

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 530860

(P2003 - 530860A)

(43)公表日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 30/88	E 4 B 0 6 3
G 0 1 N 27/447		33/53	M
30/88		33/566	
33/53		27/26	315 H

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 48数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 577517(P2001 - 577517)

(86) (22)出願日 平成13年4月12日(2001.4.12)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月15日(2002.10.15)

(86)国際出願番号 PCT/AU01/00429

(87)国際公開番号 W001/079534

(87)国際公開日 平成13年10月25日(2001.10.25)

(31)優先権主張番号 PQ 6876

(32)優先日 平成12年4月13日(2000.4.13)

(33)優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71)出願人 モノクワント プロプライアタリー リミ  
ティド

オーストラリア国,サウス オーストラリア  
5034,ウェイビル,グリーンヒル ロード  
67,シー/ - グラント ソートン サ  
ーピシーズ(エスエー)プロプライアタリー  
リミティド

(72)発明者 モーリー , アレクサンダー アラン

オーストラリア国,サウス オーストラリア  
5045,グレネルグ,コリー テラス 60/3  
2

(74)代理人 弁理士 石田 敬 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新生又は非新生細胞の検出方法

(57)【要約】

本発明は、哺乳動物体内のリンパ系新形成の進行を定性的及び/又は定量的に監視する方法、そしてさらに特定のには、分子スクリーニング技術を利用してリンパ系新形成の進行を監視する方法に関する。本発明の方法は、新生リンパ系疾病状態の進行の監視、緩解中の新生リンパ系細胞レベルの監視、緩解状態から疾病状態への対象の再発確率予想、又は既存の治療薬及び/又は新しい治療剤の有効性の査定を含む(ただしこれらに制限されるわけではない)一定範囲の利用分野において有用である。関係する態様において、本発明は同様に、哺乳動物体内のクローンリンパ球集団を定性的及び/又は定量的に検出するため、そしてより特定のには、新生リンパ系細胞が体性遺伝子再編成を受け、かくして新しく遺伝的に全く異なるクローン集団を形成している場合又は単数又は複数のクローンリンパ球集団が免疫学的応答に寄与している場合といった対象体内の多数のクローンリンパ球集団を検出するための方法も同様に提供している。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 哺乳動物体内のリンパ系新生状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検体中に含有された核酸分子と、新生細胞の特徴であるマーカー核酸分子又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記マーカー分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記マーカー分子について富化する段階；及び前記富化されたマーカー核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法。

【請求項2】 前記基準核酸分子が、ドライバ核酸分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによりマーカー分子について富化する段階にはさらに、基準核酸分子の濃度を低減させる段階が内含される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 富化段階は、タグ付けされたドライバ核酸分子に対しハイブリッド形成しなかった非マーカー核酸分子を除去し、あらゆるミスマッチハイブリダイゼーション核酸分子を酵素により分割し、ドライバ分子を除去することによって実施される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 富化段階が、ゲル又はサイズ排除又は親和力又はその他のマトリクスを介した二本鎖分子の移動差に基づいてハイブリダイゼーション及びミスマッチヘテロ2本鎖分子から基準マーカーホモ2本鎖分子を分離することにより実施される、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 前記マトリクスがカラム又は毛管の中に入れられている、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記ドライバ分子がUNGを用いることで除去される、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 前記マーカーが、再編成TCR又は免疫グロブリン可変領域

核酸分子又はその誘導体又は類似体である、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 前記可変領域核酸分子が、再編成可変領域遺伝子セグメントのゲノム形態である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記リンパ系新生状態がリンパ系悪性状態である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記監視が、微小残存腫瘍状態の監視である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 生体検体中の細胞のクローン集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法。

【請求項13】 前記細胞のクローン集団が、新生細胞の集団である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記新生細胞が悪性である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記新生細胞が、新生リンパ系細胞である、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項16】 前記マーカーが、再編成TCR又は免疫グロブリン可変領域核酸分子又はその誘導体又は類似体である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記可変領域核酸分子が、再編成可変領域遺伝子セグメントのゲノム形態である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記分離が2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動である、請求項12～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 対象の新生状態が、新生細胞のクローン進化である、請求項12～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】 生体検体中の多数の非新生リンパ系細胞を検出及び/又は定量化するための方法において、前記非新生細胞がマーカー核酸分子によって特

徴づけされ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動で  
き、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、か  
かる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子  
を検出する段階が含まれる方法。

【請求項21】 前記分離が2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動である、請求  
項20に記載の方法。

【請求項22】 実質的に図及び/又は例を参考にして以上で記述された通  
りの請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の分野**

本発明は、哺乳動物体内のリンパ系新形成の進行を定性的及び／又は定量的に監視する方法、そしてさらに特定的には、分子スクリーニング技術を利用してリンパ系新形成の進行を監視する方法に関する。本発明の方法は、新生リンパ系疾病状態の進行の監視、緩解中の新生リンパ系細胞レベルの監視、緩解状態から疾病状態への対象の再発確率の予想、又は既存の治療薬及び／又は新しい治療剤の有効性の査定を含む（ただしこれらに制限されるわけではない）一定範囲の利用分野において有用である。関係する態様において、本発明は同様に、哺乳動物体内のクローンリンパ球集団を定性的及び／又は定量的に検出するため、そしてより特定的には、新生リンパ系細胞が体性遺伝子再編成を受け、かくして新しく遺伝的に全く異なるクローン集団を形成している場合又は単数又は複数のクローンリンパ球集団が免疫学的応答に寄与している場合といった対象体内の多数のクローンリンパ球集団を検出するための方法も同様に提供している。

**【0002】****発明の背景**

本明細書のいずれの先行技術についての参照指示も、その先行技術がオーストラリアにおける一般常識の一部を成すものであるということの何らかの形の示唆又は認知ではなく、かかるものとしてみなされるべきではない。

免疫応答に役立つ細胞であるリンパ球には、抗体を産生するBリンパ球と細胞免疫に関与するTリンパ球という2つのタイプのものがある。発達中に、特異的免疫応答を発生させるべく、各々のリンパ球は独特の要領で1つ又は数個の特異的遺伝子、すなわちBリンパ球については免疫グロブリン遺伝子そしてTリンパ球についてはT細胞レセプタ遺伝子を再編成する。このとき、これらのリンパ球の子孫は全て同じ再編成を担持することになる。

**【0003】**

新生物は、単細胞の遺伝子変化の加重の結果として発生すると考えられている。その細胞のその後の増殖は、子孫集団を発生させる。B又はTリンパ球の悪性

変化から発生する新生物（往々にして「癌」と呼ばれる）は従って主として細胞クローンを含み、その各々が初代細胞の中に存在したものと同一遺伝子再編成を含有している。二次細胞再編成が、新生クローン内で発生する可能性があり、これは遺伝的に異なるサブクローンを導くことになる。

#### 【0004】

従って、リンパ球新生物はクローン障害である。これらは、単細胞内の単数又は複数の突然変異が細胞及びその後代を漸進的かつ指数的に増殖させた後に発生する。例えば、リンパ性白血病クローンが体内に $10^{11} \sim 10^{12}$ 個の細胞に達する場合、臨床的症候が結果として起こる。治療しない場合、クローンは拡大し続け、約 $10^{13}$ 個の白血病細胞が存在すると死に至る。しかしながら、患者が細胞毒性治療を受けた場合、クローンはサイズが縮小し、約 $10^{10}$ 個未満の細胞しか含まなくなった場合、もはや従来の技術によっては識別できなくなる。この時点で、患者は、臨床的及び血液学的緩解状態にあると判断されるが、この「緩解」という語は実際には、連続する白血病細胞数の一方の終着点に向かう幾分か恣意的な点しか意味しない。緩解中に残存する可能性のある白血病細胞の数は分かっておらず、 $0 \sim 10^{10}$ の範囲内にある可能性があるため、緩解が達成された後の治療は経験的なものであり、その強度は、診断において又は治療の初期に決定されたさまざまな臨床的な要素又は臨床検査による予知的な要素に基づいている。その結果、患者の中には、受ける治療が少なすぎる者もあれば、多すぎる可能性もある。

#### 【0005】

悪性リンパ球を定量化するための現行方法には、クローンの全ての細胞が共有する「マーカー」の使用が関与している。マーカーは、1つの表面抗原又は数個の表面抗原のパターンであってもよいし、或いは又分子変化であってもよい。使用される分子変化は、染色体転座又は逆位が関与するものと免疫グロブリン又はT細胞レセプタ遺伝子の編成を使用するものという2つのタイプに大きく分類できる。

#### 【0006】

現行の方法は、その複雑性、実施の容易さ、感度及び応用性がさまざまである

。一般に、複雑性と感度の間には直接的な関係があり、最も感度の高い方法は通常非常に複雑で時間のかかるものである。その複雑性のため、新生リンパ系細胞の数を測定するため、分子マーカーとして遺伝子再編成を使用する現行の方法は、なお、研究用手段として使用するためのみに適し、広く用いられる臨床的用途には適していない。

#### 【0007】

最小残存腫瘍を検出し定量化することに関して、基本的問題は、不均一な正常ポリクローナルリンパ球から誘導された不均一マーカーのバックグラウンドに対して新生リンパ系クローンから特定のマーカーを検出し定量化するという問題である。検出レベルを高めるための大部分のアプローチは、新生リンパ系マーカー自体を直接的かつ能動的に検出するための方法を改善することに基づいてきた。例えば、PCRベースの方法は、ラベル付けされた配列特異的プローブを用いたプロービングを使用してきたか又は新生リンパ系配列に特異的なPCRプライマを用いたPCR初回免疫を使用してきた。異なる1つのアプローチは、新生リンパ系表現型の直接的検出に依存している。

#### 【0008】

しかしながら問題のDNAのプロービング又は増幅に基づく最も一般的に使用されている分子技術に付随する重大な欠点は、特異的プローブ又はプライマを適切に設計し合成するためのヌクレオチド配列情報に対する先行必要条件にある。このため、かかる技術は、必然的に複雑で費用のかかるものとなっている。

従って、非常に感度が高くしかも実施が簡単な、対象体内の新生リンパ系細胞レベルの定性的及び/又は定量的検出のための改良型方法を開発するニーズが存在している。本発明まで導いた研究作業の中で、本発明者らは、哺乳動物体内のリンパ系新形成の進行を監視するための単純かつ感度の高い方法を開発した。該方法の単純性及び感度は、本発明者らが、まず最初に対象マーカーに関するヌクレオチド配列情報を得る必要なく、新生リンパ球特異的マーカー、特にT細胞レセプタ又は免疫グロブリン領域についてコードする再編成された核酸分子の存在について分子レベルで生体検体をスクリーニングすることに基づく検出方法を開発したという事実由来している。それでもなお、該方法はきわめて感度の高い

ものである。

#### 【0009】

本発明者らは、不均一DNA集団から問題のDNAを特異的プロービング又は特異的に増幅することを試みるのではなくむしろ非マーカバックグラウンドDNAを減少させることによって、新生細胞をスクリーニングする非常に高感度でかつ単純な方法が可能となる、ということを見極めた。特に、本発明者らは、診断において得られた新生リンパ球DNAの検体で患者の検査DNAをハイブリッド形成することにより、ハイブリッド形成されていない検査DNA又は不適切ハイブリダイゼーションを効率良く除去し、かくして新生DNAマーカ集団を有効に富化させることができるということを見極めた。このとき、低減されたレベルの非マーカバックグラウンドDNAのバックグラウンドに対して、新生シグナルの検出が行なわれる。検出には、PCR、蛍光検出、免疫検出又は酵素検出といったような一般的な検出システムが関与している。非新生バックグラウンド分子の除去により、使用される検出システムとは無関係に感度が増大することになる。

#### 【0010】

この方法は、分子スクリーニング技術を利用するためのヌクレオチド配列情報に対する通常的必要条件を軽減し、かくして、かかる技術について現在入手可能な高い方の感度レベルを維持し、さらに一部のケースではそれを改善しながら、該技術の実施を著しく簡略化する。

関連する態様においては、新生リンパ球内のT細胞レセプタ又は免疫グロブリン可変遺伝子の特異的分子再編成に基づいて、当該本発明者らは同様に、リンパ球新形成の診断、特に初期診断の後明らかになる体性新生リンパ球再編成（すなわちクローン進化）の診断のための高効率でかつ高感度の方法を提供するように2次元ゲル電気泳動技術も適合させた。

#### 【0011】

##### 発明の要約

本明細書及び請求の範囲全体を通して、前後関係から相反する形が必要となるのでないかぎり、「含んで成る」という語及びその三人称単数形及び現在進行形

は、記述されている整数又はステップ又は一群の整数又はステップの内含を意味するものの、その他のいずれかの整数又はステップ又は一群の整数又はステップの除外を意味するものではないと理解すべきである。

#### 【0012】

発明の一態様は、哺乳動物体内のリンパ系新生状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検体中に含有された核酸分子と、新生細胞の特徴であるマーカー核酸分子又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記マーカー分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記マーカー分子について富化する段階；及び前記富化されたマーカー核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法を提供する。

#### 【0013】

本発明のもう1つの態様は、哺乳動物体内の新生リンパ系状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又は類似体の一部分に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法を提供している。

#### 【0014】

本発明のさらにもう1つの態様は、哺乳動物体内のリンパ系悪性状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時

間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法に向けられている。

【0015】

本発明のさらにもう1つの態様は、ヒトの体内のリンパ系悪性状態を監視するための方法において、前記ヒトに由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法に向けられている。

【0016】

本発明のさらにもう1つの態様は、哺乳動物体内の新生リンパ系状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又はその類似体に相補的な核酸ドライバ分子又はその誘導体又は類似体を、前記ドライバ分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子、ハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子及び核酸ドライバ分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法を提供している。

【0017】

本発明のさらなる態様は、生体検体中の細胞のクローン集団を検出及び／又は定量化するための方法において、前記細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前

記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法に向けられている。

【0018】

本発明のもう1つのさらなる態様は、生体検体中の新生リンパ系細胞集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記検体がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法を提供する。

【0019】

本発明のさらにもう1つの態様は、生体検体中の新生リンパ系細胞集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動であり、かつ核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法を提供している。

【0020】

本発明のさらにもう1つのさらなる態様は、哺乳動物中の新生細胞を検出及び/又は定量化するための方法において、前記新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記哺乳動物に由来する検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法を提供している。

【0021】

もう1つの態様においては、生体検体中の多数の非新生リンパ系細胞を検出及び/又は定量化するための方法において、前記非新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同

時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法が提供されている。

#### 【0022】

好ましくは、前記分離は、2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動である。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、部分的には、新生マーカー核酸分子を同定すると共に検査用検体中に存在する非マーカーバックグラウンド核酸分子を減少させるための手段を提供する目的での基準核酸分子の使用に基づいている。これにより、新生リンパ系状態を監視するための単純でありながらきわめて感度の高い方法を開発が容易になった。関連する態様において、本発明者は、核酸の長さ及び配列に基づく2次元電気泳動分離を通したマーカー核酸分子の同時移動パターンに基づいた、新生細胞といったクローン細胞の集団を同定しかつ/又は監視するための技術を開発した。

#### 【0023】

従って、本発明の1つの態様は、哺乳動物体内の新生リンパ系状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検体中に含有された核酸分子と、新生細胞の特徴であるマーカー核酸分子又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記マーカー分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記マーカー分子について富化する段階；及び前記富化されたマーカー核酸分子を定性的及び/又は定量的に検出する段階を含んで成る方法を提供している。

#### 【0024】

対象の新生リンパ系細胞「の特徴である」、「マーカー核酸分子」という記載は、新生リンパ系細胞内に見い出されるものの非新生細胞内には発見されないか又は有意な数の非新生細胞中に発見されない分子についての記載として理解されるべきである。「有意な」という語は、対象マーカーの検出が、対象の哺乳動物の

体内に存在する新生リンパ系細胞のレベルの有意な標示を提供することを意味している。マーカーは、細胞内分子、分泌分子又は膜内外分子といったようなタンパク様分子をコードする核酸分子又はその領域であり得る。代替的には、マーカーは、それでもなお対象の新生細胞の特徴である非コーディング配列を含むことができる。マーカー分子は、DNA又はmRNAといったようなRNAであり得る。

#### 【0025】

マーカー分子が、タンパク様分子をコードするDNA分子である場合、その発現は、構成的であってもよく又、そうでなければその転写及び翻訳を誘発するべく新生細胞によって刺激シグナルが受取られることが必要となる可能性もある。本発明の方法は、それ自体マーカー核酸分子のためのスクリーニングに向けられていることから、ゲノミックDNAが検出対象である場合、マーカーが発現されているか否かは重要ではない。しかしながら、対象の方法がmRNAの検出に向けられ、前記マーカーによってコードされるタンパク質が構成的に産生されるものでない場合、スクリーニングに先立ち対象の新生細胞を適切な形で刺激することが必要となるだろう。かかる刺激は、対象の新生細胞を含む生体検体が哺乳動物から収獲された後でin vitroで実施されてもよいし、或いは又、生体検体の収集に先立ち哺乳動物に刺激シグナルが投与されてもよい。さらには又、マーカー核酸分子は、その形質転換に先立ち対象の新生細胞内に通常発見されるものであってもよい。代替的には、マーカーは、その形質転換の時点で対象の新生細胞に導入されるものであってよい。例えば、形質転換が非新生細胞のウイルス感染によって誘発される場合、対象マーカーは、ウイルス由来又はウイルス特異的分子でありうる。

#### 【0026】

好ましくは、マーカーは、T細胞レセプタ（本書中「TCR」と呼ばれる）鎖又は免疫グロブリン鎖の再編成されたゲノム可変領域核酸分子である。本発明をいかなる形であれ制限することなく、各々のリンパ系細胞は、およそ $10^{16}$ 個の全く異なる可変領域構造の合計抗原多様性を生成するべく再編成された特定の遺伝子に応じてその生殖細胞系可変領域遺伝子セグメント（V及びJ又はV、D及

びJセグメント)の体性組換えを受ける。T細胞又はB細胞といったような一定の任意の与えられたリンパ系細胞において、TCR又は免疫グロブリン分子を含む2鎖のうちの2つ以上の再編成に起因して、少なくとも2つの全く異なる可変領域遺伝子セグメントの再編成が発生する可能性が高い。特定的に言うと、TCRの、  
、  
又は鎖及び免疫グロブリン分子の軽鎖である。任意の与えられた免疫グロブリン又はTCR遺伝子のVJ又はVDJセグメントの再編成に加えて、ヌクレオチドは、セグメント間の接合部において無作為に除去及び/又は挿入される。こうして、多大な多様性が生み出されることになる。

#### 【0027】

従って本発明は、より特定的には、哺乳動物体内の新生リンパ系状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又は類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び/又は定量的に検出する段階を含んで成る方法を提供する。

#### 【0028】

好ましくは、前記可変領域核酸分子は、再編成された可変領域遺伝子セグメントのゲノム形態である。

「リンパ系細胞」に対する言及は、免疫グロブリン又はTCR可変領域遺伝子セグメントの少なくとも1つの生殖細胞系セットを再編成させたあらゆる細胞に対するものであると理解すべきである。再編成されうる免疫グロブリン可変領域コーディングゲノミックDNAには、重鎖又は  
又は  
軽鎖に結びつけられた可変領域が含まれるが、一方再編成可能なTCR鎖可変領域コーディングゲノミックDNAには、  
、  
及び鎖が含まれる。この点において、1つの細胞は、それが少なくとも1つの免疫グロブリン又はTCR遺伝子セグメント領域の可変領域コーディングDNAを再編成したことを条件として、「リンパ系細胞」の

定義の範囲内に入るものと理解されるべきである。細胞が同様に、再編成されたDNAを転写し翻訳していることは必要ではない。この点において、「リンパ系細胞」はその範囲内に、TCR又は免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントを再編成したもののそれでも再編成鎖（例えばTCR - 胸腺細胞といったような）をまだ発現していない、又はそのTCR又は免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントの両方の鎖をまだ再編成していない未熟なT及びB細胞を内含しているが、いかなる形であれそれに制限されるわけではない。この定義はさらに、少なくとも幾分かのTCR又は免疫グロブリン可変領域再編成を受けているもののその他の形では成熟T細胞又はB細胞に従来結びつけられた表現型又は機能特性を全て示し得ないリンパ系様細胞にまで拡大される。従って、本発明の方法は、1つの可変領域遺伝子領域の少なくとも一部分の再編成が発生したことを条件として、発達の任意の分化段階にあるリンパ系細胞、活性化されたリンパ系細胞又は非リンパ系/リンパ系様細胞を含む（ただし、これらに制限されるわけではない）細胞の新形成を監視するために使用可能である。

#### 【0029】

少なくとも1つの可変領域遺伝子領域の再編成が完成していることが好ましいものの、本発明の方法はそれでも、部分的再編成しか示さない新生細胞を監視するためにも応用可能である、ということも理解すべきである。例えば、DJ組み換え事象のみを受けたB細胞は、部分的再編成のみを受けた細胞である。DJ組換えセグメントがさらにVセグメントと組換えを行なってしまうまで、完全な再編成は達成されないことになる。本発明の方法は従って、このマーカ配列に相補的な基準分子を利用して1つのTCR又は免疫グロブリン鎖の部分的又は完全な可変領域再編成を検出するように設計され得、そうでなければ、例えば、より高い特異性が必要とされ、新生細胞がTCR又は免疫グロブリン鎖の両方の可変領域を再編成した場合、両方の再編成形態に向けられた基準分子を利用することができる。

#### 【0030】

「新生細胞」に対する言及は、異常な「成長」を示す細胞に対する言及として理解すべきである。「成長」という語は、その最も広い意味で理解されるべきで

あり、増殖の意味を内含する。この点において、異常細胞成長の一例としては、細胞の無制御増殖がある。リンパ系細胞の無制御増殖は、(例えば白血病患者の血液中に見られるような)単細胞懸濁液又は中実腫瘍のいずれかの形をとる細胞集団を導く可能性がある。新生細胞は、良性細胞又は悪性細胞のいずれの場合もある。好ましい実施形態においては、新生細胞は、悪性細胞である。この点において、「新生状態」に対する言及は、対象の哺乳動物における新生細胞の存在に対する言及である。「新生リンパ系状態」には、白血病、リンパ腫及び骨髄腫において発生するような異常に高い数の新生細胞の存在に対する言及によって特徴づけられる疾病状態に対する言及が含まれるものの、この語句は同様に、哺乳動物の体内に発見される新生細胞の数が、明らかな疾病状態から緩解状態へ又はその逆方向への哺乳動物のシフトを画定するものと通常みなされている閾値よりも低いような状況に対する言及も内含するものと理解されるべきである(緩解の間に存在する細胞数は、往々にして「最小残存腫瘍」と呼ばれる)。さらに、哺乳動物体内に存在する新生細胞の数が、本発明の到来以前に利用されていたスクリーニング方法により検出可能な閾値より低い値に低下した場合でも、その哺乳動物はなお「新生状態」を示すものとみなされる。

#### 【0031】

好ましい一実施形態においては、本発明は、哺乳動物体内のリンパ系悪性状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び/又は定量的に検出する段階を含んで成る方法に向けられている。

#### 【0032】

さらに一層好ましくは、前記監視は、最小残留疾病状態の監視である。

対象の哺乳動物由来の「検査用検体」に対する言及は、その最も広い意味にお

いて、1つの哺乳動物に由来する材料のあらゆる検体を内含するものとして理解すべきである。これには、組織及び体液（例えばリンパ系試料、血液、リンパ液、糞便又は気管支分泌物といった生検材料）といった哺乳動物の体内に天然に存在する検体及び例えば肺洗浄の後に肺から又は浣腸の後に結腸から抽出された食塩溶液といったような、哺乳動物の体内に導入されその後取出された検体の両方に対する言及が内含される。本発明の方法に従って検査される生体検体は、直接検査されてもよいし、そうでなければ、検査に先立ち何らかの形の処置が必要となる場合もある。例えば、生検検体は、検査に先立ち均質化を必要とする可能性がある。検体が細胞材料を含む場合、基準核酸分子と核酸材料の相互作用を容易にするため細胞材料中に存在する核酸材料を抽出するか又はその他の形で露呈することが必要となるかもしれない。先に詳述したように、検査がmRNAマーカ配列を検出するように設計されている場合、検体は、検査以前に何らかの形の刺激も必要とする可能性がある。

#### 【0033】

本書中に開示されている方法に従って検査するのに最も適しているのはどのようなタイプの検体であるかの選択は、監視されている新生状態の性質によって左右されることになる。例えば、新生状態がリンパ系白血病である場合、血液検体、リンパ液検体又は骨髄吸引液が適切な検査用検体を提供する可能性が高いと思われる。新生状態がリンパ腫である場合、リンパ節生検又は血液又は骨髄検体が、検査用組織の適切な供給源を提供する可能性が高いと思われる。新生細胞の原供給源を監視しているのか又は原点からの新形成の転移又はその他の形の拡散の存在を監視すべきかについての考慮も同様に必要とされることになる。この点において、いずれか1つの哺乳動物から一定数の異なる検体を収獲し検査することが望まれるかもしれない。任意の与えられた監視シナリオについて適切な検体を選ぶことは、当業者の技量の範囲内に入るとと思われる。

#### 【0034】

本書で使用されるような「哺乳動物」という語には、ヒト、霊長類、家畜（例えば、馬、牛、羊、豚、ロバ）、実験動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、モルモット）、コンパニオンアニマル（例えばイヌ、ネコ）及び捕獲野生動物（例

えばカンガルー、鹿、キツネ)が内含される。好ましくは、哺乳動物はヒト又は実験動物である。さらに一層好ましくは、哺乳動物はヒトである。

#### 【0035】

この好ましい実施形態に従うと、本発明は、ヒトの体内のリンパ系悪性状態を監視するための方法において、前記ヒトに由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又はその類似体に相補的な核酸基準分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法に向けられている。

#### 【0036】

本発明の方法は、実際の又は推定上の新生リンパ系状態を監視することを目的として以上で定義した通りのマーカー核酸分子と相互作用し得る基準核酸分子の使用に基づいている。この点において、「監視」に対する言及は、新生状態の初期診断後の対象に関する新生リンパ球の存在又はそのレベルについて対象を検査することに対する言及として理解されるべきである。「監視」という語には、日、週、月又は年の一定期間にわたる一連の検査又は1回限り単発検査の両方の実施に対する言及が内含されている。検査は、緩解状態にある哺乳動物が再発する確率を予測すること、治療プロトコルの有効性を監視すること、緩解状態にある患者の状態を点検すること、治療養生法の適用前後の新生状態の進行を監視して適切な治療に関する決定に到達する上での一助となるか又は新しい治療形態を検査すること、を含めた数多くの理由のうちのいずれかのために行なわれる。従って、本発明の方法は、臨床的手段及び研究手段の両方として有用である。

#### 【0037】

「核酸」に対する言及は、デオキシリボ核酸及びリボ核酸又はその誘導体又は類似体の両方に対する言及として理解すべきものである。

基準核酸分子は、天然に、組換えによって、又は合成によって産生され得る。

対象のマーカ分子に関する配列情報がわかっている場合、基準分子は、合成又は組換えにより生成され得る。しかしながら好ましい実施形態においては、本発明は、マーカ分子との関係におけるヌクレオチド配列情報を得ることが可能でないかつ/又は望ましくないような状況に対し応用される。このことは、本発明の方法が、臨床的環境の中で数多くの患者についての新生リンパ系状態の監視に応用される場合に特に関連している。特に、TCR又は免疫グロブリン可変領域再編成は、新生リンパ球の特に適切なマーカであることから、一定の与えられた患者の新生リンパ球が示す特定の可変領域再編成が一意的なものとなる確率が最も高い。1人の患者が一次新生リンパ系状態のため2度診察を受けにきた場合でも、第1の一次新生リンパ系状態に由来する新生細胞の可変領域再編成が、第2の一次新生リンパ系状態に由来する新生細胞のものとは異なる可能性は高い。

#### 【0038】

好ましい実施形態においては、基準核酸分子は、ドライバ核酸分子といったような天然に発生する分子である。「ドライバ」核酸分子は、本発明の方法を介して監視されつつある哺乳動物から単離された基準核酸分子を意味するものとして理解すべきである。分子は、必然的に本発明の方法を最初に実施する前に単離される。本発明において使用するのに適したドライバ分子の位置を特定し、同定し単離する方法は、当業者にとって周知のものと思われるが、1つの好ましい実施形態においては、ドライバ分子は、診断時点で対象の哺乳動物から得られた新生リンパ系細胞の検体から誘導された再編成TCR又は免疫グロブリン可変領域ゲノミックDNAである。本発明の方法で使用するのに適したドライバ分子は、例えば、診断時点で得られた細胞から抽出されたDNA又はRNAの中に存在する再編成TCR又は免疫グロブリン遺伝子の核酸増幅によって調製され得る。いかなる形であれ本発明の作用を制限するわけではないものの、新生リンパ系状態は、通常、異常な症候で患者が診察を受けにきた結果として診断されることになる。これらの症候は、通常、新生リンパ系細胞が高い濃度で存在することによってもたらされてきた(通常B細胞白血病といったような新形成については骨髓中99%以上、胸腺細胞白血病については胸腺中95%以上そして中実リンパ系腫瘍を含む細胞の99%以上)。従って、新生細胞の検体は、診断の時点か又は治療

養生法を開始する前の任意の時点で容易かつ迅速に単離され得る。任意のいずれかの患者から十分な細胞又はDNA又はRNA又はドライバ核酸分子検体を獲得し保管でき（例えば冷凍アリコート）、かくして、その患者の新生リンパ系状態の監視を必要なだけ又は望まれるだけ長く維持することが可能になっている。

#### 【0039】

従って本発明の方法は、哺乳動物体内の新生リンパ系状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又は類似体に相補的な核酸ドライバ分子又はその誘導体又は類似体を、前記ドライバ分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び／又は定量的に検出する段階を含んで成る方法を提供している。

#### 【0040】

好ましくは、前記新生状態は悪性状態であり、より一層好ましくは、前記哺乳動物はヒトである。

「誘導体」及び「類似体」に対する言及は、天然、合成又は組換え型供給源からのフラグメント、部分、部分、突然変異体、相同体、擬似体及び類似体に対する言及を内含するものと理解されるべきである。前記核酸分子の誘導体には、核酸配列の特定のエピトープ又は部分をもつフラグメントが内含される。例えば、基準分子は、それが十分なマーカーである場合、可変領域の一部分のみをコードする。同様にして、可変領域の一部分のみが、免疫グロブリン再編成のD<sub>J</sub>領域のみ又は接合点のみ、といったように、十分なマーカーを提供できる。この定義づけは同様に、その他のタンパク様又は非タンパク様の分子に融合された核酸分子をも内含している。対象の核酸分子は例えば、前記分子の単離又は検出を容易にするタグに融合され得る。本書で考慮されている類似体には、その化学的構成又は全体的配座に対する修飾といったような核酸配列に対する修飾が内含されるが、これに限られるわけではない。例えば基準核酸分子は、キャリアオーバーされ

たあらゆる望ましくない基準分子をその後除去できるようにするための酵素分割標的を提供する目的でウラシルヌクレオチドを示すことができる。これには同様に、例えば、バックボーン形成又は相補的塩基対ハイブリダイゼーションレベルにおける場合のように核酸配列がその他の核酸配列と相互作用する要領に対する修飾も含まれる。ヌクレオチド又は核酸配列のビオチニル化は、本書に定義されている通りの誘導体の一例である。核酸配列の誘導体は、単一又は多数のヌクレオチド置換、欠失及び/又は付加から誘導されうる。「誘導体」という語は、例えば天然の産物をスクリーニングした後に得られた生成物といったような核酸配列の活性のうちの任意の単数又は複数のもを示す核酸配列を包含するものとして、と同時にペプチド核酸といったような異なるバックボーン上のヌクレオチド配列を包含するものとしても理解すべきである。

#### 【0041】

検査用検体内に存在する任意のマーカ分子との相互作用が容易になるように検査用検体の核酸分子と基準核酸分子を接触させることは、任意の適切な方法によって実施可能である。これらの方法は、当業者にとって既知のものとなる。この点で、「相互作用」に対する言及は、相補的ヌクレオチド塩基間のハイブリダイゼーションといった何らかの相互作用形態又は、対象の核酸分子の核酸部分間の結合形成といったようなその他の何らかの相互作用形態に対する言及として理解されるべきである。相互作用は、共有結合、水素結合、ファンデルワールス力又はその他の相互作用メカニズムといった結合形成（ただしこれらに制限されるわけではない）を介して起こり得る。2つの核酸分子間の「ハイブリダイゼーション」に対する本書中の全ての言及は、前記分子間の任意の相互作用形態を包含するものとして理解すべきである。この相互作用を容易にするためには、基準核酸分子及び検査用検体の核酸分子の両方が、1本鎖基準分子と1本鎖マーカ分子の間のハイブリダイゼーションが発生するのに十分な時間だけかつそれに十分な条件下で、部分的又は完全に一本鎖状態にされていることが好ましい。基準核酸分子のコーディングストランドとそれに相補的なマーカ核酸分子のストランド、又は基準核酸の非コーディングストランド及びそれに相補的であるマーカ核酸分子のストランドの間でハイブリダイゼーションが発生しうるということが

わかるはずである。

【0042】

基準分子に関連して用いられる「核酸分子」という句は、その機能の中にマーカー核酸配列に対するヌクレオチド配列の少なくとも1つの領域のハイブリダイゼーションが含まれている、ヌクレオチド配列又はその誘導体を含むあらゆる分子を意味するものとして理解すべきである。従って「マーカー核酸分子」という句は、核酸配列又はその誘導体を含むものの上述のように新生細胞の特徴であり従って接触段階を介した同定の対象であるようなあらゆる分子を内含する。核酸基準分子及びマーカー核酸分子は両方共、これらの分子の検出及び/又は富化を容易にするタグといったような非核酸成分を含むことができる。これらのタグは、対象である方法の実施中任意の適切な時点で取り込まれ得る。

【0043】

本発明の理論又は作用様式を何らかの形で制限することなく、ハイブリダイゼーション条件下で基準核酸分子と検査用検体の核酸分子を接触させることにより、基準：マーカーホモ2本鎖分子、基準：基準ホモ2本鎖又はマーカー：マーカーホモ2本鎖分子の形成が結果としてもたらされる可能性がある。基準分子が非マーカー分子とミスマッチな形でハイブリッド形成する場合又はマーカー又は非マーカー核酸分子が、異なる配列の核酸分子とハイブリッド形成する場合にはヘテロ2本鎖分子が形成されることになる。マーカー；マーカーホモ2本鎖分子形成の濃度は、余剰の基準核酸分子と検査用検体を接触させることによって最小限におさえることができる。

【0044】

なおも本発明を何らかの形で制限することなく、基準核酸分子と検査用検体中に存在するマーカー核酸分子のハイブリダイゼーションにより、単純でかつ特異的な形でのマーカー核酸分子の富化が容易になる。特異性は、マーカー分子が基準分子に対しハイブリッド形成してホモ2本鎖分子を形成し、かくして検査用検体の一部をも形成するその他の非マーカー不均一核酸分子からマーカー分子を弁別するという事実によって提供される。

【0045】

「富化」に対する言及は、検査用検体中に含まれた生殖細胞系非マーカー核酸分子との関係におけるマーカー核酸分子の比を増大させることに対する言及として理解されるべきである。これは、例えば非マーカー核酸分子を分解、除去又はその他の形で減少させることによって達成できる。本発明の方法に従うと、富化段階は、マーカー核酸分子を増幅させることにより検査用検体内のマーカー核酸分子の濃度を増大させるのではなくむしろ検体中に含まれた非マーカー核酸分子の濃度を減少させる形をとる。本発明の理論又は作用様式を制限することなく、本発明者らは、マーカー核酸集団を増幅させようと試みるよりもむしろ検査用検体からの非マーカー核酸分子濃度を減少させることに基づく富化段階を利用することにより、対象の検出方法は、非特異的増幅が発生する危険性がないきわめて感度の高い手段を提供するということを発見した。さらに、本書で用いられている富化のタイプは、対象のマーカー核酸分子を標的とする基準核酸分子の使用のおかげで実現可能となっている。この分子スクリーニング方法が全体的に簡略なものであることも同様に、基準核酸分子を使用しかくして高度に特異的なプローブ及び/又はプライマ分子の設計を容易にする目的で将来のマーカー核酸分子の配列分子を行なう必要性が回避されているということと関係している。

#### 【0046】

「富化」に対する言及は、検査用検体から全ての非マーカー核酸分子を除去する富化段階に制限されるものでない、ということを理解すべきである。むしろ、先に提供した定義に従うと、これは、検査用検体中の非マーカー核酸分子の濃度の減少に対する言及である。従って、濃度の減少の程度は変動しうるものである。本発明の方法は、マーカー核酸分子集団の純度を改善するため単数又は複数の逐次的富化段階を行なうことにまで拡大されるというふうに理解すべきである。単数又は複数の富化段階を実施する必要があるか否かについての決定は、ケースバイケースで当業者が下すことができる。新生リンパ系の数が多い場合、例えば治療の初期段階の間、高濃度で存在することになるマーカー核酸分子を検出するのに単一の単純な富化段階で充分であり得る。しかしながら、緩解状態にある患者が検査対象である場合には、対象のマーカー分子の純度を最大限にするため2つ以上の異なる富化技術を実施することが望ましい可能性がある。

## 【0047】

マーカー核酸分子のための富化は、制限的な意味なく、以下のものを含む適切な一定数の技術のうちのいずれか1つ又は複数のものによって実施できる：

(i) 検査用検体に由来する核酸分子又は基準核酸分子のいずれかの中にタグを取込むこと。洗浄その他の手段による望まれない分子の除去を容易にするため、共有結合又は非共有結合のいずれによってであれ、固相に対し分子をカップリングするためにタグを使用することができる。タグは、酵素分割に対する耐性をもつ基準核酸又は検査用検体に由来する核酸分子のいずれかの上に核酸配列を提供するためにも使用可能である。かかるタグは、当業者にとって既知であり、一般に用いられているものとしてはビオチン、ジゴキシゲン及びフルオレセインがある。もう1つの一般的に使用されているタグには、酵素耐性をもつペプチド又はホスホロチオエートバックボーンが関与している。かかる用途に適した固体相には、プラスチック表面、ゲルマトリクス及びコーティングされた磁気ビーズが含まれ、これらには、ストレプトアビジン又は抗体といった捕獲分子が付着してよい。

(ii) カラム又は毛管といった器具の中に入ったゲル又はサイズ排除又は親和性又はその他の基質を通した2本鎖分子の移動差に基づき、ハイブリダイゼーションミスマッチヘテロ2本鎖分子から基準：マーカーホモ2本鎖分子を分離すること。

(iii) ミスマッチ修復タンパク質とヘテロ2本鎖分子の会合を介して、非マーカー核酸分子に対し部分的にハイブリッド形成された基準核酸分子間で形成されたものといったようなハイブリダイゼーションミスマッチヘテロ2本鎖分子を除去すること。除去は、ミスマッチ修復タンパク質がカラム又はプレートの表面といったような固相表面にカップリングされている場合のような任意の適切な技術によって容易になる。もう1つの例においては、ゲル又は基質を通してのヘテロ2本鎖分子の移動で示差的に改変するミスマッチ修復タンパク質が使用され得る。

(iv) マッチしなかった1本鎖核酸分子及び/又はハイブリダイゼーションミスマッチヘテロ2本鎖分子を、化学的又は酵素的分割技術を利用して除去する

こと。好ましくは、S1ヌクレアーゼ及び/又はT4エンドヌクレアーゼを利用した対象核分子の消化といったような酵素技術が利用される。

(v) 固相に対しタグ付きホモダイマ及びヘテロダイマをカップリングし、ハイブリッド形成されていない1本鎖分子、ヘテロダイマー又はホモダイマーを除去すること。この除去段階は、例えば、基準核酸分子に対しミスマッチな形でハイブリッド形成したいずれかの非マーカ分子を1本鎖状態にするべく残留核酸分子集団を洗浄しかつ次に加熱又は化学的処置をほどこすことによって達成できる。本発明を何らかの形で制限することなく、ハイブリダイゼーションミスマッチ非マーカ分子は、完全にハイブリッド形成されたマーカ分子よりも低い温度で融解する。このとき、洗浄段階により、新たに1本鎖にされた分子を除去することができる。

#### 【0048】

対象の富化段階は、以上の項目(i)-(v)に概略的に説明された技術のうちの単数又は複数のものである適切ないずれかの単数又は複数の技術を実施することによって達成可能である、ということを理解すべきである。対象技術は、固相に対する検査用検体核酸分子又は基準核酸分子のいずれかの付着を介してか又は分離用ゲル又はカラムを介して、又は溶解状態で、といったものを含む任意の数の方法で実施することができる。最も適切な富化プロトコルを決定することは、当業者の能力範囲内に入ると思われる。富化が複数の技術の使用を含む場合、これらの技術は好ましくは、逐次的に実施される。

#### 【0049】

以上で詳述した富化技術のうちのいずれか単数又は複数のものであることを応用することに加えて、ドライバ分子は好ましくは、マーカ核酸分子を検出するに先立ち除去される。これによりさらにマーカ核酸集団が富化される。これは、以下のものを含めた一定数の技術のうちのいずれか1つのことによって達成され得る。

(i) 単離された核酸分子2本鎖分子を1本鎖にし、基準核酸分子を、その中に取込まれたタグによって析出すること。例えば、以上で記述された通りのピオチン標識又は磁気ビーズ。

(ii) 基準核酸分子内に取込まれた適切な固定タグを用いて基準分子を特異

的に分解すること。例えば、ウラシル類似体を基準分子DNA内に取込むことにより、酵素ウラシルNグリコシラーゼ(UNG)を利用した基準分子の特異的消化が可能となる。本発明を何らかの形で制限することなく、基準：基準分子ホモ2本鎖分子が形成されたか又はドライバ：非マーカヘテロ2本鎖分子が富化を生き延びたのであるかぎり、このような段階によって、これらの余剰分子が除去されることになる。

(iii) 基準分子ではなく検査用検体に由来する核酸分子の増幅を可能にするため、これらの核酸分子に対してのみ付着された酵素耐性タグを利用すること。このことは、基準分子の相対的割合を大幅に減少させる。

#### 【0050】

最も好ましい実施形態においては、ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子の濃度を低減させることによるマーカ分子についての富化段階は、さらに、基準核酸分子の濃度の低減段階を内包している。

この最も好ましい実施形態に従うと、哺乳動物体内の新生リンパ系状態を監視するための方法において、前記哺乳動物に由来する検査用検体中に含有された核酸分子と、再編成TCR又は遺伝子可変領域核酸分子又はその誘導体又は類似体に相補的な核酸基準ドライバ分子又はその誘導体又は類似体を、前記基準ドライバ分子と前記可変領域核酸分子の相互作用を容易にするのに十分な条件下でかつそれに十分な時間だけ接触させる段階；ハイブリッド形成されていない核酸分子及びハイブリダイゼーションミスマッチ核酸分子及び核酸ドライバ分子の濃度を低減させることによって前記可変領域核酸分子について富化する段階；及び前記富化された可変領域核酸分子を定性的及び/又は定量的に検出する段階を含んで成る方法が管理されている。

#### 【0051】

最も好ましい実施形態においては、富化段階は、タグ付けされたドライバ核酸分子にハイブリッド形成されなかった非マーカ核酸分子を除去し、ミスマッチハイブリダイゼーション核酸分子を酵素により分割し、例えば、UNGの使用によりドライバ分子を除去することによって実施される。

マーカー分子の「検出」は、当業者にとって既知の適切なあらゆる方法によって実施可能である。この点において、「定性的」検出に対する言及は、新生リンパ系細胞集団の有無を検出することに対する言及として理解されるべきであり、一方「定量的」検出は、対象哺乳動物の体内に存在する新生リンパ系細胞のレベルの検出に対する言及として理解されるべきである。本発明の方法において使用するのに適した検出技術には、以下のことが内含されるが、これらに制限されるわけではない。

【0052】

(i) シグナルを発出するか又は、シグナルを発出する検出システムにカップリングされうる検出タグで、富化されたマーカー核酸分子集団を標識付けし、次に前記信号を検出すること。これには、例えば比色分析検出、蛍光検出、酵素検出又は放射性タグ検出が含まれる：又は、

(ii) 富化されたマーカー核酸分子をその検出に先立ち増幅すること。これは、マーカー核酸のコピー数が少ない（例えば、患者が緩解状態にあることを理由にして）などに必要とされ得る。マーカー核酸集団は富化されていることから、対象マーカー分子に特異的に向けられた増幅プライマを合成する必要はない。むしろ、対象マーカー核酸集団を増幅するために汎用プライマを利用することができ、電気泳動により、増幅された生成物を検出することができる。

【0053】

(iii) 異なる配列の既知の量の標準を当初の検査用検体に添加し、標準用のものとマーカー用のものの計2つの基準ドライバを用いて初期富化を実施し、最終的に得られる未知マーカー分子及び富化された標準の相対的量を決定することにより、（未知の）マーカーの定量的検出を達成することができる。未知のマーカーの量を次に計算することができる。

【0054】

(iv) 以下で記述される通りの2次元電気泳動分離を使用することができる。

本発明を何らかの形で制限することなく、本発明者らは、本発明の方法により、血液中では検体中の合計細胞数あたり  $10^{-5}$  個の白血病細胞までそして骨髄中

では $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 個までの疾患の検出及び定量化が可能となる。これは、実施が同等に簡単である現在利用可能な技術に比べ1000倍の改善に相当する(表1参照)。

#### 【0055】

関連する態様においては、当該本発明者らは、以上で定義されたマーカー核酸分子が、そのサイズ及びヌクレオチド配列について示す差異に起因して独特の電気泳動による移動パターンを示す、ということを見極めた。従って本発明者らは、単離されかくして検出可能である集団を形成するべく検査用検体中に含まれた不均一非マーカー核酸分子からのマーカー集団の電気泳動による分離に基づき生体検体中のマーカー核酸分子の集団の存在を定性的かつ/又は定量的に検出するための方法を開発した。個々のマーカー核酸集団の存在についてスクリーニングすることにより、新生状態において観察されるような細胞のクローン集団の拡大が発生したか否かを見極めることが可能である。

#### 【0056】

従って、本発明のもう1つの態様は、生体検体中の細胞のクローン集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法に向けられている。

#### 【0057】

「～を特徴とする」という句は、対象細胞が定義づけされた特徴を示すことを表わすように意図されているが、その細胞が同じくどんな特徴を示す可能性があるかについての制限としては意図されていないということを理解すべきである。同様に、対象の特徴が必然的に対象細胞のみによって示される必要はないものの、好ましい実施形態においては対象の特徴が、問題の細胞を検体中に存在する問題外の細胞と区別して同定する特徴である、ということも理解すべきである。

#### 【0058】

「クローナル(クローンの)」という語は、対象の細胞集団が共通の細胞源に

由来したものであることを意味している。例えば、新生細胞の集団は、形質転換を受けた単細胞に由来する。この点において、遺伝的に全く異なる新生細胞集団を産生するべくさらに核再編成又は突然変異を受ける新生細胞も又、細胞の「クローナル」集団である。もう1つの例においては、急性又は慢性感染又は免疫刺激に応答して拡張するT又はBリンパ球も同様に、本書に提供された定義の範囲内の「クローナル」細胞集団である。好ましくは、細胞のクローナル集団は、新生細胞の集団であり、さらに好ましくは新生リンパ系細胞である。

【0059】

従って、本発明は、より特定的には、生体検体中の新生リンパ系細胞集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記検体がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法を提供する。

【0060】

「新生」及び「リンパ系」に対する言及は、以上で示されたものと同じ意味を有するものと理解すべきである。

「マーカー核酸分子」に対する言及は、上述のものと同じ意味を有する。対象の新生細胞がリンパ系細胞であるかぎり、対象のマーカーは、好ましくは再編成TCR又は免疫グロブリン可変領域核酸分子である。

【0061】

この好ましい実施形態に従うと、生体検体中の新生リンパ系細胞集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれ、ここで前記新生リンパ系細胞の再編成TCR又は免疫グロブリン可変領域核酸分子が同時移動する方法が提供されている。

【0062】

「生体検体」に対する言及は、前述のような哺乳動物由来の検査用検体に対する言及として理解されるべきである。検体が細胞材料を含むかぎり、その検体中に含まれている核酸材料を抽出又はその他の形で単離又は露呈することが必要であるかもしれない。以上で詳述した通り、対象マーカー核酸分子がmRNA分子であるかぎり、この転写産物の産生をアップレギュレートするために検査用検体に対し刺激シグナルを最初に適用することが必要であるかもしれない。同様に、特異的プライマが利用可能である場合検査に先立ちマーカー核酸集合を増幅するか又は核酸分子のより大きな出発集団を提供する目的で汎用プライマを利用して検査用検体の核酸集団を全体として増幅することも又望ましいかもしれない。

#### 【0063】

本発明を、いずれかの理論又は行動様式に制限することなく、再編成TCR又は免疫グロブリン可変領域遺伝子といったようなマーカー分子は、独特のヌクレオチド配列を示し、この配列はかくして独特のTCR又は免疫グロブリン可変領域をコードする。本発明者らは、かかる分子を含有する核酸検体を、個々の分子の長さ及びそれらのヌクレオチド配列に応じた分離に基づいた電気泳動分離に付した時点で、マーカー分子が、電気泳動ゲル上の共通の終点まで同時移動するということを見極めた。最終的に得られる核酸移動パターンは、電気泳動分離の前後又はその間に検査用検体の核酸分子内に取込まれた分子（例えば蛍光タグ又は抗原）のオートラジオグラフィ、フルオログラフィ又は、視覚化といったような技術を利用してゲル上で視覚化することができる。

#### 【0064】

ISMを含む数多くの核酸分子集団が、独特の長さ/配列の電気泳動位置まで移動したことになるため、そして任意の与えられた位置に存在する核酸分子の数を相対的又は絶対的に決定することが可能であることから、非マーカー核酸分子集団のレベルとの関係において対象のマーカー核酸分子がより高い濃度で存在することに起因して、新生リンパ系細胞集団が検査対象の生体検体内に存在したか否かを迅速かつ簡単に見極めることができる。

#### 【0065】

この点において、マーカー核酸分子が「前記細胞集団内で同時移動可能である

」ことに対する言及は、電気泳動分離が長さ（すなわち塩基対の合計数）及び配列（すなわち対象の核酸分子の実質のヌクレオチド配列）のパラメータに基づいている場合に、同じクローナル集団に由来する細胞から誘導されるかぎりにおいて対象マーカー核酸分子が、同じ終点まで電気泳動的に移動しているということに対する言及に等しい。本発明を何らかの1つの理論又は行動様式に制限することなく、本発明は、クローナル核酸分子集団を電気泳動分離するのに、新生細胞集団及び非新生不均一細胞集団のマーカー分子間に存在する配列差を用いることに基づいている。

#### 【0066】

長さ及び配列に基づく分子の電気泳動分離は、適切ないずれの技術を利用してでも実施可能である。好ましい実施形態においては、この技術は、検査核酸分子集団がまず最初に長さに従って分離され次に分子が尿素勾配ゲル内を走行させられる2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動である。核酸分子のH結合と尿素の干渉差は配列に左右されることから、これは、ヌクレオチド配列差に基づいて核酸分子を分解するための適切な方法の1つの例を提供する。温度も、変性剤として使用可能である。一定の又は勾配変性条件を使用することができる。

#### 【0067】

従って、本発明はより特定的には、生体検体中の新生リンパ系細胞集団を検出及び/又は定量化するための方法において、前記新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動であり、かつ核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法を提供している。

好ましくは、前記新生細胞は悪性である。

#### 【0068】

本発明をいかなる形でも制限することなく、当該本発明者は、2次元電気泳動が、非マーカー核酸分子集団内のマーカー核酸分子の検出感度を10～100倍増大させるということを見極めた。

本発明のこの態様の方法は、哺乳動物の体内のクローナル細胞集団を検出する、単純でしかも高感度の方法を提供している。該方法は、比較のために検出された核酸分子の濃度と比較した又はその他の終点位置で定量的標準と比較した場合に、特定の終点まで同時移動した核酸分子の濃度がより高いことにより立証されるように、大きなクローナル集団のスクリーニングに特に有用である。本発明の方法は診断手段として使用され得るものの、これは哺乳動物体内の新生細胞集団のサイズ変調を検出することによる新生状態の監視のため又は、新生細胞のクローン進化の発生を検出するために特に有用である。

#### 【0069】

本発明を何らかの形で制限することなく、全ての未使用可変領域セグメントがその細胞の早期分化段階中の生殖細胞系の初期再編成の時点で必ずしも消失しているわけではないことから、新生リンパ系細胞は、可変領域遺伝子のさらなる再編成を受けることができる。例えば、緩解に入ってから2～5年後に再発した白血病患者は、新しいTCR又は免疫グロブリン再編成を時として示す。これは通常、診断前後のものと新生細胞のクローン進化に起因している。本発明の方法を用いると、ヌクレオチド配列情報の必要性なく、感度の高いやり方で新しいクローナル集団といったような1つのクローナル集団を同定することが可能である。この方法を一定の時間周期にわたる監視用手段として使用した場合、細胞集団のサイズ又は供給源の変化を追跡することができる。例えば、或る種の新生状態の場合、骨髄中の新生細胞の存在の証拠は、不良な予後と結びつけられることになるだろう。もう1つの例では、それは、新生細胞の治療中の予測手段として有用である。特定的には、治療から5週間後に、なお高レベルの新生細胞を示す患者は一般に、新生細胞レベルが低レベルまで減少した患者に比べて不良な予後を有することになる。

#### 【0070】

本発明のこの態様の方法は、本発明の第1の態様において記述された検査方法に加えて又はその代りに使用することができる。本発明を何らかの形で制限することなく、本発明の第1の態様は、マーカー分子を検出する基準分子を利用して新生細胞が検出され、かくして陽性結果を達成するのにその他の正常なクローナ

ル細胞集団と比べ多い数で新生細胞が存在する必要性がなくなることから、後者の方法よりもさらに感度の高い結果を提供する確率が高い。両方の方法共、新生細胞に関するマーカー核酸配列情報に対する必要性を無くするものの、本発明の後者の態様は、さらに基準分子に対する必要性をも無くする。これは、クローン進化が検出の対象であり新しいクローンに対応する基準核酸分子がまだ獲得されていない場合に特に使用される確率が高い。この点において、本発明の後者の態様は、実際に、監視及び診断の両方のための手段を提供する。

#### 【0071】

従って、関連する態様において、本発明は、哺乳動物中の新生細胞を検出及び/又は定量化するための方法において、前記新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記哺乳動物に由来する検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法を提供している。

#### 【0072】

好ましくは、前記新生状態は、新生細胞のクローン進化である。最も好ましくは、前記検出は診断である。

さらに一層好ましくは、前記電気泳動分離は、2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動である。

もう1つの態様において、生体検体中の多数の非新生リンパ球を検出及び/又は定量化するための方法において、前記非新生細胞がマーカー核酸分子によって特徴づけられ、該マーカー核酸分子が前記細胞集団内で電気泳動により同時移動でき、前記検体中に含まれた核酸分子を電気泳動により分離する段階が含まれ、かかる分離が核酸の長さ及び配列に基づいており、さらに前記分離された核酸分子を検出する段階が含まれる方法が提供されている。

#### 【0073】

好ましくは、前記分離は、2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動である。

本発明のさらなる特長は、以下の制限的意味のない例においてさらに充分記述されている。

## 例 1

「ドライバ」と呼ばれる診断時に得られた白血病再編成を、検査DNAに余剰に添加する。このドライバを、後続のプロセス中においてひき続きその除去を可能にするため、いくつかの方法のうちの一つで修飾する。その後、DNA変性させ、再度アニールさせる。結果として、ドライバは、白血病検査分子又は正常な検査分子のいずれかと会合する。白血病検査分子との会合は、パーフェクトマッチを生み出すことになり、一方異なる配列をもつ正常な不均一再編成との会合はミスマッチを生み出すことになる。ミスマッチはこのとき、カラム又は下降毛管を通過の移動差に基づくか又はカラム又はプラスチック表面といったような表面に対し物理的に付着されたミスマッチ修復タンパク質との会合により、物理的手段で除去され得る。次にドライバを除去し、正常な分子の「ノイズ」から分離された富化された白血病分子をその後検出し定量化する（例2参照）。

## 例 2

最初の手順は、例1と同じである。検査DNAに対し白血病ドライバを余剰に添加し、変性を行ない次に再アニーリングを行なう。ここでも又、ドライバは、白血病検査分子又は正常な検査分子のいずれかと会合する。このとき、ミスマッチを認識する化学プロセス又は酵素の結果として、化学的又は酵素的にミスマッチが除去される。その結果、分割した分子は、このときその後のポリメラーゼ連鎖反応において増幅しなくなる。白血病ドライバ分子は、ウラシル-N-グリコシラーゼ、ヌクレアーゼ又は制限酵素といったようなさまざまな酵素によって除去される。定量化は、もとの検査DNAに対して標準クローナルDNAを既知の量だけ添加することによって実施される。標準ドライバは、標準DNAを保護するためにも使用される。不均一正常再編成及びドライバDNAを除去した後、最終的PCRを、蛍光色素で標識づけされたプライマを用いて実施する。標準とマーカーの相対的量を、ゲル電気泳動中の蛍光を測定する遺伝子シーケンサ及び該当するソフトウェアといった計器を用いて決定する。この方法は単独で、血液中には $10^{-5}$ のレベルまで、又骨髄中では $10^{-5} \sim 10^{-6}$ の検体中合計細胞あたりの白血病細胞レベルの検出及び定量化を可能にすることが実証された。これは、表1中で言及されている患者の大部分に対して適用可能な現行の単純な方法に対

する1000倍の改善に相当する。

### 例3

これは、白血病と不均一正常再編成の間の配列差を用いるという原理に基づいている。配列差は、変性濃度勾配ゲル電気泳動により検出可能である。検査材料中の白血病及び正常遺伝子再編成は、GCクランプを伴うプライマを用いてホリメラーゼ連鎖反応によって増幅され、その後2次元勾配ゲル電気泳動に付されることになる。標的再編成及び任意の基準再編成が、2次元ゲル内のより特定のな点まで移動することになる。感度を得るためには、ゲル中のDNAを膜に移し、次に放射性又は化学的手段により、これを検出する。2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動は、新しい方法ではなく、クローナルリンパ球再編成を検出するためには1次元DGGEが使用されてきたが、悪性リンパ系クローンを検出するための2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動の使用は、生成物のための新しい用途である。しかしながら、一部の状況下では、PCR産物の検出のための単純な方法が充分感度の高いものでない可能性もある。そのような場合には、標識づけされたプローブを用いたプロービング又は感度の良い二次検出の使用といったようなさらに高感度の方法が必要となる。定量は基準モノクローナルDNAを使用することによって達成されたことになる。例1及び/又は2からの材料を研究するためにこの方法が使用される場合、PCRでは、上述の例2の中で言及されているプライマよりもむしろGCクランプを伴うプライマが使用されることになる。

### 例4

#### 迅速な方法プロトコル

1. エキソヌクレアーゼを用いて、ドライバを1本鎖にする：ドライバDNA, エキソヌクレアーゼ、10×i緩衝液及びH<sub>2</sub>Oを混合する。インキュベートする。

#### 【0074】

ドライバは、診断時の白血病DNAからのものである。方法の終了時に向けていかなる微量ドライバも除去できるような形でウラシルを取込むことにより、これを修飾する。

2. ドライバ及びマーカを変性させアニーリングして、ヘテロ2本鎖分子及

びホモ2本鎖分子を形成する。

【0075】

ドライバは、全てのマーカーストランドがドライバストランドと2本鎖分子を形成するような形で、余剰に存在する。幾分かの余剰の1本鎖ドライバ分子も同様に存在することになる。

3. S1ヌクレアーゼでS1を処置する： S1酵素及び10×S1緩衝液を添加する。インキュベートする。

【0076】

S1ヌクレアーゼは、実質的度合のミスマッチが存在するヘテロ2本鎖分子を消化する。これは又、余剰な1本鎖ドライバをも除去する。

4. 結合及び洗浄緩衝液(B&W)中の調製されたストレプトアビジンコーティングしたビーズに検体を結合させる。回転ホイール上でインキュベートする。B&Wで3回、H<sub>2</sub>Oで1回洗浄する。

【0077】

マーカーは、ビオチンで標識付けされたプライマを用いて調製された。従って、1つのマーカー分子が1本のストランドを形成するヘテロ2本鎖分子及びホモ2本鎖分子が、ストレプトアビジンに対する結合のおかげで固定相に結合することになる。

5. T4エンドヌクレアーゼで処理する： T4酵素、T4酸緩衝液を添加する。インキュベートする。B&Wで3回、H<sub>2</sub>Oで1回洗浄を行なう。

【0078】

この酵素はヘテロ2本鎖分子を消化する。

6. CelIエンドヌクレアーゼで処置する。CelI酵素、10×H緩衝液、クレノウ及びH<sub>2</sub>Oを添加する。インキュベートする。B&Wで3回、H<sub>2</sub>Oで1回、H<sub>2</sub>Oで3回高温にて洗浄する。

この酵素はヘテロ2本鎖分子を消化する。

【0079】

7. S1エンドヌクレアーゼで処置する： S1酵素、10×S1緩衝液、及びH<sub>2</sub>Oを添加する。インキュベートする。B&Wで3回、H<sub>2</sub>Oで1回、洗浄する

。

この酵素はヘテロ2本鎖分子を消化する。

8. エンドヌクレアーゼで処置する。 酵素、10x 緩衝液、及びH<sub>2</sub>Oを添加する。インキュベートする。B & Wで3回、H<sub>2</sub>Oで1回洗浄する。

【0080】

エンドヌクレアーゼ酵素は、あらゆる残留ドライバ分子を消化する。

9. 水酸化ナトリウムで1回、B & Wで3回、H<sub>2</sub>Oで3回、高温にて洗浄する。

このステップは、ビーズに結合したあらゆる2本鎖分子の第2のストランドを除去することを目的としている。

【0081】

10. ウラシルDNAグリコシラーゼ(UNG)で処置する: UNG酵素、UNG緩衝液及びH<sub>2</sub>Oを添加する。インキュベートする。

UNGの処置は、取込まれたウラシルを有することになるあらゆる存続するドライバ分子を消化することを目的とする。

11. ストレプトアビジンでコーティングされたビーズの画分についてPCRを実施し、アクリルアミドゲル上にPCR産物を走らせる。最終段階で、該プロセスは、ドライバ分子に対するパーフェクトマッチである、すなわち白血病配列を有しているために処置を生き抜いた単一のマーカーDNAストランドを結果としてもたらしているはずである。

【0082】

独自の基準ドライバを有する基準DNA分子で同じプロセスを実施することによって、定量化が達成される。該プロセスの始めに、さまざまな量の基準分子をマーカー分子と混合させ、プロセス内に取り入れる。プロセスの終りで最終PCRをフルオレセインで標識づけされたプライマを用いて実施し、白血病マーカー及び基準の相対的量を、DNAフラグメント分析を用いた定量化によって決定する。

。

【0083】

当業者であれば、本書で記述した発明が、特定的に記述されたもの以外の変更

及び修正を受け得るものである、ということ認識することだろう。本発明が、かかる全ての変更及び修正を内含するということを理解すべきである。該発明は同様に、本明細書に言及され記されている段階、特長、組成物及び化合物の全て及びこれらの段階又は特長のうちのいずれか複数のものの任意の及び全ての組合せを個別に又は集合的に内含している。

【0084】

【表1】

表1  
1つの集団中の新生リンパ系細胞の検出及び定量のための現行方法

マーカー	方法	利用率	複雑度	感度
1 表層/細胞内抗原	フローサイトメトリ	50%—70%	中程度	中程度 ( $10^{-4}$ )
2 分子マーカー				
(a) 転座	PCR	少数	単純	高度 ( $10^{-6}$ )
(b) 遺伝子再編成				
検出方法—モノクローナル	PCR	≈90%	単純	低度 ( $10^{-3}$ )
—特異的プロッピング	PCR	90%	高度	中程度
—特異的プライマーの作製	PCR	90%	高度	高度 ( $10^{-6}$ )

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、異なる量の未知のマーカー白血病DNAが正常なDNAに添加され、

未知のものの量が例2に記述した方法によって測定される2つの実験のグラフ表示である。

【図2】

図2は、遺伝マーカーの同定による、末梢血単核細胞からのDNAとさまざまな比率で混合された細胞系統DNAの検出の1つの画像である。免疫グロブリン重鎖遺伝子のCDR3領域は、クローン特異的マーカーとして作用する。B細胞系統からのDNAは、1:3~1:3000の細胞系統細胞:血球比を提供するように、さまざまな比率で末梢血から抽出されたDNAと混合された。CDR3領域は、GCクランプされたプライマを用いて、PCRによって増幅された。生成物は、6%のポリアクリルアミドゲル上で電気泳動に付された。矢印は、その細胞系統に特異的なサイズをもつ130及び120塩基対の細胞系統からの2つのマーカー生成物を表わしている。これらは、混合物3中1、10中1及び30中1の割合で見られるが、それ以上の希釈度では見られない。

M: 左側のサイズ(塩基対)をもつマーカー、

C: 細胞系統 DNA 単独

P: 末梢血細胞DNA 単独

~ve: 負の対照(DNA無し)

その他のトラック: 1血球あたりの細胞系統細胞

【図3】

図3は、2次元変性濃度勾配ゲル電気泳動によって分析された、上述の図2に詳述された生成物の画像である。上述の生成物は、まず第1に、標準ポリアクリルアミドゲル上の電気泳動により分析された。生成物を含有するゲルのストリップを切り取り、標準的処方に従って上部の0%飽和から底部の80%まで尿素とホルムアミドを含有する変性濃度勾配ゲルの上面にこれを置いた。生成物を一晩電気泳動に付した。

第1次元分離方向: サイズ毎に、標準的6%ポリアクリルアミドゲル上で

。

第2次元分離方向: ポリアクリルアミドゲル内で変性剤(尿素・ホルムアミド)の濃度勾配に基づき、融解特性による。

A : 単独細胞系統は、1つの主要生成物(円内)を提供する。

B : 希釈細胞系統は、細胞系統生成物としてのゲルの対応する部域内の生成物(円内)を高解像度で示すが、これはサイズ及び融解特性に関し類似している

。

1/3 ~ 1/300に希釈された細胞系統DNAも同様にこの生成物を提供したが、血液DNA単独も負の対照(DNA無し)もこの生成物を提供しなかった

。

結論としては、2次元分離は、1次元分離と比べ約30倍に改善された。

【図1】

迅速な定量：標準クロームの観察及び予測レベルー2回の実験

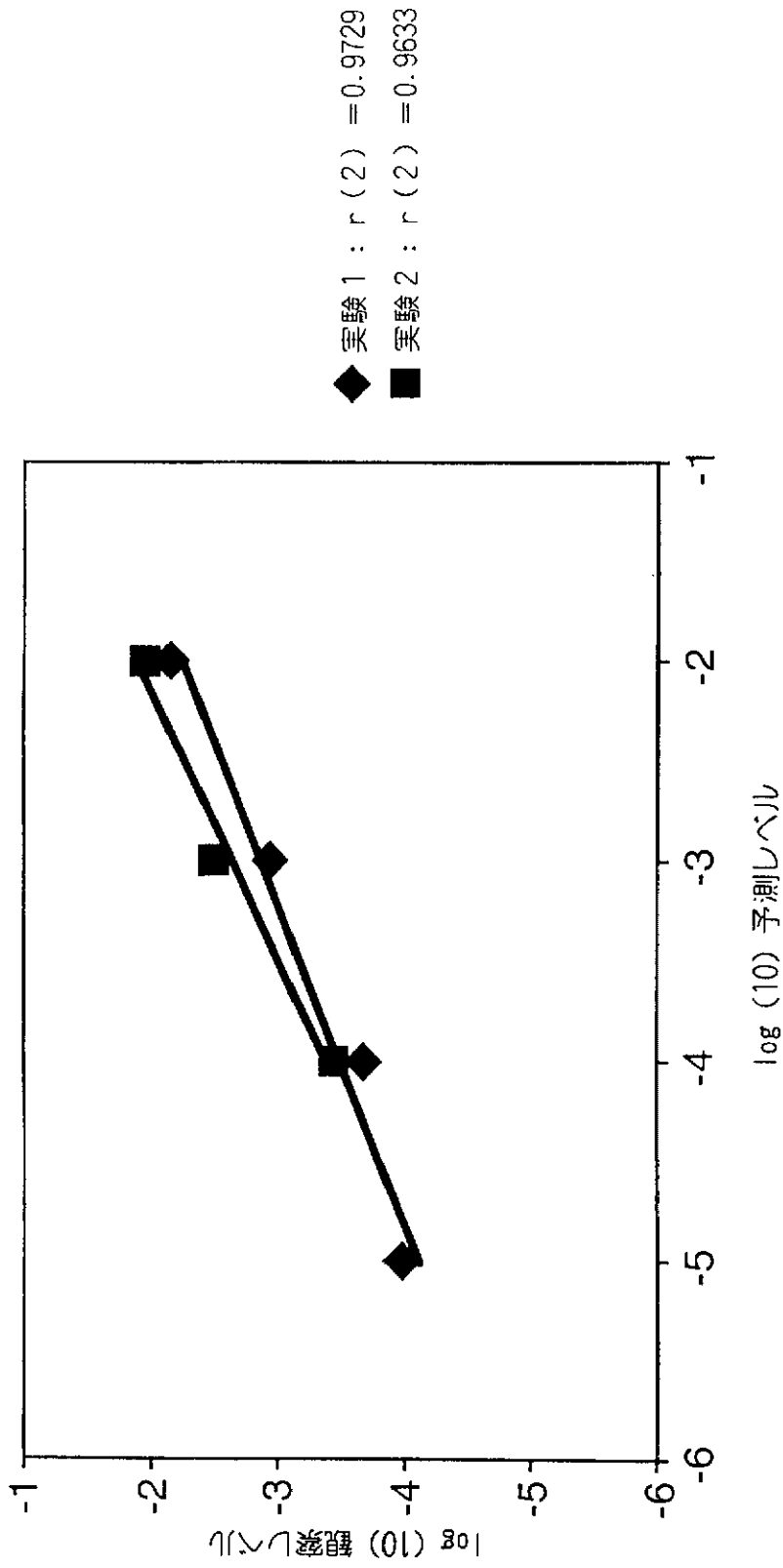


Figure 1

【図2】

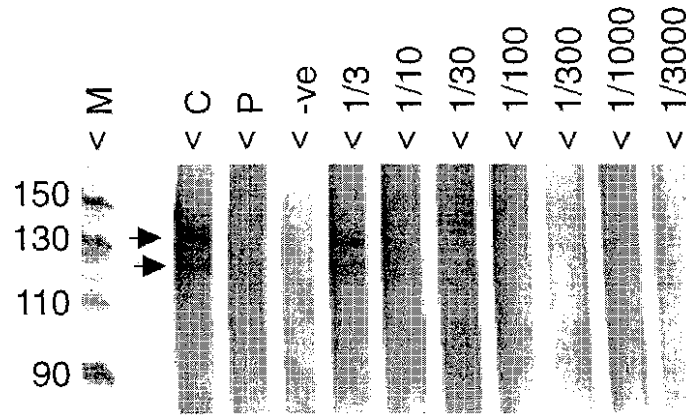


Figure 2

【図3】

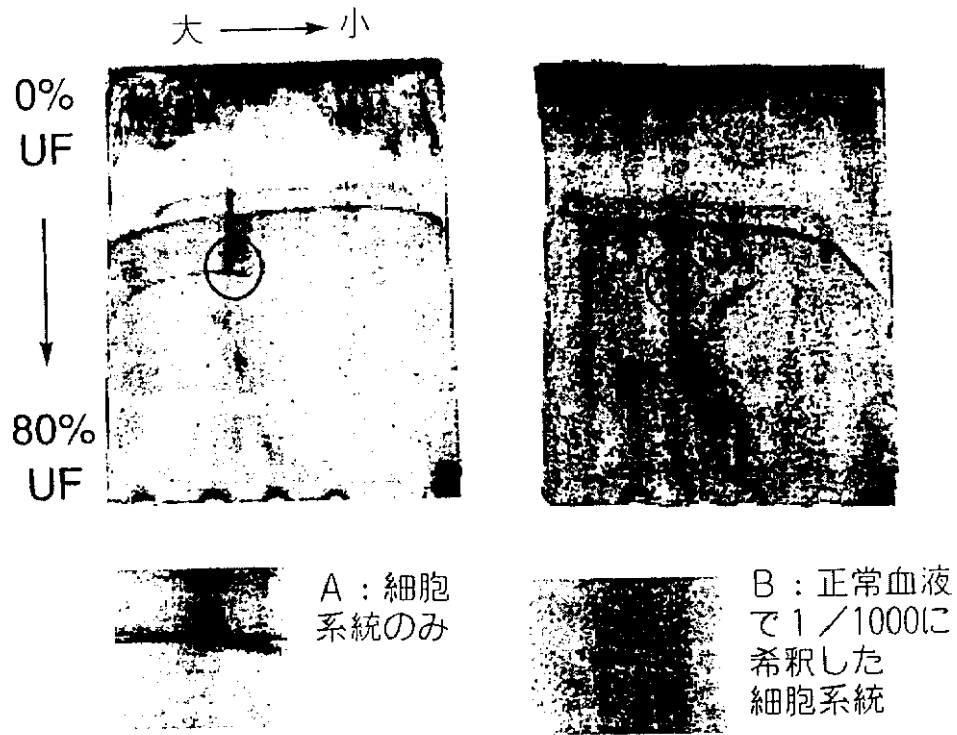


Figure 3

## 【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/00429															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>																	
Int. Cl. <sup>7</sup> : C12Q 1/68																	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>																	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) AS BELOW.																	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AS BELOW																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, Chemical Abstracts, PubMed, Keywords : leukemia, leukaemia, marker, detect, monitor, hybridise, diagnose.																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>																	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	Arnold, A., et. al. 'Immunoglobulin-Gene Rearrangements as Unique Clonal Markers in Human Lymphoid Neoplasms', The New England Journal of Medicine (1983) 309(26):1593-9. See Results.	1 - 11, 13 - 22															
X	Cossmann, J., et. al. 'Gene Rearrangements in the Diagnosis of Lymphoma/Leukemia. Guidelines for Use Based on a Multiinstitutional Study', American Journal of Clinical Pathology (1991) 95(3):347-54. See Abstract, Results and Table 2.	1 - 11, 13 - 22															
A	Alizadeh, A. A., et. al. 'Genomic-scale gene expression profiling of normal and malignant immune cells' Current Opinion in Immunology (2000) 12(2):219-25	1 - 11, 13 - 22															
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex																	
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width: 10%;">"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention															
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone															
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art															
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family															
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 2 August 2001		Date of mailing of the international search report 9 August 2001															
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer <b>ALISTAIR BESTOW</b> Telephone No : (02) 6283 2450															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/AU01/00429**

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Sanchez-Cespedes, M., et. al. 'Molecular Detection of Neoplastic Cells in Lymph Nodes of Metastatic Colorectal Cancer Patients Predicts Recurrence', Clinical Cancer Research (1999) 5:2450-4	1 - 11, 13 - 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/AU01/00429</b>
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos : <b>12</b> because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: The claim does not comprise the special technical feature which is essential to the invention. Such feature is a method involving specifically neoplastic cells or non-neoplastic cells.
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/566		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	サイクス, パメラ ジョイ オーストラリア国, サウス オーストラリア 5050, ベレビュー ハイツ, ユーリラドライブ 26		
(72)発明者	プリスコ, マイケル ジュリアン オーストラリア国, サウス オーストラリア 5074, キャンベルタウン, マインズロード 13		
Fターム(参考)	4B024 AA11 CA01 CA11 CA20 HA08 HA09 HA14 4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ53 QR32 QR35 QR40 QR55 QR62 QS12 QS16 QS17 QS20		

专利名称(译)	检测新生或非肿瘤细胞的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003530860A</a>	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001577517	申请日	2001-04-12
[标]申请(专利权)人(译)	MONOQUANT		
申请(专利权)人(译)	Monokuwanto 专有 Rimitido		
[标]发明人	モーリーアレクサンダーアラン サイクスパメラジョイ プリスコマイケルジュリアン		
发明人	モーリー,アレクサンダー アラン サイクス,パメラ ジョイ プリスコ,マイケル ジュリアン		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6809 C12Q1/6886 G01N27/447 G01N30/88 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6809 C12Q1/6886 C12Q2539/101		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N30/88.E G01N33/53.M G01N33/566 G01N27/26.315.H C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS17 4B063/QS20		
优先权	2000PQ6876 2000-04-13 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种定性和/或定量监测哺乳动物淋巴瘤形成过程的方法，更具体地说，是利用分子筛查技术监测淋巴瘤形成过程的方法。关于方法。本发明的方法包括监测新淋巴样疾病状态的进展，监测缓解期间的新淋巴样细胞水平，预测受试者从缓解到疾病状态复发的可能性，或现有治疗剂和/或新疗法。它在一系列应用中很有用，包括（但不限于）评估药物的功效。在相关方面，本发明还提供了定性和/或定量检测哺乳动物中的克隆淋巴细胞群体的方法，更具体地说，肿瘤性淋巴样细胞经历了体细胞基因重排。因此，例如在形成新的，遗传上不同的克隆种群或当一个或多个克隆淋巴细胞种群有助于免疫反应时，在受试者中检测到大量克隆淋巴细胞。还提供了方法。

表1  
1つの集団中の新生リンパ系細胞の検出及び定量のための検出方法

マーカー	方法	検出率	検出感度	検出精度
1 表型 細胞起源	フローサイトメトリ	50%-70%	中程度	中程度 (10 <sup>-3</sup> )
2 分子マーカー				
(a) 塩基	PCR	少数	単純	高感度 (10 <sup>-4</sup> )
(b) 遺伝子再編成				
検出方法 - モノクローナル	PCR	~90%	単純	中程度 (10 <sup>-3</sup> )
- 特異的プロービング	PCR	90%	複雑	中程度 (10 <sup>-3</sup> )
- 特異的プライマーの検出	PCR	90%	高感度	高感度 (10 <sup>-4</sup> )

【図面の簡単な説明】