

(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2007-504827

(P2007-504827A)

(43) 公表日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 5 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 33/566 (2006.01)	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 7 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-526299 (P2006-526299)	(71) 出願人	593108772
(86) (22) 出願日	平成16年9月8日(2004.9.8)		ヘルス リサーチ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月8日(2006.5.8)		Health Research, Inc
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/029504		.
(87) 国際公開番号	W02005/026691		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 142
(87) 国際公開日	平成17年3月24日(2005.3.24)		63、バッファロー、エルム アンド カ
(31) 優先権主張番号	60/501,070		ールトン ストリーツ (番地なし)、ロス
(32) 優先日	平成15年9月8日(2003.9.8)		ウェル パーク キャンサー インスティ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		テュート
		(74) 代理人	100068032
			弁理士 武石 靖彦
		(74) 代理人	100080333
			弁理士 村田 紀子
		(74) 代理人	100115222
			弁理士 徳岡 修二
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 13Q14染色体変化の検出

(57) 【要約】

本発明は、各種の白血病及びリンパ腫の存在に関連する染色体変化の検出方法に関する。この方法は、個体からリンパ球を含む生体サンプルを得るステップ、そのサンプルを分析して、RP11-147H23あるいはRP11-327P2内に存在する第13番染色体領域に対応する第13番染色体領域における染色体欠失を検出するステップを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体がリンパ芽球性白血病(ALL)あるいは慢性リンパ球性白血病(CLL)に罹患している可能性を有するか診断する方法であって、

a) リンパ球を含む骨髄あるいは血液のサンプルを採取するステップ、及び

b) 前記リンパ球において、バクテリア人工染色体(BAC)のRP11-147H23あるいはRP11-327P2に存在している第13番染色体配列に対応する、第13番染色体の13q14領域の全てあるいは一部が欠失しているかどうかを検出するステップを含み、

ステップb)で検出された欠失は、前記個体がCLLあるいはALLに罹患している可能性を表す

10

ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

BACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2に存在している第13番染色体配列に対応する第13番染色体の13q14領域の全てあるいは一部が欠失しているかどうかの検出が、蛍光in-situハイブリダイゼーションによって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ステップb)が、テスト・プローブ及びコントロール・プローブのハイブリダイゼーションを測定するステップを含んでおり、

前記テスト・プローブは、BACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2に存在している第13番染色体配列内の配列に対応し、

20

前記コントロール・プローブは、第13番染色体内の配列であって、BACのRP11-147H23及びRP11-327P2に存在している第13番染色体の前記領域の外の配列に対応し、

前記細胞内における前記テスト・プローブ及びコントロール・プローブ由来の2組の共-局在化シグナルは欠失の非存在を表し、1組の共-局在化シグナルは欠失の存在を表すことを特徴とする請求項1に記載の方法

【請求項 4】

前記テスト・プローブ及びコントロール・プローブのハイブリダイゼーションを、蛍光in-situハイブリダイゼーション(FISH)によって測定する、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記テスト・プローブ及びコントロール・プローブを、蛍光色素結合ヌクレオチドで標識する、請求項3に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記蛍光色素結合ヌクレオチドが、FITC-標識ヌクレオチド、テキサス・レッド-結合ヌクレオチドまたはローダミン-結合ヌクレオチドからなる、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記コントロール・プローブが、BACのRP11-215B15またはRP11-131F1である、請求項3に記載の方法。

【請求項 8】

ヒト第13番染色体の13q14領域における欠失の存在あるいは非存在を検出する方法であって、

40

a) リンパ球を含む骨髄あるいは血液由来の細胞サンプルを得るステップ、及び

b) テスト・プローブ及びコントロール・プローブのハイブリダイゼーションを測定するステップを含み、

前記テスト・プローブは、BACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2に存在する第13番染色体配列内の配列に対応し、

前記コントロール・プローブは、第13番染色体上の配列であって、BACのRP11-147H23及びRP11-327P2に存在している第13番染色体の前記領域の外の配列に対応し、

前記細胞内における前記テスト・プローブ及びコントロール・プローブ由来の2組の共-局在化シグナルは前記リンパ球内の欠失の非存在を表し、1組の共-局在化シグナルは前記リンパ球内の欠失の存在を表す

50

ことを特徴とする方法。

【請求項 9】

前記テスト・プローブ及びコントロール・プローブのハイブリダイゼーションを、蛍光 in-situハイブリダイゼーション(FISH)によって測定する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記テスト・プローブ及びコントロール・プローブを、蛍光色素結合ヌクレオチドで標識する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記蛍光色素結合ヌクレオチドが、FITC-標識ヌクレオチド、テキサス・レッド-結合ヌクレオチドまたはローダミン-結合ヌクレオチドからなる、請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記コントロール・プローブが、BACのRP11-215B15またはRP11-131F1である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

個体がALLあるいはCLLに罹患している可能性を有するか診断する方法であって、

a) 前記個体からリンパ球を含む血液あるいは骨髄細胞を得るステップ、

b) リンパ球の中に 2 つの完全なWDFY2遺伝子のコピーが存在するかどうか測定するス

テップを含み、

WDFY2遺伝子の完全なコピーが 2 つ未満であれば、前記個体がCLLに罹患していることが示唆される、

20

ことを特徴とする方法。

【請求項 14】

前記ステップ b) が、さらに

i) 前記リンパ球から mRNA を単離するステップ、

ii) 単離した mRNA を WDFY2 mRNA の一部と相補的なプライマーでハイブリッド形成させるステップ、

iii) 逆転写を利用して一本鎖 cDNA を合成するステップ、

iv) ステップ iii) で cDNA が存在すれば、ポリメラーゼ連鎖反応法及び前記 cDNA の逆鎖と相補的な一組のプライマーを用いて、ステップ iii) の cDNA を増幅するステップ、

v) 増幅された cDNA の存在あるいは非存在を検出するステップを含み、

30

増幅 cDNA の非存在が、前記リンパ球に存在する WDFY2 遺伝子の完全なコピーが 2 つ未満であることを示唆する

ことを特徴する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ ii) の前記プライマーが、配列番号 1 及び配列番号 2 からなる群から選択される配列を有する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ iii) の前記プライマーが、配列番号 1 及び配列番号 2 である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

40

細胞内に 2 つの完全な WDFY2 遺伝子のコピーが存在するかどうか測定するために、

第 1 プローブ及び第 2 プローブのハイブリダイゼーションを測定するステップを含み、

前記第 1 プローブは、WDFY2 遺伝子の第 1 エキソン内の配列に対応し、前記第 2 プローブは、WDFY2 遺伝子の第 2 エキソン内の配列に対応し、

共-局在化していない一組のシグナルは、WDFY2 遺伝子の完全なコピーが 2 つ未満存在することを示唆する、

ことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 及び第 2 プローブのハイブリダイゼーションを、蛍光 in-situハイブリダイゼーション(FISH)によって測定する、請求項 17 に記載の方法。

50

【請求項 19】

前記第1及び第2プローブを、蛍光色素結合ヌクレオチドで標識する、請求項17に記載の方法。

【請求項 20】

前記蛍光色素結合ヌクレオチドが、FITC-標識ヌクレオチド、テキサス・レッド-結合ヌクレオチドまたはローダミン-結合ヌクレオチドからなる、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記第1及び第2プローブが、互いに異なるものであって、11111、35P6、2N18、2N16、2K1及び12L24からなる群から選択されるコスミドの群から選択される、請求項17に記載の方法。

10

【請求項 22】

個体がALLあるいはCLLに罹患している可能性があるか診断する際に使用されるキットであって、

蛍光色素結合ヌクレオチドをそれぞれ含んでいるテスト・プローブ及びコントロール・プローブを有し、

前記テスト・プローブは、BACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2に存在する第13番染色体領域に対応する配列である第13番染色体の13q14領域の一部と相補的なヌクレオチド配列を有し、

前記コントロール・プローブは、BACのRP11-147H23及びRP11-327P2に存在する第13番染色体の前記領域に対応する前記配列外のヒト第13番染色体領域に対応するヌクレオチド配列を有する

20

ことを特徴とするキット。

【請求項 23】

前記蛍光色素結合ヌクレオチドが、FITC-標識ヌクレオチド、テキサス・レッド-結合ヌクレオチドまたはローダミン-結合ヌクレオチドからなる、請求項22に記載のキット。

【請求項 24】

個体がALLあるいはCLLに罹患している可能性があるか診断する際に使用されるキットであって、

蛍光色素結合ヌクレオチドをそれぞれ含む第1プローブ及び第2プローブを含み、

前記第1プローブは、WDFY2遺伝子の第1エクソン内の配列に対応し、

前記第2プローブは、WDFY2遺伝子の第2エクソン内の配列に対応することを特徴とするキット。

30

【請求項 25】

前記蛍光色素結合ヌクレオチドが、FITC-標識ヌクレオチド、テキサス・レッド-結合ヌクレオチドまたはローダミン-結合ヌクレオチドからなる、請求項24に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、主にリンパ球増殖性疾患に関する。より詳しくは、そのような疾患に関連する染色体変化の検出方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

B細胞性慢性リンパ球性白血病(B-CLL)は、西洋諸国において最も一般的な白血病であり、その推定発生率は、一年あたり1/100,000である。それは、CD5マーカーを発現し、寿命の長い(攪乱したアポトーシスプログラムに起因する可能性がある)Bリンパ球のモノクロナール増殖を特徴とする。

【0003】

疾患に関連する遺伝子変化がまだ特定されていないため、B-CLLの分子病態に関する現在の知識は限られている。特にB-CLLは、相互均衡型染色体転座と関連していない。従って、他の成熟B細胞悪性腫瘍における染色体転座に関与するプロトオンコジーン(サイク

50

リンD1、BCL-2、BCL-6、PAX-5、及びc-MYCを含む)は、B-CLLでは主に変化していない。B-CLL症例のごく一部において、癌抑制遺伝子p53(染色体17p13上)の不活性化及びATM遺伝子(染色体11q22-23上)の欠失または変異が報告されているが、そのような病変は疾患の後期に観察され、初期の腫瘍原性イベントを代表しない。しかしながら、染色体レベルで、ヒトの第13番染色体の13q14領域は、複数の血液悪性腫瘍において非常に頻繁に失われることが知られている。染色体13q14欠失(患者の約50%)は、B-CLLに関係する最も一般的な染色体変化であり(Dohner等, J Mol Med. ; 77: 266-281. 1999; Kalachikov等, Genomics. ; 42:369-377. 1997)、その後に染色体11qの構造異常(症例の19%)及び第12番染色体のトリソミー(15%)が続く。さらに第13番染色体の欠失は、細胞遺伝学的に検出可能な唯一の異常かもしれない、B-CLL発病において初期的な役割を果たしている。

10

【0004】

同様に、13q14変化(主に欠失)は、急性白血病、多発性骨髄腫及びマントル細胞リンパ腫において頻繁に観察される。13q14の変化(サンプルの25~40%)は、転帰の独立要因として統計的に有意な予後不良を伴う骨髄腫患者をもたらす(Zojer等, Blood 2000 95: 1925-30; Shaughnessy等, Blood 2000 96: 1505-11)。第13番染色体の欠失が、意義不明の単クローン性グロブリン血症(MGUS)から多発性骨髄腫への移行と関連することも示された。13q14の欠失はまた、マントル細胞リンパ腫症例の50%で観察される(Cuneo等, Blood 1999 93: 1372-80)。

【0005】

CLLサンプルの核型分析により、13q14で観察された欠失の特異性及び発生頻度が、病理学的意義を有することを示唆している、相対的に少ない染色体異常が同定された。いくつかのグループは、欠失の標的となった遺伝子あるいは遺伝子群を同定するために、ポジショナルクローニングを使用した。1Mb以上の領域が完全に配列決定され、特性が詳細に明らかになった(Bullrich等, Cancer Res 2001 61: 6640-8; Migliazza等, Blood 2001 97: 2098-2104)。いままでのところ、CLLの孤発性及び家族性の症例において、合計8つの遺伝子: Leu-1(BCMSあるいはEST70/Leu-1), Leu2(ALT1あるいはIB4/Leu-2), Leu5(CAR), CLLD6, KPNA3, CLLD7, LOC51131(推定亜鉛フィンガープロテインNY-REN-34抗原)及びCLLD8が同定され、DNA及び/またはRNAレベルの変化がスクリーニングされた。しかしながら、広範囲に及ぶヘテロ接合性欠失(LOH)、変異及び発現の研究を含む、詳細な遺伝子解析では、欠損した領域に位置する遺伝子のいずれかが、一貫して関与していることを実証することはできなかった。

20

30

【0006】

マーカーD13S31及びRB1の間の13q14.3における最小限欠失領域の決定に伴い、ヘテロ接合性欠失(LOH)状態に対して多数の腫瘍を分析することが可能になり、ホモ接合型欠失が主にD13S25遺伝子座(Chapman等, Oncogene 1994 9: 1289-93)の周辺に集中することがじきに明らかになった。ホモ接合型欠失の観察は、13q14における重要遺伝子の機能の損失が、B-CLLの発展において重要であるということも実証した。多数の腫瘍のその後の解析は、ホモ接合型欠失の観察を確認し、最小限欠失領域の範囲の絞り込みを可能にした。(Bullrich等, Blood 1996, 88: 3109-15; Bouyge-Moreau等, Genomics 1997, 46: 183-90)。

40

【0007】

絞り込まれつつある臨界領域を定義することを試みるレポートにはいくつかのバリエーションがあるが、これらは、これらの症例における独特の再配列に起因している可能性のある単一腫瘍での観察に依存していることが多く、白血病誘発と無関係かもしれない。現在、臨界領域は、約700kbの領域内にあり、マーカーD13S319及びD13S25によって結合されていると理解されている。

【0008】

それに応じて、大がかりなスクリーニングが、様々なアプローチを利用して行われた(そのうち、FISHは最も重要なアプローチの一つであり、マーカーRB1, D13S25及びD13S319に特異的なゲノムプローブが使用されている[Vysis社などの会社から現在市販されている

50

])。しかしながら、これらのスクリーニングで使用された遺伝子及び/またはプローブは、いずれも、CLLにおいて13q14欠失の検出率100%を達成し得なかった。13q14の同じ領域/遺伝子は、多発性骨髄腫及びマンツル細胞リンパ腫で研究されたが、13q14に位置する潜在的な癌抑制遺伝子に対して一貫性のある観察結果は得られなかった。

【0009】

その後、特有のt(12;13)(p12;q14)転座(Meyer等, Leukemia 2001 15(9): 1471-4)を内部に有する患者のサンプルの一つから得た細胞株を利用し、急性白血病における13q切断点の性質決定のためのプロジェクトが開始された。この細胞株は、白血病を誘発する可能性のある病原性事象の分子特性を確立するために、この再配列内に含まれる遺伝子(群)を同定する目的で使用された。そのような転座の病理的帰結の一つは、個々の染色体上に通常見られるDNA断片の近位由来の腫瘍特異的融合遺伝子の創造である。他方、反回性の染色体欠失は、欠失領域内の癌抑制遺伝子の存在、その他の変異と関連する対立遺伝子の欠失を示唆する。染色体12p12上の単一転座に含まれる遺伝子が、多くの均衡型転座に含まれるETV6遺伝子として同定される一方、潜在的なパートナー遺伝子をクローン化する試みは成功しなかった。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、個体が急性リンパ性白血病(ALL)あるいは慢性リンパ球性白血病(CLL)を有する可能性が高いことを示すヒト第13番染色体の13q14領域における染色体変化を検出する方法が求められている。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、個体がALLあるいはCLLに罹患している可能性があるかどうかを判断するための方法を提供する。当該方法は、前記個体のリンパ球を含む血液あるいは骨髄由来の細胞サンプルを得るステップ、第13番染色体13q14領域の一部(この配列は、バクテリア人工染色体(BAC)のRP11-147H23あるいはRP11-327P2内の第13番染色体の配列に対応する)が欠失しているかどうかを検出するステップを含む。

【0012】

ある実施形態において、個体の細胞において第13番染色体の13q14領域の一部が欠失しているかどうかを検出するステップには、個体の染色体を蛍光in-situハイブリダイゼーション(FISH)分析することが含まれる。この方法の一実施形態では、テスト・プローブ及びコントロール・プローブのハイブリダイゼーション・パターンを決定するために、FISH分析が行われる(テスト・プローブはBACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2内の配列に対応し、コントロール・プローブはBACのRP11-147H23及びRP11-327P2内の領域外の第13番染色体上の配列に対応する)。ハイブリダイゼーション・パターンにおいて、テスト及びコントロール・プローブから得られる共-局在化シグナルが2組あれば、欠失はなく、共-局在化シグナルが1組だけであれば、欠失の存在が示唆される。

30

【0013】

別の実施形態では、第13番染色体の13q14領域の一部が欠失しているかどうかを検出するステップに、細胞内にWDFY2の完全なコピーが2つあるかどうか測定するため、WDFY2遺伝子を含む第13番染色体の領域をFISH分析することが含まれる。この方法の一実施形態では、第1及び第2プローブのハイブリダイゼーション・パターンが測定される(第1プローブは、WDFY2遺伝子の第1エクソンに対応し、第2プローブは、WDFY2遺伝子の第2エクソンに対応する)。一組のみの共-局在化シグナルを有するハイブリダイゼーション・パターンが検出されれば、細胞内にWDFY2遺伝子の完全なコピーが1つ存在することが示唆される。

40

【0014】

別の実施形態では、核酸を分析するステップには、BACのRP11-147H23に対応する第13番染色体の領域内に存在する遺伝子から転写したmRNAの存在を検出することが含まれる。こ

50

の方法の特に好ましい実施形態では、WDFY2遺伝子から発現されるmRNAの存在あるいは非存在を検出するために、RT-PCRが行われる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は、個体がALLあるいはCLLに罹患していると診断される可能性が高いかどうかを判断する方法を提供する。この方法には、個体の血液あるいは骨髄由来の細胞サンプル（サンプルはリンパ球を含む）を採取するステップ、及び第13番染色体の13q14領域の一部が欠失しているかどうかを検出するステップが含まれる。欠失しているかどうかを分析する13q14部分は、D13S25及びD13S31マーカーの間に存在し、バクテリア人工染色体(BAC)のRP11-147H23あるいはRP11-327P2内に存在する第13番染色体の領域に対応する。この領域内の欠失の検出は、個体がCLLあるいはALLに罹患している可能性を示唆する。

10

【0016】

本発明の方法で分析されるリンパ球は、なんらかの方法で採取すればよい。例えば、リンパ球は、標準的な瀉血技術を用いて採取された血液中に存在しうる。リンパ球を含む骨髄は、骨組織内に挿入したニードルを用いた吸引あるいは生検によって採取できる。

【0017】

リンパ球内の核酸は、ノーザンブロット、サザンブロット、制限断片長多型分析、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)、逆転写PCR(RT-PCR)、RACE法、FISH分析、あるいは核酸検出に関し当業者に既知の方法など、染色体欠失を検出する様々な方法によって分析することができる。

20

【0018】

ある実施形態では、個体がALLあるいはCLLに罹患していると診断される可能性があるかどうかを判定するために、FISHが用いられる。FISHは、変性染色体DNAに対する蛍光標識DNA（プローブ）のハイブリダイゼーションによって、染色体あるいは染色体領域の存在または非存在を同定するために使用される細胞遺伝学的手法である。FISHは、当業者に既知の方法で行うことができるが、世界中の多くの研究室で行われるFISHの手順は、一般に、Kuo等("Detection of Aneuploidy Involving Chromosomes 13, 18 or 21, by Fluorescence in Situ Hybridization to Interphase and Metaphase Amniocytes," *Am. J. Hum. Genet.* 49: 112-119 (1991)); Klinger等("Rapid Detection of Chromosome Aneuploidies in Uncultured Amniocytes by Using Fluorescence in Situ Hybridization(FISH)," *Am J. Hum. Genet.* 51: 55-65 (1992)); 及びWard, B. E.等("Rapid Prenatal Diagnosis of Chromosomal Aneuploidies by Fluorescence in Situ Hybridization; Clinical Experience with 4,500 Specimens," *Am. J. Hum. Genet.* 52: 854-865 (1993))らの手順と同様である。

30

【0019】

一般に、FISH分析の実行は、染色体DNAを含む生体サンプルを採取するステップ、DNAを変性させるステップ、変性染色体DNAに蛍光標識DNAをハイブリッド形成させるステップ及び蛍光顕微鏡を使用してハイブリダイゼーション・パターンを検出するステップを含む。FISH分析に使用するための蛍光標識プローブを得る方法は、業界では広く知られており、例えば、蛍光色素結合ヌクレオチドを用いてニックトランスレーションによりDNAプローブを標識することによって達成できる。これは市販のキットを用いて行うことができる(Vysis, Downers Grove, IL)。好適な蛍光色素結合ヌクレオチドとしては、例えば、緑の蛍光を発するFITC-標識ヌクレオチド、赤の蛍光を発するテキサス・レッド(Texas Red)結合ヌクレオチドなどがある。

40

【0020】

ある実施形態では、FISH分析は、プローブとしてポリヌクレオチドを使用して行うことができ、前記ポリヌクレオチドは、ヒト第13番染色体上のヒト染色体13q14領域部分を有する。このようなポリヌクレオチドは、コスミド、酵母人工染色体あるいはバクテリア人工染色体(BACs)の一部を含む、様々な形態で提供することができる。

【0021】

50

ある実施形態では、FISHを使用して、コントロール・プローブ及びテスト・プローブの相対的位置を検出して、第13番染色体の13q14領域内に欠失があるかどうかを判定することによって、個体がCLLあるいはALLに罹患しているかどうかを判断する。ある実施形態では、欠失が分析される第13番染色体の領域は、BACのRP11-147H23 あるいはRP11-327P2に対応する第13番染色体領域である。

【0022】

このような方法の一実施形態において、BACのRP11-147H23の配列に対応する第13番染色体領域を含むテストポリヌクレオチドプローブを使用するFISH分析は、第13番染色体のその他の部分（BACのRP 11-147H23配列に対応する領域外の部分）とハイブリッド形成するコントロール・プローブとの組み合わせで使用することができる。各プローブは、お互いに区別することができるよう、異なる色の蛍光を発する蛍光色素結合ヌクレオチドで標識することができる。

10

【0023】

正常な第13番染色体に対するこの組のプローブのハイブリダイゼーションは、各組のプローブ由来のシグナルが、1つの第13番染色体の染色分体上に共-局在化するという予測可能なハイブリダイゼーション・パターンを生じる。この結果は、細胞内の2つの第13番相同染色体の各染色分体上に生じる（S期後、セントロメアで連結している複製染色分体に基づき、各染色体上に各プローブに対する2つの結合サイトがある）

【0024】

一方、BACのRP11-147H23配列に対応する染色体領域内の欠失を有する細胞に対して、同様のFISH分析を行った場合、異なるハイブリダイゼーション・パターンが生じるであろう。この場合、1組のプローブは、正常な第13番染色体上で共-局在化するかもしれないが、欠失を有する相同染色体上のプローブの組は、共-局在化しないであろう。むしろ、テスト・プローブ由来のシグナルは、BACのRP11-147H23配列に対応する染色体領域が転座したことが原因で、異なる染色体上に分離するかもしれない。BACのRP11-147H23に対応する染色体領域が完全に欠失している場合、テスト・プローブ由来のシグナルは、全く検出されない。このようなハイブリダイゼーション・パターンは、その染色体を採取した個体がCLLあるいはALLと診断され得ることを示す。

20

【0025】

別の実施形態では、BACのRP11-147H23に対応する染色体領域内に欠失がある細胞でFISH分析を行った場合、テスト・プローブ及びコントロール・プローブは、欠失の反対側にあるかもしれない。この実施形態では、正常な第13番染色体及びBACのRP11-147H23に対応する染色体領域内に欠失を有する第13番染色体が存在する場合、テスト・プローブ及びコントロール・プローブは、正常な第13番染色体上に共-局在化し、欠失を有する染色体上で共-局在化しないであろう。327由来のシグナルもまた、327クローンが染色体切断点にまたがらないため、分裂しないであろう。

30

【0026】

別の実施形態では、FISH分析において、BACのRP11-147H23内に存在する第13番染色体の領域に対応する染色体領域部分に対応するプローブのパネルを使用することができる。本発明のこの実施形態は、細胞中にWDFY2遺伝子(GenBank WDFY2 cDNA 受入番号: NM052950)の2つの完全なコピーがあるかどうかを測定するために使用することができる。この方法の一実施形態では、第1及び第2の蛍光標識プローブのFISHハイブリダイゼーション・パターンが測定される（第1プローブはWDFY2遺伝子の第1エキソンに対応し、第2プローブはWDFY2遺伝子の第2エキソンに対応する）。共-局在化シグナルが一組のみ検出されるハイブリダイゼーション・パターンは、細胞内にWDFY2遺伝子の完全なコピーが一つだけ存在することを示唆する。

40

【0027】

本発明の別の実施形態では、核酸をサンプル内の細胞から単離し、ノーザンプロット、サザンプロット、制限断片長多型分析、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)、逆転写PCR(RT-PCR)、RACE法(RACE)など、核酸検出の分野の当業者に既知の何らかの方法によって分析し、

50

BACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2配列に対応する第13番染色体の領域内の欠失を証明することによって、個体がALLまたはCLLに罹患している可能性が高いかどうか判断する。

【0028】

例えば、核酸（PCR分析の場合は一般にDNAであり、RT-PCR分析に対しては総mRNA）を血液細胞あるいは骨髄中のリンパ球から抽出する。DNA及びRNAはいずれも、当業界で周知の一般的な方法によって抽出することができる。例えば、Maniatis, T.等の"Molecular Cloning-A Laboratory Manual"、Cold Spring Harbor Laboratory (1982)を参照できる。PCR反応は、当業者に既知の様々な方法で行うことができる。同様に、mRNAを単離した場合は、RT-PCRにかければよい。一般に、RT-PCRは、mRNAをcDNAに逆転写するステップ、その後、ポリメラーゼ連鎖反応法によって逆転写されたcDNAを増幅するステップを含む。

10

【0029】

本発明の一実施形態によれば、RT-PCR反応に対し、BACのRP11-147H23クローンの配列に対応するDNA領域から転写したmRNAを増幅することができるプライマーを、そのようなmRNAの存在あるいは非存在を検出するために使用してもよい（そのようなmRNAが存在しなければ、その総mRNAを採取した個体が、ALLまたはCLLと診断される可能性が示唆される）

【0030】

ある実施形態では、RT-PCRは、WDFY2遺伝子由来のcDNAを検出するために使用される。明細書中に開示するように、BACのRP11-147H23は、染色体切断点にまたがるWDFY2遺伝子を含み、この範囲で染色体欠失が存在する場合、その染色体が採取された個体は、ALLあるいはCLLに罹患していると診断される可能性が高い。

20

【0031】

PCR及びRT-PCR反応産物はいずれも、当業界で既知の方法（ゲル電気泳動、DNA塩基配列決定法などを含むがこれに限定されない）によって分析できる。BACのRP11-147H23あるいはRP11-327P2配列に対応する第13番染色体領域内に正常に位置する核酸配列の増幅は、染色体欠失を示さず、このような増幅がなければ、その領域内の欠失の証拠となる。このような欠失は、RT-PCRで分析したサンプルが採取された個体が、CLLに罹患している可能性が高いことを示唆する。

【0032】

本発明のさらに別の実施形態は、BACのRP11-147H23またはRP11-327P2に存在している第13番染色体領域に対応する第13番染色体領域内の染色体欠失を検出するキットに関する。

30

【0033】

本発明を以下の実施例により詳細に説明する（実施例はいかなる限定も意味しない）。

【実施例1】

【0034】

本実施例は、個体がALLまたはCLLに罹患している可能性が高いか判断する際に使用するDNA配列を同定するための実例を説明するものである。

【0035】

そのような配列を同定するために、ヒト第13番染色体へのFISH染色体歩行アプローチを、RPCIのBACクローン、RP11-147H23、RP11-215B15(GenBank 受入番号：AL136527)、RP11-131F1(AL157761)及びRP11-327P2(AL 162377)（明細書中ではそれぞれ"147"、"215"、"131"及び"327"とも表す）を用いて行った。

40

【0036】

FISH分析で使用するためのBACクローンを調製するために、BACのDNAを、DNA抽出キット(Qiagen)を用いて大腸菌から抽出した。その後、抽出したBACのDNAに、市販のキットを用いて、蛍光色素結合ヌクレオチドを利用するニックトランスレーション標識法を適用した(Vysis, Downers Grove, IL)。

【0037】

これらのクローンをダブルカラーFISH分析で使用した。このアプローチにおいて、215クローンを、個体のFISH分析において、残り3つのBACクローンのそれぞれと組み合わせ

50

て使用した。215クローンは、赤の蛍光シグナルを発して、第13番染色体上の基準点として役立ち、赤の蛍光シグナルの位置は、FISH分析結果において、第13番染色体の物理的な位置に対応する。他のBACクローンは、緑色の蛍光シグナルを発する。

【0038】

図1は、13q14領域内で第13番染色体の転座があることが知られているMUTZ5細胞株（左の上下パネル）、正常な個体から採取した細胞（右上パネル）及びCLL患者から採取した細胞（右下パネル）におけるFISH分析を示す。4つのパネルの中央に示した染色分体は、下流方向におけるRb遺伝子座、D13S319マーカー、D13S25マーカー、WDFY2遺伝子及びD13S31遺伝子座それぞれの相対位置のマップを含む。赤の垂直方向のバーは、215クローン（コントロール・プローブ）のハイブリダイゼーション位置を示し、緑の垂直方向のバーは、残り3つのBACクローン（テスト・プローブ）のハイブリダイゼーション位置を示す（3つの数字の省略形で示す）。矢印は、どのBACクローンをを用いて4つのパネルそれぞれのハイブリダイゼーション・パターンを生じたかを示す。215クローンは各パネルで使用された。

10

【0039】

図1から分かるように、右上のパネルは、共-局在化シグナルを生じた215及び131クローンのハイブリダイゼーションである（第13番染色体相同体の2つの染色分体のそれぞれに対するクローンのハイブリダイゼーションがあるため、2セットのシグナルがある）。赤あるいは緑のシグナルのどちらも消滅せずあるいは異なる染色体に転座（言い換えれば、非-共局在化）しないので、この結果から、これらのクローンとハイブリッド形成する染色体座は、転座中に染色体切断が起こる位置の外側にあることが実証される。

20

【0040】

図1の右下側のパネルに示すクローン215及び327のハイブリダイゼーション（CLLに罹患した患者から採取した2つの細胞を示す）は、1つの緑及び1つの赤のシグナルが「正常な」第13番染色体相同体上に共-局在化し、他の赤及び緑のシグナルのペアは分裂するハイブリダイゼーション・パターンを生じる。この結果は、染色体切断点が215及び327クローンのハイブリダイゼーションサイトの間局在化していることを示す。1組のプローブに関して、検出された緑のシグナルが全て赤のシグナルから分離しているため、327プローブと相補的な配列を含む染色体部分は、215クローンとハイブリッド形成する染色体領域から離れて転座したことが示唆される。

30

【0041】

図1の左の上下パネルにおいて、クローン215及び147のハイブリダイゼーションは、1つの緑及び1つの赤のシグナルが共-局在化したハイブリダイゼーション・パターンを生じる。しかし、他のペアの赤と緑のシグナルでは、正常な赤のシグナルが小さな緑のシグナルとともに共-局在化していた。このハイブリダイゼーション・パターンは、147クローンの一部が結合する染色体の一部の転座に原因がある。また、別の小さな緑のシグナルが、派生（転座パートナー）染色体12上に見られ、第13番染色体の転座部分の位置が示される。

【0042】

従って、本実施例は、CLL細胞内の染色体切断点の同定を実証するものであり、クローン147は、転座に関与する配列群/遺伝子（群）を含む染色体切断点にまたがっており、また、RP11-327P2内に存在する第13番染色体配列に対応する第13番染色体領域は、前記切断点の下流にあることが示される。

40

【実施例2】

【0043】

本実施例は、実施例1に記載したダブルカラーFISH分析が、個体がALLに罹患している可能性があるため有用であることを実証するものである。

【0044】

ALLと診断された9つの個体から得た一連の骨髓サンプルを、RP11-215B13（実施例1のクローン215）と共にRP11-147H23クローンで分析した。これらのプローブは、前述のよう

50

にハイブリッド形成され、実施例 1 で記載したように検出された。表 1 にまとめるように、9 つのサンプルのうち 8 つが、一つの対立遺伝子の欠失を示した。

【 0 0 4 5 】

【 表 1 】

表 1

	<u>Pt No 13q 異常</u>	<u>欠失% (BAC 147)</u>	<u>コントロール・プローブ</u>	
1948	del(13)(q12q14)	22	+	
1217	del(13)(q12q22)	67	-	10
1539	del(13)(q14q22)	92	+	
2280	del(13)(q13)	37	-	
2040	del(13)(q14q32)	90	+	
1454	del(13)(q14q22)	0	+	
2747	del(13)(q12q22)	90	-	
1001	del(13)(q14q21)	50	-	
1037	der(9)t(9;13)(p21;q14)	30(del/split)	+	20

【 0 0 4 6 】

コントロール・プローブに対し (-) を示す患者は、コントロール・プローブと相補的な染色体領域を包含する染色体を欠失しているものと解釈される。

【 0 0 4 7 】

従って、本実施例は、ALLと診断された個体の第13番染色体領域内の欠失を検出するために、クローン147が使用できることを実証する。

【 実施例 3 】

【 0 0 4 8 】

本実施例は、実施例 1 に記載したダブルカラーFISH分析が、個体がCLLに罹患している可能性が高いと判断するために有用であることを実証するものである。

30

【 0 0 4 9 】

CLLに罹患した個体の染色体を研究するために、10のCLL症例を無作為に選択し、FISH分析した。図2の3つのパネルに示されるように、10のアッセイは全て(図2のパネル1~3に分布している)、欠失FISHハイブリダイゼーション・パターンを示した(共-局在化した一対の赤と緑のシグナル及び147クローンが正常にハイブリッド形成する領域が欠失した第13番染色体由来の不对の赤のシグナルによって各症例で実証される)。さらに、ロズウェル・パーク癌研修所(RPCI)から入手した25のCLL症例を、前記技術を用いて研究した結果、これら21症例のうち18例(85%)が、欠失ハイブリダイゼーション・パターンを示した(データは示さない)。

【 0 0 5 0 】

40

さらに、一連の非選択サンプルも、147及び215クローンを用いてハイブリッド形成させ、FISHで分析した。表2にまとめた結果は、クローン147に対する欠失ハイブリダイゼーション・パターンを示す細胞のパーセントを表す。

【 0 0 5 1 】

【表 2】

表 2 非選択性CLL患者サンプルのFISH研究

患者番号	診断	13q14欠失細胞の%
C1	コントロール	6
C2	コントロール	7.5
C3	コントロール	8
1	CLL	34
2	CLL	22
3	CLL	47
4	CLL	66
5	CLL	15
6	CLL	23
7	CLL	21
8	CLL	30
9	CLL	27
10	CLL	29
11	CLL	65
12	異型CLL	8
13	CLL	26
14	CLL	20
15	CLL	18
16	CLL	13
17	CLL	14
18	CLL	33
19	CLL	23
20	CLL	15
21	CLL	19
22	CLL	12
23	CLL	17
24	CLL	21
25	CLL	85
26	CLL	68
27	CLL	27
28	CLL	15
29	CLL	9
30	CLL	7
31	CLL	18
32	CLL	22

10

20

30

40

【 0 0 5 2 】

表 2 は、CLLに罹患した個体が、147クローン内のヒト第13番染色体領域に対応する第13番染色体領域の欠失を特徴とするハイブリダイゼーション・パターンをもつ細胞を有することを実証する。正常な個体（すなわち、C1～C3と記されたコントロール）も、この欠失特徴を示すハイブリダイゼーション・パターンが検出される細胞を、一定の割合で有する

50

が、そのようなパーセンテージは、欠失検出レベルのバックグラウンド（細胞を採取した個体がCLLと診断される可能性の指標となる細胞パーセンテージの閾値となる）を設定するために使用されることが、当業者に明白に理解されるであろう。

【実施例4】

【0053】

本実施例は、147クローンに対応する第13番染色体領域内に位置する遺伝子の発現（あるいはその欠失）に関して、CLLに罹患した個体のサンプルにおいて第13番染色体欠失の検出を説明するものである。

【0054】

CLL症例から得た12のDNAサンプルを、WDFY2遺伝子の発現を調べるためにRT-PCRによって分析した。RT-PCR反応で使用したプライマーは、WDFY2の全翻訳領域を増幅するものである。順方向プライマーは、配列：5' tctgtctcaacctgtgtccc 3'（配列番号1）を有し、逆方向プライマーは、配列：5' gaagagtccttgcgagt 3'（配列番号2）を有する。

【0055】

図3は、RT-PCR増幅産物の電気泳動分離後のゲルの写真を示す。下のパネルは、ローディング・コントロールとして使用されたGAPDH増幅のRT-PCRを示す。レーン1及び16に示すのは、EBV-LIN細胞（不死化リンパ球）及び12のCLLサンプル（レーン4～7及び8～15）のアッセイである。4つのCLLサンプル（レーン4～7）はWDF2 mRNAがネガティブであり、WDF2遺伝子あるいはその発現に必要な染色体要素のいずれかの欠失を示す。追加の8つのサンプルを、同じアプローチを使用して分析した結果（レーン8～14）、WDFY2レベルの大幅な発現低下を示した。

【0056】

レーン8～14のサンプルにおけるWDF2mRNAの大幅な発現低下の検出は、これらのサンプルが高濃度のCLL細胞を基準に選択されなかったことに原因があるかもしれない（活性CLLが唯一の選択基準であった）。一方、レーン4～7のサンプルは、高濃度のCLL細胞を基準に選択された（すなわち、蛍光標識細胞分取によって約95%CLLリンパ球を有する個体を選択した）。

【0057】

従って、本実施例は、WDFY2遺伝子をコードするmRNAの欠如の検出が、そのmRNAを単離した個体がCLLと診断される可能性が高いと決定するために使用できることを実証する。

【実施例5】

【0058】

本実施例は、WDFY2遺伝子の一部の欠失の検出が、個体がCLLに罹患している可能性が高いと判定するために使用できることを実証するものである。

【0059】

WDFY2遺伝子に特異的なDNAプローブを得るために、WDFY2cDNAをプローブとして使用し、サザンブロットにおいて、LANL第13番染色体特異的コスミドライブラリーをスクリーニングした。このライブラリーは、フィルター上にプレグリッドしたヒトゲノム・マッピングプロジェクト(HGMP)(ケンブリッジ、英国)から得た。

【0060】

6つのポジティブクローンをサザンブロットで同定した。そのクローンが位置するWDFY2遺伝子エキソンを、そのクローンの5'及び3'末端の配列を決定し、その両末端とWDFY2遺伝子配列を比較することによって、同定した。その後、前記クローンのうち3つを、緑色に蛍光を発する蛍光色素結合ヌクレオチドで標識し、別の3つのクローンを赤色に蛍光を発する蛍光色素結合ヌクレオチドで標識した。

【0061】

10

20

30

40

【表 3】

表 3

コスミドの名称	マッピング/WDFY2	サイズ (k b)	色
11I11	エキソン1	33	緑
35P6	エキソン2	47	緑
2N18	エキソン2-3	39	緑
2N16	エキソン4-6	40	赤
2K1	エキソン6-12	38	赤
12L24	エキソン10-12+3' 配列	45	赤

10

【 0 0 6 2 】

14のCLLサンプルを実施例1で記述した方法と本質的に同じFISH技術を用いて研究した(例外は、表3にまとめた通り、標識した6つのクローン全てを含む反応混液をプローブとして使用したことである)。FISH分析の結果を表4にまとめる。

【 0 0 6 3 】

【表 4】

表 4

サンプル番号	正常FISHパターン (%)	欠失FISHパターン (%)
正常	85	15
307	56	44*
442	53	47*
286	47	53*
419	62	38*
354	68	32*
316	46	54*
368	8	92*
566	24	76*
328	82	18
727	67	33*
385	59	41*
844	66	34*
604	77	23
740	47	53*

20

30

40

【 0 0 6 4 】

アスタリスクは、細胞の閾値パーセンテージに基づき、実際に欠失と見なされることが必要とされる欠失が検出された数字に付されている。本実施例では、実際の欠失とみなす検出閾値を25%に設定した。この解釈を使用した結果、サンプル14例のうち12例(86%)がWDFY2遺伝子の欠失を示した。表4にまとめた全ての症例における欠失は、全対立遺伝子あるいは遺伝子の5'末端のいずれかを含む。従って、本実施例は、WDFY2遺伝子領域を含むポリヌクレオチドの欠損の検出が、細胞内にWDFY2の2つの完全なコピーがあるかどうかを測定し、それによって、個体がCLLに罹患していると診断される可能性が高いかどうかを判定するために使用できることを実証する。

50

【0065】

特定の実施形態についての上記記述は、説明を目的とし限定と解釈されない。本発明の教示から、当業者は、様々な修正及び変更が、本発明の精神から逸脱することなくなされることを認識するであろう。

【図面の簡単な説明】

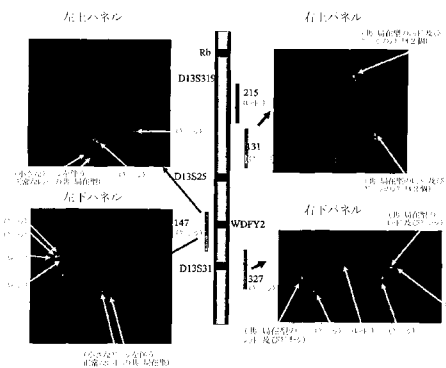
【0066】

【図1】図1は、MUTZ5細胞（上下の左側パネル）、CLLと診断された個体から採取した細胞（右下パネル）及び正常な個体から採取した細胞（右上パネル）のFISH分析の写真を示す。BACクローン215、131、147及び327を用いた染色体歩行によって、BACクローン147が13q14切断点にまたがっていることが確認された。

【図2】図2は、パネル1～3に分布する10個のサンプルにおける、BACクローン147の配列に対応する第13番染色体領域の欠失を実証するFISHハイブリダイゼーション・パターンを示す、CLL患者サンプルのFISH分析の写真を示す。

【図3】図3は、WDF2及びコントロールcDNAのRT-PCR増幅産物の電気泳動分離後のゲルの写真を示す。上のパネルは、RT-PCRを用いたWDF2cDNAの増幅を示す。下のパネルは、ローディング・コントロールに対するGAPDH増幅のRT-PCRを示す。レーンは、以下の各ソースからのRT-PCR増幅産物の分離を示す；レーン1：EBV-LIN(不死化リンパ球)；レーン2：G519(マントル細胞リンパ腫)；レーン3：正常リンパ球；レーン4～15：CLLサンプル；レーン16：EBV-LIN。2つの非標識レーンはサイズマーカーである。

【図1】

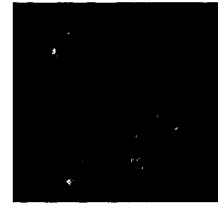


【図2】

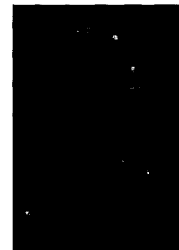
Figure 2. Panel 1



Panel 2

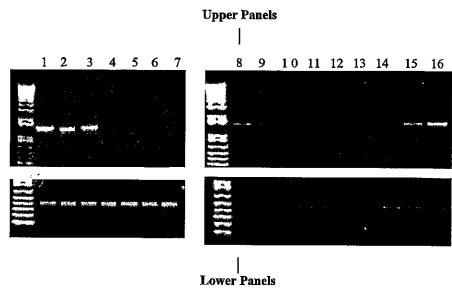


Panel 3



【 図 3 】

Figure 3.



【 配列表 】

2007504827000001.app

【 国際調査報告 】

60651260080



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/29504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																										
IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34																										
US CL : 435/6, 91.1																										
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) U.S. : 435/6, 91.1																										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																										
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																										
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X — Y	BULLRICH, F. et al. Minimal Region of Loss at 13q14 in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Blood. October 1996. Vol 88, pages 3109-3115, see especially abstract, pages 3110-3111, Figure 1 and 2.	1, 13 — 2-7																								
X — Y	SHAUGHNESSY, J. et al. High Incidence of Chromosome 13 Deletion in Multiple Myeloma Detected By Multiprobe Interphase FISH. Blood. August 2000. Vol 96, pages 1505-1511.	8-12 — 2-7																								
Y	ZECH, L. et al. Chromosome 13-A New Marker For B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Hereditas. 1988. Vol 108, pages 77-84.	1-7, 13																								
Y	HAWTHORN, L. A Yeast Artificial Chromosome Contig That Spans The RB1-D13S31 Interval on Human Chromosome 13 and Encompasses the Frequently Deleted Region in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Genomics. 1995. Vol 30, pages 425-430.	1-7, 13																								
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> <td>"I"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"&"	document member of the same patent family	"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		
* Special categories of cited documents:		"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																							
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																							
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																							
"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)	"&"	document member of the same patent family																							
"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																									
Date of the actual completion of the international search 16 December 2005 (16.12.2005)		Date of mailing of the international search report 18 JAN 2006																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Jehanne S. Sitten <i>Jehanne S. Sitten</i> Telephone No. 571 273-1600																								

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/29504

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	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:
3. <input type="checkbox"/>	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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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.: 1-21
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/29504**BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-21, drawn to methods of diagnosing ALL or CLL by determining if a region of chromosome 13q14, or the WDFY2 gene is deleted.

Group 2, claim(s) 22-23, drawn to a kit comprising probes which hybridize to portions of 13q14.

Group 3, claim(s) 24-25, drawn to a kit comprising probes which hybridize to the WDFY2 gene.

The inventions listed as Groups 1-3 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the claims in group 1 are drawn to methods of detecting deletions in chromosome 13q14 for diagnosis of CLL, which is known in the prior art (see Kalachikov et al. Genomics, vol. 42, pages 369-377). Further, the claims in groups 2 and 3 are drawn to a large genus of different nucleic acids, which read on the Fodor et al (US Patent 6,582,908), who teaches an array of all possible 10-mer nucleic acids which fall within the scope of the claims in groups 2 and 3. Accordingly, the groups lack the same or corresponding special technical feature over the prior art, and therefore lack unity.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Medline, Caplus, Biosis, Embase, Scisearch, Cancerlit, East

search terms: RP11-147H23, RP11-327P2, RP11-215B15, RP11-131F1; 13q14, deletion, translocation, WDFY2, WDF2

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 21/78 (2006.01) G 0 1 N 21/78 C

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100124796
 弁理士 重本 博充

(74) 代理人 100125586
 弁理士 大角 菜穂子

(72) 発明者 コワネ, リオネル, ジ.
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 4 0 5 1、アムハースト、チェイスウッド レーン 1 2 0
 Fターム(参考) 2G054 CA22 CE02 EA03
 4B024 AA11 CA01 CA12 HA12
 4B063 QA19 QQ02 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34
 QX02

专利名称(译)	13Q14检测染色体变化		
公开(公告)号	JP2007504827A	公开(公告)日	2007-03-08
申请号	JP2006526299	申请日	2004-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	健康研究股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	健康研究公司		
[标]发明人	コワネリオネルジ		
发明人	コワネ,リオネル,ジ.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/543 G01N21/78 G01N		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6841 C12Q2600/112		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/543.575 G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	竹石彦 徳冈修治		
优先权	60/501070 2003-09-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测与各种白血病和淋巴瘤的存在相关染色体改变的方法。该方法包括从个体获得含有淋巴细胞的生物样品，然后分析样品，所述染色体缺失在13号染色体区域对应于染色体中存在的RP11-147H23或RP11-327P2 13区域包括检测丢失的步骤。技术领域

患者番号	診断	13q14欠失細胞の%
C1	コントロール	6
C2	コントロール	7.5
C3	コントロール	8
1	CLL	34
2	CLL	22
3	CLL	47
4	CLL	66
5	CLL	15
6	CLL	23
7	CLL	21
8	CLL	30
9	CLL	27
10	CLL	29
11	CLL	65
12	異常CLL	8
13	CLL	26
14	CLL	20
15	CLL	18
16	CLL	13
17	CLL	14
18	CLL	33
19	CLL	23
20	CLL	15
21	CLL	19
22	CLL	12
23	CLL	17
24	CLL	21
25	CLL	85
26	CLL	68
27	CLL	27
28	CLL	15
29	CLL	9
30	CLL	7
31	CLL	18
32	CLL	22