

【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 25 日 (2023.4.25)

【国際公開番号】 WO2020/232081
【公表番号】 特表 2022-534625 (P2022-534625A)
【公表日】 令和 4 年 8 月 2 日 (2022.8.2)
【年通号数】 公開公報 (特許) 2022-140
【出願番号】 特願 2022-506557 (P2022-506557)
【国際特許分類】

10

C 1 2 Q 1/6806(2018.01)
C 1 2 Q 1/686(2018.01)
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
C 1 2 N 15/09(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6806 Z Z N A
C 1 2 Q 1/686 Z
C 1 2 Q 1/6844 Z
C 1 2 Q 1/6869 Z
C 1 2 N 15/09 Z

20

【手続補正書】
【提出日】 令和 5 年 4 月 17 日 (2023.4.17)
【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】

遺伝物質から標的ゲノム領域を捕捉する方法であって、
a) 最低約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドの配列を含み、前記標的ゲノム領域に隣接する第 1 の認識部位及び第 2 の認識部位を有する 1 つ以上のエンドヌクレアーゼを使用して、前記遺伝物質から前記標的ゲノム領域を開裂する工程と、
b) 前記開裂した遺伝物質を一本鎖形態に変性する工程と、
c) 前記標的ゲノム領域を、前記一本鎖形態の標的ゲノム領域の 3' 及び 5' 末端にそれぞれハイブリダイズする 3' 及び 5' 末端の配列を含む架橋オリゴにハイブリダイズさせることによって、前記一本鎖形態の標的ゲノム領域を捕捉する工程と
ことを含む、方法。

40

【請求項 2】

前記第 1 の認識部位及び前記第 2 の認識部位はそれぞれ、最低約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドの配列を含み、前記第 1 の認識部位及び前記第 2 の認識部位は、前記標的ゲノム領域に隣接する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

特異的な認識部位で前記遺伝材料を開裂する前記 1 つ以上のエンドヌクレアーゼは、制限エンドヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ又はプログラマブルエンドヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 1 つ以上のプログラマブルエンドヌクレアーゼは、Clustered Regularly Inters

50

paced Short Palindromic Repeats (CRISPR) 関連タンパク質 9 エンドヌクレアーゼ (Cas9 エンドヌクレアーゼ)、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c、RNA 又は DNA 誘導アルゴノートタンパク質及び構造誘導エンドヌクレアーゼから選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記プログラブルエンドヌクレアーゼは、前記第 1 の認識部位に相補的な配列を有する第 1 のガイド分子に基づいて前記第 1 の認識部位で DNA を切断する第 1 のヌクレアーゼ、及び前記第 2 の認識部位に相補的な配列を有する第 2 のガイド分子に基づいて前記第 2 の認識部位で DNA を切断する第 2 のプログラブルエンドヌクレアーゼを含む、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記架橋オリゴは、前記一本鎖標的ゲノム領域のそれぞれ 3' 及び 5' 末端の配列にハイブリダイズする 3' 及び 5' 末端の配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記架橋オリゴは、前記一本鎖標的ゲノム領域のそれぞれ 3' 及び 5' 末端の配列にハイブリダイズする 3' 及び 5' 末端オーバーハングを有する二本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記架橋オリゴは、レアカッター制限エンドヌクレアーゼに特異的な制限部位、プログラブルエンドヌクレアーゼの開裂部位及び／又はプライマー結合配列をさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記架橋オリゴは、固体基質上に固定化される、又はビオチン化される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

d) 前記架橋オリゴにハイブリダイズした前記一本鎖標的ゲノム領域の前記自由端部をライゲーションして、前記架橋オリゴにハイブリダイズした一本鎖環状標的ゲノム領域を生成し、

30

e) 任意で、非環状化遺伝物質を分解し、

f) 任意で、核酸増幅によって前記標的ゲノム領域を増幅して、前記標的ゲノム領域の複数のコピーを生成し、

g) 前記増幅された標的ゲノム領域を分析すること

を含む、前記標的ゲノム領域を分析することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ローリングサークル増幅 (RCA) 反応により、前記標的ゲノム領域を増幅して、前記標的ゲノム領域の複数の連結コピーを生成することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記分析は、前記標的ゲノム領域を配列決定することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記配列決定は、ナノポア配列決定、可逆的色素ターミネーター配列決定、又は単一分子リアルタイム (SMRT) 配列決定を含む、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

遺伝物質から複数の標的ゲノム領域を捕捉する方法であって、

a) 複数対のエンドヌクレアーゼを用いて、前記遺伝物質から複数の標的ゲノム領域を開裂し、各対のエンドヌクレアーゼは、第 1 の認識部位及び第 2 の認識部位を有し、各認識部位は、最低約 17 ～ 約 24 のヌクレオチドの配列を含み、各対の認識部位は、前記複数の標的ゲノム領域からの標的ゲノム領域に隣接し、

b) 前記開裂した遺伝物質を一本鎖形態に変性させ、

c) 複数の標的ゲノム領域を複数の架橋オリゴにハイブリダイズさせることによって、一

50

本鎖形態の前記複数の標的ゲノム領域を捕捉し、各架橋オリゴは、一本鎖形態の複数の標的ゲノム領域から、標的ゲノム領域の3'末端及び5'末端にそれぞれハイブリダイズする3'末端及び5'末端の配列を含む、方法。

【請求項15】

d) 前記複数の架橋オリゴにハイブリダイズした前記一本鎖標的ゲノム領域の自由端部をライゲーションして、対応する架橋オリゴにハイブリダイズした、複数の標的ゲノム領域からの標的ゲノム領域を各々含有する複数の一本鎖環状遺伝物質を生成し、

e) 任意で、非環状遺伝物質を除去し、

f) 任意で、核酸増幅によって、前記複数の標的ゲノム領域を増幅して、各標的ゲノム領域の複数のコピーを生成し、

g) 前記増幅された標的ゲノム領域を分析する

ことを含む、前記複数の標的ゲノム領域を分析することをさらに含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記複数の架橋オリゴは、固体基質上に固定化される、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記複数の標的ゲノム領域を、核酸増幅により増幅して、各標的ゲノム領域の複数のコピーを生成する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、前記標的ゲノム領域を増幅して、前記標的ゲノム領域の複数のコピーを生成することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項19】

PCRプライマーは、標的領域に特異的であるか、又は、前記架橋オリゴによって導入される共通領域に結合するように設計することによって、全ての標的に共通とすることができる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

a) エンドヌクレアーゼを標的に向ける1つ以上のガイド分子と、

b) 1つ以上の標的ゲノム領域を捕捉するように設計された1つ以上の架橋オリゴと、任意で、

c) 1つ以上のプログラマブルエンドヌクレアーゼと

を含む、キット。

10

20

30

40

50