

【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 1 2 Q 1/6851(2018.01)

C 4 0 B 40/06(2006.01)

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 45/00(2006.01)

G 0 1 N 33/53(2006.01)

C 1 2 Q 1/6827(2018.01)

10

【F I】

C 1 2 Q 1/6851 Z Z N A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 Q 1/6876 Z

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 45/00

G 0 1 N 33/53 M

C 1 2 Q 1/6827 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 8 月 9 日(2022.8.9)

【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】

D N A 断片を含む試験試料から D N A ライブラ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、

(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 D N A ライブラリ断片を同定し；

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。

40

【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可能な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 ライブラリ断片を生成するように構成され、各 DNA ライブラリ断片が 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 (cf DNA) 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】 20

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。 30

【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 ライブラリが複数の DNA ライブラリ断片を含む、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。 40

【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 1 ~ 17 のい 50

ず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 個に対合される、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 個に対合される、請求項 30 に記載の複数の組成物。

50

【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 2 9 ~ 3 1 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 ~ 3 2 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；

(i i) 非ライゲーションパートナー鎖；および

(i i i) 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 3 3 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 3 3 または請求項 3 4 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 3 3 ~ 3 5 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、

(i i) 試料タグ領域、および

(i i i) U M I 増倍管

のうち少なくとも 1 個とを含む、請求項 3 3 ~ 3 6 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 3 7 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りガーゼを含む、請求項 3 3 ~ 3 8 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鋳型として用いて、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 3 3 ~ 3 9 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 4 0 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 ~ 4 1 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 ~ 4 2 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可能なキャプチャプローブ配列

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、請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

20

【請求項 5 1】

前記キャプチャプローブ配列が、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プローブモジュールの各キャプチャプローブが、任意の他のキャプチャプローブの約 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、請求項 5 2 に記載の複数の組成物。

30

【請求項 5 4】

少なくとも 1 個のキャプチャ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 ライブラリ断片と 1 個のアダプタセットを含むゲノム DNA ライブラリであって、

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

40

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 ライブラリ断片を同定し；

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56】

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57】

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58】

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
ブラリ断片を生成するように構成され、各DNAライブラリ断片が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59】

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60】

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。

【請求項61】

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。

20

【請求項62】

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63】

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64】

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65】

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のいずれ
か一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項66】

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のいずれか一項に記載の
ゲノムDNAライブラリ。

【請求項67】

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のいずれ
か一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

40

【請求項68】

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のいず
れか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【請求項69】

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70】

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のいず

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 7 0 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 5 5 ~ 7 1 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 7 2 に記載のゲノムDNAライブラリ。

【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 7 3 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 7 4 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 5 5 ~ 7 5 のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【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 5 5 ~ 7 6 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 7 7 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 5 5 ~ 7 8 のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【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 5 5 ~ 7 9 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 5 5 ~ 7 9 のいずれか一項に記載のゲノムDNAライブラリ。

【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 5 5 ~ 8 1 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

10

20

30

40

50

領域ヌクレオチド配列のうちの 1 個に対合される、請求項 8 2 に記載のゲノム DNA ライブラリ。

【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 個のヌ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 ライブラリ。

【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 個のアンカー領域ヌクレオチド配列のうちの 1 個に対合される、請求項 8 4 に記載のゲノム DNA ライブラリ。

【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 ライブラリ。

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 ライブラリを含む、複数のゲノム DNA ライブラリ。

【請求項 8 8】

前記複数のゲノム DNA ライブラリに属する 1 つのゲノム DNA ライブラ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 ライブラリに属する他のゲノム DNA ライブラ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 ライブラリ。

【請求項 8 9】

前記複数のゲノム DNA ライブラリに属する 1 つのゲノム DNA ライブラリの前記増幅領域の核酸配列が、前記複数のゲノム DNA ライブラリに属する他のゲノム DNA ライブラ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 ライブラリ。

20

30

40

50