

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-502811

(P2025-502811A)

(43)公表日 令和7年1月28日(2025.1.28)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z Z N A	4 B 0 2 9
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z	
		C 1 2 M	1/34	A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全96頁)					

(21)出願番号	特願2024-539661(P2024-539661)	(71)出願人	517192663
(86)(22)出願日	令和4年12月28日(2022.12.28)		ファウンデーション・メディシン・イン
(85)翻訳文提出日	令和6年8月6日(2024.8.6)		コーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2022/082476		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(87)国際公開番号	WO2023/129965		2 1 0, ボストン, サマー ストリート
(87)国際公開日	令和5年7月6日(2023.7.6)		4 0 0
(31)優先権主張番号	63/294,640	(74)代理人	110002077
(32)優先日	令和3年12月29日(2021.12.29)		園田・小林弁理士法人
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ワン, イェーション
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
	最終頁に続く		2 1 0, ボストン, サマー ストリート
			4 0 0, シー／オー ファウンデーション
			メディシン インコーポレイテッド
		(72)発明者	ランバート, ニコール ジャシнда
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 単一ワークフローにおける遺伝子情報及びエピジェネティック情報の検出

(57)【要約】

単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出することに関連する方法、並びにそれに関連する治療方法、使用、システム、及びコンピュータ可読記憶媒体が、本明細書に提供される。これらの方法は、例えば、単一ワークフローにおける、かつ／又は単一試料（例えば、DNA試料）からの、遺伝子バリエーション及びエピジェネティック修飾（例えば、メチル化レベル）の検出を可能にする。

【選択図】 図 1

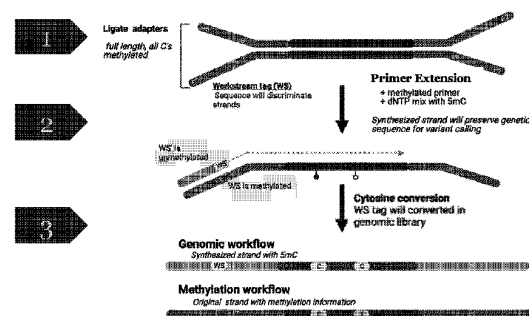


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

前記複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、(a) 前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で 1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第 1 の一本鎖 DNA 断片に対応する複数の第 1 の鎖及び前記第 1 の鎖に相補的である複数の第 2 の鎖を生成し、前記第 2 の鎖が、シトシン変換に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

10

非メチル化シトシンが前記第 1 の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の前記第 1 及び第 2 の鎖をシトシン変換処理に供することと、

前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記検出することが、配列決定によるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記配列決定が、次世代配列決定 (NGS) である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

20

前記検出することが、マイクロアレイ、定量 PCR (qPCR)、デジタル液滴 PCR (ddPCR)、又は分子反転プローブによるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記方法が、検出する前に、前記複数の第 1 の鎖及び／又は前記複数の第 2 の鎖を増幅に供することを更に含み、前記検出することが、前記複数の第 1 及び第 2 の鎖の少なくとも一部分、並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含み、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記複数の第 1 の鎖とではなく、前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、前記複数の第 2 の鎖を増幅に供することを含み、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記複数の第 2 の鎖とではなく、前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、前記複数の第 1 の鎖を増幅に供することを含み、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つ以上のプライマーが、前記第 1 の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、前記第 1 の鎖がシトシン変換を受けた後に、前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

40

前記 1 つ以上のプライマーが、前記第 1 の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記増幅が、シトシン変換後に生じる、請求項 5 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法が、検出する前に、前記複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含み、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記方法が、検出する前に、前記複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含み、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 13】

前記方法が、検出する前に、1つ以上の第1の鎖又はそれらの増幅産物を、1つ以上の第2の鎖又はそれらの増幅産物から分離することを含む、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項 14】

分離が、(a) 1つ以上のベイト分子を前記複数の第1及び2の鎖と組み合わせることであって、前記1つ以上のベイト分子が、前記第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は前記第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b) 前記核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、請求項13に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記1つ以上のベイト分子が、前記複数の第2の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、前記第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記分離が、前記シトシン変換処理後に生じ、前記1つ以上のベイト分子が、前記第1の鎖の1つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、前記第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記1つ以上のベイト分子が、前記複数の第1の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、前記第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、請求項14に記載の方法。

20

【請求項 18】

前記分離が、(a) 1つ以上の第1のベイト分子を前記複数の第1及び2の鎖と組み合わせることであって、前記1つ以上の第1のベイト分子が、前記第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第1の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b) 前記第1の核酸ハイブリッドを単離することと、(c) 1つ以上の第2のベイト分子を前記複数の第1及び2の鎖と組み合わせることであって、前記1つ以上の第2のベイト分子が、前記第2の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第2の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(d) 前記第2の核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、請求項13に記載の方法。

30

【請求項 19】

前記複数の第1及び2の鎖又はそれらの増幅産物が、一緒に検出される、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記複数の第1及び2の鎖又はそれらの増幅産物が、別々に検出される、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記方法が、(a) 前記第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、前記複数の第1の一本鎖DNA断片を2ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 22】

1つ以上の核酸アダプターを、前記第1の一本鎖DNA断片のうちの1つ以上に付着させることを更に含む、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

1つ以上の核酸アダプターを、前記第2の鎖のうちの1つ以上に付着させることを更に含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 24】

前記 1 つ以上の核酸アダプターが、ライゲーション、転位、テーリング、又は鑄型スッチングによって、前記第 1 の鎖又は前記第 2 の鎖に付着している、請求項 22 又は 23 に記載の方法。

【請求項 25】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

第 1 のアダプター核酸を、前記複数の前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分に付着させることと、

前記複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、(a) 前記第 1 のアダプター核酸の下流又は前記第 1 のアダプター核酸において、前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第 1 のアダプター核酸を有する前記第 1 の一本鎖 DNA 断片を含む複数の第 1 の鎖、及び前記第 1 の一本鎖 DNA 断片に相補的な第 2 の一本鎖 DNA 断片、及び前記第 1 のアダプター核酸に相補的な第 2 のアダプター核酸を含む複数の第 2 の鎖を生成し、前記第 2 の鎖が、シトシン変換に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

非メチル化シトシンが前記第 1 の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の第 1 及び第 2 の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後に、前記第 1 及び第 2 のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項 26】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分の 3' 末端に付着している、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分の 5' 末端に付着している、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 1 のアダプター核酸が、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、請求項 25 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 のアダプター核酸が、1 つ以上のメチル化シトシンを含み、前記プライマーが、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、請求項 25 ～ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

前記複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、(a) プライマーであって、(i) 前記第 1 の一本鎖 DNA 断片にアニールしない第 2 のアダプター核酸部分と、(ii) 前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第 2 のアダプター核酸に相補的な第 1 のアダプター核酸を有する前記第 1 の一本鎖 DNA 断片を含む複数の第 1 の鎖、並びに前記第 1 の一本鎖 DNA 断片に相補的な第 2 の一本鎖 DNA 断片、及び前記第 1 のアダプター核酸に非相補的な前記第 2 のアダプ

10

20

30

40

50

ター核酸を含む複数の第 2 の鎖を生成し、前記第 2 の鎖が、シトシン変換に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

非メチル化シトシンが前記第 1 の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の第 1 及び第 2 の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後に、前記第 1 及び第 2 のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項 3 1】

前記プライマーの前記第 2 のアダプター核酸部分が、前記第 1 の一本鎖 DNA 断片にアニールする前記プライマーの前記部分に対して 5' である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記プライマーが、プライマー伸長後に前記第 2 のアダプター核酸の一部になり、シトシン変換中に変換される、1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

前記複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、(a) プライマーであって、(i) 前記第 1 の一本鎖 DNA 断片にアニールしない非相補的 5' オーバーハングを含む、第 2 のアダプター核酸部分と、(i i) 前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び (c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第 1 の一本鎖 DNA 断片にアニールする前記第 2 のアダプター核酸部分の前記部分に相補的な第 1 のアダプター核酸を有する前記第 1 の一本鎖 DNA 断片を含む複数の第 1 の鎖、並びに前記第 1 の一本鎖 DNA 断片に相補的な第 2 の一本鎖 DNA 断片、及び前記第 2 のアダプター核酸を含む複数の第 2 の鎖を生成し、前記第 2 の鎖が、シトシン変換に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

非メチル化シトシンが前記第 1 の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の第 1 及び第 2 の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後に、前記第 1 及び第 2 のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項 3 4】

前記検出することが、配列決定によるものである、請求項 2 5 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記配列決定が、次世代配列決定 (NGS) である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記検出することが、マイクロアレイ、定量 PCR (qPCR)、デジタル液滴 PCR (ddPCR)、又は分子反転プローブによるものである、請求項 2 5 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記第 1 及び／又は第 2 のアダプター核酸に基づいて、前記第 1 及び第 2 の鎖からの配列情報を逆多重化することを更に含む、請求項 2 5 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記方法が、検出する前に、前記複数の第 1 の鎖及び／又は前記複数の第 2 の鎖を増幅

10

20

30

40

50

に供することを更に含み、前記検出することが、前記複数の第 1 及び第 2 の鎖の少なくとも一部分、並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含み、請求項 25 ～ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記複数の第 1 の鎖とではなく、前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、前記複数の第 2 の鎖を増幅に供することを含み、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分とアニールする前記 1 つ以上のプライマーが、前記第 2 のアダプター核酸の少なくとも一部分とアニールする、請求項 39 に記載の方法。

10

【請求項 41】

前記複数の第 2 の鎖とではなく、前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、前記複数の第 1 の鎖を増幅に供することを含み、請求項 38 ～ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする前記 1 つ以上のプライマーが、前記第 1 のアダプター核酸の少なくとも一部分とアニールする、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記 1 つ以上のプライマーは、前記第 1 の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、前記第 1 の鎖がシトシン変換を受けた後に、前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、請求項 41 に記載の方法。

20

【請求項 44】

前記 1 つ以上のプライマーは、前記第 1 の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、前記複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 45】

前記増幅が、シトシン変換後に生じる、請求項 38 ～ 44 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 46】

前記方法が、検出する前に、前記複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含み、請求項 25 ～ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記方法が、検出する前に、前記複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含み、請求項 25 ～ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

前記方法が、検出する前に、1 つ以上の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を、1 つ以上の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物から分離することを含み、請求項 46 又は 47 に記載の方法。

40

【請求項 49】

前記分離が、(a) 1 つ以上のベイト分子を前記複数の第 1 及び 2 の鎖と組み合わせることであって、前記 1 つ以上のベイト分子が、前記第 1 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は前記第 2 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b) 前記核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記 1 つ以上のベイト分子が、前記複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、前記第 1 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、請求項 49 に記載の方法。

50

【請求項 5 1】

前記 1 つ以上のベイト分子が、前記第 1 のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記分離が、前記シトシン変換処理後に生じ、前記 1 つ以上のベイト分子は、前記第 1 の鎖の 1 つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、前記第 1 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 1 つ以上のベイト分子が、前記複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、前記第 2 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、請求項 4 9 に記載の方法。

10

【請求項 5 4】

前記 1 つ以上のベイト分子が、前記第 2 のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

分離が、(a) 1 つ以上の第 1 のベイト分子を前記複数の第 1 及び 2 の鎖と組み合わせることであって、前記 1 つ以上の第 1 のベイト分子が、前記第 1 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第 1 の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b) 前記第 1 の核酸ハイブリッドを単離することと、(c) 1 つ以上の第 2 のベイト分子を前記複数の第 1 及び 2 の鎖と組み合わせることであって、前記 1 つ以上の第 2 のベイト分子が、前記第 2 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第 2 の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(d) 前記第 2 の核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

20

【請求項 5 6】

前記 1 つ以上の第 1 のベイト分子が、前記第 1 のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズし、かつ／又は前記 1 つ以上の第 2 のベイト分子が、前記第 2 のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記複数の第 1 及び 2 の鎖又はそれらの増幅産物が、一緒に検出される、請求項 2 5 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5 8】

前記複数の第 1 及び 2 の鎖又はそれらの増幅産物が、別々に検出される、請求項 2 5 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記方法が、(a) 前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び (c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、前記複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を 2 ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む、請求項 2 5 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 0】

前記複数の第 1 の鎖が、前記複数の第 2 の鎖とは異なる配列決定深度で配列決定される、請求項 1、2、5 ～ 3 4、及び 3 7 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記複数の第 2 の鎖が、前記複数の第 1 の鎖の配列決定深度よりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、又は少なくとも 1000 倍高い配列決定深度で配列決定される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記複数の第 1 の鎖が、前記複数の第 2 の鎖の配列決定深度よりも少なくとも 2 倍、少

50

なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される、請求項60に記載の方法。

【請求項63】

プライマー伸長後、前記複数の第1の鎖が、複数の二本鎖核酸中の前記複数の第2の鎖とハイブリダイズされる、請求項1～62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

前記プライマー伸長のラウンド前に、複数の二本鎖DNA断片を変性させて、前記複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することを更に含む、請求項1～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

試料から前記複数の一本鎖又は二本鎖DNA断片を得ることを更に含む、請求項1～64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

個体から前記試料を得ることを更に含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記個体が、がんを有するか、がんを有する疑いがあるか、又はがんの治療を受けている、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記個体が、がん又はがんの再発についてスクリーニングされている、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

前記試料が、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、請求項65～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

前記試料が、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、請求項65～69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

前記試料が、組織生検試料、液体生検試料、又は正常対照を含む、請求項65～70のいずれか一項に記載の方法。

【請求項72】

前記試料が、腫瘍生検、腫瘍標本、又は循環腫瘍細胞由来である、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

前記試料が、液体生検試料であり、かつ血液、血漿、血清、脳脊髄液、痰、便、尿、又は唾液を含む、請求項65～70のいずれか一項に記載の方法。

【請求項74】

シトシン変換に抵抗性がある前記シトシン類似体が、5-メチルシトシン(5mC)、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-カルボキシルシトシン(5caC)、5-ホルミルシトシン、5-(ベータ-D-グルコシルメチル)シトシン(5gmC)、5-エチルdCTP、5-メチルdCTP、5-フルオロdCTP、5-ブromo dCTP、5-ヨードdCTP、5-クロロdCTP、5-トリフルオロメチルdCTP、又は5-アザdCTPを含む、請求項1～73のいずれか一項に記載の方法。

【請求項75】

前記シトシン変換が、バイサルファイト処理、TET補助バイサルファイト処理、酸化バイサルファイト処理、APOBEC、又はTET/ベータ-グルコシルトランスフェラーゼ補助APOBEC処理によるものである、請求項1～74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項76】

非メチル化シトシンが前記第1の鎖内に存在する場合、少なくとも80%、少なくとも

10

20

30

40

50

85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%が、前記シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、請求項1～75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項77】

非メチル化シトシンが前記第1の鎖内に存在する場合、約80%～約97%が、前記シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、請求項1～76のいずれか一項に記載の方法。

【請求項78】

前記第2の鎖のシトシン類似体の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、最大2%、最大1%、又は最大0.5%が、前記シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、請求項1～77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項79】

前記第2の鎖のシトシン類似体の約0.5%～約5%が、前記シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、請求項1～78のいずれか一項に記載の方法。

【請求項80】

前記核酸ポリメラーゼが、前記シトシン類似体を核酸に組み込むことが可能である、請求項1～79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項81】

プライマー伸長前に、前記複数の第1の一本鎖DNA断片を末端修復に供することを更に含む、請求項1～80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項82】

前記複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物を配列決定した後に、前記複数の前記第2の鎖の配列を前記複数の前記第1の鎖の配列と比較することを更に含む、請求項1、2、5～34、及び37～81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項83】

前記複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物を配列決定した後に、前記複数の前記第1の鎖及び／又は前記第2の鎖の配列を参照ゲノム配列と比較することを更に含む、請求項1、2、5～34、及び37～81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項84】

個体においてがんを検出する方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項1～83のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異は、前記個体をがんを有するとして特定する、方法。

【請求項85】

がんの治療を受けたことがあるか、又はがんの治療を受けている個体において、微小残存病変を検出する方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項1～83のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異は、前記個体を微小残存病変を有するとして、又はその欠如を特定する、方法。

【請求項86】

がんを有する疑いがある個体をスクリーニングする方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項1～83のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異は、前記個体をがんを有する可能性があるとして特定する、方法。

【請求項87】

がんを有する個体の予後を決定する方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項1～83のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異が、前記個体の前記予後を少なくとも部分的に決定する、方法。

【請求項88】

がんを有する個体の生存期間を予測する方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項 1～83 のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異が、前記個体の前記生存期間を少なくとも部分的に予測する、方法。

【請求項 89】

がんを有する個体の腫瘍負荷を予測又は検出する方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項 1～83 のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異が、前記個体の前記腫瘍負荷を少なくとも部分的に予測又は検出する、方法。

10

【請求項 90】

がんを有する個体の治療に対する応答性を予測する方法であって、前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項 1～83 のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異が、治療に対する前記個体の応答性を予測するために少なくとも部分的に使用される、方法。

【請求項 91】

がんの治療を受けている個体の応答を監視する方法であって、

(a) がんを有する個体に治療を施すことと、

20

(b) 前記個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、請求項 1～83 のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することであって、前記試料中で検出された前記メチル化レベル及び／又は体細胞変異が、前記治療に対する応答を監視するために少なくとも部分的に使用される、検出することと、を含む、方法。

【請求項 92】

個体においてがんを監視する方法であって、

(a) 前記個体から得られた複数の核酸を含む第 1 の試料中で、請求項 1～83 のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することと、

(b) 前記個体から得られた複数の核酸を含む第 2 の試料中で、請求項 1～83 のいずれか一項に記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することと、

30

(c) 前記第 1 の試料と前記第 2 の試料との間のメチル化レベル及び／又は体細胞変異の差を決定し、それによって前記個体において前記がんを監視することと、を含む、方法。

【請求項 93】

システムであって、

1 つ以上のプロセッサと、

1 つ以上のコンピュータプログラム命令を記憶するように構成されたメモリと、を備え、前記 1 つ以上のコンピュータプログラム命令が、前記 1 つ以上のプロセッサによって実行された場合、

1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物の第 1 の複数の配列リードを得（前記第 1 の核酸分子は、非メチル化シトシンが前記第 1 の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている）、

40

1 つ以上の第 2 の核酸分子又はそれらの増幅産物の第 2 の複数の配列リードを得（前記第 2 の核酸分子が、シトシン変換前に前記第 1 の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む）、

シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された 1 つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、前記第 1 の複数の配列リードを分析し、かつ

配列情報について、前記第 2 の複数の配列リードを分析するように、構成されている、システム。

【請求項 94】

50

前記 1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 1 のアダプター核酸配列を更に含み、前記 1 つ以上のコンピュータプログラム命令が、前記 1 つ以上のプロセッサによって実行された場合、前記第 1 の複数の配列リード中の前記第 1 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、前記第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 95】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 3' 末端に付着している、請求項 94 に記載のシステム。

【請求項 96】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5' 末端に付着している、請求項 94 に記載のシステム。

【請求項 97】

前記第 1 のアダプター核酸が、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、請求項 94 ～ 96 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 98】

前記第 1 のアダプター核酸が、1 つ以上のメチル化シトシンを含む、請求項 94 ～ 96 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 99】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5' 末端と 3' 末端との間にある、請求項 94 に記載のシステム。

【請求項 100】

前記 1 つ以上の第 2 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 2 のアダプター核酸配列を更に含み、前記 1 つ以上のコンピュータプログラム命令が、前記 1 つ以上のプロセッサによって実行された場合、前記第 2 の複数の配列リード中の前記第 2 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、前記第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている、請求項 93 ～ 99 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 101】

前記第 2 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 3' 末端に付着している、請求項 100 に記載のシステム。

【請求項 102】

前記第 2 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 5' 末端に付着している、請求項 100 に記載のシステム。

【請求項 103】

前記第 2 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 5' 末端と 3' 末端との間にある、請求項 100 に記載のシステム。

【請求項 104】

前記第 1 の複数の配列リードが、前記第 2 の複数の配列リードよりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、又は少なくとも 1000 倍豊富である、請求項 94 ～ 103 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 105】

前記第 2 の複数の配列リードが、前記第 1 の複数の配列リードよりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、又は少なくとも 1000 倍豊富である、請求項 94 ～ 103 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 106】

前記第 1 の核酸分子が、シトシン変換前に試料から得られる、請求項 94 ～ 105 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 107】

前記試料が、がんを有するか、又はがんを有する疑いがある個体由来である、請求項 1

10

20

30

40

50

06に記載のシステム。

【請求項108】

前記試料が、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、請求項107に記載のシステム。

【請求項109】

前記試料が、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、請求項107又は108に記載のシステム。

【請求項110】

前記第1及び／又は第2の複数の配列リードが、配列決定によって得られ、任意選択的に、前記配列決定が、超並列配列決定(MPS)技術、全ゲノム配列決定(WGS)、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサンガー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、前記超並列配列決定技術が、次世代配列決定(NGS)を含む、請求項106～109のいずれか一項に記載のシステム。

10

【請求項111】

前記1つ以上のプログラム命令が、前記1つ以上のプロセッサによって実行された場合、前記分析に少なくとも部分的に基づいて、前記試料についての分子プロファイルを生成するように更に構成されている、請求項106～110のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項112】

治療が、前記分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて、個体に施される、請求項111に記載のシステム。

20

【請求項113】

前記分子プロファイルが、包括的ゲノムプロファイリング(CGP)試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む、請求項111又は112に記載のシステム。

【請求項114】

前記分子プロファイルが、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む、請求項111～113のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項115】

前記1つ以上のコンピュータプログラム命令が、前記1つ以上のプロセッサによって実行された場合、前記第2の複数の配列リードの1つの配列リードを前記第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較するように更に構成されている、請求項94～114のいずれか一項に記載のシステム。

30

【請求項116】

前記1つ以上のコンピュータプログラム命令が、前記1つ以上のプロセッサによって実行された場合、前記第1及び／又は第2の複数の配列リードの1つ以上の配列リードを参照ゲノム配列と比較するように更に構成されている、請求項94～114のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項117】

方法を実施するための1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行可能な1つ以上のプログラムを含む非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、

40

1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物の第1の複数の配列リードを得ることであって、前記第1の核酸分子は、非メチル化シトシンが前記第1の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている、得ることと、

1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物の第2の複数の配列リードを得ることであって、前記第2の核酸分子が、シトシン変換前に前記第1の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、得ることと、

シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された1つ以上のシトシンにおけるメチル化

50

の存在又は不在について、前記第 1 の複数の配列リードを分析することと、

配列情報について、前記第 2 の複数の配列リードを分析することと、を含む、非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 1 8】

前記 1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 1 のアダプター核酸配列を更に含み、前記方法が、前記第 1 の複数の配列リード中の前記第 1 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、前記第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む、請求項 1 1 7 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 1 9】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 3 ' 末端に付着している、請求項 1 1 8 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。 10

【請求項 1 2 0】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端に付着している、請求項 1 1 8 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 2 1】

前記第 1 のアダプター核酸が、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、請求項 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 2 2】

前記第 1 のアダプター核酸が、1 つ以上のメチル化シトシンを含む、請求項 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。 20

【請求項 1 2 3】

前記第 1 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端と 3 ' 末端との間にある、請求項 1 1 8 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 2 4】

前記 1 つ以上の第 2 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 2 のアダプター核酸配列を更に含み、前記方法が、前記第 2 の複数の配列リード中の前記第 2 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、前記第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む、請求項 1 1 7 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。 30

【請求項 1 2 5】

前記第 2 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 3 ' 末端に付着している、請求項 1 2 4 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 2 6】

前記第 2 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端に付着している、請求項 1 2 4 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 2 7】

前記第 2 のアダプター核酸が、前記複数の前記第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端と 3 ' 末端との間にある、請求項 1 2 4 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。 40

【請求項 1 2 8】

前記第 1 の複数の配列リードが、前記第 2 の複数の配列リードよりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、又は少なくとも 1000 倍豊富である、請求項 1 1 7 ～ 1 2 7 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 2 9】

前記第 2 の複数の配列リードが、前記第 1 の複数の配列リードよりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 50 倍、少なくとも 100 倍、又は少なくとも 1000 倍豊富である、請求項 1 1 7 ～ 1 2 7 のいずれか一項に 50

記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 0】

前記第 1 の核酸分子が、シトシン変換前に試料から得られる、請求項 1 1 7 ~ 1 2 9 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 1】

前記試料が、がんを有するか、又はがんを有する疑いがある個体由来である、請求項 1 3 0 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 2】

前記試料が、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、請求項 1 3 1 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 3】

前記試料が、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、請求項 1 3 1 又は 1 3 2 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 4】

前記第 1 及び／又は第 2 の複数の配列リードが、配列決定によって得られ、任意選択的に、前記配列決定が、超並列配列決定（MPS）技術、全ゲノム配列決定（WGS）、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサングー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、前記超並列配列決定技術が、次世代配列決定（NGS）を含む、請求項 1 3 0 ~ 1 3 3 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 5】

前記方法が、前記分析に少なくとも部分的に基づいて、前記試料についての分子プロファイルを生成することを更に含む、請求項 1 3 0 ~ 1 3 4 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 6】

治療が、前記分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて、個体に施される、請求項 1 3 5 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 7】

前記分子プロファイルが、包括的ゲノムプロファイリング（CGP）試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む、請求項 1 3 5 又は 1 3 6 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 8】

前記分子プロファイルが、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む、請求項 1 3 5 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 3 9】

前記方法が、前記第 2 の複数の配列リードの 1 つの配列リードを前記第 1 の複数の配列リードの 1 つの配列リードと比較することを更に含む、請求項 1 1 7 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 4 0】

前記方法が、前記第 1 及び／又は第 2 の複数の配列リードの 1 つ以上の配列リードを参照ゲノム配列と比較することを更に含む、請求項 1 1 7 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 4 1】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

前記複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、（a）前記第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で 1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第 1 の一本鎖 D

10

20

30

40

50

N A断片に対応する複数の第1の鎖及び前記第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、前記第2の鎖が、T E T補助ピリジンボラン処理に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

任意のメチル化シトシンが前記第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の前記第1及び第2の鎖をT E T補助ピリジンボラン処理に供することと、

前記複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項142】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

第1のアダプター核酸を、前記複数の前記第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、

前記複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)前記第1のアダプター核酸の下流又は前記第1のアダプター核酸において、前記第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)T E T補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第1のアダプター核酸を有する前記第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び前記第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び前記第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、前記第2の鎖が、T E T補助ピリジンボラン処理に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

任意のメチル化シトシンが前記第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の第1及び第2の鎖をT E T補助ピリジンボラン処理に供することであって、シトシン変換後に、前記第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

前記複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項143】

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

前記複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)前記第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)前記第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)T E T補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第1の一本鎖DNA断片にアニールする前記第2のアダプター核酸部分の前記部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する前記第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに前記第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び前記第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、前記第2の鎖が、T E T補助ピリジンボラン処理に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

任意のメチル化シトシンが前記第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の前記第1及び第2の鎖をT E T補助ピリジンボラン処理に供することと、

前記複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

【請求項144】

10

20

30

40

50

単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

前記複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)前記第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)前記第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、前記第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する前記第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに前記第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び前記第1のアダプター核酸に非相補的な前記第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、前記第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性がある前記シトシン類似体を含む、供することと、

10

任意のメチル化シトシンが前記第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、前記複数の前記第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することであって、シトシン変換後に、前記第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

前記複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び前記複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年12月29日に出願された米国仮特許出願第63／294,640号の利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

電子配列表の参照

電子配列表(197102007240seqlist.xml、サイズ:4,557バイト、及び作成日:2022年12月22日)の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0003】

単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出することに関連する方法、並びにそれに関連する診断、予後、監視、スクリーニング、及び治療の方法、システム、及びコンピュータ可読記憶媒体が、本明細書に提供される。

【背景技術】

【0004】

遺伝子変異は、がんの特徴である。一方で、異常なDNAメチル化は、発がんにおいて早期に生じるエピジェネティック変化の広汎な形態である。遺伝子変化分析のみを使用するよりも、精密医療における新しいアプローチは、複数の腫瘍由来のシグナルを特性評価及び検出して、患者の疾患状態の全体的な実態を表そうとする。このマルチオミックスアプローチを取って、腫瘍の遺伝子、転写、及びエピジェネティックプロファイルで構成された高解像度腫瘍分子表現型が、決定され得る。

40

【0005】

マルチオミックスシグナルを得ることは、典型的には、同じ投入材料に対して複数のアッセイを実行することを必要とする。しかしながら、限られた投入材料、並びに複数のアッセイを実行する高い費用及び複雑さは、マルチオミックスアプローチを法外なものにする可能性がある。液体生検の場合、限られたcfDNAの量は、実施されるアッセイの数を制限し得る。遺伝子シグナル及びエピジェネティックシグナルの同時の特定は、例えば、液体生検又は他の試料中のがん検出の感度を高め得る。診断現場において、情報出力を最大化する単純化されたワークフローが、必要である。

50

【0006】

シトシンメチル化を検出するために使用される伝統的なアプローチは、ゲノムバリエントコールを不利な状態のままにする。例えば、標準的なメチル化検出方法において、DNAの化学的又は酵素的処理は、シトシン塩基の大部分をウラシル塩基に変換し、シトシン変異コールを、エラーを起こしやすいものにする。このプロセスにおいて、メチル化シトシン塩基のみが変化から保護される。したがって、研究者らは、患者の遺伝子配列バリエント又はメチル化バリエントを主要バイオマーカーとして評価するかどうかを判断しなければならない。

【0007】

エピジェネティック変化及び遺伝子変化の両方におけるがん関連の変化を分析する重要性により、単一ワークフローにおいて遺伝子（例えば、配列変化）情報及びエピジェネティック（例えば、メチル化）情報の両方の統合的かつ効率的な分析を提供する、改善された方法及びシステムに対する必要性が依然としてある。

【0008】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。

【発明の概要】

【0009】

本開示は、とりわけ、単一ワークフローにおいて遺伝子配列情報及びエピジェネティック配列情報を検出する方法を提供する。これらは、単一ワークフローにおけるメチル化及び遺伝子バリエントの同時の塩基レベルの検出を提供する方法を実証している、本明細書に開示されるデータに少なくとも部分的に基づいている。これらは、例えば、配列バリエント及び／又はメチル化バリエントの検出、並びにがんの検出、監視、スクリーニング、診断、及び／若しくは予後、又はがん治療に対する応答で使用され得る。

【0010】

本開示は、単一ワークフローにおける遺伝子変化及びエピジェネティック変化の両方の同時検出を可能にする様々な技術を記載する。標準的なメチル化方法において、DNAの化学的又は酵素的処理は、シトシンの大部分をウラシルに変換し、シトシン変異コールを、エラーを起こしやすいものにする。メチル化シトシンのみが、変換から保護される。本開示の方法において、元の分子の変換抵抗性コピーが、遺伝子情報を維持するために作製される。これは、例えば、5-メチルシトシン（5mC）、又は使用される特定の変換化学に抵抗性がある別のシトシン類似体を使用して、元のDNA分子をコピーするために、プライマー伸長を使用することによって達成される。元のDNA分子は、メチル化情報を維持し、保護された鎖は、遺伝子情報を維持し、遺伝子バリエントをコールする可能性を保存する。他の能力は、NGSインデックス配列を使用して、試料だけではなく、鎖の様式（メチル又は遺伝子）も特定する可能性を含む。加えて、メチル情報及び遺伝子情報は、単一分子レベルでマルチオミックスグネチャを理解するためにペアリングされ得る。

【0011】

一態様では、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1

10

20

30

40

50

の一本鎖DNA断片を、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することによって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、複数の第1の鎖及び／又は複数の第2の鎖を増幅に供することを更に含み、検出することは、複数の第1及び第2の鎖の少なくとも一部分、並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の鎖とではなく、複数の第2の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第2の鎖を増幅に供することを含む。

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第2の鎖とではなく、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第1の鎖を増幅に供することを含む。

いくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーは、第1の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、第1の鎖がシトシン変換を受けた後に、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーは、第1の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、増幅は、シトシン変換後に生じる。

【0013】

いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、複数の第2の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、複数の第1の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、1つ以上の第1の鎖又はそれらの増幅産物を、1つ以上の第2の鎖又はそれらの増幅産物から分離することを含む。いくつかの実施形態では、分離は、(a)1つ以上のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることによって、1つ以上のベイト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b)核酸ハイブリッドを単離することと、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、複数の第2の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、分離は、シトシン変換処理後に生じ、1つ以上のベイト分子は、第1の鎖の1つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、複数の第1の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、分離は、(a)1つ以上の第1のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることによって、1つ以上の第1のベイト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第1の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、第1の核酸ハイブリッドを単離することと、1つ以上の第2のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることによって、1つ以上の第2のベイト分子が、第2の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第2の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、第2の核酸ハイブリッドを単離することと、を含む。いくつかの実施形態では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、一緒に検出される。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、別々に検出される。いくつかの実施形態では、方法は、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、複数の第1の一本鎖DNA断片を2ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、1つ以上の核酸アダプターを、第1の一本鎖DNA断片のうちの1つ以上に付着させることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、1つ以上の核酸アダプターを、第2の鎖のうちの1つ以上に付着させることを更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の核酸アダプターは、ライゲーション、転位、テーリング、又は鑄型スライディングによって、第1又は第2の鎖に付着している。

10

【0014】

一態様では、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

20

30

40

【0015】

いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分の3'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分の5'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、1つ以上のメチル化シトシンを含み、プライマーは、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。

【0016】

50

一態様では、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

20

30

【0017】

いくつかの実施形態では、プライマーの第2のアダプター核酸部分は、第1の一本鎖DNA断片にアニールするプライマーの部分に対して5'である。いくつかの実施形態では、プライマーは、プライマー伸長後に第2のアダプター核酸の一部になり、シトシン変換中に変換される、1つ以上の非メチル化シトシンを含む。

【0018】

一態様では、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖

40

50

の少なくとも一部分を検出することと、を含む。一態様では、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、方法は、第1及び／又は第2のアダプター核酸に基づいて、第1及び第2の鎖からの配列情報を逆多重化することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、複数の第1の鎖及び／又は複数の第2の鎖を増幅に供することを更に含み、検出することは、複数の第1及び第2の鎖の少なくとも一部分、並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の鎖とではなく、複数の第2の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第2の鎖を増幅に供することを含む。いくつかの実施形態では、複数の第2の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーは、第2のアダプター核酸の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第2の鎖とではなく、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第1の鎖を増幅に供することを含む。いくつかの実施形態では、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーは、第1のアダプター核酸の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーは、第1の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、第1の鎖がシトシン変換を受けた後に、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーは、第1の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、複数の第2の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、複数の第1の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、検出する前に、1つ以上の第1の鎖又はそれらの増幅産物を、1つ以上の第2の鎖又はそれらの増幅産物から分離することを含む。いくつかの実施形態では、分離は、(a)1つ以上のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることであって、1つ以上のベイト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b)核酸ハイブリッドを単離することと、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、複数の第2の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、第1のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、分離は、シトシン変換処理後に生じ、1つ以上のベイト分子は、第1の鎖の1つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、複数の第1の鎖又はそれらの増幅産物とで

20

30

40

50

はなく、第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、第2のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、分離は、1つ以上の第1のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることであって、1つ以上の第1のベイト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第1の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、第1の核酸ハイブリッドを単離することと、1つ以上の第2のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることであって、1つ以上の第2のベイト分子が、第2の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第2の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、第2の核酸ハイブリッドを単離することと、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の第1のベイト分子は、第1のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズし、かつ／又は1つ以上の第2のベイト分子は、第2のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、一緒に検出される。いくつかの実施形態では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、別々に検出される。いくつかの実施形態では、方法は、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、複数の第1の一本鎖DNA断片を2ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む。

10

20

【0020】

本明細書に記載される実施形態のいずれかに従ったいくつかの実施形態では、検出することは、配列決定(例えば、NGS)、マイクロアレイ、定量PCR(qPCR)、デジタル液滴PCR(ddPCR)、又は分子反転プローブによるものである。いくつかの実施形態では、複数の第1の鎖は、複数の第2の鎖とは異なる配列決定深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、複数の第2の鎖は、複数の第1の鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、複数の第1の鎖は、複数の第2の鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、プライマー伸長後、複数の第1の鎖は、複数の二本鎖核酸中の複数の第2の鎖とハイブリダイズされる。いくつかの実施形態では、方法は、プライマー伸長のラウンド前に、複数の二本鎖DNA断片を変性させて、複数の一本鎖DNA断片を提供することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、試料から複数の一本鎖又は二本鎖DNA断片を得ることを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、個体から試料を得ることを更に含む。いくつかの実施形態では、個体は、がんを有するか、がんを有する疑いがあるか、又はがんの治療を受けている。いくつかの実施形態では、個体は、がん又はがんの再発についてスクリーニングされている。いくつかの実施形態では、試料は、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む。いくつかの実施形態では、試料は、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む。いくつかの実施形態では、試料が、組織生検試料、液体生検試料、又は正常対照を含む。いくつかの実施形態では、試料は、腫瘍生検、腫瘍標本、又は循環腫瘍細胞由来である。いくつかの実施形態では、試料は、液体生検試料であり、かつ血液、血漿、血清、脳脊髄液、痰、便、尿、又は唾液を含む。いくつかの実施形態では、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体は、5-メチルシトシン(5mC)、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-カルボキシルシトシン(5caC)、5-ホルミルシトシン、5-(ベーターD-グルコシルメチル)シトシン(5gmC)、5-エチルdCTP、5-メチルdCTP、5-フルオロdCTP、5-ブromo dCTP、5-ヨードdCTP、5-クロロdCTP、5-トリフルオロメチルdCTP、又は5-アザdCTPを含む。いくつかの実施形態では、シトシン変換は、バイサルファイト処理、TET補助バイサルファイト処理、酸化バイサルファイト処理、A

30

40

50

P O B E C、又はT E T / ベーターゲットグコシルトランスフェラーゼ補助A P O B E C 処理によるものである。いくつかの実施形態では、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。いくつかの実施形態では、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、約80%~約97%が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。いくつかの実施形態では、第2の鎖のシトシン類似体の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、最大2%、最大1%、又は最大0.5%が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。いくつかの実施形態では、第2の鎖のシトシン類似体の約0.5%~約5%が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。いくつかの実施形態では、核酸ポリメラーゼは、シトシン類似体を核酸組み込むことが可能である。いくつかの実施形態では、方法は、プライマー伸長前に、複数の第1の一本鎖DNA断片を末端修復に供することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物を配列決定した後に、複数の第2の鎖の配列を複数の第1の鎖の配列と比較することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物を配列決定した後に、複数の第1及び／又は第2の鎖の配列を参照ゲノム配列と比較することを更に含む。

10

【0021】

一態様では、個体においてがんを検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、個体をがんを有するとして特定する

20

【0022】

一態様では、がんの治療を受けたことがあるか、又はがんの治療を受けている個体において、微小残存病変を検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、個体を微小残存病変を有するとして、又はその欠如を特定する。

【0023】

一態様では、がんを有する疑いがある個体をスクリーニングする方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、個体をがんを有する可能性があると特定する。

30

【0024】

一態様では、がんを有する個体の予後を決定する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、個体の予後を少なくとも部分的に決定する。

【0025】

一態様では、がんを有する個体の生存期間を予測する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、個体の生存期間を少なくとも部分的に予測する。

40

【0026】

一態様では、がんを有する個体の腫瘍負荷を予測又は検出する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、個体の腫瘍負荷を少なくとも部分

50

的に予測又は検出する。

【0027】

一態様では、がんを有する個体の治療に対する応答性を予測する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、治療に対する個体の応答性を予測するために少なくとも部分的に使用される。

【0028】

一態様では、がんの治療を受けている個体の応答を監視する方法が、本明細書に提供され、方法は、がんを有する個体に治療を施すことと、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異は、治療に対する応答を監視するために少なくとも部分的に使用される。

【0029】

一態様では、個体においてがんを監視する方法が、本明細書に提供され、方法は、個体から得られた複数の核酸を含む第1の試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することと、個体から得られた複数の核酸を含む第2の試料中で、上記の実施形態のいずれか1つの方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することと、第1の試料と第2の試料との間のメチル化レベル及び／又は体細胞変異の差を決定し、それによって個体においてがんを監視することと、を含む。

【0030】

一態様では、1つ以上のプロセッサと、1つ以上のコンピュータプログラム命令を記憶するように構成されたメモリと、を備えるシステムが、本明細書に提供され、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、上記の実施形態のいずれか1つに従った方法を実施するように構成されている。一態様では、1つ以上のプロセッサと、1つ以上のコンピュータプログラム命令を記憶するように構成されたメモリと、を備えるシステムが、本明細書に提供され、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物の第1の複数の配列リードを得（第1の核酸分子は、非メチル化シトシンが第1の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている）、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物の第2の複数の配列リードを得（第2の核酸分子が、シトシン変換前に第1の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む）、シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された1つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第1の複数の配列リードを分析し、かつ配列情報について、第2の複数の配列リードを分析するように構成されている。

【0031】

いくつかの実施形態では、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第1のアダプター核酸配列を更に含み、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第1の複数の配列リード中の第1のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の核酸分子の少なくとも一部分の3'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、1つ以上のメチル化シトシンを含み、プライマーは、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端と3'末端との間にある。

いくつかの実施形態では、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第2のアダプター核酸配列を更に含み、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第2の複数の配列リード中の第2のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、第2のアダプター核酸は、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の3'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第2のアダプター核酸は、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第2のアダプター核酸は、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端と3'末端との間にある。いくつかの実施形態では、第1の複数の配列リードは、第2の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第2の複数の配列リードは、第1の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第1の核酸分子は、シトシン変換前に試料から得られる。いくつかの実施形態では、試料は、がんを有するか、又はがんを有する疑いがある個体由来である。いくつかの実施形態では、試料は、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む。いくつかの実施形態では、試料は、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む。いくつかの実施形態では、第1及び／又は第2の複数の配列リードは、配列決定によって得られ、任意選択的に、配列決定は、超並列配列決定(MPS)技術、全ゲノム配列決定(WGS)、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサンガー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、超並列配列決定技術は、次世代配列決定(NGS)を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、分析に少なくとも部分的に基づいて、試料についての分子プロファイルを生成するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、個体は、分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて治療が施される。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、包括的ゲノムプロファイリング(CGP)試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第2の複数の配列リードの1つの配列リードを第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第1及び／又は第2の複数の配列リードの1つ以上の配列リードを参照ゲノム配列と比較するように更に構成されている。

10

20

30

40

50

【0032】

一態様では、上記の実施形態のいずれか1つに従った方法を実施するための1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行可能な1つ以上のプログラムを含む非一時的コンピュータ可読記憶媒体が、本明細書に提供される。一態様では、方法を実施するための1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行可能な1つ以上のプログラムを含む非一時的コンピュータ可読記憶媒体が、本明細書に提供され、方法は、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物の第1の複数の配列リードを得ることであって、第1の核酸分子は、非メチル化シトシンが第1の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている、得ることと、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物の第2の複数の配列リードを得ることであって、第2の核酸分子が、シトシン変換前に第1の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、得ることと、シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された1つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第1の複数の配列リードを分析することと、配列情報について、第2の複数の配列リードを分析することと、を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第1のアダプター核酸配列を更に含み、方法は、第1の複数の配列リード中の第1のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の核酸分子の少なくとも一部分の3'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、1つ以上のメチル化シトシンを含み、プライマーは、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第2のアダプター核酸配列を更に含み、方法は、第2の複数の配列リード中の第2のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む。いくつかの実施形態では、第2のアダプター核酸は、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の3'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第2のアダプター核酸は、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の核酸分子の少なくとも一部分の5'末端と3'末端との間にある。いくつかの実施形態では、第1の複数の配列リードは、第2の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第2の複数の配列リードは、第1の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第1の核酸分子は、シトシン変換前に試料から得られる。いくつかの実施形態では、試料は、がんを有するか、又はがんを有する疑いがある個体由来である。いくつかの実施形態では、試料は、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む。いくつかの実施形態では、試料は、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む。いくつかの実施形態では、第1及び／又は第2の複数の配列リードは、配列決定によって得られ、任意選択的に、配列決定は、超並列配列決定(MPS)技術、全ゲノム配列決定(WGS)、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサンガー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、超並列配列決定技術は、次世代配列決定(NGS)を含む。いくつかの実施形態では、方法は、分析に少なくとも部分的に基づいて、試料についての分子プロファイルを生成することを更に含む。いくつかの実施形態では、個体は、分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて治療が施される。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、包括的ゲノムプロファイリング(CGP)試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、第2の複数の配列リードの1つの配列リードを第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1及び／又は第2の複数の配列リードの1つの配列リードを参照ゲノム配列と比較することを更に含む。

【0034】

本明細書に記載の様々な実施形態の特性の1つ、いくつか、又は全てを組み合わせ、本発明の他の実施形態を形成することができることを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者に明らかになるであろう。本発明のこれら及び他の実施形態は、以下の詳細な説明によって更に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】いくつかの実施形態に従った、ゲノム鎖及びメチル化鎖を生成するための例示的

な単一ワークフローアッセイを例解する。

【図 2】いくつかの実施形態に従った、単一ワークフローアッセイにおいてゲノム鎖及びメチル化鎖を標識化及び逆多重化するための例示的な戦略を例解する。示される配列は、C T G A T C G T G G T T（配列番号 3、上）及び C T G A T C G T G G C C（配列番号 4、下）である。

【図 3 A】いくつかの実施形態に従った、単一ワークフローアッセイにおいてゲノム鎖及びメチル化鎖を標識化及び増幅するためのワークストリームタグの例示的な戦略を例解する。

【図 3 B】シトシン変換を必要とすることなく、ゲノム鎖をメチル化鎖と区別する固有の配列を含有するワークストリームタグの例示的な戦略を例解する。

【図 3 C】いくつかの実施形態に従った、鎖特異的増幅の例示的な戦略を例解する。

【図 4 A - 4 F】いくつかの実施形態に従った、例示的な単一ワークフローアッセイのステップのフローチャートを提供する。図 4 A は、末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、P C R 増幅／ライブラリ生成、及びゲノム鎖及びメチル化鎖の並列配列決定を含む、例示的なアッセイを例解する。図 4 B は、末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、P C R 増幅／ライブラリ生成、ゲノム鎖及びメチル化鎖を富化するためのハイブリッドキャプチャ、並びにゲノム鎖及びメチル化鎖の配列決定を含む、例示的なアッセイを例解する。図 4 C は、末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、及び P C R 増幅／ライブラリ生成、続いて、ゲノム鎖及びメチル化鎖の別々のライブラリの富化及び配列決定を含む、例示的なアッセイを例解する。図 4 D は、末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、及び P C R 増幅／ライブラリ生成、続いて、ゲノム鎖ライブラリの富化、並びにゲノム鎖ライブラリ及びメチル化鎖ライブラリの配列決定を含む、例示的なアッセイを例解する。図 4 E は、末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、及び P C R 増幅／ライブラリ生成、続いて、メチル化鎖ライブラリの富化、並びにゲノム鎖ライブラリ及びメチル化鎖ライブラリの配列決定を含む、例示的なアッセイを例解する。図 4 F は、末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、P C R 増幅／ライブラリ生成、ゲノム鎖及びメチル化鎖を富化するためのハイブリッドキャプチャ、並びにゲノム鎖及びメチル化鎖に基づく別々の標的化ライブラリの生成及び配列決定を含む、例示的なアッセイを例解する。

【図 5 A - 5 C】単一ワークフローにおいて、遺伝子（例えば、配列）情報及びエピジェネティック（例えば、メチル化）情報を分析する概念実証を示す。使用されたワークフローの概要は、図 5 A に提供される。図 5 B は、ゲノム鎖及びメチル化鎖並びにそれらの増幅産物から特定された配列リードのパーセンテージを示す。図 5 C は、シトシン変換の結果を示し、ゲノム鎖は、大部分がシトシン変換後に保存された一方で、メチル化鎖は、効率的に変換された。

【図 6】単一ワークフロー方法を使用して、ゲノム鎖及びメチル化鎖において観察された（シトシン変換からの）保護効率性を示す。

【図 7】単一ワークフロー方法を使用して、プライマー伸長後にゲノム鎖及びメチル化鎖について特定されたリードの豊富さを示す。

【図 8】単一ワークフロー及び標準的な全ゲノム（W G）酵素的メチル化配列決定方法を使用して得られた、がんメチル化スコア（個々の D N A からのコンセンサスメチル化部位を評価する）間の相関を示す。

【図 9 A - 9 E】単一ワークフロー又は標準的な W G メチル化方法論を使用して観察された、メチル化レベルの相関を示す。より小さいピン及び機能領域からのメチル化レベルを分析し、1 k b のピン（図 9 A）、1 0 k b のピン（図 9 B）、1 0 0 k b のピン（図 9 C）、C p G アイランド（図 9 D）、及び C p G ショア（図 9 E）を含む。

【図 1 0】標準的な酵素的メチル化配列決定と比較した、単一ワークフローにおける平均メチル化率（A M F）のピアソン相関係数を示す。各ピン／機能領域から得られた平均（ r ）が示される。

10

20

30

40

50

【図 1 1】単一ワークフロー又は標準的な全ゲノム配列決定 (WGS) 方法論を使用して観察された、主要な遺伝子バリエーションの対立遺伝子頻度の相関を示す。

【図 1 2】鎖特異的プライマーを使用したゲノム鎖の優先的増幅あり及びなしの、ゲノム鎖及びメチル化鎖について特定されたリードのパーセンテージを示す。

【図 1 3】鎖特異的プライマーを使用したゲノム鎖及び／又はメチル化鎖の優先的増幅あり及びなしの、ゲノム鎖及びメチル化鎖について特定されたリードのパーセンテージを示す。

【図 1 4 A】マルチオミックハイブリッドキャプチャ後の平均固有力バレッジを示す。ゲノムバイオマーカー及びメチル化バイオマーカーを標的化するビオチン化キャプチャベイトを、単一ワークフローライブラリの同時キャプチャのために組み合わせた。高い固有力バレッジが、ハイブリッドキャプチャ後にゲノム標的及びメチル化標的について観察された。

10

【図 1 4 B】Fold-80 ベースペナルティによって測定されたように、メチル化キャプチャ領域及びゲノムキャプチャ領域の両方にわたって、高いカバレッジ均一性があることを示す。結合ハイブリッドキャプチャにおいて、ゲノム領域及びメチル化領域の両方の高いオンターゲット率があり、効率的なマルチオミック鎖の富化を示す。

【図 1 4 C】いくつかの実施形態に従った、単一ワークフローにおいてメチル化配列情報及びゲノム配列情報を検出するための例示的なプロセスのブロック図を描画する。

【図 1 5】いくつかの実施形態に従った例示的なシステムを描画する。

【図 1 6】いくつかの実施形態に従った例示的なデバイスを描画する。

20

【発明を実施するための形態】

【0036】

本開示は、概して、単一の統合的なワークフローにおいて、核酸からの配列情報及びメチル化情報を検出することに関する。

【0037】

本開示は、単一ワークフローにおいて配列バリエーション及びメチル化バリエーションの効率的、包括的、かつ統合的な分析を提供する方法を示す。本開示は、両方のタイプの情報が、少量の投入 DNA を使用して単一試料から効率的に得られ得、したがって、がん関連 cfDNA の分析を含む様々な用途に有用であり得ることを示す。これらの方法は、配列情報を保存し、シトシン変換に抵抗性があるゲノム鎖、及びメチル化情報を保存し、シトシン変換を受けやすいメチル化鎖を生成する。単一ワークフロー方法からのメチル化レベル及び配列バリエーション検出の両方が、既存の方法を使用した配列又はメチル化レベルのいずれかの専用の全ゲノム分析を使用した得られた結果と相関することがわかった。有利に、単一ワークフロー方法は、アッセイの選好又は焦点に応じて、ゲノム鎖及び／又はメチル化鎖を増幅及び／又は富化するように適合され得る。

30

【0038】

I. 一般的な技術

本明細書に記載されるか、又は参照される技術及び手順は、一般に、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)), 一連の Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) : PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987)), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984), Methods

40

50

in Molecular Biology, Humana Press, Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press, Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987)、Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press, Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons, Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、及びCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993)に記載される広く利用されている方法論などの当業者による通常の方法論を使用して、十分に理解され、一般的に用いられる。

【0039】

II. 定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば、「1つの分子(a molecule)」との言及は、任意選択的に、2つ以上のそのような分子の組み合わせなどを含む。

【0040】

本明細書に記載される「約」という用語は、当該技術分野で当業者にとって容易に知られるそれぞれの値についての通常の見誤差範囲を指す。本明細書における「約」値又はパラメータとの言及は、その値又はパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（及び説明する）。

【0041】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む(comprising)」、「からなる(consisting)」及び／又は「から本質になる(consisting essentially of)」を含むことが理解される。

【0042】

「がん」及び「がん性」という用語は、典型的には制御されない細胞成長を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、又はそれを説明する。この定義には、良性及び

10

20

30

40

50

悪性のがんが含まれる。

【0043】

「腫瘍」という用語は、本明細書で使用される場合、悪性であるか、又は良性であるかにかかわらず、全ての新生物性の細胞成長及び増殖、並びに全ての前がん性及びがん性の細胞及び組織を指す。「がん」、「がん性」及び「腫瘍」という用語は、本明細書について言及される場合、相互に排他的なものではない。

【0044】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、本明細書で互換的に使用される場合、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び／又はそれらの類似体、あるいはDNA若しくはRNAポリメラーゼによって、又は合成反応によってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であり得る。したがって、例えば、本明細書で定義されるポリヌクレオチドとしては、限定されないが、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、一本鎖及び二本鎖領域を含むRNA、一本鎖であってもよく、又は典型的には二本鎖であってもよいが、又は一本鎖及び二本鎖領域を含むDNA及びRNAを含むハイブリッド分子が挙げられる。加えて、本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、RNA又はDNA、又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。そのような領域中の鎖は、同じ分子由来であってもよく、又は異なる分子由来であってもよい。領域は、分子のうちの1つ以上の全てを含んでもよいが、より典型的には、分子のいくつかの領域のみを伴ってもよい。三重らせん領域の分子の一方は、多くの場合、オリゴヌクレオチドである。「ポリヌクレオチド」という用語は、具体的には、cDNAを含む。

【0045】

ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在する場合、ポリマーの組み立て前又は組み立て後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断されていてもよい。ポリヌクレオチドは、合成後に、例えば、標識とのコンジュゲーションによって、更に修飾され得る。他のタイプの修飾としては、例えば、「キャップ」、類似体、ヌクレオチド間修飾による、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上の置換、例えば、帯電していない結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）を有するもの、及び帯電した結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有するもの、ペンダント部分、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリマーリジンなど）を有するもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を有するもの、キレーター（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含有するもの、アルキレーターを含有するもの、修飾結合を有するもの（例えば、アルファアノマー性核酸）、並びにポリヌクレオチドの非修飾形態が挙げられる。更に、糖内に通常存在するヒドロキシル基のいずれかが、例えば、ホスホネート基、ホスフェート基によって置き換えられ、標準的な保護基によって保護され、又は追加のヌクレオチドに対する追加の結合を調製するために活性化されてもよく、又は固体若しくは半固体の支持体にコンジュゲートされてもよい。5'末端及び3'末端のOHは、リン酸化されてもよく、又は1~20個の炭素原子のアミン又は有機キャッピング基部分で置換されてもよい。他のヒドロキシルもまた、標準的な保護基へと誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドはまた、例えば、2'-O-メチル、2'-O-アリル、2'-フルオロ、又は2'-アジド-リボース、炭素環糖類似体、 α -アノマー性糖、エピマー性糖、例えば、アラビノース、キシロース又はリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環状類似体、及びメチルリボシドなどの脱塩基ヌクレオシド類似体を含む、当該技術分野で一般に既知であるリボース又はデオキシリボース糖の類似形態を含有し得る。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替的な結合基によって置き換えられてもよい。これらの代替的な結合基としては、限定されないが、ホスフェートが、P(0)S(「チオエート」)

10

20

30

40

50

、 $P(S)S$ （「ジチオエート」）、 $(O)NR_2$ （「アミデート」）、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 CO 又は CH_2 （「ホルムアセタール」）によって置き換えられており、各 R 又は R' が、独立して、 H 、又は任意選択的にエーテル（ $-O-$ ）結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、又はアラリジル（*araldyl*）を含有する、置換若しくは非置換のアルキル（ $1 \sim 20C$ ）である実施形態が挙げられる。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。ポリヌクレオチドは、本明細書に記載の1つ以上の異なるタイプの修飾及び／又は同じタイプの複数の修飾を含有し得る。前の記載は、 RNA 及び DNA を含む、本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0046】

10

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用される場合、一般に、必ずしも約250ヌクレオチド長未満ではない短い一本鎖ポリヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチドは、合成であってもよい。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上の記載は、オリゴヌクレオチドと等しく、かつ完全に適用可能である。

【0047】

「検出」という用語は、直接的な検出及び間接的な検出を含む、任意の検出手段を含む。

【0048】

20

「増幅」は、本明細書で使用される場合、一般に、所望の配列の複数のコピーを生成するプロセスを指す。「複数のコピー」は、少なくとも2つのコピーを意味する。「コピー」は、鋳型配列に対する完全な配列相補性又は同一性を必ずしも意味しない。例えば、コピーは、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体などのヌクレオチド類似体、意図的な配列変化（例えば、鋳型に対してハイブリダイズ可能であるが、鋳型に対して相補的ではない配列を含むプライマーによって導入された配列変化）、及び／又は増幅中に生じる配列エラーを含み得る。

【0049】

本明細書で使用される「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」の技術は、一般に、微量の核酸、 RNA 、及び／又は DNA の特定の片が、例えば、米国特許第4,683,195号に記載されるように増幅される手順を指す。一般に、目的の領域の末端から、又はそれを越えた配列情報が入手可能である必要があり、その結果、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができ、これらのプライマーは、増幅される鋳型の反対側の鎖に対して配列が同一であるか、又は類似することになる。2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅された材料の末端と一致していてもよい。PCRを使用して、特定の RNA 配列を、全ゲノム DNA から特定の DNA 配列を、また、全細胞 RNA 、バクテリオファージ、又はプラスミド配列などから転写された $cDNA$ を増幅させることができる。一般に、Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 (1987)、及びErllich, ed., PCR Technology (Stockton Press, NY, 1989)を参照されたい。本明細書で使用される場合、PCRは、プライマーとしての既知の核酸（ DNA 又は RNA ）の使用を含み、核酸ポリメラーゼを使用して特定の核酸片を増幅させるか、若しくは生成するか、又は特定の核酸に相補的である特定の核酸片を増幅させるか、若しくは生成する、核酸試験試料を増幅させるための核酸ポリメラーゼ反応方法の唯一の例ではないが、一例であると考えられる。

30

40

【0050】

「診断」という用語は、分子又は病的な状況、疾患、又は状態（例えば、がん）の特定又は分類を指すために本明細書で使用される。例えば、「診断」は、特定のタイプのがんの特定を指し得る。「診断」はまた、例えば、病理組織学的基準による、あるいは分子特徴（例えば、バイオマーカーの1つ若しくは組み合わせ（例えば、特定の遺伝子、若しくは当該遺伝子によってコードされたタンパク質）の発現、又は異常な DNA メチル化レベ

50

ル及び／若しくはパターンを特徴とするサブタイプ) による、がんの特定のサブタイプの分類を指し得る。

【0051】

「診断を補助する」という用語は、疾患又は障害（例えば、がん）の症状又は状態の特定のタイプの存在、又はその性質に関する臨床的決定を下すことを補助する方法を指すために本明細書で使用される。例えば、疾患又は状態（例えば、がん）の診断を補助する方法は、個体からの生物学的試料において特定の体細胞変異又はDNAメチル化レベル及び／若しくはパターンを測定することを含み得る。

【0052】

「試料」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、物理的特徴、生化学的特徴、化学的特徴、及び／又は生理学的特徴に基づいて、特性評価及び／又は特定される細胞及び／又は他の分子実体を含有する目的の対象及び／又は個体から得られるか、又はそれらに由来する組成物を指す。例えば、「疾患試料」という語句及びその変形語は、特性決定される細胞及び／又は分子実体を含有すると予想されるか、又は含有することが知られている目的の対象から得られた任意の試料を指す。試料としては、限定されないが、組織試料、初代若しくは培養された細胞若しくは細胞株、細胞上清、細胞溶解物、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、全血、血漿、血清、血液由来の細胞、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、汗、粘液、腫瘍溶解物、及び組織培養培地、組織抽出物、例えば、均質化された組織、腫瘍組織、細胞抽出物、及びそれらの組み合わせが挙げられる。場合によっては、試料は、全血試料、血漿試料、血清試料、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、試料は、腫瘍由来（例えば、「腫瘍試料」）、例えば、生検由来である。いくつかの実施形態では、試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料である。

【0053】

本明細書に使用される「腫瘍細胞」は、腫瘍又はその試料中に存在する任意の腫瘍細胞を指す。腫瘍細胞は、当該技術分野で既知の方法及び／又は本明細書に記載の方法を使用して、腫瘍試料（例えば、間質細胞及び腫瘍浸潤免疫細胞）中に存在し得る他の細胞から区別され得る。

【0054】

「参照試料」、「参照細胞」、「参照組織」、「対照試料」、「対照細胞」、又は「対照組織」は、本明細書で使用される場合、比較目的のために使用される試料、細胞、組織、標準、又はレベルを指す。

【0055】

「相関する」、又は「相関すること」とは、いずれにせよ、第1の分析又はプロトコルの性能及び／又は結果を、第2の分析又はプロトコルの性能及び／又は結果と比較することを意味する。例えば、第2のプロトコルを実行する際に第1の分析又はプロトコルの結果を使用してもよく、かつ／又は第2の分析又はプロトコルを行うべきかどうかを決定するために、第1の分析又はプロトコルの結果を使用してもよい。ポリペプチド分析又はプロトコルの実施形態に関して、ポリペプチド発現分析又はプロトコルの結果を使用して、特定の療法計画を行うべきかどうかを決定してもよい。ポリヌクレオチド分析又はプロトコルの実施形態に関して、ポリヌクレオチド発現分析又はプロトコルの結果を使用して、特定の療法計画を行うべきかどうかを決定してもよい。

【0056】

「個体の応答」又は「応答」は、限定されないが、（1）遅らせるか、若しくは完全に停止させることを含む、疾患進行（例えば、がん進行）のある程度までの阻害、（2）腫瘍サイズの低減、（3）隣接する周辺の器官及び／若しくは組織へのがん細胞浸潤の阻害（すなわち、低減、遅らせる、若しくは完全に止める）、（4）転移の阻害（すなわち、低減、遅らせる、若しくは完全に止める）、（5）疾患若しくは障害（例えば、がん）に関連する1つ以上の症状のある程度までの緩和、（6）全生存期間及び無増悪生存期間を含む、生存期間の長さの増加若しくは延長、並びに／又は（7）治療後の所与の時間点で

10

20

30

40

50

の死亡率の減少を含む、個体に対する利益を示す任意のエンドポイントを使用して評価され得る。

【0057】

医薬による治療に対する患者の「有効応答」又は患者の「応答性」及び同様の語句は、がんなどの疾患又は障害のリスクがあるか、又はそれを受けている患者に付与された臨床的利益又は治療的利益を指す。一実施形態では、そのような利益としては、生存期間（全生存期間及び／又は無増悪生存期間を含む）を延長すること、客観的な応答が得られること（完全奏効又は部分奏効を含む）、あるいはがんの兆候又は症状を改善することが含まれる。

【0058】

「有効量」は、哺乳動物において疾患又は障害を治療又は予防するための治療薬剤の量を指す。がんの場合、治療有効量の治療薬剤は、がん細胞の数を低下させ、原発腫瘍のサイズを低下させ、周辺の器官へのがん細胞浸潤を阻害し（すなわち、ある程度まで遅らせ、いくつかの実施形態では、止める）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度まで遅らせ、いくつかの実施形態では、止める）、腫瘍成長をある程度まで阻害し、及び／又は障害に関連する症状のうちの1つ以上をある程度まで緩和し得る。薬物が、存在するがん細胞の成長を防止し、かつ／又は死滅させ得る程度まで、薬物は、細胞増殖抑制性及び／又は細胞傷害性であってもよい。がん療法の場合、インビボでの有効性は、例えば、生存持続期間、疾患進行までの時間（TTP）、奏功率（例えば、CR又はPR）、応答の持続期間、及び／又は生活の質を評価することによって測定することができる。

【0059】

「医薬製剤」という用語は、その中に含有された活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態にあり、製剤が投与される対象にとって受け入れられないほど毒性である追加の構成要素を含有しない、調製物を指す。

【0060】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、限定されないが、緩衝液、賦形剤、安定剤、又は防腐剤が挙げられる。

【0061】

本明細書で使用される場合、「治療」（及び「治療する」又は「治療すること」などのその文法的な変形語）は、治療されている個体の自然の経過を変化させようとする臨床的介入を指し、予防のため、又は一連の臨床病理中のいずれかに実施され得る。治療の所望な効果としては、限定されないが、疾患の発生若しくは再発を予防すること、症状の軽減、疾患の何らかの直接的若しくは間接的な病理学的帰結の低減、転移を予防すること、疾患進行の速度を減少させること、疾患状態の改良若しくは緩和、及び寛解又は改善された予後が挙げられる。

【0062】

本明細書で使用される場合、「個体」、「患者」、又は「対象」という用語は、互換的に使用され、治療が望ましい任意の単一動物、例えば、哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、動物園の動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、及び非ヒト霊長類のような非ヒト動物を含む）を指す。特定の実施形態では、本明細書の患者は、ヒトである。

【0063】

本明細書で使用される場合、「投与すること」は、投薬量の化合物（例えば、アンタゴニスト）又は医薬組成物（例えば、アンタゴニストを含む医薬組成物）を対象（例えば、患者）に与える方法を意味する。投与は、非経口、肺内、及び経鼻を含み、及び所望な場合には、局所治療、病変内投与のための任意の好適な手段によるものであってもよい。非経口注入としては、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が挙げられる。投薬は、一部には投与が一時的であるか長期であるかに応じて、例えば、注射（例えば、静脈内又は皮下注射）による、任意の好適な経路によるものであってもよい。限定されないが、様々な時間点にわたる単回又は複数回の投与、ボラス投与、及びパルス注入

10

20

30

40

50

を含む、様々な投薬スケジュールは、本明細書で企図される。

【0064】

「同時に」という用語は、2つ以上の治療薬剤の投与を指すために本明細書で使用され、投与の少なくとも一部は、時間的に重複している。したがって、同時投与は、1つ以上の薬剤の投与が、1つ以上の他の薬剤の投与を中止した後に継続する場合の投薬計画を含む。

【0065】

「添付文書」という用語は、治療製品の市販パッケージに通常含まれる、そのような治療製品の使用に関する適応症、使用、投薬量、投与、併用療法、禁忌、及び／又は警告についての情報を含む説明書を指すために使用される。

10

【0066】

「製造物品」は、少なくとも1つの試薬、例えば、本明細書に記載される疾患若しくは障害（例えば、がん）の治療のための医薬、又はバイオマーカー（例えば、DNAメチル化）を特異的に検出するためのプローブを含む、任意の製造物（例えば、パッケージ若しくは容器）、又はキットである。ある特定の実施形態では、製造物又はキットは、本明細書に記載の方法を行うためのユニットとして販売促進され、配布され、又は販売される。

【0067】

「メチル化」という用語は、（文脈がそうでないことを示さない限り）DNA核酸内のシトシンヌクレオチドのC5位置でのメチル基の存在を指すために本明細書で使用される。この用語は、5-メチルシトシン（5mC）、並びに5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）など、メチル基が更に修飾されているシトシンヌクレオチドを含む。この用語はまた、非修飾シトシンをウラシルに脱アミノ化する変換など、ヌクレオチドの化学的又は酵素的変換に供されたDNA核酸を含む。

20

【0068】

「異常なメチル化」という用語は、典型的には正常組織に存在しないメチル化のパターンを指すために本明細書で使用される。例えば、この用語は、正常組織において通常メチル化されない部位でのメチル化の増加、又は正常組織において通常メチル化される部位でのメチル化の減少を指し得る。いくつかの実施形態では、がん細胞由来の核酸（例えば、がん核酸）は、1つ以上のゲノム遺伝子座でのそれらのパターン及び／又はメチル化の量が、特定のタイプの組織における対応する遺伝子座に通常存在するものとは異なる場合の異常なメチル化を特徴とする。

30

【0069】

「CpGジヌクレオチド」という用語は、シトシンヌクレオチドの後に、5'→3'の方向にグアニンヌクレオチドが続く2つ以上のDNA塩基の領域、例えば、5'-C-ホスフェート-G-3'を指すために本明細書で使用される。多くのゲノムにおいて、CpGジヌクレオチドは、多くの場合、複数のCpGジヌクレオチドを含有するDNAの「クラスター」又は領域（CpGアイランドとも呼称される）で見られ得る。多くのゲノムにおけるDNAメチル化の多く又はほとんどは、（シトシンがメチル化又はヒドロキシメチル化されている）CpGジヌクレオチドに存在する。

【0070】

40

III. 方法、システム、及びデバイス

本開示の特定の態様は、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数

50

10

20

30

40

50

50

いくつかの実施形態では、分離は、（a）1つ以上のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることであって、1つ以上のベイト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、（b）核酸ハイブリッドを単離することと、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、複数の第2の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、分離は、シトシン変換処理後に生じ、1つ以上のベイト分子は、第1の鎖の1つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、1つ以上のベイト分子は、複数の第1の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、分離は、1つ以上の第1のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることであって、1つ以上の第1のベイト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は第2の鎖のうちの1つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、を含む。

ト分子が、第1の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第1の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせること、第1の核酸ハイブリッドを単離すること、1つ以上の第2のベイト分子を複数の第1及び第2の鎖と組み合わせることであって、1つ以上の第2のベイト分子が、第2の鎖のうちの1つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第2の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせること、第2の核酸ハイブリッドを単離することを含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の鎖及び／又は複数の第2の鎖を増幅に供することを更に含む。いくつかの実施形態では、増幅は、検出する（例えば、配列決定）前である。いくつかの実施形態では、検出することは、複数の第1及び第2の鎖の少なくとも一部分、並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含む。いくつかの実施形態では、増幅は、シトシン変換処理後に実施される。例えば、図4A～4Fを参照されたい。

【0076】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の鎖とではなく、複数の第2の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第2の鎖を増幅に供することを含む。例えば、プライマーは、ゲノム鎖に特異的であり得る。

【0077】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第2の鎖とではなく、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第1の鎖を増幅に供することを含む。例えば、プライマーは、メチル化鎖に特異的であり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーは、第1の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、第1の鎖がシトシン変換を受けた後に、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする。いくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーは、第1の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、複数の第1の鎖の少なくとも一部分とアニールする。

【0078】

いくつかの実施形態では、方法は、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、複数の第1の一本鎖DNA断片を2ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む。例えば、（1回の代わりに）複数ラウンドのプライマー伸長が、ゲノム鎖を富化するために、（シトシン類似体を使用する）シトシン変換前に実施され得る。

【0079】

いくつかの実施形態では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、一緒に（例えば、同時に）又は別々に検出される。

【0080】

いくつかの実施形態では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、同じ配列深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、複数の第1及び第2の鎖又はそれらの増幅産物は、異なる配列深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、複数の第2の鎖は、複数の第1の鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、ゲノム鎖又はそれらの増幅産物は、メチル化鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、複数の第1の鎖は、複数の第2の鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される。いくつかの実施形態では、メチル化鎖又はそれらの増幅産物は、ゲノム鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又

10

20

30

40

50

は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される。異なる配列決定深度を使用することは、用途に応じて有利であり得る。例えば、一塩基多型などのより低い信頼度コー
ールは、信頼度を高めるために、より高い配列決定深度に供され得る。

【0081】

いくつかの実施形態では、プライマー伸長後、複数の第1の鎖は、複数の二本鎖核酸中の複数の第2の鎖とハイブリダイズされる。

【0082】

本開示の特定の態様は、アダプター核酸配列に関する。いくつかの実施形態では、アダプター核酸配列は、メチル化鎖に対してゲノム鎖を、又はそれらの増幅産物を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、第1及び／又は第2の鎖からの配列情報を逆多重化することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、第2の鎖又はゲノム鎖からの配列リードに対して、第1の鎖又はメチル化鎖からの配列リードを区別するために、配列情報を逆多重化することを含む。いくつかの実施形態では、逆多重化することは、本開示の第1及び／又は第2のアダプター核酸に少なくとも部分的に基づいている。いくつかの実施形態では、アダプター核酸配列は、試料、実験室、医師、日付、配列決定実行、機器、複製などの特定のための配列を含むがこれらに限定されない、他のタイプの情報をコードするための配列を更に含み得る。いくつかの実施形態では、シトシン変換後、ゲノム鎖に付着したアダプター核酸は、メチル化鎖に付着したアダプター核酸にもはや相補的ではなく、例えば、図2を参照されたい。いくつかの実施形態では、アダプター核酸（例えば、メチル化鎖又はゲノム鎖に付着している）は、メチル化又は非メチル化であるシトシンを含み、例えば、図3Aを参照されたい。いくつかの実施形態では、アダプター核酸は、プライマー伸長後に、ゲノム鎖に付着したアダプター核酸が、シトシン変換なしでさえ、メチル化鎖に付着したアダプター核酸に相補的ではないような、非相補的5'オーバーハングを含む。例えば、図3Bは、アダプター核酸配列が、一本鎖DNAの2つの相補的な部分の間に挟まれた非相補性の領域（図3BのAを参照されたい）、又はアダプター配列（図3BのCを参照されたい）、又はプライマー伸長後に、2つの鎖を区別するアダプター核酸における固有の配列が、シトシン変換とは無関係に生成されるような、非相補的5'オーバーハング（図3BのBを参照されたい）をどのように含むことができるかを示す。

【0083】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、メチル化鎖及び／又はゲノム鎖の選択的増幅を含む。図3Cに示されるように、例えば、アダプター核酸配列をプライマーアンカーとして使用して、メチル化鎖及び／又はゲノム鎖を選択的に増幅するために、鎖特異的プライマーが使用され得ることが、本明細書で企図される。図3Cに例解される例示的な方法では、1ラウンド以上のPCR増幅が、シトシン変換（例えば、偏りのないプライマーを使用する）後に行われ、その後、メチル化鎖及びゲノム鎖並びにそれらの増幅産物は、鎖特異的プライマーを使用して別々に増幅される。理論に束縛されることを望むものではないが、例えば、普遍的増幅後に、第1及び第2の鎖の生成物に対して行われた優先的増幅は、メチル化鎖を増幅する場合にゲノム鎖の含有量の喪失を防止することができ、逆の場合も同じであると考えられる。もし代わりに優先的増幅を元の鎖に対して行うならば、一方の鎖は、他方の鎖を特異的に増幅する場合、希釈され、情報量が失われ得る。

【0084】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、1つ以上の核酸を、第1及び／又は第2の一本鎖DNA断片のうちの1つ以上に付着させることを含む。いくつかの実施形態では、アダプターは、ライゲーション、転位、テーリング、鋳型スイッチングなどを介して付着する。

【0085】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片

の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、検出は、マイクロアレイ、定量PCR(qPCR)、デジタル液滴PCR(ddPCR)、分子反転プローブ、及び／又は配列決定によるものである。

10

【0086】

いくつかの実施形態では、プライマーの第2のアダプター核酸部分は、第1の一本鎖DNA断片にアニールするプライマーの2つの部分間にある。いくつかの実施形態では、プライマーの第2のアダプター核酸部分は、第1の一本鎖DNA断片にアニールするプライマーの部分に対して5'である。例えば、いくつかの実施形態では、第2のアダプター核酸部分は、第1の一本鎖DNA断片にアニールしない。したがって、第2のアダプター核酸部分は、プライマーを介して導入され得、相補的配列は、第1の一本鎖DNA断片の5'末端からの埋め戻しを介して導入され得る(例えば、図3、中央の列を参照されたい)。いくつかの実施形態では、プライマーは、プライマー伸長後に第2のアダプター核酸の一部になり、シトシン変換中に変換される、1つ以上の非メチル化シトシンを含む。

20

【0087】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a) 第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、検出は、マイクロアレイ、定量PCR(qPCR)、デジタル液滴PCR(ddPCR)、分子反転プローブ、及び／又は配列決定によるものである。

30

40

【0088】

いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分の3'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分の5'末端に付着している。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。いくつかの実施形態では、第1のアダプター核酸は、1つ以上のメチル化シトシンを含み、プライマーは、シトシン変換中に変換される1つ以上の非メチル化シトシンを含む。

【0089】

50

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に記載されるような末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、PCR増幅／ライブラリ生成、並びにゲノム鎖及びメチル化鎖の並列配列決定を含む。例えば、図4Aを参照されたい。

20

【0091】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に記載されるような末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、PCR増幅／ライブラリ生成、ゲノム鎖及びメチル化鎖を富化するためのハイブリッドキャプチャ、並びにゲノム鎖及びメチル化鎖の配列決定を含む。例えば、図4Bを参照されたい。

【0092】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に記載されるような末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、及びPCR増幅／ライブラリ生成を含む。いくつかの実施形態では、別々のライブラリが、ゲノム鎖及びメチル化鎖について構築される。いくつかの実施形態では、各ライブラリが、富化（例えば、ハイブリッドキャプチャを介して）及び配列決定され得る。例えば、図4Cを参照されたい。

30

【0093】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に記載されるような末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、及びPCR増幅／ライブラリ生成を含む。いくつかの実施形態では、別々のライブラリが、ゲノム鎖及びメチル化鎖について構築される。いくつかの実施形態では、ゲノム鎖ライブラリのみが富化され（例えば、ハイブリッドキャプチャを介して）、両方のライブラリが配列決定される。例えば、図4Dを参照されたい。

【0094】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に記載されるような末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、及びPCR増幅／ライブラリ生成を含む。いくつかの実施形態では、別々のライブラリが、ゲノム鎖及びメチル化鎖について構築される。いくつかの実施形態では、メチル化鎖ライブラリのみが富化され（例えば、ハイブリッドキャプチャを介して）、両方のライブラリが配列決定される。例えば、図4Eを参照されたい。

40

【0095】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本明細書に記載されるような末端修復、アダプターライゲーション、プライマー伸長、シトシン変換処理、PCR増幅／ライブラリ生成、ゲノム鎖及びメチル化鎖を富化するためのハイブリッドキャプチャ、並びにゲノム鎖及びメチル化鎖に基づく別々のライブラリの生成を含む。次いで、両方のライブラリが配列決定され得る。例えば、図4Fを参照されたい。

50

【0096】

いくつかの実施形態では、本開示の一本鎖DNA断片は、二本鎖DNAから、例えば、本開示の試料から得られる。いくつかの実施形態では、方法は、例えば、プライマー伸長前に、複数の二本鎖DNA断片を変性させて、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することを含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、より多くのCpG部位、アイランド、又はショアのうちの1つのメチル化を検出するために使用される。CpGジヌクレオチド又は部位は、典型的には、シトシンヌクレオチドが直鎖状配列におけるグアニンヌクレオチドにすぐ隣接して位置するDNAの領域を指す。「CpG」は、ホスフェートによって分離されたシトシン及びグアニンを指す（すなわち、 $-\text{C}-\text{ホスフェート}-\text{G}-$ ）。CpG部位のより高い頻度又は濃度を有するDNAの領域は、「CpGアイランド」として知られている。哺乳動物ゲノムにおける多くの遺伝子は、遺伝子発現の制御において極めて重要な役割を果たす、遺伝子の転写開始部位（プロモーターを含む）と関連するCpGを有する。例えば、米国PG公開第US2014/0357497号を参照されたい。異常なメチル化パターンは、多くのタイプのがんで観察される。例えば、正常組織において、CpGアイランドは、多くの場合、非メチル化であるが、アイランドのサブセットは、腫瘍形成、細胞発達、及び様々な疾患状態中にメチル化される。遺伝子のプロモーター内のCpG部位の高メチル化（すなわち、メチル化レベルの上昇）は、例えば、多くのヒトがんにおいて見られる特徴である、それらのサイレンシングにつながり得る（例えば、腫瘍抑制遺伝子のサイレンシング）。

【0098】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、例えば、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換（例えば、PCR増幅／プライマー伸長中にチミンに変換されるウラシルへ）を受けるような条件下で、核酸（例えば、複数の第1及び第2の鎖）をシトシン変換処理に供することを含む。いくつかの実施形態では、シトシン変換は、バイサルファイト処理、TET補助バイサルファイト処理、酸化バイサルファイト処理、APOBEC、又はTET／ベータグルコシルトランスフェラーゼ補助APOBEC処理によるものである。

【0099】

いくつかの実施形態では、シトシン変換処理は、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、特定の効率で変換する。例えば、いくつかの実施形態では、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は100%が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。いくつかの実施形態では、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、又は81%の上限、及び80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は98%の独立して選択される下限を有するパーセンテージで、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受け、上限は、下限よりも高い。いくつかの実施形態では、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、その約80%～約97%、約85%～約97%、約90%～約97%、約95%～約97%、約80%～約95%、約85%～約95%、又は約90%～約95%が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。本開示は、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、非常に高い効率でシトシン変換を受けることを以下に示す。

【0100】

いくつかの実施形態では、第2の鎖内の本開示のシトシン類似体は、特定の効率でシトシン変換処理から保護される。例えば、いくつかの実施形態では、第2の鎖のシトシン類似体の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、最大2%、最大1%、最大0.

5 %、又は最大 0.1 % が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖のシトシン類似体は、20 %、19 %、18 %、17 %、16 %、15 %、14 %、13 %、12 %、11 %、10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、又は 1 % の上限、及び 0.1 %、0.2 %、0.3 %、0.4 %、0.5 %、0.6 %、0.7 %、0.8 %、0.9 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、又は 18 % から独立して選択される下限を有するパーセンテージで、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受け、上限は、下限よりも高い。いくつかの実施形態では、第 2 の鎖のシトシン類似体の約 0.5 % ~ 約 5 %、約 0.5 % ~ 約 3 %、約 0.5 % ~ 約 1 %、約 1 % ~ 約 5 %、約 1 % ~ 約 3 %、又は約 1 % ~ 約 2 % が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける。本開示は、第 2 の鎖内のシトシン類似体が、非常に低い効率でシトシン変換を受けることを以下に示す。

10

【0101】

メチル化レベル及び／又は DNA のパターンを決定する、一般的に使用される方法は、メチル化 CpG ジヌクレオチド配列及び非メチル化 CpG ジヌクレオチド配列を区別するために、シトシンのメチル化状態依存の変換を必要とする。例えば、CpG ジヌクレオチド配列のメチル化は、シトシン変換ベースの技術を用いることによって測定され得、これは、単離されたゲノム DNA 又はその断片内の CpG 配列のメチル化状態依存の化学的修飾、それに続く、DNA 配列分析に依存する。メチル化 CpG ジヌクレオチド配列及び非メチル化 CpG ジヌクレオチド配列を区別することが可能である化学試薬としては、核酸を切断するヒドラジン、及びバイサルファイト処理が挙げられる。バイサルファイト処理、それに続くアルカリ加水分解は、Olek A., Nucleic Acids Res. 24: 5064-6, 1996 又は Frommer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-1831 (1992) によって記載されるように、

20

非メチル化シトシンをウラシルに特異的に変換し、5-メチルシトシンを未修飾のまま残す。バイサルファイト処理 DNA は、続いて、PCR 増幅、配列決定、及びオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを含む検出などの従来の分子技術によって分析され得る。例えば、米国特許第 10, 174, 372 号を参照されたい。

【0102】

シトシン変換のための様々な方法論が、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、本開示の複数の核酸又は核酸断片は、例えば、検出前に、バイサルファイト処理、TET 補助バイサルファイト処理、TET 補助ピリジンボラン処理、酸化バイサルファイト処理、又は APOBEC 処理によって、シトシン変換を受けている。

30

【0103】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の複数の核酸又は核酸断片をバイサルファイトで処理することを含む。バイサルファイト配列決定は、一塩基分解能でメチル化データを生成するための、当該技術分野で一般的に使用される方法である。バイサルファイト変換又は処理は、非メチル化シトシン残基をウラシル残基又はチミン残基に変換するための生化学的プロセス（例えば、ウラシルへの脱アミノ化、それに続く、PCR 中のチミンとしての増幅）を指し、それによって、メチル化シトシン残基（例えば、5-メチルシトシン、5mC、又は 5-ヒドロキシメチルシトシン、5hmC）は、保存される。シトシンをウラシルに変換するための試薬は、当業者に既知であり、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素カリウム、亜硫酸水素アンモニウム、亜硫酸水素マグネシウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸カリウム、ピロ亜硫酸アンモニウム、ピロ亜硫酸マグネシウムなどのバイサルファイト試薬を含む。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の複数の核酸又は核酸断片を、酵素消化及びバイサルファイト処理で処理することを含む。方法の原理は、DNA の断片化が、超音波によっては達成されないが、複数のエンドヌクレアーゼ（Mse I、Tsp 5

50

09I、NlaIII、及びHpy CH4V)による組み合わせられた酵素消化によって達成され、MseI、Tsp509I、NlaIII、及びHpy CH4Vの制限酵素切断部位が、それぞれ、TTAA、AATT、CATG、及びTGCAである。例えば、Smiraglia D J, et al. *Oncogene* 2002; 21: 5414-5426を参照されたい。この後に、例えば、本明細書に記載されるようなバイサルファイト処理が続く。

【0105】

シトシン変換のための酵素的な方法、例えば、酵素的メチル配列決定も既知である。そのようなアプローチは、DNAを損傷及び断片化し、DNA喪失及び潜在的に偏りのある配列決定につながり得るバイサルファイトの代わりに、酵素を用いるため有利であり得る。例えば、TET2 (10-11転座 (Tet) ファミリー2メチルシトシンジオキシゲナーゼ) 及びT4-BGT (T4ファージベクターグルコシルトランスフェラーゼ) は、5mC及び5hmCを、APOBEC3A (アポリポタンパク質B mRNA編集酵素、触媒ポリペプチド様3A) によって脱アミノ化することができない生成物に変換するために使用され得、次いで、APOBEC3Aは、未修飾シトシンを、それらをウラシルに変換することによって脱アミノ化するために使用される。例えば、Vaisvila, R. et al. (2021) *Genome Res.* 31: 1-10を参照されたい。

【0106】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の複数の核酸又は核酸断片を、TET補助バイサルファイト (例えば、TAB-seq) で処理することを含む。TAB-seqアプローチでは、ベクターグルコシルトランスフェラーゼ (β GT) が、5hmCを β -グルコシル-5-ヒドロキシメチルシトシン (5gmC) に変換するために使用され、Tet酵素 (例えば、mTet1) が、5mCを5-カルボキシルシトシン (5caC) に酸化するために使用される。続いて、核酸が、バイサルファイトで処理される。例えば、Yu, M. et al. (2018) *Methods Mol. Biol.* 1708: 645-663を参照されたい。

【0107】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の複数の核酸又は核酸断片を、TET補助ピリジンボラン (例えば、TAPS) で処理することを含む。TAPSアプローチでは、TETメチルシトシンジオキシゲナーゼが、5mC及び5hmCを5caCに酸化するために使用され、次いで、5caCは、ピリジンボランを介してジヒドロウラシル (DHU) に還元される。DHUは、後続のPCR中にチミンに変換される。例えば、Liu, Y. et al. (2019) *Nat. Biotechnol.* 37: 424-429を参照されたい。

【0108】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の複数の核酸又は核酸断片を、酸化バイサルファイト (例えば、oxBS) で処理することを含む。oxBSアプローチでは、5hmCが、5-ホルミルシトシン (5fC) に酸化され、これは、バイサルファイト下でウラシルに変換され得る。次いで、バイサルファイト対酸化バイサルファイト処理からの配列決定の結果は、5mCから5hmCレベルを推定するために使用され得る。例えば、Booth, M. J. et al. (2013) *Nat. Protocols* 8: 1841-1851を参照されたい。このアプローチは、oxBS-seqにおいてゲノムワイドなレベルでスケーリングされ得、例えば、Kirschner, K. et al. (2018) *Methods Mol. Biol.* 1708: 665-678を参照されたい。

【0109】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、本開示の複数の核酸又は核酸断片をAPOBECで処理することを含む。シトシンをウラシルに変換するための酵素試薬、すなわち、シトシンデアミナーゼは、APOBEC-seq又はAPOBEC3AなどのAPOBECファミリーのものを含む。APOBECファミリーメンバーは、5-メチルシトシン

10

20

30

40

50

を維持しながら、すなわち、5-メチルシトシンを変化させることなく、シトシンをウラシルに変換するシチジンデアミナーゼである。そのような酵素は、US 2013/0244237 及び WO 2018/165366 に記載され、市販されている（例えば、NEB Next（登録商標）Enzymatic Methyl-seq Kit、New England Biolabs を参照されたい）。APOBECファミリータンパク質の非限定的な例としては、APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H、APOBEC4、及び活性化誘導（シチジン）デアミナーゼが挙げられる。

【0110】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物を使用した、1ラウンド以上のプライマー伸長を含む。いくつかの実施形態では、プライマー伸長は、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖、及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖は、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム鎖及び任意選択的にそれらの増幅産物は、シトシン類似体を含む。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドの混合物は、アデニン、グアニン、チミン/ウラシル、及びシトシン類似体を含む。

【0111】

様々なシトシン類似体が、本明細書に記載される方法での使用について企図される。シトシン類似体のタイプは、シトシン変換処理のタイプ、すなわち、シトシン類似体が処理/変換に抵抗性があることを確実にすることに依存し得る。いくつかの実施形態では、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体は、5-メチルシトシン（5mC）、5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）、5-カルボキシルシトシン（5caC）、5-ホルミルシトシン、5-（ベータ-D-グルコシルメチル）シトシン（5gmC）、5-エチル dCTP、5-メチル dCTP、5-フルオロ dCTP、5-プロモ dCTP、5-ヨード dCTP、5-クロロ dCTP、5-トリフルオロメチル dCTP、又は5-アザ dCTPを含む。いくつかの実施形態では、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体は、例えば、TET補助ピリジンボラン処理のためのシトシンを含む。

【0112】

いくつかの実施形態では、プライマー伸長に使用されるポリメラーゼは、シトシン類似体を核酸に組み込むことが可能である。

【0113】

いくつかの実施形態では、方法は、例えば、プライマー伸長前に、複数の第1の一本鎖DNA断片を末端修復に供することを更に含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、方法は、TET補助ピリジンボラン配列決定（TAPS）処理の使用を含む。当該技術分野で既知のように、TET補助ピリジンボラン処理は、5mC及び5hmCをウラシルに変換する（これは、PCR増幅中にチミンに変換され得る）。したがって、メチル化シトシンは、変換される。したがって、本明細書に開示される方法は、どのシトシンが変換されるか（すなわち、メチル化対非メチル化）を単純に逆にすることによって、TAPS用途に適合され得ることが企図される。

【0115】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件

10

20

30

40

50

下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

20

30

40

50

【0116】

いくつかの態様では、本開示は、個体においてがんを検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から(例えば、個体から得られた試料から)得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、個体をがんを有するか、又はがんを有しないとして特定する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む

、プライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）プライマーであって、（i）第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、（ii）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

20

30

40

50

【0117】

いくつかの態様では、本開示は、がんの治療を受けたことがあるか、又はがんの治療を受けている個体において、微小残存病変を検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から（例えば、個体から得られた試料から）得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、個体を微小残存病変を有するとして、又はその欠如を特定する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシ

トシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

【0118】

いくつかの態様では、本開示は、がんを有する疑いがある個体をスクリーニングする方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から（例えば、個体から得られた試料から）得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、個体ががんを有する可能性があるか、又は

10

20

30

40

50

がんを有する可能性がないとして特定する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシト

10

20

30

40

50

シン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

【0119】

いくつかの態様では、本開示は、がんを有する個体の予後を決定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から（例えば、個体から得られた試料から）得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、個体の予後を少なくとも部分的に決定する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）プライマーであって、（i）第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、（ii）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）プライマーであって、（i）第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、（ii）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供する

10

20

30

40

50

ことであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

【0120】

いくつかの態様では、本開示は、がんを有する個体の生存期間を予測する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から（例えば、個体から得られた試料から）得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、個体の生存期間を少なくとも部分的に予測する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）プライマーであって、（i）第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、（ii）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと

10

20

30

40

50

、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

【0121】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、本開示は、がんを有する個体の腫瘍負荷を予測又は検出する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から(例えば、個体から得られた試料から)得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び/若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、個体の腫瘍負荷を少なくとも部分的に予測又は検出する。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2

の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

20

【0122】

いくつかの態様では、本開示は、がんを有する個体の治療に対する応答を予測する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から(例えば、個体から得られた試料から)得られた複数の核酸に対して実施され、試料中で検出されたメチル化レベル及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如は、治療に対する個体の応答性を予測するために少なくとも部分的に使用される。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することと、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第

30

40

50

1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、
(a) 第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び
(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a) プライマーであって、(i) 第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii) 第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

20

30

40

50

【0123】

いくつかの態様では、本開示は、個体においてがんを監視する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、個体から（例えば、個体から得られた試料から）得られた複数の核酸に対して実施される。いくつかの実施形態では、方法は、個体から（例えば、個体から得られた第1の試料から）得られた第1の複数の核酸、及び個体から（例えば、個体から得られた第2の試料から）得られた第2の複数の核酸に対して実施され、第1の試料と第2の試料との間のメチル化レベル及び／又は体細胞変異の差を決定することは、個体においてがんを監視するために使用される。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a) 第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a) プライマーであって、(i) 第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii) 第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の

30

40

50

A断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む。

10

20

30

40

50

【0125】

検出

いくつかの実施形態では、（例えば、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び／又は複数の第2の鎖の少なくとも一部分を）検出することは、マイクロアレイ、定量PCR（qPCR）、デジタル液滴PCR（ddPCR）、分子反転プローブ、及び／又は配列決定によるものである。

【0126】

いくつかの実施形態では、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分は、配列決定によって検出される。いくつかの実施形態では、複数の配列リードは、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分から得られる。いくつかの実施形態では、複数の配列リードは、本開示の複数の第2の鎖の少なくとも一部分から得られる。いくつかの実施形態では、配列決定は、全ゲノムメチル配列決定（WGM S）又は次世代配列決定（NG S）である。例えば、いくつかの実施形態では、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分（例えば、メチル化鎖）は、WGM S（例えば、酵素的メチル化配列決定）を介して検出され、かつ／又は本開示の複数の第2の鎖の少なくとも一部分及び／若しくはそれらの増幅産物（例えば、ゲノム鎖）は、WG S（例えば、NG S）を介して検出される。

【0127】

WGM Sのための様々な方法が、当該技術分野で既知である。一般に、これらの方法は、シトシン変換（例えば、上記の方法を使用する）を全ゲノム配列決定技術と組み合わせる。例えば、いくつかの実施形態では、WGM Sは、バイサルファイト配列決定、全ゲノムバイサルファイト配列決定（WGB S）、APOBEC-seq、メチル-CpG結合ドメイン（MBD）タンパク質キャプチャ、メチル-DNA免疫沈降（MeDIP-seq）、メチル化感受性制限酵素配列決定（MSRE/MRE-seq若しくはMethyl-seq）、酵素的メチル化配列決定、酸化バイサルファイト配列決定（oxBS-seq）、縮小表現バイサルファイト配列決定（RRBS）、又はTet補助バイサルファイト配列決定（TAB-seq）を含む。

【0128】

いくつかのWGM S方法は、ライブラリ構築及びアダプターライゲーション、それに続く、標準的なバイサルファイト変換及び配列決定（例えば、WGB S）に依存する。代替的に、バイサルファイト処理は、アダプターライゲーションの前に実施され得る（例えば、Miura, F. et al. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40:e136）を参照されたい）。より最近の技術は、例えば、市販のNEBNext（登録商標）Enzymatic Methyl-seq Kit（New England Biolabs）にあるように、バイサルファイトによって引き起こされたDNAの損傷を低減するために、酵素的アプローチなどの他のシトシン変換方法を使用する。ライブラリ増幅、定量化、及び配列決定のステップは、一般に、バイサルファイト変換の後に続く。いくつかの実施形態では、WGM S前に、核酸が試料から抽出される。いくつかの実施形態では、WGM S前に、核酸は、断片化、修復、及びアダプターライゲーションに供される。すでに述べたように、シトシン変換は、アダプターライゲーションの前又は後に実施され得る。いくつかの実施形態では、DNA修復は、シトシン変換後に実施される。PCR増幅（一般に、少なくとも2サイクル）は、ウラシル（以前は非メチル化のシトシンによって生成された）をチミンに変換するために、シトシン変換後に実施され、ウラシルを読み取ることが可能であるポリメラーゼを使用して達成される（ブルーフリーディング及び修復活動を有するポリメラーゼを除外する）。いくつかの実施形態では、配列決定前に、断片は、所望の長さが富化される。いくつかの実施形態では、配列決定前に、核酸は、MeDIPアプローチにあるように、5mCに特異的な抗体を使用した免疫沈降などによって、メチル化配列が富化される（例えば、Pomraning, K. R. et al. (2009) *Methods* 47:142-150を参照されたい）。

【0129】

NGS方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Metzker, M. (2010) Nature Biotechnology Reviews 11:31-46に記載されている。次世代配列決定のためのプラットフォームには、例えば、Roche/454のGenome Sequencer (GS) FLX System、Illumina/SolexaのGenome Analyzer (GA)、IlluminaのHiSeq 2500、HiSeq 3000、HiSeq 4000、及びNovaSeq 6000 Sequencing System、Life/APGのSupport Oligonucleotide Ligation Detection (SOLiD) システム、PolonatorのG.007システム、Helicos BiosciencesのHeliscope Gene Sequencingシステム、並びにPacific BiosciencesのPacBio RSシステムが含まれる。NGS技術は、ステップ、例えば、鋳型調製、配列決定及び撮像、並びにデータ分析のうちの1つ以上を含み得る。鋳型調製のための方法は、核酸（例えば、ゲノムDNA）をより小さいサイズにランダムに分解し、配列決定鋳型（例えば、断片鋳型又はメイトペア鋳型）を生成するなどのステップを含み得る。空間的に分離された鋳型は、固体表面又は支持体に付着又は固定化され得、大量の配列決定反応を同時に実行することができる。NGS反応に使用され得る鋳型のタイプとしては、例えば、単一DNA分子に由来するクローン増幅鋳型、及び単一DNA分子鋳型が挙げられる。NGSのための例示的な配列決定及び撮像ステップとしては、例えば、循環可逆的終結（CRT）、ライゲーションによる配列決定（SBL）、単一分子付加（パイロ配列決定）、及びリアルタイム配列決定が挙げられる。NGSリードが生成された後、それらは、既知の参照配列に整列され得るか、又はデノボでアセンブリされ得る。例えば、試料（例えば、腫瘍試料）中の一塩基多型及び構造バリエーションなどの遺伝子変化を特定することは、NGSリードを参照配列（例えば、野生型配列）に整列することによって達成され得る。NGSの配列整列の方法は、例えば、Trapnell C. and Salzberg S. L. Nature Biotech., 2009, 27:455-457に記載されている。デノボアセンブリの例は、例えば、Warren R. et al., Bioinformatics, 2007, 23:500-501、Butler J. et al., Genome Res., 2008, 18:810-820、及びZerbino D. R. and Birney E., Genome Res., 2008, 18:821-829に記載されている。配列整列又はアセンブリは、例えば、Roche/454及びIllumina/Solexaリードデータを混合する、1つ以上のNGSプラットフォームからのリードデータを使用して実施され得る。いくつかの実施形態では、NGSは、例えば、Frampton, G. M. et al. (2013) Nat. Biotech. 31:1023-1031、及び/又はMontesion, M., et al., Cancer Discovery (2021) 11(2):282-92に記載される方法に従って実施される。

【0130】

いくつかの実施形態では、方法は、複数のポリヌクレオチドを配列決定する前又は複数の配列リードを提供する前に、複数の核酸を断片化に供することを更に含む。様々なDNA断片化技術は、NGS又はWGMSアプローチ前に、当該技術分野で使用される。いくつかの実施形態では、核酸は、小さい開口部を通して核酸を機械的にせん断するために圧縮ガスが使用される噴霧化によって断片化される。いくつかの実施形態では、核酸は、核酸をせん断するために超音波が使用される超音波処理によって断片化される。いくつかの実施形態では、核酸は、例えば、核酸を断片に消化するために1つ以上の酵素を使用して、酵素的に断片化される。例えば、2つの酵素の混合物、dsDNAニックをランダムに生成するもの、及びニック部位を認識し、反対側の鎖を切断し、dsDNA分解を生成するものであり、NEBNext（登録商標）dsDNA Fragmentaseを参照されたい。

【0131】

いくつかの実施形態では、方法は、複数のポリヌクレオチドを配列決定する前又は複数

の配列リードを提供する前に、上記のような複数の核酸又は核酸断片、例えば、メチル化鎖及び／又はゲノム鎖を選択的に富化することを更に含む。例えば、1つ以上のベイト又はプローブは、例えば、2つ以上のCpGジヌクレオチドのクラスターを含むか、又は目的の遺伝子バリエーション／変異を含む、目的のゲノム遺伝子座又はその断片とハイブリダイズするために使用され得る。例えば、Graham, B. I. et al. Twist Fast Hybridization targeted methylation sequencing: a tunable target enrichment solution for methylation detection [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2021, 2021 Apr 10-15 and May 17-21. Philadelphia (PA): AACR, Cancer Res 2021; 81 (13 Suppl): Abstract nr 2098を参照されたい。いくつかの実施形態では、メチル化鎖を選択的に富化するためのベイト又はプローブの1セット、及びゲノム鎖を選択的に富化するためのベイト又はプローブの1セットの、2つ以上のベイト又はプローブが使用される。いくつかの実施形態では、メチル化鎖を使用して生成されたライブラリを選択的に富化するためのベイト又はプローブの1セット、及びゲノム鎖を使用して生成されたライブラリを選択的に富化するためのベイト又はプローブの1セットの、2つ以上のベイト又はプローブが使用される。したがって、メチル化データ及びゲノムデータの両方のための結合ハイブリッドキャプチャが達成され得、例えば、図14Bに例解されるように、単一ワークフローにおけるメチル化情報及びゲノム情報のためのディープカバーレージ及び情報をもたらす。

10

20

【0132】

いくつかの実施形態では、方法は、複数のポリヌクレオチドを配列決定する前又は複数の配列リードを提供する前に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって複数の核酸又は核酸断片を増幅することを更に含む。WGMS及びNGSに好適な様々なPCR技術が、当該技術分野で既知である。上述のように、いくつかの実施形態では、複数の核酸又は核酸断片は、シトシン変換後にPCRによって増幅される。いくつかの実施形態では、PCRは、本開示のシトシン類似体を使用して達成される。

30

【0133】

いくつかの実施形態では、方法は、複数のポリヌクレオチドを配列決定する前又は複数の配列リードを提供する前に、ハイブリダイゼーションに好適な条件下で、ポリヌクレオチドの混合物をベイト分子と接触させることであって、混合物が、ベイト分子とハイブリダイズすることができる複数のポリヌクレオチドを含む、接触させることと、ベイト分子とハイブリダイズした複数のポリヌクレオチドを単離することであって、ベイト分子とハイブリダイズした単離された複数のポリヌクレオチドが、NGSによって配列決定される、単離することと、を更に含む。

40

【0134】

いくつかの実施形態では、ベイト分子とのハイブリダイゼーションによって捕捉された核酸に対して配列決定を実施することによって、複数の配列リードが得られる。いくつかの実施形態では、ベイト分子とのハイブリダイゼーションによって捕捉された核酸に対して全エクソーム配列決定を実施することによって、複数の配列リードが得られた。いくつかの実施形態では、ベイト分子とのハイブリダイゼーションによって捕捉された核酸に対して、次世代配列決定（NGS）、全エクソーム配列決定、又はメチル化配列決定（例えば、WGMS）を実施することによって、複数の配列リードが得られた。

【0135】

いくつかの実施形態では、ハイブリッドキャプチャアプローチが使用される。このハイブリッドキャプチャプロセス及び他のハイブリッドキャプチャプロセスについての更なる詳細は、米国特許第9,340,830号、Frampton, G. M. et al. (2013) Nat. Biotech. 31:1023-1031、及びMontesio

50

n, M., et al., Cancer Discovery (2021) 11 (2) : 282-92で見出され得る。いくつかの実施形態では、方法は、ポリヌクレオチドの混合物をバイト分子と接触させる前に、個体から試料を得ることであって、試料が、腫瘍細胞及び／又は腫瘍核酸を含む、得ることと、試料からポリヌクレオチドの混合物を抽出することであって、ポリヌクレオチドの混合物が、腫瘍細胞及び／又は腫瘍核酸由来である、抽出することと、を更に含む。いくつかの実施形態では、試料は、非腫瘍細胞を更に含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、本開示の複数の配列リードは、ペアエンド配列リードを含む。一般に、ペアエンド配列決定方法論は、例えば、WO2007/010252、WO2007/091077、及びWO03/74734に記載されている。このアプローチは、二本鎖ポリヌクレオチド鑄型のペアワイズ配列決定を利用し、これは、ポリヌクレオチド鑄型の2つの異なる別々の領域におけるヌクレオチド配列の逐次決定をもたらす。ペアエンド方法論は、他の方法で得られ得るような単一の配列決定リードのみよりもむしろ、クラスターアレイ上の各二本鎖鑄型からの配列情報の2つの結合又はペアリングされたリードを得ることを可能にする。

ペアエンド配列決定技術は、例えば、WO03/74734に記載されるように、固相増幅によって一般に形成されるクラスターアレイを特別に使用し得る。アダプターが取り付けられた標的ポリヌクレオチド二本鎖は、例えば、上記のようなブリッジ増幅を介して、各二本鎖の各鎖の5'末端で固体支持体に固定され、二本鎖DNAの高密度のクラスターを形成する。両方の鎖がそれらの5'末端で固定されるため、次いで、配列決定プライマーは、遊離3'末端にハイブリダイズされ、合成による配列決定が実施される。アダプター配列は、WO2007/091077に記載されるように、標的配列の間に挿入され、各二本鎖からの最大4つのリードを可能にし得る。この方法論の更なる適応では、特定の鎖が、WO2007/010252に記載されるように、制御された方式で切断され得る。結果として、各鎖からの配列決定リードのタイミングは、制御され、二本鎖鑄型の相補鎖上の2つの異なる別々の領域におけるヌクレオチド配列の逐次決定を可能にし得る。例えば、米国特許第10,174,372号を参照されたい。

【0137】

いくつかの実施形態では、複数の配列リードは、ペアになっていない配列リードを含む。

【0138】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、第1及び／又は第2の鎖からの配列情報を逆多重化することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、第2の鎖又はゲノム鎖からの配列リードに対して、第1の鎖又はメチル化鎖からの配列リードを区別するために、配列情報を逆多重化することを含む。いくつかの実施形態では、逆多重化することは、本開示の第1及び／又は第2のアダプター核酸に少なくとも部分的に基づいている。他の能力は、NGSインデックス配列を使用して、試料だけではなく、鎖の様式（メチル又は遺伝子）も特定する可能性を含む。

【0139】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第2の鎖の配列を複数の第1の鎖の配列と比較することを更に含む。例えば、メチル化鎖からの配列は、例えば、1つ以上のシトシンにおける変換又はその欠如を検出するために、ゲノム鎖からの対応する配列と比較され得る。

【0140】

いくつかの実施形態では、方法は、複数の第1及び／又は第2の鎖からの配列を参照ゲノム配列と比較することを更に含む。例えば、メチル化鎖からの配列は、例えば、1つ以上のシトシンにおける変換又はその欠如を検出するために、参照ゲノム配列からの対応する配列と、又は例えば、配列バリエーション／変異を検出するために、参照ゲノム配列からの対応する配列と比較され得る。

【0141】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、コンセンサスメチル化パターン及びCCFを決定する前に、参照ゲノム、例えば、ヒト参照ゲノムに対する複数からの配列リードの整列を実施することを更に含む。いくつかの実施形態では、整列は、ヒト参照ゲノムに対する3文字の整列である。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、コンセンサスメチル化パターン及びCCFを決定する前に、シトシン変換を受けることができなかった複数からの配列決定リードを除外することを更に含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、コンセンサスメチル化パターン及びCCFを決定する前に、CpGジヌクレオチドのうちの少なくとも1つの第1の位置でシトシン又はチミン以外の塩基を有する配列リードを除外することを更に含む。例えば、これらは、配列決定エラー又は変異（体細胞若しくは生殖細胞）によるものであり得る。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、コンセンサスメチル化パターン及びCCFを決定する前に、閾値塩基品質を下回る塩基品質を有する配列リードを除外することを更に含む。いくつかの実施形態では、CpGジヌクレオチド内のシトシンでの塩基コールは、2つの重複しているペアエンドリードを使用して決定される。

10

【0142】

いくつかの実施形態では、（例えば、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び／又は複数の第2の鎖の少なくとも一部分を）検出することは、マイクロアレイによるものである。（例えば、ゲノム鎖に基づく）遺伝子バリエーションの検出に好適なマイクロアレイ技術は、当該技術分野で既知であり、いくつかの実施形態では、マイクロアレイは、目的の1つ以上の遺伝子バリエーション／変異に特異的なプローブを含む。（例えば、メチル化鎖に基づく）メチル化の検出に好適なマイクロアレイ技術は、当該技術分野で既知であり、例えば、Deatherage, D. E. et al. (2009) Methods Mol. Biol. 556: 117-139を参照されたい。

20

【0143】

いくつかの実施形態では、（例えば、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び／又は複数の第2の鎖の少なくとも一部分を）検出することは、定量PCR（qPCR）によるものである。（例えば、ゲノム鎖に基づく）遺伝子バリエーションの検出に好適なqPCR技術は、当該技術分野で既知であり、いくつかの実施形態では、qPCRは、目的の1つ以上の遺伝子バリエーション／変異に特異的なプライマー及び／又はプローブを使用する。（例えば、ゲノム鎖に基づく）メチル化の検出に好適なqPCR技術は、当該技術分野で既知であり、いくつかの実施形態では、qPCRは、特定のメチル化／非メチル化シトシンでのメチル化状態に特異的なプライマー及び／又はプローブを使用する（例えば、Dugast-Darzacq, C. and Grange, T. (2009) Methods Mol. Biol. 507: 281-303を参照されたい。

30

【0144】

いくつかの実施形態では、（例えば、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び／又は複数の第2の鎖の少なくとも一部分を）検出することは、デジタル液滴PCR（ddPCR）によるものである。（例えば、ゲノム鎖に基づく）遺伝子バリエーションの検出に好適なddPCR技術は、当該技術分野で既知であり、いくつかの実施形態では、ddPCRは、目的の1つ以上の遺伝子バリエーション／変異に特異的なプライマー及び／又はプローブを使用する。（例えば、メチル化鎖に基づく）メチル化の検出に好適なddPCR技術は、当該技術分野で既知であり、例えば、Yu, M. et al. (2018) Methods Mol. Biol. 1768: 363-383を参照されたい。

40

【0145】

いくつかの実施形態では、（例えば、本開示の複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び／又は複数の第2の鎖の少なくとも一部分を）検出することは、分子反転プローブ（MIP）によるものである。（例えば、ゲノム鎖に基づく）遺伝子バリエーションの検出に好適なMIP技術は、当該技術分野で既知であり、例えば、Absalan, F. and Ronaghi, M. (2007) Methods Mol Biol 396: 315-3

50

30を参照されたい。(例えば、メチル化鎖に基づく)メチル化の検出に好適なMIP技術も、当該技術分野で既知であり、例えば、Carrascosa, L. G. et al. (2014) Chem Commun (Camb) 50:3585-3588を参照されたい。

【0146】

試料及びがん

いくつかの実施形態では、本開示の一本鎖DNA断片及び／又は二本鎖DNA断片は、試料から得られる。

【0147】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、試料から複数の核酸を単離することを更に含む。いくつかの実施形態では、核酸は、例えば、腫瘍細胞及び／又は腫瘍核酸を含む試料から得られる。例えば、試料は、腫瘍細胞、循環腫瘍細胞、腫瘍核酸(例えば、腫瘍循環腫瘍DNA、cfDNA、若しくはcfRNA)、腫瘍生検の一部若しくは全部、体液、細胞、組織、mRNA、cDNA、DNA、RNA、セルフリーDNA、及び／又はセルフリーRNAを含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、腫瘍生検又は腫瘍標本由来である。いくつかの実施形態では、試料は、非腫瘍細胞及び／又は非腫瘍核酸を更に含む。いくつかの実施形態では、体液は、血液、血清、血漿、唾液、精液、脳脊髄液、羊水、腹水、間質液などを含む。いくつかの実施形態では、試料は、非腫瘍細胞及び／又は非腫瘍核酸を更に含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、試料は、がんからの組織、細胞、及び／若しくは核酸、並びに／又は正常組織からの組織、細胞、及び／若しくは核酸を含む。いくつかの実施形態では、試料が、組織生検試料、液体生検試料、又は正常対照を含む。いくつかの実施形態では、試料は、腫瘍生検、腫瘍標本、又は循環腫瘍細胞由来である。いくつかの実施形態では、試料は、液体生検試料であり、かつ血液、血漿、血清、脳脊髄液、痰、便、尿、又は唾液を含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、試料は、全核酸の1%未満、全核酸の0.5%未満、全核酸の0.1%未満、又は全核酸の0.05%未満である腫瘍核酸の割合を含む。いくつかの実施形態では、試料は、全核酸の少なくとも0.01%、少なくとも0.05%、又は少なくとも0.1%である腫瘍核酸の割合を含む。いくつかの実施形態では、試料は、全核酸の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、又は0.02%の上限、及び全核酸の0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、又は1%の独立して選択される下限を有する腫瘍核酸の割合を含み、上限は、下限よりも高い。

【0150】

いくつかの実施形態では、試料は、生体組織若しくは生体液であるか、又はそれを含む。試料は、保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定剤、栄養素、抗生物質などの自然界で組織と天然に混合されない化合物を含むことができる。一実施形態では、試料は、凍結試料として、又はホルムアルデヒド若しくはパラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋(FFPE)組織調製物として保存される。例えば、試料は、マトリックス、例えばFFPEブロック又は凍結試料に埋め込むことができる。別の実施形態では、試料は、血液又は血液成分試料である。更に別の実施形態では、試料は、骨髓穿刺試料である。別の実施形態では、

試料は、セルフリーDNA (cfDNA) 又は循環セルフリーDNA (ccfDNA)、例えば、腫瘍cfDNA又は腫瘍ccfDNAを含む。理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、cfDNAは、アポトーシス細胞又は壊死細胞からのDNAであると考えられる。典型的には、cfDNAはタンパク質(例えば、ヒストン)によって結合され、ヌクレアーゼによって保護される。cfDNAは、例えば、非侵襲的出生前検査(NIPT)、臓器移植、心筋症、微生物叢、及びがんのバイオマーカーとして使用することができる。別の実施形態では、試料は循環腫瘍DNA(ctDNA)を含む。理論に束縛されることを望むものではないが、ctDNAは、腫瘍細胞と非腫瘍細胞に由来するものを区別することができる遺伝的又はエピジェネティックな変化(例えば、体細胞変化又はメチル化シグネチャ)を有するcfDNAである。別の実施形態では、試料は循環腫瘍細胞(CTC)を含む。理論に束縛されることを望むものではないが、いくつかの実施形態では、CTCは、原発性又は転移性腫瘍から循環に放出された細胞であると考えられている。いくつかの実施形態では、CTCアポトーシスは、血液／リンパ液中のctDNAの供給源である。

10

20

30

40

50

【0151】

本明細書に提供される方法のいずれかのいくつかの実施形態では、がんは、がん腫、肉腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫、胚細胞がん、又は芽細胞腫である。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、がんは、血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、がんは、B細胞がん、黒色腫、乳がん、肺がん、気管支がん、結腸直腸がん、前立腺がん、膵臓がん、胃がん、卵巣がん、膀胱がん、脳がん、中枢神経系がん、末梢神経系がん、食道がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、口腔のがん、咽頭のがん、肝臓がん、腎臓がん、精巣がん、胆道がん、小腸がん、虫垂がん、唾液腺がん、甲状腺がん、副腎がん、骨肉腫、軟骨肉腫、血液組織のがん、腺がん、炎症性筋線維芽細胞腫、消化管間質腫瘍(GIST)、結腸がん、多発性骨髄腫(MM)、骨髄異形成症候群(MDS)、骨髄増殖性障害(MPD)、急性リンパ性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄球性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、赤血球増加症Vera、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、軟部組織肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ血管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮がん、基底細胞がん、腺がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭状がん、乳頭状腺がん、髄様がん、気管支原性がん、腎細胞がん、肝がん、胆管がん、絨毛がん、精上皮がん、胎児性がん、ウィルムス腫瘍、膀胱がん、上皮がん、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体細胞腫、神経膠芽腫、聴神経芽腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽腫、網膜芽細胞腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肝細胞がん、甲状腺がん、胃がん、頭頸部がん、小細胞がん、本態性血小板血症、無形成性骨髄化生、好酸球増加症候群、全身性肥満細胞症、家族性好酸球増加症、慢性好酸球性白血病、神経内分泌がん、又はカルチノイド腫瘍である。

【0152】

いくつかの実施形態では、がんは、虫垂腺がん、膀胱腺がん、尿路上皮(移行細胞)がん腫、特定不能(NOS)の乳がん、乳がん腫NOS、浸潤性乳管がん腫(IDC)、浸潤性小葉がん腫(ILC)、子宮頸部扁平上皮がん腫(SCC)、結腸腺がん(CRC)、食道腺がん、食道がん腫NOS、食道扁平上皮がん腫(SCC)、眼の眼内黒色腫、胆嚢腺がん、胃食道接合部腺がん、肝内胆管がん、腎臓がんNOS、肝臓の肝細胞がん腫(HCC)、肺がんNOS、肺腺がん、肺大細胞がん腫、肺の非小細胞肺がん腫(NSCLC)NOS、肺小細胞未分化がん腫、肺扁平上皮がん腫(SCC)、卵巣がんNOS、膵臓がんNOS、膵管腺がん、膵胆管がん腫、前立腺がんNOS、前立腺腺房腺がん、前立腺導管腺がん、直腸腺がん(CRC)、皮膚黒色腫、小腸腺がん、軟部組織肉腫NOS、胃腺がんNOS、原発不明がんNOS、原発不明腺がん、原発不明がん腫(CUP)NOS、原発不明神経内分泌腫瘍、原発不明扁平上皮がん腫(SCC)、又は子宮の子宮内膜腺がんNOSである。

【0153】

いくつかの実施形態では、本開示の試料は、個体から得られる。いくつかの実施形態では、個体は、がんを有する。いくつかの実施形態では、個体は、がんを有する疑いがある。いくつかの実施形態では、個体は、がん又はその再発若しくは寛解についてスクリーニングされている。いくつかの実施形態では、個体は、例えば、がんの治療を受けているか、又は受けたことがある。

【0154】

ソフトウェア、システム、及びデバイス

別の態様では、1つ以上のプロセッサと、1つ以上のコンピュータプログラム命令を記憶するように構成されたメモリと、を備えるシステムが、本明細書に提供され、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物の第1の複数の配列リードを得（第1の核酸分子は、非メチル化シトシンが第1の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている）、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物の第2の複数の配列リードを得（第2の核酸分子が、シトシン変換前に第1の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む）、シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された1つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第1の複数の配列リードを分析し、かつ配列情報について、第2の複数の配列リードを分析するように構成されている。いくつかの実施形態では、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第1のアダプター核酸配列を更に含み、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第1の複数の配列リード中の第1のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第2のアダプター核酸配列を更に含み、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第2の複数の配列リード中の第2のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、第1の複数の配列リードは、第2の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第2の複数の配列リードは、第1の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第1及び／又は第2の複数の配列リードは、配列決定によって得られ、任意選択的に、配列決定は、超並列配列決定（MPS）技術、全ゲノム配列決定（WGS）、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサンガー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、超並列配列決定技術は、次世代配列決定（NGS）を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、分析に少なくとも部分的に基づいて、試料についての分子プロファイルを生成するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、包括的ゲノムプロファイリング（CGP）試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、個体は、分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて治療が施される。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第2の複数の配列リードの1つの配列リードを第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較するように更に構成されている。いくつかの実施形態では、1つ以上のコンピュータプログラム命令は、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第1及び／又は第2の複数の配列リードの1つ以上の配列リードを参照ゲノム配列と比較す

10

20

30

40

50

るように更に構成されている。

【0155】

別の態様では、方法を実施するための1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行可能な1つ以上のプログラムを含む非一時的コンピュータ可読記憶媒体が、本明細書に提供され、方法は、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物の第1の複数の配列リードを得ることであって、第1の核酸分子は、非メチル化シトシンが第1の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている、得ることと、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物の第2の複数の配列リードを得ることであって、第2の核酸分子が、シトシン変換前に第1の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、得ることと、シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された1つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第1の複数の配列リードを分析することと、配列情報について、第2の複数の配列リードを分析することと、を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第1のアダプター核酸配列を更に含み、方法は、第1の複数の配列リード中の第1のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物は、第2のアダプター核酸配列を更に含み、方法は、第2の複数の配列リード中の第2のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む。いくつかの実施形態では、第1の複数の配列リードは、第2の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第2の複数の配列リードは、第1の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である。いくつかの実施形態では、第1及び／又は第2の複数の配列リードは、配列決定によって得られ、任意選択的に、配列決定は、超並列配列決定(MPS)技術、全ゲノム配列決定(WGS)、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサンガー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、超並列配列決定技術は、次世代配列決定(NGS)を含む。いくつかの実施形態では、方法は、分析に少なくとも部分的に基づいて、試料についての分子プロファイルを生成することを更に含む。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、包括的ゲノムプロファイリング(CGP)試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、個体は、分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて治療が施される。いくつかの実施形態では、分子プロファイルは、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、第2の複数の配列リードの1つの配列リードを第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1及び／又は第2の複数の配列リードの1つの配列リードを参照ゲノム配列と比較することを更に含む。

【0156】

いくつかの実施形態では、本開示の分子プロファイル又はレポートは、例えば、本開示の方法を使用して、メチル化鎖及び／又はゲノム鎖を配列決定することからの結果を含む。

【0157】

図16は、一実施形態に従ったコンピューティングデバイスの一例を例解する。デバイス1100は、ネットワークに接続されたホストコンピュータであり得る。デバイス1100は、クライアントコンピュータ又はサーバであり得る。図16に示されるように、デバイス1100は、パーソナルコンピュータ、ワークステーション、サーバ、又は電話若しくはタブレットなどのハンドヘルドコンピューティングデバイス(携帯電子デバイス)などの任意の好適なタイプのマイクロプロセッサベースのデバイスであり得る。デバイス

は、例えば、プロセッサ 1 1 1 0、入力デバイス 1 1 2 0、出力デバイス 1 1 3 0、ストレージ 1 1 4 0、通信デバイス 1 1 6 0、電源 1 1 7 0、オペレーションシステム 1 1 8 0、及びシステムバス 1 1 9 0を含んでもよい。入力デバイス 1 1 2 0及び出力デバイス 1 1 3 0は、一般に、本明細書に記載のものに対応していてもよく、コンピュータと接続可能であってもよく、又はコンピュータと一体化していてもよい。

【0158】

入力デバイス 1 1 2 0は、タッチスクリーン、キーボード若しくはキーパッド、マウス、又は音声認識デバイスなどの入力を提供する任意の好適なデバイスであってもよい。出力デバイス 1 1 3 0は、タッチスクリーン、触覚デバイス、又はスピーカなど、出力を提供する任意の好適なデバイスであってもよい。

10

【0159】

ストレージ 1 1 4 0は、ストレージ（例えば、RAM（揮発性及び不揮発性）、キャッシュ、ハードドライブ、又はリムーバブルストレージディスクを含む、電氣的、磁氣的、又は光学的メモリ）を提供する任意の好適なデバイスであり得る。通信デバイス 1 1 6 0は、ネットワークインターフェースチップ又はデバイスなどのネットワークを介してシグナルを送受信し得る任意の好適なデバイスを含み得る。コンピュータの構成要素は、例えば、有線メディア（例えば、物理バス、イーサネット、若しくは任意の他の有線転送技術）を介して、又は無線（例えば、Bluetooth（登録商標）、Wi-Fi（登録商標）、又は任意の他の無線技術）で、任意の好適な様式で接続することができる。例えば、図 1 6では、構成要素は、システムバス 1 1 9 0によって接続される。

20

【0160】

検出モジュール 1 1 5 0は、ストレージ 1 1 4 0に実行可能な命令として格納され、プロセッサ 1 1 1 0によって実行されることができ、例えば、本開示の機能を具現化するプロセスを含むことができる（例えば、上記のデバイスに具現化される）。

【0161】

検出モジュール 1 1 5 0はまた、命令実行システム、装置、若しくはデバイス（例えば、本明細書に記載のもの）によって、又はそれらと接続して使用するための任意の非一時的コンピュータ可読記憶媒体内に記憶及び／又は転送することができ、命令実行システム、装置、若しくはデバイスからの、ソフトウェアに関連付けられた命令をフェッチし、命令を実行することができる。本開示の文脈において、コンピュータ可読記憶媒体は、ストレージ 1 1 4 0などの任意の媒体であり得、命令実行システム、装置、若しくはデバイスによって、又はそれらと接続して使用するためのプロセスを含む若しくは記憶することができる。コンピュータ可読記憶媒体の例としては、単一の機能ユニットとして動作するハードドライブ、フラッシュドライブ、及び配信モジュールなどのメモリユニットを挙げることができる。また、本明細書に記載の様々なプロセスは、上記の実施形態及び技法に従って動作するように構成されたモジュールとして具現化され得る。更に、プロセスは別個に示され、かつ／又は説明され得るが、当業者は、上記のプロセスが他のプロセス内のルーチン又はモジュールであり得ることを理解するであろう。

30

【0162】

検出モジュール 1 1 5 0はまた、命令実行システム、装置、若しくはデバイス（例えば、上記のもの）によって、又はそれらと接続して使用するための任意の伝送媒体内に伝播することができ、命令実行システム、装置、若しくはデバイスからの、ソフトウェアに関連付けられた命令をフェッチし、命令を実行することができる。本開示の文脈において、伝送媒体は、任意の媒体とし得、命令実行システム、装置、若しくはデバイスによって、又はそれらと接続して使用するための伝送プログラミングを通信、伝播、又は伝送し得る。伝送可読媒体は、電子、磁気、光学、電磁気、若しくは赤外線の有線又は無線伝播媒体を含み得るが、これらに限定されない。

40

【0163】

デバイス 1 1 0 0は、任意の好適なタイプの相互接続された通信システムであり得る、ネットワーク（例えば、図 1 5に示され、かつ／又は以下に記載される、ネットワーク 1

50

004) に接続され得る。ネットワークは、任意の好適な通信プロトコルを実装し得、任意の好適なセキュリティプロトコルによって保護され得る。ネットワークは、無線ネットワーク接続 (T1 若しくは T3 回線)、ケーブルネットワーク、DSL、又は電話回線などの、ネットワークシグナルの送受信を実装し得る任意の好適な配置のネットワークリンクを含み得る。

【0164】

デバイス1100は、ネットワーク上で動作するのに好適な任意のオペレーティングシステム (例えば、オペレーティングシステム1180) を実装することができる。検出モジュール1150は、C、C++、Java、又はPythonなどの任意の好適なプログラミング言語で書くことができる。様々な実施形態では、本開示の機能を具現化するアプリケーションソフトウェアは、異なる構成で (例えば、クライアント/サーバ配置で、又はウェブベースのアプリケーション若しくはウェブサービスとしてのウェブブラウザを介して) 展開され得る。いくつかの実施形態では、オペレーティングシステム1180は、1つ以上のプロセッサ、例えばプロセッサ1110によって実行される。

10

【0165】

デバイス1100は、任意の好適な電源であり得る電源1170を更に備えてもよい。

【0166】

いくつかの実施形態では、検出モジュール1150は、1つ以上のHLA-I遺伝子のLOH及び/又は腫瘍変異負荷を検出するためのモジュールであり、(例えば、本明細書に記載されるデバイスにおいて具現化されるような) 本開示の機能性を具現化するプロセスを含む。

20

【0167】

図15は、一実施形態によるコンピューティングシステムの例を例解する。システム1000では、デバイス1100 (例えば、上記に説明され、図16に例解される) は、ネットワーク1004に接続され、これはまた、デバイス1006にも接続されている。いくつかの実施形態では、デバイス1006は、シーケンサーである。例示的なシーケンサーには、限定されないが、Roche/454のGenome Sequencer (GS) FLX System、Illumina/SolexaのGenome Analyzer (GA)、IlluminaのHiSeq 2500、HiSeq 3000、HiSeq 4000、及びNovaSeq 6000配列決定システム、Life/AMGのSupport Oligonucleotide Ligation Detection (SOLiD) システム、PolonatorのG.007システム、Helicos BiosciencesのHeliscope Gene配列決定システム、又はPacific BiosciencesのPacBio RSシステムが挙げられ得る。デバイス1100及び1006は、例えば、ローカルエリアネットワーク (LAN)、仮想プライベートネットワーク (VPN)、又はインターネットなどのネットワーク1004を介した好適な通信インターフェースを使用して、通信することができる。いくつかの実施形態では、ネットワーク1004は、例えば、インターネット、イントラネット、仮想プライベートネットワーク、クラウドネットワーク、有線ネットワーク、又は無線ネットワークであり得る。デバイス1100及び1006は、イーサネット、IEEE 802.11b無線などの無線又は有線通信を介して、部分的又は全体的に通信することができる。加えて、デバイス1100及び1006は、例えば、好適な通信インターフェースを使用して、モバイル/セルラーネットワークなどの第2のネットワークを介して通信することができる。デバイス1100と1006との間の通信は、メールサーバ、モバイルサーバ、メディアサーバ、電話サーバなどの様々なサーバを更に含むか、それらと通信することができる。いくつかの実施形態では、デバイス1100及び1006は、(ネットワーク1004を介した通信の代わりに、又はそれに加えて)、例えば、イーサネット、IEEE 802.11b無線などの無線又は有線通信を介して、直接通信することができる。いくつかの実施形態では、デバイス1100及び1006は、直接接続であり得るか、又はネットワーク (例えば、ネットワーク1004) を介して生じることがで

30

40

50

きる通信1008を介して通信する。

【0168】

デバイス1100及び1006のうちの1つ又は全ては、一般に、本明細書に記載される様々な実施例に従って、ネットワーク1004を介して情報を提供及び／又は受信するために、ロジック（例えば、httpウェブサーバロジック）を含むか、あるいはローカル若しくはリモートデータベース又はデータ及びコンテンツの他のソースからアクセスされたデータをフォーマットするようにプログラムされる。

【0169】

図14Cは、本開示のいくつかの実施形態に従って、単一ワークフローにおいて遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出するための例示的なプロセス1400を例解する。プロセス1400は、例えば、ソフトウェアプログラムを実装する1つ以上の電子デバイスを使用して実行される。いくつかの例では、プロセス1400は、クライアント-サーバシステムを使用して実施され、プロセス1400のブロックは、サーバとクライアントデバイスとの間で、任意の様式で分割される。他の例では、プロセス1400のブロックは、サーバと複数のクライアントデバイスとの間で分割される。したがって、プロセス1400の部分は、クライアント-サーバシステムの特定のデバイスによって実施されているものとして本明細書に記載されているが、プロセス1400はそのように限定されないことを理解するであろう。いくつかの実施形態では、実行されるステップは、多くのシステムを介して、例えば、クラウド環境で実行され得る。他の例では、プロセス1400は、クライアントデバイスのみ、又は複数のクライアントデバイスのみを使用して実施される。プロセス1400では、いくつかのブロックが、任意選択的に組み合わせられ、いくつかのブロックの順序が、任意選択的に変更され、いくつかのブロックが、任意選択的に省略される。いくつかの例では、プロセス1400と組み合わせる追加のステップを実施することができる。したがって、例解されている（及び以下により詳細に説明されている）動作は、本質的に例示的なものであり、したがって、限定するものとみなされるべきではない。

10

20

【0170】

ブロック1402では、1つ以上の第1の核酸分子又はそれらの増幅産物の第1の複数の配列リードが得られ、第1の核酸分子は、非メチル化シトシンが第1の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような（例えば、本明細書に記載される）条件下で、シトシン変換処理を受けている。

30

【0171】

ブロック1404では、1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物の第2の複数の配列リードが得られ、第2の核酸分子は、シトシン変換前に第1の核酸分子に相補的であり、（例えば、本明細書に記載される）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む。

【0172】

ブロック1406では、例示的なシステム（例えば、1つ以上の電子デバイス）は、シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された1つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第1の複数の配列リードを分析する。

40

【0173】

ブロック1408では、例示的なシステム（例えば、1つ以上の電子デバイス）は、配列情報について、第2の複数の配列リードを分析する。

【0174】

任意選択的に、方法は、第1の複数の配列リード中の第1のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む。

【0175】

いくつかの実施形態では、第1及び／又は第2の複数の配列リードは、WGMS及び／又はWGSを実施するためのものなど、本明細書に記載されるか、又は別様に当該技術分

50

野で既知のシーケンサーを使用して得られる。

【0176】

いくつかの実施形態では、ブロック1402及び／又は1402の前に、第1及び／又は第2の複数の配列リードは、例えば、本明細書に記載されるメチル化鎖及び／又はゲノム鎖に基づいて、本開示の方法のいずれかによって生成される。

【0177】

報告

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、レポートを生成すること、及び／又はレポートを当事者に提供することを含む。いくつかの実施形態では、レポートは、例えば、本明細書に記載される個体からの試料中で検出された、メチル化及び／若しくは体細胞変異又はそれらの欠如に少なくとも部分的に基づいて、個体について特定された1つ以上の治療選択肢を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の治療選択肢は、検出された化、又は検出されなかったメチル化及び／又は体細胞変異に少なくとも部分的に基づいている。

【0178】

本開示によるレポートは、電子形態、ウェブベースの形態、又は紙形態であってもよい。レポートは、個体若しくは患者（例えば、がんを有する個体若しくは患者）に、又は介護者、医師、腫瘍学者、病院、クリニック、第三者支払者、保険会社、若しくは政府機関のうちの1つ以上など、個体若しくは患者以外（例えば、がんを有する個体若しくは患者以外）の個体若しくは事業体に提供され得る。いくつかの実施形態では、レポートは、個体（例えば、がんを有する個体）から試料を得てから約1日以上、約7日以上、約14日以上、約21日以上、約30日以上、約45日以上、又は約60日以上のうちのいずれかのうちに個体又は事業体に提供されるか、又は届けられる。いくつかの実施形態では、レポートは、個体（例えば、がんを有する個体）から得られた試料中のメチル化及び／又は体細胞変異を検出してから約1日以上、約7日以上、約14日以上、約21日以上、約30日以上、約45日以上、又は約60日以上のうちのいずれかのうちに個体又は事業体に提供されるか、又は届けられる。

【0179】

IV. 例示的な実施形態

以下の例示的な実施形態は、本発明のいくつかの態様を代表するものである。

実施形態1. 単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

複数の第1の一本鎖DNA断片を、（a）第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、（b）核酸ポリメラーゼ、及び（c）シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、

非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することと、

複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態2. 検出することが、配列決定によるものである、実施形態1に記載の方法。

実施形態3. 配列決定が、次世代配列決定（NGS）である、実施形態2に記載の方法。

実施形態4. 検出することが、マイクロアレイ、定量PCR（qPCR）、デジタル液滴PCR（ddPCR）、又は分子反転プローブによるものである、実施形態1に記載の方法。

実施形態5. 方法が、検出する前に、複数の第1の鎖及び／又は複数の第2の鎖を増幅に供することを更に含み、検出することが、複数の第1及び第2の鎖の少なくとも一部分、

並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含む、実施形態 1～4 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 6．複数の第 1 の鎖とではなく、複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、複数の第 2 の鎖を増幅に供することを含む、実施形態 5 に記載の方法。

実施形態 7．複数の第 2 の鎖とではなく、複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、複数の第 1 の鎖を増幅に供することを含む、実施形態 5 又は実施形態 6 に記載の方法。

実施形態 8．1 つ以上のプライマーが、第 1 の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、第 1 の鎖がシトシン変換を受けた後に、複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、実施形態 7 に記載の方法。

10

実施形態 9．1 つ以上のプライマーが、第 1 の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、実施形態 7 に記載の方法。

実施形態 10．増幅が、シトシン変換後に生じる、実施形態 5～9 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 11．方法が、検出する前に、複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む、実施形態 1～10 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 12．方法が、検出する前に、複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む、実施形態 1～11 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 13．方法が、検出する前に、1 つ以上の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を、1 つ以上の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物から分離することを含む、実施形態 11 又は実施形態 12 に記載の方法。

20

実施形態 14．分離が、(a) 1 つ以上のベイト分子を複数の第 1 及び第 2 の鎖と組み合わせることであって、1 つ以上のベイト分子が、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は第 2 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b) 核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、実施形態 13 に記載の方法。

実施形態 15．1 つ以上のベイト分子が、複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、実施形態 14 に記載の方法。

30

実施形態 16．分離が、シトシン変換処理後に生じ、1 つ以上のベイト分子が、第 1 の鎖の 1 つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする、実施形態 15 に記載の方法。

実施形態 17．1 つ以上のベイト分子が、複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第 2 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、実施形態 14 に記載の方法。

実施形態 18．分離が、

(a) 1 つ以上の第 1 のベイト分子を複数の第 1 及び第 2 の鎖と組み合わせることであって、1 つ以上の第 1 のベイト分子が、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第 1 の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、

40

(b) 第 1 の核酸ハイブリッドを単離することと、

(c) 1 つ以上の第 2 のベイト分子を複数の第 1 及び第 2 の鎖と組み合わせることであって、1 つ以上の第 2 のベイト分子が、第 2 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第 2 の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、

(d) 第 2 の核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、実施形態 13 に記載の方法。

実施形態 19．複数の第 1 及び 2 の鎖又はそれらの増幅産物が、一緒に検出される、実施形態 1～18 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 20．複数の第 1 及び 2 の鎖又はそれらの増幅産物が、別々に検出される、実施

50

形態 1 ～ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 21. 方法が、(a) 第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び (c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を 2 ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む、実施形態 1 ～ 20 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 22. 1 つ以上の核酸アダプターを、第 1 の一本鎖 DNA 断片のうちの 1 つ以上に付着させることを更に含む、実施形態 1 ～ 21 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 23. 1 つ以上の核酸アダプターを、第 2 の鎖のうちの 1 つ以上に付着させることを更に含む、実施形態 1 ～ 22 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 24. 1 つ以上の核酸アダプターが、ライゲーション、転位、テーリング、又は鑄型スイッチングによって、第 1 の鎖又は第 2 の鎖に付着している、実施形態 22 又は実施形態 23 に記載の方法。

実施形態 25. 単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

第 1 のアダプター核酸を、複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分に付着させることと、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、(a) 第 1 のアダプター核酸の下流又は第 1 のアダプター核酸において、第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び (c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第 1 のアダプター核酸を有する第 1 の一本鎖 DNA 断片を含む複数の第 1 の鎖、及び第 1 の一本鎖 DNA 断片に相補的な第 2 の一本鎖 DNA 断片、及び第 1 のアダプター核酸に相補的な第 2 のアダプター核酸を含む複数の第 2 の鎖を生成し、第 2 の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、

非メチル化シトシンが第 1 の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第 1 及び第 2 の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後に、第 1 及び第 2 のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分及び複数の第 2 の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態 26. 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分の 3' 末端に付着している、実施形態 25 に記載の方法。

実施形態 27. 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分の 5' 末端に付着している、実施形態 25 に記載の方法。

実施形態 28. 第 1 のアダプター核酸が、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、実施形態 25 ～ 27 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 29. 第 1 のアダプター核酸が、1 つ以上のメチル化シトシンを含み、プライマーが、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、実施形態 25 ～ 27 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 30. 単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を提供することと、

複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を、(a) プライマーであって、(i) 第 1 の一本鎖 DNA 断片にアニールしない第 2 のアダプター核酸部分と、(ii) 第 1 の一本鎖 DNA 断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び (c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1 ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第 2 のアダプター核酸に相補的な第 1 のアダプター核酸を有する第 1 の一本鎖 DNA 断片を含む複数の第 1 の鎖、並びに第 1 の一本鎖 DNA 断片に相補的な第 2 の一本鎖 DNA 断片、及

10

20

30

40

50

び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後に、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態31．プライマーの第2のアダプター核酸部分が、第1の一本鎖DNA断片にアニールするプライマーの部分に対して5'である、実施形態30に記載の方法。

実施形態32．プライマーが、プライマー伸長後に第2のアダプター核酸の一部になり、シトシン変換中に変換される、1つ以上の非メチル化シトシンを含む、実施形態31に記載の方法。

実施形態33．単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、

非メチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をシトシン変換処理に供することであって、シトシン変換後に、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態34．検出することが、配列決定によるものである、実施形態25～33のいずれか1つに記載の方法。

実施形態35．配列決定が、次世代配列決定(NGS)である、実施形態34に記載の方法。

実施形態36．検出することが、マイクロアレイ、定量PCR(qPCR)、デジタル液滴PCR(ddPCR)、又は分子反転プローブによるものである、実施形態25～33のいずれか1つに記載の方法。

実施形態37．第1及び／又は第2のアダプター核酸に基づいて、第1及び第2の鎖からの配列情報を逆多重化することを更に含む、実施形態25～36のいずれか1つに記載の方法。

実施形態38．方法が、検出する前に、複数の第1の鎖及び／又は複数の第2の鎖を増幅に供することを更に含み、検出することが、複数の第1及び第2の鎖の少なくとも一部分、並びに存在する場合、それらの増幅産物を検出することを含む、実施形態25～37のいずれか1つに記載の方法。

実施形態39．複数の第1の鎖とではなく、複数の第2の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーの存在下で、複数の第2の鎖を増幅に供することを含む、実施形態38に記載の方法。

実施形態40．複数の第2の鎖の少なくとも一部分とアニールする1つ以上のプライマーが、第2のアダプター核酸の少なくとも一部分とアニールする、実施形態39に記載の方法。

実施形態 4 1 . 複数の第 2 の鎖とではなく、複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーの存在下で、複数の第 1 の鎖を増幅に供することを含む、実施形態 3 8 ~ 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 4 2 . 複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする 1 つ以上のプライマーが、第 1 のアダプター核酸の少なくとも一部分とアニールする、実施形態 4 1 に記載の方法。

実施形態 4 3 . 1 つ以上のプライマーが、第 1 の鎖がシトシン変換を受ける前ではなく、第 1 の鎖がシトシン変換を受けた後に、複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、実施形態 4 1 に記載の方法。

実施形態 4 4 . 1 つ以上のプライマーが、第 1 の鎖のシトシンがシトシン変換を受けない場合のみ、複数の第 1 の鎖の少なくとも一部分とアニールする、実施形態 4 1 に記載の方法。

10

実施形態 4 5 . 増幅が、シトシン変換後に生じる、実施形態 3 8 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 4 6 . 方法が、検出する前に、複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む、実施形態 2 5 ~ 4 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 4 7 . 方法が、検出する前に、複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を富化することを更に含む、実施形態 2 5 ~ 4 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

実施形態 4 8 . 方法が、検出する前に、1 つ以上の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物を、1 つ以上の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物から分離することを含む、実施形態 4 6 又は実施形態 4 7 に記載の方法。

20

実施形態 4 9 . 分離が、(a) 1 つ以上のベイト分子を複数の第 1 及び第 2 の鎖と組み合わせることであって、1 つ以上のベイト分子が、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物と、又は第 2 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、(b) 核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、実施形態 4 8 に記載の方法。

実施形態 5 0 . 1 つ以上のベイト分子が、複数の第 2 の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、実施形態 4 9 に記載の方法。

実施形態 5 1 . 1 つ以上のベイト分子が、第 1 のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする、実施形態 4 9 又は実施形態 5 0 に記載の方法。

30

実施形態 5 2 . 分離が、シトシン変換処理後に生じ、1 つ以上のベイト分子が、第 1 の鎖の 1 つ以上のシトシンがシトシン変換を受ける場合、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物とハイブリダイズする、実施形態 4 9 又は実施形態 5 0 に記載の方法。

実施形態 5 3 . 1 つ以上のベイト分子が、複数の第 1 の鎖又はそれらの増幅産物とではなく、第 2 の鎖のうちの 1 つ以上若しくはそれらの増幅産物とハイブリダイズする、実施形態 4 9 に記載の方法。

実施形態 5 4 . 1 つ以上のベイト分子が、第 2 のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする、実施形態 5 3 に記載の方法。

実施形態 5 5 . 分離が、

40

(a) 1 つ以上の第 1 のベイト分子を複数の第 1 及び第 2 の鎖と組み合わせることであって、1 つ以上の第 1 のベイト分子が、第 1 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第 1 の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、

(b) 第 1 の核酸ハイブリッドを単離することと、

(c) 1 つ以上の第 2 のベイト分子を複数の第 1 及び第 2 の鎖と組み合わせることであって、1 つ以上の第 2 のベイト分子が、第 2 の鎖のうちの 1 つ以上又はそれらの増幅産物と優先的にハイブリダイズし、それによって、第 2 の核酸ハイブリッドを産生する、組み合わせることと、

(d) 第 2 の核酸ハイブリッドを単離することと、を含む、実施形態 4 8 に記載の方法。

50

実施形態 56. 1つ以上の第1のベイト分子が、第1のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズし、かつ／又は1つ以上の第2のベイト分子が、第2のアダプター核酸の少なくとも一部分とハイブリダイズする、実施形態 55に記載の方法。

実施形態 57. 複数の第1及び2の鎖又はそれらの増幅産物が、一緒に検出される、実施形態 25～56のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 58. 複数の第1及び2の鎖又はそれらの増幅産物が、別々に検出される、実施形態 25～56のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 59. 方法が、(a) 第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b) 核酸ポリメラーゼ、及び(c) シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下でのシトシン変換前に、複数の第1の一本鎖DNA断片を2ラウンド以上のプライマー伸長に供することを含む、実施形態 25～58のいずれか1つに記載の方法。

10

実施形態 60. 複数の第1の鎖が、複数の第2の鎖とは異なる配列決定深度で配列決定される、実施形態 1、2、5～34、及び37～59のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 61. 複数の第2の鎖が、複数の第1の鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される、実施形態 60に記載の方法。

実施形態 62. 複数の第1の鎖が、複数の第2の鎖の配列決定深度よりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍高い配列決定深度で配列決定される、実施形態 60に記載の方法。

20

実施形態 63. プライマー伸長後、複数の第1の鎖が、複数の二本鎖核酸中の複数の第2の鎖とハイブリダイズされる、実施形態 1～62のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 64. プライマー伸長のラウンド前に、複数の二本鎖DNA断片を変性させて、複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することを更に含む、実施形態 1～63のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 65. 試料から複数の一本鎖又は二本鎖DNA断片を得ることを更に含む、実施形態 1～64のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 66. 個体から試料を得ることを更に含む、実施形態 65に記載の方法。

30

実施形態 67. 個体が、がんを有するか、がんを有する疑いがあるか、又はがんの治療を受けている、実施形態 66に記載の方法。

実施形態 68. 個体が、がん又はがんの再発についてスクリーニングされている、実施形態 66に記載の方法。

実施形態 69. 試料が、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、実施形態 65～68のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 70. 試料が、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、実施形態 65～69のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 71. 試料が、組織生検試料、液体生検試料、又は正常対照を含む、実施形態 65～70のいずれか1つに記載の方法。

40

実施形態 72. 試料が、腫瘍生検、腫瘍標本、又は循環腫瘍細胞由来である、実施形態 71に記載の方法。

実施形態 73. 試料が、液体生検試料であり、かつ血液、血漿、血清、脳脊髄液、痰、便、尿、又は唾液を含む、実施形態 65～70のいずれか1つに記載の方法。

実施形態 74. シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体が、5-メチルシトシン(5mC)、5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)、5-カルボキシルシトシン(5caC)、5-ホルミルシトシン、5-(ベーターD-グルコシルメチル)シトシン(5gmC)、5-エチル dCTP、5-メチル dCTP、5-フルオロ dCTP、5-ブロモ dCTP、5-ヨード dCTP、5-クロロ dCTP、5-トリフルオロメチル dCTP、又は5-アザ dCTPを含む、実施形態 1～73のいずれか1つに記載の方法。

50

実施形態 75. シトシン変換が、バイサルファイト処理、TET補助バイサルファイト処理、酸化バイサルファイト処理、APOBEC、又はTET/ペーターゲットグルコシルトランスフェラーゼ補助APOBEC処理によるものである、実施形態 1～74のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 76. 非メチル化シトシンが第 1 の鎖内に存在する場合、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は 100% が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、実施形態 1～75のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 77. 非メチル化シトシンが第 1 の鎖内に存在する場合、約 80%～約 97% が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、実施形態 1～76のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 78. 第 2 の鎖のシトシン類似体の最大 20%、最大 15%、最大 10%、最大 5%、最大 2%、最大 1%、又は最大 0.5% が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、実施形態 1～77のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 79. 第 2 の鎖のシトシン類似体の約 0.5%～約 5% が、シトシン変換処理の結果としてシトシン変換を受ける、実施形態 1～78のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 80. 核酸ポリメラーゼが、シトシン類似体を核酸に組み込むことが可能である、実施形態 1～79のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 81. プライマー伸長前に、複数の第 1 の一本鎖 DNA 断片を末端修復に供することを更に含む、実施形態 1～80のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 82. 複数の第 1 及び第 2 の鎖又はそれらの増幅産物を配列決定した後に、複数の第 2 の鎖の配列を複数の第 1 の鎖の配列と比較することを更に含む、実施形態 1、2、5～34、及び 37～81のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 83. 複数の第 1 及び第 2 の鎖又はそれらの増幅産物を配列決定した後に、複数の第 1 の鎖及び／又は第 2 の鎖の配列を参照ゲノム配列と比較することを更に含む、実施形態 1、2、5～34、及び 37～81のいずれか 1つに記載の方法。

実施形態 84. 個体においてがんを検出する方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83のいずれか 1つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、個体をがんを有するとして特定する、方法。

実施形態 85. がんの治療を受けたことがあるか、又はがんの治療を受けている個体において、微小残存病変を検出する方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83のいずれか 1つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、個体を微小残存病変を有するとして、又はその欠如を特定する、方法。

実施形態 86. がんを有する疑いがある個体をスクリーニングする方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83のいずれか 1つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、個体をがんを有する可能性があるとして特定する、方法。

実施形態 87. がんを有する個体の予後を決定する方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83のいずれか 1つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、個体の予後を少なくとも部分的に決定する、方法。

実施形態 88. がんを有する個体の生存期間を予測する方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83のいずれか 1つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、個体の生存期間を少なくとも部分的に予測する、方法。

実施形態 89. がんを有する個体の腫瘍負荷を予測又は検出する方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83のいずれか 1つに記載の方法に従

10

20

30

40

50

ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、個体の腫瘍負荷を少なくとも部分的に予測又は検出する、方法。

実施形態 90. がんを有する個体の治療に対する応答性を予測する方法であって、個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83 のいずれか 1 つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することを含み、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、治療に対する個体の応答性を予測するために少なくとも部分的に使用される、方法。

実施形態 91. がんの治療を受けている個体の応答を監視する方法であって、

(a) がんを有する個体に治療を施すことと、

(b) 個体から得られた複数の核酸を含む試料中で、実施形態 1～83 のいずれか 1 つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することであって、試料中で検出されたメチル化レベル及び／又は体細胞変異が、治療に対する応答を監視するために少なくとも部分的に使用される、検出することと、を含む、方法。

実施形態 92. 個体においてがんを監視する方法であって、

(a) 個体から得られた複数の核酸を含む第 1 の試料中で、実施形態 1～83 のいずれか 1 つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することと、

(b) 個体から得られた複数の核酸を含む第 2 の試料中で、実施形態 1～83 のいずれか 1 つに記載の方法に従ってメチル化レベル及び／又は体細胞変異を検出することと、

(c) 第 1 の試料と第 2 の試料との間のメチル化レベル及び／又は体細胞変異の差を決定し、それによって個体においてがんを監視することと、を含む、方法。

実施形態 93. システムであって、

1 つ以上のプロセッサと、

1 つ以上のコンピュータプログラム命令を記憶するように構成されたメモリと、を備え、

1 つ以上のコンピュータプログラム命令が、1 つ以上のプロセッサによって実行された場合、

1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物の第 1 の複数の配列リードを得（第 1 の核酸分子は、非メチル化シトシンが第 1 の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている）、

1 つ以上の第 2 の核酸分子又はそれらの増幅産物の第 2 の複数の配列リードを得（第 2 の核酸分子が、シトシン変換前に第 1 の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む）、

シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された 1 つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第 1 の複数の配列リードを分析し、かつ

配列情報について、第 2 の複数の配列リードを分析するように、構成されている、システム。

実施形態 94. 1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 1 のアダプター核酸配列を更に含み、1 つ以上のコンピュータプログラム命令が、1 つ以上のプロセッサによって実行された場合、第 1 の複数の配列リード中の第 1 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている、実施形態 93 に記載のシステム。

実施形態 95. 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 3' 末端に付着している、実施形態 94 に記載のシステム。

実施形態 96. 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5' 末端に付着している、実施形態 94 に記載のシステム。

実施形態 97. 第 1 のアダプター核酸が、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、実施形態 94～96 のいずれか 1 つに記載のシステム。

実施形態 98. 第 1 のアダプター核酸が、1 つ以上のメチル化シトシンを含む、実施形態 94～96 のいずれか 1 つに記載のシステム。

実施形態 99. 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5

10

20

30

40

50

’末端と3’末端との間にある、実施形態94に記載のシステム。

実施形態100．1つ以上の第2の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第2のアダプター核酸配列を更に含み、1つ以上のコンピュータプログラム命令が、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第2の複数の配列リード中の第2のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第1及び第2の複数の配列リードを逆多重化するように更に構成されている、実施形態93～99のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態101．第2のアダプター核酸が、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の3’末端に付着している、実施形態100に記載のシステム。

実施形態102．第2のアダプター核酸が、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の5’末端に付着している、実施形態100に記載のシステム。

実施形態103．第2のアダプター核酸が、複数の第2の核酸分子の少なくとも一部分の5’末端と3’末端との間にある、実施形態100に記載のシステム。

実施形態104．第1の複数の配列リードが、第2の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である、実施形態94～103のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態105．第2の複数の配列リードが、第1の複数の配列リードよりも少なくとも2倍、少なくとも4倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、又は少なくとも1000倍豊富である、実施形態94～103のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態106．第1の核酸分子が、シトシン変換前に試料から得られる、実施形態94～105のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態107．試料が、がんを有するか、又はがんを有する疑いがある個体由来である、実施形態106に記載のシステム。

実施形態108．試料が、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、実施形態107に記載のシステム。

実施形態109．試料が、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、実施形態107又は実施形態108に記載のシステム。

実施形態110．第1及び／又は第2の複数の配列リードが、配列決定によって得られ、任意選択的に、配列決定が、超並列配列決定(MPS)技術、全ゲノム配列決定(WGS)、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサンガー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、超並列配列決定技術が、次世代配列決定(NGS)を含む、実施形態106～109のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態111．1つ以上のプログラム命令が、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、分析に少なくとも部分的に基づいて、試料についての分子プロファイルを生成するように更に構成されている、実施形態106～110のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態112．治療が、分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて、個体に施される、実施形態111に記載のシステム。

実施形態113．分子プロファイルが、包括的ゲノムプロファイリング(CGP)試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む、実施形態111又実施形態112に記載のシステム。

実施形態114．分子プロファイルが、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む、実施形態111～113のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態115．1つ以上のコンピュータプログラム命令が、1つ以上のプロセッサによって実行された場合、第2の複数の配列リードの1つの配列リードを第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較するように更に構成されている、実施形態94～114のいずれか1つに記載のシステム。

実施形態116．1つ以上のコンピュータプログラム命令が、1つ以上のプロセッサによ

10

20

30

40

50

って実行された場合、第 1 及び／又は第 2 の複数の配列リードの 1 つ以上の配列リードを参照ゲノム配列と比較するように更に構成されている、実施形態 9 4 ～ 1 1 4 のいずれか 1 つに記載のシステム。

実施形態 1 1 7 . 方法を実施するための 1 つ以上のコンピュータプロセッサによって実行可能な 1 つ以上のプログラムを含む非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、

1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物の第 1 の複数の配列リードを得ることであって、第 1 の核酸分子は、非メチル化シトシンが第 1 の核酸分子中に存在する場合、シトシン変換を受けているような条件下で、シトシン変換処理を受けている、得ることと、1 つ以上の第 2 の核酸分子又はそれらの増幅産物の第 2 の複数の配列リードを得ることであって、第 2 の核酸分子が、シトシン変換前に第 1 の核酸分子に相補的であり、シトシン変換に抵抗性があるシトシン類似体を含む、得ることと、

シトシン変換又はその欠如に基づいて推定された 1 つ以上のシトシンにおけるメチル化の存在又は不在について、第 1 の複数の配列リードを分析することと、

配列情報について、第 2 の複数の配列リードを分析することと、を含む、非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 1 8 . 1 つ以上の第 1 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 1 のアダプター核酸配列を更に含み、方法が、第 1 の複数の配列リード中の第 1 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む、実施形態 1 1 7 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 1 9 . 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 3 ' 末端に付着している、実施形態 1 1 8 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 0 . 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端に付着している、実施形態 1 1 8 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 1 . 第 1 のアダプター核酸が、シトシン変換中に変換される 1 つ以上の非メチル化シトシンを含む、実施形態 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか 1 つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 2 . 第 1 のアダプター核酸が、1 つ以上のメチル化シトシンを含む、実施形態 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか 1 つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 3 . 第 1 のアダプター核酸が、複数の第 1 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端と 3 ' 末端との間にある、実施形態 1 1 8 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 4 . 1 つ以上の第 2 の核酸分子又はそれらの増幅産物が、第 2 のアダプター核酸配列を更に含み、方法が、第 2 の複数の配列リード中の第 2 のアダプター核酸配列の検出に少なくとも部分的に基づいて、第 1 及び第 2 の複数の配列リードを逆多重化することを更に含む、実施形態 1 1 7 ～ 1 2 3 のいずれか 1 つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 5 . 第 2 のアダプター核酸が、複数の第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 3 ' 末端に付着している、実施形態 1 2 4 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 6 . 第 2 のアダプター核酸が、複数の第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端に付着している、実施形態 1 2 4 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 7 . 第 2 のアダプター核酸が、複数の第 2 の核酸分子の少なくとも一部分の 5 ' 末端と 3 ' 末端との間にある、実施形態 1 2 4 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 8 . 第 1 の複数の配列リードが、第 2 の複数の配列リードよりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、又は少なくとも 1 0 0 0 倍豊富である、実施形態 1 1 7 ～ 1 2 7 のいずれか 1 つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態 1 2 9 . 第 2 の複数の配列リードが、第 1 の複数の配列リードよりも少なくとも 2 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 5 0 倍、少なくとも 1 0 0 倍、又は少なくとも 1 0 0 0 倍豊富である、実施形態 1 1 7 ～ 1 2 7 のい

10

20

30

40

50

れか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態130．第1の核酸分子が、シトシン変換前に試料から得られる、実施形態117～129のいずれか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態131．試料が、がんを有するか、又はがんを有する疑いがある個体由来である、実施形態130に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態132．試料が、がんからの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、実施形態131に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態133．試料が、正常組織からの組織、細胞、及び／又は核酸を含む、実施形態131又は実施形態132に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態134．第1及び／又は第2の複数の配列リードが、配列決定によって得られ、任意選択的に、配列決定が、超並列配列決定(MPS)技術、全ゲノム配列決定(WGS)、全エクソーム配列決定、標的配列決定、直接配列決定、又はサングー配列決定技術の使用を含み、任意選択的に、超並列配列決定技術が、次世代配列決定(NGS)を含む、実施形態130～133のいずれか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態135．方法が、分析に少なくとも部分的に基づいて、試料についての分子プロファイルを作成することを更に含む、実施形態130～134のいずれか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態136．治療が、分子プロファイルに少なくとも部分的に基づいて、個体に施される、実施形態135に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態137．分子プロファイルが、包括的ゲノムプロファイリング(CGP)試験、遺伝子発現プロファイリング試験、がんホットスポットパネル試験、DNAメチル化試験、DNA断片化試験、RNA断片化試験、又はそれらの任意の組み合わせからの結果を更に含む、実施形態135又は実施形態136に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態138．分子プロファイルが、核酸配列決定ベースの試験からの結果を更に含む、実施形態135～137のいずれか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態139．方法が、第2の複数の配列リードの1つの配列リードを第1の複数の配列リードの1つの配列リードと比較することを更に含む、実施形態117～138のいずれか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態140．方法が、第1及び／又は第2の複数の配列リードの1つ以上の配列リードを参照ゲノム配列と比較することを更に含む、実施形態117～138のいずれか1つに記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

実施形態141．単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片に対応する複数の第1の鎖及び第1の鎖に相補的である複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態142．単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

第1のアダプター核酸を、複数の第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分に付着させることと、

複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)第1のアダプター核酸の下流又は第1のアダプター核酸において、第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールするプライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、及び第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、

任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することであって、シトシン変換後に、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態143. 単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない非相補的5'オーバーハングを含む、第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第1の一本鎖DNA断片にアニールする第2のアダプター核酸部分の部分に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、

任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することと、

複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出することと、を含む、方法。

実施形態144. 単一ワークフローにおいて、遺伝子情報及びエピジェネティック情報を検出する方法であって、

複数の第1の一本鎖DNA断片を提供することと、

複数の第1の一本鎖DNA断片を、(a)プライマーであって、(i)第1の一本鎖DNA断片にアニールしない第2のアダプター核酸部分と、(ii)第1の一本鎖DNA断片の少なくとも一部分にアニールする部分と、を含む、プライマー、(b)核酸ポリメラーゼ、及び(c)TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含むヌクレオチドの混合物の存在下で、1ラウンドのプライマー伸長に供することであって、それによって、第2のアダプター核酸に相補的な第1のアダプター核酸を有する第1の一本鎖DNA断片を含む複数の第1の鎖、並びに第1の一本鎖DNA断片に相補的な第2の一本鎖DNA断片、及び第1のアダプター核酸に非相補的な第2のアダプター核酸を含む複数の第2の鎖を生成し、第2の鎖が、TET補助ピリジンボラン処理に抵抗性があるシトシン類似体を含む、供することと、

任意のメチル化シトシンが第1の鎖内に存在する場合、シトシン変換を受けるような条件下で、複数の第1及び第2の鎖をTET補助ピリジンボラン処理に供することであって、シトシン変換後に、第1及び第2のアダプター核酸の配列が、もはや相補的ではない、供することと、

複数の第1の鎖の少なくとも一部分及び複数の第2の鎖の少なくとも一部分を検出するこ

10

20

30

40

50

とと、を含む、方法。

【0180】

本明細書で参照される全ての刊行物、特許、及び特許出願の開示は、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に援用される。参照により援用される参考文献が本開示と矛盾する限り、本開示が優先するものとする。

【実施例】

【0181】

本発明は、以下の実施例を参照することによって、より完全に理解されるであろう。しかしながら、それらは本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に記載された例及び実施形態は、例解的目的のみのためであり、それに照らして様々な修正又は変更が当業者に提案され、本出願及び添付の特許請求の範囲の趣旨及び範囲内に含まれることが理解される。

10

【0182】

実施例1：単一ワークフローにおける遺伝子情報及びエピジェネティック情報の概念実証
本実施例は、単一ワークフローにおける遺伝子（例えば、配列）情報及びエピジェネティック（例えば、メチル化）情報の概念実証分析を提供する。具体的には、本実施例は、「ゲノム鎖」（配列情報に対する）が、高い効率で元のDNAから合成され得、シトシン変換から保護され得ることを示す。

【0183】

材料及び方法

20

標準的な手順に従ってNEBNext Ultra IIライブラリ調製キットを使用して、20ngのメチル化及び非メチル化HCT116ヒト細胞株から遺伝子ライブラリを調製した。P7配列とi7インデックスとの間に4塩基「ワークストリーム」タグ（GGCC）を含有する完全長のメチル化アダプターを、DNAにライゲーションした。NEB Q5ポリメラーゼ、及び5-メチル-dCTPを含むZymo dNTPミックスを使用した1ラウンドのプライマー伸長、それに続いて、NEBNext（登録商標）Enzymatic Methyl-seq Kitを使用した酵素的シトシン変換を実施した。最後に、変換されたライブラリを、NEB Q5Uポリメラーゼ及びP5/P7プライマーでPCR増幅する。PCR増幅後、試料を1nMに正規化し、NovaSeq上のNGS配列決定に供し、52倍の平均カバレッジを達成した。使用されたワークフローの概要は、図5Aに提供される。

30

【0184】

結果

図5Aに示されるワークフロー後に、「ゲノム鎖」（例えば、変換抵抗性シトシン類似体を組み込む）及びその増幅産物、並びに「メチル化鎖」（例えば、トシン類似体を含まず、任意の存在するDNAメチル化を含有する）及びその増幅産物の割合を、特定されたリードのパーセンテージによって決定した。4bpのワークストリームインデックスを使用して、リードを逆多重化して、シトシン変換の結果としてのゲノム鎖及びメチル化鎖並びにそれらの増幅産物を区別した。

【0185】

40

図5Bに示されるように、ゲノム鎖及びメチル化鎖の両方を、各々から特定された配列リードに基づいた配列決定を介して特定した。ゲノム鎖を、80%の効率でのプライマー伸長ステップを介して合成し、それによって、この鎖がプライマー伸長中に高い効率で合成されたことを示した。

【0186】

図5Cは、シトシン変換の結果と示す。ゲノム鎖は、約98.7%の保護効率でのシトシン変換後に大部分が保存された。対照的に、メチル化鎖は、約96.8%の効率で保存された。これらの結果は、ゲノム鎖及びその増幅産物が、シトシン変換から保護され、それによって配列情報を保存したことを示す。

【0187】

50

実施例 2：単一アッセイにおけるがん c f D N A 中の遺伝子バリエーション及びエピジェネティックバリエーションの検出

本実施例は、がん関連のメチル化バリエーション及び遺伝子バリエーションが、単一ワークフロー方法論を使用して、c f D N A 中で検出可能であることを示す。更に、同じ投入された D N A の投入質量からの単一ワークフローは、独立した方法（例えば、W G S 及び W G メチル化配列決定）と比較して、同等のシグナルを生成することができる。

【0188】

材料及び方法

特性評価された遺伝子バリエーションを有する 4 つのがん c f D N A 試料、及び 2 つの非がん性 c f D N A 試料を分析した。20 ng の c f D N A の投入を使用して、各試料を以下のアッセイで試験した：標準的な W G S、標準的な W G メチル化（酵素的メチル化配列決定を使用する）、及び単一ワークフロープロトコル。手順に従って N E B N e x t U l t r a I I ライブラリ調製キットを使用して、標準的な W G S ライブラリを調製し、N E B Q 5 ポリメラーゼ及び N E B U n i q u e D u a l I n d e x P r i m e r を使用して、P C R 増幅した。標準的な手順に従って N E B N e x t（登録商標）E n z y m a t i c M e t h y l - s e q K i t を使用して、標準的な W G メチル化ライブラリを調製し、N E B Q 5 U ポリメラーゼ及び N E B U n i q u e D u a l I n d e x P r i m e r を使用して、P C R 増幅した。実施例 1 に記載されるように、（シトシン変換に対して酵素的メチル化配列決定、及びシトシン類似体に対して 5 - m C を使用する）本明細書に記載されるプロトコルを使用して、単一ワークフローライブラリを調製した。P C R 増幅後、ライブラリを 1 n M に正規化し、N o v a s e q 上の N G S 配列決定に供し、109 倍の平均カバレッジを達成した。

【0189】

結果

第 1 に、c f D N A からの単一ワークフローにおけるゲノム鎖とメチル化鎖との間の保護効率を評価した。ゲノム鎖は、5 - m C で生成された元の分子のシトシン変換保護コピーを指す。図 6 に示されるように、シトシンは、酵素的変換から 99.05 % 保護され（6 つのライブラリ由来の平均）、遺伝子情報の保存を可能にした。メチル化鎖は、4.3 % の保護効率（6 つのライブラリ由来の平均）で示されるように、保存され、メチル化情報を含有する。

【0190】

次に、ゲノム鎖の合成を評価した。6 つの試料にわたって、ゲノム鎖及びメチル化鎖について特定された平均リード率は、それぞれ、53.12 及び 46.88 であった（図 7）。これらの結果は、プライマー伸長が、元の D N A 分子からのゲノム鎖の合成において高効率であることを示す。ゲノム鎖及びメチル化鎖並びにそれらの増幅産物を区別する 4 塩基ワークストリームインデックスを用いて、ライブラリにおけるリードを特定した。

【0191】

単一ワークフロー方法論と比較した W G 酵素的メチル化配列決定を介して、がん c f D N A 試料のメチル化を分析した。個々の D N A 分子からのコンセンサスメチル化部位を評価するがんメチル化スコアは、図 8 に示されるように、単一ワークフロー方法及び W G 酵素的メチル化配列決定方法において強く相関していた。最良適合線は、1.1 の勾配及び $R^2 = 1$ を有した。メチル化レベルにおけるより高い相関は、より小さいビン及び機能領域において、単一ワークフロー方法論と標準的な W G メチル化方法論との間で観察され、1 k b のビン（図 9 A）、10 k b のビン（図 9 B）、100 k b のビン（図 9 C）、C p G アイランド（図 9 D）、及び C p G ショア（図 9 E）を含む。性染色体は含まれなかった。フィルタリングはビンに適用されなかった。平均メチル化率も、単一ワークフロー技術対標準的な W G メチル化分析において保存された。標準的な W G 酵素的メチル化配列決定と比較した、単一ワークフローにおける平均メチル化率（A M F）のピアソン相関係数が、図 10 に示される。これらの結果は、より小さいビンサイズ及び機能領域において 0.975 を超える r を伴い、方法論間で高い一致を示す。これらの結果は、単一ワーク

フロー技術を使用したメチル化分析が、WG 酵素的メチル化配列決定などの標準的な技術を使用して得られたメチル化分析と高度に一致していたことを示す。

【0192】

次に、単一ワークフローを使用した遺伝子バリエーションの分析を特性評価した。表 A は、分析されたバリエーションを示す。

【表 1】

表 A. 単一ワークフロー及び標準的なWGSを介して分析された遺伝子バリエーション

染色体	位置	遺伝子	参加者 ID
chr5	112175639	APC	CRF059256
chr5	112174696	APC	CRF059256
chr12	25398284	KRAS	CRF059256
chr17	29679408	NF1	CRF064005
chr16	68846037	CDH1	CRF064005
chr14	105246551	AKT1	CRF064005
chr12	25398284	KRAS	CRF064645
chr13	32953592	BRCA2	CRF064645
chr5	112175162	APC	CRF064645
chr17	7577498	TP53	CRF064645
chr5	112175303	APC	US0756490
chr17	7578265	TP53	US0756490
chr5	112116592	APC	US0756490
chr7	140453154	BRAF	US0756490
chr3	178916854	PIK3CA	US0756490
chr13	32914413	BRCA2	US0756490

10

20

30

【0193】

コールされた対立遺伝子頻度における高い一致は、4つのがんcfDNA試料中、単一ワークフローとWGSとの間で観察された（図11）。3%超の対立遺伝子頻度（AF）を有する16個の特性評価されたバリエーションが、単一ワークフロー技術と標準的なWG技術との間で共有された。これらの結果は、遺伝子バリエーションの検出における強い一致を伴い、単一ワークフロー方法論からのゲノムシグナルが保存されたことを示す。

【0194】

結論として、単一ワークフロー方法は、必要な投入DNAを制限した1つの単純化されたワークフローにおける、メチル化情報及び遺伝子情報のマルチオミック検出を可能にする。本実施例からの結果は、アッセイがcfDNAにおける技術レベルで機能することを示した。ゲノム鎖は、高い効率で元のDNA／メチル化DNAから合成され、シトシン変換中に保護された。シグナルもまた、がん関連メチル化スコア及び遺伝子バリエーションコールの両方における強い相関によって示されるように、標準的な独立した方法と比較して単一ワークフローにおいて保存された。単一ワークフローアッセイはまた、シトシン変換条件へのゲノム鎖の曝露にもかかわらず、C→Tバリエーションコールを可能にした。

40

【0195】

実施例3：単一ワークフローアッセイにおけるゲノム鎖情報及び／又はメチル化鎖情報の富化

50

本実施例は、PCR増幅中にゲノム鎖又はメチル化鎖に特異的に結合するように設計されたプライマーを使用することによって、ゲノム鎖及びメチル化鎖が、単一ワークフローアッセイ中に増幅され得ることを示す。

【0196】

材料及び方法

20 ngの投入DNAを、メチル化及び非メチル化HCT116ヒト細胞株から使用した。実施例1及び2に記載されるように、単一ワークフロー分析を実施した。2つのプライマー条件をPCRによって試験した：(1)上記のような標準的な単一ワークフロープライマー、並びに(2)ゲノム鎖に特異的に結合するように設計されたプライマー及びP5プライマー。ゲノム鎖対メチル化鎖の豊富さを、上記のような配列リード%を使用して決定した。後続のアッセイは、メチル化鎖に特異的に結合するように設計されたプライマー及びP5プライマーを同様に使用した。ゲノム鎖特異的プライマーのために使用された配列は、CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT TT (配列番号1)である。メチル化鎖特異的プライマーのために使用された配列は、CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CC (配列番号2)である。

10

【0197】

結果

ゲノム鎖の優先的増幅は、ゲノム鎖特異的プライマーを使用して達成された。2つの試料にわたって、ゲノム鎖の平均リード%は、図12に示されるように、メチル化鎖の98.7%及び1.3%であった。しかしながら、標準的な単一ワークフロープライマーを使用して、ゲノム鎖の平均リード%は、メチル化鎖の50.5%及び49.5%であった。

20

【0198】

ゲノム鎖又はメチル化鎖のいずれかに特異的なプライマーを使用して、いずれかの鎖の優先的増幅及び富化が達成され得る。図13は、この戦略が、いずれかの鎖を選択的に増幅するためにうまく使用されたことを示す。したがって、特異的プライマーは、例えば、配列決定前の富化のために、ゲノム鎖及びメチル化鎖のいずれか又は両方を増幅するために使用され得る。

【0199】

本実施例は、目的のゲノム領域に相補的なハイブリッドキャプチャベイト及び目的のシトシン保存メチル化領域に相補的なキャプチャベイトを含む単一ワークフローライブラリから、一緒に捕捉され得ることを示す。

30

【0200】

ゲノム鎖内のアクションナブル変異を標的化するカスタムハイブリッドキャプチャベイトが得られた(2.2 Mb)。目的のシトシン変換メチル化バイオマーカーに相補的な別個のセットのカスタムベイトを別に得た(5.52 Mb)。ゲノムパネルをカスタムメチル化パネルと等モル比で混合して、単一ワークフローハイブリッドキャプチャパネルを作製した。健康なドナーから単離された10 ngのcfDNAを、実施例1及び2に記載されるような単一ワークフローライブラリ調製物に投入した。500 ngの結果として生じるライブラリを、キャプチャキットを使用したカスタム単一ワークフローパネルを用いて捕捉した。

40

【0201】

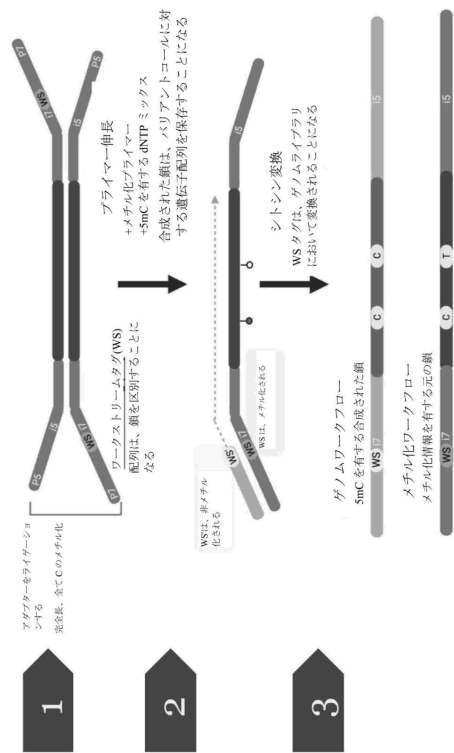
配列決定後、捕捉されたライブラリをそれらのそれぞれのゲノム又はメチル化ゲノムに整列し、断片を断片開始/終了位置によって重複除去し、ベイトされた領域にわたる平均固有カバレッジを定量化した。標的化されたゲノム領域(1598.9 X)及びメチル化領域(1510.5 X)にわたる高い固有カバレッジが、図14Aに描画されるように観察された。低いcfDNA投入質量を所与として、この結果は、単一ワークフローライブラリからの結合キャプチャにおける、両方の鎖の高いキャプチャ効率(3030の投入ハプロイドゲノム当量を所与として、約50%)を示す。キャプチャはまた、目的のゲノム領域及びメチル化領域の両方の高いオンターゲット率、並びに図14BのFold-80ベースペナルティによって測定されたように、別個のプローブセットにわたる均一なカバ

50

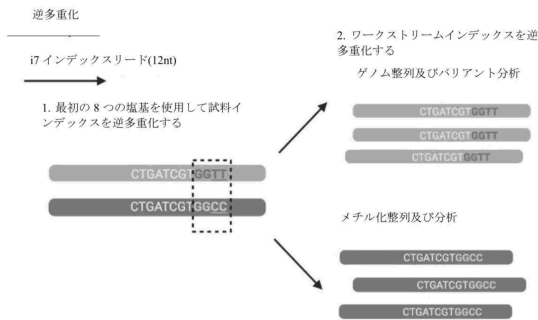
レッジを示した。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

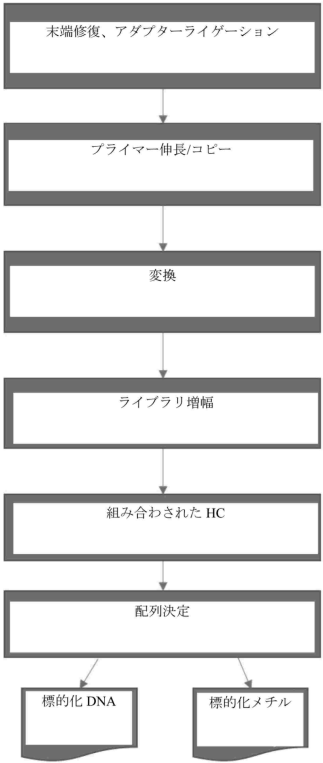
20

30

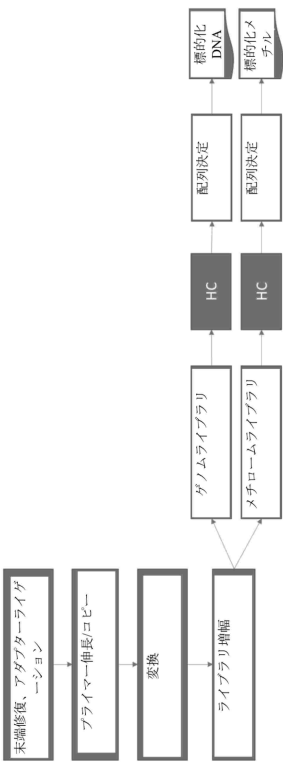
40

50

【図 4 B】



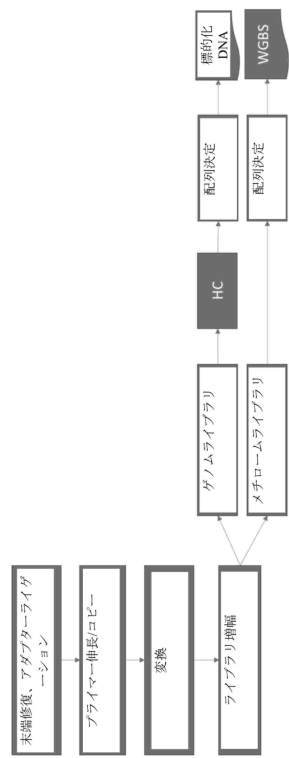
【図 4 C】



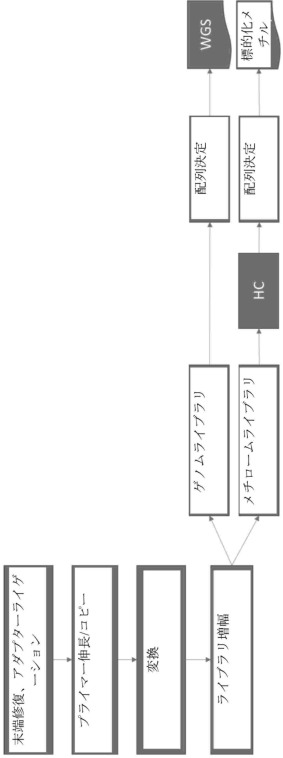
10

20

【図 4 D】



【図 4 E】

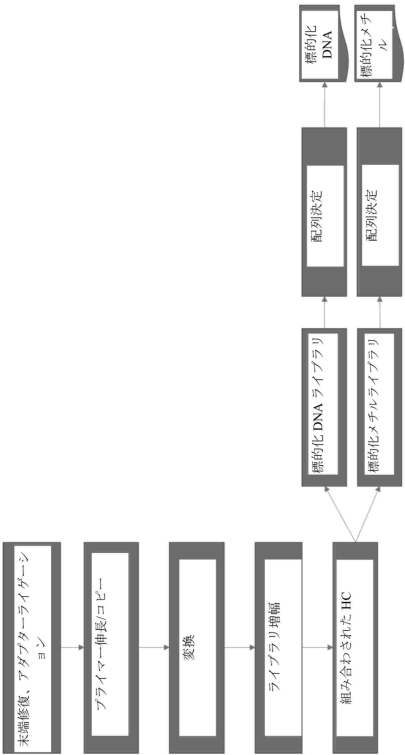


30

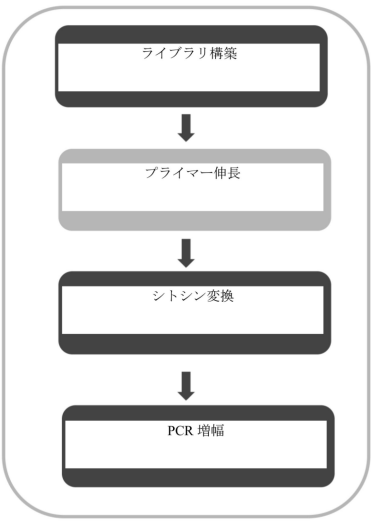
40

50

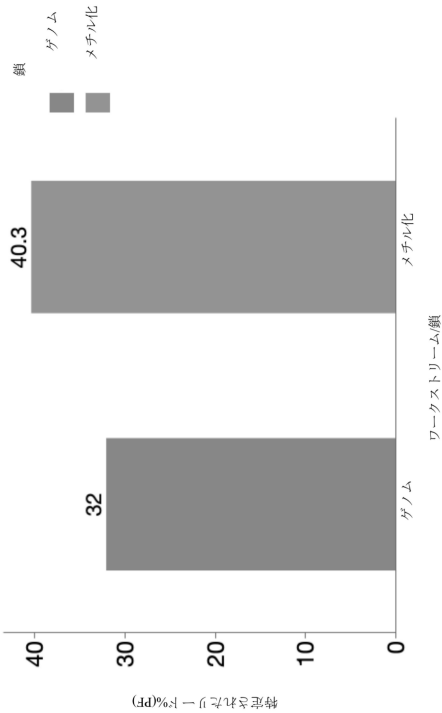
【図 4 F】



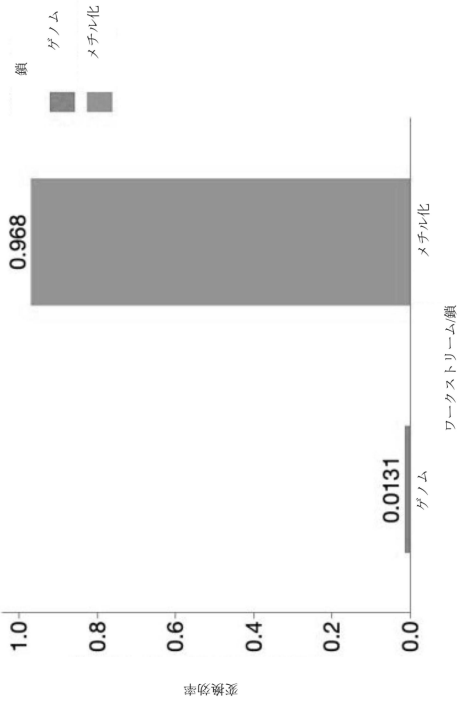
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



10

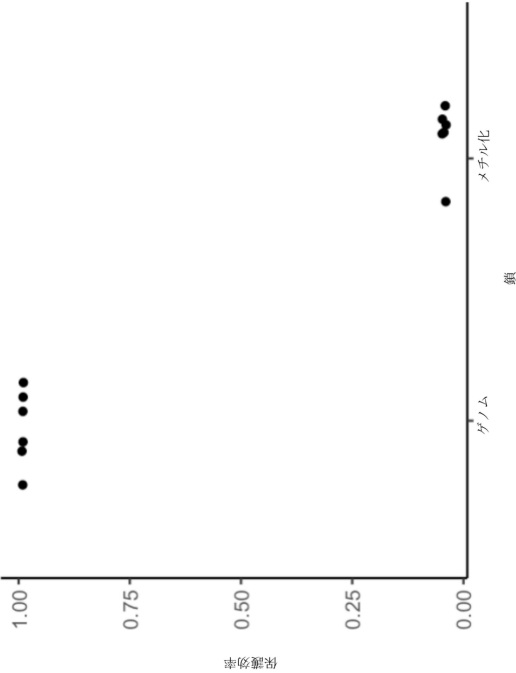
20

30

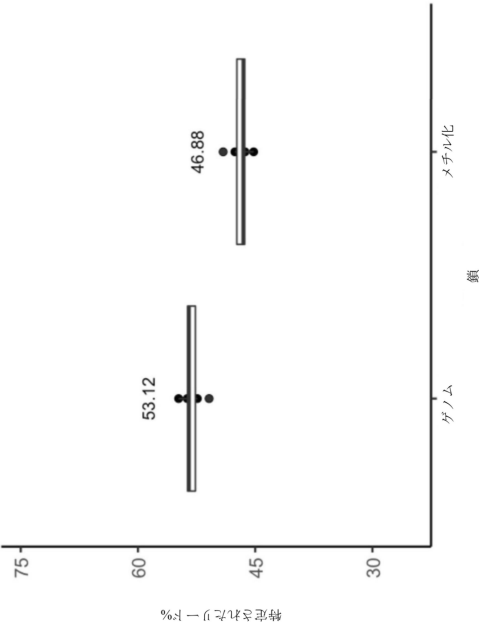
40

50

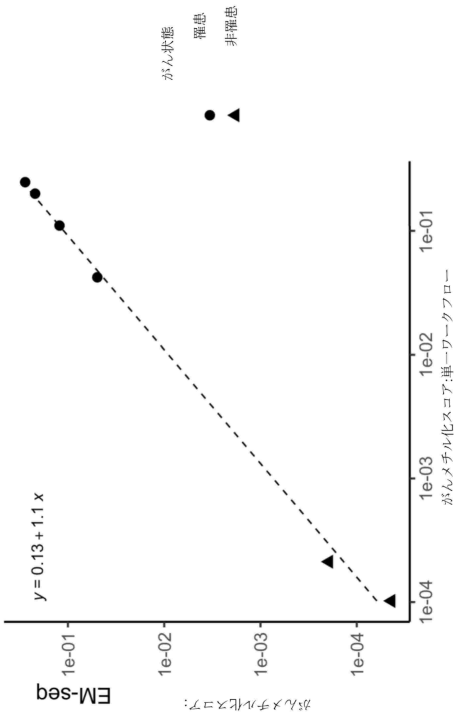
【図 6】



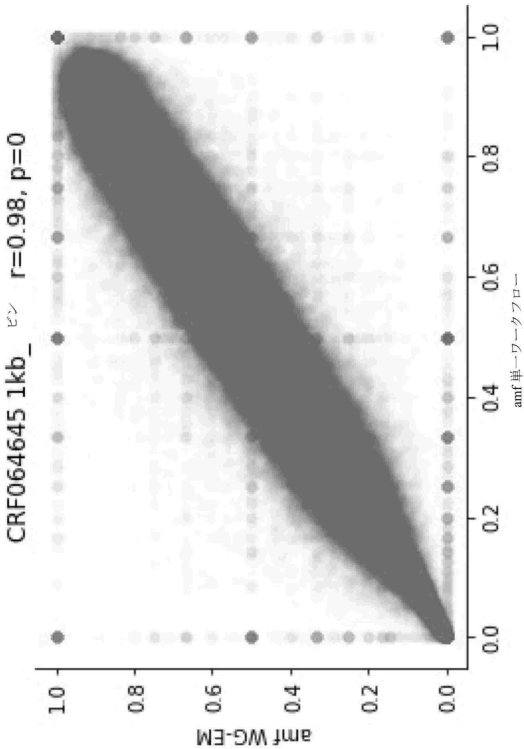
【図 7】



【図 8】



【図 9 A】



10

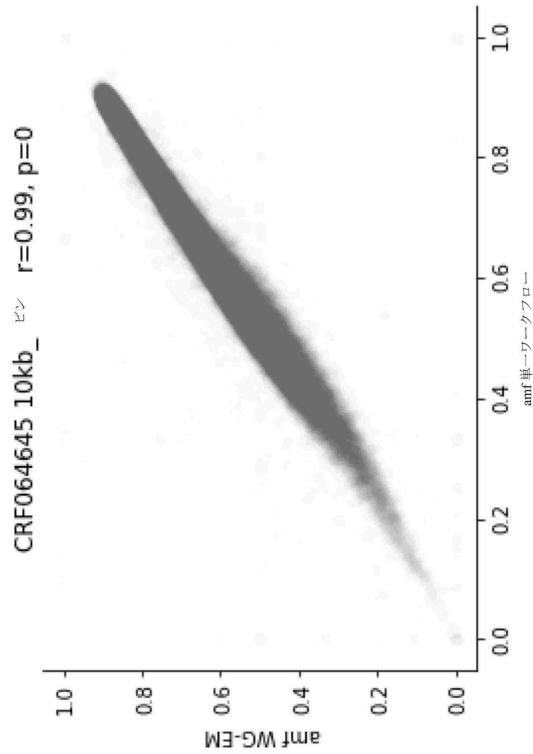
20

30

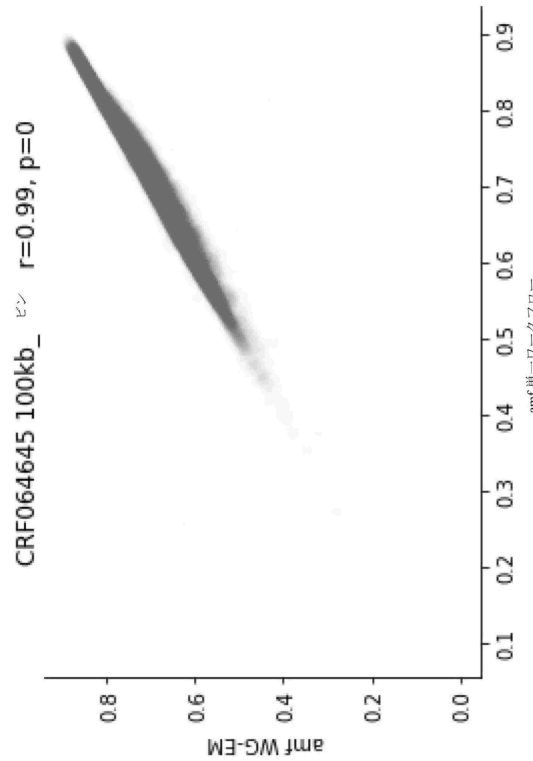
40

50

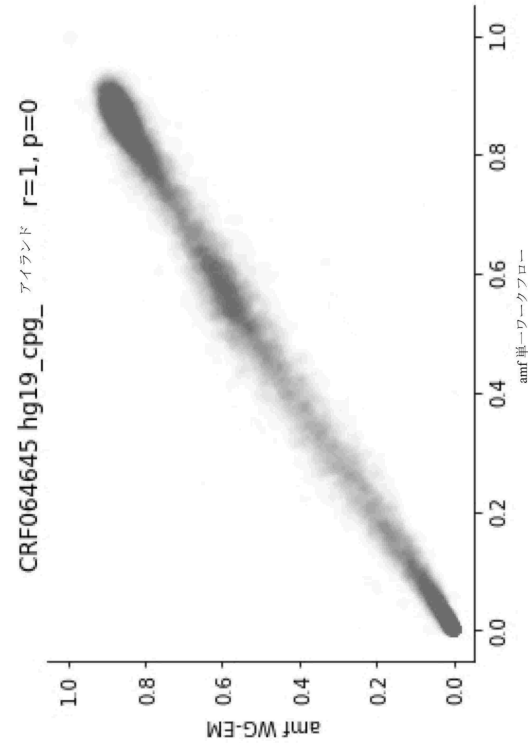
【図 9 B】



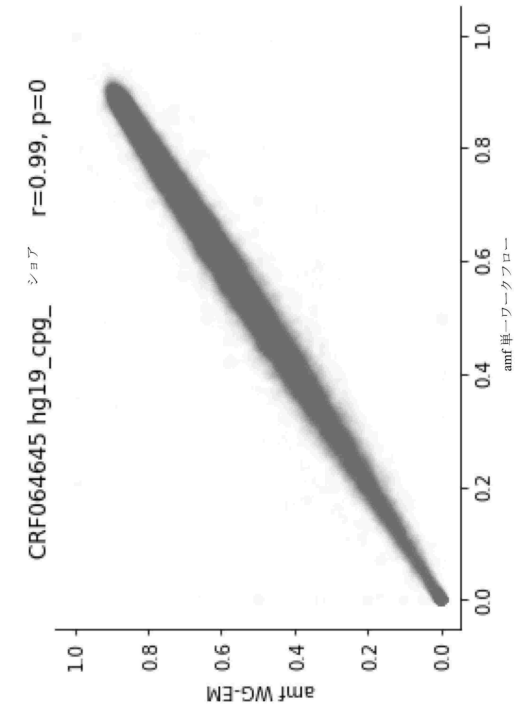
【図 9 C】



【図 9 D】



【図 9 E】



10

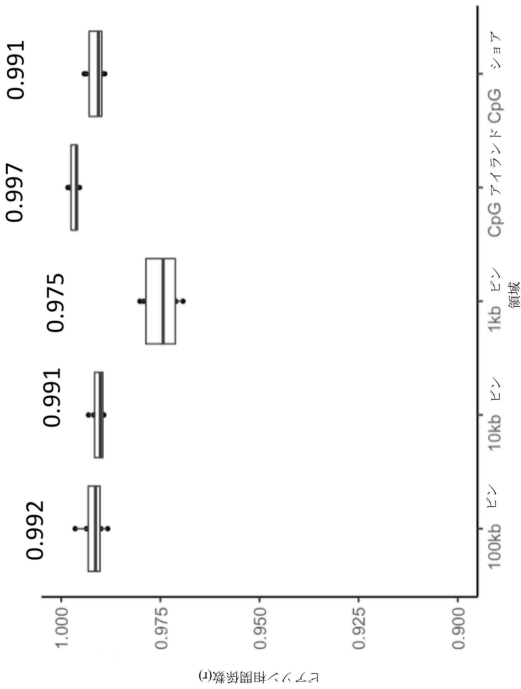
20

30

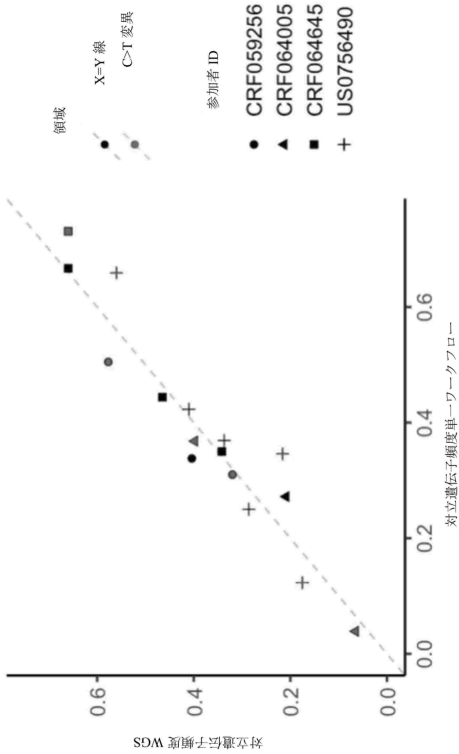
40

50

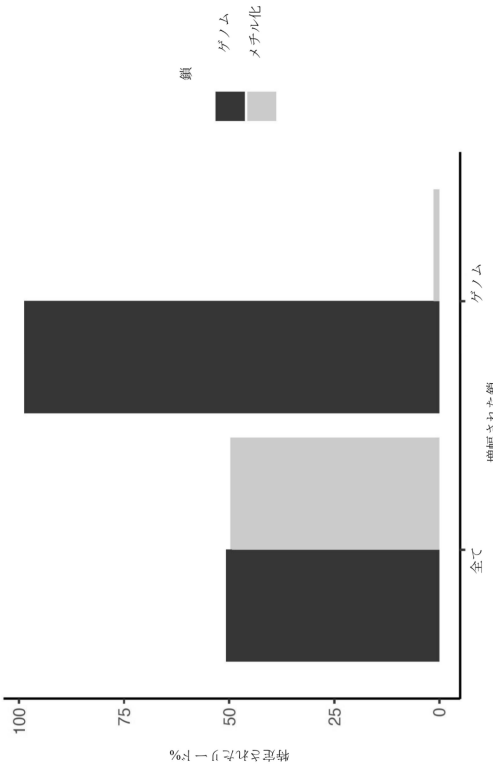
【図 1 0】



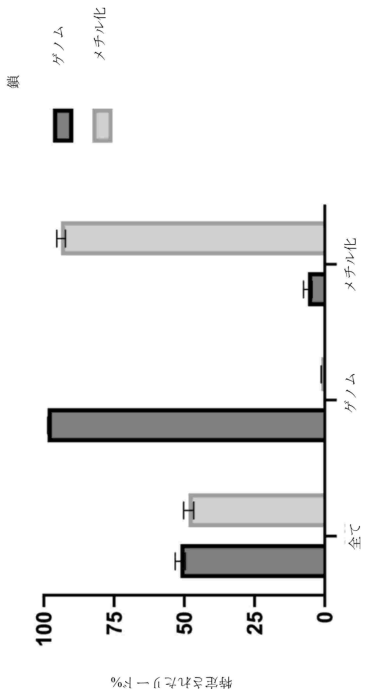
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



SEM を併用平均;
WGS 及び WGBS バイブライイン「mapped_reads」に基づいて特定されたリード%

10

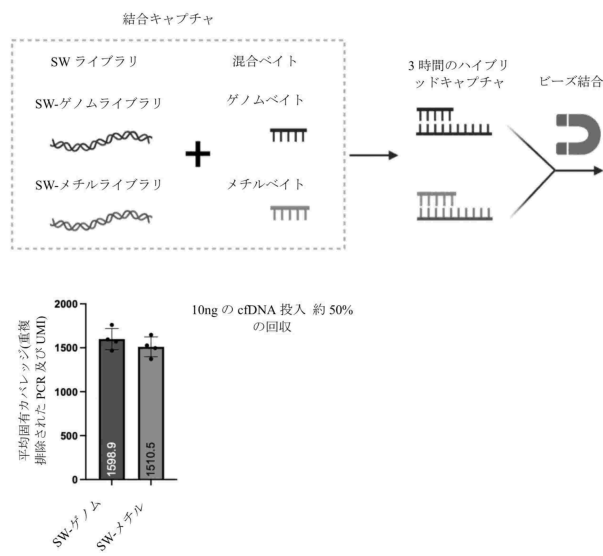
20

30

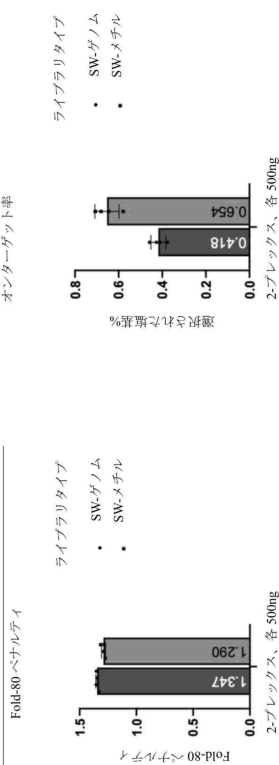
40

50

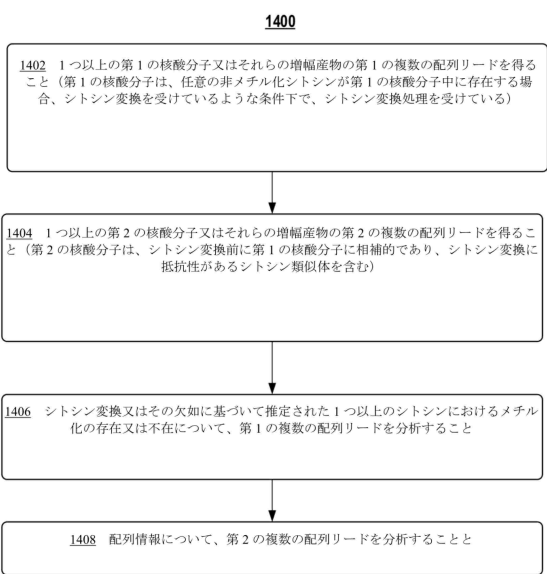
【図 1 4 A】



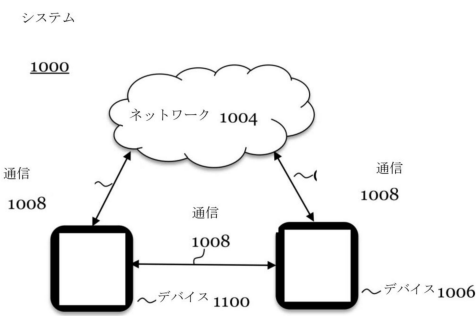
【図 1 4 B】



【図 1 4 C】



【図 1 5】



10

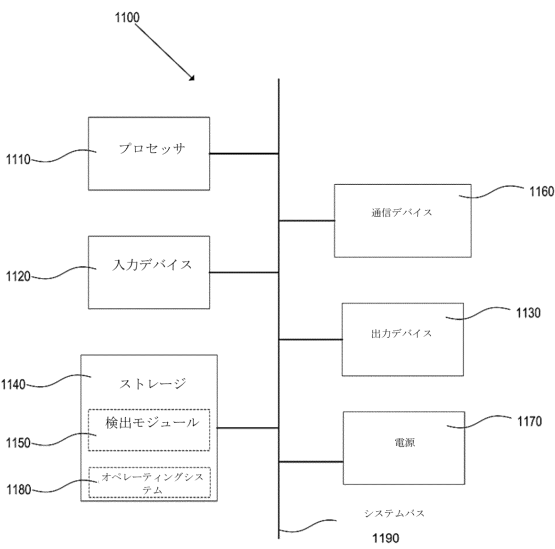
20

30

40

50

【図 16】



【配列表】

2025502811000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 22/82476
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C12Q 1/6806, C40B 20/04, G16B 20/20 (2023.01) ADD. C40B 30/00, G16B 20/00 (2023.01) CPC - INV. C12Q 1/6886, C12Q 1/6869 ADD. C12Q 2535/122, C12Q 2523/125 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2015/0011408 A1 (ILLUMINA, INC.) 08 January 2015 (08.01.2015) abstract, para [0012], [0016], [0019]-[0020], [0027], [0067]-[0068], [0071], [0081], [0111], [0115], [0122]-[0123], [0128], [0158]	1-6, 25-33 ----- 141-144
Y	US 2020/0370114 A1 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD) 26 November 2020 (26.11.2020) abstract; para [0010]	141-144
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 May 2023		Date of mailing of the international search report AUG 09 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/82476

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/82476

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-24, 34-92, 100-116, 124-140
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
 --See Supplemental Box --

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 26-33, 141-144

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/82476

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-6, 25-33, 141-144, directed to a method of detecting genetic and epigenetic information in a single workflow.

Group II, claims 93-99, 117-123, directed to a system and non-transitory computer readable storage medium for executing one or more programs for analyzing a plurality of sequence reads for the presence or absence of methylation.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a method of detecting genetic and epigenetic information in a single workflow, that is not required by Group II.

Group II has the special technical feature of a system and non-transitory computer readable storage medium for executing one or more programs for analyzing a plurality of sequence reads for the presence or absence of methylation, that is not required by Group I.

Common Technical Features:

Groups I-II share the common technical feature of:

obtaining a first plurality of sequence reads of one or more first nucleic acid molecules or their amplification products, wherein the first nucleic acid molecules have undergone cytosine conversion treatment under conditions such that unmethylated cytosine(s) if present in the first nucleic acid molecules have undergone cytosine conversion;
obtaining a second plurality of sequence reads of one or more second nucleic acid molecules or their amplification products, wherein the second nucleic acid molecules are complementary to the first nucleic acid molecules prior to cytosine conversion and comprise a cytosine analog that is resistant to cytosine conversion;
analyzing the first plurality of sequence reads for the presence or absence of methylation at one or more cytosines inferred based on cytosine conversion or a lack thereof; and
analyzing the second plurality of sequence reads for sequence information.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is anticipated by US 2015/0011408 A1 to Illumina, Inc. (hereinafter "Illumina").

Illumina discloses a method of detecting genetic and epigenetic information in a single workflow (abstract - "The present invention relates to compositions, methods and systems for analyzing the methylation state of nucleic acids"; para [0158] - "Exemplary formats that can be used in the invention to distinguish beads in a fluid sample using microfluidic devices are described"), comprising: providing a plurality of first single-stranded DNA fragments (para [0019] - "Also provided herein is a method of identifying methylated cytosines in a plurality of nucleic acids"; para [0027] - "the template nucleic acid is single-stranded and the complementary copy is single-stranded"); subjecting the plurality of first single-stranded DNA fragments to a round of primer extension (para [0067] - "a complementary polynucleotide strand can be hybridized or synthesized by a nucleic acid polymerase, for example, in a primer extension reaction") in the presence of: (a) a primer that anneals to at least a portion of the first single-stranded DNA fragments, (b) a nucleic acid polymerase (para [0088] - "the complementary copy is generated by extending an oligonucleotide primer with a nucleic acid polymerase"), and (c) a mixture of nucleotides comprising a cytosine analog that is resistant to cytosine conversion (para [0016] - "the bisulfite-resistant cytosine analog can be selected from the group consisting of: 5-ethyl dCTP, 5-methyl dCTP, 5-fluoro dCTP, 5-bromo dCTP, 5-iodo dCTP, 5-chloro dCTP, 5-trifluoromethyl dCTP, 5-aza dCTP, as well as other bisulfite-resistant nucleotides comprising a cytosine analog"), thereby generating a plurality of first strands corresponding to the first single-stranded DNA fragments and a plurality of second strands that are complementary to the first strands (para [0020] - "the method of identifying methylated cytosines in a plurality of nucleic acids can include the steps of: providing a sample comprising a plurality of template nucleic acids; generating complementary copies of the template nucleic acids, the generating being directed by an oligonucleotide primer using a nucleic acid polymerase in the presence of a bisulfite-resistant cytosine analog"), wherein the second strands comprise the cytosine analog that is resistant to cytosine conversion; subjecting the pluralities of the first and second strands to a cytosine conversion treatment under conditions such that unmethylated cytosine(s) if present in the first strands undergo cytosine conversion (para [0020] - "wherein the generating produces a complementary copy of each of the template nucleic acids such that cytosine residues in each complementary copy are methylated, and wherein each complementary copy is coupled to one of the template nucleic acids; subjecting the template nucleic acids and the complementary copies to bisulfite treatment to convert unmethylated cytosine residues in the template nucleic acids into uracil residues, resulting in each bisulfite-converted template nucleic acid being coupled to a non-converted complementary copy"); and detecting at least a portion of the plurality of first strands and at least a portion of the plurality of second strands (para [0020] - "determining the nucleotide sequence of the bisulfite-converted template nucleic acids and the non-converted complementary copies; and comparing the nucleotide sequence of the bisulfite-converted template nucleic acids to the nucleotide sequence of the non-converted complementary copies for each of the bisulfite-converted template nucleic acids coupled to non-converted complementary copies, thereby determining the methylation status of the template nucleic acids prior to bisulfite conversion").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-II inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4 above: claims 7-24, 34-92, 100-116, 124-140 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. J A V A

2. P Y T H O N

210, ボストン, サマー ストリート 400, シー／オー ファウンデーション メディシン
インコーポレイテッド

(72)発明者 ウォン, ベッキー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02210, ボストン, サマー ストリート 400, シー
／オー ファウンデーション メディシン インコーポレイテッド

(72)発明者 チョン, ユイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02210, ボストン, サマー ストリート 400, シー
／オー ファウンデーション メディシン インコーポレイテッド

(72)発明者 ウッド, ハリー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02210, ボストン, サマー ストリート 400, シー
／オー ファウンデーション メディシン インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B029 AA07 BB20 CC01 FA15 GA03 GA08 GB06 GB10

4B063 QA19 QQ08 QQ28 QQ42 QQ62 QR08 QR32 QR42 QR62 QR66

QR77 QS03 QS25 QS34 QS36 QS39 QX02