

【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26年9月4日(2014.9.4)

【公表番号】特表2013-531983(P2013-531983A)  
 【公表日】平成25年8月15日(2013.8.15)  
 【年通号数】公開・登録公報2013-043  
 【出願番号】特願2013-514408(P2013-514408)  
 【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 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成26年7月16日(2014.7.16)

【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】

被験者の中の少なくとも 1 つの標的生物を検出するための複数のプローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアを含む混合物において、各プローブまたはオリゴヌクレオチドのプライマーペアが：

a . 前記少なくとも 1 つの標的生物のゲノム中に存在する第 1 の標的配列と特異的にハイブリッド形成する第 1 の相同プローブ配列と；および

b . 前記少なくとも 1 つの標的生物のゲノム中に存在する第 2 の標的配列と特異的にハイブリッド形成する第 2 の相同プローブ配列と；

を含み、および

c . 各プローブがさらに、前記第 1 および前記第 2 の相同プローブ配列との間の、検出可能な部分およびプライマーを含む骨格配列を含み、

前記第 1 の標的配列および前記第 2 の標的配列が、少なくとも 2 つのヌクレオチドを含む対象領域によって分離されており、各プローブ中の前記第 1 および第 2 の相同プローブ配列のそれぞれが：

i . 前記標的生物と特異的にハイブリッド形成し；

i i . 50 - 72 の範囲の  $T_m$  を有し；

i i i . ( a ) 前記混合物中の他のいかなる相同プローブ配列、( b ) いかなる骨格配列、( c ) 前記被験者のゲノム中に存在するいかなるヌクレオチド配列、または ( d ) 前記標的生物以外の所定の配列決定された生物セットのゲノム中に存在するいかなるヌクレオチド配列とも特異的にハイブリッド形成せず；

i v . 前記少なくとも 1 つの標的ゲノムにおいて反復閾値未満で発生し、前記反復閾値が 20 であり；および

v . 4 つを超える連続した同一ヌクレオチドを含有せず、実質的に二次構造を有しないこと；

を特徴とする混合物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の混合物において、前記第 1 および第 2 の相同プローブ配列のそれぞれ

が、前記対象領域に隣接する前記対象生物の配列決定された変異体のゲノムと特異的にハイブリッド形成すること、および対象領域が前記対象生物の配列決定した変異体のうちで多型であり、および選択的に、当該対象領域が毒素生産または抗生物質耐性と関連していることを特徴とする混合物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の混合物において、前記混合物が、少なくとも 4、10、15、20、30、40、60、80、100、150、200、250、300、400、500、1000、2000、4000、8000、10000、15000、または 20000 の異なる標的生物に対して少なくとも 1 つのプローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアを含むことを特徴とする混合物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の混合物において、前記混合物が、少なくとも 10、20、30、40、60、80、100、200、250、500、1000、2000、4000、8000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、または 100000 のプローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアを含むことを特徴とする混合物。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の混合物において、前記混合物が、少なくとも 1 つの被験者特異的プローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアをさらに含み、当該被験者がヒトであることを特徴とする混合物。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の混合物において、前記混合物がさらに生物サンプルからの抽出核酸をさらに含み、当該生物サンプルがヒト患者に由来することを特徴とする混合物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の混合物が、少なくとも 1 つのサンプル内部校正標準核酸、少なくとも 1 つのプローブおよび / または当該内部校正標準核酸と特異的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドのプライマーペアを、さらに含むことを特徴とする混合物。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の混合物において、前記混合物が、表 4、5、6、8、または 9 のいずれか 1 つからの少なくとも 1 つの相同プローブ配列、またはそれからの逆相補的配列を含むことを特徴とする混合物。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の混合物において、前記対象領域が、少なくとも 2、4、8、10、20、40、60、80、100、125、150、200、250、300、350、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、または 2000 のヌクレオチドであることを特徴とする混合物。

【請求項 10】

1 つまたは複数の標的生物の存在を検出する方法が：

a) 標的生物を含有する疑いがある試験サンプルを、請求項 1 に記載の混合物と接触させるステップと；

b) 第 1 および第 2 の標的配列とハイブリッド形成する少なくとも 1 つのプローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアによって、対象領域を捕獲するステップと；

c) 前記捕獲された対象領域を検出し、それにより、1 つまたは複数の標的生物の存在を検出するステップと；

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、既知のゲノムの配列および配列決定エラーのモデルに関して、前記対象領域を配列決定し、および前記捕獲された対象領域の配列を分析して、前記サンプル中に存在する種々の生物の割合または存在量を推定するステップをさらに

含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 0 に記載の方法において、前記試験サンプルが、ヒト被験者から得られることを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 0 に記載の方法において、サンプル内部校正標準核酸を前記試験サンプルに添加し、および当該内部校正標準核酸を検出するステップをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 0 に記載の方法において、検出された前記少なくとも 1 つの標的生物に基づいて治療的助言を与えるステップをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 0 に記載の方法を含む、病原体に感染した被験者の治療方法において、少なくとも 1 つの病原体の存在を検出するステップと、前記検出された少なくとも 1 つの病原体に基づいて前記被験者に適切な予防を施すステップとをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 に記載の混合物の製造方法が：

a) 対象生物のための少なくとも 1 つの基準ゲノム、少なくとも 1 つの非ハイブリッド形成ゲノム、および場合により、前記基準ゲノムと同一でない少なくとも 1 つのハイブリッド形成ゲノムを提供するステップと；

b) 前記基準ゲノムを  $n$ -mer ヘスライスするステップであって、 $n$  が 18 - 50 の範囲であるステップと；

c) 前記スライスされた基準ゲノムからスクリーニングされた  $n$ -mer のセットを同定するステップであって、前記スクリーニングされた  $n$ -mer のセットが、

i) 非反復性であり、

ii) 実質的に二次構造を有しない  $n$ -mer からなり、

iii) 4 つを超える連続した同一ヌクレオチドを含有する  $n$ -mer を有さず、

iv) 50 - 72 の範囲の  $T_m$  を有する  $n$ -mer からなるステップと；

d) 相同プローブ配列のセットを同定するステップであって、前記相同プローブ配列が、スクリーニングされた  $n$ -mer からなり；

i) 前記  $n$ -mer が、いかなる非ハイブリッド形成ゲノムとも特異的にハイブリッド形成せず、

ii) 前記  $n$ -mer が、前記基準ゲノムおよび場合により少なくとも 1 つのハイブリッド形成ゲノムにおいて 1 - 20 回発生するステップと；

e) 複数のプローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアを構築するステップであって、各プローブまたはオリゴヌクレオチドのプライマーペアが第 1 の相同プローブ配列および第 2 の相同プローブ配列を含み、

i) 前記第 1 および第 2 の相同プローブ配列がそれぞれ、前記対象生物のゲノム中の第 1 および第 2 の標的配列と特異的にハイブリッド形成し、前記第 1 および第 2 の標的配列が少なくとも 2 つのヌクレオチドを含む対象領域によって分離されており、

ii) 前記複数のプローブが、互いに特異的にハイブリッド形成せず、そして

iii) 前記複数のプローブが、実質的に二次構造を有しないステップと；

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の方法において、2 つ以上の基準ゲノムが提供され、少なくとも 1 つのプローブおよび / またはオリゴヌクレオチドのプライマーペアが、前記基準ゲノムの少なくとも 1 つとハイブリッド形成することを特徴とする方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 に記載の方法において、前記混合物中の前記プローブおよび / またはオリゴ

ヌクレオチドのプライマーペアが、対象領域のゲノム配列のセット内の既知の配列間に存在する多型の閾値数に基づいてスコア化および選択されることを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の方法において、相同プローブ配列が、排除ゲノムのセットに対して指定の長さよりも長い完全な一致を含有しないように各プローブまたはオリゴヌクレオチドのプライマーペアが変更され、前記変更された配列が、1 つまたは複数の標的ゲノムとまだハイブリッド形成し得ることを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 16 に記載の方法において、追加の対象生物のそれぞれの数  $n$  に対して、ステップ (a) - (e) を繰り返すことをさらに含み、当該  $n$  が 4, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 10000, 15000、または 20000 よりも大きいことを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 16 に記載の方法において、前記少なくとも 1 つの非ハイブリッド形成ゲノムが、前記標的生物以外の所定の配列決定された生物セットを含み、選択的に前記少なくとも 1 つの非ハイブリッド形成ゲノムがヒトゲノムを含むことを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 16 に記載の方法において、前記ゲノムの  $n$  - mer へのスライシングが、1 と  $n$  の間のオフセットを有することを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 16 に記載の方法において、前記方法が、少なくとも 10、9、8、7、6、5、4、3、または 2 メガベースの標的ゲノムにおいて、シングルコア Pentium (登録商標) Xeon 2.5 ghz プロセッサを用いて 16、14、12、10、8、6、もしくは 4 日間、または 72、48、36、24、12、10、8、6、もしくは 4 時間かからないことを特徴とする方法。