

【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25年1月24日 (2013.1.24)

【公表番号】特表2011-505812(P2011-505812A)

【公表日】平成23年3月3日 (2011.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2011-009

【出願番号】特願2010-537317(P2010-537317)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年11月17日 (2011.11.17)

【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】

被験者から単離した生体試料において、F O X L - 2 及び / 又はそのプロモータ若しくは調節因子における C p G メチル化の有無を検出することによるものであり、C p G の高メチル化が、前記細胞増殖性障害の存在の指標となる、細胞増殖性障害又は肺癌の存在を検出する方法。

【請求項 2】

前記被験者から得られた生体試料から単離したゲノム DNA を、該ゲノム DNA の少なくとも 1 つの標的領域内でメチル化 C p G ジヌクレオチドと非メチル化 C p G ジヌクレオチドとを識別する、少なくとも 1 つの試薬又は試薬群に接触させる工程であって、該標的領域が、配列番号 5 の少なくとも 16 個の連続したヌクレオチドの配列を含むか、又はストリンジェントな条件下でこれとハイブリダイズし、前記連続したヌクレオチドが C p G ジヌクレオチド配列を少なくとも 1 つ含む、接触させる工程、をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

a) 該処理ゲノム DNA 又はその処理断片を、増幅酵素及び配列番号 16、17、30 及び 31 から成る群から選択される配列に相補的であるか、又は適度にストリンジェントな条件若しくはストリンジェントな条件下でこれらとハイブリダイズする少なくとも 9 ヌクレオチドの連続した配列及びその相補鎖を含む少なくとも 1 つのプライマーに接触させる工程であって、該処理ゲノム DNA 又はその断片のいずれかを増幅し、少なくとも 1 つの増幅産物を産出するか又は増幅しない、接触させる工程、並びに

b) 前記増幅産物の有無又は特性に基づき、配列番号 5 の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態若しくはレベル、又はその平均、又は配列番号 5 の複数の C p G ジヌクレオチドの平均メチル化状態若しくはレベルを反映する値を決定する工程であっ

て、細胞増殖性障害の検出又は診断の少なくとも一方を可能にする、決定する工程、
をさらに含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

該ゲノムDNA又はその断片の処理において、重亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、二亜硫酸塩、硫酸アンモニウム又は硫酸グアニジン、及びこれらの組合せから成る群から選択される試薬の使用を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記被験者から得られた該生体試料が、細胞株、組織断片、生検、パラフィン包埋組織、体液、尿、血漿、血清、全血、単離血球、血液から単離される細胞及びこれらの組合せを含む群から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

配列番号16、17、30及び31から成る群から選択される配列に相補的であるか、又は適度にストリンジェントな条件若しくはストリンジェントな条件下でこれらとハイブリダイズする少なくとも9ヌクレオチドの連続した配列及びその相補鎖を含む少なくとも1つの核酸分子又はペプチド核酸分子をさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

前記核酸分子又はペプチド核酸分子がハイブリダイズされる核酸の増幅を抑制する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

b)の決定する工程において、該増幅産物のシーケンシングを行うことを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項9】

a)の増幅又は接触させる工程において、メチル化特異的なプライマーの使用を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項10】

a)ゲノムDNAを該被験者から得られた生体試料から抽出、又は単離する工程、
b)a)のゲノムDNA又はその断片を、1つ又は複数のメチル化感受性制限酵素で消化する工程、
c)b)のDNA制限酵素消化物を、増幅酵素及び配列番号5のCpGジヌクレオチドを少なくとも1つ含む配列の増幅に適した少なくとも2つのプライマーに接触させる工程、及び
d)増幅産物の有無に基づき、配列番号5の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態若しくはレベルを決定する工程であって、これによって細胞増殖性障害、好ましくは肺癌の検出が可能になる、決定する工程、
をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

配列番号5の少なくとも16塩基長のセグメントと、同一であるか、又はこれに相補的であるか、又はストリンジェントな条件若しくは高ストリンジェントな条件下でこれとハイブリダイズする、少なくとも1つの核酸若しくはペプチド核酸とのハイブリダイゼーションによって増幅産物の有無が決定される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

配列番号16、17、30及び31から成る群から選択されるDNA配列の少なくとも16個の連続したヌクレオチド、及びそれらに相補的な配列を含む核酸。

【請求項13】

配列番号16、17、30及び31から成る群から選択されるDNA配列の少なくとも9ヌクレオチド長のセグメントと、同一であるか、又はこれに相補的であるか、又はストリンジェントな条件若しくは高ストリンジェントな条件下でこれとハイブリダイズする、オリゴヌクレオチド。

【請求項14】

(a)重亜硫酸試薬と、(b)配列番号16、17、30及び31から成る群から選択

される D N A 配列の少なくとも 9 塩基長の D N A セグメントと同一であるか、又はこれに相補的であるか、又はストリンジェントな条件若しくは高ストリンジェントな条件下でこれとハイブリダイズする、少なくとも一組のオリゴヌクレオチドとを含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法を行うのに適したキット。

【請求項 1 5】

肺癌細胞増殖障害の診断、疾患進行の状態の検出、疾患に関する良好かつ多くの情報の取得及び／又は特徴付けにおける請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法、請求項 1 2 及び 1 3 に記載の核酸及びオリゴヌクレオチド、及び／又は請求項 1 4 に記載のキットの使用。