

【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4年3月31日(2022.3.31)

【公開番号】特開2021-182940(P2021-182940A)

【公開日】令和3年12月2日(2021.12.2)

【年通号数】公開・登録公報2021-058

【出願番号】特願2021-139325(P2021-139325)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6869(2018.01)

10

C 12 Q 1/686(2018.01)

C 12 Q 1/6816(2018.01)

C 12 N 15/09(2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/6869 Z Z N A

C 12 Q 1/686 Z

C 12 Q 1/6816 Z

C 12 N 15/09 Z

【手続補正書】

20

【提出日】令和4年3月23日(2022.3.23)

【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】

(a) 1つまたは複数のアダプターと；

(b) 1つまたは複数の捕捉プローブモジュールであって、各捕捉プローブモジュールが 30   
テール配列および捕捉プローブ配列を含む、1つまたは複数の捕捉プローブモジュールと  
を含むDNA断片の標的化遺伝子解析のための複数の組成物であって、  
前記捕捉プローブ配列が長さ約60ヌクレオチド未満である、複数の組成物。

【請求項2】

前記DNA断片が循環無細胞(cfdNA)である、請求項1に記載の複数の組成物。

【請求項3】

各アダプターがPCRプライマー結合部位を含む、請求項1または請求項2に記載の複数の組成物。

【請求項4】

各アダプターが1つまたは複数のユニーコードを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の複数の組成物。 40

【請求項5】

各アダプターが、試料多重化のための1つまたは複数の試料コードを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項6】

各アダプターが1つまたは複数のアンカー配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の複数の組成物。

【請求項7】

各リードコードが、ユニクシークエンシングリードを同定するために構成される、請求項4～6のいずれか一項に記載の複数の組成物。

50

**【請求項 8】**

前記試料コードが、タグ付きDNAライブラリーの由来となった試料を同定するために構成され、前記タグ付きDNAライブラリーが、各末端でアダプターモジュールにライゲーションされたDNA断片を含み、前記1つまたは複数のアダプターの各々が1つのアダプター モジュールを含む、請求項5～7のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 9】**

前記PCRプライマー結合部位が、DNAライブラリーの単一プライマー増幅のために構成される、請求項3～8のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 10】**

前記PCRプライマー結合部位が、約12ヌクレオチド、約15ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約25ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約35ヌクレオチド、または約40ヌクレオチドである、請求項3～9のいずれか一項に記載の複数の組成物。 10

**【請求項 11】**

前記リードコードが、約2ヌクレオチド、約3ヌクレオチド、または約5ヌクレオチドであり、すべての他のリードコードと少なくとも2ヌクレオチド異なる、請求項4～10のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 12】**

前記試料コードが、約2ヌクレオチド、約3ヌクレオチド、または約5ヌクレオチドであり、すべての他の試料コードと少なくとも2ヌクレオチド異なる、請求項5～11のいずれか一項に記載の複数の組成物。 20

**【請求項 13】**

前記アンカー配列が、4つのヌクレオチド配列から選択される、請求項6～12のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 14】**

前記アンカー配列が、約8ヌクレオチド、約12ヌクレオチド、または約16ヌクレオチドである、請求項6～13のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 15】**

各アンカー配列の3'末端の2ヌクレオチドがAA、CC、TTまたはGGである、請求項6～14のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 16】**

前記1つまたは複数のアダプターが、複数のアダプター種を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の複数の組成物。 30

**【請求項 17】**

請求項1～16のいずれか一項に記載の複数の組成物であって、各アダプターがライゲーション鎖および相補鎖を含み、前記ライゲーション鎖がアダプターモジュールを含み、前記相補鎖が前記ライゲーション鎖の3'末端にハイブリダイズして、前記ライゲーション鎖と部分的な二本鎖を形成する、複数の組成物。

**【請求項 18】**

前記アダプターの前記二本鎖の領域が平滑末端である、請求項17に記載の複数の組成物。 40

**【請求項 19】**

前記アダプターの前記二本鎖領域が前記ライゲーション鎖の3'末端にオーバーハングを含み、前記オーバーハングが、そこにライゲーションするDNA断片の5' - オーバーハングと相補的である、請求項17に記載の複数の組成物。

**【請求項 20】**

請求項17～19のいずれか一項に記載の複数の組成物であって、前記1つまたは複数のアダプターが、

(a) 複数のアダプターをDNA断片とライゲーションして、前記アダプターの前記ライゲーション鎖とライゲーションしたDNA断片を含む複数の複合体を生成するステップと

—

—

—

—

—

(b) 前記複数の複合体を1つまたは複数の酵素と接触させて、複数のアダプター-タグ付きDNA断片を含むタグ付きライプラリーを形成するするステップとを含む方法を用いて、DNA断片にライゲーションしてタグ付きDNAライプラリーを生成するように構成される、複数の組成物。

**【請求項21】**

前記相補鎖がステップ(b)の部分的な二本鎖から移動するように構成される、請求項20に記載の複数の組成物。

**【請求項22】**

ステップ(b)の前記1つまたは複数の酵素を含む請求項20または請求項21に記載の複数の組成物であって、必要に応じて、前記1つまたは複数の酵素がDNAポリメラーゼを含む、複数の組成物。

10

**【請求項23】**

ステップ(a)において前記複数のアダプターをDNA断片とライゲーションさせるためのDNAリガーゼを含む請求項20～22のいずれか一項に記載の複数の組成物であって、必要に応じて、前記DNAリガーゼがT4 DNAリガーゼである、複数の組成物。

**【請求項24】**

前記1つまたは複数のアダプターが各々、1つまたは複数のシークエンシングプライマー結合部位を含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項25】**

前記1つまたは複数のアダプターが各々、DNAシークエンシングのための1つまたは複数の配列を含む、請求項1～24のいずれか一項に記載の複数の組成物。

20

**【請求項26】**

前記捕捉プローブ配列が、約25ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約35ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、または約45ヌクレオチドである、請求項1～25のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項27】**

前記捕捉プローブ配列が、約25～約45ヌクレオチド、約30～約45ヌクレオチド、約35～約45ヌクレオチド、約35～約40ヌクレオチド、または約40～約45ヌクレオチドである、請求項1～26のいずれか一項に記載の複数の組成物。

30

**【請求項28】**

前記捕捉プローブ配列が、タグ付きDNAライプラリー内の標的領域と実質的に相補的である、請求項1～27のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項29】**

前記捕捉プローブ配列が、タグ付きDNAライプラリー内の標的領域と少なくとも70%の相補性を有する、請求項1～28のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項30】**

前記捕捉プローブ配列が、タグ付きDNAライプラリー内の標的領域にハイブリダイズできる、請求項1～29のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項31】**

各捕捉プローブモジュールの前記テール配列が、パートナーオリゴにハイブリダイズして、前記パートナーオリゴと部分的な二本鎖を形成するように構成される、請求項1～30のいずれか一項に記載の複数の組成物。

40

**【請求項32】**

前記テール配列が、PCRプライマー結合部位を含む、請求項1～31のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項33】**

前記テール配列が、シークエンシングプライマー結合部位を含む、請求項1～32のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項34】**

複数の捕捉プローブモジュールを含む、請求項1～33のいずれか一項に記載の複数の組

50

成物。

**【請求項 3 5】**

少なくとも 1 つの捕捉プローブモジュールが、標的領域の下流にハイブリダイズするよう構成され、少なくとも 1 つの捕捉プローブモジュールが、前記標的領域の上流にハイブリダイズするように構成される、請求項 3 4 に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 6】**

前記複数の捕捉プローブモジュールの各捕捉プローブが、任意の他の捕捉プローブの約 200 bp 以内のその標的配列にハイブリダイズするように構成される、請求項 3 4 または請求項 3 5 に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 7】**

前記複数の捕捉プローブモジュールの各捕捉プローブモジュールが、タグ付き DNA ライブラリー断片にハイブリダイズして、複数の DNA ライブラリー断片 - 捕捉プローブモジュール複合体を形成する、請求項 3 4 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 8】**

各捕捉プローブモジュールが、前記 DNA ライブラリー断片 - 捕捉プローブモジュール複合体の単離および / または精製を容易にするように構成された結合対の特異的メンバーを含む、請求項 3 7 に記載の複数の組成物。

**【請求項 3 9】**

前記パートナーオリゴがビオチン分子を含む、請求項 3 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 0】**

DNA ライブラリー断片 - 捕捉プローブモジュール複合体を酵素的に処理して、酵素的に処理された複合体を生成するための 1 つまたは複数の酵素を含む、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 1】**

前記 1 つまたは複数の酵素が、前記 DNA ライブラリー断片を鑄型として使用して前記 DNA ライブラリー断片 - 捕捉プローブモジュール複合体の各捕捉プローブを伸長するように構成された 5' - 3' DNA ポリメラーゼを含む、請求項 4 0 に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 2】**

前記酵素的に処理された複合体を増幅して、増幅されたハイブリッド核酸分子を生成するための 1 つまたは複数の試薬を含む請求項 4 0 または請求項 4 1 に記載の複数の組成物であって、各増幅されたハイブリッド核酸分子が、捕捉プローブモジュールにハイブリダイズできる配列と、前記捕捉プローブモジュールのテール配列の相補体を含む、複数の組成物。

**【請求項 4 3】**

前記増幅されたハイブリッド核酸分子に関する定量的遺伝子解析を行うためのコンポーネントを含む請求項 4 2 に記載の複数の組成物であって、前記定量的遺伝子解析が、複数のシークエンシングリードを生成するための前記増幅されたハイブリッド核酸分子の DNA シークエンシングを含む、複数の組成物。

**【請求項 4 4】**

前記定量的遺伝子解析が、遺伝疾患に関連する 1 つまたは複数の遺伝子病変を検出するために使用される、請求項 4 3 に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 5】**

前記 1 つまたは複数の遺伝子病変が、スクレオチドトランジションもしくはトランスバージョン、スクレオチド挿入もしくは欠失、ゲノム再編成、またはコピー数の変化を含む、請求項 4 4 に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 6】**

前記遺伝疾患ががんである、請求項 4 4 または請求項 4 5 に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 7】**

前記タグ付き DNA ライブラリーの DNA が、羊水、血液、血漿、血清、精液、リンパ液

10

20

30

40

50

、脳脊髄液、眼液、尿、唾液、糞便、粘液および汗からなる群から選択される対象の生体試料から単離される、請求項 8 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 8】**

前記タグ付き DNA ライブライマーを生成するための試薬を含む、請求項 8 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 4 9】**

末端修復を行うための 1 つまたは複数の試薬を含む請求項 4 8 に記載の複数の組成物であって、前記タグ付き DNA ライブライマーの前記 DNA 断片が、アダプターへのライゲーション前に末端修復されている、複数の組成物。

**【請求項 5 0】**

末端修復を行うための前記 1 つまたは複数の試薬が、平滑末端、5' - オーバーハングまたは 3' - オーバーハングを生成する 1 つまたは複数の酵素を含む、請求項 4 9 に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 1】**

前記 DNA 断片が、ゲノム DNA 、組換え DNA 、合成 DNA または cDNA である、請求項 1 および 3 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 2】**

前記 DNA 断片の平均サイズが約 1 5 0 ヌクレオチド ~ 約 4 0 0 ヌクレオチドの間である、請求項 1 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

**【請求項 5 3】**

前記 DNA 断片の平均サイズが約 1 5 0 ヌクレオチドである、請求項 1 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の複数の組成物。

10

20

30

40

50