

【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5年4月3日(2023.4.3)

【国際公開番号】WO2018/222853
 【公表番号】特表2020-522257(P2020-522257A)
 【公表日】令和2年7月30日(2020.7.30)
 【出願番号】特願2019-566571(P2019-566571)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68(2018.01)

10

G 1 1 C 11/54(2006.01)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/48(2006.01)

C 1 2 N 15/10(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68

G 1 1 C 11/54

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 N 15/10 Z

20

【誤訳訂正書】

【提出日】令和5年3月24日(2023.3.24)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

30

核酸メモリ鎖を使用してデータを記録するための方法であって、該方法は、

データセットを表すビットのインシリコ配列を作製する工程；

複数のホモポリマーラクトまたはヘテロポリマーラクトを含む核酸メモリ鎖を合成する工程であって、該ヘテロポリマーラクトが、2つもしくはこれより多くの異なるヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログを含み、

ここで、該データセットを表すビットの該配列の各ビットが、1つのホモポリマーラクトまたはヘテロポリマーラクトにおいてコード化され、

該ヘテロポリマーラクトは、各ヘテロポリマーラクト内での該2つもしくはこれより多くの異なるヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログの互いに対する比率に基づいて、該ビットをコード化し、そして

40

該ホモポリマーラクトは、該ホモポリマーラクト間の遷移においてのみ該ビットをコード化する、

工程、

を包含する方法。

【請求項2】

前記複数のホモポリマーラクトは、2～10の間の反復ヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記データセットの各ユニットは、二進数表示において表される、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 4】

前記データセットの各ユニットは、三進数表示またはより高次の表示において表される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸メモリ鎖は、少なくとも 200ヌクレオチド長 ~ 5,000ヌクレオチド長である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記合成する工程は、dNTP濃度を変動させることによって、トラクト長を制御することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記合成する工程は、反応時間を変動させることによって、トラクト長を制御することを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数のトラクトは、2またはこれより多くの異なるヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記合成する工程は、dNTP比を変動させることによって、トラクト組成を制御する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記核酸メモリ鎖の第 1 の末端を改変する工程であって、ナノポア配列決定法システムのナノポアを経る該第 1 の末端の通過を防止する工程；

該核酸メモリ鎖の第 2 の末端を、該ナノポアを経て通過させる工程；および

該核酸メモリ鎖の該第 2 の末端を改変する工程であって、該ナノポアを通る該第 2 の末端の通過を防止し、それによって、該ナノポアに該核酸メモリ鎖を捕捉する工程、をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記データセットは、テキストファイル、イメージファイル、およびオーディオファイルからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記合成する工程は、テンプレート非依存的合成を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素を使用して、前記テンプレート非依存的合成を触媒する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ポリメラーゼ を使用して、前記テンプレート非依存的合成を触媒する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸メモリ鎖は、前記データセットへの該核酸メモリ鎖の変換を防止する共有結合した化学保護基を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

核酸メモリ鎖からデータを読み取るための方法であって、該方法は、

複数のホモポリマーラク トまたはヘテロポリマーラク トを含む核酸メモリ鎖を配列決定する工程であって、該ヘテロポリマーラク トが、2 つもしくはこれより多くの異なるヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログを含む、工程；

該核酸メモリ鎖配列をデジタル化データに変換する工程であって、ここで該複数のホモポリマーラク トまたはヘテロポリマーラク トの各々は、データのユニットに相当するビットを表す工程であって、

該ホモポリマーラク トは、該ホモポリマーラク ト間の遷移のみを読み取ることに より、ビットに変換され、そして

該ヘテロポリマーラク トは、各ヘテロポリマーラク ト内での該 2 つもしくはこれ

10

20

30

40

50

より多くの異なるヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログの互いに対する比率に基づいて、ビットに変換される、

工程；および

該デジタル化したデータ片を読み取り可能なフォーマットに変換する工程、を包含する方法。

【請求項 17】

前記読み取り可能なフォーマットをディスプレイする工程をさらに包含する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記複数のホモポリマーラクトは、2 ~ 10の間のヌクレオチド反復を含む、請求項 16 に記載の方法。 10

【請求項 19】

前記データのユニットは、二進数表示において表される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記データのユニットは、三進数表示において表される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記データのユニットは、四進数表示において表される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記核酸メモリ鎖は、少なくとも200ヌクレオチド~5,000ヌクレオチド長の間である、請求項 16 に記載の方法。 20

【請求項 23】

前記核酸メモリ鎖は、該核酸メモリ鎖を前記データセットに変換することを防止する共有結合した化学保護基を含み、前記方法は、該核酸メモリ鎖を配列決定する前に、該共有結合した化学保護基のうちの1またはこれより多くを除去する工程をさらに包含する、請求項 16 に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0006

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0006】

本明細書に記載されるとおりのホモポリマーラクトを使用するデータの記録は、長鎖（例えば、5 ~ 10 kb）の核酸を使用して最も効率的に達成される。旧来の合成技術は、長さが制限されている一方で、例えば、ヌクレオチドトランスフェラーゼを使用するテンプレート非依存的ポリヌクレオチド合成は、低減したコストにおいておよびより低い廃棄物生成で、長鎖を合成し得る。酵素合成される ssDNAメモリ鎖は、従来のホスホロアミダイトアプローチと比較して、上記DNA合成のうちの50%を要求し得るに過ぎない。なぜなら、約100 ~ 200ヌクレオチド長より長いssDNA鎖は、複雑かつコストのかかるライゲーションまたはPCR技術を要求し、ssDNAをdsDNA中間体から生成し得るに過ぎないからである。米国特許第8,808,989号（Efcavitch, et al.（本明細書に参考として援用される））を参照のこと。データコード化は、標準的ヌクレオチドを使用して数字で表される塩基2、3、4にあり得るか、またはデータ密度は8、10、12、またはより多くの底のコード化スキームを生成するために、改変されたヌクレオチドアナログの任意の数を使用して増大され得る。 40

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0010

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0010】

本発明のある種の局面は、核酸メモリ鎖を使用してデータを記録するための方法を包含する。上記方法の工程は、データセットを表すインシリコオリゴヌクレオチド配列を作製する工程を包含し得、ここで上記オリゴヌクレオチド配列の各ヌクレオチドは、上記データセットのユニットに相当する。次いで、複数のホモポリマーラクトを含む核酸メモリ鎖が合成され得、ここで各ホモポリマーラクトは、上記オリゴヌクレオチド配列のヌクレオチドに相当する。上記複数のホモポリマーラクトは、3～10の間の反復ヌクレオチドを含み得る。上記データセットの各ユニットは、特定の適用に関して所望されたとおりの底2、底3、底4、またはより高次で表され得る。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

10

【訂正対象項目名】0016

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0016】

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される：

(項目1)

核酸メモリ鎖を使用してデータを記録するための方法であって、該方法は、

データセットを表すビットのインシリコ配列を作製する工程；

規定された組成を有する複数のホモポリマーラクトまたはヘテロポリマーラクトを含む核酸メモリ鎖を合成する工程であって、各ホモポリマーまたはヘテロポリマーラクトは、該データセットを表すビットの該配列のビットに相当する工程、

20

を包含する方法。

(項目2)

前記複数のホモポリマーラクトは、2～10の間の反復ヌクレオチドを含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記データセットの各ユニットは、底2において表される、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記データセットの各ユニットは、底3またはより高次で表される、項目1に記載の方法。

30

(項目5)

前記核酸メモリ鎖は、少なくとも約200ヌクレオチド長～約5,000ヌクレオチド長である、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記合成する工程は、dNTP濃度を変動させることによって、ラクト長を制御することを包含する、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記合成する工程は、反応時間を変動させることによって、ラクト長を制御することを包含する、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記複数のラクトは、2またはこれより多くの異なるヌクレオチドを含む、項目1に記載の方法。

40

(項目9)

前記合成する工程は、dNTP比を変動させることによって、ラクト組成を制御する工程を包含する、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記核酸メモリ鎖の第1の末端を改変する工程であって、ナノポア配列決定法システムのナノポアを経る該第1の末端の通過を防止する工程；

該核酸メモリ鎖の第2の末端を、該ナノポアを経て通過させる工程；および

該核酸メモリ鎖の第2の末端を改変する工程であって、該ナノポアを通る該第2の末端

50

の通過を防止し、それによって、該ナノポアに核酸メモリ鎖を捕捉する工程、
をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記データセットは、テキストファイル、イメージファイル、およびオーディオファイル
からなる群より選択される、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記合成する工程は、テンプレート非依存的合成を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素を使用して、前記テンプレート非依存的合成を触
媒する、項目 1 2 に記載の方法。

10

(項目 1 4)

ポリメラーゼ を使用して、前記テンプレート非依存的合成を触媒する、項目 1 2 に記載
の方法。

(項目 1 5)

前記核酸メモリ鎖は、前記データセットへの該核酸メモリ鎖の変換を防止する共有結合し
た化学保護基を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

核酸メモリ鎖からデータを読み取るための方法であって、該方法は、

規定された組成を有する複数のホモポリマーラクトまたはヘテロポリマーラクトを
含む核酸メモリ鎖を配列決定する工程、

20

該核酸メモリ鎖配列をデジタル化データに変換する工程であって、ここで該複数のホモ
ポリマーまたはヘテロポリマーラクトの各々は、データのユニットに相当するビットを
表す工程；および

該デジタル化したデータ片を読み取り可能なフォーマットに変換する工程、
を包含する方法。

(項目 1 7)

前記読み取り可能なフォーマットをディスプレイする工程をさらに包含する、項目 1 6 に
記載の方法。

(項目 1 8)

前記複数のホモポリマーラクトは、約 2 ~ 約 1 0 の間のヌクレオチド反復を含む、項目
1 6 に記載の方法。

30

(項目 1 9)

前記データのユニットは、底 2 において表される、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記データのユニットは、底 3 において表される、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記データのユニットは、底 4 において表される、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記核酸メモリ鎖は、少なくとも約 2 0 0 ヌクレオチド ~ 約 5 , 0 0 0 ヌクレオチド長の
間である、項目 1 6 に記載の方法。

40

(項目 2 3)

前記核酸メモリ鎖は、該核酸メモリ鎖を前記データセットに変換することを防止する共有
結合した化学保護基を含み、前記方法は、該核酸メモリ鎖を配列決定する前に、該化学保
護基のうちの 1 またはこれより多くを除去する工程をさらに包含する、項目 1 6 に記載の
方法。

本発明の他の局面は、以下の図面および詳細な説明を考慮すれば、当業者に明らかであ
る。

【誤訳訂正 5】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 3 0

50

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0030】

図2は、ある種の実施形態に従うホモポリマートラクトで核酸メモリ鎖を合成する方法101を示す。その方法101は、データセットを表すインシリコオリゴヌクレオチド配列を作製する工程103を包含する。そのデータセットは、テキスト、イメージ、ビデオ、オーディオ、またはデジタル化され得るいずれかの他の情報片を表し得るデジタル化データを含み得る。そのオリゴヌクレオチド配列は、天然もしくは改変されたヌクレオチドまたはそのアナログの任意の数を含み得、そのメモリ鎖において使用される特有のヌクレオチドもしくはアナログの数に依存して、底2、底3、底4、またはより大きな底のスキームを使用してそのデータセットをコードし得る。単純な実施形態において、上記コード化スキームは、従来から、1またはこれより多くのヌクレオチドまたはアナログが0sに相当し得、1またはこれより多くの他のヌクレオチドが1sに相当し得る一連の0sおよび1sによって表される二進数データスキームに相当し得る。次いで、インシリコオリゴヌクレオチド配列において、順に、一連のホモポリマートラクト（各々、1ヌクレオチドに相当する）を含む核酸メモリ鎖（例えば、RNA、1本鎖または2本鎖のDNA）は、合成され得る105。ある種の実施形態において、さらなる工程は、上記メモリ鎖の一方の末端を改変する工程107、上記メモリ鎖を、ナノポアを通して通す工程109および上記鎖の他方の末端を改変して、上記末端が上記ナノポアを通して通過しないように防止する工程111を包含する。

10

20

【誤訳訂正6】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0033

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0033】

各ヌクレオチドホモポリマートラクトは、使用される塩基の数に依存して、種々の量のデータを表し得る。1バイト（十進法の256）を作製するために要求されるビット数は、以下の関係によって規定される： $\# \text{ビット} / \text{バイト} = 8 / (\log_2(n))$ （ここでn = 数字で表される使用される塩基）。各トラクトは、2を底とするコード化が使用される場合に1ビットに相当し得るか、または4を底とするコード化が使用される場合に、1バイトの1/4に相当し得る。ある種の実施形態において、DNAデータ鎖は、2~10個のヌクレオチドホモポリマートラクトから（底2のデータセット提示を使用して）構成され得、これは、333ビット~100ビットが、999塩基長~1000塩基長との間のメモリ鎖において表されることを可能にする。好ましい実施形態において、データの核酸塩基コード化は、1種のヌクレオチドの単一ホモポリマートラクトが異なるヌクレオチドのホモポリマートラクトに常に隣接しているようにされ得る。例えば、コード化は、アデニンのホモポリマートラクトは直前にないか、または別のアデニンホモポリマートラクトが続かないようにされ得る。2つの隣接するホモポリマートラクトが同じヌクレオチドを含む場合には、そのコード化データ配列中の単一のヌクレオチドを表す平均ホモポリマートラクトより測定可能に長いホモポリマートラクトが合成され得る。それらのより長いトラクトは、例えば、反応におけるdNTPの濃度を増大させるかまたは反応時間を増大させることによって、以下で記載される合成反応の操作を通じて作製され得る。2つの隣接する同一のホモポリマートラクトの正確な長さは、リードアウトデバイス（すなわち、ナノポア配列決定機）を使用して単一ホモポリマートラクトから一義的に区別されるために十分長い必要があるに過ぎない。ある種の実施形態において、非ヌクレオチドホモポリマースペーサーは、隣接する同じヌクレオチドホモポリマートラクトを互いから明確に区別するために、A、G、C、またはTのホモポリマートラクトの間に付加され得る。A、G、C、およびTのホモポリマートラクトの使用は、2つのヌクレオチド（二進数コードにおける0sおよび1sに類似）を単に使用するよりむしろ、1つの連続鎖において記

30

40

50

憶され得るデータの密度を増大させる4ビットコード化空間の作製を可能にする。例えば、4つの連続するホモポリマーは、A、G、C、およびTが底4のスキームにおいて使用される場合、256ディジット（すなわち、1バイト）をコードし得る。このような実施形態において、3ヌクレオチド長のホモポリマーまたは10ヌクレオチド長のホモポリマーがそれぞれ使用されるとすれば、83バイトまたは25バイトは、996ヌクレオチド長または1000ヌクレオチド長の核酸メモリ鎖において表され得る。

【誤訳訂正7】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0034

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0034】

種々の実施形態において、底8またはさらに底12のコード化スキームは、特有に改変されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドアナログのホモポリマーのメモリ鎖への組み込みを通じて使用され得る。それらの改変されたヌクレオチドまたは非ヌクレオチドアナログは、特有のデジタルシグナルを、ナノポア配列決定機または一分子ZMW配列決定機のようなリードアウトデバイスで生成するはずである。TdT（以下で考察されるとおり）は、ナノポアのようなリードアウトデバイスによって提供されるシグナルを増強し得る、広い範囲の改変されたdNTPアナログを組み込み得、従って、それらの中にコードされたデータを有する核酸メモリ鎖を生成するために使用され得る。改変されたヌクレオチド（例えば、A*、G*、C*およびT*またはA**、G**、C**およびT**）のホモポリマーは、8ビットまたはさらに12ビットのコード化スキームを生成するために、TdTおよび4種の塩基の各々の改変されたdNTPアナログ（例えば、dA*TPまたはdA**TP）を使用して合成され得る。より多くの塩基（n）コード化は、データ圧縮を可能にし、所定の情報量をコードするために要求されるDNA鎖の数の低減を生じる。ホモポリマーの長さの関数としてデータ1GBあたりのDNA鎖の数、数字で表される塩基（n）、および合成される鎖長を決定する関係性は、以下によって規定される： $\# \text{鎖} / \text{GB} = (8 / (\log_2(n))) * 10^9 * \text{ホモポリマー長} * 1 / \text{鎖長}$ （図4に図示されるとおり）

10

20

30

40

50