

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7008016号
(P7008016)

(45)発行日 令和4年1月25日(2022.1.25)

(24)登録日 令和4年1月12日(2022.1.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 Q

1/6844

Z Z N A

C 1 2 Q 1/6806(2018.01)

C 1 2 Q

1/6806

Z

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q

1/6869

Z

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q

1/6876

Z

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M

1/00

A

請求項の数 10 (全78頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-517602(P2018-517602)

(86)(22)出願日 平成28年10月7日(2016.10.7)

(65)公表番号 特表2018-537955(P2018-537955
A)

(43)公表日 平成30年12月27日(2018.12.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/056126

(87)国際公開番号 WO2017/062863

(87)国際公開日 平成29年4月13日(2017.4.13)

審査請求日 令和1年10月3日(2019.10.3)

(31)優先権主張番号 62/239,690

(32)優先日 平成27年10月9日(2015.10.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 517444562

アキュラジェン ホールディングス リミ
テッドイギリス領 ケイマン諸島 ケイワイ 1 -
1 1 0 6 グランド ケイマン, ジョージ
タウン, サウス チャーチ ストリート
1 0 3, ハーパー プレイス, 2 エヌ
ディー フロア, ピー.オー. ボックス
4 7 2

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 増幅産生物の富化のための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化する方法であって、

(a) 第1のプライマーを用いた複数サイクルの増幅によって環状標的ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップであって、前記複数サイクルの増幅の各サイクルが、変性温度における変性、アニーリング温度におけるプライマーのアニーリング、および伸長温度におけるプライマーの伸長を含み、前記第1のプライマーが、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端と、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端とを含むステップと、

(b) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端と、配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端とを含む第2のプライマーの延長によって前記標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物を生成するステップであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一であるステップと、

(c) 複数のアンプリコンを生成する条件下でステップ(b)の前記複数の延長産生物を増幅するステップであって、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより

多いコピーを含むアンプリコンが富化されるステップと
を含み、

(a) のプライマーの伸長が、鎖置換活性を有するポリメラーゼにより行われる、方法。

【請求項 2】

前記第 1 の共通配列と前記第 2 の共通配列とが同一である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (c) の前記増幅が第 3 のプライマーのプライマー延長を含み、前記第 3 のプライマーが、配列相補性によって前記第 1 の共通配列または前記第 2 の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

(c) の前記増幅するステップによって、前記標的ポリヌクレオチドの 2 つより少ないコピーを有するアンプリコンの百分率よりも大きな、前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記延長産生物が、(i) 前記第 1 の共通配列と前記第 2 の共通配列の相補体との間、または (i i) 前記第 2 の共通配列と前記第 1 の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションを含むステムループ構造を形成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記環状標的ポリヌクレオチドが環状化された無細胞 DNA である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記環状標的ポリヌクレオチドがゲノム DNA の環状化された断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記環状標的ポリヌクレオチドが一本鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (c) で産生された前記複数のアンプリコンをシーケンシングするステップさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

同じ反応混合物中で複数の異なる標的ポリヌクレオチドが増幅される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2015 年 10 月 9 日に提出された米国仮特許出願第 62 / 239, 690 号に対する利益を主張し、この出願は参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

大スケールの並列核酸シーケンシングの出現によって、複雑な集団の中の配列多様性を同定することが実現可能になった。ローリングサークル増幅 (RCA)、即ち鎖置換能を有するポリメラーゼを用いる増幅プロセスが、シーケンシング解析のために核酸を調製するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 手順の有用な代替および補完として出現した。RCA には、環状 DNA 鋳型等の環状ポリヌクレオチド鋳型にアニーリングされたプライマーにヌクレオチドを連続的に付加することによって繰り返し配列を有するポリヌクレオチドを成長させるステップが含まれる。この延長プロセスによって環状ポリヌクレオチド鋳型の全長を多数回カバーすることができ、それにより鋳型の繰り返し配列、即ちコンカテマーと称されるものの形成がもたらされる。コンカテマーはさらなる増幅産生物を発生させるための鋳型としても役立つことができる。しかし、この延長は直鎖状コンカテマーの末端に達するまでしか進行しない。成長するポリヌクレオチド鎖の先端が DNA の二本鎖

10

20

30

40

50

部分に到達すると、成長する鎖は鋳型から存在する鎖を置換する。その結果、鋳型配列の様々な数のリピートからなる種々の長さの二本鎖DNAの形成がもたらされることが多い。従来のRCA法においては、短いコンカテマーは、標的配列の多くのリピートを含む長いコンカテマーに比べて不均合に増幅されることが多い。したがって長いコンカテマーを引き続いて解析することはより困難になり得る。

【0003】

大スケール並列シーケンシングには、広く用いられている技法における固有のエラーの頻度が集団中の実際の配列多様性の多くにおける頻度よりも大きいという顕著な限界がある。例えば、標準的な高スループットシーケンシングにおいては0.1~1%のエラー率が報告されている。バリエーションの頻度が低く、例えばエラー率と同じまたはこれより低い場合には、稀な配列バリエーションの検出は高い偽陽性率を伴う。

10

【0004】

稀な配列バリエーションを検出する能力は種々の理由によって重要である。例えば、稀な特徴配列の検出は、細菌分類群等の有害な環境汚染物質の存在を同定し識別するために用いることができる。細菌分類群を特徴付ける一般的な方法は、rRNA配列等の高度に保存された配列における差異を同定することである。しかし今日までの典型的なシーケンシングに基づくアプローチは、所与の試料中の異なるゲノムの圧倒的な数およびメンバー間の相同性の程度に関連する困難に直面しており、既に煩雑になっている手順にとって複雑な問題となる。

【0005】

配列多様性を検出するための既存の技法は、融合遺伝子の多様性および染色体の再配列の検出において特に非効率的である。再配列された遺伝子と融合した「パートナー」遺伝子は知られていないことが多く、そのため検出が困難になる。接合部位が観察されない場合には融合遺伝子の検出も困難であり得る。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記に鑑みて、稀な配列多様性、特に稀な配列変化および遺伝子融合事象を検出するための代替のおよび/または堅固な方法および組成物に対するニーズが存在する。本開示の組成物および方法はこのニーズに対処するものであり、さらなる利点も提供する。特に本開示の種々の態様は、大量並列シーケンシング法のために用いることができる標的ポリヌクレオチドの複数のコピーを含むアンプリコンを提供する。標的ポリヌクレオチドの複数のコピーを含むアンプリコンを用いることによって、標的ポリヌクレオチドを1回より多くシーケンシングすることができ、稀な配列バリエーションおよび融合遺伝子をシーケンシングする際のエラーを減少させることができる。

30

【0007】

一態様では、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化する方法が開示される。この方法は、(a)第1のプライマーの延長によって環状標的ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップであって、前記第1のプライマーが、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端と、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端とを含むステップと、(b)配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端と、配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端とを含む第2のプライマーの延長によって前記標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産物を生成するステップであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一であるステップと、(c)複数のアンプリコンを生成する条件下でステップ(b)の前記複数の延長産物を増幅するステップであって、前記標的ポリヌ

40

50

クレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化されるステップとを含む。一部の実施形態では、ステップ(a)が鎖置換活性を有するポリメラーゼによって達成される。一部の実施形態では、前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である。一部の実施形態では、ステップ(c)の前記増幅が第3のプライマーのプライマー延長を含み、前記第3のプライマーが、配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を含む。一部の実施形態では、(c)の前記増幅するステップによって、前記標的ポリヌクレオチドの2つより少ないコピーを有するアンプリコンの百分率よりも大きな、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が得られる。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの前記百分率が少なくとも90%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの前記百分率が少なくとも80%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの前記百分率が少なくとも60%である。一部の実施形態では、前記延長産生物が、(i)前記第1の共通配列と前記第2の共通配列の相補体との間、または(ii)前記第2の共通配列と前記第1の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションを含むステムループ構造を形成する。一部の実施形態では、前記ステムループ産生物の形成が、アニーリングステップを前記第3のプライマーの融解温度の±5以内の温度に保ってステップ(c)の前記増幅を実施することによって達成される。一部の実施形態では、前記ステムループ産生物の形成が、アニーリングステップを70未満の温度に保ってステップ(c)の前記増幅を実施することによって達成される。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも9塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも15塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも20塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも25塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも30塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、ステップ(b)が6サイクル以下の前記第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、ステップ(b)が8サイクル以下の前記第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、ステップ(b)が10サイクル以下の前記第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、前記第1の共通配列、前記第2の共通配列、および前記第3のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに±5以内の融解温度(T_m)を有する。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドが環状化された無細胞DNAである。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドがゲノムDNAの環状化された断片である。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドが染色体再配列の結果生じた配列を含む。一部の実施形態では、前記染色体再配列が、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i)前記第1の3'末端に相補的な配列、(ii)前記第2の3'末端と同一の配列、および(iii)(i)と(ii)との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが75ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも50%が少なくとも75ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドが一本鎖である。一部の実施形態では、方法は、ステップ(c)で産生された前記複数のアンプリコンをシーケンシングするステップさらに含む。一部の実施形態では、前記シーケンシングするステップが、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンを、前記標的ポリヌクレオチドのただ1つのコピーを含むアンプリコンから選択的に精製することなく実施される。一部の実施形態では、方法は、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含む、ステップ(c)で産生された前記複数のアンプリコンの中のアンプリコンを精製するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、前記精製されたア

ンブリコンをシーケンシングするステップをさらに含む。一部の実施形態では、同じ反応混合物中で複数の異なる標的ポリヌクレオチドが増幅される。

【0008】

別の態様では、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンブリコンを富化するための反応混合物が開示される。一実施形態では、反応混合物は、(a)環状標的ポリヌクレオチド、(b)配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマー、ならびに(c)配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列は、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一である、第2のプライマーを含み、前記コンカテマーは、前記第1のプライマーの延長産物である。一部の実施形態では、前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である。一部の実施形態では、前記反応混合物が容器に入れられている。一部の実施形態では、前記容器が、ウェル、プレート、チューブ、チャンバー、フローセル、またはチップである。一部の実施形態では、反応混合物は、配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第3のプライマーをさらに含む。一部の実施形態では、前記第1の共通配列、前記第2の共通配列、および前記第3のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度(T_m)を有する。一部の実施形態では、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列がそれぞれ少なくとも15ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドが環状化された無細胞DNAである。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドがゲノムDNAの環状化された断片である。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドが染色体再配列の結果生じた配列を含む。一部の実施形態では、前記染色体再配列が、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i)前記第1の3'末端に相補的な配列、(ii)前記第2の3'末端と同一の配列、および(iii)(i)と(ii)との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが75ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、前記環状標的ポリヌクレオチドが一本鎖である。

【0009】

別の態様では、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンブリコンを富化するためのキットが開示される。一実施形態では、キットは、(a)配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマー、(b)配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一であり、前記コンカテマーが前記第1のプライマーの延長産物である、第2のプライマー、ならびに(c)配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第3のプライマーを含む。一部の実施形態では、前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である。一部の実施形態では、前記第1の共通配列、前記第2の共通配列、および前記第3のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度(T_m)を有する。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i)前記第1の3'末端に相補的な配列、(ii)前記第2の3'末端と同

10

20

30

40

50

一の配列、および (i i i) (i) と (i i) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが 75 ヌクレオチドまたはそれ未満である。

【 0 0 1 0 】

別の態様では、標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するために使用するためのプライマーを設計するためのシステムが開示される。一実施形態では、システムは、(a) 特定の標的配列を増幅するためのプライマーを設計するための利用者の要求を受けるように構成されたコンピュータ、(b) 1 つまたは複数のプロセッサによる実行によって前記標的配列の増幅のための少なくとも 3 つのプライマーを設計するコードを含むコンピュータ読み込み可能な媒体であって、前記少なくとも 3 つのプライマーが、(i) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第 1 の 3 ' 末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第 1 の共通配列を含む第 1 の 5 ' 末端を含む第 1 のプライマー、(i i) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第 2 の 3 ' 末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第 2 の共通配列を含む第 2 の 5 ' 末端を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の共通配列および前記第 2 の共通配列が、それぞれ 5 ' 末端に少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも 90 % 同一であり、前記コンカテマーが前記第 1 のプライマーの延長産生物である、第 2 のプライマー、ならびに (i i i) 配列相補性によって前記第 1 の共通配列または前記第 2 の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第 3 のプライマーを含む、コンピュータ読み込み可能な媒体、ならびに (c) 受容者にレポートを送るレポートジェネレータであって、前記レポートが前記少なくとも 3 つのプライマーの配列を含む、レポートジェネレータを含む。一部の実施形態では、前記第 1 の共通配列と前記第 2 の共通配列とが同一である。一部の実施形態では、前記第 1 の共通配列、前記第 2 の共通配列、および前記第 3 のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度 (T_m) を有する。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドに沿って 5 ' から 3 ' に向かって (i) 前記第 1 の 3 ' 末端に相補的な配列、(i i) 前記第 2 の 3 ' 末端と同一の配列、および (i i i) (i) と (i i) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが 75 ヌクレオチドまたはそれ未満である。

【 0 0 1 1 】

ある態様では、本開示は、ローリングサークル増幅を実施する方法を提供する。この方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドを含む環状ポリヌクレオチドを準備するステップ、(b) 増幅反応混合物を複数サイクルのローリングサークル増幅に供してコンカテマーを含む複数の増幅産生物を生成するステップを含み、前記増幅反応混合物が、(i) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、(i i) 前記環状ポリヌクレオチド、および (i i i) プライマーを含み、前記複数サイクルのローリングサークル増幅の各サイクルが、前記複数の増幅産生物を生成するように、変性温度における変性、アニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および所与の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマーの伸長を含み、生成した前記複数の増幅産生物が、変性およびプライマーアニーリングについて同等の条件下であるが前記複数サイクルの伸長時間の合計と同等の伸長時間である 1 サイクルの増幅を用いることによって生成する複数の増幅産生物と比較した場合に、より高い割合で前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを有するコンカテマーを含むことで特徴付けられる。

【 0 0 1 2 】

ある態様では、本開示は、ローリングサークル増幅によって生成される標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを有するコンカテマーの割合を増加させる方法を提供する。この方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドを含む環状ポリヌクレオチドを準備するステップ、(b) 増幅反応混合物を複数サイクルのローリングサークル増幅に供してコンカテマーを含む複数の増幅産生物を生成するステップを含み、前記増幅反応混合物が (i) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、(i i) 前記環状ポリヌクレオチド、および (i i i)

プライマーを含み、前記複数サイクルのローリングサークル増幅の各サイクルが、前記複数の増幅産生物を生成するように、変性温度における変性、アニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および所与の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマーの伸長を含み、それにより前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合を増加させる。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有する前記複数の増幅産生物におけるコンカテマーの割合が、変性およびプライマーアニーリングについて同等の条件下であるが前記複数サイクルの伸長時間の合計と同等の伸長時間である1サイクルの増幅を用いることによって生成する複数の増幅産生物と比較した場合に増加している。

【0013】

一部の実施形態では、前記ポリメラーゼが、Bsu DNAポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、PyroPhage 3173ポリメラーゼ、これらの任意のバリエーション、およびこれらの任意の断片からなる群から選択される。

【0014】

一部の実施形態では、前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞DNA (cfDNA)を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約180塩基対の平均断片長さを示す。一部の実施形態では、前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞DNA (cfDNA)を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約170塩基対の平均断片長さを示す。一部の実施形態では、前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞DNA (cfDNA)を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約40塩基～約450塩基の断片長さ分布を示す。一部の実施形態では、前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞DNA (cfDNA)を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約100塩基～約200塩基の断片長さ分布を示す。

【0015】

一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合が少なくとも約1%増加する。一部の実施形態では、方法は、前記複数サイクルのローリングサークル増幅の少なくとも1つのサイクルの後に前記反応混合物に前記ポリメラーゼを補充するステップをさらに含む。

【0016】

一部の実施形態では、前記環状ポリヌクレオチドが約40塩基～約500塩基の長さを有する。一部の実施形態では、前記環状ポリヌクレオチドが無細胞DNA (cfDNA)を含む。一部の実施形態では、前記環状ポリヌクレオチドがゲノムDNAの断片を含む。一部の実施形態では、前記環状ポリヌクレオチドが染色体再配列の結果生じた配列を含む。一部の実施形態では、前記染色体再配列が、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、前記環状ポリヌクレオチドが二本鎖である。一部の実施形態では、前記環状ポリヌクレオチドが一本鎖である。

【0017】

一部の実施形態では、複数の異なる環状ポリヌクレオチドが前記増幅反応混合物中で増幅される。一部の実施形態では、前記複数サイクルが少なくとも2つのサイクルを含む。一部の実施形態では、前記複数サイクルの各サイクルが、(i)約75～約95の変性温度における約5秒～約60秒間の変性、(ii)約45～約65のアニーリング温度における約5秒～約60秒間のプライマーアニーリング、および(iii)約65～約75の伸長温度における約30秒～約10分間の伸長時間のプライマー伸長を含む。一部の実施形態では、前記複数サイクルの各サイクルが、(i)約80の変性温度における約15秒～約30秒間の変性、(ii)約50のアニーリング温度における約15秒～約45秒間のプライマーアニーリング、および(iii)約70の伸長温度における約3分～約10分間の伸長時間のプライマー伸長を含む。

【0018】

一部の実施形態では、前記プライマーが、プライマー延長のための環状ポリヌクレオチドの種々の領域にランダムにハイブリダイズし、これをプライミングするランダム配列を含む。一部の実施形態では、前記プライマーが、配列特異的な様式でプライマー延長のための環状ポリヌクレオチドの種々の領域にランダムにハイブリダイズし、これをプライミングする遺伝子特異的な配列を含む。一部の実施形態では、前記プライマーが、(i) 配列相補性によって前記環状ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および(ii) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマーを含み、前記環状ポリヌクレオチドを鋳型として用いる前記第1のプライマーの延長によって前記複数サイクルのローリングサークル増幅の間に一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーが生成される。一部の実施形態では、前記プライマーが、(i) 配列相補性によって前記一本鎖ポリヌクレオチドを含む前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および(ii) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーを含み、前記コンカテマーを鋳型として用いる前記第2のプライマーの延長によって前記複数サイクルのローリングサークル増幅の間に前記標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物が生成される。一部の実施形態では、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一である。一部の実施形態では、前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である。

【0019】

一部の実施形態では、方法は、複数のアンプリコンを生成する条件下で前記複数の延長産生物を増幅するステップをさらに含み、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化される。一部の実施形態では、増幅するステップが第3のプライマーのプライマー延長を含み、前記第3のプライマーが、配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を含む。一部の実施形態では、増幅するステップによって、前記標的ポリヌクレオチドの2つより少ないコピーを有するアンプリコンの百分率よりも大きな、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が得られる。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも5%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも10%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも20%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも30%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも40%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも60%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも80%である。一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも90%である。

【0020】

一部の実施形態では、前記複数の延長産生物が、(i) 前記第1の共通配列と前記第2の共通配列の相補体との間、または(ii) 前記第2の共通配列と前記第1の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションを含むステムループ構造を形成する。一部の実施形態では、前記ステムループ構造の形成が、アニーリングステップを前記第3のプライマーの融解温度の ± 5 以内の温度に保って前記増幅を実施することによって達成される。一部の実施形態では、前記ステムループ構造の形成が、アニーリングステップを約70 未満の温度に保って前記増幅を実施することによって達成される。一部の実施形態で

は、前記ステムループ構造が少なくとも 9 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも 15 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも 20 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも 25 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記ステムループ構造が少なくとも 30 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、前記第 1 の共通配列、前記第 2 の共通配列、および前記第 3 のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度 (T_m) を有する。

【0021】

一部の実施形態では、前記標的ポリヌクレオチドに沿って 5' から 3' に向かって (i) 前記第 1 の 3' 末端に相補的な配列、(ii) 前記第 2 の 3' 末端と同一の配列、および (iii) (i) と (ii) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが 75 ヌクレオチドまたはそれ未満である。

【0022】

一部の実施形態では、方法は、コンカテマーを含む前記複数の増幅産物をシーケンシングするステップをさらに含む。一部の実施形態では、前記シーケンシングするステップが、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを有するコンカテマーを、前記標的ポリヌクレオチドの 2 つ未満のコピーを含むコンカテマーから選択的に分離することなく実施される。

【0023】

一部の実施形態では、方法は、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを含むコンカテマーを、前記標的ポリヌクレオチドの 2 つ未満のコピーを含むコンカテマーから分離するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを含む前記コンカテマーをシーケンシングするステップをさらに含む。

参照による組み込み

【0024】

本明細書に述べる全ての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれの個別の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれると具体的にかつ個別に示されるのと同程度に参照により本明細書に組み込まれる。

【0025】

本発明の新規な特徴を、特に添付した特許請求の範囲において説明する。本発明の原理を用いた実例的な実施形態を説明する以下の詳細な説明および付随する図面 (図) を参照することによって、本発明の特徴および利点をより良く理解することができる。

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)

標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化する方法であって、

(a) 第 1 のプライマーの延長によって環状標的ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップであって、前記第 1 のプライマーが、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第 1 の 3' 末端と、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第 1 の共通配列を含む第 1 の 5' 末端とを含むステップと、

(b) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第 2 の 3' 末端と、配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第 2 の共通配列を含む第 2 の 5' 末端とを含む第 2 のプライマーの延長によって前記標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数のコピーを含む複数の延長産物を生成するステップであって、前記第 1 の共通配列および前記第 2 の共通配列が、それぞれ 5' 末端に少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも 90 % 同一であるス

10

20

30

40

50

テップと、

(c) 複数のアンプリコンを生成する条件下でステップ (b) の前記複数の延長産生物を増幅するステップであって、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化されるステップとを含む方法。

(項目2)

ステップ (a) が鎖置換活性を有するポリメラーゼによって達成される、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である、項目1に記載の方法。

10

(項目4)

ステップ (c) の前記増幅が第3のプライマーのプライマー延長を含み、前記第3のプライマーが、配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

(c) の前記増幅するステップによって、前記標的ポリヌクレオチドの2つより少ないコピーを有するアンプリコンの百分率よりも大きな、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が得られる、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの前記百分率が少なくとも90%である、項目5に記載の方法。

20

(項目7)

前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの前記百分率が少なくとも80%である、項目5に記載の方法。

(項目8)

前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの前記百分率が少なくとも60%である、項目5に記載の方法。

(項目9)

前記延長産生物が、(i) 前記第1の共通配列と前記第2の共通配列の相補体との間、または(ii) 前記第2の共通配列と前記第1の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションを含むステムループ構造を形成する、項目1に記載の方法。

30

(項目10)

前記ステムループ構造の形成が、アニーリングステップを前記第3のプライマーの融解温度の ± 5 以内の温度に保ってステップ (c) の前記増幅を実施することによって達成される、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記ステムループ構造の形成が、アニーリングステップを70 未満の温度に保ってステップ (c) の前記増幅を実施することによって達成される、項目9に記載の方法。

(項目12)

前記ステムループ構造が少なくとも9塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目9に記載の方法。

40

(項目13)

前記ステムループ構造が少なくとも15塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目9に記載の方法。

(項目14)

前記ステムループ構造が少なくとも20塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目9に記載の方法。

(項目15)

前記ステムループ構造が少なくとも25塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目9に記載の方法。

50

(項目 16)

前記ステムループ構造が少なくとも30塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目9に記載の方法。

(項目 17)

ステップ(b)が6サイクル以下の前記第2のプライマーの延長を含む、項目1に記載の方法。

(項目 18)

ステップ(b)が8サイクル以下の前記第2のプライマーの延長を含む、項目1に記載の方法。

(項目 19)

ステップ(b)が10サイクル以下の前記第2のプライマーの延長を含む、項目1に記載の方法。

(項目 20)

前記第1の共通配列、前記第2の共通配列、および前記第3のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度(T_m)を有する、項目4に記載の方法。

(項目 21)

前記環状標的ポリヌクレオチドが環状化された無細胞DNAである、項目1に記載の方法。

(項目 22)

前記環状標的ポリヌクレオチドがゲノムDNAの環状化された断片である、項目1に記載の方法。

(項目 23)

前記環状標的ポリヌクレオチドが染色体再配列の結果生じた配列を含む、項目1に記載の方法。

(項目 24)

前記染色体再配列が、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも1つである、項目23に記載の方法。

(項目 25)

前記標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i)前記第1の3'末端に相補的な配列、(ii)前記第2の3'末端と同一の配列、および(iii)(i)と(ii)との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが75ヌクレオチドまたはそれ未満である、項目1または23に記載の方法。

(項目 26)

コンカテマーの少なくとも50%が少なくとも75ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む、項目1に記載の方法。

(項目 27)

前記環状標的ポリヌクレオチドが一本鎖である、項目1に記載の方法。

(項目 28)

ステップ(c)で産生された前記複数のアンプリコンをシーケンシングするステップさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目 29)

前記シーケンシングするステップが、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンを、前記標的ポリヌクレオチドのただ1つのコピーを含むアンプリコンから選択的に精製することなく実施される、項目28に記載の方法。

(項目 30)

前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含む、ステップ(c)で産生された前記複数のアンプリコンの中のアンプリコンを精製するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目 31)

10

20

30

40

50

前記精製されたアンプリコンをシーケンシングするステップをさらに含む、項目 30 に記載の方法。

(項目 32)

同じ反応混合物中で複数の異なる標的ポリヌクレオチドが増幅される、項目 1 に記載の方法。

(項目 33)

標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するための反応混合物であって、

(a) 環状標的ポリヌクレオチド、

(b) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第 1 の 3' 末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第 1 の共通配列を含む第 1 の 5' 末端を含む第 1 のプライマー、ならびに

(c) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第 2 の 3' 末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第 2 の共通配列を含む第 2 の 5' 末端を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の共通配列および前記第 2 の共通配列は、それぞれ 5' 末端に少なくとも 10 個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも 90% 同一である、第 2 のプライマーを含む反応混合物。

(項目 34)

前記第 1 の共通配列と前記第 2 の共通配列とが同一である、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 35)

前記反応混合物が容器に入れている、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 36)

前記容器が、ウェル、プレート、チューブ、チャンバー、フローセル、またはチップである、項目 35 に記載の反応混合物。

(項目 37)

配列相補性によって前記第 1 の共通配列または前記第 2 の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第 3 のプライマーをさらに含む、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 38)

前記第 1 の共通配列、前記第 2 の共通配列、および前記第 3 のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度 (T_m) を有する、項目 37 に記載の反応混合物。

(項目 39)

前記第 1 の共通配列および前記第 2 の共通配列がそれぞれ少なくとも 15 ヌクレオチドを含む、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 40)

前記環状標的ポリヌクレオチドが環状化された無細胞 DNA である、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 41)

前記環状標的ポリヌクレオチドがゲノム DNA の環状化された断片である、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 42)

前記環状標的ポリヌクレオチドが染色体再配列の結果生じた配列を含む、項目 33 に記載の反応混合物。

(項目 43)

前記染色体再配列が、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも 1 つである、項目 42 に記載の反応混合物。

(項目 44)

前記標的ポリヌクレオチドに沿って 5' から 3' に向かって (i) 前記第 1 の 3' 末端に相

10

20

30

40

50

補的な配列、(i i) 前記第 2 の 3 ' 末端と同一の配列、および (i i i) (i) と (i i) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが 7 5 ヌクレオチドまたはそれ未満である、項目 3 3 または 4 2 に記載の反応混合物。

(項目 4 5)

前記環状標的ポリヌクレオチドが一本鎖である、項目 3 3 に記載の反応混合物。

(項目 4 6)

標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するためのキットであって、

(a) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第 1 の 3 ' 末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第 1 の共通配列を含む第 1 の 5 ' 末端を含む第 1 のプライマー、

10

(b) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第 2 の 3 ' 末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第 2 の共通配列を含む第 2 の 5 ' 末端を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の共通配列および前記第 2 の共通配列が、それぞれ 5 ' 末端に少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも 9 0 % 同一であり、前記コンカテマーが前記第 1 のプライマーの延長産生物である、第 2 のプライマー、ならびに

(c) 配列相補性によって前記第 1 の共通配列または前記第 2 の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第 3 のプライマー

を含むキット。

20

(項目 4 7)

前記第 1 の共通配列と前記第 2 の共通配列とが同一である、項目 4 6 に記載のキット。

(項目 4 8)

前記第 1 の共通配列、前記第 2 の共通配列、および前記第 3 のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度 (T m) を有する、項目 4 6 に記載のキット。

(項目 4 9)

前記標的ポリヌクレオチドに沿って 5 ' から 3 ' に向かって (i) 前記第 1 の 3 ' 末端に相補的な配列、(i i) 前記第 2 の 3 ' 末端と同一の配列、および (i i i) (i) と (i i) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが 7 5 ヌクレオチドまたはそれ未満である、項目 4 6 に記載のキット。

30

(項目 5 0)

標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するのに使用するためのプライマーを設計するためのシステムであって、

(a) 特定の標的配列を増幅するためのプライマーを設計するための利用者の要求を受けように構成されたコンピュータ、

(b) 1 つまたは複数のプロセッサによる実行によって前記標的配列の増幅のための少なくとも 3 つのプライマーを設計するコードを含むコンピュータ読み込み可能な媒体であって、前記少なくとも 3 つのプライマーが、

40

(i) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第 1 の 3 ' 末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第 1 の共通配列を含む第 1 の 5 ' 末端を含む第 1 のプライマー、

(i i) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第 2 の 3 ' 末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第 2 の共通配列を含む第 2 の 5 ' 末端を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の共通配列および前記第 2 の共通配列が、それぞれ 5 ' 末端に少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも 9 0 % 同一であり、前記コンカテマーが前記第 1 のプライマーの延長産生物である、第 2 のプライマー、ならびに

(i i i) 配列相補性によって前記第 1 の共通配列または前記第 2 の共通配列に特異的に

50

ハイブリダイズする配列を有する第3のプライマー

を含む、コンピュータ読み込み可能な媒体、ならびに

(c) 受容者にレポートを送るレポートジェネレータであって、前記レポートが前記少なくとも3つのプライマーの配列を含む、レポートジェネレータを含むシステム。

(項目51)

前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である、項目50に記載のシステム。

(項目52)

前記第1の共通配列、前記第2の共通配列、および前記第3のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度 (T_m) を有する、項目50に記載のシステム。

(項目53)

前記標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i) 前記第1の3'末端に相補的な配列、(ii) 前記第2の3'末端と同一の配列、および(iii) (i) と(ii) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが7.5ヌクレオチドまたはそれ未満である、項目50に記載のシステム。

(項目54)

ローリングサークル増幅を実施する方法であって、

(a) 標的ポリヌクレオチドを含む環状ポリヌクレオチドを準備するステップ、

(b) 増幅反応混合物を複数サイクルのローリングサークル増幅に供してコンカテマーを含む複数の増幅産生物を生成するステップ

を含み、前記増幅反応混合物が、(i) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、(ii) 前記環状ポリヌクレオチド、および(iii) プライマーを含み、前記複数サイクルのローリングサークル増幅の各サイクルが、前記複数の増幅産生物を生成するように、変性温度における変性、アニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および所与の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマーの伸長を含み、

生成した前記複数の増幅産生物が、変性およびプライマーアニーリングについて同等の条件下であるが前記複数サイクルの伸長時間の合計と同等の伸長時間である1サイクルの増幅を用いることによって生成する複数の増幅産生物と比較した場合に、より高い割合で前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーを含むことで特徴付けられる、方法。

(項目55)

ローリングサークル増幅によって生成される標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合を増加させる方法であって、

(a) 標的ポリヌクレオチドを含む環状ポリヌクレオチドを準備するステップ、

(b) 増幅反応混合物を複数サイクルのローリングサークル増幅に供してコンカテマーを含む複数の増幅産生物を生成するステップ

を含み、前記増幅反応混合物が(i) 鎖置換活性を有するポリメラーゼ、(ii) 前記環状ポリヌクレオチド、および(iii) プライマーを含み、前記複数サイクルのローリングサークル増幅の各サイクルが、前記複数の増幅産生物を生成するように、変性温度における変性、アニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および所与の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマーの伸長を含み、

それにより前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合を増加させる、方法。

(項目56)

前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有する前記複数の増幅産生物におけるコンカテマーの割合が、変性およびプライマーアニーリングについて同等の条件下であるが前記複数サイクルの伸長時間の合計と同等の伸長時間である1サイクルの増幅を用いることによって生成する複数の増幅産生物と比較した場合に増加している、項目55に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 5 7)

前記ポリメラーゼが、B s u DNAポリメラーゼ、V e n t ポリメラーゼ、B s t D N Aポリメラーゼ、p h i 2 9 DNAポリメラーゼ、P y r o P h a g e 3 1 7 3 ポリメラーゼ、これらの任意のバリエーション、およびこれらの任意の断片からなる群から選択される、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞 DNA (c f D N A) を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約 1 8 0 塩基対の平均断片長さを示す、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞 DNA (c f D N A) を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約 1 7 0 塩基対の平均断片長さを示す、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞 DNA (c f D N A) を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約 4 0 塩基 ~ 約 4 5 0 塩基の断片長さ分布を示す、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記反応混合物中で用いられる前記環状ポリヌクレオチドがヒト無細胞 DNA (c f D N A) を含む場合に、前記複数の増幅産生物が約 1 0 0 塩基 ~ 約 2 0 0 塩基の断片長さ分布を示す、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを有するコンカテマーの割合が少なくとも約 1 % 増加する、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記複数サイクルのローリングサークル増幅の少なくとも 1 つのサイクルの後に前記反応混合物に前記ポリメラーゼを補充するステップをさらに含む、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記環状ポリヌクレオチドが約 4 0 塩基 ~ 約 5 0 0 塩基の長さを有する、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 5)

前記環状ポリヌクレオチドが無細胞 DNA (c f D N A) を含む、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 6)

前記環状ポリヌクレオチドがゲノム DNA の断片を含む、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記環状ポリヌクレオチドが染色体再配列の結果生じた配列を含む、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記染色体再配列が、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも 1 つである、項目 6 7 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記環状ポリヌクレオチドが二本鎖である、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記環状ポリヌクレオチドが一本鎖である、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

(項目 7 1)

複数の異なる環状ポリヌクレオチドが前記増幅反応混合物中で増幅される、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 7 2)

前記複数サイクルが少なくとも2つのサイクルを含む、項目54または55に記載の方法。

(項目 7 3)

前記複数サイクルの各サイクルが、(i) 約 7 5 ~ 約 9 5 の変性温度における約 5 秒 ~ 約 6 0 秒間の変性、(i i) 約 4 5 ~ 約 6 5 のアニーリング温度における約 5 秒 ~ 約 6 0 秒間のプライマーアニーリング、および(i i i) 約 6 5 ~ 約 7 5 の伸長温度における約 3 0 秒 ~ 約 1 0 分間の伸長時間のプライマー伸長を含む、項目54または55に記載の方法。

(項目 7 4)

前記複数サイクルの各サイクルが、(i) 約 8 0 の変性温度における約 1 5 秒 ~ 約 3 0 秒間の変性、(i i) 約 5 0 のアニーリング温度における約 1 5 秒 ~ 約 4 5 秒間のプライマーアニーリング、および(i i i) 約 7 0 の伸長温度における約 3 分 ~ 約 1 0 分間の伸長時間のプライマー伸長を含む、項目54または55に記載の方法。

(項目 7 5)

前記プライマーがランダム配列を含む、項目54または55に記載の方法。

(項目 7 6)

前記プライマーが遺伝子特異的配列を含む、項目54または55に記載の方法。

(項目 7 7)

前記プライマーが、(i) 配列相補性によって前記環状ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および(i i) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマーを含み、前記環状ポリヌクレオチドを鋳型として用いる前記第1のプライマーの延長によって前記複数サイクルのローリングサークル増幅の間に一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーが生成される、項目54または55に記載の方法。

(項目 7 8)

前記プライマーが、(i) 配列相補性によって前記一本鎖ポリヌクレオチドを含む前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および(i i) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーを含み、前記コンカテマーを鋳型として用いる前記第2のプライマーの延長によって前記複数サイクルのローリングサークル増幅の間に前記標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物が生成される、項目77に記載の方法。

(項目 7 9)

前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一である、項目78に記載の方法。

(項目 8 0)

前記第1の共通配列と前記第2の共通配列とが同一である、項目79に記載の方法。

(項目 8 1)

複数のアンプリコンを生成する条件下で前記複数の延長産生物を増幅するステップをさらに含み、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化される、項目78に記載の方法。

(項目 8 2)

増幅するステップが第3のプライマーのプライマー延長を含み、前記第3のプライマーが、配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を含む、項目81に記載の方法。

(項目 8 3)

増幅するステップによって、前記標的ポリヌクレオチドの2つより少ないコピーを有するアンプリコンの百分率よりも大きな、前記標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより

10

20

30

40

50

多いコピーを有するアンプリコンの百分率が得られる、項目 8 1 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 5 % である、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 1 0 % である、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 2 0 % である、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 3 0 % である、項目 8 6 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 4 0 % である、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 6 0 % である、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 8 0 % である、項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記標的ポリヌクレオチドの 2 つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率が少なくとも 9 0 % である、項目 9 0 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記複数の延長産生物が、(i) 前記第 1 の共通配列と前記第 2 の共通配列の相補体との間、または (i i) 前記第 2 の共通配列と前記第 1 の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションを含むステムループ構造を形成する、項目 7 8 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9 3)

前記ステムループ構造の形成が、アニーリングステップを前記第 3 のプライマーの融解温度の ± 5 以内の温度に保って前記増幅を実施することによって達成される、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記ステムループ構造の形成が、アニーリングステップを約 7 0 未満の温度に保って前記増幅を実施することによって達成される、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記ステムループ構造が少なくとも 9 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記ステムループ構造が少なくとも 1 5 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目 9 5 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記ステムループ構造が少なくとも 2 0 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記ステムループ構造が少なくとも 2 5 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目 9 7 に記載の方法。

(項目 9 9)

10

20

30

40

50

前記ステムループ構造が少なくとも 30 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む、項目 98 に記載の方法。

(項目 100)

前記第 1 の共通配列、前記第 2 の共通配列、および前記第 3 のプライマーのハイブリダイジング配列が、全て互いに ± 5 以内の融解温度 (T_m) を有する、項目 82 に記載の方法。

(項目 101)

前記標的ポリヌクレオチドに沿って 5' から 3' に向かって (i) 前記第 1 の 3' 末端に相補的な配列、(ii) 前記第 2 の 3' 末端と同一の配列、および (iii) (i) と (ii) との間の介在配列に対応する、前記標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さが 7.5 ヌクレオチドまたはそれ未満である、項目 78 ~ 80 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

(項目 102)

コンカテマーを含む前記複数の増幅産生物をシーケンシングするステップをさらに含む、項目 54 から 101 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 103)

前記シーケンシングするステップが、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを有するコンカテマーを、前記標的ポリヌクレオチドの 2 つ未満のコピーを含むコンカテマーから選択的に分離することなく実施される、項目 102 に記載の方法。

(項目 104)

前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを含むコンカテマーを、前記標的ポリヌクレオチドの 2 つ未満のコピーを含むコンカテマーから分離するステップをさらに含む、項目 54 から 101 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

(項目 105)

前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも 2 つのコピーを含む前記コンカテマーをシーケンシングするステップをさらに含む、項目 104 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】図 1 は、1 つの実施形態による、ステムループ産生物の形成を説明する図である。

【0027】

【図 2】図 2 は、1 つの実施形態による、RCA 増幅のための隣接する 5' 末端を有するフォワードおよびリバースプライマーを設計するバックツーバック (B2B) プライマー設計を説明する図である。

30

【0028】

【図 3】図 3 は、1 つの実施形態による、バックツーバックプライマーを用いるシーケンシングライブラリーを構築する方法を説明する図である。

【0029】

【図 4】図 4 は、1 つの実施形態による、アプリーコンを富化する方法を説明する図である。

【0030】

【図 5】図 5 は、1 サイクルのローリングサークル増幅および複数サイクルのローリングサークル増幅によって生成された増幅産生物のアガロースゲルによるサイズ分布を示す図である。

40

【0031】

【図 6】図 6 は、異なるリピート数を有する増幅産生物の間の比を示す表を提示する図である。

【0032】

【図 7】図 7 は、1 サイクルおよび複数サイクルを含む例示的なローリングサークル増幅反応における個別のリピート要素のサイズ分布を示す図である。

【0033】

【図 8】図 8 は、1 サイクルのローリングサークル増幅および複数サイクルのローリングサークル増幅によって生成された、シーケンシングされた標的の断片サイズ分布を示す図

50

である。

【0034】

【図9】図9は、1つの実施形態による、HD664、即ちELM4/ALK融合DNA試料と野生型参照DNA試料とを異なる比で混合するステップを説明する表を提示する図である。

【0035】

【図10】図10は、1つの実施形態における融合アレルの検出を説明する図である。

【0036】

【図11】図11は、1つの実施形態において、多重標的ポリヌクレオチド配列が多重反応で検出可能であることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本明細書に開示するいくつかの方法の実施は、他に指示がない限り、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクスおよび組み換えDNAの従来の技法を利用しており、これらは当技術の範囲内である。例えばSambrookおよびGreen、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、4版(2012年); Current Protocols in Molecular Biologyシリーズ(F. M. Ausubelら編); Methods In Enzymologyシリーズ(Academic Press, Inc.)、PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson、B. D. HamesおよびG. R. Taylor編(1995年)); HarlowおよびLane編(1988年) Antibodies, A Laboratory Manual; ならびにCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications、6版(R. I. Freshney編(2010年))を参照されたい。

【0038】

「約」または「ほぼ」という用語は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差範囲内であることを意味し、これは部分的にその値がどのようにして測定されたか、または決定されたか、即ち測定系の限界に依存することになる。例えば、「約」は当技術における慣習によって標準偏差の1倍または1倍より多い範囲内を意味し得る。その代わりに、「約」は所与の値の20%まで、10%まで、5%まで、または1%までの範囲を意味してもよい。その代わりに、特に生物学的システムまたはプロセスに関しては、この用語はある値と同じ桁内、その値の好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内を意味してもよい。出願および特許請求の範囲に特定の値が記載されている場合には、他に言明しない限り、特定の値についての許容される誤差範囲内を意味する「約」という用語を仮定すべきである。

【0039】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は相互変換可能に用いられる。これらはデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体であろうと、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を意味する。ポリヌクレオチドは任意の三次元構造を有することができ、公知または未知の任意の機能を果たし得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である。遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、リンケージ解析によって定義される座位(単数または複数)、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、短干渉RNA(siRNA)、短ヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドはメチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体等の1つまたは複数の改変ヌクレオチドを含んでもよい。存在する場合には、ヌクレオチド構造の改変はポ

10

20

30

40

50

リマーのアセンブリーの前または後に行ってもよい。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは標識成分とのコンジュゲーション等によって重合の後にさらに改変されてもよい。

【0040】

「標的ポリヌクレオチド」という用語は、その存在、量、および/もしくはヌクレオチド配列、またはこれらの1つまたは複数における変化を決定することが望まれる標的配列を有する、核酸分子の出発母集団中の核酸分子またはポリヌクレオチドを意味する。標的ポリヌクレオチドはより大きなポリヌクレオチドの一部（例えば増幅すべき、シーケンシングすべき、さもなければ分析すべき一部）であってもよく、標的配列を含むより大きなポリヌクレオチドを意味するために用いてもよい。一般に、「標的配列」という用語は核酸の一本鎖の上の核酸配列を意味する。標的配列は遺伝子、調節配列、ゲノムDNA、cDNA、融合遺伝子、mRNA、miRNA、rRNAを含むRNA、またはその他の一部であってもよい。標的配列は試料からの標的配列、または増幅反応の産生物等の二次標的であってもよい。

10

【0041】

一般に、「配列バリエーション」という用語は、1つまたは複数の参照配列に関する任意の配列の多様性を意味する。典型的には、配列バリエーションは参照配列が公知の個体の所与の母集団に関する参照配列よりも低い頻度で発生する。ある場合には、参照配列は単一の個体のゲノム配列等の、単一の公知の参照配列である。ある場合には、参照配列は、参照母集団として役立つ多数の個体のゲノム配列等の多数の公知の配列、または同じ個体からのポリヌクレオチドの多数のシーケンシングリードをアライメントさせることによって形成されるコンセンサス配列である。ある場合には、配列バリエーションは母集団の中で低い頻度で起こる（「稀な」配列バリエーションとも称される）。例えば、配列バリエーションは約5%もしくは約5%未満、約4%もしくは約4%未満、約3%もしくは約3%未満、約2%もしくは約2%未満、約1.5%もしくは約1.5%未満、約1%もしくは約1%未満、約0.75%もしくは約0.75%未満、約0.5%もしくは約0.5%未満、約0.25%もしくは約0.25%未満、約0.1%もしくは約0.1%未満、約0.075%もしくは約0.075%未満、約0.05%もしくは約0.05%未満、約0.04%もしくは約0.04%未満、約0.03%もしくは約0.03%未満、約0.02%もしくは約0.02%未満、約0.01%もしくは約0.01%未満、約0.005%もしくは約0.005%未満、約0.001%もしくは約0.001%未満、またはそれより低い頻度で起こり得る。ある場合には、配列バリエーションは約0.1%または約0.1%未満の頻度で起こる。配列バリエーションは参照配列に関する任意の多様性であってもよい。配列多様性は単一のヌクレオチドまたは複数のヌクレオチド（例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多いヌクレオチド）の挿入または欠失の変化からなってもよい。配列バリエーションが2つまたはそれより多いヌクレオチドの相違を含む場合には、異なるヌクレオチドは互いに連続していてもよく、不連続であってもよい。配列バリエーションの種類の非限定的な例には、単一ヌクレオチド変異多型（SNP）、欠失/挿入多型（DIP）、コピー数バリエーション（CNV）、短タンデムリピート（STR）、単純配列リピート（SSR）様々な数のタンデムリピート（VNTR）、増幅断片長多型（AFLP）、レトロトランスポゾンに基づく挿入多型、配列特異的増幅多型、および配列バリエーションとして検出可能なエピジェネティックマークの相違（例えばメチル化の相違）が含まれる。ある実施形態では、配列バリエーションは染色体再配列を意味し得、これには、これだけに限らないが、トランスロケーションまたは融合遺伝子が含まれる。

20

30

40

【0042】

本明細書において用いる「コンカテマー」という用語は一般に、標的ポリヌクレオチド配列の複数コピー（例えば標的配列の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10コピー、ある場合には少なくとも2コピー）を含む連続ポリヌクレオチドを含むライゲーション産生物または増幅産生物を意味する。ある場合には、コンカテマーはタンデムに連結された標的ポリヌクレオチド配列の複数コピーを含む。ある場合には、追加のポリ

50

ヌクレオチド配列が標的ポリヌクレオチド配列の複数コピーの間に散在している。

【 0 0 4 3 】

本明細書において用いる「ハイブリダイズ」、「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイジング」、「アニール」、および「アニーリング」という用語は一般に、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基の間の水素結合によって安定化された複合体を形成する反応を意味する。水素結合はワトソンクリック塩基対形成、フーグスタイン結合、または他の任意の配列特異的な様式によって起こり得る。複合体はデュプレックス構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つもしくはそれより多い鎖、単一の自己ハイブリダイジング鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応はPCRの開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素切断等のより広範囲のプロセスにおけるステップを構成し得る。第2の配列のヌクレオチド残基の塩基との水素結合によって安定化され得る第1の配列は、第2の配列に「ハイブリダイズ可能」と称される。そのような場合には、第2の配列は第1の配列にハイブリダイズ可能とも称され得る。

【 0 0 4 4 】

本明細書において用いる「相補体」（単数または複数）、「相補的」、および「相補性」という用語は一般に、所与の配列に完全に相補的かつハイブリダイズ可能な配列を意味する。ある場合には、所与の核酸とハイブリダイズした配列は、その所与の領域にわたる塩基の配列がその結合相手の塩基の配列と相補的に結合することができ、それにより例えば A - T、A - U、G - C、および G - U 塩基対が形成される場合には、所与の分子の「相補体」または「逆相補体」と称される。一般に、第2の配列にハイブリダイズ可能な第1の配列は第2の配列に特異的にまたは選択的にハイブリダイズ可能であり、したがってハイブリダイゼーション反応の間、第2の配列または第2の配列の組に対するハイブリダイゼーションは、非標的配列とのハイブリダイゼーションに優先する（例えば当技術で広く用いられている厳しい条件等の所与の条件の組において熱力学的により安定である）。典型的には、ハイブリダイズ可能な配列は、それらの個別の長さの全部または一部にわたって配列相補性の程度、例えば25%~100%の相補性、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%を含む配列相補性を共有している。相補性百分率を評価する目的等のための配列同一性は、これだけに限らないが、Needleman - Wunsch アルゴリズム（例えば www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html で入手可能で任意選択によりデフォルトセッティングを伴う EMBOS ニードルアライナーを参照されたい）、BLAST アルゴリズム（例えば blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi で入手可能で任意選択によりデフォルトセッティングを伴う BLAST アラインメントツールを参照されたい）、または Smith - Waterman アルゴリズム（例えば www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html で入手可能で任意選択によりデフォルトセッティングを伴う EMBOS ウォーターアライナーを参照されたい）を含む任意の好適なアラインメントアルゴリズムによって測定することができる。最適のアラインメントはデフォルトパラメーターを含む選択されたアルゴリズムの任意の好適なパラメーターを用いて評価することができる。

【 0 0 4 5 】

本明細書において用いる「延長産生物」という用語は一般に、ヌクレオチドプライマーがヌクレオチドの共有結合付加によって延長される反応の産生物を意味する。ある場合には、ヌクレオチドの組み込みは鋳型によってガイドすることができる。ある場合には、ヌクレオチドの組み込みは鋳型なしで起こることもある。ある場合には、延長産生物はPCR増幅、ローリングサークル増幅（RCA）、または等温増幅等の増幅産生物である。

【 0 0 4 6 】

本明細書において用いる「増幅する」、「増幅された」、「増幅」という用語は一般に、

10

20

30

40

50

標的ポリヌクレオチドまたはその一部から1つまたは複数のコピーが作られる任意のプロセスを意味する。ポリヌクレオチド（例えばDNAおよび/またはRNA）を増幅する種々の方法が利用可能であり、そのいくつかの例を本明細書に記載する。増幅は線形もしくは指数関数的であってよく、または多相増幅プロセス中に直線相と指数相の両方を含んでもよい。増幅法には熱変性ステップ等の温度の変化が含まれてよく、または熱変性を必要としない等温プロセスであってもよい。

【0047】

本明細書において用いる「ステムループ産生物」および「ステムループ構造」という用語は一般に、ポリヌクレオチドの部分の間で分子内ハイブリダイゼーションが起こるポリヌクレオチドの二次構造を意味する。ステムループは単一のポリヌクレオチド鎖の2つの領域がハイブリダイズして、「ステム」と称される二本鎖部分と、対を形成せず「ループ」と称される一本鎖ループを形成する際に形成され得る。ステムは塩基対の任意の様々な長さであってよく、ステムに沿った塩基対は、ステムに関与する一方または両方の部分で1つまたは複数の対になっていない塩基のギャップによって内部で中断されてもよい。ループは対になっていない塩基の任意の様々な長さであってよい。ある場合には、ループは少なくとも3塩基の長さである。ある場合には、「ステム」を形成する2つの領域は完全に相補的である。ある場合には、「ステム」を形成する2つの領域は部分的に相補的である。ある場合には、単一のポリヌクレオチドが1つのステムループ構造を含んでよい。ある場合には、単一のポリヌクレオチドが1つより多いステムループ構造を含んでよい。ステムループ構造のステム部分は、オーバーハングを伴わず、5'オーバーハングを含む一本鎖セクションを伴い、3'オーバーハングを含む一本鎖セクションを伴い、または5'末端および3'末端の両方から延びる一本鎖部分を伴って、二重鎖セクションとして終端してよい。

【0048】

本開示は、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンを生成するために用いられ得る方法および組成物を提供する。一部の実施形態では、本方法は稀な配列バリエーションおよび融合遺伝子を検出するために有用である。一部の実施形態では、遺伝子融合はパートナー遺伝子の予備知識なしに検出され、無細胞DNAまたはゲノムDNA試料等の中での遺伝子再配列事象をスクリーニングするために適用することができる。本開示の種々の態様は、大量並列シーケンシング法とともに用いられ得る標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンを提供する。

【0049】

一態様では、本開示は、ローリングサークル増幅によって生成された標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合を増大させる方法を提供する。この方法は、(a)標的ポリヌクレオチドを含む環状ポリヌクレオチドを準備するステップ、(b)増幅反応混合物を複数サイクルのローリングサークル増幅に供してコンカテマーを含む複数の増幅産生物を生成するステップを含む。増幅反応混合物は、(i)鎖置換活性を有するポリメラーゼ、(ii)標的ポリヌクレオチドを含む環状ポリヌクレオチド、および(iii)プライマーを含み得る。複数サイクルのローリングサークル増幅の各サイクルは、変性温度における変性、アニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および所与の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマーの伸長を含み得る。複数サイクルのローリングサークル増幅は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの増大した割合を有する複数の増幅産生物を生成し得る。生成した複数の増幅産生物は、変性およびプライマーアニーリングについて同等の条件下であるが複数サイクルの伸長時間の合計と同等の伸長時間である1サイクルの増幅を用いることによって生成する複数の増幅産生物と比較した場合に、より高い割合で標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーを含むことで特徴付けられ得る。

【0050】

ローリングサークル増幅は、鎖置換活性を有するポリメラーゼ、例えば鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって促進することができる。本方法において有用な種々のポリ

10

20

30

40

50

メラゼが入手可能であり、その非限定的な例には、B s t DNAポリメラーゼ大断片；B s u DNAポリメラーゼ大断片；D e e p V e n t R（商標）DNAポリメラーゼ；D e e p V e n t R（商標）（エキソ-）DNAポリメラーゼ；K l e n o w断片（3' - 5'エキソ）；DNAポリメラーゼI大断片；M - M u L V逆転写酵素；p h i 2 9 DNAポリメラーゼ；P y r o P h a g e 3 1 7 3ポリメラーゼ；V e n t R（登録商標）DNAポリメラーゼ；およびV e n t R（登録商標）（エキソ-）DNAポリメラーゼが含まれる。

【0051】

ローリングサークル増幅を実施するための増幅反応混合物は、これだけに限らないが、鋳型（例えば環状ポリヌクレオチド）、1つまたは複数のプライマー、d N T P、および緩衝成分を含む、プライマー延長反応のために必要な試薬を含んでよい。増幅の1サイクルは（i）二本鎖鋳型が一本鎖ポリヌクレオチドに変換される変性温度における変性、（i i）プライマーが一本鎖ポリヌクレオチドにハイブリダイズするアニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および（i i i）一本鎖ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたプライマーを一本鎖ポリヌクレオチドを鋳型として用いて延長させる所与の伸長時間の間の伸長温度におけるプライマー伸長が含まれ得る。鎖置換性ポリメラーゼはR C Aにおいて特に有用である。それは、置換によってポリメラーゼが環状鋳型の周囲で1回より多く連続して環状鋳型に相補的な配列のコンカテマーのタンデムコピーを生成することが可能になるからである。環状ポリヌクレオチドを鋳型として用いることによってプライマー延長を鋳型上で連続させることができ、それにより環状ポリヌクレオチド配列の複数コピーを含む増幅産生物（例えばコンカテマー）を生成することができる。一部の実施形態では、増幅反応混合物を複数サイクルのローリングサークル増幅に供することによって、複数の増幅産生物が生成される。

【0052】

一部の実施形態では、複数サイクルは少なくとも2サイクル（例えば少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10サイクル）を含む。複数サイクルR C Aにより、環状鋳型から複数の直鎖状コンカテマーの形成をもたらすことができる。変性の間に、環状鋳型からの第1のコンカテマーの延長が停止する。プライマーの結合と延長を繰り返すことによって、環状鋳型から複数のコンカテマーを複数サイクルにわたって生成することができる。一部の実施形態では、3つの温度相、即ち変性のための第1の温度相、プライマー結合のための第2の温度相、およびプライマー延長のための第3の温度相が用いられる。一部の実施形態では、プライマー延長の間のプライマー結合を最小化するために、プライマー結合のためより高いプライマー延長のための温度が選択される。プライマー延長の間のプライマー結合を最小化することによってより短い増幅産生物の形成を減少させることができ、短い断片の偏った増幅を低減させることができる。それは、増幅反応混合物中に含まれる逆プライマーの場合のように、増幅産生物が形成されるとともにプライマーが増幅産生物にハイブリダイズする可能性が低くなるからである。増幅産生物が形成されるとともに増幅産生物にハイブリダイズしたプライマーはプライマー延長に関与することもできるが、小断片の優先的な増幅をもたらす可能性がある。それは、延長の間に小さな環は所与の時間内に大きな断片よりも多くの繰り返し単位のコピーおよび多くのプライマー結合部位を生成する傾向があるからである。一部の実施形態では、プライマー延長のために選択される温度は、プライマーアニーリングのために選択される温度よりも少なくとも5（例えば少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれより大きい）高くてもよい。プライマー延長のために選択される温度は、プライマーアニーリングのために選択される温度よりも約1～20高く（例えば約2～18、約4～15、または約5～10高く）てよい。非等温R C Aのために好適な温度の範囲は用いるポリメラーゼ酵素の特性に依存し得る。

【0053】

複数サイクルの各サイクルは、少なくとも約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、

10

20

30

40

50

85、86、87、88、89、90、91、92、93、94 または95 の変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルの各サイクルは、約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94 または95 の変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、最大で約70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94 または95 の変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約70～約100、約70～約95、約70～約90、約70～約85、約70～約80 または約70～約75 の変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約70～約100、約75～約100、約80～約100、約85～約100、約90～約100 または約95～約100 の変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、少なくとも約5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒または60秒にわたる変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒または60秒にわたる変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、最大で約5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒または60秒にわたる変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約5秒～60秒、5秒～55秒、5秒～50秒、5秒～45秒、5秒～40秒、5秒～35秒、5秒～30秒、5秒～25秒、5秒～20秒、5秒～15秒または5秒～10秒にわたる変性温度における変性を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約5秒～60秒、10秒～60秒、15秒～60秒、20秒～60秒、25秒～60秒、30秒～60秒、35秒～60秒、40秒～60秒、45秒～60秒、50秒～60秒または55秒～60秒にわたる変性温度における変性を含み得る。

【0054】

複数サイクルの各サイクルは、少なくとも約45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64 または65 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64 または65 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、最大で約45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64 または65 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約45～約65、約45～約60、約45～約55 または約45～約50 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約45～約65、約50～約65、約55～約65 または約60～約65 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、少なくとも約5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒または60秒にわたるアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、最大で約5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒または60秒にわたるアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約5秒～60秒、5秒～55秒、5秒～50秒、5秒～45秒、5秒～40秒、5秒～35秒

、 5 秒 ~ 3 0 秒、 5 秒 ~ 2 5 秒、 5 秒 ~ 2 0 秒、 5 秒 ~ 1 5 秒または 5 秒 ~ 1 0 秒にわたるアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 5 秒 ~ 6 0 秒、 1 0 秒 ~ 6 0 秒、 1 5 秒 ~ 6 0 秒、 2 0 秒 ~ 6 0 秒、 2 5 秒 ~ 6 0 秒、 3 0 秒 ~ 6 0 秒、 3 5 秒 ~ 6 0 秒、 4 0 秒 ~ 6 0 秒、 4 5 秒 ~ 6 0 秒、 5 0 秒 ~ 6 0 秒または 5 5 秒 ~ 6 0 秒にわたるアニーリング温度におけるプライマーアニーリングを含み得る。

【 0 0 5 5 】

複数サイクルの各サイクルは、少なくとも約 6 5 、 6 6 、 6 7 、 6 8 、 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 、 7 3 、 7 4 または 7 5 の伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 6 5 、 6 6 、 6 7 、 6 8 、 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 、 7 3 、 7 4 または 7 5 の伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、最大で約 6 5 、 6 6 、 6 7 、 6 8 、 6 9 、 7 0 、 7 1 、 7 2 、 7 3 、 7 4 または 7 5 の伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 6 5 ~ 約 7 5 または約 6 5 ~ 約 7 0 の伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 6 5 ~ 約 7 5 または約 7 0 ~ 約 7 5 の伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、少なくとも約 3 0 秒、 1 分、 2 分、 3 分、 4 分、 5 分、 6 分、 7 分、 8 分、 9 分または 1 0 分の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 3 0 秒、 1 分、 2 分、 3 分、 4 分、 5 分、 6 分、 7 分、 8 分、 9 分または 1 0 分の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、最大で約 3 0 秒、 1 分、 2 分、 3 分、 4 分、 5 分、 6 分、 7 分、 8 分、 9 分または 1 0 分の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 3 0 秒 ~ 1 0 分、 3 0 秒 ~ 9 分、 3 0 秒 ~ 8 分、 3 0 秒 ~ 7 分、 3 0 秒 ~ 6 分、 3 0 秒 ~ 5 分、 3 0 秒 ~ 4 分、 3 0 秒 ~ 3 分、 3 0 秒 ~ 2 分または 3 0 秒 ~ 1 分の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。複数サイクルの各サイクルは、約 3 0 秒 ~ 1 0 分、 1 分 ~ 1 0 分、 2 分 ~ 1 0 分、 3 分 ~ 1 0 分、 4 分 ~ 1 0 分、 5 分 ~ 1 0 分、 6 分 ~ 1 0 分、 7 分 ~ 1 0 分、 8 分 ~ 1 0 分または 9 分 ~ 1 0 分の伸長時間にわたる伸長温度におけるプライマー伸長を含み得る。増幅産生物の収率を最適化するために伸長時間の長さを選択することができる。伸長時間を選択する際に考慮するいくつかの要素として、これだけに限らないが、環状ポリヌクレオチド（例えば環状鋳型）のサイズ、環状ポリヌクレオチド配列の G C 含量、および増幅産生物中の二次構造の形成が含まれる。例えば、増幅産生物の同様の収率を得るために、より長い環状ポリヌクレオチドは、より短い環状ポリヌクレオチドと比較してより長い伸長時間を用いてよい。さらなる例として、増幅産生物の同様の収率を得るために、より高い G C 含量を有する環状ポリヌクレオチドは、G C 含量がより低いが同等の長さを有する環状ポリヌクレオチドと比較して、より長い伸長時間を用いてよい。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態では、複数サイクルの各サイクルは、約 5 秒 ~ 約 6 0 秒にわたる約 7 5 ~ 約 9 5 の変性温度における変性、(i i) 約 5 秒 ~ 約 6 0 秒にわたる約 4 5 ~ 約 6 5 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および (i i i) 約 3 0 秒 ~ 約 1 0 分の伸長時間にわたる約 6 5 ~ 約 7 5 の伸長温度におけるプライマー伸長を含む。一部の実施形態では、複数サイクルの各サイクルは、約 1 5 秒 ~ 約 3 0 秒にわたる約 8 0 の変性温度における変性、(i i) 約 1 5 秒 ~ 約 4 5 秒にわたる約 5 0 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および (i i i) 約 3 分 ~ 約 1 0 分の伸長時間にわたる約 7 0 の伸長温度におけるプライマー伸長を含む。一部の実施形態では、複数サイクルの各サイクルは、約 2 0 秒にわたる約 8 0 の変性温度における変性、(i i) 約 3 0 秒にわたる約 5 0 のアニーリング温度におけるプライマーアニーリング、および (i i i) 約 6 分の伸長時間にわたる約 7 0 の伸長温度におけるプライマー伸長を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態では、ローリングサークル増幅の複数サイクルの任意のサイクルにおいて反応混合物にポリメラーゼが補充される。一部の実施形態では、ローリングサークル増幅の複数サイクルの少なくとも2つのサイクルにおいて反応混合物にポリメラーゼが補充される。ある場合にはポリメラーゼ活性の熱不活性化により、増幅反応混合物への補充が望ましいことがある。いくつかのポリメラーゼは高温で熱不活性化される。熱不活性化の温度は用いるポリメラーゼに依存し得る。増幅のために選択したポリメラーゼならびに変性温度、プライマーアニーリング温度、およびプライマー延長温度のうちのいずれか1つのために選択した温度に依存して、ポリメラーゼは任意選択で、増幅の少なくとも1つのサイクルの後で補充され得る。一部の実施形態では、1サイクルおき後に反応混合物にポリメラーゼが補充される。種々の実施形態では、例えば増幅産生物の収率によって必要であると決定されたなら、反応混合物にポリメラーゼが補充される。

10

【 0 0 5 8 】

一部の実施形態では、本明細書に開示した方法を用いて生成した複数の増幅産生物は、これらに変性およびプライマーアニーリングについて同等の条件下であるが複数サイクルの伸長時間の合計と同等の伸長時間である1サイクルの増幅を用いて生成する複数の増幅産生物と比較した場合に、より高い割合で標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピー（例えば少なくとも3つ、4つ、または5つのコピー）を有するコンカテマーを含むことで特徴付けられる。

【 0 0 5 9 】

より少ない標的ポリヌクレオチドのコピーを有する増幅産生物と比較してより多い標的ポリヌクレオチドのコピーを有するコンカテマーまたは増幅産生物は、より大きな断片サイズを有し得る。増幅産生物またはコンカテマー中の標的ポリヌクレオチドのコピー数の決定は種々の方法、例えばアガロースゲルによる分析、サイズ排除クロマトグラフィー、または次世代シーケンシングを用いて確認することができる。本明細書に開示する複数サイクルのローリングサークル増幅を含む方法を用いて生成したコンカテマーまたは増幅産生物は、任意の好適な方法（例えばアガロースゲル、サイズ排除クロマトグラフィー、または次世代シーケンシング）によって確認されるように、1サイクルを含むローリングサークル増幅と比較して、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合が増加し得る。標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つのコピーを有するコンカテマーの割合は、一部の実施形態においては、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、25%、または50%増加している。

20

30

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、少なくとも約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、最大で約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約150塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約160塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約170塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約180塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約190塩基対の平均断片長を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約200塩基対の平均断片長を呈する。

40

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、少なくとも約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、23

50

0、240または250塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、最大で約100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240または250塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約150塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約160塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約170塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約180塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約190塩基対の断片長中央値を呈する。一部の実施形態では、複数の増幅産生物は、約200塩基対の断片長中央値を呈する。

10

【0062】

一部の実施形態では、無細胞ポリヌクレオチド、例えば無細胞DNAの分析が望ましい。本明細書において他の箇所ですらに述べるように、無細胞DNA(cfdNA)は循環腫瘍DNAまたは循環胎児DNAであり得る。無細胞ポリヌクレオチドは、ある場合には無細胞RNAを含み得る。無細胞DNAは、例えばリガーゼ等の酵素を用いるライゲーションによって環状化し、本方法によって増幅することができる。一部の実施形態では、反応混合物において利用される環状ポリヌクレオチドがcfdNAを含む場合、複数の増幅産生物は、約40塩基～約450塩基、40塩基～約400塩基、40塩基～約350塩基、40塩基～約300塩基、40塩基～約250塩基、40塩基～約200塩基、40塩基～約150塩基、40塩基～約100塩基または40塩基～約50塩基の断片長の分布を呈する。一部の実施形態では、反応混合物において利用される環状ポリヌクレオチドがcfdNAを含む場合、複数の増幅産生物は、約40塩基～約450塩基、50塩基～約450塩基、100塩基～約450塩基、150塩基～約450塩基、200塩基～約450塩基、250塩基～約450塩基、300塩基～約450塩基、350塩基～約450塩基または400塩基～約450塩基の断片長の分布を呈する。一部の実施形態では、反応混合物において利用される環状ポリヌクレオチドがcfdNAを含む場合、複数の増幅産生物は、約100塩基～約200塩基、110塩基～約200塩基、120塩基～約200塩基、130塩基～約200塩基、140塩基～約200塩基、150塩基～約200塩基、160塩基～約200塩基、170塩基～約200塩基、180塩基～約200塩基または190塩基～約200塩基の断片長の分布を呈する。一部の実施形態では、反応混合物において利用される環状ポリヌクレオチドがcfdNAを含む場合、複数の増幅産生物は、約100塩基～約200塩基、100塩基～約190塩基、100塩基～約180塩基、100塩基～約170塩基、100塩基～約160塩基、100塩基～約150塩基、100塩基～約140塩基、100塩基～約130塩基、100塩基～約120塩基または100塩基～約110塩基の断片長の分布を呈する。

20

30

【0063】

一部の実施形態では、増幅反応混合物中のプライマーはランダム配列を含む。一部の実施形態では、増幅反応混合物中のプライマーは遺伝子特異的配列を含む。一部の実施形態では、プライマーは複数遺伝子(例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10遺伝子)の遺伝子特異的配列を含む。一部の実施形態では、プライマーは、(i)配列相補性によって環状ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および(ii)配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマーを含む。環状ポリヌクレオチドを鋳型として用いる第1のプライマーの延長による複数サイクルのローリングサークル増幅の間に一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成することができる。プライマーは、(i)配列相補性によって一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および(ii)配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライ

40

50

マーを含み得る。コンカテマーを鋳型として用いる第2のプライマーの延長による複数サイクルのローリングサークル増幅の間に標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物を生成することができる。このような第1のプライマーと第2のプライマーを用いる増幅を実施する方法は、本明細書でさらに説明するように、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するために用いることができる。

【0064】

一態様では、本開示は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、(a)第1のプライマーの延長によって環状標的ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップであって、前記第1のプライマーが、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端と、配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端とを含むステップと、(b)配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端と、配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端とを含む第2のプライマーの延長によって前記標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物を生成するステップであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一であるステップと、(c)複数のアンプリコンを生成する条件下でステップ(b)の前記複数の延長産生物を増幅するステップであって、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化されるステップとを含む。

【0065】

一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップは、第1のプライマーの延長を含む。プライマー延長は、これだけに限らないが、熱サイクル反応および等温反応を含む増幅反応によって実現することができる。一部の実施形態では、熱サイクル反応には例えば変性、プライマー結合、およびプライマー延長のいくつかのサイクルが含まれる。一部の実施形態では、本方法のコンカテマーを生成するステップはポリメラーゼによって達成される。本方法において有用な種々のポリメラーゼが入手可能であり、その非制限的な例を本明細書に提供する。一部の実施形態では、コンカテマーの生成を達成させるためのポリメラーゼは鎖置換活性を有する。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドから一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップは、等温ローリングサークル増幅(RCA)を含む。鎖置換性ポリメラーゼはRCAにおいて特に有用である。それは、置換によってポリメラーゼが環状鋳型の周囲で1回より多く連続して環状鋳型に相補的な配列のコンカテマーのタンデムコピーを生成することが可能になるからである。一部の実施形態では、一本鎖ポリヌクレオチドを含むコンカテマーを生成するステップは非等温RCAを含む。非等温RCAは少なくとも2つの温度相(例えば少なくとも2、3、4、またはそれより多い温度相)の少なくとも2つのサイクル(例えば少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多いサイクル)を含み得る。例えば、第1の温度相はプライマーの結合および延長に好適であり、第2の温度相は二本鎖ポリヌクレオチドの変性に好適であり得る。一部の実施形態では、非等温RCAは少なくとも2つの温度相の2~35サイクル(例えば3~30、4~20、5~15、または6~10サイクル)を含む。非等温RCAの間の二本鎖ポリヌクレオチドの変性に好適な第2の温度相を含む温度相を通してのサイクリングにより、環状鋳型から複数の直鎖状コンカテマーの形成をもたらすことができる。変性の間に、環状鋳型からの第1のコンカテマーの延長が停止する。プライマーの結合と延長を繰り返すことによって、環状鋳型から複数のコンカテマーを数回のサイクルにわたって生成することができる。一部の実施形態では、3つの温度相、即ちプライマーアニリングのための第1の温度相、プライマー延長のための第2の温度相、および二本鎖

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドを変性させるための第3の温度相が用いられる。一部の実施形態では、プライマー延長の間のプライマー結合を最小化するために、プライマー結合のためより高いプライマー延長のための温度が選択される。プライマー延長の間のプライマー結合を最小化することによってより短い増幅産物の形成を減少させることができ、短い断片の偏った増幅を低減させることができる。それは、RCA反応混合物中に含まれる逆プライマーの場合のように、増幅産物が形成されるとともにプライマーが増幅産物にハイブリダイズする可能性が低いからである。増幅産物が形成されるとともに増幅産物にハイブリダイズしたプライマーはプライマー延長に関与することもできるが、小断片の優先的な増幅をもたらす可能性がある。それは、延長の間に小さな環は所与の時間内に大きな断片よりも多くの繰り返し単位のコピーおよび多くのプライマー結合部位を生成する傾向があるからである。一部の実施形態では、プライマー延長のために選択される温度は、プライマーアニリングのために選択される温度よりも少なくとも5（例えば少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれより大きい）高い。プライマー延長のために選択される温度は、プライマーアニリングのために選択される温度よりも約1～20高く（例えば約2～18、約4～15、または約5～10高く）てよい。一部の実施形態では、非等温RCAは第4の温度相を含んでよい。第4の温度相は、例えば延長産物中に二次構造を形成させ、例えばステムループ構造を形成させるために好適であってよい。非等温RCAのために好適な温度の範囲は用いるポリメラーゼ酵素の特性に依存し得る。

【0066】

一部の実施形態では、RCA（等温または非等温）は環状鋳型に沿ったプライマー延長によって産生される直鎖状コンカテマーに沿った逆プライマーの延長等の、直鎖状鋳型に沿ったプライマー延長反応を含み得る。例えば、第2のプライマーは第1のプライマーの延長産物として生成された直鎖状コンカテマー鋳型を含む鋳型にハイブリダイズすることができ、プライマー延長相の間の第2のプライマーのプライマー延長によって直鎖状二本鎖ポリヌクレオチドが生成され得、その鎖は第1および第2のプライマーの追加的なコピーによる延長のための鋳型としてさらに役立ち得る。

【0067】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産物を生成するステップは、第1のプライマーの延長産物として生成した直鎖状コンカテマー鋳型にハイブリダイズした第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、複数の延長産物は非等温RCAの間の環状鋳型からの直鎖状コンカテマーの生成と同時に生成することができる。プライマーの延長および増幅の方法は、長い断片と比較して短い断片の増幅の方が有利であることが多い。一部の実施形態によれば、延長産物を生成するためのプライマー延長反応は、より短い産物に有利になるような偏りを低減し、それにより標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含む産物等のより長い産物の割合を増加させるように最適化することができる。本開示はこの目的を実現するための、単独でまたは組み合わせて用いられ得る種々の方法を意図している。これを実現するための1つの方法は、プライマー延長サイクルの数を制限し、それにより短い断片が優先的に増幅されないようにするか、または同じ長さであるがヘアピン構造を欠いた鋳型と比較して低減された頻度で増幅されるようにすることである。一部の実施形態では、延長産物を生成するステップは、15サイクル以下（例えば10、8、6、またはそれより少ないサイクル以下）の第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、延長産物を生成するステップは、2～15サイクルの第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、延長産物を生成するステップは、2～10サイクルの第2のプライマーの延長を含む。一部の実施形態では、第2のプライマーの延長は第1のプライマーの延長と同時に起こる。

【0068】

一部の実施形態では、本明細書において環状ポリヌクレオチドと相互交換可能に用いられ、コンカテマーの生成に用いられ得る環状標的ポリヌクレオチドは、直鎖状標的ポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドから形成される。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは一本鎖である。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは二本鎖である。環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは任意の長さであってよい。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、約25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、700または800ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、25~100ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、50~500ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、75~250ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、100~200ヌクレオチドの長さである。環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは染色体または遺伝子断片を含んでよい。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、これだけに限らないが、miRNA、rRNA、tRNA、およびmRNAが挙げられる遺伝子産生物を含む。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、点変異、SNP、挿入、または欠失の結果生じた配列を含む。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、染色体再配列の結果生じた配列を含む。染色体再配列は1つまたは複数の逆位、1つまたは複数の欠失、1つまたは複数の重複、1つまたは複数の転座、またはそれらの組合せであり得る。一部の実施形態では、1つまたは複数の転座を含む環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、融合遺伝子の融合点、または融合接合部を含む。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、逆位、欠失、重複、および転座のうちの少なくとも1つを含む。

【0069】

コンカテマーを生成するための1つまたは複数の本方法において用いられる第1のプライマーは、配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端と、配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端とを含み得る。第1のプライマーは少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、または100ヌクレオチド等の任意の好適な長さであってよく、その任意の部分、このプライマーがハイブリダイズする対応する標的配列（例えば、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50ヌクレオチド）に相補的であってよい。配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1のプライマーの第1の3'末端は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95ヌクレオチドの長さ等の任意の好適な長さであってよい。一部の実施形態では、第1のプライマーは、プライマー延長のための環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドの種々のランダムな領域にランダムにハイブリダイズしてこれをプライミングするランダムなヌクレオチド配列を含む第1の3'末端を含み、それぞれのランダム配列は配列相補性によって対応する相補配列に特異的にハイブリダイズする。プライマーがランダムな3'末端配列を含む場合には、標的配列はプライマー延長によって増幅された配列である。典型的には、3'末端は3'末端ヌクレオチドを含む。第1の5'末端（配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1のプライマーの第1の共通配列を有する）は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95ヌクレオチドの長さ等の任意の好適な長さであってよい。第1の共通配列は任意の好適な長さであってよい。一部の実施形態では、第1のプライマーの第1の共通配列は、少なくとも10（例えば、少なくとも15、20、25、30、またはそれより多いヌクレオチドの長さ）である。一般に、5'末端は3'末端に関して5'であるポリヌクレオチドの部分の意味する。一部の実施形態では、5'末端は5'末端ヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーは、プライマー延長によって標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物を生成するために用いることができる。複数の延長産生物を生成するための第2のプライマーは、約または少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、または100ヌクレオチド等の任意の好適な長さであってよく、その任意の部分は、このプライマーがハイブリダイズする対応する標的配列（例えば、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド）に相補的であってよい。配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2のプライマーの第2の3'末端は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95ヌクレオチドの長さ等の任意の好適な長さであってよい。一部の実施形態では、第2のプライマーは、プライマー延長のためのコンカテマーの種々のランダムな領域にランダムにハイブリダイズしてこれをプライミングするランダムなヌクレオチド配列を含む第2の3'末端を含む。配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2のプライマーの第2の共通配列を含む第2の5'末端は、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95ヌクレオチドの長さ等の任意の好適な長さであってよい。第2の共通配列は任意の好適な長さであってよい。一部の実施形態では、第2のプライマーの第2の共通配列は、少なくとも10ヌクレオチドの長さ（例えば、少なくとも15、20、25、30、またはそれより多いヌクレオチドの長さ）である。一般に、5'末端は3'末端に関して5'であるポリヌクレオチドの部分を意味する。一部の実施形態では、5'末端は5'末端ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第2の共通配列は第1の共通配列と少なくとも80%同一（例えば、少なくとも90%、95%、または100%同一）であり、そうすることで第2の共通配列は、好適な反応条件下（例えば、プライマーハイブリダイゼーションおよび/またはプライマー延長ステップ等の増幅反応における1つまたは複数のステップ）で第1の共通配列の相補体にハイブリダイズ可能である。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列は同一である。

【 0 0 7 1 】

一般に、標的に特異的にハイブリダイズしない共通配列は、3'末端が標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする条件下で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズしないように設計される（例えば増幅反応中の1つまたは複数のステップ）。一部の実施形態では、共通配列は、3'末端がハイブリダイズする部位に関して3'である標的ポリヌクレオチドに沿う配列との、標的ポリヌクレオチド内の任意の場所にある配列との、または試料中のポリヌクレオチドの任意の群（例えば細菌、ウイルス、植物、もしくはヒトゲノムDNA配列を含む動物等の生命体の全てのゲノム配列）との相補性が75%未満、50%未満、25%未満、10%未満、またはそれ未満であるように設計される。ある特定の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列はそれぞれ少なくとも10個（例えば少なくとも15、20、25、30、40、50、またはそれより多い）の連続するヌクレオチドを5'末端に含み、最適にアライメントした場合には少なくとも90%同一である。ある特定の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列は少なくとも5、10、15、20、25、または30個の連続するヌクレオチドを5'末端に含み、最適にアライメントした場合には少なくとも70%同一（例えば少なくとも80%、90%、95%、または100%同一）である。

【 0 0 7 2 】

一部の実施形態では、本方法の延長産生物は、(i)第1の共通配列と第2の共通配列の相補体との間、および/または(ii)第2の共通配列と第1の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションを含むステムループ構造を形成する。延長産生物は、非

10

20

30

40

50

等温 R C A の間、例えばステムループ構造の形成に好適な温度による第 4 の温度相の間に、ステムループ構造を形成することができる。一部の実施形態では、ステムループ構造は R C A の後の引き続く増幅反応の間に形成される。ステムループ構造の形成は二本鎖ステム領域と一本鎖ループ領域の安定性に依存し得る。ステムの安定性はその長さ、ミスマッチの数、および塩基組成に依存し得る。ステムループ構造の安定性はループの長さにも依存する。二次構造のない大きなループは不安定であることがあり、3 塩基長より短いループは立体的に不可能であろう。一部の実施形態では、より長いステム部分を有するステムループ構造は、同じループとより短いステムを有するステムループ構造よりも安定であり得る。一部の状況では、より長いループを有するステムループ構造は、同じステムとより短いループを有するステムループ構造よりも不安定であり得る。

10

【 0 0 7 3 】

コンカテマーを生成する方法の実例的な実施形態を図 1 に示す。配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第 1 の 3 ' 末端と、配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第 1 の共通配列、5 ' - T A C G C A - 3 ' を含む第 1 の 5 ' 末端とを含む第 1 のプライマーを、ローリングサークル増幅 (R C A) によって延長する。次に、標的ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数のコピーを含む複数の延長産生物を生成するステップは、配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズする第 2 の 3 ' 末端と、配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第 2 の共通配列、5 ' - T A C G C A - 3 ' (第 1 の共通配列と同一) を含む第 2 の 5 ' 末端とを含む第 2 のプライマーの延長を含む。延長産生物は第 2 の共通配列と第 1 の共通配列の相補体との間の分子内ハイブリダイゼーションの結果としてステムループ構造を形成することができる。ステムループ構造は標的ポリヌクレオチドの様々な数のコピーを含み得る。塩基対で表わしたステムの長さは様々であり得る。一部の実施形態では、ステムは少なくとも 6 、 9 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 またはそれより多い塩基対の長さである。一部の実施形態では、ステムループ構造は 5 ~ 3 0 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。一部の実施形態では、ステムループ構造は 1 0 ~ 2 0 塩基対の分子内ハイブリダイゼーションを含む。第 1 または第 2 の共通配列として用いることができる配列の非限定的な例を表 1 に示す。

20

【表 1 - 1】

表 1: 候補共通配列の非限定的な例

30

候補共通配列	配列
Common_001	CCATCTAATTCAACAAGAATTGGGACAAC
Common_002	ACATGGGTGGTGGTATAGCGCTTGCG
Common_003	CAATTTACATCTTTATTTATTAACG
Common_004	AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
Common_005	GAGTCACTTTAAAATTTGTATACAC
Common_006	CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA
Common_007	GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG
Common_008	AGCTGGACATCACCTCCCACAACG
Common_009	CTCTGAATACTTTCAACAAGTTAC
Common_010	AATATACCTCTATACTTTAACGTC
Common_011	GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG
Common_012	GCATCAATGCAGAAAGCTGATCTCA
Common_013	GACGGCATCGCAGCTTGATACAC
Common_014	CTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT
Common_015	GAGCGGATAACAATTTACACAGG

40

50

【表 1 - 2】

Common_016	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG
Common_017	CCCAGTCACGACGTTGTAACG
Common_018	AGCGGATAACAATTTACACAGG
Common_019	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC
Common_020	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC
Common_021	CAGCGGGGCTGCTAAAGCGCATGC
Common_022	CTACAAACTCTTCCTGTTAGTTAG

10

【0074】

分子内ハイブリダイゼーションに關与する塩基対の数は、第1の共通配列と第2の共通配列の連続するヌクレオチドの数、または第2の共通配列と第1の共通配列の相補体の連続するヌクレオチドの数に依存し得る。分子内ハイブリダイゼーションに關与する塩基対の数は、第1の共通配列と第2の共通配列の同一性百分率にも依存し得、ここで同一性百分率は第1および第2の共通配列が最適にアライメントした場合の第1および第2の共通配列の間の同一の塩基の百分率を意味する。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列はそれぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合には少なくとも90%同一である。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列はそれぞれ5'末端に少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、または50個の連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列はそれぞれ5'末端に5～25個の連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列は、最適にアライメントした場合には少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列は、最適にアライメントした場合には60%～100%同一である。一部の実施形態では、第1と第2の共通配列は5'末端に5～25個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合には60%～100%同一である。

20

【0075】

第1および第2のプライマーの複数の延長産物を増幅するステップは、第3のプライマーのプライマー延長を含み得る。一部の実施形態では、第3のプライマーは、配列相補性によって第1の共通配列および/または第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を含む。核酸増幅のための第3のプライマーは少なくとも5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、または100ヌクレオチド等の任意の好適な長さであってよく、その任意の部分または全部は、対応する（例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチドまたはそれより多い）標的配列に相補的であってよい。第3のプライマーは、1つまたは複数の増幅プライマーアニーリング配列またはその相補体；1つまたは複数のシーケンシングプライマーアニーリング配列またはその相補体；1つまたは複数のバーコード配列；複数の異なるプライマーの間で共有された1つまたは複数の共通配列；1つまたは複数の制限酵素認識部位；（例えば大量並列シーケンシングのためのフローセル等のシーケンシングプラットフォームへの付着のための）1つまたは複数のプロンプ結合部位またはシーケンシングアダプター；1つまたは複数のランダムまたはニアランダム配列（例えば1つまたは複数の位置で2つまたはそれより多い異なるヌクレオチドの組からランダムに選択された1つまたは複数のヌクレオチド）；ならびにそれらの組合せを含むセグメントを含み得る。増幅プライマーアニーリング配列は、シーケンシングプライマーアニーリング配列としても役立ち得る。

30

40

【0076】

ステムループ構造は、ステムループ構造の安定性に依存して様々な効率で増幅することが

50

できる。一般に、同じ長さのステムと様々な長さのループとを含む複数のステムループ構造の中で、より長いループを含むステムループ構造は熱力学的安定性が低く、鋳型としてより利用し易く、より効率的に増幅することができる。したがって一部の実施形態では、ハイブリダイズ可能な共通配列に隣接する標的配列の増幅によって、標的配列の少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化される。第3のプライマーのプライマー延長の結果生じたアンプリコンは、標的ポリヌクレオチドの様々な数のコピーを含み得る。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率は少なくとも50%（例えば少なくとも60%、70%、80%、90%、またはそれより多い）である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを有するアンプリコンの百分率は10%~100%（例えば20%~90%、30%~80%、または40%~60%）である。

10

【0077】

本方法を実施する際に、ステムループ産生物の形成および標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンの富化は、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマー配列のハイブリダイジング配列の融解温度を特定すること、ならびに増幅を行う温度を調節することの1つまたは複数によって最適化することができる。プライマー延長産生物の増幅が第1の共通配列および/または第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする第3のプライマーのプライマー延長を含む実施形態においては、第3のプライマーのプライマー結合効率は、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列の融解温度の1つまたは複数に依存し得る。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 15 以内（例えば ± 10 、 ± 5 、または ± 1 以内）の融解温度（ T_m ）を有する。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 5 以内の融解温度（ T_m ）を有する。一般に、 T_m は一般に参照配列（これは事実上、より大きなポリヌクレオチドの中のサブ配列であり得る）およびその相補配列からなるオリゴヌクレオチドの50%がハイブリダイズする（または分離する）温度を表す。 T_m は当技術で利用可能な標準的な計算、アルゴリズム、または測定に基づいてよい。 T_m を測定するための例示的なツールであるOligoAnalyzerはIntegrated DNA Technologies社のwww.idtdna.com/calc/analyserによって利用可能であり、デフォルトパラメーターを用いるように設定できる。他の同様なツールも利用可能である。

20

30

【0078】

増幅を行う温度はプライマー結合ならびに長いステムループ産生物および短いステムループ産生物のための延長の効率にも影響し得る。ある特定の実施形態では、ステムループ構造の形成は、アニーリングステップを第3のプライマーの融解温度の ± 15 以内（例えば ± 10 、 ± 5 、または ± 1 以内）の温度に保って（c）の増幅ステップを実施することによって達成することができる。一部の実施形態では、ステムループ産生物の形成は、アニーリングステップを75未満（例えば70、65、60、またはそれより低い）の温度に保って（c）の増幅ステップを実施することによって達成することができる。一部の実施形態では、ステムループ産生物の生成は、アニーリングステップを55~75（例えば60~70）の温度に保って（c）の増幅ステップを実施することによって達成することができる。

40

【0079】

一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、環状化された無細胞ポリヌクレオチド（例えば、無細胞DNA、cDNA、またはRNA）である。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAの環状化された断片である。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、染色体再配列の結果生じた配列を含む。ある特定の実施形態では、染色体再配列は、欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも1つであ

50

る。一部の実施形態では、本方法の環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは一本鎖である。一部の実施形態では、本方法の環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは二本鎖である。ある特定の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i)第1の3'末端に相補的な配列、(ii)第2の3'末端と同一の配列、および(iii)(i)と(ii)との間の介在配列に対応する、標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さは75ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、配列部分の併せた長さは、60ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、配列部分の併せた長さは、50ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、配列部分の併せた長さは、40ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の場合には、配列部分の併せた長さは、30ヌクレオチドまたはそれ未満である。 10

【0080】

1つの実例的な実施形態では、第1のプライマーと第2のプライマーは図2に示すように配置される。簡単にするため、第1および第2のプライマーの相対的ハイブリダイズ位置は、標的ポリヌクレオチドの一本鎖に対して図示している。しかし以下に注記するように、1つのプライマーは標的配列を含む鎖にハイブリダイズし、他は標的配列の相補体を含む鎖にハイブリダイズする。第1のプライマー、即ちフォワードプライマー(Fプライマー)の第1の3'末端は配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズし、第1の5'末端は標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない。第2のプライマー、即ちリバースプライマー(Rプライマー)の第2の3'末端は配列相補性によって標的ポリヌクレオチドの相補体に特異的にハイブリダイズし、第2の5'末端は標的ポリヌクレオチドの相補体に特異的にハイブリダイズしない。標的配列のモノマーに関するフォワードプライマー(Fプライマー)およびリバースプライマー(Rプライマー)の配向を考えると、この配置は「バックツーバック」(B2B)または「逆向きの」プライマーと称してもよい。このようなプライマーの設計は、従来のヘッドツーヘッド設計と比較してプライマーのフットプリント(1対のプライマーにわたる総距離)が低減している。図2において、標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'末端に向かって(i)第1の3'末端に相補的な配列、(ii)第2の3'末端と同一の配列、および(i)と(ii)の間に介在する配列に対応する標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さは約30~100ヌクレオチド(例えば40~80、または50~70ヌクレオチド)である。この併せた長さは「プライマーフットプリント」とも称される。一部の実施形態では、プライマーフットプリントは100ヌクレオチド未満の長さ(例えば90未満、80未満、70未満、60未満、50未満、またはそれより少ないヌクレオチドの長さ)である。一部の実施形態では、点変異、インデル(挿入/欠失)、または遺伝子融合を含む環状化された標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、バックツーバック配置を有する第1のプライマーおよび第2のプライマーを用いて増幅することができる。このようなプライマー対のプライマーフットプリントの低減により、標的配列の周囲の断片化事象のより多様な増幅が可能になる。接合部、例えば融合接合部が、典型的な増幅反応において見られるプライマーの(標的配列にわたって互いに対向する)配置におけるよりもB2Bプライマーの間で起こる可能性が少ないからである。 20 30 40

【0081】

1つの実例的な実施形態では、図3に示すようにシーケンシングライブラリーが構築される。最初に直鎖状DNA分子が環状化されてRCAのための鋳型を形成する。共通のシーケンシングアダプターを5'末端に有するバックツーバックプライマーが標的分子に結合し、一方、鎖置換活性を有するポリメラーゼがRCAの間に標的を増幅する。配列バリエーション、例えば点変異、SNP、および融合遺伝子の検出のために、ライブラリーをシーケンシングすることも、シーケンシングの前にPCR増幅によってさらに増幅することもできる。 40

【0082】

一部の実施形態では、試料中の複数の標的ポリヌクレオチドから複数のコンカテマーを生成することができる。試料は1つまたは複数の標的配列を含むことができる。各標的配列 50

は1つまたは複数の対応するコンカテマーを有し得る。固有の標的ポリヌクレオチドに対応する各コンカテマーは、標的ポリヌクレオチドの様々な数のコピーを含むことができる。一部の実施形態では、本方法は様々な長さのコンカテマーを生成するように最適化することができる。コンカテマーの長さの多様性は、標的ポリヌクレオチドの長さおよび/またはコンカテマーあたりの標的ポリヌクレオチドのコピー数の変動の結果生じ得る。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、またはそれより多く）は少なくとも75ヌクレオチドの長さ（例えば、少なくとも100、150、200またはそれより多いヌクレオチドの長さ）の標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも80%は、少なくとも75ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも60%は、少なくとも100ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも50%は、少なくとも150ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。

【0083】

一部の実施形態では、本開示の方法はステップ(c)で產生された複数のアンプリコンをシーケンシングするステップを含む。一部の実施形態では、シーケンシングするステップは、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンを標的ポリヌクレオチドのただ1つのコピーを含むアンプリコンから選択的に精製することなく実施される。一部の実施形態では、本開示の方法は、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含む、ステップ(c)で產生された複数のアンプリコンの中のアンプリコンを精製するステップを含む。一部の実施形態では、本方法の精製されたアンプリコンがシーケンシングされる。ある特定の実施形態では、本開示の方法は、同じ反応混合物中の複数の異なる標的ポリヌクレオチドを増幅するステップを含む。複数の標的ポリヌクレオチドの構成成分は様々な長さであってよい。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは30ヌクレオチド~1000ヌクレオチドの長さ（例えば50~600、75~500、100~400、または200~300ヌクレオチドの長さ）である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは単一の反応混合物中でのライゲーションによって環状化される。

【0084】

実例的な実施形態では、無細胞ポリヌクレオチドの混合物を含む核酸試料は、図4に示すように増幅される。混合物中のポリヌクレオチド（例えば一本鎖DNA、「ssDNA」）を環状化して環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドを形成させることができる。非等温RCAの第1の温度相、例えば55におけるプライマー結合、および非等温RCAの第2の温度相、例えば70における1つまたは複数の第1のプライマーのプライマー延長によって、コンカテマーの混合物が生成される。プライマー結合のために選択した温度よりも高い温度をプライマー延長のために選択することによって、プライマー延長の間の追加的なプライマー結合を最小化することができる。各標的ポリヌクレオチドは1つまたは複数の対応するコンカテマーを有し得る。固有の標的ポリヌクレオチドに対応する各コンカテマーは、標的ポリヌクレオチドの様々な数のコピーを含み得る。図によれば、1つまたは複数の第1のプライマーは、配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む。続く非等温増幅のサイクルにおいて、コンカテマーの生成と同時に複数の第2の延長産生物が生成され、この延長産生物は第2の温度相における1つまたは複数の第2のプライマーのプライマー延長の結果生じ、この1つまたは複数の第2のプライマーは、第1の温度相において第1のプライマーの延長産生物として生成された直鎖状コンカテマー鑄型にハイブリダイズし、前のサイクルにおける94等の第3の温度相の間の変性により環状鑄型にはハイブリダイズしない。環状鑄型の周囲で進行するポリメラーゼによる置換に際して、第2のプライマーのための新たなハイブリダイゼーション部位も露出される。1つまたは複数の第2のプライマーは、配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダ

イズする第2の3'末端、および配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む。延長産生物は標的ポリヌクレオチドの種々の数のコピーを含み得る。混合試料中において、標的ポリヌクレオチドは種々の長さであってよく、得られる延長産生物も種々の長さであってよい。種々のサイズのステムループ構造を、第1の共通配列と第2の共通配列の相補体との分子内ハイブリダイゼーションの結果として、または第1の共通配列の相補体と第2の共通配列との分子内ハイブリダイゼーションから、形成させることができる。ステムループ構造は、アニーリング、延長等の1つまたは複数の増幅の相、またはステムループ形成のための第4の温度相（例えば58℃）の間に形成し得る。ステムループ構造は、RCAの後の引き続く増幅反応の間にも形成し得る。延長産生物はアンプリコンを生成するための増幅反応の鋳型としても役立ち、ステムループ構造の安定性はプライマー結合および延長に影響し得る。引き続く増幅反応の間、より長い標的ポリヌクレオチド配列またはより多くのコピーのどちらかを含む延長産生物は、そのステムループ構造がより小さなループを有する延長産生物と比較して優先的に富化することができる。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンが富化される。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多くのコピーを有するアンプリコンの百分率は、少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%またはそれより多く）である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多くのコピーを有するアンプリコンの百分率は、10%～100%（例えば、20%～90%、30%～80%または40%～60%）である。一部の実施形態では、より長い標的ポリヌクレオチドを含むアンプリコンが富化される。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも50%（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%またはそれより多く）は、少なくとも75ヌクレオチドの長さ（例えば、少なくとも100、150、200またはそれより多くのヌクレオチドの長さ）の標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも80%は、少なくとも75ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも60%は、少なくとも100ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、コンカテマーの少なくとも50%は、少なくとも150ヌクレオチドの長さの標的ポリヌクレオチドを含む。

【0085】

別の態様では、本開示は本開示の方法による方法を実施するための反応混合物を提供する。反応混合物は種々の態様および方法のいずれに関しても本明細書に記載した1つまたは複数の種々の成分を含み得る。一部の実施形態では、本開示は標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するための反応混合物を提供する。一実施形態では、反応混合物は（a）環状標的ポリヌクレオチド、（b）配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および配列相補性によって標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマー、ならびに（c）配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および配列相補性によってコンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーであって、第1の共通配列と第2の共通配列はそれぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合には少なくとも90%同一である、第2のプライマーを含む。

【0086】

一部の実施形態では、本開示の反応混合物は容器に入れられる。各成分は異なる容器に包装され得るか、または交差反応性および保存期間が許せば成分の組合せが容器で提供され得る。容器はウェル、プレート、チューブ、チャンバー、フローセル、またはチップであってよい。

【0087】

一部の実施形態では、反応混合物は配列相補性によって第1の共通配列または第2の共通

10

20

30

40

50

配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第3のプライマーを含む。一部の実施形態では、第3のプライマーは複数の延長産生物を増幅するために用いることができる。核酸増幅のための第3のプライマーは少なくとも5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90、または100ヌクレオチド等の任意の好適な長さであってよく、その任意の部分または全部は、対応する（例えば約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチドまたはそれより多い）標的配列に相補的であってよい。第3のプライマーは、1つまたは複数の増幅プライマーアニーリング配列またはその相補体；1つまたは複数のシーケンシングプライマーアニーリング配列またはその相補体；1つまたは複数のバーコード配列；複数の異なるプライマーの間で共有された1つまたは複数の共通配列；1つまたは複数の制限酵素認識部位；（例えば大量並列シーケンシングのためのフローセル等のシーケンシングプラットフォームへの付着のための）1つまたは複数のプローブ結合部位またはシーケンシングアダプター；1つまたは複数のランダムまたはニアランダム配列（例えば1つまたは複数の位置で2つまたはそれより多い異なるヌクレオチドの組からランダムに選択された1つまたは複数のヌクレオチド）；ならびにそれらの組合せを含むセグメントを含み得る。増幅プライマーアニーリング配列は、シーケンシングプライマーアニーリング配列としても役立ち得る。

【0088】

ある特定の実施形態では、延長産生物はステムループ産生物を形成することができ、第3のプライマーのプライマー延長からのアンプリコン収率は、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーの第3のハイブリダイジング配列の特性を最適化すること、例えばそれらの融解温度を最適化することによって、最適化することができる。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 15 以内の融解温度（ T_m ）を有する。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 10 以内の融解温度（ T_m ）を有する。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 5 以内の融解温度（ T_m ）を有する。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 1 以内の融解温度（ T_m ）を有する。

【0089】

一部の実施形態では、本開示の反応混合物は、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドとして環状化された無細胞DNAを含む。一部の実施形態では、本開示の反応混合物は、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドとしてゲノムDNAの環状化された断片を含む。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは染色体再配列の結果生じた配列を含む。ある特定の実施形態では、染色体再配列は欠失、重複、逆位、および転座のうちの少なくとも1つである。一部の実施形態では、本方法の環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは一本鎖である。一部の実施形態では、本方法の環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは二本鎖である。

【0090】

一部の実施形態では、本開示の反応混合物は、標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって（i）第1の3'末端に相補的な配列、（ii）第2の3'末端と同一の配列、および（iii）（i）と（ii）との間の介在配列に対応する、標的ポリヌクレオチドの配列部分の併せた長さが75ヌクレオチドまたはそれ未満であるものを含む。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの配列部分の併せた長さは60ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの配列部分の併せた長さは、50ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの配列部分の併せた長さは、40ヌクレオチドまたはそれ未満である。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの配列部分の併せた長さは、30ヌクレオチドまたはそれ未満で

10

20

30

40

50

ある。

【0091】

本開示の方法および反応混合物を含む本明細書に記載した種々の態様の一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、直鎖状の標的ポリヌクレオチドをライゲーションすることによって形成される。直鎖状の標的ポリヌクレオチドから形成される環状化された標的ポリヌクレオチドは、特徴付けされるべき配列、例えば稀な配列バリエーションまたは融合遺伝子を含み得る。一部の実施形態では、直鎖状の標的ポリヌクレオチドは一本鎖である。他の実施形態では、直鎖状の標的ポリヌクレオチドは二本鎖である。標的ポリヌクレオチドの非限定的な例には、DNA、RNA、cDNA、dsDNA、ssDNA、プラスミドDNA、コスミドDNA、染色体DNA、ゲノムDNA、ウイルスDNA、細菌DNA、mtDNA（ミトコンドリアDNA）、mRNA、rRNA、tRNA、nRNA、siRNA、snRNA、snoRNA、scRNA、マイクロRNA、dsRNA、リボザイム、リボスイッチおよびウイルスRNA（例えばレトロウイルスRNA）が含まれる。

10

【0092】

種々の態様のいずれかの一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、これだけに限らないが、無細胞DNAまたはRNA（cfDNAまたはcfRNA）を含む無細胞ポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、無細胞ポリヌクレオチドは循環腫瘍DNAまたはRNA（ctDNAまたはctRNA）である。一部の実施形態では、無細胞ポリヌクレオチドは胎児DNAまたはRNAを含む。一部の実施形態では、無細胞ポリヌクレオチドは細胞由来であるが組織試料等の細胞源から直接に得られないポリヌクレオチドである。無細胞ポリヌクレオチドがそれに由来し得る源の非限定的な例は、正常細胞および組織、異常細胞および組織（例えばがん細胞または組織）、胎児細胞および組織、ならびに病原体である。非細胞源中に存在する無細胞ポリヌクレオチドは、細胞死（例えばアポトーシスまたはネクローシス）または細胞のシェディングに起因し得る。無細胞ポリヌクレオチドの配列解析を用いて、それから無細胞DNAが誘導された細胞または細胞の集団、例えば腫瘍細胞（例えばがんの検出において）、胎児細胞（例えば出生前診断において）、移植された組織からの細胞（例えば移植の失敗の早期検出において）、または病原体（例えば細菌またはウイルス）の特徴付けることができる。

20

【0093】

本開示の実施形態によって、任意の無細胞ポリヌクレオチドを用いることができる。無細胞ポリヌクレオチドは任意の動物または生命体等の対象から得ることができる。対象の非限定的な例には、ヒト、非ヒト霊長類、マウスおよびラット等のげっ歯類、イヌ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、その他の哺乳動物がある。一部の実施形態では対象は健康であり、対象から得られた無細胞ポリヌクレオチドは疾患または障害に付随する配列バリエーションを含まなくてもよい。一部の実施形態では、対象は疾患または障害を有する疑いがあり、対象から得られた無細胞ポリヌクレオチドは疾患または障害に付随する配列バリエーションを含んでいる可能性がある。一部の実施形態では対象は妊娠しており、対象から得られた無細胞ポリヌクレオチドは胎児ポリヌクレオチドを含む。

30

【0094】

無細胞ポリヌクレオチドは種々の非細胞源から得ることができる。それから無細胞ポリヌクレオチドが得られる非細胞源の非限定的な例には、血清、血漿、血液、汗、唾液、尿、糞便、精液、粘膜分泌物、脊髄液、羊水、およびリンパ液がある。それから無細胞ポリヌクレオチドが得られる非細胞源の試料を収集するための種々の方法が利用可能である。一部の実施形態では、それから無細胞ポリヌクレオチドが得られる非細胞源の試料は、対象から得られる。一部の実施形態では、試料は血管穿刺によって得られる。一部の実施形態では、試料は吸引によって得られる。

40

【0095】

試料から無細胞DNA等の無細胞ポリヌクレオチドを得るための種々の方法および市販のキットが利用可能である。無細胞DNAを含む無細胞ポリヌクレオチドを抽出し分離する

50

ための方法およびキットの例は、フェノール/クロロホルム抽出、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI) グリコーゲン抽出、NaI (ヨウ化ナトリウム) 抽出、グアニジン - レジン抽出、キャリアRNAを用いるQIAamp DNA血液Mid iキット、ChargeSwitch血清キット、ZR血清DNAキット、Qiagen Qubit (商標) dsDNA HSアッセイキット、Agilent (商標) DNA1000キット、TruSeq (商標) Sequencing Library Preparation、およびPuregene DNA精製システム血液キットである。

【0096】

無細胞DNAを含む無細胞ポリヌクレオチドは、細胞および体液の他の非可溶性成分から無細胞ポリヌクレオチドを分離する分画ステップによって体液から抽出し単離することができる。分画技法の例は遠心分離および濾過である。一部の実施形態では、細胞は最初に無細胞ポリヌクレオチドから分画されず、むしろ溶解される。一部の実施形態では、未処理細胞のゲノムDNAは選択的沈殿によって分画される。DNAを含む無細胞ポリヌクレオチドは可溶性のままであり得、不溶性のゲノムDNAから分離され抽出され得る。一部の手順によれば、緩衝液の添加および異なるキットに特有の他の洗浄ステップの後で、イソプロパノール沈殿を使用してDNAを沈殿させてもよい。夾雑物質または塩を除去するために、シリカ系カラム等のさらなる浄化ステップが用いられ得る。一般的なステップは特定の用途のために最適化され得る。例えば手順のある特定の態様、例えば収率を最適化するために、反応にわたって非特異的バルクキャリアポリヌクレオチドを添加してもよい。

【0097】

本明細書で開示する種々の態様のいずれかの一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAを含む。一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、ゲノムDNAから誘導される。ゲノムDNAは種々の方法およびQiagen DNeasy Tissue Kit等の利用可能な市販のキットを用いて細胞試料から得ることができる。ゲノムDNAは任意の抽出、単離および本明細書の別の箇所で既に述べた精製方法を使用して試料から得て精製することができる。抽出技法の他の非限定的な例には、(1) 自動核酸抽出器、例えばApplied Biosystems (Foster City, Calif.) から入手可能なModel 341 DNA Extractorを用いるまたは用いない、例えばフェノール/クロロホルム有機試薬 (Ausubelら、1993年) を用いる有機抽出およびそれに続くエタノール沈殿、(2) 固定相吸着法 (Walshら、米国特許第5,234,809号、1991年)、および(3) 塩誘起核酸沈殿法 (Millerら (1988年)) が含まれる。そのような沈殿法は典型的には「塩析」法と称される。核酸の単離および/または精製の別の例には、核酸が特異的または非特異的に結合することができる磁性粒子の使用およびそれに続く磁石を用いるビーズの単離、ならびにビーズから核酸を洗浄して溶出する方法 (例えば米国特許第5,705,628号を参照) が含まれる。例えば、核酸は固相可逆的固定化 (SPRI) ビーズ (Agencourt AMPure XP) を用いて単離し精製することができる。一部の実施形態では、試料からの望ましくないタンパク質の除去を助けるために、上記の単離法の前に酵素消化ステップ、例えばプロテイナーゼKまたは他の同様のプロテアーゼによる消化を行ってもよい。所望であれば、RNase阻害剤を溶解緩衝液に加えてもよい。ある特定の細胞または試料の種類については、タンパク質変性/消化ステップをプロトコールに加えることが望ましい。精製法はDNA、RNA、または両方を単離することを指向してよい。抽出手順の間またはその後DNAとRNAの両方をともに単離する場合には、一方または両方を他方から分離して精製するために、さらなるステップを用いてもよい。抽出された核酸のサブ画分も、例えばサイズ、配列、またはその他の物理的、化学的特性による精製によって生成することができる。当初の核酸単離ステップに加えて、過剰または不要の試薬、反応物、または産生物を除去する等のために、開示した方法における任意のステップの後に、核酸の精製を行うことができる。試料中の核酸の量および/または純度を決定するための種々の方法、例えば吸光度 (例えば260nm、280nmにおける吸光度、およびこれらの比) なら

10

20

30

40

50

びに標識（例えばSYBRグリーン、SYBRブルー、DAPI、ヨウ化プロビジウム、Hoechstステイン、SYBRゴールド、臭化エチジウム等の蛍光色素およびインターカレート剤）の検出が利用可能である。

【0098】

一部の実施形態では、環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、断片化された無細胞DNAまたは断片化されたゲノムDNAを含む。ポリヌクレオチドを断片化するための、これだけに限らないが、化学的、酵素的、および機械的方法、例えば超音波、剪断、および制限酵素との接触を含む種々の方法が利用可能である。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、およそ均一の長さである。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、およそ均一の長さでない。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約50～約1000ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約50～約500ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約50～約250ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約50～約200ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約50～約100ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約40～約1000ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約40～約500ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約40～約250ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約40～約200ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、無細胞DNA断片は、約40～約100ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、ゲノムDNAは、より短い長さのポリヌクレオチドに断片化される。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、およそ均一の長さである。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、およそ均一の長さでない。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、約50～約100ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、約50～250ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、約50～500ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、約50～750ヌクレオチドの長さの平均長を有する。一部の実施形態では、ゲノムDNA断片は、約100～1000ヌクレオチドの長さの平均長を有する。

【0099】

環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは、直鎖状標的ポリヌクレオチドから種々の方法で形成させることができる。一部の実施形態では、単一の直鎖状標的ポリヌクレオチドが末端連結によって環状化される。一部の実施形態では、第1の直鎖状標的ポリヌクレオチドが第2の直鎖状標的ポリヌクレオチドに連結され、次いで第1の標的ポリヌクレオチドの非連結末端が第2の直鎖状標的ポリヌクレオチドの非連結末端に連結されて、第1および第2の標的ポリヌクレオチドを含む環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドを形成する。環状化されるポリヌクレオチドは一本鎖でも二本鎖でもよい。一本鎖の環が望ましい場合には、ポリヌクレオチドは最初に単離された一本鎖のポリヌクレオチドであってもよく、あるいはポリヌクレオチドが（例えば変性によって）一本鎖になるように処理してもよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドを環状化するための方法には、リガーゼ（例えばRNAリガーゼまたはDNAリガーゼ）の使用のように酵素を含んでもよい。直鎖状標的ポリヌクレオチドを環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドにライゲーションするために用いられ得る酵素の非限定的な例は、ATP依存二本鎖ポリヌクレオチドリガーゼ、NAD⁺依存DNAまたはRNAリガーゼ、および一本鎖ポリヌクレオチドリガーゼである。リガーゼの非限定的な例は、CircLigase IおよびCircLigase II（Epicentre、Madison、WI）、Escherichia coli DNAリガーゼ、Thermus filiformis DNAリガーゼ、Tth DNAリガーゼ、Thermus scotoductus DNAリガーゼ（IおよびII）、T3 DNAリガーゼ、T4 DN

Aリガーゼ、T4 RNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、Taqリガーゼ、Ampligase (Epicentre (登録商標) Technologies Corp.)、Vanc-型リガーゼ、9°N DNAリガーゼ、Tsp DNAリガーゼ、DNAリガーゼI、DNAリガーゼIII、DNAリガーゼIV、Sso7-T3 DNAリガーゼ、Sso7-T4 DNAリガーゼ、Sso7-T7 DNAリガーゼ、Sso7-Taq DNAリガーゼ、Sso7-E.coli DNAリガーゼ、Sso7-Ampligase DNAリガーゼ、および熱安定性リガーゼ類である。リガーゼ酵素は野生型、変異体アイソフォーム、および遺伝子操作バリエーションであってよい。ライゲーション反応は緩衝成分、小分子ライゲーションエンハンサー、および他の反応成分を含んでよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドおよび酵素の濃度は分子内ライゲーションよりも分子内ライゲーションを促進するように調節される。一部の実施形態では、反応温度および反応時間または反応の長さが調節される。反応温度および時間も同じく調節できる。一部の実施形態では、分子内サークルを促進するために60 が用いられる。一部の実施形態では、反応時間は12~16時間である。反応条件は選択した酵素の製造者によって特定されるものであってよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドの末端を連結させて環状ポリヌクレオチドを形成するステップ(それ自体に直接、または1つもしくは複数の他のポリヌクレオチドに対してのいずれかで。例えば環状標的ポリヌクレオチドまたは環状ポリヌクレオチドは2つの標的ポリヌクレオチドを含む)によって、接合配列を有する接合部が産生される。一部の実施形態では、環状化反応の後でライゲーションされなかった核酸を消化するためにエクソヌクレアーゼステップを含むことができる。即ち、閉じた環は遊離の5'または3'末端を含まず、したがって5'または3'エクソヌクレアーゼの導入によって閉じた環は消化されないが、ライゲーションされなかった成分は消化される。これによって多重システムにおける特別の用途が見出され得る。

【0100】

環状化の後、その後のステップに關与するために利用可能な環状化されたポリヌクレオチドの相対的濃度または純度を増加させるため、増幅またはシーケンシングに先立って反応産物を(例えば環状ポリヌクレオチドの単離または反応中の1つまたは複数の他の分子の除去によって)精製してよい。例えば、環状化反応またはその成分を処理して、例えばエクソヌクレアーゼによる処理によって、一本鎖(環状化されていない)ポリヌクレオチドを除去してよい。さらなる例として、環状化反応またはその一部をサイズ排除クロマトグラフィーに供してよく、これにより小さな試薬は保持されて廃棄され、または環状化産物は保持されて別の体積中に放出される。ライゲーション反応を浄化するための種々のキット、例えばZymo Researchが製造しているZymoオリゴ精製キットによって提供されるキット等が利用可能である。一部の実施形態では、精製には環状化反応に用いたリガーゼを除去または分解し、および/または環状化されたポリヌクレオチドをそのようなリガーゼから離して精製する処理が含まれる。一部の実施形態では、リガーゼを分解する処理にはプロテイナーゼK等のプロテアーゼによる処理が含まれる。プロテイナーゼK処理は製造者のプロトコール、または標準プロトコール(例えばSambrookおよびGreen、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、4版(2012年)に提供されている)に従ってよい。プロテアーゼ処理の後には抽出および沈殿を行ってもよい。1つの例では、環状化されたポリヌクレオチドは0.1%のSDSおよび20mMのEDTAの存在下にプロテイナーゼK(Qiagen)処理によって精製され、1:1フェノール/クロロホルムおよびクロロホルムによって抽出され、エタノールまたはイソプロパノールによって沈殿される。一部の実施形態では、沈殿はエタノール中である。

【0101】

本開示の一部の実施形態は、コンカテマーを生成するステップ、複数の延長産物を生成するステップ、および複数の延長産物を増幅するステップの1つまたは複数等のプライマー延長および増幅反応を含む。プライマー延長反応は温度の変化(熱サイクリング)または定温(等温)を含み得る。一部の実施形態では、プライマー延長反応はポリメラーゼ

連鎖反応（PCR）を含む。PCRには多段階の変性によるサイクリング、対向する鎖へのプライマー対のアニールリング、および標的配列のコピー数を指数関数的に増加させるためのプライマー延長が含まれ、これらの段階の少なくともいくつかは一般に異なる反応温度で起こる。PCR増幅技法の非限定的な例は、定量的PCR（qPCRまたはリアルタイムPCR）、逆転写PCR（RT-PCR）、デジタルPCR（dPCRまたはdePCR）、標的特異的PCR、および定量的逆転写PCR（qRT-PCR）である。PCRに用いることができるポリメラーゼ酵素の例は、これだけに限らないが、*Thermus thermophilus* HB8；*Thermus oshimai* 変異体；*Thermus scotoductus*；*Thermus thermophilus* 1B21；*Thermus thermophilus* GK24；*Thermus aquaticus* ポリメラーゼ（Ampli Taq（登録商標）FSまたはTaq（G46D；F667Y）、Taq（G46D；F667Y；E6811）およびTaq（G46D；F667Y；T664N；R660G）；*Pyrococcus furiosus* ポリメラーゼ；*Thermococcus gorgonarius* ポリメラーゼ；*Pyrococcus species* GB-D ポリメラーゼ；*Thermococcus sp.*（9°N-7株）ポリメラーゼ；*Bacillus stearothermophilus* ポリメラーゼ；Tspポリメラーゼ；Thermal Ace（商標）ポリメラーゼ（Invitrogen）；*Thermus flavus* ポリメラーゼ；*Thermus litoralis* ポリメラーゼ；*Thermus* Z05 ポリメラーゼ；デルタZ05 ポリメラーゼ（例えばデルタZ05 Gold DNAポリメラーゼ）；およびそれらの変異体、バリエーション、または誘導体を含む熱安定性ポリメラーゼである。PCRに用いることができるポリメラーゼ酵素の追加的な例には、これだけに限らないが、DNAポリメラーゼI；DNAポリメラーゼI 変異体を含み、これだけに限らないが、Klenow断片およびKlenow断片（3'～5'エクソヌクレアーゼマイナス）；T4 DNAポリメラーゼ；T4 DNAポリメラーゼ変異体；T7 DNAポリメラーゼ；T7 DNAポリメラーゼ変異体；phi29 DNAポリメラーゼ；およびphi29 変異体DNAポリメラーゼを含む非熱安定性ポリメラーゼである。一部の実施形態では、ホットスタートポリメラーゼが用いられる。ホットスタートポリメラーゼは熱活性化を必要とする改変された形態のDNAポリメラーゼである。そのようなポリメラーゼは、例えば感度、特異性、および収率をさらに増加させるために、および/または低いコピー標的増幅をさらに改善するために用いることができる。典型的には、ホットスタート酵素は不活性状態で提供される。熱活性化されると改変または改変剤が放出され、活性酵素が生成される。Applied Biosystems；Bio-Rad；eEnzyme LLC；Eppendorf North America；Finnzymes Oy；GeneChoice, Inc.；Invitrogen；Jena Bioscience GmbH；MIDSCI；Minerva Biolabs GmbH；New England Biolabs；Novagen；Promega；QIAGEN；Roche Applied Science；Sigma-Aldrich；Stratagene；Takara Mirus Bio；USB Corp.；Yorkshire Bioscience Ltd.；その他の種々の販売元からいくつかのホットスタートポリメラーゼが入手可能である。

【0102】

一部の実施形態では、プライマー延長および増幅反応は等温反応を含む。等温増幅技術の非限定的な例は、リガーゼ鎖反応（LCR）（例えば米国特許第5,494,810号および第5,830,711号）；トランスクリプション介在増幅（TMA）（例えば米国特許第5,399,491号、第5,888,779号、第5,705,365号、第5,710,029号）；核酸配列に基づく増幅（NASBA）（例えばMalekら、米国特許第5,130,238号）；RNA技術のシグナル介在増幅（SMART）（例えばWharamら、*Nucleic Acids Res.*、2001年、29巻、e544頁）；鎖置換増幅（SDA）（例えば米国特許第5,455,166号）；好熱性SDA

(Spargoら、Mol Cell Probes、1996年、10巻、247~256頁；欧州特許第0684315号)；ローリングサークル増幅(RCA)(例えばLizardi、「Rolling Circle Replication Reporter Systems」、米国特許第5,854,033号)；DNAのループ介在等温増幅(LAMP)(例えばNotomiら、「Process for Synthesizing Nucleic Acid」、米国特許第6,410,278号)；ヘリカーゼ依存増幅(HDA)(例えば米国特許出願第2004/0058378号)；シングルプライマー等温増幅(SPIA)(例えば国際公開第2001/020035号および米国特許第6,251,639号)；ならびに環状ヘリカーゼ依存増幅(cHDA)(例えば米国特許出願第10/594,095号)である。

10

【0103】

一部の実施形態では、プライマー延長反応はRCA用等の鎖置換活性を有するポリメラーゼによって達成される。一部の実施形態では、等温増幅はローリングサークル増幅(RCA)を含む。RCA反応混合物は、1つまたは複数のプライマー、鎖置換活性を有するポリメラーゼ、およびdNTPを含み得る。鎖置換は合成の間に下流のDNAを置換する能力を意味する。鎖置換活性を有するポリメラーゼは、様々な程度の鎖置換活性を有し得る。一部の実施形態では、ポリメラーゼは弱い鎖置換活性を有し得、または鎖置換活性を有し得ない。一部の実施形態では、ポリメラーゼは強い鎖置換活性を有し得る。一部の実施形態では、鎖置換活性を有するポリメラーゼは異なる反応温度で異なるレベルの鎖置換活性を有し得る。一部の実施形態では、ポリメラーゼは穏和な温度、例えば20 ~ 37 20で鎖置換活性を示し得る。一部の実施形態では、ポリメラーゼは高温、例えば65 で鎖置換活性を示し得る。反応温度は鎖置換活性を有するポリメラーゼの活性のレベルに有利になるように調節することができる。一部の実施形態では、反応温度は、少なくとも20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85 または90 である。一部の実施形態では、反応温度は、20 ~ 80 である。一部の実施形態では、反応温度は、20 ~ 70 である。一部の実施形態では、反応温度は、20 ~ 60 である。一部の実施形態では、反応温度は、20 ~ 50 である。一部の実施形態では、異なる段階にわたって種々の反応温度をサイクルさせてポリメラーゼの鎖置換活性を増加または減少させることができる。鎖置換活性を有するポリメラーゼの非限定的な例は、Bst DNAポリメラーゼ大断片；Bsu DNAポリメラーゼ大断片；Deep Vent R(商標) DNAポリメラーゼ；Deep Vent R(商標)(エキソ-) DNAポリメラーゼ；Klenow断片(3' - 5'エキソ)；DNAポリメラーゼI大断片；M-MuLV逆転写酵素；phi29 DNAポリメラーゼ；PyroPhage 3173ポリメラーゼ；Vent R(登録商標) DNAポリメラーゼ；およびVent R(登録商標)(エキソ-) DNAポリメラーゼである。

20

30

【0104】

熱サイクル法、等温法、およびこれらの組合せを含む増幅反応の産生物として生成されるコンカテマーは、標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含み得る。コンカテマーは、標的ポリヌクレオチドの約2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多いコピーを含み得る。一部の実施形態では、コンカテマーは複数の標的ポリヌクレオチドからプライマー延長反応の産生物として生成し、複数の構成成分の長さは均一でなく、複数の配列を含む。

40

【0105】

本開示の種々の態様のいずれかの一部の実施形態では、プライマーは1つまたは複数の部分を含み得る。例えば、プライマーは1つまたは複数の増幅プライマーアニーリング配列またはその相補体；1つまたは複数のシーケンシングプライマーアニーリング配列またはその相補体；1つまたは複数のバーコード配列；複数の異なるプライマーの間で共有された1つまたは複数の共通配列；1つまたは複数の制限酵素認識部位；(例えば大量並列シーケンシングのためのフローセル等のシーケンシングプラットフォームへの付着のための)1つまたは複数のプローブ結合部位またはシーケンシングアダプター；1つまたは複数

50

のランダムまたはニアランダム配列（例えば1つまたは複数の位置で2つまたはそれより多い異なるヌクレオチドの組からランダムに選択された1つまたは複数のヌクレオチドで、異なるヌクレオチドのそれぞれはランダム配列を含むプライマーのプールの中で代表される1つまたは複数の位置で選択される）；ならびにそれらの組合せを含み得る。一部の実施形態では、第3のプライマー等のプライマーはシーケンシングアダプターエレメント（本明細書ではアダプターとも称する）を含み、これは一般にポリヌクレオチドシーケンシング反応の1つまたは複数のステップを促進するためにポリヌクレオチドの5'および/または3'末端に組み込まれるオリゴヌクレオチドを意味する。一部の実施形態では、シーケンシングアダプターはシーケンシングアダプターを含むポリヌクレオチドを次世代シーケンシングのためにフローセルに結合させるために用いられる。次世代シーケンシング法の非限定的な例は、単分子リアルタイムシーケンシング、イオン半導体シーケンシング、パイロシーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、および鎖停止である。フローセルへの付着のためのシーケンシングアダプターは、次世代シーケンシングシステム、例えば454シーケンシング、Ion Torrent ProtonまたはPGM、およびIllumina X10が適合できる任意の好適な配列を含み得る。次世代シーケンシング法のためのシーケンシングアダプターの非限定的な例には、Illuminaシーケンシングシステムの使用に好適なP5およびP7アダプター；TruSeq Universal Adapter、ならびにTruSeq Indexed Adapterが含まれる。一部の実施形態では、シーケンシングアダプターは、例えばポリメラーゼ鎖反応（PCR）等の増幅によってアダプターシーケンスを含むポリヌクレオチドを富化するために用いることができる。シーケンシングアダプターは、バーコード配列および/または試料インデックス配列をさらに含んでもよい。

【0106】

他のある特定の実施形態では、第3のプライマー等のプライマーはバーコード配列を含む。バーコード配列は、バーコードが同定されるように付随したポリヌクレオチドのある特徴を可能にする公知の核酸配列を意味する。バーコードはそれぞれ、5～35ヌクレオチド、6～30ヌクレオチド、または8～20ヌクレオチドの範囲内の長さを有し得る。一部の実施形態では、バーコードは少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、バーコードは6ヌクレオチド未満の長さである。一部の実施形態では、いくつかの標的ポリヌクレオチドに付随するバーコードは、他の標的ポリヌクレオチドに付随するバーコードとは異なる長さであってよい。1つの組の中のバーコードの融解温度は、互いの ± 10 以内、互いの ± 5 以内、または互いの ± 2 以内であってよい。バーコードは最小限に交差ハイブリダイズする組のメンバーであってよい。例えば、そのような組の各メンバーのヌクレオチド配列は、その組の他の全てのメンバーの配列と十分に異なり得るので、どのメンバーも穏和なまたは厳しいハイブリダイゼーション条件の下で他の任意のメンバーの相補体と安定な二本鎖を形成することはできない。最小限に交差ハイブリダイズする組の各メンバーのヌクレオチド配列は、他の全てのメンバーの配列と少なくとも2つのポリヌクレオチドだけ異なってよい。いくつかのバーコード技術はWinzelerら（1999年）、Science、285巻、901頁；Brenner（2000年）、Genome Biol.、1巻、1頁；Kumarら（2001年）、Nature Rev.、2巻、302頁；Giaeverら（2004年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、793頁；Easonら（2004年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、101巻、11046頁；およびBrenner（2004年）、Genome Biol.、5巻、240頁に記載されており、そのそれぞれは参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0107】

本開示の実施形態のあるものは複数のアンプリコンをシーケンシングするステップを含む。複数のアンプリコンをシーケンシングするための種々のシーケンシング方法が利用可能である。一部の実施形態では、高スループットシーケンシング方法が用いられる。用いる

10

20

30

40

50

ことができるシーケンシング方法の非限定的な例には、Illumina (HiSeq (登録商標) および MiSeq (登録商標) 等のシーケンシングシステム)、Life Technologies (Ion Torrent (登録商標)、SOLiD (登録商標) 等)、Roche の 454 Life Sciences systems、Pacific Biosciences systems 等によって製造されるシーケンシングシステムが含まれる。一部の実施形態では、シーケンシングするステップには約 50 もしくは約 50 より多い、約 75 もしくは約 75 より多い、約 100 もしくは約 100 より多い、約 125 もしくは約 125 より多い、約 150 もしくは約 150 より多い、約 175 もしくは約 175 より多い、約 200 もしくは約 200 より多い、約 250 もしくは約 250 より多い、約 300 もしくは約 300 より多いヌクレオチド、またはそれより多いヌクレオチドの長さのリードを産生させるための HiSeq (登録商標) または MiSeq (登録商標) の使用が含まれる。一部の実施形態では、シーケンシングするステップにはシーケンシングバイシンセシスプロセスが含まれ、ここでは個別のヌクレオチドが成長するプライマー延長産生物に添加されるととともに反復して同定される。ピロシーケンシングは得られる合成混合物をシーケンシング反応の副生物、即ちピロリン酸塩の存在についてアッセイすることによってヌクレオチドの組み込みを同定するシーケンシングバイシンセシスプロセスの例である。特に、プライマー/鋳型/ポリメラーゼの複合体が単一型のヌクレオチドと接触させられる。そのヌクレオチドが組み込まれると、重合反応によってトリリン酸塩鎖の および リン酸塩の間のヌクレオシドトリリン酸塩が切断され、ピロリン酸塩が放出される。次いで放出されたピロリン酸塩の存在が、AMP によってピロリン酸塩を ATP に変換する化学発光酵素レポーターシステムを用いて同定され、次いで測定できる光信号を発生させるルシフェラーゼ酵素を用いて ATP が測定される。光が検出される場合には塩基が組み込まれており、光が検出されない場合には塩基が組み込まれていない。適当な洗浄ステップの後、種々の塩基が繰り返して複合体と接触し、鋳型配列中のその後の塩基が連続的に同定される。例えば米国特許第 6,210,891 号を参照されたい。

【0108】

一部の実施形態では、アンブリコンがシーケンシングされ、参照配列に関するまたは変異のないバックグラウンドにおける配列バリエーション、例えば逆位、欠失、重複、転座、および稀な体細胞変異が検出される。一部の実施形態では、配列バリエーションは疾患に関連している。一部の実施形態では、配列バリエーションは疾患に関連していない。一般に、疾患または形質に関連する統計学的、生物学的、および/または機能的証拠が存在する配列バリエーションは、「原因遺伝子バリエーション」と称される。単一の原因遺伝子バリエーションは1つより多いの疾患または形質に関連することがある。一部の場合には、原因遺伝子バリエーションはメンデル形質、非メンデル形質、またはその両方に関連し得る。原因遺伝子バリエーションは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50またはそれより多い(例えば同じ相対的ゲノム位置における原因遺伝子バリエーションを含むポリヌクレオチドと原因遺伝子バリエーションを欠いているポリヌクレオチドとの間の)配列の相違等のポリヌクレオチドの多様性として現れることがある。原因遺伝子バリエーションの種類の非限定的な例には、単一ヌクレオチド変異多型(SNP)、欠失/挿入多型(DIP)、コピー数バリエーション(CNV)、短タンDEMリピート(STR)、制限断片長多型(RFLP)、単純配列リピート(SSR)、様々な数のタンDEMリピート(VNTR)、ランダム増幅多型DNA(RAPD)、増幅断片長多型(AFLP)、レトロトランスポゾン間増幅多型(IRAP)、長短散在要素(LINE/SINE)、長タンDEMリピート(LTR)、可動要素、レトロトランスポゾンマイクロサテライト増幅多型、レトロトランスポゾンに基づく挿入多型、配列特異的増幅多型、および遺伝性エピジェネティック修飾(例えばDNAのメチル化)が含まれる。原因遺伝子バリエーションは、密接に関連した原因遺伝子バリエーションの組であってもよい。いくつかの原因遺伝子バリエーションは、RNAポリヌクレオチドにおける配列多様性として影響を及ぼすことがある。このレベルにおいては、いくつかの原因遺伝子バリエーションはRNAポリヌクレオチドの種の有無によっても示される。また、いくつかの原因遺伝子バリエーションはタンパク質ポリペプチドにおける配列多様性をもたらす。いくつ

10

20

30

40

50

かの原因遺伝子バリエーションが報告されている。SNPである原因遺伝子バリエーションの例は鎌状赤血球貧血を引き起こすヘモグロビンのHb Sバリエーションである。DIPである原因遺伝子バリエーションの例は嚢泡性線維症を引き起こすCFTR遺伝子のデルタ508変異である。CNVである原因遺伝子バリエーションの例はトリソミー21であり、これはダウン症候群を引き起こす。STRである原因遺伝子バリエーションの例は、ハンティントン病を引き起こすタンデムリピートである。原因遺伝子バリエーションのさらなる非限定的な例は、国際公開第2014/015084号に記載されている。稀な配列バリエーションの同定のための方法のさらなる非限定的な例は、国際公開第2015/089333号に記載されている。

【0109】

本開示の種々の態様のいずれかのある特定の実施形態では、アンプリコンはシーケンシングに先立って精製される。アンプリコンは種々の方法によって精製することができる。アンプリコンは過剰のまたは望ましくない試薬、反応物、または産生物を除去するために精製してよい。アンプリコンはサイズ、配列、またはその他の物理的もしくは化学的特徴によってさらに精製してよい。一部の実施形態では、アンプリコンはサイズ排除クロマトグラフィーに供してよく、これにより標的ポリヌクレオチドのただ1つのコピーを含むアンプリコンおよび/または小さな試薬(例えばプライマー)は保持されて廃棄され、または標的ポリヌクレオチドの2つまたはそれより多いコピーを含むアンプリコンは保持されて別の体積中に放出される。一部の実施形態では、アンプリコンは(例えば、約300、400、500、またはそれより多いヌクレオチドの長さより大きい断片を富化するための)ゲルからの断片切除およびゲル濾過、ならびに結合緩衝液の濃度を微調整することによるサイズ選択のためのSPRIビーズ(Agencourt AMPure XP)に供してもよい。例えば、DNA断片との混合の間の0.6x結合緩衝液の使用が、約500塩基対(bp)より大きなDNA断片を優先的に結合させるために用いられ得る。一部の実施形態では、特にB2Bプライマーによる増幅を行った場合には、増幅産生物は、得られるアンプリコンをサイズによって濾過して、コンカテマーを含む混合物中のモノマーの数を減少および/または除去するように処理される。これは、本明細書の他の箇所に記載した任意の精製技法を使用して行うことができる。

【0110】

本明細書に提供する開示の実施形態は、1つまたは複数の種類のがんに関連する種々の配列バリエーションを含むアンプリコンを富化するために用いることができる。本開示の方法において用いることができる腫瘍学的意義を有する好適な標的配列には、これだけに限らないが、TP53遺伝子、ALK遺伝子、KRAS遺伝子、PIK3CA遺伝子、BRAF遺伝子、EGFR遺伝子、およびKIT遺伝子の変化が含まれる。特異的に増幅され、および/または配列バリエーションのために特異的に分析され得る標的配列は、がん関連遺伝子の全部または一部であってよい。一部の実施形態では、TP53遺伝子において1つまたは複数の配列バリエーションが同定される。TP53はヒトのがんにおいて最も高頻度に変異した遺伝子の1つであり、例えばTP53の変異は卵巣がんの45%、大腸がんの43%、および上部気道消化路のがんの42%で見出されている(例えばM. Olivierら、TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use、Cold Spring Harb Perspect Biol、2010年1月、2巻(1号)を参照されたい)。TP53の変異状態の特徴付けは臨床診断の助けになり、予後値を提供し、がん患者の処置に影響し得る。例えば、TP53の変異はグリア細胞に由来するCNS腫瘍の患者の不良な予後の予兆として、また慢性リンパ球性白血病の患者の急速な疾患の進行の予兆として用いられ得る(例えばMcLendon REら、Cancer、2005年10月15日、104巻(8号)1693~1699頁; Dicker Fら、Leukemia、2009年1月、23巻(1号)117~124頁を参照されたい)。配列多様性は遺伝子の中のいかなる場所でも起こり得る。したがって、本明細書においてTP53遺伝子の全部または一部を評価することができる。即ち、本明細書の他の箇所に

10

20

30

40

50

記載したように、標的特異的な成分（例えば標的特異的なプライマー）を用いる場合には、複数のTP53特異的配列を用いることによって、例えば選択された標的に用いられ得る1つまたは複数の選択されたサブ配列（変異「ホットスポット」等）のみよりも、遺伝子全体にわたって断片を増幅し検出することができる。あるいは、1つまたは複数の選択されたサブ配列（対象のクラスの中の増大した変異割合に関連するヌクレオチドまたはヌクレオチド領域、また「ホットスポット」という用語に包含される）の上流または下流にハイブリダイズする標的特異的プライマーを設計してもよい。そのようなサブ配列にわたる標準的なプライマーが設計され得、および/またはそのようなサブ配列の上流または下流にハイブリダイズするB2Bプライマーが設計され得る。

【0111】

一部の実施形態では、ALK遺伝子の全部または一部において1つまたは複数の配列バリエーションが同定されている。肺腫瘍の7%もの多くでALK融合が報告されており、そのいくつかはEGFRチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）耐性に関連している（例えばShawら、J Clin Oncol.、2009年9月10日、27巻（26号）、4247～4253頁を参照されたい）。2013年までに、ALKチロシンキナーゼドメイン全体にわたるいくつかの異なる点変異が、ALKチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）に対する二次耐性を有する患者で見出されている（Katayama R、2012年、Sci Transl Med.、2012年2月8日、4巻（120号））。したがって、ALK遺伝子における変異検出は、がん治療の決定を助けるために用いることができる。

【0112】

一部の実施形態では、KRAS遺伝子の全部または一部において1つまたは複数の配列バリエーションが同定されている。肺腺癌の患者のほぼ15～25%および結腸直腸がんの患者の40%が腫瘍関連KRAS変異を有していることが報告されている（例えばNeuman、2009年、Pathol Res Pract.、2009年、205巻（12号）、858～862頁を参照されたい）。変異の大部分はKRAS遺伝子のコドン12、13、および61に位置している。これらの変異によってKRASシグナリング経路が活性化され、これが腫瘍細胞の成長および増殖の引き金となる。いくつかの研究により、KRASの変異を有する腫瘍の患者は、抗EGFR抗体の単独または化学療法との組合せ治療による恩恵を受けないであろうということが示されている（例えばAmadoら、2008年、J Clin Oncol.、2008年4月1日、26巻（10号）、1626～1634頁；Bokemeyerら、2009年、J Clin Oncol.、2009年2月10日、27巻（5号）、663～671頁を参照されたい）。配列多様性を同定するための標的となり得る配列多様性の1つの特定の「ホットスポット」は、遺伝子の35位にある。KRAS配列バリエーションの同定は、結腸直腸がんを有する対象の治療の選択等の治療の選択に用いることができる。

【0113】

一部の実施形態では、PIK3CA遺伝子の全部または一部において1つまたは複数の配列バリエーションが同定されている。PIK3CAにおける体細胞変異は、種々の型のがんにおいてしばしば、例えば結腸直腸がんの10～30%において見出されている（例えばSamuelisら、2004年、Science、2004年4月23日、304巻（5670号）、554頁を参照されたい）。これらの変異はエクソン9（ヘリカルドメイン）とエクソン20（キナーゼドメイン）の中の2つの「ホットスポット」領域内に最も多く位置しており、これらは検出配列バリエーションの増幅および/または分析のために特異的に標的とされ得る。3140位も特異的に標的とされ得る。

【0114】

一部の実施形態では、BRAF遺伝子の全部または一部において1つまたは複数の配列バリエーションが同定されている。全悪性黒色腫の50%近くがBRAFの体細胞変異を有していることが報告されている（例えばMaldonadoら、J Natl Cancer Inst.、2003年12月17日、95巻（24号）、1878～1890頁を参照されたい）。BRAF変異は全黒色腫サブタイプに見られるが、慢性日射誘導損傷のない

10

20

30

40

50

皮膚由来の黒色腫において最も頻度が高い。黒色腫において最も一般的な B R A F 変異の中に、600位のバリンがグルタミンで置換されたミスセンス変異 V 6 0 0 E がある。B R A F V 6 0 0 E 変異には、B R A F 阻害剤治療の臨床的有益性が関連している。B R A F 変異の検出は、黒色腫の処置の選択および標的治療への耐性の研究に用いることができる。

【0115】

一部の実施形態では、E G F R 遺伝子の全部または一部において1つまたは複数の配列バリエーションが同定されている。E G F R 変異はしばしば非小細胞肺癌に関連している（米国において約10%、東アジアにおいて35%。例えば P a o ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、2004年9月7日、101巻(36号)、13306~13311頁を参照されたい）。これらの変異は典型的にはE G F R エクソン18~21の中で起こり、通常ヘテロ接合である。これらの変異のほぼ90%はエクソン19の欠失またはエクソン21 L 8 5 8 R の点変異である。

【0116】

一部の実施形態では、K I T 遺伝子の全部または一部において1つまたは複数の配列バリエーションが同定されている。消化管間質腫瘍(G I S T)の85%近くがK I T 変異を有していることが報告されている（例えば H e i n r i c h ら、2003年、J C l i n O n c o l、2003年12月1日、21巻(23号)4342~4349頁を参照されたい）。K I T 変異の大部分は膜近傍ドメイン(エクソン11、70%)、細胞外二量化モチーフ(エクソン9、10~15%)、チロシンキナーゼI(T K I)ドメイン(エクソン13、1~3%)、およびチロシンキナーゼ2(T K 2)ドメイン、ならびに活性ループ(エクソン17、1~3%)に見出される。二次的K I T 変異は標的治療イマチニブの後、および患者が治療に耐性を生じた後で広く同定されている。

【0117】

その全部または一部が本明細書に記載した方法によって配列バリエーションについて分析することができるがんに関連する遺伝子のさらなる非限定的な例には、これだけに限らないが、P T E N ; A T M ; A T R ; E G F R ; E R B B 2 ; E R B B 3 ; E R B B 4 ; N o t c h 1 ; N o t c h 2 ; N o t c h 3 ; N o t c h 4 ; A K T ; A K T 2 ; A K T 3 ; H I F ; H I F 1 a ; H I F 3 a ; M e t ; H R G ; B c l 2 ; P P A R アルファ ; P P A R ガンマ ; W T 1 (ウィルムス腫瘍) ; F G F 受容体ファミリーメンバー(5メンバー: 1, 2, 3, 4, 5) ; C D K N 2 a ; A P C ; R B (網膜芽腫) ; M E N 1 ; V H L ; B R C A 1 ; B R C A 2 ; A R (アンドロゲン受容体) ; T S G 1 0 1 ; I G F ; I G F 受容体 ; I g f 1 (4バリエーション) ; I g f 2 (3バリエーション) ; I g f 1 受容体 ; I g f 2 受容体 ; B a x ; B c l 2 ; カスパーゼファミリー(9メンバー: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12) ; K r a s ; および A p c が含まれる。さらなる例は本明細書の他の箇所で提供される。本明細書に開示する方法によって1つまたは複数の配列バリエーションを呼び出すことに基づいて診断することができるがんの例には、制限はないが、棘細胞腫、腺房細胞癌、聴神経腫、末端性黒子性黒色腫、先端汗腺腫、急性好酸球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、急性単球性白血病、化膿性急性骨髄芽球性白血病、急性骨髄樹状細胞白血病、急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、アダマンチノーマ、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺様歯原性腫瘍、副腎皮質癌、成人T細胞白血病、侵襲性NK細胞白血病、A I D S 関連がん、A I D S 関連リンパ腫、胞状軟部肉腫、エナメル上皮線維腫、肛門がん、未分化大細胞リンパ腫、未分化甲状腺がん、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管筋脂肪腫、血管肉腫、虫垂がん、星状細胞腫、非定型奇形横紋筋腫、基底細胞癌、基底様癌、B細胞白血病、B細胞リンパ腫、ペリニ管癌、胆管がん、膀胱がん、芽細胞腫、骨がん、骨腫瘍、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、乳がん、ブレナー腫瘍、気管支腫瘍、細気管支肺胞癌、ブラウン腫瘍、パーキットリンパ腫、未知原発部位のがん、カルチノイド腫瘍、癌腫、インサイチュ癌腫、陰茎癌、未知原発部位の癌腫、癌肉腫、キャスルマン病、中枢神経系胚芽腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、子宮頸がん、胆管癌、軟骨腫、軟骨肉腫、脊索腫、絨毛腫、脈絡叢乳頭腫、慢性リンパ球性白血病、慢

性単球性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓増殖性障害、慢性好中球性白血病、透明細胞腫瘍、結腸がん、結腸直腸がん、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、デゴス病、隆起性皮膚線維肉腫、皮様囊腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、瀰漫性大B細胞リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、胎生期癌、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜がん、内膜子宮がん、子宮内膜腫瘍、腸疾患関連T細胞リンパ腫、上衣芽細胞腫、上衣腫、類上皮肉腫、赤白血病、食道がん、鼻腔神経芽細胞腫、ユーイング腫瘍ファミリー、ユーイング肉腫ファミリー、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、乳腺外パージェット病、卵管がん、封入奇形胎児、線維腫、線維肉腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性甲状腺がん、胆嚢がん、胆嚢がん、神経節膠腫、神経節細胞腫、胃がん、胃リンパ腫、消化管がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、消化管間質腫瘍、胚細胞腫瘍、胚細胞腫、妊娠性絨毛癌、妊娠性絨毛性腫瘍、骨巨細胞腫、多型性膠芽腫、神経膠腫、大脳神経膠腫、グロムス腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、性腺芽腫、顆粒膜細胞腫、ヘアリー細胞白血病、ヘアリー細胞白血病、頭頸部がん、頭頸部がん、心臓がん、血管芽細胞腫、血管周囲細胞腫、血管肉腫、悪性血液疾患、肝細胞癌、肝脾T細胞リンパ腫、遺伝性乳卵巣がん症候群、ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、視床下部膠腫、炎症性乳がん、眼球内黒色腫、島細胞癌、島細胞腫瘍、若年性骨髓単球性白血病、カボシ肉腫、カボシ肉腫、腎がん、クラツキン腫瘍、クルケンバーク腫瘍、喉頭がん、喉頭がん、悪性黒子型黒色腫、白血病、白血病、唇口腔がん、脂肪肉腫、肺がん、黄体腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ上皮腫、リンパ性白血病、リンパ腫、マクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、悪性線維性組織球腫、骨悪性線維性組織球腫、悪性神経膠腫、悪性中皮腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、悪性横紋筋腫瘍、悪性トリトン腫瘍、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、マスト細胞白血病、縦隔生殖細胞腫瘍、縦隔腫瘍、髄様甲状腺がん、髄芽腫、髄芽腫、髄様上皮腫、黒色腫、黒色腫、髄膜腫、メルケル細胞癌、中皮腫、中皮腫、潜在性原発腫瘍を伴う転移性扁平上皮頸部がん、転移性尿路上皮癌、混合ミューラー腫瘍、単球性白血病、口腔がん、粘液性腫瘍、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、菌状息肉腫、骨髄異形成疾患、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、骨髄性肉腫、骨髄増殖性疾患、粘液腫、鼻腔がん、鼻咽頭がん、鼻咽頭癌、新生物、神経線維腫、神経芽細胞腫、神経芽細胞腫、神経線維腫、神経腫、結節型黒色腫、非ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、非黒色腫皮膚がん、非小細胞肺がん、眼科腫瘍、乏突起星細胞腫、乏突起膠腫、好酸性顆粒細胞腫、視神経鞘髄膜腫、口腔がん、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫、骨肉腫、卵巣がん、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性潜在性腫瘍、乳腺パージェット病、パネコースト腫瘍、膵臓がん、膵臓がん、乳頭甲状腺がん、乳頭腫、傍神経節腫、副鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、血管周囲類上皮細胞腫瘍、咽頭がん、褐色細胞腫、中分化松果体腫瘍、松果体芽細胞腫、下垂体細胞腫、下垂体腺腫、下垂体腫瘍、形質細胞新生物、胸膜肺芽腫、多胚腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、中枢神経系原発リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、原発性肝細胞がん、原発性肝がん、原発性腹膜がん、未分化神経外胚葉性腫瘍、前立腺がん、腹膜偽粘膜腫、直腸がん、腎細胞癌、染色体15上のNUT遺伝子が関与する呼吸器癌、網膜芽腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、リヒタートランスフォーメーション、仙尾部奇形腫、唾液腺がん、肉腫、神経鞘腫、皮脂腺癌、続発性新生物、セミノーマ、漿液腫瘍、セルトリ-ライディヒ細胞腫瘍、性索間質腫瘍、セザリー症候群、シグネットリング細胞癌、皮膚がん、小青色円形細胞腫瘍、小細胞癌、小細胞肺がん、小細胞リンパ腫、小腸がん、軟組織肉腫、ソマトスタチノーマ、煤煙性疣贅、脊索腫瘍、脊髄腫瘍、脾性辺縁部リンパ腫、扁平上皮細胞癌、胃がん、表在拡大型黒色腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、表層上皮性間質性腫瘍、滑膜肉腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、T細胞大顆粒リンパ球性白血病、T細胞白血病、T細胞リンパ腫、T細胞前リンパ球性白血病、奇形腫、末期リンパ腺がん、精巣がん、莖膜細胞腫、咽喉がん、胸腺癌、胸腺腫、甲状腺がん、腎盂および尿管の移行細胞がん、移行細胞癌腫、尿管がん、尿道がん、泌尿生殖器新生物、子宮肉腫、ブドウ膜黒色腫、膣がん、ウェルナーモリソン症候群、疣状癌、視覚伝導路神経膠腫、外陰がん、ワルデンストロームマクログロブリン血症、ワルチン腫瘍、ウィルムス腫瘍、およびこれらの組合せが含まれ

10

20

30

40

50

る。

【 0 1 1 8 】

その全部または一部（例えばプロモーター領域、イントロン、エクソン等）が本明細書に記載した方法によって配列バリエーションについて分析することができるがんに関連する遺伝子のさらなる非限定的な例を表 2 に示す。

【表 2 - 1】

表 2

遺伝子	説明
ABCC6	ATP 結合カセット、サブファミリー C (CFTR/MRP)、メンバー 6
ABI1	abl 相互作用因子 1
ABL1	c-abl がん遺伝子 1、非受容体型チロシンキナーゼ
ABL2	v-abl エーベルソンマウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ 2
ACSL3	アシル-CoA 合成酵素長鎖ファミリーメンバー 3
ACSL6	アシル-CoA 合成酵素長鎖ファミリーメンバー 6
AFF1	AF4/FMR2 ファミリー、メンバー 1
AFF3	AF4/FMR2 ファミリー、メンバー 3
AFF4	AF4/FMR2 ファミリー、メンバー 4
AIP	アリール炭化水素受容体相互作用タンパク質
AKAP9	A キナーゼ (PRKA) アンカータンパク質 (yotiao) 9
AKT1	v-akt マウス胸腺腫ウイルスがん遺伝子ホモログ 1
AKT2	v-akt マウス胸腺腫ウイルスがん遺伝子ホモログ 2
AKT3	v-akt マウス胸腺腫ウイルスがん遺伝子ホモログ 3 (プロテインキナーゼ B、ガンマ)
ALDH2	2 型アルデヒド脱水素酵素ファミリー (ミトコンドリア性)
ALK	未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ
APC	腺腫様多発結腸ポリープ
AR	アンドロゲン受容体
ARHGAP26	Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 26
ARHGEF12	Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 12
ARID1A	AT リッチ相互作用ドメイン 1A (SWI 様)
ARID1B	AT リッチ相互作用ドメイン 1B (SWI 様)
ARID2	AT リッチ相互作用ドメイン 2 (ARID、RFX 様)
ARID3A	AT リッチ相互作用ドメイン 3A (BRIGHT 様)
ARID3B	AT リッチ相互作用ドメイン 3B (BRIGHT 様)
ARID4A	AT リッチ相互作用ドメイン 4A (RBP1 様)
ARID4B	AT リッチ相互作用ドメイン 4B (RBP1 様)
ARID5A	AT リッチ相互作用ドメイン 5A (MRF1 様)
ARID5B	AT リッチ相互作用ドメイン 5B (MRF1 様)
ARNT	アリール炭化水素受容体核内輸送体
ASPCR1	胞巣状軟部肉腫染色体領域、候補 1
ASXL1	追加性櫛様 (additional sex combs like) 1 (ショウジョウバエ)
ATF1	活性化転写因子 1
ATIC	5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ/IMP シクロヒドロラーゼ
ATM	血管拡張性失調症変異
ATR	血管拡張性失調症および Rad3 関連
ATRX	X 連鎖アルファサラセミア/精神遅滞症候群
AURKA	オーロラキナーゼ A

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

AXIN2	アキシン 2
BAP1	BRCA1 関連タンパク質-1 (ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ)
BCL10	B 細胞 CLL/リンパ腫 10
BCL11A	B 細胞 CLL/リンパ腫 11A (ジンクフィンガータンパク質)
BCL11B	B 細胞 CLL/リンパ腫 11B (ジンクフィンガータンパク質)
BCL2	B 細胞 CLL/リンパ腫 2
BCL3	B 細胞 CLL/リンパ腫 3
BCL6	B 細胞 CLL/リンパ腫 6
BCL7A	B 細胞 CLL/リンパ腫 7A
BCL9	B 細胞 CLL/リンパ腫 9
BCOR	BCL6 共抑制因子
BCR	ブレークポイントクラスター領域
BIRC3	バキュロウイルス IAP 反復配列含有 3
BLID	BH3 様モチーフ含有、細胞死誘導因子
BLM	ブルーム症候群、RecQ ヘリカーゼ様
BMPRI1A	骨形成タンパク質受容体、IA 型
BRAF	v-raf マウス肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ B1
BRCA1	乳がん 1、若年性
BRCA2	乳がん 2、若年性
BRD3	プロモドメイン含有 3
BRD4	プロモドメイン含有 4
BRIP1	BRCA1 相互作用タンパク質 C 末端ヘリカーゼ 1
BTG1	B 細胞転座遺伝子 1、抗増殖性
BUB1B	ベンズイミダゾール 1 ホモログベータによる出芽無抑制 (酵母)
C15orf55	15 番染色体オープンリーディングフレーム 55
CANT1	カルシウム活性化ヌクレオチダーゼ 1
CARD11	カスパーゼ動員ドメインファミリー、メンバー11
CARS	システイン tRNA 合成酵素
CASC5	がん感受性候補 5
CBFA2T3	コア結合因子、runtドメイン、アルファサブユニット 2; 転座、3
CBFB	コア結合因子、ベータサブユニット
CBL	Cbl がん原遺伝子、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ
CBLB	Cbl がん原遺伝子、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ B
CBLC	Cbl がん原遺伝子、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ C
CCDC6	コイルドコイルドメイン含有 6
CCNB1IP1	サイクリン B1 相互作用タンパク質 1、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ
CCND1	サイクリン D1
CCND2	サイクリン D2
CCND3	サイクリン D3
CCNE1	サイクリン E1
CD274	CD274 分子
CD74	CD74 分子、主要組織適合性複合体、クラス II インバリアント鎖
CD79A	CD79a 分子、免疫グロブリン関連アルファ
CD79B	CD79b 分子、免疫グロブリン関連ベータ
CDC73	細胞分裂周期 73、Paf1/RNA ポリメラーゼ II 複合体成分、ホモログ (S. cerevisiae)

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

CDH1	カドヘリン 1、1 型、E-カドヘリン(上皮)
CDH11	カドヘリン 11、2 型、OB-カドヘリン(骨芽細胞)
CDH6	カドヘリン 6、2 型、K-カドヘリン(胎児腎臓)
CDK12	サイクリン依存性キナーゼ 12
CDK2AP2	サイクリン依存性キナーゼ 2 関連タンパク質 2
CDK4	サイクリン依存性キナーゼ 4
CDK6	サイクリン依存性キナーゼ 6
CDK8	サイクリン依存性キナーゼ 8
CDKN1A	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1A(p21、Cip1)
CDKN1B	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1B(p27、Kip1)
CDKN2A	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2A
CDKN2B	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2B(p15、CDK4 を阻害)
CDKN2C	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2C(p18、CDK4 を阻害)
CDKN2D	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2D(p19、CDK4 を阻害)
CDX2	caudal タイプホメオボックス 2
CEBPA	CCAAT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP)、アルファ
CHCHD7	コイルドコイルヘリックスコイルドコイルヘリックスドメイン含有 7
CHD5	クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 5
CHD6	クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 6
CHEK1	チェックポイントキナーゼ 1
CHEK2	チェックポイントキナーゼ 2
CHIC2	システインリッチ疎水性ドメイン 2
CHN1	キメリン(キマエリン)1
CIC	capicua ホモログ(ショウジョウバエ)
CIITA	クラス II、主要組織適合性複合体、トランス活性化因子
CLP1	CLP1、開裂およびポリアデニル化因子 I サブユニット、ホモログ(S. cerevisiae)
CLTC	クラスリン、重鎖(Hc)
CLTCL1	クラスリン、重鎖様 1
CNBP	CCHC 型ジンクフィンガー、核酸結合タンパク質
CNTRL	セントリオリン
COL1A1	コラーゲン、I 型、アルファ 1
COX6C	シトクロム c オキシダーゼサブユニット VIc
CREB1	cAMP 応答配列結合タンパク質 1
CREB3L1	cAMP 応答配列結合タンパク質 3 様 1
CREB3L2	cAMP 応答配列結合タンパク質 3 様 2
CREBBP	CREB 結合タンパク質
CRKL	v-crk 肉腫ウイルス CT10 がん遺伝子ホモログ(鳥)様
CRLF2	サイトカイン受容体様因子 2
CRTC1	CREB 制御転写共活性化因子 1
CRTC3	CREB 制御転写共活性化因子 3
CSF1R	コロニー刺激因子 1 受容体
CTNBN1	カテニン(カドヘリン結合タンパク質)、ベータ 1、88kDa
CXCR7	ケモカイン(C-X-C モチーフ)受容体 7
CYLD	円柱腫形成(ターバン腫瘍症候群)
CYP1B1	シトクロム P450、ファミリー1、サブファミリーB、ポリペプチド 1
DAXX	デスドメイン関連タンパク質

10

20

30

40

【表 2 - 4】

DDB2	損傷特異的 DNA 結合タンパク質 2、48kDa
DDIT3	DNA 損傷誘導性転写物 3
DDX10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスポリペプチド 10
DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスヘリカーゼ 5
DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスヘリカーゼ 6
DEK	DEK がん遺伝子
DICER1	dicer 1、III 型リボヌクレアーゼ
DNMT3A	DNA (シトシン-5-)-メチル基転移酵素 3 アルファ
DUX4	二重ホメオボックス 4
EBF1	初期 B 細胞因子 1
EGFR	上皮成長因子受容体
EIF4A2	真核生物翻訳開始因子 4A2
ELAC2	elaC ホモログ 2 (E. coli)
ELF4	E74 様因子 4 (ets ドメイン転写因子)
ELK4	ELK4、ETS ドメインタンパク質 (SRF アクセサリータンパク質 1)
ELL	伸長因子 RNA ポリメラーゼ II
ELN	エラスチン
EML4	棘皮動物微小管結合タンパク質様 4
EP300	E1A 結合タンパク質 p300
EPCAM	上皮細胞接着分子
EPHA10	EPH 受容体 A10
EPHA3	EPH 受容体 A3
EPHA5	EPH 受容体 A5
EPHA6	EPH 受容体 A6
EPHB6	EPH 受容体 B6
EPS15	上皮成長因子受容体経路基質 15
ERBB2	v-erb-b2 赤芽球性白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ 2、神経芽腫/ 神経膠芽腫由来がん遺伝子ホモログ (鳥)
ERBB3	v-erb-b2 赤芽球性白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ 3 (鳥)
ERBB4	v-erb-a 赤芽球性白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ 4 (鳥)
ERC1	ELKS/RAB6 相互作用/CAST ファミリーメンバー1
ERCC1	除去修復交差相補性齧歯類修復欠損、相補グループ 1 (オーバーラッ プしているアンチセンス配列を含む)
ERCC2	除去修復交差相補性齧歯類修復欠損、相補グループ 2
ERCC3	除去修復交差相補性齧歯類修復欠損、相補グループ 3
ERCC4	除去修復交差相補性齧歯類修復欠損、相補グループ 4
ERCC5	除去修復交差相補性齧歯類修復欠損、相補グループ 5
ERG	v-ets 赤芽球症ウイルス E26 がん遺伝子ホモログ (鳥)
ETV1	ets バリエント 1
ETV4	ets バリエント 4
ETV5	ets バリエント 5
ETV6	ets バリエント 6
EWSR1	ユーイング肉腫ブレイクポイント領域 1
EXT1	エキソストシン 1
EXT2	エキソストシン 2
EZH2	zeste ホモログ 2 のエンハンサー (ショウジョウバエ)
FAM123B	配列類似性を有するファミリー123B

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

FAM22A	配列類似性を有するファミリー 22、メンバーA
FAM22B	配列類似性を有するファミリー22、メンバーB
FAM46C	配列類似性を有するファミリー46、メンバーC
FANCA	ファンconi貧血、相補グループ A
FANCC	ファンconi貧血、相補グループ C
FANCD2	ファンconi貧血、相補グループ D2
FANCE	ファンconi貧血、相補グループ E
FANCF	ファンconi貧血、相補グループ F
FANCG	ファンconi貧血、相補グループ G
FAS	Fas (TNF 受容体スーパーファミリー、メンバー6)
FBXO11	F ボックスタンパク質 11
FBXW7	F ボックスおよび WD 反復ドメイン含有 7、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ
FCGR2B	IgG の Fc 断片、低親和性 IIb、受容体 (CD32)
FCRL4	Fc 受容体様 4
FEV	FEV (ETS がん遺伝子ファミリー)
FGF23	線維芽細胞増殖因子 23
FGFR1	線維芽細胞増殖因子受容体 1
FGFR1OP	FGFR1 がん遺伝子パートナー
FGFR2	線維芽細胞増殖因子受容体 2
FGFR3	線維芽細胞増殖因子受容体 3
FGFR4	線維芽細胞増殖因子受容体 4
FH	フマル酸ヒドラターゼ
FHIT	脆弱性ヒスチジン三連残基
FHL1	4.5LIM ドメイン 1
FIP1L1	FIP1 様 1 (S. cerevisiae)
FKBP1B	FK506 結合タンパク質 1B、12.6 kDa
FKBP9	FK506 結合タンパク質 9、63 kDa
FLCN	フォリクリン
FLI1	フレンド白血病ウイルスインテグレーション 1
FLT1	特徴付けされていないタンパク質 LOC145788
FLT3	fms 関連チロシキナーゼ 3
FLT4	fms 関連チロシキナーゼ 4
FNBP1	フォルミン結合タンパク質 1
FOLR1	葉酸受容体 1 (成体)
FOXC1	フォークヘッドボックス C1
FOXL2	フォークヘッドボックス L2
FOXO1	フォークヘッドボックス O1
FOXO3	フォークヘッドボックス O3
FOXO4	フォークヘッドボックス O4
FOXP1	フォークヘッドボックス P1
FSTL3	フォリスタチン様 3 (分泌型糖タンパク質)
FUBP1	遠位上流因子 (FUSE) 結合タンパク質 1
FUS	融合、肉腫内
GALNT3	UDP-N-アセチル-アルファ-D-ガラクトサミン:ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 3 (GalNAc-T3)
GAS7	増殖停止特異的 7

10

20

30

40

【表 2 - 6】

GATA1	GATA 結合タンパク質 1(グロビン転写因子 1)
GATA2	GATA 結合タンパク質 2
GATA3	GATA 結合タンパク質 3
GLMN	グロムリン、FKBP 関連タンパク質
GMPS	グアニン-リン酸合成酵素
GNA11	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(G タンパク質)、アルファ 11(Gq クラス)
GNAQ	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(G タンパク質)、q ポリペプチド
GNAS	GNAS 複合遺伝子座
GOLGA5	ゴルジン A5
GOPC	ゴルジ結合 PDZ およびコイルドコイルモチーフ含有
GPC3	グリピカン 3
GPHN	ゲフィリン
GSTM1	グルタチオン S 転移酵素 mu 1
GUCY1A2	グアニル酸シクラーゼ 1、可溶性、アルファ 2
HECW1	HECT、C2 および WWドメイン含有 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ 1
HERPUD1	ホモシステイン誘導性、小胞体ストレス誘導性、ユビキチン様ドメインメンバー1
HEY1	YRPW モチーフ関連ヘアリー/エンハンサー・オブ・スプリット(hairy/enhancer-of-split)1
HIP1	ハンチントン相互作用タンパク質 1
HIST1H4I	ヒストンクラスター1、H4i
HLF	肝白血病因子
HMGA1	高泳動群 AT フック 1
HMGA2	高泳動群 AT フック 2
HMGN2P46	高泳動群ヌクレオソーム結合ドメイン 2 偽遺伝子 46
HNF1A	HNF1 ホメオボックス A
HNRNPA2B1	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 A2/B1
HOOK3	フックホモログ 3(ショウジョウバエ)
HOXA11	ホメオボックス A11
HOXA13	ホメオボックス A13
HOXA9	ホメオボックス A9
HOXC11	ホメオボックス C11
HOXC13	ホメオボックス C13
HOXD11	ホメオボックス D11
HOXD13	ホメオボックス D13
HRAS	v-Ha-ras ハーベイラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ
HSD17B3	ヒドロキシステロイド(17-ベータ)デヒドロゲナーゼ 3
HSD3B2	ヒドロキシ-デルタ-5-ステロイドデヒドロゲナーゼ、3 ベータ-およびステロイドデルタ-イソメラーゼ 2
HSP90AA1	熱ショックタンパク質 90kDa アルファ(サイトゾル)、クラス A メンバー1
HSP90AB1	熱ショックタンパク質 90kDa アルファ(サイトゾル)、クラス B メンバー1
IDH1	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1(NADP+)、可溶性
IDH2	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2(NADP+)、ミトコンドリア
IGF1R	インスリン様成長因子 1 受容体
IKBKE	B 細胞におけるカッパ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの阻害因子、キナーゼイブシロン

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

IKZF1	IKAROS ファミリージンクフィンガー1(イカロス)
IL2	インターロイキン 2
IL21R	インターロイキン 21 受容体
IL6ST	インターロイキン 6 シグナル伝達因子(gp130、オンコスタチン M 受容体)
IL7R	インターロイキン 7 受容体
IRF4	インターフェロン制御因子 4
ITK	IL2 誘導性 T 細胞キナーゼ
JAK1	ヤヌスキナーゼ 1
JAK2	ヤヌスキナーゼ 2
JAK3	ヤヌスキナーゼ 3
JAZF1	JAZF ジンクフィンガー1
JUN	jun がん原遺伝子
KAT6A	K(リジン)アセチル基転移酵素 6A
KAT6B	K(リジン)アセチル基転移酵素 6B
KDM5A	リジン(K)特異的脱メチル化酵素 5A
KDM5C	リジン(K)特異的脱メチル化酵素 5C
KDM6A	リジン(K)特異的脱メチル化酵素 6A
KDR	キナーゼ挿入ドメイン受容体(III 型受容体型チロシンキナーゼ)
KDSR	3-ケトジヒドロスフィンゴシン還元酵素
KEAP1	kelch 様 ECH 結合タンパク質 1
KIAA1549	KIAA1549
KIF1B	キネシンファミリーメンバー1B
KIT	v-kit ハーディ・ズッカーマン 4 ネコ肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ
KL	クロトー
KLF6	クルッペル様因子 6
KLK2	カリクレイン関連ペプチダーゼ 2
KRAS	v-Ki-ras2 カーステンラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ
KRT17	ケラチン 17
KTN1	キネクチン 1 (キネシン受容体)
LASP1	LIM および SH3 タンパク質 1
LCK	リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ
LCP1	リンパ球サイトゾルタンパク質 1(L-プラスチン)
LHFP	脂肪腫 HMGIC 融合パートナー
LIFR	白血病阻害因子受容体アルファ
LMO1	LIM ドメインオンリー1(ロンボチン 1)
LMO2	LIM ドメインオンリー2(ロンボチン様 1)
LPP	LIM ドメイン含有優先転座パートナー、脂肪腫中
LRP5	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 5
LTBP2	潜在型トランスフォーミング増殖因子ベータ結合タンパク質 2
LTBP3	潜在型トランスフォーミング増殖因子ベータ結合タンパク質 3
LYL1	リンパ芽球性白血病由来配列 1
MAD2L1BP	MAD2L1 結合タンパク質
MAF	v-maf 筋腱膜線維肉腫がん遺伝子ホモログ(鳥)
MAFB	v-maf 筋腱膜線維肉腫がん遺伝子ホモログ B(鳥)
MALAT1	転移関連肺腺癌転写物 1(タンパク質非コード)
MALT1	粘膜関連リンパ組織リンパ腫転座遺伝子 1

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

MAML2	mastermind 様 2(ショウジョウバエ)
MAP2K1	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ 1
MAP2K2	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ 2
MAP2K4	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ 4
MAP3K1	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 1、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ
MAP3K8	分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 8
MAX	MYC 関連因子 X
MC1R	メラノコルチン 1 受容体(アルファメラノサイト刺激ホルモン受容体)
MCL1	骨髄細胞白血病配列 1(BCL2 関連)
MDM2	Mdm2、p53 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼホモログ(マウス)
MDM4	Mdm4 p53 結合タンパク質ホモログ(マウス)
MDS2	骨髄異形成症候群 2 転座関連
MECOM	MDS1 および EVI1 複合遺伝子座
MED12	メディエーター複合体サブユニット 12
MEN1	多発性内分泌腫瘍症 1
MET	met がん原遺伝子(肝細胞増殖因子受容体)
MITF	小眼球症関連転写因子
MKL1	巨核芽球性白血病(転座)1
MLF1	骨髄性白血病因子 1
MLH1	mutL ホモログ 1、大腸がん、非ポリポーシス型 2(E. coli)
MLL	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ)
MLL2	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病 2
MLL3	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病 3
MLLT1	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ); 転座、1
MLLT10	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ); 転座、10
MLLT11	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ); 転座、11
MLLT3	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ); 転座、3
MLLT4	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ); 転座、4
MLLT6	骨髄性/リンパ性または混合系統白血病(トリソラックスホモログ、ショウジョウバエ); 転座、6
MN1	髄膜腫(均衡転座において破壊)1
MNX1	運動ニューロンおよび膵臓ホメオボックス 1
MPL	骨髄増殖性白血病ウイルスがん遺伝子
MRE11A	MRE11 減数分裂組換え 11 ホモログ A(S. cerevisiae)
MSH2	mutS ホモログ 2、大腸がん、非ポリポーシス型 1(E. coli)
MSH6	mutS ホモログ 6(E. coli)
MSI2	musashi ホモログ 2(ショウジョウバエ)
MSN	モエシン
MTCP1	成熟 T 細胞増殖 1
MTCP1NB	成熟 T 細胞増殖 1 近傍

10

20

30

40

【表 2 - 9】

MTOR	ラパマイシンのメカニズム標的(セリン/スレオニンキナーゼ)
MTUS2	微小管結合腫瘍抑制因子候補 2
MUC1	ムチン 1、細胞表面結合
MUTYH	mutY ホモログ (E. coli)
MYB	v-myb 骨髄芽球性ウイルスがん遺伝子ホモログ(鳥)
MYC	v-myc 骨髄球腫症ウイルスがん遺伝子ホモログ(鳥)
MYCL1	v-myc 骨髄球腫症ウイルスがん遺伝子ホモログ 1、肺癌腫由来(鳥)
MYCN	v-myc 骨髄球腫症ウイルス関連がん遺伝子、神経芽腫由来(鳥)
MYD88	骨髄分化初期応答遺伝子(88)
MYH11	ミオシン、重鎖 11、平滑筋
MYH9	ミオシン、重鎖 9、非筋肉
MYOC	ミオシリン、小柱網誘導性グルココルチコイド応答
NACA	新生ポリペプチド関連複合体アルファサブユニット
NBN	ニブリン
NCKIPSD	SH3ドメインを含む NCK 相互作用タンパク質
NCOA1	核受容体共活性化因子 1
NCOA2	核受容体共活性化因子 2
NCOA4	核受容体共活性化因子 4
NDRG1	N-myc 下流制御 1
NF1	ニューロフィブロミン 1
NF2	ニューロフィブロミン 2(マーリン)
NFE2L2	核因子(赤血球由来 2)様 2
NFIB	核因子 I/B
NFKB2	B 細胞におけるカッパ軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子 2(p49/p100)
NIN	ニネイン(GSK3B 相互作用タンパク質)
NKX2-1	NK2 ホメオボックス 1
NONO	非 POUドメイン含有、八量体結合
NOTCH1	ノッチ 1
NOTCH2	ノッチ 2
NOTCH3	ノッチ 3
NOTCH4	ノッチ 4
NPM1	ヌクレオフォスミン(核小体ホスホタンパク質 B23、ヌマトリン)
NR4A3	核受容体サブファミリー4、グループ A、メンバー3
NRAS	神経芽腫 RAS ウイルス(v-ras)がん遺伝子ホモログ
NSD1	核受容体結合 SETドメインタンパク質 1
NTRK1	神経栄養チロシンキナーゼ、受容体、1 型
NTRK2	神経栄養チロシンキナーゼ、受容体、2 型
NTRK3	神経栄養チロシンキナーゼ、受容体、3 型
NUMA1	核有糸分裂装置タンパク質 1
NUP214	ヌクレオポリン 214kDa
NUP98	ヌクレオポリン 98kDa
OLIG2	オリゴデンドロサイト系譜転写因子 2
OMD	オステオモジュリン
OPTN	オプチニューリン
P2RY8	プリン受容体 P2Y、G タンパク質共役、8
PAFAH1B2	血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ 1b、触媒性サブユニット 2

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

	(30kDa)
PAK7	p21 タンパク質 (Cdc42/Rac) 活性化キナーゼ 7
PALB2	BRCA2 のパートナーおよび局在化因子
PALLD	パラジン、細胞骨格関連タンパク質
PATZ1	POZ (BTB) および AT フック含有ジンクフィンガー1
PAX2	ペアードボックス 2
PAX3	ペアードボックス 3
PAX5	ペアードボックス 5
PAX6	ペアードボックス 6
PAX7	ペアードボックス 7
PAX8	ペアードボックス 8
PBRM1	ポリブロモ 1
PBX1	プレ B 細胞白血病ホメオボックス 1
PCM1	中心体周辺物質 1
PCSK7	プロタンパク質変換酵素サブチリシン/ケキシシン 7 型
PDCD1LG2	プログラム細胞死 1 リガンド 2
PDE4DIP	ホスホジエステラーゼ 4D 相互作用タンパク質
PDGFB	血小板由来増殖因子ベータポリペプチド
PDGFRA	血小板由来増殖因子受容体、アルファポリペプチド
PDGFRB	血小板由来増殖因子受容体、ベータポリペプチド
PDPK1	3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ-1
PER1	ペリオドホモログ 1 (ショウジョウバエ)
PHF6	PHD フィンガータンパク質 6
PHOX2B	paired 様ホメオボックス 2b
PICALM	ホスファチジルイノシトール結合クラスリン集合タンパク質
PIK3CA	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、触媒性、アルファポリペプチド
PIK3R1	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、制御性サブユニット 1 (アルファ)
PIM1	pim-1 がん遺伝子
PLAG1	多形腺腫遺伝子 1
PLK1	ボロ様キナーゼ 1
PML	前骨髄球性白血病
PMS1	PMS1 減数分裂後分離増加 1 (S. cerevisiae)
PMS2	PMS2 減数分裂後分離増加 2 (S. cerevisiae)
POU2AF1	POU クラス 2 関連因子 1
POU5F1	POU クラス 5 ホメオボックス 1
PPARG	ベルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ
PPP2R1A	プロテインホスファターゼ 2、制御性サブユニット A、アルファ
PRCC	乳頭状腎細胞癌 (転座関連)
PRDM1	PR ドメイン含有 1、ZNF ドメインを含む
PRDM16	PR ドメイン含有 16
PRF1	パーフォリン 1 (ポア形成タンパク質)
PRKAR1A	プロテインキナーゼ、cAMP 依存性、制御性、I 型、アルファ (組織特異的消失因子 1)
PRKDC	プロテインキナーゼ、DNA 活性化、触媒性ポリペプチド
PRRX1	paired 関連ホメオボックス 1
PSIP1	PC4 および SFRS1 相互作用タンパク質 1
PTCH1	パッチド 1

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

PTEN	ホスファターゼおよびテンシンホモログ
PTK2	PTK2 タンパク質チロシンキナーゼ 2
PTK2B	PTK2B タンパク質チロシンキナーゼ 2 ベータ
PTPN11	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型 11
PTPRD	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体型、D
RABEP1	ラバプチン、RAB GTP アーゼ結合エフェクタータンパク質 1
RAD51B	RAD51 ホモログ B (<i>S. cerevisiae</i>)
RAF1	v-raf-1 マウス白血病ウイルスがん遺伝子ホモログ 1
RALGDS	ral グアニンヌクレオチド解離刺激因子
RANBP17	RAN 結合タンパク質 17
RAP1GDS1	RAP1、GTP-GDP 解離刺激因子 1
RARA	レチノイン酸受容体、アルファ
RB1	網膜芽細胞腫 1
RBM15	RNA 結合モチーフタンパク質 15
RECQL4	RecQ タンパク質様 4
REL	v-rel 網膜内皮症ウイルスがん遺伝子ホモログ (鳥)
RET	ret がん原遺伝子
RHOH	ras ホモログファミリーメンバーH
RICTOR	MTOR の RPTOR 非依存性コンパニオン、複合体 2
RMI2	RMI2、RecQ 媒介型ゲノム不安定性 2、ホモログ (<i>S. cerevisiae</i>)
RNASEL	リボヌクレアーゼ L (2,5-オリゴイソアデニル酸合成酵素依存性)
ROS1	c-ros がん遺伝子 1、受容体型チロシンキナーゼ
RPL22	リボソームタンパク質 L22
RPN1	リボフォリン I
RPTOR	MTOR の制御関連タンパク質、複合体 1
RRM1	リボヌクレオチド還元酵素 M1
RUNX1	runt 関連転写因子 1
RUNX1T1	runt 関連転写因子 1; 転座、1 (サイクリン D 関連)
SARDH	サルコシンデヒドロゲナーゼ
SBDS	シュワツハマン・ボーディアン・ダイヤモンド症候群
SDHAF2	コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体集合因子 2
SDHB	コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、サブユニット B、鉄硫黄 (Ip)
SDHC	コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、サブユニット C、内在性膜タンパク質、15kDa
SDHD	コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、サブユニット D、内在性膜タンパク質
SEPT5	セプテン 5
SEPT6	セプテン 6
SEPT9	セプテン 9
SET	SET 核内がん遺伝子
SETD2	SETドメイン含有 2
SETDB1	SETドメイン、分岐 1
SF3B1	スプライシング因子 3b、サブユニット 1、155kDa
SF3B2	スプライシング因子 3b、サブユニット 2、145kDa
SFPQ	スプライシング因子プロリン/グルタミンリッチ
SH3GL1	SH3ドメイン GRB2 様 1
SLC45A3	溶質キャリアファミリー45、メンバー3
SMAD2	SMAD ファミリーメンバー2

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

SMAD3	SMAD ファミリーメンバー3
SMAD4	SMAD ファミリーメンバー4
SMARCA4	SWI/SNF 関連、マトリックス関連、アクチン依存性クロマチン制御因子、サブファミリーa、メンバー4
SMARCB1	SWI/SNF 関連、マトリックス関連、アクチン依存性クロマチン制御因子、サブファミリーb、メンバー1
SMO	smoothened、frizzled ファミリー受容体
SNX29	ソーティングネキシン 29
SOCS1	サイトカインシグナル伝達抑制因子 1
SOX2	SRV(Y 染色体性決定領域)ボックス 2
SPECC1	カルボニン相同性およびコイルドコイルドメインを含む精子抗原 1
SPEN	spen ホモログ、転写制御因子(ショウジョウバエ)
SRC	v-src 肉腫(Schmidt-Ruppin A-2)ウイルスがん遺伝子ホモログ(鳥)
SRD5A2	ステロイド5-アルファ還元酵素、アルファポリペプチド 2(3-オキシ-5アルファ-ステロイドデルタ 4-デヒドロゲナーゼアルファ 2)
SRGAP3	SLIT-ROBO Rho GTP アーゼ活性化タンパク質 3
SRSF2	セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 2
SRSF3	セリン/アルギニンリッチスプライシング因子 3
SS18	滑膜肉腫転座、18 番染色体
SS18L1	18 番染色体上の滑膜肉腫転座遺伝子様 1
SSX1	滑膜肉腫、X ブレークポイント 1
SSX2	滑膜肉腫、X ブレークポイント 2
SSX4	滑膜肉腫、X ブレークポイント 4
STAT3	シグナル伝達兼転写活性化因子 3(急性期応答因子)
STIL	SCL/TAL1 中断遺伝子座
STK11	セリン/スレオニンキナーゼ 11
STX11	シンタキシン 11
STXBP2	シンタキシン結合タンパク質 2
SUFU	fused ホモログ抑制因子(ショウジョウバエ)
SUZ12	zeste 12 ホモログ抑制因子(ショウジョウバエ)
SYK	脾臓チロシンキナーゼ
TAF15	TAF15 RNA ポリメラーゼ II、TATA ボックス結合タンパク質(TBP)関連因子、68kDa
TAL1	T 細胞急性リンパ性白血病 1
TAL2	T 細胞急性リンパ性白血病 2
TCEA1	転写伸長因子 A(SII)、1
TCEA1P2	転写伸長因子 A(SII)、1 偽遺伝子 2
TCF12	転写因子 12
TCF3	転写因子 3(E2A 免疫グロブリンエンハンサー結合因子 E12/E47)
TCF4	転写因子 4
TCF7L2	転写因子 7 様 2(T 細胞特異的、HMG ボックス)
TCL1A	T 細胞白血病/リンパ腫 1A
TCL6	T 細胞白血病/リンパ腫 6(タンパク質非コード)
TERT	テロメラーゼ逆転写酵素
TET1	tet メチルシトシンジメチル化酵素 1
TET2	tet メチルシトシンジメチル化酵素 2
TFE3	IGHM エンハンサーに結合する転写因子 3

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

TFEB	転写因子 EB
TFG	TRK 融合遺伝子
TFPT	TCF3(E2A) 融合パートナー (小児白血病における)
TFRC	トランスフェリン受容体 (p90, CD71)
TGFR2	トランスフォーミング増殖因子、ベータ受容体 II (70/80kDa)
THRAP3	甲状腺ホルモン受容体関連タンパク質 3
TLX1	T 細胞白血病ホメオボックス 1
TLX3	T 細胞白血病ホメオボックス 3
TMEM127	膜貫通タンパク質 127
TMPRSS2	膜貫通プロテアーゼ、セリン 2
TNFAIP3	腫瘍壊死因子、アルファ誘導タンパク質 3
TNFRSF14	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 14
TNFRSF17	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 17
TOP1	トポイソメラーゼ (DNA) I
TOP2A	トポイソメラーゼ (DNA) II アルファ 170kDa
TP53	腫瘍タンパク質 p53
TPM3	トロポミオシン 3
TPM4	トロポミオシン 4
TPR	転座プロモーター領域、核バスケットタンパク質
TRIM24	三要素モチーフ含有 24
TRIM27	三要素モチーフ含有 27
TRIM33	三要素モチーフ含有 33
TRIP11	甲状腺ホルモン受容体相互作用因子 11
TSC1	結節性硬化症 1
TSC2	結節性硬化症 2
TSHR	甲状腺刺激ホルモン受容体
TTL	チューブリンチロシンリガーゼ
TYK2	チロシンキナーゼ 2
U2AF1	U2 核内低分子 RNA 補助因子 1
UNC13D	unc-13 ホモログ D (C. elegans)
USP6	ユビキチン特異的ペプチダーゼ 6 (Tre-2 がん遺伝子)
UTY	広範に転写されるテトラトリコペプチド反復配列遺伝子、Y 染色体連鎖
VHL	von Hippel-Lindau 腫瘍抑制因子、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ
VTI1A	t-SNARE ホモログとの相互作用による小胞輸送 1A (酵母)
WAS	Wiskott-Aldrich 症候群 (湿疹-血小板減少症)
WDR36	WD 反復配列ドメイン 36
WHSC1	Wolf-Hirschhorn 症候群候補 1
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn 症候群候補 1 様 1
WIF1	WNT 阻害因子 1
WRN	ウェルナー症候群、RecQ ヘリカーゼ様
WT1	ウィルムス腫瘍 1
XPA	色素性乾皮症、相補グループ A
XPC	色素性乾皮症、相補グループ C
XPO1	エクスポーチン 1 (CRM1 ホモログ、酵母)
YWHAE	チロシン 3-モノオキシゲナーゼ/トリプトファン 5-モノオキシゲナーゼ活性化タンパク質、イプシロンポリペプチド
ZBTB16	ジンクフィンガーおよび BTB ドメイン含有 16

10

20

30

40

【表 2 - 1 4】

ZMYM2	ジンクフィンガー、MYM-2 型
ZNF331	ジンクフィンガータンパク質 331
ZNF384	ジンクフィンガータンパク質 384
ZNF521	ジンクフィンガータンパク質 521
ZNF668	ジンクフィンガータンパク質 668
ZRSR2	ジンクフィンガー (CCCH 型)、RNA 結合モチーフおよびセリン/アルギニンリッチ 2

10

【0 1 1 9】

一態様では、本開示は標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するためのキットを提供する。キットは、任意の組合せで任意の種々の態様に関連する本明細書に開示した1つまたは複数の要素を含むことができる。一部の実施形態では、キットは、(a) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマー、(b) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一であり、前記コンカテマーが前記第1のプライマーの延長産生物である、第2のプライマー、ならびに(c) 配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第3のプライマーを含む。キット中の試薬およびその他の材料は任意の好適な容器に入れられていてもよく、直ちに使用可能な形態であってもよいし、またはキット中の他の試薬もしくは使用者によって供給される試薬と組み合わせること(例えば、濃縮組成物の希釈または凍結乾燥組成物の再構成)を必要としてもよい。キットは緩衝液を提供することができ、その非限定的な例には、炭酸ナトリウム緩衝液、重炭酸ナトリウム緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、トリス緩衝液、MOPS緩衝液、HEPES緩衝液、およびこれらの組合せが含まれる。キットは対照試料、例えば、陽性対照または定量標準として用いるための精製DNAを含んでもよい。一部の実施形態では、キットはポリヌクレオチドを増幅するための1つまたは複数の酵素、例えば1つまたは複数の逆転写酵素およびポリメラーゼを含む。所望であれば、本キットは増幅産生物の集積をリアルタイム等でモニタリングすることを可能にする1つまたは複数の検出可能なマーカーをさらに含んでもよい。検出可能なマーカーの非限定的な例は上に述べたが、増幅ステップの間に二本鎖DNAに優先的にまたは排他的に結合するSYBR緑色素またはEBB色素等の色素が挙げられる。一部の実施形態では、キットは増幅反応の進行または産生物を検出するためのフルオロフォアおよびクエンチャーを含むプローブオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、キットは本明細書に開示した1つまたは複数の方法にしたがってキットを使用するための説明書を含む。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列は同一である。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに±5 以内の融解温度(T_m)を有する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i) 前記第1の3'末端に相補的な配列、(ii) 前記第2の3'末端と同一の配列、および(iii) (i)と(ii)との間の介在配列に対応する、標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さは75ヌクレオチドまたはそれ未満である。

20

30

40

【0 1 2 0】

一態様では、本開示は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも2つまたはそれより多いコピーのコンカテマーを含むアンプリコンを富化するのに使用するためのプライマーを設計す

50

るためのシステムを提供する。プライマーは、本開示の任意の種々の態様に関連する本明細書に開示した任意の特徴を含むことができる。一部の実施形態では、システムは、(a) 特定の標的配列を増幅するためのプライマーを設計するための利用者の要求を受けるように構成されたコンピュータ、(b) 1つまたは複数のプロセッサによる実行によって前記標的配列を増幅のための少なくとも3つのプライマーを設計するコードを含むコンピュータ読み込み可能な媒体であって、前記少なくとも3つのプライマーが、(i) 配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする第1の3'末端、および配列相補性によって前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズしない第1の共通配列を含む第1の5'末端を含む第1のプライマー、(ii) 配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズする第2の3'末端、および配列相補性によって前記コンカテマーに特異的にハイブリダイズしない第2の共通配列を含む第2の5'末端を含む第2のプライマーであって、前記第1の共通配列および前記第2の共通配列が、それぞれ5'末端に少なくとも10個の連続するヌクレオチドを含み、最適にアライメントした場合に少なくとも90%同一であり、前記コンカテマーが前記第1のプライマーの延長産生物である、第2のプライマー、ならびに(iii) 配列相補性によって前記第1の共通配列または前記第2の共通配列に特異的にハイブリダイズする配列を有する第3のプライマーを含む、コンピュータ読み込み可能な媒体、ならびに(c) 受容者にレポートを送るレポートジェネレータであって、前記レポートが前記少なくとも3つのプライマーの配列を含む、レポートジェネレータを含む。一部の実施形態では、第1の共通配列と第2の共通配列とは同一である。一部の実施形態では、第1の共通配列、第2の共通配列、および第3のプライマーのハイブリダイジング配列は、全て互いに ± 5 以内の融解温度(T_m)を有する。一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドに沿って5'から3'に向かって(i) 第1の3'末端に相補的な配列、(ii) 第2の3'末端と同一の配列、および(iii) (i)と(ii)との間の介在配列に対応する、標的ポリヌクレオチドの配列部分を併せた長さは75ヌクレオチドまたはそれ未満である。

【0121】

一部の実施形態では、コンピュータは1つまたは複数のプロセッサを含む。プロセッサには1つまたは複数のコントローラ、計算ユニット、および/またはコンピュータシステムの他のユニットが付随し、または所望によりファームウェアに埋め込まれてよい。ソフトウェアで実装する場合には、ルーチンは任意のコンピュータ読み込み可能なメモリ、例えばRAM、ROM、フラッシュメモリ、磁気ディスク、レーザーディスク(登録商標)、または他の保存媒体に保存してよい。同様に、このソフトウェアは任意の公知の送達方法を介して、例えば電話線、インターネット、無線接続、その他等の通信チャネルを通して、またはコンピュータ読み込み可能なディスク、フラッシュドライブ、その他等の可搬型媒体を介して、コンピューティングデバイスに送達することができる。種々のステップは種々のブロック、操作、ツール、モジュール、または技法として実装でき、これらはまた、ハードウェア、ファームウェア、ソフトウェア、またはこれらの任意の組合せで実装できる。ハードウェアで実装する場合には、ブロック、操作、技法等のいくつかまたは全部は、例えばカスタム集積回路(IC)、アプリケーション特有集積回路(ASIC)、フィールドプログラマブル論理アレイ(FPGA)、プログラマブル論理アレイ(PLA)等で実装できる。一部の実施形態では、コンピュータは利用者の要求を受けて、特定された標的配列(これも利用者によって提供され得る)を増幅するためのプライマーを設計するように構成される。コンピュータは利用者の要求を直接(例えば利用者の要求を入力する利用者または使用者によって操作されるキーボード、マウス、もしくはタッチスクリーン等の入力デバイスによって)、または間接的に(例えばインターネット上を含む有線または無線接続を通して)受けることができる。

【0122】

一部の実施形態では、システムは、少なくとも3つのプライマーの配列を含むレポートを受容者に送るレポートジェネレータを含む。レポートジェネレータは利用者の要求に応じて自動的にレポートを送ってよい。あるいは、レポートジェネレータはオペレータからの

10

20

30

40

50

指示に応じてレポートを送ってよい。レポートは任意の好適な通信媒体を用いてローカルまたはリモートの場所にある受容者に送信される。例えば通信媒体はネットワーク接続、無線接続、またはインターネット接続であってよい。レポートは、そのようなネットワークまたは接続（またはこれだけに限らないが、プリントアウト等の物理的レポートをメールすることを含む他の任意の好適な情報を送信する手段）を通して受容者が受容しおよび／または閲覧できるように送信することができる。受容者は、これだけに限らないが利用者または電子システム（例えば１つまたは複数のコンピュータ、および／または１つまたは複数のサーバ）であってよい。一部の実施形態では、レポートジェネレータはパソコン、電話、タブレット、またはその他のデバイス等の受容者のデバイスにレポートを送る。レポートはオンラインで閲覧され、受容者のデバイスに保存され、または印刷され得る。

10

【 0 1 2 3 】

一態様では、本開示は１つまたは複数のプロセッサによる実行によって本明細書に開示する方法のいずれかによる方法を実装するコードを含むコンピュータ読み込み可能な媒体を提供する。コンピュータ読み込み可能な媒体は、これだけに限らないが、有形的保存媒体、搬送波媒体、または物理的送信媒体を含む多くの形態であってよい。非揮発性保存媒体には、例えば計算ステップ、プロセッシングステップ等を実装するために用いられ得るような任意のコンピュータ等の保存デバイスのいずれか等の光学ディスクまたは磁気ディスクが含まれる。揮発性保存媒体には、コンピュータのメインメモリ等のダイナミックメモリが含まれる。有形的送信媒体には同軸ケーブル、コンピュータシステムの内部のバスを含むワイヤ等の銅ワイヤおよび光学ファイバーが含まれる。搬送波送信媒体はラジオ周波数（RF）および赤外（IR）データ通信の際に発生するような電気もしくは電磁気信号、または音波または光波の形態であってよい。したがってコンピュータ読み込み可能な媒体の一般的な形態には、例えばフロッピー（登録商標）ディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、他の任意の磁気媒体、CD-ROM、DVDもしくはDVD-ROM、他の任意の光学媒体、パンチカード、紙テープ、孔のパターンを有する他の任意の物理的保存媒体、RAM、PROMおよびEPROM、FLASH-EPROM、他の任意のメモリチップもしくはカートリッジ、搬送波輸送データもしくは指示、そのような搬送波を輸送するケーブルまたはリンク、またはそれからコンピュータがプログラムコードおよび／もしくはデータを読み込むことができる他の任意の媒体が含まれる。コンピュータ読み込み可能な媒体のこれらの形態の多くは、プロセッサに実行させるための１つまたは複数の指示の１つまたは複数の配列の輸送に関与し得る。

20

30

【実施例】

【 0 1 2 4 】

以下の実施例は本発明の種々の実施形態を説明するために与えられ、いかなる様式でも本発明を限定することを意味していない。本実施例は、本明細書に記載した方法とともに、好ましい実施形態を今のところ代表するものであり、例示的であって、本発明の範囲を限定することを意図していない。その変更および特許請求の範囲によって定義される本発明の精神の中に包含されるその他の使用が、当業者には生じるであろう。

（実施例１）

１サイクルRCA増幅および複数サイクルRCA増幅からの産生物の比較

40

【 0 1 2 5 】

ゲノムDNAを超音波処理して、平均断片サイズをほぼ180bpとした。断片化したDNAを0.9×Ampureビーズで精製して、100bpより小さい断片を除去した。次いで超音波処理したDNAをライゲーションして環状標的ポリヌクレオチドを形成させた。ライゲーションのため、12μlの精製したDNA断片(>10μg)を95で30秒加熱し、氷の上で2分間冷やすことによって変性させた。次いで変性したDNA試料に2μlの10×CircLigase緩衝液、4μlの5Mベタイン、1μlの50mM MnCl₂、および1μlのCircLigase IIを含む8μlのライゲーション混合物を加え、反応物を60で少なくとも12時間インキュベートする。ライゲーションプロセスの終了時に、残存する直鎖状一本鎖DNA分子をエクソヌクレアーゼ処理ス

50

テップによって除去した。エクソヌクレアーゼ処理のため、ライゲーション産生物を 80 で 45 秒間加熱し、それに次いで 1 μ l のエクソヌクレアーゼ混合物 (Exo I 20 U/ μ l、Exo II 100 U/ μ l、比 1:2) を加えた。試料をサーマルサイクラーで 37 で 30 分間、次いで 80 で 20 分間インキュベートした。エクソヌクレアーゼ処理の後、1 μ l の 50 mM EDTA を各チューブに加えた。

【0126】

環状標的ポリヌクレオチドを 1 サイクル RCA 増幅または複数サイクル RCA 増幅の対象とした。1 サイクル RCA 増幅および複数サイクル RCA 増幅の両方のため、10 ng の環状化された DNA 試料を出発材料として用いた。各反応のため、0.34 μ L の 1 M Tris-HCl (pH 9.2)、1 μ l の 100 mM MgSO₄、2.78 μ l の 180 mM (NH₄)₂SO₄、0.75 μ L の dNTP 混合物 (それぞれ 25 mM)、0.5 μ l の 10% Tween 20、1.20 μ l の 1 M KCl、2 μ l の 10 μ M バックツバックフォワードプライマーおよびリバースプライマー、18.28 μ l の水をそれぞれ 10 ng の DNA 試料に加えた。反応物を 80 で 1 分間加熱し、63 で 5 分間インキュベートし、その後 4 に冷却した。次に 15 単位の Bst 2.0 ウォームスタート DNA ポリメラーゼを各反応物に加えた。1 サイクルの RCA 増幅については反応物を 63 で 2 時間インキュベートした。複数サイクルの RCA 増幅については、反応物をサーマルサイクラーで以下のプログラム、即ち 60 で 30 秒、70 で 4.5 分、94 で 20 秒、および 58 で 10 秒の 8 サイクルによってインキュベートした。2 サイクルごとの終了時に、15 単位の Bst 2.0 ウォームスタート DNA ポリメラーゼを加えた。

【0127】

全ての増幅産生物を、残存する洗浄ステップのために製造者の説明書に従って 50 μ l の Ampure ビーズを加えることによって精製した。溶出のため、55 μ l の溶出緩衝液を各チューブに加え、ビーズを 65 で 5 分間インキュベートした。短時間の遠心の後、チューブをマグネットに戻した。各反応物から約 50 μ l の溶出産生物が回収された。

【0128】

1 サイクルの RCA からの増幅産生物にアダプターを付着させるため、それぞれ 50 μ l の溶出物を、5.7 μ l の 10 \times AccuPrime 緩衝液、前の増幅反応で用いたプライマーの 3' 末端の共通配列に相補的な 1 μ l の 25 μ M アダプタープライマー、および 2 単位の AccuPrime HiFi Taq ポリメラーゼと混合した。アダプターは、以下の PCR プログラム、即ち 95 で 2 分; 95 で 30 秒、60 で 30 秒、72 で 2.5 分の 30 サイクル; および 72 で 7 分の最終延長を用いた増幅によって付着させた。複数サイクルの RCA からの増幅産生物については、Illumina 社の KAPA ハイパーレップキットを用いてシーケンシングアダプターを付着させた。PCR で増幅したライブラリー産生物を、アガロースゲルまたは次世代シーケンシングによって分析した。シーケンシングデータについてバイオインフォマティクスを実施するため、HiSeq ランから FASTQ ファイルを入手した。FASTQ ファイルは標的配列を含む参照ファイルにアライメントさせた。挿入サイズはシーケンシングデータに基づいて計算した。

【0129】

図 5 のアガロースゲルで定性的に示されるように、B2B プライマーおよび温度サイクリングを用いる増幅によって、1 サイクルの RCA と比較してより多くのポリヌクレオチドコピーを含むアンプリコン、ならびにより長い標的ポリヌクレオチドを含むアンプリコンが得られた。図 6 において、表はアガロースゲルの強度解析による 1 リピート (サイズ約 150 bp)、2 リピート (約 300 bp)、または 3 リピート (約 450 bp) を含む産生物の比の半定量的な比較を提供する。1 サイクルの RCA と比較して、複数サイクルの RCA ではただ 1 つのリピートを有する産生物の相対量が低減していた。

【0130】

増幅産生物のシーケンシング解析により、1 サイクルの RCA と比較して複数サイクルの RCA を用いた場合により大きな DNA 断片の割合が増加していることも示される。図 7

にリードカウントによる断片サイズの分布を示し、図 8 に分子の百分率による観察された分子サイズの分布を示す。

(実施例 2)

ステム構造を有するプライマーまたはステム構造を有しないプライマーのいずれかを用いた複数サイクルの R C A からの産生物の比較

【0131】

ゲノム DNA を超音波処理して、平均断片サイズをほぼ 150 bp とした。断片化した DNA を 0.9 × Ampure ビーズで精製して、100 bp より小さい断片を除去した。次いで超音波処理した DNA をライゲーションして環状標的ポリヌクレオチドを形成させた。ライゲーションのため、12 µl の精製した DNA 断片 (> 10 µg) を 95 で 30 秒加熱し、氷の上で 2 分間冷やすことによって変性させた。次いで変性した DNA 試料に 2 µl の 10 × CircLigase 緩衝液、4 µl の 5 M ベタイン、1 µl の 50 mM MnCl₂、および 1 µl の CircLigase II を含む 8 µl のライゲーション混合物を加え、反応物を 60 で少なくとも 12 時間インキュベートする。ライゲーションプロセスの終了時に、残存する直鎖状一本鎖 DNA 分子をエクソヌクレアーゼ処理ステップによって除去した。エクソヌクレアーゼ処理のため、ライゲーション産生物を 80 で 45 秒間加熱し、それに次いで 1 µl のエクソヌクレアーゼ混合物 (ExoI 20 U/µl、ExoIII 100 U/µl、比 1:2) を加えた。試料をサーマルサイクラーで 37 で 30 分間、次いで 80 で 20 分間インキュベートした。エクソヌクレアーゼ処理の後、1 µl の 50 mM EDTA を各チューブに加えた。

【0132】

環状標的ポリヌクレオチドを、19 マーのステム構造を形成することができるプライマーまたはステム構造なしに設計したプライマーを用いる複数サイクルの R C A 増幅の対象とした。ステム構造を形成することができる例示的な共通配列には、表 1 に示すものおよびその任意の断片が含まれる。

【0133】

各反応のため、0.34 µl の 1 M Tris-HCl (pH 9.2)、1 µl の 100 mM MgSO₄、2.78 µl の 180 mM (NH₄)₂SO₄、0.75 µl の dNTP 混合物 (それぞれ 25 mM)、0.5 µl の 10% Tween 20、1.20 µl の 1 M KCl、2 µl の 10 µM バックツリーブックフォワードプライマーおよびリバープライマー、18.28 µl の水をそれぞれ 10 ng の DNA 試料に加えた。反応物を 80 で 1 分間加熱し、63 で 5 分間インキュベートし、その後 4 に冷却した。次に 15 単位の Bst 2.0 ウォームスタート DNA ポリメラーゼを各反応物に加えた。反応物をサーマルサイクラーで以下のプログラム、即ち 60 で 30 秒、70 で 4.5 分、94 で 20 秒、および 58 で 10 秒の 8 サイクルによってインキュベートした。2 サイクルごとの終了時に、15 単位の Bst 2.0 ウォームスタート DNA ポリメラーゼを加えた。

【0134】

全ての増幅産生物を、残存する洗浄ステップのために製造者の説明書に従って 50 µl の Ampure ビーズを加えることによって精製した。溶出のため、55 µl の溶出緩衝液を各チューブに加え、ビーズを 65 で 5 分間インキュベートした。短時間の遠心の後、チューブをマグネットに戻した。各反応物から約 50 µl の溶出産生物が回収された。

【0135】

Illumina 社の KAPA ハイパープレップキットを用いてシーケンシングアダプターを付着させた。PCR で増幅したライブラリー産生物をアガロースゲルで分析し、サイズ範囲が 550 bp ~ 1000 bp の産生物をシーケンシングのためにさらに収集した。得られた増幅産生物をシーケンシングによって分析した。シーケンシングデータについてパイオインフォーマティクスを実施するため、HiSeq ランから FASTQ ファイルを入手した。FASTQ ファイルは標的配列を含む参照ファイルにアライメントさせた。挿入サイズはシーケンシングデータに基づいて計算した。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 6 】

表 3 に示すように、ステム構造を含む B 2 B プライマーおよび温度サイクリングを用いる増幅によって、より多くのポリヌクレオチドコピーを含むアンプリコンが得られた。1 つより多いリピートを含むシーケンシングリードの百分率を表 3 に示す。ステムを含まないプライマーと比較して、1 9 塩基のステムを含むプライマーを用いた増幅によって 1 つより多いリピートを含むリードの百分率が顕著に増加した。

【表 3】

表 3

RCA に用いたプライマー	リピートを有するリードの%
19 マーのステムを有するプライマー	64.62%
ステムを有しないプライマー	31.49%

10

(実施例 3)

混合ゲノム DNA 試料からの低頻度融合アレルの検出

【 0 1 3 7 】

多くのがんの型で染色体再配列が観察される。本実施例は環状化された DNA 分子およびバックツーバック (B 2 B) プライマーデザインを用いて融合アレルを検出する方法を記載する。本方法により「パートナー」遺伝子に関する予備知識なしに DNA 試料からの融合の検出が可能になり、本方法は無細胞 DNA またはゲノム DNA 試料における遺伝子再配列事象をスクリーニングするために応用することができる。

20

【 0 1 3 8 】

5 0 % の E M L 4 / A L K 融合アレルを含む E M L 4 / A L K DNA 標準参照 (H D 6 6 4 H o r i z o n D i a g n o s t i c s) からのゲノム DNA および参照ゲノム DNA を超音波処理して、平均断片サイズをほぼ 1 5 0 b p とした。断片化した DNA を 0 . 9 × A m p u r e ビーズで精製して、1 0 0 b p より小さい断片を除去した。ライゲーションのため、1 2 μ l の精製した DNA 断片 (> 1 0 n g) を 9 5 で 3 0 秒加熱し、氷の上で 2 分間冷やすことによって変性させた。次いで変性した DNA 試料に 2 μ l の 1 0 × C i r c L i g a s e 緩衝液、4 μ l の 5 M ベタイン、1 μ l の 5 0 m M M n C l 2 、および 1 μ l の C i r c L i g a s e I I を含む 8 μ l のライゲーション混合物を加え、反応物を 6 0 で少なくとも 1 2 時間インキュベートした。ライゲーションプロセスの終了時に、残存する直鎖状一本鎖 DNA 分子をエクソヌクレアーゼ処理ステップによって除去した。エクソヌクレアーゼ処理のため、ライゲーション産物を 8 0 で 4 5 秒間加熱し、次いで 1 μ l のエクソヌクレアーゼ混合物 (E x o I 2 0 U / μ l 、 E x o I I I 1 0 0 U / μ l 、比 1 : 2) を加え、サーマルサイクルで 3 7 で 3 0 分間、次いで 8 0 で 2 0 分間インキュベートした。エクソヌクレアーゼ処理の後、1 μ l の 5 0 m M E D T A を各チューブに加えた。

30

【 0 1 3 9 】

次いで超音波処理したゲノム DNA をライゲーションして環状標的ポリヌクレオチドを形成させた。2 つの環状化された DNA 試料、H D 6 6 4 および参照ゲノム DNA を q P C R によって定量し、その後ともに混合して、濃度に基づいて 2 . 5 % 、 0 . 5 % 、 0 . 0 5 % および 0 % の融合アレルを得た (図 9) 。ローリングサークル増幅のため、それぞれ 1 0 n g の混合した DNA 試料を出発材料として用いた。各反応のため、0 . 3 4 μ l の 1 M T r i s - H C l (p H 9 . 2) 、1 μ l の 1 0 0 m M M g S O 4 、2 . 7 8 μ l の 1 8 0 m M (N H 4) 2 S O 4 、0 . 7 5 μ l の d N T P 混合物 (それぞれ 2 5 m M) 、0 . 5 μ l の 1 0 % T w e e n 2 0 、1 . 2 0 μ l の 1 M K C l 、A L K / E M L 4 融合領域を標的とするよう特に設計した 2 μ l の 1 0 μ M フォワードプライマーおよびリバースプライマー (プライマー配列を表 4 に示す) 、1 8 . 2 8 μ l の水をそれぞれ 1

40

50

0 ng の DNA 試料に加えた。反応物を 80 °C で 1 分間加熱し、63 °C で 5 分間インキュベートし、その後 4 °C に冷却した。各反応物に 15 単位の Bst 2.0 ウォームスタート DNA ポリメラーゼを加え、次いで各反応物を 63 °C で 2 時間インキュベートした。

【表 4】

表 4. ALK 融合物検出のためのフォワードおよびリバースプライマー配列

オリゴ名	オリゴ配列
HD664_ALK_F	CCTTGGCACCCGAGAATTCATTTGAGGGATGGCACCATAT
HD664_ALK_R	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCGGGACAGGATAATAGGAGCTAACA

10

【0140】

増幅産生物を、残存する洗浄ステップのために製造者の説明書に従って 50 μl の Ampure ビーズを加えることによって精製した。溶出のため、55 μl の溶出緩衝液を各チューブに加え、ビーズを 65 °C で 5 分間インキュベートした。短時間の遠心の後、チューブをマグネットに戻した。各反応物から約 50 μl の溶出産生物が回収された。それぞれ 50 μl の溶出物を、5.7 μl の 10×AccuPrime 緩衝液、1 μl の 25 uM の各 Illumina シーケンシングライブラリーアダプタープライマー、および 2 単位の AccuPrime HiFi Taq ポリメラーゼと混合した。増幅によるアダプターの付着には以下の PCR プログラム、即ち 95 °C で 2 分；95 °C で 30 秒、60 °C で 30 秒、72 °C で 2.5 分の 25 サイクル；および 72 °C で 7 分の最終延長を用いた。PCR 産生物をアガロースゲルで分析し、サイズ範囲が 550 bp ~ 1000 bp の産生物をシーケンシングのために収集した。

20

【0141】

シーケンシングデータについてバイオインフォマティクスを実施するため、HiSeq ランから FASTQ ファイルを入手した。FASTQ ファイルは標的配列を含む参照ファイルにアライメントさせた。図 10 に示すように、2.5 %、0.5 %、または 0.05 % の融合アレルをスパイクとして添加した試料では融合アレルが見出されたが、0 % の融合アレルをスパイクとして添加した試料では見出されなかった。

(実施例 4)

B2B プライマーを用いる多重 RCA における標的の検出

30

【0142】

試料中の複数の標的ポリヌクレオチドの構成成分標的ポリヌクレオチドを、複数の RCA および B2B プライマーを用いる増幅で検出した。ヒト血清試料から抽出した対照 cfDNA (H6914, Sigma) 20 ng を全部で 12 μl の Tris pH 8 緩衝液中に再懸濁し、95 °C で 30 秒加熱することによって変性し、氷の上で 2 分間冷やした。次いで変性した DNA 試料に 2 μl の 10×CircLigase 緩衝液、4 μl の 5 M ベタイン、1 μl の 50 mM MnCl₂、および 1 μl の CircLigase II を含む 8 μl のライゲーション混合物を加え、反応物を 60 °C で少なくとも 12 時間インキュベートした。ライゲーションプロセスの終了時に、残存する直鎖状一本鎖 DNA 分子をエクソヌクレアーゼ処理ステップによって除去した。エクソヌクレアーゼ処理のため、ライゲーション産生物を 80 °C で 45 秒間加熱し、次いで 1 μl のエクソヌクレアーゼ混合物 (ExoI 20 U/μl、ExoII 100 U/μl、比 1:2) を加えた。試料をサーマルサイクラーで 37 °C で 30 分間、次いで 80 °C で 20 分間インキュベートした。エクソヌクレアーゼ処理の後、1 μl の 50 mM EDTA を各チューブに加えた。

40

【0143】

環状標的ポリヌクレオチドをローリングサークル増幅の対象とし、次いで B2B プライマーで増幅した。B2B プライマーの例を表 5 に示す。

50

【表 5 - 1】

表5. バックツーバックB2Bプライマーの例

遺伝子名	B2Bフォワード プライマー名	フォワードプライマー配列	B2Bリバース プライマー名	リバースプライマー配列
BRAF	BRAF-BX1a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCAGTTTGAACAGTT GTCTGGATC	BRAF-BX1b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAAACTGATGGGACCCAC TCC
CYP2	CYP2c19-BXc	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTTCCCACTATCATT GATTATTTC	CYP2c19-BXd	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATGGGAAAATTATTGCAT ATCTAAGAG
EGFR	EGFR-BX1a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCTTTCTCACCTTCTG GGATCC	EGFR-BX1b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAAATTCCTCGCTATC AAG
EGFR	EGFR-BX2a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCCATCACGTAGGCT TCCTG	EGFR-BX2b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAATGGCCAGCGTGGACA AC
EGFR	EGFR-BX3a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCGACATAGTCCAGG AGGCAGC	EGFR-BX3b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATGTCCGGGAACACAAAG AC
EGFR	EGFR-BX4a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCAAGCGACGGTCCTC CAAG	EGFR-BX4b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATGGCAGCCAGGAACGT AC
EGFR	EGFR-BX5a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCAGTACGTTCTGCGC TGCC	EGFR-BX5b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAACACCGCAGCATGTCA AG
EGFR	EGFR-BX6a	GTTCAGAGTTCTACAGTCCG	EGFR-BX6b	CCTTGGCACCCGAGAATTC

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

		ACGATCATCCACTTGATAGG CACCTTG		CAAAGTGGATGGCATTGG AATC
EGFR	EGFR-BX7a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTCTCGCTGGCAGG GATTC	EGFR-BX7b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CACCTGGAGAAAGGAGAA CGC
EGFR	EGFR-BX9a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCAACTTTGGGCGACT ATCTGC	EGFR-BX9b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAGTTCCTGAGTTGATC ATCG
EGFR	EGFR-BX10a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTTGAGTCTGTAGG ACTTGGC	EGFR-BX10b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAACTTCTACCGTGCCCTG ATG
EGFR	EGFR-BX11a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCTGCTGTGGGATG AGGTACTC	EGFR-BX11b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CACACAGCAGGGCTTCTTC AG
EGFR	EGFR-BX12a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCATGGAATGCTTGT ACCACATC	EGFR-BX12b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CACATGGGCAACTTCTCTG TTTC
EGFR	EGFR-BX4c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCTGGCAGCCAGGA ACGTACT	EGFR-BX4d	CCTTGGCACCCGAGAATTC CACGACGGTCTCCAAGTA GTTC
EGFR	EGFR-BX5c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCACACCGCAGCATGT CAAGATC	EGFR-BX5d	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAGTACGTTCTTGCTGC CAG
EGFR	EGFR_hot1- BXc	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCGCACGGTGTATAA GGTAAGGTCC	EGFR_hot1- BXd	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAGAATTCAGTTTCTTCAA GATCC
KRAS	KRAS-BX1a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCAAGAGTGCCTTGAC GATACAGC	KRAS-BX1b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATCTTGCTACGCCACCA G
KRAS	KRAS_c181- BXc	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTCGAGAATATCCAA GAGACAGG	KRAS_c181- BXd	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAGAGGAGTACAGTGCA ATGAGG
PIK3CA	PIK3CA-BX1a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCGCTTTGAGCTGTTT TTGTCTATT	PIK3CA-BX1b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAAAGCAATTTCTACACG AGATCC
PIK3CA	PIK3CA-BX2a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTTTAATTGTGTGGA AGATCCAATC	PIK3CA-BX2b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAATTAACAGCATGCATT GAACTG
PIK3CA	PIK3CA-BX1c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCCTCTCTGAAAT CACTGAGC	PIK3CA-BX1d	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAGAGGATCTCGTGAGAA ATTGC
PTEN	PTEN-BX1a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTGTTTCTGCTAACG ATCTCTTTG	PTEN-BX1b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAAGGAGATATCAAGAGG ATGGATT
PTEN	PTEN-BX2a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCAGGAAATCCATA GCAATAATG	PTEN-BX2b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATCCTGCAGAAAGACTTG AAGG
PTEN	PTEN-BX3a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCGCTTTGAATCCAAA AACCTTAAAAC	PTEN-BX3b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAGGATTCAAAGCATAAAA ACCATAC
PTEN	PTEN-BX3c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG	PTEN-BX3d	CCTTGGCACCCGAGAATTC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

		ACGATCGGATTCAAAGCATA AAAACCATAC		CAGCTTTGAATCCAAAAAC CTTAAAAAC
PTEN	PTEN-BX15c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCGATGTTAGTGACAA TGAACCTGATC	PTEN-BX15d	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATGGTGTACAGAAGTTG AACTGC
TP53	TP53-BX1a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCCCTGACTCAGACTG ACATTCTCC	TP53-BX1b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CACAGGCCCTTCTGTCTTG AAC
TP53	TP53-BX2a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCATGTTCCGAGAGCT GAATGAG	TP53-BX2b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CAGAACATCTCGAAGCGCT CAC
TP53	TP53-BX3a	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTTAAAGGACCAGAC CAGCTTTC	TP53-BX3b	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATTATGGTATAAGTTGGT GTTCTGAAG
TP53	TP53-BX3c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCTTATGGTATAAGTT GGTGTCTGAAG	TP53-BX3d	CCTTGGCACCCGAGAATTC CATTAAAGGACCAGACCAG CTTTC
TP53	TP53-BX16c	GTTTCAGAGTTCTACAGTCCG ACGATCGCTCGACGCTAGG ATCTGAC	TP53-BX16d	CCTTGGCACCCGAGAATTC CACTCTGAGTCAGGAAACA TTTTCAG

10

20

【0144】

この反応のため、0.34 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 9.2)、1 μ l の 10 mM MgSO₄、2.78 μ l の 180 mM (NH₄)₂SO₄、0.75 μ l の dNTP 混合物 (それぞれ 25 mM)、0.5 μ l の 10% Tween 20、1.20 μ l の 1 M KCl、2 μ l の 10 μ M バックツースバックフォワードプライマーおよびリバープライマー (図 11 の標的リスト表に列挙した特定の標的を標的とする 8 対のプライマーの混合物)、18.28 μ l の水をそれぞれ 10 ng の DNA 試料に加えた。反応物を 80 で 1 分間加熱し、63 で 5 分間インキュベートし、その後 4 に冷却した。次に 15 単位の Bst 2.0 ウォームスタート DNA ポリメラーゼを各反応物に加えた。B2B プライマーを用いる等温増幅のため、反応物を 63 で 2 時間インキュベートした。

30

【0145】

全ての増幅産生物を、残存する洗浄ステップのために製造者の説明書に従って 50 μ l の Ampure ビーズを加えることによって精製した。溶出のため、55 μ l の溶出緩衝液を各チューブに加え、ビーズを 65 で 5 分間インキュベートした。短時間の遠心の後、チューブをマグネットに戻した。各反応物から約 50 μ l の溶出産生物が回収された。

【0146】

アダプターを付着させるため、それぞれ 50 μ l の溶出物を、5.7 μ l の 10 \times AccuPrime 緩衝液、等温および B2B 増幅で用いたプライマーの 3' 末端の共通配列に相補的な 1 μ l の 25 μ M アダプタープライマー、および 2 単位の AccuPrime HiFi Taq ポリメラーゼと混合した。アダプターは、以下の PCR プログラム、即ち 95 で 2 分; 95 で 30 秒、60 で 30 秒、72 で 2.5 分の 30 サイクル; および 72 で 7 分の最終延長を用いた増幅によって付着させた。PCR 産生物をアガロースゲルで分析し、サイズ範囲が 550 bp ~ 1000 bp の産生物をシーケンシングのためにさらに収集した。得られた増幅産生物をシーケンシングによって分析した。図 11 に示すシーケンシング分析結果は、多重標的ポリヌクレオチド配列が多重反応によって検出可能であることを示している。

40

【0147】

本発明の好ましい実施形態を本明細書に示して記述したが、そのような実施形態は実施例としてのみ提供されることは当業者には明白である。ここで当業者には本発明から逸脱す

50

ることなく数多くの変形、変更、および置換が想到されよう。本発明を実施するにあたって本明細書に記載した本発明の実施形態に対する種々の選択肢が採用できることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲およびその同等物の範囲内の方法および構造がその範囲に含まれることが意図されている。

【図面】

【図 1】

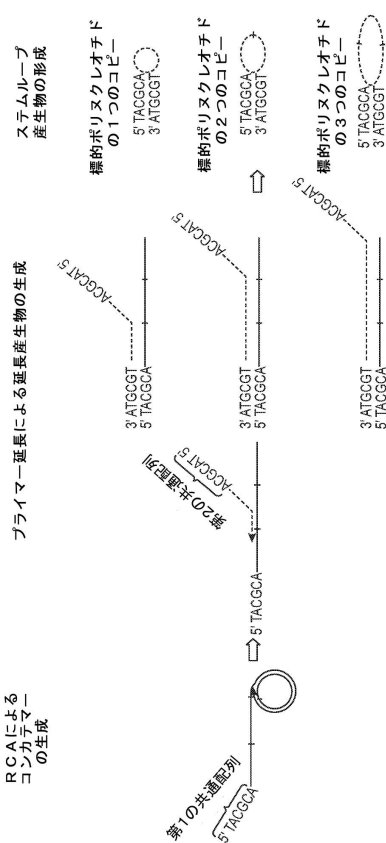


FIG. 1

【図 2】

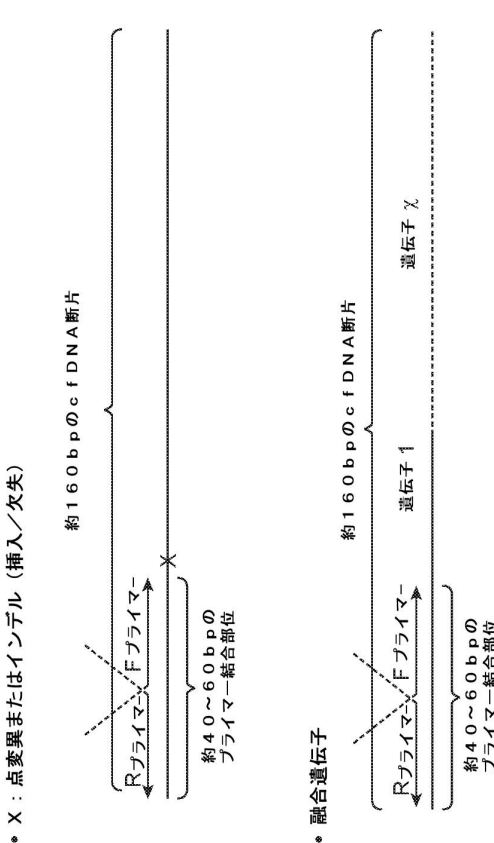


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 7】

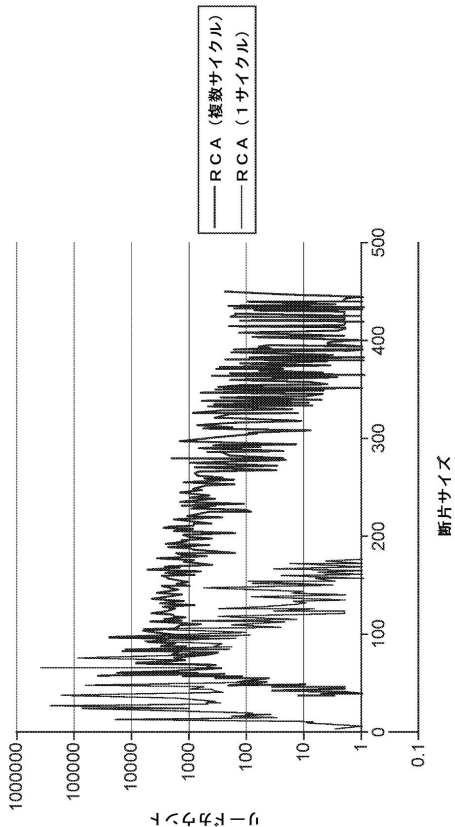


FIG. 7

【図 8】

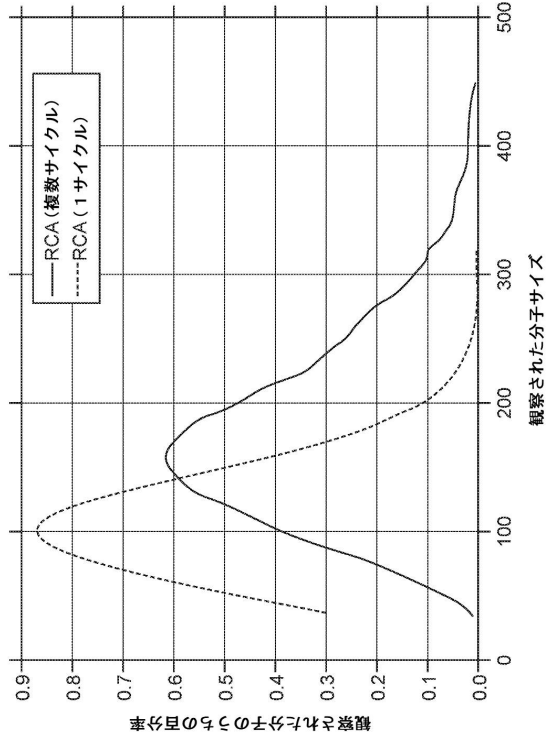


FIG. 8

【図 9】

スバイクした融合対立遺伝子の頻度	2.50%	0.50%	0.05%	0.00%
融合 DNA の $n g^*$ (HD664 ^a 、5.0%の融合対立遺伝子)	0.50	0.12	0.01	0.00
対照 DNA の $n g^*$ (野生型)	9.50	9.88	9.99	10.00

^a 選択化された DNA の $n g$
^b HD664 は 50% EML4/ALK DNA 参照標準を意味する

FIG. 9

【図 10】

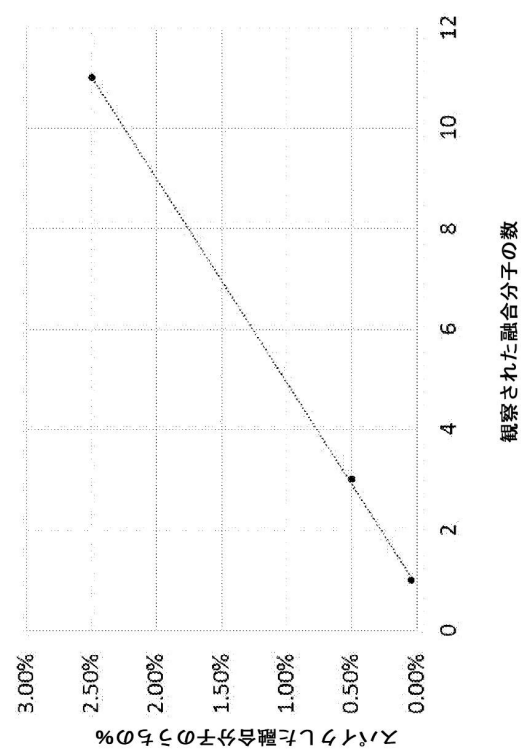


FIG. 10

10

20

30

40

50

【図 11】

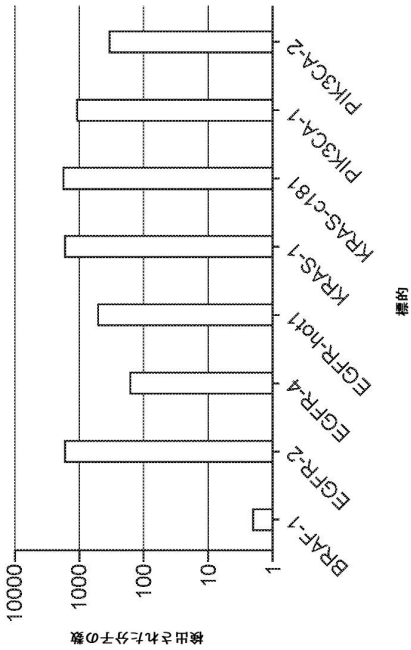


FIG. 11

標的リスト
BRAF-1
EGFR-2
EGFR-4
EGFR-hot1
KRAS-1
KRAS-c181
PIK3CA-1
PIK3CA-2

【配列表】

0007008016000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 N 9/12 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/09 Z
C 1 2 N 9/12

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウェン, リ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フリーモント, シャイロック ドライブ 3 3 9 9 1

(72)発明者 リン, シェンロン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5, フリーモント, ウィルブリッジ テラス 3 4 5 6 8

(72)発明者 タン, リン ファン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 2, サンフランシスコ, 1 9 ティーエイチ アベニュー 2 9 2 4

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 8 9 3 3 3 (W O , A 1)

特開 2 0 1 3 - 1 4 3 9 6 6 (J P , A)

特表 2 0 0 2 - 5 0 3 9 4 8 (J P , A)

特表 2 0 1 1 - 5 0 5 1 6 1 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 1 6 4 1 0 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 9 9 0 4 1 (U S , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

P u b M e d