

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成26年4月3日 (2014.4.3)

【公表番号】特表2013-521764(P2013-521764A)

【公表日】平成25年6月13日 (2013.6.13)

【年通号数】公開・登録公報2013-030

【出願番号】特願2012-553050(P2012-553050)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 M 1/34 Z

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月10日 (2014.2.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単一の核酸テンプレートと複数のプライマー対とを含む微小液滴であって、各プライマー対は、異なるターゲット部位に特異的であり、前記微小液滴内の一つのみのプライマー対が、前記テンプレートに結合する、微小液滴。

【請求項 2】

前記液滴内で生産されたアンプリコンにハイブリダイズする複数のプローブをさらに含む、請求項 1 に記載の微小液滴。

【請求項 3】

前記単一の核酸テンプレートが DNA または RNA である、請求項 1 に記載の微小液滴。

【請求項 4】

ポリメラーゼ連鎖反応を行うための試薬をさらに含む、請求項 1 に記載の微小液滴。

【請求項 5】

前記複数のプローブの構成員が検出可能標識を含有する、請求項 2 に記載の微小液滴。

【請求項 6】

前記複数のプローブが、様々な濃度のプローブの 1 つ以上の群を含む、請求項 6 に記載の微小液滴。

【請求項 7】

前記プローブの 1 つ以上の群の構成員それぞれが、同じ検出可能標識を含む、請求項 6 に記載の微小液滴。

【請求項 8】

前記複数のプローブの構成員それぞれが、異なる検出可能標識を含む、請求項 5 に記載の微小液滴。

【請求項 9】

前記検出可能標識が蛍光標識である、請求項 5 に記載の微小液滴。

【請求項 10】

ターゲット核酸を分析するための方法であって、

単一ターゲット核酸と 1 つ以上の増幅試薬とを含有する液滴を形成する工程；

前記液滴内の前記ターゲットを増幅する工程；

前記ターゲットからのアンプリコンと、ポリメラーゼエラーにより生じた前記ターゲットの変異体からのアンプリコンとを含有する液滴を、二つの別様に標識されたハイブリダイゼーションプローブを用いて識別する工程であって、一つは前記ターゲットにハイブリダイズし、一つは前記ターゲットの特異的変異体にハイブリダイズする、工程；およびターゲットアンプリコンを分析する工程を含む方法。

【請求項 11】

前記増幅する工程が、ポリメラーゼ連鎖反応であり、および前記 1 つ以上の増幅試薬が、1 つ以上のプライマー対を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記識別する工程が、前記液滴をマイクロ流体チャネル内に流す工程を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記分析する工程が、検出可能に標識されたプローブへのハイブリダイゼーションにより前記アンプリコンを検出する工程を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分析する工程が、前記識別する工程で識別されなかった液滴からのアンプリコンに対して行われる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記形成する工程が、

核酸を含む第一のサンプル流体のストリームを、流れているキャリア流体の 2 つの対向するストリームを交差するように流し、それによって、前記第一のサンプル流体を含む複数の第一の液滴を形成する工程であって、前記キャリア流体は前記サンプル流体と不混和性である、工程と；および

前記第一のサンプル流体を含む複数の第一の液滴のそれぞれと、1 つ以上の増幅試薬を含む第二の流体の部分とを合体させる工程であって、前記第二の流体の部分は場合により液滴である、工程とを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記キャリア流体が油である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記油が界面活性剤を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記界面活性剤がフッ素系界面活性剤である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記分析する工程が、

野生型ターゲットのみを含有する液滴の数を決定する工程；

前記ターゲットの変異体のみを含有する液滴の数を決定する工程

を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 20】

前記変異体のみを含有する液滴の存在が疾患の指標となる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記疾患が癌である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記変異体が対立遺伝子変異体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記対立遺伝子変異体が一塩基多型である、請求項 22 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

他の態様において、本発明は、一般に、患者における癌の再発を検出するための方法を提供する。これらの方法は、患者のサンプルから採取した単一のターゲット核酸を含有するサンプル液滴を形成すること、前記サンプル液滴を、チャンネルを通して流すこと、前記液滴内の前記ターゲットを増幅すること、前記液滴内の増幅されたターゲットを検出すること、アンプリコンの不均一集団を含む液滴を排除すること、および排除されなかった液滴を分析して再発の指標となる突然変異体対立遺伝子を決定することを含み得る。一定の実施形態において、前記分析工程は、標識された捕捉プローブを使用して前記液滴から得られたアンプリコンを捕捉することを含む。前記サンプルは、ヒト組織または体液であり得る。例示的体液は、膿、痰、精液、尿、血液、唾液、糞便および脳脊髄液である。本発明の他の態様では、低レベルのターゲット核酸を多数の他の核酸源を有する環境で法医学的に同定する方法を一般に提供する。そのような方法を、液滴以外にまたは液滴に加えて容器内で区画された流体を使用して実施することもできる。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

単一の核酸テンプレートと前記テンプレート上の複数のターゲット部位に特異的な複数のプライマー対とを含む微小液滴。

(項目 2)

前記液滴内で生産されたアンプリコンにハイブリダイズする複数のプローブをさらに含む、項目 1 に記載の微小液滴。

(項目 3)

前記単一の核酸テンプレートが DNA または RNA である、項目 1 に記載の微小液滴。

(項目 4)

ポリメラーゼ連鎖反応を行うための試薬をさらに含む、項目 1 に記載の微小液滴。

(項目 5)

前記複数のプローブの構成員が検出可能標識を含有する、項目 2 に記載の微小液滴。

(項目 6)

前記複数のプローブが、様々な濃度のプローブの 1 つ以上の群を含む、項目 6 に記載の微小液滴。

(項目 7)

前記プローブの 1 つ以上の群の構成員それぞれが、同じ検出可能標識を含む、項目 6 に記載の微小液滴。

(項目 8)

前記複数のプローブの構成員それぞれが、異なる検出可能標識を含む、項目 5 に記載の微小液滴。

(項目 9)

前記検出可能標識が蛍光標識である、項目 5 に記載の微小液滴。

(項目 10)

生体サンプル中の複数のターゲットを検出するための方法であって、

a) 単一の核酸テンプレート、およびそれぞれが前記テンプレート上の複数のターゲッ

ト部位に特異的なプライマー対とプローブの不均一混合物をそれぞれが含む、1つ以上の微小液滴を形成する工程；

b) 前記1つ以上の微小液滴内の前記核酸テンプレートを増幅する工程；および

c) 前記1つ以上の微小液滴を分析する工程を含む方法。

(項目11)

前記形成工程が、

a) 単一の核酸テンプレートを含む第一の流体を供給すること；

b) それぞれが前記テンプレート上の複数のターゲット部位に特異的な複数のプライマーおよび複数のプローブを含む第二の流体を供給すること；

c) 前記第一の流体と前記第二の流体を合体させて、前記単一の核酸テンプレートおよびプライマー対とプローブの不均一混合物を含む液滴を形成することを含む、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記第一の流体および前記第二の流体が、前記流体に対する電場の存在下で合体される、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記第一の流体および前記第二の流体が微小液滴である、項目11に記載の方法。

(項目14)

前記第二の流体が、ポリメラーゼ連鎖反応を行うための試薬をさらに含む、項目11に記載の方法。

(項目15)

前記単一の核酸テンプレートがDNAまたはRNAである、項目10に記載の方法。

(項目16)

前記分析工程が、前記1つ以上の微小液滴内の前記複数のターゲットの存在または不在を検出することを含む、項目10に記載の方法。

(項目17)

前記複数のプローブの構成員が、検出可能標識を含有する、項目10に記載の方法。

(項目18)

前記複数のプローブが、様々な濃度のプローブの1つ以上の群を含む、項目17に記載の微小液滴。

(項目19)

前記プローブの1つ以上の群の構成員それぞれが、同じ検出可能標識を含む、項目18に記載の微小液滴。

(項目20)

前記複数のプローブの構成員それぞれが、異なる検出可能標識を含む、項目17に記載の微小液滴。

(項目21)

前記検出可能標識が蛍光標識である、項目17に記載の微小液滴。

(項目22)

ターゲット核酸を分析するための方法であって、

単一ターゲット核酸と1つ以上の増幅試薬とを含有する液滴を形成する工程；

前記液滴内の前記ターゲットを増幅する工程；

前記ターゲットからのアンプリコンおよび前記ターゲットの変異体からのアンプリコンとを含有する液滴を排除する工程；および

ターゲットアンプリコンを分析する工程

を含む方法。

(項目23)

前記増幅工程が、ポリメラーゼ連鎖反応であり、および前記1つ以上の増幅試薬が、1つ以上のプライマー対を含む、項目22に記載の方法。

(項目 2 4)

前記排除工程が、前記液滴をマイクロ流体チャンネル内に流すことを含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記分析工程が、検出可能に標識されたプローブへのハイブリダイゼーションにより前記アンプリコンを検出することを含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記分析工程が、前記排除工程で排除されなかった液滴からのアンプリコンに対して行われる、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記形成工程が、

核酸を含む第一のサンプル流体のストリームを、流れているキャリア流体の 2 つの対向するストリームを交差するように流し、それによって、前記第一のサンプル流体を含む複数の第一の液滴を形成することであって、前記キャリア流体は前記サンプル流体と不混和性である、形成すること；および

前記第一のサンプル流体を含む複数の第一の液滴のそれぞれと、1 つ以上の増幅試薬を含む第二の流体の部分とを合体させることであって、前記第二の流体の部分は場合により液滴である、合体させること

を含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記キャリア流体が油である、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記油が界面活性剤を含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記界面活性剤がフッ素系界面活性剤である、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記分析工程が、

野生型ターゲットのみを含有する液滴の数を決定すること；

前記ターゲットの変異体のみを含有する液滴の数を決定することを含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記変異体のみを含有する液滴の存在が疾患の指標となる、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記疾患が癌である、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記変異体が対立遺伝子変異体である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記対立遺伝子変異体が一塩基多型である、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

核酸サンプルを加工するための方法であって、

1 つの核酸ターゲットを含む液滴を得る工程；

前記液滴内の前記核酸を増幅する工程；および

アンプリコンの不均一集団を含む液滴を、アンプリコンの均一集団を含有する液滴から分離する工程を含む方法。

(項目 3 7)

患者における癌の再発を検出するための方法であって、

平均して各液滴が患者サンプルから採取された単一ターゲット核酸を含む、サンプル液滴を形成する工程；

前記サンプル液滴を、チャンネルを通して流す工程；

前記液滴内のターゲットを増幅する工程；
前記液滴内の増幅されたターゲットを検出する工程；
アンブリコンの不均一集団を含む液滴を排除する工程；および
排除されなかった液滴を分析して、再発の指標となる突然変異体対立遺伝子の存在を決定する工程
を含む方法。

(項目 3 8)

前記形成工程が、
核酸を含むサンプル流体のストリームを、流れているキャリア流体の 2 つの対向するストリームを直行するように流すことであって、前記キャリア流体は前記サンプル流体と不混和性である、流すこと
を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記サンプルがヒト組織または体液である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記体液が、膿、痰、精液、尿、血液、唾液および脳脊髄液から成る群より選択される、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記分析工程が、標識された捕捉プローブを使用して前記液滴から得られたアンブリコンを捕捉することを含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 2)

ターゲット核酸を分析するための方法であって、
各部分が単一ターゲット核酸を含有する複数の部分に第一の流体を区画化する工程；
前記部分中のターゲットを増幅する工程；
前記ターゲットからのアンブリコンおよび前記ターゲットの変異体からのアンブリコンを含有する部分を排除する工程；および
ターゲットアンブリコンを分析する工程
を含む、方法。

(項目 4 3)

区画が、マイクロ流体デバイス内のチャンバを含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

ターゲット核酸を分析するための方法であって、
単一ターゲット核酸を含有するサンプル液滴を形成する工程；
前記液滴内のターゲットを増幅する工程；
前記ターゲットからのアンブリコンおよび前記ターゲットの変異体からのアンブリコンを含有する液滴を排除する工程；および
ターゲットアンブリコンを分析する工程
を含む、方法。

(項目 4 5)

前記第一の流体が第一の液滴内に含有され、および前記第二の流体がストリームの第一の部分であり、ならびにさらに、工程 (c) が、前記第一の液滴を前記第一の部分と合体させることを含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記第二の流体が第一の液滴内に含有され、および前記第一の流体がストリームの第一の部分であり、ならびにさらに、工程 (c) が、前記第一の液滴を前記第一の部分と合体させることを含む、項目 1 1 に記載の方法。