

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4806150号
(P4806150)

(45) 発行日 平成23年11月2日(2011.11.2)

(24) 登録日 平成23年8月19日(2011.8.19)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N	33/566	(2006.01)	G O 1 N 33/566

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2001-532245 (P2001-532245)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成12年10月16日(2000.10.16)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2003-527098 (P2003-527098A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成15年9月16日(2003.9.16)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/028627		パーク アボット パーク ロード 10
(87) 国際公開番号	W02001/029264		O
(87) 国際公開日	平成13年4月26日(2001.4.26)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成19年10月3日(2007.10.3)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	09/419, 212	(74) 代理人	100105131
(32) 優先日	平成11年10月15日(1999.10.15)		弁理士 井上 満
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞検出のための核酸プライマー及びプローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 及び配列番号 3 で示される塩基配列からなるプライマーセット。

【請求項 2】

配列番号 2 及び配列番号 3 で示される塩基配列からなるプライマーセット、並びに配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 で示される塩基配列からなる群から選ばれる配列を有するプローブ含む C K 1 9 を検出するための組成物。

【請求項 3】

C K 1 9 を増幅する方法であって、(a) 核酸増幅試薬、請求項 1 に記載の プライマーセット、及び C K 1 9 を含む疑いのある試験サンプルを含む反応混合物を形成するステップ及び(b) 混合物を増幅条件に置き、C K 1 9 に相補的な核酸配列の少なくとも一コピーを生成するステップ

を含んでなる方法。

【請求項 4】

試験サンプル中の C K 1 9 を検出する方法であって、(a) 核酸増幅試薬、請求項 1 に記載の プライマーセット、及び C K 1 9 を含むと疑われる試験サンプルを含む反応混合物を形成するステップ、

(b) 混合物を増幅条件に置き、増幅物を生成するステップ、

(c) 配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 で示される塩基配列からな

10

20

る群から選ばれるプローブを供給するステップ、

(d) (b)において得られた増幅物にプローブをハイブリダイズさせてハイブリッドを形成させるステップ；及び

(e) 試験サンプル中のCK19の存在の指標としてハイブリッドを検出するステップ

を含んでなる前記方法。

【請求項5】

ハイブリッドの検出前にハイブリッドを微粒子に固定するステップをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

CK19を特異的に検出するためのキットであって、

(a) 配列番号2及び配列番号3で示される塩基配列、並びに

(b) 増幅試薬を含有する前記キット。

【請求項7】

配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7で示される塩基配列からなる群から選ばれるプローブをさらに含む請求項6に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、腫瘍学、特に試験サンプル中の癌の検出のためのオリゴヌクレオチドに関する。

【0002】

(発明の背景)

研究により、造血器官中の上皮細胞の存在が癌の局所から体の他の部位への拡散(転移として知られる)を示すことが示唆されている。

転移は癌のある段階での症状を示すものであり、癌患者の適切な治療に関する決定が、適切な疾病の段階の特徴づけに大きく依存することから、この発見は重要である。特に、局所の癌を有する患者の治療は、転移段階の癌患者の治療と著しく異なるものとなり得る。

【0003】

免疫細胞学的アッセイの手順を含めた造血器官中の上皮細胞の検出による癌の拡散の発見に対する努力が古くからなされてきた。残念ながら、これらのアッセイに使用され、見かけ上上皮細胞に対して特異的である抗体が、造血器官に通常見られる細胞に交差反応性を示すために、これらの方法は、たいていは不正確である。故に、「正常造血細胞」が転移癌が存在しない状態でときに検出され、それ故にこれらのアッセイの手順により偽の陽性結果が得られ得る。加えて、免疫細胞学的アッセイは感度に欠け、造血器官中に低レベルの上皮細胞が実在するとき、偽の陰性結果を生じる可能性がある。したがって、免疫細胞学的アッセイの使用により早期の転移癌が誤診され得る。

【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のような核酸増幅反応の出現によって、造血器官に存在する上皮細胞が、蛋白質レベルに代わって核酸レベルで検出できるようになった。それ故に交差反応性を有する抗体に関連する問題は避けられるようになった。加えて、核酸増幅反応が、従来の抗体に基づくアッセイ法よりも著しく高感度であることはよく知られている。血流中の上皮細胞の検出のための増幅に基づくアッセイは、それ故に、転移癌の初期の発見のための免疫細胞学的アッセイに対し著しい利点をもたらした。

【0005】

造血器官中の上皮細胞の検出に使用されるPCRに基づくアッセイは文献で報告されてきた。これらのアッセイのほとんどは、上皮細胞の表面にある蛋白質の一種であるサイトケラチン19(CK19)をコードする核酸配列を標的にしている。しかし、偽遺伝子(CK19遺伝子を綿密に模倣する核酸配列を含有する)がヒトゲノム中に存在する。従って、CK19標的配列の検出のための増幅アッセイを開発する者が直面する一つの課題は、

10

20

30

40

50

CK19由来の配列を増幅し検出するが、密に関連する偽遺伝子を増幅し検出しないアッセイを設計することである。

【0006】

加えて、増幅プライマー配列を、密に関連する配列とのコンピュータ上での比較に基づいて選択できることがよく知られている。理論上では、この方法で選択された配列を、核酸増幅の原理に従って使用するとき、選択された標的配列のコピーを効果的に生成するはずである。しかし、上記方法で選択された配列の理論上の効力にもかかわらず、多くの場合、このような配列が許容可能な量の増幅物を生成しないことは事実である。残念ながらこの現象は理解されていない。従って、最初はコンピュータプログラムを使ってプライマーをスクリーニングすることができても、このプライマーを実際に試験に使用するまで、効力を的確に決定することができない。

10

【0007】

増幅物の検出のための微粒子捕捉に基づく検出法を使用するPCRアッセイの設計者は、さらなる課題に直面している。特に、微粒子の補助によって検出される増幅された標的配列は十分に短いので、微粒子上に捕捉された増幅物は、さらなる増幅物の捕捉を妨げない。従って、微粒子の補助によって増幅物の検出を選択する者は、適当な標的配列の選択に関してさらなる制限に直面する。特に、適当な標的配列は、比較的短い配列とならざるを得ない。

【0008】

従って、当該技術分野において、核酸増幅の原理に従って、微粒子ベースの検出技術を用いて、CK19標的配列を検出するために使用され得る配列と方法が必要とされている。

20

【0009】

(発明の概要)

本発明は、CK19標的配列を特異的かつ高感度に検出するために使用可能な核酸配列を提供する。特に、本発明で使用されるプライマー配列は、配列番号2及び配列番号3で示される。本明細書において、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14として同定される配列は、配列番号2及び3によって生成された増幅物の検出のためのプローブとして使用される。上記配列の組み合わせは、末梢血中のCK19標的配列を検出するための増幅反応の実施に用いられる他の試薬と共に、キットとして提供される。

30

【0010】

本明細書において配列番号1で示されるCK19標的配列は、核酸増幅試薬、CK19標的配列を含む試験サンプル、及び配列番号2及び3を含むプライマーセットを含む反応混合物の形成によって増幅することができる。増幅後、増幅された標的配列を検出することができる。例えば、配列番号4、5、6及び7で示される任意のプローブ又は任意のプローブの組み合わせを用いて、増幅された標的配列にハイブリダイズさせ、プローブ/増幅物ハイブリッドを形成させ、その後それを微粒子捕捉技術により検出することができる。故に、プライマーもしくはプローブを標識し、増幅された標的配列を捕捉及び検出することができ、よって試験サンプル中の標的配列の存在を示すことができる。

【0011】

(発明の詳細な説明)

前に記載されたように、本発明は、試験サンプル中のCK19標的配列の増幅及び検出のための試薬、方法、キットを提供する。特に、配列番号2及び3を増幅プライマーとして使用して、本明細書において配列番号1と示されるCK19標的配列を増幅することができる。これらのプライマーが、微粒子捕捉及び検出技術で分析できる増幅物を特異的かつ高感度に生成することが発見された。配列番号4から7を有するプローブ配列を用いて、特異性を確実にして、増幅物を検出することができる。

40

【0012】

本明細書で開示されたプライマー及びプローブ配列は、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)および核酸類似物、例えば、国際特許出願WO92/20702に開示

50

されたペプチド核酸 (PNA) または米国特許第 5, 185, 444 号、第 5, 034, 056 号及び第 5, 142, 047 号 (これらは本明細書において引用文献として援用される) に記載されたモルホリノ類似体を含むが、これらに限定されない非荷電核酸類似物を含んでいても良い。このような配列は、現在利用可能な多様な技術を用いて、普通に合成され得る。例えば、DNA の配列は、従来の核酸ホスホアミダイド化学、及び Applied Biosystems 社 (Foster City, CA)、DuPont (Wilmington, DE)、Milligen (Bedford, MA) から入手可能な機器を使用して合成され得る。同様に、所望ならば、配列は、米国特許第 5, 464, 746 号、第 5, 424, 414 号、及び第 4, 948, 882 号 (本明細書において引用文献として援用される) に記載されているように、当該技術分野において周知の方法を使用して標識され得る。しかし、プライマーとして使用される配列は、少なくとも配列の 3' 末端に DNA を含み、好ましくは完全に DNA からなることは理解されよう。

10

【0013】

本明細書で使用される「標的配列」は、検出され、増幅され、検出および増幅される核酸配列、あるいは本明細書において提供される配列の一つに相補的な核酸配列を意味する。標的配列という用語はときどき一本鎖と称されるが、当業者は、標的配列が実際は二本鎖であってもよいことを認めるであろう。

【0014】

本明細書で使用される「試験サンプル」という用語は、標的配列を含有する疑いのある全てのものを意味する。試験サンプルは、任意の生物学的起源のもの、例えば血液、気管支肺胞洗浄液、唾液、咽頭スワブ、眼レンズ液、脳脊髄液、汗、痰、尿、乳、腹水、粘液、滑液、腹膜液、羊水、例えば心臓組織等の組織、または発酵ブロス、細胞培養物、化学反応混合物等に由来し得る。こうした試験サンプルは、(i) そのような起源から得たままの状態直接、あるいは(ii) サンプルの特性を変えるための前処理の後で使用することができる。したがって、例えば、血液からの血漿の調製、細胞の破壊、固体物質からの液体の調製、粘性流体の希釈、液体の濾過、液体の蒸留、液体の濃縮、阻害成分の不活性化、試薬の添加、核酸の精製などにより、試験サンプルを使用前に前処理することができる。

20

【0015】

配列番号 2 及び 3 を、増幅プライマーとして使用し、当技術分野においてよく知られた増幅手順に従って、標的配列を増幅することができる。好ましくは、本明細書で提供される配列は、米国特許第 4, 683, 195 号及び第 4, 683, 202 号 (これらは本明細書に引用文献として採用される) に記載されたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の原理に従って使用される。標的配列が RNA である場合、逆転写段階が標的配列の増幅に含まれるべきであることは、当業者に理解されるであろう。Rt TH のような逆転写活性を有する酵素は、RNA 鋳型から DNA 配列を合成することができる活性があることでよく知られている。逆転写 PCR (RT PCR) は、当該技術分野において周知であり、米国特許第 5, 310, 652 号及び第 5, 322, 770 号 (これらは本明細書において引用文献として援用される) に記載されている。

30

【0016】

従って、本発明における増幅方法は、通常、(a) 核酸増幅試薬、配列番号 2 及び 3、及び標的配列を含有すると疑われる試験サンプルを含む反応混合物を形成するステップ、及び (b) 混合物を増幅条件下に置き、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも一コピーを生成するためのステップを含む。上記方法のステップ (b) が、当該技術分野において周知なように、反応混合物の温度サイクルによって数回繰り返し得ることは理解されるであろう。

40

【0017】

上記の記載のように、反応混合物は、ポリメラーゼ活性 (及び必要に応じて逆転写活性) を有する酵素、マグネシウム、又はマンガンのような酵素補因子、塩、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、及び、例えばデオキシアデニン三リン酸、デオキシグ

50

アニン三リン酸、デオキシシトシン三リン酸、及びデオキシチミン三リン酸などのデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を含むがこれらに限定されない周知の試薬を含む「核酸増幅試薬」を含む。

【0018】

「増幅条件」とは、通常、プライマー配列の標的配列へのハイブリダイズ又はアニーリング及び、その後のプライマー配列の伸長を促進させる条件として定義される。このようなアニーリングが、いくつかのパラメーター (温度、イオン強度、配列の長さ、相補性、及び配列の G : C 含有量など) に相当に予測可能な様態で依存することは、当該技術分野においてよく知られている。例えば、相補的な核酸配列の環境において、温度を低下させるとアニーリングは促進される。任意に与えられた配列のセットにおいて、融解温度、すなわち T_m は、いくつかの既知の方法のいずれかによって推測することができる。典型的には、診断用途では、融解温度に近似 (すなわち 10 °C 以内) のハイブリダイゼーション温度が使用される。イオン強度すなわち「塩」濃度も、小さい陽イオンがホスホジエステル骨格上の負電荷を打ち消すことによって二本鎖の形成を安定化する傾向があるため、融解温度に影響する。典型的な塩濃度は陽イオンの性質と原子価に依存するが、このことは当業者によってたやすく理解される。同様に、A : T 対が 2 つの水素結合を有するのに対して、G : C 対は 3 つの水素結合を有することから、また、より長鎖の配列は、配列を共に保持する水素結合をより多く有することから、高 G : C 含有量及びより長い配列の長さ、二本鎖の形成を安定化することも良く知られている。従って、高 G : C 含有量およびより長鎖の配列は、融解温度の上昇によって、ハイブリダイゼーション条件に影響する。

10

20

【0019】

ひとたび診断用途に対して配列が選択されれば、G : C 含有量と長さは明らかにされ、ハイブリダイゼーション条件が包含するものを正確に決定するために利用され得る。イオン強度は一般的に酵素活性のために最適化されるため、変化させる残った唯一のパラメーターは温度である。一般的に、ハイブリダイゼーション温度は、プローブ又はプライマーの T_m もしくはその近似値で選択される。従って、特定のプライマー、プローブ、もしくはプライマーとプローブのセットに適切なハイブリダイゼーション条件を獲得することは、当該技術分野の研究者が有する通常の技術の範囲内で十分可能である。

【0020】

上記方法で産出された増幅物は、CK19 標的配列の増幅中又はその後を検出され得る。増幅中に標的配列の増幅を検出する方法は、米国特許第 5,210,015 号 (これは本明細書において引用文献として援用される) に記載されている。増幅反応完了後の反応生成物の検出のためにゲル電気泳動が使用され得る。しかし好ましくは、増幅物は他の反応成分から分離され、微粒子および標識プローブを使用し検出される。故に、増幅された CK19 標的配列の検出方法は、(a) 標的配列に相補的な核酸配列に、少なくとも一つのハイブリダイゼーションプローブをハイブリダイズし、プローブ及び標的配列と相補的な核酸配列を含むハイブリッドを形成し、(b) ハイブリッドを試験サンプル中の標的配列の存在の指標として検出するステップを含む。

30

【0021】

上記方法によって形成されたハイブリッドは、微粒子及びこのようなハイブリッドの分離と検出に使用され得るラベルを使用し検出され得る。好ましくは、検出は、市販の Abbott LCX (登録商標) 装置 (Abbott Park, IL) によって使用されるプロトコルに従って実施される。

40

【0022】

本明細書で使用される「ラベル」という用語は、検出可能な特性もしくは特徴を有する分子もしくは部分構造 (moiety) を意味する。ラベルは、例えば放射性同位体、蛍光体、化学発光体、酵素、コロイド粒子、蛍光微粒子等を使用して直接的に検出できる。また、例えば特異的結合メンバーを使用して間接的に検出できる。直接的に検出可能なラベルは、さらなる要素、例えば基質、誘発試薬、光線、その他ラベルの検出を可能とするものを必要とする可能性もあることが理解されるであろう。間接的に検出可能なラベルが使

50

用されるときは、一般的に「コンジュゲート」と組み合わせて使用される。コンジュゲートは、一般的に、直接的に検出可能なラベルに接着もしくは結合している特異的結合メンバーである。コンジュゲート合成におけるカップリングケミストリーは、当該技術分野においてよく知られており、例えば、特異的結合メンバーの特異的結合特性もしくはラベルの検出可能特性を破壊しない任意の化学的手法及び/又は物理的手法を含むことができる。本明細書で使用される「特異的結合メンバー」は、結合対、すなわち、一方の分子が例えば化学的もしくは物理的手段により特異的に他方の分子に結合する2つの異なる分子のうち一つのメンバーを意味する。抗原と抗体の特異的結合体に加え、その他の結合対としてアビジンとビオチン、ハプテンとハプテンに対して特異的な抗体、相補的な核酸配列、酵素補因子もしくは基質と酵素等が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0023】

「微粒子」は、不溶性であるか、もしくは後の反応によって不溶化され、粒子形状を有する任意の材料を示す。従って、微粒子は、ラテックス、プラスチック、誘導体化プラスチック、磁性もしくは非磁性金属、ガラス、シリコン等であってよい。非常に数多くの微粒子形態のものもよく知られており、ビーズ、シェーピング、グレインや当業者に知られたその他の粒子を含むがこれらに限定されるものではない。本発明の微粒子は、好ましくは0.1 μM ~ 1 μMのサイズであり、より好ましくは0.3 μM ~ 0.6 μMのサイズである。

【0024】

一態様としては、ハイブリッドは、検出を容易にするためにラベルをプライマー及び/またはプローブ配列内に組み込むことによって検出され得る。故に、プライマー及びプローブに接着した第一及び第二の特異的結合メンバーを用いて、ハイブリッドを微粒子に固定し、コンジュゲートの補助により微粒子の存在を検出することができる。

20

【0025】

別の態様としては、特異的結合メンバーと直接的に検出可能なラベルの組み合わせは、ハイブリッドの検出のために使用され得る。例えば、特異的結合メンバーは、特異的結合メンバーで標識されたプライマーを使ってハイブリッドに導入され得る。直接的に検出可能なラベルは、直接的に検出可能なラベルで標識されたプローブを使ってハイブリッドに組み込まれ得る。故に、ハイブリッドを、特異的結合メンバーを使って微粒子に固定化し、プローブ上のラベルの効力により直接検出することができる。他の検出形態が当業者にとって適宜選択されるものであることが理解されよう。

30

【0026】

好ましい態様としては、米国特許出願番号08/514,074(1995年8月14日出願、本明細書において引用文献として援用される)に記載の「オリゴヌクレオチドハイブリゼーションPCR」(本明細書ではときに「OH PCR」と示される)増幅反応が、CK19標的配列の検出に使用される。すなわち、好ましい方法で使用される試薬は、少なくとも一つの増幅プライマー及び少なくとも一つの内部ハイブリダイゼーションプローブ、さらに増幅反応を実施するための増幅試薬を含む。

【0027】

プライマー配列は、標的配列(もしくはその相補体)のコピーの伸長を開始するために使用され、捕捉ラベル又は検出ラベルのいずれかによっても標識される。プローブ配列は、プライマー配列によって生成される配列とハイブリダイズするために使用され、一般的にプライマー配列を含まない配列とハイブリダイズする。プライマー配列と同様に、プローブ配列も捕捉ラベル又は検出ラベルのどちらかによって標識されるが、ただし、プライマーが捕捉ラベルにより標識されたときには、プローブは検出ラベルで標識され、プライマーが検出ラベルで標識されたときには、プローブは補足ラベルで標識される。検出ラベルは、前に定義された「ラベル」と同じ定義であり、「捕捉ラベル」は、一般的に、伸長物及びこのような任意の生成物と結合したプローブを他の増幅反応物から分離させるために用いられる。(前に定義された)特異的結合メンバーは、この目的によく適合している。また、この方法によって使用されるプローブは、好ましくは3'末端で阻止されるので、

40

50

ハイブリダイゼーション条件下で伸長しない。プローブの伸長を妨げる方法は、当業者に良く知られ、適宜選択されるものである。一般的に、プローブの3'末端へのリン酸基の添加は、プローブの伸長を阻止する目的を十分に果たす。

【0028】

プローブが初期には反応混合物の成分であるという上記の好ましい態様によれば、プライマー、プローブ、および増幅条件を選択して、プローブ配列がプライマー配列より低い融解温度を有するようにし、反応混合物を増幅条件下に置くと、標的配列もしくはその相補体のコピーがプローブの T_m より高い温度で生成されるようにするのが好ましい。このようなコピーを合成した後、変性し、混合物を冷却して、プローブと標的もしくはその相補体の任意のコピーとの間のハイブリッド形成を可能にする。変性温度からプローブが一本鎖のコピーと結合する温度への温度低下速度は、好ましくはかなり急速であり（例えば8～15分間）、特に、ポリメラーゼ活性を有する酵素がプライマーの伸長に対して活性を持つ温度範囲にわたる。このような急速な冷却は、プライマー/コピー配列ハイブリダイゼーションおよび伸長反応よりむしろコピー配列/プローブハイブリダイゼーションに有利に働く。

10

【0029】

以下に記載の実施例は、本発明をさらに例示するものであり、本発明を限定するものではない。

【0030】

(実施例)

20

以下の実施例は、本明細書で提供されるDNAオリゴマープライマーとプローブを使用した、サイトケラチン19 (CK19) の検出を示す。これらのDNAプライマーおよびプローブは、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8として同定され、CK19遺伝子内のある領域に特異的である。CK19遺伝子標的の部分は、配列番号1と示される。

【0031】

以下の実施例において、配列番号2、配列番号3、および配列番号8は、CK19遺伝子に特異的な増幅プライマーとして使用される。配列番号4、配列番号5、配列番号6、および配列番号7は、CK19遺伝子増幅物の内部ハイブリダイゼーションプローブとして使用される。

30

【0032】

実施例1. CK19プライマーおよびプローブの調製

A. CK19プライマー

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションPCRによりCK19遺伝子標的配列を増幅し検出する標的的特異的プライマーおよびプローブを設計した。これらのプライマーは、配列番号2、配列番号3、および配列番号8である。プライマー配列は、標準的なオリゴヌクレオチド合成法により合成され、米国特許第5,424,414 (本明細書において引用文献として援用する) に記載された標準的なシアノエチルホスホルアミダイトカップリング化学により5'末端においてアダマンタンでハプテン化された。

【0033】

40

B. CK19プローブ

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによりCK19標的配列とハイブリダイズする検出プローブを設計した。これらのプローブは、配列番号4、配列番号5、配列番号6、および配列番号7である。プローブ配列は、標準的なオリゴヌクレオチド合成法により合成され、米国特許第5,464,746 (本明細書において引用文献として援用する) に記載された標準的なシアノエチルホスホルアミダイトカップリング化学により3'末端において2つのカルバゾールでハプテン化された。

【0034】

実施例2. CK19 mRNAおよびcDNAの調製

CK19 RNAは、アメリカンタイプカルチャーコレクション、ATCC # HTB - 13

50

3、Rockville, Marylandから得られるT47D腺管癌細胞系から抽出された。

【0035】

RNAは、Gibco, Grand Island, NYのTRIzol (登録商標) 試薬を製品の指示書に従い使用して、T47D細胞培養物から抽出、精製された。精製RNAは、260nmの吸光度と、40の吸光係数を使用し分光光度測定法により定量し、または細胞当たりの量で定量した。

【0036】

cDNAは、(上記方法で調製された) $1 \sim 10 \times 10^5$ の細胞から精製されたRNAを、2.5ユニットMuLV逆転写酵素と共に、いずれも1mMのdGTP、dATP、dCTP、dTTP、0.5ユニットのRNase阻害剤、および2.5μMオリゴd(T)₁₆を含有する10mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、5mM MgCl₂バッファー中で、42℃で30分間インキュベートすることにより調製した。次いで99℃で5分間加熱し、4℃で5分間冷却し、4℃で保存した。

10

【0037】

実施例3. CK19の検出

A. CK19 cDNAの検出

(実施例2に記載の方法で調製された) T47D細胞系からのcDNAを、水10μlに対して1細胞に相当するように希釈した。配列番号2および配列番号3をプライマーとし、配列番号4、及び配列番号5を検出プローブとして使用して希釈されたcDNAをPCR増幅し検出した。すべての反応は、50mM N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン、81.7mM 酢酸カリウム、33.33mM 水酸化カリウム、0.01mg/ml ウシ血清アルブミン、0.1mM エチレンジアミンテトラ酢酸、0.02mg/ml アジ化ナトリウム、および8% (w/v) グリセロールを含有する190μlのバッファー中(pH8.15)で実施した。反応混合物は、5ユニット/反応の濃度の組換えThermus thermophilusポリメラーゼを、いずれも0.15mMのdATP、dGTP、dTTP、およびdCTPと共に使用した。配列番号2は250nMの濃度で使用し、配列番号3は500nMの濃度で使用し、またどちらのプローブも10nMで存在した。10μlサンプルを添加する直前に、1.63mMの最終濃度で塩化マンガンを添加した。陰性対照として水およびヒト胎盤DNA(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を用い3回繰り返して試験を行った。

20

30

【0038】

Perkin-Elmer 480 Thermal Cyclerを用いて94℃40秒間と58℃60秒間を45サイクルくり返すことにより反応混合物をPCR増幅した。反応物の温度サイクルをくり返した後、混合物を97℃で5分間維持し、プローブオリゴハイブリダイゼーションを12℃で5分間冷却することにより完成させた。プローブのハイブリダイゼーションの後、サンプルを試験されるまで12℃に保った。

【0039】

反応生成物を、Abbott LCx system (登録商標, Abbott Laboratories, Abbott Park, ILより入手可) によって検出した。抗カルバゾール抗体でコートした微粒子および抗アダマンタン抗体/アルカリホスファターゼコンジュゲート(これらはすべてAbbott Laboratories, Abbott Park, ILより入手可)の懸濁液を、LCx (登録商標) と共に用い、反応生成物の捕捉、検出を行った。この実験で得られる平均値(カウント/秒/秒; c/s/sの単位で算出される)および標準偏差(SD)は表1に示され、T47D細胞一個の同等物からのCK19 cDNAの特異的検出を示している。

40

【0040】

【表1】

表 1

サンプル	濃度/反応	LCx速度 (c/s/s)	LCx速度 (SD)
T47D cDNA	1細胞	907	18.17
ヒト胎盤 DNA	100ng	27	0.29
水	0	14	1.21

10

【0041】

付け加えるならば、上記の温度サイクルステップの直後、少量のサンプルをオリゴハイブリダイゼーション前に取り除き、2%アガロースゲル上でSYBR（登録商標）グリーンで染色して目視した。ゲルは予想される152塩基対の生成物を示した（データは示さず。）

【0042】

B. RNAまたはcDNAからのCK19の検出感度

実施例2に示す方法でT47D細胞系から精製されたRNAを、反応あたり 1×10^4 から 1×10^{-4} 細胞になるように水で10倍ごとに希釈し、その後、上記実施例3.Aに示された反応混合物で60で30分間初期インキュベートすることにより、逆転写した

20

。次いでサンプルをPCR増幅し、実施例3.Aの方法で検出した。試験は水を陰性対照として3回行われた。

【0043】

T47D細胞系からのcDNAを開始材料として使用して、上記のものを、実施例2に示す方法で調製し、反応あたり 1×10^3 から 1×10^{-4} 細胞となるよう水で10倍ごとに希釈したcDNAと比較した。反応混合物をPCR増幅し実施例3.Aの方法で検出した。

【0044】

この実験で得られる平均値（カウント/秒/秒；c/s/sの単位で算出される）および標準偏差（SD）は表2に示され、開始サンプルとしてRNAを用いると反応あたり 1×10^{-4} 細胞程度の低い濃度でT47D細胞からのCK19を検出し、開始サンプルとしてcDNAを用いると、反応あたり 1×10^{-3} 細胞程度の低濃度でT47D細胞からのCK19を検出することを示している。従って、これらのプライマーとプローブを使用したこの方法により、RNAとcDNAいずれかを開始サンプルとしてもCK19の検出が可能となる。これはcDNAが以外に早く効果的に調製され、容易に保存され、より安定であり、分解の危険性が少ないことから、臨床研究室の実験において重要となり得る。

30

【0045】

【表2】

表 2

サンプル (細胞/反応)	RNA LCx速度c/s/s (SD)	cDNA LCx速度 c/s/s (SD)
1 x 10 ⁴	1215 (34)	ND
1 x 10 ³	1176 (37)	1177 (34)
1 x 10 ²	1132 (22)	1199 (43)
1 x 10 ¹	1122 (24)	1119 (22)
1 x 10 ⁰	1114 (45)	1135 (29)
1 x 10 ⁻¹	1139 (18)	1143 (10)
1 x 10 ⁻²	1050 (47)	1134 (40)
1 x 10 ⁻³	805 (105)	949 (183)
1 x 10 ⁻⁴	946 (73)	21 (1.0)*
Water	20 (0.5)	21 (1.6)

(*著しく外れた値は除く)

【0046】

実施例4 . 1つおよび2つのプローブによるCK19の検出の比較

実施例2の方法で調製された精製T47D cDNAを、水で反応あたり0.025細胞に希釈した。その後、n=3でPCR増幅を行い、実施例3Aに示されたように配列番号4、配列番号5検出プローブの両方を使用し、もしくは配列番号5のみを単一検出プローブとして使用して検出した。水とヒト胎盤DNAを陰性対照として使用した。

【0047】

この実験で得られる平均値(カウント/秒/秒; c/s/sの単位で算出される)および標準偏差(SD)は表3に示され、両方のプローブを使用すると、アッセイのバックグラウンドを増加させずにシグナルを増加させる結果となることを示唆している。従って、ただ一つのプローブを使用する代わりに両方のプローブを使用することが、CK19の検出において有利である。

【0048】

【表3】

表 3

サンプル	濃度/反応	単一プローブ LCx速度 c/s/s (SD)	両プローブ LCx速度 (SD)
T47D cDNA	0.025細胞	672 (60) *	955 (65)
ヒト胎盤 DNA	1μg	41 (7.4)	45 (9.0)
水	0	21 (1.7)	25 (2.9)

(*著しく外れた値は除く)

【0049】

実施例5 . プライマーの長さの比較

配列番号3プライマーと、さらに2つのヌクレオチドを含んでいる配列番号8プライマーの使用について比較を行った。実施例2の方法で調製された精製T47D cDNAを、水で反応あたり0.05細胞に希釈した。その後、サイクル条件が94 40秒間と58

80秒間の45サイクルに変えたことを除く実施例3.Aの方法で、n=6でPCR増幅した。反応混合物は、実施例3.Aに示すとおりで、配列番号2プライマーと、配列番号3もしくは配列番号8プライマーのいずれかを使用した。陰性対照として水とヒト胎盤DNAをn=3で試験した。反応生成物を実施例3.Aに示す方法で検出した。

【0050】

この実験で得られるデータは表4に示され、配列番号3プライマーの代わりに配列番号8プライマーを用いると、ヒト胎盤DNAでのバックグラウンドが上がり、したがって特異性を喪失するため、アッセイに不利益をあたえることを示唆している。

【0051】

【表4】

10

表 4

サンプル	濃度/反応	プライマー 配列番号3 LCx速度 c/s/s (SD)	プライマー 配列番号8 LCx速度 c/s/s (SD)
T47D cDNA	0.05細胞	633(58)	685(90)
ヒト胎盤 DNA	1 μ g	52(8.7)	403(41)
水	0	26(ND)	26(6.3)

20

【0052】

本発明は特定の実施態様に関して詳細に記載されているが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、そのような実施態様に種々の変更および修飾を加えることは、当業者には明らかであろう。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Abbott Laboratories
Scheffel, C.
Granados, E.

<120> NUCLEIC ACID PRIMERS AND PROBES FOR
DETECTING TUMOR CELLS

<130> 6589.US.01

<140> US 09/419,212

<141> 1999-10-15

<160> 8

10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 180

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcctgggccc ctcccgcgac tacagccact actacacgac catccaggac ctgcgggaca 60
agattccttg tgccaccatt gagaactcca ggattgtcct gcagatcgac aacgcccgtc 120
tggctgcaga tgacttccga accaagttyg agacggaaca ggctctgcgc atgagcgtgg 180

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Primer

<400> 2

ccgcgactac agccactact acac 24

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Primer

<400> 3

gagcctgttc cgtctcaaa 19

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 4

ccatccagga cctgc

15

<210> 5

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

10

<400> 5

atcgacaacg ccc

13

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 6

gcaggtcctg gatgg

15

<210> 7

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Probe

<400> 7

gggcgttgtc gat

13

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Primer

<400> 8

gagcctgttc cgtotcaaac t

21

フロントページの続き

(74)代理人 100117053

弁理士 相馬 貴昌

(72)発明者 グラナドス, エドワード・エヌ

アメリカ合衆国、イリノイ・60061、バーノン・ヒルズ、モンゴメリー・19

(72)発明者 シエフエル, クリステイ・パウエル

アメリカ合衆国、イリノイ・60060、マンダライン、バンバリー・925

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 米国特許第05766888(US, A)

国際公開第1999/014372(WO, A1)

Nucleic Acids Research, 1987年, Vol.15, p.10058

Int.J.Cancer., 1999年 1月, Vol.80, p.119-125

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/68

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq