

【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5月20日(2021.5.20)

【公表番号】特表2020-516281(P2020-516281A)

【公表日】令和2年6月11日(2020.6.11)

【年通号数】公開・登録公報2020-023

【出願番号】特願2019-555645(P2019-555645)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 1 2 Q	1/6806	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6869	(2018.01)
C 4 0 B	40/06	(2006.01)
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/115	(2010.01)
C 1 2 Q	1/6855	(2018.01)

【F I】

C 1 2 N	15/11	Z N A Z
C 1 2 Q	1/6806	Z
C 1 2 Q	1/6869	Z
C 4 0 B	40/06	
C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 M	1/34	Z
C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	15/115	Z
C 1 2 Q	1/6855	Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年4月12日(2021.4.12)

【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】

分析のために核酸を調製する方法であって、

(a) 5' - 3' ポリメラーゼ活性および 3' - 5' プルーフリーディング活性を提供する1つまたは複数の酵素ならびに4つの標準ヌクレオチドタイプの作用により試料中の一本鎖オーバーハングを有する二本鎖核酸を平滑末端とするステップであって、5' 末端を有する一本鎖オーバーハングが、前記ポリメラーゼ活性による相補鎖の伸長のための鋳型として働き、3' 末端を有する一本鎖オーバーハングが、前記プルーフリーディング活性により消化されて平滑末端化核酸を生じる、ステップと、

(b) 前記平滑末端化核酸を前記試料の他の成分から分離せずに、3' - 5' プルーフリーディング機能のないポリメラーゼの作用により前記平滑末端化核酸の末端に尾部を付加するステップであって、これにより平滑末端化核酸の3' 末端へのヌクレオチドの非鋳型特異的付加が実施され、A が優先的に、次に G が優先的に、次に C または T が付加される、ステップと；

(c) ステップ(b)の前記核酸を3'末端に単一ヌクレオチド T オーバーハングを有する少なくとも部分的に二本鎖のアダプターおよび3'末端に単一ヌクレオチド C オーバーハングを有する少なくとも部分的に二本鎖のアダプターにアニールするステップと；
(d) 前記核酸を前記アダプターにライゲーションするステップと
を含む、方法。

【請求項2】

ステップ(a)の後、前記1つまたは複数の酵素を変性させるステップをさらに含む、
請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記試料を、前記1つまたは複数の酵素、前記4つの標準ヌクレオチドタイプおよび3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼと接触させるステップをさらに含み、必要に応じて、前記試料を、前記1つまたは複数の酵素、前記4つの標準ヌクレオチドタイプおよび3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼと一緒に接触させる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

ステップ(b)が、ステップ(a)よりも高い温度で実施され、必要に応じて、ステップ(a)が、周囲温度で実施され、ステップ(b)が、60°を超える温度で実施される、
請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

(i) 前記1つまたは複数の酵素が、5' - 3' ポリメラーゼ活性および3' - 5' プルーフリーディング活性を有するポリメラーゼであり、必要に応じて、5' - 3' ポリメラーゼ活性および3' - 5' プルーフリーディング活性を有する前記ポリメラーゼが、T4 ポリメラーゼまたはクレノウ大断片であり、および/または

(ii) 3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼが、熱安定性ポリメラーゼであり、前記方法が、ステップ(a)の後、前記試料の温度を上げるステップであって、5' - 3' ポリメラーゼ活性および3' - 5' プルーフリーディング活性を有する前記ポリメラーゼを不活化するステップをさらに含む、
請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

(e) 前記アダプターにライゲーションされた前記核酸を增幅するステップと；(f) 前記核酸を分析するステップとをさらに含み、必要に応じて、

(i) ステップ(a)～(e)が、単一チュープで実施されるか、

(ii) 前記試料中の利用可能な二本鎖核酸の少なくとも70%が分析されるか、

(iii) ステップ(f)が、前記アダプターにライゲーションされている前記核酸をシーケンシングすることを含み、必要に応じて、前記シーケンシングすることで、ステップ(c)または(d)においてオーバーハングを形成したヌクレオチドをシーケンシングするか、

(iv) 前記分析するステップが、体細胞または生殖系列バリアントを検出するか、

(v) 前記分析するステップが、コピー数変異を検出するか、または

(vi) 前記分析するステップが、単一ヌクレオチド変異(SNV)を検出する、
請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記試料を、前記ライゲーションするステップでの前記3'末端へのヌクレオチドの非鑄型特異的付加を受けなかった平滑末端化二本鎖核酸とライゲーションする少なくとも部分的に二本鎖の平滑末端化アダプターと接触させるステップをさらに含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

(i) 3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼが、Taq ポリメラーゼであるか、

(ii) 少なくともステップ(a)～(d)が、単一チュープで実施されるか、

(i i i) 少なくともステップ(a) ~ (d) では、前記試料から成分が除去されないか、

(i v) 単一ヌクレオチド T を有する少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの単一ヌクレオチド C を有するものに対するモル比が、 4 : 1 ~ 2 : 1 であり、必要に応じて、平滑末端化アダプターの尾部付加アダプターに対するモル比が、 1 : 5 ~ 1 : 5 0 0 であるか、および / または

(v) 前記試料中の前記二本鎖核酸の少なくとも 7 0 % が、アダプターにつながっている、

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

二本鎖 D N A をアダプタータグ付き D N A に変換する方法であって、

(a) 二本鎖 D N A 分子の集団を少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの集団と接触させるステップであって、

(i) 二本鎖 D N A 分子の前記集団が、単一ヌクレオチド A オーバーハングを含む D N A 分子および単一ヌクレオチド G オーバーハングを含む D N A 分子を含み、単一ヌクレオチド A オーバーハングは、前記集団中で単一ヌクレオチド G オーバーハングよりも豊富であり（例えば、10倍、100倍、1000倍）、

(i i) 少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの前記集団が、単一ヌクレオチド T オーバーハングを含むアダプターおよび単一ヌクレオチド C オーバーハングを含むアダプターを含む、ステップと；

(b) 前記アダプターを前記 D N A 分子にライゲーションするステップであって、これによりアダプタータグ付き D N A を生成するステップとを含む、方法。

【請求項 10】

(i) 二本鎖 D N A 分子の前記集団が、単一ヌクレオチド C オーバーハングを含む D N A 分子、単一ヌクレオチド T オーバーハングを含む D N A 分子および平滑末端のうちの少なくとも 1 つをさらに含み、

(i i) 少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの前記集団が、単一ヌクレオチド G オーバーハングを含むアダプター、単一ヌクレオチド A オーバーハングを含むアダプターおよび平滑末端のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記少なくとも部分的に二本鎖のアダプターが、 N G S (「次世代シーケンシング」) プライマー結合部位および D N A バーコードを含み、必要に応じて、

試料インデックスバーコードを含む増幅プライマーおよびフローセル支持体に固定されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするように適合されたヌクレオチド配列を使用して前記アダプタータグ付き D N A を増幅するステップ

をさらに含む、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの前記集団が、複数の異なる D N A バーコードを含み、必要に応じて、二本鎖 D N A 分子の両末端に付着可能なバーコード組合せの数が、前記集団中で二本鎖 D N A 分子の数よりも少なく、例えば、5 ~ 1 0 , 0 0 0 の間の異なる組合せである、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

(i) 前記アダプターが、 Y 型アダプターであるか、および / または

(i i) 核酸集団が、無細胞核酸集団、好ましくは無細胞 D N A である、

請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記試料が、体液試料であり、必要に応じて、前記試料が、全血、血清、または血漿である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記試料が、がんを有すると疑われる対象由来である、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】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

上または下に引用されるすべての特許申請、ウェブサイト、他の出版物、および受託番号などは、あたかもそれぞれ個々の項目が参照によりそのように組み込まれることが明確におよび個別に示されている場合と同じ程度にあらゆる目的のためにその全体が参照により組み込まれる。配列の異なるバージョンが異なる時期の受託番号に関連している場合、本出願の有効出願日にその受託番号に関連しているバージョンを意味する。有効出願日とは、実際の出願日よりも早期、または該当する場合、受託番号に言及する優先権出願の出願日を意味する。同様に、出版物、またはウェブサイトなどの異なるバージョンが異なる時期に公表される場合、他の方法で示されていなければ、出願の有効出願日の直近に公表されたバージョンを意味する。本発明のいかなる特長、ステップ、要素、実施形態、または態様も、明確に他の方法で示されていなければ、他のいずれとも組み合わせて使用することが可能である。本発明は、明快さおよび理解を目的に図表および実施例によりある程度詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲内で、ある特定の変更および改変を実行してもよいことは明らかである。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

分析のために核酸を調製する方法であって、

(a) 5' - 3' ポリメラーゼ活性および 3' - 5' プルーフリーディング活性を提供する 1 つまたは複数の酵素ならびに 4 つの標準ヌクレオチドタイプの作用により試料中の一本鎖オーバーハングを有する二本鎖核酸を平滑末端とするステップであって、5' 末端を有する一本鎖オーバーハングが、前記ポリメラーゼ活性による相補鎖の伸長のための鑄型として働き、3' 末端を有する一本鎖オーバーハングが、前記プルーフリーディング活性により消化されて平滑末端化核酸を生じる、ステップと；

(b) 前記平滑末端化核酸を前記試料の他の成分から分離せずに、3' - 5' プルーフリーディング機能のないポリメラーゼの作用により前記平滑末端化核酸の末端に尾部を付加するステップであって、これにより平滑末端化核酸の 3' 末端へのヌクレオチドの非鑄型特異的付加が実施され、A が優先的に、次に G が優先的に、次に C または T が付加される、ステップと；

(c) ステップ (c) の前記核酸を 3' 末端に單一ヌクレオチド T または C オーバーハングを有する少なくとも部分的に二本鎖のアダプターにアニールするステップと；

(d) 前記核酸を前記アダプターにライゲーションするステップとを含む、方法。

(項目 2)

ステップ (a) の後、前記 1 つまたは複数の酵素を変性させるステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記試料を、前記 1 つまたは複数の酵素、前記 4 つの標準ヌクレオチドタイプおよび 3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼと接触させ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)

前記試料を、前記 1 つまたは複数の酵素、前記 4 つの標準ヌクレオチドタイプおよび 3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼと一緒に接触させる、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

ステップ(b)が、ステップ(a)よりも高い温度で実施される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6)

ステップ(a)が、周囲温度で実施され、ステップ(b)が、60 を超える温度で実施される、項目5に記載の方法。

(項目 7)

前記1つまたは複数の酵素が、5' - 3' ポリメラーゼ活性および3' - 5' プルーフリーディング活性を有するポリメラーゼである、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼが、熱安定性ポリメラーゼであり、前記方法が、ステップ(a)の後、前記試料の温度を上げるステップであって、5' - 3' ポリメラーゼ活性および3' - 5' プルーフリーディング活性を有する前記ポリメラーゼを不活化するステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

(e) 前記アダプターにライゲーションされた前記核酸を増幅するステップと；(f) 前記核酸を分析するステップとをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 10)

前記試料を、前記ライゲーションするステップでの前記3' 末端へのヌクレオチドの非鑄型特異的付加を受けなかった平滑末端化二本鎖核酸とライゲーションする少なくとも部分的に二本鎖の平滑末端化アダプターと接触させるステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 11)

5' - 3' ポリメラーゼ活性および3' - 5' プルーフリーディング活性を有する前記ポリメラーゼが、T4ポリメラーゼまたはクレノウ大断片である、項目7に記載の方法。

(項目 12)

3' - 5' プルーフリーディング機能のない前記ポリメラーゼが、Taqポリメラーゼである、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 13)

少なくともステップ(a)～(d)が、単一チューブで実施される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 14)

少なくともステップ(a)～(d)では、前記試料から成分が除去されない、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 15)

ステップ(a)～(e)が、単一チューブで実施される、項目9に記載の方法。

(項目 16)

單一ヌクレオチドTを有する少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの單一ヌクレオチドCを有するものに対するモル比が、4 : 1 ~ 2 : 1 である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 17)

平滑末端化アダプターの尾部付加アダプターに対するモル比が、1 : 5 ~ 1 : 500 である、項目16に記載の方法。

(項目 18)

前記試料中の前記二本鎖核酸の少なくとも70 %が、アダプターにつながっている、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 19)

前記試料中の利用可能な二本鎖核酸の少なくとも70 %が分析される、項目9に記載の方法。

(項目 20)

ステップ(f)が、前記アダプターにライゲーションされている前記核酸をシーケンシングすることを含む、項目9に記載の方法。

(項目21)

前記シーケンシングすることで、ステップ(c)または(d)においてオーバーハングを形成したヌクレオチドをシーケンシングする、項目20に記載の方法。

(項目22)

二本鎖DNAをアダプタータグ付きDNAに変換する方法であって、

(a) 二本鎖DNA分子の集団を少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの集団と接触させるステップであって、

(i) 二本鎖DNA分子の前記集団が、単一ヌクレオチドAオーバーハングを含むDNA分子および単一ヌクレオチドGオーバーハングを含むDNA分子を含み、単一ヌクレオチドAオーバーハングは、前記集団中で単一ヌクレオチドGオーバーハングよりも豊富であり（例えば、10倍、100倍、1000倍）、

(ii) 少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの前記集団が、単一ヌクレオチドTオーバーハングを含むアダプターおよび単一ヌクレオチドCオーバーハングを含むアダプターを含む、ステップと；

(b) 前記アダプターを前記DNA分子にライゲーションするステップであって、これによりアダプタータグ付きDNAを生成するステップとを含む、方法。

(項目23)

(i) 二本鎖DNA分子の前記集団が、単一ヌクレオチドCオーバーハングを含むDNA分子、単一ヌクレオチドTオーバーハングを含むDNA分子および平滑末端のうちの少なくとも1つをさらに含み、

(ii) 少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの前記集団が、単一ヌクレオチドGオーバーハングを含むアダプター、単一ヌクレオチドAオーバーハングを含むアダプターおよび平滑末端のうちの少なくとも1つをさらに含む、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記少なくとも部分的に二本鎖のアダプターが、NGS（「次世代シーケンシング」）プライマー結合部位およびDNAバーコードを含む、項目22または23に記載の方法。

(項目25)

前記少なくとも部分的に二本鎖のアダプターの前記集団が、複数の異なるDNAバーコードを含む、項目22から25のいずれか一項に記載の方法。

(項目26)

二本鎖DNA分子の両末端に付着可能なバーコード組合せの数が、前記集団中で二本鎖DNA分子の数よりも少なく、例えば、5～10,000の間の異なる組合せである、項目25に記載の方法。

(項目27)

試料インデックスバーコードを含む増幅プライマーおよびフローセル支持体に固定されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするように適合されたヌクレオチド配列を使用して前記アダプタータグ付きDNAを増幅するステップをさらに含む、項目24に記載の方法。

(項目28)

前記アダプターが、Y型アダプターである、項目22から27のいずれか一項に記載の方法。

(項目29)

前記試料が、体液試料である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目30)

前記試料が、全血、血清、または血漿である、項目29に記載の方法。

(項目31)

核酸集団が、無細胞核酸集団、好ましくは無細胞DNAである、項目22から30のい

すれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記試料が、がんを有すると疑われる対象由来である、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 3 3)

前記分析するステップが、体細胞または生殖系列バリアントを検出する、項目 9 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記分析するステップが、コピー数変異を検出する、項目 9 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記分析するステップが、単一ヌクレオチド変異 (S N V) を検出する、項目 9 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記項目のいずれかに記載の方法により生成される適合された核酸の集団であって、複数の核酸分子を含み、そのそれぞれが、核酸断片とアダプターの間に A / T または G / C 塩基対を有するバーコードを含むアダプターが両側に隣接している前記核酸断片を含む、集団。

(項目 3 7)

前記複数の核酸分子が、少なくとも 1 0 0 , 0 0 0 分子である、項目 3 6 に記載の集団。

(項目 3 8)

A / T 塩基対の G / C 塩基対に対する比が、2 : 1 ~ 4 : 1 の間である、項目 3 6 または 3 7 に記載の集団。

(項目 3 9)

前記集団中の核酸分子の少なくとも 9 9 % が、異なるバーコードを有するアダプターが隣接している核酸断片を有する、項目 3 6 から 3 8 のいずれか一項に記載の集団。

(項目 4 0)

それぞれ T および C 単一ヌクレオチド 3 ' 尾部を有する少なくとも部分的に二本鎖のアダプターであって、前記尾部を除いて互いに同一であるアダプターの対を含むキット。

(項目 4 1)

前記アダプターが、配列番号 1 および 2 、ならびに 3 および 2 のオリゴヌクレオチドを含む Y 型アダプターである、項目 4 0 に記載のキット。

(項目 4 2)

T 4 ポリメラーゼまたはクレノウ大断片、および T a q ポリメラーゼ、ならびに 4 つの標準ヌクレオチドタイプをさらに含む、項目 4 0 または 4 1 に記載のキット。