

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 516162

(P2003 - 516162A)

(43)公表日 平成15年5月13日(2003.5.13)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 2 4
	ZNA	33/50	Z 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/15		33/53	M
33/50		33/531	B

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 58数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 544374(P2001 - 544374)

(86)(22)出願日 平成12年11月28日(2000.11.28)

(85)翻訳文提出日 平成14年6月7日(2002.6.7)

(86)国際出願番号 PCT/US00/32387

(87)国際公開番号 W001/042503

(87)国際公開日 平成13年6月14日(2001.6.14)

(31)優先権主張番号 60/169,457

(32)優先日 平成11年12月7日(1999.12.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 エグザクト サイエンスーズ コーポレイション
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0175
4,メイナード,グレート ロード 63

(72)発明者 シュバー, アンソニー ピー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0175
7, ミルフォード, グラント ストリート
11

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸分析に基づく薬物スクリーニングのための装置および方法

(57)【要約】

本発明は、サンプル中の完全性の高い核酸の存在または非存在を決定することによって、活性について薬物および薬物候補をスクリーニングするためのキットおよび方法を提供する。具体的には、本発明は、薬物活性をスクリーニングするための方法を提供し、この方法は、疾患を有する患者から得られた第1のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；該患者を薬物候補で処置する工程；および該患者から得られた第2のサンプルにおいて、完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬物活性をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 疾患を有する患者から得られた第1のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；

(b) 該患者を薬物候補で処置する工程；および

(c) 該患者から得られた第2のサンプルにおいて、該完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項2】 前記完全性の高い核酸が約200bpより多くを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記決定する工程が、前記サンプルにおける完全性の高い核酸の存在を決定するために、標的核酸を増幅することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記標的核酸が、1つの順方向プライマーおよび少なくとも2つの逆方向プライマーで増幅される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記標的核酸が、少なくとも2対の順方向プライマーおよび逆方向プライマーで増幅される、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 前記決定する工程が、前記完全性の高い核酸を捕捉することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記完全性の高い核酸が、支持体ベースの相補核酸プローブ上で捕捉される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、ポジティブスクリーンが、前記第1のサンプルにおける完全性の高い核酸の量に比較して、前記第2のサンプルにおける完全性の高い核酸のより少ない量の存在によって決定される、方法。

【請求項9】 前記サンプルが、糞便、痰、膿、血清、血漿、尿、唾液、初乳、胆汁および腭液からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 ポジティブスクリーンが、前記薬物候補の活性を示す、請

求項8に記載の方法。

【請求項11】 ポジティブスクリーンが、プログラムされた細胞死の誘導を示す、請求項8に記載の方法。

【請求項12】 ポジティブスクリーンが、アポトーシス活性の誘導を示す、請求項8に記載の方法。

【請求項13】 前記薬物候補が核酸を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記薬物候補がペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記薬物候補が化合物を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記薬物候補が、抗癌剤のための候補を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 請求項1に記載の方法であって、薬物候補の活性が、該薬物候補による疾患症状の緩和を予測する、方法。

【請求項18】 請求項1に記載の方法であって、前記サンプルの少なくとも1つが、少なくとも150mMのEDTAを含む緩衝液中に含まれる、方法。

【請求項19】 薬物の活性をスクリーニングするためのキットであって、該キットが、以下：

(a) 標的核酸の第1のセグメントに相補的な第1のプライマー；

(b) 該標的核酸の第2のセグメントに相補的な第2のプライマーであって、ここで、該第2のセグメントは、該第1のセグメントから少なくとも約170塩基対離れて位置する、第2のプライマー；および

(c) 該標的核の第3のセグメントに相補的な第3のプライマーであって、ここで、該第3のセグメントは、該第1のセグメントから少なくとも約170塩基対離れて位置する、第3のプライマー、を含む、キット。

【請求項20】 少なくとも150mMのEDTAを含む緩衝液をさらに含む、請求項19に記載のキット。

【請求項21】 薬物活性をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 疾患を有する被験体由来のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線

レベルを決定する工程；

(b) 該サンプルを薬物候補で処理する工程；および

(c) 該サンプルにおいて、完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項22】 前記処理する工程が、エキソビポで行われる、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記被験体が、疾患の動物モデルを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 前記サンプルが、少なくとも150mMのEDTAを含む緩衝液中に含まれる、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 薬物活性をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 疾患の動物モデル由来のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；

(b) 該動物モデルを薬物候補で処置する工程；および

(c) 該動物モデルから得られた第2のサンプルにおいて、該完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項26】 前記サンプルが、少なくとも150mMのEDTAを含む緩衝液中に含まれる、請求項25に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願についての相互参照)

本出願は、1999年12月7日に出願されたU.S.S.N.09/455,950(これは、1999年9月8日に出願されたU.S.S.N.60/152,847に対する優先権および利益を主張する)の一部継続である。本出願はまた、1999年12月7日に出願されたU.S.S.N.60/169,457に対する優先権および利益を主張する。これら3つの特許出願は全て、本明細書中で参考として援用される。

【0002】

(発明の背景)

多くの疾患は、ゲノムの不安定性に関連している。すなわち、ゲノム不安定性における破壊(例えば、変異)は、特定の疾患の発症または進行と関連付けられている。従って、ゲノム不安定性の種々の局面は、疾患についての信頼性の高いマーカーとして提唱されている。例えば、BRCA遺伝子における変異は、乳癌についてのマーカーとして提唱されており、そしてp53細胞周期調節因子遺伝子における変異は、多くの癌(特に、結腸直腸癌)と関連付けられている。特定の変異が、初期段階の特定の種類の癌の分子スクリーニングアッセイについての基本であり得ることが示唆されている。例えば、Sidranskyら, Science, 256:102-105(1992)を参照のこと。

【0003】

ゲノム疾患マーカーについての探索は、癌の検出の分野においては特に激しい。癌は、1以上の遺伝子変異と関連し得る、制御されていない細胞増殖によって特徴付けられる。このような変異は、罹患細胞が細胞死を回避することを引き起こし得る。例えば、腫瘍サプレッサ遺伝子における変異は、細胞がアポトーシス(直接的な遺伝的制御下にあると考えられる、ある種の細胞死)を回避することを引き起こし得る。アポトーシスの間、細胞はその膜を失い、細胞質が凝縮し、そして核のクロマチンが、特徴的に短い長さのオリゴヌクレオチドフラグメントへと分裂する。実際、これらの特徴的なDNA切断パターンは、アポトーシスに

ついでのアッセイとして提唱されている。

【0004】

一旦これらの疾患が検出されると、その問題は、患者に対する最も有効な処置を提供することの1つとなる。現在、医師は、患者に投与される場合の薬物の有効性をモニターするための有効で容易なストラテジーを必要とする。また、薬物の開発者は、合理的な薬物設計のために、容易で迅速なストラテジー（特に、インピボで薬物活性を予測する結果を提供するもの）を必要とする。

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、薬物選択のため、および薬物活性を決定するためのスクリーニング方法を提供する。本発明の方法は、組織または体液のサンプルにおいて観察される核酸の完全性は、疾患についてのマーカーであり、そして細胞片（cellular debris）における核酸の完全性の保存は、疾患の重篤度によって増加するという認識をうまく利用する。本発明の方法に従って、核酸の完全性はまた、薬物選択における、そして広い範囲の疾患に対して薬物の有効性を決定する際の使用のためのマーカーとして有用である。

【0006】

健常な細胞が、正常な細胞周期で進む場合、アポトーシスまたはプログラムされた細胞死は、一般的な細胞破壊（細胞膜の破壊および核酸の分解を含む）を引き起こす。このプロセスは、小さな（約140bp～約200bp）の核酸フラグメントで起こる。罹患細胞（例えば、癌細胞または癌前（pre-cancer）細胞）は、アポトーシスを起こす能力を失い、そしてそれらの核酸ハイブリダイゼーション、アポトーシスを通じて分解する。それにもかかわらず、これらの細胞の1%は、（例えば、栄養素の欠乏、機械的剪断などのために）捨てられ（slough）たり、または処分されたりして、細胞および細胞片の集団を生じ、これは、完全性の高い核酸および完全性の高いタンパク質、膜、および他の細胞成分を含む。この集団は、体内のほかの機構によって溶解および分解に供せられるが、これらの機構は、一貫して、アポトーシスを受けた細胞の特徴を示す、小さな、完全性の低いフラグメントを産生し得ない。患者のサンプルにおける

完全性の高い細胞成分（特に核酸）の存在は、疾患についてのマーカーであることが、以前認識された。例えば、1999年12月7日に出願された、同時係属、共有に係るU.S.S.N.09/455,950（これは、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。ここで、これらの同じ完全性の高いマーカーは、疾患（特に、癌および癌前）に対する有効性について薬物をスクリーニングするため、ならびに疾患を処置する際に有用な薬物の同定および選択を助けるために有用であることが認識された。この認識についての基本は、完全性の高いマーカーの量が疾患の状態によって変動するということである。従って、標的された疾患に関する薬物候補の有効性は、この薬物候補が疾患に関連する完全性の高いマーカー（例えば、核酸）を減少させる能力によって測定される。

【0007】

従って、本発明は、活性および有効性について薬物候補をスクリーニングするための方法を提供し、これは、薬物候補が、患者のサンプルにおいて観察される完全性の高い成分の量の減少を生じるか否かを決定することを包含する。好ましい完全性の高い成分は、核酸またはタンパク質である。本発明の好ましい方法は、疾患を有する患者由来の組織または体液のサンプルを得ること、このサンプルに存在する完全性の高い核酸の量を決定すること、患者を薬物候補で処置すること、そして完全性の高い核酸の量が減少されているか否かを決定するために、第2の組織または体液のサンプルを得ることによって実施される。

【0008】

本発明の方法はまた、インビトロまたはエキソビボで実施される。例えば、疾患に対する薬学的調製物の有効性は、標的の疾患を有することが知られているかまたは疑われる患者または疾患の動物モデルから得られた組織または体液のサンプルにおける完全性の高い核酸の存在を直接減少させるその能力によって測定される。

【0009】

本発明の方法はまた、処置に対する患者の応答をモニタリングするのに有用である。例えば、処置の有効性は、処置（例えば、薬物候補または薬物候補のカクテルの投与）が患者から得られた処置後のサンプルにおいて観察される完全性

の高い細胞成分において減少を生じる場合、その処置の効果は高い。当業者に明白なように、本発明の方法は、任意の処置手段（例えば、薬物、放射線、食事制限、手術および/または運動）の有効性をスクリーニングするのに有用であり、そして薬学的な活性および有効性についてのスクリーニングに限定されない。

【0010】

本発明の方法はまた、インビトロまたはエキソビボの薬物候補スクリーンとして有用である。好ましい実施形態において、組織または体液は、既知の疾患を有する患者または動物モデルから得られる。このサンプルは、薬物をこのサンプル、またはその一部分に適用し、そして問題の疾患のための前処置標準と比べて、このサンプル中の完全性の高い核酸に対する効果を観察することによって、1以上の薬物候補に対してスクリーニングされる。この標準は、サンプル中の完全性の高い核酸の前処置測定、または経験的に知られる標準（例えば、健常な患者）である。本発明のスクリーニングアッセイは、複数の患者内または患者間のサンプルの同時スクリーニングを可能にするために、多重的(multiplex)であり得る。上記のように、完全性の高い核酸のレベルは、測定されている組織または体液の疾患状態を示す。従って、サンプルにおける核酸の完全性を減少し得る薬物候補は、疾患を処置する際に有効な潜在的な医薬である。いくつかの実施形態において、サンプルは、疾患状態の細胞培養物である。

【0011】

好ましい患者のサンプルは、好ましくは、捨てられた細胞片を含むようである標本から調製される。このような標本としては、糞便、血清または血漿、痰、膿および初乳が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、いくつかの標本は、大量のインタクトな（非剥離）細胞（例えば、糞便、痰、尿、胆汁、腓液および血清または血漿（これらは全て剥がれた細胞または細胞片を含む））を含まない。他のサンプルとしては、脳脊髄液、精液、胸部乳頭吸引液、および生検組織が挙げられるが、任意の組織または体液は使用され得る。

【0012】

本明細書中で使用される場合、「完全性の高い核酸」とは、正常サンプルにおける核酸セグメントの長さと比較して長い核酸のセグメントをいう。これらのセ

グメントは、アポトーシス分解に起因するフラグメントの典型的な長さを超えるために、代表的に、約170bpより大きく、そして好ましくは、やクローン200bpより大きい。本明細書中で使用される場合、特定の疾患を有することが知られているか、特定の疾患を有することが疑われるか、または特定の疾患についてスクリーニングされている患者から直接取られようが；動物モデルとして提供されようが、または疾患を有する動物モデルから取られようが；特定の疾患の特徴を有するか、あるいは特定の疾患について診断的であるか、または特定の疾患のための診断として使用され得る細胞培養物として増殖されようが；あるいはこのような細胞培養物から収集されるようが、用語「疾患状態サンプル」とは、任意のサンプルをいう。本明細書中で使用される場合、「薬物候補」は、薬学的活性または他の活性について試験されているか、または薬学的活性または他の活性を有することが知られているが、特定の被験体（例えば、患者）において任意の型の活性を有するか否かを試験されている、問題の組成物を意味する。薬物候補の有効性は、薬学的活性の1例である。さらに、臨床的結果は、薬物候補の活性として特徴付けられ得る。

【0013】

核酸は、任意の公知の方法によって測定される。例えば、核酸の完全性は、サンプルの長い核酸を増幅する能力によって測定される。核酸の遺伝子座は、組織サンプル、流体サンプル、または細胞培養物サンプルにおいて行われる増幅反応におけるテンプレートとして使用され得る。標的遺伝子座は、任意の特定の疾患と関連することが必要とされる。なぜなら、任意の遺伝子座での増幅可能な核酸の相かまたは減少は、それ自体が診断であるからである。増幅産物（「アンプリコン」）の処置後の量は、処置前の量より少ない場合、処置は、有効であるといわれ、そしてこのサンプルが処置された薬物候補は、活性であるといわれる。DNAの場合、増幅反応は、ポリメラーゼ鎖反応（「PCR」）であることが好ましく、または、RNAの場合、増幅反応は逆方向転写酵素PCRであることが好ましい。プライマーは、分析のために選択された遺伝子座（単数または複数）を増幅するように設計される。

【0014】

いくつかの実施形態において、増幅産物の標準的な量は、遺伝子座、またはその一部分の増幅によって決定され、未処理の疾患状態のサンプル、あるいは正常と分かっているサンプル（例えば、インタクトな核酸、野生型核酸）においてスクリーニングされる。また、特定の実施形態において、標準的な量は、当該分野についての標準によって決定される。一連の各増幅反応は、異なる長さのフラグメントを増幅するために設計される。特定の実施形態において、標的フラグメントの長さは、約200bp、約400bp、約800bp、約1.3Kp、約1.8Kp、および約2.4Kbである。増幅のためのプライマーは、存在する場合、所望の遺伝子座で所望の長さのテンプレートを増幅するために、当該分野における知識に従って設計される。アポトーシスを受けるか、または受けている正常サンプルは、代表的に、有意な長さのフラグメントはほとんど含まないか、全く含まない。従って、約200bp～約2.4Kbおよびそれ以上長いフラグメントを標的とする一連の増幅反応は、大きなフラグメントの増幅によって証明されるように、アポトーシスを回避した核酸を含む疾患状態のサンプルを明らかにする。そういうものとして、患者を処置するために使用されている薬物候補の有効性は、完全性の高い核酸の非存在または存在を調べることによってアッセイされ得る。さらに、これらのフラグメントを発現するインビトロまたはエキソビロの疾患状態のサンプルは、薬物候補の活性を評価するために、薬物候補で処置され得る。フラグメントの数または存在するフラグメントのレベルにおける減少は、初期過程のサンプルまたは未処置の疾患状態のサンプルに関して、薬物候補の活性を示す。これは、特に、多きな（例えば、約1.8Kbまたは約2.4Kb）フラグメントがスクリーニングされる場合のことである。また、標準的な量は、例えば、電気泳動ゲル上の分子量マーカであり得る。あるいは、本発明の方法は、ハイブリッド捕捉によって実行され得る。例えば、ハイブリッド捕捉および捕捉されたフラグメントの引き続いての分析は、サンプルの核酸の完全性を決定するために使用され得る。

【0015】

代替の実施形態において、疾患状態のサンプルにおける薬物候補の活性のスクリーニングは、アポトーシス細胞活性についてのアッセイによってそのサンプル

中の核酸量を検出することを併用する。ポジティブスクリーンは、(1)未処理の疾患状態のサンプルに存在すると予期される量より少ない核酸量、および(2)疾患状態のサンプルに存在すると予期されるより大きいアポトーシス細胞活性の量との両方を産生するものである。複数の遺伝子座は、各遺伝子座に存在する増幅可能な核酸の量を決定するために分析され得る。本発明の方法を用いる複数の遺伝子座にわたる分析は、スクリーニングアッセイの感受性を増大させ得る。

【0016】

本発明の1つの局面において、薬物候補の活性をスクリーニングするための方法は、疾患を有する患者から得られた第1のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定するための工程；薬物候補でその患者を処置する工程；およびその患者から得られた第2のサンプルにおける完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程を包含する。代表的に、完全性の高い核酸は、長さが約200bpより大きい。好ましくは、決定する工程は、サンプル中の完全性の高い核酸の存在を決定するために、標的核酸を増幅する工程を包含する。特定の実施形態において、標的核酸は、1つの順方向プライマーおよび少なくとも2つの逆方向プライマーによって増幅される。他の実施形態において、標的核酸は、少なくとも2対の順方向と逆方向のプライマーによって増幅される。あるいは、そして/または、増幅に加えて、決定する工程は、完全性の高い核酸を捕捉する工程を包含し得る。いくつかの実施形態において、完全性の高い核酸は、支持体ベースの相補的核酸プローブ上で捕捉される。上述されるように、食事制限、運動および放射線は、本発明の方法に従って評価され得る、さらなる、非薬学的処置の例である。

【0017】

代表的に、ポジティブスクリーンは、第1のサンプル中の完全性の高い核酸の量に比較して、第2のサンプル中の完全性の高い核酸のより少ない量の存在によって決定される。いくつかの実施形態において、ポジティブスクリーンは、薬物候補の活性を示す。また、いくつかの実施形態において、ポジティブスクリーンは、プログラムされた細胞死の誘導を示す。また、いくつかの実施形態において、ポジティブスクリーンは、アポトーシス活性の誘導を示す。サンプルの例とし

ては、糞便、痰、膿、血清、血漿、尿、唾液、初乳、胆汁および腓液が挙げられる。

【0018】

薬物候補は、問題の任意の組成物であり得、核酸、ペプチドおよび化合物を含む。いくらかの場合、薬物候補は、抗癌剤のための候補である。多くの場合、薬物候補の活性は、その薬物候補によって疾患症状の緩和を示す。

【0019】

本発明の別の局面において、薬物候補の活性をスクリーニングするためのキットは、標的核酸の第1のセグメントに相補的な第1のプライマー；標的核酸の第2のセグメントに相補的な第2のプライマー；および標的核の第3のセグメントに相補的な第3のプライマーを含む。第2のセグメントは、第1のセグメントから少なくとも約170塩基対離れて位置し、そして第3のセグメントは、第1のセグメントから少なくとも約170塩基対離れて位置する。

【0020】

本発明の別の局面において、薬物候補活性をスクリーニングするための方法は、疾患を有する被験体由来のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；薬物候補でこのサンプルを処理する工程；およびこのサンプル中の完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程を包含する。いくつかの実施形態において、被験体は、疾患を有する動物モデルである。

【0021】

本発明の別の局面において、薬物候補活性をスクリーニングための方法は、動物モデル由来のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；薬物候補でこの動物モデルを処置する工程；および動物モデルから得られた第2のサンプル中の完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程を包含する。

【0022】

本発明の他の目的および利点は、以下の図面およびその詳細な説明を考慮することによって、明白である。

【0023】

(発明の詳細な説明)

本発明は、薬物活性をスクリーニングするための方法およびキットを提供する。本発明の方法は、生物学的サンプル中の核酸の完全性に基づく情報を提供する。正常な生物学的サンプル（これらは、疾患の徴候を有さない）は、代表的に、アポトーシスによる分解の結果である、多くの短いフラグメントの低い完全性の核酸（特に、DNA）を含む、細胞細片を含有する。例えば、変異がゲノムの不安定性を引き起こした場合の疾患状態のサンプルにおいては、正常な細胞周期が破壊され得、そして核酸および他の細胞成分のアポトーシス分解が、正常なサンプルで予測される速度で生じていないかもしれない。この状況は、この疾患状態のサンプルにおける完全性の高い核酸の存在を導く。本発明の方法は、薬物活性についてスクリーニングするために、この認識を利用する。

【0024】

薬物の活性および効力についてのこのスクリーニングは、薬物候補での処置下にある患者由来の核酸を含むサンプルを種々の時点で分析することによってか、または薬物候補で処置される疾患の動物モデル由来の核酸を含むサンプルを分析することによって行われ得る。あるいは、このスクリーニングは、疾患を有することが既知であるかもしくは疑われる患者から得られたサンプル、疾患の動物モデルから得られたサンプル、または疾患を示す細胞培養物から得られたサンプル（インビトロまたはエキソビボ）を処理し、そしてこのようなサンプル中の核酸の完全性を分析することによって行われ得る。このような系における薬物候補活性は、代表的に、合理的な薬物設計のためのリードを提供し、そして/または、インビボにおける薬物候補活性の可能性を示し、そして/または、インビボにおける疾患の症状を軽減する可能性を示す。種々の薬理学的アッセイが、本発明の方法に適応され得る。例えば、本発明の方法は、大きいスケールで薬物候補をスクリーニングするために、用量応答データを得るために、反応速度論研究のために、ならびに特定の患者の症状を軽減するために最も効果的な薬物候補を予測および選択するために、使用され得る。種々のキットはまた、本発明の方法に基づいて開発され得る。

【0025】

代表的に、本発明の方法に従って分析される核酸は、遺伝子のコード領域またはその一部、非コード核酸領域またはその一部、遺伝子の調節エレメントまたはその一部、および/あるいはゲノムDNAの同定されていないフラグメントから選択される。他の実施形態において、この分析される核酸は、RNAである。当業者に理解されるように、任意のゲノム遺伝子座が、本発明に従うスクリーニングに受け入れられ得る。分析のための選択される特定の遺伝子座（単数または複数）は、スクリーニングされる疾患、スクリーニングされる薬物候補のクラス、および研究者の利便性に、一部依存する。

【0026】

上記のように、必ずしも、分析のために選択される遺伝子座（単数または複数）が、任意の特定の疾患に相関付けられる必要はない。なぜなら、ゲノムの任意の部分（疾患に関連しない部分でさえ）が、本発明の方法において使用され得るからである。しかし、疾患に関連する遺伝子座（ここでは、変異が、疾患を示すか、疾患の原因であるか、さもなければ疾患の証拠である）もまた、使用され得る。疾患に関連する遺伝子座の例としては、p53、apc、MSH-2、dccc、scr、c-myc、B-カテニン、mlh-1、pms-1、pms-2、pol-、およびbaxが挙げられる。抗癌薬物候補スクリーニングにおいて、この標的フラグメントは、必要に応じて、癌遺伝子、腫瘍抑制剤、または癌に関連する任意の他のマーカーであり得る。しかし、必ずしも、本発明の方法において癌に関連するマーカーを使用する必要はない。なぜなら、このような方法は、疾患状態を示すサンプルが、より多くの量のインタクトな核酸およびより多くの量の長いフラグメントの核酸（一般には、完全性の高い核酸）を含むという一般的認識に基づくからである。従って、任意の簡便な標的核酸遺伝子座が、本発明の方法において使用され得る。

【0027】

増幅産物の量は、任意の適切な手段または簡便な手段によって決定され得る。代表的には、増幅産物の量は、ゲル電気泳動によって決定され得る。標識（例えば、蛍光標識または放射性標識）が、使用され得る。生成された増幅産物の量は、任意の適切な手段または簡便な手段によって、標準の量と比較され得る。これ

らの手段には、目視比較、機械による光学的比較、濃度測定、質量分析、ハイブリッド捕捉、および他の公知の手段が含まれる。増幅反応自体は、核酸を増幅するための任意の手段（PCR、RT-PCR、OLA、ローリングサイクル、位置塩基伸長、および当該分野で公知の他の手段を含むが、これらに限定されない）であり得る。増幅産物はまた、シグナル増幅技術（例えば、分枝鎖増幅（Chiron）のような）によって測定され得る。本発明の方法は、核酸の同定、増幅、配列決定または他の操作のための任意のプラットフォームを用いて有用である。例えば、本発明の方法は、リガーゼ連鎖反応、鎖置換（Becton-Dickinson）などに適用され得る。

【0028】

多くの実施形態は、一般に、標的核酸の増幅を使用して、所定のサンプル中の完全性の高い核酸のレベルをアッセイするので、任意の所定のPCRプライマーのセットがこのプライマーの距離を超える長さを有するDNAフラグメントを増幅する可能性を、以下：

$$\text{増幅されるフラグメント\%} = (FL - PD) / (FL + PD)$$

として表す。ここで、FLは、フラグメントの長さ（塩基対）であり、PDは、プライマー距離（塩基対）である。この等式は、サンプルDNAフラグメントの長さが、均一に分散されている（すなわち、切断が生じている特別な遺伝子座は存在しない）ことを仮定する。

【0029】

薬物候補を用いた、疾患を有する患者または疾患を有することが疑われる患者の処置後、疾患についての動物モデルの処置後、または他の疾患状態のサンプルの処理後に、異なる長さの核酸配列（もし、存在する場合に）を増幅し、この薬物候補の活性を示す増幅産物のプロフィールを作成する。例えば、サンプルを、PCRプライマーのセットに曝露する。これらのプライマーは、1つの順方向プライマー（これは、標的フラグメントを捕捉するために使用される捕捉プローブであり得る）、および複数の下流の逆方向プライマー（これは、このサンプル中の連続性の（切れ目のない）配列（もし、存在する場合）の部分にハイブリダイズする）を含む。これらのプライマーを使用する増幅は、この連続性の標的配列

がこのサンプル中に存在する場合に、各々異なる長さを有する一連の増幅産物を生じる。これらの増幅産物の長さは、順方向プライマーと各々の下流の逆方向プライマーとの間の間隔によって決定される。例を図2に示す。これは、増幅のためのプライマーの配置を示す模式図である。

【0030】

標的配列またはその一部がサンプル中に存在する場合、増幅は、これらのプライマーの間隔によって示される長さの、一連のフラグメントを生じる。上記に提示した原理に従って、活性な薬物候補で処置した患者、動物モデルまたは他の疾患状態サンプルは、処置中のより早い時点の疾患状態サンプルまたは未処置の疾患状態サンプルから得られたプロフィールと異なる、上記アッセイにおける増幅産物のプロフィールを生じる。薬物候補活性を示す差異は、一般に、インビボでの活性および/またはインビボで疾患の症状を軽減する可能性を予測する。1つの実施形態において、順方向プライマーを、最初の逆方向プライマーの少なくとも約170bp上流、および好ましくは、約200bp上流で、かつ最後の逆方向プライマーの約2.3Kb上流でハイブリダイズするように設計される。他の逆方向プライマーは、最初と最後の逆方向プライマーとの間の種々の位置でハイブリダイズするように設計される。例えば、順方向プライマーと種々の逆方向プライマーとの間の間隔は、約200bp ($F_1 - R_1$)、約400bp ($F_1 - R_2$)、約800bp ($F_1 - R_3$)、約1.3Kb ($F_1 - R_4$)、約1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および約2.3Kb ($F_1 - R_6$)であり得る。特定の実施形態において、順方向プライマーは、1番目および2番目の逆方向プライマーから、少なくとも約170bp上流である。逆方向プライマーの数および間隔は、当業者に簡便に選択される。

【0031】

いくつかの実施形態において、ハイブリッド捕捉プローブを使用して、標的配列を、好ましくは、固体支持体（例えば、ビーズ）上に固定する。次いで、複数のプローブを、この捕捉プローブの下流の種々の距離で配置する。これらのプローブは、上記で議論したように順方向および逆方向のプライマーの対であり得るか、またはこれらは、シグナル増幅プローブ（例えば、リガーゼ連鎖反応（LC

R)において使用されるプローブ、および配列の同定において使用される他のプローブ)であり得る。この複数のプローブは、標的がサンプル中に存在する場合には、標的フラグメントの長さにそってハイブリダイズする。従って、これらのプローブの存在についてサンプルを分析することによって、サンプル中に存在する配列の完全性を決定し得る。これは、多くの様式で行われ得、これらには、ハイブリッド捕捉、PCR、LCR、鎖置換、分枝鎖または当該分野で公知の他のアッセイ(これらは、ハイブリッドプローブまたはプライマーを組み込み、配列を同定または定量する)が挙げられるが、これらに限定されない。代表的には、この捕捉プローブは、標的配列(もし、サンプル中に存在する場合)を固定する。この捕捉プローブの下流の配列にハイブリダイズするプローブ(下流プローブ)は、各下流プローブがこの共通の捕捉プローブから固有の距離の間隔を空けられ、かつ各ウェルが1つの型の下流プローブのみを含むように、各ウェルに配置される。次いで、シグナルは、例えば、増幅によって、または標準的なELISA手段およびその後の増幅によって、またはLCRによって、あるいは上記の他の方法によって生成される。各ウェル中のシグナルの存在は、少なくとも捕捉プローブと下流プローブとの間の長さの配列の存在を示す。代替的な実施形態において、各ウェルは、複数の異なる下流プローブ(これは、差次的に標識され得る)を受け、そして標識の存在は、そのサンプル中に存在する配列の長さに相関付けられる。

【0032】

上記の増幅反応は、任意の適切なプロトコルまたは簡便なプロトコルに従って行われ得、そして得られる増幅産物(もしあれば)のフラグメントサイズは、任意の適切な手段または簡便な手段によって決定され得る。

【0033】

代替的な実施形態において、本発明の方法は、連続性の核酸標的フラグメントに対して一連の増幅反応を行う工程を包含し、各増幅反応は、1つの順方向プライマーおよび1つの逆方向プライマーを、順方向および逆方向のプライマー対が、サンプル中に存在することが疑われる連続性のフラグメント上で間隔を空けられるように、含む。この配置の例を、図3に示す。好ましくは、各順方向および

逆方向のプライマー対の間隔は、等価である。また、いくつかの実施形態において、順方向プライマーは、逆方向プライマーから約170bp~約200bp、かつ2番目の順方向プライマーから約170bp~約200bpである。未処置の疾患状態サンプルについて、上記のアッセイは、これらのプライマー対の全てではなくともほとんどについて、一連の同じサイズのフラグメントを生じる。このような増幅産物のアレイは、疾患を示す連続性の標的配列の証拠となる（上記を参照のこと）。正常なサンプルは、増幅産物をほとんどまたは全く生じないが、いかなる場合においても、比較的インタクトな診断標的配列を含むサンプルから予測される、増幅産物の連続的なアレイを生じない。代表的には、薬物候補がより高い活性を有するほど、実験結果は、正常なサンプルを示す可能性が高い。

【0034】

上記の方法の各々は、サンプル中のインタクトな核酸またはインタクトな核酸のセグメントが診断的であるという原理に基づく。従って、上記の方法に対する変更が意図される。このような変更としては、プライマーの配置、使用するプライマーの数、標的配列、配列を同定するための方法などが挙げられる。例えば、図3に示される（上記の）方法においては、順方向プライマーおよび逆方向プライマーの数が等しいことを、必要としない。順方向プライマーは、例えば、2つの逆方向プライマーの間でフラグメントを増幅するために使用され得る。プライマー対の配置の他の変更は、行なわれる増幅反応の詳細と同様に、当業者の範囲内である。最後に、図2および3に示されるように、捕捉プローブは、選択された標的配列を単離するために、本発明の方法において使用され得る。

【0035】

いくつかの実施形態において、増幅反応は、一連の異なるゲノム遺伝子座に対して行われる。好ましくは、約2~約7個の遺伝子座が使用される。しかし、分析される遺伝子座の正確な数は、検出される疾患、使用される薬物候補のクラス、または簡便性に基づいて、個々の研究者によって決定される。本発明の方法に従って、プライマーは、上記の選択された各々の遺伝子座で核酸（例えば、DNA）を増幅するように設計される。薬物候補での処置を受けている患者または動物モデル由来のサンプル、あるいはインビトロまたはエキソビボの疾患状態サン

プル（これらのサンプル中の、少なくとも1つの遺伝子座、好ましくは、2つの遺伝子座、そして最も好ましくは、少なくとも3つの遺伝子座は、この患者の処置の時間経過における早い段階にあるこの患者由来の最初のサンプルと比較してか、または未処理の疾患状態サンプルと比較した、検出可能な完全性の高い核酸増幅産物のレベルの減少を生じる）は、陽性薬物候補スクリーンとみなされる。さらに、このアッセイにおいて増幅されるフラグメントの長さは多様であるが、好ましくは、各々少なくとも約170bp長である。同じ長さのフラグメントがその選択された各々の遺伝子座で増幅される必要はないが、同じ長さのフラグメントがその選択された各々の遺伝子座で増幅されることが好ましい。

【0036】

以下により十分に記載されるように、薬物候補で処置される患者は、経時的に追跡され得る。サンプルを、処置開始前および処置の過程にわたる時点で採取される。これらのサンプルを、その中に含まれる核酸の完全性について分析する。完全性の高い核酸サンプルのレベルをモニターすることによって、患者の処置の進行がチェックされ得る。この情報は、例えば、特定の処置の効力の初期指標として有用である。

【0037】

処置が効果的である場合、これらのサンプルは、完全性の高い核酸の量が減少されることを示す。この薬物候補は、処置期間中に、一度にかまたは間隔を空けて投与され得る。1回の時間経過において、薬物候補は、この薬物処置の開始後2時間、4時間、6時間および8時間で試験され得る。より長い期間の時間経過研究においては、薬物候補は、この薬物処置の開始後48時間、1週間、2週間および4週間で試験され得る。早い時点でのサンプルに対する比較において、後の時点のサンプル中で検出された、増幅された完全性の高い核酸（すなわち、増幅可能な完全性の高い核酸）の総量は、その薬物候補が患者において活性であるかまたは効果的である場合には、より低いことが予測される。反対に、後の時点のサンプル中で検出された、増幅された完全性の高い核酸（すなわち、増幅可能な完全性の高い核酸）の総量は、その薬物候補が不活性であるかまたは非効果的である場合には、類似するかまたはわずかに低いことが予測される。あるいは、

完全性の高い核酸から増幅されたフラグメントのパターンが分析され得る。活性な薬物候補または効果的な薬物候補で処置されている患者における早い時間経過のサンプルにおけるフラグメントまたはそのフラグメントの量と比較して、後の時間経過サンプルにおいて、存在するフラグメント（特に、長いフラグメント）は少ないことが予測され、そして/または、それらの存在するフラグメントのいくらかまたは全ての量が少ないことが予測される。不活性な薬物候補または非効果的な薬物候補で処置されている患者における早い時間経過のサンプルと比較した場合には、後の時間経過サンプルにおいて、これらのフラグメントは、数および/または量（例えば、バンド強度）において同じなままであるか、増加するか、またはわずかに減少する。

【0038】

これらの同じ原理が、特定の疾患状態についての動物モデルを使用する薬物スクリーニングに適用され得る。薬物候補で処置されている動物モデルから採取したサンプル中の核酸の完全性が、上記のように、経時的にモニターされそして活性が評価される。

【0039】

あるいは、インビトロ設定において薬物をスクリーニングするための本発明の方法は、1つの化合物または複数の化合物が、活性について（例えば、同時に）スクリーニングされるのを可能にする。疾患状態のサンプルが、実験容器（例えば、マルチウェルサンプルプレートのウェル）に配置される。このサンプルを、1以上の化合物に対して曝露し、そしてその完全性の高い核酸の量について分析する。未処理の疾患状態サンプルに対する比較において、増幅された完全性の高い核酸（すなわち、増幅可能な完全性の高い核酸）の総量は、活性な薬物候補で処理したサンプルにおいては低いことが予測され、そして増幅された完全性の高い核酸（すなわち、増幅可能な完全性の高い核酸）の総量は、不活性な薬物候補で処理したサンプルにおいては、同様であるか、増加されるか、またはわずかに低い。あるいは、完全性の高い核酸から増幅されたフラグメントのパターンが分析され得る。未処理のサンプルにおいて存在するフラグメントまたはそのフラグメントの量と比較した場合に、活性の薬物候補で処理したサンプルにおいて、存

在するフラグメント（特に、長いフラグメント）は少ないことが予測され、そして/または、それらの存在するフラグメントのいくらかまたは全ての量が少ないことが予測される。不活性な薬物候補で処理したサンプル中には、これらのフラグメントは、数および/または量（例えば、バンド強度）において同じなままであるか、増加するか、またはわずかに減少する。

【0040】

薬物候補が活性であることが既知である場合か、または薬物候補をスクリーニングしてそして活性であることを決定する場合、用量応答曲線が作成され得る。疾患状態サンプル（例えば、動物モデルおよび組織培養物であるが、これらに限定されない）に漸増用量の薬物候補を提供し、そして各用量での完全性の高い核酸（増幅されたかまたは増幅可能な）のレベルを分析することによって、活性（そのレベルの完全性の高い核酸によって測定される）に対して薬物候補用量を関連させて、曲線を作成し得る。これらの2つの基本的な薬理学的技術は、例示でありそして限定すること意味されない。しかし、これらの技術は、活性な薬物候補について迅速にスクリーニングしそしてそれらの効力の決定を行うための方法を提供する。例えば、限定されないが、抗癌薬物候補または抗腸炎症薬物候補が、スクリーニングされ得る。

【0041】

あるいは、薬物活性は、エキソピボでアッセイされ得る。1つの実施形態において、組織または流体は、処置前の患者から取り出され得る。このサンプルを、その疾患の症状を軽減することが予測され得る種々の薬物候補で処理し得る。活性を、上記のようにアッセイする。このサンプルについて最も活性であることを示す薬物候補は、このサンプルを採取した患者における疾患の症状を軽減する可能性のある薬物候補として選択され得る。別の実施形態において、組織を、動物モデルから取り出し、そして薬物候補で処理する。活性を上記のように評価し、そして薬物候補をスクリーニングするために使用し得る。

【0042】

本発明の方法はまた、サンプルを、さらなる分析（例えば、遺伝子分析、生化学的分析、細胞学的分析または他の分析）のためにスクリーニングするためにか

または「認定 (q u a l i f y) 」するために使用され得る。認定されるサンプルは、完全性の高い核酸の存在について試験され、そして存在する場合には、その完全性の高い核酸は、このサンプルが、おそらく、インビトロスクリーニング、エキソビボ（例えば、動物モデルを認定する場合）スクリーニングまたはインビボ動物モデルスクリーニングのためのサンプルとして使用され得ることを示す。従って、薬物候補活性スクリーニングの基礎を提供する疾患状態サンプルが、この方法に従って選択され得る。サンプルが認定され、そして本発明の方法が核酸の完全性における変化を検出し得る、いくつかの疾患としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：結腸癌および腺腫；リンパ腫；ならびに胃、肺、肝臓、膵臓、前立腺、腎臓、精巣、膀胱、子宮または卵巣の癌または腺腫。さらに、ゲノムの不安定性が役割を果たしていると考えられる疾患（例えば、炎症性腸症候群、炎症性腸疾患、クローン病など）が、試験され得る。さらに、サンプル中の増幅可能なDNAのプロフィールを、疾患に関連付けられているタンパク質と相関付ける。例えば、アポトーシスタンパク質であるサービビン (s u r v i v i n) の上方制御は、R a s 癌遺伝子ならびに他の癌遺伝子およびそれらの遺伝子産物と同様に、増幅可能なDNAの量の増加に相関する。

【0043】

本発明の方法はまた、アポトーシスについてのアッセイとして有用である。サンプル中の完全性の高い核酸の増幅されたフラグメントの存在または多量の完全性の高い核酸は、このサンプルが、アポトーシスを進行しなかった細胞由来であったことを示す。このようなフラグメントまたは量の非存在は、このサンプルに寄与する細胞がアポトーシスを受けたことを示す。従って、本発明のアポトーシス活性アッセイはまた、単独またはゲノムの不安定性についての他のアッセイと組み合わせて、疾患についてのスクリーニングとして有用である。さらに、プログラムされた細胞死が、アポトーシス活性と同様の様式で測定され、プログラムされた細胞死の誘導は、多くの系におけるアポトーシス活性の増加と相関付けられる。

【0044】

以下の実施例は、本発明に記載の方法のさらなる詳細を提供する。従って、以

下の様式で例示されるが、本発明は、そのようには限定されず、そして当業者は、これらを考慮してその広範な適用を認識する。

【0045】

(結腸癌の検出のための例示的方法)

以下の実施例は、排出された糞便サンプルにおける結腸癌についてのスクリーニングに関する。本発明が基づく原理(上記を参照のこと)に基づいて、同じ分析が、他のサンプル(例えば、上記のサンプル)に対して行われ、本明細書中に示される同じ結果が得られる。

【0046】

糞便サンプルの分析のために、本発明の好ましい方法は、米国特許第5,741,650号および同時係属の共有に係る米国特許第5,952,178(両者は、本明細書中に参考として援用される)に教示されるような、排泄された糞便の少なくとも断面部分または周辺部分を得る工程を包含する。糞便の断面部分または周辺部分が所望されるが、本明細書中に提供される方法は、排泄された糞便から得られたランダムなサンプル(スミアまたは切屑を含む)に対して行われる。一旦得られると、この糞便試料をホモジナイズする。ホモジナイゼーションに好ましい緩衝液は、少なくとも16mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む。しかし、同時係属の共有に係る米国特許出願09/491,093(本明細書中に参考として援用される)に教示されるように、少なくとも150mMのEDTAの使用が、糞便からの核酸の収率を大幅に改善することが発見されている。従って、糞便のホモジナイゼーションのための好ましい緩衝液は、リン酸緩衝化生理食塩水、20~100mMのNaClまたはKCl、少なくとも150mMのEDTA、および必要に応じて、界面活性剤(例えば、SDS)およびプロテイナーゼ(例えば、プロテイナーゼK)を含む。

【0047】

ホモジナイゼーションの後、核酸は、好ましくは、この糞便サンプルから単離される。核酸の単離および抽出は、本発明の全ての方法には必要ではない。なぜなら、特定の検出技術は、核酸の単離を行うことなく、ホモジナイズした糞便において十分行われ得るからである。しかし、好ましい実施形態においては、ホモ

ジナイズした糞便をスピンして、核酸、タンパク質、脂質および他の細胞細片を含む上清を得る。この上清を、界面活性剤およびプロテイナーゼで処理してタンパク質を分解し、そして核酸を、フェノール-クロロホルム抽出する。次いで、この抽出した核酸を、アルコールで沈殿させる。他の技術を使用して、このサンプルから核酸を単離し得る。このような技術としては、ハイブリッド捕捉、およびこのホモジナイズした糞便からの直接増幅が挙げられる。核酸は、使用するスクリーニングアッセイによって必要とされる程度に、精製および/または単離され得る。総DNAが、当該分野で公知の技術を使用して単離される。

【0048】

(スクリーニングアッセイプロトコル)

上記で得られたヒトDNAフラグメントのサイズを、多くの手段によって決定し得る。例えば、ヒトDNAを、ゲル電気泳動を使用して分離し得る。3%アガロースゲルを、当該分野で公知の技術を使用して調製する。Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1995, 2-23-2-24頁(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。約200bpより大きいフラグメントは、陽性スクリーンを提供する。診断は、このスクリーニング単独に基づいてなされ得るが、陽性スクリーンを提示する患者に、好ましくは、経過観察試験で追跡して確かな診断を与えるようにアドバイスする。

【0049】

ヒトDNAフラグメントの長さを決定するための好ましい手段は、PCRを使用する。PCRを行うための方法は、周知である。本発明において、ヒトDNAフラグメントは、ヒト特異的プライマーを使用して増幅される。PCRによって生成された約200bpより大きいアンプリコンは、陽性スクリーンを提示する。他の増幅反応およびPCRの改変型(例えば、リガーゼ連鎖反応、逆相PCR、Q-PCRなど)を使用して、検出可能なレベルのアンプリコンを生成し得る。そのアンプリコンの長さ、重量または他の特性が、アンプリコンをサイズで同定する限り、アンプリコンは、レポーター(例えば、蛍光、放射性同位体など)を結合することによってか、配列決定することによってか、ゲル電気泳動によ

てか、質量分析によってか、または当該分野で公知の任意の他の手段によって検出され得る。

【0050】

(実施例)

患者および疾患の動物モデルから採取した種々のサンプルにおける核酸の完全性を分析することによって、薬物候補処置が活性かつ効果的であるか否かを決定する実験を、以下に記載する。これらの実施例は、本発明の例示であり、そして限定することを意味されない。

【0051】

(実施例1)

癌または腺腫患者において経時的に処置結果を決定するために、実験を行った。糞便サンプルを得てそして凍結させ、そしてDNAを単離する。これらのサンプルを、ヒトDNAをハイブリッド捕捉し、そして少なくとも200塩基対を有する増幅可能なDNAの量を決定することによって、スクリーニングする。各凍結糞便試料(7~33グラムの重量)を解凍し、そして500mM Tris、16mM EDTAおよび10mM NaCl (pH 9.0)中、3:1の容量:質量比でホモジナイズする。次いで、サンプルを、20:1の最終容量:質量比まで同じ緩衝液中で再度ホモジナイズし、そして2356×gでガラスマイクロピーズ中でスピンする。上清を収集し、そしてSDSおよびプロテイナーゼKで処理する。次いで、DNAを、フェノール-クロロホルム抽出し、そしてアルコールで沈殿させる。沈殿物を、10mM Trisおよび1mM EDTA (1×TE) (pH 7.4)中に懸濁する。最後に、このDNAを、RNaseで処理する。

【0052】

増幅の前に、DNAを、ハイブリッド捕捉によってサンプルから単離する。BRCA1、BRCA2、p53、APC遺伝子の部分に対するビオチン化プローブを使用する。

【0053】

BRCA1プローブは、

5' GATTCTGAAGAACCAACTTTGTCCTTAACTAGCT
CTT 3' (配列番号8)

である。

【0054】

BRCA2プローブは、

5' CTAAGTTTGAATCCATGCTTTGCTCTTCTTGATT
ATT 3' (配列番号9)

である。

【0055】

APC1プローブは、

5' CAGATAGCCCTGGACAAACCATGCCACCAAGCAG
AAG 3' (配列番号10)

である。

【0056】

p53プローブ(エキソン5の一部にハイブリダイズする)は、

5' TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAAC
TGG 3' (配列番号4)

である。

【0057】

APC2プローブは、

5' GAAGTTCCTGGATTTTCTGTTGCTGGATGGTAGT
TGC 3' (配列番号11)

である。

【0058】

サンプルの300 μ lのアリコート、10 μ lの各捕捉プローブを有する300 μ lの6M グアニジンイソチオシアネート緩衝液中に置き、そして25で一晩インキュベートした。捕捉されたDNAを、1時間室温でインキュベートした100 μ lの捕捉ビーズを使用して単離する。DNAを、ビーズから溶出しそして標準的なPCR条件下でPCR増幅する。

【0059】

本発明の方法に従って、増幅反応を、各サンプルについてこの5つの遺伝子座に対して、順方向プライマーおよび逆方向プライマーを使用して行う。順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、200bp、400bp、800bp、1.3Kb、1.8Kbおよび2.4Kbのフラグメントを増幅するように間隔を空ける。30個のPCR反応物の各々は、36サイクルで行う。アンプリコンを、35 Seakeamゲル上で泳動し、そしてエチジウムブロミドで染色する。結果を、図1Aおよび1Bに示す。各図は、この30人患者のうちの15人についての結果である。

【0060】

これらの図に示されるように、癌または腺腫を有する患者は、増幅可能なDNAの収率の増加を有する。これは、特に、1.8Kbレベル以上に当てはまる。従って、癌または腺腫を有する患者は、彼らの糞便においてより多くの増幅可能なDNAを生じるのみならず、癌を有さない患者の糞便において生成されるよりも大きいDNAフラグメントを生じる。従って、増幅可能なDNAの収率の増加および高分子量DNAの存在（特に、1.8Kb以上）は、患者の疾患状態を示す。

【0061】

完全性の高い核酸を有するこれらの患者（レーン1、3、11および18）を、抗癌薬物候補で処置する。これらの患者に、一定用量の薬物候補を、投与される薬物候補によって示される薬物動態および当業者に公知の他の因子によって指示される間隔で与える。これらの患者を、1ヶ月の期間にわたって処置およびモニターする。サンプルを、48時間、1週間、2週間および4週間で、分析のために各患者から採取する。完全性の高い核酸を有さない患者（すなわち、正常）を、処置および分析から排除するか（例えば、癌と診断されている患者のみを、抗癌薬物としての効力を有することが既知である薬物候補で処置する場合において）、または引き続くモニタリングに含め、そしてプラシーボ処置を与える（例えば、薬物候補の効力に関する臨床研究において）。この実施例において、完全性の高い核酸を有さない患者を、処置から排除し、そして高い完全性を有してい

る患者を処置する。

【0062】

完全性の高い核酸を有する4人の患者の各々について、BCRA1で分析した遺伝子座で得られた仮定の予測される結果を、以下の表1に示す。核酸の完全性は、分析する遺伝子座にかかわらず予測的であるので、類似の仮定の結果は、分析した他の遺伝子座で予測される。

【0063】

表1. BCRA1遺伝子座での仮定の予測された結果

【0064】

【表1】

	48時間で採取したサンプル	1週間で採取したサンプル	2週間で採取したサンプル	4週間で採取したサンプル
患者1	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	800bpより大きいバンドは、見られない	200bp～800bpのバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	主に200bpのバンド
患者2	開始サンプルと差異なし	開始サンプルと差異なし	開始サンプルと差異なし	開始サンプルと差異なし
患者3	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	800bpより大きいバンドは、見られない	200bp～800bpのバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	主に200bpのバンド
患者4	開始サンプルと差異なし	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	200bp～800bpのバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない

上記の結果において見られ得るように、患者1および3は、この薬物処置に有利に応答した。この4週間のモニタリング期間の終了まで、これらの患者は、未処置の患者の状態よりもむしろ、正常状態のプロフィールにより類似する、核酸の完全性のプロフィールを有する。このモニタリング期間後、増幅される最も長いフラグメントを表すバンドが、最初に欠失され、次いで、増幅される短いフラグメントを表すバンド(しかしなお、200bpより大きい)が欠失した。患者

4は、この薬物処置に対していくらか応答を示したが、患者1および3についての応答ほどの大きさではなかった。患者4のモニタリング期間中、最も長いフラグメントは、患者1および3については1週間後であったのに対して、2週間後に欠失した。増幅される短いフラグメント(200bp~800bp)は、この4週間のモニタリング期間の終了時に欠失せず、むしろ、開始処置と比較して減少しただけであった。この結果は、例えば、この処置が、この患者の癌の処置において部分的にのみ効果的であることを示し得るか、またはこの処置が、この患者において効果的になるまで長い時間を要することを示唆し得る。最後に、患者2は、いかなる長さのフラグメントの量の減少を示さず、これは、この薬物候補が、患者2に対して効果を有さなかったことを示す。

【0065】

(実施例2)

実施例1で用いたものとは異なる種々の遺伝子座を用い、癌または腺腫患者における時間に対する処理の成果を決定するための実験を実施した。糞便サンプルを、結腸鏡検査が行なわれるべきであることを示す症状または病歴を有する9人の患者から収集した。それぞれの糞便サンプルを凍結した。糞便サンプルを提供した後すぐに、患者それぞれは結腸鏡検査を受け、患者の疾患状態を決定した。結腸鏡検査の結果およびその後の結腸鏡検査の間に採取された生検サンプルの組織学的分析に基づき、個体を2群(正常および異常)のうちの1つに置いた。異常群は、癌を有するかまたは少なくとも直径1cmの腺腫を有する患者からなる。これらの結果に基づき、9人の患者のうちの4人が異常群に置かれた。異常群からのサンプルをさらに分析し、そして正常なものはさらに分析しない。

【0066】

サンプルを、ヒトDNAをハイブリッドキャプチャーすることによりスクリーニングし、そして少なくとも200塩基対を有する増幅可能なDNAの量を決定する。重量7~33gの各凍結糞便試料を解凍し、そして500mM Tris、16mM EDTA、および10mM NaCl(pH9.0)中でホモジェナイズする(容量と重量の比が3:1)。次いでサンプルを同じ緩衝液中で再度ホモジェナイズして、最終の容量と重量の比を20:1にし、そしてガラスマク

ロビーズ中で2356 × gで回転させる。上清を回収し、そしてSDSおよびブロテイナーゼkを用いて処理する。次いでDNAをフェノール/クロロホルム抽出し、そしてアルコールを用いて沈殿させる。この沈殿を、10mM Tris および1mM EDTA (1×TE) (pH7.4)に懸濁した。最後にDNAをRnase処理する。

【0067】

ヒトDNAを、配列特異的なハイブリッドキャプチャーにより沈殿から単離する。p53、K-ras、およびapc遺伝子に対するBiotynilate dプローブを用いる。

【0068】

K-rasプローブは

【0069】

【化1】

5'GTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACCTTATGTGTGAC 3'

であった(配列番号1)。

【0070】

2つのapcプローブがあり：apc-1309は、

【0071】

【化2】

5'TTCCAGCAGTGTCACAGCACCCCTAGAACCAAATCCAG 3'

(配列番号2)であり、そしてapc-1378は

【0072】

【化3】

5'CAGATAGCCCTGGACAAACAATGCCACGAAGCAGAAG 3'

であった(配列番号3)。

【0073】

p53に対する4つのプローブがあり、第1のプローブ(エキソン5の一部にハイブリダイズする)は、

【0074】

【化4】

5'TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGG3'

(配列番号4)、第2のプローブ(エキソン7の一部にハイブリダイズする)は、

【0075】

【化5】

5'ATTTCTTCCATACTACTACCCATCGACCTCTCATC3'

(配列番号5)、第3のプローブ(これもまた、エキソン7の一部にハイブリダイズする)は、

【0076】

【化6】

5'ATGAGGCCAGTGCGCCTTGGGGAGACCTGTGGCAAGC3'

(配列番号6)、および最後にエキソン8に対するプローブは配列

【0077】

【化7】

5'GAAAGGACAAGGGTGGTTGGGAGTAGATGGAGCCTGG3'

(配列番号7)を有する。

【0078】

それぞれのプローブ(20 pmol / キャプチャー)の10 µlのアリコート
を、310 µlの6 M GITC 緩衝液の存在下で300 µlのDNAを含む懸濁
液に加えた(室温、2時間)。ハイブリッド複合体を、ストレプトアビジンでコ
ートされたビーズ(Dynal)を用いて単離する。洗浄後、プローブ-ビーズ
複合体を、0.1 × TE 緩衝液(pH 7.4)に25 で1時間懸濁する。次い
でこの懸濁液を、85 で4分間熱し、そしてビーズを除去する。

【0079】

次いで捕捉されたDNAを、PCR(本質的に米国特許第4,683,202
号に記載されるようなPCR、これは本明細書中で参考として援用される)を用
いて増幅する。それぞれのサンプルを、7 遺伝子座(Kras、エキソン1、A
PCエキソン15(3つの別々の遺伝子座)、p53、エキソン5、p53、エ
キソン7、およびp53、エキソン8)にわたる正方向および逆方向のプライマ
ーを用いて増幅する(2連で行い、それぞれの遺伝子座に対して合計14の増幅
を行った)。7つの別々のPCR(それぞれ40サイクル)を、200塩基対以
上を有するサンプル中フラグメントを検出するために指向されたプライマーを用
いて実施する(2連)。増幅されたDNAを、4% Nusieve(FMC B
iochemical)ゲル(3% Nusieve、1% アガロース)上に
置き、エチジウムブロミド(0.5 µg/ml)を用いて染色する。4人の異常
患者のすべては、200 bp 長またはそれよりも長い増幅可能なDNAを有する
。得られた増幅DNAを、染色されたゲルの相対的な強度に基いて等級分けする
。増幅される種々の異なる遺伝子座。4人の異常患者の全ては200 bp 長また
はそれよりも長い増幅可能なDNAを有する。この結果は、どの遺伝子座が増幅さ
れたかに関わらず同じである。

【0080】

次いで4人の異常患者を、候補薬物を用いて4週間処理する。以下の表2に示されるように、実施例1のものと類似の結果が、これらの4人の患者について得られた。

【0081】

【表2】

表2. K-rasの遺伝子座で仮定的に予想される結果

	48時間で採取されたサンプル	1週間で採取されたサンプル	2週間で採取されたサンプル	4週間で採取されたサンプル
患者1	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	800bpより大きいバンド(不明)	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド	主に200bpのバンド
患者2	最初のサンプルと変わらないバンド	最初のサンプルと変わらないバンド	最初のサンプルと変わらないバンド	最初のサンプルと変わらないバンド
患者3	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	800bpより大きいバンド(不明)	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド	主に200bpのバンド
患者4	最初のサンプルと変わらないバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド

(実施例3)

この実施例では、本発明の方法を、結腸直腸腺腫または結腸直腸癌を有した患者に用いる。糞便サンプルをこれらの患者それぞれから獲得し、そして上述のように調整する。実施例1で言及される5つの異なる遺伝子座のフラグメントを、200、400、800、1300、1800、および2400塩基対の間隔をあけたプライマーを用い、上記の実施例1に記載されるプロトコルを用いて増幅する。それぞれの増幅について、好都合なフラグメントの増幅に1のスコアを与え、増幅のなかったフラグメントに0のスコアを与えるように記録する。6つのプライマー対をそれぞれ用いて5つの遺伝子座を尋問したので、最大スコアは30である(5つの遺伝子座全てにおいての6つのフラグメント全ての中の好都合な増幅)。陽性スクリーンのためのカットオフを21に設定した。この結果を以下に示す。表3および表4は、この得点システムに基づいて、どの患者が腺腫または癌に対して陽性であるかを示す。

【0082】

【表3】

表3. 患者が腺腫を有するかどうかを
決定するためのスコア記入

患者番号	年齢	スコア
P-003		29
P-001		23
P-045		22
P-162		21
P-163		16
P-088		15
P-050		13
P-060		11
P-061		11
P1058		10
P-075		10
P-077		8
P-024		7
P-056		7
P-067		7
P-025		6
P-080		4
P-123		4
P-048		3
P-040		2
P-006		1
P-004		0
P-015		0
P-083		0
P-047		
P-129		

【0083】

【表4】

表4. 患者が癌を有するかどうかを決定
するためのスコア記入

患者番号	年齢	スコア
P-064		30
P-103		30
P-104		30
P-108		30
P-101		29
P-102		29
P-099		28
P-107		28
P-110		26
P-098		25
P-134		24
P-062		23
P-090		23
P-095		23
P-093		22
P-100		21
P-122		18
P-084		15
P-109		15
P-118		10
P-138		10
P-091		8
P-096		8
P-053		7
P-119		6
P-117		5
P-105		0
P-097		

21またはそれより高いスコアを有する患者を、抗癌候補薬物で処理し、そして実施例1で記載されるようにモニターする。仮定的に予想される処理の結果を表5および表6に示す。

【0084】

【表5】

表5. 処理時に腺腫を有する患者についての仮定的に予想される結果
(5つの遺伝子座すべてにおけるスコア)

	48時間で 採取したサンプル のスコア	1週間で 採取したサンプル のスコア	2週間で 採取したサンプル のスコア	4週間で 採取したサンプル のスコア
P-003	28	24	20	14
P-001	23	23	23	23
P-045	22	20	14	12
P-162	21	20	18	16

【0085】

【表6】

表6. 処理時に癌を有する患者について9仮定的に予想される結果
(5つの遺伝子座すべてにおけるスコア)

	48時間で 採取したサンプル のスコア	1週間で 採取したサンプル のスコア	2週間で 採取したサンプル のスコア	4週間で 採取したサンプル のスコア
P-064	29	27	20	16
P-103	29	28	21	15
P-104	30	27	19	14
P-108	29	29	25	24
P-101	28	22	16	9
P-102	28	25	20	23
P-099	27	23	19	12
P-107	28	28	28	28
P-110	26	25	20	17
P-098	25	20	15	8
P-134	23	19	17	15
P-062	23	21	16	14
P-090	23	20	15	14
P-095	22	21	16	12
P-093	21	19	18	17
P-100	21	21	21	21

患者のスコア（上記のように、これはフラグメントの好適な増幅を反映し、また高い完全性の核酸のレベルを反映する）は、表5および表6において、抗癌候補薬物による処理のタイムコースとして示される。罹患患者の陽性スクリーンのためのカットオフを21に設定したので、患者のスコアが21より下に落ちた場合、その薬物処理は効果的であったとみなされる。表5および表6に示すように、スコアが21より下に落ちるのに費やされる時間の長さは、患者間で変化し、そして変化の大きさもまた変化する。ある患者は処理に応答せず、21より下に落ちないスコアによるか、または変化しないスコアにより示される。

【0086】

（実施例4）

本実施例は、本発明の方法が、疾患を有する動物（非ヒト）（「疾患動物」）での活性について候補薬物をスクリーニングし得る方法を示す。活性に対するマーカーとして増幅可能な高い完全性の核酸の存在または非存在を用いる。このような実験により、薬物の発展が導かれ、そして/またはどの化合物がインビボで活性でありそうかの予見を提供され、そして/またはどの化合物がインビボで疾

患の症状を緩和しそうかの予見を提供される。

【0087】

疾患を有する動物モデルを試験被験体として用い、正常な動物をコントロールとして用いた。このアッセイは、試験されるそれぞれの候補薬物に対して3連で実施されるので、3体の疾患動物を1つの候補薬物で処理する。コントロールとして、疾患動物を偽処理（例えば、投与のために候補薬物を懸濁するためのキャリア）で処理し；正常の動物を偽処理で処理し；そして正常の動物を候補薬物で処理する。

【0088】

この動物に、3週間にわたって定期的にこれらの処理を与える。投与期間の間に、サンプルを動物から採取し、このサンプルを調整し、そしてこのサンプルを、上記のように核酸の完全性について分析する。サンプルを、処理前、処理後48時間、処理後1週間、処理後2週間、そして処理後3週間で採取する。上記のようにして分析を完遂する。簡単にいうと、DNAをこれらのサンプル中から抽出する。PCRを用いて抽出されたDNAの、疾患に関連すると予想される遺伝子座の周囲を増幅する。1つの正方向プライマーを、6つの逆方向プライマーと共に用いる。正方向プライマーを、逆方向プライマーからそれぞれ、200bp ($F_1 - R_1$)、400bp ($F_1 - R_2$)、800bp ($F_1 - R_3$)、1.3Kb ($F_1 - R_4$)、1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および2.3Kb ($F_1 - R_6$)だけ離す。増幅後、このPCR産物を分離ゲル上を泳動させる。

【0089】

終了時（3週間）に、未処理（偽処理）の疾患動物は、すべてではないがせいぜいプライマー塩基対のフラグメント（200bp ($F_1 - R_1$)、400bp ($F_1 - R_2$)、800bp ($F_1 - R_3$)、1.3Kb ($F_1 - R_4$)、1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および2.3Kb ($F_1 - R_6$))（増幅された高い完全性の核酸）に対するバンドを示すと考えられる。偽処理をほどこした正常な動物は、増幅された高い完全性の核酸を（存在したとしても）ほとんど示さないと考えられる。したがって、400bp ($F_1 - R_2$)、800bp ($F_1 - R_3$)、1.3Kb ($F_1 - R_4$)、1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および2.3Kb

($F_1 - R_6$) のフラグメントに対応するバンドは、未処理の正常な動物中には実質的に存在しないと考えられる。さらに特に、200bp ($F_1 - R_1$) に関して、非常に明るいバンドが存在するかまたはまったくバンドが存在しないことが考えられる。類似のパターンが、候補薬物処理された正常な動物についても考えられる。

【0090】

今回の場合、種々の塩基対により増幅されたフラグメントを示すバンドのパターンは、高い完全性の核酸のマーカ（つまり、候補薬物活性）として用いられる。候補薬物が活性を有する場合、処理された疾患動物サンプル由来の増幅された高い完全性の核酸のプロフィールは、未処理の疾患動物サンプルのプロフィールと異なる。さらに特に、候補薬物が活性を有する場合、未処理の疾患動物サンプルと比較して、処理された疾患動物サンプルにおいて、より少ないバンドおよび/またはより明るいバンドが見られる。候補薬物の活性が強いほど、観察されるバンドが少なく、そして/または観察されるバンドが明るい。最も強力な活性の候補薬物は、正常の動物サンプルのパターンと類似のバンドパターンを生成すると考えられる。さらに、本実験の時間経過の間、本タイムコースに従い疾患動物から採取されたサンプルは、候補薬物が活性である場合、観察されるバンドの数および/または強度において変化を示す。仮定的に予想される結果を以下の表7に示す。

【0091】

【表7】

表7. 増幅された標的で仮定的に予想される結果

	48時間で採取されたサンプル	1週間で採取されたサンプル	2週間で採取されたサンプル	3週間で採取されたサンプル
疾患動物1	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	800bpより大きいバンド(不明)	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド	主に200bpのバンド
疾患動物2	最初のサンプルと変わらないバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド
疾患動物3	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	800bpより大きいバンド(不明)	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド	主に200bpのバンド
未処理の疾患動物	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド
未処理の正常な動物	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド
処理された正常な動物	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド

見込みのある候補薬物は、さらに研究され得る。例えば、種々の濃度の特定の候補薬物を用いて疾患動物を処理し、そして上記のように処理された疾患動物サンプルと未処理の疾患動物サンプル、および処理された疾患動物サンプルと正常な動物サンプルを比較することにより、同じ実験を実施し得る。用量反応性についての曲線を作成し、候補薬物活性に対する候補薬物用量の効果を示し得る。

【0092】

(実施例5)

本実施例では、増幅可能な高い完全性の核酸の存在または非存在をマーカーとして用いてアポトーシス活性またはプログラムされた細胞死を誘導する化合物をスクリーニングするために、本発明の方法をどのよう使い得るかを示す。実質的に、これらの実験は、実施例4と同じ方法で実施される。そしてアポトーシス活性またはプログラムされた細胞死の誘導が起こった場合、実施例4でのものと類似の最終点を試験し決定した。この化合物がアポトーシス活性および/またはプログラムされた細胞死を誘導する場合、処理された疾患動物(または正常な動物

)から得たサンプル中の増幅された高い完全性の核酸のプロフィールは、未処理の疾患動物(または正常な動物)サンプルのプロフィールと異なる。この化合物がアポトーシス活性および/またはプログラムされた細胞死を誘導する場合、未処理の疾患動物(または正常な動物)サンプルと比較して、処理された疾患動物(または正常な動物)由来のサンプル中でより少ないバンドおよび/またはより明るいバンドが観察される。アポトーシス活性および/またはプログラムされた細胞死の誘導が大きければ、観察されるバンドが少なくなり、そして/または観察されるバンドが明るくなる。

【0093】

(実施例6)

本実施例では、増幅可能な高い完全性の核酸の存在または非存在を活性についてのマーカーとして用いて、疾患を有する動物(非ヒト)モデル(「疾患動物」)から採取された試料における活性について候補薬物をスクリーニングするために、本発明の方法をどのように用い得るかを示す。このような実験により、薬物開発の手がかりおよび/またはインビボで活性を有する可能性がある化合物の予測ならびに/もしくはインビボで疾患の症状を緩和する可能性がある化合物の予測が提供され得る。

【0094】

疾患の動物モデルは試験被験体として用いられ、そして正常な動物はコントロールとして用いられる。このアッセイは、試験される候補薬物それぞれについて3連で実施されるので、3体の疾患動物それぞれから得られた組織試料を回収し、そしてそれぞれの試料は候補薬剤で処理される。コントロールとして、疾患動物由来の組織試料を、候補薬剤を懸濁するためのキャリアのような偽処理を用いて処理し;正常な動物由来の組織試料をこの偽処理を用いて処理し;そして正常な動物由来の組織試料を候補薬剤を用いて処理する。

【0095】

この組織試料を培養し、そして大量瞬時投与量の処理をほどこし、そして8時間インキュベートする。8時間のインキュベーション期間に、上記のようにサンプルを培養試料から採取し、このサンプルを調製し、そしてこのサンプルを核酸

の完全性について分析する。サンプルを処理時前、処理2時間後、処理4時間後、処理6時間後、および処理8時間後に採取する。分析を上記のように行う。簡単には、DNAをこれらのサンプルから抽出する。PCRを用いて、疾患に関連すると疑われる遺伝子座付近の抽出されたDNAを増幅する。1つの正方向プライマーを6つの逆方向プライマーとともに用いる。正方向プライマーを逆方向プライマーからそれぞれ200bp ($F_1 - R_1$)、400bp ($F_1 - R_2$)、800bp ($F_1 - R_3$)、1.3Kb ($F_1 - R_4$)、1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および2.3Kb ($F_1 - R_6$) 離す。増幅後、PCR産物を分離ゲル上で泳動させる。

【0096】

最終点(8時間)において、疾患動物由来の未処理(偽処理)組織試料から得られたサンプルは、すべてではないがせいぜいプライマー塩基対のフラグメント(200bp ($F_1 - R_1$)、400bp ($F_1 - R_2$)、800bp ($F_1 - R_3$)、1.3Kb ($F_1 - R_4$)、1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および2.3Kb ($F_1 - R_6$))(増幅された高い完全性の核酸)に対するバンドを示すと考えられる。正常な動物から得られた、偽処理をほどこした組織試料由来のサンプルは、増幅された高い完全性の核酸を(存在したとしても)ほとんど示さないと考えられる。したがって、400bp ($F_1 - R_2$)、800bp ($F_1 - R_3$)、1.3Kb ($F_1 - R_4$)、1.8Kb ($F_1 - R_5$)、および2.3Kb ($F_1 - R_6$)のフラグメントに対応するバンドは、正常な動物から採取された未処理の組織試料由来のサンプル中には実質的に存在しないと考えられる。さらに特に、200bp ($F_1 - R_1$)に関して、非常に明るいバンドが存在するかまたはまったくバンドが存在しないことが考えられる。そしてこれ以外のバンド(特に、より長いフラグメントに対応するバンド)は存在しないと考えられる。類似のパターンが、正常な動物ゆらいの、候補薬物処理された組織試料から得られたサンプルについても考えられる。

【0097】

今回の場合、種々の塩基対により増幅されたフラグメントを示すバンドのパターンは、高い完全性の核酸のマーカ(つまり、候補薬物活性)として用いられ

る。候補薬物が活性を有する場合、処理された疾患動物の組織試料から採取されたサンプル由来の増幅された高い完全性の核酸のプロフィールは、疾患動物から得られた未処理の組織試料由来のサンプルのプロフィールと異なる。さらに特に、候補薬物が活性を有する場合、疾患動物から得られた未処理の組織試料由来のサンプルと比較して、疾患動物から得られた処理された組織試料由来のサンプルにおいて、より少ないバンドおよび/またはより明るいバンドが見られる。候補薬物の活性が強いほど、観察されるバンドが少なく、そして/または観察されるバンドが明るい。最も強力な活性の候補薬物は、正常な動物から採取された組織試料由来のサンプルのパターンと類似のバンドパターンを生成すると考えられる。さらに、本実験の時間経過の間、本タイムコースに従い処理された疾患動物の組織試料から採取されたサンプルは、候補薬物が活性である場合、観察されるバンドの数および/または強度において変化を示す。予想される結果を以下の表8に示す。

【0098】

【表8】

表8. 増幅された標的で仮定的に予想される結果

	2時間で採取されたサンプル	4時間で採取されたサンプル	6時間で採取されたサンプル	8時間で採取されたサンプル
疾患動物1から得られた組織試料1	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	800bpより大きいバンド(不明)	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド	主に200bpのバンド
疾患動物2から得られた組織試料2	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド
疾患動物3から得られた組織試料3	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む800bpより大きいバンド	800bpより大きいバンド(不明)	最初のサンプル内に存在したのよりも小さい核酸を含む200bpと800bpとの間のバンド	主に200bpのバンド
疾患動物から得られた未処理の組織試料	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在する)最初のサンプルと変わらないバンド
正常な動物から得られた未処理の組織試料	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド
正常な動物から得られた処理された組織試料	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド	(高い完全性の核酸が存在しない)最初のサンプルと変わらないバンド

見込みのある候補薬物は、さらに研究され得る。例えば、種々の濃度の特定の候補薬物を用いて疾患動物から得られた組織試料を処理し、そして上記のように処理されたこれらの組織試料から得られたサンプル中の増幅されたフラグメントのパターンと、未処理の疾患動物由来の組織試料から得られたサンプルから獲得されたパターンおよび正常な動物のパターンを比較することにより、同じ実験を実施し得る。用量反応性についての曲線を作成し、候補薬物活性に対する候補薬物用量の効果を示し得る。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shuber, Anthony
 <120> Apparatus and Methods for Drug Screening
 <130> EXT-042PC
 <150> US 60/169,457
 <151> 1999-12-07
 <160> 11
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> K-ras probe
 <400> 1
 gtggagtatt tgatagtgtta ttaaccttat gtgtgac 37
 <210> 2
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> APC-1309
 <400> 2
 ttccagcagt gtcacagcac cctagaacca aatccag 37
 <210> 3
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> APC-1378
 <400> 3
 cagatagccc tggacaaaca atgccacgaa gcagaag 37
 <210> 4
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> p53 probe
 <400> 4
 tactcccctg ccctcaaca gatgttttgc caactgg 37

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> p53 probe

 <400> 5
 atttcttcca tactactacc catcgacctc tcatc 35

<210> 6
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> p53 probe

 <400> 6
 atgaggccag tgcgccttgg ggagacctgt ggcaage 37

<210> 7
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> p53 probe

 <400> 7
 gaaaggacaa ggggtggttg gagtagatgg agcctgg 37

<210> 8
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> BRCA1 probe

 <400> 8
 gattctgaag aaccaacttt gtccttaact agctctt 37

<210> 9
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> BRCA2 probe

 <400> 9
 ctaagtttga atccatgctt tgctcttctt gattatt 37

```

<210> 10
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> APC1

<400> 10
cagatagccc tggacaaacc atgccaccaa gcagaag          37

<210> 11
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> APC2

<400> 11
gaagttcctg gattttctgt tgctggatgg tagttgc          37

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1Aは、合計30の患者およびコントロール由来の糞便中のDNAの増幅の結果のゲル写真である。バンド強度は、サンプル中の増幅可能なDNAの量に関する。レーンNは、ネガティブコントロールであり、レーン1、3、11および18は、癌または腺腫からの存在を示す患者からの結果であり、レーン2、4、5～10、12～17および19～30は、癌または腺腫の非存在を示す患者からの結果である。得られた結果は、マーカーまたは標準である。

【図1B】

図1Bは、合計30の患者およびコントロール由来の糞便中のDNAの増幅の結果のゲル写真である。バンド強度は、サンプル中の増幅可能なDNAの量に関する。レーンNは、ネガティブコントロールであり、レーン1、3、11および18は、癌または腺腫からの存在を示す患者からの結果であり、レーン2、4、5～10、12～17および19～30は、癌または腺腫の非存在を示す患者からの結果である。得られた結果は、マーカーまたは標準である。

【図2】

図2は、本発明の方法における増幅のためのプライマーの配置の略図を示す。この方法において、単一の順方向プライマーF₁は、一連の逆方向プライマーR

$F_1 \sim R_6$ と組み合わせて使用され、これらは、標的のより長い部分を次第に増幅するために選択される。

【図3】

図3は、本発明の方法における増幅のためのプライマーの配置の略図を示す。この方法において、一連の順方向プライマーおよび逆方向プライマーの対、 $(F_1, R_1) \sim (F_3, R_3)$ は、標的の部分を増幅するために選択されて、標的に沿ってとびとびに配置される。

【図1A】

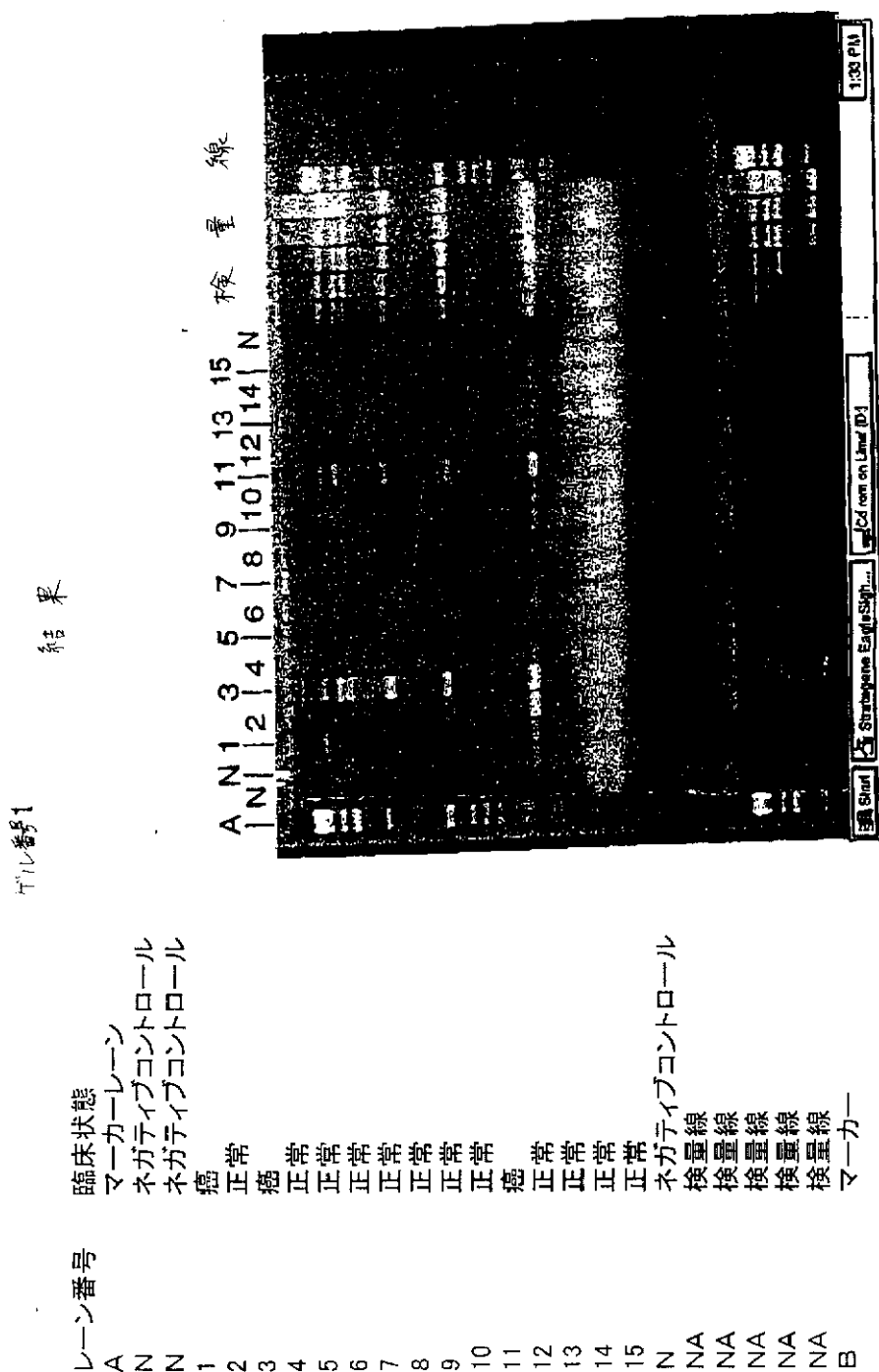


FIG. 1A

【図1B】

ゲル番号2

結果

レーン番号	臨床状態
A	メーカー
N	ネガティブコントロール
N	ネガティブコントロール
16	正常
17	正常
18	正常
19	正常
20	正常
21	正常
22	正常
23	正常
24	正常
25	正常
26	正常
27	正常
28	正常
29	正常
30	正常
N	ネガティブコントロール
NA	検量線
NA	検量線
NA	検量線
NA	検量線
NA	検量線
B	メーカー

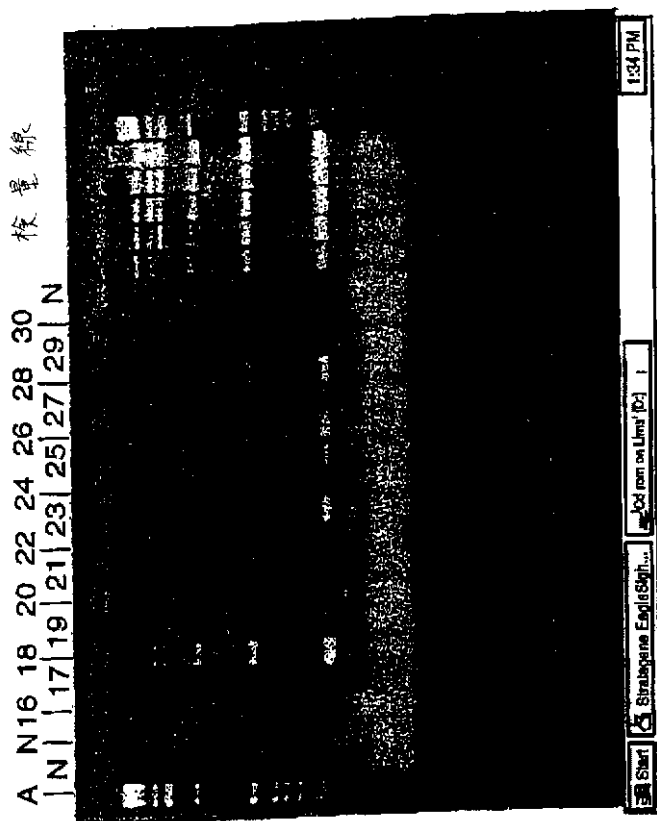


FIG. 1B

【图2】

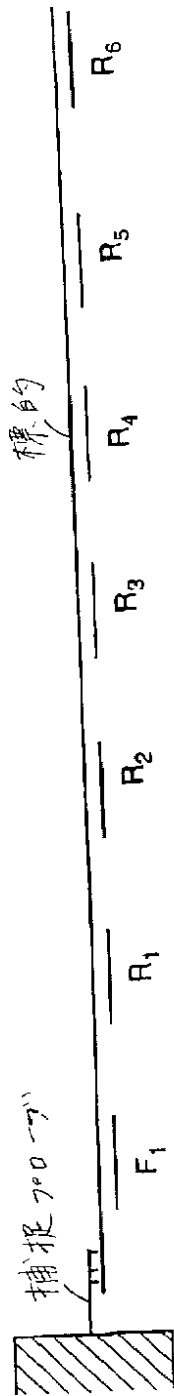


FIG. 2

【図3】

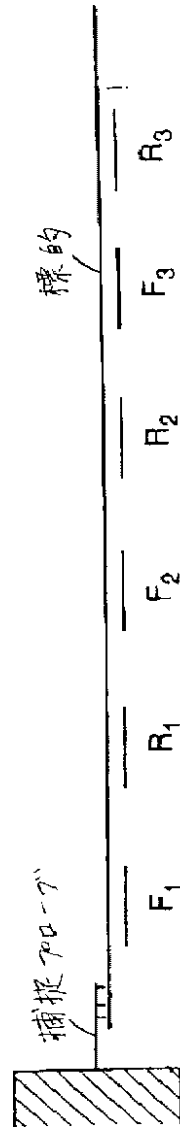


FIG. 3

【手続補正書】**【提出日】**平成14年12月3日(2002.12.3)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**特許請求の範囲**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 薬物活性をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 疾患を有する患者から得られた第1のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；

(b) 該患者を薬物候補で処置する工程；および

(c) 該患者から得られた第2のサンプルにおいて、該完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項2】 前記完全性の高い核酸が約200bpより多くを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記決定する工程が、前記サンプルにおける完全性の高い核酸の存在を決定するために、標的核酸を増幅することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記標的核酸が、1つの順方向プライマーおよび少なくとも2つの逆方向プライマーで増幅される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記標的核酸が、少なくとも2対の順方向プライマーおよび逆方向プライマーで増幅される、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 前記決定する工程が、前記完全性の高い核酸を捕捉することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記完全性の高い核酸が、支持体ベースの相補核酸プローブ上で捕捉される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 請求項1に記載の方法であって、ポジティブスクリーンが、前記第1のサンプルにおける完全性の高い核酸の量に比較して、前記第2のサンプルにおける完全性の高い核酸のより少ない量の存在によって決定される、方法。

【請求項9】 前記サンプルが、糞便、痰、膿、血清、血漿、尿、唾液、初乳、胆汁および腠液からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 ポジティブスクリーンが、前記薬物候補の活性を示す、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 ポジティブスクリーンが、プログラムされた細胞死の誘導を示す、請求項8に記載の方法。

【請求項12】 ポジティブスクリーンが、アポトーシス活性の誘導を示す、請求項8に記載の方法。

【請求項13】 前記薬物候補が核酸を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記薬物候補がペプチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記薬物候補が化合物を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記薬物候補が、抗癌剤のための候補を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】 請求項1に記載の方法であって、薬物候補の活性が、該薬物候補による疾患症状の緩和を予測する、方法。

【請求項18】 請求項1に記載の方法であって、前記サンプルの少なくとも1つが、少なくとも150 mMのEDTAを含む緩衝液中に含まれる、方法。

【請求項19】 薬物活性をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 疾患を有する被験体由来のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；

(b) 該サンプルを薬物候補で処理する工程；および

(c) 該サンプルにおいて、完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項2.0】 前記処理する工程が、エキソピボで行われる、請求項1.9に記載の方法。

【請求項2.1】 前記被験体が、疾患の動物モデルを含む、請求項1.9に記載の方法。

【請求項2.2】 前記サンプルが、少なくとも150mMのEDTAを含む緩衝液中に含まれる、請求項1.9に記載の方法。

【請求項2.3】 薬物活性をスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 疾患の動物モデル由来のサンプルにおいて、完全性の高い核酸の基線レベルを決定する工程；

(b) 該動物モデルを薬物候補で処置する工程；および

(c) 該動物モデルから得られた第2のサンプルにおいて、該完全性の高い核酸が減少されているか否かを決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項2.4】 前記サンプルが、少なくとも150mMのEDTAを含む緩衝液中に含まれる、請求項2.3に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/32387
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EADS CINDY A ET AL: "CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression." CANCER RESEARCH, vol. 59, no. 10, 15 May 1999 (1999-05-15), pages 2302-2306, XP002170143 ISSN: 0008-5472 page 2303, left-hand column -page 2304, left-hand column --- -/--	19, 20
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 2 July 2001		Date of mailing of the international search report 17/07/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Gabriels, J

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/32387
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GIACONA MARY BETH ET AL: "Cell-free DNA in human blood plasma: Length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls." PANCREAS, vol. 17, no. 1, July 1998 (1998-07), pages 89-97, XP000992791 ISSN: 0885-3177 page 89, left-hand column -page 90, left-hand column table 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>US 3 413 464 A (KAMENTSKY LOUIS A) 26 November 1968 (1968-11-26) column 1, line 43 - line 59</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>US 5 882 865 A (KINZLER KENNETH W ET AL) 16 March 1999 (1999-03-16) column 3, line 42 -column 4, line 25; claim 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-26
A	<p>US 5 976 800 A (LAU ALLAN S ET AL) 2 November 1999 (1999-11-02) claims 1,31-34</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/32387

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3413464 A	26-11-1968	BE 678974 A	16-09-1966
		CH 456198 A	15-05-1968
		DE 1598621 A	25-02-1971
		FR 1428836 A	12-05-1966
		FR 1477074 A	26-06-1967
		GB 1080084 A	23-08-1967
		NL 6605547 A	31-10-1966
		SE 327576 B	24-08-1970
US 5882865 A	16-03-1999	US 5897999 A	27-04-1999
		AU 2132697 A	10-10-1997
		CA 2248935 A	25-09-1997
		WO 9734640 A	25-09-1997
		US 6214616 B	10-04-2001
		US 5888735 A	30-03-1999
		US 5879889 A	09-03-1999
US 5976800 A	02-11-1999	AU 3583797 A	21-01-1998
		WO 9800013 A	08-01-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト(参考)				
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/566				
	33/531	C 1 2 N	15/00	Z N A A			
	33/566			A			
F タ-ム(参考)	2G045	AA29	AA40	BB51	CA26	CB03	
		CB04	CB07	CB08	CB17	DA12	
		DA13	DA14	FB02			
	4B024	AA11	CA01	CA09	HA12		
	4B063	QA01	QA18	QQ03	QQ20	QQ42	
		QR32	QR38	QR55	QR82	QS25	
		QS34	QS39	QX01			

专利名称(译)	用于基于核酸分析的药物筛选的装置和方法		
公开(公告)号	JP2003516162A	公开(公告)日	2003-05-13
申请号	JP2001544374	申请日	2000-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	确切的科学公司		
申请(专利权)人(译)	确切的科学公司		
[标]发明人	シュバーアンソニーピー		
发明人	シュバー, アンソニー ピー.		
IPC分类号	G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/531.B G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB51 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/FB02 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01		
优先权	60/169457 1999-12-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过确定样品中高度完整核酸的存在或不存在来筛选药物和候选药物活性的试剂盒和方法。具体地，本发明提供了一种筛选药物活性的方法，其确定了从患有疾病的患者获得的第一样品中的高度完整的核酸的基线水平。用候选药物治疗患者；并在从患者获得的第二个样品中确定高完整性核酸是否已还原。

	48時間で採取したサンプル	1週間で採取したサンプル	2週間で採取したサンプル	4週間で採取したサンプル
患者1	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	800bpより大きいバンドは、見られない	200bp~800bpのバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	主に200bpのバンド
患者2	開始サンプルと差異なし	開始サンプルと差異なし	開始サンプルと差異なし	開始サンプルと差異なし
患者3	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	800bpより大きいバンドは、見られない	200bp~800bpのバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	主に200bpのバンド
患者4	開始サンプルと差異なし	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	800bpより大きいバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない	200bp~800bpのバンドは、開始サンプル中よりも、含まれる量が少ない