

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年8月23日(2023.8.23)

【国際公開番号】WO2021/038010

【公表番号】特表2022-545821(P2022-545821A)

【公表日】令和4年10月31日(2022.10.31)

【年通号数】公開公報(特許)2022-200

【出願番号】特願2022-513263(P2022-513263)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/071(2010.01)

G 0 1 N 33/53(2006.01)

G 0 1 N 33/50(2006.01)

G 0 1 N 27/62(2021.01)

C 1 2 N 15/10(2006.01)

C 1 2 Q 1/6806(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 Q 1/6813(2018.01)

10

【F I】

C 1 2 N 5/071

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/50 P

G 0 1 N 27/62 V

C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z

C 1 2 Q 1/6806 Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 Q 1/6813 Z

20

30

【手続補正書】

【提出日】令和5年8月15日(2023.8.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0270

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0270】

(引用文献)

40

50

【表 2】

Bao <i>et al</i> , EMBO J., 23: 3314-3324 (2004)	
Bonisch <i>et al</i> , Nucleic Acids Res., 40(13): 5951-5964 (2012)	
Bowerman and Wereszczynski, Biophys. J., 110: 327-337 (2016)	
Church <i>et al</i> , Gut 63: 317-325 (2014)	
Conde e Silva <i>et al</i> , J. Mol. Biol. 370: 555-573 (2007)	
Crowley <i>et al</i> , Nat. Rev. Clin. Oncol., 10(8): 472-484 (2013)	
Dai <i>et al</i> , J. Vis. Exp., 50: 2593 (2011)	10
Dhaenens <i>et al</i> , Bioessays 37: 70-79 (2014)	
Dhasarathy and Wade, Mutat Res., 647: 39-43 (2008)	
Fong <i>et al</i> , Clin. Chem., 55(3): 587-589 (2009)	
Guerrero-Preston <i>et al</i> , Epigenetics, 2(4): 223-226 (2007)	
Holdenrieder <i>et al</i> , Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 95: 114-120 (2001)	
Holdenrieder and Stieber, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 46(1): 1-24 (2009)	
Jung <i>et al</i> , Clin. Chimica Acta., 411: 1611-1624, (2010)	
Mouliere <i>et al</i> , Sci Transl Med., 10: 466 (2018)	20
Nalabothula <i>et al</i> , BMC Genomics, 15:92 (2014)	
Newman <i>et al</i> , Nat. Med., 20(5): 548-554 (2014)	
Salgame <i>et al</i> , Nucleic Acids Res., 25(3): 680-681 (1997)	
Schrader <i>et al</i> , PLoS ONE 10(10): e0140076 (2015)	
Schwarzenbach <i>et al</i> , Nat. Rev. Cancer, 11(6): 426-437 (2011)	
Sina <i>et al</i> , Nat. Comm., 9: 4915 (2018)	
Snyder <i>et al</i> , Cell 164: 57-68 (2016)	
Soares <i>et al</i> , Cancer, 85(1): 112-118 (1999)	30
Sultanov <i>et al</i> , AIMS Genetics, 4(1): 21-31 (2017)	
Underhill <i>et al</i> , PLOS Genetics DOI:10.1371/journal.pgen.1006162 (2016)	
van Nieuwenhuijze <i>et al</i> , Ann. Rheum. Dis., 62: 10-14 (2003)	
Wiesler and Weinzierl, Methods Mol. Biol., 1286: 97-106. Humana Press, New York, NY (2015)	
Yang <i>et al</i> , Int. J. Oncol., 52(4): 1235-1245 (2018)	
Yi and Kim, BMB Reports, 51(5): 211-218 (2018)	
Zhou <i>et al</i> , Semin. Oncol., 39(4): 440-448 (2012)	40

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様 1)

生体液試料由来のリンカーDNAを含む循環無細胞ヌクレオソームを分離するための方法であって:

(i) 該試料を:

(a) ヌクレオソーム関連リンカーDNA;

(b) リンカーDNAに結合するクロマチン結合タンパク質; 又は

(c) リンカーDNAに関連するコアヌクレオソームの特徴

に結合する結合剤と接触させる工程; 及び

(ii) 工程(i)の該結合剤に結合している該試料由来のヌクレオソームを単離する工程を含む、前記方法。

(態様 2)

生体液試料由来のリンカーDNAを含まない循環無細胞ヌクレオソームを分離するための方法であって:

(i) 該試料を:

(a) ヌクレオソーム関連リンカーDNA;

(b) リンカーDNAに結合するクロマチン結合タンパク質; 又は

(c) リンカーDNAに関連するコアヌクレオソームの特徴

に結合する結合剤と接触させる工程; 及び

(ii) 工程(i)の該結合剤に結合していない該試料由来のヌクレオソームを単離する工程を含む、前記方法。

(態様 3)

前記ヌクレオソーム関連リンカーDNAに結合する結合剤が、ヒストンH1、macroH2A又はそれらの断片もしくは操作された類似物から選択されるヒストンタンパク質である、態様1又は2に記載の方法。

(態様 4)

前記ヌクレオソーム関連リンカーDNAに結合する結合剤が、クロマチン結合タンパク質又はその断片もしくは操作された類似物である、態様1又は2に記載の方法。

(態様 5)

リンカーDNAに結合する前記クロマチン結合タンパク質が:

(a) クロモドメインヘリカーゼDNA結合(CHD)タンパク質;

(b) DNA(シトシン-5)-メチルトランスフェラーゼ(DNMT)タンパク質;

(c) 高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)タンパク質;

(d) ポリ[ADP-リボース]ポリメラーゼ(PARP)タンパク質; 又は

(e) メチル-CpG-結合ドメイン(MBD)タンパク質、例えば、MBD1、MBD2、MBD3、MBD4、もしくはメチルCpG結合タンパク質2(MECP2))など

から選択される、態様4記載の方法。

(態様 6)

リンカーDNAに結合するクロマチン結合タンパク質に結合する前記結合剤が、抗体、アフィマー、又はアプタマーから選択される、態様1又は2に記載の方法。

(態様 7)

リンカーDNAに結合する前記クロマチン結合タンパク質が:

a) クロモドメインヘリカーゼDNA結合(CHD)タンパク質;

(b) DNA(シトシン-5)-メチルトランスフェラーゼ(DNMT)タンパク質;

(c) 高移動度群ボックスタンパク質(HMGB)タンパク質;

(d) ポリ[ADP-リボース]ポリメラーゼ(PARP)タンパク質; 又は

(e) メチル-CpG-結合ドメイン(MBD)タンパク質、例えば、MBD1、MBD2、MBD3、MBD4、もしくはメチルCpG結合タンパク質2(MECP2))など

から選択される、態様6記載の方法。

(態様 8)

前記リンカーDNAに関連するコアヌクレオソームの特徴が、ヒストンバリエーションmacroH2Aである、態様1又は2に記載の方法。

(態様 9)

(iii) 前記工程(ii)の単離された無細胞ヌクレオソームを、イムノアッセイ、質量分析、及び/又はDNA分析によって分析することをさらに含む、態様1~8のいずれか1項記載の方法。

(態様 10)

工程(iii)が、前記単離された無細胞ヌクレオソームを、以下: ヒストンの種類(例えば、H2A、H2B、H3、H4ヒストン)、翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、特定のヌクレ

10

20

30

40

50

オチドもしくは修飾されたヌクレオチド(例えば、メチル化、ヒドロキシルメチル化、もしくは他のヌクレオチド修飾)、該ヌクレオソームに付加されたタンパク質、又はそれらの組み合わせから選択されるエピジェネティックなヌクレオソームの特徴に関して分析することを含む、態様9記載の方法。

(態様11)

前記DNA分析が、次世代シーケンシング(ターゲット又は全ゲノム)及びメチル化DNAシーケンシング分析などのDNAシーケンシング、ビーミング、デジタルPCR及びcold PCR(低変性温度PCRでの共増幅)などのPCR、等温増幅、MIDI活性化加ピロリン酸分解(MAP)、又は再配列末端の個別化分析(PARE)を含む、態様9記載の方法。

(態様12)

工程(i)で結合させた前記試料を、ヌクレオソーム又はその構成要素に結合する第2の結合剤と接触させることをさらに含む、態様1~11のいずれか1項記載の方法。

(態様13)

前記生体液試料が、血液、血清、又は血漿試料から選択される、態様1~12のいずれか1項記載の方法。

(態様14)

前記試料を、リンカーDNAを含むヌクレオソームに結合する2種類以上の結合剤と接触させる、態様1~13のいずれか1項記載の方法。

(態様15)

生体液試料由来のリンカーDNAを含まない循環無細胞ヌクレオソームを分離するための方法であって:

(i)該試料を、ヒストンテールの全て又は一部が存在しないクリッピングされたヒストン分子に結合する結合剤と接触させる工程;

(ii)工程(i)の該結合剤に結合している該試料由来のヌクレオソームを単離する工程を含む、前記方法。

(態様16)

(iii)前記工程(ii)の単離された無細胞ヌクレオソームを、イムノアッセイ、質量分析、及び/又はDNA分析によって分析すること、をさらに含む、態様15記載の方法。

(態様17)

工程(iii)が、前記単離された無細胞ヌクレオソームを、以下:ヒストンの種類(例えば、H2A、H2B、H3、H4ヒストン)、翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、特定のヌクレオチドもしくは修飾されたヌクレオチド(例えば、メチル化、ヒドロキシルメチル化、もしくは他のヌクレオチド修飾)、該ヌクレオソームに付加されたタンパク質、又はそれらの組み合わせから選択されるエピジェネティックなヌクレオソームの特徴に関して分析することを含む、態様16記載の方法。

(態様18)

前記DNA分析が、次世代シーケンシング(ターゲット又は全ゲノム)及びメチル化DNAシーケンシング分析などのDNAシーケンシング、ビーミング、デジタルPCR及びcold PCR(低変性温度PCRでの共増幅)などのPCR、等温増幅、ハイブリダイゼーション、MIDI活性化加ピロリン酸分解(MAP)、又は再配列末端の個別化分析(PARE)を含む、態様16記載の方法。

(態様19)

生体液試料由来の精製された循環腫瘍DNA(ctDNA)を単離するための方法であって:

(i)態様2~18のいずれか1項記載の方法を行う工程;及び

(ii)前記単離されたヌクレオソームから該DNAを抽出する工程を含む、前記方法。

(態様20)

(i)態様2~18のいずれか1項記載の方法を行って、患者から得た生体試料由来の循環腫瘍ヌクレオソームを単離すること;及び

(ii)該単離された循環腫瘍ヌクレオソーム及び/又は関連DNAを分析すること

10

20

30

40

50

を含むがんを診断する方法。

(態様 2 1)

工程(ii)が、前記単離された循環腫瘍ヌクレオソームを、以下:ヒストンの種類(例えば、H2A、H2B、H3、H4ヒストン)、ヒストン翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、特定のヌクレオチドもしくは修飾されたヌクレオチド(例えば、メチル化、ヒドロキシルメチル化、もしくは他のヌクレオチド修飾)、該ヌクレオソームに付加されたタンパク質、又はそれらの組み合わせから選択されるエピジェネティックなヌクレオソームの特徴に関して分析することを含む、態様20記載の方法。

(態様 2 2)

前記関連DNAが、DNAシーケンシング、例えば、次世代シーケンシング(ターゲット又は全ゲノム)及びメチル化DNAシーケンシング分析から選択されるシーケンシング法、ビーミング、デジタルPCR及びcold PCR(低変性温度PCRでの共増幅)などのPCR、等温増幅、ハイブリダイゼーション、MIDI活性化加ピロリン酸分解(MAP)、又は再配列末端の個別化分析(PARE)を用いて分析される、態様20記載の方法。

10

(態様 2 3)

疾患起源の無細胞ヌクレオソームに優先的に結合する抗体又は他の結合剤を得るための方法であって:

(i)約150塩基対以下のDNAを含むヌクレオソームを、それに対して抗体又は他の結合剤を生じさせる抗原として用いる工程;

(ii)工程(i)で得た該抗体又は他の結合剤を、約165塩基対以上のDNAを含むヌクレオソームに提示する工程;及び

20

(iii)工程(i)の該ヌクレオソームに結合するが、工程(ii)の該ヌクレオソームには結合しない該抗体又は他の結合剤を選択する工程

を含む、前記方法。

(態様 2 4)

非疾患起源の無細胞ヌクレオソームに優先的に結合する抗体又は他の結合剤を得るための方法であって:

(i)約165塩基対以上のDNAを含むヌクレオソームを、それに対して抗体又は他の結合剤を生じさせる抗原として用いる工程;

(ii)工程(i)で得た該抗体又は他の結合剤を、約150塩基対以下のDNAを含むヌクレオソームに提示する工程;及び

30

(iii)工程(i)の該ヌクレオソームに結合するが、工程(ii)の該ヌクレオソームには結合しない該抗体又は他の結合剤を選択する工程

を含む、前記方法。

(態様 2 5)

ファージディスプレイライブラリー抗体選択を含む、態様23又は24記載の方法。

40

50