

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6546158号  
(P6546158)

(45) 発行日 令和1年7月17日(2019.7.17)

(24) 登録日 令和1年6月28日(2019.6.28)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/6844	(2018.01)
C 12 Q 1/686	(2018.01)
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 N 9/10	(2006.01)
C 12 Q	1/6844
C 12 Q	1/686
C 12 N	15/09
C 12 N	9/10

C 12 Q 1/6844 Z  
C 12 Q 1/686 Z  
C 12 N 15/09 Z N A Z  
C 12 N 9/10 9/10

請求項の数 28 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2016-515077 (P2016-515077)  
 (86) (22) 出願日 平成26年5月22日 (2014.5.22)  
 (65) 公表番号 特表2016-521548 (P2016-521548A)  
 (43) 公表日 平成28年7月25日 (2016.7.25)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2014/039110  
 (87) 國際公開番号 WO2014/190138  
 (87) 國際公開日 平成26年11月27日 (2014.11.27)  
 審査請求日 平成29年3月31日 (2017.3.31)  
 (31) 優先権主張番号 61/826,484  
 (32) 優先日 平成25年5月22日 (2013.5.22)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 515320949  
 テロメア ダイアグノスティクス インコ  
ーポレイテッド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
025 メンロ パーク ヘヴン アヴェ  
ニュー 3603 スイート エー  
 (74) 代理人 100106002  
 弁理士 正林 真之  
 (74) 代理人 100120891  
 弁理士 林 一好  
 (74) 代理人 100165157  
 弁理士 芝 哲央  
 (74) 代理人 100126000  
 弁理士 岩池 滉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】短いテロメアの存在量の測定

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

染色体のテロメア反復配列及びサブテロメア配列を増幅する方法であって、前記方法は：

- a ) 以下によって核酸伸長産物を作製すること：
  - i ) 二本鎖染色体DNAの3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列に伸長プライマーをハイブリダイズすることであって：
    - (1) 二本鎖染色体DNAは、テロメア反復配列を含むテロメア領域及びサブテロメア配列を含むサブテロメア領域を有し；及び
    - (2) 伸長プライマーは：
    - (A) アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする3'部分及び
    - (B) アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズしないアンカー配列を有する5'部分を含む、前記ハイブリダイズすること；及び
    - i i ) 時間制御された鎖-置換伸長反応を行って二本鎖染色体DNAのサブテロメア領域の方へ伸長プライマーを伸張することであって、伸長反応は、予め定められた長さの範囲内でテロメア領域を有する二本鎖染色体DNAのみからのテロメア反復配列及びサブテロメア配列の両方を含む伸長産物を產生するように調節される、前記伸長すること；及び
    - b ) その後のPCR反応によって伸長産物の配列を増幅すること、

10

20

を含み；これによりテロメア反復配列及びサブテロメア配列を有する核酸を含む長さの限られた増幅産物を产生し、

時間制御された伸長反応は、予め定められた長さの伸長産物を产生するように調節され

前記時間制御された伸長反応は、0.1～30分、0.1～10分、0.1～5分、0.1～4分、0.1～3分、0.1～2分、0.1～1分、または0.1～0.5分であるように調節される、前記方法。

#### 【請求項2】

配列は：

(1) アニーリング条件下で伸長産物におけるサブテロメア領域に独特の配列にハイブリダイズする第1の増幅プライマー；及び 10

(2) アニーリング条件下でアンカー配列にハイブリダイズする第2の増幅プライマー

、  
を使用して増幅される、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

第1の増幅プライマーは、配列5' - G A T G G A T C C T G A G G G T G A G G G T G A G G G - 3' [配列番号：2]、5' - C G G G C C G G C T G A G G G T A C C G C G A - 3' [配列番号：10] (染色体1)、5' - G C T A A T G C A C T C C C T C A A T A C - 3' [配列番号：11] (染色体5)または5' - C A T T C C T A A T G C A C A C A T G A T A C C - 3' [配列番号：12] (染色体9)を含む、請求項2 20  
に記載の方法。

#### 【請求項4】

第1の増幅プライマーは、配列5' - G A T G G A T C C T G A G G G T G A G G G T G A G G G - 3' [配列番号：2]を含み、及び第2のプライマーは、配列5' - T G C T C G G C C G A T C T G G C A T C - 3' [配列番号：8]を含む、請求項2に記載の方法。

#### 【請求項5】

増幅されたテロメア産物の長さ範囲は、P C R反応において時間制御された伸長時間を使用して決定することができる、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項6】

対照配列を同時増幅することをさらに含む、請求項1に記載の方法。 30

#### 【請求項7】

対照配列は、複数の非テロメア反復配列を含む、請求項6に記載の方法。

#### 【請求項8】

短いテロメアの存在量を決定するための方法であって：

- a ) 被験体から3'オーバーハングを含む二本鎖染色体D N Aを含む試料を得ること；
- b ) 請求項1の方法を使用して二本鎖染色体D N Aから長さの限られた増幅産物を产生すること；及び
- c ) 長さの限られた増幅された産物から短いテロメアの存在量を決定すること、  
を含む前記方法。 40

#### 【請求項9】

d ) 試料からの総テロメアの存在量の測定と短いテロメアの存在量を比較することをさらに含む、請求項8に記載の方法。

#### 【請求項10】

工程d )は、総テロメアの存在量の関数として短いテロメアの存在量を決定することを含む、請求項9に記載の方法。

#### 【請求項11】

短いテロメアの存在量を決定することは、q P C Rを使用して行われる、請求項8に記載の方法。

#### 【請求項12】

50

q P C R は、第 1 及び第 2 のプライマーを使用して行われ、

i ) 前記第 1 のプライマーは、第 1 の鎖の少なくとも 1 つの反復単位にハイブリダイズし、及び前記第 2 のプライマーは、第 2 の鎖の少なくとも 1 つの反復単位にハイブリダイズし、

i i ) 前記ハイブリダイズしたプライマーは、これらのそれぞれの鎖にハイブリダイズしたときに、プライマー伸長ができる、及び前記第 1 のプライマーの少なくとも 1 つのヌクレオチドは、前記第 1 のプライマーが前記第 1 の鎖の少なくとも 1 つの反復単位にハイブリダイズしたときに、前記第 1 のプライマーと前記反復単位のヌクレオチドとの間に内部塩基対ミスマッチを生じ、

i i i ) 前記第 1 のプライマーは、また第 1 及び第 2 のプライマーが互いにハイブリダイズするときに、前記第 2 のプライマーの 3' 末端ヌクレオチドとミスマッチを生じ、

i v ) 前記第 2 のプライマーの少なくとも 1 つのヌクレオチドは、前記第 2 のプライマーが前記第 2 の鎖の少なくとも 1 つの反復単位にハイブリダイズしたときに、前記第 2 のプライマーと前記反復単位のヌクレオチドとの間の内部塩基対ミスマッチを生じる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

短いテロメアの存在量を決定することは、サザンプロット、ドットプロット法、スロットプロット、免疫化学、核酸シーケンシング、またはデジタル P C R によって試料における平均テロメア長を測定することを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

短いテロメアの存在量は、存在量比の測定である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 5】

総テロメアの存在量は、ゲノム参照配列の存在量に相対的に測定される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ゲノム参照配列は、單一コピー参照核酸配列または非テロメア反復 D N A 配列を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

單一のコピー参照核酸配列は、ヒト ゲロビンである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

非テロメア反復 D N A 配列は、A l u 反復配列または動原体性反復配列である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

a ) 単離された試料において、請求項 8 ~ 9 および 1 0 ~ 1 6 に記載のいずれかの方法を使用して短いテロメアの存在量を決定すること；及び

b ) 短いテロメアの存在量を状態または疾患と関連づけること、  
を含む、方法。

【請求項 2 0】

短いテロメアの存在量の測定は、試料からの総テロメアの存在量と短いテロメアの存在量を比較して決定される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

症状または疾患は、死亡リスクの増加を示す、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

テロメアの存在量は、絶対存在量である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

絶対存在量は、テロメア配列の長さとして測定される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

症状は、疾患のリスクである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

疾患のリスクは、年齢に関連した疾患である、請求項 2 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 2 6】**

年齢に関連した疾患は、心臓血管疾患であり；及び集団における平均より低い測定は、心臓血管疾患のリスクの増加を関連づけられる、請求項 2 5 に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

a ) 単離された複数の試料を得ることであって、それぞれの単離された試料は、異なる時に得られる、前記得ること；

b ) 請求項 8 ~ 9 および 10 ~ 16 に記載のいずれかの方法を使用してそれぞれの複数の試料における短いテロメアの存在量を決定すること；

c ) 短いテロメアの存在量の測定における増減率を決定すること；及び

d ) ( 1 ) 健康の測定；( 2 ) 病態のリスク；( 3 ) テロメア疾患または( 4 ) 薬物応答性と増減率を関連づけること、  
10  
を含む、方法。

**【請求項 2 8】**

短いテロメアの存在量は、短いテロメアの存在量を試料からの総テロメアの存在量と比較することによって決定される、請求項 2 7 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願の相互参照**

この出願は、2013年5月22日に出願した U . S . P r o v i s i o n a l A p p l i c a t i o n N o . 6 1 / 8 2 6 , 4 8 4 の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に援用される。  
20

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

背景における記載は、引用文献における特性付けを裏付けすることが必ずしも意味されるわけではない。

**【0 0 0 3】**

テロメア、真核生物染色体の先端は、染色体を、核酸分解性の分解、末端間融合及び組換えから保護する。テロメアは、核酸配列 ( 5 ' - T T A G G G - 3 ' )<sub>n</sub> の反復によって特徴づけられる染色体の末端にある構造である。テロメアは、正常な細胞分裂の結果として短縮し、及び決定的に短いテロメアは、細胞の老化またはアポトーシスを引き起こす。過去 10 年におけるヒトにおける疫学的及び臨床的研究の豊富な主体は、高リスクの老化に関連した疾患及び総死亡率に短いテロメア長を関連づけてきた ( Puterman ,  
30

E . and E . E p e l , Soc Personal Psychol C o m p a s s , 2 0 1 2 . 6 ( 1 1 ) 8 0 7 - 8 2 5 ; Zhu , H . , M . Belcher , and P . van der Harst , Clin Sci ( Lond ) , 2 0 1 1 . 1 2 0 ( 1 0 ) 4 2 7 - 4 0 ; and F y h r q u i s t , F . and O . S a i j o n m a a . Ann Med , 2 0 1 2 . 4 4 Suppl 1 S 1 3 8 - 4 2 ) 。遺伝的、環境、生活様式及び行動因子は、ひとまとめにしてテロメア長に影響を与える。したがって、テロメア長は、全体の健康、疾患及び死亡リスクについての指標となってきた。  
40

**【0 0 0 4】**

平均テロメア長は、公開されたほとんどすべての臨床試験において測定され、患者の疾患及び死亡リスクを層化する際の有用性を示しているが、マウスにおける最近の研究は、また短いテロメアの集団が老化またはアポトーシスへのシグナルを ( Hemann , M . T . , et al . Cell , 2 0 0 1 . 1 0 7 ( 1 ) 6 7 - 7 7 ) 、及びしたがって、疾患及び死亡リスクをトリガーすることを示している。Hemann et al によって報告された研究では、短いテロメアをもつ第 6 世代テロメラーゼ R N A ノックアウトマウス ( m T R - / - G 6 ) を長いテロメアをもつテロメラーゼについて異種接合体であるマウス ( m T R + / - ) と交配させた。テロメラーゼヌル子孫の表現型は、これ  
50

らのテロメアの半分が長いという事実にもかかわらずmTR-/-親のものを反映し、短いテロメアの量は、及び平均テロメア長ではなく、細胞生存度及び染色体安定度のために重要であることを示唆している。天然産物に由来したテロメラーゼ活性化因子(TA-65(登録商標))を受け取る人々では、短い(<3または<4kbp)テロメアの割合の有意な減少が白血球において検出されたが(定量的FISH技術によって測定される;(Canelaa, A., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(13)5300-5を参照されたい)、平均テロメア長における変化はみられなかった(Harley, C. B., et al Rejuvenation Res. 2011. 14(1)45-56)。したがって、短いテロメアの存在量における割合の変化は、テロメアに対する生活様式及び薬理学的またはその他の介入の効果のより感受性が高い測定であると予想される。別の研究(Vera et al, "The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals", Cell Reports (2012), world wide web URL: dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023)は、「短いテロメアの存在量の増加率は、寿命の前兆であった」ことを見いだした。  
10

#### 【0005】

ゲノムDNAにおけるテロメア長の測定のために、サザンブロッティング(Kimura, M. et al, Nature Protocols, 2010, 5: 1596-1607)、Q-FISH(Rufer, N. et al, Nat. Biotechnol, 1998, 16:743-747)、フローFISH(Baerlocher, G. M. et al, Cytometry, 2002, 47:89-99)及びqPCR(Cawthon, R. M., Nucleic Acids Res., 2002, 30(10):e47)を含む種々の方法が開発されてきた。これらの方針の全ては、健康状態をモニターするために臨床状況において使用することができ、及び医師が個々の患者の必要な目的に合わせた予防的または治療的介入を処方することを可能にする。

#### 【0006】

短いテロメアの集団を測定するためには、定量的蛍光中期-伝播細胞のインサイチューハイブリダイゼーション(Q-FISH)が個々のテロメアの長さを表すテロメアシグナル強度のヒストグラムを生成するために使用してきた(Poon, S. S., et al, Cytometry, 1999. 36(4)267-78)。この方法の限界は、生細胞が必要であり、コストが高く、及びスループットが低いことである。Q-FISHアッセイのより高スループットの改変は(HTQ-FISH; Canelaa, A., et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(13)5300-5を参照されたい)、短いテロメアの割合を測定するために企業Life Length(Spain)によって最近挑戦された。主張にもかかわらず、残念なことに、現在の技術では、このアッセイは、单ースポットにおけるテロメア、特に短いテロメアのクラスター形成のため、正確であり得ない(テロメアの会合; Paeschke, K., K.R. McDonald, and V.A. Zakiyan.

FEBS Lett, 2010. 584(17) 3760-72を参照されたい)。この問題を混乱させるのは、短いテロメアが長いテロメアより頻繁に互いに会合する傾向がある事実である。加えて、FISH技術は、生または固定細胞において高分子に対するプローブの非特異的結合を受けることが公知である。費用のかからず、及び生細胞を必要としない短いテロメアの割合を測定する高スループット方法は、疫学的及び臨床的条件の両方において適応することがより容易だろうし、及びQ-FISHより優れた解析性能を有するだろう。  
40

#### 【0007】

U.S. Patent No. 5,741,677(Kozlowski et al.)は、テロメア長を測定するための方法に言及する。一つの方法は、リンクー配列が  
50

連結される、またはそうでなければ 3' テロメアの末端に共有結合される状態下でリンクマー配列とテロメアに接触することを含む。テロメア配列は、リンクマー配列に対して特異的な第 1 のプライマー及び染色体のサブテロメア領域に対して特異的な第 2 のプライマーでの長い PCR 増幅によって増幅される。もう一つの方法は、細胞の DNA 抽出物を調製すること、テロメア反復配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブと共に抽出物をインキュベートすること、テロメア長の測定として結合したプローブの量を決定することを含む。加えて、固体相にゲノム DNA を結合すること及び標識されたプローブと結合した DNA をハイブリダイズすることによってテロメア長を測定する方法が記述されている。

#### 【 0 0 0 8 】

U.S. Patent Publication No. 2004/0265815 (Baird et al.) は、テロメア長を測定するための方法に言及する。Baird et al. は、テロメアの集団の長さを検出するために以下の工程を記述する： a) 一本鎖のオリゴヌクレオチドの 3' 末端（以下、テロレッテと記載する）を、G リッチなテロメア鎖（TTAGGG 反復配列を含む）を含み、及び C リッチなテロメアの鎖（CCCCCTAA 反復配列を有する）の 5' 末端にテロレッテを共有結合するテロメアの一本鎖のオーバーハングにアニーリングすること、 b) 工程（a）において形成されたプライマー伸長産物を増幅してライゲーション産物を形成すること；及び（c）工程（b）のプライマー伸長産物の長さを検出すること。（Baird, D.M., et al., Nat Genet, 2003, 33(2) : 203-7; and Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D.; Nat Genet, 2003, 33(2) : 203-7. Epub 2003 Jan 21. PMID: 12539050 をまた参照されたい）。

#### 【 0 0 0 9 】

U.S. Patent No. 6,514,693 (Lansdorp) は、形態学的に無処置の染色体、細胞または組織切片における核酸分子の反復配列の複数のコピーを検出するための方法であって：（a）プローブを核酸分子における反復配列にインサイチューでハイブリダイズすることが可能な、変性剤を利用する変性条件下で、核酸分子における反復配列にハイブリダイズし、かつ検出可能な物質によって標識されている PNA プローブで核酸分子を処理すること；及び（b）検出可能な物質を直接または間接的に検出することによって核酸分子における反復配列にハイブリダイズした前記プローブを同定することを含み、これにより、核酸分子における反復配列の複数のコピーを検出する方法に言及する。

#### 【 0 0 1 0 】

短いテロメアの存在量を決定する方法は、サザンプロット解析、インサイチューハイブリダイゼーションにおける定量的蛍光（Q-FISH）（Poorn, S.S., et al.、Cytometry, 1999, 36(4) : 267-78）及び Q-FISH の改良高スループットバージョン（HT-Q-FISH）（Canelas, A., et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007., 104(13) : 5300-5）を含む。

#### 【 0 0 1 1 】

U.S. Patent No. 7,695,904 (Cawthon) は、非標的核酸依存的なプライミングイベントを制限するようにデザインされた核酸プライマーを使用して標的核酸を増幅するための方法を記述する。本方法は、テロメア反復単位の数などの反復性領域における反復単位の数を増幅すること、及び定量化することを可能にする。本特許は、また qPCR 法によって生物の平均テロメアの長さを決定することにも言及する。

#### 【 0 0 1 2 】

したがって、テロメアに属する材料及び方法における進歩にもかかわらず、それぞれ、染色体の集団における短いテロメアの存在量の測定を決定するための改善された方法及び材料、テロメア長を増加する、または減少する、及びそれ故、健康を増加する、または減

10

20

20

30

30

40

50

少する、または逆に将来の疾患または死のリスクを増加する、または減少する介入の健康及び効果の測定を決定するためのこれらの測定の使用に対する需要が残っている。これらの需要及びその他の需要は、本発明によって対処される。

### 【発明の概要】

#### 【0013】

一つの態様において、本発明は、核酸伸長産物を作製する方法であって： i ) 二本鎖染色体DNAの3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列に伸長プライマーをハイブリダイズすることであって： (1) 二本鎖染色体DNAは、テロメア反復配列を含むテロメア領域及びサブテロメア配列を含むサブテロメア領域を有し；及び (2) 伸長プライマーは： (A) アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする3'部分、及び (B) アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズしないアンカー配列を有する5'部分を含む、前記ハイブリダイズすること；及び ii ) 時間が限られた伸長反応を行って二本鎖染色体DNAのサブテロメア領域の方へ伸長プライマーを伸張することであって、伸長反応は、予め定められた長さの範囲内のテロメア領域を有する二本鎖染色体DNAのみからテロメア反復配列及びサブテロメア配列の両方を含む伸長産物を產生するように調節される、前記伸張することを含む、前記方法を提供する。一つの態様において、二本鎖染色体DNAは、異なる長さのテロメアを有する染色体分子を含む。さらなる態様において、アンカー配列は、(1) 3'オーバーハングを有する染色体DNAの鎖のサブテロメア領域；(2) 3'オーバーハングの20kb以内の染色体DNAのG-鎖；(3) 3'オーバーハングの50kb以内のまたは20kb以内の染色体DNAのG-鎖；または(4) 二本鎖染色体DNAにおける配列にハイブリダイズしない。さらなる態様において、伸長反応は、30分未満、10分未満、5分未満、4分未満、3分未満、2分未満、1分未満、30秒未満、20秒未満、10秒未満、5秒未満または2秒未満に調節される。プライマー伸長のための速度は、高(1秒につき400ヌクレオチド)から非常に低(たとえば、1秒につき50ヌクレオチド)までの範囲であり得るので、広範な伸長時間により、広範なテロメア長の評価ができる(理論的には、約100ヌクレオチドから何千ものヌクレオチドまで。さらなる態様において、伸長反応は、少なくとも30分、少なくとも10分、少なくとも5分、少なくとも4分、少なくとも3分、少なくとも2分、少なくとも1分または少なくとも30秒に調節される。さらなる態様において、伸長反応は、少なくとも30分、少なくとも10分、少なくとも5分、少なくとも4分、少なくとも3分、少なくとも2分、少なくとも1分、または少なくとも30秒に調節される。さらなる態様において、二本鎖染色体DNAは、固体、液体、半固体または気体試料から提供される。さらなる態様において、染色体DNAは、血液、唾液、尿、血漿、血清、脳脊髄液('CSF')または気管支肺胞洗浄液から選択される液体の試料から提供される。さらなる態様において、染色体DNAは、肺、筋肉または皮膚から選択される固体の試料から提供される。さらなる態様において、染色体DNAは、骨髄を含む半固体試料から提供される。さらなる態様において、染色体DNAは、呼気を含む気体試料から提供される。さらなる態様において、二本鎖染色体DNAは、脊椎動物のDNA、哺乳動物DNAまたはヒトDNAである。さらなる態様において、3'伸長プライマーの部分は、ヒトテロメア反復配列にハイブリダイズする。さらなる態様において、伸長プライマーの3'部分は、配列5'-(CCCTAA)n-3'またはその同じ順序置換を含み、式中nは、少なくとも1である。さらなる態様において、nは、少なくとも2である。さらなる態様において、伸長プライマーの5'部分は、配列：5' - T G C T C G G C C G A T C T G G C A T C - 3' [配列番号：8]を含む。さらなる態様において、伸長プライマーは、配列：5' - T G C T C G G C C G A T C T G G C A T C C C T A A C C - 3' [配列番号：7]を含む。さらなる態様において、時間が限られた伸長反応は、鎖-置換活性、エキソヌクレアーゼ活性または鎖分解活性を有するDNAポリメラーゼを使用する。さらなる態様において、DNAポリメラーゼは、T7ポリメラーゼ(たとえば、Sequencease)、大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノウ断片及びBst DNAポリメ

10

20

30

40

50

ラーゼ大断片及びDeep Vent R(エキソスクレアーゼ)をから選択される。さらなる態様において、第1の反応は、DNAポリメラーゼヘリカーゼと、または5'-3'エキソスクレアーゼ活性をもつDNAポリメラーゼと組み合わせて行われる。

#### 【0014】

もう一つの態様において、本発明は、a)以下によって核酸伸長産物を作製すること：i)3'二本鎖染色体DNAのオーバーハングにおけるテロメア反復配列に伸長プライマーをハイブリダイズすることであって：(1)二本鎖染色体DNAは、テロメア反復配列を含むテロメア領域及びサブテロメア配列を含むサブテロメア領域を有し；及び(2)伸長プライマーは：(A)3'アニーリング条件下でオーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする3'部分及び(B)アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズしないアンカー配列を有する5'部分を含む、前記ハイブリダイズすること；及びii)時間が限られた伸長反応を行って二本鎖染色体DNAのサブテロメア領域の方へ伸長プライマーを伸張することであって、伸長反応は、予め定められた長さの範囲内でテロメア領域を有する二本鎖染色体DNAのみからのテロメア反復配列及びサブテロメア配列の両方を含む伸長産物を產生するように調節される、前記作製すること；及びb)伸長産物の配列を増幅することを含み；これによりテロメア反復配列及びサブテロメア配列を有する核酸を含む長さの限られた増幅産物を产生する、前記方法を提供する。一つの態様において、配列は：(1)アニーリング条件下で伸長産物におけるサブテロメア領域に独特的の配列にハイブリダイズする第1の増幅プライマー；及び(2)アニーリング条件下でアンカー配列にハイブリダイズする第2の増幅プライマー、を使用して増幅される。さらなる態様において、第1の増幅プライマーは：5'-GATGGATCCTGAGGGTGAAGGGTGAGGG-3' [配列番号：2]、5'-CGGGCCGGCTGAGGGTACCGCGA-3' [配列番号：10] (染色体1)、5'-GCTAATGCACCTCCCTCAATAC-3' [配列番号：11] (染色体5)、及び5'-CATTCCTAATGCACACATGATACC-3' [配列番号：12] (染色体9)から選択される配列を含む。さらなる態様において、第1の増幅プライマーは、配列5'-GATGGATCCTGAGGGTGAAGGGTGAGGG-3' [配列番号：2]を含み、及び第2のプライマーは、配列5'-TGCTCGGCCGATCTGGCATC-3' [配列番号：8]を含む。増幅されたテロメア産物の長さ範囲は、PCR反応において時間が限られた伸長時間を使用して決定することができる。さらなる態様において、方法は、対照配列を同時増幅することをさらに含む。さらなる態様において、対照配列は、複数の非テロメアの反復配列を含む。さらなる態様において、対照配列は、インビトロにおいて合成される、またはインビボにおいて(たとえば、細菌または真菌のクローンにおいて)产生される。

#### 【0015】

もう一つの態様において、本発明は、短いテロメアの存在量を決定するための方法であって：a)被験体からの3'オーバーハングを含む二本鎖染色体DNAを含む試料を提供すること；b)本明細書において(たとえば、上記)記述した本発明の染色体のテロメア反復配列及びサブテロメア配列を増幅する方法を使用して二本鎖染色体DNAから長さの限られた増幅産物を产生すること；及びc)長さの限られた増幅された産物から短いテロメアの存在量を決定することを含む前記方法を提供する。一つの態様において、方法は：d)試料からの総テロメアの存在量と短いテロメアの存在量を比較することをさらに含む。さらなる態様において、短いテロメアは、約0.5kbより、約1kbより、約2kbより、約3kbより、約4kbよりも約5kbよりも長くない長さを有するテロメアである。さらなる態様において、比較することは、総テロメアの存在量の関数(たとえば、短いテロメアの存在量と総テロメアの存在量の比)として短いテロメアの存在量を決定することを含む。さらなる態様において、短いテロメアの存在量を決定することは、qPCRを使用して行われる。さらなる態様において、qPCRは、第1及び第2のプライマーを使用して行われ、(i)前記第1のプライマーは、前記第1の鎖の少なくとも1つの反復単位にハイブリダイズし、及び前記第2のプライマーは、前記第2の鎖の少なくとも10

30

40

50

1つの反復単位にハイブリダイズし、(i i) 前記ハイブリダイズしたプライマーは、これらのそれぞれの鎖にハイブリダイズしたときに、プライマー伸長ができる、及び前記第1のプライマーの少なくとも1つのヌクレオチドは、前記第1のプライマーが前記第1の鎖の少なくとも1つの反復単位にハイブリダイズしたときに、ヌクレオチドは前記第1のプライマーと前記反復単位との間に内部塩基対ミスマッチを生じ、(i i i) 前記第1のプライマーは、また第1及び第2のプライマーが互いにハイブリダイズするときに、前記第2のプライマーの3'末端ヌクレオチドとミスマッチを生じ、(i v) 前記第2のプライマーの少なくとも1つのヌクレオチドは、前記第2のプライマーが前記第2の鎖の少なくとも1つの反復単位にハイブリダイズしたときに、前記第2のプライマーと前記反復単位のヌクレオチドとの間の内部塩基対ミスマッチを生じる。さらなる態様において、短いテロメアの存在量を決定することは、サザンプロット、ドットプロット法、スロットプロット、免疫化学、核酸シーケンシングまたはデジタルPCRによって試料における平均テロメア長を測定することを含む。さらなる態様において、短いテロメアの存在量は、存在量比の測定である。さらなる態様において、総テロメアの存在量は、ゲノム参照配列の存在量に相対的に測定される。さらなる態様において、ゲノム参照配列は、單一コピー参照核酸配列(たとえば、ヒト グロビン)または非テロメア反復DNA(たとえば、Alu反復または動原体性反復)の存在量を含む。

#### 【0016】

もう一つの態様において、本発明は：a) 被験体からの試料における短いテロメアの存在量を決定すること；及びb) 短いテロメアの存在量を状態または疾患と関連づけることを含む方法を提供する。一つの態様において、短いテロメアの存在量の測定は、試料からの総テロメアの存在量と短いテロメアの存在量を比較することによって決定される。さらなる態様において、短いテロメアの存在量は、本明細書において(たとえば、上記の)記述した方法を使用して決定される。さらなる態様において、状態または疾患は、死亡リスクである。さらなる態様において、テロメアの存在量は、絶対存在量である。さらなる態様において、絶対存在量は、テロメア配列の長さとして測定される。さらなる態様において、テロメアの存在量を決定することは、qPCRサザンプロット、ドットプロット法、スロットプロット、免疫化学、核酸シーケンシング及びデジタルPCRによって試料における平均テロメア長を測定することを含む。さらなる態様において、状態または疾患の関連は、認知されたストレスの健康状況調査スコアである(たとえば、Cohen, S;

Kamarck T, and Mermelstein R (1983) J. Health Social Behav. 24(4) 385-396を参照されたい)。さらなる態様において、病態のリスクは、疾患(たとえば、心臓血管疾患、糖尿病、癌、肝臓纖維增多及び鬱病)のリスクである。さらなる態様において、疾患は、老化の疾患である。さらなる態様において、老化の疾患は、心臓血管疾患であり、及び集団における平均より低い測定は、心臓血管疾患のリスクの増加と関連づけられる。さらなる態様において、方法は、集団の上記三分位値における測定と比較して心臓血管疾患に対し有意に高いリスクをもつ集団の下位の2または3の三分位値の短いテロメアの存在量と関連づけることを含む。さらなる態様において、方法は、テロメア疾患と測定を関連づけることを含む。テロメア疾患は、先天性角化異常症、肺線維症、再生不良性貧血及び間質性肺炎を含むことができるが、限定されない。さらなる態様において、方法は、薬物応答性での測定を含む。たとえば、方法は、スタチンに薬物応答性(短い平均テロメア長は、個体の正常な白血球における薬物応答性と陽性に関連づけられる)またはイメテルスタトに反対に応答性(GRN 163L、制癌剤)(短いテロメア長は、血小板減少または好中球減少などの正常な白血球における有害作用と関連づけられる)である測定を含むことができる。さらなる態様において、方法は、疾患進行及びHIV、HCV HBV及びCMVなどの慢性感染症における治療結果と測定を関連づけることを含む。さらなる態様において、方法は、関連を被験体に報告することをさらに含む。さらなる態様において、方法は、関連に基づいた診断または予後を被験体に提供することをさらに含む。さらなる態様において、方法は、関連に基づいて被験体を治療することをさらに含む。

10

20

30

40

50

## 【0017】

もう一つの態様において、本発明は、被験体の状態をモニターするための方法であって：期間にわたって採取した複数の被験体試料のそれぞれにおける細胞から短いテロメアの存在量の測定を決定すること；測定における相違を決定すること；及びテロメア疾患の進行と相違を関連づけることを含み、測定における減少は、疾患の進行を示す、方法を提供する。一つの態様において、短いテロメアの存在量の測定は、試料からの総テロメアの存在量の測定と短いテロメアの存在量の測定を比較することによって決定される。

## 【0018】

もう一つの態様において、本発明は：複数の被験体試料からの細胞における短いテロメアの存在量の測定における増減率を決定することであって、それぞれの試料は、異なる時に採取されること；及び：(1) 健康の測定；(2) 病態のリスク；(3) テロメア疾患または(4) 薬物応答性と増減率を関連づけることを含む、方法を提供する。一つの態様において、短いテロメアの存在量の測定は、試料からの総テロメアの存在量の測定と短いテロメアの存在量の測定を比較することによって決定される。10

## 【0019】

もう一つの態様において、本発明は：(1)(A) アニーリング条件下で二本鎖染色体DNAの3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする3'部分及び(B) 染色体DNAにおけるテロメア領域における配列に、またはサブテロメア領域における配列にアニーリング条件下でハイブリダイズしないアンカー配列を有する5'部分を含む第1の增幅プライマー；及び(2) アニーリング条件下でサブテロメア配列にハイブリダイズする第2の增幅プライマーを含むキットを提供する。一つの態様において、キットは：(3) アニーリング条件下でアンカー配列に相補物にハイブリダイズする第3の增幅プライマーをさらに含む。さらなる態様において、キットは：(3) 短いテロメア測定のハイブリダイゼーション、伸長、増幅及び定量化工程を実施する試薬を含む。さらなる態様において、キットは：(3) 公知のテロメア長をもつ染色体DNAまたは公知の質量をもつテロメア反復をもつ合成オリゴヌクレオチドを含む対照試料及び参照試料をさらに含む。20

## 【0020】

## 参照による援用

この明細書において言及した全ての刊行物、特許及び特許出願は、それぞれの個々の公開、特許または特許出願が参照により援用されることが具体的に、及び個々に示されたのと同じ程度に本明細書において参照により援用される。30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

【図1】短いテロメアアッセイ(STA)の全体のスキームを示す。

【図2】TELOTEST、qPCRアッセイにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズするミスマッチのプライマーを使用する平均テロメア長を測定するための試験による鎖置換の間の短いテロメア増幅の確認を示す。類似のタイプのアッセイは、U.S. Patent No. 7,695,904 (Cawthon)において記述される。

【図3】は、鎖-置換産物のサザンプロット解析を示す。M：分子重量マーカー；レーン1：膀胱癌株化細胞(UM-UC3)からの総ゲノムDNAを修飾STELA(單一テロメア伸張長さ分析)プロトコル(Baird et al., 2003)によって増幅した；レーン2-5：プライマーとしてSUS及びTelomanchorを使用するPCR産物及び鎖-置換産物が鋳型である。鎖-置換反応時間を示してある(30秒、1、3及び5分)。鎖長は：30秒=約1kb；1分=約2kb；3分=約5kb；5分=約8kb。40

【図4】異なる平均テロメア長をもつDNA試料における短いテロメア定量化のための概念の証明算出を示す。UM-UC3は、短い平均テロメアをもつ細胞集団であり、及びUM-UC3/hTERは、しかしテロメラーゼ(hTERで)の過剰発現により伸張(伸張された)テロメアをもつ同一の細胞集団である。示したように、短いテロメアの存在量

1020304050

比は、UM - U C 3 / h T E RにおいてよりUM - U C 3において非常に大きい。

【図5】ザサンプロットによる(0.2-5 kbp範囲の末端制限断片の相対的シグナルを示してある)及び本発明の短いテロメアアッセイによる、UM - U C 3及びUM - U C 3 / h T E Rにおける短いテロメアの存在量比を比較する表であり、短いテロメアの割合は、短及び総テロメア測定の比である。両方の場合において、UM - U C 3 / h T E RにおいてよりUM - U C 3においておよそ3倍短いテロメアがある。

【図6】短いテロメアアッセイのためのハイスループット工程を示す。

【図7A】染色体A、B及びCでの時間制御されたプライマー伸長を示し、それぞれは、異なる長さのテロメアを有する。クロマチンは、破線によって表してある。サブテロメア独特の配列は、「S U S」によって表してある。テロメアは、実線によって表してある。伸長産物は、破線によって表してある。図7Aにおいて、プライマー伸長のための時間は、プライマーが染色体A及びBにおけるサブテロメア領域(サブテロメア独特の配列「S U S」を有する)を通って伸張するように、しかしCは通らずに選択される。

【図7B】図7Bは、3つのプライマー伸長産物の第2の鎖合成を示す。図7Bにおいて、サブテロメア独特の配列を有するプライマー「S U S」は、伸長産物A及びBにハイブリダイズすることができ、しかし伸長産物Cはできず、これは、本来の染色体における長いテロメア長のため、サブテロメア領域に伸張しなかった。したがって、第2の鎖合成は、Cからではなく、伸長産物A及びBにハイブリダイズしたS U Sプライマーから生じることができる。第2の鎖は、実線によって表してある。次いで、この産物は、本来の染色体DNAの「ショートテロメア」画分を表す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0022】

定義

##### 【0023】

本明細書において使用される用語法は、特定の態様だけを記述するためであり、及び限定することを意図しないことを理解すべきである。

##### 【0024】

明細書及び請求の範囲に使用される、用語「含むこと」は、態様「からなる」と「から本質的になる」を含むことができる。

##### 【0025】

本明細書に使用される、化合物のための名称は、有機化合物を含み、名称について一般名、IUPAC、IUBMBまたはCAS推奨を使用して与えることができる。別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての専門的及び科学用語は、一般に本発明が属する技術における当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。この明細書において、及び続く請求項において、本明細書において定義したものとする多数の用語について言及がなされるだろう。

##### 【0026】

明細書及び添付の請求の範囲に使用されるように、「ある」、「ある」及び「その」は、単数形、状況が別途はっきり指示しない限り、複数の言及を含む。したがって、たとえば、「細胞」、「ヌクレオチド」または「プライマー」に対する言及は、このような細胞、ヌクレオチドまたはプライマー及び同様のもの2つ以上の混合物を含む。

##### 【0027】

範囲は、本明細書において「約」1つの特定の値から及び/または「約」もう一つの特定の値までとして表すことができる。このような範囲が表されるとき、さらなる態様は、1つの特定の値から、及び/またはその他の特定の値までを含む。同様に、値が近似として表されるときに、先行詞の「約」の使用により、特定の値がさらなる態様を形成することが理解されるだろう。範囲のそれぞれの終点は、他方の終点に関して両方有意であり及び独立して他方の終点であることがさらに理解されるだろう。本明細書において開示される多数の値があること、及びそれぞれの値は、また本明細書においてその特定の値に加えて「約」それ自体の値として開示されることがまた理解される。たとえば、値「10」が

10

20

30

40

50

開示される場合、「約 10」も開示される。2つの特定の単位間のそれぞれの単位も開示されることが、また十分に理解される。たとえば、10及び15が開示される場合、11、12、13及び14も開示される。

#### 【0028】

本明細書に使用される、用語「約」及び「...または約」は、当該量または値がおよそまたは約同じいくつかのその他の値を示した値であることができる。本明細書に使用され、特に明記され、または推定されない限り、これは、 $\pm 10\%$ の偏差を示した名目値であることが一般に十分に理解される。本用語は、類似の値が請求の範囲に詳述した均等な結果または効果を促進することを伝えることが意図される。すなわち、量、サイズ、製剤、パラメーター、並びにその他の量及び特徴は、正確ではなく、及びその必要はないが、近似の、及び／またはより大きな、またはより小さな、所望であるとおりの、反映する寛容性、変換因子、端数計算、測定誤差及び同様のもの、及び当業者に公知であるその他の要素であることができるものと理解される。一般に、量、サイズ、製剤、パラメーターまたはその他の量または特徴は、明白にそのようなものであると述べられるか否かを問わず、「約」、または「およそ」である。「約」が定量値の前に使用される場合、別途、具体的に明示されない限り、パラメーターがそれ自体具体的な定量値をまた含むものと理解される。10

#### 【0029】

特定の要素または組成物における成分の重量部に対する明細書及び締めくくりの請求の範囲における言及は、重量部が表される組成物または物品における要素または成分と任意のその他の要素または成分との間の重量関係を意味する。したがって、2重量部の成分X及び5重量部の成分Yを含む化合物において、X及びYは、2：5の重量比にて存在し、及びさらなる成分が化合物に含まれるかどうかにかかわらず、このような比において存在する。20

#### 【0030】

成分の重量パーセント(wt.%)は、反対に具体的に明示されていなければ、成分が含まれる製剤または組成物の総重量に基づく。

#### 【0031】

本明細書に使用される、用語「任意の」または「任意に」は、その後に記述されたイベントまたは環境が生じることができ、またはできないこと、並びに記述が前記イベントまたは環境が生じる場合を例証し、及びそれがない場合を例証することを含む。30

#### 【0032】

本明細書に使用される、用語「有効量」は、組成物または方法の物理的、化学的または生物的性質の所望の変化を達成するために十分である量をいう。

#### 【0033】

本明細書に使用される、「キット」は、キットを構成する少なくとも2つの成分のコレクションを意味する。共に、構成要素は、所与の目的のための機能的単位を構成する。個々の構成要素は、共にまたは別々に、物理的にパッケージしてもよい。たとえば、キットを使用するための説明書を含むキットは、その他の個々の構成要素と共に説明書を物理的にを含んでいてもよく、または含まなくてもよい。その代わりに、説明書は、分離した構成要素として、コンピュータ読み取り可能なメモリ装置上に供給しても、またはインターネットウェブサイトからダウンロードしてもよい紙形式もしくは電子形式のいずれかで、または記録された提示法として供給することができる。40

#### 【0034】

本明細書に使用される、「説明書(類)」は、キットに属する関連した材料または方法論を記述する書類を意味する。これらの材料は、以下の任意の組み合わせを含んでいてよい：背景情報、構成要素の一覧及びこれらの在庫情報(購入情報その他)、キットを使用するための簡単な、または詳細なプロトコル、トラブルシューティング、参照文献、技術サポート及び任意のその他の関連ドキュメント。説明書は、キットと共に、または分離した構成要素として、コンピュータ読み取り可能なメモリ装置上に供給しても、またはインターネットウェブサイトからダウンロードしてもよい紙形式もしくは電子形式のいずれ50

かで、または記録された提示法として供給することができる。説明書は、1つまたは複数の文書を含むことができ、将来のアップデートを含むことが意味される。

#### 【0035】

本明細書に使用される、用語「被験体」は、哺乳動物、魚、トリ、爬虫類または両生類などの脊椎動物であることができる。したがって、本明細書において開示された方法の被験体は、ヒト、非ヒト靈長類、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、モルモットまたは齧歯類であることができる。本用語は、特定の年齢または性別を意味しない。したがって、雄または雌であるにせよ、成体及び新生児被験体、並びに胎児が含まれることが意図される。一つの態様において、被験体は、哺乳動物である。患者は、状態、疾患または障害で苦しめられる被験体をいう。用語「患者」は、ヒト及び獣医学的被験体を含む。開示された方法のいくつかの態様において、被験体は、短いテロメアの存在量における機能不全と関連する1つまたは複数の状態または疾患の治療のための必要があると診断されている。10

#### 【0036】

本明細書に使用される、用語「治療」は、疾患、病態または障害を治療する、寛解させる、安定させる、または予防する意図がある患者の医学的管理をいう。この用語は、能動的治療、すなわち具体的に疾患、病態または障害の改善の方向を目指す治療を含み、及びまた原因療法、すなわち関連する疾患、病態または障害の原因の除去の方向を目指す治療を含む。加えて、この用語は、対症療法、すなわち疾患、病態または障害の治癒よりもむしろ症候の軽減のために計画された治療；予防治療、すなわち関連する疾患、病態または障害の発症を最小限にする、または部分的に、もしくは完全に阻害することを対象とする治療；及び補助的治療、すなわち関連する疾患、病態または障害の改善の方向を目指すもう一つの具体的療法を補うために使用される治療を含む。種々の態様において、本用語は、哺乳動物（たとえば、ヒト）を含む被験体の任意の治療を含み、及び：(i) 疾患が、疾患になり得るが、それを有するとまだ診断されていない被験体において生じることから予防すること；(ii) 疾患を阻害すること、すなわちその発症を抑えること；または(iii) 疾患を軽減すること、すなわち疾患の軽減を生じさせること。一つの態様において、被験体は、靈長類などの哺乳動物であり、及びさらなる態様において、被験体はヒトである。また、用語「被験体」は、家畜化された動物（たとえば、ネコ、イヌその他）、家畜（たとえば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギその他）及び実験動物（たとえば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、フルーツフライその他）を含む。20

#### 【0037】

本明細書に使用される、用語「予防する」または「予防すること」は、特に事前の作用によって、何かが起こるのを妨げる、避ける、取り除く、前もって対処する、止める、または妨げることをいう。軽減する、阻害する、または予防するが本明細書に使用される場合、具体的に別途示されない限り、その他の2つの言葉の使用も明白に開示したものと理解される。

#### 【0038】

本明細書に使用される、用語「投与すること」及び「投与」は、医薬品製剤を被験体に提供する任意の方法をいう。このような方法は、当業者に周知であり、及び経口投与、経皮投与、吸入による投与、経鼻投与、局所的投与、腔内投与、眼内投与、内部聴覚投与、大脳内投与、直腸投与、舌下投与、頸側投与及び非経口投与を含むが、限定されず、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与及び皮下投与などの注射剤を含む。投与は、連続的で、または断続的であることができる。種々の態様において、製剤は、治療的に投与すること；すなわち、既存の疾患または条件を治療するために投与することができる。さらなる種々の態様において、製剤は、予防的に投与すること；すなわち、疾患または条件の予防のために投与することができる。40

#### 【0039】

本明細書に使用される、用語「有効量」及び「有効な量」は、所望の結果を達成するため、または望まれない状態に対して効果を有するために十分である量をいう。たとえば、50

「治療上有効な量」は、所望の治療上の結果を達成するために、または望まれない症候に対して効果を有するために十分であるが、有害な副作用を生じさせるには一般に不十分である量をいう。任意の特定の患者のための具体的な治療的に有効な用量レベルは、治療される障害及び障害の重症度；使用される具体的な組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康、性別及び食餌；投与の時間；投与経路；使用される具体的化合物の排出速度；治療の期間；使用される具体的化合物と組み合わせて、または同時に使用される薬物及び医学技術において周知の同様の因子を含む多様な因子に依存するだろう。たとえば、当該技術分野の技術内で、所望の治療効果を達成するために、及び所望の効果が達成されるまで徐々に投薬量を増加させるために必要とされるものより低いレベルにて化合物の開始用量には十分である。必要に応じて、有効な1日量は、投与の目的のために複数の用量に分割することができる。結果的に、単一用量組成物は、その1日量を構成するためにこのような量またはその約数を含むことができる。投薬量は、任意の禁忌の場合には、個々の医師によって調整することができる。投薬量は、変更することができ、及び1日または複数日の間、1つまたは複数用量投与において毎日投与することができる。ガイダンスは、医薬品製品の所与の分類のための適切な投薬量についての文献において見いだすことができる。さらなる種々の態様において、製剤は、「予防的に有効な量」；すなわち、疾患または症状の予防のために有効な量において投与することができる。

#### 【0040】

本明細書に使用される、「伸長プライマー」は、DNAポリメラーゼによって実施される時間が限られた伸長反応工程を行うために使用されるオリゴヌクレオチドプライマーを意味する。伸長プライマーは、3'部分及び5'部分を含むことができる。たとえば、3'部分は、アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズすることができ、5'部分は、アニーリング条件下で3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズしないアンカー配列を有することができる。

#### 【0041】

本明細書に使用される、「テロメア領域」は、反復テロメア配列をもつ染色体の末端におけるDNAセグメントを意味する。脊椎動物の場合において、それは、染色体の末端の( T T A G G G )<sub>n</sub>反復配列であることができる。

#### 【0042】

本明細書に使用される、「サブテロメア領域」は、テロメアの動原体末端にてテロメアにすぐ隣接するDNAのセグメントを意味する。サブテロメア領域は、変性テロメア反復をたいてい含む。ヒトの場合において、T G A G G G 及び T C A G G G の反復は、サブテロメア領域に存在し得る。

#### 【0043】

本明細書に使用される、「時間が限られた伸長反応」は、ヌクレオチドによる反応の産物のサイズ、時間が限られた伸長産物は、反応において利用されるDNAポリメラーゼの固有の伸長割合及び反応時間の関数であるDNAポリメラーゼによって実施される酵素反応を意味する。

#### 【0044】

本明細書に使用される、「アンカー配列」は、PCR反応において使用することができる鋳型ゲノムに存在しない、または20kbの意図された単位複製配列内に存在するプライマー内の独特的な配列セグメントを意味する。たとえば、伸長プライマーの5'部分は、伸長プライマーの3'部分がハイブリダイズするG-鎖におけるテロメア反復配列にアニーリング条件下でハイブリダイズしないように構成されているアンカー配列であることができる。

#### 【0045】

本明細書に使用される、「染色体DNAのG-鎖」は、3'オーバーハングを有するテロメアの鎖を意味し、及びテロメア反復配列5'-TTAGGG-3'を含む。たとえば、「染色体DNAのG-鎖」は、ヒト及びその他の脊椎動物における( T T A G G G )<sub>n</sub>テロメア配列を含む染色体におけるDNA鎖をいうことができる。

10

20

30

40

50

## 【0046】

本明細書に使用される、「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドの重合を触媒する酵素をいう。一般に、酵素は、核酸錠型配列にアニーリングしたプライマーの3' - 末端にて合成を開始するだろう。「DNAポリメラーゼ」は、デオキシリボヌクレオチドの重合を触媒する。公知のDNAポリメラーゼは、たとえばパイロコッカスフリオサス(*Pyrococcus furiosus*)(*pfu*)DNAポリメラーゼ(*Lundberg et al.*(1991)Gene 108:1)、大腸菌(*E. coli*)DNAポリメラーゼI(*Lecomte and Doubleday*(1983)Nucleic Acids Res. 11:7505)、T7 DNAポリメラーゼ(*Nordstrom et al.*(1981)J. Biol. Chem. 256:3112)、サーマスサーモフィラス(*Thermus thermophilus*)(*Tth*)DNAポリメラーゼ(*Myers and Gelfand*(1991)Bioc hemistry 30:7661)、バシラスステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)DNAポリメラーゼ(*Stenesh and McGowan*(1977)Biochim Biophys Acta 475:32)、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)(*Tli*)DNAポリメラーゼ(また、*Vent* DNAポリメラーゼともいわれる、*Cariello et al.*(1991)Nucleic Acids Res. 19:4193)、サーモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)(*Tma*)DNAポリメラーゼ(*Diaz and Sabino*(1998)Braz J. Med. Res 31:1239)及びサーマス・アクアチクス(*Thermus aquaticus*)(*Taq*)DNAポリメラーゼ(*Chien et al.*, (1976)J. Bacteriol 127:1550)を含む。上記の酵素のいずれのポリメラーゼ活性も、当該技術分野において周知の手段によって決定することができる。

## 【0047】

本明細書に使用される、「熱安定性」DNAポリメラーゼ活性は、たとえばDNAポリメラーゼの非熱安定性形態と比較したときに、高温、たとえば45~100、好ましくは55~100、65~100、75~100、85~100または95~100にて熱及び機能に対して相対的に安定であるDNAポリメラーゼ活性を意味する。

## 【0048】

DNAポリメラーゼの鎖 - 置換活性は、合成の間に遭遇した下流のDNAを置換する能力を記述する。たとえば、DNAポリメラーゼの鎖 - 置換活性は、DNAの二本鎖を2つの単一鎖に分離することができるポリメラーゼ能力をいう。鎖 - 置換活性をもつDNAポリメラーゼの例は、ウイルス、原核生物、真核生物もしくはアルケー由来ホロ酵素またはレプリカーゼの部分、*phi 29* DNAポリメラーゼ、クレノウDNAポリメラーゼエキソ、及び*Bst*エキソと命名されたバチルスステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)由来のDNAポリメラーゼである。「エキソ」は、対応する酵素が5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有しないことを示す。*phi 29* DNAポリメラーゼの周知の例は、バクテリオファージ*phi 29* DNAポリメラーゼである。本発明の方法において有用な鎖 - 置換活性をもつさらなる適切なDNAポリメラーゼは、当業者に周知であり、及び修飾T7ポリメラーゼ(たとえば、*Seq ue nase*)などのDNAポリメラーゼ大腸菌(*E. coli*)DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノウ断片及び*Bst* DNAポリメラーゼ大断片及び*D eep Vent R (exo - )*を含む。

## 【0049】

あるいは、鎖 - 置換活性をもつDNAポリメラーゼは、またそれぞれのDNAポリメラーゼに加えて使用される触媒、たとえばタンパク質または酵素であることを条件として、鎖 - 置換活性のないものであることが理解され、これはDNAの二本鎖を分離すること、またはDNAの一本鎖を安定化することができる。これらのタンパク質は、たとえば、ヘ

リカーゼ、SSBタンパク質及び組換えタンパク質を含み、これは、レプリカーゼなどのより大きな酵素複合体の成分として存在することができる。本例において、鎖-置換活性をもつポリメラーゼは、ポリメラーゼそれ自体に加えて成分と共に產生される。鎖-置換活性をもつポリメラーゼは、熱不安定性または熱安定のいずれであることもできる。

#### 【0050】

本明細書に使用される、「プライマー」は、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下で、たとえば4つの異なるヌクレオシド三リン酸及び伸長のための薬剤（たとえば、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素）の存在下で、適切な緩衝液において、及び適切な温度にて、DNA合成の開始の位置にて作用することができるオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは、鑄型核酸の完全系列を反映する必要はなく、しかし鑄型でハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。所与の標的配列の増幅のための適切なプライマーの設計は、当該技術分野において周知であり、及び本明細書において引用した文献において記述される。10

#### 【0051】

本明細書に使用される、用語「ターゲット」、「ターゲット配列」、「ターゲット領域」及び「ターゲット核酸」は、同義であり、及び増幅され、または検出される核酸の領域または部分列をいう。

#### 【0052】

本明細書に使用される、用語「ハイブリダイゼーション」は、相補的な塩基対形成のための、2つの一本鎖の核酸による二重鎖構造の形成をいう。ハイブリダイゼーションは、完全に相補的な核酸鎖の間に、または軽微なミスマッチの領域を含む「実質的に相補的な」核酸鎖の間に生じることができる。完全に相補的な核酸鎖のみがハイブリダイズするだろう条件は、「ストリンジエントハイブリダイゼーション条件」または「配列特異的ハイブリダイゼーション条件」といわれる。実質的に相補的な配列の安定な二重鎖は、よりストリンジエントでないハイブリダイゼーション条件下で達成することができ；許容されるミスマッチの程度は、ハイブリダイゼーション条件の適切な調整によって制御することができる。核酸技術の当業者は、当業者によって提供されるガイダンスにしたがって、たとえばオリゴヌクレオチドの長さ及び塩基対組成、イオン強度及びミスマッチ塩基対の発生率を含む多数の変数を考慮して経験的に2重の安定度を決定することができる（たとえば、Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) ; 及びWetmur (1991) Critical Review in Biochem. and Mol. Biol. 26 (3/4) : 227 - 259を参照されたい；両方とも参考により本明細書に援用される）。2030

#### 【0053】

用語「増幅反応」は、鑄型核酸配列のさらなるコピーを生じ、または鑄型核酸の転写を生じる、酵素反応を含む任意の化学的反応をいう。

#### 【0054】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、より長い二本鎖DNA分子の範囲内のDNA配列の指數関数的な増幅が可能な方法である。PCRは、DNAのそれぞれの2つの鎖上の定義された配列に相補的である一対のプライマーの使用を伴う。これらのプライマーは、コピーが指定された配列で作製されるようにDNAポリメラーゼによって伸張される。このコピーを作製した後、同じプライマーを、入力DNA鎖のもう一つのコピーだけでなく、また合成の第1のラウンドにおいて作製された短いコピーも作製するために再び使用することができる。これが、対数的増幅をまねく。増幅過程の各々のラウンドにおいて二重鎖DNAの2つの鎖を分離するために温度を上げる必要があるので、主要な工程の前進は、サーモス・アクアチクス（Thermus aquaticus）；熱いプールにおいて成長する細菌から単離された熱安定性DNAポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ）の発見であったし；その結果、増幅のラウンド毎に新たなポリメラーゼを添加することが必要で4050

ない。増幅の数（たいてい約40）ラウンドの後、PCR産物をアガロースゲル上で解析し、及び臭化エチジウム染色法で検出されるほど十分豊富である。

#### 【0055】

リアルタイムPCRは、定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）、定量的PCR（Q-PCR/qPCR）または動力学的なポリメラーゼ連鎖反応とも呼ばれ、PCRに基づいた実験技術であり、ターゲットされたDNA分子を増幅し、及び同時に定量化するために使用されることが理解される。qPCRは、（DNA入力またはさらなる規準化する遺伝子に規準化したときのコピーの絶対数または相対量として）DNA試料における特異的配列の検出及び定量化を可能にする。

#### 【0056】

本明細書に使用される、プライマーは、十分にストリンジェントな条件下で使用したときにプライマーが標的核酸のみに主にハイブリダイズする場合、標的配列に対して「特異的」である。典型的には、プライマーは、プライマー-標的二重鎖安定度がプライマーと試料において見いだされる任意のその他の配列との間に形成される二重鎖の安定度を上回る場合、標的配列に対して特異的である。当業者は、塩条件、並びにプライマーの塩基組成及びミスマッチの位置などの種々の因子は、プライマーの特異性に影響を及ぼすだろうこと、及びプライマー特異性のルーチンの実験的な確認が大部分の場合において必要だろうことを認識するだろう。ハイブリダイゼーション条件は、プライマーが標的配列のみと安定な二重鎖を形成することができる下で選択することができる。したがって、適切にストリンジェントな増幅条件下での標的特異的なプライマーの使用は、標的プライマー結合部位を含むこれらの標的配列の特異的増幅を可能にする。配列特異的増幅条件の使用は、正確に相補的なプライマー結合部位を含むこれらの標的配列の特異的増幅を可能にする。

10

#### 【0057】

本明細書に使用される、「相補的な」は、相補的なヌクレオシドまたはヌクレオチドとの間で従来のワツソンクリック型塩基対または（たとえば、Hoogsteenまたは逆Hoogsteen水素結合）その他の非伝統的タイプの対形成によってもう一つの核酸分子と水素結合を形成することができる核酸分子をいう。

20

#### 【0058】

核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能である標的核酸配列に100%相補的である必要がないことは、当該技術分野において十分に理解されている。すなわち、2つ以上の核酸分子は、完全に相補的より低くてもよく、及び第2の核酸分子と水素結合を形成することができる核酸分子に隣接する残基の割合によって示される。たとえば、第1の核酸分子が10ヌクレオチドを有し、及び第2の核酸分子が10ヌクレオチドを有する場合、それぞれ第1及び第2の核酸分子間の5、6、7、8、9または10ヌクレオチドの塩基対形成は50%、60%、70%、80%、90%及び100%の相補性を表す。「完全に」または「完全に」相補的な核酸分子は、以下のものを意味する。第1の核酸分子の全ての隣接する残基は、第2の核酸分子における同じ数の隣接する残基と水素結合するだろうし、両方の核酸分子は、同じ数のヌクレオチドを有し（すなわち、同じ長さを有する）、または2つの分子は、異なる長さを有する。

30

#### 【0059】

本明細書に使用される、用語「非特異的増幅」は、標的配列以外の配列にハイブリダイズし、及び次いでプライマー伸長のための基質としての役割を担うプライマーから生じる標的配列以外の核酸配列の増幅をいう。対象外の配列に対するプライマーのハイブリダイゼーションは、「非特異的ハイブリダイゼーション」といわれ、及びより低温、減少したストリンジェンシー、プレ増幅状態の間に特に生じやすい。

40

#### 【0060】

本明細書に使用される、用語「プライマーニ量体」は、鑄型独立した非特異的増幅産物をいい、これは別のプライマーが鑄型としての役割を担うプライマー伸長の結果として生じると考えられる。プライマーニ量体は、頻繁に2つのプライマー（すなわち、ニ量体）の鎖状体であるようにみえるが、2つを超えるプライマーの鎖状体も生じる。用語「プラ

50

「イマーニ量体」は、鑄型独立した非特異的增幅産物を包含するように一般的に本明細書において使用される。

#### 【0061】

本明細書に使用される、用語「反応混合物」は、所与の反応を実施するために必要な試薬を含む溶液をいう。「増幅反応混合物」は、増幅反応を実施するために必要な試薬を含む溶液をいい、適切な緩衝液におけるオリゴヌクレオチドプライマー及びDNAポリメラーゼまたはリガーゼを典型的に含む。「PCR反応混合物」は、適切な緩衝液においてオリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ（最も典型的には、熱安定性DNAポリメラーゼ）、dNTP及び二価金属カチオンを典型的に含む。反応混合物は、それが反応を可能にするために必要な全ての試薬を含む場合完全と、及びそれが必要な試薬のサブセットだけを含む場合不完全といわれる。反応成分は、便宜、貯蔵安定度のために、または成分濃度の適用依存的な調整が可能なように、それぞれが総成分のサブセットを含む別々の溶液としてルーチンで貯蔵されること、及び反応成分を反応の前に合わせて完全反応混合物を作製することが当業者には理解されるだろう。さらにまた、反応成分は、商業化のために別々にパッケージされること、及び有用な市販のキットは、開示のロックされたプライマーを含む反応成分の任意のサブセットを含んでいてもよいことが当業者には理解されるだろう。10

#### 【0062】

1. はじめに

#### 【0063】

この開示は、染色体の集団における短いテロメアの存在量の測定を決定するための、並びにテロメア長を増加する、または減少する、及びそれ故、健康を増加する、または減少する、または逆にそれぞれ将来の疾患または死のリスクを減少させる、または増加させる健康及び介入の効果の測定を決定するためにこれらの測定を使用する、方法及び材料を提供する。方法は、予め定義された長さの範囲内のテロメア（たとえば、一定の長さより長くない、たとえば約5kbより短い全てのテロメア）を有する染色体のみから染色体断片のコピーの集団を产生することを含む。このアッセイは、試料のセットにおける短いテロメアテロメアの存在量比を表すために使用することができ、またはアッセイは、短いテロメアの絶対割合を生成するために総テロメア存在量の測定と組み合わせて使用することができる。20

#### 【0064】

一つの態様において、短いテロメア産物の存在量を測定する方法は、2つの工程を含む。第1の工程は、伸長プライマーを使用して二本鎖染色体DNA鑄型から伸長産物を生成することを含む。伸長プライマーは、その3'末端にてテロメアのG-鎖におけるテロメア反復配列に相補的な配列及びその5'末端にて「アンカー」配列を有する。このように、伸長プライマーは、試料における染色体の3'オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズするのに適し、及びその後のPCR反応をプライミングするための5'-アンカー配列を利用する。伸長産物は、時間が限られた伸長反応において產生される。伸長反応は、それが限られた時間であるので、一定の長さの伸長産物しか产生しないよう構成され得る。伸長産物が限定される長さであるので、これらは、十分に短い染色体のみにおいてサブテロメア領域に伸張するだろう。第2の工程は、伸長産物、サブテロメア配列及びアンカー配列によって囲まれている配列から増幅することを含む。30

#### 【0065】

定義された反応時間によって產生される伸長産物の長さは：(a)鎖置換酵素の重合割合(R)かける伸長時間によって：(b)サザンゲル上のPCR産物のサイズを解析することによって；及び(c)シーケンシングによって純粋なTTAGGG領域のサイズを解析することによって、少なくとも3つの異なる方法によって測定することができる。シーケンシング方法は、反復DNAの長い伸長を正確にシーケンスする能力によって限定される。

#### 【0066】

50

20

30

40

50

伸長反応が限られた時間であるので、サブテロメア配列は、伸長プライマーがハイブリダイズした 3' オーバーハングにおける位置からサブテロメア領域までの距離が、伸長の予め定められた長さの範囲内である染色体からの伸長産物のみにおいて存在するだろう。予め定められた長さは、実行者によって選ばれる任意の長さの範囲であり、及びそれまでであることができる。たとえば、長さ範囲は、予め定められた長さまでの長さであることができる。一定の態様において、長さ範囲は、短いテロメア、たとえば 5 kb までの長さを包含する。その他の態様において、長さ範囲は、予め定められた距離より短い長さである。それで、たとえば、テロメアの長さが定義された伸長長より長くない染色体において（たとえば、短いテロメアをもつ染色体）、時間が限られた伸長反応は、染色体のサブテロメア領域にプライマーを伸張するだろう。テロメアの長さが予定されている伸長長より長い染色体において（たとえば、長いテロメアをもつ染色体）、時間が限られた伸長反応は、染色体のサブテロメア領域にプライマーを伸張しないだろうし、及び伸長産物は、第 2 の增幅工程のために必要なサブテロメア配列を有しないだろう。したがって、伸長産物の集団は、一定のサイズより短いテロメアを有する染色体のみからテロメア配列を含むよう制御され得る。長さ範囲が、たとえば、4 kb である場合、伸長産物は、たとえばテロメアが 4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、その他である産物を含む。10

#### 【 0 0 6 7 】

伸長産物がサブテロメア配列及びアンカー配列によって囲まれている配列を増幅するように適応される一対の增幅プライマーを使用して増幅されるとき、サブテロメア配列を有する伸長産物のみが増幅される。それらは、定義された伸長長より短いテロメアを有する染色体、たとえば短いテロメアをもつ染色体から生成される伸長産物である。したがって、伸張産物は、試料における染色体からの総テロメア配列からではなく、定義済み長さより大きくないテロメアを有する染色体からのテロメア配列のみから増幅される。このような増幅された産物は、本明細書において、「長さの限られたテロメア増幅産物」または状況に応じて「短いテロメア増幅産物」と時としていわれる。この PCR 増幅工程において限られた伸長時間を使用することによって、短いテロメアは、さらに濃縮されるだろう。したがって、この限られた伸長時間の PCR 工程は、アッセイの特異性を増加させて短いテロメア集団のみを増幅するだろう。20

#### 【 0 0 6 8 】

長さの限られたテロメア増幅産物におけるテロメア配列の量または存在量は、本明細書において、「長さの限られたテロメアの存在量」または状況に応じて「短いテロメアの存在量」と時としていわれる。長さの限られたテロメア増幅産物におけるテロメア配列の存在量は、総テロメア配列の産物におけるテロメア配列の存在量を決定するのに使用される任意の方法によって測定され得る。30

#### 【 0 0 6 9 】

この開示の方法は、二本鎖 DNA、たとえばこれらの天然の状態における染色体で始める。総テロメア配列を測定する比較法において、特にこれは、qPCR を使用して、一本鎖の、または変性した核酸の試料を提供することを含み得る。

#### 【 0 0 7 0 】

2. 長さの限られたテロメア増幅産物40

#### 【 0 0 7 1 】

2.1 試料

#### 【 0 0 7 2 】

その天然の、二本鎖の状態における染色体 DNA は、核酸を含む固体、液体、半固体または気体試料から、たとえば、血液、唾液、尿、血漿、血清、CSF、気管支肺胞洗浄液などの液体の組織から；肺、筋肉、皮膚などの固体の組織から；骨髄などの半固体組織から；及び呼気などの気体試料から得ることができる。染色体 DNA を得る生物は、3' オーバーハングをもつ直鎖状の染色体をもつ任意の生物であり得る。鋳型二本鎖染色体 DNA は、フェノール／クロロホルム抽出、塩化セシウム勾配及びシリコーン膜を結合する技術、選択的な洗浄剤媒介された DNA 沈澱方法を使用する市販のキットを含む高分子量ゲ50

ノムDNA(20kbを上回る)を得る任意のDNA精製方法を使用して得ることができる。DNA精製市販キットの例は、Agencourt DNA advance and Agencourt Genfind (Beckman Coulter)、QIAamp kit (QIAGEN, Valencia, California)、QIAamp blood kit (QIAGEN)、QIAamp FFPE tissue kit QIAGEN)、AHPrep kit (QIAGEN)、Puregene kit (QIAGEN)、PureLink and GeneCatcher (Invitrogen)及びWizard (Promega)を含む。

#### 【0073】

この開示の方法における使用のための試料は、3'末端一本鎖オーバーハングをもつ任意のゲノムDNAであり得る。一定の態様において、試料は、高分子量ゲノムDNA(たとえば、>20kb)を含む。高分子量天然ゲノムDNAを得る任意の方法が使用され得る。

#### 【0074】

テロメアを有する二本鎖染色体において、テロメア反復配列をもつ3'末端を有する一本のDNA鎖(「3'オーバーハング」)は、5'末端を有する対の一本鎖の末端を越えて伸張する。3'オーバーハングを有するテロメアの鎖は、「G鎖」といわれ、及びテロメア反復配列5'-TTAGGG-3'を含む。同じ順序置換は、文字が組み換えられない置換であるが、同じ配列における異なる位置、たとえば、反転(たとえば、YXZよりむしろXYZ、YZX、ZXZ)にて始める。この配列の同じ順序置換は：5'-TAGGGT-3'、5'-AGGGTT-3'、5'-GGGTTA-3'、5'-GGTTAG-3'及び5'-GTTAGG-3'を含む。5'末端を有する鎖は、「C鎖」といわれ、及びテロメア反復配列5'-CCCTAA-3'を含む。

#### 【0075】

テロメアの長さは、たとえばキロベースにおいて、染色体の末端からサブテロメア領域までの距離であり得る。正常なヒト成人の細胞において、テロメアは、1kb~12kbより小さい、またはいくつかの場合、>20kbまでの長さの範囲であり得る。テロメア長は、異なる細胞型において変化することが公知である(Lin et al., J Immunol Methods, 2010, 31:352(1-2):71-80)。このようなことから、短いテロメア集団の有効長範囲は、臨床有用性に基づいて広くなり得る。したがって、一定の態様において、短いテロメアは、約5kbより大きくなり、4kbより大きくなり、3kbより大きくなり、2kbより大きくなり、1kbより大きくなりまたは約0.5kbより大きくなり長さを有する。この開示の方法は、これらの長さのそれまでテロメアを検出するように構成され得る。

#### 【0076】

短いテロメア産物は、単一のテロメア、単一の染色体、単細胞からの染色体の集団または複数の細胞からの染色体の集団から生成され得る。

#### 【0077】

2.2伸長産物を產生すること

#### 【0078】

伸長反応において、プライマーは、アニーリング条件下で二本鎖染色体DNAの3'オーバーハングにアニールされる。適切なアニーリング条件は、典型的には鎖伸長のためにまたはPCRのために核酸鎖をハイブリダイズするのに使用したものなど、当業者に公知である。このような条件は、加熱ブロックにおいて10分間65°Cにてのインキュベーション及び次いで1時間の期間にわたって室温までの冷却を含むが、限定されない。その他の条件は、5分~30分間37°C~65°Cの範囲の温度にてのインキュベーション及び次いで1時間~3時間の期間にわたって室温までの冷却を含んでいてよい。

#### 【0079】

2.2.1伸長プライマー

#### 【0080】

10

20

30

30

40

50

伸長プライマーは、3'部分及び5'部分を含む。

【0081】

2.2.1.1 3'部分

【0082】

3'部分は、テロメアのG-鎖におけるテロメア反復配列をハイブリダイズするように適応される配列を有する。3'部分における配列は、テロメアの反復に相補的でありえる、またはミスマッチがプライマー伸長のためにアニーリング条件下でハイブリダイゼーションが可能な限り、それは上記のように一定のミスマッチを有し得る。たとえば、3'部分は、テロメアの反復配列の少なくとも8連続したヌクレオチド（すなわち、テロメアのC-鎖の配列）を有し得る。連続したヌクレオチドは、テロメア反復配列の任意の置換においてあり得る。その他の態様において、3'部分の配列は、テロメア反復配列の少なくとも9連続したヌクレオチド、少なくとも10連続したヌクレオチド、少なくとも11連続したヌクレオチドまたは少なくとも12連続したヌクレオチドを有し得る。その他の態様において、3'部分の配列は、任意の同じ順序置換における2つ以上、3つ以上または4つ以上のテロメア反復ユニットを有し得る。  
10

【0083】

2.2.1.15'部分

【0084】

伸長プライマーの5'部分（また「アンカー配列」と呼ばれる）は、3'部分がハイブリダイズするG-鎖におけるテロメア反復配列にアニーリング条件下でハイブリダイズしないように構成されている。好ましくは、アンカー配列は、G-鎖のサブテロメア領域における配列にアニーリング条件下でハイブリダイズしない。また、アンカー配列は、G-鎖の3'オーバーハングの末端の10kb以内、20kb以内または50kb以内の標的G-鎖の任意の配列に、または標的染色体における任意の独特の配列にハイブリダイズしないように構成され得る。アンカー配列は、その相補体がテロメアまたはサブテロメア領域もしくはテロメアのC-鎖の末端の10kb以内、20kb以内または50kb以内における染色体のC-鎖における任意の配列にハイブリダイズしないように構成され得る。たとえば、アンカー配列は、試験されている染色体において見いだされない独特の配列であり得る。  
20

【0085】

2.2.2 伸長反応

【0086】

染色体DNAに伸長プライマーをアニールした後に、伸長反応は、鎖置換活性及び/またはエキソヌクレアーゼ活性をもつポリメラーゼを使用して行われる。鎖置換ポリメラーゼの例は、T7ポリメラーゼ（たとえば、*S. e u c h r o n a s e*）、*E. coli* DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノウ断片及び*B. st.* DNAポリメラーゼLarge断片及びDeep Vent R (exo-)を含むが、限定されない。加えて、また、5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性をもつポリメラーゼは、使用され得る。

【0087】

伸長反応は、時間が限られている。すなわち、伸長反応は、予め定められた量の時間進行することを可能にする。時間は、予め定められた長さより長くない平均を有する伸長産物を产生するために較正される。鎖-置換酵素によって伸長産物を产生するのに使用される時間は、選ばれた条件及び反応物下で経験的に決定されて、予め定められた長さの伸長産物を产生することができる。本発明において有用な種々のポリメラーゼの伸長割合は、前もって決定され、及び伸長割合は、所望の伸長産物を達成するのに必要なおおよその時間を算出するのに使用され得る。例示的なポリメラーゼのための伸長割合を下の表に示す。  
40

【表1】

DNA ポリメラーゼ	伸長割合*	参照
クレノウ	13.5 ヌクレオチド/秒	Maier B, Bensimon D, and Croquette V. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> (2000) 2497(22):12002-7.
T7	75.9 ヌクレオチド/秒	Tanner, N. A. et al. <i>Nuc. Acids Res.</i> (2009) 37, e27.
Taq	35-100 ヌクレオチド/秒 (75 °C) 0.9-2.55 ヌクレオチド/秒 (37 °C)	Wittwer, C.T. and Garling, D.J., <i>BioTechniques</i> (1991) 10(1), 76-83.
phi29	25 ヌクレオチド/秒	Blanco, L., et al. <i>J Biol Chem</i> (1989) 264, 8935-8940
Bst	50-100 ヌクレオチド/秒	New England Biolabs

\* その他の情報の非存在下で関連する参照において特定されている条件または標準的な反応条件下において。

## 【0088】

伸長反応の開始は、反応チューブに鎖置換酵素を添加することによって達成される。反応は、20分間80°Cに反応チューブを置くことによって、またはEDTAを添加することによって止められ得る。さらにまた、反応は、より低い、またはより高い温度、たとえば25°Cまたは30°Cにてインキュベートすることによって制御され得る（速度を落とした、または速度を上げた）。例として、37°Cにて鎖置換ポリメラーゼSequenceの置換速度は、毎秒約28bpである。30°Cにて、それは、サザンプロット解析に基づいて、約3倍遅い。37°Cにて、Sequenceは、30秒で約1kb；1分で約2kb；3分で約5kb；及び5分で約8kbの伸長産物を产生することができる。種々のポリメラーゼシステム及び種々の試料供与源で予め定められた長さの伸長産物を产生するために必要なタイミングは、経験的に決定され、たとえば、サザンプロット解析が続く、類似の時間経過実験は、伸長時間を較正するために行われることができる。したがって、伸長反応は、30分より多くない、10分より多くない、5分より多くない、4分より多くない、3分より多くない、2分より多くない、1分より多くないまたは30秒より多くない時間を決められ得る。

## 【0089】

## 2.3 増幅反応

## 【0090】

次いで、時間が限られた伸長産物における配列は、たとえば、PCRによって増幅される。より具体的には、1つの側におけるアンカー配列及びその他の側におけるサブテロメア配列によって囲まれている配列は、増幅される。プライマーは、それがその標的（アンカー配列またはサブテロメア配列）にアニールすること及び伸長を可能にする限り、正確に相補的であり得る、またはミスマッチの配列を有することができる。

## 【0091】

アンカー配列は、変化することができる。一定の態様において、アンカー配列は、テロメア量が測定されている生物のゲノムにおいて存在しない特異的配列であり、またはアンカー配列がゲノムの他の部分において見いだされた場合、その配列がSUS配列から有意な距離である場合、それはまだ有用でありえ、その結果、増幅は、テロメアアンカー配列とテロメアSUS配列との間以外PCR工程の間に生じない。

## 【0092】

PCR条件は、最善の分析性能を得るために最適化される。PCR条件における伸長時間は、短いテロメアの意図されたサイズ範囲が濃縮されることを保証するためにサザンプロットにおける産物プロフィールを調べることによって、予め決定される。

## 【0093】

10

20

30

40

50

開示の方法において使用されるサブテロメアプライマーは、全てまたは大部分の染色体において見いだされるG鎖上の配列、たとえば、テロメア配列の変異体(T G A G G G)3...6(Xu and Blackburn, Mol. Cell, 28:315-327, 2007)または(T T G G G G)3...6(Allshire et al., Nucleic Acid Research, 17:4611-4627, 1989)もしくは(T C A G G G)3...6(Baird et al., EMBO J., 14(21):5433-5443, 1995)を含み得る。あるいは、サブテロメアプライマーは、特異的染色体(群)上で見いだされるセグメント、たとえば、Xu et alにおいて記述されるX p Y p E 2プライマー(5' - G T T G T C T C A G G G T C C T A G T G - 3' [配列番号: 1])であり得る(Xu and Blackburn, Mol Cell, 28:315-327, 2007)。一つの態様において、サブテロメア配列のためのプライマーは:

5' - G A T G G A T C C T G A G G G T G A G G G T G A G G G - 3' [配列番号: 2]

5' - C G G G C C G G C T G A G G G T A C C G C G A - 3' [配列番号: 10] (染色体1)

5' - G C T A A T G C A C T C C C T C A A T A C - 3' [配列番号: 11] (染色体5)

5' - C A T T C C T A A T G C A C A C A T G A T A C C - 3' [配列番号: 12] (染色体9)

を含む、本質的にからなる、またはからなる。

#### 【0094】

短いテロメアアッセイが開示の方法を使用してヒト以外の生物に適用されるとき、サブテロメアプライマーの特定の配列は、生物のゲノム配列に基づいてデザインされ得る。サブテロメアプライマーの配列は、3'オーバーハングをもつ鎖と一致するはずである。

#### 【0095】

増幅産物は、一定の長さの範囲内のテロメアの反復配列を有する核酸の集団を含み、及びこの範囲より長い配列を除外する。したがって、集団は、閾値長より短いテロメアを有する染色体のみからの配列を含むように構成され得る。

#### 【0096】

伸長反応効率のための制御に対する内部制御配列は、伸長反応工程において含まれ得る。この内部制御配列は、1つの末端にてサブテロメアプライマー配列をもつ二本鎖DNA及びテロメア配列のG鎖をもつ3'オーバーハングであり得る。サブテロメアプライマー配列とテロメア配列との間は、独特の非テロメア配列の伸展であり得る。たとえば、1つのこのような配列は、h T E R T 遺伝子またはR N a s e P 遺伝子であり得る。この内部制御のための伸長反応の効率は、たとえばh T E R T 遺伝子またはR N a s e P 遺伝子を定量化するためのT a q m a nに基づいたアッセイによって測定され得る。

#### 【0097】

3. テロメアの存在量を測定する方法

#### 【0098】

テロメア配列を含む試料におけるテロメアの存在量を測定するのに使用される任意の方法は、長さの限られたテロメア試料におけるテロメアの存在量を測定するのに使用され得る。

#### 【0099】

テロメアの存在量の測定は、絶対的または相対的であり得る。たとえば、テロメアの存在量の絶対測定は、たとえば、ヌクレオチドの数によって測定されるゲノムにおけるテロメア配列の全長を含む。より典型的には、テロメアの存在量は、参照に相対的に測定される。テロメア配列の検出は、アッセイにおいて產生されたシグナル強度に換算して測定され得る。このシグナル強度は、アッセイにおける参照配列によって產生されるシグナル強度と比較され得る。相対的シグナル強度は、標準化の方法として機能することができる。

10

20

30

40

50

標準化された方法は、アッセイ間でより容易に比較され得る。たとえば、テロメア配列の検出によって產生されるシグナルは、対照配列の測定によって產生されるシグナルと比較され得る。対照配列は、たとえば、ベータ グロビン遺伝子の一部であり得る。したがつて、使用したアッセイ方法に関係なく、参照配列に対するテロメア配列の相対的シグナルは、たとえば、比として表現され得る。この比は、テロメア配列存在量測定の結果を比較するのに使用され得る。

#### 【0100】

その他の態様において、短いテロメアの存在量の測定は、総テロメアの存在量と比較される。総テロメアの存在量は、U.S. Patent No. 7,695,904 (Cawthon) 及び Lin et al. (Lin et al. 2010, 352 (1-2) : 71-80) に記載されているように後に qPCR 方法が続く、鎖置換反応における、及び増幅反応における長い伸長時間によって測定され得る。短いテロメアの割合を決定するために、短いテロメア対総テロメアの比は、決定され得る。たとえば、短いテロメア測定のシグナル強度は、総テロメア測定のシグナル強度で割られ得る。

#### 【0101】

3.1 qPCR

#### 【0102】

短いテロメアの存在量を定量化する1つの方法は、Cawthon (Nucleic Acids Res., 2002, 30(10) : e47; U.S. Patent No. 7,695,904; Lin et al., J. Immunol. Methods, 2010, 352(1-2) : 71-80); または Cawthon 2009 (Nucleic Acids Res. 2009 37(3) : e21.) によって記載されているように、定量的 PCR である。

#### 【0103】

様々な当該技術分野において公知の方法は、本開示において使用されて、平均テロメア長またはテロメアの存在量を決定することができる。好ましくは、リアルタイム動力学的定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) は、Cawthon (Nucleic Acids Res., 2002, 30(10) : e47; U.S. Patent No. 7,695,904) によってテロメア長検出のために特異的に修飾されたよう利用される。方法は、単純であり、及び数多くのDNA試料の迅速高スループットプロセシングを可能にする。qPCR 方法は、ポリメラーゼ連鎖反応が進むにつれて増加するリポーター分子によって產生される蛍光の検出に基づいている。蛍光におけるこの増加は、増幅のそれぞれのサイクルで PCR 産物の蓄積のため生じる。これらの蛍光リポーター分子は、二本鎖DNA (たとえば、SYBR Green または臭化工チジウム) または配列特異的プローブ (たとえば、Molecular Beacons または T A Q M A N Probes) に結合する色素を含む。あるいは、Cawthon (Nucleic Acids Res. 2009, 37(3) : e21) によって記述される qPCR 方法は、使用され得る。方法は、テロメア反復が高存在量種である、及び単一のコピー遺伝子が低存在量種であるとき、実験的な状況を含み、多重化を経た単一の試料における T / S 比の決定を可能にする。

#### 【0104】

本開示の方法において、反復テロメア配列 (TTAGGG)<sub>n</sub> に特異的なプライマープローブが使用される。一般的に、プライマーのサイズは、使用、必要とされた特異性及び増幅技術に応じて、5 ~ 500 ヌクレオチド、10 ~ 100 ヌクレオチドの間、12 ~ 75 ヌクレオチドの間または 15 ~ 50 ヌクレオチドの間の長さに変化してもよい。本開示において、一つの態様は、標的テロメア配列の第1の一本鎖にハイブリダイズする第1のプライマー及び標的テロメア配列の第2の一本鎖にハイブリダイズする第2のプライマーを利用し、第1及び第2の鎖は、実質的に相補的である。この態様において、たとえば、tel1 (5' - GGT TTT TGAGGGT GAGGGT GAGGGT GAGGGT GAGGGT GAGGGT - 3') [配列番号：3] 及び tel2 (5' - TCC CGACT ATCCC 50

T A T C C C T A T C C C T A T C C C T A T C C C T A - 3' ) [配列番号：4] からなる対のプライマーセットが使用され得る。1つの態様において、プライマーの少なくとも1つは、少なくとも1つの変更された、または変異させられたヌクレオチド残基を含み、それは、プライマーが互いにハイブリダイズするときに、変更された残基とその他のプライマーの3'末端ヌクレオチドとの間にミスマッチを產生する。3'末端ヌクレオチドにてのミスマッチの存在は、ポリメラーゼによる伸長を遮断し、したがって、ターゲットではない核酸依存的伸長反応を限定する。この態様において、たとえば、tel 1b 5' - C G G T T T G T T G G G T T T G G G T T T G G G T T T G G G T T T G G G T T - 3' [配列番号番号：5]；及びtel 2b 5' - G G C T T G C C T T A C C T T A C C C T T A C C C T - 3' [配列番号番号：6] からなる対のプライマーセットが使用され得る。さらなる態様において、たとえば、tel 1g 5' - A C A C T A A G G T T T G G G T T T G G G T T T G G G T T T G G G T T A G T G T - 3' [配列番号番号：13]；及びtel 1c 5' - T G T T A G G T A T C C C T A T C C C T A T C C C T A T C C C T A A C A - 3' [配列番号番号：14] からなる対のプライマーセットが使用され得る。当業者は、プライマーのその他の実質的に相補的な、またはミスマッチのセットがこの開示において使用され得ることを認識するだろう。このようなプライマーは、U.S. Patent No. 7,695,904 (Cawthon et al.)において記述される。

#### 【0105】

増幅反応は、当該技術分野において周知の手順に従って実施される。PCRのための手順は、広く使用され、及び記述される（たとえば、U.S. Patent No. 4,683,195 及び 4,683,202 を参照されたい）。簡単に言うと、二本鎖標的核酸は、一般に鎖を変性するのに十分に高い温度にてインキュベートすることによって変性され、及び次いで、過剰なプライマーの存在においてインキュベートされ、それは一本鎖標的核酸にハイブリダイズ（アニール）する。DNAポリメラーゼは、ハイブリダイズしたプライマーを伸張し、標的核酸の新たなコピーを生成する。生じる二重鎖は変性され、及びハイブリダイゼーション及び伸長工程は繰り返される。相補的標的鎖のための第2のプライマーの存在における変性、アニーリング及び伸長の工程を繰り返すことによって、2つのプライマーによって包囲される標的核酸は、指数的に増幅される。プライマー伸長工程の時間及び温度は、ポリメラーゼ、増幅されている標的核酸の長さ及び増幅のために使用されたプライマー配列に依存するだろう。標的核酸を十分に増幅するために必要とされる反復する工程の数は、増幅の効率に依存するだろう。当業者は、本開示が時間、温度、緩衝液条件及び増幅過程において適用された増幅サイクルにおける変化によって限定されないことを理解するだろう。

#### 【0106】

増幅の産物は、当該技術分野において周知の方法によって検出され、及び解析される。増幅された産物は、産物の分離及び／または精製の後、または増幅反応において形成される産物の直接測定によって解析されてもよい。検出については、産物は、蛍光化合物、たとえば、臭化工チジウムまたはSYBR Greenで、または標識された核酸プローブでハイブリダイゼーションによって間接的に同定されてもよい。あるいは、標識されたプライマーまたは標識されたヌクレオチドは、増幅産物を標識する増幅反応において使用される。標識は、任意の検出可能部分を含み、蛍光標識、放射性標識、電子標識及びビオチンまたはジゴキシゲニンなどの間接的な標識を含む。

#### 【0107】

本開示のqPCR反応を行うのに適切な計測手段は、多数の市販の供与源から利用可能である（ABI Prism 7700, Applied Biosystems, Carlsbad, CA；LIGHTCYCLER 480, Roche Applied Science, Indianapolis, IN；Eco Real-Time PCR System, Illumina, Inc., San Diego, CA；RoboCycler 40, Stratagene, Ceda 50

r Creek, TX)。

【0108】

リアルタイム定量的PCRが増幅産物を検出し、及び測定するのに使用されるとき、種々のアルゴリズムは、試料における標的テロメアの数を算出するのに使用される。(たとえば、ABI Prism 7700 Software Version 1.7; Lightcycler Software Version 3を参照されたい)。定量化は、テロメア核酸の公知のコピー数をもつ標準試料の使用及び標準の対数及び閾値( $C_t$ )のサイクルからの標準曲線の生成を含んでいてもよい。一般に、 $C_t$ は、増幅産物によって生成された蛍光がベースライン蛍光より上のいくつかの偏差であるPCRサイクルまたは断片のPCRサイクルである。

10

【0109】

3.2 その他の方法

【0110】

増幅反応からの短いテロメアの存在量は、当該技術分野において公知のその他の方法によって測定されてもよい。このような方法は、直接核酸シーケンシング及びサザンプロット法並びにドットプロット法またはスロットプロットハイブリダイゼーション及びデジタルPCRを含むが、限定されない。

【0111】

単離されたDNAにおける核酸配列の直接測定のための従来の技術は、本開示において使用されてもよい。たとえば、「DNA Sequencing,」The Encyclopedia of Molecular Biology, J. Kendrew, ed., Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 1995, pp. 283-286を参照されたい。ダイターミネーター自動シーケンシングは、核酸シーケンスのために現在最も一般に使用される(ワールドワイドウェブURL labmanager.com/?articles.view/articleNo/3364/article/DNA-Sequencingにて「DNA Sequencing」, Lab Manager)。自動シーケンシング設備は、都合よく使用され、及びApplied Biosystems、Roche Applied Science及び Illumina Inc.などの企業から購入されてもよい。一旦DNA試料の配列が決定されると、次いで、いずれかの末端にてのテロメア核酸配列(TTAGGG)のコピーの数は、計数され得る。本開示のこの方法は、テロメア配列の直接測定によって絶対テロメアの存在量の測定を提供する。

20

【0112】

また、サザンプロッティング(Southern, E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98(3): 503-517)は、本開示において利用されて、ヒトテロメア核酸配列(TTAGGG)<sub>n</sub>の特異的存在を検出することによって、テロメアの存在量を決定してもよい。本開示において、Terminal Restriction Fragment (TFR)サザンプロット法は、フィルター膜に電気泳動によって分離されたDNA断片の転送を組み合わせ、続いて(TTAGGG)配列に特異的なプローブへのハイブリダイゼーションによって断片の検出をする(Allshire, R. C. et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 4611-4627)。このようなプローブは、テロメア配列に相補的な配列を有する。検出の容易さについては、プローブは、蛍光または発色性色素で放射能で標識される、またはタグを付けられる。次いで、存在する放射活性または蛍光の量は、試料におけるテロメアの存在量を示すように定量化されてもよい。M. Kimura et al. (Nature Protocols, 2010, 5: 1596-1607)は、テロメア長を決定するための適切なサザンプロット手順を記述する。

30

【0113】

サザンプロッティング法の変化は、ドットプロット法またはスロットプロット法を含み、DNAは、フィルター膜上の点またはスロットとしてスポットされ、続いて(TTAG

40

50

GG)配列に特異的なプローブにハイブリダイゼーションによって断片の検出をする(Kimura M, Aviv A, Nucleic Acids Res., 2011, 39(12):e84. doi: 10.1093/nar/gkr235. Epub 2011 Apr 27)。

【0114】

本開示の上の態様において、蛍光は、相対的蛍光ユニット(RFU)において測定されてもよい。蛍光は、電気泳動を使用することによってキャピラリー内で分離される標識された断片がレーザ光によって活性化され、及び検出窓全体に移動するとき、帯電接続された装置(CCD)アレイを使用して検出される。コンピュータプログラムは、結果を測定して、蛍光強度のレベルから、それぞれのデータポイントにて、テロメア含有断片の量またはサイズを決定する('Relative fluorescence unit (RFU)', DNA.gov: Glossary, April 2011, ワールドワイドウェブURL dna.gov/glossary/)。

【0115】

テロメアの存在量の測定は、DNAシーケンシング方法論を使用して測定され得る。このような方法は、テロメア反復を含む試料における分子をシーケンシングすること及びテロメア反復配列の存在量を決定することを含むことができる。DNAシーケンシング方法は、シーケンシングの任意の公知の方法、たとえば、SangerシーケンシングまたはMaxam Gilbertシーケンシングなどの古典的なシーケンシング方法及びライゲーションシーケンシング、ナノ細孔シーケンシング、ピロシーケンシング、超ピロシーケンシング、プロトン検出によるシーケンシング、合成によるシーケンシング及び単一分子シーケンシングなどの次世代シーケンシング方法を含むことができる。また、短いテロメアの存在量は、デジタルPCRによって測定され得る。このような技術プラットホームは、たとえば、RAINDROP Digital PCR System(Raindance Technologies, Billerica, Massachusetts)またはQX200 DROPLET DIGITAL PCR System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, California)を含むデジタルPCR、微少溶液デジタルPCR(Fluidigm Corporation, South San Francisco, California)またはOPENARRAY Real-Time PCR System(APPLIE D BIOSYSTEMS division of Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts)を含むが、限定されない。種々のさらなる態様において、短いテロメアの存在量は、適切なハイブリダイゼーション技術、たとえばNCOUNTER Analysis System(Nanostring Technologies, Seattle, Washington)によって測定され得る。

【0116】

4. キット

【0117】

また、この開示は、この開示の方法において有用なキットを提供する。このようなキットは、この開示の伸長プライマー及びサブテロメア配列に、または伸長プライマーのアンカー配列の相補的なものにハイブリダイズする増幅プライマーを含むことができる。あるいは、キットは、この開示の伸長プライマー及びサブテロメア配列によって囲まれた核酸における配列を増幅するのに適応される一対の増幅プライマー及び伸長プライマーにおけるアンカー配列を含むことができる。キットは、伸長プライマーを含む容器及び増幅プライマーの一方または両方を含むもう一つの容器を含むことができる。また、キットは、プライマー伸長のための試薬及び核酸増幅のための、たとえば、PCRのための試薬を含むことができる。また、キットは、公知の値をもつ対照及び参照試料を含むことができる。一定の態様において、キットは、伸長プライマー及び一対の増幅プライマーを含む。一定の態様において、伸長プライマーは、アニーリング条件下で二本鎖染色体DNAの3'オ-

10

20

30

40

50

バーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする 3' 部分及びテロメアの、またはサブテロメア領域における配列にハイブリダイズしない 5' アンカー部分を含む。

【 0 1 1 8 】

5 . テロメアの存在量、短いテロメアの存在量及びテロメアの存在量の増減率または短いテロメアの存在量の増減率と関連づけられる条件

【 0 1 1 9 】

一般に、テロメアの存在量と関連する条件は、本明細書に記述したように、平均テロメア長の測定を使用して典型的には得た。しかし、上で議論したように、新生のデータは、短いテロメアの存在量及びまたは短いテロメアの存在量の増減率を測定することが、より多くのセンシティブ及び平均テロメア長または平均テロメア長の増減率の測定であるより潜在的により正確な臨床的に意味がある結果（たとえば疾患または死亡リスク）の予測値でもよいことを示唆する。それゆえに、短いテロメアの存在量の高感度及び正確な測定を有することは、重要である。決定的に短いテロメアの存在が細胞生存度及び組織機能の喪失を生じさせたことは報告されており、非常に短いテロメアと細胞老化との間に因果関係があることを示した (Hemann, M.T., et al. Cell, 2001. 107 (1) 67 - 77)。

10

【 0 1 2 0 】

短い平均テロメア長（後述するように）は、臨床結果の確立された、優れた予測値であるが、短いテロメアの存在量の正確な測定がテロメア動態における介入の効果のためのより高感度の測定であり得ることが予想される (Canelas, A., et al.

20

Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104 (13) 5300 - 5 )。Harley et al. (Rejuvenation Res.

2011. 14 (1) 45 - 56 )は、テロメラーゼ、TA - 65 (登録商標) の相対的に弱い活性化因子を持つヒトが短いテロメアの割合の減少を示したが、平均テロメア長に有意なシフトがなかったことを示した。Vera et al. supra. において、短いテロメアの存在量の増加率は、マウスの別々の 2 つのコホートにおける増加した寿命を予測した 「The Rate of Increase of Short Telomeres Predicts Longevity in Mammals, Cell Reports (2012)」、ワールドワイドウェブ URL : dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.023 )。短いテロメアの存在量を測定するための正確な、コスト効率の良い、高いスループット方法の欠如のため、短いテロメアの存在量または短いテロメアの存在量の増減率を使用して、短いテロメアの存在量を測定する臨床有用性を確立する大きなヒト治験がこれまでなかった。

30

【 0 1 2 1 】

また、Vera et al. からの動物研究における概念の証明は、短いテロメアの割合の時間とともに高上昇率をもつマウスが、時間とともに短いテロメアの低上昇率をもつマウスと比較して、生存を減少させたことを示す。野生型マウスにおいて、高上昇率（たとえば 1 % / 月）をもつマウスと比較して低上昇率（たとえば、0.4 % / 月）を有したマウスの生存における相違は、約 100 週または野生型マウスにおける最大生存のほぼ 2 / 3 であった。

40

【 0 1 2 2 】

したがって、本明細書に記述したように正確及び精密なアッセイによって測定されるように短いテロメアの高い割合をもつヒトは、短いテロメアの低い割合をもつヒトと比較して、疾患または死亡リスクをより起こしやすいだろう。% 短いテロメアの定量的評価は、健康モニタリングのみでなく疾患診断法、予後及びコンパニオン診断法における有意な診断の有用性も有するだろう。

【 0 1 2 3 】

短いテロメアの存在量をモニターすることは、短いテロメア（典型的に 1 kb p より小さいまたは 2 kb p より小さい次いでまたは 3 kb p より小さい）が細胞の老化をトリガーすることが知られているので (Hemann, M.T., et al. Cell

50

, 2001. 107(1) 67 - 77)、健康モニタリングについて即時の有用性を有し、及び細胞の老化は、組織機能の喪失及び最後に疾患及び死亡を導くことが公知である。したがって、正常な個体の年齢がマッチした参照集団と比較した短いテロメアの平均より大きい存在量をもつ個体は、罹患率または死亡率のリスクが高い。このような人は、より優れた生活様式及び短いテロメアのより低い存在量の方へこれらの挙動を変えることを動機づけられるだろう、一方で参照集団と比較して短いテロメアの平均より低い存在量をもつ個体は、これらの細胞の健康がおそらく平均よりよいということを知っているだろう、及びそれ故、もしさらに改善しなければ、これらの生活様式習慣を少なくとも維持して、これらの優れた健康を維持するよう動機づけされるだろう。

## 【0124】

10

ゲノムDNAから決定される染色体末端あたりの平均テロメア長は、全体のテロメアの存在量の尺度であり、及びこれは、いくつかの重要な生物学的指標と関連づけることを示した。たとえば、これらの指標は、種々の疾患状態のリスク、たとえば、心臓血管のリスク、癌リスク、肺線維症リスク、感染性疾患リスク及び死亡のリスクを含む。また、テロメアの存在量は、暦年齢、体格指数、臀部 / 重量比及び認知されたストレスと関連づける。テロメア長の1つの測定は、テロメア / 単一コピー（「T / S」）比である。所与の集団におけるこのような比は、分位数に、たとえば、三分位値へ分けられることができる。より低い2つの三分位値におけるT / S比によるテロメアの存在量をもつ個体が、テロメア長について繁殖性の上部におけるものより心臓血管疾患のリスクが有意に高いことが分かっている。

20

## 【0125】

一般に、テロメアの存在量の百分順位の値、たとえば、参照集団（典型的にはテロメア長の繁殖性の最高のものまたは四分位数）の百分率として表されるT / S値は、集団において疾患のリスクとネガティブに関連する。すなわち、より短い平均テロメア長は、健康の改善された尺度と関連し、その一方で、より低い百分位数スコアは、減少した健康の尺度、増加した疾患リスクまたはテロメア疾患の存在と関連する。

## 【0126】

集団において、テロメア長は、経年的に減少する。したがって、個体についてのテロメア長の測定は、集団における同じ年齢範囲における人、すなわち、年齢がマッチした集団についての測定と比較され得る。たとえば、30歳の人は、30歳についての集団平均に大体同等、または20歳または40歳についての集団平均に同等であるテロメアの存在量の測定を有し得る。健康の測定とテロメアの存在量の測定の関連づけは、年齢がマッチした集団についての測定と比較したときに、より正確である。年齢がマッチした集団についての範囲は、たとえば、1年、2年、3年、4年、5年、7年または10年であることができる。

30

## 【0127】

## 5.1 健康の測定

## 【0128】

本開示の方法によって被験体試料から決定される短いテロメアの存在量は、健康の尺度と関連づけることができる。特に興味深いのは、認知されたストレスを含む健康の測定である。テロメア短縮は、酸化損傷、生化学的なストレス要因、慢性炎及びウイルス感染などのストレスの複数の形態を含む、遺伝的及び環境因子によって促進され得る（Epel, E.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 49: 17312 - 15）。一般的な健康状態の便利な測定は、John Ware によって開発されたSF-36（登録商標）Health Survey である（たとえば、ワールドワイドウェブURL sf-36.org/tools/SF36.shtmlを参照されたい）。SF-36は、好ましくは訓練された個人によって、患者に提起される36の質問のみでの多目的、簡易健康調査である。それは、機能健康及び幸福スコアの8 - スケールプロフィール並びに精神測定法に基づいた身体的及び精神的健康簡易測定及び優先度に基づいた健康効用指数を提供する。SF-36調査は、疾

40

50

患負担を測定し、及び一般的な集団基準と疾患特異的なベンチマークを比較するのに使用される。最も頻繁に研究された疾患及び健康状態は、関節炎、背痛、癌、心臓血管疾患、慢性閉塞性肺疾患、鬱病、糖尿病、消化器系統の病気、片頭痛、H I V / a i d s 、高血圧、過敏性腸症候群、腎疾患、腰痛、多発性硬化症、筋骨格疾患、神経筋疾患、骨関節炎、精神医学的な診断、慢性関節リウマチ、睡眠障害、脊髄損傷、脳卒中、薬物乱用、外科的処置、移植及び外傷((Turner - Bowker et al., SF - 36 (登録商標) Health Survey & 「SF」 Bibliography : Third Edition (1988 - 2000), Quality Metric Incorporated, Lincoln, RI, 2002)を含む。当業者は、一般的な健康状態のその他の調査方法、たとえば、RAND - 36が本開示における使用を見いだされ得ることを認識するだろう。

#### 【0129】

本開示の一つの態様において、被験体試料は時間とともに収集し、及び短いテロメアの存在量の測定は、試料から決定される。複数の試料の収集のための適切な期間は、1カ月、3カ月、6カ月、1年、2年、5年及び10年(たとえば、最も初期と最後の試料との間の時間は、大体これらの期間であり得る)を含むが、限定されない。この方法は、患者の全般的な健康状態を改善しようとする努力、及び/またはかれらの健康状態及び/または疾患リスクをモニターしようとする努力のモニタリングを可能にする。短いテロメアが細胞死をトリガーするので、個体内で短いテロメア長の割合が低下している、または時間とともに維持されているという所見は、健康改善を示し、その一方で、短いテロメアの割合の増加は、健康の低下または悪化していることを表す。

#### 【0130】

##### 5.2 病態のリスク

#### 【0131】

##### 5.2.1 疾患

#### 【0132】

テロメアの反復単位の数を測定することは、疾患リスク、疾患予後及び治療などの医学的な診断に非常に様々な応用を有する。特に、テロメア長の測定は、疾患のリスクをまねく病態を評価することに応用される。本開示の一つの態様において、疾患は、老化、たとえば心臓血管疾患、糖尿病、癌、肝線維症及び鬱病と関連するものであるが、限定されない。

#### 【0133】

一つの態様において、本開示は、心臓血管疾患の評価及びモニタリングにおける使用を見いだす。白血球におけるテロメア長は、それが血管造影法によって測定されたときに正常な冠動脈をもつ個体より重篤な三枝冠動脈疾患をもつ患者において(Samani, N. J. et al., Lancet, 2001, 358: 472 - 73)、及びまた、このような変遷のない年齢及び性別がマッチした個体と比較して50歳未満で早発性心筋梗塞を経験する患者において(Brouillette S. et al., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol., 2003, 23: 842 - 46)短いことを示した。Brouillette et al.(Lancet, 2007, 369: 107 - 14)は、冠動脈心疾患を起こしやすい人々におけるより短い白血球テロメアが、テロメア長においてその他の心血管系リスク因子の累積効果を示し得ることを示唆した。また、増加した酸化的ストレスは、アテローム硬化症に寄与し、及び増加した酸化体ストレスは、インビトロにおけるテロメア消耗の速度を増加することが示された(Harrison, D., Can. J. Cardiol., 1998, 14(suppl D): 30D - 32D; von Zglinicki, T., Ann. N. Y. Acad. Sci., 2000, 908: 99 - 110)。横断的調査において、また、喫煙、体格指数及び1型真性糖尿病は、より短い白血球テロメア長と関連すると報告された(Valdes, A., et al., Lancet, 2005, 366: 662 - 64; Jeanclos, E. e 50

t al., Diabetes, 1998, 47: 482 - 86)。増加した生活ストレス、冠動脈心疾患のリスクを増加させることが公知の因子は、おそらく増加した酸化ストレスの結果として、より短いテロメアと関連することが示された (Epele, 2004, 同書)。したがって、喫煙者及び高体格指数、糖尿病及び / または増加した生活ストレスをもつ患者全ては、本開示の方法に従ったこれらのテロメアの存在量の測定及び継続したモニタリングから利益を得るだろう。

#### 【0134】

2型糖尿病は、より短いテロメアによって特徴づけられる (Salpea, K. and Humphries, S. E., Atherosclerosis, 2010, 209(1): 35 - 38)。また、より短いテロメアは、1型糖尿病患者において観察された (Uziel O. et al., Exper. Gerontology, 2007, 42: 971 - 978)。1型糖尿病における疾患の病因は、2型におけるものといくらか異なるが、それはあっても両方の場合において、ベータ細胞不全は、最も悪化した疾患のための最終的なトリガーである。したがって、テロメア長は、それが疾患の進行と関連するので、糖尿病のための有用なマーカーである。Adai Kalakoteshwari et al. (Atherosclerosis, 2007, 195: 83 - 89) は、テロメアが対照と比較して前糖尿病性耐糖能障害をもつ患者においてより短いことを示した。加えて、テロメア短縮は、糖尿病性腎障害 (Verzola D. et al., Am. J. Physiol., 2008, 295:F1563 - 1573)、ミクロアルブミン尿症 (Tentolouris, N. et al., Diabetes Care, 2007, 30: 2909 - 2915) 及び上皮癌 (Sampson, M. J. et al., Diabetologia, 2006, 49: 1726 - 1731) などの糖尿病合併症と連結した一方で、テロメア短縮は、よく制御された糖尿病をもつ患者において減弱されるようである (Uziel, 2007, 同書)。本開示の方法は、前糖尿病性及び糖尿病患者の状態をモニターしてこれらの合併症及びその他のために初期警告を提供することにおいて、特に有用である。

#### 【0135】

本開示は、テロメラーゼ活性の活性化が細胞の不死化と関連するので、種々のタイプの癌細胞のテロメア長を決定するのに有用である。正常なヒト細胞がテロメラーゼを発現しないか、一過性に発現し、及びしたがって、それぞれの細胞分裂でこれらのテロメアを短縮する一方、大部分のヒト癌細胞は、典型的には高レベルのテロメラーゼを発現し、及び無制限の細胞増殖を示す。高テロメラーゼ発現は、細胞が増殖し、及び長期に拡大し、及びしたがって、腫瘍成長を支持することを可能にする (Roth, A. et al., in Small Molecules in Oncology, Recent Results in Cancer Research, U. M. Martens (ed.), Springer Verlag, 2010, pp. 221 - 234)。より短いテロメアは、癌のリスク、特に膀胱及び肺、喫煙関連、消化器系及び泌尿生殖系の癌に有意に関連する。過剰なテロメア短縮は、腫瘍発症及び進行を促進する役割をおそらく果たす (Ma H. et al., PLoSONE, 2011, 6(6): e20466. doi: 10.1371/journal.pone.0020466)。研究は、乳がんリスクにおける短縮されるテロメアの効果が、閉経前女性及び乏しい抗酸化能をもつ女性などの一定の集団サブグループについて有意であることをさらに示した (Shen J., et al., Int. J. Cancer, 2009, 124: 1637 - 1643)。一般に癌を評価し、及びモニターすることに加えて、本開示は、唾液試料に由来するゲノムDNAが利用される場合、口腔癌のモニタリングに特に有用である。

#### 【0136】

肝硬変は、たいてい有意な炎症性の浸潤と関連する器官の増加する線維症によって特徴づけられる (Wiemann et al. (FASEB Journal, 2002

, 16(9):935-982)は、テロメア短縮がヒトにおける肝硬変の疾患及び年齢非依存的な徵候であることを示した。テロメア短縮は、ウイルス性肝炎(慢性A型肝炎とB型肝炎)、毒性肝臓障害(アルコール症)、自己免疫及び胆汁鬱帶(PBC及びPSC)によって誘導される肝硬変に存在し、テロメアは、患者の年齢に非依存的に肝硬変において一様に短い。テロメア短縮及び老化は、硬化性肝臓における肝細胞に特異的に影響を及ぼし、及び両方のパラメーターが肝硬変の間、線維症の進行と強く関連する。したがって、本開示の方法は、肝線維症を診断し、及びモニターすることにおける使用を見いだす。

#### 【0137】

鬱病は「促進老化」の状態に例えられ、及び鬱状態の個体は、心臓血管及び脳血管疾患、代謝症候群及び認知症などの老化の種々の疾患のより高い発病率を有する。再発性鬱病をもつ人々または慢性ストレスに曝露した人々は、白血球においてより短いテロメアを示す。より短いテロメア長は、慢性ストレスへの曝露を指し示す再発性鬱病及びCortisolレベルと関連する(Wikgren, M. et al., Biol. Psych., 2011, DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.09.015)。しかし、全ての鬱状態の個体は、生涯にわたる抑鬱の発症における大きな変動のため、短縮したテロメアを同程度に示すというわけではない。長期間鬱病に罹患した人々は、対照集団と比較したときに、心理的ストレスによって誘導される酸化ストレス及び炎症に対するより長い曝露のために有意により短いテロメアを有する(Wolkowitz et al., PLoS One, 2011, 6(3):e17837)。したがって、本開示の方法は、鬱病をモニターすることにおける使用を見いだされ得る。

#### 【0138】

慢性感染症

#### 【0139】

異常なテロメア長は、HIV(Effros RB et al., AIDS. 1996 Jul; 10(8):F17-22, Pommier et al. Virology. 1997, 231(1): 148-54)及びHBV、HCV及びCMV(Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: effect of chronic infection and stress. (Effros RB, Exp Gerontol. 2011 Feb-Mar; 46(2-3): 135-40. Rejuvenation Res. 2011 Feb; 14(1):45-56. doi: 10.1089/rej.2010.1085. Epub 2010 Sep 7.)を含む慢性感染症と関連する。

#### 【0140】

Harley et al. ('A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program', Harley CB, Liu W, Blasco M, Vera E, Andrews WH, Briggs LA, Raffaele JM, Rejuvenation Res. 2011 Feb; 14(1):45-56)において、CMV陽性であった個人が、CMV陰性であったものより短いテロメアを有し、及びその上、CMV陽性被験体は、TA-65、その他の補助食品と一緒に天然物由来テロメラーゼ活性化因子の栄養補助剤プログラムに応答する傾向が強かったことが発見され、老化CD8+/CD28-細胞の存在量を減少させることにおいて、テロメラーゼ活性化因子の投与と組み合わせて、平均テロメア長または短いテロメアの存在量を測定するためのコンパニオン診断法応用を示唆する。

#### 【0141】

短いテロメア集団の測定は、予後疾患進行及び治療結果の指標として使用され得る。

#### 【0142】

10

20

30

40

50

1つの研究は、CD4+細胞におけるテロメア長が炎症等級、線維症段階、重症度の研究室指標、その後の肝臓代償不全及び慢性HCV感染をもつ患者における治療結果に関連すると報告した(Hoare et al., J. Hepatol., 2010, 53(2): 252-260)。

#### 【0143】

もう一つの報告において、より長い白血球テロメア長は、B型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の増加したリスクを予測する(Liu et al., 2011, 117(18): 4247-56.)。

#### 【0144】

HIVの場合において、テロメア短縮は、ウイルスの感染によって生じる。加えて、HIVを治療するのに使用されるヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤は、テロメラーゼ阻害剤である(Strahl and Blackburn, Mol Cell Bio, 1996, 16(1): 53-65; Hukezalie et al., PLoS One, 2012, 7(11): e47505)。短いテロメアの存在量の測定は、HAART治療の副作用及び有効性を決定するのを補助し得る。

#### 【0145】

##### 5.2.2 その他の病態

#### 【0146】

また、本開示は、老化の早発性に関連した疾患の診断における使用を見いだす。たとえば、Hutchinson Gilford早老症疾患をもつ個体は、テロメアの長さの喪失と関連する纖維芽細胞における増殖性潜在能力において早老及び減少を示す(All sop, R. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 89: 10114-10118)。この開示の方法に従ったテロメア反復の数の增幅及び定量化は、上記の通りに疾患リスクまたは予後を決定し、及び適切な介入性工程を取るのに有用である。

#### 【0147】

##### 5.3 テロメア疾患

#### 【0148】

本開示の一つの態様において、テロメアの特異的疾患の存在及び進歩の両方は、試料を使用して決定され得る。テロメア疾患は、テロメアの異常な、または早発性短縮と関連し、それは、たとえば、テロメラーゼ活性における欠損の結果として生じ得る。テロメラーゼは、真核生物におけるテロメアDNAの複製及び保護のために必要とされるリボ核タンパク質複合体である。テロメラーゼを欠いている細胞は、生存度の喪失及びゲノム不安定性における随伴性の増加を生じるテロメアDNAの進行性の喪失を経験する。これらの疾患は、受け継がれ得るし、及び先天性再生不良性貧血の一定の形態を含み得るし、骨髄の幹細胞における不十分な細胞分裂は、重篤な貧血を導く。また、皮膚及び肺の一定の遺伝性疾患は、テロメラーゼ欠損によって生じる。テロメア疾患については、T/S < 0.5の閾値は、いくつかの症状に適切である。また、一般に使用される測定基準は、< 10%未満または好ましくは、正常な集団に対して< 1%の年齢補正百分位テロメアスコアである。

#### 【0149】

先天性角化異常症(DKC)、別名Zinsser-Engman-Cole症候群は、粘膜皮膚異常によって特徴づけられるまれな、進行性の骨髄不全症候群である：網状皮膚色素過剰症、爪ジストロフィー及び口腔白斑症(Jyonouchi S. et al., Pediatr. Allergy Immunol., 2011, 22(3): 313-9; Bessler M., et al., Haematologica, 2007, 92(8): 1009-12)。この障害におけるテロメラーゼ機能不全、リボソーム欠損及びタンパク質合成機能不全についての証拠が存在する。初期の死亡率は、骨髄不全、感染症、致命的な肺合併症または悪性腫瘍とたいてい関連する。疾患は、3つの型の1つにおいて受け継がれる：常染色体優性、常染色体劣性または最も一般的

10

20

30

40

50

的な形態、X連鎖性劣性（D Cの原因である遺伝子が、X染色体の上に運ばれる）。この開示の方法を使用する疾患進歩の早めの診断及び測定は、筋肉増強剤または骨・髄刺激薬物での早期治療が骨髄不全を予防するのを補助することができるよう、これらの遺伝的特徴をもつファミリーに非常に有益である。本開示の非侵襲的、患者の親しみやすい唾液-試験方法は、乳児及び小さな子供が試験及び継続したモニタリングを必要とするので、D K Cについて特に有用である。

#### 【0150】

特発性間質性肺炎は、線維症及び炎症の組み合わせによる肺柔組織への損傷によって特徴づけられる。特発性肺纖維症（I P F）は、肺の進行性の瘢痕を生じさせるこれらの疾患の例である。纖維の瘢痕組織は時間とともに肺において蓄積し、十分な酸素を体に提供するこれらの能力に影響を及ぼす。テロメラーゼ遺伝子、T E R T 及びT E R Cのコード領域におけるヘテロ接合変異は、特発性間質性肺炎の家系性及び散発性の場合において見いだされた。突然変異をもつ全ての影響を受けた患者は、短いテロメアを有する。I P Fをもつ個体の有意な画分は、テロメラーゼにおいて突然変異をコードすることによって、説明されることができない短いテロメア長を有する（C r o n k h i t e , J . T . , et al , m . J . R e s p . C r i t . C a r e M e d . , 2 0 0 8 , 1 7 8 : 7 2 9 - 7 3 7 ）。したがって、テロメア短縮は、この年齢に関連した疾患に対して増加した素因のためのマーカーとして使用され得る（A l d e r , J . K . , et al , P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A , 2 0 0 8 , 1 0 5 ( 3 5 ) : 1 3 0 5 1 - 1 3 0 5 6 ）。さらに、I P Fの経過は、人により変化する。ある人びとについては、疾患は、長年にわたってゆっくり及び徐々に進行し得るが、その一方で、その他の人びとについては、それは迅速に進行し得る。存在する方法は、上記のように肺線維症の経過をモニターする、及び適切な介入性工程をとのに都合よく使用され得る。

#### 【0151】

再生不良性貧血は、骨髄が体に十分な赤血球、白血球及び血小板を作製するのを止める疾患である。骨髄が作製する任意の血液細胞は正常である、しかし、これらの十分な量がない。再生不良性貧血は、適度でありえ、重篤でありえ、または非常に重篤であり得る。重篤な、または非常に重篤な再生不良性貧血をもつ人々は、生命を脅かす感染症または出血のリスクにある。テロメラーゼ突然変異をもつ再生不良性貧血をもつ患者は、脊髄形成異常を発症する増加したリスクを有する。テロメラーゼ欠損は、造血幹細胞における不定の程度のテロメア短縮を生じさせ得るし、及び染色体不安定性及び悪性形質転換を導き得る（C a l a d o , R . T . a n d Y o u n g , N . S . , T h e H e m a t o l o g i s t , 2 0 1 0 ワールドワイドウェブU R L h e m a t o l o g y . o r g / P u b l i c a t i o n s / H e m a t o l o g i s t / 2 0 1 0 / 4 8 4 9 . a s p x ）。より短いテロメアをもつ再生不良性貧血患者は、より低い生存割合を有し、及びより長いテロメアをもつものより免疫療法後に再発する可能性が非常に高い。S c h e i n b e r g et al . (J A M A , 2 0 1 0 , 3 0 4 ( 1 2 ) : 1 3 5 8 - 1 3 6 4 ) は、テロメア長が増加するにつれて再発率が下がることを見いだした。また、最も短いテロメアをもつ患者の群は、骨髄癌への転換についてのより大きなリスクにあり、及び最も低い全生存割合を有した。本開示の方法は、個体の臨床管理がそれに応じて調整され得るように、再生不良性貧血患者において主要な合併症を発症するリスクをモニターするのに使用され得る。

#### 【0152】

##### 5 . 4 の薬物応答性

#### 【0153】

もう一つの態様において、本開示は、治療のモニタリング有効性において、またはテロメア長またはテロメラーゼ活性に影響を及ぼす薬物候補についてのスクリーニングにおいて有用である。テロメア特徴をモニターする能力は、特定の療法及び薬物の有効性を調べるためにウィンドウを提供することができる。個体における特定の療法に対する疾患状態

10

20

30

40

50

の薬物応答性は、本開示の方法によって決定され得る。たとえば、本開示は、細胞の増殖性潜在能力がテロメア統合性の維持に関するもので、癌療法の有効性をモニターすることにおける使用を見いだす。上記のように、正常なヒト体細胞がテロメラーゼを発現しない、または一過性にのみ発現する、及びしたがって、それぞれの細胞分裂でこれらのテロメアを短縮する一方で、大部分のヒト癌細胞は、典型的には高レベルのテロメラーゼを発現し、及び無制限の細胞増殖を示す。Roth et al. (同書, 2010) は、これらの腫瘍において非常に短いテロメア（大部分の細胞において最も短いテロメアが、テロメア機能不全に近い）及び高テロメラーゼ活性を有する癌をもつ個体が、抗癌テロメラーゼ阻害薬物から最も多く利益を得ることができることを示唆した。大部分の正常な細胞においてテロメラーゼが発現されない、または一過性に及び非常に低いレベルにて発現されるかのいずれかなので、テロメラーゼ阻害療法は、正常な細胞に対して従来の化学療法より毒性を少なくし得る。このような薬物の例は、短いオリゴヌクレオチドベースのテロメラーゼ阻害剤イメテルスタト (GRN163Lと以前に命名された) である。イメテルスタトは、第一世代のオリゴヌクレオチドGRN163の新規の脂質ベースの抱合体である (Asai, A. et al., Cancer Res., 2003, 63: 3931-3939)。しかし、正常な血液細胞（特にこれらの顆粒球）において非常に短いテロメアを有する癌患者は、骨髄などの増殖性組織におけるイメテルスタトの有害作用のより高いリスクにある。Rattain et al. (2008) は、短い顆粒球テロメア長をもつこのような被験体が、好中球減少または血小板減少などの骨髄不全症候を有する可能性がより高いことを見いだした。この状況において、医師は、イメテルスタトのより低い用量、異なる薬物または骨髄問題についてより頻繁にモニターすることを処方するかもしれない。

#### 【0154】

その他の態様において、老化の疾患、たとえば限定されながら、心臓血管疾患、糖尿病、肺線維症、肝線維症、間質性肺炎及び鬱病の治療における薬物有効性。心臓血管疾患の場合において、Brouillette et al. は、対照群より短いテロメア長をもつ中年の男性が、プラバスタチンで脂質を低くする療法から最も多く利益を得ると報告した (Brouillette, S. W. et al., Lancet, 2007, 369: 107-114)。Satoh et al. (Clin. Sci., 2009, 116: 827-835) は、集中的な脂質・低下療法が、適度なプラバスタチン療法で治療された患者と比較したときに、アトルバスタチンで治療された患者においてより優れて浸食からテロメアを保護したことを見いだす。本開示の方法は、治療された患者におけるスタチンの有効性をモニターするのに使用され得るし、短いテロメア長は、より優れた薬物有効性と関連づける。最も長いテロメアをもつ被験体が予防的スタチンから平均の利益を得なかったので、医師は、患者が特にこれらの治療プログラムの部分として優れた生活様式習慣に従順であることを示唆するかもしれない。逆に、慢性のスタチン使用の副作用を恐れる短いテロメアをもつ患者は、スタチンから利益を得るこれらのより高い確率に基づいてスタチンを摂取するよう説得されるかもしれない。使用され得るスタチンの例は、ナイアシン (ADVICOR, SIMCOR)、ロバスタチン (ALTOPREV, MEVACOR)、amlopidine (CADUET)、ロスバスタチン (CRESTOR)、シタグリプチン / シンバスタチン (JUVISYNC)、フルバスタチン (LESCOL)、プラバスタチン (PRAVACHOL)、アトルバスタチン (LIPITOR)、ピタバスタチン (LIVALO) 及びエゼチミベ / シンバスタチン (VYTORIN) を含む。

#### 【0155】

さらなる態様において、テロメア疾患、たとえば先天性角化異常症、肺線維症及び再生不良性貧血の治療における薬物有効性は、測定され得るが制限されない。たとえば、先天性角化異常症及び肺線維症の両方は、高用量ステロイドで治療され、それは多数の有害な副作用を有することが周知である。したがって、最も少ない可能性のステロイド用量の使用は、本開示の方法をこれらの患者をモニターするための有益なツールとして、高度に望

ましい。

【0156】

5.5 薬物候補スクリーニング

【0157】

もう一つの態様において、本開示は、候補薬物、栄養補助食品及びテロメラーゼ活性などのテロメア長を調節する生物学的経路に影響を及ぼす生活様式変化を含むその他の介入についてのスクリーニングの一般的な方法としての使用を見いだす。定量的様式においてテロメア反復を迅速に及び特異的に増幅する能力は、細胞におけるテロメア動態に影響を及ぼす小分子、候補核酸及びペプチド薬剤及びその他の産物または介入を同定するための高スループットスクリーニング方法を提供する。正常な細胞における正の、テロメアを長くする効果を有する薬物またはその他の産物候補は、変形性またはテロメア短縮（またはテロメラーゼ阻害）効果をもつものにおいて細胞老化関連の症状の治療において好ましい、他の全てが同等であるだろう。癌の治療の場合において、特に癌細胞における負のテロメア短縮効果を有する薬物は、好ましいだろう。10

【実施例】

【0158】

実施例1 短いテロメア配列の増幅

【0159】

ここで、我々は、短いテロメアの割合を測定するための精製したゲノムDNAを使用する定量的PCRに基づいた方法を記述する。この方法は、非ヒトプライマー「Teloprimer」の非共有結合を脊椎動物のゲノムDNAの3'オーバーハングに、伸長反応の間にテロメアのC-鎖を置換する、または分解する酵素をもつサブテロメア独特の配列「SUS」の方への時間制御されたTeloprimerの伸長を組み込み、その後にSUS及びTeloprimerの非ヒト配列部分を利用する増幅反応が続く。伸張Teloprimer産物がSUS配列に到達するように、十分に短いテロメアのみを増幅する。したがって、鎖置換反応の制御されたタイミングは、テロメア長の特定された閾値より短いテロメアの検出を可能にする。加えて、SUS及びTeloprimer AnchorプライマーによるPCR工程において伸長時間を制御することにより、短いテロメア集団は、さらに短いテロメアを測定するこのアッセイの特異性を増加させて、選択的に増幅されるだろう。20  
短いテロメアの存在量をTelotestのTrunにおいて定量化する。30

【0160】

材料及び方法

【0161】

プライマー

【0162】

全てのプライマーを標準的な脱塩された、またはHPLC精製された形でIntegrated DNA Technologiesから購入した。プライマーの配列を下に収載した：

Teloprimer : 5' - T G C T C G G C C G A T C T G G C A T C C C T A A  
C C - 3' [配列番号：7] 40

TeloAnchor : 5' - T G C T C G G C C G A T C T G G C A T C - 3' [配列番号：8]

SUS (HPLC精製された) : 5' - G A T G G A T C C T G A G G G T G A G G G  
T G A G G G - 3' [配列番号：2]

TeloProbe (HPLC精製された) : 5' - C C C T A A C C C T A A C C C  
T A A C C C T A A - 3' [配列番号：9]

【0163】

ゲノムDNAに対するTeloprimerのアニーリング

【0164】

ヒトゲノムDNAを50uL反応中20ng/uL DNA 及び1uM Telop

50

r i m e r の最終濃度にて Tel o P r i m e r と混合し、加熱ブロックにおいて10分間65°にてインキュベートし、及び次いで1時間の期間にわたって室温まで冷却した。アニールされた試料を鎖置換反応まで氷において保存する。

#### 【0165】

##### 鎖置換

#### 【0166】

鎖置換反応を50ngのアニールされたDNA、40mM Tris-HCl、pH 8.0、10mM MgCl<sub>2</sub>、50mM NaCl、5mM DTT (PN 70726, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)、100ug/mL BSA (Cat# B9001 S, New England Biolabs, Ipswich, MA)、500uM dNTP (Cat# 1708874, Bio-Rad, Hercules, CA)、5uM Single Strand Bindingタンパク質 (SSB, Cat# 70032Y 100 UG, Affymetrix, Santa Clara, CA) 及び400nM Sequenase 2.0 (cat # 70775Y 200 UN, Affymetrix, Santa Clara, CA) (Sequenaseの濃度は13U/uLである)を伴う5uL容積において実施した。Sequenase 2.0無しの混合物を1分間37°にて予熱し、及び次いでsequenase 2.0が混合物に添加された後に30秒~10分間37°にてインキュベートした。反応を20分間80°にて熱失活によって止めた。

10

20

#### 【0167】

##### 鎖置換産物のPCR増幅

#### 【0168】

鎖置換DNA反応からの産物をDNA懸濁緩衝液 (Cat# T0227, Teknova, Hollister, CA) 中に50倍に希釈した。PCRを1.5mM MgCl<sub>2</sub>、300uM dNTP (Cat# 1708874, Bio-Rad, Hercules, CA)、0.5uM SUSプライマー、0.5uM Tel o Anch orプライマー、2uL希釈DNA、5ユニットPLATINUM Taqポリメラーゼ (Cat # 10966-083, Life Technologies, Grand Island, NY) を含む40uL反応容積において実施した。

30

#### 【0169】

サイクリングプログラムは、以下のとおりである：94°にて2分、94°にて15秒の35サイクル、65°にて30秒、72°にて30秒~10分、続いて72°にて10分の延長であった。PCR反応をBio-Rad C1000 Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA)において実施した。

#### 【0170】

##### Tel o Testによる増幅されたPCR産物の定量化

#### 【0171】

PCR産物をDNA懸濁緩衝液中に10~1000倍希釈した。TELOTESTのTrunをPCR産物を定量化するのに使用した。60~600bpの完全なテロメア反復の間に含むPCR断片をそれぞれの試料のDNA濃度を算出するのに標準的なように使用した。TTAGGG3'オーバーハング及び5'の近くのSUS配列をもつ約2kb DNA断片の内標準は、置換反応からqPCR工程へのそれぞれの試料に含まれるだろう。それぞれの試料の反応効率は、内標準内で非ヒト配列のqPCRによって測定されるだろう。それぞれの試料のための規準化因子は、反応効率に基づいて生成されるだろう。

40

#### 【0172】

##### サザンプロット

#### 【0173】

サザンプロット解析を置換されたテロメアDNAのサイズを確認するために実施した。SUS 及びTel o Anch orプライマーによって増幅された鎖置換産物を0.5%

50

アガロースゲル上で実行し、正に荷電した *Nylon* 膜へ移し、及び 4 つの T T A G G G 反復をもつ D I G 標識されたオリゴプローブに 37<sup>10</sup> にて一晩ハイブリダイズした。化学発光検出をシグナル検出のために使用した。

#### 【0174】

結果

#### 【0175】

全体のスキーム

#### 【0176】

ここで記述される短いテロメアアッセイ ( S T A ) は、定量的 P C R が後に続く鎖 - 置換または鎖分解によって、ヒトゲノム D N A 試料における短いテロメアの量を定量化する。アッセイの全体のスキームを図 1 に図示する。<sup>10</sup>

#### 【0177】

アッセイをヒトゲノム D N A への第 1 のアニーリング T e l o P r i m e r によって実施した。 T e l o P r i m e r は、 5' 末端にて非ヒト配列の 19 のヌクレオチド及び 3' 末端にてテロメア配列の 8 のヌクレオチドを含む。天然ゲノム D N A を使用することは、 T e l o P r i m e r が二本鎖領域でないテロメアの 3' 一本鎖テール ( オーバーハンギング ) にのみアニールするだろうことを保証する。 T e l o P r i m e r の伸長は、鎖置換または鎖分解反応によって達成される。限られた時間で、反応は、短いテロメアをもつこれらの染色体上のテロメア変異領域に到達することができるのみだろうが、その一方で、長いテロメアをもつ染色体上で鎖 - 置換された産物は、完全なテロメア反復領域内で止まるだろう。次いで、置換された短いテロメアを S U S プライマー及び T e l o A n c h o r プライマーで P C R によって濃縮する。 S U S プライマーは、サブテロメア領域及び真のテロメア反復の間の接合部で、またはその近くで、テロメア変異領域において大部分の染色体上で見つけられる T G A G G G 配列の 3 つの反復を含む。 T e l o A n c h o r プライマーは、 T e l o P r i m e r と同じ非ヒト配列を共有し、及びテロメア配列を含まない。 S U S 及び T e l o A n c h o r の一対は、鎖 - 置換された短いテロメアを特異的に増幅するようにデザインされている。最後に、 T E L O T E S T T - r u n を短いテロメアの量を定量化するために使用する。<sup>20</sup>

#### 【0178】

鎖置換産物の定量化

#### 【0179】

鎖置換增幅は、遭遇する下流の D N A が合成の間にポリメラーゼによって置換される D N A 合成反応である。全ゲノム增幅及び法医学的分析を含む多くのプロトコルは、鎖置換を使用して微量の鑄型 D N A を増幅する。 D N A ポリメラーゼの鎖 - 置換活性のため、二ツクまたは一本鎖テールをもつ D N A を変性工程なしで鑄型として使用することができる。我々は、テロメアの一本鎖テールが鎖 - 置換酵素のために天然鑄型として役に立つ、及び i n t e r s t i a l テロメア様配列の非特異的増幅を生じさせ得るゲノムにおけるギャップを作製する 5' - 3' エキソヌクレアーゼ ( 分解酵素 ) ほど可能性が高くないので、我々の実験計画において鎖 - 置換酵素を使用することを選択した。天然のゲノム D N A 上のテロメアの一本鎖テールに対する T E L O P R I M E R のアニーリングは、 C - 鎖の 5' 末端に隣接して T e l o P r i m e r を置く ( 図 1 ) 。このデザインにおいて、鎖 - 置換された産物の長さは、テロメアの長さを正確に反映するだろう。鎖 - 置換時間を制御することによって、反応は、短いテロメアをもつこれらの染色体上のテロメアに変異領域にのみ到達することができるだろう。我々は、高特異性及び処理能力をもつ直鎖状の鑄型上で D N A を合成することが報告されているため ( Joneja , A. and X. Huang , Anal Biochem , 2011 . 414 ( 1 ) 58 - 69 ) 、 Sequenase 2.0 、エキソヌクレアーゼ活性のない T 7 D N A ポリメラーゼの遺伝子改変の形態を使用することを選択した。我々は、鎖置換反応が 30 秒 ~ 5 分かかった時間経過実験を行った。膀胱癌株化細胞 U M - U C 3 からのゲノム D N A を T e l o P r i m e r にアニールして、及び鎖 - 置換反応を材料及び方法に詳述されるように行  
<sup>40</sup>  
<sup>50</sup>

った。

#### 【0180】

図2は、増加した鎖置換反応時間をもつTELOTEST qPCRのT-runによって測定される増加したテロメア産物を示した。直線状の回帰直線は、時間増幅産物の存在量の間の強力な関係を示した( $R^2 = 0.99$ )。さらにまた、負の対照において、Sequence 2.0が添加されなかった場合、PCR産物は、Sequence 2.0を含む反応の最低測定濃度より159倍低いTELOTEST T-run(クロッシングポイント(Cp) = 25、算出濃度1.85E-07)において検出されなかつた。また、TELOTEST S-runにおける単一のコピー遺伝子(ペータグロビン)プライマーを使用する平行反応は、増幅産物を示さず、T-runにおいて測定されるテロメア産物が総ゲノムDNAからでなく、鎖-置換反応に由来することをさらに確認した。  
10

#### 【0181】

我々がここで提唱する実験計画は、短い置換反応時間で、短いテロメアからの産物のみがSUS及びTelomanchorプライマーで増幅されるだろうと予測した。我々は、サザンプロット解析によってこれを確認するために探求した。SUS及びTelomanchorプライマーによって増幅された鎖置換産物を0.5%アガロースゲル上で実行し、正に荷電したNylon膜へ移して、4つのTTAGGG反復をもつDIG標識されたオリゴプローブにハイブリダイズした。図3は、増幅されたPCR産物の長さが増加する鎖置換時間と共に増加することを示す。PCR産物の測定されたモード(強度のピーク)は、それぞれ0.5分、1分、3分及び5分の置換時間で、およそ0.6kb、0.9kb、1.2及び1.4kbである。1分の置換時間で、産物の大部分は、2kb以下である。独立した比較テストにおいて、我々は、修飾された単一のテロメア伸長の長さの解析(STELA)(Baird, D.M., et al., Nat Genet., 2003. 33(2) 203-7)プロトコルを使用して、同じ癌細胞系統UM-UC3から総ゲノムDNAのテロメア長プロフィールを解析した。Teloprimerは、C鎖の5'末端に連結され、及びXpYPE2及びTelomanchorプライマーをテロメアを増幅するのに使用した。PCR産物をゲル上で実行した(図3においてレンジ1)。これは、UM-UC3テロメアのモードが以前の報告と一致して、約1.8kbであることを明らかにした(Xu, L. and E.H. Blackburn, Mol Cell, 2007. 28(2) 315-27)。  
20  
30

#### 【0182】

短いテロメアアッセイをさらに確認するために、我々は、2つの異なるゲノムDNA試料でこのアッセイを実施した。UM-UC3 DNAに加えて、我々は、テロメラーゼhTERのRNA遺伝子を発現するレンチウイルスベクターによって感染されたUM-UC3からのゲノムDNAを使用し、テロメアの伸長を生じた(Xu, L. and E.H. Blackburn, Mol Cell, 2007. 28(2) 315-27)。UM-UC3/hTERにおけるqPCRによって測定された平均テロメア長は、UM-UC3についての0.56と比較して2.1である(Telome Health Inc. data)。UM-UC3/hTER細胞は、サザンプロット解析によって判断されるように(図5)、短いテロメアのより低い割合を有する。これと一致して、UM-UC3における短いテロメアの計算された量は、UM-UC3/hTERと比較して3倍高い(図4)。  
40

#### 【0183】

我々は、短いテロメアアッセイが短いテロメアの相対的な割合を特異的に測定すると結論する。さらにまた、鎖置換反応時間を制御することによって、このアッセイにおいて測定されるだろうテロメア長カットオフは、異なることができ、及び予め決定されることがある。

#### 【0184】

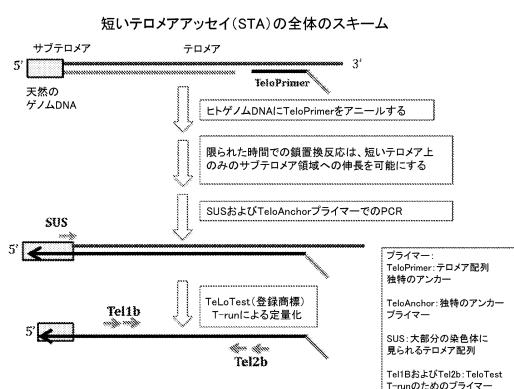
上で言及された短いテロメアアッセイは、自動化された高いスループットフォーマット  
50

に容易に適応することができる。図6は、このようなフォーマットにおける個々の工程を示す。

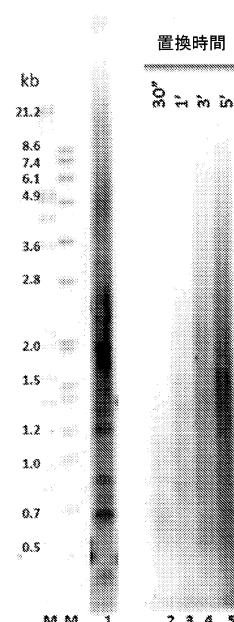
### 【0185】

本発明の好ましい態様が本明細書において示され、及び記載された一方、このような態様が例としてのみ提供されることは当業者にとって明らかだろう。多数の差異、変更及び代用は、ここで本開示を逸脱しない範囲で当業者に生じるだろう。本明細書において記述した本発明の態様の種々の選択肢が本発明の実施において使用されてもよいことを理解すべきである。以下の請求項が本発明の範囲を定義し、及びこれらの請求項及びこれらの同等のものの範囲内で方法及び構造がこれによりカバーされることが意図される。

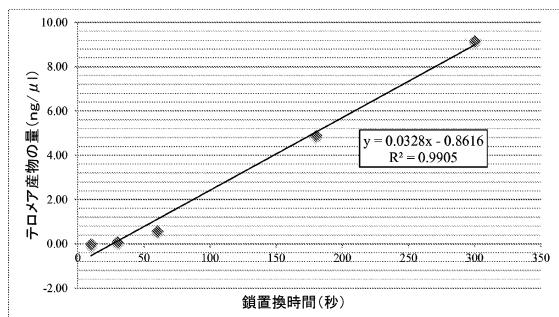
【図1】



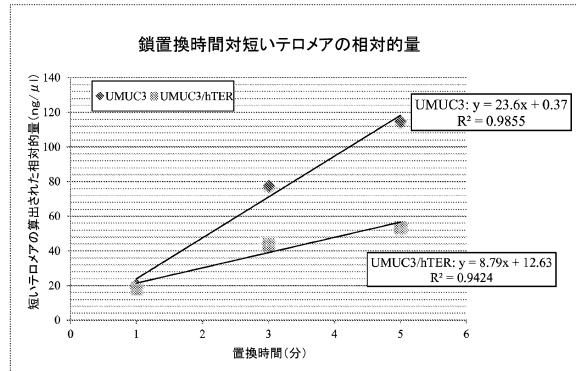
【図3】



【図2】



【図4】



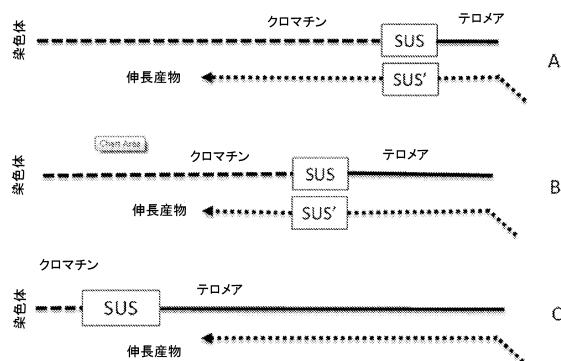
【図6】

工程	解説	自動化またはマニュアル
アニーリング	1.1.gDNAをビペットで取り、TeloPrimerおよび水と混合する	自動化
	1.2.10分間65°Cにてインキュベートし、ゆっくりと冷却した	
鎖置換	2.1.マスターをビペットで取り、Sequenase 2.0/SSB/緩衝液と混合する	自動化
	2.2.gDNAをビペットで取りおよび混合する	自動化
	2.3.プレートをシールする	マニュアル
	2.4.3分間37°Cにてインキュベートする	マニュアル
	2.5.20分間80°Cにプレートを移す	マニュアル
SUSおよびTELOANCHORでのPCR	3.1.低いEDTA Trisで工程2.5からの試料を希釈する	自動化
	3.2.PCRマスターをビペットで取り、新しい96ウェルプレートの中に混合する	自動化
	3.3.工程3.1からの希釈したDNAを工程3.2からの96ウェルプレートにビペットで移す	自動化
	3.4.両方のプレートをシールする	マニュアル
	3.5.PCRプレートをThermocyclerに移す	マニュアル
	3.6. PCR	
TELOTEST	4.1.工程3.6からのPCR産物を低いEDTA Trisで希釈する	自動化
	4.2.4.1からの希釈された試料でTeloTest(登録商標)のT-runを実行する	自動化

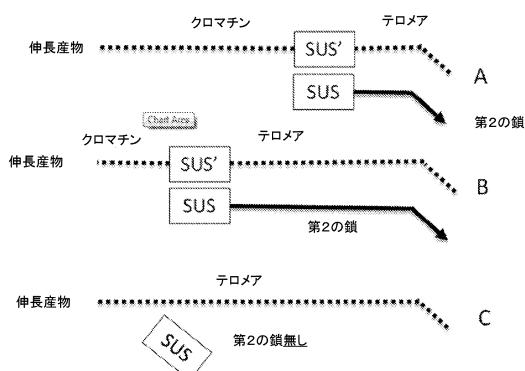
【図5】

短いテロメアの割合	UMUC3	UMUC3/hTER
サザンプロット(0.2-5Kb)	75%	26%
短いテロメアアッセイ	100%	33%

【図7 A】



【図7 B】



【配列表】

0006546158000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 ハーレー カルヴィン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95247 マーフィーズ サンダルウッド ドライブ 1  
177

(72)発明者 リン ジュエ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスター シティ カリナ レーン 887

(72)発明者 フー ヤージン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95118 サンノゼ ブロッサム ヒル ロード 156  
4

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特表2005-515778 (JP, A)

EMBO J., 2004年, Vol.23, pp.2304-2313

Nucleic Acid Res., 2009年, Vol.37, e21

Nucleic Acid Res., 2002年, Vol.30, e47

PNAS, 2007年, Vol.104, pp.5300-5305

Genome Biol., 2010年, Vol.11, R9

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q

C12N

CAPLUS / WPIIDS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)