

(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2013-510580  
(P2013-510580A)

(43) 公表日 平成25年3月28日(2013.3.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAZ	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B029
<b>C12M 1/34 (2006.01)</b>	C12M 1/34 B	4B063
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 87 頁)

(21) 出願番号 特願2012-539006 (P2012-539006)  
 (86) (22) 出願日 平成22年11月12日 (2010.11.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年5月10日 (2012.5.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/056494  
 (87) 国際公開番号 WO2011/060240  
 (87) 国際公開日 平成23年5月19日 (2011.5.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/260,804  
 (32) 優先日 平成21年11月12日 (2009.11.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511234895  
 エソテリックス ジェネティック ラボラ  
 トリーズ, エルエルシー  
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27  
 215, パーリントン, サウス メイ  
 ン ストリート 358  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子座のコピー数の分析

(57) 【要約】

標的遺伝子座のコピー数を分析し、標的遺伝子の異常なコピー数に関連する疾患またはそのキャリアを検出するためのシステムおよび方法。一態様では、本発明は、標的遺伝子座のコピー数を分析する方法を提供し、この方法は、(a) 複数の生物学的検体を提供するステップであって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を含む、ステップ; (b) 複数の生物学的アッセイを実施するステップであって、各個別の生物学的アッセイにより各個別の生物学的検体中の標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座に関する検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、複数の生物学的アッセイを実施するステップ等を含む。

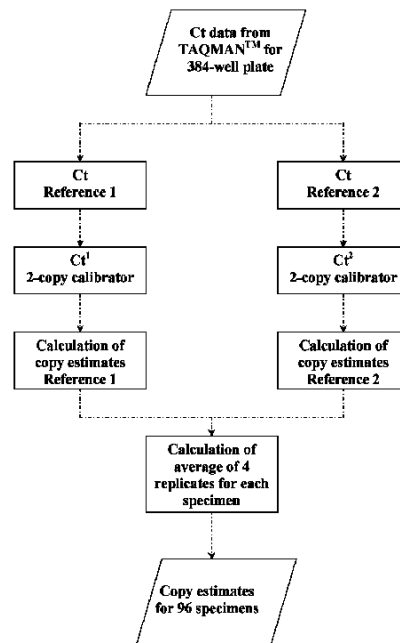


Figure 5A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的遺伝子座のコピー数を分析する方法であって、

(a) 複数の生物学的検体を提供するステップであって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する 1 つまたは複数の参照遺伝子座を含む、ステップ

;

(b) 複数の生物学的アッセイを実施するステップであって、各個別の生物学的アッセイにより前記各個別の生物学的検体中の前記標的遺伝子座および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、前記標的遺伝子座および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座に関する検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、ステップ;

(c) 前記複数の生物学的アッセイに基づいて、前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した前記標的遺伝子座の複数のコピー数の推定値を決定するステップ; ならびに

(d) 前記コピー数の推定値の質および / または前記コピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、前記標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップ

を含む、方法。

## 【請求項 2】

前記標的遺伝子座が遺伝子またはその一部を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記遺伝子またはその一部が生存運動ニューロン 1 (SMN1) のエクソンを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座が、SMARCC1 および SUT5H からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 SMN1 のエクソンがエクソン 7 である、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

ステップ (b) における前記生物学的アッセイが、前記標的遺伝子座および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座を増幅するリアルタイム PCR アッセイである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記検出可能なシグナルが蛍光シグナルであり、前記標的遺伝子座または前記 1 つもしくは複数の参照遺伝子座の蛍光シグナルのレベルが各増幅サイクルにおいて検出される、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

ステップ (c) が

(i) 各個別の生物学的検体における前記蛍光シグナルの所定のレベルに達する前記標的遺伝子座と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差 (Ct<sub>i</sub>) を決定するステップ;

(ii) 正常標的遺伝子座と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座との間の差を反映するキャリブレーション

## 【化 3 1】

( $\Delta Ct$ )

を得るステップ; および

(iii) ステップ (i) で決定された前記サイクル数の差 Ct<sub>i</sub> を前記キャリブレーション

10

20

30

40

## 【化 3 2】

 $(\overline{\Delta Ct})$ 

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップ

を含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

ステップ ( i ) が、前記蛍光シグナルの前記所定のレベルに達する前記標的遺伝子座および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座のそれぞれのサイクル数 ( Ct i ) を最初に測定するステップを含む、請求項 8 に記載の方法。

10

## 【請求項 10】

前記キャリブレータ

## 【化 3 3】

 $(\overline{\Delta Ct})$ 

が、前記複数の生物学的検体における前記標的遺伝子座と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座との間の前記 Ct i の刈り込み平均により定義される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座の前記コピー数の推定値を線形目盛上で決定する、請求項 8 から 10 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 12】

各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座の前記コピー数の推定値を対数目盛上で決定する、請求項 8 から 10 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

前記標的遺伝子座の前記コピー数の推定値の質を、前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座について得られたデータの質に基づいて評価する、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記統計的信頼度を、測定の信頼度および / または確定の信頼度を決定することにより評価する、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 15】

ステップ ( b ) で実施する前記生物学的アッセイを反復する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記コピー数の確定の前記統計的信頼度を、反復生物学的アッセイの測定の信頼度および前記複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

ステップ ( d ) が、前記確定の信頼度が所定の閾値より低い場合に前記標的遺伝子座の前記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。

40

## 【請求項 18】

標的遺伝子の異常なコピー数に関連する疾患またはそのキャリアを検出する方法であって、

( a ) 対象の個体から得られた少なくとも 1 つの生物学的検体を含む複数の生物学的検体を提供するステップ ;

( b ) 多数の反復生物学的アッセイを前記複数の生物学的検体のそれぞれについて実施して、前記標的遺伝子および既知のコピー数を有する 1 つまたは複数の参照遺伝子を分析するステップであって、前記多数の反復生物学的アッセイのそれぞれにより、前記標的遺伝子および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような前記検出可能なシグナルが得られる、ステップ ;

50

(c) 前記 1 つまたは複数の参照遺伝子に対して正規化した前記標的遺伝子のコピー数の推定値を決定するステップ；ならびに

(d) 前記コピー数の推定値の質および/または対象の前記個体のコピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、前記個体における前記標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップを含む方法。

【請求項 19】

前記個体が前記疾患を有するもしくはその危険性があるか否か、または前記個体が前記疾患のキャリアであるか否かを決定するステップをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記疾患が脊髄性筋萎縮 (SMA) である、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記標的遺伝子が生存運動ニューロン 1 (SMN1) である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

ステップ (b) で実施する前記生物学的アッセイがリアルタイム PCR アッセイである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ステップ (b) が、SMN1 のエクソン 7 の少なくとも一部を増幅するリアルタイム PCR アッセイを実施するステップを含む、請求項 22 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記検出可能なシグナルが蛍光シグナルであり、前記標的遺伝子または前記 1 つもしくは複数の参照遺伝子の前記蛍光シグナルのレベルを各増幅サイクルにおいて検出する、請求項 22 または 23 に記載の方法。

【請求項 25】

ステップ (c) が

(i) 各個別の反復アッセイにおける前記蛍光シグナルの所定のレベルに達する前記標的遺伝子と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子との間のサイクル数の差 ( $Ct_i$ ) を決定するステップ；

30

(ii) 正常標的遺伝子と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子との間のバックグラウンドの差を反映するキャリブレータ

【化 34】

$(\overline{\Delta Ct})$

を得るステップ；および

(iii) ステップ (i) で決定された前記サイクル数の差  $Ct_i$  を前記キャリブレータ

【化 35】

$(\overline{\Delta Ct})$

40

に対して正規化することによって各個別の反復アッセイに基づくコピー数の推定値を得るステップ

を含む、請求項 18 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

各個別の反復アッセイに基づく前記標的遺伝子の前記コピー数の推定値を線形目盛上で決定する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

各個別の反復アッセイに基づく前記標的遺伝子の前記コピー数の推定値を対数目盛上で決定する、請求項 25 に記載の方法。

50

## 【請求項 28】

前記コピー数の推定値の質を評価するステップが、前記1つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて品質管理メトリクスを得るステップを含む、請求項22から27のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記コピー数の推定値の質を評価するステップが、前記多数の反復生物学的アッセイ間の変動係数を求めるステップを含む、請求項18から28のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記コピー数の確定の前記統計的信頼度を評価するステップが、測定の信頼度および/または確定の信頼度を決定するステップを含む、請求項18から29のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 31】

前記コピー数の確定の前記統計的信頼度を、前記多数の反復生物学的アッセイの測定の信頼度および複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記測定の信頼度を、前記複数の反復アッセイにわたる前記コピー数の推定値の平均値および所定のコピー数の限界内に適合する前記平均値の標準誤差により定義される前記コピー数の推定値の周りの最大正規信頼区間として決定する、請求項30に記載の方法。

## 【請求項 33】

ステップ(d)が、前記測定の信頼度が所定の信頼度閾値を超えない場合に前記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、請求項32に記載の方法。

20

## 【請求項 34】

前記確定の信頼度が、隣接コピー数分布からのものである前記コピー数の推定値のt検定のp値を決定する、請求項30に記載の方法。

## 【請求項 35】

ステップ(d)が、前記確定の信頼度が所定の信頼度閾値より低い場合に前記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、請求項34に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記標的遺伝子の所定のコピー数を有する1つまたは複数の対照試料を並行して分析するステップをさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 37】

前記生物学的アッセイをマルチウェルプレートで実施する、請求項36に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記1つまたは複数の対照試料の品質管理および統計分析に基づいてプレート品質管理メトリクスを決定するステップをさらに含む、請求項37に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記1つまたは複数の対照試料のいずれかが前記品質管理もしくは統計的信頼度評価の1つに不合格である場合、またはいずれかの個別の対照試料の推定値が前記所定のコピー数に等しくない場合には、前記プレートは不合格である、請求項38に記載の方法。

40

## 【請求項 40】

対象の前記個体から得られる前記少なくとも1つの生物学的検体が、細胞、組織、全血、血漿、血清、尿、便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物または経頸部洗浄液からの核酸を含む、請求項18から39のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 41】

対象の前記個体から得られる前記少なくとも1つの生物学的検体が出生前試料である、請求項18から40のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 42】

50

標的遺伝子座のコピー数を分析するためのシステムであって、

a) 複数の生物学的検体を受容するための手段であって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を含む、手段；

b) 複数の生物学的アッセイを実施するための手段であって、各個別の生物学的アッセイにより各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座および前記1つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、前記標的遺伝子座および前記1つまたは複数の参照遺伝子座の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、手段；

c) 各個別の生物学的検体からの前記検出可能なシグナルを検出し、前記検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成された測定モジュール；

d) 前記測定モジュールからのシグナル情報を保存するように構成された記憶装置；

e) (i) 前記記憶装置に保存された前記シグナル情報に基づいて前記1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算し、(ii) 前記コピー数の推定値の質および/または前記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合された計算モジュール；ならびに

f) 使用者のための前記計算およびデータ分析結果に一部基づき、前記標的遺伝子座のコピー数の確定および/または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するためのディスプレイモジュールを含むシステム。

【請求項43】

前記生物学的アッセイがリアルタイムPCRアッセイである、請求項42に記載のシステム。

【請求項44】

前記生物学的アッセイがアレイに基づく比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)である、請求項42に記載のシステム。

【請求項45】

前記生物学的アッセイが高スループット配列決定法である、請求項42に記載のシステム。

【請求項46】

前記測定モジュールが、各増幅サイクルにおける前記検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成されており、前記検出可能なシグナルが蛍光シグナルである、請求項43に記載のシステム。

【請求項47】

前記計算モジュールが、以下：

(i) 各個別の検体における前記蛍光シグナルの所定のレベルに達する前記標的遺伝子座と前記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差( $C_{ti}$ )を決定するステップ；

(ii) 正常標的遺伝子座と前記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のバックグラウンド差を反映するキャリブレータ

【化36】

$$(\overline{\Delta Ct})$$

を得るステップ；および

(iii) ステップ(i)で測定された前記サイクル数の差  $C_{ti}$  を前記キャリブレータ

【化37】

$$(\overline{\Delta Ct})$$

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップ

10

20

30

40

50

に従って、前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算するように適合されている、請求項 45 または 46 に記載のシステム。

【請求項 48】

前記計算モジュールが、前記 1 つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて、品質管理メトリクスを少なくとも得ることにより前記コピー数の推定値の質を決定するように適合されている、請求項 43 から 47 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 49】

前記計算モジュールが、試料の変動係数を少なくとも決定することにより前記コピー数の推定値の質を決定するように適合されている、請求項 43 から 48 のいずれか一項に記載のシステム。

10

【請求項 50】

前記計算モジュールが、測定の信頼度を少なくとも決定し、決定された前記測定の信頼度を所定の閾値限界と比較することにより前記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている、請求項 43 から 49 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 51】

前記計算モジュールが、確定の信頼度を少なくとも決定し、決定された前記確定の信頼度を所定の閾値限界と比較することにより前記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている、請求項 43 から 50 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 52】

前記計算モジュールが、任意の対照試料が不合格であるか否かを決定するようにさらに適合されている、請求項 43 から 51 のいずれか一項に記載のシステム。

20

【請求項 53】

前記標的遺伝子座が生存運動ニューロン 1 (SMN1) のエクソンを含む、請求項 42 から 52 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 54】

コンピュータ上で方法を実施するための計算モジュールおよびディスプレイモジュールを含むソフトウェアモジュールを規定するための記録されたコンピュータ可読の命令を有するコンピュータ可読媒体であって、前記方法が、

a) 前記計算モジュールにより、(i) 記憶装置に保存されたリアルタイム PCR データに基づく 1 つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した標的遺伝子座のコピー数の推定値ならびに (ii) 前記コピー数の推定値の質および / または前記コピー数の確定の統計的信頼度を計算するステップ ; ならびに

30

b) 使用者のための前記計算およびデータ分析結果に一部基づき、前記標的遺伝子座のコピー数の確定および / または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するステップを含む、コンピュータ可読媒体。

【請求項 55】

前記標的遺伝子座が SMN1 のエクソン 7 またはその一部を含む、請求項 54 に記載のコンピュータ可読媒体。

40

【請求項 56】

脊髄性筋萎縮 (SMA) またはそのキャリアの診断のためのキットであって、

(a) SMN1 のエクソン 7 またはその一部を増幅するための 1 つもしくは複数の試薬 ;

(b) 既知のコピー数を有する 1 つもしくは複数の参照遺伝子座を増幅するための 1 つもしくは複数の試薬 ; および

(c) 請求項 55 に記載のコンピュータ可読媒体を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

## 関連出願

この出願は、2009年11月12日に提出された米国仮出願第61/260,804号(この完全な内容は、参考として本明細書に援用される)の利益およびそれへの優先権を主張する。

## 【0002】

## 配列表

本明細書は、配列表(2010年11月12日に「SeqListing.txt」という名称の.txtファイルとして電子的に提出された)に言及する。この.txtファイルは、2010年11月12日に作成され、6kbの大きさである。配列表の全体の内容は、参考として本明細書に援用される。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

個体の各細胞に存在する遺伝子のコピーの数は、重要な臨床的意味を持ち得る。例えば、常染色体遺伝子の2つ未満の正常コピーを有する個体は、疾患を発症し、かつ/または疾患のキャリアである危険性が高い可能性がある。したがって、遺伝子コピー数の推定値は、人生を左右するような影響を有し得る。例えば、疾患のキャリア状態を決定するための遺伝子コピー数の推定値は、子供をもうける夫婦の意思決定に影響を及ぼし得る。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

20

## 【0004】

本発明は、遺伝子座のコピー数を決定するための診断ツールが、生物学的アッセイ測定の質および/またはコピー数の確定の統計的信頼度の包括的評価と生物学的アッセイを組み合わせるにより改善することができるという認識を含む。したがって、本発明は、とりわけ、著しく低い偽陽性率を有する、遺伝子座の異常なコピー数に関連する疾患、障害もしくは状態、またはそのキャリアのより正確かつ信頼できる診断方法を提供する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

したがって、一態様では、本発明は、標的遺伝子座のコピー数を分析する方法であって、(a)複数の生物学的検体を提供するステップであって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を含む、ステップ; (b)複数の生物学的アッセイを実施するステップであって、各個別の生物学的アッセイにより各個別の生物学的検体中の標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座に関する検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、複数の生物学的アッセイを実施するステップ; (c)複数の生物学的アッセイに基づいて、1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した標的遺伝子座の複数のコピー数の推定値を決定するステップ; ならびに(d)コピー数の推定値の質および/またはコピー数の確定(call)の統計的信頼度を評価し、それにより、標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップを含む方法を提供する。

30

40

## 【0006】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、遺伝子またはその一部を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、生存運動ニューロン1(SMN1)のエクソンまたはその一部を含む。いくつかの実施形態では、SMN1エクソンは、エクソン7である。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の参照遺伝子座は、SMARCC1およびSUT5Hからなる群から選択される。

## 【0007】

いくつかの実施形態では、上述のステップ(b)における生物学的アッセイは、標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座を増幅するリアルタイムPCR(RT-PCR)アッセイである。いくつかの実施形態では、検出可能なシグナルは蛍光シグナルであ

50

り、標的遺伝子座または1つもしくは複数の参照遺伝子座の蛍光シグナルのレベルはRT-PCRの各増幅サイクルにおいて検出される。

【0008】

いくつかの実施形態では、上述のステップ(c)は、(i)各個別の生物学的検体における蛍光シグナルの所定のレベルに達する標的遺伝子座と1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差( $Ct_i$ )を決定するステップ；(ii)正常標的遺伝子座と1つまたは複数の参照遺伝子座との間の差を反映するキャリブレータ

【0009】

【化1】

( $\Delta\bar{Ct}$ )

10

を得るステップ；および(iii)ステップ(i)で決定されたサイクル数の差 $Ct_i$ をキャリブレータ

【0010】

【化2】

( $\Delta\bar{Ct}$ )

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップを含む。いくつかの実施形態では、ステップ(i)は、蛍光シグナルの所定のレベルに達する標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座のそれぞれのサイクル数( $Ct_i$ )を最初に測定するステップを含む。いくつかの実施形態では、キャリブレータ

20

【0011】

【化3】

( $\Delta\check{Ct}$ )

は、複数の生物学的検体における標的遺伝子座と1つまたは複数の参照遺伝子座との間の $Ct_i$ の刈り込み平均(例えば、80%刈り込み平均)により定義される。

【0012】

いくつかの実施形態では、各個別の生物学的検体における標的遺伝子座のコピー数の推定値を線形目盛上で求める。いくつかの実施形態では、各個別の生物学的検体における標的遺伝子座のコピー数の推定値を対数目盛上で求める。

30

【0013】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座のコピー数の推定値の質を、1つまたは複数の参照遺伝子座について得られたデータの質に基づいて評価する。いくつかの実施形態では、統計的信頼度を、測定の信頼度および/または確定の信頼度を決定することにより評価する。

【0014】

いくつかの実施形態では、上述のステップ(b)で実施する生物学的アッセイを反復する。いくつかの実施形態では、コピー数の確定の統計的信頼度を、反復生物学的アッセイの測定の信頼度および複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する。

40

【0015】

いくつかの実施形態では、上述のステップ(d)は、確定の信頼度が所定の閾値より低い場合に標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む。

【0016】

他の態様では、本発明は、標的遺伝子の異常なコピー数に関連する疾患またはそのキャリアを検出する方法であって、(a)対象の個体から得られた少なくとも1つの生物学的検体を含む複数の生物学的検体を提供するステップ；(b)多数の反復生物学的アッセイ

50

を複数の生物学的検体のそれぞれについて実施して、標的遺伝子および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子进行分析するステップであって、多数の反復生物学的アッセイのそれぞれにより、標的遺伝子および1つまたは複数の参照遺伝子の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、ステップ；(c) 1つまたは複数の参照遺伝子に対して正規化した標的遺伝子のコピー数の推定値を決定するステップ；ならびに(d) コピー数の推定値の質および/または対象の個体のコピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、個体における標的遺伝子のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、個体が疾患を有するもしくはその危険性があるか否か、または個体が疾患のキャリアであるか否かを決定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、疾患は、脊髄性筋萎縮(SMA)である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、生存運動ニューロン1(SMN1)である。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、上述のステップ(b)で実施する生物学的アッセイは、リアルタイムPCRアッセイである。いくつかの実施形態では、上述のステップ(b)は、SMN1のエクソン7の少なくとも一部を増幅するリアルタイムPCRアッセイを実施するステップを含む。いくつかの実施形態では、生物学的アッセイにより得られる検出可能なシグナルは、蛍光シグナルであり、標的遺伝子または1つもしくは複数の参照遺伝子の蛍光シグナルのレベルをRT-PCRの各増幅サイクルにおいて検出する。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、上述のステップ(c)は、(i) 各個別の反復アッセイにおける蛍光シグナルの所定のレベルに達する標的遺伝子と1つまたは複数の参照遺伝子との間のサイクル数の差( $Ct_i$ )を決定するステップ；(ii) 正常標的遺伝子と1つまたは複数の参照遺伝子との間のバックグラウンドの差を反映するキャリブレータ

【0019】

【化4】

$(\overline{\Delta Ct})$

を得るステップ；および(iii) ステップ(i)で決定されたサイクル数の差  $Ct_i$  をキャリブレータ

30

【0020】

【化5】

$(\overline{\Delta Ct})$

に対して正規化することによって各個別の反復アッセイに基づくコピー数の推定値を得るステップを含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、各個別の反復アッセイに基づく標的遺伝子のコピー数の推定値を線形目盛上で求める。いくつかの実施形態では、各個別の反復アッセイに基づく標的遺伝子のコピー数の推定値を対数目盛上で求める。

40

【0022】

いくつかの実施形態では、コピー数の推定値の質を評価するステップは、1つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて品質管理メトリクス(quality control metrics)を得るステップを含む。いくつかの実施形態では、コピー数の推定値の質を評価するステップは、多数の反復生物学的アッセイ間の変動係数を求めるステップを含む。いくつかの実施形態では、コピー数の確定の統計的信頼度を評価するステップは、測定の信頼度および/または確定の信頼度を決定するステップを含む。いくつかの実施形態では、コピー数の確定の統計的信頼度を、多数の反復生物学的アッセイの測定の信頼度および複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する。

50

## 【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、測定の信頼度を、複数の反復アッセイにわたるコピー数の推定値の平均値および所定のコピー数の限界内に適合する平均値の標準誤差により定義されるコピー数の推定値の周りの最大正規信頼区間として決定する。いくつかの実施形態では、上述のステップ(d)は、測定の信頼度が所定の信頼度閾値を超えない場合にコピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む。

## 【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、確定の信頼度は、隣接コピー数分布からのものであるコピー数の推定値のt検定のp値を決定する。いくつかの実施形態では、ステップ(d)は、確定の信頼度が所定の信頼度閾値より低い場合にコピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む。

10

## 【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、標的遺伝子の所定のコピー数を有する1つまたは複数の対照試料を並行して分析するステップをさらに含む。

## 【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、複数の生物学的検体および1つまたは複数の対照試料における生物学的アッセイは、マルチウェルプレート(例えば、96ウェルまたは384ウェルプレート)で実施する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1つまたは複数の対照試料の品質管理および統計分析に基づいてプレート品質管理メトリクスを決定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の対照試料のいずれかが品質管理もしくは統計的信頼度評価の1つに不合格である場合、またはいずれかの個別の対照試料の推定値が所定のコピー数に等しくない場合には、プレートは不合格である。

20

## 【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、本発明に適する生物学的検体は、細胞、組織、全血、血漿、血清、尿、便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物または経頸部洗浄液(transcervical lavage fluid)からの核酸を含む。いくつかの実施形態では、本発明に適する生物学的検体は、出生前試料である。

## 【 0 0 2 8 】

さらに他の態様では、本発明は、本明細書で述べる標的遺伝子座のコピー数を分析するためのシステムを提供する。いくつかの実施形態では、本発明によるシステムは、a)複数の生物学的検体を受容するための手段であって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を含む、手段；b)複数の生物学的アッセイを実施するための手段であって、各個別の生物学的アッセイにより各個別の生物学的検体における標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、標的遺伝子座および1つまたは複数の参照遺伝子座の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、手段；c)各個別の生物学的検体からの検出可能なシグナルを検出し、検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成された測定モジュール；d)測定モジュールからのシグナル情報を保存するように構成された記憶装置；e)(i)記憶装置に保存されたシグナル情報に基づいて1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算し、(ii)コピー数の推定値の質および/またはコピー数の確定の信頼度を決定するように適合された計算モジュール；ならびにf)使用者のための計算およびデータ分析結果の一部に基づき、標的遺伝子座のコピー数の確定および/または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するためのディスプレイモジュールを含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、生存運動ニューロン1(SMN1)のエクソンまたはその一部を含む。

30

40

## 【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、生物学的アッセイは、リアルタイムPCRアッセイである。いくつかの実施形態では、測定モジュールは、各増幅サイクルにおける検出可能なシグナ

50

ルのレベルを測定するように構成されており、検出可能なシグナルは、蛍光シグナルである。

【0030】

いくつかの実施形態では、計算モジュールは、(i) 各個別の検体における蛍光シグナルの所定のレベルに達する標的遺伝子座と1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差 (Ct<sub>i</sub>) を決定するステップ；(ii) 正常標的遺伝子座と1つまたは複数の参照遺伝子座との間のバックグラウンドでの差を反映するキャリブレータ

【0031】

【化6】

( $\overline{\Delta Ct}$ )

を得るステップ；および (iii) ステップ (i) で測定されたサイクル数の差 Ct<sub>i</sub> をキャリブレータ

【0032】

【化7】

( $\overline{\Delta Ct}$ )

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップに従って、標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算するように適合されている。

【0033】

いくつかの実施形態では、計算モジュールは、1つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて、品質管理メトリクスを少なくとも得ることによりコピー数の推定値の質を決定するように適合されている。いくつかの実施形態では、計算モジュールは、試料の変動係数を少なくとも決定することによりコピー数の推定値の質を適合するように構成されている。いくつかの実施形態では、計算モジュールは、測定の信頼度を少なくとも決定し、決定された測定の信頼度を所定の閾値限界と比較することによりコピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている。いくつかの実施形態では、計算モジュールは、確定の信頼度を少なくとも決定し、決定された確定の信頼度を所定の閾値限界と比較することによりコピー数の確定の統計的

【0034】

さらに他の態様では、本発明は、本明細書で述べるようにコンピュータ上で方法を実施するための計算モジュールおよびディスプレイモジュールを含むソフトウェアモジュールを規定するための記録されたコンピュータ可読の命令を有するコンピュータ可読媒体を提供する。いくつかの実施形態では、前記方法は、a) 計算モジュールにより、(i) 記憶装置に保存されたリアルタイムPCRデータに基づく1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した標的遺伝子座のコピー数の推定値ならびに(ii) コピー数の推定値の質および/またはコピー数の確定の統計的信頼度を計算するステップ；ならびにb) 使用者のための計算およびデータ分析結果の一部に基づき、標的遺伝子座のコピー数の確定および/または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するステップを含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、SMN1のエクソン7またはその一部を含む。

【0035】

他の関連する態様では、本発明は、本明細書で述べる組成物および方法を用いて遺伝子座の異常なコピー数または対立遺伝子変異型に関連する疾患、障害または状態を検出するための診断キットを提供する。いくつかの実施形態では、本発明による発明のキットは、脊髄性筋萎縮(SMA)またはそのキャリアの診断に適する。いくつかの実施形態では、本発明によるキットは、(a) SMN1のエクソン7またはその一部を増幅するための1

10

20

30

40

50

つもしくは複数の試薬；(b)既知のコピー数を有する1つもしくは複数の参照遺伝子座を増幅するための1つもしくは複数の試薬；および(c)本明細書で述べたコンピュータ可読媒体を含む。

#### 【0036】

本明細書において、「または」の使用は、特に明記しない限り、「および/または」を意味する。本明細書で用いているように、「含む(comprise)」という用語および「含むこと(comprising)」および「含む(comprises)」などの該用語の変形形態は、他の添加物、成分、整数またはステップを除外することを意図するものでない。本明細書で用いているように、「約」および「おおよそ」という用語は、同等のものとして用いる。約/おおよそを付してまたは付さずに本明細書で用いる数表示は、当業者により認識される通常の変動を含むものとする。特定の実施形態では、「おおよそ」または「約」という用語は、特に明記しない限りまたは文脈から特に明らかでない限り(そのような数が可能な値の100%を超える場合を除き)、記載される参照値のいずれかの方向の(それより大きいまたは小さい)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはより小さい範囲内に入る値の範囲を指す。

10

#### 【0037】

本発明の他の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明、図面および特許請求の範囲において明らかである。しかし、詳細な説明、図面および特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示すが、例示のみの目的で示すものであって、限定の目的で示すものではないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更および修正は、当業者に明らかになる。

20

#### 【0038】

図面は、例示の目的のみのためであって、限定のためではない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0039】

【図1】図1は、エクソン7を含むSMN1遺伝子の一部のゲノム配列を示す図である。エクソン7をコードする配列は、太字である。TAQMAN(商標)分析に用いることができた具体例としてのプライマーおよびプローブを示す(陰影付き)。具体例としての配列決定プライマー(SMNFUP1およびSMNRIP1)も示す(陰影付き)。小文字は、単一ヌクレオチド多形を示す。

30

【図2】図2は、ウェルが2コピー対照、カクテル(例えば、試薬および緩衝液の)プランクおよび複製の試料を含む、具体例としてのプレートの構成を示す図である。

【図3A】図3Aは、分析システムに含めることができる計算デバイスの実施形態を説明するブロック図である。

【図3B】図3Bは、分析システムに含めることができる計算デバイスの実施形態を説明するブロック図である。

【図4】図4は、分析システムの実施形態を説明するブロック図である。

【図5A】図5Aは、384ウェルプレート上で複製物(96検体について各4つの複製物)について実施したTAQMAN(商標)リアルタイムPCR実験からのCtデータから一連の検体におけるコピー数の推定値を得る方法の特定の実施形態の概要を説明する流れ図である。

40

【図5B】図5Bは、プレートの品質管理を実施する方法の実施形態を説明する流れ図である。

【図5C】図5Cは、検体の品質管理を実施する方法の実施形態を説明する流れ図である。

【図6A】図6Aは、検体およびプレートの統計値を表示するためのレイアウトの実施形態を示す画面コピーである。

【図6B】図6Bは、プレートおよび検体の品質管理の結果の実施形態を示す画面コピーである。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0040】

## 定義

本発明がより容易に理解されるために、特定の用語を最初に下文で定義する。以下の用語および他の用語のさらなる定義は、本明細書を通して示す。

## 【0041】

本明細書で用いているように、「対立遺伝子」という語句は、「対立遺伝子変異型」と同義で用いられ、遺伝子座または遺伝子の変異型を指す。いくつかの実施形態では、遺伝子座または遺伝子の特定の対立遺伝子は、特定の表現型、例えば、疾患または状態を発現する危険性の変化、特定の疾患または状態の段階への進行の可能性、特定の療法の適用可能性、感染に対する感受性、免疫機能等に関連する。

10

## 【0042】

本明細書で用いているように、「生物学的検体」という語句は、「生物学的試料」と同義で用いられ、「検体」または「試料」と呼ぶことができる。「生物学的検体」という語句は、本明細書で用いているように生存細胞または生物体から得られた、それにより排泄もしくは分泌された固体または流体（またはそれらの組合せ）試料を指す。特定の実施形態では、生物学的検体は、核酸を含む。生物学的検体の非限定的な例は、血液、血漿、血清、尿、便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、羊水および経頸部洗浄液などである。生物学的検体の細胞培養、例えば、絨毛膜絨毛試料の培養および/または羊膜細胞培養のような羊水培養物も生物学的検体として用いることができる。生物学的検体は、例えば、臓器

20

## 【0043】

本明細書で用いているように、「キャリア」という語句は、遺伝子突然変異または対立遺伝子変異型を有するが、遺伝子突然変異または対立遺伝子変異型に関連する疾患の症状を示さない個体を指す。しかし、キャリアは、一般的に遺伝子突然変異または対立遺伝子変異型をそれらの子孫に伝えることができ、それらの子孫はその後、突然変異遺伝子または対立遺伝子変異型を発現する可能性がある。一般的に、この現象は、多くの遺伝子の劣性の結果である。特定の実施形態では、キャリアが有する突然変異または対立遺伝子変異型は、特定の表現型、例えば、疾患または状態を発現する危険性の変化、特定の疾患または状態の段階への進行の可能性、特定の療法の適用可能性、感染に対する感受性、免疫機能等の素因となるまたはそれに関連する。制限なしに、キャリアは、遺伝子または遺伝子の一部のコピー数の減少または増加を有する可能性がある。キャリアはまた、遺伝子内の突然変異（例えば、点突然変異、多形、欠失、挿入または転座等）を有する可能性がある。「キャリア」はまた、本明細書で「遺伝キャリア」と呼ぶ。

30

## 【0044】

本明細書で用いているように、「コピー数」という語句は、遺伝子座に関して用いる場合、ゲノムまたはゲノム同等物当たりの存在するそのような遺伝子座のコピーの数を指す。「正常コピー数」は、遺伝子座に関して用いる場合、正常個体に存在する正常または野生型対立遺伝子のコピー数を指す。特定の実施形態では、コピー数は、ゼロから3、ゼロから4、ゼロから6、ゼロから7コピーに及ぶ（両端を含む）、またはゼロから7を超えるコピー数である。遺伝子座のコピー数が集団中の個体にわたって著しく異なる実施形態では、推定されたコピー数の中央値を計算および/または比較の目的のための「正常コピー数」と解釈することができる。

40

## 【0045】

本明細書で用いているように、「遺伝子」という用語は、個別の細胞（例えば、細胞内または細胞外）産物および/または機能に関与する個別の核酸配列を指す。より具体的には、「遺伝子」という用語は、タンパク質をコードする部分を含み、かつ、対象の遺伝子

50

によりコードされるタンパク質の発現の調節に關与するプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどの調節配列を場合によって含む核酸を指す。本明細書で用いているように、「遺伝子」という用語は、タンパク質をコードせずに、tRNAs、rRNAs等のような機能的RNA分子の転写の鋳型となる核酸も含み得る。あるいは、遺伝子は、タンパク質および/または核酸結合部位などの特定の事象/機能のためのゲノム位置を定義し得る。

**【0046】**

「個体」および「対象」という用語は、本明細書において同義で用いる。本明細書で用いているように、それらは、疾患もしくは障害（例えば、脊髄性筋萎縮）に苦しみ得るまたは罹りやすいが、疾患もしくは障害の症状を示し得るまたは示し得ないヒトまたは他の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマもしくは霊長類の動物）を指す。多くの実施形態では、対象は、人間である。多くの実施形態では、対象は、患者である。特に明記しない限り、「個体」および「対象」という用語は、特定の年齢を意味せず、したがって、成人、小児（例えば、幼児または新生児）および胎児を含む。

10

**【0047】**

本明細書で用いているように、「遺伝子座」という用語は、染色体上の特定のDNA配列の特定の位置を指す。本明細書で用いているように、特定のDNA配列は、任意の長さであり得る（例えば、1、2、3、10、50またはそれ以上のヌクレオチド）。いくつかの実施形態では、遺伝子座は、遺伝子もしくは遺伝子の一部であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子座は、遺伝子のエクソンもしくはエクソンの一部であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子座は、遺伝子のイントロンもしくはイントロンの一部であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子座は、遺伝子の調節エレメントもしくは調節エレメントの一部であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子座は、疾患、障害および/または状態に關連する。例えば、遺伝子座における突然変異（例えば、欠失、挿入、スプライシング突然変異、点突然変異等）は、疾患、障害および/または状態と關連させることができる。

20

**【0048】**

本明細書で用いているように、「正常」という用語は、「コピー数」または「遺伝子座」または「遺伝子」または「対立遺伝子」という用語を修飾するために用いる場合、集団に最高の百分率で存在するコピー数または遺伝子座、遺伝子もしくは対立遺伝子、例えば、野生型の数または対立遺伝子を指す。「個体」または「対象」という用語を修飾するために用いる場合、それらは、集団に最高の百分率で存在するコピー数または遺伝子座、遺伝子もしくは対立遺伝子を有する個体または個体の群、例えば、野生型個体または対象を指す。一般的に、正常「個体」または「対象」は、特定の疾患または状態を有さず、疾患または状態のキャリアでもない。「正常」という用語は、正常もしくは野生型個体または対象から分離された生物学的検体または試料を修飾する（例えば、「正常生物学的試料」）ためにも本明細書において用いる。

30

**【0049】**

本明細書で用いているように、「プローブ」という用語は、核酸のプローブに關して用いる場合、対象の核酸と結合またはハイブリダイズすることができる特定のヌクレオチド配列を有する核酸分子（例えば、RNAまたはDNA）を指す。一般的に、プローブは、1つまたは複数の種類の化学結合により、通常水素結合の形成により、相補的または実質的に相補的配列の核酸と特異的に結合する（または特異的にハイブリダイズする）。いくつかの実施形態では、プローブは、リアルタイムPCR反応においてDNAアンプリコンの核酸に結合することができる。

40

**【0050】**

本明細書で用いているように、「反復」という用語は、生物学的アッセイに關して用いる場合、信頼度、耐障害性を改善するためまたは統計分析を容易にするために実施される繰返しアッセイまたは反復アッセイを指す。いくつかの実施形態では、「反復」という用

50

語は、「反復アッセイ」または「反復生物学的アッセイ」という語句と同義で用いる。一般的に、反復アッセイは、同じ個体から採取された同じまたは類似の生物学的検体からの材料を用いて行われる。すなわち、複数の検体を特定の個体から得ることができ、および/または特定の個体からの単一の検体を部分に分割することができる（各部分が反復アッセイに用いられるか、または後の使用のために保存される）。いくつかの実施形態では、用いられる反復アッセイの数は、所定の統計的閾値によって、または経験的に選択される。いくつかの実施形態では、2反復、3反復、4反復、5反復、6反復、7反復、8反復、9反復、10反復または10を超える反復を用いる。いくつかの実施形態では、4反復を用いる。

#### 【0051】

本明細書で用いているように、「シグナル」という用語は、検出可能および/または測定可能な実体を指す。特定の実施形態では、シグナルは、ヒト眼により検出できる、例えば、目に見える。例えば、シグナルは、可視スペクトルにおける色の強度および/または波長であるか、またはそれに関連し得る。そのようなシグナルの非限定的な例は、酵素反応などの化学反応に起因する着色沈殿物および着色可溶性生成物などである。特定の実施形態では、シグナルは、装置を用いて検出できる。いくつかの実施形態では、シグナルは、励起したとき蛍光を放射する発蛍光団から発生し、光は、蛍光検出器で検出できる。いくつかの実施形態では、シグナルは、分光光度計により検出できる光（例えば、可視光および/または紫外光）であるか、またはそれに関連する。例えば、化学発光反応により発生する光は、シグナルとして用いることができよう。いくつかの実施形態では、シグナルは、放射線、例えば、放射性同位体により放射される放射線、赤外線等であるか、またはそれに関連する。特定の実施形態では、シグナルは、物理的実体の特性の直接的または間接的インジケータである。例えば、シグナルは、生物学的試料中および/または反応容器中の核酸の量および/または濃度の指標として用いることができよう。

#### 【0052】

##### 詳細な説明

本発明は、遺伝子座を分析するより正確かつ信頼できる方法を提供する。とりわけ、本発明は、生物学的アッセイを包括的な品質管理および統計的信頼度評価と組み合わせることにより遺伝子座（特に、正常遺伝子座）のコピー数を分析する方法を提供する。実施例の項で述べるように、本出願の発明者らは、生物学的および統計的分析を効果的かつ効率的に組み合わせるシステムおよび方法を開発することに成功した。いくつかの実施形態では、本発明は、例えば、生物学的アッセイの測定の信頼度およびコピー数の確定の統計的信頼度を決定することによりコピー数の推定値の質を評価する、コンピュータシステムにより実行可能なアルゴリズムを利用する。いくつかの実施形態では、本明細書で開示する発明の方法は、品質管理および/または統計的信頼度評価を容易にするために、標的遺伝子座並びに既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を同じ生物学的アッセイ（例えば、リアルタイムPCR）を用いて分析する。

#### 【0053】

多くの遺伝子座が遺伝病に関与しており、そのような遺伝子座は、本明細書で開示する方法を用いて分析することができる。したがって、本明細書で開示する方法は、キャリアの検出、患者の診断、出生前診断および/または着床のための胚の遺伝子型決定等を促進し得る。当業者により認識されているように、標的遺伝子座が関連する遺伝病は、例えば、常染色体劣性、常染色体優性、伴性優性および伴性劣性を含む多くの遺伝パターンのいずれかに従い得る。

#### 【0054】

いくつかの実施形態では、コピー数の分析は、遺伝子座の一部またはすべての欠失が疾患に関与する遺伝子座について実施する。標的遺伝子座における欠失は、20塩基対（bp）未満、20bpから100bpまで、100bpから200bpまで、200bpから500bpまで、500bpから1kbまで、1kbから2kbまで、2kbから5kbまで、5kbから10kbまで、10kbから20kbまで、20kbから30kbま

10

20

30

40

50

で、および30kbを超えるサイズの欠失を含むが、これらに限定されない。

【0055】

いくつかの実施形態では、コピー数の分析は、1つまたは複数の点突然変異および/または挿入突然変異が疾患に關与する標的遺伝子座について実施する。これらの場合、生物学的アッセイは、標的遺伝子座に存在する正常な配列または対立遺伝子のコピー数を検出するように設計することができる。例えば、リアルタイムPCRのような方法は、増幅が正常な配列が存在する場合にのみ起こるように突然変異と正常なヌクレオチド配列とを識別するプライマーを用いて適応することができる。

【0056】

本発明の様々な態様を以下の項で詳細に述べる。項を用いることは、本発明を限定することを意味しない。各項は、本発明のあらゆる態様に適用され得る。本出願において、特に明記しない限り、「または」の使用は、「および/または」を意味する。

10

【0057】

I. 標的遺伝子座ならびに關連する遺伝的疾患、障害および状態

本発明による発明の方法は、標的遺伝子座のコピー数を分析するのに適している。特定の実施形態では、標的遺伝子座は、疾患、障害または状態に關連する。例えば、標的遺伝子座におけるまたは標的遺伝子座内の突然変異または対立遺伝子変異は、疾患、障害もしくは状態および/またはそのキャリアとしての状態を発現する危険性の変化(例えば、増大または低下)と關し得る。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座におけるまたは標的遺伝子座内の突然変異または対立遺伝子変異と疾患、障害もしくは状態またはキャリア状態との間に因果關係がある。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座におけるまたは標的遺伝子座内の突然変異または対立遺伝子変異は、疾患、障害または状態と一緒に分離するが、疾患、障害または状態の発現に直接的に寄与しない。

20

【0058】

いくつかの実施形態では、本発明により分析することができる標的遺伝子座は、遺伝子またはその一部(例えば、エクソン、イントロン、プロモーターもしくは他の調節領域)を含む。表1にそのような遺伝子および關連する遺伝的疾患、障害または状態の非限定的な例を示す。当業者により理解されるように、遺伝子は、複数の名称により公知であり得る。表1における列挙は、特定の疾患に關し得るその他の遺伝子の存在を排除するものでない。本発明は、将来発見される各個別の疾患に關連するものを含むそれらのその他の遺伝子を含む。

30

【0059】

## 【表 1 - 1】

表 1 : 遺伝的疾患、障害または状態に関連する具体例としての遺伝子

疾患、障害または状態	遺伝子	タンパク質産物
軟骨無形成症	FGFR3	線維芽細胞成長因子受容体 3
副腎白質萎縮症	ABCD1	A T P 結合カセット (A B C) 輸送体
アルファ 1 - 抗トリプシン欠乏	SERPINA1	セリンプロテアーゼインヒビター
アルファ-サラセミア	HBA 1&2	ヘモグロビンアルファ 1 および 2
アルポート症候群	COL4A5	コラーゲン、I V 型、アルファ 5
筋委縮側索硬化症	SOD1	スーパーオキシドジスムターゼ 1
アンゲルマン症候群	UBE3A	ユビキチンタンパク質リガーゼ E 3 A
血管拡張性失調症	ATM	血管拡張性失調症変異
多腺性自己免疫症候群	AIRE	自己免疫調節物質
ブルーム症候群	BLM, RECQL3	r e c Q 3 ヘリカーゼ様
バーキットリンパ腫	MYC	v - m y c 骨髄球腫ウイルス癌遺伝子相同体
カナバン病	ASPA	アスパルトアシラーゼ
先天性副腎過形成	CYP21	シトクロム P 4 5 0、ファミリー 2 1
嚢胞性繊維症	CFTR	嚢胞性繊維性膜貫通調節因子
捻曲性骨異形成症	SLC26A2	硫酸塩輸送体
デュセンヌ筋ジストロフィー	DMD	ジストロフィン
家族性自律神経障害	IKBKAP	I K K 複合体関連 (associated) タンパク質
家族性地中海熱	MEFV	地中海熱タンパク質
ファンconi貧血	FANCA, FANCB (FAAP95), FANCC, FANCD1 (BRCA2), FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCJ (BRIP1), FANCL (PHF9 およ	(D N A 修復に関係するタンパク質)

10

20

30

40

【 0 0 6 0 】

【表 1 - 2】

疾患、障害または状態	遺伝子	タンパク質産物
	び POG), FANCM (FAAP250)	
脆弱 X 症候群	FMR1	脆弱 X 精神遅滞 1
フリートライヒ運動失調症	FRDA	フラタキシン
ゴーシェ病	GBA	グルコシダーゼ
グルコースガラクトース吸収不良	SGLT1	ナトリウム依存性グルコース共輸送体
I 型糖原病 (GSD I)	G6PC (GSDIa) SLC37A4 (GSDIb)	グルコース-6-ホスファターゼ グルコース-5-リン酸輸送体 3、 可溶性担体ファミリー 37 メンバー 4
脳回転委縮症	OAT	オルニチン (ornithine) アミノトランスフェラーゼ
血友病 A	F8	凝固 (hoagulation) 因子 V I I I
遺伝性ヘモクロマトーシス	HFE	ヘモクロマトーシスタンパク質
ハンチントン病	HD	ハンチンチン (Tuntingtin)
高 IgM 免疫不全	TNFSF5	腫瘍 (humor) 壊死因子メンバー 5
レッシューナイハン症候群	HPRT1	ヒポキサンチンホスホリボトランスフェラーゼ
メープルシロップ尿症 (MSUD)	BCKDHA	分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ
マルファン症候群	FBN1	フィブリリン
巨脳症性白質脳症	MLC1	(推定膜貫通性タンパク質)
メンケス症候群	ATP7A	Cu <sup>++</sup> 輸送 ATP アーゼ
異染性白質ジストロフィー (MLD)	ARSA	アリアルスルファターゼ A
ムコリピドーシス I V (MLIV)	MCOLN1	ムコリピン-1
筋強直性ジストロフィー	DMPK	筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼ
ネマリン筋障害		
神経線維腫症	NF1, NF2	ニューロフィブロミン
ニーマン-ピック病 (A 型および B 型)	SMPD1	スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 1、酸リソソーム (酸スフィンゴミエリナーゼ)
ニーマン-ピック病 (C 型)	NPC1, NPC2	ニーマン-ピック病、C 1 型 (内在性膜タンパク質) およびニーマン-ピック病、C 2 型
発作性夜間ヘモグロビン尿症	PIGA	ホスファチジルイノシトールグリカ

10

20

30

40

【 0 0 6 1 】

【表 1 - 3】

疾患、障害または状態	遺伝子	タンパク質産物
		ン
ペンドレド症候群	PDS	ペンドリン
フェニルケトン尿症	PAH	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ
レフサム病	PHYH	フィタノイルC o Aヒドロキシラーゼ
網膜芽腫	RB	網膜芽腫 1
レット症候群	MECP2	メチルC p G結合タンパク質
SCID-ADA (重症複合免疫不全-ADA)	ADA	アデノシンデアミナーゼ
SCID-X連鎖 (重症複合免疫不全-X連鎖)	IL2RG	インターロイキン-2受容体、ガンマ
鎌状細胞貧血 (ベータサラセミアとしても公知)	HBB	ヘモグロビン、ベータ
脊髄性筋萎縮 (SMA)	SMN1, SMN2	生存運動ニューロン1、生存運動ニューロン2
タンジャー病	ABCA1	ATP結合カセットA1
ティーサックス病	HEXA	ヘキソサミニダーゼ
アッシャー症候群 (ハルグレン症候群、アッシャー-ハルグレン症候群、r p-聴覚不全症候群および異栄養性網膜聴覚不全 (dystrophia retinae dysacusis) 症候群)	MYO7A	ミオシンV I I A
	USH1C	ハルモニン
	CDH23	カドヘリン23
	PCDH15	プロトカドヘリン15
	USH1G	SANS
	USH2A	アッシュェリン (Usherin)
	GPR98	V L G R 1 b
	DFNB31	ウィーリン (Whirlin)
CLRN1	クラリン1	
ホンヒッペルーリンダウ症候群	VHL	エロンギン結合タンパク質
ヴェルナー症候群	WRN	ヴェルナー症候群タンパク質
ウィルソン病	ATP7B	ATPアーゼ、Cu++輸送
ツェルベルガー症候群	PXR1	ペロキシソーム受容体1

10

20

30

したがって、本発明の方法を用いて分析することができる標的遺伝子座は、表1で識別される遺伝子またはその一部(例えば、エクソン、イントロンまたは調節領域)を含むが、これらに限定されない。表1に明らかにした遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり、遺伝子名を用いたGenBankなどの公開データベースにおける検索により容易にアクセス可能であり、そのような配列は、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0062】

大部分の遺伝子は通常ゲノム等価体当たり2コピーで存在するが、個体間にコピー数の変動が存在する多数の遺伝子が見いだされている。コピー数の差は、遺伝子重複事象、遺伝子欠失事象、遺伝子変換事象、遺伝子再配列、染色体転移等を含むが、これらに限定されない多数の機構により生じ得る。特定の遺伝子のコピー数の差は、疾患または状態を発現する危険性、特定の疾患または状態の段階への進行の可能性、特定の療法への適合性(amenableity)、感染に対する感受性、免疫機能等を含むが、これらに限定されない意味を持ち得る。表1に示した遺伝子に加えて、本明細書で開示する方法は、そのようなコピー数変異を有する遺伝子座におけるコピー数を分析するのに適している。アドレスが「http://」の直後が「projects.tcag.ca/variation」であるウェブサイトで維持されているゲノム変異体のデータベース(Data b

40

50

ase of Genomic Variants) (その全内容がそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる)は、少なくとも38,406を超えるコピー数変異を収載している(2009年3月11日現在)(例えば、それぞれの全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Iafraら(2004年)「Detection of large-scale variation in the human genome」、Nature Genetics、36巻(9号)、949~51頁;Zhangら(2006年)「Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome」、115巻(3~4号)、205~14頁; Zhangら(2009年)「Copy Number Variation in Human Health, Disease and Evolution」、Annual Review of Genomics and Human Genetics、10巻、451~481頁;およびWainら(2009年)「Genomic copy number variation, human health, and disease」、Lancet、374巻、340~350頁を参照)。

#### 【0063】

SMN1、SMN2および脊髄性筋萎縮(SMA)

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、生存運動ニューロン1(SMN1)遺伝子またはSMN1の一部(例えば、エクソン)である。SMN1の部分ヒトゲノム配列を図1に示す(ヒトSMN1に関する情報については、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、アドレスが「http」の直後が「www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\_report&list\_uids=6606&log\$=databasead&logdbfrom=nuccore」であるウェブサイトにおけるNational Center for Biotechnology Information(NCBI)のEntrezGeneデータベースにおけるGeneID#6606を参照のこと。ヒトSMN1の具体例としての部分または全ゲノム配列は、受託番号NG\_008691.1、NC\_000005.9、NT\_006713.15、AC\_000048.1、NW\_922707.1、AC\_000137.1、NW\_001838946.1およびNW\_001841229.1のもとでNCBIヌクレオチドデータベースに見いだすことができる)。

#### 【0064】

SMN1は、染色体5q13上の重複領域の一部であり、SMN1における突然変異は、脊髄の前角における運動ニューロンを侵す治療不可能な常染色体劣性障害である、脊髄性筋萎縮(SMA)に関連する。1:50から1:30までのキャリア頻度を有する、SMAは、嚢胞性線維症後の西半球における第2の最も一般的な致命的常染色体劣性疾患である。

#### 【0065】

全SMA患者の約95パーセントが両遺伝子座におけるSMN1のエクソン7を欠いている。遺伝子欠失および遺伝子変換事象の両方がSMA患者におけるSMN1のエクソン7の欠如に起因していた可能性があると考えられた。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、SMN1のエクソン7の一部またはすべてのコピー数を分析する。SMN1のエクソン7のゲノム配列については図1を参照のこと。

#### 【0066】

関連遺伝子である生存運動ニューロン2(SMN2)は、染色体5q13上のSMN1の近くに位置し、SMN1の相同体をコードする。SMN2のコーディング配列はエクソン7における単一ヌクレオチド(840C T)異なるが、SMN2遺伝子産物は、SMN1の喪失を完全には補償することはできない。理論に拘束されるものでないが、SMN2における840位における転写的にサイレントなC Tトランジションは、短縮型転写

物が発生するようにエクソンスプライシングエンハンサーの活性を低下させると考えられる。短縮型転写物は、不安定であり、細胞中で速やかに分解すると考えられる。SMN2遺伝子産物はSMN1の喪失を完全には補償することはできないが、いくつかの最近の研究でSMN2がSMN1の変異因子である可能性があることが示唆されている。いくつかの実施形態では、本発明は、SMN2またはSMN2の一部（例えば、エクソン）遺伝子を分析するのに用いることができる。

#### 【0067】

##### 腫瘍抑制遺伝子および/または癌遺伝子

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、腫瘍抑制遺伝子および/または癌遺伝子などの癌に関与する遺伝子または遺伝子の一部（例えば、エクソン）である。例えば、表皮成長因子1（EGFR）は、コピー数が個体間で異なる癌遺伝子である。EGFRコピー数は、非小細胞肺癌などの癌において正常より高いことがあり得、癌療法への適合性に密接な関係を有し得る。コピー数変異に加えて、EGFRのエクソン2～7の欠失などのEGFRの多数の突然変異体が存在する。本発明の方法を用いてコピー数を推定することができる他のまたはさらなる癌遺伝子の例は、B-r a f癌遺伝子（B R A F）；K-r a s癌遺伝子（K R A S）；およびホスファチジルイノシトール3キナーゼ、触媒作用、アルファ（P I K 3 C A）を含むが、これらに限定されない。本発明の方法を用いて数を推定することができる腫瘍抑制遺伝子の例は、ホスファターゼおよびテンシン相同体（P T E N）を含むが、これらに限定されない。（例えば、それぞれの全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Moroniら（2005年）、「Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study」、Lancet Oncol.、6巻（5号）、279～86頁；およびSohら（2009年）、「Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MSAI) frequently occur together in tumor cells」、4巻（10号）、e7464頁を参照のこと）。

10

20

30

40

#### 【0068】

##### 感染に対する感受性に関与する遺伝子

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、感染に対する感受性に関与する遺伝子または遺伝子の一部（例えば、エクソン）である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、CCL3L1の遺伝子または遺伝子の一部（例えば、エクソン）である。CCL3L1は、第17染色体のqアーム上に位置し、そのコピー数は、個体間で異なる。大部分の個体は、二倍体ゲノム当たり1～6コピーを有し、一部の個体は、コピーを有さないか、または6コピーを超えるコピーを有する。CCL3L1コピー数の増加は、ヒトHIV感染に対するより低い感受性に関連づけられた。CCL3L1は、ケモカイン結合タンパク質2およびケモカイン（C-Cモチーフ）受容体5（CCR5）を含むいくつかのケモカイン受容体に結合するサイトカインをコードする。CCR5は、HIVに対する共受容体であり、CCR5へのCCL3L1の結合は、HIVの侵入を阻害する。

#### 【0069】

##### 免疫機能の調節に関与する遺伝子

いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、免疫機能の調節に関与する遺伝子または遺伝子の一部（例えば、エクソン）である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座は、CD16表面免疫グロブリン受容体をコードするFCGR3Bである。FCGR3Bの低いコピー数は、全身性紅斑性狼瘡および類似の炎症性自己免疫疾患に対する感受性の増大と相関する。FCGR3Bのコピー数の変異は、自閉症、統合失調症および特発性学習障害に関連することも見いだされた。

#### 【0070】

50

## II . 参照遺伝子座

本発明によれば、1つまたは複数の参照遺伝子座を一般的に同じ生物学的アッセイを用いて標的遺伝子座とともに分析する。参照遺伝子座のコピー数は、既知であるか、または同じ生物学的アッセイを用いてあらかじめ決定する。一般的に、適切な参照遺伝子座は、安定したコピー数を有し、異なる生物学的検体間で変化する可能性が少ない。参照遺伝子座について得られるデータは、標的遺伝子座のコピー数の推定値を正規化し、かつ/またはコピー数の推定値の質および/またはアッセイ測定に関する統計的信頼度の評価を容易にするために用いることができる。

### 【0071】

いくつかの実施形態では、参照遺伝子座のコピー数は、標的遺伝子座の正常コピー数と同じである。いくつかの実施形態では、参照遺伝子座のコピー数は、標的遺伝子座の正常コピー数より大きい。いくつかの実施形態では、参照遺伝子座のコピー数は、標的遺伝子座の正常コピー数より小さい。いくつかの実施形態では、参照遺伝子座と標的遺伝子座が同じ染色体上に存在する。いくつかの実施形態では、参照遺伝子座と標的遺伝子座が異なる染色体上に存在する。

10

### 【0072】

既知のコピー数を有する様々な遺伝子座のいずれかを参照遺伝子座として用いることができる。いくつかの実施形態では、1つの参照遺伝子座は、SMARCC1 (SWI/SNF関連、マトリックス関連、クロマチンのアクチン依存性調節因子、サブファミリーc、メンバー1) またはTy5相同体のサブレッサー (SUP T5H) またはその一部であり得る。

20

### 【0073】

いくつかの実施形態では、1つの参照遺伝子座を標的遺伝子座と一緒に分析する。いくつかの実施形態では、2つの参照遺伝子座を標的遺伝子座と一緒に分析する。いくつかの実施形態では、2つを超える参照遺伝子座 (例えば、3つ、4つ、5つ、6つまたは6つを超える参照遺伝子座) を標的遺伝子座と一緒に分析する。

### 【0074】

#### III . コピー数の決定

標的遺伝子座のコピー数の決定は、一般的に、本明細書で述べるように複数の検体において複数の生物学的アッセイを実施することを必要とする。

30

### 【0075】

#### 1 . 生物学的検体

様々な生物学的検体のいずれかは、本明細書で開示する方法による使用に適し得る。一般的に、核酸を含む生物学的検体 (例えば、細胞、組織等) を用いることができる。特定の実施形態では、生物学的検体は、少なくとも1つの標的遺伝子座および少なくとも1つの参照遺伝子座を含む。生物学的検体の種類は、細胞、組織、全血、血漿、血清、尿、便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、羊水および経頸部洗浄液を含むが、これらに限定されない。どのような種類の組織生検試料も用いることができる。前述の検体のいずれかの細胞培養、例えば、絨毛膜培養、羊水および/または羊膜細胞培養、血球培養 (例えば、リンパ球培養) 等も発明の方法により用いることができる。いくつかの実施形態では、生物学的検体は、癌細胞を含む。

40

### 【0076】

いくつかの実施形態では、生物学的検体は、出生前試料である。例えば、生物学的検体は、胎児細胞または無細胞核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、生物学的検体は、無細胞胎児核酸および無細胞母体核酸、例えば、妊娠女性から採取された母体血液、血清または血漿の両方を含み得る。例えば、羊水および/または母体血液などの試料は、妊娠女性から採取することができ、標的遺伝子座のコピー数についてアッセイすることができる。そのような試料からのコピー数の推定値は、とりわけ出生前診断応用において有用である胎児の疾患状態に関する情報を提供し得る。

### 【0077】

50

個体または患者から直接採取された生物学的検体は、生物学的アッセイに用いることができる。場合によって、検体を生物学的アッセイに供する前に1つまたは複数の手順を生物学的検体において実施することができる。例えば、生物学的検体が組織の固体および/または半固体塊を含む場合、生物学的検体を最初に単一細胞懸濁液に処理することができる。いくつかの実施形態では、生物学的検体が体液および細胞を含む場合、細胞を最初に体液から分離することができる。いくつかの実施形態では、生物学的検体が体液を含む場合、体液を分画することができる。例えば、血液試料は、血液成分（例えば、血漿および血清）に分画することができ、成分の1つまたは複数のものをアッセイすることができる。

#### 【0078】

いくつかの実施形態では、生物学的検体を適切な保存条件下で特定の期間保存する。検体は、検体中の核酸の質を維持するのに適する温度または温度範囲内で保存することができる。そのような範囲は、いくつかの実施形態では、検体の種類に依存し得る。いくつかの実施形態では、適切な保存条件は、約37 から - 220 までの範囲の温度を含む。いくつかの実施形態では、試料を約4、約0、約-10、約-20、約-70または約-80 で保存する。いくつかの実施形態では、試料を約24時間を超える、2日を超える、3日を超える、4日を超える、5日を超える、6日を超える、1週間を超える、2週間を超える、3週間を超える、4週間を超える、1カ月を超えるまたは2カ月を超える期間保存する。以前に保存した生物学的検体の一部（例えば、一定分量）またはすべてを生物学的アッセイ時に用いることができる。

#### 【0079】

いくつかの実施形態では、そのような生物学的検体に対して1つまたは複数の分子生物学的操作を実施することができる。そのような操作は、保存する前および/または後に実施することができる。組織均質化、核酸抽出、タンパク質抽出、リボ核酸を除去するための処理（例えば、リボヌクレアーゼを用いる）、タンパク質を除去し、かつ/または分解するための処理（例えば、プロテアーゼを用いる）、細胞膜を破壊するための処理（例えば、洗剤による）、核酸の単離等を含むが、これらに限定されない。そのような操作は、当技術分野で公知であり、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら（1989年）、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、2版、Cold Spring Harbour Laboratory Press: New Yorkに記載されている。

#### 【0080】

いくつかの実施形態では、生物学的検体中の細胞を数える（すなわち、試料中の細胞の総数の推定値を得る）。細胞の計数により、例えば、分析に適する生物学的検体中のゲノム等価体の特定の推定数を得るための試料の量を決定することが容易になり得る。いくつかの実施形態では、各生物学的検体は、ほぼ同じ数の細胞からの核酸を含む。

#### 【0081】

いくつかの実施形態では、生物学的検体をアッセイする前に生物学的検体中の核酸の総量を定量する。いくつかの実施形態では、生物学的検体をアッセイする前に生物学的検体中の核酸のサブセットの量（例えば、胎児および母体核酸の混合物を含む試料中の胎児核酸の量）を定量する。いくつかの実施形態では、生物学的検体をアッセイする前に生物学的検体中のデオキシリボ核酸の総量を定量する。いくつかの実施形態では、各生物学的検体は、ほぼ同じ量の総デオキシリボ核酸を含む。いくつかの実施形態では、各生物学的検体は、分析される複数の他の生物学的検体とほぼ同じ数のゲノム等価体を含む。

#### 【0082】

##### 2. 生物学的アッセイ

一般的に、各生物学的検体中の標的遺伝子座および参照遺伝子座/遺伝子座（複数）のコピー数を分析するために1つまたは複数のアッセイを実施する。一般的に、この目的に適する生物学的アッセイは、レベルが生物学的検体または試料中の遺伝子座（例えば、標的遺伝子座または参照遺伝子座）のコピー数と直接的または間接的に相関する検出可能な

10

20

30

40

50

シグナルを発生するアッセイを含む。

【0083】

検出可能なシグナルは、様々な方法のいずれかで、例えば、励起可能な発蛍光団、酵素産物（その量を分光光度計を用いて測定することができる沈殿物など）等を用いて発生させることができる。

【0084】

特定の実施形態では、検出可能なシグナルのレベルは、試料中の核酸の量と関連し、試料中の核酸の量は、遺伝子座（例えば、標的遺伝子座または参照遺伝子座）のコピー数と関連する。いくつかの実施形態では、生物学的アッセイ（複数可）で発生する検出可能なシグナルは、試料または生物学的検体中のデオキシリボ核酸と関連する。いくつかの実施形態では、生物学的アッセイ（複数可）で発生する検出可能なシグナルは、適切な線形目盛上で生物学的検体または試料中の核酸（例えば、デオキシリボ核酸）の量と関連する。いくつかの実施形態では、生物学的アッセイ（複数可）で発生する検出可能なシグナルは、適切な対数目盛上で生物学的検体または試料中の核酸（例えば、デオキシリボ核酸）の量と関連する。いくつかの実施形態では、生物学的アッセイ（複数可）で発生する検出可能なシグナルは、試料または生物学的検体中の核酸（例えば、デオキシリボ核酸）の量と指数関数的に関連する。いくつかの実施形態では、検出可能なシグナル間の相関関係の性質は、経験的に確定することができる。

10

【0085】

特定の実施形態では、例えば、生物学的検体または試料に関する検出可能なシグナルの時間に対する曲線を作製することが可能であるように、発生する検出可能なシグナルをリアルタイムで読み、および/または記録する。

20

【0086】

例えば、いくつかの実施形態では、本発明に適する生物学的アッセイは、核酸の増幅およびそれがリアルタイムで増幅されるとき核酸の量の定量を含むリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（*rt PCR*）法である。特定の標的または参照遺伝子座の増幅は、標的または参照遺伝子座に隣接する、および/または標的または参照遺伝子座内の核酸配列とハイブリダイズさせるように設計された適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて促進することができる。いくつかの実施形態では、生物学的アッセイは、各増幅サイクルにおける標的遺伝子座または参照遺伝子座からのアンプリコンに関連するシグナルを検出するステップを含む。

30

【0087】

例えば、T A Q M A N（商標）（R o c h e M o l e c u l a r S y s t e m sの商標）リアルタイムPCRアッセイにおいて、消光蛍光プローブにより、増幅された核酸のリアルタイムでの定量が可能である。（例えば、両方の全内容が参照により本明細書に組み込まれる、Heidら（1996年）、「Real time quantitative PCR」、Genome Research、6巻、986～994頁およびGibsonら（1996年）、「A novel method for real time quantitative RT-PCR」、Genome Research、6巻、995～1001頁を参照のこと。）消光蛍光プローブは、核酸、一般的に発蛍光団および蛍光消光剤にコンジュゲートさせた対象のPCR増幅産物（例えば、標的遺伝子座または参照遺伝子座からのアンプリコン）とハイブリダイズさせるように設計されたオリゴヌクレオチドを一般的に含む。蛍光消光剤は、所与のT A Q M A N（商標）における発蛍光団に通常近接しており、したがって、発蛍光団からのシグナルを検出することはできない。T A Q M A N（商標）プローブ分子を増幅されている核酸とハイブリダイズさせるとき、増幅サイクルの伸長部分におけるポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性により、発蛍光団をプローブから放出させることができる。プローブから（したがって、消光剤から）放出されたならば、発蛍光団を検出することができる。適切な波長により励起させるとき、発蛍光団は、当該発蛍光団に特有の特定の波長スペクトルの光を放射する。したがって、発蛍光団からの検出可能なシグナルは、増幅産物を示し得る。試料または生物

40

50

学的検体における蛍光シグナルをリアルタイムで測定することができるので、T A Q M A N (商標)リアルタイムPCRにより、例えば、各増幅サイクルにおけるリアルタイムでの増幅産物(例えば、標的遺伝子座または参照遺伝子座からのアンプリコン)の定量が可能となる。

【0088】

発蛍光団をプローブとコンジュゲートさせる方法と同様に、様々な発蛍光団のいずれかを用いることができる。(例えば、R. P. Haugland、「Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994」、5版、1994年、Molecular Probes, Inc.を参照のこと。)適切な発蛍光団の非限定的な例は、フルオレセイン、ローダミン、フィコピリンタンパク質、シアニン、クマリン、ピレン、緑色蛍光タンパク質、BODIPY(登録商標)およびそれらの誘導体などである。発蛍光団の天然および合成誘導体の両方を用いることができる。フルオレセイン誘導体の例は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、オレゴングリーン、トウキョウグリーン、セミナフトフルオレセイン(seminaphthofluorescein)(SNAFL)およびカルボキシナフトフルオレセインなどである。ローダミン誘導体の例は、ローダミンB、ローダミン6G、ローダミン123、テトラメチルローダミン誘導体TRITCおよびTAMRA、スルホローダミン101(およびそのスルホニルクロリド形テキサスレッド)ならびにローダミンレッドなどである。フィコピリンタンパク質は、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、フィコエリスロシアニンおよびペリジニククロフィルタンパク質(PerCP)などである。フィコエリスリンの種類には、R-フィコエリスリン、B-フィコエリスリンおよびY-フィコエリスリンなどがある。シアニン色素およびそれらの誘導体の例は、Cy2(シアニン)、Cy3(インドカルボシアニン)、Cy3.5、Cy5(インドジカルボシアニン)、Cy5.5、Cy7、BCy7およびDBCy7などである。緑色蛍光タンパク質誘導体の例は、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)および黄色蛍光タンパク質(YFP)などである。BODIPY(登録商標)色素(Invitrogen)は、それらが置換し得る共通発蛍光団またはそれらの吸収/発光波長にちなんで命名される。BODIPY(登録商標)色素は、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY TR、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650およびBODIPY 650/665などである。

【0089】

Alexa Fluor(登録商標)色素(Invitrogen)も本発明のいくつかの実施形態による使用に適している。Alexa Fluor(登録商標)色素は、発光波長にちなんで命名され、Alexa Fluor 350、Alex Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alex Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700およびAlexa Fluor 750などである。

【0090】

VIC(商標)、JOE(商標)およびHEX(商標)(それぞれがApplied Biosystemsから入手可能である)などの市販の発蛍光団も用いることができる。

【0091】

いくつかの実施形態では、TAMRA分子をFAM発蛍光団の消光剤として用いる。

【0092】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、1つは標的遺伝子座用、もう1つは1つまたは複数の参照遺伝子座/遺伝子座(複数)用の2つの異なるプローブを用いる。例えば、1つの種類の発蛍光団を有するプローブを標的遺伝子座に用いることができ、発光スペクトルが他のプローブと区別できる他の種類の発蛍光団を有するプローブを参照遺伝子座に用いる。いくつかの実施形態では、FAM発蛍光団を有するプローブをVIC発蛍光団を有するプローブとともに用いる。

【0093】

PCR増幅において、増幅産物は、指数関数的段階、続いて直線的段階、次に静止段階というパターンに一般的に従って数段階の間に増加する。指数関数的段階の間に、産物(例えば、標的遺伝子座または参照遺伝子座からのアンプリコン)は、試薬が新鮮で、利用可能であるため、一般的にPCRのすべてのサイクル中に2倍になる。試薬が消費され、激減するとき、反応は「直線的段階」中に速度が遅くなり始め、アンプリコンの量は各サイクルでもはや2倍にならない。最後に、反応がさらに遅くなり、一斉に停止するとき、「静止」に達する。したがって、時間に対してプロットした検体または試料からの検出可能なシグナル(例えば、蛍光シグナル)の曲線は、一般的に指数関数的段階、直線的段階および静止段階をその順序で示す。特定の実施形態では、実施するPCR増幅サイクルの数は、反応が少なくとも指数関数的段階を経て、少なくとも直線的段階に、かつ/または少なくとも静止段階に進むように選択する。例えば、一般的に少なくとも24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41または42増幅サイクルを実施する。

10

20

【0094】

経過時間に対する検出可能なシグナルの曲線は、本明細書で述べるようにコピー数を推定するのに用いることができる。シグナルのあらかじめ定める閾値を選択し、所与の生物学的検体または試料における閾値に達するのに必要なPCR増幅サイクルの数をサイクル閾(Ct)値と呼ぶ。対象の所与の生物学的検体(「試験試料」とも呼ぶ)における標的遺伝子座のCt値は、既知のコピー数に一般的に関連するCt参照値と比較することができる。いくつかの実施形態では、Ct参照値は、既知のコピー数(「Z」と表す)を有する参照遺伝子座を分析することにより得られ、いくつかのそのような実施形態では、標的遺伝子座と同じ生物学的試料中の参照遺伝子座を分析し、それぞれについて得られた値を下で述べるように互いに比較する。

30

【0095】

特定の実施形態では、シグナルのあらかじめ定める閾値は、すべてまたは大部分の試料がPCR増幅反応の指数関数部分において閾値に達すると予測されるように選択する。特定の実施形態では、コピー数の推定値を決定するステップは、以下に示すように標的遺伝子のサイクル閾値と1つまたは複数の参照遺伝子のサイクル閾値との差として定義される値Ctを決定するステップを含む。

【0096】

【化8】

$$(式 1) \quad \Delta Ct \equiv Ct_R - Ct_T$$

40

式中、Ct<sub>T</sub>は、所与の試験試料中の標的遺伝子座のCt値であり、Ct<sub>R</sub>は、上述のようなCt参照値である。

【0097】

一般的に、Ctは、所与の生物学的検体における標的遺伝子座のコピー数(T)と参照遺伝子座(そのコピー数が既知である)のコピー数(Z)との比に関連する。例えば、ゲノム当たり1コピーで存在する標的遺伝子座のアンプリコンを示すシグナルは、2コピーで存在する参照遺伝子座のアンプリコンを示すシグナルと比べて増幅の1サイクル遅れる。したがって、Ctと、標的遺伝子座のコピー数(T)と参照遺伝子座のコピー数(Z)との比との間の関係は、以下の式により定義することができる。

【0098】

50

【化 9】

$$( \text{式 } 2) -\Delta Ct = \log_2 \left( \frac{Z}{T} \right)$$

式中、 $Ct$  および  $Z$  は、上述のように定義され、 $T$  は、分析する生物学的検体における標的遺伝子座のコピー数である。したがって、 $T$  は、以下の式により  $Z$  および  $Ct$  から決定することができる。

【0099】

【化 10】

$$( \text{式 } 3) T = Z \cdot 2^{\Delta Ct}$$

10

例えば、 $Z = 2$  および  $Ct = -1$  である場合、 $T = 1$  で、これは、ゲノム当たり 1 コピーを有する標的遺伝子座のアンプリコンを示すシグナルはゲノム当たり 2 コピーを有する参照遺伝子座のアンプリコンを示すシグナルと比べて 1 サイクル遅れるという理解と一致する。

【0100】

他の例として、 $Z = 4$  および  $Ct = -1$  である場合、 $T = 2$  である。

【0101】

いくつかの実施形態では、 $T$  は、整数値と推定される。

【0102】

いくつかの実施形態では、 $T$  は、非整数値と推定される。例えば、不均一な生物学的試料から  $T$  の非整数推定値を得ることが可能であり得る。非整数の  $T$  の推定値を生じさせ得る不均一な生物学的検体の例は、標的遺伝子座の不均一なコピー数を有するポリクローナル癌細胞の集団ならびに母体および胎児核酸を含む試料を含むが、これらに限定されない。

20

【0103】

リアルタイム PCR 法を例示の目的で用いたが、遺伝子のコピー数を定量する（直接的または間接的に）のに用いられる他の生物学的方法を、本明細書における発明の方法での使用に適応させることができる。そのような方法は、PCR-ELISA (PCR-酵素結合オリゴソルベントアッセイ; 「PCR-ELISA」としても公知)、アレイに基づく比較ゲノムハイブリダイゼーション (array-based comparative genomic hybridization) (aCGH) および高スループット配列決定法 (例えば、定量的次世代配列決定法) を含むが、これらに限定されない。PCR-ELISA アッセイでは、増幅が進行するとき PCR 産物を固定化捕捉プローブとハイブリダイズさせる。PCR-ELISA は、時として、リアルタイム PCR の代替として用いられる。aCGH (マトリックス CGH としても公知) では、アレイ上の各スポットがゲノム標的を含む、cDNA マイクロアレイが用いられる。高スループット配列決定法では、複数の鋳型および複数のプライマーを用いた並行配列決定反応により、ゲノムまたはゲノムの大部分の迅速な配列決定が可能になる。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、コピー数を決定するための生物学的アッセイを実施することに加えて、追加の有用な情報を提供し得る他のアッセイを実施する。例えば、生物学的検体における標的遺伝子座について配列決定を行って、標的遺伝子座のより低いコピー数の一因となった突然変異が存在するかどうかを決定することができる。

40

【0105】

### 3. アッセイの方式および対照

特定の実施形態では、より信頼できかつ正確なコピー数の推定および統計分析を促進するために、複数の生物学的アッセイを並行して実施する。一般的に、複数の個体から得られた複数の生物学的検体または試料を並行してアッセイする。いくつかの実施形態では、複数の生物学的アッセイ (特定の実施形態では異なる個体からの検体におけるアッセイを

50

含む)は、特定の個体について、または特定の生物学的検体もしくは試料において実施される反復アッセイも含む。例えば、複数の検体を特定の個体から得ることができ、かつ/または特定の個体からの単一検体をサブユニットに分割することができる(各サブユニットは、反復として用いるか、または後の使用のために保存する)。用いる反復の数は、所定の統計的閾値によって、または経験的に選択することができる。いくつかの実施形態では、2反復、3反復、4反復、5反復、6反復、7反復、8反復、9反復、10反復または10を超える反復を用いる。いくつかの実施形態では、4反復を用いる。

#### 【0106】

下でさらに説明するように、反復を用いることにより、特定の統計的判断を行うことが容易になる。例えば、いくつかの実施形態では、コピー数の確定の統計的信頼度は、反復生物学的アッセイの測定信頼度および複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により判断する。

10

#### 【0107】

いくつかの実施形態では、対照試料を個体または患者から得られた生物学的検体(試験試料)と並行して分析する。対照試料は、無鋳型対照(no template controls)(例えば、増幅に基づく方法における)、標的遺伝子座の既知の(例えば、あらかじめ測定された)コピー数を有する生物学的試料、検出可能なシグナルを校正するために用いられる他の参照試料およびそれらの任意の組合せを含むが、これらに限定されない。既知のコピー数を有する対照試料は、正常個体または標的遺伝子座の異常なコピー数に関連する疾患を有することが確認された患者(例えば、SMN1のエクソン7の欠失を有することが確認されたSMA患者)からの検証済み細胞系および/または生物学的検体を含むが、これらに限定されない多くの源から得ることができる。一般的に、反復アッセイは、試験試料について上述したように対照において実施する。いくつかの実施形態では、対照の複製物を用いる。

20

#### 【0108】

いくつかの実施形態では、複数の生物学的アッセイ(例えば、異なる個体からの)をアレイ方式で行うことができる。様々なアレイ方式を用いて、複数の生物学的検体をアッセイすることを促進することができる。いくつかの実施形態では、複数の生物学的アッセイをマルチウェルプレートで行うことができる。本発明に適する具体例としてのマルチウェルプレートは、24ウェル、48ウェル、96ウェルおよび384ウェルプレートを含むが、これらに限定されない。そのようなプレートは、シグナルを検出するステップを含む方法での使用に適する場合によって透明材料製であってよい。複数のそのようなプレートが使用され得る。一般的に、各生物学的試料またはその一部もしくはサブユニットをそのようなプレートの個々のウェルに入れ、プレートは、1つもしくは複数の空のウェルまたは溶液(例えば、緩衝液)のみで満たされたウェルを含んでいてよい。いくつかの実施形態では、各プレートは、上で説明したような特定の数および種類の対照を含む。例えば、無鋳型対照および既知のコピー数を有する対照を各プレートに含めることができる。非限定的な例として、384ウェルプレートは、96種の生物学的検体または対照の4複製物を含んでいてよい。

30

#### 【0109】

図2に対照および試料複製物を保持するウェルを含む具体例としてのマルチウェルプレートを示す。

40

#### 【0110】

さらにまたはあるいは、適切なアッセイ方式は、少なくとも50、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980または1000の生物学的アッセイを同時に実施することを促進する。

50

## 【0111】

一般的に、マルチウェルプレート（または他の形のアレイ）上に存在する複数の生物学的検体の大多数は、正常なコピー数の標的遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、マルチウェルプレート上に存在する試料の75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を超えるものが正常なコピー数の標的遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、マルチウェルプレート上に存在する試料の99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%を超えるものが正常なコピー数の標的遺伝子座を含む。

## 【0112】

IV. コピー数の推定値の質および統計的信頼度の評価

本発明による発明の方法は、コピー数の推定値の質および/またはコピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、生物学的検体における標的遺伝子座についてコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップを含む。いくつかの実施形態では、コピー数の推定値の質および/または統計的信頼度を評価するステップは、本明細書における「システム」の項で述べたように、アルゴリズムを実行する計算モジュールで行う。

## 【0113】

マルチウェルプレートを必要とするいくつかの実施形態では、アルゴリズムは、特定の品質管理メトリクスが不合格であり、メトリクスが不合格であったウェルを記録する。いくつかの実施形態では、アルゴリズムは、統計的検定の結果および/または当検定に関する試料の状態（例えば、所定の閾値または範囲による合格または不合格）を記録する。

## 【0114】

1. 較正コピー数推定値

複数の生物学的アッセイを複数の生物学的検体（例えば、異なる個体からの）において並行して実施する実施形態では、 $C_t$ 値（式1参照）を各検体について計算することができる。例示の目的のみのために、マルチウェルプレートを例として用いる。しかし、本明細書で述べる方法は、あらゆるアッセイ方式に用いることができる。

## 【0115】

いくつかの実施形態では、正常なコピー数を有する標的遺伝子座と1つまたは複数の参照遺伝子座との間のバックグラウンドでのサイクル数の差を求めるために、プレート上のすべての試料の「キャリブレータ」値

## 【0116】

【化11】

$(\overline{\Delta C_t})$

を計算する。一般的に、キャリブレータは、プレート上のすべての生物学的アッセイからの $C_t$ 値の刈り込み平均に基づいて計算する。いくつかの実施形態では、以下のように80%刈り込み平均を用いる。

## 【0117】

【化12】

(式 4)  $\overline{\Delta C_t} = \text{trimmean}(\Delta C_t, 80\%)$

キャリブレータに基づいて、標的遺伝子座のコピー数の推定値( $T_{C_i}$ )をプレート上の各試料について得ることができる（例えば、較正または正規化コピー数推定値）。いくつかの実施形態では、正規化 $T_{C_i}$ は、以下に従って線形目盛上で得ることができる。

## 【0118】

【化13】

(式 5) (線形目盛)  $T_{C_i} = Z \cdot 2^{(\Delta C_t - \overline{\Delta C_t})}$

いくつかの実施形態では、正規化 $T_{C_i}$ は、以下に従って対数目盛上で得ることができ

る。

【0119】

【化14】

$$(式 6) \quad (Log目盛) \quad T_{Ci} = Z + \Delta Ct - \Delta \bar{Ct},$$

同じ個体または同じ生物学的検体の反復アッセイに基づくコピー数の推定値は、平均することができる。いくつかの実施形態では、コピー数の確定は、平均のコピー数の推定値を四捨五入することによって行うことができる。

【0120】

## 2. 品質管理メトリクス

10

特定の実施形態では、各生物学的検体における標的遺伝子座についてコピー数の確定を行うことができるか否かを評価するために、一連の品質管理メトリクスを実施する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子座のコピー数の推定値の質は、本明細書で述べたように、1つまたは複数の参照遺伝子座について得られるデータの質に少なくとも一部基づいて評価する。

【0121】

### サイクル数の検査

いくつかの実施形態では、一連の品質管理メトリクスは、サイクル数のチェックを含む。所与の生物学的検体の1つまたは複数の参照遺伝子座のCt値が所定の範囲外にある場合、検体は、サイクル数の検査に不合格である。いくつかの実施形態では、所定の範囲は、所定の上限Ct値を含む。そのような実施形態では、特定の生物学的検体の1つまたは複数の参照遺伝子座のCt値が所定の上限Ct値を超える場合、Ctの測定は、サイクル数の検査に不合格である。いくつかの実施形態では、所定の上限Ct値は、構成ファイルで指定されている。いくつかの実施形態では、所定の上限Ct値は、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50サイクルより大きい。

20

【0122】

### シグナルレベル曲線の勾配

いくつかの実施形態では、一連の品質管理メトリクスは、勾配の検査 - 各生物学的検体における1つまたは複数の参照遺伝子座のシグナルレベル（例えば、増幅反応の曲線からの蛍光レベル）の勾配が所定の範囲内にあるという確認を含む。特定の生物学的検体の勾配が所定の範囲内に入らない場合、検体は、勾配の検査に不合格である。いくつかの実施形態では、勾配Sは、Ct測定に最も近い3つのサイクル測定について計算する。例えば、 $Y_2$ は、Ct値に最も近いサイクルの対数変換シグナルレベル（バックグラウンドに対して正規化された）とすることができる。 $Y_1$ および $Y_3$ （それらの両方ともバックグラウンドに対して正規化されている）は、Ct値に最も近いサイクルのそれぞれ直前および直後のサイクルの対数変換シグナルレベルとすることができる。いくつかの実施形態では、蛍光値は、log10目盛に基づいている。したがって、いくつかの実施形態では、勾配は、以下により計算する。

30

【0123】

【化15】

$$(式 7) \quad S = \frac{Y_3 - Y_1}{2}$$

いくつかの実施形態では、Sの許容される値の所定の範囲を構成ファイルで指定する。いくつかの実施形態では、Sの許容される範囲は、約0.15から0.55までである。

40

【0124】

### 試料変動係数

検体複製物を用いる（「アッセイ方式」で上述したように）いくつかの実施形態では、複製物間の試料変動係数（試料CV）を計算する。生物学的検体の試料CVは、当該検体

50

について合格すべきCV検査のための所定の閾値より低くなければならない。試料CVは、線形目盛上で計算し、生物学的検体のすべての複製物間の試料標準偏差と試料平均値との比である。ゼロコピー数試料の試料CVは、標準偏差と平均値プラス1との比として計算する。試料CVが所定の閾値を超える場合、当該生物学的検体についてはコピー数の確定を行わない。いくつかの実施形態では、試料CVの所定の閾値を構成ファイルで指定する。いくつかの実施形態では、試料CVの所定の閾値は、0.15である。

#### 【0125】

##### 3. 統計分析

特定の実施形態では、生物学的検体についてコピー数の確定を行うことができるか否かを決定する助けとするために1つまたは複数の統計分析を実施する。いくつかの実施形態では、統計的信頼度は、下で述べるように、測定的信頼度および/または確定的信頼度を決定することにより評価する。

10

#### 【0126】

##### 測定的信頼度

試料複製物を用いるいくつかの実施形態では、測定的信頼度の値を決定する。測定的信頼度が所定の閾値を下回る場合、検体について得られた値（例えば、コピー数の推定値）は、測定的信頼度の検査に不合格であり、コピー数の確定を行うことができない。測定的信頼度は、試料内変動の指標であり、平均値および平均値のまわりの変動を検討するものである。測定的信頼度は、特定のコピー数に関する所定のコピー数の限界内に適合するような検体または試料に関する平均コピー数推定値（複製物にわたり平均した）のまわりの最大正規信頼区間として計算される。いくつかの実施形態では、試料のすべての複製物にわたる平均値の正規性の仮定をおく。正規分布については、平均値は、線形目盛上のすべての複製物にわたる平均コピー数推定値であり、標準偏差は、平均値の標準誤差（複製物の数の平方根で割った標準偏差）である。いくつかの実施形態では、コピー数限界を構成ファイルで指定する。コピー数の確定限界の例を表2に示す。

20

#### 【0127】

#### 【表2-1】

表2：具体例としてのコピー数限界

コピー数	下限	上限
0	陰性の上限	0.01, 0.1
1	0.5, 0.6	1.4, 1.45
2	1.6, 1.65	2.35, 2.4
3	2.4, 2.5	3.4, 3.5

30

##### 確定的信頼度

いくつかの実施形態では、確定的信頼度を各検体について計算する。いくつかの実施形態では、所与の検体に関する確定的信頼度が所定の閾値より低い場合、標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができないという判断をくだす。いくつかの実施形態では、所定の閾値を構成ファイルで指定する。

#### 【0128】

##### バックグラウンド変動

確定的信頼度を計算するために、バックグラウンド変動を、Zコピーの標的遺伝子座を有する試料の確定推定値の分散として最初に計算する（ここでZは参照遺伝子座の既知の正常コピー数である）。このバックグラウンド変動を計算するためにZコピーの標的遺伝子座を有する検体（Zコピー検体）の所定の臨界数が必要であり、所定の数を構成ファイルで指定することができる。いくつかの実施形態では、所定の臨界数は、20である。

40

#### 【0129】

特定の実施形態では、検体は、バックグラウンド変動の計算に含められるためには、特定の必要条件に適合しなければならない。

#### 【0130】

50

いくつかの実施形態では、必要条件は、a) 品質管理メトリクスに合格すること(所定の範囲内の参照遺伝子座の Ct 値、所定の範囲内の参照遺伝子座のシグナルレベルの勾配、所定の閾値に適合する測定の信頼度および所定の閾値より低い試料 CV) ; b) 対照検体でないこと ; c) ほぼ Z コピーの標的遺伝子座を有すると推定されること ; ならびに d) 特定の所定の試料の種類(例えば、血液)であることの少なくとも1つまたはいずれかの組合せを含む。いくつかの実施形態では、必要条件 d) (特定の所定の試料の種類であることという必要条件)は、所定の試料の種類の種類の数 Z コピー検体の所定の臨界数を下回る場合には割愛される。

#### 【0131】

いくつかの実施形態では、必要条件は、上の a) に略述した品質管理および統計的信頼性メトリクスに合格することならびに標的遺伝子座の Z に等しいコピー数の推定値を有することの両方を含む。

10

#### 【0132】

##### 試料の種類調節

いくつかの実施形態では、試料の種類に関連する異なる変動を補償するためにバックグラウンド変動を調整する。一般的に、必要条件 d) が除外される場合には、試料の調整を行わない。調整は、各試料の種類ごとに行うことができる。すなわち、調整値を差し引くか、または加えることができる。いくつかの実施形態では、大部分の試料について試料の調整を行わない。いくつかの実施形態では、羊水および/または羊膜細胞培養試料のバックグラウンド変動を 0.03 単位調整する。いくつかの実施形態では、絨毛膜絨毛試料のバックグラウンド変動を 0.03 単位調整する。

20

#### 【0133】

##### 確定の信頼度

試料について調整することができる、またはできないバックグラウンド変動を得たならば、確定の信頼度の値を決定することができる。確定の信頼度は、複数のコピー数の推定値に基づくものであり得る。確定の信頼度を決定するために Z コピーの標的遺伝子座を有する検体 (Z コピー検体) の所定の臨界数が必要であり、所定の数を構成ファイルで指定することができる。いくつかの実施形態では、所定の臨界数は、20 である。

#### 【0134】

いくつかの実施形態では、確定の信頼度を決定するために用いるアルゴリズムは、コピー数の推定値が正規分布しており、コピー数にわたり等しい分散を有することを仮定する。正規分布を仮定する統計的検定を用いることができる。いくつかの実施形態では、Student の t 検定を用いて各検体に関する p 値を求める。

30

#### 【0135】

いくつかの実施形態では、統計的検定で検定される仮説は、検体についての観測されるコピー数の推定値が隣接コピー数分布から実際に得られるということである。すなわち、コピー数の推定値が 2 である場合、アルゴリズムは、試料が実際に 1 または 3 コピーを有する確率を求める。アルゴリズムは、2 つの検定(この例では、1 コピー仮説および 3 コピー仮説に関する)のそれぞれからの p 値を合計する。信頼度は、p 値の合計を 1 から差し引くことにより計算される。

40

#### 【0136】

コピー数の推定値が 0 (または 1 つ存在する場合、最大の可能なコピー数) である場合、1 コピー (または最大値マイナス 1) の分布である、唯一の隣接コピー数分布が存在する。そのような場合、アルゴリズムは、コピー数の推定値が隣接コピー数分布から得られるという仮説を検定することから得られる単一の p 値を用いる。確定の信頼度は、当 p 値を 1 から差し引くことにより計算される。

#### 【0137】

いくつかの実施形態では、確定の信頼度統計量は、コピー数の推定値の対数目盛上で計算する。コピー数の t 分布平均値は、個々のコピー数のコピー数の推定値のすべてを平均することにより決定する。特定の遺伝子コピーカテゴリーについて推定値が存在しない場

50

合、平均値を - 2、1、2 および 2.585 と仮定する。

【0138】

各試料について確定信頼度のQC試験を実施する。確定信頼度が構成ファイルに指定されている閾値より低い場合、試料は、確定信頼度QCメトリクスに不合格である。

【0139】

4. プレート品質管理メトリクス

プレートにおける複数の生物学的検体を分析する特定の実施形態では、プレートの特定の品質管理メトリクスが不合格である場合、プレート警報が発信される。例えば、いくつかの実施形態では、ブランク対照を除くプレートにおけるすべての対照試料を品質管理メトリクスについて検査し、かつ/または上述のように統計的に分析する(例えば、Ct値の検査、勾配の検査、測定の実験度、確定の実験度および試料CV)。これらの品質管理メトリクスのいずれかがプレート上の対照試料について不合格である場合、プレート警報がプレート内の不合格ウェルおよび不合格メトリクスのリストとともに発信される。コピー数に関する対照としての役割を果たす試料も予測されるコピー数との一致について確認する。例えば、いくつかの実施形態では、1つもしくは複数の対照試料のいずれかが品質管理もしくは統計的信頼度評価に不合格である場合、またはいずれかの個別対照試料の推定値が所定のもしくは予測されるコピー数と等しくない場合、プレートは不合格である。いくつかの実施形態では、Zコピー(Zは参照遺伝子座のコピーの数、例えば、いくつかの実施形態において2)試料の数が、所定の閾値より小さく、かつ/または確定の実験度統計量に関するt分布パラメータの推定に不十分である場合、プレートは不合格である。いくつかの実施形態では、Zコピー試料の平均値のまわりの信頼区間が所定の限界の外側である場合、プレートは不合格である。いくつかの実施形態では、Zコピー試料のコピー数の推定値の標準偏差が所定の閾値を上回る場合、プレートは不合格である。

10

20

【0140】

いくつかの実施形態では、計算モジュールは、所定のプレートレイアウトに基づいてウェル位置により対照を発見する。

【0141】

V. システムおよびコンピュータ可読媒体

いくつかの実施形態では、本明細書で述べる発明の方法は、本明細書で述べるシステムおよびコンピュータ可読媒体のようなシステムまたはコンピュータ可読媒体上で実施することができる。本明細書で述べるシステムおよび媒体による発明の方法の実施により、標的遺伝子座のコピー数の推定値が確定され、コピー数の推定値の質および/またはコピー数の確定の統計的信頼度が評価され、標的遺伝子座についてコピー数の確定を行うことができるか否かを使用者に警報され得る。いくつかの実施形態では、本明細書で述べるシステムおよび媒体は、個体が標的遺伝子座の異常なコピー数に関連する疾患、障害もしくは状態を有するか、またはそのキャリアであるかも示し得る。

30

【0142】

本明細書に記載するシステムは、いくつかの実施形態では、プロセッサが命令を実行して方法または処置(例えば、コピー数の推定値の計算および/または統計分析)を実施し得るようなコンピュータ可読媒体上に含まれる機能モジュール、クライアント、媒介物、プログラム、実行可能な命令または命令と述べることができる。本明細書で述べる機能モジュールは、コードの個別のブロックに対応する必要はない。むしろ、機能モジュールの機能部分は、様々な媒体上に保存され、様々な時に実行される様々なコード部分の実行により行うことができる。さらに、モジュールは他の機能を果たすことができ、したがって、モジュールは、特定の機能または一連の機能を有することに限定されないことを理解すべきである。いくつかの実施形態では、これらの機能モジュールは、計算デバイスにより実行することができる。機能モジュールは、計算デバイスに保存することができ、またはいくつかの実施形態では、外部ストレージリポジトリもしくは遠隔計算機に保存することができる。

40

【0143】

50

図3Aに上述の機能モジュールを保存し、かつ/または実行し得る計算デバイス400の1つの実施形態を示す。計算デバイスは、いくつかの実施形態では、コンピュータ、計算機またはプロセッサおよびメモリを有する任意の他のデバイスであり得る。いくつかの実施形態では、計算デバイスは、実体計算機にインストールされたハイパバイザにより管理される仮想計算機であり得る。計算デバイス400内には次の構成要素と通信するシステムバス450が含まれている：中央演算処理ユニット421；メインメモリ422；ストレージメモリ428；入出力(I/O)コントローラ423；ディスプレイデバイス424A~424N；およびネットワークインターフェース418。1つの実施形態では、ストレージメモリ428は、両方がプロセッサ421により実行され得るオペレーティングシステムおよびソフトウェアルーチンを含む。I/Oコントローラ423は、いくつかの実施形態では、キーボード426、ポインティングデバイス427および他の入力デバイスにさらに接続されている。他の実施形態は、複数の入出力デバイス430A~430Nに接続されたI/Oコントローラ423を含み得る。

10

20

30

40

50

#### 【0144】

図3Bに本明細書で述べた機能モジュールを保存し、かつ/または実行することができる計算デバイス400の他の実施形態を示す。いくつかの実施形態では、計算デバイス400は、次の構成要素と通信し得るシステムバス450を含む。ブリッジ470および第1のI/Oデバイス430A。他の実施形態では、ブリッジ470は、第2のI/Oデバイス430B、メインメモリ422およびキャッシュメモリ440と通信するメイン中央演算処理ユニット421とさらに通信する。いくつかの実施形態では、中央演算処理ユニット421は、I/Oポートおよびメモリポート403にさらに連結されている。

#### 【0145】

計算機400の実施形態は、次の構成要素構成のいずれか1つにより特徴づけられる中央演算処理ユニット421を含み得る：メインメモリ422からフェッチされる命令に回答し、処理する論理回路。中央演算処理ユニット421は、いくつかの実施形態では、Intel Corporationにより製造されたもの；Motorola Corporationにより製造されたもの；カリフォルニア州Santa ClaraのTransmeta Corporationにより製造されたものなどのマイクロプロセッサユニット；International Business Machinesにより製造されたものなどのRS/6000プロセッサ；Advanced Micro Devicesにより製造されたものなどのプロセッサ；または論理回路の他の組合せを含み得る。さらに他の実施形態では、中央演算処理ユニット421は、次のもののいずれかの組合せを含む：マイクロプロセッサ、マイクロコントローラ、単一プロセッシングコアを有する中央演算処理ユニット、2つのプロセッシングコアを有する中央演算処理ユニットまたは複数のプロセッシングコアを有する中央演算処理ユニット。

#### 【0146】

1つの実施形態では、中央演算処理ユニット421は、バックサイドバスとしても公知の第2のバスを介してキャッシュメモリ440と通信するが、他の実施形態では、プロセッサ421は、システムバス450を介してキャッシュメモリと通信する。ローカルシステムバス450は、いくつかの実施形態では、複数の種類のI/Oデバイス430A~430Nと通信するためにも中央演算処理ユニット421により使用され得る。

#### 【0147】

計算デバイス400は、いくつかの実施形態では、メインメモリ422およびキャッシュメモリ440を含む。キャッシュメモリ440およびメインメモリ422は、いくつかの実施形態では、次のタイプのメモリのいずれか1つであり得る：スタティックランダムアクセスメモリ(SRAM)、バーストSRAMまたはSynchBurst SRAM(BSRAM)；ダイナミックランダムアクセスメモリ(DRAM)；高速ページモードDRAM(FPM DRAM)；エンハンスドDRAM(EDRAM)、拡張データ出力RAM(EDO RAM)；拡張データ出力DRAM(EDO DRAM)；バースト拡張データ出力DRAM(BEDO DRAM)；エンハンスドDRAM(EDRAM)；

シンクロナスDRAM (SDRAM); JEDEC SRAM; PC100 SDRAM; ダブルデータレートSDRAM (DDR SDRAM); エンハンストSDRAM (ESDRAM); SyncLink DRAM (SLDRAM); ダイレクトラムバスDRAM (DRDRAM); 強誘電RAM (FRAM (登録商標)); または他のタイプのメモリ。さらなる実施形態は、システムバス450; メモリポート403; またはプロセッサ421がメモリ422にアクセスすることを可能にする他の接続、バスもしくはポートを介してメインメモリ422にアクセスし得る中央演算処理ユニット421を含む。

【0148】

コンピュータ可読媒体は、メインメモリ422に保存され、プロセッサ421により実行され得る。このコンピュータ可読媒体は、いくつかの実施形態では、ソフトウェアプログラムおよび実行されたときにコンピュータが1つまたは複数の機能を果たすことを命令する他の実行可能な一連の命令を含み得る。このコンピュータ可読媒体は、何らかの言語で、またいくつかの実施形態では、次の言語のいずれか1つで書かれた命令を含み得る: Java (登録商標)、J#; ビジュアルベーシック; C; C#; C++; フォートラン; パスカル; Eiffel、ベーシック; COBOL; およびアセンブリ言語。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、コンピュータ可読媒体は、当業者に公知の基礎計算生物学の方法 (basic computational biology method) を実施するための命令を含み得る。特に、コンピュータ可読媒体は、次の情報資源に記載されている方法を実施するための命令を含み得る: Setubal および Meidanisら、Introduction to Computational Biology Methods (PWS Publishing Company, Boston, 1997年); Salzberg, Searles, Kasif (編), Computational Methods in Molecular Biology, (Elsevier, Amsterdam, 1998年); Rashidi および Buehler, Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine (CRC Press, London, 2000年); ならびに Ouellette および Bzevanis, Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins (Wiley & Sons, Inc., 2版, 2001年)。

20

30

【0150】

いくつかの実施形態では、計算デバイス400は、1つもしくは複数のハードディスクドライブであり得る記憶装置428、独立ディスクの1つもしくは複数の冗長アレイ、またはUSBもしくはシリアルポートを介して計算デバイス400と通信し得る外部ストレージもしくは媒体デバイスを含む。さらに他の実施形態では、記憶装置428は、次の接続および/またはプロトコルのいずれかを介してアクセスすることができる遠隔記憶装置であり得る: USB; シリアル; パラレル; イーサネット (登録商標) (Ethernet (登録商標)); ブルートゥース (Bluetooth (登録商標)); WiFi; ジグビー (Zigbee (登録商標)); 無線USB; IEEE 802.15; RS-232; RS-484; IEEE 802.3 および IEEE 802.11.

40

計算デバイス400は、次の接続のいずれかを介して地域ネットワーク (LAN) または広域ネットワーク (WAN) などのネットワークに接続するためのネットワークインターフェース418をさらに含む: 標準電話線; LANもしくはWANリンク (例えば、802.11、T1、T3、56kb、X.25、SNA、DECNET)、ブロードバンド接続 (例えば、ISDN、フレームリレー (Frame Relay)、ATM、ギガビットイーサネット (登録商標)、Ethernet (登録商標) - over - SONET)、無線接続または上に列挙した接続のいずれかの組合せ。接続は、種々の通信プロトコル (例えば、TCP/IP、IPX、SPX、NetBIOS、イーサネット (登録商標)、ARCNET、SONET、SDH、光ファイバー分散データインターフェース (

50

FDDI)、RS232、RS485、IEEE802.11、IEEE802.11a、IEEE802.11b、IEEE802.11g、CDMA、GSM(登録商標)、WiMaxおよび直接非同期接続)を用いて達成することもできる。いくつかの実施形態では、計算デバイス400は、ネットワークインターフェース418を介してその他の計算デバイス、アプライアンス、入力デバイス、記憶装置または機械と交信する。この交信は、いくつかの実施形態では、Secure Socket Layer(SSL)もしくはTransport Layer Security(TLS)、Remote Desktop Protocol(RDP)またはICAプロトコルなどのゲートウェイまたはトンネリングプロトコルのいずれかの種類および/または形態で達成され得る。ネットワークインターフェース418のバージョンは、ビルトインネットワークアダプタ；  
10 ネットワークインターフェースカード；PCMCIAネットワークカード；カードバスネットワークアダプタ；無線ネットワークアダプタ；USBネットワークアダプタ；モデム；マルチプルネットワークカード；または計算デバイス400をネットワークに接続するのに適する任意の他のデバイスのいずれか1つを含み得る。

#### 【0151】

I/Oデバイス430A~430Nは、いくつかの実施形態では、次のデバイスのいずれかであり得る：キーボード426；ポインティングデバイス427；マウス；トラックパッド；オプティカルペン；トラックボール；マイクロフォン；ドロ잉タブレット；ビデオディスプレイ；スピーカー；インクジェットプリンタ；レーザープリンタ；および昇華型プリンタ；USBフラッシュドライブ；または本明細書で述べる方法およびシステムを実施することができる他の入力/出力デバイス。I/Oコントローラ423は、いくつかの実施形態では、1つまたは複数のI/Oデバイスを制御するための複数のI/O  
20 デバイス430A~430Nに接続し得る。他の実施形態では、I/Oデバイス430A~430Nは、結果を保存し、結果を表示し、またはシステムバス450と次のような外部通信バスとのブリッジとしての役割を果たす：USBバス；Apple Desktop Bus；RS-232シリアルコネクション；SCSIバス；FireWireバス；FireWire800バス；イーサネット(登録商標)バス；AppleTalkバス；ギガビットイーサネット(登録商標)バス；非同期伝送モード(Asynchronous Transfer Mode)バス；HIPPIバス；Super HIPPIバス；SerialPlusバス；SCI/LAMPバス；FibreChannelバス；またはシリアルアタッチド(Serial Attached)スモールコンピュータシステムインターフェースバス。  
30

#### 【0152】

いくつかの実施形態では、計算機400は、複数のディスプレイデバイス424A~424Nに接続し得る。他の実施形態では、計算デバイス400は、単一ディスプレイデバイス424に接続し得るが、さらに他の実施形態では、計算デバイス400は、同じ種類もしくは形態のディスプレイであるディスプレイデバイス424A~424Nに、または異なる種類もしくは形態であるディスプレイデバイスに接続する。ディスプレイデバイス424A~424Nの実施形態は、次のものによりサポートし、有効にすることができる  
40 : 1つまたは複数のI/Oデバイス430A~430N；I/Oコントローラ423；I/Oデバイス430A~430NとI/Oコントローラ423との組合せ；ディスプレイデバイス424A~424Nをサポートすることができるハードウェアとソフトウェアの組合せ；ディスプレイデバイス424A~424Nにインターフェースで接続する、交信する、接続するまたは別の方法で使用するためのあらゆる種類および/または形態のビデオアダプタ、ビデオカード、ドライバーおよび/またはライブラリ。計算デバイス400は、いくつかの実施形態では、1つまたは複数のディスプレイデバイス424A~424Nを使用するように構成することができ、これらの構成は、複数のディスプレイデバイス424A~424Nにインターフェースで接続するための複数のコネクタを有すること；各ビデオアダプタが1つまたは複数のディスプレイデバイス424A~424Nに接続された、複数のビデオアダプタを有すること；複数のディスプレイ424A~424Nをサ  
50

ポートするように構成されたオペレーティングシステムを有すること；複数のディスプレイデバイス 4 2 4 A ~ 4 2 4 N に接続し、使用するために計算デバイス 4 0 0 内に含まれている回路およびソフトウェアを使用すること；ならびにメイン計算デバイス 4 0 0 がメイン計算デバイス 4 0 0 用のディスプレイデバイス 4 2 4 A ~ 4 2 4 N として二次計算デバイスのディスプレイを使用することを可能にするためにメイン計算デバイス 4 0 0 および二次計算デバイス上のソフトウェアを実行することを含みうる。計算デバイス 4 0 0 のさらに他の実施形態は、複数の二次計算デバイスにより備えられ、ネットワークを介してメイン計算デバイス 4 0 0 に接続された複数のディスプレイ 4 2 4 A ~ 4 2 4 N を含み得る。

#### 【 0 1 5 3 】

いくつかの実施形態では、計算機 4 0 0 は、あらゆるオペレーティングシステムを実行し得るが、他の実施形態では、計算機 4 0 0 は、次のオペレーティングシステムのいずれかを実行し得る：MICROSOFT WINDOWS（登録商標）オペレーティングシステムのバージョン；Unix（登録商標）およびLinux（登録商標）オペレーティングシステムの各種リリース；Apple Computerにより製造されたMAC OSのあらゆるバージョン；あらゆる組込みオペレーティングシステム。さらに他の実施形態では、計算機 4 0 0 は、複数のオペレーティングシステムを実行し得る。

#### 【 0 1 5 4 】

計算機 4 0 0 は、次の計算デバイスのいずれか 1 つに組み込むことができる：計算ワークステーション；デスクトップコンピュータ；ラップトップまたはノートコンピュータ；サーバー；手持ちサイズコンピュータ；携帯電話；携帯遠隔通信デバイス；媒体再生デバイス；ゲームシステム；携帯計算デバイス；ノートブック；Apple Computerにより製造されたデバイスのIPODファミリーのデバイス；あるいは通信能力があり、本明細書で述べる方法およびシステムを実施するのに十分なプロセッサ能力およびメモリ容量を有する他の種類および/または形態の計算、遠隔通信または媒体デバイス。

#### 【 0 1 5 5 】

本明細書で述べる機能モジュールは、コードの個別のブロックに対応する必要はない。むしろ、機能モジュールの機能部分は、様々な媒体上に保存され、様々な時に実行される様々なコード部分の実行により行うことができる。さらに、モジュールは他の機能を果たすことができ、したがって、モジュールは、特定の機能または一連の機能を有することに限定されないことを理解すべきである。

#### 【 0 1 5 6 】

図 4 に生物学的アッセイから得られたデータ、1 つもしくは複数の構成ファイル、および/または保存参照データ（例えば、所定の閾値限界、対照および参照コピー数等）を入力し、本明細書で述べるいずれかの機能モジュールを用いてデータを分析するためのシステム 5 1 0 の 1 つの実施形態を示す。1 つの実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、分析システム 5 1 0 と、より具体的には、分析システム 5 1 0 内のプロセッサ上で動作する計算モジュール 5 4 0 と交信し得る。計算モジュール 5 4 0 は、入力デバイス 5 5 0 から得られる出力データに関連する情報を入手し、発信するためにより多くの機能または方法を遂行し得る。いくつかの実施形態では、計算モジュール 5 4 0 は、発信した情報を保存または分析システム 5 1 0 内に含まれているストレージリポジトリ 5 3 0 に保存されているデータを入力し得る。いくつかの実施形態では、計算モジュール 5 4 0 は、報告データおよび他の値を分析システム 5 1 0 内のディスプレイモジュール 5 6 0 に転送し得る。他の実施形態では、ディスプレイモジュール 5 6 0 は、ストレージリポジトリ 5 3 0 から報告データの内容を読み出すことができる。ディスプレイモジュール 5 6 0 は、両方がディスプレイモジュール 5 6 0 により受信された報告データおよび他の情報を表示し得る、出力デバイス 5 5 5 およびディスプレイデバイス 5 7 0 と交信する。

#### 【 0 1 5 7 】

図 4 にまたより詳細にさらに言及すると、1 つの実施形態では、分析システム 5 1 0 は、計算モジュール 5 4 0 およびディスプレイモジュール 5 6 0 のような機能モジュールを

10

20

30

40

50

含み得る。他の実施形態では、分析システム 5 1 0 は、基礎計算生物学の方法を実施するモジュールを含み得る。分析システム 5 1 0 は、いくつかの実施形態では、単一計算デバイス 1 0 0 で実行され得る。他の実施形態では、分析システム 5 1 0 は、1 つまたは複数の計算デバイス 1 0 0 を含み得る。分析システム 5 1 0 内に含まれる各計算デバイス 1 0 0 は、システム 5 1 0 内に含まれる他の計算デバイス 1 0 0 と交信し得る。例えば、計算モジュール 5 4 0 は、第 1 のコンピュータにより実行され得るが、ストレージリポジトリ 5 3 0 およびディスプレイモジュール 5 6 0 は、第 2 のコンピュータにより実行され得る。他の例では、ストレージリポジトリ 5 3 0 は、第 1 のコンピュータに存在し得るが、機能モジュールのそれぞれは、第 2 のコンピュータにより実行され得る。

#### 【 0 1 5 8 】

システム 5 1 0 内に含まれる複数のコンピュータ 1 0 0 の間の交信は、いくつかの実施形態では、ネットワークまたは直接接続により促進され得る。他の実施形態では、直接接続は、イーサネット（登録商標）接続、シリアル接続またはパラレル接続を含み得る。ネットワークは、かなり多くのサブネットワークを含む得、地域ネットワーク（LAN）または広域ネットワーク（WAN）であり得る。さらに、ネットワークは、私的および公的ネットワークの組合せを含み得る。1 つの実施形態では、ネットワークは、本明細書で述べたネットワークのいずれかであり得、分析システム 5 1 0 内に含まれるモジュールおよびコンピュータならびに分析システムと交信するデバイスは、本明細書で述べたネットワークのいずれかを介し、本明細書で述べたネットワークプロトコルのいずれかを用いて交信し得る。

#### 【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、分析システム 5 1 0 と交信し得る。他の実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、計算モジュール 5 4 0 または分析システム 5 1 0 内の他のモジュールと交信し得る。図 4 に分析システム 5 1 0 の外部にある入力デバイス 5 5 0 を例示するが、いくつかの実施形態では、分析システム 5 1 0 は、入力デバイス 5 5 0 を含み得る。

#### 【 0 1 6 0 】

入力デバイス 5 5 0 は、いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイ（特に、リアルタイム PCR）から得られるデータを出力することができるデバイス、機械またはコンピュータであり得る。他の実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、本明細書で述べたアッセイのいずれかから得られるデータを出力することができるデバイス、機械またはコンピュータであり得る。入力デバイス 5 5 0 は、他の実施形態では、1 つまたは複数の生物学的検体における標的遺伝子座および 1 つまたは複数の参照遺伝子座を分析する適切な生物学的アッセイを実施するために構成された機械またはデバイスであり得る。いくつかの実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、Applied Biosystems により開発された T A Q M A N プローブからのシグナルを読み込む。入力デバイス 5 5 0 は、いくつかの実施形態では、T A Q プローブの分解時に発光光団により放射される蛍光の量を測定する。蛍光量は、DNA の量を測定するのに用いることができ、いくつかの実施形態では、蛍光の特定のレベルに達するのに必要なサイクルの数を測定しうる。いくつかの実施形態では、標的および参照遺伝子座の蛍光のレベルまたは蛍光シグナルのレベルは、各増幅サイクルで検出することができる。入力デバイス 5 5 0 は、アッセイ時に発生し、分析された蛍光シグナルを表す出力データを発信し得る。

#### 【 0 1 6 1 】

1 つの実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、アッセイからの出力を表すデータ値のファイル、配列または文字列を出力し得る。この出力ファイルは、次のいずれかを表し得る 1 つまたは複数の字（characters）、数または文字（letters）を含み得る：蛍光シグナルのレベル；プレート上のウェルを識別する識別子；プレート上の試料または検体を識別する識別子；患者；試料または検体を得た方法；および出力に関連する他の識別子または情報。1 つの実施形態では、入力デバイス 5 5 0 は、各試料または検体の蛍光シグナルデータが、シグナルの数値表現、患者を識別する識別子、試料を得るため

10

20

30

40

50

に用いた方法、試料または検体を入れたウェル、および他の同様な情報を含むデータの群に反映されているフラットファイルを出力する。データの各群は、この実施形態では、平行線（「|」）、コンマ、スペースまたは他の字などの区切り字により分離することができる。ファイルの字により区切られた各部分は、プレートに含められた検体の蛍光測定値を含み得る。いくつかの実施形態では、字により区切られた各部分は、各サイクルにおけるマルチウェルプレート（例えば、384ウェルプレート）における少なくとも2つのチャンネルにおける蛍光測定値を含み得る。

#### 【0162】

いくつかの実施形態では、分析システム510は、入力デバイスからデータを得るために入力デバイス550と連動するドライバーまたは他のプログラム（図示せず）を含み得る。いくつかの実施形態では、ドライバーまたはプログラムは、入力デバイスまたは機械550から生データを受信し、生データを、分析システム510内で動作するプログラムおよびモジュールにより処理することができるフォーマットに変換する。入力デバイス550から得られた情報をフォーマットするステップは、データの種類を変更し、関係のない字を除去し、または入力デバイス550により出力された情報の図表、グラフもしくは他の視覚表示を作成するステップを含み得る。

10

#### 【0163】

1つの実施形態では、計算モジュール540は、入力デバイス550から出力データを受信するために入力デバイス550と直接交信し得る。計算モジュール540は、いくつかの実施形態では、分析システム510に含まれるモジュール、機械またはデバイスのいずれかと交信し得る。他の実施形態では、計算モジュール540は、入力デバイス550により得られた情報を保存するためにストレージリポジトリ530と交信し得る。他の実施形態では、計算モジュール540は、計算モジュール540により発信された情報を保存するためにストレージリポジトリ530と交信し得る。さらに他の実施形態では、計算モジュール540は、入力デバイス550により出力された情報の図表、グラフもしくは他の視覚表示を作成するために、計算モジュール540により使用され得る較正情報、閾値情報および対照試料情報などの情報をストレージリポジトリ530から読み出し得る。

20

#### 【0164】

1つの実施形態では、計算モジュール540は、本明細書で述べた推定計算および/または統計もしくは品質管理分析のいずれかを実施するためにコンピュータ上で動作し得る。これらの統計および/または推定計算は、次のいずれかを含み得る：参照遺伝子サイクル数の決定、プレート上の2コピー試料の数の決定、測定の信頼度の計算；同じ患者から採取された複製試料または検体間の変動係数の計算；同じ患者から採取された複製試料または検体間の標準偏差の計算；確定の信頼度の計算；参照遺伝子勾配の計算；各試料または検体ごとのコピー数の推定値；プレートのデルタサイクル数の計算；較正值；および本明細書で述べた他の計算または決定。いくつかの実施形態では、計算モジュール540は、これらの計算および決定をストレージリポジトリ530に保存し得る。他の実施形態では、計算モジュール540は、これらの計算および決定をディスプレイモジュール560に転送し得る。これらの計算および決定値は、一連の品質管理メトリクスに含めることができる。したがって、各値は、アレイ、データベース、リストまたは他のデータ保存構造に保存することができる。

30

40

#### 【0165】

1つの実施形態では計算モジュール540は、単一モジュールであり得るが、他の実施形態では計算モジュール540は、1つまたは複数のサブモジュール、サブルーチンまたはプログラムを含み得る。1つの実施形態では、計算モジュール540は、コンピュータ上で起動するスクリプトであり得る。スクリプトは、いくつかの実施形態では、主または親プログラム内で起動し得る。例えば、計算モジュール540は、いくつかの実施形態では、MATLAB内で起動するスクリプトであり得る。この例では、計算モジュール540は、本明細書で述べた統計分析を行うための1つまたは複数の定義済みプログラムまたはルーチンを含む統計ライブラリにアクセスし得る。

50

## 【 0 1 6 6 】

計算モジュール 5 4 0 は、いくつかの実施形態では、キャリブプレートまたは他の調整値を用いて計算または決定のいずれかを調整し得る。したがって、いくつかの実施形態では、次の環境問題のいずれかを補償するために較正または調整値を計算または決定値に加えまたはそれから差し引くことができる：検体または試料を得るのに用いられる方法に起因する変動；プレートアーチファクト；入力デバイス 5 5 0 の他の分野に存在するアーチファクト；アッセイの有効性に影響を及ぼす温度変動；およびアッセイの結果として得られたデータの完全性に影響を及ぼし得る他の環境条件。いくつかの実施形態では、計算標準偏差は、検体または試料を得るのに用いられる方法の種類について調整することができる。例えば、試料を、患者から血液スポットを得ること；患者の口腔を綿棒で拭き取ること；臍帯血を得ること；絨毛膜絨毛試料培養物を得ること；および羊水培養物を得ることにより得る場合、標準偏差は調整しなくてもよい。他方で、試料を羊水または絨毛膜絨毛試料から得る場合、いくつかの実施形態では、0.3 調整しなければならない。これらの調整値は、いくつかの実施形態では、ストレージリポジトリ 5 3 0 に保存される構成ファイルに含められ、プレートおよび/または検体が品質管理チェックに合格するかどうかを判定するために計算モジュール 5 4 0 により使用され得る。

10

## 【 0 1 6 7 】

1 つの実施形態では、計算モジュール 5 4 0 は、本明細書で述べた 1 つまたは複数の計算および/または決定を行った後に、得られた結果を 1 つまたは複数の参照値と比較し得る。これらの参照値は、いくつかの実施形態では、閾値または所定の範囲であり得る。1 つの実施形態では、これらの閾値または所定の範囲は、ストレージリポジトリ 5 3 0 に保存され得る。値は、いくつかの実施形態では、次のいずれか 1 つに保存することができる：フラットファイル；データベース；リスト；配列；部分文字列値の連なりを含む文字列；または他のデータ構造。さらに他の実施形態では、値は、計算モジュール 5 4 0 により要求されるまで、一時メモリエlementに保存することができる。

20

## 【 0 1 6 8 】

他の 1 つの例では、構成ファイルは、次の閾値のいずれかを含み得る：

## 【 0 1 6 9 】

## 【表 2 - 2】

閾値／範囲／調整の種類	値
対照遺伝子座閾 C T 値	30
対照遺伝子座勾配範囲	0.15~0.55
ゼロコピー数確定範囲	-0.01~0.01
1 コピー数確定範囲	0.6~1.4
2 コピー数確定範囲	1.6~2.4
3 コピー数確定範囲	2.435
2 コピー数経験的対照 (Empirical Controls)	20
2 コピー数標準偏差閾値	0.1
試料 C V 閾値	0.15
測定信頼度閾値	0.99
確定信頼度閾値	0.9999
血液スポットに関する標準偏差調整	0
口腔スワブに関する標準偏差調整	0
羊水に関する標準偏差調整	0.03
羊水培養物に関する標準偏差調整	0
絨毛膜絨毛試料に関する標準偏差調整	0.03
絨毛膜絨毛試料培養物に関する標準偏差調整	0
臍帯血に関する標準偏差調整	0

30

40

50

上の例では、閾値、値の範囲および調整値を用いて、1つまたは複数の品質管理メトリクスを得ることができる。これらの品質管理メトリクスを用いて、1つまたは複数の推定コピー数値の統計的信頼度を求めることができる。

【0170】

計算モジュール540は、いくつかの実施形態では、品質管理方針を1つまたは複数の計算または決定値に適用して、プレートが所定の品質管理チェックに合格するかどうか、かつ/または検体もしくは試料が所定の品質管理チェックに合格するかどうかを判定し得る。いくつかの実施形態では、計算モジュール540は、計算または決定値を1つまたは複数の所定の閾値および/または値の範囲と比較することにより、プレートおよび/または検体が所定の品質チェックに合格するかどうかを判定する。いくつかの実施形態では、品質管理方針は、プレートまたは検体に関する閾値および値の範囲の必要条件のそれぞれを含み得、他の実施形態では、各品質管理方針は、特定の閾値および値の範囲の必要条件を含み得る。例えば、品質管理方針は、4複製検体間の変動係数が所定の閾値を下回ることを要求し得る。この閾値は、いくつかの実施形態では、0.15であり得る。他の実施形態では、品質管理方針は、プレートが、所定の値を上回る2コピー試料の数；所定の値を下回る4複製検体間の標準偏差；所定の値を上回るまたはそれに等しい平均確定信頼度値を有し；かつ各対照試料が特定のコピー数の確定を有することを要求し得る。

10

【0171】

ストレージリポジトリ530は、いくつかの実施形態では、記憶装置、計算デバイスまたはコンピュータ可読媒体であり得る。1つの実施形態では、ストレージリポジトリ530は、メモリリポジトリ、計算デバイスまたは本明細書で述べたコンピュータ可読媒体であり得る。ストレージリポジトリ530と分析510システムに含まれるモジュールのいずれかとの通信は、ネットワーク、通信バスまたは結線により行われ得る。いくつかの実施形態では、ストレージリポジトリ530は、計算モジュール540により得られ、計算または決定された情報をメモリに読み込み得る。このデータは、遠隔計算機、分析システム510内のコンピュータ、分析システム510内のモジュール、または分析システム510内のモジュールもしくはコンピュータと通信する外部媒体デバイスによりアクセスされ得る。

20

【0172】

1つの実施形態では、計算モジュール540は、参照データ、校正データ、レポートテンプレートおよび他の情報にアクセスするためにストレージリポジトリ530と通信し得る。計算モジュール540は、読み出された情報を用いて、本明細書で述べた方法およびシステムをさらに実施し、かつ/または計算モジュール540により得られ、計算または決定された情報のいずれかを示すディスプレイ出力を発信する。計算モジュール540は、報告内容を発信し、いくつかの実施形態では、当報告内容をストレージリポジトリ530に保存する。

30

【0173】

いくつかの実施形態では、分析システム510内で動作するエンコーダーは、当情報をストレージリポジトリ530に保存する前に受信情報を暗号化し、符号化または圧縮し得る。さらに他の実施形態では、サイクル数および関連情報は、ストレージリポジトリ530上の表、データベースまたはリストに保存され得る。

40

【0174】

分析システム510内で動作するディスプレイモジュール560は、ストレージリポジトリ530および/または計算モジュール540から報告データもしくは他の出力データを得ることができる。1つの実施形態では、ディスプレイモジュール560は、得られた報告データおよび出力データをディスプレイするために報告、ユーザインターフェースおよび他のディスプレイテンプレートを発生し得る。出力データは、いくつかの実施形態では、入力デバイス550から得られたあらゆる情報および計算モジュール540により計算または決定されたあらゆる情報を含み得る。ディスプレイモジュール560は、いくつかの実施形態では、ブラウザー、フォームジェネレーター(form generator)

50

r s) またはユーザへのディスプレイのためにデータを得、フォーマットすることができる他のプログラムを含み得る。

【0175】

いくつかの実施形態では、ディスプレイモジュール560は、ディスプレイデバイス570および/または他の出力デバイス555と連動し得る。ディスプレイモジュール560は、受信報告および出力データをディスプレイデバイス570でのディスプレイのためにフォーマットし得る。1つの実施形態では、ディスプレイモジュール560は、出力デバイス555が出力シグナルを発信するために用いることができるフォーマットに出力データおよび報告データをフォーマットすることができる。

【0176】

ディスプレイデバイス570は、いくつかの実施形態では、あらゆるディスプレイデバイスであり得る。他の実施形態では、ディスプレイデバイス570は、本明細書で述べたあらゆるディスプレイデバイスであり得る。例えば、ディスプレイデバイス570は、ディスプレイ画面を有し、ディスプレイモジュール560により発信されたディスプレイを描画し、描画された画像をユーザに示すことができるモニター、手持ちサイズコンピュータまたは他の機械もしくはデバイスであり得る。図4に分析システム510と連通しているディスプレイデバイス570を示すが、いくつかの実施形態では、ディスプレイデバイス570は、分析システム510に含まれ得る。さらなる実施形態は、ディスプレイデバイス570を含むディスプレイモジュール560を含む。

【0177】

いくつかの実施形態では、出力デバイス555は、音声、視覚またはユーザの知覚可能な他のシグナルをユーザに出力するために用いることができる。出力デバイス555がディスプレイモジュール560からデータを受信する場合、いくつかの実施形態では、出力デバイス555は、プレートおよび/または検体が品質管理メトリクスのそれぞれに合格したかどうかを示すために警報を鳴らすか、または1つもしくは複数の発光ダイオードもしくは他の光源を発光させ得る。例えば、出力値がプレートが品質管理メトリクスの1つに不合格であることを示すものである場合、出力デバイス555は、不合格を示すLEDを点灯させ得る。他の実施形態では、出力デバイス555は、プレートが品質管理メトリクスの1つに不合格である場合、デジタルメッセージを出力するか、または警報を鳴らし得る。

【0178】

図5Bにプレート品質管理方針を1つまたは複数の品質管理メトリクスに適用する方法630の1つの実施形態を示す。いくつかの実施形態では、分析システム510内で動作する計算モジュール540またはデータ分析モジュール(図示せず)は、一連の品質管理メトリクスを得(ステップ632)、プレート上のZコピー試料の数(Zは参照遺伝子座のコピーの数で、いくつかの実施形態では2である)が所定の閾値を下回るかどうかを決定する(ステップ636)。Zコピー(例えば、2コピー)試料の数が閾値を下回る場合、計算モジュール540または他のモジュールは、プレートが不合格であったことを示すフラグを出力する(ステップ644)。Zコピー試料の数が所定の閾値を下回らない場合、モジュールは、Zコピー試料の標準偏差が所定の閾値を上回るかどうかを決定する(ステップ638)。標準偏差が閾値より大きい場合、モジュールは、プレートが不合格であったことを示すフラグを出力する(ステップ644)。標準偏差が閾値を超えない場合、モジュールは、Zコピー試料の平均確定が所定の閾値を超えるかどうかを決定する(ステップ640)。平均確定が所定の閾値を超える場合、モジュールは、プレートが不合格であったことを示すフラグを出力する(ステップ644)。平均確定が所定の閾値を超えない場合、モジュールは、対照試料が正しいコピー数の確定を有するかどうかを決定する(ステップ634)。モジュールが対照試料のコピー数の確定が所定の閾値を下回っていると判断した場合、モジュールは、プレートが不合格であったことを示すフラグを出力する(ステップ644)。さもなければ、モジュールは、プレートが合格であったことを示すフラグを出力する(ステップ642)。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 9 】

図 5 B にまたより詳細にさらに言及すると、1つの実施形態では、方法 6 3 0 は、計算モジュール 5 4 0 により行われ得る。他の実施形態では、方法 6 3 0 は、次のモジュールのいずれかの組合せにより行われ得る：分析システム 5 1 0 内で動作する計算モジュール 5 4 0；分析システム 5 1 0 内で動作するデータ分析モジュール（図示せず）；または分析システム 5 1 0 内のプロセッサにより動作させられる他のモジュール。

## 【 0 1 8 0 】

図 5 B に後の各ステップが、プレートが前のステップの品質管理試験に合格することを要求するような、各ステップが連続的である方法 6 3 0 の 1つの実施形態を示す。他の実施形態では、各ステップは、当該ステップの実行が、プレートが前のステップにおける品質管理試験に合格したという判断に依存しないような独立であり得る。さらに他の実施形態では、方法 6 3 0 内のステップの群は、互いに依存し得るが、ステップの第 2 の群は、それらの実行が方法に含まれる他のステップの結果に依存しないような完全に独立であり得る。

10

## 【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態では、分析システム 5 1 0 内で動作するモジュールは、一連の品質管理メトリクスを読み出す（ステップ 6 3 2）。モジュールは、いくつかの実施形態では、計算モジュール 5 4 0 であり得る。いくつかの実施形態では、モジュールは、品質管理メトリクスを計算し得るが、他の実施形態では、モジュールは、ストレージリポジトリ 5 3 0 から品質管理メトリクスを入手し得る。いくつかの実施形態では、モジュールは、品質管理メトリクスの一部を計算し、品質管理メトリクスの一部をストレージリポジトリ 5 3 0 から入手し得る。

20

## 【 0 1 8 2 】

プレートが特定の品質管理試験に合格したかどうかについて判断をくだす実施形態は、プレートが特定の品質管理試験に不合格である場合にフラッグまたは他の表示を出力するステップ（ステップ 6 4 4）を含み得る。いくつかの実施形態では、フラッグは、試験不合格を示すデータベース入力、フラッグ、シグナル、構成設定または他の変数を含み得る。このフラッグは、いくつかの実施形態では、さらなる品質管理メトリクスを試験することを続けるかどうかを決定するために計算モジュール 5 4 0 により使用され得る。他の実施形態では、計算モジュール 5 4 0 は、計算モジュール 5 4 0 により発信される報告データの内容にフラッグを示し得る。ディスプレイモジュール 5 6 0 が、プレートが分析システム 5 1 0 により行われる品質管理試験に合格したかどうかを示す出力ディスプレイを発信する場合、プレートが関連する方針に含まれる各実施試験に合格したかどうかを示すユーザが知覚できるディスプレイを発生させるためにフラッグを用いることができる。

30

## 【 0 1 8 3 】

不合格のプレートは、いくつかの実施形態では、不良な質のコピー数推定値を示す品質管理メトリクスを有するプレートである。したがって、不合格プレートは、プレート上の検体に関する計算コピー数推定値がはずんでおり、したがって、コピー数推定を行うことができないことを示し得る。

## 【 0 1 8 4 】

計算モジュール 5 4 0 は、いくつかの実施形態では、2コピーを有するプレート上の試料の数が所定の値を下回っているかどうかを決定し得る（ステップ 6 3 6）。いくつかの実施形態では、計算モジュール 5 4 0 は、プレート上の各試料ごとのコピー数の推定値を得ることができる。このリストを用いて、モジュールは、いくつかの試料がコピー数 2 を有するかを決定し得る。2コピーを有する試料の数が所定の閾値を下回る場合、プレートは、不合格とみなされる（ステップ 6 4 4）。いくつかの実施形態では、計算モジュール 5 4 0 により行われる判断は、2コピー数試料または検体の数を決定する本明細書で述べた決定であり得る。1つの実施形態では、所定の閾値は、システム 5 1 0 にハードコーディングされた経験的に定められた値であり得る。さらに他の実施形態では、所定の閾値は、歴史的データに基づいて動的に定められた値であり得る。

40

50

## 【0185】

1つの実施形態では、計算モジュール540は、2コピー試料の平均値の標準偏差を得ることができる。標準偏差は、いくつかの実施形態では、本明細書で述べた標準偏差であり得る。モジュールが、標準偏差が所定の閾値を上回っていると判断する（ステップ638）場合、モジュール540は、プレートを不合格にし得る（ステップ644）。

## 【0186】

他の実施形態では、計算モジュール540は、2コピー試料の平均コピー推定値の測定信頼度が所定の閾値を下回るかどうかを決定し得る。測定信頼度が所定の閾値を下回る場合、モジュール540は、プレートを不合格にし得る（ステップ644）。

## 【0187】

さらに他の実施形態では、計算モジュール540は、対照試料または検体が正しいコピー数の確定を有するかどうかを決定し得る（ステップ634）。この判断は、本明細書で述べた計算または決定のいずれかを用いてくだされ得る。1つの実施形態では、対照試料が正しいコピー数の確定を有するかどうかを決定するステップは、コピー数の確定が所定の閾値を下回るかどうかを決定するステップを含み得る。確定が閾値を下回る場合、モジュール540は、プレートを不合格にし得る（ステップ644）。

## 【0188】

いくつかの実施形態では、計算モジュール540または他のモジュールは、プレートが品質管理試験のそれぞれに合格したことを示すフラグを出力し得る（ステップ642）。品質管理方針のそれぞれを適用することにより、そしてプレートが要求される基準のそれぞれを満たしていたと判断することにより、モジュールは、プレートが合格したことを示すフラグ、シグナルまたは他の表示を出力し得る。図5Bにプレート合格フラグを出力する方法630を示すが、いくつかの実施形態では、方法630は、モジュールがプレート合格フラグを出力するステップを含まないことがあり得る。

## 【0189】

図5Cに検体の品質管理を実施する方法660の1つの実施形態を示す。いくつかの実施形態では、計算モジュール540は、記述したステップのいずれかを実施し得る。方法660を実施するモジュールは、一般的にモジュールと呼ばれる。いくつかの実施形態では、モジュールは、一連の品質管理メトリクスを得て（ステップ662）、参照遺伝子または遺伝子座に関するサイクル数が所定の閾値を超えているかどうかを決定する（ステップ664）。モジュールは、次に参照遺伝子または遺伝子座に関する勾配が所定の範囲外にあるか否かを決定する（ステップ668）。次に計算された変動係数が所定の閾値より大きいかまたは等しいかどうかに関する判断をくだす（ステップ670）。モジュールは、計算された測定の信頼度が所定の閾値を下回るかどうか（ステップ672）および計算された確定の信頼度が所定の閾値を下回るかどうか（ステップ678）をさらに判断する。モジュールが上述の条件のいずれかが当該検体について真である場合、モジュールは、検体が不合格であったことを示すフラグを出力し（ステップ676）、さもなければ、モジュールは、検体が合格したことを示すフラグを出力し得る（ステップ674）。

## 【0190】

図5Cにまたより詳細にさらに言及すると、1つの実施形態では、方法660は、計算モジュール540により実施され得る。他の実施形態では、方法660は、次のモジュールのいずれかの組合せにより行われ得る：分析システム510内で動作する計算モジュール540；分析システム510内で動作するデータ分析モジュール（図示せず）；または分析システム510内のプロセッサにより動作させられる他のモジュール。

## 【0191】

図5Cに後の各ステップが、検体が前のステップの品質管理試験に合格することを要求するような、各ステップが連続的である方法660の1つの実施形態を示す。他の実施形態では、各ステップは、当該ステップの実行が、検体が前のステップにおける品質管理試験に合格したという判断に依存しないような独立であり得る。さらに他の実施形態では、方法660内のステップの群は、互いに依存し得るが、ステップの第2の群は、それらの

10

20

30

40

50

実行が方法に含まれる他のステップの結果に依存しないような完全に独立であり得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、分析システム510内で動作するモジュールは、一連の品質管理メトリクスを読み出す(ステップ662)。モジュールは、いくつかの実施形態では、計算モジュール540であり得る。いくつかの実施形態では、モジュールは、品質管理メトリクスを計算し得るが、他の実施形態では、モジュールは、ストレージリポジトリ530から品質管理メトリクスを入手し得る。いくつかの実施形態では、モジュールは、品質管理メトリクスの一部を計算し、品質管理メトリクスの一部をストレージリポジトリ530から入手し得る。

【0193】

検体が特定の品質管理試験に合格したかどうかについて判断をください実施形態は、検体が特定の品質管理試験に不合格である場合にフラッグまたは他の表示を出力するステップ(ステップ676)を含み得る。いくつかの実施形態では、フラッグは、試験不合格を示すデータベース入力、フラッグ、シグナル、構成設定または他の変数を含み得る。このフラッグは、いくつかの実施形態では、さらなる品質管理メトリクスを試験することを続けるかどうかを決定するために計算モジュール540により使用され得る。他の実施形態では、計算モジュール540は、計算モジュール540により発信される報告データの内容にフラッグを示し得る。ディスプレイモジュール560が、検体が分析システム510により行われる品質管理試験に合格したかどうかを示す出力ディスプレイを発信する場合、検体が各実施試験に合格したかどうかを示すユーザが知覚できるディスプレイを発生させるためにフラッグを用いることができる。

【0194】

不合格の検体は、いくつかの実施形態では、不良な質のコピー数推定値を示す品質管理メトリクスを有する検体である。したがって、不合格検体は、当検体に関する計算コピー数推定値がはずんでおり、したがって、当検体についてコピー数の確定を行うことができないことを示し得る。

【0195】

1つの実施形態では、モジュールは、各参照遺伝子または遺伝子座ごとのサイクル数値を得て、サイクル数が所定の閾値を下回るかどうかを決定し得る(ステップ664)。モジュールは、いくつかの実施形態では、モジュールが対照遺伝子座のサイクル数が所定の閾値を下回り、かつ/またはサイクル数値の所定の範囲内に入るかどうかを決定するという方針を適用することによってこの判断をくだし得る。対照遺伝子座のサイクル数が閾値を下回る場合、モジュールは、検体が不合格であったことを決定し得る(ステップ676)。さらに他の実施形態では、モジュールは、対照遺伝子座のサイクル数値が所定の上限値を超えると判断することにより、または対照遺伝子座のサイクル数が所定の下限値を下回っている場合に、検体が不合格であったことを決定し得る。

【0196】

いくつかの実施形態では、モジュールは、参照遺伝子勾配が所定の範囲内にあるか否かを決定し得る(ステップ668)。参照遺伝子勾配は、本明細書で述べた勾配であり得る。いくつかの実施形態では、参照遺伝子勾配は、本明細書で述べた式または方法のいずれかを用いて計算しかつ/または決定することができる。参照遺伝子勾配を計算しかつ/または得ることにより、モジュールは、勾配が所定の下限値を下回るかどうかまたは勾配が所定の上限値を超えるかどうかを決定し得る。参照遺伝子勾配が所定の範囲外にある場合、モジュールは、検体が不合格であったことを示すフラッグを出力し得る(ステップ676)。

【0197】

1つの実施形態では、モジュールは、標的または対照遺伝子座の4つの複製検体の変動係数が所定の値を超えるかどうかを決定する(ステップ670)。変動係数は、いくつかの実施形態では、本明細書で述べた方法および式を用いて決定することができる。いくつかの実施形態では、モジュールは、変動係数が所定の閾値より大きくかつ/または等しい

10

20

30

40

50

ことを決定した場合、モジュールは、検体が不合格であったことを示すフラッグを出力し得る（ステップ 676）。

【0198】

モジュールは、さらに他の実施形態では、計算された測定信頼度を得て、計算された測定信頼度の値が所定の閾値を下回るかどうかを決定し得る（ステップ 672）。測定信頼度は、本明細書で述べた測定信頼度の値であり得、本明細書で述べた方法および式のいずれかを用いて計算することができる。いくつかの実施形態では、モジュールが測定信頼度の値が所定の閾値を下回ると判断した場合、モジュールは、検体が不合格であったことを示すフラッグを出力し得る（ステップ 676）。

【0199】

さらに他の実施形態では、モジュールは、計算された確定信頼度の値を得て、値が所定の閾値を下回るかどうかを決定し得る（ステップ 678）。いくつかの実施形態では、確定信頼度の値は、本明細書で述べた確定信頼度の値であり得、本明細書で述べた方法および式のいずれかを用いて計算することができる。いくつかの実施形態では、モジュールは、確定信頼度の値が所定の閾値を下回ると判断した場合、モジュールは、検体が不合格であったことを示すフラッグを出力し得る（ステップ 676）。

【0200】

いくつかの実施形態では、計算モジュール 540 または他のモジュールは、検体が品質管理試験のそれぞれに合格したことを示すフラッグを出力し得る（ステップ 674）。品質管理方針のそれぞれを適用することにより、そして検体が要求される基準のそれぞれを満たしていたと判断することにより、モジュールは、検体が合格したことを示すフラッグ、シグナルまたは他の表示を出力し得る。図 5C に検体合格フラッグを出力する方法 660 を示すが、いくつかの実施形態では、方法 660 は、モジュールが検体合格フラッグを出力するステップを含まないことがあり得る。

【0201】

図 7A ~ 7B に品質管理メトリクスならびに品質管理メトリクスへのプレートおよび検体管理方針の適用の結果ならびに計算モジュール 540 により得られ、確定または計算された他の情報のディスプレイを示す画面コピーを示す。いくつかの実施形態では、図 7A ~ 7B に例示したディスプレイは、ブラウザまたはアプリケーションウィンドウにディスプレイすることができる。他の実施形態は、スマートフォン、PDA または他の携帯端末などの携帯計算デバイスの画面に適合するように描画されたディスプレイを含む。

【0202】

図 6A にプレートが品質管理試験に合格したかどうかを決定するために再検討された品質管理情報をディスプレイするディスプレイ画面を示す。いくつかの実施形態では、次の値を画面上にディスプレイすることができる：参照遺伝子のサイクル数；参照遺伝子のサイクル数が上述の品質管理試験に合格したかどうか；参照遺伝子勾配；参照遺伝子勾配が上述の品質管理試験に合格したかどうか；対照試料およびそれらの状態；プレートにおける 2 コピー試料の平均値；プレートにおける 2 コピー標準偏差。いくつかの実施形態では、ディスプレイは、プレート品質管理試験の結果をユーザに効果的に知らせるのに用いることができる。

【0203】

図 6B にプレートが品質管理試験に合格したかどうかを決定するために分析した品質管理情報をディスプレイするディスプレイ画面を示す。いくつかの実施形態では、次の値を画面上にディスプレイすることができる：コピー数推定値；確定信頼水準；確定信頼度が合格であるか、または不合格であるか；測定信頼水準；測定信頼度が合格であるか、または不合格であるか；試料変動係数レベルおよび変動係数が合格か不合格か。これらの値は、ユーザが、コピー数の推定値が標的患者が特定の疾患を有するか、または有さないかを有効に示すかどうかを決定するのに用いることができる。

【0204】

VI. 診断応用

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本明細書で開示する方法を診断応用に用いる。

【0205】

いくつかの実施形態では、本発明の方法および/またはシステムは、疾患、障害または状態のキャリアとしての状態に関する診断を得るために用いる。例えば、個体は、遺伝病のキャリアとしてスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態では、正常個体は、標的遺伝子座の2コピーを有する。いくつかのそのような実施形態では、標的遺伝子座の1コピーのみ有する個体は、キャリアと診断される。

【0206】

いくつかの実施形態では、本発明の方法および/またはシステムは、出生前診断応用に用いる。例えば、出生前核酸を含む検体（例えば、羊水、羊水/羊膜細胞細胞培養物、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜培養物、母体血液等）は、標的遺伝子座のコピー数についてアッセイすることができる。いくつかの実施形態では、正常個体が標的遺伝子座の2コピーを有するいくつかの実施形態では、検体のゼロのコピー推定値は、胎児が特定の疾患、障害または状態を有するまたは発現する可能性がある兆候として用いることができる。本発明のコピー数の推定方法は、試料の起こりうる不均一性を補償するために変更することができる。例えば、母体血液は、胎児核酸と母体核酸の混合物を含むと予測でき、したがって、母体血液の標的対立遺伝子または標的染色体のみかけのコピー数推定値は、母体のコピー数と胎児のコピー数との中間であり得る。

【0207】

いくつかの実施形態では、コピー数推定値は、親になると予定される個体から得られ、予定される親の遺伝子コピー数推定値によって、推定値は、それらの子供（生まれなかった胎児を含む）についても得られる。例えば、コピー数推定値が1人または複数人の親が遺伝病のキャリアである場合、疾患の優性または劣性の性質によって、胎児のコピー数推定値も得られる。

【0208】

診断は、キャリアおよび疾患状態がほんの数例である種々の態様に関して行うことができる。上で説明したように、本発明の方法およびシステムにより得られる遺伝子コピー数推定値は、例えば、疾患もしくは状態を発現する危険性の変化、特定の疾患もしくは状態の段階に進行する可能性、特定の療法の適用可能性、感染の感受性、免疫機能等を決定するのにもう1つの方法としてまたはさらに有用であり得る。

【0209】

特定の実施形態では、診断を得るために本発明の方法およびシステムを他の診断方法および/またはシステムと組み合わせる、あるいは他の方法は、コピー数推定値に基づく診断を確認するのに用いることができる。例えば、遺伝子コピー数推定値は、配列決定（例えば、点突然変異などの突然変異を特定するため）、核型分析および/または生物学的マーカーの検出および/または定量などの1つまたは複数の手法と組み合わせることができる。

【実施例】

【0210】

（実施例1）

患者のSMN1コピー数を決定するためのTAQMAN（商標）リアルタイムPCR  
この実施例では、TAQMAN（商標）リアルタイムPCRシステムを用いて患者のSMN1コピー数を決定する。

【0211】

実験計画

SMN1エクソン7遺伝子座に隣接する2つのプライマーをPCR増幅に用いる。2つのプライマーの間のSMN1配列を認識するプローブを用いてSMN1のエクソン7からのアンプリコンを検出する。プローブは、FAM発蛍光団で標識されており、TAMRA消光剤を含む。このSMN1特異的FAM-TAMRAプローブは、DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によりPCR増幅の各ラウンドの伸長部分においてSMN1プロ

10

20

30

40

50

ープから放出される。プローブの T A M R A 消光剤からの F A M 発蛍光団の遊離により、熱サイクル内のレーザーが、特定の波長の光を放射するように F A M 発蛍光団を励起することが可能になる。放射される光量は、得られる P C R 産物の量に比例する。

【 0 2 1 2 】

この同じ反応物内に V I C - T A M R A プローブおよびゲノム当たり 2 コピーで常に存在することが既知である参照遺伝子に特異的な適切なプライマーが存在する。V I C 発蛍光団は、F A M 発蛍光団と同じエキソヌクレアーゼ放出およびレーザー励起を受けるが、その発光スペクトルは、F A M の発光スペクトルと区別できる。

【 0 2 1 3 】

温度サイクル機器と組み合わされたソフトウェアを用いて、P C R サイクル数の関数としての累積 F A M および V I C 蛍光データのリアルタイムプロットを行うことができる。蛍光閾値を越えるのに必要なサイクルの数は、C t (サイクル閾値)と呼ばれる。この実施例では、F A M の C t (本明細書で述べた C t<sub>T</sub>に相当する)と V I C の C t (本明細書で述べた C t<sub>R</sub>に相当する)との間の差は、C t である。C t は、2 コピーの S M N 1 を有するすべての試料についてほぼ同じであるはずである。P C R の各サイクルは鋳型を複製するため、1 コピーの S M N 1 を有する D N A 試料は、2 コピーの S M N 1 を有する試料より 1 サイクル大きい C t を有する(すなわち、1 サイクル遅れる)。したがって、1 遺伝子コピーのキャリアについてスクリーニングするために個々の試料の C t 値をすべての試料の平均デルタ

10

【 0 2 1 4 】

20

【化 1 6】

$$\overline{\Delta C t}$$

と比較することは可能である。

【 0 2 1 5 】

対照

無鋳型対照および 4 つの追加アッセイ対照を各プレート上で用いる。各対照は、プレート上に 2 回示される。これらの対照は、確認済み細胞系および/または既知のコピー数の S M N 1 を有する匿名ゲノム検体から得ることができる。具体的には、これらの対照は、次の S M N 1 遺伝子型を有する：0 コピーの S M N 1 (ヌル)、1 コピーの S M N 1 (キャリア)、2 コピーの S M N 1 (推定 1 + 1 正常)、3 コピーの S M N 1 (推定 2 + 1 正常)。

30

【 0 2 1 6 】

無鋳型対照/カクテルブランクは、患者試料を希釈するために用いる 1 0 m M トリス p H 9 . 0 緩衝液である。

【 0 2 1 7 】

材料および方法

【 0 2 1 8 】

【表 2 - 3】

SMN1 および参照遺伝子のリアルタイムPCR用プライマーおよびプローブ

オリゴ名	配列(5'→3')	説明
SMNFP	ATAGCTATTTTTTTTAATTCCTTTATTTTCC 配列 番号 1)	TaqMan アンプリコン用 SMN1/2 フォワード <sup>o</sup> プ ライマー
SMNRP	CTTACTCCTTAATTTAAGGAATGTGAGCA 配列番号 2)	TaqMan アンプリコン用 SMN1/2 リバース <sup>o</sup> プラ イマー
SMN1DL プロー ブ	FAM- AGGGTTTcAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAG - TAMRA 配列番号 3)	SMN1 特異的 TaqMan プローブ <sup>o</sup>
SMN2C プローブ	PTO- AGGGTTTtAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGG, -PO4, 配列番号 4)	SMN2 特異的競合 プローブ、(SMN2 へ の SMN1 プローブの 結合を妨げる)
Smarcc1FP	AGGTACCACTGGAATTGGTTGAA 配列番号 5)	SMARCC1 フォワード <sup>o</sup> プライマー
Smarcc1RP	CATATATTAACCCTGTCCCTTAAAAGCA 配列番号 6)	SMARCC1 リバース <sup>o</sup> プライマー
Smarcc1DL プロ ーブ	VIC-, AGTACAAAGAAGCAGCACGAGCCTCTG, - TAMRA 配列番号 7)	SMARCC1 特異的 プローブ
Supt5FP	CACGTGAAGGTGATTGCTGG 配列番号 8)	SUPT5 フォワード <sup>o</sup> プラ イマー
Supt5RP	CGACCCTTCTATCCACCTACCTC 配列番号 9)	SUPT51 リバース <sup>o</sup> プラ イマー
Supt5DL プローブ	VIC-, CGTTATCCTGTTCTCTGACCTCACCATG -TAMRA, 配列番号 10)	SUPT5 特異的プ ローブ

リアルタイムPCR用試薬

100 μM 保存 PCR プライマー

100 μM 保存 FAM および VIC 二重標識 (DL) プローブ (ABI、光を避けて -  
20 で保存)

100 μM 保存競合的プローブ

2 x TaqMan Universal PCR Master Mix (例えば、AB  
IP/N4364340)

0.2 μmろ過水。

【0219】

TAQMAN (商標) リアルタイムPCR条件

ステップ 1: 50 2分間

10

20

30

40

50

ステップ 2 : 9 5 1 0 分間  
 ステップ 3 : 9 5 1 5 秒間  
 ステップ 4 : 6 0 1 分間  
 ステップ 5 : ステップ 2 に進む、3 9 回繰り返す  
 終了。

【0220】

(実施例 2)

T A Q M A N (商標) P C R データに基づく S M N 1 のコピー数の決定

C t 値は、例えば、実施例 1 に従って実施されたリアルタイム P C R 実験から得られるシグナル対時間の曲線から得ることができる。プレート上の各複製物について、C t<sub>R</sub> (参照遺伝子座のサイクル数) および C t<sub>T</sub> (標的遺伝子座のサイクル数; この実施例では、S M N 1) が所定の閾値に達するのに必要なサイクル数として得られ、C t が式 1 に従って計算される。

10

【0221】

【化 1 7】

$$(式 1) \quad \Delta Ct \equiv Ct_R - Ct_T$$

表 3 に同じプレート上の多数の複製物の C t の具体例としての計算を示す。一般的に、表 3 に示すより多くの複製物が各プレートに用いられる。

20

【0222】

【表 3 - 1】

表 3 : プレート上の複製物の具体例としての C t の計算

ウェル	$\approx Ct_r$	$\approx Ct_t$	$\approx \Delta Ct$
1	24.1	24.2	-0.1
2	23.8	23.7	0.1
3	24.5	24.6	-0.1
4	23.7	23.9	-0.2
5	23.8	24.3	-0.5
6	24.0	24.2	-0.2
7	24.4	24.3	0.1
8	24.1	25.2	-1.1
9	23.9	23.8	0.1
10	24.2	24.4	-0.2

30

次にキャリブレーション値

【0223】

【化 1 8】

$$\Delta \bar{Ct}$$

を式 4 に従って C t 値の 8 0 % 刈り込み平均として計算する。表 3 における C t 値について、

40

【0224】

【化 1 9】

$$\Delta \bar{Ct}$$

は、値の中間 2 0 % (例えば、- 0 . 1 および - 0 . 2 ) を有するウェルの平均 C t 値となる。言い換えれば、プレートの

【0225】

【化 2 0】

$\Delta \bar{C}_t$

は、約 - 0 . 1 5 となる。

【 0 2 2 6】

次にコピー数を次の線形目盛により各ウェルについて推定する：

【 0 2 2 7】

【化 2 1】

$$\text{(線形目盛)} \quad T_{C_t} = Z \cdot 2^{(\Delta C_t - \Delta \bar{C}_t)}$$

10

例えば、ウェル 1 について、SMN 1 のコピー数 ( $T_C$ ) は、

【 0 2 2 8】

【化 2 2】

$$T_C \cong 2 \cdot 2^{(0.1 - (-0.15))} \cong 2 \cdot 2^{(0.05)} \cong 2 \cdot 1.035 \cong 2.07$$

と推定される。

【 0 2 2 9】

ウェル 8 について、SMN 1 のコピー数 ( $T_C$ ) は、

【 0 2 3 0】

【化 2 3】

20

$$T_C \cong 2 \cdot 2^{(-1.1 - (-0.15))} \cong 2 \cdot 2^{(-0.95)} \cong 2 \cdot 0.518 \cong 1.04$$

と推定される。

【 0 2 3 1】

(実施例 3)

SMN 1 遺伝子のコピー数の推定値の質の評価

この実施例では、SMN 1 遺伝子のコピー数の推定値の質をアルゴリズムおよび品質管理メトリクスを用いて評価する。

【 0 2 3 2】

この実施例で述べるアルゴリズム計算の概要を図 5 A に示す。図 5 A に示すように、96 検体のそれぞれ 4 複製物を含む 1 つまたは複数の 384 ウェルプレートにおける T A Q M A N (商標) 実験からの Ct データを用いて、96 検体のコピー推定値を得ることができる。各試料について遺伝子コピー数の推定を行う。アルゴリズムは、プレート上のすべてのウェルについて Ct 値 (SMN 1 プロブと参照遺伝子プロブとの Ct の差) を計算する。コピー数の推定値は、その後、参照遺伝子キャリプレートに依存する PCR 増幅の指数関数モデルに基づいて得られる。キャリプレートは、2 つの SMN 1 コピーを有する試料の SMN 1 と参照遺伝子との平均 Ct の差であり、プレート Ct 値の 80% 刈り込み平均として計算される。計算の最終のステップにおいて、各試料についてのコピー数の推定値を 4 つの反応にわたる平均値として計算する。

30

【 0 2 3 3】

図 5 B にコピー数の推定値の質を評価するために用いたプレート品質管理の概要を示す。プレートの全般的な質を 2 つの方法で評価する。第一に、対照試料におけるコピー数の値をそれらの既知の値と照査する。対照試料のデータの質または計算されたコピー数が既知の値と一致しない場合、プレートは不合格である。第二に、2 遺伝子コピー試料の数がバリデートされた閾値より少ない、または 2 遺伝子コピー試料の標準偏差がバリデートされた閾値を上回る場合、または 2 コピー試料の平均コピー数推定値の測定信頼度がバリデートされた閾値を下回る場合、プレートは不合格である。

40

【 0 2 3 4】

図 5 C にコピー数の推定値の質を評価するために用いた検体品質管理 (QC) の概要を示す。5 つの QC メトリクスを各検体について得る。最初の 3 つのメトリクスは、分析す

50

るデータの質を評価するものである。複製反応から得られる参照遺伝子 Ct 値、参照遺伝子増幅曲線勾配および確定の変動係数 (CV) をバリデートされた閾値と対照して評価する。これらのいずれか 1 つの結果がバリデートされた閾値外にある場合、試料は不合格である。各試料の結果の信頼度は、2 つの統計メトリクス、すなわち確定信頼度および測定信頼度により測定する。これらのメトリクスは、プレート上の試料間および試料内変動に基づいて、得られるコピー数の推定値の信頼度を与える。

【0235】

S MN 1 試験データ分析モジュールの記述ならびにモジュールにおける確定推定値 ( `call estimates` ) の計算の詳細な説明書を下に示す。

【0236】

10

I . S MN 1 試験データ分析モジュール  
内容の要約

A . データ分析品質管理メトリクス

1 . プレート品質管理

2 . 試料品質管理

B . データ分析アルゴリズム

1 . エラーの取扱い

2 . データ入力

3 . 試料名処理

4 . 勾配計算

20

5 . 勾配 QC および Ct QC

6 . デルタ Ct の計算、ウェル複製の平均および中央値洗練法

7 . 測定信頼度

8 . 試料変動係数

9 . 2 コピー数平均値および標準偏差

10 . 試料の種類調整

11 . 確定信頼度

12 . 対照の QC 試験

13 . モジュール出力

C . データ分析モジュール出力フォーマット

30

1 . プレート QC

2 . 試料 QC

D . 運営 QC に関する勧告

E . データ分析モジュール出力フォーマット

F . データ分析実行可能ファイル

1 . 実行時要件

2 . コマンドラインフォーマット

3 . 入力

4 . 出力

G . 構成ファイル

40

H . コピー数限界の計算

I . `Matlab` コンパイル要件

【0237】

A . データ分析品質管理メトリクス

1 . プレート品質管理

プレート品質管理は、対照試料が指定のとおり機能することを保証し、データ分析モジュールに必要な情報がプレートに存在することを検証するものである。

【0238】

対照試料 QC :

a . 参照遺伝子 Ct 検査 : プレート QC は、対照試料の各反応における参照遺伝子 Ct

50

が指定の閾値（構成ファイルにおける30）より低いことを検証する。対照試料ウェルが閾値を上回るまたは等しい参照遺伝子Ctを有する場合、プレート警報が不合格対照試料ウェルのリストとともに発信される。ブランク対照は除外される。

【0239】

b. 参照遺伝子勾配検査：プレートQCは、対照試料の参照遺伝子蛍光曲線の勾配が4反応のそれぞれの指定の限界（構成ファイルにおける[0.15、0.55]）内にあることを検証する。対照試料ウェルが指定の限界外の参照遺伝子勾配を有する場合、プレート警報が不合格対照試料ウェルのリストとともに発信される。ブランク対照は除外される。

【0240】

c. 対照試料確定検査：プレートQCは、対照試料のコピー数の推定値が、正しいコピー数値の測定信頼性試験（信頼度99.99%）、確定信頼性試験（信頼度99.99%）および試料CV試験（0.15）に合格することを検証する。対照試料のいずれかが測定信頼性試験に合格しない場合、プレート警報が不合格対照試料のウェルのリストとともに発信される。ブランク対照は除外される。

【0241】

統計的手法を適用する前に用いるプレート全体のQC検査：

d. 2コピー試料の数：プレートQCは、参照遺伝子Ct、参照遺伝子勾配、測定信頼性、確定信頼性および試料CV試験に合格した2コピー試料（良質試料）の数が統計分析に十分であることを確認する（20試料）。2コピー試料の数は、データ分析モジュールによりエクスポートされる。2コピー試料の数が閾値より少ない場合、プレート警報が発信される。

【0242】

e. 2コピー試料の平均値：プレートQCは、良質2コピー試料の平均値が測定信頼性試験に合格することを検証する。そうでない場合、プレート警報が発信される。平均値は、データ分析モジュールによりエクスポートされる。

【0243】

f. 2コピー試料の標準偏差：プレートQCは、良質2コピー試料の標準偏差が指定の閾値（0.1）より小さいかどうかを確認する。それが閾値より大きいか、または等しい場合、プレート警報が発信される。標準偏差は、データ分析モジュールによりエクスポートされる。

【0244】

2. 試料品質管理

以下のQC検査は、対照試料を含むプレート上の各試料について実施する。

【0245】

a. 参照遺伝子Ct検査：試料QCは、4ウェルのそれぞれの参照遺伝子Ctが指定の閾値（30）より小さいことを検証する。試料ウェルが閾値を上回るか、または等しい参照遺伝子Ctを有する場合、試料警報が不合格ウェルのリストとともに発信される。

【0246】

b. 参照遺伝子勾配検査：試料QCは、参照遺伝子蛍光曲線の勾配が4ウェルのそれぞれについて指定の限界（[0.15、0.55]）内にあることを検証する。試料ウェルが指定の限界外の参照遺伝子勾配を有する場合、試料警報が不合格ウェルのリストとともに発信される。

【0247】

c. 試料CV検査：試料QCは、コピー数の推定値の4反復測定間の試料CVを計算する。試料CVが指定の閾値（0.15）より大きいか、または等しい場合、試料警報が発信される。

【0248】

d. 測定信頼度：試料QCは、測定信頼度推定値を計算する。測定信頼度は、試料コピー数推定値がコピー数限界内にある統計的信頼レベルである。信頼度が指定の閾値（99

10

20

30

40

50

% )より低い場合、試料警報が発信される。

【0249】

e. 確定信頼度：試料QCは、確定信頼度を計算する。確定信頼度は、試料が出力で報告されたSMN1遺伝子コピーの数を有する統計的信頼レベルである。確定信頼度が指定の閾値(99.99%)より低い場合、試料警報が発信される。

【0250】

B. データ分析アルゴリズム

データ分析の作業の流れのこの記述は、SMAデータ分析モジュールにおいて実行されるアルゴリズムのステップに従う。アルゴリズムには生データの処理、統計分析およびQC分析という3つの基本的な部分が存在する。

【0251】

1. エラーの取扱い

データ分析モジュールは、エラーメッセージをログファイルにエクスポートする。ログファイルの名称は、次の命名法に従い、「SMADALog」接頭辞で始め、Ctデータファイル名を続ける。Ctデータファイル名がアルゴリズム引数に指定されていない場合、モジュールは、ログファイル「SMADALog\_Default.txt」を作る。モジュールがデータの処理に成功した場合、ログファイルは空である。アルゴリズムがエラーまたは予期しない中間結果に遭遇した場合、アルゴリズムは、計算を停止し、ログファイルにエラーメッセージを書き込む。

【0252】

2. データ入力

SMAデータ分析モジュールは、2つの入力データファイル、TaqManからのCtデータおよびTaqManからのクリップデータを必要とする。ファイルは、標準ABIフォーマットであるべきである。モジュールは、データ入力をCtデータファイルから始める。モジュールは、「Well」キーワードから始めてラインを検索し、「Well」ラインの後に384ラインを入力する。これらは、FAM Ct測定である。モジュールは、FAMを処理した後、「Well」キーワードを再び検索し、当キーワードの後に他の384テキストラインをインポートする。これらは、VIC Ct測定である。Ctデータファイルにおけるラインが3つの変数、すなわち、試料名、リポーターおよびCtについて分析される。すべての非数値Ctが40に変換される。

【0253】

クリップデータファイルは、タブ区切りファイルとして読み取られる。モジュールは、ブロックAS3...CF770を読み取る。このブロックは、40サイクルにわたる384ウェルにおける2チャンネルのデルタ蛍光測定を含む。ブロックにおけるセルは、数値を含まなければならない。

【0254】

モジュールが2つのデータファイルのいずれかを開けることができない場合、モジュールはエラーメッセージを発信し、データ処理を停止する。アルゴリズム処理の前にウェルを省略することはできない。

【0255】

3. 試料名の処理

Ctデータファイルから試料名を読み取った後、アルゴリズムは、名称を試料ID、試料の種類およびウェル位置について分析する。アルゴリズムは、試料名を垂直バー「|」により分割する。第1の垂直バーの前の文字列が試料IDとして割り当てられ、第1の垂直バーと第2の垂直バーとの間の文字列が試料の種類として割り当てられ、第2の垂直バーの後の文字列が捨てられる。空のウェルは、Ctデータファイルにおける空の試料名“ ”を有するべきである。試料の種類の識別子は、次の試料の種類の表記規則に従うべきである：BLDPER、BLOODSPOT、MOUTHWASH、AMNIO、CULTAFCEL、CVS、CVSCULT、CORDBLOOD。空の試料の種類は、SUREとする。認識できない試料の種類は、BLDPERとするが、含めない。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 5 6 】

## 4. 勾配の計算

V I Cチャンネルについての勾配の計算は、C tデータファイルに報告されたC t測定に最も近い3つのサイクル測定に基づいて行う。計算のための式は次のとおりである。

## 【 0 2 5 7 】

## 【化24】

$$S = \frac{Y_3 - Y_1}{2}$$

ここでY 1、Y 2、Y 3は、3つ（対数変換、バックグラウンド正規化）のデルタ蛍光測定値である。

## 【 0 2 5 8 】

## 5. 勾配QCおよびC tQC

アルゴリズムは、参照遺伝子チャンネル（V I C）における勾配およびC t測定をチェックする。勾配またはC t値がQCメトリクスに合格しない場合、モジュールは、対照試料を含む各試料に関する試験結果を発信する。このQC試験に不合格であった試料について、アルゴリズムは、QCメトリクス不合格のウェルを記録する。

## 【 0 2 5 9 】

## 6. デルタC tの計算、ウェル複製の平均および中央値洗練法

アルゴリズムは、V I C C t値からF A M C t値を差し引くことによりデルタC tを計算する。対照アンプリコンのそれぞれについて、アルゴリズムは、経験的分布のテイルにおける観測値の80%を刈り込むまたは計算から除外する、検体試料のV I CチャンネルとF A Mチャンネルとの間の刈り込み平均デルタC tを計算する（対照および空ウェルはこの計算から除外される）。刈り込み平均値に基づいて、アルゴリズムは、式5（線形目盛）および式6（log目盛）に従ってlogおよび線形目盛上でコピー数の推定値を得る。

## 【 0 2 6 0 】

## 【化25】

線形目盛  $T_{Ct}i = 2 \cdot 2^{(ACt - \overline{ACt})}$

(Log目盛)  $T_{Ct} = 2 + \Delta Ct - \overline{\Delta Ct}$

プレートが完全である場合、アルゴリズムは、log目盛上でコピー数の推定値の中央値洗練を行う。完了後、モジュールは、行または列のいずれかが0.2単位超調整されたかをチェックする。それらの複製行または列が中央値洗練カットオフにも適合しない場合、これらの行および列についての調整が取り消される。列1および2は、洗練から常に除外される。行および列数は、プレートQC出力に報告される。

## 【 0 2 6 1 】

線形目盛上のコピー数推定値は、調整を含めるために中央値洗練の後に再生される。

## 【 0 2 6 2 】

各試料の4つのウェルについてのコピー数の推定値をこの時点に平均する。コピー数の確定は、2つの適用除外を設けて平均コピー数推定値を四捨五入することにより計算する。ブランク対照のコピー数の確定は、“-”に既定値として設定される。コピー数の確定は、3に制限され、3より大きい確定は、3コピーで置き換えられる。プレート上の各試料に関する平均値および標準偏差は、logおよび線形目盛で保存される。

## 【 0 2 6 3 】

## 7. 測定信頼度

この計算のために、4複製ウェルにわたる試料平均の正規性の仮定を設ける。測定信頼度は、個々の試料のコピー数限界内に適合するようなコピー数推定値（4ウェルにわたり平均した）の周りの最大の正規信頼区間として決定する。言い換えると、測定信頼度は、

10

20

30

40

50

各標本または対照についての4つの複製の測定値の間の変動および平均値に注目する。それは、試料内変動の尺度である。正規分布のパラメータは、次のとおりである：平均値は、線形目盛上の4つのウェルにわたる平均コピー数推定値である。標準偏差は、平均値の標準誤差である。限界は、構成ファイルに指定されているコピー数限界である。試料QC手順は、測定信頼度が試料が良質であるのに十分に高いかどうかを確認するものである。測定信頼度がカットオフより低い場合、この試料の測定信頼度QCメトリクスは、不合格である。

【0264】

測定信頼度および測定信頼度QC試験の状態が出力ファイルにエクスポートされる。

【0265】

8. 試料変動係数

試料CVは、線形目盛で計算され、4複製物間の試料標準偏差と試料平均値との比である。ゼロコピー試料の試料CVは、ゼロで割ることが起こり得るため、別に計算する。ゼロコピー数試料の試料CVは、試料標準偏差と平均値プラス1との比として計算する。試料QC手順は、試料CVが構成ファイルに指定されている閾値より低いかどうかをチェックする。CVが試料CV QCメトリクスより大きいか、または等しい場合、試料CV QCメトリクスは、この試料について不合格である。

【0266】

試料CVおよびCV QC試験の状態は、出力ファイルにエクスポートされる。

【0267】

9. 2コピー数平均値および標準偏差

確定の信頼度の値を得るために、アルゴリズムは、バックグラウンド変動を計算する。バックグラウンド変動は、2コピー試料の確定推定値の分散である。特定の実施形態では、アルゴリズムにより要求される2コピー試料の特定の数が存在し、この数は、構成ファイルに指定されている。標準偏差および平均値の推定のために、モジュールは、良質の試料のみ、すなわち、以下の要件を満たす試料のみをプールする。

【0268】

(a) VIC Ct、VIC勾配、測定信頼性および試料CV QC試験に合格した

(b) 対照でない

(c) 2コピーのSMN1遺伝子を有すると推定された

(d) 試料の種類がBLDPER

そのような試料の数が閾値を下回る場合、要件(d)を削除し、すべての試料の種類を一緒にプールする。良質の2コピー試料の数がそれらの平均値および標準偏差とともに出力ファイルに報告される。

【0269】

測定信頼度と同様なメトリックが平均値の標準誤差に基づいてこれらの試料の平均について得られる。2コピー試料の平均の周りの信頼度が構成ファイルにおける閾値設定を下回る場合、プレートQCは、2コピー平均試験に不合格である。

【0270】

10. 試料の種類調整

2コピー試料の標準偏差は、確定信頼度の値を得るためにWestにおいて用いられる標準偏差である。異なる試料の種類は試験で異なる変動を示す可能性があるため、標準偏差の調整を構成ファイルに指定することができる。各試料の種類が調整を受け得る。試料の種類に固有の標準偏差を計算するために、調整が推定2コピー試料標準偏差に加えらる。ステップ9で要件(d)が削除される場合、調整は行われぬ。現在、AMNIOおよびCVS標準偏差のみが0.03単位調整される。

【0271】

11. 確定信頼度

確定信頼度は、t検定のp値から計算する。アルゴリズムは、次の仮定を設ける。すなわち、確定推定値が正規分布し、コピー数にわたって等分散を有する。この計算を行うこ

10

20

30

40

50

とができる前に、対照を除く2コピー試料の臨界数(20)が必要とされる。各試料について、アルゴリズムは、隣接コピー数分布の試料のt検定のp値を求める。例えば、2コピー数を有する試料について、アルゴリズムは、1コピー数分布または3コピー数分布のコピー数推定値のp値を計算する。2つのt検定p値を合計し、2つのp値の合計またはゼロもしくは3コピー数の場合には1つのp値を、低信頼度に相当する、1 - 大p値から差し引くことにより、信頼度を計算する。

#### 【0272】

コピー数t分布平均値は、遺伝子コピーの個々の数についてコピー数の推定値のすべてを平均することにより求める。特定の遺伝子コピー数の推定値が存在しない場合、平均値は-2、1、2および2.585と仮定される。コピー数t分布標準偏差は、試料の種類について調整された標準偏差であり、異なる試料の種類で異なる。

10

#### 【0273】

確定信頼度を各試料について計算するとき、確定信頼度QC試験を実施する。確定信頼度が構成ファイルに指定されている閾値より低い場合、確定信頼度試験は、当該試料について不合格である。確定信頼度試験の状態および確定信頼度の値が出力ファイルにエクスポートされる。

#### 【0274】

##### 12. 対照のQC試験

ブランク対照は、QCプロセスのこの部分から除外される。すべての対照試料を参照遺伝子(VICチャンネル)Ct、参照遺伝子勾配、測定信頼度、確定信頼度および試料CVの質について検査する。これらの試料QCメトリクスのいずれかが不合格である場合、プレート警報が不合格ウェルおよび不合格メトリクスのリストとともに発信される。対照試料のコピー数の推定値も予測されるコピー数の値とのそれらの一致について検査する。モジュールは、最終的なSMN1プレートレイアウトに基づいてウェル位置により対照を発見する。

20

#### 【0275】

##### 13. モジュール出力

データ分析モジュールは、プレートQCメトリクスから出力を開始し、試料QCメトリクスおよびデータ分析結果について続ける。対照試料が最初にファイルに書き込まれるように、試料がカラムによりエクスポートされる。空のウェルに関する情報は、出力ファイルにエクスポートされない。

30

#### 【0276】

##### C. 運営QCに関する勧告

特定のQCメトリクスの不合格は、機器、自動化スクリプトまたはアッセイ試薬の最適状態に満たない性能を示し得るものである。下に運営QCグループの緊急対応を必要とし得る不合格のリストを示す。

#### 【0277】

1. プレートQCにおける閾値を超える2コピー試料の標準偏差。このプレートQCメトリックの散発的な不合格は、アッセイ試薬または試薬分注に関連する問題を示す可能性がある。このプレートQCメトリックの一貫性のある不合格は、試薬および器具類の性能品質の再評価のきっかけとなるものである。不合格は、DNA抽出に関連する問題も示し得る。

40

#### 【0278】

2. 非確定(繰返し)試料の百分率。プレート上の繰返し試料の率の25%を超えるスパイク増加は、試薬の性能の最適状態に満たない状態または液体分注/混合に関連する問題を示し得る。プレートバッチの20%を超える一貫した繰返し率は、重要であり、運営QCの緊急対応を必要とし得る。それは、不良な試薬の質または計測ハードウェアもしくはソフトウェアに関連する問題を示す可能性がある。

#### 【0279】

3. 対照の不合格。プレートバッチにおける2つを超える対照試料の一貫した不合格は

50

、重要であり、運営QCの緊急対応を必要とする。全体的なプレート繰返し率が10%未満である場合、それは、対照試料の不合格を示すものである可能性がある。

【0280】

4. 位置不合格。プレート上の特定の位置の試料の一貫した不合格は、運営QCの緊急対応を必要とする。それは、当位置における計測ハードウェアの最適状態に満たない性能を示し得るものである。

【0281】

D. データ分析モジュール出力フォーマット

SMAデータ分析出力は、XMLフォーマットである。それは、プレートQCと試料QCの2つの部分からなる。XMLファイルは、以下の標準フォーマットングラインから始める：

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
```

続いて以下のプレート、試験番号およびモジュールバージョンを有する全体的SmaResults構造：

```
<SmaResults plateNumber="32008" runNumber="123456" moduleVersion="0.2"></SmaResults>
```

プレートQC構造は以下に含まれる：

```
<PlateQc></PlateQc>
```

試料QC構造は以下に含まれる：

```
<SampleQc></SampleQc>
```

1. プレートQC

(a) <VicCt>オブジェクトは、対照試料の参照CT測定試験の状態を表示し、さらに試験が不合格である場合、不合格ウェルをリストする。

(b) <VicSlopes>は、対照試料の参照勾配測定の状態を表示し、試験が不合格である場合、不合格ウェルをリストする。

(c) <ControlCalls>オブジェクトは、対照の状態を表示する。対照確定のいずれかが遺伝子コピーの指定された数と一致せず、試料QCメトリクスのすべてに合格しない場合、不合格対照のウェルが構造の内側に示される。

(d) <MedianPolish>オブジェクトは、中央値洗練法の状態を表示する。非洗練行および列は、あるならば、構造の内側に示される。

(e) <EmpiricalNegative>オブジェクトは、RJプレート上の2コピー試料の数を表示する。数が閾値を下回る場合、試験は不合格である。

(f) <NegativeAverage>オブジェクトは、2コピー試料の平均確定を表示する。平均値とその信頼区間が許容限界外にある場合、試験は不合格である。

(g) <NegativeStdDev>オブジェクトは、2コピー試料の標準偏差を示す。標準偏差が閾値を上回る場合、試験は不合格である。

【0282】

2. 試料QC

a. <Sample>オブジェクトは、プレート上のすべての対照および試験試料をリストする。

b. <Sample>オブジェクトは、個々の試料を含み、以下の情報を表示する。

【0283】

i. sampleIDにおける試料ID | 試料の種類

ii. typeにおける試料の種類(対照、検体)

iii. copyEstimateにおけるコピー数の値

iv. callにおける試料コピー数確定。ブランク対照は、“-”に既定値として設定されたそれらのコピー数の確定を有する。

【0284】

v. callConfidenceCriterionにおける確定信頼度試験の状態

10

20

30

40

50

(合格または不合格)

v i . m e a s u r e m e n t C o n f i d e n c e における測定信頼度

v i i . s a m p l e C v C r i t e r i o n における試料CV試験の状態(合格または不合格)

v i i i . s a m p l e C v における試料CV

i x . V i c C t におけるこの試料のVIC CT試験状態と不合格ウェルのリスト

x . V i c S l o p e s におけるこの試料のVIC 勾配試験状態と不合格ウェルのリスト

x i . F A M における4ウェルのlog10目盛上の試料FAM DeltaRnデータ: ウェルにおけるウェル位置およびサイクル1からサイクル40までのlog10DeltaRn数

x i i . V I C における4ウェルのlog10目盛上の試料VIC DeltaRnデータ: ウェルにおけるウェル位置およびサイクル1からサイクル40までのlog10DeltaRn数

E . データ分析実行可能ファイル(SMADataAnalysis.exe)

SMADataAnalysis.exeは、Win32環境においてコンパイルされるMatlab(Mathworks, Inc)スクリプトである。SMADataAnalysisは、SMN1 TaqManデータについてデータ正規化、確定割り当て(call assignment)および確定信頼度の計算を行う。

【0285】

1. 実行時コンポーネント

a. Matlab実行時ライブラリ。Windows(登録商標)ワークステーションでスクリプトを実行するためにMCRInstaller.exeが必要である。MCRInstaller.exeファイルのバージョンは、スクリプトをコンパイルするために用いられるMatlabのバージョンに適合すべきである。

【0286】

b. SMADataAnalysis.ctf。当ファイルは、スクリプトの実行中に用いられる一連のMatlab機能を含む。このファイルは、SMADataAnalysis.exeホルダーに存在する必要がある。スクリプトの最初の実行時にctfファイルをSMADataAnalysis\_\_merサブホルダーに解凍する。一度サブホルダーが作られる。

【0287】

c. SMADataAnalysis.cfg。当ファイルは、構成ファイルである。それは、プレーンテキスト形式であり、QCメトリクスに関する種々の調整可能な閾値を含む。

【0288】

2. コマンドラインフォーマット

SMADataAnalysis[CD Data File][Clipped Data File][Output File][Plate#][Run#]

a. CD Data Fileは、標準テキスト形式のABI CTデータ出力ファイルである。

【0289】

b. 短縮データファイルは、標準テキスト形式のRnおよびDeltaRn測定を含むABI短縮(clipped)データファイルに相当するものである。

【0290】

c. Output Fileは、出力ファイル名である。

【0291】

d. Plate #は、プレート番号である。

【0292】

e. Run #は、試験番号である。

10

20

30

40

50

## 【0293】

- 3. 入力
  - a. CTデータファイル
  - b. 短縮データファイル
  - c. 出力ファイル名
  - d. プレート番号
  - e. 試験番号
  - f. 構成ファイルからの構成パラメーター。

## 【0294】

## 4. 出力

10

SMADataAnalysis.exeは、以下の2つのファイルに出力を書き込む：

- a. コマンドラインに指定された出力ファイル(SMADataAnalysisOutputfileformat.docにおけるフォーマットの記述を参照)
- b. ログファイル「SMADALog\_\_[CTDataFile]」。ログファイルは、計算中の異常な中間結果および一般的コード実行エラーを登録する。成功裏の実行後にログファイルは空になるべきである。

## 【0295】

## F. 構成ファイル

構成ファイルSMADataAnalysis.cfgは、QCメトリック閾値および他のパラメーターが指定されているテキストファイルである。当ファイルは、以下のラインを有するべきである：

20

VICチャンネルCt閾値：30  
 VICチャンネル勾配範囲：[0.15 0.55]  
 0コピー数確定限界：「-0.01 0.01」  
 1コピー数確定限界：「0.6 1.4」  
 2コピー数確定限界：「1.6 2.4」  
 3コピー数確定限界：「2.43 5」  
 2コピー数経験対照の最小数：20  
 2コピー数標準偏差閾値：0.1  
 試料CV閾値：0.15  
 測定信頼度閾値：0.99  
 確定信頼度閾値：0.9999  
 BLOODSPOTに関する標準偏差調整：0  
 MOUTHWASHに関する標準偏差調整：0  
 AMNIOに関する標準偏差調整：0.03  
 CULTAFCELに関する標準偏差調整：0  
 CVSに関する標準偏差調整：0.03  
 CVSCULTに関する標準偏差調整：0  
 CORDBLOODに関する標準偏差調整：0

30

40

VIC Ct30は、参照遺伝子チャンネルの現在のCt閾値である。

## 【0296】

VICチャンネル勾配範囲の括弧内の範囲は、log10目盛上の参照遺伝子勾配の許容変動範囲である。

## 【0297】

コピー数確定限界は、各種コピー数推定値について括弧内に示す。

## 【0298】

上に示すように、構成パラメーターは、確定信頼度の計算における分散の推定に用いる2コピー試料の最小数、2コピー試料の最大許容標準偏差、最大許容試料CV、許容信頼レベルおよび各種試料の種類についての変動の調整も含む。

50

## 【0299】

## G. コピー数限界の計算

コピー数限界の再計算は、推奨されないが、新たな試薬ロット、新たな機器または実験条件の他の変更について実施することができる。いくつかの実施形態において、0、1、2および3の4つのコピー数のそれぞれについて1つの生物学的検体の30+の個別反応確定推定値が得られる。

## 【0300】

コピー数限界の計算の手順は、以下のとおりである。

## 【0301】

1. 個々の反応の確定推定測定値を標準ベータ分布に適合するように以下のように変換する。 10

## 【0302】

0から0.5までの0コピー確定推定値に2を乗ずる。[0、0.5]間隔外の測定値は捨てる。

## 【0303】

0.5から1.5までの1コピー確定推定値を0.5減じる。[0.5、1.5]間隔外の測定値は捨てる。

## 【0304】

1.5から2.5までの2コピー確定推定値を1.5減じる。[1.5、2.5]間隔外の測定値は捨てる。 20

## 【0305】

2.4から3.4までの3コピー確定推定値を2.4減じる。[2.4、3.4]間隔外の測定値は捨てる。

## 【0306】

2. 変換されたコピー数データセットのそれぞれについて平均値および分散を計算する。

## 【0307】

3. 以下のアルファおよびベータの推定により、個別のベータ分布をコピー数変換データに適合させる。

## 【0308】

## 【化26】

$$\alpha = \mu \left[ \frac{\mu(1-\mu)}{\sigma^2} - 1 \right]; \quad \beta = (1-\mu) \left[ \frac{\mu(1-\mu)}{\sigma^2} - 1 \right]$$

非対称および有界サポートのため、ベータ分布ファミリーをこの手順に選択した。

## 【0309】

4. 4つの分布について0.00005および0.99995百分位数を計算し、百分位数を最初のスケールに逆変換することにより、分布の限界を得る。例えば、2コピー数分布の0.00005および0.99995百分位数に1.5を加える。

## 【0310】

5. 以下のように分布限界を限界境界値と対照してチェックする。 40

## 【0311】

## 0コピー

- ・ 上限は [0.01、0.1] の範囲内
- ・ 下限は負の上限として設定する

## 1コピー

- ・ 上限は [1.4、1.45] の範囲内
- ・ 下限は [0.5、0.6] の範囲内

## 2コピー

- ・ 上限は [2.35、2.4] の範囲内 50

- ・下限は [ 1 . 6、 1 . 6 5 ] の範囲内  
3 コピー
- ・下限は [ 2 . 4、 2 . 5 ] の範囲内
- ・上限は 5 に設定する。

## 【 0 3 1 2 】

限界境界値は、適切な確定推定値範囲が限界により捕捉され、連続したコピー数領域の間に十分に広い未確定の範囲が存在するように設定する。境界値の配置は、試験の開発における確認済みの試料の確定推定値の変動および V e V a に基づいている。

## 【 0 3 1 3 】

I . M a t l a b コンパイル要件

モジュールは、M a t l a b v . R 2 0 0 7 a で成功裏にコンパイルされる。モジュールのコンパイルは、M a t l a b、S t a t i s t i c a l T o o l b o x、M a t l a b C o m p i l e r を必要とする。以下は、モジュールソースコードを含む M a t l a b ファイルのリストである。

## 【 0 3 1 4 】

1 . S M A D a t a A n a l y s i s . m - コマンドラインから呼び出される主スクリプト。

## 【 0 3 1 5 】

2 . S M A A n a l y s i s M o d u l e . m - 主計算スクリプト。これは、S M A D a t a A n a l y s i s . m から呼び出される。

## 【 0 3 1 6 】

- 3 . m e d i a n p o l i s h . m - 中央値洗練関数
- 4 . a l i g n R e p l i c a t e s . m - 複製処理関数 ( r e p l i c a t e s p r o c e s s i n g f u n c t i o n )
- 5 . R e a d C o n f i g . m - 構成ファイルからパラメータ値を読み出すための関数

I I . S M A データ分析モジュールにおける確定推定値の計算の詳細な説明書

デルタ C t は、式 1 に従ってプレート上の各ウェル ( i , j ) について計算する。この場合、参照遺伝子座の T A Q M A N ( 商標 ) プローブを V I C 発蛍光団で標識し、標的遺伝子座の T A Q M A N ( 商標 ) プローブを F A M 発蛍光団で標識する。したがって、各ウェルについての式 1 は以下ようになる。

## 【 0 3 1 7 】

## 【 化 2 7 】

$$\Delta C t_{ij} = C t_{ij}^{VIC} - C t_{ij}^{FAM}$$

1 . 各参照遺伝子についてプレートデルタ C T s ( 対照ウェルを除く ) の 8 0 % 刈り込み平均をとることにより、2 つの参照遺伝子について以下の校正デルタ C T s を計算する :

$C t_{S M A R C C 1} =$  刈り込み平均 (  $C t_{i j}$ 、8 0 ) ; i は S M A R C C 1 ウェルである

$C t_{S U P T 5} =$  刈り込み平均 (  $C t_{i j}$ 、8 0 ) ; i は S U P T 5 ウェルである

各参照遺伝子の刈り込み平均を、当該参照遺伝子に対応するプレート上のウェルにわたって計算する。

## 【 0 3 1 8 】

2 . 各ウェルの l o g 確定推定値の計算 :

$\log C E_{i j} = 2 + C t_{i j} - C t_{S M A R C C 1}$  ; i は S M A R C C 1 ウェルである

$\log C E_{i j} = 2 + C t_{i j} - C t_{S U P T 5}$  ; i は S U P T 5 ウェルである

3 . 各ウェルの確定推定値の計算 :

【 0 3 1 9 】

【 化 2 8 】

$$CE_{ij} = 2^{\log CE_j - 1}$$

4 . 4 つの試料ウェルの確定推定値を平均することにより、各試料についての確定推定値を計算する :

【 0 3 2 0 】

【 化 2 9 】

$$CE_{Sample_i} = \text{平均}(CE_{ij})$$

10

; i、j は 4 つの試料ウェルである

5 . 試料確定推定値を四捨五入することにより、試料確定を計算する :

【 0 3 2 1 】

【 化 3 0 】

$$C_{Sample_i} = \text{四捨五入}(CE_{Sample_i})$$

( 実施例 4 )

S M N 1 遺伝子座における突然変異を確定するためのアッセイ

本実施例では、S M N 1 遺伝子座における突然変異を確定するために追加のアッセイを実施する。この実施例における実験は、実施例 1 で述べたようなリアルタイム P C R 実験と併せて実施する (例えば、同じ組の生物学的検体について実施前、実施中または実施後に)。単一ヌクレオチド多形 ( S N P ) または他の突然変異が「 1 」または「 0 」の S M N 1 コピー数確定の原因であるか否かを決定するために、リアルタイム P C R 実験における S M N 1 アンプリコンに隣接するプライマーを用いて S M N 1 に固有の配列決定を実施する。

20

【 0 3 2 2 】

最初の P C R 増幅の後、P C R 反応物を E x o - S A P ( エキソヌクレアーゼ I - エピアルカリホスファターゼ ) で処理する。双方向配列情報を得るために各 E x o - S A P 精製 P C R 反応物をフォワードおよびリバースユニバーサルプライマー U P 1 および U P 2 を用いて配列決定する。配列決定産物をゲルを通して電気泳動し、A B I 3 1 3 0 配列決定マシンで 3 6 c m アレイおよび P O P 6 ポリマーを用いて分析する。配列の分析は、S E Q S C A P E ( 商標 ) ソフトウェア ( A p p l i e d B i o s y s t e m s ) を用いて実施する。

30

【 0 3 2 3 】

材料および方法

【 0 3 2 4 】

【表 3 - 2】

## 配列決定プライマー

ユニバーサル プライマー	配列(5'→3')	
UP1	GCGGTCGCATAAGGGTCAGT, (配列番号 11)	
UP2	CGCCAGCGTATTCCCAGTCA, (配列番号 12)	
		10
PCR プライマー	配列(5'→3')	
SMN1FP, (U P タグを含 む)	GCGGTCGCATAAGGGTCAGTCCATATAAAGCTATCTATATATAGCT ATCTATGT, (配列番号 13)	
SMN1RP, (U P タグを含 む)	CGCCAGCGTATTCCCAGTCATCTTTATTGTGAAAGTATGTTTCTTCC ACAT, (配列番号 14)	20
SME27FP FAM, (対照反 応)	TCGAGTTCAGCCACTGCCAAGTCAGATCCTTTGGAAGGTTGGAT, 配 列番号 15)	
SME27RP, (対 照反応)	GCTGAAGTCGGTGACGGTTCATCATCCATGGACCTGCCA, ( 配列番号 16)	30

## 配列決定 P C R 条件

ステップ 1 : 9 5 で 5 分間 ( 酵素変性 )  
 ステップ 2 : 9 5 で 3 0 秒間 ( d s D N A の変性 )  
 ステップ 3 : 6 3 で 2 0 秒間 ( アニール )  
 ステップ 4 : 7 2 で 1 分間 ( 伸長 )  
 ステップ 5 : ステップ 2 に進む、さらに 3 7 回  
 ステップ 6 : 7 2 で 1 0 分間 ( 最終伸長 )  
 ステップ 7 : 常時 8  
 終了。

## 【 0 3 2 5 】

( 実施例 5 )

北アメリカにおける主要民族集団における S M N 1 対立遺伝子頻度の推定  
 本明細書で開示した方法およびシステムにより行われるコピー数の確定は、さらなる分  
 析、例えば、集団における対立遺伝子頻度の推定に適用することができる。

## 【 0 3 2 6 】

脊髄性筋萎縮 ( S M A ) は、小児の最も一般的な遺伝性の致命的疾患である。 S M N 1  
 エクソン 7 の喪失に係る様々な遺伝子欠失が、この劣性形質を運ぶ突然変異対立遺伝  
 子の 9 4 % を占めると報告されている。公表文献は、一般集団における 2 5 例中 1 例から  
 5 0 例中 1 例までの S M N 1 突然変異のキャリア頻度を記載している。 S M A は汎民族疾  
 患であると考えられるが、特定の民族のキャリア頻度は不明である。

10

20

30

40

50

## 【0327】

この実施例では、コピー数の推定値を実施例1～3に記載したように得て、北アメリカにおける主要な民族集団における対立遺伝子頻度を推定するのに用いる。アフリカ系アメリカ人、アッシュケナージ系ユダヤ人、アジア人、白人およびヒスパニック集団におけるSMN1突然変異キャリア頻度の正確な評価を行うために、各民族集団における1000を超える匿名検体を、エクソコピー数(SMN1のエクソン7)を測定した臨床的にバリデートされた定量的リアルタイムPCRアッセイを用いて試験した。試料は、SMAの家族歴を有しないと推測され、承認済みプロトコルに従って完全に匿名とされた個体のルーチン臨床試験の後の残存物質から収集した。民族性は、自己報告させた。

## 【0328】

表4に示すように有意なコピー数の差がいくつかの民族間で認められた。1コピーキャリアについては、白人またはアッシュケナージ系ユダヤ人血統の個体からの検体は、アフリカ系アメリカ人およびヒスパニック背景からのものと統計的に異なる頻度を有していた。アフリカ系アメリカ人を除くすべての民族集団について、2コピー遺伝子型が3コピーより5倍以上優勢であった。アフリカ系アメリカ人では、2および3コピー遺伝子型がほぼ同等の頻度を有していた。アフリカ系アメリカ人集団におけるこれらの予期しない結果は、代替法であるマルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)(MLPA)により3コピー試料のサブセット(n=50)を試験することにより確認された。すべてのMLPA試料の結果は、リアルタイムPCR結果と一致していた。

## 【0329】

## 【表4】

表4：種々の民族にわたるSMN1コピー数の頻度

民族性	1コピー		2コピー		3+コピー		合計 n
	n	% (95% CI) <sup>1</sup>	n	% (95% CI)	n	% (95% CI)	
白人	28	<b>2.7%</b> (1.9%, 3.9%)	935	<b>91.0%</b> (89%, 93%)	65	<b>6.3%</b> (5%, 8%)	1028
アッシュケナージ系ユダヤ人	22	<b>2.2%</b> (1.5%, 3.3%)	827	<b>82.5%</b> (80%, 85%)	153	<b>15.3%</b> (13%, 18%)	1002
アジア人	18	<b>1.8%</b> (1.1%, 2.8%)	897	<b>87.3%</b> (85%, 89%)	112	<b>10.9%</b> (9.2%, 13%)	1027
アフリカ系アメリカ人	11	<b>1.1%</b> (0.61%, 1.9%)	529	<b>52.1%</b> (49%, 55%)	475	<b>46.8%</b> (44%, 50%)	1015
ヒスパニック	8	<b>0.8%</b> (0.4%, 1.5%)	870	<b>84.5%</b> (82%, 87%)	152	<b>14.8%</b> (13%, 17%)	1030

<sup>1</sup> 遺伝子型頻度推定値の信頼区間

各民族集団における対立遺伝子当たりのSMN1コピー数の頻度も表4における観測遺伝子型から計算した。計算頻度は、Hardy-Weinberg平衡を前提としており、表5に示す。

## 【0330】

## 【表 5】

表 5：対立遺伝子当たりの SMN1 コピーの頻度

民族性	0	1	2	1 <sup>D</sup>
白人	1.43%	95.29%	3.26%	0.03%
アッシュカージ系 ユダヤ人	1.21%	90.72%	8.06%	0.02%
アジア人	0.94%	93.38%	5.67%	0.02%
アフリカ系アメ リカ人	0.75%	71.89%	27.34%	0.01%
ヒスパニック	0.42%	91.86%	7.71%	0.01%

10

1<sup>D</sup> = 疾患対立遺伝子 (SMN1 エクソン 7 欠失 / 変換、例えば、点突然変異により引き起こされない)

1 = SMN1 の 1 コピーを有する対立遺伝子

2 = SMN1 の 2 またはそれ以上のコピーを有する対立遺伝子。

20

## 【0331】

すべての民族集団における 1<sup>D</sup> 対立遺伝子の罹患率は、内容が参照により本明細書に組み込まれる、Wirthら (1999年) 「Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling」、Am. J. Hum. Genet. (64 巻、1340 ~ 1356 頁) により SMA 患者について記載された頻度に基づくものであった。

30

## 【0332】

結論として、5 民族集団からの 1000 を超える検体の試験により、多くの対立遺伝子頻度の有意な差が明らかになった。

## 【0333】

材料および方法

SMN1 遺伝子のエクソン 7 のコピー数推定値の計算、品質管理チェックおよび統計的チェックは、上の実施例 1 ~ 3 で述べたように実施した。

## 【0334】

遺伝子型頻度の推定値の周りの信頼区間の計算

表 4 に示した遺伝子型頻度の推定値の周りの 95% 信頼区間 (95% CI) は、厳密ベータ分布モデルに基づいて計算した。表 5 に示した対立遺伝子頻度は、Hardy - Weinberg 平衡の仮定のもとで観測遺伝子型データから計算した最尤推定値である。EM アルゴリズムを用いて、スクリーニング集団における 0 SMN1 コピー遺伝子型の欠測値を明らかにする。アルゴリズムは、2 回の繰返し後に対立遺伝子頻度の推定値の 6 有効数字に収束する。対立遺伝子頻度の推定値の周りの 95% CI および事前危険度推定値 (表 5) は、対立遺伝子頻度および危険度推定値の模擬母集団の対応する百分位数として計算する。これらのモンテカルロシミュレーションは、事後ベータ分布と続く Hardy - Weinberg の仮定のもとでの対立遺伝子頻度の最尤推定から得られる 10000 ランダム遺伝子型観測結果に基づいている。

40

## 【0335】

他の実施形態

50

本発明の他の実施形態は、本明細書で開示した本発明の明細事項または実施の考慮により当業者には明らかであろう。本明細事項および実施例は例示的なものにすぎないとみなし、本発明の真の範囲は、以下の特許請求の範囲により示すものとする。

【図3A】

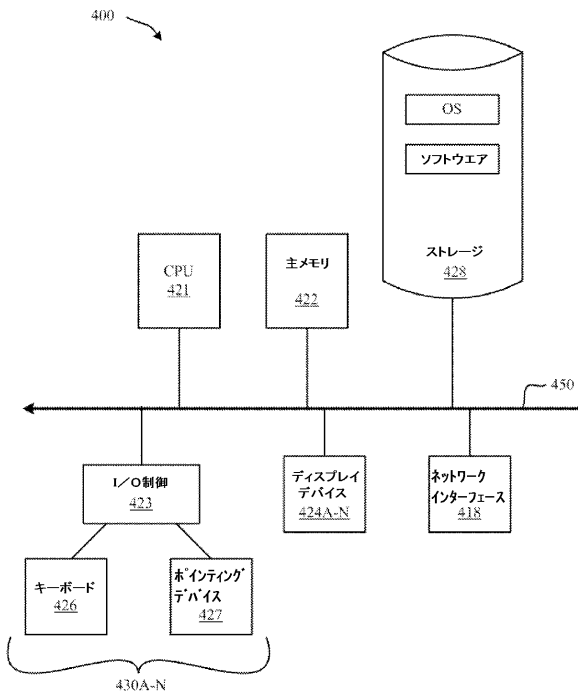


Figure 3A

【図3B】

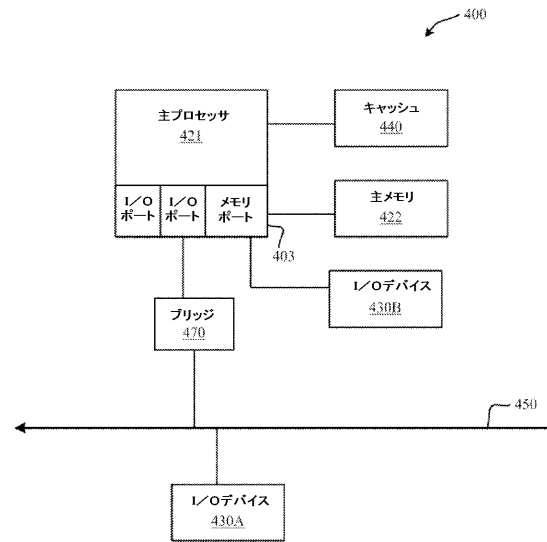


Figure 3B

【 図 4 】

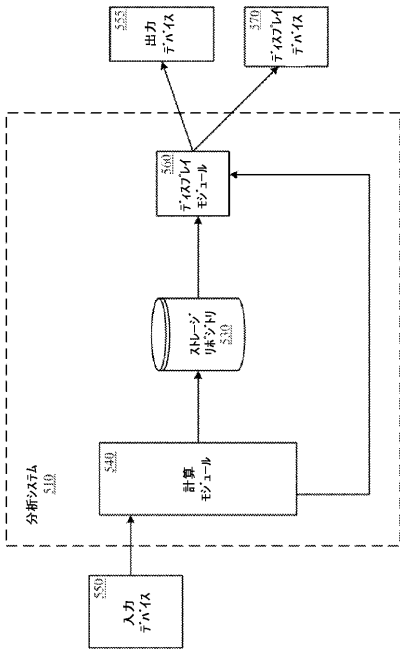


Figure 4

【 図 5 A 】

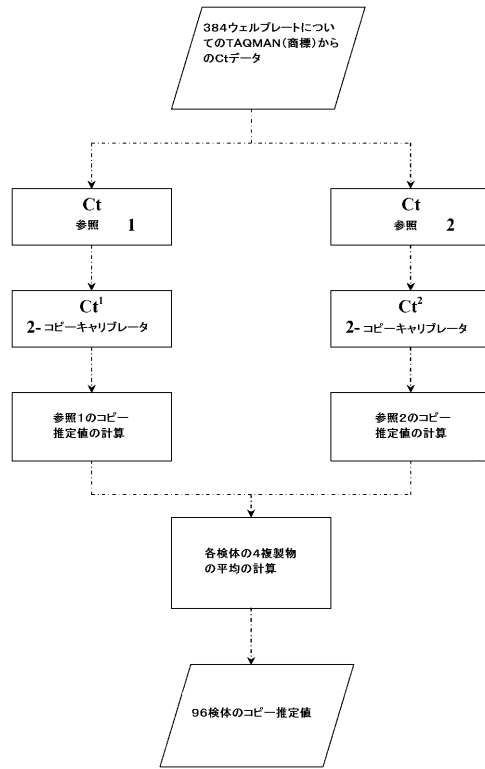


Figure 5A

【 図 5 B 】

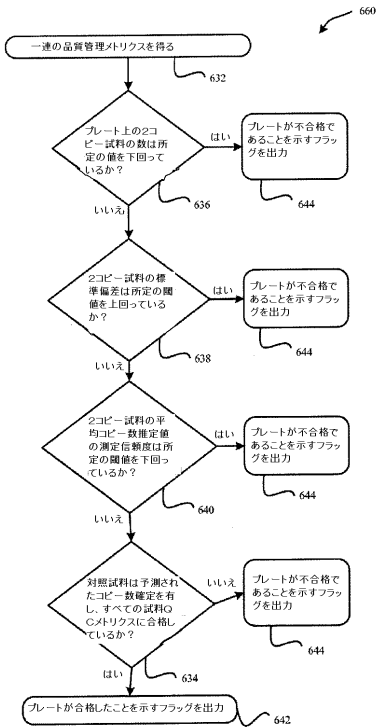


Figure 5B

【 図 5 C 】

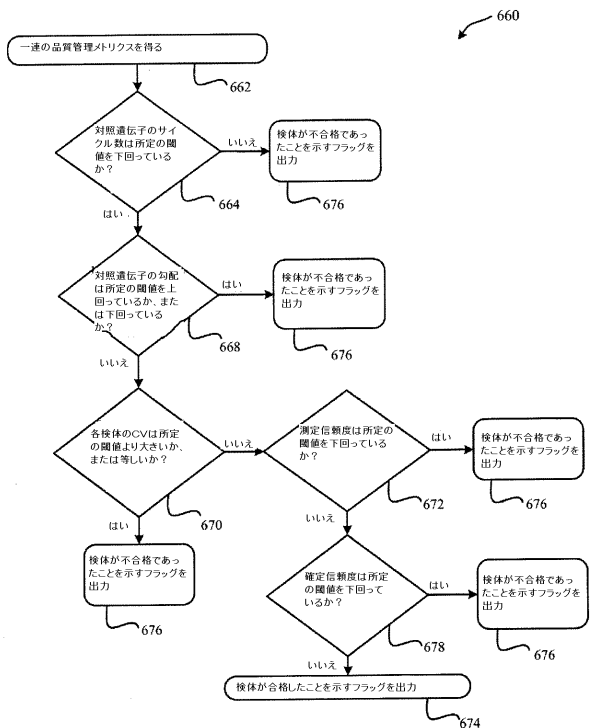


Figure 5C

【 図 6 A 】

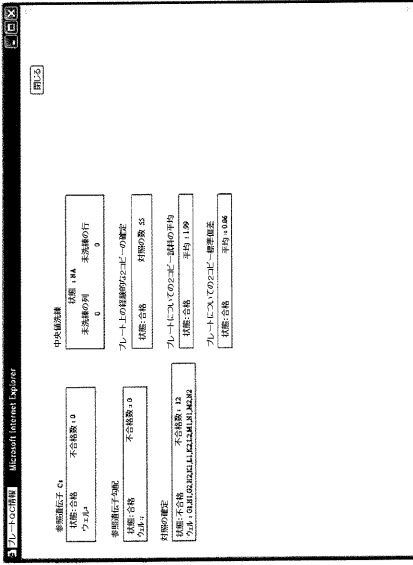


Figure 6A

【 図 6 B 】

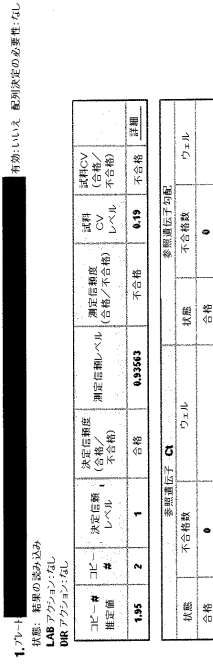


Figure 6B

## 【 図 1 】

## ヒトSMN1遺伝子の一部のゲノム配列

(エクソン7は太字であり、プライマーおよびプローブは影付きである)

( 配列番号 17) プライマー

5' TCTGATCATA TTTTGTGGAA TAAAATAAGT AAAATGTCTT GTGAAACAAA ATGCTTTTTTA 60  
 3' AGACTAGTAT AAAACAACCTT ATTTTATTCA TTTTACAGAA CACTTTGTTT TACGAAAAAT

SMNFUP1 プライマー ( 配列番号 18)

5' CCATAT AAAGCTATCT ATATATAGCT ATCTATGT 3'  
 SMN フォワードプライマー ( 配列番号 19) 5' ATAGCTAT TTTTTTTAAC  
 a

ACATCCATAT AAAGCTATCT ATATATAGCT ATCTATGTCT ATATAGCTAT TTTTTTTAAC 120  
 TGTAGGTATA TTTCGATAGA TATATATCGA TAGATACAGA TATATCGATA AAAAAAATTG

SMN1DL プローブ

( 配列番号 20) 5' AG GGTTCAGAC AAAATCAAAA AGAAGGAAG 3'  
 TTCCTTTATT TTCG AG GGTTCAGAC AAAATCAAAA AGAAGGAAGG 3' SMN2C プローブ  
 ( 配列番号 21)

TTCCTTTATT TTCCTTACAG **GGTTCAGAC AAAATCAAAA AGAAGGAAGG** **TGCTCACATT** 180  
 AAGGAAATAA AAGGAATGTC **CCAAAGTCTG TTTTAGTTTT TCTTCCTTCC** **ACGAGTGTAA**  
 3' **ACGAGTGTAA**

**CCTTAAATTA AGGAGTAAGT** CTGCCAGCAT TATGAAAGTG AATCTTACTT TTGTAAAACT 240  
**GGAATTTATT TCCTCATTCA** GACGGTCGTA ATACTTTCAC TTAGAATGAA AACATTTTGA  
**GGAATTTAAT TCCTCATTTC** 5' SMN リバースプライマー ( 配列番号 22)

TTATGGTTTG TGGAAAACAA ATGTTTTTGA ACATTTAAAA AGTTCAGATG TTAAAAAGTT 300  
 AATACCAAAC ACCTTTTGTG TACAAAAACT TGTAATTTTT TCAAGTCTAC AATTTTTCAA

GAAAGGTTAA TGTA AAACAA TCAATATTAA AGAATTTTGA TGCCAAAAC TTAGATAAA 360  
 CTTTCCAAT ACATTTTGTG AGTTATAAAT TCTTAAAAC ACGGTTTTGA TAATCTATTT

AGGTAAATCT ACATCCCTAC TAGAATTCTC ATACTTAACT GGTGGTTAT<sup>g</sup> GTGGAAGAAA 420  
 TCCAATTAGA TGTAGGGATG ATCTTAAGAG TATGAATTGA CCAACCAATA CACCTTCTTT  
 3' TA CACCTTCTTT

CATACTTCA CAATAAAGAG CTTTAGGATA TGATGCCATT TTATATCACT AGTAGGCAGA 3' 480  
 GTATGAAAGT GTTATTTCTC GAAATCCTAT ACTACGGTAA AATATAGTGA TCATCCGTCT 5'  
**GTATGAAAGT GTTATTTCTC** 5' SMN1RUP2 ( 配列番号 23)

Figure 1

【図 2】

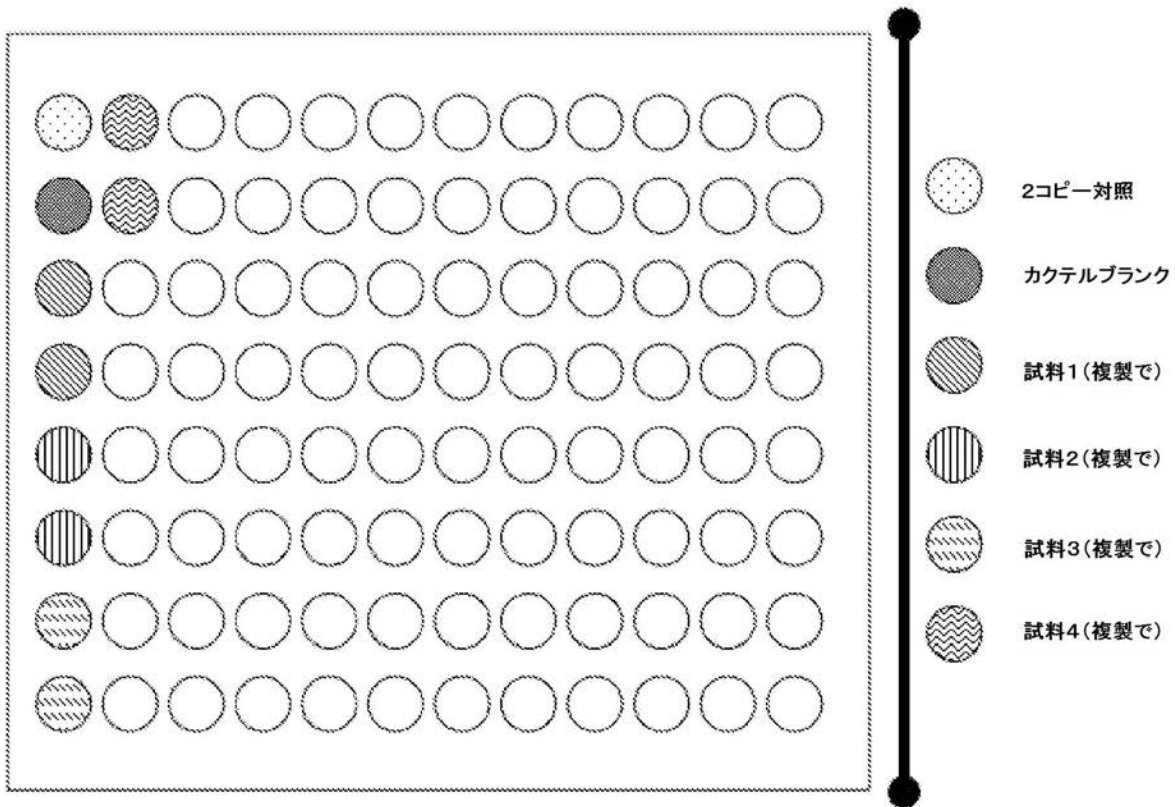


Figure 2

## 【配列表】

2013510580000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成24年5月15日(2012.5.15)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

本発明の他の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明、図面および特許請求の範囲において明らかである。しかし、詳細な説明、図面および特許請求の範囲は、本発明の実施形態を示すが、例示のみの目的で示すものであって、限定の目的で示すものではないことを理解すべきである。本発明の範囲内の様々な変更および修正は、当業者に明らかになる。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

標的遺伝子座のコピー数を分析する方法であって、

(a) 複数の生物学的検体を提供するステップであって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を含む、ステップ

;

(b) 複数の生物学的アッセイを実施するステップであって、各個別の生物学的アッセイにより上記各個別の生物学的検体中の上記標的遺伝子座および上記1つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、上記標的遺伝子座および上記1つまたは複数の参照遺伝子座に関する検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、ステップ；

(c) 上記複数の生物学的アッセイに基づいて、上記1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した上記標的遺伝子座の複数のコピー数の推定値を決定するステップ；ならびに

(d) 上記コピー数の推定値の質および/または上記コピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、上記標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップを含む、方法。

(項目2)

上記標的遺伝子座が遺伝子またはその一部を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

上記遺伝子またはその一部が生存運動ニューロン1 (SMN1) のエクソンを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

上記1つまたは複数の参照遺伝子座が、SMARCC1およびSUPT5Hからなる群から選択される、項目1に記載の方法。

(項目5)

上記SMN1のエクソンがエクソン7である、項目3に記載の方法。

(項目6)

ステップ(b)における上記生物学的アッセイが、上記標的遺伝子座および上記1つまたは複数の参照遺伝子座を増幅するリアルタイムPCRアッセイである、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

上記検出可能なシグナルが蛍光シグナルであり、上記標的遺伝子座または上記1つもしくは複数の参照遺伝子座の蛍光シグナルのレベルが各増幅サイクルにおいて検出される、項目6に記載の方法。

(項目8)

ステップ(c)が

(i) 各個別の生物学的検体における上記蛍光シグナルの所定のレベルに達する上記標的遺伝子座と上記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差 (Ct<sub>i</sub>) を決定するステップ；

(ii) 正常標的遺伝子座と上記1つまたは複数の参照遺伝子座との間の差を反映するキャリブレーション

【化31】

( $\Delta Ct$ )

を得るステップ；および

(iii) ステップ(i)で決定された上記サイクル数の差 Ct<sub>i</sub>を上記キャリブレーション

【化32】

( $\Delta Ct$ )

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における上記標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップ

を含む、項目7に記載の方法。

(項目9)

ステップ ( i ) が、上記蛍光シグナルの上記所定のレベルに達する上記標的遺伝子座および上記 1 つまたは複数の参照遺伝子座のそれぞれのサイクル数 ( C t i ) を最初に測定するステップを含む、項目 8 に記載の方法。

( 項目 1 0 )

上記キャリブレータ

【化 3 3】

( $\Delta C t$ )

が、上記複数の生物学的検体における上記標的遺伝子座と上記 1 つまたは複数の参照遺伝子座との間の上記 C t i の刈り込み平均により定義される、項目 8 に記載の方法。

( 項目 1 1 )

各個別の生物学的検体における上記標的遺伝子座の上記コピー数の推定値を線形目盛上で決定する、項目 8 から 1 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 1 2 )

各個別の生物学的検体における上記標的遺伝子座の上記コピー数の推定値を対数目盛上で決定する、項目 8 から 1 0 のいずれかに記載の方法。

( 項目 1 3 )

上記標的遺伝子座の上記コピー数の推定値の質を、上記 1 つまたは複数の参照遺伝子座について得られたデータの質に基づいて評価する、上記項目のいずれか一項に記載の方法

。

( 項目 1 4 )

上記統計的信頼度を、測定の信頼度および / または確定の信頼度を決定することにより評価する、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 1 5 )

ステップ ( b ) で実施する上記生物学的アッセイを反復する、項目 1 に記載の方法。

( 項目 1 6 )

上記コピー数の確定の上記統計的信頼度を、反復生物学的アッセイの測定の信頼度および上記複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する、項目 1 5 に記載の方法。

( 項目 1 7 )

ステップ ( d ) が、上記確定の信頼度が所定の閾値より低い場合に上記標的遺伝子座の上記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、項目 1 5 に記載の方法。

( 項目 1 8 )

標的遺伝子の異常なコピー数に関連する疾患またはそのキャリアを検出する方法であって、

( a ) 対象の個体から得られた少なくとも 1 つの生物学的検体を含む複数の生物学的検体を提供するステップ ;

( b ) 多数の反復生物学的アッセイを上記複数の生物学的検体のそれぞれについて実施して、上記標的遺伝子および既知のコピー数を有する 1 つまたは複数の参照遺伝子を分析するステップであって、上記多数の反復生物学的アッセイのそれぞれにより、上記標的遺伝子および上記 1 つまたは複数の参照遺伝子の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような上記検出可能なシグナルが得られる、ステップ ;

( c ) 上記 1 つまたは複数の参照遺伝子に対して正規化した上記標的遺伝子のコピー数の推定値を決定するステップ ; ならびに

( d ) 上記コピー数の推定値の質および / または対象の上記個体のコピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、上記個体における上記標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップ

を含む方法。

( 項目 1 9 )

上記個体が上記疾患を有するもしくはその危険性があるか否か、または上記個体が上記疾患のキャリアであるか否かを決定するステップをさらに含む、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

上記疾患が脊髄性筋萎縮 (SMA) である、項目 18 または 19 に記載の方法。

(項目 21)

上記標的遺伝子が生存運動ニューロン 1 (SMN1) である、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

ステップ (b) で実施する上記生物学的アッセイがリアルタイム PCR アッセイである、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

ステップ (b) が、SMN1 のエクソン 7 の少なくとも一部を増幅するリアルタイム PCR アッセイを実施するステップを含む、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

上記検出可能なシグナルが蛍光シグナルであり、上記標的遺伝子または上記 1 つもしくは複数の参照遺伝子の上記蛍光シグナルのレベルを各増幅サイクルにおいて検出する、項目 22 または 23 に記載の方法。

(項目 25)

ステップ (c) が

(i) 各個別の反復アッセイにおける上記蛍光シグナルの所定のレベルに達する上記標的遺伝子と上記 1 つまたは複数の参照遺伝子との間のサイクル数の差 ( $Ct_i$ ) を決定するステップ;

(ii) 正常標的遺伝子と上記 1 つまたは複数の参照遺伝子との間のバックグラウンドの差を反映するキャリブレータ

【化 34】

( $\Delta Ct$ )

を得るステップ; および

(iii) ステップ (i) で決定された上記サイクル数の差  $Ct_i$  を上記キャリブレータ

【化 35】

( $\Delta Ct$ )

に対して正規化することによって各個別の反復アッセイに基づくコピー数の推定値を得るステップ

を含む、項目 18 から 24 のいずれかに記載の方法。

(項目 26)

各個別の反復アッセイに基づく上記標的遺伝子の上記コピー数の推定値を線形目盛上で決定する、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

各個別の反復アッセイに基づく上記標的遺伝子の上記コピー数の推定値を対数目盛上で決定する、項目 25 に記載の方法。

(項目 28)

上記コピー数の推定値の質を評価するステップが、上記 1 つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて品質管理メトリクスを得るステップを含む、項目 22 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

上記コピー数の推定値の質を評価するステップが、上記多数の反復生物学的アッセイ間の変動係数を求めるステップを含む、項目 18 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

上記コピー数の確定の上記統計的信頼度を評価するステップが、測定の信頼度および /

または確定の信頼度を決定するステップを含む、項目 18 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

上記コピー数の確定の上記統計的信頼度を、上記多数の反復生物学的アッセイの測定信頼度および複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する、項目 18 に記載の方法。

(項目 32)

上記測定信頼度を、上記複数の反復アッセイにわたる上記コピー数の推定値の平均値および所定のコピー数の限界内に適合する上記平均値の標準誤差により定義される上記コピー数の推定値の周りの最大正規信頼区間として決定する、項目 30 に記載の方法。

(項目 33)

ステップ (d) が、上記測定信頼度が所定の信頼度閾値を超えない場合に上記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、項目 32 に記載の方法。

(項目 34)

上記確定の信頼度が、隣接コピー数分布からのものである上記コピー数の推定値の t 検定の p 値を決定する、項目 30 に記載の方法。

(項目 35)

ステップ (d) が、上記確定の信頼度が所定の信頼度閾値より低い場合に上記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、項目 34 に記載の方法。

(項目 36)

上記標的遺伝子の所定のコピー数を有する 1 つまたは複数の対照試料を並行して分析するステップをさらに含む、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

上記生物学的アッセイをマルチウェルプレートで実施する、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

上記 1 つまたは複数の対照試料の品質管理および統計分析に基づいてプレート品質管理メトリクスを決定するステップをさらに含む、項目 37 に記載の方法。

(項目 39)

上記 1 つまたは複数の対照試料のいずれかが上記品質管理もしくは統計的信頼度評価の 1 つに不合格である場合、またはいずれかの個別の対照試料の推定値が上記所定のコピー数に等しくない場合には、上記プレートは不合格である、項目 38 に記載の方法。

(項目 40)

対象の上記個体から得られる上記少なくとも 1 つの生物学的検体が、細胞、組織、全血、血漿、血清、尿、便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物または経頸部洗浄液からの核酸を含む、項目 18 から 39 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 41)

対象の上記個体から得られる上記少なくとも 1 つの生物学的検体が出生前試料である、項目 18 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 42)

標的遺伝子座のコピー数を分析するためのシステムであって、

a) 複数の生物学的検体を受容するための手段であって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する 1 つまたは複数の参照遺伝子座を含む、手段；

b) 複数の生物学的アッセイを実施するための手段であって、各個別の生物学的アッセイにより各個別の生物学的検体における上記標的遺伝子座および上記 1 つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、上記標的遺伝子座および上記 1 つまたは複数の参照遺伝子座の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、手段；

c) 各個別の生物学的検体からの上記検出可能なシグナルを検出し、上記検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成された測定モジュール；

d) 上記測定モジュールからのシグナル情報を保存するように構成された記憶装置；

e) (i) 上記記憶装置に保存された上記シグナル情報に基づいて上記1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した上記標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算し、(ii) 上記コピー数の推定値の質および/または上記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合された計算モジュール；ならびに

f) 使用者のための上記計算およびデータ分析結果に一部基づき、上記標的遺伝子座のコピー数の確定および/または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するためのディスプレイモジュールを含むシステム。

(項目43)

上記生物学的アッセイがリアルタイムPCRアッセイである、項目42に記載のシステム。

(項目44)

上記生物学的アッセイがアレイに基づく比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)である、項目42に記載のシステム。

(項目45)

上記生物学的アッセイが高スループット配列決定法である、項目42に記載のシステム。

(項目46)

上記測定モジュールが、各増幅サイクルにおける上記検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成されており、上記検出可能なシグナルが蛍光シグナルである、項目43に記載のシステム。

(項目47)

上記計算モジュールが、以下：

(i) 各個別の検体における上記蛍光シグナルの所定のレベルに達する上記標的遺伝子座と上記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差(Ct<sub>i</sub>)を決定するステップ；

(ii) 正常標的遺伝子座と上記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のバックグラウンド差を反映するキャリブレータ

【化36】

( $\Delta Ct$ )

を得るステップ；および

(iii) ステップ(i)で測定された上記サイクル数の差Ct<sub>i</sub>を上記キャリブレータ

【化37】

( $\Delta Ct$ )

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における上記標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップ

に従って、上記標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算するように適合されている、項目45または46に記載のシステム。

(項目48)

上記計算モジュールが、上記1つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて、品質管理メトリクスを少なくともも得ることにより上記コピー数の推定値の質を決定するように適合されている、項目43から47のいずれか一項に記載のシステム。

(項目49)

上記計算モジュールが、試料の変動係数を少なくとも決定することにより上記コピー数の推定値の質を決定するように適合されている、項目43から48のいずれか一項に記載

のシステム。

(項目50)

上記計算モジュールが、測定の信頼度を少なくとも決定し、決定された上記測定の信頼度を所定の閾値限界と比較することにより上記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている、項目43から49のいずれか一項に記載のシステム。

(項目51)

上記計算モジュールが、確定の信頼度を少なくとも決定し、決定された上記確定の信頼度を所定の閾値限界と比較することにより上記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている、項目43から50のいずれか一項に記載のシステム。

(項目52)

上記計算モジュールが、任意の対照試料が不合格であるか否かを決定するようにさらに適合されている、項目43から51のいずれか一項に記載のシステム。

(項目53)

上記標的遺伝子座が生存運動ニューロン1(SMN1)のエクソンを含む、項目42から52のいずれか一項に記載のシステム。

(項目54)

コンピュータ上で方法を実施するための計算モジュールおよびディスプレイモジュールを含むソフトウェアモジュールを規定するための記録されたコンピュータ可読の命令を有するコンピュータ可読媒体であって、上記方法が、

a) 上記計算モジュールにより、(i) 記憶装置に保存されたリアルタイムPCRデータに基づく1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した標的遺伝子座のコピー数の推定値ならびに(ii) 上記コピー数の推定値の質および/または上記コピー数の確定の統計的信頼度を計算するステップ；ならびに

b) 使用者のための上記計算およびデータ分析結果の一部に基づき、上記標的遺伝子座のコピー数の確定および/または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するステップを含む、コンピュータ可読媒体。

(項目55)

上記標的遺伝子座がSMN1のエクソン7またはその一部を含む、項目54に記載のコンピュータ可読媒体。

(項目56)

脊髄性筋萎縮(SMA)またはそのキャリアの診断のためのキットであって、

(a) SMN1のエクソン7またはその一部を増幅するための1つもしくは複数の試薬

；  
(b) 既知のコピー数を有する1つもしくは複数の参照遺伝子座を増幅するための1つ

もしくは複数の試薬；および  
(c) 項目55に記載のコンピュータ可読媒体  
を含むキット。

**【手続補正2】**

**【補正対象書類名】**特許請求の範囲

**【補正対象項目名】**全文

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】**

標的遺伝子座のコピー数を分析する方法であって、

(a) 複数の生物学的検体を提供するステップであって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する1つまたは複数の参照遺伝子座を含む、ステップ

；

(b) 複数の生物学的アッセイを実施するステップであって、各個別の生物学的アッセ

イにより前記各個別の生物学的検体中の前記標的遺伝子座および前記1つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、前記標的遺伝子座および前記1つまたは複数の参照遺伝子座に関する検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、ステップ；

(c) 前記複数の生物学的アッセイに基づいて、前記1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した前記標的遺伝子座の複数のコピー数の推定値を決定するステップ；ならびに

(d) 前記コピー数の推定値の質および/または前記コピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、前記標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップ

を含む、方法。

【請求項2】

前記標的遺伝子座が遺伝子またはその一部を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記遺伝子またはその一部が生存運動ニューロン1 (SMN1) のエクソンを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記1つまたは複数の参照遺伝子座が、SMARCC1およびSUT5Hからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記SMN1のエクソンがエクソン7である、請求項3に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(b)における前記生物学的アッセイが、前記標的遺伝子座および前記1つまたは複数の参照遺伝子座を増幅するリアルタイムPCRアッセイである、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記検出可能なシグナルが蛍光シグナルであり、前記標的遺伝子座または前記1つもしくは複数の参照遺伝子座の蛍光シグナルのレベルが各増幅サイクルにおいて検出される、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(c)が

(i) 各個別の生物学的検体における前記蛍光シグナルの所定のレベルに達する前記標的遺伝子座と前記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差 (Ct<sub>i</sub>) を決定するステップ；

(ii) 正常標的遺伝子座と前記1つまたは複数の参照遺伝子座との間の差を反映するキャリブレータ

【化31】

$$(\overline{\Delta Ct})$$

を得るステップ；および

(iii) ステップ(i)で決定された前記サイクル数の差 Ct<sub>i</sub>を前記キャリブレータ

【化32】

$$(\overline{\Delta Ct})$$

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップ

を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

ステップ(i)が、前記蛍光シグナルの前記所定のレベルに達する前記標的遺伝子座お

よび前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座のそれぞれのサイクル数 (  $Ct_i$  ) を最初に測定するステップを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記キャリブレータ

【化 33】

( $\Delta Ct$ )

が、前記複数の生物学的検体における前記標的遺伝子座と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座との間の前記  $Ct_i$  の刈り込み平均により定義される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座の前記コピー数の推定値を線形目盛上で決定する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座の前記コピー数の推定値を対数目盛上で決定する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的遺伝子座の前記コピー数の推定値の質を、前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座について得られたデータの質に基づいて評価する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

前記統計的信頼度を、測定の信頼度および / または確定の信頼度を決定することにより評価する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ ( b ) で実施する前記生物学的アッセイを反復する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記コピー数の確定の前記統計的信頼度を、反復生物学的アッセイの測定の信頼度および前記複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ ( d ) が、前記確定の信頼度が所定の閾値より低い場合に前記標的遺伝子座の前記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

標的遺伝子の異常なコピー数に関連する疾患またはそのキャリアを検出する方法であって、

( a ) 対象の個体から得られた少なくとも 1 つの生物学的検体を含む複数の生物学的検体を提供するステップ；

( b ) 多数の反復生物学的アッセイを前記複数の生物学的検体のそれぞれについて実施して、前記標的遺伝子および既知のコピー数を有する 1 つまたは複数の参照遺伝子を分析するステップであって、前記多数の反復生物学的アッセイのそれぞれにより、前記標的遺伝子および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような前記検出可能なシグナルが得られる、ステップ；

( c ) 前記 1 つまたは複数の参照遺伝子に対して正規化した前記標的遺伝子のコピー数の推定値を決定するステップ；ならびに

( d ) 前記コピー数の推定値の質および / または対象の前記個体のコピー数の確定の統計的信頼度を評価し、それにより、前記個体における前記標的遺伝子座のコピー数の確定を行うことができるか否かを決定するステップ

を含む方法。

【請求項 19】

前記個体が前記疾患を有するもしくはその危険性があるか否か、または前記個体が前記疾患のキャリアであるか否かを決定するステップをさらに含む、請求項 18 に記載の方法

。

【請求項 20】

前記疾患が脊髄性筋萎縮 (SMA) である、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記標的遺伝子が生存運動ニューロン 1 (SMN1) である、請求項 20 に記載の方法

。

【請求項 22】

ステップ (b) で実施する前記生物学的アッセイがリアルタイム PCR アッセイである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ステップ (b) が、SMN1 のエクソン 7 の少なくとも一部を増幅するリアルタイム PCR アッセイを実施するステップを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記検出可能なシグナルが蛍光シグナルであり、前記標的遺伝子または前記 1 つもしくは複数の参照遺伝子の前記蛍光シグナルのレベルを各増幅サイクルにおいて検出する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

ステップ (c) が

(i) 各個別の反復アッセイにおける前記蛍光シグナルの所定のレベルに達する前記標的遺伝子と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子との間のサイクル数の差 (Ct<sub>i</sub>) を決定するステップ；

(ii) 正常標的遺伝子と前記 1 つまたは複数の参照遺伝子との間のバックグラウンドの差を反映するキャリブレータ

【化 34】

( $\overline{\Delta Ct}$ )

を得るステップ；および

(iii) ステップ (i) で決定された前記サイクル数の差 Ct<sub>i</sub> を前記キャリブレータ

【化 35】

( $\overline{\Delta Ct}$ )

に対して正規化することによって各個別の反復アッセイに基づくコピー数の推定値を得るステップ

を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 26】

各個別の反復アッセイに基づく前記標的遺伝子の前記コピー数の推定値を線形目盛上で決定する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

各個別の反復アッセイに基づく前記標的遺伝子の前記コピー数の推定値を対数目盛上で決定する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記コピー数の推定値の質を評価するステップが、前記 1 つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて品質管理メトリクスを得るステップを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 29】

前記コピー数の推定値の質を評価するステップが、前記多数の反復生物学的アッセイ間の変動係数を求めるステップを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 30】

前記コピー数の確定の前記統計的信頼度を評価するステップが、測定の信頼度および /

または確定の信頼度を決定するステップを含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記コピー数の確定の前記統計的信頼度を、前記多数の反復生物学的アッセイの測定信頼度および複数のコピー数の推定値に基づく確定の信頼度の計算により決定する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記測定信頼度を、前記複数の反復アッセイにわたる前記コピー数の推定値の平均値および所定のコピー数の限界内に適合する前記平均値の標準誤差により定義される前記コピー数の推定値の周りの最大正規信頼区間として決定する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

ステップ (d) が、前記測定信頼度が所定の信頼度閾値を超えない場合に前記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記確定の信頼度が、隣接コピー数分布からのものである前記コピー数の推定値の t 検定の p 値を決定する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

ステップ (d) が、前記確定の信頼度が所定の信頼度閾値より低い場合に前記コピー数の確定を行うことができないことを決定するステップを含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記標的遺伝子の所定のコピー数を有する 1 つまたは複数の対照試料を並行して分析するステップをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記生物学的アッセイをマルチウェルプレートで実施する、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 1 つまたは複数の対照試料の品質管理および統計分析に基づいてプレート品質管理メトリクスを決定するステップをさらに含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 1 つまたは複数の対照試料のいずれかが前記品質管理もしくは統計的信頼度評価の 1 つに不合格である場合、またはいずれかの個別の対照試料の推定値が前記所定のコピー数に等しくない場合には、前記プレートは不合格である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

対象の前記個体から得られる前記少なくとも 1 つの生物学的検体が、細胞、組織、全血、血漿、血清、尿、便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物または経頸部洗浄液からの核酸を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

対象の前記個体から得られる前記少なくとも 1 つの生物学的検体が出生前試料である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

標的遺伝子座のコピー数を分析するためのシステムであって、

a) 複数の生物学的検体を受容するための手段であって、各個別の生物学的検体が標的遺伝子座および既知のコピー数を有する 1 つまたは複数の参照遺伝子座を含む、手段；

b) 複数の生物学的アッセイを実施するための手段であって、各個別の生物学的アッセイにより各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座を分析し、前記標的遺伝子座および前記 1 つまたは複数の参照遺伝子座の検出可能なシグナルのレベルがそれらのそれぞれのコピー数と相関するような検出可能なシグナルが得られる、手段；

c) 各個別の生物学的検体からの前記検出可能なシグナルを検出し、前記検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成された測定モジュール；

d) 前記測定モジュールからのシグナル情報を保存するように構成された記憶装置；

e) (i) 前記記憶装置に保存された前記シグナル情報に基づいて前記1つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算し、(ii) 前記コピー数の推定値の質および/または前記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合された計算モジュール; ならびに

f) 使用者のための前記計算およびデータ分析結果に一部基づき、前記標的遺伝子座のコピー数の確定および/または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するためのディスプレイモジュールを含むシステム。

【請求項43】

前記生物学的アッセイがリアルタイムPCRアッセイである、請求項42に記載のシステム。

【請求項44】

前記生物学的アッセイがアレイに基づく比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)である、請求項42に記載のシステム。

【請求項45】

前記生物学的アッセイが高スループット配列決定法である、請求項42に記載のシステム。

【請求項46】

前記測定モジュールが、各増幅サイクルにおける前記検出可能なシグナルのレベルを測定するように構成されており、前記検出可能なシグナルが蛍光シグナルである、請求項43に記載のシステム。

【請求項47】

前記計算モジュールが、以下:

(i) 各個別の検体における前記蛍光シグナルの所定のレベルに達する前記標的遺伝子座と前記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のサイクル数の差( $Ct_i$ )を決定するステップ;

(ii) 正常標的遺伝子座と前記1つまたは複数の参照遺伝子座との間のバックグラウンド差を反映するキャリブレーション

【化36】

$(\overline{\Delta Ct})$

を得るステップ; および

(iii) ステップ(i)で測定された前記サイクル数の差  $Ct_i$  を前記キャリブレーション

【化37】

$(\overline{\Delta Ct})$

に対して正規化することによって各個別の生物学的検体における前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を決定するステップ

に従って、前記標的遺伝子座のコピー数の推定値を計算するように適合されている、請求項45または46に記載のシステム。

【請求項48】

前記計算モジュールが、前記1つまたは複数の参照遺伝子について得られたサイクル数の測定およびその増幅曲線の勾配に基づいて、品質管理メトリクスを少なくともも得ることにより前記コピー数の推定値の質を決定するように適合されている、請求項43に記載のシステム。

【請求項49】

前記計算モジュールが、試料の変動係数を少なくとも決定することにより前記コピー数の推定値の質を決定するように適合されている、請求項43に記載のシステム。

【請求項50】

前記計算モジュールが、測定の信頼度を少なくとも決定し、決定された前記測定の信頼度を所定の閾値限界と比較することにより前記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている、請求項 4 3 に記載のシステム。

【請求項 5 1】

前記計算モジュールが、確定の信頼度を少なくとも決定し、決定された前記確定の信頼度を所定の閾値限界と比較することにより前記コピー数の確定の統計的信頼度を決定するように適合されている、請求項 4 3 に記載のシステム。

【請求項 5 2】

前記計算モジュールが、任意の対照試料が不合格であるか否かを決定するようにさらに適合されている、請求項 4 3 に記載のシステム。

【請求項 5 3】

前記標的遺伝子座が生存運動ニューロン 1 ( S M N 1 ) のエクソンを含む、請求項 4 2 に記載のシステム。

【請求項 5 4】

コンピュータ上で方法を実施するための計算モジュールおよびディスプレイモジュールを含むソフトウェアモジュールを規定するための記録されたコンピュータ可読の命令を有するコンピュータ可読媒体であって、前記方法が、

a ) 前記計算モジュールにより、( i ) 記憶装置に保存されたリアルタイム P C R データに基づく 1 つまたは複数の参照遺伝子座に対して正規化した標的遺伝子座のコピー数の推定値ならびに ( i i ) 前記コピー数の推定値の質および / または前記コピー数の確定の統計的信頼度を計算するステップ ; ならびに

b ) 使用者のための前記計算およびデータ分析結果に一部基づき、前記標的遺伝子座のコピー数の確定および / または品質管理もしくは統計的信頼度分析のいずれかが失敗であるか否かを示すシグナルを含む内容を表示するステップを含む、コンピュータ可読媒体。

【請求項 5 5】

前記標的遺伝子座が S M N 1 のエクソン 7 またはその一部を含む、請求項 5 4 に記載のコンピュータ可読媒体。

【請求項 5 6】

脊髄性筋萎縮 ( S M A ) またはそのキャリアの診断のためのキットであって、

( a ) S M N 1 のエクソン 7 またはその一部を増幅するための 1 つもしくは複数の試薬 ;

( b ) 既知のコピー数を有する 1 つもしくは複数の参照遺伝子座を増幅するための 1 つもしくは複数の試薬 ; および

( c ) 請求項 5 5 に記載のコンピュータ可読媒体を含むキット。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2013510580000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/56494

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; C12P 19/34; G01N 33/48 (2010.01) USPC - 435/6; 435/91.2; 702/19 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/68; C12P 19/34; G01N 33/48 (2010.01) USPC - 435/6; 435/91.2; 702/19 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: copy number, locus, locl, specimen, sample, normalize, statistic, confidence, exon, SMARCC1, SUPT5H, Spt5, survival motor neuron 1, SMN1, cycle number, Ct value, Threshold Cycle, difference, PCR, fluorescent, amplification, signal, calibrator, SMA, Spinal Muscular Atrophy, computer, array-based compar		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2009/0215036 A1 (STROPP et al.) 27 August 2009 (27.08.2009) para [0012], [0014]-[0015], [0017], [0052], [0054], [0056], [0058], [0071]-[0072], [0115], [0143]-[0144], [0145]-[0146], [0157]-[0158], [0160]-[0162], [0184], [0199], [0214], [0235], [0267], [0293], [0365]-[0366], [0368], [0379], [0403], [0405]-[0406], and [0408]	1-2, 6-7, 15-19,31, 42-44, 46, 54 ----- 3-5, 8-10, 20-23, 45, 47, 55-56
Y	EGGERMANN et al. A new splice site mutation in the SMN1 gene causes discrepant results in SMN1 deletion screening approaches. Neuromuscul Disord. 2008, 18(2):146-149; Abstract; pg 148, col 1, para 3, and Table 1	3, 5, 20-23, 55-56
Y	US 2008/0075722 A1 (DEPINHO et al.) 27 March 2008 (27.03.2008) para [0009], [0074], and [0442]	4
Y	Oort et al. Characterization of Tusc5, an adipocyte gene co-expressed in peripheral neurons. Mol Cell Endocrinol. 2007, 276(1-2): 24-35. pg 26, col 1, top para, para 1, and para 2	8-10, 47
Y	US 2008/0070792 A1 (STOUGHTON et al.) 20 March 2008 (20.03.2008) para [0085], [0167], and [0171]	45
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 another 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 04 January 2011 (04.01.2011)		Date of mailing of the international search report <b>14 JAN 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/56494

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 11-14, 24-30, 32-41, 48-53  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 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 アクマエブ, ピアチェラブ アール.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックライン, ジェイムズ ストリート  
12

(72)発明者 ヘンドリックソン, ブラント  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01545, シュルーズベリー, アッシュモント ストリート 4

(72)発明者 ショール, トーマス  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01581, ウェストボロー, ストラットン ドライブ  
7

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA20 HA08 HA11

4B029 AA07 BB20 FA15

4B063 QA01 QA19 QQ42 QR08 QR42 QR62 QS25 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	基因座拷贝数分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013510580A</a>	公开(公告)日	2013-03-28
申请号	JP2012539006	申请日	2010-11-12
申请(专利权)人(译)	密宗扫描遗传实验室, LLC		
[标]发明人	アクマエブピアチェラブアール ヘンドリクソンプラント シヨールトーマス		
发明人	アクマエブ, ピアチェラブ アール. ヘンドリクソン, プラント シヨール, トーマス		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/34 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6851 C12Q1/686 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/156 C12Q2600/16 G16B20/00 G16B40/00 C12Q2537/16 C12Q2537/165		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z C12N15/00.A C12M1/34.B G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029 /FA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/260804 2009-11-12 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于分析靶基因座的拷贝数, 检测与靶基因或其载体的异常拷贝数相关的疾病的系统和方法。

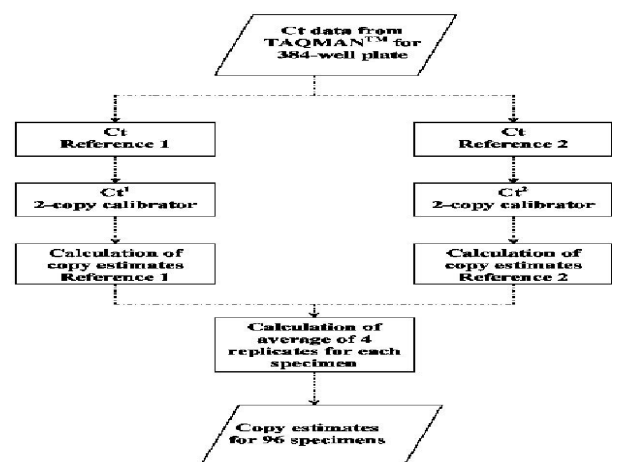


Figure 5A