

(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2004-531271

(P2004-531271A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int. Cl.⁷

C12Q 1/68

C12N 15/09

F I

C12Q 1/68

C12N 15/00

Z N A A

A

テーマコード (参考)

4B024

4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 88 頁)

(21) 出願番号 特願2003-507300 (P2003-507300)
 (86) (22) 出願日 平成14年6月21日 (2002.6.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年12月22日 (2003.12.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/019764
 (87) 国際公開番号 W02003/000919
 (87) 国際公開日 平成15年1月3日 (2003.1.3)
 (31) 優先権主張番号 60/300,266
 (32) 優先日 平成13年6月22日 (2001.6.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503469382
 ユニバーシティ オブ ジュネーブ
 スイス国, シーエイチー1211 ジュネ
 ーブ 4, リュ デゥ ジェネラルーデュ
 フール, 24
 (74) 代理人 100090941
 弁理士 藤野 清也
 (74) 代理人 100076244
 弁理士 藤野 清規
 (74) 代理人 100113837
 弁理士 吉見 京子
 (74) 代理人 100127421
 弁理士 後藤 さなえ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 染色体不均衡により引き起こされる疾患を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、増幅反応において内部対照としてパラロガスな遺伝子を使用することにより染色体異常の存在を検出する一般的な方法を提供する。上記方法は、迅速で、ハイスループットであり、かつ半自動解析しやすい。一態様では、上記方法は、PCRのような増幅反応で使用される条件下でパラロガスな遺伝子セットそれぞれに特異的にハイブリダイズすることができるプライマー対を供給することを含む。パラロガスな遺伝子は、好ましくは異なる染色体上に存在するが、同じ染色体上にも存在し得る（例えば、異なる染色体アームの損出または獲得を検出するため）。生成された増幅産物の量を比較することにより、各遺伝子の相対用量が確定され、遺伝子が位置する各染色体領域および/または各染色体の相対用量と相関され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体からの核酸試料を用意すること、
第 1 の染色体位置にある第 1 の配列を増幅して、第 1 の増幅産物を生産すること、
第 2 の染色体位置にある第 2 の配列を増幅して、第 2 の増幅産物を生産すること、
なお、前記第 1 および第 2 の増幅産物は、約 80 % を上回る配列同一性を含み、かつ少なくとも 1 つのヌクレオチド位置で少なくとも 1 つのヌクレオチド差異を含み、かつ、
前記第 1 および第 2 の増幅産物の比を確定すること、
ここで 1 : 1 ではない比は染色体不均衡の危険性を示すこと
を含む、

10

染色体不均衡の危険性を検出する方法。

【請求項 2】

前記増幅は PCR を用いて実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 および第 2 の配列は単一のプライマー対を用いて増幅される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 および第 2 の染色体位置は異なる染色体上に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 および第 2 の配列はパラログな配列である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記第 1 および第 2 の増幅産物は同じヌクレオチド長数である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 の増幅産物において前記少なくとも 1 つのヌクレオチド位置にある第 1 のヌクレオチドを同定すること、および
前記第 2 の増幅産物において前記少なくとも 1 つのヌクレオチド位置にある第 2 のヌクレオチドを同定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記同定することは前記第 1 および第 2 の増幅産物をシーケンシングすることにより実施される、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記シーケンシングが、Pyrosequencing (登録商標) である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料中の前記少なくとも 1 つのヌクレオチド位置にある前記第 1 および第 2 のヌクレオチドの量を確定することをさらに含み、前記第 1 および第 2 のヌクレオチドの比は前記試料中の前記第 1 および第 2 の配列の存在量 (dose) に比例する、請求項 7, 8, 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

同一ヌクレオチドを含む前記第 1 および前記第 2 の増幅産物においてヌクレオチド位置にあるヌクレオチドの量を確定する工程をさらに含む、請求項 7, 8, 9 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 12】

前記染色体不均衡はトリソミーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記トリソミーは 21 トリソミーである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記染色体不均衡はモノソミーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記染色体不均衡は重複である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記染色体不均衡は欠失である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記プライマーは結合対の第 2 の成員が結合されている固体支持体に結合するための結合対の第 1 の成員と連結され、前記第 2 の成員は前記第 1 の成員に特異的に結合することが可能である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 2 の成員を含む前記固体支持体を用意すること、および前記第 1 の成員を含む前記プライマーを前記支持体に結合することをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記結合することが、前記増幅に先立って実施される、請求項 17 に記載の方法。 10

【請求項 20】

前記結合することが、前記増幅の後に実施される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 1 の配列は S I M 1 の配列を含み、前記第 2 の配列は S I M 2 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記プライマー対は S I M A F (G C A G T G G C T A C T T G A A G A T) および S I M A R (T C T C G G T G A T G G C A C T G G) を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 23】

前記試料は少なくとも 1 つの胎児細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 24】

前記試料は体細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 1 の配列は G A B P A パラログの配列を含み、前記第 2 の配列は G A B P A の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 G A B P A パラログは図 3 に示す配列を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記プライマー対は G A B P A F (C T T A C T G A T A A G G A C G C T C) および G A B P A R (C T C A T A G T T C A T C G T A G G C T) を含む、請求項 3 に記載の方法。 30

【請求項 28】

前記第 1 の配列は C C T 8 パラログの配列を含み、前記第 2 の配列は C C T 8 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 C C T 8 パラログは図 4 に示す配列を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記プライマー対は C C T 8 F (A T G A G A T T C T T C C T A A T T T G) および C C T 8 R (G G T A A T G A A G T A T T T C T G G) を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 2 の配列は C 2 1 0 R F 1 9 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 32】

前記第 2 の配列は D S C R 3 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 2 の配列は K I A A 0 9 5 8 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 2 の配列は T T C 3 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 2 の配列は I T S N 1 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 1 の配列は R A P 2 A パラログの配列を含み、前記第 2 の配列は R A P 2 A 配列の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 37】

前記 R A P 2 A パラログは図 5 に示す配列を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記第 1 の配列は C D K 8 パラログの配列を含み、前記第 2 の配列は C D K 8 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 C D K 8 パラログは図 7 に示す配列を含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記第 1 の配列は A C A A 2 パラログの配列を含み、前記第 2 の配列は A C A A 2 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 41】

前記 A C A A 2 パラログは図 8 に示す配列を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記第 1 の配列は M E 2 パラログの配列を含み、前記第 2 の配列は M E 2 の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 43】

前記 M E 2 パラログは図 6 に示す配列を含む、請求項 42 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、染色体不均衡により引き起こされる疾患を検出する方法に関する。

【関連出願】

【0002】

本出願は、2001年6月22日に出願された米国特許出願第60/300,266号を基に優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

胎児における染色体異常は、典型的には染色体の誤整列 (misalignment) および不分離 (non-disjunction) により引き起こされる減数分裂中の異常染色体分離事象に起因する。性染色体不均衡は生存度 (viability) を損なわず、思春期まで診断されない場合がある一方で、常染色体不均衡は胎児に壊滅的な影響を与え得る。例えば、常染色体モノソミーおよびたいていのトリソミーは妊娠初期に死をもたらす (例えば、非特許文献 1 参照)。

【0004】

いくつかのトリソミーには出産 (term) まで生存するものもあるが、重度の発達障害を伴う。21トリソミーは、ダウン症候群に関連し (非特許文献 2)、民族集団すべてにおける精神遅滞の最も一般的な原因であり、700人の出生児 (live births) のうち1人が罹患している。ダウン症候群の子供の親は、一般に彼ら自体染色体異常を有していない一方で、母親年齢の顕著な影響が見られ、母親の年齢が進むにつれ危険性が増す (非特許文献 3)。

【0005】

21トリソミーのような染色体不均衡の診断は、核型分析および染色体特異的プローブを用いた蛍光 in situハイブリダイゼーション (FISH) 技法の開発により可能となってきた。高精度ではあるが、これらの方法は、特に分析に十分な数の胎児細胞を獲得するために羊水穿刺が実施された後に数日の細胞培養を必要とする核型分析の場合に手間と時間を要する。さらに、胎児細胞から得られる分裂中期の染色体を検査するプロセスには、非常に熟練した技術者の主観的判断が必要となる。

【0006】

伝統的な核型分析および FISH 方法に取って代わる多くの方法が長年にわたって提唱さ

10

20

30

40

50

れているが、広く使用されているものはない。これらは主に3つのカテゴリー：短いタンデム反復（STR）の使用による異数性の検出、合成競合相手鋳型（synthetic competitor template）を用いた染色体のPCRベースの定量、およびハイブリダイゼーションベースの方法に分類することができる。

【0007】

STRベースの方法は、当該染色体領域中のSTRの数の変化を検出して、余分の染色体または欠損染色体の存在を検出することに依拠する（例えば、特許文献1参照）。染色体損失または獲得は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いてヘテロ接合性STRマーカの比の変化を検出して、これらのマーカを定量することにより観察され得る。例えば、あるSTRマーカの別のSTRマーカに対する2：1の比は、おそらく余分染色体の存在を示すのに対して、マーカに関する0：1の比またはホモ接合性は、染色体損失の徴候を提供し得る。しかしながら、ある特定の個体はまた、第II減数分裂での組換え事象または不分離の結果としてホモ接合性となり、試験によりこれらの結果は区別されない。各STRマーカが異なる数の反復を有し、したがって各マーカの増幅効率が同じでないことから、STRベースの方法の定量的性質もまた疑わしい。さらに、STRマーカは非常に多型性であるため、個体すべてに普遍的に適用可能な診断アッセイの創出は不可能である。

10

【0008】

競合相手核酸（competitor nucleic acids）はまた、PCRベースのアッセイで使用され、染色体存在量（dosage）の変化をモニタリングするための内部対照を提供する。このタイプのアッセイでは、標的（すなわち、染色体上のゲノム領域）と配列類似性を有する合成PCR鋳型（競合相手）が供給され、競合相手および標的核酸は同じプライマーを用いて同時増幅される（例えば、特許文献2～5、および非特許文献3参照）。増幅された競合相手および標的核酸は、競合相手のサイズおよび/または配列の検出可能な差異を導入する操作制限部位または挿入配列のような修飾を競合相手に導入することにより区別され得る。同量の競合相手を試験試料および対照試料に添加することにより、標的ゲノムセグメントの存在量（dosage）は、増幅された競合相手核酸に対する増幅された標的の比を比較することによって確定され得る。しかしながら、競合相手核酸が試験される試料に添加されなくてはならないため、試料の取り扱いにおける変動から生じるアッセイにおける固有の変動性が存在する。かかる変動は、競合相手と標的鋳型との間のわずかな最初の差異を増幅し、かつアッセイの信頼性を小さくし得る増幅プロセスの指数関数的性質により増幅される傾向にある。

20

30

【0009】

幾つかのハイブリダイゼーションベースの方法は、標識染色体特異的プローブを用いることに依拠し、遺伝子および/または染色体存在量（dosage）における差異を検出する（例えば、非特許文献4、非特許文献5、特許文献6および特許文献7を参照）。比較ゲノムハイブリダイゼーション（comparative genome hybridization；CGH）のような他のハイブリダイゼーションベースの方法は、全ゲノムにわたる変化を評価する。例えば、CGH分析では、未知用量の標的ゲノム領域を含有する標識ゲノムDNAを含む試験試料、および既知用量の標的ゲノム領域を含有する標識ゲノムDNAを含む対照試料を固定化ゲノム鋳型に適用して、試験試料および対照試料により生じるハイブリダイゼーションシグナルを比較する。試験試料および対照試料で観察されるシグナル比は、ゲノムにおける標的のコピー数の尺度を提供する。CGHはハイスループット分析の可能性を付与するが、試験試料と対照試料との間の正規化が重要であり、この方法の感度は最適でないため、この方法は実行するのが困難である。

40

【0010】

21トリソミーを検出するため、ゲノムにおける2つの異なる標的配列へのハイブリダイゼーションに依存する方法が、非特許文献6により記載されている。この方法は、単一プライマー対を用いて、一方が21番染色体上（肝臓型ホスホフルクトキナーゼ遺伝子、PFKL-CH21）に、および一方が1番染色体上（ヒト筋肉型ホスホフルクトキナーゼ

50

遺伝子、P F K M - C H 1) に存在する 2 つの相同ホスホフルクトキナーゼ遺伝子を同時に増幅する。各遺伝子に相当する増幅産物はサイズで区別することができる。

しかしながら、Lee等(非特許文献6)は、トリソミー個体および二染色体(すなわち、正常)個体からの試料はこの方法を用いて区別可能であったと報告しているが、観察されたP F K M - C H 1 およびP F K L - C H 2 1 増幅の比は、予測した1 / 1.5ではなく1 / 3.3であり、2つの相同遺伝子が同じ効率で増幅されなかったことを示している。さらに、正常な個体およびトリソミー個体からの試料から得られる増幅値は、それらの両端(extremes)で部分的に重複しており、診断ツールとしてのこの試験の有用性を疑わしいものにした。

【特許文献1】

国際特許公開 WO 94/03638

【特許文献2】

国際特許公開 W099/14376

【特許文献3】

国際特許公開 W096/09407

【特許文献4】

国際特許公開 W094/09156

【特許文献5】

国際特許公開 W091/02187

【特許文献6】

国際特許公開 W000/24925

【特許文献7】

国際特許公開 W093/23566

【非特許文献1】

Epstein、1986、「染色体不均衡の帰結：原理、メカニズムおよびモデル」(The Consequences of Chromosome Imbalance: Principles, Mechanisms and Models)、Cambridge Univ. Press

【非特許文献2】

Lejeune et al., 1959, C. R. Acad. Sci. 248:1721-1722

【非特許文献3】

Yang et al., 1998, Fetal Diagn. Ther. 13(6):361-366

【非特許文献4】

Lapierre et al., 2000, Prenat. Diagn. 20(2): 123-131

【非特許文献5】

Bell et al., 2001, Fertil. Steril. 75(2):374-379

【非特許文献6】

Lee et al., 1997, Hum. Genet. 99(3):364-367

【発明の開示】

【0011】

本発明は、染色体異常を検出するハイスループット方法を提供する。上記方法は、出生前検査で、ならびに体細胞における染色体異常を検出するのに(例えば、癌の存在または進行を検出するためのアッセイで)使用され得る。上記方法は、トリソミー、モノソミー、および/または1つもしくは複数の遺伝子を含む染色体領域の重複(duplication)または欠失(deletion)のような多数の種々のタイプの染色体不均衡を検出するのに使用され得る。

【0012】

一態様では、本発明は、染色体不均衡の危険性を検出する方法を提供する。上記方法は、同時に、第1の染色体位置にある第1の配列を増幅し、それにより第1の増幅産物を生産し、第2の染色体位置にある第2の配列を増幅し、それにより第2の増幅産物を生産することを同時に含む。増幅産物の相対量が確定され、第1の増幅産物対第2の増幅産物の比

10

20

30

40

50

が、1 : 1 と異なる場合に、染色体不均衡の危険性を示している。好ましくは、第1および第2の配列は、異なる染色体上に位置されるパラログな配列 (paralogous sequences) であり、幾つかの態様ではあるが、第1および第2の配列は同じ染色体上 (例えば、例えば異なるアーム上) に位置される。第1および第2の増幅産物は、約80%を上回る配列同一性を含み、好ましくは実質的に同一長である。第1および第2の配列の増幅効率は、実質的に同じであるため、上記方法は非常に定量的であり、かつ信頼性が高い。

【0013】

増幅は好ましくは、単一のプライマー対を用いたPCRにより実施され、第1および第2の配列の両方を増幅する。一態様では、プライマーは、結合対の第2の成員 (member) が結合されている固体支持体 (solid support) に結合するための結合対の第1の成員と連 10
結され、第2の成員は上記第1の成員に特異的に結合することが可能である。固体支持体を供給することにより、プライマーおよび増幅産物を支持体上に捕捉することが可能であり、シーケンシングのようなさらなる手順を容易にする。一態様では、プライマーは増幅前に支持体に結合される。別の態様では、プライマーは増幅後に支持体に結合される。

【0014】

第1および第2の増幅産物は、少なくとも1つのヌクレオチド位置に位置する第1の増幅産物と第2の増幅産物との間の少なくとも1つのヌクレオチド差異を有し、それにより第1および第2の増幅産物はこの配列差異に基づいて区別されることが可能となる。したがって、一態様では、上記方法は、(i) 第1の増幅産物において記少なくとも1つのヌクレオチド位置にある第1のヌクレオチドを同定する工程、(iii) 第2の増幅産物において 20
少なくとも1つのヌクレオチド位置にある第2のヌクレオチドを同定する工程、および (iii) 第1および第2のヌクレオチドの相対量を確定する工程をさらに含む。第1および第2のヌクレオチドの比は、試料中の第1および第2の配列の存在量 (dose) に比例する。同定する工程および確定する工程はシーケンシングにより実施され得る。好ましい実施形態では、Pyrosequencing (登録商標) のシーケンシング方法が使用される。

【0015】

一態様では、本発明は、6番染色体上の第1の配列および21番染色体上の第2の配列を供給することにより、21トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供する。好ましい態様では、第1の配列は、SIM1配列を含む一方で、上記第2の配列はSIM2配列を含む。増幅は、プライマーSIMAF (GCAGT 30
GGCTACTTGAAGAT) およびSIMAR (TCTCGGTGATGGCACTGG) のような両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。約1 : 1.5の増幅SIM1とSIM2配列との比は、個体が21トリソミーまたはダウン症候群の危険性を有することを示す。

【0016】

別の態様では、本発明は、7番染色体上の第1の配列および21番染色体上の第2の配列を供給することにより、21トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供する。好ましい態様では、第1の配列はGABPA遺伝子パラログ (paralogue) 配列を含む一方で、上記第2の配列はGABPA配列を含む。一態様では、第1の配列は、図3に示すGABPA遺伝子パラログ配列を含む。増幅は、プライマ 40
ーGABPAF (CTTACTGATAAGGACGCTC) およびGABPAR (CTCATAGTTCAATCGTAGGCT) のような両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。約1 : 1.5の増幅GABPA遺伝子パラログ配列とGABPAとの比は、個体が21トリソミーまたはダウン症候群の危険性を有することを示す。

【0017】

別の態様では、本発明は、1番染色体上の第1の配列および21番染色体上の第2の配列を供給することにより、21トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供する。好ましい態様では、第1の配列はCCT8遺伝子パラログ配列を含む一方で、上記第2の配列はCCT8配列を含む。一態様では、第1の配列は図 50

4 に示す C C T 8 遺伝子パラログ配列を含む。増幅は、プライマー C C T 8 F (A T G A G A T T C T T C C T A A T T T G) および C C T 8 R (G G T A A T G A A G T A T T T C T G G) のような両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。約 1 : 1.5 の増幅 C C T 8 遺伝子パラログと C C T 8 との比は、個体が 2 1 トリソミーまたはダウン症候群の危険性を有することを示す。

【 0 0 1 8 】

別の態様では、本発明は、2 番染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は C 2 1 O R F 1 9 を含む。一態様では、第 1 の配列は C 2 1 O R F 1 9 遺伝子パラログ配列を含む。

10

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、2 番染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は D S C R 3 を含む。一態様では、第 1 の配列は D S C R 3 遺伝子パラログ配列を含む。

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は、4 番染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は C 2 1 O r f 6 を含む。一態様では、第 1 の配列は C 2 1 O r f 6 遺伝子パラログ配列を含む。

20

【 0 0 2 1 】

別の態様では、本発明は、1 2 番染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は W R B 1 を含む。一態様では、第 1 の配列は W R B 1 遺伝子パラログ配列を含む。

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本発明は、7 番染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は K I A A 0 9 5 8 を含む。一態様では、第 1 の配列は K I A A 0 9 5 8 遺伝子パラログ配列を含む。

30

【 0 0 2 3 】

別の態様では、本発明は、X 染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は T T C 3 を含む。一態様では、第 1 の配列は T T C 3 遺伝子パラログ配列を含む。

【 0 0 2 4 】

別の態様では、本発明は、5 番染色体上の第 1 の配列および 2 1 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、2 1 トリソミーの危険性および個体がダウン症候群を有する見込みを検出する方法を提供し、ここで第 2 の配列は I T S N 1 を含む。一態様では、第 1 の配列は I T S N 1 遺伝子パラログ配列を含む。

40

【 0 0 2 5 】

別の態様では、本発明は、3 番染色体上の第 1 の配列および 1 3 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、1 3 トリソミーの危険性を検出する方法を提供する。好ましい態様では、第 1 の配列は R A P 2 A 遺伝子パラログ配列を含む一方で、第 2 の配列は P A P 2 A 配列を含む。増幅は、両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。一態様では、R A P 2 A 遺伝子パラログ配列は図 5 に示す R A P 2 A 遺伝子パラログ配列を含む。

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本発明は、2 番染色体上の第 1 の配列および 1 3 番染色体上の第 2 の配列を供給することにより、1 3 トリソミーの危険性を検出する方法を提供する。好ましい態

50

様では、第1の配列はCDK8遺伝子パラログ配列を含む一方で、第2の配列はCDK8配列を含む。増幅は、両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。一態様では、CDK8遺伝子パラログ配列は図7に示すCDK8遺伝子パラログ配列を含む。

【0027】

別の態様では、本発明は、2番染色体上の第1の配列および18番染色体上の第2の配列を供給することにより、18トリソミーの危険性を検出する方法を提供する。好ましい態様では、第1の配列はACAA2遺伝子パラログ配列を含む一方で、第2の配列はACAA2配列を含む。増幅は、両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。一態様では、ACAA2遺伝子パラログ配列は図8に示すACAA2遺伝子パラログ配列を含む。

10

【0028】

別の態様では、本発明は、9番染色体上の第1の配列および18番染色体上の第2の配列を供給することにより、18トリソミーの危険性を検出する方法を提供する。好ましい態様では、第1の配列はME2遺伝子パラログ配列を含む一方で、第2の配列はME2配列を含む。増幅は、両遺伝子における同一配列に特異的にハイブリダイズする単一のプライマー対を用いて実施される。一態様では、ME2遺伝子パラログ配列は図6に示すME2遺伝子パラログ配列を含む。

【0029】

別の態様では、本発明は、染色体不均衡の危険性を検出する方法を提供し、ここで染色体不均衡は、21トリソミー、13トリソミー、18トリソミー、トリソミーX、XXYおよびXOからなる群から選択される。

20

【0030】

別の態様では、本発明は、染色体不均衡の危険性を検出する方法を提供し、ここで染色体不均衡は、ダウン症候群、ターナー症候群、クラインフェルター症候群、ウィリアムズ症候群、ランガー・ギーディオン症候群、ブリーダー・ヴィリ症候群、アンゲルマン症候群、ルーピンスタイン・テービ症候群、およびディ・ジョージ症候群からなる群から選択される疾患に関連する。

【0031】

本発明の目的および特徴は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照してよりよく理解され得る。

30

【0032】

本発明は、増幅反応において内部対照としてパラログな遺伝子を使用することにより染色体異常の存在を検出する方法を提供する。上記方法は、迅速で、ハイスループットであり、かつ半自動または全自動解析しやすい。一態様では、上記方法は、PCRのような増幅反応で使用される条件下でパラログな遺伝子セットそれぞれに特異的にハイブリダイズすることができるプライマー対を供給することを含む。パラログな遺伝子は、好ましくは異なる染色体上に存在するが、同じ染色体上にも存在し得る（例えば、異なる染色体アームの損失または獲得を検出するため）。生成された増幅産物の量を比較することにより、各遺伝子の相対存在量(dose)が確定され、遺伝子が位置する各染色体領域および/または各染色体の相対存在量(dose)と相関され得る。

40

【0033】

定義

以下の定義は、以下に記載する説明で使用される特定の用語に関して提供される。

【0034】

本明細書中で使用する場合、「パラログな遺伝子」という用語は、共通の進化起源を有するが、ヒトゲノムにおいて時間をかけて重複された遺伝子を指す。パラログな遺伝子は、遺伝子構造（例えば、イントロンおよびエキソンの数ならびに相対位置、および好ましくは転写物長）ならびに配列を保存する。一態様では、パラログな遺伝子は、増幅可能な配列領域にわたって少なくとも約80%同一性、少なくとも約85%同一性、少なく

50

とも約90%同一性、または少なくとも約95%同一性を有する。

【0035】

本明細書中で使用する場合、「増幅可能な領域」または「増幅可能な配列領域」という用語は、第1のプライマー結合部位によりその5'-末端(5'-most end)と、第2のプライマー結合部位に相補的な配列によりその3'-末端で規定され、かつ増幅可能な配列領域を含む二本鎖配列(double-stranded sequence)において第1および第2のプライマー結合部位に特異的に結合するプライマーの結合に基づく増幅条件下で増幅され得る一本鎖配列を指す。好ましくは、増幅可能な領域は、少なくとも約50ヌクレオチド長、少なくとも約75ヌクレオチド長、少なくとも約100ヌクレオチド長、少なくとも約150ヌクレオチド長、少なくとも約200ヌクレオチド長、少なくとも約300ヌクレオチド長、少なくとも約400ヌクレオチド長、または少なくとも約500ヌクレオチド長である。

10

【0036】

本明細書中で使用する場合、「プライマー結合部位」は、増幅反応のプライマーアニーリング段階中にプライマーが結合部位に特異的にハイブリダイズするように、プライマーに実質的に相補的であるか、または完全に相補的である配列を指す。

【0037】

本明細書中で使用する場合、「パラログセット」または「パラログスな遺伝子セット」は、少なくとも2つのパラログスな遺伝子またはパラログを指す。

【0038】

本明細書中で使用する場合、「染色体異常」または「染色体不均衡」は、1つもしくは複数の遺伝子を含む染色体全体または染色体領域の獲得あるいは損失である。染色体異常としては、モノソミー、トリソミー、ポリソミー、不均衡転座(unbalanced translocations)により引き起こされる欠失および重複を含む遺伝子の欠失および/または重複が挙げられる。

20

【0039】

本明細書中で使用する場合、「高度の配列類似性」なる用語は、増幅可能な領域にわたって少なくとも約80%の配列同一性を指す。

【0040】

本明細書中で使用する場合、「実質的に等しい増幅効率」または「実質的に同じ増幅効率」は、等しい量で提供される第1および第2の配列の増幅であり、第1および第2の増幅産物の量において約10%未満の差異を生じる増幅を指す。

30

【0041】

本明細書中で使用する場合、「個体」は、胎児、新生児、子供または成体を指す。

【0042】

パラログスな遺伝子の同定

パラログスな遺伝子は、重複期間および選択的機能性制限(selective functional restraints)の両方に依存して高度の配列類似性を保持する重複遺伝子である。それらの高度の配列類似性のために、パラログスな遺伝子は、これらの遺伝子が位置する染色体および/または染色体領域の相対存在量(dose)の確定を可能にする増幅反作用の理想的な鋳型を提供する。

40

【0043】

パラログスな遺伝子は、共通の進化歴を有するが、重複事象またはレトロトランスポジション事象により時間をかけて複製された遺伝子である。重複事象は、一般に保存遺伝子構造を有する2つの遺伝子をもたらす、すなわちそれらはイントロン-エキソン接合部の類似パターンを有する。他方で、レトロトランスポジションにより生成されるパラログスな遺伝子は、イントロンを含有せず、たいていの場合で進化により機能的に不活性化され、(発現されず)、したがって偽遺伝子として分類される。パラログスな遺伝子の両方のカテゴリーに関して、高度の配列保存が存在するが、機能的制約に大いに依存する割合で突然変異により差異が蓄積される。

50

【 0 0 4 4 】

一態様では、本発明は、上記方法で使用するための最適なパラログスな遺伝子セットを同定することを含む。例えば、ヒトゲノムの完成したシーケンシングから利用可能な情報を用いて重複事象が起こったことが既知である染色体のある特定の区域を標的とすることができる（例えば、Venter et al., 2001, Science 291(5507): 1304-51、Lander et al., 2001, Nature 409 (6822): 860-921参照）。これは、所定の標的遺伝子を同定し、標的遺伝子が由来するのと同じ種からの配列のゲノム配列データベースまたは発現配列データベースを検索することによりコンピュータで実行され、増幅可能な配列領域にわたって少なくとも約 80% 同一性を含む配列を同定する。好ましくは、パラログスな配列は、実質的に同一の GC 含有量を含む（すなわち、配列は、GC 含有量において約 5% 未満、好ましくは約 1% 未満の差異を有する）。配列検索プログラムは、当該技術分野で既知であり、BLAST (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410を参照)、FASTA、および SSHA (例えば、Pearson, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(5): 2444-2448、Lung et al., 1991, J. Mol. Biol. 221(4): 1367-1378を参照) が挙げられるが、これらに限定されない。

さらに、配列アラインメントの有意性を確定する方法が当該技術分野で既知であり、Needleman and Wunsch, 1970, J. of Mol. Biol. 48: 444、Waterman et al., 1980, J. Mol. Biol. 147: 195-197、Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268、および Dembo et al., 1994, Ann. Prob. 22: 2022-2039 に記載されている。一態様では、単一のクエリー配列がデータベースに対して検索される一方で、別の態様では、複数の配列がデータベースに対して検索される（例えば、NCBI からアクセス可能な MEGALBLAST プログラムを用いて）。マルチプル配列アラインメントは、ClustalW 1.6 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign/multi-align.html> で利用可能) のような当該技術分野で既知のプログラムを用いて単一回で実施され得る。

【 0 0 4 5 】

好ましい実施形態では、検索されるゲノムまたは発現配列データベースはヒト配列を含む。ヒトゲノムプロジェクト（上述の Venter et al., 2001、上述の Lander et al., 2001 を参照）の完了により、ヒト配列データベースのコンピュータ検索により、多重染色体組合せに関するパラログスなセットが同定される。多数のヒトゲノム配列データベースが存在し、NCBI GenBank データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>)、Celera Human Genome データベース (<http://www.celera.com>)、Genetic Information Research Institute (GIRI) データベース (<http://www.girinst.org>)、TIGR Gene Indices (<http://www.tigr.org/tdb/tgi.shtml>) 等が挙げられるが、これらに限定されない。発現配列データベースとしては、NCBI EST データベース、LIFESEQ (登録商標) データベース (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif.)、Human Genome Sciences からのランダム cDNA 配列データベース、および EMBL EST 8 データベース (EMBL, Heidelberg, Germany) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 6 】

一態様では、遺伝子または遺伝子セットは、パラログスな遺伝子セットを同定するためクエリー配列としてランダムに選ばれる。別の態様では、文献中でパラログスであると同定された遺伝子をクエリーとして使用して、データベースを検索して、最適な増幅可能な配列を提供するこれらの遺伝子の領域（すなわち、増幅可能な配列領域にわたって約 80% を上回る同一性、および約 1% ~ 5% 未満の GC 含有量の差異を有する遺伝子の領域）を同定する。好ましくは、パラログスな遺伝子は保存遺伝子構造および保存配列を有し、すなわちエキソンおよびイントロンの数ならびに相対位置が保存され、好ましくはパラログスな遺伝子から生成される転写物はサイズが実質的に同じである（すなわち、約 200 塩基対未満のサイズの差異、好ましくは約 100 塩基対未満のサイズの差異を有する）。表 1 は、本発明の方法により評価され得る非限定的な候補パラログスな遺伝子セットの例を提供する。表 1 A は、本発明の方法により評価され得る非限定的な候補パラログスな遺伝子セットの例を提供し、ここでセットの一つの成員は 21 番染色体上に位置する。表 1 B

は、本発明の方法により評価され得るさらなる非限定的な候補パラログな遺伝子セットの例を提供する。

【 0 0 4 7 】

【 表 1 - 1 】

表 1. 候補パラログな遺伝子	
標的領域(遺伝子(複数可))	候補パラログな領域(遺伝子(複数可))
Xq28 (SLC6A8)	6p11.1 (DXS1357E)
Xq28 (ALD)	2p11,16p11,22q11 (ALD-エキソン7-10-パラログ)
Y (SRY)	20p13 (SOX22)
1p33-34 (TALDOR)	11p15 (TALDO)
2q31 (Sp31)	7p15 (Sp4);12q13 (Sp1遺伝子)
2 (COL3A1,COL5A2,COL6A3,COL4A3;TUBA1,GL12)	12 (COL2A1,TUBAL1,GL1)
2 (TGFA,SPTBN1)	14 (TGFB3,SPTB)
2p11 (ALD-エキソン7-10-パラログ)	Xq28 (ALD);16p11および22q11 (ALD-エキソン7-10-パラログ)
3p21.3 (HYAL1,HYAL2,HYAL3)	7q31.3 (HYAL4,SPAM1,HYALP1)
3q22-q27 (CBLb)	11q22-q24 (CBLa);19 (バンド13.2) (CBLc遺伝子)
3q29 (ERM)	7p22 (ETV1);17q12 (E1A-F)
4 (FGR3,ADRA2L2,QDPR,GABRA2,GABRB1,PDGFRA,FGF5,FGFB,F11,ANX3,ANX5)	5 (FGFR4,ADRA1,DHFR,GABRA1,PDGFRB,FGFA,F12,ANX6)
5 (FGFR4,ADRA1,DHFR,GABRA1,PDGFRB,FGFA,F12,ANX6)	4 (FGR3,ADRA2L2,QDPR,GABRA2,GABRB1,PDGFRA,FGF5,FGFB,F11,ANX3,ANX5)
6p21.3 (COL11A2,NOTCH4,HSPA1A,HSPA1B,HSPA1L,VAR2,C2,C4,PBX2,RXR, NAT/RING3)	9q33-34 (COL5A1,NOTCH1,HSPA5,VAR1,C5,PBX3,RXRA,ORFX/RING3L)
6q16.3-q21 (SIM1-確認パラログ)	21q22.2 (SIM2-確認パラログ)
7p22 (ETV1)	3q29 (ERM);17q12 (E1A-F)
7q31.3 (HYAL4,SPAM1,HYALP1)	3p21.3 (HYAL1,HYAL2,HYAL3)
7 (MYH7)	14 (MYH6)
8q24.1-q24.2 (ANX13)	10q22.3-q23.1 (ANX11)
9q33-34 (COL5A1,NOTCH1,HSPA5,VAR1,C5,PBX3,RXRA,ORFX/RING3L)	6p21.3 (COL11A2,NOTCH4,HSPA1A,HSPA1B,HSPA1L,VAR2,C2,C4,PBX2,RXR, NAT/RING3)
10p11 (ALD-エキソン7-10-様)	Xq28 (ALD);2p11 (ALD-エキソン7-10-様);16p11 (ALD-エキソン7-10-様);22q11 (ALD-エキソン7-10-様)
10q22.3-q23.1 (ANX11)	8q24.1-q24.2 (ANX13)
11p15 (TALDO)	1p33-34 (TALDOR)
11q22-q24 (CBLa)	19 (バンド13.2) (CBLc遺伝子);3q22-q27 (CBLb)
11 (HRAS,IGF1;PTH)	12 (KRAS2,IGF2,PTH)H)
12 (COL2A1,TUBAL1,GL1)	2 (COL3A1,COL5A2,COL6A3,COL4A3;TUBA1,GL12)
12p12 (フォン・ウィブラント因子パラログ)	22q11 (フォン・ウィブラント因子パラログ)
14 (TGFB3,SPTB)	2 (TGFA,SPTBN1)

10

20

30

40

【 表 1 - 2 】

表1. 候補パラログスな遺伝子

標的領域(遺伝子(複数可))	候補パラログスな領域(遺伝子(複数可))
14 (MYH6)	7 (MYH7)
14q32.1 (GSC)	22q11.21 (GSCL)
15q24-q26 (TM6SF1)	19p12-13.3 (TM6SF1)
16p11.1 (DXS1357E)	Xq28 (SLC6A8)
16p13.3 (CREBBP,HMOX2)	22q13 (アデノウイルスE1A随伴タンパク質p300-CREBBPパラログ);22q12 (HMOX1-HMOX2パラログ)
17q12 (E1A-F)	3q29 (ERM);7p22 (ETV1)
17qtel (SYNGR2)	22q13 (SYNGR1)
19 (バンド13.2) (GBLc遺伝子)	3q22-q27 (CBLb);11q22-q24 (GBLa)
19p12-13.3 (TM6SF1)	15q24-q26 (TM6SF1)
20p13 (SOX22)	Y (SRY)
21q22.2 (SIM2-確認パラログ)	6q16.3-q21 (SIM1-確認パラログ)
22q13 (SYNGR1)	17qtel (SYNGR2)
22q11 (フォーン・ウィルブラント因子パラログ)	12p12 (フォーン・ウィルブラント因子パラログ)
22q11.21 (GSCL)	14q32.1 (GSC)

10

【0048】

【表1A】

20

21番染色体遺伝子およびそのパラログスなコピー

21番染色体遺伝子	位置	パラログスな遺伝子位置	種類
GABPA	21q22.1	HC7	偽遺伝子
CCT8	21q22.2	HC1	偽遺伝子
C21ORF19	21q22.2	HC2	発現遺伝子
DSCR3	21q22.2	HC2	偽遺伝子
C21Orf6	21q22.2	HC4	偽遺伝子
SIM2	21q22.2	HC6	発現遺伝子
WRB1	21q22.2	HC12	発現遺伝子
KIAA0958	21q22.3	HC7	偽遺伝子
TTC3	21q22.3	HCX	偽遺伝子
ITSN1	21q22.2	HC5	発現遺伝子

30

【0049】

【表1B】

さらなる候補パラログスな遺伝子

トリソミー13		トリソミー18	
遺伝子	パラログスな標的	遺伝子	パラログスな標的
RAP2A	HC3偽遺伝子	ACAA2	HC2偽遺伝子
CDK8	HC2偽遺伝子	ME2	HC9偽遺伝子

40

【0050】

本発明による有用なパラログスな遺伝子セットとしては、以下の：GABPA（アクセス番号：NM_002040、NT-011512、XM009709、AP001694、X84366）およびGABPAパラログ（アクセス番号：LOC154840）；CCT8（アクセス番号：NM_006585、NT_011512、AL163249、G09444）およびCCT8パラログ（アクセス番号：L

50

OC149003); RAP2A (アクセッション番号: NM_021033) および RAP2A パラログ (アクセッション番号: NM_002886); ME2 (アクセッション番号: NM_002396) および ME2 パラログ; CDK8 (アクセッション番号: NM_001260) および CDK8 パラログ (アクセッション番号: LOC129359); ACAA2 (アクセッション番号: NM_006111) および ACAA2 パラログ; DSCR3 (アクセッション番号: NT_011512、NM_006052、AP001728) および DSCR3 パラログ; C21orf19 (アクセッション番号: NM_015955、NT_005367、AF363446、AP001725) および C21orf19 パラログ; KIAA0958 (アクセッション番号: NT_011514、NM_015227、AL163301、AB023175) および KIAA0958 パラログ; TTC3 (アクセッション番号: NM_003316、NT_011512、AP001727、AP001728) および TTC3 パラログ; ITSN1 (アクセッション番号: NT_011512、NM_003024、XM_048621) および ITSN1 パラログが挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】

クエリー配列として使用することができるさらなるパラログな遺伝子セットとしては、HOX 遺伝子が挙げられる。関連 HOX 遺伝子およびそれらの染色体位置は、Popovici et al., 2001, FEBS Letters 491: 237-242 に記載されている。1 番、2 番、7 番、11 番、12 番、14 番、17 番および 19 番染色体中の遺伝子に関する候補パラログは、Lundin, 1993, Genomics 16: 1-19 に記載されている。これらの参照文献の全体が本明細書に参照により援用される。

【0052】

さらに別の態様では、クエリー配列は、重複されるヒトゲノムの領域 (例えば、完成ヒトゲノム配列の解析により確定されるような) を標的とすることにより同定され、これらの配列を用いてヒトゲノム配列のデータベース (複数可) を検索して、増幅可能な配列領域にわたって少なくとも 80% 同一の配列を同定する。

【0053】

さらなる態様では、クラスタリングプログラムを用いて、増幅可能な配列領域にわたって少なくとも約 80% 同一性を含むコンセンサス配列を共有するデータベースにおいて発現配列を類別して、適切なパラログを同定する。配列クラスタリングプログラムは、当該技術分野で既知である (例えば、Guan et al., 1998, Bioinformatics 14(9): 783-8、Miller et al., Comput. Appl. Biosci. 13(1): 81-7、および Parsons, 1995, Comput. Appl. Biosci. 11(6): 603-13 参照、これらの全体が本明細書に参照により援用される)。

【0054】

適切なパラログセットを同定するコンピュータ的方法が好ましい一方で、有意な塩基対形成が可能である配列を検出する任意の方法を使用することができ、それらは本発明の範囲内に包含される。例えば、パラログな遺伝子セットは、ハイブリダイゼーションベースの方法およびコンピュータ的方法の組合せを用いて同定され得る。この態様では、標的染色体領域を同定することができ、その領域に相当する核酸プローブを選択して (例えば、BAC ライブラリー、YAC ライブラリー、コスミド ライブラリー、cDNA ライブラリー等から)、in situ ハイブリダイゼーションアッセイ (FISH または ISH アッセイ) で使用されて、多重染色体 (好ましくは約 5 未満) へハイブリダイズするプローブを同定することができる。ハイブリダイゼーションの特異性は、標的プローブを、パラログな遺伝子 (複数可) を含有すると考えられるフローソーティングした染色体、染色体特異的ライブラリーおよび/または所定の試験染色体 (複数可) を含む体細胞ハイブリッドへハイブリダイズすることにより確認され得る (例えば、Horvath, et al., 2000, Genome Research 10: 839-852)。引き続きより小さなプローブ断片を用いて、パラログな遺伝子含有すると考えられる所定の領域を絞り込むことができ、これらの断片をシーケンシングして、最適なパラログな遺伝子セットを同定することができる。

【0055】

一態様では、

パラログスな遺伝子は本発明の方法において増幅鋳型として使用されるが、増幅可能な領域にわたって約20%未満のヌクレオチド差異を有する実質的に同一の増幅鋳型を提供するのに十分な配列同一性を含む任意のパラログスな配列が使用される。例えば、偽遺伝子は、各セットにおける配列間に十分な同一性が存在する場合に、非発現配列としてパラログセットに包含され得る。

【0056】

核酸の供給源

一態様では、本発明の方法は、出生前検査で使用され、染色体異常を有して生まれた新生児の危険性を評価する。これらのタイプのアッセイに関して、DNA試料は、羊水穿刺（例えば、Barter, Am. J. Obstet. Gynecol. 99: 795-805、米国特許第5,048,530号）、絨毛膜絨毛試料採取（例えば、Imamura et al., 1996, Prenat. Diagn. 16(3): 259-61）のような手順により、あるいは母体の末梢血試料採取（例えば、Iverson et al., 1981, Prenat. Diagn. 9:31-48、米国特許第6,210,574号）により獲得される。胎児細胞もまた、臍帯穿刺または経皮臍帯血試料採取により獲得することができるが、この技法は技術的に困難であり、広く利用されていない（Erbe, 1994, Scientific American Medicine 2, section 9, chapter IV, Scientific American Press, New York, pp41-42を参照）。好ましくは、DNAは、当該技術分野で既知の技法を用いて胎児細胞試料から単離および精製される（例えば、Maniatis et al., In Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York, 1982を参照）。

10

20

【0057】

しかしながら、別の態様では、細胞は成体または子供から（例えば、癌を有することが疑わしい患者から）獲得される。細胞は、血液試料から、あるいは癌成長部位（例えば、腫瘍または生検材料試料）から獲得され、上記のように（例えば、続く増幅）単離および精製され得る。

【0058】

増幅条件

存在量 (dosage) が確定されるべき標的遺伝子を含むパラログスな遺伝子セットおよび既知の存在量 (dosage) を有する参照遺伝子を同定する場合、プライマー対は、サイズが類似しているか、または同一である各遺伝子から増幅産物を産生するように選択される。一態様では、各パラログスな遺伝子から生成される増幅産物は、約0~75ヌクレオチド以下だけ、好ましくは約0~25ヌクレオチド以下だけ長さが異なる。増幅用のプライマーは、標準的な技法を用いて容易に合成される（例えば、米国特許第4,458,066号、米国特許第4,415,732号、およびMolecular Protocols Online http://www.protocol-online.net/molbio/PCR/pcr_primer.htmを参照）。好ましくは、プライマーは約6~50ヌクレオチド長であり、増幅産物は少なくとも約50ヌクレオチド長である。

30

【0059】

好ましい方法では、プライマーは未標識であるが、態様によっては、プライマーは例えば放射性標識、蛍光標識、高電子密度部分等の直接結合または間接結合により、当該技術分野で周知の方法を用いて標識されるものもある。プライマーはまた、固体支持体上に増幅産物を捕捉することが望ましい場合には、捕捉分子（例えば、結合対の成員）に連結され得る（例えば、国際特許公開 W099/14376を参照）。

40

【0060】

パラログスな遺伝子の増幅は、当該技術分野で既知の任意の方法を用いて実施することができ、PCR（Innis et al., 1990, PCR Protocols. A Guide to Methods and Application, Academic Press, Inc. San Diego）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu and Wallace, 1989, Genomics 4: 560、Landegren, et al., 1988, Science 241: 1077）、自己持続性配列複製（3SR: Self-Sustained Sequence Replication）（Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）等が挙げられるが、これらに限定されない。しかしながら、好ましくは、遺伝子は、標準的な条件を用いたPCRにより増幅され

50

る（例えば、米国特許第4,683,195号、米国特許第4,800,159号、米国特許第4,683,202号、および米国特許第4,889,818号に記載されるようなものを参照）。

【0061】

一態様では、増幅されたDNAは、続く定量化を容易にするために固定化される。例えば、結合対の第1の成員に連結されたプライマーを、第1の成員に特異的に結合することができる。可能な結合対の第2の成員が結合されている支持体に結合することができる。適切な結合対としては、アビジン：ビオチン、抗原：抗体対、化学基の反応性対等が挙げられるが、これらに限定されない。一態様では、プライマーは、増幅前に支持体に連結され、増幅産物の固定化は増幅プロセス自体の間に起こる。あるいは、増幅産物は増幅後に固定化することができる。固体支持体は、固相アッセイに関して当該技術分野で使用される任意の既知のものであり得る（例えば、粒子、ビーズ、磁気もしくは常磁性粒子またはビーズ、ディップスティック、キャピラリー、マイクロチップ、ガラススライド等）（例えば、米国特許第4,654,267号に記載されるようなものを参照）。好ましくは、固体支持体は、続く定量化工程の自動化を容易にするためにマイクロタイターウェル（例えば、96ウェルプレート）の形態である。

10

【0062】

遺伝子用量の定量化

個々のパラログな遺伝子の定量化は、単一のヌクレオチド差異を検出することができる当該技術分野で既知の任意の方法により実施することができる。適切なアッセイとしては、リアルタイムPCR（TAQMAN（登録商標））、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションベースのアッセイ（例えば、米国特許第6,207,373号を参照）、RFLP分析（例えば、ヌクレオチド差異が制限部位を創出または破壊する場合）、単一ヌクレオチドプライマー伸長ベースのアッセイ（例えば、米国特許第6,221,592号を参照）、シーケンシングベースのアッセイ（例えば、米国特許第6,221,592号を参照）等が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0063】

本発明の好ましい実施形態では、定量化はPyrosequencing（登録商標）方法（例えば、米国特許第6,210,891号および米国特許第6,197,505号参照、これらの全体が参照により本明細書に援用される）を用いて実施される。この方法では、パラログな遺伝子の増幅産物は、一本鎖にされ、DNAポリメラーゼ、ATPスルフィラーゼ、ルシフェラーゼ、アピラーゼ、アデノシン-5'-ホスホサルフェート（APS）およびルシフェリンの存在下で各パラログな遺伝子における同じ配列に特異的にハイブリダイズする配列を含むシーケンシングプライマーとともにインキュベートされる。適切なポリメラーゼとしては、T7ポリメラーゼ、（エクソ）クレノウポリメラーゼ、Sequenase（登録商標）Ver.2.0（USB U.S.A.）、Taq（登録商標）ポリメラーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。4つのデオキシヌクレオチドトリホスフェート（dNTP）のうちの1つ目が添加され（dATPでなくデオキシアデノシン-チオトリホスフェートが使用される）、プライマー伸長によりプライマーに組み込まれる場合、組み込まれたヌクレオチドの量と等モル量でピロリン酸（PPi）が放出される。続いて、PPiは、APSの存在下でATPスルフィラーゼによりATPに定量的に変換される。試料へのATPの放出により、ルシフェリンはATPの量に比例した量で光を発生する反応でルシフェラーゼによりオキシルシフェリンに変換される。放出された光は、電荷結合素子（CCD）により検出され、pyrogram（登録商標）ディスプレイ（例えば、Pyrosequencing（登録商標），Inc.，Westborough, MA 01581から入手可能なPyrosequencing（登録商標）PSQ 96 DNA/SNPアナライザーにおいて）上にピークとして測定され得る。アピラーゼは、非組み込みdNTPを分解し、分解が完了すると（例えば、光がもはや検出されない場合とき）、別のdNTPを添加する。dNTPの添加は1つずつ行われ、ヌクレオチド配列はシグナルピークから確定される。同一ヌクレオチドを含む2つの連続塩基の存在は、比例的により大きなシグナルピークとして検出可能である。

30

40

【0064】

50

現在好ましい実施形態では、核酸試料中の染色体存在量 (dosage) は、Pyrosequencing (登録商標) 方法を使用することで評価され、少なくとも1つのヌクレオチド位置で異なるパラログスな配列における配列差異の比を確定する。例えば、一態様では、それぞれ異なる染色体上の2つのパラログスな遺伝子からの2つのパラログスな配列が、シーケンシングされ、2つのパラログスにおける配列差異の位置にある異なるヌクレオチド塩基の比が確定される。2つの配列が異なる位置での1:1の比の異なるヌクレオチド塩基は、1:1の比の染色体を示す。しかしながら、1:1の比からの差異は、試料中に染色体不均衡が存在することを示す。例えば、3:2の比はトリソミーの存在を示す。同じ染色体上のパラログスな配列もまた、このようにして評価することができる (例えば、特定の染色体アームの損失または獲得を確定するために)。

10

【0065】

Pyrosequencing (登録商標) PSQ 96 DNA/SNPアナライザーを用いて、96個の試料を30分以内に同時に分析することができる。パラログそれぞれに特有のパラログ配列の一部に隣接してハイブリダイズするシーケンシングプライマーを使用することにより、1回または数回のみ d N T P 組み込み (すなわち、ミニシーケンシングを実施) 後にパラログ間を区別することが可能であり得る。Pyrosequencerからの出力が直接的な定量比を提供し、試料が得られた個体の遺伝子型、したがって表現型を使用者が推測することが可能となるため、分析にはゲル電気泳動も任意のさらなる試料プロセッシングも必要とされない。天然内部対照としてパラログスな遺伝子を使用することにより、試料の取り扱いによる変動性の量が低減される。さらに、放射活性も標識も必要とされない。

20

【0066】**診断用途**

パラログスな遺伝子セットの増幅は、染色体異常を有する個体の危険性を確定するのに使用され得る。所定の染色体領域由来の標的遺伝子および参照遺伝子 (好ましくは異なる染色体上に存在) を含むパラログスな遺伝子セットを用いて、上述のように遺伝子比が確定される。標的対参照遺伝子の1:1の比からの逸脱は、個体が染色体異常の危険性を有することを示す。本発明による方法を用いて評価することができる染色体異常の例を下記の表2に提示する。

【0067】**【表2 - 1】**

30

染色体異常		疾患関連
X , Y	XO	ターナー症候群
	XXY	クラインフェルター症候群
	XYY	二重Y症候群
	XXX	トリソミーX症候群
	XXXX	四重X症候群
	Xp21欠失	デュシェーンヌ症候群／ベッカー症候群、先天性副腎低形成、慢性肉芽腫症
	Xp22欠失	ステロイドスルファターゼ欠損症
	Xq26欠失	X連鎖リンパ増殖性疾患
1	1p-(体細胞性)	神経芽腫
	モノソミー	
	トリソミー	
2	モノソミー	
	トリソミー-2q	成長遅滞、発達および精神遅延、およびマイナーな身体的異常
3	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	非ホジキンリンパ腫
4	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	急性非リンパ性白血病(ANLL)
5	5p-	ネコ鳴き症候群、ルジュューヌ症候群
	5q-(体細胞性)	脊髄形成異常症候群
	モノソミー	
	トリソミー	
6	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	明細胞肉腫
	7q11.23欠失	ウィリアムズ症候群
	モノソミー	小児期の7モノソミー症候群、体細胞性：腎皮質腺腫、脊髄形成異常症候群
8	8q24.1欠失	ランガー・ギーディオン症候群
	モノソミー	
9	トリソミー	脊髄形成異常症候群、ワーカニー(Warkany)症候群、体細胞性：慢性骨髄性白血病
	モノソミー-9p	アルフィーズ (Alfi's)症候群
	モノソミー	
	9p部分的トリソミー	レトレ(rethore)症候群
10	トリソミー	完全9トリソミー症候群、モザイク9トリソミー症候群
	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	ALLまたはANLL
11	11p-	無虹彩症、ウィルムス腫
	11q-	ヤコブソン症候群
	モノソミー(体細胞性)	罹患骨髄系統(ANLL、MDS)
	トリソミー	

10

20

30

40

【表 2 - 2】

表2. (続き) 染色体異常および疾患		
染色体異常	疾患関連	
12	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	CLL、若年性顆粒膜細胞腫(JGCT)
13	13q-	13q症候群、オルベリ(Orbely)症候群
	13q14欠失	網膜芽腫
	モノソミー	
	トリソミー	パトー症候群
14	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	骨髄性障害(MDS、ANLL、非定型CML)
15	15q11-q13欠失	プラーダー・ヴィリ症候群、アンゲルマン症候群
	モノソミー	
16	トリソミー(体細胞性)	罹患骨髄系統およびリンパ系統(例えばMDS、ANLL、ALL、CLL)
	16q13.3欠失	ルービンスタイン・テービ(Rubenstein-Taybi)
	モノソミー	
17	トリソミー(体細胞性)	乳頭状腎細胞癌(悪性)
	17p-(体細胞性)	骨髄性悪性疾患における17p症候群
	17q11.2欠失	スミス・マゲニス(Smith-Magenis)
	17q13.3	ミラー・ディーカー(Miller-Dieker)
	モノソミー	
	トリソミー(体細胞性)	腎皮質腺腫
18	17p11.2-12トリソミー	1型シャルコー・マリー・トゥース症候群、HNPP
	18p-	18p部分的モノソミー症候群またはグロウチ・ラミー・チーフリ(Grouchy Lamy Thieffry)症候群
	18q-	グロウチ・ラミー・サーモン・ランドリー症候群
	モノソミー	
	トリソミー	エドワーズ症候群
19	モノソミー	
	トリソミー	
20	20p-	20pトリソミー症候群
	20p11.2-12欠失	アラジル症候群
	20q-	体細胞性:MDS、ANLL、真性赤血球増加症、慢性好中球性白血病
	モノソミー	
21	トリソミー(体細胞性)	乳頭状腎細胞癌(悪性)
	モノソミー	
21	トリソミー	ダウン症候群
	モノソミー	
22	22q11.2欠失	ディ・ジョージ症候群、口蓋・心・顔症候群(velocardiofacial syndrome)、コノランカル奇形顔症候群(conotruncal anomaly face syndrome)、常染色体優性オピッツG/BBB症候群、カイヤール心臓・顔症候群(Caylor cardiofacial syndrome)
	モノソミー	
	トリソミー	完全22トリソミー症候群

10

20

30

40

50

【0068】

概して、染色体存在量(dosage)の評価は、患者の症状の臨床的評価のような他の評価と併用して実施される。例えば、出生前評価は、親が自然流産歴を有する場合(誕生および新生児死亡にかかわらず)または母親の高齢、母親の異常血清の結果の場合、および染色体異常の家族歴を有する患者において特に適切である。出生後試験は、多発性先天性異常

(multiple congenital abnormalities)、既知の染色体症候群と一致した臨床的徴候 (clinical manifestations)、不明の精神遅滞、原発性および続発性無月経、不妊症等が見られる場合に適切であり得る。

【0069】

上記方法は、2つの染色体が同じ期間で用量を変更される見込みが無視し得る(すなわち、それぞれ試験パラログスな配列および参照パラログスな配列を含む試験染色体ならびに参照染色体が、同じ期間でモノソミーまたはトリソミーである可能性が低い)という仮定を前提としている。さらに、アッセイは、一般に、対照として染色体の正常な相補体を含む試料を用いて実施される。しかしながら、一態様では、それぞれのセットが異なる染色体対に由来するパラログスな遺伝子の多重セットを用いて、アッセイの感度を増大する。別の態様では、例えば出生後試験では、X染色体用量は概して表現型により確認され得るため、常染色体のパラログスな遺伝子セットの増幅は、X染色体配列の増幅と同じときに実施される。さらに別の態様では、階層的試験計画が使用され得る。例えば、本発明による方法を用いた21トリソミーに関する陽性の結果の後に、変更遺伝子用量を確認するための異なる試験を行うことができる(例えば、PKFL-CH21活性の増加およびM4型ホスホフルクトキナーゼ活性の欠如をアッセイすることによる等、例えば、Vora, 1981, Blood 57:724-731に記載されるようなものを参照)一方で、陰性の結果を示す試料は一般にはさらに分析されない。したがって、本発明による方法は、陽性の結果を確認するためのより低いスループットアッセイを補足することができる稀なケースの染色体異常を同定するためのハイスループットアッセイを提供する。

【0070】

同様に、パラログスな遺伝子の損失または獲得が染色体対染色体アーム対染色体バンド対パラログスな遺伝子自体のみの損失または獲得を反映するという仮定は、本発明による方法をさらなる試験で補足することにより、例えばそれぞれのセットが異なる染色体領域に相当する同じ染色体上のパラログスな遺伝子の多重セットを用いることにより、立証され得る。

【0071】

ここで本発明は、以下の実施例を参照してさらに説明される。以下の事項は単なる例の手段であり、本発明の範囲内で細目に対する変更がなされてもよいことが理解されよう。

【実施例1】

【0072】

以下の実施例は、単一のプライマー対(a single set of primers)とともに、異なる染色体に存在するパラログスな遺伝子を同時増幅することにより、染色体不均衡、例えば21トリソミーを検出するPCRベースの方法を記載する。

【0073】

パラログスな遺伝子を使用することに関する論理的根拠は、パラログスな遺伝子がほとんど同一のサイズおよび配列組成を有するため、それらは単一のプライマー対を用いて等しい効率でPCR増幅することである。2つの配列間の単一ヌクレオチド差異が同定され、各対立遺伝子(そのそれぞれが染色体を表す)の相対量が、定量される(図9を参照)。Pyrosequencing方法は非常に定量的であるため、染色体間の比を正確にアッセイすることができる。

【0074】

21トリソミーの検出に関して、上記方法は以下の工程を包含する：a. 同時増幅に適した候補物の同定(パラログスな遺伝子)、b. ヒト21番染色体と他の染色体との間のパラログスな配列の同時増幅に関する多重アッセイ(multiple assays)の設計、c. 21トリソミーおよび対照DNA試料のパネルを用いたアッセイの試験、d. 適切に大きな遊動的試料における上記方法の頑強さの試験

【0075】

類似の工程が、本発明により任意の染色体不均衡を検出するのに使用される。

【0076】

10

20

30

40

50

パラログな遺伝子の同定

21番染色体とゲノムの残部との間のパラログな配列を同定するために、21q22.1領域とテロメアとの間に位置するすべての21番遺伝子および偽遺伝子(cDNA配列)を、ダウン症候群と報告された個体すべてにおいて、この領域が3コピーで存在するため、非冗長ヒトゲノムデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>)に対して(と比較して)プラストした(図4)。

【0077】

このことから、同時増幅用の適切な標的として作用し得る10個の潜在的候補対が同定された(表1A)。

【0078】

これらの対のほとんどが機能的遺伝子およびスプライシングされない偽遺伝子により形成され、これらのパラログなコピーの最も普通の起源は古代染色体重複ではなくレトロトランスポジションであることを示唆する。

【0079】

試料

2つの最適化した試験に関する遡及的立証研究を実施するために、400個のDNA試料(200個のDNAはトリソミー個体に由来、200個の対照DNA)を使用した。これらの試料は、インフォームドコンセントを行い、過去15年かけてジュネーブ大学遺伝医学部(the Division of Medical Genetics, University of Geneva)で収集した。試料は推定上異なる方法で異なる期間に抽出されており、したがってこれらのDNAの品質は均一でないと予測される。

【0080】

診断方法の開発のためにこれらの試料を使用することに関して、この特定の使用に関して地元の倫理委員会により許可を受けた。

【0081】

本発明は、使用試料が調製されたばかりであるか、または例えば4で保管され、好ましくは少なくとも-20で凍結され、より好ましくは液体窒素中で凍結される方法を提供する。

【0082】

アッセイ設計

表1Aに取り纏めた結果を用いて、第1回のアッセイが設計され、実施された。

【0083】

アッセイの開発に関する重要な態様は、両方の遺伝子において同じエキソン内に含まれ(このことは両方のアンプリコンが等しいサイズであるために必要である)、かつ以下の条件を満たす非常に高度な配列保存(70~95%、好ましくは85~95%)の領域を選択することである:

1. 適合性プライマーが設計され得る完璧な配列保存の長い伸長物が存在すること、
2. 適切なシーケンシングプライマーが設計され得るように、完璧に相同配列(homologous sequence)により取り囲まれるアンプリマー内に1つまたは複数の単一ヌクレオチド差異が存在すること。

【0084】

これらの基準を用いて、GABPA遺伝子およびCCT8遺伝子に関してアッセイを開発した。

【実施例2】

【0085】

21トリソミーは、患者(例えば、胎児)からの少なくとも1つの細胞を含む試料を供給し、標準的な技法を用いて細胞(複数可)からDNAを抽出することにより検出される。この試料を、それぞれ21番染色体および6番染色体上に位置するパラログな遺伝子であるSIM2(GenBankアクセッション番号第U80456号、第U80457号、および第AB003185号)およびSIM1遺伝子(GenBankアクセッション

10

20

30

40

50

番号第U70212号)の両方に特異的にアニーリングする単一のプライマー対とともに、PCRで使用される標準的なアニーリング条件下でインキュベートする。SIM2およびSIM1の部分配列のアラインメントを図1に示す。

【0086】

プライマー配列SIMAF (GCAGTGGCTACTTGAAGAT) およびSIMAR (TCTCGGTGATGGCACTGG) を用いて、試料をPCR条件に付した。例えば、増幅緩衝液5.0 μl、200 μM dNTP、3 mM MgCl₂、DNA 50 ng、およびTaqポリメラーゼ5ユニットを供給して、タッチダウンPCR (例えば、94 を30秒、63~58 を30秒、および72 を10秒)の35サイクルにより、2つのパラログ間の配列差異の続く検出のために適切な量の増幅産物が生成される。

10

【0087】

SIM1およびSIM2に相当する増幅産物の量は、2つの遺伝子を区別する単一ヌクレオチド差異に関してアッセイすることにより確定される(図1の丸を施した配列を参照)。好ましくは、これは、シーケンシングプライマーSIMAS (GTGGGGCTGGTGGCCGTG)を用いたPyrosequencing方法により実行される。Pyrosequencing(登録商標)反応から得られる予測配列は、GGCCA[C/G]TCGCTGCCであり、角括弧および太字による強調は、2つの配列間の配列差異の位置を示す。

【0088】

SIM2:SIM1の対立遺伝子の比は、ある塩基の比を、2つのパラログ間のヌクレオチド差異の部位にある別の塩基に対して比較することで確定される。図2から理解されるように、かかる塩基の比は、ダウン症候群の個体では1:1.5であり、正常な個体では1:1である。

20

【実施例3】

【0089】

以下の例は、本発明の方法により21トリソミーを検出する方法について記載しており、ここでパラログな遺伝子対の1つの成員はGABPAである。

【0090】

21トリソミーは、患者(例えば、胎児)からの少なくとも1つの細胞を含む試料を供給し、標準的な技法を用いて細胞(複数可)からDNAを抽出することにより検出される。パイロット実験の結果を図11に示す。パイロット実験の性能を受けて、上記アッセイは、より高い効率の増幅ならびにより小さな試料内および試料間の変動でプライマーセットを同定することによりさらに最適化された。21トリソミーの検出に関する最適化されたアッセイの詳細を以下に提供する。

30

【0091】

400個のDNA試料(200個はトリソミー試料、および200個は対照試料)を、それぞれ7番染色体および21番染色体上に位置するパラログな遺伝子であるGABPA遺伝子パラログ(GenBankアクセッション番号LOC154840)およびGABPA遺伝子(GenBankアクセッション番号NM002040)の両方に特異的にアニーリングする単一のプライマー対とともに、PCRで使用される標準的なアニーリング条件下でインキュベートした。GABPA遺伝子パラログおよびGABPAの配列のアラインメントを図3に示す。

40

【0092】

プライマー配列GABPAF (5'ピオチンCTTACTGATAAGGACGCTC) およびGABPAR (CTCATAGTTCATCGTAGGCT) (図12)を用いて、試料をPCR条件に付した。例えば、増幅緩衝液5.0 μl、200 μM dNTP、3 mM MgCl₂、DNA 50 ng、およびTaqポリメラーゼ5ユニットを供給して、タッチダウンPCR (例えば、94 を30秒、63~58 を30秒、および72 を10秒)の35サイクルにより、2つのパラログ間の配列差異の続く検出のために適切な量の増幅産物が生成される。図12は、使用したプライマーを示す最適化アッセイを示す。図3および図7は、定量化に使用される位置(丸を施すか、または矢印で示す)を示

50

す。

【0093】

G A B P A 遺伝子パラログおよびG A B P Aに相当する増幅産物の量は、2つの遺伝子を区別する単一ヌクレオチド差異に関してアッセイすることにより確定された(図12の丸を施した配列、または図3の矢印で印を付けた配列を参照)。好ましくは、これは、シーケンシングプライマーG A B P A S (T C A C C A A C C C A A G A A A)を用いたPyrosequencing(登録商標)方法により実行される。

【0094】

試料はpyrosequencerを用いて分析した。単一のヌクレオチド組み込み当たり10ユニットの閾値は、DNAのための品質管理として設定し、それ以下では試料は分析から廃棄された。この手順に従って、169個の試料が廃棄され、残りが分析された。この閾値は非常に控えめであるが、より低いシグナル強度を有するアッセイは、信頼性がより低い定量化をもたらす。図13は分析した230個の試料に関するG値の分布を示す。G対立遺伝子は、21番染色体の相対比率を表す。対照DNAは、標準偏差1.3%で51.11%の平均G値を有していた。トリソミー個体は、標準偏差1.90%で59.54%の平均値を有していた。グラフからわかるように、2つの群は十分に分離される。しかしながら、53.0~54.9の値を有する試料に関しては、明確な診断を付与することはできない。しかしながら、試料のたった5%がこの間隔の範疇にあり、したがって、得られたデータに従って95%の事例で明確な診断を付与することができる。

10

【0095】

さらに、誤った診断が付与された試料が4つ存在した。マイクロサテライトマーカを用いたさらなる分析により、これらの個体のうち3個が誤って分類されており、したがってトリソミー個体でなく対照であることがわかった。第4の試料(D S 0 0 0 6 - F 5)はトリソミーであると確認され、したがって同じ試料がC C T 8アッセイでは正しい結果を付与したことから、おそらく反応における混入に起因した誤りを表す。

20

【0096】

図14は、G A B P Aアッセイに関する典型的なプログラムを示す。矢印は染色体定量化に使用した位置を示す。

【実施例4】

【0097】

以下の例は、本発明の方法により21トリソミーを検出する方法について記載しており、ここでパラログな遺伝子対の1つの成員はC C T 8である。

30

【0098】

21トリソミーは、患者(例えば、胎児)からの少なくとも1つの細胞を含む試料を供給し、標準的な技法を用いて該細胞(複数可)からDNAを抽出することにより検出される。

【0099】

DNA試料(トリソミー試料および対照試料)を、それぞれ21番染色体および1番染色体上に位置するパラログな遺伝子であるC C T 8(GenBankアクセッション番号N M 0 0 6 5 8 5)およびC C T 8遺伝子パラログ(GenBankアクセッション番号L O C 1 4 9 0 0 3)の両方に特異的にアニーリングする単一のプライマー対とともに、PCRで使用される標準的なアニーリング条件下でインキュベートした。C C T 8パラログおよびC C T 8の配列のアラインメントを図4に示す。

40

【0100】

プライマー配列C C T 8 F (A T G A G A T T C T T C C T A A T T T G)およびC C T 8 R (G G T A A T G A A G T A T T T C T G G) (図 1 5) を用いて、試料をPCR条件に付した。例えば、増幅緩衝液5.0μl、200μM d N T P、3mM M g C l₂、DNA 50ng、およびTaqポリメラーゼ5ユニットを供給して、タッチダウンPCR(例えば、94を30秒、63~58を30秒、および72を10秒)の35サイクルにより、2つのパラログ間の配列差異の続く検出のために適切な量の増幅産物

50

が生成される。図 15 は、使用したプライマーを示す最適化アッセイを示す。図 4 および図 15 は、定量化に使用された位置（丸を施すか、または矢印で示す）を示す。

【0101】

CCT8 遺伝子パラログおよび CCT8 に相当する増幅産物の量は、2つの遺伝子を区別する単一ヌクレオチド差異に関してアッセイすることにより確定された（図 4 及び図 15 の丸を施した配列、または矢印で印を付けた配列を参照）。好ましくは、これは、シーケンシングプライマー CCT8S (A A A C A A T A T G G T A A T G A A) を用いた pyrosequencing (登録商標) 方法により実行される。

【0102】

試料は、実施例 3 に記載するように pyrosequencer を用いて分析した。この手順に従って、210 個の試料が廃棄され、残りが分析された。 10

【0103】

図 16 は、分析した 190 個の試料に関する T 値 (HC21 の比率) の分布を示す。T 対立遺伝子は、21 番染色体の相対比率を表す。グラフからわかるように、分布は、GABPA アッセイの分布と非常に類似しており、十分に分離されたメジアンおよび明確な診断がなされ得ない中央の領域を有している。この場合、48 ~ 50 の値を有する試料は、診断することができないが、実施例 3 と同様に、試料のたった 5% がこの範囲の範疇にある。さらに、おそらく混入の結果として、誤った診断が付与された試料が 2 / 190 個存在した。図 17 は、CCT8 アッセイに関する典型的なプログラムを示す。矢印は染色体定量化に使用した位置を示す。 20

【0104】

GABPA および CCT8 試験に関する立証研究からのデータは、各アッセイを別個に使用して、出所不明である（混入により引き起こされる可能性が高い）1 ~ 1.5% の誤り率を伴って、95% の試料を正確に診断することができることを示す。しかしながら、両方の試験を一緒に考慮すれば、98% の試料を正確に診断することができ、（一方で、残りの 2% に関しては診断を付与することができず）、より重要なことには、両方のアッセイが正反対の結果を生じるように 3 つの誤りが容易に検出され得ることをデータは示す。このことは、並行して 2 つの試験を使用することを強く主張して、誤診の蓋然性を最低限に抑える。

【0105】

本明細書中に記載される事項の変形、変更および他の実施態様 (implementations) は、特許請求するような本発明の精神および範囲から逸脱することなく当業者に思い浮かぶであろう。したがって、本発明は、上述の例示的説明により規定されるべきではなく、添付の特許請求の範囲の精神および範囲により規定されるべきである。 30

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図 1】それぞれ 6 番染色体および 21 番染色体上に位置される SIM1 および SIM2 パラログの部分配列アラインメントを示す。

【図 2】ダウン症候群の個体および正常な個体における SIM1 および SIM2 パラログの対立遺伝子比を示す。 40

【図 3】GABPA 遺伝子および GABPA 遺伝子パラログ配列の配列アラインメントを示す。第 1 の配列は 21 番染色体に対応し、第 2 の配列は 7 番染色体に対応する。アッセイされたヌクレオチドには斜線を施し、矢印で示している。

【図 4】CCT8 遺伝子および CCT8 遺伝子パラログ配列の配列アラインメントを示す。第 1 の配列は 21 番染色体に対応し、第 2 の配列は 1 番染色体に対応する。アッセイされたヌクレオチドには斜線を施し、矢印で示している。

【図 5】RAP2A 遺伝子および RAP2A 遺伝子パラログ配列の配列アラインメントを示す。第 1 の配列は 13 番染色体に対応し、第 2 の配列は 3 番染色体に対応する。アッセイされたヌクレオチドには斜線を施し、矢印で示している。

【図 6】ME2 遺伝子および ME2 遺伝子パラログ配列の配列アラインメントを示す。第 50

1の配列は18番染色体に対応し、第2の配列は9番染色体に対応する。アッセイされたヌクレオチドには斜線を施し、矢印で示している。

【図7】CDK8遺伝子およびCDK8遺伝子パラログ配列の配列アラインメントを示す。第1の配列は13番染色体に対応し、第2の配列は2番染色体に対応する。

【図8】ACAA2遺伝子およびACAA2遺伝子パラログ配列の配列アラインメントを示す。第1の配列は18番染色体に対応し、第2の配列は2番染色体に対応する。

【図9】本発明の方法の原理を示す。

【図10】ゲノムビューとして示される21番染色体上のITSN1遺伝子および5番染色体上のそのパラログを示すプラスト結果の一例である。

【図11】GABPAパイロット実験の結果を示す。パネルAは、対照試料とトリソミー試料との間に明確な識別を伴うパイログラムの一例を示す。矢印で示される位置にあるピーク間の比を参照されたい。Gピークは21番染色体を表す。パネルBは、一連の24個の対照および罹患被験体DNAに関するGピーク値(21番染色体)のプロットを示す。パネルCはデータの概括である。

10

【図12】使用したプライマー、ならびにGABPA最適化アッセイにおける定量化に使用された位置(丸を施してある)を示す。

【図13】GABPAアッセイで分析された230個の試料に関するG値の分布を示す。G対立遺伝子は21番染色体の相対比率を表す。

【図14】GABPAアッセイに関する典型的なパイログラムプログラムを示す。矢印は、染色体定量化に使用された位置を示す。

20

【図15】使用したプライマー、ならびにCCT8最適化アッセイにおける定量化に使用された位置(丸を施してある)を示す。

【図16】CCT8アッセイの結果を示す。分析された190個の試料に関するT値の分布が示されている。T対立遺伝子は21番染色体の比率を表す。

【図17】CCT8アッセイに関する典型的なパイログラムプログラムを示す。矢印は、染色体定量化に使用された位置を示す。

【 図 9 】

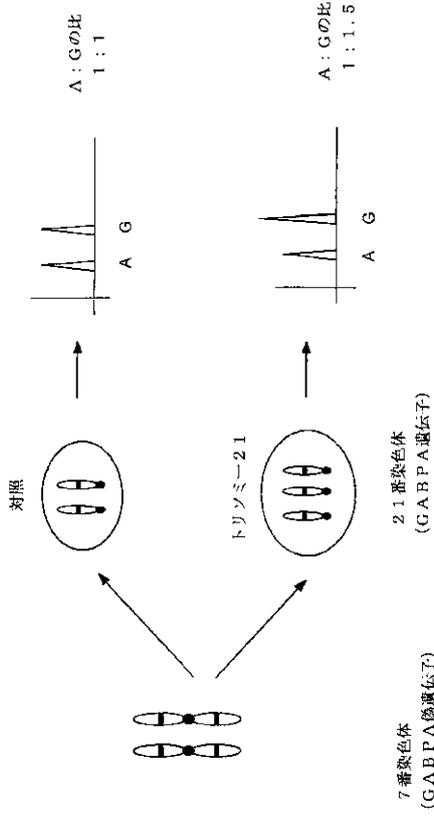


図9

【 図 10 】

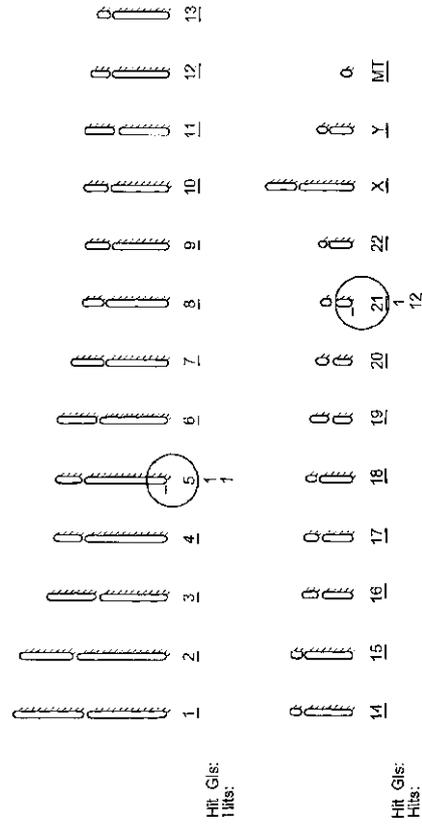


図10

【 図 11 A 】

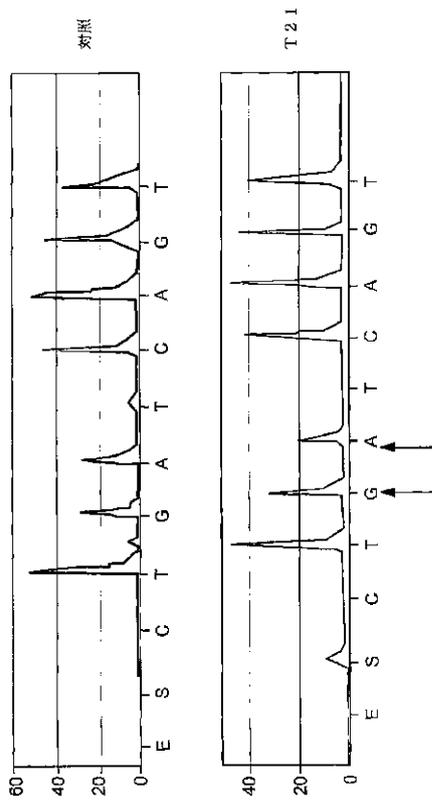


図11A

【 図 11 B 】

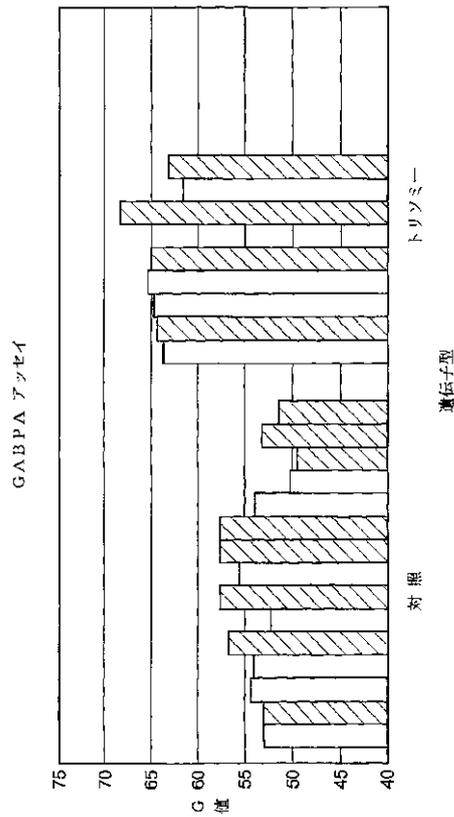


図11B

【 図 11 A 】

【 図 11 B 】

【 図 1 1 C 】

遺伝子型	N	予測G値	平均	標準偏差	最終値
対照 (2N)	15	50	54.2	2.45	57.5
トリソミー (46 X Y +21)	9	60	64.6	1.84	61.7

図 1 1 C

【 図 1 2 】

GABPA 1b アッセイ

HC21 : C (G)

HC7 : T (A)

..

```

aaatccaaactatgRoagtttttggtagaaacttcttactatgataaaggacgctcgagactgatt
tcttgggttggatRaaggtgaatttaagctaaatccgctgaaactggttgcaCaRaactg
gggacagtgtaaaaataagcctactacgargaacctatggaactcagtgctgcaattaa

```

Primer F : 5 biotin CTTACTCA/TAAGGACGCTC

Primer R : CTCATAGTTTCATCGTAGGCT

Sequencing primer : TCACCAACCCAGAGAA

図 1 2

【 図 1 3 】

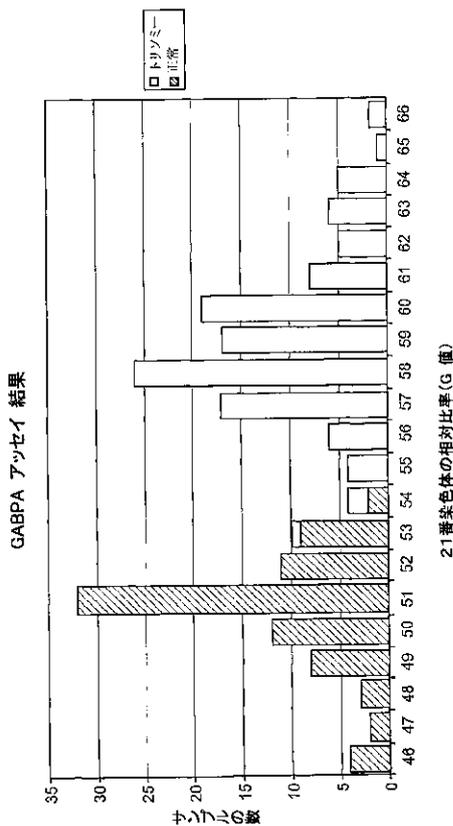


図 1 3

【 図 1 4 】

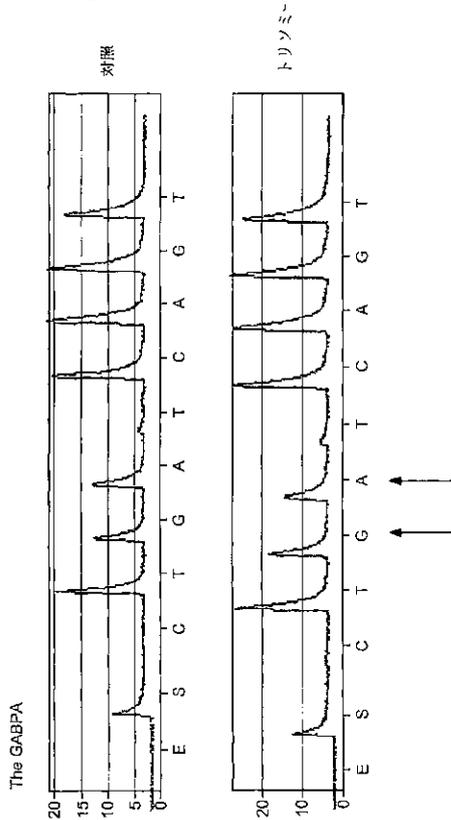


図 1 4

【 図 1 5 】

CCT8 アッセイ

HC21 :A (T)

HC1 :G (C)

```

ttgctggagctctcctcctggaattacgtgaagactctcagcattcggcctcagttccagaggtcacta
gaaggttatcgaaatagcvtgacgaaagctcctcagattctcctcattcctcctcctcctcctcctc
aaaccttcggagatattgatgagctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
atgaagttattctcggccaagcttatttgcaggcAtgcgtatcctatttttccctgattcTggccatttc
aaWgttgataaacatcagagaggtttgtaaaattctggg

```

Primer F : ATGAGATTCCTCCCTAAATTTG

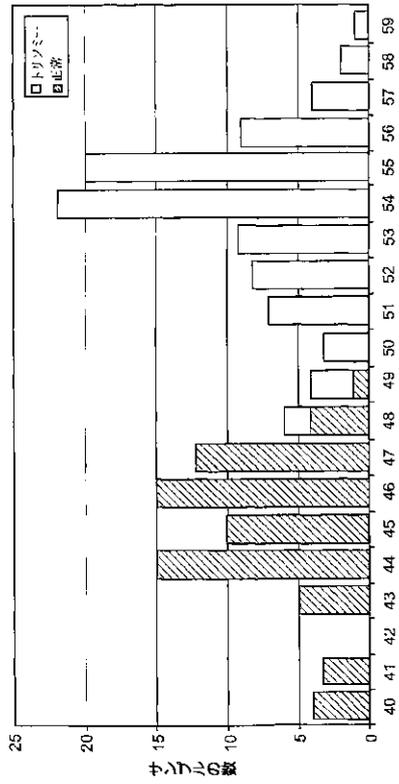
Primer R : GGTAAAGAAAGTATTTCTGG

Primer S : AAACATATGSTRATGAA

図 1 5

【 図 1 6 】

CCT8 アッセイ 結果



21番染色体の比率

図 1 6

【 図 1 7 】

The CCT8

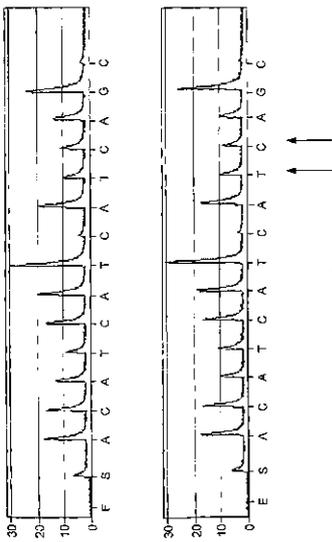


図 1 7

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000919 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q
- (21) International Application Number: PCT/US02/19764
- (22) International Filing Date: 21 June 2002 (21.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/300,266 22 June 2001 (22.06.2001) US
- (71) Applicant (*for all designated States except the UNITED STATES OF AMERICA*): UNIVERSITE DE GENÈVE (CH/CH), 24, rue du General-Delannoy, CH-1211 Genève 4 (CH).
- (72) Inventors: and
- (73) Inventors/Applicants (*for US only*): ANTONARAKIS, Stylianos (US/CH), 26, boulevard des Pâquis/epes, CH-1205 Geneva (CH); DEUTSCH, Samuel (DE/CH), 59, route de Birmes, CH-1207 Geneva (CH).
- (74) Agent: SPAR, Elizabeth, N., Palmer & Dodge LLP, 111 Huntington Avenue, Boston, MA 02199-7613 (US).
- (81) Designated States (*nationality*): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UZ); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing in the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/000919 A2

(54) Title: METHOD FOR DETECTING DISEASES CAUSED BY CHROMOSOMAL IMBALANCES

(57) Abstract: The invention provides a universal method to detect the presence of chromosomal abnormalities by using paralogous genes as internal controls in an amplification reaction. The method is rapid, high throughput, and amenable to semi-automated analyses. In one aspect, the method comprises providing a pair of primers which can specifically hybridize to each of a set of paralogous genes under conditions used in amplification reactions, such as PCR. Paralogous genes are preferably on different chromosomes but may also be on the same chromosome (e.g., to detect loss or gain of different chromosome arms). By comparing the amount of amplified products generated, the relative dose of each gene can be determined and correlated with the relative dose of each chromosomal region and/or each chromosome, or which the gene is located.

WO 03/000919

PCT/US02/19764

**METHOD FOR DETECTING DISEASES CAUSED BY CHROMOSOMAL
IMBALANCES****Related Applications**

5 This application claims priority to U.S. Application Serial Number 60/300,266, filed on
June 22, 2001.

Field of the Invention

The invention relates to methods for detecting diseases caused by chromosomal
imbalances.

Background of the Invention

10 Chromosome abnormalities in fetuses typically result from aberrant segregation events
during meiosis caused by misalignment and non-disjunction of chromosomes. While sex
chromosome imbalances do not impair viability and may not be diagnosed until puberty,
autosomal imbalances can have devastating effects on the fetus. For example, autosomal
15 monosomies and most trisomies are lethal early in gestation (see, e.g., Epstein, 1986, *The
Consequences of Chromosome Imbalance: Principles, Mechanisms and Models*, Cambridge
Univ. Press).

Some trisomies do survive to term, although with severe developmental defects. Trisomy
21, which is associated with Down Syndrome (Lejeune et al., 1959, *C. R. Acad. Sci.* 248: 1721-
20 1722), is the most common cause of mental retardation in all ethnic groups, affecting 1 out of
700 live births. While parents of Down syndrome children generally do not have chromosomal
abnormalities themselves, there is a pronounced maternal age effect, with risk increasing as
maternal age progresses (Yang et al., 1998, *Fetal Diagn. Ther.* 13(6): 361-366).

Diagnosis of chromosomal imbalances such as trisomy 21 has been made possible
25 through the development of karyotyping and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) techniques
using chromosome-specific probes. Although highly accurate, these methods are labor intensive
and time consuming, particularly in the case of karyotyping which requires several days of cell
culture after amniocentesis is performed to obtain sufficient numbers of fetal cells for analysis.
Further, the process of examining metaphase chromosomes obtained from fetal cells requires the
30 subjective judgment of highly skilled technicians.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Many methods have been proposed over the years to replace traditional karyotyping and FISH methods, although none has been widely used. These can be grouped into three main categories: detection of aneuploidies through the use of short tandem repeats (STRs); PCR-based quantitation of chromosomes using a synthetic competitor template, and hybridization-based methods.

STR-based methods rely on detecting changes in the number of STRs in a chromosomal region of interest to detect the presence of an extra or missing chromosome (see, e.g., WO 9403638). Chromosome losses or gains can be observed by detecting changes in ratios of heterozygous STR markers using polymerase chain reaction (PCR) to quantitate these markers. For example, a ratio of 2:1 of one STR marker with respect to another will indicate the likely presence of an extra chromosome, while a 0:1 ratio, or homozygosity, for a marker can provide an indication of chromosome loss. However, certain individuals also will be homozygous as a result of recombination events or non-disjunction at meiosis II and the test will not distinguish between these results. The quantitative nature of STR-based methods is also suspect because each STR marker has a different number of repeats and the amplification efficiency of each marker is therefore not the same. Further, because STR markers are highly polymorphic, the creation of a diagnostic assay universally applicable to all individuals is not possible.

Competitor nucleic acids also have been used in PCR-based assays to provide an internal control through which to monitor changes in chromosome dosage. In this type of assay, a synthetic PCR template (competitor) having sequence similarity with a target (i.e., a genomic region on a chromosome) is provided, and competitor and target nucleic acids are co-amplified using the same primers (see, e.g., WO 9914376; WO 9609407; WO 9409156; WO 9102187; and Yang et al., 1998, *Fetal Diagn. Ther.* 13(6): 361-6). Amplified competitor and target nucleic acids can be distinguished by introducing modifications into the competitor, such as engineered restriction sites or inserted sequences which introduce a detectable difference in the size and/or sequence of the competitor. By adding the same amount of competitor to a test sample and a control sample, the dosage of a target genomic segment can be determined by comparing the ratio of amplified target to amplified competitor nucleic acids. However, since competitor nucleic acids must be added to the samples being tested, there is inherent variability in the assay stemming from variations in sample handling. Such variations tend to be magnified by the exponential nature of the amplification process which can magnify small starting differences between a competitor and target template and diminish the reliability of the assay.

WO 03/00919

PCT/US02/19764

Some hybridization-based methods rely on using labeled chromosome-specific probes to detect differences in gene and/or chromosome dosage (see, e.g., Lapiere et al., 2000, *Prenat. Diagn.* 20(2): 123-131; Bell et al., 2001, *Fertil. Steril.* 75(2): 374-379; WO 0024925; and WO 9323566). Other hybridization-based methods, such as comparative genome hybridization (CGH), evaluate changes throughout the entire genome. For example, in CGH analysis, test samples comprising labeled genomic DNA containing an unknown dose of a target genomic region and control samples comprising labeled genomic DNA containing a known dose of the target genomic region are applied to an immobilized genomic template and hybridization signals produced by the test sample and control sample are compared. The ratio of signals observed in test and control samples provides a measure of the copy number of the target in the genome. Although CGH offers the possibility of high throughput analysis, the method is difficult to implement since normalization between the test and control sample is critical and the sensitivity of the method is not optimal.

A method which relies on hybridization to two different target sequences in the genome to detect trisomy 21 is described by Lee et al., 1997, *Hum. Genet.* 99(3): 364-367. The method uses a single pair of primers to simultaneously amplify two homologous phosphofructokinase genes, one on chromosome 21 (the liver-type phosphofructokinase gene, PFKL-CH21) and one on chromosome 1 (the human muscle-type phosphofructokinase gene, PFKM-CH1). Amplification products corresponding to each gene can be distinguished by size. However, although Lee et al. report that samples from trisomic and disomic (i.e., normal) individuals were distinguishable using this method, the ratio of PFKM-CH1 and PFKL-CH21 amplification observed was 1/3.3 rather than the expected 1/1.5, indicating that the two homologous genes were not being amplified with the same efficiency. Further, amplification values obtained from samples from normal and trisomic individuals partially overlapped at their extremes, making the usefulness of the test as a diagnostic tool questionable.

Summary of the Invention

The present invention provides a high throughput method for detecting chromosomal abnormalities. The method can be used in prenatal testing as well as to detect chromosomal abnormalities in somatic cells (e.g., in assays to detect the presence or progression of cancer). The method can be used to detect a number of different types of chromosome imbalances, such as trisomies, monosomies, and/or duplications or deletions of chromosome regions comprising one or more genes.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

In one aspect, the invention provides a method for detecting risk of a chromosomal imbalance. The method comprises simultaneously amplifying a first sequence at a first chromosomal location to produce a first amplification product and amplifying a second sequence at a second chromosomal location to produce a second amplification product. The relative amount of amplification products is determined and a ratio of first to second amplification products when different from 1:1 is indicative of a risk of a chromosomal imbalance. Preferably, the first and second sequence are paralogous sequences located on different chromosomes, although in some aspects, they are located on the same chromosome (e.g., on different arms). The first and second amplification products comprise greater than about 80% identity, and preferably, are substantially identical in length. Because the amplification efficiency of the first and second sequences is substantially the same, the method is highly quantitative and reliable.

Amplification preferably is performed by PCR using a single pair of primers to amplify both the first and second sequences. In one aspect, the primers are coupled with a first member of a binding pair for binding to a solid support on which a second member of a binding pair is bound, the second member being capable of specifically binding to the first member. Providing the solid support enables primers and amplification products to be captured on the support to facilitate further procedures such as sequencing. In one aspect, primers are bound to the support prior to amplification. In another aspect, primers are bound to the support after amplification.

The first and second amplification products have at least one nucleotide difference between them located at an at least one nucleotide position thereby enabling the first and second amplification products to be distinguished on the basis of this sequence difference. Therefore, in one aspect, the method further comprises the steps of (i) identifying a first nucleotide at the at least one nucleotide position in the first amplification product, (ii) identifying a second nucleotide at the at least one nucleotide position in said second amplification product, and (iii) determining the relative amounts of the first and second nucleotides. The ratio of the first and second nucleotide is proportional to the dose of the first and second sequences in the sample. The steps of identifying and determining can be performed by sequencing. In a preferred embodiment, a pyrosequencingSM sequencing method is used.

In one aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 6 and a second sequence on chromosome 21. In a preferred aspect, the first sequence comprises the SIM1 sequence, while the second sequence comprises the SIM2 sequence. Amplification is

WO 03/060919

PCT/US02/19764

performed using a single pair of primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes, such as primers SIMAF (GCAGTGGCTACTTGAAGAT) and SIMAR (TCTCGGTGATGGCACTGG). A ratio of amplified SIM1 and SIM2 sequences of about 1:1.5 indicates an individual at risk for trisomy 21 or Down Syndrome.

5 In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 7 and a second sequence on chromosome 21. In a preferred aspect, the first sequence comprises a GABPA gene paralogue sequence, while the second sequence comprises the GABPA sequence. In one aspect, the first sequence comprises the GABPA gene paralogue sequence
10 presented in Figure 3. Amplification is performed using a single pair of primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes, such as primers GABPAF (CTTACTGATAAGGACGCTC) and GABPAR (CTCATAGTTCATCGTAGGCT). A ratio of amplified GABPA gene paralogue sequence and GABPA of about 1:1.5 indicates an individual at risk for trisomy 21 or down syndrome.

15 In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 1 and a second sequence on chromosome 21. In a preferred aspect, the first sequence comprises a CCT8 gene paralogue sequence, while the second sequence comprises the CCT8 sequence. In one aspect the first sequence comprises the CCT8 gene paralogue sequence presented in Figure
20 4. Amplification is performed using a single pair of primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes, such as primers CCT8F (ATGAGATTCCTTAATTG) and CCT8R (GGTAATGAAAGTATTTCTGG). A ratio of amplified CCT8 gene paralogue and CCT8 of about 1:1.5 indicates an individual at risk for trisomy 21 or down syndrome.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the
25 likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 2 and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises C21ORF19. In one aspect, the first sequence comprises a C21ORF19 gene paralogue sequence.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the
30 likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 2 and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises DSCR3. In one aspect, the first sequence comprises a DSCR3 gene paralogue sequence.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 4 and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises C21Orf6. In one aspect, the first sequence comprises a C21Orf6 gene paralogue sequence.

5 In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 12 and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises WRB1. In one aspect, the first sequence comprises a WRB1 gene paralogue sequence.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 10 7 and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises KIAA0958. In one aspect, the first sequence comprises a KIAA0958 gene paralogue sequence.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on the X 15 chromosome and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises TTC3. In one aspect, the first sequence comprises a TTC3 gene paralogue sequence.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 21 and the likelihood that the individual has Down syndrome by providing a first sequence on chromosome 5 and a second sequence on chromosome 21, wherein said second sequence comprises TTSN1. In 20 one aspect, the first sequence comprises an TTSN1 gene paralogue sequence.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 13 by providing a first sequence on chromosome 3 and a second sequence on chromosome 13. In a preferred aspect, the first sequence comprises a RAP2A gene paralogue sequence, while the second sequence comprises the RAP2A sequence. Amplification is performed using a single 25 pair of primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes. In one aspect, the RAP2A gene paralogue sequence comprises the RAP2A gene paralogue sequence presented in Figure 5.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 13 by providing a first sequence on chromosome 2 and a second sequence on chromosome 13. In a preferred aspect, the first sequence comprises a CDK8 gene paralogue sequence, while the 30

WO 03/060919

PCT/US02/19764

second sequence comprises the CDK8 sequence. Amplification is performed using a single pair of primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes. In one aspect, the CDK8 gene paralogue sequence comprises the CDK8 gene paralogue sequence presented in Figure 7.

5 In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 18 by providing a first sequence on chromosome 2 and a second sequence on chromosome 18. In a preferred aspect, the first sequence comprises an ACAA2 gene paralogue sequence, while the second sequence comprises the ACAA2 sequence. Amplification is performed using a single pair of primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes. In one aspect, the ACAA2 gene paralogue sequence comprises the ACAA2 gene paralogue sequence presented in
10 Figure 8.

In another aspect, the invention provides a method of detecting risk of trisomy 18 by providing a first sequence on chromosome 9 and a second sequence on chromosome 18. In a preferred aspect, the first sequence comprises an ME2 gene paralogue sequence, while the second sequence comprises the ME2 sequence. Amplification is performed using a single pair of
15 primers specifically hybridizing to identical sequences in both genes. In one aspect, the ME2 gene paralogue sequence comprises the ME2 gene paralogue sequence presented in Figure 6.

In another aspect, the invention provides a method for detecting risk of a chromosomal imbalance, wherein the chromosomal imbalance is selected from the group consisting of Trisomy 21, Trisomy 13, Trisomy 18, Trisomy X, XXY and XO.

20 In another aspect, the invention provides a method for detecting risk of a chromosomal imbalance, wherein the chromosomal imbalance is associated with a disease selected from the group consisting of Down's Syndrome, Turner's Syndrome, Klinefelter Syndrome, William's Syndrome, Langer-Giedon Syndrome, Prader-Willi, Angelman's Syndrome, Rubenstein-Taybi and Di George's Syndrome.

25 **Brief Description of the Drawings**

The objects and features of the invention can be better understood with reference to the following detailed description and accompanying drawings.

Figure 1 shows a partial sequence alignment of the SIM1 and SIM2 paralogs located on chromosome 6 and chromosome 21, respectively.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Figure 2 shows allele ratios of SIM1 and SIM2 paralogs in Down syndrome individuals and normal individuals.

Figure 3 shows the sequence alignment of the GABPA gene and a GABPA gene paralogue sequence. The first sequence corresponds to chromosome 21 and the second sequence
5 corresponds to chromosome 7. The assayed nucleotide is shaded and indicated with an arrow.

Figure 4 shows the sequence alignment of the CCT8 gene and a CCT8 gene paralogue sequence. The first sequence corresponds to chromosome 21 and the second sequence corresponds to chromosome 1. The assayed nucleotide is shaded and indicated with an arrow.

Figure 5 shows the sequence alignment of the RAP2A gene and a RAP2A gene
10 paralogue sequence. The first sequence corresponds to chromosome 13 and the second sequence corresponds to chromosome 3. The assayed nucleotide is shaded and indicated with an arrow.

Figure 6 shows the sequence alignment of the ME2 gene and an ME2 gene paralogue sequence. The first sequence corresponds to chromosome 18 and the second sequence corresponds to chromosome 9. The assayed nucleotide is shaded and indicated with an arrow.

Figure 7 shows the sequence alignment of the CDK8 gene and a CDK8 gene paralogue
15 sequence. The first sequence corresponds to chromosome 13 and the second sequence corresponds to chromosome 2.

Figure 8 shows the sequence alignment of the ACAA2 gene and an ACAA2 gene
20 paralogue sequence. The first sequence corresponds to chromosome 18 and the second sequence corresponds to chromosome 2.

Figure 9 illustrates the principle of the method of the invention.

Figure 10 is an example of a blast result showing the ITSN1 gene on chromosome 21 and
its paralogue on Chromosome 5 represented as a genome view.

Figure 11 shows the result of a GABPA pilot experiment. Panel A shows an example of
25 a pyrogram, with a clear discrimination between control and trisomic sample. See ratio between peaks at the position indicated by the arrow. G peak represents chromosome 21. Panel B shows a plot of G peak values (chromosome 21) for a series of 24 control and affected subject DNAs. Panel C is a summary of data.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Figure 12 shows the primers used, as well as the position (circled) which was used for quantification in a GABPA optimized assay.

Figure 13 shows the distribution of G values for the 230 samples analyzed in a GABPA assay. The G allele represents the relative proportion of chromosome 21.

5 Figure 14 shows typical pyrogram programs for the GABPA assay. Arrows indicate positions used for chromosome quantification.

Figure 15 shows the primers used, as well as the position (circled) which was used for quantification in a CCT8 optimized assay.

10 Figure 16 shows the results of a CCT8 assay. The distribution of T values for the 190 samples analyzed are presented. The T allele represents the proportion of chromosome 21.

Figure 17 shows typical pyrogram programs for the CCT8 assay. Arrows indicate positions used for chromosome quantification.

Detailed Description

15 The invention provides a method to detect the presence of chromosomal abnormalities by using paralogous genes as internal controls in an amplification reaction. The method is rapid, high-throughput, and amenable to semi-automated or fully automated analyses. In one aspect, the method comprises providing a pair of primers which can specifically hybridize to each of a set of paralogous genes under conditions used in amplification reactions, such as PCR.

20 Paralogous genes are preferably on different chromosomes but may also be on the same chromosome (e.g., to detect loss or gain of different chromosome arms). By comparing the amount of amplified products generated, the relative dose of each gene can be determined and correlated with the relative dose of each chromosomal region and/or each chromosome, on which the gene is located.

25 Definitions

The following definitions are provided for specific terms which are used in the following written description.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

As used herein the term "paralogous genes" refer to genes that have a common evolutionary origin but which have been duplicated over time in the human genome. Paralogous genes conserve gene structure (e.g., number and relative position of introns and exons, and preferably transcript length) as well as sequence. In one aspect, paralogous genes have at least
5 about 80% identity, at least about 85% identity, at least about 90% identity, or at least about 95% identity over an amplifiable sequence region.

As used herein the term "amplifiable region" or an "amplifiable sequence region" refers to a single-stranded sequence defined at its 5'-most end by a first primer binding site and at its
10 3'-most end by a sequence complementary to a second primer binding site and which is capable of being amplified under amplification conditions upon binding of primers which specifically bind to the first and second primer binding sites in a double-stranded sequence comprising the amplifiable sequence region. Preferably, an amplifiable region is at least about 50 nucleotides, at least about 75 nucleotides, at least about 100 nucleotides, at least about 150 nucleotides, at least about 200 nucleotides, at least about 300 nucleotides, at least about 400 nucleotides, or at least
15 about 500 nucleotides in length.

As used herein, a "primer binding site" refers to a sequence which is substantially complementary or fully complementary to a primer such that the primer specifically hybridizes to the binding site during the primer annealing phase of an amplification reaction.

As used herein, a "paralog set" or a "paralogous gene set" refers to at least two
20 paralogous genes or paralogues.

As used herein a "chromosomal abnormality" or a "chromosomal imbalance" is a gain or loss of an entire chromosome or a region of a chromosome comprising one or more genes. Chromosomal abnormalities include monosomies, trisomies, polysomies, deletions and/or duplications of genes, including deletions and duplications caused by unbalanced translocations.

As used herein the term "high degree of sequence similarity" refers to sequence identity of at least about 80% over an amplifiable region.
25

As defined herein, "substantially equal amplification efficiencies" or "substantially the same amplification efficiencies" refers to amplification of first and second sequences provided in equal amounts to produce a less than about 10% difference in the amount of first and second
30 amplification products.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

As used herein, an "individual" refers to a fetus, newborn, child, or adult.

Identifying Paralogous Genes

Paralogous genes are duplicated genes which retain a high degree of sequence similarity dependent on both the time of duplication and selective functional restraints. Because of their high degree of sequence similarity, paralogous genes provide ideal templates for amplification reactions enabling a determination of the relative doses of the chromosome and/or chromosome region on which these genes are located.

Paralogous genes are genes that have a common evolutionary history but that have been replicated over time by either duplication or retrotransposition events. Duplication events generally results in two genes with a conserved gene structure, that is to say, they have similar patterns of intron - exon junctions. On the other hand paralogous genes generated by retrotransposition do not contain introns, and in most cases have been functionally inactivated through evolution, (not expressed) and are thus classed as pseudogenes. For both categories of paralogous genes there is a high degree of sequence conservation, however differences accumulate through mutations at a rate that is largely dependant on functional constraints.

In one aspect, the invention comprises identifying optimal paralogous gene sets for use in the method. For example, one can target certain areas of chromosomes where duplications events are known to have occurred using information available from the completed sequencing of the human genome (see, e.g., Venter et al., 2001, *Science* 291(5507): 1304-51; Lander et al., 2001, *Nature* 409(6822): 860-921). This may be done computationally by identifying a target gene of interest and searching a genomic sequence database or an expressed sequence database of sequences from the same species from which the target gene is derived to identify a sequence which comprises at least about 80% identity over an amplifiable sequence region. Preferably, the paralogous sequences comprise a substantially identical GC content (i.e., the sequences have less than about 5% and preferably, less than about 1% difference in GC content). Sequence search programs are well known in the art, and include, but are not limited to, BLAST (see, Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410), FASTA, and SSAHA (see, e.g., Pearson, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(5): 2444-2448; Lung et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 221(4): 1367-1378). Further, methods of determining the significance of sequence alignments are known in the art and are described in Needleman and Wunsch, 1970, *J. of Mol. Biol.* 48: 444; Waterman et al., 1980, *J. Moll. Biol.* 147: 195-197; Karlin et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-

WO 03/060919

PCT/US02/19764

2268; and Dembo et al., 1994, *Ann. Prob.* 22: 2022-2039. While in one aspect, a single query sequence is searched against the database, in another aspect, a plurality of sequences are searched against the database (e.g., using the MEGABLAST program, accessible through NCBI). Multiple sequence alignments can be performed at a single time using programs known
5 in the art, such as the ChustaW 1.6 (available at <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>).

In a preferred embodiment, the genomic or expressed sequence database being searched comprises human sequences. Because of the completion of the human genome project (see, Venter et al., 2001, *supra*; Lander et al., 2001, *supra*), a computational search of a human
10 sequence database will identify paralogous sets for multiple chromosome combinations. A number of human genomic sequence databases exist, including, but not limited to, the NCBI GenBank database (at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>); the Celera Human Genome database (at <http://www.celera.com>); the Genetic Information Research Institute (GRI) database (at <http://www.griinst.org>); TIGR Gene Indices (at <http://www.tigr.org/tdb/tgi.shtml>), and the like. Expressed sequence databases include, but are not limited to, the NCBI EST
15 database, the LIFESEQ™ database (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, Calif.), the random cDNA sequence database from Human Genome Sciences, and the EMBEST8 database (EMBL, Heidelberg, Germany).

In one aspect, genes, or sets of genes, are randomly chosen as query sequences to identify
20 paralogous gene sets. In another aspect, genes which have been identified as paralogous in the literature are used as query sequences to search the database to identify regions of those genes which provide optimal amplifiable sequences (i.e., regions of the genes which have greater than about 80% identity over an amplifiable sequence region, and less than about a 1%-5% difference in GC content). Preferably, paralogous genes have conserved gene structures as well as
25 conserved sequences; i.e., the number and relative positions of exons and introns are conserved and preferably, transcripts generated from paralogous genes are substantially identical in size (i.e., have less than an about 200 base pair difference in size, and preferably less than about a 100 base pair difference in size). Table 1 provides examples of non-limiting candidate paralogous gene sets which can be evaluated according to the method of the invention. Table 1A provides
30 examples of non-limiting candidate paralogous gene sets, wherein one member of the set is located on chromosome 21, which can be evaluated according to the method of the invention.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Table 1B provides examples of additional non-limiting candidate paralogous gene sets which can be evaluated according to the method of the invention.

Table 1. Candidate Paralogous Genes	
Target region (Gene(s))	Candidate Paralogous Region (Gene(s))
Xq28 (SLC6A8)	6p11.1 (DYS1357E)
Xq28 (ALD)	2p11, 16p11, 22q11 (ALD-exons 7-10-paralogs)
Y (SRX)	20p13(SOX22)
1p33-34 (TALDOR)	11p15 (TALDO)
2q31 (Sp31)	7p15 (Sp4), 12q13 (Sp1 gene)
2 (COL3A1, COL5A2, COL6A3, COL4A3, TUBA1, GL12)	12 (COL2A1, TUBA1, GL1)
2 (TGFA, SPTBN1)	14 (TGFB3, SPTB)
2p11 (ALD-exon 7-10 paralog)	Xq28 (ALD); 16p11 and 22q11 (ALD-exons 7-10 paralogs)
3p21.3 (HYAL1, HYAL2, HYAL3)	7q31.3 (HYAL4, SPAM1, HYALP1)
3q22-q27 (CBLb)	11q22-q24 (CBLa); 19 (band 13.2) (CBLc gene)
3q29 (ERM)	7p22 (ETV1); 17q12 (E1A-F)
4 (FGFR3, ADRA2L2, QDPR, GABRA2, GABRB1, PDGFRA, FGF5, FGFB, F11, ANX3, ANX5)	5 (FGFR4, ADRA1, DHFR, GABRA1, PDGFRB, FGFA, F12, ANX6)
5 (FGFR4, ADRA1, DHFR, GABRA1, PDGFRB, FGFA, F12, ANX6)	4 (FGR3, ADRA2L2, QDPR, GABRA2, GABRB1, PDGFRA, FGF5, FGFB, F11, ANX3, ANX5)
6p21.3 (COL1A2, NOTCH1, HSPA1A, HSPA1B, HSPALB, VARS2, C2, C4, PBX2, RXRB, NAT/RING3)	9q33-34 (COL5A1, NOTCH1, HSPA5, VARS1, C5; PBX3, RXRA, ORFX/RING3L)
6q16.3-q21 (SIM1-confirmed paralog)	21q22.2 (SIM2-confirmed paralog)
7p22 (ETV1)	3q29 (ERM); 17q12 (E1A-F)
7q31.3 (HYAL4, SPAM1, HYALP1)	3p21.3 (HYAL1, HYAL2, HYAL3)
7 (MYH7)	14 (MYH6)
8q24.1-q24.2 (ANX13)	10q22.3-q23.1 (ANX11)
9q33-34 (COL5A1, NOTCH1, HSPA5, VARS1, C5, PBX3, RXRA, ORFX/RING3L)	6p21.3 (COL11A2, NOTCH4, HSPA1A, HSPA1B, HSPALB, VARS2, C2, C4, PBX2, RXRB, NAT/RING3)
10p11 (ALD-exons 7-10-like)	Xq28 (ALD); 2p11 (ALD exons 7-10-like); 16p11 (ALD-exons 7-10-like); 22q11 (ALD-exons 7-10-like)
10q22.3-q23.1 (ANX11)	8q24.1-q24.2 (ANX13)
11p15 (TALDO)	1p53-34 (TALDOR)
11q22-q24 (CBLa)	19 (band 13.2) (CBLc gene); 3q22-q27(CBLb)
11 (KRAS, IGF1, PTH)	12 (KRAS2, IGF2, PTHLH)
12 (COL2A1, TUBA1, GL1)	2 (COL3A1, COL5A2, COL6A3, COL4A3; TUBA1, GL12)
12p12 (von Willebrand factor paralog)	22q11 (von Willebrand factor paralog)
14 (TGFB3, SPTB)	2 (TGFA, SPTBN1)

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Target region (Gene(s))	Candidate Paralogous Region (Gene(s))
14 (MYH6)	7 (MYH7)
14q32.1 (GSC)	22q11.21 (GSC1)
15q24-q26 (TM6SF1)	19p12-13.3 (TM6SF1)
16p11.1 (DXS1357E)	Xq28 (SLC6A8)
16p13.3 (CREBBP, HMOX2)	22q13 (adenovirus E1A-associated protein p500-CRFRBP paralog); 22q12 (HMOX1-HMOX2 paralog)
17q12 (E1A-F)	3q29 (FRM); 7p22 (HTV1)
17qtel (SYNGR2)	22q13 (SYNGR1)
19 (band 13.2) (CBLc gene)	3q22-q27 (CBLb); 11q22-q24 (CBLa)
19p12-13.3 (TM6SF1)	15q24-q26 (TM6SF1)
20p13 (SOX22)	Y (SRV)
21q22.2 (SIM2-confirmed paralog)	6q16.3-q21 (SIM1-confirmed paralog)
22q13 (SYNGR1)	17qtel (SYNGR2)
22q11 (von Willebrand factor paralog)	12p12 (von Willebrand factor paralog)
22q11.21 (GSC)	14q32.1 (GSC)

Table 1A: Chromosome 21 Gene and its Paralogous Copy.

Chromosome 21 gene	Position	Paralogous Gene position	Class
GABPA	21q22.1	HC 7	pseudogene
CCT8	21q22.2	HC 1	pseudogene
C21ORF19	21q22.2	HC 2	Expressed gene
DSCR3	21q22.2	HC 2	pseudogene
C21Orf6	21q22.2	HC 4	pseudogene
SIM2	21q22.2	HC 6	Expressed gene
WRB1	21q22.2	HC 12	Expressed gene
KIAAO958	21q22.3	HC 7	pseudogene
ITC3	21q22.3	HC X	pseudogene
ITSN1	21q22.2	HC 5	Expressed gene

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Table 1B: Additional Candidate Paralogous Genes

Trisomy 13		Trisomy 18	
Gene	Paralogous target	Gene	Paralogous target
RAP2A	HIC3 pseudogene	ACAA2	HIC2 Pseudogene
CDK8	HIC2 Pseudogene	ME2	HIC9 Pseudogene

Paralogous gene sets useful according to the invention include but are not limited to the following: GABPA (Accession No.: NM_002040, NT-011512, XM009709, AP001694, X84366) and the GABPA paralogue (Accession No.: LOC154840); CCT8 (Accession No.: NM_006585, NT_011512, AL163249, G09444) and the CCT8 paralogue (Accession No.: LOC149003); RAP2A (Accession No.: NM_021033) and the RAP2A paralogue (Accession No.: NM_002886); ME2 (Accession No.: NM_002396) and an ME2 paralogue; CDK8 (Accession No.: NM_001260) and a CDK8 paralogue (Accession No.: LOC129359); ACAA2 (Accession No.: NM_006111) and an ACAA2 paralogue; DSCR3 (Accession Nos.: NT_011512, NM_006052, AP001728) and a DSCR3 paralogue; C21orf19 (Accession Nos.: NM_015955, NT_005367, AF363446, AP001725) and a C21orf19 paralogue; KIAA0958 (Accession Nos.: NT_011514, NM_015227, AL163301, AB023175) and a KIAA0958 paralogue; TTC3 (Accession Nos.: NM_003316, NT_011512, AP001727, AP001728) and a TTC3 paralogue; ITSN1 (Accession Nos.: NT_011512, NM_003024, XM_048621) and a ITSN1 paralogue.

Additional paralogous gene sets which can be used as query sequences include the HOX genes. Related HOX genes and their chromosomal locations are described in Popovici et al., 2001, *FEBS Letters* 491: 237-242. Candidate paralogs for genes in chromosomes 1, 2, 7, 11, 12, 14, 17, and 19 are described further in Lundin, 1993, *Genomics* 16: 1-19. The entireties of these references are incorporated by reference herein.

In still another aspect, query sequences are identified by targeting regions of the human genome which are duplicated (e.g., as determined by analysis of the completed human genome sequence) and these sequences are used to search database(s) of human genomic sequences to identify sequences at least 80% identical over an amplifiable sequence region.

In a further aspect, a clustering program is used to group expressed sequences in a database which share consensus sequences comprising at least about 80% identity over an amplifiable sequence region, to identify suitable paralogs. Sequence clustering programs are

WO 03/060919

PCT/US02/19764

known in the art (see, e.g., Guan et al., 1998, *Bioinformatics* 14(9): 783-8; Miller et al., *Comput. Appl. Biosci.* 13(1): 81-7; and Parsons, 1995, *Comput. Appl. Biosci.* 11(6): 603-13, the entireties of which are incorporated by reference herein).

While computational methods of identifying suitable paralog sets are preferred, any method of detecting sequences which are capable of significant base pairing can be used and are encompassed within the scope of the invention. For example, paralogous gene sets can be identified using a combination of hybridization-based methods and computational methods. In this aspect, a target chromosomal region can be identified and a nucleic acid probe corresponding to that region can be selected (e.g., from a BAC library, YAC library, cosmid library, cDNA library, and the like) to be used in *in situ* hybridization assays (FISH or ISH assays) to identify probes which hybridize to multiple chromosomes (preferably fewer than about 5). The specificity of hybridization can be verified by hybridizing a target probe to flow sorted chromosomes thought to contain the paralogous gene(s), to chromosome-specific libraries and/or to somatic cell hybrids comprising test chromosome(s) of interest (see, e.g., Horvath, et al., 2000, *Genome Research* 10: 839-852). Successively smaller probe fragments can be used to narrow down a region of interest thought to contain paralogous genes and these fragments can be sequenced to identify optimal paralogous gene sets.

Although in one aspect, paralogous genes are used as amplification templates in methods of the invention, any paralogous sequence which comprises sufficient sequence identity to provide substantially identical amplification templates having fewer than about 20% nucleotide differences over an amplifiable region. For example, pseudogenes can be included in paralog sets as can non-expressed sequences, provided there is sufficient identity between sequences in each set.

Sources of Nucleic Acids

In one aspect, the method according to the invention is used in prenatal testing to assess the risk of a child being born with a chromosomal abnormality. For those types of assays, samples of DNA are obtained by procedures such as amniocentesis (e.g., Barter, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 99: 795-805; U.S. Patent No. 5,048,530), chorionic villus sampling (e.g., Inamura et al., 1996, *Prenat. Diagn.* 16(3): 259-61), or by maternal peripheral blood sampling (e.g., Iverson et al., 1981, *Prenat. Diagn.* 9: 31-48; U.S. Patent No. 6,210,574). Fetal cells also can be obtained by cordocentesis or percutaneous umbilical blood sampling, although this technique is

WO 03/060919

PCT/US02/19764

technically difficult and not widely available (see Erbe, 1994, *Scientific American Medicine* 2, section 9, chapter IV, Scientific American Press, New York, pp 41-42). Preferably, DNA is isolated from the fetal cell sample and purified using techniques known in the art (see, e.g., Maniatis et al., In *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, New York, 1982)).

- 5 However, in another aspect, cells are obtained from adults or children (e.g., from patients suspected of having cancer). Cells can be obtained from blood samples or from a site of cancer growth (e.g., a tumor or biopsy sample) and isolated and purified as described above, for subsequent amplification.

Amplification Conditions

- 10 Having identified a paralogous gene set comprising a target gene whose dosage is to be determined and a reference gene having a known dosage, primer pairs are selected to produce amplification products from each gene which are similar or identical in size. In one aspect, the amplification products generated from each paralogous gene differ in length by no greater than about 0-75 nucleotides, and preferably, by no greater than about 0 to 25 nucleotides. Primers for
15 amplification are readily synthesized using standard techniques (see, e.g., U.S. Patent No. 4,458,066; U.S. Patent No. 4,415,732; and Molecular Protocols Online at http://www.protocol-online.net/molbio/PCR/pcr_primer.htm). Preferably, primers are from about 6-50 nucleotides in length and amplification products are at least about 50 nucleotides in length.

- 20 Although in a preferred method, primers are unlabeled, in some aspects, primers are labeled using methods well known in the art, such as by the direct or indirect attachment of radioactive labels, fluorescent labels, electron dense moieties, and the like. Primers can also be coupled to capture molecules (e.g., members of a binding pair) when it is desirable to capture amplified products on solid supports (see, e.g., WO 99/14376).

- 25 Amplification of paralogous genes can be performed using any method known in the art, including, but not limited to, PCR (Innis et al., 1990, *PCR Protocols. A Guide to Methods and Application*, Academic Press, Inc. San Diego), Ligase Chain Reaction (LCR) (Wu and Wallace, 1989, *Genomics* 4: 560; Landegren, et al., 1988, *Science* 241: 1077), Self-Sustained Sequence Replication (3SR) (Guatelli et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), and the like. However, preferably, genes are amplified by PCR using standard conditions (see,
30 for example, as described in U.S. Patent No. 4,683,195; U.S. Patent No. 4,800,159; U.S. Patent No. 4,683,202; and U.S. Patent No. 4,889,818).

WO 03/060919

PCT/US02/19764

In one aspect, amplified DNA is immobilized to facilitate subsequent quantitation. For example, primers coupled to first members of a binding pair can be attached to a support on which is bound second members of the binding pair capable of specifically binding to the first members. Suitable binding pairs include, but are not limited to, avidin: biotin, antigen: antibody pairs; reactive pairs of chemical groups, and the like. In one aspect, primers are coupled to the support prior to amplification and immobilization of amplification products occurs during the amplification process itself. Alternatively, amplification products can be immobilized after amplification. Solid supports can be any known and used in the art for solid phase assays (e.g., particles, beads, magnetic or paramagnetic particles or beads, dipsticks, capillaries, microchips, glass slides, and the like) (see, e.g., as described in U.S. Patent No. 4,654,267). Preferably, solid supports are in the form of microtiter wells (e.g., 96 well plates) to facilitate automation of subsequent quantitation steps.

Quantitating Gene Dose

Quantitation of individual paralogous genes can be performed by any method known in the art which can detect single nucleotide differences. Suitable assays include, but are not limited to, real time PCR (TAQMAN[®]), allele-specific hybridization-based assays (see, e.g., U.S. Patent No. 6,207,373); RFLP analysis (e.g., where a nucleotide difference creates or destroys a restriction site), single nucleotide primer extension-based assays (see, e.g., U.S. Patent No. 6,221,592); sequencing-based assays (see, e.g., U.S. Patent No. 6,221,592), and the like.

In a preferred embodiment of the invention, quantitation is performed using a pyrosequencing[™] method (see, e.g., U.S. Patent No. 6,210,891 and U.S. Patent No. 6,197,505, the entireties of which are incorporated by reference). In this method, the amplification products of the paralogous genes are rendered single-stranded and incubated with a sequencing primer comprising a sequence which specifically hybridizes to the same sequence in each paralogous gene in the presence of DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase, apyrase, adenosine 5' phosphosulfate (APS), and luciferin. Suitable polymerases include, but are not limited to, T7 polymerase, (exo⁻) Klenow polymerase, Sequenase[®] Ver. 2.0 (USB U.S.A.), Taq[™] polymerase, and the like. The first of four deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) is added (with deoxyadenosine α -thio-triphosphate being used rather than dATP) and, if incorporated into the primer through primer extension, pyrophosphate (PPi) is released in an amount which is equimolar to the amount of the incorporated nucleotide. PPi is then quantitatively converted to ATP by ATP sulfurylase in the presence of APS. The release of ATP into the sample causes

WO 03/060919

PCT/US02/19764

luciferin to be converted to oxyluciferin by luciferase in a reaction which generates light in amounts proportional to the amount of ATP. The released light can be detected by a charge-coupled device (CCD) and measured as a peak on a pyrogram™ display (e.g., in a Pyrosequencing™ PSQ 96 DNA/SNP analyzer available from Pyrosequencing™, Inc.,
5 Westborough, MA 01581). The apyrase degrades the unincorporated dNTPs and when degradation is complete (e.g., when no more light is detected), another dNTP is added. Addition of dNTPs is performed one at a time and the nucleotide sequence is determined from the signal peak. The presence of two contiguous bases comprising identical nucleotides will be detectable as a proportionally larger signal peak.

10 In a currently preferred embodiment, chromosomal dosage in a nucleic acid sample is evaluated by using a pyrosequencing™ method to determine the ratio of sequence differences in paralogous sequences which differ at at least one nucleotide position. For example, in one aspect, two paralogous sequences from two paralogous genes, each on different chromosomes, are sequenced and the ratios of different nucleotide bases at positions of sequence differences in
15 the two paralogs are determined. A 1:1 ratio of different nucleotide bases at a position where the two sequences differ indicates a 1:1 ratio of chromosomes. However, a difference from a 1:1 ratio indicates the presence of a chromosomal imbalance in the sample. For example, a ratio of 3:2 would indicate the presence of a trisomy. Paralogous sequences on the same chromosome can also be evaluated in this way (for example, to determine the loss or gain of a particular
20 chromosome arm).

Using a Pyrosequencing™ PSQ 96 DNA/SNP analyzer, 96 samples can be analyzed simultaneously in less than 30 minutes. By using sequencing primers which hybridize adjacent to the portion of the paralog sequence which is unique to each of the paralogs, it can be possible to distinguish between the paralogs after only one or a few rounds of dNTP incorporation (i.e.,
25 performing minisequencing). The analysis does not require gel electrophoresis or any further sample processing since the output from the Pyrosequencer provides a direct quantitative ratio enabling the user to infer the genotype and hence phenotype of the individual from whom the sample is obtained. By using a paralogous gene as a natural internal control, the amount of variability from sample handling is reduced. Further, no radioactivity or labeling is required.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Diagnostic Applications

Amplification of paralogous gene sets can be used to determine an individual's risk of having a chromosomal abnormality. Using a paralogous gene set including a target gene from a chromosome region of interest and a reference gene, preferably on a different chromosome, the ratio of the genes is determined as described above. Deviations from a 1:1 ratio of target to reference gene indicates an individual at risk for a chromosomal abnormality. Examples of chromosomal abnormalities which can be evaluated using the method according to the invention are provided in Table 2 below.

Chromosome Abnormality	Disease Association
X, Y	
XO	Turner's Syndrome
XXY	Klinefelter syndrome
XYY	Double Y syndrome
XXX	Trisomy X syndrome
XXXX	Four X syndrome
Xp21 deletion	Duchenne's /Becker syndrome, congenital adrenal hypoplasia, chronic granulomatous disease
Xp22 deletion	steroid sulfatase deficiency
Xq26 deletion	X-linked lymphoproliferative disease
1	
1p- (somatic)	neuroblastoma
monosomy	
trisomy	
2	
monosomy	
trisomy 2q	growth retardation, developmental and mental delay, and minor physical abnormalities
3	
monosomy	
trisomy (somatic)	non-Hodgkin's lymphoma
4	
monosomy	
trisomy (somatic)	Acute non-lymphocytic leukaemia (ANLL)
5	
5p-	Cri du chat; Lejeune syndrome
5q- (somatic)	myelodysplastic syndrome
monosomy	
trisomy	
6	
monosomy	
trisomy (somatic)	clear-cell sarcoma
7q11.23 deletion	William's syndrome
monosomy	monosomy 7 syndrome of childhood; somatic: renal cortical adenomas; myelodysplastic syndrome
trisomy	
8	
8q24.1 deletion	Langer-Giedon syndrome
8	
monosomy	
trisomy	myelodysplastic syndrome; Warkany syndrome; somatic: chronic myelogenous leukemia
9	
monosomy 9p	Air's syndrome
monosomy	
9p partial trisomy	Reithro syndrome
trisomy	complete trisomy 9 syndrome; mosaic trisomy 9 syndrome
10	
monosomy	
trisomy (somatic)	AML or ANLL

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Table 2 (cont'd). Chromosome Abnormalities and Disease		
Chromosome Abnormality	Disease Association	
11	11p-	Aniridia, Wilms tumor
	11q-	Jacobson Syndrome
	monosomy (somatic)	myeloid lineages affected (ANLL, MDS)
	trisomy	
12	monosomy	
	trisomy (somatic)	CLL, Juvenile granulosa cell tumor (JGCT)
13	13q-	13q- syndrome; Orbelli syndrome
	13q14 deletion	retinoblastoma
	monosomy	
	trisomy	Patau's syndrome
14	monosomy	
	trisomy (somatic)	myeloid disorders (MDS, ANLL, atypical CML)
15	15q11-q13 deletion	Prader-Willi, Angelman's syndrome
	monosomy	
	trisomy (somatic)	myeloid and lymphoid lineages affected, e.g., MDS, ANLL, ALL, CLL
16	16q13.3 deletion	Rubinstein-Taybi
	monosomy	
	trisomy (somatic)	papillary renal cell carcinomas (malignant)
17	17p- (somatic)	17p syndrome in myeloid malignancies
	17q11.2 deletion	Smith-Magenis
	17q13.3	Miller-Dieker
	monosomy	
	trisomy (somatic)	renal cortical adenomas
18	17p11.2-12 trisomy	Charcot-Marie Tooth Syndrome type 1; HNPP
	18p-	18p partial monosomy syndrome or Grouchy Lamy Thierry syndrome
	18q-	Grouchy Lamy Salmon Landry Syndrome
	monosomy	
	trisomy	Edwards Syndrome
19	monosomy	
	trisomy	
20	20p-	trisomy 20p syndrome
	20p11.2-12 deletion	Alagille
	20q-	somatic: MDS, ANLL, polycythemia vera, chronic neutrophilic leukemia
	monosomy	
	trisomy (somatic)	papillary renal cell carcinomas (malignant)
21	monosomy	
	trisomy	Down's syndrome
	trisomy	Down's syndrome
22	22q11.2 deletion	DiGeorge's syndrome, velocardiofacial syndrome, conotruncal anomaly face syndrome, autosomal dominant Opitz G/BBB syndrome, Cayler cardiofacial syndrome
	monosomy	
	trisomy	complete trisomy 22 syndrome

Generally, evaluation of chromosome dosage is performed in conjunction with other assessments, such as clinical evaluations of patient symptoms. For example, prenatal evaluation may be particularly appropriate where parents have a history of spontaneous abortions, still

5 births and neonatal death, or where advanced maternal age, abnormal maternal sera results, and

WO 03/060919

PCT/US02/19764

in patients with a family history of chromosomal abnormalities. Postnatal testing may be appropriate where there are multiple congenital abnormalities, clinical manifestations consistent with known chromosomal syndromes, unexplained mental retardation, primary and secondary amenorrhea, infertility, and the like.

5 The method is premised on the assumption that the likelihood that two chromosomes will be altered in dose at the same time will be negligible (i.e., that the test and reference chromosome comprising the test and reference paralogous sequence, respectively, are not likely to be monosomic or trisomic at the same time). Further, assays are generally performed using samples comprising normal complements of chromosomes as controls. However, in one aspect, 10 multiple sets of paralogous genes, each set from different pairs of chromosomes, are used to increase the sensitivity of the assay. In another aspect, for example, in postnatal testing, amplification of an autosomal paralogous gene set is performed at the same time as amplification of an X chromosome sequence since X chromosome dosage can generally be verified by phenotype. In still another aspect, a hierarchical testing scheme can be used. For example, a 15 positive result for trisomy 21 using the method according to the invention could be followed by a different test to confirm altered gene dosage (e.g., such as by assaying for increases in PKFL-C1E21 activity and an absence of M4-type phosphofructokinase activity; see, e.g., as described in Vora, 1981, *Blood* 57: 724-731), while samples showing a negative result would generally not be further analyzed. Thus, the method according to the invention would provide a high throughput 20 assay to identify rare cases of chromosome abnormalities which could be complemented with lower throughput assays to confirm positive results.

Similarly, the assumption that loss or gain of a paralogous gene reflects loss or gain of a chromosome versus a chromosome arm versus a chromosome band versus only the paralogous gene itself, can be validated by complementing the method according to the invention with 25 additional tests, for example, by using multiple sets of paralogous genes on the same chromosome, each set corresponding to a different chromosome region.

The invention will now be further illustrated with reference to the following example. It will be appreciated that what follows is by way of example only and that modifications to detail may be made while still falling within the scope of the invention.

WO 03/008919

PCT/US02/19764

Examples**EXAMPLE 1**

The following examples describe a PCR based method for detecting a chromosomal imbalance, for example, trisomy 21 by coamplifying, with a single set of primers, paralogous genes present in different chromosomes.

The rationale for using paralogous genes is that since they are of almost identical size and sequence composition, they will PCR amplify with equal efficiency using a single pair of primers. Single nucleotide differences between the two sequences are identified, and the relative amounts of each allele, each of which represents a chromosome, are quantified (see Figure 9). Since the pyrosequencing method is highly quantitative one can accurately assay the ratio between the chromosomes.

For detecting Trisomy 21, the method involves the following steps:

- a. Identification of suitable candidates for co-amplification. (paralogous genes)
- b. Design of multiple assays for co-amplification of paralogous sequences between human chromosome 21 and other chromosomes.
- c. Testing the assays using a panel of Trisomy 21 and control DNA samples.
- d. Testing the robustness of the method on a suitably large retrospective sample.

Analogous steps are used to detect any chromosomal imbalance according to the invention.

20 Identification of Paralogous Genes

In order to identify paralogous sequences between chromosome 21 and the rest of the genome all chromosome 21 genes and pseudogenes (cDNA sequences) located between the 21q 22.1 region and the telomere were blasted against (compared with) the non redundant human genome database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html>), (Figure 4) as this region is present in three copies in all individuals reported with Down syndrome.

From this, 10 potential candidate pairs which could serve as suitable targets for co-amplification were identified (table 1A).

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Most of these pairs are formed by a functional gene and an unspliced pseudogene suggesting that the most common origin of these paralogous copies is retrotransposition rather than ancient chromosomal duplications.

Samples

5 In order to perform the retrospective validation studies for the two optimized tests, 400 DNA samples (200 DNAs from trisomic individuals and 200 control DNAs) were used. These samples were collected with informed consent by the Division of Medical Genetics, University of Geneva over the past 15 years. The samples were extracted at different periods with presumably different methods, hence the quality of these DNAs is not expected to be uniform.

10 Concerning the use of these samples for the development of a Diagnostic method, permission was granted by the local ethics committee for this specific use.

The invention provides for methods wherein the samples used are either freshly prepared or stored, for example at 4°C, preferably frozen at at least -20°C, and more preferably frozen in liquid nitrogen.

15 *Assay Design*

Using the results summarized in table 1A, a first round of assays were designed and performed.

20 A critical aspect for assay development is to choose regions of very high sequence conservation (between 70 and 95% and preferably between 85 - 95%) that are contained within the same exon in both genes (this is necessary so that both amplicons are of equal size), and that comply with the following conditions:

1. There are long stretches of perfect sequence conservation from which compatible primers can be designed.
 2. One or more single nucleotide differences are present within the amplicons which are surrounded by perfectly homologous sequence so that a suitable sequencing primer can be designed.
- 25

Using these criteria assays were developed for the GABPA gene and the CCT8 gene.

WO 03/00919

PCT/US02/19764

EXAMPLE 2

Trisomy 21 is detected by providing a sample comprising at least one cell from a patient (e.g., a fetus) and extracting DNA from the cell(s) using standard techniques. The sample is incubated with a single pair of primers which will specifically anneal to both SIM2 (GenBank accession nos. U80456, U80457, and AB003185) and SIM1 genes (GenBank accession no. U70212), paralogous genes located on chromosome 21 and chromosome 6, respectively, under standard annealing conditions used in PCR. Alignment of partial sequences of SIM2 and SIM1 is shown in Figure 1.

Using primer sequences SIMAF (GCA GTG GCTACTTGAAGAT) and SIMAR (TCTCGGTGATGGCACTGG), the sample is subjected to PCR conditions. For example, providing 5.0 μ l of amplification buffer, 200 μ M dNTPs, 3 mM MgCl₂, 50 ng DNA, and 5 Units of Taq polymerase, 35 cycles of touchdown PCR (e.g., 94°C for 30 seconds; 63-58°C for 30 seconds; and 72°C for 10 seconds) generates suitable amounts of amplification products for subsequent detection of sequence differences between the two paralogs.

The amount of amplified products corresponding to SIM1 and SIM2 is determined by assaying for single nucleotide differences which distinguish the two genes (see circled sequences in Figure 1). Preferably this is done by a pyrosequencingTM method, using sequencing primer SIMAS (GTGGGGCTGGTGGCCGTG). The expected sequence obtained from the pyrosequencingTM reaction is GGCC**A**[C/G]TCGCTGCC; the brackets and bold highlighting indicating the position of a sequence difference between the two sequences.

The allele ratio of SIM2:SIM1 is determined by comparing the ratio of one base with respect to another at the site of a nucleotide difference between the two paralogs. As can be seen in Figure 2, the ratio of such a base is 1:1.5 in a Down syndrome individual and 1:1 in a normal individual.

EXAMPLE 3

The following example describes a method for detecting Trisomy 21 according to the method of the invention, wherein one member of the paralogous gene pair is GABPA.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Trisomy 21 is detected by providing a sample comprising at least one cell from a patient (e.g., a fetus) and extracting DNA from the cell(s) using standard techniques. The results of a pilot experiment are presented in Figure 11. Following the performance of the pilot experiments, the assays were further optimized by identifying sets of primers with a higher efficiency of
5 amplification and a smaller intra and inter sample variation. The details of the optimized assay for detection of trisomy 21 are provided below.

Four Hundred DNA samples (200 trisomic and 200 control samples) were incubated with a single pair of primers which will specifically anneal to both a GABPA gene paralogue (GenBank accession nos. LOC154840) and GABPA genes (GenBank accession no.
10 NM_002040), paralogous genes located on chromosome 7 and chromosome 21, respectively, under standard annealing conditions used in PCR. Alignment of sequences of the GABPA gene paralogue and GABPA is shown in Figure 3.

Using primer sequences GABPAF (5 biotin CTTACTGATAAGGACGCTC) and GABPAR (CTCATAGTTCATCGTAGGCT) (Figure 12), the sample is subjected to PCR
15 conditions. For example, providing 5.0 μ l of amplification buffer, 200 μ M dNTPs, 3 mM MgCl₂, 50 ng DNA, and 5 Units of Taq polymerase, 35 cycles of touchdown PCR (e.g., 94°C for 30 seconds; 63-58°C for 30 seconds; and 72°C for 10 seconds) generates suitable amounts of amplification products for subsequent detection of sequence differences between the two paralogs. Figure 12 demonstrates the optimized assay showing the primers used. Figures 3 and
20 7 show the positions (circled or indicated by arrow) used for quantification.

The amount of amplified products corresponding to the GABPA gene paralogue and GABPA was determined by assaying for single nucleotide differences which distinguish the two genes (see circled sequence in Figure 12 or sequence marked by an arrow in Figure 3). Preferably this is done by a pyrosequencing™ method, using sequencing primer GABPAS
25 (TCACCAACCCAAGAAA).

Samples were analyzed using a pyrosequencer. A threshold of 10 units per single nucleotide incorporation was set as a quality control for the DNA, below which the samples were discarded from the analysis. Following this procedure 169 samples were discarded and the remainder were analyzed. Although this threshold is quite conservative, assays with lower signal intensities produce less reliable quantifications. Figure 13 shows the distribution of G values for
30 the 230 samples analyzed. The G allele represents the relative proportion of chromosome 21.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

Control DNAs had an average G value of 51.11% with a Standard deviation of 1.3%. Trisomic individuals had an average value of 59.54% with a standard deviation of 1.90%. As seen from the graph the two groups are well separated. However for samples with values between 53.0-54.9 no clear diagnosis can be given. However, only 5% of samples fall within this interval and hence an unambiguous diagnosis can be given in 95% of the cases according to the data obtained.

In addition there were 4 samples for which a wrong diagnosis was given. Further analysis using microsatellite markers showed that 3 of these individuals had been misclassified, and hence were controls rather than trisomic individuals. The fourth sample (DS0006-F5) was confirmed to be trisomic and hence probably represents an error due to contamination in the reaction, since the same sample gave a correct result with the CCT8 assay.

Figure 14 shows typical programs for the GABPA assay. Arrows indicate positions used for chromosome quantification.

EXAMPLE 4

The following example describes a method for detecting Trisomy 21 according to the method of the invention, wherein one member of the paralogous gene pair is CCT8.

Trisomy 21 is detected by providing a sample comprising at least one cell from a patient (e.g., a fetus) and extracting DNA from the cell(s) using standard techniques.

DNA samples (trisomic and control samples) were incubated with a single pair of primers which will specifically anneal to both CCT8 (GenBank accession no. NM_006585) and the CCT8 gene paralogue (GenBank accession no. LOC149003), paralogous genes located on chromosome 21 and chromosome 1, respectively, under standard annealing conditions used in PCR. Alignment of sequences of a CCT8 paralogue and CCT8 is shown in Figure 4.

Using primer sequences CCT8F (ATGAGATTCCTCAATTG) and CCT8R (GGTAATGAAGTATTTCTGG) (Figure 15), the sample is subjected to PCR conditions. For example, providing 5.0 µl of amplification buffer, 200 µM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 50 ng DNA, and 5 Units of Taq polymerase, 35 cycles of touchdown PCR (e.g., 94°C for 30 seconds; 63-58°C for 30 seconds; and 72°C for 10 seconds) generates suitable amounts of amplification products for subsequent detection of sequence differences between the two paralogs. Figure 15

WO 03/060919

PCT/US02/19764

demonstrates the optimized assay showing the primers used. Figures 4 and 15 demonstrate the position (circled or indicated by arrow) which was used for quantification.

5 The amount of amplified products corresponding to the CCT8 paralogue and CCT8 was determined by assaying for single nucleotide differences which distinguish the two genes (see circled sequence or sequence marked by arrow in Figure 4 and 15). Preferably this is done by a pyrosequencingSM method, using sequencing primer CCT8S (AAACAATATGGTAATGAA).

Samples were analyzed using a pyrosequencer as described in example 3. Following this procedure 210 samples were discarded and the remainder were analyzed.

10 Figure 16 shows the distribution of T values (proportion of IIC21) for the 190 samples analyzed. The T allele represents the relative proportion of chromosome 21. As seen from the graph, the distribution is very similar to that of the GABPA assay, with well separated medians and a region in the middle for which no clear diagnosis can be made. In this case samples with values between 48-50 could not be diagnosed, but as in Example 3, only 5% of the samples fall within this range. In addition there were 2/190 samples for which a wrong diagnosis was given, 15 probably as a result of contamination. Figure 17 shows typical programs for the CCT8 assay. Arrows indicate positions used for chromosome quantification.

The data from the validation studies for the GABPA and CCT8 tests show that using each assay separately, 95% of the samples can be correctly diagnosed, with a 1-1.5% error rate of unknown origin (likely to be caused by contamination). However if both tests are considered 20 together, the data show that 98% of the samples can be correctly diagnosed, (while for the remaining 2% no diagnosis can be given) and more importantly the 3 errors could be easily detected, as both assays gave contradictory results. This argues strongly for the use of the two tests in parallel to minimize the probability of a false diagnosis.

25 Variations, modifications, and other implementations of what is described herein will occur to those of ordinary skill in the art without departing from the spirit and scope of the invention as claimed. Accordingly, the invention is to be defined not by the preceding illustrative description but instead by the spirit and scope of the following claims.

What is claimed is:

WO 03/008919

PCT/US02/19764

CLAIMS

1. A method for detecting risk of a chromosomal imbalance, comprising:
providing a sample of nucleic acids from an individual;
amplifying a first sequence at a first chromosomal location to produce a first
5 amplification product;
amplifying a second sequence at a second chromosomal location to produce a
second amplification product, said first and second amplification products comprising
greater than about 80% identity, and comprising at least one nucleotide difference at
least one nucleotide position;
10 determining the ratio of said first and second amplification products; wherein a
ratio which is not 1:1 is indicative of a risk of a chromosomal imbalance.
2. The method according to claim 1, wherein said amplifying is performed using PCR.
3. The method according to claim 1, wherein said first and second sequence are amplified
using a single pair of primers.
- 15 4. The method according to claim 1, wherein said first and second chromosomal location
are on different chromosomes.
5. The method according to claim 1, wherein said first and second sequences are paralogous
sequences.
6. The method according to claim 1, wherein said first and second amplification products
20 are the same number of nucleotides in length.
7. The method according to claim 1, further comprising identifying a first nucleotide at said
at least one nucleotide position in said first amplification product and identifying a
second nucleotide at said at least one nucleotide position in said second amplification
product.
- 25 8. The method according to claim 7, wherein said identifying is performed by sequencing
said first and second amplification product.
9. The method according to claim 8, wherein said sequencing is pyrosequencing™.

WO 03/00919

PCT/US02/19764

10. The method according to any of claims 7-9, further comprising determining the amount of said first and second nucleotide at said at least one nucleotide position in said sample, wherein the ratio of said first and second nucleotide is proportional to the dose of said first and second sequence in said sample.
- 5 11. The method according to claim 10, further comprising the step of determining the amount of a nucleotide at a nucleotide position in said first and second amplification product comprising an identical nucleotide.
12. The method according to claim 1, wherein said chromosome imbalance is a trisomy.
13. The method according to claim 12, wherein said trisomy is trisomy 21.
- 10 14. The method according to claim 1, wherein said chromosome imbalance is a monosomy.
15. The method according to claim 1, wherein said chromosome imbalance is a duplication.
16. The method according to claim 1, wherein said chromosome imbalance is a deletion.
17. The method according to claim 3, wherein said primers are coupled with a first member of a binding pair for binding to a solid support on which a second member of a binding pair is bound, said second member capable of specifically binding to said first member.
- 15 18. The method according to claim 17, further comprising providing said solid support comprising said second member and binding said primers comprising said first member to said support.
19. The method according to claim 17, wherein said binding is performed prior to said
20 amplifying.
20. The method according to claim 18, wherein said binding is performed after said amplifying.
21. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of SIM1 and said second sequence comprises the sequence of SIM2.
- 25 22. The method according to claim 3, wherein said pair of primers comprises SIMAF (GCAGTGGCTACTTGAAGAT) and SIMAR (TCTCGG1GATGGCACTGG).

WO 03/000919

PCT/US02/19764

23. The method according to claim 1, wherein said sample comprises at least one fetal cell.
24. The method according to claim 1, wherein said sample comprises somatic cells.
25. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of a GABPA paralogue and the second sequence comprises the sequence of GABPA.
- 5 26. The method of claim 25, wherein said GABPA paralogue comprises the sequence presented in Figure 3.
27. The method according to claim 3, wherein said pair of primers comprises GABPAF (CTTACTGATAAGGACGCTC) and GABPAR (CTCATAGTTCAACGTAGGCT).
28. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of a CCT8 paralogue and the second sequence comprises the sequence of CCT8.
- 10 29. The method according to claim 28, wherein said CCT8 paralogue comprises the sequence presented in Figure 4.
30. The method according to claim 3, wherein said pair of primers comprises CCT8F (ATGAGATTCCTCCTAATTG) and CCT8R (GGTAATGAAGTATTCTGG).
- 15 31. The method according to claim 1, wherein said second sequence comprises the sequence of C210RF19.
32. The method according to claim 1, wherein said second sequence comprises the sequence of DSCR3.
33. The method according to claim 1, wherein said second sequence comprises the sequence of K1AA0958.
- 20 34. The method according to claim 1, wherein said second sequence comprises the sequence of TTC3.
35. The method according to claim 1, wherein said second sequence comprises the sequence of ITS1.
- 25 36. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of a RAP2A paralogue and the second sequence comprises the sequence of RAP2A sequence.

WO 03/060919

PCT/US02/19764

37. The method according to claim 36, wherein said RAP2A paralogue comprises the sequence presented in Figure 5.
38. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of a CDK8 paralogue and the second sequence comprises the sequence of CDK8.
- 5 39. The method according to claim 38, wherein said CDK8 paralogue comprises the sequence presented in Figure 7.
40. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of an ACAA2 paralogue and the second sequence comprises the sequence of ACAA2.
41. The method according to claim 40, wherein said ACAA2 paralogue comprises the
10 sequence presented in Figure 8.
42. The method according to claim 1, wherein said first sequence comprises the sequence of an ME2 paralogue and the second sequence comprises the sequence of ME2.
43. The method according to claim 42, wherein said ME2 paralogue comprises the sequence presented in Figure 6.

Alignment of partial sequences of Sim1 and Sim2

Sim1	757	aaggtcaccctccactgcagggctacttgaagatccgcagacagccctggacatgtccccc
Sim2	597	
Sim1	817	ttcgacggctgtaccacaaacgtggccctggctggccactcgtcctcccagc
Sim2	657	
Sim1	181	K V I H C S G Y L K I R Q Y M L D M S L
Sim2	201	Y D S C Y Q I V G L V A V G Q S L P P S

FIG. 1

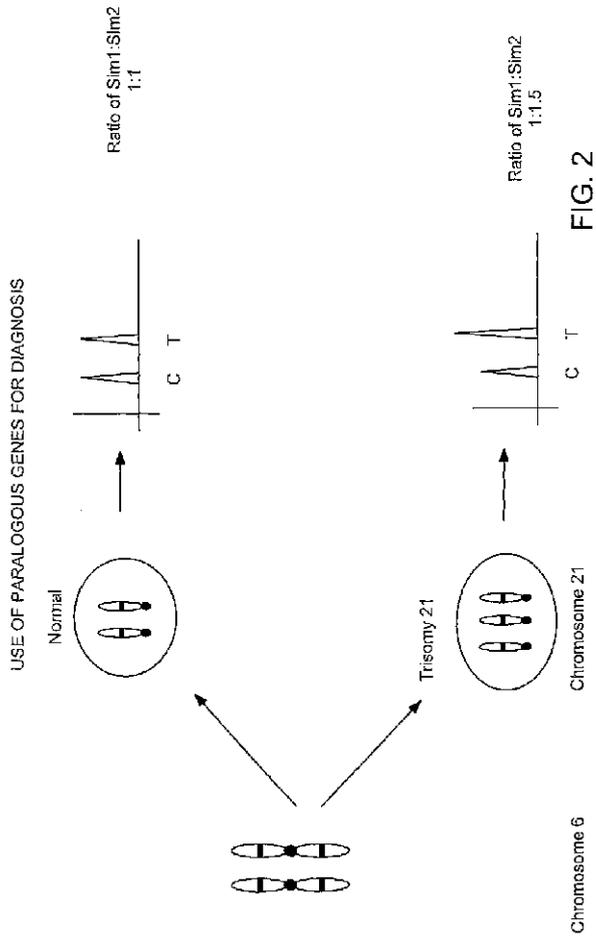


FIG. 2

WO 03/008919

PCT/US02/19764

4/19

CC18

```

atgaaatagcctgcagaaaagccatgagatctctcctaattgggtatgttctctgcaa
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
atgaaatagcctgcagaaaagccatgagatctctcctaattgggtacgttctctgcaa
      ↑
aaaacctcgagatattgatgaagtctctcactctactctccataaaggagtaaac
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
aaaacctcgagatggtgatgaagtctctcactctactctccataaaggagtaaac
      ↑
aatatggtaatgaagatattctggccaagcttattgtccaaggcatcgctatctcttc
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
aatatggtaatgaagatattctggccaagcttattgtccaaggcatcgctatctcttc

ctgattccggccatttccaatggttgataaacatcagagtttgtaaaattctgggtctggta
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
ctgattctggccatttccaagttgataaacatcagagtttgtaaaattctgggtctggta

```

Accession HC21 : NM_006585
Accession HC1 : LOC149003 (predicted gene model)

FIG. 4

WO 03/008919

PCT/US02/19764

6/19

ME2

```

aagttacagaatacctatatgctataataaattggctttc-cgataccccagaacctgaagac
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
aagttacagaatacctgtatgctataataaattggctttc-cgataccccagaacctgaagac

aagggccaatatgtttaaagaagaacatggcggagtgtaatatgatccctgctgcccagat
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
aagggccaatatgtttaaagaagaacatgatggagtgtaatatgatccctgctgcccagat

gtgtatgaatggccagaaatcctgcatcaagccctcctgtgataacagaaatagaagcactcc
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
gtgtatgaatggccagaaatcctgcatcaagccctcctgtgataacagaaatagaagcactcc
cctgataaataactttctgtgctccaggggaacccctttttccagacaagaagagataatgt
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
cctgataaataactttctgtgctccaggggaacccctttttccagacaagaagagataatgt

cttcagtttta
||||| |||||
cctcagtttta

```

Accession HC18 : NM_002396
Accession HC9 : unannotated pseudogene

FIG. 6

WO 03/008919

PCT/US02/19764

7/19

CDK8

ttagcagattggatocagtggtttacattctggtaccgagccocctgaactactctt
|||||
ttagcagattggatocagtggtttacattctggtaccgagccocctgaactactctt
|||||
ggagcaaggcattataccaagaactattgatatttgggc--tatagggtgatatttgaga
|||||
tgagttaaggcattataccaagaactattgatatttgggc--tatagggtgatatttgaga
|||||
actactaaagtcagaaccataatctcactgtcgaacaaggaggacatcaaaaactagtaatcc
|||||
actactaatgtcaaaaaccaatattccaggtcogaacaaggaggacatcaaaaactagtaatcc
|||||
ttatccaatgaccagctggacagatattcaatgtaatgggatttctctgcagataaaga
|||||
ttattccaatgactggctggacagaaactcaatgtaatgggatttctctgcagataaaga
|||||
ttgggaagatataaaaaagatgctgtaacattcaacattcaatgtaatgggatttctcagaagaaa
|||||
cggggaagatataaaaaagatgctgtaacattcaacattcaatgtaatgggatttctcagaagaaa
|||||
tacgtataccaactgcagccttatcaagtatatggaaaaaacataaagttaaaccagatag
|||||
tatgtataactgacgcttatcaagtatatggaaaaaacataaagttaaaccagatag
|||||

Accession HC13 : NM_001260
Accession HC2 : LOC129359 (predicted gene)

FIG. 7

WO 03/008919

PCT/US02/19764

8/19

ACAA2

```

agctggaagattctttatgggtatcattaacagatcagcatgtccagctcccatggcaa
|||||
agctggaagattctttatgggtatcattaacagatcagcatgtccagctcccatggcaa
|||||
tgactgcagagaatcttactgtaaacacacaaaataagcagagaagaatgtgacaaaatctg
|||||
tgactgcagagaatcttctgtaaacacacaaaataagcagagaagaatgtgacaaaatctg
|||||
ccctgcagtcacagcagagatggaaagctg
|||||
ccctgcagtcacagcagagatggaaagctg

```

Accession HC18 : NM_006111
Accession HC2 : unannotated pseudogene.

FIG. 8

WO 03/008919

PCT/US02/19764

9/19

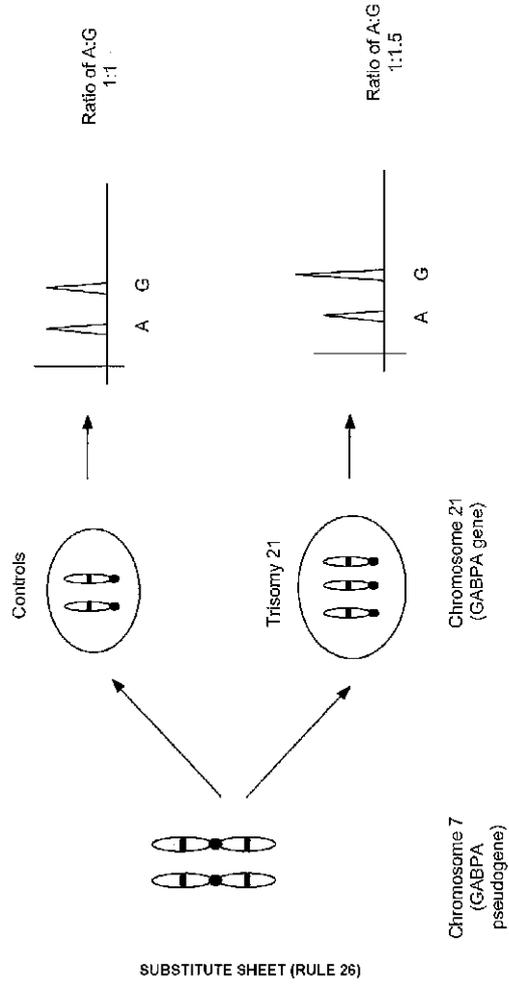


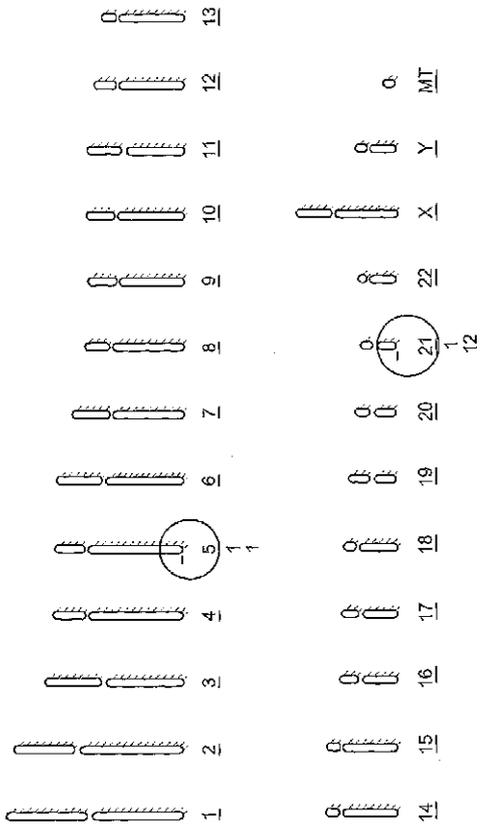
FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 03/008919

PCT/US02/19764

10/19



Hit Gls:
Hits:

Hit Gls:
Hits:

FIG. 10

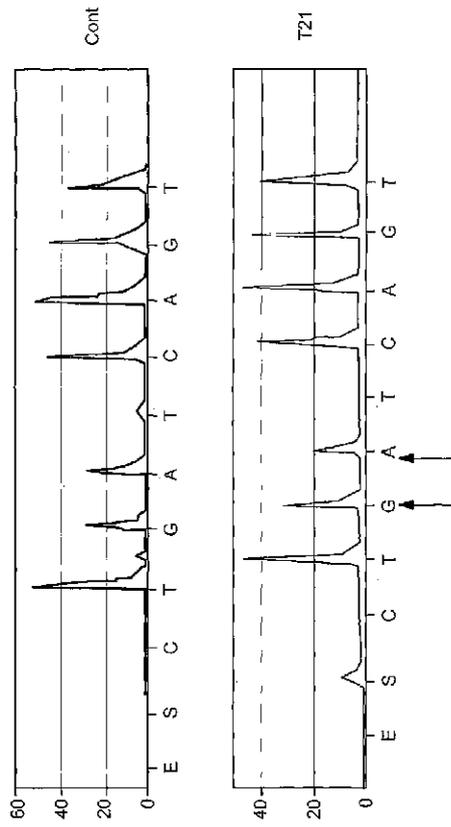


FIG. 11A

12/19

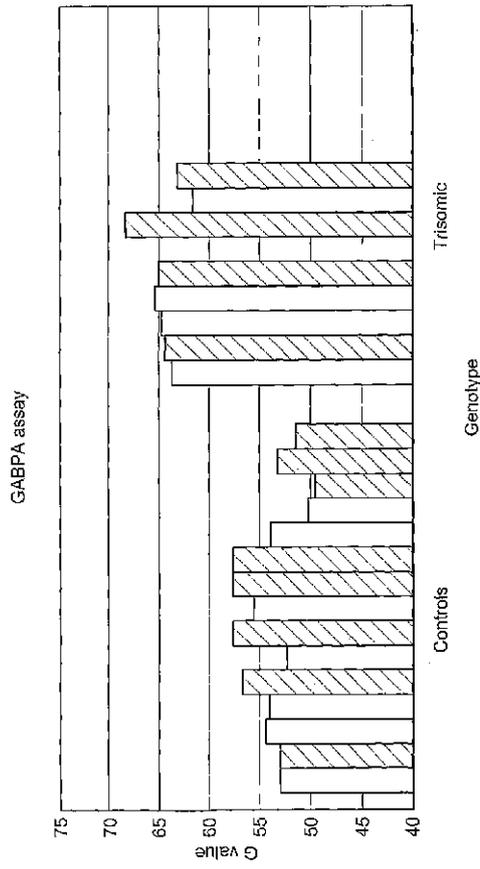


FIG. 11B

Genotype	N	Expected G value	Average	Std dev	Tail values
Control (2N)	15	50	54.2	2.45	57.5
Trisomic (46 XY + 21)	9	60	64.6	1.84	61.7

FIG. 11C

GABPA 1b assay

HC21 :C (G)

HC7 :T (A)

••

aaatcccaactatgRcaagtttttggctagaacitttactgtataagcagcgtcggagactgAtt
tcttgggttggtkacggtgatttaagttaataatagctgactgactggTgcacaaaatg
gggaccgggtaaaaataagcciaCgaTgaactatgTgaactcagTggtgcattaa

•

Primer F : 5 biotin CTTACTGATRAGGACGCTC

Primer R : CTCATAGTTCATCGTAGGCT

Sequencing primer : TCACCAACCCAGAAA

FIG. 12

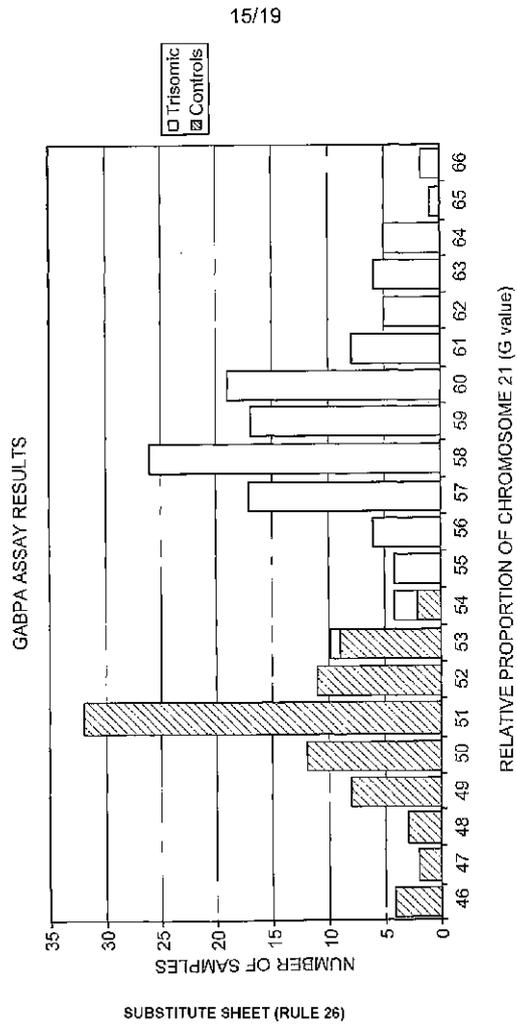


FIG. 13

16/19

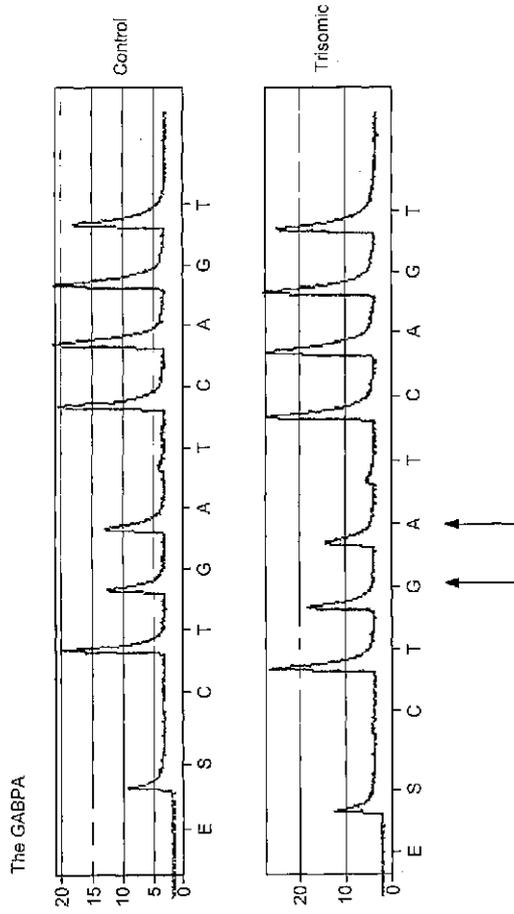


FIG. 14

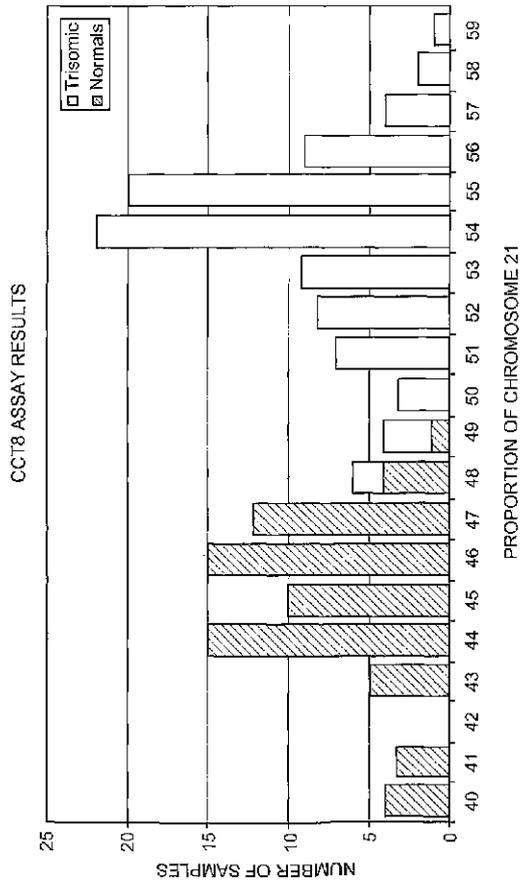
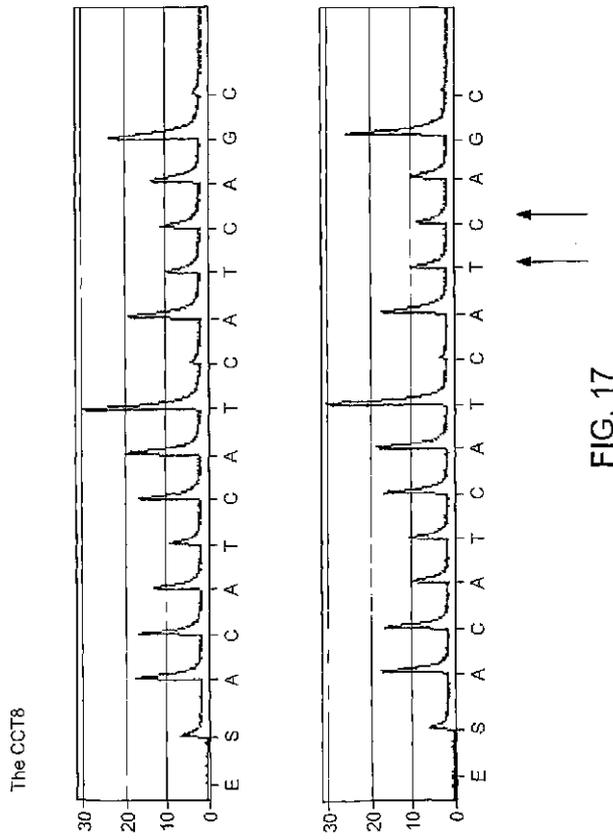


FIG. 16



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000919 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
C12P 19/54
- (21) International Application Number: PCT/US02/19762
- (22) International Filing Date: 21 June 2002 (21.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 69/360,286 22 June 2001 (22.06.2001) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): UNIVERSITY OF GENEVA (CH/CH), 24, rue du General Dufour, CH-1211 Geneva 4 (CH).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): ANTONARAKIS, Stylianos (US/CH), 28, boulevard des Philosophes, CH-1205 Geneva (CH); DEUTSCH, Samuel (US/CH), 59, route de Provenex, CH-1207 Geneva (CH).
- (74) Agent: SPAR, Elizabeth, N., Palmer & Dodge LLP, 111 Huntington Avenue, Boston, MA 02199-7813 (US).
- (81) Designated States (*national*): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
*with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims, and to be republished in the event of receipt of
amendments.*
- (88) Date of publication of the international search report:
19 June 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/000919 A3

(54) Title: METHOD FOR DETECTING DISEASES CAUSED BY CHROMOSOMAL IMBALANCES

(57) Abstract: The invention provides a universal method to detect the presence of chromosomal abnormalities by using paralogous genes as internal controls in an amplification reaction. The method is rapid, high throughput, and amenable to semi-automated analyses. In one aspect, the method comprises providing a pair of primers which can specifically hybridize to each of a set of paralogous genes under conditions used in amplification reactions, such as PCR. Paralogous genes are preferably on different chromosomes but may also be on the same chromosome (e.g., to detect loss or gain of different chromosome arms). By comparing the amount of amplified products generated, the relative dose of each gene can be determined and correlated with the relative dose of each chromosomal region and/or each chromosome, on which the gene is located.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000919 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
C12P 19/34
- (21) International Application Number: PCT/US02/19764
- (22) International Filing Date: 21 June 2002 (21.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/300,266 22 June 2001 (22.06.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF GENEVA (UNIVERSITE DE GENÈVE), 24, rue du Général Dufour, CH-1211 Genève 4 (CH).
- (72) Inventors: and
(73) Inventors/Applicants (for US only): ANTONARAKIS, Stylianos (US/CH), 28, boulevard des Philosophes, CH-1205 Geneva (CH); DEI TSCH, Samuel (VI/CH); 59, route de Fribourg, CH-1207 Geneva (CH).
- (74) Agent: SPAR, Elizabeth N., Palmer & Dodge LLP, 111 Huntington Avenue, Boston, MA 02199-7613 (US).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UZ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CF, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
— with amended claims
- (88) Date of publication of the international search report: 19 June 2003
Date of publication of the amended claims: 7 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/000919 A3

(84) Title: METHOD FOR DETECTING DISEASES CAUSED BY CHROMOSOMAL IMBALANCES

(57) Abstract: The invention provides a universal method to detect the presence of chromosomal abnormalities by using paralogous genes as internal controls in an amplification reaction. The method is rapid, high throughput, and amenable to semi-automated analyses. In one aspect, the method comprises providing a pair of primers which can specifically hybridize to each of a set of paralogous genes under conditions used in amplification reactions, such as PCR. Paralogous genes are preferably on different chromosomes but may also be on the same chromosome (e.g., to detect loss or gain of different chromosome arms). By comparing the amount of amplified products generated, the relative dose of each gene can be determined and correlated with the relative dose of each chromosomal region and/or each chromosome, on which the gene is located.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/19764
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34 US CL : 435/6; 435/91.2 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) U.S. : 435/6, 91.2, 287.2; 702/20 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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, E	US 2003/0034386 A1 (ANTONARAKIS et al) 29 MARCH 2003 (20.03.2003), page 4, par. 49; page 6, tables 1A-1B; page 10, par. 116.	1-43
Y, P	US 2002/0018767 A1 (BENSIMON et al) 25 April 2002 (25.04.2002), page 1, par. 1-16; page 4, par. 79-89; page 6, par. 115-122.	1-8, 16-20
Y	US 5,976,790 (PINKEL et al) 02 November 1999 (02.11.1999), col. 11, lines 23-67; col. 24, lines 19-56; col. 46, lines 23-64.	1-8, 14-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "P" document which may show doubt on priority (claim) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (to specify) "X" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "Y" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "Z" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application for claim 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	Date of mailing of the international search report 17 APR 2003	
06 April 2003 (06.04.2003) Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Fresenius No. 702/905-220	Authorized officer Gary Henzler Telephone No. 703-908-1255	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

FCT/ISA/210

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

EAST

search terms: high throughput analysis, chromosomal aberration, duplication, imbalance, deletion, monosomy, trisomy 21, down's syndrome, autism, search method with chromosome with deletion, yin-yang, paralogous sequence, SIM1, SIM2, SIMA5, SIMAR, GADPA, GADPAR, CCT2, CCT3, C21ORF19, DSACK, KIAA0956, ITSN1, RAR2A, CDR3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/19764
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos. : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 22, 27 and 30 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: drawn to nucleotide sequence that lack SEQ ID NO: identifiers, RSL, CRF, CD...
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 11 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

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

(72)発明者 アントナラキス, スタイリアノス

スイス国, シーエイチ - 1 2 0 5 ジュネーブ, プールバード デス フィロソフス, 2 8

(72)発明者 ドイツェ, サミュエル

スイス国, シーエイチ - 1 2 0 7 ジュネーブ, ルート デ フロテネクス, 5 9

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA03 CA20 HA11

4B063 QA19 QQ41 QQ60 QR38 QR62 QR82 QS25 QX02