

【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2年8月20日(2020.8.20)

【公表番号】特表2019-526257(P2019-526257A)

【公表日】令和1年9月19日(2019.9.19)

【年通号数】公開・登録公報2019-038

【出願番号】特願2019-511456(P2019-511456)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/6883	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6886	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6869	(2018.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/6883	Z N A Z
C 1 2 Q	1/6886	Z
C 1 2 Q	1/6869	Z
A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00	

【手続補正書】

【提出日】令和2年7月7日(2020.7.7)

【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 標的領域上での試験試料から遺伝子解析により検出される遺伝的变化を、疾患状態の指標とする方法であって、

(a) 複数のD N A ライブリ断片を含むゲノムD N A ライブリが生成されることであって、そこで各前記D N A ライブリ断片は前記試験試料からのゲノムD N A 断片、及びアダプタを含む、前記生成されること、

(b) 前記ゲノムD N A ライブリが、D N A 標的領域に特異的に結合する複数のキャプチャプローブと接触されることにより、前記D N A 標的領域を含む前記キャプチャプローブとD N A ライブリ断片との間に複合体を形成すること、ならびに

(c) 前記D N A 標的領域を含む前記ゲノムD N A 断片の定量的遺伝子解析が実施されること、

を備え、

そこで前記アダプタは增幅領域、試料タグ領域、及びアンカー領域を含むD N A ポリヌクレオチドであり、

そこで前記増幅領域はP C R 増幅についてプライマー認識部位として機能することが可能であるポリヌクレオチド配列を含み、

そこで前記試料タグは前記ユニークライブリD N A 断片の一一致度を符号化し、前記試験試料の一一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

そこで前記アンカー領域は前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、そこで前記アンカー領域は前記ゲノムD N A 断片に付着することが可能であり、

そこで前記遺伝子解析は疾患状態を示す遺伝的变化を検出するために実施される、前記方法。

【請求項 2】

疾患状態を示す前記遺伝的变化は、一塩基多様体（S N V）、40ヌクレオチド長未満の挿入、40ヌクレオチド長未満のDNA領域の欠失、及び／またはコピー数における变化から選択される、請求項1に記載の前記方法。

【請求項 3】

疾患状態を示す前記遺伝的变化は、コピー数における変化である、請求項1に記載の前記方法。

【請求項 4】

前記試験試料は、組織診である、請求項1から3のいずれかに記載の前記方法。

【請求項 5】

前記組織診は、腫瘍、または腫瘍であると疑われる組織から採取される、請求項4に記載の前記方法。

【請求項 6】

前記ゲノムDNAは、無細胞DNA（c f DNA）または細胞DNAである、請求項1から3のいずれかに記載の前記方法。

【請求項 7】

前記ゲノムDNAは、前記試験試料から単離されるc f DNAであり、前記試験試料は、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、及び汗からなる群から選択される生体試料である、請求項6に記載の前記方法。

【請求項 8】

前記ゲノムDNA断片は、

(i) 前記試験試料から細胞DNAを単離すること、  
(ii) 前記細胞DNAを断片化し、前記ゲノムDNA断片を取得すること、  
を備えるステップによって取得される、請求項1から5のいずれかに記載の前記方法。

【請求項 9】

ステップ(iii)は、前記細胞DNAを少なくとも1個の消化酵素と接触させることによって実施される、請求項8に記載の前記方法。

【請求項 10】

ステップ(iv)は、機械的応力を前記細胞DNAへ加えることによって実施される、請求項8に記載の前記方法。

【請求項 11】

前記機械的応力は、前記細胞DNAを超音波処理することによって加えられる、請求項10に記載の前記方法。

【請求項 12】

前記試料タグは、前記ユニークゲノムDNA断片の前記同定を容易にするユニーク分子識別子（UMI）をさらに含む、請求項1から11のいずれかに記載の前記方法。

【請求項 13】

前記増幅領域は、10から50の間のヌクレオチド長にある、請求項1から12のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

【請求項 14】

前記増幅領域は、20から30の間のヌクレオチド長にある、請求項1から13のうちのいずれか1項のいずれかに記載の前記方法。

【請求項 15】

前記増幅領域は、25ヌクレオチド長にある、請求項1から14のうちのいずれか1項のいずれかに記載の前記方法。

【請求項 16】

前記試料タグは、5から50の間のヌクレオチド長にある、請求項1から15のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 17】**

前記試料タグは、5から15の間のヌクレオチド長にある、請求項16に記載の前記方法。

**【請求項 18】**

前記試料タグは、8ヌクレオチド長にある、請求項16に記載の前記方法。

**【請求項 19】**

前記UMI増倍管は、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる、請求項12から18のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 20】**

前記UMI増倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、請求項19に記載の前記方法。

**【請求項 21】**

前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、64個の可能なヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項19に記載の前記方法。

**【請求項 22】**

前記アンカー領域は、1から50の間のヌクレオチド長にある、請求項1から21のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 23】**

前記アンカー領域は、5から25の間のヌクレオチド長にある、請求項22に記載の前記方法。

**【請求項 24】**

前記アンカー領域は、10ヌクレオチド長にある、請求項22または23に記載の前記方法。

**【請求項 25】**

ステップ(a)は、前記ゲノムDNA断片を複数のアダプタへ付着させることを備える、請求項1から24のいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 26】**

前記ゲノムDNA断片は、前記ゲノムDNA断片を複数のアダプタと付着させる前に、末端修復される、請求項25に記載の前記方法。

**【請求項 27】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記增幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含む、請求項25に記載の前記方法。

**【請求項 28】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、2から1,000個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項26または27に記載の前記方法。

**【請求項 29】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、50から500個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項28に記載の前記方法。

**【請求項 30】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、100から400個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項28に記載の前記方法。

**【請求項 31】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、200から300個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、請求項28に記載の前記方法。

**【請求項 32】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にある、請求項28に記載の前記方法。

**【請求項 33】**

前記ヌクレオチド配列の各配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記240個のヌクレオチド配列のいずれかの他の配列から分離する、請求項28から32のいずれかに

記載の前記方法。

【請求項 3 4】

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる U M I 増倍管を備える、請求項 2 6 から 3 3 のうちのいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 3 5】

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する U M I 増倍管を備える、請求項 2 6 から 3 4 のうちのいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 3 6】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記 U M I 增倍管は、1 から 5 の間のヌクレオチド長にある、請求項 3 4 または 3 5 に記載の前記方法。

【請求項 3 7】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記 U M I 增倍管は、3 ヌクレオチド長にある、請求項 3 6 に記載の前記方法。

【請求項 3 8】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4 個のヌクレオチド配列のうちの 1 個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記 4 個のアンカー領域のうちの 1 個のみに対応される、請求項 2 6 から 3 7 に記載の前記方法。

【請求項 3 9】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記增幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、8 ヌクレオチド長にあり、各試料タグの前記ヌクレオチド配列は、少なくとも 2 のハミング距離によって前記複数のアダプタの前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる U M I 増倍管を備え、前記複数のアダプタの各アダプタの前記 U M I 增倍管は、3 ヌクレオチド長にあり、それぞれの前記可能なヌクレオチド配列の前記 U M I 增倍管は、前記複数のアダプタの各試料タグ領域に対応される、

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4 個のヌクレオチド配列のうちの 1 個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記 4 個のアンカー領域のうちの 1 個のみに対応される、

請求項 2 5 または 2 6 に記載の前記方法。

【請求項 4 0】

前記ゲノム D N A 断片を複数のアダプタと付着させる前記ステップは、

( i ) アンカー領域の少なくとも一部を含むオリゴヌクレオチドを各ゲノム D N A 断片へ付着させることであって、そこでアンカー領域の少なくとも一部を含む前記オリゴヌクレオチドはパートナー鎖によって二本鎖にされる 5 ' リン酸化付着鎖を含む D N A 二本鎖であり、そこで前記パートナー鎖は化学修飾による付着からその 3 ' 末端で遮断され、そこで前記付着鎖は前記ゲノム D N A 断片に付着する、前記付着させること、

( i i ) 前記複数のアダプタの各アダプタのヌクレオチド配列についてアダプタ配列の全長を符号化する D N A オリゴヌクレオチドと、前記アンカー領域の少なくとも一部を含む前記オリゴヌクレオチドに付着する前記ゲノム D N A 断片を接触させること、ならびに

( i i i ) D N A ライゲーションに適切な条件下で T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ、T a q D N A リガーゼ、及び B s t ポリメラーゼ全長と、前記ゲノム D N A 断片、及び前記アダプタ配列の全長を符号化する前記 D N A オリゴヌクレオチドを接触させること、を備え、

それらにより、前記複数のアダプタを前記ゲノム D N A 断片に付着させる、請求項 2 5 から 3 9 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

【請求項 4 1】

前記ゲノム D N A 断片は、c f D N A である、請求項 2 5 から 4 0 のいずれかに記載の前記方法。

**【請求項 4 2】**

前記DNA標的領域は、コピー数における変化について解析される、請求項25から41のいずれかに記載の前記方法。

**【請求項 4 3】**

ステップ(c)は、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブラリ断片との間に形成される前記複合体の精製を備える、請求項1から42のいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 4 4】**

ステップ(c)は、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブラリ断片との間に形成される前記複合体の精製を備え、前記ゲノムDNAライブラリから前記関心領域を含む前記DNAライブラリ断片のプライマー伸長及び／または増幅を実施する、請求項1から43のいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 4 5】**

ステップ(c)は、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブラリ断片との間に形成される前記複合体の精製を備え、前記ゲノムDNAライブラリから前記関心領域を含む前記DNAライブラリ断片のプライマー伸長及び増幅を実施する、請求項1から44のいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 4 6】**

ステップ(c)は、複数のシーケンシングリードを生成するために、前記DNA標的領域を含む前記DNAライブラリ断片のDNAシーケンシングを備える、請求項1から45のいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 4 7】**

前記ゲノム解析は、DNA関心領域におけるコピー数の変化を測定することを備え、ステップ(c)は、

(i) 前記試験試料に由来する前記ゲノムDNAライブラリ中に存在する前記関心領域のコピー数を測定すること、及び

(ii) ステップ(i)において測定された前記コピー数を標準試料に由来する前記ゲノムDNAライブラリ中に存在する前記関心領域のコピー数と比較すること、  
を備え、

前記標準試料は、前記DNA標的領域の既知のコピー数を有する、

請求項1から46のいずれか1項に記載の前記方法。

**【請求項 4 8】**

前記関心領域における前記コピー数を測定することは、複数のシーケンシングリードを生成するために前記DNA標的領域を含む前記DNAライブラリ断片のDNAシーケンシングを備え、各シーケンシングリードは、ユニーク分子識別素子(UMIE)を含む、請求項47に記載の前記方法。

**【請求項 4 9】**

前記UMIEは、前記アダプタからのシーケンシング情報、及び前記ゲノムDNA配列の少なくとも一部を含む、請求項48に記載の前記方法。

**【請求項 5 0】**

同一UMIEを含むシーケンシングリードは、ユニークゲノム配列(UGS)として識別される、請求項49に記載の前記方法。

**【請求項 5 1】**

前記ゲノムDNAライブラリと接触する前記キャプチャープローブのそれぞれについて生のゲノム深度(RGD)を測定することをさらに備える、請求項47から50のいずれかに記載の前記方法。

**【請求項 5 2】**

前記RGDは、試料複製物群内の各キャプチャープローブ配列と関連するUGSの前記平均数を測定することを備える、請求項51に記載の前記方法。

**【請求項 5 3】**

非常にばらつきのある数のUGSと関連するキャプチャプローブは、ノイズの多いプローブとして識別され、さらなる計算から除外される、請求項52に記載の前記方法。

【請求項54】

試料についてRGDを計算することをさらに備え、前記試料中のすべてのキャプチャプローブについてすべてのRGDの数値平均を計算することを備える、請求項52に記載の前記方法。

【請求項55】

ノイズの多いプローブについての前記RGD値は、試料についてRGDを計算する際に含まれない、請求項52に記載の前記方法。

【請求項56】

前記キャプチャプローブについての前記RGDは、各キャプチャプローブについての前記RGDをプローブ特異的な正規化されたリードカウントに変換することによって実験群中のすべての試料にわたり正規化され、

前記プローブ特異的な正規化されたリードカウントは、

(i) 試料中の各キャプチャプローブRGDに正規化定数を乗算することであって、そこで前記正規化定数はいずれかの実数を含む、前記乗算すること、及び

(ii) 前記対応する試料について計算される前記RGDで(i)の前記積を除算すること、または

(iii) 1サブセットのプローブから計算される平均RGDで(i)の前記積を除算すること、

を備える、請求項51から55のいずれかに記載の前記方法。

【請求項57】

前記1サブセットのプローブは、1セットの対照プローブである、請求項56に記載の前記方法。

【請求項58】

前記プローブ特異的な、正規化されたリードカウントは、コピー数値に変換され、前記コピー数値は、

(i) . 女性に由来する試料において、常染色体及び/またはX連鎖領域を対象とするプローブの前記プローブ特異的な、正規化されたリードカウントに2を乗算すること、

(ii) . 男性に由来する試料において、Y連鎖領域及び/またはX連鎖領域を対象とするプローブの前記プローブ特異的な、正規化されたリードカウントに1を乗算すること、

(iii) . 実験中に、すべての試料にわたり(i)及び/または(ii)の前記積を平均すること、ならびに

(iv) . (iii)の前記平均値で(i)及び/または(ii)の前記積を除算すること、

を備える、請求項57に記載の前記方法。

【請求項59】

特異的な遺伝子を標的にするすべてのプローブについて前記近似したコピー数値は、平均される、請求項58に記載の前記方法。

【請求項60】

コピー数増加及びコピー数減少の高感度検出方法であって、

(i) キャプチャプローブについてRGDを測定すること、

(ii) 前記キャプチャプローブについての前記RGDをプローブ特異的な、正規化されたリードカウントに変換することによって、実験群中にすべての試料にわたり前記キャプチャプローブについての前記RGDを正規化すること、

(iii) 各プローブ特異的な、正規化されたリードカウントについて近似したコピー数値を計算すること、及び

(iv) 特異的な遺伝子を標的にするすべてのプローブについて前記近似したコピー数値を平均すること、

を備える、前記方法。

**【請求項 6 1】**

染色体安定性を測定する方法であって、

( i ) 1 セットの 1 つ以上の染色体安定性プローブを設計し、妥当性確認することであって、前記染色体安定性プローブはヒト染色体にわたり均一に分布する、前記妥当性確認すること、

( i i ) 前記 1 つ以上の染色体安定性プローブを使用して患者試料上で標的シーケンシングを実施すること、

( i i i ) 各染色体プローブについて近似したコピー数値を決定すること、

( i v ) 患者試料のゲノム表現型を決定することであって、そこで前記患者試料中の 1 つ以上の染色体プローブについて前記コピー数値における増減はゲノム不安定性を示すこと、

を備える、前記方法。

**【請求項 6 2】**

それを必要とする被験体中の癌を処置するための、 P A R P 阻害剤を含む組成物であって、

前記被験体は請求項 6 1 の前記方法に従い、不安定化されたゲノムを含むと識別される、前記組成物。

**【請求項 6 3】**

前記 D N A 標的領域は、遺伝子、または前記遺伝子の一部である、請求項 1 から 5 9 のいずれか 1 項に記載の前記方法。

**【請求項 6 4】**

前記遺伝子は、疾患と関連する、請求項 6 3 に記載の前記方法。

**【請求項 6 5】**

前記疾患は、癌である、請求項 6 4 に記載の前記方法。

**【請求項 6 6】**

前記遺伝子は、 B R C A 2 、 A T M 、 B R C A 1 、 B R I P 1 、 C H E K 2 、 F A N C A 、 H D A C 2 、及び／または P A L B 2 である、請求項 6 3 に記載の前記方法。

**【請求項 6 7】**

複数の D N A ライブライ断片を含むゲノム D N A ライブライであって、

前記 D N A ライブライ断片のそれぞれはアダプタ及びゲノム D N A 断片を含み、

前記アダプタは增幅領域、試料タグ領域、及びアンカー領域を含む D N A ポリヌクレオチドであり、

前記增幅領域は P C R 増幅についてプライマー認識部位として機能することが可能であるポリヌクレオチド配列を含み、

前記試料タグは前記ユニークライブライ D N A 断片の一致度を符号化し、前記試験試料の一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

前記アンカー領域は前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、前記アンカー領域は前記ゲノム D N A 断片に付着することが可能である、前記ゲノム D N A ライブライ。

**【請求項 6 8】**

前記試料タグは、ユニーク分子識別子( U M I )をさらに含み、前記 U M I は、前記ユニークゲノム D N A 断片の前記同定を容易にする、請求項 6 7 に記載の前記ゲノム D N A ライブライ。

**【請求項 6 9】**

前記增幅領域は、 1 0 から 5 0 の間のヌクレオチド長にある、請求項 6 7 または 6 8 に記載の前記ゲノム D N A ライブライ。

**【請求項 7 0】**

前記增幅領域は、 2 5 ヌクレオチド長にある、請求項 6 9 に記載の前記ゲノム D N A ライブライ。

**【請求項 7 1】**

前記試料タグは、5から50の間のヌクレオチド長にある、請求項67から70のうちのいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項72】

前記試料タグは、8ヌクレオチド長にある、請求項71に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項73】

前記UMI増倍管は、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる、請求項67から72のうちのいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項74】

前記UMI増倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、請求項73に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項75】

前記アンカー領域は、1から50の間のヌクレオチド長にある、請求項67から74のうちのいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項76】

前記アンカー領域は、10ヌクレオチド長にある、請求項75に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項77】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含む、請求項67から76のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項78】

前記試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記試料の前記ヌクレオチド配列のいずれかの他の配列から分離する、請求項67から77のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項79】

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備える、請求項67から78のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項80】

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接するUMI増倍管を備える、請求項67から78のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項81】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、請求項67から78のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

【請求項82】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にあり、前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、少なくとも2のハミング距離によって前記複数のアダプタの前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備え、前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、それぞれの前記可能なヌクレオチド配列の前記UMI増倍管は、前記複数のアダプタの前記試料タグ領域のそれぞれに対応され、

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、

所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、

請求項67に記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 8 3】**

前記ゲノムDNA断片は、cfDNAである、請求項67から82のいずれかに記載の前記ゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 8 4】**

請求項67から83のいずれか1項に従い、1個より多いゲノムライブラリを含む、複数のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 8 5】**

前記複数のゲノムDNAライブラリに属する1個のゲノムDNAライブラリの前記試料タグ領域の前記核酸配列は、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前記核酸配列と異なる、請求項84に記載の前記複数のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 8 6】**

前記複数のゲノムDNAライブラリに属する1個のゲノムDNAライブラリの前記増幅領域の前記核酸配列は、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前記核酸配列に同一である、請求項84または85に記載の前記複数のゲノムDNAライブラリ。

**【請求項 8 7】**

無細胞DNA(cfDNA)のDNA標的領域の遺伝子解析方法であって、

- (a) 請求項67から86のいずれかに記載の前記DNAライブラリを生成すること、
- (b) DNA標的領域に特異的に結着する複数のキャプチャプローブと前記cfDNAライブラリを接触させることにより、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャプローブとDNAライブラリ断片との間に複合体を形成すること、及び
- (c) 前記DNA標的領域を含む前記cfDNA断片の定量的遺伝子解析を実施すること、

を備え

それらにより、前記DNA標的領域の遺伝子解析を実施する、  
前記遺伝子解析方法。

**【請求項 8 8】**

被験体から得られた試験試料における1つ以上の標的遺伝子座における1つ以上の遺伝子損傷を、前記被験体の遺伝性疾患の進行の指標とする方法であって、

- (a) ゲノムDNAが前記試験試料から単離されることと、
- (b) 複数のDNAライブラリ断片を含むDNAライブラリが生成されることであって、前記DNAライブラリ断片のそれぞれは前記試験試料からのゲノムDNA断片、及びアダプタを含む、前記生成されることと、
- (c) 前記cfDNAライブラリが、DNA標的領域に特異的に結着する複数のキャプチャプローブと接触されることにより、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャプローブとDNAライブラリ断片との間に複合体を形成することと、
- (d) 前記cfDNAクローンライブラリにおける前記遺伝性疾患に関連する前記1つ以上の標的遺伝子座の定量的遺伝子解析が実施されることであって、前記1つ以上の標的遺伝子座における1つ以上の遺伝子損傷は前記遺伝性疾患の前記進行を示す、前記実施されることと、

を含む前記方法。

**【請求項 8 9】**

前記定量的遺伝子解析は、複数のシーケンシングリードを生成するためのDNAシーケンシングを含む、請求項87または88に記載の前記方法。

**【請求項 9 0】**

ゲノムDNAライブラリを生成するための、ユニークゲノムDNA断片の一致度、及び試験試料の一致度を符号化する1セットのアダプタを含む組成物であって、  
前記組成物中の各アダプタは増幅領域、試料タグ領域、及びアンカー領域を含むDNAポリヌクレオチドであり、

前記増幅領域は P C R 増幅についてプライマー認識部位として機能することが可能であるポリヌクレオチド配列を含み、

前記試料タグは前記ユニークライプラリ D N A 断片の前記一致度を符号化し、前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

前記アンカー領域は前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、前記アンカー領域は前記ゲノム D N A 断片に付着することが可能である、

前記組成物。

【請求項 9 1】

前記試料タグは、ユニーク分子識別子( U M I )をさらに含み、前記 U M I は、前記ユニークゲノム D N A 断片の前記同定を容易にする、請求項 9 0 に記載の前記組成物。

【請求項 9 2】

前記増幅領域は、10から50の間のヌクレオチド長にある、請求項 9 0 または 9 1 に記載の前記組成物。

【請求項 9 3】

前記増幅領域は、25ヌクレオチド長にある、請求項 9 0 から 9 2 のいずれか 1 項に記載の前記組成物。

【請求項 9 4】

前記試料タグは、5から50の間のヌクレオチド長にある、請求項 9 0 から 9 3 のいずれか 1 項に記載の前記組成物。

【請求項 9 5】

前記試料タグは、8ヌクレオチド長にある、請求項 9 4 に記載の前記組成物。

【請求項 9 6】

前記 U M I 増倍管は、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる、請求項 9 0 から 9 5 のいずれか 1 項に記載の前記組成物。

【請求項 9 7】

前記 U M I 增倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、請求項 9 6 に記載の前記組成物。

【請求項 9 8】

前記アンカー領域は、1から50の間のヌクレオチド長にある、請求項 9 0 から 9 7 に記載の前記組成物。

【請求項 9 9】

前記アンカー領域は、10ヌクレオチド長にある、請求項 9 8 に記載の前記組成物。

【請求項 1 0 0】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含む、請求項 9 0 から 9 9 のいずれかに記載の前記組成物。

【請求項 1 0 1】

前記試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記組成物の前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離する、請求項 1 0 0 に記載の前記組成物。

【請求項 1 0 2】

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる U M I 增倍管を備える、請求項 9 0 から 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の前記組成物。

【請求項 1 0 3】

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する U M I 增倍管を備える、請求項 9 0 から 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の前記組成物。

【請求項 1 0 4】

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカーレビューエンティティのうちの1個のみに対応される、請求項 1 0 3 に記載の前記組成物。

**【請求項 105】**

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にあり、前記試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記組成物の前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備え、前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、前記UMI増倍管は、64個の可能なヌクレオチド配列のうちの1個を含み、それぞれの前記64個の可能なヌクレオチド配列の前記UMI増倍管は、前記複数のアダプタの前記試料タグ領域のそれぞれに対応され、

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、

所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、

請求項90から104のいずれか1項に記載の前記組成物。

**【手続補正2】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

いくつかの実施形態において、複数のアダプタの各アダプタのアンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される。請求項75の1セットのアダプタにおいて、複数のアダプタの各アダプタの増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、各アダプタの試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にあり、試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって1セットのアダプタの試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、複数のアダプタのそれぞれは、試料タグ領域に隣接する、または試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備え、複数のアダプタの各アダプタのUMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、UMI増倍管は、64個の可能なヌクレオチド配列のうちの1個を含み、それぞれの64個の可能なヌクレオチド配列のUMI増倍管は、複数のアダプタの試料タグ領域のそれぞれに対応され、複数のアダプタの各アダプタのアンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される。

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)

DNA標的領域上で試験試料から遺伝子解析を実施する方法であって、

(a) 複数のDNAライブリ断片を含むゲノムDNAライブリを生成することであって、そこで各前記DNAライブリ断片は前記試験試料からのゲノムDNA断片、及びアダプタを含む、前記生成すること、

(b) DNA標的領域に特異的に結着する複数のキャプチャープローブと前記ゲノムDNAライブリを接触させることにより、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブリ断片との間に複合体を形成すること、ならびに

(c) 前記DNA標的領域を含む前記ゲノムDNA断片の定量的遺伝子解析を実施すること、

を備え、

そこで前記アダプタは増幅領域、試料タグ領域、及びアンカー領域を含むDNAポリヌクレオチドであり、

そこで前記増幅領域はPCR増幅についてプライマー認識部位として機能することが可能

であるポリヌクレオチド配列を含み、

そこで前記試料タグは前記ユニークライプラリDNA断片の一致度を符号化し、前記試験試料の一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

そこで前記アンカー領域は前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、そこで前記アンカー領域は前記ゲノムDNA断片に付着することが可能であり、

そこで前記遺伝子解析は疾患状態を示す遺伝的变化を検出するために実施される、前記方法。

(項目2)

疾患状態を示す前記遺伝的变化は、一塩基多様体(SNV)、40ヌクレオチド長未満の挿入、40ヌクレオチド長未満のDNA領域の欠失、及び/またはコピー数における変化から選択される、項目1に記載の前記方法。

(項目3)

疾患状態を示す前記遺伝的变化は、コピー数における変化である、項目1に記載の前記方法。

(項目4)

前記試験試料は、組織診である、項目1から3のいずれかに記載の前記方法。

(項目5)

前記組織診は、腫瘍、または腫瘍であると疑われる組織から採取される、項目4に記載の前記方法。

(項目6)

前記ゲノムDNAは、無細胞DNA(cfDNA)または細胞DNAである、項目1から3のいずれかに記載の前記方法。

(項目7)

前記ゲノムDNAは、前記試験試料から単離されるcfDNAであり、前記試験試料は、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、及び汗からなる群から選択される生体試料である、項目6に記載の前記方法。

(項目8)

前記ゲノムDNA断片は、

(i) 前記試験試料から細胞DNAを単離すること、

(ii) 前記細胞DNAを断片化し、前記ゲノムDNA断片を取得すること、  
を備えるステップによって取得される、項目1から5のいずれかに記載の前記方法。

(項目9)

ステップ(ii)は、前記細胞DNAを少なくとも1個の消化酵素と接触させることによって実施される、項目8に記載の前記方法。

(項目10)

ステップ(ii)は、機械的応力を前記細胞DNAへ加えることによって実施される、項目8に記載の前記方法。

(項目11)

前記機械的応力は、前記細胞DNAを超音波処理することによって加えられる、項目10に記載の前記方法。

(項目12)

前記試料タグは、前記ユニークゲノムDNA断片の前記同定を容易にするユニーク分子識別子(UMI)をさらに含む、先行項目のいずれかに記載の前記方法。

(項目13)

前記増幅領域は、10から50の間のヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

(項目14)

前記増幅領域は、20から30の間のヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項のいずれかに記載の前記方法。

(項目15)

前記増幅領域は、25ヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項のいずれかに記載の前記方法。

(項目16)

前記試料タグは、5から50の間のヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

(項目17)

前記試料タグは、5から15の間のヌクレオチド長にある、項目16に記載の前記方法。

(項目18)

前記試料タグは、8ヌクレオチド長にある、項目16に記載の前記方法。

(項目19)

前記UMI増倍管は、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる、項目12から18のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

(項目20)

前記UMI増倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、項目19に記載の前記方法。

(項目21)

前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、64個の可能なヌクレオチド配列のうちの1個を含む、項目19に記載の前記方法。

(項目22)

前記アンカー領域は、1から50の間のヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

(項目23)

前記アンカー領域は、5から25の間のヌクレオチド長にある、項目22に記載の前記方法。

(項目24)

前記アンカー領域は、10ヌクレオチド長にある、項目22または23に記載の前記方法。

(項目25)

ステップ(a)は、前記ゲノムDNA断片を複数のアダプタへ付着させることを備える、先行項目のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目26)

前記ゲノムDNA断片は、前記ゲノムDNA断片を複数のアダプタと付着させる前に、末端修復される、項目25に記載の前記方法。

(項目27)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含む、項目25に記載の前記方法。

(項目28)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、2から1,000個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、項目26または27に記載の前記方法。

(項目29)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、50から500個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、項目28に記載の前記方法。

(項目30)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、100から400個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、項目28に記載の前記方法。

(項目31)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、200から300個の間のヌクレオチド配列のうちの1個を含む、項目28に記載の前記方法。

(項目32)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にある、項目28に記載の前記方法。

(項目33)

前記ヌクレオチド配列の各配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記240個のヌクレオチド配列のいずれかの他の配列から分離する、項目28から32のいずれかに記載の前記方法。

(項目34)

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備える、項目26から33のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

(項目35)

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接するUMI増倍管を備える、項目26から34のうちのいずれか1項に記載の前記方法。

(項目36)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、項目34または35に記載の前記方法。

(項目37)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にある、項目36に記載の前記方法。

(項目38)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、項目26から37に記載の前記方法。

(項目39)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記增幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にあり、各試料タグの前記ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記複数のアダプタの前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備え、前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、それぞれの前記可能なヌクレオチド配列の前記UMI増倍管は、前記複数のアダプタの各試料タグ領域に対応され、

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、

項目25または26に記載の前記方法。

(項目40)

前記ゲノムDNA断片を複数のアダプタと付着させる前記ステップは、

(i) アンカー領域の少なくとも一部を含むオリゴヌクレオチドを各ゲノムDNA断片へ付着させることであって、そこでアンカー領域の少なくとも一部を含む前記オリゴヌクレオチドはパートナー鎖によって二本鎖にされる5'リン酸化付着鎖を含むDNA二本鎖であり、そこで前記パートナー鎖は化学修飾による付着からその3'末端で遮断され、そこで前記付着鎖は前記ゲノムDNA断片に付着する、前記付着させること、

(ii) 前記複数のアダプタの各アダプタのヌクレオチド配列についてアダプタ配列の全長を符号化するDNAオリゴヌクレオチドと、前記アンカー領域の少なくとも一部を含む前記オリゴヌクレオチドに付着する前記ゲノムDNA断片を接触させること、ならびに

(iii) DNAライゲーションに適切な条件下でT4ポリヌクレオチドキナーゼ、Taq DNAリガーゼ、及びBstポリメラーゼ全長と、前記ゲノムDNA断片、及び前記アダプタ配列の全長を符号化する前記DNAオリゴヌクレオチドを接触させること、を備え、

それらにより、前記複数のアダプタを前記ゲノムDNA断片に付着させる、項目25から39のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目41)

前記ゲノムDNA断片は、cfDNAである、項目25から40のいずれかに記載の前記方法。

(項目42)

前記DNA標的領域は、コピー数における変化について解析される、項目25から41のいずれかに記載の前記方法。

(項目43)

ステップ(c)は、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブラリ断片との間に形成される前記複合体の精製を備える、先行項目のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目44)

ステップ(c)は、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブラリ断片との間に形成される前記複合体の精製を備え、前記ゲノムDNAライブラリから前記関心領域を含む前記DNAライブラリ断片のプライマー伸長及び／または増幅を実施する、先行項目のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目45)

ステップ(c)は、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャープローブとDNAライブラリ断片との間に形成される前記複合体の精製を備え、前記ゲノムDNAライブラリから前記関心領域を含む前記DNAライブラリ断片のプライマー伸長及び増幅を実施する、先行項目のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目46)

ステップ(c)は、複数のシーケンシングリードを生成するために、前記DNA標的領域を含む前記DNAライブラリ断片のDNAシーケンシングを備える、先行項目のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目47)

前記ゲノム解析は、DNA関心領域におけるコピー数の変化を測定することを備え、ステップ(c)は、

(i) 前記試験試料に由来する前記ゲノムDNAライブラリ中に存在する前記関心領域のコピー数を測定すること、及び

(ii) ステップ(i)において測定された前記コピー数を標準試料に由来する前記ゲノムDNAライブラリ中に存在する前記関心領域のコピー数と比較すること、  
を備え、

前記標準試料は、前記DNA標的領域の既知のコピー数を有する、  
先行項目のいずれか1項に記載の前記方法。

(項目48)

前記関心領域における前記コピー数を測定することは、複数のシーケンシングリードを生成するために前記DNA標的領域を含む前記DNAライブラリ断片のDNAシーケンシングを備え、各シーケンシングリードは、ユニーク分子識別素子(UMIE)を含む、項目47に記載の前記方法。

(項目49)

前記UMIEは、前記アダプタからのシーケンシング情報、及び前記ゲノムDNA配列の少なくとも一部を含む、項目48に記載の前記方法。

(項目50)

同一UMIEを含むシーケンシングリードは、ユニークゲノム配列(UGS)として識別される、項目49に記載の前記方法。

(項目51)

前記ゲノムDNAライブラリと接触する前記キャプチャープローブのそれぞれについて生ゲノム深度(RGD)を測定することをさらに備える、項目47から50のいずれかに記

載の前記方法。(項目52)

前記RGDは、試料複製物群内の各キャプチャプローブ配列と関連するUGSの前記平均数を測定することを備える、項目51に記載の前記方法。

(項目53)

非常にばらつきのある数のUGSと関連するキャプチャプローブは、ノイズの多いプローブとして識別され、さらなる計算から除外される、項目52に記載の前記方法。

(項目54)

試料についてRGDを計算することをさらに備え、前記試料中のすべてのキャプチャプローブについてすべてのRGDの数値平均を計算することを備える、項目52に記載の前記方法。

(項目55)

ノイズの多いプローブについての前記RGD値は、試料についてRGDを計算する際に含まれない、項目52に記載の前記方法。

(項目56)

前記キャプチャプローブについての前記RGDは、各キャプチャプローブについての前記RGDをプローブ特異的な正規化されたリードカウントに変換することによって実験群中のすべての試料にわたり正規化され、

前記プローブ特異的な正規化されたリードカウントは、

(i) 試料中の各キャプチャプローブRGDに正規化定数を乗算することであって、そこで前記正規化定数はいずれかの実数を含む、前記乗算すること、及び

(ii) 前記対応する試料について計算される前記RGDで(i)の前記積を除算すること、または

(iii) 1サブセットのプローブから計算される平均RGDで(i)の前記積を除算すること、

を備える、項目51から55のいずれかに記載の前記方法。

(項目57)

前記1サブセットのプローブは、1セットの対照プローブである、項目56に記載の前記方法。

(項目58)

前記プローブ特異的な、正規化されたリードカウントは、コピー数値に変換され、

前記コピー数値は、

(i). 女性に由来する試料において、常染色体及び/またはX連鎖領域を対象とするプローブの前記プローブ特異的な、正規化されたリードカウントに2を乗算すること、

(ii). 男性に由来する試料において、Y連鎖領域及び/またはX連鎖領域を対象とするプローブの前記プローブ特異的な、正規化されたリードカウントに1を乗算すること、

(iii). 実験中に、すべての試料にわたり(i)及び/または(ii)の前記積を平均すること、ならびに

(iv). (iii)の前記平均値で(i)及び/または(ii)の前記積を除算すること、

を備える、項目57に記載の前記方法。

(項目59)

特異的な遺伝子を標的にするすべてのプローブについて前記近似したコピー数値は、平均される、項目58に記載の前記方法。

(項目60)

コピー数増加及びコピー数減少の高感度検出方法であって、

(i) キャプチャプローブについてRGDを測定すること、

(ii) 前記キャプチャプローブについての前記RGDをプローブ特異的な、正規化されたリードカウントに変換することによって、実験群中にすべての試料にわたり前記キャプチャプローブについての前記RGDを正規化すること、

( i i i ) 各プローブ特異的な、正規化されたリードカウントについて近似したコピー数値を計算すること、及び

( i v ) 特異的な遺伝子を標的にするすべてのプローブについて前記近似したコピー数値を平均すること、  
を備える、前記方法。

( 項目 6 1 )

染色体安定性を測定する方法であって、

( i ) 1 セットの 1 つ以上の染色体安定性プローブを設計し、妥当性確認することであって、前記染色体安定性プローブはヒト染色体にわたり均一に分布する、前記妥当性確認すること、

( i i ) 前記 1 つ以上の染色体安定性プローブを使用して患者試料上で標的シーケンシングを実施すること、

( i i i ) 各染色体プローブについて近似したコピー数値を決定すること、

( i v ) 患者試料のゲノム表現型を決定することであって、そこで前記患者試料中の 1 つ

以上の染色体プローブについて前記コピー数値における増減はゲノム不安定性を示すこと

、  
を備える、前記方法。

( 項目 6 2 )

それを必要とする被験体中の癌を処置する方法であって、

前記被験体は項目 6 1 の前記方法に従い、不安定化されたゲノムを含むと識別され、

前記癌を処置する前記方法は薬学的に有効量の P A R P 阻害剤を投与する、

ことを備える、前記方法。

( 項目 6 3 )

前記関心領域は、遺伝子、または前記遺伝子の一部である、先行項目のいずれか 1 項に記載の前記方法。

( 項目 6 4 )

前記遺伝子は、疾患と関連する、項目 6 3 に記載の前記方法。

( 項目 6 5 )

前記疾患は、癌である、項目 6 4 に記載の前記方法。

( 項目 6 6 )

前記遺伝子は、B R C A 2 、A T M 、B R C A 1 、B R I P 1 、C H E K 2 、F A N C A 、H D A C 2 、及び / または P A L B 2 である、項目 6 3 に記載の前記方法。

( 項目 6 7 )

複数の D N A ライブライ断片を含むゲノム D N A ライブライであって、

前記 D N A ライブライ断片のそれぞれはアダプタ及びゲノム D N A 断片を含み、

前記アダプタは増幅領域、試料タグ領域、及びアンカー領域を含む D N A ポリヌクレオチドであり、

前記増幅領域は P C R 増幅についてプライマー認識部位として機能することが可能であるポリヌクレオチド配列を含み、

前記試料タグは前記ユニークライブライ D N A 断片の一一致度を符号化し、前記試験試料の一一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

前記アンカー領域は前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

前記アンカー領域は前記ゲノム D N A 断片に付着することが可能である、

前記ゲノム D N A ライブライ。

( 項目 6 8 )

前記試料タグは、ユニーク分子識別子( U M I )をさらに含み、前記 U M I は、前記ユニークゲノム D N A 断片の前記同定を容易にする、項目 6 7 に記載の前記ゲノム D N A ライブライ。

( 項目 6 9 )

前記増幅領域は、10 から 50 の間のヌクレオチド長にある、項目 6 7 または 6 8 に記載

の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目70)

前記増幅領域は、25ヌクレオチド長にある、項目69に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目71)

前記試料タグは、5から50の間のヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目72)

前記試料タグは、8ヌクレオチド長にある、項目71に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目73)

前記UMI増倍管は、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる、項目67から72のうちのいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目74)

前記UMI増倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、項目73に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目75)

前記アンカー領域は、1から50の間のヌクレオチド長にある、先行項目のうちのいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目76)

前記アンカー領域は、10ヌクレオチド長にある、項目75に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目77)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含む、項目67から76のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目78)

前記試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記試料の前記ヌクレオチド配列のいずれかの他の配列から分離する、項目67から77のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目79)

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備える、項目67から78のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目80)

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接するUMI増倍管を備える、項目67から78のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目81)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、項目67から78のいずれか1項に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目82)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にあり、前記複数のアダプタの各アダプタの前記試料タグ領域は、少なくとも2のハミング距離によって前記複数のアダプタの前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備え、前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、それぞれの前記可能なヌクレオチド配列の前記UMI増倍管は、前記複数のアダプタの前記試料タグ領域のそれぞれに対応され、

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカー領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、

所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、

項目67に記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目83)

前記ゲノムDNA断片は、cfDNAである、項目67から82のいずれかに記載の前記ゲノムDNAライプラリ。

(項目84)

項目67から83のいずれか1項に従い、1個より多いゲノムライプラリを含む、複数のゲノムDNAライプラリ。

(項目85)

前記複数のゲノムDNAライプラリに属する1個のゲノムDNAライプラリの前記試料タグ領域の前記核酸配列は、前記複数のゲノムDNAライプラリに属する他のゲノムDNAライプラリの前記試料タグ領域の前記核酸配列と異なる、項目84に記載の前記複数のゲノムDNAライプラリ。

(項目86)

前記複数のゲノムDNAライプラリに属する1個のゲノムDNAライプラリの前記増幅領域の前記核酸配列は、前記複数のゲノムDNAライプラリに属する他のゲノムDNAライプラリの前記増幅領域の前記核酸配列に同一である、項目84または85に記載の前記複数のゲノムDNAライプラリ。

(項目87)

無細胞DNA(cfDNA)のDNA標的領域の遺伝子解析方法であって、

(a) 項目67から86のいずれかに記載の前記DNAライプラリを生成すること、

(b) DNA標的領域に特異的に結着する複数のキャプチャプローブと前記cfDNAライプラリを接触させることにより、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャプローブとDNAライプラリ断片との間に複合体を形成すること、及び

(c) 前記DNA標的領域を含む前記cfDNA断片の定量的遺伝子解析を実施すること

、  
を備え

それらにより、前記DNA標的領域の遺伝子解析を実施する、

前記遺伝子解析方法。

(項目88)

被験体における遺伝性疾患を予測する、診断する、または監視する方法であって、

(a) 前記被験体から試験試料を得ることと、

(b) 前記試験試料からゲノムDNAを単離することと、

(c) 複数のDNAライプラリ断片を含むDNAライプラリを生成することであって、前記DNAライプラリ断片のそれぞれは前記試験試料からのゲノムDNA断片、及びアダプタを含む、前記生成することと、

(d) DNA標的領域に特異的に結着する複数のキャプチャプローブと前記cfDNAライプラリを接触させることにより、前記DNA標的領域を含む前記キャプチャプローブとDNAライプラリ断片との間に複合体を形成することと、

(e) 前記cfDNAクローンライプラリにおける前記遺伝性疾患に関連する1つ以上の標的遺伝子座の定量的遺伝子解析を実施することであって、前記1つ以上の標的遺伝子座における1つ以上の遺伝子損傷の前記同定または検出は前記遺伝性疾患の前記進行の予後判定、診断、または監視である、前記実施することと、

を含む前記方法。

(項目89)

前記定量的遺伝子解析は、複数のシーケンシングリードを生成するためのDNAシーケンシングを含む、項目87または88に記載の前記方法。

(項目90)

ユニークゲノムDNA断片の一致度、及び試験試料の一致度を符号化する1セットのアダプタであって、ゲノムDNAライブラリを生成する際の使用のために、

前記1セットのアダプタ中の各アダプタは増幅領域、試料タグ領域、及びアンカー領域を含むDNAポリヌクレオチドであり、

前記増幅領域はPCR増幅についてプライマー認識部位として機能することが可能であるポリヌクレオチド配列を含み、

前記試料タグは前記ユニークライブラリDNA断片の前記一致度を符号化し、前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、

前記アンカー領域は前記試験試料の前記一致度を符号化するポリヌクレオチド配列を含み、前記アンカー領域は前記ゲノムDNA断片に付着することが可能である、

前記1セットのアダプタ。

(項目91)

前記試料タグは、ユニーク分子識別子(UMI)をさらに含み、前記UMIは、前記ユニークゲノムDNA断片の前記同定を容易にする、項目90に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目92)

前記増幅領域は、10から50の間のヌクレオチド長にある、項目90または91に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目93)

前記増幅領域は、25ヌクレオチド長にある、項目90から92のいずれか1項に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目94)

前記試料タグは、5から50の間のヌクレオチド長にある、先行項目のいずれか1項に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目95)

前記試料タグは、8ヌクレオチド長にある、項目94に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目96)

前記UMI増倍管は、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれる、項目90から95のいずれか1項に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目97)

前記UMI増倍管は、1から5の間のヌクレオチド長にある、項目96に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目98)

前記アンカー領域は、1から50の間のヌクレオチド長にある、項目90から97に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目99)

前記アンカー領域は、10ヌクレオチド長にある、項目98に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目100)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記増幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含む、項目90から99のいずれかに記載の前記1セットのアダプタ。

(項目101)

前記試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記1セットのアダプタの前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離する、項目100に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目102)

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備える、項目90から101のいずれか1項に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目103)

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接するUMI増倍管を備える、項目90から101のいずれか1項に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目104)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、項目103に記載の前記1セットのアダプタ。

(項目105)

前記複数のアダプタの各アダプタの前記增幅領域は、同一のヌクレオチド配列を含み、各アダプタの前記試料タグ領域は、8ヌクレオチド長にあり、前記試料タグの各ヌクレオチド配列は、少なくとも2のハミング距離によって前記1セットのアダプタの前記試料タグのいずれかの他のヌクレオチド配列から分離し、

前記複数のアダプタのそれぞれは、前記試料タグ領域に隣接する、または前記試料タグ領域内に含まれるUMI増倍管を備え、前記複数のアダプタの各アダプタの前記UMI増倍管は、3ヌクレオチド長にあり、前記UMI増倍管は、64個の可能なヌクレオチド配列のうちの1個を含み、それぞれの前記64個の可能なヌクレオチド配列の前記UMI増倍管は、前記複数のアダプタの前記試料タグ領域のそれぞれに対応され、

前記複数のアダプタの各アダプタの前記アンカータグ領域は、4個のヌクレオチド配列のうちの1個を含み、

所与の配列の各試料領域は、所与の配列の前記4個のアンカー領域のうちの1個のみに対応される、

項目90から104のいずれか1項に記載の前記1セットのアダプタ。