

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500861

(P2005-500861A)

(43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 5/06

C 1 2 Q 1/68

// C 1 2 N 15/09

G O 1 N 33/53

F I

C 1 2 N 5/00

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/00

G O 1 N 33/53

Z N A E

A

A

M

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 3

4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁)

(21) 出願番号 特願2003-525686 (P2003-525686)

(86) (22) 出願日 平成14年9月6日 (2002.9.6)

(85) 翻訳文提出日 平成16年3月8日 (2004.3.8)

(86) 国際出願番号 PCT/AU2002/001214

(87) 国際公開番号 W02003/020986

(87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003.3.13)

(31) 優先権主張番号 PR 7499

(32) 優先日 平成13年9月6日 (2001.9.6)

(33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 594202523

モナシュ ユニバーシティ

オーストラリア国, ビクトリア 3 1 6 8

, クレイトン, クレイトン ロード 2 4

6

(71) 出願人 504090101

モナシュ・アイヴィエフ・プロプライアタ

リー・リミテッド

オーストラリア国ヴィクトリア州 3 1 2 1

, リッチモンド, ブリッジ・ロード 8 9

, フォース・フロア, エブワース・ホスピ

タル

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を単離する方法及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、細胞、特に胎児細胞及び栄養芽細胞、を取り出しそして特定するための非侵襲的方法に関する。本発明は、染色体異常及び突然変異を特定するために、特に染色体及び単一遺伝子障害の遺伝子診断を行うことにより出産前診断で特定するために、細胞を使用する方法を含む。本発明は、胎児起源の細胞を確認する方法も含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

子宮頸部粘液サンプルから細胞を取り出す方法であって：

子宮頸部粘液サンプルを得ること；

該サンプルをコラゲナーゼ及びプロテアーゼで処理して該子宮頸部粘液サンプルから細胞を解離させること；及び

解離された細胞を該サンプルから取り出すこと

を含んでなる方法。

【請求項 2】

請求項 1 記載の方法であって、該子宮頸部粘液サンプルが子宮頸部内外サンプルである方法。 10

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の方法であって、該子宮頸部粘液サンプルが、子宮頸管及び子宮下支柱を含む子宮頸部領域から得られる方法。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該子宮頸部粘液サンプルが妊娠の第 1 又は第 2 三カ月期の間に得られる方法。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該子宮頸部粘液サンプルがコラゲナーゼ及びプロテアーゼ及びリペラーゼブレンドザイムの組み合わせで処理される方法。 20

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該子宮頸部粘液サンプルを粘液溶解剤で処理することを更に含む方法。

【請求項 7】

請求項 6 記載の方法であって、該子宮頸部粘液サンプルが、コラゲナーゼ及びプロテアーゼでの処理に先立って粘液溶解剤で処理される方法。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された解離細胞。

【請求項 9】

子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を取り出す方法であって： 30

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された解離細胞の混合物を得ること；

該細胞を胎児抗体で処理すること；

該胎児抗体に結合した細胞を特定すること；及び

該特定された細胞を取り出すこと

を含んでなる方法。

【請求項 10】

胎児細胞を特定する方法であって：

請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された解離細胞の混合物を得ること； 40

該細胞を胎児特異性抗体で処理すること；及び

該抗体に結合した細胞を特定すること

を含んでなる方法。

【請求項 11】

請求項 9 又は 10 に記載の方法であって、該胎児抗体が第 1 三カ月期胎児特異性抗体である方法。

【請求項 12】

請求項 9～11 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該胎児細胞を特定するために該抗体が単独で又は別の抗体と一緒に使用される方法。

【請求項 13】

請求項 9～12 のいずれか 1 項に記載の方法であって、胎児細胞を特定するために 1 又はそれを越える抗体が使用される方法。

【請求項 14】

請求項 9～13 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該胎児細胞が母体コントロールに対して比較される微小衛生マーカーによって更に特定され、前記胎児細胞が該母体細胞と微小衛生マーカーを共有している方法。

【請求項 15】

請求項 14 記載の方法であって、該微小衛生マーカーが：

tatgtgagtcaattccccaagtga；

atgatgaatgcatagatggatg；

ttgcagggaaaccacagtt；

tgaacatacatgtacatgtgtcttg；又は

cactgcagacggcatgaacttc

を含む群から選択される順向プライマー配列によって特定される方法。

10

【請求項 16】

請求項 15 記載の方法であって、該微小衛生マーカーが：

gttgtatttagtcaatgttctccag；

aatgtgtgtccttccaggc；

tccttggaataaattcccg；

ttctctacatatttactgccaacac；又は

ccagaatcacatgagccaattcc

を含む群から選択される逆相プライマー配列によって特定される方法。

20

【請求項 17】

請求項 9 又は 11～16 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された胎児細胞。

【請求項 18】

胎児細胞を特定する方法であって：

細胞サンプルを得ること；

該細胞サンプルを、本明細書に記載された N D O G 1、N D O G 5 及び F T 1 . 4 1 . 1 を含む群から選択される抗体又はそれらの等価物で処理すること；及び

該抗体に結合した細胞を特定すること

を含んでなる方法。

30

【請求項 19】

請求項 18 記載の方法であって、該胎児細胞を特定するために該抗体が単独で又は組み合わせて使用される方法。

【請求項 20】

胎児細胞を特定するために使用される組成物であって、抗体 N D O G 1、N D O G 5 及び F T 1 . 4 1 . 1 を含んでなる組成物。

【請求項 21】

胎児細胞を特徴付ける方法であって：

請求項 9～16 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得ること；

該胎児細胞を：

(a) 多重 F L - P C R ；

(b) W G A、ハイブリダイゼーション及びマイクロアレイ分析；又は

(c) m R N A の抽出、c D N A ライブラリー、ハイブリダイゼーション及び遺伝子発現マイクロアレイ分析

を含む群から選択される操作に付すること；及び

該操作の結果を分析して該細胞を特徴付けること

を含んでなる方法。

40

【請求項 22】

50

請求項 2 1 記載の方法であって、該胎児細胞が、生化学的障害、代謝障害又は遺伝子障害について特徴付けられる方法。

【請求項 2 3】

胎児細胞の染色体中の染色体異数体を特定する方法であって：

請求項 9～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得ること；

該染色体上の少なくとも 3 種の多型微小衛生マーカーを特定すること；及び

該少なくとも 3 種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定することを含んでなる方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 記載の方法であって、該対立遺伝子プロファイルが 5 種の微小衛生マーカーの 1 又はそれを越えるマーカーによって決定される方法。

【請求項 2 5】

出産前診断の方法であって：

請求項 9～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得ること；

染色体上の少なくとも 3 種の多型微小衛生マーカーを特定すること；

該少なくとも 3 種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定すること；及び

該対立遺伝子プロファイルを出産前診断のための条件と関連させることを含んでなる方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の方法であって、該出産前診断が、胎児細胞における遺伝子突然変異の存在を確認することを含み、該遺伝子突然変異が、染色体異数体、点突然変異、転座、トリヌクレオチド反復拡大、挿入及び欠失を含む群から選択される方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 記載の方法であって、該遺伝子突然変異が、腭嚢胞性繊維症、 β -地中海貧血、ハンチントン病、脆弱 X、筋強直性ジストロフィー、デュシェーヌ筋ジストロフィー、鎌型赤血球貧血症、ターナー症候群 (XO)、クラインフェルター症候群 (XXY)、XX 女性及び XYY 男性、三倍体性 (69, XXX 又は XXY 又は XYY)、パタウ症候群 (トリソミー 13) 及びエドワード症候群 (トリソミー 18)、又はダウン症候群 (トリソミー 21) を含んでなる群から選択される状態と関係している方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 記載の方法であって、該染色体異数体が、染色体 21、18、13、X 及び Y を含む群から選択されるヒト染色体で起こる方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 記載の方法であって、該対立遺伝子プロファイルが染色体 21 のトリソミーを示す方法。

【請求項 3 0】

請求項 2 8 又は 2 9 記載の方法であって、該遺伝子障害がダウン症候群である方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 3～3 0 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該微小衛生マーカーが：

tatgtgagtcaattccccaagtga；

atgatgaatgcatagatggatg；

ttgcagggaaccacagtt；

tgaacatacatgtacatgtgtcttg；又は

cactgcagacggcatgaacttc

を含む群から選択される順向プライマー配列を含む方法。

【請求項 3 2】

請求項 2 3～3 2 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該微小衛生マーカーが：

10

20

30

40

50

gttgatttagtcaatgttctccag;
aatgtgtgtccttccagc;
tccttggaaataattcccg;
ttctctacatatattactgccaacac; 又は
ccagaatcacatgagccaattcc

を含む群から選択される逆向プライマー配列を含む方法。

【請求項 33】

請求項 23～32 のいずれか 1 項に記載の方法であって、表 2 のマーカーから選択される微小衛生マーカーの使用を含む方法。

【請求項 34】

個体からの細胞の胎児起源を確認する方法であって：

請求項 9～16 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞をそして同個体から母体細胞を得ること；

該胎児又は母体細胞のいずれかに特徴的な少なくとも 3 種の多型微小衛生マーカーを選択すること；及び

該少なくとも 3 種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを該胎児細胞及び該母体細胞上で決定すること

を含んでなる方法。

【請求項 35】

請求項 34 記載の方法であって、個体からの細胞の胎児起源を確認する該方法が、該母体細胞及び該胎児細胞の染色体における染色体異数体を特定することを含む方法。

【請求項 36】

単一遺伝子障害を検知する方法であって：

請求項 9～16 のいずれか 1 項に記載の方法によって調製された子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得ること；及び

該胎児細胞の遺伝子における突然変異を検知すること

を含んでなる方法。

【請求項 37】

請求項 36 記載の方法であって、該単一遺伝子障害が、腭嚢胞性繊維症、 β -地中海貧血、ハンチントン病、脆弱 X、筋強直性ジストロフィー、デュシェーヌ筋ジストロフィー、及び鎌型赤血球貧血症を含む群から選択される方法。

【請求項 38】

請求項 37 記載の方法であって、該遺伝子障害が腭嚢胞性繊維症である方法。

【請求項 39】

請求項 1 記載の細胞を取り出す方法であって、実施例 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 9 記載の胎児細胞を取り出す方法であって、実施例 1 又は 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本願は、細胞、特に胎児細胞及び栄養芽細胞、を取り出しそして特定するための非侵襲的方法に関する。本発明は、染色体異常及び突然変異を特定するために、特に染色体及び単一遺伝子障害 (single gene disorder) の遺伝子診断を行うことによる出産前診断のために、細胞を使用する方法を含む。本発明は、胎児起源の細胞を確認する方法も含む。

【発明の背景】

【0002】

約 0.5% の夫婦は、遺伝子障害を有する子供を有する高いリスクがある。そのような遺伝子障害には、腭嚢胞性繊維症、ハンチントン病、 β -地中海貧血、及び筋強直性ジストロフィーが含まれる。例えば、オーストラリアでは、人口の 25 人に 1 人は、腭嚢胞性繊維症突然変異のキャリアであるので、最近、腭嚢胞性繊維症のための新生児スクリーニン

10

20

30

40

50

グが、全ての出産を追跡するために実行されている。

【0003】

単一遺伝子障害に加えて、染色体異常は、自然流産及び新生児に見られる最も一般的な遺伝子障害である。染色体21、18、13、X及びYに関連するトリソミーは、最大のグループであり、トリソミー21又はダウン症候群が最も頻度が高く、生産700人毎に約1人の割合で起こる。トリソミー13及び18は、特徴的先天性異常症候群で出産予定日に到達し、出生直後の期間内に死に至る唯一の他の常染色体トリソミーである。残りの生産トリソミーの個体は、余分な性染色体、つまりXXY、XYY、又はXXXを有する。出産前診断は、重荷、胎児における染色体異常、特にダウン症候群を検知しようとして行われる。ダウン症候群は、ヒトにおける心的遅れの最も重要な遺伝子的原因であり、そして先天性心疾患及び白血病の高いリスクとも関係している。 10

【0004】

出産前診断は、妊娠期間中の胎児における単一遺伝子障害又は染色体異常のいずれかを検知するために行われる。現在、出産前診断は、胎児における潜在的染色体異常を特定するために、絨毛膜絨毛サンプリング(CVS)(10~12週間)又は羊水穿刺(14~16週間)のいずれかの形態での非侵襲的操作を含む。これら両方の操作には、流産のリスク(1~2%)がある。従って、出産前試験は、高齢出産の婦人(>35歳)、異常母体血清スクリーニングの婦人又は以前に染色体異常の胎児を持ったことがある婦人を含む、高いリスクがあると予想される婦人にのみ申し入れられる。 20

【0005】

出産前診断は、通常、絨毛細胞又は羊水細胞をサンプリングするのに、非侵襲的方法によって行われる。これら方法のサンプリングで、その時点の胎児の胎児細胞も確実に試験される。その時点の胎児からの又は最近流産した胎児のものであり得る、血液のような他の供給源から得られるサンプルは、そのような細胞は数年間の循環を持続していることがあるから、胎児細胞をそれほど確実に特定できない。胎児細胞が得られたら、染色体異常を特定するために、細胞遺伝学的技術が使用される。そのような操作は長たらしく、かつ高いレベルの技術専門家を必要とする。更に、概して、結果は3週間までは患者に利用され得ない。 30

【0006】

従って、迅速で非侵襲的な診断技術であり、好ましくはその時点の胎児の試験が確実にできる技術が、高い又は低い遺伝的リスクのある全ての妊婦にかなり有益である。24時間以内の診断は、彼女らに心の平安を与え、又は彼女らの妊娠の第1三カ月期における治療的中絶に関する早期の決断の機会を与える。 40

【0007】

このことから、実質的に無傷の胎児細胞を特定し、そして、妊婦らのその時点での妊娠からダウン症候群のような普通の胎児染色体異数体、並びに他の遺伝的障害及び単一遺伝子障害を診断するために、迅速で非侵襲的な診断試験の必要性が存在する。

【0008】

従って、本発明のある側面は、先行技術の課題の幾つかを克服し又は少なくとも軽減し、そして妊婦のための遺伝的試験を改善することである。 50

【発明の要旨】

【0009】

本発明の第一の側面では、子宮頸部粘液サンプルから細胞を取り出す方法であって：
子宮頸部粘液サンプルを得ること；
該サンプルをコラゲナーゼ及びプロテアーゼで処理して、該子宮頸部粘液サンプルから細胞を解離させること；及び
解離された細胞を該サンプルから取り出すこと
を含んでなる方法が提供される。

【0010】

抗体試験を介するなどの信頼性ある特定を可能にするところの、細胞膜完全性を実質的に 50

維持している実質的に無傷な細胞を取り出すことが好ましい。

好ましい態様では、子宮頸部粘液サンプルは、細胞を解離させるためにコラゲナーゼ及びプロテアーゼで処理される前に粘液溶解剤で更に処理される。この組み合わせ法で処理されることにより子宮頸部粘液サンプルからの懸濁単一細胞の収率がより良好となることが分かった。

【0011】

その粘液サンプルは、粘液を壊すために酵素混合物で更に処理される。理想的には、その混合物は、胎児のものであっても母体のものであってもそれら細胞の特定を容易にするために、それら細胞の完全性を維持して細胞膜を保存している。このことから、それら酵素は、実質的に細胞に作用しないような組み合わせで選択された。

10

【0012】

本出願人は、プロテアーゼとコラゲナーゼとの組み合わせが、好ましくはそれらと粘液溶解剤との組み合わせが、細胞を、それらの特定及びその後の診断目的の使用を可能にする形でうまく解き放すことを見出した。本発明の別の側面では、子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を取り出す方法であって：

上記の通りに解離された細胞を得ること；

該細胞を胎児特異性抗体で処理すること；

該抗体に結合した細胞を特定すること；及び

該特定された胎児細胞を取り出すこと

を含んでなる方法が提供される。

20

【0013】

本発明の別の側面では、胎児細胞を特定する方法であって：

上記の通りに子宮頸部粘液サンプルから解離細胞を得ること；

該細胞を胎児特異性抗体で処理すること；及び

該抗体に結合した細胞を特定すること

を含んでなる方法が提供される。

【0014】

本発明の別の側面では、胎児細胞の染色体中の染色体異数体を特定する方法であって：

胎児細胞を得ること；

該染色体上の少なくとも3種の多型微小衛星マーカー (polymorphic microsatellite marker) を特定すること；及び

30

該少なくとも3種の多型微小衛星マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定すること

を含んでなる方法が提供される。

【0015】

本発明の別の側面では、出産前診断の方法であって：

本明細書に記載の通りに子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得ること；

該胎児細胞に特徴的な該染色体上の少なくとも3種の多型微小衛星マーカーを特定すること；

該少なくとも3種の多型微小衛星マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定すること；及び

40

該対立遺伝子プロファイルを出産前診断のための条件と相関させること

を含んでなる方法が提供される。

【0016】

好ましい側面では、ダウン症候群を診断する方法であって：

胎児細胞を得ること；

該染色体上の少なくとも3種の多型微小衛星マーカーを特定すること；

該少なくとも3種の多型微小衛星マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定すること；及び

染色体21のトリソミーを決定すること

を含んでなる方法により染色体異数体を特定することを含んでなる方法が提供される。

50

【0017】

本発明の別の側面では、個体からの子宮頸部粘液サンプルからの細胞の胎児起源を確認する方法であって：

該同じ個体から胎児細胞と母体細胞を得ること；

該胎児又は母体細胞のいずれかに特徴的な少なくとも3種の多型微小衛生マーカーを選択すること；及び

該少なくとも3種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを該胎児細胞及び該母体細胞上で決定すること

を含んでなる方法が提供される。

【詳細な説明】

10

【0018】

本発明の第1の側面では、子宮頸部粘液サンプルから細胞を取り出す方法であって：

子宮頸部粘液サンプルを得ること；

該サンプルをコラゲナーゼ及びプロテアーゼで処理して該子宮頸部粘液サンプルから細胞を解離させること；及び

解離された細胞を該サンプルから取り出すこと

を含んでなる方法が提供される。

【0019】

本発明は、母体及び胎児両方の細胞を子宮頸部粘液サンプルから解き放つための方法を提供する。これら細胞は複雑な粘液構造の中に捕捉されていることがあるので、これまでこれら細胞を解き放とうと試みられてきた。しかしながら、これら細胞は、これまでうまく解き放たれなかった。そして、それらがそうであったなら、それらは塊のままであるか又はそれらの細胞膜完全性が破壊されることによって、出産前診断又は効果的な特定のようなその後の用途のためのそれらの有効性が減ずる。

20

【0020】

従って、本法は、抗体試験を介するなどの信頼性ある特定を可能にするところの細胞膜完全性を実質的に維持している実質的に無傷な細胞を取り出すことが好ましい。

胎児の遺伝的障害を正確に診断するには、胎児細胞が使用されるのが理想的である。しかしながら、そのような用途のために胎児細胞の信頼性ある単離及び特定を行うには問題があった。子宮頸部粘液がこれら細胞の供給源を提供するが、その粘液から胎児細胞を効果的に単離することには、原則的に母体細胞を含有しているという問題、次いで、特定及び診断目的のためにその完全性を維持しなければならないという問題が残っていた。

30

【0021】

胎児を試験する非侵襲的な方法は、流産及び胎児死の発生を少なくする。母体の子宮下支柱 (lower uterine pole) 及び子宮頸部粘液の中に流れ込んだ胎児細胞は、胎児細胞の潜在的供給源を提供する。しかしながら、この供給源に付随するものが、更なる特定及び診断のために胎児細胞を単離することの問題となっている。これまで、これら乏しい細胞をそれらを取り囲む粘液プラグから単離するのは難しかった。細胞が粘液から解き放たれたときでさえ、希少な胎児細胞を母体細胞から単離して特定するには課題が残っていた。このことから、何らかの遺伝的障害についての単一細胞分子診断を行う前に、これら乏しい細胞を大多数の母体細胞から明確に特定することが必要とされた。これまでの検討は、その時点の胎児から源を発するこれら細胞は、妊娠の第7～13週の狭い窓にだけ出現することを示唆している。

40

【0022】

胎児起源の有核赤血球が、百万個に約1個の確率ではあるが、妊娠の第1及び第2三カ月期の間に母体の血流中に見出されている。幾つかのグループは、これら希少な胎児有核赤血球を単離しようと異なる形の細胞選別法を使用した。成功は限られたものであった。加えて、出産後の母体血流中に胎児細胞が保存されることが示され、かくして、その時点での胎児の診断を混乱させた。胎児赤血球及び他の胎児細胞の表面上の胎児特異性抗体を微小操作技術と組合わせて使用することは、これまでのところ、胎児細胞を特定するのに

50

最も見込みがある。

【0023】

“無傷”細胞という用語は、細胞膜完全性を維持している細胞を意味する。それら細胞は、理想的には細胞内容物を失っていないので、DNA、RNA及びmRNAを含む核酸の使用による更なる特定を可能にする。

【0024】

本発明は、子宮頸部粘液から細胞を、好ましくは無傷細胞を得るための手段を提供し、それは、胎児の非侵襲的試験の基礎を提供する。細胞が粘液プラグから解き放たれると、それらは、胎児細胞又は母体細胞として更に特定されることによって、遺伝子試験のための胎児細胞の供給源を提供する。

10

【0025】

サンプル中の細胞は、胎児から流れ込んだか又は子宮頸部に移動した、子宮頸管からの細胞を含む。これら細胞は、妊娠の第1三カ月期（約7～13週）の間、子宮頸管の中に見出される。それら細胞は、胎児起源又は母体起源であり得る。

【0026】

これら細胞は、退行過程にある絨毛膜絨毛から子宮下支柱及び子宮頸部粘液の中に流れ込むと推定される。胎児細胞は、パップ塗抹採取（pap smear）と類似の非侵襲的方法で、好ましくは、子宮頸管及び子宮下支柱から粘液を吸引することにより、母体細胞と一緒に取り出されることができる。これまでの研究は、これら胎児細胞が子宮頸部内外（transcervical）サンプルの50～90%に存在することを示してきた。この確率のバラツキは、サンプリング技術、オペレーターの技能、及び胎児細胞を母体細胞から明確に区別できないことに起因している。子宮頸部内外細胞の採取は安全かつ効率的であると文献に報告されている。CVSの前の妊婦達に行った予備的研究は、この操作が感染のリスクも自然流産のリスクも高めないことを示唆している。200人を越える婦人が関与したこれまでに報告された研究では、子宮頸部サンプルが進行中の妊娠期間中に吸引されたが、これら操作は、母体と胎児の健康にいかなる有害な影響ももたらさなかった。父方から受け継がれた微小衛生マーカーの存在によって、大量の子宮頸部内外細胞のPCR後に、胎児起源が幾つかのサンプルで確認されただけだった。母体細胞の混入は出産前診断を妨害する。

20

【0027】

子宮頸部粘液サンプルは、妊娠のいずれの段階で得られてもよい。好ましくは、そのサンプルは、妊娠の第1及び第2三カ月期に得られる。理想的には、そのサンプルは、胎児の幸福について決断できる段階、好ましくは治療的中絶に関する早期の決断をする機会を作れる期間内に得られる。好ましくは、そのサンプルは、妊娠の第14週までに得られる。より好ましくは、そのサンプルは、妊娠の第1三カ月期に得られる。

30

【0028】

好ましい態様では、子宮頸部粘液サンプルは、細胞を解離させるためにコラゲナーゼ及びプロテアーゼで処理される前に更に粘液溶解剤で処理される。この組み合わせ法で処理されることにより子宮頸部粘液サンプルからの細胞の収率がより良好となることが分かった。

【0029】

適する粘液溶解剤は、N-アセチル-L-システイン、DDT、トリプシン、及びトリプシン/EDTAを含む群から選択され得る。好ましくは、粘液溶解剤は、N-アセチル-L-システインである。

40

【0030】

サンプルは、好ましくは、酵素での処理の前に粘液溶解剤で処理される。しかしながら、この工程は、コラゲナーゼとプロテアーゼでの酵素処理と組み合わせて行われてもよい。この処理の組み合わせが、粘液分解の相乗的効果をもたらし、それにより細胞の解き放ちが容易になる。粘液溶解剤と酵素（コラゲナーゼとプロテアーゼ）のこの組み合わせ効果は、粘液溶解剤単独と酵素処理単独の別々の効果及び単に合わせた効果よりも大きな効果がある。

50

【0031】

好ましくは、サンプルは、 $2 \sim 20 \text{ mg/ml}$ の N-アセチル-L-システインで処理される。より好ましくは、 10 mg/ml の最終濃度が使用される。
サンプルは、粘液を溶解するのに十分な時間処理され、一般に、粘液プラグを小球に解離することによってその粘液の粘度を減少させる。より好ましくは、サンプルは、約 37°C で $30 \sim 60$ 分間処理される。最も好ましくは、サンプルは、緩やかに攪拌しながら 45 分間処理される。

【0032】

粘液サンプルは、その粘液を分解するために更に酵素混合物で処理される。理想的には、その混合物は、胎児のものであっても母体のものであってもそれら細胞の特定を容易にするために、それら細胞の完全性を維持して細胞膜を保存する。このことから、それら酵素は、実質的に細胞に作用しないような組み合わせで選択された。

10

【0033】

プロテアーゼのような酵素の使用は、細胞膜の完全性が維持されるべきであるなら一般的には避けられる。しかしながら、本出願人は、プロテアーゼとコラゲナーゼとの組み合わせが、好ましくはそれらと粘液溶解剤との組み合わせが、細胞を、それらの特定及びその後の診断目的の使用を可能にする形でうまく解き放すことを見出した。

【0034】

コラゲナーゼとプロテアーゼは、単独で使用されても組み合わせで使用されてもよい。しかしながら、粘液サンプルを処理するためには、両方の酵素が同時に使用されるのが好ましい。粘液サンプルの同時処理が達成されるように、それら酵素を粘液サンプルの処理のための混合物に調製するのも望ましい。

20

【0035】

好ましくは、酵素の濃度は、粘液を実質的に分解するのに十分な濃度である。その濃度は、好ましくは、少なくとも 1 又は 2 回の処理で粘液を分解するだけの高さになろう。
子宮頸部粘液サンプルは、コラゲナーゼとプロテアーゼで処理される。当業者が知っているあらゆるコラゲナーゼタイプもプロテアーゼタイプも使用され得る。

【0036】

リベラーゼブレンドザイムのような市販の酵素ミックスが、コラゲナーゼとプロテアーゼでの処理を補足するために使用され得る。リベラーゼブレンドザイムは、コラゲナーゼイソフォーム I と II 及びサーモリシンの組み合わせ物であり、Roche から得ることができる。酵素混合物の適する濃度は、凡そリベラーゼブレンドザイム ($0.5 \sim 10 \text{ WU/ml}$) コラゲナーゼとディスパーゼ ($0.1 \sim 1.5 \text{ mg/ml}$) である。

30

【0037】

しかしながら、本発明は、これら特定の濃度に限定されない。濃度及びインキュベーション時間の操作は、粘液サンプル中の細胞のより良好な解き放ちを提供するであろう。
解離された細胞は、母体細胞と胎児細胞を含んでなるので、出産前診断試験に使用されるためには、又は、単離細胞、即ち胎児細胞を必要とする他の使用のためには、胎児細胞は更に特定されかつ単離され得るといえるのは、この細胞混合物から来ている。

【0038】

解離された細胞は、適する緩衝液及び生理食塩水で洗浄された後、遠心分離を含む当業者にとって利用可能なあらゆる方法によってサンプルから取り出されることができる。細胞の取り出し又は取り除きは、上澄み液からの細胞の分離を包含する。取り出されたら、それら細胞は、母体細胞と胎児細胞への更なる特定ののために使用されてもよい。

40

【0039】

本発明の別の側面では、子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を取り出す方法であって：
上記の通りに解離された細胞を得ること；
該細胞を胎児特異性抗体で処理すること；
該抗体に結合した細胞を特定すること；及び
該特定された胎児細胞を取り出すこと

50

を含んでなる方法が提供される。

【0040】

胎児細胞は、上記の通りに解離細胞のサンプルを調製した後に子宮頸部粘液サンプルから取り出されることができる。子宮頸部粘液サンプルからの解離細胞は、胎児細胞と母体細胞とのミックスである。次いで、それら細胞の混合物は、胎児起源の細胞を特定するために特定操作を受ける。

【0041】

本発明の胎児細胞は、当該技術分野で周知の技術を使用して特定及び単離される。これら技術には、細胞を標識するために抗体を使用してそれを胎児起源のものであるとして特定することを包含する免疫組織化学法が含まれるがこれに限定されない。これら技術には、第1及び第2抗体を使用して細胞を第1三カ月期の胎児起源のものであるとして特定することも含まれる。好ましくは、抗体は胎児特異性抗原に結合するもので、IgG、IgM及びモノクローナル抗体であることができる。好ましくは、胎児特異性抗原は、胎児細胞の表面上に存在する。結合すると、胎児細胞は「標識された」細胞を標識の無い細胞から分離するために処理される。細胞の標識には、第1抗体に結合する第2抗体の更なる使用が含まれ得る。第2抗体の例には、マウス由来第1抗体に結合するウサギ抗マウスフルオレセインイソチオシアネート異性体I (FITC) が含まれる。しかしながら、第1抗体は、第2抗体の不存在下で細胞を特定し単離するのに適していてもよい。適する第2抗体は、第1抗体を考慮しかつその第1抗体に第2抗体を反応させることによって当業者により決定されることができる。

10

20

【0042】

胎児細胞は、胎児特異性抗体によって特定される。胎児細胞が子宮頸部サンプルの粘液から分離されたら、現時点で入手可能などのような胎児特異性抗体でも使用できる。好ましくは、胎児特異性抗体は、妊娠の第1三カ月期に特異的である。最も好ましくは、それら抗体には、合胞栄養芽層、絨毛栄養膜細胞層及び栄養膜細胞柱 (cytotrophoblast cell columns) に特異的な抗体が含まれる。

【0043】

他の適する胎児特異性抗体は、Sunderland, C. A et al (1981) "Monoclonal Antibodies to human syncytiotrophoblast", Immunology 43(3):541-6 及び Griffith-Jones, M.D. et al (1992) "Detection of fetal DNA in trans-cervical swabs from first trimester pregnancies by gene amplification: A new route to prenatal diagnosis?", British Journal of Obstetrics and Gynecology, 99(6):508-11 に記載されたものである。具体的には、これら抗体は、NDOG1、NDOG5及びFT1.41.1として掲載されている。NDOG1は妊娠第1三カ月期の合胞栄養芽層を染色し、NDOG5は合胞栄養芽層と栄養膜細胞柱を染色し、そしてFT1.41.1は合胞栄養芽層と絨毛栄養膜細胞層を染色する。これら抗体のいずれも、母体の子宮内膜にも子宮頸部組織にも反応性ではない。

30

【0044】

これら抗体は、単独でも組み合わせても使用され得る。これら抗体は、細胞がそれら抗体と反応して結合できるなら、別々にでも同時にでも細胞に付されることができる。好ましくは、それらは、胎児細胞を特定するために抗体ミックスとして使用される。これら抗体が胎児細胞の細胞膜に特異的に結合することが本出願人によって見出された。

40

【0045】

胎児特異性抗体は、全ての胎児細胞タイプに特異的であるのが好ましい。子宮頸部粘液サンプルで起こる胎児細胞の不均質性に起因して、全てのタイプの胎児細胞を検知するために胎児特異性抗体の混合物を使用するのが望ましい。1種類の抗体が使用される場合には、他の胎児細胞タイプが逃され得る。抗体は、妊娠の段階を知ることにより選択され得るので、特定の細胞タイプが予測され得る。従って、予測された細胞タイプに特異的な抗体が、優先的に単独で又は組み合わせて使用されることができる。

【0046】

50

抗体は、特定を容易にするために標識を含んでもよい。本明細書で使用される“標識”という用語は、核酸プローブや抗体のような試薬に直接又は間接に複合化し又は融合して、それが複合化し又は融合したその試薬の検出を容易にする化合物又は組成物のことを意味する。標識自体が検出可能であっても（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、酵素標識である場合に、検出可能である基質化合物又は組成物の化学変化を触媒するものであってもよい。

【0047】

抗体で標識された胎児細胞は、母体細胞のネガティブ選択又は胎児細胞のポジティブ選択のための、蛍光活性化細胞選別法（FACS）、磁気ビーズ分離技術、マイクロマニピュレーション技術、レーザー捕捉、及び蛍光免疫組織化学法を含む、当該技術分野で周知の技術を使用して特定及び／又は分離されることができる。好ましくは、胎児細胞は、母体細胞のネガティブ選択又は胎児細胞のポジティブ選択のために、蛍光免疫組織化学法を使用して特定及び／又は分離される。例えば、蛍光免疫組織化学法を使用して標識された胎児細胞は、蛍光顕微鏡で形態学的に特定され、そして、例えば、プルドガラスピペット（pulled glass pipettes）又はマイクロマニピュレーターを使用するマイクロマニピュレーション技術を使用して単離されることができる。

【0048】

細胞が特定されたら、次いで、それは、当業者に利用可能な方法によって単離又は取り出されることができる。例えば、細胞が蛍光標識されているなら、それらはレーザー捕捉によって単離され又はFACS分析によって選別されることができる。しかしながら、抗体によって特定された細胞の特定方法に依っては他の方法を使用してもよい。

【0049】

本発明の別の側面では、本明細書に記載した方法によって取り出された胎児細胞が提供される。

本発明の別の側面では、胎児細胞を特定する方法であって：

上記のように子宮頸部粘液サンプルから解離細胞を得ること；

該細胞を胎児特異性抗体で処理すること；及び

該抗体に結合した細胞を特定すること

を含んでなる方法が提供される。

【0050】

子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞をうまく特定することは、その子宮頸部粘液サンプルから細胞懸濁液を得ることにより達成される。細胞は好ましくは無傷であり、そのことが抗体が実質的に無傷の細胞膜に反応するのを可能にする。

【0051】

本発明の別の側面では、胎児細胞を特定する方法であって：

細胞サンプルを得ること；

該細胞サンプルを、本明細書に記載されたNDOG1、NDOG5及びFT1.41.1を含む群から選択される抗体又はそれらの等価物で処理すること；及び

該抗体に結合した細胞を特定すること

を含んでなる方法が提供される。

【0052】

上記のように、胎児細胞は、胎児細胞にだけ反応性の抗体の特異的カクテルを使用して特定されることができる。これら抗体、即ち、NDOG1、NDOG5及びFT1.41.1は胎児細胞に特異的である。それらは単独で使用されても組み合わせて使用されてもよく、そしてそれらは別々に加えられても同時に加えられてもよい。

【0053】

抗体NDOG1、NDOG3及びFT1.41.1に適用され、かつ本明細書で使用される“それらの等価物”という用語は、リストに挙げた抗体のいずれか1つと同じように挙動しかつ類似の特異性を有する等価の抗体を意味する。例えば、NDOG1、NDOG5及びFT1.41.1の標的部位を確認し、そしてモノクローナル抗体やポリクローナル抗体

を生じさせる方法のような当業者に知られている方法を使用することによって他の抗体を生じさせてもよい。

【0054】

好ましくは、それら抗体は上記のようなやり方で標識される。蛍光標識が最も好ましい。胎児細胞が特定され、そして好ましくは子宮頸部粘液プラグのような非侵襲的供給源から取り出されたら、それら細胞は：

- (a) 胎児特定、染色体異常及び単一遺伝子診断のための多数回 F L - P C R ；
 - (b) 胎児特定のための S N P での、及び単一遺伝子障害及び染色体異数体のためのプローブでの、W G A、ハイブリダイゼーション及びマイクロアレイ分析；又は
 - (c) m R N A の抽出、c D N A ライブラリー、ハイブリダイゼーション及び遺伝子発現マイクロアレイ分析
- を含むあらゆるやり方で使用されることができる。

【0055】

これら技術は、胎児細胞のあらゆる生化学的障害、代謝的障害又は遺伝子障害を特定するために、それら胎児細胞を特徴付けるのに使用されてもよい。単離された胎児細胞は、いずれかの細胞タイプにおいて確認されることができる胎児異常を包含する、全てのタイプの異常を特定するために使用されることができる。胎児細胞が子宮頸部粘液サンプルから単離され特定されたら、あらゆる細胞分析がそれら胎児細胞に関して行われることができる。

【0056】

胎児起源を確認するため、単一遺伝子障害及び染色体異常を診断するために、マイクロアレイが使用されてもよい。1回のマイクロアレイで、単一ヌクレオチド多型現象 (S N P) を使用して胎児細胞を特定すること、並びに単一遺伝子障害及び染色体異常を特定することが可能である。この方法で、単離され特定された単一胎児細胞は、プライマー伸長予備的増幅 P C R (P E P - P C R)、退行オリゴヌクレオチドプライムド P C R (degenerate oligonucleotide primed PCR) (D O P - P C R)、リンカーアダプター P C R、又は M S D (複数鎖追い出し) 全ゲノム増幅 (W G A) のいずれかによって、全ゲノム増幅を受けることができる。W G A からの蛍光標識産物は、マイクロアレイプラットフォームにハイブリダイズできるので、結合した蛍光のレーザー走査が、胎児起源を確認し、ヒト染色体の全ての 23 対の染色体異数体を診断し、そしてあらゆる具体的単一遺伝子欠失を特定することになる。

【0057】

本発明の別の側面では、胎児細胞を特定するために使用される組成物であって、抗体 N D O G 1、N D O G 5 及び F T 1.41.1 を含んでなる組成物が提供される。

本発明の別の側面では、胎児細胞の染色体中の染色体異数体を特定する方法であって：胎児細胞を得ること；

該染色体上の少なくとも 3 種の多型微小衛星マーカーを特定すること；及び

該少なくとも 3 種の多型微小衛星マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定することを含んでなる方法が提供される。

【0058】

本発明のこの側面は、胎児細胞の染色体中の染色体異数体を特定する方法に関する。本明細書で使用される“染色体中の染色体異数体”には、対象の正常な天然の核型と比較して、染色体の一部を欠損しているか又は余分なコピー若しくは部分を有する染色体が含まれ、特定の部位でモノソミー又はトリソミーを起こす欠失、付加及び転座が含まれる。好ましくは、異数体は、常染色体のトリソミー及びモノソミー、及び性染色体のモノソミー、ジソミー及びトリソミーを含む群から選択される。

【0059】

好ましくは、胎児細胞は、上記のように、子宮頸部粘液サンプルから得られる。好ましくは、そのサンプルは妊婦からのものである。しかしながら、本発明は、流産した婦人から胎児細胞を得ることを排除しない。

10

20

30

40

50

【0060】

絨毛膜絨毛サンプリング（CVS）又は羊水穿刺のような胎児細胞を得る侵襲的方法は、胎児細胞を提供できる、絨毛膜絨毛サンプル、羊膜細胞、胎児組織及び臍帯血をもたらす。しかしながら、子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得るための非侵襲的方法が好ましい。いかなる段階でのいかなるタイプの胎児細胞も使用できる。

【0061】

本発明は、核酸に特異的な多型微小衛生マーカーの使用を包含する。本発明の核酸はDNA、好ましくは染色体DNAであることができる。好ましくは、諸多型微小衛生マーカーは同じ染色体上に存在する。

【0062】

好ましくは、多型微小衛生マーカーは、高い異型接合性、対立遺伝子の広い分布、トリ対立遺伝子パターンを生み出す高い確率、及び所与染色体への特異性に基づいて選択される。例えば、表2に掲げられたダウン症候群の診断のための染色体21テトラヌクレオチド微小衛生マーカー及び表3に掲げられた他の症候群のための他のテトラヌクレオチド微小衛生マーカー診断法を参照のこと。

【0063】

選択される多型マーカーは、常染色体のトリソミー及びモノソミー、及び性染色体のモノソミー、ジソミー及びトリソミーを含む異数体の種々のパターンを特定するのに有用である。対立遺伝子サイズの広い分布は、そのような範囲の諸対立遺伝子サイズが、異数体、特にトリソミー、ジソミー又はモノソミーの対立遺伝子パターン診断を提供するので、遺伝子分析をうまく行うのに好ましい。それらマーカーは、各々のマーカーが、DNAフィンガープリント（fingerprint）中に、他のマーカーと重なることのない、明確に異なる対立遺伝子プロフィールを有するようにも選択される。

【0064】

トリソミーは、流産及び死産によく見られる最も一般的な染色体異常であって、染色体21、18及び13におけるトリソミー及びX及びYにおけるジソミーが最大のグループである。トリソミー21又はダウン症候群は、出産予定日に到達する最も一般的な常染色体異常である。

【0065】

本発明は、染色体異数体の特定を可能にするためにその染色体上に少なくとも3種の多型マーカーを必要とする。

3種未満の多型マーカーの増幅は、幾つかの理由により偽結果をもたらす。限定されたテンプレート上での多数回蛍光ポリメラーゼ連鎖反応（FL-PCR）によるDNAフィンガープリンティングに付随する問題には、完全増幅の失敗、親の異型接合の可能性（各々の親は同じ対立遺伝子の2コピーを有する）、対立遺伝子脱落（ADO）（PCRの最初の2、3回のサイクルで、1対立遺伝子だけが検出可能であるという程度の、1対立遺伝子の完全増幅の失敗）、及び優先的増幅（PA）（1対立遺伝子という過少表現（under-representation）が、期待される1：1ジ対立遺伝子比率からの歪みをもたらす）が含まれる。こうしたことから、1染色体当たり3種の高度に多型の微小衛生マーカーが異数体細胞の診断のために必要とされる。

【0066】

精度を向上させるために、微小衛生マーカーの数を増やしてもよい。本法は、少なくとも3種のマーカーを必要とする。しかしながら、5種の微小衛生マーカーが好ましい。少なくとも3種の微小衛生マーカーを含めることで、対立遺伝子脱落（ADO）と優先的増幅がそれほど結果に干渉することはない。もし1つの遺伝子座マーカーが害されても、他のものが正しい診断のために残っているからである。好ましくは、5種の多型マーカーが増幅される。

【0067】

この明細書の記載及び請求の範囲を通して、“含んでなる”という用語及びその類語は、他の添加物、成分、数又は工程を排除することを意図していない。

10

20

30

40

50

対立遺伝子プロファイルは、異数体及び胎児起源を特定するための手段を提供する。多型微小衛生マーカーにより特定される種々の対立遺伝子の比率は、トリソミー、ジソミー及びモノソミーを含むがこれらに限定されない異数体の種々の形態のいずれかとして特定可能な対立遺伝子パターンを提供する。

【0068】

多型微小衛生マーカーにより対立遺伝子を検出するのに種々の手段が利用可能である。他の方法には、制限フラグメント多型現象（RFLP）、単一ヌクレオチド多型現象（SNP）及びマイクロアレイが含まれる。

【0069】

好ましい態様では、対立遺伝子プロファイルは、対立遺伝子プロファイルを生じるための多型マーカーの増幅によって決定される。対立遺伝子プロファイルは、モノソミー、ジソミー又はトリソミーを含むがこれらに限定されない異数体の具体的特定を提供することができる。例えば、FL-PCR増幅で産生されるDNAの量は、初期標的配列の量に比例すると考えられるので、何らかの特定の遺伝子座についての対立遺伝子比率は、最終蛍光量から計算されることができる（第2対立遺伝子のPCR産物の量で割った第1対立遺伝子からのPCR産物の量）。従って、ジソミーは1：1の期待比対立遺伝子比率によって定義されるのに対し、トリソミーはトリ対立遺伝子パターンとして1：1：1の期待比率として定義されることができる。モノソミーの診断は、単一の対立遺伝子を表示するために全部で5種の微小衛生マーカーを必要とし得るが、トリソミーは、1種のマーカーの少なくとも1種のトリ対立遺伝子パターンによって正しく診断されることができた。

10

20

【0070】

本明細書で使用される“増幅する”という用語は、核酸又はその部分のコピーの数を増やす当該技術分野で公知のあらゆる種々の方法を含む。核酸増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含む当該技術分野で知られた種々の核酸増幅方法によって達成されることができる。多数回FL-PCRを含む種々の形態のPCRが本発明の範囲に含まれる。種々の増幅方法が当該技術分野で知られており、“The polymerase chain -reaction”, Baumforth et al., Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology 1999, (52): 1-10に記載されている。

【0071】

増幅された核酸は分析されてもよく、そして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を含む当該技術分野で周知の技術を使用して、好ましくは変性ゲルを使用して、プロファイルを生じさせる。分析は自動又は手動操作を使用して行われることができ、例えば、自動分析には、ABI Prism 377 DNA Sequencer と付随する Genescan 672 ソフトウェア（Applied Biosystems, Australia）の使用が含まれ得る。他の自動分析には、ABI Prism 3100 Genetic Analyzer 及び変性高速液体クロマトグラフィー（DHPLC）が含まれる。

30

【0072】

本明細書で使用される“プライマー”という用語には、短鎖核酸、好ましくは長さが15又はそれを越えるヌクレオチド数のDNAオリゴヌクレオチドであって、例えば、核酸ハイブリダイゼーションによって相補的標的DNA鎖へアニーリングされてそのプライマーと標的DNA鎖の間でハイブリッドを形成し、次いで、ポリメラーゼによって、好ましくは熱安定性DNAポリメラーゼによって、その標的DNA鎖に沿って伸長されることができるオリゴヌクレオチドが含まれる。プライマー対は、核酸を増幅するために、例えば、PCRにより又は当該技術分野で周知の他の核酸増幅方法により増幅するために使用される。PCRプライマー対は、核酸の配列から誘導されても、次の基準に従って設計されてもよい：約50%のGC含量、18～24塩基対の長さ、最少のプライマー二量体形成率及び自己アニーリング率、プライマーの3'末端における2G又はC塩基、同じ長さである順向プライマーと逆向プライマー（±1ヌクレオチド）、一列の中に3以下の反復塩基、及び100～400ヌクレオチドの長さであるPCR産物のサイズ。

40

【0073】

50

プライマーを調製し及び使用する方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Asubel et. al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, USA 1987 に記載されている。

【0074】

最も好ましくは、本法は、DNAフィンガープリンティングにより多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定することを包含する。

本発明の別の側面では、出産前診断の方法であって：

本明細書に記載の通りに子宮頸部粘液サンプルから胎児細胞を得ること；

該胎児細胞に特徴的な染色体上の少なくとも3種の多型微小衛生マーカーを特定すること；

該少なくとも3種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定すること；及び

該対立遺伝子プロファイルを出産前診断のための条件と関連させることを含んでなる方法が提供される。

【0075】

本明細書で使用される“出産前診断”という用語は、胎児細胞内での遺伝子突然変異又は何らかの生物学的若しくは代謝的特定物の存在を確認することを包含する。出産前診断は、全てのタイプの胎児異常を特定することを意図する。遺伝子突然変異には、染色体異数体、点突然変異、転座、トリヌクレオチド反復拡大 (trinucleotide repeat expansions)、逆位 (inversions)、多型現象、挿入及び欠失が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子突然変異は、遺伝子障害、例えば、腭嚢胞性繊維症、 β -地中海貧血、ハンチントン病、脆弱X (Fragile X)、筋強直性ジストロフィー、デュシェーヌ筋ジストロフィー、又は鎌型赤血球貧血症を起こし得る。

【0076】

出産前診断には、染色体における異常に起因して起こる遺伝子障害が含まれ得る。染色体21、18、13、X及びYを包含する染色体異常が最も高い頻度で生産に見られる。他の異数体は、一般に、移植又は第1三カ月期の早期に無くなるが、染色体の全ての23対の異数体の早期の非侵襲的方法診断は、多数回FL-PCR又はマイクロアレイで達成されることができる。ターナー症候群(XO)、クラインフェルター症候群(XXY)、XXX女性(XXX females)及びXYY男性(XYY males)、三倍体性(69, XXX又はXXY又はXYY)、パタウ症候群(トリソミー13)及びエドワード症候群(トリソミー18)、ダウン症候群(トリソミー21)を含むがこれらに限定されない遺伝子障害も本法によって検知され得る。好ましくは、本出産前診断は、異数体の形態にある染色体異常を検知することができる。出産前診断には、特定遺伝子における突然変異によって起こる単一遺伝子障害が含まれる。最も一般的な障害は、腭嚢胞性繊維症である。腭嚢胞性繊維症は、2,500回の出産に1回観察され、25個体に1個体がこの常染色体劣性状態のキャリアである。

【0077】

好ましい側面では、ダウン症候群を診断する方法であって：

胎児細胞を得ること；

その染色体上の少なくとも3種の多型微小衛生マーカーを特定すること；

該少なくとも3種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定すること；及び

染色体21のトリソミーを決定すること

を含んでなる方法によって染色体異数体を特定することを含んでなる方法が提供される。

【0078】

現在、ダウン症候群胎児の検知のため35歳未満の妊婦に申し入れられる一連の非診断的血清スクリーニングがある。これら試験は、12週目の超音波で測定される胎児の首の後

10

20

30

40

50

ろの体液蓄積量（頸の厚み）、第1三カ月期における母体血液中のフリーの β -hCG及び妊娠関連血漿プロテイン-A（PAPP-A）の濃度、並びに第2三カ月期における母体血液中のフリーの β -hCG及び α -フetoプロテイン（AFP）の濃度を含む、ダウン症候群胎児と関連するように特定されたある範囲の変数の測定を包含する。組合わせた試験結果から、患者の個人的リスクが計算され、その80～90%が検知効力であり5～10%が偽陽性率である。しかしながら、これらスクリーニング試験は非診断的であり、かつ陰性結果が胎児におけるダウン症候群の不存在を示さない。現在80%近くのダウン症候群の生産が35歳を下回る母親からのものである。

【0079】

胎児細胞は、上記のいずれかの供給源から得られる。好ましくは、それら細胞は、妊婦の子宮頸部内外から綿棒で又は子宮頸管の吸引で得られる胎児細胞である。このことは、非侵襲的診断方法のためには理想的である。

【0080】

好ましい方法では、染色体21のトリソミーは、ダウン症候群の指標である。この方法は、少なくとも3種の多型微小衛生マーカーで行われる。しかしながら、少なくとも5種のマーカーが使用されるのが好ましい。高度に異型接合性でありかつ広い分布の対立遺伝子サイズを有する染色体21上のテトラヌクレオチド微小衛生マーカーがこの方法に特に好ましい。

【0081】

ダウン症候群について、いかなる蛍光もサイズ重複も有さない明らかに異なる対立遺伝子プロファイル又はパターンを生ずるマーカーの選択が好ましい。ダウン症候群の好ましい診断について表2を参照のこと。

【0082】

本法は、少なくとも3種の多型微小衛生マーカー、好ましくは表2から選択されるものを必要とするが、5種のマーカーがダウン症候群を診断するために使用されるのが最も好ましい。

【0083】

この系に5種の微小衛生マーカーを含めることで、対立遺伝子脱落及び優先的増幅が結果に干渉することはない。もし1つの遺伝子座マーカーが害されても、正しい診断のために4種が残っているからである。

【0084】

対立遺伝子プロファイルを決定する方法は、多型微小衛生マーカーによって表示される対立遺伝子の指標となるパターンを生ずるいかなる方法によってもよい。好ましくは、対立遺伝子プロファイルは、それらマーカーのDNA増幅によって、好ましくはPCR、より好ましくはFL-PCRを使用して決定される。

【0085】

PCR産物の分析方法は、本明細書に記載されている。プロファイルが樹立されたら、DNAの量、それから決定されるそれらそれぞれの対立遺伝子の比率及びサイズに関して上記した通りにして、異数体が特定され得る。ダウン症候群について図2をそして染色体13、18、21及びXの異数体について図3を参照のこと。

【0086】

本発明の別の側面では、ダウン症候群を診断する方法に使用するための微小衛生マーカーであって、前記マーカーが：

tatgtgagtcaattccccaagtga；

atgatgaatgcatagatggatg；

ttgcagggaaaccacagtt；

tgaacatacatgtacatgtgtcttg；又は

cactgcagacggcatgaacttc

のいずれかから選択される配列を含む順向プライマー配列を有する微小衛生マーカーが提

供される。

【0087】

本発明の別の側面では、ダウン症候群を診断する方法に使用するための微小衛生マーカーであって、前記マーカーが：

gttgtagtagtcaatgttctccag；

aatgtgtgtccttccagc；

tccttgaataaattcccg；

ttctctacatatttactgccaacac；又は

ccagaatcacatgagccaattcc

のいずれかから選択される配列を含む逆方向プライマー配列を有する微小衛生マーカーが提供される。 10

【0088】

本発明の好ましい態様では、ダウン症候群を診断するための方法に使用するための微小衛生マーカーであって、表2に記載された群から選択されるいずれか1つのマーカーが提供される。これらマーカーのいずれか1つは、本明細書に記載の方法に従ってトリソミー21を診断するのに適する少なくとも2種の他のマーカーと組み合わせて使用されることができる。加えて、プライマー配列は、多数回FL-PCRにおける他のプライマー配列に相補的であるように再設計されてもよい。

【0089】

本発明の別の側面では、出産前診断のためのキットであって、胎児細胞の染色体中の染色体異数体を特定する方法に使用するための少なくとも3種の多型微小衛生マーカーを含んでなり、前記方法が： 20

胎児細胞を得ること；

該染色体上の少なくとも3種の多型微小衛生マーカーを特定すること；及び

該少なくとも3種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを決定することを含んでなるキットが提供される。

【0090】

好ましくは、その胎児細胞は、本明細書に記載した通りの子宮頸部粘液サンプルから得られる。

好ましい側面では、そのキットは、胎児細胞の特定の染色体上の多型微小衛生マーカーを特定して対立遺伝子プロファイルを得る手段を含んでなる。 30

【0091】

更なる側面では、そのキットは、多型微小衛生マーカーを、好ましくはPCR、より好ましくはFL-PCRを使用して増幅する手段を含む。マーカーを増幅する手段は、本明細書に記載されている。

【0092】

更なる好ましい側面では、ダウン症候群を診断するためのキットであって、マーカーが上記のダウン症候群のためのマーカーのいずれかから選択されるキットが提供される。

本発明の別の側面では、個体からの子宮頸部粘液サンプルからの細胞の胎児起源を確認する方法であって： 40

同じ個体から胎児細胞と母体細胞を得ること；

該胎児又は母体細胞のいずれかに特徴的な少なくとも3種の多型微小衛生マーカーを選択すること；及び

該少なくとも3種の多型微小衛生マーカーの対立遺伝子プロファイルを該胎児細胞及び該母体細胞上で決定すること

を含んでなる方法が提供される。

【0093】

好ましくは、個体から細胞の胎児起源を確認する方法は、母体細胞と胎児細胞の染色体中の染色体異数体を特定することを含む。

加えて、子宮頸管からの胎児細胞の単離で、この非侵襲的方法は、単一遺伝子障害、例え 50

ば、腭嚢胞性繊維症を起こす突然変異を検知することもできる。

【0094】

単一遺伝子障害の突然変異検知をDNAフィンガープリンティング系と組み合わせることも、染色体異数体と所与単一遺伝子障害の両方についての妊婦診断を提供することも可能である（図3を参照のこと）。

【0095】

文書、行為、材料、装置、文献等の説明は、本発明の前後関係を与える目的のためにのみこの明細書に含められている。これら事柄のいずれか又は全てが、本願の各々の請求項の優先日前にオーストラリアに存在する先行技術の一部を形成するとも本発明に関連する分野における一般的知識になっているとも示唆も表現もしていない。

10

【0096】

本発明は、以下の実施例によってより十分に説明される。しかしながら、以下の記載は、例示だけのためと理解されるべきであり、上記の本発明の広さに関する限定として解釈されるべきでない。

【実施例】

【0097】

実施例1：ダウン症候群の診断

(a) 子宮頸部内外細胞の採取と調製

第1又は第2三カ月期間の妊婦からの子宮頸部内外細胞の採取は、パップ塗抹採取と類似の操作であり、細いカテーテル (Aspiracath, Cook IVF) を使用する子宮頸管及び子宮下支柱からの子宮頸部粘液の直接吸引を含む。母体粘液細胞と子宮頸部内外細胞を含有するこのカテーテルのチップが、0.5 ml の RPMI 培地を含有し 37 °C にされたエッペンドルフ管の中に切り取られる。その内容物がカテーテルの内部チップから機械的に優しく取り外されて 37 °C の培地中に懸濁される。

20

【0098】

(b) 子宮頸部内外サンプルからの胎児細胞の特定と単離

採取後、サンプルは、20 mg / ml の N-アセチル-L-システイン 0.5 ml で処理され、更に、ゆっくり振盪されながら 37 °C で 45 分間インキュベートされる。次いで、そのサンプル全体は、PBS で 2 回洗浄された後、0.5 ml の酵素カクテル（コラゲナーゼとプロテアーゼ）で 37 °C で 1 時間インキュベートされる。インキュベーション時間の間、解離した細胞が取り出され、元のサンプルに残った塊が新しい酵素で処理される。完全に解離させた後、その細胞懸濁液は、PBS で 2 回洗浄された後に免疫蛍光標識される。

30

【0099】

フルオレセインで標識された3種の胎児特異性抗体のカクテル (NDOG 1、NDOG 5 及び FT 1.4 1.1) が 37 °C で細胞懸濁液に加えられ、そして胎児細胞だけの細胞膜に特異的に結合される。NDOG 1 は、妊娠第1三カ月期の合胞栄養芽層を染色し、NDOG 5 は、合胞栄養芽層と栄養膜細胞柱を染色し、そして、FT 1.4 1.1 は、合胞栄養芽層と絨毛栄養膜細胞層を染色する。これら抗体のいずれも、母体の子宮内膜にも子宮頸部組織にも反応性ではない。プルドガラスピペットでのマイクロマニピレーション及びマイクロディセクティング (microdissecting) 技術を使用して、反転顕微鏡下で、蛍光標識された胎児細胞の単一の小塊が特定され、単離され、そして PBS 緩衝液で 3 回洗浄された後、分析のため 0.2 ml PCR 管に移される。陰性コントロールとして、母体扁平上皮細胞も単離されて、PBS 緩衝液で 3 回洗浄された後、分析のため 0.2 ml PCR 管に移される。

40

【0100】

(c) 胎児起源の確認及びトリソミー 21 の診断

この多数回 FL-PCR 反応は、染色体 21 上で見出された5種の微小衛星マーカーを取り込む。この多数回から生じた対立遺伝子プロファイルが、母体起源又は胎児起源のいずれか、並びに染色体 21 の存在又は不存在を確認する。FL-PCR 反応は：2.5 µl

50

の10×PCR緩衝液(500mM KCl、100mM トリス-HCl、pH9.0及び15mM MgCl₂)、0.5μlの10mM dNTP(200μM)、0.3μlのTaqポリメラーゼ(5単位/μl)、11.20μl MQ-H₂O、及び10.5μlのプライマーミックスを含有し、25μlの最終容量になる。プライマー対は、各々のPCR反応に、D21S1411、D21S11、D21S1413、D21S1412、及びD21S1437を含む。全ての反応ミックスは、手動の“加熱開始(Hot Start)”を受け、多数回FL-PCRが9700 Thermocycler PCR機(Applied Biosystems, Australia)を使用して行われた。反応は、94℃で45秒間の変性、60℃で45秒間のアニーリング、及び72℃で1分間の伸長からなる35回の熱サイクルに付された。各々の単細胞多数回FL-PCRで、PCR反応ミックスが機能的でありかついずれの試薬も混ざりものでないことを確保するために、陽性及び陰性コントロールが含まれた。

10

【0101】

他の実施例は、ダウン症候群と普通腭嚢胞性繊維症δF508突然変異の同時診断を包含する。そのFL-PCRは、上記の通りであるが、プライマーミックスが、δF508突然変異検知のためのプライマー対と一緒に、情報を与えてくれる4種の染色体21微小衛星マーカーを含有するという変更を有する。

【0102】

(d) 胎児起源の読み取り及びトリソミー21の診断

全てのFL-PCR産物は、ABI Prism 3100 DNA Sequencerと付随するGenescan 672ソフトウェア(Applied Biosystems, Australia)を使用して分析される。各々のPCR産物(0.5~1.0μl)は、9.75μlのホルムアミドと0.25μlの内部標準と混合される。サンプルは、95℃で5分間変性され、氷上に置かれ、そして96ウェルプレート内に10μlが充填される。諸サンプルは、界面動電注入を受け、そしてGenescanソフトウェアによる自動サイジングで電気泳動される。Genescanプロフィール又は‘フィンガープリント’が生じ、使用された蛍光染料に依存して着色したピークとしてPCR産物を示す(図1を参照のこと、ダウン症候群対象の単細胞対立遺伝子プロフィール)。

20

【0103】

胎児起源を確認するため、単一遺伝子障害及び染色体異常を診断するために、マイクロアレイも使用されることができる。1回のマイクロアレイで、単一ヌクレオチド多型現象(SNP)を使用して胎児細胞を特定すること、単一遺伝子障害及び染色体異常を特定することが可能である。この方法で、単離され特定された単一胎児細胞は、まず、PEP-PCR、DOP-PCR、リンカーアダプター-PCR又はMSDWGAのいずれかによって、全ゲノム増幅(WGA)を受けることになる。WGAからの蛍光標識産物は、マイクロアレイプラットフォームにハイブリダイズできるので、結合した蛍光のレーザー走査が、胎児起源を確認し、ヒト染色体の全23対の染色体異数体を診断し、そしてあらゆる具体的単一遺伝子欠失を特定することになる。

30

【0104】

実施例2：ダウン症候群IIの診断

(a) 子宮頸部内外細胞の採取と調製が、実施例1に記載した通りに行われる。

40

(b) 胎児細胞の特定と単離

採取後、サンプルがスライド上に播かれて100%エタノール中に固定される。胎児細胞を特定するために第1三カ月期胎児特異性抗体を使用して免疫組織化学法が行われる。次いで、それらスライドが脱水される。レーザー捕捉マイクロディセクティング技術が、陽性に染色された細胞を、そのスライドから、PCR管の中に直接移されることができる膜上に取り出すために使用される。

【0105】

(c, d及びe) トリソミー21についてのFL-PCR DNAフィンガープリンティング、FL-PCR産物の分析、及び異数体の診断が実施例1に記載の通りに行われる。

【0106】

50

実施例 3：ダウン症候群及び腭嚢胞性繊維症 $\delta F 5 0 8$ 突然変異の同時診断

(a 及び b) 子宮頸部内外細胞の採取と調製、及び胎児細胞の特定と単離が、実施例 1 に記載した通りに行われる。

【0107】

(c) トリソミー 21 についての FL-PCR DNA フィンガープリンティング、及び腭嚢胞性繊維症 $\delta F 5 0 8$ の診断

FL-PCR 反応は、上記の通りであるが、プライマーミックスが、 $\delta F 5 0 8$ 突然変異検知のためのプライマー対と一緒に、情報を与えてくれる 4 種の染色体 21 微小衛星マーカーを含有するという変更を有する。表 2 及び 3 に概略を示した微小衛星マーカーが、DNA フィンガープリンティング系の中への取り込みのための異型接合性遺伝子座を特定する

10

【0108】

(d 及び e) FL-PCR 産物の分析及び異数体の診断は上記の通りである (図 3 を参照のこと)。

最後に、他の種々の修飾及び／又は変更が、本明細書に概略を示した本発明の精神から逸脱することなく成され得ることが理解されるべきである。

【0109】

【表 1】

表 1：異数体妊娠の詳細

20

自然流産における染色体異常		新生児における染色体異常	
異常	発生率 (%)	異常	10,000 出産 当たりの発生数
トリソミー13	2	トリソミー13	2
トリソミー16	15	トリソミー18	3
トリソミー18	3	トリソミー21	15
トリソミー21	5	45,X	1
他のトリソミー	25	47,XXX	10
モノソミーX	20	47,XXY	10
三倍体性	12	47,XYY	10
四倍体性	5	アンバランスな 再配列	10
その他	10	バランスのとれた 再配列	30

30

【0110】

【表 2】

40

表2：テトラヌクレオチド微小衛星マーカの詳細

微小衛星 マーカ	プライマー配列	蛍光色素	対立遺伝子 サイズ範囲	異型接合性	トリ対立遺伝子 パターンの確率(%)
D21S11	F - tatgtgagtcattcccccaagtga R - gttgtattagtcattgtctccag	6-FAM	172-264bp	0.93	72.5
D21S1411	F - atgatgaatgcataatgtagtg R - aatgtgtctctccaggc	HEX	>239bp	0.93	65.5
D21S1413	F - ttgcagggaaccacagtt R - tcttggaataattccgg	TET	<240bp	0.88	62.5
D21S1437	F - tgaacatacatgtacatgtgtctgg R - ttctctacatatttactgccaacac	6-FAM	107-143bp	0.93	65.5
D21S1442	F - cactgcagacggcatgaacttc R - ccagaatcacatgagccaatttc	TET	237-261bp	0.80	67.5

10

20

30

40

【 0 1 1 1 】

【 表 3 】

表3：DNAフィンガープリンティングについて特定されたテトラヌクレオチド
微小衛星マーカー及び染色体13、18、21、X及びYの異数体診断

染色体	微小衛星マーカー
染色体21	D21S1412
	D21S1414
	D21S1435
	D21S1808
	D21S1270
染色体13	D13S631
	D13S258
	D13S634
	D13S317
	D13S800
X染色体	DXS8377
	HUMARC
	HPRT
	DXS1283E
	SBMA
Y染色体	X22
	DYS391
	DYS393
染色体18	DYS390
	D18S535
	D18S51
	MBP
	D18S978
	D18S1002
	D18S974
	D18S849
	D18S865
	D18S877
	D18S386

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0112】

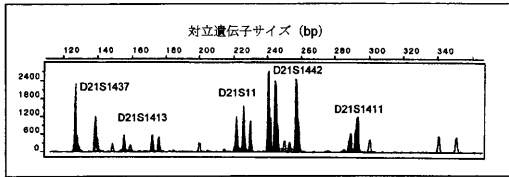
【図1】図1は、ダウン症候群を有する男性対象からの単一ヒト頬細胞のDNAフィンガープリントを示す。微小衛星マーカーD21S1413、D21S11及びD21S1442は、トリ対立遺伝子パターンを示し、D21S1437及びD21S1411は、期待1：2対立遺伝子比率を有するジ対立遺伝子2重パターンを示す。

40

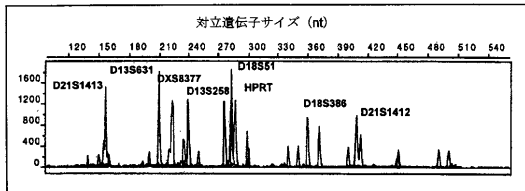
【図2】図2は、二倍体対象からの単一ヒト頬細胞のDNAフィンガープリントを示す。この8重DNAフィンガープリント系には、各々がある二倍体対立遺伝子比率を示す染色体X、13、18及び21の各々について2つの微小衛星マーカーがある。

【図3】図3は、普通腭嚢胞性繊維症δF508突然変異のキャリアである二倍体個体からの単一ヒト頬細胞のDNAフィンガープリントを示す。このDNAフィンガープリントには、染色体21についての4つの微小衛星マーカーがあり、腭嚢胞性繊維症δF508について突然変異が検知されている。

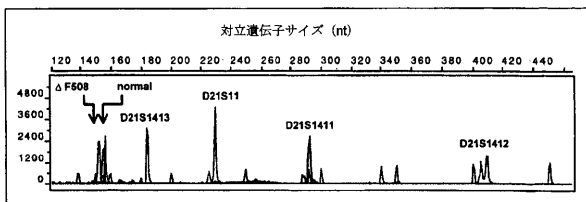
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【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
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020986 A1

(51) International Patent Classification: C12S 3/24, C12Q 1/68 (74) Agent: PHILLIPS ORMONDE & FITZPATRICK; 367 Collins Street, Melbourne, VIC 3000 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU02/01214

(22) International Filing Date:
6 September 2002 (06.09.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PR 7499 6 September 2001 (06.09.2001) AU(71) Applicants (for all designated States except US):
MONASH UNIVERSITY [AU/AU]; Clayton Road,
Clayton, VIC 3168 (AU). MONASH IVF PTY LTD
[AU/AU]; Epworth Hospital, 4th Floor, 89 Bridge Road,
Richmond, VIC 3121 (AU).(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,
VC, 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, UJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): KATZ, Mandy,
Gael [AU/AU]; 3/14 Johnson Street, Richmond, VIC 3121
(AU). CRAM, David, Stephen [AU/AU]; 25 Barnesdale
Drive, Vermont, VIC 3133 (AU).

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 03/020986 A1

(54) Title: METHOD OF ISOLATING CULLS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to a non-invasive method of retrieving and identifying cells particularly fetal cells and trophoblastic cells. The invention includes methods for use of the cells for identifying chromosomal abnormalities and mutations particularly for prenatal diagnosis by performing genetic diagnosis for chromosomal and single gene disorders. The invention also includes methods of confirming cells of fetal origin.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

1

METHOD OF ISOLATING CELLS AND USES THEREOF

The present invention relates to a non-invasive method of retrieving and identifying cells particularly fetal cells and trophoblastic cells. The invention includes methods for use of the cells for identifying chromosomal abnormalities and mutations particularly for prenatal diagnosis by performing genetic diagnosis for chromosomal and single gene disorders. The invention also includes methods of confirming cells of fetal origin.

10

INTRODUCTION

Approximately 0.5% of couples are at high risk of conceiving a child with a genetic disorder. Such genetic disorders include Cystic Fibrosis, Huntington's Disease, Beta Thalassaemia and Myotonic Dystrophy. For example, in Australia, 1 in 25 of the population is a carrier of a Cystic Fibrosis mutation and thus newborn screening for Cystic Fibrosis has recently been implemented to monitor all births.

In addition to single gene disorders chromosomal abnormalities are the most common genetic disorders seen in spontaneous miscarriages and newborn babies. Trisomies involving chromosomes 21, 18, 13, X and Y are the largest group with trisomy 21 or Down syndrome being the most frequent, occurring in approximately one in every 700 live births. Trisomies 13 and 18 are the only other autosomal trisomies that reach full term with a characteristic malformation syndrome leading to death during the immediate postnatal period. The remaining liveborn trisomic individuals have an additional sex chromosome, XXY, XYY or XXX. Prenatal diagnosis is primarily undertaken in an attempt to detect chromosomal abnormalities in the fetus, particularly Down syndrome. Down syndrome is the most important genetic cause of mental retardation in humans and is also associated with a high risk of congenital heart disease and leukaemia.

Prenatal diagnosis is performed to detect either single gene disorders or chromosomal abnormalities in the fetus during pregnancy. Currently, prenatal

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

2

diagnosis involves an invasive procedure either in the form of chorionic villous sampling (CVS) (10-12 weeks) or amniocentesis (14-16 weeks) to identify potential chromosomal aneuploidies in the fetus. Both these procedures are associated with a risk of miscarriage (1-2%). Therefore, prenatal testing is only offered to women perceived to be at increased risk, including those of advanced maternal age (>35 years), those with abnormal maternal serum screening or those who have had a previous fetal chromosomal abnormality.

Prenatal diagnosis is usually performed by an invasive method to sample chorionic or amniotic cells. These methods of sampling ensure fetal cells of the current fetus are also tested. Samples obtained from other sources such as the blood cannot ensure that the fetal cell so identified, may be derived from the current fetus or of a recently miscarried fetus because such cells can persist in the circulation for several years. Once the fetal cell is obtained cytogenetic techniques are used to identify chromosomal abnormalities. Such procedures are, lengthy and require a high level of technical expertise. Further, results generally are not available to the patient for up to three weeks.

Therefore a rapid, non-invasive diagnostic technique and preferably one which ensures the testing of a current fetus would significantly benefit all pregnant women of high or low genetic risk. A diagnosis within 24 hours would give them piece of mind and the opportunity to make an earlier decision regarding therapeutic abortion in the first trimester of their pregnancy.

Hence, there is a need for a rapid and non-invasive diagnostic test for pregnant women to identify substantially intact fetal cells and diagnose common fetal chromosomal aneuploidies such as Down syndrome from their current pregnancy as well as other genetic and single gene disorders.

Accordingly, it is an aspect of the present invention to overcome or at least alleviate some of the problems of the prior art and improve genetic testing for pregnant woman.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

3

SUMMARY OF THE INVENTION

- In a first aspect of the present invention there is provided a method of retrieving cells from a cervical mucus sample, said method comprising:
- 5 obtaining a cervical mucus sample;
 treating the sample with a collagenase and a protease to disassociate cells from the cervical mucus sample; and
 retrieving disassociated cells from the sample.
- 10 It is preferred that the present method retrieves substantially intact cells that have substantially maintained their cell membrane integrity which allows for reliable identification such as through antibody testing.
- In a preferred embodiment, the cervical mucus sample is further treated with a
- 15 mucolytic agent prior to being treated with a collagenase and a protease to disassociate the cells. It has been found that by treating in this combined manner, there is a better yield of suspended single cells from the cervical mucus sample.
- 20 The mucus sample is further treated with an enzyme mixture to break down the mucus. Ideally, the mixture maintains the integrity of the cells to preserve cellular membranes to facilitate identification of the cells either as fetal or maternal. Hence the enzymes have been selected in combination, which do not substantially effect the cell.
- 25 Applicants have found that the combination of protease with collagenase and preferably with the mucolytic agent, successfully releases cells in a form that allows their identification and use for subsequent diagnostic purposes. In yet another aspect of the present invention there is provided a method of retrieving
- 30 a fetal cell from a cervical mucus sample, said method comprising:
 obtaining disassociated cells as described above;
 treating the cells with fetal-specific antibodies;
 identifying cells that have bound to the antibodies; and
 retrieving the identified fetal cells.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

4

In another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a fetal cell, said method comprising:

- obtaining disassociated cells from a cervical mucus sample as described
- 5 above;
- treating the cells with fetal-specific antibodies; and
- identifying cells that have bound to the antibodies.

In another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of a fetal cell said

10 method comprising:

- obtaining a fetal cell;
- identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome; and
- 15 determining an allelic profile of at least three (3) polymorphic microsatellite markers.

In another aspect of the present invention there is provided a method of prenatal diagnosis, said method comprising:

- 20 obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample as described herein;
- identifying at least three (3) polymorphic microsatellite markers on the chromosome characteristic of the fetal cell;
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers; and
- 25 correlating the allelic profile with a condition for prenatal diagnosis.

In a preferred aspect, there is provided a method of diagnosing Down syndrome said method comprising identifying a chromosome aneuploidy by a method comprising:

- 30 obtaining a fetal cell;
- identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome;
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers; and

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

5

determining a trisomy of chromosome 21.

In another aspect of the present invention there is provided a method of confirming fetal origin of a cell from a cervical mucus sample from an individual, said method including:

- obtaining a fetal cell and a maternal cell from the same individual;
- selecting at least three (3) polymorphic microsatellite markers characteristic of either the fetal or maternal cell; and
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers on the fetal cell and the maternal cell.

FIGURES

Figure 1 shows a DNA fingerprint of a single human buccal cell from a male subject with Down syndrome. Microsatellite markers D21S1413, D21S11 and D21S1442 show tri-allelic patterns, while D21S1437 and D21S1411 show di-allelic double dosage patterns with the expected 1:2 allelic ratio.

Figure 2 shows a DNA fingerprint of a single human buccal cell from a diploid subject. In this octaplex DNA fingerprinting system there are two microsatellite markers for each of the following chromosomes, X, 13, 18 and 21 each displaying a diploid allelic ratio.

Figure 3 shows a DNA fingerprint of a single human buccal cell from a diploid individual who is a carrier of the common Cystic Fibrosis deltaF508 mutation. In this DNA fingerprint there are four microsatellite markers for chromosome 21 combined with mutation detection for Cystic Fibrosis deltaF508.

DETAILED DESCRIPTION

In a first aspect of the present invention, there is provided a method of retrieving cells from a cervical mucus sample, said method comprising:

- obtaining a cervical mucus sample;

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

6

treating the sample with a collagenase and a protease to disassociate cells from the cervical mucus sample; and
retrieving disassociated cells from the sample.

- 5 The present invention provides a method to liberate cells, both maternal and fetal, from cervical mucus samples. These cells may be trapped in the complex mucus structures and attempts have previously been made to release these cells. However, the cells have not been successfully released previously, and if they were they remained in clumps or their cell membrane integrity was
10 destroyed thereby reducing their effectiveness for subsequent use such as prenatal diagnosis or effective identification.

Accordingly, it is preferred that the present method retrieves substantially intact cells that have substantially maintained their cell membrane integrity which
15 allows for reliable identification such as through antibody testing.

To correctly diagnose a genetic disorder of a fetus, the fetal cell is ideally used. However, it has been a problem to obtain reliable isolation and identification of a fetal cell for such uses. The cervical mucus provides a source of these cells but
20 the problem remained to effectively isolate a fetal cell from the mucus, that contains principally maternal cells, then maintain its integrity for identification and diagnostic purposes.

Non-invasive methods of testing the fetus would reduce the incidence of
25 miscarriage and fetal death. Fetal cells shed into the lower uterine pole and cervical mucus of the mother have provided a potential source of fetal cells. However, associated with this source is the problem of isolating the fetal cells for further identification and diagnosis. Until now, it has been difficult to isolate these scarce cells from the surrounding mucus plug. Even when the cells are
30 liberated from the mucus, the problem remained to isolate and identify the rare fetal cells from maternal cells. Hence a positive identification of these scarce cells from the majority of maternal cells was required before subsequent single cell molecular diagnosis for any genetic disorders could be conducted.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

7

Previous studies suggest that these cells originating from the current fetus only appear in a narrow window of 7 to 13 weeks gestation.

5 Nucleated red blood cells of fetal origin have been found in the maternal circulation during the first and second trimesters of pregnancy, albeit at a frequency of approximately 1 in a million. Several groups have used different forms of cell sorting in an attempt to isolate these rare fetal nucleated red blood cells; however with limited success. In addition, studies have shown the perseverance of fetal cells in the maternal circulation post delivery, and thus, 10 could confound the diagnosis of the current fetus. The use of fetal-specific antigens on the surface of fetal red blood cells and other fetal cells, combined with micromanipulation techniques, has to date, been most promising for identifying fetal cells.

15 The term "intact" cells means a cell which maintains cell membrane integrity. The cells ideally have not lost intracellular content so as to allow for further identification by the use of nucleic acids including DNA, RNA and mRNA.

20 The present method provides a means to obtain cells preferably intact cells from cervical mucus which provides a basis for a non-invasive test of the fetus. Once the cells are liberated from the mucus plug, they may be further identified as fetal or maternal thereby providing a source of fetal cells for genetic testing.

25 The cells in the sample include cells from the endocervical canal that have shed from the fetus and migrated to the cervix. These cells have been found in the endocervical canal during the first trimester (approximately 7-13 weeks) of pregnancy. The cells may be of fetal or maternal origin.

30 It is hypothesised that these cells have shed from the regressing chorionic villis into the lower uterine pole and cervical mucus. Fetal cells can be retrieved along with maternal cells in a non-invasive method, similar to a pap smear preferably by aspiration of the mucus from the endocervical canal and the lower uterine pole. Previous studies have shown that these fetal cells occur in 50-90% of transcervical samples; the variability in frequency has been due to the

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

8

sampling technique, skill of the operator and the inability to definitively distinguish fetal from maternal cells. It has been reported in the literature that the collection of transcervical cells is safe and efficient. Preliminary studies performed on pregnant women prior to a CVS suggest that this procedure does not increase the risks of infection or spontaneous abortion. In studies reported to date involving more than 200 women, cervical samples were aspirated during ongoing pregnancies and these procedures have not had any deleterious effects on the health of the mother or fetus. Fetal origin has only been confirmed in some samples by the presence of paternally inherited microsatellite markers after PCR of a large number of transcervical cells. Maternal cell contamination will interfere with prenatal diagnosis.

The cervical mucus sample may be obtained at any stage of pregnancy. Preferably the sample is obtained during the first and second trimester of pregnancy. Ideally the sample is obtained at a stage when a decision can be made for the well-being of the fetus and preferably within a period where an opportunity to make an early decision regarding therapeutic abortion can be made. Preferably the sample is obtained up to 14 weeks of the pregnancy. More preferably, the sample is obtained in the first trimester of pregnancy.

In a preferred embodiment, the cervical mucus sample is further treated with a mucolytic agent prior to being treated with a collagenase and a protease to disassociate the cells. It has been found that by treating in this combined manner, there is a better yield of the cells from the cervical mucus sample.

Suitable mucolytic agents may be selected from the group including N-acetyl-L-cysteine, DTT, trypsin and trypsin/EDTA. Preferably, the mucolytic agent is N-acetyl-L-cysteine.

The sample is preferably treated with the mucolytic agent prior to treatment with the enzymes. However, this step may also be conducted in combination with the enzyme treatment with a collagenase and a protease. The combination of treatments results in a synergistic effect of mucus breakdown thereby facilitating the release of cells. The combined effect of the mucolytic agent and enzymes

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

9

(collagenase and protease) is more effective than the separate and summed effects of mucolytic agent alone and enzymatic treatment alone.

5 Preferably, the sample is treated with 2-20mg/ml of N-acetyl-L-cysteine. More preferably, a final concentration of 10 mg/ml is used.

10 The sample is treated for a period sufficient to resolve the mucus and generally to reduce the viscosity of the mucus by dissociating the mucus plug into small globules. More preferably the sample is treated at approximately 37°C for a period of 30 to 60 minutes. Most preferably the sample is treated for 45 minutes preferably with gentle agitation.

15 The mucus sample is further treated with an enzyme mixture to break down the mucus. Ideally, the mixture maintains the integrity of the cells to preserve cellular membranes to facilitate identification of the cells either as fetal or maternal. Hence the enzymes have been selected in combination which do not substantially effect the cell.

20 The use of enzymes such as proteases are generally avoided particularly if the integrity of the cell membrane is to be maintained. However, applicants have found that the combination of a protease with a collagenase and preferably with the mucolytic agent, successfully releases cells in a form that allows their identification and use for subsequent diagnostic purposes.

25 The collagenase and protease may be used singularly or in combination. However, it is preferred that both enzymes are used simultaneously to treat the mucus sample. It is also desirable to prepare the enzymes in a mixture for the treatment of the mucus sample so that simultaneous treatment of the mucus sample is achieved.

30 Preferably, the concentration of the enzyme is sufficient to substantially break down the mucus. The concentration will preferably be high enough to break down the mucus in at least one or two treatments.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

10

The cervical mucus sample is treated with a collagenase and a protease. Any collagenase type or protease type familiar to the skilled addressee may be used.

- 5 Commercially available mixes of enzymes such as liberase blendzyme may be used to complement the collagenase and protease treatment. Liberase blendzyme is a combination of collagenase isoform I and II and thermolysin and can be obtained from Roche. A suitable concentration of the enzyme mixture is approximately liberase blendzyme (0.5-10WU/ml) collagenase and dispase
10 (0.1-1.5mg/ml).

However the invention is not limited to these specific concentrations. Manipulation of the concentration and incubation time could provide better liberation of the cells in some mucus samples.

15

The disassociated cells will comprise maternal and fetal cells and it is from this cell mixture that the fetal cells may be further identified and isolated for use in prenatal diagnostic tests or for other uses which require the isolated cells or fetal cells.

20

The disassociated cells may be retrieved from the sample by any method available to the skilled addressee including centrifugation after washing with suitable buffers and salines. Retrieval or removal of the cells involves the separation of the cells from the supernatant. Once retrieved, the cells may be
25 used for further identification into maternal and fetal cells.

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of retrieving a fetal cell from a cervical mucus sample, said method comprising:

- 30 obtaining disassociated cells as described above;
treating the cells with fetal-specific antibodies;
identifying cells that have bound to the antibodies; and
retrieving the identified fetal cells.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

11

The fetal cells may be retrieved from the cervical mucus sample after preparing a sample of disassociated cells as described above. The disassociated cells from the cervical mucus sample are a mix of fetal and maternal cells. The mixture of the cells may then undergo identification to identify cells of fetal origin.

The fetal cell of the present invention may be identified and isolated using techniques well known in the art. These techniques include, but are not limited to, immunohistochemistry including the use of antibodies to label a cell and hence identify it as being of fetal origin. These techniques also include the use of primary and secondary antibodies to identify the cell as being of fetal origin of the first trimester. Preferably the antibodies bind to fetal-specific antigens and could be IgG, IgM and monoclonal. Preferably the fetal-specific antigens are located on the surface of the fetal cell. Once bound, the fetal cell is processed to separate the 'labelled' cells from those that lack the label. Labelling of the cell may include the further use of a secondary antibody that binds to the primary antibody. Examples of secondary antibodies include rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) which will bind to a mouse derived primary antibody. However, the primary antibody may be suitable to identify and isolate the cell in the absence of the secondary antibody. Suitable secondary antibodies may be determined by the skilled addressee by consideration of the primary antibody and reacting the secondary antibody to the primary antibody.

The fetal cell is identified by fetal specific antibodies. Any presently available fetal specific antibodies can be used once the cells are separated from the mucus of the cervical sample. Preferably, the fetal specific antibodies are specific for the first trimester of pregnancy. Most preferably, the antibodies include antibodies specific for syncytiotrophoblasts, villous cytotrophoblasts and cytotrophoblast cell columns.

Other suitable fetal specific antibodies are those described in Sunderland, C. A et al (1981) "Monoclonal Antibodies to human syncytiotrophoblast", Immunology 43(3):541-6 and in Griffith-Jones, M.D. et al (1992) "Detection of fetal DNA in

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

12

trans-cervical swabs from first trimester pregnancies by gene amplification: A new route to prenatal diagnosis?", British Journal of Obstetrics and Gynecology, 99(6):508-11. Specifically, these antibodies are listed as NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1. NDOG1 stains the syncytiotrophoblasts, NDOG5 the syncytiotrophoblasts and cytotrophoblast cell columns and FT1.41.1 the syncytiotrophoblasts and villous cytotrophoblasts of first trimester pregnancy. None of these antibodies are reactive to maternal endometrium or cervical tissue.

10 These antibodies may be used singularly or in combination. These antibodies may be subjected to the cells separately or simultaneously, providing the cells are allowed to react and bind to the antibodies. Preferably, they are used as an antibody mix to identify the fetal cells. It has been found by the applicants that these antibodies specifically bind to cell membranes of fetal cells.

15 It is preferred that the fetal specific antibodies are specific for all fetal cell types. Due to the heterogeneity of the fetal cells arising in the cervical mucus sample, it is desirable to use a mixture of fetal specific antibodies to detect all types of fetal cells. Where one antibody is used, other fetal cell types may be missed.

20 Antibodies may be selected by knowing the stage of pregnancy and hence a particular cell type may be predicted. Accordingly, antibodies specific to that predicted cell type may be preferentially used alone or in combination.

The antibodies may include a label to facilitate identification. The term "label" when used herein refers to a compound or composition which is conjugated or fused directly or indirectly to a reagent such as a nucleic acid probe or an antibody and facilitates detection of the reagent to which it is conjugated or fused. The label itself may be detectable (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

Fetal cells that have been labelled with an antibody may be identified and/or separated using techniques well known in the art including fluorescent activated cell sorting (FACS), magnetic bead separation techniques, micromanipulation

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

13

techniques, laser capture and fluoroimmunohistochemistry for either the negative selection of maternal cells or the positive selection of fetal cells. Preferably the fetal cells are identified and/or separated using fluoroimmunohistochemistry for either the negative selection of maternal cells or the positive selection of fetal cells. For example, fetal cells that have been labelled using fluoroimmunohistochemistry may be morphologically identified under a fluorescent microscope and the cells isolated using micromanipulation techniques using, for example, pulled glass pipettes or micromanipulators.

10 Once the cell is identified, it may then be isolated or retrieved by methods available to the skilled addressee. For instance, if the cells are fluorescently labeled they may be isolated by laser capture or sorted by FACS analysis. However, other methods may be used depending on the methods of identification of the cells identified by the antibodies.

15 In another aspect of the present invention, there is provided a fetal cell retrieved by the methods described herein.

In another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a fetal cell, said method comprising:

20 obtaining disassociated cells from a cervical mucus sample as described above;
treating the cells with fetal specific antibodies; and
identifying cells that have bound to the antibodies.

25 Successful identification of the fetal cell from a cervical mucus sample is achieved by obtaining a cell suspension from the cervical mucus sample. The cells are preferably intact which allows the antibodies to react to the substantially intact cell membrane.

30 In another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a fetal cell said method comprising:
obtaining a cell sample;

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

14

treating the cell sample with an antibody selected from the group including NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1 as herein described or equivalent thereof; and

identifying cells that have bound to the antibodies.

5

As described above, the fetal cells may be identified using a specific cocktail of antibodies reactive only to fetal cells. These antibodies namely NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1 are specific for fetal cells. They may be used singularly or in combination and they may be added separately or simultaneously.

10

The term "equivalent thereof" as it applies to the antibodies NDOG1, NDOG3 and FT1.41.1 and as used herein means an equivalent antibody which behaves in a similar manner and which has a similar specificity to any one of the listed antibodies. For instance, other antibodies may be generated by determining the target sites of NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1 and using methods familiar to the skilled addressee such as those for generating monoclonal and polyclonal antibodies.

15

Preferably, the antibodies are labelled in a manner as described above. Fluorescent labelling is most preferred.

20

Once fetal cells are identified and retrieved preferably from the non-invasive source such as the cervical mucus plug, the cells may be used in any manner including:

25

(a) multiplex FL-PCR for fetal identification, chromosomal aneuploidy and single gene diagnosis;

(b) WGA, hybridisation and microarray analysis with SNP's for fetal identification and probes for single gene disorders and chromosome aneuploidy; or

30

(c) extraction of mRNA, cDNA libraries, hybridisation and gene expression microarray analysis.

These techniques may be used to characterise the fetal cell to identify any biochemical, metabolic or genetic disorders of the fetal cell. The isolated fetal

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

15

cell may be used to identify all types of abnormalities including fetal abnormalities that can be determined in any cell type. Any cellular analysis can be performed on the fetal cell once it is isolated and identified from the cervical mucus sample.

5

Microarrays may also be used to confirm fetal origin, diagnosis of single gene disorders and chromosomal abnormalities. On a single microarray it is possible to identify fetal cells using single nucleotide polymorphisms (SNPs), as well as single gene disorders and chromosomal abnormalities. With this method the isolated and identified single fetal cell may undergo whole genome amplification (WGA) by either primer extension preamplification PCR (PEP-PCR), degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR), linker adapter-PCR or MSD (multiple strand displacement) WGA. Fluorescently labelled product from WGA can be hybridised to the microarray platform and laser scanning of bound fluorescence will confirm fetal origin and diagnosis of chromosome aneuploidy of all 23 pairs of human chromosomes and identify any specific single gene defects.

In yet another aspect of the present invention there is provided a composition when used for identifying fetal cells, said composition comprising antibodies NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1.

In another aspect of the present invention there is provided a method of identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of a fetal cell said method comprising:

- obtaining a fetal cell;
- identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome; and
- determining an allelic profile of at least three (3) polymorphic microsatellite markers.

30

This aspect of the present invention relates to a method of identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of a fetal cell. "Chromosome aneuploidy in a chromosome" as used herein includes a chromosome missing or having an extra copy or part of a chromosome as compared to the normal

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

16

native karyotype of a subject and includes deletion, addition and translocation, which causes monosomy or trisomy at particular sites. Preferably the aneuploidy is selected from the group including trisomy and monosomy of autosomes, and monosomy, disomy and trisomy of sex chromosomes.

5

Preferably the fetal cell is obtained from a cervical mucus sample as described above. Preferably, the sample is from a pregnant woman. However, this invention does not exclude obtaining fetal cells from a woman who has miscarried.

10

Invasive methods of obtaining fetal cells such as chorionic villous sampling (CVS) or amniocentesis give rise to chorionic villus samples, amniocytes, fetal tissues and cord blood can provide fetal cells. However, non-invasive methods for obtaining fetal cells from cervical mucus samples is preferred. Any type of fetal cell at any stage may be used.

15

The present invention includes the use of polymorphic microsatellite markers specific for a nucleic acid. The nucleic acid of the present invention may be DNA, preferably chromosomal DNA. Preferably the polymorphic microsatellite markers are located on the same chromosome.

20

Preferably the polymorphic microsatellite markers are selected based on high heterozygosity, broad distribution of alleles, high probability of producing a tri-allelic pattern and specificity to the indicated chromosome. For example see chromosome 21 tetranucleotide microsatellite markers for diagnosis of Down syndrome listed in Table 2 and other tetranucleotide microsatellite markers diagnostic for other syndromes listed in Table 3.

25

The polymorphic markers selected will be useful for identifying various patterns of aneuploidy including trisomy and monosomy of autosomes, and monosomy, disomy and trisomy of sex chromosomes. The broad distribution of allelic sizes is preferred for successful genetic analysis since such range of allelic sizes provides an allelic pattern diagnostic of aneuploidy, particularly trisomy, disomy or monosomy. The markers are also selected so that each marker has a

30

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

17

distinct allelic profile in the DNA fingerprint which does not overlap with other markers.

Trisomies are the most common chromosome abnormalities often seen in miscarriages and stillbirths, with trisomy in chromosomes 21, 18, and 13, and disomy of X and Y being the largest group. Trisomy 21 or Down syndrome is the most common autosomal chromosomal abnormality that reaches term.

The present invention requires at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome to allow identification of a chromosome aneuploidy.

Amplification of less than three polymorphic markers provides spurious results due to several reasons. Problems associated with DNA fingerprinting by multiplex fluorescent polymerase chain reaction (FL-PCR) on a limited template include total amplification failure, the possibility of parental homozygosity (each parent having two copies of the same allele), allele dropout (ADO) (the total amplification failure of one allele in the first few cycles of the PCR to such an extent that only one allele is detectable) and preferential amplification (PA) (the under-representation of one allele resulting in a distortion from the expected 1:1 di-allelic ratio). Hence, a minimum of three highly polymorphic microsatellite markers per chromosome is required for diagnosis of an aneuploid cell.

For improved accuracy, the number of microsatellite markers may be increased. The method requires at least three (3) markers. However, five (5) microsatellite markers are preferred. With the inclusion of at least three (3) microsatellite markers, allelic dropout (ADO) and preferential amplification does not interfere as much with the result since if one locus marker is affected, others remain for the definitive diagnosis. Preferably five polymorphic markers are amplified.

Throughout the description and claims of this specification, the word "comprise" and variations of the word, such as "comprising" and "comprises", is not intended to exclude other additives, components, integers or steps.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

18

The allelic profile provides a means for identifying aneuploidy and fetal origin. A ratio of the various alleles identified by the polymorphic microsatellite markers provides an allelic pattern identifiable as anyone of the various forms of aneuploidy including, but not limited to, trisomy, disomy and monosomy.

5

Various means are available to detect alleles by the polymorphic microsatellite markers. Other methods include restriction fragment polymorphisms (RFLP's), single nucleotide polymorphisms (SNP's) and microarrays.

- 10 In a preferred embodiment, the allelic profile is determined by amplification of polymorphic markers to generate an allelic profile. An allelic profile may provide a specific indication of aneuploidy including but not limited to monosomy, disomy or trisomy. For example, since the amount of DNA produced in FL-PCR amplification is estimated as being proportional to the quantity of the initial
- 15 target sequence, allelic ratios for any particular loci can be calculated from the final fluorescent yield (the amount of PCR product from the first allele divided by the amount of product of the second allele). Accordingly, a disomy can be defined by an expected bi-allelic ratio of 1:1, whereas a trisomy can be defined as a tri-allelic pattern and an expected ratio of 1:1:1. The diagnosis of a
- 20 monosomy may require all 5 microsatellite markers to display a single allele, while a trisomy could be definitively diagnosed by at least one tri-allelic pattern of one marker.

- The term "amplifying" as used herein includes any of a variety of methods
- 25 known to those of skill in the art that increase the number of copies of a nucleic acid or portions thereof. Nucleic acid amplification can be accomplished by any of the various nucleic acid amplification methods known in the art, including the polymerase chain reaction (PCR). Various forms of PCR are encompassed within the scope of the present invention including multiplex FL-PCR. A variety
- 30 of amplification methods are known in the art and are described in "The polymerase chain reaction", Baumforth et al., Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology 1999, (52): 1-10.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

19

Amplified nucleic acid may be analysed, and a profile generated, using techniques well known to those of skill in the art including polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), preferably using a denaturing gel. Analysis may be performed using automated or manual procedures, for example automated analysis may include use of an ABI Prism 377 DNA Sequencer and associated Genescan 672 software (Applied Biosystems Australia). Other automated analysis includes the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and denaturing high phase liquid chromatography (DHPLC).

- 10 The term "primers" as used herein includes short nucleic acids, preferably DNA oligonucleotides 15 nucleotides or more in length, that can be annealed to, for example, a complementary target DNA strand by nucleic acid hybridization to form a hybrid between the primer and the target DNA strand, then extended along the target DNA strand by a polymerase, preferably a thermostable DNA
- 15 polymerase. Primer pairs can be used to amplify a nucleic acid, e.g., by PCR or by other nucleic acid amplification methods well known in the art. PCR-primer pairs can be derived from the sequence of a nucleic acid and designed according to the following criteria, approximately 50% GC content, 18-24 base pairs in length, minimal primer-dimer formation and self annealing, 2 G or C bases at the 3' end of the primer, forward and reverse primers to be the same
- 20 length (+/- one nucleotide), no more than three repeated bases in a row and the size of the PCR product to be between 100-400 nucleotides in length.

Methods for preparing and using primers are described, for example, in

25 Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Asubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, USA 1987.

- 30 Most preferably the present method includes determining the allelic profile of the polymorphic microsatellite markers by DNA fingerprinting.

In another aspect of the present invention there is provided a method of prenatal diagnosis, said method comprising:

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

20

- obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample as described herein;
- identifying at least three (3) polymorphic microsatellite markers on the chromosome characteristic of the fetal cell;
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic
- 5 microsatellite markers; and
- correlating the allelic profile with a condition of prenatal diagnosis.

The term "prenatal diagnosis" as used herein includes determining the presence of a genetic mutation or any biochemical or metabolic identification in a fetal

10 cell. The prenatal diagnosis is intended to identify all types of fetal abnormalities. The genetic mutation includes, but is not limited to chromosomal aneuploidies, point mutations, translocations, trinucleotide repeat expansions, inversions, polymorphisms, insertions and deletions. The genetic mutation may cause a gene disorder, for example cystic fibrosis, beta-thalassaemia,

15 Huntington's Disease, Fragile X, Myotonic Dystrophy, Duchenne Muscular Dystrophy or Sickle Cell Anaemia.

Prenatal diagnosis may include genetic disorders which occur due to abnormalities in the chromosome. Chromosome abnormalities involving

20 chromosomes 21, 18, 13, X and Y are the most frequent and are found in live births. Other aneuploidies are generally lost prior to implantation or early in the first trimester however with an earlier non-invasive method diagnosis of aneuploidies of all 23 pairs of chromosomes can be achieved with multiplex FL-PCR or microarrays. Genetic disorders including, but not limited to Turners

25 syndrome (XO), Klinefelter's syndrome (XXY), XXX females and XYY males, Triploidy (69, XXX or XXY or XYY), Patau's syndrome (trisomy 13) and Edward's syndrome (trisomy 18). Down syndrome (trisomy 21) may also be detected by the present method. Preferably the prenatal diagnosis can detect chromosomal abnormalities in the form of aneuploidies. Prenatal diagnosis may

30 also include single gene disorders caused by mutation in specific genes. The most common disorder is Cystic Fibrosis. Cystic Fibrosis is observed in 1 in 2,500 births and 1 in 25 individuals are carriers of this autosomal recessive condition.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

21

In a preferred aspect, there is provided a method of diagnosing Down syndrome said method comprising identifying a chromosome aneuploidy by a method comprising:

- obtaining a fetal cell;
- 5 identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome;
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers; and
- 10 determining a trisomy of chromosome 21.

10

Currently, there are a series of non-diagnostic serum screening tests that are offered to pregnant women who are less than 35 years of age for the detection of a Down syndrome fetus. These tests involve the measurement of a range of variables that have been identified to correlate with a Down syndrome fetus including, the amount of fluid accumulation behind the fetal neck (nuchal thickness) measured at a 12 week ultrasound, the concentration of free-beta hCG and pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A) in the maternal blood in the first trimester and the concentration of free-beta hCG and alpha-fetoprotein (AFP) in the maternal blood in the second trimester. From combined

15 test results, a patient's specific risk can be calculated with a 80-90% detection efficiency and a 5-10% false positive rate. However, these screening tests are non-diagnostic and a negative result does not indicate the absence of Down syndrome in the fetus. Currently nearly 80% of Down syndrome live births are to mothers under 35 years of age.

25

The fetal cells may be obtained from any source as described above. Preferably, the cells are fetal cells obtained from the transcervical swabs or aspirations of the cervical canal of a pregnant female. This is ideal for a non-invasive method of diagnosis.

30

In the present method, a trisomy of chromosome 21 is indicative of Down syndrome.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

22

The method is performed with at least three (3) polymorphic microsatellite markers. However, it is preferred that at least five (5) markers are used. Tetranucleotide microsatellite markers on chromosome 21 that are highly heterozygous and which have a broad distribution of allelic sizes is particularly preferred for this method.

5

For Down syndrome, selection of markers which generate a distinct allelic profile or pattern which do not have any fluorescent or size overlap are preferred. See Table 2 for preferred diagnosis of Down syndrome.

10

Whilst the present method requires at least three (3) microsatellite markers, preferably selected from Table 2, it is most preferred that five (5) markers are used to diagnose Down syndrome.

15

With the inclusion of five (5) microsatellite markers in this system, allelic dropout and preferential amplification does not interfere with the result since if one locus marker was affected, there are four remaining for a definitive diagnosis.

20

The method of determining an allelic profile may be by any method which generates a pattern indicative to the alleles represented by the polymorphic microsatellite markers. Preferably, the allelic profile is determined by DNA amplification of the markers, preferably using PCR, more preferably using FL-PCR.

25

Methods of analysis of the PCR products are described herein.

30

Once a profile is established, the aneuploidy can be identified as described above with respect to the amount of DNA, their respective allelic ratios and sizes determined therefrom see Figure 2 for Down syndrome and figure 3 for aneuploidies of chromosomes 13, 18, 21 and X.

In another aspect of the present invention, there is provided a microsatellite marker for use in a method for diagnosing Down syndrome, said marker having a forward primer sequence including a sequence selected from any one of:

- tatgtgagtcattccccaagtga;
- atgatgaatgcatagatggatg;
- ttgcagggaaccacagtt;
- tgaacatacatgtacatgtgtctgg; or
- cactgcagcggcatgaactc.

In yet another aspect of the present invention, there is provided a microsatellite marker for use in a method for diagnosing Down syndrome, said marker having
5 a reverse primer sequence including a sequence selected from any one of:

- gttgtattagtcattgtctccag;
- aatgtgtgtcctccaggc;
- tccttgaataaattcccg;
- ttctctacatatttactgccaacac; or
- ccagaatcacatgagccaattcc.

In a preferred embodiment of the present invention, there is provided a microsatellite marker for use in a method for diagnosing Down syndrome,
10 wherein said marker is any one marker selected from the group described in Table 2. Any one of these markers may be used in combination with at least two (2) other suitable markers for diagnosing a trisomy 21 according to the methods described herein. In addition, primer sequences can be redesigned to complement other primer sequences in a multiplex FL-PCR.

15

In another aspect of the present invention there is provided a kit for prenatal diagnosis, said kit comprising at least three (3) polymorphic microsatellite markers for use in a method of identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of a fetal cell, said method comprising:

20

- obtaining a fetal cell;
- identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome; and
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

24

Preferably, the fetal cell is obtained from a cervical mucus sample as described herein.

- 5 In a preferred aspect, the kit further comprises a means to identify polymorphic microsatellite markers on specified chromosomes of fetal cells such that an allelic profile is obtained.

- 10 In an even further aspect, the kit includes a means to amplify the polymorphic microsatellite markers, preferably using PCR, more preferably FL-PCR. Means for amplifying the markers is described herein.

- 15 In an even further preferred aspect, there is provided a kit for diagnosing Down syndrome wherein the markers are selected from any of the markers for Down syndrome as described above.

In another aspect of the present invention there is provided a method of confirming fetal origin of a cell from a cervical mucus sample from an individual, said method including:

- 20 obtaining a fetal cell and a maternal cell from the same individual;
selecting at least three (3) polymorphic microsatellite markers characteristic of either the fetal or maternal cell; and
determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers on the fetal cell and the maternal cell.

- 25 Preferably, the method of confirming fetal origin of a cell from an individual includes identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of the maternal cell and the fetal cell.

- 30 In addition, with the isolation of fetal cells from the cervix this non-invasive method can also detect mutations causing single gene disorders for example, Cystic Fibrosis.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

25

It is also possible to combine the mutation detection for a single gene disorder with a DNA fingerprinting system and offer pregnant women diagnosis for both chromosomal aneuploidies and the indicated single gene disorder (refer to figure 3).

5

The discussion of documents, acts, materials, devices, articles and the like is included in this specification solely for the purpose of providing a context for the present invention. It is not suggested or represented that any or all of these matters formed part of the prior art base or were common general knowledge in the field relevant to the present invention as it existed in Australia before the priority date of each claim of this application.

The present invention will now be more fully described with reference to the following examples. It should be understood, however, that the description following is illustrative only and should not be taken in any way as a restriction on the generality of the invention described above.

EXAMPLES

20 Example 1: Diagnosis of Down Syndrome

(a) Collection and preparation of transcervical cells

Collection of the transcervical cells from pregnant women during the first or second trimester is a similar procedure to a pap smear and involves direct aspiration of the cervical mucus, using a thin catheter (Aspiracath, Cook IVF), from the endocervical canal and the lower uterine pole. The tip of the catheter that contains the maternal mucus and transcervical cells is cut off into an eppendorf tube containing 0.5ml of RPMI culture media and placed at 37°C. Gently the contents are mechanically removed from the inner tip of the catheter and suspended in culture media at 37°C.

25
30

(b) Identification and isolation of fetal cells from transcervical samples

After collection, samples are treated with 0.5ml of 20mg/ml of N-acetyl-L-cysteine and further incubated with gentle shaking at 37°C for 45 minutes. The

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

26

entire sample is then washed twice in PBS before an incubation with 0.5ml of enzyme cocktail (collagenases and proteases) for 1 hour at 37°C. During the incubation time disassociated cells are removed and remaining clumps of the original sample treated with fresh enzyme. After total disassociation the suspension of cells are then washed twice in PBS prior to immunofluorescent labeling.

A cocktail of three fetal specific antibodies (NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1) that have been labeled with fluorescein is added to the cell suspension at 37°C and allowed to bind specifically to the cell membranes of only fetal cells. NDOG1 stains the syncytiotrophoblasts, NDOG5 the syncytiotrophoblasts and cytotrophoblast cell columns and FT1.41.1 the syncytiotrophoblasts and villous cytotrophoblasts of first trimester pregnancy. None of these antibodies are reactive to maternal endometrium or cervical tissue. Under an inverted microscope using micromanipulation and microdissecting techniques with pulled glass pipettes, single and small clumps of fluorescently labeled fetal cells are identified, isolated and washed three times in PBS buffer before being transferred into 0.2ml PCR tubes for analysis. As a negative control, maternal squamous cells are also isolated and washed three times in PBS buffer before being transferred into 0.2ml PCR tubes for analysis.

(c) Confirmation of fetal origin and trisomy 21 diagnosis

This multiplex FL-PCR reaction incorporates five microsatellite markers found on chromosome 21. The allelic profile generated from this multiplex confirms either maternal or fetal origin as well as the presence or absence of chromosome 21. The FL-PCR reaction contains: 2.5µl of 10X PCR Buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 9.0 and 15mM MgCl₂), 0.5µl of 10mM dNTPs (200µM), 0.3µl of *Taq* polymerase (5 units/µl), 11.20µl MQ-H₂O and 10.5µl of primer mix making a final volume of 25µl. Primer pairs include D21S1411, D21S11, D21S1413, D21S1442, and D21S1437 in each PCR reaction. All reaction mixes underwent manual "Hot Start" and multiplex FL-PCR was performed using the 9700 Thermocycler PCR machine (Applied Biosystems, Australia). Reactions were subjected to 35 thermal cycles consisting of denaturation for 45 seconds at 94°C, annealing for 45 seconds at

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

27

60°C, and extension for 1 minute at 72°C. With each single cell multiplex FL-PCR, positive and negative controls are included to ensure that PCR reaction mixed were functional and none of the reagents were contaminated.

- 5 Other examples include the simultaneous diagnosis of Down Syndrome and the common Cystic Fibrosis DeltaF508 mutation. The FL-PCR is as described above with the following changes: the primer mix contains four informative chromosome 21 microsatellite markers along with the primer pair for deltaF508 mutation detection.

10

(d) Readout of fetal origin and diagnosis of trisomy 21

- All FL-PCR products are analysed using the ABI Prism 3100 DNA Sequencer and associated Genescan 672 software (Applied Biosystems, Australia). Each PCR product (0.5-1.0µl) is mixed with 9.75µl of formamide and 0.25µl of internal
15 standard. Samples are denatured at 95°C for 5 minutes, placed on ice and 10µl loaded into a 96 well plate. Samples are subjected to electrokinetic injection and electrophoresed with automatic sizing by Genescan software. Genescan profiles or 'fingerprints' are generated showing the PCR products as coloured peaks dependent on the fluorescent dye used (see Figure 1 – a single cell
20 allelic profile of a Down syndrome subject).

- Microarrays can also be used to confirm fetal origin, diagnosis of single gene disorders and chromosomal abnormalities. On a single microarray it is possible to identify fetal cells using single nucleotide polymorphisms (SNP's), single
25 gene disorders and chromosomal abnormalities. With this method the isolated and identified single fetal cell will firstly undergo whole genome amplification (WGA) by either PEP-PCR, DOP-PCR, linker adapter-PCR or MSDWGA. Fluorescently labeled product from WGA can be hybridised to the microarray platform and laser scanning of bound fluorescence will confirm fetal origin and
30 diagnosis of chromosome aneuploidy of all 23 pairs of human chromosomes and identify any specific single gene defects.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

28

Example 2: Diagnosis of Down Syndrome II

(a) The collection and preparation of transcervical cells is followed as described above in example 1.

5 **(b) The identification and isolation of fetal cells**

After collection, samples are spread onto slides and fixed in 100% ethanol. Immunohistochemistry is performed using first trimester fetal specific antibodies to identify the fetal cells. The slides are then dehydrated. Laser capture microdissection technology is used to remove positively stained cells from the
10 slide onto membranes that can be directly transferred into PCR tubes.

(c, d and e) FL-PCR DNA fingerprinting for trisomy 21 and the analysis of FL-PCR products and diagnosis of aneuploidy is followed as described above in example 1

15

Example 3: Simultaneous diagnosis of Down Syndrome and Cystic Fibrosis DeltaF508 mutation.

(a & b) The collection and preparation of transcervical cells, and the identification and isolation of fetal cells is followed as described above in
20 example 1.

(c) FL-PCR DNA fingerprinting for trisomy 21 and Cystic Fibrosis deltaF508 diagnosis

The FL-PCR reaction is as described above with the following changes: the
25 primer mix contains four informative chromosome 21 microsatellite markers along with the primer pair for deltaF508 mutation detection. Microsatellite markers outlined in Tables 2 & 3 are genotyped on parental genomic DNA to identify the heterozygous loci for incorporation into the DNA fingerprinting system. Final optimized primer pair concentrations are reaction and primer
30 specific.

(d & e) Analysis of FL-PCR products and diagnosis of aneuploidy is as described above (see Figure 3).

Finally it is to be understood that various other modifications and/or alterations may be made without departing from the spirit of the present invention as outlined herein.

Chromosome abnormalities in spontaneous abortions		Chromosome abnormalities in the newborn	
Abnormality	Incidence (%)	Abnormality	Incidence per 10,000 births
Trisomy 13	2	Trisomy 13	2
Trisomy 16	15	Trisomy 18	3
Trisomy 18	3	Trisomy 21	15
Trisomy 21	5	45,X	1
Other trisomies	25	47,XXX	10
Monosomy X	20	47,XXY	10
Triploidy	15	47,XXY	10
Tetraploidy	5	Unbalanced rearrangements	10
Other	10	Balanced rearrangements	30

5

Table 1: - Details of aneuploid pregnancies

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

30

Table 2: - Details of tetranucleotide microsatellite markers

Microsatellite Marker	Primer sequence	Fluorochrome	Allelic Size Range	Heterozygosity	Probability of a tri-allelic pattern (%)
D21S11	F - taiglgagtcattcccaagta R - gtgtattagtcaatgtctccag	6-FAM	172-264bp	0.93	72.5
D21S1411	F - atgataatgcataagatggag R - aatgtgtctctccaggc	HEX	>239bp	0.93	65.5
D21S1413	F - ttgcagggaacacacagtt R - tcttggaataaattcccg	TET	<240bp	0.88	62.5
D21S1437	F - tgaacatacagtacatgtgtcgg R - ttctcacatattatgcacaac	6-FAM	107-143bp	0.93	65.5
D21S1442	F - cactgcagagcggaacttcc R - ccagaatacagaagccaattcc	TET	237-261bp	0.80	67.5

Table 3: Tetranucleotide microsatellite markers identified for DNA fingerprinting and aneuploidy diagnosis of chromosomes 13, 18, 21, X and Y

Chromosome	Microsatellite Marker
Chromosome 21	D21S1412
	D21S1414
	D21S1435
	D21S1808
	D21S1270
Chromosome 13	D13S631
	D13S258
	D13S634
	D13S317
	D13S800
X Chromosome	DXS8377
	HUMARC
	HPRT
	DXS1283E
	SBMA
Y Chromosome	X22
	DYS391
	DYS393
	DYS390
Chromosome 18	D18S535
	D18S51
	MBP
	D18S978
	D18S1002
	D18S974
	D18S849
	D18S865
	D18S877
	D18S386

CLAIMS:

1. A method of retrieving cells from a cervical mucus sample, said method comprising:
obtaining a cervical mucus sample;
5 treating the sample with a collagenase and a protease to disassociate cells from the cervical mucus sample; and
retrieving disassociated cells from the sample.
2. A method according to claim 1 wherein the cervical mucus sample is a transcervical sample.
- 10 3. A method according to claim 1 or 2 wherein the cervical mucus sample is obtained from a region of the cervix including the endocervical canal and the lower uterine pole.
4. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the cervical mucus sample is obtained during the first or second trimester of pregnancy.
- 15 5. A method according to any one of claims 1 to 4 wherein the cervical mucus sample is treated with a combination of a collagenase and a protease and liberase blendzyme.
6. A method according to anyone of claims 1 to 5 further including treating
20 the cervical mucus sample with a mucolytic agent.
7. A method according to claim 6 wherein the cervical mucus sample is treated with a mucolytic agent prior to treatment with a collagenase and a protease.
8. A disassociated cell prepared by a method according to any one of
25 claims 1 to 7.
9. A method of retrieving a fetal cell from a cervical mucus sample, said method comprising:
obtaining a mixture of disassociated cells prepared by a method
according to any one of claims 1 to 7;
30 treating the cells with a fetal antibody;
identifying cells that have bound to the fetal antibody; and
retrieving the identified cells.
10. A method of identifying a fetal cell, said method comprising:

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

33

- obtaining a mixture of disassociated cells prepared by a method according to any one of claims 1 to 7;
treating the cells with a fetal specific antibody; and
identifying cells that have bound to the antibody.
- 5 11. A method according to claim 9 or 10 wherein the fetal antibody is a first trimester fetal specific antibody.
 12. A method according to any one of claims 9 to 11 wherein the antibody is used singularly or in combination with another antibody to identify the fetal cells.
 - 10 13. A method according to any one of claims 9 to 12 wherein one or more antibodies are used to identify fetal cells.
 14. A method according to any one of claims 9 to 13 wherein the fetal cells are further identified by microsatellite markers compared against a maternal control and wherein said fetal cells share a microsatellite marker with the maternal cell.
 - 15 15. A method according to claim 14 wherein the microsatellite marker is identified by a forward primer sequence selected from the group including:
 - tatgtgagtcaattcccaagtga;
 - atgatgaatgcatagatgga;
 - ttgcagggaaccacagtt;
 - tgaacatacatgtacatgtgtctgg; or
 - cactgcagacggcatgaactc.
 - 20 16. A method according to claim 15 wherein the microsatellite marker is identified by a reverse primer sequence selected from the group including:
 - gttgtattagtcaatgtctccag;
 - aatgtgtgtcctccaggc;
 - tccttggaataaattcccg;
 - ttctctacatattactgccaacac; or
 - ccagaatcacatgagccaattcc.
 17. A fetal cell prepared by a method according to any one of claims 9, or 11 to 16.
 18. A method of identifying a fetal cell said method comprising:

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

34

- obtaining a cell sample;
 treating the cell sample with an antibody selected from the group
 including NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1 as herein described or
 equivalent thereof; and
 5 identifying cells that have bound to the antibodies.
19. A method according to claim 18 wherein the antibodies are used
 singularly or in combination to identify the fetal cells.
20. A composition when used for identifying fetal cells, said composition
 comprising antibodies NDOG1, NDOG5 and FT1.41.1.
- 10 21. A method of characterising a fetal cell, said method comprising:
 obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample prepared by a method
 according to any one of claims 9 to 16;
 subjecting the fetal cell to a procedure selected from the group including:
 (a) multiplex FL-PCR;
 15 (b) WGA, hybridisation and microarray analysis; or
 (c) extraction of mRNA, cDNA libraries, hybridisation and gene expression
 microarray analysis; and
 analysing results of the procedure to characterise the cell.
22. A method according to claim 21 wherein the fetal cell is characterised for
 20 biochemical, metabolic or genetic disorders.
23. A method of identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of a
 fetal cell said method comprising:
 obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample prepared by a method
 according to any one of claims 9 to 16;
 25 identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the
 chromosome; and
 determining an allelic profile of at least three (3) polymorphic microsatellite
 markers.
24. A method according to claim 23 wherein the allelic profile is determined
 30 by one or more of 5 microsatellite markers.
25. A method of prenatal diagnosis, said method comprising:
 obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample prepared by a method
 according to any one of claims 9 to 16;

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

35

- identifying at least three polymorphic microsatellite markers on the chromosome;
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers; and
- 5 correlating the allelic profile with a condition for prenatal diagnosis.
26. A method according to claim 25 wherein prenatal diagnosis includes determining the presence of a genetic mutation in a fetal cell and wherein the genetic mutation is selected from the group including chromosomal aneuploidies, point mutations, translocations, trinucleotide repeat
- 10 expansions, insertions and deletions.
27. A method according to claim 26 wherein the genetic mutation is associated with a condition selected from the group comprising cystic fibrosis, beta-thalassaemia, Huntington's Disease, Fragile X, Myotonic Dystrophy, Duchenne Muscular Dystrophy, Sickle Cell Anaemia, Turners syndrome (XO), Klinefelter's syndrome (XXY), XXX females and XYY
- 15 males, Triploidy (69, XXX or XXY or XYY), Patau's syndrome (trisomy 13) and Edward's syndrome (trisomy 18), or Down syndrome (trisomy 21).
28. A method according to claim 27 wherein the chromosome aneuploides occurs in a human chromosome selected from the group including chromosome 21, 18, 13, X and Y.
29. A method according to claim 28 wherein the allelic profile indicates a trisomy of chromosome 21.
30. A method according to claim 28 or 29 wherein the genetic disorder is
- 25 Down Syndrome.
31. A method according to any one of claims 23 to 30 wherein the microsatellite marker includes a forward primer sequence selected from the group including:
- tatgtgagtcaattcccaagtga;
 - atgatgaatgcataatggatg;
 - ttgcagggaaccacagtt;
 - tgaacatacatgtacatgtgtgtgg; or
 - cactgcagacgcatgaacttc.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

36

32. A method according to any one of claims 23 to 32 wherein the microsatellite marker includes a reverse primer sequence selected from the group including:
- gttgtattagcaatgttctccag;
 - aatgtgtgtcctccaggc;
 - tcctggaataaattcccg;
 - ttctctacatatttactgccaacac; or
 - ccagaatcacatgagccaattcc.
33. A method according to any one of claims 23 to 32 wherein the method includes the use of a microsatellite marker selected from the markers in Table 2.
34. A method of confirming fetal origin of a cell from an individual, said method including:
- obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample prepared by a method according to any one of claims 9 to 16 and a maternal cell from the same individual;
- selecting at least three (3) polymorphic microsatellite markers characteristic of either the fetal or maternal cell; and
- determining an allelic profile of the at least three (3) polymorphic microsatellite markers on the fetal cell and the maternal cell.
35. A method according to claim 34 wherein the method of confirming fetal origin of a cell from an individual includes identifying a chromosome aneuploidy in a chromosome of the maternal cell and the fetal cell.
36. A method of detecting single gene disorders, said method comprising:
- obtaining a fetal cell from a cervical mucus sample prepared by a method according to any one of claims 9 to 16; and
- detecting a mutation in a gene of the fetal cell.
37. A method according to claim 36 wherein the single gene disorder is selected from the group including cystic fibrosis, beta-thalassaemia, Huntington's Disease, Fragile X, Myotonic Dystrophy, Duchenne Muscular Dystrophy, and Sickle Cell Anaemia.
38. A method according to claim 37 wherein the genetic disorder is cystic fibrosis.

WO 03/020986

PCT/AU02/01214

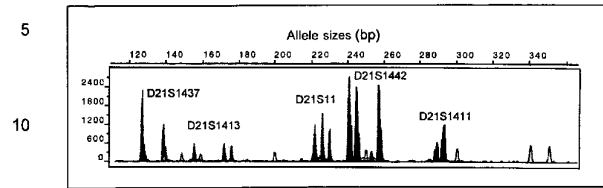
37

39. A method of retrieving cells according to claim 1 as hereinbefore described in Example 1 or 2.
40. A method of retrieving fetal cells according to claim 9 as hereinbefore described in Example 1 or 2.

WO 03/020986

1/1

PCT/AU02/01214



15 Figure 1

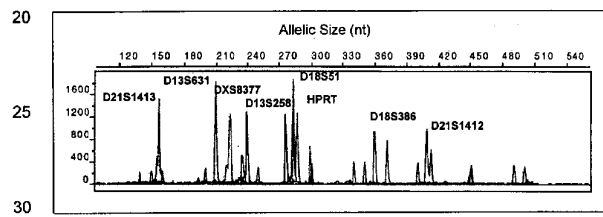


Figure 2

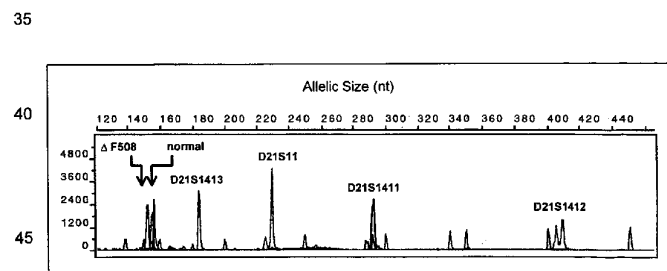


Figure 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01214
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12S 3/24 C12Q 1/68		
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)		
See Electronic Database		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Electronic Database		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
MEDLINE:WPIDS: CA		
KEYWORDS: Foetal, Foetus, Fetal, Fetus, Prenatal, Trophoblast, Cervix, Cervical, Transcervical, Endocervical, Cell, Collagenase, Hydrolase, Gelatinase, Protease, Proteinase, Peptidase, Endopeptidase, I		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	Chang et al. "Minimally-invasive early prenatal diagnosis using fluorescence <i>in situ</i> hybridization on samples from uterine lavage" Prenatal Diagnosis (1997) Vol 17 (11): pages 1019-1025 (see in particular abstract and page 1020, 2 nd column, 1st complete paragraph)	1-4, 6-17 21-30, 33-40
X, Y	Miller et al. "Transcervical recovery of fetal cells from the lower uterine pole: reliability of recovery and histological/immunocytochemical analysis of recovered cell populations" Human Reproduction (1999) Vol 14(2): pages 521-531	18-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☐ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 November 2002		Date of mailing of the international search report 28 NOV 2002
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer TERRY MOORE Telephone No : (02) 6283 2632

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01214
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Adinolfi M et al. "First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation" Human Reproduction Update (1997) Vol 3 (4): 383-392 (page 385, 1st paragraph)	6, 7
Y	Kingdom et al. "Detection of trophoblast cells in transcervical samples collected by lavage or cytobrush" Obstetrics & Gynecology (1995) Vol 86 (2): 283-288 (page 284, 2 nd column, 3 rd complete paragraph)	14-17
Y	Ko et al. "Fluorescence microsatellite analysis to study the parental origin of the supernumerary chromosome in Down's syndrome" International Journal of Gynecology & Obstetrics (1998) Vol 61: 149-153 (see entire document)	23-35

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100076691

弁理士 増井 忠次

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100098590

弁理士 中田 隆

(72)発明者 カズ, マンディー・ゲール

オーストラリア国ヴィクトリア州3 1 2 1, リッチモンド, ジョンソン・ストリート 3/14

(72)発明者 クラム, デイビッド・ステファン

オーストラリア国ヴィクトリア州3 1 3 3, ヴァーモント, バーンズデイル・ドライブ 25

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 GA27 HA12

4B063 QA08 QA19 QQ02 QQ43 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48

QR55 QR62 QS10 QS25 QS33 QS34 QX01

4B065 AA93X AC20 BA22 BD14 CA44

专利名称(译)	分离细胞的方法及其用途		
公开(公告)号	JP2005500861A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2003525686	申请日	2002-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	格哈德·莫娜的眼睛NV°F专有限公司		
申请(专利权)人(译)	莫纳什大学 莫纳什-Aivuiefu专有限公司		
[标]发明人	カズマンディー・ゲール クラムデイビッドステファン		
发明人	カズ,マンディー・ゲール クラム,デイビッド・ステファン		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/06 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12S3/24 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/56966		
FI分类号	C12N5/00.ZNA.E C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/GA27 4B024/HA12 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS10 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA22 4B065/BD14 4B065/CA44		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫 中田隆		
优先权	2001PR7499 2001-09-06 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种检索和鉴定细胞特别是胎儿细胞和滋养细胞的非侵入性方法。本发明包括通过对染色体和单基因疾病进行遗传诊断来使用细胞鉴定染色体异常和突变的方法，特别是用于产前诊断。本发明还包括确认胎儿来源的细胞的方法。

特表2005-50086 (P2005-500861A) (43) 公表日 平成17年1月13日(2005.1.13)			
(51) Int. Cl. ⁷ C12N 5/06 C12Q 1/68 // C12N 15/09 G01N 33/53	F I C12N 5/00 C12Q 1/68 C12N 15/00 G01N 33/53	Z N A E A A M	テーマコード (参考) 4B024 4B063 4B065
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁)			
(21) 出願番号 (86) (22) 出願日 (85) 翻訳文提出日 (86) 国際出願番号 (87) 国際公開番号 (87) 国際公開日 (31) 優先権主張番号 (32) 優先日 (33) 優先権主張国	特願2003-525686 (P2003-525686) 平成14年9月6日 (2002.9.6) 平成16年3月8日 (2004.3.8) PCT/AU2002/001214 WO2003/020986 平成15年3月13日 (2003.3.13) PR 7499 平成13年9月6日 (2001.9.6) オーストラリア (AU)	(71) 出願人 (71) 出願人 (74) 代理人	594202523 モナシュ ユニバーシティ オーストラリア国、ビクトリア 3168 、クレイトン、クレイトン ロード 24 6 504090101 モナシュ・アイグイエフ・プロプライエタ リー・リミテッド オーストラリア国ヴィクトリア州3121 、リッチモンド、ブリッジ・ロード 89 、フォース・フロア、エプワース・ホスピ タル 100089705 弁理士 社本 一夫
最終頁に続く			