

【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11月22日 (2018.11.22)

【公表番号】特表2017-526347(P2017-526347A)
 【公表日】平成29年9月14日 (2017.9.14)
 【年通号数】公開・登録公報2017-035
 【出願番号】特願2017-503992(P2017-503992)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

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30年10月12日 (2018.10.12)
 【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】

胎児コピー数変異の統計的尤度を提供するアッセイ方法であって：

母体および胎児細胞フリーDNAを含む母体試料に、あるいは、前記母体試料からの細胞フリーDNAに、第一標的ゲノム領域に由来する少なくとも2つの非多型遺伝子座を照合するための少なくとも2つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを含む第一組を、少なくとも2組導入する工程であって、ここで前記第一組の各々における固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドは、それぞれ前記第一標的ゲノム領域内の遺伝子座に相補的な領域を含み、前記第一組の各々における固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの1つは、捕捉領域、第一標識結合領域、および2つの制限部位を含む工程と；

母体および胎児細胞フリーDNAを含む前記母体試料に、あるいは、前記母体試料からの細胞フリーDNAに、第二標的ゲノム領域に由来する少なくとも2つの非多型遺伝子座を照合するための少なくとも2つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを含む第二組を、少なくとも2組導入する工程であって、ここで前記第二組の各々における固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドは、それぞれ前記第二標的ゲノム領域内の遺伝子座に相補的な領域を含み、前記第二組の各々における固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの1つは、捕捉領域、第二標識結合領域、および2つの制限部位を含み、前記第二組の各々における前記捕捉領域は、前記第一組の少なくとも1つにおける前記捕捉領域と実質的に同じである工程と；

前記固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを核酸連結する工程と；

核酸連結された固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを増幅してアンプリコンを生成する工程と；

前記アンプリコンを切断して切断アンプリコンを生成する工程と；

前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する切断アンプリコンを、前記切断アンプリコンの捕捉領域の、捕捉領域に相補的な捕捉プローブを含む配列へのハイブリッド形成を通じて検出する工程であって、ここで前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する切断アンプリコンは、前記捕捉領域に相補的な捕捉プローブに競合的にハイブリッド形成する工程と；

前記第一および第二標識結合領域を検出することにより、前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する照合された非多型遺伝子座の相対頻度を決定するために、前記切断アンプリコンの捕捉領域を定量化する工程と；

前記第一および第二標識結合領域の相対頻度に基づき、前記第一および第二標的ゲノム領域の相対頻度を推定する工程と；

母体および胎児細胞フリーDNAを含む前記母体試料に、あるいは、前記母体試料からの細胞フリーDNAに、前記第一および第二標的ゲノム領域とは異なる少なくとも1つの標的ゲノム領域に由来する少なくとも2つの多型遺伝子座の各対立遺伝子を照合するための少なくとも2つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを含む第三組を、複数組導入する工程であって、前記第三組の各々における前記少なくとも2つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドは、それぞれ1つの多型遺伝子座に特異的であり、前記第三組の各々における前記少なくとも2つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドのうちの1つは、その多型遺伝子座の1つの対立遺伝子に相補的な配列、その多型遺伝子座に特異的な捕捉領域、対立遺伝子特異的な標識結合領域、および2つの制限部位を含む工程と；

前記多型遺伝子座に特異的な固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを核酸連結する工程と；

アンプリコン生成のために、前記多型遺伝子座に特異的な、核酸連結された固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを増幅する工程と；

切断アンプリコンを作成するために、前記多型遺伝子座に特異的なアンプリコンを切断する工程と；

前記配列上の捕捉プローブへの前記切断アンプリコンの捕捉領域の競合的ハイブリッド形成を通じて、前記多型遺伝子座に由来する切断アンプリコンを検出する工程と；

前記試料中の胎児DNAの分率を決定するために、前記切断アンプリコン上の各対立遺伝子について、対立遺伝子特異的な標識結合領域を検出することにより、前記多型遺伝子座の対立遺伝子を定量化する工程と；

前記定量化された対立遺伝子に由来する胎児DNAの分率を決定する工程と；

前記試料中の前記第一および第二標的ゲノム領域の推定相対頻度と胎児DNAの分率とを用いて、前記母体試料中の胎児コピー数変異の統計的尤度を算定する工程と、を含む、アッセイ方法。

【請求項2】

前記第一および第二標的ゲノム領域内の非多型遺伝子座のそれぞれの照合のために、(a) 3つ以上の固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドが使用されるか、(b) 各多型遺伝子座のそれぞれの照合のために、3つ以上の固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドが使用されるか、または(a)および(b)の両方である、請求項1に記載のアッセイ方法。

【請求項3】

前記増幅ステップは、ポリメラーゼ連鎖反応を使用する普遍増幅を含む、請求項1または2に記載のアッセイ方法。

【請求項4】

更に：

多型遺伝子座の定量化された対立遺伝子に由来する低頻度対立遺伝子を特定する工程であって、ここで母体DNAは同型接合性であり、胎児DNAは異型接合性である工程と；

胎児DNAの分率を決定するために、多型遺伝子座に由来する前記低頻度対立遺伝子を使用する工程と、を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項5】

前記第一標的ゲノム領域は染色体である、請求項1～4のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項6】

前記第二標的ゲノム領域は染色体である、請求項1～5のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項7】

前記第一標的ゲノム領域は、部分的染色体領域である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 8】

前記第二標的ゲノム領域は、部分的染色体領域である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 9】

前記固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの標識結合領域は、標識を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 10】

前記固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの標識結合領域は、標識を含む 1 つのオリゴヌクレオチドに相補的なシーケンスを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 11】

前記多型遺伝子座は常染色体遺伝子座である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 12】

前記照合は更に、架橋オリゴヌクレオチドの使用を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 13】

胎児染色体異数性の尤度決定のためのアッセイ方法であって：

母体および胎児細胞フリー DNA を含む母体試料に、あるいは、前記母体試料からの細胞フリー DNA に、第一標的ゲノム領域内の非多型遺伝子座の組に相補的な 2 つ以上の固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの第一組を少なくとも 2 組、前記非多型遺伝子座への各固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの相補的領域の特異的なハイブリッド形成を可能にする条件下で導入するステップであって、ここで第一組の各々における少なくとも 1 つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドは、普遍プライマー部位、捕捉領域、第一標識結合領域、および 2 つの制限部位を含む、ステップと；

母体および胎児細胞フリー DNA を含む前記母体試料に、あるいは、前記母体試料からの細胞フリー DNA に、第二標的ゲノム領域内の非多型遺伝子座の組に相補的な 2 つ以上の固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの第二組を少なくとも 2 組、前記非多型遺伝子座への各固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの相補的領域の特異的なハイブリッド形成を可能にする条件下で導入するステップであって、ここで第二組の各々における少なくとも 1 つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドは、普遍プライマー部位、捕捉領域、第二標識結合領域、および 2 つの制限部位を含み、前記第二組の各々における前記捕捉領域は、前記第一組の少なくとも 1 つにおける前記捕捉領域と実質的に同じである、ステップと；

母体および胎児細胞フリー DNA を含む前記母体試料に、あるいは、前記母体試料からの細胞フリー DNA に、少なくとも 2 つの多型遺伝子座の各対立遺伝子を照合するための 2 つ以上の固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの第三組を複数組、多型遺伝子座への各固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの相補的領域の特異的なハイブリッド形成を可能にする条件下で導入するステップであって、ここで第三組の各々における少なくとも 1 つの固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドは、普遍プライマー部位、前記多型遺伝子座における 1 つの対立遺伝子に相補的な核酸塩基配列、対立遺伝子特異的な標識結合領域、2 つの制限部位、および捕捉領域を含み、各多型遺伝子座に対する捕捉領域は、その他の多型遺伝子座それぞれに対する捕捉領域と異なり、また前記第一および第二組の捕捉領域とも異なる、ステップと；

固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの前記第一、第二、および第三組を、前記第一および第二標的ゲノム領域、並びに前記多型遺伝子座にハイブリッド形成させるステップと；

固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの隣接的ハイブリッド形成のために、前記第一、第二、および第三組の少なくとも 1 つのハイブリッド形成された固定核酸塩基配列オリゴ

ヌクレオチドを延長するステップと；

核酸連結生成物を得るために、前記第一、第二、および第三組に由来する隣接的にハイブリッド形成された固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドを核酸連結するステップと；

アンプリコン生成のために、普遍プライマー部位を用いて核酸連結生成物を増幅するステップと；

前記アンプリコンを切断して切断アンプリコンを生成するステップと；

切断アンプリコンを配列に適用するステップであって、ここで前記配列は、前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する切断アンプリコン上の捕捉領域に相補的な捕捉プローブを含み、かつ前記配列は、各多型遺伝子座に由来する切断アンプリコン上の捕捉領域に相補的な捕捉プローブを含む、ステップと；

前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する切断アンプリコンの捕捉領域を、前記配列上の捕捉プローブにハイブリッド形成させるステップと；

前記多型遺伝子座に由来する切断アンプリコンの捕捉領域を、前記配列上の捕捉プローブにハイブリッド形成させるステップと；

ハイブリッド形成された切断アンプリコンを検出するステップと；

胎児細胞フリーDNAの割合を決定するために、切断アンプリコン上の各対立遺伝子について対立遺伝子特異的標識結合領域を検出することにより、前記多型遺伝子座に由来する各対立遺伝子の相対頻度を定量化するステップと；

胎児細胞フリーDNAの割合を決定するステップと；

第一および第二標識結合領域を検出することにより、前記第一標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンの相対頻度、および前記第二標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンの相対頻度を定量化するステップと；

前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンの相対頻度を用いて胎児染色体異数性の尤度および胎児細胞フリーDNAの割合を算定するステップと、を含む、アッセイ方法。

【請求項 14】

更に；

多型遺伝子座の定量化された対立遺伝子に由来する低頻度対立遺伝子を特定するステップであって、ここで母体DNAは同型接合性であり、胎児DNAは異型接合性である、ステップと；

胎児DNAの分率を決定するために、多型遺伝子座に由来する前記低頻度対立遺伝子を使用するステップと、を含む、請求項 13 に記載のアッセイ方法。

【請求項 15】

更に、前記第一および第二標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンの相対頻度を比較し、胎児細胞フリーDNAの割合に基づいて胎児染色体異数性の尤度を調整するステップを含む、請求項 13 または 14 に記載のアッセイ方法。

【請求項 16】

前記第一標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンの相対頻度の総和が取られ、前記第二標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンの相対頻度の総和が取られ、前記第一標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンからの総和が前記第二標的ゲノム領域に由来する遺伝子座に対応する切断アンプリコンからの総和と比較され、標的ゲノム領域比を計算する、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 17】

多型遺伝子座は常染色体遺伝子座である、請求項 13 ~ 16 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 18】

前記第一および第二標的ゲノム領域の遺伝子座に由来する切断アンプリコンおよび多型遺伝子座に由来する切断アンプリコンが単一容器内で増幅される、請求項 13 ~ 17 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 19】

前記固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの標識結合領域は、標識を含む、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項 20】

前記固定核酸塩基配列オリゴヌクレオチドの標識結合領域は、標識を含む 1 つ のオリゴヌクレオチドに相補的なシーケンスを含む、請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載のアッセイ方法。