

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4495349号  
(P4495349)

(45) 発行日 平成22年7月7日(2010.7.7)

(24) 登録日 平成22年4月16日(2010.4.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	A
G 01 N 33/53	(2006.01)	G 01 N 33/53	M

請求項の数 4 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2000-596180 (P2000-596180)
(86) (22) 出願日	平成12年1月28日 (2000.1.28)
(65) 公表番号	特表2002-535014 (P2002-535014A)
(43) 公表日	平成14年10月22日 (2002.10.22)
(86) 國際出願番号	PCT/US2000/002270
(87) 國際公開番号	W02000/044940
(87) 國際公開日	平成12年8月3日 (2000.8.3)
審査請求日	平成18年9月12日 (2006.9.12)
(31) 優先権主張番号	60/117,640
(32) 優先日	平成11年1月28日 (1999.1.28)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	500169900 ジェンープローブ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州92122 1, サン・ディエゴ, ジェネティック・センター・ドライブ 10210
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	ハービー, リチャード・シー アメリカ合衆国カリフォルニア州91360, サウザンド・オーツ, リンメアードライブ 671

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌の遺伝マーカーを生物学的サンプルにおいて検出するための核酸配列

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

前立腺特異抗原 (P S A) のターゲット核酸配列に特有の検出アッセイに使用されるオリゴヌクレオチドの組み合わせであって：

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 2 に含まれる第一の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする第一の増幅プライマーとして機能する第一のオリゴヌクレオチドと；

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 3 に含まれる第二の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする第二の増幅プライマーとして機能する第二オリゴヌクレオチドであって、S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列である A C C C A G C A A G A T C A C G C T T T T G 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物を含む第二のオリゴヌクレオチドと；

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 2 に含まれる第三の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする検出プローブとして機能する第三のオリゴヌクレオチドであって、A C A G C T G C C C A C T G C A T C A G G (S E Q I D N O : 8 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 8 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物を含む第三のオリゴヌクレオチドと；

を含んでなり、第一のオリゴヌクレオチドが、S E Q I D N O : 2 6 ( G C A G T C T G C G G C G G T G T T C T G ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 2 6 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物を含む、オリゴヌクレオチドの組み

10

20

合わせ。

【請求項 2】

前立腺特異抗原（P S A）のターゲット核酸配列に特有の検出アッセイに使用されるオリゴヌクレオチドの組み合わせであって：

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 2 に含まれる第一の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする第一の増幅プライマーとして機能する第一のオリゴヌクレオチドと；

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 3 に含まれる第二の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする第二の増幅プライマーとして機能する第二オリゴヌクレオチドであって、S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列である A C C C A G C A A G A T C A C G C T T T T G 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物からなる配列を含む第二のオリゴヌクレオチドと；

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 2 に含まれる第三の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする検出プローブとして機能する第三のオリゴヌクレオチドであって、A C A G C T G C C C A C T G C A T C A G G ( S E Q I D N O : 8 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 8 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物からなる第三のオリゴヌクレオチドと；

を含んでなり、第一のオリゴヌクレオチドが、G C A G T C T G C G G C G G T G T T C T G ( S E Q I D N O : 2 6 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 2 6 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物からなる、オリゴヌクレオチドの組み合わせ。

【請求項 3】

核酸を含有する生物学的サンプルにおいて前立腺関連ターゲット核酸を検出する方法であって：

前立腺特異抗原（P S A）をコードする発現遺伝子配列の少なくとも一部分を含むターゲット核酸を含有する核酸サンプルを提供する工程；

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 2 に含まれる第一の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする第一の増幅プライマーとして機能する第一のオリゴヌクレオチドを、前記ターゲット核酸またはターゲット核酸の相補鎖にハイブリダイズさせる工程；

第二の増幅プライマーとして機能する第二オリゴヌクレオチドであって、S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列である A C C C A G C A A G A T C A C G C T T T T G 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物と、該ターゲット結合配列に隣接した追加のプロモーター配列とを含む第二のオリゴヌクレオチドを、前記ターゲット核酸にハイブリダイズさせる工程；

前記第一の増幅プライマー及び第二の増幅プライマー、並びに少なくとも 1 つのポリメラーゼ活性を用いることによって、前記ターゲット核酸の複数の増幅産物を提供する工程；

前記ターゲット核酸の少なくとも 1 つの増幅産物と特異的にハイブリダイズするプローブオリゴヌクレオチドであって、A C A G C T G C C C A C T G C A T C A G G ( S E Q I D N O : 8 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 8 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物を含むプローブオリゴヌクレオチドを提供する工程；並びに

前記増幅産物とハイブリダイズしたプローブから生じるシグナルを検出する工程を含んでなり、第一のオリゴヌクレオチドが、G C A G T C T G C G G C G G T G T T C T G ( S E Q I D N O : 2 6 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 2 6 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物を含む、方法。

【請求項 4】

核酸を含有する生物学的サンプルにおいて前立腺関連ターゲット核酸を検出する方法であって：

10

20

30

40

50

前立腺特異抗原 ( P S A ) をコードする発現遺伝子配列の少なくとも一部分を含むターゲット核酸を含有する核酸サンプルを提供する工程；

P S A 発現遺伝子配列のエクソン 2 に含まれる第一の P S A 特異配列と特異的にハイブリダイズする第一の増幅プライマーとして機能する第一のオリゴヌクレオチドを、前記ターゲット核酸またはターゲット核酸の相補鎖にハイブリダイズさせる工程；

第二の増幅プライマーとして機能する第二オリゴヌクレオチドであって、 S E Q I D

N O : 4 0 のターゲット結合配列である A C C C A G C A A G A T C A C G C T T T T G 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 4 0 のターゲット結合配列と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物からなる配列と、前記ターゲット結合配列に隣接した追加のプロモーター配列とを含む第二のオリゴヌクレオチドを、前記ターゲット核酸にハイブリダイズさせる工程；

前記第一の増幅プライマー及び第二の増幅プライマー、並びに少なくとも 1 つのポリメラーゼ活性を用いることによって、前記ターゲット核酸の複数の増幅産物を提供する工程；

前記ターゲット核酸の少なくとも 1 つの増幅産物と特異的にハイブリダイズするプローブオリゴヌクレオチドであって、 A C A G C T G C C C A C T G C A T C A G G ( S E Q

I D N O : 8 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O : 8 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物からなるプローブオリゴヌクレオチドを提供する工程；並びに

前記増幅産物とハイブリダイズしたプローブから生じるシグナルを検出する工程  
を含んでなり、第一のオリゴヌクレオチドが、 G C A G T C T G C G G C G G T G T T C  
T G ( S E Q I D N O : 2 6 ) 若しくはその R N A 均等物、又は S E Q I D N O  
: 2 6 と相補的な塩基配列若しくはその R N A 均等物からなる、方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【 0 0 0 1 】

##### 発明の分野

本発明は、癌マーカーとして役立つ核酸の、生物学的サンプルにおける検出に関し、特に、生物学的サンプルにおいて個別又は一緒に存在するときに生物体の癌、特に前立腺癌及び乳癌の存在を指示する、前立腺特異抗原 ( P S A ) 、前立腺特異膜抗原 ( P S M A ) 、及び / 又はヒト腺カリクレイン ( h K 2 ) をコードする核酸を特異的に検出する方法に関する。

##### 【 0 0 0 2 】

##### 発明の背景

前立腺癌は、男性、特に 60 歳以上の男性の主要な死因である。この癌の生物学的攻撃性は個体間で大きく異なり、臨床上の重大性に進展しない潜在腫瘍としてとどまる癌もあれば、2 ~ 3 年以内に致命的な疾患へ急速に進行して転移する癌もある。前立腺腫瘍の臨床診断及び段階付けは、指直腸診 ( D R E ) 、コンピュータ断層撮影 ( C T ) スキャン及び / 又は直腸内磁気共鳴画像 ( M R I ) に基づいている。さらに、前立腺組織に特異的であるか又は高度に発現されている分子マーカーを有する細胞の検出が診断に使用されてきた。

##### 【 0 0 0 3 】

前立腺特異抗原 ( P S A ) は前立腺の上皮細胞において高濃度で産生されて前立腺の管へ分泌されるプロテアーゼである。 P S A は前立腺癌 ( 前立腺の腺癌 ) を検出するための分子マーカーである。前立腺の酸ホスファターゼ ( P A P ) は、前立腺転移を検出するための血清マーカーとして使用されているもう 1 つの分泌酵素である。前立腺特異膜抗原 ( P S M A ) は、骨及びリンパ節の転移を含む前立腺癌組織においてやはり高度に発現されていて、特徴づけられ、単離され、そしてそれをコードする遺伝子がクローン化されている ( Israeli et al. , への米国特許第 5 , 5 3 8 , 8 6 6 号 ; O 'Keefe D. S. et al. , 1998 , Biochim. Biophys. Acta 1443 ( 1-2 ) : 113-127 ) 。ヒト腺カリクレイン - 2 ( h K 2 ) は、前立腺癌に結びつけられているもう 1 つの前立腺関連タンパク質である ( Partin A.

10

20

30

40

50

W. et al., 1999, Urology 54 (5): 839-845; Darson M. F. et al., 1999, Urology 53 (5): 939-944)。

#### 【0004】

研究者たちはまた前立腺特異マーカーの存在を乳房組織及び/又は乳房分泌物と関連づけてきた (Yu H. & Berkel H., 1999, J. La. State Med. Soc. 151 (4): 209-213)。例えば、良性又は悪性の乳房腫瘍と乳房の囊胞液における PSA の検出が明示されている (Diamandis, E. P. et al., 1994, Breast Cancer Res. Treat. 32: 291-300; Yu, H. et al., 1994, Clin. Biochem. 27: 75-79; Monne, M. et al., 1994, Cancer Res. 54: 6344-6347; Malatesta M. et al., 1999, Breast Cancer Res. Treat. 57(2): 157-163; Romppanen J. et al., 1999, Br. J. Cancer 79 (9-10): 1583-1587)。ヒトカリクレイン-2 10 も乳房腫瘍と正常な乳房分泌物に発現されている (Black M. H. et al., 2000, Br. J. Cancer 82 (2): 361-367)。乳癌には米国女性人口の約 10% が罹患し、したがって、この疾患に関連した癌マーカーの検出には臨床上の有用性がある。

#### 【0005】

前立腺癌又は乳癌のような癌が臓器内にとどまり、局部侵襲性である (つまり、前立腺癌では、被膜又は精囊に浸透している) か、又は離れた部位へ転移しているかを決定することは、癌の予後判定と適切な治療法の決定の両方に重大な影響を及ぼす。従って、癌の転移を検出する有効な方法は医学的に重要である。例えば、前立腺癌の骨組織又は骨盤リンパ節への転移を検出することがこの疾患の進行を段階づけるのに使用してきた。これらの部位にある転移性の前立腺癌細胞は、組織学的検査、PSA 特有の免疫細胞学、又は PSA・mRNA を検出する逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) (Deguchi, T. et al., 1993, Cancer Res. 53: 5350-5354) により検出され得る。前立腺癌細胞はまた、血流に入ることで遠い部位へ広がり、そこでこの細胞は転移が成立し得ると推定されている。検出可能な前立腺特異抗原 (PSA) 及び/又は PSA 合成細胞が循環血に存在していることは、潜在的な前立腺癌の転移 (「血行性微小転移」と言われる場合もある) を示唆する異常な状況である。ただし、循環する固形癌細胞のなかで最終的に転移性の沈着物になるのはその約 0.01% にすぎない (Moreno, J. G. et al., 1992, Cancer Res. 52: 6110-6112)。同様に、女性において異常量の PSA を検出することは乳癌の存在を示す可能性がある (Yu H. & Berkel H., 1999, J. La. State Med. Soc. 151 (4): 209-213)。 30

#### 【0006】

様々な前立腺組織抗原と反応するモノクローナル抗体が開示されている (Bazinet et al. による米国特許第 4,970,299 号、Freeman et al. による第 4,902,615 号、Chu et al. による第 4,446,122 号及び再発行 Re 33,405 号、McEwan et al. による第 4,863,851 号、Ueda et al. による第 5,055,404 号、Horoszewicz による第 5,763,202 号、及び Bander による第 5,773,292 号)。体液中の全 PSA、フリー PSA (-1-アンチキモトリプシン又は「ACT」に結合していない) 及び PSA - ACT 複合体を測定するためのモノクローナル抗体をベースとした免疫アッセイが、良性前立腺肥大症 (BHP) の患者と前立腺癌の患者とを区別するための診断法として開示されている (Lilja et al. による米国特許第 5,614,372 号、Luderer et al. による米国特許第 5,698,402 号及び第 5,710,007 号)。他の既知の免疫アッセイは血清の全 PSA を測定し、血清中のフリー PSA と PSA - タンパク質複合体を区別するが、前立腺癌患者の血清では後者がより高い濃度になる傾向がある (Dowell et al. による米国特許第 5,672,480 号)。羊水の PSA 濃度も、抗体をベースとするアッセイにより判定されるように、胎児の異常を示唆するものとして妊娠期間に関連づけられている (Diamandis による米国特許第 5,579,534 号)。 40

#### 【0007】

末梢血における PSA - 合成細胞の RT - PCR 検出も、D1 ~ D3 段階の病態、及び前立腺腫瘍細胞による被膜浸透と関連づけられている (Moreno, J. G. et al., 1992, Canc 50

er Res. 52: 6110-6112; Katz, A. E. et al., 1994, Urology 43: 765-775; Croce et al.による米国特許第5,506,106号、5,688,649号及び5,674,682号; Vessella, R. L. et al., 1992, Proc. Am. Soc. Cancer Res. 33: Abstract No. 2367; Diamandis, E. P. & Yu, H., 1995, Clin. Chem. 41: 177-179)。一般に、RT-PCRアッセイは、血液サンプルからRNAを得ること、このRNAをcDNAへ逆転写すること、PSA遺伝子の様々な個別領域に相補的なプライマー対を使用してこのcDNAを増幅させること、及び特定サイズのDNAをゲル上で観察することによってこの増幅されたDNAの存在を証明することに基づく。DNAのPCR増幅は、繰り返される連続の熱変性、プライマーアニーリング及び合成の諸工程を必要とする(Mullis et al.による米国特許第4,683,195号、4,683,202号及び4,800,159号)。増幅されたDNAはまた、制限エンドヌクレアーゼ消化、PSA特異オリゴヌクレオチドを用いたプロービング(例、ササンプロッティング)、及び/又はDNA配列決定によりさらに特徴づけられる場合がある。他のタイプの固形腫瘍(メラノーマ、神経芽細胞腫、乳癌、頸部癌)の微小転移も他の細胞マーカーについてのRT-PCRアッセイを使用して検出されている(Wu, A. et al., 1990, US & Can. Acad. Pathol. Ann. Mtg., Abstract No. 641.; Smith B. et al., 1991, Lancet 338: 1227-1229; Naito, H. et al., 1991, Eur. J. Cancer 27: 762-765; Mattano, Jr., L. A. et al., 1992, Cancer Res. 52: 4701-4705; Sobel et al.による米国特許第5,543,296号及び5,766,888号)。

## 【0008】

PSAは腺カリクレインとして知られるセリンプロテアーゼ群のメンバーである。ヒトカリクレインには、膵臓/腎臓カリクレイン(hK1)、前立腺特異腺カリクレイン(hK2又はHPSK)及びPSA(hK2としても知られている)が含まれ、関連する遺伝子(それぞれhKLK1、hKLK2及びhKLK3又はPSA)によりコードされる。上記タンパク質及び遺伝子の化学的及び構造上の類似性のために、免疫アッセイにおいて個々のタンパク質を、核酸検出法において個々の遺伝子又はその対応するmRNAを区別し得ることが重要である。hK2の発現は前立腺癌及び乳癌と関連づけられてきた(Black M. H. et al., 2000, Br. J. Cancer 82 (2): 361-367; Partin A. W. et al., 1999, Urology 54 (5): 839-845; Darson M. F. et al., 1999, Urology 53 (5): 939-944)。ヒト前立腺特異腺カリクレインと特異的に反応してPSAとは反応しない抗体(抗hK2)が記載されている(Tindall et al.による米国特許第5,516,639号; Bandman et al.による米国特許第5,786,148号)。ヒトカリクレインの遺伝子配列が知られている(Bandman et al.による米国特許第5,786,148号; GenBank受入れ番号NM005551、M21895、M27274、M24543、M21897、M26663、M21896、S75755、U17040、S39329及びM18157)。

## 【0009】

RT-PCRアッセイにおけるPSA・mRNAの増幅とDNA産物の検出に有用な核酸配列がいくつか記載されている(例えば、Deguchi, T. et al., 1993, Cancer Res. 53: 5350-5354; Katz, A. E. et al., 1994, Urology 43: 765-775; Moreno, J. G. et al., 1992, Cancer Res. 52: 6110-6112; Croce et al.による米国特許第5,506,106号、5,688,649号及び5,674,682号)。前立腺組織外の部位にある前立腺関連遺伝マーカー(例、PSA、PSMA及び/又はhK2)の検出は、特に男性の前立腺癌と男性及び女性の乳癌の癌転移を検出し、それにより適切な治療法を示すことに有用である。このように、前立腺関連遺伝マーカー、即ち、診断情報を提供する特定mRNAの配列の遺伝的な発現の存在を特異的に検出するのに使用される核酸配列及び方法についての臨床上のニーズが存在する。微小転移において出現するような、このmRNAを含有する比較的少数の細胞を生物学的サンプルにおいて検出するのに有用なレベルで上記の前立腺関連マーカーmRNAを検出することについて、特にニーズが存在する。

## 【0010】

10

20

30

40

50

発明の概要

本発明は、前立腺特異抗原（P S A）をコードする核酸、特にm R N Aを非前立腺の生物学的サンプルにおいて検出及び／又は定量するためのアッセイ法に向けられている。特に、本発明には、P S A特異核酸を増幅して、増幅されたそれにハイブリダイズするのに有用な好ましい核酸配列が含まれる。

## 【0011】

本発明の1つの側面によれば、S E Q I D N O : 1 ~ S E Q I D N O : 4 3のいずれか1つの配列を有するオリゴヌクレオチドが提供される。

本発明のもう1つの側面は、S E Q I D N O : 1 5 ~ S E Q I D N O : 4 3のいずれか1つの配列からなるターゲット結合配列、並びに所望により増幅反応に必要とされる隣接配列を含んでなるオリゴヌクレオチドである。好ましい態様では、増幅反応に必要とされる隣接配列はポリメラーゼ結合配列であり、より好ましくは、このポリメラーゼ結合配列はT 7 · R N Aポリメラーゼに結合する。好ましい態様は、S E Q I D N O : 1 ~ S E Q I D N O : 1 4のいずれか1つである配列を有するオリゴヌクレオチドである。

## 【0012】

本発明のもう1つの側面は、前立腺特異抗原（P S A）のターゲット核酸配列に特有の検出アッセイに使用されるオリゴヌクレオチドの組み合わせである。この組み合わせは、P S A発現遺伝子配列のエクソンに含まれる第一のP S A特異配列と特異的にハイブリダイズするか、又はP S A発現遺伝子配列の2つのエクソンを連結する結合点に及ぶ、第一の増幅プライマとして役立つ第一のオリゴヌクレオチド；P S A発現遺伝子配列のエクソンに含まれる、別の、重複しない第二のP S A特異配列と特異的にハイブリダイズするか、又はP S A発現遺伝子配列の2つのエクソンを連結する結合点に及ぶ、第二の増幅プライマとして役立つ第二のオリゴヌクレオチド；及びP S A発現遺伝子配列の1つまたはそれ以上のエクソンに含まれる第三のP S A特異配列と特異的にハイブリダイズする、検出プローブとして役立つ第三のオリゴヌクレオチドを含む。好ましくは、第一のP S A特異配列は、P S Aのエクソン2、エクソン3若しくはエクソン4に含まれるか、又はエクソン2及び3、又はエクソン3及び4を連結する結合点に及ぶ配列である。好ましくは、第二のP S A特異配列は、P S Aのエクソン3、エクソン4若しくはエクソン5に含まれるか、又はエクソン3及び4若しくはエクソン4及び5を連結する結合点に及ぶ配列である。好ましくは、第三のP S A特異配列は、P S Aのエクソン2、エクソン3、エクソン4若しくはエクソン5の内部に含まれるか、又はP S Aのエクソン2及び3、エクソン3及び4、若しくはエクソン4及び5を連結する結合点に及ぶ。特に好ましいオリゴヌクレオチドの組み合わせは、S E Q I D N O : 1 5、S E Q I D N O : 1 6、S E Q I D N O : 1 8、S E Q I D N O : 2 0、S E Q I D N O : 2 1及びS E Q I D N O : 2 6からなる群から選択される配列を含んでなる第一のオリゴヌクレオチド；S E Q I D N O : 3 0、S E Q I D N O : 3 1、S E Q I D N O : 3 2、S E Q I D N O : 3 3、S E Q I D N O : 3 4、S E Q I D N O : 3 5、S E Q I D N O : 3 7、S E Q I D N O : 3 8、S E Q I D N O : 4 0及びS E Q I D N O : 4 1からなる群から選択される配列を含んでなる第二のオリゴヌクレオチド；及び、S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 3、S E Q I D N O : 4、S E Q I D N O : 5、S E Q I D N O : 6、S E Q I D N O : 8及びS E Q I D N O : 1 4からなる群から選択される配列を含んでなる第三のオリゴヌクレオチドである。追加の好ましい第一、第二、及び第三のオリゴヌクレオチドの組み合わせは、その順で、以下の配列を有する：

S E Q I D N O : 1 5、S E Q I D N O : 3 0及びS E Q I D N O : 1 ；

S E Q I D N O : 1 7、S E Q I D N O : 3 0及びS E Q I D N O : 1 ；

S E Q I D N O : 1 8、S E Q I D N O : 3 0及びS E Q I D N O : 1 ；

S E Q I D N O : 1 8、S E Q I D N O : 3 5及びS E Q I D N O : 1 ；

S E Q I D N O : 1 8、S E Q I D N O : 3 0及びS E Q I D N O : 4 ；

10

20

30

40

50

S E Q   I D   N O : 1 8 、 S E Q   I D   N O : 3 0 及び S E Q   I D   N O : 5 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 8 、 S E Q   I D   N O : 3 0 及び S E Q   I D   N O : 6 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 1 及び S E Q   I D   N O : 2 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 1 及び S E Q   I D   N O : 3 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 3 及び S E Q   I D   N O : 2 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 3 及び S E Q   I D   N O : 3 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 2 及び S E Q   I D   N O : 2 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 2 及び S E Q   I D   N O : 3 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 4 及び S E Q   I D   N O : 2 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 6 、 S E Q   I D   N O : 3 4 及び S E Q   I D   N O : 3 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 0 、 S E Q   I D   N O : 3 7 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 0 、 S E Q   I D   N O : 3 8 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 3 7 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 3 8 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 0 及び S E Q   I D   N O : 1 4 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 3 7 及び S E Q   I D   N O : 1 4 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 1 及び S E Q   I D   N O : 1 4 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 0 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 1 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 3 7 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 4 0 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 は  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 4 1 及び S E Q   I D   N O : 8 .  
**【0013】**

第一、第二及び第三のオリゴヌクレオチドの特に好ましい組み合わせは、その順で、以下の配列を有する：

S E Q   I D   N O : 1 7 、 S E Q   I D   N O : 3 0 及び S E Q   I D   N O : 1 ;  
 S E Q   I D   N O : 1 8 、 S E Q   I D   N O : 3 0 及び S E Q   I D   N O : 1 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 0 、 S E Q   I D   N O : 3 7 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 0 及び S E Q   I D   N O : 1 4 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 1 及び S E Q   I D   N O : 1 4 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 3 7 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 4 0 及び S E Q   I D   N O : 8 ;  
 は  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 4 1 及び S E Q   I D   N O : 8 .

**【0014】**

他の態様では、第一、第二及び第三のオリゴヌクレオチドの組み合わせは、少なくとも1つのヘルパークローブオリゴヌクレオチドをさらに包含する。ある組み合わせに包含される好ましいヘルパークローブオリゴヌクレオチドは、S E Q   I D   N O : 2 7 又は S E Q   I D   N O : 2 8 の配列を有するオリゴヌクレオチド、又はこれらの配列を有するオリゴヌクレオチドの組合せからなる。第一、第二、及び第三のオリゴヌクレオチド、及びヘルパークローブオリゴヌクレオチドの特に好ましい組み合わせは、その順で、以下の配列を有する：

S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 1 、 S E Q   I D   N O : 8 及び S E Q   I D   N O : 2 7 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 1 、 S E Q   I D   N O : 4 1 、 S E Q   I D   N O : 8 、 S E Q   I D   N O : 2 7 及び S E Q   I D   N O : 2 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 4 0 、 S E Q   I D   N O : 8 、 S E Q   I D   N O : 2 7 及び S E Q   I D   N O : 2 8 ;  
 S E Q   I D   N O : 2 6 、 S E Q   I D   N O : 3 7 、 S E Q   I D   N O : 8 、 S E

Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 ;  
 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 ;  
 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 ; 又は  
 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 。

## 【0015】

より好ましくは、第一、第二、及び第三のオリゴヌクレオチド、及びヘルパープローブオリゴヌクレオチドの特に好ましい組み合わせは、その順で、以下の配列を有する : 10  
 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 ;  
 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 ;  
 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 ; 又は  
 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 8、SE  
 Q ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28 。

## 【0016】

本発明の1つの側面は、前立腺特異抗原 (PSA)、前立腺特異膜抗原 (PSMA) 又はヒトカリクレイン2 (hK2) をコードする少なくとも1つの発現遺伝子配列の少なくとも一部が含まれるターゲット核酸を含有する核酸サンプルを提供すること；次いで、ターゲット核酸又はその相補体と特異的にハイブリダイズする配列を含有する少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドを前記ターゲット核酸とハイブリダイズさせること；少なくとも1つのポリメラーゼ活性を使用することによってターゲット核酸の複数の増幅産物を産生させること；ターゲット核酸の少なくとも1つの増幅産物と特異的にハイブリダイズするプローブオリゴヌクレオチドを提供すること；及び増幅産物とハイブリダイズしたプローブから生じるシグナルを検出することの工程を含んでなる、核酸を含有する生物学的サンプルにおいて前立腺関連のターゲット核酸を検出する方法である。好ましい態様では、少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドが SEQ ID NO: 15 ~ SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 48 のいずれか1つの配列、又は SEQ ID NO: 30 ~ SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 47 又は SEQ ID NO: 49 のいずれか1つのターゲット結合配列を含む。1つの態様では、ターゲット核酸が PSA · mRNA であり；少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドが、PSA · mRNA の少なくとも一部に相補的な配列とプロモーター配列である配列とからなるプロモーター - プライマーオリゴヌクレオチド、及び、PSA · mRNA に相補的な核酸鎖と特異的にハイブリダイズする少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドを含み；及び、プローブオリゴヌクレオチドが PSA · mRNA の増幅産物と同じであるセンスのそれと特異的にハイブリダイズする。好ましくは、プロモーター - プライマーオリゴヌクレオチドが SEQ ID NO: 30 ~ SEQ ID NO: 43 のいずれか1つの配列を含み、及び、PSA · mRNA に相補的な核酸鎖と特異的にハイブリダイズするプライマーオリゴヌクレオチドが SEQ ID NO: 15 ~ SEQ ID NO: 29 のいずれか1つの配列を含む。もう1つの態様では、ターゲット核酸が PSMA · mRNA であり；少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドが、PSMA · mRNA の少なくとも一部に相補的な配列とプロモーター配列である配列とからなるプロモーター - プライマーオリゴヌクレオチド、及び、PSMA · mRNA に相補的な核酸鎖と特異的にハイブリダイズする少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドを含み；及び、プローブオリゴヌクレオチドが PSMA · mRNA の増幅産物と同じであるセンスのそれと特異的にハイブリダイズする。好ましくは、プロモーター - プライマーオリゴヌクレオチドが SEQ ID NO: 49 の配列を含み、及び、PSM 50

A · m R N A の増幅産物と同じであるセンスのそれと特異的にハイブリダイズするプライマーオリゴヌクレオチドが S E Q I D N O : 4 8 の配列を含む。もう 1 つの態様では、ターゲット核酸が h K 2 · m R N A であり；少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドが、h K 2 · m R N A の少なくとも一部に相補的な配列とプロモーター配列である配列とからなるプロモーター - プライマーオリゴヌクレオチド、及び、h K 2 · m R N A に相補的な核酸鎖と特異的にハイブリダイズする少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドを含み；及び、プローブオリゴヌクレオチドが h K 2 · m R N A の増幅産物と同じであるセンスのそれと特異的にハイブリダイズする。好ましくは、プロモーター - プライマーオリゴヌクレオチドが S E Q I D N O : 4 7 の配列を含み、及び、h K 2 · m R N A の増幅産物と同じであるセンスのそれと特異的にハイブリダイズするプライマーオリゴヌクレオチドが S E Q I D N O : 4 6 の配列を含む、請求項 14 に記載の方法である。好ましくは、検出工程が、S E Q I D N O : 1 ~ S E Q I D N O : 1 4 、S E Q I D N O : 2 7 、S E Q I D N O : 2 8 又は S E Q I D N O : 5 0 のいずれか 1 つの配列からなる少なくとも 1 つのプローブオリゴヌクレオチドを使用する。この方法の 1 つの態様は、P S A をコードする発現遺伝子配列と P S M A 又は h K 2 をコードする少なくとも 1 つの発現遺伝子配列についてアッセイすることを含む。好ましい態様では、核酸サンプルは、ヒト前立腺組織、末梢血、乳房組織、腎臓組織、小腸、肺組織、肝臓組織又はリンパ節から単離した R N A 、より好ましくは m R N A である。好ましい態様では、検出工程は均質な検出アッセイにおけるシグナルを検出する。

## 【 0 0 1 7 】

10

発明の詳細な説明

本発明には、ヒト P S A 遺伝子のセグメントに特有の核酸配列が含まれ、これは前立腺組織からは採取されない生物学的サンプルから調製された核酸において P S A 特異配列を検出する方法に使用される。さらに本発明には他の前立腺関連遺伝マーカーであるヒト P S M A 遺伝子及び h K 2 遺伝子のセグメントに特有の核酸配列が含まれ、これらは、乳房組織を含む非前立腺組織の生物学的サンプルから調製された核酸において、有用な癌検出マーカーである前立腺関連配列を検出する方法に使用される。この非前立腺組織には、例えば、血液、リンパ節、乳房又は乳房の囊胞、腎臓、肝臓、肺、筋肉、胃又は小腸の組織が含まれる。本発明には、非前立腺組織内の P S A 特異配列、P S M A 及び / 又は h K 2 配列を個別にか又は一緒に増幅して検出するための核酸配列群を組み合わせる好ましい方法も含まれる。この好ましい方法では、加熱サイクリングを必要とせずに P S A 、P S M A 及び / 又は h K 2 の m R N A 配列が増幅され、この増幅された配列が均質アッセイ系において検出される。この方法には、末梢血、リンパ節又は骨髄のような非前立腺組織サンプルに由来する R N A サンプルを調製するための単純化された方法が場合により含まれるが、他の非前立腺組織も使用され得る。好ましい R N A 調製法は比較的単純であり、生物学的サンプルにおいて比較的少ない量で出現する m R N A 種の分析及び検出に適した R N A を提供する。

## 【 0 0 1 8 】

20

ヒト P S A 遺伝子の配列は知られていて、数多くのデータベースで利用可能である ( G e n B a n k 及び E M B L データベース、受入れ番号 : A F 0 0 7 5 4 4 、 X 0 5 3 3 2 、 M 2 6 6 6 3 、 X 0 7 7 3 0 、 M 2 1 8 9 5 、 M 2 1 8 9 6 、 M 2 1 8 9 7 、 S 7 5 7 5 5 、 U 1 7 0 4 0 、 X 1 3 9 4 2 、 X 1 4 8 1 0 、 M 2 4 5 4 3 、 M 2 7 2 7 4 ； 「 X 」 ではじまる受入れ番号は E M B L データベースの配列を示す ) 。ヒト腺カリクレイン - 1 に関連する遺伝子の配列 ( A c c . N o . S 3 9 3 2 9 ) も、ヒト前立腺特異膜抗原配列 ( G e n B a n k A c c . N o . M 9 9 4 8 7 ) と同じように知られている。図 1 に示すように、P S A 及びカリクレイン - 1 の遺伝子は類似の構造特性を共有し、4 個の内部イントロン ( I 1 ~ I 4 と表示 ) により分離された 5 個のエクソン ( E 1 ~ E 5 と表示 ) が含まれる。非翻訳 5 ' 及び 3 ' 領域を含む P S A 遺伝子の完全な配列は約 6 . 8 k b に及ぶ。P S A 遺伝子と他のカリクレイン遺伝子ファミリーメンバーとの構造及び配列上の類似性のために、P S A 特異プライマー及びプローブとして役立つ好適な P S A 配列部分

30

40

50

は、非前立腺組織サンプルにある P S A 特異核酸を増幅して検出する方法にきわめて重要である（即ち、カリクレイン核酸の増幅及び/又は検出から生じる偽陽性を回避するために）。P S A 特異配列を検出するのに使用される本発明の好ましいプローブ、プライマー及びプロモーター-プライマーを（その S E Q I D N O : とともに）表 1 に示す。

【0019】

【表1】

SEQ ID NO:	核酸配列	長さ	P S A の位置
1	G G A C C A C C T G C T A C G C C T C A G	21	エクソン3
2	G A C C A A G T T C A T G C T G T G C T G	23	エクソン4
3	G A C C A A G T T C A T G C T G T G C T G	23	エクソン4
4	G C T G T G A A G G T C A T G G A C C T G C C	23	エクソン3
5	G A A C C A A G G A G T T C T T G A C C C	22	エクソン3/4
6	G G C C A G A T G G T G C A G C C G G G A G C	23	イントロン3
7	G C A G T C T G C G G C G G T T C T G	21	エクソン2
8	A C A G C T G C C C A C T G C A T C A G G	21	エクソン2
9	G T T C A C C C T C A G A A G G T G A C C	21	エクソン4
10	G C T G T G G C T G T G A C C G C T G G A C	21	エクソン4
11	G C T T G T G G C C T C G T G G C A G T G G C A G	21	エクソン2
12	T G G C C T C T C G T G G C A G G G C A G T	22	エクソン2
13	T C T C G T G G C A G G G C A G T C T G C	21	エクソン2
14	G T G C A C C C C C A G T G G T C C T C	21	エクソン2
15	G A T G C T G T G A A G G T C A T G G A C C T G	24	エクソン3
16	G T G C G C A A G T T C A C C C T C A G A A G G	24	エクソン4
17	G A A G G T C A T G G A C C T G C C C A C C C A	24	エクソン3
18	C T G T C A G A G C C T G C G A G C T C A C G	24	エクソン3
19	G C T G C T C G C C T G T C A G A G C C T G	23	エクソン3
20	G C T T G T G G C C T C T C G T G G C A G	21	エクソン2
21	T C T C G T G G C A G G G C A G T C T G C	21	エクソン2
22	T T C C A A T G A C C T G T G G G C A	21	エクソン4
23	G G A G G C T G G G A G T G G G A A G C A T	24	エクソン2
24	G G C T G G G A G T G C G G A A G C A T	22	エクソン2
25	T G G C C T C T C G T G G C A G G G C A G T	22	エクソン2
26	G C A G T C T G C G G G G G T G T T C T G	21	エクソン2
27	G T G C A C C C C C A G T G G G C C T C	21	エクソン2
28	A C A A A A G G C G T G A T C T T G C T G G G G	23	エクソン2/3
29	C A A A A G G C G T G A T C T T G C T G G G G	22	エクソン3

表1

【0020】

【表2】

SEQ ID No:	核糖配列	長さ	PSAの位置
3 0	TAAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACCAAGAGGGTGAACCTGGGCCACACAGG	5 4	エクソン4
3 1	TAAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACCTGGTGTACAGG	5 0	エクソン5
3 2	TAAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACTCATGGTCACTGCCCATGACGTTG	5 4	エクソン5
3 3	ATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACTCATGGTCACTGCCCATGACAGG	4 8	エクソン5
3 4	ATTAAATACCGACCACTACATAGGGAGACATGGTCACTGCCCATGACGTTG	5 1	エクソン5
3 5	ATTAAATACCGACCACTACATAGGGAGAGGGTGAACCTGGGCCACACAGG	5 0	エクソン3
3 6	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACCCATTCTGAGGGTGAACCTGGCG	5 2	エクソン4
3 7	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACCCAGCAAGATCAGCG	4 9	エクソン3
3 8	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACTGGCTGACCTGAAATAAC	4 9	エクソン3
3 9	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGAGGTGACAGTGTACAGGGAGGCGTTTG	4 9	エクソン5
4 0	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACGAGTACAGGGAGGAAAGGCCCTTG	5 0	エクソン3
4 1	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGAGGCTGTGCCGACGCCAGAAGAT	5 1	エクソン3
4 2	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACCTGGTGTCTCAGGATGAAAAGG	5 2	エクソン3
4 3	TAATTAAATACCGACTCACTATAAGGGAGACTGACCTGGCTGTG	5 2	エクソン3

## 【 0 0 2 1 】

図2～4は、発現されるヒトPSA遺伝子配列(HSPSAR, Acc. No. X05332の1, 466 bp)に比較した上記配列の相対位置を示し、エクソンとインtronスプライス部位の相対位置を図の下に示す。図2を参照すると、SEQ ID No: 1～SEQ ID No: 5とSEQ ID No: 7～SEQ ID No: 14の配列を有するプローブの相対位置が示される。上記の好ましいプローブは、エクソン2、3及び4においてPSA配列に特異的である。PSAのインtron3配列(SEQ ID No: 6)に特有のプローブは図2に示されていない。図3を参照すると、SEQ ID No: 15～SEQ ID No: 29の配列を有するプライマーの相対位置が示される。これらの好ましいプライマーは、エクソン2、3、4において、及びスプライス連結部(SEQ ID No: 28)を含んで広がるエクソン2及び3において、PSA配列に特

異的である。図4を参照すると、SEQ ID NO:30～SEQ ID NO:43の配列を有するプロモーター-プライマーのターゲット結合配列の相対位置が示される。これらの好ましいターゲット結合配列はエクソン3、4、5においてPSA配列に特異的である。

【0022】

hK2配列を増幅して検出するのに好ましいプライマーは、GTCAGAGCCCTGCC  
AAGATCACAG (SEQ ID NO:46)の配列を有し、好ましいプロモーター-プライマーは、TAAATTAAATACGACTCACTATAGGGAGACCA  
CCAGCACACAAACATGAACTCTGTC (SEQ ID NO:47)の配列を有する。増幅されたhK2配列を検出するのに適した標識プローブは、表1に示したSEQ ID NO:1の配列を使用する。

10

【0023】

PSMA配列を増幅して検出するのに好ましいプライマーは、CAGATATGTCAT  
TCTGGGAGGTC (SEQ ID NO:48)の配列を有し、好ましいプロモーター-プライマーは、TAAATTAAATACGACTCACTATAGGGAGACC  
AAATTCTTCTGCATCCCCAGCTTGC (SEQ ID NO:49)の配列と、配列CTCAGAGTGGAGCAGCTGTTTTC (SEQ ID NO:50)が含まれる標識プローブを有する。

【0024】

本発明には、PSA特異RNA種を検出して定量する方法も含まれるが、これが特に重要なのは、これらのmRNA種が非前立腺組織から調製されるRNAサンプルでは比較的少ない量しか出現しないからである。本発明の他の態様には、前立腺に関連したPSMA及びhK2のRNA種を検出する方法が含まれるが、これらが個別にか又はそれぞれ互いにか又はPSA配列とともに検出されるときに重要なのは、これらも非前立腺組織において見出されるときに前立腺癌及び乳癌の癌マーカーとなるからである。さらに、上記前立腺関連マーカー(PSA、PSMA及びhK2)を個別にか又は組み合わせて検出することが臨床的に重要なのは、それぞれの患者に由来する癌が1種又はそれ以上のマーカーを発現する場合があるので、この諸マーカーの1つ又はそれ以上を検出することで、たった1つのマーカーの存在だけを試験した場合に得られるかもしれない偽陰性の可能性が減らせるからである。上記の方法は、前立腺の生検を必要としない医学的診断と前立腺癌の治療に対する患者の応答を臨床的にモニターするのに有用である。この方法は、PSA特異mRNAのような前立腺関連RNAの比較的低いレベルの存在を検出するのに十分な感度があるので、それらは前立腺癌及び/又は乳癌の再発又は転移を検出するのに有用である。本方法のもう1つの利点は、ターゲット配列の様々なエクソンに特異的な増幅プライマーが、スプライスされて近傍にあるエクソンが連結したmRNAだけを増幅するので、それにより、生物学的サンプル中に混在しているゲノムDNAから生じる可能性のある偽陽性の増幅及び検出をなくせることである。本発明のそのような態様では、ゲノム配列のエクソンがイントロン配列により分かれているために、2つのプライマー結合部位間の全領域が効率よく増幅されないので、ゲノムDNAの検出が除外され、従って検出されない。

20

【0025】

本発明には、PSA、PSMA及びhK2核酸配列に特異的なマーカーを含む、ヒト前立腺関連遺伝マーカーを増幅して検出するための核酸配列の好ましい組み合わせも含まれる。

30

【0026】

本明細書の随所で提供される定義に加え、いくつかの用語を以下のように定義した。他に示すか又は定義することがなければ、本明細書に使用されるあらゆる科学及び技術の用語は、当業者により通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に使用される多くの用語の一般的な定義については、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed. (Singleton et al., 1994, John Wiley & Sons, New York, NY), The Harper Coll

40

50

ins Dictionary of Biology (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, New York, NY) 及び Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 27th ed. (W. A. Dorland, 1988, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA) に提供される。

【0027】

「ヌクレオチド配列」又は「核酸配列」は、相補的な塩基配列を有するもう1つのDNA又はRNAの核酸鎖と水素結合し得る直線状の情報含有分子に沿った窒素性塩基の配列を意味する。この用語は、そのような情報含有分子をヌクレオチドのポリマーそのものに限定することを意味せず、ポリマー内に1つ又はそれ以上のヌクレオチド類似体又は非塩基性ユニットを含有する分子構造も包含する。ポリマーは、糖部分又はリボース又はデオキシリボースの置換物（例えば、2'-ハロゲン化物か、メトキシ置換されたペントース糖）を含有する塩基サブユニットを含み、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、及びペプチド連結のような、ホスホジエステル結合以外の連結により連結される場合がある。10

【0028】

「オリゴヌクレオチド」は、2種又はそれ以上の化学サブユニットのポリマー鎖を意味し、各サブユニットは、ヌクレオチド塩基部分、糖部分、サブユニットを線状の空間配置においてつなぐ連結部分を含んでなる。オリゴヌクレオチドはそのようなサブユニットを1000個まで含有し得るが、一般には、約5～約10個のサブユニットの下限と約20～約1000個のサブユニットの上限範囲にあるサブユニットを含有する。最も一般的なヌクレオチド塩基部分は、グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）及びウラシル（U）であるが、水素結合し得る他の稀であるか又は修飾されたヌクレオチド塩基（例、イノシン又はI）も当業者によく知られている。最も一般的な糖部分はリボース及びデオキシリボースであるが、2'-O-メチルリボース、ハロゲン化された糖、及び他の修飾された異なる糖もよく知られている。連結基は通常リン含有部分であり、普通はホスホジエステル連結であるが、他の既知のリン酸含有連結（例、ホスホロチオエート、メチルホスホネート）と当技術分野で知られているリンを含有しない連結（例えば、「ペプチド核酸」又はRNAに見出されるペプチド様の連結）も含まれる。このように、RNAはこのオリゴヌクレオチドの定義に該当すると考えられる。同様に、オリゴヌクレオチドには、少なくとも1つの塩基部分が、例えばプロピン基の付加により修飾されたものが含まれるが、但し、（1）修飾された塩基部分がG、A、C、T又はUと非共有結合を形成する能力を保持すること、及び（2）少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド塩基部分を含んでなるオリゴヌクレオチドが相補的な单鎖核酸とハイブリダイズすることが立体的に妨害されないことの限りにおいてである。特定の条件（例えば、温度、塩濃度）の下で相補的な核酸鎖とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの能力は、当業者によく知られるように、塩基部分の配列によって支配される（Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 特に、pp. 7.37-7.35 及び 11.47-11.57）。2030

【0029】

「增幅」は、意図された特定のターゲット核酸配列（PSA、PSMA又はhK2）の少なくとも一部分を含有するターゲット核酸の多重コピーを产生することを意味する。この多重コピーはアンブリコン又は增幅産物と言われる場合がある。好ましくは、增幅されるターゲットは、完全なターゲット遺伝子（イントロン及びエクソン）より少ない配列か、又は発現されるターゲット遺伝子配列（エクソン及び隣接非翻訳配列のスプライスされた転写物）を含有する。例えば、PSA特異アンブリコンは、PSAターゲットポリヌクレオチドの内部位置にハイブリダイズし、そこからポリマー化を開始する增幅プライマーを使用することにより、PSAターゲットポリヌクレオチドの一部を增幅することによって产生し得る。好ましくは、この増幅される部分は、様々な既知の方法のいずれかを使用して検出され得る、検出可能なターゲット配列を含有する。40

【0030】

「核酸増幅条件」は環境条件を意味し、それには、塩濃度、温度、温度サイクリングの有無、核酸ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、及び、核酸増幅法を使用してターゲット50

核酸又はその相補鎖の多重コピーの產生を可能にする補助因子の存在が含まれる。核酸増幅に関する多くの既知の方法では、二本鎖の核酸を選択的に変性してプライマーをハイブリダイズするために熱サイクリングが必要とされる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応又はP C R (米国特許第4,683,195号; 4,683,202号; 4,800,159号; 4,965,188号)では、変性、プライマー対の反対鎖へのアニーリング、ターゲット配列のコピーを指數関数的に増加させるプライマー伸長のサイクルが何度も使用される。R T - P C Rと呼ばれる変法では、逆転写酵素(R T)を使用してm R N Aから相補D N A(c D N A)をつくり、次いでこのc D N AをP C Rにより増幅して多数のD N Aコピーを產生する。リガーゼ連鎖反応又はL C R (Weiss, R. 1991, Science 254: 129 10 2)は、ターゲット核酸の隣接領域にハイブリダイズし、D N Aリガーゼを使用して共有結合される相補的なD N Aオリゴヌクレオチドの2セットを使用し、熱変性、ハイブリダイゼーション及び連結のサイクルを繰り返して、検出可能な二本鎖連結オリゴヌクレオチド産物を產生する。もう1つの方法は、鎖置換増幅又はS D A (Walker, G. et al., 199 20 2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 392-396; 米国特許第5,270,184号及び5,455,166号)であり、ここでは、ターゲット配列の反対の鎖へプライマー配列の対をアニールさせること、d N T P [ ] Sの存在下でプライマーを伸長させ、二重鎖の半ホスホロチオエート化されたプライマー伸長産物を產生すること、半修飾された制限エンドヌクレアーゼ認識部位をエンドヌクレアーゼ介在ニッキングすること、及び、ニックの3'末端からポリメラーゼ介在性のプライマー伸長を実施して、既存の鎖を置換し、次のラウンドのプライマーアニーリング、ニッキング及び鎖置換のために鎖を產生することのサイクルを使用して、幾何学的な増幅産物を生じさせる。好熱性S D A又はt S D Aは、本質的に同じ方法においてより高い温度で好熱性のエンドヌクレアーゼ及びポリメラーゼを使用する(欧州特許出願0684,315号)。他の増幅法には、核酸ベースの配列増幅又はN A S B A(米国特許第5,130,238号)、R N Aレプリカ-ゼ(Qレプリカ-ゼ)を使用してプローブ分子そのものを増幅する方法(Lizardi, P. et al., 1988, BioTechnol. 6: 1197-1202)、転写ベースの増幅法(Kwoh, D. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177)、自己持続性の配列複製(Guatelli, J. et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878)、及び、ターゲット配列の多重R N A転写物を產生する転写介在増幅(Kacian & Fultzによる米国特許第5,480,784号及び5,399,491号)が含まれる。既知の増幅法に関するさらなる論考については、Persing, David H., 1993, "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" in Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications (Persing et al., Eds.), pp. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC)を参照のこと。

### 【0031】

本発明の好ましい転写ベースの増幅系はR N Aポリメラーゼを利用して、ターゲット領域のR N A転写物を多数合成する(Kacian & Fultzによる米国特許第5,480,784号及び5,399,491号)。転写介在増幅(T M A)は、逆転写酵素及びR N Aポリメラーゼの存在下でターゲット核酸とハイブリダイズするプロモーター-プライマーを使用し、二本鎖プロモーターを形成させる。次いで、R N Aポリメラーゼの活性により、R N A転写物とハイブリダイズし得る第二のプライマーの存在下でT M Aのさらなるラウンドの錫型になり得るR N A転写物が產生される。熱変性を必要とするP C R、L C R又は他の方法と異なり、T M Aは等温法であり、R N A-D N AハイブリッドのR N A鎖を消化するR N AーゼHの活性を使用することによって、D N A鎖をプライマー又はプロモーター-プライマーとのハイブリダイゼーションに利用可能なようになる。一般に、このR N AーゼH活性は、増幅のために供されるレトロウイルスの逆転写酵素とともに使用される。

### 【0032】

「プライマー」又は「増幅プライマー」は、ターゲット核酸又はその相補体の領域に結合し、このターゲット核酸の核酸増幅を促進し得るオリゴヌクレオチドを意味する。ほとん 50

どの場合、プライマーは、核酸ポリメラーゼにより伸長され得るフリーの3'末端を有する。すべての増幅プライマーには、ターゲット核酸の少なくとも1つの鎖と直接か又はターゲット配列に相補的である鎖のいずれか一方と、相補的な塩基相互作用を介してハイブリダイズし得る塩基配列が含まれる。増幅プライマーは、より長い核酸産物を產生する酵素活性の基質として役立つ。

【0033】

例えば、PCRでは、増幅プライマーは、変性した二本鎖ターゲットDNAの反対鎖にアニールし、このプライマーは熱安定なDNAポリメラーゼにより伸長されて二本鎖DNA産物を產生し、これが熱で変性され、冷却され、増幅プライマーにアニールされ、そしてこのプライマーは多数サイクル（例えば、約20～約50回の熱サイクル）の間にポリメラーゼ活性により伸長される。

10

【0034】

もう1つの例であるTMAでは、1つの増幅プライマーは、ターゲットRNAとハイブリダイズする「プロモーター-プライマー」であり、逆転写酵素（RT）がターゲットRNAのcDNAコピーを產生する一方、RNアーゼHの活性がターゲットRNAを分解する。このプロモーター-プライマーは、ターゲット配列にハイブリダイズし得るターゲット結合配列の5'に位置するプロモーター配列（二本鎖になったときに機能性になる）を含むオリゴヌクレオチドである。このターゲット結合配列はこの配列の3'位でターゲットRNAの結合部位とハイブリダイズして増幅され得る。二本鎖になると、プロモーター配列はRNAポリメラーゼに結合し、プロモーター-プライマーがハイブリダイズしているターゲット配列の転写を開始させる。プロモーター-プライマーは、T7·RNAポリメラーゼ認識に特定した場合、「T7-プライマー」と言われる場合がある。ある状況では、プロモーター-プライマー、又はそのようなプロモーター-プライマーの亜集団の3'末端がプライマー伸長を妨害又は抑制するように修飾される場合がある。次いで、第二の増幅プライマーがcDNAに結合し、RTが別のDNA鎖を產生し、機能性のRNAプロモーターを一端に含有する二本鎖DNAを生じる。第二の増幅プライマーは、ターゲットRNAの相補体（即ち、cDNA鎖）にハイブリダイズし得るターゲット結合配列を含む。これは、「T7プライマー」と区別するために「非T7プライマー」と言われる場合がある。RNAポリメラーゼはこのプロモーター配列を使用して、多数のRNA転写物（すなわち、アンブリコン）を、概して約100～1,000コピー產生する。新たに合成された各アンブリコンが第二の増幅プライマーとアニールし得て、これがRTにより伸長されてDNAコピーを產生するのに対し、RNアーゼH活性はこのRNA:DNA二重鎖のRNAを分解する。次いで、プロモーター-プライマーは新たに合成されたDNAに結合し、RTにより二本鎖のDNAが創出され、それからRNAポリメラーゼが多数のアンブリコンを產生する。このようにして、2種の増幅プライマーを使用して、10億倍の等温増幅が達成され得る。

20

【0035】

増幅プライマーの「ターゲット結合配列」とは、ターゲット特異性を決定する部分である。なぜなら、この部分がターゲットの核酸鎖又はその相補鎖にアニールし得るからである。ターゲット結合配列がハイブリダイズする相補的なターゲット配列はプライマー結合配列と言われる。プライマーに追加の機能配列を必要としないプライマー又は増幅方法（例えば、PCR増幅）では、プライマー配列は本質的にターゲット結合配列からなる。一方、他の方法（例えば、TMA又はSDA）では、ターゲット結合配列に隣接した追加の特殊な配列が含まれる（例えば、プロモーター-プライマーのターゲット結合配列に隣接したRNAポリメラーゼプロモーター配列、又はSDAプライマーの制限エンドヌクレアーゼ認識配列）。例えば、表1に示した好ましいPSA特異ターゲット結合配列では、SEQ ID NO:15～SEQ ID NO:29が追加の機能配列を含まない増幅プライマーであり、SEQ ID NO:30～SEQ ID NO:43はターゲット結合配列（下線なし）以外の追加の機能配列（下線部分）を含むT7プロモーター-プライマーであり、下線を施した配列は好ましいT7ポリメラーゼプロモーター配列である。本発

30

40

50

明のすべてのプライマー及びプローブ配列は標準的な *in vitro* 合成法を使用して合成し得ることが当業者には理解されよう。また、多種多様な増幅法での使用に適したプライマーをつくるために、追加の特殊な配列（例えば、プロモーター又は制限エンドヌクレアーゼ認識配列）を付加するための定法を使用して本明細書に開示されるプライマー配列を修飾し得ることも理解されるだろう。同様に、本明細書に記載されるプロモーター-プライマー配列は、プロモーター配列を除去することによって、追加の機能配列を使用しない PCR のような増幅法に適した、本質的にはターゲット結合配列である増幅プライマーを產生するように修飾し得る。

#### 【0036】

例えば、国立医学図書館の国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information at the National Library of Medicine) から入手可能な BLASTN アルゴリズムのようなアルゴリズムのデフォルト変数を用いる並置アルゴリズムを使用するか、又は以前に詳しく記載された (Shuler et al., 1991, Proteins 9 (3): 180-190) ような多重並置構築・分析作業用 (「MACAW」; Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench) アルゴリズムを使用して、既知の HSPSAR 配列を有する PSA エクソンの既知配列とヒトカリクレインのエクソン配列 (HUMKAL2、HUMKAL2a、HUMKAL2b、HUMKAL2c、HUMKAL2d、HSKALLI 及び HUMPSAA) と並置することによって、SEQ ID NO: 1 ~ SEQ ID NO: 46 及び 47 のプライマー及びプローブの PSA 特異配列と SEQ ID NO: 46 及び 47 の hK2 特異プライマー配列を選択した。上記の配列群を並置した後で、他の配列との最少量の同一性を含有する、プライマー又はプローブが所望される PSA エクソンの領域又は hK2 領域を同定した。それらの配列から、プライマー又はプローブにとって好適な長さ及び GC 含量を有するオリゴヌクレオチド配列を選択し、試験のために合成した。ある場合では、以前に詳しく記載された (Matzura and Wennborg, Complete Applications in the Biosciences, 1996, Vol. 12, No. 3, pp 247-9) ような RNA の二次構造を計算するアルゴリズムを使用することによって、選択されたプライマー又はプローブの予測二次構造を決定した。ヒト PSM1 についての SEQ ID NO: 48 及び SEQ ID NO: 49 のプライマーと SEQ ID NO: 50 のプローブも同様に設計して選択した。配列の並置と二次構造の予測にアルゴリズムを援用したが、当業者ならば上記の工程をマニュアルで容易に実施し得る。

#### 【0037】

「ターゲット配列」は、標識されたオリゴヌクレオチドプローブを使用して、少なくともその一部が検出され得る核酸鎖のヌクレオチド塩基配列を意味する。プライマーはターゲット配列の一部に結合するが、ターゲット配列が二本鎖の核酸である場合は、両方の相補鎖が含まれる。

#### 【0038】

「均等な RNA」は、T の代わりに U が適切に置換されている、デオキシリボ核酸 (DNA) と同じヌクレオチド塩基配列を有するリボ核酸を意味する。同様に「均等な DNA」は、U が T に適切に置換されている以外は RNA と同じヌクレオチド塩基配列を有する DNA のことである。当業者には、「核酸」及び「オリゴヌクレオチド」という用語が DNA 又は RNA の塩基配列か、DNA 及び RNA の塩基配列の合成的な組み合わせのいずれかを有する分子構造を意味し、「非塩基 (abasic)」残基が含まれる、その類似体も含むことを理解されよう。

#### 【0039】

「固体支持体」は、オリゴヌクレオチド又は核酸との結合に利用し得るフリーの化学基を含んでなる、アッセイ法の溶媒及び温度条件下ではほとんど溶けない素材を意味する。好ましくは、固体支持体は、ターゲット核酸と直接的又は間接的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドと共有的にカップルする。ターゲット核酸が mRNA である場合、固体支持体に付着したオリゴヌクレオチドは、好ましくはポリ T 配列である。好ましい固体支持体はミクロン又はサブミクロンサイズのビーズ又は球体のような粒子である。例え

10

20

30

40

50

ば、シリカ、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、金属、ポリスチレン、ラテックス、ニトロセルロース、ポリプロピレン、ナイロン又はそれらの組み合わせのような多種多様な固体支持体の素材が考慮される。より好ましくは、固体支持体は、磁気コアを有する固体支持体のように、磁場によってある場所に付着され得る。特に好ましい支持体は、単分散磁気球体（即ち、均質サイズ±約5%）である。

#### 【0040】

増幅産物を「検出すること」とは、例えば、標識プローブを増幅産物の一部へハイブリダイズさせることのような、増幅された核酸の存在を判定する様々な方法のいずれかを意味する。標識プローブとは、別の配列と特異的に結合し、例えば、蛍光部分、化学発光部分、放射性同位体、ビオチン、アビジン、酵素、酵素基質又は他の反応基であり得る検出可能な基を含有するオリゴヌクレオチドである。好ましくは、標識プローブには、（米国特許第5,283,174号に記載されるような）好適な条件下で化学発光的に検出され得るアクリジニウムエステル（A E）部分が含まれる。他のよく知られた検出技術には、例えば、ゲル濾過、ゲル電気泳動及びアンブリコンの視覚化、及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が含まれる。検出工程は定性的か定量のかのいずれかであり得るが、非前立腺サンプルにおける前立腺関連遺伝子の発現（例えば、PSA特異mRNA）のレベル（これは前立腺癌及び/又は乳癌の転移又は再発の程度を示す）を決定するには、PSA特異的又は他の前立腺関連遺伝子のアンブリコンの定量的な検出が好ましい。

10

#### 【0041】

ターゲットポリヌクレオチドを精製して検出するアッセイは、しばしば、ターゲットポリヌクレオチドを固体支持体上に捕捉することを含む。固体支持体は、ターゲットポリヌクレオチド精製法の1回又はそれ以上の洗浄工程の間、ターゲットポリヌクレオチドを保持する。ターゲットポリヌクレオチドを捕捉してその存在を検出するためのハイブリダイゼーションサンドイッチ技術は、固体支持体に結合したプローブによりターゲットポリヌクレオチドを捕捉すること、及び捕捉されたターゲットポリヌクレオチドへ検出プローブをハイブリダイズさせることを含む（Ranki et al.による米国特許第4,486,539号）。ターゲットポリヌクレオチドへハイブリダイズしない検出プローブは固体支持体から速やかに洗浄除去される。こうすれば、残っているラベルは、初めにサンプルに存在したターゲットポリヌクレオチドと結びついている。もう1つの方法は、ターゲットポリヌクレオチドと固体支持体上に固定されたポリヌクレオチドの両方にハイブリダイズするメディエーターポリヌクレオチドを使用するが、メディエーターポリヌクレオチドは、ターゲットポリヌクレオチドを固体支持体へつなげて結合ターゲットを産生させる（Stabinskyによる米国特許第4,751,177号）。標識プローブはこの結合ターゲットとハイブリダイズし得るが、結合しなかった標識プローブは固体支持体から洗浄除去され得る。

20

#### 【0042】

mRNAを検出するための多くの方法、特に増幅を包含するものは、増幅及び検出に先立ってRNA及び/又はmRNAを十分精製することを必要とし、しばしばグアニジウムチオシアネートのような劇物を含む（Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), pp. 7.37-7.57; Lin, L. et al., 1993, "Simple and Rapid Sample Preparation Methods for Whole Blood and Blood Plasma" in Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications (Persing, D. H. et al., Eds., American Society for Microbiology, Washington, DC), pp. 605-616）。本発明の1つの態様は、非前立腺の生物学的サンプルを調製しRNAを得るための簡便かつ迅速な方法を使用するが、前立腺癌及び/又は乳癌の細胞を非前立腺組織において検出するために、このRNAから前立腺関連mRNA（例えば、PSA特異mRNA）を増幅して検出し得る。非前立腺の生物学的サンプルは、末梢血又は骨髄のような造血系の組織、血漿、リンパ節を含む非前立腺の生検組織、呼吸器系組織又は滲出液、胃腸組織、尿、糞、精液又は他の体液ないし物質であり得る。好ましいサンプル調製法は最少限の専門技術を必要とし、標準的な実験機器と比較的廉価な試薬を使用して、増幅に適したターゲットmRNAを产生する一方、染色体

30

40

50

D N A に見出される潜在的に交叉反応する配列から生じ得る偽陽性を回避するものである。この好ましい簡便なサンプル調製法は、染色体 D N A を十分抽出して（粘度を低下させるために）剪断することなくし、潜在的に有害な試薬（例えば、グアニジウム化合物、フェノール又はクロロホルム）の使用を回避し、工程数を最少化し、それによりサンプルの損失を最少化して、少量の m R N A 種の検出を増加させる。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明の方法には、 P S A 特異核酸、特に m R N A のような前立腺関連遺伝マーカーを検出するか又は定量する方法が含まれる。この方法には、前立腺関連遺伝マーカーのターゲット配列を潜在的に含有する非前立腺の生物学的サンプルを、ターゲット遺伝子配列（ P S A 、 P S M A 及び / 又は h K 2 ）と特異的にハイブリダイズし得る第一のプライマー又はプロモーター - プライマーと接触させること、及び、ターゲット特有の増幅産物（「アンプリコン」）を産生する核酸増幅条件の下で、少なくとも 1 つの核酸ポリメラーゼ活性を提供することが含まれる。好ましくは、このターゲット特有の増幅産物は、この特有のターゲット配列に相補的な領域と、増幅されたターゲット配列に特有の標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーション条件下ハイブリダイズすることによりプローブ：ターゲットのハイブリッドを形成し得る少なくとも 1 つのプローブ結合部位とを含んでなる、複数の核酸鎖である。この方法にはまた、非前立腺の生物学的サンプルにおける前立腺関連遺伝マーカー核酸の存在を示すものとして、標識プローブ：ターゲットのハイブリッドを検出することが含まれる。好ましい態様には、比較的簡略なサンプル調製法を使用して、生物学的サンプルからターゲット核酸の基質を調製することがさらに含まれる。さらに、この検出工程には、アッセイにおいてターゲットの検出を高める、増幅されたターゲット核酸の一部に特有の 1 種又はそれ以上のヘルパープローブが含まれる場合がある。ヘルパープローブが検出を高める機序に束縛されることを望まないが、一般に、ヘルパープローブは増幅されたターゲット配列にハイブリダイズして二次構造を除去するか、又は他のやり方で、検出される配列に他のプローブが結合する能力を高めると考えられる。好ましくは、前立腺関連遺伝マーカーのターゲット配列が R N A である場合、標識オリゴヌクレオチドプローブは同じセンスのものである。

#### 【 0 0 4 4 】

本発明の 1 つの態様では、増幅工程にはプロモーター - プライマーだけが使用され、プローブはアンプリコンの一部をターゲットにする。単一のプロモーター - プライマーが反対センスのプライマーがないままに利用される場合、ターゲット R N A は、ターゲット R N A と同じセンスのプローブを使用して検出され、（ Kacian et al. による米国特許第 5,554,516 号にかつて詳しく説明されたように）増幅された相補核酸の内部に位置する塩基配列領域とハイブリダイズし得る。

#### 【 0 0 4 5 】

本発明の好ましい態様では、ヒト P S A 、 P S M A 及び / 又は h K 2 遺伝子配列に特有の選択プライマーが、プロモーター - プライマーとプロモーター配列のない増幅プライマーの両方を使用する転写介在増幅において使用され、増幅産物は、均質アッセイにおいて検出され得るプローブとともに検出される（ Kacian & Fultz による米国特許第 5,480,784 号及び 5,399,491 号； Kacian et al. による米国特許第 5,554,516 号； Arnold et al. への米国特許第 5,283,174 号； 欧州特許出願 E P 0 709 466 号を参照のこと）。上記の一般的な増幅及び検出の方法は当技術分野で周知である。好ましい増幅法は、 R N A である増幅された核酸又はアンプリコンを産生し、さらにより好ましくは、ターゲット配列に相補的である（即ち、ターゲットと反対のセンス）増幅 R N A を主に産生する。従って、ターゲットが m R N A であり、仮に（ + ）センス鎖と指定すれば、アンプリコンは、好ましくは（ - ）センス鎖である。そのようなアンプリコンを検出するプローブは、増幅された配列と特異的にハイブリダイズし得る（即ち、アンプリコンの一部に相補的である）任意の配列である。かつて記載された（米国特許第 5,480,784 号及び 5,399,491 号）ような転写介在増幅（「 T M A 」）法を使用すれば、プロモーター - プライマーは（ - ）センスであり、鑄型のターゲット核酸は（ + ）

10

20

30

40

50

) センスであり、産生されるアンプリコンは( - ) センスである。

【 0 0 4 6 】

本発明の方法は実質的に等温であり、核酸增幅の温度サイクリングや P S A 特異的な連続增幅用のネスティドプライマーを必要としないので、 P S A 特異配列を検出する先行法より好ましい。本発明の特に好ましい態様では、増幅工程において使用される 2 種のプライマーの 1 つは、前立腺関連遺伝マーカーの m R N A に結合する T 7 ( - センス ) プロモーター - プライマーであり、 2 種のプライマーのもう 1 つは、この m R N A を鋳型として使用して T 7 プロモーター - プライマーを伸長させる逆転写酵素の活性から産生された c D N A 産物に結合する非 T 7 ( + センス ) プライマーである。この T 7 プロモーター - プライマーは、ターゲット結合配列の 5' 末端に T 7 · R N A ポリメラーゼ認識配列を含有するが、非 T 7 プライマーは T 7 · R N A ポリメラーゼ認識配列を含有せず、本質的にターゲット結合配列からなる。好ましいプロモーター - プライマーは約 3 5 ~ 4 5 n t の間の下限と約 4 5 ~ 1 0 0 n t の間の上限がある長さの範囲を有する。好ましくは、プロモーター - プライマーは約 4 0 ~ 7 0 n t の長さであり、より好ましくは、約 4 5 ~ 5 5 n t の長さである。好ましくは、プロモーター - プライマーの T 7 プロモーター配列は約 2 5 ~ 3 0 n t の長さであり；特に好ましい T 7 プロモーター配列には、 S E Q I D N O : 4 4 又は S E Q I D N O : 4 5 が含まれる。 P S A 特異プロモーター - プライマーの好ましいターゲット結合領域は、ヒト P S A 遺伝子のエクソン配列と、好ましくはエクソン 3 、 4 又は 5 のいずれか 1 つの内部で、特異的にハイブリダイズする。転写介在増幅においてプロモータープライマーとともに使用されるプライマーは、本質的に、ヒト P S A 、 P S M A 又は h K 2 遺伝子の配列に特有のターゲット結合配列からなる。好ましい P S A 特異配列は、エクソン内部か、又は 2 つのエクソンのスプライス連結部に及ぶ P S A 配列に結合し、より好ましくは、ヒト P S A 遺伝子のエクソン 2 、 3 又は 4 のいずれかに特有なターゲット結合配列を有する、又はエクソン 2 及び 3 のスプライス連結部に及ぶ。プライマーは、好ましくは、約 1 5 ~ 2 0 n t の下限と約 2 5 ~ 1 0 0 n t の範囲内に上限を有する範囲内の長さを有し、より好ましくは、約 1 5 ~ 3 0 n t の範囲であり、最も好ましくは、約 2 0 ~ 2 5 n t の範囲の長さである。表 1 に示すように、好ましい P S A 特異プライマーは S E Q I D N O : 1 5 ~ S E Q I D N O : 2 9 の配列を有し、好ましい P S A 特異プロモーター - プライマーは S E Q I D N O : 3 0 ~ S E Q I D N O : 4 3 の配列を有する（ここではプロモーター配列に下線をし、ターゲット結合配列には下線がない）。 10 20 30

【 0 0 4 7 】

本発明の 1 つの側面は、非前立腺組織から採取したサンプルに存在する m R N A 中の P S A 特異ターゲット配列を増幅すること、及び、増幅された生成物を非前立腺組織内に存在する前立腺癌又は乳癌の細胞の程度として検出し、それにより乳癌の存在や前立腺癌の転移を示す方法である。核酸プローブを検出するための均質な化学発光検出アッセイは好ましい態様であるが、当業者ならば、ハイブリダイズしたプローブを検出するには、酵素、酵素基質、蛍光、発光、化学発光及び電気化学発光の分子、放射核種及び蛍光原子に基づいたラベルのような、当技術分野でよく知られている他のラベル及び検出法を容易に使用し得るし、ゲル電気泳動又は濾過、増加吸光、濃色シフト、又は H P L C といった標準法を使用して増幅産物を検出し得るだろう。好ましい均質アッセイは非均質アッセイ（つまり、ハイブリダイズしたプローブのシグナルをハイブリダイズしていないプローブによるシグナルから差別化するために物理的な分離を必要とするアッセイ）に対する利点を有するが、均質検出という側面は本発明にとって決定的ではない。好ましくは、蛍光又は化学発光のラベルがこのプローブに取込まれ、より好ましくは、ラベルは化学発光性のアクリジニウムエステル（ A E ）である。 40

【 0 0 4 8 】

本発明の方法に使用されるプローブは検出されるアンプリコンの任意の領域へターゲットされ得て、好ましくは、プローブはターゲット核酸と同じセンスである。例えば、 P S A 特異プローブは、イントロン又はエクソン配列のいずれかにハイブリダイズし得るが、好 50

ましくは、P S A 遺伝子のエクソン（例えば、エクソン2、3又は4）内にあるか、又はエクソンのスプライス部位に及ぶ（例えば、エクソン3の3'末端とエクソン4の5'末端に及ぶ）か、又はP S A 遺伝子イントロンの内部（例えば、イントロン3の内部）にある配列とハイブリダイズする。プローブ配列は、約5～100 ntの長さの範囲内にあり得るが、好ましくは約10～50 ntの長さであり、より好ましくは約20～25ヌクレオチドの長さである。好ましいプローブ配列には、SEQ ID NO: 1～SEQ ID NO: 14を（表1に示すヒトP S A 遺伝子内のその全般的な位置で）有するものが含まれる。好ましくは、このプローブはA Eで標識され、T M A 反応の増幅R N A 産物とハイブリダイズする。

## 【0049】

10

本発明のプライマー及びプローブは、多種多様な周知の方法のいずれかにより単離される核酸基質を使用する増幅及び検出の方法において使用し得る。ターゲットm R N Aは、T M Aにおける使用に適したm R N Aを産生する以下の比較的簡単な方法により製造され得る。この方法では、少なくとも約150 mMの可溶な塩、好ましくはハロゲン化リチウム塩、キレート剤及び非イオン性界面活性剤を、核のD N A又はR N Aの実質的な放出を起さずに細胞の細胞膜を溶かすのに有効な量だけ含有する溶解液に細胞懸濁液を接触させることによって、生物学的サンプル（例えば、末梢血又は骨髄細胞）中の細胞を溶かした。細胞懸濁液と溶解液を約1:1～1:3の比率で混合し、溶解液の界面活性剤濃度を約0.5%～1.5%（v/v）の間とした。多種多様な既知の非イオン性界面活性剤のいずれもが溶解液において有効である（例えば、T R I T O N（登録商標）タイプ、T W E E N（登録商標）タイプ及びN Pタイプ）が、典型的には、溶解液はオクチルフェノキシボリエトキシエタノールの界面活性剤、好ましくは1% T R I T O N（登録商標）X-102を含んでいた。この方法は主に細胞懸濁液を含有する生物学的サンプル（例えば、血液及び骨髄）について使用されてきたが、それは、細胞を個別にか又は小さな塊へ分離するための標準的な刻み、篩い、及び/又はタンパク分解法を使用して細胞が分離されれば、他の組織についても同じように有効である。細胞の溶解後、放出された全R N Aは安定であったが、追加のR N Aアーゼ阻害剤がなくても、少なくとも2時間は室温で、有意なR N A分解を起こすことなく保存し得る。全R N Aはさらに精製せずに増幅に使用し得るし、又は、m R N AのポリA部分へのアフィニティー結合に概して依存した標準法を使用してm R N Aを単離し得る。

20

## 【0050】

30

好ましくは、m R N Aの単離には上記の溶解混合物へ加えた不溶性の粒子に付いたポリ-d Tオリゴヌクレオチドから本質的になる捕捉粒子を使用し、ポリ-d T部分をポリ-A・m R N Aへアニールし、この粒子をこの混合物から物理的に分離した。一般に、超常磁性の粒子を使用し、容器の外側へ磁場をかけることによって分離した。好ましくは、約1m lの溶解混合液へ、約1～100ピコモル/m g（好ましくは10～100ピコモル/m g、より好ましくは10～50ピコモル/m g）の密度で連結したd T<sub>14</sub>又はd T<sub>30</sub>を有する約300 μ gの粒子の懸濁液（標準的なリン酸緩衝化生理食塩水（P B S），p H 7.4、100 mM Na C l）を加えた。任意の超常磁性粒子を使用し得るが、典型的には、粒子はラテックス又はシリカでコートされた磁気コア（S e r o d y n又はD y n a 1から市販されている）であり、標準法（Lund et al., Nuc. Acid Res., 1988, 16: 10861-10880）を使用して、これにポリ-d Tオリゴヌクレオチドを付けた。この粒子を含有する溶解混合液を穏やかに混合し、約22～42で約30分インキュベートした後、試験管の外側に磁場をかけて、m R N Aの付いた粒子をこの混合液から分離し、上澄液を除去した。上記のような標準の再懸濁法と磁気分離を使用して、粒子を1回又は数回、一般的には3回洗浄した。次いで、粒子を緩衝液に懸濁し、すぐに増幅に使用するか又は冷凍保存した。

## 【0051】

40

サンプル調製に実質的に影響を及ぼすことがなければ、多くの変数を変化させてよい。例えば、粒子洗浄工程の回数は変えてよいし、粒子は他の手段（例えば、濾過、沈澱、遠心

50

分離)により上澄液から分離し得る。固体支持体は、特定のターゲット配列に相補的である、それに結合した核酸捕捉プローブを有する場合があり、このターゲット核酸と非特異的に結合する任意の粒子又は固体支持体(例えば、Arnold et al.による米国特許第5,599,667号に記載のようなポリカチオン性の支持体)を使用し得る。増幅のためには、標準の低塩溶出法を使用して捕捉粒子から単離RNAを放出させるか、又はpoly-dTとの塩基対合にも固相マトリックスとの他の相互作用にも関わらないRNAの領域に結合するプライマーを使用して、粒子上に保持させながら増幅した。上記の具体的な容量や比率は決定的ではなく、核内物質の有意な放出が起こらない限りは、変えてよい。小規模の調製には振盪混合が好ましいが、他の混合法に換えてよい。しかし、重要なのは、生物学的組織由来のサンプルを凝集させないように処理すべきことであり、溶解液のイオン強度は少なくとも約150mM、好ましくは150mM~1Mとする。より低いイオン強度では核内物質(例えば、DNA)の混入につながり、これが粘度を高め、増幅及び/又は検出の工程に干渉し、偽陽性を産生させる可能性があるからだ。RNAの分解を防ぐには溶解液にリチウム塩が好ましいが、他の可溶塩(例えば、NaCl)を1種又はそれ以上の既知RNアーゼ阻害剤と組み合わせるのも同等に有効だろう。

#### 【0052】

表2は、米国特許第5,399,491号、5,480,784号及び5,554,516号の先行記載とほとんど同じようにTMAを使用し、米国特許第5,283,174号の先行記載とほとんど同じ均質保護アッセイで検出するときの、PSA、PSMA及びhK2遺伝マークターの増幅及び検出に使用されるプライマー及びプローブの(ヘルパープローブを含むか又は含まない)好ましい組み合わせを列挙する。各行は好ましい組み合わせを表す。この中で、PSA・mRNAを増幅して検出するのに特に好ましい組み合わせを、表2の行の各欄に星印(\*)で示す。表2の最後の2つのエントリーは、hK2ターゲット(SEQ ID NO: 46、47及び1)とPSMAターゲット(SEQ ID NO: 48、49及び50)を特に増幅して検出するためのプライマー及びプローブである。

#### 【0053】

多種多様な生物学的サンプルからの核酸が、本明細書に記載のプライマー及びプローブを用いた前立腺関連マーカー mRNAの増幅及び検出の方法を試験するのに使用されてきたが、それには、PSA・cDNAのin vitro 転写物、PSA・cDNAのin vitro 転写物でスパイクした全血、前立腺癌細胞系(LNCaP細胞、Horoszewicz J. S. et al., 1983, Cancer Res. 43: 1809-1818; ATCC No. CRL-10995)、LNCaP細胞でスパイクした全血、末梢血、乳房組織細胞、肺細胞から単離した全RNA、及び、前立腺癌細胞、リンパ節、乳房組織細胞、腎臓細胞、小腸組織細胞及び白血球のゲノムDNAから単離し、それぞれ試験したpoly-A・RNAが含まれる。全RNA(肺、乳腺及び前立腺由来)とpoly-A・RNA(腎臓、肝臓、リンパ節、乳腺、小腸及び前立腺由来)を標準法(Chirgwin et al., 1979, Biochem. 18: 5294の方法、クローンテク・ラボラトリーズ社、パロアルト、CAから市販のオリゴ(dT)セルロースを用いて選択されるpoly-A・RNAを用いる)を用いて調製した。実質的に同じ方法を使用して、正常ヒトドナーの末梢血から全RNA及びpoly-A・RNAを調製した。

#### 【0054】

PSA・cDNAのin vitro 転写物はベクター(pBluscript SK-; Adams et al., 1985, Nature 377 (3): 174)に存在するPSA・cDNAクローン(ATCC, 受入れ番号106527より入手)を用いて調製するか、又は約1.2kbのPSA・cDNAフラグメントをin vitro 転写物の調製に使用する別のベクター(pSP64 poly(A)ベクター)へサブクローン化した。標準法を使用してプラスミドDNAを調製及び精製し、cDNA挿入物の3'位での酵素消化により線状にし、RNAポリメラーゼを使用して転写した。標準的な方法及び試薬(Epicenter Technologies, Corp., マジソン、WIのAMPLISCRIBE翻訳キットで供給される)を使用して転写物を調製した。

【0055】

【表3】

表2：プライマー及びプローブの好み組み合わせ (SEQ ID NO)

非T7プライマー	T7プロモーター-プライマー	プローブ	ヘルパー-プライマー
15	30	1	なし
17*	30*	1*	なし
18*	30*	1*	なし
18	35	1	なし
18	30	4	なし
18	30	5	なし
18	30	6	なし
16	31	2	なし
16	31	3	なし
16	33	2	なし
16	33	3	なし
16*	32*	2*	なし
16	32	3	なし
16	34	2	なし
16	34	3	なし
20*	37*	8*	なし
20	38	8	なし
21	37	8	なし
21	38	8	なし
21*	40*	14*	なし
21	37	14	なし
21*	41*	14*	なし
21	40	8	なし
21	41	8	なし
21	41	8	27
21*	41*	8*	27及び28*
26*	40*	8*	27及び28*
26*	37*	8*	27及び28*
26*	41*	8*	27及び28*
26	43	8	27及び28
26	38	8	27及び28
46	47	1	なし
48	49	50	なし

10

20

30

【0056】

他に断らなければ、本明細書において利用されるか又は考慮される技術は当業者に周知の標準法である。以下の態様の実施例は、説明だけのために提供される。

【0057】

【実施例】

## 実施例1：生物学的サンプルの溶解とmRNAの単離

約250μlの非凝固性末梢血又は骨髄を約750μlの溶解液へ加えた。上記2つの成分の各比率は決定的ではなく、ほぼ1:1の比から1:3の成分比でサンプルを溶解することが可能である。最も一般的に使用される溶解液は、50mM HEPES (pH 7.5), 1M LiCl, 5mM EDTA及び1% Triton (登録商標) X-102から構成された。「非凝固」とは、血液又は骨髄を回収と同時に約2mM～約20mMのEDTA、又は有効量のヘパリン又は当技術分野で既知の類似した抗凝固剤で処理したことを意味する。この混合液へ、約10～50ピコモルのポリdT/粒子1mgの密度で連結したdT<sub>14</sub>又はdT<sub>30</sub>を有する約300μgの超常磁性粒子の懸濁液 (PBS溶液、pH 7.4、140mM NaCl含有)を加えた。ポリdT粒子を含有する溶解混合液を振盪により穏やかに混合し、約22～42で約30分インキュベートした。試験管の外側に磁場をかけることによって、mRNAの付いた粒子をこの混合液から分離し、上澄液を除去した。約1mlの洗浄溶液 (50mM HEPES (pH 7.5), 5mM EDTA, 150mM NaCl及び0.1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS))

40

50

S ) ) にそれを再懸濁し、約 3 ~ 5 秒間振盪により混合してビーズを懸濁させることによつて粒子を 1 ~ 3 回洗浄し、上記のようにビーズを上澄液から分離し、この上澄洗液を捨てた。洗浄後、粒子を緩衝液 ( 10 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA ) 250 μl に懸濁し、後の使用のために -30° で保存するか、又はすぐに使用した。増幅法における使用では、RNA の付いた粒子は直接使用するか、ときには標準溶出法 ( 例えは、加熱 ) を使用して、この付いた RNA を捕捉粒子から遊離させた。固体粒子の存在は増幅を妨害しなかつたので、RNA の付いた粒子を使用する簡便性が追加の RNA 単離工程より好まれた。

#### 【 0058 】

##### 実施例 2 : PSA 特異 mRNA の増幅及び検出

10

既知 PSA 配列の転写介在増幅におけるプライマー及びプロモーター - プライマーの様々な組み合わせの相対効率を初めに試験するために、非 T7 (+) プライマーと T7 (-) プロモーター - プライマーの各組み合わせを使用して、PSA 遺伝子配列の ( 上記のような ) *in vitro* 転写物を増幅した。増幅後、アクリジニウムエステルで標識した單一プローブを使用して、相対光単位 ( 「 RLU 」 ) として化学発光シグナルを検出する、Arnold et al. による米国特許第 5,283,174 号に記載の通りの均質保護アッセイにおいて、この増幅産物を検出した。すべての実験サンプルは同一 3 検体で試験し、3 回の試験の平均 RLU を算出した。上記の実験ではプロモーター - プライマーとプローブはすべての反応で同じであったが、非 T7 プライマーは変化させた。T7 プロモーター - プライマー ( SEQ ID NO : 30 ) は PSA のエクソン 4 に特有であり、プライマーは PSA のエクソン 3 ( SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 17 及び SEQ ID NO : 18 ) に特有であり、プローブは PSA のエクソン 3 ( SEQ ID NO : 1 ) に特有である。

20

#### 【 0059 】

簡略に言うと、様々な数 ( 10<sup>3</sup>、 10<sup>4</sup> 若しくは 10<sup>5</sup> 個の分子、又は転写物を含まない陰性対照 ) の *in vitro* 転写物を含有する溶液 50 μl を、 160 mM Tris - HC 1 ( pH 7.5 ) 、 100 mM MgCl<sub>2</sub> 、 70 mM KCl 、 20 % ( w/v ) ポリビニルピロリドン、 4 種のリボヌクレオシド三リン酸 ( ATP, GTP, CTP 及び UTP ) 各 16 mM 、 4 種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸 ( dATP, dGTP, dCTP 及び dTTP ) 各 4 mM 、 400 nM ( 15 ピコモル ) を含有する増幅試薬 25 μl の入った試験管へ加えた。この実施例で試験した 3 種の組み合わせでは、反応あたり 15 ピコモル ( 約 400 nM に相当する ) の T7 プロモーター - プライマーは SEQ ID NO : 30 の配列を有し、そして 400 nM ( 15 ピコモル ) の非 T7 プライマーは、 SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 17 又は SEQ ID NO : 18 の配列を有した。各反応液は 60° で 10 分インキュベートしたが、ターゲット核酸における分子内塩基対合を溶かし得る任意の温度が適している ( 例えは、約 60° ~ 70° の間、より好ましくは約 65° ~ 約 67° の間 ) 。次いで、各反応液を約 42° で 5 分インキュベートした後、酵素試薬 ( 組換え MMLV 逆転写酵素 2000 ユニット、組換え T7 · RNA ポリメラーゼ 2000 ユニット、 8 mM HEPES ( pH 7.5 ) 、 50 mM N - アセチル - L - システイン、 0.04 mM 酢酸亜鉛、 80 mM トレハロース、 140 mM Tris - HC 1 ( pH 8.0 ) 、 70 mM KCl 、 1 mM EDTA 、 0.01 % ( w/v ) フェノールレッド、 10 % ( v/v ) Triton ( 登録商標 ) X - 102 及び 20 % ( v/v ) グリセロールを含有する 25 μl ) を加え、この反応液を穏やかに混合し、 42° で約 1 時間インキュベートした。この増幅法により、ターゲット RNA に反対のセンスの増幅 RNA が產生された。

30

#### 【 0060 】

100 mM コハク酸リチウム ( pH 4.7 ) 、 1.2 M LiCl 、 15 mM アルドリチオール - 2 、 2 % ( w/v ) ラウリル硫酸リチウム ( LLS ) 、 20 mM EDTA 、 20 mM エチレングリコール - ビス - ( - アミノエチルエーテル ) N, N, N', N' - テトラ酢酸 ( EGTA ) 、 3 % エタノール及び、 Arnold et al. への米国特許

40

50

第5, 585, 481号に記載の通りの方法を使用して非ヌクレオチドリンカーを介して連結された化学発光性のアクリジニウムエステル(AE)で標識された、SEQ ID NO:1を有するハイブリダイゼーションプローブ7.5nMを含有するプローブ試薬100μlを使用して、増幅されたRNAを検出した。この検出溶液を反応液へ加え、60で30分間インキュベートして、プローブの増幅ターゲットへのハイブリダイゼーションを可能にした。

【0061】

プローブ(SEQ ID NO:1)を、以下の工程を含む均質保護アッセイ(HPA)において検出した。非結合プローブ上のAEラベルを加水分解するために、上記の混合液へアルカリ溶液(600mM ホウ酸ナトリウム、pH 8.5及び1%(v/v)TRITON(登録商標)X-100)300μlを加えた。ハイブリダイズしたプローブ上のAEラベルが二重らせんと結合していることにより加水分解から保護されているのに対し、ハイブリダイズしていないプローブ上のAEラベルは加水分解から保護されていないので、ハイブリダイズしないプローブは検出されない。この溶液を60で10分インキュベートし、5分間室温で冷やし、30mM 過酸化水素と1mM 硝酸を含有する溶液200μlと混合し、直後に1M NaOH及び2%(w/v)ZWITTERGENT(登録商標)3-14を含有する溶液200μlを加えた。ルミノメーター(例えば、LEADER(登録商標)50)を使用して化学発光を検出し、相対光単位('RLU')で測定して出力した。

【0062】

上記の試験の結果を表3に示す。ここでは、プライマー及びプロモーター-プライマーの各組み合わせについての3回の試験それぞれについて検出されたRLUの平均数が表示されている。PSA転写物なし(陰性対照)と10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>又は10<sup>5</sup>個の転写物それぞれを使用して、プライマー及びプロモーター-プライマーの各組み合わせを試験した。

【0063】

【表4】

表3：様々なプライマーの組み合わせを用いたPSAターゲットの増幅及び検出

非T7プライマー SEQ ID NO (PSAエクソン)	T7プロモーター-プライマー SEQ ID NO (PSAエクソン)	PSA転写物(分子数/反応)	平均シグナル (RLU)
15(エクソン3)	30(エクソン4)	10 <sup>5</sup>	504, 097
15	30	10 <sup>4</sup>	56, 481
15	30	10 <sup>3</sup>	5, 528
15	30	0	950
17(エクソン3)	30(エクソン4)	10 <sup>5</sup>	31, 656
17	30	10 <sup>4</sup>	3, 409
17	30	10 <sup>3</sup>	1, 217
17	30	0	983
18(エクソン3)	30(エクソン4)	10 <sup>5</sup>	1, 490, 310
18	30	10 <sup>4</sup>	1, 451, 391
18	30	10 <sup>3</sup>	505, 344
18	30	0	901

【0064】

表3に示す結果は、この実施例で試験したプライマー及びプロモーター-プライマーの3種の組み合わせが様々なレベルの増幅をもたらすこと、同一のプローブですべて検出され、10<sup>3</sup>個のコピーのターゲットRNAがアッセイに含まれるときはすべてバックグラウンド以上のシグナルをもたらすことを示した。この3種の組み合わせのなかで最良の結果を与えたのはSEQ ID NO:18とSEQ ID NO:30の組み合わせであり、この系では、10<sup>4</sup>個のターゲットRNAのコピーがアッセイに含まれるとき、検出が飽和した。

【0065】

実施例3：前立腺組織由来の全RNA及びポリ-A・RNAにおけるPSA・mRNAの

10

20

30

40

50

増幅及び検出

この実施例では、プライマー、プロモーター-プライマー及びプローブの多数の組み合わせを使用して、上記のように前立腺から調製した全RNAサンプルのなかに含まれるPSA特異mRNAを増幅して検出した。

## 【0066】

転写介在増幅及び化学発光検出の工程は、実質的に実施例2の記載通りに実施した。初め、このアッセイの感度を決定するために、様々な数の前立腺細胞のRNA含量を表す、1 pg ~ 10 ngの範囲にわたり、全RNAを使用した。つまり、試験サンプル中の全RNAは、以下のように、算出される細胞数と同等であった：1 pgは1個より少ない細胞（約0.1個の細胞）と同等であり、10 pgは約1個の細胞と同等であり、100 pgは約10個の細胞に同等であり、1,000 pg (1 ng)は約100個の細胞に同等であり、10,000 pg (10 ng)は約1000個の細胞に同等である。ある実験では、全範囲のRNA濃度を試験しなかった。RNAを加えない陰性対照（バックグラウンド）をすべての試験に含め、すべての試験は同一3検体で実施し、平均RLUで表4に報告した。表4は、増幅に使用し、多くのAE標識プローブで検出した、非T7 (+) プライマー及びT7 (-) プロモーター-プライマーの数多くの組み合わせについての結果を示す。

## 【0067】

## 【表5】

表4：様々なプライマー及びプローブの組み合わせを用いたPSAターゲットの増幅及び検出

非T7プライマー SEQ ID NO (PSAエクソン)	T7プロモーター- プライマー SEQ ID NO (PSAエクソン)	プローブSEQ ID NO (PSAエクソン)	加えた 全RNA	平均RLU
18 (エクソン3)	30 (エクソン4)	1 (エクソン3)	10 ng	1, 592, 092
18	30	1	1 ng	1, 395, 934
18	30	1	100 pg	966, 851
18	30	1	10 pg	352, 476
18	30	1	1 pg	50, 249
18	30	1	0	520
20 (エクソン2)	37 (エクソン3)	8 (エクソン2)	1 ng	2, 490, 049
20	37	8	0	4, 780
21 (エクソン2)	40 (エクソン3)	14 (エクソン2)	10 pg	1, 061, 753
21	40	14	1 pg	130, 779
21	40	14	0. 1 pg	41, 248
21	40	14	0	32, 866
21 (エクソン2)	37 (エクソン3)	14 (エクソン2)	10 pg	108, 811
21	37	14	1 pg	52, 603
21	37	14	0. 1 pg	34, 963
21	37	14	0	37, 440
21 (エクソン2)	41 (エクソン3)	14 (エクソン2)	10 pg	3, 188, 114
21	41	14	1 pg	237, 928
21	41	14	0. 1 pg	60, 460
21	41	14	0	37, 140
21 (エクソン2)	40 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 pg	107, 787
21	40	8	1 pg	36, 444
21	40	8	0. 1 pg	8, 735
21	40	8	0	5, 953
21 (エクソン2)	37 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 pg	67, 169
21	37	8	1 pg	13, 555
21	37	8	0. 1 pg	7, 833
21	37	8	0	5, 037
21 (エクソン2)	41 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 pg	261, 249
21	41	8	1 pg	44, 013
21	41	8	0. 1 pg	6, 308
21	41	8	0	5, 242

## 【0068】

表4に示された結果からわかるように、プライマー、プロモーター-プライマー及びプローブの組み合わせはすべて、RNAを加えなかった各組み合わせのバックグラウンドシグナルに比較して、反応液へ加えた全RNAサンプルのなかにPSA・mRNAを検出した。さらに、1 pg程度のRNAを加える（0.1個の細胞に存在していると算出される量

20

30

40

50

にほぼ同等である)と、バックグラウンドより有意に高いシグナルが概ね検出された。

【0069】

上記の結果は、前立腺組織から単離したポリ-A・RNAを使用する別の実験において確かめられた。ポリ-dTオリゴヌクレオチドが約dT<sub>14</sub>~dT<sub>30</sub>の長さで、磁気粒子に共有的に連結しているポリ-dTハイブリダイゼーションを使用して、前立腺のポリ-A・RNAを単離した; 使用した精製工程(磁気分離と洗浄)は実施例1の記載と実質的に同じであった。前立腺の全RNAが約5%のPSA特異mRNAを含むと予測されたので、増幅及び検出のサンプルへ加えるポリ-A・RNA(即ち、精製したmRNA)の量をそれに応じて減少させた。1つの試験セットでは、前立腺組織由来のポリ-A・RNAを反応あたり5pg又は0.5pgで同一3検体の試験管へ加え、表4に示した結果の記載と実質的に同じようにSEQ ID NO:18及びSEQ ID NO:30(プライマー)、SEQ ID NO:1(プローブ)の組み合わせを使用して、これを増幅して検出した。5pgの前立腺mRNAでは、検出された平均RLUは1,404,286であり、0.5pgでは、検出された平均RLUは392,558であった。上記の結果は、PSA特異ターゲットをさらに精製することが、必ずしも増幅及び検出に必要ではないものの、0.5pg程度のmRNAについて検出し得るシグナルを产生することを示している。

【0070】

増幅反応へ加えられるヘルパープライマーが検出シグナルを高めるかどうかを判定するために、以下の実施例に記載のように、一連の増幅及び検出実験を実施した。

【0071】

実施例4:ヘルパープローブを用いたPSA特異ターゲットの増幅及び検出

本実施例は、1種又はそれ以上のヘルパープローブを加えることで検出されるシグナルが増加し、前立腺組織から単離した0.1pg未満の全RNA中に存在するPSA特異配列の検出が好ましい増幅及び検出系を使用して可能になることを示す。以下の試験では、実質的に実施例2及び3の記載通りに増幅を実施したが、但し、検出工程で使用するAE標識プローブとともに約100ピコモルのヘルパープローブオリゴヌクレオチドを増幅反応液へ加えた。次いで、上記のように増幅を進行させた後、上記のように化学発光を検出した。PSA特異ターゲットは、実施例3の記載のように、前立腺組織から単離した全RNAにおいて提供し、0.016pg~10pgの範囲の濃度で試験した。上記実験でのヘルパープローブはSEQ ID NO:27(PSAのエクソン2)とSEQ ID NO:28(PSAのエクソン2及び3の連結点に及ぶ)であった。上記試験の結果を表5に示すが、シグナルは試験した各RNA濃度の同一3検体サンプルの平均を表す。

【0072】

【表6】

表5:ヘルパープローブを用いた増幅とPSA特異配列の検出

非T7プライマー SEQ ID NO (PSAエクソン)	T7プロモーター- プライマー SEQ ID NO (PSAエクソン)	プローブSEQ ID NO (PSAエクソン)	各反応につ き加えた 全RNA (pg)	平均RLU
21(エクソン2)	41(エクソン3)	8(エクソン2)	10	7,539,550
21	41	8	1	1,065,253
21	41	8	0.5	422,459
21	41	8	0.25	174,277
21	41	8	0.125	126,543
21	41	8	0.062	39,283
21	41	8	0.031	24,898
21	41	8	0.016	5,504
21	41	8	0.000	3,645

【0073】

この増幅及び検出系がPSA・mRNAの検出に特異的であることを示すために、前立腺組織から単離した全RNA(クローンテク、パロアルト、CAより入手)について増幅及び検出反応を実施し、正常ドナーの末梢血から得た白血球(「WBC」)から単離した全

10

20

30

40

50

R N Aで実施したものと比較した。ヘルバープローブ (SEQ ID NO: 27 及び SEQ ID NO: 28) を、約100ピコモルの濃度で、上記增幅反応液のすべてに含ませ、非T7プライマー、T7プロモーター-プライマー及びプローブの4種の異なる組み合わせを含めた。上記の試験では、前立腺の全R N Aを各反応につき10 p g又は1 p gで使用し、これに対し、比較のために、少なくとも10,000倍以上のW B C全R N A(各反応につき1 μ g又は100 n g)を使用した。各反応のセットにつきR N Aを加えない陰性対照を含め、すべての反応を同一3検体で試験し、3回の試験の平均値(平均R L U)として結果を表示した。この結果を表6に示す。

【0074】

【表7】

10

表6：ヘルバープローブを用いた増幅とP S A特異配列の検出の特異性

非T7プライマー SEQ ID NO (P S Aエクソン)	T7プロモーター- プライマー SEQ ID NO (P S Aエクソン)	プローブ SEQ ID N O (P S Aエクソン)	各反応につ き加えた 全R N Aと 起源	平均R L U
21 (エクソン3)	41 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 p g - 前立腺	5, 217, 830
21	41	8	1 p g - 前立腺	441, 752
21	41	8	1 μ g - W B C	4, 667
21	41	8	100 n g -W B C	16, 136
21	41	8	0	2, 552
26 (エクソン2)	40 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 p g - 前立腺	9, 085, 005
26	40	8	1 p g - 前立腺	2, 708, 971
26	40	8	1 μ g - W B C	7, 417
26	40	8	100 n g -W B C	6, 124
26	40	8	0	2, 641
26 (エクソン2)	37 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 p g - 前立腺	3, 709, 715
26	37	8	1 p g - 前立腺	462, 262
26	37	8	1 μ g - W B C	18, 889
26	37	8	100 n g -W B C	5, 122
26	37	8	0	2, 592
26 (エクソン2)	41 (エクソン3)	8 (エクソン2)	10 p g - 前立腺	2, 710, 422
26	41	8	1 p g - 前立腺	439, 147
26	41	8	1 μ g - W B C	8, 409
26	41	8	100 n g -W B C	4, 738
26	41	8	10 p g - 前立腺	2, 676

【0075】

40

表6に示した結果からわかるように、試験したプライマー及びプローブの4種の各組み合わせは、前立腺の全R N A中のP S A特異ターゲットR N Aを増幅して検出した。対照的に、P S A特異ターゲットm R N Aを含有するとは考えられない正常ドナー由来のW B C全R N Aを含む、同一条件下のサンプルについては、結果はほとんど陰性であった。即ち、前立腺の全R N Aに比較して、10,000倍～1,000,000倍以上のW B C全R N Aを反応に使用しても、偽陽性は観察されなかった(つまり、1 p gの前立腺R N Aで観察されるものと同等の結果は得られなかった)。表6では、100 n gのW B C全R N AとSEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 41及びSEQ ID NO: 8の組み合わせを使用した試験で比較的高い平均R L U(平均R L U: 16, 136)が得られたが、これは1つの試験管で43, 485 R L Uが検出されたためであり、このセ

50

ットの残り 2 つの試験管がほとんど陰性対照と同じであった ( 2 , 458 及び 2 , 464 R L U ) ことから、この 1 回の高い結果は異物混入か作業者の過失によるものであろう。

【 0076 】

別の試験で、 SEQ ID NO : 26 の非 T7 (+) プライマー、 SEQ ID NO : 40 の T7 プロモーター - プライマー及び SEQ ID NO : 8 のプローブの組み合わせを、各反応につき 10 pg ~ 0.001 pg の範囲の前立腺全 RNA とともに使用する ( 即ち、各反応につき 10 、 5 、 1 、 0.5 、 0.1 、 0.05 、 0.01 又は 0.005 pg を使用する ) 増幅及び検出アッセイにおいて、 PSA 特異ターゲット配列の検出の直線性を測定した。試験アリコートは、 10 pg のアリコートを 1 : 2 及び 1 : 10 に希釈して 5 pg 及び 1 pg のアリコートを得て、次いで 5 pg のアリコートを 1 : 10 に連続希釈して 0.5 、 0.05 及び 0.005 pg のアリコートを得て、 1 pg のアリコートを同様に希釈して 0.1 及び 0.01 pg のアリコートを得た。すべてのアッセイを同一 3 検体で実施し、陰性対照は反応液に前立腺全 RNA を含まなかった。上記アッセイの結果を図 5 に図示して示すが、ここで X 軸と Y 軸はいずれも対数スケールであり、「正味平均 R L U 」は、実験サンプルの平均 R L U から陰性対照結果の平均値を差引いた値を意味する。図 5 を参照すると、実験結果を点の記号及び点線で示し、上記の結果から計算された回帰直線を実線で示す (  $R^2$  の適合値は 0.9776 に等しい ) 。全 RNA の 10 倍連続希釈系列内の結果を同じように図示し、 10 、 1 、 0.1 及び 0.01 pg の群の中で  $R^2$  を算出すると  $R^2$  値は 0.9997 であり、そして 5 、 0.5 、 0.05 及び 0.005 pg の群では、  $R^2$  値は 0.9879 であった。上記の結果は、本明細書に記載の增幅及び検出系が PSA 特異ターゲット核酸の検出について定量的であることを示す。

【 0077 】

実施例 5 : 変性ゲノム DNA における PSA ターゲット配列の増幅及び検出

末梢 WBC から単離した RNA を用いた実施例 4 で得られたネガティブな結果が WBC における PSA 遺伝子発現の不足によるものであることを示すために、末梢 WBC から得られる変性及び非変性ゲノム DNA を使用して、増幅及び化学発光検出アッセイを実施した。ゲノム DNA は正常な PSA 遺伝子を含有すると考えられるが、その非変性状態では、増幅用プライマーや検出用プローブはそれに接近できないだろう。この実験では、非 T7 (+) プライマーは SEQ ID NO : 18 で、 T7 プロモーター - プライマーは SEQ ID NO : 30 で、 AE 標識プローブは SEQ ID NO : 30 であった。陽性対照は、実質的に実施例 2 のように調製した PSA 遺伝子の *in vitro* 転写物であり、各反応につき 100 コピー、各反応につき 10 コピー、及び各反応につき 1 コピーとして使用した。陰性対照は、核酸ターゲット ( DNA 又は RNA ) を加えずに実施した反応物であった。 WBC のゲノム DNA を標準的な DNA 単離法を使用して単離し、剪断して溶液内の粘度を低下させ ( Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd Ed.) , Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY , 1989 ) 、変性させるか又はさせないで、各反応につき約 5 μg 、 0.5 μg 及び 0.05 μg で使用した。 DNA は約 10 分間で 95 ℃ へ加熱して変性させ、次いですぐに冷やした。増幅及び検出のアッセイは実質的に実施例 2 及び 3 の記載通りに実施し、各サンプルにつき同一 3 検体の試験の結果を平均 R L U として表 7 に示す。

【 0078 】

【表 8 】

表7: WBC変性ゲノムDNAにおけるPSAターゲット配列の増幅及び検出

核酸サンプル	核酸／反応	平均RLU
WBC非変性DNA	5 μg	18, 234
WBC非変性DNA	0.5 μg	21, 429
WBC変性DNA	5 μg	1, 391, 494
WBC変性DNA	0.5 μg	293, 522
PSA in vitro 転写物	100コピー	1, 457, 098
PSA in vitro 転写物	10コピー	448, 603
PSA in vitro 転写物	1コピー	1, 028
なし	なし	1, 068

## 【0079】

10

表7に示す結果は、WBCのゲノムDNAがPSA遺伝子配列を含有し、DNAが変性したときは、反応液へ加えられるターゲットの量の減少に一致してシグナルが減少して、増幅されて検出されたことを示す。対照的に、WBCの非変性DNAは比較的高いバックグラウンドを示したもの、試験した2つの濃度でほとんど同じで、同一条件の下で0.5 μgのWBC変性DNAについて検出されたシグナルの1/10未満であった。

## 【0080】

実施例6: 前立腺のポリ-A・RNAとPSA・in vitro 転写物の増幅

この実施例では、プライマー及びプローブの好み合わせを使用して増幅及び検出の結果を比較する。ターゲット核酸は前立腺組織から単離したポリ-A・RNAか又はPSA・cDNA配列のin vitro 転写物のいずれかであった。前立腺のポリ-A・RNAは、実質的に実施例1及び3の記載通りに、固体支持体に固定化したポリ-dTオリゴマーヘのハイブリダイゼーションを使用して単離し、in vitro 転写物は、実質的に実施例2の記載通りに調製した。増幅及び検出法は、非T7(+)プライマーとしてSEQ ID NO:16を有するオリゴヌクレオチドを、T7(-)プロモーター-プライマーとしてSEQ ID NO:32を有するオリゴヌクレオチドを、プローブとしてSEQ ID NO:2を有し、A-Eで標識したオリゴヌクレオチドを使用して、実施例2~4の記載通りに実質的に実施した。ターゲット配列を、試験管あたり10,000コピーのin vitro 転写物か又は試験管あたり0.875ngのポリ-A含有前立腺RNAの算出濃度で増幅反応液へ加えるか、又は陰性対照の試験管にはRNAを加えずに、各組み合わせにつき同一3検体で増幅反応を実施した。平均の結果は、陰性対照では4,022RLU、in vitro 転写物のサンプルでは8,858RLU、及びポリ-A・RNAサンプルでは1,791,197であった。つまり、上記試験において検出された化学発光は他の実施例に比較して相対的に低かったが、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:32及びSEQ ID NO:2の組み合わせは、陰性対照に比較して、2種の陽性サンプル(PSA・in vitro 転写物と前立腺mRNA)においてPSA特異ターゲット核酸を増幅して検出することができた。

## 【0081】

20

実施例7: 臨床の末梢血サンプルにおけるPSA特異ターゲットの増幅及び検出

本実施例では、良性前立腺肥大か前立腺癌のいずれかを有すると疑われる人々に由来する末梢血の臨床サンプルを試験した。末梢血のサンプルは前立腺の手術直前(術前)と前立腺の外科的除去の直後(術後)で採取した。比較のために、前立腺癌細胞系(LNCaP細胞; ATCC No. CRLI-10995)の既知数の細胞、又はPSA特異in vitro 転写物(実施例2に記載)を正常人から採取した末梢血と混合した。臨床又は対照の血液サンプルを溶解し、実質的に実施例1の記載通りに、磁気粒子に付いたポリ-dTオリゴマーの系を使用してmRNAを単離した。各アッセイにつき、臨床サンプルの溶解液を約1.2ml使用し、比較のためにLNCaP細胞の溶解液を約1.0ml使用した。増幅及び検出法は、非T7(+)プライマーとしてSEQ ID NO:18を有するオリゴヌクレオチドを、T7(-)プロモーター-プライマーとしてSEQ ID NO:30を有するオリゴヌクレオチドを、プローブとしてSEQ ID NO:1を有し、A-Eで標識したオリゴヌクレオチドを使用して、実質的に実施例2~4の記載通りに実施し

30

40

50

た。ターゲット配列を(1)約50~100ngの全RNA(各臨床サンプルの各反応につき約2.5~5ngのmRNAに相当する)、(2)各反応につき算定濃度2,000又は200又は20コピーのin vitro転写物、及び(3)各反応につき約10個の細胞、1個の細胞、0.1個の細胞に等しいと算定されるLNCaP細胞において、増幅反応液へ加え、各サンプルにつき同一3検体で反応を実施した。陰性対照にはRNAを加えなかった。各反応セットの同一3検体についての平均RLU結果、又は陰性対照に関する9回の反応の平均RLUを表8に示す。

## 【0082】

## 【表9】

表8：末梢血液サンプルにおけるPSA特異ターゲットmRNAの増幅及び検出

サンプル	各反応ごとのRNAターゲット量又は当量	検出された平均RLU
血液+PSA in vitro 転写物	2,000コピー	1,243,606
血液+PSA in vitro 転写物	200コピー	190,850
血液+PSA in vitro 転写物	200コピー	25,877
臨床サンプル1、術前	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	53,053
臨床サンプル1、術後	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	58,858
臨床サンプル2、術前	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	1,436
臨床サンプル2、術後	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	1,346
臨床サンプル3、術前	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	2,354
臨床サンプル3、術後	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	1,447
臨床サンプル4、術前	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	1,286
臨床サンプル4、術後	ポリA・RNA: 2.5~5.0ng	1,329
血液+LNCaP細胞	≈10 LNCaP細胞	1,087,426
血液+LNCaP細胞	≈1.0 LNCaP細胞	200,122
血液+LNCaP細胞	≈0.1 LNCaP細胞	21,807
正常血液(陰性対照)	なし	1,330

## 【0083】

上記の結果に基づけば、このプライマー及びプローブが、1個のLNCaP細胞の当量を含有するサンプルにおいて検出されるように、約1.0ml容量の末梢血にある1つの癌細胞の当量より少ない量のPSA特異ターゲットRNAを検出し得ることが明らかである。in vitro・PSA遺伝子転写物を含有する血液サンプルに基づけば、このアッセイが血液サンプル中にある20コピーほどの転写物を検出し得ることが明らかである。これら陽性対照とターゲットRNAを加えない陰性対照において得られた結果の比較により、臨床サンプルNo.1において検出されたRLUは、末梢血におけるPSA特異ターゲットの存在を示し、この患者の前立腺癌が血液へ発散する細胞になっていて、転移した可能性があることを示唆する。対照的に、臨床サンプルNo.2~4は、このアッセイにおいて検出されるPSA特異核酸を含有せず、これらの患者では前立腺癌ではなく、良性前立腺肥大(「BPH」)があることを示唆した。試験したすべての臨床サンプルで、個々の患者から得た術前及び術後のサンプルに検出されたRLUのレベルは、有意には異なっていなかった。BPHを示唆するRLUレベルを有する患者では、これは予想されたことである。臨床サンプルNo.1を提供した患者で、手術直後の末梢血において検出し得るPSA特異ターゲットRNAが存在していたのは、PSA・mRNAを発現する細胞、おそらくは前立腺癌細胞が依然として末梢血に存在し、癌細胞の発散又は転移を示唆することを示している。

## 【0084】

臨床サンプルのさらなる試験では、末梢血においてPSA特異ターゲットRNAを検出する同一のアッセイ系を使用して、全部で30個のサンプルを試験した：そのうち5個は正常対照から、15個は臨床的に前立腺癌を有すると診断された患者から、10個は臨床的にBPHと診断された患者からのものである。各反応物は約500ngの全RNAを含み、各サンプルは同一3検体でアッセイした。5,000より大きい平均RLUが検出されたサンプルを前立腺癌について陽性(+)として記録し、残りは前立腺癌について陰性(-)として記録した。正常対照サンプルのすべてとBPH患者由来の10サンプルのうち9個は陰性であった。PSA特異ターゲットRNAが陽性であったサンプルには、臨床的

10

20

30

40

50

に前立腺癌を有すると診断された患者からの 15 サンプルのうち 11 個と BPH と診断された患者の 1 サンプルが含まれた。上記の結果は、末梢血における PSA 特異ターゲットのアッセイが大部分の症例で臨床症状と一致することを示す。前立腺と診断され、PSA 特異ターゲットが血液中に検出されなかった患者では、癌が転移していないか、又は血液中に発散していない可能性がある。

#### 【0085】

##### 実施例 8：様々な生物学的サンプルにおける PSA 特異ターゲットの増幅及び検出

前立腺特異抗原 (PSA) は前立腺組織の癌に関連づけられてきたが、増幅及び検出のアッセイを他のヒト組織から単離した RNA に対して実施し、それら組織において検出される PSA 特異ターゲットの相対レベルを測定した。特に断らなければ、すべての組織は正常ドナー (つまり、非癌性組織) から入手した。アッセイは、ヒト組織サンプルから単離した全 RNA か又はポリ - A · RNA のいずれかを使用して、実質的にこれまでの実施例の記載通りに、SEQ ID NO: 18 を有するオリゴヌクレオチドを非 T7 (+) プライマーとして、SEQ ID NO: 30 を有するオリゴヌクレオチドを T7 (-) プロモーター - プライマーとして、SEQ ID NO: 1 の配列を有するオリゴヌクレオチドを AE 標識化プローブとして使用して、各サンプルにつき同一 3 検体で実施した。これらのアッセイの結果を表 9 に示すが、陰性対照の結果はターゲット RNA を加えないで実施した 12 回の反応の平均である。

#### 【0086】

##### 【表 10】

表 9：生物学的サンプルにおける PSA 特異ターゲットの検出

生物学的サンプル	各反応ごとに試験した量	平均RLU
前立腺組織：全 RNA	100 ng	1, 695, 965
前立腺組織：全 RNA	10 ng	1, 832, 916
前立腺組織：全 RNA	1 ng	1, 170, 802
末梢血：全 RNA	100 ng	2, 341
乳房組織：全 RNA	100 ng	54, 787
乳房組織：全 RNA	10 ng	5, 486
肺組織：全 RNA	100 ng	2, 319
全 RNA の陰性対照	0	1, 620
前立腺組織：ポリ A · RNA	10 ng	2, 510, 601
末梢血：ポリ A · RNA	10 ng	1, 811
乳房組織：ポリ A · RNA	10 ng	120, 264
腎臓組織：ポリ A · RNA	10 ng	147, 284
肝臓組織：ポリ A · RNA	10 ng	1, 900
ポリ A · RNA の陰性対照	0	1, 586
PSA · in vitro 転写物	10, 000 コピー	1, 309, 171
PSA · in vitro 転写物	1, 000 コピー	218, 205
PSA · in vitro 転写物	100 コピー	21, 421
PSA · in vitro 転写物	10 コピー	3, 771

#### 【0087】

別の実験で、ヒト前立腺組織、末梢血、乳房組織、腎臓組織、肝臓組織、小腸及びリンパ節から単離したポリ - A · RNA を、上記と同じプライマー及びプローブの組み合わせを使用して、同様の増幅及び検出アッセイにおいて比較した。前立腺組織の mRNA は各反応につき 5 fg 又は 0.5 fg でアッセイし、他の生物学的起源由来の mRNA は各反応につき 5 ng 及び 0.5 ng でアッセイした。上記の条件下で、PSA 特異ターゲットの配列は前立腺組織、乳房組織、腎臓組織、小腸及びリンパ節において検出されたが、肝臓組織や血液には陰性対照 (つまり、RNA を加えない反応) 以上のシグナルが検出されなかった。検出された相対シグナル (同一 2 検体アッセイの平均 RLU) は、乳房組織、腎臓組織、小腸及びリンパ節に存在する PSA ターゲット核酸が前立腺組織に存在するものの  $1/10^5 \sim 1/10^6$  未満であることを示した。

#### 【0088】

上記の結果は、この PSA ターゲット検出系が前立腺組織以外の組織にある比較的少ない量のターゲットさえ検出し得ることを示している。このアッセイで試験した組織のいくつか (肝臓と末梢血) が PSA 特異ターゲットについて陰性であったので、PSA 遺伝子が

10

20

30

40

50

必ずしも前立腺以外のすべてのヒト組織でより低レベルで発現されているわけではないことを示す。従って、P S A ターゲットは、選択される他のヒト組織の癌性又は前癌性状態についての一般的なマーカーになり得る。検出されるP S A 特異ターゲットの（例えば、末梢血における）増加は、転移した前立腺癌又は他のタイプの癌についての指標になり得る。

#### 【0089】

#### 実施例9：様々な生物学的サンプルにおけるP S A、P S M A及びh K 2 ターゲットの増幅及び検出

P S A だけでなく、他の前立腺関連癌マーカーターゲットであるP S M A 及びh K 2 も非前立腺組織におけるこれらのターゲットm R N A の存在を検出するのに有用である。この実施例では、ヒト組織から単離した全R N A 及びポリ（A）R N A について増幅及び検出アッセイを実施し、上記組織内のP S A、P S M A 及びh K 2 特異ターゲットの相対レベルを測定した。組織はすべて正常ドナー（即ち、非癌性組織）から入手し、実質的に実施例8の記載通りに、各サンプルにつき同一3検体で実施した。各試験サンプルで、R N A 又はポリ（A）R N A の既知量は表10に示す通りであり、ここでは5n g のポリ（A）R N A が約100n g の全R N A に相当する。P S A の検出には、S E Q I D N O：18を有する非T 7（+）プライマー、S E Q I D N O：30を有するT 7（-）プロモーター-プライマー及びS E Q I D N O：1を有するA E 標識プローブを使用して、転写介在増幅を実施した。P S M A の検出には、S E Q I D N O：48を有する非T 7（+）プライマー、S E Q I D N O：49を有するT 7（-）プロモーター-プライマー及びS E Q I D N O：50を有するA E 標識プローブを使用して、転写介在増幅を実施した。h K 2 の検出には、S E Q I D N O：46を有する非T 7（+）プライマー、S E Q I D N O：47を有するT 7（-）プロモーター-プライマー及びS E Q I D N O：1を有するA E 標識プローブを使用して、転写介在増幅を実施した。R L U の検出は実質的に上記の通りであった。同一3検体のサンプルについて実施したアッセイの平均R L U 結果を各結果について表10に示す（N D は「実施せず」を意味する）。

#### 【0090】

#### 【表11】

10

20

表10：生物学的サンプルにおける前立腺関連遺伝マーカーの検出

組織／RNA タイプ	RNA量	PSA	hK2	PSMA
前立腺／ 全RNA	1 ng	2. 58 x 10 <sup>6</sup>	1. 37 x 10 <sup>6</sup>	1. 19 x 10 <sup>6</sup>
	100 pg	2. 54 x 10 <sup>6</sup>	3. 81 x 10 <sup>5</sup>	7. 71 x 10 <sup>4</sup>
	10 pg	2. 40 x 10 <sup>6</sup>	1. 54 x 10 <sup>4</sup>	8. 97 x 10 <sup>3</sup>
	1 pg	2. 18 x 10 <sup>6</sup>	2. 15 x 10 <sup>3</sup>	2. 08 x 10 <sup>3</sup>
	100 fg	1. 87 x 10 <sup>6</sup>	1. 59 x 10 <sup>3</sup>	1. 76 x 10 <sup>3</sup>
	10 fg	6. 22 x 10 <sup>5</sup>	ND	ND
	1 fg	1. 68 x 10 <sup>3</sup>	ND	ND
血液／ 全RNA	100 ng	2. 12 x 10 <sup>3</sup>	1. 39 x 10 <sup>3</sup>	1. 57 x 10 <sup>3</sup>
	10 ng	1. 71 x 10 <sup>3</sup>	1. 27 x 10 <sup>3</sup>	1. 51 x 10 <sup>3</sup>
乳房／ 全RNA	100 ng	2. 78 x 10 <sup>6</sup>	1. 18 x 10 <sup>4</sup>	2. 04 x 10 <sup>6</sup>
	10 ng	1. 56 x 10 <sup>6</sup>	3. 14 x 10 <sup>3</sup>	1. 13 x 10 <sup>6</sup>
	1 ng	1. 17 x 10 <sup>6</sup>	ND	2. 57 x 10 <sup>4</sup>
	0. 1 ng	1. 84 x 10 <sup>3</sup>	ND	4. 46 x 10 <sup>3</sup>
肺／ 全RNA	100 ng	1. 94 x 10 <sup>5</sup>	1. 29 x 10 <sup>3</sup>	1. 85 x 10 <sup>6</sup>
	10 ng	4. 27 x 10 <sup>3</sup>	1. 37 x 10 <sup>3</sup>	3. 16 x 10 <sup>5</sup>
	1 ng	1. 76 x 10 <sup>3</sup>	ND	7. 20 x 10 <sup>3</sup>
	0. 1 ng	ND	ND	2. 61 x 10 <sup>3</sup>
リンパ節／ ポリ(A) RNA	5 ng	2. 73 x 10 <sup>6</sup>	1. 59 x 10 <sup>5</sup>	2. 14 x 10 <sup>6</sup>
	500 pg	2. 52 x 10 <sup>6</sup>	1. 68 x 10 <sup>4</sup>	1. 92 x 10 <sup>5</sup>
	50 pg	7. 89 x 10 <sup>5</sup>	2. 05 x 10 <sup>3</sup>	6. 84 x 10 <sup>3</sup>
	5 pg	1. 66 x 10 <sup>3</sup>	1. 33 x 10 <sup>3</sup>	3. 22 x 10 <sup>3</sup>
腎臓／ ポリ(A) RNA	5 ng	2. 60 x 10 <sup>6</sup>	1. 24 x 10 <sup>3</sup>	2. 54 x 10 <sup>6</sup>
	500 pg	1. 04 x 10 <sup>6</sup>	1. 29 x 10 <sup>3</sup>	8. 01 x 10 <sup>5</sup>
	50 pg	1. 29 x 10 <sup>5</sup>	ND	7. 37 x 10 <sup>4</sup>
	5 pg	1. 66 x 10 <sup>3</sup>	ND	4. 31 x 10 <sup>3</sup>
小腸／ ポリ(A) RNA	5 ng	2. 70 x 10 <sup>6</sup>	1. 42 x 10 <sup>3</sup>	1. 34 x 10 <sup>6</sup>
	500 pg	6. 40 x 10 <sup>5</sup>	2. 28 x 10 <sup>3</sup>	1. 73 x 10 <sup>6</sup>
	50 pg	4. 89 x 10 <sup>4</sup>	ND	1. 18 x 10 <sup>5</sup>
	5 pg	3. 64 x 10 <sup>3</sup>	ND	8. 32 x 10 <sup>3</sup>

## 【0091】

表10に示した結果は、この実施例で使用した増幅及び検出法が、少なくとも10 fgの全RNAを含有する前立腺サンプル、少なくとも1 ngの全RNAを含有する乳房サンプル、少なくとも100 ngの全RNAを含有する肺サンプル、及び、リンパ節、腎臓及び小腸から単離した少なくとも50 pgのポリ(A)RNAを含有するサンプルにおいて、PSA特異RNAを検出したことを示す。hK2については、このアッセイは、前立腺の全RNA(少なくとも10 pg/サンプル)、乳房の全RNA(少なくとも100 ng/サンプル)、及びリンパ節のポリ(A)RNA(少なくとも500 pg/サンプル)において、この遺伝マーカーRNAを検出した。PSMAについては、このアッセイは、前立腺の全RNA(少なくとも10 pg/サンプル)、乳房の全RNA(少なくとも1 ng/サンプル)、肺の全RNA(少なくとも1 ng/サンプル)、及びリンパ節(少なくとも50 pg/サンプル)、腎臓(少なくとも50 pg/サンプル)及び小腸(少なくとも5 pg/サンプル)から単離したポリ(A)RNAにおいて、この遺伝マーカーRNAを検出した。正常血液から単離したRNAでは、プライマー及びプローブのいかなる組み合わせも遺伝マーカー(PSA、hK2、PSMA)を検出せず、hK2は、他の組織では、PSA又はPSMAに比較して概して低い量で検出された。表10はまた、このアッセイが定量的であり、検出の飽和点(上記の実験では約2.5 x 10<sup>6</sup>RLU)まではサンプル中のターゲット特異RNAの量に比較的比列しているRLUを検出することを示している。このように、標準滴定実験を使用すれば、サンプル中のターゲットRNAの相対量を定量的に決定し得る。

## 【0092】

実施例10：臨床サンプルにおけるPSA、PSMA及びhK2ターゲットの増幅及び検出

この実施例では、臨床サンプル(良性前立腺肥大(BPH)又は前立腺癌(CaP)を有

10

20

30

40

50

する患者から採取した末梢血、又は正常対照から採取した血液)を、アッセイ実施者が試験サンプルの起源を知らない盲検法で試験した。標準的なグアニジウムイソチオシアネート抽出法 (Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), pp. 7.37-7.57) を使用して、臨床サンプルから全RNAを単離した。TMAを使用する増幅と実質的に本明細書すでに記載した検出については、PSA・RNAの検出については500ng、hK2・RNAの検出については500ng、及びPSMAの検出については100ngを使用して、各サンプルを同一2検体でアッセイした。PSA検出では5,000RLUより高く、hK2検出では10,000RLUより高く、PSMA検出では1,500RLUより高いカットオフ点を上回る検出シグナルを產生したものを陽性サンプルとし、各ターゲットについてのカットオフ点を下回るシグナルを產生したものを陰性サンプルとした。プライマー及びプローブは実施例9に記載のアッセイで使用したものと同じであった(PSAでは、SEQ ID NO: 18、30及び1; PSMAでは、SEQ ID NO: 48、49及び50; hK2では、SEQ ID NO: 46、47及び1)。上記アッセイの結果を表11に示す。サンプルを採取したヒトの病態に応じてサンプルを群分けした。

【0093】

【表12】

表11：臨床サンプルにおける前立腺関連遺伝マーカーの検出

標本番号	病態	PSAターゲット	hK2ターゲット	PSMAターゲット
1	CaP	陽性	陰性	陽性
2	CaP	陽性	陰性	陰性
3	CaP	陽性	陰性	陰性
4	CaP	陽性	陰性	陰性
5	CaP	陽性	陽性	陰性
6	CaP	陽性	陽性	陰性
7	CaP	陽性	陰性	陰性
8	CaP	陽性	陽性	陽性
9	CaP	陽性	陰性	陰性
10	CaP	陰性	陰性	陽性
11	CaP	陽性	陽性	陰性
12	CaP	陽性	陽性	陰性
28	CaP	陰性	陽性	陰性
29	CaP	陰性	陽性	陰性
30	CaP	陰性	陰性	陰性
13	正常対照	陰性	陰性	陰性
14	正常対照	陰性	陰性	陰性
15	正常対照	陰性	陰性	陰性
16	正常対照	陰性	陰性	陽性
17	正常対照	陰性	陽性	陰性
18	BPH	陰性	陰性	陰性
19	BPH	陰性	陰性	陰性
20	BPH	陽性	陽性	陰性
21	BPH	陰性	陰性	陰性
22	BPH	陰性	陰性	陰性
23	BPH	陰性	陰性	陽性
24	BPH	陰性	陽性	陰性
25	BPH	陰性	陰性	陽性
26	BPH	陰性	陽性	陰性
27	BPH	陰性	陰性	陰性

10

20

30

40

【0094】

表11の結果は、サンプルドナーの臨床状態とPSAの検出との間に概して正の相関性があることを示す。このアッセイでは、14名の前立腺癌患者のうち11名が陽性で、10名のBPH患者のうち1名だけが陽性で、正常対照は誰も陽性ではなかった。hK2の検出も前立腺癌の状態と正の相関を示した(14名のうち7名が陽性だった)が、正常対照の1名が陽性で、10名のBPH患者のうち3名が陽性だった。PSMAの検出はドナー

50

の臨床状態と強い相関を示さなかったが、P S M A 陽性と判定された 3 名の前立腺癌患者のうち 2 名については、P S A についても陽性だった。1 名の前立腺癌患者（標本 10）は P S M A だけが陽性で、2 名の前立腺癌患者は h K 2 だけが陽性だった。上記の結果は、このアッセイが臨床サンプルから単離した R N A において個別の癌遺伝マーカーを特異的に検出すること、及び各マーカーが、単独でも他の 1 ~ 2 種の前立腺関連癌遺伝マーカーと組み合わせても、前立腺癌と相関する分子マーカーを検出するのに有用であることを示している。前立腺癌の症状を示すが 1 つの遺伝マーカー（例えば、P S A）で陰性と判定された患者に対しては、別のマーカー（例えば、h K 2）が陽性シグナルを生じる可能性があり、それにより、1 つだけのマーカーの結果に依拠することから生じ得る偽陰性診断の可能性を減らすことになる。1 つの前立腺関連遺伝マーカー（例えば、P S A）について陽性と判定された前立腺患者では、別の遺伝マーカー（例えば、P S M A 又は h K 2）で得られる陽性の結果は、この陽性診断の裏付けをさらに加えるか、又は腫瘍増殖の程度を示すものを提供することに使用し得る。いずれの症例でも、非前立腺のサンプルで陽性の結果が得られたので、この結果は転移が起きているという診断を裏付ける可能性がある。  
10

#### 【0095】

本明細書に示した実施例は、先述の特許請求の範囲により規定される本発明の好ましい態様をより詳しく説明するためのものである。本発明の法的同等物である態様はすべて本発明の特許請求の範囲内にあると考えられる。  
20

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、P S A 遺伝子の構造と、以下に示す受け入れ番号（A c c . N o .）を使用する、G e n B a n k 及び / 又は E M B L から入手可能な様々な P S A 及びカリクレイン - 1 の配列の並置を示す概略図であり、ここで閉じた四角（黒四角）はエクソン 1 ~ 5（「E 1」、「E 2」、「E 3」、「E 4」及び「E 5」）を示し、開いた四角（白四角）はイントロン（「I 1」、「I 2」、「I 3」及び「I 4」）を特に表示し、第一のエクソンに先行するか又は最後のエクソンに続くイントロンは表示しない）を示すが、0 ~ 6, 800 の塩基番号を表すスケールにわたってイントロン及びエクソンの相対位置が示される。図で示した既知の P S A 遺伝子配列を以下のように表示する：「H S P S A R」（1, 466 b p ; A c c . N o . X 0 5 3 3 2）、「H U M A P S」（1, 446 b p ; A c c . N o . M 2 6 6 6 3）、「H S P S A」（1, 729 b p ; A c c . N o . X 0 7 7 3 0）、「H U M P A A」（1, 415 b p ; A c c . N o . M 2 1 8 9 5）、「H U M P A B」（1, 654 b p ; A c c . N o . M 2 1 8 9 6）、「H U M P A C」（658 b p ; A c c . N o . M 2 1 8 9 7）、「S 7 5 7 5 5」（569 b p ; A c c . N o . S 7 5 7 5 5）、「H S U 1 7 0 4 0」（990 b p ; A c c . N o . U 1 7 0 4 0）、「H S P S A 1」（389 b p ; A c c . N o . X 1 3 9 4 0）、「H S P S A 2」（287 b p ; A c c . N o . X 1 3 9 4 1）、「H S P S A 3」（372 b p ; A c c . N o . X 1 3 9 4 2）、「H S P S A 4」（281 b p ; A c c . N o . X 1 3 9 4 3）、「H S P S A 5」（900 b p ; A c c . N o . X 1 3 9 4 4）、「H S P S A G」（5, 873 b p ; A c c . N o . X 1 4 8 1 0）、「H U M P S A N T I G」（6, 153 b p ; A c c . N o . M 2 4 5 4 3）及び「H U M P S A A」（7, 130 b p ; A c c . N o . M 2 7 2 7 4）、及びヒト腺カリクレイン - 1 の配列「S 3 9 3 2 9」（1, 541 b p ; A c c . N o . S 3 9 3 2 9）。  
30  
40

【図 2】 図 2 は、発現される P S A 遺伝子（H S P S A R, A c c . N o . X 0 5 3 3 2 の 1, 466 b p 配列に基づく）の大部分を表す実線にわたり本発明の様々なプローブ（S E Q I D N O . を使用して左側に列挙される）の相対位置を示す概略図であり、エクソン 1 ~ 5（E 1、E 2、E 3、E 4 及び E 5 と表示される）の位置を実線の上に示し、欠失されるイントロン 1 ~ 4（I 1、I 2、I 3 及び I 4 と表示される）のスライス連結部位を実線の下に示す。

【図 3】 図 3 は、発現される P S A 遺伝子（H S P S A R, A c c . N o . X 0 5 3 3 2 の 1, 466 b p 配列に基づく）の大部分を表す実線にわたり本発明の様々なプローブ  
50

(SEQ ID NO.を使用して左側に列挙される)の相対位置を示す概略図であり、エクソン1～5(E1、E2、E3、E4及びE5と表示される)の位置を実線の上に示し、欠失されるイントロン1～4(I1、I2、I3及びI4と表示される)のスライス連結部位を実線の下に示す。

【図4】図4は、発現されるPSA遺伝子(HSPSAR、Acc. No. X05332の1,466bp配列に基づく)の大部分を表す「HSPSAR」と表示された実線にわたり本発明の様々なプローブ(SEQ ID NO.を使用して左側に列挙される)の相対位置を示す概略図であり、エクソン1～5(E1、E2、E3、E4及びE5と表示される)の位置を実線の上に示し、欠失されるイントロン1～4(I1、I2、I3及びI4と表示される)のスライス連結部位を実線の下に示す。10

【図5】図5は、各反応あたり前立腺の全RNAを1.0、5.1、0.5、0.1、0.05、0.01又は0.005pg含有するアッセイにおける、PSA特異ターゲットの増幅及び化学発光(正味平均RLU)の検出との直線性を示す図であり、実験結果を点線及び点の記号として示し、計算された回帰直線を実線で示す。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> GEN-PROBE INCORPORATED

<120> NUCLEIC ACID SEQUENCES FOR DETECTING GENETIC MARKERS  
FOR CANCER IN A BIOLOGICAL SAMPLE

<130> GP097-PCT

<140> to be assigned

<141> 2000-01-28

<150> 60/117,640 US

10

<151> 1999-01-28

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

20

<400> 1

ggaccacacccg ctacgcctca g

21

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

30

<400> 2

gaccaaggatcc atgctgtgtg ctg

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 3

gaccaaggttc atgctgtgtg ctg

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 4

gctgtgaagg tcatggacct gcc

23

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 5

gaaccagagg agttcttgac cc

22

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 6

ggccagatgg tgcagccggg agc

23

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 7  
gctgtgtgct ggacgctgga c 21 10

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 8  
gcttgtggcc ttcgtggca g 21 20

<210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 9  
tggcctctcg tggcagggca gt 22 30

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 10  
tctcggtggca gggcagtctg c 21

<210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct 10

<400> 11  
gtgcacccccc agtgggtctt c 21

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct 20

<400> 12  
gatgctgtga aggtcatgga cctg 24

<210> 13  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct 30

<400> 13  
gtgcgcaagt tcacccttag aagg 24

<210> 14  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 14  
gaaggtcatg gacctgccca ccca 24

<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 15  
ctgtcagagc ctgccgagct cacg 24

<210> 16  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 20

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 16  
gctgctccgc ctgtcagagc ctg 23

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 17  
gcttgtggcc tctcgtggca g 21

<210> 18  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 18  
tctcgtggca gggcagtctg c 21 10

<210> 19  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 19  
ttccaaatgac gtgtgtgcgc a 21 20

<210> 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 20  
ggaggctggg agtgcgagaa gcat 24 30

<210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 21  
ggctgggagt gcgagaagca tt 22

<210> 22  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct 10

<400> 22  
tggcctctcg tggcagggca gt 22

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct 20

<400> 23  
gcagtctgcg gcgggtttct g 21

<210> 24  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct 30

<400> 24  
gtgcacccccc agtgggtctt c 21

<210> 25  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 25  
aacaaaagcg tgatcttgct ggg 23

<210> 26  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 26  
caaaaagcgtg atcttgctgg gt 22

<210> 27  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 20

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 27  
taaattaata cgactcacta tagggagacc agagggtgaa cttgcgcaca cacg 54

<210> 28  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
construct

<400> 28  
taaattaata cgactcacta tagggagact gcaccacctt ggtgtacagg 50

<210> 29

<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 29  
taaattaata cgactcacta tagggagact catggttcac tgccccatga cgtg 54

<210> 30 10  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 30  
aatttaatac gactcactat agggagatgc accaccttgg tgtacagg 48

<210> 31 20  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 31  
aatttaatac gactcactat agggagacat ggttcaactgc cccatgacgt g 51

<210> 32 30  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 32

aatttaatac gactcactat agggagagag ggtgaacttg cgcacacacg	50
<210> 33	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct	
<400> 33	10
taaattaata cgactcacta tagggagacc accttctgag ggtgaacttg cg	52
<210> 34	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct	
<400> 34	20
taaattaata cgactcacta tagggagagc cgacccagca agatcacgc	49
<210> 35	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct	
<400> 35	30
taaattaata cgactcacta tagggagact gtggctgacc tgaaataacc	49
<210> 36	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 36

taaattaata cgactcacta tagggagagt gtacaggaa ggccttcg

49

<210> 37

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

10

<400> 37

taaattaata cgactcacta tagggagaac ccagcaagat cacgctttg

50

<210> 38

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

20

<400> 38

taaattaata cgactcacta tagggagaag gctgtgccga cccagcaaga t

51

<210> 39

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

30

<400> 39

taaattaata cgactcacta tagggagacc tgtgtcttca ggatgaaaca gg

52

<210> 40

<211> 52

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 40  
taaattaata cgactcacta tagggagact gacctgaaat acctggcctg tg 52

<210> 41 10  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 41  
taaattaata cgactcacta tagggaga 28

<210> 42 20  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 42  
aatttaatac gactcactat agggaga 27

<210> 43 30  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 43  
gcagtctgcg gcgggtttct g 21

<210> 44  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 44  
acagctgccc actgcatacg 20 10

<210> 45  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 45  
gttcaccctc agaagggtgac c 21 20

<210> 46  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic construct

<400> 46  
gtcagagcct gccaaatca cag 23 30  
30

<210> 47  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

construct

<400> 47  
taaattaata cgactcacta tagggagacc accagcacac aacatgaact ctgtc 55

<210> 48  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic 10  
construct

<400> 48  
cagatatgtc attctggag gtc 23

<210> 49  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic 20  
construct

<400> 49  
taaattaata cgactcacta tagggagacc aaattttctt gcatcccagc ttgc 54

<210> 50  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic 30  
construct - labeled probe

<400> 50  
ctcagagtgg agcagctgtt gttc 24

【図1】

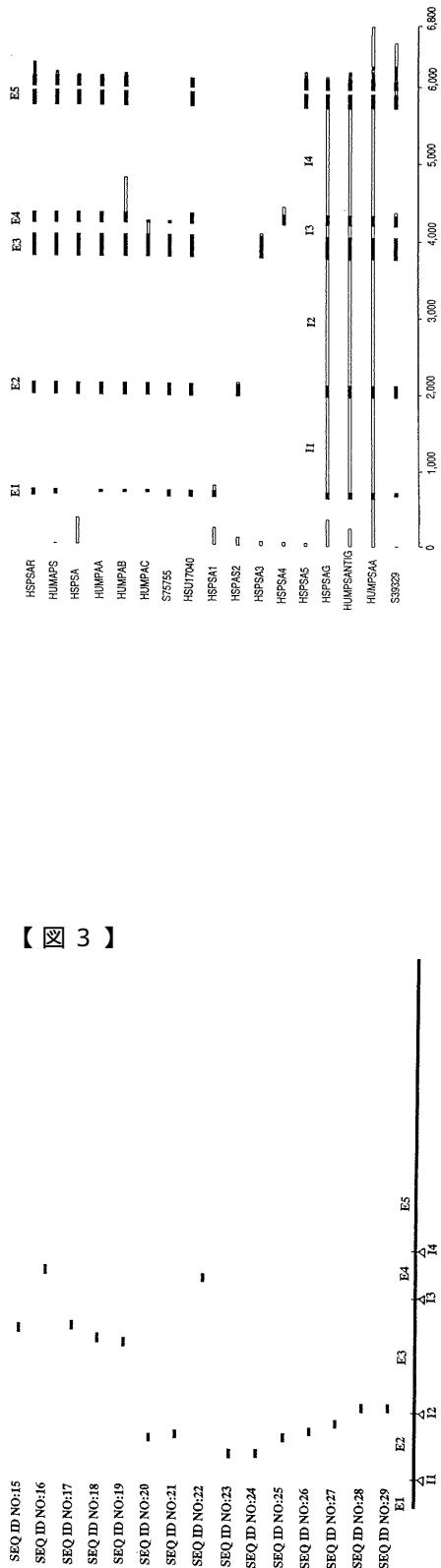


FIG. 1

【図2】

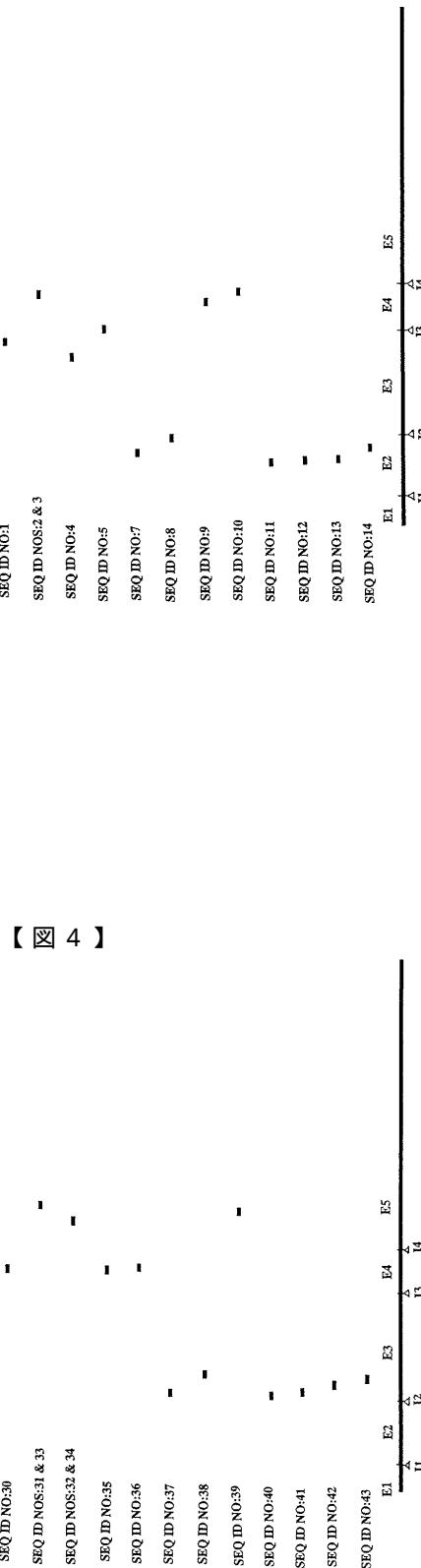


FIG. 2

【図3】



FIG. 3

【図4】

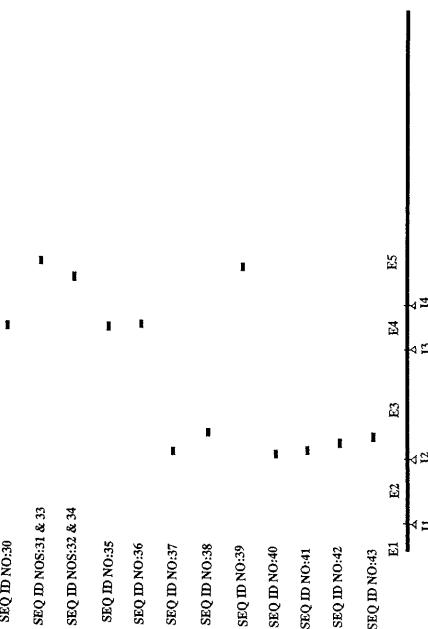
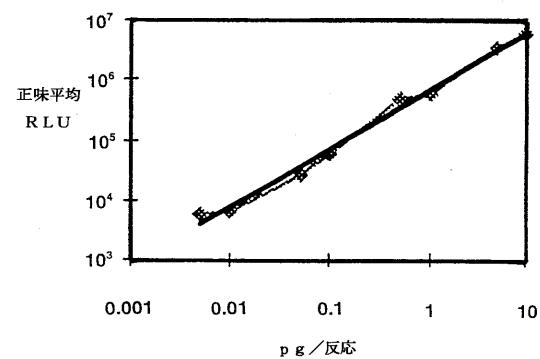


FIG. 4

【図5】



---

フロントページの続き

(72)発明者 クラーク , トーマス・ジェイ , ジュニア

アメリカ合衆国カリフォルニア州 92126 , サンディエゴ , トーマス・ヘイズ・レーン 116  
98

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第 96 / 021042 (WO , A1)

国際公開第 96 / 026272 (WO , A1)

米国特許第 05858673 (US , A)

国際公開第 98 / 002449 (WO , A1)

Clin Chem Lab Med , 1998年 , Vol.36 , p.671-681  
TEM , 1998年 , Vol.9 , p.310-316

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)