

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和1年9月26日(2019.9.26)

【公表番号】特表2018-529326(P2018-529326A)

【公表日】平成30年10月11日(2018.10.11)

【年通号数】公開・登録公報2018-039

【出願番号】特願2018-508166(P2018-508166)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/10 Z N A Z

C 1 2 N 9/16 C

C 1 2 Q 1/6806

G 0 1 N 33/50 P

C 1 2 Q 1/686 Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年8月15日(2019.8.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

目的の標的核酸配列を捕捉する方法であって、

(a) 複数の核酸配列を含む試料を提供するステップであって、前記核酸配列はメチル化ヌクレオチドを含み、前記核酸配列は5'および3'末端でアダプターにライゲートされている、ステップ；

(b) 前記試料を複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼ-gNA複合体と接触させ、それによって前記核酸配列のサブセットで目的の複数のニック入りの部位を生成するステップであって、前記gNAは前記核酸配列のサブセットの目的の標的化部位に相補的であり、そして前記標的核酸配列は5'および3'末端でアダプターにライゲートされている、ステップ；

(c) 前記試料をニック入りの部位でDNA合成を開始することが可能な酵素およびメチル化されていないヌクレオチドと接触させ、それによって、目的の前記標的化部位にメチル化されていないヌクレオチドを含む複数の核酸配列を生成するステップであって、前記核酸配列は5'および3'末端でアダプターにライゲートされている、ステップ；および

(d) 前記試料を、メチル化核酸を切断することが可能な酵素と接触させ、それによってメチル化核酸を含む複数の核酸断片を生成するステップであって、メチル化核酸を含む複数の前記核酸断片は5'および3'末端のうち最大1つでアダプターにライゲートされている、ステップ

を含む、方法。

【請求項2】

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C A S クラス I タイプ I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I I I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I V ニッカーゼ、C A S クラス I I タイプ I I ニッカーゼおよび C A S クラス I I タイプ V ニッカーゼからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、C a s 3 ニッカーゼ、C a s 8 a - c ニッカーゼ、C a s 1 0 ニッカーゼ、C s e 1 ニッカーゼ、C s y 1 ニッカーゼ、C s n 2 ニッカーゼ、C a s 4 ニッカーゼ、C s m 2 ニッカーゼ、C m r 5 ニッカーゼ、C s f 1 ニッカーゼ、C 2 C 2 ニッカーゼおよび N g A g o ニッカーゼからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 g N A が g R N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 g N A が g D N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 D N A が二本鎖 D N A である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記二本鎖 D N A がゲノム D N A からのものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ゲノム D N A がヒトのものである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 D N A 配列が 2 0 b p から 5 0 0 0 b p の長さである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

目的の前記標的化部位が一塩基多型 ( S N P )、ショートタンデムリピート ( S T R )、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

目的の前記標的化部位が前記試料中の全 D N A の 5 0 % 未満を占める、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

ニック入りの部位で核酸合成を開始することが可能な前記酵素が、D N A ポリメラーゼ I、クレノウ断片、T A Q ポリメラーゼまたは B s t D N A ポリメラーゼである、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが前記 D N A 配列の 5 ' 末端にニックを入れる、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

メチル化 D N A を切断することが可能な前記酵素が D p n I である、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

目的の標的 D N A 配列を捕捉する方法であって、

( a ) 前記試料を複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼ - g N A 複合体と接触させ、それによって目的の領域に隣接する部位で複数のニック入りの D N A を生成するステップであって、前記 g N A が、前記 D N A 配列のサブセット中の目的の前記領域に隣接する目的の標的化部位に相補的である、ステップ；

( b ) 前記試料を 6 5 °C まで加熱し、それによって、近接するニックに二本鎖切断を起

こすステップ；

(c) 前記二本鎖切断を耐熱性のリガーゼと接触させ、それによってこれらの部位にのみアダプター配列のライゲーションを可能にするステップ；および

(d) ステップ a ~ c を反復して、第 2 のアダプターを目的の前記領域の反対側に置き、こうして目的の前記領域の濃縮を可能にするステップ

を含む、方法。

【請求項 17】

前記 g N A が g R N A である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 g N A が g D N A である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが C A S クラス I タイプ I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I I I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I V ニッカーゼ、C A S クラス I I タイプ I I ニッカーゼおよび C A S クラス I I タイプ V ニッカーゼからなる群より選択される、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、C a s 3 ニッカーゼ、C a s 8 a - c ニッカーゼ、C a s 10 ニッカーゼ、C s e 1 ニッカーゼ、C s y 1 ニッカーゼ、C s n 2 ニッカーゼ、C a s 4 ニッカーゼ、C s m 2 ニッカーゼ、C m r 5 ニッカーゼ、C s f 1 ニッカーゼ、C 2 C 2 ニッカーゼおよび N g A g o ニッカーゼからなる群より選択される、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記 D N A が二本鎖 D N A である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記二本鎖 D N A がゲノム D N A からのものである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ゲノム D N A がヒトのものである、請求項 22 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

一態様では、本発明は、メチル化ヌクレオチドを含む核酸断片、核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼ - g N A 複合体および非メチル化ヌクレオチドを含む組成物を提供する。一つの実施形態では、前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C A S クラス I タイプ I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I I I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I V ニッカーゼ、C A S クラス I I タイプ I I ニッカーゼおよび C A S クラス I I タイプ V ニッカーゼからなる群より選択される。一つの実施形態では、前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、C a s 3 ニッカーゼ、C a s 8 a - c ニッカーゼ、C a s 10 ニッカーゼ、C s e 1 ニッカーゼ、C s y 1 ニッカーゼ、C s n 2 ニッカーゼ、C a s 4 ニッカーゼ、C s m 2 ニッカーゼ、C m 5 ニッカーゼ、C s f 1 ニッカーゼ、C 2 C 2 ニッカーゼおよび N g A g o ニッカーゼからなる群より選択される。一つの実施形態では、前記 g N A が g R N A である。一つの実施形態では、前記 g N A が g D N A である。一つの実施形態では、前記核酸断片が D N A を含む。一つの実施形態では、前記核酸断片が R N A を含む。一つの実施形態では、前記ヌクレオチドがピオチンで標識される。一つの実施形態では、前記ヌクレオチドが抗体コンジュゲート対の一部である。一つの実施形態では、組成物は、メチル化ヌクレオチ

ドを含むDNA断片、ニッカーゼであるCas9-gRNA複合体および非メチル化ヌクレオチドを含む。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

標的核酸配列を捕捉する方法であって、

(a) アダプターにライゲートされた複数の核酸を含む試料を提供するステップであって、前記核酸は一方の末端で第1のアダプターにライゲートされており、他方の末端で第2のアダプターにライゲートされている、ステップ；

(b) 前記試料を複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gRNA複合体と接触させ、それによって一方の末端で第1または第2のアダプターにライゲートされ、他方の末端にアダプターがない複数の核酸断片を生成するステップであって、前記gRNAは前記核酸のサブセットに含有される目的の標的化部位に相補的である、ステップ；および

(c) 前記複数の核酸断片を第3のアダプターと接触させ、それによって、一方の末端で前記第1または第2のアダプターに、他方の末端で前記第3のアダプターにライゲートした複数の核酸断片を生成するステップ

を含む、方法。

(項目2)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼがCRISPR/Cas系タンパク質である、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼが非CRISPR/Cas系タンパク質である、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼがCASクラスIタイプI、CASクラスIタイプII I、CASクラスIタイプIV、CASクラスIIタイプIIおよびCASクラスIIタイプVからなる群より選択される、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼがCas9、Cpf1、Cas3、Cas8a-c、Cas10、Cse1、Csy1、Csn2、Cas4、Csm2、Cmr5、Csf1、C2c2およびNgAgoからなる群より選択される、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記gRNAがgRNAである、項目1から5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記gRNAがgDNAである、項目1から5のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gRNA複合体と接触させるステップが、前記核酸のサブセットに含有される目的の前記標的化部位を切断し、それによって一方の末端に第1または第2のアダプターを含み、他方の末端にアダプターがない複数の核酸断片を生成する、項目1から7のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

第1または第2および第3のアダプターに特異的なPCRを使用してステップ(c)の生成物を増幅するステップをさらに含む、項目1から8のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記核酸が、一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNAおよびDNA/RNAハイブリッドからなる群より選択される、項目1から9のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記核酸が二本鎖DNAである、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記核酸がゲノムDNAからのものである、項目1から11のいずれか一項に記載の方

法。

(項目 1 3)

前記ゲノム DNA がヒトのものである、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

アダプターにライゲートされる前記核酸が 2 0 b p から 5 0 0 0 b p の長さである、項目 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5)

目的の前記標的化部位が一塩基多型 ( S N P )、ショートタンデムリピート ( S T R )、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6)

増幅される生成物がクローニング、配列決定または遺伝子型決定のために使用される、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記アダプターが 2 0 b p から 1 0 0 b p の長さである、項目 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8)

前記アダプターがプライマー結合部位を含む、項目 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9)

前記アダプターが配列決定アダプターまたは制限部位を含む、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0)

目的の前記標的化部位が前記試料中の全核酸の 5 0 % 未満を占める、項目 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記第 1 および第 2 のアダプターが同一である、項目 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記第 1 および第 2 のアダプターが異なる、項目 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 4)

前記試料が配列決定ライブラリーを含む、項目 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5)

目的の標的化部位に標識ヌクレオチドを導入する方法であって、

( a ) 複数の核酸断片を含む試料を提供するステップ；

( b ) 前記試料を複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニックアーゼ - g N A 複合体と接触させ、それによって目的の前記標的化部位で複数のニック入りの核酸断片を生成するステップであって、前記 g N A は前記核酸断片中の目的の標的化部位に相補的である、ステップ；および

( c ) 前記複数のニック入りの核酸断片を、ニック入りの部位で核酸合成を開始することが可能な酵素および標識ヌクレオチドと接触させ、それによって目的の前記標的化部位において標識ヌクレオチドを含む複数の核酸断片を生成するステップを含む、方法。

(項目 2 6)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニックアーゼが、C A S クラス I タイプ I ニッカー

ぜ、C A S クラス I タイプ I I I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I V ニッカーゼ、C A S クラス I I タイプ I I ニッカーゼおよび C A S クラス I I タイプ V ニッカーゼからなる群より選択される、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、C a s 3 ニッカーゼ、C a s 8 a - c ニッカーゼ、C a s 1 0 ニッカーゼ、C s e 1 ニッカーゼ、C s y 1 ニッカーゼ、C s n 2 ニッカーゼ、C a s 4 ニッカーゼ、C s m 2 ニッカーゼ、C m 5 ニッカーゼ、C s f 1 ニッカーゼ、C 2 C 2 ニッカーゼ、C P F 1 ニッカーゼおよび N g A g o ニッカーゼからなる群より選択される、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記 g N A が g R N A である、項目 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

前記 g N A が g D N A である、項目 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0)

前記核酸断片が、一本鎖 D N A 断片、二本鎖 D N A 断片、一本鎖 R N A 断片、二本鎖 R N A 断片および D N A / R N A ハイブリッド断片からなる群より選択される、項目 2 5 から 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記核酸断片が二本鎖 D N A 断片である、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

二本鎖 D N A 断片がゲノム D N A からのものである、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記ゲノム D N A がヒトのものである、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記核酸断片が 2 0 b p から 5 0 0 0 b p の長さである、項目 2 5 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

目的の前記標的化部位が一塩基多型 ( S N P )、ショートタンDEMリピート ( S T R )、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、項目 2 5 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

目的の前記標的化部位が前記試料中の全核酸の 5 0 % 未満を占める、項目 2 5 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目 2 5 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記標識ヌクレオチドがビオチン化ヌクレオチドである、項目 2 5 から 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記標識ヌクレオチドが抗体コンジュゲート対の一部である、項目 2 5 から 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

ビオチン化ヌクレオチドを含む前記核酸断片をアビジンまたはストレプトアビジンと接触させ、それによって目的の前記標的化部位を捕捉するステップをさらに含む、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 1)

ニック入りの部位で核酸合成を開始することが可能な前記酵素が、D N A ポリメラーゼ I、クレノウ断片、T A Q ポリメラーゼまたは B s t D N A ポリメラーゼである、項目 2

5 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 4 2 )

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが前記核酸断片の 5 ' 末端にニックを入れる、項目 2 5 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 4 3 )

前記核酸断片が 2 0 b p から 5 0 0 0 b p の長さである、項目 2 5 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 4 4 )

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目 2 5 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 4 5 )

目的の標的核酸配列を捕捉する方法であって、

( a ) アダプターにライゲートされた複数の核酸を含む試料を提供するステップであって、前記核酸は一方の末端で第 1 のアダプターにライゲートされており、他方の末端で第 2 のアダプターにライゲートされている、ステップ；および

( b ) 前記試料を複数の触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ - g N A 複合体と接触させるステップであって、前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼはトランスポザゼに融合されており、g R N A は前記核酸のサブセットに含有される目的の標的化部位に相補的であり、一方の末端に第 1 または第 2 のアダプターを含み、他方の末端に第 3 のアダプターを含む複数の核酸断片を生成するために、前記複合体に複数の第 3 のアダプターを負荷する、ステップ

を含む、方法。

( 項目 4 6 )

第 1 または第 2 および第 3 のアダプターに特異的な P C R を使用してステップ ( b ) の生成物を増幅するステップをさらに含む、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 4 7 )

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが C R I S P R / C a s 系タンパク質に由来する、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 4 8 )

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが非 C R I S P R / C a s 系タンパク質に由来する、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 4 9 )

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが、不活性な C A S クラス I タイプ I、不活性な C A S クラス I タイプ I I I、不活性な C A S クラス I タイプ I V、不活性な C A S クラス I I タイプ I I および不活性な C A S クラス I I タイプ V からなる群より選択される、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 5 0 )

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが、d C a s 9、d C p f 1、d C a s 3、d C a s 8 a - c、d C a s 1 0、d C s e 1、d C s y 1、d C s n 2、d C a s 4、d C s m 2、d C m r 5、d C s f 1、d C 2 C 2 および d N g A g o からなる群より選択される、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 5 1 )

前記 g N A が g R N A である、項目 4 5 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 2 )

前記 g N A が g D N A である、項目 4 5 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 3 )

核酸配列がゲノム D N A からのものである、項目 4 5 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 4 )

前記ゲノム D N A がヒトのものである、項目 5 3 に記載の方法。

(項目55)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが前記トランスポザーゼのN末端に融合されている、項目45から54のいずれか一項に記載の方法。

(項目56)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが前記トランスポザーゼのC末端に融合されている、項目45から54のいずれか一項に記載の方法。

(項目57)

アダプターにライゲートされる前記核酸が20bpから5000bpの長さである、項目45から56のいずれか一項に記載の方法。

(項目58)

(b)の接触させるステップが標的化核酸配列への前記第2のアダプターの挿入を可能にする、項目45から57のいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

目的の前記標的化部位が一塩基多型(SNP)、ショートタンデムリピート(STR)、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、項目45から58のいずれか一項に記載の方法。

(項目60)

増幅される生成物がクローニング、配列決定または遺伝子型決定のために使用される、項目46に記載の方法。

(項目61)

前記アダプターが20bpから100bpの長さである、項目45から59のいずれか一項に記載の方法。

(項目62)

前記アダプターがプライマー結合部位を含む、項目45から61のいずれか一項に記載の方法。

(項目63)

前記アダプターが配列決定アダプターまたは制限部位を含む、項目45から62のいずれか一項に記載の方法。

(項目64)

目的の前記標的化部位が前記試料中の全核酸の50%未満を占める、項目45から63のいずれか一項に記載の方法。

(項目65)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目45から64のいずれか一項に記載の方法。

(項目66)

目的の標的核酸配列を捕捉する方法であって、

(a)アダプターにライゲートされた複数の核酸を含む試料を提供するステップであって、前記核酸は5'末端および3'末端で前記アダプターにライゲートされている、ステップ；

(b)前記試料を複数の触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gNA複合体と接触させ、それによって触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gNA複合体に結合した、5'および3'末端でアダプターにライゲートされた複数の核酸を生成するステップであって、前記gNAは前記核酸のサブセットに含有される目的の標的化部位に相補的である、ステップ；および

(c)前記試料を複数の触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gNA複合体と接触させ、それによって5'または3'末端のうち一方のみでアダプターにライゲートされた、目的外の核酸配列を含む複数の核酸断片を生成するステップであって、前記gNAは前記核酸中の目的の標的化部位と目的外の標的化部位の両方に相補的である、ステップを含む、方法。

(項目67)



前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼがCRISPR/Cas系タンパク質である、項目66に記載の方法。

(項目68)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが非CRISPR/Cas系タンパク質である、項目66に記載の方法。

(項目69)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが不活性なCASクラスIタイプI、不活性なCASクラスIタイプII、不活性なCASクラスIタイプIV、不活性なCASクラスIIタイプIIおよび不活性なCASクラスIタイプVからなる群より選択される、項目66に記載の方法。

(項目70)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが、dCas9、dCpf1、dCas3、dCas8a-c、dCas10、dCse1、dCsy1、dCsn2、dCas4、dCsm2、dCm5、dCsf1、dC2C2、dCPF1およびdNgAgooからなる群より選択される、項目66に記載の方法。

(項目71)

前記gNAがgRNAである、項目66から70のいずれか一項に記載の方法。

(項目72)

前記gNAがgDNAである、項目66から70のいずれか一項に記載の方法。

(項目73)

(c)の接触させるステップが、ステップ(b)の触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gNA複合体に結合した、5'および3'末端でアダプターにライゲートされた複数の前記核酸を置換しない、項目66から72のいずれか一項に記載の方法。

(項目74)

(d)の接触させるステップが、前記核酸のサブセットに含有される目的外の前記標的化部位を切断し、それによって、5'または3'末端のうち一方のみでアダプターにライゲートされた、目的外の核酸配列を含む複数の核酸断片を生成する、項目66から73のいずれか一項に記載の方法。

(項目75)

前記結合した触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ-gNA複合体を除去し、アダプターに特異的なPCRを使用して(b)の生成物を増幅するステップをさらに含む、項目66から74のいずれか一項に記載の方法。

(項目76)

前記核酸が、一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNAおよびDNA/RNAハイブリッドからなる群より選択される、項目66から75のいずれか一項に記載の方法。

(項目77)

前記核酸が二本鎖DNAである、項目76に記載の方法。

(項目78)

前記核酸がゲノムDNAからのものである、項目66から77のいずれか一項に記載の方法。

(項目79)

前記ゲノムDNAがヒトのものである、項目78に記載の方法。

(項目80)

前記5'末端および3'末端でアダプターにライゲートされた前記核酸が20bpから5000bpである、項目66から79のいずれか一項に記載の方法。

(項目81)

目的の前記標的化部位が一塩基多型(SNP)、ショートタンDEMリピート(STR)、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、項目66から80のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 2)

増幅される生成物がクローニング、配列決定または遺伝子型決定のために使用される、  
項目 7 5 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記アダプターが 2 0 b p から 1 0 0 b p の長さである、項目 6 6 から 8 2 のいずれか  
一項に記載の方法。

(項目 8 4)

前記アダプターがプライマー結合部位を含む、項目 6 6 から 8 2 のいずれか一項に記載  
の方法。

(項目 8 5)

前記アダプターが配列決定アダプターまたは制限部位を含む、項目 6 6 から 8 2 のい  
ずれか一項に記載の方法。

(項目 8 6)

目的の前記標的化部位が前記試料中の全核酸の 5 0 % 未満を占める、項目 6 6 から 8 2  
のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 7)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目 6  
6 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 8)

目的の標的核酸配列を捕捉する方法であって、

( a ) 複数の核酸配列を含む試料を提供するステップであって、前記核酸配列はメチル  
化ヌクレオチドを含み、前記核酸配列は 5 ' および 3 ' 末端でアダプターにライゲートさ  
れている、ステップ；

( b ) 前記試料を複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼ - g N A 複合体と  
接触させ、それによって前記核酸配列のサブセットで目的の複数のニック入りの部位を生  
成するステップであって、前記 g N A は前記核酸配列のサブセットの目的の標的化部位に  
相補的であり、そして前記標的核酸配列は 5 ' および 3 ' 末端でアダプターにライゲート  
されている、ステップ；

( c ) 前記試料をニック入りの部位で D N A 合成を開始することが可能な酵素およびメ  
チル化されていないヌクレオチドと接触させ、それによって、目的の前記標的化部位にメ  
チル化されていないヌクレオチドを含む複数の核酸配列を生成するステップであって、前  
記核酸配列は 5 ' および 3 ' 末端でアダプターにライゲートされている、ステップ；およ  
び

( d ) 前記試料を、メチル化核酸を切断することが可能な酵素と接触させ、それによ  
ってメチル化核酸を含む複数の核酸断片を生成するステップであって、メチル化核酸を含  
む複数の前記核酸断片は 5 ' および 3 ' 末端のうち最大 1 つでアダプターにライゲートさ  
れている、ステップ

を含む、方法。

(項目 8 9)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C A S クラス I タイプ I ニッカー  
ゼ、C A S クラス I タイプ I I I ニッカーゼ、C A S クラス I タイプ I V ニッカーゼ、C  
A S クラス I I タイプ I I ニッカーゼおよび C A S クラス I I タイプ V ニッカーゼからな  
る群より選択される、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニ  
ッカーゼ、C a s 3 ニッカーゼ、C a s 8 a - c ニッカーゼ、C a s 1 0 ニッカーゼ、C  
s e 1 ニッカーゼ、C s y 1 ニッカーゼ、C s n 2 ニッカーゼ、C a s 4 ニッカーゼ、C  
s m 2 ニッカーゼ、C m r 5 ニッカーゼ、C s f 1 ニッカーゼ、C 2 C 2 ニッカーゼおよ  
び N g A g o ニッカーゼからなる群より選択される、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記 g N A が g R N A である、項目 8 8 に記載の方法。  
(項目 9 2)

前記 g N A が g D N A である、項目 8 8 に記載の方法。  
(項目 9 3)

前記 D N A が二本鎖 D N A である、項目 8 8 から 9 2 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 9 4)

前記二本鎖 D N A がゲノム D N A からのものである、項目 9 3 に記載の方法。  
(項目 9 5)

前記ゲノム D N A がヒトのものである、項目 9 4 に記載の方法。  
(項目 9 6)

前記 D N A 配列が 2 0 b p から 5 0 0 0 b p の長さである、項目 8 8 から 9 5 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 9 7)

目的の前記標的化部位が一塩基多型 ( S N P )、ショートタンデムリピート ( S T R )、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、項目 8 8 から 9 6 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 9 8)

目的の前記標的化部位が前記試料中の全 D N A の 5 0 % 未満を占める、項目 8 8 から 9 7 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 9 9)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目 8 8 から 9 8 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 1 0 0)

ニック入りの部位で核酸合成を開始することが可能な前記酵素が、D N A ポリメラーゼ I、クレノウ断片、T A Q ポリメラーゼまたは B s t D N A ポリメラーゼである、項目 8 8 から 9 9 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 1 0 1)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが前記 D N A 配列の 5 ' 末端にニックを入れる、項目 8 8 から 1 0 0 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 1 0 2)

メチル化 D N A を切断することが可能な前記酵素が D p n I である、項目 8 8 から 1 0 1 のいずれか一項に記載の方法。  
(項目 1 0 3)

目的の標的 D N A 配列を捕捉する方法であって、  
( a ) 前記試料を複数の核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼ - g N A 複合体と接触させ、それによって目的の領域に隣接する部位で複数のニック入りの D N A を生成するステップであって、前記 g N A が、前記 D N A 配列のサブセット中の目的の前記領域に隣接する目的の標的化部位に相補的である、ステップ；

( b ) 前記試料を 6 5 °C まで加熱し、それによって、近接するニックに二本鎖切断を起こすステップ；

( c ) 前記二本鎖切断を耐熱性のリガーゼと接触させ、それによってこれらの部位にのみアダプター配列のライゲーションを可能にするステップ；および

( d ) ステップ a ~ c を反復して、第 2 のアダプターを目的の前記領域の反対側に置き、こうして目的の前記領域の濃縮を可能にするステップ  
を含む、方法。

(項目 1 0 4)

前記 g N A が g R N A である、項目 1 0 3 に記載の方法。  
(項目 1 0 5)

前記 g N A が g D N A である、項目 1 0 3 に記載の方法。  
(項目 1 0 6)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼがC A SクラスIタイプIニッカーゼ、C A SクラスIタイプI I Iニッカーゼ、C A SクラスIタイプI Vニッカーゼ、C A SクラスI IタイプI IニッカーゼおよびC A SクラスI IタイプVニッカーゼからなる群より選択される、項目103から105のいずれか一項に記載の方法。

(項目107)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼがC a s 9ニッカーゼ、C p f 1ニッカーゼ、C a s 3ニッカーゼ、C a s 8 a - cニッカーゼ、C a s 10ニッカーゼ、C s e 1ニッカーゼ、C s y 1ニッカーゼ、C s n 2ニッカーゼ、C a s 4ニッカーゼ、C s m 2ニッカーゼ、C m r 5ニッカーゼ、C s f 1ニッカーゼ、C 2 C 2ニッカーゼおよびN g A g oニッカーゼからなる群より選択される、項目103から105のいずれか一項に記載の方法。

(項目108)

前記DNAが二本鎖DNAである、項目103に記載の方法。

(項目109)

前記二本鎖DNAがゲノムDNAからのものである、項目108に記載の方法。

(項目110)

前記ゲノムDNAがヒトのものである、項目109に記載の方法。

(項目111)

前記DNA配列が20bpから5000bpの長さである、項目103から110のいずれか一項に記載の方法。

(項目112)

目的の前記標的化部位が一塩基多型(SNP)、ショートタンデムリピート(STR)、がん遺伝子、挿入断片、欠失、構造的異形、エクソン、遺伝子変異または調節領域である、項目103から111のいずれか一項に記載の方法。

(項目113)

目的の前記標的化部位が前記試料中の全DNAの50%未満を占める、項目103から112のいずれか一項に記載の方法。

(項目114)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料から得られる、項目103から113のいずれか一項に記載の方法。

(項目115)

前記二本鎖切断を接触させることが可能な耐熱性の前記リガーゼが耐熱性の5' A p p DNA/RNAリガーゼまたはT4 RNAリガーゼである、項目103から113のいずれか一項に記載の方法。

(項目116)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが前記DNA配列の5'末端にニックを入れる、項目103から115のいずれか一項に記載の方法。

(項目117)

目的の配列について試料を濃縮する方法であって、

(a) 目的の配列および枯渇のための標的化配列を含む試料を提供するステップであって、目的の前記配列は前記試料の50%未満を構成する、ステップ；および

(b) 複数の核酸ガイド化RNAエンドヌクレアーゼ-gRNA複合体または複数の核酸ガイド化DNAエンドヌクレアーゼ-gDNA複合体と前記試料を接触させるステップであって、前記gRNAおよびgDNAは前記標的化配列に相補的であり、それによって前記標的化配列が切断される、ステップ

を含む、方法。

(項目118)

目的の前記配列および枯渇のための前記標的化配列を前記試料から抽出するステップをさらに含む、項目117に記載の方法。

(項目119)

抽出される前記配列を断片化するステップをさらに含む、項目 1 1 8 に記載の方法。

(項目 1 2 0)

切断される前記標的化配列がサイズ排除によって除去される、項目 1 1 7 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 1)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料のいずれか 1 つである、項目 1 1 7 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 2)

前記試料が、枯渇のために標的化される宿主核酸配列および目的の非宿主核酸配列を含む、項目 1 1 7 から 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記非宿主核酸配列が微生物の核酸配列を含む、項目 1 2 2 に記載の方法。

(項目 1 2 4)

前記微生物核酸配列が、細菌、ウイルスまたは真核寄生生物の核酸配列である、項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 5)

前記 g R N A および g D N A が、リボソーム R N A 配列、スプライシングされた転写物、スプライシングされていない転写物、イントロン、エクソンまたは非コード R N A に相補的である、項目 1 1 7 から 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 6)

抽出される前記核酸が、一本鎖または二本鎖の R N A を含む、項目 1 1 8 に記載の方法

。

(項目 1 2 7)

抽出される前記核酸が、一本鎖または二本鎖の D N A を含む、項目 1 1 8 に記載の方法

。

(項目 1 2 8)

目的の前記配列が抽出される前記核酸の 1 0 % 未満を構成する、項目 1 1 7 から 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 9)

前記核酸ガイド化 R N A エンドヌクレアーゼが C 2 c 2 を含む、項目 1 1 7 から 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 0)

前記 C 2 c 2 が触媒活性がない、項目 1 2 9 に記載の方法。

(項目 1 3 1)

前記核酸ガイド化 D N A エンドヌクレアーゼが N g A g o を含む、項目 1 1 7 から 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 2)

前記 N g A g o が触媒活性がない、項目 1 3 1 に記載の方法。

(項目 1 3 3)

前記試料が、全血、血漿、血清、涙、唾液、粘液、脳脊髄液、歯、骨、指の爪、糞便、尿、組織および生検材料から選択される、項目 1 1 7 から 1 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 4)

試料を濃縮する方法であって、

( a ) 宿主核酸および非宿主核酸を含む試料を提供するステップ；

( b ) 複数の核酸ガイド化 R N A エンドヌクレアーゼ - g R N A 複合体または複数の核酸ガイド化 D N A エンドヌクレアーゼ - g D N A 複合体と前記試料を接触させるステップであって、前記 g R N A および g D N A は前記宿主核酸の標的化部位に相補的である、ステップ、ならびに

( c ) 非宿主核酸について前記試料を濃縮するステップ

を含む、方法。

(項目135)

前記核酸ガイド化RNAエンドヌクレアーゼがC2c2を含む、項目134に記載の方法。

(項目136)

前記核酸ガイド化RNAエンドヌクレアーゼが触媒活性がないC2c2を含む、項目134に記載の方法。

(項目137)

前記核酸ガイド化DNAエンドヌクレアーゼがNgAgを含む、項目134に記載の方法。

(項目138)

前記核酸ガイド化DNAエンドヌクレアーゼが触媒活性がないNgAgを含む、項目134に記載の方法。

(項目139)

前記宿主が、ヒト、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、サル、イヌ、ネコ、スナネズミ、トリ、マウスおよびラットからなる群より選択される、項目134から138のいずれか一項に記載の方法。

(項目140)

前記非宿主が原核生物である、項目134から138のいずれか一項に記載の方法。

(項目141)

前記非宿主が、真核生物、ウイルス、細菌、真菌および原生動物からなる群より選択される、項目134から138のいずれか一項に記載の方法。

(項目142)

アダプターにライゲートされた前記宿主核酸および非宿主核酸が50bpから1000bpの範囲内である、項目134から141のいずれか一項に記載の方法。

(項目143)

前記非宿主核酸が前記試料中の全核酸の50%未満を構成する、項目134から142のいずれか一項に記載の方法。

(項目144)

前記試料が生物学的試料、臨床試料、法医学試料または環境試料のいずれか1つである、項目134から143のいずれか一項に記載の方法。

(項目145)

ステップ(c)がステップ(b)の生成物をcDNAに逆転写することを含む、項目134から144のいずれか一項に記載の方法。

(項目146)

ステップ(c)がサイズ排除によって前記宿主核酸を除去することを含む、項目134から145のいずれか一項に記載の方法。

(項目147)

ステップ(c)がビオチンの使用によって前記宿主核酸を除去することを含む、項目134から145のいずれか一項に記載の方法。

(項目148)

前記試料が、全血、血漿、血清、涙、唾液、粘液、脳脊髄液、歯、骨、指の爪、糞便、尿、組織および生検材料から選択される、項目134から147のいずれか一項に記載の方法。

(項目149)

核酸断片、核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼ-gNA複合体および標識ヌクレオチドを含む組成物。

(項目150)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、CASクラスIタイプIニッカーゼ、CASクラスIタイプIIニッカーゼ、CASクラスIタイプIVニッカーゼ、C

A S クラス I I タイプ I I ニッカーゼおよび C A S クラス I I タイプ V ニッカーゼからなる群より選択される、項目 1 4 9 に記載の組成物。

(項目 1 5 1)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニッカーゼが、C a s 9 ニッカーゼ、C p f 1 ニッカーゼ、C a s 3 ニッカーゼ、C a s 8 a - c ニッカーゼ、C a s 1 0 ニッカーゼ、C s e 1 ニッカーゼ、C s y 1 ニッカーゼ、C s n 2 ニッカーゼ、C a s 4 ニッカーゼ、C s m 2 ニッカーゼ、C m r 5 ニッカーゼ、C s f 1 ニッカーゼ、C 2 C 2 ニッカーゼおよび N g A g o ニッカーゼからなる群より選択される、項目 1 4 9 に記載の組成物。

(項目 1 5 2)

前記 g N A が g R N A である、項目 1 4 9 から 1 5 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 3)

前記 g N A が g D N A である、項目 1 4 9 から 1 5 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 4)

前記核酸断片が D N A を含む、項目 1 4 9 から 1 5 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 5)

前記核酸断片が R N A を含む、項目 1 4 9 から 1 5 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 6)

前記ヌクレオチドがピオチンで標識される、項目 1 4 9 から 1 5 5 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 7)

前記ヌクレオチドが抗体コンジュゲート対の一部である、項目 1 4 9 から 1 5 6 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 5 8)

核酸断片および触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼ - g N A 複合体を含む組成物であって、前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼはトランスポザーゼに融合されている、組成物。

(項目 1 5 9)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが、不活性な C A S クラス I タイプ I、不活性な C A S クラス I タイプ I I I、不活性な C A S クラス I タイプ I V、不活性な C A S クラス I I タイプ I I および不活性な C A S クラス I I タイプ V からなる群より選択される、項目 1 5 8 に記載の組成物。

(項目 1 6 0)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが、d C a s 9、d C p f 1、d C a s 3、d C a s 8 a - c、d C a s 1 0、d C s e 1、d C s y 1、d C s n 2、d C a s 4、d C s m 2、d C m r 5、d C s f 1、d C 2 C 2 および d N g A g o からなる群より選択される、項目 1 5 8 に記載の組成物。

(項目 1 6 1)

前記 g N A が g R N A である、項目 1 5 8、1 5 9 または 1 6 0 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 6 2)

前記 g N A が g D N A である、項目 1 5 8 から 1 6 1 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 6 3)

前記核酸断片が D N A を含む、項目 1 5 8 から 1 6 2 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 6 4)

前記核酸断片が R N A を含む、項目 1 5 8 から 1 6 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 6 5)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが前記トランスポザーゼの N 末端に融合されている、項目 1 5 8 から 1 6 4 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 6 6)

前記触媒活性がない核酸ガイド化ヌクレアーゼが前記トランスポザーゼの C 末端に融合

されている、項目158から165のいずれか一項に記載の組成物。

(項目167)

メチル化ヌクレオチドを含む核酸断片、核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニックアーゼ - gNA複合体および非メチル化ヌクレオチドを含む組成物。

(項目168)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニックアーゼが、CASクラスIタイプIニックアーゼ、CASクラスIタイプIIニックアーゼ、CASクラスIタイプIVニックアーゼ、CASクラスIIタイプIIニックアーゼおよびCASクラスIIタイプVニックアーゼからなる群より選択される、項目167に記載の組成物。

(項目169)

前記核酸ガイド化ヌクレアーゼであるニックアーゼが、Cas9ニックアーゼ、Cpf1ニックアーゼ、Cas3ニックアーゼ、Cas8a-cニックアーゼ、Cas10ニックアーゼ、Cse1ニックアーゼ、Csy1ニックアーゼ、Csn2ニックアーゼ、Cas4ニックアーゼ、Csm2ニックアーゼ、Cmr5ニックアーゼ、Csf1ニックアーゼ、C2C2ニックアーゼおよびNgAgOニックアーゼからなる群より選択される、項目167に記載の組成物。

(項目170)

前記gNAがgRNAである、項目167、168または169のいずれか一項に記載の組成物。

(項目171)

前記gNAがgDNAである、項目167から170のいずれか一項に記載の組成物。

(項目172)

前記核酸断片がDNAを含む、項目167から171のいずれか一項に記載の組成物。

(項目173)

前記核酸断片がRNAを含む、項目167から171のいずれか一項に記載の組成物。

(項目174)

前記ヌクレオチドがビオチンで標識される、項目167から173のいずれか一項に記載の組成物。

(項目175)

前記ヌクレオチドが抗体コンジュゲート対の一部である、項目167から174のいずれか一項に記載の組成物。