

(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2005-506057

(P2005-506057A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 M 1/00	C 1 2 Q 1/68 Z	4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 3
GO 1 N 30/88	GO 1 N 30/88 E	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 M	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 136 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-503836 (P2003-503836)	(71) 出願人	503453576 1 3 0 4 8 5 4 オンタリオ・リミテッド カナダ国 オンタリオ州 P 7 B 5 Z 5 サンダー・ベイ, バルモラル・ストリ ート 1 2 9 4, サード・フロア
(86) (22) 出願日	平成14年6月10日 (2002.6.10)	(74) 代理人	100103241 弁理士 高崎 健一
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月10日 (2003.12.10)	(72) 発明者	マーク・バーチ・マキン イギリス国 ニューカッスル・アポン・タ イン NE 3 4 RW ゴスフォース, キングスミア, エンブルホープ・ドライ ブ 5
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/000848		
(87) 国際公開番号	W02002/101086		
(87) 国際公開日	平成14年12月19日 (2002.12.19)		
(31) 優先権主張番号	60/297, 340		
(32) 優先日	平成13年6月11日 (2001.6.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 健康科学のための診断ツールとしての全ミトコンドリアゲノム配列

(57) 【要約】

ミトコンドリアゲノム全体の突然変異の検査が、前立腺がんや非黒色腫皮膚がんのような疾患のための診断システムとして用いられている。ミトコンドリアゲノムにおける点突然変異(トランジション、トランスバージョン)、欠失、逆位、重複、組換え、挿入またはこれらの組合せを含む特徴的な突然変異および再配列が、前立腺がんおよび非黒色腫皮膚がんの初期のインジケータとして用いられている。さらに、4977bp、または他の関連する突然変異および(または)欠失とともに「共通欠失(common deletion)」が、老化の尺度として用いられている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

mtDNAを含む被検体において病気の発生または進行を検出する方法であって、

- a) 被検体から生物学的試料を獲得する工程と、
 - b) 生物学的試料からDNAを取り出す工程と、
 - c) mtDNAの中の突然変異の存在を検出する工程と、
 - d) 生物学的試料のmtDNAをデータベースと比較する工程とを備え、データベースが、病気がないミトコンドリアDNA配列に関連した突然変異のデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる、
- ことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

請求項1の方法であって、

突然変異の存在を検出する工程が、

- a) mtDNAの配列を決定する工程と、
 - b) PCRによってmtDNAを増幅する工程と、
 - c) サザン、ノーザン、ウェスタンおよびサウスウェスタンプロット・ハイブリダイゼーションする工程と、
 - d) HPLCを変性させる工程と、
 - e) マイクロアレイ、遺伝子チップまたはバイオチップにハイブリダイゼーションする工程と、
 - f) 分子マーカー分析と、
 - g) a)ないしf)のいずれかの組合せと、
- からなるグループから選択されている、
- ことを特徴とする方法。

20

【請求項 3】

請求項2の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリアDNAは、病気と関連する既知のバイオマーカーが配置されているミトコンドリアゲノムの特異領域を有している、

ことを特徴とする方法。

30

【請求項 4】

請求項2の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリアDNAがミトコンドリアゲノム全体を有している、

ことを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項1の方法であって、

生物学的試料が、病気の潜在的部位であると疑われる組織からのものである、

ことを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項1の方法であって、

生物学的試料が、転移していると疑われる組織からのものである、

ことを特徴とする方法。

40

【請求項 7】

請求項1において、

病気が前立腺がんおよび非黒色腫皮膚がんのグループから選択されている、

ことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項7において、

病気が前立腺がんである、

ことを特徴とする方法。

【請求項 9】

50

請求項 7 において、
病気が非黒色腫皮膚がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 において、
突然変異が、単一塩基対の突然変異、欠失、挿入およびトランスバージョンのグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 1 において、
突然変異がホモプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 において、
突然変異が任意のレベルのヘテロプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 1 において、
生物学的試料が、血液、唾液、頬の細胞、前立腺液、唾、汗、PAP 頸管組織、尿、皮膚細胞、骨、髪、リンパ組織、頸管塗抹、乳吸引物、おりもの、精液、月経液または生検組織からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 14】

クレーム 1 ないし 13 のいずれかにおいて、
データベースが、少なくとも有意性のある数のミトコンドリア DNA 配列を有しており、
ミトコンドリア DNA 配列が母系および非母系双方の試料から獲得されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 15】

m t DNA を含む被検体において病気の存在を検出する方法であって、
a) 被検体から生物学的試料を獲得する工程と、
b) 生物学的試料から DNA を取り出す工程と、
c) m t DNA 中の突然変異の存在を検出する工程と、
d) 生物学的試料の m t DNA をデータベースと比較する工程とを備え、
データベースが、病気がないミトコンドリア DNA 配列に関連した突然変異のデータと、
病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる、
ことを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 の方法であって、
突然変異の存在を検出する工程が、
a) m t DNA の配列を決定する工程と、
b) PCR によって m t DNA を増幅する工程と、
c) サザン、ノーザン、ウェスタンおよびサウスウェスタンプロット・ハイブリダイゼーションする工程と、
d) HPLC を変性させる工程と、
e) マイクロアレイ、遺伝子チップまたはバイオチップにハイブリダイゼーションする工程と、
f) 分子マーカー分析と、
g) a) ないし f) のいずれかの組合せと、
からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

請求項 16 の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリア DNA は、病気と関連する既知のバイオマーカーが配置されているミトコンドリアゲノムの特異領域を有している、
ことを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 16 の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリア DNA が全ミトコンドリアゲノムを有している、
ことを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 15 の方法であって、

生物学的試料が、病気の潜在的部位であると疑われる組織からのものである、
ことを特徴とする方法。

10

【請求項 20】

請求項 15 の方法であって、

生物学的試料が、転移していると疑われる組織からのものである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 15 において、

病気が前立腺がんおよび非黒色腫皮膚がんのグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

20

【請求項 22】

請求項 21 において、

病気が前立腺がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 21 において、

病気が非黒色腫皮膚がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 15 において、

突然変異が、単一塩基対の突然変異、欠失、挿入およびトランスバージョンのグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

30

【請求項 25】

請求項 15 において、

突然変異がホモプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 15 において、

突然変異が任意のレベルのヘテロプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

40

【請求項 27】

請求項 15 において、

生物学的試料が、血液、唾液、頬の細胞、前立腺液、唾、汗、PAP 頸管組織、尿、皮膚細胞、骨、髪、リンパ組織、頸管塗抹、乳吸引物、おりもの、精液、月経液または生検組織からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 28】

クレーム 15 ないし 27 のいずれかにおいて、

50

データベースが、少なくとも有意性のある数のミトコンドリアDNA配列を有しており、ミトコンドリアDNA配列が母系および非母系双方の試料から獲得されている、ことを特徴とする方法。

【請求項29】

ミトコンドリアDNA配列の突然変異によって示される病気素質または機能障害素質を決定する方法であって、

- a) 被検体から生物学的試料を獲得する工程と、
 - b) 生物学的試料からDNAを取り出す工程と、
 - c) mtDNAの中の突然変異の存在を検出する工程と、
 - d) 生物学的試料のmtDNAをデータベースと比較する工程とを備え、
- データベースが、病気の無いミトコンドリアDNA配列に関連した突然変異のデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる、ことを特徴とする方法。

10

【請求項30】

請求項29の方法であって、

突然変異の存在を検出する工程が、

- a) mtDNAの配列を決定する工程と、
 - b) PCRによってmtDNAを増幅する工程と、
 - c) サザン、ノーザン、ウェスタンおよびサウスウェスタンブロット・ハイブリダイゼーションする工程と、
 - d) HPLCを変性させる工程と、
 - e) マイクロアレイ、遺伝子チップまたはバイオチップにハイブリダイゼーションする工程と、
 - f) 分子マーカー分析と、
 - g) a)ないしf)のいずれかの組合せと、
- からなるグループから選択されている、ことを特徴とする方法。

20

【請求項31】

請求項30の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリアDNAは、病気と関連する既知のバイオマーカーが配置されているミトコンドリアゲノムの特異領域を有している、ことを特徴とする方法。

30

【請求項32】

請求項30の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリアDNAが全ミトコンドリアゲノムを有している、ことを特徴とする方法。

【請求項33】

請求項29の方法であって、

生物学的試料が、病気の潜在的部位であると疑われる組織からのものである、ことを特徴とする方法。

40

【請求項34】

請求項29の方法であって、

生物学的試料が、転移していると疑われる組織からのものである、ことを特徴とする方法。

【請求項35】

請求項29において、

病気が前立腺がんおよび非黒色腫皮膚がんのグループから選択されている、ことを特徴とする方法。

【請求項36】

請求項35において、

50

病気が前立腺がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 37】

請求項 35 において、
病気が非黒色腫皮膚がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 38】

請求項 29 において、
突然変異が、単一塩基対の突然変異、欠失、挿入およびトランスバージョンのグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

10

【請求項 39】

請求項 29 において、
突然変異がホモプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 40】

請求項 29 において、
突然変異が任意のレベルのヘテロプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 41】

請求項 29 において、
生物学的試料が、血液、唾液、頬の細胞、唾、前立腺液、汗、乳吸引物、おりもの、精液、PAP 頸管組織、尿、皮膚細胞、骨、髪、リンパ組織、おりもの、頸管塗抹または生検組織からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

20

【請求項 42】

クレーム 29 ないし 41 のいずれかにおいて、
データベースが、少なくとも有意性のある数のミトコンドリア DNA 配列を有しており、
ミトコンドリア DNA 配列が母系および非母系双方の試料から獲得されている、
ことを特徴とする方法。

30

【請求項 43】

ヒト検体の老化の進行状態を査定する方法であって、
a) ヒト検体から生物学的試料を獲得する工程と、
b) 生物学的試料から DNA を取り出す工程と、
c) mtDNA 中の突然変異の存在を検出する工程と、
d) 生物学的試料の mtDNA をデータベースと比較する工程とを備え、
データベースが、病気がないミトコンドリア DNA 配列に関連した突然変異のデータと、
病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる、
ことを特徴とする方法。

40

【請求項 44】

請求項 43 の方法であって、
突然変異の存在を検出する工程が、
a) mtDNA の配列を決定する工程と、
b) PCR によって mtDNA を増幅する工程と、
c) サザン、ノーザン、ウェスタンおよびサウスウェスタンプロット・ハイブリダイゼーションする工程と、
d) HPLC を変性させる工程と、
e) マイクロアレイ、遺伝子チップまたはバイオチップにハイブリダイゼーションする工程と、
f) 分子マーカー分析と、

50

g) a) ないし f) のいずれかの組合せと、
からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 45】

請求項 43 の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリア DNA は、病気と関連する既知のバイオマーカーが配置
されているミトコンドリアゲノムの特異領域を有している、
ことを特徴とする方法。

【請求項 46】

請求項 43 の方法であって、

配列が決定されるミトコンドリア DNA が全ミトコンドリアゲノムを有している、
ことを特徴とする方法。

10

【請求項 47】

請求項 43 において、

突然変異が、単一塩基対の突然変異、欠失、挿入およびトランスバージョンのグループか
ら選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 48】

請求項 43 において、

突然変異がホモプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

20

【請求項 49】

請求項 43 において、

突然変異が任意のレベルのヘテロプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 50】

請求項 43 において、

生物学的試料が、血液、唾液、頬の細胞、唾、前立腺液、汗、PAP 頸管組織、尿、皮膚
細胞、骨、髪、リンパ組織、頸管塗抹、おりもの、乳吸引物、精液、月経液または生検組
織からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

30

【請求項 51】

クレーム 43 ないし 50 のいずれかにおいて、

データベースが、少なくとも有意性のある数のミトコンドリア DNA 配列を有しており、
ミトコンドリア DNA 配列が母系および非母系双方の試料から獲得されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 52】

複数のヒトミトコンドリア DNA 配列を有するデータベースであって、

ミトコンドリア DNA 配列が、病気のない状態と関連する正常な制御配列と、病気の存在
と関連する配列または病気素質を示す配列とからなるグループから選択されている、
ことを特徴とするデータベース。

40

【請求項 53】

請求項 52 において、

病気が前立腺がんおよび非黒色腫皮膚がんのグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 54】

請求項 52 において、

ミトコンドリア DNA 配列が、ヒト検体の老化のプロセスと関連している、
ことを特徴とする方法。

【請求項 55】

50

クレーム 53 または 54 において、データベースが、有意性のある数のミトコンドリア DNA 配列を有しており、ミトコンドリア DNA 配列が母系および非母系双方の試料から獲得されている、ことを特徴とする方法。

【請求項 56】

病気の診断のためのキットであって、使い捨てのチップと、マイクロアレイと、使い捨てチップを保持する手段と、ミトコンドリア DNA を取り出す手段と、ミトコンドリア DNA 配列のデータベースにアクセスするための手段とを備えた、病気の診断のためのキット。

10

【請求項 57】

病気素質を決定するためのキットであって、使い捨てのチップと、マイクロアレイと、使い捨てチップを保持する手段と、ミトコンドリア DNA を取り出す手段と、ミトコンドリア DNA 配列のデータベースにアクセスするための手段とを備えた、病気素質を決定するためのキット。

【請求項 58】

複数の核酸要素と固形基質を有するアレイであって、各核酸要素が病気の存在を示すとともに、ミトコンドリア DNA とミトコンドリア DNA から転写された RNA とからなるグループから選択されており、各核酸要素がアレイ上で特有の位置を有しており、固形基質に安定して結合している、ことを特徴とするアレイ。

20

【請求項 59】

請求項 58 において、各核酸要素が前立腺がんを示している、ことを特徴とするアレイ。

【請求項 60】

請求項 58 において、各核酸要素が非黒色腫皮膚がんを示している、ことを特徴とするアレイ。

30

【請求項 61】

複数の核酸要素と固形基質を有するアレイであって、各核酸要素が病気素質を示すとともに、ミトコンドリア DNA とミトコンドリア DNA から転写された RNA と cDNA とからなるグループから選択されており、各核酸要素がアレイ上で特有の位置を有しており、固形基質に安定して会合している、ことを特徴とするアレイ。

【請求項 62】

請求項 58 において、各核酸要素が病気素質を示している、ことを特徴とするアレイ。

40

【請求項 63】

請求項 58 において、各核酸要素が老化のプロセスと関係している、ことを特徴とするアレイ。

【請求項 64】

患者の病気を診断する方法であって、ミトコンドリア DNA から得られた核酸試料を、固形基質と複数の核酸要素を有するアレイにハイブリダイゼーションする工程を備え、各核酸要素が病気の存在を示しており、各核酸要素が特有の位置を有するとともに固形基質に安定して結合しており、アレイを有する一つまたはそれ以上の核酸要素への核酸試料のハイブリダイゼーションが、病気の存在

50

を示している、
ことを特徴とする方法。

【請求項 65】

請求項 64 において、
病気が前立腺がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 66】

請求項 65 において、
前立腺液試料を患者から分離する工程をさらに備えた、
ことを特徴とする方法。

10

【請求項 67】

請求項 65 において、
前立腺液試料から核酸試料を用意する工程をさらに備えた、
ことを特徴とする方法。

【請求項 68】

患者の非黒色腫皮膚がんを診断する方法であって、
ミトコンドリア DNA から得られた核酸試料を、固形基質と複数の核酸要素を有するアレイにハイブリダイゼーションする工程を備え、各核酸要素が非黒色腫皮膚がんを示しており、各核酸要素が特有の位置を有するとともに固形基質に安定して結合しており、アレイを有する一つまたはそれ以上の核酸要素への核酸試料のハイブリダイゼーションが、非黒色腫皮膚がんの存在を示している、
ことを特徴とする方法。

20

【請求項 69】

請求項 68 において、
皮膚試料を患者から分離する工程をさらに備えた、
ことを特徴とする方法。

【請求項 70】

請求項 69 において、
皮膚試料から核酸試料を準備する工程をさらに備えた、
ことを特徴とする方法。

30

【請求項 71】

mt DNA を含む被検体においてヘテロプラスミーを検出する方法であって、
a) 被検体から生物学的試料を獲得する工程と、
b) 生物学的試料から DNA を取り出す工程と、
c) 試料上の HPLC を変性させる工程と、
を備えた方法。

【請求項 72】

mt DNA を含む被検体において病気と関連する突然変異を検出するための方法であって、
a) 被検体から生物学的試料を獲得する工程と、
b) 生物学的試料から DNA を取り出す工程と、
c) mt DNA 中の突然変異の存在を検出する工程と、
d) 生物学的試料の mt DNA をデータベースと比較する工程とを備え、
データベースが、病気のない共通集団のバリエーションのデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる、
ことを特徴とする方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミトコンドリアゲノムの分野に関する。とくに、本発明は、ミトコンドリアゲ

50

ノムの突然変異に関するとともに、疾患のほんの初期の段階におけるそのインジケータとしての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

生物科学における最近の大きな流れは、ヒトのゲノムプロジェクトであり、そのデータの商業的利用である。しかしながら、データが個人のレベルにおいて特定のなものではないため、この情報の使用および提供には例外的な制限がある。信じられないほどに、データはほんの少数の個人からのものであり、ヒトの集団に存在する変化をほとんど表しておらず、データを一般的な適用にのみ有用なものにしている。ヒトのゲノムの驚くほどの複雑さは、個人ベースへの適用を実行不可能なものにしている。ヒト一人の核のゲノムの配列を完全に決定するために、米国のエネルギー省および国家保健研究所は、1988年以来25億ドルを投資している (<http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html>)。 10

【0003】

ミトコンドリアゲノム

ミトコンドリアゲノムは、コンパクトだが重要な核酸配列である。ミトコンドリアゲノムは、細胞呼吸に必要な酵素のサブユニットをコードする。ミトコンドリアDNAつまりmtDNAは、33億塩基対 (base pairs: bp Andersonら(1981); Andrewsら(1999)) の巨大な核ゲノムに比べて、16,569塩基対において核酸の非常に小さなゲノムである。その遺伝補体 (genetic complement) は、その核細胞の相手の遺伝補体よりも天文学的に小さい (0.0005%)。しかしながら、連絡つまり化学的シグナルは、日常的に発生している (S herrattら(1997))。さらに、特定の核成分は、ミトコンドリア配列の維持および保持に対して責任がある。潜在的な疾患を示す核の再配列によってこれらの核領域が機能しなくなったとき、mtDNA配列に突然変異が現れ始める。また、特定のミトコンドリアが、ミトコンドリアゲノムにおける体細胞突然変異によって誘発される欠失による細胞内破壊のために認定されるかもしれない。このような理論的なメカニズムは、これから発症しようとする病気の徴候として役立つかもしれない。ミトコンドリアを作成するのに、約3,000の遺伝子が必要であるが、これらのうちのたった37個がミトコンドリアゲノムによってコードされており、このことは、遺伝子座に対するミトコンドリアのかなりの依存性を示している (Naviaux(1997))。 20

【0004】

mtDNAの本質的な役割は、細胞代謝を燃焼させる細胞燃料であるアデノシン三リン酸 (ATP) の生成である。重要なことに、ミトコンドリアゲノムは、その重要な機能に必要な酸化・還元反応を達成するために、ミトコンドリアゲノムによって供給された13のポリペプチドに加えて (Leonard and Shapira(1997))、核コードされた70のタンパク質に依存している。種々の組織および器官が、異なる程度で酸化的リン酸化反応に依存している。さらに、ミトコンドリアゲノムの突然変異は、種々の慢性変性疾患に関係している (Gattermannら(1995))。欠陥酸化的リン酸化反応 (OXPHOS) に関連する疾患は、mtDNAの突然変異に関連していると考えられている (Byrne(1992))。したがって、mtDNAの突然変異の激しさが増すことによりOXPHOSが減少するにつれて、種々の臨床的表現型を引き起こす、器官特有のエネルギー閾値が超えられることになる。 40

【0005】

最近、フリス (Fliss) ら (2000) は、肺がんおよび膀胱がんからの第1期腫瘍において本来著しくホモプラスミーであったmtDNA突然変異の高周波が、突然変異mtDNAががん細胞において支配的であったことを示していることを発見した。点突然変異および欠失は、ミトコンドリアゲノムおよび膜に対して酸素のフリーラジカルによる障害であるところの、プログラムされていないが避けられない副作用であると考えられている (Miquelら(1992))。ミトコンドリアゲノムが防御ヒストンを有していないばかりか、ミトコンドリアの酸素発生内膜の近傍で酸化損傷の影響を受けやすいので、このような理論は一応妥当性がある。さらに、mtDNAがコンパクトなゲノムを有しており、イントロンを有していないので、有毒な事象が、生化学的機能障害に帰着することになるコード配列に影 50

響を与えやすくなる。この機能障害は、m t D N A 損傷のみならず核損傷につながる細胞酸化作用をさらに増加させ、これにより、細胞が癌進行状態に入る可能性を増加させる (Pentaら (2001))。この点において、研究は、年齢の増加とともに m t D N A の損傷が増加し (Cortopassi & Wang 1955)、それに続いて、いつかは起こる細胞死につながるようになる呼吸機能の低下が生じる (Miquelら (1992)) ということを示している。

【0006】

診断ツールとしての m t D N A

m t D N A 配列の成長過程は、重要な診断ツールである。m t D N A の突然変異は、核の突然変異と関係していることが多いが、病気の症状を示す予備的なインジケータとしてしばしば用いられており、以下のような病気 (これらには限定されないが) に関連するバイオマーカーとして作用している。すなわち、組織損傷、(直接)喫煙および間接喫煙による癌 (Leeら (1998); Wei (1998))、20歳の頃に始まってその後増加するミトコンドリアゲノム突然変異の蓄積に基づいた寿命 (von Wurmb (1998))、発がん物質、変異原または紫外線にさらされることによるまたは突然変異により生じる転移性疾患 (Birch-Machin (2000))、骨関節症、心臓血管障害、アルツハイマー病、パーキンソン病 (Shoffnerら (1993); Sherrattら (1997); Zangら (1998))、年齢に関係した難聴 (Seidmanら (1997))、視神経の変性および心拍不整 (Brownら (1997); Wallaceら (1988))、慢性進行性眼球突出症 (Taniikeら (1992))、粥状硬化症 (Boglioloら (1999))、乳頭状甲状腺がんおよび甲状腺腫瘍 (Yehら (2000))、ならびにその他の病気 (例: Naviaux (1997); Chinnery および Turnbull (1997))。

10

20

【0007】

とくに、これらの変性は、点突然変異 (トランジション、トランスバージョン)、欠失 (一つの塩基から何千もの塩基への)、逆位、重複 (一つの塩基から何千もの塩基への)、組換え、挿入 (一つの塩基から何千もの塩基への) を含んでいる。また、特定の塩基対の変性、欠失または結合が、前立腺がん、皮膚がんおよび肺がんの早期発症ばかりでなく、老化 (例: Polyakら (1998))、早期老化、発がん物質にさらされること (Leeら (1998)) などと関係している。

【0008】

m t D N A は卵を介してのみ子孫に伝えられるので、この遺伝手段を通じてミトコンドリア配列を理解するのは重要なことである。m t D N A の配列は、母系の血族間で広汎に変化する (Wardら (1991))。したがって、病気に関連した突然変異は、この変化と比較して明確に理解されなければならない。たとえば、特定の癌に関連して、何人かの個人の配列に見られる特定の T から C へのトランジションは、実際には、特定の地理的領域に広まったつまり民族性に関連した、母系の血族における自然の変化であろう。たとえば、先住北アメリカ人は、異常に高い頻度で大人が糖尿病を発症する。また、すべての北米先住民は、A, B, C, D および X で表される五つの基本的な母系血族によって、一般に特徴付けられている (Schurrら (1990); Stone および Stoneking (1993); Smithら (1999))。血族 A は、ミトコンドリアゲノムの 663 bp (塩基対) において部位 Hae III に帰着することになる単純点突然変異によって識別される。しかしながら、この突然変異と成人の糖尿病発症との間に原因となる関係はなかった。また、血族集団内においてさえ、配列変性が存在する。

30

40

【0009】

特定の血族に関連した特定のマーカーの外側には、人の集団における配列の変性よりももっと多く人の集団における変性がある (Eastonら (1996); Wardら (1991, 1993))。このような相違は、病気が関連した突然変異の最適な識別のために理解されなければならない。したがって、縦構造の力を真似する (つまり、被験者が実質的な時間にわたって追跡する) 母系研究のアプローチ (Parsonsら (1997)) が、病気との関連を持たない突然変異と対照的であるところの、病気と直接関連する突然変異を識別するのに用いられなければならない。さらに、タバコの間接喫煙、低レベルのアスベスト、鉛、すでに知られておりかつ多くの環境で低レベルのすべての突然変異原のような特定の物質が、特定の点突然変異の

50

原因となるかもしれないが、必ずしも病気に特異性のあるマーカーではない。したがって、実質的な m t D N A 配列データベースが、自然な進行過程としてのまたは作用因子にさらされることによる潜在的な病気を正確に予測するための明確な必要条件である。さらに、分子全体の配列が、そのすべての情報量のために決定されなければならない。点突然変異（トランジション、トランスバージョン）、欠失（一つの塩基から何千もの塩基への）、逆位、重複（一つの塩基から何千もの塩基への）、組換えおよび挿入（一つの塩基から何千もの塩基への）のすべてが、全ミトコンドリアゲノムにわたって全体として特徴付けられなければならない。これにより、ミトコンドリアゲノムにおいて利用可能なすべての情報を捕捉することが保証される。細胞質ミトコンドリアゲノム（16,569bp）は、核の場合と同様に、個人レベルでは、その配列が決定されたが、ミトコンドリアゲノムは、診断ツールとしての使用のために、集団レベルではその配列が決定されていない。

【0010】

最近、ミトコンドリアは、アポトーシスおよび腫瘍生物学の他の局面における役割ゆえに、発がん性の進行過程において密接に結び付けられてきた（Green & Reed(1998); Pentara(2001)）。とくに、m t D N A の体細胞突然変異は、多くのヒトの腫瘍で観察されてきた（Habanoら(1998); Polyakら(1998); Tamuraら(1999); Flissら(2000)）。これらのうち後者の発見は、特定の m t D N A 突然変異がホモプラスミーであると見られるという主張によって、より興味深いものとされた（Habanoら(1998); Polyakら(1998); Flissら(2000)）。また、研究者らは、紫外線照射（U V）が非黒色腫皮膚がん（N M S C）の病因および進行に重要であり（Weinstock(1998); Rees(1998)）、U V がヒトの皮膚において m t D N A の損傷を誘発する（Birch-Machin(2000a)）ということを見出した。

【0011】

さらに、時間の経過により、ミトコンドリア配列は全体性を失う。たとえば、4977bpの欠失は、年齢とともに増加する（Fahnら(1996)）。20歳のときに始まって、この欠失は、少数のミトコンドリアにおいて発生し始める。80歳までに実質的な数の分子が欠失された。この欠失は、標準的な老化のプロセスを特徴付けており、そのようなものとして、このプロセスのバイオマーカーとして機能する。このような老化プロセスの定量化は、プロセスの進行を遅くするための医用またはその他の処置を可能にするかもしれない。

【0012】

m t D N A は、主に集団遺伝学のツールとして、最近では法医学のツールとして、用いられてきたので、ミトコンドリアゲノムの薬への適用は見過ごされてきた。しかしながら、m t D N A の情報量が医用診断の分野に実質的に適用されていることがますます明らかになってきている。さらに、最近、大容量で多量処理のロボット D N A シークエンサーシステムが出現するまで、m t D N A のすべての補体の配列を決定することは骨の折れる仕事であった。また、集団遺伝学は、制御領域において大きく変化した二つの地域から重要なデータを集めることができたが、これらの小さな地域は、ゲノム全体の10%以下という小さな部分を代表しており、このことは、データのうちの分析力を有する90%が使用されないということの意味している。重要なことではあるが、病気に関連した多くの変性は、制御領域の外側にある。ゲノム全体の特性は、正確でかつ高度に分析力のある診断のためには、すべての配列情報を含むようにみなされるべきである。

【0013】

非黒色腫皮膚がん

ヒトの非黒色腫皮膚がん（N M S C）は、多くのコーカソイド人にもっともよく発生する癌である（Weinstock(1998); Rees(1998)）。これらの腫瘍の大部分は、基底細胞癌（B C C）および扁平上皮癌（S C C）である。B C C は、局部的に浸潤性があり、著しいうつ状態を生じさせるがめったに転移しない。S C C は、著しい転移の可能性を示し、免疫抑制された患者における多発性 N M S C の発生は、重大な処置問題を生じさせる（Rees(1998)）。B C C にとって予め悪性の損傷は臨床的には何ら認定されていないが、S C C の中には、前駆体損傷、すなわち化学線角化症（A K）またはボーエン病（in situ 癌）（Rees(1998)）の領域から生じると考えられているものもある。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

S C C は、いくつかの腫瘍抑制因子の発達中の関与を示唆するいくつかの染色体に影響を与えるヘテロ接合体の損失を示す。興味深いことに、A K においては、S C C と比べて、同程度のまたは大きな遺伝的損失が前駆体において観察される (Rehmanら (1994); Rehmanら (1996))。このことは、提案された発明においては重要なことである。というのは、腫瘍抑制因子の不活性化に加えて、他の機構が S C C の発達に含まれていそうだとすることを示唆しているからである。

【 0 0 1 5 】

腫瘍形成におけるミトコンドリアの役割は、当初、腫瘍細胞が呼吸系傷害および高解糖作用を有していることが発見されたときに仮定されたものである (Shay & Werbin (1987))。結腸がん (Penta (2001) により再調査された Habanoら (1998); Polyakら (1998))、膀胱、首、肺の第 1 期腫瘍 (Flissら (2000))、および胃の腫瘍 (Tamuraら (1999)) におけるホモプラスミー m t D N A 突然変異の高い発生率とともに、Green & Reed (1998) におけるミトコンドリアの役割を明らかにする最近の発見は、このような仮定をさらに支持するものである。さらに、これらのミトコンドリア突然変異が、高い分裂誘発性を有していることが示された活性酸素種 (R O S) のレベルに影響を与えるかもしれないということが指摘された。

【 0 0 1 6 】

本願の発明者その他による過去の研究は、m t D N A の突然変異およびこれに関連したミトコンドリアの機能障害がヒトの変性疾患の重要な一因となっていることを示した (Birch-Machinら (1993); Chinneryら (1999); Birch-Machinら (2000b))。これは、保護ヒストンの欠如に関連して細胞器官に生じた多量の R O S のために、および核に比べて低い比率の m t D N A 修復 (Pascucciら (1997); Sawyer & van Houten; LeDouxら (1999)) のために、ミトコンドリアゲノムが突然変異にとくに影響を受けやすいからである。確かに、m t D N A の突然変異率は、核 D N A よりも約 1 0 倍高い (Wallace (1994))。最近のヒトの腫瘍研究において認識された m t D N A 突然変異の多くは、R O S による変異原にさらされる可能性を示している。このことは、N M S C における m t D N A 突然変異の調査にとって重要である。というのは、U V 誘発の R O S がヒトの皮膚細胞における m t D N A 欠失の発生に直接関わっているという最近の証拠があるからである。また、防御色素沈着または遺伝的素質のない個人における N M S C の最大の決定因子は、U V である (Weinstock (1998))。S C C において前駆体損傷と推定されるものがまた、常時太陽にさらされた部位に際立って発見されている。このことは、重要である。というのは、Birch-Machin 研究所による成果が、太陽にさらされた体の異なる部位から採取された皮膚のミトコンドリア D N A 損傷の発生における際立った違いを示しているからである。損傷の大部分は、常時太陽にさらされた部位に発見される (Krishananら (2002))。

【 0 0 1 7 】

本願発明者のうちの一人は、U V にさらされることが m t D N A 損傷を誘発するということを定量的に示した最初の人であった (Birch-Machinら (1998))。分子マーカーとしての m t D N A が、ヒトの皮膚において年齢による老化と光老化との間の関係を研究するのに用いられた。ヒトの皮膚の太陽への露出とその生活年齢とに対する、野生型 m t D N A への 4977bp 欠失の比の変化を研究するために、3 プライマー定量化 P C R 法が用いられた。太陽から保護された部位 (1.1% [1/90]) に比べて、太陽にさらされた部位 (27% [27/100]) における高レベルの (つまり > 1%) 4977bp 欠失の m t D N A の発生が著しく増加した (Fishers exact test, $P < 0.0001$)。したがって、m t D N A の欠失または突然変異は、蓄積的な紫外線照射のマーカーとして有用である。

【 0 0 1 8 】

さらに、チミン二量体に対してモノクローナル抗体を含むサウスウェスタンプロットによるアプローチを用いた研究は、U V が引き起こす、精製 m t D N A への損傷の存在の直接的な証拠を提供した (Rayら (1998))。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

しかしながら、単一の欠失の定量化のみでは、多くの可能な欠失または組合せおよび他の関連する突然変異のうちの一つを表わしているに過ぎないので、信頼できるUVバイオマーカーを提供しない(Birch-Machin(2000))。本発明者らの研究グループによる最近の研究は、UVにさらされることに派生して生じるmtDNAの全欠失スペクトルを決定するために(Rayら(2000))、すべてのミトコンドリアゲノムを増幅する長PCR(LX-PCR)技術を用いた。表皮がその下層の真皮から分離された71の分割皮膚試料の長PCR分析は、太陽にさらされることに関連して行われた。UVに長くさらされるほど、表皮における欠失の数が著しく増加した(Kruskal-Wallis test, $p=0.0015$)。表皮における発見は、同様に長PCR技術によって検出された、年齢によるmtDNA欠失の増加とは混同されていない。認識された欠失の大きなスペクトルは、UVにさらされたことに関連するmtDNAの変異荷重および偏在する性質を強調している。低コストのPCRを用いた単一欠失の検出と比べて、長PCRは、高精度の技術であって、定量的ではないものの、皮膚のすべてのmtDNA損傷のより包括的な指数を提供するかもしれないということを示している。上記発明者のうちの一人による研究は、mtDNAがUVの重要な標的であって、このことが、皮膚の疾患におけるミトコンドリアの役割とともに、最近見直された(Birch-Machin(2000))ということをはっきりと示している。

10

【0020】

UV感度およびヒトの皮膚がんと主な共変関係にあるヒトの髪および皮膚の色が調査された。これらの調査は、皮膚がんの罹患性に関連する、個人または集団の太陽に対する感度とメラノコルチン1-受容体遺伝子の変異体との関連に集中して行われた(Smithら(1998); Healyら(1999); Flanaganら(2000); Healyら(2000); Hardingら(2000); Flanaganら(2002))。しかしながら、これらの研究は、特定の皮膚の種類および(または)髪の色に関連して、mtDNA配列における集団レベルの変化には取り組んではいなかった。

20

【0021】

ヒトの腫瘍におけるmtDNA突然変異の最近の研究によって一般に答えられていない問題の一つは、これらの腫瘍に関連したミトコンドリアゲノムの欠失の発生である。これは、答えるべき重要な問題である。というのは、単一の患者の皮膚についての予備研究が、いくつかの腫瘍と正常な皮膚(AKおよびSCC)との間の共通mtDNA欠失の発生を示したからである(Pangら(1994))。同様に、本発明者自身の予備データは、腫瘍内のmtDNA欠失の数が、正常な皮膚と比べて増加していることを示している。最後に、Birch-Machinおよびその他の者は、mtDNA欠失の発生が、複製と同様に、UVに長くさらされるほど増加するということを示した(Berneburgら(1999); Birch-Machinら(1998); Rayら(1999); Rayら(2000); Lindseyら(2001); Birch-Machinら(2001); Lowesら(2002); Krishnanら(2002))。

30

【0022】

腫瘍の発達に関連する問題は別にして、他の重要な問題が、ヒトの腫瘍におけるmtDNAの最近の研究によって一般に答えられないでいる(Habanoら(1998); Flissら(2000))。第1に、ヘテロプラスミーの変異レベルが重要な病気の変異についても示しているかもしれないので、mtDNA突然変異が本当にホモプラスミーであるのかどうか、技術的な制限のために明らかでないということである(Habanoら(1998); Polyakら(1998); Flissら(2000))。第2に、一つの研究(Tamuraら(1999))を別にしては、mtDNA欠失の発生およびその潜在的なNMSC用バイオマーカーとしての役割が、調査されなかった。研究者らは、共通欠失を見て、残りの100かそこらの欠失を無視した。同様に、調査者らは、突然変異の定量化ではなく、突然変異を識別することに集中した。mtDNA損傷のATP生産に対するしたがって細胞機能に対する閾効果のために、欠失の発生を定量的手法で正確に評価することは重要なことである。また、欠失は、特徴付けることが難しい。特徴付けられなければならない欠失のラダーを生産する長PCRが、一般に用いられている。

40

【0023】

現在のNMSC診断は、切除された組織の病理的な鑑定である。したがって、ヒトをNM

50

SCに罹りやすくする、UV誘発のDNA損傷のための早期マーカーの必要性が存在する。早期検出を可能にするとともに正確な診断を行える遺伝子ベースの診断ツールの必要性もまた存在している。

【0024】

前立腺がん

前立腺がんは、しばしば診断される固形腫瘍であって、前立腺上皮に生じることが多い(Huangら(1999))。1997年、1000万近いアメリカの男性は、その存在が前立腺がんを示唆する前立腺特異抗原(PSA)の検査を受けた(Woodwell(1999))。本当に、このことは、さらに多くの数の男性が初期のデジタル前立腺触診(DRE)を受けたということを示している。同じ年に、3100万人の男性がDREを受けた(Woodwell(1999))。さらに、米国において、前立腺がんを新たに診断したケースが年間179,000件であると見積もられている(Landisら(1999))。これは、カナダの男性において、2番目に最も多く診断された癌であり、癌死亡率の中で2番目に多い原因である。1997年、前立腺がんは、カナダの男性(28%)において、初めて診断された癌の19,800件を占めた(National Cancer Institute of Canada)。49歳を越えるすべての男性の30~40%はいくつかの癌性前立腺細胞を有しているが、これらの男性のうちの20~25%のみが臨床的に重要な形態の前立腺がんを有している(SpringNet-CE Connection, internet, www.springnet.com/ce/j803a.htm)。前立腺がんは、性的な要因および外因性の要因の双方を含む種々の組織学的性質、すなわち、社会経済的状態、食品、地理、ホルモン不安定、家族の病歴、および遺伝体質を現わす(Konishiら(1997); Haywardら(1998))。

10

20

【0025】

危険性の観点からは、家族性前立腺がんと遺伝性前立腺がんとは、同義の語とはみなされない。家族性がんは、家族内での発生を指しているが、遺伝しない。この形態は、前立腺がんの25%までを占めている(Walsh & Partin(1997))。遺伝性とは、罹患性遺伝子のメンデル性遺伝をする亜型の前立腺がんのことを指しており、報告されたケースの約9%を占めている。前立腺がんに対する家族の陽性の病歴は、これらの罹患性遺伝子が前立腺がんの発達および進行に重要な役割を果たしているということを示唆している。最近、男性を前立腺がんにかかりやすくするものとして、染色体1およびXにおける感受性遺伝子が識別されており、これにより、遺伝性がんの病因に対する大きな病識が提供されている(Berthonら(1998); Xuら(1998))。

30

【0026】

前立腺がんの予後は、主に、診断時における腫瘍の病期および進行度による。限局性前立腺がんのみが根治療法によって治療することが可能である。標準的な検出は、依然として、デジタル前立腺触診やPSA試験、生検を行った前立腺組織の組織病理検査に頼っている。生検は、悪性腫瘍を確認するのに用いられているが、これは早期検出技術ではない。残念なことではあるが、初期の腫瘍の中には、触診の間に識別することができないものもある。PSA試験は、60~70%の特異性を有するとともに、70~80%の感度を有している(personal communication, Dr. Sunil Gulavita, Northwestern Ontario Cancer Centre)。共通の組織学段階を有する腫瘍のための診断を改良する新しい技術は、フローサイメトリー法(Shankeyら(1995))を採用する倍数性DNA分析である。しかしながら、この技術は、癌の進行の後半段階になって明らかになる染色体の変化を測定しており、DNA構造の小さな変化または染色体の逆位、あるいは初期の癌における相互転座の検出には十分な感度を有していない。予後は診断時の病気の段階に大きく左右されるため、本発明においては、初期の検出に集中している。

40

【0027】

前立腺がんの遺伝子異常についての我々の理解は乏しい。前立腺がんに対する研究は、以下の領域における知識を発達させることに集中した。1)癌原遺伝子(Buttayanら(1987))。2)腫瘍抑制遺伝子(p53, p73, KAI1 and MMAC1/PTEN; Dongら(1995); Cairnsら(1997))。3)転移におけるテロメア/テロメラーゼ活性。前立腺細胞におけるテロメラーゼのアップレギュレーションおよびテロメアDNAの増幅は、診断のための効果的なマ

50

カーを提供するかもしれない。さらに、テロメアが治療のための部位として役立つかもしれない(Ozenら(1998))。多くのグループが、染色体1の短いアームに「前立腺がん遺伝子」のための証拠を提供した。多くの研究は、この領域内で特異遺伝子座を特定することが必要とされている。このマーカーが男性を家族性前立腺がんになりやすくするいくつかの可能な遺伝子のうちの一つにすぎないということが示唆されてきた。他の研究は、X染色体の上の可能なマーカー部位を示した(Xuら(1998))。もしいくつかの前立腺がんが多因性を有していれば、このような場合にすべての関連する核遺伝子間の相互作用を認識して理解するのは難しいので、mtDNAが重要な診断ツールとなる。

【0028】

確かに、前立腺がんの研究における主要な問題は、腫瘍の段階を効果的に決定して識別することができる分子マーカーを識別することである。分子マーカーは、急速に転移病に進行する新生の前立腺腫瘍の場合と、腫瘍に発展することがほとんどない場合とを区別することができるかもしれない。今日まで、研究は、主に核ゲノムの内部に隠れた秘密に集中して行われてきた。その一方で、ずっと小さなmtDNAゲノムが核内部の事象のパロメーターとして作用するように思われており、そのようなものとして、ヒトの前立腺がんの早期検出のための手段を提供している(Zevianiら(1990))。重要なことに、この点において、ミトコンドリアは、アポトーシスおよび腫瘍生物学の他の面におけるその役割ゆえに、発がんのプロセスに関係してきた(Green & Reed(1998))。とくに、mtDNAの体細胞突然変異が、多くのヒトの腫瘍において観察されてきた(Polyakら(1998); Tamuraら(1999); Flissら(2000))。しかしながら、過去の研究は、母系のmtDNAのクローン性を考慮していなかったため、もっぱら代表的な面を見てきただけであった。このような代表的な面だけを見た限定的な研究は、ある時点における突然変異を示しているにすぎない。これは、突然変異とこれに対応する病状との間の正確な関連を与えるかもしれないし、あるいは与えないかもしれない。代表的な面を見つつ母系を採用した研究は、mtDNAの突然変異を時間をかけて追跡するという利点を有しており、これにより、縦方向の構造の力をまねる。

一般的な集団異型である突然変異は、病気と関連した突然変異と対照的に、いずれも識別可能である。

【0029】

老化

老化は、分子レベルおよび細胞レベルの双方において時間の経過による変化の蓄積からなる。しかしながら、老化のプロセスを引き起こす特定の分子構造は、解明されずに残っている。老化のプロセスを説明しようとして、年取った検体におけるミトコンドリアゲノムが、同じ母系からの若い検体のゲノムと比較された。老化に関連した一つの欠失は、共通欠失または4977-bp欠失として知られている。老化の研究は、この共通欠失および制御領域における多形現象に限定されてきた。この突然変異を明確に理解するためには、すべてのゲノムが分析されなければならない。その他の欠失は、1992年のWeiから改作された表1に見られる。

【表1】

10

20

30

欠失サイズ (bp)	参考文献
4977	Cortopassi and Arnheim, 1990; Ikebe et al., 1990; Linnane et al., 1990; Corral-Debrinski et al., 1991; Yen et al., 1991; Torii et al., 1992; Zhang et al., 1992
7436	Corral-Debrinski et al., 1991; Hattori et al., 1991; Hsieh and Wei, 1992
3610	Katayama et al., 1991
6063	Hsieh and Wei, 1992; Yen et al., 1992
5827	Zhang et al., 1992
6335	Zhang et al., 1992
7635	Zhang et al., 1992
7737	Zhang et al., 1992
7856	Zhang et al., 1992
8041	Zhang et al., 1992
8044	Zhang et al., 1992
5756	Zhang et al., 1992

10

20

30

40

50

【0030】

酸素フリーラジカルは、ATP生産の標準的な副産物であるが、この欠失の確実な原因であり、年齢とともに頻度が増加する。現存する文献は、筋肉および脳のような細胞分裂しない組織においてmtDNA突然変異と、生活年齢と、全体の老化のプロセスとの間に強力な関係があることを実証している。しかしながら、年齢に関連した腫瘍の事象と年齢に関係しない腫瘍とを区別するためには、比較母系研究が必要とされている。

【0031】

最近、種々の慢性変性疾患が、mtDNAの突然変異から起因していることが示された(Gattermanら(1995))。変性OXPHOSに関連した病気がmtDNA突然変異に密接に関連していると考えられている(Byrne(1992))。さらに、これらの筋障害がミトコンドリアゲノムの4977-bpの共通欠失にしばしば関連していることが示された(Liuら(1977))。この大きな欠失はまた、正常に年老いた人の種々の組織において、ヘテロプラスミーレベルで発見されており、老化のミトコンドリア理論(Mitochondrial Theory of Aging)と一致している(Harman(1981))。これは、欠失頻度の増加(Cortopassi & Wang(1995))、およびこれに続いて起こる、結果として老齢期の細胞死につながるようになる呼吸機能の衰退(Miquelら(1992))を通じて、明らかである。早期の遺伝子診断は患者の予後を向上させるので、病気素質または機能障害素質の早期発見は、医学の介入のための最良の機会を与える。

【0032】

代表的な面だけの構造を採用した過去の研究は、mtDNAの突然変異、欠失、および(または)その組合せと老化との関連つまり因果関係を確立した。正確なデータを得るためには、年齢に特異性のある欠失および(または)突然変異の比率が簡潔に決定されなければならない。集団レベルでの特定の病気とは対照的に、突然変異を老化のプロセスに起因すると考えることは重要なことである。この情報は、いかにしてmtDNAの損傷が時間をかけて生じるのかについての理解には不可欠である。さらに、予知を行うとともに最終的に分子レベルで老化を遅らせるためには、これらの特定の突然変異の結果、頻度、およ

び老化の時間的側面における関係が知られなければならない。研究者らは、母系を通じて集団のデータの評価を必要とする、この比率を未だ決定していない。したがって、老化のプロセスを追跡するバイオマーカーの必要性が存在する。

【0033】

したがって、早期の段階の癌、老化、またはDNA要素を備えた、その他のヒトの病気を示す突然変異のための膨大な核ゲノムを監視する単純かつ簡単なシステムの必要性が存在する。ミトコンドリアゲノムの欠失に関連する非黒色腫皮膚がん、前立腺がん、肺がんおよび老化のための簡単な診断システムの必要性についても存在する。病気を引き起こすmtDNAの突然変異と、単に集団内および集団間の変異を示す突然変異とを識別する診断システムの必要性が存在する。

10

【0034】

本発明の目的は、癌、老化、DNA要素を有するその他のヒトの病気と関連した早期トランジションのために巨大な核ゲノムを監視するための単純で簡単なシステムを提供することにある。

【発明の開示】

【0035】

本発明の一実施例においては、尿、前立腺液、皮膚細胞、唾液のような組織または体液試料を含む小さな生物学的試料が、個人から採取される。病気の形態を示す細胞を識別するために、これらの試料は、組織学的検査を含む任意の適切な方法を用いて検査される。レーザー捕捉を含む（これには限定されないが）任意の適切な方法を用いて、病気の形態を示す識別細胞が試料から採取され、そこからのmtDNAの配列が決定され、続いて、健康および病気の双方に関連する既知のミトコンドリア配列のデータベースと比較される。

20

【0036】

好ましい実施例では、病気と関連するmtDNA配列の変異を決定するために、すべてのミトコンドリアゲノムの配列が集団レベルで決定される。

【0037】

他の実施例では、突然変異の進行の存在が、病気の始まりおよび進行を表している。突然変異（遺伝）荷重はまた、病気の進行状態つまり病状を示している。

【0038】

好ましい実施例では、前立腺液からのmtDNA配列が、前立腺がんと明らかに関係する、正常で一時的な転移mtDNA配列のデータベースと比較されている。この比較データの組は、母系の研究に基づいており、さらに、一般の集団に存在するミトコンドリア族に現れる変異とは対称的に、病気と明らかに関連したmtDNA変異の明らかな例を供給する母系データベースに蓄積されている集団に存在するその他の正常な母系変異の研究に基づいている。

30

【0039】

病気素質を示す特異母系があるかもしれない。

【0040】

他の実施例においては、疑わしいと考えられている非黒色腫皮膚がんからのmtDNA配列が、非黒色腫皮膚がんと明らかに関係する正常なmtDNA配列のmtDNA配列データベースと比較される。

40

【0041】

本発明の一つの特徴部分によれば、mtDNAを含む被検体において病気の発生または進行を検出する方法が提供されている。この方法は、被検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からDNAを取り出すことと、mtDNAの中の突然変異の存在を検出することとを有している。突然変異の存在を検出する工程が、mtDNAの配列を決定することと、PCRによってmtDNAを増幅することと、サウスウエスタンブロッティングすることと、変性HPLCを行うことと、マイクロアレイ、遺伝子チップまたはバイオチップにハイブリダイゼーション（ハイブリッド形成）することと、分子マーカー分析と、これらの組合せとからなるグループから選択されている。さらに、生物学的試料のm

50

tDNAがデータベースと比較されており、このデータベースが、病気のないmtDNA配列に関連した突然変異のデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる。

【0042】

本発明の一つの特徴部分によれば、ヒト検体において病気の存在を検出する方法が提供されている。この方法は、ヒト検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からDNAを取り出すことと、生物学的試料のミトコンドリアDNAの突然変異を検出することと、生物学的試料のミトコンドリアDNA配列をデータベースと比較することとを備えている。このデータベースは、病気のないミトコンドリアDNA配列に関連した突然変異のデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる。特異病に関連したミトコンドリアDNAの突然変異率は、病気の進行および予後の重要なインジケータである。このことは、病気のステージの特定ができるようにして、優れた病気干渉や特定の療法に帰着することになる病気の特定を向上させる。

10

【0043】

さらに他の実施例においては、ヘテロプラスミー検出の感度を増加させることが、試験の早期識別能力を向上させる。

【0044】

また、本発明は、転移によってターゲットされた重要な部位を観察することによって病気の進行を監視するのに用いられてもよい。

【0045】

ミトコンドリアDNA配列の突然変異によって示される病気素質または機能障害素質を決定する方法が提供されている。この方法は、ヒト検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からDNAを取り出すことと、生物学的試料のミトコンドリアDNAの中の突然変異を検出することと、生物学的試料のミトコンドリアDNA配列をデータベースと比較することとを備えている。このデータベースは、病気または機能障害にかかりやすい個人と病気または機能障害にかかりにくい個人とのミトコンドリアDNA配列に関連した突然変異のデータを含んでいる。

20

【0046】

好ましい実施例においては、ミトコンドリアDNAの配列を決定するのに、DNAマイクロアレイが使用されている。その他の技術を用いることも可能である。たとえば、検体または完全ヒトゲノムの直接配列決定法、SNaP shotTM、SNP検出、リアルタイムPCR、または当該分野で標準的なその他の方法である。

30

【0047】

本発明のさらに他の特徴部分によれば、ヒト検体の老化の進行状態を査定する方法が提供されている。この方法は、ヒト検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からDNAを取り出すことと、生物学的試料のミトコンドリアDNAの中の突然変異を検出することと、生物学的試料のミトコンドリアDNA配列をデータベースと比較することとを備えている。データベースは、老化に関連したT DNAの突然変異のデータを含んでいる。

【0048】

mtDNA突然変異の存在を検出する工程が、mtDNAの配列を決定することと、PCRによってmtDNAを増幅することと、サザン、ノーザン、ウェスタンおよびサウスウェスタンプロット・ハイブリダイゼーションすることと、変性HPLCを行うことと、マイクロアレイ、バイオチップまたは遺伝子チップにハイブリダイゼーションすることと、分子マーカー分析と、これらのいずれかの組合せとから選択されている。

40

【0049】

本発明のさらに他の実施例によれば、複数のヒトミトコンドリアDNA配列を有するデータベースが提供されている。ミトコンドリアDNA配列は、病気のない状態と関連する正常な制御配列と、病気の存在と関連する配列または病気素質を示す配列とからなるグループから選択されている。

50

【0050】

病気の診断のためのキットが提供されている。このキットは、使い捨てのチップと、マイクロアレイと、使い捨てチップを保持する手段と、ミトコンドリアDNAを取り出す手段と、ミトコンドリアDNA配列のデータベースにアクセスする手段とを備えている。

【0051】

本発明のさらに他の特徴部分によれば、患者の病気を診断する方法が提供されている。この方法は、ミトコンドリアDNAから得られた核酸試料を、固形基質と複数の核酸要素を有するアレイにハイブリダイゼーションすることを備えている。各核酸要素は病気の存在を示しており、各核酸要素は特有の位置を有するとともに、固形基質に安定して結合している。アレイを有する一つまたはそれ以上の核酸要素への核酸試料のハイブリダイゼーションが、前立腺がんの存在を示している。

10

【0052】

本発明のさらに他の特徴部分によれば、病気素質を決定するためのキットが提供されている。このキットは、使い捨てのチップと、マイクロアレイと、使い捨てチップを保持する手段と、DNAを取り出す手段と、ミトコンドリアDNA配列のデータベースにアクセスする手段とを備えている。

【0053】

本発明の他の実施例によれば、ミトコンドリアDNA配列の突然変異により示される病気または機能障害の素質を決定または徴候を示すための方法が提供されている。この方法は、ヒト検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からミトコンドリアDNAを取り出すことと、生物学的試料のミトコンドリアDNAの配列を決定することと、生物学的試料のミトコンドリアDNA配列をデータベースと比較することとを備えている。データベースは、病気のないmtDNA配列に関連した突然変異の集団レベルのデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる。

20

【0054】

本発明のさらに他の実施例によれば、患者の非黒色腫皮膚がんを診断する方法が提供されている。この方法は、ミトコンドリアDNAから得られた核酸試料を、固形基質と複数の核酸要素を有するアレイにハイブリダイゼーションすることを備えている。各核酸要素は非黒色腫皮膚がんを示しており、各核酸要素は特有の位置を有するとともに、固形基質に安定して結合している。アレイを有する一つまたはそれ以上の核酸要素への核酸試料のハイブリダイゼーションが、非黒色腫皮膚がんの存在を示している。あるいは、非特異的突然変異が、癌の進展する閾効果(threshold effect)を超えた閾効果に到達するかもしれない。同様にして、前立腺がんについても診断可能である。

30

【0055】

本発明の他の実施例によれば、mtDNAを含む被検体においてヘテロプラスミーを検出する方法が提供されている。この方法は、被検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からDNAを取り出すことと、試料上で変性HPLCを実行することとを備えている。

【0056】

本発明の他の特徴部分によれば、mtDNAを含む被検体において病気と関連する突然変異を検出する方法が提供されている。この方法は、被検体から生物学的試料を獲得することと、生物学的試料からDNAを取り出すことと、mtDNAの中の突然変異の存在を検出することと、生物学的試料のmtDNAをデータベースと比較することとを備えている。データベースは、病気のない共通集団のバリエーションのデータと、病気が関連したミトコンドリアゲノムのデータとを含んでいる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0057】

本発明の方法は、mtDNAに関連した病気を診断するのに用いることができる。本発明による方法は、生物学的試料から個人のミトコンドリアゲノムを増幅し、ミトコンドリアゲノムの一部、好ましくは個人のすべてのミトコンドリアゲノムの配列をすでに知られた

50

任意の手段を用いて決定する。多くの試料を迅速にスクリーンするのに、変性高速液体クロマトグラフィー (DHP LC) を用いるようにしてもよい。DHP LC は、突然変異のホットスポットに集中させることができる。通常のシーケンスにおける 20 ~ 25 % と比べて、DHP LC は、突然変異の検出に関しては、2 % のヘテロプラスミーを自動シーケンスするよりも感度がよい。低レベルのヘテロプラスミー (< 2 %) を検出する方法を開発してもよい。

【0058】

本明細書中で使用されるように、mtDNA における突然変異の「存在」は、ヘテロプラスミー突然変異を含んでおり、したがって、突然変異した DNA が存在する試料の中には、いくつかの正常な mtDNA が付加的に存在していると考えられる。

10

【0059】

本明細書中で使用される「紫外線角膜炎 (actinic keratoses)」は、扁平上皮がんの前駆物質表皮損傷を意味している。

【0060】

本明細書中で使用される「老化 (aging)」は、分子レベルおよび細胞レベルの双方において、時間の経過につれての変化の蓄積を意味している。

【0061】

本明細書中で使用される「対立遺伝子 (alleles)」とは、染色体の特異部位を占める一定の DNA 配列におけるいくつかの変形形態のうちの一つを意味している。

【0062】

本明細書中で使用される「付着 (attaching)」または「接着 (spotting)」は、核酸が共有結合、水素結合またはイオン作用 (イオン結合) を介して基質に不可逆に結合されるように、核酸を固形基質の上に配置して核酸アレイを形成する工程を意味している。

20

【0063】

本明細書中で使用される「基底細胞がん (basal cell carcinoma)」は、皮膚細胞の癌の一類型である

【0064】

本明細書中で使用される「ポーエン病 (Bowen's disease)」は、in situ 表皮がんを意味している。

【0065】

本明細書中で使用される「診断上の (diagnostic)」または「診断する (diagnosing)」とは、病気の診断または処置の要素として突然変異またはその組合せの存在または非存在を用いることを意味している。突然変異の検出は、病気の症状の診断の一ステップとなり得る。

30

【0066】

本明細書中で使用される「病気 (disease)」は、機能障害またはその他の異常な肉体状態を含んでいる。

【0067】

本明細書中で使用される「病気が関連したミトコンドリアゲノム (disease associated mitochondrial genomes)」とは、特定の病気を示すまたは特定の病気に関連した突然変異を含むゲノムを意味している。

40

【0068】

本明細書中で使用される「データベース (database)」とは、電子記憶システム (標準的な産業ソフトウェアを用いたコンピュータベースの) を意味しており、このシステムは、研究者らがヌクレオチドの配列構造を素早く決定するのを可能にする回収可能な情報を蓄積し提供する能力を有している。このデータベースはまた、生物学的試料を提供する個人の記述情報についても蓄積している。この記述情報は、生物学的試料に相関関係がある健康状態およびその他の関連項目を含む。

【0069】

本明細書中で使用される「欠失 (deletions)」とは、核酸の連続的な配列から DNA の

50

一部位を取り除くことを意味している。一旦欠失が発生すると、その隙間は端部を再結合することによって修復される。欠失は、一つの塩基から何千またはそれ以上の大きさの塩基までその大きさが変化し得る。

【0070】

本明細書中で使用される「重複 (duplications)」とは、DNAの特異配列が複製されて、元の複製の後方または前方にまたはゲノムのいずれかの部位に、一つまたはそれ以上挿入されることを意味している。

【0071】

本明細書中で使用される「ヘテロプラスミー (heteroplasmy)」は、突然変異の比率によって定義される。野生型 mt DNA 分子については、100% 突然変異 mt DNA が「ホモプラスミーの (homoplasmic)」と称される。ヘテロプラスミーの (heteroplasmic) 突然変異は、ミトコンドリアゲノムのすべての複製においてではないが、いくつかの複製において発生する突然変異である。

10

【0072】

本明細書中で使用される「ホモプラスミー (homoplasmy)」とは、すべてのミトコンドリア配列が同一であることを意味している。

【0073】

本明細書中で使用される「逆位 (inversions)」は、一連の DNA の長さが切除されて、逆向きに再挿入されることを指している。

【0074】

本明細書中で使用される「母性遺伝 (maternal inheritance)」とは、卵の細胞質を介して受け継がれるミトコンドリアを意味している。

20

【0075】

本明細書中で使用される「母系 (maternal line)」は、母親から次の世代に代々引き継がれるミトコンドリア DNA のクローン配列を指している。

【0076】

本明細書中で使用される「ミトコンドリア (mitochondria)」とは、細胞プロセスのための ATP を生成する真核細胞質細胞小器官を意味している。

【0077】

本明細書中で使用される「突然変異 (mutation)」は、野生型配列からの DNA 配列内の任意の変化を包含しており、これには、点突然変異、トランジション、挿入、トランスバージョン、転位、欠失、逆位、重複、組換え、またはこれらの組合せが含まれる。

30

【0078】

本明細書中で使用される「突然変異荷重 (mutation load)」は、関与遺伝子またはすべての遺伝子の機能低下につながることになる mt DNA における突然変異の増加を指している。

【0079】

本明細書中で使用される「核酸アレイ (nucleic acid array)」は、異なる核酸が1平方センチ当たり20を超える密度で固形支持部の一方の面に付着された複数の特定の核酸を指している。各核酸は、予め選択された、同一でない領域において、固形支持部の面に付着されている。一実施例においては、固形支持部の面に付着された核酸は、DNA である。好ましい実施例においては、固形支持部の面に付着された核酸は、cDNA である。他の好ましい実施例においては、固形支持部の面に付着された核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって合成された cDNA である。好ましくは、本発明による核酸アレイは、少なくとも150ヌクレオチドの長さの核酸を有している。好ましくは、核酸アレイは、6,000ヌクレオチド以下の長さの核酸を有している。より好ましくは、核酸アレイは、500ヌクレオチド以下の長さの核酸を有している。他の実施例では、アレイは、固形支持部の一方の面に付着された少なくとも10の異なる拡散を有している。さらに他の実施例では、アレイは、固形支持部の一方の面に付着された少なくとも10,000の異なる拡散を有している。本明細書中で使用される「核酸 (nucleic acid)」という語は

40

50

、「ポリヌクレオチド (polynucleotide)」と互換性がある。

【0080】

本明細書中で使用される「核酸ターゲット (nucleic acid target)」または「ターゲット核酸 (target nucleic acid)」は、一つまたはそれ以上の種類の化学的結合を介して、通常は相補的な塩基対合を介して、相補的配列の核酸要素に結合できる核酸と定義される。本明細書中で使用されるように、核酸ターゲットは、天然塩基 (例: A, G, C または T) と、修飾塩基 (7-ジアゾグアノシン、イノシンなど) を含む。また、核酸プローブの塩基は、ハイブリダイゼーションと干渉しない限り、ホスホジエステル結合以外の結合によって結合されていてもよい。これにより、核酸ターゲットは、構成塩基がホスホジエステル結合よりもむしろペプチド結合によって結合されたペプチド核酸であってもよい。好ましくは、核酸ターゲットは、ヒトの組織または体液の抽出物から取り出されている。より好ましくは、核酸ターゲットは、ヒトの組織または体液の抽出物から合成された一本鎖または二本鎖の DNA、RNA、または DNA-RNA ハイブリッドである。

10

【0081】

本明細書中で使用される「核 (nucleus)」は、真核細胞の中のもっとも有名な細胞小器官を意味しており、すべての染色体 DNA を有している。

【0082】

本明細書中で使用される「PSA 試験 (PSA Test)」は、前立腺に特異性のある抗原試験を意味しており、この抗原は、前立腺がんを示す血液中の抗原である。

【0083】

本明細書中で使用される「点突然変異 (point mutation)」は、DNA 中の単一のヌクレオチドの変化を意味している。

20

【0084】

本明細書中で使用される「多型性 (polymorphism)」とは、対立遺伝子または mtDNA ゲノムの集団内における配列の変化を意味している。

【0085】

本明細書中で使用される「前駆体障害 (precursor lesions)」とは、潜在的な病気との関連を示す DNA 変異またはその組合せを意味している。

【0086】

本明細書中で使用される「病気素質 (predisposed to a disease or a predisposition to a disease)」は、病気または機能障害と関連性がある突然変異の存在または欠如のために、人が病気または機能障害を持つようになる危険性が非常に高い、あるいは、平均的な人よりも病気または機能障害を早期に発症する危険性が非常に高いということの意味している。

30

【0087】

本明細書中で使用される「予め選択された領域 (preselected region)」、「予め限定された領域 (predefined region)」または「独特の位置 (unique position)」は、核酸の堆積のために用いられている、または用いられた、あるいは用いられようと意図されている基質上の局所領域を指している。別の言い方をすれば、ここでは、「選択領域 (selected region)」または単に「領域 (region)」のことを指している。予め選択された領域は、任意の適切な形状 (例: 円形、矩形、楕円形、楔状など) を有している。いくつかの実施例においては、予め選択された領域は、約 1 cm^2 より小さく、より好ましくは 1 mm^2 より小さく、さらに一層好ましくは 0.5 mm^2 よりも小さい。また、いくつかの実施例では、領域は約 $0.125 \sim 0.5\text{ mm}^2$ である。

40

【0088】

本明細書中で使用される「体細胞突然変異 (somatic mutation)」は、受精後の DNA 配列の変化を意味している。

【0089】

本明細書中で使用される「固形基質 (solid substrate)」または「固形支持部 (solid support)」は、堅いまたは部分的に堅い面を有する要素のことを指している。「基質 (su

50

bstrate) 」または「支持部 (support) 」という語は、ここでは、「固形基質 (solid substrate) 」または「固形支持部 (solid support) 」という語と互換性がある。固形支持部は、粒子、鎖、沈殿物、ゲル、シート、管、球、容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライドなどとして存在する、生物学的、非生物学的、生体的または非生体的なもの、あるいはこれらのうちの任意の組合せでよい。基質は、シリコン面またはガラス面、あるいは(ポリ)テトラフルオロエチレン、(ポリ)フッ化ビニリデン、ポリスチレン、ポリカーボネート、または66ナイロンやニトロセルロース、これらの組合せのような帯電膜であることが多い。好ましい実施例では、固形の支持部はガラスである。好ましくは、基質の少なくとも一つの面が実質的に平坦になっている。好ましくは、固形支持部の面は、カルボキシル基、アミノ基、ヒドロキシル基、チオール基などを含む(これらには限定されないが)官能基を有している。一実施例では、面は透光性を有している。

10

【0090】

本明細書中で使用される「扁平上皮がん (squamous cell carcinoma) 」は、皮膚細胞の癌の一類型である。

【0091】

本明細書中で使用される「安定して結合 (stably associated) 」とは、共有結合、水素結合またはイオン作用 (イオン結合) を介してアレイを形成するために、固形基質に不可逆に結合している核酸を指している。これにより、核酸が、アレイと安定して結合している他のすべての核酸に対して、あるいは、アレイが分析 (すなわち、ハイブリダイゼーションまたはスキャン) される条件下で固形基質上で予め選択された他のすべての領域に対して、予め選択された特有の位置を維持している。

20

【0092】

ミトコンドリアDNA配列の「有意性のある (statistically significant) 」数は、標準的なカイ二乗設計的アルゴリズムを用いて、つまり観測値対期待値を決定することによって、決定される。

【0093】

本明細書中で使用される「トランジション」とは、窒素を含む同じ塩基、つまりピリミジンからピリミジン、またはプリンからプリンへの置換を意味している。一方のピリミジンが他のピリミジンによって置き換えられる、あるいは一方のプリンが他方のプリンによって置換される突然変異。

30

【0094】

本明細書中で使用される「トランスバージョン」は、窒素を含む異なる塩基の置換、つまりプリンからピリミジン、またはピリミジンからプリンへの置換を意味している。一方のプリンがピリミジン置き換えられる (置換される) またはその逆に置換される突然変異。

【0095】

特異病のmtDNAおよび診断

本発明の一実施例においては、mtDNA配列を比較することにより、前立腺がんや非黒色腫皮膚がんのような特異な病気を診断するとともに老化を観察するための方法が提供されている。核DNAではなくmtDNAを用いて、前立腺がんのような病気を診断することは、いくつかの利点を有している。第1に、mtDNAは、複雑なゲノムではなく、個人レベルおよび集団レベルにおいて容易に理解される。このため、正常なゲノムおよび病気が関連したゲノムを有する大きなmtDNAデータベースが、個人の診断を非常に正確なものにする。したがって、病気に関連した変種 (variation) が理解される。第2に、mtDNAは、核DNAよりも10倍突然変異率が高い (Wallace(1992))。病気の前段階を示唆する核再配列が、素早くミトコンドリアと結合して、体細胞突然変異として現れる。第3に、mtDNAが母性遺伝パターン (maternal inheritance pattern) を有しており、すべてのミトコンドリアが同じmtDNAから始まるので、mtDNAは本質的にクローンである。このため、このクローン状態からの変種は、簡単に検出される。また、mtDNAが組換えの説得力ある証拠を示さないため、配列における何らかの変種は体細

40

50

胞の事象である。突然変異がある任意のミトコンドリアは、一つのミトコンドリアにつき多くの(コピー数2~10の)ミトコンドリアゲノムが、また一つの細胞につき多くの(500~2,000の)ミトコンドリアが存在していることの結果として、ある意味では「劣性(recessive)」である。さらに、ミトコンドリアゲノムは、損傷を受けたゲノムを有するミトコンドリアの非常に高いレベル(90%まで)を許容できる。このことは、残存する野生型mtDNAによる相補性を通じて起こる(Chomynら(1992))。しかしながら、突然変異したゲノムは、通常小さいため、野生型ゲノムに対して複製の利点を有しており(Hayashiら(1991))、したがって、突然変異したmtDNAはクローン拡大する。このことは、核遺伝子と異なり、mtDNA突然変異がいる細胞に対する選択がほとんどないかまたは全くないということを示唆している。このような高い突然変異率のために、mtDNAに現れる突然変異および(または)欠失は、細胞の寿命の間維持され、種々の変異原にさらされたことの記録として役立つ。mtDNAの全体性(integrity)は、核修復機構によって維持される。これらの遺伝子座における欠陥は、多数のミトコンドリア欠失と関連する常染色体優性異常(autosomal dominant disorder)に帰着することになることが示唆されている(Zevianiら(1990))。したがって、mtDNAは、種々の癌またはその他の病気と関連した初期の核事象の初期の見張り役として機能する。最後に、ミトコンドリアゲノムは、その配列を決定することができ、個人ベースで突然変異を監視することができる。

10

【0096】

非黒色腫皮膚がんの診断

本発明の好ましい実施例では、非黒色腫皮膚がん(NMSC)におけるmtDNAの変化や固形腫瘍の発達を示す前駆体損傷の初期診断のためのシステムが提供されている。共通欠失(common deletion)、関連する突然変異、mtDNAにおいて未だ特徴付けられていない欠失の発生のような特定の変化が、潜在的な皮膚がんの信頼できるバイオマーカーとして役立つ。ヒトのNMSCおよびその前駆体損傷におけるすべてのmtDNAゲノムの突然変異指紋(フィンガープリント)が決定される。このようにして、mtDNAの変化が、ヒトの皮膚がんおよびその前駆体損傷の早期バイオマーカーとして確立される。次に、変性HPLCが、注目されている配列において低レベルのヘテロプラスミーを評価するのに用いられる。このようなアプローチはまた、その他のヒトの腫瘍における早期変化の発達の見通しを提供することができる。

20

30

【0097】

前立腺がんの診断

本発明の他の実施例においては、前立腺がんの診断のためのシステムが提供されている。年齢に関連した、mtDNA欠陥の蓄積は、中年および老年に流行っている前立腺がんのようなある種の臨床疾患の発現に人をおかたりやすくする。好ましい実施例においては、前立腺がんのルーチン・スクリーニングが、前立腺液からのミトコンドリアゲノム配列決定を通じて行われる。がん細胞に変異した上皮細胞の存在が、前立腺液からのmtDNAの増幅を通じて決定される。このことは、デジタル直腸内診およびPSAのような現行の診断技術の影を薄くしている。最近、Flissら(2000)は、膀胱がんの患者の尿のサンプルの中に突然変異のmtDNAを認定した。前立腺液における同様の発見が、前立腺がんのための、侵襲でない(non-invasive)早期検出方法を提供する。全体として前立腺がんと対照的に、若い患者において攻撃的で成長の速い細胞の分化と同様にして、異なるタイプの前立腺がんを診断することが可能である。

40

【0098】

老化と関連する突然変異の評価

本発明によるシステムおよび方法は、4977bpの「共通欠失」やミトコンドリアゲノムの他の突然変異(Liuら(1977))のような突然変異の増加頻度に基づいて、老化を評価するのに用いられてもよい。この情報は、健康調査データと協働して、同じ突然変異/欠失に帰着する別個の原因の統計上重要な区別を可能にする。幸いなことに、mtDNAは、卵を通じてのみ遺伝し、本来、本質的にクローンである(Van De Graaff & Fox(1955))。この

50

ことは、年齢が関連した欠失の信頼できる頻度を決定するために、幾世代かにわたって母系の突然変異 / 欠失の注意深く管理された研究を可能にする。この情報は、老化のプロセスを遅らせる処置方法を開発するのに用いられてもよい。

【0099】

試料の収集

生物学的試料は、mtDNA配列のデータベースを構築する目的でまたは個人に診断検査を行う目的で、任意の既知の手段によって集めることができる。データベースの作成のために前もって用意される試料は、以下のものを含むが、これらには限定されない。すなわち、腫瘍バンク、皮膚がんおよび前立腺がん（これらには限定されない）のような特異病を高い頻度で発症するグループまたは集団からの母系研究および健康状態や老化の評価とともに、同じ母系から影響を受けた人および影響を受けていない人の母系研究。たとえば、生物学的試料を収集して記録するのに、FTA³ Gene Cards³ が用いられてもよい。適切な試料は、中皮（体腔上皮）、上皮または内皮から得られた任意の組織または体液を含んでいる。このような組織および体液は、以下のものを含むが、これらには限定されない。すなわち、血液、唾、頬細胞、唾液、前立腺液、汗、骨、髪、リンパ組織、子宮頸管塗抹、乳吸引物、おりもの、精液、月経出血および生検組織。好ましくは、約100μlの血液、100μg~25mgの固形組織が試料とされた。皮膚がんが疑われる場合には、（正常な、NMSCの、および前駆体損傷からの）皮膚細胞または皮膚組織が皮膚生検またはルーチン・サクション・プリスタリング法により採取される。病気が疑われる場合には、初期治療の医師、癌研究者またはその他の専門家は、患者から正常な組織と病気が疑われる組織の双方を抽出する。

10

20

【0100】

たとえば、前立腺または皮膚の腫瘍の試料の場合、微小分割されてパラフィンが埋め込まれた組織の同型体の横断面（5ミクロン）は、一つのスライドがヘマトキシリンおよびエオシン（HE）で染色される前に、パラフィンが取り除かれる。同型体は、当該分野で標準的なことではあるが、メチルグリーン（MG）を用いて染色されている。HE染色は、正常、前駆体について、および腫瘍の進行の適用可能な格付けについて、病理学者により格付けされる。同型体MGスライドは、格付け細胞の製造者推薦（Arcturus）によると、レーザー捕捉に用いられる。

【0101】

mtDNAの抽出

分子生物学の現行プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）に記載されているように、DNAの抽出は、当該分野で知られている任意の方法を用いて行われ、これに続いて、ミトコンドリアゲノムの配列が決定される。

30

【0102】

mtDNAの配列決定

<PCR>

本発明によるポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することができる。PCR法は、当該分野の当業者にはよく知られている。PCRには、増幅される核酸の存在、増幅される配列の両側に位置する二本鎖のオリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、緩衝剤および塩が必要である。PCRの手法は、当該分野ではよく知られている。PCRは、MullisおよびFaloona(1987)の Methods Enzymolの155:335（引用によって本明細書中に含まれる）に記載されているように実行される。

40

【0103】

一般に、PCRは、鋳型（template）DNA（少なくとも1fg；より有効的には1~1000ng）および少なくとも25pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて実行される。典型的な反応混合物は、2μlのDNA、25pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、2.5μlの10X PCR緩衝剤1（Perkin-Elmer, Foster City, CA）、0.4μlの1.25μM dNTP、0.15μl（または2.5ユニット）のTaq DNAポリメラーゼ

50

(Perkin-Elmer, Foster City, CA)、および総量 25 μ l の脱イオン水を含んでいる。流動パラフィン (mineral oil) で覆われて、PCR は、プログラム可能な熱循環器を用いて実行される。

【0104】

PCR サイクルの各ステップの長さおよび温度は、サイクルの数とともに、實際上、過酷な必要条件によって調整されている。アニール温度およびタイミングは、プライマーが鋳型にアニールすると期待される効率と、許容されるミスマッチの程度との双方によって決定される。プライマーのアニールする条件の厳しさを最適化することができる能力は、当該分野における通常の技術者の一人の知識の範囲内である。30 ~ 72 の範囲のアニール温度が用いられている。一般に、鋳型分子の初期の変性が通常 92 ~ 99 の範囲の温度で 4 分間発生し、変性からなる 20 ~ 40 サイクル (94 ~ 99 で 15 秒 ~ 1 分間) がこれに続いて、アニーリング (上述のように決定された温度で 1 ~ 2 分間) および伸長 (72 で 1 分間) が生じる。最終の伸長工程は、一般に 72 で 4 分間実行され、次に 4 で (0 ~ 24 時間) 不定の工程がこれに続く。

10

【0105】

< DNA 配列決定 >

ミトコンドリアゲノムの配列を決定するための任意の既知の手段が用いられてよい。好ましくは、mtDNA は、配列の決定に先立って、PCR により増幅される。PCR 生成物は、直接その配列が決定されるか、あるいはバクテリア宿主に配置されるベクターにクローン化される。DNA シークエンス法の例は、Brumley, R.L. Jr. および Smith, L.M. (1991) による「横型超薄ゲル電気泳動による高速 DNA シークエンス (Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis)」(Nucleic Acids Res. 19:4121-4126) と、Luckey, J.A. ら (1993) による「毛細管ゲル電気泳動による高速 DNA シークエンス (High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis)」(Methods Enzymol. 218: 154-172) とに見出される。mtDNA の配列決定および PCR を組み合わせて使用することは、Hopgood, R. ら (1992) による「PCR 生成物から直接ヒトの mtDNA の配列を自動的に決定するための方法 (Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products)」(Biotechniques 13:82-92) および Tanaka, M. ら (1996) による「mtDNA の自動配列決定 (Automated sequencing of mtDNA)」(Methods Enzymol 264:407-421) に記述されている。

20

30

【0106】

< 欠失分析および検出 >

好ましいアプローチは、伸長鋳型 (Expand Long Template) PCR システム (Boehringer Mannheim) を用いた伸長 (long extension) PCR (LX-PCR) 技術である。LX-PCR 技術は、Birch-Machin 研究所において確立され実証されたものであるが、これを用いることにより、単一の欠失の事象と対比して、mtDNA のすべてのスペクトルのために迅速にスクリーンする機会が提供される。

【0107】

全 mtDNA の中の mtDNA⁴⁹⁷⁷ 欠失の比率を評価するのに、半定量化 PCR 法 (Corral-Debrinski ら (1991)) を用いることができる。

40

【0108】

また、サザンプロットや同位元素で標識化されたプローブ技術、および当該分野で標準的な他の任意の技術を欠失検出にも用いるようにしてもよい。

【0109】

< PCR 生成物の配列決定 >

PCR 生成物の配列を決定するのに、任意の既知の手段が用いられてよい。好ましくは、すべての DNA 配列は、ABI Big Dye TerminatorTM 技術と、各々重鎖および軽鎖のための一連の 72 オーバラッププライマーとを用いたジデオキシ配列決定法によって特徴付けられている。配列決定は、一つについて、または幾つかについて、あるいは 310, 3100 または 3700 の ABI プラットフォームの組合せについて、生じる。配列決定反応は、製造者の

50

推薦に応じて実行される。

【0110】

変性高速液体クロマトグラフィー (DHP LC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography) を用いたミトコンドリアゲノムの突然変異分析

ミトコンドリアゲノムの配列決定および突然変異のホットスポットの識別に先立って、多くの試料の中の突然変異を迅速にスクリーンするのに、DHP LCを用いることができる。この技術は、低レベルのヘテロプラスミー (heteroplasmy) の識別に高感度を提供する。これは、ホモプラスミーな (homoplasmic) 変化を検出することはできないが、伝統的な配列決定技術を補完するものである。最近腫瘍内で識別されたホモプラスミーの突然変異は別にして、報告された大多数の mtDNA の突然変異はヘテロプラスミーである (Chinneryら (1999))。これらのヘテロプラスミーな (heteroplasmic) mtDNA 変化は、mtDNA の PCR 増幅の後にヘテロ二本鎖 (heteroduplexes) に帰着する。ヘテロプラスミーな mtDNA 突然変異のための迅速なスクリーニングは、変性高速液体クロマトグラフィー (DHP LC : Denaturing High Performance Liquid Chromatography) という比較的新しい技術を用いて決定される。この技術は、ヘテロプラスミーな点突然変異に関して 5% よりも低いレベルまで、すべての mtDNA ゲノムを迅速にスクリーンして識別するのに最近用いられてきた (Van den Boschら (2000))。

10

【0111】

この DHP LC は、完全自動化スクリーニングを提供する WaveTM DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, USA) に基づいて実行されてもよい。mtDNA のヘテロプラスミーな突然変異をスクリーンするのに、同じ技術を用いることが可能である。好ましくは、すべての mtDNA ゲノムは、van den Boschら (2000) により記述された二つの異なる PCR 条件を用いることによって、13 のオーバーラップ断片において PCR により増幅されている。1 ~ 2 kb の PCR 生成物が、90 ~ 600 bp の断片に分解され、その最適な溶融温度で分割される。突然変異は、二つのピークで表され、2% ヘテロプラスミーよりも低いような低比率の突然変異は、ピークの肩部 (shoulder) として表される。

20

【0112】

DNA 配列の決定は、当該分野で知られているマイクロアレイを用いて行うことも可能である。

【0113】

データの分析

一旦配列が決定されると、正常な mtDNA 配列および病気が関連した mtDNA 配列が、データベースでの比較のために記録される。再配列決定装置 (resequencing devices)、マイクロアレイ技術 (micro-array technology)、一体型微小流体増幅・分析システム (integrated microfluidic amplification and analysis system)、高速・高処理突然変異検出法 (high-speed, high-throughput, mutation detection method) およびその他の方法がすべて本発明の方法とともに用いられてよい。

30

【0114】

個人のミトコンドリアゲノムの配列決定から得られたデータは、集団レベルのデータと比較される。データは、上述したように、試料の入手および mtDNA の配列決定を通じて、獲得される。好ましくは、データベースは、母系研究からの情報を含んでいる。集団レベルデータは、データベースに保有されている。任意の適切なデータベースを使用可能である。

40

【0115】

臨床および生物学的データの多次元評価研究データベース (multidimensional evaluation research database) が用いられている。これは、この事業に携わる研究所によって集められた情報の収集、加工および流布のために必要なバイオ情報科学の基盤を提供する。このデータベースは、動的かつ強力な資源となるネットワークとリンクする中央電子システムである。

【0116】

50

データベースは、任意の既知の手段、好ましくは安全なインターネットを介して、アクセスされるようにしてもよい。好ましくは、データベースは、サーバーに構築されるとともに最適な性能および測定可能な特徴部分を通じて多数のユーザーをサポートするアプリケーションサーバーの使用を採用するe-コマース・アルゴリズムを用いて開発されている。別個の「ウェブ」サーバーは、すべての内容、アプリケーションおよび処理がユーザーに到達する前にそこを通じて流れなければならない中央ポイントとして機能し得るので、ウェブサイトのアーキテクチャーの基礎を提供することができる。

【0117】

当該分野で知られているデータ発掘アルゴリズムは、データからパターン、集団およびモデルを発見するのに利用されている(SAS 2000)。さらに、知能アルゴリズムおよび方法は、突然変異の発生、突然変異率、病気検出のための突然変異のパターン、情報回収、およびその他の複雑な配列分析ソフトウェアのために、開発されるだろう。

10

【0118】

核酸要素およびプローブ

本発明は、ターゲット核酸配列に特異的に結合する核酸要素およびプローブを提供する。ターゲット核酸配列は、前立腺がん、非黒色腫皮膚がんなどの病気を示すものとして、検出されるべき核酸または核酸の一領域である。本発明のマイクロアレイを用いて分析されるべきターゲット核酸配列は、好ましくは、ヒトの組織または体液の試料から採取されている。本発明は、RNA、RNAに対応する核酸(つまりcDNA)、またはDNAからなるターゲット核酸配列を提供する。核酸要素は、本発明によるアレイを構成するための固形支持部と安定して結合している。核酸要素は、一本鎖でも二本鎖でもよく、cDNAから増幅されたPCR断片でもよい。

20

【0119】

本発明はまた、プローブを構成するポリヌクレオチド配列を提供する。本明細書中で用いられているように、「プローブ」という語は、ターゲット領域に配列を有するプローブにおいて少なくとも一つの配列の相補性のために、ターゲット核酸に配列を有する二重構造を形成するオリゴヌクレオチドを指している。プローブは、当該分野で知られる方法により、標識化されていてもよい。本発明によるプローブは、一本鎖でも二本鎖でもよい。

【0120】

診断装置

本発明は、特異病を診断しまたは特異突然変異を識別するのに用いられるバイオチップ、遺伝子チップまたはマイクロアレイのような診断装置を含んでいる。配列が決定されたすべてのミトコンドリアゲノムは、塩基対配列の一致構造を生成するように評価されるとともに、特定の病気または機能疾患に関連した突然変異および塩基対欠失の比率の抑制指数を付与される。診断装置は、次に、バイオチップ、遺伝子チップまたはマイクロアレイを生成するのに使用される。

30

【0121】

特定の病気、病状または機能障害に関連した配列が一旦識別されると、オリゴヌクレオチドのアレイへのmtDNAのハイブリダイゼーションが特定の突然変異を識別するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションの任意の既知の手法が用いられてよい。好ましくは、野生型または突然変異領域とマッチするオリゴヌクレオチドプローブおよび制御プローブを有しているアレイが用いられる。マイクロアレイまたは遺伝子チップのような市販可能なアレイが適している。これらのアレイは、適合した何千もの制御プローブ対をスライドまたはマイクロチップの上に有している。ゲノムおよびDNA配列分析におけるマイクロアレイの使用について記述する雑誌の記事は、www.gene-chips.comで入手可能である。

40

【0122】

<マイクロアレイ>

ポリヌクレオチドアレイは、一つまたはそれ以上のターゲット核酸配列を有する試料内で多数のポリヌクレオチドの分析を可能にする高速処理技術を提供する。本発明のアレイは

50

、遺伝子発現分析、病気の診断および予後（例：治療、ドラッグスクリーニングなどに対する患者の反応の監視）に有用である。

【0123】

病気、老化またはその他健康が関連した突然変異を示すmtDNAのポリヌクレオチド配列の任意の組合せが、マイクロアレイの構築のために用いられる。

【0124】

マイクロアレイを用いて分析されるべきターゲット核酸試料は、上述したように、十分な量のmtDNAを含む任意のヒトの組織または体液、好ましくは前立腺液、固形腫瘍、血液または尿から採取される。ターゲット核酸試料は、相補核酸要素/ターゲット複合体のハイブリダイゼーションのパターンを生じさせるのに十分なハイブリダイゼーション条件下で、ポリヌクレオチド要素と接触させられる。

10

【0125】

<マイクロアレイの構築>

マイクロアレイは、固形支持部の一方の面に付着した複数の特定(unique)のポリヌクレオチドを有している。ポリヌクレオチドの各々は、予め選択された同一でない領域において固形支持部の面に付着している。アレイ上の各関連試料は、以下により詳細に記述されるように、既知のアイデンティティ(identity)、通常は既知の配列のポリヌクレオチド成分を有している。本発明においては、考えられる任意の基質を採用するようにしてもよい。

【0126】

アレイは、既知の任意の手段を用いて構成される。核酸要素は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)や逆転写(RT)のような、確立された技術を用いて生成されてもよい。これらの手法は、当該分野で現在知られている技術と類似している(例えば PCR Strategies, Michael A. Innis (Editor), et al.(1995) および PCR: Introduction to Biotechniques Series, C.R. Newton, A. Graham (1997) 参照)。増幅されたポリヌクレオチドは、当該分野でよく知られた方法(例：カラム精製)によって精製される。ポリヌクレオチドは、所望のポリヌクレオチドの合成の間に生成された不完全な生産物およびポリマーが実質的にないときには、純粋であると考えられている。好ましくは、精製されたポリヌクレオチドもまた、分子の結合作用を妨げたり邪魔をしたりする汚染物が実質的にないだろう。

20

【0127】

本発明のアレイにおいては、ポリヌクレオチドの構成成分が、固形支持部の表面に安定して結合している。支持部は、可撓性のあるまたは堅い固形支持部である。

30

【0128】

本発明においては、核酸要素が付着する任意の固形支持部を用いてよい。適切な固形支持部の材料の例は、以下のものを含むが、これらには限定されない。すなわち、ガラスおよびシリカゲルのようなケイ酸塩、セルロース紙、ニトロセルロース紙、ナイロン、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ラテックス、ラバー、およびテフロンTMのようなフッ化炭素樹脂。

【0129】

堅い支持要素は、スライドやビード(これらには限定されない)を含む幅広い種類の形状で用いられてよい。スライドは、いくつかの機能上の利点を提供しており、固形支持部の好ましい形態である。その平坦な面のために、ガラススライドを用いることにより、プローブやハイブリダイゼーション試薬が最小にされる。スライドはまた、試薬のターゲット応用を可能にし、一定の温度に保持するのを容易にし、洗浄を容易にするとともに、固形支持部に固定化されたRNAおよび(または)DNAの直接的な視覚化を容易にする。固形支持部に固定化されたRNAおよび(または)DNAの除去についても、スライドを用いることにより容易になる。

40

【0130】

固形支持部として選択される特定の材料は、記述された機能を提供する限りにおいて、本発明に本質的なものではない。通常、本発明を生産しまたは使用する者は、コスト面、入

50

手可能性、最終生成物において期待される応用条件、および全製造工程の需要に基づいて、最良の市販可能な材料を選択するだろう。

【0131】

本発明の核酸要素を基質に付着させる（スポットティングと称される工程）ための多くの手法が用いられている。たとえば、ポリヌクレオチドは、米国特許第5,807,522号の技術を用いて付着されている。なお、当該米国特許は、ポリマー付着の方法を教示するために、引用することによって本明細書の中に含まれている。あるいは、スポットティングは、密着印刷技術（contact printing technology）を用いて実行される。

【0132】

各構成成分に存在するポリヌクレオチドの量は、アレイが採用される分析の間にターゲットポリヌクレオチド配列の検出および十分なハイブリダイゼーションを提供するのに十分であろう。一般に、アレイの固形支持部と安定して結合する各核酸要素の量は、少なくとも約0.1 ngであり、好ましくは少なくとも約0.5 ngであり、より好ましくは少なくとも約1 ngである。各核酸の量は、せいぜい1000 ngまたはそれ以上であり、通常は約20 ngを超えない。拡散要素が、全体として円の大きさを有するスポット内において固形支持部の上にスポットされる場合、スポットの直径は、一般に約10~5,000 μmの範囲であり、大抵約20~2,000 μmであり、普通は約50~1,000 μmである。

【0133】

プローブが標識化されるターゲット以外の試料においてポリヌクレオチドに対する非特異性結合またはクロス・ハイブリダイゼーションを監視するために、制御ポリヌクレオチドは、アレイ上にスポットされて、ターゲット発現制御ポリヌクレオチドおよび mismatches 制御ヌクレオチドとして用いられてもよい。このため、 mismatches プローブは、ハイブリダイゼーションが特異的かそうでないかを示す。たとえば、もしターゲットが存在していれば、完全にマッチしたプローブが mismatches プローブよりも常に明るいはずである。また、もしすべて中央の mismatches が存在していれば、 mismatches プローブが突然変異を検出するのに使用される。

【0134】

<ターゲットの準備>

マイクロアレイのためのターゲットは、ヒトの体液または組織の試料から採取される。ハイブリダイゼーションに先立って、ターゲット核酸試料を増幅するのが望ましいであろう。当該分野の当業者は、どんな増幅方法が用いられようとも、もし定量的結果が望ましいのであれば、増幅されたポリヌクレオチドの相対的頻度を制御または維持する方法を使用するように注意しなければならないということを理解するだろう。「定量」増幅の方法は、当該分野の当業者には周知である。たとえば、定量PCRは、同じプライマーを用いて既知の量の制御配列を同時に増幅することを含んでいる。このことは、PCR反応を較正するのに用いられる内部基準を提供する。高密度のアレイは、増幅されたポリヌクレオチドの定量化のための内部基準に特異性を有するプローブを含んでいてよい。定量PCRのための詳細なプロトコルは、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innisらによる Academic Press, Inc. N.Y.(1990)に提供されている。その他の適切な増幅方法は、以下のものを含むが、これらには限定されない。すなわち、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Innis, et al., PCR Protocols. A guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego, (1990)）、リガーゼ連鎖反応（LCR: ligase chain reaction）（Wu and Wallace, Genomics, 4: 560(1989), Landegren, et al., Science, 241: 1077(1988) and Barringer, et al., Gene, 89: 117(1990), transcription amplification（Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173(1989)）および自動継続配列複製（self-sustained sequences replication）（Guatelli, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87: 1874 (1990)）。

【0135】

本発明は、標識ターゲットまたは標識プローブを提供する。本発明においては、分子内に付着されまたは組み込まれた、分析的に検出可能な任意のマーカーを用いてよい。分析的

に検出可能なマーカーは、分析的に検出されて定量化される任意の分子、原子団または原子を指している。本発明への使用に適した検出可能な標識は、分光、光化学、生化学、免疫化学、電気的、光学または化学的手段によって検出可能な任意の構成成分を含んでいる。本発明に有用な標識は、標識化ストレプトタビジン抱合体で染色されるビオチン、磁気ビード（例：DynabeadsTM）、蛍光染料（例：フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、グリーン蛍光タンパク質など）、放射能標識（例：³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C または ³²P）、酵素（例：西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、および E L I S A（エンザイムイムノアッセイ）において一般に使用されているその他のもの）、および金コロイド、着色ガラス、プラスチックビード（例：ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）のような比色標識を含んでいる。このような標識の使用について教示する特許は、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、第4,366,241号を含んでいる。

10

【0136】

このような標識を検出する手段は、当該分野の当業者にはよく知られている。したがって、たとえば、放射能標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて検出され、蛍光マーカーは、放出した光を検出する光検出器を用いて検出される。酵素標識は、典型的には、基質に酵素を与え、基質上の酵素反応により生成される反応生成物を検出することによって検出され、比色標識は、着色標識を単に視覚化することによって検出される。

【0137】

標識は、当該分野の当業者によく知られた多くの手段のうちのいずれかによって組み込まれる。なお、好ましい実施例においては、標識は、試料のポリヌクレオチドの準備における増幅工程の間に同時に組み込まれている。このため、たとえば、標識化プライマーまたは標識化ヌクレオチドとのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が、標識化された増幅生成物を提供するだろう。好ましい実施例においては、上述したように、標識化ヌクレオチド（フルオレセイン標識UTPおよび/またはCTP）を用いた転写増幅は、標識を転写ポリヌクレオチドに導入している。あるいは、標識は、元のポリヌクレオチド試料（例：mRNA, ポリA mRNA, cDNAなど）に、または増幅完了後の増幅生成物に直接加えてられてもよい。ポリヌクレオチドに標識を付ける手段は、当該分野の当業者にはよく知られており、たとえば、試料のポリヌクレオチドを標識（例：fluorophore）に結合するポリヌクレオチドリンカーの次の付着（連鎖反応）およびポリヌクレオチドをキナーゼ化することによるニックトランスレーションや端部標識化（end-labeling）（例えば標識化RNAとの）を含んでいる。

20

30

【0138】

好ましい実施例では、ターゲットは、マイクロアレイから発生した信号を平均化するために、マイクロアレイ上のプローブを制御するように雑種核酸を作る一つまたはそれ以上の制御分子を含んでいる。標識化された平均化ターゲットは、上述したようにマイクロアレイ上にスポットされるオリゴヌクレオチドを制御するように完全に相補的なポリヌクレオチド配列である。ハイブリダイゼーション後に平均化制御から得られた信号は、ハイブリダイゼーション条件の変化、標識強度の変化、効率の「読み（reading）」の変化、完全なハイブリダイゼーション信号をアレイ間で変化させる他の要因の変化のための制御を提供する。

40

【0139】

<ハイブリダイゼーション条件>

ポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーションは、プローブまたはターゲット核酸要素およびその相補的ターゲットが相補的な塩基対合を通じて安定したハイブリッド二重構造を形成することができる条件下で、変性プローブまたはターゲット核酸要素およびターゲットポリヌクレオチドを提供することを含んでいる。ハイブリッド二重構造を形成しないポリヌクレオチドは、付着された検出可能な標識の検出を通じて検出されるべきハイブリッド形成のポリヌクレオチドを残したまま、洗い流される。ポリヌクレオチドは、温度を上げ

50

たり、ポリヌクレオチドを含む緩衝液の塩濃度を下げたりすることによって変性することが、一般に認識されている。低緊縮条件 (low stringency conditions) 下 (例: 低温および/または高濃度塩分) では、アニーリングされた配列が完全に相補的でない場合においても、ハイブリッド二重構造体 (例: DNA:DNA, RNA:RNA, RNA:DNA, cDNA:RNA, cDNA:DNA) が形成される。このため、ハイブリダイゼーションの特異性は、低緊縮時には減少する。これとは逆に、高緊縮 (higher stringency) 時 (例: 高温または低濃度塩分) においては、成功したハイブリダイゼーションがほとんどミスマッチを要求しない。ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は、当該分野の当業者にはよく知られている (例えば、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Polynucleotide Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993))。 10

【0140】

ハイブリダイゼーションに続いて、ハイブリッド形成されずに標識化されたまたは標識化されていないポリヌクレオチドが、好都合なことに洗浄によって支持面から取り除かれる。これにより、ハイブリッド形成されたターゲットポリヌクレオチドのパターンが支持面上に生成される。種々の洗浄液が当該分野の当業者に知られており、これらが用いられてよい。結果として生じるところの、標識化されてハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドおよび (または) ポリヌクレオチドのハイブリッド形成のパターンは、種々の方法で視覚化されて検出されてよい。特定の検出方法が試験ポリヌクレオチドの特定の標識に基づいて選択されており、代表的な検出手段は、シンチレーションカウンティング、オートラジオグラフィ、蛍光測定、比色測定、発光測定などを含んでいる。 20

【0141】

<イメージ獲得およびデータ分析>

上述したように、ハイブリダイゼーション、任意の洗浄工程および (または) その後の処理に続き、その結果として生じるハイブリダイゼーションのパターンが検出される。ハイブリダイゼーションパターンを検出しまたは視覚化する際には、標識の強度または信号値が検出されるだけでなく、定量化される。このことは、ハイブリダイゼーションの各スポットからの信号が測定されて、既知の数の端部標識化ターゲットポリヌクレオチドにより発せられる信号に対応する単位値と比較され、これにより、ハイブリダイゼーションパターンにおいてアレイ上の特定のスポットにハイブリッド形成される各端部標識化ターゲットのコピー数の数または絶対値が得られるということを意味している。 30

【0142】

アレイへのハイブリッド形成から集められたデータを分析する手法は、当該分野ではよく知られている。たとえば、ハイブリッド形成の検出が蛍光標識を含んでいる場合には、データ分析は、集められたデータから基質位置の関数として蛍光強度を決定し、異常値つまり所定の統計分布から外れているデータを除去し、残りのデータから試験ポリヌクレオチドの相対的な結合親和性を計算する工程を含み得る。残りのデータは、関連するオリゴヌクレオチドと (または) ポリヌクレオチドと試験ポリヌクレオチドとの間の結合の親和性に依りて変化する各領域の強度を備えたイメージとして示されている。 40

【0143】

検出または視覚化に続いて、ハイブリッド形成のパターンが、ハイブリッド形成パターンを生成するようにアレイと接触した標識化ターゲットポリヌクレオチド試料の遺伝子の特徴のみならず、標識化ターゲットポリヌクレオチド試料が取り出された生理学的出所についての定量的情報を決定するのに用いられている。遺伝子の特徴は、試料内に存在するポリヌクレオチドの型に関する、すなわち相補性を有する遺伝子の型のみならず試料内の特定のポリヌクレオチドのコピー数に関する情報を意味している。 40

【0144】

<診断検査または予後検査>

本発明は、病気を検出するための診断検査を提供する。本発明はまた、治療に対する患者の反応を観察するための予後検査をも提供する。本発明の方法によれば、病気の存在また 50

は治療に対する患者の反応が、患者から体液または組織試料を採取することによって検出される。体液または組織の試料から、核酸を含む試料が用意される。試料から抽出された核酸は、固形基質および複数の核酸要素を含むアレイに対してハイブリッド形成される。各要素は、病気あるいは病気素質または機能障害素質の存在を示している。この診断検査によれば、アレイ上の一つまたはそれ以上の核酸要素に対する、核酸を含む試料のハイブリッド形成が、病気、病気素質または機能障害素質を示しており、さらに予後検査の場合には、治療に対する患者の反応を示している。

【0145】

本発明のその他の有用性は、上述したように、また以下の例に示すように、当該分野の当業者にはすぐに明らかとなるだろう。

10

【0146】

本発明は、以下の実例においてさらに詳細に記述されている。多数の変更例や変形例が当該分野の当業者には明らかであるので、これらの実例は単なる例示にすぎない。

【0147】

実例1：前立腺腫瘍

前立腺液の採取または前立腺腫瘍を切除する外科手術に続いて、変異細胞または癌細胞を特定するために、生検スライドが準備される。正常、良性または悪性の細胞を組織部分から分離するのに、レーザー捕捉微小切断(LCM: Laser Capture Microdissection)顕微鏡検査が用いられる。前癌性細胞や癌細胞浸潤グループのような、対象となっている罹病細胞の入手は、周囲の外性細胞の中から可能である。

20

【0148】

これらの各細胞からのすべてのDNA抽出物は、Arcturus Engineering Inc. によって概略示されたプロトコルの変形例に応じて精製される。DNAは、10 mMのトリス(pH 8.0)、0.1 mMのEDTA(pH 8.0)および0.1%のTween 20内において、1 mg/mlのプロテイナーゼK(PK)の50 μ lの容積をもって、42 で一晩かけて細胞から抽出された。42 で一晩培養した後、培養炉から管が取り出された。試料は、6400rpm(2000 x g)で5 min遠心分離された。CapSureTMが管から取り外されて廃棄された。管は、95 で10分間培養されて(PKは不活性)、室温まで冷却された。5 ~ 50 μ lの試料がPCR増幅のために用いられた。

【0149】

精製に続いて、超可変領域1(HV1)、超可変領域2(HV2)およびすべての12S領域のための適切なプライマーを用いてLX-PCRにより、個々の試料が増幅される。次に、これらのPCR生成物は、当該分野でよく知られた高速処理法を用いて配列決定される。

30

【0150】

実例2：太陽にさらされた皮膚からのmtDNAの非コード領域の複製

Qiagenにより供給されたDNeasyTMキットを使用して、実例1に記述されたように、組織試料からDNAが抽出された。太陽にさらされたことに関連した非コード領域(NCR)のタンデム重複の発生を調査するのに、「背中合わせ(back to back)」のプライマー法が用いられた。32歳に匹敵する、太陽にさらされた体の部位(n=24)および太陽から保護された体の部位(n=10)からのヒトの皮膚の分割試料が調査された。

40

【0151】

Brockingtonら(1993)およびLeeら(1994)からの以下の重複プライマーが用いられた。

C	L336	AAC ACA TCT CTG CCA AAC CC	20 mer
D	H335	TAA GTG CTG TGG CCA GAA GC	20 mer
E	L467	CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC	20 mer
F	H466	AGT GGG AGG GGA AAA TAA TG	20 mer

【0152】

プライマー対であるC/DおよびE/Fは、非コード領域の直列反復における二つの隔てられた組の部位において、「背中合わせ(back to back)」である。このため、もしこれら

50

の部位に重複が存在していれば、直列反復は単に生成物を生成するだけである。生成される生成物は、260 bpおよび（または）これより少ない200 bpの共通バリエーションである。変更されたPCR条件は、以下のとおりである。総量100ngの細胞DNA、200 μMのdNTP、2.5 U HotStar Taq ポリメラーゼおよびPCR緩衝液（Qiagen, UK）、94 4分間を1サイクル、94 x1分間、55 x1分間および72 x1分間を36サイクル、ならびに72 7分間を1サイクルである。

【0153】

太陽への露出の増加とともに、重複の発生の増加が観察された。太陽にさらされた皮膚からの試料と太陽から保護された皮膚からの試料とについてそれぞれ10/24で重複が確認され、0/10で重複が確認されなかった（Fisher's exact test, p=0.015）（Birch-Machin and Krishnan 2001）。もっとも頻度の高い重複のサイズは、200および260塩基対であった。興味深いことに、これらの同じ試料はまた、事例6に記述されている、確立された定量化3プライマーPCR分析によって決定されたような高レベル（>1%）の4977bpの共通mtDNA欠失を含んでいた。

【0154】

事例3：ヒトのNMSCおよびその前駆体損傷におけるmtDNAの突然変異フィンガープリント

QiagenによるDNeasyTMを用いて、事例1に記述されたヒトの皮膚組織試料からDNAが抽出された。特定のプライマーを用いて、mtDNAは、PCRおよびこれに続くDNA試料の準備（Qiagen）によって増幅された。突然変異は、BigDyeTM Terminator Cycle配列決定を用いた自動配列決定（PE Applied Biosystems）によって認識された。このようなやり方は、Healyら（2000）および Hearingら（2000）に記述されている。偽遺伝子やその他の核遺伝子座を増幅しないことで知られている、確立されたPCRプライマー対を用いて、すべての16,569bpのヒトのミトコンドリアゲノムの配列が決定される。推定される任意のDNA変化は、改訂された「ケンブリッジ」ヒトmtDNA文献（Andrewsら（1999））と比較することによって確認される。腫瘍のmtDNAから得られた配列は、まず、既知の多型性（Andrewsら（1999）；MITOMAP）のために比較され、次に、純粋な体細胞突然変異を認識するために、正常な皮膚からのmtDNA配列と比較される。

【0155】

完全自動化スクリーン処理を提供するDHP LCが、WAVETM DNA Fragment Analysis System（Transgenomic, Omaha, USA）において実行される。同じ技術は、皮膚腫瘍mtDNAのヘテロプラスミーのためにスクリーンするのに用いられる。

【0156】

事例2に記述されたような背中合わせ（back to back）プライマー法を用いて、非コード領域（NCR）の非常に変化しやすい部分においてDNA長さの突然変異（つまりタンデム重複）のパターンが迅速にスクリーニングされる。

【0157】

事例4：ヒトのNMSCおよびその前駆体損傷におけるすべてのミトコンドリアゲノムの欠失スペクトル

扁平上皮細胞がん（SCCS）、基底細胞がん（BCCS）、およびボーエン病や化学線角化症のような推定される前駆体損傷におけるmtDNA損傷が、太陽にさらされた体の異なる部位から採取された隣の皮膚と比較された。すべてのミトコンドリアゲノムを増幅してmtDNAのすべての欠失スペクトルを決定するために、長PCR技術（LX-PCR）（Rayら（1998））が用いられた。無数の特異欠失が、すべてのミトコンドリアゲノムにおいて発生するのが観察された。しかしながら、すべての欠失が非黒色腫皮膚がんとは相関関係を有するとは限らないが、正確な診断方法のためには、病気と関連する欠失が知らなければならない。

【0158】

DNAは、生産者の推薦に応じて、市販のキット（Qiagen）を用いて抽出される。すべてのミトコンドリアゲノムは、ExpandTM Long Template PCR SystemsTM（Boehringer Ma

nheim, スイス)を用いて、別個の二つの反応で増幅される。使用されるPCRプライマーは、ケンブリッジ配列 (Andrewsら (1999)) の以下の領域をカバーする、Kleinleら (1997) により記述されたものである。すなわち、D I A (ヌクレオチド(nt)336-363), D I B (nt 282-255), O L A (nt 5756-5781), およびO L B (nt 5745-5781)である。これらの大きな生成物は、核偽遺伝子の増幅を排除する。プライマーの配列は以下のとおりである。

DIAF:(336-363) 5' AACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACA 3'

OLBR:(5745-5721) 5' CCGGCGGGCGGAGAAGTAGATTGAA 3'

OLAF:(5756-5781) 5' GGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGC 3'

DIBR:(282-255) 5' ATGATGTCTGTGTGGAAAGTGGCTGTGC 3'

【0159】

増幅は、16 pmolの各プライマー、500 μmolのdNTP、2.2.5 MmのMgCl₂ および界面活性剤(キット)を含む10 x PCRの緩衝剤、0.75 μlの酵素(3.5 x 10³ 単位/ml)および50~200 ngの全DNAを含む50マイクロリッターの反応液内で実行される。一つの反応がゲノムの11,095bpの部分を生じ、他の反応が5,409bpの長さに帰着する(例えばKleinleら(1997))。PCR増幅条件は、93 で1分30秒の変性段階と、これに続く、93 30秒、60 30秒および68 12分の10サイクルと、さらにこれに続く、同じ温度変化の20サイクルであって各サイクルに5秒の延長時間が加えられたものから構成されている。そして、93 30秒、60 30秒および68 26分の最終サイクルがある。再生産性を確保するために、1%アガロースゲル上で既知の量のDNAが分離されており、少なくとも同じ量のDNAを有している試料のみが分析に含まれている。

【0160】

表2に示すように、腫瘍試料においてUVにさらされる時間が増えるほど、平均的に多数の欠失が発見されている。

【表2】

UV (紫外線) にさらされた体の異なる部位から採られた正常な皮膚および腫瘍の皮膚において mtDNA の LX-PCR で観察された欠失の平均数の比較

UVにさらす	隣接した正常な上皮における欠失の平均数	上皮腫瘍における欠失の平均数
常時 (n=5)	1.0	3.6
断続的 (n=2)	0	1.5
太陽から保護 (n=2)	0	0

【0161】

実例5：老化およびmtDNA

ヌクレオチドの塩基対の配列をその特異分子および可能な時間変化のために最終的に明確にするために、与えられた組織から抽出されたmtDNAのすべての配列が、時間的な母系比較(つまり曾孫から祖父母までの)を用いて、迅速かつ正確に決定される。これらの特徴付けは、大きな集団の中の特異な母系間で、健康状態および老化のインジケータと比較される。この組み合わせられた情報は、同じ突然変異/欠失に帰着することになる別個の原因の間の重要な統計的区別を与えるとともに、バイオマーカーとして用いられるmtDNA配列が、その有効性を確立するために、要求された特異性指数と感度を有しているということを証明している。また、塩基対の欠失および突然変異の比率が、一貫性のために、母方の4世代にわたって種々の組織で比較される。最近の方法論の発達は、血液試料において老化に影響を与える塩基対欠失の検出を可能にするとともに (Bassamら (1991))、mtDNAを研究するのに、骨格筋の代わりに血液試料が用いられてもよいという可能性

10

20

30

40

50

を高めた (Von Wurmbら (1998))。mtDNAの欠失および/または突然変異の代表例として、筋肉組織の代わりに白血球を採用する有効性を確立した後で、次の工程は、白血球中のmtDNAのみを評価するだけである。次に、mtDNAの欠失/突然変異が、既述したようにして決定される。

【0162】

骨格筋または白血球は、患者から採取された。DNAは、実例1で実行されたようにして抽出された。以下のプライマーが用いられた。

12ST1:(1257-1279) 5' TATACCGCCATCTTCAGCAAAC 3'

12ST2:(1433-1411) 5' TACTGCTAAATCCACCTTCGAC 3'

D1F: 5' CCTTACACTATTCCTCATCACC 3'

D1R: 5' TGTGGTCTTTGGAGTAGAAACC 3'

10

【0163】

増幅は、2.0 μmolの各プライマー、250 μmolのdNTP、10 x PCR緩衝剤 (Thermopoll Reaction Buffer)、ウシ血清アルブミン、0.5単位のDeep vent ポリメラーゼ、および50 - 200 ngの全DNAを含む50マイクロリッターの反応液中で実行された。

PCR増幅条件は、95 で5分間の変性段階 (ホットスタート) と、これに続く、94 30秒間、60 60秒間、72 10分間の最終延長がある72 30秒間の30サイクルとから構成されている。2%アガロースゲルにおいて、125ボルトで60分間、ゲル電気泳動が実行された。そして、臭化エチジウムで染色され、UV光の下で視覚化された。再生産性を確保するために、2%アガロースゲル上で既知の量のDNAが分離されており、同じ量のDNAを有している試料のみが分析に含まれている。

20

【0164】

実例6: 3-プライマーPCRによる4977bp共通mtDNA欠失の定量化検出

適切な個所において、1-5%よりも高いレベルを検出する3-プライマーPCR法による、または1%よりも低く 10^{-4} %までのレベルを検出する希釈PCR法による、定量的方法で共通欠失の発生が決定される (実例7参照)。試料は採取され、DNAは、実例1に既述したようにして抽出された。DNA試料中において欠失mtDNAおよび野生型 (wt) mtDNAの双方の比率を同時に検出して定量化するために、3-プライマーPCR法が用いられる (Birch-Machinら (1998)に既述されたように)。プライマーAおよびCは、重鎖位置13720-13705および9028-9008にそれぞれ対応しており (Andersonら (1981))

30

、プライマーBは、軽鎖位置8273-8289位置に対応している。プライマーCは、共通欠失内のmtDNA領域に位置しており、プライマーAおよびBは、欠失領域の側面に位置している。したがって、プライマーBおよびCは、wt-mtDNAを増幅するだけであり、プライマーAおよびBは、欠失mtDNAを増幅するだけである (欠失のない二つのプライマー間の距離である約5.5kbは、以下に述べるように、我々のPCR条件の下で増幅するには長すぎる)。

【0165】

三つのプライマーの使用は、wt-mtDNAに対応する長いバンド (755bp) と「共通欠失」にいる欠失mtDNAに対応する短いバンド (470bp) という二つのバンドの同時検出を可能にした。PCR反応混合物 (総量25 μl) は、総量100 ngの細胞DNAと、200 μMのdNTPと、10 mMのトリス HCL (pH 8.8) と、50 mMのKClと、1.5 mMのMgCl₂ と、0.1%のトリトンX-100と、2.5 UのTaq DNA ポリメラーゼ (BioTaq, BiolineUK Limited, London)、2.5 pmolのプライマーA、B、6.25 pmolのプライマーC、および3 μCi of [³²P]-dATP。PCR条件は、94 1分間、55 1分間、72 15分間の最終延長を含む72 2分間の25サイクルであった。次に、これらのPCR生成物は、6%の非変性ポリアクリアミドゲルを用いて電気泳動された。そして、放射性PCR断片が、ImageQuantTMソフトウェア (Moleculer Dynamics, Chesham UK) を用いた分析によって定量化された。

40

【0166】

実例7: 低レベル (< 1%) の共通mtDNA欠失を定量的に検出するための連続希釈P

50

C R 法

組織/細胞試料から抽出されたすべてのmtDNA中の共通欠失の比率を評価するために、半定量化PCR法(Corral-Debrinskiら(1991))が用いられる。生物学的試料が採取され、実例1に示すようにして、DNAが抽出された。DNA試料は、まず、制限酵素BamHI(1μlの酵素および工業用に供給された1μlの緩衝剤)を用いて37℃で90分間かけて線状にされた。(最初10倍の希釈液があった完全mtDNAのために)2倍の工程で連続希釈が実行された。そして、以下のプライマーを用いて、各希釈液(1μl)についてPCRが実行された。

完全mtDNAのためのプライマー

L3108(nt3108-3127)

H3717(nt3717-3701)

共通欠失のためのプライマー

L8282(nt8282-8305)

H13851(nt13851-13832)

【0167】

反応条件は以下のとおりである。

94℃ 2分間を1サイクル、94℃ 45秒間、51℃ 30秒間(完全mtDNA)、56℃ 30秒間(共通欠失)および72℃ 1分間を34サイクル、最後に72℃ 8分間を1サイクル。すべてのPCR反応は、以下の混合物(50μl)内で実行された。1μlの試料DNA、0.6μMの前進(forward)プライマー、0.6μMの復帰(reverse)プライマー、0.2mMのdNTP、5μlのGeneAmp^R 10x PCR緩衝剤(Perkin Elmer)、0.2μlのAmplitaq^RのDNAのポリメラーゼ(Perkin Elmer)、オートクレーブされた35.75μlの2倍無菌蒸留水。

【0168】

電気泳動に続いて、PCR生成物がUV照通装置(TMW-20, Flowgen Ltd., Lichfield, UK)で視覚化されるとともに、イメージ捕捉措置(Flowgen LTD., Lichfield, UKにより供給されたAlpha Imager 2000, Alpha Innotech Corporation,)を用いて、ゲルのデジタル像が得られた。関連するイメージ解析ソフトウェア(Alpha Ease v3.3, Alpha Innotech Corp.)は、直接希釈において各PCR生成物についての統一吸光度(IOD: Integrated Optical Density)の算出を可能にした。IOD値が零の帯域は、完全mtDNAおよび欠失mtDNAの双方について得られた。対応する希釈値が、以下のように、試料内の共通欠失の比率を計算するのに用いられている。

共通欠失(%) = [全mtDNA希釈因子(^{IOD Zero}) × 100] / [共通欠失希釈因子(^{IOD Zero})]

【0169】

実例8:変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)

試料が採取され、実例1と同様にして、DNAが抽出された。Van den Boschら(2000)により記述された二つの異なるPCR条件を用いることにより、13の重複断片についてPCRが実行された。以下は、PCRのための三つのmtDNA特異プライマー対である。

i. オリゴ配列

Mt3118F CCCTGTACGAAAGGACAAGAG

Mt3334R TGAGGAGTAGGAGGTTGG

Mt8207F CCCATCGTCCTAGAATTAATTCC

Mt8400R ATGGTGGGCCATACGGTAG

Mt14427F CCCATGCCTCAGGATACTCCTC

Mt14997R GCGTGAAGGTAGCGGATG

【0170】

1-2 kbのPCR生成物は、90-600 bpの断片に温浸され、最適な融解温度で分解された。突然変異は、二つのピークで表され、2%ヘテロプラスミーよりも低いような低い比率の突然変異は、ピークの「肩部」で表される。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 1 】

DHPLCは、二つの溶離液（pH 7.0）からなる流動相を用いて実行される。緩衝液Aは、トリエチルアンモニウムアセテート（TEAA）を含んでおり、これは、DNA上で負に帯電したリン酸基およびカラム表面の双方と相互作用する。緩衝液Bは、25%変性剤アセトニトリルを有するTEAAを含んでいる。断片は、一定の流速においてアセトニトリルの1次勾配をもって溶離した。アセトニトリルの濃度を上げると、断片が変性する。以下の表3は、製造者の指示にしたがってWAVEMAKER ソフトウェア（Transgenomics）を用いることにより、生成したPCR反応のDHPLCのための標準的な方法の一例を示している。

【表3】

10

DHPLCのための標準的な方法

工程	時間	緩衝液A (%)	緩衝液B (%)	ml/min (流速)
ローディング	0.0	52	48	0.90
勾配開始	0.1	47	53	
勾配停止	4.1	39	61	
クリーニング開始	4.2	0	100	
クリーニング停止	4.7	0	100	
平衡開始	4.8	52	48	
平衡停止	6.8	52	48	

20

【 0 1 7 2 】

種々の heteroduplexes において成功した分解の温度は、以下に詳細に示されており、表2の関連位置に置き換えることができる。

断片	融解温度 ()	緩衝液Bの濃度勾配 (%)
Mt3118F	59	51-59
Mt8207F	58	50-58
Mt14427F	56	60-68

30

【 0 1 7 3 】

参考文献

Anderson S, et al., Nature 290:457-464, 1981.

【 0 1 7 4 】

Andrews RM, et al., Nature Genetics 23(2):147, 1999.

【 0 1 7 5 】

Barringer, et al., Gene 89:117, 1990.

【 0 1 7 6 】

Bassam BJ, Caetano-Anolles PM, Gresshoff PM., Anal. Biochem. 196:80-83, 1991.

40

【 0 1 7 7 】

Berneburg M, et al., J. Biol. Chem. 274(22):1 5345-15349, 1999.

【 0 1 7 8 】

Berthon P, Valeri A, Cohen-Akeninc A, Drelon E, Paiss T, Wöhr G, Latil A et al., Am. J. Hum. Genet., 62:1416-1424, 1998.

【 0 1 7 9 】

Birch-Machin MA, et al., Methods in Toxicology, Volume 2, 51-69, 1993.

【 0 1 8 0 】

Birch-Machin MA, et al., J. Invest. Dermatol., 110:149-152, 1998.

50

- 【 0 1 8 1 】
Birch-Machin MA, オンライン会議報告書 (Sunburnt DNA) , 生化学・分子生物学国際学会。New Scientist, 2000(a).
- 【 0 1 8 2 】
Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B, Ackrell BAC, Turnbull DM. Ann Neurol 48:330-335, 2000(b).
- 【 0 1 8 3 】
Birch-Machin MA, Clin. Exp. Dermatol., 25(2), 141-146, 2000(c).
- 【 0 1 8 4 】
Birch-Machin MA and Krishnan K. Mitochondrion, 1, p45 (2001). 10
- 【 0 1 8 5 】
Birch-Machin MA, Lindsey J. Lusher M and Krishnan K. Mitochondrion, 1 Suppl. 1, S30 (2001).
- 【 0 1 8 6 】
Bogliolo M, et al., Mutagenesis, 14:77-82, 1999.
- 【 0 1 8 7 】
Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James O, Turnbull DM., Ann Neurol 43(2):217-223, 1998.
- 【 0 1 8 8 】
Brockington, et al., Nature Genet 4:67-71, 1993. 20
- 【 0 1 8 9 】
Brown M.D., et al., Am J. Humn Genet, 60:381-387, 1997.
- 【 0 1 9 0 】
Brumley R.L. Jr. and Smith L.M., 1991, 水平極薄ゲル電気泳動による高速DNA配列決定。Nucleic Acids Res. 19:4121-4126.
- 【 0 1 9 1 】
Buttayan R, Sawczuk IS, Benson MC, Siegal JD, Olsson CA., Prostate 11:327-337, 1987.
- 【 0 1 9 2 】
Byrne E., Curr Opin Rheumatol 4(6):784-793, 1992. 30
- 【 0 1 9 3 】
Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J et al., Cancer Res 57:4997-5000, 1997.
- 【 0 1 9 4 】
Chee M, et al., Science 274:610-614, 1996.
- 【 0 1 9 5 】
Chinnery PF, Howel N, Turnbull DM., J. Med. Genet. 36:425-436, 1999.
- 【 0 1 9 6 】
Chinnery PF and Turnbull DM., Lancet 354 (supplement 1):17-21, 1999.
- 【 0 1 9 7 】
Chinnery PF and Turnbull DM., Lancet 354 (supplement 1):17-21, 2000. 40
- 【 0 1 9 8 】
Chollat-Traquet C, Tobacco or health: a WHO programme., Eur J Cancer, 28(2-3):311-315, 1992.
- 【 0 1 9 9 】
Chomyn A, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(10):4221-4225, 1992.
- 【 0 2 0 0 】
Cohen D, Barton G, The cost to society of smoking cessation., Thorax. 53(2):S38-42, 1998.
- 【 0 2 0 1 】 50

Corral-Debrinski et al., *Mutat Res*, 275:169-180, 1991.

【 0 2 0 2 】

Cortopassi G.A. and Arnheim H., 高齢のヒトの組織における特異ミトコンドリアDNA欠失の検出。 *Nucleic Acids Res.* 18, 6927-6933, 1990.

【 0 2 0 3 】

Cortopassi G, Wang E., *Biochim Biophys Acta* 1271(1):171-176, 1995.

【 0 2 0 4 】

Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA, *Mutat Res* 434(3):137-148, 1999.

【 0 2 0 5 】

分子生物学の現行プロトコル。

10

【 0 2 0 6 】

Davis RM, Boyd GM, Schoenborn CA, 「一般的礼儀」と受動喫煙の排除。 Results of the 1987 National Health Interview Survey. *JAMA* 263(16):2208-10, 1990.

【 0 2 0 7 】

Dong JT, Isaacs WB, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC., *Science* 268:884-886, 1995.

【 0 2 0 8 】

Driezen P, Brown KS., Searchable database of questionnaire items from population surveys of tobacco use in Canada: A summary report to the Ontario Tobacco Research Unit (Toronto, Ontario), 1999.

20

【 0 2 0 9 】

Easton RD, Merriwether AD, Crews DE, and Ferrell RE., *Am. J. Hum. Genet.* 59:202-212, 1996.

【 0 2 1 0 】

Fahn H, Wang L, Hseith R, Chang S, Kao S, Huang M, and Wei Y. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 154:1141-1145, 1996.

【 0 2 1 1 】

Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 19(6):901-9, 1998.

【 0 2 1 2 】

Finegold D., *Mitochondrial Disease-Primary Care Physician's Guide*. Psy-Ed. Corp D /B/A *Exceptional Parents Guide*: 12, 1997.

30

【 0 2 1 3 】

Flanagan N, Birch-Machin MA, Rees JL., *Hum Mol Genet* 9(17):2531-2537, 2000.

【 0 2 1 4 】

Flanagan N, Ray AJ, Todd C, Birch-Machin MA and Rees JL., *J Invest. Dermatol* (2001) 117 (5) 1314-1317.

【 0 2 1 5 】

Fliss MS, et al. *Science* 287:2017-2019, 2000.

【 0 2 1 6 】

Gattermann N, Berneburg M, Heinisch J, Aul C, Schneider W., *Leukemia* 9(10):1704-10, 1995.

40

【 0 2 1 7 】

Green R, Reed JC., *Science* 281(5381):1309-1312, 1998.

【 0 2 1 8 】

Guatelli, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1874, 1990.

【 0 2 1 9 】

Gulavita, Sunil Dr. Northwestern Ontario Cancer Centre - Personal Communication.

【 0 2 2 0 】

Habano S, Nakamura, Sugai T., *Oncogene* 17(15):1931-1937, 1998.

50

- 【 0 2 2 1 】
Harding RM, et al., Am. J. Hum. Genet. 66, 1351-1361, 2000.
- 【 0 2 2 2 】
Harman D., Proc Natl Acad Sci USA 78(11):7124-8, 1981.
- 【 0 2 2 3 】
Hattori et al., ヒトの心臓における、欠失ミトコンドリアDNAの年齢依存性増加：possible contributory factor to presbycardia, AM. Heart J., 121, 1735-1742, 1991.
- 【 0 2 2 4 】
Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I., Proc Natl Acad Sci USA 88(23):10614-10618, 1991. 10
- 【 0 2 2 5 】
Hayward SW, Grossfeld GD, Tlsty TD, Cunha GR., Int J Oncol 13:35-47, 1998.
- 【 0 2 2 6 】
Healy E, Birch-Machin MA, Rees JL. Chapter 1 1. ヒトメラノコルチン1レセプター遺伝子。In the Melanocortin Receptors (Cone RD(ed)). Humana Press Inc. New Jersey, USA, 1999.
- 【 0 2 2 7 】
Healy E, Birch-Machin MA, Rees JL., Lancet 355, 1072-1073, 2000.
- 【 0 2 2 8 】
Hearst N, Hulley SB. Using secondary data, In Designing clinical research: an epidemiological approach. Ed. Hulley S. and Cummings S., Baltimore: Williams & Wilkins, pages 53-62, 1988. 20
- 【 0 2 2 9 】
Hopgood R., et al., 1992, PCR試料からの直接の、ヒトmtDNAの自動配列決定方法。Biotechniques 13:82-92.
- 【 0 2 3 0 】
Hsieh RH and Wei YH, ヒト筋ミトコンドリアDNAにおける年齢依存性多発性欠失。in preparation 1992.
- 【 0 2 3 1 】
Huang GM, Ng WL, Farkas J, He L, Liang HA, Gordon D, Hood R., Genomics 59(2):178-86, 1999. 30
- 【 0 2 3 2 】
<http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html>
- 【 0 2 3 3 】
Ikebe et al., パーキンソン病および老化におけるストリアートゥムでの欠失ミトコンドリアDNAの増加。Biochem. Biophys. Res. Commun. 170, 1044-1048, 1990.
- 【 0 2 3 4 】
Innis et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Application, Academic Press Inc. San Diego, 1990.
- 【 0 2 3 5 】 40
- Kaiserman MJ, Chronic Dis Can 18(1):13-9, 1997.
- 【 0 2 3 6 】
- Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K., Int. J. Exp. Pathol. 72(1):1-7, 1991.
- 【 0 2 3 7 】
- Katayama et al., 老齢のヒトの骨格筋における欠失ミトコンドリアDNA。Biochem. Int., 25, 47-56, 1991.
- 【 0 2 3 8 】
- Kleinle S, et al., Human Genet. 290:457-465, 1997.
- 【 0 2 3 9 】
- Konishi N, Cho M, Yamamoto K, Hiasa Y. Pathol. Int. 47:735-747, 1997. 50

- 【 0 2 4 0 】
Krishnan K and Birch-Machin MA. British Journal of Dermatology (2002), 146,723.
- 【 0 2 4 1 】
Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:1173, 1989.
- 【 0 2 4 2 】
Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer J. Clin. 49:8-31.
- 【 0 2 4 3 】
Landis, SH, et al., CA Cancer J. Clin. 49:8-31, 1999.
- 【 0 2 4 4 】
Landegren et al., Science, 241:1077, 1988. 10
- 【 0 2 4 5 】
LeDoux SP, et al., Mutat Res 434(3):149-159, 1999.
- 【 0 2 4 6 】
Lee HC, et al., FEBS Letters 354:79-83, 1994.
- 【 0 2 4 7 】
Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YH. Federation of European Biochemical Societies, 44
1:292-296, 1998.
- 【 0 2 4 8 】
Lee HC, et al., Arch. Biochem. Biophys. 362(2):309-16, 1999.
- 【 0 2 4 9 】 20
- Leonard & Shapira 1997.
- 【 0 2 5 0 】
- Lindsey J, Lusher M, Krishnan KJ and Birch-Machin MA., British Journal of Dermat
ology (2001), 144,655.
- 【 0 2 5 1 】
- Li Y, et al., In: Oxygen Radicals and the Disease Process, Amsterdam, The Nether
lands: Harwood Academic Publishers, 237-277, 1997.
- 【 0 2 5 2 】
- Linnane et al., 1990.
- 【 0 2 5 3 】 30
- Liu CS, Kao SH, Wei YH. Environ. Mol. Mutagen 30(1):47-55, 1997.
- 【 0 2 5 4 】
- Lowes S, Krishnan K, Lindsey J, Lusher M and Brich-Machin MA. British Journal of
Dermatology (2002), 146,736.
- 【 0 2 5 5 】
- Luckey J. A., et al., 1993, 毛細管ゲル電気泳動による高速DNA配列決定。Methods Enz
ymol. 218:154-172.
- 【 0 2 5 6 】
- McCormack, Douglas. Website: <http://cormactech.com/dna>, 2001.
- 【 0 2 5 7 】 40
- Meibner C, von Wurmb N, Oehmichen M., Int. J. Legal Med. 110:288-291, 1997.
- 【 0 2 5 8 】
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G., Science, 286:77
4-779, 1999.
- 【 0 2 5 9 】
- Miquel J, de Juan E, Sevilla I. EXS 62:47-57, 1992.
- 【 0 2 6 0 】
- MITOMAP: A human mt genome database (www.gen.emory.edu/mitomap.html).
- 【 0 2 6 1 】
- Mullis and Faloona Methods Enzymol 155, 335, 1987. 50

- 【 0 2 6 2 】
Nachman MW, Brown WM, Stoneking M, Aquardo CF., *Genetics* 142:53-963, 1996.
- 【 0 2 6 3 】
National Cancer Institute of Canada, Canadian cancer statistics 2000., National Cancer Institute of Canada., Toronto, Ont. 2000.
- 【 0 2 6 4 】
Naviaux RK., *Mitochondrial Disease-Primary Care Physican's Guide*. Psy-Ed. Corp D /B/A *Exceptional Parents Guide*: 3-10, 1997.
- 【 0 2 6 5 】
Newton CR and Graham A., *Introduction to Biotechniques Series* 1997. 10
- 【 0 2 6 6 】
Oefner PJ, Underhill PA., *Current protocols in human genetics* 19, 7.10.1-12, 1998.
- 【 0 2 6 7 】
Ozen M, et al., *Prostate* 36:264-271, 1998.
- 【 0 2 6 8 】
Pang et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 312:534-538, 1994.
- 【 0 2 6 9 】
Parsons TJ, et al., *Nature Genet.* 15(4):363-368, 1997.
- 【 0 2 7 0 】
Pascucci B, et al., *J. Mol. Biol.* 273(2):417-427, 1997. 20
- 【 0 2 7 1 】
Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC., *Mut. Res.* 488, 119-133, 2001.
- 【 0 2 7 2 】
Polyak Y, et al., *Nature Genet.* 20(3):291-293, 1998.
- 【 0 2 7 3 】
Ray AJ, Rees JL, Birch-Machin MA., *J. Invest. Dermatol.* 110:692, 1998.
- 【 0 2 7 4 】
Ray AJ, Rees JL, Birch-Machin MA., *Brit. J. Dermatol.* 140:788, 1999.
- 【 0 2 7 5 】
Ray AJ, Pickersgill L, Turner R, Nikaido O, Rees JL, Birch-Machin MA., *J. Invest. Dermatol* 115(4):674-679, 2000. 30
- 【 0 2 7 6 】
Rees JL, *Skin cancer*. In: *The Genetic Basis of Human Cancer*, eds Vogelstein B, Kinzler K. New York: McGraw-Hill, pp527-536, 1998.
- 【 0 2 7 7 】
Rehman I, Quinn AJ, Healy E, Rees JL. *Lancet* 344:788-789, 1994.
- 【 0 2 7 8 】
Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL. *Oncogene* 12:2483-2490, 1996.
- 【 0 2 7 9 】
SAS Enterprise Mining Users Guide, SAS Inc., 2000. 40
- 【 0 2 8 0 】
Sawyer E, Van Houten B., *Mutation Res.* 434(3):161-176, 1999.
- 【 0 2 8 1 】
Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, and Wallace DC., *Am. J. Hum. Genet.* 46:613-623, 1990.
- 【 0 2 8 2 】
Seidman M.D. et al., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 123:1039-1045, 1997.
- 【 0 2 8 3 】
Shankey TV, Jin JK, Dougherty S, Flanigan RC, Graham S, Pyle JM., *Cytometry* 21:3 50

- 0-39, 1995.
【 0 2 8 4 】
- Shay JW, Werbin H., *Mutat. Res*: 186:149, 1987.
【 0 2 8 5 】
- Sherrat EJ, Thomas AW, Alcolado JC., *Clin. Sci.* 92:225-235, 1997.
【 0 2 8 6 】
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckford CL, and Wallace DC., *Genomics* 17:171-184, 1993.
【 0 2 8 7 】 10
- Smith DG, Malhi RS, Eshleman J, Lorenz JG and Kaestle FA., *Am. J. Hum. Genet.* 110:271-284, 1999.
【 0 2 8 8 】
- Smith R, Birch-Machin MA, Rees JL. *J. Invest. Dermatol.* 111:101-104, 1998.
【 0 2 8 9 】
- SpringNet - CE Connection: Screening, Diagnosis: Improving Primary Care Outcomes . Website: <http://www.springnet.com/ce/j803a.htm>.
【 0 2 9 0 】
- Stone AC and Stoneking M. *Amer. J., Phys. Anthro.* 92(4):463-471, 1993.
【 0 2 9 1 】 20
- Tamura S, et al., *Eur. J. Cancer [A]* 35(2):316-319, 1999.
【 0 2 9 2 】
- Tanaka M. et al., 1996, mtDNAの自動配列決定。 *Methods Enzymol.* 264:407-421.
【 0 2 9 3 】
- Taniike M. et al., *BioChem BioPhys Res Comun*, 186:47-53, 1992.
【 0 2 9 4 】
- Taylor RW, Birch-Machin MA, Bartlett K, Turnbull DM., *J Biol Chem*, 269, 3523-3528, 1994.
【 0 2 9 5 】
- Tijssen, P. (ed) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 24: Hybridization with Polynucleotide Probes, Elsevier, N.Y., 1993.
【 0 2 9 6 】 30
- Tori et al., 加齢に関連した、ヒト横隔膜ミトコンドリアDNAの欠失。 *AM. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* in press, 1992.
【 0 2 9 7 】
- Van De Graff KM, Fox SI., *Concepts of Human Anatomy and Physiology.*, Dubuque: WM C. Brown Publishers, 1995.
【 0 2 9 8 】
- Van den Bosch BJC, et al., *Nucleic Acids Res.* 28:89, 2000.
【 0 2 9 9 】 40
- von Wurmb N, Oehmichen, M, Meissner, C., *Mutat Res.* 422:247-254, 1998.
【 0 3 0 0 】
- Wallace DC., *Annu Rev Biochem*, 61:1175-1212, 1992.
【 0 3 0 1 】
- Wallace DC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8739-8746, 1994.
【 0 3 0 2 】
- Wald and Wallace, D.C., ヒトおよびマウスのミトコンドリア病。 *Science*, 5 (283):1482-1497, 1999.
【 0 3 0 3 】
- Wald NJ, Hackshaw, AK, タバコの喫煙：疫学的概観。 *Br Med Bull.* 52(1):3-11, 1996. 50

【 0 3 0 4 】

Wallace et al., レーバー遺伝性視神経症に関連したミトコンドリアDNAの突然変異。Science, 1427-1429.

【 0 3 0 5 】

Walsh PC, Partin AW. Cancer 80:1871-1874, 1997.

【 0 3 0 6 】

Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Paabo S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8720-8724, 1991.

【 0 3 0 7 】

Ward 1993.

10

【 0 3 0 8 】

Wei YH, Pang C, You B, Lee H. Ann. NY Acad. Sci. 786:82-101, 1996.

【 0 3 0 9 】

Wei YH. Proceedings of the Nat. Sci. Council of the Republic of China April 22 (2):5567, 1998.

【 0 3 1 0 】

Weinstock MA: In: JJ Stern RS, MacKie RM and Weinstock MA, Grob (eds) Epidemiology, Blackwell (UK). pp121-128, 1998.

【 0 3 1 1 】

Woodwell DA. National Ambulatory Medical Care Survey: 1997 Summary. Advance data from vital and health statistics; no. 305. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 1999.

20

【 0 3 1 2 】

Wu & Wallace Genomics, 4:560, 1989.

【 0 3 1 3 】

Xu J, et al., Nature Genet 20:175-179, 1998.

【 0 3 1 4 】

Yamaguchi KT, et al., Free Radical Res. Commun. 16(3):167-74, 1992.

【 0 3 1 5 】

Yeh J.J., et al., Oncogene Journal, 19:2060-2066, 2000.

30

【 0 3 1 6 】

Yen et al., 加齢に関連した、ヒト肝ミトコンドリアDNAの5kb欠失。Biochem., Biophys. Res. Commun., 178, 124-131, 1991.

【 0 3 1 7 】

Yen et al., 加齢に関連した、ヒト肝ミトコンドリアDNAの6kb欠失。Biochem. Int. 26, 457-468, 1992.

【 0 3 1 8 】

Zeviani M, et al., Am. J. Hum. Genet. 47:904-914, 1990.

【 0 3 1 9 】

Zhang et al., 老齡のヒトにおける多発性ミトコンドリアDNA欠失。FEBS Lett, 297, 34-38, 1992.

40

【 0 3 2 0 】

Zhang C., et al., BioChem. BioPhys. Res. Comun., 195:1104-1110, 1993.

【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
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/101086 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68 Cancer Centre, 290 Munro Street, Thunder Bay, Ontario P7A 7T1 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00848
- (22) International Filing Date: 10 June 2002 (10.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/297,340 11 June 2001 (11.06.2001) US
- (74) Agent: TORYS LLP, Suite 3000, 79 Wellington St. W., Box 270, TD Centre, Toronto, Ontario M5K 1N2 (CA).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BIRCH-MACHIN, Mark [GB/GB]; 5 Emblichope Drive, Kingshore, Gosforth, Newcastle-upon-Tyne NE3 4RW (GB); DAKUBO, Gabriel, D. [CA/CA]; 6273 Castille Court, Ottawa, Ontario K1C 1X4 (CA); PARR, Ryan [US/CA]; 1282 Hutton Park, Thunder Bay, Ontario P7G 1J4 (CA); THAYER, Robert [CA/CA]; RR 13, Site 9, Comp. 38, Thunder Bay, Ontario P7B 5L4 (CA); NGOM, Alioune [SN/CA]; 744 Sunset Avenue, Windsor, Ontario N9B 3H5 (CA); TH'NG, John [CA/CA]; Northwestern Ontario Regional
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/101086 A2

(54) Title: COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCES AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR THE HEALTH SCIENCES

(57) Abstract: The examination of mutations in the entire mitochondrial genome is used as a diagnostic system for diseases such as prostate cancer, and non melanoma skin cancer. Characteristic mutations and rearrangements including, point mutations (transitions, transversions), deletions, inversions, duplications, recombinations, insertions or combinations thereof in the mitochondrial genome are used as early indicators of prostate cancer, and non melanoma skin cancer. Moreover, the 4977bp, or "common deletion" as well as other associated mutations and/or deletions are used as a measure of aging.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Complete Mitochondrial Genome Sequences as a Diagnostic Tool for the Health Sciences

Technical Field of the Invention

5 This invention is related to the field of mitochondrial genomics. In particular it is related to mutations in the mitochondrial genome and their utility as an indicator of the very genesis of disease.

Background of the Invention

10 The current mega-trend in the biological sciences is the human genome project, and commercial exploitation of the data. However, there is an exceptional limitation to the use and implementation of this information as the data is not specific at the level of the individual. Incredibly the data is from only a few individuals, hardly representative of the variation present in human populations, rendering the data useful in general applications
15 only. The staggering complexity of the human genome makes application on an individual basis impractical. To sequence completely one human nuclear genome the U.S. Department of Energy and the National Institute of Health have invested 2.5 billion dollars since 1988 (<http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html>).

20 **Mitochondrial Genome**

 The mitochondrial genome is a compact yet critical sequence of nucleic acid. The mitochondrial genome codes for enzyme subunits necessary for cellular respiration. Mitochondrial DNA, or "mtDNA", is a minuscule genome of nucleic acid at 16,569 base pairs (bp Anderson et al., 1981; Andrews et al., 1999) in contrast to the immense nuclear
25 genome of 3.3 billion bp. Its genetic complement is astronomically smaller than that of its nuclear cell mate (0.0005%); however, communication or chemical signalling, routinely occur (Sherratt et al., 1997). Moreover, specific nuclear components are responsible for maintenance and integrity of mitochondrial sequence (Croteau et al., 1999). When these nuclear areas are rendered non-functional by nuclear rearrangements indicative of potential
30 disease, then mutations begin to appear in mtDNA sequences. In addition, specific mitochondria may be identified for intracellular destruction by deletions prompted by somatic mutations in the mitochondrial genome. This theoretical mechanism may serve as an indication of impending disease as well. About 3,000 genes are required to make a

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

mitochondrion, with only thirty-seven of these coded by the mitochondrial genome, indicating heavy mitochondrial dependence on nuclear loci (Naviaux, 1997).

5 The essential role of mtDNA is the generation of the cellular fuel, adenosine triphosphate (ATP), which fires cellular metabolism. Significantly, the mitochondrial genome is dependent on seventy nuclear encoded proteins to accomplish the oxidation and reduction reactions necessary to this vital function, in addition to the thirteen polypeptides supplied by the mitochondrial genome (Leonard and Shapira, 1997). Different tissues and organs depend on oxidative phosphorylation to a varied extent. Moreover, mutations in the
10 mitochondrial genome are associated with a variety of chronic, degenerative diseases (Gattermann et al. 1995). Diseases related to defective oxidative phosphorylation (OXPHOS) appear to be closely linked to mtDNA mutations (Byrne, 1992). Consequently as OXPHOS diminishes due to increased severity of mtDNA mutations, organ specific energetic thresholds are exceeded which give rise to a variety of clinical phenotypes.

15

Recently, Fliss et al. (2000) found, in primary tumors from lung and bladder cancer, a high frequency of mtDNA mutations which were predominantly homoplasmic in nature, indicating that the mutant mtDNA was dominant in the malignant cells. Point mutations and deletions would appear to be the non-programmed but unavoidable side effect of
20 oxygen free radical damage to the membrane and genome of mitochondria (Miquel et al. 1992). This theory is plausible because not only is the mitochondrial genome lacking protective histones, but also is vulnerable to oxidative damage being found near the oxygen generating inner mitochondrial membrane. Moreover, as mtDNA has a compact genome and lacks introns, deleterious events are thus likely to affect a coding sequence resulting in
25 a biochemical dysfunction. This dysfunction will further increase cellular oxidative stress which will lead to nuclear as well as mtDNA damage, thereby increasing the potential for a cell to enter into the cancer process (Penta et al., 2001). In this respect, research indicates that with increasing age there is an increase in mtDNA damage (Cortopassi & Wang 1995) and a subsequent decline in respiratory function (Miquel et al. 1992) leading to eventual
30 cell death.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

MtDNA as a Diagnostic Tool

MtDNA sequence dynamics are important diagnostic tools. Mutations in mtDNA are often preliminary indicators of developing disease, often associated with nuclear mutations, and act as biomarkers specifically related to disease, such as but not limited to: 5 tissue damage and cancer from smoking and exposure to second hand tobacco smoke (Lee et al., 1998; Wei, 1998); longevity, based on accumulation of mitochondrial genome mutations beginning around 20 years of age and increasing thereafter (von Wurmb, 1998); metastatic disease caused by mutation or exposure to carcinogens, mutagens, ultraviolet radiation (Birch-Machin, 2000); osteoarthritis; cardiovascular, Alzheimer, Parkinson 10 disease (Shoffner et al., 1993; Sherratt et al., 1997; Zhang et al, 1998); age associated hearing loss (Seidman et al., 1997); optic nerve degeneration and cardiac dysrhythmia (Brown et al., 1997; Wallace et al., 1988); chronic progressive external exophthalmoplegia (Taniike et al., 1992); atherosclerosis (Bogliolo et al., 1999); papillary thyroid carcinomas and thyroid tumours (Yeh et al., 2000); as well as others (e.g. Naviaux, 1997; Chinnery and 15 Tumbull, 1999).

Specifically, these alterations include point mutations (transitions, transversions), deletions (one base to thousands of bases), inversions, duplications, (one base to thousands of bases), recombinations and insertions (one base to thousands of bases). In addition, 20 specific base pair alterations, deletions, or combinations of are associated with early onset of prostate, skin, and lung cancer, as well as aging (e.g. Polyak et al., 1998), premature aging, exposure to carcinogens (Lee et al., 1998), etc.

Since mtDNA is passed to offspring exclusively through the ovum, it is imperative 25 to understand mitochondrial sequences through this means of inheritance. The sequence of mtDNA varies widely between maternal lineages (Ward et al., 1991), hence mutations associated with disease must be clearly understood in comparison to this variation. For example, a specific T to C transition noted in the sequence of several individuals, associated with a specific cancer, could in reality be natural variation in a maternal lineage 30 widespread in a given particular geographical area or associated with ethnicity. For example, Native North Americans express an unusually high frequency of adult onset diabetes. In addition, all North American Natives are genetically characterized by five

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

basic maternal lineages designated A, B, C, D, and X (Schurr et al., 1990; Stone and Stoneking, 1993; Smith et al., 1999). Lineage A is distinguished by a simple point mutation resulting in a *Hae III* site at bp 663 in the mitochondrial genome, yet there is no causative relationship between this mutation and the adult onset of diabetes. In addition, 5 even within lineage clusters there is sequence variation.

Outside of the specific markers associated with a particular lineage there is more intrapopulation variation than interpopulation sequence variation (Easton et al., 1996; Ward et al., 1991, 1993;) This divergence must be understood for optimal identification of 10 disease associated mutations, hence a maternal line study approach (Parsons et al., 1997), mimicking the strengths of a longitudinal design (i.e. subject tracking over a substantial period of time), must be used to identify mutations directly associated with disease, as opposed to mutations without disease association. Moreover, particular substances, such as second hand tobacco smoke, low levels of asbestos, lead, all known mutagens and at low 15 levels in many environments, may be the cause of specific point mutations, but not necessarily a disease specific marker. Hence, a substantial mtDNA sequence database is a clear prerequisite to accurate forecasting of potential disease as a natural process, or through exposure to causative agents. Furthermore, the entire molecule must be sequenced for its full information content. The entire suite of point mutations (transitions, 20 transversions), deletions (one base to thousands of bases), inversions, duplications, (one base to thousands of bases), recombinations and insertions (one base to thousands of bases) must be characterized as a whole over the entire mitochondrial genome. This ensures that all possible information available in the mitochondrial genome is captured. Although the genome of cytoplasmic mitochondria (16,569bp) has been sequenced at an 25 individual level, like its nuclear counterpart, the mitochondrial genome has not been sequenced at a population level for use as a diagnostic tool.

Recently mitochondria have been implicated in the carcinogenic process because of their role in apoptosis and other aspects of tumour biology (Green & Reed, 1998, Penta et 30 al., 2001), in particular somatic mutations of mtDNA (mtDNA) have been observed in a number of human tumours (Habano et al. 1998; Polyak et al. 1998; Tamura et al. 1999; Fliss, et al. 2000). These latter findings were made more interesting by the claims that the

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

particular mtDNA mutations appeared to be homoplasmic (Habano et al. 1998; Polyak et al.1998; Fliss, et al. 2000). Additionally researchers have found that ultraviolet radiation (UV) is important in the development and pathogenesis of non-melanoma skin cancer (NMSC) (Weinstock 1998; Rees, 1998) and UV induces mtDNA damage in human skin
5 (Birch-Machin, 2000a).

Moreover, through time, mitochondrial sequence loses integrity. For example, the 4977bp deletion increases in frequency with age (Fahn et al., 1996). Beginning at age 20, this deletion begins to occur in small numbers of mitochondria. By age 80, a substantial
10 number of molecules have been deleted. This deletion characterizes the normal aging process, and as such serves as a biomarker for this process. Quantification of this aging process may allow medical or other interventions to slow the process.

This application of mitochondrial genomics to medicine has been overlooked
15 because mtDNA has been used primarily as a tool in population genetics and more recently in forensics; however, it is becoming increasingly evident that the information content of mtDNA has substantial application in the field of medical diagnostics. Moreover, sequencing the entire complement of mtDNA was a laborious task before the recent advent of high capacity, high-throughput robotic DNA sequencing systems. In addition,
20 population geneticists were able to gather significant data from two highly variable areas in the control region; however, these small regions represent a small portion of the overall genome, less than 10%, meaning that 90% of the discriminating power of the data is left unused! Significantly, many disease associated alterations are outside of the control region. The character of the entire genome should be considered to include all sequence
25 information for accurate and highly discriminating diagnostics.

Non-Melanoma Skin Cancer

Human non-melanoma skin cancer (NMSC) is the commonest cancer in many
Caucasian populations (Weinstock, 1998; Rees, 1998). The majority of these tumours are
30 basal cell carcinoma (BCC) and squamous cell carcinoma (SCC). BCCs are locally invasive and can cause significant morbidity but rarely metastasis. SCCs show significant metastatic potential and the occurrence of multiple NMSCs in patients with

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

immunosuppression causes significant management problems (Rees, 1998). While there are no clinically identified pre-malignant lesions for BCC, some SCCs are thought to arise from precursor lesions, namely actinic keratoses (AKs) or areas of Bowen's disease (in situ carcinoma)(Rees, 1998).

5

SCCs show loss of heterozygosity affecting several chromosomes which suggests the involvement of several tumour suppressor genes in their development. Interestingly, in AKs, an equal or greater degree of genetic loss is observed in these precursor lesions compared to SCCs (Rehman et al. 1994; Rehman et al. 1996). This is important for the proposed invention because it suggests that other mechanisms, in addition to inactivation of tumour suppressor genes, are likely to be involved in the development of SCCs.

A role for mitochondria in tumourigenesis was originally hypothesised when tumour cells were found to have an impaired respiratory system and high glycolytic activity (Shay & Werbin, 1987). Recent findings elucidating the role of mitochondria in apoptosis (Green & Reed, 1998) together with the high incidence of homoplasmic mtDNA mutations in colon cancer (Habano et al. 1998; Polyak et al. 1998, reviewed in Penta et al., 2001), primary tumours of the bladder, neck and lung (Fliss et al. 2000), and gastric tumours (Tamura et al. 1999), further support this hypothesis. Furthermore, it has been proposed that these mitochondrial mutations may affect the levels of reactive oxygen species (ROS) which have been shown to be highly mitogenic (Polyak et al. 1998; Li et al. 1997).

Previous studies by the inventors and others have shown that mutations in mtDNA and the associated mitochondrial dysfunction is an important contributor to human degenerative diseases (Birch-Machin et al. 1993; Chinnery et al. 1999; Birch-Machin et al. 2000b). This is because the mitochondrial genome is particularly susceptible to mutations due to the high amounts of ROS produced in this organelle coupled with the lack of protective histones and a low rate of mtDNA repair (Pascucci et al. 1997; Sawyer & van Houten; LeDoux et al.1999) compared to the nucleus. Indeed, the mutation rate for mtDNA is around ten times higher than that of nuclear DNA (Wallace,1994). Most of the mtDNA mutations identified in the recent human tumour studies have indicated possible exposure to ROS derived mutagens. This is important for the investigation of mtDNA mutations in

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

NMSC because there is recent evidence for the direct involvement of UV induced ROS in the generation of mtDNA deletions in human skin cells (Berneburg et al. 1999, Lowes et al., 2002). In addition, the major determinant of NMSC in individuals without protective pigmentation or genetic predisposition is UV (Weinstock, 1998). The putative precursor lesions of SCCs are also found predominantly on constant sun-exposed sites. This is important because work by the Birch-Machin laboratory has shown distinct differences between the incidence of mitochondrial DNA damage in skin taken from different sun-exposed body sites. The vast majority of the damage is found on constant sun-exposed sites (Krishnan et al., 2002).

10

One of the inventors was the first to quantitatively show that UV exposure induces mtDNA damage (Birch-Machin et al. 1998). MtDNA as a molecular marker was used to study the relation between chronological aging and photo aging in human skin. A 3-primer quantitative PCR method was used to study the changes in the ratio of the 4977 bp-deleted to wild type mtDNA in relation to sun exposure and chronological age of human skin. There was a significant increase in the incidence of high levels (i.e. >1 %) of the 4977bp-deleted mtDNA in sun-exposed (27%, [27/100]) compared with sun-protected sites (1.1% [1/90]) (Fishers exact test, $P < 0.0001$). Deletions or mutations of mtDNA may therefore be useful as a marker of cumulative ultraviolet radiation exposure.

20

Furthermore, a study using a South-Western Blot approach involving monoclonal antibodies against thymine dimers, provided direct evidence for the presence of UV-induced damage in purified mtDNA (Ray et al. 1998).

Quantification of a single deletion alone, however, may not provide a reliable UV bio-marker because it represents one of many possible deletions or combinations and other associated mutations (Birch-Machin, 2000). Recent work from the inventors' research group has used a long extension PCR (LX-PCR) technique to amplify the entire mitochondrial genome in order to determine the whole deletion spectrum of mtDNA secondary to UV exposure (Ray et al. 2000). Long PCR analysis of 71 split skin samples, where the epidermis is separated from the underlying dermis, was performed in relation to sun exposure. There was a significant increase in the number of deletions with increasing UV exposure in the epidermis (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0015$). The findings in the

30

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

epidermis are not confounded by any age-dependent increases in mtDNA deletions also detected by the long PCR technique. The large spectrum of identified deletions highlights the ubiquitous nature and the high mutational load of mtDNA associated with UV exposure. Compared to the detection of single deletions using competitive PCR, the study
5 shows that long PCR is a sensitive technique and may therefore provide a more comprehensive, although not quantitative, index of overall mtDNA damage in skin. The studies by one of the inventors described above clearly show that mtDNA is a significant target of UV and this together with the role of mitochondrial in skin disease has been recently reviewed (Birch-Machin, 2000).

10

The pigmentation of human hair and skin which is the major co-variant of UV sensitivity and human skin cancer has been investigated. These investigations have centred on the association of variants of the melanocortin 1 -receptor gene and sun-sensitivity of individuals and populations (Smith et al. 1998; Healy et al. 1999; Flanagan et al. 2000;
15 Healy et al. 2000; Harding et al. 2000; Flanagan et al., 2002) relating to skin cancer susceptibility. However, these studies have not addressed population-level variation in mtDNA sequences in association with particular skin types and/or hair colour.

One of the questions which remains largely unanswered by the recent studies of mtDNA mutations in human tumours is the incidence of deletions of the mitochondrial
20 genome in relationship to these tumours. This is an important question to answer because a preliminary study of a single patient in human skin has shown differences in the incidence of the common mtDNA deletion between several tumours (AKs and SCCs) and normal skin (Pang et al. 1994). As well, the inventors' own preliminary data shows an increased number of mtDNA deletions in tumours compared to normal skin. Finally, Birch-Machin
25 and others have shown that the incidence of mtDNA deletions, as well as duplications, increases with increasing UV exposure (Berneburg et al. 1999; Birch-Machin et al. 1998; Ray et al. 1998; Ray et al. 1999; Ray et al. 2000), Lindsey et al., 2001; Birch-Machin et al., 2001; Lowes et al., 2002, Krishnan et al., 2002).

30

Apart from the questions relating to tumour progression other vital questions remain largely unanswered by the recent studies of mtDNA in human tumours (Habano et al. 1998; Fiiss et al. 2000). Firstly, due to technical limitations, it is not clear whether the

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

mtDNA mutations are truly homoplasmic, as varying levels of heteroplasmy may indicate important disease transitions as well (Habano et al. 1998; Polyak et al. 1998; Fliss, et al. 2000); secondly, apart from one study (Tamura et al. 1999) the incidence of mtDNA deletions and their role as potential biomarkers for NMSC was not investigated.

5 Researchers have looked at the common deletion and ignored the rest of the 100 or so deletions. As well, investigators have been focused on identification of mutations, rather than their quantification. It is important to assess accurately in a quantitative manner the incidence of deletions because of the threshold effect of mtDNA damage on ATP production and consequently cell function. In addition, deletions are difficult to

10 characterize. Long PCR is typically used which produces a ladder of deletions which then have to be characterized.

Current diagnosis of NMSC is pathological evaluation of excised tissue. Accordingly, there is a need for an early marker of UV-induced DNA damage which

15 predisposes an individual to NMSC. There is also a need for a genetic-based diagnostic tool which allows for early detection and is diagnostically accurate.

Prostate Cancer

Prostate cancer is a frequently diagnosed solid tumour that most likely originates in

20 the prostate epithelium (Huang et al. 1999). In 1997, nearly 10 million American men were screened for prostate specific antigen (PSA), the presence of which suggests prostate cancer (Woodwell, 1999). Indeed, this indicates an even higher number of men screened by an initial digital rectal exam (DRE). In the same year, 31 million men had a DRE (Woodwell, 1999). Moreover, the annual number of newly diagnosed cases of prostate

25 cancer in the United States is estimated at 179,000 (Landis et al., 1999). It is the second most commonly diagnosed cancer and second leading cause of cancer mortality in Canadian men. In 1997 prostate cancer accounted for 19,800 of newly diagnosed cancers in Canadian men (28%) (National Cancer Institute of Canada). It is estimated that 30% to

30 40% of all men over the age of forty-nine (49) have some cancerous prostate cells, yet only 20% to 25% of these men have a clinically significant form of prostate cancer (SpringNet – CE Connection, internet, www.springnet.com/ce/f803a.htm). Prostate cancer exhibits a wide variety of histological behaviour involving both erogenous and exogenous factors, i.e.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

socio-economic situations, diet, geography, hormonal imbalance, family history and genetic constitution (Konishi et al. 1997; Hayward et al. 1998).

From a risk standpoint *familial* and *hereditary* prostate cancers are not considered
5 synonymous terms. Familial cancers refer to the incidences within a family, but are not
inherited. This form accounts for up to 25% of prostate cancers (Walsh & Partin, 1997).
Hereditary refers to a subtype of prostate cancer with a Mendelian inheritance of a
predisposing gene(s) and accounts for approximately 9% of reported cases. A positive
10 family history of prostate cancer for this disease suggests that these predisposing gene(s)
play an important role in prostate cancer development and progression. Recently,
susceptibility genes on chromosomes 1 and X have been identified as predisposing men to
prostate cancer, providing greater insight into the etiology of hereditary cancer (Berthon et
al. 1998; Xu et al. 1998).

15 Prostate cancer prognosis mainly depends on the tumour stage and grade at diagnosis.
Only localized prostate cancer can be cured by radical treatment. Standard detection still
relies on digital rectal examination, PSA testing and histopathologic examination of
prostatic biopsied tissues. Biopsy of a mass is used to confirm malignancy, it is not an
early detection technique. Unfortunately, some early tumours are impossible to identify
20 during rectal exams. PSA tests have a specificity of 60 to 70% and a sensitivity of 70 to
80% (personal communication, Dr. Sunil Gulavita, Northwestern Ontario Cancer Centre).
A newer technique which refines diagnosis for tumours of common histologic grade is
ploidy-DNA analysis employing flow cytometry (Shankey et al. 1995); however, this
technique measures chromosomal changes that are only apparent in later stages of cancer
25 development and is not sufficiently sensitive for the detection of minor alterations in DNA
structure or chromosomal inversions, or reciprocal trans-locations in early cancers. The
invention focuses on early detection since prognosis is heavily dependent on the stage of
disease at diagnosis.

30 Our understanding of genetic abnormalities in prostate cancers is scanty. Research
into prostate cancer has focussed on the development of knowledge in the following areas:
1) proto-oncogenes (Buttayan et al. 1987); 2) tumour suppressor genes (p53, p73, KAI1 and

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

MMACI/PTEN; Dong et al. 1995; Cairns et al. 1997) and 3) telomere/telomerase activity in metastasis. Up-regulation of telomerase and amplification of telomeric DNA in prostate cells may provide effective markers for diagnosis. Moreover, telomeres may serve as a site for therapy (Ozen et al. 1998). A number of groups have provided evidence for a "prostate cancer gene" in the short arm of chromosome 1 (Berthon et al. 1998). More work is needed to identify the specific locus within this region. It has been suggested that this marker is only one of several possible genes predisposing men to familial prostate cancer. Other studies have shown possible marker loci on the X chromosome (Xu et al. 1998). If some prostate cancers are polygenic, then mtDNA becomes an important diagnostic tool since it may be difficult to identify and understand the interplay between all associated nuclear genes in such cases.

Certainly, a key issue in prostate cancer research is to identify molecular markers that can effectively determine and distinguish tumour progression. Molecular markers may be able to discriminate between those cases of prostate neoplasmy which will proceed rapidly to metastatic disease and those with little chance of resulting in tumour development. Up to the present research has focused primarily on the secrets hidden within the nuclear genome; however, the much smaller mtDNA genome seems to act as a barometer for events in the nucleus and as such provides a means for the early detection of human prostate cancer (Zeviani et al. 1990). Importantly, in this respect, mitochondria have been implicated in the carcinogenic process because of their role in apoptosis and other aspects of tumour biology (Green & Reed 1998). In particular, somatic mutations of mtDNA have been observed in a number of human tumours (Polyak et al. 1998, Tamura et al. 1999, Fliss et al. 2000). However, previous studies have been exclusively cross-sectional as they have not considered the clonal nature of mtDNA in maternal lines. These limited cross-sectional studies merely show the mutation at one time point. This may or may not give an accurate link between a mutation and the corresponding disease state. Cross-sectional studies employing a maternal line have the advantage of tracking a mutation in mtDNA over time and thus mimic the strength of a longitudinal design. Mutations which are common population variants, as opposed to mutations associated with disease, can both be identified.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Aging

Aging consists of an accumulation of changes with time both at the molecular and cellular levels; however, the specific molecular mechanisms underlying the aging process remain to be elucidated. In an attempt to explain the aging process, mitochondrial genomes in older subjects are compared to the genomes of younger subjects from the same maternal lineage. One deletion associated with aging is known as the common deletion, or 4977-bp deletion. Aging research has been limited to this common deletion and polymorphisms in the control region. For a clear understanding of these mutations, the entire genome must be analyzed. Other deletions are seen in Table 1 adapted from Wei,

5

10 1992.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Table 1

Deletions size (bp)	References
4977	Cortopassi and Arnheim, 1990; Ikebe et al., 1990; Linnane et al., 1990; Corral-Debrinski et al., 1991; Yen et al., 1991; Torii et al., 1992; Zhang et al., 1992
7436	Corral-Debrinski et al., 1991; Hattori et al., 1991; Hsieh and Wei, 1992
3610	Katayama et al., 1991
6063	Hsieh and Wei, 1992; Yen et al., 1992
5827	Zhang et al., 1992
6335	Zhang et al., 1992
7635	Zhang et al., 1992
7737	Zhang et al., 1992
7856	Zhang et al., 1992
8041	Zhang et al., 1992
8044	Zhang et al., 1992
5756	Zhang et al., 1992

5 Oxygen free radicals, a normal by product of ATP production, are a probable cause of this deletion, which increases in frequency with age. Existing literature demonstrates a strong association between mtDNA (mtDNA) mutations, chronological age, and the overall aging process in postmitotic tissues such as muscle and brain; however, comparative maternal line studies are needed to discriminate between aging associated mutational events and those mutations without an aging association.

10

In recent years a variety of chronic degenerative diseases have been shown to result from mutations in mtDNA (Gatterman et al. 1995). Diseases related to defective OXPHOS appear to be closely linked to mtDNA mutations (Byrne, 1992). Furthermore, it has been shown that these myopathies are often associated with the common deletion of 4977-bp of

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

the mitochondrial genome (Liu et al. 1997). This large deletion has also been found, at heteroplasmic levels, in various tissues of normal aging persons and is consistent with the Mitochondrial Theory of Aging (Harman, 1981). This is manifest through an increase in the deletion frequency (Cortopassi & Wang, 1995) and a subsequent decline in respiratory function (Miquel et al. 1992) resulting in eventual cell death in old age. The early detection of a predisposition to a disease or disorder presents the best opportunity for medical intervention, as early genetic diagnosis may improve the prognosis for a patient.

Previous studies employing a cross-sectional design have established an association or cause and effect relationship between mtDNA mutations, deletions, and/or combinations of such and aging; however, in order to obtain accurate data the age specific deletion and/or mutation rate must be determined concisely. Attributing mutations to the aging process as opposed to a particular disease at the population level is vital. This information is imperative to an understanding of how mtDNA damage accrues over time. Moreover, the consequences of these particular mutations, their frequencies, and associations in the temporal aspects of aging must be known in order to forecast and eventually slow aging at the molecular level. Researchers have not yet determined this rate, which requires evaluation of population data through maternal lines. Accordingly, there is a need for a biomarker which tracks the aging process.

Accordingly, there is a need for a simple, straightforward system of monitoring the vast nuclear genome for mutations which indicate early stage cancer, aging or other human diseases with a DNA component. There is also a need for a simple diagnostic system for non-melanoma skin cancer, prostate cancer, lung cancer and aging linked to defects in the mitochondrial genome. There is a need for a diagnostic system which differentiates between mutations in mtDNA which cause disease, and those which simply represent variation within and between populations.

Summary of the Invention

An object of the present invention is to provide a simple, straightforward system for monitoring the vast nuclear genome for early transitions associated with cancer, aging, and other human diseases with a DNA component.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

In an embodiment of the present invention a small biological sample which includes tissue or fluid samples such as urine, prostate fluid, skin cells, or saliva is taken from an individual. These samples are examined, using any suitable method including
5 histological examination, to identify cells demonstrating disease morphology. Using any suitable method, including without limitation; laser capture, identified cells demonstrating disease morphology are recovered from the sample and the mtDNA therefrom is sequenced, followed by comparison to a database of known mitochondrial sequences associated with both health and disease.

10

In a preferred embodiment, the entire mitochondrial genome is sequenced at a population level to determine the variation of mtDNA sequences associated with disease.

In an additional embodiment, the presence of mutation progression may signal the
15 beginning and continuing development of disease. Mutation load may also indicate progression or disease state.

In a preferred embodiment, mtDNA sequences from prostate massage fluid are compared to a mtDNA sequence database of normal, transitory, and metastatic mtDNA
20 sequences clearly associated with prostate cancer. This comparative data set is based on studies of maternal lines, and other normal maternal line variation present in the population stored in a maternal line database affording a lucid picture of mtDNA mutations clearly associated with disease, as opposed to variation present in mitochondrial lineages existing in the general population.

25

There may be specific maternal lineages which indicate a predisposition to disease.

In another embodiment, mtDNA sequences from suspected non-melanoma skin
30 cancers are compared to a mtDNA sequence database of normal and mtDNA sequences clearly associated with non-melanoma skin cancer.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

According to an aspect of the present invention, there is provided a method of detecting in a subject containing mtDNA the genesis or progression of disease comprising obtaining a biological sample from the subject, extracting DNA from the biological sample, and detecting the presence of mutations in the mtDNA. The step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of sequencing the mtDNA, amplifying the mtDNA by PCR, South-Western blotting, denaturing HPLC, hybridization to microarrays, gene chips or biochips, molecular marker analysis or combinations thereof. Further, the mtDNA of the biological sample is compared to a database, the database containing data of mutations associated with the mtDNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

According to an aspect of the present invention, there is provided a method of detecting in a human subject the presence of a disease comprising obtaining a biological sample from the human subject, extracting DNA from the biological sample, detecting mutations in the mitochondrial DNA of the biological sample, and comparing the mitochondrial DNA sequence of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes. Mutation rates of mitochondria DNA associated with a specific disease may be an important indicator of disease development and prognosis. This may allow specific identification of disease stage, improving disease definition resulting in better disease intervention and specific therapy application.

In yet another embodiment, increasing the sensitivity for heteroplasmy detection increases the early identification capacity of the test.

In addition, the invention may be used to monitor the progression of disease by watching important sites targeted by metastasis.

According to another aspect of the present invention, there is provided a method of determining a predisposition to a disease or disorder indicated by mutations in a mitochondrial DNA sequence comprising: obtaining a biological sample from the human

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

subject, extracting DNA from the biological sample, detecting mutations in the mitochondrial DNA of the biological sample, and comparing the mitochondrial DNA sequence of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of individuals who are predisposed to the disease or disorder, and individuals who are not predisposed to the disease or disorder.

In a preferred embodiment, a DNA microarray is used in determining the sequence of the mitochondrial DNA. Other technologies can also be used. For example, direct sequencing of a subset, or the complete human genome, SNaP shot™, SNP detection, real time PCR or other methods as is standard in the art.

According to a further aspect of the present invention, there is provided a method for assessing the status of the aging process of a human subject comprising obtaining a biological sample from the human subject, extracting DNA from the biological sample, detecting mutations in the mitochondrial DNA of the biological sample, and comparing the mitochondrial DNA sequence of the biological sample to a database, the database containing data of mutations of TDNA associated with aging.

The step of detecting the presence of mutations in the mtDNA can be selected from: sequencing the mtDNA, amplifying mtDNA by PCR, Southern, Northern, Western, Southern blot hybridizations, denaturing HPLC, hybridization to microarrays, biochips or gene chips, molecular marker analysis or a combination of any of the above.

According to yet another aspect of the present invention, there is provided a database containing a plurality of human mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences selected from the group of normal control sequences associated with non-disease states, sequences associated with the presence of disease or sequences indicative of the predisposition to disease.

According to yet another aspect of the present invention, there is provided a kit for diagnosis of a disease comprising a disposable chip, microarray, means for holding the disposable chip, means for extraction of mitochondrial DNA and means for access to a database of mitochondrial DNA sequences.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

According to yet another aspect of the present invention there is provided a method of diagnosing a disease in a patient comprising hybridizing a nucleic acid sample obtained from mitochondrial DNA to an array comprising a solid substrate and a plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of the presence of a disease, wherein each nucleic acid member has a unique position and is stably associated with the solid substrate, and wherein hybridization of said nucleic acid sample to one or more nucleic acid members comprising said array is indicative of the presence of prostate cancer.

According to yet another aspect of the present invention there is provided a kit for determining predisposition to a disease comprising a disposable chip, microarray, means for holding the disposable chip, means for extraction of DNA and means for access to a database of mitochondrial DNA sequences.

According to another aspect of the present invention, there is provided a method of determining a predisposition to or developing symptoms of a disease or disorder indicated by mutations in a mitochondrial DNA sequence comprising obtaining a biological sample from the human subject, extracting mitochondrial DNA from the biological sample, sequencing the mitochondrial DNA of the biological sample, and comparing the mitochondrial DNA sequence of the biological sample to a database, the database containing population-level data of mutations associated with the mtDNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

According to yet another aspect of the present invention, there is provided a method of diagnosing non-melanoma skin cancer in a patient comprising: hybridizing a nucleic acid sample obtained from mitochondrial DNA to an array comprising a solid substrate and a plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of non-melanoma cancer, wherein each nucleic acid member has a unique position and is stably associated with the solid substrate, and wherein hybridization of said nucleic acid sample to one or more nucleic acid members comprising said array is indicative of the presence of non-melanoma skin cancer. Alternatively, non-specific mutations may reach a threshold effect beyond which cancer develops. In a similar manner, prostate cancer can also be diagnosed.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

According to another aspect of the present invention, there is provided a method of detecting heteroplasmy in a subject containing mtDNA comprising obtaining a biological sample from the subject; extracting DNA from the biological sample; and performing denaturing HPLC on the sample.

According to another aspect of the present invention, there is provided a method of detecting mutations associated with disease in a subject containing mtDNA comprising: obtaining a biological sample from the subject, extracting DNA from the biological sample, detecting the presence of mutations in the mtDNA, and comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of common population variants in non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

15 **Detailed Description of the Invention**

The method of the present invention can be used to diagnose diseases linked to mtDNA. The method of the present invention provides for amplification of the mitochondrial genome of an individual from a biological sample, sequencing a portion of the mitochondrial genome, preferably the entire mitochondrial genome of the individual using any known means. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) may also be used to rapidly screen many samples. DHPLC can focus on hotspots of mutations. DHPLC is more sensitive than automated sequencing in terms of detecting mutations, 2% heteroplasmy, compared with 20-25% for ordinary sequencing. Methods for detecting lower levels of heteroplasmy (<2%) may also be developed.

25 As used herein, the "presence" of a mutation in mtDNA includes heteroplasmic mutations and, therefore, it is contemplated that there may be additionally the presence of some normal mtDNA in a sample in which the mutated DNA is present.

30 As used herein, "actinic keratoses" means proposed precursor epidermal lesion of a squamous cell carcinoma.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

As used herein, "aging" refers to an accumulation of changes with time, both at the molecular and cellular levels.

As used herein, "alleles" means one of several alternative forms of a given DNA
5 sequence occupying a specific place on a chromosome.

As used herein, "attaching" or "spotting" refers to a process of depositing a nucleic acid onto a solid substrate to form a nucleic acid array such that the nucleic acid is irreversibly bound to the solid substrate via covalent bonds, hydrogen bonds or ionic
10 interactions.

As used herein, "basal cell carcinoma" means a type of cancer of skin cells.

As used herein, "Bowen's disease" means in situ epidermal carcinoma.
15

As used herein, "diagnostic" or "diagnosing" means using the presence or absence of a mutation or combination of mutations as a factor in disease diagnosis or management. The detection of the mutation(s) can be a step in the disease state diagnosis.

As used herein, "disease" includes a disorder or other abnormal physical state.
20

As used herein, "disease associated mitochondrial genomes" means genomes containing mutations indicative or otherwise associated with a particular disease.

As used herein, "database" means an electronic storage system (computer based using standard industry software) which will have the capacity to store and provide retrievable information that will enable researchers to rapidly determine the structure of the nucleotide sequences. The database will also store descriptive information about those individuals who provide the biological samples. This descriptive information will include
25 health status and other pertinent indices which may be correlated to the biological sample.
30

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

As used herein, "deletions" means removal of a region of DNA from a contiguous sequence of nucleic acids, where once a deletion has occurred, the gap is repaired by rejoining of the ends. Deletions can range in size from one base to thousands of bases or larger.

5

As used herein, "duplications" means when a specific sequence of DNA is copied and inserted behind or forward of the original copy one or more times or elsewhere in the genome.

10

As used herein, "heteroplasmy" is defined by the ratio of mutant to wild type mtDNA molecules, where 100% mutant mtDNA is termed "homoplasmic". Heteroplasmic mutations are those mutations which occur in some, but not all of the copies of the mitochondrial genome.

15

As used herein, "homoplasmy" means all mitochondrial sequences are identical.

As used herein, "inversions" refers to when a length of DNA is excised and reinserted in reverse orientation.

20

As used herein, "maternal inheritance" means mitochondria which are inherited through the cytoplasm of the ovum.

As used herein, "maternal line" refers to the clonal sequence of mitochondrial DNA as passed down through successive generations from the mother.

25

As used herein, "mitochondria" means a eukaryotic cytoplasmic organelle that generates ATP for cellular processes.

30

As used herein, "mutation" encompasses any change in a DNA sequence from the wild type sequence, including without limitation point mutations, transitions, insertions, transversions, translocations, deletions, inversions, duplications, recombinations or combinations thereof.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

As used herein, "mutation load" refers to an increase in mutations in mtDNA which eventually leads to compromised function of the involved gene or the entire genome.

5

As defined herein, a "nucleic acid array" refers to a plurality of unique nucleic acids attached to one surface of a solid support at a density exceeding 20 different nucleic acids/cm² wherein each of the nucleic acids is attached to the surface of the solid support in a non-identical preselected region. In one embodiment, the nucleic acid attached to the surface of the solid support is DNA. In a preferred embodiment, the nucleic acid attached to the surface of the solid support is cDNA. In another preferred embodiment, the nucleic acid attached to the surface of the solid support is cDNA synthesized by polymerase chain reaction (PCR). Preferably, a nucleic acid array according to the invention, comprises nucleic acids of at least 150 nucleotides in length. Preferably, a nucleic acid array comprises nucleic acids of less than 6,000 nucleotides in length. More preferably, a nucleic acid array comprises nucleic acids of less than 500 nucleotides in length. In one embodiment, the array comprises at least 500 different nucleic acids attached to one surface of the solid support. In another embodiment, the array comprises at least 10 different nucleic acids attached to one surface of the solid support. In yet another embodiment, the array comprises at least 10,000 different nucleic acids attached to one surface of the solid support. The term "nucleic acid", as used herein, is interchangeable with the term "polynucleotide".

As used herein, a "nucleic acid target" or "a target nucleic acid" is defined as a nucleic acid capable of binding to a nucleic acid member of complementary sequence through one or more types of chemical bonds, usually through complementary base pairing, usually through hydrogen bond formation. As used herein, a nucleic acid target may include natural (i. e., A, G, C, or T) or modified bases (7-deazaguanosine, inosine, etc.). In addition, the bases in nucleic acid probe may be joined by a linkage other than a phosphodiester bond, so long as it does not interfere with hybridization. Thus, nucleic acid targets may be peptide nucleic acids in which the constituent bases are joined by peptide bonds rather than phosphodiester linkages. Preferably, the nucleic acid targets are derived

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

from human tissue or fluid extracts. More preferably, the nucleic acid targets are single- or double-stranded DNA, RNA, or DNA-RNA hybrids synthesized from human tissue or fluid extracts.

5 As used herein, "nucleus" means the most conspicuous organelle in the eucaryotic cell, contains all of the chromosomal DNA.

As used herein, "PSA Test" means prostate-specific antigen test; an antigen found in blood that may be indicative of cancer of the prostate.

10

As used herein, "point mutation" means the change of a single nucleotide in DNA.

As used herein, "polymorphism" means sequence variation in a population of alleles or mtDNA genomes.

15

As used herein, "precursor lesions" means a DNA mutation, or combinations thereof, indicating potential disease association.

20 As used herein, "predisposed to a disease" or a "predisposition to a disease" means that individuals are at higher risk for developing the disease or disorder or are at higher risk for early onset of the disease or disorder than the average individual, due to the presence or absence of mutations which are associated with the disease or disorder.

25 As used herein, "preselected region", "predefined region", or "unique position" refers to a localized area on a substrate which is, was, or is intended to be used for the deposit of a nucleic acid and is otherwise referred to herein in the alternative as a "selected region" or simply a "region." The preselected region may have any convenient shape, e.g., circular, rectangular, elliptical, wedge-shaped, etc. In some embodiments, a preselected region is smaller than about 1 cm², more preferably less than 1 mm², still more preferably
30 less than 0.5 mm², and in some embodiments about 0.125 to 0.5 mm².

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

As used herein, "somatic mutation" means a change in DNA sequence after fertilization.

As used herein, "solid substrate" or "solid support" refers to a material having a rigid or semi-rigid surface. The terms "substrate" and "support" are used interchangeably herein with the terms "solid substrate" and "solid support". The solid support may be biological, non-biological, organic, inorganic, or a combination of any of these, existing as particles, strands, precipitates, gels, sheets, tubing, spheres, containers, capillaries, pads, slices, films, plates, slides, etc. Often, the substrate is a silicon or glass surface, (poly)tetrafluoroethylene, (poly)vinylidene difluoride, polystyrene, polycarbonate, a charged membrane, such as nylon 66 or nitrocellulose, or combinations thereof. In a preferred embodiment, the solid support is glass. Preferably, at least one surface of the substrate will be substantially flat. Preferably, the surface of the solid support will contain reactive groups, including, but not limited to, carboxyl, amino, hydroxyl, thiol, or the like. In one embodiment, the surface is optically transparent.

As used herein, "squamous cell carcinoma" means a type of cancer of skin cells.

As used herein, "stably associated" refers to a nucleic acid that is irreversibly bound to a solid substrate to form an array via covalent bonds, hydrogen bonds or ionic interactions such that the nucleic acid retains its unique preselected position relative to all other nucleic acids that are stably associated with an array, or to all other preselected regions on the solid substrate under conditions wherein an array is analyzed (i.e., hybridization and scanning).

A "statistically significant" number of mitochondrial DNA sequences is determined by or through the use of standard chi-square statistical algorithms using or determining observed versus expected scores.

As used herein, "transitions" means substitution of like nitrogenous bases, pyrimidine to pyrimidine, purine to purine. A mutation in which one pyrimidine is substituted by the other, or in which one purine is substituted by the other.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

As used herein, "transversions" means substitution of unlike nitrogenous bases, purine to pyrimidine, pyrimidine to purine. A mutation in which a purine is substituted or replaced by a pyrimidine or vice versa.

5

MtDNA and diagnosis of specific diseases

In an embodiment of the present invention, methods are provided for monitoring aging and diagnosing specific diseases such as prostate cancer and non-melanoma skin cancer through comparisons of mtDNA sequences. Diagnosing diseases such as prostate cancer with mtDNA, rather than nuclear DNA has several advantages. Firstly, mtDNA, a less complex genome, is easily understood at an individual and population level, hence a large mtDNA database with normal and disease associated genomes renders individual diagnosis extremely accurate. Accordingly, variation, in relationship to disease, is understood. Secondly, mtDNA has a 10-fold higher mutation rate than nuclear DNA (Wallace 1992). Nuclear rearrangements, suggestive of preliminary disease, are rapidly communicated to mitochondria, where they appear as somatic mutations. Thirdly, mtDNA has a maternal inheritance pattern, and is essentially clonal in that all mitochondria begin with the same mtDNA sequence, hence variation from this clonal condition is easily detected. Additionally, mtDNA does not show convincing evidence of recombination, thus any alterations in sequence are a somatic event. Any one mitochondrion harboring a mutation(s) is in a sense 'recessive' as a consequence of there being many mitochondrial genomes (2-10 copies) per mitochondrion, and many mitochondria per cell (500-2,000). Moreover, mitochondrial genomes can tolerate very high levels (up to 90%) of mitochondria with damaged genomes. This happens through complementation by the remaining wild type mtDNA (Chomyn et al. 1992). However, mutated genomes have a replicative advantage over wild type genomes because they are usually smaller (Hayashi et al. 1991), hence there is clonal expansion of mutated mtDNA (Brierley et al. 1998), suggesting that unlike nuclear genes, there is little or no selection against cells harboring mtDNA mutations. Because of this elevated mutation rate, mutations and/or deletions that appear in mtDNA are maintained through the life span of the cell and may serve as a record of exposures to various mutagens. The integrity of mtDNA is maintained by nuclear repair mechanisms, and a defect at these loci has been suggested to result in an autosomal

10
15
20
25
30

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

dominant disorder associated with multiple mitochondrial deletions (Zeviani et al. 1990). Consequently, mtDNA may function as an early warning sentinel of early nuclear events related to a variety of cancers or other diseases. Finally, the mitochondrial genome can be sequenced and monitored for mutations on an individual basis.

5

Diagnosis of Non-Melanoma Skin Cancer

In a preferred embodiment of the invention, a system for early diagnosis of mtDNA changes in non-melanoma skin cancer (NMSC) and their precursor lesions indicative of solid tumour development is provided. The particular changes, such as the common deletion and associated mutations, and the incidence of as yet uncharacterised deletions in mtDNA serve as reliable bio-markers of potential skin cancer. The mutation fingerprint of the entire mtDNA genome in human NMSC and its precursor lesions is determined. Thus mtDNA changes are established as an early bio-marker of human skin cancer and its precursor lesions. Denaturing HPLC can then be used to assess low levels of heteroplasmy at the sequences of interest. This approach can also provide an insight into the development of early changes in other human tumours.

10

15

Diagnosis of prostate cancer

In another embodiment of the invention, a system for diagnosis of prostate cancer is provided. Age related accumulation of mtDNA defects might predispose an individual to the appearance of certain clinical disorders such as prostate cancer which is prevalent in middle age and older men. In a preferred embodiment, routine prostate cancer screening takes place through mitochondrial genome sequencing from prostate massage fluid. The presence of epithelial cells transformed into cancer cells, can be determined through amplification of mtDNA from prostate massage fluid, eclipsing current diagnostic techniques such as digital rectal examination and PSA. Recently Fliss et al. (2000) identified mutated mtDNA in urine samples of patients with bladder cancer. Similar findings in prostate massage fluid provide a non-invasive early detection method for prostate cancer. Different types of prostate cancer can be diagnosed, as well as differentiating between aggressive, fast growing cells in younger patients in contrast to prostate cancer as a whole.

20

25

30

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Assessment of mutations associated with aging

The system and method of the present invention may be used to assess aging, based on the increasing frequency of mutations such as the "common deletion" of 4977-bp and other mutations of the mitochondrial genome (Liu et al. 1997). This information, in conjunction with health survey data, allows crucial statistical discrimination between separate causes resulting in the same mutation/deletion. Fortunately mtDNA is inherited exclusively through the ovum and is essentially clonal in nature (Van De Graaff & Fox, 1995). This permits carefully controlled studies of mutations/deletions within maternal lines through several generations to determine a reliable age related deletion frequency. This information may be used to develop treatment methods which slow the aging process.

Collection of samples

Biological samples can be collected by any known means, whether for the purpose of constructing a mtDNA sequence database, or performing a diagnostic test on an individual. Samples destined for database generation include, but are not limited to: tumour banks, maternal lineage studies involving affected and unaffected individuals from the same maternal lineage, as well as maternal lineage studies from groups or populations with high frequencies of specific disease such as, but not limited to: skin and prostate cancer, assessment of health status and aging. For example, FTA[®] Gene Cards[®] may be used to collect and archive biological samples. Suitable samples include any tissue or body fluid derived from mesothelium, epithelium, or endothelium. Such tissues and fluids include, but are not limited to blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow and biopsy tissue. Preferably, approximately 100 µl of blood, 100 µg to 25 mg of solid tissue is sampled. In the case of suspected skin cancer, skin cells or tissue, (from normal, NMSC and precursor lesions) is taken from skin biopsy or a routine suction blistering technique. Where a disease is suspected, primary care physicians, oncologists or other practitioners, may extract both normal and suspected disease tissue from the patient.

For samples of tumours such as prostate or skin, replicate cross-sections (5 microns) of micro-dissected paraffin embedded tissues are de-paraffinized prior to one slide being stained with hematoxylin and eosin (HE), with the replicate stained with methyl

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

green (MG), as is standard in the art. HE stains are graded by a pathologist for normal, precursor, and applicable grades of tumour progression. Replicate MG slides are used for laser capture, according to manufacturers recommendations (Arcturus) of graded cells.

5 **Extraction of mtDNA**

Extraction of DNA may take place using any method known in the art, followed by sequencing of the mitochondrial genome, as described in Current Protocols in Molecular Biology.

10 **Sequencing of MtDNA**

PCR

Polynucleotide sequences of the invention can be amplified by the polymerase chain reaction (PCR). PCR methods are well-known to those skilled in the art. PCR requires the presence of a nucleic acid to be amplified, two single stranded oligonucleotide primers flanking the sequence to be amplified, a DNA polymerase, deoxyribonucleoside triphosphates, a buffer and salts. The method of PCR is well known in the art. PCR is performed as described in Mullis and Faloona, 1987, *Methods Enzymol.*, 155: 335, herein incorporated by reference.

20 In general, PCR is performed using template DNA (at least 1fg; more usefully, 1-1000 ng) and at least 25 pmol of oligonucleotide primers. A typical reaction mixture includes: 2µl of DNA, 25 pmol of oligonucleotide primer, 2.5 µl of 10X PCR buffer 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0.4 µl of 1.25 µM dNTP, 0.15 µl (or 2.5 units) of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, Foster City, CA) and deionized water to a total volume of 25 µl. Mineral oil is overlaid and the PCR is performed using a programmable thermal

30 cycles, are adjusted according to the stringency requirements in effect. Annealing temperature and timing are determined both by the efficiency with which a primer is expected to anneal to a template and the degree of mismatch that is to be tolerated. The ability to optimize the stringency of primer annealing conditions is well within the

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

knowledge of one of moderate skill in the art. An annealing temperature of between 30°C and 72°C is used. In general, initial denaturation of the template molecules normally occurs at between 92°C and 99°C for 4 minutes, followed by 20-40 cycles consisting of denaturation (94-99°C for 15 seconds to 1 minute), annealing (temperature determined as
5 discussed above; 1-2 minutes), and extension (72°C for 1 minute). The final extension step is generally carried out for 4 minutes at 72°C, and may be followed by an indefinite (0-24 hour) step at 4°C.

DNA Sequencing

10 Any known means to sequence the mitochondrial genome may be used. Preferably, mtDNA is amplified by PCR prior to sequencing. PCR products can be sequenced directly or cloned into a vector which is then placed into a bacterial host. Examples of DNA sequencing methods are found in Brumley, R. L. Jr. and Smith, L.M., 1991, Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res.* 19:4121-4126
15 and Luckey, J.A., et al, 1993, High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* 218: 154-172. The combined use of PCR and sequencing of mtDNA is described in Hopgood, R., et al, 1992, Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products, *Biotechniques* 13:82-92 and Tanaka, M. et al, 1996, Automated sequencing of mtDNA, *Methods Enzymol.* 264: 407-421

20

Deletion Analysis and Detection

A preferable approach is the long extension PCR (LX-PCR) technique using the Expand Long Template PCR system (Boehringer Mannheim). Using the LX-PCR technique, which has been established and validated in the Birch-Machin laboratory (Ray
25 et al. 2000), there is the opportunity to rapidly screen for the whole spectrum of mtDNA deletions as opposed to the incidence of a single deletion.

A semi-quantitative PCR method (Corral-Debrinski *et al* 1991) can be used to estimate the proportion of the mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion in the total mtDNA.

30 In addition, Southern Blot and probing technology labeled with isotopes or any other technique as is standard in the art may be used for deletion detection as well.

Sequencing of PCR products

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Any known means may be used to sequence the PCR products. Preferably, the entire DNA sequence is characterized by di-deoxy sequencing using ABI Big Dye Terminator™ technology and a series of 72 overlapping primers each for heavy and light strands. Sequencing occurs on one, several, or a combination of ABI platforms such as the 310, 3100, or 3700. Sequencing reactions are performed according to manufacturer's recommendation.

Mutational analysis of the mitochondrial genome using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

Prior to sequencing of the mitochondrial genome and identification of mutational hotspots, DHPLC can be used to rapidly screen mutations in many samples. This technique provides greater sensitivity in identification of low levels of heteroplasmy. It cannot detect homoplasmic changes but will complement traditional sequencing. Apart from the homoplasmic mutations recently identified in tumours, the vast majority of reported mtDNA mutations are heteroplasmic (Chinnery et al. 1999). These heteroplasmic mtDNA changes result in the formation of heteroduplexes after PCR amplification of the mtDNA. Rapid screening for heteroplasmic mtDNA mutations is determined using the relatively new technique of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) (Oefner & Underhill, 1998). This technique has recently been used to rapidly screen and identify whole mtDNA genomes for heteroplasmic point mutations down to levels <5% (Van den Bosch et al. 2000).

The DHPLC may be performed on the WAVE™ DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, USA) which provides a fully automated screening procedure. The same technology can be used to screen for mtDNA heteroplasmic mutations. Preferably, the entire mtDNA genome is amplified by PCR in 13 overlapping fragments using two different PCR conditions as described by van den Bosch et al. (2000). The 1-2 kb PCR products are digested into fragments of 90-600bp and resolved at their optimal melting temperature. Mutations are represented as two peaks and mutations with low percentages, such as <2% heteroplasmy as a 'shoulder' in the peak.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

DNA sequencing can also take place using a microarray, as is known in the art (Chee et al. 1996).

Data Analysis

5 Once sequenced, normal and disease associated mtDNA sequences are archived for comparison in a database. Resequencing devices, micro-array technology, integrated microfluidic amplification and analysis systems, high-speed, high-throughput, mutation detection, and other methods may all be used with the methods of the present invention.

10 Data obtained from the sequencing of the individual mitochondrial genome is compared to population level data. The data is obtained through obtaining samples and sequencing mtDNA as described above. Preferably, the database contains information from maternal line studies. The population level data is maintained in a database. Any suitable database can be used.

15 Preferably, a multidimensional evaluation research database of clinical and biological data is used, which provides the bio-informatics infrastructure necessary for the collection, processing and dissemination of information amassed by the laboratories involved in this venture. The database is a centralized electronic system which links
20 networks resulting in a dynamic and powerful resource.

The database may be accessed through any known means, and preferably through a secure Internet pathway. Preferably, the database is developed using an e-commerce algorithm, built on a server and deployed using an application server which supports a high
25 volume of concurrent users through optimized performance and scalability features. A separate "web" server can provide the foundation of the web-site architecture since it can serve as the central point through which all content, applications, and transactions must flow before reaching users.

30 Data mining algorithms known in the art are used to discover patterns, clusters and models from data (SAS 2000). Moreover, intelligent algorithms and methods will be

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

developed for: occurrence of mutation and mutation rates, patterns of mutations for disease detection, information retrieval, and other complex sequence analysis software.

Nucleic Acid Members and Probes

5

The invention provides for nucleic acid members and probes that bind specifically to a target nucleic acid sequence. The target nucleic acid sequence is a nucleic acid or a region of a nucleic acid that is to be detected, as indicative of disease such as prostate cancer, non-melanoma skin cancer and the like. The target nucleic acid sequences to be
10 analyzed using a microarray of the invention are preferably derived from human tissue or fluid samples. The invention provides for target nucleic acid sequences comprising RNA or nucleic acid corresponding to RNA, (i.e., cDNA), or DNA. Nucleic acid members are stably associated with a solid support to comprise an array according to the invention. The nucleic acid members may be single or double stranded, and may be a PCR fragment
15 amplified from cDNA.

The invention also provides for polynucleotide sequences comprising a probe. As used herein, the term "probe" refers to an oligonucleotide which forms a duplex structure with a sequence in the target nucleic acid, due to complementarity of at least one sequence
20 in the probe with a sequence in the target region. The probe may be labeled, according to methods known in the art. A probe according to the invention may be single or double stranded.

25 Diagnostic devices

The invention includes diagnostic devices such as biochips, gene chips or microarrays used to diagnose specific diseases or identify specific mutations. All sequenced mitochondrial genomes are assessed to create a consensus structure of the base pair arrangement and are assigned a prohibiting index for proportion of base pair deletions
30 and mutations associated with a particular disease or disorder. The diagnostic arrangement is then used to create biochips, gene chips, or microarrays.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Once sequences associated with particular diseases, disease states or disorders are identified, hybridization of mtDNA to an array of oligonucleotides can be used to identify particular mutations. Any known method of hybridization may be used. Preferably, an array is used, which has oligonucleotide probes matching the wild type or mutated region, and a control probe. Commercially available arrays such as microarrays or gene chips are suitable. These arrays contain thousands of matched and control pairs of probes on a slide or microchip, and are capable of sequencing the entire genome very quickly. Review articles describing the use of microarrays in genome and DNA sequence analysis is available at www.gene-chips.com.

10

Microarray

Polynucleotide arrays provide a high throughput technique that can assay a large number of polynucleotides in a sample comprising one or more target nucleic acid sequences. The arrays of the invention are useful for gene expression analysis, diagnosis of disease and prognosis of disease (e.g., monitoring a patient's response to therapy, drug screening, and the like).

15

Any combination of the polynucleotide sequences of mtDNA indicative of disease, aging, or other health related mutations are used for the construction of a microarray.

20

The target nucleic acid samples to be analyzed using a microarray are derived from any human tissue or fluid which contains adequate amounts of mtDNA, as previously described, preferably prostate massage fluid, solid tumours, blood, or urine. The target nucleic acid samples are contacted with polynucleotide members under hybridization conditions sufficient to produce a hybridization pattern of complementary nucleic acid members/target complexes.

25

Construction of a microarray

The microarray comprises a plurality of unique polynucleotides attached to one surface of a solid support, wherein each of the polynucleotides is attached to the surface of the solid support in a non-identical preselected region. Each associated sample on the array comprises a polynucleotide composition, of known identity, usually of known sequence, as

30

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

described in greater detail below. Any conceivable substrate may be employed in the invention.

5 The array is constructed using any known means. The nucleic acid members may be produced using established techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription (RT). These methods are similar to those currently known in the art (see e.g. PCR Strategies, Michael A. Innis (Editor), et al. (1995) and PCR: Introduction to Biotechniques Series, C. R. Newton, A. Graham (1997)). Amplified polynucleotides are purified by methods well known in the art (e.g., column purification). A polynucleotide is
10 considered pure when it has been isolated so as to be substantially free of primers and incomplete products produced during the synthesis of the desired polynucleotide. Preferably, a purified polynucleotide will also be substantially free of contaminants which may hinder or otherwise mask the binding activity of the molecule.

15 In the arrays of the invention, the polynucleotide compositions are stably associated with the surface of a solid support, wherein the support may be a flexible or rigid solid support.

20 Any solid support to which a nucleic acid member may be attached may be used in the invention. Examples of suitable solid support materials include, but are not limited to, silicates such as glass and silica gel, cellulose and nitrocellulose papers, nylon, polystyrene, polymethacrylate, latex, rubber, and fluorocarbon resins such as TEFLON™.

25 The solid support material may be used in a wide variety of shapes including, but not limited to slides and beads. Slides provide several functional advantages and thus are a preferred form of solid support. Due to their flat surface, probe and hybridization reagents are minimized using glass slides. Slides also enable the targeted application of reagents, are easy to keep at a constant temperature, are easy to wash and facilitate the direct visualization of RNA and/or DNA immobilized on the solid support. Removal of RNA
30 and/or DNA immobilized on the solid support is also facilitated using slides.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

The particular material selected as the solid support is not essential to the invention, as long as it provides the described function. Normally, those who make or use the invention will select the best commercially available material based upon the economics of cost and availability, the expected application requirements of the final product, and the demands of the overall manufacturing process.

Numerous methods are used for attachment of the nucleic acid members of the invention to the substrate (a process referred as spotting). For example, polynucleotides are attached using the techniques of, for example U.S. Pat. No. 5,807,522, which is incorporated herein by reference for teaching methods of polymer attachment. Alternatively, spotting is carried out using contact printing technology.

The amount of polynucleotide present in each composition will be sufficient to provide for adequate hybridization and detection of target polynucleotide sequences during the assay in which the array is employed. Generally, the amount of each nucleic acid member stably associated with the solid support of the array is at least about 0.1 ng, preferably at least about 0.5 ng and more preferably at least about 1 ng, where the amount may be as high as 1000 ng or higher, but will usually not exceed about 20 ng. Where the nucleic acid member is "spotted" onto the solid support in a spot comprising an overall circular dimension, the diameter of the "spot" will generally range from about 10 to 5,000 μm , usually from about 20 to 2,000 μm and more usually from about 50 to 1000 μm .

Control polynucleotides may be spotted on the array and used as target expression control polynucleotides and mismatch control nucleotides to monitor non-specific binding or cross-hybridization to a polynucleotide in the sample other than the target to which the probe is directed. Mismatch probes thus indicate whether a hybridization is specific or not. For example, if the target is present the perfectly matched probes should be consistently brighter than the mismatched probes. In addition, if all central mismatches are present, the mismatch probes are used to detect a mutation.

30 *Target preparation*

The targets for the microarrays, are derived from human fluid or tissue samples. It may be desirable to amplify the target nucleic acid sample prior to hybridization. One of

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

skill in the art will appreciate that whatever amplification method is used, if a quantitative result is desired, care must be taken to use a method that maintains or controls for the relative frequencies of the amplified polynucleotides. Methods of "quantitative" amplification are well known to those of skill in the art. For example, quantitative PCR involves simultaneously co-amplifying a known quantity of a control sequence using the same primers. This provides an internal standard that may be used to calibrate the PCR reaction. The high density array may then include probes specific to the internal standard for quantification of the amplified polynucleotide. Detailed protocols for quantitative PCR are provided in PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al., Academic Press, Inc. N.Y., (1990). Other suitable amplification methods include, but are not limited to polymerase chain reaction (PCR) (Innis, et al., PCR Protocols. A guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego, (1990)), ligase chain reaction (LCR) (see Wu and Wallace, Genomics, 4: 560 (1989), Landegren, et al., Science, 241: 1077 (1988) and Barringer, et al., Gens, 89: 117 (1990), transcription amplification (Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1173 (1989)), and self-sustained sequence replication (Guatelli, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87: 1874 (1990)).

The invention provides for labeled target or labeled probe. Any analytically detectable marker that is attached to or incorporated into a molecule may be used in the invention. An analytically detectable marker refers to any molecule, moiety or atom which is analytically detected and quantified. Detectable labels suitable for use in the present invention include any composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, optical or chemical means. Useful labels in the present invention include biotin for staining with labeled streptavidin conjugate, magnetic beads (e.g., Dynabeads™), fluorescent dyes (e.g., fluorescein, texas red, rhodamine, green fluorescent protein, and the like), radiolabels (e.g., ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, or ³²P), enzymes (e.g., horseradish peroxidase, alkaline phosphatase and others commonly used in an ELISA), and colorimetric labels such as colloidal gold or colored glass or plastic (e.g., polystyrene, polypropylene, latex, etc.) beads. Patents teaching the use of such labels include U.S. Pat. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; and 4,366,241.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Means of detecting such labels are well known to those of skill in the art. Thus, for example, radiolabels may be detected using photographic film or scintillation counters, fluorescent markers may be detected using a photodetector to detect emitted light. Enzymatic labels are typically detected by providing the enzyme with a substrate and detecting the reaction product produced by the action of the enzyme on the substrate, and colorimetric labels are detected by simply visualizing the colored label.

The labels may be incorporated by any of a number of means well known to those of skill in the art. However, in a preferred embodiment, the label is simultaneously incorporated during the amplification step in the preparation of the sample polynucleotides. Thus, for example, polymerase chain reaction (PCR) with labeled primers or labeled nucleotides will provide a labeled amplification product. In a preferred embodiment, transcription amplification, as described above, using a labeled nucleotide (e.g. fluorescein-labeled UTP and/or CTP) incorporates a label into the transcribed polynucleotides. Alternatively, a label may be added directly to the original polynucleotide sample (e.g., mRNA, polyA mRNA, cDNA, etc.) or to the amplification product after the amplification is completed. Means of attaching labels to polynucleotides are well known to those of skill in the art and include, for example nick translation or end-labeling (e.g. with a labeled RNA) by kinasing of the polynucleotide and subsequent attachment (ligation) of a polynucleotide linker joining the sample polynucleotide to a label (e.g., a fluorophore).

In a preferred embodiment, the target will include one or more control molecules which hybridize to control probes on the microarray to normalize signals generated from the microarray. Labeled normalization targets are polynucleotide sequences that are perfectly complementary to control oligonucleotides that are spotted onto the microarray as described above. The signals obtained from the normalization controls after hybridization provide a control for variations in hybridization conditions, label intensity, "reading" efficiency and other factors that may cause the signal of a perfect hybridization to vary between arrays.

30

Hybridization conditions

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Polynucleotide hybridization involves providing a denatured probe or target nucleic acid member and target polynucleotide under conditions where the probe or target nucleic acid member and its complementary target can form stable hybrid duplexes through complementary base pairing. The polynucleotides that do not form hybrid duplexes are then washed away leaving the hybridized polynucleotides to be detected, typically through detection of an attached detectable label. It is generally recognized that polynucleotides are denatured by increasing the temperature or decreasing the salt concentration of the buffer containing the polynucleotides. Under low stringency conditions (e.g., low temperature and/or high salt) hybrid duplexes (e.g., DNA:DNA, RNA:RNA, RNA:DNA, cDNA:RNA and cDNA:DNA) will form even where the annealed sequences are not perfectly complementary. Thus specificity of hybridization is reduced at lower stringency. Conversely, at higher stringency (e.g., higher temperature or lower salt) successful hybridization requires fewer mismatches. Methods of optimizing hybridization conditions are well known to those of skill in the art (see, e.g., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Polynucleotide Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y., (1993)).

Following hybridization, non-hybridized labeled or unlabeled polynucleotide is removed from the support surface, conveniently by washing, thereby generating a pattern of hybridized target polynucleotide on the substrate surface. A variety of wash solutions are known to those of skill in the art and may be used. The resultant hybridization patterns of labeled, hybridized oligonucleotides and/or polynucleotides may be visualized or detected in a variety of ways, with the particular manner of detection being chosen based on the particular label of the test polynucleotide, where representative detection means include scintillation counting, autoradiography, fluorescence measurement, calorimetric measurement, light emission measurement and the like.

Image Acquisition and Data Analysis

Following hybridization and any washing step(s) and/or subsequent treatments, as described above, the resultant hybridization pattern is detected. In detecting or visualizing the hybridization pattern, the intensity or signal value of the label will be not only be detected but quantified, by which is meant that the signal from each spot of the hybridization will be measured and compared to a unit value corresponding to the signal

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

emitted by a known number of end labeled target polynucleotides to obtain a count or absolute value of the copy number of each end-labeled target that is hybridized to a particular spot on the array in the hybridization pattern.

5 Methods for analyzing the data collected from hybridization to arrays are well known in the art. For example, where detection of hybridization involves a fluorescent label, data analysis can include the steps of determining fluorescent intensity as a function of substrate position from the data collected, removing outliers, i.e., data deviating from a predetermined statistical distribution, and calculating the relative binding affinity of the test
10 polynucleotides from the remaining data. The resulting data is displayed as an image with the intensity in each region varying according to the binding affinity between associated oligonucleotides and/or polynucleotides and the test polynucleotides.

Following detection or visualization, the hybridization pattern is used to determine
15 quantitative information about the genetic profile of the labeled target polynucleotide sample that was contacted with the array to generate the hybridization pattern, as well as the physiological source from which the labeled target polynucleotide sample was derived. By genetic profile is meant information regarding the types of polynucleotides present in the sample, e.g. in terms of the types of genes to which they are complementary, as well as
20 the copy number of each particular polynucleotide in the sample.

Diagnostic or Prognostic Tests

The invention provides for diagnostic tests for detecting diseases. The invention also provides for prognostic tests for monitoring a patient's response to therapy. According to the method of the invention, the presence of disease or the patient's response
25 to therapy is detected by obtaining a fluid or tissue sample from a patient. A sample comprising nucleic acid is prepared from the fluid or tissue sample. The nucleic acid extracted from the sample is hybridized to an array comprising a solid substrate and a plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of the presence of disease or a predisposition to a disease or disorder. According to this diagnostic test,
30 hybridization of the sample comprising nucleic acid to one or more nucleic acid members on the array is indicative of disease, a predisposition to a disease or disorder, or in the case of a prognostic test, indicative of a patient's response to therapy.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Other utilities for the present invention, such as that described above and in the following examples, will be readily apparent to those skilled in the art.

5 The present invention is more particularly described in the following examples which are intended as illustrative only since numerous modifications and variations will be apparent to those skilled in the art.

Example 1: Prostate Tumours

10 Following acquisition of prostate fluid or surgery to remove prostate tumours, biopsy slides are prepared to identify transforming or cancerous cells. Laser Capture Microdissection (LCM) microscopy is used to isolate cells that are either normal, benign, or malignant from the tissue section. Procurement of diseased cells of interest, such as precancerous cells or invading groups of cancer cells is possible from among the
15 surrounding heterogeneous cells.

Total DNA extraction from each of these cells was purified according to a modification of the protocol outlined by Arcturus Engineering Inc. DNA was extracted from cells with a 50µl volume of 1 mg/ml proteinase K (PK), in 10mM Tris pH 8.0,
20 0.1mM EDTA pH 8.0, and 0.1% Tween 20, at 42°C overnight. Following incubation overnight at 42°C the tubes were removed from the incubation oven. The samples were microcentrifuged for 5 min at 6400 rpm(2000 x g). The CapSure™ was removed from the tube and discarded. The tube was incubated at 95°C for 10 minutes (PK is inactivated) and then cooled to room temperature. 5-50µl of the sample was used for PCR amplification.

25 Following purification, individual samples are amplified, by LX-PCR using the appropriate primers for hypervariable region 1 (HV1), hypervariable region 2 (HV2) and the entire 12S region. These PCR products are then sequenced using high throughput methods as is well known in the art.

30

Example 2: Duplications in the non-coding region of mtDNA from sun-exposed skin

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

DNA was extracted from tissue samples as described in Example 1, with the use of DNeasy™ kit supplied by Qiagen. A "back to back" primer methodology was used to investigate the incidence of tandem duplications in the non-coding region (NCR) in relation to sun-exposure. 32 age-matched, split human skin samples, from sun-exposed (n=24) and sun-protected body sites (n=10) were investigated.

The following duplication primers from Brockington *et al* 1993 and Lee *et al* 1994 were used:

C	L336	AAC ACA TCT CTG CCA AAC CC	20 mer
10	D	H335 TAA GTG CTG TGG CCA GAA GC	20 mer
	E	L467 CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC	20 mer
	F	H466 AGT GGG AGG GGA AAA TAA TG	20 mer

Primers pairs C/D and E/F are 'back to back' at the site of two separate sets of direct repeats in the non-coding region. As a result they only generate a product if a duplication is present at these points. Products generated are 260 bp and/or less common 200bp variant. Modified PCR conditions are: 100ng total cellular DNA, 200µM dNTPs, 2.5 U HotStarTaq polymerase and PCR buffer (Qiagen, Uk), 25 pmoles of primers: one cycle of 94°C for 4 minutes, 36 cycles of 94 °C x 1 minute, 55°C x 1 minute, 72°C x 1 minute and one cycle of 72°C x 7 minutes.

An increased incidence of duplications with increasing sun-exposure was observed, with duplications identified in 10/24 but 0/10 samples from sun-exposed and sun-protected skin respectively (Fisher's exact test, p=0.01 5) (Birch-Machin and Krishnan 2001). The sizes of the most frequent duplications were 200 and 260 base pairs. Interestingly these same samples also contained high levels (>1 %) of the 4977bp common mtDNA deletion as determined by an established quantitative 3-primer PCR assay described in Example 6.

Example 3: Mutation fingerprint of mtDNA in human NMSC and its precursor lesions

DNA was extracted from human skin tissue samples as described in Example 1, with the use of DNeasy™ by Qiagen Using specific primers, mtDNA is amplified by PCR

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

and following DNA sample preparation (Qiagen), mutations are identified by automated sequencing (PE Applied Biosystems) using BigDye™ Terminator Cycle sequencing. This methodology is described in Healy et al. 2000; Harding et al. 2000. The entire 16,569bp human mitochondrial genome is sequenced using established PCR primer pairs, which are
5 known not to amplify pseudogenes, or other nuclear loci. Any putative DNA changes are confirmed by comparison to the revised "Cambridge" human mtDNA reference (Andrews et al. 1999). The sequences obtained from the tumour mtDNA are first compared for known polymorphisms (Andrews et al. 1999; MITOMAP) and then compared with the mtDNA sequence from the normal perilesional skin to identify genuine somatic mutations.

10

DHPLC is performed on the WAVE™ DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Omaha, USA) which provides a fully automated screening procedure. The same technology is used to screen for heteroplasmic mutations in the skin tumour mtDNA.

15

Using the back to back primer methodology described in Example 2, the pattern of DNA length mutations (i.e. tandem duplications) in the hypervariable segments of the non-coding region (NCR) are rapidly screened.

20

Example 4: deletion spectrum of the entire mitochondrial genome in human NMSC and its precursor lesions

25

MtDNA damage in squamous cell carcinomas (SCCS), Basal cell carcinomas (BCCS) and putative precursor lesions such as Bowen's disease and actinic keratoses (As) was compared to adjacent perilesional skin taken from different sun-exposed body sites. A long-extension PCR technique (LX-PCR) (Ray et al. 1998) was used to amplify the entire
25 mitochondrial genome in order to determine the whole deletion spectrum of mtDNA. A myriad of specific deletions have been observed to occur in the mitochondrial genome. Not all deletions will correlate with non-melanoma skin cancer; however, for an accurate diagnostic method, those deletions that are associated with the disease must be known.

30

DNA is extracted by use of a commercial kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The entire mitochondrial genome is amplified in two separate reactions using the Expand™ Long Template PCR System™ (Boehringer

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Manheim, Switzerland). The PCR primers used are those described by Kleinle et al. (1997) covering the following regions of the Cambridge sequence (Andrews et al. 1999): DIA(nucleotides (nt) 336-363), DIB (nt 282-255), OLA (nt 5756-5781), and OLB (nt 5745-5781). These large products eliminate amplification of nuclear pseudogenes. The

5 sequences of the primers are as follows:

DIAF: (336-363) 5' AACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACA 3'

OLBR: (5745-5721) 5' CCGGCGGCGGAGAGAAGTAGATTGAA 3'

OLAF: (5756-5781) 5' GGGAGAAGCCCGGCAGGTTGAAGC 3'

DIBR: (282-255) 5' ATGATGTCGTGTGGAAAGTGGCTGTGC 3'

10

Amplifications are performed in 50 microlitre reactions containing 16 pmol of each primer, 500µmol dNTPs, 10 x PCR buffer with 22.5mM MgCl₂ and detergents(kit), 0.75 µl of enzyme (3.5 x 10³ units/ml) and 50-200ng of total DNA. One reaction generates 11,095bp segments of the genome, while another results in 5,409bp lengths (e.g. Kleinle et al, 1997). The PCR amplification conditions consists of a denaturing stage at 93°C for 1 min 30s, followed by 10 cycles of 93°C for 30s, 60°C for 30s and 68°C for 12 min, followed by a further 20 cycles of the same profile with an additional 5s added to the elongation time every cycle. There is a final cycle of 93°C for 30s, 60°C for 30s and an elongation time of 68°C for 26 minutes. To ensure reproducibility, a known amount of

20 DNA is separated on a 1% agarose gel and only samples which have at least the same amount of DNA are included in the analysis.

25

A greater mean number of deletions is found with increasing UV exposure in the tumour samples, as shown in Table 2.

UV exposure	Mean number of deletions in adjacent normal epidermis	Mean number of deletions in epidermal tumour
Constant (n=5)	1.0	3.6
Intermittent (n=2)	0	1.5
Sun-protected (n=2)	0	0

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Table 2. Comparison of the mean number of deletions observed in the LX-PCR of mtDNA between normal and tumour skin taken from different UV-exposed body sites.

5 **Example 5: Aging and MtDNA**

Using temporal maternal line comparisons (i.e. great-grandchild through great-grand parents), the entire sequence of mtDNA extracted from a given tissue is rapidly, and accurately sequenced, in order to definitively state the arrangement of nucleotide base pairs for that specific molecule and possible changes through time. These characterizations are compared to health status, aging indicators and between specific maternal lines, within larger populations. This combined information allows crucial statistical discrimination between separate causes resulting in the same mutation/deletion and establishes that the mtDNA sequences, used as a bio-marker, has the required index of specificity and sensitivity in order to establish its validity. In addition, the proportions of base pair deletions and mutations are compared for consistency in various tissues across the 4 maternal generations. Recent methodological developments have permitted detection of base pair deletions implicated in aging in blood samples (Bassam et al. 1991) and have raised the possibility that blood samples may be used to study mtDNA in lieu of skeletal muscle (von Wurmb et al. 1998). After establishing the efficacy of employing leukocytes in lieu of muscle tissue, as representative of mtDNA deletions and/or mutations, the next step measures only mtDNA in leukocytes. MtDNA deletions/mutations are then determined as previously described.

Skeletal muscle or leukocytes are obtained from a patient. DNA is extracted as set out in Example 1. The following primers were used:

12ST1: (1257-1279) 5' TATACCGCCATCTTCAGCAAAC3'

12ST2: (1433-1411) 5' TACTGCTAAATCCACCTTCGAC 3'

D1F: 5' CCTTACACTATTCCTCATCACC 3'

D1R: 5' TGTGGTCTTTGGAGTAGAAACC 3'

30

Amplifications were performed in 50 microlitre reactions containing 2.0 µmol of each primer, 250µmol dNTPs, 10 x PCR buffer(Thermopol Reaction Buffer), bovine

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

serum albumin, 0.5units Deep vent polymerase and 50-200ng of total DNA. The PCR amplification conditions consists of a denaturing stage at 95°C for 5 min (hot start), followed by 30 cycles of 94°C for 30s, 60°C for 60s and 72°C for 30s with a final extension at 72°C for 10 min. Gel electrophoresis was performed on a 2% agarose gel at 125 volts for 60 min, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. To ensure reproducibility, a known amount of DNA was separated on a 2% agarose gel and only samples which have the same amount of DNA were included in the analysis.

Example 6: Quantitative detection of the 4977bp common mtDNA deletion by 3-primer PCR

Where appropriate the incidence of the common deletion is determined in a quantitative manner by a 3-primer PCR method which detects levels greater than 1-5% or a dilution PCR method which detects levels less than 1 % down to 10⁻⁶%. (See Example 7) Samples are obtained and DNA extracted as described in Example 1. To simultaneously detect and quantify the ratios of both deleted and wild type (wt) mtDNAs in the DNA samples, a 3-primer PCR procedure is used (as described in Birch-Machin et al 1998). Primers A, and C correspond to heavy strand positions 13720-13705 and 9028-9008 respectively (Anderson et al., 1981); primer B corresponds to light strand positions 8273-8289. Primer C maps to a mtDNA region within the common deletion, whereas primers A and B flank the deleted region. Therefore primers B and C only amplify wt-mtDNAs and primers A and B only amplify deleted mtDNAs (the distance between the two primers in the absence of the deletion, approximately 5.5kb, is too long to be amplified under our PCR conditions as described below).

Using three primers allowed the simultaneous detection of two bands, the larger one (755bp) corresponding to the wt-mtDNA, and the smaller one (470bp) corresponding to deleted mtDNA harbouring the 'common deletion'. The PCR reaction mixture (25µl total volume) contained 100ng total cellular DNA, 200µM dNTPs, 10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 1.5mM Mg Cl₂, 0.1% Triton X-100, 2.5U *Taq* DNA polymerase (BioTaq, BiolineUK Limited, London), 25 pmoles of primers A and B, 6.25 pmoles of primer C and 3µCi of [α-³²P]-dATP. The PCR conditions were 25 cycles of 94°C at 1 minute, 55°C at 1 minute, 72°C at 2 minutes including a final extension of 15 minutes at 72°C. These PCR

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

products were then electrophoresed through a 6% nondenaturing polyacrylamide gel and the radioactive PCR fragments were quantified by phosphorimage analysis using the ImageQuant™ software (Molecular Dynamics, Chesham UK).

5 **Example 7: Serial Dilution PCR method to quantitatively detect low levels (<1%) of the common mtDNA deletion**

10 A semi-quantitative PCR method (Corral-Debrinski *et al* 1991) is used to estimate the proportion of the common deletion in the total mtDNA extracted from the tissue/cell samples. Biological samples are obtained and DNA extracted as described in Example 1. The DNA sample is initially linearised using the restriction enzyme *Bam* HI (1µl enzyme and 1µl of commercially supplied buffer) at 37°C for 90 minutes. Serial dilutions are performed in two-fold steps (for total mtDNA there was an initial 10-fold dilution) and PCR performed for each dilution (1µl) using the following primers:

Primers for total mtDNA

15 L3108 (nt3108-3127)
H3717 (nt3717-3701)

Primers for Common Deletion

20 L8282 (nt8282-8305)
H13851 (nt13851-13832)

The reaction conditions are as follows:

25 One cycle 94°C for 2 minutes, 34 cycles of 94°C for 45 seconds, 51°C for 30 seconds (total mtDNA), 56°C for 30 seconds (common deletion), 72°C for 1 minute and one final cycle of 72°C for 8 minutes. All PCR reactions are carried out in the following mixture (50µl): Sample DNA 1µl, 0.6µM forward primer, 0.6µM reverse primer, 0.2mM dNTP's, 5µl GeneAmp® 10x PCR Buffer, (Perkin Elmer), 0.2µl Amplitaq® DNA polymerase (Perkin Elmer), 35.75µl sterile autoclaved double distilled water.

30 Following electrophoresis the PCR productes are visualised on a UV transilluminator (TMW-20, Flowgen Ltd., Lichfield, UK) and a digital image of the gel obtained using image acquisition apparatus (Alpha Imager 2000, Alpha Innotech

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Corporation, supplied by Flowgen Ltd., Lichfield, UK). The associated image analysis software (Alpha Ease v3.3, Alpha Innotech Corp.) allows the calculation of the integrated optical density (IOD) for each PCR product in a dilution series. The band where an IOD value of zero is obtained for both total mtDNA and deleted mtDNA and the corresponding dilution values are used to calculate the percentage of common deletion in the sample thus:

$$\% \text{common deletion} = \frac{\text{total mtDNA dilution factor}^{(\text{IOD Zero})} \times 100}{\text{common deletion dilution factor}^{(\text{IOD Zero})}}$$

10 **Example 8: Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)**

Samples are obtained and DNA extracted as in Example 1. PCR in 13 overlapping fragments using two different PCR conditions as described by van den Bosch et al. (2000). The following three mtDNA specific primer pairs for PCR:

15 i. Oligo Sequence

Mt3118F CCCTGTACGAAAGGACAAGAG
Mt3334R TGAGGAGTAGGAGGTTGG

20 Mt8207F CCCATCGTCCTAGAATTAATTC
Mt8400R ATGGTGGCCATACGGTAG

Mt14427F CCCATGCCTCAGGATACTCCTC
Mt14997R GCGTGAAGGTAGCGGATG

25 The 1-2 kb PCR products are digested into fragments of 90-600bp and resolved at their optimal melting temperature. Mutations are represented as two peaks and mutations with low percentages, such as <2% heteroplasmy as a "shoulder" in the peak.

30 DHPLC is performed with a mobile phase consisting of two eluents (pH 7.0). Buffer A contains triethylammonium acetate (TEAA), which interacts with both the negatively charged phosphate groups on the DNA as well as the surface of the column. Buffer B contains TEAA with 25% of the denaturing agent acetonitrile. Fragments were

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

eluted with a linear acetonitrile gradient at a constant flow rate. Increasing the concentration of acetonitrile will denature the fragments. Table 3 below is an example of a standard method for DHPLC of a PCR reaction generated using the WAVEMAKER software (Transgenomics) according to manufacturer's instructions.

5

Table 3: Standard Method for DHPLC

Step	Time	%A (buffer)	%B (buffer)	ml/min (flow rate)
Loading	0.0	52	48	0.90
Start Gradient	0.1	47	53	
Stop Gradient	4.1	39	61	
Start Clean	4.2	0	100	
Stop Clean	4.7	0	100	
Start Equilibrate	4.8	52	48	
Stop Equilibrate	6.8	52	48	

The temperatures for successful resolution of the various heteroduplexes are detailed below and can simply be substituted into the relevant places in Table 2:

Fragment	Melting temp (°C)	Gradient of %Buffer B
Mt3118F	59	51-59
Mt8207F	58	50-58
Mt14427F	56	60-68

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

References

- Anderson S, et al., *Nature* 290:457-464, 1981
- Andrews RM, et al., *Nature Genetics* 23(2):147, 1999
- Barringer et al., *Gene*, 89:117 1990
- Bassam BJ, Caetano-Anolles PM, Gresshoff PM., *Anal. Biochem.* 196: 80-83, 1991
- Berneburg M, et al., *J. Biol. Chem.* 274(22):15345-15349, 1999
- Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wohr G, Latil A et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 62: 1416-1424,1998
- Birch-Machin MA, et al., *Methods in Toxicology*, Volume 2, 51-69,1993
- Birch-Machin MA, et al., *J.Invest.Dermatol.*, 110:149-152 1998
- Birch-Machin MA, Online Conference Report (Sunburnt DNA), International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, New Scientist, 2000(a)
- Birch-Machin MA, Taylor RW, Cochran B, Ackrell BAC, Tumbull DM. *Ann Neurol* 48: 330-335, 2000(b)
- Birch-Machin MA, *Clin. Exp. Dermatol.*, 25(2), 141-146, 2000 (c)
- Birch-Machin MA and Krishnan K. *Mitochondrion*, 1, p45 (2001).
- Birch-Machin MA, Lindsey J. Lusher M and Krishnan K. *Mitochondrion*, 1 Suppl. 1, S30 (2001).
- Bogliolo, M, et al., *Mutagenesis*, 14: 77-82, 1999
- Brierley EJ, Johnson MA, Lightowlers RN, James O, Turnbull DM., *Ann Neurol* 43(2):217-223, 1998
- Brockington, et al., *Nature Genet* 4:67-71, 1993
- Brown, M.D., et al., *Am J. Humn Genet*, 60: 381-387, 1997
- Brumley, R. L. Jr. and Smith, L.M., 1991, Rapid DNA sequencing by horizontal ultrathin gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res.* 19:4121-4126 *Nucleic Acids Res.* 19: 4121-4126
- Buttayan R, Sawczuk IS, Benson MC, Siegal JD, Olsson CA., *Prostate* 11:327-337,1987
- Byrne E., *Curr Opin Reumatol* 4(6):784-793, 1992

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J et al., *Cancer Res* 57:4997-5000, 1997

Chee, M. et al *Science* 274; 610-614, 1996

Chinnery PF, Howel N, Turnbull DM. *J.Med.Genet.*; 36: 425-436, 1999

Chinnery PF and Turnbull DM., *Lancet* 354 (supplement 1): 17-21, 1999

Chinnery PF and Turnbull DM., *Lancet* 354 (supplement 1): 17-21, 2000

Chollat-Traquet, C, Tobacco or health: a WHO programme., *Eur J Cancer*, 28(2-3): 311-315, 1992

Chomyn A, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(10):4221-4225, 1992

Cohen D, Barton G, The cost to society of smoking cessation., *Thorax*. 53(2): S38-42, 1998

Corral-Debrinski et al., *Mutat Res*, 275: 169-180, 1991

Cortopassi G. A. and Arnheim, H. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans, *Nucleic Acids Res.* 18, 6927-6933 1990

Cortopassi G, Wang E., *Biochim Biophys Acta* 1271(1):171-176, 1995

Creteau DL, Stierum RH, Bohr VA, *Mutat Res* 434(3):137-148, 1999

Current Protocols in Molecular Biology

Davis RM, Boyd GM, Schoenborn CA, "Common courtesy" and the elimination of passive smoking. Results of the 1987 National Health Interview Survey. *JAMA* 263(16): 2208-10, 1990

Dong JT, Isaacs WB, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC., *Science* 268:884-886, 1995

Driezen P, Brown KS., Searchable database of questionnaire items from populations surveys of tobacco use in Canada: A summary report to the Ontario Tobacco Research Unit (Toronto, Ontario) 1999

Easton RD, Merriwether AD, Crews DE, and Ferrell RE., *Am. J. Hum. Genet.* 59:202-212, 1996

Fahn H, Wang L, Hseith R, Chang S, Kao S, Huang M, and Wei Y. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 154:1141-1145, 1996

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- Fahn HJ, Wang LS, Kao SH, Chang SC, Huang MH, Wei YH., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 19(6): 901-9, 1998
- Finegold D., Mitochondrial Disease- Primary Care Physican's Guide. Psy-Ed. Corp D/B/A *Exceptional Parents Guide*: 12, 1997
- Flanagan N, Birch-Machin MA, Rees JL., *Hum Mol Genet* 9 (17):2531-2537,2000
- Flanagan N, Ray AJ, Todd C, Birch-Machin MA and Rees JL. *J Invest. Dermatol* (2001) 117 (5) 1314-1317
- Fliss MS, et al. *Science* 287: 2017-2019, 2000
- Gattermann, N, Berneburg, M, Heinisch, J, Aul, C, Schneider, W., *Leukemia* 9(10): 1704-10, 1995
- Green R, Reed JC., *Science* 281 (5381):1309-1312, 1998
- Guatelli, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1874 1990
- Gulavita, Sunil Dr. Northwestern Ontario Cancer Centre – Personal Communication
- Habano S, Nakamura, Sugai T., *Oncogene* 17 (15):1931-1937, 1998
- Harding RM, et al., *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1351-1361, 2000
- Harman, D., *Proc Natl Acad Sci USA* 78(11): 7124-8, 1981
- Hattori et al, Age-dependant increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia, *AM. Heart J.*, 121, 1735-1742, 1991
- Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I., *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (23):10614-10618, 1991
- Hayashi J, Ohta S, Kikuchi A, Takemitsu M, Goto Y, Nonaka I., *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (23):10614-10618, 1991
- Hayward SW, Grossfeld GD, Tlsty TD, Cunha GR., *Int J Oncol* 13:35-47, 1998
- Healy E, Birch-Machin MA, Rees JL. Chapter 1 I. *The Human Melanocortin 1 Receptor Gene. In the Melanocortin Receptors*(Cone RD (ed)). *Humana Press Inc.* New Jersey, USA, 1999
- Healy E, Birch-Machin MA, Rees JL., *Lancet* 355, 1072-1073, 2000
- Hearst N, Hulley SB. Using secondary data, *In Designing clinical research: an epidemiological approach.* Ed. Hulley, S. and Cummings, S., Baltimore: *Williams & Wilkins*, pages 53-62, 1988

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- Hopgood, R., et al, 1992, Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products, *Biotechniques* 13:82-92
- Hsieh, RH and Wei, YH, Age-dependent multiple deletions in human muscle mitochondrial DNA, in preparation 1992
- Huang GM, Ng WL, Farkas J, He L, Liang HA, Gordon D, Hood R., *Genomics* 59(2):178-86, 1999
- [Http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html](http://www.ornl.gov/hgmis/project/budget.html)
- Ikebe et al., Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 1044-1048, 1990
- Innis et al PCR Protocols, *A Guide to Methods and Application*, Academic Press Inc. San Diego 1990
- Kaiserman MJ, *Chronic Dis Can* 18(1): 13-9, 1997
- Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K., *Int. J. Exp. Pathol.* 72(1): 1-7, 1991
- Katayama et al., Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals, *Biochem. Int.*, 25, 47-56 1991
- Kleinle S, et al., *Human Genet.* 290: 457-465, 1997
- Konishi N, Cho M, Yamamoto K, Hiasa Y. *Pathol. Int.* 47:735-747, 1997
- Krishnan K and Birch-Machin MA. *British Journal of Dermatology* (2002), 146,723
- Kwoh et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 1173 1989
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. *Cancer J. Clin.* 49:8-31
- Landis, SH, et al., *CA Cancer J. Clin.* 49: 8-31, 1999
- Landegren et al. *Science*, 241: 1077 1988
- LeDoux SP, et al. *Mutat Res* 434(3):149-159, 1999
- Lee HC, et al. *FEBS Letters* 354:79-83, 1994
- Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YHu. *Federation of European Biochemical Societies*, 441:292-296, 1998
- Lee HC, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 362(2): 309-16, 1999
- Leonard & Shapira 1997

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- Lindsey J, Lusher M, Krishnan KJ and Birch-Machin MA., *British Journal of Dermatology* (2001), 144,655
- Li Y, et al., In: *Oxygen Radicals and the Disease Process*, Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 237-277, 1997
- Linnane et al., 1990
- Liu CS, Kao SH, Wei YH. *Environ. Mol. Mutagen* 30(1): 47-55, 1997
- Lowes S, Krishnan K, Lindsey J, Lusher M and Birch-Machin MA. *British Journal of Dermatology* (2002, 146,736
- Luckey, J.A., et al, 1993, High speed DNA sequencing by capillary gel electrophoresis, *Methods Enzymol.* 218: 154-172
- McCormack, Douglas. Website: <http://cormactech.com/dna>, 2001
- Meibner C, von Wurmb N, Ochmichen M., *Int. J. Legal Med.* 110: 288-291, 1997
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G., *Science* 286: 774-779,1999
- Miquel J, de Juan E, Sevilla I. *EXS* 62:47-57,1992
- MITOMAP: A human mt genome database (www.gen.emory.edu/mitomap.html)
- Mullis and Faloona *Methods Enzymol* 155, 335 1987
- Nachman MW, Brown WM, Stoneking M, Aquardo CF., *Genetics* 142:53-963,1996
- National Cancer Institute of Canada, Canadian cancer statistics 2000., National Cancer Institute of Canada., Toronto, Ont. 2000
- Naviaux, RK., *Mitochondrial Disease- Primary Care Physican's Guide.* Psy-Ed. Corp D/B/A *Exceptional Parents Guide:* 3-10, 1997
- Newton, CR and Graham, A., *Introduction toBiotechniques Series* 1997
- Oefner PJ, Underhill PA., *Current protocols in human genetics* 19, 7.10.1-12, 1998
- Ozen M, et al, *Prostate* 36:264-271,1998
- Pang et al, *Arch. Biochem.Biophys.* 312: 534-538, 1994
- Parsons TJ, et al., *Nature Genet.* 15 (4):363-368, 1997
- Pascucci B, et al., *J.Mol.Biol.* 273 (2):417-427, 1997

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC., *Mut. Res.* 488, 119-133, 2001
- Polyak Y, et al., *Nature Genet.* 20 (3):291-293, 1998
- Ray AJ, Rees JL, Birch-Machin MA., *J. Invest.Dermatol.* 110:692, 1998
- Ray AJ, Rees JL, Birch-Machin MA., *Brit.J.Dermatol.*140:788, 1999
- Ray AJ, Pickersgill L, Turner R, Nikaïdo O, Rees JL, Birch-Machin MA., *J. Invest. Dermatol* 115(4):674-679, 2000
- Rees JL, Skin cancer. In: *The Genetic Basis of Human Cancer*, eds Vogelstein B, Kinzler K. New York: McGraw-Hill, pp527-536, 1998
- Rehman I, Quinn AJ, Healy E, Rees JL. *Lancet* 344: 788-789, 1994
- Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL. *Oncogene* 12: 2483-2490, 1996
- SAS Enterprise Mining Users Guide*, SAS Inc., 2000
- Sawyer E, Van Houten B., *Mutation Res:* 434(3):161-176, 1999
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, and Wallace DC., *Am. J. Hum. Genet.* 46:613-623, 1990
- Seidman, M.D. et al., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 123: 1039-1045, 1997
- Shankey TV, Jin JK, Dougherty S, Flanigan RC, Graham S, Pyle JM., *Cytometry* 21:30-39,1995
- Shay JW, Werbin H., *Mutat. Res:*186: 149, 1987
- Sherrat EJ, Thomas AW, Alcolado JC., *Clin. Sci.* 92:225-235,1997
- Shoffner JM, Brown MD, Torrioni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Crain BJ, Fayad M, Reckford CL, and Wallace DC., *Genomics* 17: 171-184, 1993
- Smith DG, Malhi RS, Eshleman J, Lorenz JG and Kaestle FA., *Am. J. Hum. Genet.* 110:271-284, 1999
- Smith R, Birch-Machin MA, Rees JL. *J. Invest. Dermatol.* 111: 101 -104, 1998
SpringNet - CE Connection: Screening, Diagnosis: Improving Primary Care Outcomes.
Website: <http://www.springnet.com/ce/j803a.htm>
- Stone AC and Stoneking M. *Amer. J., Phys. Anthro.* 92(4):463-471, 1993

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- Tamura S, et al. *Eur.J.Cancer [A]* 35 (2):316-319, 1999
- Tanaka, M. et al, 1996, Automated sequencing of mtDNA, *Methods Enzymol.* 264: 407-421
- Taniike, M. et al., *BioChem BioPhys Res Commun.* 186: 47-53, 1992
- Taylor RW, Birch-Machin MA, Bartlett K, Turnbull DM., *J Biol Chem*, 269, 3523-3528 1994
- Tijssen, P. (ed) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 24: *Hybridization with Polynucleotide Probes*, Elsevier, N.Y., 1993
- Tori et al., Ageing-associated deletions of human diaphragmatic mitochondrial DNA, *AM. J. Respir. Cell Mol. Biol.* in press 1992
- Van De Graff, KM, Fox, SI. *Concepts of Human Anatomy and Physiology.*, Dubuque: WM. C. Brown Publishers, 1995
- Van den Bosch BJC, et al., *Nucleic Acids Res.* 28: 89, 2000
- von Wurmb, N, Oelmichen, M, Meissner, C., *Mutat Res.* 422:247-254, 1998
- Wallace DC., *Annu Rev Biochem.* 61: 1175-1212, 1992
- Wallace DC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8739-8746, 1994
- Wald and Wallace, D.C., Mitochondrial Diseases in man and Mouse. *Science*, 5(283): 1482-1497, 1999
- Wald, NJ, Hackshaw, AK, Cigarette Smoking: an epidemiological overview. *Br Med Bull.* 52(1): 3-11, 1996
- Wallace et al., Mitochondrial DNA MUTatio Assoicated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy, *Science*, 1427-1429
- Walsh PC, Partin AW. *Cancer* 80:1871-1874, 1997
- Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Paabo S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8720-8724, 1991
- Ward 1993
- Wei YH, Pang C, You B, Lee H. *Ann.NY Acad.Sci.* 786:82-101, 1996
- Wei YH. Proceedings of the Nat. Sci. Council of the Republic of China April 22(2):5567, 1998

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- Weinstock MA: In: JJ Stern RS, MacKie RM and Weinstock MA, Grob (eds) *Epidemiology*, Blackwell (UK), pp121-128, 1998
- Woodwell DA. National Ambulatory Medical Care Survey: 1997 Summary. Advance data from vital and health statistics; no. 305. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics. 1999
- Wu & Wallace *Genomics*, 4:560, 1989
- Xu J, et al., *Nature Genet* 20: 175-179,1998
- Yamaguchi KT, et al., *Free Radical Res. Commun.* 16(3):167-74, 1992
- Yeh, J.J., et al., *Oncogene Journal*, 19: 2060-2066, 2000
- Yen et al., Ageing-associated 5kb deletion in human liver mitochondrial DNA, *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 178, 124-131 1991
- Yen et al., Age-dependent 6 kb deletion in human liver mitochondrial DNA, *Biochem. Int.* 26, 457-468 1992
- Zeviani M, et al. *Am. J. Hum. Genet.* 47:904-914,1990
- Zhang et al., Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual, *FEBS Lett*, 297, 34-38 1992
- Zhang, C., et al., *BioChem. Biophys. Res. Commun.*, 195: 1104-1110, 1993

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

WE CLAIM:

1. A method of detecting in a subject containing mtDNA the genesis or progression of disease comprising:
 - a) obtaining a biological sample from the subject;
 - b) extracting DNA from the biological sample;
 - c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
 - d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

2. The method of claim 1 wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of:
 - a) sequencing the mtDNA;
 - b) amplifying mtDNA by PCR;
 - c) Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations;
 - d) denaturing HPLC;
 - e) hybridization to microarrays, gene chips or biochips;
 - f) molecular marker analysis; and
 - g) a combination of any of a) through f).

3. The method of claim 2 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located.

4. The method of claim 2 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises the entire mitochondrial genome.

5. The method of claim 1 where the biological sample is from a tissue suspected of being a potential site of disease.

6. The method of claim 1, where the biological sample is from a tissue suspected of harbouring a metastasis.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

7. The method of claim 1 where the disease is selected from the group of prostate cancer or non-melanoma skin cancer.
8. The method of claim 7, where the disease is prostate cancer.
9. The method of claim 7, where the disease is non-melanoma skin cancer.
10. The method of claim 1, where the mutations is/are selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, and transversions.
11. The method of claim 1 where the mutation is homoplasmic.
12. The method of claim 1 where the mutation is heteroplasmic at any level.
13. The method of claim 1, where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue.
14. The method of any claims 1 to 13, where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.
15. A method of detecting in a subject containing mtDNA the presence of a disease comprising:
 - a) obtaining a biological sample from the subject;
 - b) extracting DNA from the biological sample;
 - c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
 - d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

16. The method of claim 15 wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of:

- a) sequencing the mtDNA ;
- b) amplifying mtDNA by PCR;
- c) Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations;
- d) denaturing HPLC;
- e) hybridization to microarrays, gene chips or biochips;
- f) molecular marker analysis; and
- g) a combination of any of a) through f).

17. The method of claim 16 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located.

18. The method of claim 16 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises the entire mitochondrial genome.

19. The method of claim 15 where the biological sample is from a tissue suspected of being a potential site of disease.

20. The method of claim 15, where the biological sample is from a tissue suspected of harbouring a metastasis.

21. The method of claim 15 where the disease is selected from the group of prostate cancer or non-melanoma skin cancer.

22. The method of claim 21, where the disease is prostate cancer.

23. The method of claim 21, where the disease is non-melanoma skin cancer.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

24. The method of claim 15, where the mutations is/are selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, and transversions.
25. The method of claim 15 here the mutation is homoplasmic.
26. The method of claim 15 where the mutation is heteroplasmic at any level.
27. The method of claim 15, where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue.
28. The method of any claims 15 to 27, where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.
29. A method of determining a predisposition to a disease or disorder indicated by mutations in a mitochondrial DNA sequence comprising:
- a) obtaining a biological sample from the human subject;
 - b) extracting DNA from the biological sample;
 - c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
 - d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes.
30. The method of claim 29 wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of:
- a) sequencing the mtDNA ;
 - b) amplifying mtDNA by PCR;
 - c) Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations;
 - d) denaturing HPLC;
 - e) hybridization to microarrays, gene chips or biochips;

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

- f) molecular marker analysis; and
- g) a combination of any of a) through f).

31. The method of claim 30 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located.

32. The method of claim 30 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises the entire mitochondrial genome.

33. The method of claim 29 where the biological sample is from a tissue suspected of being a potential site of disease.

34. The method of claim 29, where the biological sample is from a tissue suspected of harboring a metastasis.

35. The method of claim 29 where the disease is selected from the group of prostate cancer or non-melanoma skin cancer.

36. The method of claim 35, where the disease is prostate cancer.

37. The method of claim 35, where the disease is non-melanoma skin cancer.

38. The method of claim 29, where the mutation is selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, and transversions.

39. The method of claim 29, where the mutation is homoplasmic.

40. The method of claim 29, where the mutation is heteroplasmic at any level.

41. The method of claim 29, where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, breast aspirate, fecal

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

matter, ejaculate, menstrual flow, cervical tissue from a Pap smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears or biopsy tissue.

42. The method of any of claims 29 to 41 where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

43. A method for assessing the status of the aging process of a human subject comprising:

- a) obtaining a biological sample from the human subject;
- b) extracting DNA from the biological sample;
- c) detecting mutations in the mtDNA; and
- d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

44. The method of claim 43 wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of:

- a) sequencing the mtDNA ;
- b) amplifying mtDNA by PCR;
- c) Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations;
- d) denaturing HPLC;
- e) hybridization to microarrays, gene chips or biochips;
- f) molecular marker analysis; and
- g) a combination of any of a) through f).

45. The method of claim 43 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located.

46. The method of claim 43 where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises the entire mitochondrial genome.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

47. The method of claim 43, where the mutation is selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, and transversions.

48. The method of claim 43 where the mutation is homoplasmic.

49. The method of claim 43 where the mutation is heteroplasmic at any level.

50. The method of any of claim 43, where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, fecal matter, breast aspirate, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue.

51. The method of any of claims 43 to 50 where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

52. A database containing a plurality of human mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences selected from the group of normal control sequences associated with non-disease states, sequences associated with the presence of disease or sequences indicative of the predisposition to disease.

53. The database of claim 52, wherein the disease is selected from the group of prostate cancer and non-melanoma skin cancer.

54. The database of claim 52 where the mitochondrial DNA sequences are associated with the aging process of a human subject.

55. The database of claims 53 or 54 wherein the database contains a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

56. A kit for diagnosis of a disease comprising a disposable chip, microarray, means for holding the disposable chip, means for extraction of mitochondrial DNA and means for access to a database of mitochondrial DNA sequences.
57. A kit for determining predisposition to a disease comprising a disposable chip, microarray, means for holding the disposable chip, means for extraction of mitochondrial DNA and means for access to a database of mitochondrial DNA sequences.
58. An array comprising a plurality of nucleic acid members, and a solid substrate, wherein each nucleic acid member is indicative of the presence of a disease and is selected from the group of mitochondrial DNA, RNA transcribed from mitochondrial DNA, wherein each nucleic acid member has a unique position on said array and is stably associated with the solid substrate.
59. The array of claim 58, wherein each member is indicative of prostate cancer.
60. The array of claim 58, wherein each member is indicative of non-melanoma skin cancer.
61. An array comprising a plurality of nucleic acid members, and a solid substrate, wherein each nucleic acid member is indicative of the predisposition to a disease and is selected from the group of mitochondrial DNA, RNA transcribed from mitochondrial DNA, and cDNA wherein each nucleic acid member has a unique position on said array and is stably associated with the solid substrate.
62. The array of claim 58, wherein each member is indicative of a predisposition to a disease.
63. The array of claim 58, wherein each member is associated with the aging process.
64. A method of diagnosing a disease in a patient comprising hybridizing a nucleic acid sample obtained from mitochondrial DNA to an array comprising a solid substrate and a

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of the presence of a disease, wherein each nucleic acid member has a unique position and is stably associated with the solid substrate, and wherein hybridization of said nucleic acid sample to one or more nucleic acid members comprising said array is indicative of the presence of the disease.

65. The method of claim 64, wherein the disease is prostate cancer.

66. The method of claim 65, further comprising the step of isolating a prostate massage fluid sample from said patient.

67. The method of claim 65, further comprising the step of preparing a nucleic acid sample from said prostate massage fluid sample.

68. A method of diagnosing non-melanoma skin cancer in a patient comprising: hybridizing a nucleic acid sample obtained from mitochondrial DNA to an array comprising a solid substrate and a plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of non-melanoma cancer, wherein each nucleic acid member has a unique position and is stably associated with the solid substrate, and wherein hybridization of said nucleic acid sample to one or more nucleic acid members comprising said array is indicative of the presence of non-melanoma skin cancer.

69. The method of claim 68, further comprising the step of isolating a skin sample from said patient.

70. The method of claim 69, further comprising the step of preparing a nucleic acid sample from said skin sample.

71. A method of detecting heteroplasmy in a subject containing mtDNA comprising:

- a) obtaining a biological sample from the subject;
- b) extracting DNA from the biological sample; and
- c) performing denaturing HPLC on the sample.

WO 02/101086

PCT/CA02/00848

72. A method of detecting mutations associated with disease in a subject containing mtDNA comprising:

- a) obtaining a biological sample from the subject;
- b) extracting DNA from the biological sample;
- c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
- d) comparing the mt DNA of the biological sample to a database, the database containing data of common population variants in non-disease and disease associated mitochondrial genomes.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
19 December 2002 (19.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/101086 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00848
- (22) International Filing Date: 10 June 2002 (10.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/297,340 11 June 2001 (11.06.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): 1304854 ONTARIO LTD. [CA/CA]; 3rd Floor, 1204 Balmoral Street, Thunder Bay, Ontario P7B 5Z5 (CA).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): BIRCH-MACHIN, Mark [GB/GB]; 5 Emblehope Drive, Kingsmere, Gosforth, Newcastle-upon-Tyne NE3 4RW (GB). DAKUBO, Gabriel, D. [CA/CA]; 6273 Castille Court, Ottawa, Ontario K1C 1X4 (CA). PARR, Ryan [US/CA]; 1282 Hutton Park, Thunder Bay, Ontario P7G 1J4 (CA). THAYER, Robert [CA/CA]; RR 13, Site 9, Comp. 38, Thunder Bay, Ontario P7B 5E4 (CA). NGOM, Alioune [SN/CA]; 744 Sunset Avenue, Windsor, Ontario N9B 3B5 (CA). TH'NG, John [CA/CA]; Northwestern Ontario Regional Cancer Centre, 290 Munro Street, Thunder Bay, Ontario P7A 7T1 (CA).
- (74) Agent: TORYS LLP, Suite 3000, 79 Wellington St. W., Box 270, TD Centre, Toronto, Ontario M5K 1N2 (CA).
- (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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UZ), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 11 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/101086 A3

(54) Title: COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCES AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR THE HEALTH SCIENCES

(57) Abstract: The examination of mutations in the entire mitochondrial genome is used as a diagnostic system for diseases such as prostate cancer, and non melanoma skin cancer. Characteristic mutations and rearrangements including, point mutations (transitions, transversions), deletions, inversions, duplications, recombinations, insertions or combinations thereof in the mitochondrial genome are used as early indicators of prostate cancer, and non melanoma skin cancer. Moreover, the 4977bp, or "common deletion" as well as other associated mutations and/or deletions are used as a measure of aging.

【手続補正書】
 【提出日】平成15年1月17日(2003.1.17)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】配列表
 【補正方法】追加
 【補正の内容】
 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 1304854 Ontario Ltd., et al.

<120> Complete Mitochondrial Genome Sequences as a Diagnostic Tool for the Health

<130> 31726-2002

<140> PCT/CA02/00848
 <141> 2002-06-10

<150> US 60/297,340
 <151> 2001-06-11

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer sequence

<400> 1
 aacacatctc tgccaaaccc 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer sequence

<400> 2
 taagtgtgt ggccagaagc 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 3
cccatactac taatctcatc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 4
agtgggaggg gaaaataatg 20

<210> 5
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 5
aacacatctc tgccaaaccc caaaaaca 28

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 6
ccggcggcgg gagaagtaga ttgaa 25

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 7
gggagaagcc ccggcagggt tgaagc 26

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 8
atgatgtctg tgtggaaagt ggctgtgc 28

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 9
tataccgcca tcttcagcaa ac 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 10
tactgctaaa tccaccttcg ac 22

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 11
ccttacacta ttctcatca cc 22

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 12
tgtggtcttt ggagtagaaa cc 22

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 13
ccctgtacga aaggacaaga g 21

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 14
tgaggagtag gaggttgg 18

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 15
cccacgtcc tagaattaat tcc 23

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer sequence

<400> 16
atggtgggcc atacgtag 19

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer sequence

<400> 17
 cccatgcctc aggatactcc tc 22

<210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer sequence

<400> 18
 gcgtgaaggt agcggatg 18

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

Brockingtonら(1993)およびLeeら(1994)からの以下の重複プライマーが用いられた。

SEQ ID NO: 1

C L336 AAC ACA TCT CTG CCA AAC CC 20 mer

SEQ ID NO: 2

D H335 TAA GTG CTG TGG CCA GAA GC 20 mer

SEQ ID NO: 3

E L467 CCC ATA CTA CTA ATC TCA TC 20 mer

SEQ ID NO: 4

F H466 AGT GGG AGG GGA AAA TAA TG 20 mer

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0158

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0158】

DNAは、生産者の推薦に応じて、市販のキット(Qiagen)を用いて抽出される。すべてのミトコンドリアゲノムは、ExpandTM Long Template PCR SystemsTM(Boehringer Mannheim, スイス)を用いて、別個の二つの反応で増幅される。使用されるPCRプライマーは、ケンブリッジ配列(Andrewsら(1999))の以下の領域をカバーする、Kleinleら(1997)により記述されたものである。すなわち、DIA(ヌクレオチド(nt)336-363), DIB(nt 282-255), OLA(nt 5756-5781), およびOLB(nt 5745-5781)である。これらの大きな生成物は、核偽遺伝子の増幅を排除する。プライマーの配列は以下のとおりである。

SEQ ID NO: 5

DIAF:(336-363) 5' AACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACA 3'

SEQ ID NO: 6

OLBR:(5745-5721) 5' CCGGCGGGCGGGAGAAGTAGATTGAA 3'

SEQ ID NO: 7

OLAF:(5756-5781) 5' GGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGC 3'

SEQ ID NO: 8

DIBR:(282-255) 5' ATGATGTCTGTGTGGAAAGTGGCTGTGC 3'

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0162

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0162】

骨格筋または白血球は、患者から採取された。DNAは、実例1で実行されたようにして抽出された。以下のプライマーが用いられた。

SEQ ID NO: 9

12ST1:(1257-1279) 5' TATACCGCCATCTTCAGCAAAC 3'

SEQ ID NO: 10

12ST2:(1433-1411) 5' TACTGCTAAATCCACCTTCGAC 3'

SEQ ID NO: 11

D1F: 5' CCTTACACTATTCCTCATCACC 3'

SEQ ID NO: 12

D1R: 5' TGTGGTCTTTGGAGTAGAAACC 3'

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0169

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0169】

実例8：変性高速液体クロマトグラフィー（DHPLC）

試料が採取され、実例1と同様にして、DNAが抽出された。Van den Boschら(2000)により記述された二つの異なるPCR条件を用いることにより、13の重複断片についてPCRが実行された。以下は、PCRのための三つのmtDNA特異プライマー対である。

i. オリゴ配列

SEQ ID NO: 13

Mt3118F CCCTGTACGAAAGGACAAGAG

SEQ ID NO: 14

Mt3334R TGAGGAGTAGGAGGTTGG

SEQ ID NO: 15

Mt8207F CCCATCGTCCTAGAATTAATTCC

SEQ ID NO: 16

Mt8400R ATGGTGGGCCATACGGTAG

SEQ ID NO: 17

Mt14427F CCCATGCCTCAGGATACTCCTC

SEQ ID NO: 18

Mt14997R GCGTGAAGGTAGCGGATG

【手続補正書】

【提出日】平成15年12月2日(2003.12.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

m t D N A を有する被検体において、病気、機能障害または老化に関連する突然変異を検出する方法であって、

a . 被検体から生物学的試料を用意することと、

b . 生物学的試料から D N A を抽出することと、

c . m t D N A 内の突然変異の存在を検出することと、

d . 突然変異が正常な集団内または集団間の変異に関連しているかどうか、あるいは突然変異が病気、機能障害または老化に関連しているかどうかを決定することと、
を備えた方法。

【請求項2】

請求項1の方法において、

生物学的試料の m t D N A の全変異荷重を決定することをさらに備えた、
ことを特徴とする方法。

【請求項3】

請求項1の方法において、

生物学的試料が被検体の正常組織からのものである、
ことを特徴とする方法。

【請求項4】

請求項1の方法であって、

突然変異が正常な集団内または集団間の変異に関連しているかどうか、あるいは突然変異が病気、機能障害または老化に関連しているかどうかを決定する工程において、

a) 生物学的試料の m t D N A をデータベースと比較することを備え、

データベースが、集団内変異および集団間変異のデータと、病気、機能障害または老化と
関連する突然変異のデータとを有しており、

b) 任意的に、生物学的試料の全変異荷重を決定することを備えている、
ことを特徴とする方法。

【請求項5】

診断のための請求項1の方法の使用であって、

診断が、病気素質または機能障害素質、病気または機能障害の早期発見、病気または機能
障害の発生、病気または機能障害の存在、病気または機能障害の進行からなるグループか
ら選択されている、
ことを特徴とする使用。

【請求項6】

請求項1の方法において、

突然変異の存在を検出する工程が、

a . m t D N A の配列を決定することと、

b . P C R によって m t D N A を増幅することと、

c . サザン、ノーザン、ウェスタンおよびサウスウェスタンプロット・ハイブリダイゼー
ションすることと、

d . 変性 H P L C を行うことと、

e . マイクロアレイ、遺伝子チップまたはバイオチップにハイブリダイゼーションするこ
とと、

f . 分子マーカー分析と、

g . a) ないし f) のいずれかの組合せと、

からなるグループから選択されている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 6 の方法において、
配列が決定されるミトコンドリア DNA が全ミトコンドリアゲノムを有している、
ことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 の方法において、
病気が非黒色腫皮膚がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 1 の方法において、
病気が前立腺がんである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 の方法において、
突然変異が任意のレベルのヘテロプラスミーである、
ことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 4 の方法において、
データベースが、少なくとも有意性のある数のミトコンドリア DNA 配列を有しており、
ミトコンドリア DNA 配列が母系、非母系、または双方から得られている、
ことを特徴とする方法。

【請求項 12】

病気の診断のためのキットであって、
使い捨てのチップと、マイクロアレイと、使い捨てチップを保持する手段と、ミトコンドリア DNA の抽出のための手段と、ミトコンドリア DNA 配列のデータベースにアクセスするための手段とを備えた、
病気の診断のためのキット。

【請求項 13】

病気素質を決定するためのキットであって、
使い捨てのチップと、マイクロアレイと、使い捨てチップを保持する手段と、ミトコンドリア DNA の抽出のための手段と、ミトコンドリア DNA 配列のデータベースにアクセスするための手段とを備えた、
病気素質を決定するためのキット。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 のいずれかにおいて、
病気が非黒色腫皮膚がんである、
ことを特徴とするキット。

【請求項 15】

請求項 12 または 13 のいずれかにおいて、
病気が前立腺がんである、
ことを特徴とするキット。

【請求項 16】

複数の核酸要素および固形基質を有するアレイであって、
各核酸要素が、病気、機能障害または老化の存在を示し、あるいは、病気、機能障害または老化に関連する塩基対欠失または突然変異の比率のための抑制指数に関連するとともに、
ミトコンドリア DNA、ミトコンドリア DNA から転写された RNA、および cDNA からなるグループから選択されており、各核酸要素がアレイ上に特有の位置を有し、固形基質に安定して結合している、
ことを特徴とするアレイ。

【請求項 17】

複数の核酸要素および固形基質を有するアレイであって、
各核酸要素が、病気素質、機能障害素質または老化素質を示し、あるいは、病気、機能障害または老化に関連する塩基対欠失または突然変異の比率のための抑制指数に関連するとともに、ミトコンドリアDNA、ミトコンドリアDNAから転写されたRNA、およびcDNAからなるグループから選択されており、各核酸要素がアレイ上に特有の位置を有し、固形基質に安定して結合している、
ことを特徴とするアレイ。

【請求項18】

請求項16または17のいずれかにおいて、
各要素が前立腺がんを示している、
ことを特徴とするアレイ。

【請求項19】

請求項16または17のいずれかにおいて、
各要素が非黒色腫皮膚がんを示している、
ことを特徴とするアレイ。

【請求項20】

請求項16または17のいずれかにおいて、
各要素が老化に関連している、
ことを特徴とするアレイ。

【請求項21】

mtDNAを含む被検体においてヘテロプラスミーを検出する方法であって、
a) 被検体から生物学的試料を用意することと、
b) 生物学的試料からDNAを抽出することと、
c) 試料に変性HPLCを実行することと、
を備えた方法。

【請求項22】

複数のヒトミトコンドリアDNA配列を有するデータベースであって、
ミトコンドリアDNA配列が、病気のない状態と関連する正常な制御配列と、集団内変異と関連する配列と、集団間変異と関連する配列と、病気の存在と関連する配列と、病気素質を示す配列とからなるグループから選択されている、
ことを特徴とするデータベース。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00848
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 forms used) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORTOPASSI G ET AL: "MODELLING THE EFFECTS OF AGE-RELATED MTDNA MUTATION ACCUMULATION, COMPLEX 1 DEFICIENCY, SUPEROXIDE AND CELL DEATH" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, AMSTERDAM, NL, vol. 1271, 24 May 1995 (1995-05-24), pages 171-176, XP000944048 ISSN: 0006-3002 cited in the application	1-5, 10-19, 24-33, 38-51
Y	the whole document	6-9, 20-23, 34-37
--- -/--		
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 June 2003		Date of mailing of the international search report 25.09.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3816		Authorized officer Rojo Romeo, E

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00848
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PENTA JS ET AL.: "Mitochondrial DNA in human malignancy" REVIEWS IN MUTATION RESEARCH, vol. 488, 2001, pages 119-133, XP002244375 cited in the application	1-5, 10-19, 24-33, 38-51
Y	the whole document	6-9, 20-23, 34-37
X	--- FLISS MAKIKO S ET AL: "Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 287, no. 5460, 17 March 2000 (2000-03-17), pages 2017-2019, XP002244376 ISSN: 0036-8075 cited in the application see table 1 the whole document	1-5, 10-19, 24-33, 38-42
P,X	--- JESSIE BENJAMIN C ET AL: "Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the malignant prostate of patients of different ages." EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, vol. 37, no. 1, December 2001 (2001-12), pages 169-174, XP002244377 ISSN: 0531-5565 abstract	1-5,7,8, 10-19, 21,22, 24-33, 35,36, 38-51
X	--- JESSIE BENJAMIN C ET AL: "Accumulation of mitochondrial DNA deletions in the aging prostate." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), pages 862-863, XP001153110 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research;New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X abstract	1-5,7,8, 10-19, 21,22, 24-33, 35,36, 38-51
	--- -/--	

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/CA 02/00848
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THAYER ROBERT ET AL: "Mitochondrial DNA mutations and/or deletions in prostate cancers." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), pages 532-533, XP001153105 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research;New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X abstract	1-5,7,8, 10-19, 21,22, 24-33, 35,36, 38-42
X	PETROS JOHN ANTHONY ET AL: "Mitochondrial DNA point mutations are common in prostate cancer and enhance malignant phenotype." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), page 517 XP001153111 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research;New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X abstract	1-5,7,8, 10-19, 21,22, 24-33, 35,36, 38-42
X	JERONIMO C ET AL: "Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), page 63 XP001153112 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research;New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X abstract	1-5,7,8, 10-19, 21,22, 24-33, 35,36, 38-42
X	BURGART L J ET AL: "SOMATIC MITOCHONDRIAL MUTATION IN GASTRIC CANCER" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 147, October 1995 (1995-10), pages 1105-1111, XP000863263 ISSN: 0002-9440 abstract	1-6, 10-20, 24-34, 38-42
	--- -/--	

Form PCT/ISA4210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00848
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>PARRELLA PAOLA ET AL: "Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates." CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 20, 15 October 2001 (2001-10-15), pages 7623-7626, XP002244378 ISSN: 0008-5472 the whole document ----</p>	1-6, 10-20, 24-34, 38-42
P,X	<p>ESHAGHIAN ALEX ET AL: "Alterations of mitochondrial DNA in aging skin and in non-melanoma skin cancers." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 43, March 2002 (2002-03), pages 304-305, XP001153120 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; San Francisco, California, USA; April 06-10, 2002, March, 2002 ISSN: 0197-016X abstract -----</p>	1-5,7, 9-19,21, 23-33, 35,37-51
P,X	<p>WO 01 68923 A (KINZLER KENNETH W ;JEN JIN (US); FLISS MAKIKO (US); POLYAK KOMELIA) 20 September 2001 (2001-09-20) see in particular pages 2-6, tables 1-3 and claims abstract -----</p>	1-42

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 02/00848**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim(s) 1-51 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 1-51 (incompletely), 52-54 (entirely)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-51, 72 (all partially)

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/CA 02 00848

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-14, 72 (all partially)

A method of detecting in a subject containing mtDNA the genesis or progression of disease comprising:
a) obtaining a biological sample from the subject;
b) extracting DNA from the biological sample;
c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes; wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of: sequencing the mtDNA; amplifying mtDNA by PCR; Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations; denaturing HPLC; hybridization to microarrays, gene chips or biochips; molecular marker analysis; or a combination of any of these methods; where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located; or comprises the entire mitochondrial genome; where the biological sample is from a tissue suspected of being a potential site of disease or of harbouring a metastasis; where the disease is selected from the group of prostate cancer or non-melanoma skin cancer; where the mutations are selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, transversion; where the mutation is homoplasmic or heteroplasmic at any level; where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue; where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

2. Claims: 15-28, 72 (all partially)

A method of detecting in a subject containing mtDNA the presence of a disease comprising:
a) obtaining a biological sample from the subject;
b) extracting DNA from the biological sample;
c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of: sequencing the mtDNA;

International Application No. PCT/CA 02 00848

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

amplifying mtDNA by PCR; Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations; denaturing HPLC; hybridization to microarrays, gene chips or biochips; molecular marker analysis; or a combination of any of these methods; where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located; or comprises the entire mitochondrial genome; where the biological sample is from a tissue suspected of being a potential site of disease or of harbouring a metastasis; where the disease is selected from the group of prostate cancer or non-melanoma skin cancer; where the mutations are selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, transversion; where the mutation is homoplasmic or heteroplasmic at any level; where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue; where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

3. Claims: 29-42, 72 (all partially)

A method of determining a predisposition to a disease or disorder indicated by mutations in a mitochondrial DNA sequence comprising:

- a) obtaining a biological sample from the subject;
- b) extracting DNA from the biological sample;
- c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
- d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of: sequencing the mtDNA; amplifying mtDNA by PCR; Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations; denaturing HPLC; hybridization to microarrays, gene chips or biochips; molecular marker analysis; or a combination of any of these methods; where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located; or comprises the entire mitochondrial genome; where the biological sample is from a tissue suspected of being a potential site of disease or of harbouring a metastasis; where the disease is selected from the group of prostate cancer or non-melanoma skin cancer; where the mutations are selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, transversion; where the mutation is homoplasmic or heteroplasmic at any level; where the

International Application No. PCT/CA 02 00848

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue; where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

4. Claims: 43-51 (partially)

A method for assessing the status of the aging process of a human subject comprising:
a) obtaining a biological sample from the subject;
b) extracting DNA from the biological sample;
c) detecting the presence of mutations in the mtDNA; and
d) comparing the mtDNA of the biological sample to a database, the database containing data of mutations associated with the mitochondrial DNA sequences of non-disease and disease associated mitochondrial genomes wherein the step of detecting the presence of mutations is selected from the group consisting of: sequencing the mtDNA; amplifying mtDNA by PCR; Southern, Northern, Western and South-Western blot hybridizations; denaturing HPLC; hybridization to microarrays, gene chips or biochips; molecular marker analysis; or a combination of any of these methods; where the mitochondrial DNA which is sequenced comprises specific areas of the mitochondrial genome where known biomarkers associated with disease are located; or comprises the entire mitochondrial genome; where the mutations are selected from the group of single base pair mutations, deletions, insertions, transversion; where the mutation is homoplasmic or heteroplasmic at any level; where the biological sample is from the group selected from blood, sputum, buccal cells, saliva, prostate massage fluid, sweat, cervical tissue from a PAP smear, urine, skin cells, bone, hair, lymph tissue, cervical smears, breast aspirate, fecal matter, ejaculate, menstrual flow or biopsy tissue; where the database contains at least a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences having been obtained from both maternal line and non-maternal line samples.

5. Claims: 52-54

A database containing a plurality of human mitochondrial DNA sequences, the mitochondrial DNA sequences selected from the group of normal control sequences associated with non-disease states, sequences associated with the presence of disease or sequences indicative of the predisposition to disease; wherein the disease is selected from the group of prostate cancer and non-melanoma skin cancer; the

International Application No. PCT/CA 02 00848

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

mitochondrial DNA sequences are associated with the aging process of a human subject; the database contains a statistically significant number of mitochondrial DNA sequences obtained from both maternal and non-maternal line samples.

6. Claim : 56

A kit for diagnosis of a disease comprising a disposable chip, microarray, means for holding the disposable chip, means for extraction of mitochondrial DNA and means for access to a database of mitochondrial DNA sequences.

7. Claim : 57

A kit for determining predisposition to a disease comprising a disposable chip, microarray, means for holding the disposable chip, means for extraction of mitochondrial DNA and means for access to a database of mitochondrial DNA sequences.

8. Claims: 58-60

An array comprising a plurality of nucleic acid members, and a solid substrate, wherein each nucleic acid member is indicative of the presence of a disease and is selected from the group of mitochondrial DNA, RNA transcribed from mitochondrial DNA, wherein each nucleic acid member has a unique position on said array and is stably associated with the solid substrate; wherein each member is indicative of prostate cancer; wherein each member is indicative of non-melanoma skin cancer.

9. Claims: 61-63

An array comprising a plurality of nucleic acid members, and a solid substrate, wherein each nucleic acid member is indicative of the predisposition to a disease and is selected from the group of mitochondrial DNA, RNA transcribed from mitochondrial DNA, and cDNA wherein each nucleic acid member has a unique position on said array and is stably associated with the solid substrate; wherein each member is indicative of a predisposition to a disease; wherein each member is associated with the aging progress

10. Claims: 64-67

A method of diagnosing a disease in a patient comprising hybridizing a nucleic acid sample obtained from mitochondrial DNA to an array comprising a solid substrate

International Application No. PCT/CA 02 00848

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

and a plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of the presence of a disease, wherein each nucleic acid member has a unique position and is stably associated with the solid substrate, and wherein hybridization of said nucleic acid sample to one or more nucleic acid members comprising said array is indicative of the presence of the disease; wherein the disease is prostate cancer; comprising the step of isolating a prostate massage fluid sample from said patient; comprising the step of preparing a nucleic acid sample from said prostate massage fluid sample.

11. Claims: 68-70

A method of diagnosing non-melanoma skin cancer in a patient comprising: hybridizing a nucleic acid sample obtained from mitochondrial DNA to an array comprising a solid substrate and a plurality of nucleic acid members, wherein each member is indicative of non-melanoma cancer, wherein each nucleic acid member has a unique position and is stably associated with the solid substrate, and wherein hybridization of said nucleic acid sample to one or more nucleic acid members comprising said array is indicative of the presence of the non-melanoma skin cancer; comprising the step of isolating a skin sample from said patient; comprising the step of preparing a nucleic acid sample from said skin sample.

12. Claim : 71

A method of detecting heteroplasmy in a subject containing mtDNA comprising:
a) obtaining a biological sample from the subject;
b) extracting DNA from the biological sample; and
c) performing denaturing HPLC on the sample.

International Application No. PCT/CA 02 00848

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-51 (incompletely), 52-54 (entirely)

Claims 1-51 concern methods for which step (d) does not contain any technical feature. Consequently, these methods are searched only as far as steps (a) to (c) are concerned.

Claims 52-54 concern a database containing a plurality of human mitochondrial DNA sequences, and thus do not concern technical subject-matter but merely informational subject-matter. Consequently, these claims are not searched.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 02/00848

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168923 A	20-09-2001	US 6605433 B1	12-08-2003
		AU 4573801 A	24-09-2001
		CA 2403222 A1	20-09-2001
		EP 1320627 A2	25-06-2003
		WO 0168923 A2	20-09-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	F

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

(72) 発明者 ガブリエル・ディー・ダクボ

カナダ国 オンタリオ州 K 1 C 1 X 4 オタワ, キャスティール・コート 6 2 7 3

(72) 発明者 ライアン・パール

カナダ国 オンタリオ州 P 7 G 1 J 4 サンダー・ベイ, ハットン・パーク 1 2 8 2

(72) 発明者 ロバート・セア

カナダ国 オンタリオ州 P 7 B 5 E 4 サンダー・ベイ, コンパートメント 3 8, サイト 9, RR 1 3

(72) 発明者 アリオネ・ンゴム

カナダ国 オンタリオ州 N 9 B 3 B 5 ウィンザー, サンセット・アベニュー 7 4 4

(72) 発明者 ジョン・サング

カナダ国 オンタリオ州 P 7 A 7 T 1 サンダー・ベイ, マンロ・ストリート 2 9 0, ノースウエスタン・オンタリオ・リージョナル・キャンサー・センター

Fターム(参考) 4B024 AA12 AA19 AA20 CA01 HA14 HA19

4B029 AA07 FA12

4B063 QA13 QA19 QQ42 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34

专利名称(译)	总线粒体基因组序列作为健康科学的诊断工具		
公开(公告)号	JP2005506057A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2003503836	申请日	2002-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	1304854安大略有限公司		
申请(专利权)人(译)	1304854安大略有限公司		
[标]发明人	マークバーチマキン ガブリエルディーダクボ ライアンパール ロバートセア アリオネンゴム ジョンサング		
发明人	マーク・バーチ・マキン ガブリエル・ディーダクボ ライアン・パール ロバート・セア アリオネンゴム ジョン・サング		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 G01N30/88 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/68.Z C12M1/00.A G01N30/88.E G01N33/53.M G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/HA14 4B024/HA19 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	高崎健一		
优先权	60/297340 2001-06-11 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

整个线粒体基因组的突变检查已被用作前列腺癌和非黑色素瘤皮肤癌等疾病的诊断系统。点突变的线粒体基因组(转换, 颠换), 缺失, 倒位, 复制, 重组, 插入或特性的突变和重排包括其组合, 前列腺癌和非黑色素瘤皮肤它被用作初始指标另外, 使用具有4977bp的“共同缺失”或其他相关突变和/或缺失作为衰老的度量。

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005)

(51) Int. Cl. 7	FI	テームコード (参考)
C12Q 1/68	C12Q 1/68 ZNA	4B024
C12M 1/00	C12M 1/00 Z	4B029
C12N 15/09	C12N 1/00 A	4B063
G01N 30/88	G01N 30/88 E	
G01N 33/53	G01N 33/53 M	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 136 頁) 最終頁	

(21) 出願番号	特願2003-503836 (P2003-503836)	(71) 出願人	503453576
(86) (22) 出願日	平成14年6月10日 (2002.6.10)		
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月10日 (2003.12.10)		
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/000848		
(87) 国際公開番号	W02002/101086		
(87) 国際公開日	平成14年12月19日 (2002.12.19)	(74) 代理人	100103241
(31) 優先権主張番号	60/297,340		弁理士 高崎 健一
(32) 優先日	平成13年6月11日 (2001.6.11)	(72) 発明者	マーク・バーチ・マキン イギリス国 ニューカッスル・アポン イン NE3 4RW ゴスフォード キングスミア, エンプルホープ・1 ブ 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)		