

【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30年9月6日(2018.9.6)

【公表番号】特表2018-502602(P2018-502602A)

【公表日】平成30年2月1日(2018.2.1)

【年通号数】公開・登録公報2018-004

【出願番号】特願2017-553050(P2017-553050)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成30年7月25日(2018.7.25)

【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】

ゲノム試料におけるゲノム領域の遺伝子型を決定するための方法であって、

a. ゲノム試料中の目的部位から実験的に配列リードを獲得すること、ここで前記目的部位は第1の試験部位および第2の試験部位を含み、場合により第1の試験部位および第2の試験部位が遺伝子およびその相同体に結びつけられたものである；

b. ゲノム試料中の1以上の対照部位から実験的に配列リードを獲得すること；

c. ヒト参照ゲノムへの目的部位または対照部位のアラインメントに基づいて、ステップ a ~ b 由来の配列リードを、目的部位または対照部位のいずれかに対してインシリコでパージョニングすること；

d. 目的部位と1以上の対照部位の両方でリード数を計数すること；

e. 計数された生リード数を解釈可能なコピー数コールへと変換するコピー数解析を行なうこと；ならびに、

f. 前記コピー数解析に基づいてゲノム領域の遺伝子型を決定すること；

を含む、前記方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、前記配列リードが次世代シーケンシング(NGS)を用いて得られるものであり、場合により；

(i) 前記NGSが、ターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(ii) 前記NGSが、第1の試験部位、第2の試験部位、または対照部位のいずれかに特有のリードを生じるように特異的に設計されたプローブを使用する、ハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(iii) 前記NGSが、第1の試験部位を第2の試験部位から識別する少なくとも1つの配列を含むフラグメントを捕捉および配列決定するように設計されたハイブリッド捕捉プローブを使用する、ハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(iv) 前記NGSが、ハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものであり、捕捉されたフラグメント単独で

第 1 の試験部位または第 2 の試験部位に対するリードを適切にパーティションするのに十分な識別塩基を含み、前記配列決定はハイブリッド捕捉プローブの長さを超えて伸ばしない；

(v) 前記 NGS が、第 1 の試験部位と第 2 の試験部位との間で異なる少数の塩基に隣接してアニールするように設計されたハイブリッド捕捉プローブを使用する、ハイブリッド捕捉技術を用いたターゲット DNA シーケンシングを含むものである；

(v i) 前記 NGS が、ハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲット DNA シーケンシングを含むものであり、ここでハイブリッド捕捉プローブ配列自体が配列決定フラグメントの一部となり、第 1 の試験部位と第 2 の試験部位との間の識別塩基が対合末端リードの 1 つの末端の終末またはその近くにあるように前記ハイブリッド捕捉プローブが設計されたものである；

(v i i) 前記 NGS が、1 以上のハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲット DNA シーケンシングを含むものであり、前記 1 以上のハイブリッド捕捉プローブが 10 b p ~ 1000 b p の長さである；

(v i i i) 前記 NGS が、1 以上のハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲット DNA シーケンシングを含むものであり、前記 1 以上のハイブリッド捕捉プローブが 20 b p ~ 100 b p の長さである；

(i x) 前記 NGS が、第 1 の試験部位または第 2 の試験部位のいずれかに特有のリードを生じるように特異的に設計されたプライマーを使用するアンプリコンシーケンシングを含むものである；

(X) 前記 NGS が、配列決定フラグメントが第 1 の試験部位を第 2 の試験部位から識別する少なくとも 1 つの配列を含むように設計された PCR プライマーを用いたアンプリコンシーケンシングを含むものである；

(x i) 前記 NGS が、高深度非ターゲットシーケンシングを含むものである；または、  
(x i i) 前記 NGS が、全ゲノムショットガンシーケンシングを含む高深度非ターゲットシーケンシングを含むものである。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記 NGS が (v i) に記載のものであり、ここで、シーケンサーが、少なくとも 1 b p だけハイブリッド捕捉プローブの長さを読み取る；  
または、

ハイブリッド捕捉プローブが n 塩基長であり、シーケンサーが捕捉フラグメントから n + x 塩基を読み取るものであり、ここで x = 1 であり、場合により前記プローブは n + x 番目の塩基が識別塩基であるように設計され、それにより n + x 番目の位置の塩基に基づいて全リードが第 1 の試験部位または第 2 の試験部位にパーティションされる；

前記方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法であって、以下を含む前記方法：

(i) ステップ c) におけるパーティションが、所与のリードにおいて識別塩基のサブセットのみを使用するものである；

(i i) ステップ c) が、

(c) ヒト参照ゲノムへの目的部位または対照部位のアラインメント、および第 1 の試験部位を第 2 の試験部位から識別する特定の塩基の存在に基づいて、ステップ a ~ b における配列リードを、目的部位または対照部位のいずれかに対してインシリコでパーティショニングすることである；または、

(i i i) 前記方法が、

(b) ゲノム試料中における複数の対照部位から実験的に配列リードを獲得すること、ここで前記配列リードが 2 以上の対照部位、10 の対照部位、50 の対照部位、または数百の対照部位から得られるものである；および、

(d) 目的部位と複数の対照部位の両方でリード数を計数すること。

【請求項 5】

さらにステップ g :

g . 突然変異を同定すること、ここで前記突然変異がコピー数変異体、配向を改変する逆位、遺伝子融合および/または短配列変異体を含むものであり、場合により、前記短配列変異体がSNPおよびインデルを含むものである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記ステップeにおける解析が、前記目的部位または前記1以上の対照部位で得られた生リード数を正規化することにより、前記目的部位または前記1以上の対照部位におけるコピー数を決定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記ステップeにおける解析が、

(i) 各試料の1以上の対照部位における生リード数の中央値を計算すること；  
(ii) 各試料の目的部位および1以上の対照部位の両方で計数された生リード数を、ステップ(i)で計算された中央値で割ること、およびそれにより各試料の目的部位および1以上の対照部位の両方で第1正規化リード数を計算すること；  
(iii) 全ての試料について、目的部位および対照部位のそれぞれについて中央第1正規化リード計数を計算すること；ならびに、  
(iv) 各試料の目的部位および1以上の対照部位の両方における第1正規化リード計数を、ステップ(iii)で計算された対応する中央第1正規化リード計数で割ること、およびそれにより各サンプルの目的部位および1以上の対照部位の両方で第2正規化リード計数を計算すること；  
を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記ステップ(iv)で計算された前記第2のリード計数に2を乗じて、目的部位または対照部位におけるコピー数を計算することを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記ステップ(iv)において目的部位で計算された可変リード計数に対するマルチモーダルガウス分布の最良最小二乗偏差適合を見出すこと、および最良適合分布の整数モードでの最短距離を決定することを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項10】

請求項8に記載の方法であって、さらに前記計算されたコピー数とその最も近い整数値に四捨五入されること、または

前記方法が、計算された前記コピー数の信頼性スコアを計算することをさらに含み、ここで場合により前記信頼性スコアがzスコアである、

前記方法。

【請求項11】

複数のゲノム試料を提供すること、および請求項7のステップ(i)の前に各試料について請求項1のステップa~dを行うことを含み、場合により、48もしくは48を超えるゲノム試料が提供されるか、または96もしくは96未満のゲノム試料が提供される、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

前記第1の試験部位および前記第2の試験部位が遺伝子およびその相同体に結びつけられているものであり、前記遺伝子がSMN1であり、前記相同体がSMN2である；前記遺伝子がCYP21A2であり、前記相同体がCYP21A1Pである；前記遺伝子がHBA1であり、前記相同体がHBA2である；前記遺伝子がGBAであり、前記相同体がGBAPである；前記遺伝子がCHEK2であり、前記相同体はその偽遺伝子の少なくとも1つである；または、前記遺伝子がPMS2であり、前記相同体がPMS2CLおよびその他の偽遺伝子から選択される；請求項1に記載の方法。

【請求項13】

コンピュータによって実行されると、コンピュータに請求項1~12の方法を実行させる命令を含む、非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

## 【請求項 14】

a. 1 以上のプロセッサと；  
 b. メモリと；  
 c. 前記メモリ内に記憶され、前記 1 以上のプロセッサにより実行されるように構成され、コンピュータによって実行されると、コンピュータにゲノム試料におけるゲノム領域の遺伝子型を決定するための方法を実行させる命令を含む、1 以上のプログラム；  
 を含むシステムであって、

前記方法が

i. ゲノム試料中の目的部位から配列リードを獲得すること、ここで前記目的部位は第 1 の試験部位および第 2 の試験部位を含み、場合により第 1 の試験部位および第 2 の試験部位が遺伝子およびその相同体に結びつけられたものである；

ii. ゲノム試料中の 1 以上の対照部位から実験的に配列リードを獲得すること；

iii. ヒト参照ゲノムへの目的部位または対照部位のアラインメントに基づいて、ステップ i ~ ii 由来の配列リードを、目的部位または対照部位のいずれかに対してインシリコでパーティショニングすること；

iv. 目的部位と 1 以上の対照部位の両方でリード数を計数すること；

v. 計数された生リード数を解釈可能なコピー数コールへと変換するコピー数解析を行なうこと；ならびに、

vi. 前記コピー数解析に基づいてゲノム領域の遺伝子型を決定すること；

を含む、前記システム。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載のシステムであって、

(1) 前記システムが、クライアントサーバーモデルにしたがって実装されるものである；

(2) 前記システムが、1 以上の独立型データ処理デバイスまたは分散型コンピュータネットワーク上に実装されるものである；

(3) 前記システムの特定の機能が、ユーザーデバイス上にインストールされた独立型アプリケーションとして実装されるものである；

(4) 前記システムが、ユーザーデバイス上で実行されるクライアントを含むものであり、前記ユーザーデバイス上で実行されるクライアントが、ユーザー対面入力および出力処理機能のみを提供しシステムの全ての他の機能をバックエンドサーバーに委託するシンクライアントである；または、

(5) 前記サーバーシステムが、第 3 者サービスプロバイダの様々な仮想デバイスおよび/またはサービスを利用して、サーバーシステムの基本的な計算リソースおよび/またはインフラストラクチャリソースを提供するものであり、場合により、前記第 3 者サービスプロバイダが第 3 者クラウドサービスプロバイダーである；

前記システム。

## 【請求項 16】

請求項 14 に記載のシステムであって、

(1) 前記ユーザーデバイスが、1 以上のネットワークを通して、サーバーシステムと通信するものである；

(2) 前記ユーザーデバイスが、クライアントサイドの機能を提供するものである；

(3) 前記サーバーシステムが、それぞれのユーザーデバイス上に常駐する任意の数のクライアントのためにサーバーサイドの機能を提供するものである；または、

(4) 前記サーバーシステムが、クライアント対面 I/O インターフェース、1 以上の処理モジュール、データおよびモデル記憶装置、ならびに外部サービスに対する I/O インターフェースを含み得る 1 以上の発信者サーバーを含むものである；

前記システム。

## 【請求項 17】

ゲノム試料におけるゲノム領域の遺伝子型を決定するための方法であって、

- a. ゲノム試料中の目的部位から実験的に配列リードを獲得すること、ここで前記目的部位はゲノム領域内に第1の試験部位および第2の試験部位を含み、さらに場合により1以上の対照部位から実験的に配列リードを獲得することを含み；
- b. 参照ゲノムに配列リードを整列させること；
- c. コピー数変異体解析を行うこと、ここで場合により、コピー数変異体解析は目的部位におけるリード数を計数し、計数された生リード数を解釈可能なコピー数コールへと変換することを含む；
- d. ゲノム領域にわたりコピー数の軌跡を決定すること；ならびに、
- e. コピー数の軌跡に基づいて遺伝子型を決定すること；  
を含む、前記方法。

【請求項18】

前記第1の試験部位および前記第2の試験部位が遺伝子およびその相同体に結びつけられたものであり、場合により前記遺伝子がHBA1であって前記相同体がHBA2である、または前記遺伝子がHBA2であって前記相同体がHBA1である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

請求項17に記載の方法であって、前記配列リードが次世代シーケンシング(NGS)を用いて得られるものであり、場合により；

(i) 前記NGSが、ターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(ii) 前記NGSが、第1の試験部位、第2の試験部位、または対照部位のいずれかに特有のリードを生じるように特異的に設計されたプローブを使用する、ハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(iii) 前記NGSが、第1の試験部位を第2の試験部位から識別する少なくとも1つの配列を含むフラグメントを捕捉および配列決定するように設計されたハイブリッド捕捉プローブを使用する、ハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(iv) 前記NGSが、ハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものであり、捕捉されたフラグメント単独で第1の試験部位または第2の試験部位に対するリードを適切にパーティションするのに十分な識別塩基を含み、前記配列決定はハイブリッド捕捉プローブの長さを超えて伸長しない；

(v) 前記NGSが、第1の試験部位と第2の試験部位との間で異なる少数の塩基に隣接してアニールするように設計されたハイブリッド捕捉プローブを使用する、ハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものである；

(vi) 前記NGSが、ハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものであり、ここでハイブリッド捕捉プローブ配列自体が配列決定フラグメントの一部となり、第1の試験部位と第2の試験部位との間の識別塩基が対合末端リードの1つの末端の終末またはその近くにあるように前記ハイブリッド捕捉プローブが設計されたものである；

(vii) 前記NGSが、1以上のハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものであり、前記1以上のハイブリッド捕捉プローブが10bp~1000bpの長さである；

(viii) 前記NGSが、1以上のハイブリッド捕捉プローブを使用するハイブリッド捕捉技術を用いたターゲットDNAシーケンシングを含むものであり、前記1以上のハイブリッド捕捉プローブが20bp~1000bpの長さである；

(ix) 前記NGSが、第1の試験部位または第2の試験部位のいずれかに特有のリードを生じるように特異的に設計されたプライマーを使用するアンプリコンシーケンシングを含むものである；

(X) 前記NGSが、配列決定フラグメントが第1の試験部位を第2の試験部位から識別する少なくとも1つの配列を含むように設計されたPCRプライマーを用いたアンプリコ

ンシーケンシングを含むものである；

( x i ) 前記 N G S が、高深度非ターゲットシーケンシングを含むものである；または、  
( x i i ) 前記 N G S が、全ゲノムショットガンシーケンシングを含む高深度非ターゲット  
シーケンシングを含むものである。

**【請求項 2 0】**

請求項 1 9 に記載の方法であって、前記 N G S が ( v i ) に記載のものであり、ここで  
シーケンサーが、少なくとも 1 b p だけハイブリッド捕捉プローブの長さを読み取る；  
または、

ハイブリッド捕捉プローブが n 塩基長であり、シーケンサーが捕捉フラグメントから n  
+ x 塩基を読み取るものであり、ここで x = 1 であり、場合により前記プローブは n + x  
番目の塩基が識別塩基であるように設計され、それにより n + x 番目の位置の塩基に基づ  
いて全リードが第 1 の試験部位または第 2 の試験部位にパーティションされる；

前記方法。

**【請求項 2 1】**

請求項 1 7 に記載の方法であって、ステップ a がゲノム試料中における複数の部位から  
実験的に配列リードを獲得することを含み、ここで前記配列リードが 2 以上の部位、 1  
0 の部位、 5 0 の部位、または数百の部位から得られるものである、前記方法。

**【請求項 2 2】**

さらにコピー数の軌跡のための信頼性スコアを決定することを含む、請求項 1 7 に記載  
の方法。