

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-534405
(P2013-534405A)

(43) 公表日 平成25年9月5日(2013.9.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 2 9
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 7 5	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2012-557617 (P2012-557617)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月28日 (2011. 2. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年9月26日 (2012. 9. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2011/000438
 (87) 国際公開番号 W02011/114207
 (87) 国際公開日 平成23年9月22日 (2011. 9. 22)
 (31) 優先権主張番号 12/724, 865
 (32) 優先日 平成22年3月16日 (2010. 3. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512240143
 ブルーノーム リミテッド
 イギリス, ケンブリッジ シービー22
 5エルディー, グレート シェルフォード
 , ミル コート ブレイクス ハウス
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100152319
 弁理士 曾我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 着床前遺伝学的スクリーニングのための比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ方法

(57) 【要約】

試験サンプルのゲノムDNAにおけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法が提供される。該方法は、単一の試験サンプルと第1のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションと、複数の参照サンプルと複数の他の各試験アレイとのハイブリダイゼーションとを別々に測定することができる。コピー数の決定は、試験アレイに対するベストフィットの参照アレイに基づくものとする。ベストフィットは測定シグナルの最も近い又は最も類似したシグナル対ノイズ比に基づき決定することができる。

【選択図】 図 1

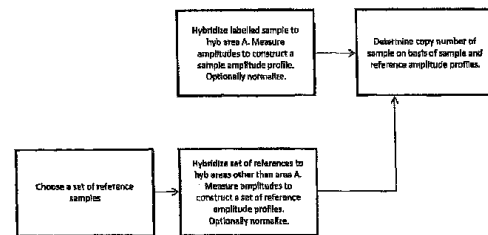


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験サンプルのゲノム DNA におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法であって、

a) 試験サンプル由来のサンプルゲノム DNA 又はその増幅産物を標識し、それにより標識した試験 DNA を形成する、標識することと、

b) 該標識した試験 DNA を第 1 のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

c) 参照サンプル由来の第 1 の参照ゲノム DNA、又はその増幅産物を標識し、標識した第 1 の参照 DNA を形成する、標識することと、

d) 該標識した第 1 の参照 DNA を第 2 のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

e) 第 2 の参照サンプル由来の第 2 の参照ゲノム DNA、又はその増幅産物を標識し、標識した第 2 の参照 DNA を形成する、標識することと、

f) 該標識した第 2 の参照 DNA を第 3 のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

g) 該標識した試験 DNA のハイブリダイゼーション後に該第 1 のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより該標識した試験 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、

h) 該標識した第 1 の参照 DNA のハイブリダイゼーション後に該第 2 のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより該標識した第 1 の参照 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、

i) 該標識した第 2 の参照 DNA のハイブリダイゼーション後に該第 3 のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより該標識した第 2 の参照 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、

j) 該第 1 のハイブリダイゼーションアレイのシグナル強度を該第 2 のハイブリダイゼーションアレイ及び該第 3 のハイブリダイゼーションアレイのうちの少なくとも 1 つのシグナル強度と比較することにより、該サンプルゲノム DNA の少なくとも 1 つの領域のコピー数を推測することと、

を含む、試験サンプルのゲノム DNA におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法。

【請求項 2】

標識した第 1 の参照 DNA が、該標識した試験 DNA に対する、ゲノムの 1 つ又は複数の所定の領域における少なくとも 1 つのコピー数の変化を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

標識した第 2 の参照 DNA が、該標識した試験 DNA に対する、該標識した第 1 の参照 DNA と同じコピー数の変化を有しない少なくとも 1 つの所定の領域を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

標識した試験 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、該 1 つ又は複数の所定の領域における該標識した第 1 の参照 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、該標識した試験 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、該 1 つ又は複数の所定の領域における該標識した第 2 の参照 DNA のハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、該方法が、予測されるコピー数に基づき該方法のダイナミックレンジを決定することを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

標識した第 1 の参照 DNA が第 1 の種の雄の動物由来であり、該標識した第 2 の参照 DNA が該第 1 の種の雌の動物由来である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

標識した第 1 の参照 DNA 及び該標識した第 2 の参照 DNA が、同じ種の動物の雄及び

10

20

30

40

50

雌由来のDNAの混合物を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、該1つ又は複数の所定の領域における該標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、それによりコピー数の第1の推測値を決定し、該標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、該1つ又は複数の所定の領域における該標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、それによりコピー数の第2の推測値を決定し、コピー数の該第1の推測値と該第2の推測値とを組み合わせ、コピー数の総合的な推測値を得る、請求項1に記載の方法。

10

【請求項8】

シグナル強度を正規化した後、該コピー数を推測する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

参照サンプル由来の該第1の参照ゲノムDNA又はその増幅産物が第1の増幅技法により生じた増幅産物を含み、参照サンプル由来の該第2の参照ゲノムDNA又はその増幅産物が同じ第1の増幅技法により生じた増幅産物を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

参照サンプル由来の該第1の参照ゲノムDNA又はその増幅産物が、異なる各濃度で複数の異なる参照を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

標識した第3の参照DNAを第4のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

標識した第4の参照DNAを第5のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

標識した第5の参照DNAを第6のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

を更に含み、コピー数の推測が該第1のハイブリダイゼーションアレイのシグナル強度を該第2のハイブリダイゼーションアレイ、該第3のハイブリダイゼーションアレイ、該第4のハイブリダイゼーションアレイ、該第5のハイブリダイゼーションアレイ及び該第6のハイブリダイゼーションアレイのそれぞれにより発生したシグナル強度と比較することを含む、請求項1に記載の方法。

20

30

【請求項12】

コピー数の推測値に基づきヒトの極体又は胚の異数性の状態を決定することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

IVF手順で決定した異数性の状態に基づき胚を着床させることを更に含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

ゲノムDNAを該試験サンプルから単離し、それにより該サンプルゲノムDNA又はその増幅産物を形成する、単離することを更に含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項15】

試験サンプルが胚又は関連の生検材料由来の少なくとも1つの細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

第1のゲノム参照DNAが染色体異常を有する動物の組織又は細胞から得られたDNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

第1のゲノム参照DNAがモザイク組織又は細胞から得られたDNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

50

標識した第 1 の参照 DNA が第 1 の濃度の DNA を有し、第 1 の濃度の第 1 の DNA の増幅産物を含み、該標識した第 2 の参照 DNA が該第 1 の濃度の第 1 の DNA を希釈した後で生じた該第 1 の DNA の増幅産物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

標識した第 1 の参照 DNA が、少なくとも 2 つの個体から採取した血液サンプルから抽出されたプールゲノム DNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

試験サンプルのゲノム DNA におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法であって、

a) 試験 DNA を標識し、それにより標識した試験 DNA を形成する、標識することと

b) 該標識した試験 DNA を第 1 のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、

c) ハイブリダイゼーション後に該第 1 のハイブリダイゼーションアレイを分析して、第 1 のハイブリダイゼーションの結果を得る、分析することと、

d) 該第 1 のハイブリダイゼーションの結果を、標識した第 1 の参照 DNA と第 2 のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションによる過去の参照ハイブリダイゼーションの結果のうち少なくとも 1 つを含む参照データ、又は数学モデルを用いて合成的に生じたデータと比較することと、

d) 該第 1 のハイブリダイゼーションの結果を、標識した第 2 の参照 DNA と第 3 のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションによる過去の参照ハイブリダイゼーションの結果と比較することと、

e) シグナル強度が、該第 2 のハイブリダイゼーションアレイ及び該第 3 のハイブリダイゼーションアレイのうち少なくとも 1 つの 1 つ又は複数の対応する領域において生じたシグナル強度と異なる該第 1 のハイブリダイゼーションアレイの 1 つ又は複数の領域を特定することによりコピー数の不均衡の存在を決定することと、を含む、試験サンプルのゲノム DNA におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法。

【請求項 21】

標識した第 1 の参照 DNA が第 1 の種の雄の動物由来であり、該標識した第 2 の参照 DNA が該第 1 の種の雌の動物由来である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

プロセッサに記憶された参照アレイデータセットのライブラリであって、それぞれの参照アレイデータセットが、各参照アレイで実施されたコピー数ハイブリダイゼーションアッセイ中に各参照アレイから集められたデータを含み、

(1) 各データセットが集められるそれぞれの参照アレイが、データセットが集められる互いの参照アレイと実質的に同一又は同一であり、

(2) 各データセットが集められるそれぞれのコピー数ハイブリダイゼーションアッセイを、データセットが集められる互いのコピー数ハイブリダイゼーションアッセイと同じ条件又は該コピー数ハイブリダイゼーションアッセイと 1 つ又は複数の異なる条件下で実施し、

(3) 該ライブラリの少なくとも 2 つの参照アレイデータセットが互いに異なる、プロセッサに記憶された参照アレイデータセットのライブラリ。

【請求項 23】

それぞれの参照アレイデータセットが蛍光シグナル強度のデータを含む、請求項 22 に記載のライブラリ。

【請求項 24】

それぞれの参照アレイデータセットを、ハイブリダイゼーションに頼らずに算出する、請求項 22 に記載のライブラリ。

【請求項 25】

コピー数ハイブリダイゼーションアッセイ中に試験アレイから集められた試験アレイデ

10

20

30

40

50

ータセットを、請求項 22 に記載のライブラリの参照アレイデータセットと比較することと、

シグナルプロセッサを用いて、試験アレイデータセットと該ライブラリ由来のデータセットとの比を決定する、用いることと、を含む方法。

【請求項 26】

ライブラリ由来のベストフィットデータセットが、比プロファイルの SNR を最大にするために該プロセッサにより決定された参照アレイデータセットである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

第 1 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと、
該第 1 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと同一の第 2 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと、
該第 1 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと同一の第 3 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと、
第 1 の参照ゲノム DNA と、
第 2 の参照ゲノム DNA と、

(1) 該第 1 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果を、該第 1 の参照ゲノム DNA を用いて該第 2 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果と比較するため、及び (2) 該第 1 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果を、該第 2 の参照ゲノム DNA を用いて該第 3 のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果と比較するための指示書とを、
備えるキット。

【請求項 28】

第 1 の参照ゲノム DNA が参照ゲノム DNA の増幅産物を含む、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】

コピー数ハイブリダイゼーションアレイと、
複数の参照アレイデータセットと、
該コピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じる試験結果に対応するデータセットを、該複数の参照アレイデータセットと比較するための指示書とを、
備えるキット。

【請求項 30】

電子記憶媒体を更に備え、該複数の参照アレイデータセットが該電子記憶媒体に記憶される、請求項 29 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本教示は、胚の細胞、卵母細胞、極体又は関連の生検材料内の遺伝的異常を検出する方法に関する。

【0002】

[関連出願の相互参照]

本願は、2010年3月16日付けで出願された先願の米国特許出願第 12 / 724 , 865 号 (その全体が参照により本明細書に援用される) からの利益を主張している。

【背景技術】

【0003】

I V F (体外受精) の分野内において、着床前に胚の細胞内の染色体の数及び補体を特

10

20

30

40

50

定することが望ましい。胚の生存能力に影響を与える最も重要な因子の1つは、コピー数の過剰/減少及び染色体全体の異数性(染色体の異常数)を含む染色体の不均衡であるとする証拠が増えてきている。

【0004】

現在の試験方法は初めに、試験のための胚を代表するものである遺伝物質の単離を含む。異数性の分析に現在使用されているサンプルは、卵母細胞に関連する極体の生検材料、割球の生検材料(3日目の胚に関連する)由来の単細胞、又は栄養外胚葉(trophectoderm)の生検材料(5日目の胚又は胚盤胞に関連する)である。しかしながら場合によっては、プロセスの他の又は複数の時点で採取されたサンプルがより効果的であることが分かっている。それから、極体又は細胞(複数の場合もあり)を、選択されたコピー数の不均衡を検出する方法により試験する。本願では、かかる試験方法は着床前遺伝学的スクリーニング(PGS)と称されるが、文献中ではPGDという用語がよく見られる。PGSという用語は、卵母細胞の品質を利用可能にするため、例えば情報に基づく卵バンキングを可能にするための極体の試験も含むものとする。

10

【0005】

比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)は、いわゆるコピー数の変化に対応するゲノムDNAにおける増幅配列又は欠失配列の存在を検出し、その位置を特定するのに用いられている技法である。典型的には、ゲノムDNAを正常な参照細胞から、及び試験細胞から単離する。2つの核酸サンプルを別々に標識し、その後参照細胞の中期染色体と*in situ*でハイブリダイズする。参照DNA及び試験DNAの両方における反復配列は除去するか、又はそれらのハイブリダイゼーション能を何らかの手段により低減する。コピー数が増加又は減少した、試験細胞における染色体領域を、2つのDNAからのシグナルの比が変化する領域を検出することにより特定することができる。コピー数が増加したかかかる領域の検出は遺伝的障害の診断に特に重要であるとされる。

20

【0006】

上で示される中期CGHはまた、全ての染色体に適用されており、異常に関して全ての染色体をスクリーニングする能力を有する。PGSに関連して適用されるCGH分析では、分析前に単細胞(5pg~10pg)から中期CGHに好適なレベル(1µg)までDNA量を増大させるのに、全ゲノムの増幅が必要とされる。増幅に一般的に使用される方法には、DOP-PCR(Telenius et al., 1992)又は最近ではGENOME PLEX(Rubicongenomics)及びREPLI-G(Qiagen)のような全ゲノム増幅キットが含まれる。臨床状況で中期CGHを使用する主な問題点は、完了するまでおよそ4日かかる場合があり、これでは胚を凍結せずに、また次のサイクルの着床を行わずに、IVFにおいて着床前の胚に必要とされる時間枠に適合することができないことである。加えて、該方法は技術課題があり、実施し、分析するには高度な専門知識を必要とする。これらの問題が、PGSにおける中期CGHの広範な使用を制限している。

30

【0007】

1998年及び2003年にPinkel et al.は、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションとして広く知られるようになる技法(以下、アレイCGHと称される)を開示した。1998年に、Solinas-Toldo et al.は類似の「マトリクスベースの比較ゲノムハイブリダイゼーション」アプローチを説明している。

40

【0008】

アレイCGH技法は、二本鎖DNAの結合特異性の利用に関してはCGHと類似のアッセイ原理に依存する。アレイCGHでは、参照細胞の中期染色体を固体支持体に結合した潜在的に数千の非標識の標的核酸(プローブ)の集合体、例えば染色体位置にマッピングしたクローンのアレイに置き換える。このためアレイCGHは、ともに同じハイブリダイゼーション区域とハイブリダイズする2つのDNAサンプル間のコピー数の違いのハイスループット検出のための比較技法の一種である。アレイCGHには、より大きい分解能を達成し、コピー数の検出が重要である他の分野のみならず、コピー数の変化により誘導される遺伝的障害の検出及び診断に適用されるという点でCGHを上回る利点がある。詳細

50

は異なるが、オリゴヌクレオチド、PAC及び細菌性人工染色体(BAC)のアレイに見られるものを含む広範な様々なプローブタイプを使用することができる。

【0009】

アレイCGHは現在、体質性細胞遺伝学及び近年では腫瘍学におけるゲノムの不均衡の研究における臨床医の努力を支持するのに使用されている。これらの用途では、これらの用途のために設計されたマイクロアレイを、学術的な又は臨床前の研究用途に用いられるものよりもはるかに厳しい基準で作製することが強く望まれている。

【0010】

アレイCGHには、解釈がかなり単純であり、容易に自動化され、加えて完全な分析にかかる時間がより短いという中期CGHを上回る利点がある。アレイCGHは、単細胞において異数性を検出するために使用することができ、PGSに適用することに成功している。該技法では単細胞を増幅しなければならず、中期CGHに用いられるものと同じ方法が利用される。アレイCGHにより、全ゲノムの包括的な分析が48時間以内に完了し、これによりPGSにおいて低温保存することなく異数性スクリーニングが可能になる。

【0011】

最適なアッセイ結果を達成するために、アレイCGHでは、試験サンプルと参照サンプルとを品質及び濃度に関して十分に適合させる必要がある。PGSに関しては、任意の分析の出発点は、卵パンキングに関連して受精胚又は卵母細胞を可能な限り代表するものである遺伝物質である。現在、極体若しくは割球、8細胞期の胚から抽出される単細胞、又は代替的に胚盤胞若しくは関連の生検材料由来の少数の細胞内に含有される遺伝物質を検査することが可能である。かかる材料からは限られた量のDNAしか得ることができないために、ほとんどの下流の分析には出発材料の多数のコピーを得るためにDNA増幅手順を使用する必要がある。受精プロセスが始まると、極体が放出され、PB1及びPB2の2つの極体が存在することが理解されよう。該プロセスは単純なものではない。本明細書中で「極体」という用語は、一次卵母細胞又は二次卵母細胞から放出された又は生検された極体を含み得る。

【0012】

増幅されていないゲノム参照材料を使用することができるが、対応するアレイCGH結果は、増幅された試験サンプルと増幅されていない参照との適合不全のため、高いノイズレベルを示す場合がある。このため、これに関連して使用される参照材料は多くの場合、少数の単細胞とさほど変わらない(broadly similar)量のDNAを含有するように希釈した「正常な」プールDNAサンプルである。その後、この希釈した参照材料を、試験サンプルと同じ方法を用いて増幅する。試験サンプル及び参照サンプルの特性を適合させるためにこれらの工程を採用したとしても、これが常に有効であるわけではなく、結果の明瞭さにはばらつきがある場合がある。このことは、出発DNAの定量における僅かの誤差、及びそれによる希釈サンプルにおけるDNA量の変化；増幅プロセスの確率的特質による変動；参照に存在しないサンプル中の不純物の増幅；非特異的な増幅の増大をもたらす低いサンプルDNA「品質」；サンプルの抽出及び保存に使用される試薬の量及びタイプの変動を含む様々な理由によるものであり得る。全ての場合で、サンプルと参照との増幅の間で生じる差異は様々であり、実際の増幅の結果を曖昧なものにする場合があり、これによりアレイCGHプロファイルの変化、並びに頻繁にノイズの増大及びダイナミックレンジの抑制が起こる。

【0013】

PGSは診断的適用であり、実験の首尾よい機能化を実証し、また例えば先に記載の増幅問題のために生じ得る、実験間のダイナミックレンジの変動を評価するための内部対照を含むことが、それぞれの実験で標準的である。アレイCGHを使用する場合、この問題点に対処するために最も一般的に用いられるアプローチは、試験サンプルに対してコピー数の過剰/減少が既知の参照サンプルを使用することである。これらはそれぞれ個々のアッセイでの性能の評価基準として使用することができる。

【0014】

10

20

30

40

50

多くの場合、参照サンプルは試験サンプルと性別が不適合であり、それによりX染色体及びY染色体に関する参照に対する試験サンプルの \log_2 比、及び結果としてダイナミックレンジの評価基準の変化が生じる。多くの状況に当てはまるが、PGSの場合、特にいずれかの性別であり得る割球又は胚盤胞の生検サンプルの異数性スクリーニングでは、一般的にサンプルの性別を先見的に知ることは不可能である。したがって内部対照としての単一参照の使用が確実に可能というわけではない。その上、胚/卵母細胞におけるコピー数の変動の程度が極めて高いため、試験サンプルに対する性染色体以外の領域における既知のコピー数の不均衡を有する適切な単一参照の選択は一般的に不可能であり、最近の研究から、安定であると予測される領域がないことが示されている。幾つかの実施の形態では、異数性の状況に基づき着床のための胚を選択することができる。他の実施の形態では、より小さい遺伝子異常に基づき選択することができる。

10

【0015】

代替法は、非ヒト制御配列を含む参照を使用することである。しかしながら、このアプローチは、ヒト配列の挙動を正確に模倣する非ヒト配列を選ぶのが困難であるために理想的とはいえない。いずれの場合でも、非ヒト制御配列の使用には、同じ増幅バイアスと他のバイアスとが問題となる場合があり、このため単一参照を選ぶことが困難である場合がある。

【0016】

PGSにおけるこの問題点を克服するために、1つが雄の参照に対するものであり、もう1つが雌の参照に対するものである単一の試験サンプルを分析するための2つの従来型のアレイCGHハイブリダイゼーションを実施し、アッセイを正確に作用させる必要がある。しかしながら、このアプローチに関連するコストは適用のために許容できないほど高い。

20

【0017】

2つ以上の細胞を胚から、例えば胚盤胞/栄養外胚葉)から採取する場合、胚が多くの場合モザイクであるため、試験サンプルにおけるモザイク現象の可能性がPGSに関連して重要となる。厄介なことには、生検方法が不正確であることにより、胚から採取された細胞の数が未知であることがある。アレイCGHはモザイク現象を検出することができるが、十分洗練された内部対照がないために、このモザイク現象を直接定量する手段は提供されず、さらに同じ理由から、実験ノイズをモザイク現象と間違える場合がある。単一の参照サンプルに対するアレイCGHの信頼性もこれに関連して問題となる。

30

【0018】

アレイCGHは、試験サンプル及び参照サンプルを標識する蛍光色素を対比させる必要がある。一般的な色素対であるCy3及びCy5がアレイCGHによく使用される。Cy5色素は環境中のオゾンにより分解されやすく、特に高い湿度と組み合わせると、アッセイ品質に対するこの影響により、実験データの損失を引き起こす場合がある。2つの蛍光標識したサンプルを同じハイブリダイゼーション区域と競合的にハイブリダイズするアレイCGHを使用し、これによりレシオメトリック比較を介して、遺伝物質の相対的な過剰/減少を確認することができる。典型的には、正規性が対象の適用で規定される場合、1つのサンプルは未知の遺伝的性質 (genetic make-up) の試験サンプルであり、1つのサンプルは正常なコピー数を有することが知られている参照サンプルである。アレイCGHは有効でかつロバスタな技法であるが、PGSの適用は独自の技術的課題を示す。幾つかの実施の形態では、胚の染色体の内容の評価は、受精後に細胞を採取することにより直接的に、又は極体、及びひいては胚を発生する卵母細胞を評価することにより間接的に行うことができる。幾つかの実施の形態では、卵母細胞の内容を評価することだけが目的である用途が存在し、必ずしも胚を発生させなくてもよい。これは本明細書中で卵バンキングと称される。

40

【0019】

Buffart et al. (2008)は、現在の技術の改良として「交差アレイCGH」(aaCGH)と呼ばれる改良型アレイCGH技法を提案している。aaCGHはアレイCGHと類

50

似しているが、試験サンプル及び参照サンプルと単一のハイブリダイゼーション区域とのハイブリダイゼーションの代わりに、試験サンプルと参照サンプルとを別々のハイブリダイゼーション区域で比較する。この特許の著者らにより独自に開発されたこの方法には、色素バイアスによりあらゆるノイズが取り除かれるため、コスト及び潜在的にデータ品質における利点がある。a a C G Hを用いて得られるプロファイルの品質は、通常の二重チャンネルアレイ C G Hを用いて得られるものに匹敵するか、又は更にはそれを上回ることが報告された。参照はマルチフォーマットアレイを用いて、試験サンプルと同時に同じスライド上でハイブリダイズすると説明されており、試験サンプル及び参照が同じ蛍光色素で標識される。これらは単一の試験サンプルを単一の参照サンプルと比較する。しかしながら、該方法は P G S の特有の課題を克服してはいない。

10

【0020】

S N P アレイ技法はアレイ C G Hとは異なり、D N A サンプルにおけるコピー数を決定するのにも用いることができ、また P G S 用途のために開発されている。S N P アレイは全ての染色体のスクリーニングを提供し、同時に遺伝子型決定を可能にする。用いられる機構は、該技法が比較によるものではないという点でアレイ C G H の機構とは実質的に異なる。参照サンプルを用いず、また同時ハイブリダイゼーションを実施せずに、コピー数の割り当て方法は、個々の対立遺伝子を評価しないアレイ C G H とは対照的に個々の対立遺伝子の定量、及びその後のレシオメトリック分析に依存する。S N P アレイの不利点には、ノイズレベルの増大、より長いプロトコル、データ解釈の複雑さ及び倫理的影響、並びに可能性として半数体サンプルの適用性の低下が含まれる。

20

【0021】

染色体特異的な D N A プローブを用いる F I S H (蛍光 *i n s i t u* ハイブリダイゼーション) の分子細胞遺伝学的技法は P G S によく適用されており、中期核に検出可能なシグナルを与える。増幅工程は必要とされないが、D N A プローブの標識に利用可能な異なる色の数によって限定される、限られた数の染色体しか同時に評価することができないという重大な不利点が存在する。通常、胚スクリーニングに用いられる最も包括的な F I S H 方法は現在、染色体の半分しか評価できず、このために一部の染色体異常が見逃される。F I S H の他の不利点には、スコアリングが困難なシグナルの重複が含まれる。

【発明の概要】**【0022】**

本教示の特徴は、従来型のアレイ C G H に関連する試験サンプル及び参照サンプルの適合不全によるアッセイ失敗のリスクを軽減する、試験 D N A サンプルのゲノム D N A におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法を提供することである。この方法は、アッセイの品質、正確さ及び収率を増大させることができる。

30

【0023】

本教示の別の特徴は、単一の試験サンプルと1つのハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーション、及び参照サンプルのセットと1つ又は複数の他のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションを別々に測定する、試験 D N A サンプルのゲノム D N A におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法を提供することである。

【0024】

本教示の更なる特徴は、試験 D N A サンプルと参照 D N A サンプルとの単一の最適な対合の選択を含む、ゲノム D N A におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法を提供することである。

40

【0025】

本教示は、試験サンプルのゲノム D N A におけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法を提供する。サンプルは、試験サンプル由来のサンプルゲノム D N A 又はその増幅産物を標識し、それにより標識した試験 D N A を形成する、標識することと、標識した試験 D N A を第1のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、参照サンプル由来の第1の参照ゲノム D N A 、又はその増幅産物を標識し、標識した第1の参照 D N A を形成する、標識することと、標識した第1の参照 D N A を第2のハイブリダイゼーション

50

ンアレイとハイブリダイズすることと、第2の参照サンプル由来の第2の参照ゲノムDNA、又はその増幅産物を標識し、標識した第2の参照DNAを形成する、標識することと、標識した第2の参照DNAを第3のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることとを含み得る。該方法は、標識した試験DNAのハイブリダイゼーション後に第1のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーション後に第2のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーション後に第3のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することとを含み得る。

10

【0026】

本教示は、試験ハイブリダイゼーションアレイのシグナル強度を2つ以上の参照ハイブリダイゼーションアレイのうち少なくとも1つのシグナル強度と比較することによりサンプルゲノムDNAの少なくとも1つの領域に対するコピー数を推測する方法を提供する。

【0027】

本教示の更なる特徴及び利点は続く本明細書に一部記載されているか、本明細書から一部明らかであるか、又は本教示の実施により知ることができる。本教示の目的及び他の利点は、本明細書及び添付の特許請求の範囲に具体的に言及された要素及び組合せにより実現又は達成される。

20

【0028】

上述の概要及び以下の詳細な説明は両方とも例示及び説明的なものにすぎず、請求項に記載の本教示の更なる説明を提供することを意図することが理解されよう。

【0029】

本願に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、本教示の実施形態の一部を例示し、本明細書とともに本教示の原理を説明する働きがある。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】本教示により試験DNAサンプルのコピー数を決定するための例示的な方法を記載するフローチャートである。

30

【図2】本教示により参照DNAサンプルのセットを調製するための例示的な方法を示すフローチャートである。

【図3】本教示により試験DNAサンプルのコピー数をどのように決定することができるかを示すフローチャートである。

【図4】本教示により2つの比プロファイルに基づき、試験DNAサンプルにおけるコピー数の変化の領域をどのように決定することができるかを示すフローチャートである。

【図5】上部のプロットは雄の参照と比較してサンプルを示し、下部のプロットは雌の参照と比較してサンプルを示す一対のプロットを示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0031】

本教示は、異数性、又はより小さいコピー数の不均衡若しくはゲノムDNAにおけるより小さい不均衡の存在を検出する方法に関する。本教示による異数性を検出する方法又はコピー数の不均衡の検出のための方法(「検出方法」)は卵バンキングの前に卵母細胞を分析するのに有用であり得る、又は体外受精手順を用いる着床の前に胚の細胞内の染色体の数及び補体を特定する着床前遺伝学的スクリーニング(PGS)に有用であり得る。該検出方法は、増加又は減少したコピー数を含有する、試験のための胚を代表するものであるゲノムDNA(「試験DNA」)における染色体領域を特定することができる。該検出方法は、試験DNAをハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズし、コピー数が既

50

知である1つ又は複数のDNA分子(「参照DNA」)を1つ又は複数の異なるハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズする、単一チャンネルのアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(「単一チャンネルのアレイCGH」)を用いることを含み得る。試験DNAにおけるコピー数の不均衡は、参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じるシグナル強度と、試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じるシグナル強度とが異なる領域を検出することにより特定することができる。本教示の様々な特徴は、国際公開第96/17958号、及び2009年10月30日付けで提出された米国特許出願第12/609,156号(これらの内容はその全体が参照により本明細書中に援用される)に記載されたゲノムハイブリダイゼーションの方法、装置及びキットを含み得る。

【0032】

該検出方法は、試験サンプルから得られる試験サンプルDNAを標識し、それにより試験DNAを形成する、標識することと、標識した試験DNAを第1のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることとを含み得る。試験サンプルDNAを標識し、試験サンプルDNAと第1のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションの検出及び/又は測定を可能にすることができる。標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより発生するシグナルを検出及び分析し、第1のハイブリダイゼーションアレイから生じたシグナル強度を決定し、それにより試験ハイブリダイゼーションの結果を得ることができる。試験ハイブリダイゼーションの結果を参照ハイブリダイゼーションの結果、すなわち1つ又は複数の参照DNAと、第1のハイブリダイゼーションアレイとは別の1つ又は複数の他のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションにより発生するシグナル強度と比較することができる。例えば、参照DNAに対するシグナル強度は、参照DNAを標識し、標識した参照DNAを第2のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることにより決定することができる。標識した参照DNAのハイブリダイゼーションにより発生するシグナルを検出及び分析し、参照DNAのシグナル強度を決定することができる。試験DNAにおけるコピー数の不均衡の存在を、シグナル強度が第2のハイブリダイゼーションアレイの1つ又は複数の対応する領域で生じたシグナル強度と異なる第1のハイブリダイゼーションアレイの1つ又は複数の領域を特定することにより決定することができる。

【0033】

標識した参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度の決定を、標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度の決定前又は決定後に行うことができる。標識した参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度の決定を、標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度の決定の前に行う場合、参照ハイブリダイゼーションの結果は過去の参照ハイブリダイゼーションの結果として記録及び記憶することができる。それから、後に試験サンプルDNAで得られる試験ハイブリダイゼーションの結果を過去の参照ハイブリダイゼーションの結果と比較して、試験DNAにおけるコピー数の不均衡を決定することができる。過去の参照ハイブリダイゼーションの結果の使用により、特定の試験ハイブリダイゼーションの結果との比較が望まれるたびに参照サンプルに対して実際のハイブリダイゼーションを実施する必要がなくなり得る。

【0034】

2つ以上の参照DNA又は複数の参照DNAサンプルを検出方法に使用することができる。例えば、参照DNAのシグナル強度を決定した後に、第2の参照DNAのシグナル強度を決定することができる。第2の参照DNAのシグナル強度を、第2の参照DNAを標識し、それを第3のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることにより決定することができる。標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより発生するシグナルを検出及び分析し、第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定することができる。コピー数の不均衡の存在を、シグナル強度が第2のハイブリダイゼーションアレイ及び/又は第3のハイブリダイゼーションアレイの1つ又は複数の対応する領域で生じたシグナル強度と異なる第1のハイブリダイゼーションアレイ

10

20

30

40

50

イの1つ又は複数の領域を特定することにより決定することができる。

【0035】

試験サンプルのゲノムDNAにおけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法は、試験サンプル由来のサンプルゲノムDNA又はその増幅産物を標識し、それにより標識した試験DNAを形成する、標識することと、標識した試験DNAを第1のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、参照サンプル由来の第1の参照ゲノムDNA、又はその増幅産物を標識し、標識した第1の参照DNAを形成する、標識することと、標識した第1の参照DNAを第2のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、第2の参照サンプル由来の第2の参照ゲノムDNA、又はその増幅産物を標識し、標識した第2の参照DNAを形成する、標識することと、標識した第2の参照DNAを第3のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることとを含み得る。該方法は、標識した試験DNAのハイブリダイゼーション後に第1のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーション後に第2のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することと、標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーション後に第3のハイブリダイゼーションアレイを分析し、それにより標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を決定する、分析することとを含み得る。コピー数は、第1のハイブリダイゼーションアレイのシグナル強度を、第2のハイブリダイゼーションアレイ及び第3のハイブリダイゼーションアレイのうち少なくとも1つのシグナル強度と比較することによりサンプルゲノムDNAの少なくとも1つの領域に対して推測することができる。

10

20

【0036】

標識した第1の参照DNAは、標識した試験DNAに対する、ゲノムの1つ又は複数の所定の領域における少なくとも1つのコピー数の変化を含み得る。標識した第2の参照DNAは、標識した試験DNAに対する、標識した第1の参照DNAと同じコピー数の変化を有しない少なくとも1つの所定の領域を含み得る。幾つかの場合、標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、1つ又は複数の所定の領域における標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、1つ又は複数の所定の領域における標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、該方法は、予測されるコピー数に基づき該方法のダイナミックレンジを決定することを更に含む。標識した第1の参照DNAは第1の種、例えばヒト等の哺乳動物の雄の動物由来のものであり、標識した第2の参照DNAは第1の種の雌の動物由来のものであり得る。標識した第1の参照DNA及び標識した第2の参照DNAは、同じ種の動物の雄由来のDNAと雌由来のDNAとの混合物を含み得る。標識した第1の参照DNAはトリソミーを含み、第2の参照DNAはモノソミーを含み得る。幾つかの実施形態では、第1の参照DNAは任意の染色体上での小さい増幅を含み、第2の参照DNAはそのようなものを排除し得る。

30

40

【0037】

標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、1つ又は複数の所定の領域における標識した第1の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、それによりコピー数の第1の推測値を決定することができ、標識した試験DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度を、1つ又は複数の所定の領域における標識した第2の参照DNAのハイブリダイゼーションにより生じたシグナル強度と比較し、それによりコピー数の第2の推測値を求めることができ、コピー数の第1の推測値と第2の推測値とを組み合わせ、コピー数の総合的な推測値を得ることができる。幾つかの実施形態では、シグナル強度を正規化した後にコピー数を推測する。

【0038】

50

幾つかの場合、参照サンプル由来の第1の参照ゲノムDNA又はその増幅産物は第1の増幅技法により生じた増幅産物を含み、参照サンプル由来の第2の参照ゲノムDNA又はその増幅産物は同じ第1の増幅技法により生じた増幅産物を含み得る。参照サンプル由来の第1の参照ゲノムDNA又はその増幅産物は、異なる出発濃度の同じ第1の参照ゲノムDNAを増幅することによりそれぞれ生成される複数の異なる増幅産物を含み得る。該方法は、コピー数の推測値に基づきヒトの極体又は胚の異数性の状況を決定することを含み得る。該方法は、IVF手順における着床のための胚を選択するのにコピー数の情報、例えば異数性の状況を使用することを更に含み得る。該方法は、試験サンプルからゲノムDNAを単離し、サンプルゲノムDNA又はその増幅産物を形成する、単離することを含み得る。

10

【0039】

試験サンプルは胚由来の少なくとも1つの細胞を含み得る。第1のゲノム参照DNAは、染色体異常を有する動物の組織又は細胞から得られるDNAを含み得る。幾つかの実施形態では、第1のゲノム参照DNAは、モザイク組織又はモザイク細胞から得られるDNAを含む。幾つかの場合、標識した第1の参照DNAは第1の濃度のDNAを有し、正常な雄のDNAを含み、標識した第2の参照DNAは第2の濃度のDNAを有し、標識した第1の参照DNAと同じ正常な雄のDNAを含み、第2の濃度は第1の濃度に比べると希釈されている。雌のDNAを雄のDNAの代わりに、又は雄のDNAに加えて使用することができる。標識した第1の参照DNAは少なくとも2つの個体から採取した血液サンプルから抽出されるプールゲノムDNAを含み得る。

20

【0040】

本教示によれば、試験DNAを標識し、それにより標識した試験DNAを形成する、標識することと、標識した試験DNAを第1のハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることと、ハイブリダイゼーション後に第1のハイブリダイゼーションアレイを分析して、第1のハイブリダイゼーションの結果を得る、分析することと、第1のハイブリダイゼーションの結果を、標識した第1の参照DNAと第2のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションによる過去の参照ハイブリダイゼーションの結果と比較することとを含む、試験サンプルのゲノムDNAにおけるコピー数の不均衡の存在を決定する方法が提供される。該方法は、第1のハイブリダイゼーションの結果を、標識した第2の参照DNAと第3のハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションによる過去の参照ハイブリダイゼーションの結果と比較することと、シグナル強度が、第2のハイブリダイゼーションアレイ及び第3のハイブリダイゼーションアレイのうちの少なくとも1つの1つ又は複数の対応する領域において生じたシグナル強度と異なる第1のハイブリダイゼーションアレイの1つ又は複数の領域を特定することによりコピー数の不均衡の存在を決定することとを更に含み得る。標識した第1の参照DNAは、第1の種の雄の動物由来であり、標識した第2の参照DNAは、第1の種の雌の動物由来であり得る。

30

【0041】

本教示は、プロセッサに記憶される参照アレイデータセットのライブラリも提供する。それぞれの参照アレイデータセットは、各参照アレイで実施されたコピー数ハイブリダイゼーションアッセイ中に各参照アレイから集められたデータを含み得るが、(1)各データセットが集められるそれぞれの参照アレイが、データセットが集められた互いの参照アレイと共通する要素を含み、(2)各データセットが集められるそれぞれのコピー数ハイブリダイゼーションアッセイを、データセットが集められた互いのコピー数ハイブリダイゼーションアッセイと1つ又は複数の異なる条件下で実施する。ライブラリの少なくとも2つの参照アレイデータセットが互いに異なり得る。幾つかの実施形態では、参照データセットの幾つかが、該技法における変動を評価するために同一の条件下で生成される。それぞれの参照アレイデータセットは蛍光シグナル強度のデータを含み得る。

40

【0042】

本教示は、コピー数ハイブリダイゼーションアッセイ中に試験アレイから集められた試験アレイデータセットを、ライブラリの参照アレイデータセットと比較することと、シグ

50

ナルプロセッサを用いて、試験アレイデータセットとライブラリ由来のデータセットとの比を決定する、用いることとを含む方法も提供する。ベストフィットデータセットは、ライブラリから決定することができ、このようにして得られた比のセットのSNRを最大にするためにプロセッサにより決定される参照アレイデータセットであり得る。

【0043】

本教示によれば、第1のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと、第1のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと同一の第2のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと、第1のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと同一の第3のコピー数ハイブリダイゼーションアレイと、第1の参照ゲノムDNAと、第2の参照ゲノムDNAと、第1のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果を、第1の参照ゲノムDNAを用いて第2のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果と比較するための指示書とを備えるキットも提供される。指示書は、第1のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じる試験結果を、第2の参照ゲノムDNAを用いて第3のコピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じた試験結果と比較するためのものでもあり得る。場合によっては、第1の参照ゲノムDNAは参照ゲノムDNAの増幅産物を含み得る。本教示は、コピー数ハイブリダイゼーションアレイと、複数の参照アレイデータセットを記憶する電子記憶媒体と、コピー数ハイブリダイゼーションアレイで実施されるハイブリダイゼーションアッセイから生じる試験結果に対応するデータセットを、複数の参照アレイデータセットと比較するための指示書とを備えるキットも提供する。

10

20

【0044】

試験DNAサンプル及び参照DNAサンプルの測定を別々のハイブリダイゼーションアレイで行うことができるので、検出方法を実施するのに標識用の色素を対比させる必要がない。また、試験DNAを単に同時にハイブリダイズした参照ではなく、無限数の参照サンプルと比較することができる。このように、要求される数の比較を、試験サンプルに対して最適なアッセイの結果を決定するために実施することができる。

【0045】

2つ以上の参照DNAの使用は、試験DNAと参照DNAとの適合不全によるアッセイの失敗の危険性を更に回避することができ、試験DNAと参照DNAとの単一の最適な対合の選択を可能にする。複数の参照DNAは単細胞のDNA増幅から得られる試験DNAと十分に適合した参照DNAを含み得る。換言すると、発生した広範な参照DNAから、試験DNAに対する最良の比較を与える単一の参照DNAを選択することができる。例えば、試験DNAと十分に適合した参照DNAを、増幅プロトコルにおける僅かな修正により広範な参照DNAサンプルを発生させることにより得ることができる。増幅プロトコルにおけるこのような僅かな修正により、技術的変動の広がりをもたらすことができる。加えて、発生される参照DNAは特定の既知の生物学的特性を有し得る。例えば、発生される参照DNAは、モザイク個体から、又は特定の性別の個体から誘導することができる。発生される参照DNAは1つ又は複数の染色体異常を有し得る。参照DNAは試験サンプルの条件に適合させるために損傷細胞 (compromised cell) から誘導することができる。参照DNAは試験サンプルと生物学的に関連する個体から誘導することができる。

30

40

【0046】

ハイブリダイゼーションアレイは、本明細書で使用する場合、マイクロアレイ、すなわち固体支持体と結合した非標識の標的核酸 (プローブ) の集合体、例えば染色体位置にマッピングされたクローンのアレイを含み得る。ハイブリダイゼーションアレイは、固体支持体又は固体表面に結合した複数のプローブ又は標的核酸分子、例えば少なくとも2つの標的核酸分子を含み得る。標的核酸分子をそれぞれのプローブに対して別々の位置で固体表面上の所定の位置において組織化することができる。固体表面に結合した標的核酸分子は、複数の同じ標的核酸分子、複数の異なる核酸分子、又はその2つの組合せであり得る。例えば、検出アッセイを多重化する (すなわち2つ以上の核酸分子を一度に検出する)

50

ことが望まれる実施形態では、異なる核酸分子と結合する複数の異なる標的核酸分子を使用することができる。固体表面は可撓性表面と剛性表面との両方を含む、アレイ C G H に好適な任意の表面であり得る。可撓性表面には、ナイロン膜が含まれ得るが、これに限定されない。剛性表面には、スライドガラスが含まれ得るが、これに限定されない。固体表面は、三次元マトリクス又は複数のビーズを更に含み得る。固体表面上に標的核酸を固定するための任意の好適な方法を使用することができる。

【 0 0 4 7 】

D N A のハイブリダイゼーションが本明細書で説明されているが、任意の種類の核酸、例えば R N A、D N A 又は c D N A を使用することができることが理解されるものとする。同様に、標的核酸分子又はプローブも、例えば R N A、D N A 又は c D N A であり得る。核酸を任意の生物から誘導することができる。プローブは合成オリゴヌクレオチドであり得るか、又はクローン化した D N A 若しくは P C R 産物から誘導することができる。オリゴヌクレオチドを *i n s i t u* で合成するか、又は合成した後に *e x s i t u* でアレイ化する (arrayed) ことができる。クローン化した D N A は細菌人工染色体 (B A C) クローン又は P I 誘導性人工染色体 (P A C) であり得る。核酸分子の配列は、疾患に関連することが知られている染色体位置を基にすることができ、疾患との関連性が試験される染色体領域を代表するものとなるように選択することができ、又は転写を化学分析する遺伝子に対応し得る。

【 0 0 4 8 】

参照 D N A を標識して、ハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることができる。ハイブリダイゼーションアレイを洗浄して、あらゆる非特異的に結合した標識物質を除去することができる。それからハイブリダイゼーションアレイをスキャンすることができ、参照 D N A のシグナル強度を試験 D N A サンプルに対する試験ハイブリダイゼーションの結果とのその後の比較のために過去の参照ハイブリダイゼーションの結果として記録及び記憶することができる。同様に、複数の異なる参照 D N A に対して一組の過去の参照ハイブリダイゼーションの結果を生成し、記録させることができる。複数の参照 D N A サンプルを標識し、同じアレイ設計を有する別個のハイブリダイゼーションアレイと個々にハイブリダイズすることができる。ハイブリダイゼーションアレイをスキャンすることができ、スキャンしたデータを過去の参照ハイブリダイゼーションの結果に変換し、後の使用のために記憶することができる。過去の参照ハイブリダイゼーションの結果を記録することができるため、複数の参照 D N A のハイブリダイゼーションを何度も行う必要はない。過去の参照ハイブリダイゼーションの結果を、1 つ又は複数の異なる試験 D N A を用いてその後のアッセイに繰り返し使用することができる。試験 D N A を標識し、過去の参照ハイブリダイゼーションの結果を得るのに使用されるハイブリダイゼーションアレイと同じアレイ設計を有するハイブリダイゼーションアレイとハイブリダイズすることができる。過去の参照ハイブリダイゼーションの結果を、コンピュータを用いて又は電子記憶媒体に入れてエンドユーザーに転送することができる。

【 0 0 4 9 】

「スキャニング」は、本明細書で使用される場合、サンプルとハイブリダイゼーションアレイとのハイブリダイゼーションの検出を可能にするスキャナーにより実施される任意の従来型の方法を表すことが理解されるものとする。スキャニングは、例えばスキャナーの光源からの光の放出、及びスキャナーの検出器でハイブリダイゼーションアレイの各位置から反射する放出光を受け取ることを含み得る。幾つかの実施形態では、スキャニングは、例えばマイクロアレイ上での蛍光色素の励起、及びスキャナーの検出器での放出された蛍光の強度の測定を含み得る。スキャニングは、例えば国際公開第 9 6 / 1 7 9 5 8 号、及び 2 0 0 9 年 1 0 月 3 0 日付けで提出された米国特許出願第 1 2 / 6 0 9 , 1 5 6 号 (それぞれ、その全体が参照により本明細書に援用される) で更に説明されている。

【 0 0 5 0 】

図 1 は、試験 D N A サンプルのコピー数を決定する一方法を示すフローチャートである。図 1 に示されるように、標識した試験 D N A サンプルをハイブリダイゼーション区域 A

とハイブリダイズすることができる。ハイブリダイゼーションにより発生されるシグナル強度又はシグナル振幅を測定し、試験DNAサンプルの振幅プロファイルを構築することができる。試験DNAサンプルの振幅プロファイルを正規化することができる。参照DNAサンプルのセットを選択し、ハイブリダイゼーション区域A以外のハイブリダイゼーション区域と別々にハイブリダイズすることができる。それぞれの参照DNAのハイブリダイゼーションにより発生されるシグナル強度又はシグナル振幅を測定し、参照DNAの振幅プロファイルを構築することができる。参照DNAの振幅プロファイルを正規化することができる。試験DNAサンプルに対するコピー数を、試験DNAサンプルの振幅プロファイルを参照DNAの振幅プロファイルと比較することにより決定することができる。幾つかの実施形態では、同一のアレイとは、多くの同じ内容物、例えば少なくとも90%の同じ内容物を含むが、他の内容物が異なり得るアレイを意味する。同様に、僅かに変更した増幅手順も使用することができ、これも依然として同一のものであるとみなされる。

10

【0051】

幾つかの実施形態では、それぞれの参照DNAは関連した振幅プロファイルを有する。それからコピー数の初期推測値を、試験DNAの振幅と参照の振幅（又は複数の参照の振幅）との比をとること、及び場合によっては様々な正規化により決定する。このコピー数の推測値には必然的にノイズがあり、更なる工程を用いて、推測したコピー数が生物学的なコピー数の真の変化に対応すると考えられるか、又は単純にノイズによるもの（したがってコピー数はゼロ）であるのかを決定することができる。

20

【0052】

複数の異なる参照DNAは、特定の既知の生物学的特性を有する参照DNAを含み得る。例えば、参照DNAを雄又は雌のサンプルから得ることができる。参照DNAを所望の染色体異常を有する細胞株から得ることができる。参照DNAをモザイクサンプルから得ることができる。合成によるモザイク参照サンプルを、モザイク核型パターンを複製するように、細胞又は抽出DNAを異なるが既知の核型と組み合わせることにより構築することができる。この組合せは参照DNAの調製中、又は標識後のいずれの段階でも実施することができる。

【0053】

参照DNAは試験サンプルの条件に適合させるために損傷細胞から誘導することができる。参照DNAは試験サンプルを採取した個体に生物学的に関連する個体から誘導することができる。

30

【0054】

試験DNAを、研究中の試験サンプル、例えば試験細胞、試験細胞集団、又は試験組織から調製することができる。試験DNAを1つ又は複数の試験細胞から単離することができる。試験DNAを、卵の染色体補体の半分が受精前に放出された極体から得ることができる。試験DNAを、割球、8細胞期の胚から抽出された単細胞、又は胚盤胞若しくは関連の生検材料、例えば栄養外胚葉（trophoectoderm）の生検材料由来の少数の細胞から得ることができる。試験細胞は胚由来の少なくとも1つの細胞を含み得る。DNA増幅手順を、試験DNAの多くのコピー数を生じるために使用することができる。

【0055】

参照DNAを、参照細胞、参照細胞集団、又は参照組織から調製することができる。参照細胞は正常な非罹患細胞であり得るか、又は疾患の他の態様の標準として働く罹患組織のサンプル由来であり得る。参照DNAは対象の遺伝子又は核酸分子のコピー数が既知であるゲノム材料である。

40

【0056】

参照DNAは、多様な出発材料を用いて生成することができる。出発材料の例としては、1つ又は複数の個体から提供される組織、例えば血液が挙げられ得る。出発材料の他の供給源には単細胞が含まれ得る。標準的な手順を用いて、参照DNAを適切な組織又は細胞から単離することができる。参照DNA又は出発材料は、正常な染色体を有する個体、及び/又は染色体異常、例えば1つ若しくは複数の染色体の過剰若しくは減少、若しくは

50

代替的には1つ若しくは複数の染色分体の過剰若しくは減少を有する個体から選ぶことができる。単細胞は *in vitro* で細胞培養物から誘導することができるか、又は意図される試験サンプルと同じタイプ又は異なるタイプのいずれかの *ex vivo* ヒト細胞であり得る。単細胞は、意図される試験サンプルのものに類似した又は類似していないクロマチン構造を有するため選択することができる。例えば高密度クロマチンを有する精子細胞を選択することができる。同様に細胞周期の異なる段階にある細胞を選ぶことができる。代替的に、高品質で濃縮されたゲノム参照DNAを細胞培養物又は血液から抽出することができる、単細胞から得られる濃度に匹敵するレベルまで抽出後に希釈することができる。

【0057】

参照DNAを得るのに使用される材料のドナーと試験サンプルとの間の家族性の関係が存在する場合があるが、このような関係は必要というわけではない。参照材料を試験サンプルと親サンプルとの間の直接比較を行うことができるように、片親又は両親から得ることができる。

【0058】

多様な条件を用いて、異なる品質の複数の参照DNAを生成することができる。参照DNAを異なる完全性の細胞から生成することができる、例えば参照サンプルを損傷細胞から生成する。参照DNA、例えばホルマリン固定したパラフィン包埋組織から抽出したDNAをサンプル回収後に処理することができる。参照DNAを物理的処理、例えば加熱処理又は超音波処理にかけることができる。化学処理、例えば酵素消化又はプロテイナーゼ消化を使用することもできる。、IVF手順中の試験サンプル条件をシミュレートする他の処理を行うことができる。このような処理には、任意の寄与を正規化するための鉱油混入及び培養培地の混入が含まれ得る。これらの因子が試験サンプルと参照サンプルとの間のアッセイ性能に差異をもたらす。

【0059】

参照DNAの調製は全ゲノム増幅の適用を伴い得る。全ゲノム増幅プロトコルを、増幅DNA産物に変動を導入させるように変えることができる。増幅のために、SUREPLEXのDNA増幅又は他の好適な増幅を使用することができる。使用するDNA増幅の正確な性質は本教示に重要ではない。増幅していないゲノム参照DNAを使用することができるが、増幅した試験DNAと増幅していない参照DNAとの適合不全により、高いノイズレベルが生じる場合がある。このため、使用する参照材料は少数の単細胞とさほど変わらない量のDNAを含有するように希釈した「正常な」プールDNAサンプルであり得る。それからこの希釈した参照材料を、試験サンプルと同じ方法を用いて増幅することができる。試験DNA及び参照DNAの増幅の間の差異を補うために、参照サンプルのセットを、適合不全に関与する変動の空間に広がるように慎重に構築することができる。この戦略は従来型のアレイCGHと関連する、試験サンプルと参照サンプルとの適合不全によるアッセイの失敗の危険性を低減することができる。本明細書に記載のように、試験サンプル及び参照サンプルの測定を分離することにより、単一の試験サンプルで得られる測定値と一連の参照サンプルで得られる測定値との比較が可能になる。このようにして、試験サンプルと参照サンプルとの単一の最適な対合を見つけることができる、又は代替的に複数の比較による結果を組み合わせ、試験DNAと比較することができる。

【0060】

図2は参照DNAサンプルのセットを調製するための例示的な方法を示すフローチャートである。図2に示すように、参照DNAサンプルのセットを作製するのに使用される増幅プロトコルを変えることにより変動を参照DNAに導入することができる。多くの同一の参照DNAサンプル対を構築することができる。それぞれの参照DNAサンプル対は、正常な雄の参照DNAと、正常な雌の参照DNAとを含み得る。それぞれのサンプル対を、連続希釈物を作製するために異なる程度まで希釈することができる。対となる(with a pair)それぞれの参照DNAを同じ程度まで希釈することができる。それぞれのサンプル対のそれぞれの参照DNAを、試験DNAを増幅するのに使用されるものと同じ増幅方

10

20

30

40

50

法を用いて別々に増幅することができる。

【0061】

試験DNA及び参照DNAを標識して、ハイブリダイゼーション複合体の検出を可能にすることができる。DNAに結合した特定の標識は、該標識がDNAと標的核酸分子とのハイブリダイゼーションに著しく干渉しなければ、本教示の重要な態様ではない。標識は、検出可能な物理的特性又は化学的特性を有する任意の材料であり得る。標識には、例えば、蛍光色素、放射性標識又は酵素が含まれ得る。概して、アレイCGHに一般的に用いられる蛍光標識、例えばCy3及びCy5が好ましい。例えばBLUEGNOME製のCYTOCHIP標識キットを使用することができる。標識により発生するシグナルの検出及び分析のための標準的な方法を使用することができる。蛍光標識には、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(「アレイCGH」)に一般的に用いられる標準的な方法を使用することができる。ハイブリダイゼーションアレイを、多色ビームスプリッタを備える蛍光顕微鏡で画像化することができる。様々なカラー画像をCCDカメラ、レーザースキャナー、その組合せ等を用いて取得することができ、デジタル画像をコンピュータに記憶することができる。それから、コンピュータプログラムを用いて、アレイにより生じたシグナルを分析することができる。

10

【0062】

試験DNAと参照DNAとの単一の最適な対合の選択、及び試験DNAにおけるコピー数の不均衡の決定を自動化して、データの分析及び解釈を簡略化し、かつ/又は再現性を増大させることができる。参照データの選択及びアッセイのスコアリングを自動化させるルゴリズムのセットを提供することができる。これらのアルゴリズムにより、データの分析、解釈を簡略化し、かつ/又は再現性を増大させることができる。アルゴリズムは、参照選択アルゴリズムと、呼び出し(calling)アルゴリズムとを含み得る。参照選択アルゴリズムは、試験DNAに対する試験ハイブリダイゼーションの結果を一組の対応する過去の参照ハイブリダイゼーションの結果と比較し、複数の参照DNAのうちどの参照DNAが試験DNAとの最良の比較をもたらすかを決定することができる。

20

【0063】

このような事象において、検出方法では、アレイ間のハイブリダイゼーションの変動、及び/又は異なる日にちでのサンプルのハイブリダイゼーションのために空間ノイズが問題となることがある。このような場合、検出方法は、空間バイアス補正のための方法、又はアレイ間のハイブリダイゼーションに関して空間的に補正するための方法を含み得る。試験DNA及び参照DNAのハイブリダイゼーションの差異のために存在し得る任意の空間バイアスを、当該技術分野で既知の方法により、例えば2009年10月30日付けで提出された米国特許出願第12/609,156号(この内容はその全体が参照により本明細書中に援用される)に記載のように検出及び除去することができる。

30

【0064】

参照選択アルゴリズムは、性能測定基準とのそれぞれの試験/参照比較の結果を特徴付けることができる。性能測定基準は、例えばシグナル対ノイズ比であり得る。シグナル構成要素は、比が試験と参照との間にあるハイブリダイゼーションアレイの選ばれた染色体対の \log_2 比の中央値間の差異と定義することができる。ノイズ構成要素を、それぞれの染色体に対するハイブリダイゼーションアレイにおいて標的核酸又はプローブのセットをとり、それぞれの個々のプローブの \log_2 比から染色体の中央値の \log_2 比を減算することにより得ることができる。染色体の傾向が取り除かれれば、ノイズを全てのプローブにわたる四分位範囲を算出することにより決定することができる。

40

【0065】

参照選択アルゴリズムにより、試験DNAにおけるコピー数の指標であるレシオメトリックデータのSNRが最大となる参照DNAを選択することができる。それから、試験-参照の対合を呼び出しアルゴリズムへと自動的に提示させることができる。呼び出しアルゴリズムを適用し、試験サンプルと参照サンプルとの間のコピー数の不均衡領域を特定することができる。呼び出しアルゴリズムにより、観察される不均衡のパターンを、予測さ

50

れる不均衡のパターンと比較することができる。参照サンプルの核型が知られているため、それにより試験サンプルの核型を推測することができる。サンプルの最終的な分類は、「正倍数体」（コピー数の不均衡がない）又は「異数体」（コピー数の不均衡がある）のいずれかであり得る。幾つの場合、試験データは品質が低い場合があり、そのため得られる任意の結果には信頼性がない。これらの状況では、呼び出しアルゴリズムは、該結果を「結果なし」に分類するものとする。

【0066】

図3は、試験DNAサンプルのコピー数をどのように決定することができるかを示すフローチャートである。図3に示されるように、仮の比プロファイルのセットを、試験DNAサンプルの振幅プロファイルをそれぞれの参照DNAの参照DNAの振幅プロファイルで除算することにより構築することができる。それぞれの仮の比プロファイルの「ノイズ」及び「ダイナミックレンジ」を算出することができる。ダイナミックレンジをX/Y染色体の比に基づき算出することができる。低いノイズと予測されるダイナミックレンジとの最良の組合せを有する比プロファイルの対を参照サンプル対に対応して選択することができる。換言すると、試験DNAと参照DNAとの対の最良の「増幅」適合を選択することができる。呼び出しアルゴリズムを用いて、比プロファイルの対に基づき試験DNAにおけるコピー数の変化の領域を決定することができる。

10

【0067】

試験DNAが単離される試験サンプルが第一極体由来である場合、参照DNAと試験DNAとの最適な対合を作製することができるが、他に概説される理由から第二極体を選択することが依然として望まれ得ることを理解すべきである。試験DNAがサンプルの性別が事前に分かっていない割球生検材料から単離される場合、参照選択アルゴリズムにより、2つの最適な対合を選択することができる。幾つの実施形態では、無限数の対合を選ぶことができる。試験DNAが割球生検材料から単離される場合、参照DNAは様々な品質の雄のゲノムDNA及び雌のゲノムDNAを含み得る。2つの最適な対合は試験DNAと雄の参照DNAとの対合、試験DNAと雌の参照DNAとの対合を含み得る。それから呼び出しアルゴリズムにより、対合の一方又は両方に存在するコピー数の不均衡を特定することができる。これらの不均衡を、予想される不均衡のパターンと比較することができる。両方の参照サンプルの核型が既知であるため、試験サンプルの核型を推測することができる。

20

30

【0068】

図4は、2つの比プロファイルに基づく試験DNAサンプルにおけるコピー数の変化の領域をどのように決定することができるかを示すフローチャートである。図4に示すように、正常な試験DNAサンプルのハイブリダイゼーション後のシグナル強度を正常な雄及び雌の参照DNAのシグナル強度と比較し、コピー数の不均衡を決定することができる。試験DNAサンプルは試験DNAと同じコピー数を有する参照DNAと同じ性別であり得る。正常な試験DNAと正常な雄の参照DNAとの比プロファイル、及び試験DNAと、正常な雌の参照DNAとの比プロファイルを得ることができる。それぞれの比プロファイルでは、アルゴリズムを用いて、試験DNAにおける潜在的に有意な異常領域、換言するとプロファイルにおけるベースラインノイズよりも有意に大きい異常領域を決定することができる。真のコピー数変化と一致する有意な比のレベルを、試験DNAサンプル及びその性別を不適合させた参照DNAに対応する比プロファイルにおけるX/Y比を考慮することにより決定することができる。先の段階で得られた有意な比レベルを用いて、それぞれの異常領域が真のコピー数変化に一致するか又は一致しないかを決定することができる。個々の比プロファイルからのコピー数の呼び出しを組み合わせ、例えば平均化することにより試験DNAに対する単一のコピー数呼び出しを形成することができる。しかしながら、X染色体領域及びY染色体領域の呼び出しは選択的に、サンプルと参照との性別適合に一致した比プロファイルに基づき得ることを理解すべきである。

40

【0069】

2つ以上の試験DNAを同じハイブリダイゼーション区域とハイブリダイズすることが

50

できる。例えば、2つ以上の試験DNAサンプルを異なる色素で標識し、同じハイブリダイゼーション区域とハイブリダイズすることができる。

【0070】

幾つかの実施形態では、試験サンプルは雄であり、第1の参照は雌であり、第2の参照は雄である。幾つかの場合、試験サンプルは雌であり、第1の参照は雄であり、第2の参照は雌である。いずれの場合であっても、第1の参照を用いて、全ての染色体を検出するのに使用することができるダイナミックレンジを決定することができ、第2の参照をX/Yでの呼び出しに使用することができる。サンプルの性別が分からないことにより生じる課題に対処するために、試験サンプルが極体である場合、雌の参照及び雄の参照の両方を使用することができ、このようにして1つの参照をサンプルに適合させ、もう1つの参照がダイナミックレンジ情報を提供する。

10

【0071】

「コピー数」は本明細書で使用する場合、参照ゲノムに対して相対的なものであることを理解すべきである。例えば、参照が雄のDNAと雌のDNAとの混合物である場合、コピー数は必ずしも整数でなくてもよい。幾つかの場合、三倍体参照を標準として使用することができるが、異なるコピー数を有したままである。

【0072】

本教示によれば、第1の参照は第1の規定の参照におけるコピー数の変化を含むサンプルの増幅産物である。幾つかの実施形態では、第1の参照は第1の規定の領域の増幅産物であり、第2の参照は規定の領域における変化ではなく規定の領域における欠失を有する。

20

【0073】

本教示によれば、異なる標識を使用する場合、第1、第2、第3及び任意の他のハイブリダイゼーション区域は同じにすることができる。

【0074】

本明細書に記載の方法はIVFのために設計されているが、該方法を出生前診断に、腫瘍学に及び/又は幹細胞に関連して適用することもできる。さらに検出方法により、様々な増幅条件下で様々なモザイク現象の程度を示す多数の参照の使用が可能となる。

【0075】

サンプルの性別が既知であったとしても、性別を適合させた参照と性別不適合させた参照との両方に対してサンプルを使用することが可能であることが依然として一般的に有用である。例えば、極体を試験する場合、サンプルが雌であれば、雄参照が内部ダイナミックレンジ対照を得るための参照の事実上の選択肢 (defacto choice) であることが分かっている。しかしながら、これには、極体のX染色体及びY染色体の解釈を複雑にするという悪影響があるとされる。そのため依然として、性別の不適合は、ダイナミックレンジを算出するのに使用され、第1染色体～第22染色体での呼び出しを提供し、性の適合は、全ての染色体を呼び出すのに使用されるという利点がある。

30

【0076】

幾つかの場合、所定の領域において、少なくとも1つの参照サンプルが試験サンプルとのコピー数の差異を有する。このコピー数の差異を「対照」として使用し、実験のダイナミックレンジ(対象となる個々の試験サンプル及びハイブリダイゼーション条件に依存する)を効果的に示すことができる。例えば、「1つ」のコピー数の差異が試験サンプルと参照における特定の所定の領域との間で予測される場合、実験的な理由から差異は僅か「0.25」であり、0.25が特定の試験において有意であり得るという、実験のダイナミックレンジに関する情報が与えられる。それからこのダイナミックレンジの推測値、又は有意性を用いて、他の参照データセットにおけるコピー数の変化、又は同じ参照データセットで異なる染色体を評価することができる。

40

【実施例】

【0077】

第13染色体及び第19染色体の1つのコピーが欠失した正常な雌を含むサンプルを準

50

備した。図5は、それぞれの上部プロットが雄参照と比較したサンプルを示し、それぞれ下部プロットが雌参照と比較したサンプルを示す一組のプロットを示す。図5の上部プロットでは、サンプルを雄参照と比較し、X染色体は、雌でXの2つのコピーが存在し、雄参照では1つだけであるため過剰を示し、同様にY染色体は、雌ではYがなく、雄参照では1つあることから減少を示す。これらの予測されるX/Y変化は、有意であるものの指標を与える。第13染色体及び第19染色体は明らかに欠失している。

【0078】

図5の下部プロットは、雌参照と比較した同じサンプルを示す。この場合、X染色体及びY染色体の数は、サンプルと参照との両方で同じであると予測される。ここでもまた、特に上部プロットにおけるX/Y比較により得られたダイナミックレンジに関する情報と組み合わせた場合に、第13染色体及び第19染色体での減少を見ることができる。

10

【0079】

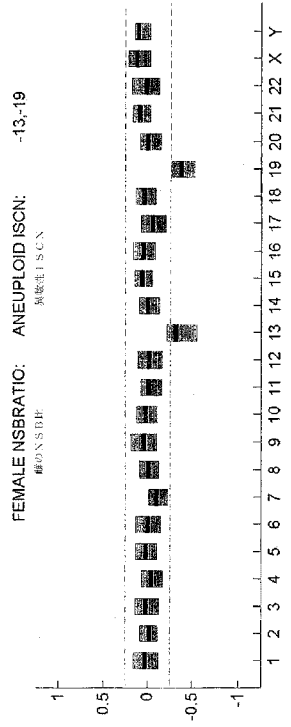
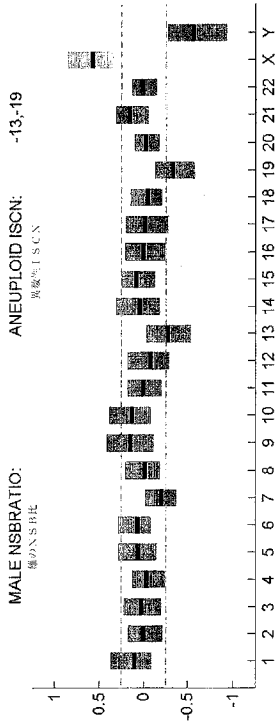
本開示における全ての引用文献はその内容全体が参照により本明細書中に援用される。さらに、量、濃度又は他の値若しくはパラメータが、範囲、好ましい範囲又は上側の好ましい値及び下側の好ましい値のリストのいずれかとして挙げられる場合、これは、範囲が別々に開示されているかに関係なく、任意の上側の範囲限定又は好ましい値と、任意の下側の範囲限定又は好ましい値との任意の対からなる全ての範囲を具体的に開示していることを理解されたい。数値の範囲が本明細書中に列挙される場合、特に指定のない限り、その範囲は、その端点、並びに範囲内の全ての整数及び小数を含むことを意図する。範囲を規定する場合、本教示の範囲が記載の特定の値に限定されることを意図するものではない。

20



【0080】

本教示の他の実施形態は、本明細書及び本明細書中に開示される本教示の実施を考慮することにより、当業者に明らかとなるであろう。本明細書及び実施例は、例示的なものにすぎないと見なされ、本教示の真の範囲及び精神は添付の特許請求の範囲及びその均等範囲によって示されることが意図される。

【 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2011/000438
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, C40B 40/06(2006.01)i, C40B 70/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68; C40B 40/08; C40B 30/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI PubMed, eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Comparative genomic hybridization, preimplantation genetic screening, a copy number imbalance, reference array, library, reference array data sets		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0274909 A1 (BROTHMAN, A. R.) 6 November 2008 See the whole document, especially Abstract; Pages 7-9; Claims 1-40.	1-30
A	US 2009-0176226 A1 (WU, B. L. et al.) 9 July 2009 See the whole document, especially Pages 17-18; Claims 1-20.	1-30
A	CARTER, N. P. "Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays." Nature Genetics. 27 June 2007, Vol. 39, pp. S16-S21 See the whole document, especially Abstract; Pages S16-S17.	1-30
A	WONG, K. K. et al. "Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele(SNP) array with whole genome amplified DNA." Nucleic Acids Research. 17 May 2004, Vol. 32, No. 9, e69, pp. 1-8 See the whole document, especially Abstract.	1-30
A	POLLACK, J. R. et al. "Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors." PNAS. 1 October 2002, Vol. 99, No. 20, pp. 12963-12968 See the whole document, especially Abstract; Page 12963.	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 DECEMBER 2011 (15.12.2011)		Date of mailing of the international search report 15 DECEMBER 2011 (15.12.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer NOH, Eun Joo Telephone No. 82-42-481-8368 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2011/000438

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008-0274909 A1	06.11.2008	AU 2005-238489 A1	10.11.2005
		CA 2563797 A1	10.11.2005
		EP 1747286 A2	31.01.2007
		WO 2005-106041 A2	10.11.2005
		WO 2005-106041 A3	15.12.2005
		WO 2005-106041 A3	10.11.2005
US 2009-0176226 A1	09.07.2009	US 2009-0203014 A1	13.08.2009
		US 8003326 B2	23.08.2011

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 クレイグ, アンドリュー
イギリス, レッチワース ガーデン シティ エスジ-6 2ティービー, 21 ケストレル ウ
オーク

(72)発明者 ブラウン, アンソニー
イギリス, ケンブリッジ シービー4 35ビー, 137 パース ウェイ

(72)発明者 ハーン, ニコラス
イギリス, ケンブリッジ シービー1 2ピーアール, 6 ヨーク テラス

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 HA08 HA12

4B029 AA07 BB20 CC03 FA12

4B063 QA01 QA19 QQ42 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX01

专利名称(译)	用于植入前遗传筛选的比较基因组杂交阵列方法		
公开(公告)号	JP2013534405A	公开(公告)日	2013-09-05
申请号	JP2012557617	申请日	2011-02-28
申请(专利权)人(译)	蓝诺姆有限公司		
[标]发明人	クレイグアンドリュー ブラウンアンソニー ハーンニコラス		
发明人	クレイグ,アンドリュー ブラウン,アンソニー ハーン,ニコラス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/09 C12M1/00		
CPC分类号	C12Q1/6837 C40B40/06 C12Q1/6827 G16B20/00 G16B25/00 C12Q2537/16 C12Q2539/115 C12Q2565/515		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/543.575 C12N15/00.A C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029 /BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX01		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	12/724865 2010-03-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于确定测试样品的基因组DNA中拷贝数不平衡的存在的方法。该方法可以单独测量单个测试样品与第一杂交阵列的杂交以及多个参考样品与多个其他测试阵列中的每一个的杂交。拷贝数的确定应基于测试阵列的最佳拟合参考阵列。可以基于测量信号的最接近或最相似的信噪比来确定最佳拟合。[选图]图1

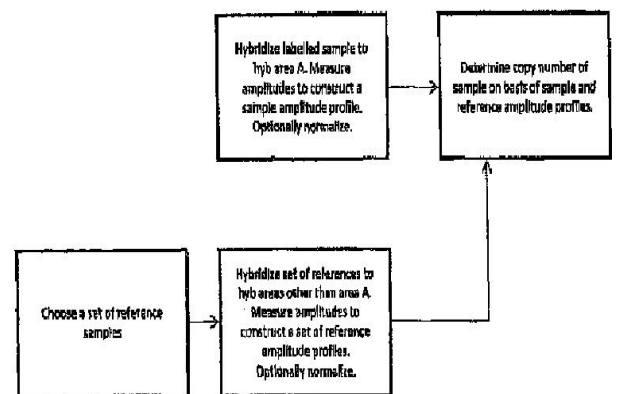


FIG. 1