

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5840708号
(P5840708)

(45) 発行日 平成28年1月6日(2016.1.6)

(24) 登録日 平成27年11月20日(2015.11.20)

(51) Int.Cl.		F I			
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

請求項の数 16 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2013-558385 (P2013-558385)	(73) 特許権者	511286517
(86) (22) 出願日	平成24年3月12日 (2012. 3. 12)		ヴェンタナ メディカル システムズ、 インク、
(65) 公表番号	特表2014-509516 (P2014-509516A)		アメリカ合衆国 アリゾナ 85755、
(43) 公表日	平成26年4月21日 (2014. 4. 21)		ツーソン、 イースト イノベーション パーク ドライブ 1910
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/054193	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開番号	W02012/123387		弁理士 園田 吉隆
(87) 国際公開日	平成24年9月20日 (2012. 9. 20)	(74) 代理人	100101199
審査請求日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		弁理士 小林 義教
(31) 優先権主張番号	61/452, 347	(72) 発明者	ファレル, マイケル
(32) 優先日	平成23年3月14日 (2011. 3. 14)		アメリカ合衆国 アリゾナ 85704、
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ツーソン、 プラシータ デル カード 8662

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染色体転座を解析する方法及びそのシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

切断点に関連した染色体転座についてサンプルを分析するための方法であって、

- 切断点に対して5'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された第一配列を含む第一核酸プローブ、
- 切断点に対して3'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された第二配列を含む第二核酸プローブ、及び
- 切断点に隣接したゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された第三配列を含む第三核酸プローブ

とサンプルを接触させ、

10

サンプル中でゲノムDNAにハイブリダイズするためにプローブに適した条件を確立し、

第一核酸プローブに関連した第一シグナル、第二核酸プローブに関連した第三シグナル、及び第三核酸プローブに関連した第二シグナルを検出することによりプローブのハイブリダイゼーションを検出し、

サンプルの順序と配向とは第一シグナル、第二シグナル、及び第三シグナルの配置である、サンプルの順序と配向を同定し、及び

サンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することを含む方法。

【請求項2】

第三配列は、切断点に対して5'に隣接したゲノムDNAにハイブリダイズするように

20

構成され、そしてサンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することは、サンプルの順序と配向が、対照の順序と配向と比較した場合に第一シグナルと第三シグナルの逆転を含むかどうかを確立することを、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第三配列は、切断点に対して 3' に隣接したゲノム DNA にハイブリダイズするように構成され、そしてサンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することは、サンプルの順序と配向が、対照の順序と配向と比較した場合に第二シグナルと第三シグナルの逆転を含むかどうかを確立することを、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

第三配列は、切断点に対して 5' 及び 3' の両方に位置する切断点に隣接したゲノム DNA にハイブリダイズするように構成され、そしてサンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することは、サンプルの順序と配向が、対照の順序と配向と比較した場合に第一シグナル又は第二シグナルのどちらかと第三シグナルとの逆転を含むかどうかを確立することを、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

- 切断点に対して 5' に位置するゲノム DNA にハイブリダイズするように構成された第一配列を含む第一核酸プローブ、
 - 切断点に対して 3' に位置するゲノム DNA にハイブリダイズするように構成された第二配列を含む第二核酸プローブ、及び
 - 切断点に隣接したゲノム DNA にハイブリダイズするように構成された第三配列を含む第三核酸プローブ
 と対照サンプルを接触させ、

対照中でゲノム DNA にハイブリダイズするためにプローブに適した条件を確立し、及び

第一核酸プローブに関連した第一シグナル、第二核酸プローブに関連した第三シグナル、及び第三核酸プローブに関連した第二シグナルを検出することによりプローブのハイブリダイゼーションを検出する

ことを含み、切断点に関連した染色体転座を欠いていることが知られる対照サンプルを分析することにより対照の順序と配向を決定することを更に含む請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

核酸プローブは、検出可能な部分で標識された RNA、DNA、PNA、LNA 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される核酸を含み、検出可能な部分は、ハプテン、酵素、蛍光分子、発光分子、及び放射性分子からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

検出可能な部分はハプテンであり、第一、第二及び第三核酸プローブは、それぞれ異なる第一、第二及び第三ハプテンで標識され、任意で、異なる第一、第二および第三ハプテンは、ピオチン、2, 4 - ジニトロフェニル (DNP)、フルオレセイン誘導体、ジゴキシゲニン (DIG)、5 - ニトロ - 3 - ピラゾールカルバミド (ニトロピラゾール、NP)、4, 5, - ジメトキシ - 2 - ニトロシンナミド (ニトロシンナミド、NCA)、2 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - キノリン - 4 - カルバミド (フェニルキノロン、DPQ)、2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 5 - カルバミド (ベンゾフラザン、BF)、3 - ヒドロキシ - 2 - キノキサリンカルバミド (ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、ロテノイソキサゾリン (Rot)、(E) - 2 - (2 - (2 - オキソ - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ [b] [1, 4] ジアゼピン - 4 - イル) フェノキシ) アセトアミド (ベンゾジアゼピン、BD)、7 - (ジエチルアミノ) - 2 - オキソ - 2H - クロメン - 3 - カルボン酸 (クマリン 343、CDO)、2 - アセトアミド - 4 - メチル - 5 - チアゾールスルホンアミド (チアゾールスルホンアミド、TS)、及び p - メトキシフェニルピラゾボ

10

20

30

40

50

ドフィルアミド (Podol) からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

検出することが、第一、第二、及び第三ハプテンにそれぞれ特異的である第一、第二及びノ又は第三抗体とサンプルとを接触させることを含み、又は検出することが、抗ハプテン認識及び酵素的シグナル増幅を用いて、第一ハプテン、第二ハプテン及び第三ハプテンを検出することを更に含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

切断点に対して 5' に位置するゲノム DNA の一部分にハイブリダイズするように構成された配列を有する第一核酸プローブ、

切断点に対して 3' に位置するゲノム DNA の一部分にハイブリダイズするように構成された配列を有する第二核酸プローブ、及び

切断点に隣接した DNA の一部分にハイブリダイズするように構成された配列を有する第三核酸プローブ

を含む、切断点に関連した染色体転座についてサンプルを分析するためのキット。

【請求項 10】

第三核酸プローブは、切断点の 5' 側と 3' 側の両方で切断点に隣接してまたいでいる DNA の一部分にハイブリダイズするように構成される配列を有する、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

第一、第二、及び第三核酸プローブは、第一、第二、及び第三ハプテンでハプテン化され、キットが第一、第二、及び第三ハプテンの視覚化を可能にするように構成された検出試薬を更に含む、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 12】

検出試薬は、第一、第二、及び第三ハプテンの明視野可視化を可能にするように構成された発色検出試薬である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

患者から単離されたサンプル中のゲノム DNA が切断点に関連した染色体転座を持つかどうかを判定するための方法であって、

サンプル中でゲノム DNA にハイブリダイズするためにプローブに適した条件下で、サンプルを一連の核酸プローブと接触させ、その一連は、切断点に関連した染色体転座の欠損下において、その一連が第一の順序と配向に従ってサンプル中でゲノム DNA にハイブリダイズするように、及び、切断点に関連した染色体転座の存在下において、その一連が異なる順序と配向に従ってサンプルにハイブリダイズするように選択され、

サンプル中でゲノム DNA にハイブリダイズしたその一連の核酸プローブの順序と配向を検出することを含み、ここで、第一の順序と配向を検出することは、サンプル中のゲノム DNA が切断点に関連した染色体転座を持たないとする判定を提供することを含む方法。

【請求項 14】

第一の順序と配向は、染色体に沿って長軸方向に配置された 3 つのシグナルの予め決められた連続である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

検出は、明視野画像を用いて視覚化される発色性検出試薬を用いることを含む、請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 の何れか一項に記載の方法を含む、患者における切断点に関連した染色体転座に関連した疾患を診断するために用いられる、データの収集方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、染色体転座を分析するためのシステムおよび方法に関し、特にインサイツハ

10

20

30

40

50

イブリダイゼーションによる染色体転座の解析に関する。

【背景技術】

【0002】

罹患した生物から採取した組織又は細胞サンプルの解釈に基づいた、疾患の診断、予後、及び治療の決定は、過去数年間で飛躍的に拡大している。従来の組織学的染色技術及び免疫組織化学的アッセイに加えて、インサイトハイブリダイゼーション及びインサイトポリメラーゼ連鎖反応などの原位置技法は、現在ヒトの疾患状態の診断を支援するために使用される。従って、細胞形態のみならず細胞及び組織内の特定の巨大分子の存在をも評価することができる様々な技術が存在する。

【0003】

例えば発色性インサイトハイブリダイゼーション(CISH)などの分子細胞遺伝学的技術は、染色体の目視評価(核型解析)を分子技術と組み合わせている。分子細胞遺伝学的方法は、細胞内における核酸プローブとその相補的核酸とのハイブリダイゼーションに基づいている。特定の染色体領域のためのプローブは、(例えば組織サンプル中における)中期染色体上又は間期核内においてその相補的配列を認識し、ハイブリダイズするであろう。プローブは、様々な診断及び研究目的のために開発されてきた。

【0004】

配列プローブは、特定の染色体領域又は遺伝子の単一コピーのDNA配列にハイブリダイズする。これらは、目的の症候群又は病気に関連付けられた、染色体の決定的な領域又は遺伝子を識別するために使用されるプローブである。

【0005】

中期染色体では、そのようなプローブは、各染色分体にハイブリダイズし、通常、染色体ごとに2つの小さな別個のシグナルを与える。

【0006】

配列プローブのハイブリダイゼーション、例えば、反復枯渴プローブ又は独特な配列プローブ(例えば米国特許出願公開第2011/0160076号を参照)は、例えば微小欠失症候群、染色体転座、遺伝子増幅及び異数性症候群などの構成的遺伝子異常、腫瘍性疾患並びに病原体感染を含む多くの疾患や症候群に関連付けられている染色体異常の検出を可能とした。最も一般的なこれらの技術は、顕微鏡スライド上の標準的な細胞遺伝学的調製物に適用される。更に、これらの手順は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織、血液又は骨髓塗抹標本、及び直接固定された細胞又は他の核分離物のスライドに使用することができる。

【0007】

これらのアッセイから得られた情報が、患者の病気を診断し、病気に罹患した患者の予後を決定し、また、疾患を持つ患者のための治療の治療コースを決定するために使用することができる。多くの場合、特定のマーカーの存在は、薬剤の予測される有効性に関連付けることができる。

【0008】

非小細胞肺癌(NSCLC)は、悪性(癌)細胞が肺の組織に形成される疾患である。NSCLCは、実は、癌で見つかった細胞の種類、及び細胞の顕微鏡下での外見にちなんで名付けられる肺癌のグループである。非小細胞肺癌の3つの主要な型は、扁平上皮癌、大細胞癌、及び腺癌である。NSCLCは肺癌の最も一般的な種類である。

【0009】

扁平上皮癌は、魚のうろこのように見える薄い、平らな細胞である扁平上皮細胞において始まる癌である。これは、類表皮癌とも呼ばれる。大細胞癌は、幾つかのタイプの大細胞において始まり得る癌である。腺癌は、肺胞を覆い、粘液などの物質を作る細胞から始まる癌である。他のあまり一般的でない型の非小細胞肺癌は、多形性、カルチノイド腫瘍、唾液腺癌、及び未分類の癌である。

【0010】

喫煙、パイプ、又は葉巻はNSCLCの最も一般的な原因である。ヒトは人生で早期に

10

20

30

40

50

喫煙を始めるほど、ヒトはより頻繁に喫煙し、ヒトはより多年にわたり喫煙し、より多くのリスクを伴う。ヒトは喫煙をやめた場合には、年が経つにつれてリスクはより低くなる。

【0011】

非小細胞肺癌を検出し、診断し、病期分類する手順及び検査はしばしば同時に行われる。以下のような検査及び手順が一般的に使用される：胸部X線；CBC、がん細胞を探すために喀痰検査；骨のスキヤン；胸部CTスキヤン；胸部のMRI；陽電子放射断層撮影法（PET）スキヤン；及び胸腔穿刺。幾つかの場合において、生検が採取され、分析される。生検により肺癌の存在が明らかになった場合には、複数の撮像検査が、癌のステージを決定するために行われる。ステージは、腫瘍の大きさと、それが広がっている程度に関する。非小細胞肺癌は5つの段階に分けられる：ステージ0 - 癌は、肺の内層を越えて転移していない；ステージI - 癌は小さく、リンパ節には未だ転移していない；ステージII - 癌は元の腫瘍近傍の幾つかのリンパ節に転移している；ステージIII - 癌は近くの組織又は遠くのリンパ節に転移している；ステージIV - 癌は身体の多くの臓器、例えば他の肺、脳又は肝臓に転移している。

10

【0012】

非小細胞肺癌の多くの異なるタイプの処置がある。処置は癌の病期によって異なる。手術は、多くの場合、近くのリンパ節を越えて転移していない非小細胞肺癌患者の第1選択の治療法である。外科医は除去することができる：肺のローブの一つ（肺葉切除）、肺のごく一部（楔状または区域の除去）、全体の肺（肺全摘）。一部の患者は、化学療法を必要とする。化学療法は癌細胞を死滅させる薬を使用し、新たなものの増殖を停止する。癌が転移している時に（ステージIV）、化学療法単独がしばしば用いられる。

20

【0013】

ある症例では、遺伝子解析が、NSCLCの最善の治療コースを決定するために行われる。例えば、EGFR遺伝子の特定の変異を有する患者の一部は、ゲフィチニブなどのEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に応答する。別の事例として、EML4-ALK転座を持つ7%のNSCLCは、臨床試験においてALK阻害剤からの恩恵を受ける場合がある。

【0014】

ブレイク - アパート（Break-apart）プローブシステムが、NSCLC患者からの組織の分析のために使用されている。しかし、NSCLCにおいて生じる染色体再配置の性質に起因して、特に再構成が、反転など同じ染色体の中である場合、偽陽性結果を伴う問題が生じる可能性がある。これらの事例では、適切にブレイク - アパートプローブの各セットからのシグナルを分離することができない場合がある。シグナルは、再構成が生じていないにもかかわらず、2つの別々のシグナルとして現れることができる。このことは、誤った結果を得ること及び生検材料の希少性のため、真の問題となる可能性がある。三色系が染色体分析のために使用されている。例えば、Makretsov et al., Genes, Chromosomes and Cancer, 40:152-57 (2004); Martin-Subero, et al., Cancer Res., 66(21):10332-38 (2006); Yoshimoto et al., Neoplasia 8(6):465-69 (2006); Renne et al., J. Mol. Diagnost., 7(3): 352-56 (2005)を参照。しかしながら、これらのシステムの何れもブレイク - アパートプローブシステムにおける偽陽性の結果に関連する問題を解決するためには適用されていない。偽陽性の結果の問題に対処するブレイク - アパートプローブシステムは、癌に罹患した患者に利益を提供するであろう。

30

40

【発明の概要】

【0015】

本開示は、染色体転座を分析するためのシステムおよび方法に関し、特にインサイツハイブリダイゼーションによる染色体転座を解析することに関する。

【0016】

例示的な実施態様において、切断点に関連付けられている染色体転座に関してサンプルを分析するための方法は、そのサンプルを、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成されている第一配列を含む第一核酸プローブ、切断点に

50

対して3'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成されている第二配列を含む第二核酸プローブ、及び切断点に隣接するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成されている第三配列を含む第三核酸プローブと接触させることを含む。

【0017】

本方法は、サンプル中のゲノムDNAにハイブリダイズするためにプローブに適した条件を確立すること、及び第一核酸プローブに関連した第一シグナル、第二核酸プローブに関連した第二シグナル、及び第三核酸プローブに関連した第三シグナルを検出することによりプローブのハイブリダイゼーションを検出することを更に含む。一実施態様において、本方法はサンプルの順序と配向を同定することを更に含み、サンプルの順序と配向は、染色体に沿って長軸方向に配置された、第一シグナル、第二シグナル、及び第三シグナルの順序である。別の実施態様において、本方法は、サンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することを更に含む。別の実施態様において、対照の順序と配向は、染色体に沿って長軸方向に配置された、第一シグナル、第二シグナル、及び第三シグナルの順序であり、ここで染色体は、切断点に関連付けられている染色体転座を欠いていることが知られている。

10

【0018】

事例的实施態様において、第三配列は、切断点に対して5'で近傍のゲノムDNAにハイブリダイズするように構成され、そしてサンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することは、サンプルの順序と配向が、対照の順序と配向と比較した場合に第一シグナルと第三シグナルの逆転を含むかどうかを確立することを含む。一実施態様において、第三配列は、切断点に対して3'で近傍のゲノムDNAにハイブリダイズするように構成され、そしてサンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することは、サンプルの順序と配向が、対照の順序と配向と比較した場合に第二シグナルと第三シグナルの逆転を含むかどうかを確立することを含む。別の実施態様において、第三配列は、切断点に対して5'及び3'の両方に位置する切断点の近傍のゲノムDNAにハイブリダイズするように構成され、そしてサンプルの順序と配向を、対照の順序と配向と比較することは、サンプルの順序と配向が、対照の順序と配向と比較した場合に第一シグナル又は第二シグナルのどちらかと第三シグナルとの逆転を含むかどうかを確立することを含む。

20

【0019】

例示的な実施態様において、本方法は、切断点に関連した染色体転座を欠いていることを知られている対照を解析することにより対照の順序と配向を決定することを含み、ここで、決定することは、その対照を、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成されている第一配列を含む第一核酸プローブ、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成されている第二配列を含む第二核酸プローブ、及び切断点に隣接するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成されている第三配列を含む第三核酸プローブと接触させることを含む。本方法は、対照群中のゲノムDNAにハイブリダイズするためにプローブに適した条件を確立すること、及び第一核酸プローブに関連した第一シグナル、第二核酸プローブに関連した第二シグナル、及び第三核酸プローブに関連した第三シグナルを検出することによりプローブのハイブリダイゼーションを検出することを更に含む。

30

40

【0020】

例示的な実施態様において、核酸プローブは、検出可能な部分で標識されたRNA、DNA、PNA、LNA及びこれらの組み合わせからなる群から選択される核酸を含む。一実施態様において、検出可能な部分は、ハプテン、酵素、蛍光分子、発光分子、及び放射性分子からなる群から選択される。別の実施態様において、検出可能な部分はハプテンであり、第一、第二及び第三核酸プローブは、それぞれ異なる第一、第二及び第三ハプテンで標識される。幾つかの実施態様において、ハプテンは、ピオチン、2,4-ジニトロフェニル(DNP)、フルオレセイン誘導体、ジゴキシゲニン(DIG)、5-ニトロ-3-ピラゾールカルバミド(ニトロピラゾール、NP)、4,5, -ジメトキシ-2-ニトロシンナミド(ニトロシンナミド、NCA)、2-(3,4-ジメトキシフェニル)-キノ

50

リン - 4 - カルバミド (フェニルキノロン、DPQ)、2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 5 - カルバミド (ベンゾフラザン、BF)、3 - ヒドロキシ - 2 - キノキサリンカルバミド (ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4 - (ジメチルアミノ)アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、ロテノンイソキサゾリン (Rot)、(E) - 2 - (2 - (2 - オキソ - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ [b] [1, 4] ジアゼピン - 4 - イル)フェノキシ (phenoxy))アセトアミド (ベンゾジアゼピン、BD)、7 - (ジエチルアミノ) - 2 - オキソ - 2H - クロメン - 3 - カルボン酸 (クマリン 343、CDO)、2 - アセトアミド - 4 - メチル - 5 - チアゾールスルホンアミド (チアゾールスルホンアミド、TS)、及び p - メトキシフェニルピラゾポドフィルアミド (p-Mehtoxyphenylpyrazopodophyllamide) (Poddo) からなる群から選択される。

10

【0021】

他の例示的实施態様において、本方法は、標識ハプテンに特異的なサンプル抗体を、例えば、第一ハプテン、第二ハプテン、及び第三ハプテンにそれぞれ特異的な第一抗体、第二抗体、及び/又は第三抗体抗体と接触させることを含む検出を含む。一実施態様において、検出は、抗ハプテン認識及び酵素的シグナル増幅を用いて、ハプテン (例えば第一ハプテン、第二ハプテン及び第三ハプテン) を検出することを更に含む。

【0022】

例示的な実施態様において、切断点に関連付けられている染色体転座に関してサンプルを分析するためのキットは、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズするように構成されている配列を有する第一核酸プローブ、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズするように構成されている配列を有する第二核酸プローブ、及び切断点に隣接するゲノムDNAの一部にハイブリダイズするように構成されている配列を有する第三核酸プローブを含む。一実施態様において、第三核酸プローブは、切断点の5'側と3'側の両方で切断点に隣接してまたいでいるDNAの一部にハイブリダイズするように構成される配列を有する。別の実施態様において、第一、第二、及び第三核酸プローブは、第一、第二、及び第三ハプテンでハプテン化され、そのキットは第一、第二、及び第三ハプテンの視覚化を可能にするように構成された検出試薬を更に含む。別の実施態様において、検出試薬は、第一、第二、及び第三ハプテンの明視野可視化を可能にするように構成された発色検出試薬である。

20

【0023】

例示的な実施態様において、患者サンプルのいて切断点にに関連付けられている染色体転座に関連する疾患を診断するための方法は、患者サンプルを一連の核酸プローブと接触させ、その一連は、切断点に関連した染色体転座の欠損下において、その一連が第一の順序と配向に従って患者のサンプルにハイブリダイズするように、及び、切断点に関連した染色体転座の存在下において、その一連が異なる順序と配向に従って患者のサンプルにハイブリダイズするように選択され、そしてその一連の核酸プローブが第一の順序と配向に従って患者のサンプルにハイブリダイズするかどうかを検出することを含み、ここで、第一の順序と配向を検出することは、患者のサンプルが患者のサンプル中で切断点に関連した染色体転座を持たないとする診断を提供する。一実施態様において、第一の順序と配向は、染色体に沿って長軸方向に配置された3つのシグナルの予め決められた配列順 (sequence) である。別の実施態様において、検出は、明視野画像を用いて視覚化される発色性検出試薬を用いることが含まれる。

30

40

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、切断点領域とそれにハイブリダイズするように構成されたプローブを示す染色体の概略図である。

【図2 (A - D)】図2 (A - D) は、典型的な検出方式の概略図を示す。

【図3】図3は、反転染色体転座が発生する可能性がある2つの切断点の位置を示す染色体及びこれにハイブリダイズするように構成されたプローブの概略図である。

【図4】図4は、反転染色体転座後の図3の染色体及び結果として得られたプローブの局

50

在を示す模式図である。

【図5(A-B)】図5(A-B)は、三重比色検出及び明視野イメージングを用いて見られるであろう(A)野生型ALK及び(B)再編成されたALKについて報告されたシグナルを示す拡大された平面図である。

【図6(A-B)】図6(A-B)は、図5(A-B)にそれぞれ対応する写真像である。

【図7】図7は、再編成染色体転座が発生する可能性がある2つの切断点の位置を示す2つの染色体の概略図である。

【図8】図8は、再編成染色体転座後の図7の染色体及び結果として得られたプローブの局在を示す模式図である。

【図9(A-B)】図9(A-B)は、三重比色検出及び明視野イメージングを用いて見られるであろう(A)野生型ALK及び(B)再編成されたALKについて報告されたシグナルを示す拡大された平面図である。

【0025】

定義

特に説明がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を持つ。分子生物学の一般的な用語の定義は、オックスフォード大学出版局により出版されたBenjamin Lewin, Genes V, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); ブラックウェルサイエンス社 (Blackwell Science Ltd.,) により出版された、Kendrewら (編), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 及びVCH出版社 (VCH Publishers, Inc.) により出版されたRobert A. Meyers (編), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見いだすことができる。

【0026】

文脈が明確に示さない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は、複数の指示対象を含む同様に、単語「or」は、文脈が明確に示さない限り、「and」を含む。用語「複数」は、フレーズの「一以上」、つまり、二又はそれ以上と同義に用いられる。さらに、核酸又はポリペプチドについて与えられる、全ての塩基の大きさ又はアミノ酸の大きさ、及び全ての分子量又は分子量の値は、概算値であり、説明のために提供されることが理解されるべきである。用語「含む (comprises)」は「含む (includes)」を意味する。略語「例えば (e.g.)」は、ラテン語の例えば (exempli gratia) に由来し、本明細書では非限定的な例を示すために用いられる。略語「例えば (e.g.)」は、用語「例えば (for example)」と同義である。本明細書に記載されるものと類似又は同等な方法及び材料が、本開示の実施又は試験において使用可能であるが、適切な方法及び材料は以下に記載される。

【0027】

抗体: 「抗体」は、まとめて、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子 (一例として、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、それらの組み合わせ、及び任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウス等の哺乳類における免疫応答中に産生される同様の分子を含むが、それらに限定されない)、及び、他の分子 (例えば、対象の分子の結合定数、すなわち、生物試料における他の分子の結合定数よりも少なくとも $10^3 M^{-1}$ より大、少なくとも $10^4 M^{-1}$ より大、または少なくとも $10^5 M^{-1}$ より大である結合定数を有する抗体及び抗体断片) への結合を実質的に除いて、対象の分子 (または対象の極めて類似する分子の群) に特異的に結合する、抗体断片を指す。

【0028】

より具体的には、「抗体」は、抗原のエピトープを特異的に認識して結合する少なくとも1つの軽鎖もしくは重鎖免疫グロブリン可変領域を含んでなるポリペプチドリガンドを指す。抗体は重鎖および軽鎖からなり、これらの各々は可変重 (VH) 領域および可変軽 (VL) 領域と呼ばれる可変領域を有する。一緒に、VH領域及びVL領域は抗体により認識される抗原を結合することに関与する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

これには、インタクトな免疫グロブリン及び当該技術分野において周知であるそれらの変異体及び一部が包含される。抗体断片には、タンパク質分解抗体断片〔例えば、当該技術分野において既知であるようなF(a b')₂断片、F a b'断片、F a b' - S H断片およびF a b断片〕、組換え抗体断片(例えばs F v断片、d s F v断片、二重特異性のs F v断片、二重特異性d s F v断片、F(a b)'₂断片、単鎖F vタンパク質(「s c F v」)、ジスルフィド安定化F vタンパク質(「d s F v」)、ダイアボディ、及びトリアボディ(当該技術分野で知られている)及び、ラクダ科動物抗体が挙げられる(例えば、米国特許第6015695号;同6005079号-同5874541号;同5840526号;同5800988号;及び同5759808号を参照のこと)。s c F vタンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖領域が、リンカーによって結合される融合タンパク質であるが、d s F v sにおいて、鎖は突然変異してジスルフィド結合を導入し、鎖の関連を安定化している。該用語は、キメラ抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)、ヘテロ共役体(例えば、二重特異性抗体)等の遺伝子組み換え形態も含む。Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL)、Kuby,J.,Immunology,3rd Ed.,W.H.Freeman&Co.,New York,1997も参照されたい。

10

【 0 0 3 0 】

典型的に、天然に存在する免疫グロブリンはジスルフィド結合により相互に連結される重(H)鎖および軽(L)鎖を有する。2つのタイプの軽鎖、ラムダ()およびカッパ()がある。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス(もしくはアイソタイプ): I g M、I g D、I g G、I g AおよびI g Eがある。

20

【 0 0 3 1 】

各重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域を含有する(これらの領域はまた、「ドメイン」としても知られている)。組み合わせで、重鎖および軽鎖可変領域は抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「C D R」とも呼ばれる3つの超可変領域により遮られる「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびC D Rの範囲は特定されている(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1991を参照)。K a b a tデータベースは、現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖もしくは重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成する軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、3次元空間においてC D Rを配置しそして並べる働きをする。

30

【 0 0 3 2 】

C D Rは、抗原のエピトープへの結合に主に関与する。各鎖のC D Rは、N末端から開始して順次番号が付され、C D R 1、C D R 2およびC D R 3と典型的に呼ばれ、そしてまた特定のC D Rが位置する鎖によっても典型的に同定される。従って、V H C D R 3はそれが存在する抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、一方、V L C D R 1はそれが見いだされる抗体の軽鎖の可変ドメインからのC D R 1である。R E Tに結合する抗体は特定のV H領域およびV L領域配列、従って、特定のC D R配列を有する。異なる特異性(すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位)を有する抗体は、異なるC D Rを有する。抗体ごとに異なるのはC D Rであるが、C D R内の限られた数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与する。C D R内のこれらの位置は、特異性決定残基(S D R)と呼ばれる。

40

【 0 0 3 3 】

「結合または安定な結合」は、2つの物質又は分子間の結合、例えば、一つの核酸分子(例えば、結合領域)のその他(又はそれ自身)に対するハイブリダイゼーションを指す。核酸分子は、標的核酸分子に結合する又は安定に結合する。十分な量の核酸分子が塩基対を形成するか、又はその標的核酸分子へハイブリダイズし、その結合の検出を可能にする。

【 0 0 3 4 】

50

核酸分子は、例えば、ワトソン - クリック塩基対、フーグスティーン塩基対、または逆フーグスティーン塩基対を形成することにより、鎖がお互いに結合（ハイブリダイズ）し、2つの分子が十分な数の相補性ヌクレオチドを共有し、安定な2本鎖又は3本鎖を形成する場合、別の核酸分子と「相補的である」と言われる。安定な結合は、核酸分子が、必要な条件下で標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）に検出可能に結合したままである場合に生じる。

【0035】

相補性とは、一方の核酸分子（例えば標的核酸プローブ）の塩基が二番目の核酸分子（例えばゲノム標的核酸分子）の塩基と塩基対を形成する度合いである。相補性は便宜上パーセンテージにより、すなわち、2つの分子間又は2つの分子の特定領域又はドメイン内で塩基対を形成するヌクレオチドの割合により、記述される。

10

【0036】

本開示において、「十分な相補性」とは、十分な数の塩基対が1つの核酸分子又はその領域と標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）との間に存在し、検出可能な結合を獲得することを意味する。結合条件の確立に関わる定性的及び定量的な検討事項の徹底した処置が、Beltz et al. *Methods Enzymol.* 100:266-285, 1983, and by Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に与えられる。

【0037】

「コンピュータに実装されたアルゴリズム」は、ユーザの指示で計算装置により行われ又は実行されるアルゴリズム又はプログラム（コンピュータ可読媒体で実行可能なコードのセット）である。本開示の文脈において、コンピュータに実装されたアルゴリズムは、特定の特徴を持つポリヌクレオチド配列の選択、例えば標的核酸配列の反復性（又は別の所望されない、例えばバックグランドを生じる）核酸配列又は一意的結合領域の同定などを容易にする（例えば自動化する）ために使用することができる。典型的には、ユーザは、配列データベースにアクセスすることができるコンピュータへコマンドを入力することでアルゴリズムの実行を開始して、一又は複数の選択閾値を設定する。配列のデータベースはコンピュータの記憶媒体内に包含することができ、又は遠隔地に格納され、インターネット又はインターネット経由で近くまたは遠隔地にあるコンピュータや記憶媒体との間の接続を介してアクセスすることができる。アルゴリズムを開始した後に、例えば、選択条件を満たす1つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列を選択するために、アルゴリズム又はプログラムがコンピュータによって実行される。最も一般的には、選択されたポリペプチド配列は、（例えば、画面上に）表示されるか又は（例えば、印刷形式またはコンピュータ可読媒体上に）出力される。

20

30

【0038】

用語「コンジュゲートする、連結する、結合する、又はリンクする」とは、一つの分子を別の分子に共有結合性にリンクして、より大きな分子を作ること指す。例えば、二本のポリペプチドを一本の連続したポリペプチド分子にすること、又はハプテン又は他の分子を、例えばs c F v抗体などのポリペプチドに共有結合すること。特定の文脈において、その用語は、抗体など特異的結合分子を半導体ナノ結晶などのシグナル発生部分に結合させることへの言及が含まれる。結合は、化学的または組換え手段によりどちらかによる。「化学的手段」は、1つの分子を生成せしめるために2つの分子間で形成される共有結合があるような抗体部分とエフェクター分子との間の反応をさす。

40

【0039】

用語「連結された」とは、第一の原子もしくは分子に適用する場合、第二の原子もしくは分子に「連結される」ことは、直接連結される及び間接的に連結されるの両方であることができる。二次抗体は、間接的連結の例を提供する。間接的連結の1つの具体例はウサギ抗ハプテン一次抗体であり、それはマウス抗ウサギI g G抗体により結合され、次にそれは検出可能な標識に共有結合されているヤギ抗マウスI g G抗体により結合される。第一及び第二の核酸（例えば、結合領域と標的核酸配列）に関して「対応する」という用

50

語は、その第一及び第二の核酸が、第一及び/又は第二の核酸の全配列の少なくとも一部分において実質的な配列同一性又は相補性を有することを示す。従って、もし結合領域が、標的核酸配列の少なくとも一部と（例えば、もしそれが少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、あるいは100%、同一又は相補的ならば）実質的な配列同一性または相補性を有する場合（例えば、逆相補性）、結合領域は、標的核酸配列に対応している。例えば、結合領域が、二本鎖標的核酸配列（例えば、ゲノム標的DNA配列）の一方の鎖に実質的な配列同一性を有している場合、又は結合領域が、一本鎖標的核酸配列（例えば、RNAまたはRNAウイルスゲノム）に実質的に相補的である場合、結合領域は、標的核酸配列に対応することができる。

【0040】

10

「ゲノム」は生物の全遺伝子構成成分である。真核生物の場合には、ゲノムは、細胞の染色体の一倍体セットに含まれている。原核生物の場合には、ゲノムは単一の染色体に含まれ、場合によっては、エピソームなど1つまたは複数の染色体外遺伝的要素（例えば、プラスミド）に含まれる。ウイルスゲノムは、特定のウイルスに応じて、1つ以上の一本鎖または二本鎖DNA又はRNA分子の形を取ることができる。

【0041】

用語「ハプテン」は、典型的には抗体と特異的に結合することができる小分子であるが、典型的には担体分子との組み合わせ以外で免疫原性であることが実質的に不可能である分子を指す。

【0042】

20

用語「単離された」とは、生物学的成分（例えば核酸分子、タンパク質、又は細胞）に関して、生物の細胞、又は生物それ自体において（そこでは他の染色体及び染色体外DNAやRNA、タンパク質及び細胞、及びオルガネラなどの成分が天然に生じる）、他の生物学的成分から実質的に分離又は精製されている生物学的成分を指す。「単離された」核酸分子は、標準的な精製方法で精製された核酸分子を含む。その用語はまた、増幅またはクローニングすることによって調製された核酸、並びに化学的に合成された核酸を包含する。

【0043】

「標識」は、その分子の検出を容易にするために、直接的または間接的に別の分子にコンジュゲートした検出可能な化合物又は組成物である。特異的な、非限定的な標識の例として、蛍光及び蛍光発生部分、発色部分、ハプテン、アフィニティタグ、および放射性同位元素を含む。標識は直接的に検出可能（例えば、光学的に検出可能）であるか又は間接的に検出可能（例えば、同様に検出可能な1つまたは複数の追加の分子との相互作用を介して）である。本明細書で開示されるプローブとの関連で典型的な標識は以下に記載される。核酸を標識するための方法、様々な目的のために有用な標識の選択の指針は、例えば、Sambrook and Russell, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) 及び Ausubel et al., in *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987, 更新を含む) に議論されている。

30

【0044】

40

用語「多重」は、複数の異なるコンジュゲートを用いて、所望されるように、サンプル中の複数の標的を実質的に同時か又は逐次に、検出されることを可能にする実施態様を指す。多重化とは、核酸、一般的には、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質を、両方個別に、かつ任意の及び全ての組み合わせで、同定及び/又は定量することを含み得る。多重化とはまた、その解剖学的文脈において、細胞内の遺伝子、メッセンジャー及びタンパク質の2つ以上を検出することを含めることができる。

【0045】

「核酸」とは、一本鎖又は二本鎖の何れかの形態のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーで、他に限定されない限り、天然に存在するヌクレオチドと同様の方法で核酸にハイブリダイズする天然ヌクレオチドのアナログを包含する。用語「ヌクレ

50

オチド」は、限定されないが、糖に結合した塩基（ピリミジン、プリン又はそれらの合成アナログ）、又はペプチド核酸（PNA）にあるようなアミノ酸に結合した塩基を包含するモノマーを含む。ヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの1つのモノマーである。ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチドの塩基配列を意味する。

【0046】

核酸「セグメント」は、標的核酸分子の補欠部分又は部分配列である。核酸セグメントは、様々な方法で標的核酸分子から仮想的に又は実際に派生させることができる。例えば、標的核酸分子（例えば、ゲノムの標的核酸分子など）のセグメントは、制限断片である核酸セグメントを生成する1つまたは複数の制限酵素で消化することによって得ることができる。核酸セグメントはまた、増幅により、ハイブリダイゼーション（例えば、サブトラクティブハイブリダイゼーション）により、人工合成により、又は配列が標的核酸分子に対応する一以上の核酸を生成する任意の別の方法により、標的核酸分子から生成することができる。核酸セグメントの特定な例は結合領域である。

10

【0047】

「プローブ」又は「核酸プローブ」とは、標的核酸分子（例えば、ゲノムの標的核酸分子）とハイブリダイズすることが可能で、かつ標的へハイブリダイズした場合に、直接的又は間接的のどちらかで検出されることが可能である核酸分子又は一組の核酸分子である。従って、プローブは、標的の核酸分子の検出、及び幾つかの例では、定量化を許容する。特定の実施例では、プローブは、標的核酸分子由来の結合領域を含み、標的核酸分子の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズすることが可能である複数の核酸分子を包含する。プローブは、「標識核酸プローブ」と呼ぶことができ、プローブが直接的又は間接的に検出可能な部分又は「標識」へ結合され、プローブを検出可能な状態にすることを意味している。

20

【0048】

用語「半導体ナノ結晶」は、量子閉じ込めに起因する大きさに依存する電子のおよび光学的特性を示すナノスケール粒子を指す。半導体ナノ結晶は例えば半導体材料（例えばカドミウムセレンドおよび硫化鉛）から、および晶子（分子ビームエピタキシーを介して成長した）等から構成されてきた。種々の表面化学および蛍光特性を有する様々な半導体ナノ結晶がLife Technologiesから市販されている（例えば、米国特許第6,815,064号、同第6,682,596号および同第6,649,138号明細書を参照にされたい）。半導体ナノ結晶はまた、eBiosciences及びEvident Technologiesから市販されている。他の半導体ナノ結晶には、ZnSSe、ZnSeTe、ZnSTe、CdSSe、CdSeTe、ScSTe、HgSSe、HgSeTe、HgSTe、ZnCdS、ZnCdTe、ZnCdTe、ZnHgS、ZnHgSe、ZnHgTe、CdHgS、CdHgSe、CdHgTe、ZnCdSSe、ZnHgSSe、ZnCdSeTe、ZnHgSeTe、CdHgSSe、CdHgSeTe、InGaAs、GaAlAsおよびInGaN半導体ナノ結晶のような合金半導体ナノ結晶がある（合金半導体ナノ結晶およびその作成法は、例えば米国特許出願公開第2005/0012182号及びPCT公開国際公開第2005/001889号に開示されている）。

30

【0049】

「サンプル」は、被験者から得た、ゲノムDNA、RNA（mRNAを含む）、タンパク質、又はそれらの組み合わせを含む生物学的標本である。例としては、限定されないが、染色体の調製物、末梢血、尿、唾液、組織生検、手術標本、骨髄、羊水のサンプル、および剖検材料が含まれる。一例において、サンプルはゲノムDNA又はRNAを含む。幾つかの例において、サンプルとは、例えば、顕微鏡スライドに置くことができる細胞遺伝学的調製物である。特定の例において、サンプルは直接使用されるか、または（例えば、ホルマリンを使用して）例えば固定することにより、使用する前に操作することができる。

40

【0050】

用語「シグナル発生部分」は、アッセイによって検出可能なシグナルを発生する組成物または分子を指す。

50

【0051】

用語「特異的結合部分」は、結合対のメンバーを指す。特異的結合対は、それらが、別の分子への結合を実質的に排除してお互いに結合することを特徴とする一对の分子である（例えば、特異的結合対は、生物学的サンプル中の他の分子との結合対の2つのメンバーのどちらかについての結合定数よりも、少なくとも 10^3 M^{-1} より大きい、 10^4 M^{-1} より大きい、又は 10^5 M^{-1} より大きい結合定数を有し得る）。特異的結合部分の特定の例は、特異的結合タンパク質（例えば、抗体、レクチン、ストレプトアビジンなどのアビジン、プロテインA）、核酸配列、及びタンパク質-核酸を含む。特異的結合部分は、そうした特異的結合タンパク質が特異的に結合している分子（又はその一部）を含むことができる。

10

【0052】

用語「特異的結合剤」は、シグナル発生部分にコンジュゲートした特異的結合部分を含む分子を指す。

【0053】

「被検体」は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物（例えば、獣医学的被検体）などの任意の多細胞脊椎動物生物を含む。

【0054】

「標的の核酸配列又は分子」は、核酸分子の定義された領域又は特定の部分、例えば、ゲノム（例えば、目的の遺伝子を含む遺伝子又は哺乳動物のゲノムDNAなど）である。標的核酸配列が標的ゲノム配列である一例において、そのような標的は、（例えば、正常細胞内で）染色体上の位置により定義されることができ、例えば、細胞遺伝学的命名法に従い、染色体上の特定の位置を参照することにより；遺伝地図上の位置への参照により；仮想的又は集合したコンティグへの参照により；その特異的な配列または機能により；その遺伝子またはタンパク質名により；又はゲノムの他の遺伝子配列の中からそれを一意的に同定する任意の他の手段によって定義することができる。いくつかの例では、標的核酸配列は、哺乳類又はウイルスのゲノム配列である。別の例では、標的核酸配列は、RNA配列である。

20

【0055】

いくつかの例では、標的核酸配列（例えばゲノム核酸配列）の変化は疾患又は病気と「関連する」。すなわち、標的核酸配列の検出は、疾患又は病気に関してサンプルの状態を推論するために使用することができる。例えば、標的核酸配列は2つ（又はそれ以上の）区別可能な形態で存在し得、第一の形態は疾患又は病気の非存在と関連し、第二（又は異なる）形態は疾患又は病気の存在と関連する。二つの異なる形態は、例えばポリヌクレオチド多型などによって、定性的に区別することができ、及び/又は二つの異なる形態は、例えば細胞内に存在する標的核酸配列のコピー数などによって、定量的に区別することができる。

30

【0056】

「ベクター」は、ベクターに対して天然型ではない他の（外来の）核酸配列のための担体としてはたらく任意の核酸である。適切な宿主細胞に導入されると、ベクターはそれ自身（それによって、外来の核酸配列）を複製し得、又は外来核酸配列の少なくとも一部を発現し得る。一つの文脈において、ベクターは直鎖状または環状核酸であって、その中へ、複製（例えば生産）及び/又は標準的な組換え核酸技術（例えば制限酵素消化）を用いて操作する目的のため、目的の標的核酸配列が導入（例えば、クローニング）される。ベクターは、宿主細胞内で複製することを可能とする核酸配列、例えば複製起点などを含めることができます。ベクターはまた、当技術分野で知られている1つ以上の選択マーカー遺伝子および他の遺伝的要素を含めることができます。一般的なベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、人工染色体（例えば、BAC、PAC、HAC、YAC）及びこれらの型のベクターの1つ以上の特徴を取り込んだハイブリッドを含む。典型的には、ベクターは、標的核酸配列の挿入を容易にする1カ所又は複数の固有の制限部位（場合によってはマルチクローニングサイト）を含む。

40

50

【 0 0 5 7 】

詳細な記述

本開示は、染色体再配置を分析するためのシステムおよび方法に関し、特にインサイツハイブリダイゼーションによる染色体転座の解析に関する。染色体再配置は、新しい連鎖関係において遺伝子を配置し、正常な対形成パートナーなしで染色体を生成する。本開示は、本開示は、の任意の特定のタイプの染色体再配置の分析に限定されるものではない。幾つかの実施態様において、染色体再配置は、同じ染色体の中に生じる。このタイプの再配置の例は反転である。幾つかの実施態様において、再配置は転座である。転座では、一方の染色体からのセグメントが非相同染色体に、又は同じ染色体上の新しい部位へ転移される。非相互転座は、染色体セグメントが非相同染色体上に転移された一方向の転座である。一方、相互転座は、2つの非相同染色体からのセグメントの交換を含む。再配置が2つの本来分離している遺伝子を結合するとき、遺伝子融合が作り出される場合があり、その発生は癌において一般的である。染色体切断点は、正常配置された染色体の二本鎖が再配置が起きることができるよう切断された染色体の領域である。転座は、2つの二本鎖の切断を必要とする。

10

【 0 0 5 8 】

本開示は、生物学的サンプル中の標的遺伝子配列の検出に使用するためのプローブ及びプローブシステムを提供する。好ましい実施態様において、標的配列は、遺伝子及び再配置しやすい周囲の配列(5'及び3')である。染色体の切断点に依存して、再配置は、正常な遺伝子機能の停止又は誤制御をもたらすことができる。これらの分子の再配置は、多くの場合、様々な癌の主な原因であると考えられる。実際、過去数十年にわたって、臨床の細胞遺伝学者は、白血病、リンパ腫、及び肉腫のサブタイプを含む、臨床的に定義されている癌に特有の染色体切断点を連結することができる。腫瘍で観察される事実上全ての再配置が体細胞変異を通じて生じているので、これらは、家族で遺伝しない。

20

【 0 0 5 9 】

これらの再配置切断点の多くを囲むDNA配列の解析は、癌に対する重要なメカニズムの洞察を提供した。いくつかの場合において、再配置は、第二遺伝子の調節配列に近接する第一遺伝子のコード配列を配置する。説明されるべきこの種の第一の再配置は、パーキットリンパ腫患者における染色体8と14を含む再配置であった。この特定の再配置は、14番染色体上の強力な免疫グロブリン重鎖遺伝子(IGH)プロモーターの制御下で、染色体8由来のMYC癌原遺伝子を配置する。

30

【 0 0 6 0 】

MYCタンパク質は、通常、細胞増殖のためのシグナルをトリガーし、IGHプロモーターが正常に活性がある場合、その再配置は、リンパ系細胞において高レベルのMYC過剰発現を引き起こす。

【 0 0 6 1 】

他の癌では、再配置は、強力な癌遺伝子を生成するために2つの遺伝子のコード配列を一緒に融合する。歴史的興味のある例は、フィラデルフィア染色体であり、これらは当初、慢性骨髄性白血病(CML)を有する患者における微小、又は異常に小さい染色体として同定された。フィラデルフィア染色体は、実際には、染色体9と22のqアームの両端で小さなセグメントを含む相互転座の産物である。複数の研究室が関与するその後の分子解析は、転座は、第22染色体上のBCR(切断点クラスター領域)遺伝子のコード配列を染色体9上のABL遺伝子のコード配列と融合することを明らかにした。キメラ遺伝子によりコードされるBCR-ABL融合タンパク質は、細胞の成長と増殖に関与するシグナル伝達経路を恒常的に活性化するタンパク質チロシンキナーゼである。この特定の切断点の知識は、研究者らが、BCR-ABLタンパク質を過剰発現して結晶化するために配列情報を使用することができ、そのことが次にこのタンパク質の活性を阻害する薬剤の開発につながったため、CMLの治療成功へと導いた。

40

【 0 0 6 2 】

幾つかの好ましい実施態様では、プローブ及びプローブシステムは、インサイツハイブ

50

リダイゼーション法、例えば、蛍光インサツハイブリダイゼーション（FISH）、比色インサツハイブリダイゼーション（CISH）、及び銀インサツハイブリダイゼーション（SISH）のために利用される。幾つかの実施態様において、生物学的サンプルは組織切片（生検によって得られたような）、または細胞診標本（例えばパパニコロウスマアまたは血液塗抹など）が含まれる。開示されたプローブ及びプローブシステムを使用することができる他の型のアッセイは、当業者に容易に明らかであり、特定の実施例は以下に議論される。

【0063】

幾つかの好ましい実施態様において、プローブシステムは、染色体切断点を含む特定の標的配列の解析用に少なくとも3つのプローブを含む。好ましい実施態様において、各プローブは、好ましくはゲノムDNAの定められた領域にハイブリダイズする複数のプローブを含む。好ましい実施態様において、プローブセットは、Human Genome Browser及びRepeat Maskerなどのバイオインフォマティクスツールを使って設計される。好ましい実施態様において、反復的な要素は、プローブ設計から排除される。幾つかの実施態様において、プローブは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によって合成される。例えば、幾つかの実施態様において、Primer3プログラム（ワールド・ワイド・ウェブ上のprimer3.sourceforge.net）が、染色体の定義された領域にまたがる固有の配列に対するプライマーを設計するために使用される。幾つかの実施態様において、設計されたPCR断片及びプライマーは、例えば、ヒトゲノム転写産物との類似度について、Human BLAT及びBlatntを用いて分析される（ワールド・ワイド・ウェブ上のgenome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat）。他の領域への高い類似性を示す断片（即ち、染色体他の定義された領域であって、それに対して他のプローブが設計される）が除外され、全てのPCR断片が配列決定により確認される。幾つかの好ましい実施態様において、PCR断片は、ハプテンにコンジュゲートしたヌクレオチド（例えば、dUTP又はdCTP）を用いるニックトランスレーションにより連結され、ランダムに増幅され、標識化される（以下でより詳細に説明する）。

【0064】

さて図1を参照すると、切断点領域120を有する染色体の模式図が示されている。切断点領域（120）を横断して、第一核酸プローブ（121）、第二核酸プローブ（123）、及び第三核酸プローブ（122）が、切断点領域（120）にハイブリダイズするように構成され得る。矢印（124、125、126）は、3つの例示的なプローブ構造における切断点についての説明に役立つ切断点である。一実施態様において、プローブ（121、122、123）は、矢印124で示されるように、プローブ（121）の5'末端及びプローブ（122）の3'末端で切断点を配置するように構成される。同様に、プローブ構造は、矢印（126）で示されるように、プローブ（123）の3'末端及びプローブ（122）の5'末端で切断点を配置する。別の実施態様において、プローブ構造は、矢印（125）で示されるように、プローブ（122）の全長内に切断点を配置する。プローブは、プローブとの関連で複数の異なる場所に切断点を配置するように構成することができる。矢印（124、125、126）により示される切断点の場所は、有用であることが、この時点で理解される位置の単なる例示である。プローブ（121）又はプローブ（123）の内部の切断点の局在はまた、好ましい実施態様ではないかもしれないが、合理的である。例示的な実施形態において、プローブは別個のシグナルを生じるように構成される。従って、図1は異なる陰影を持つプローブを示す（例えば、プローブ（121）は垂直の縞模様によって描かれ、プローブ（122）は黒一色として描かれ、プローブ（123）は水平の縞模様で描かれている）。幾つかの実施態様において、これらのプローブは、それらは、互いに視覚的に区別されるように、標識を含むように構成されるであろう。特定の検出手法に限定されるものではないが、図2（A-D）は、サンプル遺伝子のDNAへのハイブリダイゼーションに続く、異なる標識を検出することに対する例示的アプローチを示す。

【0065】

図2(A-D)を参照すると、切断点に関連した染色体転座についてサンプルを分析することに対する例示的アプローチの模式図が示される。切断点領域27は、第一核酸プローブ(21)、第二核酸プローブ(23)、及び第三核酸プローブ(22)に及んでいるものとして描かれている。核酸プローブは標識され、第一標識は菱形(221)として示され、第二標識は三角形(222)として示され、第三標識(223)は五角形として示される。プローブは単一の標識で示されているが、この表示は単なる象徴である。各プローブは、実際には複数の標識で標識される。例えば、第一核酸プローブ(21)は、非常に多数の小さなハプテン化オリゴヌクレオチドプローブ種へ翻訳される、700kbの核酸配列の切れ目を含み得る。切断点の典型的な場所は、矢印(24)、(25)及び(26)として示される。図2(A-D)は、サンプルを解析するための例示的な方法を示す。

(A) サンプルを少なくとも3つのプローブと接触させ、サンプルで見つかった遺伝子のDNAを持つそれらのプローブのハイブリダイゼーションのための適切な条件を確立し、(B) 標識されたプローブの一つに対して指向される抗体(28)とサンプルを接触させ、(C) 複数の酵素分子にコンジュゲートした第二抗体29とサンプルを接触させ、及び(D) 酵素的沈着を用いて、プローブの近位で、検出可能な種(19)の沈着を生じる検出試薬とサンプルを接触させることを含む。

10

【0066】

図2Aを再び参照すると、説明のための実施態様において、第一核酸プローブをサンプルと接触させることは、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された第一配列を有する第一核酸プローブ21を含む。3つの潜在的な切断点(24)、(25)、及び(26)で示されている。どの切断点の位置が選択されているかに関係なく、プローブ(21)は、切断点の5'にとどまる。同様に、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された第二配列を有する第二核酸プローブ(23)が、切断点の位置の各々に対して3'の位置で示されている。サンプルを解析するための方法は、切断点に近接したゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された第三配列を含んでなる第三核酸プローブとサンプルを接触させることを含む。切断点に隣接したゲノムDNAにハイブリダイズするように構成された例示的配列がプローブ(22)として示される。例示的な切断点(24)、(25)及び(26)により示されるように、プローブ(22)は、一方又は他方に直接的にその位置が切断点(例えば矢印(24)又は(26)により示される)に隣接しているか又は切断点をまたぐことによる(矢印(25))かのどちらかである。

20

30

【0067】

図2Bを参照すると、示されるのは、標識プローブの一つに対して指向される抗体(28)とサンプルを接触させる例示的工程の表示である。例えば、ハプテン標識プローブは、抗ハプテン抗体とサンプルを接触させることによって検出することができる。図2(A-D)は、3つのプローブの代表的なハイブリダイゼーション、及びその後のこれらのプローブの一つの検出を示す。逐次又は同時検出の戦略を、他のプローブのハイブリダイゼーションを検出するために使用することができる。つまり、標識(222)と標識(223)に特異的な異なる抗体は、同時又は逐次にサンプルと接触することができ、抗体(28)となる。更に、複数の酵素分子にコンジュゲートした第二抗体とサンプルを接触させる図2Cにより表された工程は、標識(222)と標識(223)を検出するために同様の工程を同時又は逐次に伴う場合がある。同じ方法で、図2Dにより表された検出工程は、標識(222)及び標識(223)に対応する追加の検出可能な種を沈着する同様の工程を同時又は逐次に伴う場合がある。実例として、各標識を標識するための検出可能な種は異なる。

40

【0068】

図1を参照すると、プローブ(121)、(122)、及び(123)は異なるパターンで示される。同様に、図2A-2Dを参照すると、標識(221)、(222)及び(223)は異なる形状で示される。異なるパターン及び形状の使用は、多種多様な検出戦略は、これらの様々なプローブの検出に用いることができることを示すことを意図してい

50

る。このように、検出化学物質は、種々のプローブの位置の区別を可能にすることを選択することができる。例示的实施態様において、プローブのハイブリダイゼーションを検出することは、第一核酸プローブに関連した第一シグナル、第二核酸プローブに関連した第二シグナル、及び第三核酸プローブに関連した第三シグナルを検出することを含む。一実施態様では、シグナルが区別される。幾つかの好ましい実施態様において、第一、第二及び第三のプローブは、異なる検出可能な部分、例えばハプテンで標識され、それは分離されるべき3つのプローブのそれぞれのハイブリダイゼーションを可能にする。

【0069】

本開示の幾つかの実施態様において、本システムは、染色体切断点に対して5'であるゲノムDNAの一部(即ちゲノムDNAの第一定義領域)にハイブリダイズする第一核酸プローブセット、染色体切断点に対して3'であるゲノムDNAの一部(即ちゲノムDNAの第二定義領域)にハイブリダイズする第二核酸プローブセット、及び、第三核酸プローブが、再配置を欠くときに染色体切断点領域(即ちゲノムDNAの第三定義領域)をまたぐ(即ち、またがる定義領域にハイブリダイズする)ように、染色体切断点に近接した5'及び3'配列にハイブリダイズする、5'部分と3'部分を含む第三核酸プローブセットを含む。

【0070】

切断点領域に対するプローブセットは、切断点に対してゲノムDNAの5'にハイブリダイズする個々のプローブの一部(即ち5'でハイブリダイズする部分)、及び切断点に対してゲノムDNAの3'にハイブリダイズする個々のプローブの一部(即ち3'でハイブリダイズする部分)を含むことが理解されるであろう。切断点が遺伝子内にある一実施態様において、本システムは、標的配列の5'非コード領域にハイブリダイズする第一核酸プローブ、標的配列の3'非コード領域にハイブリダイズする第二核酸プローブ、及び、第三核酸プローブが、標的配列が再配置されないときは、標的配列の切断点にわたって(即ち、またがる定義領域にハイブリダイズする)ように、標的配列の切断点に近接した5'及び3'配列にハイブリダイズする、5'部分と3'部分を含む第三核酸プローブを含む。

【0071】

例示的な実施態様では、サンプルを分析する方法は、転座の検出を含む。図3を参照すると、同じ染色体上で発生する転座(例えばEML4-ALK融合遺伝子)であることが示されている。図7を参照すると、異なる染色体の間で発生する転座(例えばKIF5B-ALK融合又はTFG-ALK融合)が示されている。図3を参照すると、切断点に関連した染色体転座についてサンプルを分析するためのシステムの方法と適用が示されている。示されるのは、染色体2の表示(10)、ALK遺伝子に関連した切断点領域(20)及びEML4遺伝子に関連した切断点(30)である。EML4及びALK遺伝子においては、遺伝子間の距離(11)は約12Mbであり、ALKは2p23に位置しており、EML4は2p21に位置している。ALK遺伝子に関連した切断点(20)にわたって、3つのプローブは、ALK遺伝子の固有領域に相補的配列を有するように構成されている。第一プローブ(321)は切断点に対して3'で配列に相補的であり、第二プローブ(323)は切断点に対して5'で配列に相補的であり第三プローブ(322)は切断点にまたがる配列に相補的である。染色体2(10)は、図3に、転座が無いその野生型で示されている。図4は、ALK-EML4融合遺伝子に関連付けられた反転が含まれる染色体2(410)を示す。プローブの局在における反転の影響が、プローブ(321)、(322)及び(323)の局在化によって示される。すなわち、染色体転座は遺伝子DNAプローブにハイブリダイズする別個の方法により同定することができる。図5(A-B)を参照すると、野生型遺伝子配置を有する染色体スプレッド(500)(図5A)が、本明細書に記載の方法に従って、ALK-EML4融合遺伝子を有する染色体スプレッド(501)(図5B)と区別することができる方法を示す模式図が示されている。特に、図5Aは図3に示される模式図に対応し;標識される順序は、(321)、(322)及び(323)の順である。図6Aを参照すると、プローブ(321)は赤色素原で

10

20

30

40

50

検出され、プローブ(322)は青色色素原で検出され、そしてプローブ(323)は黄色色素原で検出される実施態様を示されている。従って、図6Aに画像で示され、図5Aに模式的に示されるように、プローブの順序と配向は、染色体の長さに沿って長軸方向に整列された赤、青、黄色の順序と配向を有するシグナルを生成する。図6Aにおいて、赤、青、及び黄色のシグナルは「R」(赤シグナル)、「B」(青シグナル)又は「Y」(黄色シグナル)が付いた矢印で示される。同様に、図5Bは、図4に示される模式図に対応し；標識付けの順序は、2つの別々のクラスターに配置されている(321)、(322)、(323)及び(322)の順である。図6Bを参照すると、プローブ(321)は赤色色素原で検出され、プローブ(322)は青色色素原で検出され、そしてプローブ(323)は黄色色素原で検出される実施態様を示されている。従って、図6Bに画像で示され、図5Bに模式的に示されるように、プローブの順序は、一方は赤と青を含み、他方は黄色と青を含む、2つのクラスターのシグナルに配置された、赤、青、黄色の順序と配向を有するシグナルを生成する。図6Bにおいて、赤、青、及び黄色のシグナルは「R」(赤シグナル)、「B」(青シグナル)又は「Y」(黄色シグナル)が付いた矢印で示される。図5Bにおいて、遺伝子のコピーは、野生型配置のままであるが、遺伝子の第二のコピーは反転ISHシグナルを示すことが見て取れる。反転ISHシグナルは、切断点にまたがるプローブ(322)の分割を含み、2つのシグナルとなる(図6Bと5Bにそれぞれ青い点として、又は黒い点として示される)。分割されたプローブからのシグナルは、同じ長さのプローブが2つの場所で局在しているという事実のために強度が減少していても良い。野生型染色体において、プローブは互いに近接するように構成されており、緊密にクラスタ化されたISHシグナルが得られる。これは、図5Aに明瞭に見ることができる。転座を含む染色体においては、図5Bに二重の矢印(510)として示すように、ISHシグナルは広がり示す。

【0072】

一実施態様では、サンプルを分析する方法は、転座の検出を含む。図7を参照すると、異なる染色体の間で発生する転座(例えばKIF5B - ALK融合又はTFG - ALK融合)が示されている。示されるのは、染色体2の表示(10)、ALK遺伝子に関連した切断点領域(20)及び染色体10の表示(50)及びKIF5B遺伝子に関連した切断点(52)である。この転座によると、染色体2(10)の領域(12)は、矢印55に従って染色体10(50)の領域(512)と転座する。この転座は図8に示した修飾された染色体、修飾された染色体2(810)及び修飾された染色体10(850)を生じる。ALK遺伝子20に関連した切断点領域にわたって、ALK遺伝子の固有領域に相補的な配列を有する3つのプローブが設計されている。第一プローブ(321)は切断点に対して3'で配列に相補的であり、第二プローブ(323)は切断点に対して5'で配列に相補的であり第三プローブ(322)は切断点にまたがる配列に相補的である。ALK遺伝子(20)に関連した切断点領域にまたがるこれらのプローブは、図3に示される。図9(A-B)を参照すると、野生型遺伝子配置を有する染色体スプレッド(900)は(図9A)、本明細書に記載される方法に従って、KIF5B - ALK融合遺伝子を有する染色体スプレッド(901)(図9B)から区別され得る。特に、図9Aは、図7に示される模式図に対応し；標識付けの順序は、緊密に分布したクラスターにおいて染色体の長さに沿って長軸方向に配置された(321)、(322)、(323)の順序と配向である。図9Aに模式的に示されるように、プローブの順序は第一の順序を有するシグナル(例えば、赤、黒、及び青)を生成する。同様に、図9Bは、図8に示される模式図に対応し；標識付けの順序は、(321)、(322)、(323)及び(322)の順序と配向である(例えば、赤黒は青黒から分離される)。図9Bにおいて、遺伝子のコピーは、野生型配置のままであるが、遺伝子の第二のコピーは転座したISHシグナルを示すことが見て取れる。転座したISHシグナルは、切断点にまたがるプローブ(322)の分割を含み、2つのシグナル(図9Bに黒い点として示される)は、実質的な距離で分離せられ、二重の矢印(910)により表わされる。分割されたプローブからのシグナルは、同じ長さのプローブが2つの場所で局在しているという事実のために強度が減少して

10

20

30

40

50

も良い。図9Bに示されるシグナルの間の距離は、図9Aに示したクラスタ化されたシグナルに対比すると、融合遺伝子が存在するという証拠を提供する。

【0073】

例示的实施態様において、本開示に係る方法は、第一核酸プローブに関連した第一シグナル、第二核酸プローブに関連した第二シグナル、及び第三核酸プローブに関連した第三シグナルを検出することにより、プローブのハイブリダイゼーションを検出することを含む。図5(A-B)及び9(A-B)に示されるように、染色体再配置が起きるときに、シグナルが生成され、ここで第三核酸プローブからのシグナル(例えば、以下でより詳細に説明するように、適切な標識からの比色定量シグナル、蛍光定量的シグナル又は発光シグナル)は、第一及び第二核酸プローブからのシグナルの各々と別々に共局在する。見てとれるように、第一核酸プローブからのシグナルと第三核酸プローブからのシグナルを含む明確な第一シグナル、及び第二核酸プローブからのシグナルと第三核酸プローブからのシグナルを含む明確な第二シグナルがある。第一及び第二の異なるシグナルは、再配置に依存して同一又は異なる染色体に属するゲノムDNA上に配置することができる。再配置が生じたサンプルにおいて、切断点領域に対応するプローブセットは分割され、切断点に隣接する5'及び3'領域にハイブリダイズするプローブセットの別個の部分に伴い、即ち、プローブセットの5'ハイブリダイズする部分は再配置された標的配列の5'末端にハイブリダイズし、プローブセットの3'ハイブリダイズする部分は再配置された標的配列の3'部分にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションパターンは、第三プローブの分割(即ち、2つの別々の信号)につながる。第三プローブは最初の二つのプローブからの別々の色で標識されている場合、アッセイの分解能及び偽陽性シグナルを識別する能力は大幅に向上する。

【0074】

また、図5(A-B)及び9(A-B)に示されるように、染色体転座が生じない場合、シグナルが生成され、ここで第三核酸プローブからのシグナル(例えば、以下でより詳細に説明するように、適切な標識からの比色定量シグナル、蛍光定量的シグナル又は発光シグナル)は、第一及び第二核酸プローブからのシグナルの各々と共局在する。見てとれるように、第一、第二及び第三の核酸からのシグナルを含む単一シグナルがある。この状況では、第一及び第二プローブは、標的配列の5'及び3'領域にハイブリダイズし、第三プローブは推定される切断点にまたがるように(すなわち、貫通する領域にハイブリダイズするように)、標的配列にハイブリダイズする。

【0075】

本開示の幾つかの実施態様において、本システムは、染色体切断点に対して5'であるゲノムDNAの一部(即ちゲノムDNAの第一定義領域)にハイブリダイズする第一核酸プローブセット、染色体切断点に対して3'であるゲノムDNAの一部(即ちゲノムDNAの第二定義領域)にハイブリダイズする第二核酸プローブセット、及び、再配置の欠損下で染色体の切断点領域に対してゲノムの直近5'の範囲にハイブリダイズし、好ましい実施態様において、標的再配置遺伝子(例えば、図3に示したALK遺伝子)にハイブリダイズする第三核酸プローブ(即ち、ゲノムDNAの第三定義領域)を含む。代替的な実施態様では、第三核酸プローブセットは、再配置の欠損下で染色体の切断点領域に対してゲノムの直近3'の範囲にハイブリダイズし(即ち、ゲノムDNAの第三定義領域)、好ましい実施態様において、標的再配置遺伝子にハイブリダイズする。幾つかの好ましい実施態様において、第一、第二及び第三のプローブは、異なる検出可能な部分、例えばハプテンで標識され、それは分離されるべき3つのプローブのそれぞれのハイブリダイゼーションを可能にする。例えば、染色体再配置が起きるときに、シグナルが生成され、ここで第三核酸プローブからのシグナル(例えば、本明細書でより詳細に説明するように、適切な標識からの比色定量シグナル、蛍光定量的シグナル又は発光シグナル)は、再配置されないゲノムDNAと比較して、配向が変化した5'プローブからのシグナルと別々に共局在する。好ましい実施態様において、変化した配向は、例えば図5Bに示すように、逆方向である。本明細書で使用される場合、逆なる用語は、プローブハイブリダイゼーシ

10

20

30

40

50

ヨンのパターンに関して使用される場合、野生型サンプルで観察されたのと反対である配向をいう。別の実施態様において、第三プローブセットが、再配置の欠損下で染色体の切断点領域に対してゲノムの直近3'の範囲にハイブリダイズする場合、第三プローブセットからのシグナルは3'プローブと共局在する。

【0076】

幾つかの実施態様において、第一、第二及び第三の核酸プローブは、検出可能な部分を含む。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、ハプテン、酵素、蛍光分子、蛍光分子、及び放射性分子からなる群から選択される。幾つかの実施態様において、検出可能な部分はハプテンであり、第一、第二及び第三核酸プローブは、それぞれ異なる第一、第二及び第三ハプテンで標識される。幾つかの実施態様において、異なる第一、第二および第三ハプテンは、ピオチン、2,4-ジニトロフェニル(DNP)、フルオレセイン誘導体、ジゴキシゲニン(DIG)、5-ニトロ-3-ピラゾールカルバミド(ニトロピラゾール、NP)、4,5-ジメトキシ-2-ニトロシンナミド(ニトロシンナミド、NCA)、2-(3,4-ジメトキシフェニル)-キノリン-4-カルバミド(フェニルキノロン、DPQ)、2,1,3-ベンゾオキサジアゾール-5-カルバミド(ベンゾフラザン、BF)、3-ヒドロキシ-2-キノキサリンカルバミド(ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド(DABSYL)、ロテノイソキサゾリン(Rot)、(E)-2-(2-(2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-4-イル)フェノキシ(phenozy))アセトアミド(ベンゾジアゼピン、BD)、7-(ジエチルアミノ)-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボン酸(クマリン 343、CDO)、2-アセトアミド-4-メチル-5-チアゾールスルホンアミド(チアゾールスルホンアミド、TS)、及びp-メトキシフェニルピラゾポドフィリアミド(p-Mehtoxyphenylpyrazopodophyllamide)(Podod)からなる群から選択される。幾つかの実施態様において、検出することは、第一、第二、及び第三ハプテンにそれぞれ特異的である第一、第二及び/又は第三抗体とサンプルとを接触させることを含む。幾つかの実施態様において、第一、第二及び第三の抗体は、酵素とコンジュゲートしている。幾つかの実施態様において、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、-グルクロニダーゼ及び-ラクタマーゼから成る群から選択される。幾つかの実施態様において、本方法は、第一、第二及び/又は第三抗体に結合する抗体にサンプルを接触させることを更に含む。幾つかの実施態様において、第一、第二及び第三の抗体に結合する抗体は、酵素とコンジュゲートしている。幾つかの実施態様において、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、-グルクロニダーゼ及び-ラクタマーゼから成る群から選択される。幾つかの実施態様において、第一、第二及び第三の抗体に結合する抗体は、異なる蛍光分子とコンジュゲートしている。

【0077】

幾つかの実施態様では、本方法は、比色検出試薬とサンプルを接触させることを更に含む。幾つかの実施態様では、本方法は、比色検出試薬とサンプルを接触させることを更に含む。幾つかの実施態様において、検出は、比色検出、蛍光検出、及び放射検出からなる群から選択される方法を含む。幾つかの実施態様において、染色体転座の存在は、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAに対する第一核酸プローブ部分のハイブリダイゼーション、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAに対する第二核酸プローブ部分のハイブリダイゼーション、切断点に近接する5'配列に対する第三核酸プローブの5'部分、及び切断点に近接する3'配列に対する第三核酸プローブの3'部分の別々のハイブリダイゼーションにより示される。幾つかの実施態様において、染色体転座の欠損は、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAに対する第一核酸プローブ部分のハイブリダイゼーション、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAに対する第二核酸プローブ部分のハイブリダイゼーション、及び、第三プローブが切断点にまたがるゲノムDNAの領域に対してハイブリダイズできるような、切断点に近接する5'配列に対する第三核酸プロー

10

20

30

40

50

ブの5'部分、及び切断点に近接する3'配列に対する第三核酸プローブの3'部分のハイブリダイゼーションにより示される。

【0078】

幾つかの実施態様において、本開示は、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第一核酸、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第二核酸、及び切断点に隣接するDNAの一部にハイブリダイズする第三核酸プローブを含む、切断点に関連した染色体転座を有することが疑われるサンプルを解析するためのシステムを提供する。

【0079】

幾つかの実施態様において、第三核酸プローブは5'部分及び3'部分を更に含み、ここで第三核酸プローブは、再配置の欠損下で切断点にまたがってゲノムDNAの領域にハイブリダイズすることができるように、5'部分は、切断点に隣接して5'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズし、3'部分は、切断点に隣接して3'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、再配置の存在下で、第一核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルは、再配置の欠損下で第一核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルの配向と比較した場合、逆転している配向を有するように、第三核酸プローブは切断点に隣接して5'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、再配置の存在下で、第二核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルは、再配置の欠損下で第二核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルの配向と比較した場合、逆転している配向を有するように、第三核酸プローブは切断点に隣接して3'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズする。

【0080】

幾つかの実施態様において、本発明は、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第一核酸、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第二核酸、及び切断点に隣接するDNAの一部にハイブリダイズする第三核酸プローブを含む、切断点に関連した染色体転座を有することが疑われるサンプルを解析するためのキットを提供する。幾つかの実施態様において、第三核酸プローブは5'部分及び3'部分を更に含み、ここで第三核酸プローブは、再配置の欠損下で切断点にまたがってゲノムDNAの領域にハイブリダイズすることができるように、5'部分は、切断点に隣接して5'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズし、3'部分は、切断点に隣接して3'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、再配置の存在下で、第一核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルは、再配置の欠損下で第一核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルの配向と比較した場合、逆転している配向を有するように、第三核酸プローブは切断点に隣接して5'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、再配置の存在下で、第二核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルは、再配置の欠損下で第二核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルの配向と比較した場合、逆転している配向を有するように、第三核酸プローブは切断点に隣接して3'であるゲノムDNAの一部にハイブリダイズする。

【0081】

幾つかの実施態様において、本開示は、切断点に関連した染色体転座に関連した疾患を診断するための方法を提供する。

【0082】

切断点に関連した染色体転座に関連する疾患を有することが疑われる患者からのサンプルを提供し、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第一核酸プローブ、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイ

10

20

30

40

50

ズする第二核酸プローブ、及び切断点に隣接するDNAの一部にハイブリダイズする第三核酸プローブを提供し；サンプル中でゲノムDNAに対してプローブをハイブリダイズし；サンプル中でゲノムDNAに対するプローブのハイブリダイゼーションを検出し；検出の結果を用いて、患者の疾患の診断を提供することを含む。

【0083】

幾つかの実施態様において、本開示は、切断点に関連した染色体転座に関連する疾患を有することが疑われる患者からのサンプルを提供し、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第一核酸プローブ、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第二核酸プローブ、及び切断点に隣接するDNAの一部にハイブリダイズする第三核酸プローブを提供し；サンプル中でゲノムDNAに対してプローブをハイブリダイズし；サンプル中でゲノムDNAに対するプローブのハイブリダイゼーションを検出し；及び検出の結果を用いて、患者の疾患に関連する予後を提供することを含む、切断点に関連した染色体転座に関連した疾患に罹患した患者に対する転帰のための方法を提供する。

10

【0084】

幾つかの実施態様において、本開示は、切断点に関連した染色体転座に関連する疾患を有することが疑われる患者からのサンプルを提供し、切断点に対して5'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第一核酸プローブ、切断点に対して3'に位置するゲノムDNAの一部にハイブリダイズする第二核酸プローブ、及び切断点に隣接するDNAの一部にハイブリダイズする第三核酸プローブを提供し；サンプル中でゲノムDNAに対してプローブをハイブリダイズし；サンプル中でゲノムDNAに対するプローブのハイブリダイゼーションを検出し；及び検出の結果を用いて、患者に対する治療的処置を決定することを含む、切断点に関連した染色体転座に関連した疾患に罹患した患者のための治療を決定する方法を提供する。

20

【0085】

以前に記述された2色ブレイクアパートプローブシステムにおいては、5'及び3'ブレイクアパートプローブの間のギャップに起因する問題があった。細胞内部で5'及び3'プローブシグナルがどの程度曲がっているかに依存して、5'及び3'プローブシグナルは、たとえ全く転位が発生していないとしても、2つの別個のプローブシグナルと見ることができる。これが、偽陽性シグナルである。現在のシステムは、最初の二つのプローブと連動してシグナルを発生する第三のプローブを導入することによってこれらの問題を解決する。本システムはまた、転座が染色体の間で発生したときに、読みやすいシグナルを生成するという利点を有するものの、本システムは、再配置が同じ染色体で発生した（例えば、反転）場所で特に有用である。様々な実施態様を以下でより詳細に説明する。

30

【0086】

A. 標的核酸プローブ

本開示は、核酸プローブを利用する。好ましい実施態様において、核酸プローブは、上述されたように、サンプル中でゲノムDNAの定義された領域（即ち標的核酸配列）に結合する又はハイブリダイズするプローブセットである。好ましくは、核酸プローブは、RNA（リボ核酸）、DNA（デオキシリボ核酸）、LNA（ロックト核酸）、PNA（ペプチド核酸）、またはそれらの組み合わせなどの任意の適切な核酸を含み、デオキシリボヌクレオチドなどの標準ヌクレオチド、及びヌクレオチドアナログを含み得る。

40

【0087】

幾つかの実施態様において、核酸プローブセットは、所望の標的核酸配列に80%以上相補的であり、好ましくは、所望の標的核酸配列に90%以上相補的であり、より好ましくは、所望の標的核酸配列に99%以上相補的であり、最も好ましくは、所望の標的核酸配列に約100%相補的である。一般に、核酸プローブの設計は、当該分野で標準的である実践を使い遂行される。例えば、得られたプローブが、標的核酸に結合することを犠牲にして自分自身に折り重なるか、またはお互いにハイブリダイズするような自己相補性

50

を有する配列は一般的に回避される。

【0088】

標的プローブ部分の長さを選択する際の1つの考慮事項は、標的核酸を含むサンプルの複雑さである。例えば、ヒトゲノムは、長さが約 3×10^9 塩基対である。任意の10ヌクレオチド配列は、30億塩基対において約2861回の頻度で現れる。この長さの標的プローブ部分は、ヒトゲノムの大きさの配列を持つ標的内にいる10ヌクレオチド領域に一意的に結合する機会は乏しいであろう。しかし仮に、標的配列がプラスミド3キロバイト以内であった場合は、そのようなオリゴヌクレオチドは、一意的に結合することが非常に合理的な機会がある可能性がある。これと同じ計算により、16ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド(すなわち、16量体)が 3×10^9 塩基対に一回現れることが、数学的に可能性のある配列の長さの最小値であることが分かる。このレベルの特異性はまた、2つ以上の短い核酸配列が協調的な方法で(すなわち、それらが両方もしくは全てがそれらの意図した標的配列に結合している場合にのみ、意図した複合体を生成することができるように)結合するように形成されている場合、2つ以上の短い核酸配列によって提供される場合があり、ここでその短い配列の組み合わせが所望の特異性を提供する。

10

【0089】

標的プローブ部分の長さを選択する際の第二の考慮事項は、標的プローブ部分が機能することが期待されるであろう温度範囲である。平均塩基含有量(50%のG-C塩基)の16量体は、とりわけ、プローブとその標的の濃度、反応の塩濃度、及びヌクレオチドの正確な順序に依存する、約41と計算される T_m を有するであろう。実際問題として、長い標的プローブ部分は、通常、ハイブリダイゼーションの特異性を高めるために選択される。例えば、長さが20から25ヌクレオチドの標的プローブ部分は、 T_m の近傍(T_m の約5以内)の温度で行う反応で使用した場合、非常に特異的である可能性があるため、使用することができる。

20

【0090】

好ましい実施態様において、標的プローブ部分がユーザーによって定義された適切な条件下で、標的核酸にハイブリダイズするように、核酸プローブセットはこれらの考慮事項を考慮して設計されている。

【0091】

核酸は、手動で、又は、温度、長さ、GC含量などの所望のパラメータに基づいて、プライマーの選択を最適化する、コンピュータ実装されたアルゴリズムの支援を受けて選択することができる。インターネットを介して又はパーソナルコンピュータ上で使用する数多くのコンピューターに実装されたアルゴリズムが入手できる。例えば、標的核酸配列(例えば、ゲノム標的核酸配列)から複数の結合領域を生成するため、反復的な(または他の望ましくない、例えば、バックグラウンドを生み出す)核酸配列を欠いた配列の領域が、例えば手動で、あるいはコンピューター・アルゴリズムを使用して、同定される。数千から数百キロベースまたがる標的核酸配列内(例えば、ゲノム標的核酸配列)において、実質的に又は完全に反復が無い(または他の望ましくない、例えば、バックグラウンドを生じる)核酸配列である典型的な多くの結合領域が同定される。

30

【0092】

核酸プローブは、任意の公知の方法により合成することができる。幾つかの実施態様において、核酸プローブをコードする配列は、プラスミド発現ベクターにクローニングされる。核酸プローブは、核酸プローブをコードするRNA分子を提供するために、好ましくはRNAポリメラーゼによりベクターから転写される。幾つかの実施態様において、核酸プローブは、例えば、ホスホロアミダイトアナログを用いて、化学的に合成される。幾つかの実施態様において、DNAプローブは、プラスミドDNAの増殖、精製、制限酵素消化によって合成され、標的核酸プローブをコードするDNA分子を提供する。二本鎖DNAは、続いてハイブリダイゼーションプロトコルにおける使用のための一本鎖に溶融させることができる。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブは、非対称PCRにより合成される。幾つかの実施態様において、一方のプライマーは、例えば、核酸アナログ(

40

50

例えば、LNA)である可能性がある。このプロセスは、ロックトヌクレオチド及び標準的dNTPから作成される検出標的部分を含む標的特異的部分を有するプローブを生成する。幾つかの実施態様において、LNA含有プライマーは、望まれるストランドの精製を容易にするためにビオチンを含む。

【0093】

幾つかの実施態様において、核酸プローブは、1つ又は検出可能な部分を含む。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は直接検出可能であり、他の実施態様において、検出可能な部分は、間接的に検出可能である。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、検出プローブに組み込まれる。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、検出可能なシグナルを生成するシグナル生成部分である。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は検出プローブの合成に用いられるヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに結合している。例えば、望まれる検出可能な部分に結合しているヌクレオシドホスホロアミダイトは、当技術分野で知られているように、化学合成を介して検出プローブを合成するために使用される。

10

【0094】

幾つかの実施態様において、検出可能な部分を間接的に検出される。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、第一及び第二のメンバー、又は第一、第二、及び第三メンバーを含む結合分子システムの第一のメンバーである。これらの実施態様において、結合対の第一のメンバーにコンジュゲートしたヌクレオチドは、好ましくは、結合対の第一のメンバーにコンジュゲートしたヌクレオシドホスホロアミダイトの使用を介して、検出プローブに組み込まれる。次に、サンプルを結合ペアの第二メンバー（すなわち、特異的結合部分）を含む特異的結合剤と接触させる。幾つかの実施態様において、結合ペアの第二のメンバーは、シグナル生成部分に結合し、結合ペアの第一のメンバーへの結合を介して検出プローブを検出するために使用される。他の実施態様において、サンプルは第二の結合メンバーに特異的に結合する第三の結合メンバーと接触させる。これらの実施態様において、第三のメンバーはシグナル生成部分にコンジュゲートしている。適切な結合分子系の例としては、限定されないが、アビジン、ビオチン、ハプテンは、抗ハプテン抗体、抗抗体抗体、及びそれらの組み合わせが挙げられる。例えば、幾つかの実施態様において、検出プローブの検出可能な成分の部分は、1つまたは複数のハプテニル化された(haptenyated)ヌクレオチドを含む。これらのハプテニル化されたヌクレオチドは、抗ハプテン抗体及びシグナル生成部分にコンジュゲートした抗(抗ハプテン抗体)抗体の使用により検出される。

20

30

【0095】

従って、幾つかの実施態様において、本開示は、結合分子システムの第一のメンバーに結合している1つ以上のヌクレオチドを含む核酸プローブを提供する。幾つかの実施態様において、結合分子システムの第一のメンバーは、ハプテンである。幾つかの実施態様において、検出プローブの検出可能な成分部分は、ハプテン分子(例えばニトロ芳香族化合物(例えば、ジニトロフェニル(DNP))、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニンなど)に共有結合したdNTPを組込んだ核酸分子である。(例えば、標識プローブへの組み込みを容易にするために)ハプテン及び他の標識をdNTPにコンジュゲートするための方法は、当技術分野で周知である。方法の例については、例えば、米国特許第5,258,507号、同4,772,691号、同5,328,824号、及び同4,711,955号を参照のこと。実際に、数多くの標識されたdNTPが、例えば、Invitrogen Detection Technologies (Molecular Probes社、ユージーン、オレゴン州)から市販されている。標識は、直接的または間接的にdNTPの上の任意の位置、例えば、リン酸(例えば、 α 、 β 、 γ 、又は δ リン酸)や糖などでdNTPへ結合させることができる。

40

【0096】

様々なハプテンが核酸プローブに使用され得る。そのようなハプテンは、限定されないが、ピラゾール、特にニトロピラゾール；ニトロフェニル化合物；ベンゾフラザン；トリテルペン；尿素及びチオ尿素類、特にフェニル尿素、更に具体的にはフェニルチオ尿素；

50

ロテノン及びロテノン誘導体、ここではロテノイドとも言う；オキサゾール及びチアゾール、特にオキサゾール及びチアゾールスルホンアミド；クマリンおよびクマリン誘導体；ポドフィロトキシン及びポドフィロトキシン誘導体に代表されるシクロリグナン；及びそれらの組み合わせが挙げられる。ハプテンの具体的な例としては、限定されないが、2, 4 - ジニトロフェニル (DNP)、ピオチン、フルオレセイン誘導体 (FITC、TAMRA、テキサスレッドなど)、ジゴキシゲニン (DIG)、5 - ニトロ - 3 - ピラゾールカルバミド (ニトロピラゾール、NP)、4, 5, - ジメトキシ - 2 - ニトロシナミド (ニトロシナミド、NCA)、2 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - キノリン - 4 - カルバミド (フェニルキノロン、DPQ)、2, 1, 3 - ベンゾオキサジアゾール - 5 - カルバミド (ベンゾフラザン、BF)、3 - ヒドロキシ - 2 - キノキサリンカルバミド (ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4 - (ジメチルアミノ) アゾベンゼン - 4' - スルホンアミド (DABSYL)、ロテノンイソキサゾリン (Rot)、(E) - 2 - (2 - (2 - オキソ - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンゾ [b] [1, 4] ジアゼピン - 4 - イル) フェノキシ (phenozyl)) アセトアミド (ベンゾジアゼピン、BD)、7 - (ジエチルアミノ) - 2 - オキソ - 2H - クロメン - 3 - カルボン酸 (クマリン 343、CDO)、2 - アセトアミド - 4 - メチル - 5 - チアゾールスルホンアミド (チアゾールスルホンアミド、TS)、及び p - メトキシフェニルピラゾポドフィルアミド (p-Mehtoxyphenylpyrazopodophyllamide) (Poddo) が挙げられる。これらのハプテンとそれらのプローブにおける使用については、共同所有の出願である、米国特許出願公開第 2008 / 0305497号、同 2008 / 0268462号、及び同 2008 / 0057513号により詳細が説明されている。

【0097】

核酸プローブがハプテンを含む実施態様では、結合分子システムの第二のメンバーは、好ましくは、抗原結合分子としてハプテンに特異的に結合する分子である。適切な抗原結合分子の例としては、限定されないが、抗体、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子 (一例として、限定するものでないが、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMを含む)、抗体断片、例えば、当該技術分野において知られている F(ab')₂ 断片、抗体断片、Fab' 断片、Fab' - SH断片など、組換え抗体断片 (例えば sFv断片、dsFv断片、二重特異性の sFv断片、二重特異性 dsFv断片、F(ab')₂ 断片、単鎖 Fvタンパク質 ('scFv'))、ジスルフィド安定化 Fvタンパク質 ('dsFv'))、ダイアボディ、及びトリアボディ (当該技術分野で知られている) 及び、ラクダ科動物抗体が挙げられる (例えば、米国特許第 6,015,695号；同 6,005,079号 - 同 5,874,541号；同 5,840,526号；同 5,800,988号；及び同 5,759,808号を参照のこと)。幾つかの実施態様において、検出可能なシグナルを生成する検出可能な部分は、抗原結合分子に、付着するか、そうでなければ共有結合している。適切な第二の結合対のメンバーは、限定されないが、検出可能なシグナルを生成する検出可能な部分にコンジュゲートしている抗 DNP 抗体、抗ピオチン抗体、抗 FITC 抗体、抗 DIG 抗体、抗 NP 抗体、抗 NCA 抗体は、抗 DPQ 抗体、抗 BF 抗体、抗 HQ 抗体、抗ダブルシル抗体、抗 Rot 抗体、抗 BD 抗体、抗 CDO 抗体、抗 TS 抗体、および抗 Poddo 抗体が挙げられる。更なる実施態様において、結合分子システムの第二のメンバーは、検出可能な部分を含まない抗ハプテン一次抗体である。これらの実施態様において、結合性分子システムの第三のメンバーは、二次抗抗体 (例えば、ヤギ抗マウス IgG 抗体など) であり、検出可能なシグナルを生成するために利用されるシグナルを生成する検出可能な部分を含む。

【0098】

上述したように、検出プローブは、直接的に検出可能であるか又は間接的に検出可能であってよい。幾つかの直接的検出の実施態様では、検出プローブは、検出可能なシグナルを発生する検出可能な部分 (例えば、シグナル発生部分) を含み、一方幾つかの間接的検出の実施態様では、検出可能なシグナルを発生するシグナル発生部分にコンジュゲートしている結合分子システム (例えば二次抗体など) のメンバーを含む特異的結合剤が利用さ

10

20

30

40

50

れている。これらの実施態様では、検出可能なシグナルを発生する様々なシグナル発生部分が、検出プローブに組み込まれ得、又は結合対のメンバーにコンジュゲートされ得る。

【 0 0 9 9 】

好ましい実施態様において、シグナル生成部分は、光子（無線周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視周波数と紫外線周波数の光子を含む）の吸収、放出及び/又は散乱を含む、任意の公知又は未発見のメカニズムによって検出することができる。シグナル生成部分は着色、蛍光、燐光及び発光分子や物質を含む。一つの物質を別の物質に変換し、（例えば、無色の物質を着色物質に変換したり、又はその逆であったり、又は沈殿物を生成するか、サンプルの濁度を増加させるなどにより）検出可能な差を与える触媒（酵素など）、及び常磁性分子及び磁性分子または物質を包含する。

10

【 0 1 0 0 】

シグナル発生部分の特定の例においては、蛍光分子（又は蛍光色素）が含まれる。多数の蛍光色素が、当業者に知られており、例えばInvitrogenから選択することができ、例えば、The Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Invitrogen Detection Technologies, Molecular Probes, Eugene, Oreg.)を参照。核酸分子又は抗原結合分子などのタンパク質に結合させる（例えば、化学的にコンジュゲートさせる）ことができる特定の蛍光色素は、限定されないが、以下を包含する；4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアン酸スチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、アクリジン及びアクリジンイソチオシアネートなどのアクリジン及び誘導体、5 - ((2 - アミノエチル)アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)、4 - アミノ - N - [3 - (ビニルスルホニル)フェニル]ナフタルイミド - 3, 5ジスルホン酸 (ルシファーイエローVS)、N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル)マレイミド；アントラニルアミド；ブリリアントイエロー、例えば、クマリン、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC、クマリン120)などのクマリン及び誘導体、7 - アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン (7-amino-4-trifluoromethylcouluarin) (クマリン151)；シアノシン；4', 6 - ジアミノ - 2 - フェニンドール (DAPI)；5', 5'' - ジプロモピロガロール - スルホンフタレイン (プロモピロガロールレッド)；7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン；ジエチレントリアミンペンタアセテート；4, 4' - ジイソチオシアナトジヒドロスチルベン - 2, 2'ジスルホン酸；4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2'ジスルホン酸；5 - [ジメチルアミノ]ナフタレン - 1 - スルホニルクロライド (DNS、塩化ダンシル)；4 - (4' - ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL)；4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアネート (DABITC)；エオシンおよびエオシンイソチオシアネートなどのエオシンおよび誘導体；エリトロシンBおよびエリトロシンイソチオシアネートなどのエリトロシンおよび誘導体；エチジウム；5 - カルボキシフルオレセイン (FAM)、5 - (4, 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル)アミノフルオレセイン (DTAF)、2'7' - ジメトキシ - 4'5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、およびQFITC (XFITC)などのフルオレセインおよび誘導体；2', 7' - ジフルオロフルオレセイン (OREGON GREENTM)；フルオレスカミン；IR144；IR1446；マラカイトグリーンイソチオシアネート；4 - メチルウンベリフェロン；オルトクレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラローザニリン；フェノールレッド；B - フィコエリスリン；o - フタルジアルデヒド；ピレン酪酸、1 - ピレン酪酸スクシンイミジルなどのピレンおよび誘導体；リアクティブレッド4 (シバクロン (商標)ブリリアントレッド3B - A)；6 - カルボキシ - X - ローダミン (ROX)、6 - カルボキシローダミン (R6G)などのローダミン及び誘導体；リサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン (Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、ローダミングリーン、スルホローダミンB、スルホローダミン101、スルホローダミン101の塩化スルホニル誘導体 (テクサスレッド)、N, N, N', N' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (TAMRA)；テトラメチルローダミン；テトラメ

20

30

40

50

チルローダミンイソチオシアネート (T R I T C) ; リボフラビン ; ロゾール酸およびテルビウムキレート誘導体。

【 0 1 0 1 】

他の適切なフルオロフォアは、約 6 1 7 n m で放射するチオール反応性ユウロピウムキレート (Heyduk and Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999)、並びに G F P、リサミン・T M、ジエチルアミノクマリン、フルオレセインクロロトリアジニル、ナフトフルオレセイン、4, 7 - ジクロロローダミン及びキサテン (Lee らによる米国特許第 5, 8 0 0, 9 9 6 号に記載された) 及びそれらの誘導体を包含する。当業者に既知である他のフルオロフォア、例えば、Invitrogen Detection Technologies, Molecular Probes (Eugene, Oreg.) から入手可能なものもまた使用でき、色素の A L E X A F L U O R ^{T M} 系 (例えば、米国特許第 5, 6 9 6, 1 5 7 号、同 6, 1 3 0, 1 0 1 号、及び同 6, 6, 7 1 6, 9 7 9 号に記載される)、色素の B O D I P Y 系 (ジピロメテンボロンジフルオリド色素 (dipyrrrometheneboron difluoride dyes)、例えば、米国特許第 4, 7 7 4, 3 3 9 号、同 5, 1 8 7, 2 8 8 号、同 5, 2 4 8, 7 8 2 号、同 5, 2 7 4, 1 1 3 号、同 5, 3 3 8, 8 5 4 号、同 5, 4 5 1, 6 6 3 号、及び同 5, 4 3 3, 8 9 6 号に記載される)、カスケードブルー (米国特許第 5, 1 3 2, 4 3 2 号に記載されるスルホン化ピレンのアミン反応性誘導体)、及びマリナーブルー (米国特許第 5, 8 3 0, 9 1 2 号) を包含する。

10

【 0 1 0 2 】

上記の蛍光色素に加えて、蛍光標識は、半導体ナノ結晶などの蛍光ナノ粒子が可能である (例えば、QDOT NANOCRYSTALS, Life Technologies; 米国特許第 6, 8 1 5, 0 6 4 号、同第 6, 6 8 2, 5 9 6 号及び同第 6, 6 4 9, 1 3 8 号も参照)。半導体ナノ結晶は、大きさに依存する光学的および/または電気的特性を有する微細な粒子である。半導体ナノ結晶は、一次エネルギー源で照射されている場合、エネルギーの二次電子放出は、半導体ナノ結晶で使用される半導体材料のバンドギャップに対応する周波数で発生する。この放出は、特定の波長または蛍光色の光として検出することができる。異なるスペクトル特性を持つ半導体ナノ結晶は、例えば、米国特許第 6 6 0 2 6 7 1 号に記載されている。半導体ナノ結晶は、様々な生体分子 (d N T P 及び/又は核酸を含む)、及び基質に対して、例えば、Bruchez et. al. (1998) *Science* 281:2013-6, Chan et al. (1998) *Science* 281; 及び米国特許第 6, 2 7 4, 3 2 3 号に記載された技術によって結合することができる。

20

30

【 0 1 0 3 】

様々な組成物の半導体ナノ結晶の形成は、例えば、米国特許第 6, 9 2 7, 0 6 9 号; 同 6, 9 1 4, 2 5 6 号; 同 6, 8 5 5, 2 0 2 号; 同 6, 7 0 9, 9 2 9 号; 同 6, 6 8 9, 3 3 8 号; 同 6, 5 0 0, 6 2 2 号; 同 6, 3 0 6, 7 3 6 号; 同 6, 2 2 5, 1 9 8 号; 同 6, 2 0 7, 3 9 2 号; 同 6, 1 1 4, 0 3 8 号; 同 6, 0 4 8, 6 1 6 号; 同 5, 9 9 0, 4 7 9 号; 同 5, 6 9 0, 8 0 7 号; 同 5, 5 7 1, 0 1 8 号; 同 5, 5 0 5, 9 2 8 号; 同 5, 2 6 2, 3 5 7 号及び米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 6 5 9 5 1 号並びに P C T 出願公開番号第 9 9 / 2 6 2 9 9 号 (1 9 9 9 年 5 月 2 7 日 公 開) に開示されている。半導体ナノ結晶の別個の集団を、その異なるスペクトル特性に基づいて識別可能であるように生成することができる。例えば、半導体ナノ結晶は、その組成、サイズまたはサイズおよび組成に基づいて異なる色の光を発するように生成することができる。例えば、サイズに基づいて異なる波長 (5 6 5 n m、6 5 5 n m、7 0 5 n m、又は 8 0 0 n m の発光波長) で発光する半導体ナノ結晶は、本明細書に開示されたプローブにおいて蛍光標識として適しており、Invitrogen から入手される。

40

【 0 1 0 4 】

更なるシグナル発生部分は、例えば、放射性同位元素 (³H, ³⁵S 及び ³²P など)、G d ³⁺ などの放射性金属イオン又は常磁性金属イオンの D O T A 及び D P T A キレートなどの金属キレート、及びリポソームを包含する。

【 0 1 0 5 】

50

シグナル発生部分はまた、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ラクタマーゼを含む。検出可能な標識が酵素を含む場合、色素原、蛍光発生化合物、又は発光性化合物が、酵素と組み合わせ使用することができ、検出可能なシグナルを生成する（多くのそうした化合物が、例えば、Life Technologiesから市販されている）。発色化合物の特定の例としては、ジアミノベンジジン（DAB）、4-ニトロフェニルリン酸（pNPP）、ファーストレッド（fast red）、プロモクロロインドリルリン酸（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、BCIP/NBT、ファーストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン（TMB）、2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸（ABTS）、*o*-ジアニシジン、4-クロロナフトール（4-CN）、ニトロフェニル-*D*-ガラクトピラノシド（ONPG）、*o*-フェニレンジアミン（OPD）、5-ブromo-4-クロロ-3-インドイル-*D*-ガラクトピラノシド（X-Gal）、メチルウンベリフェリル-*D*-ガラクトピラノシド（MU-Gal）、*p*-ニトロフェニル-*D*-ガラクトピラノシド（PNP）、5-ブromo-4-クロロ-3-インドイル-*D*-グルクロニド（X-Gluc）、3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（INT）、テトラゾリウムブルー、及びテトラゾリウムバイオレッドを包含する。

【0106】

あるいは、酵素は、金属組織学的検出方式で使用することができる。例えば、SISHの方法は、ハイブリダイズしたゲノムの標的核酸配列の同定及び局在についての金属組織学的検出方式を含む。金属組織学的検出方法は、水溶性金属イオン及び酵素の酸化還元不活性な基質と組み合わせて、アルカリフォスファターゼ等の酵素を使用することを包含する。基質は酵素により酸化還元活性剤に変換され、その酸化還元活性剤は金属イオンを還元し、それを検出可能な沈殿物を形成させる。（例えば、米国特許出願公開第2005/0100976、PCT国際公開第2005/003777及び米国特許出願公開第2004/0265922を参照）。金属組織学的検出方法には、オキシドレダクターゼ酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼなど）を、水溶性金属イオン、酸化剤及び還元剤と一緒に使用することを含み、再び検出可能な沈殿物を形成する。（例えば、米国特許第6670113を参照）。

【0107】

幾つかの実施態様において、シグナル生成部分は、蛍光タンパク質である。蛍光タンパク質はまた、可視化を容易にするために、担体として使用することができ、又は担体に結合させることができる。例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）は、もともとはオワンクラゲの発光器官から単離された。キメラGFP融合は、細胞への遺伝子導入によりインサイトで発現させることができ、適切な標的化シグナルによって、細胞内の特定の部位に局在化させることができる。青、シアン、黄緑色の発光を伴うスペクトルの変異が首尾よくオワンクラゲGFPから生成されるが、何一つ529nmより長い発光極大を示すものは無かった。GFP様タンパク質が、生物学的用途のために利用可能な色の範囲を著しく拡大した花虫綱（サンゴ動物）から単離されている。配列データベースに寄託された「GFP様タンパク質」のファミリーは、現在およそ30の有意に異なるメンバーを有している。蛍光タンパク質は、発色団の自己触媒的合成によって自発的に蛍光を発することができるタンパク質を指す。赤色波長又は遠赤色波長（赤色蛍光タンパク質又はRFP）で蛍光を発するタンパク質が知られている。RFPは、多色標識実験及び蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）実験の両方において、より短い波長で蛍光を発する他の蛍光タンパク質との組み合わせで使用することができる。市販のRFPは、2つの野生型GFP様タンパク質に由来する。DsRed（drFP583）は、558nmと583nmで、それぞれ励起極大及び発光極大を持つ。遠赤外蛍光タンパク質は、571nmで吸収する色素タンパク質の変異誘発によって生成された。HcRed1（Clontech）は、588nmと618nmで、それぞれ励起極大及び発光極大を持つ。最長波長（導入されている任

意の変異なし)で蛍光を発する蛍光タンパク質は、イソギンチャク*Entacmaea quadricolor*からクローニングされた、e q F P 6 1 1である。このタンパク質は、559 nmで吸収し、611 nmで発光する。

【0108】

B. プローブ及びプローブシステムの使用

本開示は、開示されたプローブ及びプローブシステムを使用する方法を提供する。例えば、プローブは標的核酸分子を検出し分析するために使用することができる。一例において、本方法は、サンプル中の核酸分子と標的核酸プローブとのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で、核酸分子を含むサンプルと開示された標的核酸プローブの一つ以上を接触させることを含む。次いで、検出プローブと標的核酸プローブとの間のハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で、サンプルを検出プローブと接触させる。検出プローブは、上述したように検出される。

10

【0109】

本開示のプローブ及びプローブシステムは、インサイツハイブリダイゼーション手順(例えば、蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)、発色インサイツハイブリダイゼーション(CISH)及び銀インサイツハイブリダイゼーション(SISH))のような、核酸検出のために使用することができる。相補的な核酸分子間のハイブリダイゼーションは、相補的なヌクレオチド単位間のワトソン-クリック型、フーグスティーン型または逆転フーグスティーン型水素結合を含む水素結合を介して媒介される。例えば、アデニン及びチミンは、水素結合の形成を介して対になる相補的核酸塩基である。本開示のプローブの特定の位置にあるヌクレオチド単位が、DNAまたはRNA分子(例えば、標的核酸配列)の同じ位置にあるヌクレオチド単位と水素結合することが可能である場合、オリゴヌクレオチドは、その位置で互いに相補的である。プローブ及びDNA又はRNAは、各分子において十分な数の対応する位置が、互いに水素結合し、検出可能な結合を生成することができるヌクレオチド単位によって占有されている場合、互いに相補的である。プローブは、特異的にハイブリダイズ可能な、標的核酸配列(例えば、ゲノム標的核酸配列)と100%相補的である必要はない。その配列が複雑な混合物中(例えば、全細胞DNA又はRNA)に存在する場合には、プローブが標的核酸配列に結合し、二重鎖を作り、又は標的核酸配列にのみハイブリダイズするか又は実質的にそれのみにハイブリダイズするために、十分な相補性が必要である。

20

30

【0110】

インサイツハイブリダイゼーションは、標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)を含むサンプルを、中期または間期の染色体調製物(例えば、スライド上にマウントされた細胞または組織サンプルなど)の関連で、標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)に対して特異的にハイブリダイズできるか又は特異的であるプローブ(例えば、上述の標的核酸プローブ)に、接触させることを包含する。スライドは、例えば、パラフィン又は均一なハイブリダイゼーションを妨げる可能性がある他の材料を除去するために、必要に応じて前処理される。染色体サンプルおよびプローブの両方は、二本鎖核酸を変性させるため、例えば加熱により処理される。(適当なハイブリダイゼーション緩衝液中に調製された)プローブとサンプルは、ハイブリダイゼーションが起こることを可能にするため(典型的には平衡に達するまで)の条件下で十分な時間において混ぜ合わされる。染色体の調製物は、過剰な標的核酸プローブを除去するために洗浄され、染色体標的の特異的標識の検出が行われる。本開示のいくつかの実施態様によれば、検出は、標的核酸プローブ二対する検出プローブのハイブリダイゼーションによって促進される。検出プローブは、直接検出又は間接的検出にによって検出することができる。

40

【0111】

例えば、幾つかの直接検出の実施態様では、検出プローブは、1つまたはそれ以上の蛍光化合物で標識され、サンプルは蛍光顕微鏡又はイメージングにより解析される。幾つかの間接的検出の実施態様では、検出プローブは、上述のように、結合システムの第二又は第二及び第三メンバーとサンプルを接触させることにより検出される、結合システムの第

50

ーメンバー（即ちハプテン又はビオチン）を含んでなる一又は複数の検出可能な部分を含む。インサイトハイブリダイゼーションの方法の一般的な記述については、例えば米国特許第4888278号を参照。蛍光インサイトハイブリダイゼーション（FISH）、発色インサイトハイブリダイゼーション（CISH）及び銀ハイブリダイゼーションのための多数の手順が、当技術分野で知られている。例えば、FISHを実施するための方法は、米国特許第5,447,841号、同5,472,842号、同5,427,932号、及び例えば、Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2934-2938, 1986; Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9138-9142, 1988; 及びLichter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9664-9668, 1988に記載される。CISHは、例えば、Tanner et al., Am. J. Pathol. 157:1467-1472, 2000及び米国特許第6,942,970号に記載される。更なる検出方法が、米国特許第6,280,929号に与えられている。インサイトハイブリダイゼーションによって、ウイルスを検出するための典型的な手順は、Poddighe et al., J. Clin. Pathol. 49:M340-M344, 1996に見いだすことができる。

【0112】

多数の試薬および検出方式が、感度、解像度、または他の望ましい特性を向上させるためにFISH、CISH、及びSISHの方法と併せて用いることができる。幾つかの実施態様において、検出プローブ、又は特異的結合剤（抗体、例えば、一次抗体、レセプター又は他の結合剤など）は、蛍光性又は発色性の組成物を、蛍光性、着色された、或いはそうでなければ検出可能なシグナル（例えば、SISHにおける検出可能な金属粒子の蒸着など）へと変換することが可能な酵素を含む。上に示したように、酵素は、関連するプローブ又は検出試薬ヘリンカーを介して直接または間接的に結合することができる。適切な試薬の例（例えば、結合試薬）及び化学物質（例えば、リンカー及び結合化学物質）は、米国特許出願公開第2006/0246524号；同2006/0246523号及び同2010/0136652号に記載されている。

【0113】

他の実施態様において、FISHを行う際に蛍光物質（蛍光色素と半導体ナノ結晶を含む）で標識した検出プローブは、直接光学的に検出することができる。あるいは、検出プローブは、ハプテンなどの非蛍光分子（例えば、以下の非限定的な例など：ビオチン、ジゴキシゲニン、DNP、およびそれらの様々なオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアシル、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、クマリン系化合物、ポドフィロトキシン、ポドフィロトキシン系化合物、およびそれらの組み合わせ）、リガンド又は他の間接的に検出可能な部分で標識することができる。このような非蛍光分子で標識した検出プローブ（及びそれらが結合する標的核酸配列）は、サンプル（例えば、プローブが結合した細胞又は組織サンプル）を標識検出試薬、例えば、選択されたハプテン又はリガンドに特異的な抗体（又は受容体、又は他の特異的結合パートナー）と接触させることによって検出することができる。検出試薬は、フルオロフォア（例えば、半導体ナノ結晶）又は他の間接的に検出可能部分で標識することができ、又は一つ又は複数の更なる特異的結合剤（例えば、二次的又は特異的抗体）と接触することができ、それらは順にフルオロフォアで標識することができる。任意で、検出可能な標識は、抗体、受容体（または他の特異的結合剤）に直接結合される。あるいは、検出可能な標識がリンカー、例えば、ヒドラジドチオールリンカー、ポリエチレングリコールリンカーなど、又は匹敵する反応性を持った他の柔軟な連結部分を介して結合剤に結合される。例えば、抗体、レセプター（又は他の抗リガンド）、アビジン等の特異的結合剤は、ヘテロ二官能性ポリエチレングリコール（PEG）リンカーなどのヘテロ二官能性アルキレングリコールリンカーを介して、フルオロフォア（又は他の標識）で共有結合性に修飾することができる。ヘテロ二官能性リンカーは、例えば、カルボニル反応性基、アミン反応性基、チオール反応性基及び光反応性基から選択された2つの異なる反応性の基を結合し、その第一番目は標識に結合し、その第二番目は特異的結合剤に結合する。

【0114】

標識された検出プローブ及び/又は標識された結合対を適切に選択することにより、多

10

20

30

40

50

重検出方式を作り出すことができ、1回のアッセイによって（例えば、単一の細胞又は組織サンプルに関して、又は複数の細胞又は組織サンプルに関して）、複数の標的核酸配列又は標的核酸配列の複数の部分（例えば、ゲノムの標的核酸配列）の検出を容易にすることが可能であることが当業者によって理解されるであろう。例えば、好ましい実施態様において、標的配列の第一の部分に対応する第一検出プローブは第一ハプテンで標識することができ、標的配列の第二の部分に対応する第二検出プローブは第二ハプテン、例えばDNPで標識することができ、標的配列の第三の部分に対応する第三検出プローブは第三ハプテン、例えばNPで標識することができる。プローブセットへのサンプルの暴露後、結合したプローブは結合システムの第二又は第二及び第三メンバーで検出することができる。標準的な光学又は蛍光顕微鏡は、比色分析化合物又は蛍光化合物を組み込んだ試薬およびプローブの検出のための安価なツールである。

10

【0115】

一つの好ましい実施態様は、図3に示されたアプローチで、これは、ALK転座を検出するための検出方式を示す。図3つのプローブは、各々異なる検出可能な部分で、本実施例では、異なるハプテンで標識される。標的の5'非コード領域に対する第一核酸プローブは、DIGで標識される。標的の3'非コード領域に対する第二核酸プローブは、DNGで標識される。推定される切断点にまたがる第三の核酸プローブはNPで標識される。ハイブリダイゼーションの後、3つの異なるプローブは、異なるシグナル発生システム、例えば、比色試薬、蛍光剤、半導体ナノ結晶、又は他の適切なシグナル発生部分で検出することができる。図6(A-B)は、3つのプローブの各々に特異的シグナルを生成するための比色試薬の使用を示す。本例示的なシステムにおいては、試薬は逐次適用される。しかし、他のシステムでは、試薬を同時に添加することができる。一例では、サンプルは、マウス抗NP抗体と接触させる。次いで、サンプルを、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされたヤギ抗マウス抗体と接触させる。次いで、サンプルを銀検出するための試薬と接触させる。これにより、第三核酸プローブのシグナルを生成する。次いで、サンプルをマウス抗DIG抗体と接触させる。次に、サンプルをアルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗マウス抗体と接触させる。次いで、サンプルをファストブルー検出するための試薬と接触させる。これにより、第一核酸プローブのシグナルを生成する。次いで、サンプルをアルカリホスファターゼ活性をブロックする試薬と接触させる。次にサンプルをウサギ抗DNP抗体と接触させ、続いてアルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体と接触させる。次いで、サンプルをファストレッド検出用の試薬と接触させる。これにより、第二核酸プローブのシグナルを生成する。これらの検出工程に続いて、サンプルは、上述したように三つのプローブの各々に特異的なシグナルの同時視覚化のために顕微鏡検査によって分析することができる。このアプローチを用いて生成することができる得られた画像を図6(A-B)に示す。

20

30

【0116】

当業者には、上記の検出システム及び試薬、並びに当技術分野で公知の他の試薬及び検出システムは、これらの例示的な試薬で置換することができることが理解されるであろう。例えば、代替システムは、直接標識された核酸プローブ、標識された第一抗体、又は第一及び第二抗体の異なる組み合わせを使用することができる。プローブ又は抗体を標識するために用いられるシグナル生成部分は、例えば他の比色試薬、蛍光分子、発光分子、及び半導体ナノ結晶から選択することができる。記述されたプローブシステムで利用3つのプローブの各々に特異的な検出可能な信号を生成するための数多くの異なるスキームが存在することが理解されるであろう。

40

【0117】

C. 標的

本開示に係る標的核酸配列は、染色体転座事象に関わる染色体切断点を含む任意の配列であって良い。特定の実施態様では、標的配列は、例えばヒトゲノムなどの真核生物のゲノム由来のゲノム標的配列又はゲノムのサブシーケンスである。固有の非反復DNAの少なくとも一部分を含有する、本質的に任意のゲノムの標的配列に対応する、標的核酸プロ

50

ープを作成することができる。

【0118】

幾つかの実施態様において、標的核酸分子は、疾患に関連した（例えば、相関し、因果的に関与したなどの）配列とすることができる。幾つかの実施態様において、疾患や病気に関連した標的核酸が選択され、ハイブリダイゼーションによる検出を、疾患又は病気に関連する情報（サンプルが得られた患者の診断又は予後情報など）を推測するために用いることができる。所定の実施態様において、選択された標的核酸分子は、腫瘍性疾患（又は癌）に関連付けられた標的核酸分子である。幾つかの実施態様において、ゲノム標的配列は、癌に関連した染色体転座に関連した染色体切断点を含む配列である。そのような転座の例としては、ワールド・ワイド・ウェブ上の atlasgeneticsoncology.org//Anomalies/Anomliste で利用できる「腫瘍学及び血液学における遺伝学と細胞遺伝学のアトラス (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology)」で同定されたものを含む。

10

【0119】

標的核酸配列（例えば、ゲノムの標的配列）は、任意の数の塩基対にまたがることのできる。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、少なくとも1000塩基対に及ぶ。特定の実施例において、標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）は、長さが少なくとも10000塩基対、少なくとも50000塩基対、少なくとも100000塩基対、少なくとも150000塩基対、少なくとも250000塩基対、又は少なくとも500000塩基対（例えば、100kbから600kb、200kbから500kb、又は300kbから500kb）である。実施例において、標的核酸配列が、真核生物のゲノム（例えば、哺乳動物のゲノム、例えば、ヒトゲノムなど）由来である場合、標的配列は、典型的には、生物のゲノムのごく一部（又は単一染色体の小さな部分）を表している（例えば、生物のゲノムDNA（又は単一染色体）の20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、又は1%未満）。

20

【0120】

幾つかの実施態様では、標的配列へのプローブのハイブリダイゼーションの分析から得られた情報は、癌の転帰に関連する診断又は予後を判断するために使用される。幾つかの実施態様において、癌は、非小細胞肺癌であり、再配置は、ALK再配置である。未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）遺伝子の発癌性再配置は、一部の非小細胞肺癌（NSCLC）で発生する。ALK遺伝子を遮断してそれを別の遺伝子と融合させる染色体再配置は、発癌性のALK融合遺伝子の作成を生じる。次に、これらは、細胞増殖と生存を高める。幾つかの実施態様において、ALK融合遺伝子は、ALK-EML4である。

30

【0121】

アッセイがALK再配置を示す幾つかの実施態様において、情報は、ALK再配置の存在及び種類に応じて患者に対する治療的処置を選択するために使用される。幾つかの実施態様において、治療的処置はALK阻害剤の投与である。ALK阻害剤の例としては、PF02341066（ファイザー）に限定されるものではない。

【0122】

D. キット

幾つかの実施態様において、本開示は、少なくとも第一、第二及び第三核酸プローブを含むキットを提供する。幾つかの実施態様において、第一核酸プローブは染色体切断点に対して5'である染色体の一部にハイブリダイズし、第二核酸プローブは染色体切断点に対して3'である染色体の一部にハイブリダイズし、第三核酸プローブは5'部分と3'部分を含み、転座の欠損下で、第三核酸プローブが染色体切断点にまたがることのできるように、染色体切断点の近傍の5'と3'配列にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、FISH, CISH、及び/又はSISHなどのインサイツハイブリダイゼーション法のためのキットは、本明細書に記載される少なくとも第一、第二、及び第三核酸プローブを含んでなる。幾つかの実施態様において、キットはさらに、少なくとも一つの標的核酸プローブと組み合わせて使用するための1つ以上の検出試薬を含む。幾つか

40

50

の実施態様において、キットはさらに、第一、第二及び第三核酸プローブと組み合わせて使用するための少なくとも一の特異的結合剤を含む。従って、キットは、1つ以上の標的核酸プローブ、1つ以上の検出プローブ、及び1つ以上の特異的結合剤を含むことができる。

【0123】

キットはまた、インサイツハイブリダイゼーションアッセイを実施するための、又はプローブを作成するための一以上の試薬を含み得る。例えば、キットは、一以上のバッファ、標識されたdNTP、標識酵素（ポリメラーゼなど）、プライマー、核酸分解酵素フリーの水、及び標識化プローブを作成するためのインストラクションとともに、少なくとも一つの核酸分子（又はそのような分子の集団）を含めることができる。

10

【0124】

一実施例において、キットは、バッファ及びインサイツハイブリダイゼーションを行うための他の試薬、例えばパラフィン前処理バッファ、プロテアーゼ、及びプロテアーゼバッファ、プレハイブリダイゼーションバッファ、ハイブリダイゼーションバッファ、洗浄バッファ、対比染色、封入剤、またはそれらの組み合わせなどと一緒に、第一、第二、及び第三核酸プローブ及び一以上の特異的結合剤を含む。キットには、必要に応じてさらに、ハイブリダイゼーションおよびプローブの信号を評価するための対照のスライドを含めることができる。

【0125】

E. 自動化

20

当業者は、ハプテンコンジュゲートを使用するための本明細書に開示される方法の実施態様が自動化することができることを理解するであろう。Ventana Medical Systems, Inc. は、米国特許第5,650,327号、第5,654,200号、第6,296,809号、第6,352,861号、第6,827,901号および第6,943,029号、及び米国特許出願公開第20030211630号及び第20040052685号を含む、自動化された分析を実行するためのシステムおよび方法を開示する数々の米国特許の譲受人である。高分子ハプテン染色手順の特定の実施態様が、様々な自動化工程を使用して行うことができる。

典型的な作業実施態様に関する更なる詳細は、実施例に記載される。

【実施例】

30

【0126】

実施例1

材料と方法

ALKトリプルプローブの設計

ブレイク - アパートインサイツハイブリダイゼーション (ba - ISH) アッセイは、ALK遺伝子座 (ALK - EML4融合) の配置を評価するように設計される。3つのプローブが、隣接するセントロメア領域 (770 kb) 及びALK遺伝子のテロメア領域 (683 kb) 及びALK遺伝子領域 (728 kb) とハイブリダイズさせるために生成された (図1)。ALK遺伝子プローブはNPハプテンで標識され、5' ALKプローブはDIGハプテンで標識され、3' ALKプローブはDNPハプテンで標識される。

40

【0127】

自動化された明視野ブレイク - アパートインサイツハイブリダイゼーションプロトコル明視野インサイツハイブリダイゼーションALK遺伝子ba - ISHアッセイのための全ての最適化及び性能評価は、Benchmark (登録商標) XT自動化スライド処理システム (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) で実施される。ba - ISH機器のソフトウェアは、ベーキングから対比染色までの全工程が中断することなく行うことができるように作成される。スライドは、パラフィンを溶かすために機器上で65で20分間ベーキングされ、液体カバーガラス (Liquid Coverslip (Ventana Medical Systems, Inc.)) プライムドEZ Prep (Ventana Medical Systems, Inc.) 脱パラフィン工程が続く。DNA標的は、細胞コンディショニング2 (酸性pH、クエン酸緩衝液、Vent

50

ana Medical Systems, Inc.) 及び I S H プロテアーゼ 2 又は I S H プロテアーゼ 3 (Ventana Medical Systems, Inc.) による組織消化と熱処理の併用により回収される。適切なプロテアーゼ消化時間は、臨床サンプルの異なる組織固定および処理条件に起因し、各組織サンプルについて決定される。5' 及び 3' A L K 及び A L K プローブの混合物は、Ventana のハイブリダイゼーション緩衝液中のヒト胎盤 DNA (2 mg/ml) で用いて調整される。プローブと標的 DNA を 85 °C で 20 分間共変性させ、44 °C で 5 時間ハイブリダイゼーションを実施する。ストリンジェンシー洗浄工程を、2 X S S C (Ventana Medical Systems, Inc.) を用い、72 °C で実施する。I S H シグナル検出の順序は、1) 西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) に基づく銀検出、2) アルカリホスファターゼ (A P) に基づく青色検出、3) A P に基づく赤検出である。N P ハプテンは、マウス抗 N P 抗体、続いて H R P 結合ヤギ抗マウス抗体で検出される。H R P 酵素は、酢酸銀、ヒドロキノン、及び H₂O₂ で着色されている (ultra view S I S H 検出キット Ventana Medical Systems, Inc.)。D I G ハプテンは、マウス抗 D I G 抗体で標識され、抗 D I G 抗体は、A P - 結合ヤギ抗マウス抗体と反応させ、そして A P 酵素はファストブルー検出で着色される。次いで、A P 酵素は、37 °C で 30 分間、ハイブリダイゼーション緩衝液で変性される。2 X S S C でスライドを洗浄した後、3 度目の I S H 検出が行われる。D N P ハプテンは、ウサギ抗 D N P 抗体で標識され、D N P 抗体は、A P 結合ヤギ抗ウサギ抗体と反応させ、そして A P 酵素がファストレッド検出で着色される (ultra view Red I S H 検出キット Ventana Medical Systems, Inc.)。全てのスライドは、ヘマトキシリン I I (Ventana Medical Systems, Inc.) 及び青味剤 (Ventana Medical Systems, Inc.) で対比染色される。対比染色されたスライドを、D A W N (登録商標) (Proctor & Gamble Company, Cincinnati, OH) を含有する蒸留水ですすぐ。最後に、空気乾燥されたスライドは、T i s s u e - T e k (登録商標) フィルムカバースライド (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) をかぶせる。

【 0 1 2 8 】

実施例 2

以下の実施例は、3色ブレイクアパートシステムによる A L K 再編成の解析についての方法を説明する。スライドは、パラフィン溶かすために機器上で 65 °C で 20 分間ベーキングされ、液体カバーガラス (Liquid Coverslip (Ventana Medical Systems, Inc.)) プライムド E Z P r e p (Ventana Medical Systems, Inc.) 脱パラフィン工程が続いた。DNA 標的は、クエン酸緩衝液に基づいた標的回収溶液 (Ventana Medical Systems, Inc.) 及び I S H プロテアーゼ 2 (Ventana Medical Systems, Inc.) による組織消化と熱処理の併用により回収された。適切なプロテアーゼ消化時間は、臨床サンプルの異なる組織固定および処理条件に起因し、各組織サンプルについて決定された。3つの A L K プローブ (D N P 標識 5' A L K プローブ、フルオレセイン標識の内部 A L K プローブ及び D I G 標識 3' A L K プローブ、各々は 12 µg/ml) が、Ventana ハイブリダイゼーション緩衝液中で f i s h DNA を用いて調製された。プローブと標的 DNA を 85 °C で 20 分間共変性させ、44 °C で 5 時間ハイブリダイゼーションを実施した。ストリンジェンシー洗浄工程を、2 X S S C (Ventana Medical Systems, Inc.) を用い、72 °C で実施した。フルオレセイン標識の内部 A L K プローブは、マウス抗フルオレセイン抗体、続いて H R P 結合ヤギ抗マウス抗体でインキュベートした後、D A B 検出で可視化された。5' A L K プローブ上の D N P ハプテンは、ウサギ抗 D N P 抗体で標識され、その抗 D N P 抗体を、A P - 結合ヤギ抗ウサギ抗体と反応させ、そして A P 酵素はファストブルー検出で着色された。次いで、A P 酵素は、37 °C で 30 分間、ハイブリダイゼーション緩衝液で変性された。2 X S S C でスライドを洗浄した後、3 度目の I S H 検出が行われた。3' A L K プローブ上の D I P ハプテンは、マウス抗 D I G 抗体で標識され、その抗 D I G 抗体を、A P - 結合ヤギ抗マウス抗体と反応させ、そして A P 酵素はファストレッド検出で着色された。全てのスライドは、希釈されたヘマトキシリン I I (Ventana Medical Systems, Inc.) 及び青味剤 (Ventana Medical Systems, Inc.) で対比染色された。対比染色されたスライドを、D A W N (登録商標) (Proctor & Gamble Com

10

20

30

40

50

pany, Cincinnati, OH) を含有する蒸留水ですすいだ。最後に、空気乾燥されたスライドは、Tissue-Tek (登録商標) フィルムカバースライド (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) をかぶせた。b a - I S H スライドを分析し、ニコンデジタルカメラ D S - F i 1 (Nikon Instruments Inc.) を具備するニコン E C L P S E 9 0 i 顕微鏡 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) を用いて写真を撮った。結果は図 6 (A - B) に与えられる。

【 0 1 2 9 】

前述の実施例によれば、本開示は、切断点に対して 5 ' に位置するゲノム DNA の一部分にハイブリダイズする第一核酸、切断点に対して 3 ' に位置するゲノム DNA の一部分にハイブリダイズする第二核酸、及び切断点に隣接する DNA の一部分にハイブリダイズする第三核酸プローブを接触させ；サンプル中でゲノム DNA に対してハイブリダイズするためにプローブに適した条件を確立し；及びサンプル中でゲノム DNA に対するプローブのハイブリダイゼーションを検出することを含む、切断点に関連した染色体転座を有することが疑われるサンプルを解析するための方法を提供する。幾つかの実施態様において、第三核酸プローブは 5 ' 部分及び 3 ' 部分を更に含み、ここで第三核酸プローブは、再配置の欠損下で切断点にまたがってゲノム DNA の領域にハイブリダイズすることができるように、5 ' 部分は、切断点に隣接して 5 ' であるゲノム DNA の一部分にハイブリダイズし、3 ' 部分は、切断点に隣接して 3 ' であるゲノム DNA の一部分にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、再配置の存在下で、第一核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルは、再配置の欠損下で第一核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルの配向と比較した場合、逆転している配向を有するように、第三核酸プローブは切断点に隣接して 5 ' であるゲノム DNA の一部分にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、再配置の存在下で、第二核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルは、再配置の欠損下で第二核酸プローブに対して検出されたシグナル及び第三核酸プローブに対して検出されたシグナルの配向と比較した場合、逆転している配向を有するように、第三核酸プローブは切断点に隣接して 3 ' であるゲノム DNA の一部分にハイブリダイズする。幾つかの実施態様において、核酸プローブは、RNA、DNA、PNA、LNA 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される核酸を含む。

10

20

30

【 図 1 】

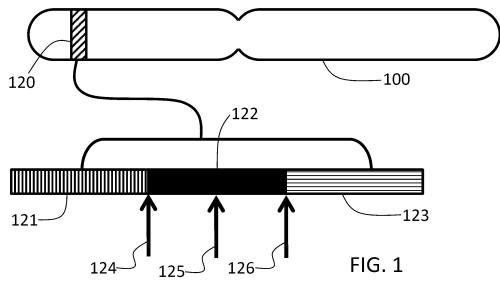


FIG. 1

【 図 2 A - 2 D 】

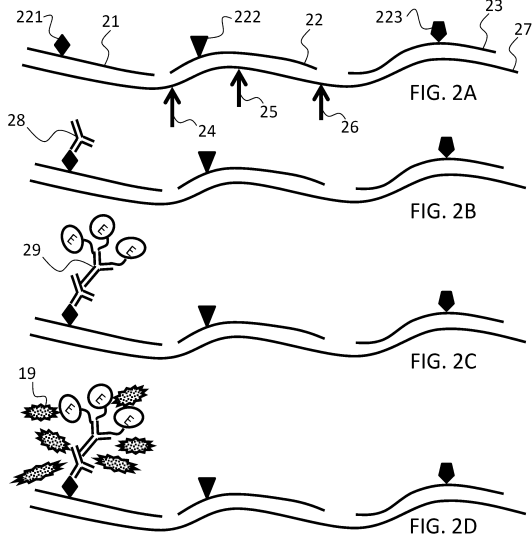


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

FIG. 2D

【 図 7 】

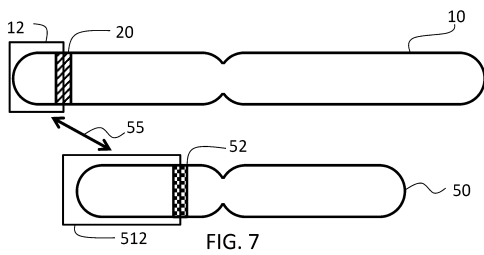


FIG. 7

【 図 8 】

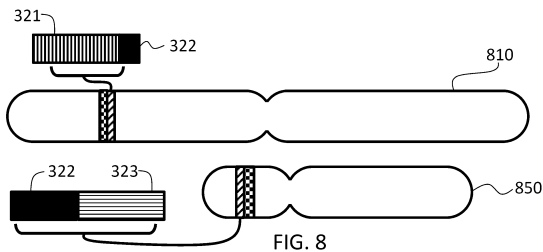


FIG. 8

【 図 3 】

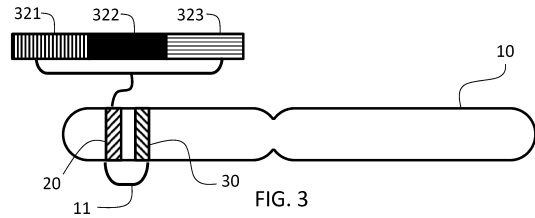


FIG. 3

【 図 4 】

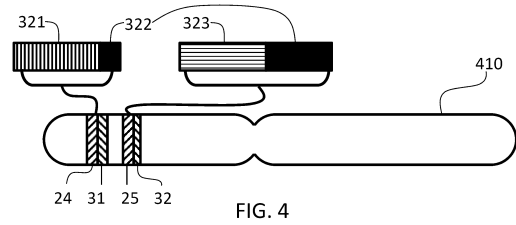


FIG. 4

【 図 5 A - 5 B 】

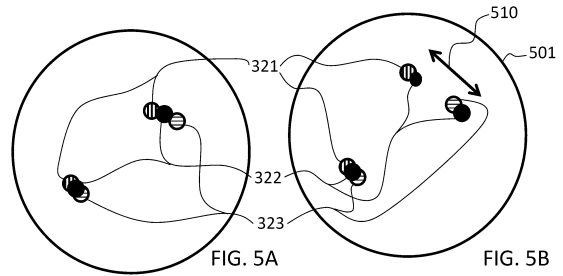


FIG. 5A

FIG. 5B

【 図 9 A - 9 B 】

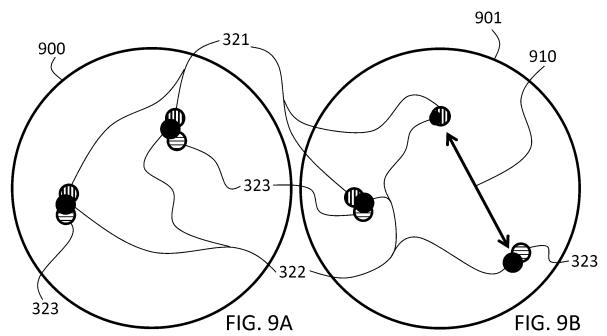


FIG. 9A

FIG. 9B

【 6 A - 6 B 】

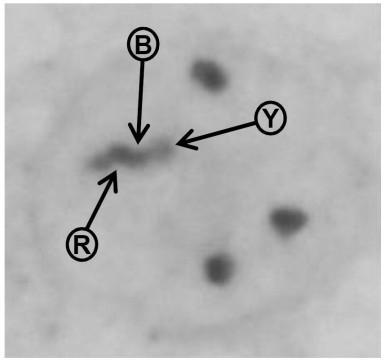


FIG. 6A

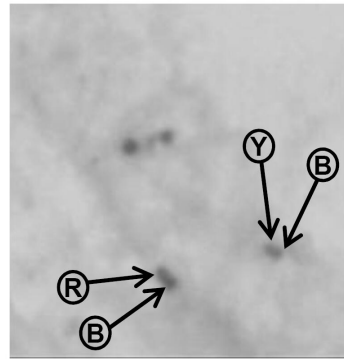


FIG. 6B

フロントページの続き

- (72)発明者 グローガン, トーマス エム
アメリカ合衆国 アリゾナ 85718, ツーソン, ビア アルカルデ 5555
- (72)発明者 ニッタ, ヒロアキ
アメリカ合衆国 アリゾナ 85737, オロ ヴァレー, ノース クアンドリー ドライブ
11654
- (72)発明者 チャン, ウェンチュン
アメリカ合衆国 アリゾナ 85737, ツーソン, ノース ラピリンス ドライブ 116
32

審査官 吉岡 沙織

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0057513 (US, A1)
SZYMANOWSKA N. et al., Cancer Genetics and Cytogenetics, 2008年, Vol.186, P.110-114
村田晋一 他, 組織細胞化学, 2006年, P.63-71
MARTIN-SUBERO J. I. et al., Cancer Res, 2006年, Vol.66, No.21, P.10332-10338
RIED T. et al., GENES, CHROMOSOMES & CANCER, 1992年, Vol.4, P.69-74
VAANDRAGER Jan-Willem et al., GENES, CHROMOSOMES & CANCER, 2000年, Vol.27, P.85-94
HATTINGER C. M. et al., Cytogenetics and Cell Genetics, 2001年, Vol.93, P.29-35

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)