

【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 3 年 2 月 4 日 (2021.2.4)

【公表番号】特表 2020-504606 (P2020-504606A)  
 【公表日】令和 2 年 2 月 13 日 (2020.2.13)  
 【年通号数】公開・登録公報 2020-006  
 【出願番号】特願 2019-533331 (P2019-533331)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6855 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6806 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6855 Z

C 1 2 Q 1/6874 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 12 月 18 日 (2020.12.18)

【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】

異なる程度の修飾を有する核酸を含む核酸集団を解析する方法であって、

前記核酸集団を、前記修飾を有する核酸と優先的に結合する作用物質と接触させるステップと、

前記作用物質と結合している第 1 のプールの核酸を、前記作用物質と結合していない第 2 のプールの核酸から分離するステップであって、前記第 1 のプールの核酸が、前記修飾について過剰提示され、前記第 2 のプール中の前記核酸が、前記修飾について提示不足である、ステップと、

前記第 1 のプールおよび / または第 2 のプール中の前記核酸を、前記第 1 のプールおよび前記第 2 のプール中の前記核酸を区別する 1 種または複数の核酸タグと連結して、タグが付けられた核酸の集団を産生するステップと、

標識された核酸を増幅するステップであって、前記核酸および連結されたタグが増幅される、ステップと、

増幅された核酸および連結されたタグの配列データをアッセイするステップであって、前記アッセイするステップによって、前記タグを解読するための配列データを得て、配列データがアッセイされた前記核酸が、前記第 1 または前記第 2 のプール中の鋳型から増幅されたか否かを明らかにする、ステップと

を含む方法。

【請求項 2】

前記タグを解読して、配列データがアッセイされた前記核酸が、前記第 1 または前記第 2 のプール中の鋳型から増幅されたか否かを明らかにするステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記作用物質と結合している核酸を洗浄するステップと、前記第 1 および第 2 のプールに対して中間の程度に複製後修飾を有する核酸を含む第 3 のプールとして洗浄物を回収す

るステップとをさらに含む、請求項 1 または 請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

配列データをアッセイするステップの前に、前記増幅された標識された核酸が、標的配列について濃縮される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

アッセイするステップの前に、前記プールからの前記タグが付けられた核酸を組み合わせるステップを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸集団が、体液試料に由来する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記核酸集団が、無細胞核酸集団である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記体液試料が、がんを有すると疑われる対象に由来する、請求項 6 または 請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記修飾が、核酸のタンパク質との結合である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記タンパク質が、ヒストンまたは転写因子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記修飾が、ヌクレオチドへの複製後修飾である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記複製後修飾が、メチル化シトシンであり、前記作用物質の核酸との結合の程度が、前記核酸中のシトシンメチル化の程度とともに増大する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記複製後修飾が、5 - メチル - シトシンであり、前記作用物質の核酸との結合の程度が、前記核酸中の 5 - メチル - シトシンの程度とともに増大する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記作用物質が、磁気ビーズとコンジュゲートされたメチル結合ドメイン ( M B D ) である、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記配列データが、体細胞または生殖系列変異の存在を示す、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

参照による援用

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が、参照により組み込まれると具体的に、個別に示されるかのように同程度に参照により本明細書に組み込まれる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

二本鎖 DNA、一本鎖 DNA および一本鎖 RNA から選択される核酸のうち少なくとも 2 種の形態を含む核酸集団を解析する方法であって、前記少なくとも 2 種の形態の各々が、複数の分子を含み、前記方法が、

( a ) 核酸の前記形態のうち少なくとも 1 種を、前記形態を互いに区別するために少なくとも 1 種のタグ核酸と連結するステップと、

( b ) その少なくとも 1 種が少なくとも 1 種の核酸タグに連結された核酸の前記形態を増幅するステップであって、前記核酸および連結された核酸タグが増幅されて増幅された核酸を産生し、そのうち前記少なくとも 1 種の形態から増幅されたものにタグが付けられている、ステップと、

( c ) その少なくとも一部にタグが付けられている前記増幅された核酸の配列データをアッセイするステップであって、前記アッセイするステップによって、前記増幅された核酸の前記タグ核酸分子を解読するのに十分な配列情報を得て、前記集団中の核酸の前記形態を明らかにし、配列データがアッセイされた前記タグ核酸分子に連結された前記増幅された核酸の元の鋳型を提供する、ステップと  
を含む、方法。

( 項目 2 )

前記増幅された核酸の前記タグ核酸分子を解読して、前記集団中の核酸の前記形態を明らかにし、配列データがアッセイされた前記タグ核酸分子に連結された前記増幅された核酸の元の鋳型を提供するステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

( 項目 3 )

前記形態のうち少なくとも 1 種を、その他の形態のうち 1 種または複数に対して濃縮するステップをさらに含む、項目 1 または 2 に記載の方法。

( 項目 4 )

前記集団中の核酸の各形態の前記分子の少なくとも 70 % がステップ ( b ) において増幅される、項目 1 または 2 に記載の方法。

( 項目 5 )

少なくとも 3 種の形態の核酸が前記集団中に存在し、前記形態のうち少なくとも 2 種が、前記 3 種の形態の各々を互いに区別する異なるタグ核酸形態に連結されている、項目 1 または 2 に記載の方法。

( 項目 6 )

前記集団中の前記少なくとも 3 種の形態の核酸の各々が、異なるタグに連結されている、項目 5 に記載の方法。

( 項目 7 )

同一形態の各分子が、同一の同定タグを含むタグに連結されている、項目 1 または 2 に記載の方法。

( 項目 8 )

同一形態の分子が、異なる種類のタグに連結されている、項目 1 または 2 に記載の方法。

( 項目 9 )

ステップ ( a ) が、前記集団を、タグが付けられたプライマーを用いる逆転写に付すステップを含み、前記タグが付けられたプライマーが、前記集団中の RNA から作製された cDNA 中に組み込まれる、項目 1 または 2 に記載の方法。

( 項目 10 )

前記逆転写が、配列特異的である、項目 9 に記載の方法。

( 項目 11 )

前記逆転写がランダムである、項目 9 に記載の方法。

( 項目 12 )

前記 cDNA と二本鎖を形成している RNA を分解するステップをさらに含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 13 )

一本鎖 DNA を二本鎖 DNA から分離するステップと、核酸タグを前記二本鎖 DNA にライゲーションするステップとをさらに含む、項目 5 に記載の方法。

( 項目 14 )

前記一本鎖DNAが、1種または複数の捕捉用プローブとのハイブリダイゼーションによって分離される、項目13に記載の方法。

(項目15)

c i r c l i g a s eを用いて一本鎖DNAを環状化するステップと、核酸タグを前記二本鎖DNAにライゲーションするステップとをさらに含む、項目5に記載の方法。

(項目16)

アッセイするステップの前に、異なる形態の核酸を含むタグが付けられた核酸をプールするステップを含む、項目1に記載の方法。

(項目17)

前記核酸集団が、体液試料に由来する、項目1から16に記載の方法。

(項目18)

前記体液試料が、血液、血清または血漿である、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記核酸集団が、無細胞核酸集団である、項目1または2に記載の方法。

(項目20)

前記体液試料が、がんを有すると疑われる対象に由来する、項目18に記載の方法。

(項目21)

前記配列データが、体細胞または生殖系列変異の存在を示す、項目1から20に記載の方法。

(項目22)

前記配列データが、コピー数変異の存在を示す、項目1から21に記載の方法。

(項目23)

前記配列データが、単一ヌクレオチド変異(SNV)、挿入欠失または遺伝子融合の存在を示す、項目1から22に記載の方法。

(項目24)

異なる程度の修飾を有する核酸を含む核酸集団を解析する方法であって、

前記核酸集団を、前記修飾を有する核酸と優先的に結合する作用物質と接触させるステップと、

前記作用物質と結合している第1のプールの核酸を、前記作用物質と結合していない第2のプールの核酸から分離するステップであって、前記第1のプールの核酸が、前記修飾について過剰提示され、前記第2のプール中の前記核酸が、前記修飾について提示不足である、ステップと、

前記第1のプールおよび/または第2のプール中の前記核酸を、前記第1のプールおよび前記第2のプール中の前記核酸を区別する1種または複数の核酸タグと連結して、タグが付けられた核酸の集団を産生するステップと、

標識された核酸を増幅するステップであって、前記核酸および連結されたタグが増幅される、ステップと、

増幅された核酸および連結されたタグの配列データをアッセイするステップであって、前記アッセイするステップによって、前記タグを解読するための配列データを得て、配列データがアッセイされた前記核酸が、前記第1または前記第2のプール中の鋳型から増幅されたか否かを明らかにする、ステップと

を含む方法。

(項目25)

前記タグを解読して、配列データがアッセイされた前記核酸が、前記第1または前記第2のプール中の鋳型から増幅されたか否かを明らかにするステップを含む、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記修飾が、核酸のタンパク質との結合である、項目25または26に記載の方法。

(項目27)

前記タンパク質が、ヒストンまたは転写因子である、項目25または26に記載の方法

。

(項目 2 8)

前記修飾が、ヌクレオチドへの複製後修飾である、項目 2 5 または 2 6 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記複製後修飾が、5 - メチル - シトシンであり、前記作用物質の核酸との結合の程度が、前記核酸中の 5 - メチル - シトシンの程度とともに増大する、項目 2 7 に記載の方法

。

(項目 3 0)

前記複製後修飾が、5 - ヒドロキシメチル - シトシンであり、前記作用物質の核酸との結合の程度が、前記核酸中の 5 - ヒドロキシメチル - シトシンの程度とともに増大する、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記複製後修飾が、5 - ホルミル - シトシンまたは 5 - カルボキシル - シトシンであり、前記作用物質の結合の程度が、前記核酸中の 5 - ホルミル - シトシンまたは 5 - カルボキシル - シトシンの程度とともに増大する、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記作用物質と結合している核酸を洗浄するステップと、前記第 1 および第 2 のプールに対して中間の程度に複製後修飾を有する核酸を含む第 3 のプールとして洗浄物を回収するステップとをさらに含む、項目 2 5 または 2 6 に記載の方法。

(項目 3 3)

アッセイするステップの前に、前記第 1 および第 2 のプールからタグが付けられた核酸をプールするステップを含む、項目 2 5 または 2 6 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記作用物質が、5 - メチル結合ドメイン磁気ビーズである、項目 2 5 または 2 6 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記核酸集団が、体液試料に由来する、項目 2 4 から 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記体液試料が、血液、血清または血漿である、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記核酸集団が、無細胞核酸集団である、項目 2 5 または 2 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記体液試料が、がんを有すると疑われる対象に由来する、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記配列データが、体細胞または生殖系列変異の存在を示す、項目 2 5 から 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記配列データが、コピー数変異の存在を示す、項目 2 5 から 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

項目 2 5 から 3 9 のいずれかに記載の方法であって、前記配列データが、単一ヌクレオチド変異 (SNV)、挿入欠失または遺伝子融合の存在を示し、

i v) 核酸であって、前記核酸および前記連結されたタグが増幅され、NGS 機器を用いて分子タグが付けられた分割物をアッセイする、核酸と、

v) 前記タグを解読するための配列データを作成するためのソフトウェアモジュールと

、

v i) 前記タグを解読して、配列データがアッセイされた前記核酸が、前記第 1 または前記第 2 のプール中の鋳型から増幅されたか否かを明らかにするために前記配列データを解析するためのソフトウェアモジュールと。