

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4589106号  
(P4589106)

(45) 発行日 平成22年12月1日(2010.12.1)

(24) 登録日 平成22年9月17日(2010.9.17)

(51) Int.Cl.	F I
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 Y
<b>C12N 5/073 (2010.01)</b>	C12N 5/00 202B
<b>C12Q 1/04 (2006.01)</b>	C12Q 1/04

請求項の数 23 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2004-509429 (P2004-509429)	(73) 特許権者	503009948
(86) (22) 出願日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		ジェネティック テクノロジーズ リミテッド
(65) 公表番号	特表2005-528616 (P2005-528616A)		オーストラリア国 ビクトリア州 306
(43) 公表日	平成17年9月22日 (2005.9.22)		5 フィッツロイ ハノーバーストリート
(86) 国際出願番号	PCT/AU2003/000676		60-66
(87) 国際公開番号	W02003/102595	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成15年12月11日 (2003.12.11)		弁理士 志賀 正武
審査請求日	平成18年5月26日 (2006.5.26)	(74) 代理人	100089037
(31) 優先権主張番号	60/385,170		弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成14年5月31日 (2002.5.31)	(74) 代理人	100108453
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 母体血由来の胎児細胞を同定し濃化するための胎児細胞マーカーとしての母体抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

母体血サンプルで胎児細胞を同定する方法であって、胎児細胞に結合した母体抗体を検出することを含む方法。

## 【請求項2】

胎児細胞に結合した母体抗体を、前記母体抗体と複合体を形成することができる物質にさらすことをさらに含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

サンプル中で胎児細胞を同定する方法であって、サンプル中の細胞を母体抗体にさらし、胎児細胞に結合した母体抗体を検出することを含み、前記母体抗体が、父由来胎児抗原に特異的な母体産生抗体を含む方法。

## 【請求項4】

前記母体抗体が、可溶性HLA抗原および/または抗イディオタイプ抗体との複合体から、抗体を解離させることを含むプロセスにより調製される、請求項3に記載の方法。

## 【請求項5】

胎児細胞に結合した母体抗体を、前記母体抗体と複合体を形成することができる物質にさらすことをさらに含む、請求項3または4に記載の方法。

## 【請求項6】

前記物質が抗体、抗体断片または免疫グロブリンに結合するポリペプチドである、請求項2または5に記載の方法。

10

20

## 【請求項 7】

前記物質が検出可能に標識される、請求項2、5または6に記載の方法。

## 【請求項 8】

胎児細胞を母体血サンプルから濃化する方法であって、

i)末梢血単核細胞を含む分画を前記サンプルから単離し、

ii)i)における分画を、父由来胎児抗原に特異的な母体産生抗体が前記分画中の胎児細胞と十分に結合できる条件下で、母体血サンプルからの抗体と接触させ、

iii)ii)からの複合細胞を、母体抗体と複合体を形成できる物質と接触させ、

iv)物質-母体抗体複合体に結合した細胞を回収する、工程を含む方法。

## 【請求項 9】

i)が、前記細胞から、前記細胞由来の細胞表面抗原と結合した抗体を除去するかまたは抗原-抗体複合体を除去することをさらに含む、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記母体血サンプルから得られた抗原反応性抗体が、可溶性HLA抗原および/または抗イディオタイプ抗体との複合体からの解離によって調製されている、請求項8または9に記載の方法。

## 【請求項 11】

請求項8のii)およびiii)が、補体溶解経路が機能しないかまたは機能できない条件下で行われる、請求項8から10のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記物質が、検出可能な標識かまたは単離可能な標識に結合する、請求項8から11のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記物質が抗体、抗体断片または免疫グロブリンに結合するポリペプチドである、請求項8から12のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

母体血サンプルから胎児細胞を濃化する方法であって、前記サンプルから胎児細胞-母体抗体複合体を回収することを含む方法。

## 【請求項 15】

母体血から得られる細胞のサンプルから胎児細胞を濃化する方法であって、サンプル中の細胞を母体抗体にさらし、胎児細胞-母体抗体複合体を回収することを含み、前記母体抗体が、父由来胎児抗原に特異的な母体産生抗体を含む方法。

## 【請求項 16】

前記母体抗体が、可溶性HLA抗原および/または抗イディオタイプ抗体との複合体から、抗体を解離させることを含むプロセスにより調製される、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記サンプルから胎児細胞-母体抗体複合体を回収する工程が、前記複合体を前記複合体中の母体抗体に結合できる物質と接触させて、物質-母体抗体複合体が結合した細胞を回収することによって行われる、請求項14から16のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 18】

母体血サンプルから胎児細胞を濃化する方法であって、胎児細胞を含む母体血またはその有核細胞分画を、暫時、胎児細胞-母体抗体複合体が十分形成できる条件下で、母体血漿の抗体含有分画と接触させ、前記複合体を前記複合体中で母体抗体と結合することができる物質と接触させ、物質-母体抗体複合体が結合した細胞を回収することを含む方法。

## 【請求項 19】

母体血漿の前記抗体含有分画が、可溶性HLA抗原および/または抗イディオタイプ抗体との複合体から、母体血漿中の抗体を解離させることを含むプロセスにより調製される、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記物質が、検出可能な標識かまたは単離可能な標識に結合する、請求項17から19のい

10

20

30

40

50

ずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記物質が抗体、抗体断片または免疫グロブリンに結合するポリペプチドである、請求項17から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

父由来胎児抗原に特異的に結合する母体産生抗体の、母体血またはその有核細胞分画から胎児細胞を濃化するための使用。

【請求項 2 3】

父由来胎児抗原に特異的に結合する母体産生抗体の、母体血またはその有核細胞分画中の胎児細胞を同定するための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、母体血由来の胎児細胞を同定し濃化する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

胎児の染色体異常のテストは、多くの場合、羊水穿刺かまたは絨毛膜絨毛サンプリング(CVS)を使用して得た細胞について行う。羊水穿刺は、胎児を囲む羊水から胎児細胞を回収するために使用する手法である。この比較的侵襲的な手段は、妊娠第12週後に実施される。羊水穿刺後は、流産危険率が約0.5%増加する。CVSは比較的侵襲度が小さく、受胎から10週間と早い時期に実施できる。CVS後は、流産危険率が約1%増加する。

【0003】

血小板、色素体、赤血球および白血球などの少なくとも数種の胎児細胞型が、胎盤を通過し母体血中を循環することがわかっている(Douglasら、Am.J.Obstet.Gynec.78、960-973、1959;Schroder、J.Med Genet.12、230-242、1975)。母体血は、胎児細胞型の非侵襲性供給源であるが、母体血から胎児細胞を単離することは、それが単にサブ細胞集団であるからではなく、母体循環中にこのような胎児細胞が希少であり、すべての胎児細胞を同定するマーカーが存在しないことから、困難なものになっている。汎胎児細胞特異的抗体は利用できない。

【非特許文献 1】 Douglasら、Am.J.Obstet.Gynec.78、960-973、1959

【非特許文献 2】 Schroder、J.Med Genet.12、230-242、1975

【非特許文献 3】 J.Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning、John Wiley and Sons(1984)

【非特許文献 4】 J.Sambrookら、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989)

【非特許文献 5】 T.A.Brown(編集者)、Essential Molecular Biology:A Practical Approach、1および2巻、IRL Press(1991)

【非特許文献 6】 D.M.GloverおよびB.D.Hames(編集者)、DNA Cloning:A Practical Approach、1-4巻、IRL Press(1995および1996)

【非特許文献 7】 F.M.Ausubelら(編集者)、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub.AssociatesおよびWiley-Interscience(1988、現在までのすべての最新内容を含む)

【非特許文献 8】 Ed HarlowおよびDavid Lane(編集者)Antibodies:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory、(1988)

【非特許文献 9】 J.E.Coliganら(編集者)、Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons(現在までのすべての最新内容を含む)

【非特許文献 1 0】 Hoffmanら、(Proteomics 1、807-818、2001)

【非特許文献 1 1】 Tsangら、J.Immunol.Methods 138、291-299、1991

【特許文献 1】 米国特許第5,641,870号

【非特許文献 1 2】 「Monoclonal Antibodies:A manual of techniques」、H Zola(CRC P

10

20

30

40

50

ress、1988)

【非特許文献13】「Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications」、J G R Hurrell(CRC Press、1982)

【特許文献2】米国特許第3,817,837号

【特許文献3】米国特許第3,850,752号

【特許文献4】米国特許第3,939,350号

【特許文献5】米国特許第3,996,345号

【特許文献6】米国特許第4,277,437号

【特許文献7】米国特許第4,275,149号

【特許文献8】米国特許第4,366,241号

10

【非特許文献14】Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes And Research Chemicals(R.P.Haugland 第8版、CD-ROM、2001)

【特許文献9】米国特許第6,130,101号

【特許文献10】英国9611997.9号

【特許文献11】米国特許第6,162,931号

【特許文献12】米国特許第5,969,157号

【特許文献13】米国特許第5,830,912号

【特許文献14】WO 02/26891

【非特許文献15】Al-Muftiら(1999)

【非特許文献16】Bianchiら、Eur.J.Obstet Gynecol.Reprod.Biol.92、103-108、2000

20

【非特許文献17】Parkerら、Transplantation 71、440-446、2001

【非特許文献18】The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease、第7版、I,II and III巻、Scriver,C.R.、Beudet,A.L.、Sly,W.S.、およびValle,D.(編集)、Mc Graw Hill、1995

【非特許文献19】Nevensら、J.Chromatogr.597、247-256、1992;Pierce

【非特許文献20】Sisson and Castor、J.Immunol.Methods 127、215-220、1990

【非特許文献21】Coppolaら、J.Chromatogr.476、269-290、1989

【非特許文献22】Folkersenら、J.Immunol.Methods 23、127-135、1978

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0004】

本発明の1つの態様では、胎児細胞-母体抗体複合体を同定するかまたは回収する、母体血由来の胎児細胞を同定かつ/また濃化するための方法が提供される。これらの方法では、様々な異なる胎児細胞型、特に父由来の胎児の抗原に特異的な、母体産生抗体を検出または単離する試薬を使用する。

【0005】

正常妊娠経過中は、父由来の胎児の抗原に対して、母体の体液性免疫反応が上昇する。抗HLA抗体、抗イディオタイプ(抗-抗-HLA)抗体および可溶性HLA抗原の複合ネットワークが母体血漿中に存在する。母体抗体は、父由来のHLA抗原を発現している胎児細胞に特異的に結合できる。この抗体は、特定の妊娠期間に特有であるが、ただし、胎児が同じ父由来の抗原のいくつかを有するその後の妊娠期間中に胎児細胞を同定するのに有用である可能性がある。

40

【0006】

胎児細胞は、胎児細胞の表面に存在する、父由来の胎児の抗原に対して母体で産生された母体抗体を使用して同定され、母体血から回収される。父由来の抗原は、特有の胎児細胞マーカーであり、これが母体血から胎児細胞を単離するためのターゲットとされる。

【0007】

母体末梢血由来の胎児細胞を同定かつ/また単離する方法は、母体血から単離された有核細胞中の胎児細胞に特異的に結合している母体抗体を検出することによって行われる。

【0008】

50

胎児細胞は、母体循環系に混入時より、母体血漿にさらされるため、抗体は採血時にはすでに胎児細胞に結合している。さらにあるいはまた、末梢血単核細胞の調製物と、母体血漿、この血漿の抗体含有分画、またはこの血漿から単離された精製反応性抗体調製物を、胎児細胞と抗体複合体の形成ができる条件下で接触させる。

【0009】

母体抗体と結合した胎児細胞複合体は、二次抗体またはヒト抗体と結合する他の分子によって同定される。胎児細胞は、細胞標識に基づく細胞単離手法によって物理的に単離できる。この手法の例には、二次抗体上に蛍光標識を使用して、蛍光活性化細胞選別が含まれる。また別の例では、二次標識を常磁性ビーズと結合させると、胎児細胞を磁石で単離できる。

10

【0010】

母体抗体はまた、循環系で母体細胞のサブ細胞集団に結合することもある。したがって、場合によっては、さらに物理的にこのような母体細胞を除去するか、分析中に母体細胞を胎児細胞から区別するために前工程または後工程を行う。

【0011】

本発明の濃化方法では、母体細胞に比べて少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも100倍、より好ましくは少なくとも1,000倍、より好ましくは10,000倍、さらにより好ましくは、少なくとも100,000倍の胎児細胞数の増加が生じる。本発明の方法を使用すると、絶対精製(100%胎児細胞)が可能であり得るが、このような厳密さは、本発明の目的には必要ない。本発明は胎児細胞の絶対精製法に限定されない。

20

【0012】

必要であれば、胎児細胞の単離が成功したことは、胎児細胞の独立マーカーを使用して確認できる。胎児が男である場合、これはY染色体に特異的なマーカーである。胎児が女である場合は、胎児細胞の単離は、SNPまたはHLA系などの多型マーカーを使用して確認できる。

【0013】

本発明の方法を使用して単離または濃化した胎児細胞は、胎児の遺伝的疾患の出生前診断に使用できる。基本的に、羊膜穿刺またはCVSなどの侵襲手法によって得た胎児細胞を使用して通常行われているすべての診断手法を行うことができる。このような遺伝疾患の例には、ダウン症、トリソミー18、トリソミー13、鎌状赤血球貧血、21-ヒドロキシラーゼ欠損症、嚢腫性線維化症などが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0014】

本発明の方法は、ヒト胎児細胞を濃化または同定するために行われることが特に好ましいが、この方法は、ウマ、家畜、イヌなどの任意の有胎盤哺乳類由来の胎児細胞を濃化することまたは同定することに使用することもできるがこれらに限定されない。

【0015】

本発明の第2の態様では、本明細書に記載される発明の方法によって単離または取得された胎児細胞を含む組成物が提供される。

【0016】

汎用技法および定義

40

本明細書に含まれている文書、法令、物質、装置、品物などについてのいかなる議論も、本発明の状況を提供することを単に目的とする。これらの事柄のなにもものもまたはすべてが従来技術基盤の一部を形成するかまたは、本出願の各請求項の優先日以前に存在していた本発明関連分野に共通する一般知識であったとは認められない。

【0017】

本明細書に記載された本発明が、具体的に記載された以外に変更および修正が可能であることは、当業者ならわかるであろう。本発明はこのような変更および修正をすべて包含すると理解すべきである。本発明はまた、本明細書に参照し示した工程、特徴、組成物および化合物のすべてを、個々にまたはまとめて、および任意およびすべての組合せで包含し、あるいは2つ以上の工程または特徴を包含するものである。

50

## 【 0 0 1 8 】

本発明は、本明細書に記載した特定の実施例または好ましい実施形態によってその範囲を限定されるものではない。機能的に同等の製品、組成物および方法は、本明細書に記載したとおり、明らかに本発明の範疇に入る。

## 【 0 0 1 9 】

反対に、文脈上他の意味に解すべき場合または具体的に記述された場合を除き、本明細書に単数の整数、工程または要素として本明細書に列挙した本発明の整数、工程または要素は、列挙した整数、工程または要素の単数形と複数形との両方を明らかに包含する。

## 【 0 0 2 0 】

特に断りのない限り、本発明の特定の態様または実施形態を参照して本明細書に記載した各特徴は、必要な変更を加えて本発明の各態様および他のすべての態様または実施形態に適用されるものと解釈される。

10

## 【 0 0 2 1 】

特に定義のない限り、本明細書に使用したすべての技術的および科学的用語は、当分野(たとえば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、核酸化学、ハイブリダイゼーション技術および生化学)の技術者が通常理解しているものと同じ意味を有するものと解釈される。

## 【 0 0 2 2 】

特に指示のない限り、本発明で利用する組換えDNAおよび免疫学技法は、当業者に公知の標準手法である。このような技法は、J.Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning、John Wiley and Sons(1984)、J.Sambrookら、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989)、T.A.Brown(編集者)、Essential Molecular Biology:A Practical Approach、1および2巻、IRL Press(1991)、D.M.GloverおよびB.D.Hames(編集者)、DNA Cloning:A Practical Approach、1-4巻、IRL Press(1995および1996)、およびF.M.Ausubelら(編集者)、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub.AssociatesおよびWiley-Interscience(1988、現在までのすべての最新内容を含む)、Ed Harlow および David Lane(編集者)Antibodies:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbour Laboratory、(1988)、およびJ.E.Coliganら(編集者)Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons(現在までのすべての最新内容を含む)などの情報源の文献中に記載および説明され、引用によって本明細書に組み込まれている。

20

## 【 0 0 2 3 】

本明細書に言及したすべての刊行物は、その全文を本明細書に組み込む。

30

## 【 0 0 2 4 】

本明細書中、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む(comprise)」という言葉、またはその変形「含む(comprises)」あるいは「含む(comprising)」などは、記述した工程または要素または整数、あるいは工程または要素または整数の群を包含することを意味し、その他の工程または要素または整数あるいは要素または整数の群を除外することを意味するものではないと理解すべきである。

## 【 0 0 2 5 】

本明細書で使用されるように、用語「由来する」は、特定した整数が特定の供給源から取得されるが、必ずしもこの供給源から直接得られるものでなくてもよいことを示すと解釈される。

40

## 【 0 0 2 6 】

本明細書で使用されるように、用語「濃化すること」または「濃化」は、胎児細胞数と本発明の方法に供するサンプル中の母体細胞数の比率が、この胎児細胞が由来する母体血サンプル中の同比率に対して上昇したことを示す。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 2 7 】

## 1. 母体抗体-胎児細胞複合体の母体血漿からの直接単離

本発明の1つの実施形態では、母体血に存在する胎児細胞を同定かつ/また濃化するための方法を提供するものであって、この母体血に存在する胎児細胞-母体抗体複合体を同定

50

または回収するものである。

【0028】

母体末梢血由来の胎児細胞の同定および/または回収および/または単離は、母体血から単離された有核細胞中にある胎児細胞に特異的に結合した母体抗体を検出し、単離または回収することを含むプロセスによって好ましく実施される。この母体抗体は、妊娠期間中、たとえば胎児細胞が母体循環系に入り込んだ時から胎児細胞が母体血漿にさらされているために、血液収集の前または血液収集時には胎児細胞に結合しており、これによって母体抗体が結合した胎児細胞複合体が形成される。たとえば、胎児細胞に結合した抗-(HLA抗原)-Ig、または胎児細胞に結合した抗-抗-(HLA抗原)-Igからなる複合体が、母体血サンプルに由来する細胞サンプル中から単離される。

10

【0029】

本発明の別の実施形態では、母体血から胎児細胞を濃化する方法を提供する。この方法は、母体血の胎児細胞-母体抗体複合体と、この複合体中のヒト抗体と結合できる物質とを接触させて、この物質を単離することを含む。

【0030】

好ましい実施形態では、母体血は前もって妊婦被検者から取得する。本方法は、好ましくは第1工程である母体血のサンプルを提供することをさらに包含する。

【0031】

2. 母体血の抗体含有分画を使用した、母体血の細胞分画からの胎児細胞の単離

母体末梢血由来の胎児細胞の同定および/または回収および/または単離もまた、母体血由来の細胞を、母体血漿の抗体含有分画と、暫時母体抗体が結合した胎児細胞複合体が十分形成できる条件下で接触させることを含むプロセスにより実施される。たとえば、胎児細胞に結合した抗-(HLA抗原)-Igを含む複合体が形成される。

20

【0032】

別の実施形態では、母体血サンプルから胎児細胞を濃化する方法を提供する。この方法は、胎児細胞を含む母体血からの細胞調製物と、母体血漿の抗体含有分画あるいは母体血漿からの精製された反応性抗体の調製物とを、暫時母体抗体が結合した胎児細胞複合体が十分形成できる条件下で接触させ、この複合体を、この複合体中のヒト抗体と結合できる単離可能な物質と接触させ、この物質を単離することを含む。

【0033】

別の実施形態では、母体血から取得された細胞のサンプルから胎児細胞を濃化する方法を提供する。この方法は、サンプル中の細胞と母体抗体とを暫時、母体抗体が結合した胎児細胞複合体が十分形成できる条件下で接触させ、この複合体を回収することを含み、この方法では、母体抗体が、父由来の胎児の抗原に特異的な、母体産生抗体を含み、この母体抗体を結合した胎児細胞の複合体を、この複合体中の母体抗体と結合可能で単離可能な物質と接触させ、この物質を単離し、これによって複合体を回収する。

30

【0034】

特に好ましい実施形態で、本発明は母体血サンプルから胎児細胞を濃化する方法を提供する。この方法は、PBMC調製物を、母体抗体が結合した胎児細胞複合体が十分に形成できる条件下で、母体血漿、この血漿の抗体含有分画、またはこの血漿から単離され、精製されたかあるいは部分精製された抗体調製物と接触させて、複合体を回収することを含み、この方法では、母体抗体が、父由来の胎児の抗原に特異的な、母体産生抗体を含む。好ましくは、母体抗体が結合した胎児細胞複合体と、この複合体中の母体抗体と結合可能な物質とを接触させて、この物質を単離し、これによって複合体を回収する。

40

【0035】

さらにより特に好ましい実施形態で、本発明は、母体血サンプルから胎児細胞を濃化する方法を提供する。この方法は、下記工程を含む。

i) 末梢血単核細胞をサンプルから単離し、

ii) i)からの細胞を、父由来胎児抗原に特異的な母体産生抗体が胎児細胞と十分に結合できる条件下で、母体血漿サンプルからの抗体と接触させ、

50

iii)ii)からの複合細胞を、母体抗体と複合体を形成できる物質と接触させ、  
iv)物質-母体抗体複合体に結合した細胞を回収する。

【0036】

本明細書で使用する用語「細胞」「細胞分画」「PBMC」、「PBMC分画」、または類似する用語は、明確に説明すると、たとえばフィコールで血液を精製した後に母体血から単離された有核細胞を指す。当業者なら知っているように、PBMCまたは単離されたPBMCの調製物は、胎児細胞を含めた細胞の混合物を含む母体血の分画である。したがって、胎児細胞が、このような有核細胞分画中の母体PBMCと共に単離される。

【0037】

用語「母体血の抗体含有分画」は、抗体産生細胞、抗体または、たとえばIgMまたはIgGなどの免疫グロブリンを含む母体血の精製または部分精製分画を含むと解釈される。したがって、母体血の抗体含有分画には、明らかに母体血漿から単離されたIgMまたはIgG分画が含まれる。

10

【0038】

本発明の方法の好ましい実施形態では、母体血漿および/または母体血漿の抗体含有分画を、妊婦被検者の血液サンプルから取得し、同じ血液サンプルに由来する細胞調製物と反応させる。

【0039】

好ましい実施形態では、母体血漿または母体血漿の他の抗体含有分画および/または母体血漿の細胞分画を、妊婦被検者から前もって取得する。

20

【0040】

好ましくは、本方法が、母体血、母体血漿または母体血の他の抗体含有分画のサンプルを提供する第1工程をさらに含む。あるいはまたはさらに、母体血の細胞分画(たとえば、PBMC)を被検者から前もって取得する。

【0041】

さらにより好ましくは、本方法が、当業者に公知の任意の標準手法に準拠して、母体血サンプルを提供し、PBMC分画および/または血漿あるいは抗体分画を母体血サンプルから単離する第1工程をさらに含む。本発明の本実施形態もまた、母体血の用意および母体血からの血漿の単離を明らかに包含する。

【発明を実施するための最良の形態】

30

【0042】

母体血サンプル

本明細書で使用されるように、用語「母体血サンプル」は、母体抗体および胎児細胞を含む任意の血液サンプルを意味すると解釈される。

【0043】

好ましくは、母体血サンプルは、妊婦から直接採取された末梢血サンプルからなる。

【0044】

より好ましくは、このサンプルは、妊娠最初の3カ月に妊婦より取得する。

【0045】

このサンプルはヘパリンまたは好ましくはACD溶液を含有するサンプルなどの、凝固を防いだ血液サンプルであってよい。

40

【0046】

このサンプルは、好ましくは新しいうちに使用するかまたは成分の劣化を最小限に抑えるため使用するまで0 から約4 で貯蔵する。

【0047】

このサンプルの胎児細胞数は、胎児年齢などの要素によって変わる。一般的には、母体血10~30mlから、十分な胎児細胞が母体細胞から分離されて提供される。当業者なら、母体抗体および/または胎児細胞含有量の観点から、10~30mlの母体血と同等である他のサンプルの分量がわかるはずである。

【0048】

50

## 母体抗体の調製

### 1. 汎用技法

母体抗体を、当技術分野に公知の任意の技法を使用して、母体血から単離するかまたは部分精製するか、あるいは精製して他のタンパクを除くこととする。この手法は、本発明の方法のどの段階でも行われる。好ましくは、有核細胞および母体抗体を、母体血漿とは別個に調製し、再び混合して胎児細胞を単離するための免疫複合体を作る。

#### 【0049】

母体抗体調製方法では、確実に、血漿抗体を十分に濃化し、胎児細胞を同定かつ/また単離するのに必要な胎児細胞表面抗原および/または任意の物質を結合させることができる。

10

#### 【0050】

抗体の精製手法の例には、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析および親和性クロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されない。親和性クロマトグラフィーがここでは好ましい精製技法である。

#### 【0051】

### 2. Ig分画の単離

プロテインAおよび/またはプロテインG親和性クロマトグラフィーはIgGを単離するのに好ましく使用される。親和性リガンドを付着させるマトリックスは、ほとんどの場合、アガロースまたはセファロース(ファーマシア、スウェーデン)であるが、他のマトリックスも利用可能である。たとえば、被制御細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成できるよりも早い流速およびより短い処理時間を可能にする。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース(商標)でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラムなど)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿などの抗体精製のための他の技法もまたこの状況に有用である。

20

#### 【0052】

当業者なら知っているように、プロテインAおよびプロテインGは、IgGのFc部分に結合する。したがって、免疫グロブリンG(IgG)は、プロテインAセファロースまたはプロテインGセファロースでの親和性クロマトグラフィーによる精製に適用できる。最初の結合工程は、任意のタンパク-タンパク相互作用(たとえば、抗体に対するプロテインAまたはプロテインGの結合、または抗体-抗体相互作用)を混乱させないように自然状態で行う。抗体は、このプロテインAまたはプロテインGから、たとえば、非結合成分として抗体を分泌する高濃度の塩を含む緩衝液(たとえば、HEPES pH7.2中3MのMgCl<sub>2</sub>)などの解離緩衝液を使用して溶出される。

30

#### 【0053】

別の実施形態では、Kaptive-M(商標)セファロースで親和性クロマトグラフィーによって抗体分画を他の構成成分から分離する。当業者なら、IgMが、Kaptive-M(その活性成分がペプチド模倣物である)に結合することがわかっている。

#### 【0054】

また、MBPセファロースも使用できる。当業者ならMBPがIgM Fc5 $\mu$ 領域上に存在するマンノース残基に結合でき、結果としてIgMに特異的であることを知っている。結合の初期工程は、タンパク-タンパク相互作用(たとえば、抗体に対するMBP結合または抗体-抗体相互作用)を混乱させないように自然状態で行う。IgMは、たとえば、非結合成分として抗体を分泌する高濃度の塩を含む緩衝液(たとえば、HEPES pH7.2中3MのMgCl<sub>2</sub>)などの解離緩衝液を使用して親和性マトリックスから溶出される。

40

#### 【0055】

別の実施形態では、抗体分画をカプリル酸および硫酸アンモニウム沈殿を使用して単離する。当業者なら知っているように、これらの物質によって、本質的にIgを含む調製物が提供される。Ig分画をたとえば、高塩濃度の緩衝液(たとえば、/HEPES pH7.2中3MのMgCl<sub>2</sub>

50

)などの解離緩衝液中に溶解することによって、抗体を非結合成分として分泌させる。次に、抗体分画をたとえば解離緩衝液を溶出液として使用してSECで分離し、IgGおよびIgM成分を非結合成分として維持する。

【0056】

別の実施形態では、免疫グロブリンを変性条件下でフリーフロー電気泳動に供する。母体血から単離した血漿を浄化し、大量の血漿タンパクをIg および  $\gamma_2$ マクログロブリンを多少、溶液中に残す条件下で沈殿させる。次にIg分画を沈殿させ、適切な緩衝液で再溶解し、基本的にHoffmanら、(Proteomics 1、807-818、2001)に記載されているような連続溶液相等電点電気泳動によって分離するためのフリーフロー電気泳動(FFE)装置(たとえば、Octopus, Tecan)にかける。好ましくは分画当たり約0.01~約0.05pH単位の範囲に相当する分画を取得し、PD-10カラムまたはfast脱塩カラム(アマーシャム、バイオサイエンス)を使用して、適切な緩衝液(たとえばPBS)と交換して、生存率をテストする。

10

【0057】

また、抗体分画は、さらなる使用に備えてCNBrセファロースまたはNHSセファロース(ファーマシア)と結合させるため、高塩濃度の緩衝液中に移される。

【0058】

3.免疫グロブリンのさらなる精製

抗原反応性抗体(すなわち、胎児細胞表面に存在する父方抗原に対する母体抗体に結合する抗体)を、好ましくは可溶性HLA抗原および/または抗イディオタイプ抗体との複合体から解離させて調製する。

20

【0059】

したがって、好ましい実施形態において、抗体の調製は、部分精製するか、または無抗原または実質的に無抗原となるまで精製する。これは一般的に母体血に存在する抗体-抗原複合体を解離させて達成する。当業者には明らかであろうが、胎児細胞および母方抗原からなる複合体が、母体血から直接単離されるかまたは回収される場合には、母体血サンプルについてこのような手法はとられないが、このような手法は、一旦母体血から単離または回収されたこのような複合体を解離するためにその次に利用される手法と類似であってもよい。この抗体分画を、たとえば高濃度の塩を含む緩衝液などの解離緩衝液中で抽出すると、多くの場合、結合抗原が分泌されることになる。

【0060】

特に好ましい実施形態では、高分子量の抗体(たとえば、約150 kDaの分子質量を有するIgGまたは約950 kDaの分子質量を有するIgM)を、塩および長さが約9~40残基の低分子質量のペプチドHLA抗原から、低塩緩衝液中で脱塩して分離する。可溶性HLA抗原が抗HLA抗体から解離することによって、反応性抗体が分泌されるのであるが、この解離は、まず母体血由来の血漿をカプリル酸でインキュベーションし、これによって大量の血漿タンパクをIgおよび数種の  $\gamma_2$ マクログロブリンに悪影響を与えずに沈殿させる。この初期沈殿の後、Ig分画を、たとえば硫酸アンモニウムを使用して沈殿させ(Tsangら、J. Immunol. Methods 138、291-299、1991)、緩衝液中に高濃度の塩(たとえば、3Mの塩化マグネシウム)および25%(v/v)のエチレングリコールを含む適切な緩衝液(たとえばHEPES pH7.2)中に再溶解させる。次にこの溶液を、移動相であるトリス緩衝液中で、たとえば、PD-10カラムまたはFAST脱塩カラム(アマーシャムバイオサイエンス)を使用したクロマトグラフィーによって急速に脱塩させて、塩およびペプチドHLA抗原を取り除く。PBSなどの緩衝液は、リン酸ベースの緩衝液が、マグネシウム系の塩の存在下で沈殿するので、塩化マグネシウムと一緒に使用できない。得られた高分子量の分画は、実質的にペプチドHLA抗原がなく、さらなる使用に備え脱塩されている。次に精製された抗HLA抗体を、目的とする多少の胎児細胞を含む母体血細胞調製物と暫時、複合体が生じるに十分な条件下で反応させ、この複合体を本明細書に記載されるように単離する。

30

40

【0061】

この抗体はさらに精製でき、本明細書に記載する方法に使用するため、より均一または実質的に均一な調製物を得る。たとえば、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)、特

50

に米国特許第5,641,870号に記載されるような低pHのHIC(LPHIC)を使用して、さらに抗体を精製する。特にLPHICは、望ましくない混入物(たとえば、間違っ結合した軽鎖および重鎖断片)から、正確に折り畳まれジスルフィド結合した抗体を除去するに有用である。

【0062】

#### 4. 胎児細胞上の父方抗原に結合する特異的抗体の濃化

好ましくは、父由来胎児抗原に特異的な、母体産生抗体を本発明の方法に適用する前に濃化する。1つの実施形態では、単離された母体抗体を、たとえば、固体支持体に結合したHLA抗原の大パネルにさらす。既知のHLA抗原を結合する抗体を、HLA抗原を結合しない抗体から分離する。母方HLA抗原を結合する母体抗体は、もし存在するとしても、それは極わずかで、これが起こりうる可能性はかなり低いので、その結果、結合するHLA抗体の大半は、父由来のHLA抗原に特異的である。

10

【0063】

母方のHLAタイプが既知であるかまたは標準技法を使用して決定されているとすれば、精製工程におけるHLA抗原の大パネルの使用により、母方のHLA抗原は好ましく除去され、これによって、残りのHLA結合抗体が父由来のHLA抗原に対するものになることが確実となる。加えて、もし、父方のHLAタイプが既知であるかまたは標準技法を使用して決定されているとすれば、父由来の抗原を含み、好ましくは母由来のHLA抗原または母由来抗原と共通であるものは何も含まないようなHLA抗原のパネルが選択できる。

【0064】

HLA抗原によって抗体を単離する特定の実施形態では、多色の色でコード化されたビーズ(Luminex、Life-Codes)が使用される。ここでは、各色タイプがそれぞれ特定のHLA抗原と接合している。色でコード化された多重ビーズを使用して、父由来のHLA抗原に対する母体抗体が母体血サンプルから同定され単離される。たとえば、母方HLAタイプが既知であれば、母由来の抗原のビーズを除く多重ビーズを使用して、父由来胎児HLA抗原が単離または精製かつ測定され、および/または捕捉された胎児特異的抗体が対応する多重ビーズのフロー選別によって単離される。

20

【0065】

また、一旦胎児HLAタイプがわかると、1つまたは数個の胎児HLA抗原と接合した磁気捕捉ビーズを使用して、胎児特異的抗体が母体血漿から単離される。

【0066】

本発明のさらなる態様は、それが本明細書に記載の本発明の方法で単離または取得される場合、父方抗原または父由来胎児抗原に結合する任意の単離された母体抗体またはその精製されたIg分画にまで拡張される。

30

【0067】

本発明のまたさらなる態様は、父方抗原または父由来胎児抗原と結合する単離された母体抗体またはそのIg分画を、たとえば、胎児細胞の単離、同定または濃化などの際の薬剤への使用、または母体血中の胎児細胞用マーカーへの使用、あるいは薬剤への前記使用の内、任意の1つまたは複数の使用のための試薬を調製するための使用を提供する。

【0068】

#### 胎児細胞に結合した母体抗体との複合体を形成する物質

母体抗体が結合した胎児細胞複合体は、容易に検出可能なおよび/または容易に単離可能な物質、たとえば、二次抗体、抗体断片、またはヒト抗体に結合する他の分子などの物質(たとえば、ヤギの抗ヒトIgまたはIgMまたはIgGに結合するポリペプチド、たとえば、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLからなる群から選択されるポリペプチドなど)を使用して同定される。

40

【0069】

用語「物質」は、胎児細胞と結合した母体抗体と複合体を形成することができる分子を意味し、これには母体抗体のリガンドまたは母体抗体と結合するレポーター分子が含まれる。「リポーター分子」とは、検出可能な信号を提供する物質を意味する。

【0070】

50

好ましくは、この物質は、母体抗体以外の母体血中の分子と結合しない。

【0071】

1つの実施形態では、物質は母体抗体に対する抗体、その断片またはその誘導体である。

【0072】

抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。

【0073】

好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、ある種属中で、別種の抗体の結合部位に対して生じる。当業者なら、別種由来の免疫グロブリンに対してある種属で生じる抗体であればどんな抗体でも、その別種由来の免疫グロブリンに一般に結合する抗体を提供することを知っている。好ましくは、胎児細胞がヒト細胞であり、物質が任意のヒト抗体に結合することである。ヒト抗体に対するこのような抗体は、当分野に公知である。この例には、ヤギの抗ヒトIgG、マウスの抗ヒトIgG、ヤギの抗ヒトIgM、マウスの抗ヒトIgM、ヤギの抗ヒトIgA、およびマウスの抗ヒトIgAが含まれるがこれらに限定されない。

【0074】

当業者ならモノクローナル抗体を慣用的に産生するための数種の技法を知っている。選択された抗原に対する適切なモノクローナル抗体は、公知の技法、たとえば「Monoclonal Antibodies: A manual of techniques」、H Zola(CRC Press、1988)および「Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications」、J G R Hurrell(CRC Press、1982)に開示された技法で調製する。

【0075】

ポリクローナル抗体もまた本発明の方法に有用である。単一特異的なポリクローナル抗体が好ましい。適切なポリクローナル抗体は、当分野に公知の方法を使用して調製できる。

【0076】

抗原結合部分またはモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体は、抗体の一部(たとえばFab断片)であるかまたは合成抗体断片(たとえば、一本鎖Fv断片「ScFv」)であってもよい。したがって、このような断片は本発明の文脈に入る物質として明らかに有用である。

【0077】

FabおよびF(ab)<sub>2</sub>断片などの抗体の断片もまた、遺伝子工学的に作製できる抗体および抗体断片として使用し得る。

【0078】

抗原の特異性は、可変ドメインによって与えられ、定常ドメインとは無関係である。したがって、たとえば、Fab様分子、Fv分子、一本鎖Fv(ScFv)分子(ここで、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>のパートナードメインがフレキシブルなオリゴペプチドを経て連結している)および単離されたVドメインを含む単一のドメイン抗体(dAbs)などの1つまたは複数の可変ドメインからなる組換え抗体断片もまた、本発明の文脈において物質として有用である。

【0079】

全抗体およびF(ab')<sub>2</sub>断片は、「2価」である。「2価」は、前記抗体およびF(ab')<sub>2</sub>断片が2つの抗原結合部位を有することを意味する。対照的に、Fab、Fv、ScFvおよびdAb断片は、1価で、ただ1つ抗原結合部位を有する。

【0080】

Fab、Fv、ScFvおよびdAb抗体断片は、すべて大腸菌で発現され、大腸菌から分泌でき、これによって大量の前記断片が産生される。

【0081】

特に好ましい実施形態では、物質は、父方抗原に特異的な母体抗体に結合する抗イディオタイプ抗体である。このような抗イディオタイプ抗体は、母体血から、母体抗体および抗イディオタイプ抗体からなる免疫複合体として、場合によっては、たとえば、可溶性HL

10

20

30

40

50

A抗原として父方抗原をさらに含む、免疫複合体として通常単離される。

【0082】

抗体-抗イディオタイプ抗体の複合体は、上記本明細書に記載したように、通常抗体調製物用に母体血のIg分画から単離され、解離されて反応性抗体を得る。たとえば、抗体複合体は、Igに特異的なリガンド(たとえば、プロテインG、プロテインA、プロテインL、Kaptive-M(商標)セファロースまたはMBPセファロース)を使用して、いかなるタンパク-タンパクとの相互作用も乱さないような自然状態でクロマトグラフィーによって単離でき、続いてこの抗体複合体を、たとえば、非結合成分として抗体を分泌する高濃度の塩を含む緩衝液(たとえば、HEPES pH7.2中3MのMgCl<sub>2</sub>)などの解離緩衝液を使用して解離する。一般に、抗体の調製物についてはまた、カプリル酸および硫酸アンモニウム沈殿も、父方抗原に対する抗体と複合化した抗イディオタイプ抗体を単離するために使用でき、次にこの抗イディオタイプ抗体は、たとえば、この抗体複合体を、高濃度の塩緩衝液(たとえば、HEPES pH7.2中3MのMgCl<sub>2</sub>)などの解離緩衝液中で解離させて放出させ、この抗体を未結合成分として放出する。次に抗体分画を、たとえば、溶出液として解離緩衝液を使用してSECで分離して、非結合成分であるIgGおよびIgM成分を維持する。抗イディオタイプ抗体が、IgMまたはIgGクラスである場合は、このような抗イディオタイプ抗体は、固体支持体(CNB rセファロースまたはNHSセファロースあるいは他のアミン反応性ビーズ)に結合させて、大量の母方IgMまたはIgG分画からの抗体の分離を維持する。ここでは、分離抗体断片はもはや、イディオタイプ抗体結合を有さない。

10

【0083】

たとえば高濃度の塩を含む緩衝液などの解離緩衝液で抗体分画を抽出しても、ほとんどの結合抗原が分泌される。高分子量の抗体(たとえば、約150 kDaの分子質量を有するIgGまたは約950 kDaの分子質量を有するIgM)は、低塩緩衝液中で脱塩することで、塩および長さが約9~40残基の低分子質量のペプチドHLA抗原から分離される。

20

【0084】

好ましくは、抗イディオタイプ抗体が父方HLA抗原に対する母体抗体を認識することである。

【0085】

別の実施形態では、物質が抗体に結合する非抗体ポリペプチドである。このようなポリペプチドは、当分野で公知であり、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLが含まれるがこれらに限定されない。

30

【0086】

本明細書に使用される用語「プロテインG」は、プロテインGの1つまたは複数の自然のIgG結合ドメインを含むタンパク、天然または自然に生じるプロテインGのIgG結合ドメインを含むハイブリッドまたは融合タンパク、または天然プロテインGのIgGに結合する能力を保持している天然または自然に生じるプロテインGの変異体または変種、あるいは天然プロテインGのIgGに結合する能力を保持している天然または自然に生じるプロテインGの断片を含むと解釈される。

【0087】

本明細書に使用される用語「プロテインA」は、プロテインAの1つまたは複数の自然のIgG結合ドメインを含むタンパク、天然または自然に生じるプロテインAのIgG結合ドメインを含むハイブリッドまたは融合タンパク、または天然プロテインAのIgGに結合する能力を保持している天然または自然に生じるプロテインAの変異体または変種、あるいは天然プロテインAのIgGに結合する能力を保持している天然または自然に生じるプロテインAの断片を含むと解釈される。

40

【0088】

本明細書に使用される用語「プロテインL」は、プロテインLの1つまたは複数の自然の抗体軽鎖結合ドメインを含むタンパク、天然または自然に生じるプロテインLの抗体軽鎖結合ドメインを含むハイブリッドまたは融合タンパク、または天然プロテインLの抗体軽鎖に結合する能力を保持している天然または自然に生じるプロテインLの変異体または変

50

種、あるいは天然プロテインLの抗体軽鎖に結合する能力を保持している天然または自然に生じるプロテインLの断片を含むと解釈される。

【0089】

単離可能または検出可能な標識

母体抗体と結合する物質は、検出可能な信号(たとえば、蛍光標識、色素札、放射性標識、常磁性粒子、化学発光標識、ビオチン、ストレプトアビジンまたは二次的、酵素のまたは結合工程によって検出される標識)を提供することができる単離可能または検出可能な標識と結合または接合する。

【0090】

本明細書に使用されるように、用語「単離可能な標識」または「検出可能な標識」は、たとえば、検出可能な信号、またはサンプル中の物質で他の組成物から標識に結合した複合体の区別、沈降またはその他の分離を容易にする物理的性質を提供することによって、物質-母体抗体-胎児細胞の複合体の検出を可能とさせる分子を意味すると解釈される。

10

【0091】

多種多様の標識および接合技法は公知で、科学的文献にも特許文献にも広く報告されている。好ましい検出可能な標識には、蛍光標識、放射性標識、常磁性粒子、化学発光標識が含まれるがこれらに限定されない。本発明は明らかに、標識を使用して、標識が二次リガンドの結合によって検出されるかまたは標識によって決まる酵素反応によって検出することを目論んでいる。当業者なら、本発明物質に結合する適切な標識が他にもあることを知っているかあるいは日常の実験法を使用して適切な標識を確認することができるだろう。このような標識を開示している特許には、米国特許第3,817,837号;第3,850,752号;第3,939,350号;第3,996,345号;第4,277,437号;第4,275,149号;および第4,366,241号が含まれる。物質に対してこのような標識を結合することは、当業者に公知の標準技法を使用して行われる。

20

【0092】

好ましい標識は蛍光成分であって、たとえば、Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes And Research Chemicals(R.P.Haugland 第8版、CD-ROM、2001)に記載されるようなものである。特に好ましい蛍光成分は、キサンテン(たとえば、フルオレセイン、ローダミン、ロードール)である。スルホン化キサンテンは、たとえば、米国特許第6,130,101号および英国第9611997.9号に開示されているものなどが特に好ましい。フッ化キサンテンは、たとえば、米国特許第6,162,931号に開示されているものなども好ましい。クマリンは、たとえば、スルホン化クマリン(たとえば、米国特許第5,969,157号)またはフッ化クマリン(たとえば、米国特許第5,830,912号)あるいは、シアニン(たとえばWO 02/26891)も使用できる。

30

【0093】

物質は、当技術分野に公知の様々な方法を使用して間接的に標識してもよい。たとえば、「二次抗体」(物質に対して特異的に結合する抗体に直接標識される)は、抗体からなる物質を検出するために使用できる。また、物質はビオチンを使用して変性でき、この場合標識したストレプトアビジンを使用すると変性された物質に標識が結合できる。

【0094】

本発明が、父由来の胎児HLA抗原に結合する母体抗体を同定するために、HLA抗原に接合したコード化された多重ピーズの使用にまで拡張されるのは明らかだ。HLA抗原と連結されたこのような多重ピーズは、商業的に入手可能(LifeMatch、Orchid)である。HLA抗原に接合されたこのようなコード化多重ピーズは、父方HLA抗原に対応する父由来の胎児HLA抗原に対して向けられた特異的な母体抗体を単離するために特に有用である。この多重ピーズはコード化され、蛍光標識によって同定される。ピーズに結合した抗体は、抗体に特異的に結合する標識(たとえば、抗体に付着する二次蛍光標識)によって検出可能である。目的の抗体に結合している特異的ピーズはフロー選別されて結合抗体が回収できる。

40

【0095】

胎児細胞に結合した母体抗体の回収および/または検出

50

母体抗体に結合した胎児細胞は、母体血サンプルから直接回収するかまたは母体抗体の調製物と母体血または母体血の細胞分画(たとえば、PBMC分画)とをex vivoで結合させた後に回収する。母体抗体および標識された物質が結合した胎児細胞を、標識で選別する方法で区分され単離される。

【0096】

レポーター分子を検出するための好ましい手段には、たとえば、二次抗体上の蛍光標識を使用する蛍光活性化細胞選別(FACS)、また磁界あるいは常磁界を二次抗体に付着している磁性ビーズあるいは常磁性ビーズに適用することが含まれる。

【0097】

本明細書に記載したように、好ましくは検出可能に標識された「物質」をこうした回収および/または検出手法に使用する。有用な技法には、細胞選別、特に蛍光活性化細胞選別(FACS)であって、基質(たとえば、プラスチック表面、パニング状態で)に結合した物質を使用するか、または固体相粒子/ビーズに結合した物質を使用して行われる(これは粒子/ビーズ(たとえば、有色ラテックスビーズまたは磁気粒子/常磁性粒子)の特性をベースに単離される)選別法があるがこれらに限定されない。

【0098】

細胞選別によって胎児細胞を回収および検出するために、物質をたとえば、細胞ソーターを使用して検出される色素染料または蛍光染料などの物質で直接または間接に標識する。好ましくはこの染料が蛍光染料である。多数の異なる染料/成分/標識が当技術分野に公知で、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリンなどが含まれる。細胞ソーター用に適した特質を有する任意の検出可能な物質を使用してもよい(たとえば、蛍光染料の場合は、ソーターの光源によって励起でき、その発光スペクトルが細胞ソーターの検出器で検出できる染料)。

【0099】

固体相粒子を使用して胎児細胞の回収または検出するためには、所望の特質を有する任意の粒子を利用し得る。たとえば、沈降を容易にするため、大きな粒子(たとえば、直径約90~100 nmより大)を使用してもよい。好ましくは、この粒子が「常磁性粒子」(すなわち、磁界をサンプルにかけることによって収集できる粒子で、これによって液相から粒子と結合した複合物との区分けが容易になる)である。磁性粒子は、現在DynaI Biotech(Oslo, Norway)を含めた多数のメーカーから一般に入手可能である。たとえば、磁性細胞選別(MACS)の一例はAl-Muftiら(1999)によって提供される。

【0100】

基質に結合した物質を使用して胎児細胞の回収または検出するために、物質は、好ましくは直接(たとえば共有結合、イオン相互作用またはファンデルワールス相互作用によって)基質に吸着されるか結合される。好ましくは、基質が、プラスチック板またはフラスコの表面であって、物質を直接この表面に吸着させる。多くの物質で吸着は容易に行われ、物質が抗体である場合、吸着は抗体を含む溶液を基質と単純に接触させることで達成される。また、基質が修飾されたもの、たとえばアビジンまたはストレプトアビジンと接合させて基質を修飾したもの、またはビオチンと接合させて修飾した物質、あるいは二機能性の架橋剤で活性化したアミン誘導体化基質などを使用してもよい。好ましくは、物質を含む溶液を基質上に接触させて物質を基質に吸着させる。

【0101】

好ましくは、胎児細胞の単離は、胎児細胞を検出するための独立したマーカーを使用することからなる方法で確認される。たとえば、もし胎児が男であったら、Y染色体に特異的なマーカーから構成されるマーカーを、従来技術と認められている手法に従って使用し、単離された細胞集団が胎児細胞を含むことを確認する。一方、胎児が女である場合、たとえば、SNPまたはHLA系に特異的なマーカーなどの多型マーカーから構成されるマーカーを、従来技術と認められている手法に従って使用し、単離された細胞集団が胎児細胞を含むことを確認する。

【0102】

10

20

30

40

50

### 母体細胞の減少

胎児細胞の回収または検出は、母体血サンプル中にある母体細胞または母体細胞型が減少することで増進または助長されてもよい。この減少は、母体抗体が結合した胎児細胞と物質とが接触する工程とこの物質-抗体-胎児細胞の複合体を回収する工程の前、中、または後で行う。当業者なら、母体血中の母体細胞型には、赤血球、B細胞、T細胞、単核細胞、マクロファージ、および樹状細胞が含まれることを知っている。この点で、母体抗体もまた、循環中に母体細胞の亜細胞集団と複合または結合し得るので、これによって、*ex vivo*で母体血中の胎児細胞との複合に使用される母体抗体の利用可能性が減少する。本発明は明らかに、母体血漿または母体血漿の抗体あるいは抗体含有分画の単離の前、中、または後に行われる補助的工程を包含し、ここでは、このような工程により、母体細胞と胎児細胞集団が物理的に分離され、母体細胞集団が減少し、少なくとも1種の母体細胞型の母体細胞が減少し、または分析中に胎児細胞から母体細胞が識別される。

10

#### 【0103】

好ましくは、母体血サンプルまたはその有核細胞分画を、母体細胞上の細胞性マーカーと結合する抗体に、暫時、抗体-母体細胞複合体が十分形成される条件下でさらし、この抗体-母体細胞複合体を単離することによって、母体細胞集団または母体細胞を減少させる。本明細書に記載される他の実施形態では、抗体-母体細胞複合体は、好ましくは、この複合体を容易に検出可能および/または容易に単離可能な物質と接触させて単離する。好ましくは、このような物質を、胎児細胞集団を、単離、増大、濃化するために使用した物質とは違うものとし、たとえば、母体細胞の減少および胎児細胞の濃化を同時に行わせる。

20

#### 【0104】

たとえば、一核性の細胞(たとえば、胎児細胞を含むPBMC調製物)は、密度勾配遠心分離によって妊婦の血液から単離できる。このサンプル中に存在する胎児細胞の割合をさらに高めるために、胎児を起源としないような血液細胞型(たとえば成熟白血球)を除去する。1つの実施形態では、このような細胞は、母方抗原を結合する特異的抗体と共に細胞をインキュベーションすることで選択的に除去される。母方有核血液細胞のマーカーを結合する抗体は、当技術分野に公知である。好ましくは、この抗体は母体血一核性細胞の細胞表面上に存在する抗原を結合するが、胎児細胞上の母方または父方抗原とは結合しない。

30

#### 【0105】

好ましくは、抗体が固体支持体に付着する。固体支持体には、磁性ビーズ、プラスチックフラスコ、プラスチック皿、カラムなどが含まれる。

#### 【0106】

選択的にこのような母体細胞を除去するために親和性精製工程を採用することによって、細胞懸濁液中に残存する母方有核細胞の全数を減らし、サンプル中に存在する胎児細胞集団の割合を増加させる。

#### 【0107】

##### 母体抗体のマスキング除去

場合によっては、胎児細胞を*in vivo*で母体血漿にさらしている間に胎児細胞に付着する母体抗体は、マスキングされるかまたは別の方法で、物質との結合および、物質に結合する標識を使用するその後の単離または検出に利用できないこともある。このマスキングは、たとえば、母方の免疫攻撃から胎児細胞を防御するというまだ解明されていないメカニズムにより生じる。たとえば、血漿抗体は、二次、抗イディオタイプ抗体または可溶性HLA抗原と複合することによりマスキングされるかまたは失活され得る。

40

#### 【0108】

胎児細胞と結合した母体抗体はまた、補体を固定し、母方循環系中にある間、抗体が結合した胎児細胞を多少破壊する可能性がある。このような場合は、多数の母体抗体が結合した胎児細胞のみが単離に利用されることになる。

#### 【0109】

したがって、本発明の好ましい実施形態では、母体血(母方および胎児細胞集団を含む)

50

の細胞が、マスキングをはずされた結合抗体であり、これによって胎児細胞に結合した母体抗体を経由してその後行われる胎児細胞の回収または検出が増進される。

【0110】

1つの実施形態では、母体血由来の細胞および母体血漿由来の抗体が、母体血サンプルから別個な分画として抽出され、適宜処理されて母体抗体のマスキングを除去し、胎児細胞をさらに増大させるために発明の方法に従って再び混ぜ合わせる。このような「前処理」については、さらに詳細に下記で論じる。

【0111】

本発明は、母体血から単離された細胞を、母方に由来する抗体調製物(下記参照)に、補体融解をさせない条件下、たとえばEDTAなどキレート剤の存在下でさらすという好ましい工程を明らかに包含し、これによって母体血サンプルまたはその分画中で胎児細胞の数を増大させる。

【0112】

胎児細胞の母体抗体からの解離

好ましくは、本明細書に記載の任意の実施形態、具体的には、前記記載の任意の実施形態による本発明の方法は、胎児細胞を分泌させるために、母体抗体の結合した胎児細胞複合体を、好ましくは破壊することにより、胎児細胞を母体抗体から単離することをさらに包含する。好ましくは、この分泌された胎児細胞は、生存可能な胎児細胞である。特に好ましい実施形態では、胎児細胞をin vitroで暫時、遺伝疾患または遺伝疾患にかかりやすい体質の診断または胎児細胞の核型診断に使用されるに十分な条件下で培養する。

【0113】

1つの実施形態では、母体抗体-胎児細胞複合体からなる母体血由来の細胞サンプルを、結合した抗体を細胞から除去するように処理して、短時間培養段階に供し、この間に細胞は、HLA抗原を十分発現かつ表示し、場合によっては増殖ができる。培養後に、たとえば、細胞分画を母体血漿由来の抗体調製物と接触させて胎児細胞を同定する。さらに、培養した細胞を本明細書に記載したような前精製工程に供し、B細胞などの母体細胞を細胞分画から減少させる。あるいはまたはさらに、本明細書上記に記載のように抗体のマスキングを除去してもよい。

【0114】

本実施形態によると、当技術分野に公知の多くの手法を使用して、細胞の生存能力を維持しながら、抗体を細胞表面から取り除く。「細胞の生存能力を維持しながら」とは、標準組織培養技法を使用した細胞の継代培養によって、さらなる増殖のために十分に生存可能な細胞が回収できることを意味する。

【0115】

好ましくは、母体血サンプルを女性被検者から採取した時から4~72時間以内にこのような技法を行う。というのは、培養中に増殖した細胞は、この時間をすぎると、細胞表面に結合している抗体を容易に脱落させてしまうからである。

【0116】

1つの実施形態では、トリプシンによる消化(すなわちトリプシン処理)または他の適切なプロテアーゼあるいは細胞表面タンパクの混合プロテアーゼ消化によって非共有結合タンパクを急速に取り除く。あるいはまたはさらに、細胞表面のジスルフィド架橋の還元が行われてもよい。

【0117】

トリプシンは、タンパクを基本的なアミノ酸残基、すなわちリジンとアルギニンの付近で切断することが知られる。本実施形態によれば、トリプシン処理は、暫時、他の分子で立体的に障害を受けていないすべてまたは大半の細胞表面タンパクを切断するに十分な条件下で行い、これによって細胞表面からペプチドを漸次消化して取り除き、組織培養後に新しいHLA複合体が出現するのを促進する。細胞表面タンパクのトリプシン処理の場合は、母体血調製物から得られた胎児細胞は、確立された組織培養技術によって増殖され、たとえば燐酸緩衝食塩水(PBS)などの、細胞と相性の良い適切な培地または緩衝溶液中で洗

10

20

30

40

50

浄し、トリプシンを含む培地(たとえばPBS中0.1%(w/v)トリプシン/0.02%(w/v)ペルセン溶液)でインキュベーションし、また、暫時、タンパク溶解が十分生じる条件下でインキュベーションする。インキュベーションの条件の例としては、約37℃約1分～約20分間、より好ましくは約1～5分間のインキュベーションが挙げられる。インキュベーション時間は、細胞の生存能力に悪影響を及ぼさないで結合抗体を破棄するために必要な切断の程度に依存して決まり、試験的アッセイで実験的に決定される。消化が完了したら、細胞をたとえば遠心分離工程などの分離技法に供し、その結果、細胞ペレットとして細胞が収集される。次に細胞を、たとえば適切な固体培地上にプレートし、確立した技法を使用して連続培養で培養する。

#### 【0118】

混合プロテアーゼ消化が、単純なトリプシン処理以上に有効であるので、好ましい。これは、多数の異なる酵素を使用する結果得られる酵素特異性が非常に広範囲に及ぶからである。使用するプロテアーゼの混合物のおかげで、リジンおよびアルギニン残基の付近だけでなく、芳香族アミノ酸(すなわちフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン)、疎水性アミノ酸、および多くの非特異的部位が切断できる。混合タンパク溶解の場合、トリプシンがたとえば、トリプシン、パパイン、プロナーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼおよびキモトリプシンからなる群から選択されるプロテアーゼを含む混合物などのプロテアーゼ混合物に置換される以外は、胎児細胞がトリプシン処理と類似の条件下に供される。他のプロテアーゼの組合せも除外されない。

#### 【0119】

当業者なら、細胞表面のジスルフィド架橋を還元すると、タンパクの2つのシスチン残基間のジスルフィド結合が切断され、これによってペプチド鎖中でシスチンが2つの遊離SHシステイン残基に変換されることを知っている。このような方法で、多くのタンパクが折り畳みを解除されてその三次構造が破壊される。膜タンパクに結合した非共有結合タンパクは、これによって細胞表面から除去される。新HLA複合体の出現は、細胞をさらに組織培養した後に生じる。細胞表面ジスルフィド架橋を還元するには、細胞を、たとえばジチオスレイトール(DTT)またはトリス(2-カルボキシエチル)ホスファイン(TCEP)などの適切な還元剤の存在下でインキュベーションする。TCEPは、DTTよりも強力な還元剤であって、細胞表面に結合したタンパクをより急速に還元することで、DTTに比べて有利となる。還元は一般に、約0.1mM～約50mMの濃度の還元剤を使用し、約1分～約30分の間インキュベーションして行う。任意の還元剤が適切であるかどうかを決定し、適切なインキュベーション条件を確立するために、母体血からの単離した細胞を確立された条件下で培養し、適切な培地または緩衝溶液(たとえばPBS)中で洗浄し、濃度範囲の還元剤を含む培地で、様々な時間インキュベーションする。インキュベーション後、細胞を洗浄し、還元剤を除去して培養培地に載せ、暫時、細胞が十分に増殖するかまたは細胞分裂が十分に生じる条件下でインキュベーションする。細胞増殖または細胞分裂が維持される条件を選択する。さらに増殖させて、単離した胎児細胞を、胎児ヘモグロビンまたはトランスフェリン受容体CD71の存在について、このようなタンパクに特異的に結合するモノクローナル抗体を使用してモニターする(Bianchiら、Eur.J.Obstet Gynecol.Reprod.Biol.92、103-108、2000)。同様の手法は使用されていて、抗-Gal 1-3Gal抗体を細胞表面から解離させることに成功している(Parkerら、Transplantation 71、440-446、2001)。

#### 【0120】

##### 単離された胎児細胞の使用

本明細書に記載したように調製した単離された胎児細胞は、たとえば羊水穿刺かまたは絨毛膜絨毛サンプリングなどの公知の侵襲手法によって取得した胎児細胞を使用して行うことができる任意および全出生前診断テストに適切に使用される。本発明は明らかに、本明細書に記載された任意の実施形態に従って産生された単離または培養された胎児細胞の、たとえば胎児における遺伝的疾患または遺伝的疾患にかかりやすい体質を決定するための薬剤への使用を提供する。当業者に公知の診断手法は、慣用的にスクリーニングされる多くの遺伝的疾患、たとえば、ダウン症、トリソミー18、トリソミー13、鎌状赤血球貧血

10

20

30

40

50

、21-ヒドロキシラーゼ欠損症、嚢腫性線維化症などの内の1つまたは複数の疾患を決定するために本発明の方法で単離した胎児細胞で行うことができる。

【0121】

したがって、本発明のさらなる態様では、動物被検者で遺伝的疾患を検出する方法が提供される。この方法は、胎児細胞を決定または同定し、かつ/または胎児細胞を母体血またはその有核細胞分画から本明細書に記載された任意の実施形態に従って濃化することから構成される方法を行うことを含む。当業者には明らかであろうが、胎児細胞が遺伝的疾患または遺伝的疾患にかかりやすい体質を示す遺伝子を保持かつ/また発現する場合、この遺伝子の存在および/または発現もまた、胎児細胞が由来する無傷の胎児中に、その遺伝的疾患またはかかりやすい体質があることを示す。

10

【0122】

本発明の方法が、ヒト胎児細胞の濃化または同定、あるいはヒト胎児で遺伝的欠陥についてスクリーニングするために使用されることが特に好ましいが、本発明は同じく、ウマ、家畜、イヌなど(これには限定されない)の任意の有胎盤哺乳類由来の胎児細胞を濃化することまたは同定することに有用である。本発明はまた、単離または濃化された胎児細胞を基にした有胎盤哺乳類の遺伝学的スクリーニングにも有用である。

【0123】

本発明の1つの実施形態では、単離された胎児細胞または胎児細胞の濃化分画が直接出生前遺伝子診断テストに使用される。あるいは、胎児細胞を培養し細胞数を増やすと、核型分析が容易となる。

20

【0124】

本発明の方法で得られる胎児細胞は、胎児の体細胞と同じ遺伝子DNAの造作を含むので、これらの胎児細胞は、当技術分野に公知の技法を使用して、異常性について分析することができる。ここで、検出される異常性とは、無傷の胎児中の異常性診断である。

【0125】

遺伝的疾患または遺伝的疾患にかかりやすい体質についての胎児細胞の分析は、欠陥の検出を許可されている胎児細胞に由来する任意の細胞性物質について行うことができる。好ましくは、この物質は核のDNAであるが、単離された胎児細胞由来のRNAまたはタンパクを分析しても情報が得られる例が少なくともある。さらにDNAには、ゲノム遺伝子または翻訳されていないRNA、あるいは情報をもたらす転写されないマーカ―(たとえば繰返しDNAマーカ―またはSNP)が含まれてもよい。

30

【0126】

1つの好ましい実施形態では、染色体異常が検出される。「染色体異常」は、染色体のいかなる全体的異常または染色体数の異常を意味する。たとえば、染色体異常には、ダウン症候群を暗示する染色体21のトリソミー;トリソミー18;トリソミー13;クラインフェルター症候群(47, XXY)、XYYまたはターナー症候群などの性染色体異常;染色体の転座および欠損の検出が含まれ、ダウン症候群の患者は、割合は小さいが転座を有し、染色体欠損症候群にはブリーダー-ヴィリ症候群およびエンジェルマン症候群が含まれ、その両方が染色体15の一部に欠損を含み、および個々の遺伝子には変異(欠損、挿入、転移、移転位、および他の変異など)が検出されている。脆弱X症候群などの他の型の染色体問題もあり、これはDNA分析によって検出できる。

40

【0127】

DNA分析によって検出できる他の遺伝的疾患は公知で、たとえば、21-ヒドロキシラーゼ欠乏症またはホロカルボキシラーゼ合成酵素欠乏症、アスパルチルグルコサミン尿症、異染色性脳白質ジストロフィー、ウィルソン病、ステロイドサルファターゼ欠損症、X連鎖遺伝子副腎白質ジストロフィー、ホスホリラーゼキナーゼ欠損症(タイプVI糖原病)、および脱分枝酵素欠損症(タイプIII糖原病)がある。これらおよび他の遺伝的疾患は、The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease、第7版、I, II and III巻、Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., およびValle, D.(編集)、McGraw Hill、1995に記載されている。遺伝子がクローンされ、変異が検出されているいかなる遺伝的疾患も分析できる

50

ことは明らかである。

【0128】

遺伝子アッセイ法には、核型分析標準技法、メチル化パターン分析、制限断片長多型アッセイ、PCRをベースとするアッセイ、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、のみならず他に下記に記載の方法が含まれる。

【0129】

染色体異常は、当技術分野に公知の核型分析によって検出できる。核型分析は一般に、コルヒチンなどの有糸分裂紡錘体阻害剤の添加によって阻害されている有糸分裂期に細胞上で行われる。好ましくは、ギームザ染色された染色体スプレッドを調製すると、染色体数の分析のみならず染色体転座を検出できる。

10

【0130】

遺伝子アッセイには、変異または多型を同定するために任意の適切な方法が関与する。この方法には、たとえば、1つまたは複数の該当位置でのDNAのシーケンシング、野生型または変異配列のいずれかの該等位置でハイブリダイズするようにデザインされたオリゴヌクレオチドプローブの識別ハイブリダイゼーション、好ましくは該当DNA領域の増幅後適切な制限酵素による消化を行った後の変性ゲル電気泳動、S1ヌクレアーゼ配列分析、好ましくは該当DNA領域の増幅後の非変性ゲル電気泳動、汎用RFLP(制限断片長多型)アッセイ、野生型配列に適合し、変異配列には適合しないかまたはその逆のオリゴヌクレオチドを使用した選択的DNA増幅、または野生型あるいは変異遺伝子型に適合したPCR(または類似)プライマーを使用した制限部位の選択的導入後の制限消化などが含まれる。アッセイは間

20

【0131】

非変性ゲルを使用して、適切な制限酵素による消化で得られる断片の長さの違いを検出してよい。DNAは通常消化前にたとえばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法およびその改変法を使用して増幅しておく。

【0132】

DNA増幅は、確立されたPCR法またはそれを発展させた方法、あるいはリガーゼ連鎖反応、QBリプリカーゼおよび核酸配列をベースとする増幅などの代替法によって達成してもよい。

30

【0133】

「適切な制限酵素」とは、野生型配列を認識し切断する酵素であって変異配列は認識も切断しないかまたはその逆である。制限酵素が認識し切断する配列(場合によっては切断しない)は、変異の結果存在していてもよいしまたは、PCR反応にミスマッチオリゴヌクレオチドを使用して正常遺伝子座または変異遺伝子座に導入されたものでもよい。もし酵素がDNAを非常に稀にしか切断しないならば、言い換えると、酵素が、非常に稀にしか生じない配列を認識するならば都合がよい。

【0134】

別の実施形態では、特殊な疾患またはかかりやすい体質に関係する野生型または変異/変種遺伝子のどちらかとハイブリダイズするが、両方の遺伝子座とはハイブリダイズしないPCRプライマー対を使用する。増幅されたDNAの有無により、野生型または変異型遺伝子型(したがって表現形)が暗示される。

40

【0135】

好ましい実施形態では、同様に、野生型または変異配列のただ1つとのみハイブリダイズする以外は類似のPCRプライマーが使用されるが、これらのプライマーは、他の方法ではありえない制限部位を野生型または変異配列のどちらかに導入する。

【0136】

増幅された配列のその後のクローニングを促進するために、プライマーはその5'末端に制限酵素部位が付加されていてもよい。このように、プライマーのすべてのヌクレオチド

50

が、制限酵素部位を形成するのに必要な数個のヌクレオチド以外は、目的の遺伝子配列に由来するかまたはその遺伝子に隣接する配列に由来する。このような酵素および部位は当技術分野において公知である。プライマー自身は、当技術分野に公知の技法を使用して合成できる。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーは、当技術分野に認められている手法を使用した機械、および商業的に利用可能な装置で合成される。

【0137】

蛍光染料を使用するPCR技法は、本発明の方法で単離された胎児細胞由来のDNA中の遺伝子欠損を検出するためにも使用してよい。これらには、下記5種の技法が含まれるがこれらに限定されない。

【0138】

i) 蛍光染料が、特異的なPCR増幅された二本鎖DNA産物を検出するために使用できる(たとえば、エチジウムブロミドまたはSYBRグリーンI)。

【0139】

ii) PCR産物の伸長中にTaqDNAポリメラーゼのヌクレアーゼ活性によって解放されるまでは、その蛍光が発生しない特別に構築されたプライマーを使用する5'ヌクレアーゼ(TaqMan)アッセイが使用できる。

【0140】

iii) 分子ビーコン(Molecular Beacon)技法に基づくアッセイが使用できる。この技法は、自己ハイブリダイズすると蛍光が消える(蛍光染料と消光分子が隣り合っている)特別に構築されたオリゴヌクレオチドに依拠する。特異的に増幅されたPCR産物にハイブリダイズすると、蛍光分子から消光分子が分離することに起因して蛍光が増加する。

【0141】

iv) アンプリフローラ(Amplifluor)(Intergen)技法に基づくアッセイが使用できる。この技法は特別に調製されたプライマーを利用し、この場合もやはり、自己ハイブリダイズによって蛍光が消えている。この場合、プライマー配列による伸長が生じた結果蛍光分子と消光分子とが分離することによって、PCR増幅中に蛍光が放出される。

【0142】

v) 蛍光共鳴エネルギー転換の増大に依拠するアッセイが使用できる。このアッセイは、その末端に異なる蛍光色素を有する2つの特別にデザインされた、隣り合うプライマーを利用している。これらのプライマーを特異的なPCR増幅産物に対してアニールすると、この2つの蛍光色素が一緒になる。1つの蛍光色素を励起すると、結果として他の蛍光色素の蛍光が増加することになる。

【0143】

上記手法は、本明細書に記載したように母体血から直接に、あるいは培養中の胎児細胞の増幅後に、得られる胎児細胞を使用して行うことができる。

【0144】

培養中、体細胞変異または体細胞クローン変異を時々行う培養された胎児細胞の場合、胎児細胞の培養およびテストを平行して行うことが好ましい。このような実施形態によると、同じ胎児に由来する胎児細胞の平行または二重サンプルで同じ異常が検出されると、胎児に生じている異常が診断される。というのは2つの別個の培養から独立して同じ体細胞クローン変異が生じる見込みは低いからである。

【0145】

あるいはまたはさらに、胎児細胞は、妊娠の異なる段階または妊娠中異なる回数、本明細書に記載の方法を使用して採取された母体血から取得して、異常性についてテストしてもよい。同じ妊婦から得られた2つ以上の胎児細胞サンプルで同じ異常が存在すると、これも体細胞クローン変異の結果というよりも、無傷の胎児中の異常性を表す。

【0146】

本発明を下記の非限定実施例を参照してさらに記載する。

【実施例1】

【0147】

10

20

30

40

50

## 母体血からの胎児細胞の濃化

5人の妊婦から血液サンプル(10ml)を取得した。在胎齢は10~14週にわたり、胎児の性別および状態は未確認であった。血液サンプルを下記のように処理した。

## 【0148】

有核細胞を密度勾配で単離した。Bリンパ球および単核細胞を抗CD19および抗CD-14磁気ビーズを使用して除去した。残りの単離した細胞をヤギF(ab')<sub>2</sub>抗ヒトIgGおよびヤギF(ab')<sub>2</sub>抗ヒトIgMの混合物に30分間さらして、どちらも蛍光染料フィコエリトリン(PE)と接合させた。この細胞を洗浄し1%(v/v)ホルムアルデヒド、DNA特異的染料ヘキスト33342および0.05%(v/v)TritonX100を有するPBS中に懸濁した。

## 【0149】

サンプル中の有核細胞(サンプル当たり500~1000万個)を、蛍光活性化細胞選別(FACS)に供し、ヘキスト<sup>+</sup>/PE<sup>+</sup>細胞(すなわち正常DNA配合量を有す細胞およびPE接合した抗体断片に結合した細胞)を単離した。細胞がPE<sup>+</sup>であると階級わけするための閾値レベルを、PE<sup>+</sup>細胞集団が母体血サンプル中の全細胞の約0.01%を構成するように定義した。

## 【0150】

フロー選別された細胞(顕微鏡スライド上)に、YおよびX染色体にそれぞれ特異的なプローブを使用する蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)で標識した。Y信号(すなわち父由来のY染色体を有し男児胎児から派生する)を含む細胞の数を蛍光顕微鏡を使用して測定した。2種の母体血液細胞調製物が、Y信号を生じた。1種の母体血液細胞調製物が、Y信号を生じる10細胞を含んでいた。

## 【0151】

胎児の性別が前もってわかっていなかったことを考慮すると、胎児の幾人かは女である可能性があり、その胎児細胞はY特異的ハイブリダイゼーションでは検出できない。もし選別したすべてのサンプルが胎児細胞を含んでいたならば、その統計学的検出率は50%となるであろう。テストした5つの母体血サンプルのうち2つで、Y信号を生じる胎児細胞の検出が、理論値の50%検出率に近づいた。これは、少なくともほとんど、多分すべての選別されたサンプルが胎児細胞を含んでいたことを示す。

## 【0152】

フロー選別した細胞集団中の胎児細胞の濃度は、1:1000より大きかった。この単離が、前もって詳細な最適条件を精緻に調べることをなしに行った事を考慮すれば、これは勇気づけられる結果であり、母方の抗胎児抗体の存在に関する原理のみならず胎児細胞を単離する方法の実用性を証明するものである。

## 【実施例2】

## 【0153】

## 血漿からの反応性母体抗体の単離

## IgGおよびIgMの親和性捕捉

母体血から単離した血漿をまず清澄させ(10,000gで遠心分離して、0.45 μmのろ紙によってろ過する)、プロテインAまたはプロテインGカラム(Amersham Biosciences)を通過させて、全ヒトIgGを結合する。同時に、清澄させた母体血をKaptiv-M(商標)セファロースカラム(Interchim)またはマニン(mannin)結合タンパク(MBP)セファロースカラム(Nevensら、J.Chromatogr.597、247-256、1992;Pierce)を通過させて、全IgM(Sisson and Castor、J.Immunol.Methods 127、215-220、1990)を結合させる。すべての工程を約4で行う。

## 【0154】

IgGおよびIgM分画がカラムに結合したならば、カラムをTBSで洗浄し、カラムを取り外す。

## 【0155】

はじめに、IgGを、3M塩化マグネシウム/25%エチレングリコール/HEPES pH8.0を移動相として使用して溶出させ、個々のIgG分画を非結合成分として維持する。次に、プロテインAまたはプロテインGカラムを、ポンプシステムから取り外し、Kaptiv-Mカラムを再結合する。IgM結合カラムをTBSで洗浄し、IgMを同じ緩衝液(すなわち3M塩化マグネシウム/25%

10

20

30

40

50

エチレングリコール/HEPES pH8.0)を移動相として使用して溶出させ、個々のIgM分画を非結合成分として維持する。

【0156】

MBPセファロースカラムを4 で使用してIgMの結合を維持する。結合後、このカラムを冷所より取り除き、室温で平衡化させ、IgM溶出緩衝液を加え、カラムで30分インキュベーションする。インキュベーション後、IgMを溶出させ、PD-10カラムまたはFast脱塩カラムを使用して、さらなる使用に備えて、分画の緩衝液交換を好ましい緩衝液に対して行う。溶出後、各カラムからの個々の分画を、標準条件(下記プロトコール1参照)を使用して活性化したCNBrセファロースまたはNHSセファロースに共有結合させる。

【0157】

免疫グロブリンのサイズ排除クロマトグラフィー分離

母体血から単離した血漿を、まず清澄させ(10,000gで遠心分離して、0.45 μmのろ紙によってろ過する)、次にカプリル酸で処理して、Igおよび数種の<sub>2</sub>マクログロブリンに悪影響を与えずに大量の血漿タンパクを沈殿させる。

【0158】

次に、Ig分画を硫酸アンモニウムで沈殿させる(TsangおよびWilkins、J.Immunol.Meth.138、291-299、1991)。沈殿後、Ig分画をHEPES緩衝液中で再溶解し、3M塩化マグネシウム/25%(v/v)エチレングリコール/HEPES pH8.0の最終緩衝液組成物に調製する。

【0159】

次に、この再懸濁したIg分画を、3M塩化マグネシウム/25%(v/v)エチレングリコール/HEPES pH8.0を移動相として使用して、スーパーローズ-6(ファーマシア)でのサイズ排除クロマトグラフィー(Coppolaら、J.Chromatogr.476、269-290、1989;Folkersenら、J.Immunol.Methods 23、127-135、1978)に供し、個々のIg分画(IgMおよびIgG)を非結合成分として維持する。IgMおよびIgGを分離分画として溶出後、個々の分画を、活性化したCNBrセファロースまたはNHSセファロースに標準条件(下記プロトコール1参照)を使用して連結させる。

【0160】

もし、抗胎児細胞抗体およびその片割れの抗イディオタイプ抗体のクラスおよびサイズがお互いに異なるようであれば、これらの単離した抗体は、さらなる使用に備えて、非結合抗体を提供するため、TBSを移動相として使用するPD-10カラムまたはFAST脱塩カラム(アマーシャム、バイオサイエンス)でバッチ式カラム脱塩によって脱塩できる。

【0161】

片割れの抗イディオタイプ抗体からの抗体の分離を維持するために、抗体調製物を初期に共有結合させるのに、CNBrセファロースまたはNHSセファロースとの結合を必要とせず、最大の効率化をねらってピーズと結合した抗体を必要とする方法で抗体を精製すべき場合は、下記プロトコール2を好ましくは使用する。

【0162】

変性状態下での免疫グロブリン分画のフリーフロー電気泳動

母体血から単離した血漿をまず清澄させ(10,000gで遠心分離して、0.45 μmのろ紙によってろ過する)、カプリル酸で処理してIgおよび数種の<sub>2</sub>マクログロブリンに悪影響を与えずに大量の血漿タンパクを沈殿させる。次に、Ig分画を硫酸アンモニウムで沈殿させる(TsangおよびWilkins、J.Immunol.Meth.138、291-299、1991)。

【0163】

単離後、Ig分画を0.1M Tris/0.2% ヒドロキシプロピルメチルセルロース/0.2%(v/v)両性電解質/2~6M尿素中に再溶解する。この溶液を、連続溶液相等電点電気泳動(Hoffmannら、Proteomics.1、807-818、2001)によって分離するためにフリーフロー電気泳動(FFE)装置(Octopus,Tecan)にかける。PD-10カラムまたはfast脱塩カラム(アマーシャム、バイオサイエンス)を使用して、分画(1分画当たりの解像度0.01~0.05pH単位)をPBSに緩衝液交換する。または、さらなる使用に備えて、CNBrセファロースまたはNHSセファロースに結合させるために、分画を3M塩化マグネシウム中に移す。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 4 】

プロトコール1:CNBr 活性化セファロースに対するタンパクの共有結合

1.凍結乾燥粉末(1gの凍結乾燥粉末は約3.5ml最終容量を与える)の必要量を計量し、1mMのHCl中に懸濁させる。この培地はすぐに膨張するので、焼結ガラスフィルター(空隙率が推奨される)上で1mMのHClにより15分間洗浄すべきである。凍結乾燥粉末グラム当たり1mMのHClを約200ml使用し、数アリコットで添加する。

2.3M塩化マグネシウム/25%エチレングリコール中の抗体調製物をpH8.0で約5mg/mlまで、100K MWCO膜(ウルトラフリー15、ミリポア)付き遠心分離濃化装置を使用して濃化する。凍結乾燥粉末グラム当たり約5mlの抗体溶液を使用する。

3.抗体調製物をファルコンチューブで混合する。混合物を1時間室温でまたは一晩4 で逆さまに回転させる。他の穏やかな回転方法の使用は可。磁気スターラーは使用しない。

4.過剰のリガンドを、結合緩衝液の少なくとも5倍の培地(ゲル)体積用量で洗浄除去する。

5.残りの任意の活性基をアミン緩衝液でブロックする。培地を0.1 MのTris-HCl緩衝液、pH8.0または1Mエタノールアミン、pH8.0に移し、2時間静置する。

6.培地をpHが交互に変わるサイクルで少なくとも3回洗浄する。少なくとも5倍の培地体積量の各緩衝液で洗浄する。各サイクルは0.5MのNaClを含む0.1Mの酢酸緩衝液pH4.0による洗浄、その後の0.5MのNaClを含む0.1MのTris-HCl、pH8の洗浄から構成すべきである。

7.非使用時には、ビーズを4 で保存する。

## 【 0 1 6 5 】

プロトコール2:抗体親和性樹脂上の抗体の方向付けの指示

臭化シアンで活性化したセファロースを使用して固体マトリックス上に抗体を固定する従来法は、抗体活性の低い親和性カラムを生じる。なぜなら、免疫グロブリン分子がランダムな方向で、セファロースの多部位に付着していて、それが、抗体/抗原相互作用の効果を減少させているからである。本プロトコールには、Fcドメインを介してプロテインGアガロースと抗体との有向結合、続いてこの複合体をジメチルピメリミデート(DMP)を使用して共有架橋させることが記載される。プロテインGは、免疫グロブリン分子のFc部分と結合し、これによって抗体の最適な空間配向および最大の抗原結合有効性がもたらされる。本プロトコールは、1mlカラムを対象にして記載されているが、バッチモード/溶液結合用に容易に調整できる。

## 【 0 1 6 6 】

## 1. 試薬

1.架橋緩衝液:架橋緩衝液は0.1M トリエタノールアミン(pH8.5)または別の非アミン配合緩衝液、pH7~9。

2.ジメチルピメリミデート(DMP)溶液:0.1Mトリエタノールアミン(pH9.5;DMPの酸性度により、溶液のpHは約8.0に減少することになる)中、20mMのDMP(Pierce)を10ml調製する。この試薬は使用直前に調製される。

3.リン酸緩衝食塩水(PBS):20mMリン酸緩衝液、150mMのNaCl、pH7.4。

4.停止溶液:停止溶液は0.1Mのエタノールアミンまたは、トリスまたはグリシンのようなアミン含有溶液。反応を停止するためにサンプルに対して1:4の比率で添加する。

5.フィルターシリンジ(0.2 μm低タンパク結合のDurapore(ミリポア)または同等物)。

6.オンラインUV検出器(たとえばPharmacia Monitor UV-1 or UV-MII)。

7.プロテインGカラム(6%の高度に架橋された球状アガロース(Amersham Biosciences)に固定されたプロテインGを含む1-ml HiTrap プロテインGカラムまたはバッチモード用のフリービーズ。膨張したゲルのプロテインGの含有量は2mg/mlで、ヒトIgGに対する結合能力は> 20mg/ml(排出ゲル当たり)。ゲルは予め1mlまたは5mlの床容量を有し、保存液として25%エタノール中に平衡化されたカラム中に事前に充填されて供給される(カラムは4~30に貯蔵すべきである)。

8.100K限界ろ過装置(ミリポア)

## 【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

## 2. 方法

1. 非リガンド抗体の緩衝液をPBSまたは結合緩衝液に交換し、その濃度を約1mg/mLに調整する。
2. プロテインGカラムを、ぜん動性のポンプを0.5ml/分の流速で使用して20倍のカラム容量のPBSで平衡化する。
3. 抗体溶液をカラム上に約0.5ml/分の流速でポンプ供給する。
4. PBSでカラムを広範に洗浄し、収集分画を254nmまたは280nmの吸光度について、オンラインUV検出器を使用してモニターする。もし>75%の抗体がプロテインGセファロースに結合していないならば、残りのプロトコールに進む。もし抗体がプロテインGカラムに弱くしか結合せず、プロテインGカラムから「滴り落ちる」ならば、このプロトコールを中止する。分画を収集し、臭化シアンで活性化したセファロースまたはNヒドロキシスクシンイミドで活性化したセファロースのどちらかを使用して、抗体を無方向型でマトリックスに結合させる。
5. ぜん動性のポンプを0.5ml/分の流速で使用して、抗体結合カラムを約10mlの架橋緩衝液(10倍のカラム容量)で平衡化する。
6. 約5mlの新たに調製したDMP溶液をカラムを通して0.5ml/分の流速でポンプ供給し10分間静置する。
7. さらに2.5mlのDMP溶液をカラムにポンプ供給し、さらに10分間静置する。
8. 残りのDMP溶液をカラムにポンプ供給し、最後の10分間静置する。
9. カラムを5倍のカラム容量の架橋緩衝液で洗浄する。
10. 5倍のカラム容量の停止溶液(たとえば0.1Mエタノールアミン)で反応を停止する。
11. 0.02%のアジ化ナトリウムを補給した約20倍のカラム容量のPBSでカラムを平衡化する。このカラムはこの時点で免疫親和性捕捉研究のための準備が整った。
12. 非使用時にはカラムを4 で保存する。

### 【実施例3】

#### 【0168】

可溶性HLA抗原の抗HLA抗体からの解離

母体血から単離された血漿はまずカプリル酸で処理して、大量の血漿タンパクを、Igおよび数種の<sub>2</sub>マクログロブリンに悪影響を与えずに沈殿させる。この初期沈殿の後、上澄み液を取り除き、Ig分画を硫酸アンモニウムで沈殿させる(TsangおよびWilkins、J. Immunol. Meth. 138、291-299、1991)。

#### 【0169】

単離後、このIg分画をHEPES pH7.2中に再溶解させて、3Mの塩化マグネシウム/25%エチレングリコール/HEPES pH7.2を作る。次にこの溶液を、PD-10カラムまたはFAST脱塩カラム(アマーシャム、バイオサイエンス)で、トリス緩衝食塩水を移動相として使用するパッチ式カラム脱塩によって塩化マグネシウムおよびペプチドHLA抗原から急速に脱塩する(塩化マグネシウムが燐酸ベース緩衝液を沈殿させるので、PBSはこの段階で使用できないことに留意のこと)。得られた高分子量分画は、基本的にペプチドHLA抗原がなく、さらなる使用に備えて脱塩されている。

### 【実施例4】

#### 【0170】

結合している抗体と抗体との複合体の胎児細胞表面からの脱離

非共有結合タンパクが、下記方法を使用して単離された胎児細胞から急速に脱離されて、生存可能な胎児細胞を生じる。

#### 【0171】

##### 1. 細胞表面タンパクのトリプシン処理

母体血調製物から得られた細胞を、PBS中0.1%(w/v)トリプシン/0.02%(v/v)ベルセン溶液でインキュベーションし、37 で、細胞の生存能力を失うことなく結合した抗体を脱落させるために必要とされる切断の程度に依存して、約1~5分またはそれ以上インキュベーションする。

## 【0172】

消化が完了したら、細胞を洗浄しトリプシンを、できればトリプシン阻害剤を含む緩衝液を使用して除去する。

## 【0173】

## 2. 混合プロテアーゼ細胞表面消化

母体血調製物から得られた細胞を、PBS中0.1%(w/v)タンパク分解酵素の混合物(たとえば、トリプシン、プロナーゼ、エラスターゼ、コラゲナーゼおよびキモトリプシン)でインキュベーションし、37℃で、細胞の生存能力を失なうことなく結合した抗体を脱落させるために必要な切断の適度に依存して、1~5分またはそれ以上インキュベーションする。

## 【0174】

消化が完了したら、細胞を洗浄し、できれば、たとえばフェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)、ロイペプチンおよびトリプシン阻害剤を含むプロテアーゼ阻害剤カクテルなどの酵素中和剤により洗浄し酵素を除去する。

## 【0175】

## 3. 細胞表面ジスルフィドの還元

ジチオスレイトール(DTT)またはトリス(2-カルボキシエチル)ホスファイン(TCEP)の還元を行うために、母体血から単離した細胞を確立した条件下で培養し、1×PBSで洗浄する。洗浄後、1mM~50mM DTTまたは0.1mM~50mM TCEPを含むPBSを細胞に加え、これを1~30分間インキュベーションする。細胞を3回PBSで洗浄して培養培地に置いて細胞の生存能力を維持する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0176】

【図1】母体抗体にまだ結合していないかまたはその抗原-抗体複合体がマスキングされた胎児細胞を単離するためのスキームを示す図である。

【図2】胎児細胞に結合した母体抗体を有する胎児細胞を、その抗体を標識する物質を使用して単離するスキームを示す図である。

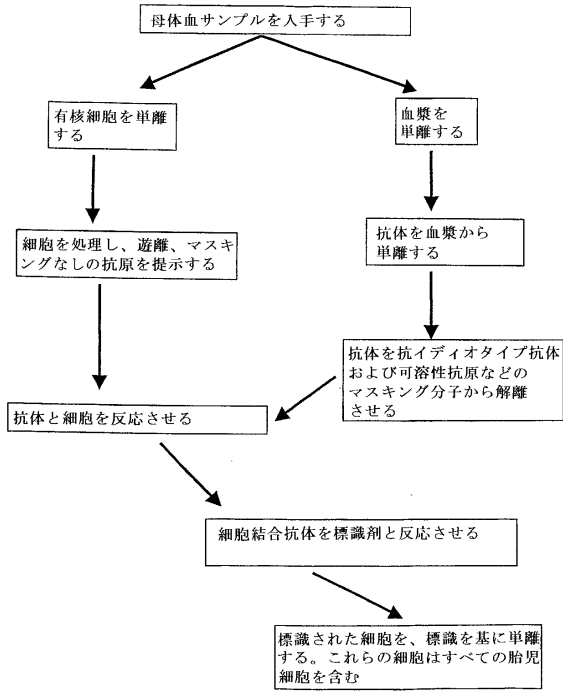
10

20

【 図 1 】

図 1

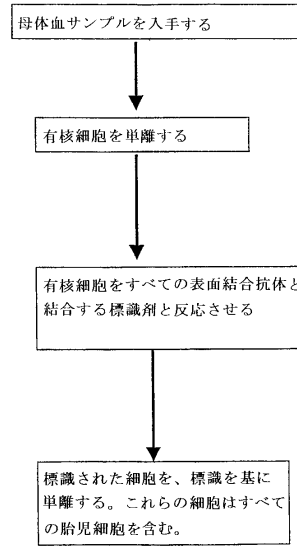
母体抗体にまだ結合していないかまたはその抗原-抗体複合体がマスキングされている胎児細胞を単離する



【 図 2 】

図 2

母体抗体をすでに結合させている胎児細胞を、この抗体を標識する物質を使用して単離する



---

フロントページの続き

(72)発明者 ラルフ・ポーマー  
オーストラリア・ヴィクトリア・3 1 8 2・ウエスト・セント・キルダ・カウデロイ・ストリート  
・4

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表平05 - 506144 (JP, A)  
Journal of Reproductive Immunology , 1991年, 20, 115 - 128

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53-579

C12N 5/073

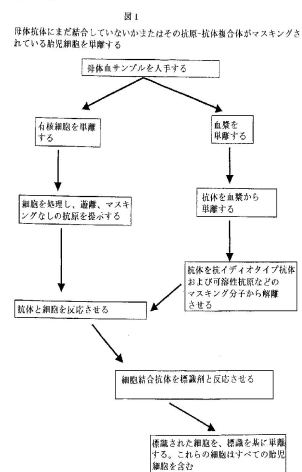
C12Q 1/04

专利名称(译)	母体抗体作为胎儿细胞标记物，用于鉴定和富集源自母体血液的胎儿细胞		
公开(公告)号	<a href="#">JP4589106B2</a>	公开(公告)日	2010-12-01
申请号	JP2004509429	申请日	2003-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	基因类型私人有限公司		
申请(专利权)人(译)	基因类型私人有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基因科技有限公司		
[标]发明人	ラルフ・ポーマー		
发明人	ラルフ・ポーマー		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/073 C12Q1/04 C12N5/00 C12N5/06 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/567 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/56977 G01N33/6854 G01N33/689 G01N2800/36 G01N2800/368 Y10T436/101666 Y10T436/25125 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N33/53.Y C12N5/00.202.B C12Q1/04		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	60/385170 2002-05-31 US		
其他公开文献	JP2005528616A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种使用由母体产生的抗体作为胎儿细胞标记物来鉴定和/或富集来自母体血液的胎儿细胞的方法。使用结合母体抗体的标记试剂鉴定和分离胎儿细胞 - 母体抗体复合物。本发明还提供了使用所述母体抗体作为胎儿产前基因诊断的胎儿DNA来源分离的胎儿细胞。

【 図 1 】



【 図 2 】

