAGCGCGATATT (SEQ ID NO: 869)
358	GSK3B (SEQ ID NO: 32)	GGGTAAAGTGTGGATATT (SEQ ID NO: 870)

10

20

30

40

【 0 1 2 7 】

【 表 3 - 2 1 】

番号	遺伝子	オリゴ
359	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	TATGTTTTTCGGCGAATGG (SEQ ID NO: 871)
360	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	TATGTTTTTTGGTGAATGG (SEQ ID NO: 872)
361	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	GGGGAATAGTCGAGGAGT (SEQ ID NO: 873)
362	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	GGGGAATAGTTGAGGAGT (SEQ ID NO: 874)
363	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	AGGAGTCGTTGTTTGGGG (SEQ ID NO: 875)
364	GSK3 β (SEQ ID NO: 32)	AGGAGTTGTTGTTTGGGG (SEQ ID NO: 876)
365	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	TAGTTATTCGGAAGGTA (SEQ ID NO: 877)
366	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	TAGTTATTTGGGAAGGTA (SEQ ID NO: 878)
367	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	AGGTATTGCGGTAGTTGG (SEQ ID NO: 879)
368	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	AGGTATTGTGGTAGTTGG (SEQ ID NO: 880)
369	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	GGGTTATTCGATTGGTGA (SEQ ID NO: 881)
370	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	GGGTTATTTGATTGGTGA (SEQ ID NO: 882)
371	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	AAATTGTTCTGATTTTGGT (SEQ ID NO: 883)
372	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	AAATTGTTTGTATTTGGT (SEQ ID NO: 884)
373	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	AGATATATCGGAGTTTGG (SEQ ID NO: 885)
374	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	AGATATATTGGAGTTTGG (SEQ ID NO: 886)
375	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	GTTTGGTACGGGGTATAT (SEQ ID NO: 887)
376	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	GTTTGGTATGGGGTATAT (SEQ ID NO: 888)
377	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	TTTAAATCGAGTTGTGT (SEQ ID NO: 889)

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

【 表 3 - 2 2 】

番号	遺伝子	オリゴ
378	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	TTTTAAATTGAGTTGTGT (SEQ ID NO: 890)
379	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	TATGAGTTCGGGAGATTA (SEQ ID NO: 891)
380	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	TATGAGTTTGGGAGATTA (SEQ ID NO: 892)
381	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	TGGAGGTTTCGGGAGTTTA (SEQ ID NO: 893)
382	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	TGGAGGTTTGGGAGTTTA (SEQ ID NO: 894)
383	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	TTTGGTATCGTTTAGAGT (SEQ ID NO: 895)
384	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	TTTGGTATTGTTTAGAGT (SEQ ID NO: 896)
385	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	GTATGAGTCGTGGTAGGA (SEQ ID NO: 897)
386	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	GTATGAGTTGTGGTAGGA (SEQ ID NO: 898)
387	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	GTGGATTCGGCGGGATTT (SEQ ID NO: 899)
388	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	GTGGATTGTTGGGATTT (SEQ ID NO: 900)
389	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	TTTAGAGGCGGAGAAGAA (SEQ ID NO: 901)
390	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	TTTAGAGGTGGAGAAGAA (SEQ ID NO: 902)
391	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	GAAGAGGTAGCGAGTGGA (SEQ ID NO: 903)
392	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	GAAGAGGTAGTGAGTGGA (SEQ ID NO: 904)
393	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	TAGGTTGTCGGTTTGTGC (SEQ ID NO: 905)
394	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	TAGGTTGTTGGTTTGTGC (SEQ ID NO: 906)
395	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	TTTGTATTCGGTGGTTAT (SEQ ID NO: 907)
396	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	TTTGTATTTGGTGGTTAT (SEQ ID NO: 908)

10

20

30

40

【 0 1 2 9 】

【 表 3 - 2 3 】

番号	遺伝子	オリゴ
397	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	GGAGTTTTCGCGGGTTTTT (SEQ ID NO: 909)
398	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	GGAGTTTGTGGGTTTTT (SEQ ID NO: 910)
399	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	TAGGATTTCGGTAGGTAA (SEQ ID NO: 911)
400	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	TAGGATTTTGGTAGGTAA (SEQ ID NO: 912)
401	BAX (SEQ ID NO: 8)	AGTTTGGGCGTGGGTTAT (SEQ ID NO: 913)
402	BAX (SEQ ID NO: 8)	AGTTTGGGTGTGGGTTAT (SEQ ID NO: 914)
403	BAX (SEQ ID NO: 8)	ATTAGAGTTGCGATTGGA (SEQ ID NO: 915)
404	BAX (SEQ ID NO: 8)	ATTAGAGTTGTGATTGGA (SEQ ID NO: 916)
405	BAX (SEQ ID NO: 8)	GTATTTATCGGGAGATGT (SEQ ID NO: 917)
406	BAX (SEQ ID NO: 8)	GTATTTATTGGGAGATGT (SEQ ID NO: 918)
407	BAX (SEQ ID NO: 8)	TTTAGAGGCGGGGGTGAG (SEQ ID NO: 919)
408	BAX (SEQ ID NO: 8)	TTTAGAGGTGGGGGTGAG (SEQ ID NO: 920)
409	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	GAAGTAAACGGTTTTTAG (SEQ ID NO: 921)
410	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	GAAGTAAATGGTTTTTAG (SEQ ID NO: 922)
411	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	TTATAATACGAAGTTATG (SEQ ID NO: 923)
412	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	TTATAATATGAAGTTATG (SEQ ID NO: 924)
413	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	GAGGTTTTCGGATTTTTT (SEQ ID NO: 925)
414	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	GAGGTTTTTGGATTTTTT (SEQ ID NO: 926)
415	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	TTTTGTTTCGGTAAAAGG (SEQ ID NO: 927)

10

20

30

40

【 0 1 3 0 】

【 表 3 - 2 4 】

番号	遺伝子	オリゴ
416	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	TTTTGTTTTGGTAAAAGG (SEQ ID NO: 928)
417	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	GAATGAGTCGAGGAAGGT (SEQ ID NO: 929)
418	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	GAATGAGTTGAGGAAGGT (SEQ ID NO: 930)
419	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	TATTGAGACGTTAAGTAA (SEQ ID NO: 931)
420	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	TATTGAGATGTTAAGTAA (SEQ ID NO: 932)
421	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	TAAGGTTACGTAGTTAGT (SEQ ID NO: 933)
422	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	TAAGGTTATGTAGTTAGT (SEQ ID NO: 934)
423	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	GTTAATAGCGGGGATTTT (SEQ ID NO: 935)
424	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	GTTAATAGTGGGGATTTT (SEQ ID NO: 936)
425	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	TATATGATCGAGGATATT (SEQ ID NO: 937)
426	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	TATATGATTGAGGATATT (SEQ ID NO: 938)
427	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	ATTTTTTAGTCGGGTGTT (SEQ ID NO: 939)
428	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	ATTTTTTAGTTGGGTGTT (SEQ ID NO: 940)
429	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	TTAGTTAGCGTATATTGT (SEQ ID NO: 941)
430	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	TTAGTTAGTGTATATTGT (SEQ ID NO: 942)
431	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	TGATAAAACGTTAGAGGT (SEQ ID NO: 943)
432	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	TGATAAAATGTTAGAGGT (SEQ ID NO: 944)
433	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TTAGAGTACGTTTTTTGG (SEQ ID NO: 945)
434	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TTAGAGTATGTTTTTTGG (SEQ ID NO: 946)

10

20

30

40

【 0 1 3 1 】

【 表 3 - 2 5 】

番号	遺伝子	オリゴ
435	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TTTATAGTCGATATTAGG (SEQ ID NO: 947)
436	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TTTATAGTTGATATTAGG (SEQ ID NO: 948)
437	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TAGATTCGGTTTATAGTTG (SEQ ID NO: 949)
438	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TAGATTTGGTTTATAGTTG (SEQ ID NO: 950)
439	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TTTTGGAACGGTGGTAGT (SEQ ID NO: 951)
440	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	TTTTGGAATGGTGGTAGT (SEQ ID NO: 952)
441	PML (SEQ ID NO: 48)	TTAAGAGTCGTAGATGTA (SEQ ID NO: 953)
442	PML (SEQ ID NO: 48)	TTAAGAGTTGTAGATGTA (SEQ ID NO: 954)
443	PML (SEQ ID NO: 48)	GAGTTGGCGTATAAAGA (SEQ ID NO: 955)
444	PML (SEQ ID NO: 48)	GAGTTGGGTGTATAAAGA (SEQ ID NO: 956)
445	PML (SEQ ID NO: 48)	GTAAAGCGGGAGAGGTAG (SEQ ID NO: 957)
446	PML (SEQ ID NO: 48)	GTAAAGTGGGAGAGGTAG (SEQ ID NO: 958)
447	PML (SEQ ID NO: 48)	TTAAAGATACGTTTAGAG (SEQ ID NO: 959)
448	PML (SEQ ID NO: 48)	TTAAAGATATGTTTAGAG (SEQ ID NO: 960)
449	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	AGTTAGTCGGGTTTAAAG (SEQ ID NO: 961)
450	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	AGTTAGTTGGGTTTAAAG (SEQ ID NO: 962)
451	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	TTATAGGGTTCGGTTTTT (SEQ ID NO: 963)
452	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	TTATAGGGTTTGTTTTT (SEQ ID NO: 964)
453	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	TTTAAAGGCGAGGTTAAA (SEQ ID NO: 965)

10

20

30

40

【 0 1 3 2 】

【 表 3 - 2 6 】

番号	遺伝子	オリゴ
454	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	TTTTAAGGTGAGGTAAA (SEQ ID NO: 966)
455	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	ATGATAGGCGTTTATTAA (SEQ ID NO: 967)
456	HOXA5 (SEQ ID NO: 35)	ATGATAGGTGTTTATTAA (SEQ ID NO: 968)
457	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	GGTTATACGATTTTGTG (SEQ ID NO: 969)
458	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	GGTTATATGATTTTGTG (SEQ ID NO: 970)
459	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TAGGTTTTGCGGGTTATA (SEQ ID NO: 971)
460	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TAGGTTTTGTGGGTATA (SEQ ID NO: 972)
461	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	ATGTGAATCGTGTTAAGA (SEQ ID NO: 973)
462	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	ATGTGAATTGTGTTAAGA (SEQ ID NO: 974)
463	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TTTTATATCGGGTGTGTT (SEQ ID NO: 1223)
464	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TTTTATATTGGGTGTGTT (SEQ ID NO: 1224)
465	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	TTAAGAGACGGAATAAAG (SEQ ID NO: 975)
466	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	TTAAGAGATGGAATAAAG (SEQ ID NO: 976)
467	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	AATTAGGACGGGTGGGA (SEQ ID NO: 977)
468	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	AATTAGGATGGGTGGGA (SEQ ID NO: 978)
469	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	TAGGAGTACGGATTTTA (SEQ ID NO: 979)
470	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	TAGGAGTATGGATTTTA (SEQ ID NO: 980)
471	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	GAGTTAATCGAGGAGTAG (SEQ ID NO: 981)
472	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	GAGTTAATTGAGGAGTAG (SEQ ID NO: 982)

10

20

30

40

【 0 1 3 3 】

【 表 3 - 2 7 】

番号	遺伝子	オリゴ
473	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	GGATTGCGGGGTATTT (SEQ ID NO: 983)
474	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	GGATTGGTGGGGTATTT (SEQ ID NO: 984)
475	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	AGTTTAGACGAAGTTTTA (SEQ ID NO: 985)
476	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	AGTTTAGATGAAGTTTTA (SEQ ID NO: 986)
477	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	GTTATTTTCGGTGGTTGA (SEQ ID NO: 987)
478	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	GTTATTTTGGTGGTTGA (SEQ ID NO: 988)
479	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	AGGGTGATAGCGGAAGAT (SEQ ID NO: 989)
480	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	AGGGTGATAGTGAAGAT (SEQ ID NO: 990)
481	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	GTTAGGATCGATATTTGT (SEQ ID NO: 991)
482	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	GTTAGGATTGATATTTGT (SEQ ID NO: 992)
483	PRAME (SEQ ID NO: 50)	GGGATTGTCGTATAAAAT (SEQ ID NO: 993)
484	PRAME (SEQ ID NO: 50)	GGGATTGTTGTATAAAAT (SEQ ID NO: 994)
485	PRAME (SEQ ID NO: 50)	TTTAGATTTCGATTTGGGA (SEQ ID NO: 995)
486	PRAME (SEQ ID NO: 50)	TTTAGATTGATTTGGGA (SEQ ID NO: 996)
487	PRAME (SEQ ID NO: 50)	TAGAGTTGCGGGTTTTTA (SEQ ID NO: 997)
488	PRAME (SEQ ID NO: 50)	TAGAGTTGTGGTTTTTA (SEQ ID NO: 998)
489	PRAME (SEQ ID NO: 50)	AATAGGTCGCGTGGTGAG (SEQ ID NO: 999)
490	PRAME (SEQ ID NO: 50)	AATAGGTTGTGTGGTGAG (SEQ ID NO: 1000)
491	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	AGTTTTGGCGTTTTTTT (SEQ ID NO: 1001)

10

20

30

40

【 0 1 3 4 】

【 表 3 - 2 8 】

番号	遺伝子	オリゴ
492	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	AGTTTGGTGTGTTTTTT (SEQ ID NO: 1002)
493	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	GGTAAAGTCGTTTTTTTT (SEQ ID NO: 1003)
494	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	GGTAAAGTTGTGTTTTTT (SEQ ID NO: 1004)
495	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	TTTGTTGCGTTATAGTT (SEQ ID NO: 1005)
496	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	TTTGTTGTGTTATAGTT (SEQ ID NO: 1006)
497	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	ATATTTTCGAGTTTAA (SEQ ID NO: 1007)
498	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	ATATTTTGTGAGTTTAA (SEQ ID NO: 1008)
499	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	TTTAAAGCGTAGGTTGT (SEQ ID NO: 1009)
500	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	TTTAAAGTGTAGGTTGT (SEQ ID NO: 1010)
501	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	GGTGGATGCGGGGGGTTT (SEQ ID NO: 1011)
502	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	GGTGGATGTGGGGGGTTT (SEQ ID NO: 1012)
503	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGGTGGGGCGGGGAGTAG (SEQ ID NO: 1013)
504	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGGTGGGGTGGGGAGTAG (SEQ ID NO: 1014)
505	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTAGTTTCGGAGTGGGT (SEQ ID NO: 1015)
506	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTAGTTTGGAGTGGGT (SEQ ID NO: 1016)
507	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	AAGGAGTACGTTTAGTT (SEQ ID NO: 1017)
508	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	AAGGAGTATGTTTAGTT (SEQ ID NO: 1018)
509	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	AGTTTAGTCGGTTGGTAT (SEQ ID NO: 1019)
510	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	AGTTTAGTTGGTTGGTAT (SEQ ID NO: 1020)

10

20

30

40

【 0 1 3 5 】

【 表 3 - 2 9 】

番号	遺伝子	オリゴ
511	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTGTTTTCGTTTTTTAG (SEQ ID NO: 1021)
512	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTGTTTGTGTTTTTTAG (SEQ ID NO: 1022)
513	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTTTTAGCGTGTAATTT (SEQ ID NO: 1023)
514	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTTTTAGTGTGTAATTT (SEQ ID NO: 1024)
515	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGGGTTATCGGGGATTGA (SEQ ID NO: 1025)
516	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGGGTTATTGGGGATTGA (SEQ ID NO: 1026)
517	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGTGGGGTCGGTTTTATT (SEQ ID NO: 1027)
518	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGTGGGGTTGGTTTTATT (SEQ ID NO: 1028)
519	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGAGAGGGCGGGGTTTGT (SEQ ID NO: 1029)
520	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGAGAGGGTGGGGTTTGT (SEQ ID NO: 1030)
521	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTGAGGGTCGTTAGGTGG (SEQ ID NO: 1031)
522	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTGAGGGTTGTTAGGTGG (SEQ ID NO: 1032)
523	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	ATTAGAGTCGGGAGGGGC (SEQ ID NO: 1033)
524	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	ATTAGAGTTGGGAGGGGC (SEQ ID NO: 1034)
525	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGGTATTCGGGTTTTTT (SEQ ID NO: 1035)
526	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGGTATTTGGGTTTTTT (SEQ ID NO: 1036)
527	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTTGGTTTCGTTGTGGAG (SEQ ID NO: 1037)
528	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTTGGTTTTGTTGTGGAG (SEQ ID NO: 1038)
529	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTGAGTAGCGTTGGAGTC (SEQ ID NO: 1039)

10

20

30

40

【 0 1 3 6 】

【 表 3 - 3 0 】

番号	遺伝子	オリゴ
530	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTGAGTAGTGTTGGAGTC (SEQ ID NO: 1040)
531	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGTTTTGCGGTTGAGGA (SEQ ID NO: 1041)
532	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGTTTTGTGGTTGAGGA (SEQ ID NO: 1042)
533	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	AGTTTTTTCGTTGTTTAC (SEQ ID NO: 1043)
534	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	AGTTTTTTTGTTGTTTAC (SEQ ID NO: 1044)
535	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GTTGTTTACGGTTTTTAT (SEQ ID NO: 1045)
536	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GTTGTTTATGGTTTTTAT (SEQ ID NO: 1046)
537	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTTGAGGGCGGTGGTGGT (SEQ ID NO: 1047)
538	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTTGAGGGTGGTGGTGGT (SEQ ID NO: 1048)
539	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGTGTTTCGGGTAGAGA (SEQ ID NO: 1049)
540	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGTGTTTTGGGTAGAGA (SEQ ID NO: 1050)
541	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GAGATTTTCGGGTTTGGG (SEQ ID NO: 1051)
542	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GAGATTTTGGGTTTGGG (SEQ ID NO: 1052)
543	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTGTTTTCGTTGAGTAG (SEQ ID NO: 1053)
544	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTGTTTTTGTTGAGTAG (SEQ ID NO: 1054)
545	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTATTTTCGTTTTTGGG (SEQ ID NO: 1241)
546	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTATTTTGTTTTTGGG (SEQ ID NO: 1242)
547	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	ATAGGTTTCGAGTTTTT (SEQ ID NO: 1055)
548	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	ATAGGTTTTGAGTTTTT (SEQ ID NO: 1056)

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

【 表 3 - 3 1 】

番号	遺伝子	オリゴ
549	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTATAGTTCGTTAGTTTT (SEQ ID NO: 1057)
550	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTATAGTTTGTTAGTTTT (SEQ ID NO: 1058)
551	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TGGAGTATCGTGAAGGTC (SEQ ID NO: 1059)
552	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TGGAGTATTGTGAAGGTC (SEQ ID NO: 1060)
553	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTTTTTACGTTAATTAC (SEQ ID NO: 1061)
554	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTTTTTATGTTAATTAC (SEQ ID NO: 1062)
555	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GTTAATTACGGTATAGTT (SEQ ID NO: 1063)
556	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GTTAATTATGGTATAGTT (SEQ ID NO: 1064)
557	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GAAGGGTTCGTTTTTTAA (SEQ ID NO: 1065)
558	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GAAGGGTTTGTTTTTTAA (SEQ ID NO: 1066)
559	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TAATTTTTCGAGGTTTTG (SEQ ID NO: 1067)
560	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TAATTTTTTGAGGTTTTG (SEQ ID NO: 1068)
561	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	ATTAATAGCGTTTTGGTT (SEQ ID NO: 1069)
562	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	ATTAATAGTGTTTTGGTT (SEQ ID NO: 1070)
563	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GTTTAGTTCGATTATTT (SEQ ID NO: 1071)
564	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GTTTAGTTTGATTATTT (SEQ ID NO: 1072)
565	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GGTTGTTACGTTTATTT (SEQ ID NO: 1073)
566	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GGTTGTTATGTTTATTT (SEQ ID NO: 1074)
567	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TACTTCAACGTCCTAATA (SEQ ID NO: 1239)

10

20

30

40

【 0 1 3 8 】

【 表 3 - 3 2 】

番号	遺伝子	オリゴ
568	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TACTTCAACATCCTAATA (SEQ ID NO: 1240)
569	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CAATACTCCGTCCATTAA (SEQ ID NO: 1243)
570	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CAATACTCCATCCATTAA (SEQ ID NO: 1244)
571	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TAATCAACCGCAACCTCC (SEQ ID NO: 1075)
572	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TAATCAACCACAACCTCC (SEQ ID NO: 1076)
573	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CTTACCCCGTCAATCAA (SEQ ID NO: 1077)
574	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CTTACCCCATCAATCAA (SEQ ID NO: 1078)
575	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	GCTAATCTCGAAATAAAC (SEQ ID NO: 1079)
576	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	GCTAATCTCAAAATAAAC (SEQ ID NO: 1080)
577	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	TTATAGAGCGTTAGTATT (SEQ ID NO: 1081)
578	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	TTATAGAGTGTTAGTATT (SEQ ID NO: 1082)
579	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	AAGTGTAGCGTAGAAGAT (SEQ ID NO: 1083)
580	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	AAGTGTAGTG TAGAAGAT (SEQ ID NO: 1084)
581	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	AGGGGAGGCGGGGGAAGG (SEQ ID NO: 1085)
582	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	AGGGGAGGTGGGGGAAGG (SEQ ID NO: 1086)
583	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	GGGGAAGGCGGTTGAGTG (SEQ ID NO: 1087)
584	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	GGGGAAGGTGGTTGAGTG (SEQ ID NO: 1088)
585	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	GTGTTTGGCGTTTGGTTA (SEQ ID NO: 1089)
586	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	GTGTTTGGTGGTTTGGTTA (SEQ ID NO: 1090)

10

20

30

40

【 0 1 3 9 】

【 表 3 - 3 3 】

番号	遺伝子	オリゴ
587	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	TAACCTATACGAACTACAA (SEQ ID NO: 1091)
588	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	TAACCTATACAAACTACAA (SEQ ID NO: 1092)
589	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	ACCCTCCTCGCTAAACTT (SEQ ID NO: 1093)
590	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	ACCCTCCTCACTAAACTT (SEQ ID NO: 1094)
591	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	CCAAACCCCGACAACCCT (SEQ ID NO: 1095)
592	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	CCAAACCCCAACAACCCT (SEQ ID NO: 1096)
593	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	TCCCTTTCCGCTAAATAC (SEQ ID NO: 1097)
594	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	TCCCTTTCCACTAAATAC (SEQ ID NO: 1098)
595	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	TCAACTCACGTCCCTTTC (SEQ ID NO: 1099)
596	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	TCAACTCACATCCCTTTC (SEQ ID NO: 1100)
597	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1235)
598	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTTGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1236)
599	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	ATTTCCTCCGAAACTCCT (SEQ ID NO: 1237)
600	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	ATTTCCTCCAAAACCTCCT (SEQ ID NO: 1238)
601	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GATTGATTCGTATTAGGG (SEQ ID NO: 1101)
602	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GATTGATTTGTATTAGGG (SEQ ID NO: 1102)
603	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	CCCTAATACGAATCAATC (SEQ ID NO: 1103)
604	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	CCCTAATACAAATCAATC (SEQ ID NO: 1104)
605	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGATTTAGCGGATTGGTC (SEQ ID NO: 1105)

10

20

30

40

【 0 1 4 0 】

【 表 3 - 3 4 】

番号	遺伝子	オリゴ
606	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGATTTAGTGGATTGGTC (SEQ ID NO: 1106)
607	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GACCAATCCGCTAAATCC (SEQ ID NO: 1107)
608	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GACCAATCCACTAAATCC (SEQ ID NO: 1108)
609	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGATTGGTCGAGGATAGG (SEQ ID NO: 1109)
610	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGATTGGTTGAGGATAGG (SEQ ID NO: 1110)
611	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	CCTATCCTCGACCAATCC (SEQ ID NO: 1111)
612	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	CCTATCCTCAACCAATCC (SEQ ID NO: 1112)
613	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GAGGGGAACGTGAGGAGA (SEQ ID NO: 1113)
614	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GAGGGGAATGTGAGGAGA (SEQ ID NO: 1114)
615	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TCTCCTCACGTTCCCCTC (SEQ ID NO: 1115)
616	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TCTCCTCACATTCCCCTC (SEQ ID NO: 1116)
617	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TAGGTTAGCGTATTGGGA (SEQ ID NO: 1117)
618	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TAGGTTAGTGTATTGGGA (SEQ ID NO: 1118)
619	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TCCAATACGCTAACCTA (SEQ ID NO: 1119)
620	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TCCAATACACTAACCTA (SEQ ID NO: 1120)
621	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TATTGGGACGTTTGTAGTT (SEQ ID NO: 1121)
622	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	TATTGGGATGTTTGTAGTT (SEQ ID NO: 1122)
623	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AACTAAAACGTCCCAATA (SEQ ID NO: 1123)
624	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AACTAAAACATCCCAATA (SEQ ID NO: 1124)

10

20

30

40

【 0 1 4 1 】

【 表 3 - 3 5 】

番号	遺伝子	オリゴ
625	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TTGTTATTCGGTTT TAGT (SEQ ID NO: 1125)
626	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TTGTTATTTGGTTT TAGT (SEQ ID NO: 1126)
627	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGTTGGTACGGAGGTATA (SEQ ID NO: 1127)
628	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGTTGGTATGGAGGTATA (SEQ ID NO: 1128)
629	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGTATAGCGTTAGAGGG (SEQ ID NO: 1129)
630	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGTATAGTGTTAGAGGG (SEQ ID NO: 1130)
631	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGGGTTACGTGGTTT TG (SEQ ID NO: 1131)
632	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGGGTTATGTGGTTT TG (SEQ ID NO: 1132)
633	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TGTATAGTCGGATGGGGA (SEQ ID NO: 1133)
634	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TGTATAGTTGGATGGGGA (SEQ ID NO: 1134)
635	AR (SEQ ID NO: 69)	ACCTCTCTCGAAATAACA (SEQ ID NO: 1135)
636	AR (SEQ ID NO: 69)	ACCTCTCTCAAATAACA (SEQ ID NO: 1136)
637	AR (SEQ ID NO: 69)	CTCTAAAACGCAACCTCT (SEQ ID NO: 1137)
638	AR (SEQ ID NO: 69)	CTCTAAAACACAACCTCT (SEQ ID NO: 1138)
639	AR (SEQ ID NO: 69)	AACTACTACGACAACCCC (SEQ ID NO: 1139)
640	AR (SEQ ID NO: 69)	AACTACTACAACAACCCC (SEQ ID NO: 1140)
641	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTAACCTCGCTCAAAAT (SEQ ID NO: 1141)
642	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTAACCTCACTCAAAAT (SEQ ID NO: 1142)
643	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCGAATACTAC (SEQ ID NO: 1257)

10

20

30

40

【 0 1 4 2 】

【 表 3 - 3 6 】

番号	遺伝子	オリゴ
644	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCAAATACTAC (SEQ ID NO: 1258)
645	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TATGGGGTCGTAGGAATC (SEQ ID NO: 1143)
646	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TATGGGGTTGTAGGAATC (SEQ ID NO: 1144)
647	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GATTCCTACGACCCCATATA (SEQ ID NO: 1145)
648	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GATTCCTACAACCCCATATA (SEQ ID NO: 1146)
649	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGAAGGGTCGTTTAAGGG (SEQ ID NO: 1147)
650	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGAAGGGTTGTTTAAGGG (SEQ ID NO: 1148)
651	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCCTTAAACGACCCTTCC (SEQ ID NO: 1149)
652	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCCTTAAACAACCCTTCC (SEQ ID NO: 1150)
653	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGCGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1247)
654	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGTGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1248)
655	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCCGCCCTTAAA (SEQ ID NO: 1249)
656	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCCACCCTTAAA (SEQ ID NO: 1250)
657	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	AGGATTTTCGATGTAAGG (SEQ ID NO: 1151)
658	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	AGGATTTTGTGATGTAAGG (SEQ ID NO: 1152)
659	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCTTACATCGAAAATCCT (SEQ ID NO: 1153)
660	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCTTACATCAAAAATCCT (SEQ ID NO: 1154)
661	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTACGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 1231)
662	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTATGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 1232)

10

20

30

40

【 0 1 4 3 】

【 表 3 - 3 7 】

番号	遺伝子	オリゴ
663	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TCCAACCACGTAAAACCC (SEQ ID NO: 1233)
664	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TCCAACCACATAAAAACCC (SEQ ID NO: 1234)
665	Humos (SEQ ID NO: 71)	CCTTACTACGTAAACTC (SEQ ID NO: 1155)
666	Humos (SEQ ID NO: 71)	CCTTACTACATTAAACTC (SEQ ID NO: 1156)
667	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTACCACCGAACTCCAT (SEQ ID NO: 1245)
668	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTACCACCAAACCTCCAT (SEQ ID NO: 1246)
669	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACGTCCCCCTC (SEQ ID NO: 1253)
670	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACATCCCCCTC (SEQ ID NO: 1254)
671	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCAATACGACAATAAA (SEQ ID NO: 1157)
672	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCAATACAACAATAAA (SEQ ID NO: 1158)
673	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCGTTCACAAC (SEQ ID NO: 1251)
674	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCATTTCACAAC (SEQ ID NO: 1252)
675	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GTGTAGGTCGGTTTGTT (SEQ ID NO: 1159)
676	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GTGTAGGTTGGTTTGTT (SEQ ID NO: 1160)
677	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	AACCAAACCGACCTACAC (SEQ ID NO: 1161)
678	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	AACCAAACCAACCTACAC (SEQ ID NO: 1162)
679	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TTGTTATTCGGAGTTGGG (SEQ ID NO: 1163)
680	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TTGTTATTTGGAGTTGGG (SEQ ID NO: 1164)
681	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	CCCAACTCCGAATAACAA (SEQ ID NO: 1165)

10

20

30

40

【 0 1 4 4 】

【 表 3 - 3 8 】

番号	遺伝子	オリゴ
682	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	CCCAACTCCAAATAACAA (SEQ ID NO: 1166)
683	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TGGGTAAGCGGGTGGGAG (SEQ ID NO: 1167)
684	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TGGGTAAGTGGGTGGGAG (SEQ ID NO: 1168)
685	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	CTCCCACCCGCTTACCCA (SEQ ID NO: 1169)
686	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	CTCCCACCCACTTACCCA (SEQ ID NO: 1170)
687	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GAGAATAGCGAAGATAGC (SEQ ID NO: 1171)
688	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GAGAATAGTGAAGATAGC (SEQ ID NO: 1172)
689	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GCTATCTTCGCTATTCTC (SEQ ID NO: 1173)
690	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GCTATCTTCACTATTCTC (SEQ ID NO: 1174)
691	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TATTGAGTCGTTATTATC (SEQ ID NO: 1175)
692	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TATTGAGTTGTTATTATC (SEQ ID NO: 1176)
693	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GATAATAACGACTCAATA (SEQ ID NO: 1177)
694	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	GATAATAACAACACTCAATA (SEQ ID NO: 1178)
695	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	GAAGAAATCGATGTTGTT (SEQ ID NO: 1179)
696	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	GAAGAAATTGATGTTGTT (SEQ ID NO: 1180)
697	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGGTGTTACGTTTTTATA (SEQ ID NO: 1181)
698	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGGTGTTATGTTTTTATA (SEQ ID NO: 1182)
699	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTTTTATTCGGAAGGATT (SEQ ID NO: 1183)
700	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTTTTATTTGGAAGGATT (SEQ ID NO: 1184)

10

20

30

40

【 0 1 4 5 】

【 表 3 - 3 9 】

番号	遺伝子	オリゴ
701	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	GTAATAATCGAAAATGTA (SEQ ID NO: 1185)
702	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	GTAATAATTGAAAATGTA (SEQ ID NO: 1186)
703	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTAAGAGGCGAATATATA (SEQ ID NO: 1187)
704	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTAAGAGGTGAATATATA (SEQ ID NO: 1188)
705	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	ATATATAACGTTTTGGAG (SEQ ID NO: 1189)
706	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	ATATATAATGTTTTGGAG (SEQ ID NO: 1190)
707	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTTTGGAGCGTTAGAGGA (SEQ ID NO: 1191)
708	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTTTGGAGTGTTAGAGGA (SEQ ID NO: 1192)
709	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGGAGGAACGAGTTAAAA (SEQ ID NO: 1193)
710	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGGAGGAATGAGTTAAAA (SEQ ID NO: 1194)
711	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGTTAAAACGGAGTTTTT (SEQ ID NO: 1195)
712	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGTTAAAATGGAGTTTTT (SEQ ID NO: 1196)
713	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTGTTTTGCGTGATTAGA (SEQ ID NO: 1197)
714	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTGTTTTGTGTGATTAGA (SEQ ID NO: 1198)
715	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTAGATTTCGGAGTTGGA (SEQ ID NO: 1199)
716	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTAGATTTTGGAGTTGGA (SEQ ID NO: 1200)
717	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	ATTTTGTTTCGTTTAAGTA (SEQ ID NO: 1201)
718	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	ATTTTGTTTGTTTAAGTA (SEQ ID NO: 1202)
719	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AATAGTTACGGAATTTTT (SEQ ID NO: 1203)

10

20

30

40

【 0 1 4 6 】

【 表 3 - 4 0 】

番号	遺伝子	オリゴ
720	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AATAGTTATGGAATTTTT (SEQ ID NO: 1204)
721	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTTTTGTGCGTAAGGAAA (SEQ ID NO: 1205)
722	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TTTTTGTGTGTAAGGAAA (SEQ ID NO: 1206)
723	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AAGGAAAACGATTTTTTT (SEQ ID NO: 1207)
724	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AAGGAAAATGATTTTTTT (SEQ ID NO: 1208)
725	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TGAGTAATCGTTTATGAA (SEQ ID NO: 1209)
726	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	TGAGTAATTGTTTATGAA (SEQ ID NO: 1210)

10

【 0 1 4 7 】

20

表 4 : 健康体細胞及び白血病細胞の間の差別化に使用されるハイブリッド化オリゴヌクレチッド (図 3)

【 表 4 - 1 】

番号	遺伝子	オリゴ
1	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTACCACCGAACTCCAT (SEQ ID NO: 1245)
2	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTACCACCAAACCTCCAT (SEQ ID NO: 1246)
3	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTACCACCGAACTCCAT (SEQ ID NO: 1245)
4	Humos (SEQ ID NO: 71)	GTTACCACCAAACCTCCAT (SEQ ID NO: 1246)
5	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGCGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1247)
6	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGTGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1248)
7	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCCGCCCTTAAA (SEQ ID NO: 1249)
8	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCACCCCTTAAA (SEQ ID NO: 1250)

30

40

【 0 1 4 8 】

【 表 4 - 2 】

番号	遺伝子	オリゴ
9	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGCGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1247)
10	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGTGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1248)
11	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCCGCCCTTAAA (SEQ ID NO: 1249)
12	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCCACCCTTAAA (SEQ ID NO: 1250)
13	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCGTTCACAAC (SEQ ID NO: 1251)
14	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCATTCACAAC (SEQ ID NO: 1252)
15	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCGTTCACAAC (SEQ ID NO: 1251)
16	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCATTCACAAC (SEQ ID NO: 1252)
17	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACGTCCCCCTC (SEQ ID NO: 1253)
18	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACATCCCCCTC (SEQ ID NO: 1254)
19	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACGTCCCCCTC (SEQ ID NO: 1253)
20	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACATCCCCCTC (SEQ ID NO: 1254)
21	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTCGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1255)
22	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTTGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1256)
23	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCGAATACTAC (SEQ ID NO: 1257)
24	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCAAATACTAC (SEQ ID NO: 1258)
25	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTCGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1255)
26	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTTGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1256)
27	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCGAATACTAC (SEQ ID NO: 1257)

10

20

30

40

【 0 1 4 9 】

【 表 4 - 3 】

番号	遺伝子	オリゴ
28	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCAAATACTAC (SEQ ID NO: 1258)

【 0 1 5 0 】

表 3 : 急性リンパ性白血病と急性骨髄性白血病の間の差別化に使用されるハイブリッド化オリゴヌクレオチッド (図 5 及び図 6)

【 表 3 - 1 】

番号	遺伝子	オリゴ
1	N33 (SEQ ID NO: 46)	TTGGTTCGGGAAAGGTAA (SEQ ID NO: 1211)
2	N33 (SEQ ID NO: 46)	TTGGTTTGGGAAAGGTAA (SEQ ID NO: 1212)
3	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGTGGGAAGCGTATTTAT (SEQ ID NO: 1213)
4	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGTGGGAAGTGTATTTAT (SEQ ID NO: 1214)
5	N33 (SEQ ID NO: 46)	ATTAGTTCGGGGGAGGA (SEQ ID NO: 1215)
6	N33 (SEQ ID NO: 46)	ATTAGTTTGGGGGAGGA (SEQ ID NO: 1216)
7	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTATTTTCGGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1217)
8	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTATTTTGGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1218)
9	N33 (SEQ ID NO: 46)	GTTTAGTTAGCGGGTTTT (SEQ ID NO: 1219)
10	N33 (SEQ ID NO: 46)	GTTTAGTTAGTGGGTTTT (SEQ ID NO: 1220)
11	Humos (SEQ ID NO: 71)	GAGTTTAACGTAGTAAGG (SEQ ID NO: 1221)
12	Humos (SEQ ID NO: 71)	GAGTTTAATGTAGTAAGG (SEQ ID NO: 1222)
13	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TTTTATATCGGGTGTGTT (SEQ ID NO: 1223)
14	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TTTTATATTGGGTGTGTT (SEQ ID NO: 1224)

10

20

30

40

【 0 1 5 1 】

【 表 3 - 2 】

番号	遺伝子	オリゴ
15	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	TTATAGTTCGAGTTTTTT (SEQ ID NO: 1225)
16	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	TTATAGTTTGAGTTTTTT (SEQ ID NO: 1226)
17	MPL (SEQ ID NO: 42)	TGTAGTGAGTCGAGATTA (SEQ ID NO: 1227)
18	MPL (SEQ ID NO: 42)	TGTAGTGAGTTGAGATTA (SEQ ID NO: 1228)
19	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTTGGTGCGCGTAGAGAA (SEQ ID NO: 1229)
20	TP73 (SEQ ID NO: 58)	TTTGGTGTGTGTAGAGAA (SEQ ID NO: 1230)
21	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTTACGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 1231)
22	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTTATGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 1232)
23	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TCCAACCACGTAAAACCC (SEQ ID NO: 1233)
24	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TCCAACCACATAAAAACCC (SEQ ID NO: 1234)
25	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTTACGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 1231)
26	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGGTTTTATGTGGTTGGA (SEQ ID NO: 1232)
27	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TCCAACCACGTAAAACCC (SEQ ID NO: 1233)
28	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TCCAACCACATAAAAACCC (SEQ ID NO: 1234)
29	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1235)
30	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTTGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1236)
31	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	ATTTCCTCCGAAACTCCT (SEQ ID NO: 1237)
32	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	ATTTCCTCCAAAACCTCCT (SEQ ID NO: 1238)
33	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTCGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1235)

10

20

30

40

【 0 1 5 2 】

【 表 3 - 3 】

番号	遺伝子	オリゴ
34	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	AGGAGTTTTGGAGGAAAT (SEQ ID NO: 1236)
35	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	ATTTCCTCCGAAACTCCT (SEQ ID NO: 1237)
36	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	ATTTCCTCCAAACTCCT (SEQ ID NO: 1238)
37	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TACTTCAACGTCCTAATA (SEQ ID NO: 1239)
38	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TACTTCAACATCCTAATA (SEQ ID NO: 1240)
39	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TACTTCAACGTCCTAATA (SEQ ID NO: 1239)
40	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	TACTTCAACATCCTAATA (SEQ ID NO: 1240)
41	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTATTTTCGTTTTTGGG (SEQ ID NO: 1241)
42	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTATTTTGTGTTTTGGG (SEQ ID NO: 1242)
43	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTATTTTCGTTTTTGGG (SEQ ID NO: 1241)
44	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	TTTATTTTGTGTTTTGGG (SEQ ID NO: 1242)
45	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CAATACTCCGTCCATTAA (SEQ ID NO: 1243)
46	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CAATACTCCATCCATTAA (SEQ ID NO: 1244)
47	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CAATACTCCGTCCATTAA (SEQ ID NO: 1243)
48	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CAATACTCCATCCATTAA (SEQ ID NO: 1244)

10

20

30

40

50

【産業上の利用可能性】

【0153】

本発明は、急性リンパ球性白血病と急性骨髄性白血病を識別することに関連し、正常な造血細胞と増殖異常の造血細胞を識別する方法及び核酸に関する。

【図面の説明】

【0154】

図 1

ヒト因子 V I I I 遺伝子のエクソン 1 4 における二つの CpG ジヌクレオチッドのメチル化解析及び数量化。較正目的のために、一連のハイブリッド化が、因子 V I I I 遺伝子のエクソン 1 4 の合成の高メチル化及び低メチル化 DNA 断片の混合物によって行なわれた。低メチル化及び高メチル化 DNA 断片は、メチル化度を代表して、メチル化度、100%、66%、33%及び0%で、混合比0:3、1:2、2:1、3:0で混合された。図 1 A は、オリゴヌクレオチッドマイクロアレーハイブリッド化による、メチル化の検知である。因子 V I I I エクソン 1 4 オリゴヌクレオチッド F 8 ~ 5 (T T A T T A A C G G G A A A T A A T、T T A T T A A T G G G A A A T A A T) 及び F 8 ~ 3 (A A T A A G T T C G A A A T A G A A、A A T A A G T T T G A A A T A G A A) の C G 及び T G ヴァージョンの蛍光信号が示され、この信号は、メチル化度、0%、33%、66%及び100%である試料から発せられたものである。ハイブリッド化信号は、ブルー、グリーン及びイエローで示す、仮の色のイメージで、各200~800、800~2000及び2000~8000の635nmにおける蛍光信号である。

図 1 B は二つの CpG メチル化についての異なるメチル化 DNA の測定の配布及び確率である。各 CpG 位置について、二種類の検知オリゴマーが使用された。CpG がメチル化されている、オリゴマーは C G オリゴマーと呼ばれ、CpG がメチル化されていない、オリゴマーは T G オリゴマーと呼ばれる。4 種類の化合物 5 9、3 6、4 0、6 3 は同じスライドが作製された。C G 及び T G 検知オリゴマーハイブリッド化強度の対数比が計算され、次いで、各々 3 つの同じ実験を含む実験の部分群が平均された。C G : T G 比の配布函数は、異なる混合の測定値がうまく分別され、そのため、単一 CpG のメチル化レベルの検知が良好に達成されたことを示す。これはメチル化依存部類の予測または部類の発見のために前以って必須のものである。100%および0%メチル化 DNA、及び較正実験において調べられた 2 2 CpG サイトの平均化のみを考慮して、メチル化の検知エラーは 4 % である。対数比はゼロ周辺に対称的に群在せず、マイナス値へシフトする。我々は G - T 及び A - C の不適合の異なる効果が、強力に、メチル化対立遺伝子の、逆よりも容易に、非メチル化を示すオリゴヌクレオチッドへのハイブリッド化を許容していると推察する。

【 0 1 5 5 】

図 2

性別及び A L L / A M L の CpG サイト予測及び健全な血液試料

高い確率のメチル化は赤に、不確実なものは黒に、低い確率のメチル化はグリーンに対応する。図の左側のラベルは遺伝子及び識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を、各列は一群のメチル化レベルを示す。

図 2 A

性別

男性、女性間の最大有意差のある 2 0 CpG サイトが示される。唯一非細胞系が使用される。期待されるように、二つの X 染色体遺伝子由来の CpG ジヌクレオチッド (ELK1、AR)。

図 2 B

健全試料と A L L 試料間の差異

健全試料と A L L 試料間の最大有意差のある 5 4 CpG サイトが示される。高い確率のメチル化は赤に、不確実なものは黒に、低い確率のメチル化はグリーンに対応する。図の左側のラベルは遺伝子及び CpG 識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を各列は一群のメチル化レベルを示す。

図 2 C はグレイ目盛での図 2 B の複製である。高い確率のメチル化は黒に、不確実なものはグレイに、低い確率のメチル化は白に対応する。図の左側のラベルは遺伝子及び識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を、各列は一群のメチル化レベルを示す。

図 2 A の記号の説明

1 : 女性 ; 2 : 男性

図 2 B の記号の説明

1 : 健全 ; 2 : A L L

【 0 1 5 6 】

図 3

部類予測及び血液試料の部類発見

図 3 A は、訓練データとして全ての使用可能な健全及び A L L 試料を使用する、健全と A L L の判別のために最も重要な二つの C p G サイトでの訓練 S V M を示す。赤いポイントは健全試料、黄色のポイントは A L L 試料を示す。円で囲まれたポイントは、健全を予測されるグリーンエリアと A L L を予測されるブルーエリアの間の白い境界線で示されるサポートベクターである。色の濃度は予測の確度に対応する。図 3 B は、A M L と A L L の部類の予測のためのサポートベクターマシーンである。赤いポイントは A L L , 黄色のポイントは A M L である。円で囲まれたポイントは、A L L を予測されるグリーンエリアと A M L を予測されるブルーエリアの間の白い境界線で示されるサポートベクターである。色の濃度は予測の確度に対応する。図 3 C は部類の発見である。使用される全試料の階層的クラスタリングを示す。健全なものはグリーン、A L L 及び A M L 患者はブルーで示される。星印を付されたものは細胞系試料を示す。特徴スペースは二つの X 染色体遺伝子を除く全ての C p G サイトからなる。診断はアルゴリズムに対して未知である。

10

図 3 A の記号の説明 : t 試験ランキング (健全 ~ A L L)

1 : M O S C p G 5 ; 2 : C D K 4 C p G 2

20

図 3 B の記号の説明 : t 試験ランキング (A M L ~ A L L)

1 : C S N K 2 B C p G 2 ; 2 : C D K 4 C p G 1 0

【 0 1 5 7 】

図 4

図 4 A は主要な成分分析を示す。全データ集合がその最初の主要 2 成分に投影される。円は細胞系を、三角形は 1 次患者の組織を示す。黒く塗られた円または三角形は A M L 試料を、白いものは A L L 試料を示す。

図 4 B はフィッシャー基準である。フィッシャー基準によるランキング 2 0 位までの C p G サイトが示される。最高位の特徴は図の最下方にある。高確率メチル化は黒に対応し、不明確なものはグレイに、低確率は白に対応する。

30

図 4 C : 二試料 t 試験

図 4 D : 逆行消去

【 0 1 5 8 】

図 5 はフィッシャー基準の二つのベストな特徴についてのサポートベクターマシーンである。図は訓練データとして使用される全ての A L L 及び A M L 試料を使用して、フィッシャー基準に従って、二つの最高位の C p G サイトでの訓練 S V M を示す。黒いポイントは A M L を、グレイのポイントは A L L 試料である。円で囲まれたポイントは A M L 及び A L L 予測エリア間の白い境界線で限定される、サポートベクターである。バックグラウンドのグレイ値は予測確度に対応する。

図 5 の記号の説明

40

1 : C S N K 2 B C p G 2 ; 2 : C D K 4 C p G 3

【 0 1 5 9 】

図 6 は、特徴選別の性能のディメンジョン依存性である。図は多数の選別特徴に対する 4 つの異なる特徴選別法による線形 S V M の普遍化性能を示す。X 軸は対数目盛で、S V M への特徴インプット数を与え、2 から始まる。Y 軸は発揮される普遍化性能を与える。最大主成分数が使用される試料数に対応することに注意されたい。

図 6 の記号の説明

1 : 特徴数 ; 2 : 試験エラー ; 3 : フィッシャー基準 ; 4 : t 試験 ; 5 : 逆行消去 ; 6 : 主成分分析。

【 0 1 6 0 】

50

図 7

図 7 A は健全な及び急性リンパ球性白血病試料間の差異である。メチル化の高確率は赤であり、不確定は黒、低確率はグリーンである。図の左側のラベルは遺伝子及び CpG 識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を、各列は一群のメチル化レベルを示す。

図 7 B は、図 7 A で示された、急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病間の差異をグレイ目盛で再掲示した。メチル化の高確率は黒に対応し、不確定はグレイであり、低確率は白である。図の左側のラベルは遺伝子及び CpG 識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を、各列は一群のメチル化レベルを示す。

【 0 1 6 1 】

10

図 8

図 8 A は急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病試料間の差異である。メチル化の高確率は赤に対応し、不確定は黒であり、低確率はグリーンである。図の左側のラベルは遺伝子及び CpG 識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を、各列は一群のメチル化レベルを示す。

図 8 B は、図 8 A で示された、急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病間の差異をグレイ目盛で再掲示した。メチル化の高確率は赤に対応し、不確定は黒であり、低確率はグリーンである。図の左側のラベルは遺伝子及び CpG 識別名である。右側のラベルは二群の平均間の有意差を示す。各行は単一 CpG を、各列は一群のメチル

【図面の簡単な説明】

20

【 0 1 6 2 】

【図 1 A】図 1 A は、オリゴヌクレオチッドマイクロアレーハイブリッド化による、メチル化の検知結果を示す。

【図 1 B】図 1 B は、二つの CpG メチル化についての異なるメチル化 DNA の測定の配布及び確率を示す。

【図 2 A】図 2 A は男性、女性間の最大有意差のある 20 CpG サイトを示す。

【図 2 B】図 2 B は健全試料と ALL 試料間の差異を示す。

【図 2 C】図 2 C はグレイ目盛での図 2 B の複製を示す。

【図 3 A】図 3 A は、訓練データとして、全ての使用可能な健全な、及び ALL 試料を使用した、健全と ALL の判別のために最も重要な二つの CpG サイトでの訓練 SVM を示す。

30

【図 3 B】図 3 B は、AML と ALL の部類の予測のためのサポートベクターマシンを示す。

【図 3 C】図 3 C は部類の発見である。使用される全試料の階層的クラスタリングを示す。

【図 4 A】図 4 A は主要な成分分析を示す。

【図 4 B】図 4 B はフィッシャー基準を示す。

【図 4 C】図 4 C は二試料 t 試験結果を示す。

【図 4 D】図 4 D は逆行消去を示す。

【図 5】図 5 はフィッシャー基準の二つのベストな特徴についてのサポートベクターマシ

40

ンを示す。

【図 6】図 6 は、特徴選別の性能のディメンジョン依存性を示し、多数の選別特徴に対する 4 つの異なる特徴選別法による線形 SVM の普遍化性能を示す。

【図 7 A】図 7 A は健全な及び急性リンパ球性白血病試料間の差異を示す。

【図 7 B】図 7 B は、図 7 A で示された、急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病間の差異をグレイ目盛で再掲示したものを示す。

【図 8 A】図 8 A は急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病試料間の差異を示す。

【図 8 B】図 8 B は、図 8 A で示された、急性リンパ球性白血病及び急性骨髄性白血病間の差異をグレイ目盛で再掲示したものを示す。

【図 1 A】

CH3

状態
(%)

F8-5

F8-3

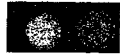
0



33



66



100

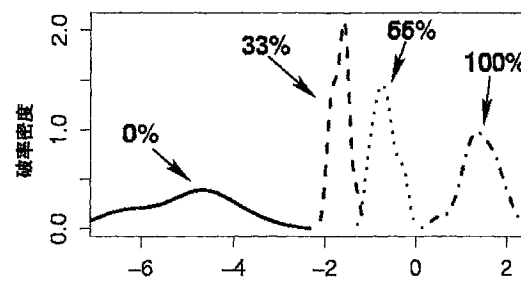


TG CG

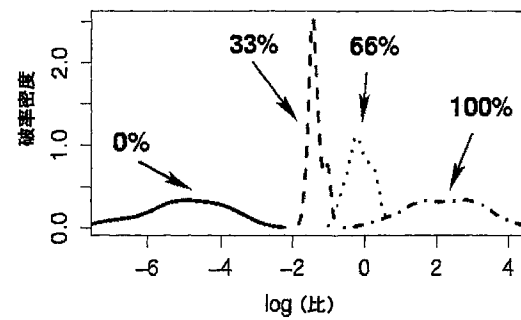
TG CG

【図 1 B】

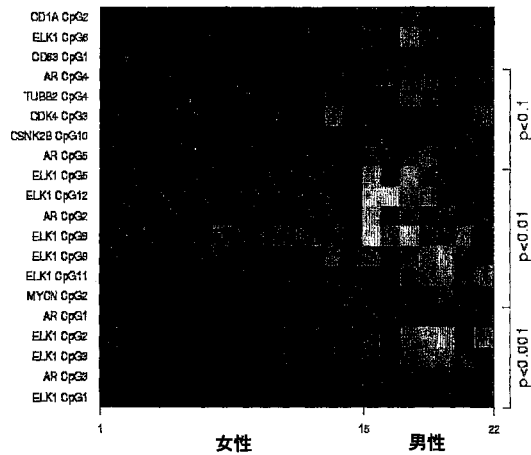
F8-3



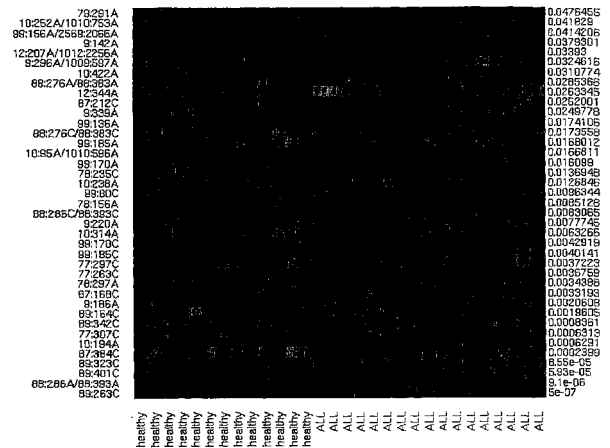
F8-5



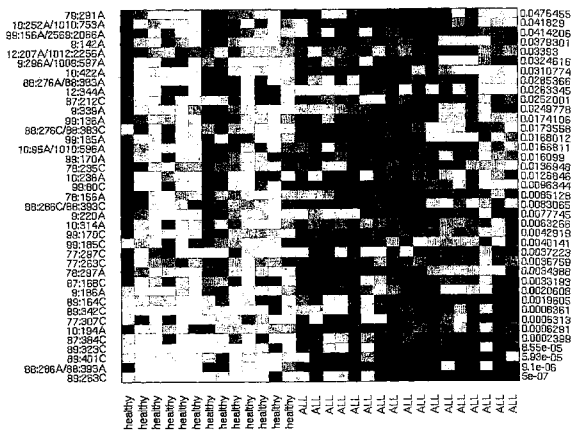
【図 2 A】



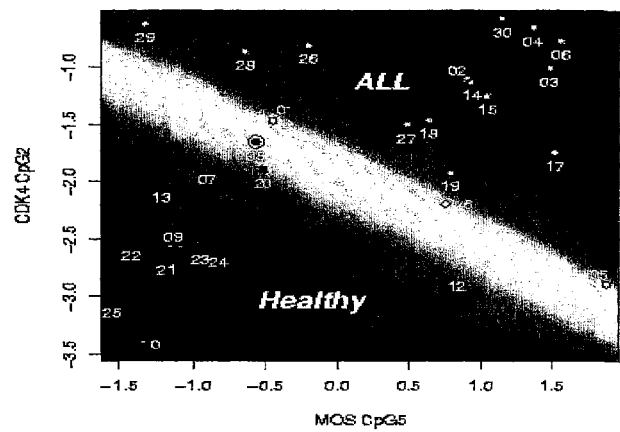
【図 2 B】



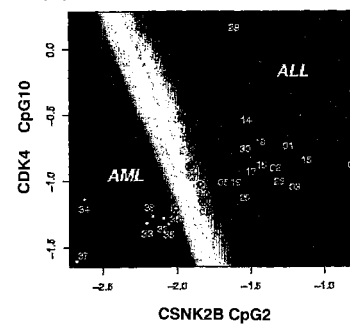
【 図 2 C 】



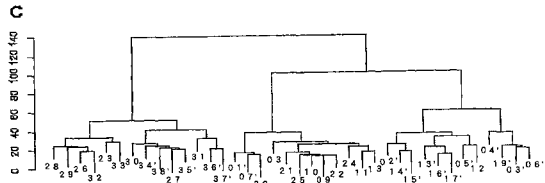
【 図 3 A 】



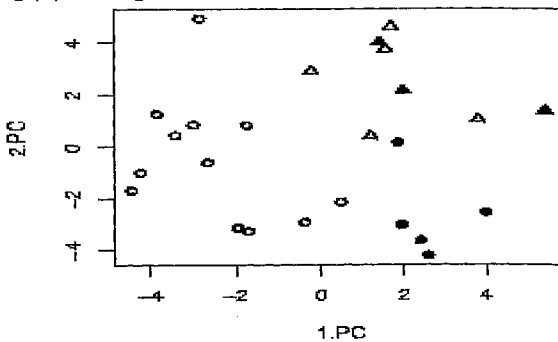
【 図 3 B 】



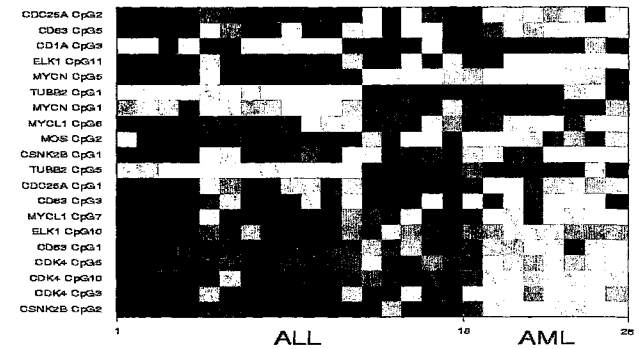
【 図 3 C 】



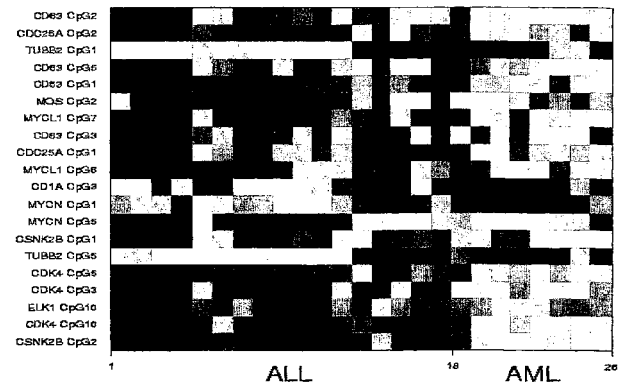
【 図 4 A 】



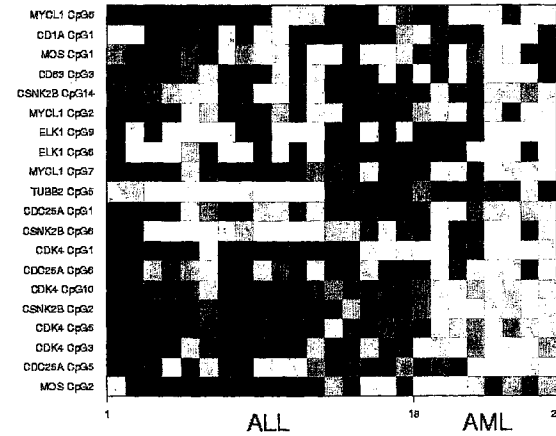
【 図 4 B 】



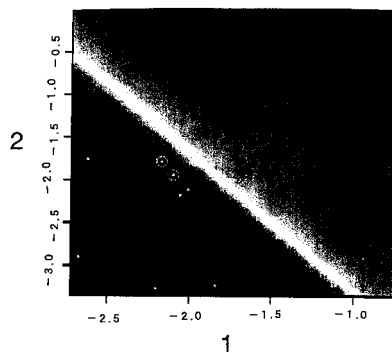
【 図 4 C 】



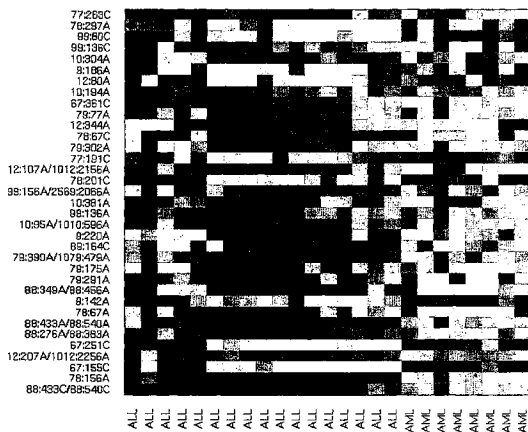
【図 4 D】



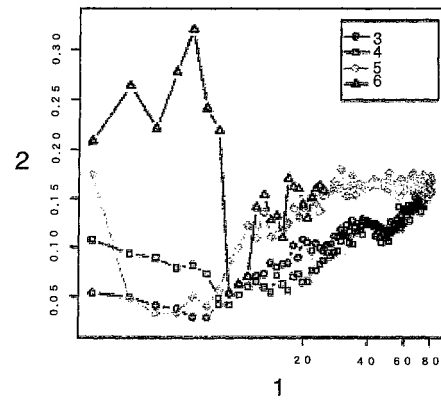
【図 5】



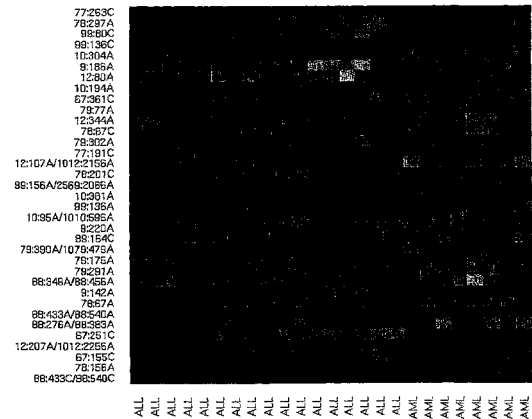
【図 7 B】



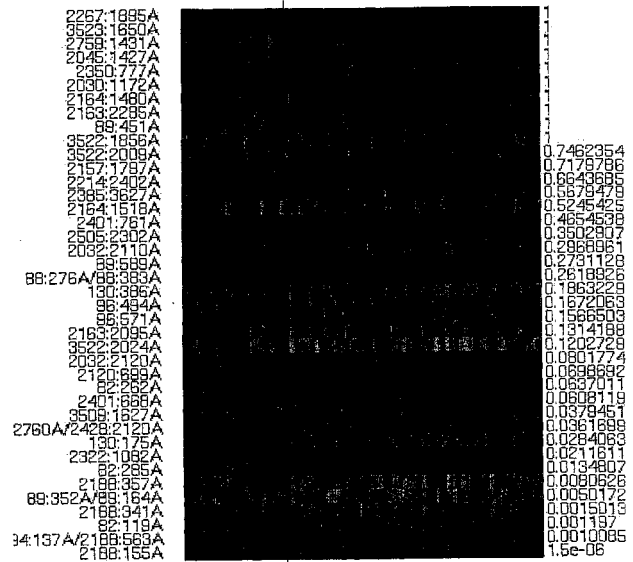
【図 6】



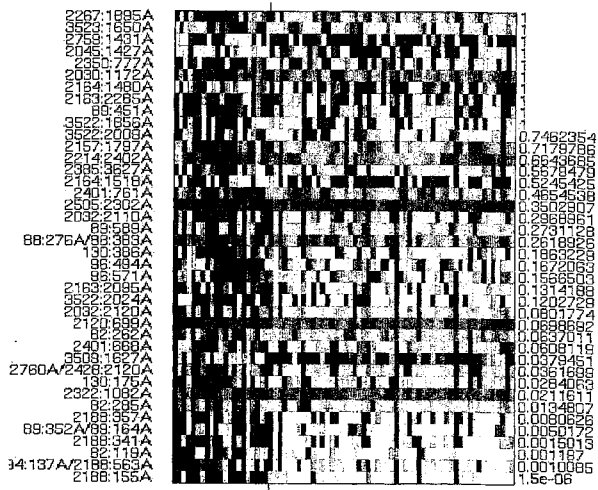
【図 7 A】



【図 8 A】



【図 8 B】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077272 A2

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/EP02/03401

(22) International Filing Date: 26 March 2002 (26.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/278,333 26 March 2001 (26.03.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkaferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE); BRAUN, Aron [CH/DE]; Christinenstrasse 24, 10119 Berlin (DE); DISTLER, Jürgen [DE/DE]; Hefewaldstrasse 2, 10825 Berlin (DE); GÜTIG, David [DE/DE]; Kastanienallee 74, 10435 Berlin (DE); HOWE, André [DE/DE]; Tivelerborger Strasse 28, 13189 Berlin (DE); MÜLLER, Jürgen [DE/DE]; Schliemannstrasse 46, 10437 Berlin (DE); OLEK, Alexander [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE); PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwartzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE); ADORJAN, Peter [DE/DE]; Danckerstrasse 4, 10437 Berlin (DE); GRABS, Gabi [DE/DE]; Senmuckstrasse 29, 12103 Berlin (DE); LESCHKE, Ralf [DE/DE]; Dänenstrasse 15, 10439 Berlin (DE); LEU, Erik [DE/DE]; Mühsamstrasse 24, 10249 Berlin (DE); LEWIN, André [DE/DE]; Wichertstrasse 52, 10439 Berlin (DE); LIPSCHER, Evelyne [DE/DE]; Brehmstrasse 13, 13187 Berlin (DE); MAIER, Sabine [DE/DE]; Markelstrasse 60,

12163 Berlin (DE); MODEL, Fabian [DE/DE]; Debenzerstrasse 73, 12683 Berlin (DE); MÜLLER, Volker [DE/DE]; Dossstrasse 13, 10247 Berlin (DE); OTTO, Thomas [DE/DE]; Walliserstrasse 11, 13407 Berlin (DE); PELET, Cécile [DE/DE]; Grosse Hamburger Strasse 1, 10115 Berlin (DE); SCHWOPE, Ina [DE/DE]; Idlandischestrasse 16, 10439 Berlin (DE); ZIEBARTH, Heike [DE/DE]; Paul-Robeson-Strasse 20, 10439 Berlin (DE).

(74) Agent: SCHUBERT, Klemens; Nene Promenade 5, 10178 Berlin (DE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, 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, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, 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).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/077272 A2

(54) Title: METHODS AND NUCLEIC ACIDS FOR THE ANALYSIS OF HEMATOPOIETIC CELL PROLIFERATIVE DISORDERS

(57) Abstract: The present invention relates to modified and genomic sequences, to oligonucleotides and/or PNA-oligomers for detecting the cytosine methylation state of genomic DNA, as well as to a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genes for use in the differentiation, diagnosis, treatment and/or monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders, or the predisposition to hematopoietic cell proliferative disorders.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

1

Methods and nucleic acids for the analysis of hematopoietic cell proliferative disordersField of the invention

Class prediction is of crucial importance for most therapeutic decisions in cancer, therefore prediction of tumour class is one of the most important problems in diagnostic oncology. Different classes and sub-classes of cancers respond differently to specific types of treatment. Vital therapeutic decisions such as which therapeutic regimen is used are therefore crucially dependent on the precise recognition of tumour class. Currently tumour classification generally depends on morphological, histopathological or immunological parameters, and single molecular markers (R. W. McKenna, *Clin Chem.* 46, 1252 (2000); F. R. Appelbaum, *Semin Hematol.* 36, 401 (1999)). However, none of the diagnostic procedures currently in use is sufficient to classify tumours correctly. Different methods have to be combined, and correct classification of a tumour depends on the experience of individual pathologists.

Recently, several groups have shown that precise determination of tumour class can be achieved by microarray-based expression analysis. Golub and coworkers screened the expression levels of almost 7000 genes, between 10 and 100 of which were then shown to be sufficient to distinguish between acute lymphoblastic leukaemia (ALL) and acute myeloid leukaemia (AML) (T. R. Golub *et al.*, *Science* 286, 531 (1999)). In a similar approach, Alizadeh and coworkers discovered yet unknown subclasses of diffuse large B-cell lymphoma with significant differences regarding response to therapy and disease outcome (A. A. Alizadeh *et al.*, *Nature* 403, 503 (2000)). Also, it was shown that global transcript analysis can predict phenotypic characteristics of malignant melanoma (M. Bittner *et al.*, *Nature* 406, 535 (2000)).

Large scale analysis using mRNA based microarrays are primarily impeded by the instability of mRNA (T. Emmert-Buck *et al.*, *Am J Pathol.* 156, 1109 (2000)). Also expression changes of only a minimum of a factor 2 can be routinely and reliably detected (R. J. Lipshutz, S. P. A Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart, *Nature Genetics* 21, 20 (1999); D. W. Selinger, K. J. Cheung, R. Mei, E. M. Johansson, C. S. Richmond, *Nature Biotechnology* 18, 1262 (2000)). Furthermore, sample preparation is complicated by the fact that expression changes occur within minutes following certain triggers. The inability to resolve the individual contributions of such influences on an expression profile, and difficulties with quantifying the gradual nature of the occurring changes complicates data analysis.

Aberrant DNA methylation within CpG islands is common in human malignancies leading to

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

2

abrogation or overexpression of a broad spectrum of genes (P. A. Jones, *Cancer Res* 65, 2463 (1996)). Abnormal methylation has also been shown to occur in CpG rich regulatory elements in intronic and coding parts of genes for certain tumours (M. F. Chan, G. Liang, P. A. Jones, *Curr Top Microbiol Immunol* 249, 75(2000)). Using restriction landmark genomic scanning, Costello and coworkers were able to show that methylation patterns are tumour-type specific (J. F. Costello *et al.*, *Nat Genet* 24, 132 (2000)). Highly characteristic DNA methylation patterns could also be shown for breast cancer cell lines (T. H.-M. Huang, M. R. Perry, D. E. Laux, *Hum Mol Genet* 8, 459 (1999)). As does large scale mRNA expression monitoring, genome wide assessment of methylation status represents a molecular fingerprint of cancer tissues and therefore should allow tumour class prediction and discovery.

Leukemia is a malignant disease that originates in a cell in the marrow, and is characterized by the uncontrolled proliferation of developing marrow cells. The majority of leukemias are classified according to the cell type from which they develop, as either myelogenous or lymphocytic. Both classes may be acute or chronic. Acute leukemia is a rapidly progressing disease that results in the accumulation of immature, functionless cells in the marrow and blood. In many cases the marrow can no longer produce sufficient quantities of normal red and white blood cells and platelets. Anemia, a deficiency of red cells, develops in virtually all leukemia patients. The lack of normal white cells impairs the body's ability to fight infections. A shortage of platelets results in bruising and easy bleeding. Chronic leukemia progresses more slowly and permits greater numbers of more mature, functional cells to be made.

Among an estimated 31,500 new cases of leukemia in the United States in 2001, about equal proportions are acute leukemia and chronic types. Most cases occur in older adults; more than half of all cases occur after age 60. Leukemia usually strikes ten times as many adults as children. Leukemia is the most common childhood cancer and acute lymphocytic leukemia (hereinafter also referred to by the abbreviation ALL) accounts for 80 percent of the childhood leukemia cases. The most common types of leukemia in adults are acute myelogenous leukemia (hereinafter also referred to by the abbreviation AML), with an estimated 10,000 new cases annually. Acute lymphocytic leukemia will account for about 3,500 cases this year.

In addition to environmental and viral causes a variety of genes involved in cellular pathways such as cell signalling, apoptosis, cell proliferation, and senescence are thought to be involved in the development of leukemia. Examples of such genes in Bcl2, ALL1,

5-methylcytosine is the most frequent covalent base modification in the DNA of eukaryotic cells. It plays a role, for example, in the regulation of the transcription, in genetic imprinting, and in tumorigenesis. Therefore, the identification of 5-methylcytosine as a component of genetic

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

3

information is of considerable interest. However, 5-methylcytosine positions cannot be identified by sequencing since 5-methylcytosine has the same base pairing behavior as cytosine. Moreover, the epigenetic information carried by 5-methylcytosine is completely lost during PCR amplification.

A relatively new and currently the most frequently used method for analyzing DNA for 5-methylcytosine is based upon the specific reaction of bisulfite with cytosine which, upon subsequent alkaline hydrolysis, is converted to uracil which corresponds to thymidine in its base pairing behavior. However, 5-methylcytosine remains unmodified under these conditions. Consequently, the original DNA is converted in such a manner that methylcytosine, which originally could not be distinguished from cytosine by its hybridization behavior, can now be detected as the only remaining cytosine using "normal" molecular biological techniques, for example, by amplification and hybridization or sequencing. All of these techniques are based on base pairing which can now be fully exploited. In terms of sensitivity, the prior art is defined by a method which encloses the DNA to be analyzed in an agarose matrix, thus preventing the diffusion and renaturation of the DNA (bisulfite only reacts with single-stranded DNA), and which replaces all precipitation and purification steps with fast dialysis (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 1996 Dec 15;24(24):5064-6). Using this method, it is possible to analyze individual cells, which illustrates the potential of the method. However, currently only individual regions of a length of up to approximately 3000 base pairs are analyzed, a global analysis of cells for thousands of possible methylation events is not possible. However, this method cannot reliably analyze very small fragments from small sample quantities either. These are lost through the matrix in spite of the diffusion protection.

An overview of the further known methods of detecting 5-methylcytosine may be gathered from the following review article: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2255.

To date, barring few exceptions (e.g., Zeschnick M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet.* 1997 Mar-Apr;5(2):94-8) the bisulfite technique is only used in research. Always, however, short, specific fragments of a known gene are amplified subsequent to a bisulfite treatment and either completely sequenced (Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 1997

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

4

Nov;17(3):275-6) or individual cytosine positions are detected by a primer extension reaction (Gonzalzo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2529-31, WO Patent 9500669) or by enzymatic digestion (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2532-4). In addition, detection by hybridization has also been described (Olek et al., WO 99 28498).

Further publications dealing with the use of the bisulfite technique for methylation detection in individual genes are: Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays.* 1994 Jun;16(6):431-6, 431; Zeschnick M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet.* 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994 Feb 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene.* 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97 46705, WO 95 15373 and WO 45560.

An overview of the Prior Art in oligomer array manufacturing can be gathered from a special edition of *Nature Genetics* (*Nature Genetics Supplement*, Volume 21, January 1999), published in January 1999, and from the literature cited therein.

Fluorescently labeled probes are often used for the scanning of immobilized DNA arrays. The simple attachment of Cy3 and Cy5 dyes to the 5'-OH of the specific probe are particularly suitable for fluorescence labels. The detection of the fluorescence of the hybridized probes may be carried out, for example via a confocal microscope. Cy3 and Cy5 dyes, besides many others, are commercially available.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF) is a very efficient development for the analysis of biomolecules (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

5

of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct 15;60(20):2299-301). An analyte is embedded in a light-absorbing matrix. The matrix is evaporated by a short laser pulse thus transporting the analyte molecule into the vapor phase in an unfragmented manner. The analyte is ionized by collisions with matrix molecules. An applied voltage accelerates the ions into a field-free flight tube. Due to their different masses, the ions are accelerated at different rates. Smaller ions reach the detector sooner than bigger ones.

MALDI-TOF spectrometry is excellently suited to the analysis of peptides and proteins. The analysis of nucleic acids is somewhat more difficult (Gut I G, Beck S. DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Current Innovations and Future Trends. 1995, 1; 147-57). The sensitivity to nucleic acids is approximately 100 times worse than to peptides and decreases disproportionally with increasing fragment size. For nucleic acids having a multiply negatively charged backbone, the ionization process via the matrix is considerably less efficient. In MALDI-TOF spectrometry, the selection of the matrix plays an eminently important role. For the desorption of peptides, several very efficient matrixes have been found which produce a very fine crystallization. There are now several responsive matrixes for DNA, however, the difference in sensitivity has not been reduced. The difference in sensitivity can be reduced by chemically modifying the DNA in such a manner that it becomes more similar to a peptide. Phosphorothioate nucleic acids in which the usual phosphates of the backbone are substituted with thiophosphates can be converted into a charge-neutral DNA using simple alkylation chemistry (Gut IG, Beck S. A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 1995 Apr 25;23(8):1367-73). The coupling of a charge tag to this modified DNA results in an increase in sensitivity to the same level as that found for peptides. A further advantage of charge tagging is the increased stability of the analysis against impurities which make the detection of unmodified substrates considerably more difficult.

Genomic DNA is obtained from DNA of cell, tissue or other test samples using standard methods. This standard methodology is found in references such as Fritsch and Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

The method according to the invention presents a novel microarray-based assay which is suited for methylation analysis of very large numbers of genes and CpG dinucleotides in parallel. Samples

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

6

obtained from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) or acute myeloid leukemia (AML)
can be classified based solely on DNA methylation patterns.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

7

Description

The invention provide a method for the analysis of biological samples for features associated with the development of hematopoietic cell proliferative disorders , characterised in that the nucleic acid of at least one member of the group comprising the genes: ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARHI, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2 , CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIIb beta, GPR37, GSK3 β , GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFBR2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3 is/are contacted with a reagent or series of reagents capable of distinguishing between methylated and non methylated CpG dinucleotides within the genomic sequence of interest.

The present invention makes available a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genomic DNA. The method is for use in the improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders, more specifically by enabling the improved identification of and differentiation between subclasses of said disorder and the genetic predisposition to said disorders. The invention presents improvements over the state of the art in that it enables a highly specific classification of hematopoietic cell proliferative disorders, thereby allowing for improved and informed treatment of patients.

In a particularly preferred embodiment the present invention makes available methods and nucleic acids that allow the differentiation between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia.

Furthermore, the method enables the analysis of cytosine methylations and single nucleotide polymorphisms.

In a preferred embodiment, the method comprises the following steps:

In the first step of the method the genomic DNA sample must be isolated from sources such as cell lines or blood samples. Extraction may be by means that are standard to one skilled in the art, these include the use of detergent lysates, sonification and vortexing with glass beads. Once the nucleic acids have been extracted the genomic double stranded DNA is used in the analysis.

In a preferred embodiment the DNA may be cleaved prior to the next step of the method, this may be by any means standard in the state of the art, in particular, but not limited to, with restriction

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

8

endonucleases.

In the second step of the method, the genomic DNA sample is treated in such a manner that cytosine bases which are unmethylated at the 5'-position are converted to uracil, thymine, or another base which is dissimilar to cytosine in terms of hybridization behaviour. This will be understood as 'pretreatment' hereinafter.

The above described treatment of genomic DNA is preferably carried out with bisulfite (sulfite, disulfite) and subsequent alkaline hydrolysis which results in a conversion of non-methylated cytosine nucleobases to uracil or to another base which is dissimilar to cytosine in terms of base pairing behaviour. If bisulfite solution is used for the reaction, then an addition takes place at the non-methylated cytosine bases. Moreover, a denaturing reagent or solvent as well as a radical interceptor must be present. A subsequent alkaline hydrolysis then gives rise to the conversion of non-methylated cytosine nucleobases to uracil. The chemically converted DNA is then used for the detection of methylated cytosines.

Fragments of the pretreated DNA are amplified, using sets of primer oligonucleotides according to SEQ ID NO:387 to SEQ ID NO: 534, and a, preferably heat-stable, polymerase. Because of statistical and practical considerations, preferably more than ten different fragments having a length of 100 - 2000 base pairs are amplified. The amplification of several DNA segments can be carried out simultaneously in one and the same reaction vessel. Usually, the amplification is carried out by means of a polymerase chain reaction (PCR).

The method may also be enabled by the use of alternative primers, the design of such primers is obvious to one skilled in the art. These should include at least two oligonucleotides whose sequences are each reverse complementary or identical to an at least 18 base-pair long segment of the base sequences specified in the appendix (SEQ ID NO:95 through SEQ ID NO: 386). Said primer oligonucleotides are preferably characterized in that they do not contain any CpG dinucleotides. In a particularly preferred embodiment of the method, the sequence of said primer oligonucleotides are designed so as to selectively anneal to and amplify, only the hematopoietic cell specific DNA of interest, thereby minimizing the amplification of background or non relevant DNA. In the context of the present invention, background DNA is taken to mean genomic DNA which does not have a relevant tissue specific methylation pattern, in this case, the relevant tissue being

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

9

hematopoietic cells, both healthy and diseased.

According to the present invention, it is preferred that at least one primer oligonucleotide is bound to a solid phase during amplification. The different oligonucleotide and/or PNA-oligomer sequences can be arranged on a plane solid phase in the form of a rectangular or hexagonal lattice, the solid phase surface preferably being composed of silicon, glass, polystyrene, aluminum, steel, iron, copper, nickel, silver, or gold, it being possible for other materials such as nitrocellulose or plastics to be used as well.

The fragments obtained by means of the amplification can carry a directly or indirectly detectable label. Preferred are labels in the form of fluorescence labels, radionuclides, or detachable molecule fragments having a typical mass which can be detected in a mass spectrometer, it being preferred that the fragments that are produced have a single positive or negative net charge for better detectability in the mass spectrometer. The detection may be carried out and visualized by means of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) or using electron spray mass spectrometry (ESI).

The amplicates obtained in the second step of the method are subsequently hybridized to an array or a set of oligonucleotides and/or PNA probes. In this context, the hybridization takes place in the manner described as follows. The set of probes used during the hybridization is preferably composed of at least 10 oligonucleotides or PNA-oligomers. In the process, the amplicates serve as probes which hybridize to oligonucleotides previously bonded to a solid phase. In a particularly preferred embodiment, the oligonucleotides are taken from the group comprising SEQ ID NO: 535 to SEQ ID NO: 1258. In a further preferred embodiment as described in the examples, the oligonucleotides are taken from the group comprising SEQ ID NO: 1211 to SEQ ID NO: 1258. The non-hybridized fragments are subsequently removed. Said oligonucleotides contain at least one base sequence having a length of 10 nucleotides which is reverse complementary or identical to a segment of the base sequences specified in the appendix, the segment containing at least one CpG or TpG dinucleotide. In a further preferred embodiment the cytosine of the CpG dinucleotide, or in the case of TpG, the thiamine, is the 5th to 9th nucleotide from the 5'-end of the 10-mer. One oligonucleotide exists for each CpG or TpG dinucleotide.

In the fifth step of the method, the non-hybridized amplicates are removed.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

10

In the final step of the method, the hybridized amplicates are detected. In this context, it is preferred that labels attached to the amplicates are identifiable at each position of the solid phase at which an oligonucleotide sequence is located.

According to the present invention, it is preferred that the labels of the amplicates are fluorescence labels, radionuclides, or detachable molecule fragments having a typical mass which can be detected in a mass spectrometer. The mass spectrometer is preferred for the detection of the amplicates, fragments of the amplicates or of probes which are complementary to the amplicates, it being possible for the detection to be carried out and visualized by means of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) or using electron spray mass spectrometry (ESI). The produced fragments may have a single positive or negative net charge for better detectability in the mass spectrometer.

The aforementioned method is preferably used for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters of genomic DNA.

In order to enable this method, the invention further provides the modified DNA of genes ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARH1, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2, CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIb beta, GPR37, GSK3B, GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFB2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3 as well as oligonucleotides and/or PNA-oligomers for detecting cytosine methylations within said genes. The present invention is based on the discovery that genetic and epigenetic parameters and, in particular, the cytosine methylation patterns of genomic DNA are particularly suitable for improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders. Furthermore, the invention enables the differentiation between different subclasses of hematopoietic cell proliferative disorders or detection of a predisposition to hematopoietic cell proliferative disorders.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

11

The nucleic acids according to the present invention can be used for the analysis of genetic and/or epigenetic parameters of genomic DNA.

This objective is achieved according to the present invention using a nucleic acid containing a sequence of at least 18 bases in length of the pretreated genomic DNA according to one of SEQ ID NO: 95 through SEQ ID NO: 386 and sequences complementary thereto.

The modified nucleic acid could heretofore not be connected with the ascertainment of disease relevant genetic and epigenetic parameters.

The object of the present invention is further achieved by an oligonucleotide or oligomer for the analysis of pretreated DNA, for detecting the genomic cytosine methylation state, said oligonucleotide containing at least one base sequence having a length of at least 10 nucleotides which hybridizes to a pretreated genomic DNA according to SEQ ID NO: 95 through SEQ ID NO: 386. The oligomer probes according to the present invention constitute important and effective tools which, for the first time, make it possible to ascertain specific genetic and epigenetic parameters during the analysis of biological samples for features associated with the development of hematopoietic cell proliferative disorders. Said oligonucleotides allow the improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders and detection of the predisposition to said disorders. Furthermore, they allow the differentiation of different subclasses of hematopoietic carcinomas. The base sequence of the oligomers preferably contains at least one CpG or TpG dinucleotide. The probes may also exist in the form of a PNA (peptide nucleic acid) which has particularly preferred pairing properties. Particularly preferred are oligonucleotides according to the present invention in which the cytosine of the CpG dinucleotide is the 5th - 9th nucleotide from the 5'-end of the 13-mer; in the case of PNA-oligomers, it is preferred for the cytosine of the CpG dinucleotide to be the 4th - 6th nucleotide from the 5'-end of the 9-mer.

The oligomers according to the present invention are normally used in so called "sets" which contain at least one oligomer for each of the CpG dinucleotides within SEQ ID NO: 95 through SEQ ID NO: 386. Preferred is a set which contains at least one oligomer for each of the CpG dinucleotides, from SEQ ID NO: 535 through SEQ ID NO: 1258. Further preferred is a set comprising SEQ ID NO: 1211 to SEQ ID NO: 1258.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

12

In the case of the sets of oligonucleotides according to the present invention, it is preferred that at least one oligonucleotide is bound to a solid phase. It is further preferred that all the oligonucleotides of one set are bound to a solid phase.

The present invention moreover relates to a set of at least 10 n (oligonucleotides and/or PNA-oligomers) used for detecting the cytosine methylation state of genomic DNA using treated versions of said genomic DNA (according to SEQ ID NO: 95 through SEQ ID NO: 386 and sequences complementary thereto). These probes enable improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders. In particular they enable the differentiation between different sub classes of hematopoietic cell proliferative disorders and the detection of a predisposition to said disorders. In a particularly preferred embodiment the set comprises SEQ ID NO: 74 to SEQ ID NO: 1258.

The set of oligomers may also be used for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) using pretreated genomic DNA according to one of SEQ ID NO: 95 through SEQ ID NO: 386.

According to the present invention, it is preferred that an arrangement of different oligonucleotides and/or PNA-oligomers (a so-called "array") made available by the present invention is present in a manner that it is likewise bound to a solid phase. This array of different oligonucleotide- and/or PNA-oligomer sequences can be characterized in that it is arranged on the solid phase in the form of a rectangular or hexagonal lattice. The solid phase surface is preferably composed of silicon, glass, polystyrene, aluminum, steel, iron, copper, nickel, silver, or gold. However, nitrocellulose as well as plastics such as nylon which can exist in the form of pellets or also as resin matrices are suitable alternatives.

Therefore, a further subject matter of the present invention is a method for manufacturing an array fixed to a carrier material for the improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders, the differentiation between different subclasses of hematopoietic carcinomas and/or detection of the predisposition to hematopoietic cell proliferative disorders. In said method at least one oligomer according to the present invention is coupled to a solid phase. Methods for manufacturing such arrays are known, for example, from US Patent 5,744,305 by

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

13

means of solid-phase chemistry and photolabile protecting groups.

A further subject matter of the present invention relates to a DNA chip for the improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders. Furthermore the DNA chip enables detection of the predisposition to hematopoietic cell proliferative disorders and the differentiation between different subclasses of hematopoietic carcinomas. The DNA chip contains at least one nucleic acid according to the present invention. DNA chips are known, for example, in US Patent 5,837,832.

Moreover, a subject matter of the present invention is a kit which may be composed, for example, of a bisulfite-containing reagent, a set of primer oligonucleotides containing at least two oligonucleotides whose sequences in each case correspond to or are complementary to a 18 base long segment of the base sequences specified in the appendix (SEQ ID NO: 95 through SEQ ID NO: 386), oligonucleotides and/or PNA-oligomers as well as instructions for carrying out and evaluating the described method. However, a kit along the lines of the present invention can also contain only part of the aforementioned components.

The oligomers according to the present invention or arrays thereof as well as a kit according to the present invention are intended to be used for the improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders. Furthermore the use of said inventions extends to the differentiation between different subclasses of hematopoietic carcinomas and detection of the predisposition to hematopoietic cell proliferative disorders. According to the present invention, the method is preferably used for the analysis of important genetic and/or epigenetic parameters within genomic DNA, in particular for use in improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders, detection of the predisposition to said disorders and the differentiation between subclasses of said disorders.

The methods according to the present invention are used, for example, for improved diagnosis, treatment and monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders progression, detection of the predisposition to said disorders and the differentiation between subclasses of said disorders.

A further embodiment of the invention is a method for the analysis of the methylation status of genomic DNA without the need for pretreatment. In the first step of the method the genomic DNA

sample must be isolated from tissue or cellular sources. Such sources may include cell lines, histological slides, body fluids, or tissue embedded in paraffin. Extraction may be by means that are standard to one skilled in the art, these include the use of detergent lysates, sonification and vortexing with glass beads. Once the nucleic acids have been extracted the genomic double stranded DNA is used in the analysis.

In a preferred embodiment the DNA may be cleaved prior to the treatment, this may be any means standard in the state of the art, in particular with restriction endonucleases. In the second step, the DNA is then digested with one or more methylation sensitive restriction enzymes. The digestion is carried out such that hydrolysis of the DNA at the restriction site is informative of the methylation status of a specific CpG dinucleotide.

In the third step the restriction fragments are amplified. In a preferred embodiment this is carried out using a polymerase chain reaction.

In the final step the amplicates are detected. The detection may be by any means standard in the art, for example, but not limited to, gel electrophoresis analysis, hybridisation analysis, incorporation of detectable tags within the PCR products, DNA array analysis, MALDI or ESI analysis.

The analysis of the methylation status of CpG positions using either of the molecular biological techniques described above in multiple patient samples generates a large set of data points which are then analysed using the following techniques in order to define CpG marker positions for a particular phenotypic class, in particular by using supervised machine learning techniques.

The problem of class prediction was addressed by using a supervised machine learning method called support vector machine (SVM) (V. Vapnik, *Statistical Learning Theory* (Wiley, New York 1998); N. Cristianini, J. Shawe-Taylor, *An Introduction to Support Vector Machines* (Cambridge University Press, Cambridge 2000)), which has already been successfully applied to the analysis of microarray gene expression data (M. P. Brown *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 262(2000); T. Gaasterland, S. Bekiranov, *Nature Genetics* 24, 204(2000)). The SVM constructs an optimal discriminant between two classes of given training samples. In this case each sample is described by the methylation patterns (CG/TG ratios) at the investigated CpG sites. A supervised learning technique, such as SVM, has the advantage that it exploits the prior knowledge represented by data labels. Furthermore, SVMs are capable to account for highly non-linear interdependencies between individual dimensions (in this case CpG sites) and still avoid overfitting the data (V. Vapnik, *Statistical Learning Theory* (Wiley, New York 1998)).

In order to quantify the contribution of single CpG sites to the prediction of classes, we initially ranked all CpG sites according to their discriminatory power for the investigated sample classes using a two sample t-test. Then the SVM was trained using an increasing number of CpG sites in the order of their ranking. The number of CpG sites where the prediction error is minimized depends on which particular classes are to be separated from each other. This is explained by the fact that, on the one hand, the exclusion of certain CpG positions from the analysis potentially leads to a loss of information. On the other hand, as suggested by statistical learning theory (*V. Vapnik, Statistical Learning Theory (Wiley, New York 1998)*), for a limited number of samples the reliability of the class-predictor generally increases with decreasing number of free parameters, in our case number of CpG sites. The inherent, task-specific complexity of the classification problem determines where these two counteracting effects are balanced and class prediction achieves its optimal performance. This suggests, that a proper feature selection in genome-wide analyses not only improves class prediction *J. Weston et al., in Advances in neural information processing systems* (MIT Press, Cambridge, MA 2001), but also provides information about the complexity of the problem.

The present invention moreover relates to the diagnosis and/or prognosis of events which are disadvantageous or relevant to patients or individuals in which important genetic and/or epigenetic parameters within genomic DNA, said parameters obtained by means of the present invention may be compared to another set of genetic and/or epigenetic parameters, the differences serving as the basis for the diagnosis and/or prognosis of events which are disadvantageous or relevant to patients or individuals.

In the context of the present invention the term "hybridization" is to be understood as a bond of an oligonucleotide to a completely complementary sequence along the lines of the Watson-Crick base pairings in the sample DNA, forming a duplex structure.

In the context of the present invention, "genetic parameters" are mutations and polymorphisms of genomic DNA and sequences further required for their regulation. To be designated as mutations

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

16

are, in particular, insertions, deletions, point mutations, inversions and polymorphisms and, particularly preferred, SNPs (single nucleotide polymorphisms).

In the context of the present invention, "epigenetic parameters" are, in particular, cytosine methylations and further modifications of DNA bases of genomic DNA and sequences further required for their regulation. Further epigenetic parameters include, for example, the acetylation of histones which, cannot be directly analyzed using the described method but which, in turn, correlates with the DNA methylation.

In the following, the present invention will be explained in greater detail on the basis of the sequences and examples without being limited thereto.

SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 73 represent 5' and/or regulatory regions of the genomic DNA of genes: ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARH1, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2, CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIb beta, GPR37, GSK3B, GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFBR2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3. These sequences are derived from Genbank and will be taken to include all minor variations of the sequence material which are currently unforeseen, for example, but not limited to, minor deletions and SNPs.

SEQ ID NO: 95 to SEQ ID NO: 386 exhibit the pretreated sequence of DNA derived from genes: ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARH1, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2, CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIb beta, GPR37, GSK3B, GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFBR2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3. These sequences will be taken to include all minor variations of the sequence material which are currently unforeseen, for example, but not limited to, minor deletions and SNPs.

SEQ ID NO: 387 to SEQ ID NO: 534 exhibit the sequence of primer oligonucleotides for the amplification of pretreated DNA according to SEQ ID NO: 95 to SEQ ID NO: 386.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

17

SEQ ID NO: [IDOLIGOFIRST] to SEQ ID NO: 1258 exhibit the sequence of oligomers which are useful for the analysis of CpG positions within genomic DNA according to SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 73.

SEQ ID NO: 1211 to SEQ ID NO: 1258 exhibit the sequence of oligomers which are useful for the analysis of CpG positions within genomic DNA according to SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 73.

Examples 1 and 2: Digital Phenotype

In the following examples, multiplex PCR was carried out on samples from patients with acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia. Each sample was treated in the manner described below in Example 1 in order to deduce the methylation status of CpG positions, the CpG methylation information for each sample was collated and then used in an analysis, as detailed in Example 2. An alternative method for the analysis of CpG methylation status is further described in Example 3.

Example 1

A total of 17 ALL samples and 8 AML samples were included. T- and B-cells from 8 healthy donors, MACS-sorted with anti-CD4 and anti-CD19 antibodies, respectively, served as controls. 11 genes were randomly selected from a panel of genes representing different pathways associated with tumourigenesis. Two of the 11 selected genes are located on the X-chromosome. A total of 81 CpG dinucleotides located in CpG rich regions of the promoters, intronic and coding sequences of these genes were evaluated for methylation status.

In order to allow sequence specific distinction of the methylated from the unmethylated state of CpG dinucleotides by hybridisation analysis, total DNA from all samples was bisulphite treated converting all unmethylated cytosines to uracil whereas methylated cytosines were conserved (M. Frommer *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1827 (1992)). Regions of interest were then amplified by PCR using fluorescently labelled primers converting originally unmethylated CpG dinucleotides to TG and conserving originally methylated CpG sites. Primers were designed complementary to DNA segments containing no CpG dinucleotides. This allowed unbiased amplification of both methylated and unmethylated alleles in one reaction. All PCR products performed on an individual sample were mixed and hybridised to glass slides carrying for each CpG position a pair of immobilised oligonucleotides. Each of these detection oligonucleotides was designed to hybridise to the bisulphite converted sequence around one CpG site which was either originally unmethylated (TG) or methylated (CG). Hybridisation conditions were selected to allow the detection of the single nucleotide differences between the TG and CG variants. Ratios for the two signals were calculated based on comparison of intensity of the fluorescent signals. Sensitivity for detection of methylation changes was determined using artificially up- and downmethylated DNA fragments mixed at different ratios. For each of those mixtures, a series of experiments was conducted to define the range of CG/TG ratios that corresponds to varying degrees of methylation at each of the

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

19

CpG sites tested.

In the first step the genomic DNA was isolated from the cell samples using the Wizzard kit from (Promega).

The isolated genomic DNA from the samples are treated using a bisulfite solution (hydrogen sulfite, disulfite). The treatment is such that all non methylated cytosines within the sample are converted to thiamidine, conversely 5-methylated cytosines within the sample remain unmodified. Bisulphite treatment of genomic DNA was done with minor modifications as described by A. Olek, J. Oswald, J. Walter, *Nucleic Acid Res.* 24, 5064 (1996). Genomic DNA was digested with *MssI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) prior to the modification by bisulphite.

The treated nucleic acids were then amplified using multiplex PCRs, amplifying 8 fragments per reaction with Cy5 fluorescently labelled primers. PCR primers used are described in Table 1. PCR conditions were as follows.

For the PCR amplification of the bisulphite treated sense strand of the genes used for class prediction and discovery the primers were designed according to the guidelines of Clark and Frommer (S. J. Clark, M. Frommer, in *Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*, G. R. Taylor ed. (CRC Press, Boca Raton 1997)). CpG sites from the following genes were analysed: ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARH1, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2, CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIb beta, GPR37, GSK3B, GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFBR2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3.

10 ng DNA was used as template DNA for the PCR reactions. The template DNA, 12.5 pmol or 40 pmol (CY5-labelled) of each primer, 0.5-2 U *Taq* polymerase (HotStarTaq, Qiagen, Hilden, Germany) and 1 mM dNTPs were incubated with the reaction buffer supplied with the enzyme in a total volume of 20 µl. After activation of the enzyme (15 min, 96 °C) the incubation times and temperatures were 95°C for 1 min followed by 34 cycles (95°C for 1 min, annealing temperature (see Supplementary information) for 45 sec, 72°C for 75 sec) and 72°C for 10 min.

See Table 2 for further details of PCR products.

All PCR products from each individual sample were then hybridised to glass slides carrying a pair

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

20

of immobilised oligonucleotides for each CpG position under analysis. Each of these detection oligonucleotides was designed to hybridise to the bisulphite converted sequence around one CpG site which was either originally unmethylated (TG) or methylated (CG). See Table 3 for further details of all hybridisation oligonucleotides used (both informative and non-informative). Hybridisation conditions were selected to allow the detection of the single nucleotide differences between the TG and CG variants.

Oligonucleotides with a C6-amino modification at the 5' end were spotted with 4-fold redundancy on activated glass slides (T. R. Golub *et al.*, *Science* 286, 531 (1999)). For each analysed CpG position two oligonucleotides $N_{(2-16)}\text{-CG-}N_{(2-16)}$ and $N_{(2-16)}\text{-TG-}N_{(2-16)}$, reflecting the methylated and non methylated status of the CpG dinucleotides, were spotted and immobilised on the glass array. The oligonucleotide microarrays representing 81 CpG sites were hybridised with a combination of up to 11 Cy5-labelled PCR fragments as described earlier (D. Chen, Z. Yan, D. L. Cole, G. S. Srivatsa, *Nucleic Acid Res* 27, 389 (1999)). Subsequently, the fluorescent images of the hybridised slides were obtained using a GenePix 4000 microarray scanner (Axon Instruments). Hybridisation experiments were repeated at least three times for each sample.

The sensitivity of the method for detection of methylation changes was determined using artificially up- and downmethylated DNA fragments mixed at different ratios. For each of those mixtures, a series of experiments was conducted to define the range of CG/TG ratios that corresponds to varying degrees of methylation at each of the CpG sites tested. In Fig. 1B results for two CpG positions located in exon 14 of the human factor VIII gene are shown as examples. For the mixtures of 3:0, 2:1, 1:2 and 0:3 the degree of methylation of the individual CpG sites could safely be distinguished.

To verify the detection of methylation changes in the real data set two X-chromosomal genes were included in the gene set. Because one of the two X-chromosomes in females becomes inactivated by methylation we can expect a higher degree of methylation of X-chromosomal genes in females compared to males. In Fig. 2A CpGs are ranked according to the significance of the difference between male and female methylation levels. As expected, the X-chromosomal genes (ELK1, AR) show a significantly higher methylation for females. This clearly demonstrates that the method really detects changes in methylation.

Statistical Analysis

Support Vector Machines

In our case, the task of cancer classification consists of constructing a machine that can predict the leukemia subtype (ALL or AML) from a patients methylation pattern. For every patient sample this pattern is given as a vector of average (Every hybridisation experiment was at least 3 times repeated and the results averaged.) log CG/TG ratios at 81 CpG positions. Based on a given set of training examples $X = \{x^i : x^i \in \mathbb{R}^n\}$ with known diagnosis $Y = \{y^i : y^i \in \{\text{ALL}, \text{AML}\}\}$ a discriminant function $f : \mathbb{R}^n \rightarrow \{\text{ALL}, \text{AML}\}$, where n is the number of CpGs, has to be learned. The number of misclassifications of f on the training set $\{X, Y\}$ is called training error and is usually minimised by the learning machine during the training phase. However, what is of practical interest is the capability to predict the class of previously unseen samples, the so called generalisation performance of the learning machine. This performance is usually estimated by the test error, which is the number of misclassifications on an independent test set $\{X', Y'\}$.

The major problem of training a learning machine with good generalisation performance is to find a discriminant function f which on the one hand is complex enough to capture the essential properties of the data distribution, but which on the other hand avoids over-fitting the data. The Support Vector Machine (SVM) tries to solve this problem by constructing a linear discriminant that separates the training data and maximises the distance to the nearest points of the training set. This maximum margin separating hyperplane minimises the ratio between the radius of the minimum enclosing sphere of the training set and the margin between hyperplane and training points. This corresponds to minimising the so called radius margin bound on the expected probability of a test error and promises good generalisation performance (Vapnik V. "Statistical Learning Theory." Wiley, New York (1998)).

Of course there are more complex classification problems, where the dependence between class labels y^i and features x^i is not linear and the training set can not be separated by a hyperplane. In order to allow for non-linear discriminant functions the input space can be non-linearly mapped into a potentially higher dimensional feature space by a mapping function $F : x^i \mapsto F(x^i)$. Because the SVM algorithm in its dual formulation uses only the inner product between elements of the input

space, the knowledge of the kernel function $K(x^i, x^j) = \langle F(x^i) \cdot F(x^j) \rangle$ is sufficient to train the SVM. It is not necessary to explicitly know the mapping F and a non-linear SVM can be trained efficiently by computing only the kernel function. Here we will only use the linear kernel $K(x^i, x^j) = \langle x^i \cdot x^j \rangle$

and the quadratic kernel $K(x^i, x^j) = (\langle x^i \cdot x^j \rangle + 1)^2$. In the next section we will compare SVMs trained on different feature sets. In order to evaluate the prediction performance of these SVMs we used a cross-validation method (Bishop, C.M. „Neural networks for pattern recognition.“ Oxford University Press, New York (1995)). For each classification task, the samples were partitioned into 8 groups of approximately equal size. Then the SVM predicted the class for the test samples in one group after it had been trained using the 7 other groups. The number of misclassifications was counted over 8 runs of the SVM algorithm for all possible choices of the test group. To obtain a reliable estimate for the test error the number of misclassifications were averaged over 50 different partitionings of the samples into 8 groups.

Feature Selection

The simplest way for applying a SVM to our methylation data is to use every CpG position as a separate dimension, not making any assumption about the interdependence of CpG sites from the same gene. On the leukemia subclassification task the SVM with linear kernel trained on this 81 dimensional input space had an average test error of 16%. Using a quadratic kernel did not significantly improve the results.

An obvious explanation for this relatively poor performance is that we have only 25 data points (even less in the training set) in a 81 dimensional space. Finding a separating hyperplane under these conditions is a heavily under-determined problem. And as it turns out, the SVM technique of maximising the margin is not sufficient to find the solution with optimal generalisation properties. It is necessary to reduce the dimensionality of the input space while retaining the relevant information for classification. This should be possible because it can be expected that only a minority of CpG positions has any connection with the two subtypes of leukemia.

Principle Component Analysis

The probably most popular method for dimension reduction is principle component analysis (PCA) (Bishop, C.M. „Neural networks for pattern recognition.“ Oxford University Press, New York (1995)). For a given training set X , PCA constructs a set of orthogonal vectors (principle components) which correspond to the directions of maximum variance. The projection of X onto the first k principle components gives the 2-norm optimal representation of X in a k -dimensional orthogonal subspace. Because this projection does not explicitly use the class information Y , PCA is an unsupervised learning technique.

In order to reduce the dimension of the input space for the SVM we performed a PCA on the combined training and test set $\{X, X'\}$ and projected both sets on the first k principle components. This gives considerably better results than performing PCA only on the training set X and is justified by the fact that no label information is used. However, the generalisation results for $k=2$ and $k=5$, were even worse than for the SVM without feature selection. The reason for this is that PCA does not necessarily extract features that are important for the discrimination between ALL and AML. It first picks the features with the highest variance, which are in this case discriminating between cell lines and primary patient tissue (see Fig. 4, right, second line), i.e. subgroups that are not relevant to the classification task. As is shown in Fig. 6, features carrying information about the leukemia subclasses appear only from the 9th principle component on. The generalisation performance including the 9th component is significantly better than for a SVM without feature selection. However, it seems clear that a supervised feature selection method, which takes the class labels of the training set into account, should be more reliable and give better generalisation.

Fig. 4A shows the methylation profiles of the best 20 CpGs according to the Fisher criterion.

Fisher Criterion and t-Test

A classical measure to assess the degree of separation between two classes is given by the Fisher criterion (Bishop, C.M. „Neural networks for pattern recognition.“ Oxford University Press, New York (1995)). In our case it gives the discriminative power of the k th CpG as

where $(m_k)^{ALL/AML}$ is the mean and $(s_k)^{ALL/AML}$ is the standard deviation of all $(x_i)^j$ with $y_i = ALL/AML$. The Fisher criterion gives a high ranking for CpGs where the two classes are far apart compared to the within class variances. A very similar criterion was used by Golub and coworkers for their ALL/AML classification based on mRNA expression data (T. R. Golub *et al.*, *Science* 286, 531 (1999)). Fig. 4B shows the methylation profiles of the best 20 CpGs according to the Fisher criterion.

Another approach to rank CpGs by their discriminative power is to use a test statistic for computing the significance of class differences. Here we assumed normal distribution of the two classes and used a two sample t-test to rank the CpGs according to the significance of the difference between the class means (Mendenhall, W., Sincich, T., „Statistics for engineering and the sciences.“ Fig. 4 (right, first line) shows the ranking, which is very similar to the Fisher criterion because a large mean difference and a small within class variance are again the important factors.

In order to improve classification performance we trained SVMs on the k highest ranking CpGs according to the Fisher criterion or t-test. Fig. 5 shows a trained SVM on the best two CpGs from the Fisher criterion. The test errors for k=2 and k=5 are given in the table above. The results show a dramatic improvement of generalisation performance. Using Fisher criterion for feature selection and k=5 CpGs the test error was decreased to 3% compared to 16% for the SVM without feature selection. Fig. 6 shows the dependence of generalisation performance from the selected dimension k and indicates that especially the Fisher criterion gives dimension independent good generalisation for reasonable small k.

Although the two described CpG ranking methods give very good generalisation, they have some potential drawbacks. One problem is that they can only detect linear dependencies between features and class labels. A simple XOR or even OR combination of two CpGs would be completely missed. Another drawback is that redundant features are not removed. In our case there are usually several CpGs from the same gene which have a high likelihood of comethylation. This can result in a large set of high ranking features which carry essentially the same information. Although the good results seem to indicate that the described problems do not appear in our data set, they should be considered.

Backward Elimination

PCA, Fisher criterion and t-test construct or rank features independent of the learning machine that does the actual classification and are therefore called filter methods (Blum, A., Langley, P. „Selection of relevant features and examples in machine learning.“ Artificial Intelligence 97, 245-271 (1997)). Another approach is to use the learning machine itself for feature selection. These techniques are called wrapper methods and try to identify the features that are important for the generalisation capability of the machine. Here we propose to use the features that are important for achieving a low training error as a simple approximation. In the case of a SVM with linear kernel these features are easily identified by looking at the normal vector w of the separating hyperplane. The smaller the angle between a feature basis vector and the normal vector the more important is the feature for the separation. Features orthogonal to the normal vector have obviously no influence on the discrimination at all. This means the feature ranking is simply given by the components of the normal vector as $(w_i)^2$. Of course this ranking is not very realistic because the SVM solution on the full feature set is far from optimal as we demonstrated in the last subsections. A simple heuristic is to assume that the feature with the smallest $(w_i)^2$ is really unimportant for the solution and can be safely removed from the feature set.

Then the SVM can be retrained on the reduced feature set and the procedure is repeated until the feature set is empty. Such a successive feature removal is called backward elimination (Blum, A., Langley, P. „Selection of relevant features and examples in machine learning.“ Artificial Intelligence 97, 245-271 (1997)). The resulting CpG ranking on our data set is shown in Fig. 4D and differs considerably from the Fisher and t-test rankings. It seems backward elimination is able to remove redundant features. However, as shown in the table above and Fig. 6 the generalisation results are not better than for the Fisher criterion. Furthermore, backward elimination seems to be more dimension dependent and it is computationally more expensive. It follows that at least for this data set the simple Fisher criterion is the preferable feature selection technique.

Exhaustive Search

A canonical way to construct a wrapper method for feature selection is to evaluate the generalisation performance of the learning machine on every possible feature subset. Cross-validation on the training set can be used to estimate the generalisation of the machine on a given feature set. What makes this exhaustive search of the feature space practically useless is the enormous number of 2^n different feature combinations and there are numerous heuristics to search the feature space more efficiently (e.g. backward elimination) (Blum, A., Langley, P. „Selection of relevant features and examples in machine learning.“ Artificial Intelligence 97, 245-271 (1997)).

Here we only want to demonstrate that there are no higher order correlations between features and class labels in our data set. In order to do this we exhaustively searched the space of all two feature combinations. For every of the 3240 two CpG combinations of $k = 2$ CpGs at the same time without repetitions, out of all together $n = 81$ CpGs we computed the leave-one-out cross-validation error of a SVM with quadratic kernel on the training set. From all CpG pairs with minimum leave-one-out error we selected the one with the smallest radius margin ratio. This pair was considered to be the optimal feature combination and was used to evaluate the generalisation performance of the SVM on the test set.

The average test error of the exhaustive search method was with 6% the same as the one of the Fisher criterion in the case of two features and a quadratic kernel. For five features the exhaustive computation is already infeasible. In the absolute majority of cross-validation runs the CpGs selected by exhaustive search and Fisher criterion were identical. In some cases suboptimal CpGs were chosen by the exhaustive search method. These results clearly demonstrate that there are no higher order feature combinations in our data set that are important for an ALL/AML discrimination.

Example 2

The data obtained according to Example 1 is sorted into a ranked matrix (Figures 3 to 8) according to CpG methylation differences between the two classes of diseased and healthy hematopoietic cells using an algorithm. The most significant CpG positions are at the bottom of the matrix with significance decreasing towards the top. On the right side of the matrix p values for the individual CpG positions are shown. The p values are the probabilities that the observed distribution occurred by chance in the data set.

As discussed above, for selected distinctions, we trained a learning algorithm (support vector machine, SVM). The SVM (as discussed by F. Model, P. Adorjan, A. Olek, C. Piepenbrock, Feature selection for DNA methylation based cancer classification. *Bioinformatics*. 2001 Jun;17 Suppl 1:S157-64) constructs an optimal discriminant between two classes of given training samples. In this case each sample is described by the methylation patterns (CG/TG ratios) at the investigated CpG sites. The SVM was trained on a subset of samples of each class, which were presented with the diagnosis attached. Independent test samples, which were not shown to the SVM before were then presented to evaluate, if the diagnosis can be predicted correctly based on the predictor created in the training round.

A cross validation method was used to evaluate the prediction performance of the SVM (C. M. Bishop, *Neural networks for pattern recognition* (Oxford University Press, New York 1995)). For each classification task, the samples were partitioned into 8 groups of approximately equal size. Then the SVM predicted the class for the test samples in one group after it had been trained using the 7 other groups. The number of misclassifications was counted over 8 runs of the SVM algorithm for all possible choices of the test group. To obtain a reliable estimate for the test error, i.e. the probability of misclassification for a previously unknown sample, the number of misclassifications were averaged over 10 different partitionings of the samples into 8 groups.

The SVM was trained to recognise the difference between healthy CD19+ B cells and CD4+ T cells, and T and B cell leukaemias (from both patient samples and cell lines). Samples could be classified with 15% test error using the two most informative CpG positions. Remarkably, the test error could be reduced to 4 % by including a total of 54 CpG positions into the analysis. Individual CpG sites were ranked according to their contribution to the decision of the support vector machine, showing that the decision between healthy T and B cells and ALL was primarily based on CpG sites located in intron 1 of the CDK4 gene and the coding sequence of the c-MOS oncogene, but CpG sites located in regulatory regions of other genes contributed significantly (Table 1 and Figures 2B and 2C). Compared to the healthy group, the tumour cells consistently showed relative hypermethylation

of these particular CpG sites. Also, classification could be achieved between ALL patient samples and healthy donor B and T cells with a test error of only 13% using two CpG positions. This low-dimensional classification was based on methylation status of CpG sites from CSNK2B and CDC25A, both of which were hypermethylated in ALL patients. The test error could be further improved to 5% by increasing the number of CpG positions used for classification to a total of 31.

In a next step, we tried to distinguish the two classes of leukaemia. Again the support vector machine was initially presented with a training set of AML and ALL samples (from both patient samples and cell lines) with the class information attached. Previously not included samples could then be classified into one of the classes with a test error of 5% when using two CpG positions. The optimal number of CpG sites in this case was calculated to be 6, decreasing the test error to only 1% (Table 1 and Fig 3B). The most informative CpG sites were located in intron 1 of the CDK4 gene and the promoter region of CSNK2B. The overall degree of methylation at these sites was reproducibly higher in ALL than in AML cells. However, the CpG sites in the CDK4 gene contributing information to this particular decision were different from those in the same gene distinguishing between ALL and healthy lymphocytes. This shows clearly that in some cases, different CpG sites within one cluster can contribute independent information, with different CpG sites potentially answering questions on different aspects of a phenotype.

There is evidence that CpG islands of several tissue-specific genes become methylated in cell lines (F. Antequera, J. Boyes, A. Bird, *Cell* 62, 503 (1990)). Hence, it is important to rule out that the above classifications are based on cell line specific artefacts rather than on disease specific changes. We therefore grouped leukaemia cell lines in one and primary leukaemia samples into another class. Classification was possible with a test error of 28% based on 2 CpG positions and 12% using 30 CpG sites (Table 1). Importantly, the CpG sites that contributed most to this distinction were not informative in any of the earlier classifications, excluding that any of them is based merely on cell line specific markers. This knowledge then enabled us to identify disease specific methylation differences between healthy T cells and T-ALL cell lines. Classification was performed with a test error of 0% based on two CpG positions, which could not distinguish cell lines from non cell lines. Decisive CpG sites were located in the coding sequence of the c-MOS gene (Table 1). In conclusion, although our results confirm the occurrence of cell line specific methylation changes, these do not interfere with classification of tumour types.

Figure 7 shows the use of a selection of genes from the panel for use in differentiating between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia. Using the 2 most significant CpG positions, test error was calculated to be 5%. The optimal number of CpG sites in this case was calculated to be 6, decreasing the test error to 1%. The most informative CpG sites were located in intron 1 of the CDK4 gene and the promoter region of CSNK2B. The overall degree of methylation at these sites was reproducibly higher in ALL than in AML cells. However, the CpG sites in the CDK4 gene contributing information to this particular decision were different from those in the same gene distinguishing between ALL and healthy lymphocytes. This shows clearly that in some cases, different CpG sites within one cluster can contribute independent information, with different CpG sites potentially answering questions on different aspects of a phenotype.

Figure 8 shows the use of an alternative selection of genes from the panel for use in differentiating between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia. The test error in this case was 16.3%.

In all classes classification results were comparable to mRNA based assays regarding test error, safety and reproducibility. However, classification was achieved with significantly fewer, randomly chosen genes, suggesting that methylation data may actually contain more information per dimension than expression profiles.

More importantly, in expression profiling signal intensities strongly depend on both the absolute and relative amounts of the different mRNA-species, comparison between independent experiments is challenging at best. Hence, although signals are generally calibrated against those derived from housekeeping genes, there remains an inability of mRNA profiling to detect subtle changes in expression levels (R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart, *Nature Genetics* 21, 20 (1999)). In our approach, a CG/TG ratio is used as an internal calibration, and thus the amount of probe hybridised to the slide does not influence the results. This greatly improves the comparability of the results and therefore enables the screening of larger populations, as for example needed in multicenter trials and prospective studies.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

30

Example 3: Identification of the methylation status of a CpG site within the gene N33 (NM_006765).

A fragment of the gene N33 (Seq ID NO: &[GENEID 2188]) was PCR amplified using primers AAAGCCGCTGCCATCC and TTTCGGCGACGGTAGG. The resultant fragment (548 bp in length) contained an informative CpG at position 446. The amplificate DNA was digested with the restriction endonuclease *FauI*, recognition site CCCGC. Hydrolysis by said endonuclease is blocked by methylation of the CpG at position 446 of the amplificate. The digest was used as a control.

Genomic DNA was isolated from sample using the DNA wizzard DNA isolation kit (Promega). Each sample was digested using *AvaI* according to manufacturer's recommendations (New England Biolabs).

10 ng of each genomic digest was then amplified using PCR primers AAAGCCGCTGCCATCC and TTTCGGCGACGGTAGG. The PCR reactions were performed using a thermocycler (Eppendorf GmbH) using 10 ng of DNA, 6 pmole of each primer, 200 µM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U of HotstartTaq (Qiagen AG). The other conditions were as recommended by the Taq polymerase manufacturer. Using the above mentioned primers, gene fragments were amplified by PCR performing a first denaturation step for 14 min at 96 °C, followed by 30 - 45 cycles (step 2: 60 sec at 96°C, step 3: 45 sec at 52 °C, step 4: 75 sec at 72 °C) and a subsequent final elongation of 10 min at 72 °C. The presence of PCR products was analysed by agarose gel electrophoresis.

PCR products were detectable with *FauI* hydrolyzed DNA isolated wherein the CpG position in question was upmethylated, when step 2 to step 4 of the cycle program were repeated 34, 37, 39, 42 and 45 fold. In contrast PCR products were only detectable with *FauI* hydrolyzed DNA isolated from downmethylated DNA (and control DNA) when step 2 to step 4 of the cycle program were repeated 39, 42 and 45 fold. These results were incorporated into a CpG methylation matrix analysis as described in Example 2.

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

31

TablesTable 1

<i>Class 1</i>		<i>Class 2</i>		<i>Test Error 2 CpGs</i>	<i>Significance 2 CpGs</i>	<i>Optimal CpG Number</i>	<i>Test Error optimal CpGs</i>	<i>Significance optimal CpGs</i>
Healthy-B	13	B-ALL-cl	17	15%	1.3E-4	54	4%	3.2E-7
Healthy-T		T-ALL-cl						
B-ALL-cl	17	AML	8	5%	3.7E-4	6	1%	5.4E-10
T-ALL-cl		AML-cl						
ALL								
Female-nod	14	Male-nod	7	5%	7.4E-4	2	5%	7.4E-4
Healthy-T	6	T-ALL-cl	6	0%	2.5E-3	2	0%	2.5E-3
Healthy-B	13	AML	8	16%	6.9E-3	22	0%	2.3E-6
Healthy-T		AML-cl						
Primary leukemia samples	8	CellLines	17	28%	2.2E-2	30	12%	7.9E-5
Healthy-B	13	ALL	5	13%	8.2E-3	31	5%	9.1E-5
Healthy-T								
Healthy-B	7	B-ALL-cl	6	27%	5.5E-2	11	8%	1.8E-3
Female-cl	9	Male-cl	8	52%	5.3E-1	42	40%	1.9E-1
B-ALL-cl	6	T-ALL-cl	6	38%	5.7E-1	70	51%	3.9E-1
Healthy-B	7	Healthy-T	6	63%	6.8E-1	11	49%	3.8E-1

Table 2: PCR primers and products

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
1	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG (SEQ ID NO: 388) TAAAAACTATCCCATATAAATCCCAAC (SEQ ID NO: 387)	633
2	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGGGAAATGGAGAAGTGTA (SEQ ID NO: 512) CTACCAATCCCCAAAATAACC (SEQ ID NO: 511)	524
3	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	AGGGGGATTGAGTGTTAAGT (SEQ ID NO: 392) CCCCAACATAAACACAAAAAT (SEQ ID NO: 391)	293
4	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA (SEQ ID NO: 532) ACCCCTAAATAATTATCCT (SEQ ID NO: 531)	460

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

32

No:	Gene:	Primer:	Amplificate Length:
5	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	GGTAGTTGGTTATATGGTGAGG (SEQ ID NO: 395) TCACACTCTTAAAAACCACAAAA (SEQ ID NO: 396)	748
6	Humos (SEQ ID NO: 71)	TGATTGGGAGTAGGTGTGTT (SEQ ID NO: 397) CAAATCTTCCAACCTCTCAAA (SEQ ID NO: 398)	523
7	RB1 (SEQ ID NO: 52)	TTTAAGTTTGTGTTTGTGTTGGT (SEQ ID NO: 399) TCCTACTCTAAATCCTCTCAA (SEQ ID NO: 400)	719
8	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	TTGGGAGTTTTATTGATTTT (SEQ ID NO: 401) ACAACCTAAAAATTAAATCCAAA (SEQ ID NO: 402)	445
9	GPIb beta (SEQ ID NO: 30)	GGTGATAGGAGAATAATGTTGG (SEQ ID NO: 403) TCTCCCAACTACAACCAAAC (SEQ ID NO: 404)	379
10	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	ATTAGGGGTATAGAGGAGTATTGA (SEQ ID NO: 405) CTTACAAACCCACAATAAACAA (SEQ ID NO: 406)	883
11	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	GTTTAGAAGTTAAGATTAG (SEQ ID NO: 407) CAAAACTCAACCTCTATCT (SEQ ID NO: 408)	611
12	WT1 (SEQ ID NO: 59)	AAAGGGAAATTAAGTGTGT (SEQ ID NO: 410) TAACTACCCTCAACTCCC (SEQ ID NO: 409)	747

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

33

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
13	MYCL1 (SEQ ID NO: 44)	AGGTTGGGTTATTGAGTTT (SEQ ID NO: 411) CATTATTCCTAACTACCTTATATCTC (SEQ ID NO: 412)	491
14	ABL1 (SEQ ID NO: 2)	GGTGGGAGATTTAATTATT (SEQ ID NO: 414) ACCAATCCAACTTTTCCTT (SEQ ID NO: 413)	967
15	ELK1 (SEQ ID NO: 27)	AAGTGTTTAGTTTTAAATGGGTA (SEQ ID NO: 415) CAAACCCAAACTCACCTAT (SEQ ID NO: 416)	966
16	ABL1 (SEQ ID NO: 1)	GTTAGGAGGGGTTAAGG (SEQ ID NO: 417) CCAACCTCAAACAAATCTCC (SEQ ID NO: 418)	291
17	APC (SEQ ID NO: 4)	TCAACTACCATCAACTTCCTTA (SEQ ID NO: 419) AATTATTTTAGTGTTGTAGTGGG (SEQ ID NO: 420)	
18	ARHI (SEQ ID NO: 6)	GTGAGTTTTGGGGTGTTA (SEQ ID NO: 421) TCAATCTTACTTCACACTACATAA (SEQ ID NO: 422)	444
19	BCL2 (SEQ ID NO: 9)	GTATTTATGTTAAGGGGAAA (SEQ ID NO: 423) AAAAACCACAATCCTCCC (SEQ ID NO: 424)	640
20	CCND2 (SEQ ID NO: 13)	TTTGGTATGTAGGTTGGATG (SEQ ID NO: 425) CCTAACCTCCTTCCTTAACT (SEQ ID NO: 426)	426

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

34

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
21	CDHI (SEQ ID NO: 16)	CAAATAAACCCCTCAACCAATC (SEQ ID NO: 427) TGGAGGGGGTAGGAAAGT (SEQ ID NO: 428)	474
22	CDKN1A (SEQ ID NO: 19)	GGATTAGTGGGAATAGAGGTG (SEQ ID NO: 429) AAACCCAAACTCCTAACTACC (SEQ ID NO: 430)	408
23	CDKN1B (p27 Kip1) (SEQ ID NO: 20)	GTGGGGAGGTAGTTGAAGA (SEQ ID NO: 431) ATACACCCCTAACCCAAAAT (SEQ ID NO: 432)	478
24	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	TTGAAAATTAAGGGTTGAGG (SEQ ID NO: 433) CACCTCTAATAACCAACCA (SEQ ID NO: 434)	598
25	CDKN2a (SEQ ID NO: 22)	GGGGTTGGTTGGTTATTAGA (SEQ ID NO: 435) AACCTCTACCCACCTAAAT (SEQ ID NO: 436)	256
26	CDKN2B (SEQ ID NO: 23)	GGTTGGTTGAAGGAATAGAAAT (SEQ ID NO: 437) CCCACTAAACATACCCTTATTC (SEQ ID NO: 438)	708
27	DAPK1 (SEQ ID NO: 25)	AACCCTTTCTCAAATTACAAA (SEQ ID NO: 439) TGATTGGGTTTTAGGGAAATA (SEQ ID NO: 440)	348
28	FOS (SEQ ID NO: 29)	TTTTTGGGGTTTAGTTTAGAAT (SEQ ID NO: 441) AACCTTCATCCCCTAACCT (SEQ ID NO: 442)	308

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

35

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
29	GSTP1 (SEQ ID NO: 33)	ATTTGGGAAAAGAGGGAAAAG (SEQ ID NO: 443) TAAAAACTCTAAACCCCATCC (SEQ ID NO: 444)	300
30	HIC-1 (SEQ ID NO: 34)	TGGGTGGAGAAGAAGTTTA (SEQ ID NO: 445) TCATATTCCAAAAACACACC (SEQ ID NO: 446)	280
31	IGF2 (SEQ ID NO: 36)	CCCTTCCCCTTAACATAACT (SEQ ID NO: 447) AATTGGGTTAGGTTTGGA (SEQ ID NO: 448)	364
32	MGMT (SEQ ID NO: 38)	AAGGTTTGGGAAGAGTGTTT (SEQ ID NO: 449) ACCTTTCTATCACAAAAATAA (SEQ ID NO: 450)	636
33	MLH1 (SEQ ID NO: 39)	TAAGGGGAGAGGAGGAGTTT (SEQ ID NO: 451) ACCAATCTCAATCATCTCTTT (SEQ ID NO: 452)	545
34	MOS (SEQ ID NO: 40)	ACCCTACAACAATCCCTCA (SEQ ID NO: 453) TGTTTTTAGGTTATTTGATT (SEQ ID NO: 454)	343
35	MPL (SEQ ID NO: 42)	TGGGGAGATTGATTGAGTAT (SEQ ID NO: 455) AATTCCTCAATAACATACCCTT (SEQ ID NO: 456)	594
36	MYC (SEQ ID NO: 43)	AGAGGGAGTAAAAGAAAATGGT (SEQ ID NO: 457) CCAAATAAACAATAACCTCC (SEQ ID NO: 458)	712

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

36

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
37	N33 (SEQ ID NO: 46)	TTTtagattgaggttttagggT (SEQ ID NO: 459) ATCCATTCTACCTCCTTTTCT (SEQ ID NO: 460)	498
38	PMS2 (SEQ ID NO: 49)	GATTGAGATTATTtgggtTtT (SEQ ID NO: 461) ACTTAAACCTTCCCTCTCCAC (SEQ ID NO: 462)	561
39	PTEN (SEQ ID NO: 51)	TTTTAGGTAGTTATtTGGGTATGTT (SEQ ID NO: 463) TCAACTCTCAAACITCCATCA (SEQ ID NO: 464)	346
40	RBL2 (SEQ ID NO: 53)	GAAAATGGGTGTGTGTGG (SEQ ID NO: 465) TACAAATAAAAACAAATCCCT (SEQ ID NO: 466)	112
41	SPN (SEQ ID NO: 55)	GAAGAGAGGAGAGGGAGGTA (SEQ ID NO: 468) CTATCCAACAAACCAACA (SEQ ID NO: 467)	489
42	TGFBR2 (SEQ ID NO: 57)	GTAATTGAAGAAAGTTGAGGG (SEQ ID NO: 469) CCAACAACATAACAAAACCTCT (SEQ ID NO: 470)	296
43	TP73 (SEQ ID NO: 58)	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA (SEQ ID NO: 472) GAAAAACCTCTAAAACTACTCTCC (SEQ ID NO: 471)	607
44	CDKN1C (SEQ ID NO: 21)	GGGGAGGTAGATATTtGGATAA (SEQ ID NO: 473) AACTACCATTTATATTCCAC (SEQ ID NO: 474)	300

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

37

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
45	GSK3β (SEQ ID NO: 32)	TAAGTGATAAAGGAAGGAAGGA (SEQ ID NO: 475) CCTTCAAACCCCAACAA (SEQ ID NO: 476)	243
46	CDC2 (SEQ ID NO: 14)	ATTAGAAGTGAAAGTAATGGAATT (SEQ ID NO: 477) TCAATTCCAAAAACCAAC (SEQ ID NO: 478)	418
47	ESR1 (SEQ ID NO: 28)	AGGGGAATTAAATAGAAAGAG (SEQ ID NO: 479) CAATAAAACCATCCCAATACT (SEQ ID NO: 480)	662
48	APAF1 (SEQ ID NO: 3)	AGATATGTTTGGAGATTTTAGGA (SEQ ID NO: 481) AACTCCCCACCTCTAATTCTAT (SEQ ID NO: 482)	674
49	BAK1 (SEQ ID NO: 7)	AATTAGGGATGGGAAAAGTAGT (SEQ ID NO: 483) AAACATAACAAATCAAATCCC (SEQ ID NO: 484)	558
50	BAX (SEQ ID NO: 8)	AAATAAATAGAAAAGTAGGTTTGGC (SEQ ID NO: 485) TTCTACCCCTCAATACTTAAAAA (SEQ ID NO: 486)	716
51	CASP10 (SEQ ID NO: 10)	TCTTCCCAACAAATAAAACT (SEQ ID NO: 487) GTTTGTAGGTTAAATGAGTGGT (SEQ ID NO: 488)	468
52	CASP8 (SEQ ID NO: 11)	AGTGGATTGGAGTTTAGATGT (SEQ ID NO: 489) AACAAAATAAAACTCTCCCA (SEQ ID NO: 490)	431

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

38

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
53	CASP9 (SEQ ID NO: 12)	GGAAGAGTTGTAGGTGGATTAG (SEQ ID NO: 491) CCACATTTTCCCAATAAATACT (SEQ ID NO: 492)	424
54	TCL1A (SEQ ID NO: 56)	CCACAACACATCAAACCTATAA (SEQ ID NO: 493) TTTGGTGGTAAGTGAGGGT (SEQ ID NO: 494)	491
55	PML (SEQ ID NO: 48)	AATTCCTCAAACAACTTTTACA (SEQ ID NO: 495) TGGAGAGGAAGTGAGATAGAAG (SEQ ID NO: 496)	459
56	HXA5 (SEQ ID NO: 35)	AAACCCAAACAACCTCTAT (SEQ ID NO: 498) GAAGGGGAAAGTTATTTAGTTA (SEQ ID NO: 497)	392
57	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	CCTAACTACCCTCATTCCTTT (SEQ ID NO: 499) AGTTGGGGAAATTAAGGTITAG (SEQ ID NO: 500)	269
58	PITX2 (SEQ ID NO: 47)	TCCTCAACTCTACAAACCTAAAA (SEQ ID NO: 501) GTAGGGGAGGGAAGTAGATGT (SEQ ID NO: 502)	408
59	GPR37 (SEQ ID NO: 31)	ACTTATTTTCTTTCTCTAAAAAC (SEQ ID NO: 503) TATGGTTTGGTGAGGGTATATT (SEQ ID NO: 504)	489
60	PRAME (SEQ ID NO: 50)	ACCACTCAAAAACAAACCTTTA (SEQ ID NO: 505) ATGGGTATGGTGGTTAAGAGTA (SEQ ID NO: 506)	303

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

39

<i>No:</i>	<i>Gene:</i>	<i>Primer:</i>	<i>Amplificate Length:</i>
61	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTGGTAGTTGGTTATATG (SEQ ID NO: 508) AAAAATAACACAATAACTCA (SEQ ID NO: 507)	474
62	CDC25A (SEQ ID NO: 72)	AGAAGTTGTTTATTGATTGG (SEQ ID NO: 510) AAAATTAAATCCAAACAAAC (SEQ ID NO: 509)	272
63	CSNK2B (SEQ ID NO: 67)	GGGGAAATGGAGAAGTGTA (SEQ ID NO: 512) CTACCAATCCCAAAATAACC (SEQ ID NO: 511)	524
64	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	ATTTATTTTG (SEQ ID NO: 514) ATCCCAAATAAAAAACAAACCACC (SEQ ID NO: 513)	568
65	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	AAACCCAAAACTAAAAAA (SEQ ID NO: 515) ATGTTATTTAGGTTGGGTTATTG (SEQ ID NO: 516)	461
66	CSF1 (SEQ ID NO: 65)	GAGAAATGGGGTGG (SEQ ID NO: 518) TATAAAAAATCACCTAACC (SEQ ID NO: 517)	
67	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	ACCTAAATCA (SEQ ID NO: 519) ATGTGAGTTAGGGATTTTT (SEQ ID NO: 520)	
68	CD1R3 (SEQ ID NO: 66)	ATTATGGTTGGAATTGTAAT (SEQ ID NO: 522) ACAAAAACAACAAACACCCC (SEQ ID NO: 521)	413

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

40

No:	Gene:	Primer:	Amplificate Length:
69	N-MYC (SEQ ID NO: 60)	GGGAGGAGTATAATTTG (SEQ ID NO: 524) AAAATATCCTC (SEQ ID NO: 523)	368
70	Tubulin (SEQ ID NO: 64)	CTTATATACCTCCC (SEQ ID NO: 525) GGGTTTAGAGTTAAGATTG (SEQ ID NO: 526)	453
71	CMYCex3 (SEQ ID NO: 73)	AGGAGGAATAAGAAGATGAG (SEQ ID NO: 528) TTCAATCTCAAACTCAACC (SEQ ID NO: 527)	
72	ELK1 (SEQ ID NO: 63)	GAAAAAAAAAACCAATAT (SEQ ID NO: 529) ATGGTTTGTITAAT (SEQ ID NO: 530)	523
73	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA (SEQ ID NO: 532) ACCCCTAAATAATTATCCT (SEQ ID NO: 531)	460
74	Humos (SEQ ID NO: 71)	TTTATTGATTGGGAGTAGGT (SEQ ID NO: 534) CTAATTTTACAAACATCCTA (SEQ ID NO: 533)	494

Table 3: Hybridisation oligonucleotides

No:	Gene	Oligo:
1	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGGTCGTTTAAAGG (SEQ ID NO: 535)
2	MDR1 (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGGTTGTTTAAAGG (SEQ ID NO: 536)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

41

No:	Gene	Oligo:
3	MDR1	TTGAAAGACGTGTTTATA
	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 537)
4	MDR1	TTGAAAGATGTGTTTATA
	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 538)
5	MDR1	AGGTGTAACGGAAGTTAG
	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 539)
6	MDR1	AGGTGTAATGGAAGTTAG
	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 540)
7	MDR1	TAGTTTTTCGAGGAATTA
	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 541)
8	MDR1	TAGTTTTTGAGGAATTA
	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 542)
9	CSNK2B	AGGAGTTTCGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1235)
10	CSNK2B	AGGAGTTTGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1236)
11	CSNK2B	GAGAGTTGCGAAAGAGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 543)
12	CSNK2B	GAGAGTTGTGAAAGAGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 544)
13	CSNK2B	GGGTTTTCGTGATAGT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 545)
14	CSNK2B	GGGTTTTGTGATAGT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 546)
15	CSNK2B	TAGGTTAGCGTATTGGGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1117)
16	CSNK2B	TAGGTTAGTGTATTGGGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1118)
17	EGR4	GGTGGGAAGCGTATTTAT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 1213)
18	EGR4	GGTGGGAAGTGTATTTAT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 1214)
19	EGR4	AATAATAACGTTATAGTT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 549)
20	EGR4	AATAATAATGTTATAGTT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 550)
21	EGR4	TTATAGTTCGAGTTTTTT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 1225)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

42

No:	Gene	Oligo:
22	EGR4	TTATAGTTTGAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 1226)
23	EGR4	GGAGTTTTCGGTATATAT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 551)
24	EGR4	GGAGTTTTCGGTATATAT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 552)
25	AR	TGTTATTTTCGAGAGAGGT
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 553)
26	AR	TGTTATTTTCGAGAGAGGT
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 554)
27	AR	AGAGGTTGCGTTTAGAG
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 555)
28	AR	AGAGGTTGCGTTTAGAG
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 556)
29	AR	GTAGTATTCGAAGGTAGT
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 1255)
30	AR	GTAGTATTTGAAGGTAGT
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 1256)
31	AR	GGAGGTTTCGGGGGTTT
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 557)
32	AR	GGAGGTTTGGGGGTTT
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 558)
33	CDK 4	GTATGGGGTCGTAGGAAT
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 559)
34	CDK 4	GTATGGGGTGTAGGAAT
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 560)
35	CDK 4	GGAAGGGTCGTTAAGGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1147)
36	CDK 4	GGAAGGGTGTGTTAAGGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1148)
37	CDK 4	GGGTTGGCGTGAGGTA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 563)
38	CDK 4	GGGTTGGTGTGAGGTA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 564)
39	CDK 4	AGGATTTTCGATGTAAGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 565)
40	CDK 4	AGGATTTTGTGTAAGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 566)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

43

No:	Gene	Oligo:
41	CDK 4	GGGTTTACGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 567)
42	CDK 4	GGGTTTATGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 568)
43	Humos	GAGTTTAACGTAGTAAGG
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1221)
44	Humos	GAGTTTAATGTAGTAAGG
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1222)
45	Humos	TATGGAGTTCGGTGGTAA
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 569)
46	Humos	TATGGAGTTTGGTGGTAA
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 570)
47	Humos	TTTATTGTCGTATTGGAG
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 571)
48	Humos	TTTATTGTTGTATTGGAG
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 572)
49	Humos	GTTGTGAACGTTTGTTT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 573)
50	Humos	GTTGTGAATGGTTTGTTT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 574)
51	RB1	TTAGATTTCGGGATAGGG
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 575)
52	RB1	TTAGATTTTGGGATAGGG
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 576)
53	RB1	TATAGTTTCGTTAAGTGT
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 577)
54	RB1	TATAGTTTGTTAAGTGT
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 578)
55	RB1	GTGTATTTTCGGTTTGGAG
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 579)
56	RB1	GTGTATTTTGGTTTGGAG
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 580)
57	RB1	TTGGAAGGCGTTTGGATT
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 581)
58	RB1	TTGGAAGGTGTTTGGATT
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 582)
59	RB1	TGGATTACGTTAGGTTT
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 583)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

44

No:	Gene	Oligo:
60	RBI	TGGATTATGTTAGGTTT
	(SEQ ID NO: 52)	(SEQ ID NO: 584)
61	CDC25A	GTGTAGGTCGGTTGGTT
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1159)
62	CDC25A	GTGTAGGTTGGTTGGTT
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1160)
63	CDC25A	TTGTTATTCGGAGTTGGG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1163)
64	CDC25A	TTGTTATTGGAGTTGGG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1164)
65	CDC25A	GGAGAATAGCGAAGATAG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 589)
66	CDC25A	GGAGAATAGTGAAGATAG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 590)
67	CDC25A	GAAAGGTCGGTTGGT
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 591)
68	CDC25A	GAAAGGTTGGTTGGT
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 592)
69	GPIb beta	TTTGAGAGCGGTGGGAG
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 593)
70	GPIb beta	TTTGAGAGTGGGTGGGAG
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 594)
71	GPIb beta	GTGGGAGCGAAGTTTGA
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 595)
72	GPIb beta	GTGGGAGTGGAAAGTTTGA
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 596)
73	GPIb beta	GGTTAGGTCGTAGTATTG
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 597)
74	GPIb beta	GGTTAGGTTGTAGTATTG
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 598)
75	GPIb beta	ATGGGTTTCGGTGAGTTT
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 599)
76	GPIb beta	ATGGGTTTGGTGAGTTT
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 600)
77	GPIb beta	GGGTTTTCGGTTGTTTTT
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 601)
78	GPIb beta	GGGTTTTCGGTTGTTTTT
	(SEQ ID NO: 30)	(SEQ ID NO: 602)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

45

No:	Gene	Oligo:
79	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	ATAGTAGTCGGGTGTTGG (SEQ ID NO: 603)
80	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	ATAGTAGTTGGGTGTTGG (SEQ ID NO: 604)
81	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GTGTTAGTCGTTTAGGGT (SEQ ID NO: 605)
82	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GTGTTAGTTGTTTAGGGT (SEQ ID NO: 606)
83	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	TAGTTGTTTCGTTTGGGTT (SEQ ID NO: 607)
84	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	TAGTTGTTTGTGTTGGGTT (SEQ ID NO: 608)
85	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GGTTATTACGGATAAATA (SEQ ID NO: 609)
86	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	GGTTATTATGGATAAATA (SEQ ID NO: 610)
87	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	AATTAGGTCGGATAGGAG (SEQ ID NO: 611)
88	MYOD1 (SEQ ID NO: 45)	AATTAGGTTGGATAGGAG (SEQ ID NO: 612)
89	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	AAATTAGTCGGGTGTGGT (SEQ ID NO: 613)
90	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	AAATTAGTTGGGTGTGGT (SEQ ID NO: 614)
91	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TGTGCTGGCGTAAGTTTG (SEQ ID NO: 615)
92	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TGTGGTGGTGAAGTTTG (SEQ ID NO: 616)
93	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	GGAGTTTTCGTTTITAGT (SEQ ID NO: 617)
94	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	GGAGTTTITGTTTITAGT (SEQ ID NO: 618)
95	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TAGAATTGCGAGATAGAG (SEQ ID NO: 619)
96	CDH3 (SEQ ID NO: 17)	TAGAATTGTGAGATAGAG (SEQ ID NO: 620)
97	WT1 (SEQ ID NO: 59)	TAGTGAGACGAGGTTTTT (SEQ ID NO: 621)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

46

No:	Gene	Oligo:
98	WT1	TAGTGAGATGAGGTTTTT
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 622)
99	WT1	TATATTGGCGAAGGTAA
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 623)
100	WT1	TATATTGGTGAAGGTAA
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 624)
101	WT1	TGTTATATCGGTTAGTTG
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 625)
102	WT1	TGTTATATTGGTTAGTTG
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 626)
103	WT1	TGTTTGGTCGGGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 627)
104	WT1	TGTTTGGTTGGGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 628)
105	WT1	TTAGTTTCGATTTTGG
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 629)
106	WT1	TTAGTTTGGATTTTGG
	(SEQ ID NO: 59)	(SEQ ID NO: 630)
107	MYCL1	TTGAGGGTCGTTAGGTGG
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 631)
108	MYCL1	TTGAGGGTTGTTAGGTGG
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 632)
109	MYCL1	TTTAGTTTCGAGTGGGT
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 633)
110	MYCL1	TTTAGTTTGGAGTGGGT
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 634)
111	MYCL1	AGTTTAGTCGGTTGGTAT
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 635)
112	MYCL1	AGTTAGTTGGTTGGTAT
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 636)
113	MYCL1	GGGGTTATCGGGGATTGA
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 637)
114	MYCL1	GGGGTTATTGGGGATTGA
	(SEQ ID NO: 44)	(SEQ ID NO: 638)
115	ABL1	GTTTGGGTCGCGAGAGTT
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 639)
116	ABL1	GTTTGGGTTGTGAGAGTT
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 640)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

47

No:	Gene	Oligo:
117	ABL1	GGATATTGCGGGTGGTTT
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 641)
118	ABL1	GGATATTGTGGGTGGTTT
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 642)
119	ABL1	TTTGGTTTCGTTGTGGAG
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 643)
120	ABL1	TTTGGTTTGTGTGGAG
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 644)
121	ABL1	GGGTTTTCGTTGAGGA
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 645)
122	ABL1	GGGTTTGTGGTTGAGGA
	(SEQ ID NO: 2)	(SEQ ID NO: 646)
123	ELK1	TTTGTTCGTTGAGTAG
	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 647)
124	ELK1	TTTGTTCGTTGAGTAG
	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 648)
125	ELK1	TTTATTTTCGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 649)
126	ELK1	TTTATTTTGTTCGTTGGG
	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 650)
127	ELK1	GAAGGGTTCGTTTAA
	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 651)
128	ELK1	GAAGGGTTGTTTAA
	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 652)
129	APC	TATTAGAGCGTTTAAAG
	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 653)
130	APC	TATTAGAGTGTTCGTTAAAG
	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 654)
131	APC	GTTTTTTCGATTGGGT
	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 655)
132	APC	GTTTTTTGATTGGGT
	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 656)
133	ARHI	TGTTGTTGCGTAGTAGAA
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 657)
134	ARHI	TGTTGTTGTTAGTAGAA
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 658)
135	ARHI	GAATTATTCGTAGTTTG
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 659)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

48

No:	Gene	Oligo:
136	ARHI	GAATTATTTGTAGTTTGG
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 660)
137	ARHI	GATAGTTTCGTTGGGAAG
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 661)
138	ARHI	GATAGTTTGTGGGAAG
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 662)
139	ARHI	TAGAAGAACGAGGTTTGA
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 663)
140	ARHI	TAGAAGAATGAGGTTTGA
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 664)
141	ARHI	TATAGTTGCGTAGGTAGT
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 665)
142	ARHI	TATAGTTGTGTAGGTAGT
	(SEQ ID NO: 6)	(SEQ ID NO: 666)
143	BCL2	AGAGGTGTCGTTGGTTT
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 667)
144	BCL2	AGAGGTGTTGTTGGTTT
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 668)
145	BCL2	TAAGTTGTCGTAGAGGGG
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 669)
146	BCL2	TAAGTTGTTGTAGAGGGG
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 670)
147	BCL2	AGGGGTTACGAGTGGGAT
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 671)
148	BCL2	AGGGGTTATGAGTGGGAT
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 672)
149	BCL2	TTTGTACGGTGGTGGA
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 673)
150	BCL2	TTTGTATGGTGGTGGA
	(SEQ ID NO: 9)	(SEQ ID NO: 674)
151	CCND2	AGTTGGGTCGGGTTAGTT
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 675)
152	CCND2	AGTTGGGTTGGGTTAGTT
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 676)
153	CCND2	TTTAATAACGAGAGGGGA
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 677)
154	CCND2	TTTAATAATGAGAGGGGA
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 678)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

49

No:	Gene	Oligo:
155	CCND2	TTAGTTTGC GTTATCGTT
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 679)
156	CCND2	TTAGTTTGTGTTATTGTT
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 680)
157	CCND2	TTTAGAGCGGAGAAGAG
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 681)
158	CCND2	TTTAGAGTGGAGAAGAG
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 682)
159	CCND2	GGTAGTTTCGAGGTTTG
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 683)
160	CCND2	GGTAGTTTGTAGGTTTG
	(SEQ ID NO: 13)	(SEQ ID NO: 684)
161	CDHI	AGTTTCGACGTTATTGAG
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 685)
162	CDHI	AGTTTGTATGTTATTGAG
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 686)
163	CDHI	AGAGGTTGCGGTTTAAAG
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 687)
164	CDHI	AGAGGTTGTGGTTTAAAG
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 688)
165	CDHI	AGTAGCGTCGAGAGGTTG
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 689)
166	CDHI	AGTAGTGTGAGAGGTTG
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 690)
167	CDHI	AGGGGATTCGGGTATTT
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 691)
168	CDHI	AGGGGATTTGGGGTATTT
	(SEQ ID NO: 16)	(SEQ ID NO: 692)
169	CDKN1A	AGGTGTATCGTTTATATA
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 693)
170	CDKN1A	AGGTGTATTGTTTATATA
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 694)
171	CDKN1A	TGGGTTAGCGGTGAGTTA
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 695)
172	CDKN1A	TGGGTTAGTGGTGAGTTA
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 696)
173	CDKN1A	GTITATTTCCGTGGGGAAA
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 697)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

50

No:	Gene	Oligo:
174	CDKN1A	GTITATTTTGTGGGGAAA
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 698)
175	CDKN1A	TTGGAATTCGGTTAGGTT
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 699)
176	CDKN1A	TTGGAATTTGGTTAGGTT
	(SEQ ID NO: 19)	(SEQ ID NO: 700)
177	CDKN1B (p27 Kip1)	AAGAGAAACGTTGAATA
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 701)
178	CDKN1B (p27 Kip1)	AAGAGAAATGTTGAATA
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 702)
179	CDKN1B (p27 Kip1)	TTTGATTTCGAGGGGAGT
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 703)
180	CDKN1B (p27 Kip1)	TTTGATTTTGAGGGGAGT
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 704)
181	CDKN1B (p27 Kip1)	GTATTTGGCGGTTGGATT
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 705)
182	CDKN1B (p27 Kip1)	GTATTTGGTGGTTGGATT
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 706)
183	CDKN1B (p27 Kip1)	TATAATTCGGGAAAGAA
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 707)
184	CDKN1B (p27 Kip1)	TATAATTTTGGGAAAGAA
	(SEQ ID NO: 20)	(SEQ ID NO: 708)
185	CDKN2a	AGAGTGAACGTATTTAAA
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 709)
186	CDKN2a	AGAGTGAATGTATTTAAA
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 710)
187	CDKN2a	GTTATATTCGTTAAGTGT
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 711)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

51

No:	Gene	Oligo:
188	CDKN2a	GTTATATTGTAAAGTGT
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 712)
189	CDKN2a	TAAGTGTTCCGAGTTAAT
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 713)
190	CDKN2a	TAAGTGTTGGAGTTAAT
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 714)
191	CDKN2a	GTTAGTATCGGAGGAAGA
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 715)
192	CDKN2a	GTTAGTATTGGAGGAAGA
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 716)
193	CDKN2a	GGAGTTTTCGGTTGATTG
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 717)
194	CDKN2a	GGAGTTTTGGTTGATTG
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 718)
195	CDKN2a	TTGTTAACGTATCGAAT
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 719)
196	CDKN2a	TTGTTAATGTATTGAAT
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 720)
197	CDKN2a	AATAGTTACGGTCGGAGG
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 721)
198	CDKN2a	AATAGTTATGGTTGGAGG
	(SEQ ID NO: 22)	(SEQ ID NO: 722)
199	CDKN2B	ATATTAGCGAGTAGTGT
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 723)
200	CDKN2B	ATATTAGTGAGTAGTGT
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 724)
201	CDKN2B	ATAGGGGGCGGAGTTTAA
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 725)
202	CDKN2B	ATAGGGGGTGAGTTTAA
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 726)
203	CDKN2B	TTATTGTACGGGTTTAA
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 727)
204	CDKN2B	TTATTGTATGGGTTTAA
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 728)
205	CDKN2B	TTTAAAGTCGTAGAAGGA
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 729)
206	CDKN2B	TTTAAAGTTGTAGAAGGA
	(SEQ ID NO: 23)	(SEQ ID NO: 730)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

52

No:	Gene	Oligo:
207	DAPK1	GTTGGAGTCGAGGTTTGA
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 731)
208	DAPK1	GTTGGAGTTGAGGTTTGA
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 732)
209	DAPK1	GAAGGGAGCGTATTTAT
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 733)
210	DAPK1	GAAGGGAGTGTATTTAT
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 734)
211	DAPK1	TTGTTTTTCGAAATTG
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 735)
212	DAPK1	TTGTTTTTGAAATTG
	(SEQ ID NO: 25)	(SEQ ID NO: 736)
213	FOS	AATGTTTTTCGTACGTAGG
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 737)
214	FOS	AATGTTTTGTATGTAGG
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 738)
215	FOS	TATATGGTCGAGAAAAAT
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 739)
216	FOS	TATATGGTTGAGAAAAAT
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 740)
217	FOS	TTTAGTATCGTAAAGTAG
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 741)
218	FOS	TTTAGTATTGTAAAGTAG
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 742)
219	FOS	GTATTGTTTCGAGTTCGAG
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 743)
220	FOS	GTATTGTTTGAGTTTGAG
	(SEQ ID NO: 29)	(SEQ ID NO: 744)
221	GSTP1	GGTTTTTTCGGTTAGTTG
	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 745)
222	GSTP1	GGTTTTTTTGTTAGTTG
	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 746)
223	GSTP1	TTTAGGGCGTTTTTTTG
	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 747)
224	GSTP1	TTTAGGGTGTTTTTTTG
	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 748)
225	GSTP1	GTAGTTTTTCGTTATTAGT
	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 749)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

53

No:	Gene	Oligo:
226	GSTP1	GTAGTTTGTGTTATTAGT
	(SEQ ID NO: 33)	(SEQ ID NO: 750)
227	HIC-1	TTAAAACGGCGTATAGGG
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 751)
228	HIC-1	TTAAAATGGTGTATAGGG
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 752)
229	HIC-1	AGGAGATTCGAAAGTTA
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 753)
230	HIC-1	AGGAGATTGAAAGTTA
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 754)
231	HIC-1	GGGTTTACGTGGTTGTT
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 755)
232	HIC-1	GGGTTTATGTGGTTGTT
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 756)
233	HIC-1	TTTAGAGCGTTAGGGTT
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 757)
234	HIC-1	TTTAGAGTGTTAGGGTT
	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 758)
235	IGF2	AGTTTGAACGATGTAAGA
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 759)
236	IGF2	AGTTTGAATGATGTAAGA
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 760)
237	IGF2	GGTTATTACGATAATTG
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 761)
238	IGF2	GGTTATTATGATAATTG
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 762)
239	IGF2	TTGTATGGTCGAGTTTAT
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 763)
240	IGF2	TTGTATGGTTGAGTTTAT
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 764)
241	IGF2	GATTAGGCGGGAAATAT
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 765)
242	IGF2	GATTAGGGTGGGAAATAT
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 766)
243	IGF2	TGGAGTTTACGGAGGTTT
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 767)
244	IGF2	TGGAGTTTATGGAGGTTT
	(SEQ ID NO: 36)	(SEQ ID NO: 768)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

54

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
245	MGMT	TAAGGATACGAGTTATAT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 769)
246	MGMT	TAAGGATATGAGTTATAT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 770)
247	MGMT	TTGGAGAGCGGTTGAGTT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 771)
248	MGMT	TTGGAGAGTGGTTGAGTT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 772)
249	MGMT	TAGGTTATCGGTGATTGT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 773)
250	MGMT	TAGGTTATTGGTGATTGT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 774)
251	MGMT	TAGGGGAGCGGTTTAGG
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 775)
252	MGMT	TAGGGGAGTGGTTTAGG
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 776)
253	MGMT	AGTAGGATCGGGATTTT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 777)
254	MGMT	AGTAGGATTGGGATTTT
	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 778)
255	MLH1	TTGAGAAGCGTTAAGTAT
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 779)
256	MLH1	TTGAGAAGTGTAAAGTAT
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 780)
257	MLH1	TTAGGTAGCGGGTAGTAG
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 781)
258	MLH1	TTAGGTAGTGGGTAGTAG
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 782)
259	MLH1	GTAGTAGTCGTTTAGGG
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 783)
260	MLH1	GTAGTAGTTGTTTAGGG
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 784)
261	MLH1	ATAGTTGTCGTTGAAGGG
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 785)
262	MLH1	ATAGTTGTTGTTGAAGGG
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 786)
263	MLH1	TTGGATGGCGTAAGTTAT
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 787)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

55

No:	Gene	Oligo:
264	MLH1	TTGGATGGTGTAAGTTAT
	(SEQ ID NO: 39)	(SEQ ID NO: 788)
265	MOS	AGTAGTTTCGTAGGTAGT
	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 789)
266	MOS	AGTAGTTTGTAGGTAGT
	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 790)
267	MOS	GTAAGTCGTTTGTATAT
	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 791)
268	MOS	GTAAGTTGTTTGTATAT
	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 792)
269	MOS	ATGTTAGTCGGTTTTGG
	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 793)
270	MOS	ATGTTAGTTGGTTTTGG
	(SEQ ID NO: 40)	(SEQ ID NO: 794)
271	MPL	GTGGTGGGCGTTTGTAAT
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 795)
272	MPL	GTGGTGGGTGTTTGTAAT
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 796)
273	MPL	TTTGAGGTCGGGAGTTTA
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 797)
274	MPL	TTTGAGGTTGGGAGTTTA
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 798)
275	MPL	TGTAGTGAGTCGAGATTA
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 1227)
276	MPL	TGTAGTGAGTTGAGATTA
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 1228)
277	MPL	GGTAATAGAGCGAGATTT
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 799)
278	MPL	GGTAATAGAGTGAGATTT
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 800)
279	MPL	TTAAGTAGCGGGTAAGGT
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 801)
280	MPL	TTAAGTAGTGGGTAAGGT
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 802)
281	MYC	TTAGAGTGTTCGGTTGTT
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 803)
282	MYC	TTAGAGTGTTCGGTTGTT
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 804)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

56

No:	Gene	Oligo:
283	MYC	TTATAATGCGAGGGTTTG
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 805)
284	MYC	TTATAATGTGAGGGTTTG
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 806)
285	MYC	AGGATTTTCGAGTTGTGT
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 807)
286	MYC	AGGATTTTGTAGTTGTGT
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 808)
287	MYC	AATTTTAGCGAGAGGTAG
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 809)
288	MYC	AATTTTAGTGAGAGGTAG
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 810)
289	MYC	TGTGGGCGTTTGGGAA
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 811)
290	MYC	TGTGGGTGTTTGGGAA
	(SEQ ID NO: 43)	(SEQ ID NO: 812)
291	N33	TGGTTCGGGAAAGGTAA
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1211)
292	N33	TGGTTTGGGAAAGGTAA
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1212)
293	N33	TGTTATTTCGAGGGTTT
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1217)
294	N33	TGTTATTTGGAGGGTTT
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1218)
295	N33	GTTTAGTTAGCGGGTTT
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1219)
296	N33	GTTTAGTTAGTGGGTTT
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1220)
297	N33	ATTAGTTCGGGGGAGGA
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1215)
298	N33	ATTAGTTTGGGGGAGGA
	(SEQ ID NO: 46)	(SEQ ID NO: 1216)
299	PMS2	AGATTATACGTTGTATGT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 813)
300	PMS2	AGATTATATGTTGTATGT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 814)
301	PMS2	TAGGAGTTCGAGATTAGT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 815)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

57

No:	Gene	Oligo:
302	PMS2	TAGGAGTTTGAGATTAGT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 816)
303	PMS2	AAATTAGTCGGGTTTAGT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 817)
304	PMS2	AAATTAGTTGGGTTTAGT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 818)
305	PMS2	GTGGATAGCGTTTGTAAT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 819)
306	PMS2	GTGGATAGTGTGTGTAAT
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 820)
307	PTEN	GGATTTTGC GTTCGTATT
	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 821)
308	PTEN	GGATTTTGTGTTTGATT
	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 822)
309	PTEN	AGAGTTATCGTTTGTTT
	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 823)
310	PTEN	AGAGTTATTGTTTGTTT
	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 824)
311	PTEN	TGATGTGGCGGATTTT
	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 825)
312	PTEN	TGATGTGGTGGGATTTT
	(SEQ ID NO: 51)	(SEQ ID NO: 826)
313	RBL2	ATTAGTGTGTTGTTAAG
	(SEQ ID NO: 53)	(SEQ ID NO: 827)
314	RBL2	ATTAGTGTGTGTTAAG
	(SEQ ID NO: 53)	(SEQ ID NO: 828)
315	RBL2	AGATTATACGGATAAGGG
	(SEQ ID NO: 53)	(SEQ ID NO: 829)
316	RBL2	AGATTATATGGATAAGGG
	(SEQ ID NO: 53)	(SEQ ID NO: 830)
317	SFN	ATAGAGTTCGGTATTGGT
	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 831)
318	SFN	ATAGAGTTTGGTATTGGT
	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 832)
319	SFN	GAGTAGGTCGAACGTTAT
	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 833)
320	SFN	GAGTAGGTTGAATGTTAT
	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 834)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

58

No:	Gene	Oligo:
321	SFN	AAAAGTAACGAGGAGGGT
	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 835)
322	SFN	AAAAGTAATGAGGAGGGT
	(SEQ ID NO: 55)	(SEQ ID NO: 836)
323	TGFBR2	ATTGGAGCGAGGAATT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 837)
324	TGFBR2	ATTGGAGTGAGGAATT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 838)
325	TGFBR2	TTGAAAGTCGGTTAAAGT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 839)
326	TGFBR2	TTGAAAGTTGGTTAAAGT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 840)
327	TGFBR2	AAAGTTTTCGGAGGGGTT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 841)
328	TGFBR2	AAAGTTTTCGGAGGGGTT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 842)
329	TGFBR2	GGTAGTTACGAGAGAGTT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 843)
330	TGFBR2	GGTAGTTATGAGAGAGTT
	(SEQ ID NO: 57)	(SEQ ID NO: 844)
331	TP73	TGATTAGCGTAGGTTG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 845)
332	TP73	TGATTAGTGTAGGTTG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 846)
333	TP73	TTTGGTGCGGTAGAGAA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 1229)
334	TP73	TTTGGTGTGTAGAGAA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 1230)
335	TP73	TTAGAGTTCGAGTTTATA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 847)
336	TP73	TTAGAGTTGAGTTTATA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 848)
337	TP73	GAGTGTTCGCTTTTGGG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 849)
338	TP73	GAGTGTTCGCTTTTGGG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 850)
339	TP73	AAGATGTGCGAGTTAGTC
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 851)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

59

No:	Gene	Oligo:
340	TP73	AAGATGTGTGAGTTAGTC
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 852)
341	TP73	AAGTTACGGGTTTATTG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 853)
342	TP73	AAGTTATGGGTTTATTG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 854)
343	TP73	TTAGATTACGGGTTTAT
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 855)
344	TP73	TTAGATTATGGGTTTAT
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 856)
345	TP73	TAAGTAGCGTCGTATTG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 857)
346	TP73	TAAGTAGTGTGTTATTG
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 858)
347	TP73	GGAAGTTTCGATGGTTA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 859)
348	TP73	GGAAGTTTGATGGTTA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 860)
349	CDKN1C	ATGAAGAACGGTTAAGGG
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 861)
350	CDKN1C	ATGAAGAATGGTTAAGGG
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 862)
351	CDKN1C	TTAAGTTACGGTTATTAG
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 863)
352	CDKN1C	TTAAGTTATGGTTATTAG
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 864)
353	CDKN1C	TTAGTGTTCTGTTGGAAT
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 865)
354	CDKN1C	TTAGTGTTGTTGGAAT
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 866)
355	CDKN1C	AGGAGTTGCGGTGGGAAT
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 867)
356	CDKN1C	AGGAGTTGTGGTGGGAAT
	(SEQ ID NO: 21)	(SEQ ID NO: 868)
357	GSK3β	GGGTAAAGCGCGGATATT
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 869)
358	GSK3β	GGGTAAAGTGTGGATATT
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 870)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

60

No:	Gene	Oligo:
359	GSK3B	TATGTTTTCGGCGAATGG
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 871)
360	GSK3B	TATGTTTTGGTGAATGG
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 872)
361	GSK3B	GGGGAATAGTCGAGGAGT
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 873)
362	GSK3B	GGGGAATAGTTGAGGAGT
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 874)
363	GSK3B	AGGAGTCGTGTGTTGGGG
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 875)
364	GSK3B	AGGAGTTGTTGTTGGGG
	(SEQ ID NO: 32)	(SEQ ID NO: 876)
365	CDC2	TAGTTATTCGGGAAGGTA
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 877)
366	CDC2	TAGTTATTGGGAAGGTA
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 878)
367	CDC2	AGGTATTGCGGTAGTTGG
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 879)
368	CDC2	AGGTATTGTGGTAGTTGG
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 880)
369	CDC2	GGGTTATTCGATTGGTGA
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 881)
370	CDC2	GGGTTATTGATTGGTGA
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 882)
371	CDC2	AAATTGTCGTATTTGGT
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 883)
372	CDC2	AAATTGTTGTATTTGGT
	(SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 884)
373	ESR1	AGATATATCGGAGTTTGG
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 885)
374	ESR1	AGATATATTGGAGTTTGG
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 886)
375	ESR1	GTTTGGTACGGGTATAT
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 887)
376	ESR1	GTTTGGTATGGGTATAT
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 888)
377	ESR1	TTTTAAATCGAGTTGTGT
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 889)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

61

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
378	ESR1	TTTAAATTGAGTTGTGT
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 890)
379	ESR1	TATGAGTTCGGGAGATTA
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 891)
380	ESR1	TATGAGTTTGGGAGATTA
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 892)
381	ESR1	TGGAGGTCGGGAGTTTA
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 893)
382	ESR1	TGGAGGTTGGGAGTTTA
	(SEQ ID NO: 28)	(SEQ ID NO: 894)
383	APAF1	TTTGGTATCGTTAGAGT
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 895)
384	APAF1	TTTGGTATGTTAGAGT
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 896)
385	APAF1	GTATGAGTCGTGGTAGGA
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 897)
386	APAF1	GTATGAGTTGTGGTAGGA
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 898)
387	APAF1	GTGGATTTCGGCGGATTT
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 899)
388	APAF1	GTGGATTTGGTGGGATTT
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 900)
389	APAF1	TTTAGAGCGGAGAAGAA
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 901)
390	APAF1	TTTAGAGGTGGAGAAGAA
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 902)
391	APAF1	GAAGAGGTAGCGAGTGGA
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 903)
392	APAF1	GAAGAGGTAGTGAGTGGA
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 904)
393	BAK1	TAGGTGTCTGGTTTGTGC
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 905)
394	BAK1	TAGGTGTGTTGTTTGTGC
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 906)
395	BAK1	TTTGTATTCGGTGGTTAT
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 907)
396	BAK1	TTTGTATTGGTGGTTAT
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 908)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

62

No:	Gene	Oligo:
397	BAK1	GGAGTTTCGCGGGTTTTT
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 909)
398	BAK1	GGAGTTTGTGGGTTTTT
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 910)
399	BAK1	TAGGATTTCGGTAGGTAA
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 911)
400	BAK1	TAGGATTTGGTAGGTAA
	(SEQ ID NO: 7)	(SEQ ID NO: 912)
401	BAX	AGTTTGGGCGTGGGTTAT
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 913)
402	BAX	AGTTTGGGTGTGGGTTAT
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 914)
403	BAX	ATTAGAGTTGCGATTGGA
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 915)
404	BAX	ATTAGAGTTGTGATTGGA
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 916)
405	BAX	GTATTATCGGGAGATGT
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 917)
406	BAX	GTATTATTGGGAGATGT
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 918)
407	BAX	TTTAGAGCGGGGGTGAG
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 919)
408	BAX	TTTAGAGGTGGGGTGAG
	(SEQ ID NO: 8)	(SEQ ID NO: 920)
409	CASP10	GAAGTAAACGGTTTTTAG
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 921)
410	CASP10	GAAGTAAATGGTTTTTAG
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 922)
411	CASP10	TTATAATACGAAGTTATG
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 923)
412	CASP10	TTATAATATGAAGTTATG
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 924)
413	CASP10	GAGGTTTTCGGATTTTTT
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 925)
414	CASP10	GAGGTTTGTGGATTTTTT
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 926)
415	CASP10	TTTTGTTTCGGTAAAAGG
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 927)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

63

No:	Gene	Oligo:
416	CASP10	TTTTGTTTGGTAAAAGG
	(SEQ ID NO: 10)	(SEQ ID NO: 928)
417	CASP8	GAATGAGTCGAGGAAGGT
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 929)
418	CASP8	GAATGAGTTGAGGAAGGT
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 930)
419	CASP8	TATTGAGACGTTAAGTAA
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 931)
420	CASP8	TATTGAGATGTTAAGTAA
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 932)
421	CASP8	TAAGGTTACGTAGTTAGT
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 933)
422	CASP8	TAAGGTTATGTAGTTAGT
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 934)
423	CASP8	GTAAATAGCGGGGATTTT
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 935)
424	CASP8	GTAAATAGTGGGGATTTT
	(SEQ ID NO: 11)	(SEQ ID NO: 936)
425	CASP9	TATATGATCGAGGATATT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 937)
426	CASP9	TATATGATTGAGGATATT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 938)
427	CASP9	ATTTTITAGTCGGGTGTT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 939)
428	CASP9	ATTTTITAGTTGGGTGTT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 940)
429	CASP9	TTAGTTAGCGTATATTGT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 941)
430	CASP9	TTAGTTAGTGTATATTGT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 942)
431	CASP9	TGATAAAACGTTAGAGGT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 943)
432	CASP9	TGATAAAATGTTAGAGGT
	(SEQ ID NO: 12)	(SEQ ID NO: 944)
433	ICL1A	TTAGAGTACGTTTTTTGG
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 945)
434	ICL1A	TTAGAGTATGTTTTTTGG
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 946)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

64

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
435	TCL1A	TTTATAGTCGATATTAGG
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 947)
436	TCL1A	TTTATAGTTGATATTAGG
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 948)
437	TCL1A	TAGATTTCGGTTTATGTTG
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 949)
438	TCL1A	TAGATTTCGGTTTATGTTG
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 950)
439	TCL1A	TTTTGGAACGGTGGTAGT
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 951)
440	TCL1A	TTTTGGAATGGTGGTAGT
	(SEQ ID NO: 56)	(SEQ ID NO: 952)
441	PML	TTAAGAGTCGTAGATGTA
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 953)
442	PML	TTAAGAGTTGTAGATGTA
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 954)
443	PML	GAGTTGGCGTATAAAGA
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 955)
444	PML	GAGTTGGGTGTATAAAGA
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 956)
445	PML	GTAAAGCGGAGAGGTAG
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 957)
446	PML	GTAAAGTGGAGAGGTAG
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 958)
447	PML	TTAAAGATACGTTAGAG
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 959)
448	PML	TTAAAGATATGTTAGAG
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 960)
449	HOXA5	AGTTAGTCGGTTTAAAG
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 961)
450	HOXA5	AGTTAGTTGGTTTAAAG
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 962)
451	HOXA5	TTATAGGTTTCGGTTTTT
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 963)
452	HOXA5	TTATAGGTTTGGTTTTT
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 964)
453	HOXA5	TTTAAAGGCGAGGTAAA
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 965)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

65

No:	Gene	Oligo:
454	HOXA5	TTTAAAGGTGAGGTAA
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 966)
455	HOXA5	ATGATAGCGTTTATTAA
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 967)
456	HOXA5	ATGATAGGTGTTTATTAA
	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 968)
457	SDC4	GGTTATACGATTTTGTG
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 969)
458	SDC4	GGTTATATGATTTTGTG
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 970)
459	SDC4	TAGGTTTTGCGGTTATA
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 971)
460	SDC4	TAGGTTTGTGGTTATA
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 972)
461	SDC4	ATGTGAATCGTTAAGA
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 973)
462	SDC4	ATGTGAATTGTGTTAAGA
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 974)
463	SDC4	TTTTATATCGGGTGTGTT
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 1223)
464	SDC4	TTTTATATGGGTGTGTT
	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 1224)
465	PITX2	TTAAGAGACGGAATAAAG
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 975)
466	PITX2	TTAAGAGATGGAATAAAG
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 976)
467	PITX2	AATTAGGACGGTTGGGA
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 977)
468	PITX2	AATTAGGATGGTTGGGA
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 978)
469	PITX2	TAGGAGTACGGATTTTA
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 979)
470	PITX2	TAGGAGTATGGATTTTA
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 980)
471	PITX2	GAGTTAATCGAGGAGTAG
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 981)
472	PITX2	GAGTTAATTGAGGAGTAG
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 982)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

66

No:	Gene	Oligo:
473	PITX2	GGATTTGGCGGGGTATTT
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 983)
474	PITX2	GGATTTGGTGGGGTATTT
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 984)
475	GPR37	AGTTTAGACGAAGTTTAA
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 985)
476	GPR37	AGTTTAGATGAAGTTTAA
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 986)
477	GPR37	GTTATTTTCGGTGGTTGA
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 987)
478	GPR37	GTTATTTTGGTGGTTGA
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 988)
479	GPR37	AGGGTGATAGCGGAAGAT
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 989)
480	GPR37	AGGGTGATAGTGAAGAT
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 990)
481	GPR37	GTTAGGATCGATATTTGT
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 991)
482	GPR37	GTTAGGATTGATATTTGT
	(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 992)
483	PRAME	GGGATTGTCGTATAAAAT
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 993)
484	PRAME	GGGATTGTTGTATAAAAT
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 994)
485	PRAME	TTAGATTTCGATTGGGA
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 995)
486	PRAME	TTAGATTGATTGGGA
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 996)
487	PRAME	TAGAGTTGCGGGTTTTTA
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 997)
488	PRAME	TAGAGTTGTGGGTTTTTA
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 998)
489	PRAME	AATAGGTCGCGTGGTGAG
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 999)
490	PRAME	AATAGGTTGTGTGGTGAG
	(SEQ ID NO: 50)	(SEQ ID NO: 1000)
491	N-MYC	AGTTTTGGCGTTTTTTTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1001)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

67

No:	Gene	Oligo:
492	N-MYC	AGTTTGGTGTTTTTTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1002)
493	N-MYC	GGTAAAGTCGTTTTTTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1003)
494	N-MYC	GGTAAAGTTGTTTTTTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1004)
495	N-MYC	TTTGTTGCGTTATAGTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1005)
496	N-MYC	TTTGTTGTGTTATAGTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1006)
497	N-MYC	ATATTTTCGAGTTTAA
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1007)
498	N-MYC	ATATTTTGTAGTTTAA
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1008)
499	N-MYC	TTTAAAGCGTAGGTTGT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1009)
500	N-MYC	TTTAAAGTGTAGGTTGT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1010)
501	N-MYC	GGTGATGCGGGGGTTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1011)
502	N-MYC	GGTGATGTGGGGGGTTT
	(SEQ ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 1012)
503	L-MYC	GGGTGGGCGGGAGTAG
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1013)
504	L-MYC	GGGTGGGTGGGAGTAG
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1014)
505	L-MYC	TTTAGTTCGGAGTGGGT
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1015)
506	L-MYC	TTTAGTTGGAGTGGGT
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1016)
507	L-MYC	AAGGAGTACGGTTAGTT
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1017)
508	L-MYC	AAGGAGTATGTTTAGTT
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1018)
509	L-MYC	AGTTAGTCGGTTGGTAT
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1019)
510	L-MYC	AGTTAGTTGGTTGGTAT
	(SEQ ID NO: 61)	(SEQ ID NO: 1020)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

68

No:	Gene	Oligo:
511	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTGTTTGC GTTTT TAG (SEQ ID NO: 1021)
512	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTGTTTGT GTTTT TAG (SEQ ID NO: 1022)
513	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTTTTAGCGTGTAAATT (SEQ ID NO: 1023)
514	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTTTTTAGTGTGTAAATT (SEQ ID NO: 1024)
515	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGGGTTATCGGGGATTGA (SEQ ID NO: 1025)
516	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGGGTTATTGGGGATTGA (SEQ ID NO: 1026)
517	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGTGGGGTCGGTTTATT (SEQ ID NO: 1027)
518	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGTGGGGTTGGTTTATT (SEQ ID NO: 1028)
519	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGAGAGGCGGGGTTTGT (SEQ ID NO: 1029)
520	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	GGAGAGGTTGGGGTTTGT (SEQ ID NO: 1030)
521	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTGAGGGTCGTTAGGTGG (SEQ ID NO: 1031)
522	L-MYC (SEQ ID NO: 61)	TTGAGGGTTGTTAGGTGG (SEQ ID NO: 1032)
523	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	ATTAGAGTCGGGAGGGGC (SEQ ID NO: 1033)
524	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	ATTAGAGTTGGGAGGGGC (SEQ ID NO: 1034)
525	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGGTATTCGGGTTTTT (SEQ ID NO: 1035)
526	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	GGGGTATTGGGTTTTT (SEQ ID NO: 1036)
527	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTTGTTTCGTTGTGGAG (SEQ ID NO: 1037)
528	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTTGTTTTGTTGTGGAG (SEQ ID NO: 1038)
529	C-ABL (SEQ ID NO: 62)	TTGAGTAGCGTTGGAGTC (SEQ ID NO: 1039)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

69

No:	Gene	Oligo:
530	C-ABL	TTGAGTAGTGTGGAGTC
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1040)
531	C-ABL	GGGTTTTGCGGTGAGGA
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1041)
532	C-ABL	GGGTTTTGTGGTGAAGGA
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1042)
533	C-ABL	AGTTTTTTCGTTGTTTAC
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1043)
534	C-ABL	AGTTTTTTTGTGTTTAC
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1044)
535	C-ABL	GTTGTTTACGGTTTTTAT
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1045)
536	C-ABL	GTTGTTTATGGTTTTTAT
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1046)
537	C-ABL	TTTGAGGGCGGTGGTGGT
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1047)
538	C-ABL	TTTGAGGGTGGTGGTGGT
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1048)
539	C-ABL	GGGTGTTTCGGGTAGAGA
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1049)
540	C-ABL	GGGTGTTTGGGTAGAGA
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1050)
541	C-ABL	GAGATTTTCGGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1051)
542	C-ABL	GAGATTTTGGGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 62)	(SEQ ID NO: 1052)
543	ELK1	TTTGTTCGTTGAGTAG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1053)
544	ELK1	TTTGTTCGTTGAGTAG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1054)
545	ELK1	TTTATTTTCGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1241)
546	ELK1	TTTATTTTGTGTTTGGG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1242)
547	ELK1	ATAGGTTTCGAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1055)
548	ELK1	ATAGGTTTGTAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1056)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

70

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
549	ELK1	TTATAGTTCGTTAGTTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1057)
550	ELK1	TTATAGTTTGTTAGTTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1058)
551	ELK1	TGGAGTATCGTGAAGGTC
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1059)
552	ELK1	TGGAGTATTGTGAAGGTC
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1060)
553	ELK1	TTTTTTACGTTAATTAC
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1061)
554	ELK1	TTTTTTATGTTAATTAC
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1062)
555	ELK1	GTAAATTACGTTATAGTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1063)
556	ELK1	GTAAATTATGTTATAGTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1064)
557	ELK1	GAAGGGTTCGTTTTTAA
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1065)
558	ELK1	GAAGGGTTTGTTTTTAA
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1066)
559	ELK1	TAATTTTTCGAGGTTTG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1067)
560	ELK1	TAATTTTTCGAGGTTTG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1068)
561	ELK1	ATTAATAGCGTTTGGTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1069)
562	ELK1	ATTAATAGTGTGTTGGTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1070)
563	ELK1	GTTTAGTTCGATTATT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1071)
564	ELK1	GTTTAGTTTGATTATT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1072)
565	ELK1	GGTTGTTACGTTATTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1073)
566	ELK1	GGTTGTTATGTTATTT
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1074)
567	Tubulin	TACTTCAACGTCCTAATA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1239)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

71

No:	Gene	Oligo:
568	Tubulin	TACTTCAACATCCTAATA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1240)
569	Tubulin	CAATACTCCGTCCATTAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1243)
570	Tubulin	CAATACTCCATCCATTAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1244)
571	Tubulin	TAATCAACCGCAACCTCC
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1075)
572	Tubulin	TAATCAACCACAACCTCC
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1076)
573	Tubulin	CTTACCCCGTCAATCAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1077)
574	Tubulin	CTTACCCCATCAATCAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1078)
575	Tubulin	GCTAATCTCGAAATAAAC
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1079)
576	Tubulin	GCTAATCTCAAAATAAAC
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1080)
577	CSF1	TTATAGAGCGTTAGTATT
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1081)
578	CSF1	TTATAGAGTGTAGTATT
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1082)
579	CSF1	AAGTGTAGCGTAGAAGAT
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1083)
580	CSF1	AAGTGTAGTGTAGAAGAT
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1084)
581	CSF1	AGGGGAGGCGGGGAAGG
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1085)
582	CSF1	AGGGGAGGTGGGGGAAGG
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1086)
583	CSF1	GGGGAAGGCGTTGAGTG
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1087)
584	CSF1	GGGGAAGGTGTTGAGTG
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1088)
585	CSF1	GTGTTTGGCGTTTGTTA
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1089)
586	CSF1	GTGTTTGGTGTGTTGTTA
	(SEQ ID NO: 65)	(SEQ ID NO: 1090)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

72

No:	Gene	Oligo:
587	CD1R3	TAACTATACGAACTACAA
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1091)
588	CD1R3	TAACTATACAAACTACAA
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1092)
589	CD1R3	ACCCTCCTCGCTAAACTT
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1093)
590	CD1R3	ACCCTCCTCACTAAACTT
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1094)
591	CD1R3	CCAAACCCCGACAACCTT
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1095)
592	CD1R3	CCAAACCCCAACAACCTT
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1096)
593	CD1R3	TCCCTTTCCGCTAAATAC
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1097)
594	CD1R3	TCCCTTTCCACTAAATAC
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1098)
595	CD1R3	TCAACTCACGTCCTTTC
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1099)
596	CD1R3	TCAACTCACATCCCTTTC
	(SEQ ID NO: 66)	(SEQ ID NO: 1100)
597	CSNK2B	AGGAGTTTCGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1235)
598	CSNK2B	AGGAGTTTGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1236)
599	CSNK2B	ATTTCCTCCGAACTCCT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1237)
600	CSNK2B	ATTTCCTCCAAAACCTCT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1238)
601	CSNK2B	GATTGATTCTGATTAGGG
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1101)
602	CSNK2B	GATTGATTGTATTAGGG
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1102)
603	CSNK2B	CCCTAATACGAATCAATC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1103)
604	CSNK2B	CCCTAATACAAATCAATC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1104)
605	CSNK2B	GGATTAGCGGATTGGTC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1105)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

73

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
606	CSNK2B	GGATTTAGTGGATTGGTC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1106)
607	CSNK2B	GACCAATCCGCTAAATCC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1107)
608	CSNK2B	GACCAATCCACTAAATCC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1108)
609	CSNK2B	GGATTGGTCGAGGATAGG
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1109)
610	CSNK2B	GGATTGGTTGAGGATAGG
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1110)
611	CSNK2B	CCTATCCTCGACCAATCC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1111)
612	CSNK2B	CCTATCCTCAACCAATCC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1112)
613	CSNK2B	GAGGGGAACGTGAGGAGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1113)
614	CSNK2B	GAGGGGAATGTGAGGAGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1114)
615	CSNK2B	TCTCCTCACGTCCCTC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1115)
616	CSNK2B	TCTCCTCACATTCCCTC
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1116)
617	CSNK2B	TAGGTTAGCGTATTGGGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1117)
618	CSNK2B	TAGTTAGTGTATTGGGA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1118)
619	CSNK2B	TCCCAATACGCTAACCTA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1119)
620	CSNK2B	TCCCAATACATAACCTA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1120)
621	CSNK2B	TATTGGGACGTTTGTAGTT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1121)
622	CSNK2B	TATTGGGATGTTTGTAGTT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1122)
623	CSNK2B	AACTAAAACGTCCAATA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1123)
624	CSNK2B	AACTAAAACATCCAATA
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1124)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

74

No:	Gene	Oligo:
625	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TTGTTATTCGGTTT TAGT (SEQ ID NO: 1125)
626	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TTGTTATTGGTTT TAGT (SEQ ID NO: 1126)
627	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGTTGGTACGGAGGTATA (SEQ ID NO: 1127)
628	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGTTGGTATGGAGGTATA (SEQ ID NO: 1128)
629	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGTATAGCGTTAGAGGG (SEQ ID NO: 1129)
630	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGTATAGTGTAGAGGG (SEQ ID NO: 1130)
631	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGGGTTACGTGGTTTG (SEQ ID NO: 1131)
632	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	AGGGGTTATGTGGTTTG (SEQ ID NO: 1132)
633	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TGTATAGTCGGATGGGGA (SEQ ID NO: 1133)
634	Me491/TD63 (SEQ ID NO: 68)	TGTATAGTTGGATGGGGA (SEQ ID NO: 1134)
635	AR (SEQ ID NO: 69)	ACCTCTCTCGAAATAACA (SEQ ID NO: 1135)
636	AR (SEQ ID NO: 69)	ACCTCTCTCAAATAACA (SEQ ID NO: 1136)
637	AR (SEQ ID NO: 69)	CTCTAAAACGCAACCTCT (SEQ ID NO: 1137)
638	AR (SEQ ID NO: 69)	CTCTAAAACACAACCTCT (SEQ ID NO: 1138)
639	AR (SEQ ID NO: 69)	AACTACTACGACAACCCC (SEQ ID NO: 1139)
640	AR (SEQ ID NO: 69)	AACTACTACAACAACCCC (SEQ ID NO: 1140)
641	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTAACCTCGCTCAAAAT (SEQ ID NO: 1141)
642	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTAACCTCACTCAAAAT (SEQ ID NO: 1142)
643	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCGAATACTAC (SEQ ID NO: 1257)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

75

No:	Gene	Oligo:
644	AR	ACTACCTTCAAATACTAC
	(SEQ ID NO: 69)	(SEQ ID NO: 1258)
645	CDK 4	TATGGGGTCGTAGGAATC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1143)
646	CDK 4	TATGGGGTGTAGGAATC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1144)
647	CDK 4	GATTCCTACGACCCATA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1145)
648	CDK 4	GATTCCTACAACCCATA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1146)
649	CDK 4	GGAAGGGTCGTTAAGGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1147)
650	CDK 4	GGAAGGGTTGTTAAGGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1148)
651	CDK 4	CCCTTAAACGACCCTTC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1149)
652	CDK 4	CCCTTAAACAACCCCTTC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1150)
653	CDK 4	TTTAAGGGCGGAAGTGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1247)
654	CDK 4	TTTAAGGGTGGGAAGTGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1248)
655	CDK 4	CCACTTCCCGCCCTTAAA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1249)
656	CDK 4	CCACTTCCCAACCTTAAA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1250)
657	CDK 4	AGGATTTTCGATGTAAGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1151)
658	CDK 4	AGGATTTTGTATGTAAGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1152)
659	CDK 4	CCTTACATCGAAAATCCT
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1153)
660	CDK 4	CCTTACATCAAAAATCCT
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1154)
661	CDK 4	GGGTTTACGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1231)
662	CDK 4	GGGTTTATGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1232)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

76

No:	Gene	Oligo:
663	CDK 4	TCCAACACGTAAAACCC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1233)
664	CDK 4	TCCAACCATATAAACCC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1234)
665	Humos	CCTTACTACGTAAACTC
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1155)
666	Humos	CCTTACTACATTAACCTC
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1156)
667	Humos	GTTACCACCGAACTCCAT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1245)
668	Humos	GTTACCACCAAACTCCAT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1246)
669	Humos	CTCCCCTACGTCCCCCTC
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1253)
670	Humos	CTCCCCTACATCCCCCTC
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1254)
671	Humos	CTCCAATACGACAATAAA
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1157)
672	Humos	CTCCAATACAACAATAAA
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1158)
673	Humos	AAACAAACCGTTCACAAC
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1251)
674	Humos	AAACAAACCATTCACAAC
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1252)
675	CDC25A	GTGTAGGTCGGTTTGTT
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1159)
676	CDC25A	GTGTAGGTTGGTTTGTT
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1160)
677	CDC25A	AACCAAACCGACCTACAC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1161)
678	CDC25A	AACCAAACCAACCTACAC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1162)
679	CDC25A	TTGTTATTCGGAGTTGGG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1163)
680	CDC25A	TTGTTATTTGGAGTTGGG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1164)
681	CDC25A	CCCAACTCCGAATAACAA
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1165)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

77

No:	Gene	Oligo:
682	CDC25A	CCCAACTCCAAATAACAA
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1166)
683	CDC25A	TGGGTAAAGCGGGTGGGAG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1167)
684	CDC25A	TGGGTAAAGTGGGTGGGAG
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1168)
685	CDC25A	CTCCCACCCGCTTACCCA
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1169)
686	CDC25A	CTCCCACCCACTTACCCA
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1170)
687	CDC25A	GAGAATAGCGAAGATAGC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1171)
688	CDC25A	GAGAATAGTGAAGATAGC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1172)
689	CDC25A	GCTATCTTCGCTATTCTC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1173)
690	CDC25A	GCTATCTTCACTATTCTC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1174)
691	CDC25A	TATTGAGTCGTTATTATC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1175)
692	CDC25A	TATTGAGTTGTTATTATC
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1176)
693	CDC25A	GATAATAACGACTCAATA
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1177)
694	CDC25A	GATAATAACAACCTCAATA
	(SEQ ID NO: 72)	(SEQ ID NO: 1178)
695	CMYCex3	GAAGAAATCGATGTTGTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1179)
696	CMYCex3	GAAGAAATTGATGTTGTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1180)
697	CMYCex3	AGGTGTTACGTTTTTATA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1181)
698	CMYCex3	AGGTGTTATGTTTTTATA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1182)
699	CMYCex3	TTTTTATTCGGAAGGATT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1183)
700	CMYCex3	TTTTTATTTGGAAGGATT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1184)

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

78

No:	Gene	Oligo:
701	CMYCex3	GTAATAATCGAAAATGTA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1185)
702	CMYCex3	GTAATAATTGAAAATGTA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1186)
703	CMYCex3	TTAAGAGGCGAATATATA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1187)
704	CMYCex3	TTAAGAGGTGAATATATA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1188)
705	CMYCex3	ATATATAACGTTTGGAG
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1189)
706	CMYCex3	ATATATAATGTTTGGAG
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1190)
707	CMYCex3	TTTGGAGCGTTAGAGGA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1191)
708	CMYCex3	TTTGGAGTGTAGAGGA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1192)
709	CMYCex3	AGGAGGAACGAGTAAAA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1193)
710	CMYCex3	AGGAGGAATGAGTAAAA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1194)
711	CMYCex3	AGTAAAACGGAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1195)
712	CMYCex3	AGTAAAATGGAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1196)
713	CMYCex3	TTGTTTTCGTGATTAGA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1197)
714	CMYCex3	TTGTTTGTGTGATTAGA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1198)
715	CMYCex3	TTAGATTTCGGAGTTGGA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1199)
716	CMYCex3	TTAGATTTGGAGTTGGA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1200)
717	CMYCex3	ATTTTGTTTCGTTAAGTA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1201)
718	CMYCex3	ATTTGTTTGTTTAAGTA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1202)
719	CMYCex3	AATAGTTACGGAATTTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1203)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

79

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
720	CMYCex3	AATAGTTATGGAATTTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1204)
721	CMYCex3	TTTTGTGCGTAAGGAAA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1205)
722	CMYCex3	TTTTGTGTGTAAGGAAA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1206)
723	CMYCex3	AAGGAAAACGATTTTTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1207)
724	CMYCex3	AAGGAAAATGATTTTTT
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1208)
725	CMYCex3	TGAGTAATCGTTATGAA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1209)
726	CMYCex3	TGAGTAATTGTTATGAA
	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 1210)

Table 4: Hybridisation oligonucleotides used in the differentiation between healthy and leukemia cells (Figure 3)

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
1	Humos	GTTACCACCGAACTCCAT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1245)
2	Humos	GTTACCACCAAACTCCAT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1246)
3	Humos	GTTACCACCGAACTCCAT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1245)
4	Humos	GTTACCACCAAACTCCAT
	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 1246)
5	CDK 4	TTTAAGGCGGGAAGTGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1247)
6	CDK 4	TTTAAGGGTGGGAAGTGG
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1248)
7	CDK 4	CCACTTCCCGCCCTTAAA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1249)
8	CDK 4	CCACTTCCCACCCCTTAAA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1250)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

80

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
9	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGCGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1247)
10	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	TTTAAGGGTGGGAAGTGG (SEQ ID NO: 1248)
11	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCCGCCCTTAAA (SEQ ID NO: 1249)
12	CDK 4 (SEQ ID NO: 70)	CCACTTCCACCCCTTAAA (SEQ ID NO: 1250)
13	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCGTTCACAAC (SEQ ID NO: 1251)
14	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCATTCACAAC (SEQ ID NO: 1252)
15	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCGTTCACAAC (SEQ ID NO: 1251)
16	Humos (SEQ ID NO: 71)	AAACAAACCATTCACAAC (SEQ ID NO: 1252)
17	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACGTCCCCCTC (SEQ ID NO: 1253)
18	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACATCCCCCTC (SEQ ID NO: 1254)
19	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACGTCCCCCTC (SEQ ID NO: 1253)
20	Humos (SEQ ID NO: 71)	CTCCCCTACATCCCCCTC (SEQ ID NO: 1254)
21	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTGGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1255)
22	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTTGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1256)
23	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCGAATACTAC (SEQ ID NO: 1257)
24	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCAAATACTAC (SEQ ID NO: 1258)
25	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTGGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1255)
26	AR (SEQ ID NO: 69)	GTAGTATTTGAAGGTAGT (SEQ ID NO: 1256)
27	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCGAATACTAC (SEQ ID NO: 1257)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

81

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
28	AR (SEQ ID NO: 69)	ACTACCTTCAAATACTAC (SEQ ID NO: 1258)

Table 3: Hybridisation oligonucleotides used in differentiation between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia (Figures 5 and 6).

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
1	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTTCGGGAAAGGTAA (SEQ ID NO: 1211)
2	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTTGGGAAAGGTAA (SEQ ID NO: 1212)
3	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGTGGGAAGCGTATTTAT (SEQ ID NO: 1213)
4	EGR4 (SEQ ID NO: 26)	GGTGGGAAGTGTATTTAT (SEQ ID NO: 1214)
5	N33 (SEQ ID NO: 46)	ATTTAGTTCGGGGAGGA (SEQ ID NO: 1215)
6	N33 (SEQ ID NO: 46)	ATTTAGTTGGGGAGGA (SEQ ID NO: 1216)
7	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTATTTTCGGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1217)
8	N33 (SEQ ID NO: 46)	TGTTATTTTCGGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1218)
9	N33 (SEQ ID NO: 46)	GTTTAGTTAGCGGGTTT (SEQ ID NO: 1219)
10	N33 (SEQ ID NO: 46)	GTTTAGTTAGTGGGTTT (SEQ ID NO: 1220)
11	Humos (SEQ ID NO: 71)	GAGTTAACGTAGTAAGG (SEQ ID NO: 1221)
12	Humos (SEQ ID NO: 71)	GAGTTAATGTAGTAAGG (SEQ ID NO: 1222)
13	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TTTTATATCGGGTGTGTT (SEQ ID NO: 1223)
14	SDC4 (SEQ ID NO: 54)	TTTTATATGGGTGTGTT (SEQ ID NO: 1224)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

82

No:	Gene	Oligo:
15	EGR4	TTATAGTTTCGAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 1225)
16	EGR4	TTATAGTTTGAGTTTTT
	(SEQ ID NO: 26)	(SEQ ID NO: 1226)
17	MPL	TGTAGTGAGTCGAGATTA
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 1227)
18	MPL	TGTAGTGAGTTGAGATTA
	(SEQ ID NO: 42)	(SEQ ID NO: 1228)
19	TP73	TTTGGTGC CGTAGAGAA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 1229)
20	TP73	TTTGGTGTGTGTAGAGAA
	(SEQ ID NO: 58)	(SEQ ID NO: 1230)
21	CDK 4	GGGTTTACGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1231)
22	CDK 4	GGGTTTATGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1232)
23	CDK 4	TCCAACCACGTAAAACCC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1233)
24	CDK 4	TCCAACCACATAAAACCC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1234)
25	CDK 4	GGGTTTACGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1231)
26	CDK 4	GGGTTTATGTGGTTGGA
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1232)
27	CDK 4	TCCAACCACGTAAAACCC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1233)
28	CDK 4	TCCAACCACATAAAACCC
	(SEQ ID NO: 70)	(SEQ ID NO: 1234)
29	CSNK2B	AGGAGTTTCGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1235)
30	CSNK2B	AGGAGTTTGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1236)
31	CSNK2B	ATTCCTCCGAAACTCCT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1237)
32	CSNK2B	ATTCCTCCAAACTCCT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1238)
33	CSNK2B	AGGAGTTTCGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1235)

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

83

<i>No:</i>	<i>Gene</i>	<i>Oligo:</i>
34	CSNK2B	AGGAGTTTGGAGGAAAT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1236)
35	CSNK2B	ATTTCTCCGAAACTCCT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1237)
36	CSNK2B	ATTTCTCCAAACTCCT
	(SEQ ID NO: 67)	(SEQ ID NO: 1238)
37	Tubulin	TACTTCAACGTCCTAATA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1239)
38	Tubulin	TACTTCAACATCCTAATA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1240)
39	Tubulin	TACTTCAACGTCCTAATA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1239)
40	Tubulin	TACTTCAACATCCTAATA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1240)
41	ELK1	TTTATTTTCGTTTITGGG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1241)
42	ELK1	TTTATTTTGTTTITGGG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1242)
43	ELK1	TTTATTTTCGTTTITGGG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1241)
44	ELK1	TTTATTTTGTTTITGGG
	(SEQ ID NO: 63)	(SEQ ID NO: 1242)
45	Tubulin	CAATACTCCGTCCATTAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1243)
46	Tubulin	CAATACTCCATCCATTAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1244)
47	Tubulin	CAATACTCCGTCCATTAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1243)
48	Tubulin	CAATACTCCATCCATTAA
	(SEQ ID NO: 64)	(SEQ ID NO: 1244)

Description of the figures:

Figure 1

Methylation analysis and quantification of two CpG dinucleotides in exon 14 of the human factor VIII gene. For calibration purpose a series of hybridisations was performed with mixtures of artificially up- and down-methylated DNA fragments of the factor VIII exon 14 gene. Down- and up-methylated DNA fragments were mixed at ratios: 0:3, 1:2, 2:1, 3:0, representing a methylation status of 100 %, 66 %, 33 % and 0 %, respectively. **A**, Methylation detection by oligonucleotide microarray hybridisation. The fluorescence signals of the CG and TG version of the factor VIII exon 14 oligonucleotides F8-5 (TTATTAACGGGAAATAAT, TTATTAATGGGAAATAAT) and F8-3 (AATAAGTTCGAAATAGAA, AATAAGTTTGAAATAGAA) are shown which are generated by samples reflecting the methylation status 0%, 33 %, 66 % and 100 %. The hybridisation signals are shown in a false colour image with the colours blue, green and yellow indicating fluorescence signal ranges at 635nm of 200 to 800, 800 to 2000 and 2000 to 8000, respectively. **B**, Distribution and probability of measurement of different methylated DNA for two CpG methylation. For each CpG position two kinds of detection oligomers were used. Oligomers that hybridise if the CpG was methylated are referred to as CG oligomer and the oligomers that hybridise if the CpG was not methylated are referred to as TG oligos. For the 4 kinds of compounds 59, 36, 40, 63 identical slides were made. The log-ratio of the CG and the TG detection oligomer hybridisation intensity was calculated and then averaged for experimental subgroups each containing 3 identical experiments. The distribution function of the CG: TG ratios shows that measurement values of the different mixtures are well separated and therefore allow a high resolution detection of the methylation level of a single CpG. This is an essential prerequisite for methylation dependent class prediction or class discovery. Taking into account only the 100% and 0% methylated DNA, and averaging for the 22 CpG sites investigated in the calibration experiments, the average error for methylation detection is 4%. The log-ratios are not grouped symmetrically around zero but shifted towards negative values. We assume that the energetically different effects of G-T and A-C mismatches allow hybridisations of the methylated allele to the oligonucleotide representing the unmethylated more easily than vice versa.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

85

Figure 2

Gender separation and CpG site prediction of ALL/AML and healthy blood samples. High probability of methylation corresponds to red, uncertainty to black and low probability to green. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Figure 2 A, Gender separation. The 20 CpG sites with the most significant difference between female and male samples are shown. Only non cell lines were used. As expected the significant CpG dinucleotides come from the two X-chromosome genes (ELK1, AR).

Figure 2 B, differentiation between healthy samples and ALL samples. The 54 CpG sites with the most significant difference between healthy and ALL samples are shown. High probability of methylation corresponds to red, uncertainty to black and low probability to green. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Figure 2C shows Figure 2B reproduced in greyscale. High probability of methylation corresponds to black, uncertainty to grey and low probability to white. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Legend Fig. 2A:

1 ~ Female

2 ~ Male

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

86

Legend Fig. 2B:

1 – Healthy

2 – ALL

Figure 3

Class prediction and class discovery of blood samples. **A**, The plot shows a SVM trained on the two most significant CpG sites for the healthy-ALL discrimination using all available healthy and ALL samples as training data. The red points are healthy, the yellow ones ALL samples. Circled points are the support vectors defining the white borderline between the green area of healthy prediction and the blue area of an ALL prediction. The colour intensity corresponds to the prediction strength. **B**, Support Vector Machine for AML-ALL class prediction. The red points are ALL, the yellow ones AML samples. Circled points are the support vectors defining the white borderline between the green area of ALL prediction and the blue area of an AML prediction. The colour intensity corresponds to the prediction strength. **C**, Class discovery. The figure shows a hierarchical clustering of all available samples. Healthy individuals are coloured green, patients with ALL red and patients with AML blue. Asterisks indicate cell line samples. The feature space consisted of all CpG sites except those from the two X-chromosomal genes. The diagnosis was unknown to the algorithm.

Legend Fig. 3A: t-Test ranking (Healthy vs. ALL)

1 – MOS CpG5

2 – CDK4 CpG2

Legend Fig. 3B: t-Test ranking (AML vs. ALL)

1 - CSNK2B CpG2

2 – CDK4 CpG10

Figure 4: Feature selection methods.

Figure 4A shows principle component analysis. The entire data set was projected onto its first 2 principle components. Circles represent cell lines, triangles primary patient tissue. Filled circles or triangles are AML, empty ones ALL samples.

Figure 4B: Fisher criterion. The 20 highest ranking CpG sites according to the Fisher criterion are shown. The highest ranking features are on the bottom of the plot. High probability of methylation corresponds to black, uncertainty to grey and low probability to white.

Figure 4C: Two sample t-test.

Figure 4D: Backward elimination.

Figure 5

Support Vector Machine on two best features of the Fisher criterion. The plot shows a SVM trained on the two highest ranking CpG sites according to the Fisher criterion with all ALL and AML samples used as training data. The black points are AML, the grey ones ALL samples. Circled points are the support vectors defining the white borderline between

the areas of AML and ALL prediction. The grey value of the background corresponds to the prediction strength.

Legend Fig. 5:

1 – CSNK2B CpG2

2 – CDK4 CpG3

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

88

Figure 6

Dimension dependence of feature selection performance. The plot shows the generalisation performance of a linear SVM with four different feature selection methods against the number of selected features. The x-axis is scaled logarithmically and gives the number of input features for the SVM, starting with two. The y-axis gives the achieved generalisation performance. Note that the maximum number of principle components corresponds to the number of available samples.

Legend Fig. 6:

- 1 – Feature Number
- 2 – Test Error
- 3 – Fisher Criterion
- 4 – t-Test
- 5 – Backward Elimination
- 6 – Principle Component Analysis

Figure 7A

Differentiation between healthy and acute lymphocytic leukemia samples. High probability of methylation corresponds to red, uncertainty to black and low probability to green. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Figure 7B

Differentiation between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia, this shows Figure 7A reproduced in greyscale. High probability of methylation

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

89

corresponds to black, uncertainty to grey and low probability to white. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Figure 8A

Differentiation between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia samples. High probability of methylation corresponds to red, uncertainty to black and low probability to green. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Figure 8B

Differentiation between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia, this shows Figure 8A reproduced in greyscale. High probability of methylation corresponds to red, uncertainty to black and low probability to green. The labels on the left side of the plot are gene and CpG identifiers. The labels on the right side give the significance of the difference between the means of the two groups. Each row corresponds to a single CpG and each column to the methylation levels of one sample.

Patent Claims

1. A method for detecting and differentiating between hematopoietic cell proliferative disorders associated with at least one gene and/or their regulatory regions from the group comprising ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARHI, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2, CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIb beta, GPR37, GSK3B, GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFBR2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3 in a subject, said method comprising contacting a target nucleic acid in a biological sample obtained from said subject with at least one reagent or a series of reagents, wherein said reagent or series of reagents, distinguishes between methylated and non methylated CpG dinucleotides within the target nucleic acid.
2. A method according to claim 1 wherein,
said method differentiates between normal hematopoietic cells and proliferative disorder hematopoietic cells.
3. A method according to claim 1 wherein,
said method differentiates between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia.
4. Use of methods according to claims 1 and 2 wherein,
CDKN1A, CDK 4, AR are used to differentiate between healthy hematopoietic cells and proliferative disorder hematopoietic cells.
5. Use of methods according to claims 1 and 3 wherein,
N33,EGR4, CDKN1A, SDC4, MPL, TP 73, BAK 1, CSNK2B, ARHI, CASP 10 are used to

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

91

differentiate between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia.

6. A method according to any one of Claims 1 to 5 comprising the following steps:

- obtaining a biological sample containing genomic DNA
- extracting the genomic DNA
- converting cytosine bases in the genomic DNA sample which are unmethylated at the 5-position, by treatment, to uracil or another base which is dissimilar to cytosine in terms of base pairing behaviour;
- fragments of the pretreated genomic DNA are amplified
- identification of the methylation status of one or more cytosine positions

7. The method according to claim 6,

characterized in that the reagent is a solution of bisulfite, hydrogen sulfite or disulfite.

8. The method as recited in Claims 6 and 7,

characterized in that the amplification is carried out by means of the polymerase chain reaction (PCR).

9. The method as recited in one of the Claims 6 through 8,

characterized in that the amplification is carried out by means of a heat-resistant DNA polymerase.

10. The method as recited in one of the Claims 6 through 9,

characterized in that more than ten different fragments having a length of 100 - 2000 base pairs are amplified.

11. The method as recited in one of claims 6 through 10,

wherein the amplification step is carried out using a set of primer oligonucleotides

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

92

comprising SEQ ID NO: 387 through SEQ ID NO: 534.

12. The method as recited in one of the Claims 6 through 11, characterized in that the amplification of several DNA segments is carried out in one reaction vessel.
13. The method as recited in one of Claims 6 through 12, characterized in that the amplification step preferentially amplifies DNA which is of particular interest in healthy and/or diseased hematopoietic cells, based on the specific genomic methylation status of hematopoietic cells, as opposed to background DNA.
14. The method according to one of Claims 6 through 13, characterized in that the methylation status within at least one gene and/or their regulatory regions from the group comprising ABL1, ABL1, APAF1, APC, AR, ARH1, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2, CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIIb beta, GPR37, GSK3 β , GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFB β 2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3 is detected by hybridization of each amplificate to an oligonucleotide or peptide nucleic acid (PNA)-oligomer.
15. A method according to Claim 14, characterized in that the oligonucleotide or peptide nucleic acid (PNA)-oligomer is taken from the group comprising SEQ ID NO: 535 to SEQ ID NO: 1258.
16. The method according to Claims 6 through 15, characterized in that the amplicates are labelled.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

93

17. The method as recited in Claim 16,
characterized in that the labels of the amplicates are fluorescence labels.
18. The method as recited in Claim 16,
characterized in that the labels of the amplicates are radionuclides.
19. The method as recited in Claims 16,
characterized in that the labels of the amplicates are detachable molecule fragments having a
typical mass which are detected in a mass spectrometer.
20. The method as recited in one of the Claims 6 through 19,
characterized in that the amplicates or fragments of the amplicates are detected in the mass
spectrometer.
21. The method as recited in one of the Claims 19 and 20,
characterized in that the produced fragments have a single positive or negative net charge.
22. The method as recited in one of the Claims 19 through 21,
characterized in that detection is carried out and visualized by means of matrix assisted laser
desorption/ionization mass spectrometry (MALDI) or using electron spray mass spectrometry
(ESI).
23. A method according to Claims 1 through 5 comprising the following steps;
- a) obtaining a biological sample containing genomic DNA
 - b) extracting the genomic DNA
 - c) digesting the genomic DNA comprising at least one or more CpGs of the genes ABL1, ABL1,
APAF1, APC, AR, ARH1, BAK1, BAX, BCL2, CASP10, CASP8, CASP9, CCND2, CDC2 ,

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

94

CDC25A, CDH1, CDH3, CDK 4, CDKN1A, CDKN1B (p27 Kip1), CDKN1C, CDKN2a, CDKN2B, CSNK2B, DAPK1, EGR4, ELK1, ESR1, FOS, GPIb beta, GPR37, GSK3 β , GSTP1, HIC-1, HOXA5, IGF2, MDR1, MGMT, MLH1, MOS, Humos, MPL, MYC, MYCL1, MYOD1, N33, PITX2, PML, PMS2, PRAME, PTEN, RB1, RBL2, SDC4, SFN, TCL1A, TGFB β 2, TP73, WT1, N-MYC, L-MYC, C-ABL, ELK1, Tubulin, CSF1, CD1R3, CSNK2B, Me491/TD63, AR, CDK 4, Humos, CDC25A, CMYCex3 with one or more methylation sensitive restriction enzymes

d) detection of the DNA fragments generated in the digest of step c)

24.A method according to Claim 23,

wherein the DNA digest is amplified prior to Step d.

25.The method as recited in Claim 24,

characterized in that the amplification is carried out by means of the polymerase chain reaction (PCR).

26.The method as recited in one of the Claims 24 and/or 25,

characterized in that the amplification of more than one DNA fragments is carried out in one reaction vessel.

27.The method as recited in one of the Claims 24 through 26,

characterized in that the polymerase is a heat-resistant DNA polymerase.

28.An isolated nucleic acid of a pretreated genomic DNA according to one of the sequences taken from the group comprising SEQ ID NO: 95 to SEQ ID NO: 386 and sequences complementary thereto.

29.An oligomer, in particular an oligonucleotide or peptide nucleic acid (PNA)-oligomer, said oligomer comprising at least one base sequence of at least 10 nucleotides which hybridizes to or

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

95

is identical to a pretreated genomic DNA according to one of the SEQ ID NO:95 to SEQ ID NO: 386 according to Claim 28.

30.The oligonucleotide as recited in Claim 29; wherein the base sequence includes at least one CpG or TpG dinucleotide sequence.

31.The oligonucleotide as recited in Claim 30;characterized in that the cytosine of the at least one CpG or TpG dinucleotide is/are located approximately in the middle third of the oligomer.

32.An oligomer, in particular an oligonucleotide or peptide nucleic acid (PNA)-oligomer, according to one of the sequences taken from the group comprising SEQ ID NO: 535 to SEQ ID NO: 1258.

33.A set of oligonucleotides, comprising at least two oligonucleotides according to any of Claims 29 through 32.

34.A set of oligonucleotides, comprising at least two oligonucleotides according to SEQ ID NO: 1245, 1245, 1246, 1246, 1247, 1247, 1248, 1248, 1249, 1249, 1250, 1250, 1251, 1251, 1252, 1252, 1253, 1253, 1254, 1254, 1255, 1255, 1256, 1256, 1257, 1257, 1258, 1258 .

35.One or more isolated nucleic acid(s) taken from the group according to SEQ ID NO: 88 - 94 .

36.A set of oligonucleotides, comprising at least two oligonucleotides according to SEQ ID NO: 1211 - 1231, 1231, 1232, 1232, 1233, 1233, 1234, 1234, 1235, 1235, 1236, 1236, 1237, 1237, 1238, 1238, 1239, 1239, 1240, 1240, 1241, 1241, 1242, 1242, 1243, 1243, 1244, 1244 .

37.One or more isolated nucleic acid(s) taken from the group according to SEQ ID NO: 74 - 87 .

38. A set of oligomers, peptide nucleic acid (PNA)-oligomers and/or isolated nucleic acids as recited in Claims 33 through 35 and 37, comprising oligomers for detecting the methylation state

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

96

of all CpG dinucleotides within one or more of the sequences according to SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 73 and sequences complementary thereto.

39. Use of a set of oligomers or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers according to any of claims 29 through 34 and 36 as probes for determining the cytosine methylation state and/or single nucleotide polymorphisms (SNPs) of sequences according to SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 73 and sequences complementary thereto.

40. Use of a set of oligonucleotides according to Claim 34 or nucleic acid(s) according to Claim 35 for the differentiation between healthy hematopoietic cells and proliferative disorder hematopoietic cells.

41. Use of a set of oligonucleotides according to Claim 36 or nucleic acid(s) according to Claim 37 for the differentiation between acute lymphocytic leukemia and acute myelogenous leukemia.

42. A set of at least two oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers as recited in Claim 29, as primer oligonucleotides for the amplification of DNA sequences of one of SEQ ID NO: 95 to SEQ ID NO: 386 according to Claim 28 and/or sequences complementary thereto and segments thereof.

43. Use of a pretreated genomic DNA according to claim 28 for the determination of the methylation status of a corresponding genomic DNA and/or detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs).

44. A set of oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers as recited in Claims 33, 34 or 36 characterized in that at least one oligonucleotide is bound to a solid phase.

45. A set of oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers as recited in Claims 33, 34 or 36, characterized in that all members of the set are bound to a solid phase.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

97

46. A method for manufacturing an arrangement of different oligomers or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers (array) for analyzing diseases associated with the corresponding genomic methylation status of the CpG dinucleotides within one of the SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 73 and sequences complementary thereto, wherein at least one oligomer according to any of the Claims 33, 34 or 36 is coupled to a solid phase.
47. An arrangement of different oligomers or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers (array) obtainable according to claims 44 and 45.
48. An array of different oligonucleotide- and/or PNA-oligomer sequences as recited in Claim 47, characterized in that these are arranged on a plane solid phase in the form of a rectangular or hexagonal lattice.
49. A nucleic acid or peptide nucleic acid array for the analysis of hematopoietic cell proliferative disorders associated with the methylation state of genes comprising at least one nucleic acid according to one of the preceding claims.
50. The array as recited in any of the Claims 47 through 49, characterized in that the solid phase surface is composed of silicon, glass, polystyrene, aluminium, steel, iron, copper, nickel, silver, or gold.
51. A kit comprising a bisulfite (= disulfite, hydrogen sulfite) reagent as well as oligonucleotides and/or PNA-oligomers according to one of the Claims 29 through 37.
52. The use of oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA)-oligomers according to SEQ ID NO: 74 to SEQ ID NO: 94 and SEQ ID NO: 535 to SEQ ID NO: 1258 for the detection of a predisposition to, differentiation between subclasses, diagnosis, prognosis, treatment and/or

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

98

monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders.

53.A DNA sequence according to one of the sequences taken from the group comprising SEQ ID NO: 95 to SEQ ID NO: 386 and sequences complementary thereto for use in the analysis of cytosine methylation within said nucleic acid for the detection of a predisposition to, differentiation between subclasses, diagnosis, prognosis, treatment and/or monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders.

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

1/18

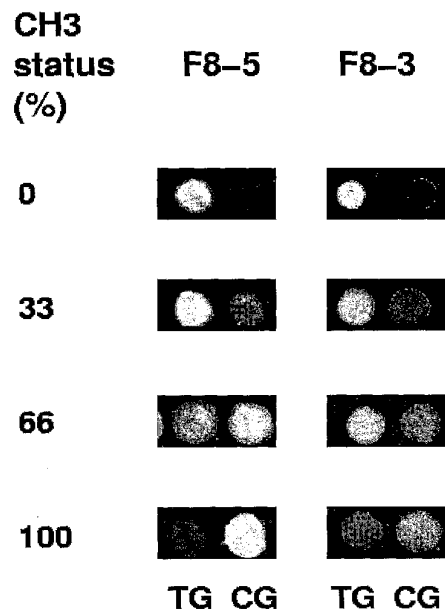


Figure 1A

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

2/18

Figure 1B

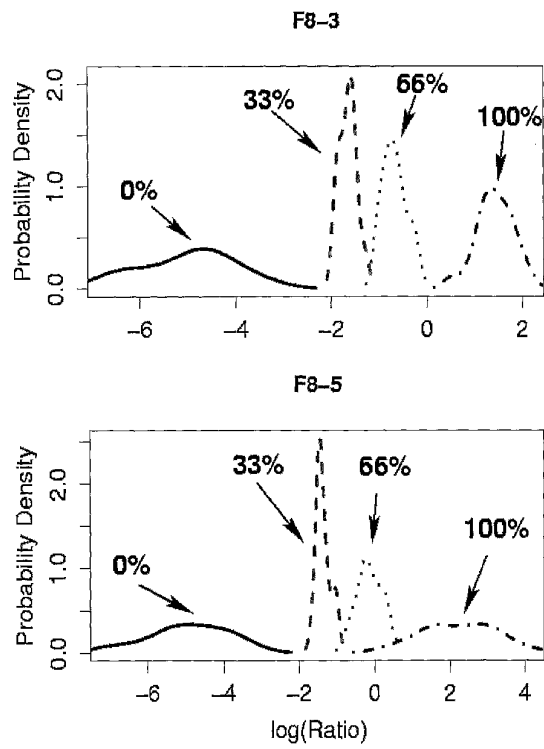
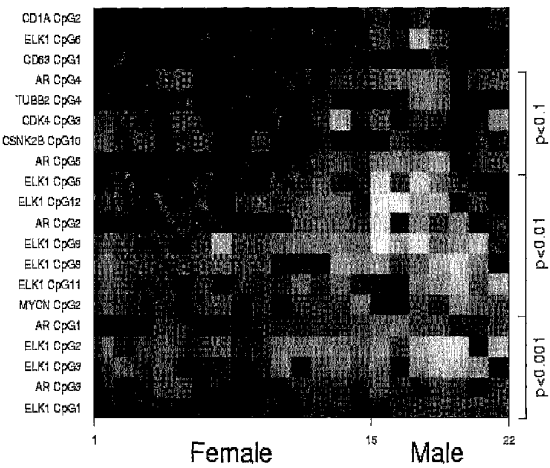


Figure 2A

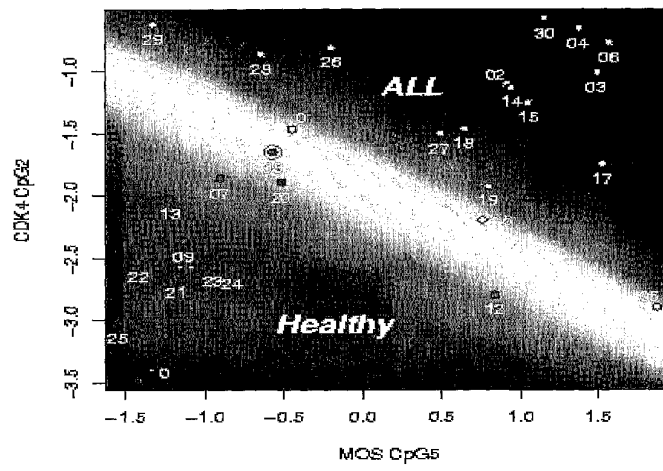


WO 02/07272

PCT/EP02/03401

6/18

Figure 3A

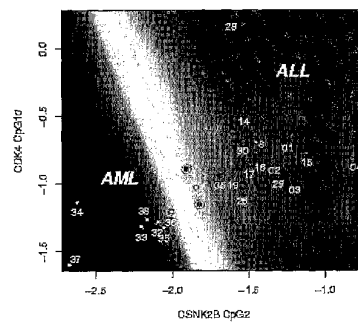


WO 02/07272

PCT/EP02/03401

7/18

Figure 3B



WO 02/077272

PCT/EP02/03401

9/18

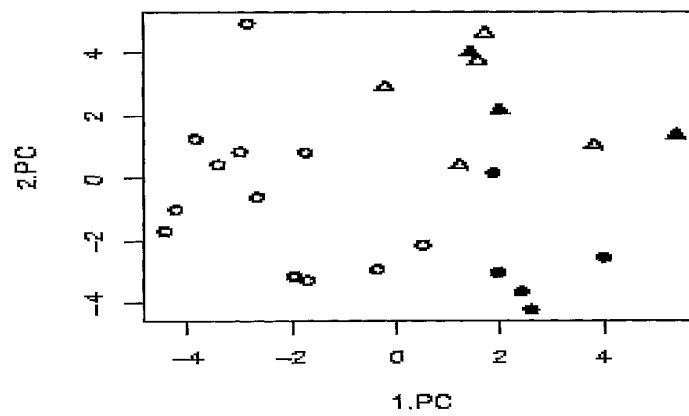


Figure 4A

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

10/18

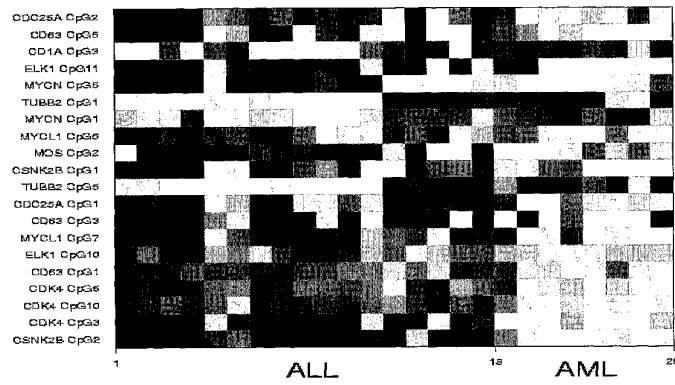


Figure 4B

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

11/18

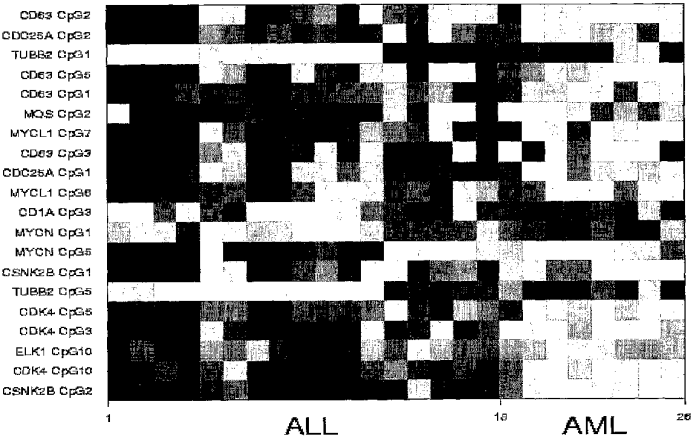


Figure 4C

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

12/18

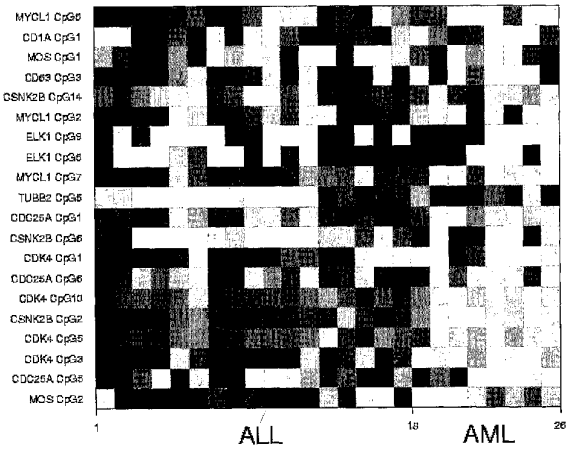
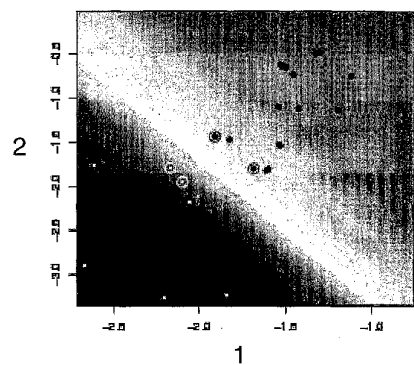


Figure 4D

WO 02/077272

PCT/EP02/03401

13/18

*Fig. 5*

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

14/18

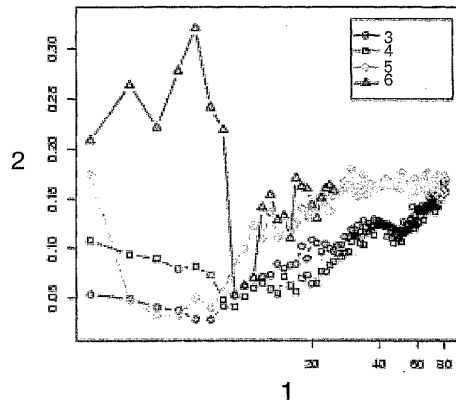


Fig. 6

WO 02/07272

PCT/EP02/03401

17/18

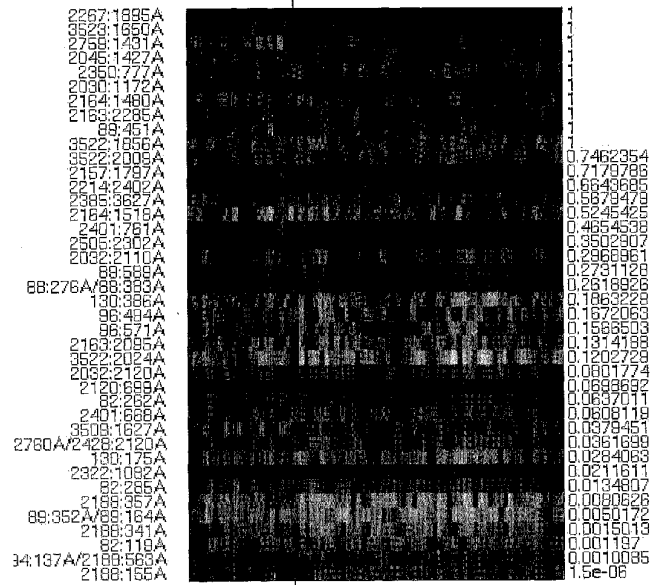


Figure 8A

18/18

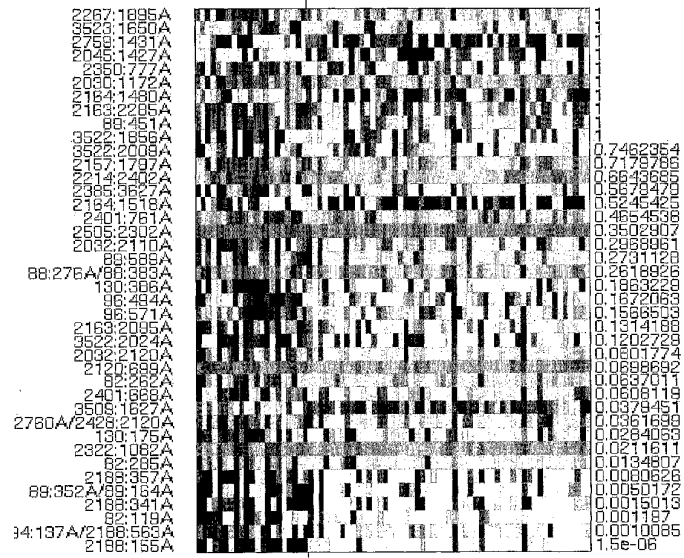


Figure 8B

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077272 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/03401
- (22) International Filing Date: 26 March 2002 (26.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/278,333 26 March 2001 (26.03.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): EPIGE-
NOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin
(DE).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): ADORJAN, Peter
[DE/DE]; Danckerstrasse 4, 10437 Berlin (DE). LESCHE,
Ralf [DE/DE]; Dänckerstrasse 15, 10439 Berlin (DE). LIP-
SCHER, Evelyne [DE/DE]; Brohmstrasse 13, 13187
Berlin (DE). MAIER, Sabine [DE/DE]; Markelstrasse
60, 12163 Berlin (DE). MODEL, Fabian [DE/DE];
Debenzstrasse 73, 12683 Berlin (DE). NIMMRICH,
Inko [DE/DE]; Ilcinz-Kapelle-Str. 9, 10407 Berlin (DE).
- (74) Agent: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin (DE).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI,
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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau
- (88) Date of publication of the international search report:
27 November 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/077272 A3

(54) Title: METHODS AND NUCLEIC ACIDS FOR THE ANALYSIS OF HEMATOPOIETIC CELL PROLIFERATIVE DIS-
ORDERS(57) Abstract: The present invention relates to modified and genomic sequences, to oligonucleotides and/or PNA-oligomers for
detecting the cytosine methylation state of genomic DNA, as well as to a method for ascertaining genetic and/or epigenetic parameters
of genes for use in the differentiation, diagnosis, treatment and/or monitoring of hematopoietic cell proliferative disorders, or the
predisposition to hematopoietic cell proliferative disorders.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/03401
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document	32,33, 36,38, 39,44-51
Y	DE 199 05 082 C (EPIGENOMICS GMBH) 18 May 2000 (2000-05-18) the whole document	32,33, 36,38, 39,44-51
	-/-	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 May 2003		Date of mailing of the international search report 02/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/03401

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE EMBL 'Online! EBI; 26 June 1997 (1997-06-26) ELKAHLOUN ET AL.: "Homo sapiens CDK4, SAS and KIAA0167 genes, complete cds; and OS6 gene, partial cds; from cosmid 6E5, complete sequence" retrieved from HTTP://WWW.EBI.AC.UK Database accession no. U81031 XP002197857 the whole document	32, 33, 36, 38, 39, 44-51
Y	HELLER-HARRISON R A ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A COMPLEMENTARY DNA ENCODING THE BETA SUBUNIT OF HUMAN CASEIN KINASE II" BIOCHEMISTRY, vol. 28, no. 23, 1989, pages 9053-9058, XP002240514 ISSN: 0006-2960 figure 1	32, 33, 36, 38, 39, 44-51
P, X	WO 01 68911 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 20 September 2001 (2001-09-20) the whole document SEQ ID No. 426	32, 33, 38, 39, 44-51
P, X	WO 02 02808 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 10 January 2002 (2002-01-10) the whole document SEQ ID Nos. 125 and 126	32, 33, 36, 38, 39, 44-51
P, X	WO 02 00705 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 3 January 2002 (2002-01-03) the whole document table 1 SEQ ID Nos. 129 and 131	32, 33, 36, 38, 39, 44-51
A	ASIMAKOPOULOS FOTIS A ET AL: "ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 94, no. 7, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 2452-2460, XP002195393 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-12, 14-27, 32, 33, 36, 38-41, 44-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/03401

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ITTER M ET AL: "DETECTION OF DNA METHYLATION IN THE CALCITONIN GENE IN HUMAN LEUKEMIAS USING DIFFERENTIAL POLYMERASE CHAIN REACTION" LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 9, no. 5, May 1995 (1995-05), pages 915-921, XP009004895 ISSN: 0887-6924 the whole document	1-12, 14-27, 32,33, 36, 38-41, 44-52
E	WO 02 36814 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 10 May 2002 (2002-05-10) the whole document	1-4, 6-10,12, 14,16-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 02/03401
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)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claims Nos.: <u>6</u> because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	☒	Claims Nos.: 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 FURTHER INFORMATION sheet 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 Application No. PCT/EP 02 03401

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 6 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out with respect to a method not involving a step of surgery.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 6

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 13,28-31,34,35,37,42,43,53(completely) and 1-12,14-27,32,33,36,38-41,44-52(partially)

1. Present claims 1-12 and 14-27 relate to an extremely large number of possible methods. In fact, the claims contain so many options and possible permutations that a lack of clarity and conciseness (Art. 6 PCT) arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Claim 1 covers any method of detecting and differentiating between haematopoietic cell proliferative disorders associated with at least one of numerous genes and/or their regulatory regions. Moreover, the disorders referred to are not clear as is the target nucleic acid whose CpG methylation state is analysed in said method (Art. 6 PCT). Further clarity problems concerning claim 1 arise from the use of apparent synonyms e.g. ABL1 and c-ABL or MYCL1 and L-MYC as well as from the use of generic names which cannot be found in any database e.g. CMYCex3. The same considerations apply to dependent claims 2-27. A further lack of clarity and conciseness results from the use of a large number of oligonucleotides in the method according to claims 11 and 15, as well as from the detection of the methylation status of numerous genes in a vast number of permutations as suggested by claim 14. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely a method for detecting AML or ALL and of differentiating between AML and ALL based on the analysis of CpG sites located in intron 1 of the CDK4 gene and in the promoter region of the CSNK2b gene using oligonucleotides or PNA-oligomers consisting of SEQ ID Nos. 395, 396, 511, 512, 559 and 1235.

2. Present claim 13 relates to a method defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that the amplification step preferentially amplifies DNA which is of particular interest in healthy and/or diseased haematopoietic cells. The claim lacks clarity (Art. 6 PCT), because the DNA to be amplified is only characterised in that it is of "particular interest in healthy and/or diseased haematopoietic cells".

International Application No. PCT/EP 02 03401

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This sole feature is however not sufficient for the skilled person to understand the actual scope of the claim (Art. 6 PCT). Consequently, no search has been carried out with respect to claim 13.

3. Present claims 28-53 relate to an extremely large number of possible product and uses thereof. In fact, the claims contain so many options and possible permutations that a lack of clarity and conciseness (Art. 6 PCT) arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible.

Claims 28 and 53 relate to 292 different sequences as well as to sequences complementary to the latter.

Claims 29-32, 35 and 37 suggest a vast number of oligomers.

Claims 34 and 36 relate to a vast number of sets of oligonucleotides comprising at least two of the SEQ ID Nos. listed in said claims. An additional lack of clarity of said claims arises from the double listing of most of the sequences (Art. 6 PCT).

The above considerations also apply to claims 33 and 38-52 as they refer to said large number of oligonucleotides, oligomers and sequences, respectively.

As it furthermore amounts to an undue burden to determine which of the oligomers and nucleic acids can be used in the analysis of the methylation state of which of the proposed genes, only claims 32, 33, 36, 38-41 and 44-52 have been searched, insofar as they relate to SEQ ID Nos. 559 and 1235 which allow the analysis of CpG sites in the CDK4 gene, respectively the CSNK2B gene and which are furthermore used in the method of detecting ALL or AML or of differentiating between AML and ALL as outlined above, whereas claims 28-31, 34, 35, 37, 42, 43 and 53 were considered to lack clarity and conciseness to such an extent as to render a meaningful search impossible at all.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/03401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9928498	A	10-06-1999	DE 19754482 A1 01-07-1999
			AT 217348 T 15-05-2002
			AU 753368 B2 17-10-2002
			AU 2408599 A 16-06-1999
			CA 2310384 A1 10-06-1999
			CN 1283235 T 07-02-2001
			WO 9928498 A2 10-06-1999
			DE 59804090 D1 13-06-2002
			DK 1034309 T3 26-08-2002
			EP 1034309 A2 13-09-2000
			ES 2173669 T3 16-10-2002
			HU 0100424 A2 28-06-2001
			JP 2001525181 T 11-12-2001
			NZ 504586 A 25-10-2002
			PL 341681 A1 23-04-2001
			PT 1034309 T 31-10-2002
			SI 1034309 T1 31-08-2002
			US 6214556 B1 10-04-2001
DE 19905082	C	18-05-2000	DE 19905082 C1 18-05-2000
			AU 3144700 A 18-08-2000
			CA 2359182 A1 03-08-2000
			WO 0044934 A2 03-08-2000
			DE 10080169 D2 24-01-2002
			EP 1147228 A2 24-10-2001
WO 0168911	A	20-09-2001	JP 2002535011 T 22-10-2002
			DE 10013847 A1 27-09-2001
			DE 10019058 A1 20-12-2001
			DE 10032529 A1 07-02-2002
			AU 4835201 A 24-09-2001
			AU 5038101 A 24-09-2001
			AU 5460101 A 24-09-2001
			WO 0168910 A2 20-09-2001
			WO 0168911 A2 20-09-2001
			WO 0168912 A2 20-09-2001
			EP 1283905 A2 19-02-2003
			EP 1268855 A2 02-01-2003
			EP 1292707 A2 19-03-2003
			AU 5478801 A 23-10-2001
			AU 5479401 A 23-10-2001
			AU 7384001 A 23-10-2001
			AU 7566301 A 23-10-2001
			AU 7633001 A 23-10-2001
			AU 7633101 A 23-10-2001
			AU 7748701 A 23-10-2001
			AU 7842001 A 07-11-2001
			AU 8960001 A 11-12-2001
			WO 0177373 A2 18-10-2001
			WO 0177375 A2 18-10-2001
			WO 0177164 A2 18-10-2001
			WO 0177376 A2 18-10-2001
			WO 0177377 A2 18-10-2001
			WO 0181622 A2 01-11-2001
			WO 0192565 A2 06-12-2001
			WO 0177378 A2 18-10-2001
			WO 0176451 A2 18-10-2001
			EP 1268857 A2 02-01-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/EP 02/03401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168911	A	EP 1272670 A2	08-01-2003
		EP 1278892 A1	29-01-2003
		EP 1278893 A2	29-01-2003
		EP 1274865 A2	15-01-2003
		EP 1274866 A2	15-01-2003
		EP 1268861 A2	02-01-2003
		AU 5057201 A	23-10-2001
		EP 1268856 A2	02-01-2003
		WO 0177384 A2	18-10-2001
		AU 7637101 A	14-01-2002
		AU 7752101 A	14-01-2002
		AU 7765301 A	08-01-2002
		AU 7970701 A	14-01-2002
		AU 8391501 A	08-01-2002
		AU 8391601 A	14-01-2002
		AU 8757501 A	08-01-2002
		AU 8757601 A	08-01-2002
		AU 8961701 A	08-01-2002
		WO 0202806 A2	10-01-2002
WO 0202808	A	DE 10032529 A1	07-02-2002
		AU 4835201 A	24-09-2001
		AU 5038101 A	24-09-2001
		AU 5478801 A	23-10-2001
		AU 5479401 A	23-10-2001
		AU 7566301 A	23-10-2001
		AU 7633001 A	23-10-2001
		AU 7633101 A	23-10-2001
		AU 7637101 A	14-01-2002
		AU 7748701 A	23-10-2001
		AU 7752101 A	14-01-2002
		AU 7765301 A	08-01-2002
		AU 7842001 A	07-11-2001
		AU 7970701 A	14-01-2002
		AU 8391501 A	08-01-2002
		AU 8391601 A	14-01-2002
		AU 8757501 A	08-01-2002
		AU 8757601 A	08-01-2002
		AU 8960001 A	11-12-2001
		AU 8961701 A	08-01-2002
		WO 0168911 A2	20-09-2001
		WO 0168912 A2	20-09-2001
		WO 0177375 A2	18-10-2001
		WO 0177164 A2	18-10-2001
		WO 0177376 A2	18-10-2001
		WO 0177377 A2	18-10-2001
		WO 0181622 A2	01-11-2001
		WO 0192565 A2	06-12-2001
		WO 0177378 A2	18-10-2001
		WO 0176451 A2	18-10-2001
		WO 0202806 A2	10-01-2002
		WO 0202807 A2	10-01-2002
		WO 0200926 A2	03-01-2002
		WO 0200927 A2	03-01-2002
		WO 0200928 A2	03-01-2002
		WO 0202808 A2	10-01-2002
		WO 0200705 A2	03-01-2002
		WO 0202809 A2	10-01-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/03401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0202808	A	EP 1283905 A2	19-02-2003	
		EP 1268855 A2	02-01-2003	
		EP 1268857 A2	02-01-2003	
		EP 1272670 A2	08-01-2003	
		EP 1278893 A2	29-01-2003	
		EP 1274865 A2	15-01-2003	
		EP 1274866 A2	15-01-2003	
		EP 1294947 A2	26-03-2003	
		EP 1297182 A2	02-04-2003	
		EP 1294948 A2	26-03-2003	
		EP 1294950 A2	26-03-2003	
		EP 1294951 A2	26-03-2003	
WO 0200705	A	03-01-2002	DE 10032529 A1	07-02-2002
			AU 4835201 A	24-09-2001
			AU 5038101 A	24-09-2001
			AU 5478801 A	23-10-2001
			AU 5479401 A	23-10-2001
			AU 7566301 A	23-10-2001
			AU 7633001 A	23-10-2001
			AU 7633101 A	23-10-2001
			AU 7637101 A	14-01-2002
			AU 7748701 A	23-10-2001
			AU 7752101 A	14-01-2002
			AU 7765301 A	08-01-2002
			AU 7842001 A	07-11-2001
			AU 7970701 A	14-01-2002
			AU 8391501 A	08-01-2002
			AU 8391601 A	14-01-2002
			AU 8757501 A	08-01-2002
			AU 8757601 A	08-01-2002
			AU 8960001 A	11-12-2001
			AU 8961701 A	08-01-2002
			WO 0168911 A2	20-09-2001
			WO 0168912 A2	20-09-2001
			WO 0177375 A2	18-10-2001
			WO 0177164 A2	18-10-2001
			WO 0177376 A2	18-10-2001
			WO 0177377 A2	18-10-2001
			WO 0181622 A2	01-11-2001
			WO 0192565 A2	06-12-2001
			WO 0177378 A2	18-10-2001
			WO 0176451 A2	18-10-2001
			WO 0202806 A2	10-01-2002
			WO 0202807 A2	10-01-2002
			WO 0200926 A2	03-01-2002
			WO 0200927 A2	03-01-2002
			WO 0200928 A2	03-01-2002
			WO 0202808 A2	10-01-2002
			WO 0200705 A2	03-01-2002
			WO 0202809 A2	10-01-2002
			EP 1283905 A2	19-02-2003
			EP 1268855 A2	02-01-2003
			EP 1268857 A2	02-01-2003
			EP 1272670 A2	08-01-2003
			EP 1278893 A2	29-01-2003
			EP 1274865 A2	15-01-2003
			EP 1274866 A2	15-01-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/03401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200705 A		EP 1294947 A2	26-03-2003
		EP 1297182 A2	02-04-2003
		EP 1294948 A2	26-03-2003
		EP 1294950 A2	26-03-2003
		EP 1294951 A2	26-03-2003
WO 0236814 A	10-05-2002	DE 10054974 A1	06-06-2002
		AU 1828302 A	15-05-2002
		WO 0236814 A2	10-05-2002

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 27/62	G 0 1 N 27/62	G 4 H 0 4 5
G 0 1 N 27/64	G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 27/64	B
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/60	G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/60	Z
	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 レッシェ,ラルフ

ドイツ国、1 0 4 3 9 ベルリン、デンネンシュトラッセ 1 5

(72)発明者 リプシャー,エベリネ

ドイツ国、1 3 1 8 7 ベルリン、ブレーメシュトラッセ 1 3

(72)発明者 マイヤー,ザビネ

ドイツ国、1 2 1 6 3 ベルリン、マルケルシュトラッセ 6 0

(72)発明者 モーデル,ファーピアーン

ドイツ国、1 2 6 8 3 ベルリン、デーベンゼルシュトラッセ 7 3

(72)発明者 ニムリッヒ,インコ

ドイツ国、1 0 4 0 7 ベルリン、ハインツ - カペレ - シュトラッセ 9

F ターム(参考) 2G045 AA35 CA19 CB01 DA13 FA11 FB02 FB12 GC15 JA01

2G054 AA08 CA22 CE02 EA03 GA04 GB02

4B024 AA11 CA02 HA14

4B029 AA07 BB15 BB20 FA15

4B063 QA01 QA05 QA11 QQ80 QR32 QR50 QR62 QR82 QS25 QS36

QX02

4H045 AA10 BA54 EA50

专利名称(译)	用于分析造血细胞增殖异常的方法和核酸		
公开(公告)号	JP2004528837A	公开(公告)日	2004-09-24
申请号	JP2002575314	申请日	2002-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	アードルヤンペーター レッシェラルフ リプシャーエベリネ マイヤーザビネ モーデルファービアーン ニムリッヒインコ		
发明人	アードルヤン,ペーター レッシェ,ラルフ リプシャー,エベリネ マイヤー,ザビネ モーデル,ファービアーン ニムリッヒ,インコ		
IPC分类号	G01N27/62 C07K19/00 C12M1/00 C12N5/08 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N21/78 G01N27/64 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58 G01N33/60 G01N37/00 G06F19/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/154 C12Q2600/158 C12Q2600/16 Y02A90/24 Y02A90/26		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N27/62.G G01N27/62.V G01N27/64.B G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A G01N33/60.Z G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/CA19 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA11 4B063/QQ80 4B063/QR32 4B063/QR50 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/BA54 4H045/EA50		
优先权	60/278333 2001-03-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种检测和区分与特定受试者基因组的至少一个和/或调节区域相关的造血细胞的增殖异常的方法，包括鉴定靶核酸中的甲基化或未甲基化的CpG二核苷酸。使得自所述受试者的生物样品中的靶核酸与至少一种试剂或一系列试剂接触。所述区分正常造血细胞和增殖性异常造血细胞的方法。一种初步鉴定急性淋巴细胞白血病和急性髓性白血病的方法和所述方法。

特許庁 (P2004-5288) (43) 公表日 平成16年9月24日 (2004.9)			
(51) Int. Cl. ⁷ C12N 15/09 C07K 19/00 C12M 1/00 C12Q 1/68 G01N 21/78	FI C12N 15/00 ZNAA C07K 19/00 C12M 1/00 A C12Q 1/68 A G01N 21/78 C	テーマコード (参考) 2G045 2G054 4B024 4B029 4B063	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 213 頁) 最終頁に
(21) 出願番号 特願2002-575314 (P2002-575314) (36) (22) 出願日 平成14年3月26日 (2002. 3. 26) (35) 翻訳文提出日 平成15年8月26日 (2003. 8. 26) (36) 国際出願番号 PCT/EP2002/003401 (37) 国際公開番号 WO2002/077272 (38) 国際公開日 平成14年10月3日 (2002. 10. 3) (31) 優先権主張番号 60/278, 333 (32) 優先日 平成13年3月26日 (2001. 3. 26) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 500247105 エビゲノミクス アーゲー ドイツ国、ダーニ 10435 ベルリ: カスターニアンアレー 24 (74) 代理人 100093735 弁理士 荒井 雄司 (74) 代理人 100105429 弁理士 河野 尚孝 (74) 代理人 100108143 弁理士 崎崎 英一郎 (72) 発明者 アードルヤン, ペーター ドイツ国、10437 ベルリン、ド: カーシュトラッセ 4	最終頁に続	