

【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8月19日(2022.8.19)

【公開番号】特開2022-23213(P2022-23213A)

【公開日】令和4年2月7日(2022.2.7)

【年通号数】公開公報(特許)2022-022

【出願番号】特願2021-180899(P2021-180899)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6851(2018.01)

10

C 40 B 40/06(2006.01)

C 12 Q 1/6876(2018.01)

A 61 P 35/00(2006.01)

A 61 P 43/00(2006.01)

A 61 K 45/00(2006.01)

G 01 N 33/53(2006.01)

C 12 Q 1/6827(2018.01)

【F I】

C 12 Q 1/6851 Z Z N A

20

C 40 B 40/06

C 12 Q 1/6876 Z

A 61 P 35/00

A 61 P 43/00 1 1 1

A 61 K 45/00

G 01 N 33/53 M

C 12 Q 1/6827 Z

【手続補正書】

【提出日】令和4年8月9日(2022.8.9)

【手続補正1】

30

【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】

D N A 断片を含む試験試料から D N A ライブライアリを生成するための複数の組成物であって、前記複数の組成物は、ユニーク試料タグ領域のプールを含むアダプタセットを含み、各アダプタが、

(i) 増幅領域、

40

(ii) 試料タグ領域、および

(iii) アンカー領域

を含み、前記アダプタセットの各アダプタの前記試料タグ領域が、ポリヌクレオチド配列を含み、前記ポリヌクレオチド配列が、前記試験試料を同定し、前記ポリヌクレオチド配列が、ユニーク D N A ライブライアリ断片を同定し；

前記試料タグ領域内の少なくとも3ヌクレオチドを含むいかなる連続配列も、ユニーク試料タグ領域の前記プールの全試料タグ領域の間で保存されない、

複数の組成物。

【請求項2】

前記増幅領域が、P C R 増幅のためのプライマー認識部位として機能することが可能なポ

50

リヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の複数の組成物。

【請求項 3】

前記アンカー領域が、DNA断片に付着することができるポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 4】

前記アダプタセットの各アダプタが、前記試験試料のDNA断片に付着して、DNAライプラリ断片を生成するように構成され、各DNAライプラリ断片が1個のアダプタに付着したDNA断片を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 5】

各アダプタの前記試料タグ領域が、これに付着された前記DNA断片を同定する、請求項 4 に記載の複数の組成物。 10

【請求項 6】

前記試験試料が組織診試料である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 7】

前記DNA断片が無細胞DNA(cfDNA)または細胞DNAである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 8】

前記DNA断片がゲノムDNAである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 9】

前記DNA断片が前記試験試料から単離され；かつ

前記試験試料が、羊水、血液、血漿、血清、精液、リンパ液、脳脊髄液、眼液、尿、唾液、便、粘液および汗からなる群より選択される生体試料である、

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 10】

前記増幅領域の配列が、前記アダプタセット間で保存されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 11】

前記増幅領域が、約 10 ~ 約 50 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 12】

前記増幅領域が、約 25 ヌクレオチドの長さである、請求項 11 に記載の複数の組成物。

【請求項 13】

前記DNAライプラリが複数のDNAライプラリ断片を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 14】

前記試料タグ領域が、約 5 ~ 約 50 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 15】

前記試料タグ領域が、約 8 ヌクレオチドの長さである、請求項 14 に記載の複数の組成物。

。

【請求項 16】

前記アンカー領域が、約 1 ~ 約 50 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項 17】

前記アンカー領域が、約 10 ヌクレオチドの長さである、請求項 16 に記載の複数の組成物。

【請求項 18】

前記アダプタセットの各アダプタが、ユニークDNAライプラリ断片を同定するためのユニーク配列の数を増加させるユニーク分子識別子(UMI)を含む、請求項 1 ~ 17 のい

10

20

30

40

50

すれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 19】**

前記 U M I が、前記試料タグ領域と U M I 増倍管を含み、前記 U M I 増倍管が、前記試料タグ領域に隣接するかまたは前記試料タグ領域内に含まれる、請求項 18 に記載の複数の組成物。

**【請求項 20】**

前記 U M I 増倍管が、約 1 ~ 約 5 ヌクレオチドの長さである、請求項 19 に記載の複数の組成物。

**【請求項 21】**

前記 U M I 増倍管が、約 3 ヌクレオチドの長さであり、64 個のヌクレオチド配列のうちの 1 個を含む、請求項 20 に記載の複数の組成物。 10

**【請求項 22】**

ユニーク試料タグ領域の前記プールが、複数のプールから選択され、かつ前記選択されたプールが前記試験試料に対してユニークである、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 23】**

ユニーク試料タグ領域の前記プールが、約 2 ~ 約 1,000 個のユニーク試料タグ領域配列を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 24】**

ユニーク試料タグ領域の前記プールが、240 個のユニーク試料タグ領域配列を含む、請求項 23 に記載の複数の組成物。 20

**【請求項 25】**

各ユニーク試料タグ領域配列が、少なくとも 2 塩基だけいずれかの他のユニーク試料タグ領域配列から分離する、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 26】**

前記アダプタセットの各アダプタの前記試料タグ領域が、ポリヌクレオチド配列を含み、前記ポリヌクレオチド配列が、固定された開始位置と固定された末端位置を有し、前記固定された開始位置から前記固定された末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、前記試験試料を同定し、そして、前記固定された開始位置から前記固定された末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、ユニーク DNA ライブラリ断片を同定する、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の複数の組成物。 30

**【請求項 27】**

前記アダプタセットの各アダプタの前記試料タグ領域が、開始位置と末端位置を有するポリヌクレオチド配列を含み、その開始位置からその末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、前記試験試料を同定し、そして、その開始位置からその末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、ユニーク DNA ライブラリ断片を同定する、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 28】**

前記アダプタセットの各アダプタの前記アンカー領域が、少なくとも 2 個のアンカー領域ヌクレオチド配列のうちの 1 個を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の複数の組成物。 40

**【請求項 29】**

ユニーク試料タグ領域の前記プールの各試料タグ領域が、前記少なくとも 2 個のアンカー領域ヌクレオチド配列のうちの 1 個に対応される、請求項 28 に記載の複数の組成物。

**【請求項 30】**

前記アダプタセットの各アダプタの前記アンカー領域が、4 個のヌクレオチド配列のうちの 1 個を含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 31】**

ユニーク試料タグ領域の前記プールの各試料タグ領域が、前記 4 個のアンカー領域ヌクレオチド配列のうちの 1 個に対応される、請求項 30 に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 2】**

前記試料タグ領域と前記アンカー領域の組み合わせが前記試験試料を同定する、請求項 29～31 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 3】**

請求項 1～32 のいずれか一項に記載の複数の組成物であって、

(i) アンカー配列を含むライゲーション鎖；

(ii) 非ライゲーションパートナー鎖；および

(iii) 全長アダプタ鎖であって、前記ライゲーション鎖のオリゴヌクレオチドよりも長い、全長アダプタ鎖

を含む、複数の組成物。

10

**【請求項 3 4】**

前記非ライゲーションパートナー鎖が、前記ライゲーション鎖の 3' 末端にハイブリダイズして、それと二本鎖を形成するように構成される、請求項 33 に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 5】**

前記アダプタセットの各アダプタが、非ライゲーションパートナー鎖と二本鎖を形成したライゲーション鎖を含む、請求項 33 または請求項 34 に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 6】**

前記非ライゲーションパートナー鎖が、3' 末端に、末端修復された DNA 断片の 5' 末端へのライゲーションおよび / またはアダプタ二量体の形成を防ぐ修飾を含む、請求項 33～35 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

20

**【請求項 3 7】**

前記全長アダプタ鎖が、アンカー配列と、以下：

(i) 増幅領域、

(ii) 試料タグ領域、および

(iii) UMI 増倍管

のうち少なくとも 1 個とを含む、請求項 33～36 のいずれか一項に記載の複数の組成物

**【請求項 3 8】**

前記ライゲーション鎖の前記アンカー配列が、前記全長アダプタ鎖の前記アンカー配列と少なくとも部分的に相補的である、請求項 37 に記載の複数の組成物。

30

**【請求項 3 9】**

前記ライゲーション鎖に、末端修復された DNA 断片の 3' 末端にライゲーションさせるように構成されたリガーゼを含む、請求項 33～38 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 0】**

前記ライゲーション鎖が、前記全長アダプタ鎖にハイブリダイズするように構成され、前記ライゲーション鎖が、前記全長アダプタ鎖を鑄型として用いて、その 3' 末端において伸長されるように構成される、請求項 33～39 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 1】**

前記伸長されたライゲーション鎖が、末端修復された DNA 断片の 3' 末端にライゲーションするように構成され、前記全長アダプタ鎖が、前記末端修復された DNA 断片の 5' 末端にライゲーションするように構成される、請求項 40 に記載の複数の組成物。

40

**【請求項 4 2】**

DNA 断片の末端リン酸残基を除去するように構成された脱リン酸化酵素を含む、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 3】**

1 つ以上の DNA 末端修復酵素を含む、請求項 1～42 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 4】**

末端修復された DNA 断片の各鎖の 5' 末端ヌクレオチドにリン酸基を加えるように構成

50

されたキナーゼを含む、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 5】**

1つ以上のキャプチャープローブモジュールを含む、請求項 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 6】**

各キャプチャープローブモジュールが、

( i ) テール配列、および

( i i ) 前記試験試料の標的遺伝子座にハイブリダイズすることができるキャプチャープローブ配列

を含む、請求項 4 5 に記載の複数の組成物。

10

**【請求項 4 7】**

前記テール配列が、プライマー結合部位を含む、請求項 4 6 に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 8】**

前記テール配列が、シーケンシングプライマー結合部位を含む、請求項 4 7 に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 9】**

前記1つ以上のキャプチャープローブモジュールが、ビオチンまたは好適なハプテンにコンジュゲートされる、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 0】**

前記キャプチャープローブ配列が、約 2 5 ヌクレオチド ~ 約 4 5 ヌクレオチドの長さである 20  
、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 1】**

前記キャプチャープローブ配列が、4 0 ヌクレオチドの長さである、請求項 4 6 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 2】**

複数のキャプチャープローブモジュールを含む、請求項 4 6 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 3】**

前記複数のキャプチャープローブモジュールの各キャプチャープローブが、任意の他のキャプチャープローブの約 2 0 0 b p 以内の標的遺伝子座にハイブリダイズするように構成される 30  
、請求項 5 2 に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 4】**

少なくとも1個のキャプチャープローブモジュールが、前記標的遺伝子座の標的領域の下流にハイブリダイズするように構成され、少なくとも1個のキャプチャープローブモジュールが、前記標的領域の上流にハイブリダイズするように構成される、請求項 5 2 または請求項 5 3 に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 5】**

複数のDNAライプラリ断片と1個のアダプタセットを含むゲノムDNAライプラリであって、

前記複数のDNAライプラリ断片が、複数のDNA断片を含む試験試料から生成され、 40  
前記DNAライプラリ断片の各々が、1個のDNA断片に付着された1個のアダプタを含み、

前記アダプタセットの各アダプタが、

( i ) 増幅領域、

( i i ) 試料タグ領域、および

( i i i ) アンカー領域

を含み、前記アダプタセットの各アダプタの前記試料タグ領域が、ポリヌクレオチド配列を含み、前記ポリヌクレオチド配列が、前記試験試料を同定し、前記ポリヌクレオチド配列が、ユニークDNAライプラリ断片を同定し；

前記試料タグ領域内の少なくとも3ヌクレオチドを含むいかなる連続配列も、ユニーク試 50

料タグ領域の前記プールの全試料タグ領域の間で保存されない、  
ゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 5 6】**

前記増幅領域が、PCR増幅のためのプライマー認識部位として機能することが可能なポリヌクレオチド配列を含む、請求項55に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 5 7】**

前記アンカー領域が、DNA断片に付着することが可能なポリヌクレオチド配列を含む、  
請求項55または請求項56に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 5 8】**

前記アダプタセットの各アダプタが、前記試験試料のDNA断片に付着して、DNAライ  
ブライ断片を生成するように構成され、各DNAライブライ断片が1個のアダプタに付着  
したDNA断片を含む、請求項55～57のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

10

**【請求項 5 9】**

各アダプタの前記試料タグ領域が、これに付着された前記DNA断片を同定する、請求項  
58に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 6 0】**

前記試験試料が組織診試料である、請求項55～59のいずれか一項に記載のゲノムDN  
Aライブラリ。

20

**【請求項 6 1】**

前記DNA断片が無細胞DNA(cfDNA)または細胞DNAである、請求項55～6  
0のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 6 2】**

前記DNA断片がゲノムDNAである、請求項55～60のいずれか一項に記載のゲノム  
DNAライブラリ。

**【請求項 6 3】**

前記DNA断片が前記試験試料から単離され；かつ  
前記試験試料が、羊水、血液、血漿、血清、精液、リンパ液、脳脊髄液、眼液、尿、唾液  
、便、粘液および汗からなる群より選択される生体試料である、  
請求項55～62のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

30

**【請求項 6 4】**

前記増幅領域の配列が、前記アダプタセット間で保存されている、請求項55～63のい  
ずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 6 5】**

前記増幅領域が、約10～約50ヌクレオチドの長さである、請求項55～64のいすれ  
か一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 6 6】**

前記増幅領域が、約25ヌクレオチドの長さである、請求項65のいすれか一項に記載の  
ゲノムDNAライブラリ。

40

**【請求項 6 7】**

前記DNAライブラリが複数のDNAライブラリ断片を含む、請求項55～66のいすれ  
か一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 6 8】**

前記試料タグ領域が、約5～約50ヌクレオチドの長さである、請求項55～67のいす  
れか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 6 9】**

前記試料タグ領域が、約8ヌクレオチドの長さである、請求項68に記載のゲノムDN  
Aライブラリ。

**【請求項 7 0】**

前記アンカー領域が、約1～約50ヌクレオチドの長さである、請求項55～69のいす

50

れか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 1】

前記アンカー領域が、約10ヌクレオチドの長さである、請求項70に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 2】

前記アダプタセットの各アダプタが、ユニークDNAライブラリ断片を同定するためのユニーク配列の数を増加させるユニーク分子識別子(UMI)を含む、請求項55～71のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 3】

前記UMIが、前記試料タグ領域とUMI増倍管を含み、前記UMI増倍管が、前記試料タグ領域に隣接するかまたは前記試料タグ領域内に含まれる、請求項72に記載のゲノムDNAライブラリ。 10

【請求項 7 4】

前記UMI増倍管が、約1～約5ヌクレオチドの長さである、請求項73に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 5】

前記UMI増倍管が、約3ヌクレオチドの長さであり、64個のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項74に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 6】

ユニーク試料タグ領域の前記プールが、複数のプールから選択され、かつ前記選択されたプールが前記試験試料に対してユニークである、請求項55～75のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。 20

【請求項 7 7】

ユニーク試料タグ領域の前記プールが、約2～約1,000個のユニーク試料タグ領域配列を含む、請求項55～76のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 8】

ユニーク試料タグ領域の前記プールが、240個のユニーク試料タグ領域配列を含む、請求項77に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 7 9】

各ユニーク試料タグ領域配列が、少なくとも2塩基だけいずれかの他のユニーク試料タグ領域配列から分離する、請求項55～78のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。 30

【請求項 8 0】

前記試料タグ領域の前記ポリヌクレオチド配列が、固定された開始位置と固定された末端位置を有し、前記固定された開始位置から前記固定された末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、前記試験試料を同定し、そして、前記固定された開始位置から前記固定された末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、ユニークDNAライブラリ断片を同定する、請求項55～79のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 8 1】

前記アダプタセットの各アダプタの前記試料タグ領域が、開始位置と末端位置を有するポリヌクレオチド配列を含み、その開始位置からその末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、前記試験試料を同定し、そして、その開始位置からその末端位置までの前記ポリヌクレオチド配列が、ユニークDNAライブラリ断片を同定する、請求項55～79のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。 40

【請求項 8 2】

前記アダプタセットの各アダプタの前記アンカー領域が、少なくとも2個のアンカー領域ヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項55～81のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項 8 3】

ユニーク試料タグ領域の前記プールの各試料タグ領域が、前記少なくとも2個のアンカー 50

領域又クレオチド配列のうちの 1 個に対応される、請求項 8 2 に記載のゲノム DNA ライブリ。

【請求項 8 4】

前記アダプタセットの各アダプタの前記アンカー領域が、4 個の又クレオチド配列のうちの 1 個を含む、請求項 5 5 ~ 8 1 のいずれか一項に記載のゲノム DNA ライブリ。

【請求項 8 5】

ユニーク試料タグ領域の前記プールの各試料タグ領域が、前記 4 個のアンカー領域又クレオチド配列のうちの 1 個に対応される、請求項 8 4 に記載のゲノム DNA ライブリ。

【請求項 8 6】

前記試料タグ領域と前記アンカー領域の組み合わせが前記試験試料を同定する、請求項 8 3 ~ 8 5 のいずれか一項に記載のゲノム DNA ライブリ。10

【請求項 8 7】

請求項 5 5 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の 2 つ以上のゲノム DNA ライブリを含む、複数のゲノム DNA ライブリ。

【請求項 8 8】

前記複数のゲノム DNA ライブリに属する 1 つのゲノム DNA ライブリの前記試料タグ領域の核酸配列が、前記複数のゲノム DNA ライブリに属する他のゲノム DNA ライブリの前記試料タグ領域の核酸配列と異なる、請求項 8 7 に記載の複数のゲノム DNA ライブリ。

【請求項 8 9】

前記複数のゲノム DNA ライブリに属する 1 つのゲノム DNA ライブリの前記増幅領域の核酸配列が、前記複数のゲノム DNA ライブリに属する他のゲノム DNA ライブリの前記増幅領域の核酸配列と同一である、請求項 8 7 または 8 8 に記載の複数のゲノム DNA ライブリ。20

30

30

40

50