

【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7年3月18日(2025.3.18)

【公開番号】特開2025-29149(P2025-29149A)

【公開日】令和7年3月5日(2025.3.5)

【年通号数】公開公報(特許)2025-040

【出願番号】特願2024-212058(P2024-212058)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6837(2018.01)

10

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 N 9/12(2006.01)

C 1 2 N 9/00(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6837 Z

C 1 2 Q 1/6844 Z Z N A

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 N 9/12

20

C 1 2 N 9/00

【手続補正書】

【提出日】令和7年3月10日(2025.3.10)

【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】

30

【請求項1】

複数の試料中の1以上の標的ヌクレオチド配列のハイスルーブット検出のための方法であって、

(i) 前記複数の試料中の各標的ヌクレオチド配列に、

第1のプロープ、第2のプロープおよび架橋オリゴまたは互いにアニーリングして架橋オリゴ複合体を形成することができる複数のオリゴヌクレオチド、を提供し、

前記第1のプロープは、分子の5'末端から出発し、第1の架橋オリゴ特異性配列、および/または任意に第1の配列バーコード、および第1のプロープの3'末端に第1の標的特異性部分を含み；

前記第2のプロープは、分子の5'末端から出発し、第2の標的特異性部分、および/または任意に第2の配列バーコード、および第2のプロープの3'末端に第2の架橋オリゴ特異性配列を含み；および、

40

前記架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体は、前記第1のプロープおよび前記第2のプロープのそれぞれの前記第1の架橋オリゴ特異性配列および前記第2の架橋オリゴ特異性配列に相補的な配列、および/または任意に第3のバーコードを含み；および、

前記第1の配列バーコードまたは前記第2の配列バーコードまたは前記第3のバーコードの少なくとも1つが、それぞれ前記第1のプロープまたは前記第2のプロープまたは前記架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体中に存在し；および、

前記第1のプロープまたは前記第2のプロープまたは前記架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体の少なくとも1つが、エンドヌクレアーゼの認識配列を含み；および、

50

前記第 1 のプローブまたは前記第 2 のプローブまたは前記架橋オリゴまたは互いにアニーリングして架橋オリゴ複合体を形成することができる複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つは、第 1 の捕捉部分を含む、工程と、

( i i ) 前記 1 以上の各標的ヌクレオチド配列について、前記第 1 のプローブおよび前記第 2 のプローブを前記架橋オリゴまたは互いにアニーリングして前記架橋オリゴ複合体を形成できる複数のヌクレオチドと接触させ、自己アニーリングによって複数のライゲーション複合体を形成する、工程であって、

前記複数のライゲーション複合体は、前記第 1 のプローブ、前記第 2 のプローブ及び前記架橋オリゴまたは互いにアニーリングして前記架橋オリゴ複合体を等モル量で組み合わせることによって構築される、工程と、

10

( i i i ) 前記標的ヌクレオチド配列について試験される前記試料の各々に存在する核酸を、前記ライゲーション複合体と接触させる、工程と、

( i v ) 前記第 1 のプローブおよび前記第 2 のプローブの各前記第 1 の標的特異性部分および前記第 2 の標的特異性部分を、前記標的ヌクレオチド配列上の本質的に隣接する部分にハイブリダイズさせて、それにより、ハイブリダイゼーション複合体を形成する、工程と、

( v i ) 前記ハイブリダイゼーション複合体中の前記第 1 および第 2 のプローブを第 1 のプローブと第 2 のプローブとの間のギャップを埋めるようにライゲーションさせて、ライゲーションされたライゲーション複合体を供給する、工程と、

( v i i ) 1 以上の前記ライゲーションされたライゲーション複合体から標的ヌクレオチド配列を、鎖置換ポリメラーゼによるローリングサークル増幅を使用して、1 以上の一本鎖コンカテマー配列を得るために増幅する、工程と、

20

( i x ) 工程 ( v i i ) で得られた増幅された 1 以上の一本鎖コンカテマー配列を、エンドヌクレアーゼの認識配列を含む特定のオリゴヌクレオチドでアニーリングに供し、前記特定のオリゴヌクレオチドが、前記エンドヌクレアーゼに対する認識部位を有するアニーリングされた複合体が得られるように、工程 ( i ) で指定された認識配列とアニーリングする、工程と、

( x ) 工程 ( v i i i ) で得られた前記一本鎖コンカテマー配列または工程 ( i x ) で得られたアニーリングされた複合体を前記エンドヌクレアーゼで切断する、工程と、

( x i ) 工程 ( x ) で切断された断片、または工程 ( v i i i ) で得られた一本鎖コンカテマー配列を、ハイスループットシーケンシング技術に供して、前記第 1 の配列バーコードまたは前記第 2 の配列バーコードまたは前記第 3 のバーコードのバーコード配列を決定する工程と、および

30

( x i i ) 前記第 1 の標的特異性部分および / または前記第 2 の標的特異性部分の少なくとも一部、および / または前記第 1 の配列バーコードおよび / または前記第 2 の配列バーコードの少なくとも一部、および / または前記第 3 のバーコードの少なくとも一部を決定することによって、前記複数の試料中の前記標的ヌクレオチド配列の存在および / または数を特定する工程と、を含む方法。

#### 【請求項 2】

前記第 1 のプローブ、前記第 2 のプローブ及び前記架橋オリゴまたは互いにアニーリングして架橋オリゴ複合体を形成することができる複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つは、第 1 の捕捉部分を含み、

40

前記工程 ( i v ) の後に、前記ハイブリダイゼーション複合体を、第 2 の捕捉部分を含む固体支持体と接触させ、前記ハイブリダイゼーション複合体が前記固体支持体に連結されるように、前記第 1 の捕捉部分と前記第 2 の捕捉部分とを相互作用させ、および、固体支持体に結合していない試料の成分から固体支持体に結合したハイブリダイゼーション複合体を分離する、工程 ( v ) を含む請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

前記工程 ( v i ) の後に、前記複数の試料から前記ライゲーションされたライゲーション複合体をプールする工程 ( v i i ) を含む請求項 1 又は 2 に記載の方法。

50

## 【請求項 4】

前記複数の試料が、血液試料、唾液試料、尿試料または糞便試料を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記第 1 のプローブまたは第 2 のプローブまたは架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体の少なくとも 1 つは第 1 の捕捉部分を含み、

前記工程 (v) を含み、前記工程 (v) の前に前記試料中に含まれる核酸を濃縮する工程を含まない、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記第 1 のプローブまたは第 2 のプローブまたは架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体の少なくとも 1 つは第 1 の捕捉部分を含み、

前記工程 (v) を含み、前記第 1 の捕捉部分はピオチン部分であり、前記第 2 の捕捉部分はストレプトアビジン部分またはアビジン部分である、請求項 2 又は 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記第 1 のプローブまたは第 2 のプローブまたは架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体の少なくとも 1 つは第 1 の捕捉部分を含み、

前記工程 (v) を含み、前記工程 (v) と (v i) の間に洗浄工程が行われる、請求項 2、5、6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記架橋オリゴまたは架橋オリゴ複合体は、

(i) 1 ~ 5 個の 3' 突出塩基、および / または

(i i) 3' リン酸、および / または

(i i i) 3' 末端から 3 番目の位置以内の 1 または複数のホスホロチオエート修飾を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記第 1 の標的特異性部分、前記第 2 の標的特異性部分、前記第 1 の架橋オリゴ特異性配列、および / または前記第 2 の架橋オリゴ特異性配列が、互いに独立して 1 以上の化学修飾ヌクレオチドを含有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記工程 (v i i i) は、phi 29 ポリメラーゼまたは B s t ポリメラーゼを用いて実施される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記第 1 のプローブは、第 1 のユニバーサル配列を含み、前記第 2 のプローブは第 2 のユニバーサル配列を含み、PCR 増幅は、前記第 1 および第 2 のユニバーサル配列に結合するプライマーを使用して、工程 (x) と工程 (x i) との間で行われ、および前記プライマーは、工程 (x i) におけるその後の配列決定のためのアダプターを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 12】

第 1 の配列バーコードまたは第 2 の配列バーコード、またはその両方は、分子バーコードを含み、

工程 (x i i) において、前記標的ヌクレオチド配列の存在および / または数を特定することを、標的あたりの、および試料あたりの分子バーコードの数を数えることによって行う、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 13】

2 つ以上の試料または 2 以上の遺伝子座 / 対立遺伝子の組み合わせに対して、前記第 1 の配列バーコード、前記第 2 の配列バーコードまたは第 3 のバーコードが使用されて、1 以上の配列および / または多型の試料の遺伝子型を決定する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50