

(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2005-518219

(P2005-518219A)

(43) 公表日 平成17年6月23日(2005.6.23)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 5 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 9
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78 C	4 B O 6 3
G O 1 N 27/62	G O 1 N 27/62 V	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-571500 (P2003-571500)	(71) 出願人	501198899
(86) (22) 出願日	平成15年2月27日 (2003. 2. 27)		エビゲノミクス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月19日 (2004. 10. 19)		ドイツ国、デー-10435 ベルリン、
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/002034		カスタニーンアレー 24
(87) 国際公開番号	W02003/072820	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003. 9. 4)		弁理士 庄司 隆
(31) 優先権主張番号	02004551.4	(74) 代理人	100124453
(32) 優先日	平成14年2月27日 (2002. 2. 27)		弁理士 資延 由利子
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100129160
			弁理士 古館 久丹子
		(72) 発明者	アドルヤン, ベーター
			ドイツ連邦共和国, 10437 ベルリン
			, ドウンケルシュトラーセ 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸細胞増殖性疾患を分析するための方法および核酸

## (57) 【要約】

## 【課題】

## 【解決手段】

本発明は1つ以上のバーシカン (Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4遺伝子の分析により、結腸細胞増殖性疾患を検出、区別または識別するための方法および核酸を提供する。本発明はさらに、前記遺伝子の細胞増殖性疾患特異的分析に有用な新規な核酸配列ならびにその方法、アッセイおよびキットを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 6 ~ 配列番号 25 を含む群から選択される配列およびそれらに相補的な配列の 1 つである化学的に前処理されたゲノム DNA のセグメントの長さが少なくとも 18 塩基である配列を含む核酸。

## 【請求項 2】

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸 (PNA) - オリゴマーであって、配列番号 6 ~ 25 に記載される前処理されたゲノム DNA またはそれらに相補的な配列に相補的であるか、または適度に厳密なまたは厳密な条件下でハイブリダイズする少なくとも 9 ヌクレオチドの長さを有する少なくとも 1 つの塩基配列を含むオリゴマー。

10

## 【請求項 3】

塩基配列は少なくとも 1 つの CpG、TpG または CpA ジヌクレオチドを含む、請求項 2 に記載されるオリゴマー。

## 【請求項 4】

CpG のシトシンまたは TpG のチミンまたは CpA ジヌクレオチドのアデノシンがオリゴマーのほぼ中 3 分の 1 に位置することを特徴とする、請求項 3 に記載されるオリゴマー。

## 【請求項 5】

請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 2 つのオリゴマーを含む、オリゴマーのセット。

20

## 【請求項 6】

配列番号 6 ~ 配列番号 25 の 1 つの DNA 配列およびそれらに相補的な配列の増幅のためのプライマーオリゴヌクレオチドとして使用され得る、請求項 2 ~ 5 に記載される少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドのセット。

## 【請求項 7】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドが固相に結合されていることを特徴とする、請求項 2 ~ 5 に記載されるオリゴヌクレオチドのセット。

## 【請求項 8】

配列番号 1 ~ 配列番号 5 に記載される配列の 1 つまたはそれらに相補的な配列内のシトシンメチル化状態および / または単一ヌクレオチド多型 (SNP) を検出するための請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも 4 つを含むオリゴマープロブセットの使用。

30

## 【請求項 9】

配列番号 1 ~ 配列番号 5 の 1 つおよびこれらに相補的な配列の CpG ジヌクレオチドのメチル化状態に関連した結腸細胞増殖疾病を分析するための担体物質に固定化された異なったオリゴマーの配列 (アレイ) を製造する方法であって、請求項 2 ~ 5 および 7 のいずれか 1 項に記載される少なくとも 1 つのオリゴマーが固相に結合されている方法。

## 【請求項 10】

請求項 7 で得られうる異なったオリゴマーの配列 (アレイ)。

## 【請求項 11】

四角形または六角形の格子形態の固相上に配列されることを特徴とする、請求項 10 に記載される異なったオリゴヌクレオチド - および / または PNA - オリゴマー配列のアレイ。

40

## 【請求項 12】

固相表面がシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金から構成されることを特徴とする、請求項 10 または 11 に記載されるアレイ。

## 【請求項 13】

被験者のバーシカン (Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよび EYA4 を含む群から得た少なくとも 1 つの遺伝子および / またはその制御領域に

50

関連する結腸細胞増殖性疾患を検出、区別または識別する方法であって、被験者から得た生体試料中の標的核酸を、標的核酸中のメチル化 CpG ジヌクレオチドおよび非メチル化 CpG ジヌクレオチドを識別する少なくとも 1 つの試薬または一連の試薬と接触させることを含む方法。

【請求項 14】

a) 被験者のゲノム DNA を有する生体試料を被験者から得て；  
b) ゲノム DNA またはその断片を 1 つ以上の試薬で処理して、5 - 位非メチル化シトシン塩基をウラシルあるいはハイブリダイゼーション特性面からシトシンと異なって検出可能な他の塩基に変換し；  
c) 処理されたゲノム DNA または処理されたその断片を、各ケースにおいて配列番号 6 ~ 配列番号 25 からなる群から選択された配列に相補的であるか、あるいは適度に厳密なまたは厳密な条件下でハイブリダイズする、長さが少なくとも 16 ヌクレオチドである近接した配列またはその相補体を含む少なくとも 2 つのプライマーおよび増幅酵素と接触させ、処理された DNA またはその断片は増幅されて 1 つ以上の増幅産物を生成するか、あるいは増幅されず；そして  
d) 前記増幅産物の存否に基づくか、あるいは増幅産物の性質に基づいて、配列番号 1 ~ 配列番号 5 の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチド配列のメチル化状態、あるいは配列番号 1 ~ 配列番号 5 の複数の CpG ジヌクレオチド配列の平均的メチル化状態または平均的メチル化状態を反映する値を測定し、結腸細胞増殖性疾患の検出または識別のうちの少なくとも 1 つを部分的に可能とする  
ことを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

a) 被験者のゲノム DNA を有する生体試料を被験者から得て；  
b) ゲノム DNA またはその断片を 1 つ以上の試薬で処理して、5 - 位非メチル化シトシン塩基をウラシルあるいはハイブリダイゼーション特性面からシトシンと異なって検出可能な他の塩基に変換し；  
c) 処理された DNA の 1 つ以上の断片を、結腸または結腸細胞増殖性疾患細胞に由来する DNA が唯一または優先的に増幅されるように増幅させ；  
d) 増幅産物またはその特性を検出し、それにより結腸細胞増殖性疾患の有無を検出する工程を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記結腸細胞増殖性疾患は、腺癌、ポリープ、扁平上皮細胞癌、カルチノイド腫瘍、肉腫およびリンパ腫を含む群から選択される、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 17】

工程 a) で、被験者から得た生体試料は組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、血液、血清、血漿、尿、痰およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 18】

ゲノム DNA またはその断片を処理する工程 b) は、重亜硫酸塩溶液を使用することを  
含む、請求項 14 ~ 17 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 19】

b) の処理の後、アガロース中に DNA を包埋する、請求項 14 ~ 16 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 20】

ゲノム DNA を処理する工程 b) は、DNA 変性剤または遊離基捕捉剤の少なくとも 1 つの存在下で処理することを  
含む、請求項 14 ~ 19 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 21】

工程 c) で接触または増幅することは、  
増幅酵素である耐熱性 DNA ポリメラーゼの使用；

5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼの使用；  
ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の使用；  
検出可能な標識を有する増幅産物核酸分子の産生；および  
これらの組合せを含む、請求項14～20のいずれか1項に記載される方法。

【請求項22】

検出可能な増幅産物標識は、  
蛍光標識；放射性核種または放射性標識；質量分析計で検出可能な増幅産物質量標識；質量分析計で検出可能な分離できる増幅産物断片質量標識；質量分析計で検出可能な1価正または1価負正味荷電を有する分離できる増幅産物断片質量標識からなる標識群から選択される、請求項21に記載される方法。

10

【請求項23】

工程d)で増幅産物または分離できる増幅産物断片の質量標識を検出するための質量分析計の使用を含む、請求項22に記載される方法。

【請求項24】

前記方法の工程c)で、2つ以上の異なった断片が増幅される、請求項14～23のいずれか1項に記載される方法。

【請求項25】

1つ以上の前記プライマーが配列番号34～配列番号49、96、97、101、102、106および107の群から選択される配列を含む、請求項14～24のいずれか1項に記載される方法。

20

【請求項26】

1つ以上の前記プライマーは、1つ以上のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む、請求項14～24のいずれか1項に記載される方法。

【請求項27】

前記プライマーが2～5個のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む、請求項26に記載される方法。

【請求項28】

1つ以上の前記CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドがプライマーの3'半分内に位置する、請求項26または27に記載される方法。

【請求項29】

前記プライマーは請求項14の工程b)または請求項15の工程c)の処理で変換された位置にハイブリダイズする1つ以上の塩基を含む、請求項26～28のいずれか1項に記載される方法。

30

【請求項30】

少なくとも1つの前記塩基がプライマーの3'半分内に位置する、請求項29に記載される方法。

【請求項31】

工程d)で得られた前記増幅産物は、3個以上のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む少なくとも1つの20塩基対配列を含む、請求項14～30のいずれか1項に記載される方法。

40

【請求項32】

さらに、1つ以上のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む長さが少なくとも18塩基対である、少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子の工程c)における使用を含み、前記分子配列は配列番号6～配列番号25からなる群から選択された配列およびその相補体と相補的であるかまたは同一であり、かつ、前記核酸分子またはペプチド核酸分子は、それがハイブリダイズした核酸の増幅を抑制する、請求項14～31のいずれか1項に記載される方法。

【請求項33】

前記核酸またはペプチド核酸の配列は、配列番号85～配列番号87、98、103および108およびそれらに相補的な配列からなる群から選択される、請求項32に記載さ

50

れる方法。

【請求項 3 4】

工程 b) の処理前に非メチル化されていた DNA の増幅が抑制される、請求項 3 2 に記載される方法。

【請求項 3 5】

前記核酸分子またはペプチド核酸分子は、各ケースにおいてその 5' - 末端で変性されて、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素によって分解を阻止する、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 3 6】

前記核酸分子またはペプチド核酸分子は、各ケースにおいて 3' ヒドロキシル基を欠く、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載される方法。 10

【請求項 3 7】

増幅酵素は、5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼである、請求項 3 2 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 3 8】

オリゴヌクレオチドまたは PNA オリゴマーの結合部位は、プライマーの結合部位と同じであるか、あるいは重複し、それによって、その結合部位へのプライマーのハイブリダイゼーションを妨げる、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載される方法。

【請求項 3 9】

少なくとも 2 つのオリゴヌクレオチドまたは PNA オリゴマーの結合部位は、少なくとも 2 つのプライマーの結合部位と同じであるか、あるいは重複し、それによってそれらの結合部位へのプライマーのハイブリダイゼーションを妨げる、請求項 3 2 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載される方法。 20

【請求項 4 0】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸オリゴマーのハイブリダイゼーションは、フォワードプライマーのハイブリダイゼーションを妨げ、かつ、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸オリゴマーのハイブリダイゼーションは前記フォワードプライマーの伸長産物に結合するリバースプライマーのハイブリダイゼーションを妨げる、請求項 3 9 に記載される方法。

【請求項 4 1】

前記オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸オリゴマーは、フォワードおよびリバースプライマーの結合部位間でハイブリダイズする、請求項 3 2 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載される方法。 30

【請求項 4 2】

工程 d) で測定することは、各ケースにおいて 1 つ以上の CpG、TpG または CpA ジヌクレオチドを含む長さが少なくとも 9 ヌクレオチドの近接した配列を含む、少なくとも 1 つの核酸分子またはペプチド核酸分子のハイブリダイゼーションを含み、かつ前記分子の配列は配列番号 6 ~ 配列番号 2 5 からなる群から選択された配列と相補的であるか、あるいは同一である、請求項 1 4 または 1 5 に記載される方法。

【請求項 4 3】

このようにハイブリダイズする少なくとも 1 つの核酸分子またはペプチド核酸分子は、固相に結合されている、請求項 4 2 に記載される方法。 40

【請求項 4 4】

このようにハイブリダイズする複数の核酸分子またはペプチド核酸分子は、線状、六角形、四角形およびこれらの組合せからなるアレイ群から選択された核酸またはペプチド核酸アレイ形態の固相に結合される、請求項 4 3 に記載される方法。

【請求項 4 5】

工程 d) で測定することは、増幅産物の配列決定を含む、請求項 1 4 または 1 5 に記載される方法。

【請求項 4 6】

工程 d) で測定することは、配列番号 6 ~ 配列番号 25 からなる群から選択された配列およびその相補体に相補的であるか、あるいは適度に厳密なまたは厳密な条件下にハイブリダイズする長さが少なくとも 9ヌクレオチドである近接した配列を含む少なくとも 1つの核酸分子をハイブリダイズさせることを含む、請求項 14 または 15 に記載される方法。

【請求項 47】

前記核酸またはペプチド核酸の配列は、配列番号 50 ~ 配列番号 84、配列番号 88 ~ 配列番号 90、99、100、104、105、109、110 およびそれらに相補的な配列からなる群から選択される、請求項 42 に記載される方法。

【請求項 48】

前記オリゴヌクレオチドまたは PNA オリゴマーは蛍光標識され、その検出は蛍光または蛍光偏光の増加または減少のいずれかによる、請求項 42 に記載される方法。

【請求項 49】

オリゴヌクレオチドまたは PNA オリゴマーのハイブリダイゼーションは、蛍光共鳴エネルギー移動により検出され、その検出は蛍光の増加または減少のいずれかによる、請求項 42 に記載される方法。

【請求項 50】

バックグラウンド DNA 濃度は、検証される DNA の濃度の 100 ~ 1000 倍過剰である、請求項 14 または 15 に記載される方法。

【請求項 51】

a) 被験者のゲノム DNA を有する生体試料を被験者から得て；  
b) ゲノム DNA を抽出し；  
c) 配列番号 1 ~ 配列番号 5 または配列番号 1 ~ 配列番号 5 に厳密な条件下にハイブリダイズする配列を含むゲノム DNA またはその断片を、1つ以上のメチル化感受性制限酵素と接触させ、ゲノム DNA はそれによって分解されて、分解断片を生成するか、あるいは分解されず；そして  
d) 少なくとも 1つのそのような断片の存否またはその性質に基づいて、少なくとも 1つの配列番号 1 ~ 配列番号 5 の CpG ジヌクレオチド配列のメチル化状態、または配列番号 1 ~ 配列番号 5 の複数の CpG ジヌクレオチド配列の平均メチル化状態または平均メチル状態を反映する値を測定し、前立腺細胞増殖性疾患の検出あるいは前立腺細胞増殖性疾患起源の移行性領域と末梢性領域の識別が、少なくとも部分的にできることを含む、請求項 13 に記載される方法。

【請求項 52】

工程 d) で測定する前に、さらに分解または未分解ゲノム DNA を増幅することを含む、請求項 51 に記載される方法。

【請求項 53】

増幅することは、増幅酵素である耐熱性 DNA ポリメラーゼの使用、検出可能な標識を有する増幅産物核酸の産生、およびそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1つの方法の使用を含む、請求項 52 に記載される方法。

【請求項 54】

検出可能な増幅産物標識は、蛍光標識；放射性核種または放射性標識；質量分析計で検出可能な増幅産物質量標識；質量分析計で検出可能な分離可能な増幅産物断片質量標識；質量分析計で検出可能な 1価正または 1価負正味荷電を有する分離可能な増幅産物断片質量標識；およびこれらの組合せからなる標識群から選択される、請求項 53 に記載される方法。

【請求項 55】

増幅産物または分離可能な増幅産物断片質量標識を検出するための質量分析計の使用を含む、請求項 54 に記載される方法。

【請求項 56】

質量分析計はマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化質量分析 (MALDI)、電子

10

20

30

40

50

スプレー質量分析 (ESI) およびこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 5 5 に記載される方法。

【請求項 57】

被験者から得た生体試料は、組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、血液、血清、血漿、尿、痰またはこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 5 1 に記載される方法。

【請求項 58】

i) 重亜硫酸塩試薬；および ii) 各ケースにおいて配列番号 1 ~ 配列番号 25 およびその相補体からなる群から選択された配列に相補的であるか、または適度に厳密なまたは厳密な条件下にハイブリダイズする長さ少なくとも 9 ヌクレオチドである近接した配列を含む少なくとも 1 つの核酸分子またはペプチド核酸分子を含む結腸細胞増殖性疾患を検出、区別または識別するために有用なキット。

10

【請求項 59】

さらに、MS-SNuPE、MSP、MethylLight、HeavyMethyl、COBRA、核酸配列決定およびこれらの組合せからなる群から選択されたメチル化アッセイを行うための標準試薬を含む、請求項 58 に記載されるキット。

【請求項 60】

結腸細胞増殖性疾患または結腸細胞増殖性疾患の素因の分類、区別および/または診断のための請求項 1 に記載される核酸、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載されるオリゴヌクレオチドまたは PNA-オリゴマー、請求項 58 または 59 に記載されるキット、請求項 11 または 12 に記載されるアレイ、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載されるオリゴヌクレオチドのセット、または請求項 13 ~ 57 のいずれか 1 項に記載される方法の使用。

20

【請求項 61】

結腸細胞増殖性疾患の治療のための請求項 1 に記載される核酸、請求項 2 ~ 7 のいずれか 1 項に記載されるオリゴヌクレオチドまたは PNA-オリゴマー、請求項 58 または 59 に記載されるキット、請求項 11 または 12 に記載されるアレイ、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載されるオリゴヌクレオチドのセット、または請求項 13 ~ 57 のいずれか 1 項に記載される方法の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

結腸癌は、男性および女性の癌死亡率の主要な原因の第 4 位にある。5 年生存率はステージ全体にわたって 61% であり、早期発見がこの疾患の治療的療法の必須条件である。全結腸直腸癌の 95% までは、分化の程度が異なる腺癌である。

【0002】

散発性結腸癌は、正常結腸上皮の病理的形質転換から始まり、浸潤癌に継続的に進行する腺腫に至る多段階プロセスで発生する。結腸腺腫の進行速度は、現在、その組織学的外観、位置、広がり、および腸関与の範囲に基づいて予測されている。例えば、管状型良性腺腫は稀に悪性腫瘍に進行するが、絨毛性良性線種は特に直径が 2 cm より大きいなら、有意に悪性である可能性を有する。

40

【0003】

良性増殖性病変から悪性新生物への進行中に、いくつかの遺伝的および後成的変化が生じることが知られている。APC 遺伝子の体細胞変異は、結腸直腸腺腫および癌腫の 75 ~ 80% である最も初期の事象の 1 つであると思われる。K-RAS の活性化は、悪性表現型への進行における臨界的段階であると考えられる。引き続き、他の発癌遺伝子の変異ならびに腫瘍抑制遺伝子の不活性化となる変質が蓄積する。

【0004】

CpG アイランド内の異常な DNA メチル化は、広範囲の遺伝子の抑止または過剰発現

50

につながるヒト癌の最も初期および最も一般的な変質の中に共通している。さらに、異常なメチル化はある種の腫瘍における遺伝子のイントロンおよびコード部分の CpG リッチ制御要素に生じることが示されている。腫瘍抑制遺伝子の特異的高メチル化と対照的に、DNAの全体的低メチル化が腫瘍細胞中に観察され得る。全体的メチル化におけるこの低下は、あからさまな腫瘍形成への発達よりずっと前に、早くから観察され得る。また、低メチル化と大きな遺伝子発現との相関性は、多くの発癌遺伝子について報告されている。結腸癌では、異常なDNAメチル化は最も顕著な変質の1つを構成し、p14ARF、p16INK4a、THBS1、MINT2およびMINT31などの多くの腫瘍抑制遺伝子およびhMLH1などのDNAミスマッチ修復遺伝子を不活性化する。

#### 【0005】

10

結腸直腸癌の分子的進化では、DNAメチル化異常は2つの異なる役割を果たすと示唆されている。正常な結腸粘膜細胞では、メチル化異常はこれらの細胞の新生物形質転換への素因となる加齢的および経時的な事象の機能として蓄積する。例えば、数種の遺伝子座位の高メチル化は、腺腫、特に腺管絨毛および絨毛サブタイプにおいて、既に存在することが示されている。その後の段階で、CpGアイランドの増加したDNAメチル化は、いわゆるCpGアイランドメチル化誘発表現型(CIMP)により影響される腫瘍のサブセットで重要な役割を果たす。全散発性結腸直腸癌の約15%を構成するほとんどのCIMP+腫瘍は、hMLH1プロモーターおよび他のDNAミスマッチ修復遺伝子の高メチル化によるマイクロサテライト不安定性(MIN)を特徴とする。反対に、CIMP-結腸癌は高率のp53変異および染色体変化をとともなう、より古典的な遺伝的不安定経路(CIN)に沿って進化する。

20

#### 【0006】

しかしながら、分子サブタイプは単に分子変化に関する変動する頻度を示していないだけではない。マイクロサテライト不安定性または染色体異常のいずれかの存在によって、結腸癌は有意な臨床的差異を示す2つのクラスに分類され得る。ほとんど全てのMIN腫瘍は、近位結腸(上行性および横行性結腸)に由来するが、CIN腫瘍の70%は、遠位結腸および直腸に位置する。これは結腸の異なった部分での異なった発癌性物質の変動する有病率に起因している。近位結腸での一般的な発癌性物質を構成するメチル化発癌性物質は、MIN癌の病理学である役割を果たすことが示唆されているが、一方、CIN腫瘍は結腸および直腸の遠位部分でより頻繁に生じる付加物生成発癌性物質によってより頻繁に引き起こされると考えられている。さらに、MIN腫瘍はCIN表現型を有する腫瘍よりもより良い予後を示し、補助的化学療法に対してより良く反応する。結腸癌腫の分化ならびに早期検出のためのマーカーの同定は、現在の研究の大きな目標である。

30

#### 【0007】

-カルシトニン遺伝子は、ペプチド:カルシトニン、カタカルシン、およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の小さなファミリーをコードする。カルシトニンは骨格の完全性に関与し、カルシトニンの分泌は、部分的にはエストロゲン依存性であり、閉経後のカルシトニン分泌の下降は、閉経後骨粗鬆症発生の一要素であるようである。

#### 【0008】

40

カルシトニン遺伝子の研究は、該遺伝子のプロモーター領域の高メチル化が、数種の癌タイプ、特に急性白血病の新生細胞中に存在することを明らかにしている。前記研究の大きな部分は、メチル化感受性酵素による方法を使用して実施され、これが複数のタイプの癌における遺伝子のプロモーターおよび第1エクソン領域内の高メチル化の一般的な現象を確認した。しかしながら、前記方法は選択されたCpG位置の目標とされた分析を不可能とする。高メチル化観察は、領域内のコメチル化の仮定によってのみ実施可能であった。コメチル化は、1つのCpG位置のメチル化がこの領域内の全CpG位置のメチル化の指標となる現象である。制限酵素法を使用して実施された研究例としては、非特許文献1および2が挙げられる。

#### 【0009】

50

CSPG2としても公知である遺伝子「バーシカン (Versican)」(NM\_004385)は、大きなコンドロイチン硫酸プロテオグリカンをコードする。この遺伝子は異常なメチル化パターンを示すことが知られていて、この問題について対立する意見が発表されている。例えば、アダニイ(Adany)Rおよびイオッゾ(lozzo)RVは、低メチル化と結腸新生物との相関性を観察した(非特許文献3)。しかし、最近になって、非特許文献4には、非UC制御粘膜に比べた(58%対31%、 $P=0.01$ )あるいは隣接した非関与粘膜に比べた(58%対35%、 $P=0.06$ )形成異常粘膜の高メチル化の観察が記載されている。したがって、この遺伝子の異常メチル化が結腸直腸細胞増殖性疾患に観察されているが、この異常メチル化の特徴付けは、なおも自明ではなく、コメチル化の一般に行われる仮定が、この遺伝子の場合、行えないようである。

10

## 【0010】

遺伝子TPEF(TMEFF2としても公知である)NM\_016192は、EGFおよびホリスタチンドメインを含む膜貫通タンパクをコードする。これは最初にジョーンズ(Jones)らにより、そのメチル化特性をもとに同定された(非特許文献5)。そこで、該遺伝子の5'領域はCpGアイランドを含み、その3'領域は腫瘍細胞株中で有意な高メチル化を示すことが明らかにされた。有意であるけれども、前記知見は臨床または診断に応用するには適切でない方法である任意にプライムされたPCRによって実施された。

## 【0011】

EYA4は、脊椎動物Eya(eyes-absent)遺伝子ファミリーのうちで最も近年に同定された一員であり、正常な発生学的発達を確実にする保存制御ヒエラルキー(hierarchy)において他のタンパクと相互作用する4種の転写活性化因子のグループである。EYA4遺伝子は、6q22.3に存在し、640アミノ酸タンパクをコードする。EYA4の構造は、EYA1~3により確定された基本パターンと一致し、eya相同領域(eyaHR;または、eyaドメインまたはeya相同性ドメイン1と呼ばれる)と称する高度に保存された271アミノ酸のC末端およびN末端の多種のプロリン-セリン-スレオニン(PST)リッチな(34~41%)転写促進活性化ドメインを含む。EYAタンパクは初期胚発達中にSIXおよびDACHタンパクファミリーのメンバーと相互作用する。EYA4遺伝子の変異は、DFNA10座で後天性、進行性、常染色体優性難聴の原因である(非特許文献6および他の参考文献)。EYA4遺伝子におけるシトシン位置のメチル化と癌の関連は未だ確定されていない。

20

30

## 【0012】

カドヘリンは、選択的細胞認識および接着の原因である細胞表面糖タンパクの1つのファミリーである。CDH1(E-カドヘリン)およびCDH13(H-カドヘリン、NM\_001257)を含む数種のファミリーメンバーは、染色体16の長腕上に位置し、他の遺伝子群は染色体5の短腕上に存在する。カドヘリンのうちのいくつかの染色体位置は、多くの腫瘍型におけるヘテロ接合性の頻繁な消失部位である。16qの欠失は、乳房、肺および他の癌腫でしばしば生じる。カドヘリンの発現消失は、多くの上皮癌で述べられていて、これは腫瘍細胞浸潤および転移である役割を果たすであろう。CDH13発現は、乳房および肺の癌で減少する。卵巣腫瘍で、欠失と異常なメチル化の組合せがCDH13を不活性化すると報告されている。CDH13の異常なメチル化はまた、肺癌でも報告されている。

40

## 【0013】

5-メチルシトシンは、真核生物細胞のDNAにおける最も頻度の高い塩基修飾である。これは例えば転写、制御、遺伝子インプリンティングおよび腫瘍形成においてある役割を果たす。したがって、遺伝子情報の1成分として、5-メチルシトシンの同定はかなり興味深いものである。しかしながら、5-メチルシトシンの位置はシトシンとして同じ塩基対形成挙動を有するから、配列決定によって同定することができない。さらに、5-メチルシトシンが行う後成的情報は、PCR増幅中に完全に失われる。

## 【0014】

5-メチルシトシンのDNA分析のための相対的に新しく、かつ現在、最も頻繁に使用

50

される方法は、シトシンと重亜硫酸塩との特異的な反応に基づく。これはその後のアルカリ加水分解において、その塩基対形成挙動でチミジンに対応するウラシルに変換される。しかしながら、5-メチルシトシンはこれらの条件下で未変性のまま残存する。その結果、そのハイブリダイゼーション挙動でシトシンと元来、区別され得ないメチルシトシンが、「通常の」分子生物学的技術を使用して、例えば増幅およびハイブリダイゼーションまた配列決定によって、唯一、残存するシトシンとして検出され得るような方法で、元のDNAを変換する。これらの技術の全ては、完全に活用され得る塩基対形成に基づく。感度からみて、先行技術はアガロースマトリックス中で分析されるDNAを囲む方法に限定され、すなわち、DNAの拡散および再生を阻止し（重亜硫酸塩のみが単一鎖DNAとの反応する）、そして高速透析により沈殿および精製工程全てを置換する（非特許文献7）。この方法を使用すると、個々の細胞を分析することが可能となり、このことはこの方法の潜在性を示す。しかしながら、現在、長さが約3000塩基対以下の塩基対の個々の領域のみが分析されているが、数千の可能性あるメチル化事象に関する全体的な細胞分析は可能ではない。しかもこの方法は小さなサンプル量から得た非常に小さな断片を確実に分析することはできない。これらは拡散の保護にもかかわらずマトリックス中で失われる。5-メチルシトシンを検出する別な公知方法に関する概要は、次の総説文献：非特許文献8から得てもよい。

10

**【0015】**

現在まで、いくつかの例外（例えば、非特許文献9）を除いて、重亜硫酸塩技術が唯一、研究において使用されている。いつも公知遺伝子の短い特定断片が重亜硫酸処理に続いて増幅され、いずれかが完全に配列決定されるか（非特許文献10）または個々のシトシン位置がプライマー伸長反応（非特許文献11、特許文献1）または酵素分解（非特許文献12）によって検出される。さらに、ハイブリダイゼーションによる検出もまた、記述されている（オレク(Olek)ら、特許文献2）。

20

**【0016】**

個々の遺伝子のメチル化検出における重亜硫酸塩技術の使用を扱っている別な刊行物は、非特許文献13～16、特許文献3および4がある。

オリゴマーアレイ製造における先行技術の概要は、1999年1月に発行された非特許文献17およびそこに引用された文献から集めることができる。

**【0017】**

蛍光標識されたプローブは、しばしば、固定化DNAアレイの走査に使用される。特異的プローブの5'-OHへのCy3およびCy5染料の単純な結合は、蛍光標識において特に好適である。ハイブリダイズされたプローブの蛍光検出は、例えば、共焦点顕微鏡によって実施してもよい。とりわけ、Cy3およびCy5染料が市販されている。

30

**【0018】**

マトリックスアシストレーザー脱離イオン化質量分析計(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry)(MALDI-TOF)は、生物分子を分析するには非常に効率的な開発である（非特許文献18）。分析物は光吸収性マトリックス中に包埋される。マトリックスを短いレーザーパルスで蒸発させ、未断片化方法で蒸気相中へ分析物分子を輸送する。分析物はマトリックス分子とともに衝突によってイオン化される。適用された電位がこのイオンをフィールドフリー飛行管中へ加速する。その異なった質量によって、イオンは異なった速度で加速される。より小さなイオンは大きなものよりも早く検出器へ届く。

40

**【0019】**

MALDI-TOF分光測定は、ペプチドおよびタンパクの分析にきわめて適している。核酸の分析はいくぶんより困難である（非特許文献19）。核酸の感度は、ペプチドよりも約100倍も悪く、断片サイズが大きくなるにつれて反比例して減少する。多重負電荷バックボーンを有する核酸では、マトリックスによるイオン化方法は、非常に効率が低い。MALDI-TOF分光測定では、マトリックスの選択が著しく重要な役割を果たす。ペプチドの脱離には、非常に微細な結晶化を生じるいくつかの効率的なマトリックスが

50

見出されている。DNAに対するいくつかの反応性マトリックスが現在は存在するが、しかしながら、感度の相違はまだ減少していない。感度の相違は、ペプチドにより類似するような方法にて、DNAを化学的に変性させることによって減少させることができる。バックボーンの通常のリン酸塩がチオリン酸塩で置換されたホスホチオエート核酸は、簡単なアルキル化化学を使用して電荷中性DNAに変換され得る（非特許文献20）。変性DNAへの電荷タグの結合は、ペプチドにおいて見られた感度と同じ程度に感度が増加する。電荷タグの結合のさらなる利点は、未変性基質の検出を非常に困難なものとする不純物に対する分析における大きな安定性である。

ゲノムDNAは標準方法によって細胞、組織または他の試験試料DNAから得られる。この標準的方法論は、非特許文献21などの参考文献に見られる。

10

【特許文献1】WO95/00669

【特許文献2】WO99/28498

【特許文献3】WO97/46705

【特許文献4】WO95/15373

【非特許文献1】ヒルツネン(Hiltunen) M0、コイステイナホ(Koistinaho)J、アルホネン(Alhonen) L、ミヨハネン(Myohanen)S、マリン(Marin)S、コスマ(Kosma)VM、パッコネン(Paakkonen)M、ジェイン(Janne)J。「ヒト結腸直腸癌の染色体11pのWT1およびカルシトニン遺伝子プロモーター領域の高メチル化」、BrJ Cancer. 1997; 76 (9):1124-30。

【非特許文献2】シルバーマン(Silverman) AL, パーク(Park) JG, ハミルトン(Hamilton) SR, ガツダー(Gazdar) AF, ルック(Luk)GD, ベイリン(Baylin)SB, 「ヒト結腸新生物のカルシトニン遺伝子の異常メチル化」、CancerRes.1989 Jul1; 49 (13): 3468-73。

20

【非特許文献3】アダニイ(Adany)Rおよびイオッゾ(Iozzo)RV、「ヒト結腸癌腫のパーシカン(Versican)プロテオグリカン遺伝子の変化したメチル化」、BiochemBiophysRes Commun 1990 Sep 28; 171 (3): 1402-13)。

【非特許文献4】イッサ(Issa)ら、「潰瘍性結腸炎の加速度的年齢関連 CpG アイランドのメチル化」、CancerResearch61,3573-3577,May1, 2001。

【非特許文献5】ジョーンズ(Jones)ら、「上皮細胞成長因子およびホリスタチンドメインを含む新規な膜貫通タンパクの遺伝子は、ヒト腫瘍細胞中で頻りに高メチル化される」、CancerResearch60, 4907-4912, September1, 2000。

30

【非特許文献6】ウェイン(Wyane)S、ロバートソン(Robertson)NG、デクロ(DeClau) F、チェン(Chen)N、ベルホーベン(Verhoeven)K、プラサド(Prasad)S、トランジャグ(Tranebjerg)L、モートン(Morton)CC、リヤン(Ryan)AF、ファンキャンプ(VanCamp) G、スミス(Smith) RJ: 「転写活性因子EYA4の変異がDFNA10座で遅発性聴覚障害を引き起こす」、HumMolGenet 2001 Feb1; 10(3): 195-200。

【非特許文献7】オレク(Olek)A、オズワルド(Oswald) J、ウォルター(Walter)J、「重亜硫酸塩系シトシンメチル化分析のための修正および改良方法」、NucleicAcidsRes. 1996 Dec15; 24(24): 5064-6。

【非特許文献8】レイン(Rein),T、デパムフィリス(DePamphilis),M.L、ゾルバス(Zorbas),H、Nucleic AcidsRes.1998,26, 2255。

40

【非特許文献9】ツェシュニック(Zeschnigk)M、リッチ(Lich)C、ビュティング(Buiting) K、ドエルフラー(Doerfler)W、ホルステムケ(Horsthemke)B、「SNRP N座のアレル変異メチル化相違に基づくアンジェルマンおよびプラダー・ウィリー症候群の診断のための単管PCR試験」、EurJHum H Genet. 1997 Mar-Apr; 5 (2): 94-8。

【非特許文献10】オレク(Olek)A、ウォルター(Walter)J、「H19メチル化刷り込みの移植前個体発生」、Nat Genet.1997Nov;17(3): 275-6。

【非特許文献11】ゴンザルゴ(Gonzalgo)ML、ジョーンズ(Jones)PA、「メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長(Ms-SNUP E)を使用する特定部位でのメチル化相違の迅速定量」、NucleicAcidsRes. 1997 Jun 15; 25 (12): 2529-31。

【非特許文献12】シオン(Xiong)Z、レアーダ(Laird) PW、COBRA: 「高感度および定量

50

的 DNA メチル化分析」、Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15; 25 (12): 2532-4。

【非特許文献 13】グリッグ(Grigg)G、クラーク(Clark)S、「ゲノム DNA の 5 - メチルシトシン残基の配列決定」、Bioassays. 1994 Jun; 16(6): 431-6, 431。

【非特許文献 14】ツエシュニク(Zeschnigk)M、シュミッツ(Schmitz)B、ディトリッチ(Dittrich)B、ビューティング(Buiting)K、ホルステムケ(Horsthemke)B、ドエルフラー(Doerfler)W、「ヒトゲノム中の刷り込みされたセグメント：ゲノム配列決定法により測定されたブラダー・ウィリーノアンジェルマン症候群流域中の異なった DNA メチル化パターン」、HumMolGenet. 1997 Mar; 6 (3) 387-95。

【非特許文献 15】フェイル(Feil)R、チャールトン(Charlton)J、バード(Bird)AP、ウォルター(Walter)J、レイク(Reik)W、「個々の染色体上のメチル化分析：重亜硫酸塩ゲノム配列決定の改良プロトコール」、Nucleic Acids Res. 1994 Feb 25; 22 (4): 695-6。 10

【非特許文献 16】マーチン(Martin)V、リビエラス(Ribieras)S、ソンーウォン(Song-Wang)X、リオ(Rio)MC、ダンテ(Dante)R、「ゲノム配列決定は p S 2 遺伝子の 5' 領域中の DNA 低メチル化とヒト乳癌細胞株でのその発現の相関性を示す」、Gene. 1995 May 19; 157(1-2): 261-4。

【非特許文献 17】Nature Genetics の特別版(Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999)。

【非特許文献 18】カラス(Karas)M、ヒレンカムプ(Hillenkamp)F、「10,000 ダルトンを超える分子量を有するタンパクのレーザー脱離イオン化」、Anal Chem. 1988 Oct 15; 60 (20): 2299-301。 20

【非特許文献 19】グット(Gut)IG、ベック(Beck)S、「DNA およびマトリックスアシストレーザー脱離イオン化質量分光分析」、Current Innovations and Future Trends 1995, 1; 147-57。

【非特許文献 20】グット(Gut)IG、ベック(Beck)S、「選択的 DNA アルキル化のための手法と質量分析による検出」、Nucleic Acids Res. 1995 Apr 25; 23(8): 1367-73。

【非特許文献 21】サンプルック(Sambrook)、フリッシュ(Fritsch)およびマニアティス(Maniatis)編、Molecular Cloning: 「研究室マニュアル」、1989。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】 30

本発明は、バーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよび EYA4 を含む群の少なくとも 1 つの核酸を、目的のゲノム配列内でメチル化および非メチル化 CpG ジヌクレオチド間を区別することができる試薬または一連の試薬と接触させることを特徴とする、結腸細胞増殖性疾患の発達に關与する態様の生体試料分析方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0021】 40

本発明の基礎を形成する遺伝子は、「遺伝子パネル」、すなわち、本発明の特別な遺伝子配列および/またはそれぞれの参考となるメチル化部位を含むコレクションを形成するために使用してもよい。遺伝子パネルの形成は、乳癌治療の特異的な面の緊急かつ特異的な分析を可能とする。本発明で記述され、かつ使用される遺伝子パネルは、結腸細胞増殖性疾患の改善された診断、治療およびモニタリングにおいて驚くべき高効率で使用される。

【発明の効果】

【0022】 50

本発明は、体液試料の結腸直腸癌を検出するために使用されるマーカーが現在、存在しない当該技術分野の状況を超えた有意義な改良を提供する。結腸細胞増殖性疾患を検出および診断するために使用される現在の方法は、結腸鏡検査、S字結腸鏡検査、および糞便潜血大腸癌を含む。これらの方法に比べて、開示される方法は、結腸鏡検査よりもより侵襲性が低く、かつ、あたかも S 字結腸鏡検査および FOB T よりも感度は高くない。文献

中のこれらのマーカーの説明に比べると、記述される発明は、遺伝子パネルを使用することと高感度の分析技術を有利に組み合わせることにより、感度と特異性の面から有意な利点をもたらす。

【0023】

本発明は、ゲノムDNAの遺伝的および/または後成的パラメーターを確認する方法を利用可能とする。この方法は、より具体的には、結腸細胞増殖性疾患のサブクラスおよび該疾患への遺伝的素因の改良された同定および区別を可能とすることによる結腸細胞増殖性疾患の改良された診断、治療およびモニタリングにおける使用に関する。本発明は結腸癌腫の高特異的分類を可能にし、それによって改善され、かつ同意を得た患者の治療を可能とする、当該技術分野の現状を超えた改良をもたらす。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明の1つの態様では、開示された事項は、前記遺伝子内のメチル化の分析に有用な新規な核酸配列を提供し、他の態様は結腸細胞増殖性疾患を検出、分化および区別するための遺伝子および遺伝子産物ならびに方法、アッセイおよびキットの新規な使用を提供する。本発明の方法および核酸は、腺癌、ポリープ、扁平上皮細胞癌、カルチノイド腫瘍、肉腫およびリンパ腫からなる群から選択される結腸細胞増殖性疾患の分析に使用してもよい。

【0025】

1つの実施態様では、本方法は結腸細胞増殖性疾患の区別、検出および識別のためのマーカーとして、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4からなる群から選択された1つ以上の遺伝子を使用することを開示する。この遺伝子の使用は、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4からなる群から選択された1つ以上の遺伝子およびこれらのプロモーターまたは制御要素のメチル化状態の分析によって行ってもよい。

20

【0026】

本発明の目的は、配列番号1~配列番号5の1つ以上のゲノム配列およびそれらに相補的配列内のCpGジヌクレオチドのメチル化状態の分析によって達成してもよい。配列番号1~配列番号5は、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4およびそれらのプロモーターおよび制御要素からなる群から選択された遺伝子の核酸配列を開示し、該断片は疾患特異的メチル化パターンを示すCpGジヌクレオチドを含む。遺伝子コードの縮重によって、配列番号1~配列番号5として同定された配列は、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4の遺伝子によってコードされたものの生物学的活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター領域の上流にある実質的に類似および均等である配列を含むと解釈されるべきである。

30

【0027】

本方法の好ましい実施態様では、本発明の目的は配列番号6~配列番号25の1つおよびその相補的配列の長さ少なくとも18塩基の配列を含む核酸の分析によって達成される。

40

配列番号6~配列番号25の配列は、配列番号1~配列番号5の核酸の修飾された変形を提供する。前記配列の変換は、以下の通り特殊であって、かつ配列番号1~配列番号5と区別される配列を有する核酸の合成となる。(下記表1も参照):配列番号1~配列番号5、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4およびそれらのプロモーターおよび制御要素のセンスDNA鎖;配列番号6~配列番号15、変換された配列番号1~配列番号5および相補的配列、ここで、「C」が「T」に変換するが、「CpG」は「CpG」のままである(すなわち、CpGジヌクレオチド配列の「C」残基の全てがメチル化され、したがって変換されていない場合に対応する);配列番号16~配列番号25、変換された配列番号1~配列番号5および相補的配列、ここで、「CpG」ジヌクレオチド配列のものを含めて、「C」残基の全てにおいて

50

「C」は「T」に変換した（すなわち、配列番号1～配列番号5において、CpGジヌクレオチド配列の「C」残基の全てがメチル化されていない場合に対応する）；

【0028】

【表1】

配列番号1～配列番号25の説明

配列番号	配列番号1～配列番号5の関係	シトシン塩基変換の状態
配列番号1～配列番号5	センス鎖（バーシカン、TFE F、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA 4およびそれらのプロモーターおよび制御要素）	なし：未処理配列
配列番号6～配列番号15	変換されたメチル化鎖	「C」から「T」へ、しかし「CpG」は「CpG」のままである（CpGの「C」残基はメチル化される）。
配列番号16～配列番号25	変換されたセンス鎖	「C」残基の全てにおいて「C」から「T」へ（CpGの「C」残基の全てがメチル化されていない。）

10

【0029】

これまで、配列番号6～配列番号25の核酸配列および分子は、結腸細胞増殖性疾患の確認法と有意に関係または関連付けされていなかった。

開示される発明は、さらに配列番号6～配列番号25の前処理されたDNA内のシトシンメチル化状態を検出するためのオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーを記載する。該オリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、配列番号6～配列番号25の前処理された核酸配列および/またはそれらに相補的な配列に、適度に厳密なまたは厳密な条件下に（上記定義されたように）ハイブリダイズする長さ少なくとも9ヌクレオチドを有する核酸を含む。

20

【0030】

すなわち、本発明は配列番号6～配列番号25の配列の全てまたは一部に、またはそれらの相補体に、適度に厳密なおよび/または厳密なハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズする核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸（PNA）分子（PNA-オリゴマー））を含む。ハイブリダイズする核酸のハイブリダイズ部分は、通常、長さ少なくとも9、15、20、25、30または35個のヌクレオチドである。しかしながら、より長い分子も本発明の有用性を有し、したがって本発明の範囲内に含まれる。

30

【0031】

好ましくは、本発明のハイブリダイズする核酸のハイブリダイズ部分は、配列番号6～配列番号25の配列、またはその部分、またはそれらの相補体と少なくとも95%、または少なくとも98%、または100%同一である。

【0032】

ここに開示されるタイプの核酸ハイブリダイゼーションは、例えばプライマー（例えば、PCRプライマー）、または診断および/または予知用プローブまたはプライマーとして使用され得る。好ましくは、核酸試料へのオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションは、厳密な条件下に実施され、プローブは標的配列と100%同一である。2本鎖核酸またはハイブリッド安定性は、プローブが標的DNAから解離する温度である融点またはT<sub>m</sub>で表現される。この融点は要求される厳密さの条件を決定するために使用される。

40

【0033】

配列番号1～配列番号5の対応する配列に関連し、かつ、同一よりむしろ実質的に同一である標的配列（アレル変異体およびSNPなど）では、特定濃度の塩（例えば、SSCまたはSSPE）で相同的ハイブリダイゼーションのみが生じる最低温度をまず達成することが有用である。次いで、1%ミスマッチがT<sub>m</sub>において1減少となると仮定して、ハイブリダイゼーション反応の最終洗浄温度をそれに応じて低下させる（例えば、もしプローブと95%以上の同一性を有する配列なら、最終洗浄温度を5減少させる）。実際

50

には、 $T_m$ の変化は1%ミスマッチ当たり0.5 から1.5 である。

【0034】

例えば、配列番号1～配列番号5を参照してポリヌクレオチド位置で示される長さ $X$ (ヌクレオチド)の本発明のオリゴヌクレオチドの例としては、長さ $X$ の連続重複オリゴヌクレオチドのセットに対応するものが挙げられる。ここで、各連続重複セット(所与の $X$ 値に対応)内のオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドの位置: $n \sim (n + (X - 1))$ から $Z$ 個のオリゴヌクレオチドの有限セットとして定義される。

ここで、 $n = 1, 2, 3, \dots, (Y - (X - 1))$ ;

ここで、 $Y$ は配列番号1～5の長さ(ヌクレオチドまたは塩基対)に等しい;

ここで、 $X$ はセットの各オリゴヌクレオチドの共通長さ(ヌクレオチド)に等しい(例えば、連続重複20マーでは、 $X = 20$ );および

ここで、長さ $Y$ の配列番号において、長さ $X$ の連続重複オリゴマーの数( $Z$ )は、 $Y - (X - 1)$ に等しい;

例えば、配列番号1～配列番号5のセンスまたはアンチセンスのいずれかのセットにおいて、 $Z = 2, 785 - 19 = 2, 766$ 、ここで、 $X = 20$ である。

好ましくは、このセットは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むこれらのオリゴマーに限定される。

【0035】

本発明は配列番号6～配列番号25(センスおよびアンチセンス)のそれぞれにおいて、長さ $X$ (ここでは、例えば $X = 9, 10, 17, 20, 22, 23, 25, 27, 30$ または35ヌクレオチド)のオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドの多重連続重複セットを包含する。

【0036】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、配列番号1～配列番号5に対応するゲノム配列の遺伝的および後成的パラメータを確認するために有用な効率的ツールを構成する。このような長さ $X$ のオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドの好ましいセットは、配列番号1～配列番号25(およびそれらの相補体)に対応するオリゴマーのこれらの連続重複セットである。好ましくは、このオリゴマーは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。配列番号11～配列番号15に対応する好ましいオリゴマーは、これらの好ましいセットに含まれる。

【0037】

本発明の特に好ましいオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーは、オリゴヌクレオチドの中の3分の1に、CpGジヌクレオチドのシトシン(またはTpGジヌクレオチドのチミンまたはCpAジヌクレオチドのアデノシン)が存在するものである。すなわち、オリゴヌクレオチドが、例えば長さ13塩基である場合、CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドは5'末端から5番目から9番目のヌクレオチド内に位置する。

【0038】

本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの活性、安定性または検出を増大させるために、1つ以上の分子または共役体にオリゴヌクレオチドを化学的に結合することによって変性され得る。このような分子または共役体としては、発色団、蛍光物質、コレステロールなどの脂質、コール酸、チオエーテル、脂肪族鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール(PEG)、パルミチル分子、および例えば、米国特許第5,514,758号、第5,565,552号、第5,567,810号、第5,574,142号、第5,585,481号、第5,587,371号、第5,597,696号および第5,958,773号に記載される他のものが挙げられる。プローブは、特に好ましい対形成特性を有するPNA(ペプチド核酸)の形態で存在していてもよい。したがって、オリゴヌクレオチドはペプチドなどの他の付属基を含んでいてもよく、また、ハイブリダイゼーション誘因切断剤(クロール(Krol)ら、BioTechniques6958-976,1988)または挿入剤(ツオン(Zon)、Pharm. Res. 5: 539-549, 1988)を含んでいてもよい。このために、オリゴヌクレオチドは他の分子、例えば発色団、蛍光物質、ペプチド、ハイブリダイ

ゼーション誘因架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘因切断剤などと結合されていてもよい。

オリゴヌクレオチドはまた、当該技術分野で認められている少なくとも1つの変性糖および/または塩基部分を含んでいてもよく、または変性バックボーンまたは非天然インターヌクレオシド結合を含んでいてもよい。

#### 【0039】

本発明のオリゴヌクレオチドは、通常、いわゆる「セット」として使用され、1つの実施態様では、配列番号1～配列番号5を含むゲノム配列およびそれらに相補的な配列のCpGジヌクレオチドまたは配列番号6～配列番号25の前処理された核酸およびそれらに相補的な配列内の対応するCG、TGまたはCAジヌクレオチドの各分析のための少なくとも1つのオリゴマーを含む。好ましいセットは、配列番号1～配列番号25の各遺伝子の前処理されたものおよびゲノムの両者中のバーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4およびそれらのプロモーターおよび制御要素からなる群から選択された1つ以上の遺伝子内の各CpGジヌクレオチドのための少なくとも1つのオリゴマーを含むものである。しかしながら、経済的または他の要因から、該配列内のCpGジヌクレオチドの限定された選択を分析することが好ましいことが予期され、オリゴヌクレオチドのセットの内容はそれゆえ変更されるべきである。したがって、本発明はさらに前処理されたゲノムDNA(配列番号6～配列番号25およびこれらに相補的な配列)およびゲノムDNA(配列番号1～配列番号5およびそれらに相補的な配列)のシトシンメチル化状態を検出するために使用される少なくとも4つのオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマーのセットに関する。これらのプローブは細胞増殖性疾患の遺伝的および後成的パラメーターの診断および/または治療を可能とする。オリゴマーのセットは、前処理されたゲノムDNA(配列番号6～配列番号25およびこれらに相補的な配列)およびゲノムDNA(配列番号1～配列番号5およびこれらに相補的な配列)中の単一ヌクレオチド多型(SNP)を検出するために使用してもよい。

#### 【0040】

さらに、本発明は配列番号6～配列番号25およびそれらに相補的な配列、またはそれらの断片の1つのDNA配列を増幅するためのいわゆる「プライマーオリゴヌクレオチド」として使用することができる少なくとも2つのオリゴヌクレオチドのセットを入手可能とする。

#### 【0041】

本発明のオリゴヌクレオチドのセットの場合、オリゴヌクレオチドのセットの少なくとも1つ、より好ましくは全てが固相に結合されることが好ましい。

#### 【0042】

本発明では、本発明によって入手可能となった異なったオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマーの配列(いわゆる「アレイ」)が、固相に結合されるようにして存在することが好ましい。異なったオリゴヌクレオチド-および/またはPNA-オリゴマー配列のこのアレイは、四角形または六角形格子形態の固相上に配列されることを特徴とする。固相表面は、好ましくはシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、銅、鉄、銅、ニッケル、銀または金から構成される。しかしながら、ニトロセルロースならびにナイロンなどのプラスチックもペレットの形態で存在することができ、または樹脂マトリックスとして使用してもよい。

#### 【0043】

したがって、本発明のさらなる主題は、細胞増殖性疾患に関連した分析のための担体物質に固定化されたアレイを製造する方法であり、本発明の少なくとも1つのオリゴマーが固相に結合される方法である。このようなアレイを製造する方法は、例えば固相化学および感光性保護基を用いる米国特許第5,744,305号から公知である。

本発明の別な主題は、細胞増殖性疾患の分析のためのDNAチップに関する。DNAチップは、例えば米国特許第5,837,832号から公知である。

#### 【0044】

10

20

30

40

50

本発明はさらに、パーシカン (Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4およびこれらのプロモーターおよび制御要素からなる群から選択された1つ以上の遺伝子の遺伝的および/または後成的パラメーターの分析を実施する方法を提供する。最も好ましくは、パーシカン (Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4からなる群から選択された1つ以上の遺伝子のメチル化を検出するために、下記方法による分析を使用する。ここで、メチル化核酸は過剰のバックグランドDNAをさらに含む溶液中に存在し、バックグランドDNAは検出されるべきDNAの濃度の100~1000倍で存在する。前記方法は被験者から得た核酸試料を少なくとも1つの試薬または一連の試薬と接触させることを含み、該試薬または一連の試薬は、標的核酸内のメチル化および非メチル化CpGジヌクレオチドを区別する。

10

**【0045】**

好ましくは、前記方法は下記工程を含む：第1工程では分析されるべき組織の試料を得る。その原料は好適なものであればよく、好ましくは試料の原料は組織学的スライド、生検、パラフィン包埋組織、体液、糞便、血液、血清、血漿、尿、痰およびこれらの組合せからなる群から選択される。好ましくは、原料は生検、体液、尿または血液である。

**【0046】**

次いで、DNAは試料から単離される。抽出は、界面活性剤可溶化液の使用、超音波処理およびガラスビーズによる渦流動を含む当業者にとって標準的な手段による。一度、核酸が抽出されると、ゲノム2本鎖DNAが分析に使用される。

**【0047】**

本方法の第2工程では、ゲノムDNA試料は5'位でメチル化されないシトシン塩基がウラシル、チミン、またはハイブリダイゼーション挙動の面ではシトシンに類似しない他の塩基に変換されるような方法で処理される。これはここでは「前処理」として理解されるであろう。

20

**【0048】**

ゲノムDNAの上記処理は、好ましくは非メチル化シトシン核酸塩基をウラシルまたは塩基対形成挙動の面からシトシンに類似していない他の塩基に変換することとなる、重亜硫酸塩（亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩）およびそれに続くアルカリ加水分解でもって実施する。アガロースマトリックス中に分析されるべきDNAを包括し、それによって、DNAの拡散および再生を阻止し（重亜硫酸塩のみが1本鎖DNAに作用する）、かつ、全沈殿および精製工程を高速透析に代替する（オレク(Olek)Aら、「重亜硫酸塩によるシトシンメチル化分析のための変性および改良方法」、NucleicAcidsRes.24:5064-6,1996）。さらに、重亜硫酸塩処理は遊離基捕捉剤またはDNA変性剤の存在下で実施することが好ましい。

30

**【0049】**

本方法の第3工程では、前処理したDNA断片を増幅する。DNA原料が血清であるDNAを含まないか、またはパラフィンから抽出されたDNAを含まない場合には、増幅産物断片の大きさは長さ100~200塩基対であることが特に好ましく、該DNA起源が細胞原料（例えば、組織、生検、細胞株）から抽出された場合、増幅産物は長さ100~350塩基対であることが好ましい。該増幅産物が少なくとも3つのCpGジヌクレオチドを含む20塩基対配列を少なくとも1つ含むことが特に好ましい。該増幅産物は、本発明のプライマーオリゴヌクレオチドのセット、および好ましくは熱安定性ポリメラーゼを使用して実施する。数種のDNAセグメントの増幅は、1つおよび同じ反応容器中で同時に実施することができ、本方法の1つの実施態様では、好ましくは2つ以上の断片を同時に増幅する。通常、増幅はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して実施する。プライマーオリゴヌクレオチドのセットは、その配列が配列番号6~配列番号25の塩基配列およびこれらに相補的な配列のうち、少なくとも18塩基対長のセグメントにそれぞれ逆相補的であるか、同一であるか、または厳密な条件または高度に厳密な条件下にハイブリダイズする少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。

40

**【0050】**

50

本方法の別な実施態様では、配列番号6～配列番号25を含む核酸配列内の前以て選択されたCpG位置のメチル化状態をメチル化特異的プライマーオリゴヌクレオチドを使用して検出してもよい。この技術(MSP)は米国特許第6,265,171号、ハーマン(Herman)に記載されている。重亜硫酸塩処理されたDNAの増幅のためのメチル化状態特異的プライマーの使用は、メチル化および非メチル化核酸を区別できる。MSPプライマー対は、重亜硫酸塩処理されたCpGジヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも1つのプライマーを含む。したがって、該プライマーの配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。非メチル化DNAに特異的なMSPプライマーは、CpGのC位置の3'位に「T」を含む。好ましくは、それゆえ、該プライマーの塩基配列は配列番号6～配列番号25に記載される前処理された核酸配列およびこれらに相補的な配列にハイブリダイズする長さ少なくとも18ヌクレオチドを有する配列を含むことが必要である。ここで、該オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。本発明方法のこの実施態様では、MSPプライマーは2～5のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含むことが特に好ましい。さらに、該ジヌクレオチドはプライマーの3'半分内に位置することが好ましい。例えば、プライマーが長さ18塩基である場合、特定ジヌクレオチドは分子の3'末端から最初の9塩基内に位置する。CpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドに加えて、該プライマーはさらに数種の重亜硫酸塩変換塩基(すなわち、チミンに変換されたシトシン、またはハイブリダイズする鎖でアデニンに変換されたグアニン)を含むことが好ましい。さらに好ましい実施態様では、該プライマーは2つ以下のシトシンまたはグアニン塩基を含むように設計される。 10 20

本方法の1つの実施態様では、プライマーは配列番号34～配列番号49、96、97、101、102、106および107からなる群から選択してもよい。

#### 【0051】

増幅によって得られた断片は、直接または間接に検出可能な標識を保持できる。蛍光標識、放射性核種または質量分析計で検出可能な通常の質量を有する検出可能な分子状断片の形状である標識が好ましい。該標識が質量標識である場合、標識された増幅産物は1価正または負正味荷電を有し、質量分析計でより良い検出能を可能とする。検出は例えば、マトリックスアシストレーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI)により、または電子スプレー質量分析(ESI)を使用して、実施し、可視化してもよい。 30

#### 【0052】

マトリックスアシストレーザー脱離/イオン化質量分析(MALDI-TOF)は生体分子の分析における非常に有効な開発である(カラス(Karas)およびヒレンカンプ(Hillenkamp)、Anal.Chem., 60: 2299-30, 1988)。検体は光吸収性マトリックスに包埋する。マトリックスは短いレーザーパルスによって蒸発し、従って検体分子を未断片化状態で蒸気相中へ移送する。検体はマトリックス分子と衝突してイオン化される。負荷された電圧はイオンをフィールドフリー飛行管中へ加速する。それらの異なる質量により、イオンは異なった速度で加速される。小さなイオンは大きなものよりも早く検出器へ到達する。MALDI-TOF分光測定は、ペプチドおよびタンパクの分析によく適している。核酸の分析は幾分、より困難である(グット(Gut)およびベック(Beck)、Current Innovations and Future Trends, 1:147-57, 1995)。核酸分析の感度は、ペプチドにおけるものよりもおよそ100倍も低く、断片の大きさが増加するに従い逆比例して減少する。さらに、多重負電荷バッグボーンを有する核酸では、マトリックスを経たイオン化工程はより効率が低いと考えられる。MALDI-TOF分光測定では、マトリックスの選択がきわめて重要な役割を果たす。ペプチドの脱離では、非常に微細な結晶化を生じる数種の非常に有効なマトリックスが見出されている。現在、DNAに対して反応性ある数種のマトリックスが存在するが、ペプチドと核酸の感度の差異は減少していない。しかしながら、この感度の差異はペプチドにより類似するような方法でDNAを化学的に修飾することによって減少され得る。例えば、バックボーンの通常のリン酸塩がチオリン酸塩で置換されているホスホロチオエート核酸は、単純なアルカリ化化学(グット(Gut)およびベック(Beck)、Nucle 40 50

icAcidsRes. 23: 1367-73, 1995) を使用して、電荷中性 DNA に変換され得る。この修飾 DNA へ電荷タグを結合すると、MALDI-TOF 感度がペプチドにおいて見られるものと同じ程度に増加する。電荷タグの結合のさらなる利点は、未修飾基質の検出を相当困難とする不純物の検出における大きな安定性である。

#### 【0053】

本方法の特に好ましい実施態様では、第3工程の増幅は、少なくとも1つのブロッカーオリゴヌクレオチドの存在下で実施する。このようなブロッカーオリゴヌクレオチドの使用は、ユ(Yu)ら、BioTechniques23:714-720,1997に記述されている。ブロッキングオリゴヌクレオチドの使用は、核酸亜集団の増幅において改良された特異性を可能にする。核酸にハイブリダイズしたブロッキングプローブは、該核酸のポリメラーゼを介する増幅を抑制するか、あるいは妨げる。本方法の1つの実施態様では、ブロッキングオリゴヌクレオチドは、バックグランド DNA にハイブリダイズするように設計される。本方法の別な実施態様では、該オリゴヌクレオチドはメチル化核酸とは対照的に、非メチル化核酸の増幅を妨げるか、あるいは抑制するように設計されるか、またはその逆である。

10

#### 【0054】

ブロッキングプローブオリゴヌクレオチドは、PCRプライマーと同時に重亜硫酸塩処理された核酸にハイブリダイズする。核酸のPCR増幅はブロッキングプローブの5'位で停止し、その結果、核酸の増幅はブロッキングプローブに相補的な配列が存在するところで抑制される。プローブは重亜硫酸塩処理核酸にメチル化状態特異的方法でハイブリダイズするように設計してもよい。例えば、非メチル化核酸の集団内のメチル化核酸の検出において、問題の位置で非メチル化された核酸の増幅抑制は、「CpG」ではなく、問題の位置の「TpG」を含むブロッキングプローブを使用して実施する。本方法の1つの実施態様では、該ブロッキングオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号6～配列番号25からなる、好ましくは1つ以上のCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む群から選択された長さ少なくとも18塩基対の配列に相補的または同一であるべきである。本方法の1つの実施態様では、該オリゴヌクレオチド配列は、配列番号85～配列番号87、98、103および108およびこれらに相補的な配列からなる群から選択される。

20

#### 【0055】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用するPCR法において、ポリメラーゼを介する増幅の有効な破壊は、ブロッカーオリゴヌクレオチドがポリメラーゼによって伸長しないことを要する。好ましくは、これは3'-デオキシオリゴヌクレオチド、または「遊離」ヒドロキシ基以外により3'位で誘導体化されたオリゴヌクレオチドであるブロッカーの使用により達成される。例えば、3'-O-アセチルオリゴヌクレオチドがブロッカー分子の好ましいものの代表である。

30

#### 【0056】

さらに、ブロッカーオリゴヌクレオチドのポリメラーゼによる分解は阻止されるべきである。好ましくは、このような阻止は、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼを使用するか、あるいはブロッカー分子をヌクレアーゼ抵抗性とする5'-末端に、例えばチオエート架橋を有する修飾ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用することを含む。特別な用途には、このようなブロッカーの5'修飾を必要としない。例えば、もしもブロッカー結合部位とプライマー結合部位が重複するなら、それによるプライマーの結合阻止(例えば、過剰ブロッカーで)、ブロッカーオリゴヌクレオチドの分解は、実質的に阻止されるであろう。これは、ポリメラーゼがプライマーをブロッカーに向かって(5'-3'方向において)進ませる伸長を行わないことによる。これは通常、ハイブリダイズしたブロッカーオリゴヌクレオチドの分解となる方法である。

40

#### 【0057】

本発明の目的において、またここに実施されるように、特に好ましいブロッカー/PCR実施態様は、ブロッキングオリゴヌクレオチドとしてのペプチド核酸(PNA)オリゴマーの使用を含む。このようなPNAブロッカーオリゴヌクレオチドは、ポリメラーゼによって分解あるいは伸長しないため理想的に適している。

50

## 【0058】

本方法の1つの実施態様では、ブロッキングオリゴヌクレオチドの結合部位はプライマーの結合部位と同じであるか、あるいは重複し、それによって、その結合部位へのプライマーのハイブリダイゼーションを阻止する。本方法のさらに好ましい実施態様では、2つ以上のこのようなブロッキングオリゴヌクレオチドを使用する。特に好ましい実施態様では、ブロッキングオリゴヌクレオチドのうちの1つのハイブリダイゼーションは、フォワードプライマーのハイブリダイゼーションを妨げ、プローブ(ブロッカー)オリゴヌクレオチドの他のもののハイブリダイゼーションは該フォワードプライマーの増幅産物へ結合するリバースプライマーのハイブリダイゼーションを妨げる。

## 【0059】

本方法の別な実施態様では、ブロッキングオリゴヌクレオチドが処理されたバックグラウンドDNAのリバースプライマー位置とフォワードプライマー位置の間にハイブリダイズし、それによって、プライマーオリゴヌクレオチドの伸長を妨げる。

ブロッキングオリゴヌクレオチドはプライマー濃度の少なくとも5倍の濃度で存在することが特に好ましい。

## 【0060】

本方法の第4工程で、本方法の第3工程で得られた増幅産物は、処理前のCpGジヌクレオチドのメチル化状態を確認するために分析される。

## 【0061】

増幅産物がMSP増幅および/またはブロッキングオリゴヌクレオチドによって得られた実施態様では、増幅産物の有無がプライマーおよび/またはブロッキングオリゴヌクレオチドによってカバーされたCpG位置のメチル化状態そのものをその塩基配列により示す。電気泳動、配列決定、液体クロマトグラフィー、ハイブリダイゼーション、リアルタイムPCR分析またはこれらの組合せを含むが、これらに限定されない可能性ある公知の分子生物学的方法の全てをこの検出において使用してもよい。本方法のこの工程は、さらに先の工程の定性的コントロールとして作用する。

## 【0062】

本方法の第4工程で、標準的PCRおよびメチル化特異的PCRの双方によって得られた増幅産物は、さらに本方法の第1工程で単離されたゲノムDNAのCpGメチル化状態を決定するために分析される。これは、アレイ技術およびプローブ使用技術などの塩基利用方法によって、ならびに配列決定および鋳型特異的伸長などの技術によって、実施してもよいが、これらに限定されない。

## 【0063】

本方法の1つの実施態様では、第3工程で合成された増幅産物は続いてオリゴヌクレオチドおよび/またはPNAプローブのアレイまたはセットにハイブリダイズさせる。ここでは、ハイブリダイゼーションは次の方法：ハイブリダイゼーション中に使用されるプローブセットは好ましくは少なくとも2つのオリゴヌクレオチドまたはPNAオリゴマーからなり；この方法で生じる増幅産物は固相に先に結合されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするプローブとして作用し；ハイブリダイズしなかった断片は続いて除去され；該オリゴヌクレオチドは配列番号2～配列番号5に記載されている塩基配列のセグメントと逆相補的または同一である長さ少なくとも9ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列を含み；そして、このセグメントは少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

## 【0064】

好ましい実施態様では、該ジヌクレオチドはオリゴマーの1/3の中央に存在する。例えば、オリゴマーが1つのCpGジヌクレオチドを含む場合、該ジヌクレオチドは好ましくは、13マーの5'末端から5番目～9番目のヌクレオチドである。1つのオリゴヌクレオチドは配列番号1～配列番号5に記載される配列内の各CpGジヌクレオチドおよび配列番号6～配列番号25内の均等な位置の分析のために存在する。該オリゴヌクレオチドはまた、ペプチド核酸の形態であってもよい。次いで、ハイブリダイズされなかった増

10

20

30

40

50

幅産物を除去する。ハイブリダイズされた増幅産物は検出される。ここで、増幅産物に結合された標識は、オリゴヌクレオチド配列が位置する固相の各位置で確認できることが好ましい。本方法の1つの実施態様では、該オリゴヌクレオチドは配列番号50~77、88および89を含む群から選択してもよい。

**【0065】**

本方法のなおも別な実施態様では、CpG位置のゲノムメチル化状態はPCR増幅プライマー（該プライマーはメチル化特異的であるか、あるいは標準的である）と同時に重亜硫酸塩処理DNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブによって確かめてもよい。

**【0066】**

この方法の特に好ましい実施態様は、蛍光利用リアルタイム定量的PCR（ハイド(Heid)ら、Genome Res. 6:986-994, 1996；米国特許第6,331,393号も参照）の使用である。この方法を利用する好ましい2つの実施態様が存在する。TaqMan<sup>TM</sup>分析として公知である1つの実施態様は、二重標識蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。TaqMan<sup>TM</sup>PCR反応は、フォワード増幅プライマーとリバース増幅プライマーの間に位置するCpGリッチ配列にハイブリダイズするように設計されたTaqMan<sup>TM</sup>プローブと呼ばれる非伸張性インテロゲイティングオリゴヌクレオチドを使用する。TaqMan<sup>TM</sup>プローブはさらに、蛍光「レポーター部分」およびTaqMan<sup>TM</sup>オリゴヌクレオチドのヌクレオチドに結合したリンカー部分（例えば、ホスホアミダイト）に共有結合した「消光部分」を含む。ハイブリダイズしたプローブは置換され、増幅反応のポリメラーゼによって分解され、それによって蛍光が増加する。重亜硫酸塩処理に続く核酸内のメチル化分析において、プローブは米国特許第6,331,393号（ここにその全体が参考として導入される）に記載されるようにメチル化特異的であることが必要である。これは、MethylLight<sup>TM</sup>アッセイとしても公知である。この技術の第2の好ましい実施態様は、二重プローブ技術（Lightcycler<sup>TM</sup>）の使用であり、それぞれのプローブが蛍光分子の供与体または受容体を有し、互いに近接した2つのプローブのハイブリダイゼーションが増加または蛍光増幅プライマーによって示される。これらの両技術が重亜硫酸塩処理DNAの使用、さらにCpGジヌクレオチド内のメチル化分析に適した方法で適用される。本方法の1つの実施態様では、該プローブオリゴヌクレオチド配列は、配列番号78~84、90、99、100、104、105、109および110を含む群から選択してもよい。

10

20

30

**【0067】**

本方法のさらに好ましい実施態様では、本方法の第4工程はゴンザルゴ(Gonzalgo)およびジョーンズ(Jones)、Nucleic Acids Res.25:2529-2531, 1997に記載されるMS-SNuPEなどの鑄型特異的オリゴヌクレオチド伸長を使用することを含む。該実施態様では、MS-SNuPEプライマーは配列番号2~配列番号5の群から選択される1つ以上の配列のうち、長さ少なくとも9、好ましくは25ヌクレオチド以下の配列と同一または相補的であることが好ましい。

**【0068】**

本方法の別な実施態様では、本方法の第4工程は本方法の第3工程で生じた増幅産物の配列決定およびその後の配列分析を含む（サンガー(Sanger)F.ら、ProcNatIAcad Sci USA 74: 5463-5467, 1977）。

40

本発明のさらなる実施態様は、本発明のゲノムDNA（配列番号1~配列番号5）のメチル化状態の前処理を必要としない分析方法を提供する。

**【0069】**

このようなさらなる実施態様の第1工程では、ゲノムDNA試料は組織または細胞原料から単離される。好ましくは、このような原料としては細胞株、組織学的スライド、体液、またはパラフィン包埋組織が挙げられる。抽出は界面活性剤可溶化液の使用、超音波処理およびガラスビーズによる渦流動を含む当業者にとって標準的な手段によるが、これらに限定されない。一度、核酸が抽出されると、ゲノム二重鎖DNAが分析に使用される。

50

好ましい実施態様では、DNAは処理前に開裂されてもよく、これは特にメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼを使用する当該技術分野で標準的な手段によってもよい。

【0070】

第2工程では、次いでDNAは1つ以上のメチル化感受性制限酵素により分解される。該分解は、制限部位のDNAの加水分解が特異的CpGジヌクレオチドのメチル化状態を知らせるように実施される。

【0071】

任意であるが、好ましい実施態様である第3工程では、制限酵素断片が増幅される。これは、好ましくはポリメラーゼ連鎖反応を使用して実施され、該増幅産物は上記したような好適な検出可能な標識、いわゆる蛍光標識、放射性核種および質量標識を有していてもよい。

10

【0072】

最終工程では、増幅産物が検出される。検出は当該技術分野で標準的な手段、例えばゲル電気泳動分析、ハイブリダイゼーション分析、PCR産生物内の検出可能なタグの結合、DNAアレイ分析、MALDIまたはESI分析によってもよいが、これらに限定されない。

【0073】

本発明は、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4内の重要な遺伝的および/または後成的パラメーターおよびそれらのプロモーターまたは制御要素がマーカーとして使用される、患者または個人にとって不利益な病気の診断および/または予知を可能とする。本発明の手段によって得られた該パラメーターは、遺伝的および/または後成的パラメーターの他のセットと比較してもよい。その差異が患者または個人にとって不利益である病気の診断および/または予知における基礎となる。

20

【0074】

特に、本発明はパーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4 CpGジヌクレオチド配列の差別的メチル化の測定に基づく、診断的および/または予知的な癌アッセイを提供する。このような差別的メチル化を測定するのに有用な好ましい遺伝子配列は、配列番号1~配列番号25によってここに示されている。通常、このようなアッセイは、試験組織から組織試料を得て、該組織試料から誘導される本発明のパーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA4特異的CpGジヌクレオチド配列の少なくとも1つのメチル化状態をコントロール試料と対比して測定するアッセイを行い、それに基づいて診断または予知を行うことを含む。

30

【0075】

特に好ましい実施態様では、本発明のオリゴヌクレオチドは配列番号：全オリゴヌクレオチドに対応する代表的な好ましいオリゴマーを含む配列番号1~配列番号25に基づくものなど、パーシカン(Versican)、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよび/またはEYA4特異的CpGジヌクレオチドのメチル化状態を評価するために使用され、これらのアレイならびにこれらに基づくキットは癌および/または他の前立腺細胞増殖性疾患の診断および/または予知において有用である。

40

【0076】

さらに、本発明は結腸細胞増殖性疾患の診断および/または治療における診断薬および/または治療剤に関し、該診断薬および/または治療剤は、配列番号1~配列番号25に基づく少なくとも1つのプライマーまたはプローブができるだけ好適な添加剤および補助剤とともに、該診断薬および/または治療剤を製造するために使用されることを特徴とする。

【0077】

さらに、本発明のさらなる態様は、例えば：重亜硫酸塩含有試薬ならびに少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含むキットであり、その配列は各ケースにおいて配列番号1~

50

配列番号5の配列の18塩基長セグメントに対応するか、相補的であるか、あるいは厳密なまたは高度に厳密な条件下にハイブリダイズする。該キットは、さらに上記した方法を実施し、かつ評価する指示書を含んでもよい。別な好ましい実施態様では、該キットはさらにCpG位置特異的メチル化分析を行うための標準試薬を含み、該分析は次の技術：MS-SNuPE、MSP、MethyLight、HeavyMethyl<sup>TM</sup>、COBRAおよび核酸配列決定のうちの一つ以上を含む。しかしながら、本発明のキットは、また前記した成分の一部のみを含むこともできる。

#### 【0078】

COBRA分析のための通常の試薬（例えば、通常のCOBRA系キットに見られるように）は、特異的遺伝子（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）のためのPCRプライマー；制限酵素および適当な緩衝液；遺伝子ハイブリダイゼーションオリゴ；コントロールハイブリダイゼーションオリゴ；オリゴプローブのためのキナーゼ標識キット；および放射活性ヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。さらに、重亜硫酸塩変換試薬は、DNA変性緩衝液；スルホン化緩衝液；DNA回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外濾過、親和性カラム）；脱スルホン化緩衝液；およびDNA回収成分を含んでいてもよいが、これらに限定されない。

10

#### 【0079】

MethyLightアッセイのための通常の試薬（例えば、通常のMethyLight系キットに見られるように）としては、特異的遺伝子（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）のためのPCRプライマー；TaqMan<sup>R</sup>プローブ；至適PCR緩衝液およびデオキシヌクレオチド；およびTaqポリメラーゼを含んでいてもよいが、これらに限定されない。

20

#### 【0080】

Ms-SNuPE分析のための通常の試薬（例えば、通常のMs-SNuPE系キットに見られるように）としては、特異的遺伝子（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）のためのPCRプライマー；至適PCR緩衝液およびデオキシヌクレオチド；ゲル抽出キット；ポジティブコントロールプライマー；特異的遺伝子のためのMs-SNuPEプライマー；反応緩衝液（Ms-SNuPE反応のための）；および放射活性ヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。さらに、重亜硫酸塩変換試薬としては、DNA変性緩衝液；スルホン化緩衝液；DNA回収試薬またはキット（例えば、沈殿、限外濾過、親和性カラム）；脱スルホン化緩衝液；およびDNA回収成分を含んでいてもよいがこれらに限定されない。

30

#### 【0081】

MSP分析のための通常の試薬（例えば、通常のMSP系キットに見られるように）は、特異的遺伝子（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）のためのメチル化および非メチル化PCRプライマー；至適PCR緩衝液およびデオキシヌクレオチド、および特異的プローブを含んでいてもよいが、これらに限定されない。

#### 【0082】

##### 定義

「CpGアイランド」との用語は、CpGジヌクレオチドの頻度が「観察/予測比率」 $>0.6$ に対応する基準（1）および「GC含量」 $>0.5$ である基準（2）を満足するゲノムDNAの隣接領域を呼ぶ。CpGアイランドは通常、長さ約0.2～約1kbであるが、これに限定されない。

40

#### 【0083】

「メチル化状況」または「メチル化状態」との用語は、DNA配列内の1つまたは複数のCpGジヌクレオチドの5-メチルシトシン（「5-mCyt」）の有無をいう。DNA配列内の1つ以上の特定の回文構造のCpGメチル化部位（それぞれは2つのCpGCpGジヌクレオチド配列を有する）のメチル化状態は、「非メチル化」、「完全メチル化」および「半メチル化」を含む。

#### 【0084】

50

「半 - メチル化」または「半メチル化」との用語は、回文構造の C p G メチル化部位の 2 つの C p G ジヌクレオチド配列のうちの一つにおける一つのシトシンのみがメチル化されている (例えば、5' - C C<sup>M</sup> G G - 3' (トップ鎖) : 3' - G G C C - 5' (ボトム鎖)) 回文構造の C p G メチル化部位のメチル化状態をいう。

【0085】

「高メチル化」との用語は、正常なコントロール DNA 試料内の対応する C p G ジヌクレオチドに見られる 5 - m C y t 量に対する、試験 DNA 試料の DNA 配列内の 1 つまたは複数の C p G ジヌクレオチドにおける 5 - m C y t の増加に対応した平均的メチル化状態をいう。

【0086】

「低メチル化」との用語は、正常なコントロール DNA 試料内の対応 C p G ジヌクレオチドに見られる 5 - m C y t 量に対する、試験 DNA 試料の DNA 配列内の 1 つまたは複数の C p G ジヌクレオチドにおける 5 - m C y t の減少に対応した平均的メチル化状態をいう。

【0087】

「マイクロアレイ」との用語は、当該技術分野で認められるに広く「DNA マイクロアレイ」および「DNA チップ」をいい、全技術分野で認められる固体支持体を包含し、かつ、それに核酸分子を固定する方法およびその上で核酸を合成する方法を包含する。

【0088】

「遺伝的パラメーター」は遺伝子およびその制御にさらに必要である配列の変異および多型である。特に、挿入、欠失、点変異、転化および多型を変異といい、かつ、SNP (単一ヌクレオチド多型) が特に好ましい。

【0089】

「後成的パラメーター」は、特にシトシンメチル化である。別な後成的パラメーターとしては、上述した方法を使用して直接に分析することができないが、代わって、DNA メチル化と関連する、例えばヒストンのアセチル化が挙げられる。

【0090】

「重亜硫酸塩試薬」との用語は、メチル化および非メチル化 C p G ジヌクレオチド配列を区別するために、ここに記載される有用な重亜硫酸塩、二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩またはこれらの組合せを含む試薬をいう。

【0091】

「メチル化アッセイ」との用語は、DNA の配列内の 1 つ以上の C p G ジヌクレオチド配列のメチル化状態を決定するいかなる分析をいう。

【0092】

「MS . AP - PCR」(メチル化感受性アービトラリリープライムド (Arbitrarily-Primed) ポリメラーゼ連鎖反応) との用語は、C p G ジヌクレオチドを含む可能性が最も高い領域に焦点を当てた C G リッチプライマーを使用するゲノムの広範囲のスキャンを可能とする当該技術分野で認められた技術をいい、これは、ゴンザルゴ (Gonzalگو) ら、Cancer Research 57: 594-599, 1997 に記載される。

【0093】

「M e t h y L i g h t」との用語は、イーズ (Eads) ら、Cancer Res. 59: 2302-2306, 1999 に記載される当該技術分野で認識されている蛍光系リアルタイム PCR 技術をいう。

【0094】

ここで実施される実施態様の「Heavy M e t h y l」アッセイとの用語は、Heavy M e t h y l<sup>TM</sup> M e t h y L i g h t アッセイを呼ぶ。これは M e t h y L i g h t<sup>TM</sup> アッセイの変形であり、ここで、M e t h y L i g h t アッセイは増幅プライマー間の C p G 位置を包囲するメチル化特異的ブロッキングプローブと組み合わせられる。

【0095】

「M s - S N u P E」(メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長) との用語は

10

20

30

40

50

、ゴンザルゴ(Gonzalvo)およびジョーンズ(Jones)、NucleicAcidsRes. 25: 2529-2531, 1997に記載される当該技術分野で認識されているアッセイをいう。

【0096】

「MSP」(メチル化特異的PCR)との用語は、ハーマン(Herman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996および米国特許第5786146号に記載される当該技術分野で認識されているアッセイをいう。

【0097】

「COBRA」(混合型重亜硫酸塩限定分析)との用語は、ション(Xiong)およびレアード(Laird)、Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997に記載される当該技術分野で認識されているメチル化分析をいう。

10

【0098】

「ハイブリダイゼーション」との用語は、試料DNA中でワトソン-クリック塩基対形成に似た方法で、二重鎖構造を形成する相補的配列へのオリゴヌクレオチドの結合として理解されるべきである。

【0099】

ここで定義される「厳密なハイブリダイゼーション条件」とは、 $5 \times SSC / 5 \times$  デンハルト溶液 /  $1.0\% SDS$  中、 $68^\circ C$  でハイブリダイズし、 $0.2 \times SSC / 0.1\% SDS$  中にて室温で洗浄することを含み、当該技術分野で認識されている均等なもの(例えば、ハイブリダイゼーションを $2.5 \times SSC$  緩衝液中、 $60^\circ C$  で実施し、続いて、低緩衝液濃度にて $37^\circ C$  で数回洗浄工程を行い、そして安定な状態とする)を含む。ここに定義される中程度に厳密な条件は、 $3 \times SSC$  中、 $42^\circ C$  での洗浄、あるいは当該技術分野で認識されている均等なものを含むことに関する。塩濃度および温度のパラメーターは、プローブと標的核酸間の同一性の至適レベルを達成するために変化し得る。このような条件に関する手引きは、例えば、サンプルック(Sambrook)ら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; およびオズベル(Ausubel)ら(編集)、1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, N.Y.)のユニット2.10により、当該技術分野で容易に入手可能である。

20

ここで使用される「バックグランドDNA」は、結腸細胞以外の原料に由来する全ての核酸をいう。

【実施例】

30

【0100】

次の実施例は、健康および病的結腸細胞増殖性疾患試料中のEYA4、カルシトニン、TPEF、H-カドヘリンおよびパーシカン(Versican)遺伝子のメチル化状態の分析を記載する。該遺伝子と結腸細胞増殖性疾患の初期関連性は、下記実施例13に記載されたハイブリダイゼーション分析によって初めてもたらされた。次いで、EYA4、カルシトニン、TPEF、H-カドヘリンおよびパーシカン(Versican)遺伝子をこれらの実施例で分析されるより大きな遺伝子群から選択し、メチル化状態と結腸細胞増殖性疾患との相関性を他のメチル化分析技術、いわゆるMSP-MethylightおよびHeavy Methyl Methylightアッセイを使用し、試料を分析して確認した。「Methylight」との用語は、Taqman(単一プローブ)およびLightcycler(二重プローブ)技術の両プローブを使用する重亜硫酸塩処理DNAのリアルタイムPCR分析を記述するために使用されることを注記する。

40

【0101】

実施例1

MSP-Methylightアッセイを使用する結腸癌内のメチル化分析(EYA4)DNAは、Qiagen抽出キットを使用して33個の結腸腺腫試料および43個の結腸正常隣接組織から抽出した。各試料から得たDNAはアガロースビーズ法(Olek)ら、1996)による重亜硫酸塩溶液(亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩)を使用して処理した。この処理は試料内の非メチル化シトシンの全てがチミジンに変換されるようなものである。逆に、試料内の5メチル化シトシンは未変性のままである。

50

## 【0102】

メチル化状態は、問題の CpG アイランド (island) のために設計された MSP - Methyl Light アッセイとベータアクチン遺伝子から得たコントロール断片 (イーズ (Eads) ら、2001) を使用して測定した。CpG アイランドアッセイは、プライマーおよび Taqman スタイルプローブに両方に CpG 部位を包含し、一方、コントロール遺伝子は包含しない。コントロール遺伝子は全 DNA 濃度の目安として使用され、CpG アイランドアッセイ (メチル化アッセイ) はその部位のメチル化の程度を測定する。

## 【0103】

方法: EYA4 遺伝子 CpG アイランドアッセイは、下記プライマーおよびプローブを使用して実施した。

フォワードプライマー: CGGAGGGTACGGAGATTACG (配列番号 40):

リバースプライマー: CGACGACGCGCGAAA (配列番号 41): および

プローブ: CGAAACCCTAAATATCCCGAATAACGCCG (配列番号 81)

対応するコントロールアッセイは、下記プライマーおよびプローブを使用して実施した。

プライマー: TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT (配列番号 91)

プライマー: AACCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA (配列番号 92) および

プローブ: ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA (配列番号 93)

下記アッセイ条件でもって、各 DNA 試料について反応を 3 回、実施した。

反応溶液: (900 nM プライマー; 300 nM プローブ; 3.5 mM 塩化マグネシウム; Taq ポリメラーゼ 1 単位; 200 μM dNTP; DNA 7 μl; 最終反応容量 20 μl 中);

サイクリング条件: (95 °C、10 分、次いで、95 °C で 15 秒、60 °C で 1 分を 50 サイクル)

## 【0104】

データは既に文献 (イーズ (Eads) ら、2001) に記載されている PMR 計算を使用して分析した。

結果; 正常な試料の平均 PMR は 0.15 であり、標準偏差は 0.18 であった。腫瘍試料の平均 PMR は 17.98 であり、標準偏差は 18.18 であった。腫瘍試料と正常試料のメチル化程度の全体的差異は、t-検定で有意であった ( $p = 0.00000312$ )。その結果を図 1 に示す。該アッセイの受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) もまた測定した。ROC は診断試験の異なる可能カットポイントにおける偽ポジティブ割合に対する真のポジティブ割合のプロットである。これは選択カットポイントに依存する感度および特異性間のトレードオフを示す (感度の増加は特異性の減少を伴うであろう)。ROC 曲線下の領域 (AUC) は診断試験の精度の基準である (その領域が大きいほど良く、最適は 1 であり、ランダム試験は領域 0.5 を有する対角線上に位置する ROC 曲線を有する。J.P.イーガン (Eagan)、*「シグナル検出理論と ROC 分析」*、Academic Press, New York, 1975) 参照。MSP - Methyl - Light アッセイの AUC は 0.94 である (図 2)。

## 【0105】

## 実施例 2

結腸癌内のメチル化は EYA4 - Heavy Methyl Methyl Light アッセイを使用して分析した。同じ DNA 試料を Heavy Methyl アッセイとも呼ばれる Heavy Methyl Methyl Light (または HM Methyl Light) アッセイを用いて、CpG アイランドのメチル化を分析することにも使用した。メチル化状態は上記したように、問題の CpG アイランドおよび同じコントロール遺伝子分析のために設定された HM Methyl Light アッセイを使用して測定した。CpG アイランドアッセイはブロッカーと Taqman スタイルプローブの両方に CpG 部位を包含するが、コントロール遺伝子は包含しない。

## 【0106】

10

20

30

40

50

方法：下記プライマーおよびプローブを使用して、CpGアイランドアッセイ（メチル化アッセイ）を実施した。

フォワードプライマー：GGTGATTGTTTATTGTTATGGTTTG（配列番号44）

リバースプライマー：CCCCTCAACCTAAAACTACAAC（配列番号45）

フォワードブロック：GTTATGGTTTGTGATTTTGTGTGGG（配列番号87）

リバースブロック：AACTACAACCACTCAAATCAACCCA（配列番号86）

プローブ：AAAATTACGACGACGCCACCCGAAA（配列番号84）

#### 【0107】

下記アッセイ条件でもって、各DNA試料について反応を3回、実施した：

反応溶液：（400nMプライマー；400nMプローブ；10μM両ブロック；3.5mM塩化マグネシウム；1×ABITaqman緩衝液；ABITaqGoldポリメラーゼ1単位；200μMdNTP；およびDNA7μl、最終反応溶液20μl中）；

サイクリング条件：（95℃で10分）；（95℃で15秒、64℃で1分（2サイクル））；（95℃で15秒、62℃で1分（2サイクル））；（95℃で15秒、60℃で1分（2サイクル））；および（95℃で15秒、58℃で1分、60℃で40秒（41サイクル））

#### 【0108】

結果：正常試料の平均PMRは1.12であり、標準偏差は1.45であった。腫瘍試料の平均PMRは38.23であり、標準偏差は33.22であった。腫瘍試料と正常試料のメチル化程度の全体的差異は、t-検定で有意である（ $p = 0.000000326$ ）。その結果を図1に示す。

該アッセイのROC曲線も測定した。MSP-Methyl-LightアッセイのAUCは0.91である（図3）。

該アッセイを結腸試料の別なセット（25個の腺癌、33個の正常、および13個の腺腫瘍）において試験した。その結果は再び有意な差異を示した（図4）。ROCを図5～7に示す。

Methyl-LightアッセイのMSPおよびHeavyMethyl変異体が、EYA4遺伝子のメチル化分析において均等であると決定された。図22は2つの方法を使用した各試料で検出されたメチル化パーセントの回帰プロットを示す。

#### 【0109】

##### 実施例3

EYA4-HeavyMethyl-Methyl-Lightアッセイもまた、他の組織のパネルに対して試験した（図8）。結腸癌試料のほかに、2つの乳癌組織の1つのみがメチル化されていた。しかしながら、21個のさらなる乳癌腫瘍（異なった段階）パネルで、たった1つがメチル化されていた（図9）。それゆえ、このマーカーは結腸腫瘍試料に対して特異的である。全てのプライマー、プローブ、ブロックおよび反応条件は、結腸癌試料の分析に使用されたもの（実施例2）と同一とした。

#### 【0110】

##### 実施例4

リアルタイムPCRで分析した結腸組織のうち、12個は外科手術前に採取されたペア血清も有していた。我々はQuiaGenUltraSensDNA抽出キットを使用して、該血清1mlからDNAを抽出し、DNA試料を重亜硫酸塩処理し、該試料についてEYA4-HeavyMethyl-Methyl-Lightアッセイを実施した。コントロール遺伝子は癌血清試料のうち3個および正常血清試料のうち3個において増幅しなかったことから、これらの事例では試料調製が正常にできなかったと結論を下した。他の事例では、正常試料よりも癌試料で高いメチル化の証拠が存在していた（図10）。

#### 【0111】

##### 実施例5

カルシトニン-MSP-Methyl-Lightアッセイを使用する結腸癌内のメチル化

## 分析

実施例 1 に記載した結腸癌試料は、Taqman<sup>®</sup>スタイルプローブを用い、カルシトニン - M S P - M e t h y l i g h t アッセイを使用して分析した。試料調製を上記したようにして実施した (実施例 1)。アッセイは、下記プライマーおよびプローブを使用して実施した。

プライマー：AGGTTATCGTCGTCGCGAGTGT (配列番号 34)；

プライマー：TCACTCAAACGTATCCCAAACCTA (配列番号 35)；および

プローブ：CGAATCTCTCGAACGATCGCATCCA (配列番号 78)

## 【0112】

対応するコントロールアッセイを上記したようにして実施した (実施例 1)。

下記アッセイ条件を用い、各 DNA 試料について反応を 3 回、実施した。

反応溶液：(900 nM プライマー；300 nM プローブ；3.5 mM 塩化マグネシウム；taq ポリメラーゼ 1 単位；200 μM dNTP；DNA 7 μl；最終反応容量 20 μl 中)；

サイクリング条件：(95 で 10 分；95 で 15 秒；67 で 1 分 (3 サイクル))；(95 で 15 秒，64 で 1 分 (3 サイクル))；(95 で 15 秒，62 で 1 分 (3 サイクル))；および (95 で 15 秒、60 で 1 分 (40 サイクル))

## 【0113】

データは文献 (イーズ (Eads) ら、2001) に既に記載される PMR 計算を使用して分析した。

結果：正常試料の平均 PMR は 0.19 であり、標準偏差は 0.79 であった。正常試料のいずれも正規平均に関する 2 つの標準偏差よりも大きくなかったが、腫瘍試料 33 個のうち 18 個がメチル化のこの程度にまで達した。腫瘍試料と正常試料のメチル化程度の全体的差異は、t - 検定で有意であった (p = 0.002)。その結果を図 1 に示す。有意にも腫瘍試料は正常コントロール組織に比べて大幅に高メチル化されていた。該アッセイの ROC 曲線も測定した。MSP - M e t h y l - L i g h t アッセイの AUC は 0.80 であった (図 11)。

## 【0114】

## 実施例 6

結腸癌内のメチル化をカルシトニン - H e a v y M e t h y l M e t h y l i g h t アッセイを使用して分析した。Taqman<sup>®</sup>スタイルプローブを使用する H e a v y M e t h y l M e t h y l i g h t アッセイを使用して、カルシトニン - C p G アイランドのメチル化を分析するために、同じ DNA 試料を使用した (実施例 2 参照)。

CpG アイランドアッセイ (メチル化アッセイ) を下記プライマーおよびプローブを使用して実施した：

プライマー：GGATGTGAGAGTTGTTGAGGTTA (配列番号 46)；

プライマー：ACACACCCAAACCCATTACTATCT (配列番号 47)；

プローブ：ACCTCCGAATCTCTCGAACGATCGC (配列番号 83)；および

ブロッカー：TGTTGAGGTTATGTGTAATTGGGTGTGA (配列番号 85)

## 【0115】

下記アッセイ条件を用い、各 DNA 試料について反応をそれぞれ 3 回、実施した：

反応溶液：(300 nM プライマー；450 nM プローブ；3.5 mM 塩化マグネシウム；taq ポリメラーゼ 2 単位；400 μM dNTP；5 μM ブロッカー；および DNA 7 μl；最終反応容量 20 μl 中)

サイクリング条件：(95 で 10 分)；(95 で 15 秒、67 で 1 分 (3 サイクル))；(95 で 15 秒、64 で 1 分 (3 サイクル))；(95 で 15 秒、62 で 1 分 (3 サイクル))；および (95 で 15 秒、60 で 1 分 (40 サイクル))

## 【0116】

対応するコントロールアッセイを上記したようにして実施した (実施例 2)。

結果：正常試料の平均 PMR は 0.13 であり、標準偏差は 0.58 であった。正常試料

10

20

30

40

50

のいずれも正規平均について2つの標準偏差よりも大きくなかったが、腫瘍試料33個のうち、19個はメチル化のこの程度にまで達した。腫瘍試料と正常試料とのメチル化の程度の全体的差異はt-検定で有意である( $p = 0.0004$ )。その結果を図1に示す。該アッセイのROC曲線もまた、測定した。HM-Methyl-Lightアッセイは0.84である(図12)。

#### 【0117】

カルシトニンおよびEYA4遺伝子を含む遺伝子パネルを分析するリアルタイムアッセイの感度および特異性を評価するために、該アッセイのROCを、ロジスティックモデルを使用して、2つの遺伝子(上記した)のROCを組み合わせてインシリコ(insillico)で決定した。該曲線のAUC(図21)は0.97である。

10

#### 【0118】

Methyl-LightアッセイのMSPおよびHeavyMethyl変異体は、カルシトニン遺伝子のメチル化分析において、均等であると判断した。図23は2つの方法を使用して各試料で検出されたメチル化パーセントの回帰プロットを示す。

#### 【0119】

##### 実施例7

##### カルシトニン-HM Methyl-Lightアッセイ

リアルタイムPCRで分析した結腸組織のうち、12個は外科手術前に採取したペア血清を有していた。Quiagen UltraSens<sup>®</sup> DNA抽出キットを使用して、該血清1mlからDNAを抽出し、DNA試料を亜硫酸塩処理し、そして、これらの試料についてHeavyMethyl-Methyl-Lightアッセイを実施した(実施例3参照)。カルシトニンは全腫瘍中でメチル化されていなかったが、腫瘍中に最も高い程度のメチル化を示す5人の患者の血清のうち、4つの血清中にメチル化を検出することができた。これに対し、健康な供与者から採取した11個の血清試料のいずれにもメチル化を検出できなかった。

20

#### 【0120】

##### 実施例8

##### カルシトニン遺伝子内のCpG部位のメチル化状態の同定

カルシトニン遺伝子(配列番号1)の上流領域断片をプライマー:

CCTTAGTCCCTACCTCTGCT(配列番号94)およびCTCATTTACACACACCCAAAC(配列番号95)を使用するPCRにより増幅した。得られた長さ378bpの増幅産物は、165位に参考となるCpGを含んでいた。増幅産物DNAを認識モチーフGGCGCCであるメチル化感受性制限エンドヌクレアーゼNarIを使用して分解した。該エンドヌクレアーゼによる加水分解は増幅産物の165位のCpGをメチル化することによって阻止した。分解物をコントロールとして使用した。

30

#### 【0121】

DNAwizzard<sup>®</sup> DNA単離キット(Promega)を使用して、ゲノムDNAを試料から単離した。製造者(NewEnglandBiolabs)の推奨に従い、NarIを使用して各試料を分解した。

#### 【0122】

次いで、各ゲノム分解物約10ngをPCRプライマー:CCTTAGTCCCTACCTCTGCT(配列番号94)およびCTCATTTACACACACCCAAAC(配列番号95)を使用して増幅した。PCR反応は、サーモサイクラー(EppendorfGmbH)を使用し、DNA10ng、各プライマー6pmole、各dNTPを200μM、1.5mM MgCl<sub>2</sub>およびHotStar<sup>®</sup> Taq(QuiagenAG)を使用して実施した。他の条件はTaqポリメラーゼ製造者が推奨するものであった。

40

#### 【0123】

上記プライマーを使用して、遺伝子断片を変性工程1:96で14分、続いて(工程2:96で60秒、工程3:52で45秒、工程4:72で75秒)30~45回、そして引き続き72で10分の最終伸長を実施するPCRにより増幅した。PCR産

50

物の存在はアガロースゲル電気泳動で分析した。

【0124】

サイクルプログラムの工程2から工程4が34、37、39、42および45回繰り返されたとき、PCR産物は単離されたNarI加水分解DNAで検出可能であり、問題の組織は非メチル化DNAを含んでいた。対照的に、PCR産物はサイクルプログラムの工程2から工程4が42および45回繰り返されたとき、下方メチル化組織から単離したNarI加水分解DNAによってのみ検出可能であった。

【0125】

実施例9

バーシカン (Versican) MSP - Methyl Lightアッセイを使用する結腸癌内のメチル化分析 10

Taqman<sup>®</sup>スタイルプローブを使用するバーシカン (Versican) MSP - Methyl Lightアッセイを使用して、実施例1に記載された結腸癌試料を分析した。試料調製は上記したようにして実施した (実施例1)。該アッセイは下記プライマーおよびプローブを使用して実施した：

フォワードプライマー：TGGGATTAAGATTTTCGGTTAGTTTC (配列番号36)

リバースプライマー：CACTACAACGCTACGCGACTAAA (配列番号37)

プローブ：TCGACGTTACCCAAACGAATCACATAAAAAAC (配列番号79)

【0126】

対応するコントロールアッセイは上記したようにして実施した (実施例1)。下記アッセイ条件にて各DNA試料について、反応を3回、実施した。 20

反応溶液：(900 nMプライマー；300 nMプローブ；3.5 mM塩化マグネシウム；Taqポリメラーゼ1単位；200 μM dNTP；5 μMプロッカー；およびDNA 7 μl、最終反応容量20 μl中)；

サイクリング条件：95 で10分；(95 で15秒、60 で1分)50サイクル。データは文献 (イーズ (Eads)ら、2001) に既に記載されているPMR計算を使用して分析した。

【0127】

結果：その結果を図1に示す。正常試料の平均PMRは3.93であり、標準偏差は3.57であった。腫瘍試料の平均PMRは23.06であり、標準偏差は20.23であった。腫瘍試料と正常試料のメチル化程度の全体的差異は、t-検定で有意である (p = 0.000003063)。該アッセイのROC曲線を図13に示す。AUCは0.84である。 30

これは、さらに二重Lightcyclerプローブを使用するバーシカン (Versican) Heavy Methyl Methyl Lightアッセイを使用して確認した。

【0128】

方法：CpGアイランドアッセイ (メチル化アッセイ) は、下記プライマーおよびプローブを使用して実施した。

フォワードプライマー：TGGATAGGAGTTGGGATTAAGATTTT (配列番号96) 40

リバースプライマー：CTTATTACAATTTAAAAAAAATTCACTACAA (配列番号97)

プロッカー：AAATTCCTACAACACTACACAATAATTCAACATTAC (配列番号98)

プローブ：TTTTTCGATTTTTTTTCGGGTTATTACGTTTT-Fluor (配列番号99)

プローブ：LC640-ATGTGATTCGTTTGGGTAACGTCGA-Phos (配列番号100)

【0129】

下記アッセイ条件を使用し、各DNA試料についてそれぞれ反応を3回、実施した：

反応条件：

500 nMプライマー

10 μMプロッカー

250 nMプローブ

## 【0130】

Light Cycler Fast Start ハイブリダイゼーションプロブ混合物

4 mM 塩化マグネシウム

サイクリングプロファイル：

95 で10分間の変性

95 で10秒、57 で30秒、72 で20秒を50サイクル

## 【0131】

実施例10

TPEF - MSP - Methyl Light アッセイを使用する結腸癌内のメチル化分析

TaqMan<sup>®</sup> スタイルプロブを使用する TPEF - MSP - Methyl Light アッセイを使用して、実施例1に記載した結腸癌組織を分析した。試料調製は上記したようにして実施した(実施例1)。該アッセイは下記プライマーおよびプロブを使用して実施した。 10

フォワードプライマー：TTTTTTTTTCGGACGTCGTTG (配列番号38)

リバースプライマー：CCTCTACATACGCCGCAAT (配列番号39)

プロブ：AATTACCGAAAACATCGACCGA (配列番号80)

## 【0132】

下記アッセイ条件を使用して、各DNA試料について反応を3回、実施した：

反応溶液：(900 nM プライマー；300 nM プロブ；3.5 mM 塩化マグネシウム；Taq ポリメラーゼ1単位；200 μM dNTP、5 μM ブロッカー；およびDNA 20  
7 μl、最終反応容量20 μl中)；

サイクリング条件：95 で10分；(95 で15秒、60 で1分)50サイクル

## 【0133】

対応するコントロールアッセイを上記したようにして実施した(実施例1)。

データは文献(イーズ(Eads)ら、2001)に既に記載されるPMR計算を使用して分析した。

結果：その結果を図1に示す。正常試料の平均PMRは3.04であり、標準偏差は4.21であった。腫瘍試料の平均PMRは21.38であり、標準偏差は24.08であった。腫瘍試料と正常試料とのメチル化程度の全体的差異はt-検定で有意である(p=0.0000101973)。該アッセイのROC曲線を図14に示す。AUCは0.80 30  
である。

## 【0134】

これは、さらにTPEF - Heavy Methyl Methyl Light アッセイ(二重標識Light cyclerプロブを使用する)を用いて確認した。

方法：CpGアイランドアッセイ(メチル化アッセイ)を下記プライマーおよびプロブを使用して実施した：

フォワードプライマー：GTAGGGTTATTGTTTGGGTTAATAAAT (配列番号101)

リバースプライマー：TAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCTCTACATAC (配列番号102)

ブロッカー：AACTCCTCTACATACACCACAAATAAATT (配列番号103)

プロブ：CGAAAACATCGACCGAACACG-Fluor (配列番号104) 40

プロブ：LC640-GTCCGAAAAAAAAAAAAAAAAACGAACTCC-Phos (配列番号105)

## 【0135】

下記アッセイ条件を使用して、各DNA試料についてそれぞれ反応を3回、実施した：

反応条件：

フォワードプライマー：600 nM

リバースプライマー：300 nM

ブロッカー：10 μM

プロブ：500 nM

Taqポリメラーゼ：0.1単位/μl

dNTP：それぞれ0.2 mM 50

塩化マグネシウム：4 mM

B S A：0.25 mg/ml

M g C l 不含Roche緩衝液：1 ×

【0136】

サイクリング条件：

95 で10分の変性

95 で10秒、57 で25秒、72 で10秒を50サイクル

【0137】

実施例11

T P E F - M S P - M e t h y L i g h tアッセイを使用する結腸癌内のメチル化分析 10  
T P E Fの別なアッセイを結腸試料について試験した。該アッセイは2セットの組織、  
すなわち結腸腺癌12個および正常隣接組織試料12個についてそれぞれ試験した。

試料調製は上記したようにして実施した(実施例1)。該アッセイは下記プライマーお  
よびプローブを使用して実施した。

フォワードプライマー：GGACGTTTTTTTATCGAAGGCG(配列番号48)

リバースプライマー：GCCACCCAACCGCGA(配列番号49)

プローブ：ACCCGAAATCACGCGCGAAAAA(配列番号90)

【0138】

下記アッセイ条件を使用して、各DNA試料について反応を3回、実施した：

反応溶液：(900 nMプライマー；300 nMプローブ；3.5 mM塩化マグネシウム 20  
；Taqポリメラーゼ1単位；200 μM dNTP、5 μMブロッカー；およびDNA  
7 μl、最終反応容量20 μl中)；

サイクリング条件：95 で10分；(95 で15秒、60 で1分)50サイクル

【0139】

対応するコントロールアッセイは上記したようにして実施した(実施例1)。

データは文献(イーズ(Eads)ら、2001)に既に記載されるPMR計算を使用して分析し  
た。両事例で、T P E Fは癌試料で有意によりメチル化されていた。該アッセイのROC  
曲線を図19~20に示す。AUCは0.93および1である。

【0140】

実施例12 30

H - カドヘリン - M S P - M e t h y L i g h tアッセイを使用する結腸癌内のメチル  
化分析

H - カドヘリン - M S P - M e t h y L i g h tアッセイを使用して、実施例1に記載  
した結腸癌試料を分析した。試料調製は上記したようにして実施した(実施例1)。該ア  
ッセイは下記プライマーおよびプローブを使用して実施した。

フォワードプライマー：GACGGATTTTTTTTTTAACGTTTTTTC(配列番号42)

リバースプライマー：AAATAAAATACCACCTCCGCGA(配列番号43)

プローブ：GCTCCTCGCGAAATACTCACCCG(配列番号82)

【0141】

下記アッセイ条件を使用して、各DNA試料について反応を3回、実施した： 40

反応溶液：(900 nMプライマー；300 nMプローブ；3.5 mM塩化マグネシウム  
；Taqポリメラーゼ1単位；200 μM dNTP、5 μMブロッカー；およびDNA  
7 μl、最終反応容量20 μl中)；

サイクリング条件：95 で10分；(95 で15秒、60 で1分)50サイクル

対応するコントロールアッセイは上記したようにして実施した(実施例1)。

データは文献(イーズ(Eads)ら、2001)に既に記載されているPMR計算を使用して分  
析した。

【0142】

結果：その結果を図1に示す。正常試料の平均PMRは2.25であり、標準偏差は2.  
42であった。腫瘍試料の平均PMRは25.67であり、標準偏差は17.57であっ 50

た。腫瘍試料と正常試料とのメチル化程度の全体的差異は  $t$ -検定で有意である ( $p = 0.00000000118$ )。該アッセイのROC曲線を図15に示す。AUCは0.94である。

このことは、さらにLightcycler二重プローブ技術を用いる二重Lightcyclerプローブを使用し、H-カドヘリン-HeavyMethylMethylLightアッセイを使用して確認した。

#### 【0143】

方法：CpGアイランドアッセイ(メチル化アッセイ)を下記プライマーを使用して実施した：

フォワードプライマー：GTTAGTTAGTTAATTTTTTAAATAGATTAGTAG (配列番号106)

10

リバースプライマー：CAAAAAACAAATAAAATACCACCTCC (配列番号107)

ブロッカー：CCTCCACAAAACCTCACTCCTCACAAAATAC (配列番号108)

プローブ：red640 TTTCGTTTTGTATGGTAGATACGGGGTGA-phosphate (配列番号109)

プローブ：ATTAATGGTTTTATAAGACGGATTTTTTTTTAACGT-fluorescein (配列番号110)

下記アッセイ条件を使用して、各DNA試料について反応を3回、実施した：

反応条件：

フォワードプライマー：600 nM

リバースプライマー：300 nM

ブロッカー：10  $\mu$ M

プローブ：500 nM

20

Taqポリメラーゼ：0.1単位/ $\mu$ l

dNTP：各0.2 mM

塩化マグネシウム：4 mM

B SA：0.25 mg/ml

MgCl<sub>2</sub> 不含Roche緩衝液：1 x

サイクリング条件：

95 で10分の変性

95 で10秒、57 で25秒、72 で10秒を50サイクル

#### 【0144】

実施例13

30

結腸癌試料のMultiplex-PCR

第1工程でWizzardキット(Promega)を使用して、ゲノムDNAを細胞試料から単離した。重亜硫酸塩溶液(亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩)を使用して、試料から単離されたゲノムDNAを処理した。該処理は試料内の全非メチル化シトシンをチアミンに変換し、逆に試料内の5-メチル化シトシンを未変性のまま残す。次いで、Cy5蛍光標識プライマーとの反応当たり8断片を増幅する多重PCRを使用して、処理された核酸を増幅した。使用したPCRプライマーを表1に記載する。PCR条件は以下の通りであった。

#### 【0145】

反応溶液：

重亜硫酸塩処理DNA 10 ng

40

3.5 mM MgCl<sub>2</sub>

400  $\mu$ M dNTP

各プライマー 2 pmol

Hot Star Taq (Qiagen) 1単位

#### 【0146】

以下のようにして増幅を40サイクル、実施した。95 で15分の変性、続いて55 で45秒のアニーリング、65 で2分のプライマー伸長、65 での最終伸長は10分行った。

次いで、各CpG位置の1対の固定化オリゴヌクレオチドを有するガラススライドに、各個人試料から得た全てのPCR産物をハイブリダイズさせた。これらの検出オリゴヌク

50

レオチドのそれぞれは、最初から非メチル化 ( T G ) またはメチル化 ( C G ) のいずれかである 1 つの C p G 部位のまわりの重亜硫酸塩変換配列にハイブリダイズするように設計した。使用した全ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチドのさらなる詳細は、表 2 を参照 ( 参考および非参考の両方 ) 。ハイブリダイゼーション条件は、 T G 変異体および C G 変異体の単一ヌクレオチド差異を検出することができるように選択した。

【 0 1 4 7 】

各多重 P C R 産物の 5  $\mu$  l 容量を 1 0 x S s a r c 緩衝液 ( 1 0 x S s a r c : 2 0 x S S C 2 3 0 m l 、 2 0 % ナトリウムラウロイルサルコシネート溶液 1 8 0 m l 、 d H <sub>2</sub> O で 1 0 0 0 m l に希釈 ) で希釈した。次いで、反応混合物を以下のように検出オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせた。9 5 °C で変性、1 0 °C まで冷却、4 2 °C で一夜、ハイブリダイゼーション、次いで、4 2 °C で 1 0 x S s a r c および d H <sub>2</sub> O で洗浄。

10

【 0 1 4 8 】

各ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドからの蛍光シグナルを g e n e p i x スキャナーとソフトウェアを使用して検出した。2 つのシグナル ( 各 C p G 位置を分析するために使用した C G オリゴヌクレオチドと T G オリゴヌクレオチドから ) の割合は、蛍光シグナルの強度比較に基づいて計算した。

【 0 1 4 9 】

次いで、アルゴリズムを使用して、2 つの組織クラス間の C p G メチル化差異に従い、ランク付けされたマトリックス中ヘデータを分類した ( 図 1 6 ~ 1 8 に示される ) 。最も有意な C p G 位置は、上部へ向かって減少する有意性を有するマトリックスの下部にある。黒色は所与の C p G 位置の全メチル化を示し、白色は特定の位置にメチル化を有しないことを示す。メチル化の程度は明るい灰色 ( 低割合のメチル化 ) から暗い灰色 ( 高割合のメチル化 ) で示される。各列は 1 つの遺伝子内の 1 つの特定 C p G 位置を示し、各カラムは 1 つの試料の異なる C p G におけるメチル化プロファイルを示す。左側に C p G と遺伝子認識物が示される。これは問題の遺伝子と使用された検出オリゴヌクレオチドを確認するための表 ( 表 1 ~ 6 ) を相互参照する。右側に、個々の C p G 位置における p 値を示す。p 値は観測される分布がデータセットで偶然生じた確率である。

20

【 0 1 5 0 】

選択された識別には、我々は学習アルゴリズム ( サポートベクターマシン、 S V M ) について訓練した。S V M ( F. モデル ( Model ) 、 P. アドージャン ( Adorjan ) 、 A. オレク ( Olek ) 、 C. ピーペンブロック ( Piepenbrock ) 、 「 癌分類に基づく D N A メチル化の特徴選択 」 、 B i o i n f o r m a t i c s ; 2 0 0 1 J u n e 1 7 ; S u p p l 1 : S 1 5 7 - 6 4 ) は、2 つの所与の訓練試料クラス間の最適弁別手段を構築する。この場合、各試料は検証する C p G 部位のメチル化パターン ( C G / T G 比 ) によって表される。S V M は各分類の試料のサブセットについて訓練され、関連する診断とともに示される。その前に S V M に示されなかった独立した試験試料は、もしも診断が訓練ラウンド中に作られた予測変数に正確に基づいて予測できるなら、評価に供された。この方法は試料の異なった区分を使用して数回、繰り返した。これは、交差検証法と呼ばれる方法である。先の実施により得られた知識を全く使用しないで、全てのラウンドを実施することに留意されたい。正しい分類の数は、全ての実施を平均した。これは試験の正確性 ( 全ラウンドに対して正しく分類された試料のパーセント ) を有効に

30

40

【 0 1 5 1 】

表

## 【表 1】

配列番号 1～配列番号 25 の説明

配列番号	配列番号 1～配列番号 5 の関係	シトシン塩基変換の状態
配列番号 1～配列番号 5	センス鎖 (パーシカン、T P E F、H-カドヘリン、カルシトニンおよび E Y A 4 およびそれらのプロモーターおよび制御要素)	なし：未処理配列
配列番号 6～配列番号 15	変換されたメチル化鎖	「C」から「T」へ、しかし「C p G」は「C p G」のままである (C p G の「C」残基はメチル化される)。
配列番号 16～配列番号 25	変換されたセンス鎖	「C」残基の全てにおいて「C」から「T」へ (C p G の「C」残基の全てがメチル化されていない。)

10

## 【 0 1 5 2 】

## 【表 2】

ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチド

遺伝子	オリゴマー配列
パーシカン (配列番号 2)	AAGATTTTCGGTTAGTTT (配列番号 8 8)
パーシカン (配列番号 2)	AAGATTTTGGTTAGTTT (配列番号 8 9)
パーシカン (配列番号 2)	ATGTGATTCGTTGGGTA (配列番号 5 0)
パーシカン (配列番号 2)	ATGTGATTTGTTGGGTA (配列番号 5 1)
パーシカン (配列番号 2)	GGGTAACGTCGAATTTAG (配列番号 5 2)
パーシカン (配列番号 2)	GGGTAATGTTGAATTTAG (配列番号 5 3)
パーシカン (配列番号 2)	AAAAATTCGCGAGTTTAG (配列番号 5 4)
パーシカン (配列番号 2)	AAAAATTTGTGAGTTTAG (配列番号 5 5)
E Y A 4 (配列番号 3)	TATATATACGTGTGGGTA (配列番号 5 6)
E Y A 4 (配列番号 3)	TATATATATGTGTGGGTA (配列番号 5 7)
E Y A 4 (配列番号 3)	AGTGTATGCGTAGAAGGT (配列番号 5 8)
E Y A 4 (配列番号 3)	AGTGTATGTGTAGAAGGT (配列番号 5 9)
E Y A 4 (配列番号 3)	TTTAGATACGAAATGTTA (配列番号 6 0)
E Y A 4 (配列番号 3)	TTTAGATATGAAATGTTA (配列番号 6 1)
E Y A 4 (配列番号 3)	AAGTAAGTCGTTGTTGTT (配列番号 6 2)
E Y A 4 (配列番号 3)	AAGTAAGTTGTTGTTGTT (配列番号 6 3)
H-カドヘリン (配列番号 4)	GAAGTGGTCGTTAGTTTT (配列番号 6 4)
H-カドヘリン (配列番号 4)	GAAGTGGTTGTTAGTTTT (配列番号 6 5)
H-カドヘリン (配列番号 4)	TTGTTTAGCGTGATTTGT (配列番号 6 6)
H-カドヘリン (配列番号 4)	TTGTTTAGTGTGATTTGT (配列番号 6 7)
H-カドヘリン (配列番号 4)	AAGGAATTCGTTTGTAA (配列番号 6 8)
H-カドヘリン (配列番号 4)	AAGGAATTTGTTTGTAA (配列番号 6 9)
H-カドヘリン (配列番号 4)	AATGTTTTCGTGATGTTG (配列番号 7 0)
H-カドヘリン (配列番号 4)	AATGTTTTGTGATGTTG (配列番号 7 1)
T P E F (配列番号 5)	ATTTGTTTCGATTAATTT (配列番号 7 2)
T P E F (配列番号 5)	ATTTGTTTTCGATTAATTT (配列番号 7 3)
T P E F (配列番号 5)	ATAGGTTACGGGTTGGAG (配列番号 7 4)
T P E F (配列番号 5)	ATAGGTTATGGGTTGGAG (配列番号 7 5)
T P E F (配列番号 5)	AATTTGCGAACGTTTGGG
T P E F (配列番号 5)	AATTTGTGAATGTTTGGG

20

30

## 【 0 1 5 3 】

【表 3】

結腸腫瘍または癌腫組織と健康結腸組織の区別に使用したオリゴヌクレオチド

遺伝子	オリゴ:
H-カドヘリン (配列番号4)	AATGTTTTCGTGATGTTG (配列番号70)
H-カドヘリン (配列番号4)	AATGTTTTGTGATGTTG (配列番号71)
TPEF (配列番号5)	AATTGCGAACGTTGGG (配列番号76)
TPEF (配列番号5)	AATTTGTGAATGTTGGG (配列番号77)
パーシカン (配列番号2)	GGTAACGTCGAATTTAG (配列番号52)
パーシカン (配列番号2)	GGTAATGTTGAATTTAG (配列番号53)
H-カドヘリン (配列番号4)	AAGGAATTCGTTTTGTAA (配列番号68)
H-カドヘリン (配列番号4)	AAGGAATTTGTTTTGTAA (配列番号69)
TPEF (配列番号5)	ATAGGTTACGGTTGGAG (配列番号74)
TPEF (配列番号5)	ATAGGTTATGGTTGGAG (配列番号75)
EYA4 (配列番号3)	AAGTAAGTCGTTGTTGTT (配列番号62)
EYA4 (配列番号3)	AAGTAAGTTGTTGTTGTT (配列番号63)
EYA4 (配列番号3)	AGTGTATGCGTAGAAGGT (配列番号58)
EYA4 (配列番号3)	AGTGTATGTGTAGAAGGT (配列番号59)
パーシカン (配列番号2)	AAAAATTCGCGAGTTTAG (配列番号54)
パーシカン (配列番号2)	AAAAATTTGTGAGTTTAG (配列番号55)
パーシカン (配列番号2)	AAGATTTTCGGTTAGTTT (配列番号88)
パーシカン (配列番号2)	AAGATTTTTCGGTTAGTTT (配列番号89)
TPEF (配列番号5)	ATTTGTTTCGATTAATTT (配列番号72)
TPEF (配列番号5)	ATTTGTTTTCGATTAATTT (配列番号73)

10

【0154】

【表 4】

結腸癌腫組織と健康結腸組織の区別に使用したオリゴヌクレオチド

遺伝子	オリゴ:
H-カドヘリン (配列番号4)	AATGTTTTCGTGATGTTG (配列番号70)
H-カドヘリン (配列番号4)	AATGTTTTGTGATGTTG (配列番号71)
TPEF (配列番号5)	AATTGCGAACGTTGGG (配列番号76)
TPEF (配列番号5)	AATTTGTGAATGTTGGG (配列番号77)
H-カドヘリン (配列番号4)	AAGGAATTCGTTTTGTAA (配列番号68)
H-カドヘリン (配列番号4)	AAGGAATTTGTTTTGTAA (配列番号69)
パーシカン (配列番号2)	GGTAACGTCGAATTTAG (配列番号52)
パーシカン (配列番号2)	GGTAATGTTGAATTTAG (配列番号53)
EYA4 (配列番号3)	AGTGTATGCGTAGAAGGT (配列番号58)
EYA4 (配列番号3)	AGTGTATGTGTAGAAGGT (配列番号59)
EYA4 (配列番号3)	AAGTAAGTCGTTGTTGTT (配列番号62)
EYA4 (配列番号3)	AAGTAAGTTGTTGTTGTT (配列番号63)
TPEF (配列番号5)	ATAGGTTACGGTTGGAG (配列番号74)
TPEF (配列番号5)	ATAGGTTATGGTTGGAG (配列番号75)

20

30

【0155】

【表 5】

結腸腫瘍組織と健康結腸組織の区別に使用したオリゴヌクレオチド

遺伝子	オリゴ:
H-カドヘリン (配列番号4)	AATGTTTTCGTGATGTTG (配列番号70)
H-カドヘリン (配列番号4)	AATGTTTTGTGATGTTG (配列番号71)
TPEF (配列番号5)	AATTGCGAACGTTGGG (配列番号76)
TPEF (配列番号5)	AATTTGTGAATGTTGGG (配列番号77)
TPEF (配列番号5)	ATAGGTTACGGTTGGAG (配列番号74)
TPEF (配列番号5)	ATAGGTTATGGTTGGAG (配列番号75)
パーシカン (配列番号2)	GGTAACGTCGAATTTAG (配列番号52)
パーシカン (配列番号2)	GGTAATGTTGAATTTAG (配列番号53)
H-カドヘリン (配列番号4)	AAGGAATTCGTTTTGTAA (配列番号68)
H-カドヘリン (配列番号4)	AAGGAATTTGTTTTGTAA (配列番号69)
EYA4 (配列番号3)	AAGTAAGTCGTTGTTGTT (配列番号62)
EYA4 (配列番号3)	AAGTAAGTTGTTGTTGTT (配列番号63)
EYA4 (配列番号3)	AGTGTATGCGTAGAAGGT (配列番号58)
EYA4 (配列番号3)	AGTGTATGTGTAGAAGGT (配列番号59)
パーシカン (配列番号2)	AAAAATTCGCGAGTTTAG (配列番号54)
パーシカン (配列番号2)	AAAAATTTGTGAGTTTAG (配列番号55)

40

【0156】

【表 6】

図16~18に示される分析された遺伝子

図面の番号	遺伝子名
健康vs非健康	
50-D	Hカドヘリン
20-C	CD44
54-C	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
21-C	パーシカシ
50-C	Hカドヘリン
25-B	GSTP1
43-C	TCFBE2
36-B	N33
49-A	CAV1
52-C	PTGS2
46-A	TP73
54-B	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
20-A	CD44
24-D	EYA4
24-B	EYA4
26-B	GTBPMSSH6
4-C	EGR4
15-E	CDH1
23-E	ECFR
30-B	LIG1
22-D	DAPK1
29-D	ICF2
10-A	HLA-F
28-C	ICF2
36-C	N33
21-D	パーシカシ
32-D	PTEN
32-B	MLH1
28-A	GTBPMSSH6
14-C	CALCA
23-C	DAPK1
32-C	PTEN
9-D	WT1
23-A	ECFR
21-A	パーシカシ
30-A	LIG1
9-C	WT1
60-E	ESR1
12-A	APC
28-A	ICF2
8-D	MYOD1
36-A	N33
54-A	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
18-E	CDKN2a
15-D	CDH1
12-C	APC
健康vs癌	
50-D	Hカドヘリン
54-C	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
50-C	Hカドヘリン
21-C	パーシカシ
20-C	CD44
24-B	EYA4
12-A	APC
52-C	PTGS2
24-D	EYA4
32-B	PCR
25-B	GSTP1
49-A	CAV1
23-E	ECFR
36-B	N33
29-C	ICF2
10-D	HLA-F
54-B	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
46-A	TP73
健康vs癌	
20-C	CD44
10-A	HLA-F
43-C	TCFBE2
28-A	GTBPMSSH6
26-B	GTBPMSSH6
32-B	LIG1
20-A	CD44
36-C	N33
50-D	Hカドヘリン
46-A	TP73
32-D	PTEN
36-B	N33
54-C	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
25-B	GSTP1
23-A	ECFR
49-A	CAV1
39-D	N33
49-A	CAV1
54-B	TPEF (=TMEFF2 =HPP1)
18-E	CDKN2a
32-A	N33
32-B	MLH1
12-C	APC
21-C	パーシカシ
15-E	CDH1
52-C	PTGS2
62-D	RASSF1
9-C	WT1
18-D	CDKN2a
60-E	ESR1
29-D	ICF2
8-D	MYOD1
50-C	Hカドヘリン
4-C	EGR4
42-C	SIWAA2
22-D	DAPK1
31-E	MGMT
24-D	EYA4
56-A	CEA
9-D	WT1
7-E	GFB-beta
14-C	CALCA
52-D	PTGS2
8-B	MYOD1
24-B	EYA4
21-D	パーシカシ
38-C	PCR
68-A	PONA
34-D	M3H9
9-B	WT1
35-B	MTG
27-C	HIC-1
52-B	PTGS2
23-E	ECFR
30-A	LIG1
29-C	ICF2
38-C	PTEN
13-D	BCL2
6-B	AR
15-D	CDH1
健康vs癌	
18-B	CDKN2a
7-E	GFB-beta

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】異なるMSP MethyLightアッセイおよびHeavyMethylMethyLightアッセイによって測定されたメチル化の程度を示す。Y軸はメチル化

50

度を示す。腫瘍試料は白点で示され、正常結腸組織試料は黒点で示される。有意に高いメチル化度は健康な組織試料中よりも腫瘍試料中に観察された。

【図2】実施例1の腺癌のEYA4-MSP-Methyl-Lightアッセイの受信者動作特性曲線(ROC曲線)を示す。MSP-Methyl-LightアッセイのAUCは、0.94である。

【図3】実施例2の腺癌のEYA4-HM-Methyl-Lightアッセイの受信者動作特性曲線(ROC曲線)を示す。HM-Methyl-LightアッセイのAUCは、0.91である。

【図4】結腸試料(腺癌25、正常33および腺腫13)の別なセットを試験する実施例2のEYA4-HeavyMethylMethylLight<sup>TM</sup>アッセイによって測定されたメチル化の程度を示す。Y軸は検査するEYA4遺伝子の領域内のメチル化度を示す。腺癌試料を白四角で、正常結腸組織試料を黒ダイヤで示す。有意に高いメチル化度が健康な組織試料よりも腫瘍試料に見られた。t-検定を使用して測定した有意水準は、0.00424であった。

【図5】実施例2(別な試料セット)の腺癌および腺腫におけるEYA4-HM-Methyl-Lightアッセイの受信者動作特性曲線(ROC曲線)を示す。ROC曲線下の領域(AUC)は、診断試験の精度に関する基準である。HM-Methyl-LightアッセイのAUCは、0.81である。

【図6】実施例2(別な試料セット)の腺癌におけるEYA4-HM-Methyl-Lightアッセイの受信者動作特性曲線(ROC曲線)を示す。ROC曲線下の領域(AUC)は、診断試験の精度に関する基準である。HM-Methyl-LightアッセイのAUCは、0.844である。

【図7】実施例2(別な試料セット)の腺腫におけるEYA4-HM-Methyl-Lightアッセイの受信者動作特性曲線(ROC曲線)を示す。ROC曲線下の領域(AUC)は、診断試験の精度に関する基準である。HM-Methyl-LightアッセイのAUCは、0.748である。

【図8】実施例3のEYA4-HeavyMethylMethylLight<sup>TM</sup>アッセイによって測定された、異なる腫瘍および健康な組織のメチル化の程度を示す。Y軸は検査したEYA4遺伝子の領域内のメチル化度を示す。結腸癌試料に加えて、2つの乳癌組織のうち1つのみがメチル化された。

【図9】実施例3のEYA4-HeavyMethylMethylLight<sup>TM</sup>アッセイによって測定された、異なる乳癌組織のメチル化の程度を示す。たった1つがメチル化されていた。

【図10】実施例4のEYA4-HeavyMethylMethylLight<sup>TM</sup>アッセイによって測定された血清試料のメチル化の程度を示す。Y軸は検査したEYA4遺伝子の領域内のメチル化度を示す。

【図11】実施例5のカルシトニン-MSP-Methyl-Lightアッセイの受信者動作特性曲線(ROC曲線)を示す。ROC曲線下の領域(AUC)は、診断試験の精度に関する基準である。HM-Methyl-LightアッセイのAUCは、0.85である。

【図12】実施例6のカルシトニン-HM-Methyl-LightアッセイのROC曲線を示す。AUCは0.81である。

【図13】実施例9のパーシカン(Versican)MSP-Methyl-LightアッセイのROC曲線を示す。AUCは0.84である。

【図14】実施例10のTBEF-MSP-Methyl-LightアッセイのROC曲線を示す。AUCは0.80である。

【図15】実施例12のカドヘリン-MSP-Methyl-LightアッセイのROC曲線を示す。AUCは0.94である。

【図16】健康組織と非健康組織の区別を示す。非健康試料片は結腸腺腫または結腸癌腫のいずれかから得た(実施例13)。評価は27個の遺伝子から得た参考となるCpG位

10

20

30

40

50

置を使用して実施した。パーシカン (Versican)、TPEF、EYA4 および H - カドヘリンの遺伝子から得た参考となる CpG 位置をさらに表 3 に記載する。

【図 17】15 個の遺伝子から得た参考となる CpG 位置を使用する健康組織と癌腫組織の区別を示す (実施例 13)。パーシカン (Versican)、TPEF、EYA4 および H - カドヘリンの遺伝子から得た参考となる CpG 位置をさらに表 4 に記載する。

【図 18】40 個の遺伝子から得た参考となる CpG 位置を使用する健康組織と腺腫組織の区別を示す (実施例 13)。パーシカン (Versican)、TPEF、EYA4 および H - カドヘリンの遺伝子から得た参考となる CpG 位置をさらに表 5 に記載する。

【図 19】実施例 11 の TPEF - MSP - Methyl - Light アッセイの ROC 曲線を示す (第 1 試料セット)。AUC は 0.93 である。

10

【図 20】実施例 11 の TPEF - MSP - Methyl - Light アッセイの ROC 曲線を示す (第 2 試料セット)。AUC は 1 である。

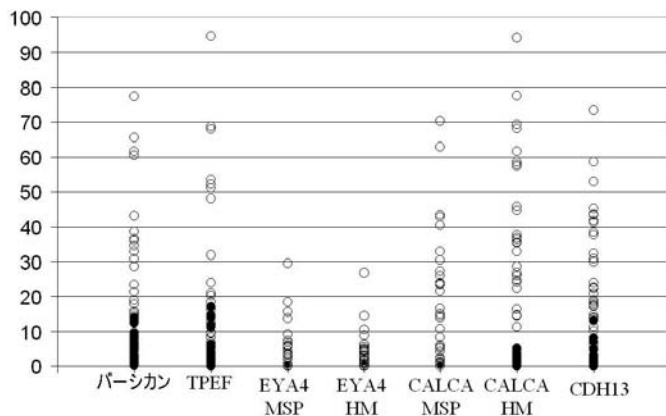
【図 21】実施例 6 の EYA4 - カルシトニン - Heavymethyl - Methyl - Light - 併合アッセイの ROC 曲線を示す。AUC は 0.97 である。

【図 22】Methylight アッセイの MSP および Heavymethyl 変異体を使用する各試料の EYA4 遺伝子内の算出されたメチル化パーセントの回帰プロットを示す。

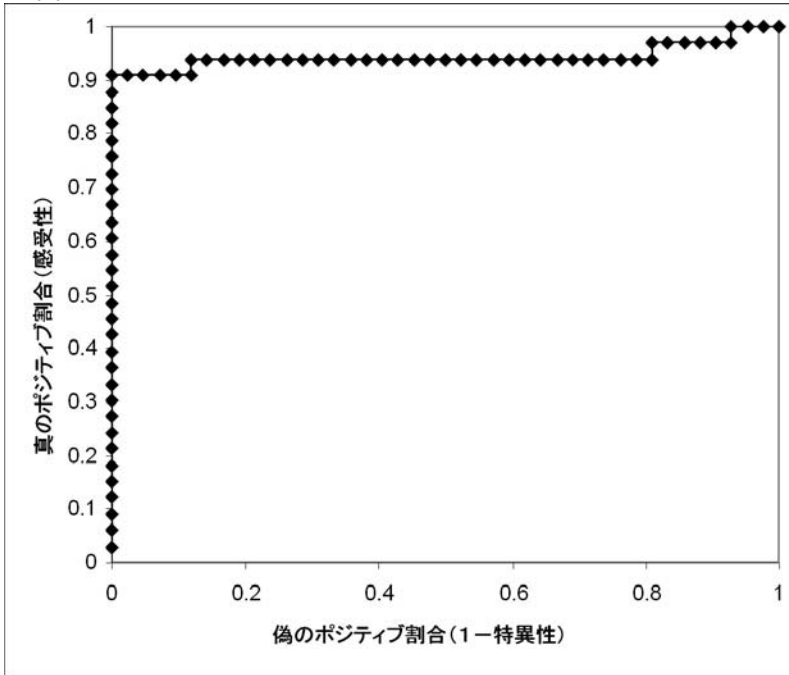
【図 23】Methylight アッセイの MSP および Heavymethyl 変異体を使用する各試料のカルシトニン遺伝子内の算出されたメチル化パーセントの回帰プロットを示す。

20

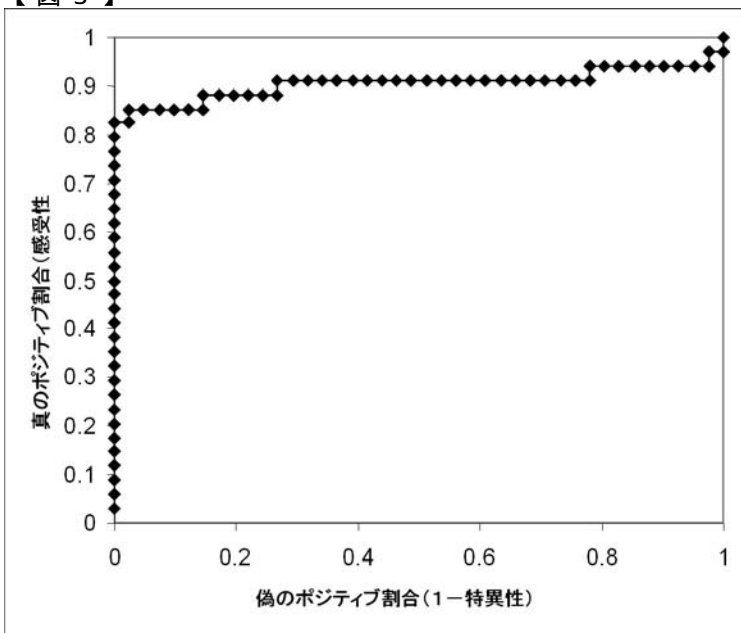
【図 1】



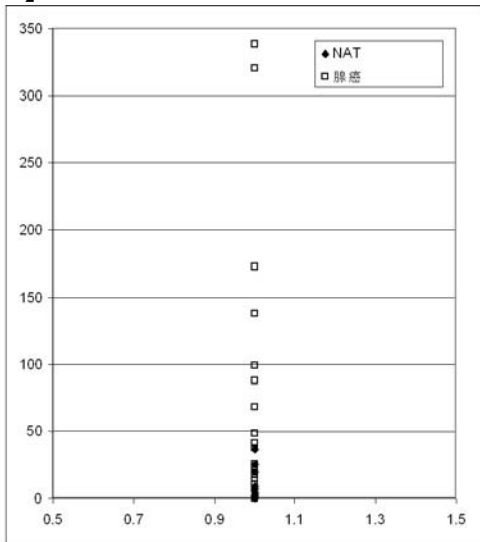
【 図 2 】



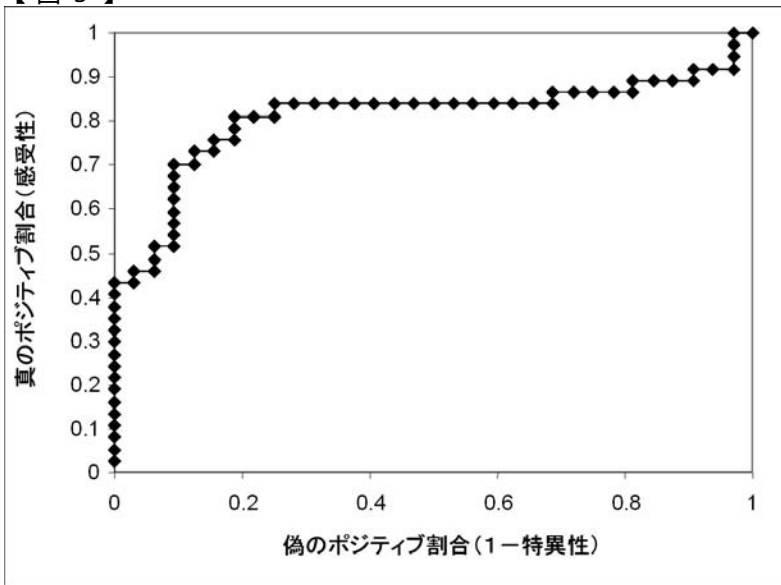
【 図 3 】



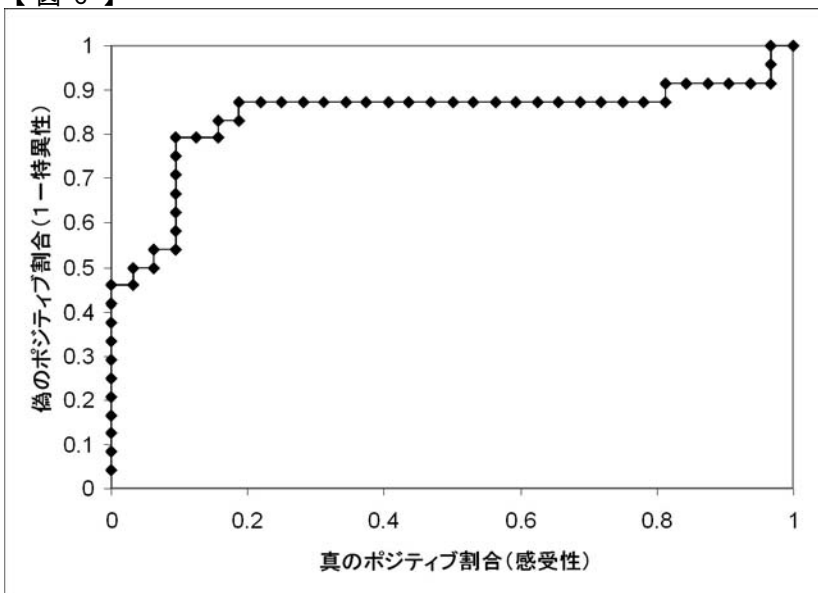
【 図 4 】



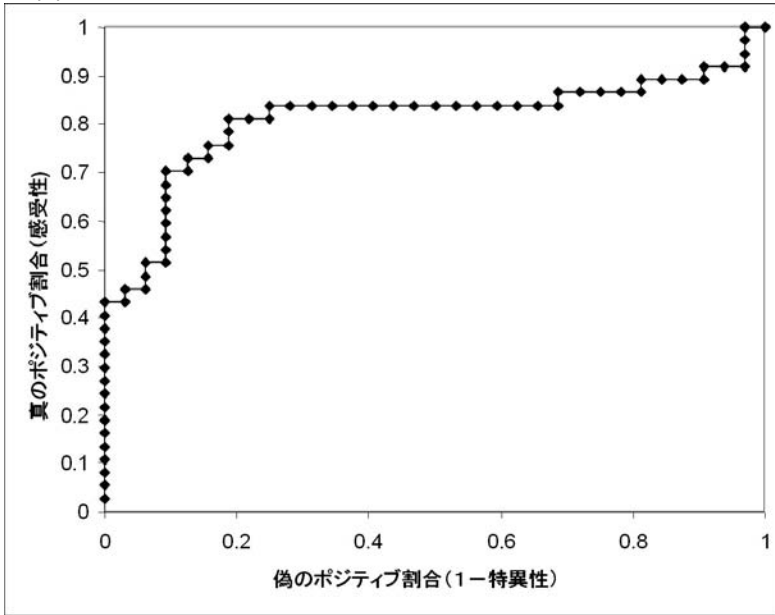
【 図 5 】



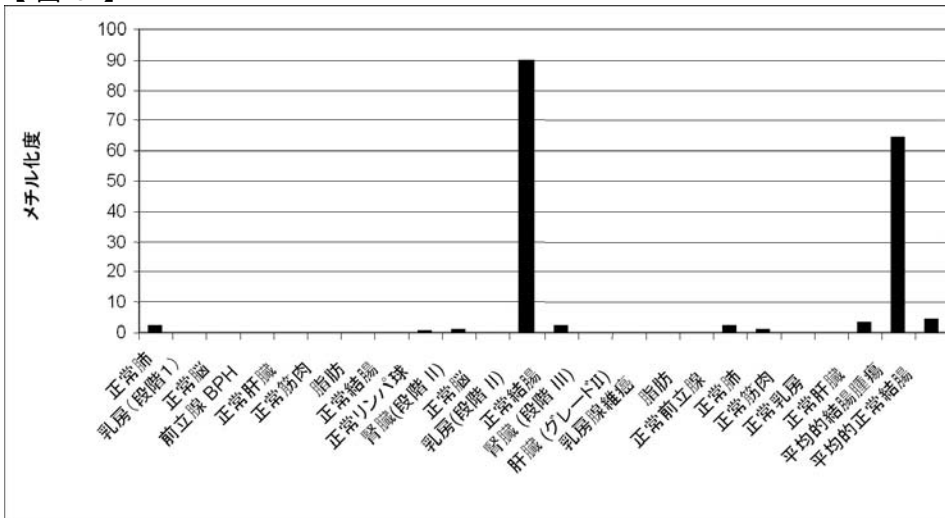
【 図 6 】



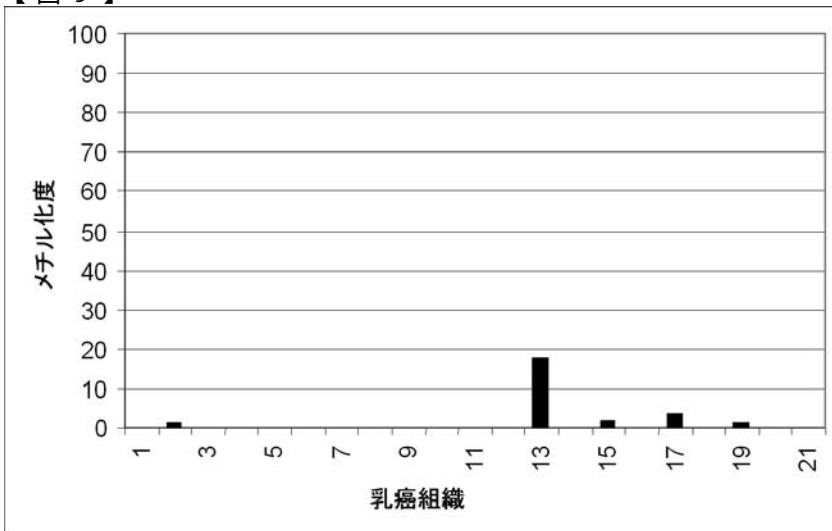
【 図 7 】



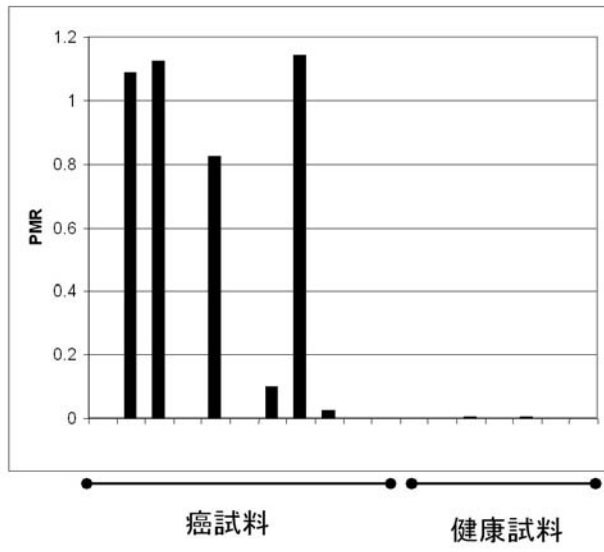
【 図 8 】



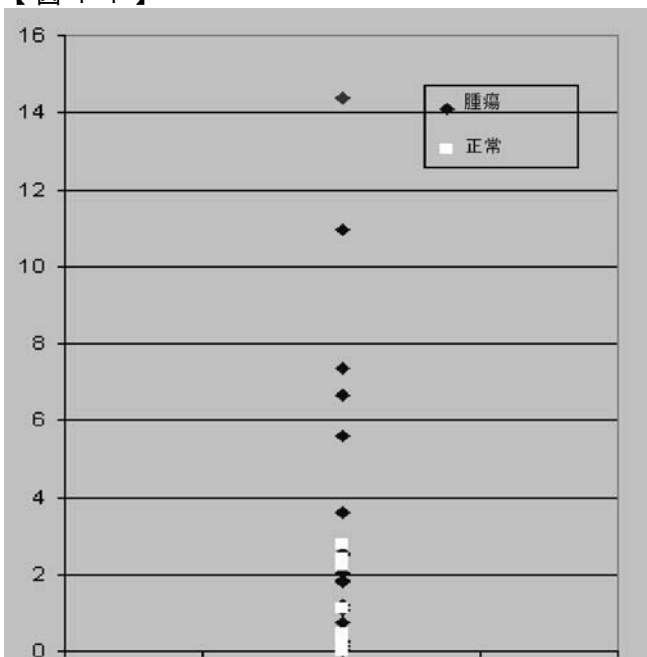
【 図 9 】



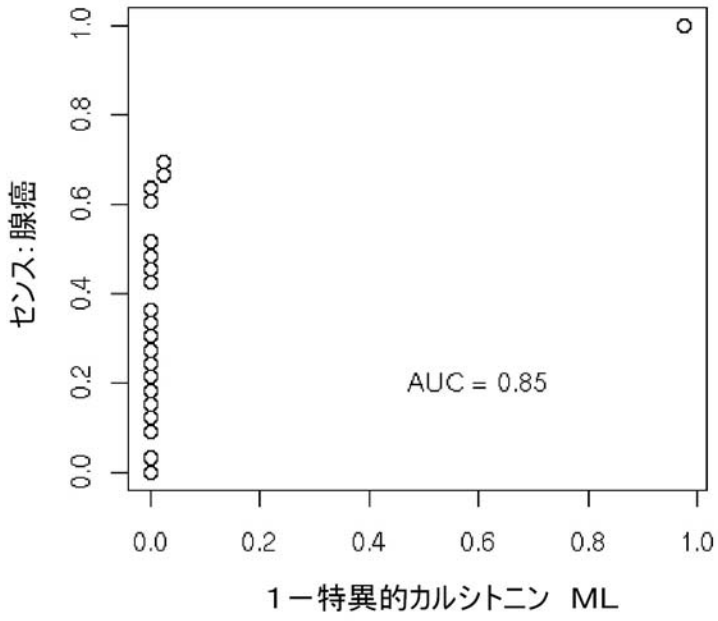
【 図 1 0 】



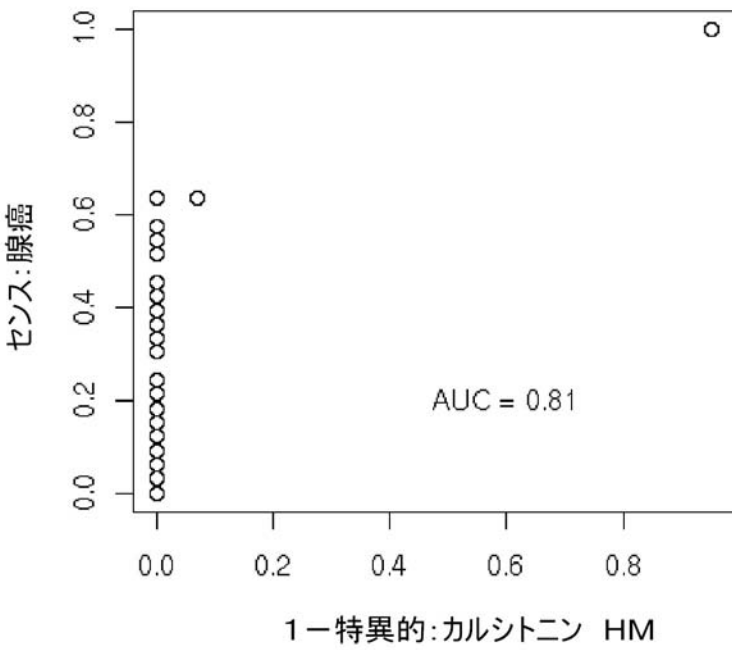
【 図 1 1 】



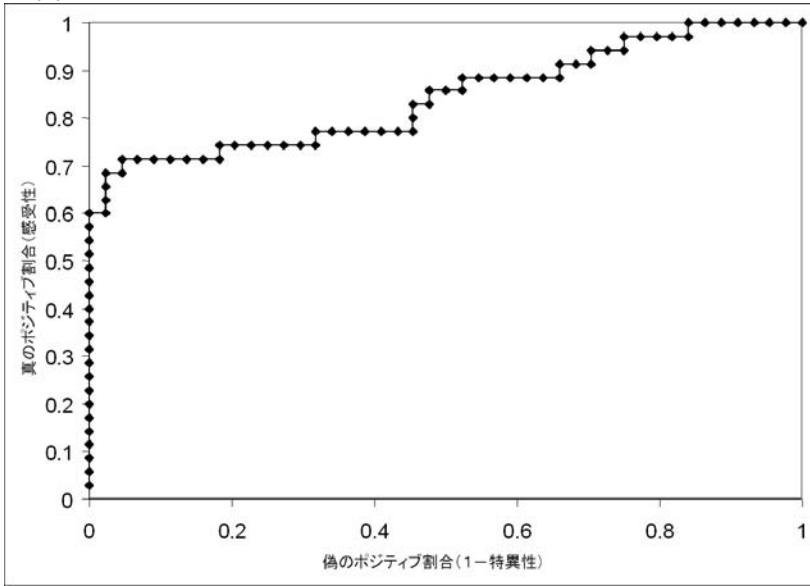
【 図 1 2 】



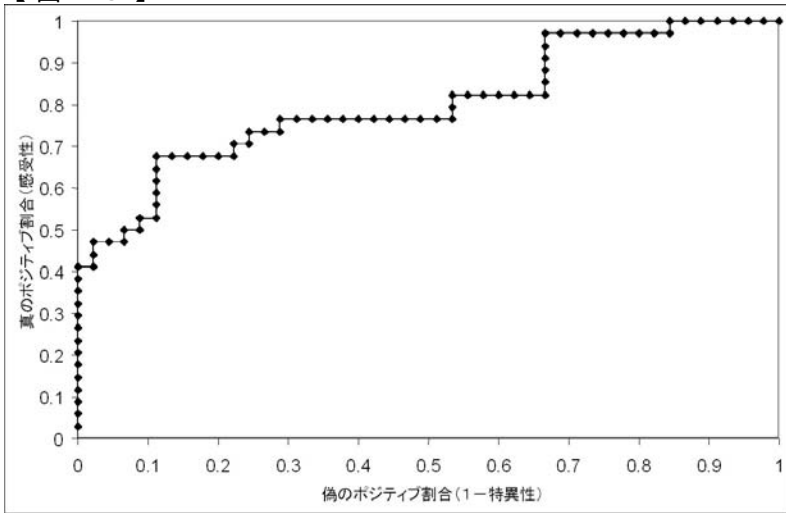
【 図 1 3 】



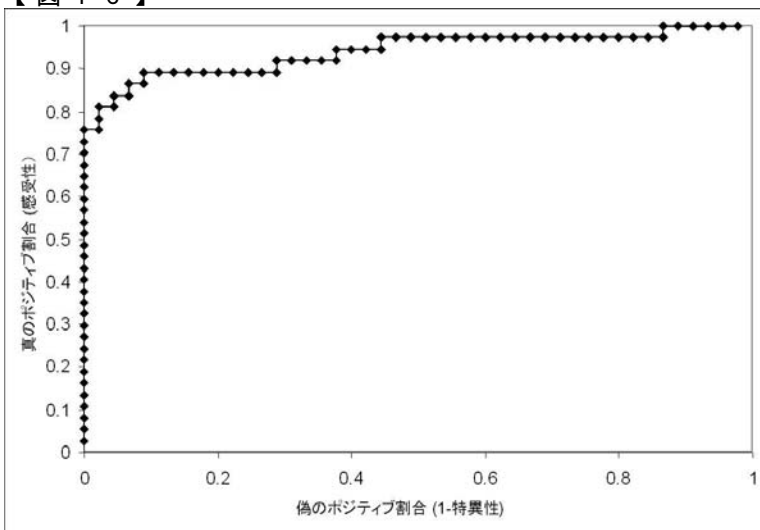
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

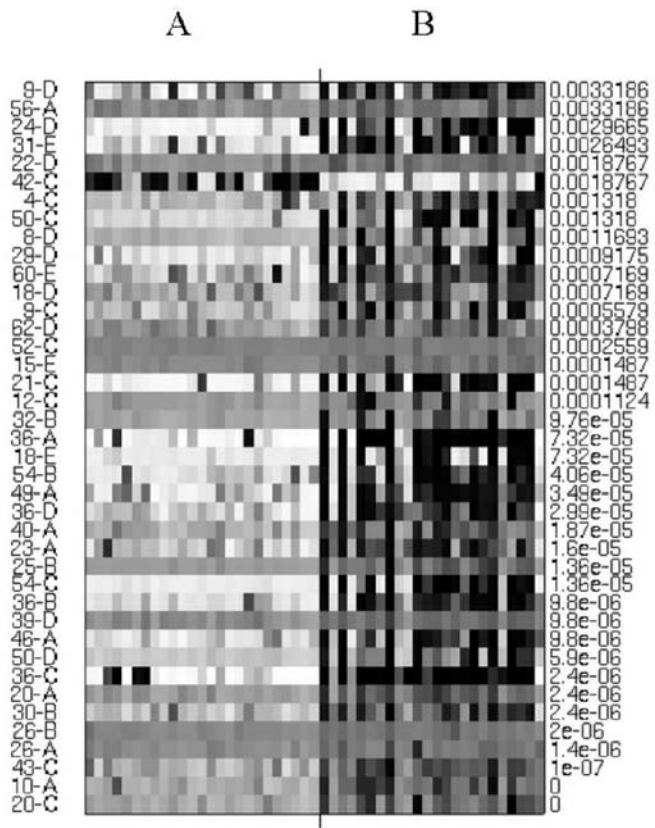


【 図 1 6 】

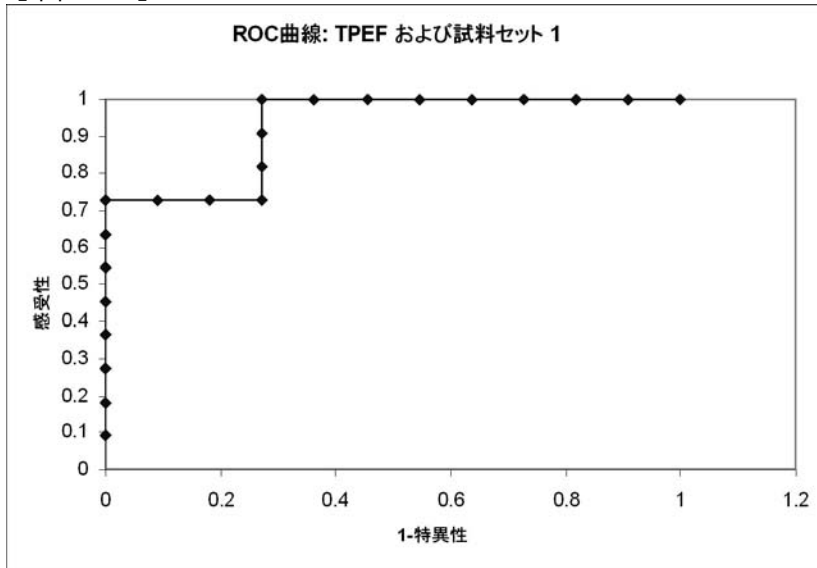




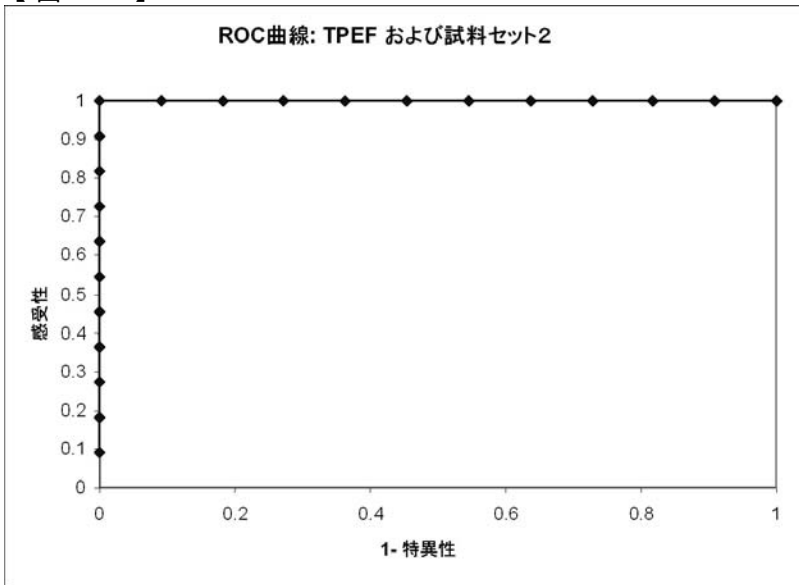
【 図 1 9 】



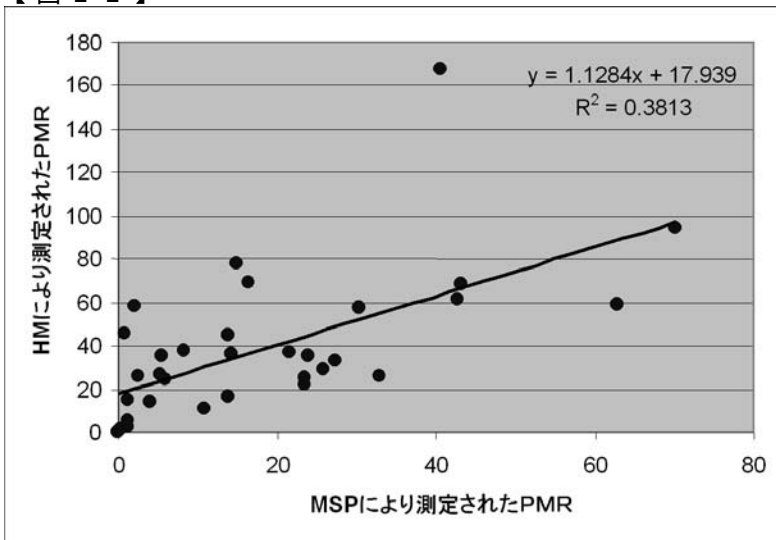
【 図 2 0 】



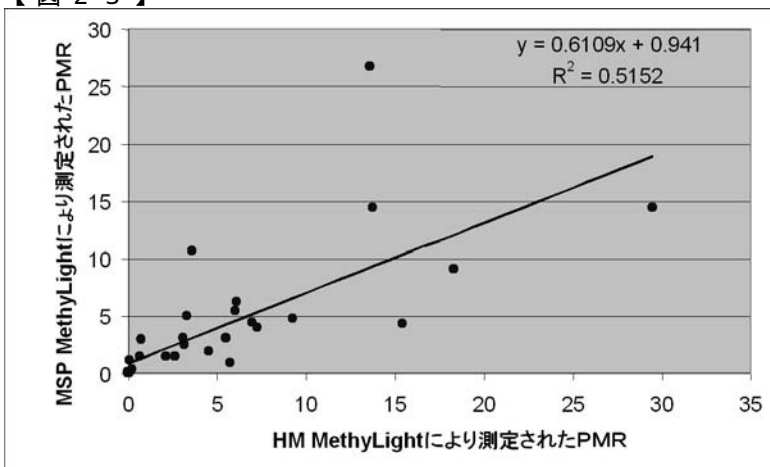
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【配列表】

2005518219000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/02034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HILTUNEN MO ET AL: "HYPERMETHYLATION OF THE WT1 AND CALCITONIN GENE PROMOTER REGIONS AT CHROMOSOME 11P IN HUMAN COLORECTAL CANCER" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 76, no. 9, 1997, pages 1124-1130, XP000979772 ISSN: 0007-0920	1-4, 13-22, 26-32, 34-46, 48-50, 58-60
Y	page 1127 -page 1129; figure 2 --- -/--	23,24, 55,56
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 December 2003	Date of mailing of the international search report 16 JAN 2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gabriëls, J	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 03/02034

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 00928 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 3 January 2002 (2002-01-03)	1-12,58,59
Y	the base sequence of SEQ ID NO: 269 (3540-4030 bp) of W00200928 is 100 % identical to SEQ ID NO:6 between bp 470-965 claims 1-15 the base sequence of SEQ ID NO: 493 of W00200928 is similar to SEQ ID NO:2	5-12,14,15,18,20,23,24,55,56
X	WO 01 68912 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 20 September 2001 (2001-09-20)	1-12,58,59
Y	the base sequence of SEQ ID NO: 17 (3540-4030 bp) of W00200928 is 100 % identical to SEQ ID NO:6 between bp 470-965 claims 1-15	5-12,14,15,18,20,23,24,55,56
X	WO 01 68911 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ;BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK) 20 September 2001 (2001-09-20)	1-12,58,59
Y	SEQ ID NO:17 claims 1-32	5-12,14,15,18,20,23,24,55,56
X	WO 02 074079 A (HECKEL DAVID G ;GAHAN LINDA J (US); UNIV CLEMSON (US)) 26 September 2002 (2002-09-26) primer RintR-F4 of W002074079 comprises a sequence 21 bases in length of SEQ ID N:6 of the present application page 18	1-4
X	US 5 580 722 A (LIECHTFRIED FRANZ E ET AL) 3 December 1996 (1996-12-03) Oligonucleotide primer SEQ ID NO: 84	2-4
X	KUISMANEN SHANNON A ET AL: "Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 22, 26 October 1999 (1999-10-26), pages 12661-12666, XP002255304 Oct. 26, 1999 ISSN: 0027-8424 page 12661, right-hand column page 12663, left-hand column; figure 1	13,16,17,19,21,22,26-31,51-54,57,60
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/02034

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOYOTA MINORU ET AL: "Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 10, 15 May 1999 (1999-05-15), pages 2307-2312, XP002211911 ISSN: 0008-5472	13,16, 17,19, 21,22, 26-31, 51-54, 57,60
Y	the whole document	5-12,14, 15,18, 20,23, 24,55,56
X	WO 00 26401 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 11 May 2000 (2000-05-11)	13,16, 17,19, 21,22, 26-31, 51-54, 57,60
Y	MINT11 is part of SEQ ID NO:2 (Versican gene) of the present application example 3  claim 61	5-12,14, 15,18, 20,23, 24,55,56
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; March 1998 (1998-03) HO COTY ET AL: "Hypermethylation of the versican gene promoter in colorectal tumors" Database accession no. PREV199800197539 XP002265914 abstract & PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 39, March 1998 (1998-03), pages 539-540, 89th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; New Orleans, Louisiana, USA; March 28-April 1, 1998, March, 1998 ISSN: 0197-016X	13
X	WO 02 088381 A (GENOVOXX GMBH ; TCHERKASSOV DMITRI (DE)) 7 November 2002 (2002-11-07) at least 9 or 18 bases in length of SEQ ID NO:8,9,18,19 the whole document	1-4
A	WO 01 07647 A (BERLIN KURT ; EPIGENOMICS AG (DE)) 1 February 2001 (2001-02-01) examples 1-4	1-60
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/02034

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 09183 A (EICHELBAUM MICHEL ;EPIDAUROS (DE); HOFFMEYER SVEN (DE); ROOTS IVAR) 8 February 2001 (2001-02-08) page 2 -page 3; claim 1 ---	1-60
A	WO 91 08230 A (JOLLA CANCER RES FOUND) 13 June 1991 (1991-06-13) the whole document ---	1-60
P,X	WO 03 064700 A (OLEK SVEN ;OLEK ALEXANDER (DE); EPIGENOMICS AG (US)) 7 August 2003 (2003-08-07) the whole document -----	1-60

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/02034**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 61  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,  
no additional fees are to be refunded.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-60 (all partially) with respect to the Versican and Calcitonin gene
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 03 02034

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims 13-57 contain the step of taking a sample from a subject and are therefore directed to a diagnostic method practised on the human/animal body. Notwithstanding this deficiency, the search has been carried out and based on an in vitro diagnostic assay.

---

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 61

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

International Application No. PCT/EP 03 02034

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-60 (partially)

Isolated nucleic acids, nucleic acids, oligomers, peptide nucleic acids, and sets thereof derived from the Calcitonin gene (SEQ ID NO:1,6,..), arrays or kits thereof for the use in methods for detecting, differentiating, distinguishing between colon cell proliferative disorders and normal tissue based on its methylation state.

Invention 2: claims 1-60 (partially)

Isolated nucleic acids, nucleic acids, oligomers, peptide nucleic acids, and sets thereof derived from the Versican gene, arrays or kits thereof for the use in methods for detecting, differentiating, distinguishing between colon cell proliferative disorders and normal tissue based on its methylation state.

Invention 3: claims 1-60 (partially)

Isolated nucleic acids, nucleic acids, oligomers, peptide nucleic acids, and sets thereof derived from the TPEF gene, arrays or kits thereof for the use in methods for detecting, differentiating, distinguishing between colon cell proliferative disorders and normal tissue based on its methylation state.

Invention 4: claims 1-60 (partially)

Isolated nucleic acids, nucleic acids, oligomers, peptide nucleic acids, and sets thereof derived from the H-Cadherin gene, arrays or kits thereof for the use in methods for detecting, differentiating, distinguishing between colon cell proliferative disorders and normal tissue based on its methylation state.

Invention 5: claims 1-60 (partially),

Isolated nucleic acids, nucleic acids, oligomers, peptide nucleic acids, and sets thereof derived from the EYA4 gene, arrays or kits thereof for the use in methods for detecting, differentiating, distinguishing between colon cell proliferative disorders and normal tissue based on its methylation state.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/02034

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200928	A	03-01-2002	DE 10032529 A1	07-02-2002
			AU 4835201 A	24-09-2001
			AU 5038101 A	24-09-2001
			AU 5478801 A	23-10-2001
			AU 5479401 A	23-10-2001
			AU 7566301 A	23-10-2001
			AU 7633001 A	23-10-2001
			AU 7633101 A	23-10-2001
			AU 7637101 A	14-01-2002
			AU 7748701 A	23-10-2001
			AU 7752101 A	14-01-2002
			AU 7765301 A	08-01-2002
			AU 7842001 A	07-11-2001
			AU 7970701 A	14-01-2002
			AU 8391501 A	08-01-2002
			AU 8391601 A	14-01-2002
			AU 8757501 A	08-01-2002
			AU 8757601 A	08-01-2002
			AU 8960001 A	11-12-2001
			AU 8961701 A	08-01-2002
			DE 20121966 U1	20-11-2003
			WO 0168911 A2	20-09-2001
			WO 0168912 A2	20-09-2001
			WO 0177375 A2	18-10-2001
			WO 0177164 A2	18-10-2001
			WO 0177376 A2	18-10-2001
			WO 0177377 A2	18-10-2001
			WO 0181622 A2	01-11-2001
			WO 0192565 A2	06-12-2001
			WO 0177378 A2	18-10-2001
			WO 0176451 A2	18-10-2001
			WO 0202806 A2	10-01-2002
			WO 0202807 A2	10-01-2002
			WO 0200926 A2	03-01-2002
			WO 0200927 A2	03-01-2002
			WO 0200928 A2	03-01-2002
			WO 0202808 A2	10-01-2002
			WO 0200705 A2	03-01-2002
			WO 0202809 A2	10-01-2002
			EP 1283905 A2	19-02-2003
			EP 1268855 A2	02-01-2003
			EP 1268857 A2	02-01-2003
			EP 1272670 A2	08-01-2003
			EP 1278893 A2	29-01-2003
			EP 1274865 A2	15-01-2003
			EP 1274866 A2	15-01-2003
			EP 1294947 A2	26-03-2003
			EP 1360319 A2	12-11-2003
			EP 1297182 A2	02-04-2003
			EP 1358351 A2	05-11-2003
WO 0168912	A	20-09-2001	DE 10013847 A1	27-09-2001
			DE 10019058 A1	20-12-2001
			DE 10032529 A1	07-02-2002
			AU 4835201 A	24-09-2001
			AU 5038101 A	24-09-2001
			AU 5460101 A	24-09-2001
			WO 0168910 A2	20-09-2001

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/02034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0168912	A	WO 0168911 A2	20-09-2001	
		WO 0168912 A2	20-09-2001	
		EP 1283905 A2	19-02-2003	
		EP 1268855 A2	02-01-2003	
		EP 1292707 A2	19-03-2003	
		AU 5478801 A	23-10-2001	
		AU 5479401 A	23-10-2001	
		AU 7384001 A	23-10-2001	
		AU 7566301 A	23-10-2001	
		AU 7633001 A	23-10-2001	
		AU 7633101 A	23-10-2001	
		AU 7748701 A	23-10-2001	
		AU 7842001 A	07-11-2001	
		AU 8960001 A	11-12-2001	
		WO 0177373 A2	18-10-2001	
		WO 0177375 A2	18-10-2001	
		WO 0177164 A2	18-10-2001	
		WO 0177376 A2	18-10-2001	
		WO 0177377 A2	18-10-2001	
		WO 0181622 A2	01-11-2001	
		WO 0192565 A2	06-12-2001	
		WO 0177378 A2	18-10-2001	
		WO 0176451 A2	18-10-2001	
		EP 1268857 A2	02-01-2003	
		EP 1272670 A2	08-01-2003	
		EP 1278892 A1	29-01-2003	
		EP 1278893 A2	29-01-2003	
		EP 1274865 A2	15-01-2003	
		EP 1274866 A2	15-01-2003	
		EP 1360319 A2	12-11-2003	
		EP 1370685 A2	17-12-2003	
		EP 1268861 A2	02-01-2003	
		JP 2003534780 T	25-11-2003	
		JP 2003531589 T	28-10-2003	
		US 2003082609 A1	01-05-2003	
		US 2003162194 A1	28-08-2003	
		US 2003148326 A1	07-08-2003	
		US 2003148327 A1	07-08-2003	
		AU 5057201 A	23-10-2001	
		EP 1268856 A2	02-01-2003	
WO 0177384 A2	18-10-2001			
AU 7637101 A	14-01-2002			
AU 7752101 A	14-01-2002			
WO 0168911	A	20-09-2001	DE 10013847 A1	27-09-2001
			DE 10019058 A1	20-12-2001
			DE 10032529 A1	07-02-2002
			AU 4835201 A	24-09-2001
			AU 5038101 A	24-09-2001
			AU 5460101 A	24-09-2001
			WO 0168910 A2	20-09-2001
			WO 0168911 A2	20-09-2001
			WO 0168912 A2	20-09-2001
			EP 1283905 A2	19-02-2003
			EP 1268855 A2	02-01-2003
			EP 1292707 A2	19-03-2003
			AU 5478801 A	23-10-2001
			AU 5479401 A	23-10-2001

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/02034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168911	A	AU 7384001 A	23-10-2001
		AU 7566301 A	23-10-2001
		AU 7633001 A	23-10-2001
		AU 7633101 A	23-10-2001
		AU 7748701 A	23-10-2001
		AU 7842001 A	07-11-2001
		AU 8960001 A	11-12-2001
		WO 0177373 A2	18-10-2001
		WO 0177375 A2	18-10-2001
		WO 0177164 A2	18-10-2001
		WO 0177376 A2	18-10-2001
		WO 0177377 A2	18-10-2001
		WO 0181622 A2	01-11-2001
		WO 0192565 A2	06-12-2001
		WO 0177378 A2	18-10-2001
		WO 0176451 A2	18-10-2001
		EP 1268857 A2	02-01-2003
		EP 1272670 A2	08-01-2003
		EP 1278892 A1	29-01-2003
		EP 1278893 A2	29-01-2003
		EP 1274865 A2	15-01-2003
		EP 1274866 A2	15-01-2003
		EP 1360319 A2	12-11-2003
		EP 1370685 A2	17-12-2003
		EP 1268861 A2	02-01-2003
		JP 2003534780 T	25-11-2003
		JP 2003531589 T	28-10-2003
		US 2003082609 A1	01-05-2003
		US 2003162194 A1	28-08-2003
		US 2003148326 A1	07-08-2003
		US 2003148327 A1	07-08-2003
		AU 5057201 A	23-10-2001
		EP 1268856 A2	02-01-2003
WO 0177384 A2	18-10-2001		
AU 7637101 A	14-01-2002		
AU 7752101 A	14-01-2002		
WO 02074079	A 26-09-2002	WO 02074079 A2	26-09-2002
		US 2003096983 A1	22-05-2003
US 5580722	A	US 5846720 A	08-12-1998
		US 6376175 B1	23-04-2002
		US 2003166281 A1	04-09-2003
		US 6203976 B1	20-03-2001
		US 5665543 A	09-09-1997
		US 6165712 A	26-12-2000
		US 5976793 A	02-11-1999
		US 6136779 A	24-10-2000
		AT 238431 T	15-05-2003
		AU 660405 B2	29-06-1995
		AU 6140090 A	22-02-1991
		CA 2063822 A1	19-01-1991
		DE 69034061 D1	28-05-2003
		EP 0483249 A1	06-05-1992
		JP 4506902 T	03-12-1992
		WO 9101379 A1	07-02-1991
		US 5863733 A	26-01-1999

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/02034

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0026401	A	11-05-2000	AU 1453700	A 22-05-2000
			CA 2350085	A1 11-05-2000
			EP 1127157	A1 29-08-2001
			JP 2002533061	T 08-10-2002
			WO 0026401	A1 11-05-2000
WO 02088381	A	07-11-2002	DE 10120798	A1 19-12-2002
			WO 02088381	A2 07-11-2002
WO 0107647	A	01-02-2001	DE 19935772	A1 08-02-2001
			AU 6981800	A 13-02-2001
			CA 2378569	A1 01-02-2001
			WO 0107647	A2 01-02-2001
			EP 1204765	A2 15-05-2002
			JP 2003516117	T 13-05-2003
			US 2003032026	A1 13-02-2003
WO 0109183	A	08-02-2001	AU 1131901	A 19-02-2001
			BG 106362	A 30-09-2002
			CA 2376666	A1 08-02-2001
			CZ 20020329	A3 17-07-2002
			EE 200200049	A 15-04-2003
			WO 0109183	A2 08-02-2001
			EP 1232260	A2 21-08-2002
			HU 0201997	A2 28-09-2002
			JP 2003510021	T 18-03-2003
			NO 20020470	A 26-03-2002
			SK 1502002	A3 02-07-2002
			ZA 200200773	A 18-09-2002
			WO 9108230	A
AU 6914591	A 26-06-1991			
WO 9108230	A1 13-06-1991			
WO 03064700	A	07-08-2003	WO 03064700	A2 07-08-2003
			WO 03064701	A2 07-08-2003
			US 2003215842	A1 20-11-2003

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 7 5
	C 1 2 N 15/00	F

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

(72) 発明者 ブルガー, マティアス

ドイツ連邦共和国, 1 0 9 6 7 ベルリン, グレーフェシュトラッセ 7 6

(72) 発明者 マイアー, サピニ

ドイツ連邦共和国, 1 2 1 6 3 ベルリン, マルケルシュトラッセ 6 0

(72) 発明者 レシェ, ラルフ

ドイツ連邦共和国, 1 0 4 3 9 ベルリン, デネンシュトラッセ 1 5

(72) 発明者 コットレル, スーザン

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 0 2, シアトル, エイピーティー. 4 0 2, 2 0 2 6 イ  
ェール エイブイイー. イー.

(72) 発明者 ムーニー, スザンナ

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 5, シアトル, エヌイー, 1 3 7 1 6 ナインティーン  
ス アベニュー

F ターム(参考) 2G054 CA22 CE02 EA03

4B024 AA01 AA12 CA01 CA09 HA12

4B029 AA07 BB20 CC03 FA15

4B063 QA01 QA05 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ43 QR08 QR32 QR56

QR62 QR77 QR82 QS03 QS12 QS25 QS28 QS34 QS39 QX02

QX07

专利名称(译)	用于分析结肠细胞增殖性疾病的方法和核酸		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005518219A</a>	公开(公告)日	2005-06-23
申请号	JP2003571500	申请日	2003-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	外延基因组学公司		
[标]发明人	アドルヤンペーター ブルガーマティアス マイアーサビニ レシエラルフ コットレルスーザン ムーニースザンナ		
发明人	アドルヤン,ペーター ブルガー,マティアス マイアー,サビニ レシエ,ラルフ コットレル,スーザン ムーニー,スザンナ		
IPC分类号	G01N27/62 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/02 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/58 G01N37/00 C12Q1/68		
CPC分类号	A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/6886 C12Q2600/154 Y10T436/143333		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N27/62.V G01N33/53.M G01N33/543.575 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX07		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2002004551 2002-02-27 EP		
其他公开文献	JP2005518219A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于检测基因组DNA的胞嘧啶甲基化状态的寡核苷酸和/或PNA寡聚体的修饰和基因组序列，以及用于确定用于分化的基因的遗传和/或表观遗传参数的方法，结肠细胞增殖性疾病的诊断，治疗和/或监测，或结肠细胞增殖性疾病的易感性。

配列番号	配列番号1～配列番号5の関係	シトシン塩基変換の状態
配列番号1～配列番号5	センス鎖 (バシカン、TPEF、H-カドヘリン、カルシトニンおよびEYA 4およびそれらのプロモーターおよび制御要素)	なし：未処理配列
配列番号6～配列番号16	変換されたメデル化鎖	「C」から「T」へ、しかし「CpG」は「CpG」のままである（CpGの「C」残基はメデル化される）。
配列番号18～配列番号25	変換されたセンス鎖	「C」残基の全てにおいて「C」から「T」へ（CpGの「C」残基の全てがメデル化されていない。）