

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-19604
(P2021-19604A)

(43) 公開日 令和3年2月18日(2021.2.18)

| | | | | |
|------------------------------------|------------------|---------|--------|-------------|
| (51) Int.Cl. | | F I | | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/02 | (2006.01) | C 1 2 Q | 1/02 | 2 G O 4 5 |
| C 1 2 Q 1/68 | (2018.01) | C 1 2 Q | 1/68 | 2 G O 5 4 |
| G O 1 N 33/48 | (2006.01) | G O 1 N | 33/48 | P 4 B O 6 3 |
| G O 1 N 33/84 | (2006.01) | G O 1 N | 33/84 | A |
| G O 1 N 33/483 | (2006.01) | G O 1 N | 33/483 | E |
| 審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 13 頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|--------------------|----------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2020-163583 (P2020-163583) | (71) 出願人 | 513156548 |
| (22) 出願日 | 令和2年9月29日 (2020.9.29) | | グッド スタート ジェネティクス, インコーポレイテッド |
| (62) 分割の表示 | 特願2017-516096 (P2017-516096) の分割 | | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, パトナム アベニュー 237 |
| 原出願日 | 平成27年9月18日 (2015.9.18) | (74) 代理人 | 100078282 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/054,725 | | 弁理士 山本 秀策 |
| (32) 優先日 | 平成26年9月24日 (2014.9.24) | (74) 代理人 | 100113413 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| | | (74) 代理人 | 100181674 |
| | | | 弁理士 飯田 貴敏 |
| | | (74) 代理人 | 100181641 |
| | | | 弁理士 石川 大輔 |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 遺伝子アッセイのロバストネスを増大させるためのプロセス制御

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生体試料を処理するための組成物および方法、より具体的には、着床前遺伝子スクリーニングアッセイにおいて試料を分析するための組成物および方法の提供。

【解決手段】 試料を、pHの変化に応答して変色するpH指示薬と接触させるステップを包含する。クレゾールレッドなどのpH指示薬の存在は、他にも利益がある中で、アッセイ中の試料の可視化の改善、試料が適切に凍結および解凍されていることの確認、ならびにpH調整の精度の向上をもたらす。該方法は、試験所での試験のために発送する前に細胞を含む液体試料が凍結しているか否かを決定するため、ならびに下流の分析向けに細胞を溶解してそれらの核酸を遊離させる試験所におけるプロセスの完全性を監視および確保するために、光学的指示薬を活用する方法である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

本明細書の一部に記載の発明。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、2014年9月24日に出願された米国仮特許出願62/054,725号の利益および米国仮特許出願62/054,725号に対する優先権を主張し、その内容は、その全体が参照として本明細書に援用される。

10

【0002】

本発明は、一般には、生体試料を処理するための組成物および方法に関する。より具体的には、着床前遺伝子スクリーニングアッセイにおいて試料を分析するための組成物および方法に関する。

【背景技術】**【0003】**

着床前遺伝子スクリーニング(PGS)は、胎芽から1個または複数の細胞を生検し、分析して、その胎芽の核型を決定する手順である。典型的には、凍結させ、試験のために試験所に引き渡す前に、生検は、エンブリオロジスト(embryologist)により実施され、エンブリオロジストは細胞を2~3ulの液体と共に管に入れる。試験所は生検された細胞を含有する凍結液体を受領し、核酸を遊離させる溶解手順を実施する。溶解はいくつかの異なる方法で実施可能であるが、最も一般的な技術では必要に応じて昇温状態において、アルカリ溶液を使用して細胞を溶解させ、下流の分析のための核酸を潜在的に変性および/または剪断する。

20

【0004】

ある特定の遺伝的障害について胎芽のプロファイリングを行うことにより、将来の親は、障害がなく、妊娠に成功する高い可能性を有し、より低いがんの素因を有する胎芽および様々な他の考慮すべきことを選択することができる。着床前遺伝子診断は、特定の疾患または状態についてアッセイするのではなく、一部がリスクがあり得る卵母細胞または受精胎芽の群から望ましい卵母細胞または胎芽を選択するために使用される。着床前遺伝子スクリーニングも、正倍数性の染色体組(22対の常染色体および2個の性染色体)を有する、あるいは転位またはサブ染色体の増加もしくは減少を含む、より微細な規模でのゲノム再編成を欠く胎芽を選択するために使用され得、それにより、胎芽が成功裏に着床し、出産予定日まで発育し、健康な生児出生をもたらす可能性を高め、選択的妊娠中絶に関する潜在的な望みを減少させ得る。

30

【0005】

着床前遺伝子スクリーニングは、ドナーから複数の卵子を取り出し、それらを受精させて胎芽を産生し、胎芽を分析し、ある特定の望ましい特徴に適合する胎芽を選択することに関係し得る。着床前の(preimplanted)胎芽または胚盤胞を分析するために、一般的にごく少量の細胞材料を生検すればよい。胎芽または胚盤胞は合計数十個の細胞しか有し得ないため、PGSアッセイでは1個の細胞のみを生検することに関係し得る。一般的に、1個または複数の細胞を生検および分析して、胎芽の核型を決定する。

40

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0006】**

本開示は、細胞試料を処理するための組成物および関連する方法を提供する。具体的には、本発明の方法は、試験所での試験のために発送する前に細胞を含む液体試料が凍結しているか否かを決定するため、ならびに下流の分析向けに細胞を溶解してそれらの核酸を遊離させる試験所におけるプロセスの完全性を監視および確保するために、光学的指示薬を活用することに関係する。さらに、ある特定の指示薬はまた、試料の安定化およびpH

50

の監視にも有用であることが発見されている。

【0007】

一実施形態では、細胞試料を生検によって取得し、適切な緩衝液または収集保存液に入れる。下記にてより具体的に記載される指示薬を添加し、試料を凍結させる。あるいは、細胞試料を生検によって取得し、既に指示薬を含有する適切な保存液または収集液に入れることができる。試料が凍結されていることおよび試験所に引き渡すのに十分であることを指示薬の変色を使用して、決定する。試験所は試料を取得および凍結する施設と同じ場所にあってもよく、または遠く離れていてもよい（すなわち、試験のために凍結試料を試験所の人員に引き渡す前に、凍結試料を単に保存しておけばよい）。あるいは、試料の導電性の変化を使用して、指示薬を監視する。

10

【0008】

本発明の実施の特に有用な様式は、着床前遺伝子スクリーニングの文脈においてであり、この文脈では、遺伝子分析のための処理の前の凍結試料の質および位置が決定的である。生検された胎芽材料を、収集緩衝液と一緒に収集管に入れる。次いで指示薬を収集管に添加する。試料が適切に調製されたか否かの決定に有用である任意の指示薬を使用してよい。しかし、PGSの文脈において特に有用な指示薬はクレゾールレッド、または別のトリアールメタン色素である。クレゾールレッドは、pHの変化に応答して可視スペクトル内で変色する造塩発色性発色団(halochromic chromophore)の一例である。クレゾールレッドの存在は、PGSで使用する小アリコットの液体の可視化を助け、それにより液体の配置および凍結の監視ならびにpHの微調整の監視の改善も可能にする。試料をまず収集し、クレゾールレッドを添加した後、大抵は試料を必要に応じて凍結し、さらなる分析のために別の試験所へ発送する。試料の適切な凍結および解凍は、細胞試料の完全性を維持するために必要である。クレゾールレッドは凍結に反応して変色することが発見されていることから、管内のクレゾールレッドの存在は、試料を取り扱う臨床医に対し、試料が適切に凍結または解凍されているか否かについて注意を喚起するのに有用である。

20

【0009】

解凍後、アルカリ溶解溶液を管に添加することにより、試料を溶解させることができる。該方法を実施する臨床医は、液体を適切な変色について監視し、そして必要に応じて酸または塩基で滴定することによってpHを調整して、溶解ステップに適する範囲を達成することができる。溶解後、中和溶液を添加し、そして試料が適切な範囲に達したことを示す適切な変色について再び監視することによってpHを中和する。その後の下流の分析のための適切な中性pHを確保するために、必要に応じてpHを再び微調整することができる。

30

【0010】

クレゾールレッドまたは別のpH指示薬が液体混合物中に存在することにより、臨床医は、a)液体が凍結前に管の底部に存在すること、b)エンブリオロジストが管を発送する前に液体が凍結していること、c)試験所が受領する時点で液体が凍結していること、d)pHを上昇させるのに十分な容量のアルカリ溶液が管に添加されること、およびe)pHを中和させるのに十分な容量の酸が管に添加されることを確保することが可能となる。

40

【0011】

該方法の代替的实施形態では、pH指示薬をどのステップで添加してもよい。クレゾールレッドなどのpH指示薬は、該方法の全体にわたり様々なステップにおいて多様な利益（すなわち凍結前の液体の可視化、適切な凍結および解凍の確保、ならびに微妙なpH変化の監視）をもたらすので、pH指示薬を手順の早い段階で添加することが有益である。しかし、当業者であれば、例えば凍結を含まないアッセイなど、一部のアッセイはpH指示薬の早期添加を必要としなくともよいことを理解するであろう。また、pH指示薬の添加がプロトコルの早期ステップに干渉する場合など、他の制限を有する一部のアッセイは、指示薬を後で添加することから利益を得る。

50

【 0 0 1 2 】

各ステップを試験所で実施した後、pH指示薬の変色を目視により監視することができる。あるいは、溶液の正確な色、それゆえ正確なpHを決定する能力のあるコンピュータソフトウェアにより制御されるカメラを含むシステムにより、pH指示薬の変色を自動的に監視することができる。下流の分析ステップを実施する前に、コンピュータソフトウェアは、溶液が適正なpHにされることを確保する介入のために、適正なpHでない任意の試料をフラグ付けすることができる。試料が不適正なpHを有する場合、適量の酸または塩基を、自動化された手段で、または臨床医により手作業で添加することにより、pHを調整することができる。

【 0 0 1 3 】

該方法は、pH指示薬が下流の分析ステップに適合する限り、クレゾールレッド、他の任意のトリアリールメタン色素、またはpHの変化に应答して変色する他の任意のpH指示薬を使用して実施することができる。例えば、Taqポリメラーゼの活性に干渉することが公知であるpH指示薬は、溶解および中和後にTaqベースのPCRを必要とするアッセイには有用でない。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される：

(項目1)

生体試料を処理するための方法であって、溶液中に少なくとも1つの細胞を含む試料を取得するステップと、該試料が凍結されていることおよび特定のあらかじめ規定されたpH範囲内であることの視覚的な指標を提供する指示薬と該試料を接触させるステップとを含む方法。

(項目2)

前記試料が凍結されているか否か、および前記pH範囲が適切であるかどうかを決定するために前記指示薬を評価するステップと、該試料が凍結されていることを該指示薬が示す場合、該試料を試験所に引き渡すステップとをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記試料を含有するバイアル中における前記細胞の位置を決定するために前記指示薬を評価するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記指示薬が色素である、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記色素がトリアリールメタン色素である、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記色素がメチルバイオレット2B、メチルバイオレット6B、メチルバイオレット10B、パラローザニン、フクシン、ニューフクシン、フクシン酸、フェノールレッド、クロロフェノールレッド、クレゾールレッド、マラカイトグリーン、およびブリリアントグリーンからなる群から選択される、項目4に記載の方法。

(項目7)

核酸を遊離させるために前記細胞を溶解させるステップと、該核酸に関する分析を実施するステップとをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記評価するステップの前に前記試料を凍結させるステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記指示薬を必要に応じて含有するアルカリ溶解溶液を添加するステップと、必要に応じて試料のpHを評価するステップと、

10

20

30

40

50

該指示薬を必要に応じて含有する溶液を用いて該溶解溶液を中和させるステップと、必要に応じて該試料のpHを評価するステップとをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記細胞が胎芽細胞である、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記試料の変色を観察することによって前記評価するステップが実施される、項目1に記載の方法。

(項目12)

変色が目視によって監視される、項目11に記載の方法。

10

(項目13)

変色が自動的手段(例えばカメラ)によって監視される、項目11に記載の方法。

(項目14)

前記試料における導電性を監視することによって前記評価するステップが実施される、項目1に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、生体試料を処理するための方法のステップを示す。

【図2A】図2Aおよび2Bは、様々なpH指示薬およびそれらの特徴的な色範囲を示す。

20

【図2B】図2Aおよび2Bは、様々なpH指示薬およびそれらの特徴的な色範囲を示す。

【図3】図3は、造塩発色性発色団の変色をカメラを使用して識別するよう構成されたシステムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

詳細な記載

本開示は、生体試料を処理する方法を記載する。該方法は、試料を、pHの変化にตอบสนองして変色する指示薬と接触させるステップを包含する。クレゾールレッドなどのpH指示薬の存在は、他の利益がある中で、アッセイ中の試料の可視化の改善、試料が適切に凍結および解凍されていることの確認、ならびにpH調整精度の向上という利益を提供する。

30

【0016】

該方法は、着床前遺伝子スクリーニング(PGS)に特に有用である。PGSアッセイは一般的に、小容量の液体中の少量試料を必要とし、これらは分析の前に凍結および解凍されなければならない。加えて、PGSプロトコルは、アッセイの有効性を維持するために、正確でなければならない様々なpH調整を必要とする。クレゾールレッドなどのpH指示薬の液体混合物への添加により、臨床医は、a)液体が凍結前に管の底部に存在すること、b)エンブリオロジストが管を送る前に液体が凍結していること、c)試験所が受領する時点で液体が凍結していること、d)pHを上昇させるのに十分な容量のアルカリ溶液が管に添加されること、ならびにe)pHを中和させるのに十分な容量の酸が管に添加されることを確保することが可能となる。

40

【0017】

本明細書に記載の方法はPGS分析に特に有用である一方、それらはまた、生体材料の他のアッセイにも使用することができる。胎芽試料のアッセイに加え、該方法は口腔試料、血液試料、羊水試料、頸部試料、眼球試料または細胞もしくは細胞材料(核酸が挙げられる)を含む他の任意の試料を分析するために使用することができる。本明細書に記載の方法は、試料または反応混合物のpHの変化を含む1つまたは複数のステップを必要とする当該技術分野において公知の任意のアッセイに適応させることができる。

【0018】

本発明の好ましい実施形態はクレゾールレッドの使用を含むが、該方法は別のトリアリ

50

ールメタン色素を使用して実施することができる。トリアリールメタン色素は、トリフェニルメタンの骨格を含有し、可視スペクトル内で強く色を発する、合成有機化合物である。多くはpHの変化に対して反応し、それゆえ、pH指示薬として有用である。pHの変化に反応して変色するか、または別の様式で反応するものであり、そして下流の分析ステップに適合するものである限り、他の任意のpH指示薬は、本発明の方法と併せて使用することができる。例えば、Taqポリメラーゼの活性に干渉することが公知であるpH指示薬は、溶解および中和ステップの下流のTaqベースのPCRを含むアッセイには有用でない。

【0019】

図1は、本発明の好ましい実施形態における一連のステップを表すフローチャート100である。フローチャート100は、本開示の方法によって生体試料を処理するステップを示している。ステップ110において、細胞を含む試料を被験体から取得する。試料は、被験体の胎芽または卵母細胞から生検された1個または複数の細胞からなるものであり得る。試料を収集した後、ステップ120で収集媒体と接触させる。収集媒体は緩衝液、アルコール、保存媒体または当業者に公知である他の任意のそのような媒体であってもよい。PGS分析の場合は大抵、収集媒体の容量は非常に少ない。容量は例えば1 μ lまたはそれ未満であってもよい。用量はまた、アッセイのニーズに応じて約2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l、10 μ l、20 μ l、50 μ l、100 μ l、またはそれ超であり得る。

10

【0020】

ステップ120の後、試料を凍結させ、別の試験所へ発送して手順のその後のステップを実施してもよい。あるいは、全てのステップを単一の試験所で実施し、試料を凍結および解凍する必要性を省くことができる。収集試料の凍結を含む本発明の実施形態では、ステップ130を実施する前に収集試料を解凍する。ステップ130では、混合物にアルカリ溶解溶液を添加することにより、収集試料中の細胞を溶解させる。該方法の他の実施形態では、機械的剪断、浸透圧溶解、化学的変性、遠心分離、超音波処理、凍結/解凍、または当該技術分野において公知の他の技術などの他の技術を使用して細胞を溶解させる。

20

【0021】

ステップ130のようにアルカリ溶液を使用して溶解を実施する場合、必要に応じて溶液を昇温状態に曝露させて溶解プロセスをさらに触媒することができる。ステップ130では、混合物中の1個または複数の細胞を溶解させ、それらの中の核酸をまた変性または剪断し、下流の分析のために調製することもできる。

30

【0022】

ステップ130に続き、ステップ140では中和溶液の添加により溶液を中和させる。一般的に中和溶液は、アルカリ溶解溶液を中和させるために、酸性である。溶解ステップ130と中和ステップ140とは両方とも、適切なpHレベルを達成する精度が必要である。溶解試薬または中和試薬のいずれかのピペット採取容量(pipetted volume)が不正確であると、準最適なpHという結果を招く。ステップ140後のpHが中性でない場合、例えば、下流のステップが阻害されることがあり、アッセイ失敗をもたらし得る。

40

【0023】

とりわけその理由から、pH指示薬をステップ150で添加する。クレゾールレッドなどのpH指示薬は、本発明の方法にとって有用である。クレゾールレッドは、pHの変化に反応して可視スペクトル内で変色する造塩発色性発色団である。クレゾールレッドはpH7.2未満では黄色、pH8.8までは赤色、そしてpH8.8を超えるとすみれ色に見える。pH指示薬の変色は目視により監視することができるか、または溶液の正確な色、それゆえ正確なpHを決定する能力のあるコンピューターソフトウェアにより制御されるカメラを含むシステムにより、自動的に監視することができる。コンピューターソフトウェアは、適正でないpHの任意の試料をフラグ付けすることができ、臨床医は下流の分析ステップを実施する前に溶液が最適なpHにされることを確保するよう、介入すること

50

ができる。その介入もまた自動化することができ、これによりコンピューターシステムは、不適正な pH の識別に応答して pH 調整を起こす。pH 調整は、試験所技術者が手作業で実施するか、またはコンピューターシステムにより自動的に実施されるかを問わず、適量の酸または塩基を必要に応じて添加することによって達成され得る。

【0024】

図1の様々な実施形態では、ステップ150はステップ110~140のいずれかのすぐ下流で起こり得る。本発明の方法は、ステップ110、ステップ120、ステップ130、またはステップ140の直後に、試料を指示薬150と接触させるステップを包含する。他の実施形態では、ステップ150をステップ120、130、140、または150と同時に実施する。

10

【0025】

クレゾールレッドなどの pH 指示薬の添加は、該方法の様々な段階において利点を有する。クレゾールレッドまたは別の適合する pH 指示薬の存在は、複数回の pH の微調整を必要とする手順の全体にわたり、試料の監視に役立つ。さらに、前述のとおり、試料をまず収集した後、大抵は試料を凍結し、さらなる分析のために別の試験所へ発送する。これは、試料の適切な凍結および解凍が、細胞試料の完全性を維持するために必要であることを意味する。クレゾールレッドは凍結および解凍に反応して変色することが発見されていることから、ステップ120、130および140における試料混合物中のクレゾールレッドの存在は、試料が適切に取り扱われてきたことを確認するのに役立つ。加えて、クレゾールレッドは試料管中の小容量の液体のより容易な可視化を可能にする。したがって、クレゾールレッドの存在は、容量が少なく、臨床医が凍結に先立って試料が管の底部に存在することを確保しなければならない、PGSおよび他の類似するアッセイにおいて特に有用である。

20

【0026】

クレゾールレッドに加え、開示された本発明の他の実施形態において有用である他の pH 指示薬は、ゲンチアナバイオレット（メチルバイオレット10B）、マラカイトグリーン、チモールブルー、メチルイエロー、プロモフェノールブルー、コンゴレッド、メチルオレンジ、プロモクレゾールグリーン、メチルレッド、アゾリトミン、プロモクレゾールパープル、プロモチモールブルー、フェノールレッド、ニュートラルレッド、ナフトールフタレイン、クレゾールフタレイン、フェノールフタレイン、チモールフタレイン、アリザリンイエローRおよび当該技術分野において公知の他の任意の一般的な試験所用 pH 指示薬である。

30

【0027】

図2A~Bは、本発明と併せて使用できるいくつかの pH 指示薬のリストを、異なる pH レベルにおける各指示薬の特徴的な変色と共に示す。図2A~Bに示すとおり、いくつかの指示薬は、ほとんどの pH レベルについて、重複する範囲を有する。これは、特定の pH を必要とする所与のアッセイについて、多数の pH 指示薬を使用することができることを意味する。前述の PGS アッセイの場合、ニュートラルレッドおよびフェノールレッドなどの指示薬は、クレゾールレッドと類似の範囲を有し、したがって代用することができる。異なる pH 要件を必要とするアッセイの場合、観察者が必要に応じて微妙な pH 変動間を区別することを可能にする適切な範囲を有する pH 指示薬を選択することができる。

40

【0028】

図2A~Bに列挙されているものに加え、他の pH 指示薬としてアントシアニン、リトマス、およびアジサイが挙げられる。加えて、蛍光は pH の相関関係であるため、蛍光色素を直接の pH 指示薬として使用してもよい。pH の両極端 (pH extremes) で変性し、中性 pH で復元するか、または別の形で構造形成を変える、核酸レポーター分子をまた使用してもよい。構造を読み出すために、これらをフルオロフォア/クエンチャーのペアと結合させるか、FRETのペアと結合させるか、またはインターカレート色素と混合することができる。pH の相関関係としてコンホメーションを変えるタンパク質レ

50

ポーター分子を、pH感受性蛍光タンパク質と同様の方法で使用することができる（例えばKneen、1998年、「Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator」、Biophys J. 74巻(3号):1591~99頁;Miesenboeck、1998年、「Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins」、Nature 394巻(6689号):192~95頁;およびLlopis、1998年、「Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95巻(12号):6803~08頁を参照のこと）。

【0029】

加えて、pH計を使用してpHを電子的に測定することができる。電子式pH計は、Hach Company(コロラド州、ラブランド)から入手可能なHach HQ440D Benchtop Meterなどが利用可能である。また、Ion Torrentまたはイオン感受性電界効果トランジスタなどの小型pH計も利用可能であり、これらは溶液中のイオン濃度変化を検出し、トランジスタを通る電流の変化に応答する。前述のとおり、あらゆる場合において、選択されるpH測定技術は下流の分析ステップに適合すべきである。例えばプロモフェノールブルーなど、一部の造塩発色性発色団はTaqポリメラーゼの通常活性に干渉することが公知であることから、溶解および中和後に核酸にTaqベースのPCRを実施する場合、最適な選択にはならない。

【0030】

本開示は物質の組成物をさらに提供し、該組成物は1個または複数の細胞を含む試料、収集媒体、アルカリ溶解溶液、中和溶液、およびpH指示薬を含む。該組成物は、先行技術の組成物よりも安定であり、望ましいpHレベルに合わせて調整するのがより容易である、PGS分析のための反応混合物を提供する。該組成物は、胎芽から生検された試料を含み得る。あるいは、試料は口腔試料、血液試料、羊水試料、頸部試料、眼球試料または細胞もしくは細胞材料(核酸が挙げられる)を含む他の任意の試料であり得る。収集媒体は緩衝液、アルコール、もしくは保存媒体、または当該技術分野において公知の他の任意の類似の媒体であり得る。中和溶液は、溶解液のpHを中和させる任意の溶液を含む。したがって、溶解液がアルカリ性である場合、中和溶液は酸性である。pH指示薬はクレゾールレッド、もしくは図2A~Bに列挙されているpH指示薬、または当該技術分野において別段に公知の他の任意のpH指示薬であり得る。該組成物は本明細書に記載の方法と併せて生成することができる。

【0031】

前述のとおり、pH指示薬の変色を、コンピューターに接続されたカメラなど、自動化されたメカニズムによって観察することができる。当業者であれば、本発明の方法の実施のために必要または最適と認識するように、本発明のコンピューターシステムまたは機械は、バスを介して相互に通信する、1個または複数のプロセッサ(例えば中央処理装置(CPU)、グラフィックス処理装置(GPU)、または両方)、メインメモリーおよびスタティックメモリーを含む。

【0032】

図3に示す例示的な実施形態では、システム200は、配列読み取りデータを取得するためのデータ収集モジュール205を有するカメラ201を含み得る。カメラ201は、必要に応じて、カメラ自身の、例えば専用のカメラコンピューター233(入力/出力メカニズム237、プロセッサ241およびメモリー245のうちの1個または複数を含む)を含むか、またはこれに作動可能に結合され得る。加えて、または代替的に、カメラ201はネットワーク209を介してサーバー213またはコンピューター249(例えばラップトップ、デスクトップ、またはタブレット)に作動可能に結合され得る。コンピューター249は、1個または複数のプロセッサ259およびメモリー263ならびに入力/出力メカニズム254を含む。本発明の方法が、クライアント/サーバーアーキテクチャを採用する場合、本発明の方法のステップを、プロセッサ221およびメモリー229のうちの1個または複数を含み、データ、命令などを取得する能力、またはインタ

ーフェースモジュール 225 を介して結果を提供する能力、もしくは結果をファイル 217 として提供する能力がある、サーバー 213 を使用して実施することができる。サーバー 213 は、ネットワーク 209 を介してコンピューター 249 もしくは端末 267 につなげて (engage) よいし、またはサーバー 213 は、1 個または複数のプロセッサ 275 およびメモリー 279、ならびに入力/出力メカニズム 271 を含む端末 267 に直接接続してもよい。

【0033】

本発明によるシステム 200 または機械は、I/O 249、237、または 271 のいずれか向けに、ビデオ表示装置 (例えば液晶ディスプレイ (LCD) または陰極線管 (CRT)) をさらに含み得る。本発明によるコンピューターシステムまたは機械はまた、英数字入力装置 (例えばキーボード)、カーソル制御装置 (例えばマウス)、ディスクドライブユニット、信号生成装置 (例えばスピーカー)、タッチ画面、加速度計、マイクロフォン、セルラー方式無線周波数アンテナ、およびネットワークインターフェース装置 (例えばネットワークインターフェースカード (NIC)、Wi-Fi カード、またはセルラーモデムであってもよい) も含み得る。

10

【0034】

本発明によるメモリー 263、245、279、または 229 は、本明細書に記載の方法論または機能のいずれか 1 つまたは複数を実体化する 1 つまたは複数のセットの命令 (例えばソフトウェア) を保存する、機械可読媒体を含み得る。ソフトウェアはまた、コンピューターシステムによるその実行中に、メインメモリー内および/またはプロセッサ内にも完全に、または少なくとも部分的に存在し得、メインメモリーおよびプロセッサはまた機械可読媒体も構成する。

20

【0035】

ソフトウェアはさらに、ネットワークインターフェース装置を介してネットワーク上で送信または受信され得る。

【0036】

機械可読媒体は、例示的な実施形態では単一の媒体であってもよいが、「機械可読媒体」という用語は、1 つまたは複数のセットの命令を保存する単一の媒体または複数の媒体 (例えば集中型もしくは分散型のデータベース、ならびに/または付随するキャッシュおよびサーバー) を含むと解釈されるべきである。「機械可読媒体」という用語はまた、機械による実行のための 1 セットの命令を格納、コード化または保有する能力があり、本発明の方法論のいずれか 1 つまたは複数を実行させる、任意の媒体を含むとも解釈される。したがって、「機械可読媒体」という用語は、ソリッドステートメモリー (例えば加入者識別モジュール (SIM) カード、セキュアデジタルカード (SD カード)、マイクロ SD カード、またはソリッドステートドライブ (SSD))、光学的媒体および磁気媒体、ならびに他の任意の有形記憶媒体を含むが、これらに限定されないと解釈される。

30

参照による援用

【0037】

本開示の全体を通じて、特許、特許出願、特許公報、雑誌、書籍、論文およびウェブコンテンツなどの他の文献を参照および引用した。すべての当該文献は、全ての目的でそれらの全体が参照により本明細書に援用される。

40

同等物

【0038】

本明細書に示され、記載されているものに加えて、本発明およびその多数のさらなる実施形態の様々な修正版が、本明細書において引用されている科学文献および特許文献の参照を含め、本書の全内容から当業者に明らかとなる。本明細書の主題は、本発明の様々な実施形態およびその同等物における本発明の実施に対して適応され得る重要な情報、例示および指針を含む。

【手続補正書】

【提出日】令和2年10月28日(2020.10.28)

【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】

生体試料を処理するための方法であって、

2～3 μlの液体の溶液中に胚から生検された少なくとも1つの細胞を含む試料を、該試料が凍結されていることおよび特定のあらかじめ規定されたpH範囲内であることの視覚的な指標を提供する指示薬の色素と接触させるステップと；

該試料を凍結温度に曝露させるステップと；

該視覚的な指標に基づいて該試料が凍結されていることを決定するステップと；

以下：

コンピューターソフトウェアにより制御されるカメラを用いて該試料の色を評価することと、

該コンピューターソフトウェアにより、該色が、該試料が凍結したままであることを示すことを確認することと、

該試料をアルカリ溶解溶液と接触させ、次いで、該試料を酸と接触させて、中性pHを達成することと、

該カメラおよび該コンピューターソフトウェアを用いて、該試料の色を評価し、該試料が中性pHを有することを確認することと、

該試料中の該少なくとも1つの生検された細胞の核型を解析することと、
を含む着床前遺伝子スクリーニング手順を実施するステップと
を含む方法。

【請求項2】

前記pH範囲が適切であるかどうかを決定するために前記指示薬を評価するステップと、
前記試料が凍結されていることを該指示薬が示す場合、該試料を試験所に引き渡すステップと

をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記試料を含有するバイアル中における前記細胞の位置を決定するために前記指示薬を評価するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記アルカリ溶解溶液が前記指示薬を含有し、
前記酸が前記指示薬を含有する、
請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記試料の変色を観察することによって前記評価するステップが実施される、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

変色が自動的手段によって監視され、前記自動的手段がカメラを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記試料における導電性を監視することによって前記評価するステップが実施される、請求項2に記載の方法。

【請求項8】

前記指示薬の色素がトリアリールメタンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記指示薬の色素がクレゾールレッドを含む、請求項 1 に記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/80 (2006.01) G 0 1 N 21/80

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 エリック ディー . ボイデン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 , ケンブリッジ , ホーマー アベニュー 6
6 アpartment 2 0 8

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB01 DB03 FA19 FB11

2G054 AA03 AA07 AB10 CE01 EA06 GA03 GB04 GB05

4B063 QA08