

【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 21 年 9 月 24 日 (2009.9.24)

【公表番号】特表 2009-504153 (P2009-504153A)
 【公表日】平成 21 年 2 月 5 日 (2009.2.5)
 【年通号数】公開・登録公報 2009-005
 【出願番号】特願 2008-525967 (P2008-525967)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 6 F 17/30 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

G 0 6 F 17/30 1 7 0 F

【手続補正書】

【提出日】平成 21 年 8 月 7 日 (2009.8.7)

【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】

(I) 増幅される少なくとも 1 つの標的核酸の少なくとも 1 つの領域を同定および / または選択するステップと、ここで、領域が平均増幅効率 (A E) よりも高い A E を有し、

(II) 同定および / または選択された領域にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを設計するステップと

を任意の順序で含む、核酸検出のための少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを設計する方法。

【請求項 2】

選択される領域の A E が、フォワードプライマー r_i が位置 i に結合することができ、リバープライマー r_j が標的核酸の位置 j に結合することができる確率である、増幅効率スコア (A E S) として計算され、および $|i - j|$ が、増幅されることが所望される標的核酸の領域である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

$|i - j|$ が 10000 bp 以下である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (I) が、幾何学的増幅バイアスまたは標的核酸の各位置の効果を判定すること、および平均増幅効率 (A E) よりも高い A E を有する領域として増幅される少なくとも 1 つの領域を選択することを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

選択される領域にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドが、以下の基準：

(a) 選択されたオリゴヌクレオチドは、40% ~ 60% の C G 含有量を有する；

(b) オリゴヌクレオチドは、隣接モデルに基づいて計算される、最も高い自由エネルギーを有することによって選択される；

(c) 標的核酸 v_a および v_b のオリゴヌクレオチド s_a およびオリゴヌクレオチド s

s_b サブストリングを仮定すると、 s_a は s_a と標的核酸 v_b 由来の任意の長さ m のサブストリング s_b との間のハミング距離ならびに / または s_a およびオリゴヌクレオチド s_b の最も長い共通するサブストリングに基づいて選択される；

(d) 標的核酸 v_a に特異的な長さ m の任意のオリゴヌクレオチド s_a について、標的核酸と異なる核酸のいずれの領域ともいかなるヒットも有さない場合、オリゴヌクレオチド s_a が選択され、長さ m のオリゴヌクレオチド s_a が標的核酸と異なる核酸とヒットを有する場合、最も小さい最大アライメント長および / または最少の数のヒットを有する長さ m のオリゴヌクレオチド s_a が選択される；ならびに

(e) 標的核酸の位置 i のオリゴヌクレオチド p_i が、増幅された標的核酸の位置 i にハイブリダイズすると予測される場合、 p_i が選択される
の少なくとも 1 つに従って選択および設計される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

$P(p_i | v_a) >$ であり、式中 θ が 0.5 であり、 $P(p_i | v_a)$ が、標的核酸 v_a の位置 i のオリゴヌクレオチド p_i が標的核酸 v_a の位置 i にハイブリダイズする確率である場合、基準 (e) に基づいて、 p_i が選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

【数 1】

$$P(p_i | v_a) \approx P(X \leq x_i) = \frac{c_i}{k}$$

であり、式中 X は v_a の全てのオリゴヌクレオチドの増幅効率スコア (AES) 値を表す確率変数であり、 k は v_a 中のオリゴヌクレオチドの数であり、 c_i は AES 値が x_i 以下であるオリゴヌクレオチドの数である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

(i) 少なくとも 1 つの生体試料を提供するステップと、

(ii) 生体試料中に含まれる核酸を増幅するステップと、

(iii) 生体試料中に標的核酸が存在する場合、少なくとも 1 つの標的核酸にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを提供するステップと、ここで請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法に従って前記オリゴヌクレオチドが設計および / または調製され、

(iv) 前記オリゴヌクレオチドを増幅された核酸と接触させるステップおよび / または標的核酸にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを検出するステップとを含む、少なくとも 1 つの標的核酸を検出する方法。

【請求項 9】

前記増幅が、少なくとも 1 つのランダムフォワードプライマーおよび / または少なくとも 1 つのリバースランダムプライマーの存在下で行われる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

位置 i に結合しているフォワードランダムプライマーおよび標的核酸 v_a の位置 j に結合しているリバースランダムプライマーが、

【数 2】

$$AES_i = \sum_{j=i-Z}^i \left\{ P^f(j) \times \sum_{k=\max(i+1, j+500)}^{j+Z} P^r(k) \right\}$$

の標的核酸 v_a の各位置 i についての増幅効率スコア (AES_i) を有するプライマーの間で選択され、

式中、

【数 3】

$$\sum_{k=\max(i+1, j+500)}^{j+Z} P^r(k) = \text{Pr}(i+1) + \text{Pr}(i+2) + \dots + \text{Pr}(j+Z),$$

であり、 $P^f(i)$ および $P^r(i)$ は、それぞれ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーとしてランダムプライマー r_i が v_a の位置 i に結合する確率であり、1000bp 以下である Z は、増幅されることが所望される v_a の領域である、請求項 2～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅が、フォワードおよびリバースプライマーを含み、フォワードおよびリバースプライマーのそれぞれが、5' - 3' 配向で、不変のプライマー頭部および可変のプライマー尾部を含み、かつ、少なくとも可変の尾部が、標的核酸 v_a の一部にハイブリダイズする、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

検出される標的核酸が、生体試料の核酸にとって外因性の核酸である、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

検出ステップ (iv) において、 v_a にハイブリダイズするプローブのシグナル強度の平均値が、 v_a に含まれないプローブの平均値よりも統計的に高く、それによって生体試料中の v_a の存在が示される、請求項 8～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

検出ステップ (iv) において、 v_a にハイブリダイズするプローブのシグナル強度の平均値が、 v_a に含まれないプローブの平均値よりも統計的に高いことを特徴とし、高いシグナル強度を有する検出方法において使用されるプローブの割合に対する、高いシグナル強度を有し v_a に含まれないプローブの割合の相対的差異を計算するステップをさらに含む請求項 8～12 のいずれか一項に記載の方法であって、プローブ v_a のシグナル強度の密度分布が、 v_a に含まれないプローブのものよりも正に歪んでおり、それによって生体試料中の v_a の存在が示される方法。

【請求項 15】

検出ステップ (iv) において、生体試料中の少なくとも 1 つの標的核酸の存在が、0.1 以下の t 検定の値および / または 0.05 以下のアンダーソン・ダーリン検定値および / または 1.0 以上の重み付きカルバック・ライブラー情報量の値によって示される、請求項 8～12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

検出ステップ (iv) が、重み付きカルバック・ライブラー (WKL) 情報量スコア：

【数 4】

$$WKL(P_a | \bar{P}_a) = \sum_{j=0}^{k-1} \frac{Q_a(j) \log\left(\frac{Q_a(j)}{\bar{Q}_a(j)}\right)}{\sqrt{\bar{Q}_a(j)[1 - \bar{Q}_a(j)]}}$$

の分布を計算することによって、標的核酸 v_a についての各サインプローブセット (SPS) におけるプローブのシグナル強度を評価することを含み、式中、 $Q_a(j)$ は瓶 b_j に見られる P_a におけるプローブのシグナル強度の累積分布関数であり、

【数 5】

$$Q_a(j)$$

は瓶 b_j に見られる

【数 6】

$$\overline{P_a}$$

におけるプローブのシグナル強度の累積分布関数であり、 P_a はウイルス v_a のプローブのセットであり、

【数 7】

$$\overline{P_a} = P \cdot P_a$$

である、請求項 8 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

標的核酸 v_a の非存在を表す各サインプローブセット (SPS) が、正規分布したシグナル強度および / または 5 より小さい重み付きカルバック・ライブラー (WKL) 情報量スコアを有し、かつ、少なくとも 1 つの標的核酸 v_a の存在を表す各サインプローブセット (SPS) が、正に歪んでいるシグナル強度分布および / または 5 より大きい重み付きカルバック・ライブラー (WKL) 情報量スコアを有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

WKL スコアの分布に関してアンダーソン・ダーリン検定を行うことをさらに含み、 $P > 0.05$ の結果が、それによって標的核酸 v_a の非存在を示し、かつ、 $P < 0.05$ の結果が、それによって標的核酸 v_a の存在を示す、請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法により設計または調製された、少なくとも 1 つの標的核酸 v_a に対する少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションを検出することを含み、 v_a にハイブリダイズするプローブのシグナル強度の平均値が v_a に含まれないプローブの平均値よりも統計的に高く、それによって v_a の存在が示される、少なくとも 1 つの標的核酸 v_a の存在を判定する方法。

【請求項 20】

v_a にハイブリダイズするプローブのシグナル強度の平均値が、 v_a に含まれないプローブの平均値よりも統計的に高く、高いシグナル強度を有する検出方法において使用されるプローブの割合に対する、高いシグナル強度を有する v_a に含まれないプローブの割合の相対的差異を計算するステップをさらに含み、プローブ v_a のシグナル強度の密度分布が v_a に含まれないプローブのものより正に歪んでおり、それによって v_a の存在が示される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

少なくとも 1 つの生体試料中の少なくとも 1 つの標的核酸の存在が、0.1 以下の t 検定の値および / または 0.05 以下のアンダーソン・ダーリン検定値および / または 1.0 以上の重み付きカルバック・ライブラー情報量の値によって示される、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

(I) 増幅される少なくとも 1 つの標的核酸の少なくとも 1 つの領域を同定および / または選択する、ここで、前記領域が平均増幅効率 (AE) よりも高い AE を有する、ならびに

(II) 同定および / または選択される領域にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを設計する

ように構成された、核酸検出のための少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを設計するための装置。

【請求項 23】

選択される領域の AE が、フォワードプライマー r_i が位置 i に結合することができ、リバースプライマー r_j が標的核酸の位置 j に結合することができる確率である、増幅効

率スコア (AES) として計算され、および $|i - j|$ が、増幅されることが所望される標的核酸の領域である、請求項 22 に記載の装置。

【請求項 24】

$|i - j|$ が 10000 bp 以下、1000 bp 以下、または 500 bp 以下である、請求項 23 に記載の装置。

【請求項 25】

ステップ (I) が、幾何学的増幅バイアスまたは標的核酸の各位置の効果を判定すること、および平均増幅効率 (AE) よりも高い AE を有する領域として増幅される少なくとも 1 つの領域を選択することを含む、請求項 22 ~ 24 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 26】

選択される領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドが、以下の基準：

- (a) 選択されたオリゴヌクレオチドが、40% ~ 60% の CG 含有量を有する；
- (b) オリゴヌクレオチドが、隣接モデルに基づいて計算される最も高い自由エネルギーを有することによって選択される；
- (c) 標的核酸 v_a および v_b のオリゴヌクレオチド s_a およびオリゴヌクレオチド s_b サブストリングを仮定すると、 s_a が s_a と標的核酸 v_b 由来の任意の長さ m のサブストリング s_b との間のハミング距離および / または s_a およびオリゴヌクレオチド s_b の最も長い共通するサブストリングに基づいて選択される；
- (d) 標的核酸 v_a に特異的な長さ m の任意のオリゴヌクレオチド s_a について、標的核酸と異なる核酸のいずれの領域ともいかなるヒットも有さない場合、オリゴヌクレオチド s_a が選択され、長さ m のオリゴヌクレオチド s_a が標的核酸と異なる核酸とヒットを有する場合、最も小さい最大アライメント長および / または最少の数のヒットを有する長さ m のオリゴヌクレオチド s_a が選択される；ならびに
- (e) 標的核酸の位置 i の少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチド p_i が、増幅された標的核酸の位置 i にハイブリダイズすると予測される場合に、 p_i が選択されるの少なくとも 1 つに従って選択および / または設計される、請求項 22 ~ 25 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 27】

$P(p_i | v_a) >$ であり、式中 θ が 0.5 であり、 $P(p_i | v_a)$ が、標的核酸 v_a の位置 i のオリゴヌクレオチド p_i が標的核酸 v_a の位置 i にハイブリダイズする確率である場合に、基準 (e) に基づいて、 p_i が選択される、請求項 26 に記載の装置。

【請求項 28】

【数 8】

$$P(p_i | v_a) \approx P(X \leq x_i) = \frac{c_i}{k}$$

であり、式中 X は v_a の全てのオリゴヌクレオチドの増幅効率スコア (AES) 値を表す確率変数であり、 k は v_a 中のオリゴヌクレオチドの数であり、 c_i は AES 値が x_j 以下であるオリゴヌクレオチドの数である、請求項 22 ~ 26 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 29】

- (i) 少なくとも 1 つの生体試料を提供するステップと、
- (ii) 生体試料中に含まれる核酸を増幅するステップと、
- (iii) 生体試料中に標的核酸が存在する場合、少なくとも 1 つの標的核酸にハイブリダイズすることができる少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを提供するステップと、ここで前記オリゴヌクレオチドが、請求項 22 ~ 28 のいずれか一項に記載の装置に従って構成されている装置に従って設計および / または調製され、
- (iv) オリゴヌクレオチドを増幅された核酸と接触させる、および / または標的核酸にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを検出するステップと

のいずれか 1 つのステップを含む、少なくとも 1 つの標的核酸を検出するよう構成された装置。

【請求項 30】

増幅ステップが、少なくとも 1 つのランダムフォワードプライマーおよび / または少なくとも 1 つのリバースランダムプライマーの存在下で行われる、請求項 22 ~ 29 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 31】

位置 i に結合しているフォワードランダムプライマーおよび標的核酸 v_a の位置 j に結合しているリバースランダムプライマーが、

【数 9】

$$AES_i = \sum_{j=i-Z}^i \left\{ P^f(j) \times \sum_{k=\max(i+1, j+500)}^{j+Z} P^r(k) \right\}$$

の標的核酸 v_a の各位置 i についての増幅効率スコア (AES_I) を有するプライマーの間で選択され、式中、

【数 10】

$$\sum_{k=\max(i+1, j+500)}^{j+Z} P^r(k) = \Pr(i+1) + \Pr(i+2) + \dots + \Pr(j+Z)$$

であり、 $P^f(i)$ および $P^r(i)$ は、それぞれフォワードプライマーおよびリバースプライマーとして、ランダムプライマー r_i が v_a の位置 i に結合する確率であり、10000bp 以下である Z は増幅されることが所望される v_a の領域である、請求項 22 ~ 30 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 32】

増幅ステップが、フォワードおよびリバースプライマーを含み、フォワードおよびリバースプライマーのそれぞれが、5' - 3' 配向で、不変のプライマー頭部および可変のプライマー尾部を含み、少なくとも可変の尾部は、標的核酸 v_a の一部にハイブリダイズする、請求項 22 ~ 31 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 33】

検出される標的核酸が、生体試料の核酸にとって外因性である少なくとも 1 つの核酸である、請求項 22 ~ 32 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 34】

少なくとも 1 つのプローブを配置する少なくとも 1 つの不溶性支持体を含む、請求項 22 ~ 33 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 35】

検出ステップ (iv) において、 v_a にハイブリダイズするプローブのシグナル強度の平均値が、 v_a に含まれないプローブの平均値よりも統計的に高く、それによって生体試料中の v_a の存在が示される、請求項 29 ~ 34 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 36】

検出ステップ (iv) において、 v_a にハイブリダイズするプローブのシグナル強度の平均値が、 v_a に含まれないプローブの平均値よりも統計的に高いことを特徴とし、高いシグナル強度を有する検出方法において使用されるプローブの割合に対する、高いシグナル強度を有する v_a に含まれないプローブの割合の相対的差異を計算するステップをさらに含むよう構成された請求項 29 ~ 34 のいずれか一項に記載の装置であって、プローブ v_a のシグナル強度の密度分布が v_a に含まれないプローブのものよりも正に歪んでおり、それによって生体試料中の v_a の存在が示される、装置。

【請求項 37】

検出ステップ (iv) において、生体試料中の標的核酸の存在が、0.1 以下の t 検定

の値および／または 0.05 以下のアンダーソン・ダーリン検定値および／または 1.0 の重み付きカルバック・ライブラー情報量の値によって示される、請求項 29～34 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 38】

検出ステップ (iv) が、重み付きカルバック・ライブラー (WKL) 情報量スコアの分布：

【数 11】

$$WKL(P_a | \bar{P}_a) = \sum_{j=0}^{k-1} \frac{Q_a(j) \log\left(\frac{Q_a(j)}{\bar{Q}_a(j)}\right)}{\sqrt{Q_a(j)[1-Q_a(j)]}}$$

を計算することによって、標的核酸についての各サインプロープセット (SPS) におけるプロープのシグナル強度を評価することを含み、式中 $Q_a(j)$ は瓶 b_j に見られる P_a におけるプロープのシグナル強度の累積分布関数であり、

【数 12】

$$Q_a(j)$$

は瓶 b_j に見られる

【数 13】

$$\bar{P}_a$$

におけるプロープのシグナル強度の累積分布関数であり、 P_a はウイルス v_a のプロープのセットであり、

【数 14】

$$\bar{P}_a = P \cdot P_a$$

である、請求項 29～34 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 39】

標的核酸の非存在を表す各サインプロープセット (SPS) が、正規分布したシグナル強度および／または 5 より小さい重み付きカルバック・ライブラー (WKL) 情報量スコアを有し、かつ、少なくとも 1 つの標的核酸の存在を表す各サインプロープセット (SPS) が、正に歪んでいるシグナル強度分布および／または 5 より大きい重み付きカルバック・ライブラー (WKL) 情報量スコアを有する、請求項 38 に記載の装置。

【請求項 40】

WKL スコアの分布に関してアンダーソン・ダーリン検定を行うことをさらに含み、 $P > 0.05$ の結果が、それによって標的核酸の非存在を示し、かつ、 $P < 0.05$ の結果が、それによって標的核酸の存在を示す、請求項 38 または 39 に記載の装置。

【請求項 41】

少なくとも 1 つの電子記憶媒体上で構成が記憶される、請求項 22～40 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 42】

請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法を行うよう構成された、コンピュータプログラム製品。

【請求項 43】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを設計するためおよび／または少なくとも 1 つの標的核酸を検出するために、WKL 情報量スコアおよび／またはアンダーソン・ダーリン

検定を判定するよう構成されたソフトウェアを含むコンピュータプログラム製品であって、W K L、アンダーソン・ダーリン検定、オリゴヌクレオチドプローブの設計、オリゴヌクレオチドプライマーの設計、および/または標的核酸の検出が、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法に従って定義される、コンピュータプログラム製品。

【請求項 4 4】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法を行うよう構成されたソフトウェアを含む、取り外し可能な電子記憶媒体。

【請求項 4 5】

少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプローブを設計するため、オリゴヌクレオチドプライマーを設計するため、および/または少なくとも 1 つの標的核酸を検出するために、W K L 情報量スコアおよび/またはアンダーソン・ダーリン検定を判定するよう構成されたソフトウェアを含む、取り外し可能な電子記憶媒体であって、W K L、アンダーソン・ダーリン検定、オリゴヌクレオチドプローブの設計、オリゴヌクレオチドプライマーの設計、および/または標的核酸の検出が、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に従って定義される、取り外し可能な電子記憶媒体。