

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 515317

(P2003 - 515317A)

(43)公表日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		1/68	A 4 B 0 2 4
1/68		G 0 1 N 33/49	A 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/49		33/53	M
33/53		33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 39数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 523798(P2001 - 523798)

(86)(22)出願日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月15日(2002.3.15)

(86)国際出願番号 PCT/FR00/02439

(87)国際公開番号 W001/020027

(87)国際公開日 平成13年3月22日(2001.3.22)

(31)優先権主張番号 99/11563

(32)優先日 平成11年9月16日(1999.9.16)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 エグゾニ・セラピューティック・ソシエテ  
・アノニム

EXONHIT THERAPEUTI

CS SA

フランス国、エフエール - 75013 パリ、ブルヴァール・マセナ 63 - 65

(72)発明者 トック, ブルーノ

フランス国、エフ - 92400 クールブヴォワ、ブルヴァール・サン - デニ 58

(72)発明者 ブラッコ, ローラン

フランス国、エフ - 75014 パリ、リュ・デパルシュ 30

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 病的事象の検出のための組成物及び方法

(57)【要約】

本発明は、病的事象の検出のための新規な組成物及び方法に関する。更に詳細には、被験者における病態又は病的事象の存在のインビトロ検出のための方法であって、被験者の血球の試料をとって、該試料中の、病態に特徴的な生理的状态を有する血球の存在を測定することからなる方法に関する。本発明はまた、該方法の実行のための道具、キット及び組成物、並びにヒト及び動物の健康管理の分野、又は例えば実験的研究における、これらの用途に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 被験者における病態のインビトロ検出のための方法であって、被験者から血球の試料を採取して、この試料中の、病態に特徴的な生理的状态を提示する血球の存在を測定することを特徴とする方法。

【請求項2】 この試料中の、病態に特徴的なタンパク質又はタンパク質ドメインを提示する血球の存在の測定を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 この試料中の、病態に特徴的な遺伝子プロファイルを示す血球の存在の測定を含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】 この試料中の、病態の存在に特徴的な遺伝子発現における変質を提示する血球の存在の測定を含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】 この試料中の、病態の存在に特徴的な遺伝子発現における転写及び/又は転写後の変質を提示する血球の存在の測定を含む、請求項4記載の方法。

【請求項6】 (i) 試料からの核酸の調製及び(ii) こうして調製された核酸と、病的状態に特徴的な少なくとも1つの核酸バンクとのハイブリダイゼーション(ハイブリダイゼーションプロファイルは、病態に特徴的な試料中の血球の存在を示す)、を含む、請求項3～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】 バンクが、病的状況にある血球において発現のレベルが改変されている遺伝子に特異的な核酸を含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】 バンクが、病的状況にある血球に特徴的な、遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含む、請求項6記載の方法。

【請求項9】 単数又は複数のバンクが、支持体に沈積している、請求項6～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】 試料から調製される核酸が、全RNA若しくはメッセンジャーRNA、又はこれらに由来するcDNAである、請求項6～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】 核酸が、標識されている、請求項10記載の方法。

【請求項12】 血球が、有核細胞である、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】 有核血球が、リンパ球、マクロファージ、単球及び/又は樹状細胞を含む、請求項12記載の方法。

【請求項14】 被験者における病態の進行の段階のインビトロ検出のための、請求項1～13のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】 被験者における病態の部位のインビトロ検出のための、請求項1～14のいずれか1項記載の方法。

【請求項16】 神経変性障害の存在、進行の段階及び/又は部位のインビトロ検出のための、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。

【請求項17】 癌性病態の存在、進行の段階及び/又は部位のインビトロ検出のための、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。

【請求項18】 病的状態に特徴的な血球のインビトロ検出の方法であって、被験者から血球の試料を採取して、この試料中の、病態に特徴的な遺伝子プロファイルを提示する血球の存在を測定することを特徴とする方法。

【請求項19】 病的状態に特徴的な核酸バンクの調製の方法であって、(i)病態を提示する生物から単離された血球から最初の核酸調製物を得ること、(ii)この病態を提示しない生物から単離される血球から核酸参照調製物を得ること、(iii)該第1の調製物と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び病的状況にある生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする方法。

【請求項20】 病態の進行の段階に特徴的な核酸のバンクの調製の方法であって、(i)進行の確定段階の病態を提示している生物から単離された血球から最初の核酸調製物を得ること、(ii)この病態を異なる進行の段階で提示している生物から単離された血球から核酸参照調製物を得ること、(iii)該第1の調製物と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び(iv)病態の進行の確定段階の生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする方法。

【請求項21】 ハイブリダイズしない核酸のクローンの回収を含む、請求項19又は20記載の方法。

【請求項22】 遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸クローンの、

生成したハイブリッドからの回収を含む、請求項19又は20記載の方法。

【請求項23】 バンクが、支持体に沈積している、請求項19～22のいずれか1項記載の方法。

【請求項24】 病的状況にある生物からの血球において発現のレベルが改変されている遺伝子に特異的な核酸を含むことを特徴とする、核酸調製物。

【請求項25】 病的状況にある生物からの血球に特徴的な、遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含むことを特徴とする、核酸調製物。

【請求項26】 病的状況にある生物からの血球に特徴的な遺伝子発現における改変に特異的な核酸を含む核酸バンクを含む、請求項3～18のいずれか1項記載の方法の実行のために使用可能なキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、病的事象の検出のための新しい組成物及び方法に関する。更に詳細には、病的事象の遠隔検出のための組成物及び方法に関する。本発明はまた、このような方法の実行のための道具、キット及び組成物、更にはヒト若しくは動物の健康の分野、又は例えば実験的研究におけるこれらの用途を提供する。

**【0002】**

工業国における住民の加齢は、診断における新しいニーズを生みだしている。癌又は神経変性障害のような疾患は、疾患の発症又は進行を予測するための診断の道具が利用可能であれば、患者及び社会の両方の益となるように、より良好に管理されよう。

**【0003】**

経験により、診断が早く行われるほど、疾患の推定過程を制御する機会が大きくなることが判っている。このことは、癌の場合には非常に明白に確立されている。ごく普通のマンモグラフィの使用による乳癌の早期検出キャンペーンによって、これらの癌の平均余命は改善している。同様に、アルツハイマー病になる患者では早期介入によって、有意にその進行を遅らせることができると推定される。

**【0004】**

癌及び神経変性障害のような疾患の発生率は、住民の年齢と共に鋭く増加する。これらの疾患は、検出できる程度まで発現するのに数年かかるようである。例えば、ヒトゲノムにおける継時的突然変異の蓄積が、癌を起こすのに必要であることが見い出された。同様に、動物における遺伝子実験と共に行われる、アルツハイマー病が高発生率である選択されたコホートにおける遺伝子研究は、この疾患の発病の多因子性を更に強調する。

**【0005】**

これらの加齢関連疾患は、以下を含む幾つかの共通の特色を共有する：

- ・物理的、化学的又は生物学的物質による損傷のため、患部組織の環境における平衡失調に応じて起こる細胞内変質；

・免疫系の細胞の関与。

【0006】

患部組織における変質は、生検によってのみ選択的に同定されるが、免疫系の多くの細胞が、組織と血液又はリンパ区画の間を循環するため、進行中の疾患過程を反映する免疫細胞における変質を、これらの疾患の発現の部位の遠方で検出できる場合もある。

【0007】

リンパ球性細胞及びマクロファージは、細胞性免疫応答の主なメディエーターである。リンパ球及びマクロファージは、組織と血液の両方に存在する。これらは、異種組織と接触することになる最初の細胞である。マクロファージは、関係する組織及び物質を分解する。分解タンパク質から誘導されるペプチドは、次にこれらをマクロファージ表面（ここで複合体はTリンパ球に認識される）に輸送する主要組織適合抗原系クラスII分子に結合される。ペプチド提示及び免疫応答活性化の他の系が存在しており、そして特に癌の発現の場合には報告されている。

【0008】

今日、これらのような疾患は、病態が既に現れた後に診断されている。例えば癌の症例では、診断は、医用画像研究及び生検組織の形態学的診断に基づいて行われる。アルツハイマー病のような疾患では、診断は、一連の医学的所見に基づいて行われる。

【0009】

よって、疾患、特に細胞シグナル生成調節機序の欠損に関連する疾患、とりわけ癌、神経変性障害、狭窄症などのような、過剰な細胞増殖を特徴とする疾患の発現の早期で、簡便かつ信頼性ある検出を可能にする、道具及び方法に対する真のニーズが存在する。

【0010】

生物情報技術と組合せた分子生物学の方法の出現は、所定の病態に特徴的なDNA断片のライブラリー（又はバンク）を作成することを可能にしており、このため任意の組織の非常に小さな試料中の病態マーカーの存在又は非存在の検出が

可能になっている。

【0011】

今や本発明は、インビトロでの病態の検出のための新しいアプローチを示す。更に具体的には、本発明は、病的事象、特に病的遺伝子サインの検出のための新しい方法及び組成物を記述する。本発明は更に、病的事象の遠隔検出（即ち、病的組織とは別個の生物学的材料を使用する）のために使用可能な方法及び組成物を記述する。本発明により提供される組成物及び方法は、今や臨床医、生物学者及び生産業者に、自動化可能な、直接的、迅速、高感度かつ経済的な方法に基づく、インビトロ診断のための新しい解法を提案している。

【0012】

更に詳細には、本発明は、循環細胞を含むことを特徴とする生物学的試料から、病態の存在又はその発現のリスクを測定できるという証明に特に基づく。更に詳細には、本発明は、血球を含むことを特徴とする生物学的試料中で、他の全ての現存する診断法では無効であろう、初発及び発現の非常に初期段階におけるものを含めて、病態の存在を検出できるという証明に基づく。

【0013】

本発明の第1の目的は、更に具体的には被験者における病態の存在のインビトロ検出のための方法であって、被験者から血球の試料をとること、及びこの試料中の、疾患に特徴的な生理的状态を提示する血球の存在の測定を含むことを特徴とする方法に基づく。

【0014】

特定の実施態様において、本発明の方法は、試料中の、疾患に特徴的なタンパク質又はタンパク質ドメインを提示する血球の存在の測定を含むことを特徴とする。これに関連して、「提示」という用語は、細胞内（任意の細胞区画内）のこのタンパク質又はタンパク質ドメインの存在と、細胞膜内又は細胞表面のこの存在の両方を意味する。この実施態様において、タンパク質（又はタンパク質ドメイン）の存在は、抗体（又は抗体の断片若しくは誘導体）により、又は当業者には周知の任意の他の方法により測定することができる。

【0015】

別の特定の実施態様において、本発明の方法は、試料中の、疾患に特徴的な遺伝子プロファイルを提示する血球の存在の測定を含むことを特徴とする。

【0016】

更に好ましくは、本発明の方法は、試料中の、疾患の存在に特徴的な遺伝子発現における変質を提示する血球の存在の測定を含むことを特徴とする。

【0017】

即ち、本発明は、第1に病的事象の存在に関する遠隔検査における血球の使用に基づき、そして第2にこれらの細胞中のゲノムの発現（特に転写）における変質の検出のゲノム法の使用に基づく。

【0018】

よって特定の変法において、本発明は、更に好ましくは生物学的試料中の、疾患の存在に特徴的な遺伝子発現における転写及び/又は転写後の変質を提示する血球の存在の測定を含むことを特徴とする。

【0019】

本発明は、胚性病巣が、脳若しくは脊髄（神経変性疾患の部位）のような神経組織又は癌が発現しうる任意の他の組織、例えば、乳房、肺、前立腺、肝臓、骨などに存在しうるとき、血球において同定されるゲノムのサインから、発現の進行中の病態を検出することができるという証明に基づく。

【0020】

本発明は、血球（好ましくは、リンパ球、マクロファージ、単球、樹状細胞などのような有核細胞）中に、疾患の初発にある細胞との直接又は間接の相互作用から生じる、遺伝子発現における転写及び転写後の変質が存在することを期せず証明している。

【0021】

更に詳細には、本発明は、血球（好ましくは、リンパ球、マクロファージ、単球、樹状細胞などのような有核細胞）中に、疾患の初発にある細胞との直接又は間接の相互作用による、遺伝子転写において定性的な変質が存在することを期せず証明している。

【0022】

別の好ましい実施態様では、本発明の方法は、(i) 試料からの核酸の調製及び(ii) こうして調製される核酸の、病的状態に特徴的な少なくとも1つの核酸のバンクとのハイブリダイゼーション(ハイブリダイゼーションプロファイルは、試料中の、病態に特徴的な血球の存在を示す)を含むことを特徴とする。

【0023】

更に詳細には、本発明の1つの実施態様において、使用されるバンクは、発現のレベルが病的状況にある身体からの血球において変性している遺伝子に特異的な核酸を含むことを特徴とする。

【0024】

本発明の別の実施態様において、使用されるバンクは、病的状況にある身体からの血球に特徴的な遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含むことを特徴とする。

【0025】

本発明は、原法である、遺伝子産物の機能に不可欠な領域における挿入又は欠失(選択的スプライシング)の存在に関連する差異の定性分析に特に基づいている。これらの挿入及び欠失は、正確に調節され、かつ身体の細胞における生理学的及び病態生理学的状態(特に増殖性及び分化した状態)に特徴的である。この調節のレベルは、多くの病態の発症、維持及び発現中に変性する。よって好ましい実施態様において、本発明はまた、予測診断試験を開発する目的のための、これらの調節逸脱を同じ手順で分析するために設計されるゲノム技術の応用に基づく。即ち、本発明によって、病的事象の間の循環細胞中の調節逸脱した遺伝子の同定が可能になり、そして病的事象の予測又は検出のための診断試験における、これらの定性的な遺伝子事象の使用が可能になり、そしてそのことが、保健費用の包括的制御に寄与する。

【0026】

例えば、臨床検査又は典型的な診断試験によって診断するには早すぎる段階での、罹患生物の血球中に存在する遺伝子発現の特異的マーカーの同定を予想して、本発明は有利には転写後の変質の同定法を提供する。実際、これらの変質は、主として遺伝子発現における重要な段階：スプライシングの調節における変性に

由来する。選択的スプライシングは、所定の病態生理学的状況に関連する存在又は非存在が診断の根拠を与えうる、RNAからのエクソン又はイントロンを包含又は排除することにより、このRNAを定性的に変性させる。この診断は、2つの状況の間のスプライシングされた配列の特異的な示差的検出が可能になるように、PCR又はハイブリダイゼーションの使用に基づくことができる。代替エクソンの使用を通して、又はメッセンジャーRNA中のイントロンの保持による、選択的スプライシングは、しばしば対応するタンパク質の配列に影響を及ぼす。アミノ酸配列におけるこれらの差によって、代替タンパク質配列を特異的に認識する抗体の使用に基づく診断を構想することが可能になる。

#### 【0027】

上記のように、本発明の方法は、特に生物学的材料としての循環細胞の使用に基づく。更に具体的には、これらは、血球、好ましくは有核細胞である。特にリンパ球、マクロファージ、単球、樹状細胞などを引用することができる。これらの細胞は、細胞アフエレーシス(cytapheresis)、フィコール勾配(Ficoll gradients)、末梢血単核細胞の調製などを含む、当業者には既知の任意の方法により、被験者から採取することができる。本発明の実行を目的として、特異的ゲノムのサインを提示する特異的な型だけが使用されるように、異なる集団の血球を相互に分離することができる。しかし本発明により述べられる試験はまた、未分離血球を含むことを特徴とする生物学的試料で実施することもできる。更には、循環細胞はまた、例えば転移過程の場合には、病的組織から分離された腫瘍細胞であってもよい(又はこれを含んでもよい)。核酸は、細胞溶解、抽出、RNA単離などを含む、当業者には周知の任意の方法により試料から調製することができる。更には、これらの核酸は、好ましくはハイブリダイゼーション工程の前に、例えば、cDNAを生成させるため、これらの核酸を増幅するため、これらを標識するなどのために処理される。これに関して、標識は、放射活性、酵素、蛍光、比色法又は任意の他の型であってよい。本発明の方法は、典型的には、生物の血液試料をとり、核酸を放出させるために血球を処理し、核酸(及び場合に依りてその逆転写配列)を増幅し、核酸を標識して、これらを1つ以上のバンクにハイブリダイズさせることを含む。

## 【0028】

本発明の方法は、病態（又は病的事象）の存在、即ち、病態の初発又は発現の状況に特徴的な細胞機序の存在を検出するために使用することができる（このような臨床的症候がまだ明白でないとしても）。これに関して、本発明の方法はまた、被験者における病態の進行の段階のインビトロ検出をも可能にする。即ち、細胞の遺伝子のサインは、病態の進行の段階に応じて変化し、そして特異的バンクの使用によって病態の進行を検出することができる。更には、本発明の方法はまた、被験者における病態の部位、即ち、例えば病態部位が存在する組織のインビトロ検出を可能にする。

## 【0029】

上記のように、本発明の方法は、異なる型の病態、特に細胞シグナル生成経路の統制解除に関連する病態の検出のために実行することができる。これらは、例えば神経変性障害のような加齢に関連する病態、又は特に癌、狭窄症などのような、異常レベルの細胞増殖を伴う任意の他の病態であってよい。

## 【0030】

特定の実施態様において、本発明は、神経変性障害の存在、進行の段階及び/又は部位のインビトロ検出のための、上述のような方法に関する。

## 【0031】

別の特定の実施態様において、本発明は、癌性疾患の存在、進行の段階及び/又は部位のインビトロ検出のための、上述のような方法に関する。これらは、例えば、肝臓の充実性腫瘍、肺癌、頭頸部癌、黒色腫、肝癌、膀胱癌、乳癌などのような、異なる型の癌であってよい。

## 【0032】

本発明はまた、病的状態に特徴的な血球のインビトロ検出の方法であって、被験者から血球の試料をとって、この試料中の、病態に特徴的な遺伝子プロファイルを提示する血球の存在を測定することを特徴とする方法を提供する。

## 【0033】

上記のように、本発明は、部分的には病的状態に特徴的な核酸のバンクの構成及び使用に基づく。第1の実施態様において、これらは、発現のレベルが病的状

況にある生物からの血球において変更されている、遺伝子の特定の核酸を含むことを特徴とする核酸のバンク（又は調製物）である。

【0034】

別の実施態様において、これらは、病的状況にある生物からの血球に特徴的な、遺伝子のスプライシング型に特異的な核酸を含むことを特徴とする核酸のバンク（又は調製物）である。

【0035】

調製物及びバンクは、更に詳細には後述されるように、精製及び混合して、支持体に沈積させてもよい。

【0036】

本発明は更に、このようなバンクの調製のための方法を記述している。特に、これらの方法は、(i)病態を提示する生物から単離された血球から初期核酸調製物を得ること、(ii)該病態を提示しない生物から単離された血球から参照核酸調製物を得ること、(iii)該初期調製物と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び病的状況にある生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする。

【0037】

本発明はまた、病態の進行の段階に特徴的な核酸バンクの調製の方法であって、(i)進行の確定段階の病態を提示する生物から単離された血球から初期核酸調製物を得ること、(ii)該病態を進行の異なる段階で提示している生物から単離された血球から参照核酸調製物を得ること、(iii)該初期調製物と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び(iv)病態の進行の確定段階の生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする方法を記述している。

【0038】

更に詳細には後述されるように、クローンの回収は、ハイブリダイズしない核酸クローンの回収、又は生成したハイブリッドからの遺伝子のスプライシング型に特異的な核酸クローンの回収のいずれかを特徴としてよい。

【0039】

本発明はまた、病的状況にある生物の血球に特徴的な遺伝子発現における変更  
に特異的な核酸を含むことを特徴とする、核酸バンクを含むことを特徴とする、  
上述の方法の実行のために使用することができる、任意のキットに関する。

#### 【0040】

転写及び転写後の変質の特異的マーカーの同定

上記のように、本発明は、病態の進行の段階に特徴的な核酸バンクの調製の方法  
であって、(i) 進行の確定段階の病態を提示する生物から単離される血球か  
ら初期核酸調製物を得ること、(ii) 該病態を進行の異なる段階で提示している  
生物から単離される血球から参照核酸調製物を得ること、(iii) 該初期調製物  
と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び(iv) 病態の進行の確  
定段階の生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする方法を記  
述している。

#### 【0041】

本発明により示される方法は、更に詳細には、異なる疾患から、その進行の異  
なる段階で抽出され、かつ病的組織と遺伝子発現がこれらの組織により影響を及  
ぼされた血球との両方から得られるRNAからの、核酸クローン及びバンクの構  
成を含むことを特徴とする。これらのクローン及びバンクは、有利には、遺伝子  
発現の示差的分析のための方法により得られる。よって得られる示差的サインは  
、一方では健常組織と患部組織の間の差異に特異的であり、そして他方では患者  
の血球と健常対照の血球の間の差異に特異的である。よってこれらのサインは、  
病態試料又は対照試料のいずれかで優先的に発現されうる。

#### 【0042】

クローンを得るため、又はバンクを構成するために使用される核酸集団は、例  
えば、病的状況から抽出される細胞のRNA（全又はメッセンジャーRNA）及  
び対照状況に対応するRNA（全又はメッセンジャーRNA）、あるいはこの全  
又はメッセンジャーRNAから逆転写、増幅、ベクターへのクローニングなど  
により誘導される核酸である。これらの核酸は、当業者には周知の方法により調製  
することができる。簡単に述べると、これらの方法は一般に、細胞、組織又は試  
料の溶解、及び抽出によるRNAの単離を含むことを特徴とする。特にこれは、

チオシアン酸グアニジウム (guanidium thiocyanate) のようなカオトロピック剤 (細胞を分解してRNAを保護する) による処理と、これに続くフェノール又はクロロホルムのような溶媒によるRNAの抽出から成つてよい。当業者であれば、このような方法は周知であり (Maniatisら, Chomczynskiら, Anal. Biochem. 162 (1987) 156を参照のこと)、そしてこれらは、全RNA用のUS73750キット (アマーシャム (Amersham)) のような市販のキットを用いて容易に実行することができる。使用されるRNAは、完全に純粋である必要はなく、そして特に調製物中の痕跡量のゲノムDNA又はタンパク質などのような他の細胞成分の存在は、これらがRNA安定性に顕著に影響を及ぼさないかぎり問題ではない。更には、場合により、全RNA調製物の代わりにメッセンジャーRNAの調製物を使用することが可能である。メッセンジャーRNAは、生物学的試料から直接、又は従来法により全RNAからポリT配列を用いて単離することができる。これに関して、メッセンジャーRNAは、US72700キット (アマーシャム) のような市販のキットの使用により入手できる。RNAはまた、先に調製されるか、かつ/又はコレクションとして利用可能なバンク又は他の試料から直接に入手して、適切な条件下で貯蔵することもできる。

#### 【0043】

ハイブリダイゼーションは、当業者が調整可能な異なる条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーションは、好ましくは対照状況に由来する核酸集団に対して過剰な調節逸脱状況に由来する核酸集団を利用する。

#### 【0044】

ハイブリダイゼーション反応の産物を使用して、本発明の調節逸脱 (病態) に特徴的なクローンを単離するために2つの主要な型のアプローチを利用することができる。第1は、厳密に定量的であるが、2つの状況の間の発現のレベルの差から生じる全ての (又はかなりの部分の) クローンを含む核酸調製物の生成を可能にする。このようなクローン (及びバンク) は、主としてハイブリダイゼーション工程中に生成したハイブリッドを排除して、選択された対照状況に対して調節逸脱状況に特徴的なハイブリダイズしないクローンだけを保持することから成る、既知のサブトラクティブハイブリダイゼーション法により得られる。

## 【0045】

しかし好ましい実施態様では、選択される対照状況に対して調節逸脱状況に特徴的な機能性遺伝子突然変異から生ずる全ての（又は大部分の）クローンを含む核酸調製物の生成を可能にするために、定性的方法が使用される。更に詳細には、このような定性的バンクは、発現が変性しているクローンの全群を含むのではなく、例えば、2つの状況の間で異なるスプライシング又は欠失事象に対応するクローンを含むことを特徴とする。細胞調節及び形質転換経路における選択的スプライシングの役割を考えると、このような調製物（及びバンク）は、有利には重要な機能的価値を有するクローンを含むことを特徴とし、よって統制解除の状況に関係する遺伝子変性を反映しやすい。よってこのようなクローンは、より大きな予測能力を持つバンクの構成及び更に典型的な遺伝子マーカーの生成を可能にする。

## 【0046】

このような定性的バンクは、示差的スプライシング又は欠失に対応する核酸領域の、ハイブリダイゼーション工程中に生成したハイブリッドからの単離により構成することができる。使用される方法に応じて、これらの領域は、非対領域又は対形成領域のいずれかに対応する。

## 【0047】

これらの2つのアプローチは、更に詳細に後述される。

## 【0048】

示差定量的バンクの製造及び使用

したがって第1の実施態様において、本発明は、示差定量的バンク、即ち、発現のレベルが、対照状況に対して病的状況の細胞において変性している、遺伝子に対応する核酸クローンを含むことを特徴とするバンクを利用する。このようなバンクはまた、示差定量的分析から、発現が細胞の統制解除現象において増大又は減少している配列をプールして誘導することができる。この型のバンクを確立するための方法は、当業者には周知であり、そして以下のカテゴリーに分類することができる。

## 【0049】

### 高流量配列測定のための電子的サブトラクション

このプロセスは、ある数のcDNAのランダム配列測定に基づく。次に分析される2つの状況の間のサブトラクションを実行するために、コンピュータ検索エンジンを使用することができる。

#### 【0050】

### 遺伝子発現の連続分析 (Serial Analysis of Gene Expression) (SAGE)

このプロセスは、制限酵素及びオリゴヌクレオチドアダプターを使用することによる、各cDNAに関連するサインの認識に基づく。この標識は、cDNA配列の一部に対応する(対応するcDNAを疑いなく同定するために10ヌクレオチド長)。次にこの標識は、配列測定及び分析のために集合させる (Velculescuら, Science, 1995, 270: 484-487)。よってこのアプローチは、系統的な配列測定への近道を表す。

#### 【0051】

### 核酸アレイ

この方法は、膜、ガラス板又はバイオチップのような固体支持体への、オリゴヌクレオチド、PCR断片又はcDNAのような核酸の幾分高密度での適用に基づく。次に健常又は病態試料からのメッセンジャーRNAプローブを、過剰発現又は発現不足のメッセンジャーを同定するために、ハイブリダイゼーションにおいて使用する。

#### 【0052】

### ディファレンシャルディスプレイ

この方法は、cDNA集団にPCRを実行するために、オリゴ-dTプライマー及びランダムプライマーを利用する。次にPCR産物は、非常に高分解能のゲル上で比較する。次に示差的に発現される断片を単離して、これらの存在を配列測定の前にノーザンブロット分析により確認する。この方法の幾つかの変法が報告されている (PrasharとWeissman, PNAS, 1996, 93: 659-663)。これらの変法は、プライマーと制限酵素及び使用されるアダプターに関して異なる。SAGE法によるように、これらは、cDNAの3'末端を利用する。このアプローチは、幾つかの市販のキットの存在により利用しやすくなっている。

## 【0053】

## サブトラクティブクローニング

この方法は、比較される2つの試料に共通なcDNAの排除に基づく。即ち、「テスター」cDNAが過剰の「ドライバー」cDNAとハイブリダイズする異なるキットが利用できる（クローンテック（Clontech））。最終産物は、示差的に発現されるcDNAから誘導されるPCR増幅断片のプールから成り、そしてこれらは、次の分析のために適切なベクターにクローン化することができる。RDA（リプレゼンテーションショナルディファレンスアナリシス（Representational Difference Analysis））は、このサブトラクションの原理に基づく別の方法である（Lisitsynら, Science, 1993, 259: 946-951）。

## 【0054】

したがってこれらの示差的分析方法の実行は、定量的バンク及びクローンの生成、即ち、発現が病態に関係する細胞の統制解除現象において増大又は減少している、全ての配列を含むことを特徴とするこれらの生成を可能にする。

## 【0055】

## 示差定性的バンクの製造及び使用

別の実施態様において、本発明は、有利には、示差定性的バンク、即ち、少なくとも配列の一部が、病態細胞と対照細胞において示差的にスプライシングされる遺伝子の配列に対応する、核酸クローンを含むことを特徴とするバンクを使用する。よってこの型のバンクは、病理学的な調節逸脱プロセスにおいて示差的にスプライシングされる配列を含むことを特徴とする。

## 【0056】

この型のバンクの使用は、特に有利である。実際、例えば癌及び神経変性障害のような多くの疾患において変更されている異なるシグナル生成経路は、発現が選択的スプライシングにより調節される遺伝子を含み、そのためmRNAをも含む。更には、文献がもたらす増大する数の例は、病的状態において特異的に観測されるRNA型が、選択的スプライシングから生じることを示している。

## 【0057】

本発明の独創性に関して、免疫応答に関与する異なる型の細胞の活性化の状態

が、そのメディエーターがスプライシングにより調節される、シグナル生成カスケードにより調節されることにも注目すべきである。

#### 【0058】

即ち、アルツハイマー病、ハンチントン病及びパーキンソン病は、真の経済的影響力を有する、神経変性成分を伴う疾患のほんの数例である。臨床的特色の記述及び幾つかの感受性遺伝子の同定が、これらの疾患の我々の理解を顕著に前進させているとしても、その発現に潜在する分子機序は、未だ全くあいまいである。これらの病的状態において調節逸脱しているシグナル生成カスケードの解明は、確実に診断及び治療の尺度にしたがう標的の発見に導くであろう。文献は、RNAスプライシングプロセスにおける変質の重要性を強調している。

・棘筋萎縮は、最もありふれた遺伝子病の1つである。2つの遺伝子、SMN1及びSMN2は、同一のタンパク質をコードする。2つのSMN1対立遺伝子の消失及びSMN2遺伝子におけるスプライシング突然変異は、疾患の発現を導く(Lorsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96: 6307-6311)。

・プレシニリン(presinilin)遺伝子のPS1における特異的スプライシング突然変異が、アルツハイマー病の患者の生検標本で見いだされた(Isoe-Wadaraら, Eur. J. Neurol., 1999: 163-167)。

・グルタミン酸輸送タンパク質は、例えば、筋萎縮性側索硬化症又はてんかんのような神経変性疾患において重要なものである。このトランスポーターにおけるスプライシング突然変異は、その機能に影響を及ぼす(Meyerら, Neurosci. Lett., 1998, 241: 68-70)。

#### 【0059】

対応するメッセンジャーの選択的スプライシングに由来する抗腫瘍遺伝子活性の不活化の多くの例が、今や知られている：

・小細胞肺癌において、RB(網膜芽腫タンパク質)ファミリーの一員であるp130タンパク質をコードする遺伝子は、スプライシングコンセンサス配列で突然変異している。この突然変異によって、エクソン2が排除され、これによって未熟な停止コドンの存在のためタンパク質合成がなくなる。この知見は、まっ先に腫瘍形成におけるRBファミリータンパク質の重要性を強調した。

・頭頸部癌において、p53不活化の機序の1つは、スプライシングコンセンサス配列における突然変異を伴う。

・他の型の肺癌において、サイクリン依存性CDK4及びCDK6キナーゼのインヒビターであるp16/INK4Aタンパク質をコードする遺伝子は、スプライシングドナー部位で突然変異している。この突然変異によって、半減期の短い切断型タンパク質が産生される。p16タンパク質は、普通はCDK4及びCDK6に結合して、これらのD型サイクリンへの結合、及び特にRBのリン酸化を阻害し、このため、活性化低リン酸化型のRBの蓄積が起こる。p16の非存在下では、RBは、リン酸化により不活化される。p16遺伝子座が、特に複雑であり、p16発現とは別に、選択的スプライシングによりp19発現を可能にするという事実に注目すべきである。p16タンパク質と何ら共通のアミノ酸を共有しないp19タンパク質は、MDM2プロト腫瘍遺伝子に結合して、p53の存在下で細胞サイクルをブロックすることができ、このため腫瘍抑制物質として作用する。

・突然変異すると、ウィルムス腫瘍を引き起こしうる転写リプレッサーをコードする抗腫瘍遺伝子であるWT1は、選択的スプライシングにより生成する幾つかのメッセンジャーRNAに転写される。乳癌において、異なる変種の相対割合は、健常組織と比較して変性しており、これが、診断の道具及び腫瘍の進行における異なるWT1機能性ドメインの重要性の理解への糸口を与える。

・異なるメッセンジャーRNA型及びタンパク質イソフォームの割合の変性のこの同じ現象は、神経線維腫におけるニューロフィブリンNF1の場合に起こる。

・腫瘍の進行のインジケーターとしてのスプライシング事象の変調のこの概念はまた、HDM2の例により強化される。実際、5つの選択的スプライシング型のHDM2が、卵巣及び膵臓癌で検出されており、そしてその発現が腫瘍の病期と共に増大することは特に興味深い。

・TGF- $\beta$ の分泌及び貯蔵に関係する種々の組織の細胞外マトリックスの成分であるLTBPもまた、異なるイソフォームで産生される。タンパク質分解に恐らくあまり感受性でない1つのこのようなイソフォームは、TGF- $\beta$ の生物

学的活性を変調すると考えられ、そして異なる肝臓の病態に関係しているであろう。

#### 【0060】

細胞性及び液性免疫応答は、転写制御の下にある。文献は、これらの免疫応答に関係する選択的スプライシングにより産生される、未変性イソフォームの多くの例を提供する。

・マクロファージ「スカベンジャー」受容体は、これらの血球の生理的及び病的応答に必要とされる膜糖タンパク質であり、これらの機能は、スプライシングにより生成するイソフォームにより調節される (Goughら, J. Lipid Res; 1998; 39: 531-543)。

・Tリンパ球の活性化は、幾つかの調節タンパク質及び受容体の機能的な存在を必要とする。Borielloら (J. Immunol. 1995; 155: 5490-5497) は、この遺伝子の選択的スプライシングにより生成する、B7活性化コファクターのイソフォームの存在を報告して、これらのスプライシング変種が免疫応答に与える相当な柔軟性を強調している。

#### 【0061】

これらの現象及びこの複雑さを考慮するため、そして病的状態に特異的であり、血球に存在するサインを単離するために、本発明の方法は、有利には、遺伝子マーカーとして、統制解除の状況に特徴的なスプライシング事象を利用する。そうするために、本発明は、例えば、未公開国際特許出願PCT/FR 99/00547に記載されている「DATAS」法により製造される示差定性的核酸バンクを使用する。特に、このようなバンクは、病的状況にある血液から単離される細胞から誘導される核酸集団と、対照状況にある循環細胞から誘導される核酸集団との間のハイブリダイゼーション、及び生成したハイブリッドからの示差スプライシングに対応する核酸の単離により調製することができる。

#### 【0062】

このアプローチにおいて、ハイブリダイゼーションは、好ましくは液相で行われる。更には、チューブ (例えば、エッペンドルフ型チューブ)、プレート又は分子生物学において一般に使用される任意の他の適切な支持体のような、適切な

装置中で行うことができる。ハイブリダイゼーションは、有利には10～1000 µlの間、例えば10～500 µlの間の容量で行われる。使用される装置及び容量が、当業者であれば容易に適合させられることは言うまでもない。ハイブリダイゼーションに使用される核酸の量もまた、当業者には知られている。一般に、マイクログラム量の核酸（例えば、約0.1～100 µgの間）で十分である。更には、約50～0.02、好ましくは40～0.1の範囲のドライバ/テスター比にある核酸を使用することができる。更に有利には、この比は、好ましくは約1以上、有利には約1～約10の間である。この比が、プロセスの条件（核酸の利用可能な量、生理的状況、目的など）に応じて、当業者であれば適合させられることは言うまでもない。時間、温度及びイオン強度を含む他のハイブリダイゼーションパラメーターもまた、当業者であれば適合させることができる。概して、例えば加熱によるテスターとドライバの変性後に、ハイブリダイゼーションは、約2～24時間、約37の温度（あるいは温度のスパイクを受ける）で、かつ例えば0.1～5M NaClの範囲であってよいイオン強度の標準条件で行われる。イオン強度は、特に固体支持体上のハイブリダイゼーションの場合には、ハイブリダイゼーションの厳密さを測定する因子の1つであることが知られている。

#### 【0063】

本発明の特定の実施態様では、ハイブリダイゼーションは、フェノールエマルジョン中で、例えば、Kohne D.E.らにより報告（Biochemistry, Vol. 16, No. 24, pp 5329-5341, 1977）されるPERT法（「フェノールエマルジョンDNA再結合法（Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique）」）により行われる。ハイブリダイゼーションは、有利には温度循環（温度は約37から約60/65に上昇する）により振動させずに維持されるフェノールエマルジョン中で、MillerとRibletにより報告（NAR 23 (1995) 2339）される方法によって行われる。

#### 【0064】

液相、好ましくはエマルジョン中の任意の他のハイブリダイゼーション法を、本発明の範囲内で使用することができる。更には、ハイブリダイゼーションはま

た、支持体に固定化される1本の鎖により行ってもよい。有利には、固定化されるのはドライバーである。これは、特にビオチン化プライマーのため、又は当業者には既知の固定化の任意の他の手段により行うことができる。

#### 【0065】

ハイブリダイゼーションにより生成する核酸集団を使用して、本発明の遺伝子マーカー（定性的ゲノム変質に特徴的なクローン）は、当業者には周知の任意の方法により同定することができる。RNA/DNAヘテロ二重鎖の場合には、これらの領域は、主として非対RNA（RNAループ）の領域であり、そしてヘテロ二重鎖と1本鎖核酸（反応しなかった過剰の核酸）の分離、2本鎖RNA（ヘテロ二重鎖に関係するドメイン）の選択的消化、及びこれに続く生じる1本鎖RNAと1本鎖DNAの分離により、同定及びクローン化することができる。ヘテロ三重鎖の場合には、これらの示差的スプライシング領域は、主として2本鎖DNAの領域から成っており、RNAを消化する酵素、次いで1本鎖DNAを消化する酵素のような適切な酵素での処理により、同定及びクローン化することができる。こうして得られる核酸は、まさに2本鎖DNAの形であり、そして任意の適切なベクターにクローン化することができる。

#### 【0066】

核酸の単離、定性的クローンのハイブリダイゼーション及び獲得のための、他の特定の变法及び条件が、未公開の出願番号PCT/FR99/00547に示されることは言うまでもない。

#### 【0067】

これらの方法は、健常状況からの血球を病的状況からのものと区別可能にする、定性的遺伝子マーカーに対応する、クローン及び核酸バンクの生成を可能にする。実験セクションに示されるように、これらの核酸調製物は、血液試料から神経変性障害及び癌を診断するのに特に有用なマーカーである。

#### 【0068】

##### バンクの多様性

よって前述の方法は、健常及び病的状況の間の差に特徴的な核酸クローンの群の生成を可能にする。調製の各方法は、バンクを構成する多くのクローンを生成

する。これらのバンクは、そのまま、支持体に沈積させて、クローンの付加又は除去により変性させて使用することができるか、あるいは異なるバンクを組合せるか、又は対照クローンを付加するなどができる。

#### 【0069】

本発明により提供されるバンクは、10～50,000クローン、更に一般的には10～10,000クローン、そして更に好ましくは50～5,000クローンを含んでいてよい。クローンは、一般には、ハイブリダイゼーション結果の分析を促進するために、1つ以上の支持体に十分に規則正しく沈積させる。支持体は、ガラス、ナイロン、プラスチック、繊維などから成っていてよいが、又は一般には核酸の沈積に適した任意の固体支持体であってよい。バンクは、支持体上に、例えば、国際出願番号PCT/FR99/00547に記載されるように、当業者には既知の従来法により沈積させることができる。

#### 【0070】

使用されるバンクは、発現のレベルが変質している遺伝子に対応する核酸クローン（定量的遺伝子マーカー）及び配列の少なくとも一部が病的及び健常状況において示差的にスプライシングされるエクソン又はイントロンに対応する核酸クローン（定性的遺伝子マーカー）の両方を含んでよい。即ち、遺伝子マーカーは、異なるアプローチにより生成し、次に可能な限り予測的な応答を得るためにプールすることができる。

#### 【0071】

また、同じ支持体上の同じバンク内に、異なる病態の循環血球中で特異的に発現する遺伝子マーカーをプールすることも可能である。よってこのようなバンクのハイブリダイゼーションは、同じ血液試料を用いて、幾つかの病態の発現をモニターすることを可能にする。

#### 【0072】

よって本発明の主題はまた、循環血球に存在して病態を示す細胞の統制解除に特徴的な定性的及び定量的遺伝子マーカーを含むことを特徴とする、核酸調製物に基づく。特定の主題は、統制解除の異なる状況に特徴的な遺伝子マーカーを含むことを特徴とするバンクに関する。本発明の別の主題は、統制解除の2つの状

況に特徴的な核酸の少なくとも2つのバンクが沈積している、任意の固体支持体である。これに関連して、本発明は更に、固体支持体への、統制解除の状況に特徴的な1つ以上の核酸調製物の適用を含むことを特徴とする、病態を診断するために使用されるDNAチップの調製の方法に関する。

#### 【0073】

更には、好ましい実施態様において、異なる病態又は同じ病態の異なる段階への実際の関与に基づくクローンの選択により、使用を通じて精製される核酸バンクが利用される。初期バンクは、実際に病態の発症後の統制解除の状況の遺伝子事象に特徴的な、全てのクローンを含んでいてもよい。次に本発明により示される診断法の実行により、クローンの幾つかが、病態の発現の早期及び中間期からのプローブとハイブリダイズすることを観測することができる。よってこれらのクローンは、早期のマーカースとして同定することができ、そして任意の他の臨床的基準又は任意の他の診断の道具に先だって、非常に強力な診断の道具を提供することができる。

#### 【0074】

更に具体的には、本発明は今や、疾患の存在及び進行の遺伝子マーカースとして使用することができる、このようなクローンの同定及び性状解析を記述する。

#### 【0075】

これらの遺伝子マーカースの同定及びクローン化の主要な応用の1つは、所定の被験者の血球から抽出されるRNAのハイブリダイズ能力の評価に関する。この評価は、この被験者の細胞のメッセンジャーRNAに対応するプローブを、上述のような病的状況に特徴的なサインの1つ以上のバンクとハイブリダイズすることにより行うことができる。この応用は、更に詳細に後述される。

#### 【0076】

病態のサインの分析及び診断のための方法

本発明により、循環血中に存在する細胞からの核酸の試料を、上述の遺伝子マーカースとハイブリダイズすることにより、異なる病期に特異的なサインの存在の測定が可能になる（観測されるハイブリダイゼーションプロファイルは、血液試料をとった被験者における病態生理学的統制解除を示す）。このため、使用され

る遺伝子マーカーは、応答が可能な限り予測的になるように、好ましくはバンク中に組合せられる。本発明の利点の1つはまた、使用される多数のマーカーに関するが、このため得られる情報がより予測的になる。情報の予測性は、使用及び調製されるマーカーのタイプにより更に強化される。

#### 【0077】

本発明の特定の主題は、a) 血球からの核酸の試料とb) 細胞内シグナル生成経路における統制解除に特徴的な遺伝子事象に対応する核酸バンクの間の少なくとも1つのハイブリダイゼーション工程(ハイブリダイゼーションプロファイルは、その生物における病態生理学的統制解除を示す)を含むことを特徴とする、血球の状態の分析の方法に基づく。

#### 【0078】

本発明の他の側面及び利点は、以下の実験セクションにおいて明らかになるが、これらは例示的及び非限定的なものと考えべきである。

#### 【0079】

##### 実験セクション

##### 神経変性障害の例：ALS

動物モデルによって、疾患の発現の異なる段階を分析し、これらの段階を健常対照と比較するために使用することができる、生物学的試料を入手できる。

#### 【0080】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、レビ小体(Lewis bodies)のような封入体の異なるタイプに関連する神経変性疾患であり、脊髄及び皮質運動ニューロンのアポトーシスを特徴とする；致死的前後に時として前頭葉痴呆が発生する。突然変異が同定されていない散発型は、スーパーオキシドジスムターゼをコードするSOD1遺伝子における突然変異に関連する家族型(FALS)と並んで共存する。FALSに見られる突然変異の1つ(突然変異G93A)を有するヒトSOD1遺伝子を発現するトランスジェニックマウスは、使用者のライセンスがノースウェスタン大学(Northwestern University)から得られれば、ジャクソンラボラトリー(Jackson Laboratory)から入手可能である。SOD1におけるG93A突然変異によるALSの症候の発症は、スーパーオキシドジスムターゼ

活性の低下に起因するのではなく、フリーラジカルを生成するその能力を増強するその機能の増大に起因する。このモデルは、ヒトの疾患に類似した症候プロファイルを有する致死的予後の疾患を120日間再現する。このモデルは、脳、脊髄及び末梢血試料の入手を提供する。

#### 【0081】

A L Sモデルにおける特異的スプライシング型の同定：

エクソンヒット療法 (ExonHit Therapeutics) は、D A T A S ( 選択的スプライシングされた転写配列の示差的分析 (Differential Analysis of Transcript Alternatively Spliced) ) 法を用いる示差的定性スクリーニングの独創的なアプローチを開発した。この技術は、ヨーロッパ及び米国における特許出願の主題である。D A T A Sにより同定される配列は、代替エクソン又は比較される2つの病態生理学的状況の一方におけるイントロンの保持に由来しうる。よって得られるデータは、タンパク質の機能性ドメインに影響を及ぼす、R N A配列の発現における変性を特徴づける。示差的定性分析は、トランスジェニックマウス及び60及び100日齢の同系対照からの試料で行われる。60日は、第1の症候の発症の直前に存在する段階であるが、既に脳細胞の生理における変化を特徴とし、特にミトコンドリア代謝における変質を特徴とする段階に対応する。100日目には、50%の皮質及び脊髄運動ニューロンが死んで、ニューロンの活性アポトーシスが星状膠細胞の活性化と平行して誘発される。

#### 【0082】

よって示差的定性分析が、以下において行われる：

- ・疾患の発現に関連する最大の選択的スプライシング事象を考慮に入れるために、ニューロンの予備的単離を伴わない脳及び脊髄標本から抽出されるR N Aにおいて。

- ・末梢全血又は血球画分において。

#### 【0083】

D A T A Sにより同定される配列は、病的状況と健常状況の間のスプライシングを介する示差的発現がP C Rにより確認される、イントロン及び/又はエクソンに対応する。

## 【0084】

これらの配列のデータベースとの比較によって、得られる情報の分類ができ、更に別の試験に付すべき2つの配列の十分に根拠ある選択ができる。

## 【0085】

得られる配列の二次的性状解析

PCRにより確認される配列は、神経変性プロセスを伴う相補的モデルにおいてスクリーニングすることができる。例えば、脳虚血のモデルからのRNA又はプリオン疾患の動物モデルからのRNAは、ALSマーカー又は更に一般的には神経変性疾患のマーカーの選択的発現を確認するために、有益に研究することができる。

## 【0086】

同定されるスプライシング型の発現は、神経変性成分を伴う異なる病態からのヒト試料において探索される：

・アルツハイマー病、パーキンソン病などのような神経変性疾患の患者からの血液試料。

## 【0087】

癌の例：上部消化管及び呼吸器管癌

トランスジーン の形質導入は、実験腫瘍学の分野における幾らかの実験応用の主題である。即ち、ある腫瘍遺伝子の優性対立遺伝子は、今や癌の研究の実験モデルであるトランスジェニックマウスを入手するために使用される。

## 【0088】

癌は、疾患の不均質なファミリーであり、それぞれは異常な細胞増殖及び転移の播種をもたらす遺伝子突然変異の複合群を特徴とする。癌の発症及び進行を誘導する遺伝子突然変異の同定は、今や腫瘍の進行の診断及びモニタリングに必須であると考えられるが、この研究が製薬工業を代表する、重要な関与を説明するのは、この知識に基づく新しい早期診断の道具を開発する期待である。突然変異すると、細胞に癌性を与えうる多くの遺伝子が存在する。これらの遺伝子は、発生中ばかりでなく細胞の生存中にわたって必須な役割を演じる。例えば、これらは、増殖、分化、DNA修復及び細胞生存と同様に活力度高く機能を果たす。突

然変異すると、細胞サイクルを異常に活性化するタンパク質の産生に導く遺伝子は、腫瘍遺伝子と呼ばれる。このカテゴリーは、例えば、細胞内遺伝子のmyc及びrasを含む。対照的に、抗腫瘍遺伝子は、普通には細胞サイクルを減速させるように作用する。これらの活性の阻害により、細胞は増殖作用を持つ遺伝子にのみ依存するようになり、これが腫瘍の進行を促進する。このカテゴリーは、遺伝子のRB（網膜芽腫）及びp53を含む。腫瘍遺伝子及び抗腫瘍遺伝子と共に、プログラムされた細胞死、即ちアポトーシスを変調する遺伝子は、腫瘍形成において重要な演者であると考えられる。生理的細胞分化のプロセスと同様に、プログラムされた細胞死は、遺伝子の制御下にある。細胞の除去を可能にする末端分化を誘発するこの能力の消失は、この細胞を、形質転換クローンの出現に有利な異常な生存の状況に据える。

#### 【0089】

転写の異なるドライバー（プロモーター領域）を使用することにより、特定の組織においてトランスジーンが発現を優先的に得ることが可能である。こうして、特定の組織環境において発現する腫瘍モデルを確立することができる。これらの標的の異なる腫瘍モデルは、腫瘍の位置による循環細胞中の特異的サインを検出することが可能であることを示唆する。

#### 【0090】

##### 肝臓を標的とする腫瘍モデル

ネズミ肝細胞癌（HCC）モデルは、大及び小T抗原をコードするSV40ウイルス初期配列の肝臓における制限された発現に関連づけられる（Dubois, N., Bennoun, M., Allemand, I., Molina, T., Grimber, G., Daudet-Monsac, M., Abelant, R.,及びBriand, P. (1991) トランスジェニックマウスにおける分化した肝細胞癌及び肺転移の経時発現 J. Hepatol., 13, 227-239）。トランスジーンは、ウイルス抗原の初期の連続発現を行わせるヒトアンチトロンビンIIIプロモーターの制御下にある。このため、肝細胞増殖は、2段階の摂動を受ける。トランスジェニック肝細胞の増殖指数は、肝臓発生中（誕生～5週）には正常よりも比較的高く、次にかなり低下するが、正常な静止肝臓に特徴的な低レベルに達することはない。これらのトランスジェニックマウスは、分化したHCCを系統

的に発現させるが、これは、全ての動物に対して7ヶ月以前に致死的となる。肝細胞増殖の早期の統制解除にもかかわらず、肝腫は経過の後期にのみ存在する。HCCの発現に先立つ前新生物段階の分析は、このモデルにおいて正常肝重量を維持するアポトーシス補償機序の存在を明らかにした(Allemandら, 1995)。このアポトーシスが、正常肝が静止期に入るちょうどその時に停止することに注目すべきである。この点を超えると、肝臓の恒常性はもはや制御されないようである。アポトーシスに対する感受性の系統的研究は、このトランスジェニックモデルから誘導される肝細胞が、CD95/Fas受容体の選択的スプライシングとは独立した機序により、CD95/Fas系に依存性の細胞死に対する抵抗性を獲得したことを示した(Rouquet N, Allemand I, Molina T, Bennoun M, Briand P及びJoulin V. (1995) トランスジェニック肝臓においてFas依存性アポトーシスは、SV40 T抗原により損なわれる。Oncogene, 11, 1061-1067; Rouquet N, Allemand I, Grimber G, Molina T, Briand P及びJoulin V. (1996) 非形質転換SV40 T抗原変異体によるFas介在性アポトーシスからの肝細胞の保護。Cell Death & Diff., 3, 91-96)。しかし、スプライシング変質の全体的な分析だけが、CD95/Fas受容体シグナル生成経路に関係する全てのメンバーに関してこのプロセスにおける変質を説明できる。

#### 【0091】

このトランスジェニックモデルは、1) その遺伝子が、形質転換に必須(腫瘍遺伝子)であろうとなかろうと、又は腫瘍の進行を阻害(アポトーシス遺伝子)しようとしまいと、前新生物移行期から新生物形成に伴う遺伝子発現における変性; 2) 腫瘍からの腫瘍細胞の逸脱に関連づけられる癌発現の循環サイン; 3) 癌の発現に特徴的な血球における遺伝子発現の変質の事象を同定するための理想的な道具である。

#### 【0092】

特異的なサインの同定

示差定性的アプローチは、正常マウス、及びSV40 T抗原のアンチトロンピンIIIによる発現により肝細胞癌(HCC)を発現させるマウスの、肝臓及び血球から抽出されるRNAを用いて行われる。対照及びトランスジェニック動物

は、非常に早期の前新生物及び新生物段階（このモデルにおいて、特に肝臓の恒常性に必要なアポトーシスの活性化と次の不活化を特徴とする）を研究することができるように、異なる齢で選択される。

【0093】

同定した配列の用途

これらの配列の発現における変質は、ヒトの治療及び診断に応用の分野を広げるために、次にヒト腫瘍生検においてスクリーニングすることができる。

【0094】

これらのcDNAは、このトランスジェニックモデル及び一連のトランスジェニックネズミHCCモデルにおける腫瘍の進行をモニターするために使用される（Bennoun M, Grimber G, Couton D, Seye A, Molina T, Briand P及びJoulin V. (1998) SV40大T抗原のアミノ末端領域は、十分にマウスにおいて肝臓腫瘍を誘導できる Oncogene, 17, 印刷中）。即ち、腫瘍の発現前に、異なる非常に早期に血球中に検出される特異的cDNAを使用することにより、健常及びトランスジェニックマウスの混合集団において、どの動物が腫瘍を発現するかを予測することができる。

【0095】

これらの腫瘍特異的cDNAから誘導されるヌクレオチドプローブ又はPCRプライマーを使用して、ヒト腫瘍生検における、同定されたスプライシング型及び/又はこのモデルにおいて量に変質しているRNAの発現に関してスクリーニングすることができる。

【0096】

同様に、腫瘍発現の異なる段階の動物の血液において同定されたプローブを使用して、癌患者からの血液試料に共通なサインを検出することもできる。

【0097】

本発明の上述のプロセスにより得られるcDNAバンクを使用する戦略において、癌患者からの血液試料から調製される全プローブを使用して、一方では腫瘍の進行の異なる段階のネズミモデルから、そして他方では異なるヒト腫瘍の生検から、確立される異なるバンクに共通なサインに関してスクリーニングすること

もできる。これらのハイブリダイゼーションは、当業者には周知の方法により行われる（特に、出願番号PCT/FR99/00547に示されるハイブリダイゼーション条件を参照のこと）。

#### 【0098】

ヒトにおける予測診断のための研究

このセクションに記述される方法は、上述の定量又は定性分析法のいずれかを使用することにより実行することができる。それにもかかわらず、本発明は、上述の利点のため、遺伝子発現における定性的変質に関係づけられるマーカーの使用及び研究を奨励する。

#### 【0099】

本発明は、生検試料からの、病態の進行に特徴的なサインのバンクの同定及び構成を記述している。即ち、これらの病態の経過及び部位を表すcDNA配列のバンクを確立することができる。よってバンクに存在するものと同一のcDNAサインの存在に関して、血液試料をスクリーニングすることができる。そして共通のサインの存在は、疑わしい病態に関して、病的組織の細胞から誘導されたにほかならない、生検標本で見いだされたのと同じ変質を持つ核酸の存在を示す。

#### 【0100】

このスクリーニングは、特に血球からのプローブの作成、及びこれこれの病態に特異的な異なるマーカーを有するフィルター上のこれらのプローブのハイブリダイゼーションに基づく。

#### 【0101】

本発明は、血球中の遺伝子発現における変質を同定する可能性、及びヒトの病態の全部又は一部を模倣する、この実験モデルの使用を記述している（例えば、ネズミALSモデル又は肝臓腫瘍モデル）。

#### 【0102】

スクリーニングされた病態（神経変性疾患、癌など）を伴うか又は伴わない患者の血球から誘導される核酸プローブの使用によって、実験疾患モデルから作成された実験的予測バンクに存在するサインの存在に関してスクリーニングすることができる。共通のサインの存在は、検査される個人がこのような病態を発現す

るおそれがあるという診断を構成する。

【0103】

本発明によってまた、以下のように進行させることが可能になる：

- ・スクリーニングされる疾患を伴うか又は伴わない患者からの血液試料は、健全及び病的状態の両方を表すRNAのストックを構成するためにプールされる。

- ・このRNAは、本発明に示される方法により示差的分析に付して、病的及び健全状態に特徴的なcDNAバンクを作成する。

- ・次にこれらのcDNAバンクは、患者又は健全被験者からの個々の血液試料から調製されるプローブとのハイブリダイゼーションにより確認する。

- ・こうして確認されたバンクは、次にごく普通の検査に関して医者にかかる被験者の大集団からの血液試料から調製されるプローブの使用によって分析する。これらのバンクは、本発明に特異的な診断の道具を構成する。例えば、マンモグラフィによる、ごく普通の乳癌スクリーニングを受ける患者から、少量の血液試料をとることができる。このような試料から調製される核酸プローブによって、陽性の放射線診断的知見がない場合でさえ、次に癌の発現を示す非常に早期のサインを検出することが可能になる。

【0104】

本発明は、バイオチップの形で使用することができる。このバイオチップは、DNAの2つのいわゆる相補鎖が非常に特異的に相互に結合するハイブリダイゼーションの性質を利用する。本発明はまた、所望のDNAに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーによるDNA増幅法を使用することにより、病態に関する1つ以上のDNAマーカーを特異的に探索することにより使用することができる。

【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年10月5日(2001.10.5)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 被験者における病態の存在のインビトロ検出のための方法であって、(i)該被験者からの血球の試料からの核酸の調製、及び(ii)こうして調製される核酸の、病的状況にある血球に特徴的な遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含む少なくとも1つの核酸ライブラリーとのハイブリダイゼーション(ハイブリダイゼーションプロファイルは、病態に特徴的な試料中の血球の存在を示す)、を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 ライブラリーが、病的状況にある血球において発現のレベルが改変されている遺伝子に特異的な核酸を更に含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 単数又は複数のライブラリーが、支持体に沈積している、請求項1又は2のいずれか1項記載の方法。

【請求項4】 試料から調製される核酸が、場合によっては増幅されている、全-若しくはメッセンジャーRNA、又はそれに由来するcDNAである、請求項1~3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 核酸が、標識されている、請求項4記載の方法。

【請求項6】 血球が、有核細胞である、請求項1~5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】 有核血球が、リンパ球、マクロファージ、単球及び/又は樹状細胞を含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】 被験者における病態の進行の段階のインビトロ検出のための、請求項1~7のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】 被験者における病態の部位のインビトロ検出のための、請求

項1～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】 神経変性障害の存在、進行の段階及び/又は部位のインビトロ検出のための、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】 癌性病態の存在、進行の段階及び/又は部位のインビトロ検出のための、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

【請求項12】 病的状態に特徴的な血球のインビトロ検出の方法であって、(i)被験者からの血球の試料からの核酸の調製、及び(ii)こうして調製された核酸の、病的状況にある血球に特徴的な遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含む少なくとも1つの核酸ライブラリーとのハイブリダイゼーション(ハイブリダイゼーションプロファイルは、病態に特徴的な試料中の血球の存在を示す)、を含むことを特徴とする方法。

【請求項13】 病的状態に特徴的な核酸ライブラリーの調製の方法であって、該方法が(i)病態を提示する生物から単離される血球から第1の核酸調製物を得ること、(ii)該病態を提示しない生物から単離される血球から参照核酸調製物を得ること、(iii)該第1の調製物と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び病的状況にある生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする方法。

【請求項14】 病態の進行の段階に特徴的な核酸のライブラリーの調製の方法であって、(i)進行の確定段階の病態を提示している生物から単離される血球から第1の核酸調製物を得ること、(ii)該病態を異なる進行の段階で提示している生物から単離された血球から参照核酸調製物を得ること、(iii)該第1の調製物と参照調製物との間のハイブリダイゼーション工程、及び(iv)病態の進行の確定段階の生物からの血球に特徴的な核酸の回収を含むことを特徴とする方法。

【請求項15】 ハイブリダイズしない核酸のクローンの回収を含む、請求項13又は14記載の方法。

【請求項16】 遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸クローンの、生成したハイブリッドからの回収を含む、請求項13又は14記載の方法。

【請求項17】 ライブラリーが、支持体に沈積している、請求項13～1

6のいずれか1項記載の方法。

【請求項18】 該調製物が、病的状況にある生物からの血球において発現のレベルが改変されている遺伝子に特異的な核酸を含む、核酸調製物。

【請求項19】 該調製物が、病的状況にある生物からの血球に特徴的な、遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含む、核酸調製物。

【請求項20】 病的状況にある生物からの血球に特徴的な遺伝子のスプライシング形態に特異的な核酸を含む核酸ライブラリーを含むことを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項記載の方法の実行のために使用可能なキット。

【請求項21】 被験者における神経変性疾患又は癌の存在のインビトロ検出のための方法であって、(i)該被験者からの血球の試料からのタンパク質の調製、及び(ii)該調製物(i)中の、該疾患に特徴的なタンパク質又はタンパク質ドメインの存在の測定(該存在は、神経変性疾患又は癌の存在を示す)を含むことを特徴とする方法。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/FR 00/02439
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TRÖSTER H ET AL.: "One gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögrens' syndrome" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 180, 1994, pages 2059-2067, XP000925381 the whole document --- -/--	1-8,10, 12-16
<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 *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 January 2001		Date of mailing of the international search report 16/01/2001
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) 340-3016		Authorized officer  Knehr, M

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02439

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DIATCHENKO L ET AL.: "SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION: A METHOD FOR GENERATING DIFFERENTIALLY REGULATED OR TISSUE-SPECIFIC CDNA PROBES AND LIBRARIES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 93, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 6025-6030, XP002911922 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-8,10, 12-16
A	SPILSBURY K ET AL.: "Isolation of a novel macrophage-specific gene by differential cDNA analysis" BLOOD, vol. 85, no. 6, 1995, pages 1620-1629, XP000925451 the whole document	
P,X	WO 99 46403 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); EXONHIT THERAPEUTICS S A (FR);) 16 September 1999 (1999-09-16) cited in the application the whole document	1-26

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02439

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9946403 A	16-09-1999	FR 2775984 A	17-09-1999
		AU 2839999 A	27-09-1999
		EP 1062364 A	27-12-2000

---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/566 33/68		G 0 1 N 33/68 C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	シュヴェゴフェ, ファビアン フランス国、エフ - 94300 ヴァンサンヌ、 アヴニュ・ポール・デルレド 38		
Fターム(参考)	2G045 AA02 CA25 CB01 DA13 DA36 FB02 FB07 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 CA12 HA11 HA14 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ43 QQ52 QQ53 QQ79 QR32 QR35 QR40 QR55 QR84 QS31 QS34 QX02 QX10		

专利名称(译)	用于检测病理事件的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003515317A</a>	公开(公告)日	2003-05-07
申请号	JP2001523798	申请日	2000-09-05
申请(专利权)人(译)	Eguzoni兵馬備治療, 興業ANONYME		
[标]发明人	トックブルーノ ブラッコローラン シュヴェゴフェファビアン		
发明人	トック,ブルーノ ブラッコ,ローラン シュヴェゴフェ,ファビアン		
IPC分类号	G01N33/49 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6809 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/56972 C12Q1/6809		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/49.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/68 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB07 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/HA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR84 4B063/QS31 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX10		
优先权	1999011563 1999-09-16 FR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于检测病理事件的新型组合物和方法。更特别地，一种用于在体外检测受试者中病理状况或病理事件的存在的方法，其中获取受试者的血细胞样品，该血细胞具有样品中病理状况的生理状况特征。一种方法，包括测量本发明还涉及用于实施该方法的工具，试剂盒和组合物，及其在人和动物保健领域或例如在实验研究中的用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Number of Applicant's PCT/FR 00/02439
<b>1. TITLE AND SUBJECT MATTER</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC: <b>2. FIELD OF THE INVENTION</b> IPC Class. C12Q		
Documents are searched other than in the above classification in the event that such documents are included in the data searched. The following data have been consulted during the International Search: Courts or other bodies with jurisdiction to grant patents; Search engines used: EPO-internal, SPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> (Category) (Reason of document with indication, where appropriate, of the relevant passages) (Referred to claim No.)		
Y	TRÖSTER H ET AL.: "One gene, two transcripts. Isolation of an alternative transcript encoding for the aut antigen Lp55-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögrens' syndrome." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 180, 1994, pages 2059-2067. the whole document	1-8, 10, 12-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are cited in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>4. SPECIAL CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS:</b> *X* Documents defining the general state of the art which do not constitute a part of the prior art. *Y* Documents which have been cited on priority claims or which are otherwise specifically cited. *Z* Documents referred to in the abstract, but not cited in the main body of the text. *A* Documents mentioned in the same patent family. *B* Documents mentioned in the same patent family.		
Date of the actual completion of the international search: 10 January 2001		Date of mailing of the international search report: 16/01/2001
Name and mailing address of the ISA: International Patent Office, P.O. Box 600, Geneva, CH-1211, Switzerland. Tel. +41 22 719 6111, Fax +41 22 719 6112, Telex 710000, Telex 710001.		Authorized officer: Knehn, M