

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-528554

(P2011-528554A)

(43) 公表日 平成23年11月24日 (2011.11.24)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

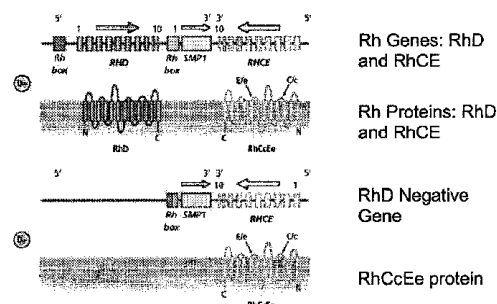
(21) 出願番号	特願2011-518950 (P2011-518950)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成21年7月17日 (2009.7.17)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成23年3月7日 (2011.3.7)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/051061		3 5
(87) 国際公開番号	W02010/009440	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成22年1月21日 (2010.1.21)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/082, 169	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成20年7月18日 (2008.7.18)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ファン, ウェン-ファ
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
			26, サン ディエゴ, クローナ
			ロード 11181

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 母親の全血からの非侵襲的胎児 R h D ジェノタイピング

## (57) 【要約】

本発明は、被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法を開示する。特に、本発明は、胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルから胎児 R h D 遺伝子型を判定する非侵襲的方法を提供する。本発明はまた、記載した方法に有用な新規プローブおよびプライマーも提供する。さらに、新規プローブおよびプライマーを含むキットおよび混合物も開示する。被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法は、被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプル中の細胞を溶解して溶解混合物を形成すること、前記溶解混合物から核酸を抽出すること、および前記抽出された核酸において R h D 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンを検出することを含み、前記エクソンの有無から被験体の R h D 遺伝子型が示される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 22 および配列番号 23 からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含む、単離されたポリヌクレオチド。

**【請求項 2】**

前記ポリヌクレオチドがヒト RHD 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

**【請求項 3】**

配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21 および配列番号 24 からなる群より選択される配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含む、単離されたポリヌクレオチド。

**【請求項 4】**

レポーター分子が前記ポリヌクレオチドの 5' 末端に結合し、クエンチャー分子が前記ポリヌクレオチドの 3' 末端に結合する、請求項 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

**【請求項 5】**

前記ポリヌクレオチドがヒト RHD 遺伝子のエクソンを検出する、請求項 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

**【請求項 6】**

配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 33 に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記単離されたポリヌクレオチドが 50 未満の塩基を含む、単離されたポリヌクレオチド。

**【請求項 7】**

前記ポリヌクレオチドがヒト Y 染色体を検出する、請求項 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

**【請求項 8】**

フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む少なくとも 1 種のプライマーセット、

30

少なくとも 1 種の標識プローブ、および

生物学的サンプルにおいて RHD 遺伝子を検出するための、前記少なくとも 1 種のプライマーセットおよび前記少なくとも 1 種のプローブの使用説明書を含み、前記フォワードプライマーおよび前記リバースプライマーがヒト RHD 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする、RhD ジェノタイピングキット。

**【請求項 9】**

前記エクソンがヒト RHD 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 またはエクソン 10 である、請求項 8 に記載のキット。

40

**【請求項 10】**

前記エクソンがエクソン 4 である、請求項 9 に記載のキット。

**【請求項 11】**

前記フォワードプライマーが配列番号 1 または配列番号 4 であり、前記リバースプライマーが配列番号 2 または配列番号 5 である、請求項 10 に記載のキット。

**【請求項 12】**

前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 3 または配列番号 6 である、請求項 10 に記載のキット。

**【請求項 13】**

前記エクソンがエクソン 5 である、請求項 9 に記載のキット。

50

## 【請求項 14】

前記フォワードプライマーが配列番号 7 または配列番号 10 であり、前記リバースプライマーが配列番号 8 または配列番号 11 である、請求項 13 に記載のキット。

## 【請求項 15】

前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 9 または配列番号 12 である、請求項 13 に記載のキット。

## 【請求項 16】

前記エクソンがエクソン 7 である、請求項 9 に記載のキット。

## 【請求項 17】

前記フォワードプライマーが配列番号 13 または配列番号 16 であり、前記リバースプライマーが配列番号 14 または配列番号 17 である、請求項 16 に記載のキット。

## 【請求項 18】

前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 15 または配列番号 18 である、請求項 16 に記載のキット。

## 【請求項 19】

前記エクソンがエクソン 10 である、請求項 9 に記載のキット。

## 【請求項 20】

前記フォワードプライマーが配列番号 19 または配列番号 22 であり、前記リバースプライマーが配列番号 20 または配列番号 23 である、請求項 19 に記載のキット。

## 【請求項 21】

前記少なくとも 1 種の標識プローブが配列番号 21 または配列番号 24 である、請求項 19 に記載のキット。

## 【請求項 22】

前記キットが 2 種以上のプライマーセットおよび 2 種以上の標識プローブを含む、請求項 8 に記載のキット。

## 【請求項 23】

前記 2 種以上のプライマーセットがヒト RHD 遺伝子の 1 個のエクソンにハイブリダイズする、請求項 22 に記載のキット。

## 【請求項 24】

前記 2 種以上のプライマーセットがヒト RHD 遺伝子の 2 個以上のエクソンにハイブリダイズする、請求項 22 に記載のキット。

## 【請求項 25】

溶解試薬をさらに含む、請求項 8 に記載のキット。

## 【請求項 26】

前記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素を含む、請求項 25 に記載のキット。

## 【請求項 27】

前記溶解試薬が S - (2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル) - メチル - イソチオ尿素、ビタミン E、サポニン、DMSO、トリトン X - 100 および pH 7.2 ~ 7.4 の緩衝液を含む、請求項 26 に記載のキット。

## 【請求項 28】

被験体の RHD 遺伝子型を判定する方法であって、前記方法は、

前記被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプル中の細胞を溶解させて溶解混合物を形成する工程、

前記溶解混合物から核酸を抽出する工程、および

前記抽出された核酸において RHD 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンを検出する工程を含み、ここで、前記エクソンの有無から前記被験体の RHD 遺伝子型が示される、方法。

## 【請求項 29】

前記被験体が胎児である、請求項 28 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 30】

前記生物学的サンプルが胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記母親の生物学的サンプルが全血サンプルである、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記胎児細胞が母親の細胞よりも優先的に溶解させられる、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 33】

細胞を溶解させる前記工程が、前記母親の生物学的サンプルを溶解試薬と一定の時間接触させる工程を含み、前記溶解試薬が S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素を含む、請求項 32 に記載の方法。

10

## 【請求項 34】

前記溶解試薬が S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素、ビタミン E、サポニン、トリトン X - 100、DMSO および pH 7.2 ~ 7.4 の緩衝液を含む、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

前記時間が約 10 分から約 30 分である、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 36】

RHD 遺伝子の少なくとも 1 個のエクソンの前記検出が、前記少なくとも 1 個のエクソンを 1 種または複数種のプライマーセットで増幅する工程、および前記少なくとも 1 個のエクソンを 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程を含む、請求項 28 に記載の方法。

20

## 【請求項 37】

前記 1 種または複数種のプライマーセットがフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記少なくとも 1 個のエクソンがヒト RHD 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 またはエクソン 10 である、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 4 である、請求項 38 に記載の方法。

30

## 【請求項 40】

前記フォワードプライマーが配列番号 1 または配列番号 4 であり、前記リバースプライマーが配列番号 2 または配列番号 5 である、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 3 または配列番号 6 である、請求項 39 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 5 である、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記フォワードプライマーが配列番号 7 または配列番号 10 であり、前記リバースプライマーが配列番号 8 または配列番号 11 である、請求項 42 に記載の方法。

40

## 【請求項 44】

前記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 9 または配列番号 12 である、請求項 42 に記載の方法。

## 【請求項 45】

前記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 7 である、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 46】

前記フォワードプライマーが配列番号 13 または配列番号 16 であり、前記リバースプライマーが配列番号 14 または配列番号 17 である、請求項 45 に記載の方法。

## 【請求項 47】

50

前記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 1 5 または配列番号 1 8 である、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記少なくとも 1 個のエクソンがエクソン 1 0 である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記フォワードプライマーが配列番号 1 9 または配列番号 2 2 であり、前記リバースプライマーが配列番号 2 0 または配列番号 2 3 である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 2 1 または配列番号 2 4 である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

2 種以上のプライマーセットが前記少なくとも 1 個のエクソンを増幅するために使用され、2 種以上の標識プローブが前記少なくとも 1 個のエクソンを同定するために使用される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 2 種以上のプライマーセットがヒト R H D 遺伝子の 1 個のエクソンを増幅する、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 2 種以上のプライマーセットがヒト R H D 遺伝子の 2 個以上のエクソンを増幅する、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記抽出された核酸において胎児 D N A の存在を確認する工程をさらに含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

胎児 D N A の存在を確認する前記工程が Y 染色体を検出する工程を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 Y 染色体が、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む 1 種または複数種のプライマーセットで前記 Y 染色体上にある遺伝子を増幅する工程、および、前記遺伝子を 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程により検出される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記 Y 染色体上にある前記遺伝子が S R Y、F C Y および D A Z からなる群より選択される、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記遺伝子が D A Z である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記フォワードプライマーが配列番号 3 1 であり、前記リバースプライマーが配列番号 3 2 である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記 1 種または複数種の標識プローブが配列番号 3 3 である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

胎児 D N A の存在を確認する前記工程が父系遺伝の対立遺伝子を検出する工程を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法であって、前記方法は、

前記被験体由来の 1 つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプルから核酸を抽出する工程、および

前記抽出された核酸において R H D 遺伝子の少なくとも 3 個のエクソンを検出する工程

10

20

30

40

50

を含み、ここで、前記エクソンの有無から前記被験体の R h D 遺伝子型が示される、方法。

【請求項 6 3】

R H D 遺伝子の少なくとも 3 個のエクソンの前記検出が、前記少なくとも 3 個のエクソンを 3 種以上のプライマーセットで増幅する工程、および前記少なくとも 3 個のエクソンを 3 種以上の標識プローブで同定する工程を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記少なくとも 3 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 からなる群より選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

R H D 遺伝子の 4 個のエクソンが、前記抽出された核酸において検出される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 4 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記被験体が胎児である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記生物学的サンプルが胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抽出された核酸において胎児 D N A の存在を確認する工程をさらに含む、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

胎児 D N A の存在を確認する前記工程が Y 染色体を検出する工程を含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記 Y 染色体が、前記 Y 染色体上にある遺伝子を 1 種または複数種のプライマーセットで増幅する工程、および、前記遺伝子を 1 種または複数種の標識プローブで同定する工程により検出される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記 Y 染色体上にある前記遺伝子が S R Y、F C Y および D A Z からなる群より選択される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

胎児 D N A の存在を確認する前記工程が父系遺伝の対立遺伝子を検出する工程を含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 4】

単離された核酸、各々がフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、R H D 遺伝子の 3 個以上のエクソンを増幅するための 3 種以上のプライマーセット、ならびに 3 種以上の標識プローブを含む、試薬混合物。

【請求項 7 5】

前記 3 個以上のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 からなる群より選択される、請求項 7 4 に記載の試薬混合物。

【請求項 7 6】

前記 3 種以上のプライマーセットの前記フォワードプライマーが配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、配列番号 13、配列番号 16、配列番号 19 および配列番号 22 からなる群より選択される、請求項 7 5 に記載の試薬混合物。

【請求項 7 7】

前記 3 種以上のプライマーセットの前記リバースプライマーが配列番号 2、配列番号 5、配列番号 8、配列番号 11、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 20 および配列番

10

20

30

40

50

号 2 3 からなる群より選択される、請求項 7 5 に記載の試薬混合物。

【請求項 7 8】

前記 3 種以上の標識プローブが配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 1 2、配列番号 1 5、配列番号 1 8、配列番号 2 1 および配列番号 2 4 からなる群より選択される、請求項 7 5 に記載の試薬混合物。

【請求項 7 9】

前記混合物が、単離された核酸、R H D 遺伝子の 4 個のエクソンを増幅するための 4 種のプライマーセット、および 4 種の標識プローブを含む、請求項 7 4 に記載の試薬混合物。

【請求項 8 0】

前記 4 個のエクソンがヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 1 0 である、請求項 7 9 に記載の試薬混合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

この発明は、2 0 0 8 年 7 月 1 8 日に出願された米国仮出願 6 1 / 0 8 2 , 1 6 9 への優先権を主張し、上記米国仮出願の内容は、参照によって本明細書に援用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

( 発明の背景 )

一般に、胎児の性別、遺伝性障害または疾患のマーカー、および染色体異常など 1 つまたは複数の遺伝的特性を判定するには出生前診断が行われる。こうした出生前検査の 1 つに、胎児アカゲザル D 抗原 ( R h D : R h e s u s D a n t i g e n ) 状態の判定がある。この検査は、R h D 陰性の妊婦にとって特に重要である。R h D 陽性胎児を妊娠した R h - D 陰性の母親は、胎児赤血球の表面に発現する R h D 抗原への抗体を産生する可能性がある。この抗体は、胎盤を通して胎児循環に入ることができるため、R h D 陽性胎児は、母親の抗 D 抗体が D 陽性の胎児赤血球を攻撃してこれを溶解させる胎児新生児溶血性疾患 ( H D F N : h e m o l y t i c d i s e a s e o f t h e f e t u s a n d n e w b o r n ) のリスクがある。H D F N のリスクは、胎児が R h D 陽性である第 2 子以降の妊娠で著しく高まる。H D F N は、比較的軽度の場合、網状赤血球増加を伴う胎児貧血を、最も重度の場合、胎児の死亡を特徴とする。

【0 0 0 3】

D 表面抗原を発現する可能性がある胎児の循環中の赤血球に対して母親の R h D 抗体が産生されるのを防ぐには、予防的な抗 R h D 免疫グロブリン処置剤を妊娠約 2 8 週の R h D 陰性妊婦全員に投与し、さらに任意に妊娠 3 4 週にブースターを投与するのが出産前の一般的な医療行為である。しかしながら、こうした女性の最大約 3 8 % が R h D 陰性胎児を妊娠し、予防的処置を受ける必要がない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

現在利用できる胎児 R h D 状態の判定方法では、検査用の胎児細胞を採取する侵襲的な手順が必要となるのが一般的である。たとえば、R h D 状態または遺伝的異常のスクリーニングには絨毛膜絨毛サンプリング ( C V S : c h o r i o n i c v i l l u s s a m p l i n g ) または羊水穿刺 ( a m i n o c e n t e s i s ) を行う場合がある。しかしながら、自然流産、感染症および同種免疫にはこうした侵襲的な手順が関連している。したがって、侵襲的な診断検査に伴う合併症、および高価な予防的処置剤の不必要な投与を回避するには、胎児 R h D 状態を判定する非侵襲的な手順を開発することが望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

( 発明の概要 )

10

20

30

40

50

本発明は1つには、母体血液サンプルから胎児DNAを単離する非侵襲的方法の開発、およびRhD遺伝子の特定のエクソンの特定領域の検出からRhD遺伝子型が予測されるという発見に基づく。したがって、本発明は、生物学的サンプルから被験体、特に胎児被験体のRhD遺伝子型を判定する非侵襲的方法、および本発明の方法に使用できる新規なプローブおよびプライマーを提供する。

【0006】

一実施形態では、本発明は、ヒトRH D遺伝子のエクソン4、エクソン5、エクソン7およびエクソン10を増幅するためのプライマーとして有用な単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態では、本発明は、RH D遺伝子のエクソン4、エクソン5、エクソン7またはエクソン10を検出するためのプローブとして有用な単離されたポリヌクレオチドを提供する。単離されたポリヌクレオチドは、二重標識プローブであってもよい。

10

【0007】

本発明は、被験体のRH D遺伝子型を判定する方法を包含する。一実施形態では、この方法は、被験体由来の1つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプル中の細胞を溶解して溶解混合物を形成すること；前記溶解混合物から核酸を抽出すること；および前記抽出された核酸においてRH D遺伝子の少なくとも1個のエクソンを検出することを含み、前記エクソンの有無から被験体のRH D遺伝子型が示される。別の実施形態では、被験体は胎児であってもよい。生物学的サンプルは、全血サンプルなど胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルであってもよい。いくつかの実施形態では、母親の細胞よりも胎児細胞を優先的に溶解することができる。

20

【0008】

別の実施形態では、本方法は、少なくとも1個のエクソンを1種または複数種のプライマーセットで増幅し、少なくとも1個のエクソンを1種または複数種の標識プローブで同定することによりRH D遺伝子の少なくとも1個のエクソンを検出することを含む。エクソンは、ヒトRH D遺伝子のエクソン4でも、エクソン5でも、エクソン7でも、あるいはエクソン10でもよい。別の実施形態では、2種以上のプライマーセットを使用して少なくとも1個のエクソンを増幅し、2種以上の標識プローブを使用して少なくとも1個のエクソンを同定する。別の実施形態では、2種以上のプライマーセットによりヒトRH D遺伝子の1個のエクソンを増幅する。さらに別の実施形態では、2種以上のプライマーセットによりヒトRH D遺伝子の2個以上のエクソンを増幅する。

30

【0009】

本発明の別の実施形態では、本方法は、被験体由来の1つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプルから核酸を抽出すること；および抽出された核酸においてRH D遺伝子の少なくとも3個のエクソンを検出することを含み、エクソンの有無から被験体のRH D遺伝子型が示される。一実施形態では、RH D遺伝子の4個のエクソンを検出する。検出され得るエクソンには、ヒトRH D遺伝子のエクソン4、エクソン5、エクソン7およびエクソン10が含まれる。RH D遺伝子の3個以上のエクソンは、3種以上のプライマーセットで3個以上のエクソンを増幅し、3種以上の標識プローブで3個以上のエクソンを同定することにより検出できる。いくつかの実施形態では、その被験体は胎児である。他の実施形態では、生物学的サンプルは胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、本方法はさらに、前記抽出された核酸において胎児DNAの存在を確認することを含む。一実施形態では、胎児DNAの存在は、Y染色体を検出することにより確認される。別の実施形態では、Y染色体は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む1種または複数種のプライマーセットでY染色体上にある遺伝子を増幅し；1種または複数種の標識プローブで遺伝子を同定することにより検出される。別の実施形態では、Y染色体上にある遺伝子は、SR Y、FC YおよびDA Zからなる群より選択される。なお別の実施形態では、胎児DNAの存在は、父系遺伝の対立遺伝子を検出することにより確認される。

50



## 【 0 0 1 1 】

本発明はさらに、本明細書に開示された新規なプライマーおよびプローブを含む R h D ジェノタイピングキットを提供する。一実施形態では、キットは、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む少なくとも 1 種のプライマーセット；少なくとも 1 種の標識プローブ；および生物学的サンプルにおいて R H D 遺伝子を検出するための、前記少なくとも 1 種のプライマーセットおよび前記少なくとも 1 種のプローブの使用説明書を含み、前記フォワードプライマーおよび前記リバースプライマーは、ヒト R H D 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする。エクソンは、ヒト R H D 遺伝子のエクソン 4 でも、エクソン 5 でも、エクソン 7 でも、あるいはエクソン 10 でもよい。別の実施形態では、キットは、2 種以上のプライマーセットおよび 2 種以上の標識プローブを含む。2 種以上のプライマーセットは、ヒト R H D 遺伝子の 1 個のエクソンにハイブリダイズしてもよいし、あるいは 2 種以上のプライマーセットは、ヒト R H D 遺伝子の 2 個以上のエクソンにハイブリダイズしてもよい。別の実施形態では、キットはさらに、溶解試薬を含む。溶解試薬は、S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素および任意にビタミン E、トリトン X - 100、トウイーン - 20、NP - 40 およびサポニンなどの界面活性剤を含んでいてもよい。

10

## 【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、単離された核酸と、本明細書に開示された新規なプローブおよびプライマーセットの様々な組み合わせとを含む試薬混合物を企図している。一実施形態では、試薬混合物は、単離された核酸；各々がフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、R H D 遺伝子の 3 個以上のエクソンを増幅するための 3 種以上のプライマーセット；および 3 種以上の標識プローブを含む。別の実施形態では、試薬混合物は、単離された核酸；R H D 遺伝子の 4 個のエクソンを増幅するための 4 種のプライマーセット；および 4 種の標識プローブを含む。プライマーセットおよび標識プローブは好ましくは、ヒト R H D 遺伝子のエクソン 4、エクソン 5、エクソン 7 およびエクソン 10 から選択される 3 個以上のエクソンにハイブリダイズする。

20

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 R h D 陽性および陰性遺伝子型の R h 抗原遺伝子およびそのコードされた R h タンパク質の模式図である。反対の方向を向いている R h D 遺伝子（赤色）および R h C E 遺伝子（青色）の 10 個のエクソン、R h ボックスおよび S M P 1 遺伝子を示す。

30

【 図 2 】 R h D 陽性胎児を妊娠した R h D 陰性の母親の血液サンプルから単離された D N A における、プライマーセットを用いた R h D 遺伝子のエクソン 4 の P C R 増幅を示す。A は、R h D プライマーセット 4 . 2 で増幅されたサンプル 1 4 2 0 2 である。一番上のバンドは予想された 7 0 b p の単位複製配列（アスタリスク）に対応する。B は、R h D プライマーセット 4 . 3 で増幅されたサンプル 1 4 2 0 2 である。単一のバンドは予想された 6 2 b p の単位複製配列（アスタリスク）に対応する。

【 図 3 】 R h D 陽性胎児を妊娠した R h D 陰性の母親から得られた血液サンプルから単離した D N A における、プライマーセットを用いた R h D 遺伝子のエクソン 5 の P C R 増幅を示す。A は、R h D プライマーセット 5 で増幅されたサンプル 1 4 1 8 0（最後の 2 レーン）である。一番上のバンドは予想された 8 3 b p の単位複製配列（アスタリスク）に相当する。B は、R h D プライマーセット 5 . 2 で増幅されたサンプル 1 4 1 8 0（最後の 2 レーン）である。一番上のバンドは予想された 7 2 b p の単位複製配列（アスタリスク）に相当する。

40

【 図 4 】 R h D 陽性胎児を妊娠した R h D 陰性の母親から得られた血液サンプルから単離した D N A における、プライマーセットを用いた R h D 遺伝子のエクソン 7 の P C R 増幅を示す。A は、R h D プライマーセット 7 で増幅されたサンプル 1 4 2 0 2 である（最後の 3 レーン）。4 . 5 % M S 8 アガロースゲル上に約 5 3 および 5 8 b p というサイズに近い 2 個のバンドが目視可能である。シーケンシングデータから 5 8 b p のバンドは間違いなく単位複製配列（アスタリスク）であることが確認された。B は、R h D プライマー

50

セット 7 . 3 で増幅されたサンプル 1 4 2 0 2 である (最後の 2 レーン)。単一のバンドは予想された 6 1 b p の単位複製配列 (アスタリスク) に相当する。

【図 5】R h D 陽性胎児を妊娠した R h D 陰性の母親から得られた血液サンプルから単離した DNA における、プライマーセットを用いた R h D 遺伝子のエクソン 1 0 の P C R 増幅を示す。サンプル 1 4 1 8 0 は、エクソン 1 0 (最後の 2 レーン) および 1 0 . 1 (最初の 2 レーン; 1 0 H) の R h D プライマーセットで増幅した。一番上のバンドは間違いなく、プライマーセット 1 0 (5 9 b p、最後の 2 レーン) およびプライマーセット 1 0 . 1 (7 4 b p、最初の 2 レーン) の単位複製配列に相当する。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 4】

10

(発明の詳細な説明)

アカゲザル (R h : R h e s u s) 血液型抗原は、免疫原性が高いため臨床的に最も重要と考えられている。R h 抗原への抗体は、新生児の溶血性疾患だけでなく、輸血反応および自己免疫性溶血性貧血にも関わっている。ヒト R h 表現型は、1 番染色体 (1 p 3 4 . 1 - 1 p 3 6) 上にある近接した 2 つの R h 遺伝子、R h D および R h C E により制御されている。R h D は D 抗原をコードし、R h C E は C c および E e 抗原をコードする (Y . C o l i n e t a l . ( 1 9 9 1 ) B l o o d , V o l . 7 8 : 2 7 4 7)。2 つの遺伝子は 1 0 個のエクソンを含み、配列相同性が各々約 9 4 % であるが、テイル - テイル (t a i l - t o - t a i l) 構造をとり染色体上で反対の方向を向いているため、R h D 遺伝子のコード鎖は R h C E の非コード鎖であり、その逆も同様である (図 1 ; N . D . A v e n t e t a l . ( 2 0 0 6 ) E x p e r t R e v i e w s i n M o l . M e d . , V o l . 8 : 1)。膜小タンパク質 (S M P 1 : s m a l l m e m b r a n e p r o t e i n 1) 遺伝子は、この 2 つの R h 遺伝子の間にある。また、R h D は、相同性が 9 8 . 6 % でアカゲザル (R h e s u s) ボックスとして公知の 2 つの 9 k b の領域に挟まれている。

20

【0 0 1 5】

R h D および R h C E は、4 1 7 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする。R h D および R h C E タンパク質は、アミノ酸が 3 1 ~ 3 5 個異なっている。R h D は D 抗原をコードし、R h C E は、2 組の対立遺伝子の C / c および E / e 抗原の発現に関わる 4 つの共通の対立遺伝子をコードする。R h D 陰性の個体の場合、R h D 遺伝子が完全に欠失しているか、あるいは遺伝子に変異していたり、一部が欠失していたりして遺伝子が非機能的になっているため R h D 抗原が赤血球上に発現しない。

30

【0 0 1 6】

コーカサス人種は約 1 5 パーセントが R h D 陰性であり、通常 R h D の欠失のホモ接合体である。R h D 陰性の黒人系アフリカ人の 6 6 パーセントはインタクトな R h D を持っているが、この遺伝子は、2 6 9 番目のチロシンのコドン翻訳終結コドンに変化させるエクソン 6 のナンセンス変異のため不活性である。このインタクトな R h D 遺伝子は R h D 偽遺伝子 (R H D) として公知であり、イントロン 3 とエクソン 4 の境界における 3 7 b p の重複、エクソン 5 のミスセンス変異、およびエクソン 6 のナンセンス変異など複数の変異を持っている (B . K . S i n g l e t o n , e t a l . ( 2 0 0 0 ) B l o o d , V o l . 8 9 : 2 5 6 8)。この不活性な偽遺伝子は D タンパク質も D 抗原も産生しない。アフリカ人に比較的に多く見られるもう 1 つの非機能的な遺伝子としては R h D - C E - D がある。R h D エクソンが存在していても、R h D 抗原は産生されない。

40

【0 0 1 7】

上記で論じたように、R h D 陰性の母親が R h D 陰性胎児を妊娠していることが分かれば、出産前の不要な抗 R h 免疫グロブリン予防法および往診がなくなる。胎児 R h D 遺伝子型の判定に利用できる標準的な臨床試験は典型的には、妊娠を危うくするリスクを伴う侵襲的な手順を使用する必要がある。したがって、胎児 R h D 状態を判定する非侵襲的な臨床試験の開発が求められている。

【0 0 1 8】

50

本発明は1つには、母親の生物学的サンプルから胎児DNAを単離する新規な方法の開発による。参照によってその全体を本明細書に援用する、2007年11月1日出願された同時係属中の米国特許仮出願第60/984,698号に詳しく記載されているように、この方法は、生物学的サンプルを所定の時間特定の溶解試薬 ( *lysing reagent* ) に曝露することにより母親の細胞よりも胎児細胞を選択的に溶解することを含む。この方法により、選択的ライセートからの胎児DNA、たとえば、質の高い胎児DNAの抽出が可能になる。抽出された胎児DNAは、RhD遺伝子型など様々な遺伝的マーカーのスクリーニングに使用することができる。

#### 【0019】

本発明はまた、RhD遺伝子の1個または複数の特定のエクソンの検出からRhD遺伝子型が正確に予測されるという知見に基づく。したがって、本発明は、被験体のRhD遺伝子型を判定する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、被験体由来の1つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプル中の細胞を溶解して溶解混合物を形成すること；前記溶解混合物から核酸を抽出すること；および前記抽出された核酸においてRhD遺伝子の少なくとも1個のエクソンを検出することを含み、前記エクソンの有無から被験体のRhD遺伝子型が示される。別の実施形態では、その被験体は胎児である。別の実施形態では、前記生物学的サンプルは胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである。例示的な母親の生物学的サンプルとして、全血、血漿、血清、尿、頸管粘液、羊水または絨毛膜絨毛サンプルがあるが、これに限定されるものではない。好ましい実施形態では、前記母親の生物学的サンプルは全血サンプルである。

#### 【0020】

生物学的サンプル中の細胞を溶解するには、任意の好適な溶解試薬 ( *lysing reagent* ) を用いればよい。溶解試薬の例としては、ビタミンE、サポニン、S - [ ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) メチル ] - イソチオ尿素 ( *GTM I* ) またはその塩、グアニジニウムヒドロクロリド、グアニジニウムイソチオシアネート；尿素、フェリシアン化リチウム、フェリシアン化ナトリウムおよびチオシアン酸ナトリウム、フェリシアン化カリウムおよびチオシアン酸カリウム、アンモニウムクロリド、ジエチレングリコール、Zap - Oglobin、およびトリトン、トウィーンおよびNP - 40、DMSOなどの一般に用いられる界面活性剤、ならびに参照によってその全体を本明細書に援用する、2007年11月1日出願された米国特許仮出願第60/984,698号に記載された組成物のいずれか一つがあるが、これに限定されるものではない。

#### 【0021】

本発明の一実施形態では、胎児細胞は、母親の生物学的サンプルにおける母親の細胞よりも優先的に溶解される。胎児細胞は、母親の生物学的サンプルを、本明細書に記載するような溶解試薬と一定の時間接触させることにより母親の細胞よりも優先的に溶解することができる。技術的な限界にとらわれるわけではないが、母親の循環血中の胎児細胞は元来、傷ついており ( *compromised* )、アポトーシスを起こしやすい ( *apoptotic* ) と考えられ、たとえば、胎児細胞は、母親の細胞がほとんど溶解しない濃度の溶解試薬で、あるいは ( 同じ濃度の溶解剤を使用する場合 ) 母親の細胞の溶解に要する時間より短い時間で優先的に溶解できる。胎児細胞を優先的に溶解する溶解条件に関連する様々な因子は変化させてもよい。以下に限定されるものではないが、溶解反応の時間、溶解剤の濃度、溶解剤の性質、溶解液のpHおよび溶解反応が起こる温度などの例示的な因子は、胎児細胞の優先的な溶解を実現するが、母親の細胞の溶解は実現しないように変化させてもよい。別の実施形態では、前記時間は、約10分から約30分である。別の実施形態では、前記溶解試薬は、S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素 ( *GTM I* ) またはその塩を含む。GTM I の濃度は、約0.1mM ~ 約500mM、一層好ましくは約0.5mM ~ 約25mM、最も好ましくは約20mMであってもよい。別の実施形態では、溶解試薬は、GTM I、ビタミンE、界面活性剤および任意にサポニンを含む。別の実施形態では、溶解試薬は、GTM I、ビタミンE、サポニン、トリトンX - 100、DMSOおよびpH7.2 ~ 7.4の緩衝液を含む。

## 【0022】

上記のように、母親の生物学的サンプルにおいて母親の細胞よりも胎児細胞の優先的な溶解を実現するには、様々な因子を変化させてもよい。一実施形態では、母親の生物学的サンプルを約0.1 mM～約500 mMのG T M I溶液と濃度範囲の上限で約1～10秒間、さらに濃度範囲の下限で約1時間接触させる。別の実施形態では、母親の生物学的サンプルを約1 mM～約25 mMのG T M I溶液と濃度範囲の上限値で約5分間、さらに濃度範囲の下限値で約30分間接触させる。なお別の実施形態では、生物学的サンプルを約1 mM～約5 mMのG T M I溶液と約10～30分間接触させる。こうした変更および操作は、当業者の知識の範囲内である。

## 【0023】

核酸については、当該技術分野において公知の任意の手段により溶解混合物から抽出することができる。一実施形態では、溶解混合物の遠心分離により得られた上清から任意の好適な手段により核酸を単離する。上清は任意に、核酸を単離する前にさらに処理してもよい。たとえば、上清は、試薬、たとえば、タンパク質を消化して溶解混合物中の核酸を取り出したり、あるいは精製したりしやすくするプロテイナーゼKで処理してもよい。こうした試薬を使用する場合、たとえば、サンプルを約95℃に加熱して試薬を不活性化する。次いで核酸を、たとえばフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させてさらに精製してよい。次いで核酸ペレットをヌクレアーゼフリー水に懸濁し、その後の遺伝学的分析に使用してよい。あるいは、市販されているキット、たとえば、RocheのApoptotic DNA Ladderキット、またはQIAMP DNA Blood Miniキット、またはRocheのMAGNA Pure LC DNAキット1を使用して上清から核酸を取り出してもよい。

## 【0024】

本発明の一実施形態では、RHD遺伝子の少なくとも1個のエクソンを検出して被験体のRhD遺伝子型を確認する。10個のエクソンのいずれかを検出してRhD遺伝子型を判定できる。好ましくは、エクソン4、エクソン5、エクソン7またはエクソン10の少なくとも1個を検出する。いくつかの実施形態では、RHD遺伝子の少なくとも2個のエクソンを検出する。他の実施形態では、RHD遺伝子の少なくとも3個のエクソンを検出する。本発明の方法は、好ましいエクソン各々の起こり得るすべての組み合わせの検出を企図している。たとえば、エクソン4および5；エクソン4および7；エクソン4および10；エクソン5および7；エクソン5および10；またはエクソン7および10の検出を使用すれば、被験体のRhD遺伝子型を予測することができる。同様に、エクソン4、5および7；エクソン4、5および10；エクソン5、7および10またはエクソン4、7および10の検出を使用すれば、被験体のRhD遺伝子型を診断することができる。別の実施形態では、エクソン4、5、7および10を検出して被験体のRhD遺伝子型を判定する。

## 【0025】

RHD遺伝子の2個以上のエクソンを検出するとアッセイの感度および特異性が高まる。前述したように、RHD遺伝子のエクソンの一部または全部を含む個体群にはRHD遺伝子の改変体が存在するが、遺伝子の変異により機能的なD抗原は産生しない。したがって、こうした対立遺伝子を保有する個体はRhD陰性である。2個以上のエクソンまたはエクソンの特定の領域（特定のpsi領域など）を検出することで、こうした非機能的なRHD改変体による偽陽性を排除できる。たとえば、エクソン7を検出すれば、RHD遺伝子および非機能的なRHD改変体が共に同定される。しかしながら、エクソン5の特定のpsi領域の検出はRHD遺伝子のみ同定する。いくつかの実施形態では、RHD遺伝子の3個以上のエクソンを検出して被験体のRhD遺伝子型を判定する。他の実施形態では、RHD遺伝子の4個のエクソンを検出して被験体のRhD遺伝子型を判定する。

## 【0026】

RHD遺伝子のエクソンは、特定の核酸配列の存在を同定する、当該技術分野において

10

20

30

40

50

公知の任意の方法により検出することができる。好適な方法として、サザンブロット法、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR：Polymerase Chain Reaction）、サンドイッチハイブリダイゼーションおよびリアルタイムPCR（RT-PCR：Real Time-Polymerase Chain Reaction）があるが、これに限定されるものではない。本発明の一実施形態では、RHD遺伝子の少なくとも1個のエクソンの検出は、前記少なくとも1個のエクソンを1種または複数種のプライマーセットで増幅し、その少なくとも1個のエクソンを1種または複数種の標識プローブで同定することを含む。本明細書で使用する場合「プライマーセット」とは、一対のプライマー、すなわち特定のヌクレオチド配列またはゲノム領域に隣接し、かつポリメラーゼが特定の配列またはゲノム領域を増幅することを可能にする遊離の3'ヒドロキシル末端を持つフォワードプライマーおよびリバースプライマーをいう。「標識プローブ」とは、検出可能なシグナルを発生する化合物にコンジュゲートされ、かつ標的DNA配列と相補的である一本鎖核酸をいう。本発明の別の実施形態では、1種または複数種のプライマーセットにより、ヒトRHD遺伝子のエクソン4を増幅する。別の実施形態では、1種または複数種のプライマーセットにより、ヒトRHD遺伝子のエクソン5を増幅する。別の実施形態では、1種または複数種のプライマーセットにより、ヒトRHD遺伝子のエクソン7を増幅する。さらに別の実施形態では、1種または複数種のプライマーセットにより、ヒトRHD遺伝子のエクソン10を増幅する。2種以上のプライマーセットを使用して1個のエクソンの特定の領域を増幅してもよい。たとえば、第1のプライマーセットにより第1のエクソンの第1の領域を増幅してもよく、第2のプライマーセットにより第1のエクソンの第2の領域を増幅してもよい。エクソンの第1の領域および第2の領域は重複しても構わない。その代わりに、またはそれに加えて、2種以上のプライマーセットを使用して2個の異なるエクソンを増幅してもよい。いくつかの実施形態では、2種以上のプライマーセットによりヒトRHD遺伝子の2個以上のエクソンを増幅する。

10

20

30

40

50

#### 【0027】

上記で論じたように、プライマーセットは、ヒトRHD遺伝子の特定のエクソンまたはそのエクソンの特定の領域を増幅するように設計してもよい。したがって、本発明はさらに、ヒトRHD遺伝子の1つまたは複数のエクソンの特定の領域を増幅するためのプライマーとして使用できる単離された新規なポリヌクレオチド（たとえばオリゴヌクレオチド）を提供する。単離されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22および配列番号23からなる群より選択される配列を含んでいてもよく、単離されたポリヌクレオチドは50未満の塩基を含む。一実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号4、配列番号5、配列番号10、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22および配列番号23からなる群より選択される配列を含み、単離されたポリヌクレオチドは50未満の塩基を含む。プライマーポリヌクレオチドは、以下に限定されるものではないが、ロックド核酸（LNA：locked nucleic acid）、ペプチジル核酸（PNA：peptidyl nucleic acid）、2'-O-アルキル（たとえば2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル）などの糖修飾、2'-フルオロおよび4'チオ修飾、骨格修飾、1つまたは複数のホスホロチオアート結合、メチルホスホナート結合、モルホリノ結合またはホスホノカルボキシレート結合などを含む1つまたは複数の化学修飾を含んでいてもよい。一実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、約10～約30塩基を含む。別の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、約15～約25塩基を含む。ヒトRHD遺伝子のエクソン4を増幅するための好ましいプライマーセットとして、配列番号1、配列番号2、配列番号4または配列番号5に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドがある。ヒトRHD遺伝子のエクソン5を増幅するための好ましいプライマーセットとして、配列番号7、配列番号8、配列番号10または配列番号11に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドがある。ヒトRHD

遺伝子のエクソン 7 を増幅するための好ましいプライマーセットとして、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 16 または配列番号 17 に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドがある。ヒト RHD 遺伝子のエクソン 10 を増幅するための好ましいプライマーセットとして、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 22 または配列番号 23 に記載された配列を含む単離されたポリヌクレオチドがある。本発明の別の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、ヒト RHD 遺伝子のエクソンにハイブリダイズする。なお別の実施形態では、本発明のプライマーは、非常に密接に関連する RHC E 遺伝子、またはゲノム内の他の任意の遺伝子の任意の部分を増幅せずに RHD 遺伝子の特定のエクソンまたはエクソンの領域を特異的に増幅し、たとえば、プライマーは高感度であり、汚染染色体 DNA のバックグラウンドが大きくても、RHD 遺伝子の配列を含む非常に少量の DNA を増幅することができる。

10

#### 【0028】

本発明の別の実施形態では、プライマーポリヌクレオチドは、配列番号 76、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 83、配列番号 84、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 92、配列番号 93、配列番号 95、配列番号 96、配列番号 98、配列番号 99、配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 107、配列番号 109、配列番号 110、配列番号 112、配列番号 113、配列番号 114、配列番号 115、配列番号 116、配列番号 117、配列番号 118、配列番号 119、配列番号 121 および配列番号 122 からなる群より選択される配列を含んでもよく、プライマーポリヌクレオチドは 50 未満の塩基を含む。

20

#### 【0029】

本発明はさらに、RHD 遺伝子の 1 つまたは複数のエクソンを検出するプローブとして使用できる単離されたポリヌクレオチド（たとえばオリゴヌクレオチド）を提供する。単離されたポリヌクレオチドは、配列番号 3、配列番号 6、配列番号 9、配列番号 12、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21 および配列番号 24 からなる群より選択される配列を含んでもよく、単離されたポリヌクレオチドは、50 未満の塩基を含む。一実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、約 10 ~ 約 40 塩基を含む。別の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、約 15 ~ 約 30 塩基を含む。RHD 遺伝子のエクソン 4 を検出する例示的なプローブポリヌクレオチドは、配列番号 3 または配列番号 6 に記載された配列を含む。RHD 遺伝子のエクソン 5 を検出する例示的なプローブポリヌクレオチドは、配列番号 9 または配列番号 12 に記載された配列を含む。RHD 遺伝子のエクソン 7 を検出する例示的なプローブポリヌクレオチドは、配列番号 15 または配列番号 18 に記載された配列を含む。RHD 遺伝子のエクソン 10 を検出する例示的なプローブポリヌクレオチドは、配列番号 21 または配列番号 24 に記載された配列を含む。

30

#### 【0030】

別の実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、配列番号 78、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 85、配列番号 88、配列番号 91、配列番号 94、配列番号 97、配列番号 106、配列番号 108、配列番号 111、配列番号 120 および配列番号 123 からなる群より選択される配列を含んでもよく、プローブポリヌクレオチドは 50 未満の塩基を含む。

40

#### 【0031】

好ましくは、単離されたプローブポリヌクレオチドは、1 つまたは複数の方法により検出が可能なシグナルを発生する少なくとも 1 つの標識を含む。好適な標識としては、<sup>35</sup>S、<sup>33</sup>P および <sup>32</sup>P などの放射能標識、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光色素およびアルカリホスファターゼなどの酵素があるが、これに限定されるものではない。別の標識および標識の適切な検出方法については、当業者であれば確認することができる。一実施形態では、標識は、単離されたポリヌクレオチドの 5' 末端に結合される。別の実施形態では、標識は、単離されたポリヌクレオチドの 3' 末端に結合される。別の実施形態では、第 1 の標識を単離されたポリヌクレオチドの 5' 末端に結合し、第 2 の標識を単離され

50

たポリヌクレオチドの3'末端に結合する。第1の標識および第2の標識は、相互作用して特有のシグナルを発生してもよいし、またはどちらかの標識が発生したシグナルを減弱させてもよい。たとえば、蛍光共鳴エネルギー転移、すなわちFRET (fluorescence resonance energy transfer) として公知の現象では、第1の蛍光標識が励起されると、エネルギーが転移するため第1の蛍光標識の近傍にある第2の蛍光標識の発光波長でシグナルが発生する。この現象の変形では、第1の蛍光標識の近傍にある第2の標識により第1の蛍光標識のシグナルを消光 (quench) することができる。こうした様式で相互作用する第1の標識および第2の標識を使用すれば、標識を結合した分子の特定のコンホメーションを検出することができる。本発明の好ましい実施形態では、単離されたプローブポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドの5'末端に結合したレポーター分子、およびポリヌクレオチドの3'末端に結合したクエンチャー分子を含む。レポーター/クエンチャーの任意の組み合わせを単離されたポリヌクレオチドにコンジュゲートしてもよい。好適なレポーター分子として、6-カルボキシフルオレセイン (6-FAM)、テトラクロロフルオレセイン (TET: tetrachlorofluorescein)、ROX、HEXおよびJOEがあるが、これに限定されるものではない。好適なクエンチャー分子としては、テトラメチルローダミン (TAMRA: tetramethylrhodamine)、ジヒドロシクロピロロインドールトリペプチド副溝結合物質 (MGB: minor groove binder)、ブラックホールクエンチャー (BHQ: black hole quencher) および副溝結合型非蛍光クエンチャー (MGBNFQ: minor groove binding nonfluorescent quencher) があるが、これに限定されるものではない。こうした二重標識ポリヌクレオチドは、リアルタイムPCR技術を使用してRHD遺伝子の1つまたは複数のエクソンを検出する際に本発明のプライマーポリヌクレオチドと併用するとプローブとして特に有用である。

10

20

30

40

50

#### 【0032】

本発明は、胎児のRHD遺伝子型を判定する方法であって、胎児細胞を含む母親の生物学的サンプル中の細胞を溶解して溶解混合物を形成すること；前記溶解混合物から核酸を抽出すること；および前記抽出された核酸においてRHD遺伝子の少なくとも1個のエクソンを検出することを含み、前記エクソンの有無から胎児のRhD遺伝子型が示される、方法を包含する。一実施形態では、この方法はさらに、前記抽出された核酸において胎児DNAの存在を確認することを含む。

#### 【0033】

いくつかの実施形態では、抽出された核酸中の胎児DNAの存在は、Y染色体を検出することにより確認される。生物学的サンプルから抽出されたDNAのY染色体を検出するには、いくつかの方法が当業者に知られている。一実施形態では、Y染色体は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む1種または複数種のプライマーセットでY染色体上にある遺伝子を増幅し；1種または複数種の標識プローブで遺伝子を同定することにより検出する。ヒトY染色体上にある遺伝子、AMELY (amelogenin, Y-chromosomal: アメロゲニン、Y染色体)、ANT3Y (adenine nucleotide translocator-3 on the Y: Y上のアデニンヌクレオチド輸送体-3)、ASMTY (アセチルセロトニンメチルトランスフェラーゼ (acetylserotonin methyltransferase) を表す)、AZF1 (azoospermia factor 1: 無精子症因子1)、AZF2 (azoospermia factor 2: 無精子症因子2)、BPY2 (basic protein on the Y chromosome: Y染色体上の塩基性タンパク質)、CSF2RY (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor, alpha subunit on the Y chromosome: Y染色体上の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体、サブユニット)、DAZ (deleted in azoospermia: 無精子症で欠失)、IL3RAY (interleukin-

3 receptor: インターロイキン - 3 受容体)、PRKY (protein kinase, Y-linked: プロテインキナーゼ、Y連鎖)、RBM1 (RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1: RNA 結合モチーフタンパク質、Y染色体、ファミリー1、メンバーA1)、RBM2 (RNA binding motif protein 2: RNA 結合モチーフタンパク質2)、RPS4Y (Ribosomal protein S4, Y-linked copy 1: リボソームタンパク質S4、Y連鎖コピー1)、RPS4Y2 (Ribosomal protein S4, Y-linked copy 2: リボソームタンパク質S4、Y連鎖コピー2)、SRY (sex-determining region: 性決定領域)、TSPY (testis-specific protein: 精巣特異的タンパク質)、UTY (ubiquitously transcribed TPR gene on Y chromosome: Y染色体上で遍在的に転写されるTPR遺伝子)、ZFY (zinc finger protein: 亜鉛フィンガータンパク質) およびFCYなどのいずれか一つを検出すればよい。好ましい実施形態では、遺伝子はSRY、FCYまたはDAZである。SRY遺伝子を増幅するための例示的なプライマーとして、配列番号25または配列番号26に記載された配列を含むポリヌクレオチドがある。FCY遺伝子を増幅するための例示的なプライマーとして、配列番号28または配列番号29に記載された配列を含むポリヌクレオチドがある。DAZ遺伝子を増幅するための例示的なプライマーとして、配列番号31または配列番号32に記載された配列を含むポリヌクレオチドがある。SRY遺伝子を検出するための例示的なプローブとして、配列番号27を含むポリヌクレオチドがある。FCY遺伝子を検出するための例示的なプローブとして、配列番号30を含むポリヌクレオチドがある。DAZ遺伝子を検出するための例示的なプローブとして、配列番号33を含むポリヌクレオチドがある。

#### 【0034】

本発明はさらに、Y染色体上のDAZ遺伝子の検出に例示的なプライマーおよびプローブとして使用できる新規なポリヌクレオチド (polynucleotide) (たとえばオリゴヌクレオチド) を提供する。一実施形態では、この単離されたポリヌクレオチドは、配列番号31、配列番号32または配列番号33に記載された配列を含み、単離されたポリヌクレオチドは、50未満の塩基を含む。別の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、約10～約30塩基を含む。別の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、約15～約25塩基を含む。

#### 【0035】

他の実施形態では、抽出された核酸中の胎児DNAの存在は、父系遺伝の対立遺伝子を検出することにより確認される。父系遺伝の対立遺伝子の検出は、1つまたは複数の多型マーカーの存在を判定することにより行えばよい。一実施形態では、母親の細胞から得られたDNAの1つまたは複数の多型マーカーをスクリーニングする。その後、母体血液サンプルの選択的溶解物から得られる抽出されたDNAについて、母親のDNA抽出物に認められない1つまたは複数の多型マーカーをスクリーニングする。選択溶解物からの抽出物に1つまたは複数の多型マーカーが存在すれば父系遺伝の対立遺伝子が示され、抽出物中に胎児DNAが存在することが確認される。父系遺伝の対立遺伝子の判定には様々な多型マーカーを使用してもよい。プライマーおよびプローブについては、抽出されたDNAにおいて適切な多型マーカーを検出するように設計すればよい。多型マーカーならびに多型マーカーを検出するためのプライマーおよびプローブの例示的なセットは実施例3に記載する。

#### 【0036】

本発明はさらに、被験体から得られる生物学的サンプルから抽出された核酸においてRHD遺伝子の複数のエクソンを検出することにより被験体のRHD遺伝子型を判定する方法を包含する。一実施形態では、この方法は、被験体由来の1つまたは複数の細胞を含む生物学的サンプルから核酸を抽出すること；および前記抽出された核酸においてRHD遺

10

20

30

40

50



伝子の少なくとも3個のエクソンを検出することを含み、前記エクソンの有無から被験体のRhD遺伝子型が示される。別の実施形態では、前記抽出された核酸においてRhD遺伝子の4個のエクソンを検出する。いくつかの実施形態では、被験体は胎児である。他の実施形態では、生物学的サンプルは胎児細胞を含む母親の生物学的サンプルである。

【0037】

RhD遺伝子の10個のエクソンの任意の組み合わせの検出を使用して被験体のRhD遺伝子型を確認することができる。好ましくは、エクソン4、エクソン5、エクソン7およびエクソン10の組み合わせを検出する。いくつかの実施形態では、エクソン4、エクソン5、エクソン7およびエクソン10の4個をすべて検出して被験体のRhD遺伝子型を判定する。RhD遺伝子の3個以上のエクソンの検出では、3種以上のプライマーセットでの3個以上のエクソンの増幅、および3種以上の標識プローブまたは上述の他の任意の方法での3個以上のエクソンの同定を含んでもよい。3種以上のプライマーセットおよび3種以上の標識プローブは、本明細書に記載の本発明のプライマーおよびプローブのいずれであってもよい。

10

【0038】

本発明はさらに、本明細書に記載の新規なプライマーセットおよび新規なプローブを含むRhDジェノタイピングキットを提供する。一実施形態では、このキットは、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む少なくとも1種のプライマーセット；少なくとも1種の標識プローブ；および生物学的サンプルにおいてRhD遺伝子を検出するための、前記少なくとも1種のプライマーセットおよび前記少なくとも1種のプローブの使用説明書を含み、前記フォワードプライマーおよび前記リバースプライマーは、ヒトRhD遺伝子のエクソンにハイブリダイズする。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、キットは、2種以上のプライマーセットおよび2種以上の標識プローブを含む。他の実施形態では、2種以上のプライマーセットは、ヒトRhD遺伝子の1個のエクソンにハイブリダイズする。なお他の実施形態では、2種以上のプライマーセットは、ヒトRhD遺伝子の2個以上のエクソンにハイブリダイズする。好ましくは、各プライマーセットは、RhD遺伝子のエクソンを増幅するためのフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む。一実施形態では、エクソンは、ヒトRhD遺伝子のエクソン4、エクソン5、エクソン7またはエクソン10である。別の実施形態では、フォワードプライマーは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号16、配列番号19または配列番号22に記載された配列を含むポリヌクレオチドを含んでもよい。別の実施形態では、リバースプライマーは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号11、配列番号14、配列番号17、配列番号20または配列番号23に記載された配列を含むポリヌクレオチドを含んでもよい。なお別の実施形態では、標識プローブは、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号15、配列番号18、配列番号21または配列番号24に記載された配列を含むポリヌクレオチドを含んでもよい。

30

【0040】

別の実施形態では、キットはさらに、溶解試薬を含む。溶解試薬は、本明細書に記載のものを含む生体細胞を溶解するための溶解試薬 ( l y i n g   r e a g e n t ) のいずれでもよい。好ましい実施形態では、溶解試薬は、S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素を含む。別の実施形態では、溶解試薬は、S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素、ビタミンE、トリトンX - 100およびサポニンを含む。なお別の実施形態では、溶解試薬は、S - ( 2 - グアニジノ - 4 - チアゾイル ) - メチル - イソチオ尿素、ビタミンE、サポニン、DMSO、トリトンX - 100およびpH7.2~7.4の緩衝液を含む。キットは、生物学的サンプル中の細胞を溶解し、その後そのライセートからDNA抽出物を調製するための溶解試薬の使用説明書をさらに含んでもよい。別の実施形態では、説明書には、母親の生物学的サンプル中の胎児細胞を選択的に溶解するための、溶解試薬の使用について記載されていてもよい。

40

50

## 【0041】

本発明はさらに、単離された核酸および本明細書に記載の新規なプライマーおよびプローブの様々な組み合わせを含む試薬混合物を企図している。一実施形態では、この試薬混合物は、単離された核酸；各々がフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、RHD遺伝子の3個以上のエクソンを増幅するための3種以上のプライマーセット；および3種以上の標識プローブを含む。「単離された核酸」とは、被験体の生物学的サンプルから抽出された核酸をいう。単離された核酸は、試薬混合物に含まれる本発明のプライマーによりRHD遺伝子の特定のエクソンを増幅するための鋳型としてもよい。好ましい実施形態では、3個以上のエクソンは、ヒトRHD遺伝子のエクソン4、エクソン5、エクソン7およびエクソン10からなる群より選択される。別の実施形態では、試薬混合物は、単離された核酸；RHD遺伝子の4個のエクソンを増幅するための4種のプライマーセット；および4種の標識プローブを含む。4個のエクソンは、ヒトRHD遺伝子のエクソン4、エクソン5、エクソン7およびエクソン10であってもよい。

10

## 【0042】

上記に詳細に記載されているように、本発明の新規なプライマーおよびプローブは、RHD遺伝子の特定のエクソンまたは特定のエクソンの領域を特異的に増幅する。試薬混合物には、前述のプライマーポリヌクレオチドおよびプローブポリヌクレオチドのいずれが含まれていてもよい。いくつかの実施形態では、3種以上のプライマーセットのフォワードプライマーは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号16、配列番号19および配列番号22からなる群より選択される。他の実施形態では、3種以上のプライマーセットのリバースプライマーは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号11、配列番号14、配列番号17、配列番号20および配列番号23からなる群より選択される。なお他の実施形態では、3種以上の標識プローブは、配列番号3、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号15、配列番号18、配列番号21および配列番号24からなる群より選択される。

20

## 【0043】

以下、別の例により本発明をさらに説明するが、こうした例を限定するものと解釈してはならない。この出願において引用した参考文献、特許および公開された特許出願ならびに図の内容はすべて、参照によってその全体を本明細書に援用する。

30

## 【実施例】

## 【0044】

(実施例)

(実施例1．母体血液ライセートから得られた胎児細胞のRhDジェノタイピング)

蓋をした50mlチューブにおいて妊婦(妊娠8~12週)由来の血液サンプル(20ml)を溶解試薬(2ml)で穏やかに混合しながら室温で10~20分間処理した。溶解試薬は、10mMのS-(2-グアニジノ-4-チアゾイル)-メチル-イソチオ尿素(GTMI)、5mMのビタミンE、1%トリトンX-100、0.5%サポニン、2.5%DMSO、0.15MのNaClおよび0.05MのHEPES、pH7.2を含んでいた。次いでチューブを2000gで10分間遠心分離し、上清を別の50mlチューブに移した。この手順を行うことで、母体血液サンプル中に存在する母親の細胞よりも、アポトーシスを起こしやすい胎児細胞の方を優先的に溶解する。参照によってその全体を本明細書に援用する、2007年11月1日出願された同時係属中の米国特許仮出願第60/984,698号を参照されたい。

40

## 【0045】

DNAから任意のタンパク質を分離するため、まず上清をプロテイナーゼK(10mg/ml)で55、10分間処理し、続いて溶解緩衝液(5mMのグアニジニウムイソチオシアネート12ml、20%トリトンX-100を含む50mMのトリスHCl(pH7.2)、あるいは12ml、Magna Pureキット、Roche Diagnosticsのどちらか)および磁性ガラス粒子(MGP:Magnetic Glass Particle)(3ml、Magna Pureキット)で処理した。よく混合し

50

てからチューブを回転ホイールで室温にて20～30分間回転させた。チューブの上清を磁性ラックに2分間置いてMGPに結合したDNAを集めた。MGPで集めた後、上清を捨て、MGPを洗浄用緩衝液Iで2回、さらに洗浄用緩衝液IIで2回、あるいは洗浄液が透明になるまで洗浄した。MGPを数時間にわたって完全に風乾した。このビーズから溶出緩衝液でDNAを溶出し(2×400μl)、濃度をNanoDrop Spectrophotometer-1000で判定した。溶出したDNAは、下記のような胎児起源および胎児RhD状態を判定するPCR増幅に使用した。

# 【0046】

特異性を高めるため、RhD遺伝子の4個のエクソン(4、5、7および10)各々に対しプライマーとプローブとのセットを2組作製した。母体血液から抽出したDNAからの胎児RhD状態の確認は、一致する胎児組織でのDNAのリアルタイム・ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により行った。既知のRhD陽性およびRhD陰性の個体由来のDNAを対照として使用した。胎児遺伝子型を評価する定量PCR法に使用できる、ヒトRhD遺伝子のエクソンごとに作製したプライマーおよびプローブの配列を以下に示す。

# 【0047】

## 【化1】

	5'-----3'		
RhDエクソン4.2 フォワードプライマー	AGACAAACTGGGTATCGTTGCTG	(配列番号 1)	
RhDエクソン4.2 リバースプライマー	GTGCCTGCCAAAGCCTCTAC	(配列番号 2)	
RhDエクソン4.2 プローブ	(6FAM)-CTGATCTTTATCCTCCGTTCC-(BHQ)	(配列番号 3)	
RhDエクソン4.3 フォワードプライマー	ACTACCACATGAACATGATGCACA	(配列番号 4)	
RhDエクソン4.3 リバースプライマー	GGCCACAGACAGCCCAA	(配列番号 5)	
RhDエクソン4.3 プローブ	(6FAM)-CTACGTGTTCCGAGCCT-(BHQ)	(配列番号 6)	
RhDエクソン5 フォワードプライマー	CGCCCTCTTCTTGTGGATG	(配列番号 7)	
RhDエクソン5 リバースプライマー	GAACACGGCATTTCTTCCTTTC	(配列番号 8)	
RhDエクソン5 プローブ	(6FAM)-TCTGGCCAAGTTCAACTCTGCTCGCT-(BHQ)	(配列番号 9)	
RhDエクソン5.2 フォワードプライマー	TGTGGATGTTCTGGCCAAGTT	(配列番号 10)	
RhDエクソン5.2 リバースプライマー	TGAACACGGCATTTCTTCCTTTC	(配列番号 11)	
RhDエクソン5.2 プローブ	(6FAM)-AACTCTGCTCTGCTGAGAAGTCCAAT-(BHQ)	(配列番号 12)	
RhDエクソン7 フォワードプライマー	GGATTCCCCACAGCTCCAT	(配列番号 13)	
RhDエクソン7 リバースプライマー	CTCCAAGCAGACCCAGCAA	(配列番号 14)	
RhDエクソン7 プローブ	(6FAM)-ATGGGCTACAACTTC-(MGBNFQ)	(配列番号 15)	
RhDエクソン7.3 フォワードプライマー	CCGGCTCCGACGGTATC	(配列番号 16)	
RhDエクソン7.3 リバースプライマー	TGGGTCTGCTTGGAGAGATCAT	(配列番号 17)	
RhDエクソン7.3 プローブ	(6FAM)-ACCAGCAGCACAATG-(BHQ)	(配列番号 18)	
RhDエクソン10 フォワードプライマー	TGCCTGCATTTGTACGTGAGA	(配列番号 19)	
RhDエクソン10 リバースプライマー	CCTGCGCGAACATTGGA	(配列番号 20)	
RhDエクソン10 プローブ	(6FAM)-ACGCTCATGACAGCAA-(BHQ)	(配列番号 21)	
RhDエクソン10.1 フォワードプライマー	CCTCTCACTGTTGCCTGCATT	(配列番号 22)	
RhDエクソン10.1 リバースプライマー	AGTGCCTGCGCGAACATT	(配列番号 23)	
RhDエクソン10.1 プローブ	(6FAM)-TACGTGAGAAACGCTCATGACAGCAAAGTCT-(BHQ)	(配列番号 24)	

RT-PCR反応はすべて3連で行った。3反応のうち少なくとも2反応を、胎児RhD遺伝子型判定の前にPCR増幅産物を生じさせるために必要とした。PCR反応混合物の組成およびサイクルプロトコルを以下に示す。RT-PCR反応の実施および分析はす

べてABI社の7900HT Fast Real-Time PCR Systemにより行った。

【0048】

【化2】

PCR反応混合物の組成 :

DNA	= 7.5 ul
Taqman Universal PCR Master Mix	= 12.5 ul
RhD エクソンフォワードプライマー	= 1.25 ul (0.3 pmol/ul)
RhD エクソンリバースプライマー	= 1.25 ul (0.3 pmol/ul)
RhD エクソンプローブ	= 2.5 ul (0.15 pmol/ul)
PCRの全反応量	= 25 ul

10

PCRサイクル:

ポリメラーゼ活性化 95℃で10分  
 アニール 60℃で60秒  
 伸長 60℃で10秒  
 変性 95℃で15秒  
 45サイクル

RT-PCRの結果は、PCR反応ごとにサイクル閾値 (Ct: cycle threshold) に基づいて表にした。初期DNA鋳型の量が多いほど、Ct値は低くなる。低いCt値 (< 30) は母親のRhD陽性状態を示す (RhD遺伝子の非機能的な遺伝的変体の存在によりサンプルの1~3%で母親のDNAから陽性シグナルを得た)。高いCt値 (34~43) から、陽性胎児RhD状態が診断されるだけでなく、ライセートに胎児DNAが存在することも確認した。鋳型 (抽出された) DNAの増幅がないとき、機能的なD抗原がない胎児 (すなわち胎児のRhD陰性) と解釈し、これは、対応する胎児組織から抽出されたDNAのRT-PCRにより確認した。表1は、16例のRhD陰性母体血液サンプルから抽出されたDNAのRT-PCRのCt値を示す。その結果を表2にまとめている。

20

【0049】

30

【表 1】

表1: RhD陰性母体血液サンプルから抽出したDNAから増幅されたRHDエクソンのサイクル閾値

サンプルID	GA	胎児組織	Ct値 RT-PCR																							
			エクソン4.2				エクソン4.3				エクソン5				エクソン5.2				エクソン7				エクソン7.3			
13560	9.0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13577	9.0	pos	35.5	34.5	35.2	35.1	34.7	34.8	35.5	36.1	35.8	34.0	34.5	34.0	34.2	35.5	35.0	34.1	35.2	35.0	33.2	33.9	34.0	36.7	37.5	37.0
13580	11.0	pos	neg	neg	neg	44.0	43.7	43.6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	36.2	36.6	36.0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13613	7.0	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	42.2	41.6	41.0	41.7	42.4	41.0	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13634	8.0	pos	40.4	41.1	41.4	37.2	37.0	37.6	36.7	37.5	38.0	neg	neg	neg	35.2	35.6	36.0	37.8	38.3	38.0	36.6	37.5	37.0	neg	neg	neg
13661	9.0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13667	18.0	pos	36.5	36.7	37.0	35.7	34.9	35.5	36.9	35.1	36.2	34.5	34.8	35.0	33.6	33.1	34.0	37.1	36.7	37.0	35.9	34.9	35.0	36.7	36.7	37.0
13679	9.0	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
13690	6.0	pos	neg	neg	neg	29.0	29.5	29.2	42.5	neg	44.7	41.7	neg	neg	25.5	26.8	25.9	29.9	30.0	30.2	31.1	32.8	29.9	33.2	32.2	31.6
13699	7.0	pos	42.6	neg	neg	41.1	40.1	40.6	neg	44.5	neg	37.2	neg	neg	35.7	36.5	39.9	neg	42.3	42.0	neg	41.3	41.8	43.5	neg	neg
13701	9.0	pos	35.2	36.3	35.1	34.2	35.4	35.0	35.3	34.6	33.7	31.6	37.8	37.8	31.9	31.7	31.5	35.4	35.2	36.0	34.0	33.1	33.8	34.6	35.1	35.7
13709	9.0	pos	36.0	36.5	36.4	36.6	36.3	35.8	39.0	37.5	38.4	34.5	34.8	35.1	36.1	35.8	35.5	37.4	36.6	37.3	32.3	35.9	35.7	38.4	neg	neg
13711	12.0	pos	36.3	36.3	35.9	35.9	35.9	37.0	43.1	39.8	40.3	33.5	33.0	35.0	32.2	31.1	32.0	37.5	38.1	38.4	37.6	36.1	35.7	38.8	37.3	37.5
13713	12.0	pos	28.7	28.5	28.6	28.4	28.6	28.7	28.5	28.6	28.5	29.0	28.5	28.0	26.6	26.5	26.5	29.0	29.0	29.7	27.2	27.1	26.9	28.9	28.0	28.9
13722	11.0	pos	34.3	36.3	35.8	35.8	36.7	25.8	36.0	35.2	33.8	34.0	35.0	34.3	32.6	32.6	33.4	36.2	36.0	36.3	34.9	34.1	34.8	35.6	36.6	35.7
13743	9.0	pos	neg	38.0	38.2	neg	neg	neg	39.0	38.3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

【 0 0 5 0 】

【表 2】

表2: 結果の概要。全16例で胎児RhD状態は正確に同定された。

一致する胎児組織		
	RhD- 陽性	RhD- 陰性
RhD- 陽性	13	0
RhD- 陰性	0	3

\* 感度 : 100% ( 偽陰性なし )

\* 特異性 : 100% ( 偽陽性なし )

( 実施例 2 . RhDエクソンプライマーセットのパリテーション )

RhD陰性の母親由来の選択溶解血液でのRT-PCR増幅を行った際に、37を超える高いCt値が認められることもあった。RhDプライマーにより作製された単位複製配列のこうした高いCt値が実際に少量のRhD陽性胎児DNAの存在に対応するPCR産物を反映するものであることを確認するため、PCR産物のサイズをゲル電気泳動により調査し、その後RhD遺伝子座が間違いなく増幅されていたかを確認するため配列決定を行った。

【 0 0 5 1 】

実施例 1 に記載した方法に従って、RhD陽性胎児 ( サンプル 1 4 1 8 0 または 1 4 2 0 2 ) を妊娠しているRhD陰性の母親の血液サンプルを溶解させた。溶解後、Roch MagNA Pureキットを使用してDNAを単離した。Taqman Universal Master Mix ( Applied Biosystems ) と実施例 1 に記載したRhDプライマーセット 4 . 2、4 . 3、5、5 . 2、7、7 . 3、10および10 . 1とを使用してABI社の7900HT RT-PCR Systemでリア

ルタイムPCRを行った。すべてのプライマーセットでDNA鋳型なしの対照（NTC：no DNA template control）を実行したところ、増幅を示すものではない、特定されないCt値を常に得た。次いで1.5%アガロースゲルあるいは4.5%アガロースMS-8ゲルで高いCt(>37)PCR反応物およびNTCを流し、マーカーとして既知のDNAラダーを基準に単位複製配列のサイズを評価した。すべてのRhDプライマーから得られた全PCR産物で、予想された単位複製配列サイズ、58~83bp長を観察した。

#### 【0052】

予想された単位複製配列のバンドをゲルから抽出後、フォワードあるいはリバースPCRプライマーのどちらかを使用して単位複製配列の配列決定を直接行った。シーケンシングは、San DiegoのRetrogenが行った。得られたシーケンシングデータが不確定である場合、単位複製配列をpCR4-TOPOベクター（Invitrogen）にクローニングし、T3プライマーを使用して配列決定を行った。8個の単位複製配列のうち6個は直接配列決定ができたのに対し、残りの2個はpCR4-TOPOベクターから配列決定を行う必要があった。BLASTアルゴリズムを使用して、単位複製配列ごとに得られた配列をGenBank配列データベース（NCBI）で公表されている配列と比較した。各プライマーセットについては以下で検討する。黒文字のDNA配列は、実験で得られた単位複製配列の配列を表す。赤文字のDNA配列は、GenBankで公表されている配列（以下Gene Bankと表示）である。すべての場合において、PCRの単位複製配列の配列はRhD遺伝子座に100%一致した。

10

20

#### 【0053】

（Rh（D）プライマーセット4.2（エクソン4））

図2Aは、プライマーセット4.2で増幅されたサンプル14202を示す（Ct40.2）。観察された3つのPCR産物を、pCR4-TOPOに別々にクローニングし、配列決定を行った。一番上のバンドは70bpの単位複製配列に正確に対応しており、BLASTによりRhD遺伝子座と同定した。

#### 【0054】

#### 【化3】

シーケンシング:ヒト(Homo sapiens)Rh血液型、D抗原(RHD)、mRNA

30

```

検出された配列  GTGCCTGCCAAAGCCTCTACCCGAGGGAACGGAGGATAAAGATCAGACAGCAACGATACCCAGTTTGTCT  70
                  |||
Gene Bank  GTGCCGCGCAAAGCCTCTACCCGAGGGAACGGAGGATAAAGATCAGACAGCAACGATACCCAGTTTGTCT  682

```

（Rh（D）プライマーセット4.3（エクソン4））

図2Bは、RhDプライマーセット4.3で増幅されたサンプル14202の電気泳動ゲルを示す（Ct40.4）。

#### 【0055】

#### 【化4】

シーケンシング:ヒト(Homo sapiens)Rh血液型、D抗原(RHD)、mRNA

40

```

検出された配列  TGTTCGCAGCCTATTTTGGGCTGTCTGTGGCC  32
                  |||
Gene Bank  配列  TGTTCGCAGCCTATTTTGGGCTGTCTGTGGCC  610

```

（Rh（D）プライマーセット5（エクソン5））

図3Aは、RhDプライマーセット5で増幅されたサンプル14180の電気泳動ゲルを示す（最後の2レーン）（Ct39.3）。

#### 【0056】

## 【化 5】

シーケンシング:ヒト(Homo sapiens)Rh血液型、D抗原(RHD)、mRNA

検出された配列      ACTCTGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAATGCC    41  
 |||||  
 Gene Bank 配列      ACTCTGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGAATGCC

(Rh(D)プライマーセット5.2(エクソン5))

図3Bは、RhDプライマーセット5.2によるサンプル14180の増幅を示す(最後の2レーン)(Ct35)。

【0057】

10

## 【化 6】

シーケンシング:ヒト(Homo sapiens)Rh血液型、D抗原(RHD)、mRNA

検出された配列      GAGCAGAGTTGAAACTTGGCCAGAACATCCACA    33  
 |||||  
 Gene Bank 配列      GAGCAGAGTTGAAACTTGGCCAGAACATCCACA    705

(Rh(D)プライマーセット7(エクソン7))

図4Aは、RhDプライマーセット7で増幅されたサンプル14202の電気泳動ゲルを示す(最後の3レーン)(Ct37.3)。4.5%MS8アガロースゲル上に約53および58bpというサイズに近い2個の単位複製配列が目視可能である。この2つの産物をどちらも別々にTAクローニングベクターにクローニングし、複数のクローンの配列決定を行った。配列決定したクローンはすべて、間違いなく同一の58bpの単位複製配列であることを明らかにし、これを、BLASTによりRhD遺伝子座と同定した。

20

【0058】

## 【化 7】

シーケンシング:ヒト(Homo sapiens)Rh血液型、D抗原(RHD)、mRNA

検出された配列      TCTCCAAGCAGACCCAGCAAGCTGAAGTTGTAGCCCATGATGGAGCTGTGGGGAATCC    58  
 |||||  
 Gene bank      TCTCCAAGCAGACCCAGCAAGCTGAAGTTGTAGCCCATGATGGAGCTGTGGGGAATCC    1020

(Rh(D)プライマーセット7.3(エクソン7))

図4Bは、RhDプライマーセット7.3で増幅されたサンプル14202の電気泳動による分析を示す(最後の2レーン)(Ct38.2)。BLASTによりRhD遺伝子座と同定された約61bpの単位複製配列が1個存在した。

30

【0059】

## 【化 8】

シーケンシング:ヒト(Homo sapiens)Rh血液型、D抗原(RHD)、mRNA

検出された配列      CATTGTGCTGCTGGTGCTTGATACCGTCGGAGCCGG    36  
 |||||  
 Gene Bank 配列      CATTGTGCTGCTGGTGCTTGATACCGTCGGAGCCGG    1122

(Rh(D)プライマーセット10および10.1)

図5は、RhDプライマーセット10(Ct42.1、最後の2レーン、59bp)および10.1(10H; Ct37.7、最初の2レーン、74bp)で増幅されたサンプル14180を示す。プライマーセット10.1および10の約74bpおよび59bpの単位複製配列をそれぞれ、BLASTによりRhD遺伝子座と同定した。

40

【0060】

## 【化 9】

RhD プライマーセット 10 (エクソン 10):

シーケンシング: ヒト (Homo sapiens) Rh 血液型、D 抗原 (RHD)、mRNA

検出された配列 CATGACAGCAAAGTCTCCAATGTTTCGCGCAGG 32  
 |||||  
 Gene Bank 配列 CATGACAGCAAAGTCTCCAATGTTTCGCGCAGG 1430

RhD プライマーセット 10H (エクソン10):

シーケンシング: ヒト (Homo sapiens) Rh 血液型、D 抗原 (RHD)、mRNA

検出された配列 CGCTCATGACAGCAAAGTCTCCAATGTTTCGCGCAGGCACT 40  
 |||||  
 Gene Bank 配列 CGCTCATGACAGCAAAGTCTCCAATGTTTCGCGCAGGCACT 1434

10

表 3 にまとめたこれらの実験結果から、RhD プライマーで行ったリアルタイム PCR から得られた Ct 値 42.1 までの Ct が高い PCR 産物はすべて、本物の増幅産物であることを確認する。

【0061】

【表 3】

表3: RhD プライマーセットの Ct バリデーションの結果

20

RhD エクソン	単位複製配列の サイズ	サンプル	Ct	同定された配列	方法
4.2	70	14202	40.2	RhD 遺伝子座- 100% 一致	クローニング
4.3	62	14202	40.4	RhD 遺伝子座- 100% 一致	PCR
5	83	14180	39.3	RhD 遺伝子座- 100% 一致	PCR
5.2	73	14180	35	RhD 遺伝子座- 100% 一致	PCR
7	58	14202	37.3	RhD 遺伝子座- 100% 一致	クローニング
7.3	61	14202	38.2	RhD 遺伝子座- 100% 一致	PCR
10	59	14180	42.1	RhD 遺伝子座- 100% 一致	PCR
10.1	74	14180	37.7	RhD 遺伝子座- 100% 一致	PCR

(実施例 3 - 母体血液サンプル中の胎児 DNA の存在の判定)

30

(胎児 RhD 陰性男性サンプル)

この実施例に記載した実験の目的は、母体血液サンプルから調製したライセートに胎児 DNA が存在することを確認することであった。RhD 陰性の母親の血液由来の胎児 RhD が陽性であれば、母親のサンプルに胎児 DNA が存在する診断指標となると考えた。胎児 RhD 状態が陰性である場合、DNA の胎児起源を、まず、Y 染色体上の SRY (性決定領域) および FCY 遺伝子座を増幅するように設計されたプライマーおよびプローブを使用して RT-PCR で胎児の性別を判定することにより確認した。使用した FCY プライマーおよびプローブについては、以前文献 (D. Bianchi, et al., (2001) Clin. Chem., Vol. 47: 1867) に報告された。さらに胎児の性別は、Y 染色体上の DAZ (deleted in azoospermia: 無精子症で欠失) 遺伝子を増幅するために作製された新規なプライマーおよびプローブによっても判定した。グロビン遺伝子をハウスキーピング遺伝子として、さらに既知の男性 DNA を陽性対照として、女性 DNA を陰性対照として使用した。SRY 陽性サンプルの Ct 値は 32 ~ 37.5 の範囲であったのに対し、FCY 陽性サンプルの Ct 値は 32 ~ 38 であった。DAZ 陽性サンプルの Ct 値は 30 ~ 35 の範囲であり、このことは、DAZ プライマーおよびプローブの方が、SRY および FCY プライマー / プローブより感度が高いことを示した。グロビンの値は 24 ~ 32 の範囲であった。SRY、FCY、DAZ および グロビン遺伝子のプライマーおよびプローブの配列を以下に示す。

40

【0062】



## 【化 1 0】

5'-----3'  
 SRY フォワードプライマー TGCACAGAGAGAAATACCCGAATTA (配列番号 25)  
 SRY リバースプライマー TGCAATTCTTCGGCAGCAT (配列番号 26)  
 SRY プローブ (6FAM)-AAGTATCGACCTCGTCGGAAGGCGAA-(MGBNFQ) (配列番号 27)

FCY フォワードプライマー TCCTGCTTATCCAAATTCACCAT (配列番号 28)  
 FCY リバースプライマー ACTTCCCTCTGACATTACCTGATAATTG (配列番号 29)  
 FCY プローブ (6FAM)-AAGTCGCCACTGGATATCAGTTCCCTTGT-(TAMRA) (配列番号 30)

10

DAZ 1.3 フォワードプライマー CGTATTCATTTTTTCTGGAACCTTT (配列番号 31)  
 DAZ 1.3 リバースプライマー CTGATATCCAGTGGCGACTTGA (配列番号 32)  
 DAZ プローブ (6FAM)-CAGGCATTTCTGCTTATCCAAATTCACC-(BHQ-1) (配列番号 33)

β-グロビン フォワードプライマー GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA (配列番号 34)  
 β-グロビン リバースプライマー CCTTGATACCAACCTGCCAG (配列番号 35)  
 β-グロビン プローブ (6FAM)-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-(TAMRA) (配列番号 36)

(胎児 R h D 陰性女性サンプル)

父親から胎児に遺伝した対立遺伝子を増幅するように設計された 16 組の多型マーカーを使用して、R h D 陰性、かつ Y 染色体遺伝子陰性でもあったサンプルを R T - P C R により分析した (M . A l i z a d e h , e t a l . , ( 2 0 0 2 ) , B l o o d , V o l . 9 9 : 4 6 1 8 ) 。最初にこれらの 2 対立遺伝子 ( b i - a l l e l i c ) マーカーについて母親の D N A を検査した。次いで母親の D N A で陰性であったこれらのマーカーについて胎児の D N A を検査した。胎児の D N A に対立遺伝子が存在し、母親のゲノムに同じ対立遺伝子が存在しないことは、対立遺伝子が父親から胎児に遺伝したことを示した。これらのマーカーの検出用のプライマーおよびプローブの配列を以下に示す。

20

## 【 0 0 6 3】

## 【化 1 1】

5'-----3'  
 S01-フォワードプライマー GGTACCGGGTCTCCACATGA (配列番号 37)  
 S01-リバースプライマー GGGAAAGTCACTCACCCAAGG (配列番号 38)  
 S01 プローブ (6FAM)-CTGGGCCAGAATCTTGGTCCTCACA-(BHQ) (配列番号 39)

30

S02-フォワードプライマー GCTTCTCTGGTTGGAGTCACG (配列番号 40)  
 S02-リバースプライマー GCTTGCTGGCGGACCCT (配列番号 41)  
 S02-プローブ (6FAM)-CTGCACCACCAAATCATCCCCGTG-(BHQ) (配列番号 42)

## 【 0 0 6 4】

## 【化 1 2】

	5'-----3'		
S03-フォワードプライマー	CTTTTGCTTTCTGTTTCTTAAGGGC ( 配列番号	43)	
S03-リバースプライマー	TCAATCTTTGGGCAGGTTGAA ( 配列番号	44)	
S03-プローブ (6FAM)-CATACGTGCACAGGGTCCCCGAGT-(BHQ) ( 配列番号	45)		
S04-フォワードプライマー	CTGGTGCCACAGTTACGCT ( 配列番号	46)	
S04-リバースプライマー	AAGGATGCGTGACTGCTATGG ( 配列番号	47)	
S04-プローブ (6FAM)-TCCTGGCAGTGTGGTCCCTCAGAA-(BHQ) ( 配列番号	48)		
S05-フォワードプライマー	AAAGTAGACACGGCCAGACTTAGG ( 配列番号	49)	10
S05-リバースプライマー	CATCCCCACATACGGAAAAGA ( 配列番号	50)	
S05-プローブ (6FAM)-CCCTGGACACTGAAAACAGGCAATCCT-(BHQ) ( 配列番号	51)		
S06-フォワードプライマー	CAGTCACCCCGTGAAGTCCT ( 配列番号	52)	
S06-リバースプライマー	TTTCCCCATCTGCCTATTG ( 配列番号	53)	
S06-プローブ (6FAM)-CCCATCCATCTTCCCTACCAGACCAGG-(BHQ) ( 配列番号	54)		
S07-フォワードプライマー	TGGTATTGGCTTTAAAATACTGGG ( 配列番号	55)	
S07-リバースプライマー	TGTACCCAAAACCTCAGCTGCA ( 配列番号	56)	
S07-プローブ (6FAM)-TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG-(BHQ) ( 配列番号	57)		20
S07b- フォワードプライマー	GGTATTGGCTTTAAAATACTCAACC ( 配列番号	58)	
S07b-リバースプライマー	CAGCTGCAACAGTTATCAACGTT ( 配列番号	59)	
S07- プローブ (6FAM)-TCCTCACTTCTCCACCCCTAGTTAAACAG-(BHQ) ( 配列番号	57)		
S08-フォワードプライマー	CTGGATGCCTCACTGATCCA ( 配列番号	60)	
S08-リバースプライマー	TGGGAAGGATGCATATGATCTG ( 配列番号	61)	
S08 -プローブ (6FAM)-CTCCCAACCCCCATTTCTGCCTG-(BHQ) ( 配列番号	62)		
S08b- フォワードプライマー	GCTGGATGCCTCACTGATGTT ( 配列番号	63)	
S08-リバースプライマー	TGGGAAGGATGCATATGATCTG ( 配列番号	61)	
S08- プローブ (6FAM)-CTCCCAACCCCCATTTCTGCCTG-(BHQ) ( 配列番号	62)		30
S09a-フォワードプライマー	GGGCACCCGTGTGAGTTTT ( 配列番号	64)	
S09a-リバースプライマー	TCAGCTTGTCTGCTTTCTGGAA ( 配列番号	65)	
S09- プローブ (6FAM)-TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG-(BHQ) ( 配列番号	66)		
S09a- フォワードプライマー	GGGCACCCGTGTGAGTTTT ( 配列番号	64)	
S09b-リバースプライマー	CAGCTTGTCGCTTTCTGCTG ( 配列番号	67)	
S09- プローブ (6FAM)-TGGAGGATTTCTCCCCTGCTTCAGACAG-(BHQ) ( 配列番号	66)		

## 【 0 0 6 5 】

## 【化 1 3】

5'-----3'

S10a- フォワードプライマー GCCACAAGAGACTCAG (配列番号 68)

S10a- リバースプライマー TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT (配列番号 69)

S10- プローブ (6FAM)-CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA-(BHQ) (配列番号 70)

S10b- フォワードプライマー TTAGAGCCACAAGAGACAACCAG (配列番号 71)

S10a- リバースプライマー TGGCTTCCTTGAGGTGGAAT (配列番号 69)

S10- プローブ (6FAM)-CAGTGTCCCACTCAAGTACTCCTTTGGA-(BHQ) (配列番号 70)

S11a- フォワードプライマー TAGGATTCAACCCTGGAAGC (配列番号 72)

S11a- リバースプライマー CCAGCATGCACCTGACTAACA (配列番号 73)

S11- プローブ (6FAM)-CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC-(BHQ) (配列番号 74)

S11b- フォワードプライマー CCCTGGATCGCCGTGAA (配列番号 75)

S11a- リバースプライマー CCAGCATGCACCTGACTAACA (配列番号 73)

S11- プローブ (6FAM)-CAAGGCTTCCTCAATTCTCCACCCTTCC-(BHQ) (配列番号 74)

10

C t 値が 4 3 と高い単位複製配列のシーケンシングは、こうした C t の高い単位複製配列が実際に本物の P C R 産物であることを疑いの余地なく示している（データ示さず）。これらの実験結果から、実施例 1 に記載されているように母体血液サンプルの選択的溶解により胎児 D N A を抽出できること、さらにこの単離された D N A を使用して胎児の R h D 遺伝子型を正確に予測できることを明らかにする。

20

## 【0066】

（実施例 4 - R h D 遺伝子の特定のエクソンを増幅するための新規なプライマーおよびプローブ）

本実施例は、ヒト R h D 遺伝子の特定のエクソンを増幅および検出するための別の新規なプライマーおよびプローブ配列について記載する。こうしたプローブおよびプライマーの配列を、被験体の R h D 遺伝子型を判定する方法、特に R T - P C R をベースとした方法において使用する。

30

## 【0067】

## 【化 1 4】

5'-----3'

RhD エクソン 2.2 フォワードプライマー CCGTGATGGCGGCCA (配列番号 76)

RhD エクソン 2.2 リバースプライマー CAGCTGTGTCTCCGAAACTC (配列番号 77)

RhD エクソン 2.2 プローブ (NED)-CTTGGGCTTCCTCACCT-(MGBNFQ) (配列番号 78)

## 【0068】

## 【化 1 5】

5'-----3'  
 RhD イントロン4 フォワードプライマー ACAAGGAAACAAAGGCCAAGAG (配列番号 79)  
 RhD イントロン4 リバースプライマー AATTAAGCACTTCACAGAGCAGGTT (配列番号 80)  
 RhD イントロン4 プローブ (6FAM)-TTGAAATCTGCATACCCCAGGCCTCCT-(MGBNFQ) (配列番号 81)

RhD イントロン4 フォワードプライマー ACAAGGAAACAAAGGCCAAGAG (配列番号 79)  
 RhD イントロン4 リバースプライマー AATTAAGCACTTCACAGAGCAGGTT (配列番号 80)  
 RhD イントロン4 プローブ (6FAM)-TTGAAATCTGCATACCCCAGGCCTCCT-(BHQ) (配列番号 82)

10

RhCED イントロン4.1 フォワードプライマー AGGCTGAGGCAGGAGAATCTT (配列番号 83)  
 RhCED イントロン4.1 リバースプライマー GCAGTGGCGCGATCTTG (配列番号 84)  
 RhCED イントロン4.1 プローブ (6FAM)-TGAATCCAGGTGGTGGAGGTTGCA-(MGBNFQ) (配列番号 85)

RhD イントロン4.1 フォワードプライマー TGAGTAGTGTTTGCTAAATTCATACCTTT (配列番号 86)  
 RhD イントロン4.1 リバースプライマー ACCCCAGGCCTCCTGAAC (配列番号 87)  
 RhD イントロン4.1 プローブ (6FAM)-TAAGCACTTCACAGAGCAG-(BHQ) (配列番号 88)

RhDψエクソン4.2 フォワードプライマー GCATGGCAGACAAACTGGGTAAT (配列番号 89)  
 RhDψエクソン4.2 リバースプライマー CTGCCAAAGCCTCTACCGG (配列番号 90)  
 RhDψエクソン4.2 プローブ (6FAM)-TTGCTGTCTGATCTTT-(BHQ) (配列番号 91)

20

RHDψエクソン5.1 フォワードプライマー ATGTTCTGGCCAAGTTTCAAGAT (配列番号 92)  
 RHDψエクソン5.1 リバースプライマー GCTACAGCATAGTAGGTGTTGAAGTC (配列番号 93)  
 RHD ψエクソン5.1 プローブ (6FAM)-CTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGA-(BHQ) (配列番号 94)

RHDψエクソン5.1 フォワードプライマー ATGTTCTGGCCAAGTTTCAACGT (配列番号 95)  
 RHDψエクソン5.1 リバースプライマー GCTACAGCATAGTAGGTGTTGAACGC (配列番号 96)  
 RHD ψエクソン5.1 プローブ (6FAM)-CTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGA-(MGBNFQ) (配列番号 97)

30

RHDψエクソン5.1 フォワードプライマー GATGTTCTGGCCAAGTTTCAACTC (配列番号 98)  
 RHDψエクソン5.1 リバースプライマー CTGCTACAGCATAGTAGGTGTTGAACAC (配列番号 99)  
 RHD ψエクソン5.1 プローブ (6FAM)-CTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGA-(BHQ) (配列番号 94)

## 【0069】

## 【化 1 6】

5'-----3'

RHDΨエクソン5.1 フォワードプライマー ATGTTCTGGCCAAGTTTCAACAT (配列番号 100)  
 RHDΨエクソン 5.1 リバースプライマー GCTACAGCATAGTAGGTGTTGAACTC (配列番号 101)  
 RHD Ψエクソン5.1 プローブ (6FAM)-CTCTGCTGAGAAGTCCAATCGAAAGGAAGA-(BHQ) (配列番号 94)

RhDエクソン5.2 フォワードプライマー AATAAATCATAATGTGGATGTTCTGGCCAAGTT (配列番号 102)  
 RhDエクソン5.2 リバースプライマー AATAAATCATAATGAACACGGCATTCTTCCTTTC (配列番号 103)  
 RhDエクソン5.2 プローブ (6FAM)-AACTCTGCTCTGCTGAGAAGTCCAAT-(BHQ) (配列番号 12)

RHDΨエクソン5.2 フォワードプライマー GCGCCCTCTTCTTGTGGAAC (配列番号 104)  
 RHDΨエクソン 5.2 リバースプライマー CATTCTTCCTTTCGATTGGACTTCT (配列番号 105)  
 RHDΨエクソン 5.2 プローブ (6FAM)-TCTGGCCAAGTTTC-(BHQ) (配列番号 106)

RHDΨエクソン 5.3 フォワードプライマー TGTGGATGTTCTGGCCAAGTT (配列番号 10)  
 RHDΨエクソン 5.3 リバースプライマー TTGAACACGGCATTCTTCCTT (配列番号 107)  
 RHDΨエクソン 5.3 プローブ (6FAM)-CAACTCTGCTCTGCTGAGAAGTCCAATCG-(BHQ) (配列番号 108)

RHDΨエクソン6.1 フォワードプライマー CACACGCTATTTCTTTGCAGACTTAT (配列番号 109)  
 RHDΨエクソン6.1 リバースプライマー GTTGTCTAGTTTCTTACCGGCAGGT (配列番号 110)  
 RHDΨエクソン6.1 プローブ (6FAM)-TGTCACCTGATCCCTTCTCCGTGGC-(BHQ) (配列番号 111)

RHDΨエクソン6.1 フォワードプライマー ACGCTATTTCTTTGCAGACTTGG (配列番号 112)  
 RHDΨエクソン6.1 リバースプライマー GTTGTCTAGTTTCTTACCGGCAGTT (配列番号 113)  
 RHDΨエクソン6.1 プローブ (6FAM)-TGTCACCTGATCCCTTCTCCGTGGC-(BHQ) (配列番号 111)

RHDΨエクソン6.1 フォワードプライマー ACGCTATTTCTTTGCAGACTATG (配列番号 114)  
 RHDΨエクソン6.1 リバースプライマー GTTGTCTAGTTTCTTACCGGCACCT (配列番号 115)  
 RHDΨエクソン6.1 プローブ (6FAM)-TGTCACCTGATCCCTTCTCCGTGGC-(BHQ) (配列番号 111)

RHDΨエクソン6.1 フォワードプライマー ACGCTATTTCTTTGCAGACTTTG (配列番号 116)  
 RHDΨエクソン6.1 リバースプライマー GTTGTCTAGTTTCTTACCGGCAGCT (配列番号 117)  
 RHDΨエクソン6.1 プローブ (6FAM)-TGTCACCTGATCCCTTCTCCGTGGC-(BHQ) (配列番号 111)

10

20

30

40

## 【 0 0 7 0 】

## 【化 17】

5'-----3'

RhD エクソン7.2 フォワードプライマー CAGCTCCATCATGGGCTACAA (配列番号 118)  
 RhD エクソン7.2 リバースプライマー GCACCAGCAGCACAATGTAGA (配列番号 119)  
 RhD エクソン7.2 プローブ (6FAM)-CTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAG-(BHQ) (配列番号 120)

RhD エクソン10.3 フォワードプライマー GCAGTGCCGCAATCTCG (配列番号 121)  
 RhD エクソン10.3 リバースプライマー CTGAGGCAGGAGAATTGCTTG (配列番号 122)  
 RhD エクソン10.3 プローブ (6FAM)-AACCTCCGCCTCCCA-(MGBNFQ) (配列番号 123)

10

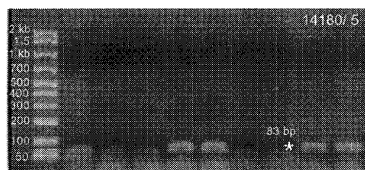
開示された発明は、記載した特定の方法論、プロトコルおよび材料が変化しても構わないため、それらに限定されるものではないことが理解される。また、本明細書に使用した用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、本発明の範囲を限定することを意図するものではないことも理解される。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

## 【0071】

当業者であれば、本明細書に記載した本発明の具体的な実施例に対する等価物を数多く認識するか、あるいはごく通常の実験を用いるのみで確認することができる。そのような等価物は以下の特許請求の範囲の包含するところとして意図されている。

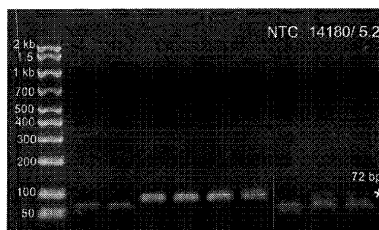
【図3A】

A.



【図3B】

B.



【図5】

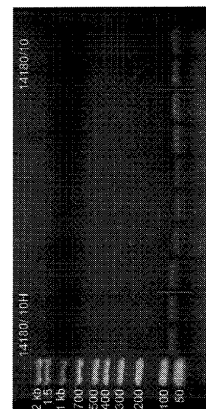
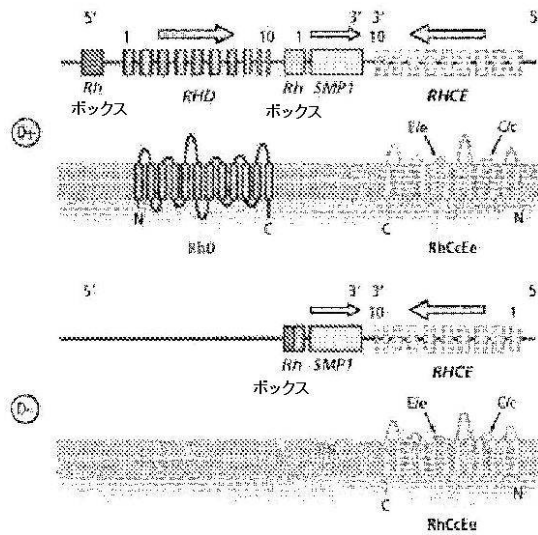


FIGURE 5

【 図 1 】

FIGURE 1



Rh 遺伝子 : RhD  
および RhCE

Rh タンパク質 : RhD  
および RhCE

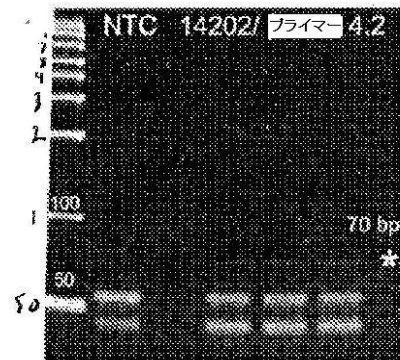
RhD 陰性遺伝子

RhCcEe タンパク質

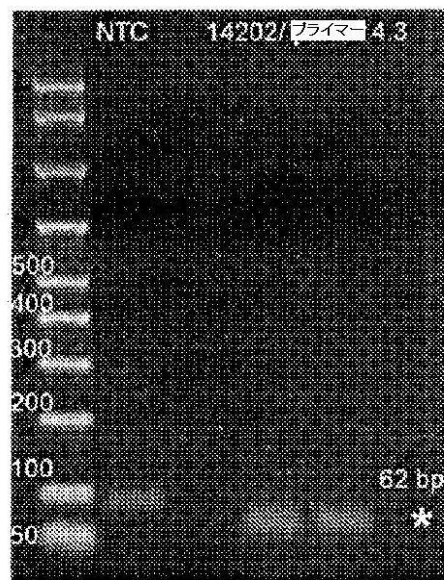
【 図 2 】

FIGURE 2

A.



B.

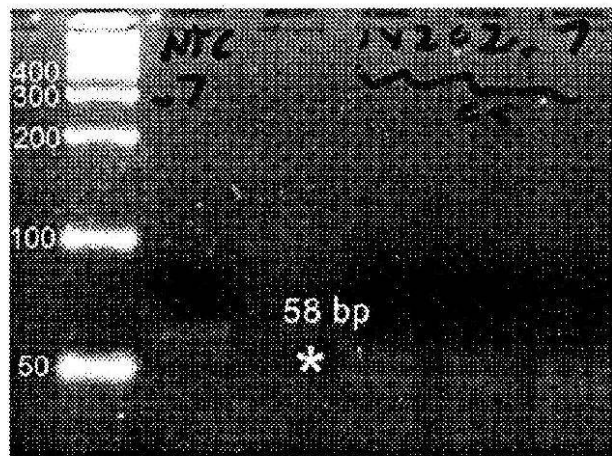




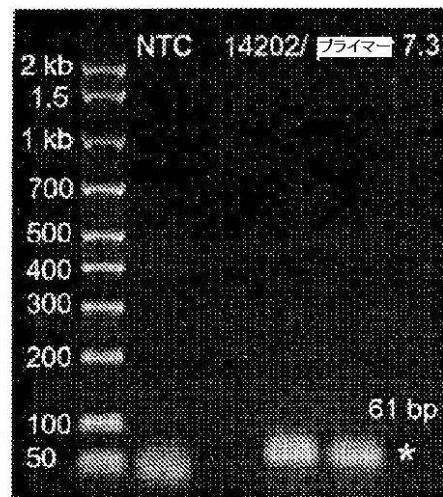
【 図 4 】

FIGURE 4

A.





B.



【 配列表 】

2011528554000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2009/051061</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C07K 19/00(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC C07K 19/00, G01N 33/50, C12Q 1/68, C07H 21/04, C12N 15/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), PubMed(NCBI), JPO, USPTO, Google		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,723,293 A (Cheng-Han Huang) March 3, 1998. See Abstract, Fig 1-9, Columns 13-20	1-80
X	Young Ree Kim et al. 'RHD Genotyping in RhD-negative Korean Donors -by Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers (PCR-SSP) Method' Korean J Clin Pathol. Vol. 20, pp. 92-97.(2000) See Abstract, Pages 93-94, Tables 1-2	1-80
X A	US 2008-0071076 A1 (Sinuhe Hahn et al.) March 20, 2008. See Abstract, Paragraphs [0004]-[0011], Examples 1-2	1-73 74-80
A	US 4,683,195 A (Kary B. Mullis et al.) July 28, 1987. See Abstract, Fig 2-9, Column 2 line 45 - column 5 line 31	1-80
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 MARCH 2010 (31.03.2010)		Date of mailing of the international search report <b>01 APRIL 2010 (01.04.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer PARK, Yeong-Gwan Telephone No. 82-42-481-8407 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/051061

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-7, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 59, 60 and 76-78 totally contain 27 polynucleotides constituting a different chemical structure. Because the polynucleotides do not have common technical features, the each petide is considered as an individual invention (Group 1-27).

Claims 8-10, 13, 16, 19 and 22-27 are directed to an RhD genotyping kit (Group 28).

Claims 28-30, 42, 45, 48, 51-58 and 61-73 are directed to a method of determining RhD genotype of a subject (Group 29).

Claims 74, 75, 79 and 80 are directed to a reagent mixture (Group 30).

Since the above mentioned groups of claims do not share any of the technical feature identified, a technically special relationship between the inventions does not exist.

Accordingly the claims do not relate to one invention or to a single inventive concept, a priori (PCT Rules 13.1 and 13.2).

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/051061**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 05723293 A	03.03.1998	CN 1200767 A0	02.12.1998
		CN 1200767 A	02.12.1998
		EP 0873421 A4	21.08.2002
		EP 0873421 A1	28.10.1998
		EP 0873421 A1	18.12.2002
		JP 2000-500010 A	11.01.2000
		WO 1997-017468 A1	15.05.1997
US 2008-0071076 A1	20.03.2008	EP 1524321 A1	20.04.2005
		EP 1524321 B1	01.07.2009
		JP 2005-160470 A	23.06.2005
		US 2005-0164241 A1	28.07.2005
US 04683195 A	28.07.1987	CA 587978C	21.11.2000
		CA 2071196 C	23.04.2002
		CA 2071213 C	02.05.2000
		CA 2075037 C	26.11.2002
		CA 2087724 C	16.09.2003
		CA 2090614 C	11.12.2001
		CA 2089495 C	03.04.2007
		CN 87105787 A	11.05.1988
		CN 1018264 A0	11.05.1988
		EP 0229701 A2	22.07.1987
		EP 0229701 B1	13.09.1995
		EP 0236069 A3	03.10.1990
		EP 0236069 B1	02.05.1997
		EP 0237362 A1	16.09.1987
		EP 0237362 B2	21.10.1998
		EP 0258017 A3	11.10.1989
		EP 0258017 B1	04.06.1997
		JP 2000-189198 A	11.07.2000
		JP 2000-189199 A	11.07.2000
		US 05322770 A	21.06.1994
		US 05333675 A	02.08.1994
		US 05352600 A	04.10.1994
		US 05374553 A	20.12.1994
		US 05386022 A	31.01.1995
		WO 1989-006691 A2	27.07.1989
		WO 1989-004875 A2	01.06.1989

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ティム , ロジャー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 , ラ ホーヤ , ギルマン ドライブ 8 2 6 8  
 , ユニット 7

(72)発明者 コスコ , カレナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 0 9 , カールズバッド , アベニーダ オルメダ 3  
 1 4 7

(72)発明者 パート , ラム

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0 , サン ディエゴ , サントロ ウェイ 3 5 7  
 5

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA20 HA14

4B063 QA01 QQ42 QR06 QR55 QR62 QS25 QS34