

【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 1 年 7 月 4 日 (2019.7.4)

【公表番号】特表 2018-522543 (P2018-522543A)

【公表日】平成 30 年 8 月 16 日 (2018.8.16)

【年通号数】公開・登録公報 2018-031

【出願番号】特願 2017-564364 (P2017-564364)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6811 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6855 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/11 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6811 Z

C 1 2 Q 1/6855

C 1 2 Q 1/6876 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 6 月 3 日 (2019.6.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、核酸試料中に存在する変異配列標的ポリヌクレオチドを検出するための方法：

(a) (i) 前記核酸試料由来の複数のポリヌクレオチド及び (ii) 複数のオリゴヌクレオチドタグを含有する単一反応混合物を形成する工程であって、

前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、複数の一本鎖または二本鎖プライマーを含み、

個々のプライマーが、

i . 前記核酸試料由来の複数のポリヌクレオチド中の標的配列に特異的に結合する 3' 領域と、

ii . 前記核酸試料由来の複数のポリヌクレオチド中の標的配列と相補的でない配列を有し、ランダムタグ配列を含む配列を含有する、5' テイルと

を含有し、

前記複数のオリゴヌクレオチドタグのうちの個々のオリゴヌクレオチドタグが、固定タグ配列と交互になっている異なるランダムタグ配列を含むランダムタグ配列を有する領域を含有し、

前記ランダムタグ配列中の前記固定タグ配列が、配列アライメントアンカーを形成する、

工程；

(b) 前記複数のオリゴヌクレオチドタグからの少なくとも 1 つのタグを前記複数のポリヌクレオチド内の個々のポリヌクレオチドに付加することによって、前記単一反応混合物内で複数のタグ付きポリヌクレオチドを生成する工程；

(c) 前記複数のタグ付きポリヌクレオチドを増幅することによって、タグ付き増幅産

物の集団を生成する工程；

(d) 複数の候補配列リードを生成するために、前記タグ付き増幅産物の集団の少なくとも一部を配列決定する工程；

(e) 前記複数の候補配列リードの配列アライメントアンカーをアラインして、エラー修正された配列決定データを生成する工程；ならびに

(f) 前記変異配列標的ポリヌクレオチドが前記核酸試料中に0.05～5%の存在量レベルで存在することを判定する工程。

【請求項2】

前記単一反応混合物が、標的ポリヌクレオチド及び非標的ポリヌクレオチドの混合物を含む1～100ngの前記複数のポリヌクレオチドを含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、前記核酸試料中の2～500の異なるポリヌクレオチドの存在を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、前記核酸試料中に存在する前記異なるポリヌクレオチドのうちの85～100%を検出する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記核酸試料が、血液、血漿、唾液、痰、汗、涙、洗浄液、羊水、脳脊髄液、腹水、尿、大便、糞便、精液、および穿刺吸引物からなる群より選択される生体液を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記複数のタグ付きポリヌクレオチドのうちの任意の2つが、互いとは異なるタグを付加されており、前記複数のタグ付きポリヌクレオチドのうちの任意の2つが、両端に異なるオリゴヌクレオチドタグを付加されている、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記単一反応混合物が、 $10^4 \sim 10^9$ の異なるランダムタグ配列を有する複数のオリゴヌクレオチドタグを含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記ランダムタグ配列が、構造 $(N)_n(X)_x(M)_m(Y)_y$ を含み、配列中、
(i)「N」はランダムタグ配列を表し、前記ランダムタグ配列中の各塩基位置は、A、G、C、またはTから独立して選択され、かつ長さ「n」は2～10であり；

(ii)「X」は、前記複数のタグの全てにおいて同じである固定タグ配列を表し、かつ長さ「x」は2～10であり；

(iii)「M」はランダムタグ配列を表し、前記ランダムタグ配列中の各塩基位置は、A、G、C、またはTから独立して選択され、前記ランダムタグ配列「M」は前記ランダムタグ配列「N」とは異なり、かつ長さ「m」は2～10であり；

(iv)「Y」は、前記複数のタグの全てにおいて同じである固定タグ配列を表し、前記固定タグ配列「Y」は前記固定タグ配列「X」とは異なり、かつ長さ「y」は2～10であり；

(v)前記固定タグ配列「 $(X)_x$ 」及び「 $(Y)_y$ 」は、配列アライメントアンカーである、

請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、工程(b)でのプライマー伸長反応において個々のポリヌクレオチドに付加される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、工程(b)での酵素的ライゲーション反応において個々のポリヌクレオチドに付加され、前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、複数の二本鎖直鎖状アダプター、ステムループ

アダプター、または Y 字形アダプターを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、前記ランダムタグ配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 1】

増幅プライマー配列、配列決定プライマー配列、捕捉プライマー配列、及び切断可能部位からなる群より選択される少なくとも 1 つのユニバーサル配列を前記複数のポリヌクレオチドに付加することによって複数のタグ付き捕捉ポリヌクレオチドを生成する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

(a) 前記複数のタグ付き捕捉ポリヌクレオチドを、支持体に結合した複数の捕捉プライマーに結合させることによって、複数の捕捉されたポリヌクレオチドを形成する工程；及び

(b) 前記複数の捕捉されたポリヌクレオチドを配列決定する工程をさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記支持体が、 $10^4 \sim 10^9$ 個の配列決定反応部位のアレイを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記配列決定反応部位が、ヌクレオチド取り込み事象を検出する少なくとも 1 つの CMOS センサに動作可能に連結されている、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記工程 (d) での配列決定が、前記複数の捕捉されたポリヌクレオチド上に 1 種類のヌクレオチドを流すことをさらに含み、前記 1 種類のヌクレオチドが、光学的に検出可能な標識で標識されたヌクレオチド、光学的に検出可能な標識で標識されていないヌクレオチド、ターミネーターヌクレオチド、またはターミネーターヌクレオチドではないヌクレオチドからなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記工程 (d) での配列決定が、前記複数の捕捉されたポリヌクレオチド上に 2 ~ 4 つの異なる種類のヌクレオチドを流すことを含み、前記 2 ~ 4 つの異なる種類のヌクレオチドのうちの少なくとも 1 種類が、光学的に検出可能な標識で標識されたヌクレオチド、光学的に検出可能な標識で標識されていないヌクレオチド、ターミネーターヌクレオチド、またはターミネーターヌクレオチドではないヌクレオチドからなる群より選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法が、前記タグ付き増幅産物の集団の少なくとも一部を配列決定して、固定タグ配列と交互になっている異なるランダムタグ配列を含む前記ランダムタグ配列を有する複数の候補配列リードを生成する工程をさらに含み、前記ランダムタグ配列内の前記固定タグ配列が、配列アライメントアンカーを形成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記複数の候補配列リードの前記配列アライメントアンカーをアラインすることをさらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記工程 (d) での配列決定が、2 以下の偽陽性配列リードを含む複数の配列リードを生成する、請求項 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 4】

いくつかの実施形態では、工程 (d) における配列決定は、(i) 上部に捕捉されたポ

リヌクレオチドを有する複数の配列決定反応部位を有するか、または結合したポリヌクレオチドを担持するビーズが複数の配列決定反応部位に堆積されている支持体であって、配列決定反応部位上のポリヌクレオチドは、第1及び第2の捕捉されたポリヌクレオチドを含む、支持体を提供することと、(i i) 配列決定反応部位上に2～4つの異なる種類のヌクレオチド(例えば、d A T P、d G T P、d C T P、またはd T T Pのうちの2～4つの任意の組み合わせ)を流すこととをさらに含む。流されたヌクレオチドは、配列決定反応部位上でポリヌクレオチドと接触する。任意に、2～4つの異なる種類のヌクレオチドのうちの少なくとも1種類は、光学的に検出可能な標識で標識されているか、または光学的に検出可能な標識で標識されていない。任意に、2～4つの異なる種類のヌクレオチドの少なくとも1種類は、ターミネーターヌクレオチドであるかまたはターミネーターヌクレオチドではない。

[本発明1001]

以下の工程を含む、核酸試料中に存在する変異配列標的ポリヌクレオチドを検出するための方法：

(a) (i) 前記核酸試料由来の複数のポリヌクレオチド及び(i i) 複数のオリゴヌクレオチドタグを含有する単一反応混合物を形成する工程；

(b) 前記複数のオリゴヌクレオチドタグからの少なくとも1つのタグを前記複数のポリヌクレオチド内の個々のポリヌクレオチドに付加することによって、前記単一反応混合物内で複数のタグ付きポリヌクレオチドを生成する工程；

(c) 前記複数のタグ付きポリヌクレオチドを増幅することによって、タグ付き増幅産物の集団を生成する工程；

(d) 前記タグ付き増幅産物の集団の少なくとも一部を配列決定する工程；ならびに

(e) 前記変異配列標的ポリヌクレオチドが前記核酸試料中に0.05～5%の存在量レベルで存在することを判定する工程。

[本発明1002]

前記単一反応混合物が、標的ポリヌクレオチド及び非標的ポリヌクレオチドの混合物を含む1～100 ngの前記複数のポリヌクレオチドを含有する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、前記核酸試料中の5～100の異なるポリヌクレオチドの存在を検出する、本発明1001の方法。

[本発明1004]

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、前記核酸試料中に存在する前記異なるポリヌクレオチドのうちの85～100%を検出する、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記核酸試料が、生体液由来の無細胞核酸、生検組織由来の核酸、針生検由来の核酸、または細胞由来の核酸を含む、本発明1001の方法。

[本発明1006]

前記複数のタグ付きポリヌクレオチドのうちの任意の2つが、互いとは異なるタグを付加されており、前記複数のタグ付きポリヌクレオチドのうちの任意の2つが、両端に異なるオリゴヌクレオチドタグを付加されている、本発明1001の方法。

[本発明1007]

前記複数のオリゴヌクレオチドタグにおける個々のオリゴヌクレオチドタグが、固定タグ配列と交互になっている異なるランダムタグ配列を含むランダムタグ配列を有する領域を含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

前記単一反応混合物が、 $10^4 \sim 10^9$ の異なるランダムタグ配列を有する複数のオリゴヌクレオチドタグを含有する、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記ランダムタグ配列が、構造(N)_n(X)_x(M)_m(Y)_yを含み、配列中、(i) 「N」はランダムタグ配列を表し、前記ランダムタグ配列中の各塩基位置は、A

、G、C、またはTから独立して選択され、かつ長さ「n」は2～10であり；

(i i) 「 X 」は、前記複数のタグの全てにおいて同じである固定タグ配列を表し、かつ長さ「x」は2～10であり；

(i i i) 「 M 」はランダムタグ配列を表し、前記ランダムタグ配列中の各塩基位置は、A、G、C、またはTから独立して選択され、前記ランダムタグ配列「M」は前記ランダムタグ配列「N」とは異なり、かつ長さ「m」は2～10であり；

(i v) 「 Y 」は、前記複数のタグの全てにおいて同じである固定タグ配列を表し、前記固定タグ配列「Y」は前記固定タグ配列「X」とは異なり、かつ長さ「y」は2～10であり；

(v) 前記固定タグ配列「(X)_x」及び「(Y)_y」は、配列アライメントアンカーである、

本発明1008の方法。

[本発明1010]

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、工程(b)でのプライマー伸長反応において個々のポリヌクレオチドに付加され、前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、(i) 前記核酸試料由来の前記複数のポリヌクレオチド中の標的配列に特異的に結合する3'領域と、(i i) 前記核酸試料由来の前記複数のポリヌクレオチド中の標的配列に結合しない配列を有する5'テイルとを含む複数の一本鎖プライマーを含み、前記5'テイルが、前記ランダムタグ配列を含む配列を含む、本発明1009の方法。

[本発明1011]

前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、工程(b)での酵素的ライゲーション反応において個々のポリヌクレオチドに付加され、前記単一反応混合物中の前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、複数の二本鎖直鎖状アダプター、ステムループアダプター、またはY字形アダプターを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドタグが、前記ランダムタグ配列を含む、本発明1009の方法。

[本発明1012]

増幅プライマー配列、配列決定プライマー配列、捕捉プライマー配列、及び切断可能部位からなる群より選択される少なくとも1つのユニバーサル配列を前記複数のポリヌクレオチドに付加することによって複数のタグ付き捕捉ポリヌクレオチドを生成する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1013]

(a) 前記複数のタグ付き捕捉ポリヌクレオチドを、支持体に結合した複数の捕捉プライマーに結合させることによって、複数の捕捉されたポリヌクレオチドを形成する工程；及び

(b) 前記複数の捕捉されたポリヌクレオチドを配列決定する工程をさらに含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記支持体が、 $10^4 \sim 10^9$ 個の配列決定反応部位のアレイを含む、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記配列決定反応部位が、ヌクレオチド取り込み事象を検出する少なくとも1つのCMOSセンサに動作可能に連結されている、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記工程(b)での配列決定が、前記複数の捕捉されたポリヌクレオチド上に1種類のヌクレオチドを流すことをさらに含み、前記1種類のヌクレオチドが、光学的に検出可能な標識で標識されたヌクレオチド、光学的に検出可能な標識で標識されていないヌクレオチド、ターミネーターヌクレオチド、またはターミネーターヌクレオチドではないヌクレオチドからなる群より選択される、本発明1013の方法。

[本発明1017]

前記工程(b)での配列決定が、前記複数の捕捉されたポリヌクレオチド上に2～4つの

異なる種類のヌクレオチドを流すことをさらに含み、前記2～4つの異なる種類のヌクレオチドのうちの少なくとも1種類が、光学的に検出可能な標識で標識されたヌクレオチド、光学的に検出可能な標識で標識されていないヌクレオチド、ターミネーターヌクレオチド、またはターミネーターヌクレオチドではないヌクレオチドからなる群より選択される、本発明1013の方法。

[本発明1018]

前記方法が、前記タグ付き増幅産物の集団の少なくとも一部を配列決定して、固定タグ配列と交互になっている異なるランダムタグ配列を含む前記ランダムタグ配列を有する複数の候補配列リードを生成する工程をさらに含み、前記ランダムタグ配列内の前記固定タグ配列が、配列アライメントアンカーを形成する、本発明1007の方法。

[本発明1019]

前記複数の候補配列リードの前記配列アライメントアンカーをアラインすることをさらに含む、本発明1018の方法。

[本発明1020]

本発明1001の方法によって生成された、複数のタグ付きポリヌクレオチド。