

【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 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

G 06 F 17/30 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A A

C 12 N 15/00 A

G 06 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(AE)よりも高いAE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1に記載の方法。

【請求項3】

$|i - j|$ が10000bp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(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CG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_b

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】

$P(p_i | v_a) > 0.5$ であり、式中 z 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、1000 bp 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、不变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($i v$)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($i v$)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($i v$)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・ダーリング検定値および/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($i v$)が、重み付きカルバック・ライブラー(WKL)情報量スコア：

【数4】

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

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 (S P S) 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 (W K L) 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 (S P S) 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 (W K L) 情報量スコアを有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項18】

W K L スコアの分布についてアンダーソン・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も正に歪んでおり、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 (A E) よりも高い A E 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 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（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22に記載の装置。

【請求項24】

| i - j |が10000bp以下、1000bp以下、または500bp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（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C G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_b 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 c_i 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（A E S）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A E S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、
- (i i) 生体試料中に含まれる核酸を増幅するステップと、
- (i i i) 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、
- (i v) 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 3 0】

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 2 2 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 1】

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 1 0】

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

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、1000 bp 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 2 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 2】

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、不变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 2 2 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 3】

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 2 2 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 4】

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 2 2 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 5】

検出ステップ (i v) 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 2 9 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 3 6】

検出ステップ (i v) 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 2 9 ~ 3 4 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 3 7】

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

【数11】

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

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12】

$$Q_{\bar{a}}(j)$$

は瓶 b_j に見られる

【数13】

\bar{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－(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－(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スコアの分布についてアンダーソン・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、WKL、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1～21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44】

請求項1～21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45】

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、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、取り外し可能な電子記憶媒体であって、WKL、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1～21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。