

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6637920号
(P6637920)

(45) 発行日 令和2年1月29日(2020.1.29)

(24) 登録日 令和1年12月27日(2019.12.27)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z N A Z
C 1 2 Q 1/6858 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6858 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 21 (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2017-91888 (P2017-91888)	(73) 特許権者	513029079
(22) 出願日	平成29年5月2日(2017.5.2)		アリオサ ダイアグノスティックス イン
(62) 分割の表示	特願2013-523386 (P2013-523386)		コーポレイテッド
原出願日	平成23年8月8日(2011.8.8)		ARIOSA DIAGNOSTICS,
(65) 公開番号	特開2017-127335 (P2017-127335A)		INC.
(43) 公開日	平成29年7月27日(2017.7.27)		アメリカ合衆国 95138 カリフォル
審査請求日	平成29年5月2日(2017.5.2)		ニア州 サンノゼ オプティカル コート
(31) 優先権主張番号	13/013, 732	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成23年1月25日(2011.1.25)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100068755
			弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	61/371, 605	(74) 代理人	100142907
(32) 優先日	平成22年8月6日(2010.8.6)		弁理士 本田 淳
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料中の発生源寄与の決定のためのアッセイシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも母体の遺伝子型についての事前知識なく、母体および胎児の無細胞DNAを含む母体試料中の胎児寄与率を決定する方法であって、

第1および第2の固定配列オリゴヌクレオチドのセットを、該セットの固定配列オリゴヌクレオチドが、多型遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料または前記母体試料由来の無細胞DNAに導入する工程であって、前記第1および第2の固定配列オリゴヌクレオチドの各々が、第1タイプおよび第2タイプの固定配列オリゴヌクレオチドを含み、前記第1タイプの固定配列オリゴヌクレオチドが第1の対立遺伝子にハイブリダイズし、前記第2タイプの固定配列オリゴヌクレオチドが第2の対立遺伝子にハイブリダイズする、工程；

前記ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドを連結して、前記多型遺伝子座上の前記領域に相補的な連結産物を作製する工程；

前記連結産物を増幅して増幅産物を作製する工程；

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチド由来の前記増幅産物を検出する工程；

前記第1の対立遺伝子と第2の対立遺伝子とのうち低い方の前記増幅産物の読み取り値について少ない対立遺伝子頻度(MAF)を決定する工程；および

0.075%~15%の前記少ない対立遺伝子頻度(MAF)を有する前記多型遺伝子座を情報遺伝子座として選択して、前記試料中の胎児の無細胞DNAの寄与率を算出する工程であって、前記情報遺伝子座が、胎児の核酸内でヘテロ接合性且つ母体核酸内でホモ

接合性であり、または、胎児の核酸内でホモ接合性且つ母体核酸内でヘテロ接合性である、工程；

を含む、方法。

【請求項 2】

1 つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、該架橋オリゴヌクレオチドが、前記多型遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料または前記母体試料由来の無細胞 DNA に導入する工程であって、前記 1 つ以上の架橋オリゴヌクレオチドは、前記セットの前記第 1 および第 2 の固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な前記遺伝子座の前記領域の間の領域に相補的である、該工程をさらに含む、

請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドにおいて、前記第 1 および第 2 の固定配列オリゴヌクレオチドの一方または両方がユニバーサルプライマー領域を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドは、前記連結産物の増幅の前に除去される、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドは、前記架橋オリゴヌクレオチドの導入の前に導入される、

請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドとこれらがハイブリダイズした前記多型遺伝子座とのハイブリダイゼーション産物は、前記架橋オリゴヌクレオチドの導入の前に単離される、

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の架橋オリゴヌクレオチドは、前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドと同時に導入される、

請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記増幅産物は、次世代シーケンシングにより検出および定量される、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドにおける前記第 1 および第 2 の固定配列オリゴヌクレオチドは、1 つ以上の指標を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記増幅産物は、前記 1 つ以上の指標の次世代シーケンシングによって検出および定量される、

請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドにおける前記第 1 および第 2 の固定配列オリゴヌクレオチドは、対立遺伝子指標を含み、該対立遺伝子指標は、母体および胎児核酸中の遺伝子座における対立遺伝子を同定する一連の独自のヌクレオチドを含んでいる、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記増幅産物は、前記対立遺伝子指標をアレイにハイブリダイズさせることにより検出および定量される、

50

請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記増幅産物は、前記対立遺伝子指標の次世代シーケンシングによって検出および定量される、

請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記増幅産物は、前記検出工程の前に単離される、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記架橋オリゴヌクレオチドは、長さ 3 ~ 9 ヌクレオチドである、

請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

前記架橋オリゴヌクレオチドは、長さ 10 ~ 30 ヌクレオチドである、

請求項 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 以上の多型遺伝子座にハイブリダイズする固定配列オリゴヌクレオチドを含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドは、前記多型遺伝子座上の直接隣接する相補性領域にハイブリダイズする、

請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

前記セットの固定配列オリゴヌクレオチドおよび前記架橋オリゴヌクレオチドは、前記多型遺伝子座上の直接隣接する相補性領域にハイブリダイズする、

請求項 2 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ハイブリダイズした固定配列オリゴヌクレオチドは、1 以上のヌクレオチドのギャップにより離間しているとともに、ポリメラーゼおよび d N T P を用いて前記オリゴヌクレオチドを伸長する工程をさらに含む、

請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

前記ハイブリダイズした固定配列オリゴヌクレオチドおよび前記架橋オリゴヌクレオチドは、1 以上のヌクレオチドの少なくとも 1 つのギャップにより離間しているとともに、ポリメラーゼおよび d N T P を用いて前記オリゴヌクレオチドを伸長する工程をさらに含む、

請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単一のアッセイにおいて混合試料中のコピー数変動を同定するためのアッセイシステムに関する。

40

【背景技術】

【0002】

以下の考察においては、特定の物品および方法を背景および導入目的で説明する。本明細書に含まれるものは、先行技術の「自認」と解釈すべきではない。出願人は、必要に応じて、本明細書に記載の物品および方法が適用可能な法令の条項の下で先行技術を構成しないことを証明する権利を明示的に保持する。診断法における近年の進歩は、疾患のリスク、存在および予後を決定するための低侵襲機構に焦点を当ててきた。遺伝子異常を決定するための診断方法は、特定の疾患および障害を同定するだけでなく、疾患発生源および

50

治療選択肢に関する価値ある情報を得るための標準的な技術になっている。

【0003】

血液および血漿などの生体試料中の無細胞核酸の同定により、臨床決定を行うのに採血などの低侵襲技術を用いることが可能になる。例えば、癌患者の末梢血には悪性固形腫瘍に由来する無細胞DNAが見出されており、移植を受けた個体は移植された器官に由来する無細胞DNAがその血流中に存在し、妊娠女性の血液および血漿中には無細胞胎児DNAおよびRNAが見出されている。さらに、ウイルス量の検出などの感染性生物に由来する核酸の検出または特定の株のウイルスもしくは細菌病原体の遺伝的同定は、重要な診断および予後の指標となる。したがって、患者自身の正常細胞とは別の発生源に由来する無細胞核酸によって、例えば、治療選択肢、診断、予後などに関する重要な医学的情報を得ることができる。

10

【0004】

そのような試験の感度は、異なる発生源に由来する核酸の量の同定、特に、第2の発生源に由来するより高レベルの核酸のバックグラウンドのある発生源に由来する低レベルの核酸の同定に依存することが多い。生体試料中に存在する無細胞核酸に対する少量の核酸種の寄与の検出は、得られるデータの正確な統計的解釈を実現することができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、試料中の核酸の寄与に関する情報を用いて生体試料中の1つ以上の(1または複数の)ゲノム領域中のコピー数変動(CNV)を算出するための方法が必要である。本発明は、この必要性に取り組む。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

この概要は、以下の詳細な説明においてさらに説明される単純化された形態の概念の選択を導入するために示される。この概要は、特許請求される主題の鍵となるか、もしくは本質的な特徴を同定することを意図されるものではなく、特許請求される主題の範囲を制限するために用いられることを意図されるものでもない。特許請求される主題の他の特徴、詳細、利用性、および利点は、添付の図面に例示され、添付の特許請求の範囲に定義される態様を含む以下の詳細な説明から明らかである。

30

【0007】

本発明の方法は、個体に由来する試料内の多い発生源(より多い方の発生源)および/または少ない発生源(より少ない方の発生源)の寄与を決定し、混合試料中の遺伝子座の発生源の寄与と比較したゲノム領域の値の差異を決定するための単一の発生源内の1つ以上のゲノム領域に関するコピー数情報を決定する能力を有する単一アッセイシステムを含む。本発明は、混合試料内の単一の発生源からの発生源寄与およびコピー数変動(CNV)を決定するための非多型および多型検出の両方を用いる単一アッセイシステムを用いる。試料内の多いおよび/または少ない発生源の寄与の決定により、混合試料中のCNVの決定のためのゲノム領域の十分な同定を可能にする両発生源に由来する十分な遺伝物質の存在に関する情報を得ることができる。

40

【0008】

1態様においては、前記アッセイシステムは、個体に由来する混合試料中の選択遺伝子座(選択された遺伝子座)の増幅および検出を用いて、発生源寄与を算出し、1つ以上のゲノム領域のコピー数を同定する。1つの具体的な態様においては、本発明は、混合試料中の多いおよび/または少ない発生源に由来する核酸の寄与ならびに混合試料中の単一の発生源に由来する1つ以上の(1または複数の)ゲノム領域でのCNVの存在または非存在を決定する能力を有する単一アッセイシステムを提供する。前記アッセイシステムは、混合試料内の2つ以上の発生源中に存在するゲノム領域のコピー数を特異的に検出することができる。寄与の決定のためには、ある発生源に由来する選択遺伝子座を、混合試料中の少なくとも1つの他の発生源の選択遺伝子座と区別する。しかし、コピー数変動を混合

50

試料内の2つ以上のゲノム領域のレベルの比較によって検出することができるため、ゲノム領域のコピー数変動の決定のために、選択遺伝子座は発生源寄与に関して区別されても良いが、区別される必要はない。好ましくは、前記アッセイシステムにおいて分析される無細胞核酸は、無細胞DNA (cfDNA) である。

【0009】

かくして、第1の実施において、本発明は、1) 2つ以上の情報遺伝子座から誘導された頻度データを用いて混合試料中の多い発生源および/または少ない発生源の寄与を決定するため; 2) 多いおよび少ない発生源における1つ以上のゲノム領域の頻度を決定するため; ならびに3) 多いおよび/または少ない発生源における1つ以上のゲノム領域に関してCNVの存在または非存在を同定するための単一アッセイシステムを提供する。好ましくは、CNVの同定は、混合試料中の多いおよび/または少ない発生源に由来する2つ以上のゲノム領域のコピー数の比較に基づく。

10

【0010】

好ましくは、本発明のシステムを用いて分析される核酸は、無細胞核酸である。より好ましくは、前記アッセイシステムにおいて分析される核酸は、無細胞DNA (cfDNA) を含む。

【0011】

別の具体的な態様においては、本発明は、アッセイが、第1のセットの固定配列(固定された配列)オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、ゲノム領域中の、またはそれに関連する1つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程; 第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、2つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程; ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、選択遺伝子座に相補的な連続的連結産物を作製する工程; 連続的連結産物を増幅させて、増幅産物を作製する工程; および増幅産物を検出する工程を含む、混合試料内の発生源寄与の算出および1つ以上のゲノム領域におけるCNVの存在または非存在の検出のためのアッセイシステムを提供する。増幅産物の検出は、混合試料中の発生源寄与および1つ以上のゲノム領域のコピー数を算出するために用いられる。

20

【0012】

固定オリゴヌクレオチドのセットは、ゲノム領域または情報遺伝子座の連続的領域にハイブリダイズする2つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの好ましい態様においては、遺伝子座のセットはCNVについて調査され、より大きいゲノム領域(例えば、染色体の全部または一部)の増幅を示す。好ましくは、前記アッセイシステムは、混合試料内の多い発生源と少ない発生源との間でこれらの遺伝子座のコピー数を区別することができる。選択遺伝子座のレベルを、目的のゲノム領域について決定し、1つ以上の他の目的のゲノム領域および/または1つ以上の参照ゲノム領域の遺伝子座の量と比較して、混合試料中の遺伝子座頻度に基づく潜在的なCNVを検出することができる。

30

【0013】

試料中の染色体異常の検出は、多いおよび/もしくは少ない発生源に由来する単一の染色体上に位置するかまたは該染色体に関連した複数の選択遺伝子座に関するCNVの検出に基づくものであってよい。かくして、別の具体的な態様においては、本発明は、1) 2つ以上の情報遺伝子座から誘導された頻度データを用いて、混合試料中の多い発生源および/または少ない発生源の寄与を決定し; 2) 多いおよび少ない発生源における1つ以上のゲノム領域の頻度を決定し; 3) 混合試料中の多いおよび/または少ない発生源における染色体異常の存在または非存在を同定するための単一アッセイシステムを提供する。

40

【0014】

かくして、本発明は、アッセイが、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定配列オリゴヌクレオチドが、第1の染色体に対応する2つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程; 第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、第2の染色体に対応

50

する2つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；第3のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、2つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；連続的連結産物を増幅させて、増幅産物を作製する工程；および増幅産物を検出する工程を含む、単一アッセイを用いる混合試料中の発生源寄与の算出および染色体異常の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムを提供する。増幅産物の検出を、混合試料中の発生源寄与の算出ならびに染色体異常の同定のために用いることができる。

【0015】

より具体的な態様においては、本発明のアッセイシステムは、母体試料中の胎児寄与率および染色体異常を同定するために用いられる。本発明は、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、第1の染色体に対応する2つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で母体試料に導入する工程；第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、第2の染色体に対応する2つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で母体試料に導入する工程；第3のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、2以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で母体試料に導入する工程；ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；連続的連結産物を増幅させて、増幅産物を作製する工程；および増幅産物を検出する工程を含む、アッセイシステムを提供する。増幅産物の検出を、母体試料における胎児寄与の算出ならびに胎児核酸中の染色体異常の同定のために用いることができる。

【0016】

本発明の特定の態様においては、固定オリゴヌクレオチドがアッセイの連結工程の間に直接的に連結されるように、それらは連続的領域のすぐ近くでハイブリダイズされる。しかしながら、他の態様においては、連続的領域におけるハイブリダイゼーション後に固定オリゴヌクレオチドの末端の間に1つ以上のヌクレオチドのギャップが存在してもよい。例えば、ポリメラーゼを用いるプライマー伸長と連結との組合せにより、固定オリゴヌクレオチドを連結する。

【0017】

それぞれのセットの固定配列核酸は、選択遺伝子座中の少なくとも2つの別々の領域にハイブリダイズするように設計される。好ましい態様においては、2つ以上の別々のオリゴをセットで用いてこれらの領域にハイブリダイズさせ、選択遺伝子座に相補的な隣接核酸を提供する。しかしながら、いくつかの態様においては、セットは、本明細書でより詳細に説明されるように、選択遺伝子座に相補的な2つ以上の異なる非隣接領域を有する単一プローブ（例えば、パドロックプローブ）からなってもよい。固定配列オリゴのセットを、アッセイにおいて連続的に、またはアッセイにおいて同時に提供することができる。

【0018】

特定の好ましい態様においては、架橋オリゴを用いて、オリゴセットの特異性を増加させる、および/または固定配列オリゴヌクレオチド間のギャップを埋める。従って、本発明の別の具体的な態様は、アッセイが、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、ゲノム領域中またはそれと関連する1つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、少なくとも1つの情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；それぞれのセットの固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な領域の間およびすぐ近くの遺伝子座の領域に相補的である、1つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、架橋オリゴヌクレオチドが、前記遺伝子座中の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で導入する工程；ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結

10

20

30

40

50

して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；連続的連結産物を増幅させて、増幅産物を作製する工程；ならびに増幅産物を検出する工程を含む、混合試料内の発生源寄与の算出および1つ以上のゲノム領域中のCNVの存在または非存在の検出のためのアッセイシステムを提供する。増幅産物の検出を用いて、混合試料中の発生源寄与および1つ以上のゲノム領域のコピー数を算出する。

【0019】

本発明の別の具体的な態様は、混合試料中の発生源寄与を算出し、染色体異常を同定するための架橋オリゴヌクレオチドを用いるアッセイシステムを提供する。このアッセイは、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、第1の染色体に対応する2つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、第2の染色体に対応する2つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；第3のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、2つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で混合試料に導入する工程；それぞれのセットの固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な領域の間およびすぐ近くの遺伝子座の領域に相補的である、1つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、架橋オリゴヌクレオチドが、前記遺伝子座中の相補的領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で導入する工程；それぞれのセットの固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な領域の間およびすぐ近くの遺伝子座の領域に相補的である、1つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、架橋オリゴヌクレオチドが、前記遺伝子座中の相補的領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で導入する工程；ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続連結産物を作製する工程；連続連結産物を増幅させて、増幅産物を作製する工程；ならびに増幅産物を検出する工程を含む。増幅産物の検出を、混合試料中の発生源寄与（母体試料中の胎児寄与など）の算出、ならびに染色体異常の同定のために用いることができる。

【0020】

本発明の特定の態様においては、固定オリゴヌクレオチドが全部、アッセイの連結工程の間に直接連結されるように、それらは架橋オリゴのすぐ近くでハイブリダイズされる。しかしながら、他の態様においては、架橋オリゴのハイブリダイゼーション後に固定オリゴヌクレオチドと架橋オリゴとの一方または両方の末端の間に1つ以上のヌクレオチドのギャップが存在してもよい。例えば、ポリメラーゼを用いるプライマー伸長と連結との組合せにより、固定オリゴヌクレオチドと、架橋オリゴとを連結する。

【0021】

本発明の多重化されたアッセイが、5以上、好ましくは10以上、好ましくは16以上、好ましくは20以上、好ましくは30以上、好ましくは32以上、好ましくは40以上、好ましくは48以上、好ましくは50以上、好ましくは60以上、好ましくは70以上、好ましくは80以上、好ましくは90以上、およびより好ましくは96以上の選択遺伝子座を同時に分析することができることが重要な特徴である。これらの選択遺伝子座は、単一の試料に由来する異なる遺伝子座であってもよく、またはそれらは2つ以上の混合試料に由来する遺伝子座であってもよい。後者の場合、選択遺伝子座の分析に用いられる2つの固定配列オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、該遺伝子座を特定の試料と関連付けることができる試料識別子（例えば、「試料指標」）を含む。あるいは、試料指標は、試料指標を含むプライマーを用いることにより連結産物の増幅中に添加することができる。

【0022】

好ましい態様においては、これらの遺伝子座の調査は、単一の増幅反応において複数の遺伝子座の増幅を可能にするユニバーサル増幅技術を用いる。本発明のアッセイシステムにおける寄与算出ならびにCNVおよび/または染色体異常の検出のための選択核酸を、混合試料からの初期選択的増幅後にユニバーサル増幅方法を用いて増幅させることができ

10

20

30

40

50

る。ユニバーサル増幅の使用は、単一の、または限られた数の増幅プライマーを用いて、単一または複数の試料に由来する複数の核酸領域を増幅させることを可能にし、単一の反応において複数の選択領域を増幅させるのに特に有用である。好ましい態様においては、増幅産物の配列決定においてユニバーサルプライマー領域を用いる。別の好ましい態様においては、ゲノム領域の検出のために用いられる固定配列オリゴヌクレオチドおよび多型の検出のために用いられる固定配列オリゴヌクレオチドにおいて、同じユニバーサルプライマー領域を用いる。

【 0 0 2 3 】

かくして、本発明の具体的な態様においては、ユニバーサル増幅における使用のためのプライマーに相補的な配列を、選択的増幅の間またはその後に選択遺伝子座に導入する。好ましくは、そのような配列を、そのような選択核酸の末端に導入するが、それらをユニバーサル増幅手順からの増幅産物の同定を可能にする任意の位置に導入してもよい。

【 0 0 2 4 】

特定の好ましい態様においては、用いられるプライマーの一方または両方は、試料指標または他の識別子を含む。具体的な態様においては、試料指標は1つ以上のユニバーサルプライマーに含まれる。試料指標を増幅産物中に組み込み、次いで、異なる試料に由来する増幅産物を組み合わせることができる。試料指標はC N Vおよび多型を元の試料に適切に割り当てることができるように、C N Vまたは染色体異常の検出ならびに多型の検出と同時に検出される。

【 0 0 2 5 】

特定の態様においては、アッセイシステムは2つ以上の調査される遺伝子座中の領域に相補的である1以上の共通の架橋オリゴヌクレオチドを用いて遺伝子座調査を多重化する、すなわち、2つ以上の固定オリゴヌクレオチドセットについて単一の架橋オリゴを用いることができる。これにより、多重化されたアッセイシステムにおいて用いられる架橋オリゴヌクレオチドの数を、アッセイにおいて調査される遺伝子座の数より小さくできる。特定の具体的な態様においては、アッセイシステムは、本発明のアッセイシステムを用いて調査される2つ以上の遺伝子座と適合するようにそれぞれ設計された架橋オリゴヌクレオチドのプールを用いる。

【 0 0 2 6 】

選択遺伝子座の頻度を、目的のゲノム領域について決定し、1つ以上の他の目的のゲノム領域および/または1つ以上の参照ゲノム領域の遺伝子座の頻度と比較して、混合試料中の遺伝子座頻度に基づいて潜在的なC N Vを検出することができる。

【 0 0 2 7 】

いくつかの例においては、用いて検出される染色体異常は、目的の染色体上での遺伝子増幅または遺伝子座伸長と関連する。他の例においては、染色体異常は、ゲノム中の染色体の余分な部分の存在をもたらす転座と関連する。さらに他の例においては、遺伝子異常は欠失である。

【 0 0 2 8 】

特定の好ましい態様においては、染色体異常は、目的の染色体の異数性と関連する。例えば、胎児における最も一般的な染色体異常は、トリソミー21、18、13、Xおよび/もしくはYまたはモノソミーXである。具体的な好ましい態様においては、本発明のアッセイシステムは、母体試料の胎児DNAにおけるそのような一般的な染色体異数性を検出するために用いられる。

【 0 0 2 9 】

本発明のアッセイシステムにおいては、必要に応じて、増幅産物を単離した後、検出する。単離される場合、好ましくはそれらを個々の分子として単離して、その後の検出を補助する。単離後、増幅産物をさらに増幅させて、個々の増幅産物の全部または一部の同一コピーを作製した後、検出することができる。あるいは、単離された増幅産物をさらに増幅させて、個々の増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一コピーを作製した後、検出することができる。

【0030】

CNVの検出の様々な方法を、本発明のアッセイシステムにおける多型の検出と共に用いることができる。1つの一般的な態様においては、アッセイシステムは、混合試料中の目的の第1のゲノム領域から1つ以上の選択核酸を増幅する工程；混合試料中の目的の第2の遺伝子座から1つ以上の選択核酸を増幅する工程、選択遺伝子座の相対頻度を決定する工程、選択遺伝子座の相対頻度を比較する工程、ならびに第1および第2の遺伝子座に由来する選択核酸の比較された相対頻度に基づいてCNVの存在または非存在を同定する工程を含む、混合試料中の1つ以上の遺伝子座におけるCNVの決定のための方法を用いる。好ましくは、アッセイ方法は、異なるゲノム領域に由来する2つ以上の選択遺伝子座を増幅するが、該遺伝子座は、同一の一般的なゲノム領域中に位置してもよく、これは、単一の遺伝子座由来のCNVよりもむしろ染色体異常から生じるCNVの確認のためである。

10

【0031】

より好ましくは、ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドを除去した後、架橋オリゴヌクレオチドを導入する。いくつかの態様においては、架橋オリゴヌクレオチドを連結混合物と同時に導入する。他の態様においては、固定配列オリゴヌクレオチドと遺伝子座とのハイブリダイゼーション産物を単離した後、架橋オリゴヌクレオチドを導入する。

【0032】

特定の具体的な態様においては、アッセイシステムは、本発明のアッセイシステムを用いて調査される2つ以上の遺伝子座と適合するようにそれぞれ設計された架橋オリゴヌクレオチドのプールを用いる。これらの態様においては、多重化アッセイにおいて用いられる架橋オリゴヌクレオチドは、好ましくは ± 5 の範囲、より好ましくは ± 2 の範囲の T_m を有するように設計される。

20

【0033】

特定の態様においては、架橋オリゴヌクレオチドは、長さ2~45ヌクレオチドである。具体的な態様においては、架橋オリゴヌクレオチドは、長さ3~9ヌクレオチドである。さらに別の具体的な態様においては、オリゴヌクレオチドは長さ10~30ヌクレオチドである。

【0034】

CNVについて調査される遺伝子座は、いくつかの例においては、より大きいゲノム領域、例えば、染色体の全部または一部の増幅を示すものであってよい。好ましくは、アッセイシステムは混合試料内の多い発生源と少ない発生源との間でこれらの遺伝子座のコピー数を区別することができる。

30

【0035】

別の態様においては、本発明は、混合試料中のCNVおよび感染性因子の両方の同定を可能にする技術を用いる。これは特に、臨床結果が感染性因子の存在によって悪化し得る患者をモニターするのに役立つ。例えば、移植を受けた患者は、免疫抑制剤を服用する可能性が高く、したがって一般により感染しやすい。同様に、妊娠女性はその免疫系において変化を有し、かくして、母親および/または胎児に対して有害な効果を有し得る病原体による感染により罹りやすい。また、特定の型の癌は感染性因子と関連し(例えば、肝臓癌はB型肝炎およびC型肝炎感染と関連し、子宮頸癌はヒトパピローマウイルス感染と関連する)、感染性因子の同定は臨床結果を予測するか、または患者のための医学的処置の好ましい経過を決定するのに有益であってよい。

40

【0036】

かくして、特定の態様においては、本発明は、アッセイが、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが、ゲノム領域中の、またはそれと関連する1つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で、混合試料に導入する工程；第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定オリゴヌクレオチドが少なくとも1つの情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズす

50

ることができる条件下で、混合試料に導入する工程；第3のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、固定配列オリゴヌクレオチドが、感染性因子を示す遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で、混合試料に導入する工程；ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、遺伝子座に相補的な連続的連結産物を作製する工程；連続的連結産物を増幅させて、増幅産物を作製する工程；ならびに増幅産物を検出する工程を含む、単一のアッセイを用いて、混合試料中の発生源寄与の算出、ゲノム領域のCNVの存在または非存在、ならびに感染性因子の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムを提供する。増幅産物の検出は、混合試料中のゲノム領域のコピー数および感染性因子の存在または非存在と相関する。

【0037】

10

別の一般的な態様においては、アッセイシステムは、混合試料中の第1の目的の染色体から1つ以上の選択遺伝子座を増幅する工程；混合試料中の第2の目的の染色体から1つ以上の選択遺伝子座を増幅する工程；第1および第2の目的の染色体に由来する選択領域の相対頻度を決定する工程、第1および第2の目的の染色体に由来する選択領域の相対頻度を比較する工程；ならびに選択領域の比較された相対頻度に基づいて異常の存在または非存在を同定する工程を含む、ゲノム領域中のCNVと関連する染色体異常の存在または非存在を決定するための方法を用いる。好ましくは、それぞれの染色体から2つ以上の核酸領域を選択し、より好ましくは、それぞれの染色体から5つ以上の遺伝子座を選択する。

【0038】

20

さらに別の一般的な態様においては、アッセイシステムは、混合試料中の第1の目的の染色体に対応するcfDNA中の2つ以上の選択遺伝子座を増幅する工程；混合試料中の第2の目的の染色体に対応するcfDNA中の2つ以上の選択遺伝子座を増幅する工程、第1および第2の目的の染色体に由来する選択領域の相対頻度を決定する工程、第1および第2の目的の染色体に由来する選択領域の相対頻度を比較する工程、ならびに選択領域の比較された相対頻度に基づいて異数性の存在または非存在を同定する工程を含む、個体から得た混合試料中の異数性の存在または非存在の決定のための方法を用いる。具体的な態様においては、第1および第2の染色体の遺伝子座を単一の反応中で、好ましくは単一の容器内に含まれる単一の反応中で増幅する。

【0039】

30

好ましくは、アッセイシステムは、血液、血漿、血清などの被験体から容易に取得することができる試料中の遺伝子座の存在または非存在を検出する。1つの一般的な態様においては、アッセイシステムは、混合試料中のcfDNA中の選択領域の検出を用いる。1つのより具体的な態様においては、アッセイシステムは、ゲノム領域中のCNVの存在または非存在および1つ以上の遺伝子座における多型の存在または非存在を同定するために個体から得た混合試料のcfDNA中の選択領域の検出を用いる。ゲノム領域内のコピー数を、選択遺伝子座の量の検出ならびに別のゲノム領域に由来する選択遺伝子座の量および/または参照ゲノム領域に由来する選択遺伝子座の量との比較に基づいて決定することができる。特定の態様においては、核酸の頻度の比率を、遺伝的に「正常な」被験体、すなわち、アッセイシステムにおいて調査される特定の遺伝子座と関連するCNVを有さない被験体の統計的に有意な集団について決定される参照平均比率と比較する。

40

【0040】

本発明の好ましい態様においては、選択核酸に対応する増幅産物を、選択遺伝子座の分析のために個々の分子として単離する。これらの個々の増幅産物を、互いに単離する、および好ましくは物理的に単離する（例えば、基質上で、または個々の容器中で）。単離後に個々の分子をさらに増幅して、複数の同一コピーの増幅産物、その一部、または増幅産物もしくはその一部に相補的な核酸を作製することができる。

【0041】

好ましい態様においては、個々の増幅産物は配列決定を通じて分析される。他の態様においては、個々の増幅産物はハイブリダイゼーション技術を用いて分析される。

50

選択遺伝子座のコピー数を、非多型検出方法、すなわち、選択核酸領域を同定するための特定の多型の存在または非存在に依存しない検出方法を用いて検出することができることが本発明の特徴である。好ましい態様においては、アッセイ検出システムは、混合試料中に存在する選択遺伝子座の相対数を「計測する」ための非多型検出方法を用いる。これらの数を用いて、統計的に、混合試料が混合試料内の多いおよび/または少ない発生源中のゲノム領域中にCNVを有する可能性があるかどうかを決定することができる。同様に、これらの数を用いて、統計的に、多い発生源および/または少ない発生源に由来する核酸が1つ以上の多型を有するかどうかを決定することができる。そのような情報を用いて、特定の病状または遺伝的障害を同定する、疾患または障害の診断または再発を確認する、疾患または障害の予後を決定する、潜在的な治療選択肢を決定するのを補助することなどができる。

10

【0042】

いくつかの態様においては、前記アッセイシステムにより用いられる異数性の決定のための方法は、試料中の2つ以上の染色体に由来する複数の選択遺伝子座のコピー数変動を測定する。特定の染色体に対応する異なる選択遺伝子座のレベルを個別に定量および比較して、混合試料中の1つ以上の細胞源中の染色体異数性の存在または非存在を決定することができる。個別に定量された領域は、正規化計算を受けてもよく、またはそのデータを外れ値除外にかけた後、比較して、混合試料中の異数性の存在または非存在を決定してもよい。

【0043】

20

他の態様においては、選択遺伝子座の相対頻度を用いて、第1および第2の目的の染色体の染色体頻度を決定し、異数性の存在または非存在は第1および第2の目的の染色体の比較された染色体頻度に基づく。

【0044】

さらに他の態様においては、選択遺伝子座の相対頻度を用いて、目的の染色体および参照染色体の染色体頻度を決定し、異数性の存在または非存在は目的の染色体および参照染色体の比較された染色体頻度に基づく。

【0045】

本発明のアッセイシステムは好ましくは高度に多重化されたシステムとして配置されるため、個々の試料および/または複数の試料内の単一または複数の染色体に由来する複数の遺伝子座を同時に分析することができる。そのような多重化されたシステムにおいては、試料を別々に分析するか、またはより多数の試料の分析のためにそれらを2つ以上の群に最初にプールすることができる。プールされたデータが得られる場合、好ましくはそのようなデータを異なる試料について同定した後、異数性の分析を行う。しかしながら、いくつかの態様においては、プールされたデータを潜在的なCNVについて分析し、最初の結果が、異数性の可能性がプールされた群内で検出されたことを示す場合、その群に由来する個々の試料を続いて分析することができる。

30

【0046】

特定の態様においては、アッセイシステムは、特定の試料に関する情報を提供する1つ以上の指標を用いる。例えば、指標は、核酸が増幅された試料を示唆する選択的または普遍的増幅において用いることができる。

40

【0047】

1つの特定の態様においては、選択遺伝子座を単離した後、検出する。分析のために混合試料中に存在する特定の核酸を選択的に単離する任意の手段、例えば、ハイブリダイゼーション、増幅または混合試料からの核酸の他の形態の配列に基づく単離を用いて、選択遺伝子座を混合試料から単離することができる。単離後、選択核酸を、混合試料中のそれぞれの選択核酸の配列および/または相対量の決定のために、好適な検出形式に、例えば、マイクロアレイ上、またはフローセル中に個々に分配する。検出された核酸の相対量は、混合試料中に存在する選択核酸に対応する染色体のコピー数を指示する。

【0048】

50

好適な形式での選択核酸の単離および分配後、選択配列を、例えば、選択配列の配列決定を通じて同定する。

1つの具体的な態様においては、本発明は、母体および胎児のcfDNAを含む混合試料を提供する工程、混合試料中の第1および第2の目的の染色体に由来する2つ以上の選択遺伝子座を増幅する工程、混合試料中の第1および第2の目的の染色体に由来する2つ以上の選択遺伝子座を増幅する工程、目的の染色体に由来する選択領域の相対頻度を決定する工程、第1および第2の目的の染色体に由来する選択遺伝子座の相対頻度を比較する工程、ならびに選択遺伝子座の比較された相対頻度に基づいて胎児異数性の存在または非存在を同定する工程を含む、胎児異数性の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムを提供する。

10

【0049】

いくつかの具体的な態様においては、ゲノム領域に由来する遺伝子座の相対頻度を個々に算出し、個々の遺伝子座の相対頻度を比較して、染色体異常の存在または非存在を決定する。他の具体的な態様においては、選択遺伝子座の相対頻度を用いて、第1および第2の目的の染色体ならびに参照染色体の染色体頻度を決定し、染色体または染色体のゲノム領域に関するコピー数変動は、第1および第2の目的の染色体の比較された染色体頻度に基づく。

【0050】

分析に用いられる混合試料は、本発明のアッセイシステムを用いて分析しようとする目的の核酸を含有する任意の試料から取得または誘導することができる。例えば、混合試料は、限定されるものではないが、母体血漿、母体血清、または母体血液を含む、母体および胎児の両方の無細胞核酸を含む任意の母体体液に由来するものであってよい。移植患者に由来する混合試料は、ドナー細胞および患者の細胞の両方に由来する無細胞核酸を含有する任意の液体または組織であってよい。悪性腫瘍を有する患者からの混合試料は、患者の正常な、健康な組織に由来する無細胞核酸ならびに癌細胞に由来する無細胞核酸を含む。

20

【0051】

アッセイシステムは、混合試料中のcfDNAを検出するために用いられることが好ましいが、特定の態様においては、本発明のアッセイシステムを用いて分析される目的のDNAは、多い細胞種および少ない細胞種に由来するDNAを含有する混合試料に由来するよりもむしろ、異なる細胞種に直接由来するDNAを含む。そのような試料は、標的DNAに依存する様々な発生源から取得することができる。例えば、分析のための胎児細胞を、羊水、胎盤（例えば、絨毛膜）などの試料から誘導することができる。ドナー器官の試料は、生検により個体中で取得することができる。感染性生物は個体から直接単離し、単離後に分析することができる。DNAは癌細胞または組織から抽出し、分析に用いることができる。

30

【0052】

混合試料から単離され、前記アッセイシステムにおいて検出される実質的な大部分の核酸が、混合試料中の特定の遺伝子座の存在、量および/または多型性に関連する情報を提供することが本発明の別の特徴である。これにより、本発明のアッセイシステムにおいて分析される大部分の核酸が情報を有することが確保される。

40

【0053】

いくつかの態様においては、複数の選択遺伝子座のセットをそれぞれのゲノム領域について調査し、混合試料中に存在する選択領域のセットの量を個々に合計して、混合試料中のゲノム領域の相対頻度を決定する。これは、混合試料中に存在する組み合わせた母体および胎児のDNAに関する遺伝子座の頻度の決定を含む。好ましくは、決定は別々の発生源に由来するDNA間の区別を必要としないが、特定の態様においては、この情報は、全体として試料中の相対頻度の情報に加えて取得することができる。

【0054】

好ましい態様においては、情報遺伝子座に対応する選択核酸を検出、合計して、混合試

50

料中のゲノム領域の相対頻度を決定する。混合試料中の第2の遺伝子座に由来する遺伝子座と比較した場合に第1のゲノム領域に由来する遺伝子座について予想されるものよりも高い頻度は、混合試料中の第1のゲノム領域のCNVを指示する。

【0055】

ゲノム領域の比較は、染色体の一部または全部の比較であってよい。例えば、CNVについて検出されたゲノム領域は、両方が異数性である可能性が最小である場合、胎児における全染色体（例えば、第18および21染色体）であってよい。これはまた、一方が異数性であると推定され（例えば、第21染色体）、他方が参照染色体（例えば、第2染色体などの常染色体）として作用する染色体の比較であってよい。さらに他の態様においては、比較は、異数性であると推定される2つ以上の染色体および1つ以上の参照染色体を用いることができる。

10

【0056】

1態様においては、本発明のアッセイシステムは、目的の染色体上の選択遺伝子座を表す複数の核酸を分析し、試料に由来するそれぞれの選択遺伝子座の相対頻度を分析して、試料中のそれぞれの特定の目的の染色体に関する相対染色体頻度を決定する。次いで、2つ以上の染色体またはその一部の染色体頻度を比較して、染色体異常が存在するかどうかを統計的に決定する。

【0057】

別の態様においては、本発明のアッセイシステムは目的の染色体上の選択遺伝子座の複数コピーのセットを分析し、試料に由来するそれぞれの選択遺伝子座の相対頻度を分析し、独立に定量して、試料中のそれぞれの選択遺伝子座に関する頻度を決定する。試料中の遺伝子座の合計を比較して、混合試料中の1つの発生源のゲノム領域中の1つ以上の遺伝子座についてCNVが存在するかどうかを統計的に決定する。

20

【0058】

別の態様においては、それぞれの染色体上の遺伝子座のサブセットを分析して、染色体異常が存在するかどうかを決定する。遺伝子座頻度を特定の染色体について合計し、遺伝子座の合計を用いて異数性を決定することができる。本発明のこの態様は、それぞれのゲノム領域中の個々の遺伝子座の頻度を合計した後、ある染色体のゲノム領域上の遺伝子座の合計を別の染色体のゲノム領域に対して比較して、染色体異常が存在するかどうかを決定する。遺伝子座のサブセットを無作為であるが、染色体異常が存在するかどうかを決定する際に統計的に有意な結果をもたらすのに十分な数の遺伝子座を用いて選択することができる。異なる遺伝子座のサブセットの複数の分析を混合試料内で実施して、より高い統計力を得ることができる。別の態様においては、試料間であまり変動しないことが知られるか、または染色体頻度の決定に用いられるデータを制限することにより、例えば、試料内の非常に高いか、もしくは非常に低い頻度を有する遺伝子座に由来するデータを無視することにより、特定の遺伝子座を選択することができる。

30

【0059】

特定の態様においては、1つ以上の特定の遺伝子座の測定された量を正規化して、試料中の遺伝子座の量の差異を説明する。アッセイシステム（例えば、温度、試薬ロットの相違）、試料の基本的な生物学（例えば、核酸含量）、操作者の相違、または任意の他の変数などの発生源に由来する既知の変動を正規化することにより、これを行うことができる。

40

【0060】

特定の具体的な態様においては、混合試料中の少ない発生源に由来する核酸の相対割合の決定が、その試料中の少ない発生源内のコピー数変動を示し得る遺伝子座の相対的な統計的存在に関する重要な情報を提供するため、アッセイシステムを実施するのに有益であり得る。少ない発生源に由来する混合試料に寄与した遺伝子座の決定は、目的のゲノム領域に関する頻度の統計的に有意な差異を算出するのに用いられる情報を提供することができる。かくして、そのような遺伝子座は、アッセイにおいて2つの形態の情報を提供することができる - 対立遺伝子情報は混合試料中の少ない細胞の寄与率を決定するのに用いる

50

ことができ、対立遺伝子情報の合計は混合試料中のその遺伝子座の相対的な全体の頻度を決定するのに用いることができる。対立遺伝子情報はその遺伝子座の相対的な全体の頻度を決定するのに必要とされない。

【0061】

別の具体的な態様においては、本発明のアッセイシステムを用いて、細胞集団中の潜在的なモザイク現象、ならびに多いおよび/または少ない発生源におけるモザイク現象の同定を確認するためにさらなる確認試験を行うべきであるかどうかを決定することができる。特定の例においては、混合試料中の少ない発生源に由来する核酸のパーセントの決定は、モザイク現象の見積もられたレベルの定量を補助することができる。続いて、特定の細胞または組織におけるモザイクの完全または部分的な異数性を識別することができる他の試験法を用いて、モザイク現象を確認することができる。

10

【0062】

さらに別の具体的な態様においては、本発明のアッセイシステムを用いて、少ない種が夾雑種である、試料中の夾雑を決定することができる。

別の態様においては、所与の選択核酸のオリゴヌクレオチドを、環状または単分子プローブがそれに結合することができるように、非配列特異的末端で接続することができる。この態様においては、環状プローブの3'末端および5'末端は、選択遺伝子座に結合し、少なくとも1つのユニバーサル増幅領域が環状プローブの選択されていない特異的配列中に存在する。

【0063】

20

増幅産物を、初期混合試料から多型領域の富化を要することなく直接分析することができることがアッセイの重要な特徴である。かくして、本発明は、選択遺伝子座の配列決定の前に介入多型富化工程を行うことなく母体試料に由来するCNVおよび多型の両方の検出を可能にする。

【0064】

選択増幅および検出の標的化手法を用いてCNVおよび発生源寄与の両方を決定することが、アッセイの別の重要な特徴である。これにより、アッセイにおいて集められた情報の大部分がCNVおよび/または発生源寄与の決定にとって有用になり、参照配列と整理させなければならない配列リードを生成させる必要性を取り除くことができる。

【0065】

30

これらのおよび他の態様、特徴および利点を本明細書に記載のようにより詳細に提供する。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】本発明のアッセイシステムにおいて用いられる全工程の単純化された流れ図。

【図2】本発明の連結に基づくアッセイシステムの第1の全体図。

【図3】本発明の連結に基づくアッセイシステムの第2の全体図。

【図4】本発明の連結に基づくアッセイシステムの第3の全体図。

【図5】本発明の1アッセイシステムを用いて得られた遺伝子型決定性能を例示する図。

【図6】本発明のアッセイを用いた胎児パーセントの決定の結果を例示するグラフ。

40

【図7】母体試料の2つのコホートに関する異数性および多型の検出に用いられる要素を示す図。

【図8-1】妊娠被験体の第2のコホートのサブセットに関する患者の概要および試料情報およびデータを示す図。

【図8-2】妊娠被験体の第2のコホートのサブセットに関する患者の概要および試料情報およびデータを示す図。

【図8-3】妊娠被験体の第2のコホートのサブセットに関する患者の概要および試料情報およびデータを示す図。

【図8-4】妊娠被験体の第2のコホートのサブセットに関する患者の概要および試料情報およびデータを示す図。

50

【図 8 - 5】妊娠被験体の第 2 のコホートのサブセットに関する患者の概要および試料情報およびデータを示す図。

【図 9】第 1 のコホートに関して本発明の 1 態様を用いて達成された第 2 1 染色体の異数性検出を例示する図。

【図 10】第 1 のコホートに関して本発明の 1 態様を用いて達成された第 1 8 染色体の異数性検出を例示する図。

【図 11】第 2 のコホートに関して本発明の 1 態様を用いて達成された第 2 1 染色体の異数性検出を例示する図。

【図 12】第 2 のコホートに関して本発明の 1 態様を用いて達成された第 1 8 染色体の異数性検出を例示する図。

【発明を実施するための形態】

【0067】

(定義)

本明細書で用いられる用語は、当業者によって理解されるような平易で通常の意味を有することが意図される。以下の定義は、読者が本発明を理解するのを助けることを意図されるものであって、具体的に指摘しない限りそのような用語の意味を変化させるか、またはさもなければ制限することを意図されるものではない。

【0068】

用語「増幅された核酸」は、混合試料中のその出発量と比較して、インビトロ (in vitro) で実施された任意の核酸増幅法または複製方法によって量が少なくとも 2 倍増加した任意の核酸分子である。

【0069】

本明細書で用いられる用語「増幅産物」とは、鋳型として連続的連結産物を用いる増幅反応から生じる産物、または鋳型として連続的連結産物に相補的な分子を用いる増幅反応から生じる産物を指す。

【0070】

用語「染色体異常」とは、単一の遺伝子座よりも大きい染色体の全部または一部に影響する任意の遺伝的变化を指す。遺伝子変異体は、限定されるものではないが、増幅または欠失、転座、逆位、および突然変異などの任意の CNV を含んでもよい。染色体異常の例としては、限定されるものではないが、ダウン症候群 (トリソミー 21)、エドワード症候群 (トリソミー 18)、パトー症候群 (トリソミー 13)、クラインフェルター症候群 (XXY)、トリプル X 症候群、XY Y 症候群、トリソミー 8、トリソミー 16、ターナー症候群、ロバートソン転座、ディジョージ症候群およびヴォルフ・ヒルシュホルン症候群が挙げられる。

【0071】

用語「相補的」または「相補性」は、塩基対形成規則により関連する核酸分子 (すなわち、ヌクレオチドの配列) を参照して用いられる。相補的ヌクレオチドは、一般に、A と T (もしくは A と U)、または C と G である。2 つの一本鎖 RNA または DNA 分子は、最適に整列され、好適なヌクレオチド挿入または欠失を有する、一方の鎖のヌクレオチドが、少なくとも約 90% ~ 約 95% の相補性、およびより好ましくは約 98% ~ 約 100% の相補性、およびさらにより好ましくは 100% の相補性で対形成する場合、実質的に相補的であると言われる。あるいは、RNA または DNA 鎖がその相補体を選択的ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする場合、実質的な相補性が存在する。選択的ハイブリダイゼーション条件としては、限定されるものではないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が挙げられる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、典型的には、約 1 M 未満、より通常は約 500 mM 未満および好ましくは約 200 mM 未満の塩濃度を含む。ハイブリダイゼーション温度は、一般に、融点 (T_m) よりも少なくとも約 2 ~ 約 6 低い。

【0072】

本明細書で互換的に用いられる用語「コピー数変動」または「CNV」は、DNA 中の

10

20

30

40

50

1つ以上の遺伝子座の異常な数のコピーを有する細胞をもたらすゲノムのDNAの変化である。臨床的に関連するCNVは、単一の遺伝子に限られるか、または遺伝子の連続するセットを含んでもよい。CNVはまた、完全な染色体の1つ以上のさらなるコピーを含むものまで、特定の染色体上で欠失、逆位または複製したゲノムの比較的大きい領域に一致してもよい。本明細書で用いられる用語「CNV」は、任意の配列関連情報を指すものではなく、むしろ試料中に存在する遺伝子領域の量または「計数」を指すものである。

【0073】

用語「補正指標」とは、増幅、配列決定または配列決定中の1つ以上の塩基の欠失、置換もしくは挿入ならびにオリゴ合成、増幅、およびアッセイの他の態様などの配列決定の外部で起こり得るヌクレオチド変化の検出を含む他の実験誤差の同定および補正を可能にするさらなるヌクレオチドを含んでもよい指標を指す。これらの補正指標は、別々の配列である独立指標であってよく、またはそれらを他の領域内に埋込んで、用いられる実験技術の正確度を確保するのに助けることができる、例えば、補正指標はユニバーサル増幅に用いられる配列のサブセットまたは試料遺伝子座のヌクレオチドのサブセットであってもよい。

10

【0074】

本明細書で用いられる用語「診断ツール」とは、例えば、診断試験または患者試料に対するアッセイを実行するためのシステムにおいて組み合わせて用いられる本発明の任意の組成物またはアッセイを指す。

【0075】

用語「疾患形質」とは、病理学的状態、例えば、疾患、障害、症候群または素因と関連する単一遺伝子または多遺伝子形質を指す。

20

本明細書で用いられる用語「ゲノム領域」とは、ゲノム中に連続的様式で通常認められる1つ以上の遺伝子座の任意の領域を指す。ゲノム領域は、最大で染色体全体を含むものまでサイズが変化してもよい。

【0076】

用語「ハイブリダイゼーション」は一般に、核酸の相補鎖の対形成が起こる反応を意味する。DNAは通常二本鎖であり、鎖が分離された場合、それらは好適な条件下で再度ハイブリダイズする。ハイブリッドはDNA-DNA、DNA-RNAまたはRNA-RNAの間で形成することができる。それらは、短い鎖と、短い鎖に相補的な領域を含む長い鎖との間で形成することができる。不完全なハイブリッドも形成することができるが、それらがより不完全であるほど、それらはより不安定である（形成する可能性が低くなる）。

30

【0077】

本明細書で用いられる用語「情報遺伝子座」とは、特定の染色体またはある染色体の全部もしくは一部のCNVを決定する目的で調査されたその染色体の一部の上のある細胞源にとってホモ接合性であり、第2の細胞源にとってヘテロ接合性である遺伝子座を指す。本発明のアッセイシステムにおける使用のための情報遺伝子座としては、参照染色体の調査のために用いられる遺伝子座ならびに細胞源中で異数性であると推定される染色体の調査のために用いられる遺伝子座が挙げられる。情報遺伝子座はまた、単一の個体内の異なる個体に由来する細胞源中の遺伝子座のコピー数を識別することもできる（例えば、移植レシピエントにおける移植ドナー細胞の検出または母体混合試料内の胎児DNAの検出）。

40

【0078】

本明細書で用いられる用語「遺伝子座」とは、ゲノム中の既知の位置の遺伝子座を指す。

用語「多い発生源」とは、ある個体由来の試料中の核酸（当該個体において支配的なゲノム材料を表す）の発生源を指す。

【0079】

本明細書で用いられる用語「母体試料」とは、胎児および母体の両方の無細胞ゲノム材

50

料（例えば、DNA）を含む妊娠した哺乳動物から採った任意の試料を指す。好ましくは、本発明における使用のための母体試料は、比較的非侵襲的な手段、例えば、静脈切開術または被験体から末梢試料を抽出するための他の標準的な技術により得られる。

【0080】

用語「融解温度」または「 T_m 」は、一般的に二本鎖核酸分子の集団の半分が一本鎖に解離するようになる温度と定義される。核酸の T_m を算出するための式は当業界で周知である。標準的な参考文献により示されるように、 T_m 値の単純な見積もりを、核酸が0.5 M以下の陽イオン濃度を有する水溶液中にあり、(G+C)含量が30%~70%であり、nが塩基数であり、mが塩基対不一致の割合である場合、式： $T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% [G+C]) - 675 / n - 1.0m$ により算出することができる（例えば、サムブルック ジェイら (Sambrook J et al.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)を参照されたい)。他の参考文献は、 T_m の算出のために構造ならびに配列の特徴を考慮に入れる、より洗練された計算を含む。

10

【0081】

「マイクロアレイ」または「アレイ」とは、アレイのそれぞれの部位が、実質的に同一の、または同一のコピーのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドからなり、空間的に規定され、アレイの他のメンバーの部位と重複しない、すなわち、部位が空間的に別個のものであるような核酸を含有する部位のアレイを担持する、表面、好ましくは全く平面的ではなく、または実質的に平面的な表面を有する固相支持体を指す。アレイまたはマイクロアレイはまた、ビーズまたはウェルなどの表面を有する非平面的な調査可能な構造からなってもよい。アレイのオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを固相支持体に共有結合させるか、または非共有結合させることができる。従来のマイクロアレイ技術は、例えば、シーナ (Schena), Ed., *Microarrays: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (2000)に概説されている。「アレイ分析」、「アレイによる分析」または「マイクロアレイによる分析」とは、例えば、マイクロアレイを用いる1つ以上の生物分子の配列分析などの分析を指す。

20

【0082】

用語「少ない発生源」とは、限られた量で存在し、そのゲノム構成および/または発現における差異に起因して多い発生源から識別可能である、個体内の核酸の発生源を指す。少ない発生源の例としては、限定されるものではないが、妊娠女性における胎児細胞、悪性腫瘍を有する患者における癌細胞、移植患者におけるドナー器官に由来する細胞、感染した宿主における感染性生物に由来する核酸などが挙げられる。

30

【0083】

本明細書で用いられる用語「混合試料」とは、一方が多い発生源であり、他方が単一の個体内の少ない発生源である、2つ以上の目的の細胞種（細胞タイプ）に由来する無細胞ゲノム材料（例えば、DNA）を含む任意の試料を指す。混合試料の例としては、母体試料（例えば、母体および胎児の両方のDNAを含む母体の血液、血清または血漿）、ならびに末梢由来体細胞試料（例えば、異なる細胞種、例えば、造血細胞、間葉細胞、および他の器官系に由来する循環細胞を含む血液、血清または血漿）が挙げられる。混合試料は、個体における多い発生源および少ない発生源の両方に由来するゲノム材料を含む試料を含み、例えば、正常な体細胞および非定型体細胞、または2つの異なる個体に由来するゲノムを含む細胞であってよく、2つの異なる個体に由来するとは、例えば、母体および胎児の両方のゲノム材料を含む試料、またはドナーおよびレシピエントの両方に由来する細胞を含む移植患者に由来する試料を含む。

40

【0084】

本明細書で用いられる用語「単一遺伝子形質」とは、単一の遺伝子中の突然変異または多型と関連する、正常な、または病理学的な任意の形質を指す。そのような形質としては

50

、単一の遺伝子における機能障害により引き起こされる疾患、障害、または素因と関連する形質が挙げられる。形質はまた、非病理学的特徴（例えば、特定の細胞種上の細胞表面分子の存在または非存在）も含む。

【0085】

用語「非母体」対立遺伝子は、胎児対立遺伝子（*de novo*でのSNPもしくは突然変異を有する対立遺伝子）および/または親対立遺伝子中に認められるが、母体対立遺伝子中には認められない多型および/または突然変異を有する対立遺伝子を意味する。

【0086】

選択遺伝子座の検出に関して用いられる場合、「非多型」とは、1つ以上の多型を含んでもよいが、検出が領域内の特定の多型の検出に依らない、そのような遺伝子座の検出を意味する。かくして、選択遺伝子座は多型を含んでもよいが、本発明のアッセイシステムを用いる領域の検出は、その領域中の特定の多型の存在または非存在よりもむしろ領域の発生に基づく。

【0087】

本明細書で用いられる「ヌクレオチド」とは、塩基 - 糖 - リン酸の組合せを指す。ヌクレオチドは、核酸配列（DNAおよびRNA）のモノマー単位である。用語「ヌクレオチド」は、リボヌクレオシド三リン酸ATP、UTP、CTG、GTPおよびdATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTPなどのデオキシリボヌクレオシド三リン酸、またはその誘導体を含む。そのような誘導体としては、例えば、[S]dATP、7-デアザ-dGTPおよび7-デアザ-dATP、ならびにヌクレオチド誘導体を含む核酸分子に対してヌクレアーゼ耐性を付与するヌクレオチド誘導体が挙げられる。本明細書で用いられる用語「ヌクレオチド」はまた、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ddNTP）およびその誘導体をも指す。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例としては、限定されるものではないが、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、およびddTTPが挙げられる。

【0088】

本発明によれば、「ヌクレオチド」は標識されていないか、または周知の技術により検出可能に標識されていてもよい。蛍光標識およびオリゴヌクレオチドへのその付着は、ハウグランド（Haugland）、*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 9th Ed.*, Molecular Probes, Inc., Eugene OR (2002); ケラー（Keller）およびマナク（Manak）、*DNA Probes, 2nd Ed.*, Stockton Press, New York (1993); エクステイン（Eckstein）、*Ed.*, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991); ウェットムール（Wetmur）、*Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 227-259 (1991)などの多くの概説に記載されている。本発明に適用可能な他の方法は、以下の参考文献：ファングら（Fung et al.）、米国特許第4,757,141号；ホブス ジュニアら（Hobbs, Jr., et al.）、米国特許第5,151,507号；クルイクシャンク（Cruickshank）、米国特許第5,091,519号；メンチェンら（Menchen et al.）、米国特許第5,188,934号；ベゴットら（Begot et al.）、米国特許第5,366,860号；リーら（Lee et al.）、米国特許第5,847,162号；カナラ（Khanna et al.）、米国特許第4,318,846号；リーら（Lee et al.）、米国特許第5,800,996号；リーら（Lee et al.）、米国特許第5,066,580号；マチエスら（Mathies et al.）、米国特許第5,688,648号などに開示されている。以下の特許および特許公開：米国特許第6,322,901号；第6,576,291号；第6,423,551号；第6,251,303号；第6,319,426号；第6,426,513号；第6,444,

10

20

30

40

50

143号；第5,990,479号；第6,207,392号；米国特許出願公開第2002/0045045号および第2003/0017264号に開示されたような、量子ドットを用いて標識を実行することもできる。検出可能な標識としては、例えば、放射性アイソトープ、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識および酵素標識が挙げられる。ヌクレオチドの蛍光標識は、限定されるものではないが、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン(R6G)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、4-(4'ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)、カスケードブルー、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニンおよび5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)を含んでもよい。蛍光標識されたヌクレオチドの具体例としては、パーキンエルマー社(Perkin Elmer) [米国カリフォルニア州フォスターシティ(Foster City)所在]から入手可能な[R6G]dUTP、[TAMRA]dUTP、[R110]dCTP、[R6G]dCTP、[TAMRA]dCTP、[JOE]ddATP、[R6G]ddATP、[FAM]ddCTP、[R110]ddCTP、[TAMRA]ddGTP、[ROX]ddTTP、[dR6G]ddATP、[dR110]ddCTP、[dTAMRA]ddGTP、および[dROX]ddTTP；アマシャム社(Amersham) [米国イリノイ州アーリントンハイツ(Arlington Heights)所在]から入手可能なFluoroLink Deoxy Nucleotides、FluoroLink Cy3-dCTP、FluoroLink Cy5-dCTP、FluoroLink FluorX-dCTP、FluoroLink Cy3-dUTP、およびFluoroLink Cy5-dUTP；ベーリンガーマンハイム社(Boehringer Mannheim) [米国インディアナ州インディアナポリス(Indianapolis)所在]から入手可能なフルオレセイン-15-dATP、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチル-ローダミン-6-dUTP、IR770-9-dATP、フルオレセイン-12-ddUTP、フルオレセイン-12-UTP、およびフルオレセイン-15-2'-dATP；ならびにモレキュラープローブ社(Molecular Probes) [米国オレゴン州ユージーン(Eugene)所在]から入手可能なChromosomee Labeled Nucleotides、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、カスケードブルー-7-UTP、カスケードブルー-7-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、フルオレセイン-12-dUTP、オレゴングリーン488-5-dUTP、ローダミングリーン-5-UTP、ローダミングリーン-5-dUTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、テキサスレッド-5-UTP、テキサスレッド-5-dUTP、およびテキサスレッド-12-dUTPが挙げられる。

【0089】

本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」または「オリゴ」とは、ワトソン-クリック型の塩基対形成、塩基スタッキング、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型の塩基対形成などの規則的なパターンのモノマー間相互作用により一本鎖ポリヌクレオチドに特異的に結合することができる、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、そのアノマー形態、ペプチド核酸モノマー(PNA)、ロックドヌクレオチド酸モノマー(LNA)など、またはその組合せを含む天然または改変核酸モノマーの線状オリゴマーを指す。通常、モノマーはホスホジエステル結合またはその類似体により連結されて、数個のモノマー単位、例えば、8~12個から数十個のモノマー単位、例えば、100~200個以上の大きさの範囲のオリゴヌクレオチドを形成する。好適な核酸分子を、ボーケージ(Beaucage)およびカルターズ(Carruthers)(Tetrahedron Lett., 22:1859-1862(1981))により記載されたホ

スホルアミダイト法により、またはマテウッチら (Matteucci et al.) (J. Am. Chem. Soc., 103: 3185 (1981)) によるトリエステル法により (両方とも本明細書に援用する)、または市販の自動化オリゴヌクレオチド合成装置を用いるなどの他の化学的方法により調製することができる。

【0090】

本明細書で用いられる用語「多遺伝子形質」とは、2つ以上の遺伝子における突然変異または多型と関連する正常な、または病理学的な任意の形質を指す。そのような形質としては、2つ以上の遺伝子における機能障害により引き起こされる疾患、障害、症候群、または素因と関連する形質が挙げられる。形質はまた、2つ以上の遺伝子の相互作用と関連する非病理学的特徴をも含む。

10

【0091】

本明細書で用いられる用語「ポリメラーゼ」とは、鋳型として別の鎖を用いて、個々のヌクレオチドを長い鎖と一緒に連結する酵素を指す。2つの一般的な種類のポリメラーゼ-DNAを合成するDNAポリメラーゼ、およびRNAを合成するRNAポリメラーゼが存在する。これらの2つのクラスの中に、どの種類の核酸が鋳型として機能することができ、どの種類の核酸が形成されるかに応じて、いくつかのサブタイプのポリメラーゼが存在する。

【0092】

本明細書で用いられる「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、過剰の非特異的DNAの存在下でも、*in vitro*で選択DNAの特定の小片を複製するための技術 20を指す。プライマーを選択DNAに添加すると、プライマーはヌクレオチドおよび典型的には、Taqポリメラーゼなどを用いて選択DNAのコピーを開始する。温度を循環させることにより、選択DNAは変性およびコピーを繰り返す。他の無作為のDNAと混合した場合でも、1コピーの選択DNAを増幅して、数十億の複製物を得ることができる。ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、非常に少量のDNAを検出および測定し、DNAの特製小片を作製することができる。いくつかの例においては、線状増幅法をPCRの代替として用いることができる。

20

【0093】

本明細書で用いられる用語「多型」とは、限定されるものではないが、単一ヌクレオチド多型 (SNP)、メチル化差異、ショートタンデムリピート (STR)、単一遺伝子多型、点突然変異、トリヌクレオチドリピート、インデルを含む任意の遺伝子変化または遺伝子座の配列変異体を指す。

30

【0094】

一般に、「プライマー」は、ポリメラーゼ連鎖反応の合成工程または特定の配列決定反応において用いられるプライマー伸長技術などにおいて主DNAの伸長、連結および/または合成を準備するのに用いられるオリゴヌクレオチドである。プライマーはまた、特定の遺伝子座の検出のための捕捉オリゴヌクレオチドに遺伝子座の相補性を提供するための手段としてハイブリダイゼーション技術において用いることもできる。

【0095】

本明細書で用いられる用語「研究ツール」とは、薬理的および/または生物学的治療剤の開発を含む、科学的探求、事実上は学問的または商業的探求に用いられる本発明の任意の組成物またはアッセイを指す。本発明の研究ツールは、治療剤または規制認可にかけられることを意図するものではなく、むしろ、本発明の研究ツールは研究を容易にし、規制当局への提出を支援するための情報をもたらす意図をもって実施される任意の活動を含むそのような開発活動を補助することを意図されるものである。

40

【0096】

用語「試料指標」とは、一般に、一連の独自のヌクレオチド (すなわち、それぞれの試料指標は複数の試料の分析のための多重化されたアッセイシステム中の試料にとって独自である) を指す。かくして、試料指標を用いて、それぞれの試料をその試料指標に基づいて同定することができるように、単一の反応容器中の異なる試料の多重化のための遺伝子 50

50

座同定を補助することができる。好ましい態様においては、試料のセット中のそれぞれの試料について独自の試料指標が存在し、試料は配列決定の間にプールされる。例えば、12の試料が単一の配列決定反応中にプールされる場合、それぞれの試料が独自に標識されるように少なくとも12の独自の試料指標が存在する。

【0097】

本明細書で用いられる用語「選択遺伝子座」とは、例えば、コピー数、1つ以上の多型の存在または非存在、感染性生物の存在または非存在などについて調査された遺伝子座に対応する遺伝子座を指す。そのような選択遺伝子座を、ハイブリダイゼーションおよび/または他の配列に基づく技術に基づいて直接単離し、検出のために試料から増幅させるか、またはそれらを配列の検出の前に鋳型として試料を用いて増幅させることができる。本発明のアッセイシステムにおける使用のための核酸領域を、個体間のDNAレベルの変動に基づいて、特定の染色体に対する特異性に基づいて、選択遺伝子座のCG含量および/もしくは必要とされる増幅条件に基づいて、または本開示を読む際に当業者に明らかである他の特徴に基づいて選択することができる。

【0098】

本明細書で用いられる用語「配列決定 (sequencing)」、「配列決定 (sequence determination)」などは、一般に、核酸中のヌクレオチド塩基の順序を決定するのに用いることができる任意かつ全ての生化学的方法を指す。

【0099】

本明細書で用いられる用語「発生源寄与」とは、個体内の核酸の2つ以上の発生源の相対的寄与を指す。単一からの寄与は、一般に、試料からの核酸のパーセントとして決定されるが、任意の相対的測定値を用いてもよい。

【0100】

用語「特異的に結合する」、「特異的結合」などは、指定されたアッセイ条件下で統計的に有意な正のシグナルの生成をもたらす結合パートナー（例えば、核酸プローブまたはプライマー、抗体など）を指す場合に本明細書で用いられる。典型的には、続いて、相互作用は、望ましくない相互作用（バックグラウンド）の結果として生成された任意のシグナルの標準偏差の少なくとも2倍である検出可能なシグナルをもたらす。

【0101】

遺伝子との関係において本明細書で用いられる用語「状態」とは、特定の遺伝子からの翻訳および/またはタンパク質発現に影響するコード領域および非コード領域を含む、その遺伝子の対立遺伝子の配列の状態を指す。軟骨形成不全症（例えば、線維芽細胞増殖因子受容体をコードする遺伝子）もしくはハンチントン病（例えば、ハンチンチン遺伝子）、または男性胎児の場合のX連鎖疾患などの常染色体優性疾患と関連する遺伝子の状態を、罹患、すなわち、ある対立遺伝子が疾患もしくは障害の原因である突然変異を有する、または非罹患、すなわち、両方の対立遺伝子がそのような突然変異を欠く、と分類することができる。常染色体劣性疾患と関連する遺伝子またはX連鎖劣性障害と関連する母体遺伝子の状態を、罹患、すなわち、両方の対立遺伝子が疾患もしくは障害の原因となる突然変異を有する；キャリア、すなわち、ある対立遺伝子が疾患もしくは障害の原因となる突然変異を有する；または非罹患、すなわち、両方の対立遺伝子がそのような突然変異を欠く、と分類することができる。遺伝子の状態は、多遺伝子病を発症する危険性と関連する特定の対立遺伝子、例えば、特定の疾患もしくは障害に対して保護的である多型または特定の疾患もしくは障害の危険性の増強と関連する多型の存在または非存在を示唆することもできる。

【0102】

（発明の詳細な説明）

本明細書に記載のアッセイシステムおよび方法は、別途指摘しない限り、当業者の技術の範囲内にある、分子生物学（組換え技術を含む）、細胞生物学、生化学、マイクロアレイおよび配列決定技術の従来技術および説明を用いてもよい。そのような従来技術としては、ポリマーアレイ合成、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび連結

10

20

30

40

50

、オリゴヌクレオチドの配列決定、ならびに標識を用いるハイブリダイゼーションの検出が挙げられる。好適な技術の具体的な例示は、本明細書に記載の実施例を参照することにより有することができる。しかしながら、等価な従来の手順も、勿論、用いることができる。そのような従来技術および説明は、グリーンら (Green et al.), Eds., *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)* (1999); ワイナーら (Weiner et al.), Eds., *Genetic Variation: A Laboratory Manual* (2007); ディーフエンバッハ (Diefenbach), ドベクスラー (Dveksler), Eds., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (2003); ボウテル (Bowtell) およびサムブルック (Sambrook), *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (2003); マウント (Mount), *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2004); サムブルック (Sambrook) およびラッセル (Russell), *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2006); ならびにサムブルック (Sambrook) およびラッセル (Russell), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2002) (全て Cold Spring Harbor Laboratory Press から); ストライヤー エル (Stryer, L.), *Biochemistry* (4th Ed.) ダブルユー エイチ フリーマン (W.H. Freeman), New York (1995); ゲイト (Gait), "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); ネルソン (Nelson) およびコックス (Cox), Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2000); ならびにバーグら (Berg et al.), *Biochemistry*, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002) (全てあらゆる目的でその全体を本明細書に援用する) などの標準的な実験室マニュアルに見出すことができる。本発明の組成物、研究ツールおよび方法を説明する前に、本発明が記載される特定の方法、組成物、標的および使用に限定されず、そのようなものとして、勿論、変化してもよいことが理解されるべきである。また、本明細書で用いられる用語は、特定の態様のみを説明するためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0103】

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる単数形「a」、「an」および「the」は、本文が別途明確に述べない限り、複数の指示対象を含むことに留意すべきである。かくして、例えば、「遺伝子座 (a locus)」に対する参照は、1つの領域、1より多い領域、またはそのような領域の混合物を指し、「アッセイ (an assay)」に対する参照は当業者には公知の等価な工程および方法に対する参照などを含む。

【0104】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限の間のそれぞれの途中の値およびその記述される範囲中の任意の他の記述されるか、または途中の値が本発明に包含される。記述された値が上限および下限を含む場合、これらの含まれる限界のいずれかを除く範囲も本発明に含まれる。

【0105】

明確に記述しない限り、本明細書で用いられる用語は当業者によって理解されるような平易かつ通常の意味を有することが意図される。以下の定義は、読者が本発明を理解するのに助けることを意図するものであるが、具体的に指摘しない限りそのような用語の意味を変化させるか、またはさもなければ限定することを意図するものではない。本明細書に記載の全ての刊行物は、その刊行物に記載され、本願で説明される発明と関連して用いる

10

20

30

40

50

ことができる製剤および方法を説明および開示する目的で本明細書に援用される。

【0106】

以下の説明において、いくつかの具体的な詳細を、本発明のより完全な理解を提供するために記載する。しかしながら、本発明は1つまたは複数のこれらの具体的な詳細がなくても実施することができることが当業者には明らかである。他の例においては、本発明を不明確にするのを避けるために、周知の特徴および当業者には周知の手順は記載されていない。

【0107】

(一般的な本発明)

本発明は、単一の個体からの混合試料中の疾患状態と関連するコピー数変動、多型および核酸(例えば、病原体に由来する核酸、または癌、糖尿病、アルツハイマー病などと関連する核酸)を検出する能力を有する単一のアッセイシステムを提供する。前記アッセイは、試料中の選択遺伝子座のコピー数に関する情報ならびに試料中の多い発生源および1つ以上の少ない発生源に由来する核酸の寄与の割合に関する情報を用いる、混合試料中の1つ以上の少ない発生源における遺伝子変動の同定を可能にする。これらの方法は、単一の個体中に存在する多いおよび少ない発生源に由来するゲノム材料(例えば、DNA)を含有する任意の混合試料にとって有用である。

10

【0108】

本発明のアッセイ方法における選択遺伝子座の使用は、混合試料内の1つ以上の発生源におけるコピー数変動の決定のための遺伝子座の直接検出を提供する。本発明の注目すべき利点は、コピー数変動および/または多型に対応する選択遺伝子座を、限定されるものではないが、ハイブリダイゼーション技術、デジタルPCRおよび高効率配列決定技術を含む様々な検出および定量技術を用いてさらに分析できることである。任意の染色体に関する任意の数の選択遺伝子座に対してプローブを設計することができる。選択遺伝子座の同定および定量の前の増幅は義務ではないが、検出の前に混合試料の限定的な増幅を用いて、出発材料内の核酸の全体数を拡張することができる。

20

【0109】

図1は、本発明のアッセイシステムにおいて用いられる全工程の単純化された流れ図である。図1は方法100を示し、第1の工程110において、混合された核酸試料が分析のために提供される。そのような技術は当業者には公知であるため、混合試料を実質的に任意の試料から調製することができる(例えば、ティエツ(Tietz), *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th Ed., Chapter 2, パーティスシー(Burtis, C.)アッシュウッドイー(Ashwood E.)およびブランズディー(Bruns, D.) eds. (2006); *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: Sample Collection, Preparation and Analytical Method*, メシラクソエム(Mesilaakso, M.), ed., (2005); パウリスジンジェイ(Pawliszyn, J.), *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*, (2002); ベンカテシュイエンガーギーら(Venkatesh Iyengar, G., et al.), *Element Analysis of Biological Samples: Principles and Practices* (1998); ドリエラクエス(Driellak, S.), *Hot Zone Forensics: Chemical, Biological, and Radiological Evidence Collection* (2004); ウェルズディー(Wells, D.), *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation (Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis)* (2002)(それぞれ本明細書に援用する)を参照されたい)。選択された混合試料の種類に応じて、さらなるプロセッ

30

40

50

シングおよび/または精製工程を実施して、所望の純度またはサイズの核酸断片を取得することができる。超音波処理、噴霧化、ゲル精製、PCR精製系、ヌクレアーゼ切断、またはこれらの方法の組合せを含むプロセッシング方法を用いることができるが、これらに限定されるものではない。好ましい態様においては、無細胞DNA (cfDNA)を含む試料を用いる。

【0110】

工程120で、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、混合核酸試料に、第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドが混合核酸試料にハイブリダイズすることができる条件下で導入する。第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドは、混合試料中の1つ以上の選択遺伝子座に相補的である核酸配列からなり、本明細書で詳細に説明されるように、コピー数変動および/または染色体異常を決定するのに有用である。コピー数変動および/または染色体異常を決定することができる核酸配列は、増幅または欠失、異数性、転座、または逆位などの染色体異常の同定を可能にする配列を含む。

10

【0111】

工程130では、第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、混合核酸試料および第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドに、第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドが混合核酸試料にハイブリダイズすることができる条件下で導入する。第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドは、多型を検出することができる、混合試料中の1つ以上の選択遺伝子座に相補的である核酸配列を含む。必要に応じて、洗浄工程を、工程120と130との間、および工程130と140との間に行ってもよい。

20

【0112】

工程140では、混合試料中の選択遺伝子座の隣接領域にハイブリダイズした第1および第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを連結し、工程150では、連結されたオリゴヌクレオチドを増幅させる。次いで、連結および増幅されたオリゴヌクレオチドを検出および分析し、工程160でのコピー数変動または染色体異常の決定および多型の同定を可能にする。

【0113】

固定配列核酸のセットは、選択遺伝子座中の少なくとも2つの別々の領域にハイブリダイズするように設計される。好ましい態様においては、2つ以上の別々のオリゴを用いてこれらの領域にハイブリダイズさせて、選択遺伝子座に相補的な隣接核酸を提供する。しかしながら、いくつかの態様においては、いわゆる「パドロックプローブ」または「分子反転プローブ(MIP)」などのプレサーキュラ(precircular)プローブを含む選択遺伝子座に相補的である2つ以上の異なる非隣接領域を含む単一のプローブを用いることができる。

30

【0114】

本発明は、大規模並行配列決定、ショットガン配列決定、およびCNVを検出ために他者により用いられた無作為デジタルPCRの使用などのより無作為な技術と比較して改善されたシステムを提供する。これらの上記手法は、試料中の全ての、または統計的に有意な集団のDNA断片の配列決定、次いで、これらの断片のマッピングまたはさもなければその好適な染色体への前記断片の結合に依る。次いで、同定された断片を互いに、またはいくつかの他の参照(例えば、正常な染色体構成)に対して比較して、特定の染色体上のCNVを決定する。目的の主要な染色体のみが、混合試料中のそのようなDNA断片の検出から生成される少数のデータを構成するため、これらの方法は、本発明と比較して本質的に不十分である。

40

【0115】

本発明のアッセイは、選択遺伝子座の標的化された検出を提供し、これは、選択遺伝子座の両含量に関する情報(すなわち、多型領域の存在)および試料中の選択遺伝子座の頻度に関する情報(その領域中の任意の推定される多型を検出するか、または検出しない)を提供する選択。この鍵となる特徴は、本発明の多重化されたアッセイの実施からの単一のデータセットとして、選択遺伝子座のコピー数および選択遺伝子座における多型の存在

50

または非存在の両方を検出する能力を提供することである。

【0116】

試料中のDNAの非常に広いサンプリングに依存する技術は、分析される非常に広範囲のDNAを提供しているが、実際には、1X以下のペースで試料内に含まれるDNAをサンプリングしている(すなわち、サブサンプリング)。対照的に、本発明のアッセイにおいて用いられる選択遺伝子座の増幅は、目的の特定の遺伝子座の範囲の深さを提供し、最初の混合試料中に存在する選択遺伝子座(1つ以上の、少ない発生源に由来するものを含む)の、好ましくは2X以上の平均配列範囲、より好ましくは100X以上の配列範囲、さらにより好ましくは1000X以上の配列範囲を有するそのような選択遺伝子座の「スーパーサンプリング」を提供する。

10

【0117】

本発明の注目すべき利点は、アッセイから生じる増幅産物を、限定されるものではないが、ハイブリダイゼーション技術、デジタルPCRおよび高効率配列決定技術を含む様々な検出および定量技術を用いて分析することができることである。

【0118】

本発明の方法は、データのより効率的および経済的な使用を提供し、試料増幅後に分析される実質的に大部分の配列は混合試料中の選択遺伝子座の配列同一性および頻度に関する断定的な情報をもたらす。かくして、染色体領域の大規模並行配列決定または無作為デジタル「計数」およびそのような計数からの関連データのその後の同定に依る技術と違って、本発明のアッセイシステムは、当業界の他者により教示された無作為手法よりも非常に効率的なデータ収集の使用を提供する。

20

【0119】

(アッセイ方法)

本発明のアッセイシステムは、上記の一般的なスキームを用いるが、多くの異なる配置および変更を用いてもよく、そのいくつかは以下に記載され、その多くは2010年8月6日出願された米国特許出願第61/371605号(その全体を本明細書に援用する)に例示されている。

【0120】

図2は、本発明の連結に基づくアッセイシステムの第1の全体図を示す。固定配列オリゴヌクレオチド201、203は、それぞれ、ユニバーサルプライマー領域209および211ならびにそれぞれ選択遺伝子座205および207に相補的な領域を含む。しかしながら、さらに、図2に記載のアッセイシステムは、第1の固定配列オリゴヌクレオチド201上の試料指標領域221を用いる。特定の態様においては、選択遺伝子座の配列の全部または一部を、記載された技術を用いて、例えば、配列決定またはハイブリダイゼーション技術により直接検出する。図2の例では、試料指標を第1の固定配列オリゴヌクレオチド201と結合させる。指標の検出は、高度に多重化されたアッセイシステムにおいて特定の試料に由来する配列を同定することができる。

30

【0121】

工程202では、固定配列オリゴヌクレオチド201、203を工程202において混合試料200に導入し、選択遺伝子座215に特異的に結合させる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドを残りの遺伝子試料から分離するのが好ましい(例えば、洗浄による(図示なし))。次いで、架橋オリゴを導入し、工程204において、第1(201)および第2(203)の固定配列オリゴヌクレオチドの間の遺伝子座の領域215にハイブリダイズさせる。結合したオリゴヌクレオチドを工程206において連結して、目的の遺伝子座に広がるそれに相補的な連続的核酸を作製する。本発明の特定の態様においては、架橋オリゴヌクレオチドは長さ2~45ヌクレオチドである。具体的な態様においては、架橋オリゴヌクレオチドは長さ3~9ヌクレオチドである。さらに別の具体的な態様においては、オリゴヌクレオチドは長さ10~30ヌクレオチドである。

40

【0122】

50

連結後、連結産物をgDNA鋳型から溶出させる。ユニバーサルプライマー217、219を工程208において導入して、連結された第1および第2の固定配列オリゴヌクレオチドを増幅させて、目的の遺伝子座の配列を含む増幅産物223を作製する(210)。これらの産物223を単離、検出、同定および定量して、混合試料中の選択遺伝子座の存在および量に関する情報を提供する。好ましくは、増幅産物を、配列決定により検出および定量する。具体的な態様においては、試料指標と増幅産物との両方の配列を決定して、例えば、試料ならびに遺伝子座の同定を提供することが望ましい。本発明で想定される本明細書に示された試料指標などの指標を、第1の固定配列オリゴヌクレオチド、第2の固定配列オリゴヌクレオチドまたはその両方と結合させることができる。あるいは、またはさらに、指標を、連結された第1および第2の固定配列オリゴヌクレオチドを増幅させるのに用いられるプライマーであって、指標を増幅産物中に組込むのにも役立つプライマーと結合させてもよい。

10

【0123】

好ましい態様において、および図2に示されたように、核酸を単離することができる混合試料を代表する指標を用いて、多重化アッセイシステムにおいて選択遺伝子座の発生源を同定する。そのような態様においては、核酸を、試料指標を用いて独自に同定する。次いで、独自に同定されたオリゴヌクレオチドを単一の反応容器中で、他の混合試料に由来する核酸と組み合わせた後、配列決定することができる。そのような場合、配列決定データを独自の試料指標により分離して、それぞれの混合試料に関するそれぞれの標的遺伝子座の頻度を決定し、個々の試料中に染色体異常が存在するかどうかを決定する。

20

【0124】

試料指標を用いる本発明の態様においては、情報を同定することを含む試料指標が、ユニバーサルプライマー領域209および211と、試料中の選択遺伝子座に相補的な領域205および207との間に配置されるように、固定配列オリゴヌクレオチドを設計するのが好ましい。あるいは、指標およびユニバーサル増幅配列を、別々の試料について連結産物を増幅させるのに用いられるプライマー中にこれらの指標を含有させることにより、連結された第1および第2の固定配列オリゴ(および存在する場合、架橋オリゴ)に付加することができる。いずれの場合でも、好ましくは、前記指標は、それらが増幅時に保存されるように、遺伝子座特異的配列の上流であるが、ユニバーサルプライマーの下流でコードされる。

30

【0125】

図3は、1つ以上の架橋オリゴヌクレオチドが用いられ、どのように多型が検出および同定されるかを例示するアッセイシステムの方法を例示する。図3では、2つのセットの固定配列オリゴヌクレオチドが用いられる。これら2つのセットの固定配列オリゴヌクレオチドは、実質的に同じユニバーサルプライマー309、311および配列特異的領域305、307を含むが、異なる試料指標321、323を含み、その異なる指標は、特定の試料中に存在する単一ヌクレオチド多型の異なる塩基配列に対応するセットの固定配列オリゴヌクレオチド上にある。同じ混合試料300に由来するが、異なる対立遺伝子特異的オリゴセットを含む個別のチューブ中の材料を用いて連結反応を実行する。選択遺伝子座313、333におけるこのSNPの2つの可能なヌクレオチドに対応する架橋オリゴヌクレオチドを用いて、それぞれの連結反応において選択遺伝子座を検出する。連結された第1、第2の、および架橋オリゴヌクレオチドの実際の配列の配列決定は必ずしも必要ないが、連結産物全体の配列の多型を同定し、および/または確認を提供するために依然として決定することができるように、特定の多型対立遺伝子を示唆する2つの対立遺伝子指標321、323を増幅産物中に組込む。

40

【0126】

それぞれの固定配列オリゴヌクレオチドは、選択遺伝子座に相補的な領域305、307、および混合試料からの選択遺伝子座の最初の選択および/または単離後に、異なる選択遺伝子座を増幅させるのに用いられるユニバーサルプライマー領域309、311を含む。ユニバーサルプライマー領域は、前記指標および目的の核酸に相補的な領域にフラン

50

キングする固定配列オリゴヌクレオチド301、303および323の末端に位置し、かくして、任意のユニバーサル増幅法の産物中に核酸特異的配列および試料指標を保存する。固定配列オリゴヌクレオチド301、303、323を工程302で遺伝子試料300のアリコートに導入し、選択遺伝子座315または325に特異的に結合させる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドを残りの遺伝子試料から、例えば、洗浄（示さず）により分離するのが好ましい。

【0127】

A/T SNP 313またはG/C SNP 333に対応する架橋オリゴを導入し、工程304において、固定配列オリゴヌクレオチドの第1（305）および第2（307）の核酸相補領域の間の選択遺伝子座315または325の領域に結合させる。あるいは、架橋オリゴ313、333を、固定配列オリゴヌクレオチドと同時に試料に導入することができる。結合したオリゴヌクレオチドを工程306において、単一の反応混合物中で連結して、選択遺伝子座に広がるそれに相補的な連続的核酸を作製する。

10

【0128】

連結後、好ましくは、別々の反応をユニバーサル増幅および検出工程のために組み合わせることができる。ユニバーサルプライマー317、319を工程308で組合せ反応に導入して、連結された鋳型領域を増幅させ、工程310で、連結された第1および第2の固定配列オリゴならびに架橋オリゴの産物327、329を作製する。これらの連結産物327、329は、選択遺伝子座中の両方のSNPを表す。これらの連結産物327、329を、試料指標および/または選択遺伝子座中にSNPを含有する産物の領域を介して、連結産物の配列決定により検出および定量する。

20

【0129】

本発明のアクセシシステムの方法の代替的な配置においては、架橋オリゴは、固定配列オリゴの一方または両方に相補的な領域に直接隣接しない領域にハイブリダイズしてもよく、1つ以上のオリゴの伸長を必要とする中間工程が連結の前に必要である。例えば、図4に例示されるように、それぞれのセットのオリゴヌクレオチドは、好ましくは、固定配列の2つのオリゴヌクレオチド401、403および1つ以上の架橋オリゴヌクレオチド413を含む。それぞれの固定配列オリゴヌクレオチドは、選択遺伝子座405、407に相補的な領域、およびプライマー配列を含み、プライマー配列は、好ましくは、ユニバーサルプライマー配列409、411、すなわち、ユニバーサルプライマーに相補的なオリゴ領域である。プライマー配列409、411は、固定オリゴヌクレオチド401、403の末端またはその近くに位置し、かくして、任意のユニバーサル増幅法の産物中に核酸特異的配列を保存する。固定配列オリゴヌクレオチド401、403を工程402で混合試料400に導入し、目的の遺伝子座415の相補部分に特異的に結合させる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドを、残りの遺伝子試料から分離するのが好ましい（図示なし）。

30

【0130】

次いで、架橋オリゴヌクレオチドを工程404で導入し、第1（401）および第2（403）の固定配列オリゴヌクレオチドの間の選択遺伝子座415の領域に結合させる。あるいは、架橋オリゴを、固定配列オリゴヌクレオチドと同時に導入することができる。この例示的態様においては、架橋オリゴは第1の固定配列オリゴ領域405に直接隣接する領域にハイブリダイズするが、第2の固定配列オリゴヌクレオチド407の相補領域から1つ以上のヌクレオチド離れている。固定配列および架橋オリゴのハイブリダイゼーション後、架橋オリゴ413を、工程406で、例えば、ポリメラーゼおよびdNTPを用いて伸長させて、架橋オリゴ413と第2の固定配列オリゴ403との間のギャップを埋める。伸長後、結合したオリゴヌクレオチドを工程408で連結して、目的の遺伝子座415に広がるそれに相補的な連続的核酸を作製する。連結後、ユニバーサルプライマー417、419を工程410で導入して、連結された第1、第2の、および架橋オリゴを増幅させて、工程412で、目的の選択遺伝子座の配列を含む増幅産物423を作製する。必要に応じて、増幅産物423を単離、検出および定量して、混合試料中の選択遺伝子座

40

50

の存在および量に関する情報を提供する。

【0131】

(コピー数変動の検出)

本発明は、1つ以上の遺伝子座のコピー数変動および1つ以上の多型の存在または非存在を同定するための方法を提供する。これを、単一の遺伝子配列に対応する目的の遺伝子座の特定の染色体に対応する遺伝子座の同定のための増幅方法を用いて実施することができる。

【0132】

前記アッセイシステムは、混合試料中の選択遺伝子座を同定し、好ましくは単離するために設計された核酸プローブを用いる。特定のプローブは、コピー数(すなわち、遺伝子座頻度)について調査される選択遺伝子座中の目的の配列を同定し、他のプローブは、混合試料中の多い発生源または少ない発生源に対応する核酸中の目的の多型(すなわち、遺伝子座含量)に対応する配列を同定する。

10

【0133】

具体的な態様においては、本発明のアッセイシステムは、分析される実質的に全ての選択遺伝子座を単離、増幅または分析するための1つ以上の選択的増幅工程(例えば、選択遺伝子座に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーを用いる)を用いる。そのような増幅技術は一般に、ゲノムの全部または実質的な部分の無作為の増幅を含むため、これは、例えば、大規模並行配列決定を用いる他者により用いられる無作為増幅手法とは正反対である。さらに、初期試料は必要に応じて、混合試料中の核酸のコピー数を増加させる一般的な増幅などの方法を用いて富化することができる。好ましくは、目的の遺伝子座を同定するのに用いられるハイブリダイゼーション、連結、および増幅工程を、混合試料上で直接実施する。

20

【0134】

一般的な態様においては、本発明の使用者は、異なる染色体上の複数の選択遺伝子座を分析する。試料について複数の遺伝子座を分析する場合、好ましい実施形態は、1つの反応容器中でそれぞれの試料について全ての選択遺伝子座を増幅させることである。複数の選択遺伝子座の頻度を用いて、染色体異常が存在するかどうかを決定し、必要に応じて、選択遺伝子座中の多型を同定する。

【0135】

好ましい態様においては、2つ以上の試料に由来する複数の選択遺伝子座を、単一の反応溶液中で増幅させ、例えば、配列決定により、単一のデータセット中で情報を同時に分析する。次いで、得られるデータを分析して、異なる試料に関する結果を分離し、個々の試料におけるCNVの存在または非存在および発生源寄与を決定するために用いる。

30

【0136】

1態様においては、複数の染色体上の複数の選択遺伝子座を用いて本発明のアッセイシステムにおいて染色体異常を同定し、複数の染色体上の選択遺伝子座の頻度を比較して、染色体上の複数の遺伝子座の頻度比に基づいて異数性の可能性の増加を同定する。頻度の正規化または標準化を、1つ以上の選択遺伝子座について実施することができる。

【0137】

別の態様においては、前記アッセイシステムは、2つ以上の染色体上の選択遺伝子座の頻度を合計した後、別の染色体に対して、ある染色体上の選択遺伝子座の合計を比較して、染色体異数性が存在するかどうかを決定する。別の態様においては、前記アッセイシステムは、2つ以上の染色体上の選択遺伝子座頻度のサブセットを分析して、2つの染色体のうちの1つについて染色体異数性が存在するかどうかを決定する。この比較は、同じか、または異なる染色体内で行うことができる。

40

【0138】

特定の態様においては、選択遺伝子座の頻度を決定するのに用いられるデータは、実験誤差に起因すると考えられるか、または特定の試料内の特発的な遺伝的偏りに基づいてレベルが上昇もしくは抑制された外れ値データを排除することができる。1例においては、

50

合計するのに用いられるデータは、1つ以上の試料中の特に上昇した頻度を有するDNA領域を排除することができる。別の例においては、合計するために用いられるデータは、1つ以上の試料中で特に少ない量で見出される選択遺伝子座を排除することができる。

【0139】

別の態様においては、選択遺伝子座のサブセットを選択して、染色体異常が存在するかどうかを決定する場合に統計的に有意な結果を得ることができる。選択遺伝子座の異なるサブセットの複数の分析を、混合試料内で実施して、より高い統計力を得ることができる。例えば、第21染色体について100の選択遺伝子座および第18染色体について100の選択遺伝子座が存在する場合、それぞれの染色体について100より少ない領域を評価する一連の分析を実施することができる。この例では、選択遺伝子座は選択的に排除されない。

10

【0140】

特定の染色体上で検出可能な異なる核酸の量は、混合試料中の異なる細胞源における遺伝子座の一般的表示、混合試料中の異なる遺伝子座を表す異なる核酸の分解速度、試料調製方法を含むいくつかの因子に応じて変化してもよい。かくして、別の態様においては、染色体上の特定の遺伝子座の量を合計して、試料中の異なる染色体の遺伝子座の量を決定する。遺伝子座の頻度を特定の染色体について合計し、遺伝子座の合計を用いて、異数性を決定する。本発明のこの態様は、それぞれの染色体上の個々の遺伝子座の頻度を合計した後、ある染色体上の遺伝子座の合計を1つ以上の他の染色体に対して比較して、染色体異常が存在するかどうかを決定する。

20

【0141】

好ましくは、本発明のアッセイシステムを用いて分析される核酸を選択的に増幅し、必要に応じて、目的の遺伝子座（例えば、混合試料中の目的の遺伝子座に）に特異的なプライマーを用いて混合試料から単離する。選択的増幅のためのプライマーを、様々な理由のために選択することができるが、好ましくは、1)目的の染色体に由来する領域を効率的に増幅する；2)異なる混合試料中の母体および/または胎児発生源からの推定可能な範囲の発現を有する；ならびに3)特定の染色体にとって特徴的である、すなわち、他の染色体上の相同領域を増幅しないように設計する。以下は、本発明のアッセイシステムにおいて用いることができる例示的技術である。

【0142】

本発明のアッセイシステムは、目的の特定の遺伝子座の同定および定量により、異数性および特定の染色体異常の両方を検出する。そのような染色体異常としては、限定されるものではないが、欠失突然変異、挿入突然変異、コピー数多型、コピー数変異体、第22染色体q11欠失症候群、第11染色体上の11q欠失症候群、第8染色体上の8p欠失症候群などが挙げられる。一般に、同じか、または別々の染色体上に存在する少なくとも2つの選択遺伝子座を分析し、選択遺伝子座の少なくとも1つは胎児対立遺伝子異常と関連する。次いで、2つの選択遺伝子座の配列および2つの選択遺伝子座のコピー数を比較して、染色体異常が存在するかどうかを決定し、そうである場合、異常の性質を決定する。

30

【0143】

本明細書に含まれる説明の多くは、1つ以上の推定異数性染色体上の選択遺伝子座の量および1つ以上の正常な染色体上の選択遺伝子座の量を計数することにより異数性を検出することを記載するが、同じ技術を用いて、コピー数変動が染色体の一部にのみ起こるそのようなコピー数変動を検出することができる。コピー数変動の検出においては、推定コピー数変動位置内の複数の選択遺伝子座を、推定コピー数変動位置の外部の複数の選択遺伝子座と比較する。例えば、22q11欠失内の2つ以上の遺伝子座および22q11欠失の外側の2つ以上の遺伝子座を選択することにより、母体試料中で胎児における第22染色体q11欠失症候群を検出することができる。22q11欠失の外側の遺伝子座は、第22染色体の別の領域上にあるか、または完全に異なる染色体上にあってもよい。それぞれの遺伝子座の量を、本出願に記載の方法により決定する。

40

50

【0144】

いくつかの態様においては、選択遺伝子座を増幅させるためにユニバーサル増幅を用いることができる。いくつかの態様においては、それぞれの試料に関する選択遺伝子座を単一の容器中の単一の反応においてアッセイする。他の態様においては、複数の試料に由来する遺伝子座を、単一の容器中の単一の反応においてアッセイすることができる。

【0145】

本発明の特定の態様は、そのような欠失の境界を含む欠失を検出することができる。いくつかの態様においては、少なくとも24の選択遺伝子座を推定される欠失の領域内で用いることができ、少なくとも24の選択遺伝子座を推定される欠失の領域の外側で用いることができる。別の態様においては、少なくとも48の選択遺伝子座を推定される欠失の領域内で用いることができ、少なくとも48の選択遺伝子座を推定される欠失の領域の外側で用いることができる。別の態様においては、少なくとも48の選択遺伝子座を推定される欠失の領域内で用いることができ、少なくとも96の選択遺伝子座を推定される欠失の領域の外側で用いることができる。別の態様においては、少なくとも48の選択遺伝子座を推定される欠失の領域内で用いることができ、少なくとも192の選択遺伝子座を推定される欠失の領域の外側で用いることができる。好ましい態様においては、少なくとも384の選択遺伝子座を推定される欠失の領域内で用いることができ、少なくとも384の選択遺伝子座を推定される欠失の領域の外側で用いることができる。推定される領域内の選択遺伝子座と、推定される欠失の領域の外側の選択遺伝子座とを合計する。次いで、これらの合計を互いに比較して、欠失の存在または非存在を決定する。必要に応じて、合計の比率を計算し、その比率を正常な集団から作製された平均比率と比較することができる。1つ以上の選択遺伝子座の比率が期待される比率の統計的に外側にある場合、欠失が検出される。欠失を正に同定するための閾値は、正常な集団において算出される変動の2倍以上、好ましくは4倍以上であってよい。複数の選択遺伝子座が推定される欠失の領域の内部および外部に求められた場合、欠失の境界を同定することができる。

【0146】

(疾患または素因に関連する多型)

本発明のアッセイシステムを用いて、常染色体優性または劣性疾患または突然変異に関連する多型などの多型を検出することもできる。本発明のアッセイシステムの多重化された性質を考慮すると、検出は染色体異常の検出と同じアッセイで行う。かくして、単一のアッセイシステムは、異なるクラスの遺伝子突然変異に関する診断情報を提供することができる。従って、本発明の好ましいアッセイシステムは高度に多重化され、混合試料内の数百から数千もの選択遺伝子座を調査することができるため、特定の態様においては、混合試料内のマーカー遺伝子座、例えば、遺伝的危険性と関連する遺伝子座または感染性生物の存在または非存在を同定する遺伝子座について試料を調査するのが望ましい。かくして、前記アッセイシステムは、混合試料中のコピー数決定のための選択遺伝子座の検出と共にそのようなマーカー遺伝子座の検出を提供する。

【0147】

かくして、本発明のアッセイシステムを用いて、混合試料中の多型を検出ことができ、そのような多型は、常染色体劣性障害に関連する遺伝子、常染色体優性障害に関連する突然変異；疾患および/または疾患の進行（例えば、転移）を生じる危険性ならびに予後指示因子に関連する多型に関連する。

【0148】

他の具体的な態様においては、本発明のアッセイシステムを用いて、母体試料中で胎児突然変異または多型を検出ことができ、そのような突然変異または多型は、冠動脈性心疾患、糖尿病、高血圧、鬱血性心不全、およびてんかんなどの多遺伝子障害と関連する。例としては、癌感受性遺伝子における突然変異（例えば、BRCA1もしくはIIまたはp53における突然変異）などの素因に関連する遺伝子における突然変異；アルツハイマー病の危険性に関連するAPOE3遺伝子多型などの、後に疾患を開始する高い危険性に関連する多型が挙げられる。

【 0 1 4 9 】

染色体異常および単一遺伝子突然変異または単一遺伝子もしくは多遺伝子疾患、障害、もしくは素因に関連する多型の検出に加えて、本発明のアッセイシステムは、混合試料中の感染性因子を同定することができる。

【 0 1 5 0 】

(選択的増幅)

いくつかの選択的増幅方法を用いて、本発明のアッセイシステムにおいて分析される増幅された核酸を提供することができ、そのような方法を用いて、混合試料中の選択遺伝子座の初期含量に関する情報の保存を可能にする様式で混合試料中の選択遺伝子座のコピー数を増加させるのが好ましい。増幅および分析の全ての組合せが本明細書で詳細に説明されるわけではないが、本明細書と一致する領域の核酸を単離および/または分析するために様々な増幅方法および/または分析ツールを用いることは当業者の技術の範囲内にあり、そのような変更は本開示を読めば当業者には明らかである。

10

【 0 1 5 1 】

そのような増幅方法としては、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 号 ; および第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号 ; PCR Technology : Principles and Applications for DNA Amplification , ed . イチ エー エルリッヒ (H . A . Erlich) , Freeman Press , NY , N . Y . , 1 9 9 2) 、リガーゼ連鎖反応 (LCR) (ウー (Wu) およびウォレス (Wallace) , Genomics 4 : 5 6 0 , 1 9 8 9 ; ランデグレンら (Landegren et al .) , Science 2 4 1 : 1 0 7 7 , 1 9 8 8) 、鎖置換増幅 (SDA) (米国特許第 5 , 2 7 0 , 1 8 4 号 ; および第 5 , 4 2 2 , 2 5 2 号) 、転写媒介性増幅 (TMA) (米国特許第 5 , 3 9 9 , 4 9 1 号) 、連結線形増幅 (LLA) (米国特許第 6 , 0 2 7 , 9 2 3 号) など、自己持続型配列複製 (グアテリら (Guatelli et al .) , Proc . Nat . Acad . Sci . USA , 8 7 , 1 8 7 4 (1 9 9 0) および WO 9 0 / 0 6 9 9 5) 、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅 (米国特許第 6 , 4 1 0 , 2 7 6 号) 、コンセンサス配列プライムポリメラーゼ連鎖反応 (CP - PCR) (米国特許第 4 , 4 3 7 , 9 7 5 号) 、任意プライムポリメラーゼ連鎖反応 (AP - PCR) (米国特許第 5 , 4 1 3 , 9 0 9 号、第 5 , 8 6 1 , 2 4 5 号) ならびに核酸に基づく配列増幅 (NASBA) (米国特許第 5 , 4 0 9 , 8 1 8 号、第 5 , 5 5 4 , 5 1 7 号および第 6 , 0 6 3 , 6 0 3 号 (それぞれ本明細書に援用する) を参照されたい) が挙げられる。用いることができる他の増幅方法としては、PCT特許出願第 PCT / US 8 7 / 0 0 8 8 0 号に記載の Qbeta Replicase、ウォーカーら (Walker et al .) , Nucleic Acids Res . 2 0 (7) : 1 6 9 1 - 6 (1 9 9 2) に記載の SDA などの等温増幅法、および米国特許第 5 , 6 4 8 , 2 4 5 号に記載のローリングサークル増幅が挙げられる。用いることができる他の増幅方法は、米国特許第 5 , 2 4 2 , 7 9 4 号、第 5 , 4 9 4 , 8 1 0 号、第 4 , 9 8 8 , 6 1 7 号および米国特許出願第 0 9 / 8 5 4 , 3 1 7 号および米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 1 4 3 5 9 9 号 (それぞれ本明細書に援用する) に記載されている。いくつかの態様においては、DNA を多重遺伝子座特異的 PCR により増幅する。好ましい態様においては、DNA をアダプター連結および単一プライマー PCR を用いて増幅する。他の利用可能な増幅方法は、平衡化 PCR (マクリジオルゴスら (Makrigiorgos et al .) , Nature Biotechnol , 2 0 : 9 3 6 - 9 (2 0 0 2)) ならびに核酸配列に基づく増幅 (NASBA) および自己持続型配列複製 (グアテリら (Guatelli et al .) , PNAS USA 8 7 : 1 8 7 4 (1 9 9 0)) などの等温増幅方法などである。そのような方法に基づいて、当業者であれば、目的の遺伝子座の 5 ' および 3 ' 側の任意の好適な領域中でプライマーを設計することができる。そのようなプライマーを用いて、DNA が目的の選択遺伝子座を含む限り、任意の長さの DNA を増幅することができる。

20

30

40

50

【 0 1 5 2 】

目的のゲノム領域に由来する増幅された選択遺伝子座の長さは、増幅および/または選択された他の遺伝子座から、増幅された遺伝子座を識別するための十分な配列情報を提供するに十分な長さである。一般に、選択遺伝子座に対応する増幅された核酸は、少なくとも約16ヌクレオチドの長さであり、より典型的には、選択遺伝子座に対応する増幅された核酸は、少なくとも約20ヌクレオチドの長さである。本発明の好ましい態様においては、選択遺伝子座に対応する増幅された核酸は、少なくとも約30ヌクレオチドの長さである。本発明のより好ましい態様においては、選択遺伝子座に対応する増幅された核酸は、少なくとも約32、40、45、50または60ヌクレオチドの長さである。本発明の他の態様においては、選択遺伝子座に対応する増幅された核酸は、約100、150または最大で200の長さであってよい。

10

【 0 1 5 3 】

特定の態様においては、選択的増幅は、混合試料に由来するDNAの出発量が非常に限られる場合、例えば、試料中の無細胞DNAが限られた量で利用可能である場合に特に有用であり得る、初期線形増幅工程を含む。この機構は、元のDNA含量を代表するDNA分子の量を増加させ、DNAまたはDNAの画分(例えば、母体試料中の胎児DNA寄与)の正確な定量が必要とされるサンプリング誤差を低下させるのに役立つ。

【 0 1 5 4 】

かくして、1態様においては、限られたサイクル数の配列特異的線形増幅を、cfDNAを含む出発混合試料に対して実施する。サイクル数は一般に、典型的なPCR増幅に用いられるものよりも少なく、例えば、5~30サイクル以下である。プライマーまたはプローブを設計して、選択遺伝子座を含む特異的ゲノム断片または領域を増幅させることができる。プライマーもしくはプローブを5'末端の末端標識を用いて(例えば、ビオチンを用いて)、または他に、増幅産物をさらなる単離もしくは分析のために精製するか、もしくは固体基質(例えば、ビーズもしくはアレイ)に結合させることができるようなプライマーもしくはプローブに沿って改変することができる。好ましい態様においては、単一の反応が、異なる領域に由来する複数のDNA断片をもたらしように、プライマーを多重化する。次いで、線形増幅に由来する増幅産物を、標準的なPCR方法またはさらなる線形増幅を用いて増幅させることができる。

20

【 0 1 5 5 】

例えば、cfDNAを妊娠女性の血液、血漿または血清から単離し、目的の染色体に対応する設定数の選択遺伝子座に対するプライマーと共にインキュベートすることができる。好ましくは、初期線形増幅に用いられるプライマーの数は、12以上、より好ましくは24以上、より好ましくは36以上、さらにより好ましくは48以上、およびさらにより好ましくは96以上である。それぞれのプライマーは、単一の選択遺伝子座に対応し、必要に応じて、同定および/または単離のためにタグ付けされる。限られたサイクル数、好ましくは10以下のサイクル数を線形増幅と共に実施する。続いて、増幅産物を単離する、例えば、プライマーをビオチン分子に連結する場合、増幅産物を固体基質上のアビジンまたはストレプトアビジンへの結合により単離することができる。次いで、増幅産物を、他のプライマーを用いるさらなる増幅などのさらなる生化学的方法ならびに/または配列決定およびハイブリダイゼーションなどの検出技術にかける。

30

40

【 0 1 5 6 】

線形増幅の効率は、特定の系において、正規化を用いて線形増幅に由来する産物が混合試料中の核酸の頻度および配列を代表することを確保できるように、部位間およびサイクル間で変化してもよい。本発明のアッセイシステムを実施する者であれば、試料の複数のアリコートに由来する情報を用いて、異なる選択遺伝子座における変動を含む選択遺伝子座を代表する異なる増幅産物の量における変動および/または限定的初期線形増幅後の選択遺伝子座間の変動を決定することができる。そのような情報を用いて、試料DNA含量中の選択遺伝子座の初期レベルを決定し、選択遺伝子座の頻度の正規化を可能にすることができる。

50

【 0 1 5 7 】

(ユニバーサル増幅)

本発明の好ましい態様においては、選択的に増幅された遺伝子座を、本発明のアッセイシステムを用いる様々な選択遺伝子座の全部または実質的に全部のユニバーサル増幅によりさらに増幅させるのが好ましい。選択的に増幅された遺伝子座を単一のユニバーサル増幅反応においてさらに増幅させることができるように、ユニバーサルプライマー領域を固定配列オリゴヌクレオチドに付加する。これらのユニバーサルプライマー配列を、選択的増幅方法の間に核酸領域に付加することができる、すなわち、選択的増幅のためのプライマーはユニバーサルプライマー配列を含む。あるいは、ユニバーサル増幅配列を含むアダプターを、初期増幅後および混合試料に由来する選択的に増幅された選択遺伝子座の単離後にアダプターとして選択的に増幅された選択遺伝子座の末端に付加することができる。

10

【 0 1 5 8 】

1つの例示的な態様においては、選択遺伝子座を、目的の選択遺伝子座に相補的なプライマーを用いて混合試料から最初に増幅させた後、ユニバーサル増幅工程を行って、分析のための遺伝子座の数を増加させる。混合試料に由来する初期増幅産物へのプライマー領域の導入により、分析、例えば、配列決定の前、またはその間に選択核酸の全部または一部のその後の制御されたユニバーサル増幅が可能になる。

【 0 1 5 9 】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 中に見られるように、DNA増幅中には偏りおよび変動性が導入され得る。増幅反応が多重化される場合、異なる選択遺伝子座は異なる速度または効率で増幅する可能性がある。これは、より良好な効率 (すなわち、より好ましいハイブリダイゼーション反応速度) を有する多重反応中のいくつかのプライマーに部分的に起因し得、これは、プライマーおよび鋳型DNAの配列含量、バッファー条件、および他の条件など、他のプライマーよりもいくつかのプライマーを好む実験条件に起因する。多重化されたアッセイシステムにおけるユニバーサルDNA増幅は一般に、増幅される遺伝子座の間に導入される偏りおよび変動性がより少ない。

20

【 0 1 6 0 】

従って、1態様においては、遺伝子座特異的配列を用いる小さいサイクル数 (例えば、1 ~ 10、好ましくは3 ~ 5) の選択的増幅を実施した後、ユニバーサルプライマーを用いるユニバーサル増幅を行う。ユニバーサルプライマーを用いるサイクル数は変化しますが、好ましくは、少なくとも10サイクル、より好ましくは少なくとも5サイクル、さらにより好ましくは20サイクル以上である。より少ない数の増幅サイクル後にユニバーサル増幅に移動することにより、特定の遺伝子座が他のものより大きい速度で増幅する偏りは低下する。

30

【 0 1 6 1 】

必要に応じて、アッセイシステムは、選択的増幅反応において選択的に増幅されない任意の核酸を除去するために選択増幅方法とユニバーサル増幅方法との間に工程を含む。

選択的増幅に由来する全産物または産物のアリコート、ユニバーサル増幅反応に用いることができる。同じか、または異なる条件 (例えば、ポリメラーゼ、バッファーなど) を増幅工程において用いて、例えば、偏りおよび変動性が実験条件に起因して不注意に導入されないことを確保することができる。さらに、プライマー濃度における変動を用いて、他の選択遺伝子座と比較して、いくつかの選択遺伝子座について、配列特異的増幅サイクルの数を示差的に制限することができる。

40

【 0 1 6 2 】

特定の態様においては、アッセイシステムにおいて用いられるプライマーまたはアダプターのユニバーサルプライマー領域は、1つの容器中の1つの反応において同時に多数の核酸を分析するための一般的なプライミング機構を用いる従来の多重化アッセイ方法と適合するように設計される。そのような「ユニバーサル」プライミング方法は、混合試料中に存在する選択遺伝子座の量の効率的な高容量の分析を可能にし、異数性の決定のためのそのような混合試料内の選択遺伝子座の存在の包括的定量を可能にする。

50

【0163】

そのようなアッセイ方法の例としては、限定されるものではないが、オリファントら (Oliphant et al.)、米国特許第7,582,420号に記載のものなどの、様々な試料を同時に増幅および/または遺伝子型決定するのに用いられる多重化方法が挙げられる。

【0164】

いくつかの態様は、それぞれの方法の初期段階に由来するオリゴヌクレオチドが、方法の後の段階に由来するオリゴヌクレオチドにより用いることができる配列を含む核酸配列の多重検出のための共役反応を用いる。限定されるものではないが、以下に記載の方法(それぞれその全体が本明細書に援用される)を含む試料中の核酸を増幅および/または検出するための例示的方法を、単独で、または組み合わせて用いることができる。

10

【0165】

特定の態様においては、本発明のアッセイシステムは、以下の組合せの選択的およびユニバーサル増幅技術の1つを用いる：(1)ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)と一緒にリガーゼ検出反応(「LDR」)；(2)LDRと一緒に二次PCRと一緒に一次PCR；および(3)二次PCRと一緒に一次PCR。本発明のこれらの態様の各々は、特定の核酸特徴を検出する際に特定の適用性を有する。しかしながら、それぞれは、それぞれの方法の初期段階に由来するオリゴヌクレオチドが、方法の後の段階に由来するオリゴヌクレオチドにより用いることができる配列を含む核酸配列の差異の多重検出のための共役反応の使用を必要とする。

20

【0166】

バラニーら(Barany et al.)、米国特許第6,852,487号、第6,797,470号、第6,576,453号、第6,534,293号、第6,506,594号、第6,312,892号、第6,268,148号、第6,054,564号、第6,027,889号、第5,830,711号、第5,494,810号は、様々な核酸試料中の特異的ヌクレオチド配列の検出のためのリガーゼ連鎖反応(LCR)アッセイの使用を記載している。

【0167】

バラニーら(Barany et al.)、米国特許第7,807,431号、第7,455,965号、第7,429,453号、第7,364,858号、第7,358,048号、第7,332,285号、第7,320,865号、第7,312,039号、第7,244,831号、第7,198,894号、第7,166,434号、第7,097,980号、第7,083,917号、第7,014,994号、第6,949,370号、第6,852,487号、第6,797,470号、第6,576,453号、第6,534,293号、第6,506,594号、第6,312,892号および第6,268,148号は、核酸検出のためのLDR共役PCRを記載している。

30

【0168】

バラニーら(Barany et al.)、米国特許第7,556,924号および第6,858,412号は、核酸検出のための共役したLDRおよびポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)を用いるプレサークルプローブ(「パドロックプローブ」または「多逆位プローブ」とも呼ばれる)の使用を記載している。

40

【0169】

バラニーら(Barany et al.)、米国特許第7,807,431号、第7,709,201号および第7,198,814号は、核酸配列の検出のためのエンドヌクレアーゼ切断および連結反応の組合せの使用を記載している。

【0170】

ウィリスら(Willis et al.)、米国特許第7,700,323号および第6,858,412号は、多重化された核酸増幅、検出および遺伝子型決定におけるプレサークルプローブの使用を記載している。

【0171】

50

ロナギら (Ronaghi et al.) , 米国特許第 7 , 6 2 2 , 2 8 1 号は、ユニークなプライマーおよびバーコードを含むアダプターを用いて核酸を標識および増幅するための増幅技術を記載している。

【 0 1 7 2 】

好ましい態様においては、増幅産物を、以前に記載のように多重化する。好ましい態様においては、多重増幅産物を、増幅産物の分析によって定量する。好ましい態様においては、増幅方法に由来する個々の分子の代表的試料を、さらなる分析のために残りの試料から単離する。個々の分子の代表的試料を得るために、遺伝子座あたりの平均分子数は多重化反応により作られるサンプリングノイズを超えなければならない。1 態様においては、遺伝子座あたりの平均数は 1 0 0 より多い。別の態様においては、遺伝子座あたりの平均数は 5 0 0 より多い。別の態様においては、遺伝子座あたりの平均数は 1 0 0 0 より多い。

10

【 0 1 7 3 】

増幅産物に由来する個々の分子を、異なる増幅産物を分析において互いに識別することができる様式で他の分子から物理的に単離するのが好ましい。好ましい態様においては、この単離は、固体基質上で行う。それぞれの単離された分子を、分析の前に特定の同定可能な、もしくは物理的なアドレスと結合させることができるか、またはアドレスは分析の結果に基づいて特定の増幅産物について既知となってもよい。基質は平面的な表面であるか、またはビーズなどの三次元的な表面であってもよい。

【 0 1 7 4 】

一度単離されたら、個々の増幅産物をさらに増幅して、同じ既知の、または同定可能な位置でその分子の複数の同一のコピーを作製することができる。増幅は、その位置が同定可能な、または物理的なアドレスになる前または後に行ってもよい。次いで、増幅産物および/またはそのコピー（増幅産物と同一であるか、または該増幅産物に相補的であってもよい）を、増幅産物またはそのコピーの配列に基づいて分析して、特定の遺伝子座および/またはそれが代表する対立遺伝子を同定する。

20

【 0 1 7 5 】

好ましい態様においては、増幅産物または増幅産物の一部の全長を、配列決定を用いて分析することができる。決定するのに必要な塩基数は、特定の遺伝子座および/または対立遺伝子に属するものとして増幅産物を独自に同定するのに十分なものでなければならない。1 つの好ましい態様においては、増幅産物の配列決定により遺伝子座を分析する。

30

【 0 1 7 6 】

配列決定のいくつかの方法は、本発明のアッセイシステムと適合する。配列決定のための例示的方法としては、限定されるものではないが、ドルマナク (Drmanac) , 米国特許第 6 , 8 6 4 , 0 5 2 号 ; 第 6 , 3 0 9 , 8 2 4 号 ; および第 6 , 4 0 1 , 2 6 7 号 ; ならびにドルマナくら (Drmanac et al.) , 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 9 1 6 5 6 号 (本明細書に援用する) に開示されたものなどのハイブリダイゼーションに基づく方法、合成方法による配列決定、例えば、ナイレンら (Nyren et al.) , 米国特許第 7 , 6 4 8 , 8 2 4 号、第 7 , 4 5 9 , 3 1 1 号および第 6 , 2 1 0 , 8 9 1 号 ; バラスブラマニアン (Balasubramanian) , 米国特許第 7 , 2 3 2 , 6 5 6 号および第 6 , 8 3 3 , 2 4 6 号 ; クエイク (Quake) , 米国特許第 6 , 9 1 1 , 3 4 5 号 ; リら (Li et al.) , Proc. Natl. Acad. Sci. , 1 0 0 : 4 1 4 - 4 1 9 (2 0 0 3) ; ロナギら (Ronaghi et al.) , 米国特許第 7 , 6 4 8 , 8 2 4 号、第 7 , 4 5 9 , 3 1 1 号、第 6 , 8 2 8 , 1 0 0 号および第 6 , 2 1 0 , 8 9 1 号に記載のピロリン酸配列決定 ; ならびに連結に基づく配列決定法、例えば、ドルマナくら (Drmanac et al.) , 米国特許出願第 2 0 1 0 0 1 0 5 0 5 2 号およびチャーチら (Church et al.) , 米国特許出願第 2 0 0 7 0 2 0 7 4 8 2 号および第 2 0 0 9 0 0 1 8 0 2 4 号などが挙げられる。

40

【 0 1 7 7 】

50

多くの配列が好ましくは高効率連続方法を用いて並行して読み取られる、本質的に並行様式で多くの（典型的には、数千から数十億）の核酸配列を決定する方法を用いて、配列情報を決定することができる。そのような方法としては、限定されるものではないが、ピロ配列決定（例えば、454ライフサイエンスインコーポレイティッド社（454 Life Sciences, Inc.）[米国コネチカット州ブランフォード（Branford）所在]により市販）；連結による配列決定（例えば、SOLID（商標）技術、ライフテクノロジーインコーポレイティッド社（Life Technology, Inc.）[米国カリフォルニア州カールスバッド（Carlsbad）所在]で市販）；改変ヌクレオチドを用いる合成による配列決定（イルミナインコーポレイティッド社（Illumina, Inc.）[米国カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）所在]によるTruSeq（商標）およびHiSeq（商標）技術、ヘリコスバイオサイエンスコーポレーション社（Helicos Biosciences Corporation）[米国マサチューセッツ州ケンブリッジ（Cambridge）所在]によるHeliscope（商標）、ならびにパシフィックバイオサイエンスオブカリフォルニアインコーポレイティッド社（Pacific Biosciences of California, Inc.）[米国カリフォルニア州メンロパーク（Menlo Park）所在]によるPacBio RSなどで市販）、イオン検出技術による配列決定（イオン Torrent インコーポレイティッド社（Ion Torrent, Inc.）[米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ（South San Francisco）所在]）；DNAナノボールの配列決定（コンプリートジェノミックスインコーポレイティッド社（Complete Genomics, Inc.）[米国カリフォルニア州マウンテンビュー（Mountain View）所在]）；ナノ孔に基づく配列決定技術（例えば、オックスフォードナノポアテクノロジーズリミテッド社（Oxford Nanopore Technologies, LTD）[英国オックスフォード（Oxford）所在]により開発されたもの）、および同様に高度に並行化された配列決定法が挙げられる。

【0178】

あるいは、別の態様においては、増幅産物または増幅産物の一部の全長を、ハイブリダイゼーション技術を用いて分析することができる。検出のためのポリヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイを行う方法は、当業界でよく開発されている。ハイブリダイゼーションアッセイ手順および条件は、用途に応じて変化し、マニアティスら（Maniatis et al.）Molecular Cloning: A Laboratory Manual（2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）；ベルガー（Berger）およびキンメル（Kimmel）Method in Enzymology, Vol. 152, Guide to Molecular Cloning Techniques（Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987）；ヤング（Young）およびデビス（Davis），P. N. A. S., 80: 1194（1983）に記載のものを含む公知の一般的結合方法に従って選択される。反復的および制御的ハイブリダイゼーション反応を実行するための方法および装置は、米国特許第5, 871, 928号、第5, 874, 219号、第6, 045, 996号および第6, 386, 749号、第6, 391, 623号（それぞれ本明細書に援用する）に記載されている。

【0179】

本発明はまた、特定の好ましい態様においては、リガンド間のハイブリダイゼーションのシグナル検出も想定する。米国特許第5, 143, 854号、第5, 578, 832号、第5, 631, 734号；第5, 834, 758号；第5, 936, 324号；第5, 981, 956号；第6, 025, 601号；第6, 141, 096号；第6, 185, 030号；第6, 201, 639号；第6, 218, 803号；および第6, 225, 625号、米国特許出願第60/364, 731号ならびにPCT出願第PCT/US99/06097号（WO99/47964として公開）（それぞれあらゆる目的で全体を本

10

20

30

40

50

明細書に援用する)を参照されたい。

【0180】

シグナル検出および強度データのプロセッシングのための方法および装置は、例えば、米国特許第5,143,854号、第5,547,839号、第5,578,832号、第5,631,734号、第5,800,992号、第5,834,758号；第5,856,092号、第5,902,723号、第5,936,324号、第5,981,956号、第6,025,601号、第6,090,555号、第6,141,096号、第6,185,030号、第6,201,639号；第6,218,803号；および第6,225,625号、米国特許出願第60/364,731号ならびにPCT出願第PCT/US99/06097号(WO99/47964として公開)(それぞれあらゆる目的で全体を本明細書に援用する)に開示されている。

10

【0181】

(試料内および試料間の変動の最小化)

混合試料中での検出による染色体異常の検出に関する1つの課題は、少ない発生源に由来する核酸が、通常の多い発生源に由来する核酸よりも非常に少ない量で存在し得ることである。胎児および母体cfDNAを含有する母体試料の場合、全cfDNAの割合としての無細胞胎児DNAは1~40%未満で変化することがあり、最も一般的には、20%以下で存在し、10%以下で存在することが多い。そのような母体試料の胎児DNAにおけるトリソミー21(ダウン症候群)などの異数性の検出においては、第21染色体の相対的増加は胎児DNAにおいては50%であり、かくして、母体試料中の全DNAの割合として、一例としては、胎児DNAは全部の5%であり、全部の割合としての第21染色体の増加は2.5%である。本明細書に記載の方法によってこの差異を確実に検出しようとする場合、第21染色体の測定値の変動は、胎児DNAに由来する第3の第21染色体により寄与される第21染色体の増加率よりも非常に小さいものでなければならない。

20

【0182】

試料間で認められる、および/または試料内の遺伝子座に関するレベル間の変動は、その多くが本出願に記載される分析方法の組合せを用いることにより最小化することができる。例えば、前記アッセイにおける内部参照を用いることにより、変動が少なくなる。内部参照の例は、同じ試料中の、異数性などの推定される異常な量で存在する染色体に対して比較するための「正常な」量で存在する染色体(例えば、常染色体のダイソミー)の使用である。参照染色体としての1つのそのような「正常な」染色体の使用で十分であり得るが、定量の統計力を増加させるための内部参照染色体として2つから多くの正常な染色体を使用することも可能である。

30

【0183】

内部参照を用いる1つの方法は、染色体比と呼ばれる、試料中の正常な染色体の量に対する推定される異常な染色体の量の比率を算出することである。染色体比の算出においては、それぞれの染色体のそれぞれの選択遺伝子座の量または計数を一緒に合計して、それぞれの染色体に関する全計数を算出する。次いで、1つの染色体に関する全計数を、異なる染色体に関する全計数で除算して、これらの2つの染色体に関する染色体比を作る。

40

【0184】

あるいは、それぞれの染色体に関する染色体比を、それぞれの染色体に関するそれぞれの選択遺伝子座の計数を最初に合計した後、1つの染色体に関する合計を、2つ以上の染色体に関する全合計で除算することにより算出することができる。一度算出されたら、染色体比を正常な集団に由来する平均染色体比と比較する。

【0185】

前記平均は、正規化および外れ値データの排除を用いるか、または用いない、平均値、中央値、最頻値または他の平均であってよい。好ましい態様においては、平均値を用いる。正常な集団に由来する染色体比に関するデータセットを生成させる際に、測定された染色体の正常な変動を算出する。この変動は、いくつかの方法で、最も典型的には、変動係

50

数、またはCVと表すことができる。試料に由来する染色体比を、正常集団に由来する平均染色体比と比較する場合に、試料に関する染色体比が正常集団に関する平均染色体比の統計的に外側にある場合、試料は異数性を含む。異数性を宣言するための統計的閾値を設定するための基準は、染色体比の測定値における変動ならびにアッセイに関する許容可能な偽陽性率および偽陰性率に依存する。一般に、この閾値は、染色体比において観察される変動の倍数であってよい。1例においては、この閾値は、染色体比の変動の3倍以上である。別の例においては、それは染色体比の変動の4倍以上である。別の例においては、それは染色体比の変動の5倍以上である。別の例においては、それは染色体比の変動の6倍以上である。上記の例において、染色体比は、染色体による選択遺伝子座の計数を合計することにより決定される。典型的には、それぞれの染色体に関して同じ数の選択遺伝子座を用いる。染色体比を生成させる代替的な方法は、それぞれの染色体に関して遺伝子座の平均計数を算出することである。前記平均は、平均値、中央値または最頻値の任意の推定値であってよいが、典型的には、平均を用いる。平均は、トリム平均もしくは加重平均などの全計数またはいくつかの変動の平均値であってよい。それぞれの染色体に関する平均計数が算出されたら、それぞれの染色体に関する平均計数を、他のもので除算して2つの染色体の間の染色体比を得ることができ、それぞれの染色体に関する平均計数を、全ての測定された染色体に関する平均の合計で除算して、上記のようなそれぞれの染色体に関する染色体比を得ることができる。上記で強調されたように、推定DNAが少ない相対量にある母体試料において異数性を検出する能力は、アッセイにおける異なる選択遺伝子座の測定値の変動に大きく依存する。この変動を低下させ、かくして、異数性を検出するためのこの方法の感度を改善するいくつかの分析方法を用いることができる。アッセイの変動性を低下させるための1つの方法は、染色体の量を算出するのに用いられる選択遺伝子座の数を増加させることである。一般に、染色体の単一の選択遺伝子座の測定された変動がX%であり、Y個の異なる選択遺伝子座が同じ染色体上で測定される場合、その染色体上のそれぞれの選択遺伝子座の量を合計するか、または平均することにより算出された染色体量の測定値の変動は $Y^{-1/2}$ で除算した約X%である。別の言い方をすれば、染色体量の測定値の変動は、遺伝子座の数の平方根で除算したそれぞれの選択遺伝子座の量の測定値のおおよその平均変動である。

【0186】

本発明の好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は少なくとも24である。本発明の別の好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は少なくとも48である。本発明の別の好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は少なくとも100である。本発明の別の好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は少なくとも200である。それぞれの遺伝子座の測定に対する増分費用が存在し、かくして、選択遺伝子座の数を最小化することが重要である。本発明の好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は2000未満である。本発明の好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は1000未満である。本発明の最も好ましい態様においては、それぞれの染色体に関して測定される選択遺伝子座の数は少なくとも48および1000未満である。1態様においては、それぞれの選択遺伝子座の量を測定した後、選択遺伝子座のサブセットを用いて、異数性の存在または非存在を決定することができる。選択遺伝子座のサブセットを選択するための多くの標準的な方法が存在する。これらの方法は、特定のパーセンタイル値より下および/または上のレベルが検出された選択遺伝子座が分析から廃棄される、外れ値排除を含む。1態様においては、前記パーセンタイル値は、量により測定される最小および最高5%であってよい。別の態様においては、前記パーセンタイル値は、量により測定される最小および最高10%であってよい。別の態様においては、前記パーセンタイル値は、量により測定される最小および最高25%であってよい。

【0187】

選択遺伝子座のサブセットを選択するための別の方法は、いくつかの統計的限界の外側

10

20

30

40

50

にある領域の消去を含む。例えば、平均量の1つ以上の標準偏差の外側にある選択遺伝子座を、分析から除去することができる。選択遺伝子座のサブセットを選択するための別の方法は、選択遺伝子座の相対量を、健康な集団中の同じ選択遺伝子座の期待量と比較し、期待値試験内にある選択遺伝子座を廃棄することによってよい。アッセイにおける変動をさらに最小化するために、それぞれの選択遺伝子座が測定される回数を増加させることができる。考察されたように、ゲノムが1回未満の平均で測定される異数性を検出する無作為の方法と対照的に、本発明のアッセイシステムはそれぞれの選択遺伝子座を複数回意図的に測定する。一般に、事象を計数する場合、計数における変動はポアソン統計により決定され、変動の計数は典型的には1を計数の平方根で除算したものに等しい。本発明の好ましい態様においては、選択遺伝子座をそれぞれ、平均で少なくとも100回測定する。本発明の好ましい態様においては、選択遺伝子座をそれぞれ、平均で少なくとも500回測定する。本発明の好ましい態様においては、選択遺伝子座をそれぞれ、平均で少なくとも1000回測定する。本発明の好ましい態様においては、選択遺伝子座をそれぞれ、平均で少なくとも2000回測定する。本発明の好ましい態様においては、選択遺伝子座をそれぞれ、平均で少なくとも5000回測定する。

10

【0188】

別の態様においては、遺伝子座のサブセットを無作為であるが、十分な数の選択遺伝子座を用いて選択して、染色体異常が存在するかどうかを決定する際に統計的に有意な結果を得ることができる。異なる遺伝子のサブセットの複数の分析を混合試料内で実施して、より高い統計力を得ることができる。この例では、無作為分析の前に選択遺伝子座を除去または消去する必要があってもなくてもよい。例えば、第21染色体に関して100個の選択遺伝子座が存在し、第18染色体に関して100個の選択遺伝子座が存在する場合、それぞれの染色体に関して100個未満の遺伝子座を評価する一連の分析を実施することができる。

20

【0189】

前記アッセイにおける変動を低下させるための上記方法に加えて、その多くが本出願中の以前に記載された他の分析技術を組み合わせる用いることができる。一般に、前記アッセイにおける変動を、それぞれの試料について全ての選択遺伝子座を単一の容器中の単一の反応において調査する場合に低下させることができる。同様に、アッセイにおける変動を、ユニバーサル増幅システムを用いる場合に低下させることができる。さらに、アッセイの変動を、増幅のサイクル数が限定される場合に低下させることができる。

30

【0190】

(癌患者からの混合試料における検出のためのアッセイシステムの使用)

前記アッセイシステムは、癌患者における診断、予後、およびモニタリングマーカーとしての、DNA鎖完全性、突然変異の頻度、マイクロサテライトの異常、および遺伝子のメチル化などのcfDNAの定量的および定性的腫瘍特異的变化の検出を可能にする。単一の遺伝子変化(点突然変異、インデルおよびコピー数変動など)のそのような検出と、CNV検出とを組み合わせる能力は、悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる患者における臨床診断、治療、結果予測および進行モニタリングを補助するための強力な方法を提供する。

40

【0191】

いくつかの態様においては、本発明のアッセイシステムを、診断目的で、例えば、患者における悪性腫瘍の存在および/もしくは性質を検出するため、または患者における腫瘍量の定量的見積もりを提供するために用いる。循環する腫瘍DNAおよびマイクロRNAは、肺癌などの特定の癌と関連してきた(ロスシーラ(Roth C et al.), Mol Oncol. 2011 Jun; 5(3): 281-91 Epub 2011 Feb 24)。コピー数変動はまた、乳癌患者におけるcfDNA中のHER2およびエストロゲン受容体の増幅など、特定の癌において検出されてきた(ページケイ(Page K.), Br J Cancer. 2011 Apr 12; 104(8): 1342-8 Epub 2011 Mar 22)。

50

【0192】

本発明の他の態様においては、前記アッセイシステムを癌患者において用いて、治療に対する応答をモニターする、および/または疾患の進行を追跡する、例えば、化学放射線療法(CRT)を受けている患者における単一遺伝子変化およびcfDNAを測定する。特定の癌においては、cfDNA完全性指標は治療に対する腫瘍応答と有意かつ独立に関係し得ることが示されている。アゴスティニ エムら(Agostini M et al.), *Ann Surg Oncol*. 2011 Mar 17。また、特定の遺伝子変化および/またはコピー数変動の差異の存在または非存在も、化学療法に対する応答および/または疾患の進行と関連してきた。例えば、癌における治療応答および生存の決定のための有用な遺伝的変動を記載するサバス エス(Savas S.), *Acta Oncol*. 2010 Nov; 49(8): 1217-26 Epub 2010 Jul 29を参照されたい。例えば、K-RAS遺伝子および/またはp53遺伝子における突然変異の検出と組み合わせたcfDNAレベルの検出は、卵巣癌、子宮内膜癌およびリンパ腫を含む様々な癌の進行を測定する際の強力な、比較的非侵襲的なツールを提供する。ドブリチカ ビーら(Dobrzycka B et al.), *Ann Oncol*. 2011 May; 22(5): 1133-40 Epub 2010 Nov 23; ドブリチカ ビーら(Dobrzycka B et al.), *Int J Cancer*. 2010 Aug 1; 127(3): 612-21; ホスニー ジーら(Hosny G et al.), *Cancer Lett*. 2009 Mar 18; 275(2): 234-9 Epub 2008 Nov 28。そのような分析を、遺伝的变化ならびに治療結果および予後との関連の同定のための機能的データベースポータルであるVarietasなどのツールを用いてさらに補助することができる。パナネン ジェイら(Paananen J et al.), *Database (Oxford)*. 2010 Jul 29; 2010; baq016。

10

20

【0193】

(移植患者からの混合試料の検出のためのアッセイシステムの使用)

本発明のアッセイシステムを用いて、cfDNAの検出とSNPまたは1つ以上の単一遺伝子における突然変異の検出との組合せを用いて移植患者における器官の健康をモニターすることができる。移植された器官は、レシピエント患者のゲノムとは異なるゲノムを有し、器官の健康はアッセイシステムを用いて検出することができる。例えば、急性細胞拒絶は、心臓移植レシピエントにおけるドナーゲノムに由来する無細胞DNAの有意に増加したレベルと関連することが示されている。スナイダー ティーエムら(Snyder TM et al.), *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Apr 12; 108(15): 6229-34. Epub 2011 Mar 28。さらに、ケモカインおよび接着分子は、白血球を同種移植片に補充することにより同種移植片拒絶を媒介し、インターロイキン(IL)-8、CXCR1、CXCR2に位置するSNPは同種移植の結果と相関することが示されている。ロー エイチら(Ro H. et al.), *Transplantation*. 2011 Jan 15; 91(1): 57-64。かくして、本発明のアッセイシステムは、固形器官移植レシピエントをモニターするための非侵襲的試験を提供し、器官生検または他のより面倒な診断もしくは予後技術を要することなく拒絶の初期兆候を同定するのを助けることができる。

30

40

【0194】

(母体試料における検出のためのアッセイシステムの使用)

特定の具体的態様においては、試料中の胎児DNAの割合は染色体の予想される統計的存在、および予想が胎児異数性を示唆し得る変動に関する重要な情報を提供するため、母体試料中の胎児DNAの相対割合の決定が増幅産物の分析において有益であり得る。胎児寄与率は母体試料中の同定された選択遺伝子座のレベルの変動における定量的統計的有意性を決定するのに用いることができるため、これは母体試料中の胎児DNAのレベルが低い環境において特に役立つ。他の態様においては、母体試料中の胎児cfDNAの相対パーセントの決定は、胎児異数性の検出における確実性のレベルまたは力を見積もるの

50

に有益であり得る。

【0195】

いくつかの具体的な態様においては、目的の対立遺伝子での母体DNAの相対胎児寄与を、その対立遺伝子での父方の寄与と比較して、試料中のおおよその胎児DNA濃度を決定することができる。他の具体的な態様においては、父方由来の配列（例えば、Y染色体配列または父方特異的多型）のみの相対量を用いて、母体試料中の胎児DNAの相対濃度を決定することができる。

【0196】

母体試料における胎児寄与率を決定するための別の例示的な手法は、胎児および母体DNAの間で異なるパターンのDNAメチル化を有するDNA断片の分析によるものである。好ましい態様においては、無細胞DNAからの増幅されたDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による。本開示を読む際に当業者に明らかであるように、本明細書でより詳細に説明されるものを含む増幅のための他の機構を同様に用いることができる。

【0197】

胎児が男性である環境では、試料中の胎児DNAのパーセントは、Y特異的遺伝子座の検出および算出された母体DNA含量との比較により決定することができる。Y染色体上に位置し、かくして、胎児DNAのものである、性決定領域Y遺伝子に由来する領域（SRY）などの、増幅されたY特異的遺伝子座の量を、試料から決定し、母体DNAと胎児DNAの両方に存在し、好ましくは、胎児において異数性である可能性があると考えられる染色体、例えば、第21または18染色体上にはない常染色体領域に由来するものではない1つ以上の増幅された選択遺伝子座と比較することができる。好ましくは、この増幅工程を、選択的増幅工程と並行して実施するが、多重化アッセイの性質に応じて、それを選択的増幅の前または後に実施してもよい。

【0198】

特定の態様においては、母体試料中の無細胞胎児DNAの割合を、母体試料から単離された連続希釈されたDNAを用いるPCRにより決定することができる。この方法は、増幅された遺伝子を含むゲノム数を正確に定量することができる。母体試料から単離された連続希釈されたDNAを用いるPCRは、男性胎児を含む胎児DNAのパーセントを決定する場合に好ましい。例えば、血液試料が100%の男性胎児DNAを含み、1：2連続希釈を実施する場合、1コピーのY連鎖遺伝子および2コピーの常染色体遺伝子が存在するため、平均でY連鎖シグナルは常染色体シグナルの前に1倍希釈で消失する。

【0199】

具体的な態様においては、母体血漿中の遊離胎児DNAの割合は、以下の式：遊離胎児DNAの割合 = (Y連鎖遺伝子のコピー数 × 2 × 100) / (常染色体遺伝子のコピー数) (式中、それぞれの遺伝子のコピー数はその遺伝子が検出された最も高い連続希釈率を観察することにより決定される) を用いて男性胎児について算出される。この式は、ゲノム、胎児または母体のそれぞれのうちの2コピーの常染色体遺伝子と比較して1コピーのみのY連鎖遺伝子が存在するという事実について正規化するために用いられる、2の増倍率を含む。

【0200】

(混合試料中の少ない発生源のDNA含量の決定)

本発明の特定の態様においては、少ない発生源からのDNAの寄与の決定は、これらの試料中の遺伝子座のコピー数変動の決定において有用であり得る。例えば、それぞれの母体由来試料中で、胎児に由来するDNAは、母親から継承した遺伝子座の約50%を継承し、父親に由来する遺伝子座の50%を継承する。非母体発生源から胎児への遺伝子座寄与の決定は、母体試料中の胎児DNAの見積もりを可能にし、かくして、目的の染色体に関する染色体頻度の統計的に有意な差異を算出するのに用いられる情報を提供する。

【0201】

特定の態様においては、少ない発生源の多型の決定には、混合試料中の少ない発生源のDNAの存在を同定するための標的化SNPおよび/または突然変異分析が必要である。

この計算に必要とされる情報を、本発明のアッセイを用いて提供することができる。いくつかの態様においては、従来の遺伝子型決定、例えば、移植のドナーの遺伝子型決定、母体試料中の父親および母親の遺伝子型決定の使用が役立つ。しかし一般には、従来の遺伝子型決定に属するこの情報は、アッセイを実施する前には必要ではなく、混合試料内の選択遺伝子座のコピー数の決定と同時に遺伝子型決定を実施する。

【0202】

1つの好ましい態様においては、混合試料中の少ない発生源の核酸のパーセントを、従前の遺伝子型の知識を用いずに多重化されたSNP検出を用いて定量することができる。この態様においては、それぞれの領域中に既知のSNPを含む2つ以上の選択多型遺伝子座を用いる。好ましい態様においては、選択多型遺伝子座は、遺伝子座増幅する。好ましい態様においては、増幅はユニバーサルである。好ましい実施形態においては、選択多型遺伝子座を、1つの容器中の1つの反応において増幅する。母体試料中の選択多型遺伝子座のそれぞれの対立遺伝子を決定および定量する。好ましい態様においては、高効率配列決定を、そのような決定および定量に用いる。多いおよび少ない発生源の遺伝子型が異なる遺伝子座が同定される、例えば、ドナー遺伝子型は同型であり、レシピエント遺伝子型は異型である。特定の選択遺伝子座について一方の対立遺伝子の高い相対頻度(>80%)および他方の対立遺伝子の低い相対頻度(<20%および>0.15%)を観察することにより、この同定を行う。複数の遺伝子座の使用は、対立遺伝子の量の測定における変動の量を低下させるため、特に有利である。この要件を満たす遺伝子座の全部またはサブセットを用いて、統計分析により少ない発生源の核酸濃度を決定する。1態様においては、2つ以上の遺伝子座に由来する低い頻度の対立遺伝子を一緒に合計し、高頻度の対立遺伝子の合計で除算し、2を掛けることにより、濃度を決定する。別の態様においては、少ない発生源の核酸のパーセントを、2つ以上の遺伝子座に由来する低頻度の対立遺伝子を平均し、高頻度の対立遺伝子の平均で除算し、2を掛けることにより決定する。

【0203】

多くの対立遺伝子について、多いおよび少ない発生源の核酸配列は同型および同一であることがあり、この情報は特徴的ではないため、混合試料中の少ない発生源の核酸の決定においてはそれは有用ではない。本発明は、少ない発生源の核酸の割合の算出において、細胞源(例えば、母体対立遺伝子とは異なる少なくとも1つの対立遺伝子を含む胎児対立遺伝子)間の識別可能な差異が存在する対立遺伝子情報を用いる。かくして、多いおよび少ない発生源について同じである対立遺伝子領域に関するデータは分析のために選択されず、有用なデータを無力化しないように割合の決定の前に関連データから除去される。

【0204】

母体血漿中の胎児DNAを定量するための例示的方法は、例えば、本明細書に援用するチューら(Chuet al.), Prenat Diagn 2010; 30: 1226-1229に見出すことができる。

【0205】

1態様においては、領域の量または頻度が実験誤差に起因する、または特定の試料内の特異的な遺伝的偏りに由来する外れ値であると考えられる場合、選択遺伝子座を排除してもよい。別の態様においては、選択遺伝子座は、総和または平均化の前に正規化、標準化、クラスター化、または変換などの統計的または数学的調整を受けてもよい。別の態様においては、選択核酸は、総和または平均化の前に、正規化およびデータ実験誤差排除の両方を受けてもよい。

【0206】

好ましい態様においては、12以上の遺伝子座を、分析のために用いる。別の好ましい態様においては、24以上の遺伝子座を分析のために用いる。別の好ましい態様においては、48以上の遺伝子座を分析のために用いる。別の態様においては、1つ以上の指標を用いて試料を同定する。

【0207】

10

20

30

40

50

具体的な態様においては、少ない発生源の寄与を、タンデムSNP検出を用いて定量することができる。例えば、母体試料から抽出されたDNA中のタンデムSNPを同定するための技術は、ミッチェルら(Mitchell et al.)、米国特許第7,799,531号ならびに米国特許出願第12/581,070号、第12/581,083号、第12/689,924号および第12/850,588号に開示されている。これらのものは、胎児ゲノムと母体ゲノムとの間で異なるハプロタイプを有する母体試料中の少なくとも1つのタンデム単一ヌクレオチド多型(SNP)の検出による胎児および母体の遺伝子座の分化を記載している。これらのハプロタイプの同定および定量は、ミッチェルら(Mitchell et al.)の開示に記載のように、母体試料上で直接実施し、母体試料中の胎児寄与率を決定するのに用いることができる。

10

【0208】

胎児の性別について以前に試験されていなかった試料は、胎児が男性であるおおよそ50%の可能性を有するため、Y特異的配列はそのような試料の半分においてのみ適用可能である。具体的な態様においては、胎児発生源寄与の決定に用いられる多型遺伝子座はY染色体上にはない。

【0209】

cfDNAのパーセントが少ない発生源について算出されたら、このデータを異数性検出のための方法と組み合わせて、混合試料が異数性を含む可能性を決定することができる。1態様においては、例えば、クエイク(Quake)、米国特許出願第11/701,686号;シューメイカーら(Shoemaker et al.)、米国特許出願第12/230,628号に記載のものなどの、無作為DNAセグメントの分析を利用する異数性検出方法を用いる。好ましい態様においては、混合試料中の選択遺伝子座の分析を利用する異数性検出方法は、単一の反応において染色体異常を検出するための、少ない発生源のDNA含量の決定のための領域ならびに2つ以上の染色体に由来する非多型領域の両方を含む。単一の反応は、アッセイシステムにおける様々な工程の間に導入され得るか、さもなければ染色体異常の存在または非存在を決定するのに役立つ少ない発生源のDNA含量を利用する場合に結果を歪曲し得る、夾雑または偏りの危険性を最小化するのに役立つ。他の態様においては、選択遺伝子座または領域を、少ない発生源のDNA含量の決定ならびに少ない発生源の染色体異常の検出の両方のために用いることができる。DNA含量と染色体異常の検出との両方について同じ領域を用いることは、実験誤差または夾雑に起因する任意の偏りを最小化するのに役立つ。

20

30

【0210】

(実施例)

以下の実施例は、本発明をどのように行い、使用するかを完全な開示および説明を当業者に提供するために提示されるものであり、発明者がその発明と見なすものの範囲を制限することを意図するものでもなく、また、発明者が、以下の実験が実施される実験の全部であるか、または唯一の実験であることを表すか、または含蓄することを意図するものでもない。当業者であれば、広く記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、具体的な態様に示されたように本発明に対して多くの変更および/または改変を行うことができることを理解する。従って、本発明の態様は、あらゆる点で、例示的であり、限定的ではないと考えられるべきである。

40

【0211】

用いられる数(例えば、量、温度など)に関して正確性を確保するために努力が払われたが、いくらかの実験誤差および偏差が説明されるべきである。別途指摘しない限り、部分は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏で表され、および圧力は大気圧周辺のものである。

【0212】

(実施例1)

本発明のアッセイシステムの一般的態様

いくつかのアッセイ形式を試験して、多数(例えば、96以上)の目的の遺伝子座の多

50

重化された、連結に基づく検出を証明するための独立遺伝子座の選択的増幅および検出を実施する能力を証明した。これらの遺伝子座は、特定の染色体の存在または特定の対立遺伝子中の突然変異もしくは多型の存在もしくは非存在を示唆する遺伝子座を含んでいた。

【0213】

これらのアッセイを、ヒトゲノム配列に基づいて設計し、それぞれの調査は、アッセイにおいて調査される選択遺伝子座あたり2つの固定配列オリゴからなっていた。ゲノム領域の3'領域に相補的な第1のオリゴは、以下の配列(5'から3'に向かって)オリゴ要素:全アッセイに共通のユニバーサルPCRプライミング配列: T A C A C C G G C G T T A T G C G T C G A G A C (配列番号1); 選択遺伝子座に特異的な9ヌクレオチドの同定指標; 第1のSNP独立セット中の遺伝子座指標としておよび多型特異的な第2のセット中の遺伝子座/対立遺伝子指標として作用する9塩基の遺伝子座-または遺伝子座/対立遺伝子特異的配列; ゲノム遺伝子座中の対応する塩基とは異なるハイブリダイゼーション破壊ヌクレオチド; ならびに選択ゲノム遺伝子座に相補的な20~24bpの配列を含んだ。選択ゲノム遺伝子座のこの部分においてSNPまたは突然変異が検出される場合に備えて、対立遺伝子特異的調査セットは、2つの第1の固定配列タンデム連結プライマーからなっており、それぞれ、突然変異/SNP位置に、異なる遺伝子座/対立遺伝子指標および異なる対立遺伝子特異的塩基を含んでいた。これらの第1のオリゴを、それぞれの選択核酸について、アッセイセットにおける全ての調査にわたって2の変動を含む予測された均一の T_m を提供するように設計した。

【0214】

ゲノム遺伝子座の5'領域に相補的な、第2の固定配列オリゴは、以下の配列(5'から3'に向かって)要素:ゲノム遺伝子座中の5'領域に相補的な20~24bの配列; ゲノム遺伝子座中の対応する塩基とは異なるハイブリダイゼーション破壊ヌクレオチド; およびアッセイセットにおいて全ての第3のオリゴに共通であるユニバーサルPCRプライミング配列: A T T G C G G G G A C C G A T G A T C G C G T C (配列番号2)を含んだ。

【0215】

選択ゲノム遺伝子座においてSNPまたは突然変異が検出される場合に備えて、対立遺伝子特異的調査セットは、2つのタンデム連結プライマーからなっており、それぞれ、突然変異/SNP位置に、異なる遺伝子座/対立遺伝子座指標および異なる対立遺伝子特異的塩基を含んでいた。この第2の固定配列オリゴを、それぞれの選択核酸について、第1のオリゴセットと実質的に同じ T_m であるアッセイセットにおける全ての調査にわたって2の変動を含む予測された均一な T_m を提供するように設計した。

【0216】

特定の試験された態様においては、それぞれの選択遺伝子座のために用いられる第1および第2の固定配列オリゴに相補的な領域間でゲノム遺伝子座配列に相補的である1つ以上の架橋オリゴを用いた。試験された具体的な態様においては、2つ以上の架橋オリゴを用いて、固定配列オリゴヌクレオチド間のギャップを測り、必要に応じて、1つ以上の架橋オリゴを、前記配列中の1つ以上の突然変異またはSNPを同定するために設計することができる。前記アッセイシステムにおいて用いられる架橋オリゴヌクレオチドの長さは、5から36塩基対まで変化した。

【0217】

タンデム連結形式で用いられた全てのオリゴヌクレオチドを、従来の固相化学を用いて合成した。第2の固定配列オリゴおよび架橋オリゴヌクレオチドを、隣接するオリゴヌクレオチドの3'ヒドロキシル末端への連結を可能にする5'リン酸部分を用いて合成した。

【0218】

(実施例2)

タンデム連結手順における使用のためのDNAの調製

白人男性(NA12801)または白人女性(NA11995)に由来するゲノムDN

10

20

30

40

50

Aを、コリエルセルレポジトリーズ (Coriell Cell Repositories) [米国ニュージャージー州カムデン (Camden) 所在] から取得し、音響剪断 (コバリス社 (Covaris) [米国マサチューセッツ州ウォバーン (Woburn) 所在]) により、約 200 bp の平均断片サイズまで断片化した。

【0219】

コリエル (Coriell) の DNA を、標準的な手順を用いてビオチン化した。簡単に述べると、コバリス (Covaris) の断片化された DNA を、1.5 ml マイクロチューブ中に以下の反応液: 5 µg の DNA、12 µl の 10X T4 リガーゼバッファー (エンザイマティクス社 (Enzymatics) [米国マサチューセッツ州ベバリー (Beverly) 所在])、50 U の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (エンザイマティクス社 (Enzymatics) [米国マサチューセッツ州ベバリー (Beverly) 所在])、および H₂O で 120 µl まで、を作製することにより末端修復した。これを 37 °C で 30 分間インキュベートした。約 2 ng / µl の所望の最終濃度まで、10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8.5 を用いて DNA を希釈した。

【0220】

5 µl の DNA を 96 穴プレートの各ウェルに入れ、プレートを粘着プレートシーラを用いて密封し、250 x g で 10 秒間遠心分離した。次いで、プレートを 95 °C で 3 分間インキュベートし、25 °C に冷却し、250 x g で 10 秒間、再度遠心分離した。ビオチン化マスターミックスを、1.5 ml マイクロチューブ中に、1X TdT バッファー (エンザイマティクス社 (Enzymatics) [米国マサチューセッツ州ベバリー (Beverly) 所在])、8 U TdT (エンザイマティクス社 (Enzymatics) [米国マサチューセッツ州ベバリー (Beverly) 所在])、250 µM CoCl₂、0.01 nmol / µl ビオチン-16-dUTP (ロシュ社 (Roche) [米国ニュージャージー州ナットレー (Nutley) 所在]) および H₂O で 1.5 ml までの最終濃度に調製した。15 µl のマスターミックスを 96 穴プレートの各ウェルに分注し、プレートを粘着プレートシーラを用いて密封した。プレートを 250 x g で 10 秒間遠心分離し、37 °C で 60 分間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを 250 x g で 10 秒間再度遠心分離し、7.5 µl の沈降ミックス (1 µg / µl の Dextran Blue、3 mM NaOAc) を各ウェルに添加した。

【0221】

プレートを粘着プレートシーラを用いて密封し、3000 rpm で 2 分間、IKA プレートボルテックスを用いて混合した。27.5 µl のイソプロパノールを各ウェルに添加し、プレートを粘着プレートシーラを用いて密封し、3000 rpm で 5 分間ボルテックスした。プレートを 3000 x g で 20 分間遠心分離し、上清をデカントし、プレートを反転させ、10 x g で 1 分間、吸収ワイプ上で遠心分離した。プレートを 5 分間空気乾燥し、ベレットを 30 µl の 10 mM Tris pH 8.0、1 mM EDTA 中に再懸濁した。

【0222】

(実施例 3)

タンデム連結を用いる例示的アッセイ形式

ビオチン化 DNA を用いるいくつかのタンデム連結アッセイ形式を試験して、本発明のアッセイシステムに関する概念の証拠を示し、一連の異なるアッセイ形式を用いる多数の独立遺伝子座の高度に多重化された標的化された検出を実施する能力を証明した。本発明の例示的アッセイ形式を、遺伝子試料中の遺伝子座あたり 96 以上の調査を含むように設計し、SNP が検出された場合、アッセイ形式は、それぞれ遺伝子試料中の 96 の遺伝子座あたり異なる対立遺伝子の検出を用いる、192 以上の別々の調査を用いた。それぞれのアッセイ形式について記載された例は、SNP が同定されたか否かに応じて、選択遺伝子座について合計 96 または 192 の調査反応を含む、2 つの異なるセットの固定配列オリゴヌクレオチドおよび / または 架橋オリゴ (実施例 1 に記載) を用いた。

【0223】

10

20

30

40

50

第1の例示的アッセイ形式は、第1の固定配列オリゴと架橋オリゴとの間に1塩基のギャップが存在し、架橋オリゴと第2の固定配列オリゴとの間に第2の1塩基のギャップが存在する、遺伝子座特異的な固定配列オリゴおよび架橋オリゴを用いた。2つのギャップのそれぞれは、2つの異なるSNPを包含した。この形式では、DNAポリメラーゼを用いて、それぞれのSNP塩基を組み込み、リガーゼを用いて、それによって形成されたニックを塞いだ。SNP塩基識別は、ポリメラーゼによる塩基組み込みの忠実性、および誤組み込みの事象においては、不一致の塩基に隣接するニックを塞がないリガーゼの傾向に由来するものであった。

【0224】

第2の例示的アッセイ形式は、固定配列オリゴ間に約15～35塩基のギャップが存在し、ギャップが1つ以上のSNPに広がる、2つの遺伝子座特異的な固定された配列オリゴヌクレオチドを用い、架橋オリゴを用いなかった。この形式では、ポリメラーゼを用いてギャップの失われる塩基を組み込み、リガーゼを用いてそれによって形成されたニックを塞いだ。SNP塩基識別は、ポリメラーゼによる塩基組み込みの忠実性、および誤組み込みの事象においては、不一致の塩基に隣接するニックを塞がないリガーゼの傾向に由来するものであった。

【0225】

第3の例示的アッセイ形式は、第1および第2の固定配列オリゴの間に約15～35塩基のギャップが存在し、ギャップが1つ以上のSNPに広がる、対立遺伝子特異的な第1および第2の固定配列オリゴを用い、架橋オリゴを用いなかった。2つの別々の対立遺伝子特異的な第1の固定配列オリゴおよび2つの別々の対立遺伝子特異的な第2の固定配列オリゴを用いた。ポリメラーゼを用いて、失われる塩基を組み込み、リガーゼを用いて、それによって形成されたニックを塞いだ。SNP塩基識別は、ハイブリダイゼーション特異性、3'末端近くに不一致を含むアニーリングしたプライマーを伸長させない非校正ポリメラーゼの傾向、および不一致の塩基に隣接するニックを塞がないリガーゼの傾向に由来するものであった。

【0226】

第4の例示的形式は、対立遺伝子特異的な固定配列オリゴおよび遺伝子座特異的架橋オリゴを用いた。この形式では、第1は標的化SNPの一方の対立遺伝子に特異的な3'塩基を含み、第2は標的化SNPの他方の対立遺伝子に特異的な3'塩基を含む、目的の遺伝子座の3'末端に相補的な2つの別々の固定配列オリゴを用いた。同様に、第1は第2の標的化SNPの一方の対立遺伝子に特異的な5'塩基を含み、第2は第2の標的化SNPの他方の対立遺伝子に特異的な5'塩基を含む、2つの別々の第2の固定配列オリゴを用いた。架橋オリゴは、第1および第2の固定配列オリゴに相補的な遺伝子座領域に直接隣接する領域に相補的であり、かくして、連結の前のポリメラーゼは必要なかった。リガーゼを用いて、固定配列オリゴと架橋オリゴとの間のニックを塞いだ。このアッセイ形式におけるSNP塩基識別は、ハイブリダイゼーションの特異性および不一致の塩基に隣接するニックを塞がないリガーゼの傾向に由来するものであった。この例示的形式を、連続的鑄型の作製のためにT4リガーゼまたはTaqリガーゼを用いて試験し、両方とも以下に記載のような反応において有効であることが証明された。

【0227】

第5の例示的形式は、目的の核酸上の隣接領域に相補的である遺伝子座特異的な固定配列オリゴを用い、かくして、これらのオリゴのハイブリダイゼーションによってギャップは作製されなかった。この形式では、ポリメラーゼは不要であり、リガーゼを用いてオリゴ間の単一のニックを塞いだ。

【0228】

第6の例示的形式は、固定配列オリゴに相補的な遺伝子座領域間に5塩基の短い塩基ギャップが存在する、対立遺伝子特異的な固定配列オリゴおよび遺伝子座特異的架橋オリゴを用いた。この例における遺伝子座特異的架橋オリゴは、第1および第2の固定配列オリゴに相補的な領域に直接隣接する領域に相補的な5マーであった。この形式では、ポリメ

10

20

30

40

50

ラーゼは必要なく、リガーゼを用いてオリゴ間の2つのニックを塞いだ。

【0229】

第7の例示的形式は、架橋オリゴに相補的な領域中にSNPを含有する5塩基のより短い塩基ギャップが存在する、遺伝子座特異的な固定配列オリゴおよび遺伝子座特異的な架橋オリゴを用いた。可能なSNPに対応する対立遺伝子特異的な架橋オリゴをハイブリダイゼーションおよび連結反応に含有させた。この形式では、ポリメラーゼは必要なく、リガーゼを用いて、オリゴ間の2つのニックを塞いだ。このアッセイ形式におけるSNP塩基識別は、ハイブリダイゼーションの特異性および不一致の塩基に隣接するニックを塞がないリガーゼの傾向に由来するものであった。

【0230】

第8の例示的形式は、第1および第2の固定配列オリゴに相補的な領域の間に10塩基のギャップが存在する、遺伝子座特異的な固定配列オリゴおよび2つの隣接する遺伝子座特異的な架橋オリゴを用いた。遺伝子座特異的な架橋オリゴを、ギャップを架橋するために2つの連続する5マーを要するギャップと共に、連結反応に含有させた。この形式では、ポリメラーゼは必要なく、リガーゼを用いてオリゴ間の3つのニックを塞いだ。

【0231】

上記アッセイ形式のそれぞれについて、実施例2に記載のように調製されたオリゴから、等モルプール(それぞれ40nM)の第1および第2の遺伝子座または対立遺伝子座特異的な固定配列オリゴヌクレオチドのセットを作製した。別の等モルプール(それぞれ20μM)の架橋オリゴヌクレオチドも同様に、選択ゲノム遺伝子座の配列に基づくアッセイ方法のために作製した。

【0232】

100μgのストレプトアビジンビーズを、96穴プレートのウェルに移し、上清を除去した。60μlのBB2バッファー(100mM Tris pH 8.0、10mM EDTA、500mM NaCl₂、58%ホルムアミド、0.17%Tween-80)、10μlの40nMの固定配列オリゴプールおよび実施例2で調製された30μlのピオチン化鋳型DNAを、ビーズに添加した。プレートを粘着プレートシーラを用いて密封し、ビーズが再懸濁されるまで3000rpmでボルテックスした。70°Cで5分間インキュベートした後、室温までゆっくりと冷却することにより、オリゴを鋳型DNAにアニーリングさせた。

【0233】

プレートを持ち上げた棒磁石プレート上に2分間置いて、磁気ビーズおよび結合したDNAをウェル側に引き寄せた。ピペティングにより上清を除去し、50μlの60%BB2(水中でv/v)と置換した。ボルテックスによりビーズを再懸濁し、再度磁石上に置き、上清を除去した。このビーズ洗浄手順を、50μlの60%BB2を用いて1回繰り返す、50μlの洗浄バッファー(10mM Tris pH 8.0、1mM EDTA、50mM NaCl₂)を用いてさらに2回繰り返した。

【0234】

1X Taqリガーゼバッファー(エンザイマティクス社(Enzymatics)[米国マサチューセッツ州ベバリー(Beverly)所在])、1U Taqリガーゼ、および2μM架橋オリゴプール(アッセイ形式に依存する)からなる37μlの連結反応ミックス中にビーズを再懸濁し、37°Cで1時間インキュベートした。必要に応じて、およびアッセイ形式に応じて、非校正熱安定性ポリメラーゼ+200nMの各dNTPをこの混合物中に含有させた。プレートを持ち上げた棒磁石プレートの上に2分間置いて、磁気ビーズおよび結合したDNAをウェル側に引き寄せた。ピペティングにより上清を除去し、50μlの洗浄バッファーと置換した。ボルテックスによりビーズを再懸濁し、再度磁石上に置き、上清を除去した。洗浄手順を1回繰り返した。

【0235】

ストレプトアビジンビーズから生成物を溶出させるために、30μlの10mM Tris 1mM EDTA、pH 8.0を96穴プレートの各ウェルに添加した。プレー

10

20

30

40

50

トを密封し、IKAボルテクサを用いて3000 rpmで2分間混合してビーズを再懸濁した。プレートを95℃で1分間インキュベートし、8チャンネルのピペッタを用いて上清を吸引した。各ウェルから25 µlの上清を、ユニバーサル増幅のために新鮮な96穴プレート中に移した。

【0236】

(実施例4)

タンDEM連結産物のユニバーサル増幅

目的の遺伝子座にハイブリダイズした第1および第2の固定配列オリゴ中に存在するユニバーサル配列に相補的なユニバーサルPCRプライマーを用いて、重合した、および/または連結された核酸を増幅させた。25 µlの実施例3のそれぞれの反応混合物を、それぞれの増幅反応において用いた。50 µlのユニバーサルPCR反応は、25 µlの溶出した連結産物 + 1X Pfusionバッファー (フィンザイムス (Finnzymes)、フィンランド)、1Mのベタイン、400 nMの各dNTP、1UのPfusion誤差補正熱安定性DNAポリメラーゼ、および以下のプライマー対: T A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A G A T C T A C A C C G G C G T T A T G C G T C G A G A (配列番号3) および T C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T X A A A C G A C G C G A T C A T C G G T C C C C G C A A (配列番号4) (配列中、Xはプール化および配列決定の前に個々の試料を独自に同定するのに用いられた96の異なる試料指標の1つである) からなる。PCRを、BioRad Tetrad (商標) サーマサイクラーを用いてストリンジントな条件下で行った。

【0237】

それぞれの試料に由来する10 µlのユニバーサルPCR産物をプールし、プールされたPCR産物を、AMPure XP (商標) SPRIビーズ (ベックマン - カウルター社 (Beckman - Coulter) [米国マサチューセッツ州ダンバーズ (Danvers) 所在]) を用いて精製し、Quant-iT (商標) PicoGreen (インビトロジェン社 (Invitrogen) [米国カリフォルニア州カールスバッド (Carlsbad) 所在]) を用いて定量した。

【0238】

(実施例5)

選択遺伝子座の検出および分析

各アッセイ形式の精製されたPCR産物を、Illumina HiSeq (商標) 2000 (イルミナ社 (Illumina) [米国カリフォルニア州サンディエゴ (San Diego) 所在]) 上でスライドの単一レーン上で配列決定した。配列決定の実行は、典型的には、約100Mの生の読み取り値を生じさせ、そのうちの約85M (85%) は予想されたアッセイ構造にマッピングされた。これは、実験にわたって平均で約885Kの読み取り値 / 試料、および (96の遺伝子座を用いる実験の場合) 96の遺伝子座にわたって9.2Kの読み取り値 / 複製 / 遺伝子座に換算された。このマッピングされた読み取り値を複製 / 遺伝子座 / 対立遺伝子計数中で解析し、様々な測定基準を、以下のように、それぞれの条件について計算した。

【0239】

収率: 遺伝子座あたりの独自の読み取り値の平均数 (複製 / 遺伝子座あたりの独自の同定指標読み取り値のみを計数する) を入力DNA中に含まれるゲノム当量の総数で除算したもとして計算された、配列決定において調査された入力DNAの割合の測定基準。

【0240】

80パーセントイル遺伝子座頻度範囲: 遺伝子座の80%を包含する倍数範囲として解釈された、配列決定データにおける遺伝子座頻度の変動性の測定基準。それは、遺伝子座あたりの全読み取り値の90パーセントイルを、遺伝子座あたりの全読み取り値の10パーセントイルで除算したもとして、全ての遺伝子座にわたって、遺伝子座あたりの全読み取り値の分布上で計算されたものであった。

【0241】

SNP 誤差率：SNP 位置での誤差率の測定基準であり、SNP 位置に不一致塩基を含有する読み取り値の割合として計算されたものである。

これらの結果を、テーブル 1 にまとめる。

【0242】

テーブル 1：タンDEM 連結アッセイ形式の結果のまとめ

【0243】

【表 1】

アッセイ形式	固定配列オリゴ 第1および/または第2	用いた架橋オリゴ	用いた酵素	収率	80% 遺伝子頻度 範囲	SNP 誤差率
1	遺伝子座特異的	遺伝子座特異的	pol+lig	9.5%	5.3	0.18%
2	遺伝子座特異的	なし	pol+lig	1.4%	58.3	0.19%
3	対立遺伝子特異的	なし	pol+lig	0.4%	61.7	1.00%
4	対立遺伝子特異的	遺伝子座特異的	Taq lig	5.0%	5.9	0.92%
4	対立遺伝子特異的	遺伝子座特異的	T4 lig	5.3%	4.4	0.95%
5	遺伝子座特異的	なし	Taq lig	22.5%	1.7	N/A
6	遺伝子座特異的	遺伝子座特異的	Taq lig	12.5	2.9	N/A
7	遺伝子座特異的	対立遺伝子特異的	Taq lig	14.3	2.8	0.20%
8	遺伝子座特異的	2遺伝子座 特異的	Taq lig	18.5%	2.8	N/A

pol:ポリメラーゼ
lig:リガーゼ

【0244】

テーブル 1 は、架橋オリゴを用いる遺伝子座特異的タンDEM 連結アッセイが、高収率（約 10%）、高割合の標的遺伝子座に由来する産物（15%の読み取り値は予想されたアッセイ構造を含まなかった）、遺伝子座の限定された偏り（80%の遺伝子座が約 5 倍の濃度範囲内にある）、および高い SNP 正確度（0.2%の SNP 誤差率）で、鋳型 DNA を標的化産物に変換したことを示す。架橋オリゴを用いない遺伝子座特異的タンDEM 連結アッセイは、収率および実質的な遺伝子座の偏りの低下をもたらしたが、依然として高い正確度の SNP 遺伝子型決定データをもたらした。架橋オリゴを用いる対立遺伝子特異的タンDEM 連結アッセイは T4 および Taq リガーゼの両方を用いる遺伝子座特異的アッセイと比較して中間の収率をもたらしたが、遺伝子座の限定された偏りおよび高い正確度の SNP 遺伝子型決定データを依然としてもたらした。架橋を用いない対立遺伝子特異的タンDEM 連結アッセイは収率および実質的な遺伝子座の偏りの低下をもたらしたが、高い正確度の SNP 遺伝子型決定データを依然としてもたらした。

【0245】

アッセイ形式 6 から 8 は、鋳型 DNA を高い収率（12 ~ 18%）、標的遺伝子座に由来する高い割合の産物（約 76%の読み取り値が予想されたアッセイ構造を含んでいた）および遺伝子座の限られた偏り（80%の遺伝子座が 2 ~ 3 倍の濃度範囲内にある）で標的産物に変換することができることを示した。図 5 は、単一の試料中で観察された全ての多型アッセイの 2 つの対立遺伝子に関する配列計数を比較する、アッセイ形式 7 を用いて得られた遺伝子型決定性能を例示する。同型および異型クラスターの明確な分離、ならびに同型クラスター間で観察された低いバックグラウンド計数に留意されたい。

【0246】

（実施例 6）

タンデム連結を用いる胎児DNAパーセントの決定

1つの例示的な本発明のアッセイシステムを設計して、遺伝子試料中の胎児DNA濃度パーセントを決定し、ならびに試料内の選択遺伝子座に関する計数を提供した。この例示的アッセイは、それぞれ母体試料中での異なる遺伝子座の検出を用いる、480の個別の調査を含んだ。最初の例は、男性胎児を担持する被験者における胎児DNAパーセントの決定を使用し、従って、Y染色体上の遺伝子座ならびに母体配列とは異なる父方から継承された胎児SNPを含有する遺伝子座を使用した。

【0247】

具体的には、480の選択核酸を、前記アッセイシステムを用いて調査した。480の選択核酸は、Y染色体上の遺伝子座に対応する核酸の48の配列特異的調査、第21染色体上の遺伝子座に対応する核酸の192の配列特異的調査、第18染色体上の遺伝子座に対応する選択核酸の192の配列特異的調査、および第1~16染色体上の多型遺伝子座に対応する選択核酸の144の配列特異的調査を含んだ。これらのアッセイは、ヒトゲノム配列に基づいて設計されたものであり、それぞれの調査は、アッセイにおいて調査された選択核酸あたり3つのオリゴを用いた。

【0248】

それぞれの調査に用いられた第1のオリゴは、選択ゲノム領域の3'領域に相補的であり、以下の配列(5'から3'に向かって)オリゴ要素:全アッセイに共通のユニバーサルPCRプライミング配列:TACACCGGCGTTATGCGTCGAGAC(配列番号1);9ヌクレオチドを含む選択遺伝子座に特異的な同定指標;および選択ゲノム遺伝子座に相補的な20~24bpの配列を含んだ。この第1のオリゴは、それぞれの選択核酸について、480のアッセイセットにおける全ての調査にわたって2'の変動を含む予測された均一の T_m を提供するように設計した。

【0249】

それぞれの調査に用いられた第2のオリゴは、第1のオリゴヌクレオチドに相補的なゲノム領域に直接隣接するゲノム遺伝子座配列に相補的な架橋オリゴであった。目的の選択核酸に基づいて、架橋オリゴを、アッセイセットにおいて480の調査の全部のために架橋オリゴとして役立ち得る合計12のオリゴヌクレオチド配列の利用を可能にするように設計した。

【0250】

それぞれの調査に用いられた第3のオリゴは、選択ゲノム遺伝子座の5'領域に相補的であり、以下の配列(5'から3'に向かって)要素:ゲノム遺伝子座中の5'領域に相補的な20~24bpの配列;ゲノム遺伝子座中の対応する塩基とは異なるハイブリダイゼーション破壊ヌクレオチド;およびアッセイセットにおいて全ての第3のオリゴに共通であるユニバーサルPCRプライミング配列:ATTGCGGGGACCGATGATCGCGTC(配列番号2)を含んだ。この第3のオリゴは、それぞれの選択核酸について、480のアッセイセットにおいて全ての調査にわたって2'の変動を含む予測された均一な T_m を提供するように設計され、その T_m 範囲は、第1のオリゴセットと実質的に同じ T_m 範囲であった。

【0251】

全てのオリゴヌクレオチドを、従来の固相化学を用いて合成した。第1のオリゴヌクレオチドおよび架橋オリゴヌクレオチドを、隣接するオリゴヌクレオチドの3'ヒドロキシル末端への連結を可能にする5'リン酸部分を用いて合成した。多重化アッセイにおいて全ての調査に用いられた第1および第3のオリゴヌクレオチドのセットの等モルプールを作製し、全ての架橋オリゴヌクレオチドの別の等モルプールを作製して、別々のハイブリダイゼーション反応を可能にした。

【0252】

Dynal Silane viral NAキット(インビトロジェン社(Invitrogen)[米国カリフォルニア州カールスバッド(Carlsbad)所在])を用いて、5mLの血漿からゲノムDNAを単離した。7人の非妊娠女性被験者、男を妊娠

10

20

30

40

50

している10人の女性被験者、および女を妊娠している22人の女性被験者を含む、37人の女性から、それぞれ約12 ngのDNAを調製した。標準的な手順を用いてDNAをビオチン化し、ビオチン化されたDNAをストレプトアビジンで被覆された固相表面上に固定化して、その後のアッセイ工程においてゲノムDNAの保持を可能にした。

【0253】

固定化DNAを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、それぞれの調査される配列のための第1および第3のオリゴを含む第1のプールにハイブリダイズさせた。次いで、プール中のハイブリダイズしなかったオリゴを、固相支持体の表面から洗浄し、固定化DNAを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で架橋オリゴヌクレオチドを含むプールにハイブリダイズさせた。架橋オリゴヌクレオチドを、固定化DNAにハイブリダイズさせたら、残りの未結合のオリゴを表面から洗浄し、選択遺伝子座に結合した3つのハイブリダイズしたオリゴを、T4リガーゼを用いて連結して、増幅のための連続DNA鋳型を提供した。

10

【0254】

連結されたDNAを、誤差補正熱安定性DNAポリメラーゼ、第1のユニバーサルPCRプライマーTAAATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACACCGGC GTTATGCGTCGAGA(配列番号3)および第2のユニバーサルPCRプライマーTCAAGCAGAAAGACGGCATACGAGATXAAACGACGCGATCATCGGTC C C C G C A A(配列番号4)(配列中、Xはプール化および配列決定の前に個々の試料を独自に同定するのに用いられた96の異なる試料指標の1つである)を用いて固体基質から増幅させた。上記の37の試料のそれぞれに由来する10 μLのユニバーサルPCR産物およびプールされたPCR産物を、AMPure(商標)SPRIビーズ(ベックマン-カウルター社(Beckman-Coulter)[米国マサチューセッツ州ダンバーズ(Danvers)所在])を用いて精製し、Quant-iT(商標)(インビトロジェン社(Invitrogen)[米国カリフォルニア州カールスバッド(Carlsbad)所在])を用いて定量した。

20

【0255】

精製されたPCR産物を、Illumina HiSeq(商標)2000上の6レーンの単一スライド上で配列決定した。配列決定の実行は、384 Mの生の読み取り値を生じさせ、そのうちの343 M(89%)が予想されたゲノム遺伝子座にマッピングされ、37の試料にわたって試料あたり平均3.8 Mの読み取り値、および480の遺伝子座にわたって遺伝子座あたり試料あたり8 Kの読み取り値が得られた。マッピングされた読み取り値を試料および遺伝子座計数で解析し、胎児DNAパーセントの2つの別々の測定基準を以下のように計算した。

30

【0256】

Y染色体遺伝子座により検出された男性DNAパーセントは、Y染色体遺伝子座調査から誘導された読み取り値の相対割合と、常染色体遺伝子座調査から誘導された読み取り値の相対割合とに対応し、(試験被験者におけるY染色体の読み取り値の数/試験被験者における常染色体の読み取り値の数)/(男性対照被験者における読み取り値の数/男性対照被験者における常染色体読み取り値の数)として計算した。この測定基準を、Y染色体の相対読み取り値を用いる男性胎児の場合、胎児DNAパーセントの尺度として用いた。

40

【0257】

多型遺伝子座により検出された胎児DNAパーセントは、そのような区別を行うことができる遺伝子座での母体対立遺伝子に対する非母体から誘導された読み取り値の割合に対応する。第1に、それぞれの同定された遺伝子座について、最も少ない計数を有する対立遺伝子(低頻度の対立遺伝子)の読み取り値の数を、読み取り値の総数で除算して、それぞれの遺伝子座に関する少ない対立遺伝子頻度(MAF)を提供した。次いで、0.075%~15%のMAFを有する遺伝子座を、情報遺伝子座として同定した。試料に関する見積もられた胎児DNAパーセントを、情報遺伝子座の少ない対立遺伝子頻度の平均に2を掛けたものとして算出した、すなわち、 $0.075\% < \text{MAF} < 15\%$ の場合、 $2 \times \text{平}$

50

均 (M A F) 出現率として計算した。

【 0 2 5 8 】

図 6 は、これらの計算の結果を示す。図 6 に示されるように、上記の Y 染色体測定基準を用いて決定された男性遺伝子座パーセント (灰色の円) は、男性胎児を含む妊娠を、女性胎児 (灰色の菱形) および非妊娠試料 (黒色の円) を含む妊娠から分離することができる。さらに、多型遺伝子座測定基準による試料中の胎児量パーセントの計算は、妊娠試料を非妊娠試料から識別することができる。最後に、Y 染色体から得られた試料に関する胎児 DNA パーセント見積もり値と、男性胎児を含む妊娠における多型遺伝子座との間には相関があった。この相関は、非常に低い胎児パーセント値まで持続する。

【 0 2 5 9 】

(実施例 7)

母体試料中の異数性の検出

本発明のアクセシシステムを、妊娠女性の 2 つの別々のコホートにおける多型および染色体異常の検出において用いた。190 の正常、36 の T 2 1、および 8 の T 1 8 妊娠の第 1 のコホートならびに 126 の正常、36 の T 2 1 および 8 の T 1 8 妊娠の第 2 のコホートを、胎児異数性について試験した。染色体異数性を、576 の第 2 1 染色体および 576 の第 1 8 染色体アッセイを用いて検出し、一緒にプールして、以下に記載のように単一の反応においてアッセイした。

【 0 2 6 0 】

異数性検出アッセイにおいて用いられた要素を図 7 に例示する。母体試料から単離された c f DNA (7 0 1) を、各母体試料中の第 2 1 染色体および第 1 8 染色体の両方に由来する複数の選択遺伝子座のハイブリダイゼーション、連結および増幅のための鋳型として用いた。3 つのオリゴヌクレオチドをそれぞれの選択遺伝子座にハイブリダイズさせて、増幅および検出のための連結産物を作製した。左側 (または第 1 の) 固定配列オリゴヌクレオチドは、選択遺伝子座に相補的な領域 (7 0 9) および第 1 のユニバーサルプライマー領域 (7 1 1) を含んだ。右側 (または第 2 の) 固定配列オリゴヌクレオチド (7 0 5) は、選択遺伝子座に相補的な第 2 の領域 (7 1 3) および第 2 のユニバーサルプライマー領域 (7 1 5) を含んだ。用いた架橋オリゴヌクレオチド (7 0 7) は、それぞれ、異数性検出アッセイにおいて用いられた 2 つ以上の選択遺伝子座の架橋領域にハイブリダイズするように設計された。固定配列オリゴヌクレオチド (7 0 3、7 0 5) および架橋オリゴヌクレオチド (7 0 7) が c f DNA (7 0 1) の相補的領域にハイブリダイズした場合、その末端は 2 つのニックを形成した。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの c f DNA への連結の際に、それぞれの選択遺伝子座について、7 0 3、7 0 5 および 7 0 7 を含む連結産物を作製し、これを増幅プライマー (7 1 9、7 2 1) のための鋳型として用いた。

【 0 2 6 1 】

次いで、それぞれ、第 1 および第 2 のユニバーサルプライマー領域に相補的な領域を含む 2 つの増幅プライマー (7 1 9、7 2 1) を用いて、連結産物を増幅させた。この増幅産物は、選択遺伝子座の配列を含んでいた。右側の増幅プライマーはまた、遺伝子座が多重化アッセイにおいて得られた特定の試料を同定するための試料指標 (7 1 7) を含んだ。96 の異なる右側の増幅プライマー (7 2 9) を用いる増幅は、単一のレーン上での 96 の異なる増幅産物のプール化および同時的配列決定を可能にした。

【 0 2 6 2 】

増幅プライマー (7 1 9、7 2 1) はまた、Illumina HiSeq (商標) 2000 システム (イルミナ社 (Illumina) [米国カリフォルニア州サンディエゴ (San Diego) 所在]) を用いる配列決定のためのクラスター増幅を支援する左側のクラスター配列 (7 2 3) (T A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A) (配列番号 7) および右側のクラスター配列 (7 2 5) (A T C T C G T A T G C C G T C T T C T G C T T G A) (配列番号 8) も含んでいた。第 1 のユニバーサルプライマー配列を含む配列決定プライマー (7 2 7) を用いて、増幅産物の配列を決定し、第 2 の配列決定

10

20

30

40

50

プライマー（729）を用いて、増副産物の試料指標（717）を決定した。

【0263】

簡単に述べると、約10mLの末梢血を各患者からBC Tチューブ（ストレック社（Streck）[米国ネブラスカ州オマハ（Omaha）所在]）中に採取し、翌日配達便でタンデムダイアグノスティクス社（Tandem Diagnostics）に出荷した。1600gで10mの遠心分離により血液採取の72h以内にBC Tチューブから血漿を単離した。血漿を第2のチューブに移し、1600gで10m遠心分離して、残存する細胞を除去した。患者1人あたり4～5mLの血漿から、cfDNAを単離した。それぞれの患者試料から約15ngのcfDNAを単離し、96穴プレートの個々のウェルに配置した。その後のプロセッシングは全て、アレイシステム方法あたり最大で96のcfDNA患者試料の多重化バッチ上で行った。

10

【0264】

各ウェル中の母体試料から単離されたcfDNAをビオチン沈降させ、上記の実施例3に記載のように30μLのTE中に再懸濁した。ビオチン化された鋳型DNAを、100μgのMyOneC1ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ（ライフテクノロジーズ社（Life Technologies）[米国カリフォルニア州カールスバッド（Carlsbad）所在]）、60μLのBB2バッファー（100mM Tris pH8.0、10mM EDTA、500mM NaCl₂、58%ホルムアミド、0.17% Tween-80）、ならびに10μLのプールされた40nMの左側（703）および右側（705）の固定配列オリゴヌクレオチドと混合した。混合物を70℃に加熱し、2時間冷却した。次いで、ビーズをウェルの側に磁氣的に固定し、50μLの60%BB2（H₂Oでv/v）で2回洗浄し、50μLの洗浄バッファー（10mM Tris pH8.0、1mM EDTA、50mM NaCl₂）でさらに2回洗浄した後、1UのTaqリガーゼ（エンザイマティクス社（Enzymatics）[米国マサチューセッツ州ベバリー（Beverly）所在]）、1X Taqリガーゼバッファー（エンザイマティクス社（Enzymatics））、および10μMの5'-リン酸化された5マーの架橋オリゴヌクレオチド（707）を含有する50μLの反応液中に再懸濁した。混合物を37℃で1時間インキュベートした。ビーズを再度ウェルの側に磁氣的に固定し、50μLの洗浄バッファーで2回洗浄した後、30μLのTE中に再懸濁した。

20

【0265】

95℃で3分間インキュベートすることにより、連結産物を固定化ビーズから溶出させた。溶出した連結産物を、1UのPfu fusionポリメラーゼ（サーモフィッシャー社（Thermo Fisher）[米国マサチューセッツ州ウォルサム（Waltham）所在]）、1Mのベタイン、1X Pfu fusionバッファー、ならびに400nMの左側および右側の増幅プライマー（それぞれ、719、721）を含有する50μLの反応液中での26サイクルのPCRによって増幅した。右側プライマーは、HiSeq2000（イルミナ社（Illumina）[米国カリフォルニア州サンディエゴ（San Diego）所在]）上での96の試料の多重化配列決定を可能にする7塩基の試料指標（717）を含んでいた。左側の固定配列オリゴの配列は、T A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A G A T C T A C A C C G G C G T T A T G C G T C G A G A C（配列番号5）であった。

30

40

【0266】

そして、右側の固定配列オリゴの配列は、T C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T N N N N N N N A A A C G A C G C G A T C A T C G G T C C C C G C A A T（配列番号6）であった。

【0267】

単一の96穴プレートに由来する増幅産物を等量でプールし、プールされた増幅産物を、製造業者の説明書に従ってAMPure XP（商標）SPRIビーズ（ベックマン・カウルトー社（Beckman-Coulter）[米国マサチューセッツ州ダンバース（Danvers）所在]）を用いて精製した。それぞれの精製されたプールされたライブ

50

ラリーを、製造業者のプロトコルに従ってIllumina TruSeq v2 SR クラスターキットフローセル(イルミナ社(Illumina)[米国カリフォルニア州サンディエゴ(San Diego)所在])上でのクラスター増幅のための鋳型として用いた。スライドをIllumina HiSeq(商標)2000(イルミナ社(Illumina)[米国カリフォルニア州サンディエゴ(San Diego)所在])上でプロセッシングして、左側の配列プライマー(723)から56塩基の遺伝子座特異的配列を生成させ、8塩基の試料特異的配列の別々の読み取り値を、第2の配列プライマー(725)から得た。試料あたり平均で903Kの生の読み取り値を収集した。平均で876K(97%)の読み取り値を予想されたアッセイ構造に割り当てた。

【0268】

図8は、配列決定実行の単一レーン上での1つの多重化アッセイにおいて全て分析された、第2のコホートからの患者試料のサブセットに関する例示的データを示す。最初に96の異なる試料をこの特定の実行において実行したが、試料品質対照閾値を満たさないものとして6つの試料をこの分析セットから後に排除した。アッセイにおいて生成された読み取り値に基づく試料について第18染色体および第21染色体のそれぞれについてトリム平均を算出した。試料による各染色体の高いおよび低い計数の10%を除去することにより、トリム平均を計算した。様々な選択遺伝子座に対応する検出された増幅産物を用いて、各サンプルに関する第21染色体の割合の測定基準および第18染色体の割合の測定基準を計算した。第21染色体割合については、各試料について、384の第21染色体の選択遺伝子座における計数のトリム平均を、全部で576の第21染色体の遺伝子座と576の第18染色体の遺伝子座の計数のトリム平均の合計で除算したのとしてこれを算出した。

【0269】

第1のコホートの母体試料中では選択遺伝子座あたり平均で834の読み取り値計数が観察され、第2のコホートに由来する選択遺伝子座あたり664の読み取り値計数が観察された。これらの計数を用いて、第21染色体および第18染色体に関する染色体割合のzスコアを計算した。

【0270】

簡単に述べると、各試料につき、遺伝子座計数あたりの中央値を一般値(例えば、1000)にスケールリングすることによりzスコアを算出し、スケールリングされた計数をlog₂基数2により変換した。RMA log線形モデリングおよび中央値分散分析を実施して(ボルスタッド、ビー、エムら(Bolstad, B.M. et al.)(2003) *Bioinformatics* 19(2):185-193; ラファエル、エー(Rafael, A.)(2003) *Nucleic Acids Research* 31(4):e15; イリザリー、アールエーら(Irizarry, R.A. et al.)(2003) *Biostatistics* 4(2):249-64)、染色体効果、遺伝子座効果、試料効果、および残差を見積もった。見積もられた染色体効果を一般値、例えば、0に設定し、 $2^{\text{(染色体効果 + 試料効果 + 残差)}}$ を各遺伝子座について算出して正規化された計数を作製した。zスコアが0の平均を有し、1の標準偏差を有するように反復打ち切りを用いてzスコアをスケールリングした。

【0271】

第1のコホートの試料から得られたデータを用いて、第21染色体および第18染色体に関する第1のコホートのzスコアを決定し、それぞれ、図9および図10に示した。正常な試料は暗灰色の菱形で示され、トリソミーを有する試料は明灰色の菱形で示される。179/180(99.4%)の正常な試料(暗灰色の菱形)は3未満のzスコアを有した; 1つの正常な試料は第21染色体の3.4のzスコアおよび第18染色体の3.0のzスコアを有していた。35/35(100%)のT21および7/7(100%)のT18試料が、染色体割合の3を超えるzスコアを有していた。T18の平均zスコアは8.5であり、その範囲は5.8~10.9であった。T21の平均zスコアは11.5であり、その範囲は6.1~19.8であった。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 2 】

図 8 に提供されたデータを、第 2 のコホートの残りの試料からのデータと組み合わせて、第 2 1 染色体および第 1 8 染色体に関する z スコアを決定し、それぞれ、図 1 1 および図 1 2 に示した。正常な試料は暗灰色の菱形で示され、トリソミーを有する試料は明灰色の菱形で示される。1 2 5 / 1 2 5 の正常な試料は、3 未満の z スコアを有し、3 6 / 3 6 (1 0 0 %) の T 2 1 および 8 / 8 (1 0 0 %) の T 1 8 試料が 3 を超える z スコアを有していた。T 1 8 の平均 z スコアは 9 . 5 であり、その範囲は 5 . 1 ~ 1 9 . 8 であった。T 2 1 の平均 z スコアは 1 1 . 4 であり、その範囲は 3 . 4 ~ 2 1 . 8 であった。

【 0 2 7 3 】

これらのコホートにおける異数性の検出に加えて、特定の多型を用いて、母体試料への胎児寄与率も決定した。これらの胎児寄与率の決定のために用いられた一般的方法是、全体が本明細書に援用される 2 0 1 1 年 7 月 1 9 日に出願された米国特許出願第 6 1 / 5 0 9 , 1 8 8 号に記載されている。

10

【 0 2 7 4 】

簡単に述べると、検出可能な多型を有する特定の遺伝子座の配列決定は、情報遺伝子座としてこれらの遺伝子座を同定した。母体多型領域とは異なる胎児多型領域を有する同定された遺伝子座の計数を用いて、母体試料に関するおおよその胎児寄与を算出した。母体試料への胎児寄与率の算出において用いられたそれぞれの遺伝子座は、最小で 2 5 6 の計数を有していた。この算出のための例示的 S N P データセットを、以下のテーブル 2 およびテーブル 3 に例示する。これらのセットに由来する同定された情報遺伝子座に対応するデータを、寄与率の算出において用いた。情報遺伝子座を、それぞれの表において太字で示す。

20

テーブル 2 : 母体試料 1 に関する S N P 検出および算出された胎児率 (%)

【 0 2 7 5 】

【表 2】

染色体／遺伝子座	SNP_1 の数	SNP_2 の数	合計数	算出された 胎児パーセント
Ch01_Lc067487	294	26	320	0.210138
Ch01_Lc067489	187	167	354	
Ch01_Lc067490	389	1	390	
Ch01_Lc067491	233	113	346	
Ch01_Lc067492	0	267	267	
Ch01_Lc067493	145	132	277	
Ch01_Lc067495	106	172	278	10
Ch01_Lc067496	308	28	336	
Ch01_Lc067497	298	0	298	
Ch01_Lc067498	310	1	311	
Ch01_Lc067499	256	1	257	
Ch01_Lc067501	26	273	299	
Ch01_Lc067503	296	0	296	
Ch01_Lc067504	134	149	283	
Ch02_Lc067508	0	337	337	
Ch02_Lc067510	37	324	361	
Ch02_Lc067511	138	147	285	20
Ch02_Lc067512	180	251	431	
Ch02_Lc067514	0	383	383	
Ch02_Lc067515	316	31	347	
Ch02_Lc067516	276	2	278	
Ch02_Lc067519	42	276	318	
Ch02_Lc067521	312	47	359	
Ch02_Lc067522	158	170	328	
Ch02_Lc067523	38	328	366	
Ch02_Lc067524	177	127	304	
Ch02_Lc067525	292	0	292	
Ch02_Lc067526	361	0	361	30
Ch02_Lc067527	261	26	287	
Ch02_Lc067529	140	146	286	
Ch03_Lc067530	0	268	268	
Ch03_Lc067531	217	178	395	
Ch03_Lc067532	245	153	398	
Ch03_Lc067533	1	286	287	
Ch03_Lc067534	384	38	422	
Ch03_Lc067535	192	114	306	
Ch03_Lc067537	32	276	308	
Ch03_Lc067538	243	15	258	
Ch03_Lc067539	132	247	379	40
Ch03_Lc067540	162	105	267	
Ch03_Lc067541	239	35	274	

【 0 2 7 6 】

Ch03_Lc067542	3	406	409	
Ch03_Lc067544	2	271	273	
Ch03_Lc067545	373	0	373	
Ch03_Lc067546	354	0	354	
Ch03_Lc067547	1	256	257	
Ch03_Lc067548	365	0	365	
Ch03_Lc067549	187	111	298	
Ch04_Lc067550	33	312	345	
Ch04_Lc067552	323	1	324	
Ch04_Lc067553	217	119	336	10
Ch04_Lc067557	35	236	271	
Ch04_Lc067558	184	166	350	
Ch04_Lc067559	295	32	327	
Ch04_Lc067560	140	141	281	
Ch04_Lc067561	160	123	283	
Ch04_Lc067562	313	2	315	
Ch04_Lc067566	142	191	333	
Ch04_Lc067569	117	206	323	
Ch05_Lc067570	0	403	403	
Ch05_Lc067571	229	219	448	
Ch05_Lc067572	185	134	319	20
Ch05_Lc067573	271	22	293	
Ch05_Lc067575	261	142	403	
Ch05_Lc067578	0	399	399	
Ch05_Lc067579	307	46	353	
Ch05_Lc067581	189	109	298	
Ch05_Lc067582	0	268	268	
Ch05_Lc067583	167	203	370	
Ch05_Lc067585	209	119	328	
Ch05_Lc067586	3	327	330	
Ch05_Lc067587	321	0	321	
Ch06_Lc067589	286	0	286	30
Ch06_Lc067590	2	344	346	
Ch06_Lc067591	124	179	303	
Ch06_Lc067592	0	330	330	
Ch06_Lc067593	0	286	286	
Ch06_Lc067594	396	2	398	
Ch06_Lc067595	349	0	349	
Ch06_Lc067597	340	1	341	
Ch06_Lc067598	0	412	412	
Ch06_Lc067599	182	93	275	
Ch06_Lc067600	44	307	351	
Ch06_Lc067601	43	324	367	40
Ch06_Lc067602	358	1	359	
Ch07_Lc067603	160	141	301	
Ch07_Lc067604	302	0	302	

Ch07_Lc067605	37	414	451	
Ch07_Lc067606	269	290	559	
Ch07_Lc067607	166	159	325	
Ch07_Lc067609	1	396	397	
Ch07_Lc067610	225	134	359	
Ch07_Lc067611	48	391	439	
Ch07_Lc067612	2	333	335	
Ch07_Lc067614	200	246	446	
Ch07_Lc067615	188	184	372	
Ch07_Lc067616	167	116	283	10
Ch07_Lc067617	204	186	390	
Ch07_Lc067618	281	28	309	
Ch07_Lc067619	44	297	341	
Ch07_Lc067620	336	0	336	
Ch07_Lc067621	48	342	390	
Ch08_Lc067622	313	1	314	
Ch08_Lc067623	414	0	414	
Ch08_Lc067624	230	142	372	
Ch08_Lc067625	0	377	377	
Ch08_Lc067626	41	357	398	
Ch08_Lc067627	133	258	391	20
Ch08_Lc067628	388	1	389	
Ch08_Lc067629	348	0	348	
Ch08_Lc067630	37	314	351	
Ch08_Lc067631	185	129	314	
Ch08_Lc067632	49	308	357	
Ch08_Lc067633	186	195	381	
Ch08_Lc067634	174	217	391	
Ch08_Lc067635	161	152	313	
Ch08_Lc067637	0	284	284	
Ch08_Lc067638	343	50	393	
Ch09_Lc067639	164	99	263	30
Ch09_Lc067640	185	186	371	
Ch09_Lc067641	344	0	344	
Ch09_Lc067642	294	0	294	
Ch09_Lc067643	36	336	372	
Ch09_Lc067644	221	144	365	
Ch09_Lc067645	315	36	351	
Ch09_Lc067646	141	143	284	
Ch09_Lc067647	33	270	303	
Ch09_Lc067648	43	349	392	
Ch09_Lc067649	147	152	299	
Ch09_Lc067650	201	187	388	40
Ch09_Lc067651	176	151	327	
Ch10_Lc067652	29	277	306	
Ch10_Lc067653	134	157	291	

Ch10_Lc067654	174	196	370	
Ch10_Lc067655	189	181	370	
Ch10_Lc067656	125	174	299	
Ch10_Lc067657	375	2	377	
Ch10_Lc067658	0	345	345	
Ch10_Lc067659	204	174	378	
Ch10_Lc067661	236	271	507	
Ch10_Lc067662	39	325	364	
Ch11_Lc067663	2	378	380	
Ch11_Lc067664	42	298	340	10
Ch11_Lc067666	196	200	396	
Ch11_Lc067667	220	164	384	
Ch11_Lc067668	20	290	310	
Ch11_Lc067670	1	356	357	
Ch12_Lc067671	212	195	407	
Ch12_Lc067673	1	298	299	
Ch12_Lc067674	242	30	272	
Ch12_Lc067675	2	292	294	
Ch12_Lc067676	1	381	382	
Ch12_Lc067677	139	179	318	
				20

【 0 2 7 9 】

テーブル 3 : 試料 2 の S N P 検出および算出された胎児率 (%)

【 0 2 8 0 】

【 表 3 】

染色体／遺伝子座	SNP_1 の数	SNP_2 の数	合計数	算出された 胎児パーセント	
Ch01_Lc067487	181	134	315	0.096075	
Ch01_Lc067489	18	337	355		
Ch01_Lc067490	17	333	350		30
Ch01_Lc067491	356	0	356		
Ch01_Lc067492	12	264	276		
Ch01_Lc067493	7	385	392		
Ch01_Lc067494	140	118	258		
Ch01_Lc067495	163	118	281		
Ch01_Lc067496	198	172	370		
Ch01_Lc067498	15	301	316		
Ch01_Lc067499	162	170	332		
Ch01_Lc067501	11	252	263		
Ch01_Lc067502	129	130	259		
Ch01_Lc067503	148	172	320		40
Ch01_Lc067504	157	146	303		
Ch02_Lc067508	188	196	384		
Ch02_Lc067510	1	356	357		

【 0 2 8 1 】

Ch02_Lc067511	3	308	311	
Ch02_Lc067512	262	193	455	
Ch02_Lc067513	318	0	318	
Ch02_Lc067514	1	440	441	
Ch02_Lc067515	169	166	335	
Ch02_Lc067516	189	149	338	
Ch02_Lc067519	218	133	351	
Ch02_Lc067521	153	180	333	
Ch02_Lc067522	14	326	340	
Ch02_Lc067523	180	178	358	10
Ch02_Lc067524	330	1	331	
Ch02_Lc067526	202	185	387	
Ch02_Lc067527	149	192	341	
Ch02_Lc067529	140	160	300	
Ch03_Lc067530	132	128	260	
Ch03_Lc067531	20	392	412	
Ch03_Lc067532	202	270	472	
Ch03_Lc067533	328	0	328	
Ch03_Lc067534	224	223	447	
Ch03_Lc067535	188	142	330	
Ch03_Lc067537	315	1	316	20
Ch03_Lc067538	265	0	265	
Ch03_Lc067539	191	214	405	
Ch03_Lc067540	166	124	290	
Ch03_Lc067542	256	208	464	
Ch03_Lc067543	139	123	262	
Ch03_Lc067544	190	180	370	
Ch03_Lc067545	378	12	390	
Ch03_Lc067546	22	352	374	
Ch03_Lc067547	184	162	346	
Ch03_Lc067548	363	0	363	
Ch03_Lc067549	0	312	312	30
Ch04_Lc067550	162	156	318	
Ch04_Lc067552	331	0	331	
Ch04_Lc067553	225	155	380	
Ch04_Lc067555	121	146	267	
Ch04_Lc067557	284	13	297	
Ch04_Lc067558	229	208	437	
Ch04_Lc067559	7	311	318	
Ch04_Lc067560	154	136	290	
Ch04_Lc067561	12	258	270	
Ch04_Lc067562	410	1	411	
Ch04_Lc067566	320	18	338	40
Ch04_Lc067569	0	289	289	
Ch05_Lc067570	19	444	463	
Ch05_Lc067571	498	0	498	

Ch05_Lc067572	169	182	351	
Ch05_Lc067573	294	0	294	
Ch05_Lc067575	422	0	422	
Ch05_Lc067578	18	388	406	
Ch05_Lc067579	17	304	321	
Ch05_Lc067580	156	149	305	
Ch05_Lc067581	303	19	322	
Ch05_Lc067583	23	347	370	
Ch05_Lc067585	22	293	315	
Ch05_Lc067586	391	0	391	10
Ch05_Lc067587	434	1	435	
Ch05_Lc067588	157	129	286	
Ch06_Lc067589	274	0	274	
Ch06_Lc067590	23	320	343	
Ch06_Lc067591	10	342	352	
Ch06_Lc067592	181	177	358	
Ch06_Lc067593	0	296	296	
Ch06_Lc067594	267	200	467	
Ch06_Lc067595	212	201	413	
Ch06_Lc067596	329	12	341	
Ch06_Lc067597	319	1	320	20
Ch06_Lc067598	243	186	429	
Ch06_Lc067600	0	341	341	
Ch06_Lc067601	417	0	417	
Ch06_Lc067602	1	340	341	
Ch07_Lc067603	168	185	353	
Ch07_Lc067604	333	11	344	
Ch07_Lc067605	211	287	498	
Ch07_Lc067606	2	542	544	
Ch07_Lc067607	310	0	310	
Ch07_Lc067609	178	189	367	
Ch07_Lc067610	425	0	425	30
Ch07_Lc067611	1	449	450	
Ch07_Lc067612	169	149	318	
Ch07_Lc067614	0	446	446	
Ch07_Lc067615	0	427	427	
Ch07_Lc067616	13	278	291	
Ch07_Lc067617	239	246	485	
Ch07_Lc067618	17	267	284	
Ch07_Lc067619	0	335	335	
Ch07_Lc067620	319	0	319	
Ch07_Lc067621	0	354	354	
Ch08_Lc067622	25	232	257	40
Ch08_Lc067623	470	0	470	
Ch08_Lc067624	0	376	376	
Ch08_Lc067625	212	202	414	

Ch08_Lc067626	377	0	377	
Ch08_Lc067627	379	16	395	
Ch08_Lc067628	189	210	399	
Ch08_Lc067629	16	338	354	
Ch08_Lc067630	152	153	305	
Ch08_Lc067631	0	379	379	
Ch08_Lc067632	25	355	380	
Ch08_Lc067633	186	236	422	
Ch08_Lc067634	2	375	377	
Ch08_Lc067635	169	159	328	
Ch08_Lc067636	13	274	287	10
Ch08_Lc067637	373	11	384	
Ch08_Lc067638	28	431	459	
Ch09_Lc067640	367	0	367	
Ch09_Lc067641	359	0	359	
Ch09_Lc067642	307	1	308	
Ch09_Lc067643	350	32	382	
Ch09_Lc067644	168	241	409	
Ch09_Lc067645	174	179	353	
Ch09_Lc067646	133	177	310	
Ch09_Lc067647	199	188	387	
Ch09_Lc067648	24	450	474	20
Ch09_Lc067649	340	0	340	
Ch09_Lc067650	22	348	370	
Ch09_Lc067651	20	365	385	
Ch10_Lc067652	0	292	292	
Ch10_Lc067653	0	279	279	
Ch10_Lc067654	0	396	396	
Ch10_Lc067655	160	170	330	
Ch10_Lc067656	175	121	296	
Ch10_Lc067657	212	188	400	
Ch10_Lc067658	0	356	356	
Ch10_Lc067659	400	13	413	30
Ch10_Lc067661	263	268	531	
Ch10_Lc067662	20	324	344	
Ch11_Lc067663	12	357	369	
Ch11_Lc067664	142	179	321	
Ch11_Lc067665	278	0	278	
Ch11_Lc067666	180	232	412	
Ch11_Lc067667	13	438	451	
Ch11_Lc067668	0	365	365	
Ch11_Lc067669	15	263	278	
Ch11_Lc067670	0	374	374	
Ch12_Lc067671	233	183	416	
Ch12_Lc067672	0	269	269	
Ch12_Lc067673	412	11	423	
Ch12_Lc067676	37	436	473	
Ch12_Lc067677	168	197	365	

【 0 2 8 4 】

これらの多型に関するデータは、図 1 1 および図 1 2 に示された異数性データと同じデータセットにおいて得られたものである。かくして、単一のアッセイが、胎児異数性を同定する能力を証明し、胎児遺伝子座と母体遺伝子座との多型の差異は、情報遺伝子座の同

定および情報遺伝子座に基づく試料中の胎児 c f D N A パーセントの見積もり値の算出を可能にした。

【 0 2 8 5 】

(付 記)

好ましい実施形態として、上記実施形態から把握できる技術的思想について、以下記載する。

[項 目 1]

混合試料中における発生源寄与の算出および1つ以上のゲノム領域中のコピー数変動 (C N V) の存在または非存在の検出のための単一のアッセイシステムであって、

第1のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドがゲノム領域中の、または該ゲノム領域に関連した1つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

第2のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが2つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；

第1および第2のユニバーサルプライマー領域を用いて前記連続的連結産物を増幅して、増幅産物を作製する工程；および

前記増幅産物の配列を検出する工程を含む、アッセイシステム。

[項 目 2]

前記固定配列オリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー領域を含む、項目1に記載のアッセイシステム。

[項 目 3]

前記ユニバーサルプライマー領域が、増幅産物の配列決定において用いられる、項目2に記載のアッセイシステム。

[項 目 4]

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドが、連続的連結産物の増幅の前に除去される、

項目1に記載のアッセイシステム。

[項 目 5]

固定配列オリゴヌクレオチドの一方または両方がプレサークルプローブを含む、項目1に記載のアッセイシステム。

[項 目 6]

前記増幅産物が、検出の前に単離される、項目1に記載のアッセイシステム。

[項 目 7]

前記増幅産物が、検出の前に個々の分子として単離される、項目5に記載のアッセイシステム。

[項 目 8]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部の同一のコピーが作製される、

項目7に記載のアッセイシステム。

[項 目 9]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一のコピーが作製される、

項目7に記載のアッセイシステム。

[項 目 1 0]

コピー数に関して調査される少なくとも1つの遺伝子座が、多型に関して調査される全

10

20

30

40

50

ての遺伝子座と異なる、

項目 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 1]

コピー数に関して調査されるいくつかの遺伝子座が、多型に関して調査される遺伝子座と異なる、

項目 1 0 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 2]

前記混合試料が、母体および胎児の c f D N A を含む母体試料である、

項目 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 3]

単一アッセイを用いた、混合試料中における発生源寄与の算出および染色体異常の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムであって、

第 1 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 1 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

第 2 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 2 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

第 3 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが 2 つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；

前記連続的連結産物を増幅して、増幅産物を作製する工程；および

前記増幅産物を検出する工程

を含む、アッセイシステム。

[項目 1 4]

前記固定配列オリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー領域を含む、

項目 1 3 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 5]

前記ユニバーサルプライマー領域が、増幅産物の配列決定において用いられる、

項目 1 4 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 6]

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドが、前記連続的連結産物の増幅の前に除去される、

項目 1 5 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 7]

前記固定オリゴヌクレオチドのセットが同時に導入される、

項目 1 3 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 8]

前記増幅産物が、検出の前に単離される、

項目 1 3 に記載のアッセイシステム。

[項目 1 9]

前記増幅産物が、検出の前に個々の分子として単離される、

項目 1 8 に記載のアッセイシステム。

[項目 2 0]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部の同一のコピーが作製される、

項目 1 9 に記載のアッセイシステム。

[項目 2 1]

10

20

30

40

50

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一のコピーが作製される、

項目 19 に記載のアッセイシステム。

[項目 22]

コピー数に関して調査される少なくとも 1 つの遺伝子座が、多型に関して調査される全ての遺伝子座と異なる、

項目 13 に記載のアッセイシステム。

[項目 23]

コピー数に関して調査されるいくつかの遺伝子座が、多型に関して調査される遺伝子座と異なる、

項目 22 に記載のアッセイシステム。

[項目 24]

前記混合試料が、母体および胎児 cfDNA を含む母体試料である、

項目 13 に記載のアッセイシステム。

[項目 25]

胎児異数性の存在または非存在を検出するために前記アッセイシステムが用いられる、

項目 24 に記載のアッセイシステム。

[項目 26]

単一アッセイを用いた、母体試料中の発生源寄与の算出および染色体異常の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムであって、

第 1 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 1 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料に導入する工程；

第 2 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 2 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料に導入する工程；

第 3 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが 2 つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料に導入する工程；

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；

前記連続的連結産物を増幅して、増幅産物を作製する工程；および

前記増幅産物を検出する工程

を含む、アッセイシステム。

[項目 27]

前記固定配列オリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー領域を含む、

項目 26 に記載のアッセイシステム。

[項目 28]

前記ユニバーサルプライマー領域が、前記増幅産物の配列決定において用いられる、

項目 27 に記載のアッセイシステム。

[項目 29]

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドが、前記連続的連結産物の増幅の前に除去される、

項目 27 に記載のアッセイシステム。

[項目 30]

前記固定オリゴヌクレオチドのセットが同時に導入される、

項目 26 に記載のアッセイシステム。

[項目 31]

前記増幅産物が、検出の前に単離される、

項目 26 に記載のアッセイシステム。

10

20

30

40

50

[項目 3 2]

前記増幅産物が、検出の前に個々の分子として単離される、
項目 3 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 3 3]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部の同一のコピーが作製される、
項目 3 2 に記載のアッセイシステム。

[項目 3 4]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一のコピーが作製される、
項目 3 2 に記載のアッセイシステム。

10

[項目 3 5]

コピー数に関して調査される少なくとも 1 つの遺伝子座が、多型に関して調査される全ての遺伝子座と異なる、
項目 2 6 に記載のアッセイシステム。

[項目 3 6]

コピー数に関して調査されるいくつかの遺伝子座が、多型に関して調査される遺伝子座と異なる、
項目 2 6 に記載のアッセイシステム。

[項目 3 7]

前記母体試料が、母体および胎児 c f D N A を含む、
項目 2 6 に記載のアッセイシステム。

20

[項目 3 8]

混合試料内の 1 つ以上のゲノム領域中の発生源寄与の算出および C N V の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムであって、

第 1 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドがゲノム領域中の、または該ゲノム領域に関連した 1 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

第 2 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 つの情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；

30

それぞれのセットの前記固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な領域の間の遺伝子座の領域に相補的な 1 つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、該架橋オリゴヌクレオチドが前記遺伝子座中の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で導入する工程；

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；

前記連続的連結産物を増幅して、増幅産物を作製する工程；および

前記増幅産物を検出する工程

を含む、アッセイシステム。

40

[項目 3 9]

前記固定配列オリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー領域を含む、
項目 3 8 に記載のアッセイシステム。

[項目 4 0]

第 1 および第 2 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドが、架橋オリゴヌクレオチドの導入の前に導入される、

項目 3 9 に記載のアッセイシステム。

[項目 4 1]

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドが、架橋オリゴヌクレオチドの導入の前に除去される、

50

- 項目 3 8 に記載のアッセイシステム。
- [項目 4 2]
前記架橋オリゴヌクレオチドが連結混合物と同時に導入される、
項目 3 8 に記載のアッセイシステム。
- [項目 4 3]
前記固定配列オリゴヌクレオチドと前記核酸領域とのハイブリダイゼーション産物が、
前記架橋オリゴヌクレオチドの導入の前に単離される、
項目 3 8 に記載のアッセイシステム。
- [項目 4 4]
前記増幅産物が、検出の前に単離される、
項目 3 8 に記載のアッセイシステム。 10
- [項目 4 5]
前記増幅産物が、検出の前に個々の分子として単離される、
項目 4 4 に記載のアッセイシステム。
- [項目 4 6]
検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の前記増幅産物の全部または一部の同一のコピーが作製される、
項目 4 5 に記載のアッセイシステム。
- [項目 4 7]
検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一のコピーが作製される、
項目 4 5 に記載のアッセイシステム。 20
- [項目 4 8]
前記第 1 または第 2 のオリゴヌクレオチドが試料指標を含む、
項目 3 8 に記載のアッセイシステム。
- [項目 4 9]
前記混合試料が、母体および胎児 c f D N A を含む母体試料である、
項目 3 8 に記載のアッセイシステム。
- [項目 5 0]
個体由来混合試料中の D N A の少ない発生源における 1 つ以上の染色体異常および 1 つ以上の多型を決定する能力を有する単一のアッセイシステム。 30
- [項目 5 1]
単一のアッセイを用いた、混合試料中の発生源寄与の算出および染色体異常の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムであって、
第 1 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 1 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座に対応する 2 つ以上の核酸上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；
第 2 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 2 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程； 40
第 3 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが 2 つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記混合試料に導入する工程；
それぞれのセットの前記固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な領域の間の遺伝子座の領域に相補的な 1 つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、該固定配列オリゴヌクレオチドが前記遺伝子座中の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で導入する工程；
ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；
前記連続的連結産物を増幅して、増幅産物を作製する工程；および 50

前記増幅産物を検出する工程を含む、アッセイシステム。

[項目 5 2]

前記固定配列オリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー領域を含む、項目 5 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 5 3]

前記ユニバーサルプライマー領域が、前記増幅産物の配列決定において用いられる、項目 5 2 に記載のアッセイシステム。

[項目 5 4]

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドが、前記連続的連結産物の増幅の前に除去される、項目 5 1 に記載のアッセイシステム。

10

[項目 5 5]

固定配列オリゴヌクレオチドの一方または両方のセットがプレサークルプローブを含む、項目 5 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 5 6]

前記増幅産物が、検出の前に単離される、項目 5 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 5 7]

前記増幅産物が、検出の前に個々の分子として単離される、項目 5 5 に記載のアッセイシステム。

20

[項目 5 8]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の増幅産物の全部または一部の同一のコピーが作製される、項目 5 7 に記載のアッセイシステム。

[項目 5 9]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一のコピーが作製される、項目 5 7 に記載のアッセイシステム。

30

[項目 6 0]

コピー数に関して調査される少なくとも 1 つの遺伝子座が、多型に関して調査される全ての遺伝子座と異なる、項目 5 1 に記載のアッセイシステム。

[項目 6 1]

コピー数に関して調査されるいくつかの遺伝子座が、多型に関して調査される遺伝子座と異なる、項目 6 0 に記載のアッセイシステム。

[項目 6 2]

前記混合試料が、母体および胎児 c f D N A を含む母体試料である、項目 5 1 に記載のアッセイシステム。

40

[項目 6 3]

単一のアッセイを用いた、母体試料中の発生源寄与の算出および染色体異常の存在または非存在の検出のためのアッセイシステムであって、

第 1 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 1 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座に対応する 2 つ以上の核酸上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料に導入する工程；

第 2 のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが第 2 の染色体に対応する 2 つ以上の遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料に導入する工程；

50

第3のセットの固定配列オリゴヌクレオチドを、該固定オリゴヌクレオチドが2つ以上の情報遺伝子座上の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で前記母体試料に導入する工程；

それぞれのセットの前記固定配列オリゴヌクレオチドに相補的な領域の間の遺伝子座の領域に相補的な1つ以上の架橋オリゴヌクレオチドを、該固定配列オリゴヌクレオチドが前記遺伝子座中の相補領域に特異的にハイブリダイズすることができる条件下で導入する工程；

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを連結して、核酸に相補的な連続的連結産物を作製する工程；

前記連続的連結産物を増幅して、増幅産物を作製する工程；および

前記増幅産物を検出する工程を含む、アッセイシステム。

10

[項目64]

前記固定配列オリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー領域を含む、項目63に記載のアッセイシステム。

[項目65]

前記ユニバーサルプライマー領域が、前記増幅産物の配列決定において用いられる、項目64に記載のアッセイシステム。

[項目66]

ハイブリダイズしなかった固定配列オリゴヌクレオチドが、前記連続的連結産物の増幅の前に除去される、

項目63に記載のアッセイシステム。

20

[項目67]

固定配列オリゴヌクレオチドの一方または両方のセットがプレサークルプローブを含む、

項目63に記載のアッセイシステム。

[項目68]

前記増幅産物が、検出の前に単離される、

項目63に記載のアッセイシステム。

[項目69]

前記増幅産物が、検出の前に個々の分子として単離される、

項目68に記載のアッセイシステム。

30

[項目70]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の増幅産物の全部または一部の同一のコピーが作製される、

項目69に記載のアッセイシステム。

[項目71]

検出の前に、個々の単離された前記増幅産物がさらに増幅されて、個々の増幅産物の全部または一部に相補的な分子の同一のコピーが作製される、

項目69に記載のアッセイシステム。

40

[項目72]

コピー数に関して調査される少なくとも1つの遺伝子座が、多型に関して調査される全ての遺伝子座と異なる、

項目63に記載のアッセイシステム。

[項目73]

コピー数に関して調査されるいくつかの遺伝子座が、多型に関して調査される遺伝子座と異なる、

項目72に記載のアッセイシステム。

[項目74]

前記母体試料が、母体および胎児cfDNAを含む、

50

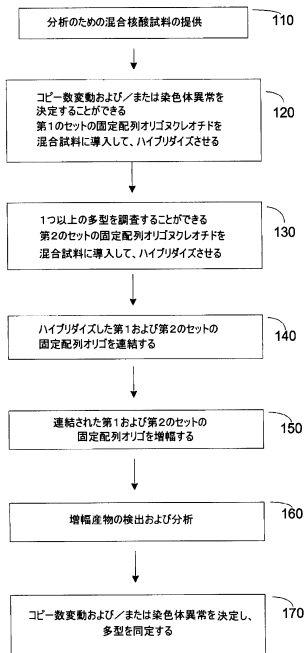
項目 6 3 に記載のアッセイシステム。

[項目 7 5]

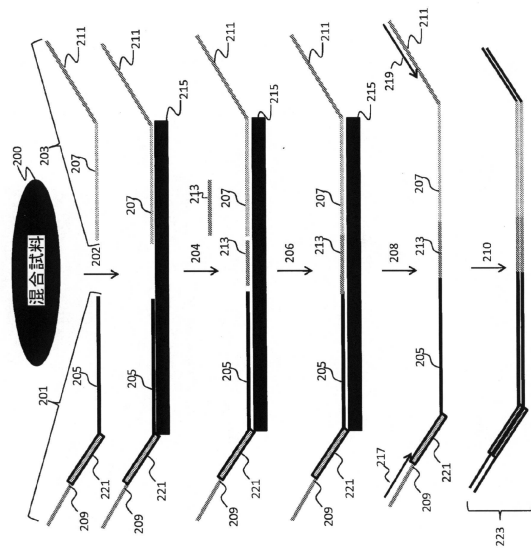
胎児染色体異常の存在または非存在を検出するために前記アッセイシステムが用いられる、

項目 6 3 に記載のアッセイシステム。

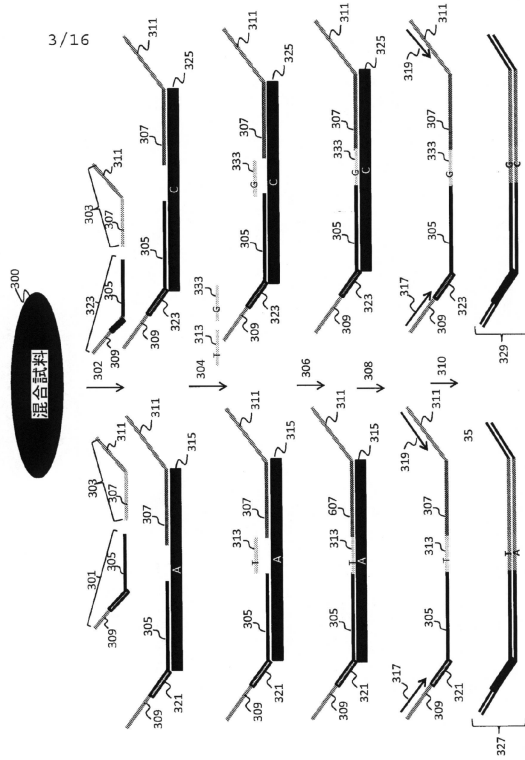
【 図 1 】



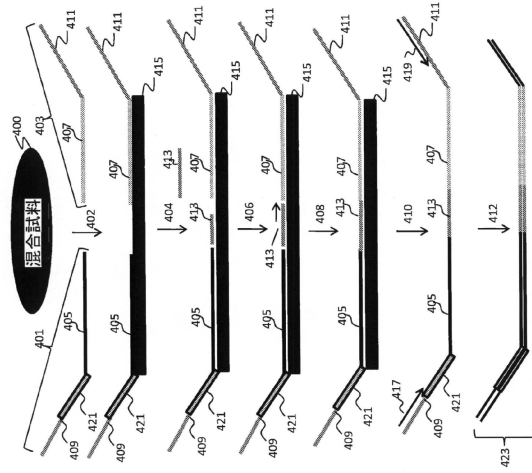
【 図 2 】



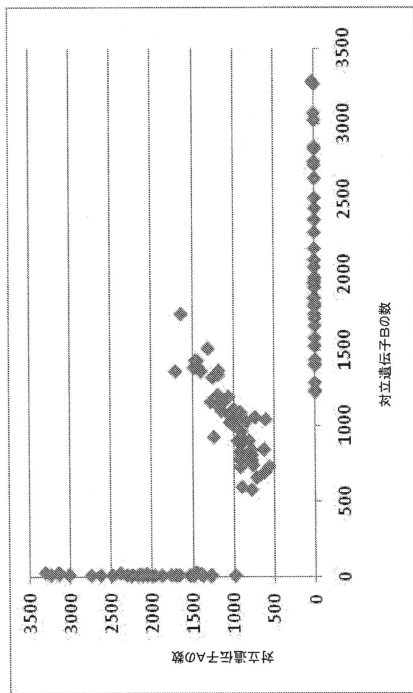
【 図 3 】



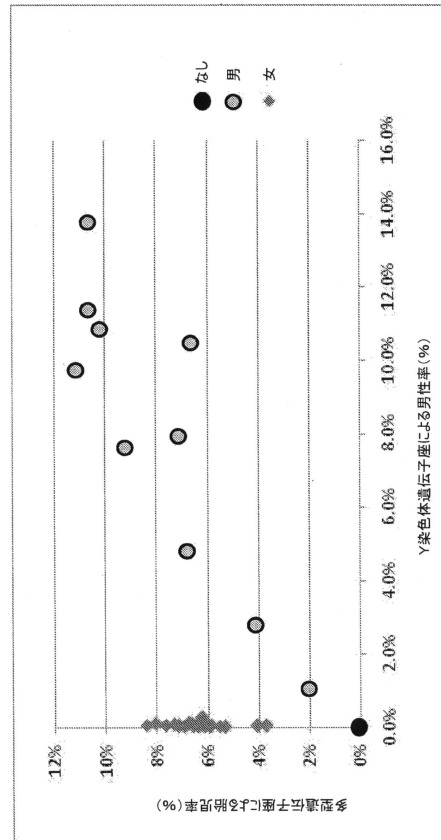
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



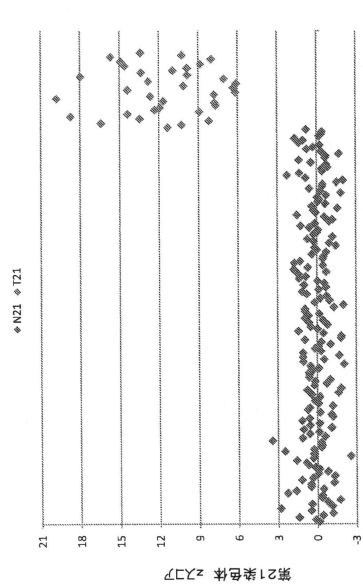
【 8 - 4 】

材料	材料ID 性別	7/11含量	身体 組成	体素 組成	年齢 性別	身体年齢	脂肪 量(%)	平均18	平均21	脂肪18	脂肪21	Z統計18	Z統計21	
65	TAAGAGT F	2532	40XX	40XX+13	35	90	41	0.14442	997.7136	988.3962	0.52986	0.497154	1.36964	-1.36906
66	TAAAGAT F	7668	40XX	40XX+13	30	141	37	0.057703	998.6741	999.8426	0.501968	0.498832	0.795151	-0.79515
67	TCTGCAC M	3996	40XX	40XX+13	35	161	26	0.211564	1001.317	998.1811	0.507074	0.499216	0.021337	-0.02134
68	CTCGCCT F	7360	40XX	40XX+21	35	125	28	0.092562	983.1548	1024.575	0.489644	0.510359	-7.2619	7.2619
69	GTCGACT F	13248	40XX	40XX+21	19	132	30	0.083949	990.027	1003.997	0.489763	0.510237	-7.18225	7.182254
70	GCTCAGC F	7423	40XX	40XX+21	40	91	31	0.056151	998.5338	1011.076	0.494668	0.505132	-3.84532	3.845324
71	GCGCCAC M	5308	40XX	40XX+21	18	166	32	0.140102	965.1286	1037.339	0.48197	0.51803	-12.2738	12.27379
73	GCTCAGC M	5184	40XX	40XX+18	29	147	29	0.157072	1044.147	969.7899	0.52081	0.47919	13.11012	-13.11011
75	GACTTCG F	2689	40XX	40XX+18	40	93	24	0.129256	1038.787	988.3378	0.520141	0.479859	12.67306	-12.6731
76	CAATGAC F	7633	40XX	40XX+18	43	133	24	0.048391	1015.894	982.9916	0.50623	0.49377	4.863983	-4.86398
78	GCTCTGT F	7128	40XX	40XX+18	25	128	30	0.06033	1018.978	985.6703	0.508908	0.491092	4.938613	-4.93861
79	CGAGAAC M	4444	40XX	40XX+18	40	82	31	0.082749	1022.638	974.749	0.519398	0.488812	7.34468	-7.34467
80	ATCGAAT F	2100	40XX	40XX+18	42	98	39	0.094043	1021.02	977.542	0.511452	0.488548	6.93932	-6.93933
81	ATCAGAT M	4176	40XX	40XX+21	35	147	33	0.148476	973.3759	1038.729	0.479622	0.520378	-13.8102	13.81016
82	AGTTACT M	4500	40XX	40XX+21	39	124	19	0.205964	925.9748	1049.25	0.472958	0.524042	-16.205	16.20002
83	AGTAGAC M	8640	40XX	40XX+21	37	125	30	0.130907	973.3372	1028.835	0.486146	0.513854	-5.4628	5.46281
84	AGCTCT M	16992	40XX	40XX+21	43	94	35	0.126455	976.6225	1029.797	0.486749	0.513251	-9.1521	9.152097
85	AGGATAT M	4212	40XX	40XX+21	40	157	24	0.119821	969.1251	1025.932	0.485703	0.514237	-9.79643	9.796425
86	AGGACCG M	4644	40XX	40XX+21	33	97	31	0.053737	992.2248	1011.59	0.495168	0.504832	-3.64941	3.649405
87	AGAGATT M	4320	40XX	40XX+21	31	119	37	0.088022	978.7159	1014.132	0.491114	0.508886	-6.29884	6.298937
89	AGCTGCC F	6768	40XX	40XX+21	31	98	35	0.126696	963.2226	1024.818	0.484509	0.515491	-10.616	10.61595

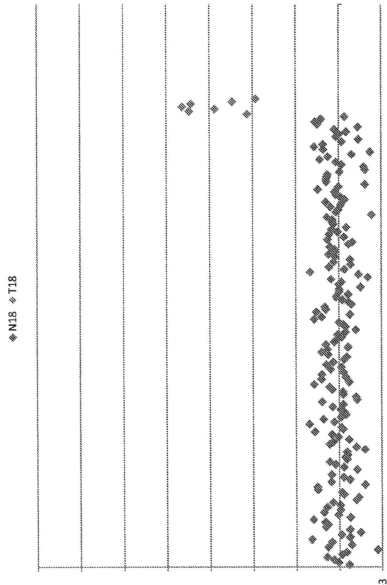
【 8 - 5 】

材料	材料ID 性別	7/11含量	身体 組成	体素 組成	年齢 性別	身体年齢	脂肪 量(%)	平均18	平均21	脂肪18	脂肪21	Z統計18	Z統計21	
90	AGCGCTG M	1375	40XX	40XX+21	36	162	36	0.133202	961.1764	1032.034	0.482225	0.517775	-12.1088	12.10879
91	AGCATGC M	5155	40XX	40XX+21	41	154	37	0.095349	967.2823	1017.613	0.487322	0.512678	-8.77777	8.77767
92	AAATGTT F	2549	40XX	40XX+21	41	119	32	0.090505	965.3134	1025.717	0.484831	0.515169	-10.4056	10.4056
93	AAGTAG F	9216	40XX	40XX+21	42	253	32	0.209015	946.6902	1022.348	0.473273	0.526277	-17.96	17.96002
94	AAATAGC F	2041	40XX	40XX+21	36	161	32	0.102534	973.7957	1025.545	0.487658	0.512442	-8.94982	8.949816
95	AAATCTT M	1843	40XX	40XX+21	42	91	35	0.137238	965.4467	1031.523	0.485449	0.516551	-11.3309	11.33094

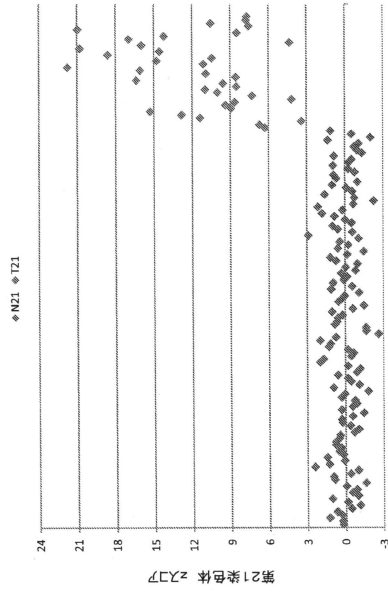
【 9 】



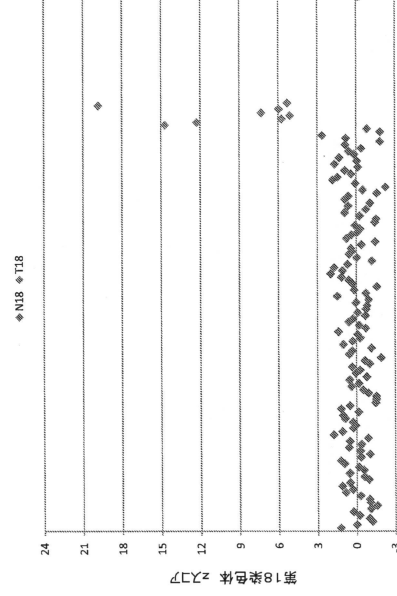
【 10 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

0006637920000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 スパークス、アンドリュー

アメリカ合衆国 95138 カリフォルニア州 サンノゼ オプティカル コート 5945

アリオサ ダイアグノスティックス インコーポレイテッド 内

(72)発明者 ストラブル、クレイグ

アメリカ合衆国 53217 ウィスコンシン州 グレンデール エヌ.ナパホ アベニュー 5

523

(72)発明者 ワン、エリック

アメリカ合衆国 95035 カリフォルニア州 ミルピタス メンテ リンダ ループ 713

(72)発明者 オリファント、アーノルド

アメリカ合衆国 95138 カリフォルニア州 サンノゼ オプティカル コート 5945

アリオサ ダイアグノスティックス インコーポレイテッド 内

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表2006-508632(JP,A)

特表2009-528054(JP,A)

Lancet (2007) vol.369, issue 9560, p.474-481

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/6813

C12Q 1/6858

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)