

(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2005-509871**(P2005-509871A)**

(43) 公表日 平成17年4月14日(2005.4.14)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 1/36	GO 1 N 1/28	2 GO 5 2
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/70	GO 1 N 33/53	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-545838 (P2003-545838)	(71) 出願人	504193516
(86) (22) 出願日	平成14年11月20日 (2002.11.20)		エグザクト サイエンシズ コーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月19日 (2004.5.19)		ション
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/037452		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1
(87) 国際公開番号	W02003/044217		7 5 4, メイナード, クリート ロー
(87) 国際公開日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		ド 6 3
(31) 優先権主張番号	60/331, 654	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成13年11月20日 (2001.11.20)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自動化サンプル調製方法および装置

(57) 【要約】

本発明は、自動化サンプル処理のための方法および装置を供給する。本発明は、サンプルを、サンプル中の標的検体の濃度に基づいて選択される工程にて、複数の希釈手順に導入する工程を包含する。サンプルを標準化するための方法であって、該方法が、以下の工程：複数のサンプルの各々における検体の初期濃度を決定する工程；各々のサンプルの一部を装置上に導入する工程であって、その結果該各々のサンプルの一部が、該検体の初期濃度に関する該装置上の特有の位置を占める工程；および該複数のサンプルを希釈する工程であって、その結果該複数のサンプルが、検体濃度に関して標準化されるような工程、を包含する、方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルを標準化するための方法であって、該方法が、以下の工程：
複数のサンプルの各々における検体の初期濃度を決定する工程；
各々のサンプルの一部を装置上に導入する工程であって、その結果該各々のサンプルの一部が、該検体の初期濃度に関する該装置上の特有の位置を占める工程；および
該複数のサンプルを希釈する工程であって、その結果該複数のサンプルが、検体濃度に関して標準化されるような工程、
を包含する、方法。

【請求項 2】

前記各々のサンプルの一部が、ロボットで前記装置上に導入される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記サンプルが、生物学的サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記生物学的サンプルが、便、尿、唾液、精液、血液、痰、脳脊髄、腓液、胆汁、リンパ、膿、および吸引液からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記検体が、核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸が、ヒト DNA である、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記ヒト DNA の濃度が、qPCR によって決定される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記装置が、アレイである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記特有の位置が、ウェルまたはポロニーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アレイが、マイクロタイタープレートである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記マイクロタイタープレートが、複数のウェルを含む、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記アレイが、スライドである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記各々のサンプルの位置が、前記スライド上の異なるポロニーとして投入される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

PCR 反応が、前記サンプルの一部において実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記サンプルの前記一部が、経路中の最終希釈段階に位置する、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記サンプルが、前記最終希釈段階で、約 10 核酸分子に希釈される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記サンプルが、前記最終希釈段階で、約 5 核酸分子に希釈される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記サンプルが、前記最終希釈段階で、約 1 核酸分子に希釈される、請求項 15 に記載の方法。

50

【請求項 19】

請求項 1 に記載の方法であって、サンプルの一部を分析する工程を、さらに包含する、方法。

【請求項 20】

前記サンプルが、経路中の最終希釈段階に位置する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 5 に記載の方法であって、検出可能標識を有する前記核酸のサンプルにおいて、核酸配列を標識する工程をさらに包含する、方法。

【請求項 22】

前記検出可能標識が、放射性同位体、蛍光化合物、抗原性マーカー、および酵素マーカーからなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。 10

【請求項 23】

前記生物学的サンプルが、細胞性物質を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 24】

前記分析工程が、列挙された L O H、D N A 完全アッセイ、変異検出、発現アッセイ、および F I S H からなる群から選択されるアッセイを実施する工程を包含する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

前記アッセイが、p 5 3、r a s、A P C、D C C、および B A T - 2 6 からなる群から選択される遺伝子座での変異を検出する、請求項 24 に記載の方法。 20

【請求項 26】

前記分析工程が、ウイルス検出アッセイを実施する工程を包含する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 27】

前記ウイルスアッセイが、H I V ウイルスまたは H P V ウイルスを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

サンプル希釈の自動化のためのコンピュータプログラム可能な方法であって、該方法は、以下の工程：

経路中の一連の希釈点に沿ったサンプルの自動化希釈のためのプログラムされたアルゴリズムに対応するデータを入力する工程； 30

少なくとも一つのサンプルの所定の初期濃度に対応するデータを入力する工程；

該経路中で一連の希釈点に沿って該サンプルを導入するための適切な入口点を決定する工程であって；ここで該適切な入口点は、該サンプルの該初期濃度によって決定される、工程；および、

命令を自動化デバイスに送る工程であって、該自動化デバイスは、該経路中で該一連の希釈点に沿って該サンプルを希釈することができる、工程、

を包含する、方法。

【請求項 29】

サンプルを導入するための、前記適切な入口点が、複数のサンプルについて決定されるような、請求項 28 に記載の方法。 40

【請求項 30】

サンプル希釈を自動化するための方法であって、該方法は、サンプルを自動化希釈手順に導入する工程を包含し、該自動化希釈手順は、複数の希釈工程を包含し、ここで該サンプルは、該サンプル濃度によって決定される希釈工程にて導入される、方法。

【請求項 31】

複数のサンプルが、前記自動化希釈手順に導入され、各々のサンプルが、その濃度によって決定される工程にて導入される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

サンプルを標準化するための方法であって、該方法は、以下の工程：

経路中で所定の一連の希釈段階を提供する、工程；

サンプル中の検体の初期濃度を決定する、工程；

該サンプルの一部を装置上の特有の位置に導入する工程であって、ここで該特有の位置が、該検体の該初期濃度によって決定される、工程；および

該サンプルを希釈する工程であって、その結果、該サンプル中の該検体の最終濃度が、標準化される、工程、

を包含する、方法。

【請求項 3 3】

前記希釈工程が、連続的に行われる、請求項 3 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願)

本願は米国特許出願番号 6 0 / 3 3 1 , 6 5 4 (2 0 0 1 年 1 1 月 2 0 日出願) の利益および優先権を主張し、この開示は本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

(発明の技術分野)

本発明は分析のための生物学的サンプルの調製のための方法および装置に一般に関する。より詳細には、本発明は核酸サンプル調製を自動化するための方法および装置に関する。本発明はその後の分析のためのサンプルの濃度を標準化するのに特に有用である。

20

【背景技術】

【0 0 0 3】

(発明の背景)

核酸サンプルは、疾患のスクリーニングおよび診断について使用される頻度が増加している。寄生性疾患、感染性疾患、遺伝性疾患、または散在性疾患の証拠が、異なる生物源（便を含む）からの核酸サンプルに見出され得る。例えば、便から調製された核酸サンプルは、結腸直腸癌を示唆する指標のために分析され得る。

【0 0 0 4】

しかし、生物学的サンプルから代表的に得られる核酸の可変量および予測不能の量は、自動化診断アッセイのための核酸の供給源として生物学的サンプル（例えば、臨床的サンプル）を使用する場合、重大な問題である。患者および/または生物学的サンプルの型に依存して、標準化された核酸調製手順から得られるヒト核酸標的の濃度は、サンプル全部にわたって 1 0 , 0 0 0 倍も変化し得る。この可変性は、自動化された核酸調製および分析を複雑にする。

30

【0 0 0 5】

これらの問題を解決するための試みがなされてきた。例えば、マルチウェルプレートを用いる自動化アッセイが、少なくとも 1 つのウェルにおける核酸濃度が、実施されるアッセイの型に適切であることを確かめるために、核酸サンプルの複数の希釈物に対して、代表的に実施される。しかし、このようなアプローチは、予測できない結果を産み出し、アッセイ物質を浪費する。さらに、これらのアプローチは、単一のアッセイについて多数のデポジットの分析を必要とする。当該分野で利用可能な方法および装置は、サンプルの操作の量を最小限にし、自動化核酸分析のために必要なサンプルの分析の量を減らすような予想可能および再生産可能な溶液を提供しない。従って、自動化サンプル調製のための、そしてより詳細には自動化核酸サンプル調製のための、方法および装置について当該分野で必要性が残っている。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

(発明の要旨)

本発明は、一般的に自動化サンプル処理のための方法および装置を提供する。本発明は

50

、具体的には、ひとつの供給源由来、または多数の供給源からのいずれかである、複数のサンプルを処理するのに有用であり、同時に、続く分析のための等しく希釈されたサンプルを生成するのに有用である。

【0007】

本発明の方法は、複数のサンプルを標準化するのに有用である。本発明に従って、方法は、複数のサンプルの各々における検体の初期の濃縮を決定する工程を包含する。本発明の方法はさらに、各々のサンプルの一部が、検体の初期の濃度に関して装置において特有の位置を占めるように、装置上の各々のサンプルの一部を導入する工程を包含する。本発明の方法はさらに、検体濃度に関して標準化されるように装置上の各々のサンプルの一部を希釈する工程を包含する。

10

【0008】

本発明は、一般的に、サンプルを、複数の工程を有する自動化液体操作手順に導入または置く工程を包含する。例えば、自動化液体操作手順は、あらかじめ決定された経路においての一連の希釈工程または希釈段階である。本発明に従って、サンプルは、この経路においてサンプル特有の希釈段階または希釈点で、この手順に導入される。この経路におけるサンプル特有の希釈段階または希釈点は、サンプルの特性によって決定される。例えば、サンプルの初期の特性（例えば、核酸濃度）が、好ましくは決定され、その結果、サンプルが、自動化希釈手順の適切な工程で希釈点において導入され得るか、またはデポジットされ得る。希釈経路における1つの工程は、経路における後の、特有の異なる希釈位置であらかじめ決定された希釈濃度を含むサンプルを作り出すために、適切な希釈段階でサ

20

【0009】

本発明は、以前に自動化が困難だったサンプルを標準化するための方法および装置を提供する。均一のサンプルの生成を自動化するための効率的で効果的な溶液は、多くのアッセイが、個々のサンプル分析および希釈工程を包含する特定の核酸濃度を必要とするという事実によって制限されてきた。例えば、生物学的サンプルからの身体の変異体の検出はまた、野生型配列、または異種性の高いDNAの存在下で少量の突然変異DNAを検出する能力を引き起こす。結果として、便サンプルからの初期段階の結腸直腸癌の分析のために、1%に満たない突然変異DNAを検出する必要がある。これらの制限はまた、まれな伝染病、すなわち病原体の検出について真実である。異なる開始濃度のサンプルが、経路

30

【0010】

本発明の方法および装置は、複数のサンプルの処理を自動化するのに有用である。特定の実施形態において、本発明の方法および装置は、アレイ中の複数のサンプルの自動化処理を包含する。また、本発明の特定の実施形態は、2次元以上の次元のアレイを含む。本発明の方法および装置は、デジタル増幅反応のための核酸サンプルの処理に特に有用である。本発明の方法および装置はまた、下流分析技術およびその技術的感度に関連するDNA異種性の調節に有用である。さらに、本発明は、標的配列を濃縮することにより、微量なDNA標的を検出する能力を提供する。例えば、1%の変異体集団が検出され得る場合（例えば、突然変異反応に特異的な固相の小型の塩基配列決定を用いて）、0.05~0.1%の変異体（おのおの20倍~10倍の濃縮の後）を検出することもまた可能であり得る。本発明の方法および装置はまた、遺伝子型試験、例えば、HIV遺伝型試験のような、レトロウイルス検出試験を介しての、変異体の検出に有用である。他の実施形態において、本発明の方法および装置は、法医学試験、インビトロでの出生前診断、循環細胞の分析、およびサンプルの希釈を含み得る任意の他のアッセイまたは試験に関して使用され得る。

40

【0011】

本発明の1つの実施形態において、複数のサンプル（例えば、複数の患者から得られたサンプル）を自動的に処理して、分析的分析のための均一なサンプルを生成する。本発明によると、各々のサンプルは、これらのサンプルが、希釈経路における種々の異なった段

50

階で導入されるように、異なる初期のサンプル濃度を有し得る。本発明の別の実施形態において、単一の患者からの1つ以上のサンプルを、自動的に加工されて多数の分析のための分析 (a n a l y s e s) についての均質なサンプルを作り出す。

【 0 0 1 2 】

本発明により企図される構造は、種々のフォーマット (例えば、標準マイクロタイタープレートフォーマット (例えば、96ウェルプレート、384ウェルプレート、および1536ウェルプレート) 、特定のアッセイのために特に設計された非標準マイクロタイタープレート、および離れた場所または特有の場所でのサンプルの連続的な投入のためのスライドまたは他の表面を含む。さらに、形式は、標準フォーマットおよび微小流体性 (m i c r o f l u i d i c) フォーマットを含む。ロボット工学の液体操作子が、現在全てのこれらのフォーマットを扱い得、特定のアッセイに基づく非標準フォーマットを扱うように適合され得る。熱的サイクラー (P C R についての) の制限は、現在384ウェルプレートである。しかし、本発明は、マイクロタイタープレートを含む、熱的循環追加フォーマットのために適合した装置を企図する。本発明はまた、他のマイクロタイタープレートフォーマット (非標準マイクロタイタープレートフォーマットを含む) を含む自動化手順を企図する。

10

【 0 0 1 3 】

本発明のさらなる局面および利点は、以下の詳細な説明の考察に対して明らかである。

【 0 0 1 4 】

(発明の詳細な説明)

20

本発明は、希釈過程において必要な工程を最小限にするための方法および装置を提供する。本発明はまた、希釈過程を自動化するための方法および装置を提供する。本発明は、検体が、所定の標的濃度に希釈されるように、所定の希釈経路における、サンプル特有の (または濃度特有の) 希釈位置にサンプルが導入される工程を決定するための方法を提供する。具体的には、本発明は、検体のサンプル濃度を決定することおよび、この検体の濃度に基づいて、続いて、希釈経路におけるどの位置に、またはどの点にサンプルが導入されるべきかを決定することを包含する。

【 0 0 1 5 】

生物学的サンプルの分析は、診断アッセイのようなアッセイのための物質 (例えば、核酸) の所定の量をしばしば必要とする。従って、均一な濃度のサンプルを作り出すための自動化手順は、効率的に多数のサンプルを処理するために有用である。本発明は、自動化希釈手順のために必要となる操作の数を減らすための方法を提供する。本発明によれば、サンプル濃度が決定され、そしてこのサンプル濃度が、一連の希釈点の間の複数の連続した希釈工程を包含する、所定の希釈経路にサンプルを導入する適切な導入位置または入口点を決定するのに用いられる。例えば、10,000倍の希釈は、サンプルを、希釈経路の第1の位置または点から、希釈経路の第5の位置または点に持っていく4つの連続した10倍希釈工程を包含する経路において、得られ得る。本発明によれば、サンプルまたはサンプルの一部は、そのサンプルまたはサンプルの一部中の検体の初期濃度に対応する装置 (例えば、スライドまたはマイクロタイタープレート) における特有の位置に導入される。従って、本発明の方法は、経路における所定の一連の希釈段階を提供する工程を包含する。このように、サンプル中の検体の初期濃度が決定した後、サンプルの一部は、経路における適切なサンプル特有の希釈点または希釈位置に導入される。例えば、核酸サンプルでは、経路における適切なサンプル特有の希釈位置または希釈点は、サンプルの核酸濃度によって決定される。その後、このサンプルは、希釈経路に沿うそれぞれの段階で順番に希釈される。本発明によれば、サンプルは、サンプルの初期濃度に関わらず、経路において異なる最終希釈点に希釈される。

30

40

【 0 0 1 6 】

特定の実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。例えば、生物学的サンプルは、便、尿、唾液、精液、血液、痰、脳脊髄、脾液、胆汁、リンパ、膿、および/もしくは吸引液体である (かまたはこれらに由来し得る) 。生物学的サンプルは、1患者

50

から得られる１つの核酸サンプルまたは複数の患者から得られる複数の核酸サンプルであり得る。関連した実施形態において、核酸サンプルは、ヒトDNAまたは動物DNAを含む。特定の実施形態において、生物学的サンプルはまた、細胞物質を含む。別の実施形態において、サンプルは、非生物学的サンプルであり得る。さらなる実施形態において、本発明の方法および装置は、非ヒトサンプルの希釈を自動化するのに有用である。例えば、ウイルスサンプル（例えば、インタクトなウイルス、ウイルス核酸、またはウイルスタンパク質）は、本発明の方法を用いて希釈され得る。

【００１７】

一般的に、本発明によれば、サンプル中の検体の濃度が決定される。例えば、本発明の１つの実施形態において、ヒトDNAを含む核酸サンプルを含む方法および装置のために、ヒトDNA濃度は、qPCRによって決定され得る。しかし、サンプルの濃度は、当業者に公知の任意の手段により、決定され得、希釈されるべきサンプルに基づいて変わり得る。

10

【００１８】

複数のサンプルを標準化するための方法および装置は、装置上の希釈点または希釈位置のアレイにわたってサンプルの一部を入れることを包含する。本発明の実施形態は、２以上の次元を構成するアレイのような装置を企図する。また、本発明の方法および装置は、ウェルまたはポロニーのような装置上の分離した、特有の位置を有する。ポロニーは、例えば、スライドまたは他の表面上に導入されたデポジットである。一般的に、各々のデポジットまたはサンプルの集合は、サンプルまたは液体の表面張力の結果として、スライド上に（または他の表面上に）ポロニーまたは液滴を形成する。このように、本発明の装置は、アレイを含み、このアレイは、マイクロタイタープレートのような、少なくとも１つのウェルを有する、任意の標準的なプレートであり得る。本発明の別の実施形態において、装置は、アレイを含み、このアレイは、スライドの表面上のポロニーのアレイにわたってサンプルデポジットを受容することができるスライドを含む。さらに、各々のポロニーは、サンプル中の検体の初期の濃度に対応する、装置上の特有の位置を占める。

20

【００１９】

本発明はまた、サンプル上でPCR反応を実施することを包含する。特定の実施形態において、PCR反応が、希釈経路における最終希釈段階でのサンプルの一部で実施される。また、本発明の特定の実施形態において、サンプルは、最終希釈段階で、約１０核酸分子に希釈される。本発明の別の実施形態において、サンプルは、最終希釈段階で、約５核酸分子に希釈される。本発明のさらに別の実施形態において、サンプルは、最終希釈段階で、約１核酸分子に希釈される。

30

【００２０】

本発明の実施形態はまた、サンプルを分析する工程を包含する。１つの実施形態において、経路中の最終希釈段階のサンプルが、分析される。しかし、サンプルは、経路中の任意の希釈段階で単離および分析され得る。サンプルを分析することは、サンプルに対してアッセイを実施する工程を包含し得る。例えば、有用なアッセイとしては、列挙されたLOH、DNA完全性アッセイ、変異体検出、発現アッセイ、およびFISHが挙げられる。しかし、任意のアッセイまたは分析技術が、利用され得、そして標的サンプルに依存し得る。また、特定のアッセイは、p53、ras、APC、DCC、およびBAT-26からなる群から選択された遺伝子座での変異体を検出し得る。本発明の方法および装置はまた、レトロウイルス検出試験またはレトロウイルス検出アッセイを実施する工程を包含する。例えば、特定の試験またはアッセイは、ウイルスを遺伝子型決定する（genotype）ため、例えば、HIVウイルスサンプルまたはHPVウイルスサンプル内の変異または改変体を検出するために行われ得る。

40

【００２１】

また、本発明の方法は、検出可能標識で、核酸サンプル中の核酸配列を標識する工程を包含する。検出可能標識の例としては、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、抗原性マーカー、および酵素マーカーが挙げられる。他の検出可能マーカーが、用いられ得、当業者

50

に公知である。

【0022】

本発明の方法はまた、サンプル希釈の自動化のための、コンピュータプログラム可能な方法を含む。一般的に、本発明の方法は、経路中の一連の希釈点に沿った、サンプルの自動化希釈のためのプログラムされたアルゴリズムに対応するデータを入力することを包含する。これらの方法はまた、少なくとも1つのサンプルの所定の初期濃度に対応するデータを入力することを包含する。さらに、これらの方法は経路中の一連の希釈点に沿ってサンプルを導入するための適切な入口点を決定する工程を包含する。本発明によれば、適切な入口点が、サンプルの初期の濃度によって決定される。さらに、これらの方法は、コンピュータまたは自動装置デバイスに指示を送ることを包含し、このコンピュータまたは自動装置デバイスは、サンプルを経路中の特定の段階に導入し得、経路中の希釈段階に沿ってサンプルを希釈し得る。関連した実施形態において、全ての情報およびデータは、可視ディスプレイまたは音響機器で表示される。関連した実施形態において、これらの方法は、コンピュータプログラム可能な方法で使用するために、サンプルの初期濃度のような、データを入力するためのインプットモジュールを含む。さらに、関連した実施形態において、全ての情報およびデータは、有線ネットワークまたは無線ネットワーク上でユーザーに提供され得る。

10

【0023】

本発明は、均一な濃度のサンプルを生成するのと並行して、複数の患者サンプルを処理するための方法および装置を提供する。本発明によれば、異なる開始濃度の物質を有する検体を含むサンプルを、異なる工程で、経路（または自動化連続希釈手順）中の一連の希釈点に導入する。例えば、より濃縮された患者サンプルは、希釈手順においてより早く導入され、希釈手順のより遅くに導入されるあまり濃縮されていない患者サンプルよりも多くの希釈工程を経る。患者サンプルの適切な導入は、あらかじめ決定されたアルゴリズムにより決定され得るか、またはユーザーによって操作され得る。

20

【0024】

内部コントロールは、並行なサンプル間の希釈工程における変動性について希釈プロファイルおよびコントロールをモニタリングするために用いられ得る。例えば、既知の量の蛍光マーカーまたは他のマーカーが、希釈経路における、ある段階で、好ましくは最初の段階で、導入され得る。マーカーの量は、希釈経路における1つ以上の希釈段階で決定され、そして参照の量、またはこの希釈経路における同じ段階にある並行サンプルにおけるマーカーの量と比較される。変化の量は、並行サンプル中の希釈経路の再現性の指標である。

30

【0025】

本発明は特に、サンプルデポジットの2次元アレイ（例えば、試験管の2次元アレイ、2次元マルチウェルプレート、サンプルチャンバーの2次元アレイ、または他のサンプル容器の2次元の構成）を用いて実施される、希釈経路または自動化希釈手順における、一連の希釈点の状況において有用である。本発明の1つの利点は、96ウェルプレート、384ウェルプレートおよび/または1536ウェルプレートを含む標準マルチウェルプレートのための標準自動装置および標準ロボット機器を用いて実施され得ることである。また、本発明の他の利点は、スライドを用いて実施され得ることである。例えば、一連の希釈点に沿うデポジットが、ポロニーとしてスライド上で導入され得る。従って、スライド上または任意の他の適切な表面上のポロニーの使用は、マルチウェルプレートにおいて従来必要とされる、固定された寸法もしくはチャンバーまたは実質的に固定された寸法もしくはチャンバーを必要とすることなしに、単離されたサンプルの分配を提供する。

40

【0026】

本発明の方法および装置はまた、枝分かれした経路または二又に分かれた経路を含む一連の希釈経路を含む。例えば、枝分かれした経路または二又に分かれた経路の使用は、包括的な分析および研究のためのサンプルの大規模な希釈および分配を提供する。さらに、本発明の方法および装置はまた、個々に制御されかつアドレス指定可能な経路を含む。例

50

えば、特定の経路は、サンプルの特定の特性に基づいて除外され得る。

【0027】

図1は、連続的希釈過程を示し、ここで開始サンプルは、列Aに導入され、列Cに向かうアレイを横切って動く一連の2倍希釈を経て段階的に希釈される。このような希釈手順は、少ない数の工程で大きな割合の希釈に帰し得る。例えば、各々の工程が2倍希釈を包含する、12工程の希釈手順は、 2^{12} （すなわち4096倍）の希釈に帰し、50,000 pg / 100 μlの初期のDNA濃度を有するサンプルを12 pg / 100 μlに希釈する。当業者は、希釈係数が、各々の工程でサンプルウェルの所定の大きさに適切な条件であれば、各々の希釈工程が、異なる希釈係数（例えば、5倍希釈、10倍希釈、または他の希釈係数）を含み得ることを理解する。従って、適切な希釈スキームが、任意の適用のために設計され得る。

10

【0028】

希釈を計算する一般的に適用可能な等式は以下のとおりである：

$$C_f = N^x \cdot C_i ; C_f \text{ は最終濃度である}$$

N = 列から列に移る度の希釈係数

x = 希釈の回数（投入する行に依存する）

図1に示した実施例は、異なるサンプルの初期の濃度が同じである、希釈手順を例示する。しかし、多くの状況において、生物学的サンプルの初期の濃度は、あるサンプルと次のサンプルとで大きく異なる。本発明に従って、異なる濃度を有するサンプルが、連続的な希釈過程における異なる工程で希釈アルゴリズムに導入される。例えば、図2は、異なる初期の濃度を有する5つのサンプルが、5つの異なる段階で希釈手順に導入され、同一の最終濃度に帰する希釈過程を示す。この実施例において、P1の初期の濃度を有する他のサンプルを、列Aに導入する。同様に、P2、P3、P4、およびP5の初期の濃度を有する他のサンプルを、丁寧に列B、C、D、EおよびFに導入される。この方法の利点は、均質な自動化希釈手順が、2次元アレイを横切って実施されるが、個々に区別された希釈が、希釈手順において異なる工程で個々のサンプルを導入することにより得られることである。

20

【0029】

従って、図2は、開始サンプルは、列Aから列Fの1つに導入され、列Fへ向かうアレイを横切って動く一連の希釈を経て段階的に希釈される連続的な希釈過程を示す。このアレイに示されていないが、当業者は、サンプルの特性に基づいて、仮定的な列G、Hなど（示さず）において、さらなる希釈が段階的に続き得ることを理解する。

30

【0030】

また、サンプルが適切なウェル（マイクロタイタープレートのような、実質的に固定された寸法を備える装置の場合）またはポロニー（スライドのような、装置の場合）中に導入され、または投入（deposit）された後、サンプルが段階的自動化連続希釈過程において希釈された後、各々の行（P1～P5）において最終希釈サンプルまたは最終希釈デポジットは、実質的に同じ濃度を有する。結果として、実施例2で供されるように、初期のP1におけるサンプル濃度は、初期のP2よりも大きく、初期のP2は初期のP3よりも大きくなど、これが初期のP5まで続く。しかし、最終のP1～P5におけるサンプルの濃度は、実質的に等しい。

40

【0031】

従って、式： $n = \log_2 C_{\text{初期}} / C_{\text{最終}}$ 、ここで n = 希釈の回数、 $C_{\text{初期}}$ = 初期の濃度および $C_{\text{最終}}$ = 最終濃度：を用いて、本方法または装置のユーザーは、所望される最終濃度を達成するのに必要な希釈の回数を決定し得る。

【0032】

当業者は、希釈手順において続く工程が、二次元アレイにおいて隣接している必要がないことを理解する。例えば、初期の希釈工程が、列5で実施され得、第2の希釈工程が列2においてであり得、第3が列8においてであり得る。しかし、二次元アレイを横切る連続した列に、連続した希釈工程を割り当てることが一般的により便利である。

50

【 0 0 3 3 】

当業者はまた、二次元アレイが、説明の便利さおよび簡明さのための列および行を有するように記載されることを理解する。本発明は、サンプルウェルのアレイを横切る、任意の方向において希釈工程を実施することにより行われ得る。例えば、本発明はまた、異なる希釈工程を、２次元アレイにおける異なる列とは対照的に異なる行に割り当てることにより実行され得る。

【 0 0 3 4 】

本発明の好ましい実施形態において、サンプル特有の希釈工程は、あまり大きく異ならず、この希釈工程は、あまり大きく異ならない初期濃度を有する、異なるサンプルについて、多数の入口点を提供する。より好ましくは、サンプル特有の希釈工程が、所定のサン

10

【 0 0 3 5 】

本発明の一つの実施形態において、自動化希釈手順は、異なる濃度の患者サンプルから、等しく希釈されたサンプルの大規模な並行なアレイを作り出すのに有用である。これは図 3 において例示され、ここで希釈されたサンプルは、診断の分析のために、サンプルのアレイ（例えば、他のマルチウェルプレート）に移される。この実施例において、異なるサンプルは、同じ診断試験（例えば、同じマーカーを探す）を用いて全てアッセイされる。しかし、代替の実施形態において、診断アッセイは、希釈手順における最終サンプルの工程で（例えば、希釈アレイにおける最終希釈工程を包含する列で）直接実施され得る。

【 0 0 3 6 】

本発明の別の実施形態において、自動化希釈手順は、図 4 に例示されるように、単一の患者からの等しく希釈されたサンプルの大規模の並行なアレイを作り出すのに有用である。この実施例において、これらのサンプルは、異なるアッセイ（例えば、異なる診断マーカーについて）を用いて試験される。

20

【 0 0 3 7 】

本発明の別の実施形態において、自動化希釈方法および装置は、その後の分析のためのサンプルを作り出すのに有用である。例えば、図 5 に表されたように、サンプルは、希釈プレート上の適切な列においてデポジット中のサンプル濃度に基づいて導入される。そしてその後、サンプルを、アレイを横切って動く一連の希釈を経て段階的に希釈する。一般的に、最終希釈サンプルまたは最終希釈デポジット（例えば、右側の最終列）が分析される場合、このサンプルまたはデポジット中に多重 P C R 反応を行うために、十分な量がなければならない。また、図 5 に示されるように、特定の実施形態において、リアルタイム定量的 P C R 分析が、当業者に公知の手段（例えば、T a q M a n（登録商標）分析を実施するような）によって、特定の異なった希釈点で既知のサンプル濃度を有する、一つまたは複数のサンプルにおいて実施され得る。別の実施形態において、特定の希釈濃度を有する一つまたは複数のサンプルは、遺伝子発現分析、遺伝子型決定、ウイルスもしくは病原体の検出 / 定量、および / または変異体スクリーニングについて評価し得る。当業者は、検出アッセイが、希釈経路での任意の一つ以上の点または段階で実施され得ることを理解する。1つの実施形態において、最後の 2 つ ~ 5 つの希釈点または希釈段階が、アッセイされる。

30

40

【 0 0 3 8 】

また、特定の実施形態において、P C R 反応を、特定のサンプル濃度を有する一つまたは複数のサンプルで実施し得る。一般的に必要とされる P C R の数は、変異体濃縮および分析感度に依存し、従って、変異体集団の検出可能性へ導く。以下の表は、必要とされる P C R の数と、変異体の濃縮の程度および分析感度の程度と、変異体集団を検出する可能性との間の関係の代表的な実証を提供する。

【 0 0 3 9 】

【表 1】

表 A: 100PCR当たり検出可能な名目上の変異反応

開始 変異体 不均質性 ⁽¹⁾	変異体 % ⁽²⁾ (合計100PCR当たりの変異PCRの名目上の数)			
	1コピー/PCR ⁽³⁾	5コピー/PCR	10コピー/PCR	50コピー/PCR
10%	100% (10)	20% (50)	10% (100)	2% (100)
5%	100% (5)	20% (25)	10% (50)	2% (100)
1%	100% (1)	20% (5)	10% (10)	2% (50)
0.5%	100% (<1) ⁽⁴⁾	20% (2.5)	10% (5)	2% (25)
0.1%	100% (<1)	20% (<1)	10% (1)	2% (5)

10

20

30

40

50

(1) 全分子(変異体+野生型)に対する変異体分子(コピー)のパーセンテージ

(2) DNAの不均一集団における変異体の検出のために必要とされる分析感度に相当する。

(3) 1分子/PCRに相当する。これは変異体%(変異体分子が存在する場合)が100%であることを意味する。

(4) 変異体を検出するために必要な実施>100PCR。

表Aは、100PCRあたりに検出可能な名目上の変異反応を示す。実際の濃縮および変異体検出可能性は、開始サンプルにおける分子のPoisson分布に起因して、そして操作(例えば、ピペティング、希釈、PCR反応の調製、可変性PCR効率など)の間の配布の結果として変わり得る(正または負)。表Aが示すように、開始変異不均一性は、全分子(変異体および野生型)に対する変異体分子(コピー)のパーセンテージである。変異体のパーセンテージは、DNAの不均一な集団における変異の検出のために必要とされる分析感度に等しい。また、1コピー/PCRは、1PCR当たり一分子に等しく、これはまた、100%の変異体パーセンテージ(変異体分子が存在している場合)に等しい。また、合計100PCR当たりの変異体のPCRの名目上の数が、約1より小さいならば、これは、100を超えるPCRが、変異体を検出するために、行われなければならないことの表れである。

【0040】

本発明の方法および装置は、核酸サンプル調製のために特に有用である。本発明に従って、患者サンプルは、サンプル中の患者(例えばヒト)核酸の濃度に基づいて適切な希釈工程で希釈手順に導入され得る。サンプル中の患者核酸の量は、当該分野で公知の方法に従って決定され得る。サンプルが患者細胞(例えば血液)から調製される場合、サンプル中の核酸の量は、サンプル中の患者核酸の量を示し、これは、例えば260nmでのUV吸収により、または定量方法に基づく標準染料を使用することにより、測定され得る。対照として、サンプルが、便サンプルから調製される場合、患者核酸の量は、細菌核酸の量より、はるかに少ない。従って、患者核酸の量は、ヒト特異的(またはより一般的には、標的特異的)オリゴヌクレオチドプローブを用いて、定量PCR(qPCR)により決定される。あるいは、患者核酸を、当業者に公知の標準的技術を用いて、細菌核酸を除くことにより精製し得る。精製された患者核酸は、上記のようにまたは当業者に公知の任意の他の手段により、定量化され得る。

【0041】

本発明に従って、希釈されたサンプルは、DNA配列決定、固相微小配列決定、プライマー伸長反応、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーションプローブ、オリゴヌクレオチド連結アッセイ(OLA)、対立遺伝子特異的PCR(AS

P)、MALDIおよびESIイオン化技術を含むマスペクトロメトリー(MS)、酵素結合免疫アッセイ(ELISA)、微小アレイ、ならびにタンパク質切断試験(PTT)を含む、当該分野で公知の技術を含む数多くの技術によって、アッセイされ得るか、または分析され得る。

【0042】

本発明の他の局面および利点は、本明細書中の開示を考慮した際に明らかである。

【実施例】

【0043】

(デジタルPCRに対する自動化サンプル希釈)

デジタルPCR(DIG-PCR)は、単一の分子が単離され、次いでPCRを用いて増幅される点までの開始DNA溶液の希釈に基づく。しかし、希釈プロセスは、一般的に面倒である。しかし、本発明により提供される代替のアプローチは、市販されているロボット工学の流体操作子および標準マイクロタイタープレートフォーマットを用いて、希釈過程を自動化することであり、これは、下流分析技術のためのより大きな可撓性を提供する。より重要なことに、非常に多数の分析「ウェル」に対する必要性が排除される。これは、分析段階での患者DNA可変性に対する、患者の標準化に起因する。このことは、本発明を用いる大生産ウェルの数の増加(すなわち、正のPCR結果に帰する)に起因する。

【0044】

一般的なロボット工学の液体操作子を用いて、デジタルPCRのために高程度の希釈を再生可能に生じるというチャレンジは、以下の因子を含む：

正確さおよび再現性を確かめるために、連続希釈に頼ること；

初期DNA濃度の高程度の可変性を、サンプル間で予測するのを可能にすること；

5 ~ 50 pg DNAの範囲内(標的配列の1 ~ 5細胞等量の範囲内)の最終濃度を標準化すること；

直接の適合可能性について、標準装置(ロボット工学の液体操作子)および消費可能(マイクロタイタープレート)フォーマットに適合させること。

【0045】

本発明の1つの実施形態に従って、サンプルを、マイクロタイタープレートの列にロボットによって導入し、ロボット液体操作子を、行において1つのウェルから次のウェルに移す場合に、サンプルを連続して希釈し、各々の移動で等容量の新鮮な緩衝液を加える(各々の移動で2x希釈をもたらす)ようにプログラム化する。標準的なマイクロタイタープレートフォーマット(8x12ウェル)において、これは、同時に8サンプルまでの希釈を可能にする。1つの実施例において、50,000 pg / 100 μlの初期濃度を仮定し、ウェルA1で開始し、そしてウェルA12に移すことによって、以下の式に従って、最終濃度12 pg / 100 μlが得られる：

$$C_{final} = C_{initial} / (2)^n, \text{ ここで } n = \text{希釈の回数}.$$

【0046】

行の最後のウェルにおいて残された希釈されたDNA溶液の容量は、結果として「相同的な」または濃縮されたDNA集団を分析する元のDIG-PCR概念と協力して、多くの並列のPCR反応を与えるのに十分である。250 μlの希釈されたDNAの最終量が最後のウェルに残っているような実施例において、これは、1回の反応当たり5 μlのDNA溶液(例えば、全50 μl反応体積)を仮定する50 PCR反応、またはより小規模のPCR反応体積を仮定する非常に多数の反応を行うのに十分である。

【0047】

本発明の1つの局面に従って、サンプル希釈手順は、サンプルが単一の分子に希釈されることを必要としない。好ましい実施形態において、サンプルは、約5分子が存在している点に希釈される。例えば、変異がこのサンプル中で検出され得、但し、検出アッセイは、分子の20%に存在する変異を検出するのに十分に感受性である。従って、好ましいサンプル希釈は、希釈されたサンプルに対して実施されるべき診断検出アッセイの感受性に

10

20

30

40

50

より決定される。

【 0 0 4 8 】

本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態において具体化され得る。従って、この前述の実施形態は、本明細書中に記載された本発明を限定するのではなく、全ての点で例示的に考察されるべきである。従って、本発明の範囲は前述の記載によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、従って、本特許請求の範囲の意味および均等の範囲内で生じる全ての変化は、本発明に包含されるように意図される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 9 】

【図 1】図 1 は、初期濃度を有するサンプルについての本発明の方法またはアルゴリズムを用いる連続的な希釈経路を示す概略図である。

【図 2】図 2 は、異なる初期濃度を有するサンプルについての本発明の方法またはアルゴリズムを用いる連続的な希釈経路を示す概略図である。

【図 3】図 3 は、多くの患者から等しく希釈されたサンプルの並行なアレイを示す概略図である。

【図 4】図 4 は、一人の患者から等しく希釈されたサンプルの並行なアレイを示す概略図である。

【図 5】図 5 は、希釈されたサンプルの並行なアレイおよびアレイにおける希釈されたサンプルに対して P C R を実施するための P C R プレートを示す概略図である。

【図 1】

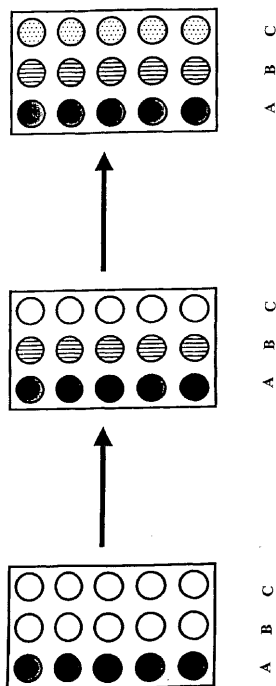


Fig. 1

【図 2】

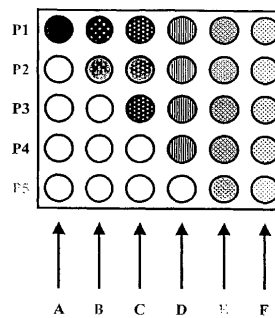


Fig. 2

10

20

【 図 3 】

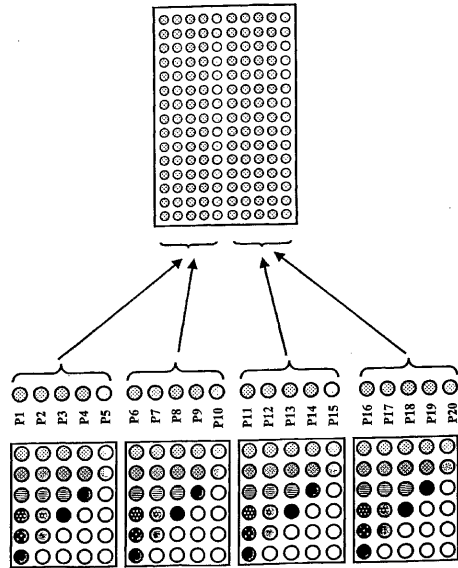


Fig. 3

【 図 4 】

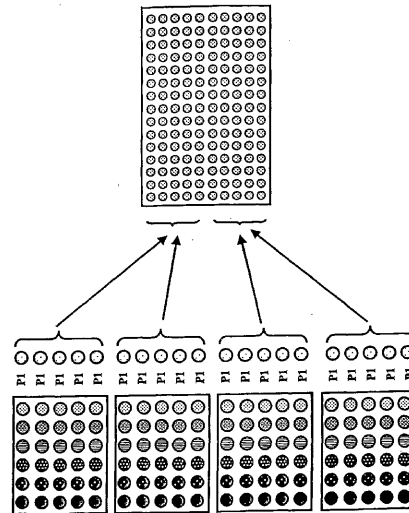


Fig. 4

【 図 5 】

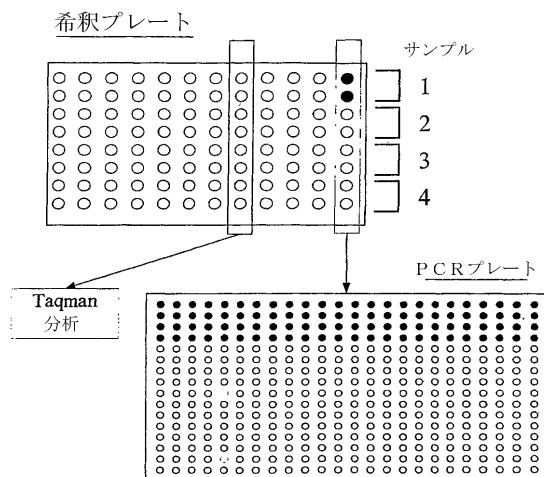


Fig. 5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 33/48		
US CL : 702/019		
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. : 702/019		
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) EAST AND STN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,E	US 6,586,193 B2 (YGUERABIDE et al) 01 June 2003 , see entire document.	1-33
A,P	US 6,579,719 B1 (HUTCHENS et al) 17 June 2002, see the entire document.	1-33
A,E	US 6,555,360 B1 (SRIENC et al) 29 April 2003 , see entire document.	1-33
A,P	6,444,461 b1 (KNAPP et al) 03 September 2002 , see the entire document.	1-33
A,P	US 6,406,893 B1 (KNAPP et al) 18 June , see the entire document.	1-33
A,P	US 6,391,622 B1 (KNAPP et al) 21 May 2002 see the entire document.	1-33
<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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report 03 SEP 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Shubo "Joe" Zhou Telephone No. (703)-308-0196

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	C 1 2 N 15/00	A
// C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ウィットニー , ダンカン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 6 , サドバリー , リード ロード 2 0

F ターム(参考) 2G052 AA29 AA30 AA32 AB20 AD26 AD46 DA06 FD01 GA29
 4B024 AA11 CA01 FA10 FA13 HA11 HA12
 4B029 AA07 AA23 BB01 BB20 CC08 FA15 HA05 HA09
 4B063 QA01 QA17 QA18 QQ02 QQ05 QQ42 QR55 QR56 QR62 QR82
 QS02 QS03 QS10 QS25 QS36 QS39 QX01 QX07

专利名称(译)	自动化样品制备方法和装置		
公开(公告)号	JP2005509871A	公开(公告)日	2005-04-14
申请号	JP2003545838	申请日	2002-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	确切的科学公司		
申请(专利权)人(译)	确切的科学公司		
[标]发明人	ウィットニーダンカン		
发明人	ウィットニー, ダンカン		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N1/36 G01N1/38 G01N33/566 G01N33/569 G01N35/00 G01N35/10 G01N37/00		
CPC分类号	G01N1/38 G01N2035/00158 G01N2035/1032		
FI分类号	G01N1/28.Z C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.L G01N37/00.102 C12N15/00.A C12M1/00.A		
F-TERM分类号	2G052/AA29 2G052/AA30 2G052/AA32 2G052/AB20 2G052/AD26 2G052/AD46 2G052/DA06 2G052/FD01 2G052/GA29 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/FA10 4B024/FA13 4B024/HA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB01 4B029/BB20 4B029/CC08 4B029/FA15 4B029/HA05 4B029/HA09 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ05 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS02 4B063/QS03 4B063/QS10 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/331654 2001-11-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于自动化样品处理的方法和设备。本发明包括在基于样品中目标分析物的浓度选择的步骤中将样品引入多个稀释程序中。一种用于归一化样品的方法，该方法包括以下步骤：确定多个样品中的每一个中的分析物的初始浓度;将每个样品的一部分引入到该装置上使得每个样品的一部分相对于样品的初始浓度占据装置上的独特位置;和稀释所述多个覆盖采样的样品的步骤得到的所述多个，步骤如相对于分析物浓度，该方法标准化。

				特表2005 (P2005- (43) 公表日 平成17年4月14日(改)
(51) Int. Cl. 7	F I	テーマコード (彙)		
G O 1 N 1/36	G O 1 N 1/28	Z	2 G O 5 2	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68	A	4 B Q 2 4	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/70		4 B O 2 9	
C 1 2 Q 1/70	G O 1 N 33/53	M	4 B O 6 3	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/566			
		審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	(全 16 頁) 最終
(21) 出願番号	特願2003-545838 (P2003-545838)	(71) 出願人	504193516	
(86) (22) 出願日	平成14年11月20日 (2002.11.20)		エグザクト サイエンシース コ	
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月19日 (2004.5.19)		ション	
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/037452		アメリカ合衆国 マサチューセッ	
(87) 国際公開番号	W02003/044217		7 5 4, メイナード, クリー	
(87) 国際公開日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		ド 6 3	
(31) 優先権主張番号	60/331,654	(74) 代理人	100078282	
(32) 優先日	平成13年11月20日 (2001.11.20)		弁理士 山本 秀策	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409	
			弁理士 安村 高明	
		(74) 代理人	100113413	
			弁理士 森下 夏樹	
				最終頁