

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-528629

(P2010-528629A)

(43) 公表日 平成22年8月26日(2010.8.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
<b>G O 1 N 33/53</b> (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2010-510614 (P2010-510614)	(71) 出願人	508151895 シモンズ ハプロミクス リミテッド SIMONS HAPLOMICS LIMITED
(86) (22) 出願日	平成20年6月6日 (2008.6.6)		
(85) 翻訳文提出日	平成22年1月28日 (2010.1.28)		
(86) 国際出願番号	PCT/AU2008/000808		
(87) 国際公開番号	W02008/148161		
(87) 国際公開日	平成20年12月11日 (2008.12.11)		
(31) 優先権主張番号	2007903074	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(32) 優先日	平成19年6月7日 (2007.6.7)	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子地図作製及びハプロタイプ決定のための現場 ( i n s i t u ) 法

(57) 【要約】

本発明は、被験体の正確なハプロタイプを提供するための現場 ( i n s i t u ) 法に関する。本明細書に記載される方法によって提供されるハプロタイプ情報は、推定ハプロタイプを提供するだけの先行技術の方法によって提供される情報よりも更に正確である。従って本発明はその一側面において、倍数体である被験体の遺伝情報を得るための現場法であって、被験体から ( i ) 少なくとも1個の父系DNA分子及び/又は ( i i ) 少なくとも1個の母系DNA分子を含む生体サンプルを採取する段階と、ヌクレオチド配列情報のために父系DNA分子又は母系DNA分子の中の一以上を解析する段階であって、ある2個のDNAマーカーが1本の染色体上にシスで存在するか、2本の姉妹染色体上にトランスで存在するかを決定する解析段階と、を含む現場法を提供する。F I S H等の現場法の使用は、姉妹染色体の物理的な分離のための方法に頼らない、DNAマーカーの相特異的な情報の提供を可能とする。本出願人は、本方法がハプロタイプ内の二以上の遺伝子座の相に関する不正確な或いは誤解を招く推測の問題を取り除き、遺伝様式の差異によって単純化されるハプロタイプ内の二以上の参加遺伝子を明らかにできることを示す。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

倍数体である被験体の遺伝情報を得るための現場 ( i n s i t u ) 法であって、被験体から

( i ) 少なくとも 1 個の父系 D N A 分子及び / 又は

( i i ) 少なくとも 1 個の母系 D N A 分子

を含む生体サンプルを採取する段階と、ヌクレオチド配列情報のために父系 D N A 分子又は母系 D N A 分子の中の一以上を解析する段階であって、ある 2 個の D N A マーカーが 1 本の染色体上にシス ( c i s ) で存在するか、2 本の姉妹染色体上にトランス ( t r a n s ) で存在するかを決定する解析段階と、を含む現場法。

10

## 【請求項 2】

父系 D N A 分子と母系 D N A 分子の一方又は両方における D N A マーカーの局在が特定できる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

D N A 分子又は関連するタンパク質が二倍体細胞に存在する或いは二倍体細胞から得られる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

二倍体材料が体細胞から得られる、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

マーカーが一塩基変異多型である、請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

配列情報が、情報提供的なオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによって提供される、請求項 1 ~ 5 のうちいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

オリゴヌクレオチドプローブが一塩基変異多型の有無を検出する、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

ヌクレオチド配列情報が対立遺伝子情報を提供する、請求項 1 ~ 7 のうちいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

対立遺伝子情報がコード領域の対立遺伝子に関する、請求項 8 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

遺伝情報が被験体の表現型情報を提供することができる、請求項 1 ~ 11 のうちいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 11】

表現型情報が、疾病、健康状態又は障害の有無；疾病、健康状態又は障害の素因；潜在的な治療分子に応答する能力の有無；異種抗原又は自己抗原に対する免疫応答を備える能力の有無；アレルギーの有無；アレルギー体質；からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は一般に遺伝学の分野に関する。より詳細には、本発明はゲノム地図作製法及び現場 ( i n s i t u ) 法を用いた被験体のハプロタイプを決定するための方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ゲノム地図は、各染色体における遺伝子その他のマーカーの順序と、それらの間隔とを記述するものである。ヒトゲノム地図は種々の異なるスケール或いは解像度レベルで作成される。最も粗い解像度のものは遺伝的連鎖地図であり、これは D N A マーカー ( 遺伝子

50

及び他の同定可能なDNA配列)の染色体上の相対的な位置(マーカーの遺伝パターンによって決定される)を表す。遺伝的連鎖地図は、染色体に沿って特定のDNAマーカーの相対的な位置関係を示している。個体間で異なり実験室で検出可能な、遺伝する物理的乃至分子的特性の全てが遺伝マーカーとしての可能性を有している。マーカーは、発現DNA領域(遺伝子)であっても良いし、或いはコードする機能は知られていないが、その遺伝パターンを追跡することができるDNA断片であっても良い。DNA配列の差異は、量が多く正確に特徴づけることが容易なことから、特に有用なマーカーである。

#### 【0003】

地図作製に有用であるためには、マーカーは多型性でなければならない。即ち、家系調査において異なるメンバー間で検出可能であるために、個体間で代替的な型が存在しなければならない。多型性とは、平均して300~500bp毎に1回生じるDNA配列の変異のことである。エクソン配列内における変異は、眼の色や血液型、罹病性の違い等、観察可能な変化を引き起こし得る。大部分の変異はイントロン内で生じ、生物の外見や機能に殆ど或いは全く影響しないが、DNAレベルでは検出可能でありマーカーとして使用することができる。これらのタイプのマーカーとして、(1)DNA制限酵素で切断可能なDNA部位における配列変異を反映する制限断片長多型(RFLPs)と(2)反復単位の数、従って長さ(容易に測定できる特性である)を異にする短い反復配列であるタンデムリピート配列数が挙げられる。ヒトの遺伝的連鎖地図は、どのような頻度で2個のマーカーが共に遺伝するかを観察することによって作成される。

10

#### 【0004】

同一染色体上に互いに近接して位置する2個のマーカーは、連れ立って親から子供に伝えられる傾向がある。精子細胞と卵細胞の正常な形成において、DNA鎖が切れて同じ染色体の異なる位置又は同じ染色体の異なるコピー(即ち、相同染色体)上で再結合することがある。この過程(減数分裂における組み換え)は、元々同一染色体上に存在した2個のマーカーを分離させてしまう可能性がある。マーカーは互いに近ければ近い程より緊密に連鎖し、マーカー間の組み換えと分離は起こりにくくなる。従って、組み換え頻度によって2個のマーカー間の距離が推測できる。

20

#### 【0005】

遺伝子地図の価値は、例え或る遺伝性疾患の分子基盤がまだ解明されておらず、原因遺伝子も同定されていないとしても、罹患した個体が有している(一方、罹患していない個体は有していない)DNAマーカーの遺伝様式を追跡することによって、地図にその遺伝性疾患の位置を示すことができる点にある。遺伝子地図は、嚢胞性線維症や鎌状赤血球病、テイ・サックス病、脆弱X症候群、筋緊張性ジストロフィー等、種々の重要な疾病遺伝子の、染色体上の正確な位置を知るために用いられてきた。

30

#### 【0006】

ゲノム中の遺伝子機能に影響する遺伝子を同定するための現在のアプローチは、2項目の共通する特徴がある。第一に、非コード配列変異マーカーを用いて、候補遺伝子を含む染色体領域を解明すること、第二に、配列変異マーカーと、対象とする表現型との間の関連を全ゲノム解析によって調べることである。全ゲノム関連解析(連鎖不平衡マッピングとしても知られる)によって遺伝子を見出すことは文献(特許文献1)の主題である。

40

#### 【0007】

ゲノム情報は連鎖研究に有用であるが、ハプローム(haplome)上の情報は、疾病関連遺伝子の機能の明確化において対象ゲノム領域のマーカーを同定するのに、より有用であると考えられている。検討中の形質に対する、遺伝子の第二のコピー(相同染色体上に位置するものとしての)の関与を考慮する必要がないため、ハプローム配列の使用は連鎖研究における誤りを減少させる。

#### 【0008】

2003年、国立衛生研究所からの助成金を受けて国際コンソーシアムが100,000,000米ドルの3カ年プロジェクトを開始した。このプロジェクトは、ハプロタイプに基づいた複雑な疾病におけるマーカー対立遺伝子疾病遺伝子の関連によって遺伝子の発

50

見を容易にするために、ヒトゲノムハプロタイプ地図（「HapMap」と言う）を作成することを目的としたものである。この連鎖不平衡対立遺伝子関連マッピング（関連マッピング）戦略は、互いに関連のない個々の患者に対して行われ、家族が利用できない場合に従来のアプローチである家族（家系）連鎖解析に代わり得る、より新しいアプローチである。

#### 【0009】

HapMapの前提は、二倍体DNAの遺伝子型決定によるハプロタイプ推定によって、全ゲノム遺伝子発見戦略としての展開を保障すべく、関連マッピングが十分に決定されるということである。

#### 【0010】

更なる前提は、4集団（西アフリカのナイジェリア人、日本人、中国人、アメリカ人）から得られた数百人のSNP（一塩基変異多型）解析は、余剰SNPを同定するのに適切であり、従って全ての集団（混合集団を含む）におけるハプロタイプブロックを特徴づけるのに十分な、ハプロタイプをマークする単一SNP又はSNP最小セットを同定するのに適切である、ということである。HapMapコンソーシアムはまた、共通ハプロタイプ（ $>5 \sim 10\%$ ）のみが共通の多重遺伝子性疾患と薬剤反応において重要であり、これら共通ハプロタイプは約200人の調査において同定可能になるだろうと報告している。

#### 【0011】

更なる前提によると、ハプロームは別々の「ブロック」にまとめられ、各ブロックは特定のSNP「タグ」によって同定可能である。遺伝学の分野では現在、HapMapプロジェクトによって明らかにされた最少の基本的SNPを利用することで、疾患遺伝子探索や薬剤作用の薬理ゲノミクスにおける余分のハプロタイプ共有の検出のために、如何なる集団においても十分な共通ハプロタイプを同定できると考えられている。

#### 【0012】

このように現在の技術水準では、HapMapこそが最も信頼でき、連鎖研究の為に十分過ぎる情報を提供可能であるとされている。しかし、HapMapプロジェクトを詳細に検討すると、このプロジェクトで入手できるのはせいぜい限定的な情報だけであろうこと、また多重遺伝子性疾患を見出すことに本プロジェクトを適用しようとしても根本的な不備があり得ることが示唆される。例えば、SNPの同定は、現存するハプロタイプのある割合だけは検出できるが、恐らく共通して生じるハプロタイプの全てでさえ検出できないであろう。非共通ハプロタイプ（HapMapでは検出できないと思われる）もまた、個体間の遺伝子機能の差異に寄与するであろう。

#### 【0013】

前提となるハプローム・ブロック構造もまた、誤りの原因となるかもしれない。組み換えその他の再配列は、「コア」集団の限定的な解析によっては解明されないであろう、混合集団におけるハプロタイプブロック構造に影響することが予想される。

#### 【0014】

推定ハプロタイプの分解能(resolving power)が問題となりうると予想されるのは、異なる遺伝様式（劣性、優性、共優性）の、機能の異なる（罹患しやすくなる、罹患しにくくなる）、病気進行の異なるステージで作用する、2個以上の遺伝子が単一の染色体領域内で生じる場合である。分解能が最も問題となるのは、例えば複合ヘテロ接合劣性疾患において両方の染色体がリスクに寄与する場合であり、また、HLA複合体の遺伝子等、共優性遺伝する遺伝子とシス(cis)だけでなくトランス(trans)の共優性相互作用が起こるところである。これら疑問の重要性は、本技術分野で認識されていない。

#### 【0015】

ハプロタイプ決定関連マッピングの有用性に関する重要な判断基準は、既に家系連鎖解析によって同定された対象遺伝子領域を同定する能力である。重要なテストケースにおいて、関連マッピングはハプロタイプ共有連鎖解析によって同定された上咽頭癌における遺伝的リスク(RR:下限=20~上限=無限大)の6p21.3(HLA)領域を同定できなかった。このことは、本技術分野における別の問題を指摘する。即ち、非コード配列

10

20

30

40

50

に基づく戦略は、ヒトにおけるありふれた癌との最も強い遺伝的関連でさえ、検出するには不十分な分解能しか有していない。

【0016】

多くの疾病は、多重遺伝子性であることが知られているか或いはそのように疑われている。確かに、大部分の疾病は多重遺伝子性であると考えられ、一遺伝子性疾病は例外的であると思われる。先行技術の各種方法においては、多重遺伝子性疾病に關与する遺伝子の同定は、母系の遺伝子型と父系の遺伝子型からなる遺伝子の遺伝パターンのため、複雑なものとなっている。従って、先行技術におけるマッピング法と遺伝子発見法は、遺伝様式が単純で疾病への關与も単純である遺伝子の同定には有用であったが、複雑な疾病における遺伝子關与を解明するための、より強力な方法に対する明確な必要性が存在する。

10

【0017】

或る細胞の半数体構成を調べる為に様々な代替的方法を提供することには利点がある。或る方法が経済性、使用の容易性、正確性、装置の入手・利用可能性という理由等から適切でないときに、それら代替的方法の内の一法を使用できるからである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

【特許文献1】米国特許第5,851,762号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0019】

従って本発明は、その一側面において、先行技術の問題点を克服又は少なくとも緩和しようとするものである。特に本発明は、半数体の情報を用いてより正確に遺伝子をマッピングするための他の方法を提供することを目的とする。

【0020】

本明細書においては様々な文書、活動、材料、機器、物品等が記述されるが、これは単に本発明に文脈を提供する目的のためのものである。これらの事項のいずれも、本願の各請求項の優先日より前に存在したとして、先行技術基準の一部を構成しているとも、また本発明に關連する分野における共通一般知識であったとも示唆するものでなく、また表現するものでもない。

30

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明は、とりわけ被験体の正確なハプロタイプを提供するための現場 (*in situ*) 法に關する。本明細書に記載される方法によってもたらされるハプロタイプ情報は、単に推定ハプロタイプを提供するだけの先行技術の方法によって提供される情報よりも更に正確である。従って本発明はその一側面において、倍数体である被験体の遺伝情報を得るための現場法であって、被験体から (i) 少なくとも1個の父系 DNA 分子及び / 又は (ii) 少なくとも1個の母系 DNA 分子を含む生体サンプルを採取する段階と、ヌクレオチド配列情報のために父系 DNA 分子又は母系 DNA 分子の中の一以上を解析する段階であって、ある2個の DNA マーカーが1本の染色体上にシス (*cis*) で存在するか、2本の姉妹染色体上にトランス (*trans*) で存在するかを決定する解析段階と、を含む現場法を提供する。

40

【0022】

本出願人は、本明細書に記載される現場法の使用は、ハプロタイプ内の二以上の遺伝子座の相に關する不正確な或いは誤解を招く推測の問題を取り除き、遺伝様式の差異によって単純化されるハプロタイプ内の二以上の参加遺伝子 (*participatory genes*) を明らかにできることを示す。本方法においては、厳密なシス相関連の保証は、現場法による母系 DNA と父系 DNA の選択的解析によって提供される。現場法を利用することで、一般病理学研究室や研究所での解析が便利になる。

【0023】

50

本方法の一形態においては、配列情報は対立遺伝子に関する。本方法の他の一形態においては、対立遺伝子はコード配列の対立遺伝子である。

【0024】

本出願人は、ハプロタイプの解明における、最大尤度アルゴリズムの使用と組み合わせた二倍体材料の無差別使用に内在する問題の重要性を認識している。先行技術の方法における誤り(errors)は、多重遺伝子に基づく形質を調査するときに特に問題となることが予想される。

【0025】

二倍体ゲノムやその一部の現場解析は、体細胞等の二倍体細胞で行うことができる。精子細胞や卵細胞等の元々が半数体である材料の使用は、これら生殖細胞を診療所で採取するのは困難なため、避けるべきである。先にシスで連鎖していた遺伝子座がトランス(trans)関連するようになる組み換え現象が時に起こる減数分裂過程を考慮する場合、ハプロタイプ解析において配偶子の使用を避けることは更に有利である。配偶子のハプロタイプ解析は、二倍体細胞から得られる半数体要素とは異なった(即ち、不正確な)ハプロタイプ情報を提供するであろう。

10

【0026】

他の一側面において、本発明は被験体の正確なハプロタイプを決定するための本明細書に記載される現場法の使用を提供する。

【0027】

他の一側面において、本発明は多重遺伝子性の疾病又は形質に関する遺伝子を同定するための方法であって、本明細書に記載される方法の使用を含む方法を提供する。本明細書に記載される現場法によって提供される正確なハプロタイプの提供によって、単一遺伝子の多重遺伝子システムへの関与の解明を混乱させる不確実性が取り除かれる。

20

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明はその一側面において、倍数体である被験体の遺伝情報を得るための現場法であって、被験体から(i)少なくとも1個の父系DNA分子及び/又は(ii)少なくとも1個の母系DNA分子を含む生体サンプルを採取する段階と、ヌクレオチド配列情報のために父系DNA分子又は母系DNA分子の中の一以上を解析する段階であって、ある2個のDNAマーカーが1本の染色体上にシスで存在するか、2本の姉妹染色体上にトランスで存在するかを決定する解析段階と、を含む現場法を提供する。

30

【0029】

本出願人は、上に記される現場法の使用が、ハプロタイプ内の二以上の遺伝子座の相に関する不正確な或いは誤解を招く推測の問題を取り除き、遺伝様式の差異によって単純化されるハプロタイプ内の二以上の参加遺伝子を明らかにできることを示す。更に本方法は、一般病理学研究室や研究所に取り入れられるように修正できる。

【0030】

本発明は、少なくとも部分的に、先行技術のハプロタイプ決定法の改善と、本明細書に記載される正確なハプロタイプ決定法を前提とする。その差異をより良く理解するためには、本技術分野で現在理解されているハプロタイプ概念と、被験体のハプロタイプ決定法について考察することが有益である。

40

【0031】

用語「ハプロタイプ(haplotype)」は、語句「半数体の遺伝子型(haploid genotype)」の短縮であり、現在認められているところによると、通常1個のユニットとして受け継がれる、母系又は父系の染色体の一方に存在する1セットのヌクレオチド配列多型又は対立遺伝子を意味する。ヒト等の二倍体生物の場合、ハプロタイプは遺伝子座の一組の対立遺伝子の一方を含むであろう。

【0032】

先行技術の方法において、ハプロタイプの決定は臨床的に採取するのに便利な二倍体材料の使用から始める。本出願人は、無差別に二倍体材料を用いる、一般に認められた形態

50

のハプロタイプ決定法は不適當であると考え。代替案として元々半数体である材料の使用（例えば精子又は卵から得られる）があるが、これは通常不便であり、女性にとっては特に観血的である。更に、配偶子から得られる配列情報は、減数分裂における交差によって混乱（例えばSNP間のシス相関連が真正であると保証できない）させられる可能性がある。

**【0033】**

二倍体DNAを利用した先行技術のアプローチは、ハプロタイプとしてシス連鎖する遺伝子座の直接的な決定ができないため、ハプロタイプの発生確率は最大尤度や同様のアルゴリズムに基づいた予測値によって推定される。従って、2個の多型がトランス相で存在し、その結果単一のメンデル単位として遺伝してこなかった可能性が常にある。従って先行技術の方法は、「推定ハプロタイプ」を提供するものであると、より正確に記述される。本方法はより厳密には、メンデル遺伝の基本単位を親世代の組み換え部位によって結合する染色体区分として考慮することによる、ハプロタイプの厳密な定義に関連する。

10

**【0034】**

従来当業者は、二倍体出発材料の無差別使用における潜在的に逆方向の結果を考慮しないことが原因の誤りの効果に対して、疑問を持たなかった。従って、集団における形質関連決定の或いは被験体のハプロタイプ決定の問題は認識されてこなかった。対照的に本出願人は、ハプロタイプ決定における最大尤度アルゴリズムの使用と組み合わせた二倍体材料の無差別使用に内在する問題の重要性を認識する。先行技術の方法における誤りは、多重遺伝子に基づく形質の調査の場合に特に問題となることが予想される。

20

**【0035】**

従って、本発明はその一実施形態において、正確な(definitive)ハプロタイプの形で遺伝情報を提供するための方法に関する。本明細書において、用語「正確なハプロタイプ」は、厳密にシス相関連だけがハプロタイプであると考えを意味する。本明細書に記載される方法は、2個の多型が同一DNA分子上に存在するかどうかについていかなる見積もりも推定も含まない。これは、相に関係なく二倍体材料の配列情報をデータベース検索する(HapMapプロジェクトで行われるような)ことによって得られる、上述の先行技術の「推定ハプロタイプ」とは異なる。

**【0036】**

推定の問題はさておき、二倍体細胞の無差別使用は、大きな対立遺伝子ほど特異的に増幅されない、短い対立遺伝子の優位性（「対立遺伝子の欠落」）から生じる更なる複雑性をもたらす。従って、より大きな対立遺伝子の存在は完全に無視され、誤ったハプロタイプ情報が結果として生じる。

30

**【0037】**

本方法では、ハプロタイプ決定における厳密なシス相関連の保証は、父系DNA及び/又は母系DNAの配列情報の選択的な解析によって提供される。

**【0038】**

本現場法は、被験体のゲノム又はその一部において行うことができる。本明細書において、用語「ゲノム」は、被験体の全遺伝物質を意味し、被験体のDNA配列の完全な1セットを含む。ゲノムの「その一部」についての言及は、被験体のゲノムにおける核酸の一部（例えばDNA）を意味する。

40

**【0039】**

ゲノムやその一部は、核酸を含む全ての細胞又は生体サンプルから得ることができる。二倍体細胞からゲノムを得る場合、コルセミド等、当業者に良く知られた誘導剤の添加によって、細胞を中期に誘導しても良い。中期には個々に分離した染色体が現れ、後述するようにハプローム構成要素に切り分けることができる。

**【0040】**

本方法は通常、体細胞の常染色体において行われる。用語「常染色体」は、正常な体細胞又は生殖細胞における、性染色体を除く全ての染色体を意味する。例えば、ヒトでは1~22番染色体が常染色体である。

50

## 【0041】

上で議論したように、精子細胞や卵細胞等、元々が半数体である材料の使用は、診療所でのこれら生殖細胞の採取における問題のために避けるべきである。ハプロタイプ決定において配偶子の使用を避けることは、減数分裂過程において先にシスで連鎖していた遺伝子座がトランス関連するようになる組み換え現象が起こることがあることを考慮すると、更に有利である。配偶子のハプロタイプ解析は、二倍体細胞から得られるハプロタイプ情報とは異なった（即ち不正確な）ハプロタイプ情報を提供するであろう。

## 【0042】

本明細書において、用語「現場（*in situ*）法」は、母系DNAから父系DNAを（逆もまた同じ）物理的に単離することを要求しない全ての方法を含む。現場法は、ある2個のマーカーの相を決定できるように、母系DNAの存在下で父系DNAを（逆もまた同じ）選択的に解析することができる。実際面では、本発明に関連して用いられる方法は、それによってDNA分子が所定のマーカーのためのプローブになることができ、所定の姉妹染色体ペアの一方又は両方とプローブの結合が起こることを示すことができるような、全ての方法であり得る。このように本方法は、2本の姉妹染色体を予め物理的に分離することなく、2個のDNAマーカーがシス（1本の染色体上に）で存在するか或いはトランス（2本の姉妹染色体に亘って分かれて）で存在するかを明らかにすることができる。

10

## 【0043】

現場法の利点は、標準的な病理学研究室や研究所に、より容易に取り入れることができることである。例えば、父方由来染色体と母方由来染色体の物理的な分離を必要とする方法は、マイクロ・マニピュレーターやレーザーカタパルティング顕微鏡等、高価な機器の使用を必要とする。対照的に、現場法は、蛍光顕微鏡等の標準的な機器や技法を用いて行うことができる。

20

## 【0044】

相特異的なヌクレオチド配列情報を提供できる現場法を多くの方法で実行できることを、当業者は理解できるであろう。従って、本発明はいかなる特定の技法にも限定されず、次の方法は単なる一例として考えるべきである。

## 【0045】

本発明の一形態において、本方法は蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）技法を用いて行われる。FISHは、有糸分裂染色体の調製上或いは間期細胞における特定のDNA又はRNA配列を可視化するための、標識核酸配列プローブの使用を言う。核酸プローブ（DNAであれ、RNAであれ）を標識するための一手順は、蛍光分子又は免疫原性のハプテンを結合したヌクレオチド類似体を、ランダムプライム法かニックトランスレーション法のいずれかによって酵素的に取り込む。直接的な化学ラベリングもまた、本発明との関連で有用なプローブを提供することができる。より最近では、ペプチド核酸（PNA）分子が開発されており、これもまた有用なプローブとして用いることができる。

30

## 【0046】

ハイブリダイゼーションの標的は、RNAであっても良いし、変性した一本鎖DNAであっても良い。プローブがその相補的な標的配列とアニーリングするのに十分な時間を置いた後、余分なプローブ分子を洗い流し、ハイブリダイゼーションパターンを蛍光顕微鏡で可視化する。ハプテン標識プローブは、蛍光体結合抗体での検出を必要とすることに留意すべきである。チラミドの使用やローリングサークル増幅法等のシグナル増幅技法は、従来のアプローチではそれまで検出できなかった小さなDNA標的に由来するシグナルの強度を増加するために開発された。

40

## 【0047】

FISH技法のためのプローブは、オリゴヌクレオチド、プラスミド、PNA、コスミド、YAC、BAC或いはライブラリープローブであることができる。一実施形態においては、プローブはPNAである。PNA-FISH法は、Strauss 2002（"

50

PNA - FISH" in FISH Technology. Rautenstrauss / Liehr Eds. Springer Verlag. Heidelberg) に開示されている。技術的には、特に間期 FISH に理想的なプローブは、バックグラウンドが殆どないか或いは全くない状態で強く特異的なシグナルを提供し、約 90% を越える高いハイブリダイゼーション効率を有するべきである。好ましくは、SNP の検出を対象とするプローブが使用される。

## 【0048】

FISH 技法を行うための標準的な方法は、本技術分野において公知である。基本的な FISH 法は次の段階を含むことができる。

## 【0049】

スライド準備

- 1) 70% エタノールでスライドを洗浄する(グリースや埃を取り除く)。
- 2) 数滴のペレットを滴下し、スライドを風乾する。
- 3) スライドを 90 のインキュベーターに 1.5 時間又は 37 で一晩置きエージングする。

## 【0050】

スライド処理

- 1) インキュベーターに 1.5 時間置いた後、スライドを放冷し、次に 150 ~ 200  $\mu$  L の 0.005% ペプシン / 0.001 M HCl を添加し、37 で 15 分間置く。
- 2) 1 x PBS の入ったコップリンジャーに 5 分間置く。
- 3) 固定後洗浄液(post fixation wash)に 5 分間。
- 4) パラフォルムアルデヒド / PBS 洗浄液に 5 分間。
- 5) 1 x PBS に 5 分間。
- 6) エタノールシリーズ 70%、90%、100% に各 5 分間(ハイブリダイズの準備ができるまで、スライドを 100% エタノールに放置することができる)。
- 7) プローブとハイブリダイズする前に、スライドを取り出して完全に風乾する。

## 【0051】

ニクトランスレーション法によるプローブの直接ラベリング

- 10  $\mu$  L DNA
  - 3  $\mu$  L 10 x バッファー
  - 0.6  $\mu$  L dAGC (dUTP / CY - 3 (赤色) の場合) 又は 1.8  $\mu$  L dAGT (FluorX - dCTP (緑色) の場合)
  - 0.3  $\mu$  L dUTP / CY - 3 又は 0.9  $\mu$  L FluorX - dCTP
  - 3  $\mu$  L B - メルカプトエタノール
  - 0.3  $\mu$  L DNA ポリメラーゼ
  - 6  $\mu$  L DNAse (1 : 700  $\mu$  L H<sub>2</sub>O)
- 最終容量が 30  $\mu$  L になるよう、H<sub>2</sub>O を加える。

- 1) 酵素や DNA を含むラベリング混合液を調製した後、これを 16 のウォーターバスに 2 時間置く。
- 2) 2 時間が経過した後、プローブを沈澱させるために適量の標識プローブを取り、新しいエッペンドルフチューブに入れる(約 30  $\mu$  L)。
- 3) 標識プローブに次の試薬を加える。
  - 3  $\mu$  L サケ精子 DNA (SSD)
  - 10  $\mu$  L Cot - 1 DNA (30  $\mu$  L の標識 DNA に対して 10  $\mu$  L の Cot、同様にコスミドに対して 15  $\mu$  L を加える)
  - 1 / 10 容量の NaAC
  - 3 容量の冷 EtOH (100%)

## 【0052】

沈澱

- 1) 沈澱させるために、エッペンドルフチューブを - 80 で 15 分間或いは - 20 で

10

20

30

40

50

少なくとも30分間置く。

2) + 4 で20分間遠心分離する。

3) 上清を取り除き、ペレットを乾燥させる。

4) ハイブリダイゼーション Mixにペレットを再懸濁する。

5) サーモミキサーに置き、室温で10分間混合する。

6) 乾燥させたスライド上にプローブを置く。

7) カバーガラスを置き、ゴムセメントで封をする。

8) Hybrite (Vysis)にスライドを置き、サイクルを開始する。

Hybrite 温度: Melt: 69、2分間

(ヒトのスライド) Hyb: 37、一晚

10

【0053】

多重ハイブリダイゼーション

2種類のプローブを異なる蛍光色素で標識し、同一スライド上でハイブリダイズさせる: CY3-dUTP (赤色)とFluorX-dCTP (緑色)。これらは直接標識プローブなので、容易に使用することができる。

各プローブは個々に標識し、続いて混合して沈澱させる。

例: 30 uLの標識プローブAと、30 uLの標識プローブBと、3 uLのSSDと、(10 uL + 10 uL) 20 uLのCot-1 DNAと、8.3 uL NaAcと、270 uLのEtOH。

【0054】

20

ハイブリダイゼーション後洗浄

・ 0.1 x SSCで57、各5分間で3回洗浄。

・ DAPI (60 mLの2 x SSC、120 uLのDAPI)で5分間。

・ 数滴の抗退色剤DABCOをカバーガラス上に滴下し、スライドとカバーガラスとの間に気泡がないことを確認する。

【0055】

解析

LEICA DMRXA 蛍光顕微鏡で解析する。画像はapplied spectral imaging (ASI) カメラを用いて撮り、FISH view 2.0ソフトウェアで解析することができる。

30

【0056】

当業者であれば、どのような特定用途に対しても、上述のプロトコールを修正適用することができるであろう。

【0057】

本発明において、染色体上の2個のマーカー (例えば、2個のSNP) を対象とするFISHプローブは、被験体の常染色体の中期ストレッチを染色するのに用いることができる。2個のマーカーが一本の染色体上に存在するか (シス) 或いは2本の姉妹染色体上に存在するか (トランス) において、一つの表現型が表されることがわかるであろう。蛍光顕微鏡を用いることによって、2本の関連する姉妹染色体が同定される。2種類のプローブが1本の染色体に結合する場合、マーカーはシスに存在する。これらが異なる染色体 (1本は父系でもう1本は母系) に結合する場合、マーカーはトランスに存在する。この例からわかるように、どちらのマーカーがどちらの染色体上にあるかを知る必要はない。単純に、これらが1本の染色体 (この染色体が父系か母系かに関係なく) 上に存在するか、2本の姉妹染色体 (即ち、1本は父系で1本は母系) に分散するかを決定することが必要である。

40

【0058】

FISH法はまた、高速大量処理のためのマイクロアレイプラットフォームに関連して用いることもできる。DNAマイクロアレイは数千個のサンプルを同時解析することができる。

【0059】

50

本方法を実行するのに適した他の *in situ* 技法は、プライムド *in situ* ラベリングである。この技法は FISH の代替法であり、基本的に単一の特異的プライマーと標識 dUTP / dNTP 溶液を必要とする 1 サイクル PCR である。PRINS 技法は通常、特異的なプライマーと、dNTP と Dig-11-dUTP、DNA ポリメラーゼを用いて、染色体プレパレート上でプライマー伸長反応を行う。PRINS 反応キットはベーリンガーマンハイム (Boehringer Mannheim) から入手できる。下に例示的なプロトコールを記す。

#### 【0060】

反応混合液

10 × ラベリングバッファー 3.0 uL  
 10 × 反応溶液 3.0 uL  
 プライマー 60 ~ 200 pmol  
 Taq DNA ポリメラーゼ 3.0 uL (3 u)  
 30 μL になるように ddH<sub>2</sub>O を加える。

10

#### 【0061】

反応混合液をスライドプレパレートに塗布し、カバーガラスで覆い、ゴムセメントで所定の位置に封入する。ゴムセメントが乾いた後、スライドを PCR ブロック (Hybaid Omni Gene *in situ* Block) に置く。

#### 【0062】

プライマー伸長

プライマー伸長は、1 サイクルの 93 °C、5 分間 (染色体 DNA を変性するため) と、続く 61 °C、30 分間 (プライマーのアニーリングと伸長のため) で起こる。

20

#### 【0063】

シグナルの検出

ゴムセメントとカバーガラスを慎重に取り除き、50 mM NaCl、50 mM EDTA で 60 °C、3 分間穏やかにスライドを浸して伸長反応を停止させる。シグナルの検出は、Hirai, H. and Lo Verde, P. T. (1995) "FISH techniques for constructing physical maps on Schistosoma Chromosomes." *Parasitology Today* 11 (8), 310 ~ 314 に記載の技法に従う。即ち次の通りである。

30

#### 【0064】

- 1) BN バッファー (0.1 M 重炭酸ナトリウム、0.1% Nonidet P-40) 50 mL に 10 分間浸す。
- 2) ブロッキングバッファー (5% 脱脂乳、BN バッファー中) 50 mL に 10 分間浸す。
- 3) 抗ジゴキシゲニン - フルオレセイン結合体 (ベーリンガーマンハイム) (800 ng、ブロッキングバッファー中) 50 mL に浸し、37 °C で 30 分間暗所でインキュベートする。
- 4) 過剰量の BN バッファーでシェイカーを用いて室温で洗浄し、結合していない結合体を除去する。
- 5) ヨウ化プロピジウム (30 ng/mL) と DAPI (30 ng/mL) を含む 20 μL の抗退色溶液をマウントし、染色体を対比染色する。
- 6) カバーガラスで覆って余分なマウント液を除去し、観察する。

40

#### 【0065】

本明細書における用語「ヌクレオチド配列情報」が、染色体上の 2 個以上のマーカーに関する情報を含むことを意図していることは理解されるであろう。マーカーは単一のヌクレオチド (例えば、SNP) であっても良いし、或いは隣接する複数のヌクレオチド、不連続の複数のヌクレオチドであっても良い。

#### 【0066】

「配列情報の獲得」は、核酸分子のヌクレオチド配列決定のための、当業者に知られた

50

全ての現場法を含むことが意図されている。本明細書において、用語「核酸」は二本鎖核酸分子のどちらか一方の或いは両方の鎖を包含し、損傷していない核酸分子のあらゆる断片又はその一部を含む。また、DNAとRNAの両方を含む。例えば配列情報は、情報提供的なオリゴヌクレオチドプローブの結合（或いは非結合）によって得ることができる。配列情報の獲得は通常SNPの同定を含み、当業者は如何なるSNPをも検出することができるプローブを設計できるであろう。通常、プローブは多型部位がプローブの中央とハイブリダイズするよう設計された、約25ヌクレオチドの長さを有するであろう。

【0067】

DNAは、実質的に全ての組織源（純粋な赤血球を除く）から得ることができる。例えば便利な組織サンプルは、全血、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、頬、皮膚及び毛髪を含む。

10

【0068】

DNA増幅（例えばPCR）を含む方法を、本発明において使用することができる。例えば、母系DNA又は父系DNAに特異的なプライマーを、姉妹染色体ペアの一方又は両方の領域を選択的に増幅するために使用することができる。続いてPCR産物をシーケンシングしてこの領域上の情報を得るが、その情報は母系、或いは父系、の染色体に由来する情報であるとわかっている。

【0069】

適切なプライマーを用いたPCR等、当業者に知られたあらゆる適切な方法によって、DNAを解析用に調製することができる。ゲノム全体を解析するのが望ましい場合、全ゲノム増幅（WGA）法を使用することができる。例えば、後期細胞は2個のハプロームの可視化を可能にする処理をすることができ、その後WGAを行うことができる。この方法のために、シグマアルドリッチ社（Sigma-Aldrich Corp）（セントルイス、ミズーリ州、米国）製造のGenoplexR Complete WGAキット等の市販のキットを容易に使用することができる。このキットは、ゲノムを一組のテンプレートにするランダムな断片化に基づく。その結果生じるより短いDNA鎖から、確定した3'末端と5'末端を有するDNA断片のライブラリーを作製する。ライブラリーを、初期段階での直線的な等温増幅、続いて限定的なサイクルの幾何級数的（PCR）増幅を用いて複製する。

20

【0070】

DNAのPCR増幅のために様々な戦略を利用できる。これらは、Kleinら（PNAS 96（8）：4494～4499，Apr. 13，1999）に記載される方法を含み、この方法は（1）完全で偏りのない全ゲノム増幅と、（2）数十～数百の遺伝子座を増幅できる可能性を提供する。

30

【0071】

mRNAサンプルもまた多くの場合増幅の対象である。この場合通常、増幅に先立って逆転写を行う。全ての発現するmRNAの増幅は、国際公開第96/14839号や国際公開第97/01603号に記載される通りに行うことができる。サンプルを採取する被験体が、発現mRNA内で生じる多型部位においてヘテロ接合体である場合、二倍体サンプルから得られるRNAサンプルの増幅は、2種の標的分子を生じる。

40

【0072】

ヌクレオチド多型を同定する便利な一方法は、マイクロアレイ技術の使用によるものである。本発明におけるこの形態の具体例は、AffymetrixRによって販売されるGeneChipR技術に見出される。この技術は、5"×5"石英基板を、基板とDNAプローブの第一のヌクレオチドとの間の結合を阻害する光感受性化合物で覆うことによる、フォトリソグラフィプロセスに依存する。基板表面上の特定の位置において光を遮蔽或いは透過するために、リソグラフィマスクを用いる。続いて、アデニン、チミン、シトシン、グアニンのいずれかを含む溶液を表面に流すと、照明によって脱保護されたガラス上の領域のみで結合が起こる。結合ヌクレオチドはまた光感受性の保護基を生じ、従ってこのサイクルを繰り返すことができる。プローブを固定化する他の方法は、Oxford

50

Gene Technology (オックスフォード、英国) や、Agilent Technologies (パロアルト、カリフォルニア州、米国)、Nimblegen Systems Inc (マディソン、ウィスコンシン州、米国) 等、多くの会社によって提供されている。

【0073】

被験体の両ハプロタイプの情報を提供できるように設計されたプローブは、単一のマイクロアレイチップ上に組み込み得ることが予想される。プローブは、父系のハプロタイプ情報のある1タイプの蛍光タグによって標識することができ、一方母系のハプロタイプ情報を別のタグで標識することができなければならない。

【0074】

本発明の一形態において、2個以上の多型はコード配列の対立遺伝子の一部である。本方法を用いれば、余分な対立遺伝子共有を示すことで、遺伝子と形質との間の関連を表すことができる。本発明において、用語「対立遺伝子」はコード領域に関する遺伝的変異を言い、所定の遺伝子の代わりとなる型を含む。本明細書において、用語「対立遺伝子共有」は、個体群における対立遺伝子の存在(又は共有)の概念を言う。対立遺伝子共有の存在と範囲は、当業者に利用可能な数多くの統計ソフトウェアパッケージのいずれか一種を用いることによって見出すことができる。コード配列の対立遺伝子の使用は、コードハプロタイプの間接的な表示のための非コード配列変異(例えば、SNPやSTR)のHapMap使用とは異なる。HapMapによるこの間接的なアプローチは、集団のハプロタイプ多様性のSNP表示性や、ハプロタイプブロック長、連鎖不平衡、相に固有の不確実性を有する。

【0075】

本方法はまた、対立遺伝子に関連する従来知られてこなかった複雑性レベルを解明する。本明細書の他の部分で議論される通り、組み換えによってあらゆる2領域がシス又はトランスで存在できるように領域を類別できることを考えると、染色体のあらゆる2領域の相は重要である。従って本出願人は、染色体上に存在する対立遺伝子が実際に、1領域は父親側が寄与し他の領域は母親側が寄与するハイブリッド型対立遺伝子であるところの、トランス型対立遺伝子の存在を予測する。このようなトランス型対立遺伝子の存在は、本技術分野ではまだ認識されておらず、対立遺伝子形成の洞察を提供するかもしれない、或いは新規の対立遺伝子の発見又は新規の対立遺伝子の予測法をもたらすかもしれない。

【0076】

相の重要性はまた、遺伝子調節領域(即ち、5'上流配列と3'下流配列)にまで広がる。組み換えは、片親側からの5'調節領域ともう一方の親側からの3'調節領域の並列の原因となるであろうことが予測できる。このような調節領域の再連合の実際的結果として、これら領域の調節下の遺伝子の発現が著しく影響する可能性がある。

【0077】

他の一側面において、本発明は被験体の正確なハプロタイプ決定のための、父系DNAと母系DNAの選択的解析を提供する。

【0078】

他の一側面において、本発明は多重遺伝子性の疾病又は形質に関わる遺伝子を同定するための方法であって、本明細書に記載される方法の使用を含む方法を提供する。ハプロタイプ決定のための本方法が推定に基づくと仮定するならば、多重遺伝子性の疾病又は形質におけるあらゆる所定の遺伝子の役割を調査するのは、不可能ではないにしても非常に難しい。本明細書に記載される通りの正確なハプロタイプの提供は、多重遺伝子システムにおける単一遺伝子の関与の説明を混乱させる不確実性を取り除く。

【0079】

本発明が多くの用途を有するであろうことは、当業者には明らかであろう。本発明はその一実施形態において、本明細書に記載される方法の、一遺伝子性の疾病又は表現型に関わる遺伝子の同定のための使用を提供する。更なる一実施形態においては、本明細書に記載される方法の、多重遺伝子性の疾病又は表現型に関わる遺伝子の同定のための使用を提

10

20

30

40

50

供する。正確なハプロタイプの提供はまた、組織移植におけるより近いドナーとレシピエントのマッチングを可能にする。

【0080】

本発明はいかなる被験体にも適用することができる。被験体はヒトであっても良いし、ウマ科、ウシ亜科、ヤギ、ヒツジ、イヌ科、ネコ科、ブタであっても良い。植物等の生物もまた適切であることを、当業者は理解するであろう。数種の生物（例えば数種の植物と甲殻類）は倍数体であり、各細胞に3本以上の相同染色体が存在するという紛らわしい問題が関わる場合、本発明は更に大きい利点を有することが予想される。

【0081】

更なる一側面において、本発明は薬剤反応に関わる遺伝子の同定における、本明細書に記載される方法の使用を提供する。薬理ゲノム学は、個体の遺伝形質がどのように身体の薬剤反応に影響するかの研究である。薬理ゲノム学の基本は、薬剤を個人の遺伝子構造に適合するよう、個人用にオーダーメイドすることができることである。環境や食事、年齢、生活習慣、健康状態が個人の薬剤反応に影響する可能性はあるが、個人の遺伝子構造の理解は、より優れた効能と安全性を有する個人向け薬剤を作製するために重要であると考えられる。

10

【0082】

本発明を使用することによって、遺伝子と疾病に関連するタンパク質、酵素、RNA分子に基づいた創薬が可能であるかもしれない。これは創薬を容易にし、更に特定の疾病を標的にした治療を研究者によって実現させることができる。この正確性は治療効果を最大化させるだけでなく、周囲の健全な細胞へのダメージを減少させる。

20

【0083】

患者と正しい薬剤を適合させる標準的な試行錯誤法に代わって、臨床医学者は患者の遺伝的プロファイルを解析し、治療開始時から最も有効な薬剤治療を処方することができる。患者のための正しい薬剤同定から当て推量を取り除くだけでなく、このことは回復時間を速め、安全性（例えば、拒絶反応をなくす可能性）を高めるであろう。薬理ゲノム学は、米国で医薬品副作用の結果生じる年間推定100,000人の死亡と2百万人の入院を劇的に減少させる可能性を有する。

【0084】

本発明の実行による一結果は、適切な投薬量を決定するための、より正確な方法であり得る。体重と年齢に基づいて投薬量を決定する現在行われている方法は、患者の遺伝的特徴に基づいた投薬量に取って代わられるであろう。正確な遺伝的プロファイルは、例えば身体がどのように薬剤を代謝するか、従ってそれを代謝するのにかかる時間の目安を提供することができる。このことは治療の重要性を最大化し、過剰摂取の可能性をも減らすであろう。

30

【0085】

本発明の実行による他の一結果は、改善された疾病検診方法であり得る。個体の遺伝的プロファイルを知ることによって、1種以上の罹病性を同定できる。罹病性の知識は、初期段階で個人を適切な生活習慣や環境に変えさせ、遺伝的疾患の重症度をなくす或いは減らすことができる。同様に特定の罹病性の予備知識は、個人を注意深く観察させ、治療を最適化するために最も適切な段階で処置を導入することができる。

40

【0086】

本発明の実行による更なる一結果は、改善されたワクチンであり得る。DNAであれRNAであれ、遺伝物質で作製されたワクチンは、リスクの全くない既存のワクチンの利益を約束する。遺伝的ワクチンは免疫系を活性化するが、感染の原因とはならないであろう。これらは安価で、安定し、保存が容易で、数株の病原体を同時に運ぶよう設計することができる。

【0087】

本発明はまた、創薬と承認審査方式を改善するために使用することができる。製薬会社は、ゲノム標的を用いることでより容易に潜在的な治療を発見することができるであろう

50

。先に失格であった薬剤候補は、それらが働くニッチ集団と適合するとして復活するかもしれない。医薬品承認審査方式は、より大きな成功を提供する特定の遺伝的集団群を標的に試験することによって容易となるべきである。臨床試験のコストとリスクは、薬剤に反応することができる個人だけを標的にすることによって減少するであろう。

【0088】

従って、本発明による正確な遺伝情報の提供は、薬剤の副作用の数、医薬品試験の失敗の数、医薬品の規制認可を達成するのにかかる時間、患者が薬物治療を受ける時間の長さ、効果的な治療を同定するために患者が受けなければならない薬物治療の数、身体における疾病の影響（早期検出によって）の減少と、可能性のある薬剤標的範囲の増加をもたらすことができる。これらの利点は、保険医療費の純減少をもたらすことができる。

10

【0089】

上で述べた通り、本発明の方法はまた、個体を疾病に罹り易くする（単一又は複数の）遺伝子の同定に有用であり得る。糖尿病等の多重遺伝子性疾病の場合、特にその通りである。例えば、その不完全なコピーを有する人々が2型糖尿病に3倍罹り易くなる、主要な糖尿病罹病性遺伝子が発見された。カルパイン-10（プロテアーゼ）遺伝子におけるSNPは、2型糖尿病に関連することが知られている。この関連は、この疾病に罹り易いメキシコ系アメリカ人で示された。この集団から得られたDNAサンプルをシーケンスし、この配列の統計解析を行うことによって、これらメキシコ系アメリカ人がインスリン抵抗性を有し、カルパイン-10遺伝子発現レベルの減少を示すことが分かった。本発明は、遺伝子/疾病関連のより簡単な検出を可能にし、喘息や統合失調症、アルツハイマー病等の他の遺伝的に複雑な疾患の遺伝的基盤の同定を容易にするであろう。

20

【0090】

他の一側面において、本発明は薬剤又は遺伝子治療のための遺伝子標的（又はタンパク質標的）を同定する方法の使用を提供する。本発明の実施によって得られる疾病の遺伝的基盤の知識は、医薬品設計と遺伝子治療のための有効な標的を提供する。例えば、（単一又は複数の）遺伝子が疾病と関連を有することが同定されれば、この遺伝子の活性を抑制或いは促進することで治療成果を提供できる。或いはこの遺伝子のタンパク質産物は、結合してタンパク質活性を調節できる各種実体物のスクリーニングアッセイの基礎を形成することができる。更に、タンパク質の三次元構造を作成できる場合、合理的な医薬品設計を行うことが可能である。

30

【0091】

他の一側面において、本発明は疾病素因を有する個体を同定するための、本明細書に記載される方法の使用を提供する。本方法の使用によって遺伝子が特定の疾病と関連を有することが同定されれば、当業者はその遺伝子の欠損型の選別検定を設計することができるであろう。特定の疾病リスクがある個人の同定は、薬物治療や生活習慣の変化等の予防措置を取らせるであろう。

【0092】

更なる一側面において、本発明は環境刺激応答素因を有する個体を同定するための方法の使用を提供する。この使用例において、様々な物質のアレルギーを有する個人を同定することができる。或る一部の個体においては、アレルゲンの応答（例えば、ピーナッツや蜂毒における）は、潜在的に致命的なアナフィラキシー反応の原因となる可能性がある。特に敏感な個体を同定することで、脱感作処置を取ることができる。

40

【0093】

最後に、本明細書に概説される本発明の精神から逸脱することなく、他の様々な修正及び/又は変更を施すことも可能であると理解するべきである。

【0094】

本願に基づいて或いは優先権を主張して、今後、特許出願がオーストラリア又は外国で提出される可能性が存在する。付帯する暫定的請求項は、単なる例として提供されたものであり、これら将来の出願において請求される可能性のある如何なる範囲をも限定する意図のないことを理解するべきである。後日、発明を更に定義或いは再定義するためにこれ

50

ら暫定的請求項に特徴を追加したり或いはこれらから削除することがありうる。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/AU2008/000808</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl. <b>C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>WPI, EPODOC: Keywords (haplotype, paternal, marker) and like terms; CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS: Keywords (haplotype, paternal, marker, in situ) and like terms</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 1999/028507 A1 (EXACT LABORATORIES INC) 10 June 1999  See whole document, but particularly page 1, line 26 – page 2, line 7; page 4, lines 3-12; page 5, lines 20-26; page 6, lines 14-18; page 8, lines 3-7; page 11, line 14 – page 13, line 2; page 15, lines 23-27; page 16, lines 11-20; claim 1.	1-11
X	US 2004/0137470 A1 (DHALLAN) 15 July 2004  See whole document, but particularly examples; claims 1, 6, 28 and 56; paragraphs [0036], [0041]-[0043], [0045]-[0049], [0068], [0074], [0081], [0117], [0193], [0380], [0384], [0426].	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search <b>1 August 2008</b>		Date of mailing of the international search report <b>05 AUG 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer <b>Julie Christie</b> AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2616

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2008/000808

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	WO 2007/057647 A1 (LONDON BRIDGE FERTILITY, GYNAECOLOGY AND GENETICS CENTRE LIMITED) 24 May 2007	
X	See whole document, but particularly abstract; page 3, line 35 – page 4, line 10; page 7, lines 11-14; page 8, lines 23-30; page 12, line 17 – page 13, line 25; page 15, lines 10-18; page 19, lines 12-24; examples 3 and 5; claims 1-30.	1-11
	WO 1999/043851 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, CORK) 2 September 1999	
X	See whole document, but particularly page 8, lines 14-18; page 10, lines 24-31; page 12, line 23 – page 13, line 2; page 19, line 9 – page 22, line 24; claims 2 and 17.	1-11
	WO 2007/062164 A2 (GENE SECURITY NETWORK LLC) 31 May 2007	
X	See whole document, but particularly page 17, line 29 – page 18, line 14; page 18, lines 20-25; page 26, lines 23-32; page 30, lines 16-29; page 47, lines 16-28; page 91, line 9 – page 93, line 25; page 124, line 21 – page 128, line 3; claims 1-13.	1-11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2008/000808

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO 1999/028507	AU 14307/97	AU 18019/99	AU 39189/00		
	CA 2211702	CA 2313014	CA 2331254		
	CA 2369045	EP 0815263	EP 1034307		
	EP 1086247	EP 1185693	US 5670325		
	US 5928870	US 6020137	US 6100029		
	US 6143529	US 6146828	US 6203993		
	US 6214558	US 6300077	US 2002004201		
	US 2002119469	WO 0058514	WO 9723651		
	WO 9966077				
US 2004/137470	AU 2003217826	AU 2003225634	AU 2003268333		
	BR PI0308134	BR PI0308161	CA 2477611		
	CA 2477761	CA 2517017	CN 1650031		
	CN 1650032	EP 1481092	EP 1481097		
	EP 1601785	EP 1601793	MX PA04008472		
	MX PA04008477	MX PA05009140	NZ 535045		
	US 6977162	US 7208274	US 7332277		
	US 2003186239	US 2004106102	US 2005260656		
	US 2006121452	US 2006160105	US 2007122835		
	US 2007178478	US 2007196842	WO 03074723		
	WO 03074740	WO 2004078994	WO 2004079011		
	WO 2007075836				
	WO 2007/057647	NONE			
WO 1999/043851	AU 26363/99	AU 2003231618	CA 2321223		
	EP 1056886	NO 20004222			
WO 2007/062164	US 2007027636	US 2007178501	US 2007184467		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74)代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 シモンズ, マルコム, ジェームス

オーストラリア 3 2 1 5 ヴィクトリア, ベル ポスト ヒル, ネイル ストリート, 4 5

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA20 HA14

4B063 QA01 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	用于遗传作图和单倍型测定的原位方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010528629A</a>	公开(公告)日	2010-08-26
申请号	JP2010510614	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	SIMONS HAPLOMICS		
申请(专利权)人(译)	西蒙斯Hapuromikusu有限公司		
[标]发明人	シモンズマルコムジェームス		
发明人	シモンズ,マルコム,ジェームス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6841 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2007903074 2007-06-07 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及用于提供受试者的准确单倍型的原位方法。由本文描述的方法提供的单倍型信息比仅提供推定的单倍型的现有技术方法提供的信息更准确。因此，在它的的一个方面，本发明中，用于获得对象的遗传信息的字段的方法是多倍体，至少一个从所述对象 (i) 至少一个父源DNA分子和/或 (ii) 母体DNA分子;分析一个或多个父本DNA分子或母体DNA分子的核苷酸序列信息，其中两个DNA标记存在于一个并且用于确定染色体是否存在于染色体上或存在于两个姐妹染色体上的变换体中的分析步骤。使用诸如FISH的原位方法使得可以提供不依赖于姐妹染色体的物理分离方法的DNA标记的相特异性信息。申请人的方法去除不准确或误导性的猜测单倍型内发出两个或多个位点阶段，单倍型中的两个或多个参与者的基因是由遗传的差异简化它清楚地显示了你可以做什么。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2008/000808
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <i>C12Q 1/68 (2006.01)</i> <i>G01N 33/50 (2006.01)</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPODOC; Keywords (haplotype, paternal, marker) and like terms; CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS; Keywords (haplotype, paternal, marker, in situ) and like terms		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 1999/028507 A1 (EXACT LABORATORIES INC) 10 June 1999 See whole document, but particularly page 1, line 26 - page 2, line 7; page 4, lines 3-12; page 5, lines 20-26; page 6, lines 14-18; page 8, lines 3-7; page 11, line 14 - page 13, line 2; page 15, lines 23-27; page 16, lines 11-20; claim 1. US 2004/0137470 A1 (DHALLAN) 15 July 2004	1-11
X	See whole document, but particularly examples; claims 1, 6, 28 and 56; paragraphs [0036], [0041]-[0043], [0045]-[0049], [0068], [0074], [0081], [0117], [0193], [0380], [0384], [0426].	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance; "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date; "L" document which may have priority (date(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other prior art (as specified) 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; "I" later document published after the international filing date or priority date and not to 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 combinations being obvious to a person skilled in the art; "d" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 August 2008		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2008
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WOODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999		Authorized officer JIMIE CRYSTIE AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No.: +61 2 6283 2616