

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-175976

(P2012-175976A)

(43) 公開日 平成24年9月13日(2012.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 B	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 A	

審査請求 有 請求項の数 22 O L 外国語出願 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-99354 (P2012-99354)	(71) 出願人	309021320
(22) 出願日	平成24年4月25日 (2012. 4. 25)		ベリデックス・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー
(62) 分割の表示	特願2008-532351 (P2008-532351) の分割		Veridex, LLC
原出願日	平成18年9月20日 (2006. 9. 20)		アメリカ合衆国ニュージャージー州ラリタ
(31) 優先権主張番号	60/713, 676	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成17年9月20日 (2005. 9. 20)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	60/729, 536		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成17年10月24日 (2005.10.24)	(74) 代理人	100156122
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐藤 剛
(31) 優先権主張番号	60/786, 117		
(32) 優先日	平成18年3月27日 (2006. 3. 27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ユニーク配列のDNAプローブを作製するための方法および組成物、DNAプローブの標識、ならびにこれらプローブの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ユニーク配列のDNAプローブを得るための方法および組成物を提供する。

【解決手段】 組成物はユニーク配列を含む任意の二本鎖DNAからなり、反復配列が排除されている。個別に単離した標的細胞の表現型および遺伝型の複数パラメータ解析を組み合わせることによって、希少循環細胞を解析する。注目する細胞を調査するために、免疫磁気選択および蛍光標識後に同定された細胞を保存し、免疫磁気選択および蛍光標識後に同定された細胞の遺伝子解析をする。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a. 試験対象から生物検体を得る工程であって、前記検体が標的細胞を含むと疑われる混合細胞集団を含む工程と；
- b. 免疫磁気濃縮によって疑わしい前記標的細胞の部分集団を単離する工程と；
- c. 複数パラメータ表現型プロファイルによって疑わしい標的細胞を同定する工程と；
- d. 疑わしい標的細胞を複数パラメータ遺伝子型プロファイル用に調製する工程と；
- e. 前記遺伝型プロファイルによって疑わしい標的細胞を確認する工程であって、前記個々の疑わしい標的細胞が前記標的細胞の表現型および遺伝型プロファイルをどちらも含む工程と

10

を含む、混合細胞集団中の疑わしい標的細胞の検出および計数を確認する方法。

## 【請求項 2】

前記免疫磁気濃縮が、

- a. 他の集団を実質的に排除するために、前記検体を、疑わしい前記腫瘍細胞と特異的に結合するリガンドに連結したコロイド状免疫磁気粒子と混合する工程と；
- b. 前記腫瘍細胞が前記試験検体中に存在する場合は、免疫磁気粒子と結合した腫瘍細胞が濃縮された、分離された細胞画分を生じるために、検体 - 免疫磁気粒子混合物を高勾配磁場に供する工程と

を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記表現型プロファイルが、複数パラメータフローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡観察、レーザー走査サイトメトリー、明視野系イメージング解析、毛細容量測定、スペクトルイメージング解析、手動細胞解析、自動細胞解析およびその組合せよりなる群から選択される方法によって決定される、請求項 1 記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記遺伝子解析が、ISH、FISH、CGH、スペクトル核型分析、染色体彩色、ノーザンブロット、サザンブロット、マイクロアレイ解析、およびその組合せよりなる群から選択される方法によって決定される、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

標的細胞が内皮細胞、上皮細胞、胎児細胞、細菌細胞、心筋細胞、ウイルス感染細胞、およびその組合せよりなる群から選択される、請求項 1 記載の方法。

30

## 【請求項 6】

前記遺伝子解析が、*in situ*ハイブリダイゼーション中に、形態学的に同定可能な細胞核内の染色体の存在を検出する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記遺伝子解析が、第 1 染色体、第 7 染色体、第 8 染色体、第 17 染色体、およびその組合せよりなる群から選択される染色体を検出することである、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記疑わしい標的細胞の確認により、前記試験対象の診断的、予後的、または治療的情報が提供される、請求項 1 記載の方法。

40

## 【請求項 9】

前記染色体が、DAPIを用いて染色した細胞核内で形態学的に同定可能である、請求項 7 記載の方法。

## 【請求項 10】

- a. 試験対象から生物検体を得る手段であって、前記検体が標的細胞を含むと疑われる混合細胞集団を含む手段と；
- b. 免疫磁気濃縮手段によって疑わしい前記標的細胞の部分集団を単離する手段と；
- c. 表現型プロファイル解析手段によって疑わしい標的細胞を同定する手段と；
- d. 疑わしい標的細胞を遺伝型プロファイル解析手段用に調製する手段と；
- e. 前記遺伝型プロファイルによって疑わしい標的細胞を確認する手段であって、前記

50

個々の疑わしい標的細胞が表現型および遺伝型特徴をどちらも含む手段と

を含む、混合細胞集団中の疑わしい標的細胞の検出および計数を確認するシステム。

【請求項 1 1】

生物検体を得るための前記手段が前記検体の固定を含む、請求項 1 0 記載のシステム。

【請求項 1 2】

前記免疫磁気濃縮手段がコロイド状磁気粒子を用いる、請求項 1 0 記載のシステム。

【請求項 1 3】

前記表現型プロフィール解析手段が自動免疫蛍光細胞解析手段である、請求項 1 0 記載のシステム。

【請求項 1 4】

前記遺伝型プロフィール解析手段が F I S H である、請求項 1 0 記載のシステム。

【請求項 1 5】

- a . 反復配列を除去したポリヌクレオチドと；
  - b . 前記ポリヌクレオチドに連結した標識部分と
- を含む、ヌクレオチドを標識するキット。

【請求項 1 6】

染色体のセントロメア領域に相補的な配列を有する、請求項 1 5 記載のキット。

【請求項 1 7】

二重鎖特異的ヌクレアーゼを用いた消化によって前記ポリヌクレオチドから前記反復配列を除去する、請求項 1 5 記載のキット。

【請求項 1 8】

前記標識部分が、白金系の配位結合によって前記ポリヌクレオチドと連結したフルオロフォアである、請求項 1 5 記載のキット。

【請求項 1 9】

- a . 緩衝溶液中に疑わしい癌細胞を有する試料を含むカートリッジを得る工程と；
  - b . 置き換えられる緩衝溶液を吸引しながら F I S H 解析用の固定溶液を分注する工程であって、固定液と緩衝液とが最小限の混合を有する工程と；
  - c . 分注と吸引の流動のバランスをとることによって細胞に対する剪断力を最小限にする工程と
- を含む、疑わしい標的細胞を含むカートリッジ内の緩衝溶液を交換する方法。

【請求項 2 0】

- d . 緩衝溶液中に疑わしい癌細胞を有する試料を含むカートリッジを得る手段と；
  - e . 置き換えられる緩衝溶液を吸引しながら F I S H 解析用の固定溶液を分注する手段であって、固定液と緩衝液とが最小限の混合を有する手段と；
  - f . 分注と吸引の流動のバランスをとることによって細胞に対する剪断力を最小限にする手段と
- を含む、疑わしい標的細胞を含むカートリッジ内の緩衝溶液を交換する装置。

【請求項 2 1】

疑わしい細胞を免疫磁氣的に捕捉し、観察面に沿って整列させることによって得られる、前記疑わしい標的細胞の蛍光イメージングに用いるカートリッジ装置用の改善されたストッパーであって、改善がチャンバ内の流体を置き換えるためのストッパープローブ伸長手段を含み、前記ストッパープローブの伸長物の直径が、プローブがチャンバ開口部を通して滑るような直径である該ストッパー。

【請求項 2 2】

- a . カートリッジ中の流体を移すためのシリンジポンプ（ここに、前記流体は、緩衝液、固定液、またはハイブリダイゼーション緩衝液である）と；
- b . 試薬を移すための試料結合システムと；
- c . 乾燥用の吸引プローブと；
- d . フィードバック熱電対、制御熱電対、および温度調節器を介して作動するヒーターブロックと

10

20

30

40

50

を含む、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション用に疑わしい癌細胞の集団を調製するための装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明者：Mark Carle Connelly、Brad Foulk；Michael Kagan、Joost F. Swennenhuis；Leon W.M. Terstappen、Arjan G.J. Tibbe、およびJohn Verrant

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2005年9月20日出願の米国仮特許出願第60/718,676号；2005年10月24日出願の第60/729,536号；および2006年3月出願の第60/786,117号の優先権を主張する非仮出願である。前記の各出願をここに出典明示して全体を本明細書の一部とみなす。

【0003】

本発明は、一般的に、DNA配列、遺伝子または染色体の同定の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

DNAプローブの作製

ヒトゲノムDNAは、ゲノム全体にわたって複数のコピー数が存在するユニーク配列および反復配列の混合物である。一部の適用では、反復配列を検出するための核酸ハイブリダイゼーションプローブが望ましい。これらのプローブは、胎児細胞の診断学、腫瘍学、および細胞遺伝学の分野において有用性が示されている。他の適用では、染色体上の注目するユニーク配列にのみアニーリングするハイブリダイゼーションプローブを作製することが望ましい。ユニーク配列のプローブの調製は、生物のゲノム全体にわたって多数のクラスの反復配列が存在することによって混乱する(Hood他、*Molecular Biology of Eucaryotic Cells* (Benjamin/Cummings Publishing Company、カリフォルニア州Menlo Park、1975年)。ハイブリダイゼーションプローブ中に反復配列が存在することにより、プローブの一部が注目する配列外に見つかる他の反復配列と結合するので、プローブの特異性が低下する。したがって、ハイブリダイゼーションプローブが特定の目的配列に結合することを確実にするために、プローブ中の反復配列が注目する配列外の標的DNAにアニーリングしないことを確実にする努力を行わなければならない。

【0005】

最近の寄稿では、非標識の遮断核酸を使用することで反復配列のハイブリダイゼーションを阻害することによって、この問題に対処している(US5,447,841号およびUS6,596,479号)。ハイブリダイゼーションにおける遮断核酸の使用は、高価であり、反復配列のハイブリダイゼーションを完全には阻止せず、ゲノムハイブリダイゼーションパターンを変形させる可能性がある(Newkirk他、「*Distortion of quantitative genomic and expression hybridization by Cot-1 DNA: mitigation of this effect*」、*Nucleic Acids Res.*、第33巻(22):e191(2005年)」。したがって、最適なハイブリダイゼーションのために、遮断DNAを使用せずに反復配列のハイブリダイゼーションを阻止する方法が必要である。

【0006】

これを達成する一手段は、ハイブリダイゼーション前に、ハイブリダイゼーションプローブから所望しない反復セグメントを除去することである。反復性の高い配列を除去することを含む技術は、従前に記載されている。ヒドロキシアパタイトのような吸収剤により

10

20

30

40

50

、抽出したDNAから反復性の高い配列を除去する手段が提供されている。ヒロキシアパタイトクロマトグラフィーでは、温度、塩濃度、または他のストリンジェンシーのような二重鎖の再会合の条件に基づいてDNAを分画する。この手順は厄介であり、異なる配列で変動する。反復DNAは、固定したDNAへのハイブリダイゼーションによって除去することもできる(Brisson他、「General Methods for Cloning Amplified DNA by Differential Screening with Genomic Probes」、Molecular and Cellular Biology、第2巻、578~587頁(1982年))。これらの手順すべてにおいて、反復配列の物理的除去は、DNA配列の塩基組成に基づいた、固有の変異を用いた条件の厳密な最適化に依存するであろう。

10

**【0007】**

ハイブリダイゼーションプローブから反復配列を除去するためのいくつかの他の方法が記載されている。一方法は、反復配列のハイブリダイゼーションを直接防止するため、またはPCR反応において反復配列の増幅を防止するために、架橋化剤を用いて反復配列を架橋結合させることを含む。(US6,406,850号)。別の方法では、PCR支援アフィニティークロマトグラフィーを用いてハイブリダイゼーションプローブから反復を除去する(US6,569,621号)。これらの方法はどちらも、反復配列を除去するために標識したDNAの使用に依存し、それにより、これらの方法が複雑かつ再現が困難となる。さらに、どちらの方法も時間がかかり、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)または高い標的特異性を要する他のハイブリダイゼーション反応での使用に適した機能的なプローブを生じるために、複数回の反復の除去を必要とする。

20

**【0008】**

二本鎖デオキシリボ核酸分子を優先的に切断する二重鎖特異的ヌクレアーゼの使用が、一塩基多型のような配列変異体の検出適用に記載されている(US2005/0164216号;US6,541,204号)。一本鎖と比較して完全一致した核酸二重鎖ポリヌクレオチドを優先的に切断する酵素の能力により、非標的二本鎖DNAを試料混合物から除去する手段が提供される。

**【0009】**

ポリヌクレオチドの二重鎖形態を特異的に消化するこれらのヌクレアーゼの能力は本発明において発見され、遮断DNAを必要とせず、したがって遮断DNAのコストおよび妨害の影響が排除されることで、ユニークな標的特異的プローブの製造において相当な利益がもたらされ、また、特異性の高いプローブの迅速、効率的かつ対費用効果の高い生産が提供される。

30

**【0010】**

ゲノム中の特異的配列の検出は、DNAが2本のDNA鎖のらせんからなること、およびこれら2本の鎖が相同体である場合にこの二本鎖が最も安定しているという事実を利用する。DNAはリン酸-糖リン酸の主鎖からなり、それぞれの糖に、4個の異なる窒素塩基、シトシン、グアニン、チミンまたはアデニンのうちの1個が存在し得る。相同体の鎖は、それぞれのシトシンをグアニンと、またそれぞれのチミンをアデニンと対合する。標識した相同体配列をゲノムに加えてDNAを一本鎖にした場合、これらの標識した配列は、正しい状況下でゲノム中の特異的相同体配列とハイブリダイズする。このin situハイブリダイゼーションには、様々な検出目的および適用のためにいくつかのプローブが利用可能である。

40

**【0011】****全染色体/彩色プローブ(WCP)**

WCPは、具体的な染色体に相同的な標識したDNA材料を取り込む。材料は分裂中期の染色体の流動分別または分裂中期の拡大物からレーザー切開によって得て、これをPCRまたは関連技術によって増幅する。それを標識し、適切に準備した核に施用した後、これは標的染色体を染色する。しかしながら、このような標識プローブは、染色体の一部またはすべてで共有される構造配列要素または反復配列要素のため、他の非標的染色体も染

50

色する。したがって、意図する注目する染色体に由来する配列のみを染色するために、通常は、遮断DNAを用いたハイブリダイゼーションまたは非特異的な相互作用を遮断もしくは除去する他の方法によってこれらの共通の反復要素を阻害する。

#### 【0012】

また、複数の染色体彩色を単一の核に施用する。WCPを異なる蛍光色素または蛍光色素の組合せによって標識し、1回のハイブリダイゼーションで施用するWCPの量に制限はない。WCPは主に、核型分析、ならびに、核の分裂中期の拡大物において最も良好に観察される染色体の大きな断片、領域および小領域の転座を研究するために用いる。

#### 【0013】

##### セントロメアプローブ

セントロメアプローブは、ヒト染色体のすべてのセントロメア領域中で反復的な順序で生じる171bpの配列を標的とする。すべての染色体はわずかに異なる配列を有しており、このため、正しいハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを用いた場合はすべての染色体が個別に検出される。2対の染色体、すなわち、第13と第21および第14と第22のみが、同じ反復を共有しており独立して検出することができない。一般的に、セントロメアプローブは、171bpの反復の1コピーまたは数コピーからの挿入物を含むプラスミドから生成する。これらのプローブは、171bpの配列が注目する領域外では出現しないので、遮断DNAを加えずにハイブリダイズできる。

10

#### 【0014】

##### テロメアプローブ

ヒトテロメアは、短い反復配列（すなわち、TTAGGG）のアレイからなる。これは、それぞれの染色体および個々の試験対象の年齢について、異なる量で数回繰り返される。この反復配列は、すべての染色体を染色するプローブとして用いるが、すべての染色体が同等の強度では染色されない。染色体のテロメア末端を検出するために、ほとんどの場合はサブテロメア細菌人工染色体（BAC）クローンを用いる。このBACクローンは、ハイブリダイゼーション中またはその前に遮断または除去すべき反復配列を含む。

20

#### 【0015】

##### 比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）プローブ

CGHは、試験ゲノムを参照ゲノムとハイブリダイズさせることを含む方法である。参照ゲノムは、健康な個体からの分裂中期の染色体の拡大物の形態をとり得るか、またはゲノムの全体もしくは一部を表すプローブ配列を用いたアレイに基づき得る。BACクローンを用いて作製したマイクロアレイプローブは、ハイブリダイゼーション前に遮断しなければならない反復配列を含む。しかしながら、遮断は、反復を除去したプローブと比較した場合にずれを生じさせる潜在性がある（KnollおよびRogan、Nucleic Acids Research、2005年、第33巻、第22号）。さらに、遮断工程はハイブリダイゼーションアッセイのコストを上げる。プローブ配列から反復配列を除去すれば、標識したゲノムDNAの遮断工程は不要であり、コスト軽減およびすべてのばらつきを排除がもたらされる。

30

#### 【0016】

##### 遺伝子特異的プローブ

遺伝子特異的プローブは、標的遺伝子または遺伝子群を含むゲノムの領域を検出するために設計される。これらのプローブは、注目する特異的遺伝子の発現レベルに相関する、特異的ゲノム領域の増幅または欠失を検出するために用いる。遺伝子（または複数の遺伝子）自体のコード配列は、標準的な蛍光顕微鏡を用いて可視的なプローブについて検出シグナルを生じるほど十分に大きくない。したがって、そのような遺伝子特異的プローブは、コード遺伝子配列（エクソン）だけに限定されず、非コード配列（イントロン）、制御配列または遺伝子周辺の他の配列も含む。遺伝子特異的プローブの設計にさえ包含される大きな配列のため、これらは、所望しない反復配列の不所望の包含にしばしば苦しむ。その後、このような材料を標識してハイブリダイゼーションで用いるか、またはハイブリダイゼーションで用いた後に標識した場合、遺伝子領域の特異的な検出を可能にするために

40

50

は、所望しない配列をプローブから遮断または除去しなければならない。

【0017】

マイクロアレイプローブ

C G Hと同様、マイクロアレイプローブは担体に固定する。一般的に、自動ロボット技術を用いてc D N A - P C R産物または合成オリゴヌクレオチドをスライドまたは類似の固定表面上にスポットする。また、配列をスライド上で直接合成する技術が存在する(A f f i m e t r i x , I n c、S a n t a C l a r a)。異なる標識c D N AまたはR N Aを組み合わせて、スライドを標識c D N AまたはR N Aと共にハイブリダイズさせる。

【0018】

レポーター分子とD N Aプローブとのカップリング

D N Aプローブをカップリングさせたレポーター分子によって可視化する。これらの分子は、D N Aプローブに取り込ませるか、またはそれに付着させる必要がある。一方法では、酵素反応に連結したヌクレオチドを有するレポーター分子を利用する。例には、ニックトランスレーションまたはランダムプライム反応による取り込みが含まれる。さらに、次いで、この方法で構築したアミン結合ヌクレオチドをレポーター分子に直接または間接的にカップリングさせる。カップリングは、D N Aの化学標識によって行う。一例は、U L S標識(K r e a t e c h D i a g n o s t i c s、A m s t e r d a m)で用い、U S 5 , 5 8 0 , 9 9 0号; U S 5 , 7 1 4 , 3 2 7号; U S 5 , 9 8 5 , 5 6 6号; U S 6 , 1 3 3 , 0 3 8号; U S 6 , 2 4 8 , 5 3 1号; U S 6 , 3 3 8 , 9 4 3号; U S 6 , 4 0 6 , 8 5 0号; およびU S 6 , 7 9 7 , 8 1 8号に記載の、グアニンのN 7位と配位結合を形成する白金基に連結したレポーター分子のカップリングである。レポーター分子は、放射性同位体、非同位体標識、ジゴキシゲニン、酵素、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン、放射線発光性薬剤、化学発光性薬剤、生物発光性薬剤、および光発光性薬剤(蛍光およびリン光を含む)等の発光性薬剤、色素、ハプテンなどであり得る。

【0019】

試料調製

静止期の染色体に結合した標識プローブを検出できるようになるためには、核はF I S H手順中およびその後形態学を維持すべきである。固定を用いて、細胞または核を顕微鏡スライドのような固体層に付着させる。固体層への付着前、その間、またはその後の固定により、同定の参照が提供される。細胞または組織の種類に応じて、核は、通常はタンパク質分解酵素、熱、アルコール、変性剤、洗剤溶液または処理の組合せで前処理することによってプローブD N Aに接近可能でなければならない。プローブおよび核D N Aは熱またはアルカリ処理によって一本鎖にし、その後、ハイブリダイズさせる。

【0020】

D N Aプローブの使用

マイクロアレイ

マイクロアレイの1つの一般的な使用は、疑わしい組織、腫瘍、または微生物のR N A発現プロファイルを決定することである。R N A発現プロファイルを解析することにより、患者の治療および生存の予後診断が提案される。臨床使用のためのR N Aマイクロアレイの予後的価値はまだ決定されていない。マイクロアレイのもう一つの一般的な使用は、アレイに基づいたC G Hである。この技術を用いて、ゲノム全体を染色体領域の増幅および/または欠失についてスクリーニングできる。

【0021】

顕微鏡観察

出生前または出生後試験における細胞遺伝学的解析を用いて、胎児からの細胞集団において胎児が細胞遺伝学な異常を有するかどうかを決定する。試料は、多くの場合、細胞遺伝学的異常の危険性が高いと考えられる妊娠女性で実施する羊水穿孔を介して得る。したがって、これらの細胞を細胞遺伝学的異常について調査する。細胞遺伝学的異常を確認するため、または出産後に得られた細胞集団において疑わしい細胞遺伝学的異常を調査する

10

20

30

40

50

ために、同種の調査を行う。

【0022】

母体血中の胎児細胞の評価

妊娠中、胎児細胞が母体血中に入り込む場合があり、外傷、子癇（前）症および異常妊娠においてこのような胎児細胞の数の増加が見出される。胎児母体出血のルーチン評価では、頻繁に使用されるクライハウアー - ベトケ試験は胎児ヘモグロビンを発現する赤血球の検出に基づいている。細胞遺伝学的異常の検出には、母体血からの有核細胞が必要である。これらの細胞の頻度は著しく低く、母体血 1 mL あたり 1 ~ 10 個の胎児細胞の範囲であると推定される。有核赤血球、栄養芽細胞、および胎児由来の造血前駆体の存在により、妊娠初期の細胞遺伝学的異常の検出における単離およびプローブハイブリダイゼーションの標的が提供される。現在までに、これらの細胞の細胞遺伝学的組成を同定および評価する信頼性および再現性のある方法は利用可能となっていない。この解析の主な問題の 1 つは、手順全体にわたる様々な工程での胎児細胞の損失であり、一貫性のないまたは決定的でない情報がもたらされることである。

10

【0023】

腫瘍学

FISH は、転座、欠失、増幅、逆位、および重複のような様々な種類の染色体異常を検出するために用いる。これらの異常は、あらゆるタイプの細胞および組織において検出されている。白血病では、細胞を血液または骨髄から単離し、次いで FISH 解析を行う。膀胱癌では、細胞を尿から単離する。固形腫瘍からの細胞は、腫瘍自体の穿刺または切除によって得る。また、固形腫瘍によって放出される細胞を血液から単離し、FISH によって解析する。後者は、腫瘍中の染色体の変化を検出するために腫瘍治療を綿密に監視する機会を与える。いくつかのタイプの癌において、FISH は腫瘍進行の予後診断を提供するか、または特定の投薬の有効性を予測する。商業的には、最も使用されている FISH 試験は、慢性骨髄性白血病における BCR - ABL 転座 FISH および乳癌における *her2/neu* 遺伝子増幅 FISH である。

20

【0024】

播種性腫瘍細胞

腫瘍細胞だけでなく希少な細胞、または生体試料からの他の生物学的実体の特徴づける方法は、従前に記載されている (US 6,365,362 号)。この 2 段階方法は、解析前に実質的な量の細片および他の妨害物質を排除しつつ、標的細胞の獲得を確実にし、イメージング技術による細胞検査を可能にするために、効率的な濃縮を要する。この方法は、免疫磁気濃縮の要素と、複数パラメータフローサイトメトリー、顕微鏡観察および免疫細胞化学的解析とを、独自に自動化された方法で組み合わせる。この組合せ方法を用いて、血液試料中の上皮細胞を濃縮および計数し、したがって、癌を測定するための手段が提供される。

30

【0025】

この 2 段階方法は、癌の予後診断および転移癌を有する患者の生存において適用を有する (WO 04076643)。血液中に形態学的に無処置の循環癌細胞が存在することに基いて、この方法は、転移性乳癌患者の循環癌細胞の存在を、疾患の進行および生存の時間に相関させることができる。より具体的には、7.5 ミリリットルあたり 5 個以上の循環腫瘍細胞の存在により最初の経過観察で予測的な値がもたらされ、したがって、患者の生存の初期予後指標がもたらされる。

40

【0026】

前記のアッセイの特異性は検出される細胞数に伴って増大し、数個（一般的に 5 個未満の循環腫瘍細胞）しか検出されない場合には不十分である。この問題の 1 つの解決策は、疑わしい癌細胞に関して詳細な遺伝情報を提供することである。したがって、複数パラメータイメージサイトメトリーを用いた血液試料の濃縮および個々の疑わしい癌細胞の複数パラメータ遺伝子解析を組み込む方法が、患者のスクリーニング、疾患の再発の評価、または全体的な生存のための現在の手順を顕著に改善するための、完全なプロフィールおよ

50

び確証的な機構を提供するであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0027】

ここに出典明示して本明細書の一部とみなす、W O O O / 6 0 1 1 9 ; M e n g 他、P N A S、1 0 1 ( 2 5 ) : 9 3 9 3 ~ 9 3 9 8 ( 2 0 0 4 年 ) ; F e h m 他、C l i n C a n R e s、8 : 2 0 7 3 ~ 2 0 8 4 ( 2 0 0 2 年 ) に記載のように、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション ( F I S H ) が、濃縮後の希少細胞の検出における単一の解析方法として記載されている。上皮細胞の濃縮後、捕捉した細胞を公知のハイブリダイゼーション方法によってスクリーニングし、顕微鏡スライド上でイメージングする。特有の技術的変動および満足できる遺伝情報の確認の欠如のため、ハイブリダイゼーションパターンだけでは、5 個未満の標的細胞を含む試料の評価のように、高感度分析に必要な臨床的信頼度のレベルが提供されない。さらに、この F I S H 解析の方法は自動化が困難である。

10

【0028】

個々の細胞の解析においてハイブリダイゼーションに基づいた方法を免疫細胞化学と組み合わせることは、従前に記載されている ( U S 6 , 5 2 4 , 7 9 8 号 ) 。個々の細胞の表現型および遺伝型の同時評価には、表現型特徴が *in situ* ハイブリダイゼーションの準備工程後に安定に保たれていることを要し、検出可能な標識の選択が限定される。典型的には、慣用の *in situ* ハイブリダイゼーションアッセイは以下の工程を要する：( 1 ) 熱またはアルカリでの変性；( 2 ) 非特異的結合を減少させるための所望による工程；( 3 ) 1 つまたは複数の核酸プローブと標的核酸配列とのハイブリダイゼーション；( 4 ) 結合していない核酸断片の除去；および( 5 ) ハイブリダイズしたプローブの検出。これらの工程の1 つまたは複数完了するために用いた試薬 ( すなわち、メタノール洗浄 ) は、続く免疫細胞化学において抗原認識を変化させるか、標的細胞の位置にわずかなシフトを引き起こすか、または標的細胞を完全に除去し、これにより、疑わしい細胞の誤った特徴づけの可能性が導入される。

20

【0029】

複数パラメータ F I S H 解析のプローブセットおよび方法が肺癌について記載されている ( U S 2 0 0 3 0 0 8 7 2 4 8 号 ) 。また、患者における膀胱癌の検出につき 9 5 % の感度をもたらす 3 個のプローブの組合せが記載されており、U S 6 , 3 7 6 , 1 8 8 号 ; U S 6 , 1 7 4 , 6 8 1 号を参照されたい。これらの方法は少数の標的細胞の評価につき特異性および感度を欠いており、したがって、病状の初期検出の確証的な評価を欠いている。また、好都合な自動化の手段も提供しない。

30

【課題を解決するための手段】

【0030】

本発明の一態様は、個別に単離した標的細胞の表現型および遺伝型の複数パラメータ解析を組み合わせることによって、希少循環細胞の解析において確証的なアッセイを提供し、その結果、臨床的に有意なレベルの感度をもたらす、したがって、得られたすべての定量的情報に関して臨床家に確実性を与える。関連病状は非常に少数 ( 1 個、2 個、3 個、または 4 個 ) の循環腫瘍細胞 ( C T C ) を用いて評価し、初期の疾患検出の確認を提供する。

40

【0031】

反復を除去した D N A プローブの作製

本発明の一実施形態には、D N A から反復配列を排除するための方法および組成物が含まれる。任意の二本鎖 D N A が、本発明の方法の適用において適切な源である。反復配列を欠く一本鎖 D N A を得るために、最初に、増幅全ゲノムライブラリを D N A 源から標準的な手順に従って作製する。得られたライブラリは、サイズが約 2 0 0 ~ 5 0 0 塩基対の範囲にあるランダムに選択された断片からなる。各断片は、標的配列の各末端に P C R プライマー配列を有する二本鎖 D N A からなる。一般的に、このライブラリは D N A 源の代

50

表的なものである。また、増幅を可能にするDNAの改変断片をもたらす他の方法も、断片の大きさに制限なしに本発明で考慮される。これらには、限定されるものではないが、変性オリゴヌクレオチドプライムポリメラーゼ連鎖反応(DOP PCR)、ローリングサークルおよび等温増幅方法が含まれる。二本鎖DNA断片は、95℃まで加熱することによって、または一本鎖DNA断片を得るための他の手段によって変性させる。得られた一本鎖DNA断片は、反復配列、ユニーク配列またはユニーク配列および反復配列の組合せを含む。過剰のCot DNAまたは反復配列に結合する他の適切な相殺DNAを加える。続いて温度を下げることにより、反復配列を含むそれらの断片についてのみ二本鎖DNAの形成をもたらされる。二本鎖DNAの消化を行わせるために二重鎖特異的ヌクレアーゼ(DSN)を加える。一実施形態では、DSN酵素を2時間、65℃で加える。得られた組成物は主に、ユニーク配列のみを有する一本鎖DNAおよび消化DNAを含む。ここでは両末端にPCRプライマーを有する一本鎖DNAとなったユニーク配列を、プローブの生成で用いる大量のユニーク配列を作製するための鋳型として用いる。所望のユニーク配列を含むBACクローンをDNA源として用いた場合、この方法によって作製した鋳型はそのユニーク配列のみを含む。境界配列が知られている場合は、この方法は、ゲノムDNA中の境界配列の間のヌクレオチドにわたるプローブを得るために有用である。さらに、本発明には、その反復配列を排除した後にこれらのDNA配列を生成することにより得られた、使用方法および組成物が含まれる。これらの反復を除去したDNA配列は、所望しないDNA配列の無効化または遮断を要するいずれかの適切な適用において、遮断DNAを使用せずにハイブリダイゼーションプローブとして機能する。

10

20

30

40

50

#### 【0032】

本発明の別の実施形態は、続くFISH解析のために免疫磁気標識した細胞の保存におけるシステム、装置、および方法を提供する。本態様は、それを同定するために従前に使用したものと同一または同様のレポーター分子を利用した、個々の細胞の再解析を可能にする。したがって、免疫磁気選択および最初の蛍光標識後、注目する細胞を同定し、その位置を記録する。細胞の位置を固定し、次いで適切な処置を行う。あるいは、細胞の位置を固定し、後の時点で処置するために保管する。FISH適用には、試料をDNAの融解温度より高く加熱し、その結果、最初に標的細胞を同定するために用いたレポーター分子が失われる。蛍光FISHプローブをハイブリダイズさせ、核材料を再度蛍光標識するFISHの完了後、FISHプローブからの蛍光シグナルを検査するために注目する細胞を位置付ける解析器に試料を再度導入する。

#### 【0033】

本発明のもう一つの実施形態は、循環腫瘍細胞(CTC)のような希少循環細胞の同定における確認として、免疫磁気標識した細胞の再解析方法を提供する。したがって、特異性を増大させ、したがって患者内の疑わしいCTCが何であるかを癌細胞として確認する手段として、濃縮、免疫蛍光標識および続く*in situ*ハイブリダイゼーションを用いた確証的な解析後に細胞をさらに処置する方法ならびに技術。転移性癌腫患者で検出される形態学的に疑わしいCTC中で検出される細胞遺伝学的異常は、形態学的に明らかなCTCを有する患者または多量のCTCを有する患者に類似の予後診断を有する。本発明の一実施形態は、癌腫を診断され、CTCを有する、または骨髄中に播種性腫瘍細胞(DTC)を有する患者における確認アッセイを考慮しており、この場合、再発の危険性が高まっている。さらに、本発明の方法は、CTC中に、限定されるものではないが、Her1、Her2、アンドロゲン受容体(AR)、cMy c、またはP10のような薬物標的が存在するまたは存在しないかを評価する必要がある場合に適用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0034】

【図1】BAC開始DNAから反復を除去したDNAプローブの作製を示す模式図である。断片化した全ゲノム増幅ライブラリを変性し、過剰のCot DNAの存在下で再アニリングさせた。二本鎖DNAのDSN消化により、プローブ生成の鋳型として利用可能な一本鎖ユニーク配列の混合物がもたらされる。

【図2】DNA源からの特異的DNA配列の切断およびそのクローンの生成を示す模式図である。適切な由来源からの二本鎖DNAを変性し、特異的DNA配列をハイブリダイズさせる。二本鎖DNAのDSN消化、次いで、大きさによる一本鎖DNAの分離により、所望の一本鎖DNAの単離がもたらされる。第2の鎖の合成後、生成のために所望のDNAを適切なベクター内にクローニングする。

【図3】FISH解析における反復を除去したプローブを用いた比較を示す図である。白血球を、反復を含むHer-2プローブと、遮断DNAなしでハイブリダイズさせた。遮断DNAが存在しない場合は、プローブは反復領域を用いたハイブリダイゼーション後に核全体を標識する。パネルAは、反復を含むHer-2 FISHプローブと、遮断DNAなしでハイブリダイズさせた白血球を示す。パネルBは、核をDAPIで標識した後の同じ細胞を示す。パネルCは、2つのシグナルを重ね合わせ、Her-2の解像を欠いた図である。パネルDは、反復を除去したHer-2プローブを用いた白血球のFISH解析を示す。矢印はHer-2のユニーク染色体配列の位置を示す。パネルEは核をDAPIで標識した後の同じ細胞を示す。パネルFは、パネルDおよびEを重ね合わせ、細胞核内のHer-2部位の位置を可視化した図である。

【図4】パネルAは、黒色腫を特徴づけるために頻りに用いられる9p21を標的とする、P16(CDKN2A)で標識した反復を含まないプローブとハイブリダイズした染色体の拡大物を示す図である。2個の染色体が9p21の存在を示し矢印によって例示する。パネルBは、特定の種類の白血病を同定するために用いられる11q23を標的とする、MLLで標識した反復を含まないプローブとハイブリダイズした染色体の拡大物を示す図である。矢印によって例示するように、2個の染色体が11q23の存在を示す。

【図5】試料をFISH解析用に調製するために用いる固定およびハイブリダイゼーション装置の模式図である。免疫磁気濃縮および最初の蛍光イメージング後にFISH解析用に試料を調製するための小型かつ携帯型装置。コントロールパネル、電子機器、ポンプ、およびポワァー供給を試料カートリッジに関連して示す。

【図6】最初の蛍光イメージング後のFISHの基本的な工程の模式図である。試料カートリッジおよび磁気担体(黒いくさび状)の存在の断面図を示す。パネル1は、Cell Tracks Systemを用いた最初の蛍光イメージング後のカートリッジのイメージング面の内部表面に沿って配置された細胞を示す。パネル2は、緩衝溶液をFISH用に固定液で同時に交換することを示す。パネル3では、固定液を吸引して流体をカートリッジから除去する。パネル4は、カートリッジを乾燥させるために空気を強制的に加えることを示す。パネル5では、カートリッジを反転し、細胞を覆うだけの十分なFISHプローブを加える。パネル6は、ハイブリダイゼーションを可能にするための熱源上のカートリッジを示す。パネル7では、FISH試薬を洗浄して、パネル8でFISHシグナルの再走査および解析を可能にする。

【図7】カートリッジのチャンバ容量を縮小するための、プローブ伸長物を備えた、FISHカートリッジ用のストッパーの模式図である。

【図8】カートリッジの模式図である。反転したカートリッジおよび細胞の位置の断面図であり、FISH試薬はチャンバの低い試薬容量分布およびより小さな面を例示し、したがって下部表面全体に沿った細胞を覆うのに十分なだけの試薬を許容する。

【図9】最初に免疫細胞化学(ICC)によって、続いて第1、7、8および17染色体の存在に対するFISH解析によって同定した腫瘍細胞の代表的な画像である。パネルAは、そのICCシグネチャに基づいてソフトウェアによって同定したCTC候補のリストを示す。パネルBは、獲得した蛍光ICC画像を示す。パネルCは、同じ細胞腫瘍細胞の異数体シグネチャを実証する第1、7、8および17染色体の対応するFISHシグナルを示す。

【図10】5つの異なる蛍光色素について励起/発光フィルターを用いた、細胞の異なる焦点面での5つの蛍光画像を示す図である。パネルAはPEを用いた細胞の画像を示す。パネルBは、DAPIを用いた同じ細胞の画像を示す。パネルCは、APCを用いた同じ細胞の画像を示す。パネルDは、FITCを用いた同じ細胞の画像を示す。パネルEは、

10

20

30

40

50

Dy 415 を用いた同じ細胞の画像を示す。

【図 11】CTC を確認する、ICC および FISH 解析の結果を示す図である。パネル A は、疑わしい CTC が同定された ICC 走査の ICC 画像を示す。パネル B は、FISH プローブを用いた、対応する蛍光シグナルを示す。それぞれのプローブのシグナルの対応する計数をそれぞれの画像の横に示す；PE では 4 つ、APC は 1 つ、FITC では 4 つ、Dy 415 では 2 つである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

反復を除去した DNA プローブの作製

DNA はユニーク配列および反復配列を含む。反復配列は染色体全体にわたって出現し、これらの反復配列外の特異的領域またはユニーク配列を標的とする *in situ* ハイブリダイゼーションのようなハイブリダイゼーション反応を妨害する潜在性を有する。染色体、遺伝子または DNA 配列上の特異的配列の存在、量および位置を同定するためには、ハイブリダイゼーションプローブが注目する位置でのみハイブリダイズすることが重要である。ハイブリダイゼーションプローブ混合物中に反復配列が存在することにより結合の特異性が低減するので、方法では、反復配列をプローブから除去するか、またはプローブが標的上の反復配列とハイブリダイズすることを阻止する必要がある。たとえば、プローブと反復配列との結合を阻止するために、しばしば Cot-1 DNA をハイブリダイゼーション中に加える (US 5,447,841 号および US 6,596,479 号)。

【0036】

最近の寄稿では、反復配列を無効化することによってこの問題に対処している。Cot-1 DNA の使用は、利用可能な一本鎖反復配列と二重鎖構造体を形成し、したがって配列のこの部分とユニーク標的配列との非特異的結合の相互作用を最小限にする、Cot-1 DNA の能力に依存する。ハイブリダイゼーション工程中にユニーク標的配列を用いて、または事前会合工程でハイブリダイゼーション前に反復 DNA を遮断することにより、その相補的配列と二重鎖構造体を形成する反復セグメントと、そのユニーク標的セグメントとのハイブリダイゼーションに利用可能な標的プローブの一本鎖形態とを有する混合物がもたらされる。残念ながら、続く増幅または標識反応においてこの二重鎖の存在は、特にシグナルが非常に弱い場合に、非特異的ノイズの導入によってシグナルに影響を与える。反復配列を遮断する代替方法は、所望しない反復セグメントを反応混合物から除去することである。

【0037】

この阻止の、反復を除去した DNA プローブの作製を図 1 に示す。本発明の一実施形態では、デオキシリボ核酸分子を優先的に切断する二重鎖特異的ヌクレアーゼ (DSN) を利用する (参考として組み込まれている US 2005/0164216 号および US 6,541,204 号)。一本鎖 DNA と比較して核酸二重鎖ポリヌクレオチドを優先的に切断する酵素の能力は、非標的二本鎖 DNA を試料混合物から除去する手段を提供する。これらのヌクレアーゼがポリヌクレオチドの二重鎖形態を優先的に消化する能力は、ユニーク標的的特異的プローブの製造における潜在的な使用を提供し、遮断 DNA の妨害影響を排除し、迅速、効率的かつ対費用効果の高いその生成手段を提供する。

【0038】

本発明の実施で用いる開始 DNA は、典型的には、多数の DNA セグメントを含む 1 つまたは複数の DNA 配列の形態である。プローブ組成物の生成における個々の出発物質の最初の由来源は、直接標識したプローブの生成に記載されている (US 6,569,626 号)。最適には、開始ポリヌクレオチドの由来源を組織から精製し、限定されるものではないが、酵素処理 (制限酵素)、ポリメラーゼ、制限 DNase I 消化、リョクトウ制限ヌクレアーゼ消化、超音波処理、DNA の剪断のような任意の周知の技術を用いて、150 kb ~ 200 kb のセグメントへと断片化する。これらのセグメント断片の一部が、特定のユニーク標的配列中の 1 つまたは複数の DNA セグメントの少なくとも一部分と相補的となる。個々の DNA セグメントを、プラスミド構築体内にクローニングし、その

後細菌内に形質移入する方法などの、一般的に知られている方法によって増殖させる。クローン化断片を増殖させた後、単離された断片を表す個々のコロニーは、注目する配列の少なくとも一部分を含むと同定される。同定は、ハイブリダイゼーション、PCR、または市販ライブラリの確立されたデータベースの検索のような周知の技術によって行う。選択されたそれぞれのコロニーを増殖させ、染色体上の標的配列のセグメントに少なくとも部分的に相補的なユニーク断片を有する単離プラスミド構築体を得られる。例示的な標的配列には、HER-2、IGF-1、MUC-1、EGFR、およびARが含まれ、市販の供給者から入手可能であり得る（すなわち、BACクローン）。注目するクローン化断片を増殖および単離した後、それらからその反復ポリヌクレオチド配列を除去する。全遺伝子増幅（WGA）を用いて、断片を200～500bpのセグメントとして単離したプラスミド構築体から増幅する。市販のDOP PCRは、この手順のこの一部分の一実施形態とみなされる。Cot-1DNAを増幅後に、最初に95℃まで加熱して二本鎖ポリヌクレオチドを一本鎖状態に変性し、その後、65℃まで冷却して反復配列の選択的再アニーリングを行わせることによって、WGAライブラリプールと合わせる。その後、最適DSN条件下の二重鎖特異的ヌクレアーゼ（DSN）を、完全一致した核酸二重鎖を含むが残りのどの一本鎖セグメントにも影響を与えない、優先的に切断するデオキシリボ核酸分子に加える。二重鎖核酸の選択的切断は、DNA-DNA二重鎖およびDNA-RNA二重鎖の酵素消化によって行う。本発明の具体的な実施形態には、カムチャッカ・カニ（US10/845,366号）またはエビ（US6,541,204号）から単離したDSNが含まれるが、二重鎖構造体の任意の酵素的除去が本発明で考慮される。エンドヌクレアーゼに特異的なヌクレアーゼの使用では、二重鎖DNA主鎖中のリン酸ジエステル結合が加水分解され、ヌクレオチド配列に特異的でないという利点が提供され、したがって、ほとんどの注目する標的に適用可能である。DSN消化は、続く残りの一本鎖ポリヌクレオチドの増幅のための、実質的な量の核酸二重鎖の除去を提供する。本発明の一実施形態は、2時間、65℃でのDSN消化である。得られた組成物は、染色体上のユニーク標的配列の一部、ある程度の量の未消化の二本鎖DNA、および消化された塩基対に対応する一本鎖DNAを含む。好ましくは、遠心分離（すなわち、スピンカラムクロマトグラフィー）によって未消化のDNAを消化されたDNAおよびDSNから分離する。混合物は直ちに使用するか、または、標識およびin situハイブリダイゼーションでの使用などに続いて利用するために、精製した組成物を増幅する前またはその後、80℃で保管する。増幅後、得られた標的プローブ配列をPCRによって増幅し、90%～99%純粋な標的プローブ配列が得られ、これを、反復を除去したDNAと称する。

#### 【0039】

一本鎖ポリヌクレオチドを二本鎖から濃縮および単離することにおけるDSNの使用は、一本鎖の実体を二本鎖の汚染物質から分離することが望ましい任意の一本鎖ポリヌクレオチドの生成に適用可能である。これは、限定されるものではないが、遺伝子もしくは染色体を同定するための標識プローブの生成、核型決定または一本鎖および二本鎖ポリヌクレオチドのプールのパンニングに特に適切である。

#### 【0040】

生じたプローブは、組成物および生成のどちらも、本発明の実施形態とする主題に組み込まれている。本発明に記載した反復を除去したDNAは、FISHおよびすべての他の核酸ハイブリダイゼーションアッセイを含めたin situハイブリダイゼーションに有用である。本発明に記載した反復を除去したプローブを用いることで競合的結合の必要性が排除され、その結果、反応の特異性の増大および結合に必要なプローブの量の減少がもたらされる。

#### 【0041】

##### 二重鎖特異的ヌクレアーゼ方法

標的配列に対するハイブリダイゼーションプローブを作製するために、注目する配列を含むDNAを得る。注目する配列を含むDNAを得る方法は当業者に知られており、限定されるものではないが、組織または細胞からのゲノムDNAの単離、染色体の流動分別、

ハイブリダイゼーション、電気的、またはPCRによる染色体のクローン化断片のスクリーニングライブラリが含まれる。

【0042】

本発明の実施で用いる開始DNAは、任意の方法によって由来源から精製する。典型的には、開始DNAは、ゲノム、染色体、染色体の一部、または染色体のクローン化断片からなる。癌関連遺伝子の標的配列を含むことが知られている流動分別した染色体および細菌人工染色体(BAC)により、本発明に特に適用性が与えられる。例示的な標的配列には、HER-2、IGF-1、MYC、EGFR、およびARが含まれる。これらの配列を含むBACクローンは市販の供給者から入手可能である。

【0043】

注目する配列を含むDNAを同定して得た後、これらから反復ポリヌクレオチド配列を除去する。この過程は、注目する配列を含むライブラリを断片化および調製することから始まる。一方法は、クローン化断片を200~500bpの断片へとランダムに切断し、リンカー配列を付着させることで、後にPCRを用いてライブラリを増幅および再増幅するために使用することができる、GenomePlex(登録商標)全ゲノム増幅(WGA)方法(GenomePlex(登録商標)はRubicon Genomics, Inc.の商標である)である。この例では、断片化した増幅したライブラリをDNA源とみなす。

【0044】

反復配列を除去するために、DNA源を一本鎖状態に変性し、その後、反復配列がアニリングして二本鎖分子を形成し、ユニーク配列は一本鎖のままで保たれることを選択的に可能にする条件下で冷却する。その後、二本鎖反復断片を優先的に切断する一方で一本鎖ユニーク配列を切断しない二重鎖特異的ヌクレアーゼ(DSN)を加える。得られた混合物は、染色体上のユニーク標的配列の一部、ある程度の量の未消化の二本鎖DNA、および消化された塩基対に対応する一本鎖DNAを含む。好ましくは、スピンカラムクロマトグラフィー、フェノールクロロホルム抽出またはいくらかの他の同様の方法によって未消化のDNAを消化されたDNAおよびDSNから分離するが、分離は必要条件ではない。その後、反復を除去したライブラリをハイブリダイゼーションプローブとして用いるか、またはPCRを用いて再増幅して、より大量のプローブDNAを調製する。増幅後、得られた標的プローブ配列は90%~99%純粋な標的プローブ配列であり、これを、反復を除去したDNAと称する。

【0045】

前記のライブラリ断片化および増幅方法は限定することを意図せず、むしろ、断片化および増幅方法をどのように用いて反復を除去したプローブを作製するかの一例として役割を果たす。核酸を断片化および増幅する数々の方法が存在し、リンカー-アダプターPCR、DOP PCR、ローリングサークル増幅、転写媒介増幅が含まれ、すべての他の方法が本発明で考慮される。様々なライブラリの断片化および増幅の方法に適應するために、反復を除去したDNAを調製する上記方法のある程度の変形が必要となることが予測され、これらの変形も本発明に含まれる。

【0046】

本発明における1つの考慮は、二本鎖DNAを切断できるが、一本鎖DNAを切断できない酵素の使用である。本発明に含まれる酵素は、糖-リン酸主鎖の溶解、DNA二重鎖の一方もしくは両方の鎖の除去、または窒素塩基を除去してアプリン/アピリミジン部位を形成することを含めた任意の様式で二本鎖DNAを切断し得る。これらの酵素の非限定的な例には、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、制限酵素、ニックング酵素、DNA修復酵素、トポイソメラーゼ、DNAジャイレース、および相同組換えに関連する酵素が含まれる。本発明の具体的な実施形態には、すべて参考として組み込まれている、カムチャッカ・カニ(US10/845,366号)、エビ(US6,541,204号)、T7エンドヌクレアーゼI、およびイー・コリエキソヌクレアーゼIIIから単離したDSNが含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0047】

酵素濃度、消化時間、ならびに塩およびマグネシウムイオン濃度などの緩衝液条件が、二本鎖DNAに対するDSNの特異性に影響を与えることができる要素である。効率的な反復の除去を成すためにはこれらの条件の最適化が必要である。

## 【0048】

本発明における反復除去の効率および特異性は、変性および再アニーリングに用いる反応条件、ならびにDSNを用いた消化中に存在する条件に依存する。変性は、アルカリまたは加熱によって達成する。DNA再アニーリングの度合は、試料中に存在するDNAの濃度および再アニーリングにかかる時間に依存する。反復配列の選択的再アニーリングが起こるためには、反復配列がユニーク配列よりも高い濃度で存在していなければならない。特定のクローン中の反復配列 - 対 - ユニーク配列の比は、ゲノム全体にわたって領域ごとに異なる。様々な数の反復配列を有する領域にわたって除去過程を標準化するために、過剰の相殺DNAを反応に加える。加える相殺DNAの質量は所望の除去する反復の量に応じて変動し、好ましくはDNA源の質量の10~50倍である。本発明では、相殺とは、相殺配列とDNA源中の配列の一部分とのハイブリダイゼーションを可能にして相殺配列を有用にする、ヌクレオチド配列中で反復配列と十分に相同的な配列を含むいずれかの核酸または核酸類似体であると考えられる。本発明の一実施形態には、DNA源から反復配列を除去するために用いる相殺DNAとしてCot-1DNAが含まれる。

10

## 【0049】

再アニーリングのストリンジェンシーは本発明のもう一つの構成要素である。塩濃度および温度が、いずれかの再アニーリング工程のストリンジェンシーを決定する要素である。反復除去の度合は、この工程のストリンジェンシー条件を調節することによって制御する。ストリンジェンシー条件を調節して100%相同的でない配列間のある程度のアニーリングを許容することにより、反復除去の度合が改善される。塩濃度の範囲は5ミリモラー~1000ミリモラーのNaClであり、アニーリング温度の範囲は15~80である。

20

## 【0050】

一実施形態では、反復除去過程は、再アニーリングおよびDSN消化が逐次的に起こるように行う。したがって、DNAを変性し、アニーリングに最適化した条件下で一定時間冷却する。その後、反応条件を、DSN消化の特異性および活性を最適化する条件に変更する。もう一つの実施形態では、再アニーリングおよびDSN消化は、同一条件下で同時に起こる。

30

## 【0051】

また、混合物中の一本鎖または二本鎖の画分のどちらかに対する酵素の特異性を変化させるために、DNA源または相殺DNAを、酵素消化の前またはその間に化学的または物理的薬剤で処理することも、本発明の範囲内である。たとえば、イー・コリRecAタンパク質を一本鎖および二本鎖DNAの混合物に加える。このタンパク質は混合物中の一本鎖DNAをコーティングし、混合物中の二本鎖DNAの消化を可能にしつつ、一本鎖DNAをイー・コリRecBCDNaseから保護する(「Escherichia coli RecA protein protects single stranded DNA or Gapped Duplex DNA from degradation by RecBCDNase」。Williams, JGK, Shibata, T. Radding, CM Journal of Biological Chemistry、第246巻、第14号、7573~7582頁)。また、一本鎖または二本鎖DNA画分に対する酵素の特異性を変化させる修飾ヌクレオチドを用いてDNA源または相殺DNAを作製することも可能である。

40

## 【0052】

二本鎖からの一本鎖ポリヌクレオチドの濃縮および単離におけるDSNの使用は、一本鎖の実体を二本鎖の汚染物質から分離することが望ましい、任意の一本鎖ポリヌクレオチドの生成に適用可能である。これには、いずれかの所望しない配列をDNA源から除去す

50

ることが含まれる。これらの所望しない配列には、限定されるものではないが、反復配列、ユニーク配列、およびベクター配列が含まれる。この方法は、遺伝子もしくは染色体を同定するための標識プローブの生成、核型分析、または一本鎖および二本鎖ポリヌクレオチドのプールのパンニングに特に適切である。

#### 【0053】

##### 選択的結合方法

DNA源を変性し、反復配列のアニーリングを選択的に可能にすることによって、一本鎖または二本鎖DNA構造に優先的に結合する任意の薬剤を用いて反復配列をDNA源から除去する。このような薬剤の例には、限定されるものではないが、DNAまたはRNAポリヌクレオチド、酵素、抗体、DNA結合タンパク質、抗体とDNA結合剤との組合せ、ならびに天然または合成の化合物および分子が含まれる。DNA結合剤は、ユニーク配列または反復配列の陽性または陰性クロマトグラフィー選択を可能にする固体担体に、直接または間接的に連結してよい。一例には、一本鎖または二本鎖DNAに対するビオチン標識抗体を用いた、一本鎖および二本鎖DNAの分離が含まれる。ストレプトアビジンでコーティングした常磁粒子を用いて、所望の集団を分離する。あるいは、一本鎖または二本鎖DNAに優先的に結合するDNA結合剤に対するビオチン標識抗体を同じ様式で用いる。

10

#### 【0054】

##### 他の一本鎖または二本鎖特異的酵素

また、本発明は、反復除去の促進におけるDNA源または相殺DNAの修飾において一本鎖または二本鎖DNAに優先的に作用する任意の酵素を具体化する。非限定的な第1の例は、変性および反復との選択的再アニーリング後にDNAリンカーを二本鎖DNA集団に選択的に連結することである。反復配列を除去するために、このリンカーを磁気（または常磁）粒子に付着した相同的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。第2の例は、DNA源の変性および選択的再アニーリング後に存在する一本鎖DNAを選択的に環化させるために一本鎖DNA/RNAリガーゼを用いることである。次いで、得られた環を、ローリングサークル増幅によって増幅および濃縮する。

20

#### 【0055】

##### 反復配列の構造特異的分離

特異的プローブの生成方法に加えて、かつ二本鎖DNAからの一本鎖DNAの分離に基づいて、本発明は、当該技術分野で知られている任意の方法を考慮し、ここで、ユニーク配列からの反復配列の分離が反復配列またはユニーク配列のどちらか中にある程度の検出可能なDNA構造の確立に伴って起こり、この検出可能な構造を用いて一方の集団を他方から分離する。検出可能なDNA構造のいくつかの例には、限定されるものではないが、三重鎖または四重鎖DNA、ヘアピン、パンハンドル、フラップ、Z-DNA、ホリデイジャンクションおよび組換え中に形成された他の構造が含まれる。これらの構造は、注目する配列中に天然に存在するか、または核酸源もしくは相殺核酸のどちらかもしくは両方を修飾することによって誘導し得る。

30

#### 【0056】

##### 反復配列の選択的消化

反復配列をDNA源から除去するもう一つの方法は、断片化して増幅可能なDNAライブラリを、その認識配列が反復DNA配列中に存在することが知られている制限酵素で消化することである。消化されたDNA源をPCRによって再増幅した場合、残りのライブラリはユニーク配列について濃縮され、反復を含む配列が除去される。

40

#### 【0057】

##### 消化および選択的ライゲーション

反復を除去したプローブを調製するもう一つの方法は、標的DNAを、消化された配列上に異なるオーバーハングを残す2つの制限酵素で消化することである。第1の制限酵素は、好ましくは反復配列内で切断する酵素であり、第2の制限酵素は、反復配列内で切断しない酵素である。消化後、第2の制限酵素によって切断された配列の末端にリンカーを

50

選択的に付着させる。その後、これらのリンカー配列を用いて、反復配列が除去されたライブラリをPCR増幅する。得られた反復を除去したDNAは、組成物も生成も、本発明に組み込まれる。本発明に記載した反復を除去したDNAは、標的配列の特異的結合が所望される任意の種類の高ブリダイゼーションアッセイのプロープとして有用である。このような技術には、限定されるものではないが、ISH、FISH、CGH、スペクトル核型分析、染色体彩色、サザンプロット、ノーザンプロット、およびマイクロアレイが含まれる。ユニーク配列のみを含む高ブリダイゼーションプロープの生成は、本発明の一実施形態である。したがって、競合的結合の必要性が排除され、その結果、反応の特異性の増大、および結合に必要なプロープの量の減少がもたらされる。

#### 【0058】

DNAを所望の位置で切断するための二重鎖特異的ヌクレアーゼの使用。

二重鎖特異的ヌクレアーゼの使用は、DNAから特異的配列を切断することにおいて有用性を有する。図2は、本実施形態の模式図を示す。所望の配列を含む一本鎖DNAをDNA源から得る。所望の配列の両末端を同定するオリゴヌクレオチドを加え、二重鎖特異的ヌクレアーゼを導入して所望のDNAプロープをDNA源から切断する。サイズ排除によって所望のDNAプロープを分離した後、DNAの第2の鎖を合成し、クローニングして、DNAプロープ源がもたらされる。したがって、二重鎖特異的ヌクレアーゼを用いてDNA配列を特異的領域で切断する。この方法は、PCRによって増幅するには大きすぎる注目する断片をクローニングする場合、および断片が適切な制限酵素部位を欠く場合に最も有用である。その後、これらの断片を高ブリダイゼーションプロープとして用いるか、配列決定するか、または任意の他の目的のために用い得る。図2では、DNAの一方または両方の鎖にアニーリングし、注目する配列に隣接する、2つのオリゴヌクレオチドを設計する。注目する配列を含むDNAを変性し、過剰の隣接オリゴヌクレオチドの存在下で再アニーリングさせる。二重鎖特異的ヌクレアーゼを用いた消化により、オリゴヌクレオチドがアニーリングした部位でDNAが選択的に切断される。残りの一本鎖DNA分子をサイズによって分画して注目する配列を得る。DNAポリメラーゼを用いて注目する配列を二本鎖にし、プラスミド内にクローニングする。これにより、より大きなDNAポリヌクレオチドから注目する配列をクローニングまたはサブクローニングする可能性が作り出される。部位特異的切断の第2の例は、ベクターを選択的に消化することによる、プラスミドベクターからのクローン化断片の回収である。一例では、クローン化DNA断片を含むプラスミドを変性し、クローン化DNAを欠く過剰のプラスミドの存在下で再度アニーリングさせる。二重鎖特異的ヌクレアーゼを加えることによりプラスミド配列が切断され、一本鎖のクローン化DNAを無処置のまま残す。その後、残りの一本鎖DNAを、限定されるものではないが、配列決定またはサブクローニングを含めた当該技術分野で知られている任意の用途に用いる。

#### 【0059】

実施例1 - 反復を除去したDNAプロープを用いた、染色体または染色体の一部分の検出

UCSCゲノムブラウザソフトウェア (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) を用いたヒトゲノムの電子スクリーニングによる、Her-2遺伝子についてのプロープとして用いるために、BACクローンCTD-2019C10を選択し、クローンはInvitrogen (カリフォルニア州Carlsbad) から得た。BAC DNAはQiagen (カリフォルニア州Valencia) からのLarge Constructキットを用いて単離した。DNA源は、製造者の指示に従って、10ナノグラムの精製BACおよびGenome Plex (登録商標) 完全全ゲノム増幅キット (Sigma-Aldrich、ミズーリ州St. Louis) を用いて調製した。2マイクログラムのCot-1DNA、1x二重鎖特異的ヌクレアーゼ緩衝液 (Evr ogen、ロシア、Moscow)、0.3モラーのNaCl、および66ナノグラムのDNA源を含む除去混合物を調製した。除去混合物を5分間、95 で変性し、氷上に10秒間置き、1単位の二重鎖特異的ヌクレアーゼ (Evr oge

10

20

30

40

50

n、ロシア、Moscow)を加えた。試料を65℃で90分間インキュベートした。GeneLute PCRクリーンアップキット(Sigma-Aldrich、ミズーリ州St. Louis)を用いて5マイクロリットルの反応を精製し、精製したDNAを50マイクロリットルのアリコートで溶出させた。その後、15マイクロリットルの除去した試料を、全ゲノム再増幅キット(Sigma-Aldrich、ミズーリ州St. Louis)を用いてPCRによって再増幅した。記載のようにPCR反応を精製し、そのA<sub>260</sub>に基づいて定量した。10ナノグラムの第1の再増幅混合物を第2の再増幅の鋳型として用い、記載のように精製した。この物質を200~500塩基対の平均分子量まで超音波処理し、エタノール沈殿し、蒸留H<sub>2</sub>Oに再懸濁させた。Kreatech ULS Platinum Bright Red/Orangeキット(Kreatech、オランダAmsterdam)を用いて生じたDNAを蛍光標識した。比較のために、反復を有するプローブも、除去過程で使用したDNA源から作製した。

10

#### 【0060】

75%メタノール、25%酢酸で固定することによってフィトヘマグルチニンで刺激した白血球をFISH用に調製し、標準的な技術を用いてスライド上にスポットした。反復を除去したプローブとDNA源プローブとを2ng/μlで、Cot遮断DNAなしで、50%のホルムアミド、10%の硫酸デキストラン、および1×SSCからなるハイブリダイゼーション緩衝液中でハイブリダイズさせた。スライドおよびプローブを80℃で3分間同時に変性し、終夜、37℃でハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、試料を5分間、50×、0.5×SSC、0.001%のSDSで洗浄した。試料を0.5μg/mlのDAPIで5分間対比染色し、50%のグリセロールに載せた。画像は、ローダミンおよびDAPIに適したフィルターを備えたLeica DM-RXA蛍光顕微鏡(Leica Microsystems、イリノイ州Bannockburn)を用いて得た。画像は、Photometrics SynSys白黒デジタルカメラ(Photometrics、アリゾナ州Tucson)を用いて得た。DAPIシグナルを増強し、Leica FW4000ソフトウェアを用いて重ね合わせた画像を作成した。比較のために、Her-2の画像は編集しておらず、同じカメラ設定でキャプチャした。図3は画像の比較を示す。パネルAは、反復を含むDNA源をハイブリダイゼーションプローブとして用いた場合、プローブは核全体を染色し、Her-2に特異的なシグナルは見られないことを示す。反復を除去したDNAをプローブとして用いた場合(パネルD)、Her-2遺伝子に対応する特異的シグナルは明白に検出可能である(矢印)。

20

30

#### 【0061】

実施例2 - 本発明に従って反復配列を除去したDNAプローブは、手順中に遮断する反復を含む従来のDNAプローブと比較して、蛍光標識したDNAプローブの可視化を向上する。

蛍光標識したプローブの信号対雑音比は、本発明に従って得た反復を除去したDNAプローブを用いた場合に有意に向上する。この比較のために、当業者に知られている9p21および11q23を標的とするDNAプローブを用いた。これらのシグナルは、シグナルが比較的小さく、識別が困難だということが問題である。本発明に従ってプローブから反復配列を除去し、グアニンのN7位と配位結合を形成する白金基に連結した蛍光レポーター分子を用いて、プローブを蛍光標識した(ULS labeling、Kreatech、Amsterdam)。図4のパネルAおよびBは、それぞれローダミンで標識した9p21およびdGreenで標識した11q23のプローブとハイブリダイズした染色体の拡大物を示す。図中に矢印で示したように、反復を含まないプローブからの明白なシグナルは、反復を含まないプローブから識別することができる。したがって、これらのプローブの存在の可視化は、従来方法により得られたプローブを用いて得られるものより優れている。この可視化の向上により、黒色腫(パネルA、9p21、P16(CDKN2A))および白血病(パネルB、11q23、MLL)のより正確な示差的診断がもたらされる。

40

#### 【0062】

50

## 続く解析のための免疫磁気標識した細胞の保存

免疫細胞化学 ( ICC ) イメージング解析中、細胞は、外部磁石によって適用される磁力によって、カートリッジの光学的に透明な表面に磁氣的に保持される ( US 5 , 4 6 6 , 5 7 4 号 ) 。装置の計算した保持力は約  $10^{-9}$  ニュートンである。この保持力は、限定されるものではないが、細胞上の強磁性流体粒子の数、磁気粒子の大きさ、および外部磁石によって適用される磁場勾配を含めたいくつかの変数に依存する。細胞をガラス表面に固定するためには、緩衝溶液を除去し、メタノール、アセトン、酢酸、当該技術分野で知られている他の薬剤およびこれらの組合せなどの細胞固定溶液によって置き換えなければならない。解析する細胞を移動または除去しないように、緩衝溶液の吸引は注意深く完了しなければならない。流体を試料チャンバから吸引する際、流体のメニスカスが磁氣的に保持された細胞に剪断力を適用する。これらの剪断力は磁気保持力よりも大きい場合がある ( 計算すると  $10^{-9}$  ニュートンを超える ) 。そのような場合、細胞をカートリッジ内で移動させるか、または緩衝溶液と共にカートリッジから吸引されるように移動させる。流体の剪断力は、カートリッジのガラス部分を渡って移動する速度、吸引プローブとガラス表面との距離、吸引する流体の速度および粘度ならびに他のパラメータの関数である。さらに、吸引後、固定溶液を加える前にガラス表面を乾燥させることは、カートリッジ内の細胞に負の効果を与える可能性がある。加えて、固定溶液を空のカートリッジに加えることは、細胞の分布をさらに乱す。

## 【 0 0 6 3 】

したがって、本発明の一態様は、細胞をメニスカスによって引き起こされる流体剪断力に供さずに緩衝溶液を固定流体に交換する方法を提供することによって、これらの問題に対処する。固定溶液をカートリッジの底部に分注すると同時に、置き換えられる緩衝溶液をカートリッジの上部から吸引する。固定液および緩衝液のある程度の混合が2つの流体の境界で起こるが、ガラス表面への必要な細胞固定を完了するために十分な固定溶液を分注する。この流体置換は、分注した固定溶液と置換した流体の吸引との流動のバランスをとり、また、免疫磁気によりガラスの表面に付着した細胞を保つ磁気保持力によって、カートリッジ中の細胞に与えられる剪断力を最小限にして起こる。本発明の好ましい一実施形態では、カートリッジから溢れさせずにカートリッジ内の約 100 マイクロリットルの流体を置換することにおいて、US 6 , 8 6 1 , 2 5 9 号 ; US 1 0 / 9 8 8 , 0 5 7 号 ; および US 7 , 0 1 1 , 7 9 4 号 ; US 1 1 / 2 9 4 , 0 1 2 号に記載の試料チャンバの入口面積を利用する。カートリッジの開口部は、固定溶液を分注して緩衝溶液を置き換えて、吸引プローブからの緩衝溶液の除去を可能にするために十分である。細胞が固定流体によって固定された後、細胞を乱す危険性なしに流体を除去し得る。この手順は、調製過程にばらつきを導入する可能性のあるオペレータのインタラクションを最小限にして、続く F I S H または他の解析のための試料の自動処置を可能にする。

## 【 0 0 6 4 】

本発明は、ベンチトップ装置での ICC イメージング後にカートリッジ中の細胞の完全かつ一貫した固定を可能にする自動装置を記載し、続く F I S H イメージング解析のための、ICC後の標的細胞の調製の全工程を組み込む。図5は、個々の構成要素の相対的な位置を示す、装置の模式図を示す。したがって、緩衝液の除去および固定のために、ICC イメージングを行った試料を含むカートリッジを装置内に入れる。ピペットと組み合わせたシリンジおよびシリンジポンプにより、緩衝液を吸引して固定液を分注する。図6は、細胞の固定およびハイブリダイゼーションに関与する工程の模式図である。本発明の一実施形態では、流体の除去および添加によって示される力による細胞の動きを最小限にするために、緩衝液の除去および固定液の添加を同時に行う。固定は、すべての流体をカートリッジから除去し、続いて固定試薬の添加および除去に用いたものと同じピペットを用いてカートリッジ内に空気流動を強制することによってカートリッジを乾燥させることによって、完了する。固定および乾燥後、カートリッジを保管するか、または直ちに F I S H もしくは他の追加の解析に使用する。固定液に最適な混合物は標的の実体 ( すなわち、DNA、RNA、タンパク質 ) に応じて異なる。

## 【0065】

## F I S Hの固定プロトコル

細胞を上部表面上に固定し、無処置のまま残し、F I S Hプローブが接近可能にするためには、以下のプロトコルを開発し、自動ベンチトップ装置に実装する：

1．250マイクロリットルの固定液をカートリッジの底部から分注する（カートリッジは立位）。

2．上部から250マイクロリットルを吸引し、廃棄する。

3．250マイクロリットルの新しい固定液をカートリッジの底部から分注することを繰り返す。

4．すべての流体をカートリッジの上部から吸引する。

5．カートリッジに空気を流すことによってカートリッジを乾燥させる。吸引/分注に用いたピペットを空気流動にも用いる。

10

## 【0066】

## 容量の縮小

抗体またはポリヌクレオチドプローブの費用およびそれらを高濃度で用いることが必要であることから、高濃度を用いることによるコストが非常に少量の試薬しか用いないことによって相殺されるように、反応を非常に小さな閉ざされた容量内で実施する（たとえば5マイクロリットル～25マイクロリットル）。US6,861,259号；第10/988,057号；およびUS7,011,794号；第11/294,012号に記載の試料カートリッジを、チャンバ内での固定後の反応器として用いる。これらのカートリッジでは、細胞を固定するチャンバの実際の容量は320マイクロリットルである。したがって、固定した細胞を*in situ*ハイブリダイゼーションで解析する必要があるが、ほとんどのプローブを高濃度の320マイクロリットル加えることは高価かつ非現実的である。

20

## 【0067】

この問題に対処するために、加えたプローブの容量の縮小と共に、細胞を固定したカートリッジの光学的に透明な表面の表面全体にわたって均一なプローブ混合物の分布が必要である。この方法は以下によって達成する：

1．カートリッジ内に物体を挿入して容量を縮小する。

2．カートリッジが水平位にあり、細胞の面が下側にある場合に（底部に光学的観察面）、十分に大きな容量であるが、細胞を固定した全表面にわたって320マイクロリットルよりも小さい容量を用いる。

30

3．小さな容量、および試薬の密度よりも低い密度を有する流体を用いる。低密度の流体は試薬の上方に浮き、試薬が表面全体にわたって均一に拡大することを可能にする。

## 【0068】

第1の可能性の例として、ストッパーのプローブ末端に伸長物を導入して、その部分がチャンバの全長を伸長するようにする（図7）。伸長物はチャンバの容量の約1/3を満たす。伸長物の直径は、チャンバの開口部を通して滑るような寸法、直径2.36mmである。伸長物は、既存のプラグのモールド上に新しいプラグ全体をモールドすることによって、または固体金属棒をプラグの中心線に挿入することによって作製する。材料は、たとえば、316ステンレス鋼、ポリプロピレンまたはインコネル625など、試薬に対して不活性でなければならない。プラグの上部分を熱可塑性プラスチックでオーバーモールドすることは、挿入中に形状を維持するための適切なプラスチック硬度計を確実にするため、かつ液体の密封およびプラグの固定を維持するためにチャンバ内に配置した際に必要である。さらに、プラグおよび伸長物は、所望により、過程中にチャンバ内の温度を監視するために、中央の穴から出し入れすることができる。プラグはさらに、取り外して適切な洗浄後に再使用するよう設計されている。

40

## 【0069】

第2の実施形態を図8に示す。50マイクロリットルの容量のF I S H試薬が、カートリッジの上部表面全体を覆うのに十分である。完全な反応を確実にするためにこの容量が

50

必要であり、これは試薬の粘度および疎水性に依存する。試薬の添加後、試薬への曝露をさらに確実にするためにカートリッジを水平位に置く。

【0070】

1つの他の実施形態は、第2の実施形態を、試薬容量をさらに縮小して組み込む。記載のように試薬を注入した後、より低い密度の余剰の流体を注入する。より低い密度の流体は試薬の試薬の上方に浮くので、表面全体にわたってより完全な反応となる。試薬の構成成分に応じて、25マイクロリットルの試薬の容量が得られる。

【0071】

免疫磁気標識した細胞の再解析

染色体異数性は遺伝子障害、特に癌に関連している。これらの染色体異常の、特に *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を用いた検出を提供する診断方法が利用可能である。組織または細胞試料における ISH および免疫細胞化学 (ICC) の適用はよく確立されているが、単一細胞における ISH および ICC の同時解析に診断上有効な方法を確立する明らかな必要性が存在する。本発明の一態様は、個々の細胞におけるこれらの染色体異常の検出を提供し、これは、対費用効果および特異性の高い手段によって形態学的に疑わしい癌細胞を確認することに関する。

10

【0072】

本発明の一態様は、濃縮および免疫細胞化学的 (ICC) 解析後の、希少細胞のさらなる処置を提供する。たとえば、上皮細胞のような循環希少細胞は、疑わしい癌細胞として同定されている (US 6,365,362号; US 6,645,731号; および US 11/202,875号は参考として組み込まれている)。疑わしい細胞は、特異的細胞抗原および核酸標識によって同定する。これらの疑わしい細胞の確認は、次いで、同定した疑わしい細胞内の染色体変化 (すなわち、異数性) を評価するために用いる染色体および/または遺伝子のどちらかを定義する、特異的ユニーク標的配列の発現によって決定される。したがって、本発明の一実施形態には、ICC染色と、続いてCTCを定義する選択された染色体の群に対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) による確認との組合せが含まれる。

20

【0073】

癌を確証するアッセイは、Cell Tracks (登録商標) Auto Prep (登録商標) および Cell Tracks (登録商標) Analyzer II System (Immunicon Corporation) によって提供され、US 6,365,362号にさらに記載されているように、循環腫瘍細胞の免疫磁気濃縮および蛍光イメージングを行った後、特異性の増加を提供する。確証的な試験は、疾患の段階にかかわらず1つまたは複数のCTCを癌細胞として指定することを可能にし、したがって、試料をCTCに対して陽性と呼ぶ閾値が低下する。本発明の一実施形態は、ICCで決定された疑わしいCTCを確認するために、第1、7、8および/または17染色体中の異数性を評価することである。さらなる実施形態には、治療標的が存在することまたは存在しないことを検出するために、限定されるものではないが、HER-2、IGF-1、MYC、EGFR、およびアンドロゲン受容体 (AR) のような個々の遺伝子の検出が含まれ、したがって正しい治療の選択を行う手段が提供される。

30

40

【0074】

したがって、自動化および標準化された血液試料の処置方法は、ICCによる循環上皮細胞の同定を提供する。分配した血液試料からの吸引した血漿を、標的細胞集団に特異的な抗体 (すなわち、EpCAM陽性) にコンジュゲートした強磁性流体試薬と合わせる。これらの細胞を、外部から適用した磁場によって免疫磁氣的に採取し、非標識細胞の分離および除去が可能となる。

【0075】

標的細胞を分離した後、画像提示装置を用いたイメージング解析のためにこれらを使い捨てカートリッジに分注する (US 6,790,366号およびUS 6,890,426号)。この装置は、続くICCイメージングのために標識した細胞をチャンバの光学的に

50

透明な表面に沿って配向させる磁場を及ぼすように設計されている。

【0076】

ICCイメージング後、適切なアルゴリズムを用いて疑わしい細胞を同定する。疑わしい細胞の画像をユーザに提示し、ユーザが提示された疑わしい細胞が何であるかの最終決断を行う。疑わしい細胞の画像およびチャンバの光学的に透明な観察面に沿ったその相対的な位置を、後に使用するために記録および保管する。ICCイメージング単独では、5個未満のCTCを有する血液試料の臨床的有意性を評価するため、または疑わしい癌細胞に関する詳細な遺伝情報を提供するための特異性を欠くので、完全なプロフィールを提供し、スクリーニング、疾患の再発の評価、および全体的な生存を含めた診断的解析に用いることができる確証的な機構を確立するためには、個々の疑わしい細胞に対する複数パラメータ遺伝子プロファイリングを用いた解析が続いて必要である。本発明の一実施形態では蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)を複数パラメータ遺伝子解析として利用するが、他のプロフィール評価も考慮される。これにより、観察面に沿って存在する個々の細胞の表現型および遺伝型のプロフィール評価がどちらも提供される。

10

【0077】

FISHは、DNAの融解温度を超える温度およびICC標識と適合性のない試薬を必要とする。ICCおよびDNA標識のほとんどはFISH手順を乗りきれず、すべてのシグナルが処置中に失われる。したがって、FISH解析に興味深い細胞と同定された細胞は、その位置を辿ることができない。したがって、ICC画像が得られた後、続く複数パラメータ遺伝子解析(FISH)またはICC標識が失われる他の種類の解析のために、光学的に透明な観察面に沿った細胞の位置が維持される検出方法の必要性が存在する。これは、部分的に、細胞の損失または表面に沿った実質的な移動がまったくなくICC画像が得られた後、細胞を光学的に透明な表面上に固定することによって成される。したがって、FISH試薬の添加後、カートリッジをホットプレートに載せ、固定細胞を有する表面をホットプレートと接触させる。アッセイの種類に応じて、ホットプレートを2~48時間実行する異なる温度サイクルでプログラミングする。温度サイクルの完了後、過剰のFISH試薬をカートリッジから除去する。固定した細胞の核を可視化するために、カートリッジにDNA標識を含む緩衝溶液を満たす。用いたDNA標識に応じて、標識はカートリッジ中に残るか、染色後にカートリッジから洗い流される。

20

【0078】

次に、2回目の走査のためにカートリッジをCellTracks(登録商標)Analyzer IISystemに戻す。1回目のICCイメージング解析中に上部表面上に存在していた細胞は固定されていたので、同じ細胞はカートリッジ内で同じ相対的な位置のままである。イメージングシステム(CellTracks(登録商標)Analyzer IISystem)に対するカートリッジのシフトを評価するために、2回目の走査の画像中の核の位置を、1回目のICC走査の画像中の核の位置と比較する。互いに対するこれらの画像のシフトは、畳み込みアルゴリズムを用いて決定する。このシフトを決定した後、特異的な注目する細胞をそのICC画像に基づいてリストから選択し、2回目の走査のFISH後にカートリッジの表面上に再配置することができる。次に、様々なFISHプローブの蛍光画像が得られる。

30

40

【0079】

図9は、ICCによって同定し、第1、第7、第8および第17染色体の存在についてプロービングした腫瘍細胞の代表的な画像を示す。パネルAは、ソフトウェアによってサイトケラチン(上皮由来の細胞中に存在する細胞骨格タンパク質)陽性およびDAPI(核酸染色)陽性として同定されたCTC候補のリストを示す。ハイライトした事象の対応する画像は、CTCの定義(サイトケラチン陽性、CD45陰性、DAPI陽性の事象および細胞の形態的外観)が確認されたので、ユーザによってCTCとして同定された。10x対物レンズを用いて撮影した4つの画像をパネルBに示す。左上の画像は核のDAPI染色を示し、左下の画像は細胞質のサイトケラチン染色を示す。陽性染色の欠如によって例示されるように、CD45染色およびFITC染色は欠如している。細胞を保存し、

50

第1、第7、第8および第17染色体についてセントロメアプローブのプロービングを行った後、カートリッジの上部表面の画像を再度獲得し、パネルCに、第1、第7、第8および第17染色体のプローブの蛍光シグナルをパネルBに示す細胞と同じ細胞について示す。2個のコピーの第1染色体、3個のコピーの第7染色体、4個のコピーの第8染色体および2個のコピーの第17染色体が明白に視認でき、これは、細胞が異数体であることを実証しており、実際に癌細胞であることが確認された。

#### 【0080】

図10に示す画像は、10x、NA0.5プランアクロマート対物レンズを用いて獲得した。解像度はほとんどのセントロメアプローブには十分であるが、遺伝子特異的プローブ、たとえばHER-2およびEGFR FISHプローブには不十分である。この理由から、ICC画像収集に用いる対物レンズ10x、NA0.5対物レンズを、カートリッジの透明な上部表面の光学的厚さに対して補正した40x、NA0.6対物レンズに交換する。高いNAの対物レンズの使用により、注目する細胞の3Dイメージングが可能となり、選択した細胞中のFISHプローブで標識した配列の正しいコピー数を確信的に決定することが可能となる。注目する特異的細胞の光学軸に沿った様々な焦点面での複数の画像を獲得し、次いで細胞の3D再構成を行う。図10は、5つの異なる蛍光色素について励起/発光フィルターを用いた、細胞の5つのそのような切片を示す。パネルAはPEの5つの切片を示す。切片#2では2つのシグナルしか視認できないが、切片#3では3つのシグナルが視認できる。パネルBはDAPI染色の5つの切片を示す。パネルCのAPC切片では、切片#2は1つのシグナルを示す。パネルDのFITC切片では、切片#3は2つのシグナルを示し、切片#4は2つの異なるシグナルを示し、このプローブの合計が4つとなる。パネルEでは、Dy415切片は、切片#2で1つのシグナルを示し、切片#3で2つのシグナルを示す。画像から、プローブが核の様々な部分に位置し、シグナルの計数に1つの焦点面しか用いないことは妥当でないことが明らかである。図11、パネルAは、図10からの画像の積み重ねとして提示するCTCの蛍光ICC画像。パネルBでは、それぞれの蛍光色素の切片を加えて平均強度が提示され、したがって、画像のスケールがとられて強度レベルの範囲全体が使用され、これは計数を容易にする。それぞれのプローブのシグナル数の計数をそれぞれの画像の横に示す(すなわち、PEで4つ、APCで1つ、FITCで4つ、dy415で2つ)。

#### 【0081】

本発明の主題は癌細胞の検出に限定されず、他の細胞種を特徴づけるためにも使用できることを理解されたい。細胞遺伝学的異常の検出に頻繁に追求される一細胞種は、母体血中の胎児細胞である。このような細胞を濃縮するためには、胎児細胞上に高頻度で存在し、母体細胞上に低頻度で存在するマーカーを標的とする必要がある。頻繁に追求されている一細胞種は有核赤血球である。すべての有核赤血球上に存在するマーカーは、たとえば、トランスフェリン受容体(CD71)である。強磁性流体と連結した場合、有核赤血球は、CellTracks(登録商標)Autoprep(登録商標)Systemを用いて全血から再現性よく濃縮される。濃縮した細胞は、胎児有核赤血球、母体有核赤血球、活性Tリンパ球、未熟網状赤血球および免疫磁気濃縮によって持ち越された他の細胞を含む。ここで、濃縮した細胞集団を、胎児由来および母体由来の細胞を識別するマーカーを用いて染色する。マーカーのそのようなパネルの1つは、解析から白血球を排除するためのCD45と、胎児赤血球中に存在するが母体赤血球中には稀にしか存在しないヘモグロビンF、成人赤血球中にのみ存在する炭酸脱水酵素、および細胞の核を同定するためのDAPIとを、組み合わせて使用することである。CellTracks(登録商標)Autoprep(登録商標)Systemを用いて細胞を再現性のよい様式で染色する。抗原の一部は細胞内にあるので、抗体が細胞膜を通過するためには細胞を透過処理する必要がある。透過処理に用いる薬剤は未熟網状赤血球も溶解し、CD71および手順にわたって持ち越された残存赤血球を使用することによって特異的に選択される。様々なレポーター分子を有するプローブを用いて細胞を染色した後、染色した細胞を含むカートリッジをCellTracks(登録商標)Analyzer II Systemに入れる。

このシステムは、胎児有核赤血球候補を D A P I <sup>+</sup>、C D 4 5 <sup>-</sup>、胎児ヘモグロブリン <sup>+</sup>、炭酸脱水酵素 <sup>-</sup> の事象として同定する。ユーザは、これらの事象が胎児有核赤血球に典型的なすべての特徴を確かに有することを確認することができる。システムが胎児有核赤血球の位置を記録した後、前記のようにカートリッジを空にし、細胞遺伝学解析のために細胞をプローブとハイブリダイズさせる。比較的頻繁な細胞遺伝学的異常を同定するために典型的に用いるプローブは、X、Y、第13、第18および第21染色体を認識するものである。1回目のICCイメージング解析中に上部表面上に存在していた細胞は固定されており、同じ細胞はカートリッジ内で同じ位置のままであるので、細胞を染色した後、カートリッジをCell Tracks (登録商標) Analyzer II Systemに再度挿入する。システムは事象に戻り、X、Y、第13、第18および第21染色体を同定するために用いた蛍光色素の画像を撮影する。その後、ユーザがそれぞれの染色体のコピー数を評価し、胎児の性別を決定し、染色体のコピー数が細胞遺伝学的異常の存在を示唆するかどうかを決定する。

10

20

30

40

50

#### 【0082】

実施例1 - CTC同定後の細胞遺伝学的異常の検出。

7.5 mLの血液からのCTCが、Cell Search System (Veridex, LLC)を用いてEpCAM抗原を標的とした免疫磁気濃縮後に、サイトケラチン<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>有核細胞として同定された。CTCはCell Tracks (登録商標) Analyzer (Immunicon Corporation)によって同定し、細胞はカートリッジの上部表面に沿って磁氣的に保持されている。細胞遺伝学解析には、細胞の最初の位置を維持したまま、カートリッジ中の流体を除去して細胞を固定した。第1、7、8および17染色体に対する蛍光標識したプローブをカートリッジ内に導入し、細胞とハイブリダイズさせた。固定およびハイブリダイゼーション過程により、CTCの同定に用いた蛍光標識が除去される。ハイブリダイゼーション後、カートリッジをCell Tracks (登録商標) Analyzerに再度入れ、2回目の解析を行った。その後、1回目の走査で同定されたCTCの蛍光画像を、2回目の走査で得られた4個の染色体標識のそれぞれからの蛍光画像と合わせた。1回目の走査で同定されたそれぞれのCTCについて、第1、7、8および17染色体の数を計数した。CTCを取り囲む白血球中に検出された染色体の数を内部対照として用いた。転移性癌腫に罹患している8名の患者からの7.5 mLの血液のうち、1~7個のCTCを同定した。2個を超えるまたは2個未満のコピー数の第1、7、8または17染色体が、8名の患者全員で検出された。染色体異常の不均一性は、異なる患者のCTC間だけでなく、同一患者のCTC間でも検出された。検査した21個のCTCのうち、77%が染色体異常を示し、大多数が染色体のコピー数の増加を示していた。対照的に、80%を超える検査した白血球で2コピーの染色体が示され、染色体コピー数の増加を示したものは存在しなかった。

結論：CTCの細胞遺伝学組成物は、同定した後に評価することができる。染色体異数性CTCの存在は、患者の状態の結果に関する情報を提供し、臨床成績の予後的指標を提供する。さらに、CTCの遺伝子変化は、現在および将来のがん治療の指標を提供する。

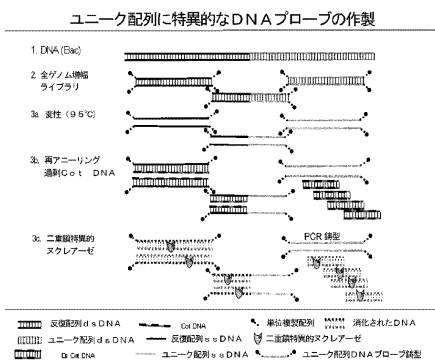
#### 【0083】

実施例2 - 治療の成功を予測するためのCTCに対する抗癌標的の評価。

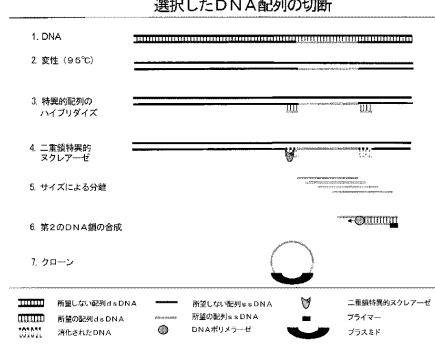
Cell Search System (商標)は、転移性癌腫に罹患している患者の血液中の腫瘍細胞の存在が乏しい生存の見込みに関連していることを実証するために、多施設の先見的研究で用いられている。これらの研究において1サイクルの治療後に循環腫瘍細胞(CTC)の排除に成功しなかったことは、これらの患者が無益な治療を受けていることを強く示唆している。腫瘍に対する治療標的の存在の評価により、適切な治療選択が可能となるはずである。治療の開始前に抗癌標的をCTCで同定する。7.5 mLの血液からの細胞が、EpCAM免疫磁気選択後にサイトケラチン(CK)<sup>+</sup>、CD45<sup>-</sup>および有核と同定された。疑わしいCTCを同定し、カートリッジの上部表面に局在化させて磁場によって保持した。HER2、IGF-1、Bcl-2およびEGFRのような、既知の治療に関連する治療標的を認識する蛍光標識した抗体をCTCで評価する。次いで、

細胞遺伝学解析のためにCTCを保存する。カートリッジ中の流体を除去した後、細胞を固定し、プローブハイブリダイゼーションのために最初の位置を維持する。システムがその最初の位置を知っているので、注目するプローブの存在について細胞を再検査することができる。結果は、第1、7、8および17染色体とのハイブリダイゼーション前および後のCTCおよび白血球を示す。

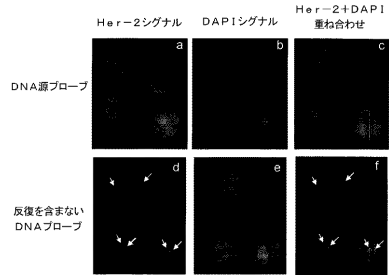
【 図 1 】



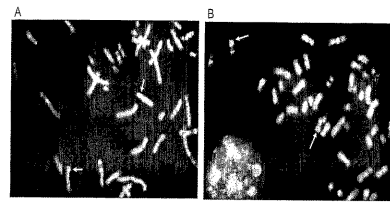
【 図 2 】



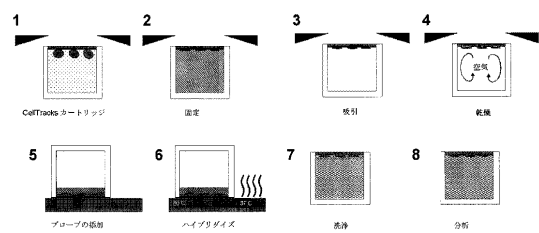
【 図 3 】



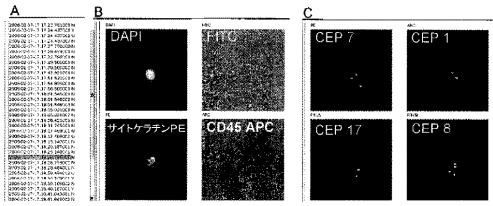
【 図 4 】



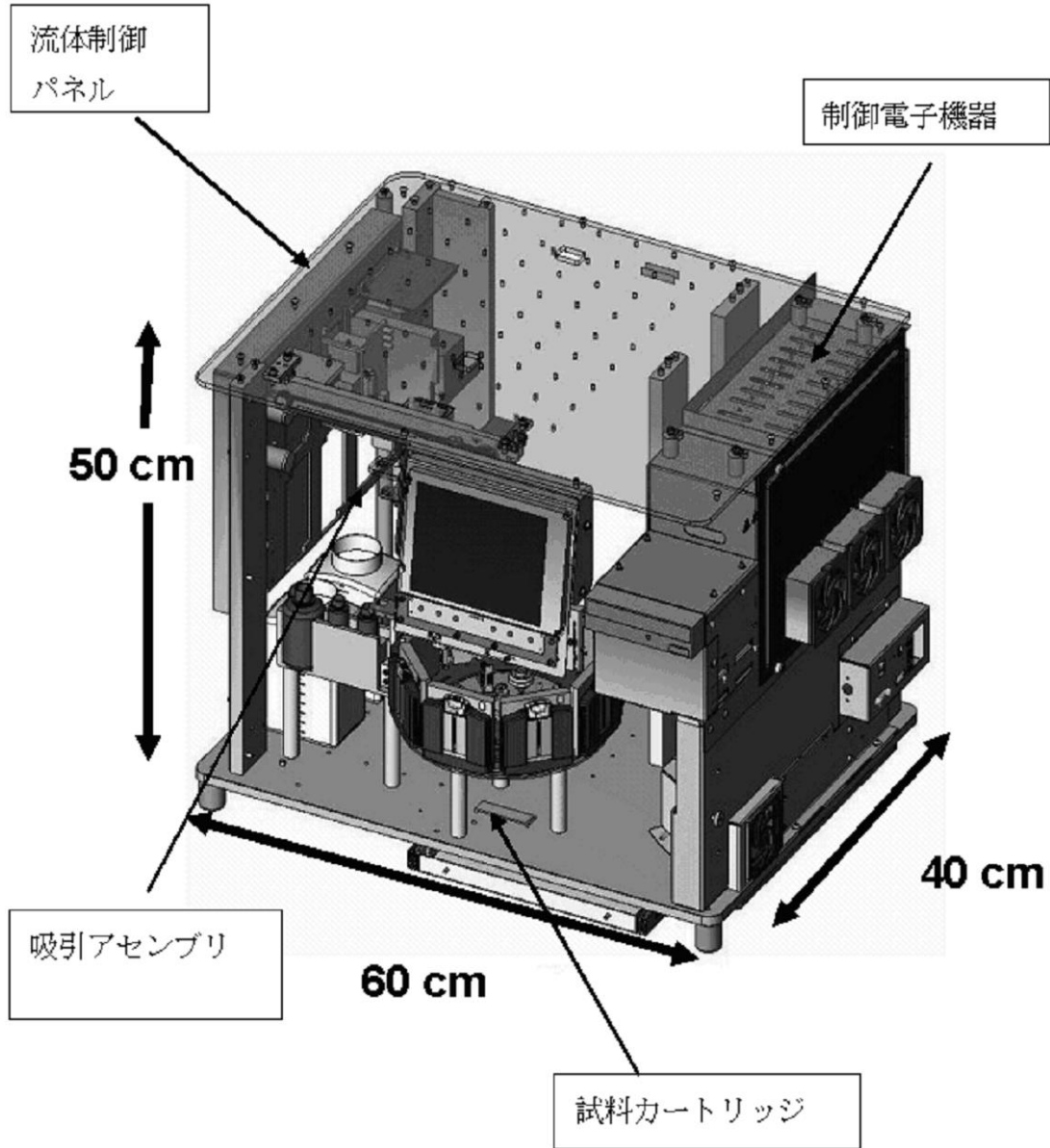
【 図 6 】



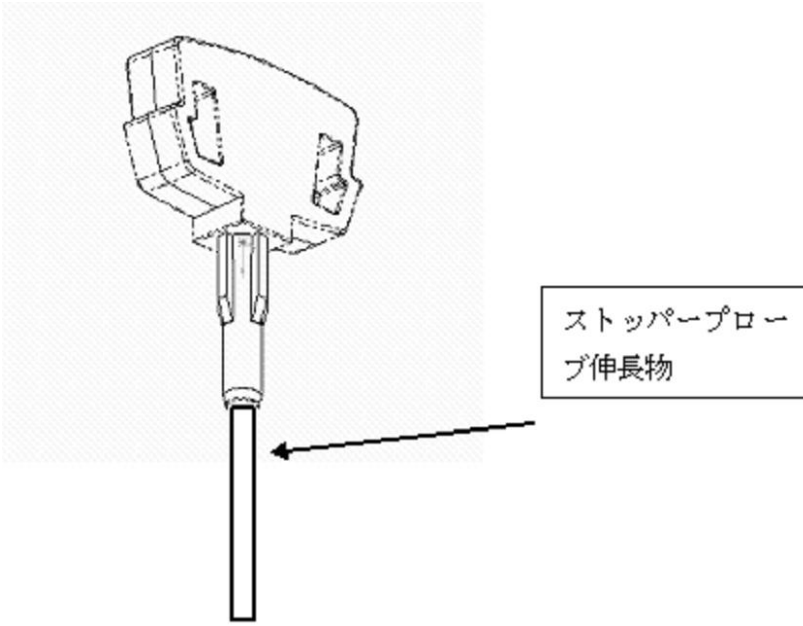
【 図 9 】



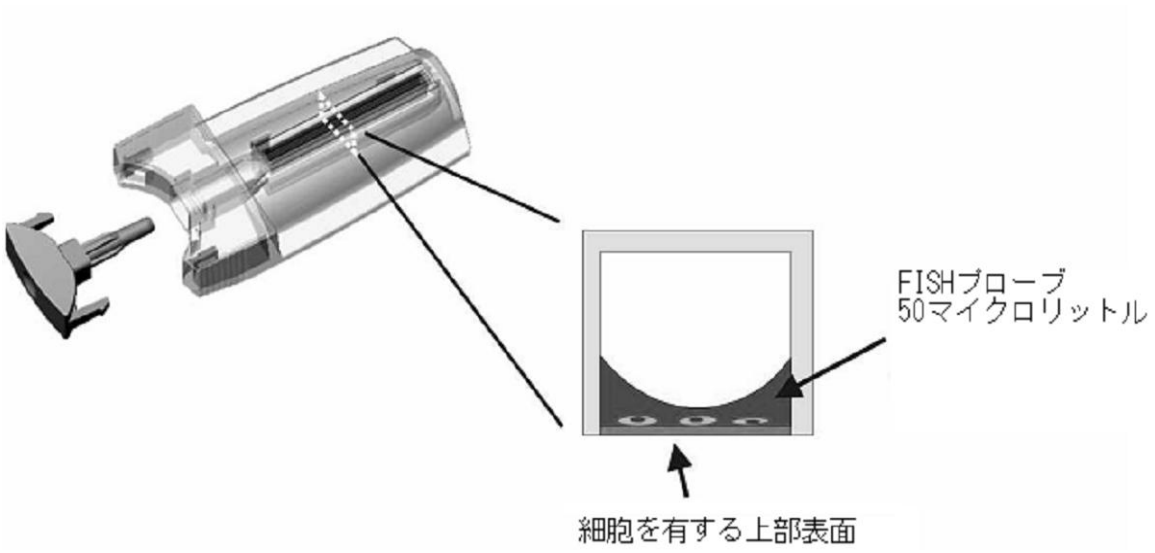
【 図 5 】



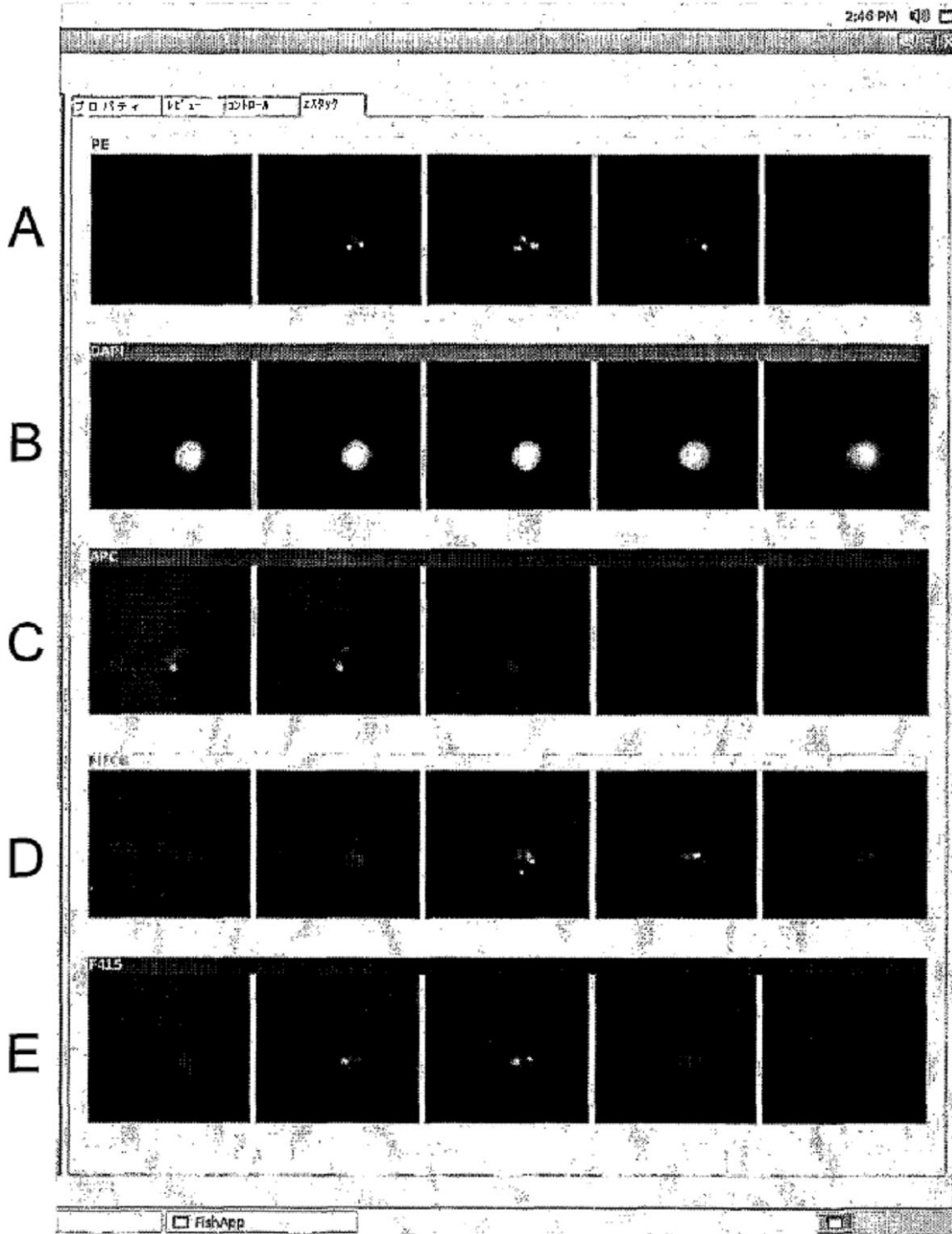
【 図 7 】



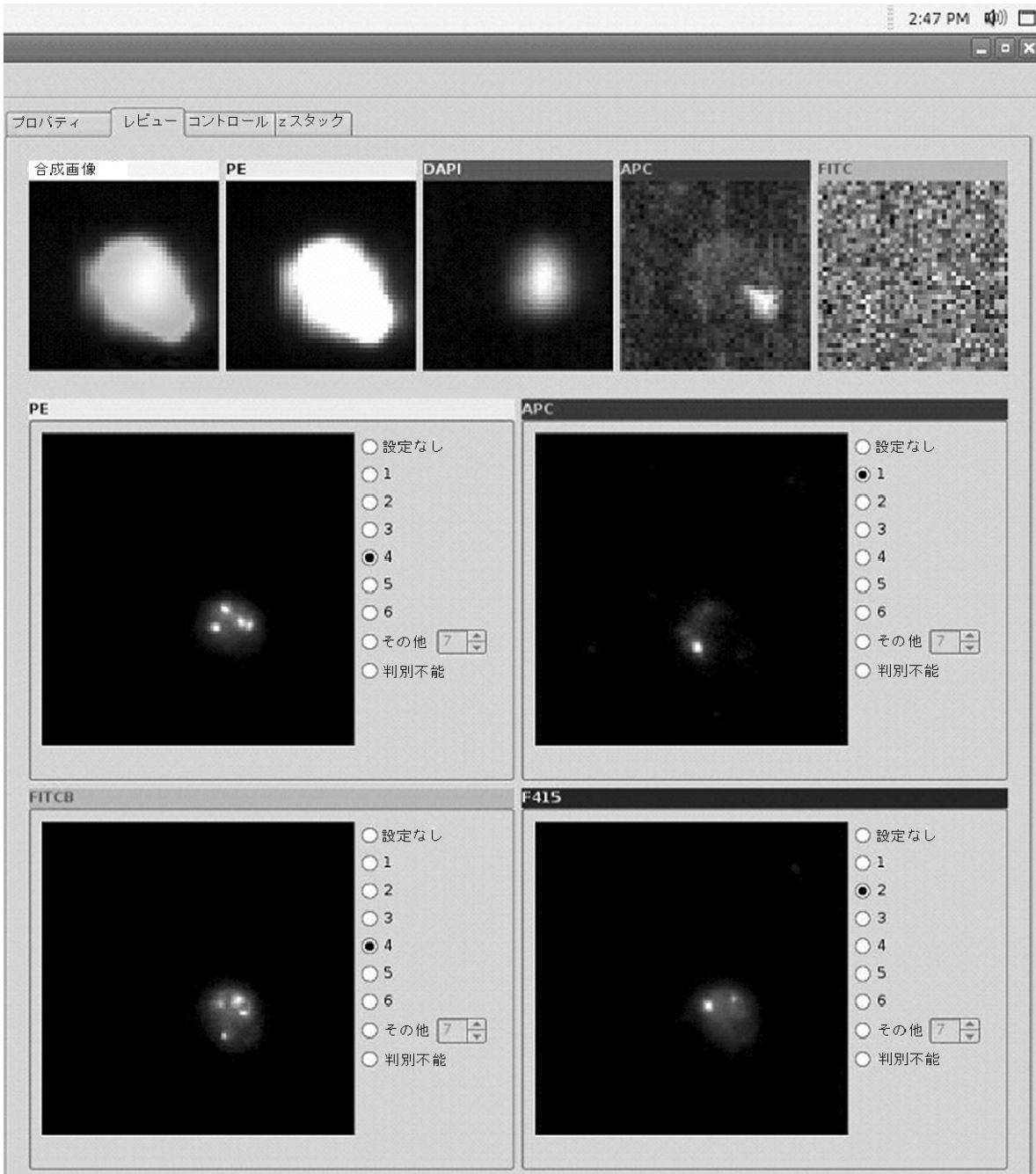
【 図 8 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	37/00	1 0 2
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	M
		G 0 1 N	33/53	D

- (72)発明者 マーク・カール・コネリー  
アメリカ合衆国 1 8 9 0 1 ペンシルベニア州ドイルズタウン、ノッティンガム・ウェイ 4 7 7 0 番
- (72)発明者 ブラッド・フォーク  
アメリカ合衆国 1 8 9 1 4 ペンシルベニア州シャルフォント、エディンボロ・サークル
- (72)発明者 マイケル・ティー・ケーガン  
アメリカ合衆国 1 8 9 0 1 ペンシルベニア州ドイルズタウン、グレゴリー・ドライブ 4 1 9 0 番
- (72)発明者 ヨースト・エフ・スウェンネンハイス  
オランダ、エヌエル 7 2 1 1 デーサー・エーフィデ、バルヘウエッヒ 1 4 番
- (72)発明者 レオン・ウェー・エム・エム・テルスタッペン  
アメリカ合衆国 1 9 0 0 6 ペンシルベニア州ハンティンドン・バレー、オールド・フォード・ロード 1 3 5 4 番
- (72)発明者 アルヤン・ヘー・イエー・ティッベ  
オランダ、エヌエル 7 4 2 4 ベーエル、デーフェンター、クリスティアーン・ブルニングスストラート 3 8 番
- (72)発明者 ジョン・エイ・バーラント  
アメリカ合衆国 1 8 9 6 3 ペンシルベニア州ソールベリー、ポスト・オフィス・ボックス 2 4 3、ノース・スーガン・ロード 2 7 5 2 番

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA14  
4B029 AA07 BB11 BB20 FA15  
4B063 QA01 QQ08 QQ42 QR32 QR48 QR51 QR56 QR77 QR83 QS25  
QS33 QS34 QS36 QX02

**【 外国語明細書 】**

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

**Title:** METHODS AND COMPOSITION TO GENERATE UNIQUE SEQUENCE DNA PROBES LABELING OF DNA PROBES AND THE USE OF THESE PROBES

**Inventors:** Mark Carle Connelly, Brad Foulk; Michael Kagan, Joost F. Swennenhuis; Leon W.M.M. Terstappen, Arjan G.J. Tibbe, and John Verrant

**Cross-Reference to Related Applications**

This is a non-provisional application which claims priority to U.S. Provisional Applications 60/718,676, filed 20 September 2005; 60/729,536, filed 24 October 2005; and 60/786,117, filed March 2006. Each of the aforementioned applications is incorporated in full by reference herein.

**BACKGROUND OF THE INVENTION****Field of the Invention**

The invention relates generally to the field of identification of DNA sequences, genes or chromosomes.

**Generation of DNA probes**

Human genomic DNA is a mixture of unique sequences and repetitive sequences that are present in multiple copies throughout the genome. In some applications, nucleic acid hybridization probes to detect repetitive sequences are desirable. These probes have shown utility in the fields of fetal cell diagnostics, oncology, and cytogenetics. In other applications it is desirable to generate hybridization probes that anneal only to unique sequences of interest on a chromosome. Preparation of unique sequence probes is confounded by the presence of numerous classes of repetitive sequences throughout the genome of the organism (Hood et al., *Molecular Biology of Eucaryotic Cells* (Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA 1975). The presence of repetitive sequences in hybridization probes will reduce the specificity of the probes because portions of the probe will bind to other repetitive sequences found outside the sequence of interest. Thus, to ensure binding of hybridization probes to a specific sequence of interest, efforts must be made to ensure that repetitive sequences in the probe do not anneal to the target DNA outside the sequence of interest.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

Recent contributions have addressed this question by inhibiting hybridization of the repetitive sequences with the use of unlabeled blocking nucleic acids (US 5,447,841 and US 6,596,479). Use of blocking nucleic acids in hybridizations is expensive, does not completely prevent hybridization of the repetitive sequences, and can distort genomic hybridization patterns (Newkirk et al., "Distortion of quantitative genomic and expression hybridization by Cot-1 DNA: mitigation of this effect," *Nucleic Acids Res.* vol 33 (22):e191 (2005)). Thus, methods that prevent hybridization of repeat sequences without the use of blocking DNA are necessary for optimal hybridization.

One means to achieve this is to remove unwanted repeat segments from the hybridization probes prior to hybridization. Techniques involving the removal of highly repetitive sequences have been previously described. Absorbents, like hydroxyapatite, provide a means to remove highly repetitive sequences from extracted DNA. Hydroxyapatite chromatography fractionates DNA on the basis of duplex re-association conditions, such as temperature, salt concentration, or other stringencies. This procedure is cumbersome and varies with different sequences. Repeat DNA can also be removed by hybridization to immobilized DNA (Brisson et al., "General Methods for Cloning Amplified DNA by Differential Screening with Genomic Probes," *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 2, pp. 578-587 (1982)). In all of these procedures, the physical removal of the repetitive sequences will depend upon the strict optimization of conditions with inherent variations based upon the base composition of the DNA sequence.

Several other methods to remove repetitive sequences from hybridization probes have been described. One method involves using a cross-linking agent to cross-link repetitive sequences either to directly prevent hybridization of repetitive sequences or to prevent amplification of repeat sequences in a PCR reaction. (US 6,406,850). Another method uses PCR assisted affinity chromatography to remove repeats from hybridization probes (US 6,569,621). Both of these methods rely on the use of labeled DNA to remove repeat sequences which makes these processes complex and difficult to reproduce. Further, both methods are time consuming, requiring multiple rounds of repeat removal to produce functional probes, suitable for use in fluorescent *in situ* hybridization (FISH) or other hybridization reactions requiring high target specificity.

The use of duplex specific nucleases which preferentially cleave double stranded deoxyribonucleic acid molecules has been described for sequence variant detection applications such as single nucleotide polymorphisms (US 2005/0164216; US 6,541,204). The ability of the enzyme to preferentially cleave perfectly matched nucleic acid duplex

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

polynucleotides as compared to single stranded provides a means for removing non-target double stranded DNA from the sample mixture.

The ability of these nucleases to specifically digest the duplex form of polynucleotides was discovered in the instant invention to provide substantial benefit in manufacturing unique target specific probes that do not require blocking DNA, thus eliminating the costs and interfering affect of blocking DNA, and providing a means for rapid, efficient and cost effective production of high specificity probes.

Detection of specific sequences in a genome makes use of the fact that DNA consists of a helix of two DNA strands and that this double strand is most stable when these two strands are homologues. The DNA consists of a phosphate-sugar phosphate backbone and to every sugar one of four different nitrogenous bases, cytosine guanine thymine or adenine, might be present. Homologue strands pair every cytosine with a guanine and every thymine with an adenine. When a labeled homologue sequence is added to a genome and the DNA is made single stranded, these labeled sequences will hybridize, under the right circumstances, to the specific homologue sequence in the genome. For this in situ hybridization, a number of probes are available for different detections purposes and applications.

*Whole chromosome / paint probes (WCP)*

WCP incorporates labeled DNA material, homologous to a specific chromosome. The material is obtained by flow sorting of metaphase chromosomes or by laser dissection from a metaphase spread which is amplified by PCR or a related technique. After labeling and applying it to a properly prepared nucleus, it will stain the target chromosome. However, such labeled probes will in addition stain other non-target chromosomes because of structural or repetitive sequence elements that are shared among some or all chromosomes. Accordingly in order to stain only those sequences originating from the intended chromosome of interest, these common repetitive elements are usually inhibited by hybridization with blocking DNA or other methods that block or remove non-specific interactions.

Multiple chromosome paints are also applied to a single nucleus. WCP are labeled by different fluorochromes or with a combination of fluorochromes, providing no limit to the amount of WCP's applied in a single hybridization. WCP's are mainly used for karyotyping and to study translocations of large fragments, regions and subregions of chromosomes which are best observed in a metaphase spread of a nucleus.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

*Centromere probes*

Centromere probes are targeted to a 171 bp sequence that occurs in repetitive order in every centromeric region of the human chromosomes. All chromosomes have a slightly different sequence and because of this all chromosomes are detected separately when the right hybridization stringency is used. Only two chromosome pairs, 13 with 21 and 14 with 22, share the same repeat and cannot be detected independently. Generally, centromeric probes are produced from plasmids containing an insert from one or a few copies of the 171 pb repeat. These probes are able to be hybridized without the addition of blocking DNA because the 171bp sequences do not occur outside the regions of interest.

*Telomere probes*

Human telomeres consist of an array of short repetitive sequences (i.e. TTAGGG). This is repeated several times in different amounts for every chromosome and individual test subject age. This repetitive sequence is used as a probe that will stain all chromosomes although not every chromosome will stain equally strong. To detect the telomeric end of chromosomes, mostly a sub-telomeric bacterial artificial chromosome (BAC) clone is used. This BAC clone contains repetitive sequences which should be blocked or removed during or before hybridization.

*Comparative Genomic Hybridization (CGH) probes*

CGH is a process that involves hybridizing a test genome to a reference genome. The reference genome may take the form of a metaphase chromosome spread from a healthy individual or may be array based using probe sequences that represent all or part of a genome. Microarray probes made using BAC clones contain repetitive sequences which must be blocked prior to hybridization. However, blocking has the potential to cause a deviation in the results when compared to repeat depleted probes (Kno1 and Rogan, *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33, No. 22). Further, the blocking step increases the cost of hybridization assays. If the probe sequences are depleted of repetitive sequences, the blocking step of the labeled genomic DNA is not necessary, resulting in a reduction in the cost and removal of any variation.

*Gene specific probes*

Gene specific probes are designed to detect a region of the genome containing a target gene or group of genes. These probes are used to detect amplifications or deletions of

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

specific genomic areas which correlated to the expression level of the specific gene of interest. The coding sequence of the gene(s) itself is not large enough to generate a detection signal for the probe that is visible using standard fluorescence microscope. Therefore such gene specific probes are not limited to just the coding gene sequences (exons) but also involve non-coding (introns), regulatory or other sequences around the gene. Because of the large sequences encompassed within even a gene specific probe design they often suffer from the undesirable inclusion of unwanted repetitive sequences. When such material is then either labeled and used in hybridizations or used in hybridizations and then labeled, the unwanted sequences must be blocked or removed from the probe to be able to detect the gene area specifically.

#### *Microarray probes*

Similar to CGH, microarray probes are fixed to a carrier. In general, automated robotic techniques are used to spot cDNA-PCR products or synthetic oligonucleotides on a slide or similar fixed surface. Also, techniques exist to synthesize sequences directly on a slide (Affimetrix, Inc, Santa Clara). The slides are hybridized with labeled cDNA or RNA in combination with different labeled cDNA or RNA as controls.

#### **Coupling reporter molecules to DNA probes**

DNA probes are visualized by coupled reporter molecules. These molecules need to be incorporated in or attached to the DNA probe. One method utilizes a reporter molecule, having nucleotides linked to enzymatic reactions. Examples include incorporation by nick translation or a random prime reaction. Further, an amine coupled nucleotide, built in this way, is subsequently coupled directly or indirectly to reporter molecules. Coupling is done by chemical labeling of the DNA. An example is the coupling of a reporter molecule linked to a platinum group which forms a coordinative bond to the N7 position of guanine as used in ULS labeling (Kreatech Diagnostics, Amsterdam) and described in US 5,580,990; US 5,714,327; US 5,985,566; US 6,133,038; US 6,248,531; US 6,338,943; US 6,406,850; and US 6,797,818. Reporter molecules can be radioactive isotope, non-isotopic labels, digoxigenin, enzymes, biotin, avidin, streptavidin, luminescent agents such as radioluminescent, chemiluminescent, bioluminescent, and photoluminescent, (including fluorescent and phosphorescent), dyes, haptens, and the like.

#### **Sample preparation**

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

To be able to detect the labeled probes bound to interphase chromosomes, the nucleus should maintain morphology during and after the FISH procedures. Using fixation, cells or nuclei are attached to a solid layer such as a microscope slide. Fixation before during or after attachment to the solid layer, provide reference for identification. Depending on the type of cell or tissue, the nuclei have to be accessible for probe DNA, usually by pre-treating with proteolytic enzymes, heat, alcohols, denaturants, detergent solutions or a combination of treatments. Probe and nucleic DNA are made single stranded by heat or alkali treatment and then allowed to hybridize.

#### **Use of DNA probes**

##### *Microarrays*

One common use of microarrays is to determine the RNA expression profile of a suspect tissue, tumor, or microbe. By analyzing the RNA expression profile, a prognosis for the treatment and survival of the patient is proposed. The prognostic value of RNA microarrays for clinical usage has yet to be determined. Another common use of microarrays are array based CGH. With this technique an entire genome can be screened for amplifications and/or deletions of chromosomal regions

##### *Microscopy*

Cytogenetic analysis in pre and post natal testing is used to determine whether or not a fetus has a cytogenetic abnormality in a cell population from the fetus. Samples are frequently obtained through amniocentesis, conducted in pregnant women who are considered to have an increased risk for cytogenetic abnormalities. Accordingly, these cells are investigated for cytogenetic abnormalities. The same type of investigations are performed to confirm cytogenetic abnormalities or investigate suspect cytogenetic abnormalities in cell populations obtained after delivery.

##### *Assessing Fetal Cells in Maternal Blood*

During pregnancy, fetal cells may enter into the maternal blood with increases in the number of these fetal cells found with trauma, (pre)-eclampsy and abnormal pregnancies. In routine assessments of fetomaternal hemorrhages, the frequently used Kleihauer-Betke test is based on the detection of red blood cells expressing fetal hemoglobin. For detection of cytogenetic abnormalities, nucleated cells from maternal blood are needed. The frequency of these cells is considerably lower and are estimated to be in the range of 1- 10 fetal cells per

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

mL of maternal blood. Nucleated red blood cells, trophoblast cells and the presence of hematopoietic progenitors that are of fetal origin provide a target for isolation and probe hybridization in the detection of cytogenetic abnormalities early in the pregnancies. To date a reliable and reproducible method to identify and assess the cytogenetic composition of these cells is not available. One of the main problems with this analysis is the loss of fetal cells at various steps throughout the procedure, resulting in inconsistent or inconclusive information.

#### *Oncology*

FISH is used to detect various kinds of chromosomal aberrations like translocations, deletions, amplifications, inversions, and duplications. These aberrations are detected in all types of cells and tissue. In leukemia, cells are isolated from blood or bone marrow for subsequent FISH analysis. In bladder cancer, cells are isolated from urine. Cells from solid tumors are obtained by puncture or excision of the tumor itself. Also, cells that are released by solid tumors are isolated from the blood and analyzed by FISH. The latter gives the opportunity to monitor tumor treatment closely in order to detect a chromosomal change in the tumor. In some types of cancer, FISH provides a prognosis of tumor progression or predicts the efficacy of specific medication. Commercially, the most used FISH tests are the BCR-ABL translocation FISH in Chronic myelogenous leukemia and the her2/neu gene amplification FISH in breast cancer.

#### *Disseminated tumor cells*

Methods for the characterization of not only tumor cells, but also rare cells, or other biological entities from biological samples have been previously described (US 6,365,362). This two stage method requires efficient enrichment to ensure acquisition of target cells while eliminating a substantial amount of debris and other interfering substances prior to analysis, allowing for cellular examination by imaging techniques. The method combines elements of immunomagnetic enrichment with multi-parameter flow cytometry, microscopy and immunocytochemical analysis in a uniquely automated way. The combination method is used to enrich and enumerate epithelial cells in blood samples, thus providing a tool for measuring cancer.

The two stage method has applications in cancer prognosis and survival for patients with metastatic cancer (WO 04076643). Based on the presence of morphologically intact circulating cancer cells in blood, this method is able to correlate the presence of circulating

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

cancer cells of metastatic breast cancer patients with time to disease progression and survival. More specifically, the presence of five (5) or more circulating tumor cells per 7.5 milliliters provides a predictive value at the first follow-up, thus providing an early prognostic indicator of patient survival.

The specificity of the assay described above increases with the number of cells detected and is not sufficient in cases where only few (generally less than 5 circulating tumor cells) are detected. One solution to this problem is to provide detailed genetic information about suspected cancer cells. Accordingly, a method that would incorporate enrichment of a blood sample with multi-parametric image cytometry and multi-parametric genetic analysis on an individual suspect cancer cell would provide a complete profile and confirmatory mechanism to significantly improve current procedures for patient screening, assessing recurrence of disease, or overall survival.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) has been described as a single mode of analysis in rare cell detection after enrichment as described in WO 00/60119; Meng et al. PNAS 101 (25): 9393-9398 (2004); Fehm et al. Clin Can Res 8: 2073-2084 (2002) and incorporated by reference herein. After epithelial cell enrichment, captured cells are screened by known hybridization methods and imaged on a microscope slide. Because of inherent technical variations and a lack of satisfactory confirmation of the genetic information, the hybridization pattern alone does not provide a level of clinical confidence that would be necessary for sensitive analysis, as in assessing samples with less than 5 target cells. Further, this method for FISH analysis is difficult to automate.

Coupling hybridization-based methods with immunocytochemistry in the analysis of individual cells has been previously described (US 6,524,798). Simultaneous phenotypic and genotypic assessment of individual cells requires that the phenotypic characteristics remain stable after *in situ* hybridization preparatory steps and are limited in the choice of detectable labels. Typically, conventional *in situ* hybridization assays require the following steps: (1) denaturation with heat or alkali; (2) an optional step to reduce nonspecific binding; (3) hybridization of one or more nucleic acid probes to the target nucleic acid sequence; (4) removal of nucleic acid fragments not bound; and (5) detection of the hybridized probes. The reagents used to complete one or more of these steps (i.e. methanol wash) will alter antigen recognition in subsequent immunocytochemistry, cause small shifts in the position of target cells or completely removes the target cells, which introduces the possibility of mischaracterization of suspect cells.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

Probe sets and methods for multi-parametric FISH analysis has been described in lung cancer (US 20030087248). A 3 probe combination resulting in 95% sensitivity for detecting bladder cancer in patients has also been described, see US 6,376,188; US 6,174,681. These methods lack the specificity and sensitivity for assessing small numbers of target cells, and thus a confirmatory assessment for early detection of disease state. They also do not provide a means for convenient automation.

One aspect of the present invention provides a confirmatory assay in the analysis of rare circulating cells by combining phenotypic and genotypic multiparametric analysis of an individually isolated target cell, resulting in a clinically significant level of sensitivity and, therefore, assurance to the clinician of any quantitative information acquired. Relevant disease states are assessed using extremely small (1, 2, 3, or 4) numbers of circulating tumor cells (CTC's) and provide a confirmation for early disease detection.

## SUMMARY OF THE INVENTION

### Generation of repeat depleted DNA probes

One embodiment of the present invention includes methods and compositions to eliminate repetitive sequences from DNA. Any double stranded DNA is a suitable source in the application of the methods of the present invention. To obtain single stranded DNA, devoid of repetitive sequences, first an amplified whole genome library is made from the source DNA according to standard procedures. The library obtained consists of randomly selected fragments ranging in size from approximately 200 to 500 base pairs. Each fragment consists of double stranded DNA, having PCR primer sequences at each end of a target sequence. Generally, this library is representative of the source DNA. Other methods that results in modified fragments of DNA to permit amplification are also considered in this invention with no limit to the size of the fragments. These include, but are not limited to, degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction (DOP PCR), rolling circles and isothermal amplification methods. Double stranded DNA fragments are denatured by heating up to 95°C or other means to obtain single stranded DNA fragments. The resulting single stranded DNA fragments contain repetitive sequences, unique sequences or a combination of unique and repetitive sequences. An excess of Cot DNA or other appropriate subtractor DNA that binds to repetitive sequences is added. Subsequent lowering of the temperature results in the formation of double stranded DNA for only those fragments that contain repetitive sequences. Duplex Specific Nuclease (DSN) is added to allow digestion of double

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

stranded DNA. In one embodiment, the DSN enzyme is added for 2 hours at 65°C. The resulting composition contains mostly single stranded DNA, having only unique sequences, and digested DNA. The unique sequence, now single stranded DNA with PCR primers at both ends, is used as a template to generate large amounts of the unique sequence for use in probe production. When BAC clones containing a desired unique sequence is used as source DNA, the template generated by this method contains only that unique sequence. When the boundary sequences are known, this method is useful in obtaining probes that cover the nucleotides between the boundary sequences in genomic DNA. Further, the present invention includes methods of use and compositions, resulting from the production of these DNA sequences after elimination of their repetitive sequences. These repeat depleted DNA sequences function as hybridization probes without the use of a blocking DNA in any appropriate application requiring disabling or blocking of undesired DNA sequences.

Another embodiment of the present invention provides for a system, apparatus, and methods in the preservation of immunomagnetically labeled cells for subsequent FISH analysis. This aspect permits the reanalysis of individual cells, utilizing the same or similar reporter molecules previously used to identify them. Accordingly after immunomagnetic selection and initial fluorescent labeling, the cells of interest are identified and their location is recorded. The cells are fixed in position followed by appropriate processing. Alternatively, the cells are fixed in position and stored for processing at a later point in time. For FISH applications, the sample is heated above the melting temperature of DNA, resulting in the loss of reporter molecules used to initially identify the target cells. After completing FISH in which the fluorescent FISH probes are hybridized and the nuclear material is again fluorescently labeled, the sample is reintroduced in an analyzer which locates the cells of interest to examine fluorescent signals from the FISH probes.

Another embodiment of the present invention provides methods for the reanalysis of immunomagnetically labeled cells as a confirmation in identifying rare circulating cells such as circulating tumor cells (CTC's). Thus, methods and techniques for the further processing of cells after enrichment, immunofluorescent labeling and subsequent confirmatory analysis, using *in situ* hybridization, as a means to increase specificity and thereby confirm the identity of suspect CTC's in patients as being cancer cells. Cytogenetic abnormalities detected in morphologically suspect CTC's, detected in metastatic carcinoma patients, have a prognosis similar to patients with morphologically obvious CTCs or having an abundance of CTCs. One embodiment of the present invention considers confirmation assays in patients diagnosed with carcinomas and having CTCs, or disseminated tumor cells (DTC's) in bone marrow,

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

where there is an increased risk for recurrence. In addition, the methods of the present invention are applicable when there is a need to assess for the presence or absence of drug targets in CTC such as, but not limited to, Her1, Her2, Androgen Receptor (AR), cMyc, or P10.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

**BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

**Figure 1:** Schematic representation depicting the generation of repeat depleted DNA probes from BAC starting DNA. A fragmented whole genome amplification library is denatured and allowed to re-anneal in the presence of excess Cot DNA. DSN digestion of the double strand DNA results in a mixture of single strand unique sequence, available as a template for probe production.

**Figure 2:** Schematic representation depicting the cleavage of a specific DNA sequence from a DNA source and production of clones thereof. Double stranded DNA from an appropriate source is denatured and specific DNA sequence is allowed to hybridize. DSN digestion of the double strand DNA followed by separation of single strand DNA by size results in isolation of the desired single strand DNA. After synthesis of the second strand, the desired DNA is cloned into an appropriate vector for production.

**Figure 3:** Comparison using repeat-depleted probes in FISH analysis. White blood cells hybridized with a Her-2 probe containing repeats and no blocking DNA. In the absence of blocking DNA, the probe labels the entire nucleus after hybridization with repeat regions. Panel A shows white blood cells hybridized with a Her-2 FISH probe containing repeats and no blocking DNA. Panel B shows the same cells after labeling the nucleus with DAPI. Panel C shows the overlay of the two signals and the lack of Her-2 resolution. Panel D shows FISH analysis on white blood cells using repeat-depleted a Her-2 probe. Arrows indicate locations of unique chromosome sequence for Her-2. Panel E shows the same cells after labeling the nucleus with DAPI. Panel F shows the overlay of panel D and E, visualizing the location of the Her-2 site within the cell nucleus.

**Figure 4:** Panel A shows a chromosome spread hybridized with a P16 (CDKN2A) labeled repeat free probe targeting 9p21 frequently used to characterize melanoma. Two chromosomes show the presence of 9p21 and are illustrated by arrows. Panel B shows a chromosome spread hybridized with MLL labeled repeat free probe targeting 11q23 used to identify a specific type of leukemia. Two chromosomes show the presence of 11q23 as illustrated by arrows.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

**Figure 5:** Schematic representation of the fixation and hybridization device used to prepare samples for FISH analysis. A compact and portable device for preparing a sample for FISH analysis after immunomagnetic enrichment and initial fluorescent imaging. Shown are the control panel, electronics, pump, and poser supply in relation to the sample cartridge.

**Figure 6:** Schematic representation of the basic steps for FISH after initial fluorescent imaging. Shown are cross-sectional images of the sample cartridge and the presence of magnetic support (black wedges). Panel 1 shows the cells arranged along the internal surface of the imaging face of the cartridge after initial fluorescent imaging using CellTracks System. Panel 2 shows the simultaneous replacement of the buffer solution with a fixative for FISH. In Panel 3, the fixative is aspirated to remove fluids from the cartridge. Panel 4 shows the addition of forced air to dry the cartridge. In Panel 5, the cartridge is inverted and enough FISH probe is added to cover the cells. Panel 6 shows the cartridge on a heat source to allow hybridization. In Panel 7, the FISH reagents are washed to allow rescanning and analysis of the FISH signals in Panel 8.

**Figure 7:** Schematic representation of the stopper with probe extension for FISH cartridge for reducing the chamber volume of the cartridge..

**Figure 8:** Schematic representation of the cartridge. A cross-sectional illustration depicts the cartridge inverted with the location of the cells and FISH reagents illustrating a low reagent volume distribution the lower face of the chamber, thus allowing enough reagents to only cover the cells along entire lower surface.

**Figure 9:** Representative image of a tumor cell initially identified through immunocytochemistry (ICC) with subsequent FISH analysis for the presence of chromosome 1, 7, 8 and 17. Panel A shows a list of CTC candidates identified by the software on basis of their ICC signature. Panel B shows the acquired fluorescent ICC images acquired. Panel C shows the corresponding FISH signals for chromosomes 1, 7, 8 and 17 demonstrating the aneuploid signature of the same cell tumor cell.

**Figure 10:** Shown are five fluorescence images at different focal planes through the cell using excitation/emission filters for 5 different fluorochromes. Panel A shows the images for a cell using PE. Panel B shows images for the same cell using DAPI. Panel C shows images

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

for the same cell using APC. Panel D shows images for the same cell using FITC. Panel E shows images for the same cell using Dy415.

**Figure 11:** Results from ICC and FISH analysis to confirm a CTC. Panel A shows ICC images of the ICC scan on which a suspect CTC was identified. Panel B shows the corresponding fluorescence signals, using FISH probes. Corresponding counts of the signals for each probe are shown next to each image; 4 count for PE, 1 count for APC, 4 count for FITC and 2 count for Dy415.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

### Generation of repeat depleted DNA probes

DNA contains unique as well as repetitive sequences. The repetitive sequences occur throughout the chromosomes and have the potential to interfere with hybridization reactions, such as with *in situ* hybridization, targeted toward specific regions or unique sequences outside these repetitive sequences. To identify the presence, amount and location of specific sequences on chromosomes, genes or DNA sequences it is important that the hybridization probes hybridize only at the location of interest. The presence of repetitive sequences in the hybridization probe mixture reduces the specificity of the binding, requiring methods to either remove the repetitive sequences from the probes or prevent the probes from hybridizing to the repetitive sequences on the target. For example, Cot-1 DNA is often added during hybridization to prevent binding of the probes to the repetitive sequences (US 5,447,841 and US 6,596,479).

Recent contributions have addressed this question by disabling the repetitive sequences. The use of Cot-1 DNA relies on the ability of Cot-1 DNA to form a duplex structure with available single strand repeat sequences, and thereby minimize non-specific binding interaction of this portion of the sequence with the unique target sequence. Blocking the repetitive DNA, either during a hybridization step with the unique target sequence or prior as in a pre-association step, results in a mixture having repetitive segments forming duplex structures with their complementary sequence and a single strand form of the target probe, available for hybridization to its unique target segment. Unfortunately, the presence of this duplex in a subsequent amplification or labeling reaction affects the signal through the introduction of non-specific noise, especially in situations where the signal is very weak. An

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

alternative to blocking the repetitive sequence is to remove the unwanted repeat segments from the reaction mix.

Generation of repeat-depleted DNA probes of this prevention is depicted in Figure 1. One embodiment of the present invention makes use of duplex specific nucleases (DSN) which preferentially cleave deoxyribonucleic acid molecules (US 2005/0164216 and US 6,541,204 incorporated by reference). The ability of the enzyme to preferentially cleave nucleic acid duplex polynucleotides as compared to single strand DNA provides a means for removing non-target double stranded DNA from the sample mixture. The ability of these nucleases to preferentially digest the duplex form of polynucleotides provides potential use in manufacturing an unique target specific probe, eliminating the interfering affect of blocking DNA, and providing a means for their rapid, efficient and cost effective production.

Starting DNA used in the practice of this invention is typically in the form of one or more DNA sequences which contain a multiplicity of DNA segments. The initial source of individual starting material in the production of the probe composition has been described in the production of direct-labeled probes (US 6,569,626). Optimally the source of the starting polynucleotide is purified from tissue and fragmented into 150 kb to 200 kb segments, using any known technique such as, but not limited to, enzyme treatment (restriction enzymes), polymerase, limited DNase I digestion, limited mung bean nuclease digestion, sonication, shearing of DNA, and the like. Some of these segmental fragments will be complementary to at least a portion of one or more DNA segments in the particular unique target sequence. The individual DNA segments are propagated by commonly known methods, such as cloning into a plasmid construct and then transfected into bacteria. After propagating the cloned fragments, individual colonies representing isolated fragments are identified as containing at least a portion of the sequence of interest. Identification is accomplished by known techniques such as hybridization, PCR, or searching established databases of commercially available libraries. Each chosen colony is grown to obtain an isolated plasmid construct having a unique fragment, at least partially complementary to a segment of the target sequence on the chromosome. Exemplary target sequences include HER-2, IGF-1, MUC-1, EGFR, and AR and may be available through commercial vendors (i.e. BAC clones). Once the cloned fragments of interest are propagated and isolated, they are depleted of their repetitive polynucleotide sequences. Using whole gene amplification (WGA), the fragments are amplified as 200 to 500bp segments from the isolated plasmid constructs. Commercially available DOP PCR is considered as one embodiment to this portion of the procedure.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

Cot-1 DNA is combined with the WGA library pool after amplification by first heating to 95°C to denature the double-strand polynucleotide into a single strand state and then cooling to 65°C to allow selective re-annealing of the repeat sequences. Duplex specific nucleases (DSN) under optimized DSN conditions are then added to preferentially cleave deoxyribonucleic acid molecules containing perfectly matched nucleic acid duplexes while not affecting any remaining single stranded segments. Selectively cleaving the duplex nucleic acids is accomplished by enzymatic digestion of DNA-DNA duplexes and DNA-RNA duplexes. Specific embodiments of the present invention include DSN isolated from the Kamchatka crab (US 10/845,366) or shrimp (US 6,541,204), but any enzymatic removal of duplex structure is considered in the present invention. The use of endonuclease-specific nucleases hydrolyzes a phosphodiester bond in the duplex DNA backbone, providing the advantage of not being nucleotide sequence-specific and therefore applicable to most targets of interest. DSN digestion provides for the removal of a substantial amount of the nucleic acid duplex for subsequent amplification of the remaining single-strand polynucleotide. One embodiment of the present invention is a 2 hour DSN digestion at 65°C. The resulting composition contains single stranded DNA, corresponding to portions of the unique target sequence on the chromosome, some amount of undigested double-strand DNA, and digested base pairs. Preferably, the undigested DNA is separated from the digested DNA and the DSN by centrifugation (i.e. spin column chromatography). The mixture is used immediately or stored at 80°C, either before or after amplification of the purified composition for subsequent utilization such as labeling and use for *in situ* hybridization. After amplification, the resulting target probe sequence is amplified by PCR yielding 90% to 99% pure target probe sequence, and designated repeat-depleted DNA.

The use of DSN in the enrichment and isolation of a single strand polynucleotide from double strand is applicable in the production of any single strand polynucleotide wherein separation of the single strand entity from double strand contaminants is desirable. This is particularly relevant, although not limited, in the production of labeled probes for gene or chromosome identification, karyotype or panning a pool of single strand and double strand polynucleotides.

The resulting probes, both composition and production, are incorporated in the subject matter embodied in the present invention. Repeat-depleted DNA, as described in the present invention, is useful for *in situ* hybridization, including FISH, and all other nucleic acid hybridization assays. The requirement for competitive binding is eliminated using the repeat-

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

depleted probes described in this invention, resulting in increased specificity of the reaction and a reduction in the amount of probes necessary for binding.

#### **The Duplex Specific Nuclease Method**

To make a hybridization probe toward a target sequence, DNA containing the sequence of interest is obtained. Methods to obtain DNA containing sequences of interest will be known to those skilled in the art and include, without limitation, isolation of genomic DNA from tissues or cells, flow sorting of chromosomes, and screening libraries of cloned fragments of chromosomes by hybridization, electronically, or PCR.

Starting DNA used in the practice of this invention is purified from a source by any method. Typically the starting DNA consists of genomes, chromosomes, portions of chromosomes, or cloned fragments of chromosomes. Flow --sorted chromosomes and Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) known to contain target sequences of cancer related genes make the present invention particularly applicable. Exemplary target sequences include HER-2, IGF-1, MYC, EGFR, and AR. BAC clones containing these sequences are available through commercial vendors.

Once the DNA containing sequences of interest are identified and obtained, they are depleted of repetitive polynucleotide sequences. This process begins by fragmenting and preparing a library containing the sequence of interest. One method is the GenomePlex® Whole Genome Amplification (WGA) method (GenomePlex® is a trademark of Rubicon Genomics, Inc.) that randomly cleaves the cloned fragments into 200-500 bp fragments and attaches linker sequences which can then be used to amplify and re-amplify the library using PCR. In this example the fragmented, amplified library is considered the source DNA.

To remove the repetitive sequences, the source DNA is denatured to a single stranded state and then cooled under conditions that selectively allow repetitive sequences to anneal to form double stranded molecules and unique sequences to remain single stranded. A duplex specific nuclease (DSN) is then added which preferentially cleaves the double stranded repetitive fragments while not cleaving the single stranded unique sequences. The resulting mixture contains single stranded DNA, corresponding to portions of the unique target sequence on the chromosome, some amount of undigested double-strand DNA, and digested base pairs. Preferably, the undigested DNA is separated from the digested DNA and the DSN by spin column chromatography, phenol chloroform extraction or some other similar method, but separation is not a requirement. Then, the repeat-depleted library is used as a hybridization probe or re-amplified using PCR to prepare larger amounts of probe DNA.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

After amplification, the resulting target probe sequence is 90% to 99% pure target probe sequence, and designated Repeat-depleted DNA.

The library fragmentation and amplification methods described above are not intended to be limiting but rather serve as an example of how one fragmentation and amplification method is used to make repeat-depleted probes. There are numerous methods of fragmenting and amplifying nucleic acids including linker-adaptor PCR, DOP PCR, rolling circle amplification, transcription-mediated amplification and all other methods are considered this invention. It is expected that some modification of the above method to prepare repeat-depleted DNA will be necessary to accommodate the different methods of library fragmentation and amplification and these modifications are also included in the present invention.

One consideration in this invention is the use of an enzyme that is capable of cleaving double stranded DNA while not cleaving single stranded DNA. Enzymes included in this invention may cleave double stranded DNA in any way, including lysis of the sugar-phosphate backbone, removal of one or both strands in a DNA duplex or removal of nitrogenous bases to form apurinic/apyrimidinic sites. Non-limiting examples of these enzymes include endonucleases, exonucleases, restriction enzymes, nicking enzymes, DNA repair enzymes, topoisomerases, DNA gyrases, and enzymes involved in homologous recombination. Specific embodiments of the present invention include DSN isolated from the Kamchatka crab (US 10/845,366), shrimp (US 6,541,204), T7 Endonuclease I, and *E.coli* exonuclease III, all incorporated by reference.

Enzyme concentration, time of digestion, and buffer conditions such as salt and magnesium ion concentration are factors that can affect the specificity of DSN toward double stranded DNA. Optimization of these conditions is necessary to get efficient repeat-depletion.

Efficiency and specificity of repeat removal in this invention are dependent on the reaction conditions used to denature and re-anneal as well as the conditions present during digestion with the DSN. Denaturation is accomplished by alkali or heating. The degree of DNA re-annealing is dependent on the concentration of DNA present in the samples and the time allowed for re-annealing. In order for selective re-annealing of repetitive sequences to occur, the repeat sequences must be present in a higher concentration than the unique sequences. The ratio of repeat to unique sequences within a particular clone will vary from region to region throughout the genome. To standardize the depletion process across regions with varying numbers of repeat sequences, an excess of subtractor DNA is added to the

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

reaction. The mass of subtractor DNA added varies depending on the desired amount of repeat removal and is preferably 10-50 times the mass of the source DNA. The present invention considers that a subtractor is any nucleic acid or nucleic acid analogue containing sequences sufficiently homologous in nucleotide sequence to the repetitive sequences as to allow hybridization between subtractor sequences and a portion of the sequences in the source DNA, making the subtractor sequence useful. One embodiment of the present invention includes Cot-1 DNA as a subtractor DNA which is used to remove repetitive sequences from source DNA.

The stringency for re-annealing is another component in the present invention. Salt concentration and temperature are factors that determine the stringency of any re-annealing step. The degree of repeat removal is controlled by adjusting stringency conditions for this step. Adjusting the stringency conditions to allow some degree of annealing between sequences that are not 100% homologous improves the degree of repeat removal. Salt concentrations range from 5 millimolar to 1000 millimolar NaCl with annealing temperatures range from 15 °C to 80°C.

In one embodiment, the repeat-depletion process is performed such that re-annealing and DSN digestion occur sequentially. Accordingly, the DNA is denatured and allowed to cool for a period of time under conditions optimized for annealing. Then, the reaction conditions are changed to conditions that optimize the specificity and activity of DSN digestion. In another embodiment, the re-annealing and DSN digestion take place simultaneously, under the same conditions.

Also within the scope of this invention, the source or subtractor DNA is treated with an agent, either chemical or physical, before or during enzymatic digestion to alter the specificity of an enzyme toward either the single stranded or double stranded fractions within the mixture. For example, *E. coli* RecA protein is added to a mixture of single stranded and double stranded DNA. This protein coats the single stranded DNA in the mix and protects the single strand DNA from *E. coli* RecBC DNase while allowing the double stranded DNA in the mixture to be digested ("*Escherichia coli* RecA protein protects singles stranded DNA or Gapped Duplex DNA from degradation by RecBC DNase". Williams, JGK, Shibata, T. Radding, CM Journal of Biological Chemistry V246 no.14 pp 7573-7582). It is also possible to generate source or subtractor DNA using modified nucleotides which alter the specificity of an enzyme toward the single strand or double strand DNA fractions.

The use of DSN in the enrichment and isolation of a single strand polynucleotide from double strand is applicable in the production of any single strand polynucleotide wherein

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

separation of the single strand entity from double strand contaminants is desirable. This includes removal of any undesirable sequence from a source DNA. These undesirable sequences include without limitation, repetitive sequences, unique sequences, and vector sequences. This method is particularly relevant in the production of labeled probes for gene or chromosome identification, karyotyping, or panning a pool of single strand and double strand polynucleotides.

#### **The Selective Binding Method**

By denaturing source DNA and selectively allowing repetitive sequences to anneal, any agent that binds preferentially to a single or double stranded DNA structure is used to remove repeat sequences from source DNA. Examples of these agents include, without limitation, DNA or RNA polynucleotides, enzymes, antibodies, DNA binding proteins, combinations of antibodies and DNA binding agents, and natural or synthetic compounds and molecules. DNA binding agents may be linked directly or indirectly to a solid support which allows for positive or negative chromatographic selection of unique or repetitive sequences. One example includes separation of single and double strand DNA using biotinylated antibodies toward single strand or double strand DNA. The desired population is separated using streptavidin-coated paramagnetic particles. Alternately, a biotinylated antibody toward a DNA binding agent that preferentially binds single or double strand DNA is used in the same fashion.

#### **Other Single or Double Strand Specific Enzymes**

The present invention also embodies any enzyme that preferentially acts on single or double strand DNA in modifying source or subtractor DNA in facilitating repeat removal. One non-limiting example is to selectively ligate a DNA linker to the double stranded DNA population after denaturation and selective re-annealing the repeats. This linker is hybridized to a homologous oligonucleotide attached to a magnetic (or paramagnetic) particle to remove repetitive sequences. A second example is to use a single strand DNA/RNA ligase to selectively circularize single stranded DNA present after denaturation and selective re-annealing the source DNA. The resulting circles are then be amplified and enriched by rolling circle amplification.

#### **Structure Specific Separation of Repetitive Sequences**

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

In addition to specific probe production methods and based on separation of single stranded DNA from double strand DNA, the present invention considers any method known in the art whereby separation of repeat sequences from unique sequences occurs with the establishment some detectable DNA structure in either the repeat sequences or the unique sequences and this detectable structure is used to separate one population from the other. Some examples of detectable DNA structures include without limitation, triple or quadruple stranded DNA, hairpins, panhandles, flaps, Z-DNA, Holliday junctions and other structures formed during recombination. These structures may be naturally occurring within the sequences of interest or they may be induced by modifying either or both the source nucleic acid or the subtractor nucleic acid.

#### **Selective Digestion of Repeat Sequences**

Another method to remove repeat sequences from source DNA is to digest a fragmented and amplifiable DNA library with a restriction enzyme whose recognition sequence is known to exist in repetitive DNA sequences. When the digested source DNA is re-amplified by PCR, the remaining library will be enriched for unique sequences and depleted of sequences that contain repeats.

#### **Digestion and Selective Ligation**

Another method to prepare repeat-depleted probes is to digest target DNA with two restriction enzymes that leave different overhangs on the digested sequence. The first restriction enzyme is preferably an enzyme that cuts within the repeat sequences and the second is an enzyme that does not cut within the repeat sequences. Following digestion, linkers are selectively attached to the ends of the sequences cut by the second restriction enzyme. These linker sequences are then used to PCR amplify a library, depleted of repeat sequences. The resulting repeat-depleted DNA, both composition and production, are incorporated in the present invention. Repeat-depleted DNA, as described in the present invention, is useful as probes for any type of hybridization assay where specific binding of target sequences is desired. These techniques include, without limitation, ISH, FISH, CGH, spectral karyotyping, chromosome painting, Southern blot, Northern blot, and microarrays. Production of hybridization probes that only contain unique sequence is one embodiment of the present invention. Consequently, the requirement for competitive binding is eliminated, resulting in an increase in the specificity of the reaction, and reducing the amount of probes necessary for binding.

**Use of Duplex Specific Nuclease to Cleave DNA at a Desired Location.**

The use of duplex specific nucleases has utility in cleaving specific sequences from DNA. Figure 2 show a schematic representation of this embodiment. Single strand DNA is obtained from a DNA source, containing the desired sequence. Oligonucleotides identifying both ends of the desired sequence are added, and duplex specific nucleases introduced to cut the desired DNA probe from the source DNA. After separating the desired DNA probe by size exclusion, second strand DNA is synthesized and cloned to provide a source for DNA probes. Thus, duplex specific nucleases are used to cleave DNA sequences at specific regions. This method is most useful in cloning of fragments of interest that are too large to amplify by PCR and when the fragments lack appropriate restriction enzyme sites. These fragments may then be used as hybridization probes, sequenced, or used for any other purpose. In Figure 2, two oligonucleotides are designed to anneal to one or both strands of the DNA, and flank the sequence of interest. DNA containing a sequence of interest is denatured and allowed to re-anneal in the presence of an excess of the flanking oligonucleotides. Digestion with a duplex specific nuclease selectively cuts the DNA at the site where the oligonucleotides are annealed. The remaining single strand DNA molecules are fractionated by size to obtain the sequence of interest. The sequence of interest is made double stranded using a DNA polymerase and cloned into a plasmid. Thus making possibilities to clone or subclone sequences of interest from a larger DNA polynucleotides. A second example of site specific cleavage is the recovery of cloned fragments from plasmid vectors by selectively digesting the vectors. In one example, the plasmid containing cloned DNA fragment is denatured and allowed to re-anneal in the presence of excess plasmid, lacking cloned DNA. Addition of a duplex specific nuclease cleaves the plasmid sequences and leaves the single strand cloned DNA intact. The remaining single strand DNA is then be used for any application known in the art including, but not limited to, sequencing or subcloning.

**Example 1-Detection of Chromosomes or Portions of Chromosomes using Repeat-Depleted DNA Probes**

BAC clone CTD-2019C10 was selected to be used as a probe for the Her-2 gene by electronically screening the human genome using the UCSC Genome Browser software (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) and clones were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). BAC DNA was isolated using the Large Construct Kit from Qiagen

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

(Valencia, CA). Source DNA was prepared using 10 nanograms of purified BAC and the Genomeplex® Complete Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) according to the manufacturer's directions. Depletion mixes were prepared containing 2 micrograms of Cot-1 DNA, 1x Duplex Specific Nuclease buffer (Evrogen, Moscow, Russia), 0.3 molar NaCl, and 66 nanograms of source DNA. The depletion mixes were denatured for 5 minutes at 95 °C, placed on ice for 10 seconds and 1 unit of Duplex Specific Nuclease (Evrogen, Moscow, Russia) added. Samples were incubated at 65°C for 90 minutes. Five microliters of the reaction were purified using the Genelute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) and the purified DNA was eluted in 50 microliter aliquots. Fifteen microliters of the depleted samples were then re-amplified by PCR using the Whole Genome Re-amplification kit (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). PCR reactions were purified as described and quantified based upon their A<sub>260</sub>. Ten nanograms of the first re-amplification mixture was used as template in a second re-amplification, purified as described. This material was sonicated to an average molecular weight of 200-500 base pairs, ethanol precipitated, and resuspended in distilled H<sub>2</sub>O. The resulting DNA was fluorescently labeled using the Kreatech ULS Platinum Bright Red/Orange Kit (Kreatech, Amsterdam, Netherlands). For comparison, probes with repeats were also made from the source DNA which was used in the depletion process..

Phytohemagglutinin-stimulated white blood cells were prepared for FISH by fixation in 75%methanol, 25% acetic acid and spotted on slides using standard techniques. Repeat-depleted probes and source DNA probes were hybridized at 2ng/μl without Cot blocking DNA in a hybridization buffer consisting of 50% formamide, 10% dextran sulfate, and 1x SSC. Slides and probe were co-denatured at 80°C for 3 minutes and hybridized overnight at 37 °C. Following hybridization, samples were washed for five minutes at 50 °C in 0.5x SSC, 0.001% SDS. Samples were counterstained in 0.5 μg/ml DAPI for 5 minutes and mounted in 50% glycerol. Images were acquired using a Leica DM-RXA fluorescent microscope (Leica Microsystems, Bannockburn, IL) equipped with filters appropriate for rhodamine and DAPI. Images were acquired with a Photometrics SynSys black and white digital camera (Photometrics, Tucson, AZ). DAPI signals were enhanced and overlay images were generated using Leica FW 4000 software. Her-2 images are unedited and were captured using identical camera settings comparison purposes. Figure 3 depicts a comparison of the images. Panel A shows that when source DNA containing repeats is used as a hybridization probe, the probes stain the entire nucleus and no Her-2 specific signals are visible. When repeat-

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

depleted DNA is used as a probe (Panel D) specific signals that correspond to the Her-2 gene are clearly detectable (arrows).

**Example 2- DNA probes depleted from repeat sequences according to this invention improves the visualization of fluorescently labeled DNA probes as compared to traditional DNA probes that contain repeats which are blocked during the procedure.**

The signal to noise ration of fluorescently labeled probes is significantly improved when employing repeat depleted DNA probes obtained according to the invention. For this comparison, DNA probes targeting 9p21 and 11q23 were used as they are known to those skilled in the art. These signals are problematic in that they are relatively small signals and difficult to discern. Probes were depleted from repeat sequences according to the invention and fluorescent reporter molecule linked to a platinum group which forms a coordinative bond t the N7 position of guanine was used to fluorescently label the probes (ULS labeling, Kreatech, Amsterdam). Figure 4 Panels A and B show a chromosome spread hybridized with rhodamine labeled 9p21 and dGreen labeled 11q23 probe respectively. Clear signals from the repeat free probes can be discerned with the repeat free probes as indicated by arrows in the figures. Thus, the visualization of the presence of these probes is superior to those that are obtained using probes that are obtained through traditional methods. This improvement in visualization provides a more accurate differential diagnosis of melanoma (Panel A, 9p21, P16 (CDKN2A) and leukemia (Panel B, 11q23, MLL).

**Preservation of Immunomagnetically-Labeled Cells for Subsequent Analysis**

During immunocytochemistry (ICC) image analysis the cells are magnetically held to the optically transparent surface of the cartridge by magnetic forces applied by an external magnet (US 5,466,574). The calculated holding force of the device is approximately  $10^{-9}$  Newtons. This holding force is dependant upon several variables including but not limited to the number of ferrofluid particles on the cell, the size of the magnetic particles and the magnetic field gradient applied by the external magnet. In order to fix the cells to the glass surface, the buffer solution must be removed and replaced by a cell fixative solution, such as methanol, acetone, acetic acid, other agents known in the art and combinations of these. Aspiration of the buffer solution must be carefully completed so as to not displace or remove the cells to be analyzed. So as fluid is aspirated from the sample chamber, the meniscus of the fluid applies shear forces on the magnetically held cells. These shear forces can be greater than the magnetic holding forces (calculated at greater than  $10^{-9}$  Newtons). In such

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

situations, the cells will either be moved within the cartridge or displaced such that they are aspirated from the cartridge along with the buffer solution. Fluid shear forces are a function of the rate at which the meniscus moves across the glass portion of the cartridge, the distance between the aspiration probe and the glass surface, the velocity and viscosity of the fluid being aspirated and other parameters. Additionally after aspiration, any drying of the glass surface before the fixation solution is added can have a negative effect on the cells within the cartridge. Plus, the addition of a fixation solution into an empty cartridge will further disturb the distribution of the cells.

Accordingly, one aspect of the present invention address these issues by providing a method for replacing the buffer solution with the fixation fluid without subjecting the cells to fluid shear forces caused by the meniscus. Fixation solution is dispensed into the bottom of the cartridge with the simultaneous aspiration of the displaced buffer solution from the top of the cartridge. While some mixing of fixative and buffer will take place at the interface of the two fluids, sufficient fixation solution will be dispensed to complete the required cell fixation to the glass surface. This fluid displacement will occur with minimal shear forces applied to the cells in the cartridge by balancing the flow between the dispensed fixative solution and aspiration of the displaced fluid, in addition to the magnetic holding force retaining the immunomagnetic attached cells to the surface of the glass. One preferred embodiment of the present invention utilizes the entry area of sample chambers described in US 6,861,259; US 10/988,057; and US 7,011,794; US 11/294,012 in displacing approximately 100 microliters of fluid within the cartridge without spilling out of the cartridge. The opening port of the cartridge is sufficient to allow an aspiration probe to remove buffer solution as the fixative solution is being dispensed to displace the buffer solution. Once the cells have been fixed in place by the fixation fluid, the fluid may be removed without risk of cell disturbance. This procedure allows for automated processing of samples for subsequent FISH or other analysis with minimal operator interaction that could introduce variability into the preparation process.

The present invention describes an automated device which allows for complete and consistent fixation of cells in the cartridge after ICC imaging in a bench-top device, and incorporates all the steps in the preparation of target cells after ICC for subsequent FISH image analysis. Figure 5 depicts a schematic view of the apparatus showing the relative locations of the individual components. Accordingly, the cartridge containing the ICC imaged sample is placed into the device for buffer removal and fixation. A syringe and syringe pump in combination with a pipette aspirates the buffer and dispenses the fixative.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

Figure 6 is a schematic representation of the steps involved in the fixation and hybridization of the cells. In one embodiment of the invention the buffer removal and addition of fixative are performed simultaneously to minimize cell movement through the forces exhibited by the fluid removal and addition. The fixation is completed by removal of all fluids from the cartridge followed by drying of the cartridge by a forced air flow inside the cartridge using the same pipette as used for the addition and removal of fixation reagents. After fixation and drying the cartridge is stored or used immediately for FISH or other additional analysis. Optimal mixtures for the fixative differ depending on the target entity (i.e. DNA, RNA, protein).

#### **Fixation Protocol for FISH**

To fix the cells on the upper surface and leave them intact and accessible for FISH probes, the following protocol is developed and implemented in the automated bench-top device:

1. Dispense 250 microliters of fixative from the bottom of the cartridge (cartridge in upright position).
2. Aspirate 250 microliters from the top and dispose..
3. Repeat the dispense 250 microliters new fixative from the bottom of the cartridge.
4. Aspirate all fluid from the top of the cartridge.
5. Dry the cartridge by flowing air through the cartridge. Pipette used for aspiration/dispensing is used for air flow as well.

#### **Volume Reduction**

As a consequence of the expense of antibodies or polynucleotide probes and the requirement to use them in high concentrations, reactions are carried out in very small closed volumes (for example 5 microliters to 25 microliters) so the cost of using a high concentration is offset by having to use very small volumes of reagents. Sample cartridges as described in US 6,861,259; 10/988,057; and US 7,011,794; 11/294,012 are used as the reaction vessel after immobilization in the chamber. In these cartridges, the immediate volume of the chamber where the cells are immobilized is 320 microliters. Thus, there is a need to analyze immobilized cells by *in situ* hybridization, but the adding 320 microliters of a high concentration of most probes are expensive and impractical.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

To address this problem, a uniform distribution of the probe mixture across the surface of the optically transparent surface of the cartridge where the cells are immobilized is needed, while reducing the volume of the added probe. This method is obtained by the following:

1. Inserting an object inside the cartridge to reduce the volume.
2. Using a volume that is large enough, but smaller than the 320 microliters across the entire surface where the cells are immobilized when the cartridge is in a horizontal position and the surface with the cells is downside (optical viewing surface on bottom).
3. Use a small volume plus a fluid with a density that is lower than the density of the reagents. The low density fluid floats on top of the reagent and allows the reagents to spread uniformly across the entire surface.

As an example of the first possibility, an extension is introduced at the probe end of the stopper so that a portion extends the full length of the chamber (Figure 7). The extension consumes approximately 1/3 of the volume of the chamber. The extension diameter is dimensioned such that it will slide through the chamber opening, 2.36 mm diameter. The extension is made by molding an entire new plug over the molding on the existing plug, or inserting a solid metal rod through the center line of the plug. The material must be inert to the reagents as, for example, 316 stainless steel, polypropylene or Inconel 625. The over molding of the upper portion of the plug with a thermal plastic is necessary to ensure the proper plastic durometer for maintaining shape during insertion and when positioned in the chamber to maintain liquid seal and locking of the plug. Further, the plug and extension optionally has an access hole through the center for monitoring temperature within the chamber during processing. The plug is further designed to be removed and re-used after proper cleaning.

A second embodiment is depicted in Figure 8. A volume of 50 microliters of FISH reagents is sufficient to cover the whole upper surface of the cartridge. This volume needed to ensure complete reactions and is dependent on the viscosity and hydrophobicity of the reagents. After addition of the reagents, the cartridge is placed in a horizontal position to further ensure exposure to the reagents.

One other embodiment incorporates the second embodiment with a further reduction in reagent volume. After injecting of the reagents as described, an extra fluid with a lower density is injected. As the lower density fluid floats on top of the reagents of the reagents, there is a more complete reaction over the entire surface. Depending on the components of the reagents, a volume of 25 microliters reagents is obtained.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

**Reanalysis of Immunomagnetically-Labeled Cells**

Chromosomal aneuploidy is associated with genetic disorders, particularly cancer. Diagnostic methods are available that provide for the detection of these chromosomal abnormalities particularly with the use of *in situ* hybridization (ISH). The application of ISH and immunocytochemistry (ICC) on tissue or cell samples has been well established, but there is a clear need to establish a diagnostically effective method for the simultaneous analysis of ISH and ICC on a single cell. One aspect of the present invention provides for the detection of these chromosomal abnormalities on individual cells as they relate to the confirmation of morphologically suspect cancer cells through a cost effective and highly specific means.

One aspect of the present invention provides for the further processing of rare cells after enrichment and immunocytochemical (ICC) analysis. For example, circulating rare cells such as epithelial cells are identified as suspect cancer cells (US 6,365,362; US 6,645,731; and US 11/202,875 are incorporated by reference). Suspect cells are identified through specific cellular antigens and nucleic acid labeling. Confirmation of these suspect cells are subsequently determined by the expression of specific unique target sequences, defining either a chromosome and/or gene, used to assess chromosomal changes (i.e. aneuploidy) within the identified suspect cell. Accordingly, one embodiment of the present invention includes the combination of ICC staining and subsequent confirmation by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) on a group of selected chromosomes which define a CTC.

The cancer confirmatory assay provides an increased specificity after immunomagnetic enrichment and fluorescent imaging of circulating tumor cells as provided by the CellTracks® AutoPrep® and CellTracks® Analyzer II Systems (Immunicon Corporation) and further described in US 6,365,362. A confirmatory test permits the designation of 1 or more CTC's as a cancer cell regardless of the stage of the disease and thus lowers the threshold for calling a sample positive for CTCs. One embodiment of the present invention is assessing aneuploidy in chromosomes 1, 7, 8 and/or 17 to confirm ICC-determined suspect CTC's. A further embodiment includes the detection of individual genes such as, but not limited to, HER-2, IGF-1, MYC, EGFR, and the androgen receptor (AR) to detect the presence or absence of therapeutic targets and thus provides a means to make the correct choice of treatment.

Accordingly, an automated and standardized method for blood sample processing provides identification of circulating epithelial cells by ICC. Aspirated plasma from a

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

partitioned blood sample is combined with a ferrofluid reagent conjugated to antibodies specific for a target cell population (i.e. EpCAM positive). These cells are immunomagnetically collected through an externally applied magnetic field, allowing for separation and removal of unlabeled cells.

Once the target cells are separated, they are dispensed into a disposable cartridge for image analysis using an image presentation device (US 6,790,366 and US 6,890,426). The device is designed to exert a magnetic field that orients the labeled cells along the optically transparent surface of the chamber for subsequent ICC imaging.

After ICC imaging, suspect cells are identified using appropriate algorithms. Images of the suspected cells are presented to the user who makes the final decision about the identity of the presented suspect cells. Images of the suspect cells and their relative position along the optically transparent viewing surface of the chamber are recorded and archived for later use. Since ICC imaging alone lacks the specificity to assess the clinical significance of blood samples with less than 5 CTC's or to provide detailed genetic information about suspected cancer cells, subsequent analysis using multiparametric genetic profiling on individual suspect cells is needed to provide a complete profile and establish a confirmatory mechanism that can be used in diagnostic analysis, including screening, assessing recurrence of disease, and overall survival. One embodiment of the present invention utilizes fluorescent *in situ* hybridization (FISH) as a multiparametric genetic analysis, but other profile assessments are considered. This provides both phenotypic and genotypic profile assessment for an individual cell present along the viewing surface

FISH requires temperatures above the melting temperature of DNA as well a reagents that are not compatible with the ICC labeling. Most of the ICC and DNA labels do not survive the FISH procedure with any signals lost in processing. Thus, a cell that was identified as being an interesting cell for FISH analysis can not be traced back on its position. Therefore there is a need to have a detection method that once the ICC image is obtained, the cell position along the optically transparent viewing surface is maintained for subsequent multiparametric genetic analysis (FISH) or other types of analysis in which the ICC labels are lost. This is achieved, in part, by fixing the cells on the optically transparent surface after the ICC image is obtained without a loss of cells or any substantial movement along the surface. Accordingly after addition of the FISH reagents, the cartridge is placed on a hotplate having the surface with the immobilized cells in contact with the hotplate. Depending on the type of assay the hotplate is programmed with different temperature cycles that run between 2 and 48 hours. After the temperature cycles are completed, the excess FISH reagents are removed

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

from the cartridge. The cartridge is filled with a buffer solution containing a DNA label to visualize the nuclei of immobilized cells. Depending on the DNA label used, the label remains in the cartridge or is washed out of the cartridge after staining.

Next, the cartridge is placed back in the CellTracks® Analyzer II System for a second scan. Because cells present on the upper surface during the first ICC image analysis were immobilized, the same cells are still in the same relative location inside the cartridge. To assess the shift of the cartridge relative to the imaging system (CellTracks® Analyzer II System), the locations of the nuclei in the images of the second scan are compared to the location of the nuclei in the images of the first ICC scan. The shift of these images with respect to each other is determined using convolution algorithms. After this shift has been determined a specific cell of interest, based on its ICC image, can be selected from a list and be relocated on the surface of cartridge after FISH in the second scan. Next fluorescent images of the different FISH probes are acquired.

Figure 9 shows a representative image of a tumor cell, identified by ICC and probed for the presence of chromosome 1, 7, 8 and 17. Panel A shows a list of CTC candidates identified by the software as cytokeratin (cytoskeletal protein present in cells of epithelial origin) positive and DAPI (nucleic acid stain) positive. The corresponding images of the highlighted event were identified as a CTC by the user as it confirmed the CTC definition (cytokeratin positive, CD45 negative, DAPI positive event with the morphological appearance of a cell). Four images taken with a 10X objective are shown in Panel B. The top left image shows the DAPI staining of the nucleus and the bottom left image the cytokeratin staining of the cytoplasm. CD45 staining and FITC staining are lacking as illustrated by the lack of positive staining. After the cells were preserved and probed for the centromeric probes for chromosome 1, 7, 8 and 17, images of the upper surface of the cartridge were reacquired and the fluorescent signals of the probes for chromosome 1, 7, 8 and 17 are shown in Panel C for the same cell shown in B. Two copies of chromosome 1, three copies of chromosome 7, four copies of chromosome 8 and two copies of chromosome 17 are clearly visible demonstrating that the cell is aneuploid and confirming that the cell indeed is a cancer cell.

Images displayed in Figure 10 are acquired using a 10X, NA 0.5 plan achromat objective. Although the resolution is sufficient for most centromeric probes, it is not sufficient for the gene specific probes, for example HER-2 and EGFR FISH probes. For this reason the 10X, NA 0.5 objective, the objective used for ICC image acquisition, is replaced by a 40X, NA 0.6 objective, corrected for the optical thickness of the transparent upper surface of the cartridge.

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

The use of high NA objectives allows for 3D imaging of the cell of interest allowing for a confident determination of the correct number of copies for FISH probe labeled sequence in a selected cell. Multiple images at different focal planes along the optical axis of a specific cell of interest are acquired followed by 3D reconstruction of the cell. Figure 10 shows 5 such slices through the cell using excitation/emission filters for 5 different fluorochromes. In Panel A, five slices for PE are shown. In slice # 2, only two signals are visible whereas in slice # 3 three signals are visible. Panel B shows 5 slices of the DAPI staining. In the APC slices of Panel C, # 2 slice shows 1 signal. In the FITC slices of Panel D, slice #3 shows two signals and slice #4 shows two different signals, making the total for this probe 4. In Panel E, Dy415 slices show 1 signal in slice #2 and two signals in slice #3. From the images, it is clear that the probes are located in different parts of the nucleus and that using only one focal plane the counting of the signals would not be correct. In Figure 11 Panel A fluorescence ICC images of the CTC, presented as a stack of images from Figure 10. In panel B, the slices for each fluorochrome are added and the average intensity is presented thereby scaling the images to use the full range of intensity levels which facilitates enumeration. The count for the number of signals with each probe are shown next to each image (i.e. 4 for PE, 1 for APC, 4 for FITC and 2 for dy415).

It is understood that the subject matter of this invention is not limited to the detection of cancer cells but can also be used to characterize other cell types. One cell type frequently pursued for detection of cytogenetic abnormalities is fetal cells in maternal blood. To enrich for such cells, markers need to be targeted that are present at high frequency on the fetal cells and in low frequency on the maternal cells. One cell type that is frequently pursued is the nucleated red blood cells. A marker that is present on all nucleated red blood cells is, for example, the transferrin receptor (CD71). When coupled to ferrofluids, nucleated red blood cells are reproducibly enriched from whole blood with the CellTracks® Autoprep® System. The enriched cells contain fetal nucleated red blood cells, maternal nucleated red blood cells, activated T-lymphocytes, immature reticulocytes and other cells that have been carried over by the immunomagnetic enrichment. The enriched cell population is now be stained with markers that discriminate between cells of fetal and maternal origin. One such panel of markers is the use of CD45 to eliminate leukocytes from the analysis in combination with Hemoglobin F that is present in fetal red blood cells but only rarely in maternal red blood cells, carbonic anhydrase that is only present in adult red blood cells and DAPI to identify the nucleus of the cells. The CellTracks® Autoprep® System is used to stain the cells in a reproducible manner. As some of the antigens are intracellular the cells, cells need to be

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

permeabilized for the antibodies to pass the cell membrane. The agents used for permeabilization also lyse the immature reticulocytes, specifically selected by the use of CD71 and the remaining erythrocytes that were carried over through the procedure. After the staining of the cells with the probes that have different reporter molecules, the cartridge containing the stained cells are placed in the CellTracks® Analyzer II System. The system identifies fetal nucleated red blood cell candidates as DAPI<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, Fetal Hemoglobin<sup>+</sup>, Carbonic Anhydrase<sup>+</sup> events. The user can confirm that these events indeed have all the characteristics typical for fetal nucleated red blood cells. After the system remembers the location of the fetal nucleated red blood cells, the cartridge is emptied as described above and the cells are hybridized with probes for cytogenetic analysis. Probes that are typically used to identify relatively frequent cytogenetic abnormalities are those that recognize chromosome X, Y, 13, 18 and 21. After the cells have been stained, the cartridge is reinserted in the CellTracks® Analyzer II System, because the cells that were present on the upper surface during the first ICC image analysis were immobilized the same cells are still on the same location inside the cartridge. The system returns to the events and takes images of the fluorochromes used to identify chromosomes X, Y, 13, 18 and 21. The user then assesses whether the copy number of each of the chromosomes and determines the sex of the fetus and whether or not the copy number of the chromosomes suggest the presence of cytogenetic abnormalities.

**Example 1- Detection of Cytogenetic Aberrations after CTC Identification.**

CTCs from 7.5 mL of blood were identified as cytokeratin<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> nucleated cells after immunomagnetic enrichment targeting the EpCAM antigen using the CellSearch System (Veridex, LLC). CTCs are identified by the CellTracks® Analyzer (Immunicon Corporation) where the cells are magnetically held along the upper surface of a cartridge. For cytogenetic analysis, the fluid in the cartridge was removed and the cells fixed while maintaining their original position. Fluorescently labeled probes for chromosome 1, 7, 8 and 17 were introduced into the cartridge and hybridized to the cells. The fixation and hybridization process removes the fluorescent labels used for CTC identification. After hybridization the cartridges were again placed on the CellTracks® Analyzer and analyzed for a second time. The fluorescent images of the CTC's identified in the first scan are then combined with the fluorescent images from each of the four chromosomes labels obtained in the second scan. The number of chromosomes 1, 7, 8 and 17 were enumerated for each CTC that was identified in the first scan. The number of chromosomes detected in leukocytes that

WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

surrounded the CTC's were used as internal controls. In 7.5 mL of blood from 8 patients with metastatic carcinoma, 1 to 7 CTC's were identified. Greater than or less than two copies of chromosome 1, 7, 8 or 17 were detected in all 8 patients. Heterogeneity in the chromosomal abnormalities were not only detected between CTC's of different patients but also among CTCs of the same patient. Of the 21 CTCs examined, 77% showed chromosomal abnormalities and a majority showed an increase in the number of copies of the chromosomes. In contrast, more than 80% of the leukocytes examined showed two copies of the chromosomes and none showed an increase in chromosome copy number.

Conclusions: Cytogenetic composition of CTC's can be assessed after they have been identified. The presence of aneusomic CTC's provides information to the outcome of patient conditions and provides a prognostic indicator of clinical outcome. Further, gene alterations in CTC's provide indices to current and future cancer therapies.

#### **Example 2- Evaluation of Anti-Cancer Targets on CTC's to Predict Therapeutic Success.**

The CellSearch System™ has been used in multi-center prospective studies to demonstrate that presence of tumor cells in blood of patients with metastatic carcinomas is associated with poor survival prospects. Failure to eliminate Circulating Tumor Cells (CTCs) after one cycle of therapy in these studies strongly suggests that these patients are on a futile therapy. Assessment of the presence of therapeutic targets on the tumor should enable the appropriate choice of therapy. Anti-cancer targets are identified on CTCs before initiation of therapy. Cells from 7.5 mL of blood are identified as cytokeratin(CK)+, CD45- and nucleated after EpCAM immunomagnetic selection. Suspect CTCs are identified and localized at the upper surface of a cartridge where they are held by a magnetic field. Fluorescently labeled antibodies that recognize treatment targets associated with known therapies such as HER2, IGF-1, Bcl-2 and EGFR are assessed on the CTCs. Subsequently, CTCs are preserved for cytogenetic analysis. After the fluid in the cartridge is removed, the cells are fixed and maintain their original position for probe hybridization. Since the system knows their original position, the cells can be reexamined for the presence of probes of interest. The results show a CTC and a leukocyte before and after hybridization with chromosome 1, 7, 8 and 17.

1. A method for confirming the detection and enumeration of suspect target cells in a mixed cell population, comprising:
  - a. obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing target cells;
  - b. isolating a subpopulation of suspect said target cells by immunomagnetic enrichment;
  - c. identifying suspect target cells by a multiparametric phenotype profile;
  - d. preparing suspect target cells for multiparametric genotype profile; and
  - e. confirming suspect target cells by said genotypic profile wherein said individual suspect target cell contains both a phenotypic and genotypic profile of said target cell.
2. The method of Claim 1 wherein said immunomagnetic enrichment comprises:
  - a. mixing said specimen with colloidal immunomagnetic particles coupled to a ligand which binds specifically to suspect said tumor cells, to the substantial exclusion of other populations; and
  - b. subjecting the specimen-immunomagnetic particle mixture to a high gradient magnetic field to produce a separated cell fraction enriched in immunomagnetic particle-bound tumor cells, if said tumor cells are present in said test specimen.
3. The method of Claim 1 wherein said phenotypic profile is determined from a method selected from a group consisting of multiparameter flow cytometry, immunofluorescent microscopy, laser scanning cytometry, bright field base image analysis, capillary volumetry, spectral imaging analysis, manual cell analysis, automated cell analysis and combinations thereof.
4. The method of Claim 1 wherein said genetic analysis is determined from a method selected from a group consisting of ISH, FISH, CGH, spectral karyotyping, chromosome painting, Northern blots, Southern blots, microarray analysis, and combinations thereof.
5. The method of Claim 1 whereby the target cells are selected from a group consisting of endothelial cells, epithelial cells, fetal cells, bacterial cells, myocardial cells, virally infected cells, and combinations thereof.
6. The method of Claim 1 wherein said genetic analysis is detecting the presence of chromosomes within a morphologically identifiable cell nucleus during in situ hybridization.

7. The method of Claim 1 wherein said genetic analysis is detecting a chromosome selected from a group consisting of chromosome 1, chromosome 7, chromosome 8, chromosome 17, and combinations thereof.
8. The method of Claim 1 wherein said confirming suspect target cell provides diagnostic, prognostic, or therapeutic information of said test subject.
9. The method of Claim 7 wherein said chromosome is morphologically identifiable within the cell nucleus stained with DAPI.
10. An system for confirming the detection and enumeration of suspect target cells in a mixed cell population, comprising:
  - a. means for obtaining a biological specimen from a test subject, said specimen comprising a mixed cell population suspected of containing target cells;
  - b. means for isolating a subpopulation of suspect said target cells by immunomagnetic enrichment means;
  - c. means for identifying suspect target cells by a phenotypic profile analysis means;
  - d. means for preparing suspect target cells for genotypic profile analysis means; and
  - e. means for confirming suspect target cells by said genotypic profile wherein said individual suspect target cell contains both phenotypic and genotypic characteristics.
11. The system of Claim 10 wherein said means for obtaining a biological specimen includes fixation of said specimen.
12. The system of Claim 10 wherein said immunomagnetic enrichment means is with colloidal magnetic particles.
13. The system of Claim 10 wherein said phenotypic profile analysis means is automated immunofluorescent cell analysis means.
14. The system of Claim 10 wherein said genotypic profile analysis means is FISH.
15. A kit for labeling a nucleotide comprising:
  - a. a polynucleotide depleted of repetitive sequences; and
  - b. a labeling moiety linked to said polynucleotide.
16. The kit of Claim 15 having a sequence complementary to a centromeric region of a chromosome.
17. The kit of Claim 15 wherein said polynucleotide is depleted of said repetitive sequences by digestion with duplex-specific nuclease.

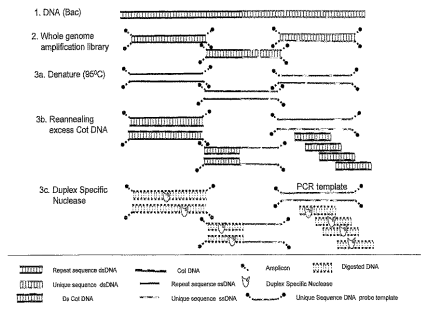
18. The kit of Claim 15 wherein said labeling moiety is a fluorophore linked to said polynucleotide by a platinum-based coordinative bond.
19. A method for replacing the buffer solution within a cartridge which contains suspect target cells comprising:
- obtaining a cartridge containing a sample with suspect cancer cells in a buffer solution;
  - dispensing a fixative solution for FISH analysis while aspirating the displaced buffer solution whereby the fixative and buffer have minimal mixing; and
  - minimizing the shear forces on the cells by balancing the flow between dispensing and aspirating.
20. An apparatus for replacing the buffer solution within a cartridge which contains suspect target cells comprising:
- means for obtaining a cartridge containing a sample with suspect cancer cells in a buffer solution;
  - means for dispensing a fixative solution for FISH analysis while aspirating the displaced buffer solution whereby the fixative and buffer have minimal mixing; and
  - means for minimizing the shear forces on the cells by balancing the flow between dispensing and aspirating.
21. An improved stopper for a cartridge device used to fluorescently image suspect target cells obtained by immunomagnetically capturing said suspect cells and aligning along a viewing surface, wherein the improvement comprises a stopper probe extension means for displacing the fluid within the chamber, said stopper probe extension diameter such that probe slides through the chamber opening.
22. A device for preparing a population of suspect cancer cells for fluorescent in situ hybridization comprising:
- a syringe pump for transfer of fluids in cartridge, wherein said fluids are buffer, fixative, or hybridization buffer;
  - a sample engagement system for reagent transfer;
  - an aspiration probe for drying; and
  - a heater block wherein said block operates through a feedback thermocouple, control thermocouple, and temperature controller.

**(57) Abstract:** The invention relates generally to the field of identification of DNA sequences, genes or chromosomes. Methods and composition to obtain Unique Sequence DNA probes are provided. Composition comprises of any double stranded DNA containing Unique Sequences from which the repetitive sequences are eliminated according to the method described in this invention. The invention also relates to the preservation of cells that have been identified after immunomagnetic selection and fluorescent labeling in order to further interrogate the cells of interest. Furthermore the invention relates to genetic analysis of cells that have been identified after immunomagnetic selection and fluorescent labeling.

WO 2007/053245 1/11 PCT/US2006/036656

Figure 1

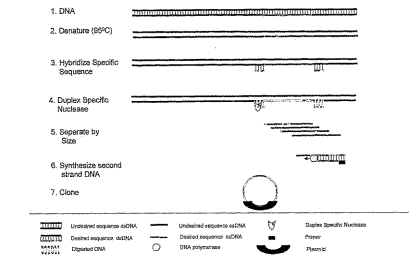
Generation of Unique Sequence Specific DNA Probes



WO 2007/053245 2/11 PCT/US2006/036656

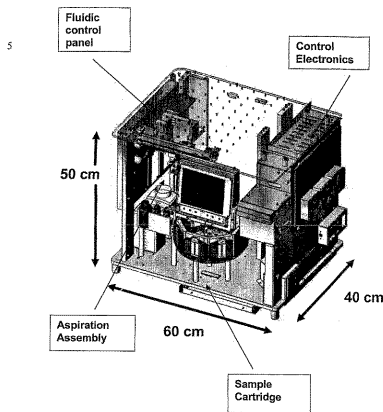
Figure 2

Cleavage of Selected DNA Sequence



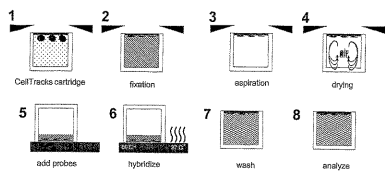
WO 2007/053245 5/11 PCT/US2006/036656

Figure 5



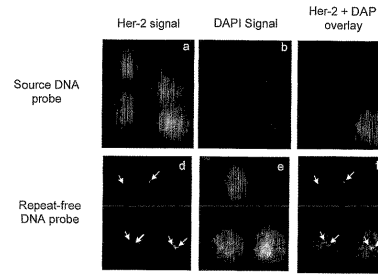
WO 2007/053245 6/11 PCT/US2006/036656

Figure 6



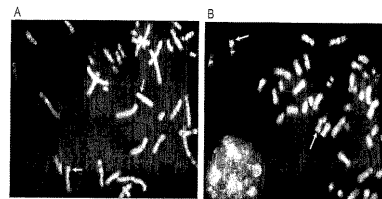
WO 2007/053245 3/11 PCT/US2006/036656

Figure 3



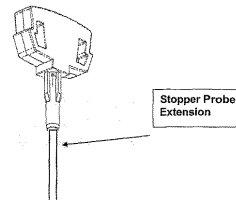
WO 2007/053245 4/11 PCT/US2006/036656

Figure 4



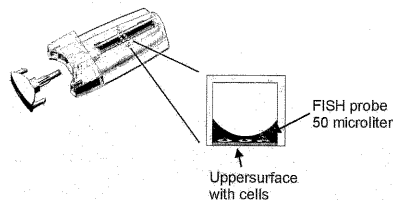
WO 2007/053245 7/11 PCT/US2006/036656

Figure 7



WO 2007/053245 8/11 PCT/US2006/036656

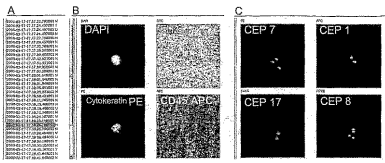
Figure 8



WO 2007/053245

PCT/US2006/036656

Figure 9

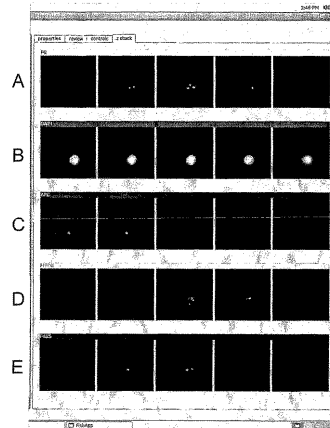


WO 2007/053245

10/11

PCT/US2006/036656

Figure 10



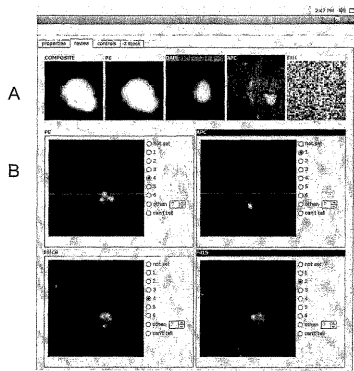
9/11

WO 2007/053245

11/11

PCT/US2006/036656

Figure 11

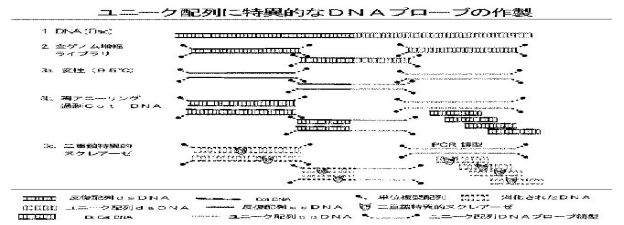


专利名称(译)	用于制造独特的DNA探针测序方法和组合物，DNA探针的标记和探针的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012175976A</a>	公开(公告)日	2012-09-13
申请号	JP2012099354	申请日	2012-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	维里德克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	贝里指数有限责任公司		
[标]发明人	マークカールコネリー ブラッドフォーク マイケルティーケーガン ヨーストエフスウェンネンハイス レオンウェーエムエムテルスタッペン アルヤンハーイエーティッペ ジョンエイバーラント		
发明人	マーク・カール・コネリー ブラッド・フォーク マイケル・ティー・ケーガン ヨースト・エフ・スウェンネンハイス レオン・ウェー・エム・エム・テルスタッペン アルヤン・ハー・イエー・ティッペ ジョン・エイ・バーラント		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/04 C12M1/34 C12N15/09 G01N33/543 G01N37/00 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/34 C12Q1/6811 C12Q1/6876 C12Q2600/106 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2533/101 C12Q2531/113 C12Q2521/301 C12Q2563/131 C12Q2563/103		
FI分类号	C12Q1/68.A C12Q1/04 C12M1/34.B C12N15/00.A G01N33/543.541.A G01N37/00.102 G01N33/53.M G01N33/53.D C12Q1/6811.C C12Q1/6811.Z C12Q1/6876.C C12Q1/6876.Z C12Q1/6886.C C12Q1 /6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063 /QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QR83 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 佐藤 剛		
优先权	60/713676 2005-09-20 US 60/729536 2005-10-24 US 60/786117 2006-03-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

解决的问题：提供一种获得具有独特序列的DNA探针的方法和组合物。该组合物包含任何含有独特序列的双链DNA，重复序列除外。通过将个别分离的靶细胞的表型和基因型进行多参数分析，从而分析稀有循环细胞。为了研究目的细胞，保存了免疫磁选择和荧光标记后鉴定的细胞，并对免疫磁选择和荧光标记后鉴定的细胞进行了遗传分析。[选择图]无

【 図 1 】



【 図 2 】

