

(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2004-502466

(P2004-502466A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	4 B O 2 4
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	
G O 1 N 33/553	G O 1 N 33/53	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-509525 (P2002-509525)	(71) 出願人	502381184 シーメグ リミテッド イギリス国, バーミンガム, ビー13 9 エイチジェイ, モズレイ, メイフィールド ロード 22
(86) (22) 出願日	平成13年7月9日 (2001.7.9)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月10日 (2003.1.10)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003092	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02002/004672	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(87) 国際公開日	平成14年1月17日 (2002.1.17)	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治
(31) 優先権主張番号	0016742.9		
(32) 優先日	平成12年7月10日 (2000.7.10)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断方法

(57) 【要約】

母親由来のDNAを含む試料、例えば血液又は膺の試料中の胎児DNAの同定のための方法であって、(a)前記試料からDNAを単離し、(b)前記DNAの末端領域を除去することができるように酵素によるエキソヌクレアーゼ消化に前記DNAをかけ、そして(c)前記消化過程の結果として、胎児DNAに残っているが母親由来のDNAは存在していないDNA配列の存在を検出することを含んで成る方法。一度同定されると、胎児DNAは、例えば染色体/DNA異常、特に異数性、例えば胎児トリソミー21を検出するための診断にかけられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

母親由来の DNA を含む試料中の胎児 DNA の同定のための方法であって、(a) 前記試料から DNA を単離し、(b) 前記 DNA の末端領域を除去することができるように酵素によるエキソヌクLEASE 消化に前記 DNA をかけ、そして(c) 前記消化過程の結果として、胎児 DNA に残っているが母親由来の DNA は存在していない DNA 配列の存在を検出することを含んで成る方法。

【請求項 2】

前記母親由来の DNA を含む試料が血液又は腔の試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

予備的段階において、細胞が最初に母親由来の血漿から単離され、そして DNA が続いて段階(a)のこれらから単離される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

段階(a)由来の DNA が、制限酵素を用いて段階(b)の前にフラグメントへと切断される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

DNA フラグメントの切断末端が、エキソヌクLEASE 酵素による消化を受けないようにエキソヌクLEASE による消化の前に保護される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

DNA フラグメントを形成するために使用される制限酵素が、保護部分のための結合部位を提供するように切断し、そして保護がその保護部分のライゲーシオンによって達成される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

保護部分がアダプターである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

アダプターが 2'-O-メチルリボヌクレオチド DNA 又はホスホロチオネート連結を含む相補オリゴヌクレオチドである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

胎児 DNA が母親由来の DNA から単離される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

胎児 DNA フラグメントが、消化後に胎児 DNA 内に残っているテロメア DNA 配列に特異的なビオチン化プローブを、前記 DNA にハイブリダイズし、そしてその後前記プローブをストレプトアビジンで覆われた支持体に固定化することによって分離される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ストレプトアビジンで覆われた支持体が常磁性粒子を含んで成る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

胎児 DNA 内に残っている前記 DNA 配列がテロメア配列又はテロメア領域の近位に位置している染色体マーカーである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

胎児 DNA 内に残っている前記 DNA 配列がテロメア配列である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

胎児 DNA 内に残っている前記 DNA 配列がサブテロメア多型性染色体特異的マーカーである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 DNA 配列が、前記 DNA 配列に特異的な一次標識プローブを用いて検出される、請求項 1 ~ 14 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記標識が蛍光標識である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

エキソヌクレアーゼ酵素が B a l 3 1 である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

エキソヌクレアーゼによる消化が、第一段階において 3' 伸長 DNA が除去され、第二段階において 3' - 5' s s 領域が切除され、そして第三段階において s s 領域が消化される段階で達成される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

第一段階が M u n g b e a n ヌクレアーゼを用いて達成される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

第二段階がエキソヌクレアーゼ I I I を用いて達成される、請求項 18 又は請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

第三段階が M u n g b e a n ヌクレアーゼを用いて達成される、請求項 18 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

試料中の胎児起源の DNA の量が決定される、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

試料中の胎児 DNA が増幅される、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

増幅がポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いて達成される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

P C R が試料中の胎児 DNA の量を定量するために使用され、又は増幅された試料が遺伝子解析にかけられる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

同定された胎児 DNA が出生前診断にかけられる、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記診断が染色体異常を検出する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

段階 (c) の前に、DNA がサイズに応じて分離される、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

胎児起源であるとして同定され、分離された DNA が、特定の染色体又は DNA の診断領域に特異的な標識プライマーを用いて増幅される、請求項 25 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第二プライマーが蛍光標識を担持する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

胎児 DNA が、蛍光標識プライマーを用いて増幅され、そして増幅された配列が、染色体又は DNA の状態について診断されるものである、請求項 25 又は 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記プライマーが、第 18 染色体、第 21 染色体、第 13 染色体、X 染色体又は Y 染色体に特異的な配列を増幅する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

母親の症状の診断に使用される、請求項 25 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 34】

前記症状が、予定日前の陣痛の危険性の診断において、そして自己免疫疾患の後期発症において子癇前症である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

母親由来の血液又は臍の試料中の胎児 DNA を同定するためのキットであって、血液又は臍の試料から DNA を抽出するための手段、DNA を消化することができるエキソヌクレアーゼ酵素、及び DNA の末端領域に見られる特異的な DNA 配列を検出するのに適した標識プライマー、を含んで成るキット。

【請求項 36】

酵素消化から DNA フラグメントの切断末端を保護するのに適したアダプターのための、DNA 上の結合部位を作り出すように DNA を切断する制限酵素を更に含んで成る、請求項 35 に記載のキット。 10

【請求項 37】

酵素消化から DNA フラグメントの末端を保護するのに適したアダプターを更に含んで成る、請求項 35 に記載のキット。

【請求項 38】

ビオチン化テロメアプローブを更に含んで成る、請求項 34 ~ 37 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 39】

ストレプトアビジンでコーティングした常磁性粒子を更に含んで成る、請求項 38 に記載のキット。 20

【請求項 40】

染色体の状態の診断のための標識プライマーを含んで成る、請求項 34 ~ 39 に記載のキット。

【請求項 41】

実質的に本明細書に記載されている、母親由来の DNA を含む試料中の胎児 DNA の同定のための方法。

【請求項 42】

実質的に本明細書に記載されている、母親由来の DNA を含む試料中の胎児 DNA の同定のためのキット。 30

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、母親由来の試料、例えば血液又は臍の試料における胎児 DNA の同定のための方法に関する。この方法で同定された胎児 DNA は、例えば出生前の診断に使用され得る。

【0002】

染色体疾患はとりわけヒトにおける最も一般的な遺伝病である。体質性の染色体疾患は、妊娠の最初の三ヶ月の流産と関連した 50% 超の死亡率、そして約 5% の子宮内死又は周産期死亡に及ぶ。更に、少なくとも 0.5% の生産児が、精神的及び/又は肉体的障害と関連した体質的な染色体異常を有する。 40

【0003】

染色体異常は、数的なものでも構造的なものであってもよい。数的な異常は、身体の組織における 46 の二倍体の染色体数からの変化を意味しており、トリソミー（染色体が 1 つ過剰）、モノソミー（1 つ染色体を欠いている）及び倍数性（染色体の組み合わせ全てが過剰）を含む。染色体の破壊、それに続く、異なる位置における破壊された染色体の末端の治癒によって生じる構造的な再配列には、いわゆる転移、逆位及び挿入がある。構造的な再配列は平衡型で起こることがあり、この場合遺伝子材料は通常正常なものと同様のままである。

【0004】

平衡型の構造的な染色体の再配列の保因者は肉体的且つ精神的に正常であるが、受精率の 50

低下並びに染色体的に平衡でない子孫についての危険性の増大による生殖の問題に苦しむことがあり、このことは流産、出産の間の又は周産期の死亡並びに／あるいは肉体的及び／又は精神的な障害を有する生産児という結果に至る。

【0005】

ヒトの個体群において実際に起こる最も一般的な染色体異常は、トリソミー21であり、これはダウン症と関連している。一般的に、約1/650の生産児が、多かれ少なかれ深刻な精神運動性の発育の遅れを特徴とするトリソミー21のダウン症を有することが認められている。世界中の異なる国々において、トリソミー21のダウン症の発生率の実質的な差異は存在しない。

【0006】

子供及び大人におけるトリソミー21のダウン症の診断は、*in vitro*における血液性リンパ球の培養の後の染色体解析によって通常実施される。細胞培養の手順は、染色体が標準的な分染技術によるそれら個々の同定のために十分に凝縮される場合、標準的な染色体細胞周期の中期の細胞を十分蓄積させるために2～3日かかる。

【0007】

標準的なトリソミー21のダウン症を有する子供を持つことについて、唯一明確に文書化された臨床的な危険因子は、母体の年齢に関連している。このように、母体の年齢が進むにつれ、トリソミー21の子供を有する危険性が増大し、45歳超の最高年齢群においては妊娠の10%を超すこともあることは、一般に受け入れられている。この状況は、トリソミー21を有する子供を恐らく持つであろうものを同定する、妊娠女性の強制的なスクリーニングプログラムに至っている。これらのスクリーニングプログラムは、生化学的な特徴についての母体の血液試料の解析並びに、ダウン症及び幾つかの他の一般的な異数性を有する胎児において特徴的に増大する、首の皮膚の下の体液の蓄積を見ることを特に目的とする胎児の超音波検査法、を含む。

【0008】

尚、ある年齢、通常35歳以上の年齢の妊娠女性は、染色体解析のために胎児の細胞標本を採取する侵襲的な処置（絨毛膜標本採取及び／又は羊水穿刺）を習慣的に提案される。染色体疾患の出生前の診断を実施するための最も一般的な現在の方法は、羊水試料の*in vitro*での培養の後の染色体分析（*karyotyping*）に関するものである。これは、染色体が十分に凝集している有糸分裂細胞の顕微鏡解析を含む。細胞培養は約1～3週かかり、そして診断の長期の遅れは、親の多くの不安を伴うと認識される。

【0009】

更に迅速な出生前の染色体診断のための別の技術として、（1）培養していない羊水試料由来の静止（間期）細胞の蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）、及び（2）羊水試料から単離し、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）及びQ-PCR技術によって量が決定された染色体特異的プライマーによって増幅したDNAを用いるDNA診断、がある。

【0010】

腹水試料を用いる、染色体疾患のための出生前診断についてのこれら2つの代替法は、報告が、試料が研究室に到着したその日又は次の日のうちに素速く発表されうることを暗示しうる。これまで、それらは最も一般的な染色体異常、すなわちトリソミー21、13、18及び性染色体の異数性、の迅速な診断に限定されていた。

【0011】

いずれにしても、侵襲的な方法、例えば羊水穿刺及び絨毛膜標本採取は、母親にとって不安だけでなく、約1～1.5%の流産の危険性の増大を伴う。従って、その様な侵襲的な標本採取方法に頼ることなく出生前の診断を行う更に効果的な方法を提供する必要性が存在している。

【0012】

あまり侵襲的でない方法を用いて、妊娠している母親から得られた試料は、一般的に、1/10,000～1/10,000,000の次数で、比較的少数の胎児細胞と一緒に大

10

20

30

40

50

量の母体細胞を含む。胎児細胞の単離のための現時点での方法には、抗体の使用、勾配分画法、優先的な母親由来の細胞の溶解、磁気活性細胞分離 (MACS)、磁石による磁気流体 (ferrofluid) の懸濁、個々の細胞の顕微操作、チャージドフローセパレーション (charged flow separation) 及び蛍光活性細胞分離 (FACS) がある。しかしながら、母親由来の細胞は、なおも回収された任意な胎児細胞を圧倒する傾向にある。更に、これらの技術の多くは時間がかかり、且つ労働者に厳しい。

【0013】

母親由来の血液試料、特に血漿又は血清が比較的大量の胎児DNAを含むことがごく最近になって認識されてきた (Lo et al., Lancet 1997, 350, 485-487, WO 98/39474)。更に、この胎児DNAが、PCRの様な技術による *in vitro* での増幅の後、胎児特異的配列に関連して同定され得ることも証明されてきた。この技術は、Y染色体特異的プライマーによる胎児の性別の診断及び他の条件、例えば異常ヘモグロビン症の診断のための複数の機会に適用されており、ここでの出生前の診断は胎児DNAの特異的な変異に基づいている。

10

【0014】

尚、胎児染色体の異常、例えばトリソミー21が、上文で例示したような胎児特異的プライマーを用いて、正常な状態と比較した場合に、母親由来の血清/血漿中での胎児DNAの増大と関連することが証明されている。更に、妊娠における合併症、例えば子癇前症及び予定日前の陣痛及び自己免疫疾患の分娩後の発生も、胎児母体輸血によって特徴づけられることがあり、これは母親由来の血液中に高レベルの胎児細胞をもたらす (reviews in Pertland Bianchi Semin Perinatol 23, 5, 393-402, 1999; Bianchi Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 92, 1, 103-8, 2000)。

20

【0015】

胎児特異的DNAプライマー (例えば雄性的胎児のY染色体特異的プライマー) によって確かめられた胎児DNAの量は、胎児の染色体の異数性についての危険性が増大している妊娠の検出についてのスクリーニング方法として使用されることがある。しかしながら、最も重大なことに、胎児の異数性は前記方法だけでは診断することができなかった。このように、これらの方法は、胎児が正常であるか又は異数性であるかを決定するために、胎児DNA間の差異を測定するのに十分な感度でない。これらの試験がもたらす様々な結果の例は以下の図1に例示する。図1aにおいて、胎児は正常であり、そして母親由来の対立遺伝子に相当する2つのピークが存在している。これらのうちの一方 (M2) は、他方のもの (M1) よりも大きく、そして胎児のDNA (F) に由来する追加量のDNAが存在している。このサイズは、父親起源の胎児対立遺伝子 (F-Pat) に由来するピークと同一である。

30

【0016】

図1bにおいて、胎児は、母親由来の対立遺伝子M1及びM2のそれぞれの上にFの1つのコピーと、それに加えて父系起源の1つのコピー (F-Pat) を持つトリソミー21を有する。これは、(a) で例示されている正常な状況と比較して、対立遺伝子M1とM2との間の、蛍光の差異を減少させる。図1cにおいて、胎児は、母親由来の対立遺伝子M2上にFの2つのコピーと、それに加えて父系起源の1つのコピー (F-Pat) を持つトリソミー21を有する。これは、図1aに例示した正常な状況と比較して対立遺伝子M1とM2との間の蛍光の差異を増大させる。最後に、図1dにおいて、胎児は父親起源のF-Patの2つのコピーを持つトリソミー21を有する。これは、母性対立遺伝子M1とM2に由来する蛍光に差異を与えないが、父親由来の対立遺伝子の蛍光は重複している。その様な結果は解釈することが非常に困難であり、そして我々が知っている限り、トリソミー21 (又は任意な他の異数性) の出生前診断が、母親由来の血液又は臍の試料を用いてこの様に診断されたことについて文書化されたものは存在していない。

40

【0017】

それ故に、母親由来のDNA含有試料、例えば血液又は臍の試料中の胎児DNAを同定す

50

るための新規方法であって、非侵襲的な出生前診断の新規方法を含んで成るものについての急を要する必要性が存在している。

【0018】

染色体の末端をキャップする反復DNA配列を構成するテロメアが、若い人が高齢の人よりも多くの反復を有するというように変化することは周知である。DNAの複製はテロメア反復の本当の末端で起こらないと考えられる。このことは、各細胞分割で、テロメアが以前よりも短くなることを意味している。また、この短縮が最終的には細胞死を導くと考えられている。

【0019】

全てのヒト染色体のテロメアが同一のDNAコアリピートTTAGGGを含む。個体の年齢に伴うテロメアの長さの変化は、全ての染色体上で観察される一般的な現象である。個体の年齢に依存して、テロメアの反復の長さにおける変化はDNAの4~200kb程度であると推定される。 10

【0020】

染色体特異的なテロメアの長さは、特別なソフトウェア並びに、テロメアプローブ又は市販のペプチド核酸プローブ(PNA, DAKO Ltd)とハイブリダイズした染色体の顕微鏡画像解析を用いて測定され得る。これらの研究は、個々の染色体のテロメア含量において、個々の細胞核間に多少の変化があり得ることを示唆している。それにも関わらず、既に言及したように、対象者の年齢と共にテロメアの長さの実質的な減少が存在している。 20

【0021】

これに基づくと、胎児細胞内の個々の染色体のテロメアの長さは新生児のものより長く、そして成人のものより遙かに長いはずである。従って、胎児細胞が、母親由来の細胞よりも長いテロメア、すなわち染色体当たりテロメアDNA反復のより多くのコピー数を有することが潜在している(Butler et al., Cancer Genetics and Cytogenetics 105, 138-144, 1998; Krejci and Koch, Chromosoma 107, 198-203, 1998)。

【0022】

出願人は、この特性が、母親由来のDNA含有試料、例えば血液(血漿又は血清を含む)又は臍の試料中に存在する母親由来のDNAと胎児DNAの間の、特にDNAの差異についての基礎として使用され得ることを見出した。 30

【0023】

このように、本発明により、母親由来のDNA含有試料中の胎児DNAの同定のための方法であって、(a)前記試料からDNAを単離し、(b)前記DNAの末端領域を除去するような酵素によってエキソヌクレアーゼによる消化に前記DNAをかけ、そして(c)前記消化過程の結果として、胎児DNAにはあるが、母親由来のDNAにはないDNA配列の存在を検出すること、を含んで成る方法が提供される。

【0024】

段階(a)及び(b)は任意な順序で実施され得る。例えば、DNAは最初に細胞から単離され、そして次に段階(b)に従う酵素消化にかけられる。しかし、あるいは消化が細胞内で直接達成され、そして消化されたDNAが、段階(c)での解析のために、例えばPCR増幅によってそれらから単離されることもある。 40

【0025】

適当な場合には、母親由来のDNA含有試料は血液又は臍の試料である。好ましくは、前記方法は母親由来の血液試料を用いて実施される。「血液試料」の表現は、本明細書で使用される場合、全血、あるいはそれらに由来する血清又は血漿を包含する。

【0026】

特に好ましい態様において、細胞は最初に母親由来の血漿から単離され、そしてDNAが、前記過程の段階(a)として、あるいは、適切な場合には段階(b)の間又はその後、これらから抽出される。極少量の材料が利用可能である場合に有利な、その様なDNA増 50

幅の例は、例えば Findlay et al Mol Pathol 51 (3), 164-167, 1998, Klein et al Proc Natl Acad Sci USA 96 (8), 4494-4499, 1999 に記載されている。

【0027】

しかしながら、本発明が他の出生前試料の型、例えば羊水の解析に便宜的に利用される場合もあり得る。一般に、羊水試料は比較的少ない母親由来のDNAを含み、そして胎児DNAの同定は困難ではない。しかしながら、ある場合には、当該試料は母親由来の血液が混入しており、そして、例えばQ-PCR法を用いて解析した場合、蛍光パターンを複雑にする。予備的段階として本発明の方法を用いるその様な試料からの胎児DNAの単離は有用であると思われる。

10

【0028】

DNAは、常用の方法を用いて試料から単離され得る。好ましくは、長いDNAフラグメントの単離をもたらす技術が適用される。その様な方法の例は、Heiskanen et al., Biotechniques 17, 5, 928-929; 9320933, 1994 に記載されているアガロースプラグの使用である。

【0029】

1つの態様において、段階(a)由来のDNAは、制限酵素を用いて、段階(b)の前にフラグメントへと切断される。この様に、エキソヌクLEASEによる消化はDNAフラグメントの末端領域を除去する(以下の図2を参照のこと)。[しかしながら、このことは常に必要であるわけではなく、特に、血漿から単離された細胞がそれ自身直接的にエキソヌクLEASEによる消化にかけられ、そして生じたDNAが解析前にPCRによって増幅される場合には必要ではない]

20

【0030】

特に好ましい態様において、DNAの切断末端は、エキソヌクLEASEによる消化にかけられる前に、それらがエキソヌクLEASE酵素、例えばBal31による消化を受けにくくなるように保護される。このことは、DNAの末端領域由来のフラグメントの消化が、テロメア領域から内側への一方向であることを意味する。近位末端は、フラグメントがDNAの内部領域に由来するように、消化から保護される。その結果、消化はテロメア領域においてのみ起こる(以下の図3を参照のこと)。

【0031】

適当な場合には、DNAフラグメントを形成するために使用される制限酵素は、保護部分、例えばアダプターのために結合部位を提供するように切断するものである。続いて、保護は適当なアダプターのライゲーションによって達成され得る。適当なアダプターは、2'-O-メチルリボヌクレオチドDNA (Mukai et al. Nucleic Acid Research Symposium Series 19, 1998) 又は相補的オリゴヌクレオチド含有ホスホロチオネート連結であってもよい。

30

【0032】

段階(c)で検出され得る胎児DNAに残っている適当なDNA配列は、テロメア配列又はテロメア領域近くに位置する染色体マーカーであり、そして最も好ましくはサブテロメア配列、特に特異的な染色体に対して独特なものである。

40

【0033】

段階(c)の検出は、任意な既知の技術によって達成されうる。しかし、好ましい態様において、胎児DNAは、磁気分離技術を用いて単離され、そして精製される。これが達成され得る特定の方法は、テロメアに特異的なプローブとしてビオチン化したプライマーの使用を包含する。プライマーのハイブリダイゼーションは、胎児DNAが、ストレプトアビジンでコーティングされた常磁性粒子(PMP)又はビーズを用いて磁氣的に単離され得るビオチン標識を有することを意味する(例えば図4を参照のこと)。

【0034】

本発明の方法に関連して、プライマーがプローブとして機能するために使用され得る場合がしばしば存在する。当業者にとって、これが適用される場合は明確であろう。このよう

50

に、用語「プライマー」は、本明細書で使用する場合、プローブ機能を有することがある配列、及び増幅反応のために常用のプライマーとして使用される配列を言及するものとして理解されるべきである。

【0035】

一度この方法で単離されてから、DNAフラグメントは解析されうる。必要に応じて、それらは最初に増幅にかけられることもある。この方法で得られた純粋な、増幅された胎児DNAは、非侵襲的な出生前の遺伝子解析及び診断における広範に適用されうる。特に、例えばApplied Biosystems DNAシーケンサー及びGenescan softwareによる、例えば蛍光Q-PCR法、並びにPyrosequencing及びMicroarraysを含む様な他の方法を用いて定量的な解析を実施することが好ましいことがある。これらの方法の多くが現在完全に自動化され始めている。

10

【0036】

事実上、本発明は、母親由来のDNA含有試料中の胎児DNAの同定を基礎として、胎児DNAと母親由来のDNAの、テロメア反復の数の差異を使用する。段階(b)の間、DNAであって、好ましくはフラグメント、そして最も好ましくは長いフラグメントの形態のものが、好ましくは切断末端の保護の後に、テロメアの末端領域から内側へと一定方向に消化される。

【0037】

試料中に存在する全染色体のテロメア領域は、最初にこの過程の間に消化される。エキソヌクレアーゼによる消化は、少なくとも全ての母親由来のテロメアDNA配列を排除するのに十分な期間実施され得る。

20

【0038】

消化がこの時点で停止する場合、いくつかの胎児DNAフラグメントはいくつかのテロメアDNAを保持する(図3a)。このDNAは、例えば、結果として胎児DNAにのみハイブリダイズし得るプライマー、テロメアDNAに特異的な標識プライマーを用いて検出可能なものである。

【0039】

しかしながら、消化は、サブテロメア配列が母親由来のDNAの全てのフラグメントから除去される様に続けられ得る(図3b)。この場合、より長い胎児テロメアの消化がより長期間かかるので、いくつかの染色体特異的DNAが胎児DNAのフラグメントの相当部位に残り、そしてその結果、例えば結果としてマーカーとして働くそのDNAのためのプライマーを用いて検出可能となる。当該プライマーは、これらの環境の下では母親由来のDNAとハイブリダイズしない。

30

【0040】

好ましくは、検出に使用されるプライマーは、可視的な標識、例えば蛍光標識で標識される。

【0041】

段階(c)で検出された配列が染色体マーカーである場合、当該マーカーがそれ自身出生前の診断において直ちに有用なものとなりうる可能性があるため、それがサブテロメア多型性染色体マーカーであることが好ましいと思われる。

40

【0042】

いずれにせよ、胎児DNAの同定は、同定されたDNAの出生前診断に対する予備的な段階として使用され得る。

【0043】

特に別の態様において、消化後に試料中に存在するDNAは、前記DNA配列、例えばテロメア配列及び/又はサブテロメア配列に特異的な最初の標識DNAプライマーを用いて増幅される。最も好ましくは、最初のプライマーは視覚的な標識、特に蛍光標識で標識され、そして増幅された試料由来の蛍光が検出される。

【0044】

エキソヌクレアーゼ消化を行うのに適した酵素としてBal31がある。更に制御可能な

50

工程を保証するために、前記DNAの特異的な領域のみを消化する酵素を使用することが好ましい。特に、消化は3つの段階で達成され、ここで、第一段階において3'伸長DNAが除去され、第二段階において3'-5' ss領域が切除され、そして第三段階において、ss領域が消化される。第一及び第三段階を達成するのに適した酵素として、mung beanヌクレアーゼがあり、そして第二段階に適した酵素として、エキソヌクレアーゼIIIがある。

【0045】

母親由来のDNAと胎児DNAの間の識別を可能にする信頼性のある消化を提供するために必要とされる条件、例えば酵素濃度、緩衝液系、インキュベーションの温度と時間は慎重な選択を必要とし、そして使用される特定の酵素の様な因子に依存する。

10

【0046】

異なるDNA末端間のテロメアDNA配列反復の数の変更の結果として、好ましくは染色体特異的に酵素系を最初に「較正(calibrate)」することが望ましい。この型の較正は、様々な条件のもと単離されたDNAのエキソヌクレアーゼによるテロメアの消化結果を解析することによって達成されうる。

【0047】

特定の酵素系を較正する別の手段は、母親由来及び胎児の組織試料中の個々の染色体末端のテロメアの長さについての基準となる情報を得ることである。これは、細胞周期の中期のテロメアDNA配列の蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)を用いて行われうる。この段階において、各染色体末端にある個々のテロメアは、テロメア特異的プローブと共に、サブテロメアDNAプローブを組み合わせるFISHを用いて強調される。テロメア配列の測定は、Comparative Genomic Hybridization(CGH)ソフトウェアプログラムを用いる、顕微鏡映像解析によって実施され得る。

20

【0048】

臍帯穿刺術にかけられた胎児由来の血液試料及び出産時に得られる臍帯血試料も、母親由来及び胎児の組織試料中の各染色体の腕についての、テロメアDNA配列の長さにおける正常な変化についての基準となる追加情報を得る観点で利用されうる。

【0049】

母親由来のDNA由来のサブテロメアマーカを排除するために必要とされる酵素濃度及び曝露時間の条件は、同様の方法で決定されうる。この例において、例えば、DNA産物のサブテロメアマーカのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる増幅は、構成的な母親由来のDNA対立遺伝子と胎児DNA対立遺伝子とを識別するために実施され得る。この実験は、適用した各酵素消化条件によるサブテロメア配列の除去の速度に対する基本的な情報を提供する。

30

【0050】

好ましいサブテロメアマーカとして、例えばスモールタンデムリピート(STR)又はマイクロサテライトがある。この目的のために、それらは、エキソヌクレアーゼ消化によるそれらの消失速度の評価のために、且つ構成的母親由来のDNAと胎児DNAとの間の識別のためにのみ使用されるので、それらは多型性マーカであっても、そうでなくてもよい。

40

【0051】

しかしながら、多型性診断マーカは、当該解析が引き続き出生前診断に使用される場合に好ましいと思われる。第21染色体特異的多型性4塩基反復マーカの例は、D21S11、D21S1412、D21S1411及びD21S1414である。2塩基反復であるIFNARも、多くの他のより小さな反復マーカと比較して単純な増幅パターンを示し、これは断続的な(stutter)バンドを伴うことがある。多型性マーカの他の例として一塩基多型(SNP)があり、これはヒトゲノムにおいて非常に高頻度で起こり、そして同定されているものが現在増大している。

【0052】

50

この場合、胎児マーカーの濃度が、例えば定量的PCR法、例えばTAQMAN(商標)を用いて引き続いて決定され得る。この情報は、あるDNA配列の量だけが胎児と母親との間で異なるような胎児の状態の出生前診断において有用なことがある。染色体に独特な胎児DNAの量の信頼性のある定量は、母親由来の血液試料を用いて、異数性、例えばトリソミー21のダウン症を含む一般的な胎児の状態の非侵襲的な出生前診断に必要とされる。

【0053】

好ましい選択肢において、問題のサブテロメアマーカーは、各染色体の腕の中において、染色体に独特なDNA配列間で出来る限り離れて位置するべきである。これらのマーカーは、研究される個体群における多型の位置及び程度に関して各染色体末端別々にあらかじめ選択される。

10

【0054】

適当な場合には、選択されるDNAマーカーは、染色体特異的な独特のDNAを含む、サブテロメアがある染色体の位置に戦略的に局在化される。これらの局在は、2つの主な理由から好ましい。

【0055】

最初に、テロメア付近に局在化されているが、なおも独特な染色体特異的なDNAを含むマーカーは、母親由来の更に近位で中間にあるDNAを選択的に排除するのに必要とされる消化と比較して、わずかに限定されたエキソヌクラーゼ消化が要求されるように、消化手順を容易にする。これは、一方向の消化が上述の様に保証される場合に特に有用である。

20

【0056】

次に、多型性サブテロメア染色体/DNAマーカーの使用は、数的な染色体異常(例えばトリソミー)だけでなく、不均衡な構造的染色体再配列、例えば不均衡な転位の定量も可能にする。不均衡な転位は、あるサブテロメアマーカーについての遺伝子量の重複として、別のサブテロメアマーカーについての遺伝子量の欠失と一緒に、染色体の転位への関与に依存して同定され得る。更に、他の比較的一般的な染色体異常は、この方法で同定されるはずである。これらは、余分なマーカー染色体、例えば胎児iso 12p, 又はiso 18pを含み、これは共に深刻な胎児の奇形と関連しており、正常な状況に対して余分な二重の遺伝子量をもたらす。

30

【0057】

特別なエキソヌクラーゼ的な手順が、余分な染色体マーカー、例えば15 inv dupの診断に必要とされ得るのは、これが15pテロメアDNA配列の2つの余分な遺伝量に関与するためである。その様なテロメア配列の重複自身は、胎児の発育に関して有害ではないが、第15染色体特異的なDNAも含む、q腕の近位部分に位置するマーカーは、深刻なものと考えられ得る、胎児の精神運動性の発育の遅れと関連している。

【0058】

出生前の胎児の診断において使用されるサブテロメアマーカーの適当な選択によって、胎児の発育障害を導く染色体異常の大部分が、この方法を用いて決定されうる。サブテロメアDNAマーカーのみを利用する当該方法を用いて検出され得ないわずかな染色体異常は、予想外の、更に近位の(中間部の)欠失及び重複であり、それ故にそれらの正確な位置は決定することができない。特別に改良した本方法が、言及した欠失及び重複を診断するのに必要とされ、期待されるのは、どちらかの親が保因者であるためである。

40

【0059】

本発明の方法を用いて一度同定されると、胎児DNAは、例えば染色体異常、例えば異数性、ダウン症、エドワード症候群又はクラインフェルター症候群の存在あるいは他の情報、例えば胎児の性別を決定するために、出生前診断にかけられ得る。

【0060】

適当な場合には、DNAは、例えば磁気分離法を用いて、解析前に分離される。特に、DNAは標識プライマー、例えば特異的なビオチン化プライマーを用いて増幅される。テロ

50

メアプライマーがこの時点で使用される場合、テロメア含有、すなわち胎児DNAフラグメントのみが測定され、そして標識され、全ての相当する母親由来のDNAが消化の間に排除されたことが確認される。

【0061】

前記DNAフラグメントは、例えば、ストレプトアビジンでコーティングした常磁性粒子又はビーズを用いて捕捉されうる。上清から磁気粒子を分離した後、標的DNAは粒子の溶出によって放出されうる(図4)。

【0062】

一度分離されると、前記DNAは、特定の染色体又はDNAの診断領域に特異的な標識プライマーを用いて、当該プライマーが試料中でDNAを増幅する条件下で増幅されうる。従って、胎児起源であるとして同定されたDNAにおけるこのプライマーの検出は、その胎児についての情報を提供する。第二プライマーが第18、第21又は第13染色体、あるいはX染色体又はY染色体に特異的である場合、特定の目的に依存してそれは有用であると思われる。これらの染色体の染色体数の異常(異数性)は、最も一般的である。

10

【0063】

本発明の特に好ましい態様において、DNAは母親由来の血液試料から、例えば、母親由来の血漿中の細胞から単離され、制限酵素でフラグメント化され、そしてアダプターにライゲーションされる。修飾されたフラグメントは、エキソヌクレアーゼ酵素、例えばBal31と共に、母親由来のテロメアを完全に消化するが、幾つかの胎児テロメアDNAを残すのに十分な期間インキュベートされる。テロメア含有(胎児)DNAの更なる精製は、ビオチン化テロメアプローブ又はプローブとして使用されるテロメアプライマー及びストレプトアビジン常磁性粒子(PMP)を用いる磁気的な分離によって達成され得る(図4)。

20

【0064】

単離されたテロメア含有(胎児)DNAフラグメントは次に、PCRのような方法によって、染色体特異的プライマーを用いて増幅される。その後、例えばDNAシーケンサー及びGenescanソフトウェア(Applied Biosystems)を利用するO-PCRのような蛍光法、リアルタイムPCR及びPyrosequencingを用いる解析が実施される。

【0065】

更に、特に母親由来の試料中の胎児DNA濃度の程度に関連する、本発明の方法を用いて得ることができる情報は、出生前スクリーニング/診断並びに母体の各種状態の診断において有用であると思われる。これらは、妊娠の合併症、例えば子癇前症、予定日前の陣痛の予測、及び自己免疫疾患の後期発症を含む。

30

【0066】

本発明の更なる観点に従い、母親由来のDNA含有試料中の胎児DNAを同定するためのキットであって、DNA含有試料、DNAの末端領域を消化することができるエキソヌクレアーゼ酵素、及びDNAの末端領域にみられる特異的なDNA配列を検出するための標識プライマーからDNAを単離するための手段を含んで成るキットが提供される。

【0067】

当該キットは、上述の方法を実施するために必要とされる1又は複数の追加の試薬又は商品を含んでもよい。特に、当該キットは、更に、アダプターのためのDNA上に結合部位を作り出すようにDNAを切断する制限酵素を、酵素消化からDNAフラグメントの切断末端を保護するのに適したアダプターと一緒に含んで成っていてもよい。

40

【0068】

前記方法に依存して当該アッセイは実施され、ビオチン化プライマー及び特にビオチン化テロメアプライマー並びにストレプトアビジン常磁性粒子も含まれることがある。

【0069】

他の可能性のあるキットの構成要素としては、1又は複数の追加の標識プライマー、例えば異なる蛍光で標識されたプライマーがあり、これは染色体の状態の診断に用いられる。

50

【0070】

本発明は、添付図面に関連した例によって特に説明される。

【0071】

例 1段階 1DNA 抽出

5 ml の母親由来の血液が、1 つは EDTA を含んだ、2 つのチューブのそれぞれに入れられた。血液試料は 3000 g で遠心され、そして血清が、EDTA 含有チューブ、そして何も含まないチューブから、それぞれきれいなチューブへと慎重に除去された。血漿及び血清試料は再び 3000 g で遠心され、そして上清はきれいなチューブへと移された。

10

【0072】

DNA は、製造者の推奨に従い、Qiagen の QIAmp Blood キットを用いて血漿及び血清から抽出された。

【0073】

段階 2)アダプター付着部位を提供するための制限酵素消化

抽出された DNA は、Not I のような酵素により、標準的な制限酵素消化プロトコールを用いて消化される。

【0074】

段階 3)エキソヌクレアーゼ酵素 (例えば Bal 31) による消化から DNA フラグメントの近位末端を保護するための DNA 鋳型とアダプターのライゲーシオン

このアプローチは、Bal 31 ヌクレアーゼを用いる一方向からの DNA 欠失に関する (Mukai S., Shibahara S., Morisawa H. Nucleic Acids Research Symposium Series no. 19, 1998)。その原理は、7 bp の 2' - O - メチルリボヌクレオチド - DNA キメラアダプターがより大きな安定性を築き、そして更に立体障害に起因してヌクレアーゼの攻撃を防ぐという事実に基づいている。従って、DNA フラグメント上の Not I 部位へのライゲーシオンは一方の末端のみに由来する消化を可能にする。

20

【0075】

DNA とアダプターは、リガーゼ及び緩衝液と一緒に 15 で一晩インキュベートされる。

30

【0076】

段階 4)エキソヌクレアーゼ酵素、例えば Bal 31 によるライゲーシオンされた DNA 鋳型とアダプターの消化

DNA 1 µg 当たり 1 ユニットの Bal 31 は、30 で 20 分以上の期間、均一な欠失のラダー (> 1 kb) を生成するために使用された。当該反応は、50 mM の終濃度まで EDTA を添加することによって停止した (図 3)。DNA は、Bal 31 の反応から高い NaCl 濃度を除去するためにエタノール沈殿された。濃度及び曝露のタイミングの変更は、各染色体数を数えるために最適化される。最適化された状況において、全ての母親由来のテロメア配列が消化され、一方、胎児テロメア DNA 配列のいくつかが残る (図 3a)。このことは、本質的に母親由来の DNA フラグメントと胎児 DNA フラグメントの識別を可能にする。

40

【0077】

伸長された消化は、染色体特異的プライマー部位に相当する DNA 配列を除去し (図 3b)、これは、Q-PCR 後に、胎児 DNA のポジティブな同定及び各染色体数を数えることを可能にする。

【0078】

段階 5)

50

ビオチン化テロメアプローブを用いる胎児DNAの磁気的精製

DNAフラグメントは、65 で10分間DNAを加熱し、ビオチン化プライマーを添加し、そしてその溶液を室温にまで冷却することによって、溶液中でビオチン化テロメアDNAプライマーとハイブリダイズされる。その後、ストレプトアビジン常磁性粒子(SA-PMP)を0.5 x SSCで洗浄する。アニーリングしたDNAフラグメントとビオチン化テロメアプライマーを加え、そして室温で10分間インキュベートする。ビオチン化プライマーと結合したSA-PMPは、磁気スタンドを用いて捕捉され、そして上清が慎重に除去される。粒子は、0.1 x SSCで4回洗浄される。テロメアポジティブな(胎児の)フラグメントは、脱イオン水中で最後のSA-PMP粒子を再懸濁することによって溶出される。

【0079】

段階6)染色体特異的多型性マーカーを用いるQ-PCR

定量的PCRは、我々の刊行物、Verma et al., The Lancet 352, 9-12, 1998に記載のような、標準的な方法を用いて実施された。

【0080】

例2

本発明の方法を用いて解析を行うためのプロトコールを以下のスキーム1に例示する。

【0081】

段階1パーコールグラジエント上での血液試料の調製

血液試料はパーコールグラジエント上で調製され、そして血漿を除く。血漿細胞は、不連続パーコールグラジエントのための改良した標準的なプロトコールを用いる遠心によって回収される(例えばVan Wijke et al. Clinical Chemistry 46, 5, 729-731, 2000を参照のこと)。

【0082】

特に、それぞれ3mlの40%、45%及び50%のパーコール溶液(Amersham Pharmacia)/PBSのそれぞれにつき、チューブが調製される。3mlのEDTA血液は、15mlのポリスチロールチューブ(Sarstedt, Rother 15mlチューブ、カタログ番号62.553.042)において3mlのPBSと混合される。3mlの40%パーコールは、5mlのシリンジに結合したカニユーレ(B. Braun, Filter Straw, カタログ番号415020)を用いて下層として導入される。カニユーレのチップは血液を通過させるチューブの底に据えられ、そしてパーコール溶液が徐々に排出される。同一のカニユーレを用いて、下層での過程は45%及び50%のパーコールを用いてそれぞれ二回繰り返される。それぞれの場合において、カニユーレのチップはチューブの底に据えられ、そしてグラジエントを乱さないように排出が慎重に行われる。

【0083】

通常、3~4のチューブが、試験中に各試料のためにこの方法で調製される。調製されたチューブは、続いて500gで、18~20 で30分間遠心される(遠心ブレーキを用いない)。

【0084】

この後、当該チューブを取り出し、そして血漿(頂上)層を抽出し、そしてきれいなチューブの中に入れる。同一の試料に由来する、異なるチューブ由来の血漿は、各チューブ中に約6mlの液体が存在することを保証するために一緒に添加されうる。これは、再び500gで20分間遠心され、この際にはブレーキを用いた。生じた細胞のペレットは、続いて6mlのPBS中で2~3回洗浄される。

【0085】

段階2高分子量DNAの抽出

10

20

30

40

50

血漿細胞¹を、P B V S中で $50 \mu\text{l}^2$ 当たり 2×10^5 個の細胞となるよう再懸濁した。等量のアガロース溶液(1.9% Nu Sieve GTG)を、 1×10^5 個の細胞を含む細胞懸濁物に加える。 $50 \mu\text{l}$ を型に分配し、そして静置する。アガロースプラグを続いて0.5 M E D T A , p H 8 . 0 , 1 % N - ラウリルサルコシン、2 mg / ml プロテイナーゼK中で24 ~ 72時間、50 で処理する(しかし、O / Nインキュベーションは、我々の以下の適用にとって十分であることもある)。この処理は細胞を消化し、後の段階での酵素膜の貫通を可能にする。当該アガロースプラグは、続いて水の中で洗浄され、そして、酵素処理に影響を及ぼし得るあらゆる残りのプロテイナーゼKを完全に不活性化するためにP M S F (プロテアーゼ阻害剤)中で50 でインキュベートされる。

10

【0086】

注意：

1. 3 mlの血液は $\sim 2 \times 10^3$ 個の血漿細胞を含む。

2. 1×10^5 個の細胞 = $1 \mu\text{l}$ DNA

血漿DNAはフェノール：クロロホルム(1:1)で抽出され、エタノール沈殿され、70%エタノール中で二回洗浄され、そして水の中で慎重に再懸濁される。

【0087】

段階3 .

ヌクレアーゼ耐性アダプターのライゲーション

この手順は、アダプターのライゲーションが不必要である場合、アガロースプラグ中に存在するDNAによって影響を受ける唯一の段階であるので省略することが出来る。Bal 31消化とPCR反応は共にアガロースプラグによって影響を受けないであろう。当該プロトコルは、アルコール溶解性のオリゴ糖中にアガロースを溶解させ、これにより、当該DNAは、DNAを損傷することなく、又は剪断することなく更に利用しやすいものとなる。アガロースプラグは溶解され、そして等量の50xバッファーが1Uの - アガラーゼと一緒に添加され、45 で60分間インキュベートされる。残りのオリゴ糖及び - アガラーゼはその後の酵素反応を妨害しない。

20

【0088】

アダプターのライゲーションのために、DNAは、ヒトゲノム内でそれぞれ670 kb及び310 kb毎に切断するAsc I又はNot Iの様なレアカッターで切断されなければならない。これは、ライゲーションするためのアダプターにとって適合可能な末端を作り出し、テロメアとマーカーとの間の制限部位は、これらの酵素がこの領域間を切断しないことを保証するように検討されなければならない。

30

【0089】

10Uの酵素を含む $100 \mu\text{l}$ の1x制限緩衝液中でアガロースプラグを平衡化し、2時間インキュベートし、そして次に水ですすぐ。

【0090】

ホスホロチオネート連結を含む相補的なオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ消化に対する耐性のあるアダプターを作り出すためにアニーリングされる。それらは、DNA試料を開裂するために使用される制限エンドヌクレアーゼと相補的な粘着末端も含む。これらのアダプターは、1xライゲーションバッファー、5Uリガーゼの添加によってライゲーションされ、そして37 で2時間いんきゅべーとされる。

40

【0091】

段階4 .

テロメア末端のBal 31ヌクレアーゼ消化

高分子量DNAを含むアガロースプラグは、50Uの酵素(NEBL)を含む1mlの1x Bal 31バッファー中、氷上で30分間平衡化される。消化は、反応液を30 に据え、各時点、すなわち0, 30, 60, 90及び120分でプラグを除去し、そして1mlの氷冷したTE中に据えることによって達成される。Bal 31は、氷冷した水の中でプラグを30分間すすぐことによって除去される。Bal 31は、PCRの加熱変性

50

段階の間に完全に不活性化されるはずである。より長いテロメアを有する胎児DNAの識別を可能にするため、要求されるDNAの長さを除去するために必要な消化時間を確立する時間が最初に採用される。

【0092】

段階5

QF-PCRによる多型性マーカーの増幅

多型性マーカーは、標準的な技術を用いてQF-PCRによって増幅される(例えば、Verma et al., Lancet, 352, 9-12, 1998; Pertl et al., Amer. J. Obstet. Gynecol. 177, 4, 899-906を参照のこと)。

10

【0093】

X22マーカー(テロメアから~300kbのものは、この方法で増幅されうる特定のマーカーであるが、他のテロメア多型性マーカーも特定の診断目的に依存して選択され得る。例えば、chr14 D14S1419及びD14S1420上の2つの高度に多型性のあるマーカーは、テロメアから~210kb及び95kbに位置する。

【0094】

例3: 本発明の方法を用いる胎児トリソミー21ダウン症の非侵襲的な出生前診断

例3A

1. 妊娠及び血液試料

12mlの血液が、Local Ethical Committeeの倫理的な承認を受けたインフォームドコンセントの書面に従い、12週の妊娠期間にある妊娠女性から静脈穿刺によって2エドト酸(EDTA)チューブに抜き出された。

20

【0095】

2. 核区分及び血漿からの細胞の単離

核区分由来の有核細胞及び血漿由来のものは共に、記載通りのプロトコール(Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R. - D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp401-415)に従い、Triple Density Gradientを若干改良して用いて母親由来の血液から単離された。

30

【0096】

12mlのEDTA血液を12mlのリン酸バッファー溶液(PBS)に添加し、そしてチューブを反転させることによって混合する。6mlの血液/PBS混合物を4つの15mlポリスチロールチューブ内でピペティングする。パーコール(商標)(Amersham Pharmacia)の3つの層が下層となり、3mlの45%、そして3mlの50%パーコールが続く。懸濁液は、続いて500gで30分間遠心される。血漿層及びリンパ球層が除去され、そしてきれいなチューブに移され、そして再び500gで10分間遠心される。細胞のペレットはPBS中で洗浄され、そして5µlのプロテイナーゼK溶液(400mg/lプロテイナーゼK、20mmol/lジチオスレイトール、1.7µmol/lドデシル硫酸ナトリウム、10mmol/lトリスバッファー、50mmol/l塩化カリウム)を含むマイクロチューブに移される。

40

【0097】

3. 高分子量DNAの抽出

血漿細胞は、PBVS中で、50µl当たり 2×10^6 個の細胞となるように再懸濁される。等量のアガロース溶液(1.9% NuSieve GTG)を、 1×10^5 個の細胞を含む細胞懸濁物に加える。50µlを型に分配し、そして静置する。アガロースプラグを続いて0.5M EDTA, pH 8.0, 1% N-ラウリルサルコシン、2mg/mlプロテイナーゼK中で24~72時間、50°Cで処理する。当該アガロースプラグは、続いて水の中で洗浄され、そして、酵素処理に影響を及ぼし得るあらゆる残りのプロテイナーゼKを完全に不活性化するためにPMSF(プロテアーゼ阻害剤)中で50°Cでインキ

50

ュベートされる。

4. ヌクレアーゼ耐性アダプターのライゲーション

アガロースプラグは溶解され、そして等量の50×バッファーが1Uの - アガラーゼと一緒に添加され、45 で60分間インキュベートされる。アガロースプラグは、10Uの酵素を含む100μlの1×制限バッファー中で平衡化され、2時間インキュベートされ、続いて水ですすぐられる。

【0098】

これらのアダプターは、続いて1×ライゲーションバッファー、5Uリガーゼの添加によってライゲーションされ、そして37 で2時間インキュベートされる。

【0099】

5. テロメア末端のBa131ヌクレアーゼ消化

高分子量DNAを含むアガロースプラグは、5Uの酵素(NEBL)を含む1mlの1×Ba131バッファー中、氷上で30分間平衡化される。消化は、反応液を30 に据え、各時点、すなわち0, 30, 60, 90及び120分でプラグを除去し、そして1mlの氷冷したTE中に据えることによって達成される。Ba131は、氷冷した水の中でプラグを30分間すすぐことによって除去される。

【0100】

6. QF-PCRによる多型性マーカーの増幅

マルチプレックス蛍光PCRアッセイが、D21S1411及びD21S1446のためのプライマーを用いる慣習的な技術(例えば、Pertlet al 1997 Am. J. Obstet. Gynecol. 177, 899-906を参照のこと)によって適用される。各上流プライマーは、PCR産物の視覚化及び解析を可能にする蛍光色素で標識される(5'末端)。最初の変性後、95 で48秒間、60 で48秒間、そして72 で1分間のサイクルを24回、続いて72 で15分間の伸長を実施する。

【0101】

7. 解析

対立遺伝子フラグメントは6%変性ポリアクリルアミドゲル上で分離され、そしてApplied Biosystems (Warrington) 373 DNAシーケンサー上で、Genescan 672ソフトウェアを実行して解析される。増幅産物はサイズが決定され、そしてエレクトロフェログラム上で見られるピーク面積に基づきそれらの蛍光強度を算出する。解析は、(a)母親由来の血液試料のリンパ球に直接由来するDNA、(b)酵素消化後の同一の細胞型に由来するDNA、及び(c)酵素消化後の母親由来の試料(胎児細胞を豊富に含むことが予想されるもの)の血漿成分中の細胞に由来するDNA、を用いて実施される。

【0102】

8. 結果

(a)母親由来の血液試料のリンパ球のDNAのPCR産物から得られるエレクトロフェログラムは、2つのプライマーD21S1411及びD21S1446のそれぞれについて、2つの等しいサイズを有するピークが発生していることを示す。この結果は正常な雌性から予想されるものである。

【0103】

(b)2ユニットのBa131を用いる20分間の酵素的なエキソヌクレアーゼ消化の後、母親由来の血液試料由来のリンパ球のDNAのPCR産物から得られたエレクトロフェログラムは、最も遠位のマーカーD21S1446についてのシグナルが存在せず、一方、2つの等しいサイズのシグナルが近位のマーカーD21S1411に関する位置で見られることを示す。

【0104】

このことは、酵素消化のためのこれらの条件が、母親由来のDNAと胎児DNAとを識別する我々の目的にとって最適であることを示唆する。

【0105】

10

20

30

40

50

(c)(b)と同一の条件下での酵素消化の後の、母親由来の血漿中の細胞のDNAから得られたエレクトロフェログラムは、近位マーカーD21S1411については不明瞭なシグナルを示すが、遠位マーカーD21S1446については3つのはっきりとしたシグナルを示す。

【0106】

この結果は、まず最初に、テロメアDNA配列が全体的に除去されたことを示唆する(母親由来のDNA及び胎児DNA両方)。第二に、近位マーカーD21S1411のDNA配列の不明瞭なシグナルは、母親由来のDNAと胎児DNAの混合物によって生じるものと解される。第三に、我々は遠位マーカーD21S1446の3つの明確なシグナル(これらのうちの1つは、母体の血液試料のリンパ球に由来するDNAのエレクトロフェログラムに見られたものと同一ではない場所に位置する)は胎児のものであり、そして胎児がトリソミー21を有する事を示していると結論づけている。

10

【0107】

9. 要約

この例は、テロメアDNA及びサブテロメアDNA配列の酵素消化の後の、母親由来の血液試料のDNA解析によって第21染色体の数を普通に数えることができ、それにより胎児のトリソミー21ダウン症を同定することが可能であることを例示している。当該方法は、研究室に当該血液試料が到着したその日のうちに結果が得られる迅速なものである。更に、実質的な自動化が可能である。

【0108】

例3B

1. 妊娠及び血液試料

12mlの血液が、Local Ethical Committeeの倫理的な承認を受けたインフォームドコンセントの書面に従い、12週の妊娠期間にある妊娠女性から静脈穿刺によって2エドト酸(EDTA)チューブに抜き出された。

【0109】

2. 核区分及び血漿からの細胞の単離

核区分由来の有核細胞及び血漿由来のものは共に、記載通りのプロトコール(Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R. - D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp401-415)に従い、Triple Density Gradientを若干改良して用いて母体の血液から単離された。

30

【0110】

12mlのEDTA血液を12mlのリン酸バッファー溶液(PBS)に添加し、そしてチューブを反転させることによって混合する。6mlの血液/PBS混合物を4つの15mlポリスチロールチューブ内でピペッティングする。パーコール(商標)(Amersham Pharmacia)の3つの層が下層となり、3mlの45%、そして3mlの50%パーコールが続く。懸濁液は、続いて500gで30分間遠心される。血漿層及びリンパ球層が除去され、そしてきれいなチューブに移され、そして再び500gで10分間遠心される。細胞のペレットはPBS中で洗浄され、そして5µlのプロテイナーゼK溶液(400mg/lプロテイナーゼK、20mmol/lジチオスレイトール、1.7µmol/lドデシル硫酸ナトリウム、10mmol/lトリスバッファー、50mmol/l塩化カリウム)を含むマイクロチューブに移される。

40

【0111】

3. エキソヌクレアーゼ酵素による消化

DNA 1µg当たり1ユニットのBal31は、30 で20分以上の期間、均一な欠失のラダー(>1kb)を生成するために使用された。当該反応は、50mMの終濃度までEDTAを添加することによって停止した。

【0112】

酵素消化は、胎児DNAと母親由来のDNAとの間の識別を可能にするDNA配列の最適

50

な除去に必要とされる濃度及び時間を較正するために、リンパ球のDNAで最初に実施される。この場合に選択されるプライマーは、テロメアDNA配列TTAGGGのためのプライマーと組み合わせられた、21q22.3に位置するD21S1446及びD21S1411である(但し、D21S1411はD21S1446に対して近位に位置する)。

【0113】

母親由来のシグナルと胎児シグナルを識別するための至適な条件が、母親由来の血液試料(主に母親由来の細胞)のリンパ球のDNAにおけるテロメア+マーカーD21S1446の除去のために設定された。これは、段階4及び5に記載したように評価した。母親由来の血漿(胎児細胞を豊富に含む母親由来の細胞の混合物)から単離した細胞の酵素消化は、これらの立証された最適条件のもとBal31に曝露された。

10

【0114】

4. マルチプレックスPCR

マルチプレックス蛍光PCRアッセイが、D21S1411及びD21S1446のためのプライマーを用いる慣習的な技術(例えば、Pertl et al 1997 Am. J. Obstet. Gynecol. 177, 899-906を参照のこと)によって適用される。各上流プライマーは、PCR産物の視覚化及び解析を可能にする蛍光色素で標識される(5'末端)。最初の変性後、95で48秒間、60で48秒間、そして72で1分間のサイクルを24回、続いて72で15分間の伸長を実施する。

20

【0115】

5. 解析

対立遺伝子フラグメントは6%変性ポリアクリルアミドゲル上で分離され、そしてApplied Biosystems (Warrington) 373 DNAシーケンサー上で、Genescan 672ソフトウェアを実行して解析される。増幅産物はサイズが決定され、そしてエレクトロフェログラム上で見られるピーク面積に基づきそれらの蛍光強度を算出する。解析は、(a)母親由来の血液試料のリンパ球に直接由来するDNA、(b)酵素消化後の同一の細胞型に由来するDNA、及び(c)酵素消化後の母親由来の試料(胎児細胞を豊富に含むことが予想されるもの)の血漿成分中の細胞に由来するDNA、を用いて実施される。

30

【0116】

6. 結果

(a)母親由来の血液試料のリンパ球のDNAのPCR産物から得られるエレクトロフェログラムは、2つのプライマーD21S1411及びD21S1446のそれぞれについて、2つの等しいサイズを有するピークが発生していることを示す。この結果は正常な雌性から予想されるものである。

【0117】

(b)2ユニットのBal31を用いる20分間の酵素的なエキソヌクレアーゼ消化の後、母性の血液試料由来のリンパ球のDNAのPCR産物から得られたエレクトロフェログラムは、最も遠位のマーカーD21S1446についてのシグナルが存在せず、一方、2つの等しいサイズのシグナルが近位のマーカーD21S1411に関する位置で見られることを示す。

40

【0118】

このことは、酵素消化のためのこれらの条件が、母親由来のDNAと胎児DNAとを識別する我々の目的にとって最適であることを示唆する。

【0119】

(c)(b)と同一の条件下での酵素消化の後の、母親由来の血漿中の細胞のDNAから得られたエレクトロフェログラムは、近位マーカーD21S1411については不明瞭なシグナルを示すが、遠位マーカーD21S1446については3つのはっきりとしたシグナルを示す。

【0120】

50

この結果は、まず最初に、テロメアDNA配列が全体的に除去されたことを示唆する（母親由来のDNA及び胎児DNA両方）。第二に、近位マーカーD21S1411のDNA配列の不明瞭なシグナルは、母親由来のDNAと胎児DNAの混合物によって生じるものと解される。第三に、我々は遠位マーカーD21S1446の3つの明確なシグナル（これらのうちの1つは、母親由来の血液試料のリンパ球に由来するDNAのエレクトロフェログラムに見られたものと同一ではない場所に位置する）は胎児のものであり、そして胎児がトリソミー21を有する事を示していると結論づけている。

【0121】

要約

この例は、テロメアDNA及びサブテロメアDNA配列の酵素消化の後の、母親由来の血液試料のDNA解析によって第21染色体の数を普通に数えることができ、それにより胎児のトリソミー21ダウン症を同定することが可能であることを例示している。この例において、DNAはほとんど分解されず、そしてそれ故にアダプターの適用無しに診断的な解析を実施することが可能であった。例3Aのように、当該方法は、研究室に当該血液試料が到着したその日のうちに結果が得られる迅速なものであり、そして実質的な自動化が可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、常用の方法を用いて実施された、(a)胎児が正常である母親由来の血液、並びに(b)、(c)及び(d)胎児がトリソミー21を有する母親由来の血液試料から抽出されたDNAのGenescan解析の比較例を示す。

20

【図2】

図2は、Ba131のような、DNAフラグメントのエキソヌクレアーゼによる消化を図式的に例示し、ここで、フラグメントは両末端で消化されるが、胎児配列(F)と比較して少ない、母親由来の配列(M)のテロメア配列が存在し、そしてそれにより胎児DNAを同定することができるが、MとFの間の蛍光マーカーシグナルの差異は、これが示した通りに位置している場合には起こり得ない。

【図3】

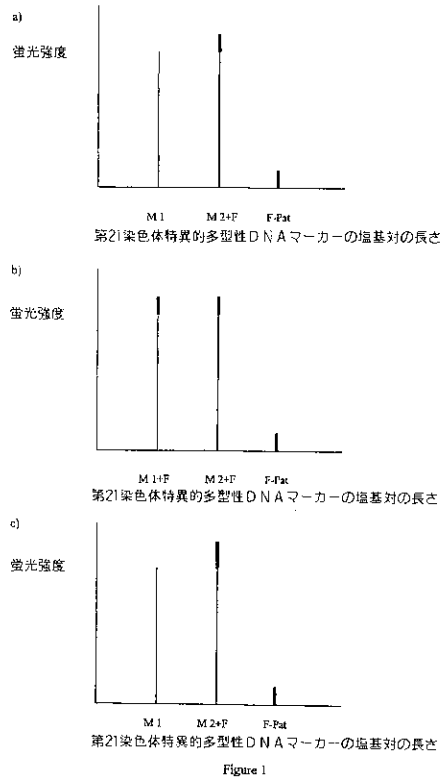
図3は、本発明の好ましい態様に従い、アダプターを用いるDNAフラグメントの一方向性のエキソヌクレアーゼ消化を図式的に例示し、ここで、最適な時間経過において、当該酵素は全てのMテロメア配列(図3a)、そして更にはM蛍光マーカーシグナル(図3b)を排除する。その様な系は、例えばQ-PCRによるDNA増幅後に関係するF染色体数を数えることを可能にするF蛍光シグナルの選択的な保持によりMとFのフラグメントの識別を可能にする。

30

【図4】

図4は、ビオチン化テロメアプローブを用いる胎児DNAの磁気的精製を図式的に例示する。

【 図 1 】



【 図 1 (続き) 】

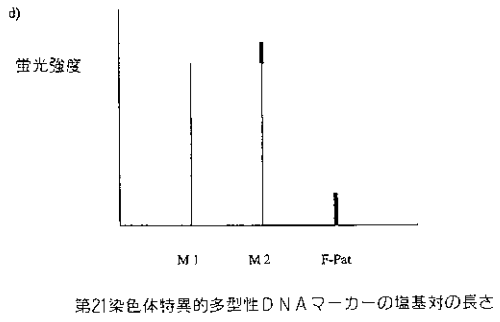


Figure 1 (続き)

【 図 2 】

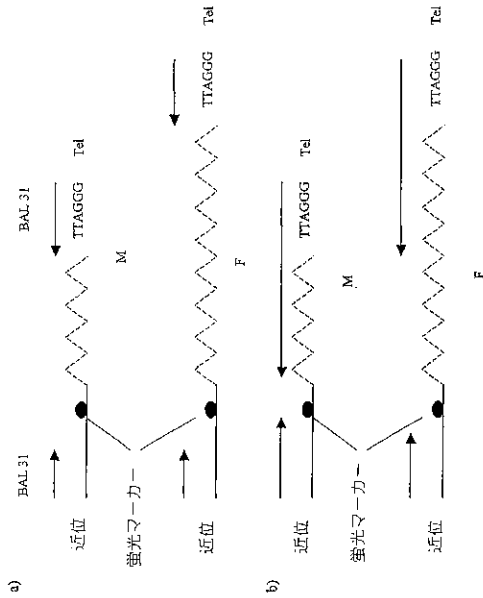


Figure 2

【 図 3 】

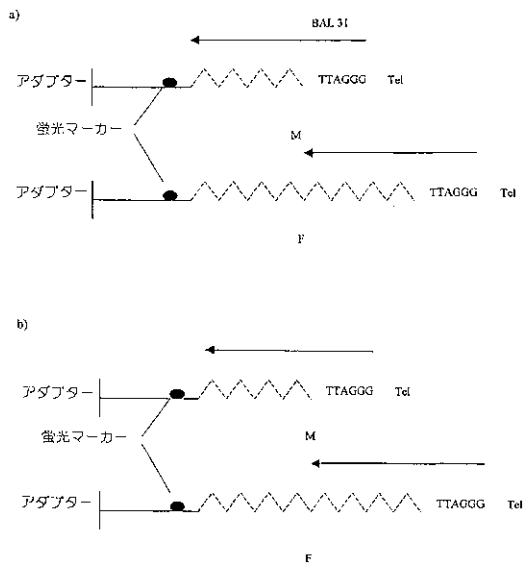


Figure 3

【 図 4 】

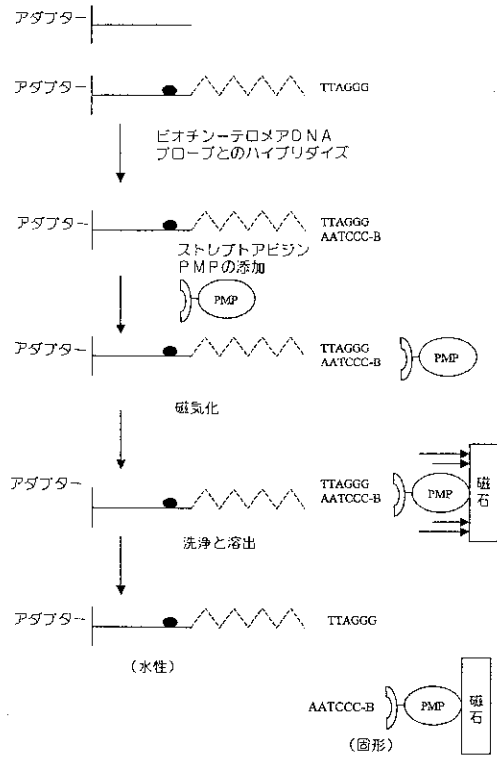


Figure 4

【 図 5 】

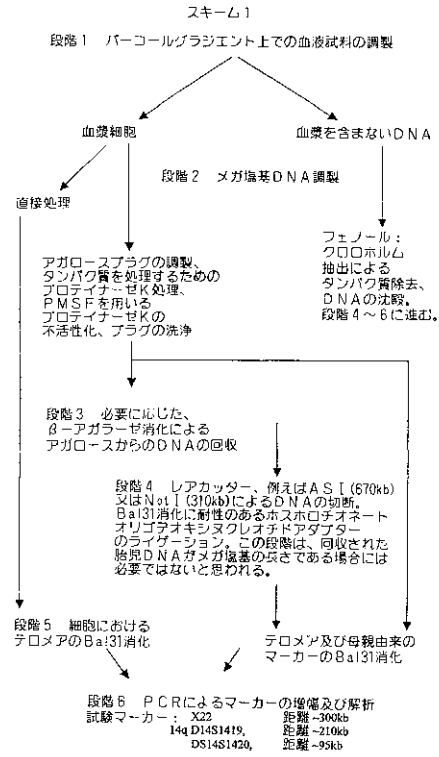


Figure 5

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/04672 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
 - (21) International Application Number: PCT/GB01/0092
 - (22) International Filing Date: 9 July 2001 (09.07.2001)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data: 00(6742.9) 10 July 2000 (10.07.2000) GB
 - (71) Applicant (for all designated States except US): SIMERG LIMITED [GB/GB]; 22 Mayfield Road, Moseley, Birmingham B13 9HJ (GB).
 - (72) Inventor; and
 - (75) Inventor/Applicant (for US only): HULTEN, Maj, Anita [SE/SE]; 22 Mayfield Road, Moseley, Birmingham B13 9HJ (GB).
 - (74) Agents: GREAVES, Carol, Pauline et al., Greaves Brewster, 24A Woodborough Road, Wincoburn, North Somerset BS25 1AD (GB).
 - (81) Designated States (individual): AP, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 - (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette*



WO 02/04672 A2

- (54) Title: DIAGNOSTIC METHOD
- (57) Abstract: A method for the identification of foetal DNA in a maternal DNA-containing sample such as a blood or vaginal sample, said method comprising (a) isolating DNA from said sample, (b) subjecting said DNA to exonuclease digestion by an enzyme so as to remove end regions of each DNA molecule, and (c) detecting the presence of a DNA sequence remaining in foetal DNA but absent from maternal DNA as a result of said digestion process. Once identified, the foetal DNA can be subject to diagnosis for example to detect chromosomal/DNA abnormalities, including in particular aneuploides such as foetal trisomy 21.

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

1

Diagnostic method

The present invention relates to a method for the identification of foetal DNA, in a maternal sample such as a blood or vaginal sample. Foetal DNA identified in this way can then be used, for instance, in pre-natal diagnosis.

Chromosome disorders are among the most common genetic disease in humans. Constitutional chromosome disorders range in incidence from more than 50% of the lethality associated with miscarriage during the first trimester of pregnancy as well as around 5% of intrauterine or perinatal deaths. In addition at least 0.5% of liveborn children have a constitutional chromosome abnormality associated with mental and/or physical disability.

Chromosome abnormalities may be either numerical or structural. Numerical abnormalities, implying a change from the normal diploid chromosome number of 46 in somatic tissues include trisomies (one extra chromosome), monosomies (one chromosome missing) and polyploidy (whole extra set of chromosomes). Structural rearrangements, caused by chromosome breakage followed by healing of the broken chromosome ends in aberrant positions, include so called translocations, inversions and insertions. Structural chromosome rearrangements can occur in balanced form, in which case the genetic material usually remains the same as normal.

Carriers of balanced structural chromosome rearrangement are physically and mentally normal but may suffer reproductive problems with an increased risk for reduced fertility as well as an increased risk for chromosomally unbalanced offspring, leading to miscarriage, intra-or perinatal death and/or liveborn children with physical and/or mental disability.

35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

2

The most common chromosome abnormality occurring as an entity in the human population is trisomy 21, associated with Down Syndrome. It is generally accepted that around 1/650 liveborn children has trisomy 21 Down Syndrome characterised by more or less severe psychomotor development delay. There is no substantial difference in the incidence of trisomy 21 Down Syndrome in different countries world-wide.

The diagnosis of trisomy 21 Down Syndrome in child- and adulthood is usually performed by chromosome analysis following in vitro culture of blood lymphocytes. The cell culture procedure takes 2-3 days to allow accumulation of enough cells in the metaphase stage of the cell cycle, when chromosomes are sufficiently condensed for their individual identification by standard chromosome banding technology.

The only clearly documented clinical risk factor for having a child with regular trisomy 21 Down Syndrome concerns maternal age. Thus it is generally accepted that there is an increasing risk for having a trisomy 21 child with advancing maternal age, which in the highest age group of more than 45 years may be over 10% of pregnancies. This situation has led to intensive screening programmes of pregnant women to identify those that are most likely to be carrying a child with trisomy 21. These screening programmes include analysis of maternal blood samples for biochemical characteristics as well as ultrasonography of the foetus with the aim especially to look at the accumulation of fluid under the skin of the neck, which is characteristically increased in foetuses with Down Syndrome and some other common aneuploidies.

In addition pregnant women over a certain age, usually 35 years, are routinely offered invasive procedures (chorionic villus sampling and/or amniocentesis) to allow foetal cell sampling for chromosome analysis. The most common current method for performing prenatal diagnosis of chromosome

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

3

disorders concerns karyotyping, following in vitro culture of amniotic fluid samples. This involves microscopy analysis of mitotic cells, where chromosomes are sufficiently condensed. Cell cultures occupy around 1-3 weeks, and the long delay in diagnosis is recognised as being associated with much parental anxiety.

Alternative technologies for more rapid prenatal chromosome diagnosis include (1) fluorescence in situ hybridisation (FISH) of resting (interphase) cell nuclei from uncultured amniotic fluid samples, and (2) DNA diagnosis using DNA isolated from amniotic fluid samples, amplified by for example the polymerase chain reaction (PCR) and quantity of chromosome-specific primers determined by Q-PCR techniques.

These two alternatives for prenatal diagnosis for chromosome disorders, using amniotic fluid samples, may imply that reports can be issued rapidly, within the same or the following day after the sample has arrived in the laboratory. So far they have been limited to the rapid diagnosis of the most common chromosome abnormalities, i.e. those involving trisomies 21, 13, 18 and sex chromosome aneuploidy.

In any case, invasive methods such as amniocentesis and chorionic villus sampling, as well as being uncomfortable for the mother, are associated with an increased risk of miscarriage of around 1-1.5%. There is a need therefore to provide a more efficient way of carrying out pre-natal diagnosis without resorting to such invasive sampling methods.

Samples obtained using less invasive methods from the pregnant mother will commonly contain a vast majority of maternal cells with a relatively small number of foetal cells, in the order of 1 per 10,000 to 1 per 10 million. Current methods for foetal cell isolation include the use of antibodies, gradient fractionation, preferential maternal cell lysis, magnetic

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

4

activated cell sorting (MACS), ferrofluid suspension with magnet, micromanipulation of individual cells, charged flow separation and fluorescence activated cell sorting (FACS). However, maternal cells still tend to dominate any foetal cells recovered. In addition, many of these techniques are time consuming and labour intensive.

It has more recently been recognised that maternal blood samples, in particular plasma or serum contain relatively large amounts of foetal DNA (Lo et al., Lancet 1997, 350, 485-487, WO 98/39474). It has further been demonstrated that this foetal DNA, following in vitro amplification by techniques such as PCR may be identified with respect to foetus-specific sequences. This technology has been applied on several occasions for diagnosis of foetal sex by Y-chromosome specific primers, and other conditions such as Haemoglobinopathies, where prenatal diagnosis is based on specific mutations in foetal DNA.

In addition it has been shown that foetal chromosome abnormalities such as trisomy 21 is associated with an increase in foetal DNA in maternal serum/plasma in comparison to the normal situation using foetal-specific primers as exemplified above. Furthermore complications in pregnancy such as pre-eclampsia and preterm labour and the post partum development of autoimmune disease, may also be characterised by increased fetomaternal transfusion, leading to higher levels of fetal cells in maternal blood (reviews in Ferti and Bianchi Semin Perinatol 23, 5, 393-402, 1999; Bianchi Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 92, 1, 103-8, 2000).

It has been concluded that the amount of foetal DNA, ascertained by foetal-specific DNA primers, (such as Y-chromosome specific primers in male foetuses) may be used as a screening method for the detection of pregnancies, where there is an increased risk for foetal chromosome aneuploidy. Most importantly however, it has not been possible to diagnose

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

5

foetal aneuploidy per se by said methods. Thus these methods are not sensitive enough to measure the difference between foetal DNA, to determine whether the foetus is normal or aneuploid. Examples of the sorts of results these tests give are illustrated in Figure 1 hereinafter. In Figure 1a, the foetus is normal and there are two peaks corresponding to the maternal alleles. One of these (M2) is larger than the other (M1) and there is an additional amount of DNA originating from the foetal DNA (F). The size of this is the same as the peak originating from the foetal allele of paternal origin (F-Pat).

In Figure 1b, the foetus has trisomy 21 with one copy of F on each of the maternal alleles M1 and M2, plus one copy of paternal origin (F-Pat). This will reduce the difference in fluorescence between the alleles M1 and M2 in comparison to the normal situation illustrated in (a). In Figure 1c, the foetus has trisomy 21 with two copies of F on maternal allele M2, plus one copy of paternal origin (F-Pat). This increases the difference in fluorescence between the alleles M1 and M2 in comparison to the normal situation illustrated in Figure 1a. Finally in Figure 1d, the foetus has trisomy 21 with 2 copies of paternal origin F-Pat. This makes no difference to the fluorescence from the maternal alleles M1 and M2, but the fluorescence of the paternal allele is doubled. Such results are very difficult to interpret, and there is to our knowledge no documented case where prenatal diagnosis of trisomy 21 (or any other aneuploidy) has been diagnosed in this way, using a maternal blood or vaginal sample.

There is therefore an urgent need for new methods to identify foetal DNA in a maternal DNA-containing sample such as a blood or vaginal sample, comprising a novel way of non-invasive prenatal diagnosis.

It is well known that the telomeres, constituting repeated DNA sequences that cap the ends of chromosomes, vary such that

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

6

young people have a higher number of the repeats than older people. It is thought that DNA replication is not taking place at the very ends of the telomere repeats. This means that, at each cell division, the telomeres become shorter than before.

5 It is also thought that this shortening eventually leads to cell death.

Telomeres of all human chromosomes contain the same DNA core repeat TTAGGG. The variation in telomere length with age of
10 the individual is a general phenomenon observed on all the chromosomes. Depending upon the age of the individual, variation in repeat length of telomeres is estimated to be in the order of 4-200 Kb of DNA.

15 Chromosome-specific telomere lengths can be measured using special software and microscopy image analysis of chromosomes hybridised with telomeric probes or commercially available peptide nucleic acid probes (PNA, DAKO Ltd). These investigations indicate that there may be some variation
20 between individual cell nuclei in the telomere content of individual chromosomes. Nevertheless, as already mentioned, there is a substantial decrease in telomere length with the age of the subject.

25 On this basis, the telomere length of individual chromosomes in foetal cells should be longer than in the newborn child, and longer still than in the adult. It is implicit therefore that foetal cells have longer telomeres, i.e. a higher copy number per chromosomes of the telomere DNA repeats, than cells from
30 the mother (Butler et al., Cancer Genetics and Cytogenetics 105, 138-144, 1998; Kreji and Koch, Chromosoma 107, 198-203, 1998).

The applicants have found that this characteristic can be used
35 as a basis for differentiation between maternal and foetal DNA,

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

7

in particular DNA, present in a maternal DNA-containing sample such as a blood (including plasma or serum) or vaginal sample.

Thus according to the present invention there is provided a method for the identification of foetal DNA in a maternal DNA-containing sample, said method comprising (a) isolating DNA from said sample, (b) subjecting said DNA to exonucleolytic digestion by an enzyme so as to remove end regions of said DNA, and (c) detecting the presence of a DNA sequence remaining in foetal DNA but absent from maternal DNA as a result of said digestion process.

Steps (a) and (b) may be conducted in any order. For example, DNA is first isolated from the cells and then subject to enzymatic digestion in accordance with step (b). However, alternatively, the digestion may be effected directly in cells, and digested DNA isolated for example by PCR amplification therefrom for analysis in step (c).

Suitably the maternal DNA-containing sample is a blood or vaginal sample. Preferably, the method is carried out using a maternal blood sample. The expression "blood sample" as used herein encompasses whole blood, or serum or plasma derived therefrom.

In a particularly preferred embodiment, cells are first separated from maternal plasma and DNA extracted from these as step (a), or if appropriate during or after step (b), of the process. Examples of such DNA amplification, which is advantageous when only a small amount of material is available, are described for instance in Findlay et al Mol Pathol 51 (3), 164-167, 1998, Klein et al Proc Natl Acad Sci U S A 96 (8), 4494-4499, 1999.

However there may be cases where the invention is conveniently employed in the analysis of other prenatal sample types such as

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

8

amniotic fluid. Generally amniotic fluid samples contain relatively little maternal DNA and identification of foetal DNA is not difficult. On some occasions however, the samples are contaminated with maternal blood, and give complicated fluorescence patterns when analysed for example using the Q-PCR method. Isolation of foetal DNA from such samples using a method of the invention as a preliminary step might be useful.

DNA may be isolated from the sample using conventional methods. Preferably techniques are employed which result in the isolation of long DNA fragments. An example of such a method is the use of agarose plugs as described by Heiskanen et al., *Biotechniques* 17, 5, 928-929; 9326933, 1994.

In one embodiment, the DNA from step (a) is cut using a restriction enzyme into fragments prior to step (b). Thus the exonucleolytic digestion removes terminal regions of the DNA fragments (See Figure 2 hereinafter). [However, this may not always be necessary, in particular where cells isolated from plasma are themselves directly subject to exonucleic digestion, and the resultant DNA amplified by PCR prior to analysis.]

In a particularly preferred embodiment, cut ends of the DNA fragments are protected prior to the exonucleolytic digestion so that they are not susceptible to digestion by exonucleolytic enzymes such as Bal31. This will mean that the digestion of fragments derived from the terminal regions of the DNA will be unidirectional, from the telomere region inwards. The proximal end will be protected from digestion, as will fragments derived from internal regions of the DNA. As a result, digestion will take place only in the telomere region (See Figure 3 hereinafter).

Suitably, the restriction enzyme used to form the DNA fragments is one which cuts so as to provide binding sites for a protecting moiety, such as an adaptor. Protection can then be

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

9

effected by ligation of a suitable adaptor. A suitable adaptor may be 2'-O-methyl ribonucleotide DNA (Kukai et al. Nucleic Acid Research Symposium Series 19, 1998) or complementary oligonucleotide containing phosphorothiate links.

5

Suitable DNA sequences remaining in foetal DNA which may be detected in step (c) is a telomere sequence or a chromosome marker located proximal to the telomere region, and is most preferably a subtelomeric sequence, in particular one which is
10 unique to the specific chromosome.

Detection in step (c) may be effected by any of the known techniques. In a preferred embodiment however, foetal DNA is isolated and purified using magnetic separation techniques. A
15 particular method by which this can be achieved involves the use of biotinylated primers as probes specific for telomeres. Hybridisation of primers will mean that the foetal DNA will have a biotin label which can be separated magnetically using streptavidin coated paramagnetic particles (PMPs) or beads (see
20 for example Figure 4).

In context of the methods of the invention, it is frequently the case that primers can be used to function as probes. It will be clear to the skilled person where this applies. Thus
25 the term "primer" as used herein should be understood as referring to sequences which may have probe function, as well as sequences which are used as conventional primers for amplification reactions.

30 Once isolated in this way, the DNA fragments may be analysed. If necessary, they may first be subjected to amplification. Pure amplified foetal DNA obtained in this way may have a wide application in non-invasive prenatal genetic analysis and diagnosis. It may be particularly preferred to carry out
35 quantitative analysis for example, using a fluorescence Q-PCR method for instance by Applied Biosystems DNA sequencers and

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

10

the Genescan software, as well a Pyrosequencing and other such methods including Microarrays. Many of these methods are now becoming fully automated.

5 In effect, the invention uses differences in the number of telomere repeats in foetal and maternal DNA as a basis for identification of foetal DNA in maternal DNA-containing samples. During step (b), DNA, preferably in the form of fragments and most preferably long fragments, is digested,
10 preferably unidirectionally following protection of cut ends, from the telomeric end regions of the fragments inwards.

Telomere regions of all chromosomes present in the sample are digested first during this process. Exonucleolytic digestion
15 may be carried out for a period of time sufficient to eliminate at least all maternal telomeric DNA sequences.

If digestion is halted at this point, some foetal DNA fragments will retain some telomeric DNA (Figure 3a). This DNA is then
20 detectable using for example, a labelled primer specific for the primer telomere DNA which will therefore hybridise only to foetal DNA.

Digestion may however be continued such that subtelomeric DNA
25 sequences are eliminated from all fragments of maternal DNA (Figure 3b). In this instance, because digestion of the longer foetal telomeres takes longer, some chromosome-specific DNA will remain at the corresponding site in fragments of foetal DNA and so will be detectable for example using a primer for
30 that DNA which therefore acts as a marker. The primer would not hybridise to maternal DNA under these circumstances.

Preferably, primers used in the detection are labelled with visible labels such as fluorescent labels.

35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

II

Where the sequence detected in step (c) is a chromosome marker, it may be preferable that it is a sub-telomeric polymorphic chromosome marker, as this gives rise to the possibility that the marker can itself be readily useful in pre-natal diagnosis.

5

In any event, the identification of foetal DNA can be used as a preliminary step to pre-natal diagnosis of the identified DNA.

In a particularly alternative embodiment, DNA present in the sample after digestion is amplified with a first labelled DNA primer specific for the said DNA sequence, such as the telomeric and/or subtelomeric sequence. Most preferably the first primer is labelled with a visible label in particular a fluorescent label, and fluorescence from the amplified sample is detected.

10
15

Suitable enzymes for conducting exonucleolytic digestion include Bal31. It may be preferable to use enzymes which digest specific regions of the DNA only, in order to ensure a more controllable digestion process. In particular, digestion is effected in a three step process, in which, in a first step, 3' extension DNA is removed, in a second step, 3'-5' ss regions are excised and in a third step, ss regions are digested. Suitable enzymes for effecting the first and third steps include Mungbean nuclease, and for the second step, suitable enzymes include Exonuclease III.

The conditions, such as enzyme concentrations, buffer systems, temperature and time of incubation, required in order to provide reliable digestion to allow differentiation between maternal and foetal DNA, require careful selection and depend upon factors such as the particular enzyme being used.

As a result of the variation in the numbers of telomeric DNA sequence repeats between different DNA ends, it is desirable first to "calibrate" the enzyme system, preferably in a

30
35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

12

chromosome specific manner. Calibration of this type may be effected by analysing the results of exonucleolytic telomeric digestion of the isolated DNA under various conditions.

- 5 Another means of calibrating particular enzyme systems is to obtain base-line information on the telomeric length of each individual chromosome end in maternal and foetal tissue samples. This may be done using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of telomeric DNA sequences at the
10 metaphase stage of the cell cycle. At this stage the individual telomeres at each chromosome end may be highlighted using FISH with telomere-specific probes in combination with subtelomeric DNA probes. Measurements of telomeric sequences may be performed by Microscopy Image Analysis, using for
15 example a Comparative Genomic Hybridisation (CGH) software programme.

- Blood samples from foetuses subject to cordocentesis and cord blood samples, obtained at delivery, can also be utilised, with
20 a view to obtaining additional base-line information on the normal variation in length of telomeric DNA sequences for each chromosome arm in maternal and foetal tissue samples.

- The conditions of enzyme concentrations and exposure times
25 required to eliminate a subtelomeric marker from maternal DNA can be determined in a similar manner. In this instance, amplification for example using the polymerase chain reaction (PCR) of the subtelomeric markers of the DNA product may be effected in order to distinguish between constitutional
30 maternal DNA alleles and foetal DNA alleles. This experimentation will provide base-line information on the rate of removal of subtelomeric DNA sequences by the respective enzymatic digestion conditions applied.

- 35 Preferred subtelomeric markers include, for instance a small tandem repeat (STR) or a microsatellite. For this purpose,

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

13

they may or may not be polymorphic markers as they are only used for evaluation of their rate of disappearance by the exonucleolytic digestion and for differentiation between constitutional maternal and foetal DNA.

5

Polymorphic diagnostic markers may be preferred however if the analysis is subsequently used for prenatal diagnosis. Examples of chromosome 21- specific polymorphic tetranucleotide repeat markers are D21S11, D21S1412, D21S1411 and D21S1414. IFNAR, which is a dinucleotide repeat also shows a simple amplification pattern, in contrast to most other smaller repeat markers, which may be associated with stutter bands. Other examples of polymorphic markers include single nucleotide polymorphisms (SNPs), which occur with very high frequency in the human genome, and where an increasing number are currently being identified.

In this case, the concentration of the foetal marker may subsequently be determined, for example using quantitative PCR methods such as TAQMAN™. This information, can be useful in pre-natal diagnosis of foetal conditions where only the amount of certain DNA sequences are different between the foetus and the mother. A reliable quantification of amount of chromosome-unique foetal DNA is required for the non-invasive prenatal diagnosis of common foetal conditions, including aneuploidies, such as Trisomy 21 Down syndrome, using a maternal blood sample.

In a preferred option the subtelomeric markers in question should be located as distal as possible among the chromosome-unique DNA sequences within each chromosome arm. These markers will be preselected for each chromosome end separately with respect to locations and degree of polymorphisms in the population studied.

35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

14

Suitably the DNA markers selected are strategically localised in subtelomeric chromosome positions, containing chromosome-specific unique DNA. These locations are preferred for two main reasons.

5

Firstly, markers, localised near to the telomeres but yet containing unique chromosome specific DNA, will facilitate the digestion procedure, as only limited exonucleolytic digestion will be required in comparison to that needed to selectively eliminate maternal, more proximal, interstitial, DNA. This will be particularly useful when unidirectional digestion is undertaken as described above.

Secondly, the use of polymorphic subtelomeric Chromosome/DNA markers will allow quantification of not only numerical chromosome aberrations (such as trisomies) but also unbalanced structural chromosome rearrangements such as unbalanced translocations. An unbalanced translocation may be identified as a duplication of dosage for one subtelomeric marker in combination with a deletion of dosage for another subtelomeric marker, dependent on which chromosomes are involved in the translocation. In addition, other relatively common chromosome aberrations should be identifiable this way. These include extra marker chromosomes such as foetal iso 12p, or iso 18p, both associated with severe foetal malformations, which would give rise to extra double dosages in relation to the normal situation.

Special exonucleolytic procedures may be required for the diagnosis of extra chromosome markers such as 15 inv dup, as this involves two extra doses of 15p telomeric DNA sequences. Such duplications of telomeric sequences alone are harmless with respect to foetal development, while markers that also contain chromosome 15-specific DNA, located in the proximal part of the q arm, are associated with foetal psychomotor development delay, which may be severe.

35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

15

By appropriate selection of subtelomeric markers used in the prenatal foetal diagnosis, the majority of chromosome abnormalities, leading to foetal development disturbance may be determined using this method. The only chromosome abnormalities that may not be detectable using the method, applying subtelomeric DNA markers alone, are more proximal (interstitial) deletions and duplications that are unexpected and therefore their exact locations cannot be determined. Special modifications of the method will also be required to diagnose specified deletions and duplications, expected because either parent is a carrier.

Once identified using the method of the invention, foetal DNA, may be subject to pre-natal diagnosis, for example to determine the presence of chromosome aberrations such as aneuploidy, Down syndrome, Edward Syndrome or Klinefelter Syndrome or other information such as the sex of the foetus.

Suitably, DNA is separated prior to analysis, for example using a magnetic separation method. In particular, the DNA is amplified using a labelled primer such as a specific biotinylated primer. If say a telomeric primer is used at this point, only telomere-containing, i.e. foetal DNA fragments will be measured and labelled, assuming all the corresponding maternal DNA has been eliminated during the digestion.

Said DNA fragments may then be captured using for example streptavidin coated para-magnetic particles or beads. After separation of the magnetic particles from the supernatant, the target DNA can be released by elution of the particles (Figure 4).

Once separated, said DNA may be amplified with a labelled primer which is specific for a particular chromosome or diagnostic region of DNA under conditions in which the primer amplifies DNA within the sample. Detection of this primer in

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

16

DNA identified as being of foetal origin will therefore provide information about the foetus. Depending upon the particular diagnostic purpose, it may be useful if the second primer is specific for chromosome 18, 21 or 13, or the X or Y chromosomes. Abnormalities in chromosome number (aneuploidies) of these chromosomes are the most common.

In a particularly preferred embodiment of the invention, DNA is isolated from a maternal blood sample, for example, from cells in maternal plasma, fragmented with a restriction enzyme, and then ligated to an adaptor. The modified fragments are then incubated with an exonucleolytic enzyme such as Bal31, for a period of time which is sufficient to entirely digest maternal telomeres, but leave some foetal telomeric DNA. Further purification of telomere-containing (foetal) DNA fragments may be achieved by magnetic separation using biotinylated telomeric probes or telomeric primers used as probes and streptavidin paramagnetic particles (PMs) (Fig 4).

Isolated telomere-containing (foetal) DNA fragments are then amplified by a method such as PCR, using chromosome-specific primers. Analysis is thereafter performed using a fluorescent method such as Q-PCR utilising, for instance, a DNA sequencer and Genescan software (Applied Biosystems), real time PCR or pyrosequencing.

In addition, the information obtainable using the method of the invention, in particular relating the amount of concentration of foetal DNA in the maternal sample, may be useful in prenatal screening/diagnosis as well as in diagnosis of a range of maternal conditions. These include complications in pregnancy such as pre-eclampsia, in predicting the risk of pre-term labour, and in the later development of autoimmune disease.

According to a further aspect of the invention, there is provided a kit for identifying foetal DNA in a maternal DNA-

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

17

containing sample, said kit comprising means for isolating DNA from a DNA-containing sample, an exonucleolytic enzyme capable of digesting terminal regions of DNA, and a labelled primer for detecting a specific DNA sequence found in a terminal
5 region of DNA.

The kit may contain one or more further reagents or commodities which are required for affecting the method as described above. In particular, the kit may further comprise a restriction
10 enzyme which cuts DNA so as to produce a binding site on the DNA for an adaptor, together with the adaptor suitable for protecting the cut ends of DNA fragments from enzymatic digestion.

15 Depending upon the way the assay is operated, biotinylated primers and particularly biotinylated telomeric primers as well as streptavidin paramagnetic particles may also be included.

Other potential kit components include one or more additional
20 labelled primers, such as a different fluorescently labelled primer, which is diagnostic of a chromosome condition.

The invention will now be particularly described by way of example with reference to the accompanying diagrammatic
25 drawings in which:

Figure 1 shows a comparative example of GeneScan analysis of DNA extracted from maternal blood (a) where the foetus is normal and (b), (c) and (d) where the foetus has trisomy 21, as
30 carried out using prior art method.

Figure 2 illustrates diagrammatically the exonucleolytic digestion of DNA fragments such as Bal31, where fragments are digested at both ends: although there are fewer telomeric
35 sequences in the maternal sequences (M) in comparison to the foetal sequence (F) and so allow foetal DNA to be identified,

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

18

differentiation between M and F fluorescent marker signals, if positioned as shown, would not be possible;

Figure 3 illustrates diagrammatically the unidirectional
5 exonucleolytic digestion of DNA fragments using an adaptor in
accordance with a preferred embodiment of the invention; such
that in an optimal time course, the enzyme will eliminate all M
telomeric sequences (Fig. 3a) and also the M fluorescent marker
signal (Fig 3b). Such a system will allow differentiation of
10 M and F fragments with selective retention of F fluorescent
signal allowing enumeration of the F chromosomes concerned
following DNA amplification e.g. by Q-PCR; and
Figure 4 illustrates diagrammatically the magnetic purification
of foetal DNA using a biotinylated telomere probe.

15

Example 1

Step 1

DNA extraction

5mls of maternal blood was taken into each of two tubes, one of
20 which contained EDTA. Blood samples were centrifuged at 3000g
and plasma and serum were carefully removed, into clean tubes,
from the EDTA-containing and plain tubes, respectively. The
plasma and serum samples were centrifuged again at 3000g and
the supernatants were transferred into clean tubes.

25

DNA was extracted from the plasma and serum samples using the
QIAamp Blood Kit from Qiagen, according to the manufacturers'
recommendations.

30 Step 2)

Restriction enzyme digest to provide adaptor attachment sites

The extracted DNA is digested with enzymes such as NotI using
standard restriction enzyme digestion protocols.

35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

19

Step 3)Ligation of DNA template and adaptor to protect the proximal ends of DNA fragments from digestion by exonucleolytic enzyme (such as Bal 31)

- 5 This approach concerns a unidirectional DNA deletion with Bal 31 nuclease (Mukai S., Shibahara S., Morisawa H. Nucleic Acids Research Symposium Series no. 19, 1998). The principle is based on the fact that 7bp of 2'-O-methyl ribonucleotide-DNA chimeric adaptor forms greater stability and also due to steric hindrance prevents the action of nuclease attack. Therefore, 10 ligation to NotI sites on the DNA fragments will allow digestion from one end only.

DNA and adaptor are incubated overnight at 15°C with Ligase and 15 buffer.

Step 4)Digestion of ligated DNA templates and adaptor with exonucleolytic enzyme such as Bal 31

- 20 1 unit of Bal 31 per microgram of DNA was used to yield a uniform ladder of deletions (>1kb) over a 20 minute period at 30°C. The reaction was stopped by adding EDTA to a final concentration of 50mM. (Fig 3). DNA is ethanol precipitated, to remove the high NaCl concentration from the Bal 31 reaction. 25 Variation in conc. and/or timing of exposure is optimised for each chromosome enumeration. In the optimised situation all maternal telomeric sequences will be digested, while some of foetal telomeric DNA sequences will remain (Fig 3a). This allows differentiation between maternal and foetal DNA 30 fragments per se.

Extended digestion will eliminate the DNA sequences corresponding to the chromosome-specific primer site (Fig 3b), which will allow positive identification of foetal DNA and 35 enumeration of the respective chromosome, following Q-PCR.

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

20

Step 5)**Magnetic purification of foetal DNA using biotinylated telomere probe**

DNA fragments are hybridised in solution with a Biotinylated
5 telomere DNA primer by heating the DNA at 65°C for 10 mins,
adding the biotinylated primer and leaving the solution to cool
down at room temperature. Thereafter streptavidin paramagnetic
particles (SA-PMP) are washed with 0.5x SSC. The annealed DNA
fragments and biotinylated telomeric primer are added and
10 incubated at room temperature for 10 mins. SA-PMPs bound to
the biotinylated primer are captured using a magnetic stand,
and the supernatant is carefully removed. The particles are
washed 4 times with 0.1x SSC. Telomere positive (foetal)
fragments are eluted by resuspending the final SA-PMP particles
15 in deionised water.

Step 6)**Q-PCR using chromosome specific polymorphic markers**

Quantitative PCR was carried out using standard methodology as
20 described in our publication Verma et al., The Lancet 352, 9-
12, 1998.

Example 2

A protocol for conducting analysis using the method of the
25 invention is illustrated in Scheme 1 hereinafter.

Step 1**Preparation of blood samples on Percoll gradient**

Blood samples are prepared on Percoll gradients and the plasma
30 removed. Plasma cells are recovered by centrifugation using a
modification of the standard protocol for discontinuous Percoll
gradient (see e.g. Van Wijke et al. Clinical Chemistry 46, 5,
729-731, 2000).

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

21

- In particular, 3 mls each of 40%, 45% and 50% Percoll solution (Amersham Pharmacia) in PBS, for each tube are prepared. 3mls of EDTA blood are mixed with 3mls of PBS in a 15ml Polystyrol tube (Sarstedt, Røher 15ml tubes cat no. 62.553.042). 3ml of
- 5 40% Percoll is introduced as an underlayer using a canula (B.Sraun, Filter Straw cat no. 415020) attached to a 5ml syringe. The tip of the canula is placed at the bottom of the tube going through the blood and the Percoll solution ejected slowly. Using the same canula, the underlayering process is
- 10 then repeated twice with 45% and 50% Percoll respectively. In each case, the tip of the canula is placed at the bottom of the tube and the ejection is made carefully so as not to disturb the gradients.
- 15 In general 3-4 tubes will be prepared in this way for each sample under test. The prepared tubes are then centrifuged (without using the centrifuge brakes) at 500g for 30 minutes at 18-20°C.
- 20 After this, the tubes are removed and the plasma (top) layer taken off and put in a clean tube. Plasma from different tubes from the same sample may be added together to ensure that there is about 6mls of fluid in each tube. This is then centrifuged again at 500g for 20 minutes, this time with the brakes on. The
- 25 resultant cell pellet is then washed in 6ml of PBS a couple of times.

Step 2.

Extraction of high molecular weight DNA

- 30 Plasma cells¹ are resuspended in PBVS at 2×10^5 cells per $50\mu\text{l}^2$. Equal amounts of agarose solution (1.9% NuSieve GTG) are added to cell suspension-containing 1×10^5 cells. $50\mu\text{l}$ are dispensed into molds and allowed to set. Agarose plugs are then treated in: 0.5M EDTA, pH 8.0, 1%N-Laurylsarcosine, 2
- 35 mg/ml Proteinase K for 24-72 hours at 50°C (although O/N

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

22

incubation may be sufficient for our downstream applications). This treatment digests cell membrane allowing penetration of enzymes in later stages. The agarose plugs are then washed in water and incubated at 50°C in PMSF (a protease inhibitor) to fully inactivate any remaining Proteinase K that will effect enzymatic treatment. Agarose plugs are then washed and stored at 4°C.

Note:

1. 3 ml blood contains ~ 2×10^3 plasma cells
2. 1×10^5 cells = 1 μ l DNA

Plasma DNA is extracted with phenol:chloroform (1:1), ethanol precipitated, washed twice in 70% ethanol and carefully resuspended in water.

15

Step 3

Ligation of Nuclease resistant adapters

This procedure may be omitted if the ligation of adapters is unnecessary, as this is the only step that is affected by the DNA being in the agarose plugs. Both Bal31 digestion and the PCR reaction will be unaffected by the agarose plugs. The protocol allows the agarose to be digested into alcohol soluble oligosaccharides, this makes the DNA more accessible without damaging or shearing the DNA. The agarose plugs are melted and an equal volume of 50 x buffer is added plus 1U β -Agarase incubated at 45°C for 60 minutes. The remaining oligosaccharides and β -Agarase do not interfere with subsequent enzymatic reactions.

- 30 For the ligation of adapters the DNA will have to be cut with a rare cutter such as Asc I or Not I which cut within the human genome ~ every 670kb and 310kb respectively. This will produce compatible ends for the adapter to ligate to, restriction sites between the telomere and marker will have to be checked to ensure that these enzymes do not cut within this region.

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

23

Equilibrate the agarose plug in 100µl of 1 x restriction buffer with 10U of enzyme, incubate for 2 hours and then rinse with water.

- 5 Complementary oligonucleotides containing phosphorothioate links will be annealed to produce adapters resistant to nuclease digestion. They will also contain cohesive ends complementary to the restriction endonuclease used to cleave the DNA samples. These adapters will be ligated by the addition of 1 x ligation buffer, 5U Ligase and incubated at 10 37°C for 2 hours.

Step 4.

Bal31 Nuclease digestion of telomere ends

- 15 Agarose plugs containing high molecular weight DNA are equilibrated for 30 minutes in 1 ml of 1 x Bal31 buffer with 50 U of enzyme (NEBL) on ice for 30 minutes. Digestion is effected by placing the reaction at 30°C, removing plugs at each time point i.e. 0, 30, 60, 90 and 120 minutes and placing 20 in 1 ml ice-cold TE. Bal31 is removed by rinsing plugs in water for 30 minutes on ice. Bal31 should be completely inactivated during the heat denaturation step of the PCR. Time points are taken initially to establish the length of digestion needed to remove the required length of DNA to allow 25 discrimination of the fetal DNA with the longer telomeres.

Step 5

Amplification of polymorphic markers by QF-PCR

- Polymorphic markers are amplified by QF-PCR using standard 30 technology (see e.g. Verma et al., Lancet, 352, 9-12, 1998; Pertl et al., Amer. J. Obstet. Gynecol. 177, 4, 899-906).

- The X22 marker (~300kb from telomere) is a particular marker which may be amplified in this way, but other telomeric 35 polymorphic markers may be selected depending upon the

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

24

particular aims of the diagnosis. For example, two highly polymorphic markers on chr14 D14S1419 and D14S1420 are located at ~210kb and 95kb from the telomere.

5 **Example 3: Non-invasive Prenatal Diagnosis of Foetal Trisomy 21 Down Syndrome using the Methods of the Invention**

Example 3a

10 **1. Pregnancy and Blood Sample**

12 ml of blood was drawn into 2 edetic acid (EDTA) tubes by venipuncture from a pregnant woman at 12 weeks gestational age, following written informed consent with Ethical Approval from the Local Ethical Committee.

15

2. Isolation of cells from the nuclear compartment and plasma

Both nucleated cells from the nuclear compartment and from plasma were isolated from the maternal blood using a Triple Density Gradient according to the protocol as described (Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R. -D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp 401-415) with slight modifications.

20

25 12 ml of the EDTA blood is added to 12 ml of Phosphate Buffer Solution (PBS) and mixed by inverting the tube. 6 ml of the blood/PBS mixture is pipetted into four 15ml polystyrol tubes. Three layers of Percoll^A (Amersham Pharmacia) are underlayered, using a long and thin canula attached to a syringe. Initially
30 3ml of 40% Percoll is underlayered, followed by 3ml of 45% and 3ml of 50% Percoll. The suspension is then centrifuged at 500g for 30 min. The plasma layer and the lymphocyte layer are removed and transferred to clean tubes and again centrifuged at
35 500 g for 10 min. The cell pellet is washed in PBS and transferred to microtubes containing 5µl proteinase K solution (400mg/l proteinase K, 20 mmol/l dithiothreitol, 1.7 µmol/l sodium dodecyl sulfate, 10mmol/l Trisbuffer, 50mmol/l potassium

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

25

chloride).

3. Extraction of high molecular weight DNA

Plasma cells are resuspended in PBVS at 2×10^6 cells per 50 μ l.
5 Equal amounts of agarose solution (1.9% NuSieve GTG) are added to the cell suspension, containing 1×10^6 cells. 50 μ l are dispensed into molds and allowed to set. Agarose plugs are then treated in: 0.5M EDTA, pH 8.0, 1%N-Laurylsarcosine, 2 mg/ml Proteinase K for 24-72 hours at 50°C. The agarose plugs
10 are then washed in water and incubated at 50°C in PMSF (a protease inhibitor) to fully inactivate any remaining Proteinase K that will effect enzymatic treatment.

4. Ligation of Nuclease resistant adapters

15 The agarose plugs are melted and an equal volume of 50 x buffer is added plus 1U β -Agarase and incubated at 45°C for 60 minutes. The agarose plug is equilibrated in 100 μ l of 1 x restriction buffer with 10U of enzyme, incubated for 2 hours and then rinsed with water.

20

These adapters are then ligated by the addition of 1 x ligation buffer, 5U Ligase and incubated at 37°C for 2 hours.

5. Bal31 Nuclease digestion of telomere ends

25 Agarose plugs containing high molecular weight DNA are equilibrated for 30 minutes in 1 ml of 1 x Bal31 buffer with 5 U of enzyme (NEBL) on ice for 30 minutes. Digestion is effected by placing the reaction at 30°C, removing plugs at each time point i.e. 0, 30, 60, 90 and 120 minutes and placing
30 in 1 ml ice-cold TE. Bal31 is removed by rinsing plugs in water for 30 minutes on ice.

6. Amplification of polymorphic markers by QF-PCR

A multiplex fluorescence PCR assay is applied by routine
35 technology (see e.g. Pertl et al 1997 Am. J. Obstet. Gynecol.

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

26

177,899-906) using primers for D21S1411 and D21S1446. Each of the forward primers is labelled (5'end) with a fluorescent dye to enable visualisation and analysis of the PCR product. After the initial denaturation, 24 cycles of 95°C for 48 sec, 60°C
5 For 48 sec, and 72°C for 1 min is performed, followed by an extension of 72°C for 15 min.

7. Analysis

The allelic fragments are resolved on a 6% denaturing
10 polyacrylamide gel, and analysed on an Applied Biosystems (Warrington) 373 DNA sequencer running Genescan 672 software. Amplification products are sized, and their fluorescence intensities calculated, based on the areas of the peaks seen on the electropherograms. Analysis was performed on (a) DNA from
15 lymphocytes of the maternal blood sample directly, (b) DNA from same type of cells after enzymatic digestion, and (c) DNA from cells in the plasma component of the maternal sample (expected to contain an enrichment of fetal cells) after enzymatic digestion.

20

8. Results

(a) The electropherogram obtained from PCR products of DNA of the lymphocytes of the maternal blood sample shows the occurrence of two equal sized peaks for each of the two primers
25 D21S1411 and D21S1446. This result is the expected from a normal female.

(b) The electropherogram obtained from PCR products of DNA of the lymphocytes from the maternal blood sample, following
30 enzymatic exonucleolytic digestion with 2 Units of Bal31 for 20 min, shows absence of signals for the most distal marker D21S1446, while two equal sized signals are seen at positions for the proximal marker D21S1411.

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

27

This indicates that these conditions for enzymatic digestion are optimal for our purposes of differentiating between maternal and fetal DNA.

5 (c) The electropherogram obtained from the DNA of cells in maternal plasma, following enzymatic digestion under same conditions as in (b) shows unclear signals for the proximal marker D21S1411 but three clear signals for the distal marker D21S1446.

10

This result indicates first of all that the telomeric DNA sequences have been entirely eliminated (both from maternal and fetal DNA). Secondly, the unclear signal of the DNA sequences of the proximal marker D21S1411, is interpreted to be caused by 15 a mixture of maternal and fetal DNA. Thirdly, we conclude that the three clear signals of the distal marker D21S1446 (one of which is located in a position, which is not the same as the maternal as seen in the electropherogram of the DNA from the lymphocytes of the maternal blood sample), are fetal, and shows 20 that the fetus has trisomy 21.

9. Summary

This example illustrates that it is possible to routinely enumerate numbers of chromosomes 21 and thus identify foetal 25 trisomy 21 Down syndrome by DNA analysis of a maternal blood sample, following enzymatic digestion of telomeric and subtelomeric DNA sequences. The process is rapid with results available within the same day of arrival of the blood sample in the laboratory. Furthermore, substantial automation is 30 possible.

Example 3B

1. Pregnancy and Blood Sample

35 12 ml of blood was drawn into 2 edetic acid (EDTA) tubes by venipuncture from a pregnant woman at 12 weeks gestational age,

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

28

following written informed consent with Ethical Approval from the Local Ethical Committee.

2. Isolation of cells from the nuclear compartment and plasma

5 Both nucleated cells from the nuclear compartment and from plasma were isolated from the maternal blood using a Triple Density Gradient according to the protocol as described (Ganshirt et al., Diagnostic Cytogenetics, Springer Lab Manual, 1999 R. -D. Wagner, Fetal Cells in Maternal blood, pp 401-415)
10 with slight modifications.

12 ml of the EDTA blood is added to 12 ml of Phosphate Buffer Solution (PBS) and mixed by inverting the tube. 6 ml of the blood/PBS mixture is pipetted into four 15ml polystyrol tubes.
15 Three layers of PercollR (Amersham Pharmacia) are underlayered, using a long and thin canula attached to a syringe. Initially 3ml of 40% Percoll is underlayered, followed by 3ml of 45% and 3ml of 50% Percoll. The suspension is then centrifuged at 500g for 30 min. The plasma layer and the lymphocyte layer are
20 removed and transferred to clean tubes and again centrifuged at 500 g for 10 min. The cell pellet is washed in PBS and transferred to microtubes containing 5µl proteinase K solution (400mg/l proteinase K, 20mmol/l dithiothreitol, 1.7µmol/l sodium dodecyl sulfate, 10mmol/l Trisbuffer, 50mmol/l potassium chloride).
25

3. Exonucleolytic enzyme digestion

1 unit of Bal31 per microgram of DNA was used to yield a uniform ladder of deletions (>1kb) over a 20 minute period at
30 30°C. The reaction was stopped by adding EDTA to a final concentration of 50mM.

Enzymatic digestion is first performed on DNA of lymphocytes to calibrate the concentration and time required for optimal
35 elimination of DNA sequences to allow differentiation between

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

29

fetal and maternal DNA. The primers chosen in this case are D21S1446 and D21S1411 at 21q22.3 (with D21S1411 being located proximal to D21S1446) together with the primer for the telomere DNA sequence TTAGGS.

5

The optimal conditions to discriminate between maternal and fetal signals was set for elimination of telomeres plus the marker D21S1446 in DNA of lymphocytes of the maternal blood sample (primarily maternal cells). This was evaluated as described in steps 4 and 5. The enzymatic digestion of cells isolated from maternal plasma (a mixture of maternal cells with an enrichment of fetal cells) was then exposed to Bal31 under these verified optimal conditions.

15

4. Multiplex PCR

A multiplex fluorescence PCR assay is applied by routine technology (see e.g. Pertl et al., 1997 Am. J. Obstet. Gynecol. 177,899-906) using primers for D21S1411 and D21S1446. Each of the forward primers was labelled (5'end) with a fluorescent dye to enable visualisation and analysis of the PCR product. After the initial denaturation, 24 cycles of 95°C for 48 sec, 60°C for 48 sec, and 72°C for 1 min was performed followed by an extension of 72°C for 15 min.

25

5. Analysis

The allelic fragments were resolved on a 6% denaturing polyacrylamide gel, and analysed on an Applied Biosystems (Warrington) 373 DNA sequencer running Genescan 672 software. Amplification products were sized, and their fluorescence intensities were calculated, based on the areas of the peaks seen on the electropherograms. Analysis was performed on (a) DNA from lymphocytes of the maternal blood sample directly, (b) DNA from same type of cells after enzymatic digestion, and (c) DNA from cells in the plasma component of the maternal sample

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

30

(expected to contain an enrichment of fetal cells) after enzymatic digestion.

6. Results

5 (a) The electropherogram obtained from PCR products of DNA of the lymphocytes of the maternal blood sample shows the occurrence of two equal sized peaks for each of the two primers D21S1411 and D21S1446. This result is the expected from a normal female.

10

(b) The electropherogram obtained from PCR products of DNA of the lymphocytes from the maternal blood sample, following enzymatic exonucleolytic digestion with 2 units of Bal31 for 20 min shows absence of signals for the most distal marker D21S1446, while two signals are seen at positions for the proximal marker D21S1411.

This indicates that these conditions for enzymatic digestion are optimal for our purposes of differentiating between maternal and fetal DNA.

20

(c) The electropherogram obtained from the DNA of cells in maternal plasma, following enzymatic digestion under same conditions as in (b) shows unclear signals for the proximal marker D21S1411 but three clear signals for the distal marker D21S1446.

This result indicates first of all that the telomeric DNA sequences have been entirely eliminated (both from maternal and fetal DNA). Secondly, the unclear signal of the DNA sequences of the proximal marker D21S1411, is interpreted to be caused by a mixture of maternal and fetal DNA. Thirdly, we conclude that the three clear signals of the distal marker D21S1446 (one of which is located in a position, which is not the same as the maternal as seen in the electropherogram of the DNA from the

35

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

31

lymphocytes of the maternal blood sample), are fetal, and shows that the fetus has Trisomy 21.

Summary

5 This example illustrates that it is possible to routinely enumerate numbers of chromosomes 21 and thus identify foetal trisomy 21 Down syndrome by DNA analysis of a maternal blood sample, following enzymatic digestion of telomeric and
10 subtelomeric DNA sequences. In this examples DNA is less degraded, and it has therefore been possible to perform the diagnostic analysis without the application of an adaptor. As with Example 3A analysis is rapid with results available within the same day of arrival of the blood sample in the laboratory; and substantial automation is possible.

15

20

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

32

Claims

1. A method for the identification of foetal DNA in a maternal DNA-containing sample, said method comprising (a) isolating DNA from said sample, (b) subjecting said DNA to exonucleolytic digestion by an enzyme so as to remove end regions of said DNA, and (c) detecting the presence of a DNA sequence remaining in foetal DNA but absent from maternal DNA as a result of said digestion process.
- 10 2. A method according to claim 1 wherein said maternal DNA-containing sample is a blood or vaginal sample.
3. A method according to claim 1 of claim 2 wherein in a preliminary step, cells are first isolated from maternal plasma, and DNA then isolated from these in step (a).
- 15 4. A method according to any one of the preceding claims wherein DNA from step (a) is cut using a restriction enzyme into fragments prior to step (b).
- 20 5. A method according to claim 4 wherein cut ends of the DNA fragments are protected prior to the exonucleolytic digestion so that they are not susceptible to digestion by the exonucleolytic enzyme.
- 25 6. A method according to claim 5 wherein the restriction enzyme used to form the DNA fragments is one which cuts such as to provide binding sites for a protecting moiety, and protection is achieved by ligation of that protecting moiety.
- 30 7. A method according to claim 6 wherein the protecting moiety is an adaptor.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

33

8. A method according to claim 7 wherein the adaptor is 2'-
O-methyl ribonucleotide DNA or a complementary oligonucleotide
containing phosphorothioate links.
- 5 9. A method according to any one of the preceding claims
wherein foetal DNA is isolated from maternal DNA.
10. A method according to claim 9 wherein foetal DNA
fragments are separated by hybridising biotinylated probes
10 specific for telomere DNA sequences remaining in foetal DNA
after digestion, to said DNA and thereafter immobilising said
probes to a streptavidin covered support.
11. A method according to claim 10 wherein said streptavidin
15 covered support comprises a paramagnetic particle.
12. A method according to any one of the preceding claims
wherein the said DNA sequence remaining in foetal DNA is a
telomere sequence or a chromosome marker located proximal the
20 telomere region.
13. A method according to claim 12 wherein said DNA sequence
remaining in foetal DNA is a telomere sequence.
- 25 14. A method according to claim 12 wherein said DNA sequence
remaining in foetal DNA is a sub-telomeric polymorphic
chromosome-specific marker.
15. A method according to any one of the preceding claims
30 wherein the said DNA sequence is detected using a first
labelled probe which is specific for said sequence.
16. A method according to claim 15 wherein said label is a
fluorescent label.
35

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

34

17. A method according to any one of the preceding claims wherein the exonucleolytic enzyme is Bal31.
18. A method according to any one of claims 1 to 16 wherein exonucleolytic digestion is effected in stages in which, in a first step, 3' extension DNA is removed, in a second step, 3'-5' ss regions are excised and in a third step, ss regions are digested.
19. A method according to claim 18 wherein the first step is effected using Mungbean nuclease.
20. A method according to claim 18 or claim 19 wherein the second step is effected using Exonuclease III.
21. A method according to any one of claims 18 to 20 wherein the third step is effected using Mungbean nuclease.
22. A method according to any one of the preceding claims wherein the amount of DNA of foetal origin in the sample is determined.
23. A method according to any one of the preceding claims wherein foetal DNA in the sample is amplified.
24. A method according to claim 23 wherein the amplification is effected using the polymerase chain reaction (PCR).
25. A method according to claim 24 wherein PCR is used to quantitate the amount of foetal DNA in the sample, or the amplified sample is subjected to genetic analysis.
26. A method according to any one of the preceding claims wherein foetal DNA identified is subjected to pre-natal diagnosis.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

35

27. A method according to claim 26 wherein the diagnosis detects chromosome aberrations.
28. A method according to any one of the preceding claims wherein before step (c), DNA is separated according to size.
29. A method according to any one of claims 25 to 27 wherein separated DNA identified as being of foetal origin is amplified with a labelled primer which is specific for a particular chromosome or diagnostic region of DNA.
30. A method according to claim 29 wherein said second primer carries a fluorescent label.
31. A method according to claim 25 or claim 26 wherein foetal DNA is amplified using a fluorescently labelled primer, and the amplified sequence is diagnostic for a chromosome or DNA condition.
32. A method according to claim 31 wherein said primer amplifies a sequence which is specific for chromosome 18, 21, 13, X or Y.
33. A method according to claim 25 which is used in the diagnosis of conditions of the mother.
34. A method according to claim 33 wherein the conditions are pre-eclampsia, in predicting the risk of pre-term labour, and in the later development of autoimmune disease.
35. A kit for identifying foetal DNA in a maternal blood or vaginal sample, said kit comprising means for extracting DNA from a blood or vaginal sample, an exonucleolytic enzyme capable of digesting DNA, and a labelled primer suitable for detecting a specific DNA sequence found in a terminal region of DNA.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

36

36. A kit according to claim 35 which further comprises a restriction enzyme which cuts DNA so as to produce a binding site on the DNA for an adaptor suitable for protecting the cut ends of DNA fragments from enzymatic digestion.
- 5
37. A kit according to claim 34 or claim 35 which further comprises an adaptor suitable for protecting the ends of DNA fragments from enzymatic digestion.
- 10
38. A kit according to any one of claims 34 to 37 which further comprises a biotinylated telomeric probe.
39. A kit according to claim 38 which further comprises streptavidin coated paramagnetic particles.
- 15
40. A kit according to any one of claims 34 to 39 which comprises a labelled primer which is diagnostic of a chromosome condition.
- 20
41. A method for the identification of foetal DNA in a maternal DNA-containing sample, substantially as hereinbefore described.
42. A kit for the identification of foetal DNA in a maternal
- 25 DNA-containing sample substantially as hereinbefore described.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

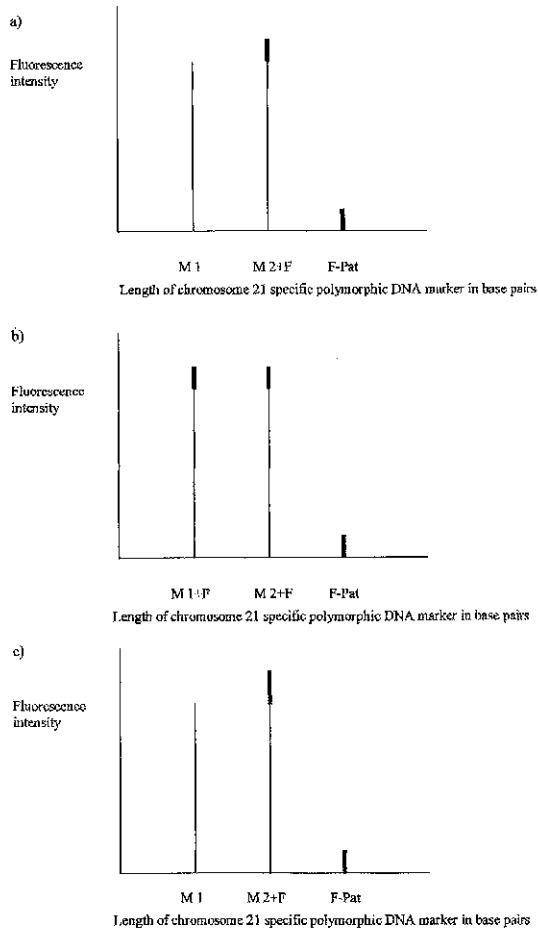


Figure 1
1/5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

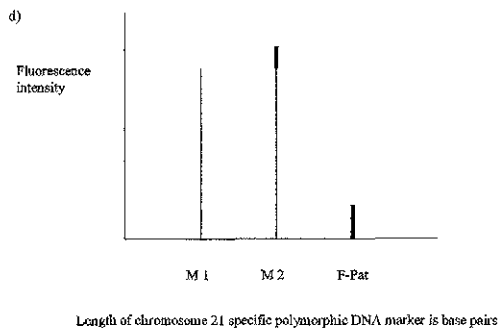


Figure 1 (cont'd)

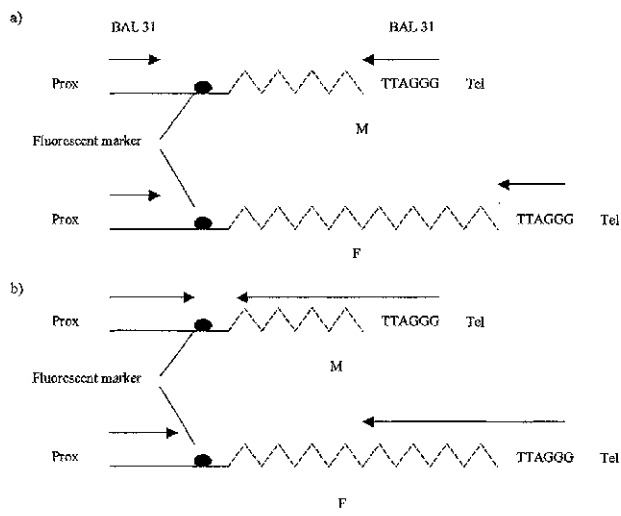


Figure 2
2/5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

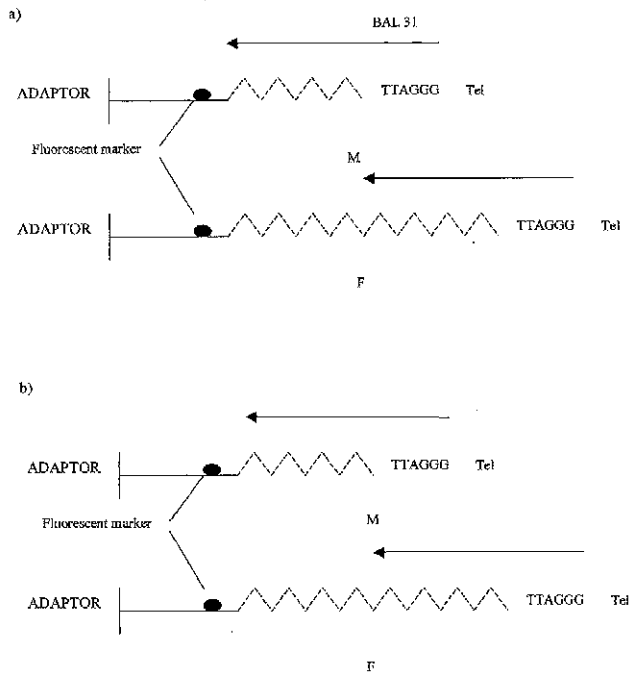


Figure 3

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

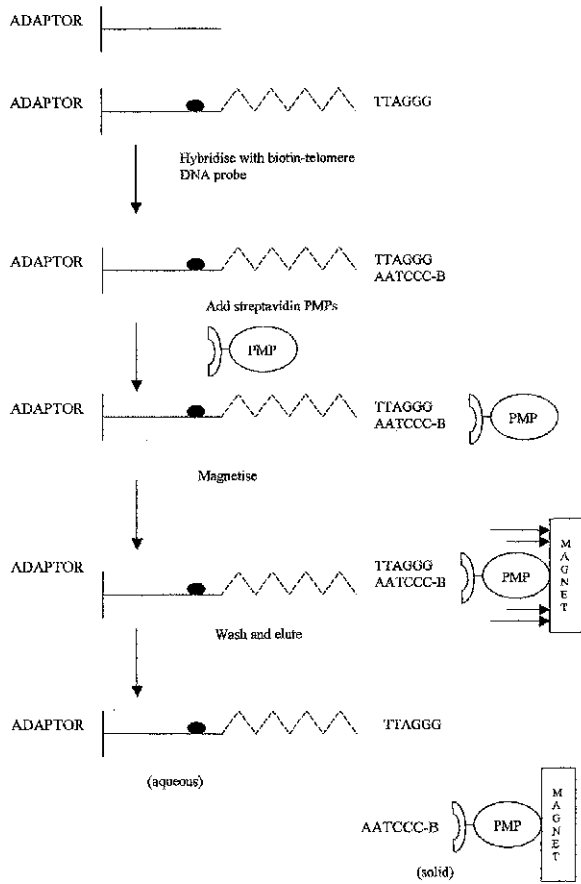


Figure 4

4/5

WO 02/04672

PCT/GB01/03092

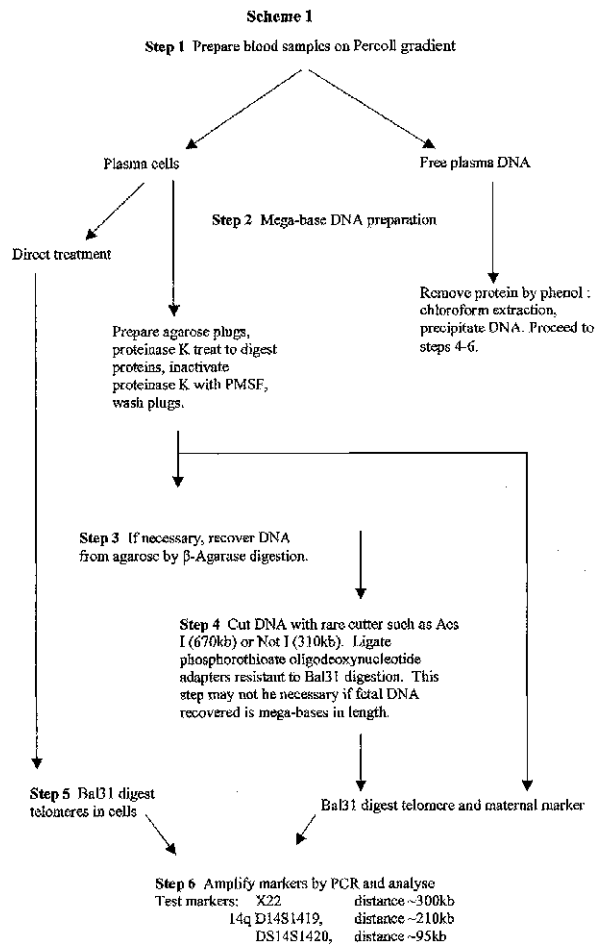


Figure 5
5/5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/004672 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/GB01/03092
- (22) International Filing Date: 9 July 2001 (09.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00/67129 10 July 2000 (10.07.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): SIMERG LIMITED (GB/GB); 22 Mayfield Road, Moseley, Birmingham B13 9UD (GB).
- (81) Designated States (internationally): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regionally): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published with international search report



- (72) Inventor: and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): HULLEN, Maj, Anita (SP/GB); 22 Mayfield Road, Moseley, Birmingham B13 9UD (GB).
- (74) Agents: GRAVES, Carol, Pauline et al.; Gwynes Howler, 24A Wincoborough Road, Wincobombe, North Sover, SO125 1AD (GB).
- (82) Date of publication of the international search report: 6 September 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/004672 A3

(54) Title: DIAGNOSTIC METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF FOETAL DNA IN A MATERNAL SAMPLE

(57) Abstract: A method for the identification of foetal DNA in a maternal DNA-containing sample such as a blood or vaginal sample, said method comprising (a) isolating DNA from said sample, (b) subjecting said DNA to exonuclease digestion by an enzyme so as to remove end regions of each DNA molecule, and (c) detecting the presence of a DNA sequence remaining in foetal DNA but absent from maternal DNA as a result of said digestion process. Once identified, the foetal DNA can be subject to diagnosis for example to detect chromosomal DNA abnormalities, including in particular aneuploidies such as foetal trisomy 21.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. GB 01/03092
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Classification of document, with indicator, where appropriate, of the relevant passage(s)	Relevant to claim No.
X	EP 0 430 402 A (UNIV CALIFORNIA) 5 June 1991 (1991-06-05) page 21, line 41 - line 50; claims 10-18, 41, 73, 85	35, 36, 38, 40, 42
A	WO 98 39474 A (LO YUK MING DENNIS; MAINSCOTT JAMES STEPHEN; ISIS INNOVATION (GB)) 11 September 1998 (1998-09-11) claims 1-8, 18	1-34, 41
A	WO 94 02646 A (RES DEV FOUNDATION; ASGARI MORTEZA (US); PRASHAD NAGINDRA (US); CU) 3 February 1994 (1994-02-03) claims 1-5, 12	1-34, 41
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" late document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to corroborate the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to comprise an inventive step where the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step where the document is taken in combination with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 June 2002		13/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 501 Patankova 2 Vienna 1100 Austria Tel: (+43-1-72) 340-2040, Tx: 31 651 epc nl Fax: (+43-1-72) 340-2076		Authorized officer Gabriels, J

Form No. ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 01/03092

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOUNGREN KJELL ET AL: "Synchrony in telomere length of the human fetus." HUMAN GENETICS, vol. 102, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 640-643, XP002200862 ISSN: 0340-6717 the whole document	1-34,41
A	IWAMA HIROSHI ET AL: "Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals." HUMAN GENETICS, vol. 102, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 397-402, XP002200863 ISSN: 0340-6717 page 399 -page 401; table 1	1-34,41

Form PCT/ISAR/10 (with addition of search sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.				
Information on patent family members				PCT/JP 01/03092				
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date					
EP 0430402	A	05-06-1991	AT 176281 T	05-02-1999				
			AU 647741 B2	31-03-1994				
			AU 5898790 A	06-06-1991				
			CA 2021489 A1	20-01-1991				
			DE 69032920 D1	11-03-1999				
			DE 69032920 I2	09-09-1999				
			EP 0430402 A2	05-06-1991				
			EP 0885971 A2	23-12-1998				
			EE 902727 A1	05-06-1991				
			IL 94906 A	31-10-1995				
			JP 3224499 A	03-10-1991				
			NZ 234529 A	23-12-1993				
			NZ 245427 A	26-07-1994				
			PT 94751 A	20-03-1991				
			US 5756696 A	26-05-1998				
			US 5721098 A	24-02-1998				
			US 6344315 B1	05-02-2002				
			US 6132961 A	17-10-2000				
			US 6280929 B1	28-08-2001				
			US 6159685 A	12-12-2000				
			ZA 9005561 A	24-04-1991				
			WO 9839474	A	11-09-1998	AU 727919 B2	04-01-2001	
						AU 6507498 A	22-09-1998	
						EP 0994963 A1	26-04-2000	
						WO 9839474 A1	11-09-1998	
						JP 2001513648 T	04-09-2001	
						US 6258540 B1	10-07-2001	
						US 2001051341 A1	13-12-2001	
WO 9402646	A	03-02-1994				AU 4685593 A	14-02-1994	
			BR 9306867 A	08-12-1998				
			CA 2140278 A1	03-02-1994				
			EP 0662152 A1	12-07-1995				
			JP 7509136 T	12-10-1995				
			WO 9402646 A1	03-02-1994				
			US 5629147 A	13-05-1997				
			US 5766843 A	16-06-1998				
			US 5861253 A	19-01-1999				
			US 5858649 A	12-01-1999				

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/566 G 0 1 N 33/553
 G 0 1 N 33/566

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

(72)発明者 フルテン, マユ アニータ
 イギリス国, バーミンガム ビー 1 3 9 エイチジェイ, モズレイ, メイフィールド ロード 2

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA27 BA11 BB51 CA25 CA26 CB01 CB15 DA12 DA13
 DA77 FB01 FB02 FB03 FB07 FB12 GC15
 4B024 AA11 CA04 CA09 HA09 HA12
 4B063 QA19 QA20 QQ03 QQ43 QR08 QR14 QR42 QR56 QS25 QS34
 QX02

专利名称(译)	诊断方法		
公开(公告)号	JP2004502466A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002509525	申请日	2001-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	SIMEG		
申请(专利权)人(译)	Shimegu Rimitido		
[标]发明人	フルテンマユアニータ		
发明人	フルテン,マユ アニータ		
IPC分类号	G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6881 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q2600/156		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.A G01N33/50.J G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/553 G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA27 2G045/BA11 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB15 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA77 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA09 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	2000016742 2000-07-10 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种鉴定包含母体DNA (例如血液或阴道样品) 的样品中胎儿DNA的方法, 包括 (a) 从所述样品中分离DNA和 (b) 去除所述DNA的末端区域通过酶对DNA进行核酸外切酶消化以便能够这样做, 并且 (c) 作为消化过程的结果, 检测保留在胎儿DNA中但不存在于母体DNA中的DNA序列的存在。一种包含事物的方式。一旦鉴定, 就对胎儿DNA进行诊断, 例如检测染色体/ DNA畸变, 特别是非整倍性, 例如胎儿三体性21。

