

【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 12 Q 1/6804(2018.01)

C 12 Q 1/6813(2018.01)

C 12 Q 1/686(2018.01)

C 12 N 15/10(2006.01)

C 12 Q 1/6869(2018.01)

C 12 Q 1/6876(2018.01)

10

【F I】

C 12 Q 1/6804 Z Z N A

C 12 Q 1/6813 Z

20

C 12 Q 1/686 Z

C 12 N 15/10 100 Z

C 12 Q 1/6869 Z

C 12 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

30

【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

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cDNA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-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)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5hmC残基を官能化する工程；

30

(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5hmC含有DNAを前記無細胞サンプルから取り出す工程；

(e) 前記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

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5hmC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 U F I 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 c f 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；

(b) 前記サンプル中の RNA から c DNA 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 c DNA アダプターを前記 c DNA 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 DNA を提供する工程；

(c) 前記無細胞サンプルから 5 hmC 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 5 - ヒドロキシメチルシトシン (5 mC) 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 c DNA とともに、前記タグ付けされた 5 hmC 含有 DNA を取り出す工程；

(e) 前記タグ付けされた 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 DNA およびアダプター結合 c DNA とともに、前記タグ付けされた 5 mC 含有 DNA を取り出す工程；

(i) 前記タグ付けされた 5 mC 含有 DNA に 5 mC 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 hmC 含有 DNA 、前記タグ付けされた 5 mC 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 c DNA 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 5 hmC 含有 DNA および前記タグ付けされた 5 mC 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 c DNA 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 c f 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；

(b) 前記サンプル中の RNA から c DNA を合成し、5 hmC 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 c DNA アダプターを前記 c DNA 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 c DNA を提供する工程；

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

(e) 前記 5 hmC 含有 DNA および前記バーコード化アダプター結合 c DNA のプールされた混合物を増幅し、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 を增幅し、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 c DNA とともに、前記タグ付けされた 5 hmC 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 5 hmC 含有 DNA に 5 hmC 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 1_3 に記載のプロセス。

【請求項 1_8】

(l) 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 c DNA を增幅し、かつシーケンシングする工程
をさらに含む、請求項 1_7 に記載のプロセス。

【請求項 1_9】

工程 (k) において提供された前記バーコード化 5 hmC 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 c DNA とともにプールされる、請求項 1_8 に記載のプロセス。

【請求項 2_0】

(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 c DNA とともに、前記タグ付けされた 5 mC 含有 DNA を取り出す工程；および
(o) 前記タグ付けされた 5 mC 含有 DNA に 5 mC 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 1_7 に記載のプロセス。

【請求項 2_1】

(p) 前記タグ付けされた 5 hmC 含有 DNA 、前記タグ付けされた 5 mC 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 c DNA を增幅し、かつシーケンシングする工程

をさらに含む、請求項 2_0 に記載のプロセス。

【請求項 2_2】

前記タグ付けされた 5 hmC 含有 DNA および前記タグ付けされた 5 mC 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 c DNA とともにプールされる、請求項 2_1 に記載のプロセス。

【請求項 2_3】

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 1_2 に記載のプロセス。

【請求項 2_4】

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 2_3 に記載のプロセス。

【請求項 2_5】

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 ds DNA 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 2_4 に記載のプロセス。

【請求項 2_6】

前記ヒストン修飾バーコード化 ds DNA テンプレート分子、前記アダプター結合 c DNA および前記タンパク質バーコード化 ds DNA テンプレート分子を增幅し、かつシーケンシングする工程をさらに含む、請求項 2_5 に記載のプロセス。

【請求項 2_7】

前記ヒストン修飾バーコード化 ds DNA テンプレート分子、前記アダプター結合 c DNA および前記タンパク質バーコード化 ds DNA 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 2_6 に記載のプロセス。

【請求項 2_8】

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 1_7 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2_8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 d s DNA 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2_9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 c DNA 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3_0に記載のプロセス。

【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 c DNA が、シーケンシングの前にプールされる、請求項3_1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2_0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3_3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 d s DNA 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3_4に記載のプロセス。

【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 c DNA 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3_5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 c DNA が、シーケンシングの前にプールされる、請求項3_6に記載のプロセス。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 1 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 1 7】

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 1 2 に示されている。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

10

20

30

40

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(dsDNA)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dsDNA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dsDNA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

(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dsDNA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、5hmC残基を含むキャプチャ配列を前記dsDNAセグメントに組み込み、それによって、前記キャプチャ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)

前記キャプチャ配列および前記タンパク質識別子バーコードが、前記dsDNA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dsDNA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dsDNA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、それがキャプチャ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17)

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16に記載の方法。

(項目18)

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1~17のいずれか1つの項目に記載の方法。

(項目19)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中のスクレオソーム内の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18に記載の方法。

(項目20)

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(PTM)を含む、項目19に記載の方法。

(項目21)

前記PTM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20に記載の方法。

(項目22)

前記少なくとも1つのPTM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、SUMO化、O-GlcNAc化、ADPリボシル化またはそれらの組み合わせを含む、項目20に記載の方法。

(項目23)

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19に記載の方法。

(項目24)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の無細胞DNA(cfDNA)の少なくとも1つの配列を含む、項目18に記載の方法。

(項目25)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中のcfDNAの少なくとも1つの配列をさらに含む、項目19~23のいずれか1項に記載の方法。

(項目26)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中の無細胞RNA(cfRNA)の少なくとも1つの配列を含む、項目18に記載の方法。

(項目27)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中のcfRNAの少なくとも1つの配列をさらに含む、項目19~23のいずれか1項に記載の方法。

(項目28)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中のcfRNAの少なくとも1つの配列をさらに含む、項目24に記載の方法。

(項目29)

前記情報が、前記無細胞核酸サンプル中のcfRNAの少なくとも1つの配列をさらに含む、項目25に記載の方法。

(項目30)

前記情報が、エピジェネティックデータを含む、項目18に記載の方法。

(項目31)

前記情報が、DNAヒドロキシメチル化に関する、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記情報が、DNAメチル化に関する、項目30に記載の方法。

(項目33)

前記情報が、さらにDNAメチル化に関する、項目31に記載の方法。

(項目34)

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 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

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 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

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、U D P 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 3 7 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記アダプターが、固有特性識別子 (U F I) 配列をさらに含む、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記アダプターが、少なくとも 2 つの U F I 配列を含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記少なくとも 2 つの U F I 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 U F I 配列を含む、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

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 D N A および R N A 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 U F I 配列を含む第 1 のアダプター配列を含む D N A アダプターを前記無細胞サンプル中の平滑末端 D N A の末端にライゲートして、アダプター結合 D N A を提供する工程であって、ここで、前記少なくとも 1 つの U F I 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 D N A および R N A を精製して、アダプター結合 D N A および R N A の無細胞混和物を提供する工程；

(c) 前記 R N A から c D N A の第 1 鎖を合成する工程；

(d) 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

(e) 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第 2 のアダプター配列を含む 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、前記アダプター結合 D N A も含む無細胞混和物中にアダプター結合 c D N A を提供する工程を含む、方法。

(項目 4 6)

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 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

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 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 を提供する工程であって、ここで、前記少なくとも 1 つの U F I 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 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、前記アダプター結合 D N A も含む無細胞混和物中にアダプター結合 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

10

20

30

40

50

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 c

DNA 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 c DNA 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 48)

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 47 に記載の方法。

10

(項目 49)

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 c DNA とともにプールされる、項目 47 または項目 48 に記載のプロセス。

(項目 50)

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 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 c f 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；

20

(b) 前記サンプル中の RNA から c DNA 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 c DNA アダプターを前記 c DNA 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 DNA を提供する工程；

(c) 前記無細胞サンプルから 5 hmC 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 5 mC 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 c DNA とともに、前記タグ付けされた 5 hmC 含有 DNA を取り出す工程；

(e) 前記タグ付けされた 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

30

(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 DNA およびアダプター結合 c DNA とともに、前記タグ付けされた 5 mC 含有 DNA を取り出す工程；

(i) 前記タグ付けされた 5 mC 含有 DNA に 5 mC 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 hmC 含有 DNA 、前記タグ付けされた 5 mC 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 c DNA 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。

(項目 51)

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 50 に記載のプロセス。

(項目 52)

前記前記タグ付けされた 5 hmC 含有 DNA および前記タグ付けされた 5 mC 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 c DNA とともにプールされる、項目 50 または項目 51 に記載のプロセス。

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 cf 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；

(b) 前記サンプル中の RNA から c DNA を合成し、5 hmC 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 c DNA アダプターを前記 c DNA 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 c DNA を提供する工程；

(c) 前記無細胞サンプルから 5 hmC 含有種を選択的に取り出すことを可能にするアフ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 5 hmC 含有 DNA および前記バーコード化アダプター結合 c DNA を前記無細胞サンプルから取り出す工程；および

(e) 前記 5 hmC 含有 DNA および前記バーコード化アダプター結合 c DNA 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 cf RNA 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 (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' 末端を有する ds DNA 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 NTP 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 ds DNA 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 ds DNA 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 c DNA の第 1 鎖を合成する工程；

(g) 前記第 1 鎖に相補的な c DNA の第 2 鎖を合成して、c DNA 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 c DNA アダプターをリガーゼの非存在下において前記 c DNA 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 DNA および前記ヒストン修飾バーコード化 ds DNA 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55)

(i) 前記ヒストン修飾バーコード化d s DNAテンプレート分子および前記アダプター結合c DNAを增幅し、かつシーケンシングする工程
をさらに含む、項目54に記載のプロセス。

(項目56)

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 DNAにライゲートする、項目55に記載のプロセス。

(項目57)

前記追加のバーコードが、ソース識別子配列を含む、項目56に記載のプロセス。

10

(項目58)

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57に記載のプロセス。

(項目59)

(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c DNA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54、56、57および58のいずれか1項に記載のプロセス。

(項目60)

(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c DNAを增幅し、かつシーケンシングする工程

をさらに含む、項目59に記載のプロセス。

(項目61)

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c DNAとともにプールされる、項目60に記載のプロセス。

30

(項目62)

(m) 前記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；

(n) 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；

(o) 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c DNA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

(p) 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59に記載のプロセス。

(項目63)

(q) 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c DNAを增幅し、かつシーケンシングする工程

40

をさらに含む、項目62に記載のプロセス。

(項目64)

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c DNAとともにプールされる、項目63に記載のプロセス。

(項目65)

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54に記載のプロセス。

50

(項目66)

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65に記載のプロセス。

(項目67)

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 DNA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66に記載のプロセス。

(項目68)

前記ヒストン修飾バーコード化d s DNAテンプレート分子、前記アダプター結合c DNAおよび前記タンパク質バーコード化d s 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をさらに含む、項目67に記載のプロセス。

10

(項目69)

前記ヒストン修飾バーコード化d s DNAテンプレート分子、前記アダプター結合c DNAおよび前記タンパク質バーコード化d s DNA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68に記載のプロセス。

(項目70)

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59に記載のプロセス。

(項目71)

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70に記載のプロセス。

20

(項目72)

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 DNA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71に記載のプロセス。

(項目73)

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c DNA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72に記載のプロセス。

(項目74)

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c DNAが、シーケンシングの前にプールされる、項目73に記載のプロセス。

30

(項目75)

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62に記載のプロセス。

(項目76)

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75に記載のプロセス。

(項目77)

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 DNA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76に記載のプロセス。

40

(項目78)

前記5hmC含有DNA、前記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c DNA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77に記載のプロセス。

(項目79)

前記5hmC含有DNA、前記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c DNAが、シーケンシングの前にプールされる、項目78に記載のプロセス。

(項目80)

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、

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あり、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 (PTM) を含む、項目 8 4 に記載の方法。

20

(項目 8 6)

前記 PTM 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 PTC 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、ヒドロキシル化、O - G1cNAc 化、ADP 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。

30

(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。

(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來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 DNA または cDNA 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 DNA フラグメントまたは無細胞 RNA に由来する cDNA 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 DNA テンプレート分子。

50

(項目 9 5)

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94に記載のDNAテンプレート分子。

(項目96)

そ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95に記載のDNAテンプレート分子。

(項目97)

5hmC残基をさらに含む、項目94に記載のDNAテンプレート分子。

(項目98)

5hmC残基をさらに含む、項目95に記載のDNAテンプレート分子。

(項目99)

前記5hmC残基が、前記アダプター内に含まれている、項目98に記載のDNAテンプレート分子。

(項目100)

5hmC残基をさらに含む、項目96に記載のDNAテンプレート分子。

(項目101)

前記アダプターの少なくとも1つが、5hmC残基を含む、項目100に記載のDNAテンプレート分子。

(項目102)

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94に記載のDNAテンプレート分子。

(項目103)

無細胞RNAに由来するcDNA、およびそれに付加された5hmC残基を含む核酸配列を含む、無細胞核酸組成物。

(項目104)

前記核酸配列が、アダプターを含む、項目103に記載の組成物。

(項目105)

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103または104に記載の組成物。

(項目106)

前記核酸配列が、RNAインジケーターバーコードをさらに含む、項目102~104のいずれかに記載の組成物。

(項目107)

前記核酸配列が、RNAインジケーターバーコードをさらに含む、項目105に記載の組成物。

(項目108)

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DNAテンプレート分子をそれが含む、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dsDNA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dsDNAテンプレート分子のそれが、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cfDNAテンプレート分子を含む少なくとも1つのcfDNA由来サンプル画分であって、ここで、前記cfDNA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cfDNA由来サンプル画分

を含む、組み合わせ。

(項目109)

10

20

30

40

50

前記タンパク質関連 d s DNA 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、 ビオチンであり、 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 DNA 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 DNA 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 DNA 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 DNA 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 DNA テンプレートセグメントを含み；

(b) 第 2 の c f DNA 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 DNA 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 DNA 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 DNA 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 DNA 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 DNA 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 DNA 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 RNA に由来するアダプター結合 c DNA 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 108～121 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 123)

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～50 塩基対の範囲である二本鎖セグメントおよびそれが 2 塩基～25 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(ii) 前記アダプターの一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一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 124)

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対～35 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～25 塩基の範囲である、項目 123 に記載の方法。

(項目 125)

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 124 に記載の方法。

(項目 126)

前記 DNA アダプターが、2 塩基対～50 塩基対の範囲である二本鎖セグメントおよびそれが 2 塩基～25 塩基の範囲である 2 つの一本鎖セグメントを有する Y 構築物の形態である、項目 38、45、47、50 および 53 に記載の方法。

(項目 127)

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対～35 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～25 塩基の範囲である、項目 126 に記載の方法。

(項目 128)

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 127 に記載の方法。

(項目 129)

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～50 塩基対の範囲である二本鎖セグメントおよびそれが 2 塩基～25 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；

(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(ii) 前記アダプターの一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 130)

前記二本鎖セグメントが、5 塩基対～35 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～25 塩基の範囲である、項目 129 に記載のキット。

(項目 131)

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