

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4413014号

(P4413014)

(45) 発行日 平成22年2月10日 (2010. 2. 10)

(24) 登録日 平成21年11月27日 (2009. 11. 27)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 33/533 (2006. 01)

G O 1 N 33/533

G O 1 N 33/542 (2006. 01)

G O 1 N 33/542 A

G O 1 N 33/574 (2006. 01)

G O 1 N 33/574 Z

請求項の数 5 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-586584 (P2003-586584)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月15日 (2003. 4. 15)
 (65) 公表番号 特表2005-522231 (P2005-522231A)
 (43) 公表日 平成17年7月28日 (2005. 7. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/011179
 (87) 国際公開番号 W02003/089899
 (87) 国際公開日 平成15年10月30日 (2003. 10. 30)
 審査請求日 平成18年4月11日 (2006. 4. 11)
 (31) 優先権主張番号 10/122, 568
 (32) 優先日 平成14年4月15日 (2002. 4. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 10
 O
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞の検出用プローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6、配列番号 7、配列番号 6 の相補体及び配列番号 7 の相補体からなる群から選択される核酸を含む C K 1 9 標的配列を検出するための組成物。

【請求項 2】

核酸が配列番号 6 及び配列番号 7 からなる群から選択される請求の範囲第 1 項に記載の組成物。

【請求項 3】

更に蛍光標識及び蛍光消光剤を含む請求の範囲第 2 項に記載の組成物。

【請求項 4】

(a) 核酸増幅試薬、請求の範囲第 1 項に記載の組成物及び標的配列を含有すると疑われる試験サンプルからなる反応混合物を形成するステップ及び (b) 前記混合物を増幅条件にかけて、前記標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも 1 コピーを作製するステップを含む C K 1 9 標的配列の増幅方法。

【請求項 5】

(a) 請求の範囲第 1 項に記載の組成物及び (b) 増幅試薬を含む C K 1 9 標的配列の増幅用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は腫瘍学に関する。特に、本発明は試験サンプル中のガンを検出するためのオリゴヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

造血系中に上皮細胞が存在するとガンが限局域から身体他の部分に広まる（転移としても公知）ことが研究により示唆されている。この知見は、転移がガンの特定段階の兆候であり、ガン患者の適正な治療に関する決定は病気の段階の適正な特徴付けに大いに依存しているので重要である。特に、限局性ガンを有する患者の治療はガンの転移段階で患者に与えられる治療とも大きく異なり得る。

【0003】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような核酸増幅反応の出現にともなって、造血系中に存在する上皮細胞はタンパク質レベルの代わりに核酸レベルで検出され得る。よって、交差反応性抗体に関わる問題が解消される。更に、核酸増幅反応は一般的な抗体ベースアッセイ方法よりも非常に高感度であることは公知である。血液流中の上皮細胞を検出するための増幅ベースアッセイは転移癌の初期段階を検出するために免疫細胞学的アッセイ法に比して非常に有利である。

【0004】

造血系中の上皮細胞を検出するために使用されているPCRベースアッセイは文献に報告されている。これらのアッセイの多くは、上皮細胞上に存在するタンパク質であるサイトケラチン19（CK19）をコードする核配列を標的としている。しかしながら、（CK19の遺伝子に非常によく似た核酸配列を含む）多くの擬似遺伝子がヒトゲノム中に存在している。よって、CK19標的配列を検出するための増幅アッセイを開発する際に当面する1つの問題は、非常に関連している擬似遺伝子を増幅も検出もしないが、CK19遺伝子由来の配列を増幅し、検出するアッセイを設計することである。

【0005】

更に、増幅プライマー配列がコンピューターによる非常に関連している配列の比較に基づいて選択され得ることは公知である。理論的には、この方法で選択される配列は核酸増幅原理に従って使用したときに特定標的配列のコピーを効率的に生産するはずである。上記方法で選択した配列の理論的効率にかかわらず、前記配列が許容できる量の増幅産物を生成しないことはしばしば確かである。しかしながら、この現象は解明できていない。従って、プライマーは当初コンピュータープログラムを用いてスクリーニングされ得るが、効率は前記プライマーが実際使用されるまで十分に決定できない。

【0006】

別の問題は、増幅産物を検出するために微粒子捕捉検出手順を用いるPCRアッセイを設計することである。具体的には、微粒子を用いて検出される増幅標的配列は、微粒子に捕捉された増幅産物が別の増幅産物の捕捉を干渉しないように十分に短くなければならない。従って、微粒子を用いて増幅産物を検出するように選択するアッセイでは適当な標的配列の選択に関して制限が加わることとなる。特に、選択標的配列は比較的短い配列に制限される。

【0007】

米国特許第6,203,992号明細書は、CK19標的配列を検出するためのPCRベース方法を開示している。しかしながら、米国特許'992号明細書に開示されている方法はサンプル中に存在するCK19レベルを正確に定量する望ましい能力を有さない。

【0008】

従って、CK19標的配列を検出するために核酸増幅原理に従って使用され得、高度の定量を与える改良方法及び配列が当業界で要望されている。

【発明の開示】

【0009】

本発明は、サイトケラチン19（CK19）を特異的に且つ高感度で検出するために使用され得る核酸配列を提供する。特に、本発明で使用されるプライマー配列は配列番号2

10

20

30

40

50

及び配列番号 3 と称される。本明細書中配列番号 4 で同定される配列を含むプローブはサンプル中の C K 1 9 レベルを有効に定量するために使用され得る。上記した配列の組合せは、末梢血中の C K 1 9 を検出すべく増幅反応を実施し、病気の転移段階のガン細胞またはガンを循環させるための他の試薬と一緒にキット中に提供され得る。

【0010】

本明細書中配列番号 1 と称される C K 1 9 標的配列は、核酸増幅試薬及び C K 9 標的配列を含有する試験サンプルからなる反応混合物を形成することにより増幅され得る。適当な C K 1 9 増幅手段を使用し得る。増幅配列の長さが 200 ヌクレオチド未満であることが好ましい。好ましくは、C K 1 9 標的を配列番号 2 及び 3 を含むプライマーセットを用いる P C R により増幅する。

10

【0011】

増幅後、増幅標的配列が検出され得る。例えば、増幅標的配列にハイブリダイズしてプローブ／産物ハイブリッドを形成するために配列番号 4 と称される配列を含むプローブまたはその組合せを使用し得る。その後、プローブ／産物ハイブリッドは適当な技術を用いて検出され得る。この技術には微粒子捕捉技術が含まれるが、これに限定されない。場合により、プライマーまたはプローブを増幅標的配列を捕捉／検出し、よって試験サンプル中の標的配列の存在を示すために標識してもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明は、試験サンプル中の C K 1 9 標的配列を増幅し、検出するための試薬、方法及びキットを提供する。特に、

20

【0013】

【化 1】

GGCCTGGGCC CTCCGCGAC TACAGCCACT ACTACACGAC CATCCAGGAC
CTGCGGGACA AGATTCTTGG TGCCACCATT GAGAACTCCA GGATTGTCCT
GCAGATCGAC AACGCCCCGTC TGGCTGCAGA TGA CTTC CGA ACCAAGTTTG
AGACGGAACA GGCTCTGCGC ATGAGCGTGG [配列番号 1].

30

である C K 1 9 標的配列を増幅するための増幅プライマーとして 5' C C G C G A C T A C A G C C A C T A C T A C A C 3' (配列番号 2) 及び 5' G A G C C T G T T C C G T C T C A A A 3' (配列番号 3) が使用され得る。しかしながら、DNA を増幅するための当業界で公知の他の適当な方法、例えばローリングサークル増幅、TMA、N A S B A、リガーゼ連鎖反応等も使用し得る。これらのプライマーが微粒子捕捉／検出方法にかけられ得る増幅産物を特異的且つ高感度で生成することが知見された。

【0014】

増幅 DNA は、増幅 C K 1 9 DNA を含む試験サンプルにおいて C K 1 9 が特異的に検出されるように以下の 21 ヌクレオチド、すなわち 5' G T G C C A C C A T T G A G A A C T C C A G G A 3' (配列番号 4) の少なくとも 15、より好ましくは少なく

40

【0015】

より好ましくは、増幅 DNA は配列

【0016】

【化 2】

5' TGGTGCCACC ATTGAGAACT CCAGGATTG 3' [配列番号 5].

の少なくとも 15、より好ましくは少なくとも 24、更に好ましくは 29 全部を有するプローブを用いて検出される。より好ましい実施態様では、プローブは、蛍光物質に加えて

50

分子ビーコンプローブが増幅標的C K 1 9に結合しないときに比較して分子ビーコンプローブが該標的に結合したときに蛍光物質の放出を検出可能に変化させる部分を含む分子ビーコンプローブである。

【0017】

更に好ましい実施態様では、プローブは配列

【0018】

【化3】

5' CGTGGTGCCA CCATTGAGAA CTCCAGGACC ACG 3' [配列番号6].

を有する分子ビーコンプローブである。明白にするために、この配列は

10

【0019】

【化4】

CGTGGT-GCCACCATTGAGAACTCCAGG-ACCACG [配列番号6]

(ここで、太字配列はC K 1 9 標的配列とハイブリダイズし得、オリゴヌクレオチドの各末端の2つの配列は互いに相補的である)で表される得る。

【0020】

等しく好ましい実施態様では、プローブは配列

【0021】

20

【化5】

5' CCGTGCCACC ATTGAGAACT CCAGGATTGC ACGG 3' [配列番号7].

を有する分子ビーコンプローブである。明白にするために、この配列は

【0022】

【化6】

CCGTGC-CACCATTGAGAACTCCAGGATT-GCACGG [配列番号7]

(ここで、太字配列はC K 1 9 標的配列とハイブリダイズし得、オリゴヌクレオチドの各末端の2つの配列は互いに相補的である)で表される得る。

30

【0023】

また、本発明は、配列番号1～3以外の上記したオリゴヌクレオチドに相補的であるオリゴヌクレオチドをも提供する。C K 1 9 標的に対するオリゴヌクレオチドの特異性が実質的に低下しない限り、前記オリゴヌクレオチドの適当な修飾または誘導化も本発明において使用され得ることは自明である。

【0024】

1つの特定実施態様では、プローブはフルオレセイン及び消光剤からなる分子ビーコンプローブである。適当な消光剤が使用され得るが、この中にはD a b c y l、D a b s y l、D a r k H o l e Q u e n c h e r等が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0025】

プローブの長さは、好ましくは140ヌクレオチド未満、より好ましくは70ヌクレオチド未満、更に好ましくは50ヌクレオチド未満、特に好ましくは35ヌクレオチド未満である。

【0026】

本発明のプローブ配列は特異性を保証し、増幅産物を検出するために使用され得る。

【0027】

特にプローブが分子ビーコンの場合、この分子ビーコンを信号対雑音比が約3以上、より好ましくは約4以上、更に好ましくは約5以上であるようにプライマーを用いるアッセイにおいて使用することが好ましい。本発明では、標的配列の存在下でプローブにより直

50

接または間接的に発生した信号をポリ Aヌクレオチドの存在下でプローブにより直接または間接的に発生した信号で割る。従って、プローブが分子ビーコンプローブの場合、用語「信号対雑音比」はアンプリコンの存在下でのビーコンの生蛍光信号をネガティブコントロール（ポリ Aのみ）の存在下での同一ビーコンの生蛍光信号で割った値を意味する。更に、信号対雑音比は、最低の検出可能量よりも有意に高いが、発生信号を消光する（すなわち、“フック”効果を誘導する）ほど高くない量の標的を用いて通常の条件下で適当数サイクルにかけた後測定される。下記実施例では、45回の熱サイクル反応にかけた後信号を測定する。明白にするために、バックグラウンド信号の補正または減算は信号対雑音比を計算する際に含める部分でない。

【0028】

本明細書中に開示されているプライマー及びプローブ配列は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、または非帯電核酸アナログのような核酸アナログから構成され得る。前記アナログには、国際特許出願公開第92/20702号パンフレットに開示されているペプチド核酸（PNA）及び米国特許第5,185,444号明細書、同第5,034,506号明細書及び同第5,142,047号明細書に記載されているモルホリノアナログが含まれるが、これらに限定されない。前記配列は、現在利用可能な各種技術を用いてルーチンに合成され得る。例えば、DNA配列は慣用のヌクレオチドホスホラミダイト化学及びApplied Biosystems, Inc.（カリフォルニア州フォスターシティ）、DuPont（デラウェア州ウィルミントン）またはMilligen（マサチューセッツ州ベッドフォード）から市販されている機器を用いて合成され得る。また、所望ならば、配列を米国特許第5,464,746号明細書、同第5,424,414号明細書及び同第4,948,882号明細書に記載されているような当業界で公知の方法を用いて標識してもよい。しかしながら、プライマーとして使用する配列は少なくとも該配列の3'末端にDNAを含んでいなければならない、完全にDNAからなることが好ましいことを理解されたい。

【0029】

本明細書中、「標的配列」は検出及び／または増幅されるか或いは本明細書に記載の配列の1つに相補的である核酸配列を意味する。標的配列は時々一本鎖と称されているが、当業者は標的配列が実際には二本鎖であり得ることを認識している。

【0030】

本明細書中、「試験サンプル」は標的配列を含有すると疑われるものを意味する。試験サンプルは血液、気管支胞洗浄液、唾液、咽頭スワブ、眼房液、脳脊髄液、汗、喀痰、尿、乳、腹水、粘液、滑液、腹膜液、羊水、組織（例えば、心組織）等のような生物学的ソース、発酵ブロス、細胞培養液、化学反応混合物等に由来され得る。試験サンプルは（i）ソースから入手したものをそのまま直接、または（ii）サンプルの特性を修飾すべく前処理後に使用され得る。よって、試験サンプルは使用前に、例えば血液からの血漿の調製、細胞の破壊、固体物質からの液体の調製、粘性流体の希釈、液体の濾過、液体の蒸留、液体の濃縮、干渉成分の不活化、試薬の添加、核酸の精製等により予備処理され得る。最も一般的には、試験サンプルは末梢血である。

【0031】

配列番号2及び3は、標的配列を増幅させるために当業界で公知の増幅手順に従って増幅プライマーとして使用され得る。好ましくは、本明細書に記載されている配列が米国特許第4,683,195号明細書及び同第4,683,202号明細書に記載されているポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の原理に従って使用される。当業者が理解しているように、標的配列がRNAの場合には標的配列の増幅の際に逆転写ステップを含めなければならない。逆転写活性を有する酵素、例えばTaqポリメラーゼはRNA鋳型からDNA配列を合成し得る活性に関して公知である。逆転写PCR（RT-PCR）は当業界で公知であり、米国特許第5,310,652号明細書及び同第5,322,770号明細書に記載されている。

【0032】

従って、本発明の増幅方法は、通常（a）核酸増幅試薬、少なくとも1つの増幅プライマー（すなわち、配列番号2または3）及び標的配列を含有すると疑われる試験サンプルからなる反応混合物を形成するステップ及び（b）前記混合物を増幅条件にかけて、標的配列に相補的な核酸配列の少なくとも1コピーを作製するステップを含む。当業界で公知のように上記方法のステップ（b）は反応混合物を熱サイクルにかけることにより複数回繰り返されることを理解されたい。

【0033】

上記したように、反応混合物は“核酸増幅試薬”を含む。この試薬には公知の試薬が含まれ、ポリメラーゼ活性（及び、所要により逆転写酵素活性）を有する酵素；酵素コファクター、例えばマグネシウムやマンガン；塩；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）；及びデオキシヌクレオチドリホスフェート（dNTP）、例えばデオキシアデニントリホスフェート、デオキシグアニントリホスフェート、デオキシシトシントリホスフェート及びデオキシチミントリホスフェートが含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

「増幅条件」は、通常プライマー配列の標的配列へのハイブリダイズまたはアニーリング及びその後のプライマー配列の伸長を促進させる条件として定義される。前記アニーリングが十分に予測可能な方法で複数のパラメーター（例えば、温度、イオン強度、配列の長さ、相補性及び配列のG：C含量）に依存することは当業界で公知である。例えば、相補性核酸配列の環境の温度を下げるとアニーリングが促進される。所与の組の配列の場合、溶融温度 T_m は幾つかの公知の方法により推定される。典型的には、診断用途では、溶融温度に近い（すなわち、 10°C の範囲内）ハイブリダイゼーション温度を使用する。小カチオンはホスホジエステル骨格上の負電荷を打ち消すことにより二重鎖の形成を安定化させる傾向にあるので、イオン強度、すなわち“塩”濃度は溶融温度に影響を与える。典型的な塩濃度はカチオンの種類及び原子価に依存するが、これは当業者に容易に理解される。また、G：C対には3水素結合が関与し、A：T対にはたった2水素結合しか関与しないことと長い配列は配列と一緒に保持するのにより多くの水素結合を有しているので、高G：C含量及びより長い配列長さが二重鎖形成を安定化させることも公知である。よって、高G：C含量及びより長い配列長さは溶融温度を上げることによりハイブリダイゼーション条件に影響を与える。

【0035】

所与の診断用途のために配列を選択したら、G：C含量及び長さは公知であり、ハイブリダイゼーション条件が関わるものを正確に決定する際に明らかにされ得る。イオン強度は通常酵素活性に対して最適化されるので、変更するように残ったパラメーターは温度だけである。通常、ハイブリダイゼーション温度はプライマーまたはプローブの T_m またはその近くの温度で選択される。よって、特定のプライマー、プローブまたはプライマー-プローブ組のための適当なハイブリダイゼーション条件は当業者により十分得られる。

【0036】

上記したように作製される増幅産物は適当な方法及び本発明のプローブを用いたCK19標的配列の増幅中または増幅後に検出され得る。よって、増幅CK19標的配列は、（a）プローブ及び標的配列に対して相補的な核酸配列からなるハイブリッドを形成するように標的配列に相補的な核酸に対して少なくとも1つの本発明のハイブリダイゼーションプローブをハイブリダイズするステップ及び（b）前記ハイブリッドを試験サンプル中の標的配列の存在の指標として検出するステップを含む方法により検出され得る。

【0037】

上記したように形成したハイブリッドは、該ハイブリッドを分離及び／または検出するために使用され得る標識を用いて検出され得る。

【0038】

本発明のオリゴヌクレオチドは、検出可能な特性を有する分子または部分（“標識”）を含み得る。標識は放射性同位元素、蛍光基、化学発光基、酵素、コロイド粒子、蛍光微粒子等のように直接検出され得る。または、標識は特異的結合メンバーのように間接的に

検出され得る。直接検出可能な標識は標識を検出し得るように追加の成分、例えば基質、トリガー試薬、光等を必要とすることがあると理解されたい。間接的に検出可能な標識を使用するときには、この標識は通常“コンジュゲート”と一緒に使用される。コンジュゲートは通常直接検出可能な標識に結合またはカップリングさせた特異的結合メンバーである。コンジュゲートを合成するためのカップリング化学は当業界で公知であり、例えば特異的結合メンバーの特異的結合性または標識の検出可能性を低下させない化学的手段及び／または物理的手段を含み得る。本明細書中、「特異的結合メンバー」は結合対（すなわち、分子の1つが例えば化学的または物理的手段により他の分子に特異的に結合している2つの異なる分子）のメンバーである。抗原－抗体特異的結合対以外の他の特異的結合対には、アビジン－ビオチン；ハプテン－ハプテンに対して特異的な抗体；相補的ヌクレオチド配列；酵素ファクターまたは基質－酵素；等が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0039】

別の実施態様によれば、ハイブリッドを検出するために特異的結合メンバーと直接検出可能な標識の組合せが使用され得る。例えば、特異的結合メンバーは、特異的結合メンバーで標識したプライマーを用いてハイブリッド中に導入され得る。直接検出可能な標識は、直接検出可能な標識で標識したプローブを用いてハイブリッド中に導入され得る。よって、ハイブリッドは特異的結合メンバーを用いて微粒子に固定化され、プローブ上の標識により直接検出され得る。他の検出構成も当業者の選択事項であると理解されたい。

【0040】

プローブが当初増幅混合物の一部である1つの好ましい実施態様によれば、プローブ配列がプライマー配列よりも低い溶融温度を有し、反応混合物を増幅条件に置いたときに標的配列またはその相補体のコピーがプローブのT_mよりも高い温度で生ずるようにプライマー、プローブ及び増幅条件を選択することが好ましい。前記コピーを合成したら、変性し、混合物を冷却して、プローブと標的またはその相補体のコピー間でハイブリッドが形成できる。変性温度からプローブが一本鎖コピーに結合する温度に低下させる速度が非常に速い（例えば、8～15分）ことが好ましく、ポリメラーゼ活性を有する酵素がプライマー伸長のために活性である温度範囲を通ることが特に好ましい。このように迅速に冷却することは、プライマー／コピー配列ハイブリダイゼーション及び伸長よりもむしろコピー配列／プローブハイブリダイゼーションにとって好ましい。

20

【0041】

本発明を更に説明するために下記実施例を提示する。これらの実施例は本発明の範囲を限定するものと解釈すべきでない。

30

【実施例】

【0042】

下記実施例は、本発明のプローブを用いるサイトケラセン19（CK19）の検出を示す。より具体的には、本実施例では、本発明の分子ビーコンプローブがサンプル中に存在するCK19標的配列を検出し、その量を定量し得るPCRアッセイにおいてうまく働くことを立証する。更に、実施例では、驚くことに本発明の分子ビーコンプローブが該分子ビーコンに類似の大きさ及び構成を有する別の分子ビーコンよりも優れていることを立証する。

40

【0043】

下記実施例では、配列番号2及び配列番号3をCK19標的配列に特異的な増幅プライマーとして使用する。分子ビーコンが標的配列に結合したとき検出可能に強い信号を発するように、各分子ビーコンの5'末端をフルオレセインで、3'末端を適当な蛍光消光剤（配列番号6及び7に対してはdabcyl、配列番号8に対してはBlack Hole Quencher（BHQ））で標識した。

【0044】

可変量のCK19 RNAを含有する試験サンプルに対してPCRを次のように実施した。前記サンプルに逆転写試薬を添加した後、48℃で45分間インキュベートして、CK19 RNAを逆転写した。次に、94℃で2分間インキュベートして、逆転写酵素を

50

不活化した。次に、増幅試薬の存在下で反応物を $94^{\circ}\text{C} \times 15$ 秒間、 $58^{\circ}\text{C} \times 20$ 秒間のサイクルに 45 回かけた。増幅後、反応物を 68°C で 20 秒間、その後 35°C で 30 秒間インキュベートした。この間にビーコンの蛍光を検出した。

【0045】

本発明の分子ビーコン

【0046】

【化7】

CGTGGTGCCA CCATTGAGAA CTCCAGGACC ACG [配列番号6]

及び比較の分子ビーコン

【0047】

【化8】

CGTGCGGACCTGCGGGACAAGATGCACG [配列番号8]

について信号対雑音比 (S/N) を計算した。配列番号 6 を有するビーコンの信号対雑音比は 5.2 であったのに対して、配列番号 8 を有するビーコンの信号対雑音比は 2.6 であった。

【0048】

同様の実験で、配列番号 7 を有するビーコンは 配列番号 6 を有するビーコンと類似であった。

【0049】

本明細書中に引用した特許明細書、特許出願明細書及び特許出願公開明細書を含めた文献はすべて援用により本明細書に含まれるとする。

【0050】

本発明を好ましい実施態様を強調して記載してきたが、好ましい実施態様に変更を加え得ること及び本発明は本明細書中に具体的に記載されている以外の方法で実施され得ることは当業者に自明である。従って、本発明には請求の範囲に規定される発明の趣旨及び範囲内に含まれるすべての修飾が含まれる。

【配列表】

10

20

30

SEQUENCE LISTING

<110> Abbott Laboratories
Hayden, Mark A.

<120> Probes For Detecting Tumor Cells

<130> 6910.WO.01

<140> Not Yet Assigned

<141> 2002-04-15

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 180

<212> DNA

<213> CK 19 Target Sequence

<400> 1

```
ggcctggggc ctcccgcgac tacagccact actacacgac catccaggac ctgcggggaca      60
agattcttgg tgccaccatt gagaactcca ggattgtcct gcagatcgac aacgcccgtc      120
tggctgcaga tgacttcoga accaagtttg agacggaaca ggctctgcgc atgagcgtgg      180
```

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplification Primer

<400> 2

```
ccgcgactac agccactact acac      24
```

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplification Primer

<400> 3

```
gagcctgttc cgtctcaaa      19
```

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

10

20

30

<400> 4 gtgccaccat tgagaactcc agga	24	
<210> 5 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Probe		
<400> 5 tgggtgccacc attgagaact ccaggattg	29	
<210> 6 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence		10
<220> <223> Molecular Beacon Probe		
<400> 6 cgtggtgccca ccattgagaa ctccaggacc acg	33	
<210> 7 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Molecular Beacon Probe		20
<400> 7 ccgtgccacc attgagaact ccaggattgc acgg	34	
<210> 8 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Molecular Beacon Probe		
<400> 8 cgtgcggacc tgcgggacaa gatgcacg	28	30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/58 (2006.01) G 0 1 N 33/58 A

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ヘイデン, マーク・エイ

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 1、イングルサイド、ウエスト・セダーウツド・レイン・2
5 0 5 9

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 2 9 2 6 4 (WO, A 1)

Sequence 45 from Patent W09849324. [21-JAN-2000] Retrieved from Entrez Nucleotide [Online]; United States National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA., Entrez Nucleotide Accession no. A83616, [retrieved on 6 January 2009], URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=6732868>

VAN TRAPPEN, THE LANCET, 2 0 0 1 年 1 月 6 日, V357, P15-20
Nat.Biotechnol., Vol.14(1996)p.303-308

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

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

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed