

【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24年11月1日(2012.11.1)

【公表番号】特表2012-502631(P2012-502631A)

【公表日】平成24年2月2日(2012.2.2)

【年通号数】公開・登録公報2012-005

【出願番号】特願2011-527069(P2011-527069)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A A

C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年9月11日(2012.9.11)

【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】

サンプル中の胎児核酸の量を決定するための方法であって、該方法は：

a) 妊娠からのサンプル中に存在する核酸を、複数の遺伝子座でメチル化されていない母体核酸を特異的に消化する作用物質と接触させることにより、該胎児核酸を濃縮する工程であって、該サンプルは、差次的にメチル化された胎児核酸および母体核酸を含み、該胎児核酸と該母体核酸との組み合わせは、該サンプル中の総核酸を構成する、工程；および  
 b) (a)における胎児核酸の量を決定する工程

を包含する、方法。

【請求項2】

メチル化されていない母体核酸を特異的に消化する前記作用物質が、メチル化感受性制限酵素である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記サンプル中に存在する核酸の総量を決定する工程を包含する、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記サンプル中の胎児核酸の量を決定する工程が、(b)における胎児核酸の量を前記核酸の総量と比較することを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

(a)の後に、既知濃度の1つ以上の競合物質を導入する工程を包含する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記サンプル中の胎児核酸の絶対量を決定する工程を包含する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記複数の遺伝子座が、配列番号1～89の遺伝子座から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記複数の遺伝子座が、配列番号1～59および配列番号86～89の遺伝子座から選択

される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記複数の遺伝子座が、配列番号 1 ~ 5 9 の遺伝子座から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記複数の遺伝子座が、配列番号 4 2 の遺伝子座を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記複数の遺伝子座が、配列番号 5 2 の遺伝子座を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

胎児核酸の前記濃度が、胎児の形質を示す方法とともに用いられる、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記胎児の形質が、胎児の異数性である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記方法が、ある特定の臨床的感度または臨床的特異性の必要条件を満たす濃度の胎児核酸を必要とする、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記胎児核酸の量を決定する工程が、質量分析法、R T - P C R、デジタル P C R、アレイに基づく方法、配列決定法、ナノポアに基づく方法、核酸に結合したビーズに基づくカウント方法および競合物質に基づく方法およびメチル化の状態に基づいて核酸に結合する作用物質を用いて核酸を分離するための方法から選択される 1 以上のプロセスの使用を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記胎児核酸の量を決定する工程が、質量分析法の使用を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

。

【請求項 17】

前記胎児核酸の量を決定する工程が、配列決定法の使用を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

。

【請求項 18】

前記配列決定法は、合成により配列決定することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 19】

前記メチル化感受性制限酵素の消化効率が、決定される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

妊娠からのサンプル中の Y 染色体核酸の有無を判定する工程を包含する、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

妊娠からのサンプル中に存在する Y 染色体核酸の量が、男の胎児に対して決定される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 22】

前記胎児核酸の量が、前記 Y 染色体核酸の量と比較される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 23】

1 0 以上の遺伝子座における胎児核酸の量が決定される、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記男の胎児に対する Y 染色体核酸の量、および前記メチル化感受性制限酵素の消化効率が、決定される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 25】

2つ以上のアッセイが、核酸の総量を決定するために用いられ、1つ以上のアッセイが、男の胎児に対するY染色体核酸の量を決定するために用いられ、そして1つ以上のアッセイが、前記メチル化感受性制限酵素の消化効率を決定するために用いられる、請求項2\_4に記載の方法。

【請求項2\_6】

3以上の遺伝子座における胎児核酸の量が決定される、請求項2\_5に記載の方法。

【請求項2\_7】

前記胎児核酸の量が、前記消化された母体核酸の平均長より大きいアンプリコンを生成する増幅反応により、該胎児核酸がさらに濃縮されることによって決定される、請求項1～2\_6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項2\_8】

標的染色体由来の胎児核酸の量が決定され、そして参照染色体由来の胎児核酸の量が決定される、請求項1～2\_7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項2\_9】

前記標的染色体由来の胎児核酸の量と前記参照染色体由来の胎児核酸の量とを比較することにより、胎児異数性の有無を決定する工程をさらに包含する、請求項2\_8に記載の方法。

。

【請求項3\_0】

サンプル中の胎児の割合を決定するための方法であって、

(a) 1以上の多型核酸標的についてサンプル核酸を濃縮する工程であって、該サンプル核酸は、胎児核酸および母体核酸を含む、工程；

(b) 配列決定プロセスによって該核酸標的の一部または全てについてのヌクレオチド配列を得る工程；

(c) (b)のヌクレオチド配列を分析する工程；および

(d) (c)における分析に基づいて胎児の割合を決定する工程を包含する、方法。

【請求項3\_1】

前記濃縮する工程が、複数の多型核酸標的を増幅することを含む、請求項3\_0に記載の方法。

【請求項3\_2】

前記濃縮する工程が、増幅反応において増幅生成物を生成することを含む、請求項3\_0または3\_1に記載の方法。

【請求項3\_3】

前記増幅が单一反応において多重化される、請求項3\_2に記載の方法。

【請求項3\_4】

前記多型核酸標的が各々少なくとも1つの單一ヌクレオチド多型(SNP)を含む、請求項3\_0～3\_3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項3\_5】

前記多型核酸標的が各々少なくとも1つの短いタンデム反復(STR)を含む、請求項3\_0～3\_3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項3\_6】

前記胎児の割合を決定する工程が、(i)(b)における前記ヌクレオチド配列から少なくとも1つの情報的に有益な多型部位を同定すること、および胎児多型部位および母体多型部位の量から該胎児の割合を計算することを含む、請求項3\_0～3\_5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項3\_7】

1以上の多型核酸標的での前記母体遺伝子型が(a)の前には知られていない、請求項3\_0～3\_6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項3\_8】

10以上の多型核酸標的が濃縮される、請求項3\_0～3\_7のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 3 9】**

100以上の多型核酸標的が濃縮される、請求項38に記載の方法。

**【請求項 4 0】**

前記配列決定プロセスが、合成法によって配列決定することを含む、請求項30～39のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 4 1】**

(c)における分析に基づいて胎児の異数性の有無を判定することをさらに含む、請求項30～40のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 4 2】**

胎児の異数性の有無を判定することが、(c)において得られたヌクレオチド配列に基づく、請求項41に記載の方法。

**【請求項 4 3】**

胎児の異数性の有無を判定することが、(i)標的染色体由来の胎児核酸の量と参照染色体由来の胎児核酸の量を決定すること、および(ii)該標的染色体由来の胎児核酸の量を該参照染色体由来の胎児核酸の量と比較することにより、胎児の異数性の有無を判定することを含む、請求項41または42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】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

**【0045】**

CpGアイランドは、いくつかの場合においてCpG含有ゲノム配列として使用され得る一方、他の場合では、CpG含有ゲノム配列は、CpGアイランドでないかもしれない。いくつかの実施形態において、本技術は、本技術の方法を行うためのキットを提供する。そのキットの1つの構成要素は、メチル化感受性結合剤である。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

**(項目1)**

胎児核酸を調製するための方法であって、該方法は：

a) 妊婦からサンプルを得る工程；

b) 胎児核酸と母体核酸対応物との間の異なるメチル化状態に従って、該妊婦のサンプル由来の該母体核酸から該胎児核酸を分離する工程であって、ここで、該胎児核酸は、配列番号1～89のポリヌクレオチド配列の1つ以上からの1つ以上のCpG部位を含む、工程；および

c) パート(b)において分離された胎児核酸を鋳型として利用するプロセスによって、胎児核酸を含む核酸を調製する工程を包含する、方法。

**(項目2)**

前記胎児核酸が、メチル化ヌクレオチドに特異的に結合する作用物質によって前記母体核酸から分離される、項目1に記載の方法。

**(項目3)**

メチル化ヌクレオチドに結合する前記作用物質が、メチル-CpG結合タンパク質(MBD)またはそのフラグメントである、項目2に記載の方法。

**(項目4)**

メチル化ヌクレオチドに結合する前記作用物質が、メチル化された胎児核酸に結合する、項目2に記載の方法。

**(項目5)**

メチル化ヌクレオチドに結合する前記作用物質が、メチル化された母体核酸に結合する、項目2に記載の方法。

**(項目6)**

前記胎児核酸が、非メチル化ヌクレオチドに特異的に結合する作用物質によって前記母体核酸から分離される、項目2に記載の方法。

(項目7)

前記胎児核酸が、メチル化されていない母体核酸を特異的に消化する作用物質によって前記母体核酸から分離される、項目1に記載の方法。

(項目8)

メチル化されていない母体核酸を特異的に消化する前記作用物質が、メチル化(methylation)感受性制限酵素である、項目7に記載の方法。

(項目9)

2つ以上のメチル化感受性制限酵素が、同じ反応において使用される、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記工程c)のプロセスが、增幅反応である、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記工程c)のプロセスが、胎児核酸の絶対量を測定するための方法である、項目1に記載の方法。

(項目12)

配列番号1～89のポリヌクレオチド配列のうちの3つ以上が、調製される、項目1に記載の方法。

(項目13)

母体サンプル中の胎児核酸の絶対量を測定するための方法であって、ここで、該母体サンプルは、差次的にメチル化された母体核酸および胎児核酸を含み、該方法は：

a) 1つ以上のメチル化感受性制限酵素を用いて母体サンプル中の該母体核酸を消化することにより、該胎児核酸を濃縮する工程；および

b) 多型に基づかない定量方法および亜硫酸水素塩に基づかない定量方法を用いて工程a)からの胎児核酸の絶対量を測定する工程

を包含する、方法。

(項目14)

胎児核酸の前記絶対量または濃度が、胎児の形質を判定する診断法とともに用いられ、ここで、該診断法は、ある特定の臨床的感度または臨床的特異性の必要条件を満たす所与の絶対量または濃度の胎児核酸を必要とする、項目13に記載の方法。

(項目15)

母体サンプル中の胎児核酸の濃度を測定するための方法であって、ここで、該母体サンプルは、差次的にメチル化された母体核酸および胎児核酸を含み、該方法は：

a) 該母体サンプル中に存在する核酸の総量を測定する工程；

b) メチル化感受性制限酵素を用いて母体サンプル中の該母体核酸を消化することにより、該胎児核酸を濃縮する工程；

c) 多型に基づかない定量方法および亜硫酸水素塩に基づかない定量方法を用いて工程b)からの胎児核酸の量を測定する工程；および

d) 工程c)からの胎児核酸の量を工程a)からの核酸の総量と比較することにより、該母体サンプル中の胎児核酸の濃度を測定する工程

を包含する、方法。

(項目16)

胎児核酸の前記絶対量または濃度が、胎児の形質を判定する診断法とともに用いられ、ここで、該診断法は、ある特定の臨床的感度または臨床的特異性の必要条件を満たす所与の絶対量または濃度の胎児核酸を必要とする、項目15に記載の方法。

(項目17)

母体サンプル由来の胎児核酸を用いて胎児の異数性の有無を判定するための方法であって、ここで、該母体サンプルは、差次的にメチル化された母体核酸および胎児核酸を含み、該方法は：

a ) メチル化感受性制限酵素を用いて母体サンプル中の該母体核酸を消化することにより、該胎児核酸を濃縮する工程；  
b ) 多型に基づかない定量方法および亜硫酸水素塩に基づかない定量方法を用いて標的染色体由来の胎児核酸の量を測定する工程；  
c ) 多型に基づかない定量方法および亜硫酸水素塩に基づかない定量方法を用いて参照染色体由来の胎児核酸の量を測定する工程；  
d ) 工程 b ) からの胎児核酸の量を工程 c ) からの胎児核酸の量と比較する工程であって、ここで、標的の胎児核酸の量と参照の胎児核酸の量との間の統計学的有意差は、胎児の異数性の存在を示す、工程を包含する、方法。

(項目 18)

前記標的染色体および参照染色体の各々における 3 から 15 遺伝子座における胎児核酸の量が、測定される、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記メチル化感受性制限酵素の消化効率が、測定される、項目 13、15 または 17 に記載の方法。

(項目 20)

前記定量を行うための、多型に基づかない方法および亜硫酸水素塩に基づかない方法は、胎児核酸の量を測定するために競合物質に基づく方法を用いる、項目 13、15 または 17 に記載の方法。

(項目 21)

前記方法が、母体サンプル中に存在する Y 染色体核酸の有無を判定する工程をさらに包含する、項目 13、15 または 17 に記載の方法。

(項目 22)

母体サンプル中に存在する前記 Y 染色体核酸の量が、男の胎児に対して測定される、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記胎児核酸の量が、前記 Y 染色体核酸の量と比較される、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50 またはそれ以上の遺伝子座における胎児核酸の量が測定される、項目 13 または 15 に記載の方法。

(項目 25)

母体サンプル中に存在する核酸の総量が測定される、項目 13 または 17 に記載の方法。

(項目 26)

前記核酸の総量および男の胎児に対する Y 染色体核酸の量が、測定される、項目 13、15 または 17 に記載の方法。

(項目 27)

前記核酸の総量、男の胎児に対する Y 染色体核酸の量、および前記メチル化感受性制限酵素の消化効率のすべてが、測定される、項目 13、15 または 17 に記載の方法。

(項目 28)

2 つ以上のアッセイが、核酸の総量を測定するために用いられ、1 つ以上のアッセイが、男の胎児に対する Y 染色体核酸の量を測定するために用いられ、そして 1 つ以上のアッセイが、前記メチル化感受性制限酵素の消化効率を測定するために用いられる、項目 27 に記載の方法。

(項目 29)

3 またはそれ以上の遺伝子座における胎児核酸の量が測定される、項目 28 に記載の方法。

。

(項目 30)

前記胎児核酸の量が、消化された母体核酸の平均長より大きいアンプリコンを生成する増幅反応によって測定され、それにより、該胎児核酸がさらに濃縮される、項目 13、15

または 17 に記載の方法。