

【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 4 年 11 月 14 日(2022.11.14)

【国際公開番号】WO2020/097315

【公表番号】特表 2022-506546(P2022-506546A)

【公表日】令和 4 年 1 月 17 日(2022.1.17)

【年通号数】公開公報(特許)2022-007

【出願番号】特願 2021-523956(P2021-523956)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6874(2018.01)

C 1 2 Q 1/6837(2018.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6874 Z

C 1 2 Q 1/6837 Z Z N A

C 1 2 Q 1/686 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 11 月 4 日(2022.11.4)

【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】

試料中の核酸標的を標識するための方法であって、

核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、
各オリゴヌクレオチドバーコードは、第 1 のユニバーサル配列、分子標識、および前記核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；

前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；

ランダムプライマーを前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、前記ランダムプライマーの各々は、第 2 のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；ならびに

前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成することを含む方法。

【請求項 2】

前記第 1 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および前記第 2 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して前記複数の伸長産物を増幅し、それにより第 1 の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(a)前記複数の伸長産物の増幅は、配列決定プライマーならびに / もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに / もしくはそれらの一部を、前記複数の伸長産物に付加することを含む；および / または

(b)前記方法は、前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、前記試料中の前記核酸標的のコピー

10

20

30

40

50

数を決定することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

試料中の核酸標的の数を決定するための方法であって、

核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第 1 のユニバーサル配列、分子標識、および前記核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；

前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；

ランダムプライマーを前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、前記ランダムプライマーの各々は、第 2 のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；

前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成すること；

前記第 1 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および前記第 2 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して前記複数の伸長産物を増幅し、それにより第 1 の複数のバーコード化アンプリコンを生成すること；および

前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、前記試料中の前記核酸標的のコピー数を決定すること

を含む方法。

【請求項 5】

核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含み、

前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、前記複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含み、および

前記試料中の前記核酸標的のコピー数の決定は、前記複数の核酸標的の各々の配列を含む前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する前記分子標識の数に基づき、前記試料中の前記複数の核酸標的の各々の数を決定することを含み、および、任意に、前記複数の核酸標的の各々の配列は、前記複数の核酸標的の各々の部分配列を含んでいても良い、請求項 3 (b) または請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコン中の前記核酸標的の配列は、前記核酸標的の部分配列を含む、請求項 3 (b) ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および前記第 2 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンを増幅し、それにより第 2 の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

(a) 前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンの増幅は、配列決定プライマーならびに / もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに / もしくはそれらの一部を、前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンに付加することを含む；

(b) 前記方法が、前記第 2 の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、前記試料中の前記核酸標的のコピー数を決定することを含む；

(c) 核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチ

ドバーコードと接触させることを含む；

(d) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、前記複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含む；および/または

(e) 前記試料中の前記核酸標的のコピー数の決定は、前記複数の核酸標的の各々の配列を含む前記第2の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する前記分子標識の数に基づき、前記試料中の前記複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む、および/または

(f) 前記第2の複数のバーコード化アンプリコン中の前記核酸標的の配列は、前記核酸標的の部分配列を含む、請求項7に記載の方法。

10

【請求項9】

前記第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび/または前記第2の複数のバーコード化アンプリコンの各々は、前記第1のユニバーサル配列、前記第2のユニバーサル配列、または両方の少なくとも一部分を含む、請求項2～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

(a) 前記第1のユニバーサル配列および前記第2のユニバーサル配列は

____(i) 同じである；もしくは

____(ii) 異なる；および/または

(b) 前記第1のユニバーサル配列および/または前記第2のユニバーサル配列は、配列決定プライマーならびに/もしくは配列決定アダプターの結合部位、それらの相補配列、ならびに/もしくはそれらの一部を含む、任意に、

20

(i) 前記配列決定アダプターは、P5配列、P7配列、それらの相補配列、ならびに/もしくはそれらの一部を含んでいてもよく；または

(ii) 前記配列決定プライマーは、リード1配列決定プライマー、リード2配列決定プライマー、それらの相補配列、ならびに/もしくはそれらの一部を含んでいてもよく；および/または

(c) 前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、逆転写酵素を使用して、前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含み、任意に、前記逆転写酵素は、ウイルス逆転写酵素を含んでいてもよく；および/または

30

(d) (i) 前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含み、任意に、前記DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含んでもよく；もしくは

(ii) 前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長することを含み、任意に前記DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含んでもよい、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項11】

(a) 前記第1の複数のバーコード化アンプリコンならびに/もしくは前記第2の複数のバーコード化アンプリコンは、全トランスクリプトーム増幅(WTA)産物を含む；

(b) 前記第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび/または前記第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも10%に相当する；および/または

(c) 前記第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび/または前記第2の複数のバーコ

50

ード化アンプリコンは、単一細胞の mRNA の少なくとも 50 % または少なくとも 90 % に相当する、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

- (a) 前記複数の核酸標的の 1 つまたは複数の、低発現遺伝子の mRNA を含む；
- (b) 前記ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含み、任意に前記ヌクレオチドのランダム配列は、約 4 ~ 約 30 ヌクレオチド長であってもよく、さらに、任意に前記ヌクレオチドのランダム配列は、6 または 9 ヌクレオチド長であってもよい；
- (c) 前記標的結合性領域は、オリゴ d T 配列、ランダム配列、標的特異的配列、またはそれらの組合せを含む；
- (d) 前記標的結合性領域は、ポリ (d T) 領域を含み、前記核酸標的は、ポリ (d A) 領域を含む；
- (e) 前記方法は、ランダムプライマーを、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させるステップ、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長するステップ、および前記複数の伸長産物を増幅するステップを繰り返すことを含む；
- (f) 前記方法は、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを第 3 の複数のバーコード化アンプリコンを生成するための鋳型として使用して、第 3 の複数のバーコード化アンプリコンを合成することを含み、

任意に、

- (i) 第 3 の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅を実施することを含んでもよく；
- (ii) 第 3 の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、前記第 1 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および標的特異的プライマーを使用する PCR 増幅を含んでいてもよく、任意に、前記標的特異的プライマーは、免疫受容体に特異的にハイブリダイズしてもよく、任意に、前記免疫受容体は、T 細胞受容体 (TCR) および / または B 細胞受容体 (BCR) 受容体であってもよく；ならびに / もしくは

(iii) 前記方法は前記第 3 の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物の配列情報を得ることを含んでいてもよく、任意に、前記配列情報の取得は、配列決定アダプターを、前記第 3 の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付着させることを含んでいてもよい；および / または

- (g) 前記試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む；および / または
- (h) 前記試料は、末梢血単核細胞または免疫細胞を含み、前記免疫細胞は、B 細胞、T 細胞、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記複数の伸長産物の増幅は、固体支持体の存在下では実施されない、請求項 2 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

- (a) 前記方法が、RNA-seq 誘導性プライミング、末端修復、および / またはアダプターライゲーションを含まない、
- (b) 前記方法が、断片化、タグ付け、または両方を含まない、
- (c) 前記第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、バーコード化デオキシリボ核酸 (DNA) 分子、バーコード化リボ核酸 (RNA) 分子、もしくは両方を含む、
- (d) 前記核酸標的は核酸分子を含み、ならびに、任意に、

(i) 前記核酸分子は、リボ核酸 (RNA)、メッセンジャー RNA (mRNA)、マイクロ RNA、低分子干渉 RNA (siRNA)、RNA 分解産物、ポリ (A) テイルを含む RNA、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよく；ならびに / もしくは

(ii) 前記 m R N A は免疫受容体をコードしてもよく、ならびに / もしくは

(iii) 前記核酸標的は細胞成分結合性試薬を含んでもよく、任意に、前記核酸分子は、前記細胞成分結合性試薬に付随していてもよく、任意に、前記方法は、前記核酸分子および前記細胞成分結合性試薬を解離させることを含んでいてもよく、および / または

(e) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも 10 個は、異なる分子標識配列を含む；

(f) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識は、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む；

(g) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、個体支持体に付随しており、任意に

10

、
(i) 前記固体支持体は、合成粒子、平面状表面、またはそれらの組合せを含んでもよく
；ならびに / もしくは

(ii) 同じ固体支持体に付随している前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、同一の試料標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識は、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含んでいてもよく、および / または

(h) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、細胞標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含んでいてもよく、

任意に

(i) 同じ固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、同じ細胞標識を含んでいてもよく；ならびに / もしくは

20

(i i) 異なる固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、異なる細胞標識を含んでいてもよい、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記試料は単一細胞を含み、前記方法は、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、前記試料中の前記単一細胞に付随させることを含み、任意に、

(a) 前記方法は、前記合成粒子を前記単一細胞に付随させた後で前記単一細胞を溶解することを含んでいてもよく、前記単一細胞の溶解は、前記試料を加熱すること、前記試料を界面活性剤と接触させること、前記試料の p H を変化させること、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよく；

30

(b) 前記合成粒子および前記単一細胞は同じ区画に存在してもよく、任意に、前記区画は、ウェルまたは液滴であってもよく；

(c) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも 1 つは、前記合成粒子上に固定化されているかまたは部分的に固定化されていてもよく；

(d) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも 1 つは、前記合成粒子内に封入されているかまたは部分的に封入されていてもよく；

(e) 前記合成粒子は破壊可能であり、前記合成粒子は、破壊可能なヒドロゲル粒子であってもよく；

(f) 前記合成粒子はビーズを含んでいてもよく、任意に、前記ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテイン A コンジュゲートビーズ、プロテイン G コンジュゲートビーズ、プロテイン A / G コンジュゲートビーズ、プロテイン L コンジュゲートビーズ、オリゴ (d T) コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、ヒドロゲルビーズ、ゲルビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよく；

40

(g) 前記合成粒子は、ポリジメチルシロキサン (P D M S)、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材

50

料を含んでいてもよく、および / または

(h) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各々は、リンカー官能基を含んでいてもよく

、

前記合成粒子は、固体支持体官能基を含み、ならびに / もしくは

前記支持体官能基および前記リンカー官能基は互いに付随しており；ならびに、任意に
前記リンカー官能基および前記支持体官能基は、C 6、ビオチン、ストレプトアビジン
、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組合せからなる群から個々に
選択されてもよい、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50