

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-202552

(P2007-202552A)

(43) 公開日 平成19年8月16日(2007.8.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 27/447 (2006.01)	G O 1 N 27/26 3 1 5 F	

審査請求 未請求 請求項の数 32 O L 外国語出願 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2006-336023 (P2006-336023)	(71) 出願人	506413937
(22) 出願日	平成18年12月13日 (2006.12.13)		アンスティテュート キュリー
(31) 優先権主張番号	05027186.5		フランス国, 7 5 2 4 8 パリ セデック
(32) 優先日	平成17年12月13日 (2005.12.13)		ス O 5, リュ ダルム 2 6
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人	500531141
			セントレ・ナショナル・デ・ラ・レシエル
			シェ・サイエンティフィック
			フランス・F-7 5 0 1 6・パリ・リュ・
			ミッシェル・アンジュ・3
		(74) 代理人	100085545
			弁理士 松井 光夫
		(72) 発明者	ジャンールイ ビオビー
			フランス国, 7 5 0 1 3 パリ, リュ ド
			レスペランス 2 6
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸における点変異及び／又は大規模変更をアッセイするための方法及び組成物、並びに遺伝疾病及び癌の診断におけるそれらの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 少なくとも1つの核酸フラグメントに関する点変異及び／又は大規模変更を検出するための方法の提供。

【解決手段】 第1の核酸フラグメントと、該核酸フラグメントと区別可能であり且つ量的参照としての役割を果たす第2の核酸フラグメントとを含むかもしれないサンプルを用意し、該核酸フラグメントを変性し、ホモデュプレックス及び起こりうるヘテロデュプレックスを含む産物を得るために適切な条件において、それらを再アニーリングし、第1の核酸フラグメントの存在するデュプレックス形を識別する信号の強度を、第2の参照核酸フラグメントから得られた信号の強度と比較すること等を含む方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの核酸フラグメント（以下、第 1 の核酸フラグメントと言う）に関する点変異及び／又は大規模変更を検出するための方法であって、

a. 前記第 1 の核酸フラグメントと、前記第 1 の核酸フラグメントと区別可能であり且つ量的参照としての役割を果たす少なくとも第 2 の核酸フラグメントとを含むかもしれないサンプルを用意すること、

b. 前記核酸フラグメントを変性し、そしてホモデュプレックス及び起こりうるヘテロデュプレックスを含む産物を得るために適切な条件において、それらを再アニーリングすること、

c. 前記第 1 の核酸フラグメントの存在するデュプレックス形を識別する信号の強度を、前記第 2 の参照核酸フラグメントから得られた信号の強度と比較することによって、前記第 1 の核酸フラグメントの既存のデュプレックス形を識別する信号及び前記第 1 の核酸フラグメントについての相対的量データを少なくとも得るために適切な分析方法を前記再アニーリングされた産物に対して実行すること、及び

d. 工程 c において得られた相対的量データを、大規模変更がその中に存在しない第 1 の核酸フラグメントについて予想される対照相対的量データと比較すること、

からなる工程を少なくとも含む方法。

【請求項 2】

工程 c において得られた前記第 1 の核酸フラグメントからの信号の形状の分析を含む追加工程 e を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記追加工程 e が、前記第 1 の核酸フラグメントからの信号の形状を、前記第 1 の核酸フラグメントの非変異形に等価である前記第 1 の核酸フラグメントの形に工程 a ～ c を適用することによって得られる信号の形状と比較することによって実行される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプルが、1 より多い第 1 の核酸フラグメントを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の及び前記第 2 の核酸フラグメントの少なくとも幾つか又は全てが、少なくともそれらの個々の長さによって互いに異なっている、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

異なる長さのフラグメント間の前記長さ差が少なくとも 1 である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

第 1 の及び第 2 の核酸フラグメントの幾つか又は全てが、少なくとも別個のマーカーによって互いに区別可能である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 2 の参照核酸フラグメントが、前記第 1 の核酸フラグメントを含むかもしれないサンプル中に天然に存在する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 2 の参照核酸フラグメント及び前記第 1 の核酸フラグメントが、2 つの別個の遺伝子から得られる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 2 の参照核酸フラグメント及び前記第 1 の核酸フラグメントが、同じ遺伝子から得られる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 2 の参照核酸フラグメントが、前記第 1 の核酸フラグメントを含むかもしれない

10

20

30

40

50

サンプル内に、前記サンプル中に存在する核酸の総量に対して所定の量で取り込まれる、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

第 1 の核酸フラグメント及び第 2 の参照核酸フラグメントの増幅を少なくとも含む追加工程 f をさらに含み、前記工程 f が工程 b の前に実行される、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記増幅が非飽和条件で実行される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記増幅が半定量的増幅である、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

工程 b が P C R 又は R T - P C R によって実行される、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

P C R 又は R T - P C R が、2 2 ～ 2 7 の範囲である増幅サイクルの数を含む、請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

P C R 又は R T - P C R が、 $n_i - 7 \sim n_i + 2$ の範囲である増幅サイクルの数を含み、 n_i は増幅曲線の変曲点に対応するサイクルの数である、請求項 1 2 ～ 1 4 又は 1 6 に記載のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記工程 f がローリングサークル増幅又は N A S B A によって実行される、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記工程 c が非変性条件において実行される、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

個々の分析方法が、電気泳動、クロマトグラフ又は質量スペクトル法から選択される、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

30

前記個々の分析方法が、キャピラリー又はマルチキャピラリー電気泳動である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記電気泳動分析が分離培地の使用を含む、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

分離培地が絡み合ったポリマーの溶液である、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記分離培地が、アクリルアミド、メタクリルアミド又はアクリルアミド誘導体の架橋化された又は架橋化されていないポリマーを含む、請求項 2 0 又は 2 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 5】

前記分離培地が、アクリルアミド及びジメチルアクリルアミドのブロックコポリマーを含む、請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記分離培地が、ヌクレオチド A、T、G、C の一つと特異的な塩基対相互作用を受ける少なくとも 1 つの化合物をさらに含み、前記化合物は前記分離培地において少なくとも 1 g / l の濃度である、請求項 2 2 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

工程 c、d 及び／又は e が自動化されたソフトウェアによって実行される、請求項 1 ～

50

26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法を含む、癌への素因の診断のための方法。

【請求項29】

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法を含む、癌診断のための方法。

【請求項30】

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法を含む、遺伝疾病の診断のための方法。

【請求項31】

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法を含む、治療のための新しい目標を発見するための又は治療の効率性をスクリーニングするための方法。

10

【請求項32】

請求項1～27のいずれか一項に記載の方法を含む、疾病又は病理状態のための新しいバイオマーカーを発見するための方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ゲノミクスにおける最近の発展は、ヒトの健康及びバイオテクノロジーにおける改良のためにかんがりの望みをもたらしている。

【0002】

医薬において、例えば遺伝疾病及び癌の理解及び診断又は感染性有機体の研究は、DNA及び核酸の分析にますます依存する。

20

【0003】

バイオテクノロジーはまた、分子遺伝及び核酸高スループット分析にますます依存している。特に、個体間の遺伝的差のマッピングは、法医学調査、医薬応用、バイオテクノロジー及び食品産業について重要性を増している。

【0004】

例えば、異常タンパク質をもたらす変異を検出することは、疾病の遺伝起源を識別するために必須でありうる。多くの遺伝した病理状態が、DNAの構造分析の方法を使用して、症状の兆候前に診断されうる。癌研究において、例えば、乳癌を進展することの可能性において強い増加をもたらすことを認識するBRCA1及びBRCA2遺伝子における変異の探索が、大規模で今実行される。遺伝子APCがまた、結腸直腸癌への強い素因をもたらすことが知られている。遺伝スクリーニングがまた、多くの遺伝疾病について、初期に又は実に子宮において実行されうる。現在、700個の遺伝疾病が識別され、その中にセラセシア及びミオパシーがある。

30

【0005】

後天性の遺伝的疾患の識別及び詳細な分析（例えば、特に癌において生ずるそれら）がまた、腫瘍の「遺伝マッピング」によって、より有効な及び個人化された治療のための望みをもたらしている。変異及び遺伝的変異性の大规模遺伝スクリーニング（「遺伝子型特定」ともよばれる）がまた、薬理遺伝的アプローチにおける治療のための新しい目標を見つけるために、疾病及び遺伝子間の相関を決定するために最高に重要である。

40

【0006】

遺伝スクリーニングがまた、医薬品、食品産業、獣医又は生物テロ応用における特定の病原種の識別を含む病原体を検出するために使用されうる。例えば、食品産業において、出発原料又は食材における遺伝的に改変された有機体「GMO」の検出は、高まる関心事である。

【0007】

疾病機構に関係する変異は、点変異（単一の塩基置換、又は塩基対の一つ若しくは数十の小さな挿入又は欠失）又は大きな染色体再配列でありうる。

【0008】

それ故に、正確な、再現可能な及び信頼可能な様式において、非病理状態（野生型）に関

50

連する遺伝子に関して変異を検出するための又は遺伝子の異なる対立遺伝子を識別するための方法論の必要性が存在する。

【0009】

DNA分子は、ヌクレオチドと呼ばれるサブユニットの直線状ポリマーである。各ヌクレオチドは、フォスフェート基によって隣接ヌクレオチドの糖に連結される共通の環状糖分子と、塩基と呼ばれる異なる環状置換基の一つとを含む。該糖及び塩基の組み合わせは、ヌクレオシドと呼ばれる。天然起源からのDNAにおいて共通に見つけられた4つの塩基は、アデニン、グアニン、シトシン及びチミジン（本明細書で以下、A、G、C及びTと夫々呼ばれる）である。個体のDNAにおけるこれら塩基の直線配列は、その「ゲノム」である。それは、タンパク質の合成のための情報を生み出すコード領域、遺伝子発現の制御のための領域、及びその役割が完全に理解されていない所謂「非コード」領域を含む。 10

【0010】

二重鎖DNA（全ての細胞有機体の染色体におけるDNAによって適用される形状）において、2つのDNA鎖は内側へ配向された塩基を有する正確な螺旋状配位において絡まれ、反対の鎖からの塩基間の相互作用を可能にする。2つの鎖は、塩基の特定の対の構造の相補性によって塩基間に許容される水素結合によって主に、正確な配列において互いに保たれる。この構造相補性は、化学的性質及び塩基の各々についての置換の位置によって決定され、水素基の一定の数及び配向を特にもたらず。従って、二重鎖DNAにおいて、通常一つの鎖上の各Aは、反対の鎖からのTと好相互作用を有し（2つの水素結合を含む）、及び各Gは、反対のCと好相互作用を有する（3つの水素結合を含む）。基本的に、それらは、DNA分子が複製され、そして正確なコピーが細胞複製の間（有糸分裂）に細胞子孫へ、或いは複製が生殖体に関係する場合（減数分裂）に、個体の子孫へ伝えられることを保証する。 20

【0011】

時折、不正確な塩基対が複製の間に生じることがあり、それは新しい鎖の更なる複製後に、親DNA分子のそれから1以上の塩基の欠失、挿入又は置換のような遺伝性の塩基相違を含む配列を有する二重鎖DNA子孫をもたらず。そのような遺伝性の変化は、遺伝変異、又はより特には本件の場合、「点変異」と呼ばれる。遺伝変異のマッピングは、実質的に同一の（すなわち相同性の）塩基配列を含むDNA分子間の配列相違と、また比較される分子における配列の幾つかのサブセット内にそれらの相違の物理的局在との両方の検出を含む。DNA配列における変化がまた、非コード領域に影響しうる。特に、高い変異性、例えば短鎖縦列反復配列(short tandem repeat: STR)又は1塩基ヌクレオチド多型(SNP)が、非コード領域において存在することができ、及び遺伝子型特定において非常に有用である。 30

【0012】

点変異、特に置換を検出することは、特に挑戦的である。なぜならば、それらは非常に局在化され、そして多くの発生において、それらの位置は前もって知られることができないからである。実際に、疾病に関連付けられた多くの変異について、変異の正確な位置は実験的に知られていず、そして（塩基の数千又は数万を一般に表す）遺伝子の全コード配列が完全にスクリーニングされていなければならない。時折、幾つかの大規模変更がまた現れうる。最近の研究は、長さにおいて数キロ塩基から数メガ塩基までの特定のゲノムセグメントの再配列による疾病のグループを明らかにした。再配列が一般に1キロ塩基より多いに関与する場合、標準PCRに基づく技術は、そのような変異の検出に適していない。 40

【0013】

点変異を検出するための現在で最も顕著な技術は、配列決定及び変成HPLCである。

【0014】

手法「ダイレクトシーケンシング」において、全遺伝子が、各患者について全体として配列決定されるが、費用のかかる方法である。加えて、ヘテロ接合体(heterozygosity)の存在のために、変異された患者配列は「純粋」でなく、そしてデータの解釈は慣用のシーケンシングについてほど直接的でない。最も重要なことに、全遺伝子及び隣接領域がスクリ 50

ーニングするための各患者又は個体について完全に配列決定されなければならない故に、この方法は長く且つ費用がかかる。遺伝子又は遺伝子の一部の欠失又は複製は、この方法で検出されえない。

【0015】

「変性条件のグラジエントにおけるクロマトグラフィー」(DHPLC)は、ホモデュプレックスからヘテロデュプレックスの分離に基づく(Oefner PJ, Underhill PA. 1995年. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). Am. J. Hum. Genet. 57:S: A266)。遺伝子の位置を含むDNAフラグメントがPCRによって増幅される場合、両遺伝子が増幅される。該増幅されたDNAが変性され、次にゆっくりと復元され、4個の異なる種類の複製DNAが得られうる：すなわち、2つの初期の対立遺伝子(通常のもの及び変性されたもの)のDNAに対応する2つのホモデュプレックス、及び一つの対立遺伝子からの一つの鎖を、他の対立遺伝子からの(ほとんど)相補的な鎖と混合する2つのヘテロデュプレックス。これらヘテロデュプレックスは、変異の位置で、ミスマッチ「バブル」を含む。これらミスマッチ「バブル」は、DHPLCによって探索されうる。復元された(ホモデュプレックス及び、関連する場合、ヘテロデュプレックス)DNAはHPLCカラム上で吸着され、そしてDNAの変性(それはヘテロデュプレックスについてわずかに初期に生じる)は、DNAの遊離、及びカラムの出口での検出をもたらす(例えば、Wagner, T., Stoppa-Lyonnet, D., Fleischmann, E., Muhr, D., Pages, S., Sandberg, T., Caux, V., Moeslinger, R., Langbauer, G., Borg, A., Oefner, P., Genomics, 1999年, 第62巻, 第369~376頁を参照)。しかしながら、DHPLCの一連の性質(それは一度に一つのサンプルのみを分析しうる)のために、大きい遺伝子がスクリーニングされなければならない場合、DHPLCの全工程は長い。その上、この方法は、大規模変更の検出を可能にしない。

10

20

30

40

50

【0016】

点変異の検出のために使用される他の方法、例えば一本鎖高次構造多型(single strand conformation polymorphism : SSCP)(Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989年. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A 第86(8)巻: 第2766~70頁)、化学開裂(Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD. 1988年. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 第85(12)巻: 第4397~401頁)及びダイレクトシーケンシングも、大きな再配列を検出しえない。

【0017】

大規模変更に関して、現在で最も顕著な技術は、多重化半定量的(multiplexed semi-quantitative)PCRに基づく。

【0018】

PCR増幅は、幾つかの段階に分解されうる。第1の段階の間(dNTP及びプローブが過剰であり、DNAポリメラーゼ活性が高い)、増幅は 2^n に近い増幅速度で指数関数的である。次に、この増幅速度が減少し、新しいDNAの生成が飽和し、そして停滞に到達する。該PCRの指数関数的部分においてとどまるために、当業者はPCRサイクルの数を制限しなければならない(すなわち、非飽和条件においてPCRを実行する)。全体として、総DNA量は、S字状曲線を与える。

【0019】

PCRサイクルの数がこのS字状の速く増加する領域においてとどまることを制限される場合、所定の数の増幅サイクル後のフラグメントのコピーの最終数は、コピーの初期数に強く依存する。より特には、それは、コピーの初期数におよそ比例的である。2以上のDNAフラグメントはPCRで同時に増幅されうる。これは、多重PCRと呼ばれる。従って、最終サンプルにおいてこれら2つのフラグメントのコピーの最終数を比較することによって、初期DNA濃度を相対的に数値化することが可能である。

【0020】

少なくとも2つの所定のピーク間のバンド強度の比を比較することによって、大きな複製又は欠失の存在を決定することが可能である。実際、通常の患者は、ある比をもたらすだろう遺伝子又は遺伝子の部分の2つの通常のコピーを有するだろう。遺伝子又は遺伝子の部分の欠失を有する患者は、遺伝子又は遺伝子の部分の一つの通常のコピーのみを有し、それは通常の患者よりも2倍低い比をもたらすだろう。最終的に、遺伝子又は遺伝子の部分の複製を有する患者は、遺伝子又は遺伝子の部分の3つの通常のコピーを有し、次に通常の患者よりも1.5倍高い比をもたらすだろう。遺伝子の多重複製がある場合、該比は1.5よりも高くありうる。

【0021】

「多重ライゲーション依存プローブ増幅」(MLPA) (Schouten JP, McElgunn CJ, Waaij R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002年. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 第30(12)巻:e57) は、特定のDNAプローブの半定量PCRに基づく。2つの近接部位にハイブリダイズするDNAプローブのカップル(couples)が使用される。該プローブの一つは、DNA上にハイブリダイズしない且つ遺伝子の研究された部分に依存するサイズ依存配列を有する。該プローブの一つは、PCRプライマーに相補的であるその3'末端で特異的配列を有する。他のプローブは、他のPCRプライマーに相補的であるその5'末端で特異的配列を有する。プローブの幾つかのカップルが、同時に使用されうる。プローブハイブリダイゼーション後に、特定の酵素、リガーゼが、2つの隣接プローブ間でライゲーションを作るために使用される。複製又は欠失のない遺伝子の部分は、2つのライゲーションされたプローブカップルの形成をもたらすだろう。複製を有する遺伝子の部分は、3つのライゲーションされたプローブカップルの形成をもたらすだろう。欠失を有する遺伝子の部分は、1つのライゲーションされたプローブカップルの形成をもたらすだろう。次に、プローブは、プライマーの単一セットを使用して増幅される(全てのライゲーションされたプローブは、それらの3'末端で、同じPCRプライマーハイブリダイゼーション配列を有し、及び全てのライゲーションされたプローブは、それらの5'末端で、同じPCRプライマーハイブリダイゼーション配列を有する)。次に、増幅されたフラグメントは、ゲル又はキャピラリー電気泳動を使用して分離され、次に40個までの異なるDNA領域は、同じ反応においてスキャンされうる。この方法は、点変異の検出を可能にしない。

【0022】

「短蛍光フラグメントの定量的多重PCR(QMP SF)」(Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M. 2002年. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat* 第20(3)巻:第218~26頁) は、10より上のDNA領域の同時増幅を可能にするために、特定のPCRプライマーの使用に基づく。全てのフォワードプライマーは、それらの3'末端で特定の伸張を持つ。全てのリバースプライマーは、それらの5'末端で特定の伸張を持つ。16個のヌクレオチドのこれら伸張は、研究されたDNAの相補的でない非常にまれな配列である。それらは、非常に同種のアニーリング温度を有することを第2のPCRサイクルから可能にする。これら特定のプライマーの使用は、同種の蛍光ピークレベルを達成するために、相対的プライマー濃度を調節する際に投入される努力を減少する。この方法は、小さな挿入及び欠失の検出を可能にする。

【0023】

これらの方法は、全体遺伝子を含む大規模変更、又は数十から数千の塩基の通常DNAと変性されたDNAとの間の配列相違の検出に有効的である。しかしながら、それらは、点変異、特に置換についての情報を提供しない。患者又はより一般的に有機体の変異を生じると疑われる場合において、この変異が比較的に大規模又は局所の変異を含む場合、当業者は先験的に知らない。現在、変異のこれら2つの種類は、2つの異なる方法論を使用

10

20

30

40

50

して、並行に探索される。これは、努力の重複、並びに費用の増加を意味する。

【0024】

大規模変更を検出するために使用される他の方法、例えば実時間PCR又は多重液体クロマトグラフィー (Multiplex liquid chromatography、MP/LC) (Dehainault C, Laugel A, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S, Doz F, Desjardins L, Couturier J, Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D, Houdayer C. 2004年. Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene. Nucleic Acids Res 第32(18) 巻:e139) がまた、単一の塩基置換を検出できず且つ小さな挿入及び欠失についてあまり信頼できない。

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

従って、核酸 (例えばゲノムDNA) における点変異及び大規模変更と同じくらい異なる変異を同時に検出することを可能にすることができ、並びに最小の操作者技術で及び費用の減少された量で、迅速に、正確に及び簡単に実行されることができ、簡単且つ非常に特定の方法の必要性がなおある。

【課題を解決するための手段】

【0026】

大規模及び局在の変異の同時探索、従って変異探索努力の簡易化及び加速化を可能にすることが本発明の正確な目的である。

20

【0027】

より正確には、少なくとも1つの核酸フラグメント (以下、第1の核酸フラグメントと言う) に関する点変異及び/又は大規模変更を検出するための方法であって、

a. 前記第1の核酸フラグメントと、前記第1の核酸フラグメントと区別可能であり且つ量的参照としての役割を果たす少なくとも第2の核酸フラグメントとを含むかもしれないサンプルを用意すること、

b. 前記核酸フラグメントを変性し、そしてホモデュプレックス及び起こりうるヘテロデュプレックスを含む産物を得るために適切な条件において、それらを再アニーリングすること、

c. 前記第1の核酸フラグメントの存在するデュプレックス形を識別する信号の強度を、前記第2の参照核酸フラグメントから得られた信号の強度と比較することによって、前記第1の核酸フラグメントの既存のデュプレックス形を識別する信号及び前記第1の核酸フラグメントについての相対的量データを少なくとも得るために適切な分析的方法を前記再アニーリングされた産物に対して実行すること、及び

30

d. 工程cにおいて得られた相対的量データを、大規模変更がその中に存在しない第1の核酸フラグメントについて予想される対照相対的量データと比較すること、

からなる工程を少なくとも含む方法を提案することが本発明の目的である。

【0028】

前記第1の核酸フラグメントが、異なる配列を有する少なくとも2つの形において前記サンプル中に存在する場合に、工程bで前記起こりうるヘテロデュプレックスを得ることが生じうる。

40

【0029】

第1の実施態様では、本発明に従う方法は、工程cにおいて得られた前記第1の核酸フラグメントからの信号の形状の分析を含む追加工程eを少なくとも含む。

【0030】

この追加の分析は、前記第1の核酸フラグメントからの信号の形状を、前記第1の核酸フラグメントの非変異形に等価である前記第1の核酸フラグメントの形に工程a～cを適用することによって得られる信号の形状と比較することによって実行されうる。

【0031】

一つの実施態様に従うと、前記第1の核酸フラグメント及び前記第2の参照核酸フラグメ

50

ントは、DNAを含むサンプルに制限酵素を適用することによって得られうる。

【0032】

他の実施態様では、前記第1の核酸フラグメント及び前記第2の参照核酸フラグメントは、核酸増幅方法によって得られうる。核酸増幅方法は、例えばNASBA、ローリングサークル増幅(RCA)又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)でありうる。

【0033】

その観点の他に従うと、本発明は、本発明に従う方法を含む、癌への素因の診断のための方法に関する。

【0034】

その観点の他に従うと、本発明は、本発明に従う方法を含む、癌診断のための方法に関する。 10

【0035】

その観点の他に従うと、本発明は、本発明に従う方法を含む、遺伝疾病の診断のための方法に関する。

【0036】

その観点の他に従うと、本発明は、本発明に従う方法を含む、治療のための新しい目標を発見するための又は治療の効率性をスクリーニングするための方法に関する。

【0037】

その観点の他に従うと、本発明は、本発明に従う方法を含む、疾病又は病理状態のための新しいバイオマーカーを発見するための方法に関する。 20

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

定義

本発明に従うと、

ー表現「核酸」は、任意の合成の又は天然のDNA、RNA、核酸類縁物(例えば、PNA(ペプチド核酸))、LNA、チオール化されたDNAなどを包含することを意味する。

ー表現「核酸フラグメント」は、2つの所定の隣接配列(flanking sequence)間に(包括的に)含まれる核酸のストレッチ(stretch)を意味することを意図する。典型的に、本発明内で核酸フラグメントは、50 bpから50,000 bp、及び好ましくは100 bpから1000 bpの範囲である長さを有しうる。核酸フラグメントAは、それが同じ2つの隣接配列間で含まれるがフラグメントBのこれと等しいまたは異なる配列を有しうる場合に、核酸フラグメントBに「等価である」と言われる。 30

ー表現「隣接配列(flanking sequence)」は、有機体又は個体のゲノムに沿った配列の対であって、このゲノム内の配列の2つの側を定義することを意図する。本発明内で使用されうる最も共通の隣接配列は、プライマー配列の対でありうる。より特には、所定の配列を有するオリゴヌクレオチドであってよく、ヌクレオチド及びポリメラーゼの存在下に置いた場合、単一ストランド核酸上でハイブリダイズすることができ、及び前記単一ストランド核酸上で複製を開始することができる。隣接配列の対の他の例は、DNA分子に沿った2つの別個の及び連続した制限部位の配列(そこで制限酵素がDNAを切断するだろう)によって与えられうる。PCRプライマー対に対向して、隣接配列として制限酵素を使用することは、DNAを増幅することの必要性を避けることの有利点を有しうる。 40

ー表現「プライマー配列対」は、DNAの2つの相補鎖上にハイブリダイズし、そしてポリメラーゼ連鎖反応によって増幅を生じうるプライマー配列の対を意味することを意図する。

ー語「信号」は、本発明に従う方法の工程c)、d)及び/又はe)で得られた再アニーリングされた産物に対する分析的方法の応用から生じるプロファイルデータにおける一つの核酸フラグメントに対応するピーク又はピークのアンサンブルを意味することを意図する。

ー表現「信号強度」は、所定のピーク又は信号に対応する物質の量の量的決定を意味す 50

ることを意図する。

ー表現「核酸増幅」は、2つの所定の配列間に含まれる少なくとも一つの核酸フラグメントの複数のコピーをサンプル中に生成しうる任意の方法を意味することを意図する。好ましくは、最終産物において生成されたコピーの数が、サンプル中に初期に存在するコピーの数の関数でありうる。

ー語「第1の核酸フラグメント」は、当業者がそれに関する変異を探しているサンプル中の任意の多重度の核酸フラグメントを示すだろう。従って、「第1の」は、当業者が、同じサンプル中の参照として使用される「第2の」核酸フラグメントから、そのような変異をその上で探すフラグメントを区別するための一般的な表現として使用される。

ー表現「第1の核酸フラグメントの非変異形に等価を形成する」は、多型を有する形状を含む第1の核酸フラグメントの任意の非変異野生型を対象とすること、すなわち本発明の意味内、すなわち疾病機構に関係した任意の変異を有しないことを意味する。 10

【0039】

本発明の方法は2つの別個の分析をシングルランで及び同じ第1の核酸フラグメント上で処理することを可能にする故に、本発明の方法は特に有利である。

【0040】

その上、本発明は、単一の第1の核酸フラグメント上の点変異及び大規模変更のシングルランにおける探索に制限されない。

【0041】

それは、分離方法のシングルランにおいて、幾つかの「第1の核酸フラグメント」を含むサンプルに適用されうる。 20

【0042】

要するに、本発明に従う方法は、点変異及び／又は1より大きい、特に2より大きい、特に5より大きい、及びより特には多数の異なる核酸フラグメント（同じ遺伝子に属する又は属しない「第1の核酸フラグメント」と名付けられる）に関する大規模変更の検出に有効に適用されうる。

【0043】

従って、本発明は、幾つかの核酸フラグメント上のそのような探索を実行し、引き続き分析方法による一つの単一分離工程を実行することの有利な可能性を提供しうる。本発明のこの有利な実施態様は、下記「多重化(multiplexing)」において求められる。 30

【0044】

幾つかの「第1の」核酸フラグメントが本発明内の一つのサンプルにおいて存在する場合、これら核酸フラグメントは区別出来なければならない。

【0045】

前に述べられたように、両分析のうちの一つは、点変異の検出に向けられうる。

【0046】

より特には、ヘテロデュプレックスをもたらす、サンプルにおける異なる対立遺伝子の存在は、点変異の存在を決定することの目的において使用されうる。それは、ヘテロデュプレックスがその上で形成されるフラグメント上で、単一置換を含む変異の存在を認識するための方法でありうる。これは、サンプルが変異及び非変異形において同時に核酸フラグメントを含みうることを意味する。 40

【0047】

例えば、サンプルがそれから得られる有機体はヘテロ接合体であり、変異遺伝子の少なくとも1つのコピー、及び対応する通常の遺伝子の少なくとも1つのコピーを含む場合、ヘテロデュプレックスは、任意の他の核酸の追加なしに、再アニーリングの間に自然に形成されうる。このケースは非常に一般的であり、例えば、患者が、探索された変異のための（その例の問題として生じる場合、限定されないが、乳癌の素因をつくるBRCA1又はBRCA2遺伝子に沿った変異のための）ヘテロ接合である全てのケースに対応しうる。

【0048】

スクリーニングされるべき有機体、組織、又はより一般に生物学的材料が、変異のための 50

ホモ接合体である場合に、ヘテロデュプレックスは、考慮中のフラグメントにいて非変異であると知られている参照核酸をサンプル内に追加することによって、変異の痕跡としてまだ得られうる。この場合好ましくは、参照非変異フラグメントのコピーの数が、考慮中のフラグメントのコピーの数の0.1倍～10倍の間、好ましくは0.5倍～2倍、及びさらにより好ましくは等しい数を含まれるように、サンプルに追加された参照、非変異フラグメントに対応する核酸の量が適応される。

【0049】

例えばダイレクトシーケンシングと又はDHP LCと比較して、本発明の有利点の一つは、それが通常の及び変異核酸の濃度における違いに比較的敏感でないことであることは注目するに値する。従って、それはプロトコルのローバスト性を増加させる。典型的に、本発明の方法は、10%以下の少ない又は90%以上の大きい濃度で変異フラグメントの存在を検出する。

10

【0050】

有利に、点変異の存在はまた、第1の核酸フラグメントについての工程c)において得られる信号の形状を分析することによって検出されうる。

【0051】

より特には、この分析は、第1の核酸フラグメントについて得られた信号の形状を、第1の核酸フラグメントの非変異形に等価である第1のフラグメントの形について得られ、且つ本明細書の以下に、より詳細に記載されている同様の分析条件において得られた信号の形状と比較することによって実行されうる。

20

【0052】

好ましい実施態様では、多重化は、同じラン（実行）において、異なる長さを有するフラグメントを組み合わせることによって達成されうる。ホモデュプレックス及びヘテロデュプレックスは一般に、近い移動性を有する故に、ホモデュプレックス及びヘテロデュプレックスの幾つかの組み合わせが、それら自身の間で十分に異なるサイズを有し、第2の参照核酸フラグメントと十分に異なる第1の核酸フラグメントを混合することによって、シングルランにおいて分離されそして識別されうる。

【0053】

欠失及び／又は複製のような大規模変更の検出に向けられた他の分析は、量的分析方法、及び分析するための第1の核酸フラグメントに、第1の核酸フラグメントと区別可能な参照核酸フラグメント（第2の核酸フラグメントとも呼ばれる）を組み合わせるの使用に基づく。この方法は、最初に、参照核酸フラグメントを参照することによって第1の核酸フラグメントに対する量データを評価すること、そして第2に、所謂相対的量データを、第1の核酸フラグメントを含む大規模変異が存在しない第1の核酸フラグメントに、分析の同じ条件において期待される量データと比較することを含む。

30

【0054】

参照核酸フラグメントに関して、分析するための第1の核酸フラグメントから区別出来なければならない。

【0055】

一つの実施態様に従うと、第2の核酸フラグメント及び第1の核酸フラグメントの幾つか又は全ては、少なくともそれらの個々の長さによって異なりうる。特に、それらは、少なくとも1だけ、特に少なくとも3だけ、特に少なくとも5だけ、特に少なくとも10だけ、特に少なくとも15だけ、特に少なくとも20だけ、特に少なくとも30塩基だけ、そしてより特には少なくとも100塩基だけ異なりうる。

40

【0056】

全ての場合において、サンプルにおける第1の及び第2の核酸フラグメントが区別可能でなければならない。典型的に、分析方法が電気泳動である場合、該フラグメントは、サイズにおいて10～100 bpの間、好ましくは20～100 bpの間だけ異ならなければならない。しかしながら、分析方法が質量分析である場合、この方法はより高い解像度を有する故に、サイズにおいて2～100の間だけ異なるフラグメントを有すると十分でありうる。

50

【0057】

長さの同様の差が、本明細書の下記に記載された多重化が実行されるときに、異なる第1の核酸フラグメント間に適用されうる。

【0058】

当業者によって理解される技術的な理由のために、長さの差は、1000よりも大きくない塩基でありうる。

【0059】

第2の実施態様に従うと、第2の核酸フラグメント、及び第1の核酸フラグメントの幾つか又は全てが、少なくとも別個のマーカによって互いに区別可能になりうる。これらのマーカは蛍光又は同位体であることができ、及び例えば蛍光的に又は同位体的にラベル付けされたプライマーであることができる。 10

【0060】

以前の実施態様と組み合わせられうる実施態様では、多重化は、例えば蛍光的にラベル付けされた異なるプライマーを用いたPCRを使用して、異なる波長で蛍光を有するタグを運ぶ異なるサンプルを用意することによって実行されうる。異なるサンプルの増幅は、単一反応において実行されることができ、混合物は、シングル電気泳動ランにおいて分析されうる。DNAシーケンシング又はフラグメント分析のために設計された幾つかのキャピラリー電気泳動機械（例えばABI 310、3100、3700、又はAmersham「Megabase」）が、異なる蛍光放出波長で産物を同時に分析しうる。

【0061】

分析方法がクロマトグラフ方法である場合、異なる蛍光タグの使用がまた使用されうる。最終的に、分析方法が質量分析である場合、異なる同位体によるタグ付けが使用されうる。 20

【0062】

当然に、第1の及び第2の核酸フラグメントを区別するために提案された前の両方の実施態様（すなわち、個々の長さ又は個別のマーカによる）が、組み合わせられうる。

【0063】

第2の参照核酸フラグメントが、サンプル、特に分析するための第1の核酸フラグメントを含むかもしれない生物学的サンプル中に天然に存在しうる。当然に、それは、それを分析するためのフラグメントから区別するための以前の要求に適合するために選択されるだろう。 30

【0064】

一つの実施態様に従うと、第2の参照核酸フラグメント及び第1の核酸フラグメントが、2つの別個の遺伝子から得られうる。

【0065】

一つの実施態様に従うと、第2の参照核酸フラグメント及び第1の核酸フラグメントが、同じ遺伝子から得られうる。

【0066】

他の実施態様に従うと、参照核酸フラグメントが、第1の核酸フラグメントを含むかもしれないサンプル内に取りこまれうる。そのような場合、それは、サンプル中に存在する核酸の総量に対して所定の量で導入されうる。 40

【0067】

例えば、第1の核酸フラグメントからの信号と第2の核酸フラグメントからの信号との間の量比較を容易にするために、2つの信号があまりにも異なる振幅を有しないことが好ましいだろう。例えば、第2の核酸参照フラグメントからの信号が考慮中の第1の核酸フラグメントからの信号の0.1倍～10倍の間、好ましくは0.5倍～2倍の間で含まれることが適切でありうる。この観点を達成するために、当業者が、例えば264 nmでの光学密度によって、初期サンプルにおける総核酸量の総濃度c（例えばg/lで）の測定をなしうる。

【0068】

（一般にコーディング配列の場合である）単一コピーとしてゲノムにおいて存在する配列 50

について、サンプル中のリットル当たりのこの配列のコピーの数が有機体のゲノムの総分子量によって割られた総核酸濃度 c に等しくありうる。次に、同等の濃度における第2の参照核酸フラグメントを用意することは容易である。そのようにするための一つの特に簡単な方法は、第1の核酸フラグメントを用いて、遺伝子変更がその上で知られてない第2の核酸フラグメントを共増幅することによって、第2の参照核酸フラグメントを用意することでありうる。

【0069】

そのような第2の参照核酸フラグメントの使用は、分析されたサンプルにおいて存在する第1の核酸フラグメントについての第1の相対的量データを得ることを可能にしうる。この第1の相対的量データを、対応する第1の核酸フラグメントの分析のための工程a)からd)で選択される条件を表す分析の条件において大規模変更が存在しない第1の核酸フラグメントについて得られる相対的対照量データと比較することによって、分析された第1の核酸フラグメントに関する大規模変更の起こりうる存在に関する結論が得られうる。

【0070】

この対照相対的量データが、対照サンプル（すなわち、大規模変更がその中に存在しない第1の核酸フラグメント及び同じ第2の核酸フラグメントを含む）上で少なくとも工程a)からd)を再生だけすることによって分析されるべきサンプルの相対的量データよりも、同時に又は同時でなく得られうる。この対照分析は、サンプルの分析とともに同時に実行されうるが、それは必要でない。

【0071】

真に、相対的量データが、異なる実験間で、第1の核酸に関する濃度の比でサンプルにおいて存在する内部の第2の参照核酸フラグメントに関連して再現的に得られうることは、本発明の重要な有利点でありうる。

【0072】

従って、別々の実行において分析されるサンプルが第1の核酸フラグメントと第2の核酸フラグメントの両方を含み、第1の及び第2の核酸フラグメントの間の濃度の比が、分析されるべきサンプルと対照サンプルにおいて同じである場合、対照相対的量データが別々の実行（ラン）において得られうる。

【0073】

対照相対的量データは、対応するサンプルを分析するために適用される工程a)からd)に定義される本発明の方法の条件を正確に再現することによって得られうる。しかしながら、対応するサンプルを分析するために適用される工程a)からd)に定義される方法の条件がこれらの等価な又は異なる条件に基づき推定されうるという場合に、それはまた等価な又は異なる条件から得られうる。

【0074】

一つの実施態様では、対照相対データは、第2の参照核酸フラグメントからの信号の強度に対する第1の核酸フラグメントからの信号の強度の比でありうる。

【0075】

一般に、一つの単一の第2の核酸フラグメントは、同じサンプルにおける幾つかの第1の核酸フラグメントについての参照として使用されうる。

【0076】

しかしながら、幾つかの場合では、幾つかの第2の核酸フラグメントが使用されうる。

【0077】

また、参照として使用される第1の核酸フラグメントは大規模変異に関与されるかもしれない又は野生型としてコピーの同じ数を示すという場合に、幾つかの場合では、「第1の」核酸フラグメントが他の第1の核酸フラグメントのための参照として使用されうる。

【0078】

集団における一つの特定の変異の発生の可能性が低い故に、この特定の実施態様が、例えば同様の条件において、異なる患者からの多くのサンプルを分離する場合に達成されうる。次に、信号強度間の量比のほとんどが一つのサンプルから他へ不変であり、及びまれな

異常が大規模変異の痕跡として容易に識別されうる。

【0079】

典型的に、本発明の方法は、1%ほど少ない又は99%ほど多い濃度で、変異フラグメントにおける大規模変更の存在を検出する。

【0080】

分析方法

本発明に従う方法において使用される分析方法は、それらの長さの関数として、それらの配列の関数として、又は好ましくは両方として、2つの二重DNA分子を区別する任意の方法でありうる。

【0081】

一つの実施態様に従うと、本発明に適切な個々の分析方法は、電気泳動の、クロマトグラフの、又は質量スペクトルの方法でありうる。

【0082】

電気泳動は、これについて特に適切である方法でありうる。なぜならば、その使用の便利さ、その量的な特徴、並びにそれがサイズ及び配座識別において提案する高解像度のためである。

【0083】

「チップ上のラボ (labs on chips)」における分離 (マイクロ流体システムとも呼ばれる) がまた、高い見込みでありうる。

【0084】

しかしながら、分析方法はまた、質量分析 (MS) 方法でありうる。質量分析による点変異の検出は、Laken SJ, Jackson PE, kinzler KW, Vogelstein B, Strickland PT, Groopman JD, Friesen MD. 1998年. Genotyping by mass spectrometric analysis of short DNA fragments. Nat Biotechnol 第16(13)巻: 第1352-6頁においてすでに提案されているが、MSによる点変異及び大規模変更の共同の決定は決して提案されなかった。MSが分析方法として使用される場合、クロマトグラフィー又は電気泳動法について、典型的に30 bp~500 bp、及び好ましくは50 bpから250 bpの範囲よりも小さい核酸フラグメントを使用することは一般に有利でありうる。

【0085】

本発明の好ましい実施態様では、分析方法は、特に分離培地の使用を含む電気泳動方法でありうる。

【0086】

より特には、ミスマッチを有する核酸、特にヘテロデュプレックスは、キャピラリー電気泳動又は例えばマイクロチャンネルにおけるマルチキャピラリー電気泳動によって検出されうる。

【0087】

本発明の方法の工程c)の分析方法は、非変性条件において実行されうる。

【0088】

本発明は、下記の理由のためにキャピラリー電気泳動又はマイクロチャンネルにおけるマルチキャピラリー電気泳動について特に有利でありうる。

【0089】

それは、電気泳動分析の感度、困難な検出可能なミスマッチ、たとえば特に置換を有意に改善する。

【0090】

それは、シーケンシングよりもより早い分離を可能にしうる。

【0091】

困難な方法で多重化を可能にし、従って処理能力をさらに増加させうる。

【0092】

「電気泳動ヘテロデュプレックス分析」(EHDA)と名付けられたアプローチは、非変性条件における電気泳動によって、ヘテロデュプレックス対で現れるミスマッチに関連付けられ

10

20

30

40

50

た「変性バブル(denaturation bubble)」又は「ループ(loop)」によって導入される移動性における差を直接的に測定する。

【0093】

サンプルが非変性条件における電気泳動によって分離される場合、ヘテロデュプレックス分子上の局所の「ミスマッチバブル(mismatch bubble)」の存在は、二重鎖の柔軟性のジオメトリ(geometry)における差(それは、ホモデュプレックスと比較して移動性における差をもたらす)をもたらす。分析するための核酸フラグメントが通常のデュプレックスフラグメント及び変異フラグメントを示す場合(すなわち、DNAがそれから抽出される有機体が、対応するDNAフラグメントについてヘテロ接合体である場合)に、ピークの多重度(2~4)は電気泳動図において現れるだろう。これらの異なるピークは、本発明の意味において、同じフラグメントに対応する(すなわち、それらは同じ隣接配列によって区切られる)。

【0094】

EHD A方法のパワーは、ミスマッチバブルの存在のために、移動速度におけるわずかな差を検出するための能力に主に依存する。

【0095】

電気泳動、スラブゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、マルチキャピラリー電気泳動、又はマルチチャンネル電気泳動の異なる種類が使用されうる。マルチキャピラリー電気泳動は、高スループット自動化スクリーニングのために特に恵まれうる。

【0096】

一つの実施態様では、多重化は同じランにおいて、異なる長さを有するフラグメントを組み合わせることによって達成されうる。ホモデュプレックス及びヘテロデュプレックスは近い移動性を一般に有している故に、ホモデュプレックス及びヘテロデュプレックスの幾つかの組み合わせは、十分に異なるサイズを有するフラグメントを混合することによって、シングルランにおいて分離され、そして識別されうる。典型的に、該フラグメントは、10~100 bpの間、好ましくは20~100 bpの間でサイズによって異ならなければならない。

【0097】

多重化は、異なるサンプルの幾つかの逐次的な注入を実行することによって達成されうる。原理は、異なるサイズのフラグメントの分離についてと同じでありうる:それは、例えばシーケンシングと対照的に、単一フラグメントの電気泳動分析が電気泳動法によって提供される分離ウィンドウの非常に制限された部分のみを使用し、従って、シフトされた適切な開始時間を有する幾つかのサンプルが、シングルランで分離されうる。

【0098】

他の実施態様では、ヘテロデュプレックスフラグメントの分離は、本発明において記載された組成物の存在でDGGEによって、又は同じ種類の組成物の存在でDHPLCによって実行されうる。

【0099】

分離培地

分離培地又は基質の異なる種類が、本発明に従う分離のために使用されうる。

【0100】

実に、サイズによって核酸を分離しうる任意の基質又は分離培地がまた使用されうる。スラブゲル電気泳動のために、最も有用な基質がポリアクリルアミドゲルでありうるが、例えばアガロース、又は例えば、Andrews, A.T., 1986年, Electrophoresis:Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, (Clarenton, Oxford); Righetti, P.G., 1989年, J. of Biochem. Biophys. Methods 第19巻, 第1-20頁において調べられた他の基質の網羅的でないリストの例で与えられた他の基質が使用されうる。

【0101】

一つの実施態様に従うと、本発明に適切な分離培地は、絡み合ったポリマー溶液でありうる。

【0102】

10

20

30

40

50

キャピラリー電気泳動について、全ての分離培地が使用されうる。そのような培地の網羅的でない例が、(Barbier V, Viovy JL. 2003年. Advanced polymers for DNA separation. Curr Opin Biotechnol 第14(1)巻:第51-7巻; Righetti, P. G. and C. Gelfi. 1997年. In Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis, C. Hellerによって編集, Chromatographia, CE series 1, (Vieweg, Wiesbaden), 第255-271頁)において列挙されている。

【0103】

また、幾つかの非ポリマー基質又は篩分特性を示す分離培地が使用されうる(例えば、Rill, R., T. Liu, B. R. Locke and D. H. Van Winkle, 1998年, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 第95巻, 第1534-1539頁を参照)。

10

【0104】

しかしながら、分離の実行のために、従って本発明の最適な操作のために、サイズ差について及びまた恵まれるべきであるヘテロデュプレックス及びホモデュプレックス間の識別について最高の識別力を有する基質を有することが重要でありうる。

【0105】

一つの実施態様に従うと、本発明に従う分離培地は、アクリルアミド、メタクリルアミド又はアクリルアミド誘導体の架橋化された又は架橋化されていないポリマーを含みうる。

【0106】

特に、例えばMadabushi等に対する米国特許第5,567,292号明細書に記載されているPDMA(ポリジメチルアクリルアミド)に基づく篩分基質は、本発明の範囲内で興味深い。

20

【0107】

例えば、本発明に便利なポリマーは、N,N-二置換されたポリアクリルアミド、N-モノ置換されたポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリジンなどを含みうるが、これらに制限されない。ポリアクリルアミドの例示的な置換は、 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル; ハロ置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル; メトキシ置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル; ヒドロキシル置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキルなどを含む。

【0108】

直線のアクリルアミドは、当業者に知られているDNA電気泳動のための篩分ポリマーでありうる。

【0109】

一つの実施態様に従うと、本発明に適切な分離培地は、アクリルアミド及びジメチルアクリルアミドのブロックコポリマーを含みうる。

30

【0110】

該ポリマーは、アクリルアミド骨格(backbone)及びポリジメチルアクリルアミド(PDMA)側鎖を有するブロックコポリマー、またはより一般的にブロックコポリマータイプ、例えばBarbierに対するフランス国特許出願第00/0856号明細書に引用されたそれらでありうる。

【0111】

本発明に従う方法の工程e)の分析方法は、非変性条件において有利に適用されうる。

【0112】

しかしながら、変性剤のような追加の成分は、本発明の分離培地、例えばデュプレックス又はポリヌクレオチドにおける第2の構造の形成を防止するための変性剤において含まれうる。

40

【0113】

変性剤は、ホルムアミド(例えば1~90%)、尿素(例えば0.1~8M)、商業的に又は非商業的に入手可能なラクタム(例えばピロリジン)などを含みうる。電気泳動におけるそれらの使用についてのガイドラインは、周知の分子生物学文献、例えばSambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989年)においてみられうる。

【0114】

50

ヌクレオチド塩基対(pairing)化合物

一つの実施態様に従うと、本発明に従う分離培地はまた、ミスマッチに關与するヌクレオチドと特に、特異的な塩基対相互作用を受けうる少なくとも1つの化合物を含みうる。

【0115】

前記化合物は、一つの単一の塩基対単位を含みうる。該「塩基対単位」は、塩基（A、T、G、U又はC）の一つと塩基対相互作用を受けうる分子基を意味する。

【0116】

そのような化合物は、単独で、或いはヘテロデュプレックスのミスマッチに關与する核酸の塩基と、特異的な塩基対相互作用を受けうる一つの又は幾つかの他の化合物を有する混合物において使用されうる。

10

【0117】

一つの実施態様に従うと、前記化合物が、それを又はそれらを、変異のアッセイをするための核酸の好ましくは10 g / l、及び最も好ましくは少なくとも25 g / lと接触するために使用される分離培地の少なくとも1 g / lの組み合わせられた濃度で使用されうる。

【0118】

「組み合わせられた濃度」によって、例えば幾つかの種類の化合物の使用の場合、それは前記化合物の総濃度と理解され、該組み合わせられた濃度は、各化合物の総濃度である。そのような化合物の濃度は、分析するための核酸を含む培地の総容量に關して表される。

【0119】

一つの実施態様に従うと、そのような化合物は、5未満のヌクレオチド、好ましくは3未満のヌクレオチド、より好ましくは2未満のヌクレオチドの長さを有するオリゴヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基又はそれらの混合物からなる群から選択されうる。

20

【0120】

そのような化合物の非制限的な例は、

—塩基 アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、ウラシル（U）、及びチミン（T）

—アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、及びチミンを生じる様々な置換体、特に置換されていない塩基における塩基対相互作用を引き起こすアミノ及び水酸基に対して影響を有しない置換体

—塩基 A，T，G，C，Uを用いて形成されたヌクレオシド、

30

—塩基 A，T，G，C，Uを用いて形成されたヌクレオチド、

—オリゴヌクレオチド類似体、及び様々に置換されたオリゴヌクレオチド、及び

—それらの混合物である。

【0121】

一つの実施態様に従うと、前記化合物は、ヌクレオシド アデノシン、グアノシン、ウリジン、シチジン、チミジン及びそれらの混合物間で選択されるヌクレオシドでありうる。

【0122】

例えば、本発明に従う方法は、シチジン及びチミジン、又はシチジン及びアデノシン、又はグアノシン及びチミジン、又はグアノシン及びアデノシンを有利に使用しうるが、例えばチミジン及びアデノシン、又はシチジン及びグアノシンでない。

40

【0123】

信号

前に述べられたように、分析は、分析されるべき第1の核酸フラグメントから出される信号の強度及び／又は形状を、第2の参照核酸フラグメント信号の強度及び／又は形状、該第1の核酸フラグメントを含む大規模変異が存在しない第1の核酸フラグメントの形及び第1の核酸フラグメントの非変性形に等価である第1の核酸フラグメントの形と比較することによって実行されうる。

【0124】

信号の形状は、信号のピークの数によって、信号の幅によって、又は両方によって特徴付けられうる。変異のないフラグメントは、単一のピークを通常もたらすだろう。フラグメ

50

ントの信号の形状を対照サンプルの信号の形状と比較することによって、当業者は変異の存在又は非存在を決定しうる。形状差は、ピークの数における差でありうる（ピークの最大値は、2つのホモデュプレックス及び2つのヘテロデュプレックスに対応する4個であるべきである）。ピークショルダー又はピーク拡張（widening）がまた、変異の存在の痕跡として識別されうる。この形状差は、操作者による視覚観察によって又は特定の曲線分析ソフトウェアの使用によって決定されうる（ピーク多重度及びピーク拡張の比較は、例えば、Peakfit, OriginPro (Originlab)又はIgor(Wavemetrics)曲線分析ソフトウェアを用いて容易に実行されうる。）。

【0125】

しかしながら、好ましくは分析は、専用の自動化されたソフトウェアによって実行されることができ、完全に自動化された方法で、信号中のピークの数及び信号の拡張を分析すること、及び結果、特に参照信号の信号拡張に対してサンプルの信号拡張の比を、所定の値と比較することができる。

【0126】

対照的に、大規模変更の存在は、信号の正規化されたピーク強度（又は面積）を、何ら大規模変更のない対照サンプルの信号の正規化されたピーク強度（又は面積）と比較することによって検出されうる。ピーク強度（又は面積）は、多重において存在する内部参照（関心のある遺伝子と異なるDNA領域からのフラグメント）のピーク強度（又は面積）によって、又は分離の間にサンプルにおいて存在する関心のある遺伝子の他のフラグメントのピーク強度（又は面積）によって、正規化されうる。

【0127】

対照の第1の核酸フラグメントのピーク強度（又は面積）よりも少なくとも1.2倍、及び好ましくは少なくとも1.35倍高いピーク強度（又は面積）は、複製の存在の痕跡でありうる。

【0128】

0.5（±0.3）倍の対照の変性されていない第1の核酸フラグメントの多くとも0.8倍、及び好ましくは多くとも0.7倍のピーク強度（又は面積）が、欠失の存在の痕跡でありうる。

【0129】

これらのピーク強度（又は面積）差は、操作者による視覚観察によって又は特定の曲線分析ソフトウェアの使用によって決定されうる。

【0130】

「ピーク強度又は信号強度は、所定のピーク又は信号に対応する物質の量の量的決定を意味することを意図される。ピーク強度の測定の典型的な方法は、ベースライに関して最大高さ又は信号の後ろの累積面積を測定しうる。

【0131】

好ましくは、特に信号が幾つかのピークを含む場合、該強度は累積面積を使用して決定されうる。

【0132】

異なる通常のデータ処理方法が、信号増幅及び信号形状分析の信頼性を改善するために、本発明内で使用されうる。そのような方法は、網羅的でないが、ベースライン控除、ノイズ減少、所定のピーク形状を有するピークフィッティング、偽ピーク消去などを含みうる。

【0133】

点変異

本発明に従い、検出可能な点変異は、不正確な塩基対が生じる欠失変異、挿入変異及び置換変異を含む。欠失及び挿入変異はまた、タンパク質内の遺伝コードの翻訳に対するそれらの影響のために、「フラグメントシフト」変異として知られている。

【0134】

デュプレックス形において対とされる核酸の2つの相同鎖間の差が単一ヌクレオチド差、

すなわち小さな挿入若しくは欠失からなる場合、ミスマッチされたデュプレックスが形成されうる。本発明に従う該方法は、ミスマッチされたデュプレックスを検出するために特に効率的でありうる。

【0135】

より特には、本発明に従う方法は特に、点変異がその上で疾病又は疾病への増加する素因に関連付けられている又は推定的に関連付けられている遺伝子に関連した核酸配列を有するDNAフラグメントのスクリーニングに有用でありうる。前記疾病は、癌、遺伝疾病、又は疾病への増加する素因、例えば、例としてサラセミア、心疾患、ミオパシー、癌、及びより一般的に遺伝的に遺伝可能な疾病の異なる種類でありうる。関連付けられた遺伝子及び集団における罹患率を有するそのような疾病の網羅的でないリストが、例の問題として下記表に与えられる。このリストは、本発明の範囲を制限する意味によって考慮されるべきではないが、ヒト健康における本発明の応用の範囲が遺伝学の進行とともに大きく且つ絶えず拡張することを明らかにするためにのみ、本明細書において提案される。

10

【0136】

癌疾病への増加する素因に関連付けられた遺伝子、その診断の制限されないリストが、本発明の応用の恵まれうる範囲を構成しうる。

【0137】

素因	関連付けられた推定の変異遺伝子	一般の集団において生じる変異の頻度	癌に冒された患者に生じる変異の頻度
乳房、卵巣	BRCA1, BRCA2	1/500	1/30
大腸、(endometrium) (HNPCC 症候群)	hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, TGFbeta	1/500	1/20
黒色腫	CDKN2A, CDK4	1/500	1/20
腎臓	c-MET	1/5000~10000	1/20
胃 (HNPCC を除く)	CDH1	1/10000~20000	1/100~200
大腸	APC	1/8000	1/100
過誤腫性 (Hamartomatoses)			
VHL	VHL	1/40000	
NF2	NF2	1/30000	
ポイツ・ジェガース (Peutz-Jegherz)	LKB1	1/50000~100000	
ゴーリン (Gorlin) 症候群	PTCH	1/50000~100000	
カウデン、バナヤン・ゾナナ (Cowden, Banayan-Zonana) 症候群	PTEN	1/50000~100000	
NF1	NF1	1/3000	
ブールネビーレ (Bourneville) 硬化症	TSC1, TSC2	1/10000~15000	
多発性内分泌腺腫症 (Multiple endocrinian neoplasia)			
1 型	MEN1	1/30000~40000	
2 型	Ret	1/30000~40000	1/10~20
カルニー (Carney) 症候群	PRKAR1A	1/50000~80000	
DNA 破損に関連した疾病			
血管拡張性失調症	ATM	1/40000~300000	
ファンコニ (Fanconi) 疾病	6個の関連付けられた遺伝子	1/350000	
ブルーム (Bloom) 疾病	BLM	1/1000000	
色素性乾皮症	8個の関連付けられた遺伝子	1/500000~1000000	
ウェルナー (Werner) 疾病	WRN	1/300000~1000000	

10

20

30

40

50

【0138】

特に、本発明に従う方法は特に、変異について、ヒト乳癌素因遺伝子 (BRCA1及びBRCA2のような (BRCA)) のスクリーニングに有用である。

【0139】

本発明の方法に従うと、野生型BRCA1又はBRCA2座の変異が検出されうる。加えて、該方法は、野生型BRCA1又はBRCA2座を検出し、従ってBRCA1及びBRCA2座での癌への素因の欠失を確認することによって実行されうる。

【0140】

大規模変異

本発明に従うと、この語は、複数の塩基対に影響し、欠失又は複製からなりうる点変異よりも大きい変異を包含することを意図する。

【0141】

特に、幾つかの大規模変更が、繰り返しDNA領域における複製機構の「ずれ (slippage)」により生じ、可変サイズの挿入物又は欠失物をもたらす。

【0142】

典型的に、本発明は特に、ゲノム上に核酸フラグメントの幾つかの増幅可能なコピーの存在、又は対照的に、核酸フラグメントの増幅の不存在をもたらさうる大規模変更を検出する際に有用である。典型的に、そのような大規模変更は、非常に多種多様の核酸長（ときどき、10又は数十kb、しかしより一般的に数百又は数千bpほど小さい）を含みうる。

【0143】

例として、大規模変更は、10 bps～10 kbps、又は20、30、又は40 kbpsの範囲でありうる。例えば、それは、100 bps～10 kbps、又は例えば200 bps～5000 bps、又は例えば500 bps～1000 bpsの範囲でありうる。 10

【0144】

例として、大規模変更は、100 bps～1000 bpsの範囲でありうる。

【0145】

時々、それらは実に全遺伝子を含み、従って数Mbpsをカバーしうる。

【0146】

核酸増幅方法

一つの実施態様に従うと、本発明に従う方法は、非飽和条件において、第1の核酸フラグメント及び第2の核酸フラグメントの増幅、及びより特にはセミ定量増幅を少なくとも含む追加工程、工程f)を含みうる（前記工程f)は、工程b)の前に実行される）。 20

【0147】

最も一般的な核酸増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）であり、この方法は、本発明における追加工程f)を実行するために恵まれうる方法でありうる。

【0148】

リガーゼ連鎖反応、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR、RT-PCR）及びローリングサークル増幅（RCA）又は核酸配列に基づく増幅（NASBA）のような技術を含みうるがこれに制限されない増幅の任意の直線又は対数方法が使用されうる。

【0149】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR、RT-PCR）は、本発明にとって特に便利でありうる。 30

【0150】

該増幅は、非飽和増幅条件で実行されうる。

【0151】

本発明内で、表現「非飽和増幅条件」は、増幅サイクルの数、又は増幅生成物における核酸フラグメントのコピーの最終数がサンプルにおけるコピーの初期数に有意に且つ再現可能な方法で依存するように選択された増幅のより一般的な条件を意味すると意図される。増幅方法がPCRである場合、特に、サイクルの数は、コピーの最終数がその中でほぼ $C_{final} = C_{initial} * 2^n$ （ここでnはPCRサイクルの数であり、 C_{final} 及び $C_{initial}$ は所定の核酸フラグメントのコピーの夫々最終数及び初期数である）にほぼ比例する「指数領域」であるように選択されうる。 40

【0152】

該増幅はまた、増幅曲線のS字状形状の変曲点を囲む領域に対応する「直線領域」において実行されうる（コピーの数対サイクルの数）。

【0153】

当業者は、所定のサンプルについて、コピーの初期数に依存するコピーの最終数を有する条件を満足するために適した条件を決定する異なる方法を知る。

【0154】

所定のサイズのゲノムについて、それらの条件を決定するための単純な方法は、初期サンプルにおいて核酸の所定濃度を有するために、サンプルを希釈することでありうる。 50

【0155】

例えば、下記の実施例においてより詳細に記載されているように、ヒト診断について、従ってゲノムヒトDNAを含むサンプルについて、100ngの初期DNA量が適切でありうる。そのような濃度について、25回の数PCRサイクルが適切でありうる。

【0156】

サンプルにおけるDNAの量が上記したこれと異なる場合、単純な式がまた、この規則から推定することを可能にしうる。

【0157】

典型的に当業者は、下記の式を使用しうる：

$$n_{\text{最適}} = 2500/x$$

式において、xはサンプルにおけるDNA量であり、ngで表される。

10

【0158】

この式は、10μlの容量について有効である。異なる等価の式が、異なる増幅条件の異なるサンプル容量、異なるゲノムについて当業者によって決定されうる。

【0159】

例えば、そのようなより一般的な方法は、第1の例において、量的PCR装置、例えばAppliederaによるライトサイクラー（Light Cycler）における増幅を実行すること、そして増幅曲線の変曲点に対応する「 n_i 」の数をこの方法によって決定することからなりうる。

【0160】

PCR又はRT-PCRサイクルの増幅の数は、 $n_i - 7 \sim n_i + 2$ 、及び好ましくは $n_i - 3 \sim n_i + 1$ の範囲でありうる。ここで、 n_i は、増幅曲線の変曲点に対応するサイクルの数である。

20

【0161】

一つの実施態様に従うと、PCR又はRT-PCRは、22～27の範囲である増幅サイクルの数を含みうる。

【0162】

フラグメントが、異なる対立遺伝子に対応する2つの異なる配列を有するサンプルにおいて存在する場合、DNA増幅の最後で、該増幅された核酸は、ヘテロデュプレックスの形成を助けるために例えばゆっくりと冷やすことによってのような便利な条件で復元されうる。

30

【0163】

そのような条件は、およそ90℃又はそれより高い温度でサンプルを加熱すること、そしてこのサンプルをゆっくりと冷やすこと（典型的にはほぼ1℃/分程度で）から本質的になりうる。例えば、実施例に記載されているように、1℃/分の温度減少が使用されうる。

【0164】

サンプル

分析されるべき核酸フラグメントを含むサンプルは、合成の若しくは天然のサンプル、又バイオテクノロジー由来のサンプルでありうる。恵まれた実施態様では、それは患者からのサンプルである。

【0165】

特に、本発明は、なんらかの特定の制限なしに核酸フラグメントを含む全ての生物サンプルを包含する。より特には、本発明に従う生物サンプルは、細胞、組織、器官、固定された又は固定されていない外科的な若しくは生検試験片、例えば骨髓吸引液、又は体液を含む生体液、例えば全血、血清、血漿、脳脊髄液、尿、リンパ液、並びに呼吸器、腸及び尿生殖路、涙、唾液、乳、白血球細胞及び細胞培養上清の様々な外分泌物由来でありうる。該サンプルの起原は、動物（好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト）、植物、ウィルス、細菌、原生動物又は菌でありうる。該サンプルは、真核、原核、又は無細胞でありうる。生物サンプルを含む細胞（特に組織、器官、生物液又は生検由来である場合）は、利用可能な細胞の数を増加させるために、培養されうる。該サンプルは、単一の種からの又は混合された細胞種の細胞を含みうる。細胞、組織、及び試験片は、正常個体から又は

40

50

疾病又は疾患を患う患者から由来しうる。疾病又は疾患は、例えば、癌、神経変性の疾病、炎症疾病、心血管疾病、免疫疾患、体重疾患（例えば肥満）などでありうる。任意の特定の細胞、細胞種、病理細胞、発生又は疾病の進展の特定の状態での細胞が、本発明において検討される。

【0166】

本発明に従う方法は、特定の点変異及び／又は大規模変更に関連付けられた又は推定的に関連付けられた疾病の素因の診断、或いはそのような疾病の診断又は予後のいずれかに特に有用でありうる。

【0167】

本発明はさらに、遺伝疾病或いは癌への素因の診断、又は前記疾病若しくは癌の診断若しくは予後において、本発明に従う方法を使用することに関する。

10

【0168】

本発明はまた、前記疾病の治療において前記方法を使用することに関する。

【0169】

特に、関係ある疾病は、それらが特定の点変異に関連付けられている又は推定的に関連付けられている範囲で多くの癌、例えば黒色腫、白血病、星状細胞腫、グリア芽腫、リンパ腫、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、肉腫、筋肉腫、胆管癌、扁平上皮細胞癌、及び膵臓、胸、脳、前立腺、膀胱、甲状腺、卵巣、子宮、精巣、腎臓、胃、大腸、直腸の癌を含みうる。

【0170】

図面及び下記に与えられた実施例は、本発明の制限されない例によって示される。

20

【0171】

実施例

分離のために使用された全てのフラグメントが、表1に示される。置換の種類、フラグメントサイズ、プライマー配列及び多重組成が、下記表において示される。

【0172】

【表 1】

エクソン	変異	フラグメント サイズ	センスプライマー配列	リバースプライマー配列	多重
5		290	aatatctaaaagtagtattccaac	tgtatgaaacaaactcccac	M25BC2
21		365	gcagttatatagtttcttcttta	atcccttttgagaaatgcagc	M25BC2
20		412	taatctcagcctcccaaagtt	aaaaagaataccctagatactaaa	M25BC2
16		472	tgtttttagtagaagattctag	tgcttaaccataatgcacttaaaa	M25BC2
19		268	aaggacctctcctctgtcat	tgtgcattgttaaggaaagtg	M1BC1-A
6		334	agaggttttctactgttgctg	cagaactaaaattaacctagact	M1BC1-A
22		433	gtggcaaattgacttaaaatcc	cagttctcaaatccttaccca	M1BC1-A
11.5	c.2430T>C/Leu771Leu	519	atacttcccagagctgaagt	tggcgctttgaaacctgaat	M1BC1-A
19		268	aaggacctctcctctgtcat	tgtgcattgttaaggaaagtg	M1BC1-B
6	欠失 3-16	334	agaggttttctactgttgctg	cagaactaaaattaacctagact	M1BC1-B
22		433	gtggcaaattgacttaaaatcc	cagttctcaaatccttaccca	M1BC1-B
11.5	欠失 3-16	519	atacttcccagagctgaagt	tggcgctttgaaacctgaat	M1BC1-B
19	複製 18-19	268	aaggacctctcctctgtcat	tgtgcattgttaaggaaagtg	M1BC1-C
6		334	agaggttttctactgttgctg	cagaactaaaattaacctagact	M1BC1-C
22		433	gtggcaaattgacttaaaatcc	cagttctcaaatccttaccca	M1BC1-C
11.5	c.2430T>C/Leu771Leu	519	atacttcccagagctgaagt	tggcgctttgaaacctgaat	M1BC1-C

10

20

【0173】

PCRが、下記プロトコルに従い行われた。

【0174】

変異スクランニングのために使用されるサンプルが、100 ngのゲノムDNA、0.06ユニット/μLのTaqポリメラーゼ (Amplitaq gold, Applied biosystems)、4 mM MgCl₂、800 μm dNTP、及び1×バッファー (Applied biosystems)を含む50 μL反応容量において生成された。オリゴヌクレオチド濃度が、多重に含まれる全てのフラグメントについて同種の強度を有するために適合された。

30

【0175】

PCRプログラムが、Icycler thermocycler (Biorad)において実行され、及び96℃で15分間の変性工程、引き続き96℃で30秒間での変性の25サイクル、58℃で30秒間でのアニーリング、そして72℃、30秒間での伸張からなった。次に、PCR生成物は5分間、96℃で変性され、そして96℃～25℃まで1℃/分でサンプル温度を減少することによって71分間に亘って徐々にリアニールされた。

40

【0176】

全ての実験は、50cmの有効長を有する50 μm内径キャピラリー用いて、ABI 3100 (Applied biosystems, Foster city, 米国)で実行される。分離基質は、Tris (50 mM)、Taps (50 mM)、EDTA (2 mM) バッファーに溶解された5% (g/100 ml)でのポリ (アクリルアミド-g-ポリ (ジメチルアクリルアミド)) からなる。2.5%のチミジン及び2.5%のシチジンが、基質に添加される。温度は、30℃で一定である。最終的に、SYBRgreen1 (Molecularprobes) が、DNA検出のために1×で使用される。

【0177】

ポリ (アクリルアミド-g-ポリ (ジメチルアクリルアミド)) 特徴は、下記の通りであ

50

る：2,377,000 Daのコポリマー分子量、5,000 Daのポリジメチルアクリルアミド片分子量、及び9.7%のポリジメチルアクリルアミド片密度。

【0178】

液体分離培地のコポリマーは、国際公開公報第02/01218号明細書に開示された調製の工程に従い用意された。それらは、良好な篩分特性を有し、及び表面活性である。

【実施例1】

【0179】

SYBRgreen1ーキャピラリー対キャピラリー変動性 (variability) を用いたキャピラリー電気泳動を使用したDNA濃度の半定量的測定

多重 (Multiplex) M25BC2が、この実験のために使用される。それは、遺伝子BRCA2のエクソン5、21、20、及び16に夫々対応するサイズによって異なる4つのフラグメント (290 bp、365 bp、412 bp及び472 bp) からなる。 10

【0180】

注入は、2kVで20秒間行われる。分離は、同じキャピラリーアレイにおいて同じ実行 (ラン) の間実行される。

【0181】

図1は、実施例1について得られた異なるピークの面積測定のキャピラリー対キャピラリー再現性を示す図である。全てのピーク面積が、第2のフラグメント (エクソン21) の面積で正規化された。最大の観察された変動性はほぼ10%程度であり、それは大きい再配列検出と完全に互換性である。実に、複製の痕跡が少なくとも50%の振幅 (amplitude) で増加をもたらし、及び欠失はほぼ50%の振幅の減少をもたらす。エラーバーが10%のオーダーである故に、これらデータは、分析において、偽陽性又は偽陰性の危険がないことを示す。 20

【実施例2】

【0182】

変動性を実行するために、SYBRgreen1ーランを用いたキャピラリー電気泳動を使用したDNA濃度の半定量的測定

多重M25BC2が、実験のこの設定のために使用される。それは、遺伝子BRCA2のエクソン5、21、20、及び16に夫々対応するサイズによって異なる4つのフラグメント (290 bp、365 bp、412 bp及び472 bp) からなる。 30

【0183】

注入は、2kVで20秒間行われる。分離は、順次実行される。5回の注入が実行される。

【0184】

図2は、実施例2についての、5回連続ラン (実行) に対する異なるピークの平均正規化された面積測定のラン対ラン再現性を示す図である。ピーク面積が、第2のフラグメント (エクソン21) の面積で正規化された。平均正規化された面積は、ラン対ランから非常に再現可能である。エラーバーが標準偏差に対応する。再び、これは、大規模変異のための偽陽性が非常にありそうもないことを示す。

【実施例3】

【0185】

一人の患者における大きな欠失及び異なる患者における置換の同時検出

多重M1BC1が、この実験のために使用される。それは、BRCA1遺伝子の異なるエクソン (夫々エクソン19、エクソン6、エクソン20、及びエクソン11.5) に対応するサイズによって異なる4つのフラグメント (268 bp、334 bp、433 bp及び519 bp) からなる。 40

【0186】

多重M1BC1-Aは、大きな染色体再配列を有しないがエクソン11.5において単一の塩基置換を有する患者に対応する。

【0187】

多重M1BC1-Bは、エクソン3からエクソン16の大きな欠失を有する患者に対応する。

【0188】

当業者は、M1BC1-Bのエクソン6及びエクソン11.5に対応するピークが、M1BC1-Aのそれらよりもおよそ2倍小さいことがわかる。これは、エクソン6及び11.5が、M1BC1-Bにおいて欠失されることを示す。当業者はまた、M1BC1-Aのエクソン11.5が2つのピークを有し、一方M1BC1-Bのエクソン11.5が単一のピークを有することに気付く。これは、M1BC1-Aのエクソン11.5における小さな変化 (variation) の存在を示す。このフラグメントのシーケンシングは、単一の塩基置換を明らかにした (c.2430T>C/Leu771Leu)。

【0189】

図3は、実施例3で述べられたM1BC1-A及びM1BC1-Bの分離に対応する2つの重ねられた電気泳動図を示す。

【実施例4】

10

【0190】

一人の患者における大きな複製及び単一の塩基置換の同時検出

多重M1BC1が、この実験のために使用される。それは、BRCA1遺伝子の異なるエクソン (夫々エクソン19、エクソン6、エクソン20、及びエクソン11.5) に対応するサイズによって異なる4つのフラグメント (268 bp、334 bp、433 bp及び519 bp) からなる。

【0191】

多重M1BC1-Aは、大きな染色体再配列を有しないがエクソン11.5において単一の塩基置換を有する患者に対応する。

【0192】

多重M1BC1-Cは、エクソン18及び19の大きな複製及びエクソン11.5における単一の塩基置換を有する患者に対応する。

20

【0193】

前の実施例において、当業者は、単一の塩基置換に対応するM1BC1-Aのエクソン11.5の二重ピークを観察しうる。

【0194】

M1BC1-Cの第1のピークはM1BC1-Aのそれよりもおよそ1.5倍高く、それはM1BC1-Cにおけるエクソン19の複製を示す。M1BC1-Aにおいて観察された同じ二重ピークがM1BC1-Cのエクソン11.5において存在し、単一の塩基置換の存在を示す。

【0195】

図4は、実施例4で述べられたM1BC1-A及びM1BC1-Cの分離に対応する2つの重ねられた電気泳動図を示す。

30

【実施例5】

【0196】

M1BC1-B及びM1BC1-Cにいて存在する大きな再配列の検出のための正規化された面積の分布
M1BC1-Aで6個の分離、M1BC1-Bで9個の分離、及びM1BC1-Cで10個の分離が実行された。ピーク面積は、多重の何れにおいても何らの種類の変異を与えない第3のピーク (エクソン22) で正規化された。

【0197】

非変異フラグメントと比較して2倍のピーク面積差に対応する欠失は、非常によく識別される (M1BC1-Bのエクソン16及び11.5)。非変異フラグメントと比較して1.5倍のピーク面積差に対応する複製は、エクソン19の見本上の変性されていないフラグメントと非常に小さな重なり (overlap) を示す。

40

【0198】

図5は、実施例5で述べられたフラグメントM1BC1-A、M1BC1-B及びM1BC1-Cについての正規化された面積の分布を示す。

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1】実施例1について得られた異なるピーク的面積測定のカピラリー対カピラリー再現性を示す図である。

【図2】実施例2についての、5回連続ランに対する異なるピークの平均正規化された面

50

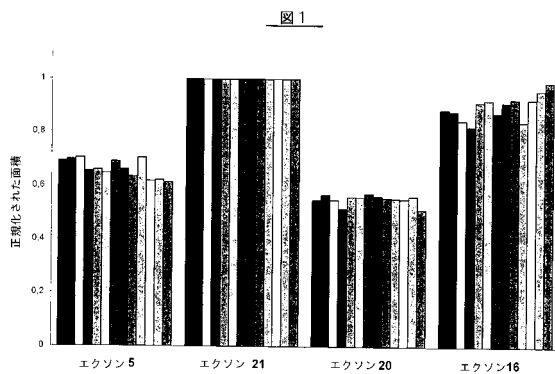
積測定 of ラン対ラン再現性を示す図である。

【図 3】実施例 3 で述べられた M1BC1-A 及び M1BC1-B の分離に対応する 2 つの重ねられた電気泳動図を示す図である。

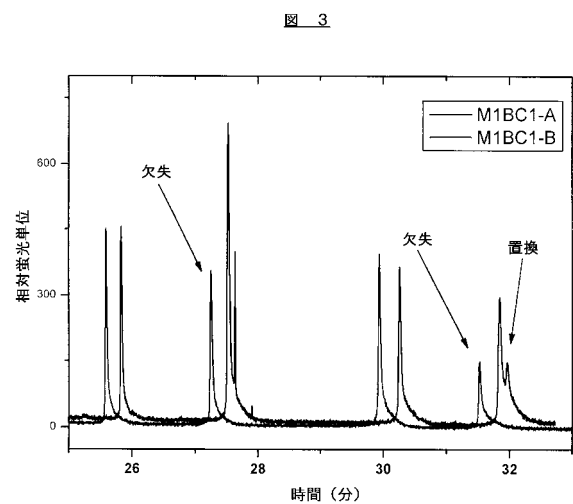
【図 4】実施例 4 で述べられた M1BC1-A 及び M1BC1-C の分離に対応する 2 つの重ねられた電気泳動図を示す図である。

【図 5】実施例 5 で述べられたフラグメント M1BC1-A、M1BC1-B 及び M1BC1-C についての正規化された面積の分布を示す図である。

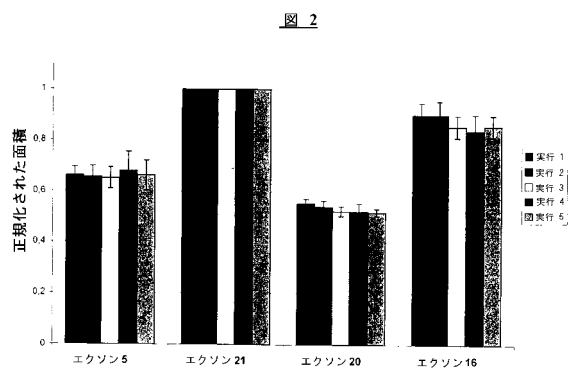
【図 1】



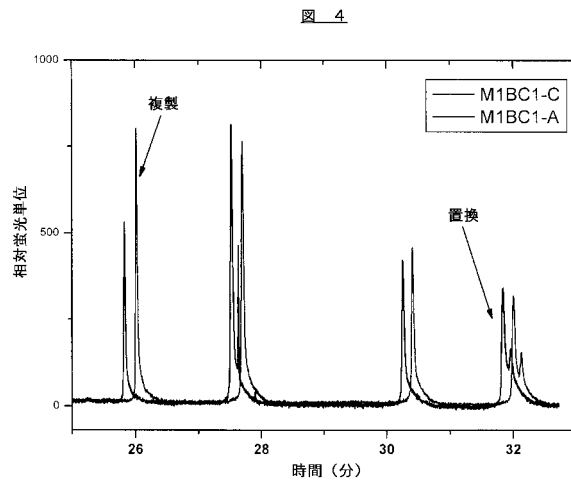
【図 3】



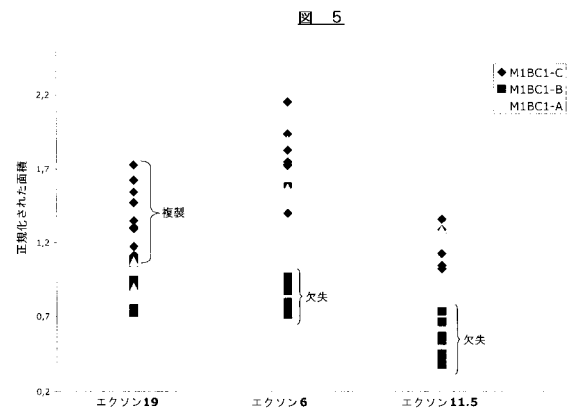
【図 2】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 クロード ホダイエ
フランス国, 9 3 3 1 0 ル プレ サンーゲルヴェ, リュ ダントン 6 3
- (72)発明者 ドミニク ストッパーリヨネット
フランス国, 7 5 0 0 7 パリ, ブールバール デ ザンバリッド 1 2
- (72)発明者 ジェレミー ウェバー
フランス国, 7 5 0 2 0 パリ, リュ デ グラン シャン 5 4
- F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 HA14
4B063 QA01 QA17 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62 QS16
QS17 QS25 QS34 QX02

【外国語明細書】

[20072025520000001.pdf](#)

[20072025520000002.pdf](#)

[20072025520000003.pdf](#)

[20072025520000004.pdf](#)