

【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10月5日(2022.10.5)

【国際公開番号】WO2020/126602

【公表番号】特表2022-513546(P2022-513546A)

【公表日】令和4年2月9日(2022.2.9)

【年通号数】公開公報(特許)2022-024

【出願番号】特願2020-572480(P2020-572480)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6874(2018.01)

C 12 Q 1/6844(2018.01)

C 12 N 15/11(2006.01)

C 12 N 9/16(2006.01)

C 12 N 9/12(2006.01)

10

【F I】

C 12 Q 1/6874 Z

C 12 Q 1/6844 Z

C 12 N 15/11 Z

C 12 N 9/16 B

C 12 N 9/12

C 12 N 9/16 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和4年9月27日(2022.9.27)

【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】

30

【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的核酸の第1領域および第2領域のペアワイズシーケンシング方法であって、前記第1領域および第2領域が、前記標的核酸の相補鎖にあり、以下の工程を含む、方法：

(a) 複数の増幅部位を含むアレイを用意する工程であって、

前記増幅部位が、(i)複数の捕捉核酸と、(ii)複数のクローン一本鎖アンプリコンとを含み、

各一本鎖アンプリコンがその5'末端で捕捉核酸に付着しており、

前記捕捉核酸が切断部位を含んでいる、工程；

(b) 第1シーケンシングプライマーを、各一本鎖アンプリコンに存在するユニバーサル配列にハイブリダイズさせる工程；

(c) 前記一本鎖アンプリコンを第1鋳型として使用し、前記第1シーケンシングプライマーにスクレオチドを順次付加して第1配列決定反応を実施して第1領域の配列を決定し、前記第1領域の相補鎖を生成する工程；

(d) 前記第1領域の相補鎖を伸長させ、前記第1シーケンシングプライマーと、前記配列決定反応中に組み込まれたスクレオチドと、前記伸長中に組み込まれたスクレオチドとを含む二本鎖アンプリコンを形成する工程であって、前記第1領域の相補鎖が前記増幅部位の表面に付着していない、工程；

(e) 前記一本鎖アンプリコンに付着している捕捉核酸を切断する工程であって、

前記切断が、前記一本鎖アンプリコンを、(i)短縮した捕捉核酸と、(ii)前記

40

50

捕捉核酸に 5' 末端で付着していない非付着第 1 鑄型とに変える、工程；

(f) 前記相補鎖を第 2 鑄型として使用し、前記相補鎖にハイブリダイズした第 2 シーケンシングプライマーにヌクレオチドを順次付加して第 2 配列決定反応を実施して第 2 領域の配列を決定する工程であって、前記第 2 シーケンシングプライマーが溶液中にあり、前記第 2 配列決定反応が、前記切断された二本鎖アンプリコンを、非付着第 1 鑄型を除去する条件にさらすことと、前記第 2 シーケンシングプライマーを前記相補鎖に存在するユニバーサル配列にハイブリダイズさせることを含む、工程。

#### 【請求項 2】

前記切断部位が、酵素的、化学的、または光化学的な切断を可能にし、任意で、前記切断部位が、ニッキングエンドヌクレアーゼによる切断のための部位である、請求項 1 に記載の方法。10

#### 【請求項 3】

前記切断工程が、前記切断部位に脱塩基部位を作り出すための少なくとも 1 つの酵素を含む組成物を前記アレイに接触させることを含み、かつ

切断が前記切断部位で起こり、任意で、前記捕捉核酸が、ウラシル塩基または 8 - オキソグアニン塩基を含む、請求項 2 に記載の方法。

#### 【請求項 4】

前記切断部位に脱塩基部位を作り出すための少なくとも 1 つの酵素が、ウラシル DNA グリコシラーゼと、DNA グリコシラーゼリアーゼエンドヌクレアーゼ V I I I または F p G グリコシラーゼから選択されるエンドヌクレアーゼとを含み、任意で、前記酵素での切削工程により、3' - リン酸で終結した前記切断部位の 3' 末端を得る、請求項 6 に記載の方法であって、前記アレイをホスファターゼと接触させて 3' - O H で終結した前記切断部位を得る工程をさらに含み、さらに任意で、前記第 2 配列決定反応が、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼの使用を含む、請求項 3 に記載の方法。20

#### 【請求項 5】

前記第 1 シーケンシングプライマーが、溶液中にあり、任意で、前記第 1 シーケンシングプライマーの 5' 末端が、プロックされている、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 6】

前記第 2 シーケンシングプライマーが、前記切断部位の 3' 末端を含み、任意で、前記第 2 配列決定反応が、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼの使用を含む、請求項 1 に記載の方法。30

#### 【請求項 7】

前記非付着第 1 鑄型を除去する工程が、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を含むエキソヌクレアーゼと前記アレイを接触させることを含み、任意で、前記エキソヌクレアーゼが、T 7 エキソヌクレアーゼである、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 8】

前記アレイ上の増幅部位の少なくとも 95 % が、異なる单一標的核酸の増幅に由来するクローン一本鎖アンプリコンを含む、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 9】

前記第 1 配列決定反応が、前記一本鎖アンプリコンの領域の配列を決定し、前記第 2 配列決定反応が、前記相補鎖の領域の配列を決定し、40

前記一本鎖アンプリコンの領域が、

i ) 前記相補鎖の領域に相補的であるか、または

ii ) 前記相補鎖の領域に相補的ではない、

請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 10】

(d) または (f) の間に組み込まれた前記ヌクレオチドが、完全機能性ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 11】

i ) 前記第 1 配列決定反応が、前記第 1 シーケンシングプライマーに所定の数のヌクレオ50

チドを順次付加することを含み、かつ／または

i i ) 前記第2配列決定反応が、前記第2シーケンシングプライマーに所定の数のヌクレオチドを順次付加することを含む、

請求項1に記載の方法。

**【請求項12】**

前記捕捉核酸、前記第1シーケンシングプライマー、または前記第2シーケンシングプライマーが、少なくとも1つの非ヌクレオチド化学部位、非天然ヌクレオチド、または非天然骨格連結を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項13】**

前記一本鎖アンプリコンが、2つのインデックスを含み、任意で、前記方法が、前記インデックスを配列決定する工程をさらに含み、さらに任意で、

i ) 第1インデックスが、(c)の後に配列決定され、かつ／または

i i ) 第2インデックスが、(f)の後に配列決定される、

請求項1に記載の方法。

**【請求項14】**

前記アレイが以下の工程：

(a) (i) 増幅部位のアレイと、

(ii) 複数の異なる標的核酸およびプライマーを含む溶液  
を含む増幅試薬を用意する工程であって、

前記増幅部位の各々が、前記溶液中の異なる標的核酸に存在するユニバーサル配列にハイブリダイズすることができる前記複数の捕捉核酸を含み、

前記溶液中の異なる標的核酸の数が、前記アレイの増幅部位の数を上回るものあり、

前記異なる標的核酸が、前記複数の増幅部位へ流体アクセスでき、

前記増幅部位の各々が、前記複数の異なる標的核酸のうちのいくつかの核酸を収容することが可能な容量を持つものである、工程；ならびに

(b) 前記増幅試薬を反応させて、前記溶液からの個々の標的核酸由来の二本鎖アンプリコンのクローン集団を各々が含む複数の増幅部位を作製する工程であって、

前記二本鎖アンプリコンが、その5'末端で捕捉核酸に付着している第1鎖と、前記増幅部位に付着していない第2鎖とを含み、

前記反応が、同時に

(i) 前記異なる標的核酸を平均輸送速度で前記増幅部位に輸送することと、

(ii) 前記増幅部位にある標的核酸を、前記平均輸送速度を上回る平均増幅速度で増幅させることを含む、工程

を含む方法によって作製される、請求項1に記載の方法であって、

任意で、

a) 前記方法が、前記二本鎖アンプリコンを、前記増幅部位に付着していない第2鎖を除去する条件にさらす工程をさらに含み、さらに任意で、

前記第2鎖を除去する条件が変性剤を含み、任意で、

前記変性剤がホルムアミドを含み、かつ／または

b) 前記溶液が分子クラウディング剤を含み、かつ／または

c) 前記プライマーが、各一本鎖アンプリコンに存在するユニバーサル配列にハイブリダイズする、

方法。

**【請求項15】**

増幅部位のアレイを含む組成物であって、

増幅部位が、複数のクローン二本鎖アンプリコンを含み、

各二本鎖アンプリコンが、5'末端で前記増幅部位の表面に付着しており、かつその骨格内に切断部を含む第1鎖と、前記増幅部位の表面に付着しておらず、かつ前記第1鎖のヌクレオチドに相補的にハイブリダイズしているヌクレオチドを含む第2鎖とを含み、

10

20

30

40

50

前記第1鎖の骨格内の切断部が、両側を前記第2鎖の相補的ヌクレオチドによって挟まれてあり、

前記骨格内の切断部が、付着している5'末端から5~50ヌクレオチドに位置している、組成物。

【請求項16】

増幅部位のアレイを含む組成物であって、

増幅部位が、複数のクローン二本鎖アンプリコンを含み、

各二本鎖アンプリコンが、5'末端で前記増幅部位の表面に付着しており、かつその骨格内に切断部を含む第1鎖と、前記増幅部位の表面に付着しておらず、かつ前記第1鎖のヌクレオチドに相補的でハイブリダイズしているヌクレオチドを含む第2鎖とを含み、

前記第1鎖の骨格内の切断部が、両側を前記第2鎖の相補的ヌクレオチドによって挟まれてあり、

前記第1鎖が、前記切断部の5'に位置しており、前記第2鎖にハイブリダイズしている少なくとも5つのヌクレオチドを含み、

任意で、前記骨格内の切断部が、付着している5'末端から5~50ヌクレオチドに位置している、

組成物。

【請求項17】

前記アレイ上の増幅部位の少なくとも95%が、クローン一本鎖アンプリコンを含む、  
請求項15または16に記載の組成物。

20

【請求項18】

前記骨格内の切断部が、以下：

i) 第1鎖内の切断部が、少なくとも1つの欠失したホスホジエステル結合を含むか、  
ii) 第1鎖内の切断部が、少なくとも1つの欠失した非天然骨格連結を含むか、または  
iii) 少なくとも1つの脱塩基部位  
を含む、請求項15または16に記載の組成物。

【請求項19】

前記第1鎖が、非天然骨格連結を含み、前記第2鎖が、前記第1鎖の全ヌクレオチドよりも少ないヌクレオチドに相補的である、請求項15または16に記載の組成物。

30

【請求項20】

前記第2鎖の5'末端が、5'プロックを含む、請求項5または16に記載の組成物。

30

40

50