

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-504168

(P2009-504168A)

(43) 公表日 平成21年2月5日(2009.2.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	C12N 15/00 A	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/53 V	
	GO1N 33/543 541A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2008-526444 (P2008-526444)
 (86) (22) 出願日 平成18年8月16日 (2006.8.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月17日 (2008.4.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/008097
 (87) 国際公開番号 W02007/020081
 (87) 国際公開日 平成19年2月22日 (2007.2.22)
 (31) 優先権主張番号 GR20050100430
 (32) 優先日 平成17年8月17日 (2005.8.17)
 (33) 優先権主張国 ギリシャ (GR)
 (31) 優先権主張番号 60/795,149
 (32) 優先日 平成18年4月25日 (2006.4.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508050141
 メディクシス エス. エー.
 ギリシャ共和国 ジーアールー145 6
 8 アテネ クリオネリ アスクリピオウ
 ストリート 4
 (74) 代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (72) 発明者 リアニドウ, エヴリクリア
 ギリシャ共和国 ジーアールー145 7
 5 アテネ ピペロプロウ 19
 (72) 発明者 スタトプロウ, アリキ
 ギリシャ共和国 ジーアールー115 2
 4 アテネ ハッツィコンスタンティ 3
 1

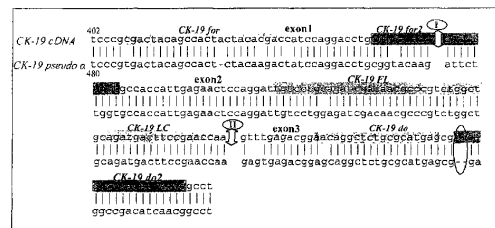
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CK19発現を確認する組成物及び方法

(57) 【要約】

生体サンプル中のCK-19 mRNA陽性細胞の定量測定についての方法が開示されている。この方法は例えば、患者の癌を検出するために末梢血を用いて使用することができる。ある態様では、この方法をアジュバント治療前に癌を検出して、それによって治療効果に関する情報を提供するために使用することができる。本発明方法の実施は、感度が高く、信頼性が高く、そして実施が容易である。

【選択図】 図1



CK-19 cDNA and CK-19 pseudo gene sequence alignment and hybridization sites for primers and probes used in protocols A and B. Points I and II represent junctions between exons 1/2 and exons 2/3, respectively.

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つのプライマーが少なくとも 1 つのイントロンを挟む部位を包含することを特徴とする、少なくとも 1 つのイントロンを包含する遺伝子の標的配列とハイブリッド形成できるプライマー対。

【請求項 2】

当該プライマーが、当該遺伝子の偽遺伝子とハイブリッド形成しないことを特徴とする、請求項 1 に記載のプライマー対。

【請求項 3】

当該プライマーの少なくとも 1 つが、当該偽遺伝子の 3' 末端にある少なくとも 1 つの塩基にミスマッチする、請求項 2 に記載のプライマー対。

10

【請求項 4】

遺伝子が、ヒト C K 1 9 遺伝子である、請求項 1、2 又は 3 に記載のプライマー対。

【請求項 5】

プライマー対の 1 つが、SEQ ID NO: 1 の配列又は SEQ ID NO: 2 の配列を含んでなる、請求項 4 に記載のプライマー対。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 1 の配列を有する 1 つのプライマー及び SEQ ID NO: 2 の配列を有する 1 つのプライマーを含んでなる、請求項 5 に記載のプライマー対。

【請求項 7】

プライマーが、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体又は標識を含んでなる、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のプライマー対。

20

【請求項 8】

少なくとも 1 つのプライマーが少なくとも 1 つのイントロンを挟む部位を包含し、

(i) 核酸増幅試薬、請求項 1 に記載のプライマー対及びテストサンプルを包含する反応混合物を形成すること、

(i i) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも 1 つのコピーを生成すること、及び

(i i i) P C R 時のリアルタイム観察を用いて、サンプル中の m R N A の量を測定すること、

30

の工程を含んでなる、プライマー対を用いて、少なくとも 1 つのイントロンを包含する遺伝子由来の m R N A の、テストサンプル中の存在を定量する方法。

【請求項 9】

工程 (i) の反応混合物の形成前に、テストサンプルを逆転写する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

テストサンプルが、血液サンプル、骨髄からのサンプル及びリンパ節由来のサンプルから選ばれる、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

テストサンプルが、血液サンプルである、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

血液サンプルが、反応混合物の形成前に遠心分離される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

工程 (i) の反応混合物が、ハウスキーピングプライマー対を更に含んでなる、請求項 8 ~ 12 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

ハウスキーピングプライマー対が、SEQ ID NO: 5 及び 6 を有している、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

(i) 患者から生体サンプルを提供すること、

50

(i i) 生体サンプルから核酸を単離すること、
 (i i i) 核酸の供給源がRNAである場合、単離した核酸を任意に逆転写すること、
 (i v) 核酸増幅試薬、請求項4に記載のプライマー対、及び工程(i i)で単離した核酸又は工程(i i i)の逆転写された核酸のアリコートを含む、反応混合物を形成すること、

(v) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、

(v i) PCR時のリアルタイム観察を用いて、サンプル中のCK-19 mRNA陽性細胞を定量すること、及び

(v i i) サンプル中のCK-19 mRNA陽性細胞の量に基づいて、アジュバント治療の見通しを判断すること、
 の工程を含んでなる、癌を患っている患者におけるアジュバント治療の見通しを判断する診断方法。

【請求項16】

前記癌が、乳癌、好ましくは手術可能な乳癌である、請求項15に記載の診断方法。

【請求項17】

前記生体サンプルが、血液サンプルである、請求項15又は16に記載の診断方法。

【請求項18】

工程(i i i)の反応混合物が、ハウスキーピングプライマー対を更に含んでなる、請求項15~17の何れか一項に記載の診断方法。

【請求項19】

ハウスキーピングプライマー対がSEQ ID NO: 5及び6を有している、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

(i) 請求項1に記載のプライマー対、

(i i) 癌細胞上に追加のマーカと任意にハイブリッド形成する配列、及び

(i i i) 増幅試薬、

を含んでなる、CK19標的配列を増幅するための診断キット。

【請求項21】

前記増幅試薬が、SEQ ID NO: 3及び4のハイブリダイゼーションプローブを含んでなる、請求項20に記載の診断キット。

【請求項22】

前記キットが、ハウスキーピングプライマー対、好ましくはSEQ ID NO: 5及び6による配列を有するプライマー対を更に含んでなる、請求項20又は21に記載の診断キット。

【請求項23】

増幅試薬及びプライマー対(複数を含む)が、凍結乾燥されている、請求項20~22の何れか一項に記載の診断キット。

【請求項24】

第1プライマーの長さが約10~約20個の核酸塩基であって、更に図1で示されるCK-19 cDNA配列と特異的にハイブリッド形成が可能である、SEQ ID NO: 1又は2で示される配列の少なくとも約8個の核酸塩基を有する第1プライマーを含んでなる、プライマー対。

【請求項25】

第2プライマーの長さが約10~約20個の核酸塩基であって、更に図1で示されるCK-19 cDNA配列と特異的にハイブリッド形成が可能である、SEQ ID NO: 1又は2で示される配列の少なくとも約8個の核酸塩基を有する第2プライマーを更に含んでなる、請求項24に記載のプライマー対。

【請求項26】

第1及び第2プライマーの少なくとも1つが、修飾ヌクレオチド間架橋、修飾糖部分又

10

20

30

40

50

は修飾核酸塩基を含んでなる、請求項 24 ~ 25 に記載のプライマー対。

【請求項 27】

第 1 及び第 2 プライマーの少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの固定された核酸 (locked nucleic acid; LNA) ユニットを含有している、請求項 26 に記載のプライマー対。

【請求項 28】

少なくとも 1 つのプライマーが、少なくとも 1 つのイントロンを挟む部位を包含し、
(iv) 核酸増幅試薬、請求項 24 ~ 27 に記載のプライマー対及びテストサンプルを包含する反応混合物を形成すること、

(v) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも 1 つのコピーを生成すること、及び

(vi) PCR 時のリアルタイム観察を用いて、サンプル中の mRNA の量を測定すること、

の工程を含んでなる、プライマーの対を用いて、少なくとも 1 つのイントロンを包含する遺伝子由来の mRNA の、テストサンプル中の存在を測定する方法。

【請求項 29】

ハウスキーピングプライマー対の使用を更に含んでなる、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 24 ~ 27 に記載のプライマー又はプライマー対を含んでなる、診断キット。

【請求項 31】

(a) 生体液から何れかの単核細胞を分離すること、

(b) 分離した単核細胞に、単核細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗体 (又はその抗原結合断片) を接触させること (ここにおいて、抗体 (又は断片) は固体担体に結合されており、この接触は、細胞、抗体 (又は断片) 及び固体担体の結合複合体を形成するのに十分である)、

(c) 結合していない物質の何れかから、複合体を分離すること、

(d) 複合体に結合している内皮単核細胞から、核酸を単離すること、

(e) 核酸増幅試薬、請求項 24 ~ 27 に記載のプライマー対及び核酸を包含する反応混合物を形成すること、

(f) 当該混合物を増幅条件下において、CK-19 標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも 1 つのコピーを生成すること、及び

(g) PCR を用いて、生体サンプル中の CK-19 mRNA を検出すること、

の工程を含んでなる、生体サンプル中の CK-19 mRNA の存在を確定する方法。

【請求項 32】

上皮単核細胞が、濾過又は遠心分離で分離される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

遠心分離工程が、Ficoll 密度勾配法の使用を含んでなる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

抗体が、内皮単核細胞によって発現されるグリコプロテインに特異的に結合するモノクローナルである、請求項 31 ~ 33 に記載の方法。

【請求項 35】

モノクローナル抗体が、Ber-EP4 である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

固体担体が、免疫磁性ビーズである、請求項 31 ~ 35 に記載の方法。

【請求項 37】

工程 (c) の方法が、結合複合体に磁場を掛けて、結合していない物質の全てから複合体を分離することを含んでなる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

プライマー対が、SEQ ID NO: 1 及び SEQ ID NO: 2 で表される、請求項

10

20

30

40

50

31 ~ 36 に記載の方法。

【請求項39】

生体液が、末梢血である、請求項31 ~ 38 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体サンプル中のCK-19 mRNA陽性細胞を定量するための組成物及び方法に関する。

【0002】

特に、本発明は、癌を患っている患者からの生体サンプル中の分子マーカーCK-19の定量に基づく、循環腫瘍細胞(CTCs)を検出する方法に関する。本発明による方法を用いることによって、アジュバント治療の開始前に、この治療の有効性に関する情報を提供するための、検出を実施することができる。

10

【背景技術】

【0003】

最近の数年間、乳癌患者の骨髄又は末梢血中の腫瘍細胞の検出及び特定化が、無病生存率及び全生存率に関して、臨床的関連性があるという一連の証拠が増えている(A.C. Lambrechts et al; 1998)。更に、微小残存病変(MRD)の予測評価が、アジュバント治療の有効性に関する情報を与えることができる(K. Pantel et al; 2003)。従って、循環腫瘍細胞を初期に検出するための感度の高い方法は、MRDの初期診断及びより有効な治療に対して非常に重要である。

20

【0004】

中間フィラメント・サイトケラチン-19(CK-19)は、上皮腫瘍細胞の大半で安定且つ豊富に発現され、そして乳癌患者の末梢血中の肉眼で見えない腫瘍細胞の検出のために最もよく用いられるマーカーの1つである(S. Braun et al; 2000; Y.H. Datta et al; 1994; A. Schoenfield et al; 1997)。本発明者らは最近、末梢血におけるCK-19 mRNA陽性細胞の検出が、患者におけるアジュバント治療前の手術可能な乳癌患者の転帰の最も重要な因子の1つであることを示していること、そしてCK-19 mRNAに陰性な患者が長期の生存率及び無病生存率の十分な可能性を有していることを、明らかにした(A. Stathopoulou et al; 2002)。

30

【0005】

更に、以前の検討において、本発明者らは、CK-19 mRNAに対する蛍光標識された特異的ハイブリダイゼーションプローブのPCR時のリアルタイム観察に基づく定量方法を開発した(A. Stathopoulou et al; 2003)。この方法を乳癌患者に適用することにより、I/I(手術可能)又はIV(転移)ステージの何れかで、更に健常な血液提供者で、本発明者らは、それぞれ70/337(20.77%)及び2/89(2.2%)の末梢血中に陽性細胞を見出した。この場合、本発明者らは、5µgのRNAに対して0.6MCF-7細胞当量のカットオフ値(この方法の検出限界)をセットしたときに、正常血液提供者に対して偽陽性率(2.2%)を観察した。この統計的に計算されたカットオフを用いることによって、患者及び健常な提供者の末梢血サンプルの幾つかは、非常に高い交差点(Crossing point; Cps)でのCK-19の増幅カーブを示したにも関わらず、陰性に見なされた。これらの増幅カーブは、造血細胞からの低レベルの通常では認められない転写されたCK-19(J. A. Lopez-Guerrero et al; 1997)の増幅、CK-19a及びCK-19bの偽遺伝子(P. Ruud et al; 1999; E. S. Savtchenko et al; 1988)又は本発明者らのサンプルから全RNAと共に抽出された夾雑ゲノムDNAの増幅に起因していた。しかしながら、このカットオフ値の非常に近いところに見られるサンプルでは、この「グレーゾーン」の結果の解釈は、本発明者らの初期乳癌患者の治療に対して非常に重大な意味を持っていた(V. Bozionellou et al; in press)。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 6 】

従って、生体サンプル中の mRNA 転写物を定量測定するためのプライマー及び方法に、改善する必要性が依然として存在している。特に、従来のプライマー及び方法に比べてノイズが減少し、高い感受性及び偽陽性の低い頻度をもたらす方法であり、手術可能な癌患者の末梢血中の CK - 19 mRNA 陽性細胞を測定するための改善されたプライマー及び方法が要望されている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

従って、本発明の一態様では、少なくとも1つのイントロンを包含する遺伝子の標的配列とハイブリッド形成できるプライマー対（ここにおいて、当該プライマー対の少なくとも1つは、少なくとも1つのイントロンを挟む部位を包含する）に関する。少なくとも1つのプライマーが、可能性のある偽遺伝子に対して相同性が低い配列を有していることが好ましい。

10

【 0 0 0 8 】

好ましい態様では、当該遺伝子がヒト CK - 19 遺伝子である。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の態様では、ゲノム遺伝子及び任意に1つ又はそれ以上の偽遺伝子を包含するサンプル中で、プライマー対を用いて少なくとも1つのイントロン配列を含む遺伝子由来の mRNA を定量する改善された方法を提供する。ここにおいて、この方法は、1つ又はそれ以上の当該プライマーは、少なくとも1つのイントロンを挟む部位を包含しており、

20

(i) 核酸増幅試薬、本発明のプライマー対及びテストサンプルを包含する反応混合物を形成すること、

(i i) この混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、及び

(i i i) PCR時のリアルタイム観測を用いて、サンプル中の mRNA の量を測定すること、

の工程を含んでなる。

【 0 0 1 0 】

遺伝子がヒト CK - 19 であって、サンプルが血液サンプル、骨髄由来のサンプル又はリンパ節由来のサンプルであることが好ましい。癌を患っている患者の生体サンプル中の分子マーカー CK - 19 の定量測定に基づく、CK - 19 プライマー及び本発明の方法を用いる循環腫瘍細胞 (CTC s) の早期検出は、従来の方法及びプライマーを用いるのに比べて、より高い精度で実施することができる。

30

【 0 0 1 1 】

更なる態様では、本発明は、癌を患っている患者におけるアジュバント治療の見通しを判断するための診断方法に関し、その方法は、

(i) 患者から生体サンプルを提供すること、

(i i) 生体サンプルから核酸を単離すること、

(i i i) 核酸の供給源が RNA である場合、単離した核酸を任意に逆転写すること、

40

(i v) 核酸増幅試薬、本発明によるプライマー対、及び工程 (i i) で単離した核酸のアリコートを含む、反応混合物を形成すること、

(v) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、

(v i) PCR時のリアルタイム観測を用いて、サンプル中の CK - 19 mRNA 陽性細胞を定量すること、及び

(v i i) サンプル中の CK - 19 mRNA 陽性細胞の量に基づいて、アジュバント治療の見通しを判断すること、

の工程を含んでなる。

【 0 0 1 2 】

50

本発明による診断方法を用いると、患者の生体サンプル中のCK-19 mRNA陽性細胞の量のより少量での検出が可能となり、更に、偽陽性判定の頻度が非常に低くなる。このことは、疾患の進行の初期に信頼性のある判定ができ、患者の回復可能性が大いに改善されるという結果を伴うことを意味する。

【0013】

別の態様では、本発明は、ハウスキーピングのプライマー対を提供する。このハウスキーピングのプライマー対は、特定の細胞型/臓器に偏在するハウスキーピング遺伝子とハイブリッド形成する。ハウスキーピングのプライマー対を用いると、偽陰性の出現を回避できるので、定量リアルタイムPCRの適用を大きく改善できる。

【0014】

更なる態様では、本発明は、本発明によるプライマー対、及び本発明による方法に必要な幾つかの又は全ての試薬を包含するキットに関する。

【0015】

本発明は、血液のような生体液中のCK-19 mRNAの存在を確定する方法も提供する。この方法は次の工程の少なくとも1つ、好ましくはその全てを含む。

- (a) 生体液から上皮単核細胞を分離すること、
- (b) 分離した単核細胞に、上皮単核細胞によって発現される抗原に結合する（好ましくは、特異的に結合する）抗体を接触させること、好ましくは、抗体は固体担体に結合されており、そしてこの接触が、細胞、抗体及び固体担体の結合複合体を形成するのに十分であること、
- (c) 結合していない物質の何れかから、結合複合体を分離すること、
- (d) 複合体に結合している上皮単核細胞から核酸を単離すること、
- (e) 核酸増幅試薬、本明細書に開示されているプライマー対及び上皮単核細胞から単離された核酸を包含する反応混合物を形成すること、
- (f) 当該混合物を増幅条件下において、CK-19標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、及び
- (g) PCR、好ましくはリアルタイムPCRを用いて生体サンプル中のCK-19 mRNAの量を測定すること。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、PCR時のリアルタイム観察を用いる、少なくとも1つのイントロンを包含する遺伝子のmRNAを検出するためのプライマー及び方法を提供する。

【0017】

mRNAの定量検出は、PCR産物の定量測定のために利用できる何れかの方法を用いて実施する。この方法はリアルタイムPCRであることが好ましいが、その他の適切な方法、例えば競合PCRは本発明の範囲内である。定量化は、何れかの適切な方法で実施することができ、そして方法の選択は当該技術の範囲内である。

【0018】

本発明は、少なくとも1つのイントロンを包含する遺伝子のmRNAの存在を検出するための診断方法及びキットを更に提供する。

【0019】

従って、第一の態様では、少なくとも1つのイントロンを包含する遺伝子の標的配列にハイブリッド形成可能なプライマー対が提供され、ここにおいて当該プライマーの少なくとも1つは、少なくとも1つのイントロンを挟む部位を含有している。

【0020】

本明細書に記載のプライマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、又は国際特許出願公開WO92/20702号公報に記載されているペプチド核酸(PNA)又は米国特許第5,185,444号；同第5,034,506号及び同第5,142,047号に記載されているモルホリノ類縁体を含む非荷電の核酸のような核酸類縁体を包含していてもよい。このような配列は、多種の技術を用いて規定通りに合成できる

10

20

30

40

50

。これに代わる態様では、プライマーは、標識を包含している。

【0021】

本明細書で用いる「標的配列」は、検出、増幅、又は増幅及び検出の両方が実施される配列であるか、又は天然状態で、すなわちゲノムDNA又は染色体外DNAとして少なくとも1つのイントロンを有している、本明細書又は別で提供される配列に相補的である配列を意味している。標的配列という用語は、時々一本鎖と言われているが、当業者は、標的配列が二本鎖であってもよいことを認識するであろう。

【0022】

特に、標的配列は、CK19遺伝子のmRNA転写物である。好ましい態様では、SEQ ID NO: 1 (5' CGGGACAAGATTCTTGGT - 3' 順方向) 及びSEQ ID NO: 2 (5' CGTTGATGTCGGCCTCCA - 3' 逆方向) の配列をそれぞれ有し、このプライマーは、CK19標的配列を増幅するために用いることができる。

10

【0023】

SEQ ID NO: 1 及びSEQ ID NO: 2 の配列は、本発明によるプライマー対の好ましい具体例であるということ認識できるであろう。本発明によると、プライマー対の主要な特徴は、それが少なくとも1つのイントロンを挟む部位を包含することである。これは、例えばmRNA、cDNAからスプライシングで切り出されたイントロンの配列のみに結合できるプライマー対を提供する。この「スプライシング」は、自然に、すなわち生体サンプル中のmRNAの検出を提供するために、生じることを理解されるであろう。しかしながら、この用語は、配列、例えばcDNAの「スプライシングで切り出された」イントロンを有する遺伝子操作された配列も包含する。イントロンを挟む部位は、プライマーが採用されている条件下でイントロンのない配列のみに結合するならば、イントロンのどちらかの部位にある1個の塩基のみを含むことができる。順方向及び逆方向のプライマーのうちの片方又は両方が、1つ又はそれ以上のイントロンを挟む部位を包含することができる。好ましい態様では、プライマーの1つだけが、イントロンを挟む部位を包含し、特に好ましい態様では順方向プライマーがイントロンを挟む部位を包含する。

20

【0024】

本発明の開示において、順方向のプライマーは、標的核酸のコード鎖と同じ方向に伸びるプライマーである。反対に、逆方向プライマーは、標的核酸の非コード鎖と同じ方向に伸びているプライマーである。従って、プライマーは、互いに向き合っているそれらの3'末端で直線になっている。

30

【0025】

本発明によるプライマーの別な特徴は、プライマー配列が、目的の特定の遺伝子の偽遺伝子とハイブリッド形成又は結合しないことである。この第2の特徴は、偽遺伝子が存在する場合のみに必要であり、そしてこのような配列の構築には、可能性のある偽遺伝子の配列が公知であるか又は配列データベース中に見出されることが必要である。

【0026】

本発明のこの好ましい態様では、少なくとも1つの当該プライマーが、可能性のある偽遺伝子の3'末端に少なくとも1つのミスマッチ、そして好ましくは2つ又は3つのミスマッチを包含するように、プライマー対が設計されている。本発明の特に好ましい態様では、少なくとも1つのプライマーが、CK-19の偽遺伝子であるCK-19aの3'末端に少なくとも1つのミスマッチを包含する。

40

【0027】

本発明の第2の態様では、本発明のプライマーを用いて、テストサンプル中のmRNAの存在を検出する方法が提供される。この方法は、(i)核酸増幅試薬、本発明のプライマー対及びテストサンプルを包含する反応混合物を形成すること、(ii)この混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、及び(iii)リアルタイムPCR観察を用いて、サンプル中のmRNAを定量すること、の工程を含んでなる。

50

【0028】

本明細書の記載において、「テストサンプル」及び「生体サンプル」は、同じ意味で用いられる。これに関連して、「テストサンプル」は、標的配列を含むと思われるものの何れかを意味する。テストサンプルは、例えば血液、骨髄、リンパ節、気管支肺胞洗浄液、唾液、咽頭拭き取り検体、接眼レンズ液、髄液、汗、喀痰、尿、乳汁、腹水症液、粘液、滑液、腹水、脳脊髄液、腹水、乳房組織等の組織のような、生体源の何れか；又は発酵濾液、細胞培養液、化学反応混合物等の由来であってもよい。肺細胞又は組織もまた、使用できる。最も一般的なテストサンプルは、末梢血、骨髄又はリンパ節のような、血液に由来する。テストサンプルは、供給源から得られたものを直接に、又は前処理してサンプルの特徴を修飾した後に使用することができる。従って、テストサンプルは、例えば、血液から血漿を調製すること、細胞を破壊すること、固体物質から液体を調製すること、粘性液体を希釈すること、液体をろ過すること、液体を蒸留すること、液体を濃縮すること、上皮細胞のような干渉する成分を不活性化すること、核酸を精製する試薬を添加すること等によって、使用前に前処理することができる。前処理の好ましい態様は、遠心分離である。

10

【0029】

「生体液」は、液体形態を有する（又は有するようにした）生体サンプルである。例えば、末梢血、血漿、又は細胞若しくは組織からの抽出物を含む。

【0030】

標的配列（すなわち、標的配列の種類がRNAである場合）を増幅するために必要ならば、本発明の方法には、逆転写工程が含まれていてもよい。逆転写を意味するこの工程は、逆転写酵素と呼ばれるRNA依存性のDNAポリメラーゼ酵素の影響下で起こる。この工程は更に、逆転写のために緩衝液及びdNTPsのような試薬を必要とする。逆転写キットは、市販されており、そしてこの工程を実施することは、通常の技術範囲内である。

20

【0031】

本発明で使用される核酸増幅試薬は、公知の試薬、これらに限定されないが、ポリメラーゼ活性を有する酵素、例えばTaq-ポリメラーゼ（及び必要により、例えばmRNAを観察する場合に、逆転写活性を有するもの）のような熱に安定なポリメラーゼ、マグネシウム又はマンガンの塩のような酵素補助因子、及びデオキシヌクレオチドトリホスフェート（dNTPs）を含む。

30

【0032】

「増幅条件」という用語は一般に、プライマー配列を標的配列とのハイブリッド形成又はアニーリング、そして引き続くプライマー配列の伸長を促進する条件として定義されている。このようなアニーリングは、温度、イオン強度、配列の長さ、相補性及び配列のG:C含有量を含む、幾つかのパラメーターに依存していることは、当該技術分野では公知である。

【0033】

例えば、相補的な核酸配列は、環境における温度低下でアニーリングが促進される。所定の一連の配列の溶融温度、又はT_mは、幾つかの公知の方法によって測定することができる。通常、診断的適用では、溶融温度に近い（すなわち、10以内の）ハイブリッド形成温度が用いられる。

40

【0034】

イオン強度又は「塩」濃度も、小さいカチオンがホスホジエステル骨格上の負電荷を打ち消すことによって二本鎖の形成を安定化する傾向にあるので、溶融温度に影響を及ぼす。一般の塩濃度は、カチオンの性質及び価数によって決まるが、これは当業者に容易に理解されるであろう。

【0035】

同様に、高いG:C含有量及び増大した配列長も、A:T対が2つの水素結合であるのに対してG:C対が3つの水素結合を含み、そして長い配列が、配列と共により多くの水

50

素結合を有しているため、二本鎖の形成を安定化することが知られている。従って、高い G : C 含有量及び増大した配列長は、溶融温度を上昇させることによってハイブリッド形成条件に影響を及ぼす。特定の診断への適用に対して配列が選ばれると、G : C 含有量及び配列長が分かり、そしてハイブリッド形成の条件に何が含まれるかを正確に決定し説明することができる。

【0036】

イオン強度は一般に、酵素活性に対して最適化されるので、変更できるパラメーターは温度だけである。通常、ハイブリッド形成温度は、プライマー又はプローブの溶融温度 (T_m) 又はその付近で選ばれる。従って、特定のプライマー、プローブ、又はプライマーとプローブのセットについての適切なハイブリッド形成の条件を得ることは、当業者の通常 10の技術の範囲内である。上記の様にして産生された増幅産物は、以下に詳細に開示されている適切な方法及びプローブの何れかを用いて、標的配列の増幅時又はその後を検出することができる。

【0037】

本発明は更に、増幅産物を検出/定量するための、ハイブリダイゼーションプローブ、Taqman プローブ又は分子ビーコンタイププローブ (molecular Beacon type probe) のような、配列特異的プローブを開示する。更に、このプローブは、特異性を保証するために使用することができる。当該プローブは、CK19 遺伝子の増幅を検出するための SEQ ID NO : 3 及び 4 による配列を有していてもよい。標的配列の増幅を検出するためのプローブの構築は、当業者の技術範囲内である。 20

【0038】

プローブを標識化することが、好ましい。標識は、例えばフルオロフォア、化学発光団、蛍光粒子等のような直接検出できるものか、又は特異結合性パートナー及び核酸のような間接的に検出できるものの何れであってもよい。好ましい標識は、直接検出できるもので、そして特に好ましい標識は、サイバークリーン I (Sybr Green I)、FAM、HEX、VIC、フルオレセイン LC Red 610、LC Red 640、LC Red 670、LC Red 705 及び当該技術分野で公知のその他の蛍光染料のような、蛍光染料である。

【0039】

一態様では、プローブは、最初に増幅反応混合物の一部であってもよく、この場合、プローブ配列がプライマー配列より低い溶融点を有するような条件を選ぶことが好ましい。この方法では、プローブが標的配列とハイブリッド形成しないような、すなわちプローブの T_m を越えないように、温度を最初に選ぶことができる。この標的配列が、テストサンプル中にもともと存在していて、引き続いてこの標的配列が存在する可能性を検出できるならば、標的配列のコピーが合成された後に、プローブを新しく合成された標的配列とハイブリッド形成させるために温度を下げるることができる。あるいはプローブを別々に加える。プローブが、プライマー配列に対応する配列とハイブリッド形成しないことが好ましい。 30

【0040】

本発明のこの第二の態様の別の変形では、工程 (i) の方法が、テストサンプル中に増幅可能な物質が存在することを保証するため、そして偽陰性の結果を避けるために、ハウスキーピング遺伝子とハイブリッド形成するハウスキーピングプライマー対を更に包含することができる。当該ハウスキーピングプライマー対は、ヒポキサンチン - グアニン - ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPR T) 用の市販ハウスキーピングプライマー対 (Roche applied Science より購入) であってよい。 40

【0041】

あるいは、本発明者らによって同定されたハウスキーピングプライマー対を、本発明の方法で用いることができる。

【0042】

従って、本発明の第三の態様では、順方向及び逆方向のプライマーに対して、SEQ 50

ＩＤ ＮＯ：５及び６による配列をそれぞれ有しているハウスキーピングプライマー対が提供される。

【 0 0 4 3 】

本発明との関連において、「ハウスキーピングプライマー対」及び「プライマー対」は、同一ではない。本発明との関連において、「ハウスキーピングプライマー対」という用語は、特定の細胞に偏在している遺伝子の標的配列とハイブリッド形成可能なプライマー対を意味するように意図されている。すなわち、「ハウスキーピングプライマー対」は、本発明の方法又はキットの内部標準、すなわち陰性対照として使用することができる。

【 0 0 4 4 】

本発明の当該ハウスキーピングプライマー対は、ハウスキーピング遺伝子 P B G D : ヒト非赤血球形成性ポルホビリノーゲンデアミナーゼ (P B G D ; ヒドロキシメチルピランシターゼ ; 受入番号 ; X 0 4 8 0 8) であるヘム生合成経路の第 3 酵素とハイブリッド形成する。この酵素は、4つのポルホビリノーゲンユニットの段階的な縮合を触媒的に進めてヒドロキシメチルピラン (これは、次いでコシテターゼによってウロポルホビリノーゲン I I I に変換される) を生成する。ハウスキーピング遺伝子は、細胞にとって必須な遺伝子であるので、どんな条件下でも存在している。P B G D m R N A を増幅するために本発明者が設計したハウスキーピングプライマー対は、順方向 (H G F 1) が 5 ' - G G T G G G T G T G C T G C A C G A T - 3 ' (S E Q I D N O : 5) で、逆方向 (H G R) が 5 ' - A T C T T C A T G C T G G G C A G G G A - 3 ' (S E Q I D N O : 6) である。

10

20

【 0 0 4 5 】

当該ハウスキーピングプライマー対は、本発明の方法及びキットに適切である。しかしながら、本発明の第三の態様によるハウスキーピングプライマー対の使用は、当該方法及びキットに限定されるものではなく、テストするサンプル (細胞) が、ヒト非赤血球形成性ポルホビリノーゲンデアミナーゼをコードする遺伝子を偏在的に包含する場合はいつでも使用することができる。

【 0 0 4 6 】

リアルタイム P C R ハイブリダイゼーションプローブにおいて、T a q m a n プローブ又は分子ビーコンタイププローブを、P C R 産物の可視化のために請求項 1 のプライマー対に関連して先に記載したようにして使用することができる。1つの好ましい T a q m a n プローブは、6 F A M - A T G A A G G A T G G G C A A C T G T A C C T G A C T G G - T M R である。

30

【 0 0 4 7 】

生体サンプル中で、増幅された P B G D の標的配列又はその他の適切なハウスキーピング遺伝子を検出するために、上記の T a q m a n プローブの代わりに一連のハイブリダイゼーションプローブの何れかを使用できることは、当業者には理解されるであろう。更に、当該技術分野で公知の P C R 機器 (3 ~ 6 個の蛍光チャンネルを有する機器が市販されている) で利用可能な異なった蛍光チャンネルの存在を利用することにより、ハウスキーピングプライマー対は多くの異なった場合において内部標準として使用できるので、ハウスキーピング遺伝子の増幅を、C K - 1 9 遺伝子又はその他の適当な標的遺伝子の何れかの増幅と同時に処理することができる。

40

【 0 0 4 8 】

ハウスキーピングプライマーは、サンプル中の夾雑しているゲノム D N A の非特異的な増幅を避けるために、ゲノム D N A 又は c D N A の増幅を避けるような方法で設計することが好ましい。これは、本発明による C K - 1 9 プライマーを設計するために用いるのと原則的に同じ基準を用いて、ハウスホールドプライマーを設計して達成することができる。

【 0 0 4 9 】

本発明の第四の態様では、癌を患っている患者におけるアジュバント治療の見通しを判断する診断方法が開示される。この方法は、(i) 患者から生体サンプルを提供すること

50

、(i i) 生体サンプルから核酸を単離すること、(i i i) 核酸増幅試薬、請求項 1 のプライマー対、工程 (i i) で単離した核酸のアリコートを含む、反応混合物を形成すること、(i v) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも 1 つのコピーを生成すること、(v) リアルタイム PCR 観察を用いて、サンプル中の CK - 19 mRNA 陽性細胞を定量すること、及び (v i) サンプル中の CK - 19 mRNA 陽性細胞の量に基づいて、アジュバント治療の見通しを判断すること、の工程を含む。この態様の好ましい態様では、プライマー対が、SEQ ID NO : 1 及び 2 による配列を有している。

【 0 0 5 0 】

別の好ましい態様では、生体サンプルが、血液、骨髄又はリンパ節由来であり、特に好ましい態様では、このサンプルが、血液、例えば末梢血サンプルである。

10

【 0 0 5 1 】

更に別の好ましい態様では、癌が乳癌で、好ましくは手術可能な乳癌である。

【 0 0 5 2 】

一般に、本発明の診断方法は、上皮性起源の癌種における CK - 19 マーカーに基づく循環腫瘍細胞 (CTC s) の検出 / 定量にも使用することができる。上皮性起源は、これらに限定されないが、(扁平上皮乳頭種及び扁平上皮癌のような) 扁平上皮、(移行上皮乳頭種及び移行上皮癌のような) 移行上皮、(基底細胞癌のような) 基底細胞、(腺腫、嚢胞腺腫及び腺癌のような) 腺上皮、(腎尿細管腺腫、腎細胞癌及びグラウィッツ腫瘍 (Grawitz tumor) のような) 腎尿細管上皮、(肝細胞腺腫及び肝細胞癌のような) 肝細胞、(胆管細胞腺腫及び胆管細胞癌のような) 胆管上皮、及び (色素性母斑及び悪性黒色腫のような) メラニン細胞を含む。

20

【 0 0 5 3 】

この本発明の第四の態様では、サンプルを、先に述べた「テストサンプル」と同様に前処理することができる。従って、好ましい態様では、典型的な血液サンプルを、末梢血単核球 (P B M C s) を単離するために核酸を単離する前に遠心分離する。これは F i c o l l 濃縮法、PAX 遺伝子採血システム、免疫磁性分離及び濃縮法のような当該技術分野で公知の遠心分離技術の何れかを用いて行うことができ、好ましい遠心分離技術は、段階遠心分離である。本発明のこの態様に関わる「核酸増幅試薬」及び「増幅条件」は、上記と同様である。

30

【 0 0 5 4 】

本発明の第五の態様では、本発明の第四の態様の診断方法で用いるためのキットが提供される。当該キットは、本発明のプライマー対、癌細胞上のその他のマーカーとハイブリッド形成する任意の追加プライマー、及び増幅試薬を含む。

【 0 0 5 5 】

当該増幅試薬及びプライマー対は、別々に、又は必要に応じて混合するかのどちらかで提供される。

【 0 0 5 6 】

上記の好ましい態様では、追加プライマーの配列は、CK 19 とハイブリッド形成する。別の好ましい態様では、追加プライマーは、HER 2 / neu、及び (CK 20、CK 8 等の) サイトケラチン、マスピン (maspin)、G A B A A n、B 3 0 5 D - C、P I P、S 1 0 0 A 9、S 1 0 0 A 1 4、P S A、ムチン、癌胎児性抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピンの - サブユニット、マンマグロビン、上皮増殖因子、Ep - C A M 及び当該技術分野で公知の幾つかのその他の mRNA マーカー、とハイブリッド形成する。追加のマーカーの選択及び組み合わせは、当業者の技術範囲内である。プライマーの組み合わせは、癌の徴候のタイプによって自由に選択できる。特に好ましい態様では、プライマー対は、SEQ ID NO : 1 及び 2 による配列を有している。

40

【 0 0 5 7 】

2 つ又はそれ以上のプライマーの組み合わせは、癌細胞で 1 つ以上のマーカーが検出されることを考えると、偽陰性の出現率が減少することを保証できる。

50

【0058】

本発明の別の好ましい態様では、キットが、偽陰性を避けるために内部標準を包含しており、この内部標準としてハウスキーピングプライマー対が好ましい。このハウスキーピングプライマー対は、SEQ ID NO: 5及び6による配列を有していることが好ましい。

【0059】

本発明によるキットの更なる別の好ましい態様では、全ての成分が凍結乾燥されている。更なる別の態様では、2つ又はそれ以上の、例えば全ての凍結乾燥された試薬が、混合されている。この場合、使用者、例えば臨床医は、増幅前に、単に混合物を適当な緩衝液に溶解して、テストするサンプルに加えるだけでよい。取り扱い方法の簡素化に加えて、凍結乾燥は、試薬をより安定に貯蔵できる。

10

【0060】

本発明の追加のCK-19プライマー

上記から明らかなように、本発明は、ヒトCK-19遺伝子(そのPCR増幅断片を含む)を検出できる、広範囲の適切な「修飾された」プライマー(又は修飾されたプライマーの対)を包含する。好ましくは、このような修飾されたプライマー又はその対は、本明細書に開示されている特異的なプライマーのハイブリッド形成条件の1つ又は組み合わせの下で、CK-19標的(例えば、図1に示されている配列)に特異的に結合する能力がある。

【0061】

「特異的なハイブリッド形成」とは、特定のハイブリッド形成条件下で、対象のプライマー又はプライマー対が、CK-19標的と結合複合体(この複合体は、PCR増幅されて、増幅産物を産生できる)を形成できることを意味する。この増幅産物は、定量的アガロースゲル電気泳動のような標準的な方法で測定する場合、その他の増幅産物に比べて、約90%の存在量、好ましくは95%又はそれ以上の存在量であることが好ましい。使用して本発明の1つ又はそれ以上の目的を達成できるならば、このプライマー又はプライマー対は「適切」である。

20

【0062】

具体的なプライマー修飾についての更なる考察に入る前に、本発明の目的は、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2で示される配列の少なくとも約8個の核酸塩基(すなわち、連鎖したヌクレオシド)を有しているプライマー(複数を含む)を提供することである。プライマーの一方又は両方が、好ましくはそのような核酸塩基の少なくとも約10個又は約12個、より好ましくはそのような核酸塩基の少なくとも約15個~18個を含有している。SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2の何れかの全配列を有しているプライマーが、本発明の多くの適用に対して好ましいであろう。

30

【0063】

その他の適切なプライマーは、追加配列の約20個~約30個の核酸塩基(好ましくは、配列の5'末端に配列されている)を有しているものを含む。更なるその他の本発明による適切なプライマーは、SEQ ID NO: 1又はSEQ ID NO: 2で示される配列から選ばれる、少なくとも8個の連続した核酸塩基、好ましくは少なくとも約10個~約15個の核酸塩基、より好ましくは約16個又は17個の核酸塩基の伸展を含有する、長さが約8個~約18個の範囲のオリゴヌクレオチド配列のものを含む。

40

【0064】

本発明による更なる具体的なプライマー対は、1つ又はそれ以上の適切なプライマーを含むが、このプライマーでは、DNA配列(又は時にはRNA配列)が、図1(CK-19 cDNAの約449~455番目のヌクレオチド)に示されるようなエクソン1/2接合部のどちらかの側に、少なくとも4個の連続した核酸塩基、好ましくは5個、6個、7個、8個又は9個の連続した核酸塩基を有している。

【0065】

更に適切なプライマーは、そのそれぞれの3'末端に、図1に示すような対応のCK-

50

19 偽遺伝子のアルファ配列とハイブリッド形成しない(すなわち、これと水素結合を形成することができない)少なくとも約1、2、3又は4個のヌクレオチドを含む。

【0066】

好ましくは、このようなハイブリッド形成しないヌクレオチドは、CK-19cDNAの約568~571番目のヌクレオチドにまたがっている。すなわち、ヌクレオチドの置換、又はある場合は削除により、プライマー対の1つ又は両方のプライマーの3'末端は、選ばれた1つ又は組み合わせたハイブリッド形成条件下で、CK-19偽遺伝子と十分にはハイブリッド形成しないようになる。

【0067】

本発明の範囲内の更なる適切なプライマーは、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2で示される配列の1つの5'末端部分からの少なくとも約10個の追加のヌクレオチド(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9個のヌクレオチド)を有しているものを含む。多くの使用に対してあまり好ましくないが、本発明は、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2で示される配列の1つの3'末端部分からの少なくとも約5個の追加のヌクレオチド(例えば、1、2、3、4又は5個のヌクレオチド)を有している適切なプライマーも包含する。

10

【0068】

当業者は、本願明細書をみて、広範囲の他のプライマー及びプライマー対が本発明の範囲内であることを認識するであろう。このような態様は、これらに限定されないが、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2で示されるヌクレオチドの1個、2個又は3個が、A、G、C、T又はUで置換されている適切なプライマーを含む。また、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2で示される配列中の1個、2個又は3個の配列(連続した又は連続していない)の適切な削除も考慮されている。

20

【0069】

当然のことながら、ヌクレオシドは、塩基-糖の組み合わせである。ヌクレオシドの塩基部分は通常、複素環塩基である。このような複素環塩基の2つの最も一般的な種類は、プリン及びピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖の部分に共有結合するリン酸基を更に含むヌクレオシドである。ペントフラノシル糖を含有するヌクレオシドでは、リン酸基は、糖の2'、3'又は5'のヒドロキシ部分に結合することができる。オリゴヌクレオチドの形成において、リン酸基は、隣接するヌクレオシドに互いに結合して、線状の重合化合物を形成する。

30

【0070】

同様に、この線状重合構造の各々の末端は、更に結合して環状構造を形成することができるが、開環した線状構造が一般に好ましい。更に、線状構造は、内部核酸塩基の相補性も有することができる、それにより二本鎖構造を形成するような方法で折り畳むことができる。オリゴヌクレオチド構造において、リン酸基は、オリゴヌクレオチドの内部ヌクレオシド骨格を形成するものと通常は見なされている。RNA及びDNAの通常の結合又は*骨格は、3'から5'へのリン酸ジエステル結合である。

【0071】

修飾されたCK-19プライマー:骨格

本発明の範囲内にあるプライマー及びプライマー対の更なる例は、修飾された骨格又は非天然型のヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドを含む。本明細書で定義されているように、修飾された骨格を有しているオリゴヌクレオチドは、リン原子を骨格中に保持しているもの及び骨格中にリン原子を有していないものを包含する。この明細書の目的のために、そして時には技術分野内で参照されるように、そのヌクレオシド間骨格にリン原子を有していない修飾されたオリゴヌクレオチドも、オリゴヌクレオチドであると見なすことができる。

40

【0072】

従って本発明は、プライマーの一方又は両方が修飾されたオリゴヌクレオチド骨格を含むプライマー及びプライマー対を包含する。このような骨格には、ホスホロチオエート、

50

キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、(3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート及びキラルホスホネートを含む)メチル及びその他のアルキルホスホネート、ホスフイネート、(3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含む)ホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、(通常の3'-5'結合を有する)セレノホスフェート及びボラノ-ホスフェート、これらの2'-5'結合類縁体、及び逆方向極性を有して、1つ又はそれ以上のヌクレオチド間結合が3'-3'、5'-5'又は2'-2'結合であるものが含まれる。

【0073】

逆方向極性を有する追加のオリゴヌクレオチドは、3'-mostヌクレオチド間結合、すなわち脱塩基してもよい単一逆方向ヌクレオチド残基(核酸塩基は、欠失しているか又はその代わりに水酸基を有している)に結合する3'-3'単一結合を包含する。多種の塩、混合塩及び遊離酸形態も含まれる。

【0074】

例えば以下の特許、第3,687,808号;第4,469,863号;第4,476,301号;第5,023,243号;第5,177,196号;第5,188,897号;第5,264,423号;第5,276,019号;第5,278,302号;第5,286,717号;第5,321,131号;第5,399,676号;第5,405,939号;第5,453,496号;第5,455,233号;第5,466,677号;第5,476,925号;第5,519,126号;第5,536,821号;第5,541,306号;第5,550,111号;第5,563,253号;第5,571,799号;第5,587,361号;第5,194,599号;第5,565,555号;第5,527,899号;第5,721,218号;第5,672,697号及び第5,625,050号、更に本明細書に開示されている引例も参照されたい。

【0075】

本発明の更なる目的は、一方又は両方のプライマーがリン原子を含んでいない、適切なプライマー及びプライマー対を提供することである。このような態様では、骨格は、短鎖アルキル又はシクロアルキルのヌクレオチド間結合、混合のヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルのヌクレオチド間結合、又は1つ又はそれ以上の短鎖複素原子若しくは複素環のヌクレオチド間結合によって形成される。これらは、モルホリノ結合(上記で検討のヌクレオチドの糖部分から一部が形成される)を有するもの;シロキサ骨格;スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格;ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格;メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格;リボアセチル骨格;アルケン含有骨格;スルファメート骨格;メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格;スルホネート及びスルホンアミド骨格;アミド骨格;及び混合のN、O、S及びCH₂の構成部を有するその他のものを含む。

【0076】

例えば以下の特許、第5,034,506号;第5,166,315号;第5,185,444号;第5,214,134号;第5,216,141号;第5,235,033号;第5,264,562号;第5,264,564号;第5,405,938号;第5,434,257号;第5,466,677号;第5,470,967号;第5,489,677号;第5,541,307号;第5,561,225号;第5,596,086号;第5,602,240号;第5,610,289号;第5,602,240号;第5,608,046号;第5,610,289号;第5,618,704号;第5,623,070号;第5,663,312号;第5,633,560号;第5,677,437号;第5,792,608号;第5,646,269号;第5,677,439号;及び本明細書に開示されている引例を参照されたい。

【0077】

幾つかの本発明の態様では、新規な基を有する、すなわち、天然のヌクレオチドと関連

10

20

30

40

50

していない1つ又は両方のプライマーを有していることが有用であろう。優れたハイブリッド形成特性を示しているオリゴヌクレオチド模倣体である、このようなオリゴマー化合物のあるものは、ペプチド核酸(PNA; 上記を参照されたい)と呼ばれている。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格が、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格に置き換わっている。核酸塩基は保持されて、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合している。

【0078】

PNA化合物の製造及び使用についての更なる情報については、例えば以下の特許、第5,539,082号;第5,714,331号;及び第5,719,262号を参照されたい。

【0079】

本発明による更なる適切なプライマー及びプライマー対は、ホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチド、及び複素原子骨格、特に $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ (メチレン(メチレンイミノ)又はMMI骨格として知られている)、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 及び $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ 、及び $-O-P-O-CH_2-$ を有するオリゴヌクレオチドを含む。モルホリノ骨格構造を有しているオリゴヌクレオチドも好ましい。上記の検討及び米国特許第5,034,506号を参照されたい。米国特許第5,489,677及び5,602,240号も参照されたい。

【0080】

修飾されたCK-19プライマー:糖基

幾つかの本発明の態様では、オリゴヌクレオチドが1つ又はそれ以上の置換された糖残基を有するように修飾されているプライマー及びプライマー対を有することが有用である。このように修飾された好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に、以下のもの:OH;F;O-、S-又はN-アルキル;O-、S-又はN-アルケニル;O-、S-又はN-アルキニル;又はO-アルキル-O-アルキルのうちの1つを含み、ここにおけるアルキル、アルケニル及びアルキニルは、置換又は非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルである。

【0081】

更なる修飾体は、 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 、及び $O(CH_2)_nN[(CH_2)_nCH_3]_2$ を含有しており、ここにおいて、n及びmは、1~約10である。その他の典型的なオリゴヌクレオチドは、2'位に、以下のもの: $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカール(alkaryl)、アラール、O-アルカール又はO-アラール、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換シリル、RNA開裂基、レポーター基、又は核酸挿入剤:のうちの1つを含有する。

【0082】

更なる修飾体は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2'-メトキシエチル)又は2'-MOEとしても知られている)(Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504)すなわち、アルコキシアルコキシ基を含有する。

【0083】

更なる修飾体の実例は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ(すなわち、 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 基で、以下の実施例に記載されているように、2'-DMAOEとしても知られている)、及び2'-ジメチルアミノ-エトキシエトキシ(2'-O-ジメチル-アミノ-エトキシ-エチル又は2'-DMAEOEとしても知られている)、すなわち、 $2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_3)_2$)を含有することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0084】

その他の適切なプライマー及びプライマー対は、本発明の範囲内である。これらは、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-アリル(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-アリル(2'-O-CH₂-CH=CH₂)及び2'-フルオロ(2'-F)を含む修飾を有しているプライマーを含有する。2'-修飾は、アラビノ位(上向き)又はリボ位(下向き)にあつてよい。

【0085】

2'-アラビノ修飾の例は、2'-Fである。同様な修飾を、オリゴヌクレオチドのその他の位置、特に3'末端ヌクレオチド又は2'-5'結合オリゴヌクレオチド上の糖の3'位、及び5'末端ヌクレオチドの5'位、で行うことができる。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりに、シクロブチル部分のような糖模倣体を有していてもよい。

10

【0086】

例えば、以下の特許、第4,981,957号;第5,118,800号;第5,319,080号;第5,359,044号;第5,393,878号;第5,446,137号;第5,466,786号;第5,514,785号;第5,519,134号;第5,567,811号;第5,576,427号;第5,591,722号;第5,597,909号;第5,610,300号;第5,627,053号;第5,639,873号;第5,646,265号;第5,658,873号;第5,670,633号;第5,792,747号及び第5,700,920号を参照されたい。

20

【0087】

本発明による更なるプライマー対は、固定された核酸(Locked Nucleic Acid; LNA)を有する1つ又はそれ以上のプライマーを含む。好ましいLNAは、糖の環の3'又は4'炭素原子に結合している2'-ヒドロキシ基を特徴として、これにより2環性の糖部分を形成する。結合は、2'酸素原子及び4'炭素原子を繋げるメチレン(-CH₂-)_n基が好ましく、ここにおいて、nは1又は2である。

【0088】

LNA_s及びその製造法は、国際特許出願公開第WO98/39352号及び第WO99/14226号に、更に以下の米国特許及び米国特許公開第6,794,499号;第6,670,461号;第2003/0082807(Xylo-LNA);第20030087230号(L-ribo-LNA);及び第2003/0224377号にも記載されている。

30

【0089】

修飾されたCK-19プライマー:核酸塩基

明らかなように、オリゴヌクレオチドは、核酸塩基(当該技術分野では、単に「塩基」と呼ぶことが多い)の修飾及び置換も含んでいる。本明細書で用いられる「修飾されていない」又は「天然の」核酸塩基は、プリン塩基のアデニン(A)及びグアニン(G)、及びピリミジン塩基のチミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を含む。

【0090】

修飾された核酸塩基は、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及びその他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及びその他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル(-C≡C-CH₃)ウラシル及びシトシン、ピリミジン塩基のその他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル(偽性ウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-ヒドロキシル及びその他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル及びその他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-ア

40

50

ザグアニン及び 8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン及び 7 - デアザアデニン、並びに 3 - デアザグアニン及び 3 - デアザアデニンのような、その他の合成及び天然の核酸塩基を含む。

【0091】

更なる修飾された核酸塩基は、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、置換フェノキサジンシチジンのような G-クランプ(例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4]、スピロロ(Spyrrolo)[2,3-d]ピリミジン-2-オン)のような 3 環性のピリミジンを含む。

10

【0092】

修飾された核酸塩基は、プリン又はピリミジン塩基がその他の複素環、例えば 7 - デアザ - アデニン、7 - デアザグアノシン、2 - アミノピリジン及び 2 - ピリドンで置換されているものも含む。

【0093】

更なる核酸塩基は、米国特許第 3,687,808 号に開示されているもの、「Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering, Pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990」に開示されているもの、「Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613」によって開示されたもの、及び「Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Reserach and Applications, pages 289-302, Crooke S. T. and Lebleu, B. ed., CRC press, 1993」によって開示されたものを含む。

20

【0094】

更なる修飾は、2 - アミノプロピルアデニン、3 - プロピニルウラシル及び 5 - プロピニルシトシンを含有する、5 - 置換ピリミジン、6 - アザピリミジン並びに N - 2、N - 6 及び O - 6 置換プリンを含む。5 - メチルシトシン置換は、核酸の二本鎖の安定性を 0.6 ~ 1.2 で向上させることが示され(Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B. eds., Antisense Reserach and Applications, CRC press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、塩基置換の典型例であり、より具体的には、2' - O - メトキシエチル糖修飾と組み合わせる場合がある。

30

【0095】

例えば、米国特許第 3,687,808 号を、更に米国特許第 4,845,205 号; 第 5,130,302 号; 第 5,134,066 号; 第 5,175,273 号; 第 5,367,066 号; 第 5,432,272 号; 第 5,457,187 号; 第 5,459,255 号; 第 5,484,908 号; 第 5,502,177 号; 第 5,525,711 号; 第 5,552,540 号; 第 5,587,469 号; 第 5,594,121 号; 第 5,596,091 号; 第 5,614,617 号; 第 5,645,985 号; 第 5,830,653 号; 第 5,763,588 号; 第 6,005,096 号; 及び第 5,681,941 号、第 5,750,692 号も参照されたい。

40

【0096】

本発明によるプライマー又はプライマー対は、前記オリゴヌクレオチド修飾の少なくとも 1 つを含むならば、「修飾されて」いる。容易に理解できるように、修飾されたプライマー及びプライマー対の幾つかは、リアルタイム PCR の実施のような本発明の幾つかの態様に対しては最適ではない。しかしながら、修飾されたプライマーは、例えば電気泳動のマーカーとして、及び / 又は「アンチセンス」組成物として有用であり得る。

【0097】

標的親和性及び特異性の増大が有用である、又はロバスト性の増強が役立つような PCR 適用に対しては、SEQ ID NO: 1 又は SEQ ID NO: 2 で示される 1 つ又は

50

両方の配列を、少なくとも1つのLNA、例えば、このようなLNAの1つ、2つ、3つ、4つ又は5つを含むように修飾することができる。LNAオリゴヌクレオチドの製造及び使用に関する更なる開示については、例えば、「Vester, B and J. Wengel (2004) Biochemistry 43: 13233」及びそこに引用されている参考文献を参照されたい。

【0098】

上記で検討したように、本発明は、生体液中のCK-19 mRNAの存在を測定する方法も提供する。

一態様では、この方法は、次の工程(a)~(g)を含む。

【0099】

a) 生体液から単核細胞の何れかを分離すること。

分離工程は、ろ過及び/又は遠心分離のような生体液から細胞を分離できる殆ど全ての方法を用いて実施することができる。遠心分離を選択した態様では、Ficoll又はその他の適切な細胞分離勾配を用いることが多くの場合好ましい。Ficoll Histopaque-1077システム(Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA))の使用が、生体液が末梢血であるような多くの適用に対して好ましい。

10

【0100】

b) 分離した単核細胞に、上皮単核細胞によって発現される抗原に特異的に結合するポリクローナル又はモノクローナル抗体(又はFab、F(ab')₂、一本鎖抗体などのような、それらの抗原結合断片)を接触させること。

一態様では、抗原は、細胞により、例えば細胞の表面又は細胞質で発現する糖タンパク質である。抗体の実例としては、抗原CDC326、例えば、ber-EP4、B302(323/A3)、B29.1(VU-ID9)、VU-ID9、HEA125に特異的に結合するものである。これら及び他の適切な抗体は、「Abcam plc (Cambridge, UK)»; 「Dako UK LTD. (Cambridgeshire, UK)」及び「Santa Cruz Biotechnology INC (Santa Cruz, CA (USA))」のような市販の供給源から得ることができる。抗体(又は、その抗原の結合断片)は、適当な固体担体の何れか、例えばグラスファイバー濾紙、ニトロセルロース、焼結ガラス、プラスチック、合成ポリマー、酢酸セルロース、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、又はポリビニリデンフルオライドに、事前に結合させることができる。一態様では、この固体担体は、好ましくは磁性又は常磁性物質を含む、ビーズ形態である。好ましいビーズは、Dyna1で製造されているものである。好ましくは、この方法の接触工程は、細胞、抗体及び固体担体の間の結合複合体を形成するのに十分なものである。

20

30

【0101】

c) 結合していない物質の何れかから、結合複合体を、例えば、ろ過及び/又は遠心分離によって分離すること。

【0102】

d) 複合体に結合している内皮単核細胞から核酸(例えば、mRNAのようなRNA)を単離すること。

通常は、そして上記のように、cDNAは、細胞から単離されたRNAから作成される。

40

【0103】

e) 核酸増幅試薬、本明細書で開示されるようなプライマー対、例えばSEQ ID NO: 1及び2で示される配列を有しているプライマー、及び単核細胞から単離された核酸を包含する反応混合物を形成すること。

【0104】

f) この混合物を増幅条件において、CK-19標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること。

【0105】

g) PCR、好ましくはRT-PCRを用いて、生体サンプル中のCK-19 mRNAを検出すること。必要により、生体液中のCK-19 mRNAの量が測定できる。

50

【0106】

「特異的に結合する」という用語又は同様の用語は、本明細書で開示されている分子が他の分子と結合し、それにより特定の結合対を形成することを意味する。しかしながら、この分子は、例えば、ウェスタンブロッティング E L I S A、R I A、移動度シフトアッセイ、酵素免疫測定法、競合アッセイ、飽和アッセイ (saturation assay) 又は当該技術分野で公知のその他のタンパク質結合試験によって測定されるような、その他の分子を認識しない又は結合しない。分子間の特異的結合を検出する方法の例については、一般に、「Harlow and Lane in, Antibodies; A Laboratory Manual (1988)」及びそこで引用されている参考文献を参照されたい。

【0107】

固体担体が磁性ビーズである前記方法の態様では、方法は更に、結合複合体に磁場を掛けて、結合していない物質の全てから、この複合体を分離する工程を含む。分離されたビーズ複合体を、次に標準的な方法で細胞を単離する (そして、そこから核酸を調製する) ように操作することができる。例えば、D y n a l (Epithelial Enriched Dynabeads) の情報を参照されたい。

【0108】

方法は、本明細書に開示されているプライマー対の1つ又は組み合わせの使用に対して柔軟性及び互換性がある。特定のプライマー対の使用は、使用目的に依存する。しかしながら、多くの態様では、S E Q I D N O : 1 及び S E Q I D N O : 2 で示されるプライマーで十分である。好ましい生体液は、抹消血である。

【0109】

必要に応じて、この方法は、実施例に記載のような1つ又はそれ以上の適切な対照のアッセイの使用を含むことにも容易に適合する。例えば、ユーザーが、特定の生体サンプル中にある単核細胞の検出のみならず定量も望む場合の態様において、C K - 1 9 発現細胞の標準曲線を作成することがしばしば有用である。以下の実施例は、M C F - 7 細胞を混合した抹消血の具体的な標準曲線の作成方法を示す。当然のことながら、標準曲線を作成するためにその他の細胞も使用できる。一度標準曲線を作成すると、その方法を実施する毎に作成を繰り返す必要がないことも当然であろう。例えば、本発明を臨床に用いる態様では、標準曲線は一度作成すればよく (又は、殆どの場合は数回)、ここでは患者から得た末梢血のような、生体サンプルの1つ又は少数のタイプがアッセイされる。

【0110】

必要に応じて、前記の方法を、本明細書に記載の1つ又はそれ以上のハウスキーピング遺伝子の使用を含むことに適合させることもできる。増幅された C K - 1 9 標的配列を、本明細書に開示されているプローブを用いて検出及び任意に定量することができる。

【0111】

上記より明らかのように、本発明は、柔軟性があり、正常及び異常の (例えば、癌性の) 組織を含む各種の生体サンプル中で発現するような C K - 1 9 を検出又は任意に定量するために使用することができる。

【0112】

正常の組織に関しては、以下の例がある ; 毛包、汗腺の分泌細胞、メルケル細胞 (Merkel cells)、乳管の管腔上皮細胞、子宮内膜及び子宮頸部の表面粘膜及び腺、子宮頸外部 (exocervix)、卵巣表面中皮、ファロピウス管上皮、細胞栄養層細胞及び合胞体栄養細胞、羊膜、臍帯表面上皮、前立腺の管腔及び基底細胞、精巣網上皮、精巣輸出管、精巣上体細管、ボーマン嚢、腎臓の近位 -、遠位 - 及び集合尿管、尿路上皮、胆管 - 及び胆嚢上皮、舌の扁平上皮 -、味蕾 -、分泌腺細胞及び分泌腺管、食道の扁平上皮 - 及び小唾液腺、胃の表面粘膜 - 及び腺、小腸及び大腸の表面粘膜及び腺窩、膵臓管、唾液腺の分泌性 - 及び管細胞、甲状腺上皮、気管の表面粘膜 - 及び腺、気管支粘膜 - 及び腺、肺泡、胸膜中皮、ハッサル小体及び胸腺上皮細胞。

【0113】

異常な組織に関しては、以下のリストが例示される : ヒトの乳腺腫瘍、線維腺腫、線

10

20

30

40

50

維嚢胞性疾患、葉状嚢肉腫、浸潤性導管癌、浸潤性小葉腺癌、髄様癌及び転移、湿潤癌、管内乳頭腫、純上皮内癌 (pure in situ carcinomas)、ページェット病を有する組織、甲状腺腫、結腸 -、胃 - 及び肺腺腫、卵巣 - 及び膀胱癌、奇形腫、胎児性癌、睾丸癌、表皮性癌、扁平上皮 - 及び基底細胞癌、及び角化棘細胞腫。

【0114】

先の発明のある態様は、2005年8月17日出願のギリシャ国特許出願GR20050100430号；及び2006年4月4日出願の米国仮出願第60/795,149号に開示されている。これらは、それぞれ本明細書に参照として組み入れられている。

【0115】

本明細書で引用されている全ての引例は、参照として組み入れられている。本発明はこれらの好ましい態様を、参照として詳細に記載されている。しかしながら、当然のことながら、当業者は、本開示を熟考すれば、本発明の精神及び範囲内で修飾及び改良を実施することができるであろう。

10

【実施例】

【0116】

原料及び方法

A. 細胞サンプル

C-19遺伝子を発現するヒト乳癌細胞株MCF-7 (American Type Culture Collection; ATCCより入手)を、陽性対照として用い、以前に記載 (A. Stathopoulou et al; 2001) のように培養した。

20

【0117】

B. 臨床用サンプル

EDTA中の末梢血を、第I/II病期 (初期) の乳癌術後の患者160名及び健常な志願女性 (年齢18~65歳) 62名から得た。皮膚の上皮細胞による血液汚染を低減するために、血液の最初の5mLを廃棄し、針を抜く前に採血管を外した。健常提供者及び患者から末梢血サンプルを集めて、同じ方法で処理した。全ての患者及び提供者からインフォームド・コンセントを得、そして検討は、参加施設の倫理科学委員会 (Ethical and Scientific Committees) によって承認された。末梢血単核細胞 (PBMC) を静脈穿刺から1時間以内に、先に記載した (A. Stathopoulou et al; 2001) ように、Ficoll Hypaque-1077 (Sigma Chemical Company, LTD, England) を用いて勾配遠心分離によって単離して、細胞ペレットを全RNAの抽出まで-80に維持した。

30

【0118】

C. 全RNAの単離及びcDNAの合成

Trizol LS試薬 (Invitrogen, Corp., Calsbad, USA) を用い、製造会社の使用説明書に従って、全RNAの単離を行った。全てのRNAの製造及び取り扱い工程を、層流フード内、RNAseが無い条件下で行った。単離されたRNAを、RNA貯蔵緩衝液 (Ambion, USA) に溶解して使用するまで-70で保存した。RNA濃度を、RiboGreen RNA定量キット (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を、簡易蛍光光度計の役割をするLightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) と一緒に用いて測定した。RNAの定量化は、次の方法で行った: 5µLのキットに付いているの濃度公知のRNA溶液若しくはその希釈液、又は未知のサンプルを、5µLのフルオロフォアRiboGreenと共に、LightCyclerガラスキャピラリーに加えた。標準曲線を、Real Fluorometer Mode (5~500ng/mLの範囲) で、LightCycler機器を用いて測定したRNA標準溶液の蛍光値を用いて作成した。サンプルの蛍光を3回測定し、標準曲線を用いてRNAの濃度を計算した。

40

【0119】

THERMOSCRIPT RT-PCRシステム (Invitrogen, USA) によりRNAの逆転写を行った。MCF-7細胞株から調製した全RNAを、陽性対照として用いた。cDNAを、製造業者の使用説明書に従って、健常な志願者及び乳癌患者のPBMCから

50

単離された全RNAから合成した。

【0120】

RNAの完全性を、製造業者の使用説明書に従って、LightCycler-h-H
PRT遺伝子セット (Roche Diagnostics) を用いて、ヒトヒポキサンチン - グアニンホ
スホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) のリアルタイムPCR増幅によって、cD
NA調製物でテストした。しかしながら、現在の科学データは、単一のハウスキーピング
遺伝子への標準化は不適當であると示唆しているため [C. Tricarico et al; 2002 and K.
Dheda et al; 2004]、本発明者らは、結果をHPRT遺伝子の量に標準化せずに、以前
に記載 (A. Stathopoulou et al; 2003) のように、むしろcDNAの合成のために用い
た全RNA量に標準化した。

10

【0121】

D. 最適化されたプロトコールBのためのプライマーの設計

(プロトコールB) に使用される新規なプライマー対のCK19 - do2及びCK19
- for2のオリゴヌクレオチド配列は、最初に、プライマー二量体の形成、偽のプライ
ミング位置及びヘアピン構造の形成を避けるために、プライマーPremier5ソフト
ウェア (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) を用いて設計して、イ
ンシリコ (コンピュータ上) で評価した。更に、順方向プライマー (CK19 - for2
) を、イントロン - エクソン接合上の位置に選択して、ゲノムCK - 19 DNAとのハイ
ブリッド形成を完全に避けた。また、BLAST配列相同性検索ツール (NCBI, NIH) で
検索して、高度の相同性を有するCK - 19 a偽遺伝子と区別するようにプライマー及び
プローブを設計した (図1を参照されたい)。特に、逆方向プライマー (CK19 - do
2) は、Taq DNAポリメラーゼ伸長が不可能であり、CK - 19 a偽遺伝子の増幅
から得られる偽陽性を避けるように、CK - 19 a偽遺伝子に対してCK - 19 mRNA
の特定の位置、3'末端で2つのミスマッチがあるように設計された (図1)。ハイブリ
ダイゼーションプローブ (TIBmol, Berlin, Germany) は、以前に記載 (プロトコールA
) (A. Stathopoulou et al; 2003) と同一であった。プライマーは、Lab of M
icrochemistry (FORTH, Crete, Greece) で合成された。全てのプライマー
及びハイブリダイゼーションプローブが、表1に示されている。

20

【0122】

【表 1】

表 1. 本検討のプロトコールBで用いられるプライマー及びハイブリダイゼーションプローブの配列

遺伝子	用途	名称	オリゴヌクレオチド配列 (5' - 3')
CK-19	順方向プライマー	CK19-for2	C g g g A C A A g A T T C T T g g
	逆方向プライマー	CK19-do2	C g T T g A T G T g g C C T C C A
	ハイブリダイゼーション プローブ	CK19-FL ^a	T g T C C T g C A g A T C g A - C A A C g C C C - F L
	ハイブリダイゼーション プローブ	CK19-LC ^b	L C R e d - C T g g C T g C A - g A T g A C T T C C g A A C C

a フルオレセインで標識

b LC Red640 (TIB MOLBIOL) で標識

【0123】

新規なプライマー対のゲノムDNAに対する特異性を評価する過程において、本発明者らは、以前に用いたプライマー (CK19-do及びCK19-for) と新たに設計したプライマー (CK19-do2及びCK19-for2) を使用して、健常提供者の末梢血から単離したゲノムDNAサンプルのリアルタイムPCR増幅を進めた。

【0124】

D. CK-19 mRNAに対する最適化されたリアルタイムRT-PCR (プロトコールB)

定量化は、CK-19に対する蛍光標識された特定のハイブリダイゼーションプローブでの、PCR時のリアルタイムモニタリングに基づいている。蛍光がバックグラウンドのノイズより上になる時点 (交差ポイント; crossing point、Cp) が、曲線の二次導関数の最大値として、LightCyclerソフトウェアによって最もよく定量化される。CK-19 mRNAのリアルタイムRT-PCRを、LightCyclerシステム (Roche Diagnostics) を用いて実施した。プロトコールAについては、プライマー (CK19-do及びCK19-for) 及びハイブリダイゼーションプローブ (CK19-FL及びCK19-LC) を以前に記載 (A. Stathopoulou et al; 2003) のようにして用いた。プロトコールBについては、本発明者らの新たに設計したプライマー、CK19-do2及びCK19-for2を、プロトコールAと同じハイブリダイゼーションプローブと一緒に用いた。表1を参照されたい。

【0125】

リアルタイムPCRを、LightCyclerのガラスキャピラリー中の総容量20 µLで実施した。PCRのために2 µLのcDNAを、18 µLの反応容量 (2 µLのMg²⁺を抜いたPCR合成緩衝液 (10x)、1 µLのMgCl₂ (50 mM)、0.4 µLのdNTPs (10 mM)、0.3 µLのBSA (10 µg/mL)、0.2 µLのプラチナTaq DNAポリメラーゼ (5 U/µL) (Invitrogen, USA)、1 µLのセンスプライマーCK19-for2 (3 µM)、1 µLのアンチセンスプライマーCK19

- d o 2 (3 μ M)、 1 μ L のハイブリダイゼーションプローブ C K 1 9 - F L (3 μ M)、 1 μ L のハイブリダイゼーションプローブ C K 1 9 - L C (3 μ M) 及び D E P C - H ₂ O (最終容量になるように添加) を含む) に添加した。 P C R 反応を、 9 5 ° で 1 0 分間変性後に開始 (ホットスタート P C R) して、 4 0 ° の 3 0 秒間の冷却工程で終了した。 繰り返しプロトコールは、 1 0 秒間の 9 5 ° での変性工程、 2 0 秒間の 5 5 ° でのアニーリング、 及び 2 0 秒間の 7 2 ° での伸長工程からなり、そしてこれを 5 0 回繰り返した。 蛍光検出を、各アニーリング工程の最後の 0 秒時に実施した。

【 0 1 2 6 】

定量のために外部標準 c D N A s を用いて、外部校正曲線を得た。 1 \times 1 0 ⁶ 個の M C F - 7 細胞から総 R N A を調製した (血球計で確認して)。 1 ~ 1 0 0 0 個の M C F - 7 細胞に対応する、この R N A 調製物の D E P C 処理水中の連続希釈液を、 c D N A 合成に用いた。これらの c D N A を、 - 2 0 ° でアリコート保存して、本検討を通して外部標準として用いた。この校正曲線は、各外部標準に対応する M C F - 7 細胞の数を、その交差ポイント (C p) の値に対してプロットして作成した。全てのテストサンプルの循環 C K - 1 9 m R N A 陽性細胞の数は、以前に記載 (A. Stathopoulou et al; 2003) のように、外部標準校正曲線による、 L i g h t C y c l e r ソフトウェア 3 . 1 で測定された総 R N A の 5 μ g に相当する M C F - 7 細胞として表した。

10

【 0 1 2 7 】

全てのサンプルに増幅可能な物質が存在していることを保証するために、そして偽陰性の結果を避けるために、ハウスキーピング遺伝子であるヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H P R T) (L i g h t C y c l e r - h - H P R T 遺伝子セット、 Roche Applied Science) のリアルタイム増殖を、全てのサンプルについて実施した。

20

【 0 1 2 8 】

ハウスキーピング遺伝子の増幅に、以下のプロトコールを用いた。リアルタイム P C R を、 L i g h t C y c l e r のガラスキャピラリー中の総容量 2 0 μ L で実施した。 P C R のために 2 μ L の c D N A を、 1 8 μ L の反応容量 (2 μ L の M g ²⁺ を抜いた P C R 合成緩衝液 (1 0 \times)、 1 μ L の M g C l ₂ (5 0 m M)、 0 . 4 μ L の d N T P s (1 0 m M)、 0 . 3 μ L の B S A (1 0 μ g / m L)、 0 . 2 μ L のプラチナ T a q D N A ポリメラーゼ (5 U / μ L) (Invitrogen, USA)、 1 μ L の各ハウスキーピングセンス及びアンチセンスプライマー (3 μ M)、 1 μ L のハイブリダイゼーションプローブ C K 1 9 - F L (3 μ M)、 2 μ L の T a q m a n プローブ (6 F A M - A T G A A G G A T G G G C A A C T G T A C C T G A C T G G - T M R) (3 μ M) 及び D E P C - H ₂ O (最終容量になるように添加) を含む) に添加した。 P C R 反応を、 9 5 ° で 1 0 分間変性後に開始 (ホットスタート P C R) して、 4 0 ° の 3 0 秒間の冷却工程で終了した。 繰り返しプロトコールは、 1 0 秒間の 9 5 ° での変性工程、 2 0 秒間の 5 5 ° でのアニーリング、 及び 2 0 秒間の 7 2 ° での伸長工程からなり、そしてこれを 5 0 回繰り返した。 蛍光検出を、各アニーリング工程の最後の 0 秒時に実施した。

30

【 0 1 2 9 】

予防措置

汚染のリスクを低減するために、 R N A 抽出、 c D N A 合成、リアルタイム R T - P C R 工程の調製及び熱サイクルを別な部屋で実施した。 P C R 混合物の調製を、フード (B i o T e c h n e H e p a , T E C H N E , C a m b r i d g e , U K) 中で実施し、そして全ての操作の間、それぞれの抽出及び合成に対して、本発明者らはフィルターチップを使用し、陽性及び陰性の対照サンプルを含有させた。

40

【 0 1 3 0 】

統計

マクニマー及びフィッシャーの正確確率検定を、プライマー対の両方のセットによる同じ c D N A 上の C K - 1 9 m R N A 検出に関するリアルタイム P C R の結果を比較するのに用いた。 1 対の非正規分布に関するウィルコクソン検定を、 2 つのプロトコールで測定

50

された本発明者らのサンプルのCK-19陽性細胞のレベルを比較するために用いた ($p < 0.05$ は、統計的に有意であると考えられる)。データ分析は、Statmost統計パッケージ (Statmost, DataMost Corp, USA) で実施した。

【0131】

結果

A. プロトコールBのCK-19及びゲノムDNAに関するリアルタイムRT-PCR

CK-19のリアルタイムRT-PCRに対して最適化されたプロトコールBの特異性を、ゲノムDNAサンプル中の、プライマーの4つの組み合わせ [A) CK19-do2/CK19-for2、B) CK19-do2/CK19-for、C) CK19-do/CK19-for、D) CK19-do/CK19-for2] を適用して評価した (図2を参照されたい)。プライマー対CK19-do2/CK19-for2は、どの産物の増幅も示さなかったのに対して、その他の3つの組み合わせは増幅を実証した。

10

【0132】

B. 最適化されたプロトコールBのCK-19に関するリアルタイムRT-PCR

CK-19に対して新規で特異性の高いプライマー対を設計することにより、本発明者らは先に報告したリアルタイムアッセイ (A. Stathopoulou et al; 2003) を改善した。プロトコールBのPCR反応の条件についてほんの少しの修正が必要で、増幅温度を60から55に下げ、そして増幅時間を10から20秒に増やした。

【0133】

本発明者らは、4つの実験においてcDNA外部標準 (上記のようにして調製) を分析することにより、プロトコールBのCK-19のリアルタイムRT-PCRの分析感度及び線形性を評価した。これらのデータから作成された較正曲線は、全定量範囲 (1~1000のMCF-7細胞数) にわたる直線性、及び全ての場合において正確な対数線形関係を示唆する、0.99以上の相関関数を示した。この較正曲線の平均傾き及び切片は、それぞれ -3.226 ± 0.14 ($CV = 4.3\%$ 、 $n = 4$) 及び 32.30 ± 0.22 ($CV = 0.7\%$ 、 $n = 4$) であり、一方、 $E = [10^{-1} / slope] - 1$ (I.R. Peters et al; 2004) で表されるPCR効率は、 1.04 ± 0.06 ($CV = 2.9\%$ 、 $n = 4$) であった。第1外部標準 (1個のMCF-7細胞当量) のCpの標準偏差値の3.3倍を較正曲線の平均傾きで割る値 ($DL = 3.3SD / 傾き$) と定義される、この方法の分析の検出限度は、0.4個のMCF-7細胞当量に相当することが見いだされた。

20

30

【0134】

プロトコールBの連続実験 (run) 内精度を測定するために、CK-19 mRNAを、LightCyclerで、同じ連続実験中の1、10、100及び1000個のMCF-7細胞に相当する4つのDNAサンプルで、6つを平行して測定し、定量した。

【0135】

【表 2】

表 2. CK-19 mRNA に関するリアルタイム RT-PCR
プロトコール B の連続実験内及び連続実験間精度

アッセイの再現性									
連続実験内精度 (n = 6)					連続実験間精度 (n = 4)				
MCF-7 細胞	交差点 (Cp)		MCF-7 細胞	交差点 (Cp)		MCF-7 細胞	交差点 (Cp)		MCF-7 細胞
当量	平均 (SD)	CV (%)	平均 (SD)	CV (%)	平均 (SD)	CV (%)	平均 (SD)	CV (%)	当量
1	33.6 (0.42)	1.25	10.4 (0.25)	2.5	32.3 (0.34)	1.05	10.9 (0.15)	13.8	
10	29.6 (0.11)	0.37	10.5 (0.7)	6.6	29.1 (0.21)	0.76	9.64 (1.8)	18.9	
100	26.0 (0.1)	0.42	86.5 (5.4)	6.3	25.8 (0.24)	0.93	89.5 (6.0)	6.7	
1000	21.7 (0.04)	0.21	10.84 (31.0)	2.9	22.3 (0.25)	1.12	97.2 (97.2)	10	

10

20

30

【0136】

表 2 は、校正曲線で測定した MCF-7 細胞についての連続実験内の CV 値が、2.9% ~ 25% の範囲であるのに対し、対応する Cp 値は 0.21% ~ 1.25% であることを示している。更に、アッセイの連続実験間精度を測定するために、同じ cDNA サンプルをアリコートで冷凍 (-20) して、1 ヶ月間かけて異なった 4 日間に 4 回の別なアッセイを行った。表 2 は、校正曲線で測定した MCF-7 細胞についての連続実験間 CV は 6.7% ~ 18.9% の範囲であるのに対し、対応する Cp 値は 0.76% ~ 1.12% の範囲であることを示している。

【0137】

C. 末梢血サンプルにおける CK-19 mRNA 陽性細胞の比較定量化

CK-19 に関するリアルタイム RT-PCR のための最適化されたプロトコール B の特異性及び検出感度を、プロトコール A に関連させて評価した。62 人の健常女性の血液提供者及び 160 人の手術可能な (ステージ I / II) 乳癌患者から得た合計 222 の末梢血サンプルに、2 つの定量プロトコールを適用した。これらのサンプル全てを、HPRT ハウスキーピング遺伝子の発現によって、RNA の特性及び cDNA の合成についてテストした。それぞれのサンプルの総 RNA を、RiboGreen により蛍光分析で定量した。RNA の同量を、cDNA の合成及び本発明者らの定量的な RT-PCR データの標準化のために用いた (A. Stathopoulou et al; 2003)。

【0138】

40

50

新しいプライマーのセットの特異性を、本発明者らが以前にプロトコールAで分析した (A. Stathopoulou et al; 2003) 健常な志願者からの血液サンプル89のうちの62について再分析して、評価した。プロトコールAを適用すると、これら89サンプルのうちの2つがこのアッセイの分析カットオフ値 (analytical cut-off) によると陽性であると思われた ($C_p = 32.17 \pm 0.70$ 、 $CV(\%) = 2.2$) のに対して、62サンプル (2つの陽性サンプルが含まれていた) の何れも、プロトコールBで分析した場合に何ら増幅を示さなかった。最適化された方法の検出感度は、手術可能な乳癌患者の末梢血サンプル160を両方のプロトコールで分析して評価した。

【0139】

【表3】

10

表3. 抹消血サンプルにおけるCK-19陽性細胞の検出に関するリアルタイムPCRのためのプロトコールA及びBの比較

プロトコールA及びプロトコールBの比較			
プロトコール A	プロトコールB		合 計
	+	-	
+	29	20	49
-	4	169	173
合 計	33	189	222

20

30

一致率: 89.2% (198/222)、($p = 0.0022$ 、マクニマー及びフィッシャーの正確確率検定)

【0140】

表3に示すように、これらのサンプルのうちの33 (20.6%) が、陽性であることが分かった。グレーゾーンにあってプロトコールAで陽性に見なされていた20サンプルが、プロトコールBで陰性であることが分かった。一方、カットオフ値よりも大きい C_p sの増幅曲線を示すのでプロトコールAで陰性に見なされていた4サンプルが、プロトコールBで陽性であることが見い出された。テストされた全ての末梢血サンプル (健常提供者 $n = 69$ 及び乳癌患者 $n = 160$) を含めると、両方のプロトコールで29サンプルが陽性で、169サンプルが陰性であったので、2つのプロトコール間では89.2% (198/222) の陽性及び陰性の一致率であった (マクニマー及びフィッシャーの正確確率検定、 $n = 222$ 、 $p = 0.0022$) (表3)。図3に示すように、これらの2つのプロトコールで得られたCK-19 mRNA陽性細胞レベル (MCF-7細胞当量/5 μ g RNAで示した) は、非常に良く相関しており ($r = 0.986$ 、 $n = 29$)、2群

40

50

に差異は有意になかった（対データに関するウィルコクソン検定、 $n = 29$ 、 $p = 0.164$ ）。

【0141】

末梢細胞の免疫磁性濃縮

3つのサンプル群を新しいプロトコルの有効性を評価するために、末梢血から循環腫瘍細胞（CTCs）を単離してテストした。図6は、後続の操作と共にそれぞれのサンプル群を示す。

【0142】

第1群（図6ではグループAとして示す）

第1群は、既知量のMCF-7細胞を混ぜた末梢血サンプルからなり、これらのサンプルをFicoll Histopaque-1077システム（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）に加え、1,500rpmで30分間遠心分離した。単核細胞層を除去し、PBSで2回洗浄し、PBS/0.1%ウシ血清アルブミンで1mLに希釈し、そして上皮富化ダイナビーズ（Epithelial Enriched Dynabeads；20 μ L容量中に 1×10^7 ビーズ）と共に振盪しながら1時間培養した。細胞懸濁液を磁石の上に少なくとも6分間おいて、上澄液を注意深く除去した。磁性ビーズに付着した細胞を1mLのPBS/0.1%ウシ血清アルブミンで3回洗浄して、キットで提供されている溶解結合緩衝液で溶解した。溶解した細胞懸濁液（及び付着したビーズ）を次の操作まで-80で貯蔵した。このMCF-7上皮細胞を、モノクローナル抗体、Ber-EP4、及び磁性ダイナビーズ上皮富化キット（magnetic Dynabeads Epithelial Enrich kit）を用い、製造会社（Dyna）の使用説明書に従って、免疫磁性捕捉で濃縮した。製造会社は、このキットを用いると、上皮細胞の5対数の濃縮、及びビーズが付着していない生存能力のある腫瘍細胞が70%の収率で得られることを示した。Ber-EP4抗体は、扁平上皮、肝細胞及び壁細胞の表層を除く、上皮細胞の表面及び細胞質にある2つの糖タンパク質を認識する。

【0143】

第2群（図6ではグループBとして示す）

第2群は、PBS中で既知量のMCF-7細胞を混ぜて調製したサンプルからなり、そして引き続いて第1群と同じ操作を行った。サンプルのこの群は、Ficoll単離した後のMCF-7細胞の回収で、免疫磁性濃縮する群（第1群）又は濃縮しない群（第3群）の参考として用いた。

【0144】

第3群（図6ではグループCとして示す）

第3群は、既知量のMCF-7細胞を混ぜた末梢血サンプルからなり、Ficoll Histopaque-1077システム（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）に加え、1,500rpmで30分間遠心分離した。単核細胞層を除去し、PBSで2回洗浄し、そしてPBMCsを次の操作まで-80で貯蔵した。

【0145】

mRNAの単離及び逆転写

総RNAの単離を、Trizol LS試薬（Invitrogen）を用い、製造会社の使用説明書に従って実施した。RNAの全ての調製及び取り扱い工程を層流フード内で、RNA分解酵素の無い条件下で行った。単離したRNAを、RNA貯蔵緩衝液（Ambion, USA）に溶解して、使用するまで-80で貯蔵した。RNAの濃度を、NanoDropスペクトロフォトメータND-1000（NanoDrop）を用いて測定した。RNAの逆転写は、Superscript III Platinum Two Step qRT-PCRキット（Invitrogen）を用いて実施した。

【0146】

リアルタイムPCR（定量的PCR）

CK-19についてリアルタイムPCRを、LightCyclerのガラスキャピラリー中の総容量20 μ L中で実施した。PCRのために2 μ LのcDNAを、18 μ Lの反応容量（2 μ LのMg²⁺を抜いたPCR合成緩衝液（10 \times ）、1 μ LのMgCl₂

10

20

30

40

50

(50 mM)、0.4 μLのdNTPs (10 mM)、0.3 μLのBSA (10 μg/mL)、0.2 μLのプラチナTaq DNAポリメラーゼ (5 U/μL) (Invitrogen, USA)、1 μLのセンスプライマーCK19 - for 2 (3 μM)、1 μLのアンチセンスプライマーCK19 - do 2 (3 μM)、1 μLのハイブリダイゼーションプローブCK19 - FL (3 μM)、1 μLのハイブリダイゼーションプローブCK19 - LC (3 μM)、及びDEPC-H₂O (最終容量になるように添加)を含む)に添加した。PCR反応を、95 で10分間変性後に開始 (ホットスタートPCR) して、40 の30秒間の冷却工程で終了した。繰り返しプロトコールは、10秒間の95 での変性工程、20秒間の55 でのアニーリング、及び20秒間の72 での伸長からなり、そしてこれを50回繰り返し返した。蛍光検出を各アニーリング工程の最後の0秒時に実施した。

10

【0147】

ここで図8A~Cを参照すると、MCF-7細胞を混ぜて末梢血単核細胞 (PBMC) をFicoll分離し、免疫磁性濃縮した場合、高い検出感度を得られることが分かる。これらの実験では、1個のMCF-7細胞/mL PBまでの検出限界が得られた。図8Aを参照されたい。

【0148】

本発明の更なる用途

本発明は、例えば、患者の生体サンプル中で同定される循環腫瘍細胞の定量測定方法を開示する。一例は、乳癌を患っている患者である。好ましい本発明の方法は、本発明のプライマー対を用いて特定のCK-19 mRNA転写産物のリアルタイムPCR増幅に使用

20

【0149】

腫瘍中に豊富に発現される上皮マーカーであるCK-19は、子宮内膜 (Ji XQ et al, Gynecol Oncol. 2006 Feb; 100(2):355-60)、結腸直腸 (Yeh CS et al, Int J Oncol. 2006 Feb;28(2):411-20; Wang JY et al, World J Surg. 2006 Jun; 30(6):1007-13)、胃 (Wu CS et al, Int J Cancer. Jul 15; 119(2):373-9)、頭及び頸 (Tao L et al, Br J Cancer. 2006 Apr 24; 94(8):1164-9)、前立腺 (O'Hara SM et al, Clin Chem. 2004 May; 50(5):826-35) 及び多くの型の腫瘍が引き起される悪性胸膜滲出 (Xe F et al, J Zhejiang Univ Sci. 2004 Oct; 5(10):1286-9)を含む、上皮起源の腫瘍を有する患者の生体サンプル中の循環腫瘍細胞を同定するためのマーカー (単独又はその他のマーカーと組み合わせて) でもある。このような生体サンプルは、末梢血、骨髓、リンパ節、髄液及び接眼レンズ液を含んでいてもよい。

30

【0150】

上記の腫瘍を有する患者から提供される生体サンプルからのCK-19 mRNA陽性の循環腫瘍細胞を同定するために、本明細書に開示されている方法の1つ又は組み合わせを用いることができる。例えば、臨床サンプルを集めて、単離された末梢血単核細胞 (PBMCs) を用いて総RNAが調製される。例えば、上記で概説した免疫磁性精製の方策を用いることができる。RNAを定量して、必要によって、-70 に長期間貯蔵する。また、RNA (5 μg) は、cDNA (標的配列) 合成のための逆転写反応を行うために用いられる。健常者からのサンプルは、対照として用いられ、同一の方法で臨床サンプルと平行して処理される。当然のことながら、このような対照を、テストする対照サンプルが公知のCK-19発現プロフィールを有しているなら、実施する必要はない。合成されたcDNAは、CK-19配列を増幅するために上記のようなプライマー対及びハイブリダイゼーションプローブ対を用いるリアルタイムPCR反応で使用される。SEQ ID NO: 1及び2で示されるプライマー対の使用は、多くの用途に対して好ましいであろう。

40

【0151】

定量化のために、外部校正曲線は、本願で前記したように、 1×10^6 個のMCF-7細胞から単離したRNAから調製された外部標準cDNAを用いることによって作成される。

【0152】

50

考察

本発明者らは、乳癌患者の末梢血サンプル中の循環 C K - 1 9 m R N A 陽性細胞を定量する特異的且つ精度の高い方法を開発した (A. Stathpoulou et al; 2003)。このアッセイは、非常に低い偽陰性率 (健康血液提供者 8 9 名のうちの 2 名のみ (2 . 2 %) が C K - 1 9 m R N A に対して陽性であることが見い出されたので) にもかかわらず、アッセイの分析検出限界より低い、非常に高い交差ポイントで検出されたので陰性と考えられる c D N A 配列に、増幅可能な c D N A 配列を有するサンプルがあった。カットオフ値よりもやや低い C p に増幅曲線を示す患者サンプルの結果を評価することは、非常に困難且つ重大であることが判明した。

【 0 1 5 3 】

この「グレーの判定区域」があることで、本発明者らが、新規なプライマーのセット (C K 1 9 - d o 2 及び C K 1 9 - f o r 2) を設計及び評価することになった。本発明者らの主な目標は、ゲノム D N A 汚染又は正当性を欠いた発現の何れかによる偽陽性、更に本発明者らのサンプル中の C K - 1 9 m R N A の非常に低い初期濃度による偽陰性を避けることであった。新旧の C K - 1 9 プライマー対の 4 つの異なった組み合わせを、純粋なゲノム D N A と共にテストすることにより、このハイブリダイゼーションプロブ対と組み合わせたこの新規なプライマー対が、非常に特異的であり、そして高濃度のゲノム D N A 及び C K - 1 9 偽遺伝子の存在によって影響を受けないことを、本発明者らは明確に示した。以前に検討したのと同じ健康提供者のサブグループ (n = 6 2) からのサンプルと新しいプライマー対との再テストで、これらのサンプルの何れも C K - 1 9 m R N A の増幅可能な産物を有していなかったことから、このアッセイの特異性において有意な改善があった。

【 0 1 5 4 】

この新規で高い特異性のあるプライマー対を C K - 1 9 m R N A のリアルタイム P C R 定量に使用することによって、本発明者らは、この方法の特異性を大幅に改善した。この方法では、陽性及び陰性のサンプルの明確な区分が達成され、そして以前のアッセイにおけるグレーゾーン結果の難しい解釈を完全に避けることができる。サンプルの大部分に対して、プライマー対の 2 つのセットが殆ど同じ結果をもたらし、テストした全 2 2 9 サンプルのうち、両方のプライマー対によって、2 9 サンプルが陽性で、1 6 9 サンプルが陰性であることが見い出された [8 9 . 2 % の一致率 (1 9 8 / 2 2 2)]。

【 0 1 5 5 】

しかしながら、プロトコール A の方法で、濃度が分析検出限界に非常に近くグレーゾーンとされた陽性の 1 0 サンプルについては、プロトコール B で 4 つが真の陽性であり (4 0 %)、一方 6 サンプルが偽陽性であると見い出された (6 0 %)。プロトコール A で陰性であった 1 9 サンプルの他のセットでは、分析検出限界よりやや低い濃度である 2 例がプロトコール B で偽陰性であることが見い出された (1 0 . 5 %)。このように、プロトコール A で C K - 1 9 検出の「グレーゾーン」に入っていると測定された、小さい割合の患者サンプル 2 9 / 2 2 2 (1 3 %) を、プロトコール B で陽性又は陰性としてより明確に特徴付けることができた。というのも、このプロトコールは、全 R N A と一緒に抽出される微量のゲノム D N A によって影響を受けないからである。

【 0 1 5 6 】

以下の引例の概説は、本発明の正しい評価を高めるであろう。

A. C. Lambrechts, L. J. Veer, S. Rodenhuis, Ann. Oncol. 9 (1998) 1269-1276.

K. Pantel, V. Muller, M. Auer, N. Nusser, N. Harbeck, S. Braun, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 6326-6334.

S. Braun, K. Pantel, P. Muller, W. Janni, F. Hepp, C. R. Kentenich, S. Gastroph, A. Wischnik, T. Dimpfl, G. Kindermann, G. Riethmuller, G. Schlimok, N. Engl. J. Med. 342 (2000) 525-533.

Y. H. Datta, P. T. Adams, W. R. Drobyski, S. P. Ethier, V. H. Terry, M. S. Roth, J. Clin. Oncol. 12(1994) 475-482.

10

20

30

40

50

A. Schoenfeld, K. H. Kruger, J. Gomm, H. D. Sinnett, J. C. Gazet, N. Sacks, H. G. Bender, Y. Luqmani, R. C. Coombes, *Eur. J. Cancer* 33 (1997) 854-861.

A. Stathopoulou, I. Vlachonikolis, D. Mavroudis, M. Perraki, Ch. Kouroussis, S. Apostolaki, N. Malamos, S. Kakolyris, A. Kotsakis, N. Xenidis, D. Reppa, V. Georgoulas, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 3404-3412.

A. Stathopoulou, A. Gizi, M. Perraki, S. Apostolaki, N. Malamos, D. Mavroudis, V. Georgoulas, E. Lianidou, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 5145-5151.

J. A. Lopez-Guerrero, P. Bolufer-Gilabert, M. Sanz-Alonso, E. Barragan-Gonzalez, J. Palau-Perez, J. De la Rubia-Comos, A. Sempere-Talens, S. Bonanad-Boix, *Clin. Clim. Acta* 263 (1997) 105-116.

P. Ruud, O. Fodstad, E. Hovig, *Int. J. Cancer* 80 (1999) 119-125.

E. S. Savtchenko, T. A. Schiff, C. K. Jiang, I. M. Freedberg, M. Blumenberg, *Am. J. Hum. Genet.* 43 (1988) 630-637.

V. Bozionellou, D. Mavroudis, M. Perraki, S. Papadopoulos, S. Apostolaki, E. Stathopoulos, A. Stathopoulou, E. Lianidou, V. Georgoulas, Trastuzumab (herceptin) administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 (ck-19) mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer, *Clin. Cancer Res.* (in press).

A. Stathopoulou, K. Angelopoulou, V. Georgoulas, E. S. Lianidou, *Clin Biochem.* 34 (2001) 651-659.

C. Tricarico, P. Pinzani, S. Bianchi, M. Paglierani, V. Distante, M. Pazzagli, S. Bustin, C. Orlando, *Anal. Biochem.* 309 (2002) 293-300.

K. Dheda, J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook, A. Zumla, *Biotechniques*, 37 (2004) 118-119.

I. R. Peters, C. R. Helps, E. J. Hall, M. J. Day, *J. Immunol. Methods* 286 (2004) 203-217.

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】図1は、CK-19 cDNA及びCK-19偽遺伝子の配列アラインメント、並びにプロトコルA及びBで用いられるプライマー及びプローブのハイブリッド形成部位を示している。点I及びIIは、それぞれエクソン1/2及びエクソン2/3の接合部を示している。

【図2】図2は、同じハイブリダイゼーションプローブとプライマーの4つの組み合わせ[A) CK19 - do2 / CK19 - for2、B) CK19 - do2 / CK19 - for、C) CK19 - do / CK19 - for、D) CK19 - do / CK19 - for2]を用いることによる、ゲノムDNAについてのリアルタイムPCRである。

【図3】図3は、プロトコルA及びBで得られる、MCF-7細胞当量/5µgRNAで表したCK-19 mRNA陽性細胞のレベルを示すグラフである。

【図4】図4は、PBGDについての一般的なリアルタイムPCRのグラフである。このグラフは、PBGD遺伝子を効率よく増幅する、5人の健常提供者の生体サンプル(末梢血)(正常サンプル1~5)を用いて、本発明のハウスキーピングプライマー対を用いて生成したハウスキーピング遺伝子についての、本発明のTagmanプローブを用いて検出したリアルタイムPCR増幅カーブを示す。図で、ゲノムDNA(健常者から単離されたDNA)を含有している2つのサンプルでは、増幅が生じなかったことが観察される。これはゲノムDNAが増幅されないようにハウスキーピングプライマーを設計した結果である。陰性対照(ネガティブコントロール; NC)は、核酸鋳型を含有していないPCR反応に対応している。

【図5】図5は、PBGDのPCR産物についてのアガロースゲル電気泳動(2%)である。実際のPCR産物をアガロースゲル上に添加した。反応物の10µl(総容量の半分)を添加して、標準的な臭化エチジウム染色を用いて検出した。サンプル1~5は、図4

10

20

30

40

50

の正常サンプル 1 ~ 5 に対応し、一方、陰性対照は、図 4 の陰性対照に対応している。

【図 6】図 6 は、末梢血 (P B) から循環腫瘍細胞 (C T C s) を単離するためのある特定の実験工程を示す概略図である。

【図 7】図 7 は、モノクローナル抗体 B e r - E P 4 及び磁性ダイナビーズ濃縮キット (magnetic dynabeads epithelial enrich kit) を用いる、免疫磁性の濃縮を示す概略図である。

【図 8 A】図 8 A ~ C は、実施例で示されるサンプルの 3 群についての、リアルタイム P C R の結果を示すグラフである。図 8 A は、第 1 群 = P B に既知量の M C F - 7 細胞を混ぜ、そして免疫磁性濃縮したサンプルを示す。

【図 8 B】図 8 A ~ C は、実施例で示されるサンプルの 3 群についての、リアルタイム P C R の結果を示すグラフである。図 8 B は、第 2 群 = P B S に既知量の M C F - 7 細胞を混ぜたサンプルを示す。

【図 8 C】図 8 A ~ C は、実施例で示されるサンプルの 3 群についての、リアルタイム P C R の結果を示すグラフである。図 8 C は、免疫磁性濃縮以外は第 1 群と同じ処理したサンプルを示す。

10

【 図 1 】

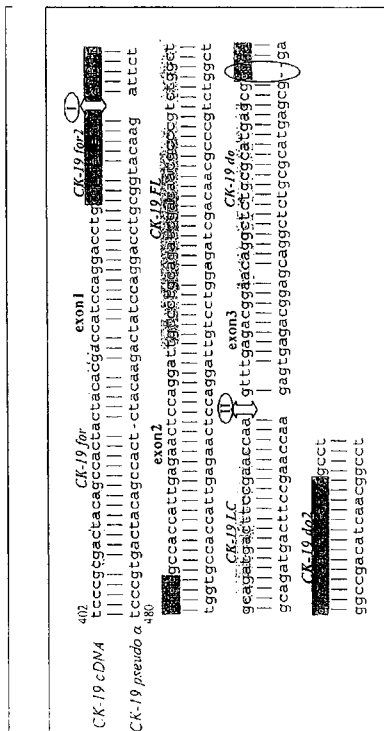


図 1. 19 cDNA及びCK 19 偽遺伝子の配列構造及びプロトコル-A及び B に用いられるプライマー及びプローブのハイブリッド形成部位、ポリイントロ及びIIは、エクソン 1 / 2 及びエクソン 2 / 3 接合部をそれぞれ示す

【 図 2 】

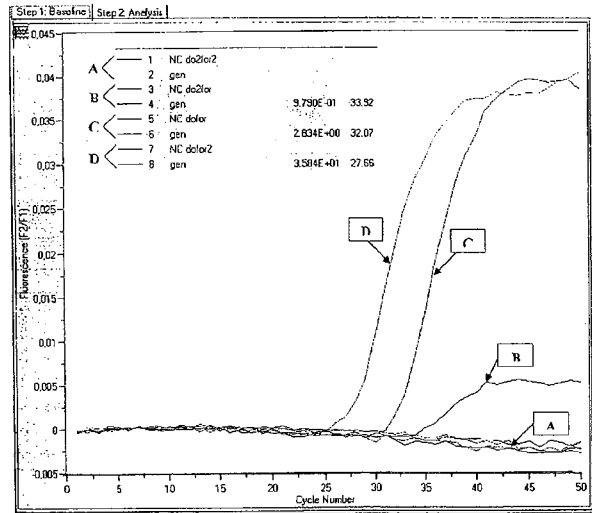


図 2 同じハイブリダゼーションプローブと一緒に四つのプライマーの組み合わせを用いたゲノムDNAのリアルタイムPCR. A) CK19-do2/CK19-for2, B) CK19-do2/CK19-for, C) CK19-do/CK19-for, D) CK19-do/CK19-for2

【 図 3 】

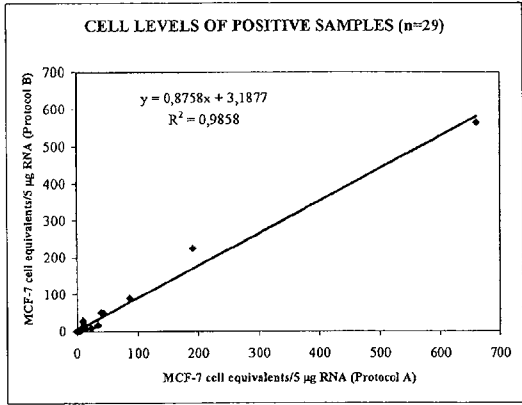


図3
プロトコルA及びBにより得られるCK 19 mRNA陽性細胞レベル (MCF-7細胞当量/5μg RNA)

【 図 4 】

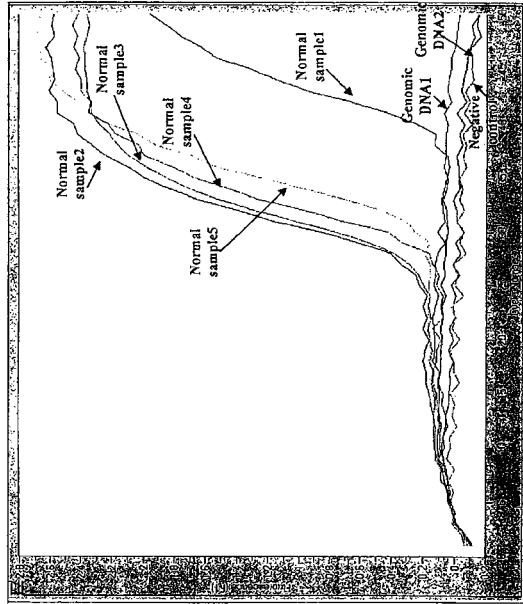


図4
PBGDの一般的なリアルタイムPCRグラフ

【 図 5 】



図5
P.BGDのPCR産物のアガロースゲル電気泳動 (2%)

【 図 6 】

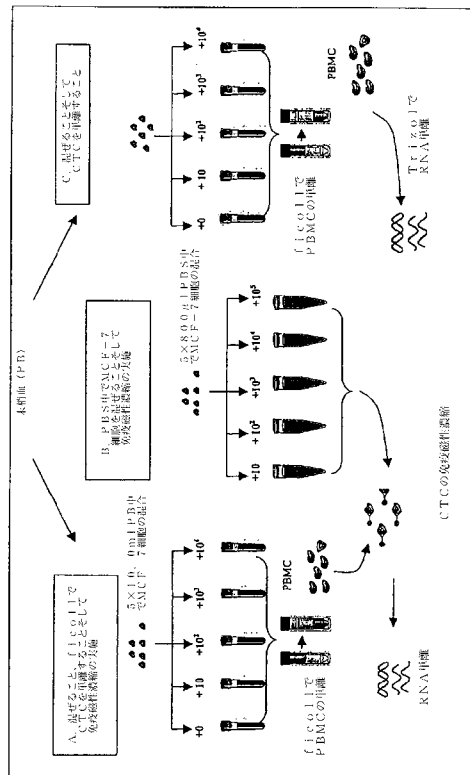


図6

【 図 7 】

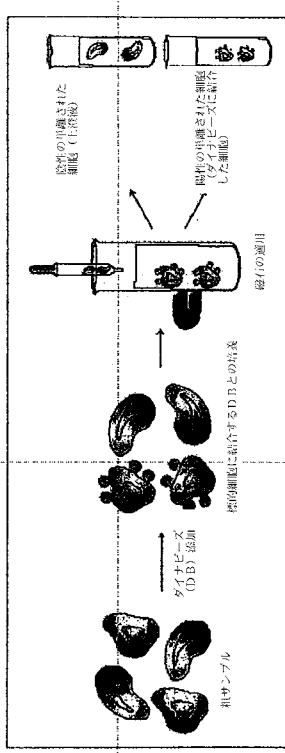


図 7

【 図 8 A 】

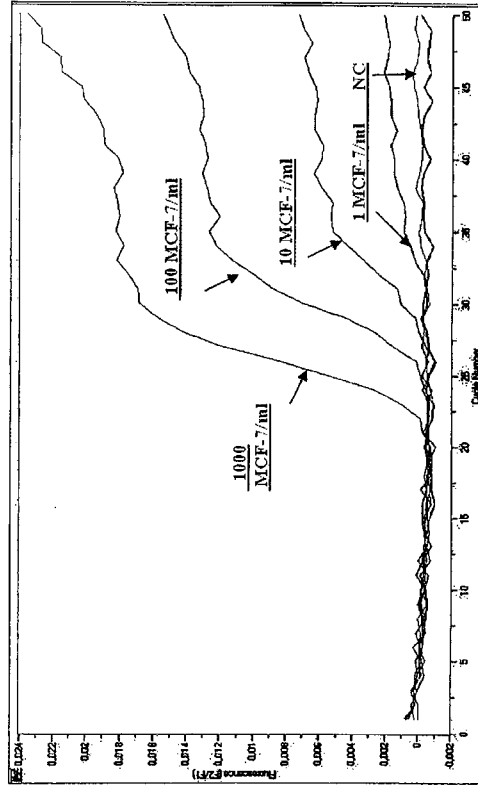


図 8 A

【 図 8 B 】

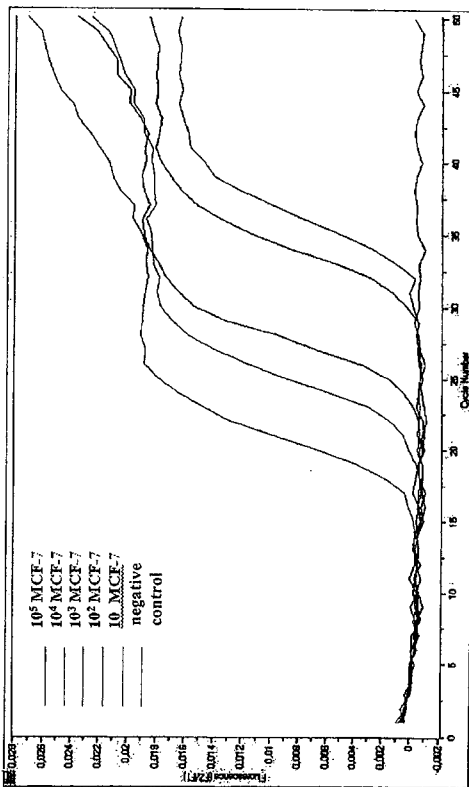


図 8 B

【 図 8 C 】

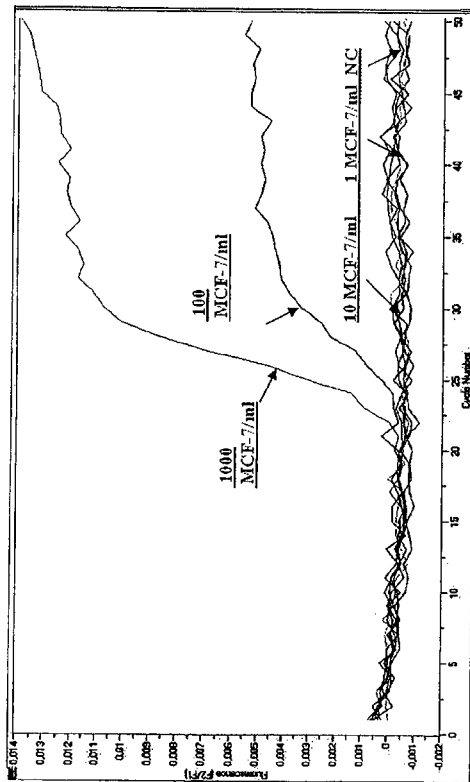


図 8 C

【配列表】

2009504168000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年2月12日(2007.2.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 1の配列を有する1つのプライマー及びSEQ ID NO: 2の配列を有する1つのプライマーを含んでなる、プライマー対。

【請求項2】

プライマーが、ヌクレオチド、ヌクレオチドの類似体又は標識を含んでなる、請求項1に記載のプライマー対。

【請求項3】

少なくとも1つのプライマーが少なくとも1つのイントロンを挟む部位を包含し、
(i) 核酸増幅試薬、請求項1に記載のプライマー対及びテストサンプルを包含する反応混合物を形成すること、
(ii) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、及び
(iii) PCR時のリアルタイム観察を用いて、サンプル中のmRNAの量を測定すること、
の工程を含んでなる、プライマー対を用いて、少なくとも1つのイントロンを包含する遺伝子由来のmRNAの、テストサンプル中の存在を定量する方法。

【請求項4】

工程(i)の反応混合物の形成前に、テストサンプルを逆転写する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

テストサンプルが、血液サンプル、骨髓からのサンプル及びリンパ節由来のサンプルから選ばれる、請求項3又は4に記載の方法。

【請求項6】

テストサンプルが、血液サンプルである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

血液サンプルが、反応混合物の形成前に遠心分離される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

工程(i)の反応混合物が、ハウスキーピングプライマー対を更に含んでなる、請求項3～7の何れか一項に記載の方法。

【請求項9】

ハウスキーピングプライマー対が、SEQ ID NO: 5及び6を有している、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

(i) 患者から生体サンプルを提供すること、
(ii) 生体試料から核酸を単離すること、
(iii) 核酸の供給源がRNAである場合、単離した核酸を任意に逆転写すること、
(iv) 核酸増幅試薬、請求項1に記載のプライマー対、及び工程(ii)で単離した核酸又は工程(iii)の逆転写された核酸のアリコートを包含する、反応混合物を形成すること、
(v) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1

つのコピーを生成すること、

(v i) P C R 時のリアルタイム観察を用いて、サンプル中の C K - 1 9 m R N A 陽性細胞を定量すること、及び

(v i i) サンプル中の C K - 1 9 m R N A 陽性細胞の量に基づいて、アジュバント治療の見通しを判断すること、

の工程を含んでなる、癌を患っている患者におけるアジュバント治療の見通しを判断する診断方法。

【請求項 1 1】

前記癌が、乳癌、好ましくは手術可能な乳癌である、請求項 1 0 に記載の診断方法。

【請求項 1 2】

生体サンプルが、血液サンプルである、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の診断方法。

【請求項 1 3】

工程 (i i i) の反応混合物が、ハウスキーピングプライマー対を更に含んでなる、請求項 1 0 ~ 1 2 の何れか一項に記載の診断方法。

【請求項 1 4】

ハウスキーピングプライマー対が、 S E Q I D N O : 5 及び 6 を有している、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

(i) 請求項 1 に記載のプライマー対；

(i i) 癌細胞上に追加のマーカと任意にハイブリッド形成する配列；及び

(i i i) 増幅試薬；

を含んでなる、C K 1 9 標的配列を増幅するための診断キット。

【請求項 1 6】

前記増幅試薬が、S E Q I D N O : 3 及び 4 のハイブリダイゼーションプローブを含んでなる、請求項 1 5 に記載の診断キット。

【請求項 1 7】

前記キットが、ハウスキーピングプライマー対、好ましくは S E Q I D N O : 5 及び 6 による配列を有するプライマー対を更に含んでなる、請求項 1 5 又は 1 6 に記載の診断キット。

【請求項 1 8】

増幅試薬及びプライマー対 (複数を含む) が、凍結乾燥されている、請求項 1 5 ~ 1 7 の何れか一項に記載の診断キット。

【請求項 1 9】

第 1 プライマーの長さが約 1 0 ~ 約 2 0 個の核酸塩基であって、更に図 1 で示される C K - 1 9 c D N A 配列と特異的にハイブリッド形成が可能である、S E Q I D N O : 1 又は S E Q I D N O : 2 で示される配列の少なくとも約 8 個の核酸塩基を有する第 1 プライマー、

及び第 2 プライマーの長さが約 1 0 ~ 約 2 0 個の核酸塩基であって、更に図 1 で示される C K - 1 9 c D N A 配列と特異的にハイブリッド形成が可能である、S E Q I D N O : 1 又は S E Q I D N O : 2 で示される配列の少なくとも約 8 個の核酸塩基を有する第 2 プライマーを更に含んでなる、プライマー対。

【請求項 2 0】

第 1 及び第 2 プライマーの少なくとも 1 つが、修正ヌクレオチド間架橋、修飾糖部分又は修飾核酸塩基を含んでなる、請求項 1 9 に記載のプライマー対。

【請求項 2 1】

第 1 及び第 2 プライマーの少なくとも 1 つが、少なくとも 1 つの固定された核酸 (l o c k e d n u c l e o t i c a c i d ; L N A) ユニットを含有している、請求項 2 6 のプライマー対。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 つのプライマーが少なくとも 1 つのイントロンを挟む部位を包含し、

(i v) 核酸増幅試薬、請求項 1 9 ~ 2 1 に記載のプライマー対及びテストサンプルを

包含する反応混合物を形成すること、

(v) 当該混合物を増幅条件下において、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、及び

(vi) PCR中のリアルタイム観察を用いて、サンプル中のmRNAの量を測定すること、

の工程を含んでなる、プライマーの対を用いて、少なくとも1つのイントロンを包含する遺伝子由来のmRNAの、テストサンプル中の存在を測定する方法。

【請求項23】

ハウスキーピングプライマー対の使用を更に含んでなる、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

請求項19～21に記載のプライマー又はプライマー対を含んでなる、診断キット。

【請求項25】

(a) 生体液から何れかの単核細胞を分離すること、

(b) 分離した単核細胞に、単核細胞によって発現される抗原に特異的に結合する抗体(又はその抗原結合断片)を接触させること(ここにおいて、抗体(又は断片)は固体担体に結合されており、この接触は、細胞、抗体(又は断片)及び固体担体の結合複合体を形成するのに十分である)、

(c) 結合していない物質の何れかから、複合体を分離すること、

(d) 複合体に結合している内皮単核細胞から、核酸を単離すること、

(e) 核酸増幅試薬、請求項19～21に記載のプライマー対及び核酸を包含する反応混合物を形成すること、

(f) 当該混合物を増幅条件下において、CK-19標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1つのコピーを生成すること、及び

(g) PCRを用いて、生体サンプル中のCK-19 mRNAを検出すること、の工程を含んでなる、生体サンプル中のCK-19 mRNAの存在を確定する方法。

【請求項26】

上皮単核細胞が、濾過又は遠心分離で分離される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

遠心分離工程が、Ficoll密度勾配法の使用を含んでなる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

抗体が、内皮単核細胞によって発現されるグリコプロテインに特異的に結合するモノクローナルである、請求項25～27に記載の方法。

【請求項29】

モノクローナル抗体が、Ber-EP4である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

固体担体が、免疫磁性ビーズである、請求項25～29に記載の方法。

【請求項31】

方法の工程(c)が、結合複合体に磁場を掛けて、結合していない物質の全てから複合体を分離することを含んでなる、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

プライマー対が、SEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:2で表される、請求項31～36に記載の方法。

【請求項33】

生体液が、末梢血である、請求項25～32に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/008097

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/17080 A (IMP CANCER RES TECH [GB]; SELBY PETER JOHN [GB]; BURCHILL SUSAN ANN [G] 6 June 1996 (1996-06-06) SEQ.ID.NO. 15 example 1; table 1 & DATABASE GENBANK 27 January 1997 (1997-01-27), "Cytokeratin 19 mRNA specific sense PCR primer" Database accession no. AAT31783 the whole document	1-39
X	WO 2005/068612 A2 (NOVAHEP AB [SE]; HOLGERSSON SUCHITRA [SE]) 28 July 2005 (2005-07-28) SEQ.ID.NO:1 example 1 -/--	1-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
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 document 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		*G* 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	Date of mailing of the international search report	
21 November 2006	12/12/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Madlener, Marianne	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/008097

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& DATABASE GE 6 October 2005 (2005-10-06), "Sense primer for PCR of human CK-1, SEQ ID NO:1" Database accession no. AEB31032 the whole document -----	
X	DATABASE GENBANK 26 February 2004 (2004-02-26), "Human cytokeratin 19-related R3 PCR primer - SEQ ID 379" XP002408339 Database accession no. ADF92291 the whole document & WO 03/097878 A (SYSMEX CORP [JP]; TADA SACHIYO [JP]; AKAI YASUMASA [JP]; IMURA YASUYUK) 27 November 2003 (2003-11-27) & EP 1 510 587 A (SYSMEX CORP [JP]) 2 March 2005 (2005-03-02) SEQ ID 379 claim 19 -----	1-39
Y	STATHOPOULOU ALIKI ET AL: "Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. 1 NOV 2003, vol. 9, no. 14, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 5145-5151, XP002407125 ISSN: 1078-0432 cited in the application the whole document -----	1-39
Y	STATHOPOULOU A ET AL: "Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. 15 AUG 2002, vol. 20, no. 16, 15 August 2002 (2002-08-15), pages 3404-3412, XP002407126 ISSN: 0732-183X cited in the application the whole document -----	1-39
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/008097

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XENIDIS N ET AL: "Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer." ANNALS OF ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY / ESMO. JUN 2003, vol. 14, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 849-855, XP002407127 ISSN: 0923-7534 the whole document	1-39
Y	AERTS J ET AL: "A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood." ANNALS OF ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY / ESMO. JAN 2001, vol. 12, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 39-46, XP009074839 ISSN: 0923-7534 the whole document	1-39
P,X	STATHOPOULOU ALIKI ET AL: "A highly specific real-time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. 1 OCT 2006, vol. 119, no. 7, 17 May 2006 (2006-05-17), pages 1654-1659, XP002407128 ISSN: 0020-7136 abstract; figure 1; table 1 page 1657 - page 1658	1-39
A	DATABASE GENBANK 26 February 2004 (2004-02-26), "Human cytokeratin 19-derived R1c DNA - SEQ ID 363" XP002408340 Database accession no. ADF92275 abstract & WO 03/097878 A (SYSMEX CORP [JP]; TADA SACHIYO [JP]; AKAI YASUMASA [JP]; IMURA YASUYUK) 27 November 2003 (2003-11-27) & EP 1 510 587 A (SYSMEX CORP [JP]) 2 March 2005 (2005-03-02) SEQ ID 363 claim 19	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/008097

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE GENBANK 26 February 2004 (2004-02-26), "Human cytokeratin 19-derived R1c DNA - SEQ ID 364" XP002408341 Database accession no. ADF92276 the whole document & WO 03/097878 A (SYSMEX CORP [JP]; TADA SACHIYO [JP]; AKAI YASUMASA [JP]; IMURA YASUYUK) 27 November 2003 (2003-11-27) & EP 1 510 587 A (SYSMEX CORP [JP]) 2 March 2005 (2005-03-02) SEQ ID NO 364 claim 19</p>	1-39
A	<p>DATABASE GENBANK 27 January 2005 (2005-01-27), "Human prophobilinogen deaminase (PBGD) gene, PCR primer #4" XP002408342 Database accession no. ADT93953 the whole document & US 2004/219534 A1 (BELLY ROBERT [US] ET AL) 4 November 2004 (2004-11-04) SEQ ID NO 9 example 3</p>	1-39
A	<p>DATABASE GENBANK 10 February 2005 (2005-02-10), "Intraoperative molecular diagnostic assay oligonucleotide #9" XP002408343 Database accession no. ADV66394 the whole document & CA 2 464 874 A1 (VERIDEX LLC [US]) 1 November 2004 (2004-11-01) SEQ ID NO 9</p>	1-39
A	<p>WERTHER K ET AL: "The use of the CELLection Kit® in the isolation of carcinoma cells from mononuclear cell suspensions" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 238, no. 1-2, April 2000 (2000-04), pages 133-141, XP004195469 ISSN: 0022-1759 the whole document</p>	1-39

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/008097

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GUO JUNMING ET AL: "Combined use of positive and negative immunomagnetic isolation followed by real-time RT-PCR for detection of the circulating tumor cells in patients with colorectal cancers" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (BERLIN), vol. 82, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 768-774, XP002407129 ISSN: 0946-2716 the whole document</p> <p>-----</p>	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/008097

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9617080	A	06-06-1996	NONE
WO 2005068612	A2	28-07-2005	AU 2005205240 A1 CA 2553303 A1 EP 1711597 A2 US 2006040386 A1
WO 03097878	A	27-11-2003	AU 2003234932 A1 CN 1656235 A EP 1510587 A1 US 2006094008 A1
EP 1510587	A	02-03-2005	AU 2003234932 A1 CN 1656235 A WO 03097878 A1 US 2006094008 A1
WO 03097878	A	27-11-2003	AU 2003234932 A1 CN 1656235 A EP 1510587 A1 US 2006094008 A1
EP 1510587	A	02-03-2005	AU 2003234932 A1 CN 1656235 A WO 03097878 A1 US 2006094008 A1
WO 03097878	A	27-11-2003	AU 2003234932 A1 CN 1656235 A EP 1510587 A1 US 2006094008 A1
EP 1510587	A	02-03-2005	AU 2003234932 A1 CN 1656235 A WO 03097878 A1 US 2006094008 A1
US 2004219534	A1	04-11-2004	AU 2004201841 A1 BR 0401650 A CA 2463716 A1 CN 1680422 A EP 1559784 A2 JP 2004329213 A KR 20040094649 A MX PA04004243 A
CA 2464874	A1	01-11-2004	AU 2004201842 A1 BR 0401651 A CN 1618987 A EP 1526187 A2 JP 2004344167 A KR 20040094650 A MX PA04004242 A

フロントページの続き

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

(72)発明者 マヴルディス, ディミトリス

ギリシャ共和国 ジーアール - 7 1 3 0 6 イラクリオン デモクラティアス 2 7

(72)発明者 ジオゴウリアス, ヴァシレイオス

ギリシャ共和国 ジーアール - 7 1 3 0 5 イラクリオン マグネシアス 1 2

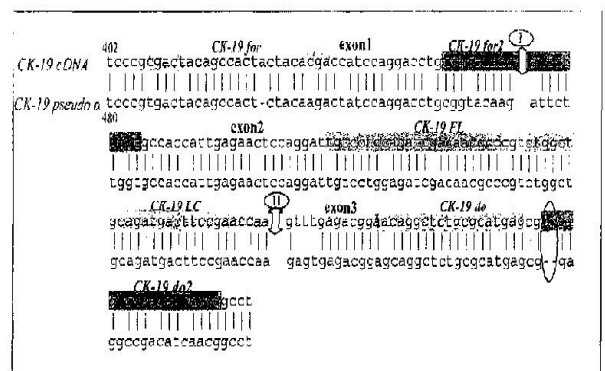
Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA02 CA09 HA12

4B063 QA19 QQ03 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QX02

专利名称(译)	用于确认CK19表达的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2009504168A	公开(公告)日	2009-02-05
申请号	JP2008526444	申请日	2006-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	MEDI-点击顺SA		
申请(专利权)人(译)	Medikushisu上课.二.		
[标]发明人	リアニドウエヴリクリア スタトプロウアリキ マヅルデイスディミトリス ジオゴウリアスヴァシレイオス		
发明人	リアニドウ,エヴリクリア スタトプロウ,アリキ マヅルデイス,ディミトリス ジオゴウリアス,ヴァシレイオス		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/158 C12Q2600/16 C12N15/09 C12Q1/6804 C12Q1/6876 C12Q2600/118		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.V G01N33/543.541.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX02		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	20050100430 2005-08-17 GR 60/795149 2006-04-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种定量测定生物样品中CK-19mRNA阳性细胞的方法。该方法可以用于例如外周血以检测患者的癌症。在某些实施方案中，该方法可用于在辅助治疗之前检测癌症，从而提供关于治疗效果的信息。本发明方法的实现灵敏，可靠且易于实现。点域1



CK-19 cDNA and CK-19 pseudo a gene sequence alignment and hybridization sites for primers and probes used in protocols A and B. Points 1 and 2 represent junctions between exons 1/2 and exons 2/3, respectively.