

【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27年1月15日 (2015.1.15)

【公表番号】特表2014-507141 (P2014-507141A)
 【公表日】平成26年3月27日 (2014.3.27)
 【年通号数】公開・登録公報2014-016
 【出願番号】特願2013-553423 (P2013-553423)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】
 【提出日】平成26年11月18日 (2014.11.18)
 【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】

染色体または染色体セグメント上の複数の多型遺伝子座における、調製された試料中の D N A の測定を、妊娠中の胎児における染色体または染色体セグメントの倍数性状態の指標とする方法であって、

該染色体または染色体セグメント上の複数の多型遺伝子座における、調製された試料中の該 D N A を測定するステップであって、該調製された試料は、該胎児の母親由来の母系 D N A および該胎児由来の胎児 D N A を含む第 1 の D N A の試料から該 D N A を単離することによって調製されたものである、ステップと、

該調製された試料に対して行った該 D N A 測定から、該複数の多型遺伝子座における対立遺伝子数をコンピュータで算出するステップと、

それぞれが、該染色体または染色体セグメントにおける可能性のある異なる倍数性状態に関する、複数の倍数性仮説をコンピュータで作製するステップと、

各倍数性仮説について、該染色体または染色体セグメント上の該複数の多型遺伝子座における予測される該対立遺伝子数についての同時分布モデルをコンピュータで構築するステップと、

該同時分布モデルおよび該調製された試料において測定された該対立遺伝子数を用いて、該倍数性仮説のそれぞれの相対的確率をコンピュータで決定するステップと、

最大の確率を有する該仮説に対応する該倍数性状態を選択することによって該胎児の該倍数性状態を呼び出すステップとを含む方法。

【請求項 2】

前記第 1 の試料中の前記 D N A が母系の血漿を起源とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の試料中の前記 D N A が複数の多型遺伝子座において優先的に富化されたものであり、

該複数の多型遺伝子座における該 D N A を該優先的に富化するステップが、

複数のライゲーション媒介性 P C R プローブを得るステップであって、それぞれの P C

Rプローブが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、該PCRプローブの上流部および下流部が、該遺伝子座の多型部位から少数の塩基で隔てられているDNAの一方の鎖上のDNAの領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21～25、26～30、31～60、またはそれらの組合せである、ステップと、

該ライゲーション媒介性PCRプローブと前記第1の試料由来の前記DNAをハイブリダイズさせるステップと、

該ライゲーション媒介性PCRプローブ末端間のギャップを、DNAポリメラーゼを用いて埋めるステップと、

該ライゲーション媒介性PCRプローブをライゲーションするステップと、

ライゲーションされた該ライゲーション媒介性PCRプローブを増幅するステップとを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記第1の試料中の前記DNAが複数の多型遺伝子座において優先的に富化されたものであり、

複数の多型遺伝子座における該DNAを該優先的に富化するステップが、

複数の内側のフォワードプライマーを得るステップであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、該内側のフォワードプライマーのそれぞれの3'末端が、該遺伝子座の多型部位の上流にあり少数の塩基で該多型部位から隔てられているDNAの領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1塩基対、2塩基対、3塩基対、4塩基対、5塩基対、6～10塩基対、11～15塩基対、16～20塩基対、21～25塩基対、26～30塩基対、および31～60塩基対からなる群から選択される、ステップと、

必要に応じて、複数の内側のリバースプライマーを得るステップであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、該内側のリバースプライマーのそれぞれの3'末端が、該遺伝子座の多型部位の上流にあり少数の塩基で該多型部位から隔てられているDNAの領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1塩基対、2塩基対、3塩基対、4塩基対、5塩基対、6～10塩基対、11～15塩基対、16～20塩基対、21～25塩基対、26～30塩基対、および31～60塩基対からなる群から選択される、ステップと、

該内側のプライマーを該DNAとハイブリダイズさせるステップと、

ポリメラーゼ連鎖反応を用いて該DNAを増幅してアンプリコンを形成するステップとを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

複数の外側のフォワードプライマーを得るステップであって、それぞれのプライマーが前記多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、そして該外側のフォワードプライマーのそれぞれが、前記内側のフォワードプライマーの上流のDNAの領域とハイブリダイズするように設計されている、ステップと、

必要に応じて、複数の外側のリバースプライマーを得るステップであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、そして該外側のフォワードプライマーのそれぞれが、前記内側のリバースプライマーのすぐ下流のDNAの領域とハイブリダイズするように設計されている、ステップと、

前記第1のプライマーを該DNAとハイブリダイズさせるステップと、

前記ポリメラーゼ連鎖反応を用いて該DNAを増幅するステップとをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

複数の外側のリバースプライマーを得るステップであって、それぞれのプライマーが前記多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、そして該外側のフォワードプライマーのそれぞれが、対応する前記内側のリバースプライマーのすぐ下流のDNAの領域とハイブリダイ

ズするように設計されている、ステップと、

必要に応じて、複数の外側のフォワードプライマーを得るステップであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、そして該外側のフォワードプライマーのそれぞれが、対応する前記内側のフォワードプライマーの上流のDNAの領域とハイブリダイズするように設計されている、ステップと、

前記第1のプライマーを該DNAとハイブリダイズさせるステップと、

前記ポリメラーゼ連鎖反応を用いて該DNAを増幅するステップと

をさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

(a) 前記第1の試料を調製する前記ステップが、

該第1の試料中の前記DNAにユニバーサルアダプタを付加するステップと、

該第1の試料中の前記DNAを、前記ポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅するステップと
をさらに含む；

(b) 前記DNAを増幅する前記ステップが、1つまたは複数の個々の反応容積で行われ、個々の反応容積のそれぞれが、500超の異なるフォワードプライマーとリバースプライマーとの対を含有し；あるいは

(c) 前記内側のプライマーが、望ましくないプライマー2重鎖を形成する可能性があるプライマー対を同定するステップ、および望ましくないプライマー2重鎖を形成する可能性があると同定されたプライマーの対の少なくとも1つを前記複数のプライマーから除去するステップによって選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記胎児の一方の親または両親からの複数の多型遺伝子座における遺伝子型データを得るステップをさらに含む、

(a) 前記染色体または染色体セグメント上の前記複数の多型遺伝子座の前期予測される対立遺伝子数の確率についての同時分布モデルを構築する前記ステップが、前記一方の親または両親から得られた前記遺伝子データを用いて行われるか；あるいは

(b) 前記第1の試料が母系の血漿から単離されたものであり、前記母親から遺伝子型データを得る前記ステップが、前記調製された試料に対して行った前記DNA測定から該母系の遺伝子型データを推定するステップによって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記第1の試料中の前記DNAが複数の多型遺伝子座において優先的に富化されたものであり、前記優先的な富化により、前記調製された試料と前記第1の試料の間に、1.2倍以下の平均の対立遺伝子の偏りがもたらされる、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記複数の多型遺伝子座が一塩基多型である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

(a) 対立遺伝子数の確率についての同時分布モデルを構築する前記ステップを、染色体内の異なる場所における該染色体乗換えの確率に関するデータを使用して、該染色体上の多型対立遺伝子間の依存性をモデリングすることによって行うか；

(b) 各仮説の前記相対的確率を決定する前記ステップが、前記調製された試料中の胎児DNAの推定される小部分を使用するか；あるいは

(c) 前記胎児の前記倍数性状態を呼び出す前記ステップが、

前記同時分布モデルおよび前記対立遺伝子数の確率を用いて決定される前記倍数性仮説のそれぞれの前記相対的確率と、読み取り数解析、ヘテロ接合率の比較、親の遺伝子情報を使用する場合にのみ利用可能な統計量、特定の親の状況に対して正規化された遺伝子型シグナルの確率、前記第1の試料または前記調製された試料の推定される胎児の割合を用いて算出される統計量、およびそれらの組合せからなる群から選択される一つ以上の統計学的技法を用いて算出される該倍数性仮説のそれぞれの相対的確率とを組み合わせるステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記呼び出された倍数性状態について信頼度推定値が算出され、好ましくは前記信頼度が、第 1 8 番染色体および第 2 1 番染色体について 9 8 % を超える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

請求項 4 に記載の方法で使用するために設計された、妊娠中の胎児における標的染色体または染色体セグメントの倍数性状態を決定するためのキットであって、

前記複数の内側のフォワードプライマーおよび、必要に応じて前記複数の内側のリバースプライマーであって、該プライマーのそれぞれが前記標的染色体または染色体セグメント上の前記多型部位のうちの 1 つのすぐ上流および / または下流の DNA の領域とハイブリダイズするように設計されており、該ハイブリダイズする領域が、少数の塩基によって該多型部位から隔てられており、該少数が、1、2、3、4、5、6 ~ 10、11 ~ 15、16 ~ 20、21 ~ 25、26 ~ 30、31 ~ 60、およびそれらの組合せからなる群から選択されるプライマーを含むキット。

【請求項 1 4】

胎児のゲノム DNA と母系のゲノム DNA の混合物から無作為に選択された DNA 断片の配列を、胎児のゲノム DNA および母系のゲノム DNA を含む母系の組織試料において胎児の異数性の存在または不在の指標とする方法であって、

a) 該母系の組織試料由来の胎児のゲノム DNA と母系のゲノム DNA の混合物から無作為に選択された DNA 断片の大規模並行 DNA 配列決定を行って、該 DNA 断片の配列を決定するステップと、

b) ステップ a) で得られた配列が属する染色体または染色体セグメントを同定するステップと、

c) ステップ b) のデータを用いて、母系のゲノム DNA と胎児のゲノム DNA の該混合物中の少なくとも 1 つの第 1 の染色体または染色体セグメントの量を決定するステップであって、該少なくとも 1 つの第 1 の染色体または染色体セグメントが、該胎児において正倍数性であると推定されるステップと、

d) ステップ b) のデータを用いて、母系のゲノム DNA と胎児のゲノム DNA の該混合物中の第 2 の染色体または染色体セグメントの量を決定するステップであって、該第 2 の染色体または染色体セグメントが、該胎児において異数性であることが疑われるステップと、

e) 胎児 DNA と母系 DNA の該混合物中の胎児 DNA の割合を算出するステップと、

f) 該第 2 の標的染色体または染色体セグメントが正倍数性である場合、ステップ c) の数を用いて該第 2 の標的染色体または染色体セグメントの量の予測される分布を算出するステップと；

g) 該第 2 の標的染色体または染色体セグメントが異数性である場合、ステップ c) の数およびステップ e) で算出された、胎児 DNA と母系 DNA の該混合物中の胎児 DNA の前記割合を用いて該第 2 の標的染色体または染色体セグメントの量の予測される分布を算出するステップと、

h) 最尤法または最大事後確率法を用いて、ステップ d) で決定された該第 2 の染色体または染色体セグメントの量がステップ f) で算出された該分布またはステップ g) で算出された該分布のどちらの一部である可能性がより高いかを決定し、それにより、胎児の異数性の存在または不在が示される、ステップとを含む方法。

【請求項 1 5】

妊娠中の胎児における染色体の倍数性状態の決定に役立つ診断ボックスであって、請求項 1 に記載の方法における調製するステップおよび測定するステップを実行することができる診断ボックス。

【請求項 1 6】

前記胎児の前記呼び出された倍数性状態に基づいた臨床的措置がとられるかどうかの指標となり、該臨床的措置は、妊娠中絶すること、または妊娠を維持することの一方から選択される、請求項 1 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】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

いくつかの実施形態では、胎児のゲノム DNA および母系のゲノム DNA を含む母系の組織試料において胎児の異数性の存在または不在を決定するための方法であって、(a) 前記母系の組織試料から、胎児のゲノム DNA と母系のゲノム DNA の混合物を得るステップと、(b) ステップ a) の胎児のゲノム DNA と母系のゲノム DNA の混合物から無作為に選択された DNA 断片の大規模並行 DNA 配列決定を行って、前記 DNA 断片の配列を決定するステップと、(c) ステップ b) で得られた配列が属する染色体を同定するステップと、(d) ステップ c) のデータを用いて、前記母系のゲノム DNA と胎児のゲノム DNA の混合物中の少なくとも 1 つの第 1 の染色体の量を決定するステップであって、前記少なくとも 1 つの第 1 の染色体が、胎児において正倍数性であると推定されるステップと、(e) ステップ c) のデータを用いて、前記母系のゲノム DNA と胎児のゲノム DNA の混合物中の第 2 の染色体の量を決定するステップであって、前記第 2 の染色体が、胎児において異数体であることが疑われるステップと、(f) 胎児 DNA と母系 DNA の混合物中の胎児 DNA の割合を算出するステップと、(g) 第 2 の標的染色体が正倍数性である場合、ステップ d) の数を用いて第 2 の標的染色体の量の予測される分布を算出するステップと、(h) 第 2 の標的染色体が異数性である場合、ステップ d) の第 1 の数およびステップ f) で算出された、胎児 DNA と母系 DNA の混合物中の胎児 DNA の割合を用いて第 2 の標的染色体の量の予測される分布を算出するステップと、(i) 最尤法または最大事後法を用いて、ステップ e) で決定された第 2 の染色体の量がステップ g) で算出された分布またはステップ h) で算出された分布の一部である可能性がより高いかを決定し、それにより、胎児の異数性の存在または不在を示すステップとを含む方法が開示されている。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

妊娠中の胎児における染色体の倍数性状態を決定するための方法であって、

該胎児の母親由来の母系 DNA および該胎児由来の胎児 DNA を含む第 1 の DNA の試料を得るステップと、

調製された試料が得られるように該 DNA を単離することによって該第 1 の試料を調製するステップと、

該染色体上の複数の多型遺伝子座における該調製された試料中の該 DNA を測定するステップと、

該調製された試料に対して行った該 DNA 測定から、該複数の多型遺伝子座における対立遺伝子数をコンピュータで算出するステップと、

それぞれが、該染色体における可能性のある異なる倍数性状態に関する、複数の倍数性仮説をコンピュータで作製するステップと、

各倍数性仮説について、該染色体上の該複数の多型遺伝子座における予測される該対立遺伝子数についての同時分布モデルをコンピュータで構築するステップと、

該同時分布モデルおよび該調製された試料において測定された該対立遺伝子数を用いて、該倍数性仮説のそれぞれの相対的確率をコンピュータで決定するステップと、

最大の確率を有する該仮説に対応する該倍数性状態を選択することによって該胎児の該倍数性状態を呼び出すステップと

を含む方法。

(項目2)

前記第1の試料中の前記DNAが母系の血漿を起源とする、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記第1の試料を調製する前記ステップが、前記DNAを増幅するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記第1の試料を調製する前記ステップが、複数の多型遺伝子座における前記第1の試料中の前記DNAを優先的に富化するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記複数の多型遺伝子座における前記第1の試料中の前記DNAを前記優先的に富化するステップが、

複数の環状化前プローブであって、それぞれのプローブが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、該プローブの3'末端および5'末端が該遺伝子座の多型部位から少数の塩基で隔てられているDNAの領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21~25、26~30、31~60、またはそれらの組合せであるプローブを得るステップと、

該環状化前プローブと該第1の試料由来のDNAをハイブリダイズさせるステップと、
該ハイブリダイズしたプローブ末端間のギャップを、DNAポリメラーゼを用いて埋めるステップと、

該環状化前プローブを環状化するステップと、

該環状化されたプローブを増幅するステップと

を含む、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記複数の多型遺伝子座における前記DNAを前記優先的に富化するステップが、
複数のライゲーション媒介性PCRプローブであって、それぞれのPCRプローブが該多型遺伝子座のうちの1つを標的とし、該PCRプローブの上流部および下流部が、該遺伝子座の多型部位から少数の塩基で隔てられているDNAの一方の鎖上のDNAの領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21~25、26~30、31~60、またはそれらの組合せであるPCRプローブを得るステップと、

該ライゲーション媒介性PCRプローブと前記第1の試料由来の前記DNAをハイブリダイズさせるステップと、

該ライゲーション媒介性PCRプローブ末端間のギャップを、DNAポリメラーゼを用いて埋めるステップと、

該ライゲーション媒介性PCRプローブをライゲーションするステップと、

ライゲーションされた該ライゲーション媒介性PCRプローブを増幅するステップと
を含む、項目4に記載の方法。

(項目7)

前記複数の多型遺伝子座における前記DNAを前記優先的に富化するステップが、

該多型遺伝子座を標的とする複数のハイブリッド捕捉プローブを得るステップと、

該ハイブリッド捕捉プローブを、前記第1の試料中の前記DNAとハイブリダイズさせるステップと、

DNAに関する該第1の試料からハイブリダイズしていないDNAの一部または全部を物理的に除去するステップと

を含む、項目4に記載の方法。

(項目8)

前記複数のハイブリッド捕捉プローブが、前記多型部位と隣接しているがオーバーラッ

プはしていない領域とハイブリダイズするように設計されている、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記複数のハイブリッド捕捉プローブが、前記多型部位と隣接しているがオーバーラップはしていない領域とハイブリダイズするように設計されており、該隣接捕捉プローブの長さが、約 1 2 0 塩基未満、約 1 1 0 塩基未満、約 1 0 0 塩基未満、約 9 0 塩基未満、約 8 0 塩基未満、約 7 0 塩基未満、約 6 0 塩基未満、約 5 0 塩基未満、約 4 0 塩基未満、約 3 0 塩基未満、および約 2 5 塩基未満からなる群から選択することができる、項目 7 に記載の方法。

(項目 1 0)

前記複数のハイブリッド捕捉プローブが、前記多型部位とオーバーラップする領域とハイブリダイズするように設計されており、該複数のハイブリッド捕捉プローブが、各多型遺伝子座に対する少なくとも 2 つのハイブリッド捕捉プローブを含み、各ハイブリッド捕捉プローブが、一方の多型遺伝子座において別の対立遺伝子と相補的であるように設計されている、項目 7 に記載の方法。

(項目 1 1)

複数の多型遺伝子座における前記 DNA を前記優先的に富化するステップが、

複数の内側のフォワードプライマーであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの 1 つを標的とし、該内側のフォワードプライマーの 3 ' 末端が、前記多型部位の上流にあり少数の塩基で該多型部位から隔てられている DNA の領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1 塩基対、2 塩基対、3 塩基対、4 塩基対、5 塩基対、6 ~ 1 0 塩基対、1 1 ~ 1 5 塩基対、1 6 ~ 2 0 塩基対、2 1 ~ 2 5 塩基対、2 6 ~ 3 0 塩基対または 3 1 ~ 6 0 塩基対からなる群から選択されるプライマーを得るステップと、

必要に応じて、複数の内側のリバースプライマーであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの 1 つを標的とし、該内側のリバースプライマーの 3 ' 末端が、該多型部位の上流にあり少数の塩基で該多型部位から隔てられている DNA の領域とハイブリダイズするように設計されており、該少数が、1 塩基対、2 塩基対、3 塩基対、4 塩基対、5 塩基対、6 ~ 1 0 塩基対、1 1 ~ 1 5 塩基対、1 6 ~ 2 0 塩基対、2 1 ~ 2 5 塩基対、2 6 ~ 3 0 塩基対または 3 1 ~ 6 0 塩基対からなる群から選択されるプライマーを得るステップと、

該内側のプライマーを該 DNA とハイブリダイズさせるステップと、

ポリメラーゼ連鎖反応を用いて該 DNA を増幅してアンプリコンを形成するステップとを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 1 2)

複数の外側のフォワードプライマーであって、それぞれのプライマーが前記多型遺伝子座のうちの 1 つを標的とし、前記内側のフォワードプライマーの上流の DNA の領域とハイブリダイズするように設計されているプライマーを得るステップと、

必要に応じて、複数の外側のリバースプライマーであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの 1 つを標的とし、前記内側のリバースプライマーのすぐ下流の DNA の領域とハイブリダイズするように設計されているプライマーを得るステップと、

第 1 のプライマーを該 DNA とハイブリダイズさせるステップと、

前記ポリメラーゼ連鎖反応を用いて該 DNA を増幅するステップとをさらに含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

複数の外側のリバースプライマーであって、それぞれのプライマーが前記多型遺伝子座のうちの 1 つを標的とし、前記内側のリバースプライマーのすぐ下流の DNA の領域とハイブリダイズするように設計されているプライマーを得るステップと、

必要に応じて、複数の外側のフォワードプライマーであって、それぞれのプライマーが該多型遺伝子座のうちの 1 つを標的とし、前記内側のフォワードプライマーの上流の DNA の領域とハイブリダイズするように設計されているプライマーを得るステップと、

前記第 1 のプライマーを該 DNA とハイブリダイズさせるステップと、
前記ポリメラーゼ連鎖反応を用いて該 DNA を増幅するステップと
をさらに含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記第 1 の試料を調製する前記ステップが、
該第 1 の試料中の前記 DNA にユニバーサルアダプタを付加するステップと、
該第 1 の試料中の前記 DNA を、前記ポリメラーゼ連鎖反応を用いて増幅するステップ
と
をさらに含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 5)

増幅された前記アンプリコンの少なくとも小部分が 1 0 0 b p 未満、9 0 b p 未満、8
0 b p 未満、7 0 b p 未満、6 5 b p 未満、6 0 b p 未満、5 5 b p 未満、5 0 b p 未満
または 4 5 b p 未満であり、前記小部分が 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6
0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % または 9 9 % である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記 DNA を増幅する前記ステップが、1 つまたは複数の個々の反応容積で行われ、個
々の反応容積のそれぞれが、1 0 0 超の異なるフォワードプライマーとリバースプライマ
ーの対、2 0 0 超の異なるフォワードプライマーとリバースプライマーの対、5 0 0 超の
異なるフォワードプライマーとリバースプライマーの対、1 , 0 0 0 超の異なるフォワ
ードプライマーとリバースプライマーの対、2 , 0 0 0 超の異なるフォワードプライマーと
リバースプライマーの対、5 , 0 0 0 超の異なるフォワードプライマーとリバースプライ
マーの対、1 0 , 0 0 0 超の異なるフォワードプライマーとリバースプライマーの対、2
0 , 0 0 0 超の異なるフォワードプライマーとリバースプライマーの対、5 0 , 0 0 0 超
の異なるフォワードプライマーとリバースプライマーの対、または、1 0 0 , 0 0 0 超の
異なるフォワードプライマーとリバースプライマーの対を含有する、項目 1 1 に記載の方
法。

(項目 1 7)

前記第 1 の試料を調製する前記ステップが、該第 1 の試料を複数の部分に分割するステ
ップであって、前記複数の多型遺伝子座のサブセットにおける各部分内の前記 DNA が優
先的に富化されるステップをさらに含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記内側のプライマーを、望ましくないプライマー 2 重鎖を形成する可能性があるプラ
イマー対を同定するステップ、および望ましくないプライマー 2 重鎖を形成する可能性が
あると同定されたプライマーの対の少なくとも 1 つを前記複数のプライマーから除去する
ステップによって選択する、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記内側のプライマーが、前記標的の多型遺伝子座の上流または下流のいずれかとハイ
ブリダイズするように設計された領域を含有し、必要に応じて、PCR 増幅が可能になる
ように設計されたユニバーサルプライミング配列を含有する、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記プライマーの少なくとも一部が、個々のプライマー分子各々について異なるランダ
ムな領域をさらに含有する、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記プライマーの少なくとも一部が、分子バーコードをさらに含有する、項目 1 1 に記
載の方法。

(項目 2 2)

前記胎児の一方の親または両親から遺伝子型データを得るステップをさらに含む、項目
1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記胎児の一方の親または両親から遺伝子型データを得る前記ステップが、

該両親由来の前記DNAを調製するステップであって、前記複数の多型遺伝子座における前記DNAを優先的に富化し、調製された親のDNAを得るステップを含むステップと

必要に応じて、該調製された親のDNAを増幅するステップと、

該複数の多型遺伝子座における該調製された試料中の該親のDNAを測定するステップと
を含む、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記染色体上の前記複数の多型遺伝子座の前期予測される対立遺伝子数の確率についての同時分布モデルを構築する前記ステップを、前記一方の親または両親から得られた前記遺伝子データを用いて行う、項目22に記載の方法。

(項目25)

前記第1の試料を母系の血漿から単離し、前記母親から遺伝子型データを得る前記ステップを、前記調製された試料に対して行った前記DNA測定から該母系の遺伝子型データを推定するステップによって行う、項目22に記載の方法。

(項目26)

前記優先的な富化により、前記調製された試料と前記第1の試料の間に、2倍以下、1.5倍以下、1.2倍以下、1.1倍以下、1.05倍以下、1.02倍以下、1.01倍以下、1.005倍以下、1.002倍以下、1.001倍以下および1.0001倍以下からなる群から選択される係数の程度の、平均の対立遺伝子の偏りがもたらされる、項目4に記載の方法。

(項目27)

前記複数の多型遺伝子座がSNPである、項目1に記載の方法。

(項目28)

前記調製された試料中の前記DNAを測定する前記ステップを配列決定するステップによって行う、項目1に記載の方法。

(項目29)

妊娠中の胎児における染色体の倍数性状態の決定に役立つ診断ボックスであって、項目1に記載の方法における調製するステップおよび測定するステップを実行することができる診断ボックス。

(項目30)

前記対立遺伝子数がバイナリーではなく確率的なものである、項目1に記載の方法。

(項目31)

前記複数の多型遺伝子座における前記調製された試料中の前記DNAの測定値を、前記胎児がハプロタイプに関連づけられる遺伝性の1つまたは複数の疾患を有するか否かを決定するためにも用いる、項目1に記載の方法。

(項目32)

対立遺伝子数の確率についての同時分布モデルを構築する前記ステップを、染色体内の異なる場所における染色体乗換えの確率に関するデータを使用して、前記染色体上の多型対立遺伝子間の依存性をモデリングすることによって行う、項目1に記載の方法。

(項目33)

対立遺伝子数についての同時分布モデルを構築する前記ステップと各仮説の前記相対的確率を決定する前記ステップをどちらも、参照染色体を使用することを必要としない方法を用いて行う、項目1に記載の方法。

(項目34)

各仮説の前記相対的確率を決定する前記ステップが、前記調製された試料中の胎児DNAの推定される小部分を使用する、項目1に記載の方法。

(項目35)

対立遺伝子数の確率を算出するステップおよび各仮説の前記相対的確率を決定するステップにおいて使用する前記調製された試料からの前記DNA測定値が、一次遺伝子データ

を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 6)

最大の確率を有する前記仮説に対応する前記倍数性状態を選択するステップを、最尤推定または最大事後推定を使用して行う、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記胎児の前記倍数性状態を呼び出す前記ステップが、

前記同時分布モデルおよび前記対立遺伝子数の確率を用いて決定される前記倍数性仮説のそれぞれの前記相対的確率と、読み取り数解析、ヘテロ接合率の比較、親の遺伝子情報を使用する場合にのみ利用可能な統計量、特定の親の状況に対して正規化された遺伝子型シグナルの確率、前記第 1 の試料または前記調製された試料の推定される胎児の割合を用いて算出される統計量、およびそれらの組合せからなる群から選択される統計学的技法を用いて算出される該倍数性仮説のそれぞれの相対的確率とを組み合わせるステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記呼び出された倍数性状態について信頼度推定値を算出する、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記胎児の前記呼び出された倍数性状態に基づいて、妊娠中絶すること、または妊娠を維持することの一方から選択される臨床的措置をとるステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 4 0)

妊娠 4 週から 5 週の間；妊娠 5 週から 6 週の間；妊娠 6 週から 7 週の間；妊娠 7 週から 8 週の間；妊娠 8 週から 9 週の間；妊娠 9 週から 10 週の間；妊娠 10 週から 12 週の間；妊娠 12 週から 14 週の間；妊娠 14 週から 20 週の間；妊娠 20 週から 40 週の間；妊娠初期；妊娠中期；妊娠後期；またはそれらの組合せにおいて実施することができる、項目 1 に記載の方法。

(項目 4 1)

項目 1 に記載の方法を用いて生成した、決定された妊娠中の胎児における染色体の倍数性状態を示す報告。

(項目 4 2)

項目 1 に記載の方法で使用するために設計された、妊娠中の胎児における標的染色体の倍数性状態を決定するためのキットであって、

前記複数の内側のフォワードプライマーおよび、必要に応じて前記複数の内側のリバースプライマーであって、該プライマーのそれぞれが前記標的染色体上の前記多型部位のうちの 1 つのすぐ上流および / または下流の DNA の領域とハイブリダイズするように設計されているプライマーと、必要に応じてさらに別の染色体であって、該ハイブリダイズする領域が、少数の塩基によって該多型部位から隔てられており、該少数が、1、2、3、4、5、6 ~ 10、11 ~ 15、16 ~ 20、21 ~ 25、26 ~ 30、31 ~ 60、およびそれらの組合せからなる群から選択される染色体とを含むキット。

(項目 4 3)

胎児のゲノム DNA および母系のゲノム DNA を含む母系の組織試料において胎児の異数性の存在または不在を決定するための方法であって、

a) 該母系の組織試料から、胎児のゲノム DNA と母系のゲノム DNA の混合物を得るステップと、

b) ステップ a) の胎児のゲノム DNA と母系のゲノム DNA の混合物から無作為に選択された DNA 断片の大規模並行 DNA 配列決定を行って、該 DNA 断片の配列を決定するステップと、

c) ステップ b) で得られた配列が属する染色体を同定するステップと、

d) ステップ c) のデータを用いて、母系のゲノム DNA と胎児のゲノム DNA の該混合物中の少なくとも 1 つの第 1 の染色体の量を決定するステップであって、該少なくとも

1 つの第 1 の染色体が、該胎児において正倍数性であると推定されるステップと、

e) ステップ c) のデータを用いて、母系のゲノム DNA と胎児のゲノム DNA の該混合物中の第 2 の染色体の量を決定するステップであって、該第 2 の染色体が、該胎児において異数性であることが疑われるステップと、

f) 胎児 DNA と母系 DNA の該混合物中の胎児 DNA の割合を算出するステップと、

g) 該第 2 の標的染色体が正倍数性である場合、ステップ d) の数を用いて該第 2 の標的染色体の量の予測される分布を算出するステップと；

h) 該第 2 の標的染色体が異数性である場合、ステップ d) の第 1 の数およびステップ f) で算出された、胎児 DNA と母系 DNA の該混合物中の胎児 DNA の前記割合を用いて該第 2 の標的染色体の量の予測される分布を算出するステップと、

i) 最尤法または最大事後法を用いて、ステップ e) で決定された該第 2 の染色体の量がステップ g) で算出された該分布またはステップ h) で算出された該分布のどちらの一部である可能性がより高いかを決定し、それにより、胎児の異数性の存在または不在を示すステップと

を含む方法。