

【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 10 月 4 日(2022.10.4)

【国際公開番号】WO2020/072829

【公表番号】特表 2022-504078(P2022-504078A)

【公表日】令和 4 年 1 月 13 日(2022.1.13)

【年通号数】公開公報(特許)2022-005

【出願番号】特願 2021-518090(P2021-518090)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6804(2018.01)

C 1 2 Q 1/6813(2018.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 N 15/10(2006.01)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6804 Z Z N A

C 1 2 Q 1/6813 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 9 月 26 日(2022.9.26)

【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】

無細胞核酸サンプルを調製して、DNA シーケンシングベースの技術を用いて、前記無細胞核酸サンプルに含まれているヌクレオソームにおける少なくとも 1 つのヒストン修飾の識別を可能にするための方法であって、前記方法は、

(a) ヒストンコアの周囲に巻き付いた cfDNA 分子をそれぞれが含む複数のヌクレオソームを含む無細胞核酸サンプルを提供する工程；

(b) 末端ハイブリダイズ領域を含むアダプターを前記 cfDNA 分子の末端にライゲートし、それによって、それぞれがヒストンコアの周囲に巻き付いたアダプター結合 cfDNA 分子を含む修飾された無細胞核酸サンプルを提供する工程；

(c) 第 1 の末端に、目的のヒストン修飾に特異的に結合するヒストン修飾結合ドメイン；第 2 の末端に、末端ハイブリダイズ領域に相補的な核酸結合ドメイン；およびそれらの間に、前記目的のヒストン修飾に対応し、それによって、ヒストン修飾バーコードとして供される、核酸配列を含む非ハイブリダイズ領域、を含む近接プローブを提供する工程であって、ここで、前記近接プローブは、前記ヒストン修飾結合ドメインが前記目的のヒストン修飾に結合することと、前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションすることとが同時に起きることを可能にするような寸法である、工程；

(d) (i) 前記ヒストン修飾結合ドメインが前記ヒストン修飾に結合すること、および

10

20

30

40

50

( i i ) 前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションして、前記無細胞 DNA を起源とする 5' 末端および前記近接プローブを起源とする 3' 末端を有し、かつ前記ヒストン修飾バーコードを含む dsDNA セグメントを形成すること、を促進するのに効果的な条件下において前記修飾された無細胞核酸サンプルを前記近接プローブとインキュベートする工程；および

( e ) ポリメラーゼおよび dNTP 混合物を添加することによって、前記 dsDNA セグメントの 5' 末端を前記近接プローブの前記非ハイブリダイズ領域および前記ヒストン修飾バーコードに沿って伸長し、それによって、増幅用およびシーケンシング用の、ヒストン修飾バーコード化 dsDNA テンプレート分子を提供する工程

を含む、方法。

10

【請求項 2】

工程 ( c ) が、それぞれが異なるヒストン修飾を標的にする複数の近接プローブを提供することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ヒストン修飾バーコード化 dsDNA テンプレート分子を増幅する工程をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記増幅されたヒストン修飾バーコード化 dsDNA テンプレート分子をシーケンシングする工程、および生成された配列リードにおいて観察されるヒストン修飾バーコードからヒストン修飾のタイプおよび位置に関する情報を決定する工程をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

単一の無細胞核酸サンプルから複数の種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、前記プロセスは、

( a ) 少なくとも 1 つの UFI 配列を含む第 1 のアダプター配列を含む DNA アダプターを前記サンプル中の平滑末端 cfDNA の末端にライゲートして、アダプター結合 DNA を提供する工程であって、ここで、前記少なくとも 1 つの UFI 配列は、ソース識別子バーコードを含む、工程；

( b ) 前記サンプル中の RNA から cDNA を合成し、前記ソース識別子バーコードおよび RNA インジケーターバーコードを含む cDNA アダプターを前記 cDNA の少なくとも 1 つの末端に共有結合させ、それによって、前記アダプター結合 DNA も含む無細胞混合物中にアダプター結合 cDNA を提供する工程；

30

( c ) 前記無細胞サンプルから 5 - ヒドロキシメチルシトシン ( 5 hmC ) 含有 DNA を選択的に取り出すことを可能にするアフィニティータグで前記サンプル中の 5 hmC 残基を官能化する工程；

( d ) 前記サンプル中に残っているタグ付けされていない DNA およびアダプター結合 cDNA とともに、前記 5 hmC 含有 DNA を前記無細胞サンプルから取り出す工程；

( e ) 前記 5 hmC 含有 DNA に 5 hmC プロセスバーコードを付加する工程；および

( f ) 前記 5 hmC 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA を増幅し、かつシーケンシングする工程

40

を含む、組み合わせワークフロープロセス。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの UFI 配列が、分子バーコード、鎖識別子バーコード、ヒストン修飾バーコードまたはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 ( e ) において提供された前記 5 hmC 含有 DNA が、増幅の前に、前記タグ付けされていない DNA およびアダプター結合 cDNA とともにプールされる、請求項 5 に記載のプロセス。

【請求項 8】

単一の無細胞核酸サンプルから複数の種類のデータを抽出するための組み合わせワークフ

50

ロープロセスであって、前記プロセスは、

- (a) ソース識別子バーコードを含む少なくとも1つのUFI配列を含む第1のアダプター配列を含むDNAアダプターを前記サンプル中の平滑末端cfDNAの末端にライゲートして、アダプター結合DNAを提供する工程；
  - (b) 前記サンプル中のRNAからcDNAを合成し、前記ソース識別子バーコードおよびRNAインジケーターバーコードを含むcDNAアダプターを前記cDNAの少なくとも1つの末端に共有結合させ、それによって、アダプター結合cDNAを提供する工程；
  - (c) 前記無細胞サンプルから5hmC含有DNAを選択的に取り出すことを可能にする第1のアフィニティタグで前記サンプル中の5hmC残基を官能化する工程；
  - (d) 前記サンプル中に残っているタグ付けされていない5-ヒドロキシメチルシトシン(5mC)含有DNA、タグ付けされていない未修飾のDNAおよびアダプター結合cDNAとともに、前記タグ付けされた5hmC含有DNAを取り出す工程；
  - (e) 前記タグ付けされた5hmC含有DNAに5hmCプロセスバーコードを付加する工程；および
  - (f) 前記残りのサンプル中のメチルシトシン残基を酸化されたメチルシトシン残基に変換する工程；
  - (g) 前記サンプルから前記官能化種を選択的に取り出すことを可能にする第2のアフィニティタグで前記酸化されたメチルシトシン残基を官能化する工程；
  - (h) 前記サンプル中に残っているタグ付けされていないDNAおよびアダプター結合cDNAとともに、前記タグ付けされた5mC含有DNAを取り出す工程；
  - (i) 前記タグ付けされた5mC含有DNAに5mCプロセスバーコードを付加する工程；および
  - (j) 前記タグ付けされた5hmC含有DNA、前記タグ付けされた5mC含有DNA、前記タグ付けされていないDNAおよび前記アダプター結合cDNAを増幅し、かつシーケンシングする工程
- を含む、組み合わせワークフロープロセス。

【請求項9】

前記少なくとも1つの分子バーコードが、フラグメント識別子配列、鎖識別子配列、またはフラグメント識別子配列と鎖識別子配列との両方をさらに含む、請求項8に記載のプロセス。

【請求項10】

前記前記タグ付けされた5hmC含有DNAおよび前記タグ付けされた5mC含有DNAが、シーケンシングの前に、前記前記タグ付けされていないDNAおよび前記アダプター結合cDNAとともにプールされる、請求項8に記載のプロセス。

【請求項11】

単一の無細胞核酸サンプルから少なくとも2種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、前記プロセスは、

- (a) ソース識別子バーコードを含む少なくとも1つの分子バーコードを含む第1のアダプター配列を含むDNAアダプターを前記サンプル中の平滑末端cfDNAの末端にライゲートして、アダプター結合DNAを提供する工程；
- (b) 前記サンプル中のRNAからcDNAを合成し、5hmC残基、前記ソース識別子バーコードおよびRNAインジケーターバーコードを含むcDNAアダプターを前記cDNAの少なくとも1つの末端に共有結合させ、それによって、バーコード化アダプター結合cDNAを提供する工程；
- (c) 前記無細胞サンプルから5hmC含有種を選択的に取り出すことを可能にするアフィニティタグで前記サンプル中の5hmC残基を官能化する工程；
- (d) 前記5hmC含有DNAおよび前記バーコード化アダプター結合cDNAを前記無細胞サンプルから取り出す工程；および
- (e) 前記5hmC含有DNAおよび前記バーコード化アダプター結合cDNAのプールされた混和物を増幅し、かつシーケンシングして、DNAヒドロキシメチル化および同じ

10

20

30

40

50

サンプル中の c f R N A に関するデータを提供する工程を含む、組み合わせワークフロープロセス。

【請求項 1 2】

単一の無細胞核酸サンプルから複数の種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、

( a ) ハイブリダイズ核酸領域を含むアダプターをヌクレオソーム会合 D N A の各末端にライゲートし、それによって、アダプター結合 D N A と会合したヌクレオソームを含む修飾された無細胞核酸サンプルを提供する工程；

( b ) 第 1 の末端に、ヒストン修飾結合ドメイン、反対側の第 2 の末端に、前記ハイブリダイズ核酸領域に相補的な核酸結合ドメイン、およびそれらの間に、特定のヒストン修飾に対応し、それによってヒストン修飾バーコードとして供されるように選択された核酸配列を含む非ハイブリダイズ領域を含む、近接プローブを提供する工程であって、ここで、前記近接プローブは、前記ヒストン修飾結合ドメインが前記ヒストン修飾に結合することと、前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションすることとが同時に起きることを可能にするような寸法である、工程；

( c ) ( i ) 前記ヒストン修飾結合ドメインが前記ヒストン修飾に結合すること、および ( i i ) 前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションして、前記無細胞 D N A を起源とする 5 ' 末端および前記近接プローブを起源とする 3 ' 末端を有する d s D N A セグメントを形成すること、を促進するのに効果的な条件下において前記修飾された無細胞核酸サンプルを前記近接プローブとインキュベートする工程；および

( d ) ポリメラーゼおよび d N T P 混合物を添加することによって、前記セグメントの 5 ' 末端を前記近接プローブの前記非ハイブリダイズ領域および前記ヒストン修飾バーコードに沿って伸長し、それによって、さらなる処理用およびシーケンシング用の、ヒストン修飾バーコード化 d s D N A テンプレート分子を提供する工程；

( e ) 前記サンプル中の核酸を精製して、ヒストン修飾バーコード化 d s D N A および D N A を含む組成物を提供する工程；

( f ) 前記サンプル中の R N A から c D N A の第 1 鎖を合成する工程；

( g ) 前記第 1 鎖に相補的な c D N A の第 2 鎖を合成して、c D N A 二重鎖を提供する工程；および

( h ) ソース識別子バーコードおよび R N A インジケーターバーコードを含む配列を含む c D N A アダプターをリガーゼの非存在下において前記 c D N A 二重鎖の少なくとも 1 つの末端に共有結合させ、それによって、アダプター結合 c D N A および前記ヒストン修飾バーコード化 d s D N A テンプレート分子を含む核酸組成物を提供する工程を含む、組み合わせワークフロープロセス。

【請求項 1 3】

( a ) 前記ヒストン修飾バーコード化 d s D N A テンプレート分子および前記アダプター結合 c D N A を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、請求項 1 2 に記載のプロセス。

【請求項 1 4】

工程 ( d ) の後に、追加のバーコードを含むアダプターを、前記ヒストン修飾バーコード化 d s D N A にライゲートする、請求項 1 3 に記載のプロセス。

【請求項 1 5】

前記追加のバーコードが、ソース識別子配列を含む、請求項 1 4 に記載のプロセス。

【請求項 1 6】

前記追加のバーコードが、フラグメント識別子配列、鎖識別子配列、またはフラグメント識別子配列と鎖識別子配列との両方をさらに含む、請求項 1 5 に記載のプロセス。

【請求項 1 7】

( i ) 5 h m C 含有種を選択的に取り出すことを可能にする第 1 のアフィニティータグで、前記核酸組成物中の 5 h m C 残基を官能化する工程；

10

20

30

40

50

(j) 残っているタグ付けされていないDNAおよびアダプター結合cDNAとともに、前記タグ付けされた5hmC含有DNAを前記組成物から取り出す工程；および

(k) 前記タグ付けされた5hmC含有DNAに5hmCプロセスバーコードを付加する工程

をさらに含む、請求項13に記載のプロセス。

【請求項18】

(l) 前記5hmC含有DNA、前記タグ付けされていないDNAおよび前記アダプター結合cDNAを増幅し、かつシーケンシングする工程

をさらに含む、請求項17に記載のプロセス。

【請求項19】

工程(k)において提供された前記バーコード化5hmC含有DNAが、シーケンシングの前に、前記タグ付けされていないDNAおよびアダプター結合cDNAとともにプールされる、請求項18に記載のプロセス。

【請求項20】

(l) 前記残りのサンプル中のメチルシトシン残基を酸化されたメチルシトシン残基に変換する工程；

(m) 前記サンプルから前記官能化種を選択的に取り出すことを可能にする第2のアフィニティータグで前記酸化されたメチルシトシン残基を官能化する工程；

(n) 残っているタグ付けされていないDNAおよびアダプター結合cDNAとともに、前記タグ付けされた5mC含有DNAを取り出す工程；および

(o) 前記タグ付けされた5mC含有DNAに5mCプロセスバーコードを付加する工程をさらに含む、請求項17に記載のプロセス。

【請求項21】

(p) 前記タグ付けされた5hmC含有DNA、前記タグ付けされた5mC含有DNA、前記タグ付けされていないDNAおよび前記アダプター結合cDNAを増幅し、かつシーケンシングする工程

をさらに含む、請求項20に記載のプロセス。

【請求項22】

前記タグ付けされた5hmC含有DNAおよび前記タグ付けされた5mC含有DNAが、シーケンシングの前に、前記タグ付けされていないDNAおよび前記アダプター結合cDNAとともにプールされる、請求項21に記載のプロセス。

【請求項23】

前記無細胞核酸サンプルが、血液サンプルから得られる、請求項12に記載のプロセス。

【請求項24】

前記血液サンプルの一部に対して血漿タンパク質分析を実施する工程をさらに含む、請求項23に記載のプロセス。

【請求項25】

血漿タンパク質が、タンパク質分析物に対応するタンパク質識別子バーコードを含むdsDNAテンプレート分子を生成することによって分析される、請求項24に記載のプロセス。

【請求項26】

前記ヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子、前記アダプター結合cDNAおよび前記タンパク質バーコード化dsDNAテンプレート分子を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、請求項25に記載のプロセス。

【請求項27】

前記ヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子、前記アダプター結合cDNAおよび前記タンパク質バーコード化dsDNAテンプレート分子が、シーケンシングの前にプールされる、請求項26に記載のプロセス。

【請求項28】

前記無細胞核酸サンプルが、血液サンプルから得られる、請求項17に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

## 【請求項 29】

前記血液サンプルの一部に対して血漿タンパク質分析を実施する工程をさらに含む、請求項 28 に記載のプロセス。

## 【請求項 30】

血漿タンパク質が、タンパク質分析物に対応するタンパク質識別子バーコードを含む dsDNA テンプレート分子を生成することによって分析される、請求項 29 に記載のプロセス。

## 【請求項 31】

前記 5 h m C 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、請求項 30 に記載のプロセス。

10

## 【請求項 32】

前記 5 h m C 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA が、シーケンシングの前にプールされる、請求項 31 に記載のプロセス。

## 【請求項 33】

前記無細胞核酸サンプルが、血液サンプルから得られる、請求項 20 に記載のプロセス。

## 【請求項 34】

前記血液サンプルに対して血漿タンパク質分析を実施する工程をさらに含む、請求項 33 に記載のプロセス。

## 【請求項 35】

血漿タンパク質が、タンパク質分析物に対応するタンパク質識別子バーコードを含む dsDNA テンプレート分子を生成することによって分析される、請求項 34 に記載のプロセス。

20

## 【請求項 36】

前記 5 h m C 含有 DNA、前記 5 m C 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、請求項 35 に記載のプロセス。

## 【請求項 37】

前記 5 h m C 含有 DNA、前記 5 m C 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA が、シーケンシングの前にプールされる、請求項 36 に記載のプロセス。

30

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0317

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0317】

切断型アダプターおよびインデックス付き PCR プライマーの相対的な機能は、単一のテンプレートから調製されたホールゲノムライブラリーの収率を、限られた PCR サイクルを用いる代替のアダプターストラテジーと比較することによって見積もることができる。この場合、高いホールゲノムライブラリー濃度は、全体的により効率的なプロセスを示唆する、テンプレート分子のより効率的なサンプリングを反映していると推定される。市販のアダプター (KAPA、BIOO) と比べて、切断型アダプターは、上に記載された条件下におけるテンプレート DNA 分子のサンプリングにおいておよそ  $1.5 \times \sim 2 \times$  より効率的である。ここで観察された値は、 $> 10\%$  (BIOO アダプター) に対して  $> 18\%$  (切断型アダプター) という、テンプレート DNA からライブラリーへの変換効率の改善を示唆する。アダプターの効率を隣り合わせで比較した結果が、図 12 に示されている。

40

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

50

第 1 の近接プローブおよび第 2 の近接プローブをそれぞれが含む複数のプローブ対を提供することであって、ここで、各プローブ対は、特定のタンパク質分析物を標的にすること、および対応するタンパク質分析物の存在下において各プローブ対の前記プローブ間で二本鎖 DNA ( ds DNA ) セグメントを生成することによって、生物学的サンプル中の複数のタンパク質分析物を識別するための改善された近接伸長アッセイであって、前記改善された近接伸長アッセイは、

( a ) タンパク質識別子バーコードとして供されるタンパク質特異的核酸配列を前記 ds DNA セグメントに組み込み、それによって、タンパク質バーコード化 ds DNA テンプレート分子を形成する工程；

( b ) 前記タンパク質バーコード化 ds DNA テンプレート分子を増幅し、かつシーケンシングする工程；および

( c ) 工程 ( b ) において生成された配列リードにおいて観察される前記タンパク質識別子バーコードから前記生物学的サンプル中の前記タンパク質分析物を識別する工程を含む、改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 2 )

各タンパク質特異的核酸配列が、アダプター内に含められ、工程 ( a ) が、前記アダプターを前記 ds DNA セグメントに末端結合することを含む、項目 1 に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 3 )

工程 ( a ) が、 5 h m C 残基を含むキャプチャー配列を前記 ds DNA セグメントに組み込み、それによって、前記キャプチャー配列を含むタンパク質バーコード化 ds DNA テンプレート分子を形成する工程をさらに含む、項目 1 に記載の改善された近接アッセイ。

( 項目 4 )

前記キャプチャー配列および前記タンパク質識別子バーコードが、前記 ds DNA セグメントに末端結合された少なくとも 1 つのアダプター内に含められている、項目 3 に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 5 )

分子バーコードとして供されるために、ランダムな核酸配列を各 ds DNA テンプレート分子に組み込む工程を工程 ( b ) の前にさらに含む、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 6 )

少なくとも 1 つのタンパク質濃度コントロール組成物を前記 ds DNA テンプレート分子と合わせる工程を工程 ( b ) の前にさらに含む、項目 5 に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 7 )

各タンパク質分析物が、前記生物学的サンプル中に元の濃度で存在し、前記アッセイが、( d ) 特定のタンパク質分析物を示唆する配列リードを、前記タンパク質濃度コントロール組成物によって生成された配列リードと比較することによって、前記サンプル中の少なくとも 1 つのタンパク質分析物の元の濃度を決定する工程をさらに含む、項目 6 に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 8 )

複数の生物学的サンプルの各々における前記複数のタンパク質分析物を並行して検出する工程をさらに含む、項目 1 ~ 6 のいずれかに記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 9 )

複数の生物学的サンプルの各々における前記複数のタンパク質分析物を並行して検出する工程をさらに含む、項目 7 に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 10 )

前記複数の生物学的サンプルが、少なくとも 300 個の生物学的サンプルを含む、項目 9 に記載の改善された近接伸長アッセイ。

( 項目 11 )

10

20

30

40

50

前記複数の生物学的サンプルが、少なくとも500個の生物学的サンプルを含む、項目10に記載の改善された近接伸長アッセイ。

(項目12)

前記複数の生物学的サンプルが、少なくとも1000個の生物学的サンプルを含む、項目11に記載の改善された近接伸長アッセイ。

(項目13)

前記複数の生物学的サンプルが、384または1536個の生物学的サンプルを含み、前記アッセイが、マイクロプレートの個々のウェルにおける各生物学的サンプルを用いて実施される、項目9に記載の改善された近接伸長アッセイ。

(項目14)

DNAシーケンシングベースの技術を用いて生物学的サンプル中の複数のタンパク質分析物を識別するための方法であって、前記方法は、

(a) それぞれが、特定のタンパク質分析物を標的にし、第1の末端にタンパク質結合ドメイン、反対側の第2の末端に核酸結合ドメインおよびそれらの間に非ハイブリダイズ核酸領域を含む、複数のプローブ対を提供する工程であって、ここで、(i) 前記第1および第2の近接プローブの前記タンパク質結合ドメインは、同じタンパク質分析物上の異なる結合部位に同時に結合することができ、(ii) 前記第1および第2の近接プローブが、両方とも前記タンパク質に結合しており、ハイブリダイゼーションが生じるのに十分近接しているとき、前記プローブの前記核酸結合ドメインは、互いに相補的であり、ハイブリダイズして、dsDNAセグメントを形成する、工程；

(b) (i) プローブ対内の各近接プローブの前記タンパク質結合ドメインが対応するタンパク質分析物に結合すること、および(ii) 前記核酸結合ドメインが互いにハイブリダイゼーションして、前記第1の近接プローブを起源とする5'末端および前記第2の近接プローブを起源とする3'末端を有するdsDNAセグメントを形成すること、を促進するのに効果的な条件下において前記生物学的サンプルまたはその一部を前記プローブ対とインキュベートする工程；

(c) ポリメラーゼおよびdNTP混合物を添加することによって、前記第1の近接プローブの5'末端を前記第2の近接プローブに沿って伸長して、タンパク質識別子バーコードとして供されるタンパク質特異的核酸配列および5hmC残基を含むキャプチャー配列を組み込むdsDNAセグメントを前記プローブの間に生成する工程であって、ここで、(i) 前記第1のプローブ、前記第2のプローブ、または前記第1のプローブと第2のプローブの両方の前記核酸結合領域が、前記キャプチャー配列、前記タンパク質識別子バーコード、または前記キャプチャー配列と前記タンパク質識別子バーコードの両方を含み；(ii) 前記dNTP混合物は、少なくとも1つの5hmC残基を含み；かつ/または(iii) ポリメラーゼ伸長後に前記dsDNAセグメントの末端にアダプターがライゲートされ、ここで、少なくとも1つのアダプターが、前記キャプチャー配列、前記タンパク質識別子バーコードまたは前記キャプチャー配列と前記タンパク質識別子バーコードの両方を含み、それによって、それぞれがキャプチャー配列を含むタンパク質バーコード化dsDNAテンプレート分子が形成される、工程；

(d) キャプチャー配列を含む前記タンパク質バーコード化dsDNAテンプレート分子を増幅し、かつシーケンシングする工程；および

(e) 工程(b)において生成された配列リードにおいて観察される前記タンパク質識別子バーコードから前記生物学的サンプル中の前記タンパク質分析物を識別する工程を含む、方法。

(項目15)

各タンパク質結合ドメインが、抗原を含み、各結合部位が、エピトープを含む、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記生物学的サンプルが、血液サンプルを含み、工程(b)が、前記血液サンプルの一部に対して実施される、項目14または項目15に記載の方法。

10

20

30

40

50



( 項目 1 7 )

工程 ( b ) が、前記血液サンプルから得られた血漿に対して実施される、項目 1 6 に記載の方法。

( 項目 1 8 )

前記生物学的サンプルから得られた無細胞核酸サンプルに関する情報を取得する工程をさらに含む、項目 1 ~ 1 7 のいずれか 1 つの項目に記載の方法。

( 項目 1 9 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中のヌクレオソーム内の 1 またはそれを超えるヒストン修飾の存在、同一性または量を含む、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 0 )

前記 1 またはそれを超えるヒストン修飾が、共有結合による翻訳後修飾 ( P T M ) を含む、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 1 )

前記 P T M が、遺伝子発現に影響を与えるヒストン構造の変化を含む、項目 2 0 に記載の方法。

( 項目 2 2 )

前記少なくとも 1 つの P T M が、アセチル化、メチル化、プロピオニル化、ブチリル化、クロトニル化、2 - ヒドロキシイソブチリル化、マロニル化、スクシニル化、ホルミル化、ユビキチン化、シトルリン化、リン酸化、ヒドロキシル化、S U M O 化、O - G 1 c N A c 化、A D P リボシル化またはそれらの組み合わせを含む、項目 2 0 に記載の方法。

( 項目 2 3 )

前記 1 またはそれを超えるヒストン修飾が、被験体における病状を評価するためのヒストン修飾バイオマーカーを含む、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 4 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の無細胞 D N A ( c f D N A ) の少なくとも 1 つの配列を含む、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 5 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の c f D N A の少なくとも 1 つの配列をさらに含む、項目 1 9 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 6 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の無細胞 R N A ( c f R N A ) の少なくとも 1 つの配列を含む、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 2 7 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の c f R N A の少なくとも 1 つの配列をさらに含む、項目 1 9 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 8 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の c f R N A の少なくとも 1 つの配列をさらに含む、項目 2 4 に記載の方法。

( 項目 2 9 )

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の c f R N A の少なくとも 1 つの配列をさらに含む、項目 2 5 に記載の方法。

( 項目 3 0 )

前記情報が、エピジェネティックデータを含む、項目 1 8 に記載の方法。

( 項目 3 1 )

前記情報が、D N A ヒドロキシメチル化に関する、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 2 )

前記情報が、D N A メチル化に関する、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 3 )

前記情報が、さらに D N A メチル化に関する、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 4 )

10

20

30

40

50

無細胞核酸サンプルを調製して、DNAシーケンシングベースの技術を用いて、前記無細胞核酸サンプルに含まれているヌクレオソームにおける少なくとも1つのヒストン修飾の識別を可能にするための方法であって、前記方法は、

(a) ヒストンコアの周囲に巻き付いたcfDNA分子をそれぞれが含む複数のヌクレオソームを含む無細胞核酸サンプルを提供する工程；

(b) 末端ハイブリダイズ領域を含むアダプターを前記cfDNA分子の末端にライゲートし、それによって、それぞれがヒストンコアの周囲に巻き付いたアダプター結合cfDNA分子を含む修飾された無細胞核酸サンプルを提供する工程；

(c) 第1の末端に、目的のヒストン修飾に特異的に結合するヒストン修飾結合ドメイン；第2の末端に、末端ハイブリダイズ領域に相補的な核酸結合ドメイン；およびそれらの間に、前記目的のヒストン修飾に対応し、それによって、ヒストン修飾バーコードとして供される、核酸配列を含む非ハイブリダイズ領域、を含む近接プローブを提供する工程であって、ここで、前記近接プローブは、前記ヒストン修飾結合ドメインが前記目的のヒストン修飾に結合することと、前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションすることとが同時に起きることを可能にするような寸法である、工程；

(d) (i) 前記ヒストン修飾結合ドメインが前記ヒストン修飾に結合すること、および(ii) 前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションして、前記無細胞DNAを起源とする5'末端および前記近接プローブを起源とする3'末端を有し、かつ前記ヒストン修飾バーコードを含むdsDNAセグメントを形成すること、を促進するのに効果的な条件下において前記修飾された無細胞核酸サンプルを前記近接プローブとインキュベートする工程；および

(e) ポリメラーゼおよびdNTP混合物を添加することによって、前記dsDNAセグメントの5'末端を前記近接プローブの前記非ハイブリダイズ領域および前記ヒストン修飾バーコードに沿って伸長し、それによって、増幅用およびシーケンシング用の、ヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子を提供する工程

を含む、方法。

(項目35)

工程(c)が、それぞれが異なるヒストン修飾を標的にする複数の近接プローブを提供することを含む、項目34に記載の方法。

(項目36)

前記ヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子を増幅する工程をさらに含む、項目35に記載の方法。

(項目37)

前記増幅されたヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子をシーケンシングする工程、および生成された配列リードにおいて観察されるヒストン修飾バーコードからヒストン修飾のタイプおよび位置に関する情報を決定する工程をさらに含む、項目36に記載の方法。

(項目38)

無細胞核酸サンプルから抽出するためにcfDNAを調製するための方法であって、前記方法は、

(a) 5hmC残基を含むキャプチャー配列を含むDNAアダプターを前記無細胞核酸サンプル中の平滑末端DNAの末端にライゲートして、アダプター結合DNAを提供する工程；および

(b) タグ付けされたcfDNAを選択的に取り出すことを可能にするアフィニティータグで前記5hmC残基を官能化する工程

を含む、方法。

(項目39)

前記アフィニティータグが、ビオチンから構成され、工程(b)が、前記少なくとも1つの5hmC残基をビオチン化して、ビオチン化されたアダプター結合cfDNAを形成す

10

20

30

40

50

ることを含む、項目 38 に記載の方法。

(項目 40)

前記 5 h m C 残基が、化学選択的基を前記 5 h m C 残基に共有結合させ、次いで前記化学選択的基を官能化ビオチン部分と反応させることによってビオチン化される、項目 39 に記載の方法。

(項目 41)

前記化学選択的基がクリックケミストリー反応において前記官能化ビオチンと反応するように、前記化学選択的基が、UDP グルコース - 6 - アジドであり、前記官能化ビオチン部分が、アルキン官能化ビオチンである、項目 37 に記載の方法。

(項目 42)

前記アダプターが、固有特性識別子 (UFI) 配列をさらに含む、項目 38 に記載の方法。

(項目 43)

前記アダプターが、少なくとも 2 つの UFI 配列を含む、項目 42 に記載の方法。

(項目 44)

前記少なくとも 2 つの UFI 配列が、ソース識別子バーコード、ならびに分子バーコード、鎖識別子バーコードおよびヒストン修飾バーコードから選択される少なくとも 1 つの追加の UFI 配列を含む、項目 43 に記載の方法。

(項目 45)

シーケンシングベースの同時識別のために単一の無細胞核酸サンプル中の DNA および RNA を調製するための方法であって、前記方法は、

(a) 少なくとも 1 つの UFI 配列を含む第 1 のアダプター配列を含む DNA アダプターを前記無細胞サンプル中の平滑末端 DNA の末端にライゲートして、アダプター結合 DNA を提供する工程であって、ここで、前記少なくとも 1 つの UFI 配列は、ソース識別子バーコードを含む、工程；

(b) 前記アダプター結合 DNA および RNA を精製して、アダプター結合 DNA および RNA の無細胞混和物を提供する工程；

(c) 前記 RNA から cDNA の第 1 鎖を合成する工程；

(d) 前記第 1 鎖に相補的な cDNA の第 2 鎖を合成して、cDNA 二重鎖を提供する工程；および

(e) 前記ソース識別子バーコードおよび RNA インジケータバーコードを含む第 2 のアダプター配列を含む cDNA アダプターをリガーゼの非存在下において前記 cDNA 二重鎖の少なくとも 1 つの末端に共有結合させ、それによって、前記アダプター結合 DNA も含む無細胞混和物中にアダプター結合 cDNA を提供する工程

を含む、方法。

(項目 46)

前記少なくとも 1 つの UFI 配列が、分子バーコード、鎖識別子バーコード、ヒストン修飾バーコードまたはそれらの組み合わせをさらに含む、項目 45 に記載の方法。

(項目 47)

単一の無細胞核酸サンプルから複数の種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、前記プロセスは、

(a) 少なくとも 1 つの UFI 配列を含む第 1 のアダプター配列を含む DNA アダプターを前記サンプル中の平滑末端 cfDNA の末端にライゲートして、アダプター結合 DNA を提供する工程であって、ここで、前記少なくとも 1 つの UFI 配列は、ソース識別子バーコードを含む、工程；

(b) 前記サンプル中の RNA から cDNA を合成し、前記ソース識別子バーコードおよび RNA インジケータバーコードを含む cDNA アダプターを前記 cDNA の少なくとも 1 つの末端に共有結合させ、それによって、前記アダプター結合 DNA も含む無細胞混和物中にアダプター結合 cDNA を提供する工程；

(c) 前記無細胞サンプルから 5 h m C 含有 DNA を選択的に取り出すことを可能にする

10

20

30

40

50

アフィニティータグで前記サンプル中の 5 h m C 残基を官能化する工程；

( d ) 前記サンプル中に残っているタグ付けされていない D N A およびアダプター結合 c D N A とともに、前記 5 h m C 含有 D N A を前記無細胞サンプルから取り出す工程；

( e ) 前記 5 h m C 含有 D N A に 5 h m C プロセスバーコードを付加する工程；および

( f ) 前記 5 h m C 含有 D N A、前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A を増幅し、かつシーケンシングする工程

を含む、組み合わせワークフロープロセス。

( 項目 4 8 )

前記少なくとも 1 つの U F I 配列が、分子バーコード、鎖識別子バーコード、ヒストン修飾バーコードまたはそれらの組み合わせをさらに含む、項目 4 7 に記載の方法。

( 項目 4 9 )

工程 ( e ) において提供された前記 5 h m C 含有 D N A が、増幅の前に、前記タグ付けされていない D N A およびアダプター結合 c D N A とともにプールされる、項目 4 7 または項目 4 8 に記載のプロセス。

( 項目 5 0 )

単一の無細胞核酸サンプルから複数の種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、前記プロセスは、

( a ) ソース識別子バーコードを含む少なくとも 1 つの U F I 配列を含む第 1 のアダプター配列を含む D N A アダプターを前記サンプル中の平滑末端 c f D N A の末端にライゲートして、アダプター結合 D N A を提供する工程；

( b ) 前記サンプル中の R N A から c D N A を合成し、前記ソース識別子バーコードおよび R N A インジケーターバーコードを含む c D N A アダプターを前記 c D N A の少なくとも 1 つの末端に共有結合させ、それによって、アダプター結合 c D N A を提供する工程；

( c ) 前記無細胞サンプルから 5 h m C 含有 D N A を選択的に取り出すことを可能にする第 1 のアフィニティータグで前記サンプル中の 5 h m C 残基を官能化する工程；

( d ) 前記サンプル中に残っているタグ付けされていない 5 m C 含有 D N A、タグ付けされていない未修飾の D N A およびアダプター結合 c D N A とともに、前記タグ付けされた 5 h m C 含有 D N A を取り出す工程；

( e ) 前記タグ付けされた 5 h m C 含有 D N A に 5 h m C プロセスバーコードを付加する工程；および

( f ) 前記残りのサンプル中のメチルシトシン残基を酸化されたメチルシトシン残基に変換する工程；

( g ) 前記サンプルから前記官能化種を選択的に取り出すことを可能にする第 2 のアフィニティータグで前記酸化されたメチルシトシン残基を官能化する工程；

( h ) 前記サンプル中に残っているタグ付けされていない D N A およびアダプター結合 c D N A とともに、前記タグ付けされた 5 m C 含有 D N A を取り出す工程；

( i ) 前記タグ付けされた 5 m C 含有 D N A に 5 m C プロセスバーコードを付加する工程；および

( j ) 前記タグ付けされた 5 h m C 含有 D N A、前記タグ付けされた 5 m C 含有 D N A、前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A を増幅し、かつシーケンシングする工程

を含む、組み合わせワークフロープロセス。

( 項目 5 1 )

前記少なくとも 1 つの分子バーコードが、フラグメント識別子配列、鎖識別子配列、またはフラグメント識別子配列と鎖識別子配列との両方をさらに含む、項目 5 0 に記載のプロセス。

( 項目 5 2 )

前記前記タグ付けされた 5 h m C 含有 D N A および前記タグ付けされた 5 m C 含有 D N A が、シーケンシングの前に、前記前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A とともにプールされる、項目 5 0 または項目 5 1 に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

( 項目 5 3 )

単一の無細胞核酸サンプルから少なくとも2種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、前記プロセスは、

( a ) ソース識別子バーコードを含む少なくとも1つの分子バーコードを含む第1のアダプター配列を含むDNAアダプターを前記サンプル中の平滑末端cfDNAの末端にライゲートして、アダプター結合DNAを提供する工程；

( b ) 前記サンプル中のRNAからcDNAを合成し、5hmC残基、前記ソース識別子バーコードおよびRNAインジケーターバーコードを含むcDNAアダプターを前記cDNAの少なくとも1つの末端に共有結合させ、それによって、バーコード化アダプター結合cDNAを提供する工程；

( c ) 前記無細胞サンプルから5hmC含有種を選択的に取り出すことを可能にするアフィニティタグで前記サンプル中の5hmC残基を官能化する工程；

( d ) 前記5hmC含有DNAおよび前記バーコード化アダプター結合cDNAを前記無細胞サンプルから取り出す工程；および

( e ) 前記5hmC含有DNAおよび前記バーコード化アダプター結合cDNAのプールされた混和物を増幅し、かつシーケンシングして、DNAヒドロキシメチル化および同じサンプル中のcfRNAに関するデータを提供する工程

を含む、組み合わせワークフロープロセス。

( 項目 5 4 )

単一の無細胞核酸サンプルから複数の種類のデータを抽出するための組み合わせワークフロープロセスであって、

( a ) ハイブリダイズ核酸領域を含むアダプターをヌクレオソーム会合DNAの各末端にライゲートし、それによって、アダプター結合DNAと会合したヌクレオソームを含む修飾された無細胞核酸サンプルを提供する工程；

( b ) 第1の末端に、ヒストン修飾結合ドメイン、反対側の第2の末端に、前記ハイブリダイズ核酸領域に相補的な核酸結合ドメイン、およびそれらの間に、特定のヒストン修飾に対応し、それによってヒストン修飾バーコードとして供されるように選択された核酸配列を含む非ハイブリダイズ領域を含む、近接プローブを提供する工程であって、ここで、前記近接プローブは、前記ヒストン修飾結合ドメインが前記ヒストン修飾に結合することと、前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションすることとが同時に起きることを可能にするような寸法である、工程；

( c ) ( i ) 前記ヒストン修飾結合ドメインが前記ヒストン修飾に結合すること、および ( i i ) 前記相補的な核酸結合ドメインが前記ハイブリダイズ核酸領域とハイブリダイゼーションして、前記無細胞DNAを起源とする5'末端および前記近接プローブを起源とする3'末端を有するdsDNAセグメントを形成すること、を促進するのに効果的な条件下において前記修飾された無細胞核酸サンプルを前記近接プローブとインキュベートする工程；および

( d ) ポリメラーゼおよびdNTP混合物を添加することによって、前記セグメントの5'末端を前記近接プローブの前記非ハイブリダイズ領域および前記ヒストン修飾バーコードに沿って伸長し、それによって、さらなる処理用およびシーケンシング用の、ヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子を提供する工程；

( e ) 前記サンプル中の核酸を精製して、ヒストン修飾バーコード化dsDNAおよびDNAを含む組成物を提供する工程；

( f ) 前記サンプル中のRNAからcDNAの第1鎖を合成する工程；

( g ) 前記第1鎖に相補的なcDNAの第2鎖を合成して、cDNA二重鎖を提供する工程；および

( h ) ソース識別子バーコードおよびRNAインジケーターバーコードを含む配列を含むcDNAアダプターをリガーゼの非存在下において前記cDNA二重鎖の少なくとも1つの末端に共有結合させ、それによって、アダプター結合cDNAおよび前記ヒストン修飾バーコード化dsDNAテンプレート分子を含む核酸組成物を提供する工程

10

20

30

40

50

を含む、組み合わせワークフロープロセス。

(項目 5 5)

(i) 前記ヒストン修飾バーコード化 dsDNA テンプレート分子および前記アダプター結合 cDNA を増幅し、かつシーケンシングする工程

をさらに含む、項目 5 4 に記載のプロセス。

(項目 5 6)

工程 (d) の後に、追加のバーコードを含むアダプターを、前記ヒストン修飾バーコード化 dsDNA にライゲートする、項目 5 5 に記載のプロセス。

(項目 5 7)

前記追加のバーコードが、ソース識別子配列を含む、項目 5 6 に記載のプロセス。

10

(項目 5 8)

前記追加のバーコードが、フラグメント識別子配列、鎖識別子配列、またはフラグメント識別子配列と鎖識別子配列との両方をさらに含む、項目 5 7 に記載のプロセス。

(項目 5 9)

(i) 5hmC 含有種を選択的に取り出すことを可能にする第 1 のアフィニティータグで、前記核酸組成物中の 5hmC 残基を官能化する工程；

(j) 残っているタグ付けされていない DNA およびアダプター結合 cDNA とともに、前記タグ付けされた 5hmC 含有 DNA を前記組成物から取り出す工程；および

(k) 前記タグ付けされた 5hmC 含有 DNA に 5hmC プロセスバーコードを付加する工程

20

をさらに含む、項目 5 4、5 6、5 7 および 5 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

(項目 6 0)

(l) 前記 5hmC 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA を増幅し、かつシーケンシングする工程

をさらに含む、項目 5 9 に記載のプロセス。

(項目 6 1)

工程 (k) において提供された前記バーコード化 5hmC 含有 DNA が、シーケンシングの前に、前記タグ付けされていない DNA およびアダプター結合 cDNA とともにプールされる、項目 6 0 に記載のプロセス。

(項目 6 2)

30

(l) 前記残りのサンプル中のメチルシトシン残基を酸化されたメチルシトシン残基に変換する工程；

(m) 前記サンプルから前記官能化種を選択的に取り出すことを可能にする第 2 のアフィニティータグで前記酸化されたメチルシトシン残基を官能化する工程；

(n) 残っているタグ付けされていない DNA およびアダプター結合 cDNA とともに、前記タグ付けされた 5mC 含有 DNA を取り出す工程；および

(o) 前記タグ付けされた 5mC 含有 DNA に 5mC プロセスバーコードを付加する工程をさらに含む、項目 5 9 に記載のプロセス。

(項目 6 3)

(p) 前記タグ付けされた 5hmC 含有 DNA、前記タグ付けされた 5mC 含有 DNA、前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA を増幅し、かつシーケンシングする工程

40

をさらに含む、項目 6 2 に記載のプロセス。

(項目 6 4)

前記前記タグ付けされた 5hmC 含有 DNA および前記タグ付けされた 5mC 含有 DNA が、シーケンシングの前に、前記前記タグ付けされていない DNA および前記アダプター結合 cDNA とともにプールされる、項目 6 3 に記載のプロセス。

(項目 6 5)

前記無細胞核酸サンプルが、血液サンプルから得られる、項目 5 4 に記載のプロセス。

(項目 6 6)

50

前記血液サンプルの一部に対して血漿タンパク質分析を実施する工程をさらに含む、項目 6 5 に記載のプロセス。

( 項目 6 7 )

血漿タンパク質が、タンパク質分析物に対応するタンパク質識別子バーコードを含む d s D N A テンプレート分子を生成することによって分析される、項目 6 6 に記載のプロセス。

( 項目 6 8 )

前記ヒストン修飾バーコード化 d s D N A テンプレート分子、前記アダプター結合 c D N A および前記タンパク質バーコード化 d s D N A テンプレート分子を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、項目 6 7 に記載のプロセス。

( 項目 6 9 )

前記ヒストン修飾バーコード化 d s D N A テンプレート分子、前記アダプター結合 c D N A および前記タンパク質バーコード化 d s D N A テンプレート分子が、シーケンシングの前にプールされる、項目 6 8 に記載のプロセス。

( 項目 7 0 )

前記無細胞核酸サンプルが、血液サンプルから得られる、項目 5 9 に記載のプロセス。

( 項目 7 1 )

前記血液サンプルの一部に対して血漿タンパク質分析を実施する工程をさらに含む、項目 7 0 に記載のプロセス。

( 項目 7 2 )

血漿タンパク質が、タンパク質分析物に対応するタンパク質識別子バーコードを含む d s D N A テンプレート分子を生成することによって分析される、項目 7 1 に記載のプロセス。

( 項目 7 3 )

前記 5 h m C 含有 D N A 、前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、項目 7 2 に記載のプロセス。

( 項目 7 4 )

前記 5 h m C 含有 D N A 、前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A が、シーケンシングの前にプールされる、項目 7 3 に記載のプロセス。

( 項目 7 5 )

前記無細胞核酸サンプルが、血液サンプルから得られる、項目 6 2 に記載のプロセス。

( 項目 7 6 )

前記血液サンプルに対して血漿タンパク質分析を実施する工程をさらに含む、項目 7 5 に記載のプロセス。

( 項目 7 7 )

血漿タンパク質が、タンパク質分析物に対応するタンパク質識別子バーコードを含む d s D N A テンプレート分子を生成することによって分析される、項目 7 6 に記載のプロセス。

( 項目 7 8 )

前記 5 h m C 含有 D N A 、前記 5 m C 含有 D N A 、前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A を増幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、項目 7 7 に記載のプロセス。

( 項目 7 9 )

前記 5 h m C 含有 D N A 、前記 5 m C 含有 D N A 、前記タグ付けされていない D N A および前記アダプター結合 c D N A が、シーケンシングの前にプールされる、項目 7 8 に記載のプロセス。

( 項目 8 0 )

核酸テンプレート分子の非古典的な配列特徴を決定するためのシーケンシングベースの方法であって、

10

20

30

40

50

前記テンプレート分子の特定の非配列特徴を指定する固有特性識別子配列を前記核酸テンプレート分子に付加する工程；

前記核酸テンプレート分子および前記付加された識別子配列を増幅して、前記付加された識別子配列をそれぞれが含む複数のアンプリコンを得る工程；および

前記アンプリコンをシーケンシングし、得られた配列リードから前記非配列特徴を決定する工程

を含む、シーケンシングベースの方法。

(項目 8 1)

前記核酸テンプレート分子が、複数の異なる核酸テンプレート分子を含む組成物に含まれており、各テンプレート分子の特定の非古典的な配列特徴を指定する少なくとも 1 つの識別子配列が、前記核酸テンプレート分子に付加されている、項目 8 0 に記載の方法。

10

(項目 8 2)

前記非古典的な配列特徴が、前記核酸テンプレート分子と会合したタンパク質の一態様を含む、項目 8 0 または項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記タンパク質が、ヒストンである、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記態様が、ヒストン修飾を含む、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記ヒストン修飾が、共有結合による翻訳後修飾 ( P T M ) を含む、項目 8 4 に記載の方法。

20

(項目 8 6)

前記 P T M が、遺伝子発現に影響を与えるヒストン構造の変化を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記少なくとも 1 つの P T C 修飾が、アセチル化、メチル化、プロピオニル化、ブチリル化、クロトニル化、2 - ヒドロキシイソブチリル化、マロニル化、スクシニル化、ホルミル化、ユビキチン化、シトルリン化、リン酸化、ヒドロキシ化、O - G l c N A c 化、A D P リボシル化またはそれらの組み合わせを含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記 1 またはそれを超えるヒストン修飾が、被験体における病状を評価するためのヒストン修飾バイオマーカーを含む、項目 8 5 に記載の方法。

30

(項目 8 9)

前記非古典的な配列特徴が、近接伸長法において前記核酸テンプレートが由来したタンパク質分析物を含む、項目 8 0 または項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記非古典的な配列特徴が、エピジェネティック修飾を含む、項目 8 0 または項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記非古典的な配列特徴が、前記核酸テンプレート分子をゲノム D N A または c D N A として識別することを含む、項目 8 0 または項目 8 1 に記載の方法。

40

(項目 9 2)

前記組成物が、無細胞核酸サンプルを含む、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

前記非古典的な配列特徴が、前記核酸テンプレート分子を無細胞 D N A フラグメントまたは無細胞 R N A に由来する c D N A として識別することを含む、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

近接伸長法における既知のタンパク質分析物に由来する核酸配列を含み、それによって、タンパク質識別子バーコードとして供される、二本鎖 D N A テンプレート分子。

(項目 9 5)

50



前記分子の末端にライゲートされたアダプターをさらに含む、項目 9 4 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 9 6 )

それぞれが前記分子の末端にライゲートされた 2 つのアダプターを含む、項目 9 5 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 9 7 )

5 h m C 残基をさらに含む、項目 9 4 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 9 8 )

5 h m C 残基をさらに含む、項目 9 5 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 9 9 )

前記 5 h m C 残基が、前記アダプター内に含まれている、項目 9 8 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 1 0 0 )

5 h m C 残基をさらに含む、項目 9 6 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 1 0 1 )

前記アダプターのうちの少なくとも 1 つが、5 h m C 残基を含む、項目 1 0 0 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 1 0 2 )

前記近接プローブが、同じタンパク質分析物に結合されたとき、タンパク質分析物に由来する前記核酸配列が、2 つの近接プローブの間に形成するハイブリダイズした核酸領域内に核酸配列を含む、項目 9 4 に記載の D N A テンプレート分子。

( 項目 1 0 3 )

無細胞 R N A に由来する c D N A、およびそれに付加された 5 h m C 残基を含む核酸配列を含む、無細胞核酸組成物。

( 項目 1 0 4 )

前記核酸配列が、アダプターを含む、項目 1 0 3 に記載の組成物。

( 項目 1 0 5 )

前記核酸配列が、ソース識別子バーコードをさらに含む、項目 1 0 3 または 1 0 4 に記載の組成物。

( 項目 1 0 6 )

前記核酸配列が、R N A インジケータバーコードをさらに含む、項目 1 0 2 ~ 1 0 4 のいずれかに記載の組成物。

( 項目 1 0 7 )

前記核酸配列が、R N A インジケータバーコードをさらに含む、項目 1 0 5 に記載の組成物。

( 項目 1 0 8 )

単一の血液サンプルに由来するアダプター結合バーコード化二本鎖 D N A テンプレート分子をそれぞれが含む、サンプル画分の組み合わせであって、前記組み合わせは、

( a ) 少なくとも 1 つのタンパク質関連 d s D N A テンプレート分子を含む血漿由来サンプル画分であって、前記タンパク質関連 d s D N A テンプレート分子のそれぞれが、特定のタンパク質分析物に対応するタンパク質特異的核酸配列を含み、それによって、タンパク質識別子バーコードとして供される、血漿由来サンプル画分；および

( b ) 前記血液サンプルから抽出された無細胞核酸サンプルから得られた二本鎖 c f D N A テンプレート分子を含む少なくとも 1 つの c f D N A 由来サンプル画分であって、ここで、前記 c f D N A テンプレート分子は、ソース識別子バーコード、フラグメント識別子バーコード、鎖識別子バーコード、ヒストン修飾バーコード、ランダムバーコードおよびそれらの組み合わせから選択される固有特性識別子を含むアダプターのセットに末端結合されている、少なくとも 1 つの c f D N A 由来サンプル画分を含む、組み合わせ。

( 項目 1 0 9 )

10

20

30

40

50

前記タンパク質関連 d s D N A セグメントが、5 h m C 残基を含む、項目 1 0 8 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 0 )

前記アダプターの第 1 のセットにおける少なくとも 1 つのアダプターが、5 h m C 残基を含む、項目 1 0 9 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 1 )

前記 5 h m C 残基が、結合対の第 1 のメンバーに共有結合されている、項目 1 0 9 または 1 1 0 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 2 )

前記結合対の第 1 のメンバーが、前記結合対の第 2 のメンバーに結合されている、項目 1 1 1 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 3 )

前記結合対の第 2 のメンバーが、固体支持体表面に付着されている、項目 1 1 2 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 4 )

前記結合対の第 1 のメンバーが、ピオチンであり、前記結合対の第 2 のメンバーが、アビジンまたはストレプトアビジンである、項目 1 1 2 または項目 1 1 3 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 5 )

( a ) において、c f D N A テンプレートのセグメントが、5 h m C 残基を含む、項目 1 0 8 ~ 1 1 4 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 6 )

少なくとも 2 つの c f D N A 由来サンプル画分を含み、各画分は、アダプター結合バーコード化二本鎖 c f D N A テンプレート分子を含み、少なくとも 1 つの画分は、5 m C、5 h m C およびそれらの組み合わせから選択される修飾されたシトシン残基を含む、項目 1 0 8 ~ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 7 )

( a ) 第 1 の c f D N A 由来サンプル画分が、アフィニティータグ付けされた 5 h m C 残基を含む第 1 の c f D N A テンプレートセグメントを含み；

( b ) 第 2 の c f D N A 由来サンプル画分が、アフィニティータグ付けされた 5 m C 残基を含むが 5 h m C 残基を実質的に含まない第 2 の c f D N A テンプレートセグメントを含み；必要に応じて、

( c ) 第 3 の c f D N A 由来サンプル画分が、修飾されたシトシン残基を実質的に含まない第 3 の c f D N A テンプレートを含む、

項目 1 1 6 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 8 )

各 c f D N A テンプレートセグメントが、ソース識別子バーコード、ならびにフラグメント識別子バーコード、鎖識別子バーコードおよびヌクレオソーム位置識別子バーコードから選択される少なくとも 1 つの追加の識別子バーコードを含む、項目 1 0 8 ~ 1 1 7 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ。

( 項目 1 1 9 )

各 c f D N A テンプレートセグメントが、ソース識別子バーコード、フラグメント識別子バーコードおよび鎖識別子バーコードを含む、項目 1 1 8 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 2 0 )

各 c f D N A テンプレートセグメントが、ヒストン修飾バーコードをさらに含む、項目 1 1 9 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 2 1 )

前記無細胞核酸サンプル中の c f R N A に由来するアダプター結合 c D N A 分子をさらに含む、項目 1 0 8 に記載の組み合わせ。

( 項目 1 2 2 )

10

20

30

40

50

項目 1 0 8 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の組み合わせを合わせ、増幅し、かつシーケンシングすることによって調製された、DNAシーケンシングの準備が整っている、プールされた混合物。

( 項目 1 2 3 )

識別子バーコードを dsDNA 分子に付加するための方法であって、

( a ) 2 塩基対 ~ 5 0 塩基対の範囲である二本鎖セグメントおよびそれぞれが 2 塩基 ~ 2 5 塩基の範囲である 2 つの一本鎖セグメントを有する Y 構築物の形態のシーケンシングアダプターを提供する工程；

( b ) 前記シーケンシングアダプターを A テール化平滑末端 dsDNA テンプレート分子にライゲートする工程；

( c ) 少なくとも 1 つのバーコード化プライマーを用いる PCR プロセスにおいて前記アダプター結合 dsDNA テンプレート分子を増幅する工程であって、ここで、前記バーコード化プライマーは、( i ) 前記アダプターの中のいずれの配列にも相補的でなく、識別子バーコードを含む、第 1 の領域；および ( i i ) 前記アダプターの本鎖セグメントに十分に相補的であり、それにハイブリダイズする第 2 の領域を含み、その結果、ポリメラーゼの存在下における前記バーコード化プライマーの伸長によって、前記プライマーの第 2 の領域と前記アダプターの本鎖セグメントとの二本鎖複合体が生じ、ここで、前記識別子バーコードを含む前記第 1 の領域は、前記二本鎖複合体の末端を超えて一本鎖オリゴヌクレオチドテールとして伸長する、工程

を含む、方法。

( 項目 1 2 4 )

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対 ~ 3 5 塩基対の範囲であり、前記 2 つの本鎖セグメントがそれぞれ、約 5 塩基 ~ 2 5 塩基の範囲である、項目 1 2 3 に記載の方法。

( 項目 1 2 5 )

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対 ~ 2 5 塩基対の範囲であり、前記 2 つの本鎖セグメントがそれぞれ、約 5 塩基 ~ 2 0 塩基の範囲である、項目 1 2 4 に記載の方法。

( 項目 1 2 6 )

前記 DNA アダプターが、2 塩基対 ~ 5 0 塩基対の範囲である二本鎖セグメントおよびそれぞれが 2 塩基 ~ 2 5 塩基の範囲である 2 つの本鎖セグメントを有する Y 構築物の形態である、項目 3 8、4 5、4 7、5 0 および 5 3 に記載の方法。

( 項目 1 2 7 )

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対 ~ 3 5 塩基対の範囲であり、前記 2 つの本鎖セグメントがそれぞれ、約 5 塩基 ~ 2 5 塩基の範囲である、項目 1 2 6 に記載の方法。

( 項目 1 2 8 )

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対 ~ 2 5 塩基対の範囲であり、前記 2 つの本鎖セグメントがそれぞれ、約 5 塩基 ~ 2 0 塩基の範囲である、項目 1 2 7 に記載の方法。

( 項目 1 2 9 )

dsDNA テンプレート分子を増幅し、かつシーケンシングするためのキットであって、

( a ) 2 塩基対 ~ 5 0 塩基対の範囲である二本鎖セグメントおよびそれぞれが 2 塩基 ~ 2 5 塩基の範囲である 2 つの本鎖セグメントを有する Y 構築物の形態のシーケンシングアダプター；

( b ) ( i ) 前記アダプターの中のいずれの配列にも相補的でなく、識別子バーコードを含む、第 1 の領域；および ( i i ) 前記アダプターの本鎖セグメントに十分に相補的であり、それにハイブリダイズする、第 2 の領域を含む、バーコード化プライマー；および

( c ) ポリメラーゼ

を備える、キット。

( 項目 1 3 0 )

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対 ~ 3 5 塩基対の範囲であり、前記 2 つの本鎖セグメントがそれぞれ、約 5 塩基 ~ 2 5 塩基の範囲である、項目 1 2 9 に記載のキット。

( 項目 1 3 1 )

10

20

30

40

50

前記二本鎖セグメントが、5塩基対～25塩基対の範囲であり、前記2つの一本鎖セグメントがそれぞれ、約5塩基～20塩基の範囲である、項目130に記載の方法。

(項目132)

標的化配列に対してシーケンスベースの富化工程を実施する工程をさらに含む、項目38、45、47、50および53のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50