

【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 1 年 12 月 19 日 (2019.12.19)

【公表番号】特表 2019-504618 (P2019-504618A)

【公表日】平成 31 年 2 月 21 日 (2019.2.21)

【年通号数】公開・登録公報 2019-007

【出願番号】特願 2018-524250 (P2018-524250)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)

G 1 6 B 30/00 (2019.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/10 1 0 0 Z

C 1 2 Q 1/6806 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 Q 1/6851 Z

G 0 6 F 19/22

C 4 0 B 40/06

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 11 月 8 日 (2019.11.8)

【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】

DNA ライブラリーを構築する方法であって、

(a) 1 つ以上の DNA 断片の末端リン酸残基を除去すること；

(b) 前記脱リン酸化 DNA 断片を 1 種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復 DNA を生成すること；

(c) 1 つ以上の二重鎖 DNA (dsDNA) プレアダプターを前記末端修復 DNA 断片の各鎖の 3' 末端に対しライゲーションして、プレアダプター / 末端修復 DNA 複合体を形成することであって、各 dsDNA プレアダプターが、(i) 前記末端修復 DNA の各鎖の 3' 末端にライゲーションされ、アンカー配列を含むライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、(ii) 非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドとを含む、前記ライゲーションすること；

(d) 前記プレアダプター / 末端修復 DNA 複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター / 末端修復 DNA 複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；ならびに

(e) 前記アダプター / 末端修復 DNA 複合体を 1 種以上の酵素で処理して、連続した dsDNA 断片のライブラリーを形成すること；

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドが、3'末端において、前記末端修復DNA断片の5'末端に対するライゲーション及び/またはアダプターダイマー形成を防止する修飾を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記1つ以上のDNA断片の供与源が、ゲノムDNA (gDNA)、相補DNA (cDNA)、及びセルフリーDNA (cfDNA) からなる群から選択されるDNAである、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記DNAの供与源が、羊水試料、血液試料、皮膚試料、毛髪試料、毛包試料、唾液試料、粘液試料、口腔粘液試料、腔粘液試料、汗試料、涙試料、上皮組織試料、尿試料、精液試料、精漿試料、前立腺液試料、射精前液 (カウパー腺液) 試料、排泄物試料、生検試料、腹水試料、脳脊髄液試料、リンパ液試料、組織抽出物試料、生検試料、血漿試料、血清試料、リンパ液試料、眼球液試料、便試料、及びホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料からなる群から選択される生体試料である、請求項4に記載の方法。

【請求項 5】

前記生体試料から前記DNAを単離すること、前記DNAを断片化すること、及びステップ (c) の前に前記1つ以上のDNA断片の損傷を修復することをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記損傷が、脱アミノ化シトシン (ウラシル)、脱塩基部位、グアニンのO<sup>6</sup>MeGへのメチル化、DNAニック、ギャップ、またはチミンダイマーである、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、  
(i) 1つ以上のユニークリードコード；  
(ii) 1つ以上の連続したdsDNAライブラリー分子をPCR増幅するためのPCRプライマー結合部位；  
(iii) 試料多重化のための1つ以上の試料コード；  
(iv) DNAシーケンシングのための1つ以上のプライマー結合部位  
の1つ以上をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記修復オリゴヌクレオチドがアンカー配列と、  
(i) 1つ以上のユニークリードコード  
(ii) 1つ以上の連続したdsDNAライブラリー分子をPCR増幅するための1つ以上のプライマー結合部位  
(iii) 試料多重化のための1つ以上の試料コード  
(iv) DNAシーケンシングのための1つ以上のプライマー結合部位  
の1つ以上とを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドおよび前記修復オリゴヌクレオチドのそれぞれがアンカー配列を含み、前記ライゲーション鎖の前記アンカー配列が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記アンカー配列の少なくとも一部に対し相補的である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドおよび前記修復オリゴヌクレオチドのそれぞれが、1つ以上のタグ付きdsDNA断片を増幅させるためのPCRプライマー結合部位をさらに含み、前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記PCRプライマー結合部位が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記PCRプライマー結合部位に対し相補的である

、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記 1 つ以上のアダプターが、複数のライゲーション鎖オリゴヌクレオチド種及び／または複数の修復オリゴヌクレオチド種を含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドおよび前記修復オリゴヌクレオチドのそれぞれが、1 つ以上のタグ付き dsDNA 断片を増幅させるための PCR プライマー結合部位をさらに含み、前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記 PCR プライマー結合部位が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記 PCR プライマー結合部位に対し相補的ではない、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記 PCR プライマー結合部位に結合するプライマーが、前記修復オリゴヌクレオチドの前記 PCR プライマー結合部位に実質的に結合しない、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

アダプターライゲーションの効率が、脱リン酸化アダプター分子がリン酸化 DNA 断片にライゲーションされる方法と比較して増大する、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 DNA ライブラリーを増幅して DNA クローンライブラリーを生成し、定量的遺伝子解析を、前記 DNA クローンライブラリーにおける複数の遺伝子座上で実施する、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

定量的遺伝子解析が、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み、前記複数のシーケンシングリードのバイオインフォマティクス解析をさらに含む、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記複数のシーケンシングリードのバイオインフォマティクス解析をさらに含み、前記バイオインフォマティクス解析を、以下の目的：

- (a) 前記 DNA クローンライブラリー内で解析されるゲノム当量数の定量化；
- (b) ターゲット遺伝子座における遺伝子バリエーションの検出；
- (c) ターゲット遺伝子座の中の突然変異の検出；
- (d) ターゲット遺伝子座の中の遺伝子融合の検出；及び／または
- (e) ターゲット遺伝子座の中のコピー数変動の測定；

で使用する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記定量的遺伝子解析を、遺伝子疾患の原因となるまたは遺伝子疾患に関連する、1 つ以上の遺伝子病変を識別または検出するために使用する、請求項 1 7 に記載の方法であって、前記遺伝子病変が、ヌクレオチドのトランジションもしくはトランスバージョン、ヌクレオチドの挿入もしくは欠失、ゲノム再編成、コピー数の変化、または遺伝子融合を含む、方法。

【請求項 1 9】

1 つ以上のターゲット遺伝子座における 1 つ以上の遺伝子病変を、対象における遺伝子疾患の予測、診断、またはモニターのための指標とする方法であって、

- (a) 対象の生体試料から DNA を単離または取得すること；
- (b) 前記 DNA の末端リン酸残基を除去すること；
- (c) 前記脱リン酸化 DNA を 1 種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復 DNA を生成すること；
- (d) 1 つ以上の二重鎖 DNA (dsDNA) プレアダプターを前記末端修復 DNA の

各鎖の3'末端に対しライゲーションして、プレアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各dsDNAプレアダプターが、前記末端修復DNAの各鎖の3'末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドとを含む、前記ライゲーションすること；

(e) 前記プレアダプター/末端修復DNA複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；

(f) 前記アダプター/末端修復DNA複合体を1種以上の酵素で処理して、連続した二重鎖のDNA断片のライブラリーを形成すること；

(g) 前記DNAライブラリーを増幅してDNAクローンライブラリーを生成すること；

(h) 前記DNAクローンライブラリーにおけるゲノム当量数を決定すること；ならびに

(i) 前記DNAクローンライブラリーにおける前記遺伝子疾患に関連する1つ以上のターゲット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つ以上のターゲット遺伝子座における1つ以上の遺伝子病変の識別または検出が、前記遺伝子疾患の予後判定、診断、または進行のモニターである、前記実施すること；

を含む、前記方法。

#### 【請求項20】

DNAクローンライブラリーにおける遺伝子疾患に関連する1つ以上のバイオマーカーを、対象に遺伝子疾患の治療をすべきかどうかの指標とする方法であって、

(a) 対象の生体試料からDNAを単離または取得すること；

(b) 前記DNAの末端リン酸残基を除去すること；

(c) 前記脱リン酸化DNAを1種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復DNAを生成すること；

(d) 1つ以上の二重鎖DNA(dsDNA)プレアダプターを前記末端修復DNAの各鎖の3'末端に対しライゲーションして、プレアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各dsDNAプレアダプターが、前記末端修復DNAの各鎖の3'末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドとを含む、前記ライゲーションすること；

(e) 前記プレアダプター/末端修復DNA複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；

(f) 前記アダプター/末端修復DNA複合体を1種以上の酵素で処理して、連続した二重鎖のDNAライブラリーを形成すること；

(g) 前記DNAライブラリーを増幅してDNAクローンライブラリーを生成すること；

(h) 前記DNAクローンライブラリーにおけるゲノム当量数を決定すること；ならびに

(i) 前記DNAクローンライブラリーにおける遺伝子疾患に関連する1つ以上のバイオマーカーの定量的遺伝子解析を実施することであって、前記1つ以上のバイオマーカーのうちの少なくとも1つの検出または検出失敗が、前記対象に前記遺伝子疾患の治療をすべきかどうかを指示するものである、前記実施すること；

を含む、前記方法。

#### 【請求項21】

前記DNAが、ゲノムDNA、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料からのDNA、cDNA、またはcfDNAである、請求項19または20に記載の方法。

#### 【請求項22】

前記バイオマーカーが、ヌクレオチドのトランジションもしくはトランスバージョン、ヌクレオチドの挿入もしくは欠失、ゲノム再編成、コピー数の変化、または遺伝子融合から選択される遺伝子病変である、請求項 20 に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記遺伝子疾患ががんである、請求項 18 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【手続補正 2】**

**【補正対象書類名】**明細書

**【補正対象項目名】**0068

**【補正方法】**変更

**【補正の内容】**

**【0068】**

あるいくつかの実施形態では、遺伝子疾患はがんである。

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)

1 つ以上の DNA 断片に対するアダプターライゲーションの効率を高める方法であって

、

(a) 1 つ以上の DNA 断片の末端リン酸残基を除去すること；

(b) 前記脱リン酸化 DNA 断片を 1 種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復 DNA を生成すること；

(c) 1 つ以上の二重鎖 DNA (dsDNA) プレアダプターを前記末端修復 DNA の各鎖の 3' 末端に対しライゲーションして、プレアダプター / 末端修復 DNA 複合体を形成することであって、各 dsDNA プレアダプターが、前記末端修復 DNA の各鎖の 3' 末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを含む、前記ライゲーションすること；

(d) 前記プレアダプター / 末端修復 DNA 複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター / 末端修復 DNA 複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；ならびに

(e) 前記アダプター / 末端修復 DNA 複合体を 1 種以上の酵素で処理して、連続した二重鎖の DNA ライブラリーを形成すること；  
を含み、

アダプターライゲーションの効率が、脱リン酸化アダプター分子がリン酸化 DNA 断片に対しライゲーションされる方法よりも高められる、前記方法。

(項目 2)

DNA ライブラリーを構築する方法であって、

(a) 1 つ以上の DNA 断片の末端リン酸残基を除去すること；

(b) 前記脱リン酸化 DNA 断片を 1 種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復 DNA を生成すること；

(c) 1 つ以上の二重鎖 DNA (dsDNA) プレアダプターを前記末端修復 DNA の各鎖の 3' 末端に対しライゲーションして、プレアダプター / 末端修復 DNA 複合体を形成することであって、各 dsDNA プレアダプターが、前記末端修復 DNA の各鎖の 3' 末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを含む、前記ライゲーションすること；

(d) 前記プレアダプター / 末端修復 DNA 複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター / 末端修復 DNA 複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；ならびに

(e) 前記アダプター / 末端修復 DNA 複合体を 1 種以上の酵素で処理して、連続した二重鎖の DNA ライブラリーを形成すること；

を含む、前記方法。

(項目3)

前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドが、3'末端において、前記末端修復DNAの5'末端に対するライゲーション及び/またはアダプターダイマー形成を防止する修飾を含む、項目1または項目2に記載の方法。

(項目4)

前記1つ以上のDNA断片の供与源が、ゲノムDNA(gDNA)、相補DNA(cDNA)、及びセルフリーDNA(cfDNA)からなる群から選択されるDNAである、項目1~3のいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

前記DNAの供与源が、血液、皮膚、毛髪、毛包、唾液、口腔粘液、腔粘液、汗、涙、上皮組織、尿、精液、精漿、前立腺液、射精前液(カウパー腺液)、排泄物、生検、腹水、脳脊髄液、リンパ液、及び組織抽出物試料または生検試料からなる群から選択される生体試料である、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記DNAの供与源が、羊水、血液、血漿、血清、精液、リンパ液、脳脊髄液、眼球液、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4に記載の方法。

(項目7)

対象の生体試料から前記DNAを単離することをさらに含む、項目5または項目6に記載の方法。

(項目8)

対象の生体試料から前記DNAを断片化することをさらに含む、項目5または項目6に記載の方法。

(項目9)

ステップ(c)の前に前記1つ以上のDNA断片の損傷を修復することをさらに含む、先行項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

前記損傷が、脱アミノ化シトシン(ウラシル)、脱塩基部位、グアニンのO<sup>6</sup>MeGへのメチル化、DNAニック、ギャップ、またはチミンダイマーである、項目9に記載の方法。

(項目11)

cfDNAライブラリーを構築する方法であって、

(a) 対象の生体試料からcfDNAを単離または取得すること；

(a) 前記cfDNAの末端リン酸残基を除去すること；

(b) 前記脱リン酸化cfDNAを1種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復cfDNAを生成し、任意選択によりDNA損傷を修復すること；

(c) 1つ以上の二重鎖DNA(dsDNA)プレアダプターを前記末端修復cfDNAの各鎖の3'末端に対しライゲーションして、プレアダプター/末端修復cfDNA複合体を形成することであって、各dsDNAプレアダプターが、前記末端修復cfDNAの各鎖の3'末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを含む、前記ライゲーションすること；

(d) 前記プレアダプター/末端修復cfDNA複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター/末端修復cfDNA複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；

(e) 前記アダプター/末端修復cfDNA複合体を1種以上の酵素で処理して、連続した二重鎖のcfDNAライブラリーを形成すること；ならびに

(f) 前記cfDNAライブラリーを増幅して、セルフリーDNAクローンライブラリーを生成すること；

を含む、前記方法。

(項目 1 2)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドがアダプターダイマー形成を防止する 1 つ以上の修飾を含み、任意選択により、前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドの 3' 末端の修飾がアダプターダイマー形成を防止する、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 3)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、アンカー配列、リードコード、または P C R プライマー結合部位を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 4)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、アンカー配列、リードコード、及び P C R プライマー結合部位を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 5)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、1 つ以上の連続した二重鎖の D N A ライブラリー分子を P C R 増幅するための 1 つ以上の P C R プライマー結合部位を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 6)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、1 つ以上のユニークリードコードを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 7)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、試料多重化のための 1 つ以上の試料コードを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、D N A シークエンシングのための 1 つ以上の配列を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、アンカー配列を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記修復オリゴヌクレオチドが、アンカー配列、リードコード、または P C R プライマー結合部位を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記修復オリゴヌクレオチドが、アンカー配列、リードコード、及び P C R プライマー結合部位を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記修復オリゴヌクレオチドが、1 つ以上の連続した二重鎖の D N A ライブラリー分子を P C R 増幅するための 1 つ以上のプライマー結合部位を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記修復オリゴヌクレオチドが、1 つ以上のユニークリードコードを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記修復オリゴヌクレオチドが、試料多重化のための 1 つ以上の試料コードを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記修復オリゴヌクレオチドが、D N A シークエンシングのための 1 つ以上の配列を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドが、前記修復オリゴヌクレオチドに対し相補的である、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 7 )

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記アンカー配列が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記アンカー配列に対し相補的である、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 8 )

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記 P C R プライマー結合部位が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記 P C R プライマー結合部位に対し相補的である、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 2 9 )

前記 1 つ以上のアダプターが、複数のライゲーション鎖オリゴヌクレオチド種を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 0 )

前記 1 つ以上のアダプターが、複数の修復オリゴヌクレオチド種を含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 1 )

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記プライマー結合部位が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記プライマー結合部位に対し相補的ではない、項目 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 2 )

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記プライマー結合部位が、前記修復オリゴヌクレオチドの前記プライマー結合部位とは実質的に異なる、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 3 )

前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチドの前記プライマー結合部位に結合するプライマーが、前記修復オリゴヌクレオチドの前記プライマー結合部位に実質的に結合しない、項目 3 1 に記載の方法。

( 項目 3 4 )

前記 D N A ライブラリーを増幅して D N A クローンライブラリーを生成する、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 5 )

q P C R を前記 D N A クローンライブラリー上で実施し、q P C R 測定値を既知のゲノム当量の標準物質と比較して、前記 D N A クローンライブラリーのゲノム当量を決定する、項目 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 6 )

前記 q P C R を、A l u 配列に結合するプライマー及びアダプター内の配列に結合するプライマーを用いて実施する、項目 3 4 に記載の方法。

( 項目 3 7 )

定量的遺伝子解析を、前記 D N A クローンライブラリーにおける複数の遺伝子座上で実施する、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 8 )

定量的遺伝子解析を、複数の D N A クローンライブラリーにおける複数の遺伝子座上で実施する、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 3 9 )

定量的遺伝子解析が、1 つ以上のキャプチャープローブをターゲット遺伝子座とハイブリダイズして、キャプチャープローブモジュール - D N A クローン複合体を形成することを含む、先行項目のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 4 0 )

定量的遺伝子解析が、前記キャプチャープローブ - D N A クローン複合体を単離することを含む、項目 3 9 に記載の方法。

( 項目 4 1 )

前記定量的遺伝子解析が、前記単離したキャプチャープローブ - D N A クローン複合体



内のDNAクローン配列を増幅することを含む、項目49に記載の方法。

(項目42)

定量的遺伝子解析が、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、先行項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目43)

前記複数のシーケンシングリードのバイオインフォマティクス解析をさらに含む、項目42に記載の方法。

(項目44)

定量的遺伝子解析を、前記DNAクローンライブラリーにおける複数の遺伝子座上で実施し、バイオインフォマティクス解析を、以下の目的：

(a) 前記DNAクローンライブラリー内で解析されるゲノム当量数の定量化；

(b) ターゲット遺伝子座における遺伝子バリエーションの検出；

(c) ターゲット遺伝子座の中の突然変異の検出；

(d) ターゲット遺伝子座の中の遺伝子融合の検出；及び/または

(e) ターゲット遺伝子座の中のコピー数変動の測定；

で使用する、先行項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目45)

前記定量的遺伝子解析を、遺伝子疾患の原因となるまたは遺伝子疾患に関連する、1つ以上の遺伝子病変を識別または検出するために使用する、項目44に記載の方法。

(項目46)

前記遺伝子病変が、ヌクレオチドのトランジションもしくはトランスバージョン、ヌクレオチドの挿入もしくは欠失、ゲノム再編成、コピー数の変化、または遺伝子融合を含む、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記遺伝子疾患ががんである、項目45に記載の方法。

(項目48)

前記定量的遺伝子解析を、胎児cfDNA内の1つ以上のターゲット遺伝子座における1つ以上の遺伝子バリエーションまたは遺伝子病変を識別または検出するために使用する、項目44に記載の方法。

(項目49)

前記キャプチャープローブが、任意選択によりハプテン標識パートナーオリゴヌクレオチドと共に二重鎖形成されたキャプチャープローブモジュールの構成成分であり、前記ハプテン標識パートナーオリゴヌクレオチドが前記キャプチャープローブモジュール内のテール配列とハイブリダイズする、項目38～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目50)

対象における遺伝子疾患の予測、診断、またはモニターの方法であって、

(a) 対象の生体試料からDNAを単離または取得すること；

(b) 前記DNAの末端リン酸残基を除去すること；

(c) 前記脱リン酸化DNAを1種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復DNAを生成すること；

(d) 1つ以上の二重鎖DNA(dsDNA)プレアダプターを前記末端修復DNAの各鎖の3'末端に対しライゲーションして、プレアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各dsDNAプレアダプターが、前記末端修復DNAの各鎖の3'末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドとを含む、前記ライゲーションすること；

(e) 前記プレアダプター/末端修復DNA複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；

(f) 前記アダプター/末端修復DNA複合体を1種以上の酵素で処理して、連続した

二重鎖のDNAライブラリーを形成すること；

(g) 前記DNAライブラリーを増幅してDNAクローンライブラリーを生成すること；

；  
(h) 前記DNAクローンライブラリーにおけるゲノム当量数を決定すること；ならびに

(i) 前記DNAクローンライブラリーにおける前記遺伝子疾患に関連する1つ以上のターゲット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つ以上のターゲット遺伝子座における1つ以上の遺伝子病変の識別または検出が、前記遺伝子疾患の予後判定、診断、または進行のモニターである、前記実施すること；

を含む、前記方法。

(項目51)

前記DNAが、ゲノムDNA、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFP E)試料からのDNA、cDNA、またはcfDNAである、項目50に記載の方法。

(項目52)

前記cfDNAが、羊水、血液、血漿、血清、精液、リンパ液、脳脊髄液、眼球液、尿、唾液、便、粘液、及び汗の群から選択される生体試料から単離される、項目51に記載の方法。

(項目53)

前記遺伝子病変が、ヌクレオチドのトランジションもしくはトランスバージョン、ヌクレオチドの挿入もしくは欠失、ゲノム再編成、コピー数の変化、または遺伝子融合を含む、項目51に記載の方法。

(項目54)

前記遺伝子疾患ががんである、項目50に記載の方法。

(項目55)

遺伝子疾患のコンパニオン診断であって、

(a) 対象の生体試料からDNAを単離または取得すること；

(b) 前記DNAの末端リン酸残基を除去すること；

(c) 前記脱リン酸化DNAを1種以上の末端修復酵素で処理して、末端修復DNAを生成すること；

(d) 1つ以上の二重鎖DNA(dsDNA)プレアダプターを前記末端修復DNAの各鎖の3'末端に対しライゲーションして、プレアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各dsDNAプレアダプターが、前記末端修復DNAの各鎖の3'末端にライゲーションされたライゲーション鎖オリゴヌクレオチドと、非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドとを含む、前記ライゲーションすること；

(e) 前記プレアダプター/末端修復DNA複合体から前記非ライゲーションパートナー鎖オリゴヌクレオチドを離し、修復オリゴヌクレオチドで置き換えてアダプター/末端修復DNA複合体を形成することであって、各アダプターが前記ライゲーション鎖オリゴヌクレオチド及び前記修復オリゴヌクレオチドを含む、前記置き換えること；

(f) 前記アダプター/末端修復DNA複合体を1種以上の酵素で処理して、連続した二重鎖のDNAライブラリーを形成すること；

(g) 前記DNAライブラリーを増幅してDNAクローンライブラリーを生成すること；

；  
(h) 前記DNAクローンライブラリーにおけるゲノム当量数を決定すること；ならびに

(i) 前記DNAクローンライブラリーにおける遺伝子疾患に関連する1つ以上のバイオマーカーの定量的遺伝子解析を実施することであって、前記1つ以上のバイオマーカーのうちの少なくとも1つの検出または検出失敗が、前記対象に前記遺伝子疾患の治療をすべきかどうかを指示するものである、前記実施すること；

を含む、前記コンパニオン診断。

(項目56)

前記DNAが、ゲノムDNA、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料からのDNA、cDNA、またはcfDNAである、項目55に記載の方法。

（項目57）

前記cfDNAが、羊水、血液、血漿、血清、精液、リンパ液、脳脊髄液、眼球液、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から単離される、項目56に記載の方法。

（項目58）

前記バイオマーカーが遺伝子病変である、項目55に記載の方法。

（項目59）

前記遺伝子病変が、ヌクレオチドのトランジションもしくはトランスバージョン、ヌクレオチドの挿入もしくは欠失、ゲノム再編成、コピー数の変化、または遺伝子融合を含む、項目58に記載の方法。

（項目60）

前記遺伝子疾患ががんである、項目55に記載の方法。