

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-500261
(P2024-500261A)

(43)公表日 令和6年1月9日(2024.1.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6811(2018.01)	C 1 2 Q	1/6811	Z Z N A	4 B 0 2 9
C 1 2 N	15/115(2010.01)	C 1 2 N	15/115	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全29頁)

(21)出願番号	特願2022-580954(P2022-580954)	(71)出願人	500358711 イルミナ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イルミナ ウェイ 5 2 0 0
(86)(22)出願日	令和3年12月16日(2021.12.16)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(85)翻訳文提出日	令和5年2月1日(2023.2.1)	(74)代理人	100132263 弁理士 江間 晴彦
(86)国際出願番号	PCT/US2021/063835	(72)発明者	シャムーン, カッサンドラ アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニ ア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2022/140158	F ターム (参考)	4B029 AA07 BB20 CC01 FA15 GA03 HA05
(87)国際公開日	令和4年6月30日(2022.6.30)		
(31)優先権主張番号	63/128,669		
(32)優先日	令和2年12月21日(2020.12.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シークエンシングを用いるアプタマーの選択

(57)【要約】

複数のアプタマー候補からアプタマーを選択するための方法及びシステムが提供される。標的は、基板内に配置された複数のウェルの各ウェル中で結合される。各ウェルを複数のアプタマー候補を含む流体と接触させる。少なくとも1つのウェル内で、標的に対して選択的である任意のアプタマー候補が標的に結合される。標的に結合していない任意のアプタマー候補は除去される。ウェル内において、標的に対して選択的である任意のアプタマーを同定するために、除去後に残る任意のアプタマー候補がシークエンシングされる。

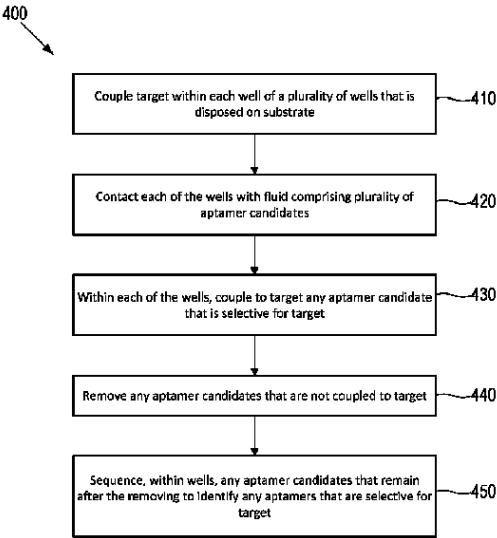


FIG. 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数のアプタマー候補からアプタマーを選択する方法であって、
基板内に配置された複数のウェルの各ウェル内に標的を結合することと、
前記ウェルの各々を、複数のアプタマー候補を含む流体と接触させることと、
前記ウェルのうち少なくとも 1 つの中で、前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補を前記標的に結合させることと、
前記標的に結合されていない任意のアプタマー候補を除去することと、
前記ウェル内で、前記除去後に残る任意のアプタマー候補をシーケンシングして、前記標的に対して選択的である任意のアプタマーを同定することと、
を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記複数のウェルの各ウェル内で前記標的を結合することが、
前記ウェルの各々の中で第 1 の部分を結合することと、
複数の第 2 の部分を前記標的のそれぞれのものへと結合させることと、
前記ウェルの各々の中で前記第 2 の部分を前記第 1 の部分へと結合させることと、
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の部分が、ストレプトアビジンを含み、前記第 2 の部分が、ビオチンを含む、
請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記第 1 の部分が、捕捉プライマーによって前記ウェルの各々の中で結合される、請求項 2 又は請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記シーケンシングを実行する前に、前記捕捉プライマーから前記第 1 の部分を脱離することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記基板が、前記除去後に残る前記アプタマー候補をシーケンシングするために使用される検出回路を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記複数のウェルが、前記流体が並行して流れるフローセルを備える、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補が、前記標的に結合したときに変化する三次構造を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補のアンプリコンを生成することを更に含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補のアンプリコンを生成することが、
前記アプタマー候補を前記標的から分離することと、
ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、そのアプタマー候補を使用してアンプリコンを生成することと、
を含む、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記 PCR が、前記ウェルとは別個の増幅チャンバ内で実行される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ウェルの各々を、前記アンプリコンを含む流体と接触させることと、

50

前記ウェルの各々の中で、前記標的に対して選択的である任意のアンプリコンを前記標的に結合させることと、

前記標的に結合していない任意のアンプリコンを除去することと、
を更に含む、請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

シーケンシングされる任意のアプタマー候補が、前記標的に結合されていない任意のアンプリコンを除去した後に残る任意のアンプリコンを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記標的に対して選択的である任意のアンプリコンの追加的なアンプリコンを生成することを更に含む、請求項 12 又は請求項 13 に記載の方法。

10

【請求項 15】

任意のアプタマー候補のシーケンシングが、

前記ウェル中に配置された捕捉プライマーに、前記除去後に残る任意のアプタマー候補を結合することと、

前記ウェル内で増幅を実行して、前記捕捉プライマーに結合したアンプリコンを生成することと、

前記捕捉プライマーに結合された前記アンプリコンをシーケンシングすることと、
を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記標的が、前記捕捉プライマーのそれぞれのものを介して前記ウェル中で結合される、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記捕捉プライマーが、前記ウェル中の第 1 の部分に結合し、かつ第 2 の部分が、前記第 1 の部分及び前記ウェル内の前記標的に結合している、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記捕捉プライマーが、前記標的とは別に前記ウェルへと結合される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アプタマー候補の各々が、それぞれの捕捉プライマーに相補的な第 1 のアダプター及び第 2 のアダプターを含む、請求項 15 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記アプタマー候補の各々が、前記第 1 のアダプターと前記標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第 1 のスペーサー、及び前記第 2 のアダプターと前記標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第 2 のスペーサーを更に含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記アプタマー候補の各々が、オリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

複数のアプタマー候補からアプタマーを選択するためのシステムであって、

40

複数のウェルを含む基板と、

前記ウェルの各々の中に結合された標的と、

複数のアプタマー候補を含み、かつ前記ウェルの各々と接触する流体であって、前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補が前記標的に結合される、流体と、

前記ウェル中の任意のアプタマー候補をシーケンシングして、前記標的に対して選択的である任意のアプタマーを同定するための検出回路と、

を備える、システム。

【請求項 23】

第 1 の部分が、前記ウェルの各々の中で結合され、

複数の第 2 の部分が、前記標的のそれぞれ 1 つに結合され、

50

前記第 2 の部分が、前記ウェルの各々の中で前記標的を結合するように、前記ウェルの各々の中で前記第 1 の部分に結合される、

請求項 2 2 に記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記第 1 の部分が、ストレプトアビジンを含み、前記第 2 の部分が、ビオチンを含む、請求項 2 3 に記載のシステム。

【請求項 2 5】

前記第 1 の部分が、捕捉プライマーによって前記ウェルの各々の中で結合される、請求項 2 3 又は請求項 2 4 に記載のシステム。

【請求項 2 6】

前記第 1 の部分が、前記捕捉プライマーから脱離可能である、請求項 2 5 に記載のシステム。

【請求項 2 7】

前記複数のウェルが、前記検出回路上に配置される、請求項 2 2 ～ 2 6 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 8】

前記複数のウェルが、前記流体が並行して流れるフローセルを備える、請求項 2 2 ～ 2 7 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 9】

前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補が、前記標的に結合したときに変化する三次構造を有する、請求項 2 2 ～ 2 8 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 3 0】

アンプリコンが、前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補から生成される、請求項 2 2 ～ 2 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 3 1】

前記標的に対して選択的である任意のアプタマー候補の前記アンプリコンが、前記アプタマー候補を前記標的から分離することと、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、そのアプタマー候補を使用してアンプリコンを生成することと、を含む工程を用いて生成される、請求項 3 0 に記載のシステム。

【請求項 3 2】

前記 PCR を実行するために前記ウェルとは別個の増幅チャンバを備える、請求項 3 1 に記載のシステム。

【請求項 3 3】

前記アンプリコンを含み、かつ前記ウェルの各々と接触する流体であって、前記標的に対して選択的である任意のアンプリコンが、前記標的に結合される、流体を更に備える、請求項 3 0 ～ 3 2 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 3 4】

シーケンシングされる任意のアプタマー候補が、前記標的に結合されていない任意のアンプリコンを除去した後に残る任意のアンプリコンを含む、請求項 3 3 に記載のシステム。

【請求項 3 5】

前記標的に対して選択的である任意のアンプリコンの追加的なアンプリコンを更に備える、請求項 3 4 に記載のシステム。

【請求項 3 6】

前記ウェル内に配置され、かつ前記除去後に残る任意のアプタマー候補に結合された捕捉プライマーと、

前記捕捉プライマーに結合された前記アプタマー候補のアンプリコンと、

を更に含み、

前記検出回路が、前記捕捉プライマーに結合された前記アンプリコンをシーケンシン

10

20

30

40

50

グするためのものである、

請求項 22～35 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 37】

前記標的が、前記捕捉プライマーのそれぞれのものを介して前記ウェル中で結合される、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 38】

前記捕捉プライマーが、前記ウェル中の第 1 の部分に結合し、かつ第 2 の部分が、前記第 1 の部分及び前記ウェル内の前記標的に結合している、請求項 37 に記載のシステム。

【請求項 39】

前記捕捉プライマーが、前記標的とは別に前記ウェルへと結合される、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 40】

前記アダプター候補の各々が、それぞれの捕捉プライマーに相補的な第 1 のアダプター及び第 2 のアダプターを含む、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 41】

前記アダプター候補の各々が、前記第 1 のアダプターと前記標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第 1 のスペーサー、及び前記第 2 のアダプターと前記標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第 2 のスペーサーを更に含む、請求項 40 に記載のシステム。

【請求項 42】

前記アダプター候補の各々が、オリゴヌクレオチドを含む、請求項 22～41 のいずれか一項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（関連出願の相互参照）

本出願は、2020 年 12 月 21 日に提出された「Selecting Aptamers Using Sequencing」と題する米国仮特許出願第 63 / 128, 669 号の利益を主張するものであり、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

生物学的試料中に存在し得る特定の核酸配列の検出は、いくつかの例として、微生物を同定及び分類する、感染症を診断する、遺伝子異常を検出及び特徴付ける、がんに関連する遺伝的変化を識別する、疾患に対する遺伝的感受性を調べる、並びに様々なタイプの治療に対する応答を測定するための方法として使用されてきた。特定の標的分子に結合する核酸配列は、「アダプター」と称されてもよく、かつ合成であり得るか、又は生物学的試料に由来し得る。特定の核酸配列を検出するための一般的な技術は、合成であろうと生物学的試料からであろうと、核酸シーケンシングである。

【0003】

核酸シーケンシング方法は、Maxam 及び Gilbert によって使用された化学的分解法並びに Sanger によって使用されたストランド伸長法から進化している。現在では、単一のフローセル上で数百万、又は更に数十億の核酸の並行処理を可能にするいくつかのシーケンシング方法が使用されている。いくつかのプラットフォームは、ビーズベース及びマイクロアレイのフォーマットを含み、シリカビーズが、シーケンシング、遺伝子型決定、又は遺伝子発現プロファイリングを含む用途でのこのようなフォーマットの適用に応じたプローブで官能化される。いくつかのシーケンシングシステムは、「合成によるシーケンシング」であろうと遺伝子型決定であろうと、シーケンシング操作で使用するための異なる試薬を担持する複数の異なるリザーバを含む基板を利用する。

【発明の概要】

【0004】

本明細書で提供される例は、シーケンシングを用いたアプタマーの選択に関する。そのような選択を実行するための装置及び方法が開示される。

【0005】

本明細書のいくつかの実施例は、複数のアプタマー候補からアプタマーを選択する方法を提供する。本方法は、基板内に配置された複数のウェルの各ウェル内に標的を結合することを含み得る。本方法は、ウェルの各々を、複数のアプタマー候補を含む流体と接触させることを含み得る。本方法は、ウェルのうち少なくとも1つの中で、標的に対して選択的である任意のアプタマー候補を標的に結合することを含み得る。本方法は、標的に結合していない任意のアプタマー候補を除去することを含み得る。本方法は、標的に対して選択的である任意のアプタマーを同定するために、除去後に残る任意のアプタマー候補をウェル中でシーケンシングすることを含み得る。

10

【0006】

いくつかの例では、複数のウェルの各ウェル中の標的を結合することは、ウェルの各々の中の第1の部分を結合することと、複数の第2の部分を標的のそれぞれのものに結合させることと、ウェルの各々の中で第2の部分を第1の部分へと結合させることと、を含む。いくつかの例では、第1の部分はストレプトアビジンを含み、第2の部分はビオチンを含む。いくつかの例では、第1の部分は、捕捉プライマーによってウェルの各々の中で結合される。いくつかの例では、シーケンシングを実行する前に、捕捉プライマーから第1の部分を脱離する。

20

【0007】

いくつかの例では、基板は、除去後に残るアプタマー候補をシーケンシングするために使用される検出回路を含む。

【0008】

いくつかの例では、複数のウェルは、流体が並行に流れるフローセルを含む。

【0009】

いくつかの例では、標的に対して選択的である任意のアプタマー候補は、標的に結合したときに変化する三次構造を有する。

【0010】

いくつかの例では、本方法は、標的に対して選択的である任意のアプタマー候補のアンプリコンを生成することを更に含む。いくつかの例では、標的に対して選択的である任意のアプタマー候補のアンプリコンを生成することは、そのアプタマー候補を標的から分離することと、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、そのアプタマー候補を用いてアンプリコンを生成することと、を含む。いくつかの例では、PCRは、ウェルとは別個の増幅チャンバ内で実行される。いくつかの例では、本方法は、アンプリコンを含む流体とウェルの各々を接触させることと、ウェルの各々の中で、標的に対して選択的である任意のアンプリコンを標的に結合させることと、標的に結合していない任意のアンプリコンを除去することと、を更に含む。いくつかの例では、シーケンシングされる任意のアプタマー候補は、標的に結合されていない任意のアンプリコンを除去した後に残る任意のアンプリコンを含む。いくつかの例では、本方法は、標的に対して選択的である任意のアンプリコンの追加的なアンプリコンを生成することを更に含む。

30

40

【0011】

いくつかの例では、任意のアプタマー候補をシーケンシングすることは、ウェル中に配置された捕捉プライマーに、除去後に残る任意のアプタマー候補を結合することと、ウェル内で増幅を実行して、捕捉プライマーに結合したアンプリコンを生成することと、捕捉プライマーに結合されたアンプリコンをシーケンシングすることと、を含む。いくつかの例では、標的は、捕捉プライマーのそれぞれのものを介してウェル中で結合される。いくつかの例では、捕捉プライマーは、ウェル中の第1の部分に結合し、かつ第2の部分は、第1の部分及びウェル内の標的に結合している。いくつかの例では、捕捉プライマーは、標的とは別にウェルへと結合される。いくつかの例では、アプタマー候補の各々は、

50

それぞれの捕捉プライマーに相補的である第1のアダプター及び第2のアダプターを含む。いくつかの例では、アダプター候補の各々は、第1のアダプターと標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第1のスペーサー、及び第2のアダプターと標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第2のスペーサーを更に含む。

【0012】

いくつかの例では、アダプター候補の各々は、オリゴヌクレオチドを含む。

【0013】

本明細書におけるいくつかの例は、複数のアダプター候補からアダプターを選択するためのシステムを提供する。システムは、複数のウェルを含む基板を含み得る。システムは、ウェルの各々の中で結合された標的を含み得る。システムは、複数のアダプター候補を含み、かつウェルの各々と接触する流体を含んでもよく、ここで、標的に対して選択的である任意のアダプター候補は標的に結合される。システムは、ウェル中の任意のアダプター候補をシーケンシングして、標的に対して選択的である任意のアダプターを同定するための検出回路を含み得る。

10

【0014】

いくつかの例では、第1の部分は、各ウェル中で結合される。いくつかの例では、複数の第2の部分は、標的のそれぞれのものに結合される。いくつかの例では、第2の部分は、ウェルの各々の中で標的を結合するように、ウェルの各々の中で第1の部分に結合される。いくつかの例では、第1の部分はストレプトアビジンを含み、第2の部分はビオチンを含む。いくつかの例では、第1の部分は、捕捉プライマーによってウェルの各々の中で結合される。いくつかの例では、第1の部分は、捕捉プライマーから脱離可能である。

20

【0015】

いくつかの例では、複数のウェルは、検出回路上に配置される。

【0016】

いくつかの例では、複数のウェルは、流体が並行に流れるフローセルを含む。

【0017】

いくつかの例では、標的に対して選択的である任意のアダプター候補は、標的に結合したときに変化する三次構造を有する。

【0018】

いくつかの例では、アンプリコンは、標的に対して選択的である任意のアダプター候補から生成される。いくつかの例では、標的に対して選択的である任意のアダプター候補のアンプリコンは、そのアダプター候補を標的から分離することと、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、そのアダプター候補を用いてアンプリコンを生成することと、を含む工程を用いて生成される。いくつかの例では、システムは、PCRを実行するためにウェルとは別個の増幅チャンバを含む。

30

【0019】

いくつかの例では、システムは、アンプリコンを含み、かつウェルの各々と接触する流体であって、標的に対して選択的である任意のアンプリコンが、標的に結合される、流体を更に含む。いくつかの例では、シーケンシングされる任意のアダプター候補は、標的に結合されていない任意のアンプリコンを除去した後に残る任意のアンプリコンを含む。いくつかの例では、システムは、標的に対して選択的である任意のアンプリコンの追加的なアンプリコンを更に含む。

40

【0020】

いくつかの例では、システムは、ウェル内に配置され、かつ除去後に残る任意のアダプター候補に結合された捕捉プライマーと、捕捉プライマーに結合されたアダプター候補のアンプリコンと、を更に含む。検出回路は、捕捉プライマーに結合されたアンプリコンをシーケンシングするためのものであり得る。いくつかの例では、標的は、捕捉プライマーのそれぞれのを介してウェル中で結合される。いくつかの例では、捕捉プライマーは、ウェル中の第1の部分に結合し、かつ第2の部分は、第1の部分及びウェル内の標的に結合している。いくつかの例では、捕捉プライマーは、標的とは別にウェルへと結合さ

50

れる。いくつかの例では、アダプター候補の各々は、それぞれの捕捉プライマーに相補的である第1のアダプター及び第2のアダプターを含む。いくつかの例では、アダプター候補の各々は、第1のアダプターと標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第1のスペーサー、及び第2のアダプターと標的に対して選択的な候補である領域との間に配置された第2のスペーサーを更に含む。

【0021】

いくつかの例では、アダプター候補の各々は、オリゴヌクレオチドを含む。

【0022】

本明細書に記載されている利益を実現するため、本明細書に記載されている本開示の態様の各々の任意の個々の特徴／例は、任意の好適な組み合わせと一緒に実施されてもよいこと、及びこれらの態様のいずれか1つ以上からの任意の特徴／例は、任意の好適な組み合わせで、本明細書に記載されている他の態様の特徴のいずれかと一緒に実施されてもよいことを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1B】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1C】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1D】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1E】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1F】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1G】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1H】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図1I】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図2A】シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図2B】シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図2C】シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図2D】シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図2E】シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図2F】シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用する、例示的な装置及び操作を概略的に示す。

【図3】図1A～図1I又は図2A～図2Fを参照して説明したような装置又はプロセスフローで使用するための、例示的なアダプター候補を概略的に示す。

【図4】シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローにおける、例示的な操作を概略的に示す。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0024】

本明細書で提供される例は、シーケンシングを用いたアプタマーの選択に関する。そのような選択を実行するための装置及び方法が開示される。

【0025】

いくつかのアプタマーは、酵素、抗体、単一細胞、又は任意の他の目的の分子標的などの、標的分子に高い選択性で結合するオリゴヌクレオチド鎖である。そのような選択的結合の間、アプタマーは三次構造を得ることができる。S E L E X又は試験管内進化法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) とは、アプタマーを選択するプロセスである。従来知られているS E L E Xプロセスは、典型的には、標的が結合される媒体を含有するカラムなどの、従来の固相基板上で実行される。アプタマー候補を含む流体を基板に流す。標的に対して選択的である任意のアプタマーは標的に結合される一方で、他のアプタマーは結合されず、したがって基板から流出する。次いで、標的に選択的なアプタマーを標的から分離し、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いて、例えば96ウェルプレート中で増幅する。P C R産物を再び基板に流して増幅し、更に濃縮させてもよい。次いで、増幅されたアプタマーをシーケンシングして、標的に結合させ、したがって最も「成功」したアプタマーを同定する。これらのプロセスは時間及び労働集約的であり得る。

10

【0026】

対照的に、本明細書で提供されるように、本装置及び本方法は、シーケンシングの使用を通じてS E L E Xプロセスを合理化及び単純化することができる。より具体的には、いくつかの例では、アプタマーの選択及びシーケンシングの両方のための操作は、同じウェル内で、例えば、シーケンシングシステム内の基板のウェル内で実行され得る。選択プロセスが実行される基板は、アプタマーのシーケンシングで使用するための検出回路を含み得る。例示的には、標的はウェルの各々の中で結合されてもよく、複数のアプタマーがウェルの各々に流入した。標的に対して選択的な任意のアプタマーが標的に結合されてもよく、任意の他のアプタマーが除去されてもよい。標的に選択的であるアプタマーを増幅してもよく、次いで、例えば各ウェル内でまた結合されている捕捉プライマーを用いて、ウェル内でシーケンシングしてもよい。このように、本装置及び本方法は、以前から知られているS E L E Xプロセスと比較して、材料使用量及び廃棄物が大幅に少ない、大幅に合理化され単純化されたプロセスを提供し得る。

20

30

【0027】

最初に、本明細書で使用されるいくつかの用語を簡単に説明する。次いで、シーケンシング及び関連装置を用いてアプタマーを選択するためのいくつかの例示的な方法を説明する。

【0028】

用語

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。用語「含むこと (including)」、「並びに「含む (include)」、「含む (includes)」及び「含まれた (included)」などの他の形態の使用は、限定ではない。用語「有すること (having)」、「並びに「有する (have)」、「有すること (has)」及び「有した (had)」などの他の形態の使用は、限定ではない。本明細書で使用される場合、移行句中か又は請求項の本文中のいずれであっても、用語「含む (comprise)」及び「含む (comprising)」は、オープンエンドの意味を有するものとして解釈されるべきである。すなわち、上記の用語は、語句「少なくとも有する」又は「少なくとも含む」と同義であると解釈されるべきである。例えば、プロセスの文脈において使用される場合、用語「含む (comprising)」は、プロセスが少なくとも列挙された工程を含むが、追加の工程を含み得ることを意味する。化合物、構成物、又はデバイスの文脈で使用される場合、用語「含む (comprising)」は、化合物、構成物、又はデバイスが少なくとも列挙された特徴又は構成要素を含むが、追加の特徴又は構成要素も含み得ることを意味する。

40

50

【0029】

本明細書全体を通して使用される「実質的に」、「およそ (approximately)」、及び「約」という用語は、処理のばらつきなどに起因する小さな変動を記載及び考慮するために使用されている。例えば、それらは、±5%以下など、±2%以下など、±1%以下など、±0.5%以下など、±0.2%以下など、±0.1%以下など、±0.05%以下などの、±10%以下を指し得る。

【0030】

本明細書で使用される場合、「ハイブリダイズ」は、それらのポリマーの長さに沿って第1のポリヌクレオチドを第2のポリヌクレオチドに非共有結合させて、二重の鎖となった「二本鎖」を形成することを意図する。例えば、2つのDNAポリヌクレオチド鎖は、相補的な塩基対合を介して会合し得る。第1及び第2のポリヌクレオチド間の会合の強度は、それらのポリヌクレオチド内のヌクレオチド配列間の相補性とともに増加する。ポリヌクレオチド間のハイブリダイゼーションの強度は、二重鎖の50%が互いに解離する融解温度 (T_m) によって特徴付けられ得る。

10

【0031】

本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド」は、糖、及び少なくとも1つのホスフェート基を含み、一部の例では、核酸塩基もまた含む分子を意味することが意図される。核酸塩基を欠くヌクレオチドは、「脱塩基」と称され得る。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、ペプチドヌクレオチド、修飾ペプチドヌクレオチド、修飾ホスフェート糖骨格ヌクレオチド、及びそれらの混合物を含む。ヌクレオチドの例には、アデノシン一リン酸 (AMP)、アデノシン二リン酸 (ADP)、アデノシン三リン酸 (ATP)、チミジン一リン酸 (TMP)、チミジン二リン酸 (TDP)、チミジン三リン酸 (TTP)、シチジン一リン酸 (CMP)、シチジン二リン酸 (CDP)、シチジン三リン酸 (CTP)、グアノシン一リン酸 (GMP)、グアノシン二リン酸 (GDP)、グアノシン三リン酸 (GTP)、ウリジン一リン酸 (UMP)、ウリジン二リン酸 (UDP)、ウリジン三リン酸 (UTP)、デオキシアデノシン一リン酸 (dAMP)、デオキシアデノシン二リン酸 (dADP)、デオキシアデノシン三リン酸 (dATP)、デオキシチミジン一リン酸 (dTMP)、デオキシチミジン二リン酸 (dTDP)、デオキシチミジン三リン酸 (dTTP)、デオキシシチジン二リン酸 (dCDP)、デオキシシチジン三リン酸 (dCTP)、デオキシグアノシン一リン酸 (dGMP)、デオキシグアノシン二リン酸 (dGDP)、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP)、デオキシウリジン一リン酸 (dUMP)、デオキシウリジン二リン酸 (dUDP) 及びデオキシウリジン三リン酸 (dUTP) が含まれる。

20

30

【0032】

本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド」はまた、天然に存在するヌクレオチドと比較して修飾された核酸塩基、糖及び／又はリン酸部分を含むタイプのヌクレオチドである、任意のヌクレオチドアナログを包含することが意図される。例となる修飾核酸塩基の例には、イノシン、キササニン、ヒポキササニン、イソシトシン、イソグアニン、2-アミノプリン、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、2-アミノアデニン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、2-プロピルグアニン、2-プロピルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、15-ハロウラシル、15-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-ウラシル、4-チオウラシル、8-ハロアデニン又はグアニン、8-アミノアデニン又はグアニン、8-チオールアデニン又はグアニン、8-チオアルキルアデニン又はグアニン、8-ヒドロキシルアデニン又はグアニン、5-ハロ置換ウラシル又はシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、8-アザグアニン、8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン、3-デアザアデニンなどが含まれる。当技術において公知のとおり、ある特定のヌクレオチドアナログは、ポリヌクレオチド、例えば、アデノシン5'-ホスホ

40

50

スルフェートなどのヌクレオチドアナログに組み込まれた状態にはなり得ない。ヌクレオチドは、任意の好適な数のホスファート、例えば、3、4、5、6、又は6を超えるホスファートを含み得る。

【0033】

本明細書で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、相互に結合しているヌクレオチドの配列を含む分子を指す。ポリヌクレオチドは、ポリマーの非限定的な一例である。ポリヌクレオチドの例は、デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid、DNA)、リボ核酸 (ribonucleic acid、RNA)、及びそれらのアナログを含む。ポリヌクレオチドは、RNA又は一重鎖DNAなどのヌクレオチドの一重鎖配列であり得、二重鎖DNAなどのヌクレオチドの二重鎖配列であるか、又はヌクレオチドの一重鎖及び二重鎖配列の混合物を含み得る。二本鎖DNA (double stranded DNA、dsDNA) は、ゲノムDNA、及びPCR及び増幅生成物を含む。一本鎖DNA (single stranded DNA、ssDNA) は、dsDNAに変換され得、その反対もあり得る。ポリヌクレオチドには、エナンチオマーDNAなどの天然に存在しないDNAが含まれ得る。ポリヌクレオチド中のヌクレオチドの正確な配列は、既知であっても未知であってもよい。以下は、ポリヌクレオチドの例である：遺伝子又は遺伝子断片 (例えば、プローブ、プライマー、発現配列タグ (expressed sequence tag、EST)、又は遺伝子発現連続分析 (serial analysis of gene expression、SAGE) タグ)、ゲノムDNA、ゲノムDNA断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (messenger RNA、mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、いかなる配列の単離されたDNA、いかなる配列の単離されたRNA、核酸プローブ、前述のいずれかのプライマー又は増幅されたコピー。

【0034】

本明細書で使用される場合、「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドをポリヌクレオチドに重合することによってポリヌクレオチドを組み立てる活性部位を有する酵素を意味することが意図される。ポリメラーゼは、プライミングされた一重鎖標的ポリヌクレオチドに結合し、ヌクレオチドをプライマーに連続的に付加して成長させ、標的ポリヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する「相補的コピー」ポリヌクレオチドを形成することができる。次いで、別のポリメラーゼ、又は同じポリメラーゼは、その相補的コピーポリヌクレオチドの相補的コピーを形成することによって、標的ヌクレオチドのコピーを形成することができる。かかるコピーのいずれも、本明細書では「アンプリコン」と称され得る。DNAポリメラーゼは、標的ポリヌクレオチドに結合し、次いで、標的ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチド鎖の3'末端の遊離ヒドロキシル基に連続的に付加して成長させ (アンプリコン成長) つつ、標的ポリヌクレオチドを下流へ移動することができる。DNAポリメラーゼは、DNA鋳型から相補的DNA分子を合成し得、RNAポリメラーゼは、DNA鋳型からRNA分子を合成し得る (転写)。ポリメラーゼは、短いRNA又はDNA鎖 (プライマー) を使用して、鎖成長を開始し得る。いくつかのポリメラーゼは、それらが鎖に塩基を付加する部位の上流の鎖を置換し得る。かかるポリメラーゼは、鎖置換であるとも言われ得、これは、ポリメラーゼによって読み取られる鋳型鎖から相補鎖を除去する活性を有すると言われ得る。鎖置換活性を有する例示的なポリメラーゼには、Bst (バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus)) ポリメラーゼ、エキソクレノウポリメラーゼ又はシークエンシンググレードT7エキソポリメラーゼの大きな断片が含まれるが、これらに限定されない。いくつかのポリメラーゼは、それらの前の鎖を切断し、それを成長する鎖に効果的に置き換える (5'エキソヌクレアーゼ活性)。いくつかのポリメラーゼは、それらの後ろの鎖を分解する活性を有する (3'エキソヌクレアーゼ活性)。いくつかの有用なポリメラーゼは、3'及び/又は5'エキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除するために変異又は他の方法で修飾されている。

【0035】

本明細書で使用される場合、「プライマー」という用語は、ヌクレオチドが遊離3' O

H基を介して付加され得るポリヌクレオチドとして定義される。プライマーの長さは、任意の適切な数の塩基の長さであり得、天然及び／又は非天然ヌクレオチドの適切な組み合わせを含み得る。標的ポリヌクレオチド（例えば、限定されないが、アダプターなど）は、プライマーにハイブリダイズする（それに相補的な配列を有する）「アダプター」を含み得、プライマーの遊離3' OH基にヌクレオチドを付加することによって相補的コピーポリヌクレオチドを生成するよう増幅され得る。プライマーは、基板に結合され得る。互いに「相補的」であるプライマーは、実質的にそれらの全長に沿って互いにハイブリダイズし得るが、互いに「直交」であるプライマーは、実質的に互いにハイブリダイズせず、それらのアンプリコンもハイブリダイズしない。「捕捉プライマー」は、基板に結合し、標的ポリヌクレオチドの第1のアダプターにハイブリダイズし得るプライマーを意味することが意図され、「直交捕捉プライマー」は、基板に結合し、その標的ポリヌクレオチドの第2のアダプターにハイブリダイズし得るプライマーを意味することが意図される。第1のアダプターは、捕捉プライマーの配列と相補的な配列を有し得、第2のアダプターは、直交捕捉プライマーのものと相補的な配列を有し得る。捕捉プライマー及び直交捕捉プライマーは、互いに異なる独立した配列を有し得る。

10

【0036】

いくつかの例では、捕捉プライマーは、Illumina, Inc. から市販されているP5又はP7プライマーである。P5及びP7プライマーは、互いに直交するプライマーの非限定的な例である。P5及びP7プライマー配列は、いくつかの例では、以下の配列を有し得る：

20

ペアリードセット：

P5：5' - AATGATACGGCGACCCAGAGAUCTACAC - 3'

P7：5' - CAAGCAGAAAGACGGGCATACGA^{G*}AT - 3'

単一リードセット：

P5：5' - AATGATACGGCGACCCAGAG - 3'

P7：5' - CAAGCAGAAAGACGGGCATACGA3'

式中、G^{*}は、G又は8-オキソグアニンである。

【0037】

いくつかの例では、結合したオリゴヌクレオチド（プライマー、又はP5若しくはP7プライマーなど）は、5'末端にリンカー又はスペーサーを含む。そのようなリンカー又はスペーサーは、化学的若しくは酵素的切断を可能にするために、又は他の何らかの望ましい特性を付与するために、例えば、ポリマー若しくは固体支持体への共有結合を可能にするために、又は切断部位を固体支持体から最適距離に配置するためのスペーサーとして作用するために、含まれ得る。ある特定の場合では、10個のスペーサーヌクレオチドは、ポリマー又は固体支持体に対するP5又はP7プライマーの結合点の間に配置され得る。いくつかの例では、ポリTスペーサーが使用されるが、他のヌクレオチド及びそれらの組み合わせもまた使用することができる。一例では、スペーサーは6T~10Tスペーサーである。いくつかの例では、リンカーは、ビシナルジオール又はアリルトなどの化学的に切断可能な官能基を含む、切断可能なヌクレオチドを含む。

30

【0038】

本明細書で使用する時、用語「アンプリコン」は、核酸に関して使用する場合、核酸の複製による生成物を意味し、この生成物は、核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部と実質的に同じ又は相補的なヌクレオチド配列を有する。「増幅」及び「増幅すること」は、ポリヌクレオチドのアンプリコンを作製するプロセスを指す。標的ポリヌクレオチドの第1のアンプリコンは、典型的には相補的なコピーであり得る。追加的なアンプリコンは、第1のアンプリコンの生成後に、標的ポリヌクレオチド又は第1のアンプリコンから作成されたコピーである。後続のアンプリコンは、標的ポリヌクレオチドと実質的に相補的であるか、又は標的ポリヌクレオチドと実質的に同一である配列を有し得る。ポリヌクレオチドの（例えば、増幅アーチファクトによる）少数の変異が、そのポリヌクレオチドのアンプリコンを生成するときに起こり得ることは理解されるであろう。

40

50

【0039】

本明細書で使用される場合、用語「基板」とは、本明細書に記載されている構成物のための支持体として使用される材料を指す。例となる基板材料は、ガラス、シリカ、プラスチック、石英、金属、金属酸化物、オルガノシリケート（例えば、多面体有機シルセスキオキサン（polyhedral organic silsesquioxanes、POSS））、ポリアクリレート、酸化タンタル、相補型金属酸化膜半導体（complementary metal oxide semiconductor、CMOS）、又はそれらの組み合わせを含むことができる。POSSの一例は、Kehagias et al., Microelectronic Engineering 86 (2009), pp. 776-778に記載されているものであり得、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の例では、本出願に使用される基板は、ガラス、溶融シリカ、又は他のシリカ含有材料などのシリカベースの基板を含む。いくつかの例では、基板は、シリコン、窒化ケイ素、又は水素化シリコンを含み得る。一部の例では、本出願において使用される基板は、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ（塩化ビニル）、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、及びポリ（メタクリル酸メチル）などのプラスチック材料又は構成成分を含む。プラスチック材料の例は、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリスチレン、及び環式オレフィンポリマー基板を含む。一部の例では、基板は、シリカベースの材料若しくはプラスチック材料、又はそれらの組み合わせであるか、又はそれらを含む。特定の例では、基板は、ガラス又はケイ素系ポリマーを含む少なくとも1つの表面を有する。いくつかの例では、基板は金属を含み得る。一部のこのような例では、金属は金である。いくつかの例では、基板は、金属酸化物を含む少なくとも1つの表面を有する。一例では、表面は、酸化タンタル又は酸化スズを含む。アクリルアミド、エノン、又はアクリレートもまた、基板材料又は構成成分として利用することができる。他の基板材料としては、ガリウムヒ素、インジウムホスフィド、アルミニウム、セラミック、ポリイミド、石英、樹脂、ポリマー、石英、樹脂、ポリマー及びコポリマーが挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの例では、基板及び／又は基板表面は、石英であり得るか、又は石英を含み得る。いくつかの他の例では、基板及び／又は基板表面は、GaAs又はITOなどの半導体であり得るか、又はそれを含み得る。上述のリストは、本出願を例示することが意図されているが、本出願を限定するものではない。基板は、単一の材料又は複数の異なる材料を含み得る。基板は、複合材又は積層体であり得る。いくつかの例では、基板は、有機シリケート材料を含む。基板は、平坦、円形、球形、棒状、又は任意の他の好適な形状であり得る。基板は、剛性であってもよく、又は可撓性であってもよい。一部の例では、基板は、ビーズ又はフローセルである。

【0040】

いくつかの例では、表面はパターン化された表面である。「パターン化された表面」は、基板の露出層内又はその上における、異なる領域の配置を指す。例えば、1つ以上の領域は、1つ以上の捕捉プライマーが存在する特徴であり得る。この特徴は、捕捉プライマーが存在しない間隙領域によって分離され得る。いくつかの例では、パターンは、行及び列にある特徴のx-yフォーマットであり得る。いくつかの例では、パターンは、特徴及び／又は間隙領域の反復配列であり得る。いくつかの例では、パターンは、特徴及び／又は間隙領域のランダム配列であり得る。いくつかの例では、基板は、表面にウェル（窪み）のアレイを含む。ウェルは、実質的に垂直な側壁によって提供され得る。ウェルは、フォトリソグラフィ、スタンピング技術、成形技術、及びマイクロエッチング技術を含むがこれらに限定されない様々な技術を使用して、当該技術分野において一般的に知られているように製造することができる。当該技術分野において理解されるように、使用される技術は、アレイ基質の組成物及び形状に依存する。

【0041】

基板のパターン付き表面内の特徴としては、パターン化された、ポリ（N-（5-アジドアセトアミルペンチル）アクリルアミド-コ-アクリルアミド）（PAZAM）などの共有結合性のゲルが、ガラス、シリコン、プラスチック、又は他の適切な材料の上にアレ

イ状に並んだウェルなどが挙げられ得る。このプロセスは、シーケンシングのために使用されるゲルパッドを作成し、これは、多数のサイクルでシーケンシング操作にわたって安定であり得る。ポリマーをウェルに共有結合することは、様々な用途の間に、構造化基板の寿命全体にわたってゲルを構造化特徴部に維持するのに有用であり得る。しかしながら、多くの例では、ゲルは、ウェルに共有結合される必要はない。例えば、いくつかの条件では、構造化基板のどの部分にも共有結合されていないシランフリーのアクリルアミド（SFA）をゲル材料として使用することができる。

【0042】

特定の例では、構造化基板は、ウェル（例えば、マイクロウェル又はナノウェル）を用いて適切な材料をパターニングし、パターニングされた材料をゲル材料（例えば、PAZAM、SFA、又はその化学修飾された変異体、例えばSFAのアジド化型（アジド-SFA）など）でコーティングし、ゲルでコーティングされた材料を、例えば化学的研磨又は機械的研磨によって研磨することによって作製することができ、それによって、ウェル内にゲルが保持されるが、ウェル間の構造化基板の表面の間隙領域からは、実質的に全てのゲルを除去されるか又は不活性化される。プライマーは、ゲル材料に結合され得る。次いで、複数の標的ポリヌクレオチド（例えば、断片化されたヒトゲノム又はその一部）を含む溶液を、個々の標的ヌクレオチドがゲル材料に付着したプライマーとの相互作用を介して個々のウェルにシードされるように、研磨された基板と接触させ得るが、標的ポリヌクレオチドは、ゲル材料が存在しないか又はそれが不活性であるため、間隙領域を占有しない。標的ポリヌクレオチドの増幅は、間隙領域内のゲルの不在又は不活性により、クラスタの外向きの移動を防止するため、ウェル内に限局され得る。このプロセスは、簡便な製造が可能であり、スケーラブルであり、また従来のマイクロ又はナノ製造方法を利用するものである。

【0043】

パターン化された基板としては、例えば、スライド又はチップにエッチングされたウェルが挙げられ得る。ウェルのエッチング及び幾何学形状のパターンは、様々な異なる形状及びサイズとすることができ、かかる特徴は、互いに物理的又は機能的に分離可能であり得る。かかる構造的特徴を有する特に有用な基板としては、ミクスフェアなどの、固体粒子のサイズを選択し得るパターン化基板が挙げられる。これらの特性を有するパターン化基板の例は、BEAD ARRAY technology（Illumina, Inc., San Diego, Calif.）に関連して使用されるエッチング基板である。

【0044】

いくつかの例では、基板は、フローセルの少なくとも一部を形成するか、又はフローセル内に位置するか、又はフローセルに結合されている。フローセルは、複数のレーン又は複数のセクターに分割されているフローチャンバを含んでもよい。本明細書に記載の方法及びシステムで使用され得るフローセルの製造のためのフローセル及び基板の例としては、Illumina, Inc.（San Diego, CA）から市販されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

本明細書で使用するとき、用語「複数の」とは、2つ以上の異なるメンバーの集団を意味することを意図する。複数とは、小さい、中程度、大きい、から非常に大きいサイズまでの範囲であり得る。小さいサイズの複数とは、例えば、数メンバー～数十メンバーの範囲であり得る。中程度のサイズの複数とは、例えば、数十メンバー～約100メンバー又は数百メンバーの範囲であり得る。大きい複数とは、例えば、約数百メンバー～約1000メンバー、数千メンバー、及び数万メンバーの範囲であり得る。非常に大きな複数とは、例えば、数万メンバー～約数十万、数百万、数千万、又は数億以上のメンバーの範囲であり得る。したがって、複数は、2から1億をはるかに超えるメンバーのサイズの範囲、並びにメンバーの数によって測定される全てのサイズの間及び上記の例示的な範囲よりも大きい範囲であり得る。複数のポリヌクレオチドの例としては、例えば、約 1×10^5 以上、 5×10^5 以上又は 1×10^6 以上の異なるポリヌクレオチドの集団が挙げられる。

したがって、この用語の定義は、2より大きい全ての整数値を含むことが意図される。複
数値の上限は、例えば、試料中のポリヌクレオチド配列の理論的多様性によって設定され
得る。

【0046】

用語「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は、本明細書においては交換可
能に使用される。用語の違いは、特に明記しない限り、サイズ、配列、又は他の特性の任
意の特定の違いを示すことを意図するものではない。説明を明確にするために、いくつか
のポリヌクレオチド種を含む特定の方法又は組成物を説明する際に、1つの種のポリヌク
レオチドを別の種と区別するために用語を使い分けてもよい。

【0047】

本明細書で使用される場合、「シーケンシングシステム」という用語は、ポリヌクレ
オチドの配列を決定するように構成されたシステムを指す。様々なシーケンシングシス
テムが市販されている。実例として、シーケンシングシステムは、Illumina,
Inc. (San Diego, CA) から市販されている iSeq (商標) 100 シー
ケンシングシステムであり得るか、又はこれを含み得る。iSeq (商標) 100 シー
ケンシングシステムは、異なるシーケンシング試薬を貯蔵するリザーバを含むプレフ
ィルドカートリッジを用いて、合成によるシーケンシングを実行するベンチトップシス
テムである。シーケンシングシステムの他の非限定的な例としては、Illumina
Inc. から市販されている cBot 2、NovaSeq 6000、及び Mini
Seq システム、並びに他の供給源からのシーケンシングシステムが挙げられる。

【0048】

本明細書で使用される場合、「アダプター」とは、標的に対して選択的なオリゴヌクレ
オチドを生じさせる三次構造を有するオリゴヌクレオチドを意味するよう意図され、「ア
ダプター候補」とは、標的に対して潜在的に選択的であり得る可能性のあるオリゴヌクレ
オチドを意味するよう意図される。標的に対して「選択的」であることは、その標的に結
合し、かつ異なる標的に結合しないことを意味するよう意図される。したがって、所与の
複数のアダプター候補の中で、1つ以上のアダプター候補は、潜在的に所与の標的に対
して選択的であってもよく、したがってその標的に対するアダプターであり得る。しかしな
がら、任意の所与の複数のアダプター候補は、所与の標的に対するアダプターを必ずしも
含む必要はないことが理解されよう。アダプター候補は、アダプター候補を標的に結合す
ること（選択性を示す）と、アダプター候補のシーケンシングとを含む操作を用いて、
標的に対して選択的なアダプターとして同定され得る。アダプター候補のアンプリコンは
、そのアンプリコンがアダプター候補のコピーであるか相補的コピーであるかにかかわら
ず、それ自体がアダプター候補であり得る。アダプターのアンプリコンは、例えば、その
アンプリコンがアダプターのコピーである場合、それ自体がアダプターであり得る（ア
ダプターの相補的コピーとは対照的に、その相補的コピーはアダプター候補であり得るが、
必ずしもアダプターであるとは限らない）。アダプターは、本明細書の他の箇所に例示さ
れるような、任意の好適なタイプのオリゴヌクレオチド、例えば DNA、RNA、及び／
又は核酸類似体を含み得る。アダプターは、相互作用の任意の好適な組み合わせを介して
、例えば静電相互作用、疎水性相互作用、及び三次構造の形成の任意の適切な組み合わせ
を介して、標的に結合することができる。

【0049】

本明細書で使用される場合、「標的」とは、アダプターを選択することが望ましい化学
元素を意味するよう意図される。標的は、ヌクレオチドではない化学的実体を含み得る
。標的の例は、タンパク質標的である。タンパク質は、構造にフォールドされたポリペプ
チドの配列を含む。別の例示的な標的は代謝物標的である。代謝物標的は、代謝中に形成
又は使用される化学要素である。追加の例示的な標的としては、炭水化物、脂肪酸、糖（
グルコースなど）、アミノ酸、ヌクレオシド、神経伝達物質、リン脂質、及び重金属等が
挙げられるが、これらに限定されない。本開示において、分析物は、疾患状態の分析、代
謝健康の分析、マイクロバイオームの分析、薬物相互作用の分析、薬物反応の分析、毒性

10

20

30

40

50

の分析、又は感染性疾患の分析等の任意の好適な用途（複数可）の文脈において、標的に
ついて選択され得る。例示的に、代謝産物は、疾患に应答して上方制御又は下方制御され
る化学要素を含み得る。標的の非限定的な例としては、キナーゼ、セリンヒドロラーゼ、
メタロプロテアーゼ、特定の疾患のための抗原等の疾患特異的バイオマーカー、及びグル
コースが挙げられる。

【0050】

本明細書で使用される場合、「三次構造」を有するオリゴヌクレオチドは、三次元の三
次構造にフォールディングされているオリゴヌクレオチドが、所定の位置にフォールディ
ングを保持する内部架橋を有することを意味するように意図される。それに対し、一次構
造体（例えば、一緒に連結した核酸の特定の配列）及び二次構造（例えば、局所構造）を
有するが、フォールディングを定位置に保持する内部架橋がないオリゴヌクレオチドは、
その用語が本明細書に使用されている三次構造を有するとは見なされない。アプタマーの
三次構造は、アプタマーが標的に結合すると変化し得る。

10

【0051】

本明細書で使用される場合、「異なる」要素は、要素のうちの1つが、要素を互いに区
別可能にする他の要素に対して、少なくとも1つの変化を有することを意味するように意
図される。例えば、互いに異なるオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの核酸によって
互いに異なる核酸配列を有し得る。別の例として、互いに異なるタンパク質は、少なく
とも1つのペプチドによって互いに対して変化するペプチド配列を有し得る。別の例として
、代謝物は、少なくとも1つの化学基によって互いに対して変化し得る。本明細書で提供
されるように、本装置及び本方法を用いて、異なる標的に対して異なるアプタマーを選択
してもよい。

20

【0052】

本明細書で使用される場合、「フルオロフォア」という用語は、第1の波長とは異なる
第2の波長の光による励起に应答して第1の波長の光を放出する分子を意味することを意
図している。フルオロフォアによって放出された光は、「蛍光」と呼ばれ得、好適な光学
検出回路によって検出され得る。

【0053】

蛍光は、フルオロフォアから受け取った光に基づいて電気信号を生成するための光学検
出器と、電気信号を使用して、フルオロフォアから光を受け取ったことを決定するための
電子回路とを含み得る任意の適切な光学検出回路を使用して検出され得る。一例として、
光検出器は、光検出器によって受け取られた光に基づいて電気信号を生成するように構成
された増幅光検出器のアレイを含むアクティブピクセルセンサ（APS）を含むことができ
る。APSは、当技術分野で知られている相補型金属酸化膜半導体（CMOS）技術に
基づいてもよい。CMOSベースの検出器は、電界効果トランジスタ（FET）、例えば
、金属酸化物半導体電界効果トランジスタ（MOSFET）を含み得る。特定の例では、
例えば、蛍光寿命イメージング（FLIM）を実行するために、単一光子アバランシェダイ
オード（CMOS-SPAD）を有するCMOS imagerが使用されてもよい。
他の例では、光検出器は、アバランシェフォトダイオード、電荷結合素子（CCD）、極
低温光子検出器、逆バイアス発光ダイオード（LED）、フォトレジスタ、フォトラン
ジスタ、光電池、光電子増倍管（PMT）、量子ドット光伝導体又はフォトダイオード等
のフォトダイオードを含むことができる。光学検出回路は、光学検出器から電気信号を受
信するように光学検出器と動作可能に通信し、そのような信号に基づいて、例えばフル
オロフォアからの光を検出する光学検出器に基づいて蛍光を検出するように構成されたハー
ドウェアとソフトウェアとの任意の適切な組み合わせを更に含んでもよい。例えば、電子
回路は、メモリと、メモリに結合されたプロセッサと、を含み得る。メモリは、プロセッ
サに光検出器から信号を受信させ、そのような信号を使用してフルオロフォアを検出させ
るための命令を記憶することができる。例えば、命令は、光検出器からの信号を使用して
、光検出器の視野内で蛍光が放出され、そのような決定を使用してフルオロフォアが存在
することを決定することをプロセッサに決定させることができる。基板は、光学検出回路

30

40

50

を含むことができ、例えば、シークエンシングを用いてアダマーを選択するために使用される1つ以上のウェルが配置され得る光学検出器を含み得る。

【0054】

シークエンシングを用いるアダマーの選択

上記のように、また以下により詳細に記載されるように、本装置及び本方法は、シークエンシングを用いてアダマーを選択するために使用され得る。標的は、アダマー選択及びアダマーシークエンシングの両方が実行される、複数のウェルの各々の中で結合され得る。複数のアダマー候補（例えば、SELEXアダマーライブラリ）をウェルに導入して、標的をアダマー候補と接触させてもよく、標的に対して選択的である任意のアダマー候補が標的に結合されるが、一方で残りのアダマー候補は、標的に結合されないままであり、洗い流されてもよい。標的に結合されるようになったアダマー候補は、増幅されてもよく、標的に対して選択的であるアダマー（複数可）を同定するためにウェル中でシークエンシングされてもよい。

10

【0055】

例えば、図1A～図1Iは、シークエンシングを用いてアダマーを選択するためのプロセスフローで使用される、例示的な装置及び操作を概略的に示す。図1Aに示す装置100は、複数のリザーバを含む基板110を含み得る。図1Aに示す非限定的な例では、リザーバは、共通の一体的に形成された基板110内に互いに設けられた、ウェル121、122、123、124を含み得る。しかしながら、ウェル121、122、123、124のうちの1つ以上、実際にはウェル121、122、123、124の全ては、互いに物理的に分離されてもよく、かつ互いに共通の基板内に形成される必要はないことが理解されよう。任意の好適なサイズ及び配置の任意の好適な数のウェルを提供してもよい。例えば、基板110は、数千、数万、数十万、又は更には数百万のウェルを含み得る。ウェル121、122、123、124の各々は、図1H～図1Iを参照して以下で更に説明するような様式で、候補アダマーを増幅及びシークエンシングするために使用され得る複数の第1及び第2の捕捉プライマー111、112の各々を含み得る。装置100は更に、例えば図1Iを参照して説明したような様式で、ウェル中の任意のアダマー候補をシークエンシングして、標的に対して選択的である任意のアダマーを同定するための検出回路190を含み得る。ウェル121、122、123、124は、検出回路190上に配置されてもよく、そうでなければ結合されてもよい。非限定的な一例では、検出回路190はCMOS光学検出器を含み、ウェル121、122、123、124は、流体を並行して流すことができるフローセルを含み、CMOSは、フローセル内のオリゴヌクレオチドのシークエンシング中に蛍光を検出する。

20

30

【0056】

例示的には、装置100は、シークエンシングを用いてアダマーを選択するためのシークエンシングシステムで使用するためのものであり得る。実例として、シークエンシングシステムは、Illumina, Inc. (San Diego, CA) から市販されているiSEQ (商標) 100シークエンシングシステムであり得るか、又はこれを含み得る。iSEQ (商標) 100シークエンシングシステムは、図1A～図1Bに示される装置100のものと同様の様式で異なるシークエンシング試薬を貯蔵するリザーバを含む、プレフィルドカートリッジを用いて合成によるシークエンシングを実行するベンチトップシステムである。しかしながら、装置100は、好適には、Illumina, Inc. から市販されているcBot 2、NovaSeq 6000、若しくはMiniSeqシステム、又は別の供給源からのシークエンシングシステムなどの、任意の他のシークエンシングシステムでの使用に適合され得ることが理解されよう。

40

【0057】

アダマーを見つけることが所望され得る標的は、ウェル121、122、123、124の各々の中で結合され得る。標的の非限定的な例は、本明細書の他の箇所に提供される。標的は、任意の好適な連結を介して、例えば、図2A～図2Fを参照して以下に更に記載されるような様式で、捕捉プライマーを介して直接結合され得る。あるいは、標的は

50

、互いに相互作用する部分を介して間接的に結合されてもよい。例えば、図 1 A に示されるような様式で、第 1 の部分 1 3 0 は、例えば任意の好適な連結を介して、ウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 の各々の中で結合され得る。ウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 は、複数の分子 1 4 0 を含む流体と接触させてもよく、その各々の分子は、任意の好適な連結を介して互いに結合された第 2 の部分 1 5 0 及び標的 1 6 0 を含んでもよく、その結合は、場合により切断可能である。第 1 の部分 1 3 0 とウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 との間、及び第 2 の部分 1 5 0 と標的 1 6 0 との間のそれぞれの連結は、N T A - H i s - T a g、S p y t a g - S p y c a t c h e r、相補的オリゴヌクレオチドへのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、銅 (I) 触媒クリック反応、又は歪み促進アジド-アルキン環化付加などの、任意の好適な相互作用によって形成され得る。任意の好適な数のそのような連結は、8-オキソ-9-G などの切断可能な部分、又はプロテイナーゼを用いて切断され得るタンパク質を含んでもよく、以下により詳細に記載されるような様式で、1 つ以上の要素を基板から分離するために使用してもよい。

10

20

30

40

50

【0058】

図 1 B に示すような様式で、第 2 の部分 1 5 0 は、ウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 の各々の中の標的 1 6 0 を結合するように、第 1 の部分 1 3 0 に結合され得る。互いに共有結合的又は非共有結合的に相互作用する任意の好適な部分を、第 1 及び第 2 の部分 1 3 0、1 5 0 に提供してもよい。非限定的な一例では、第 1 の部分 1 3 0 はストレプトアビジンを含み、第 2 の部分 1 5 0 はビオチンを含む。別の非限定的な例では、第 1 の部分 1 3 0 はビオチンを含み、第 2 の部分 1 5 0 はストレプトアビジンを含む。あるいは、標的 1 6 0 は、N T A - H i s - T a g、S p y t a g - S p y c a t c h e r、相補的オリゴヌクレオチドへのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、銅 (I) 触媒クリック反応、又は場合により 8-オキソ-9-G などの切断可能部分、若しくはプロテイナーゼを用いて切断され得るタンパク質を含む、歪み促進アジド-アルキン付加環化などの、任意の好適な相互作用を介してウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 の各々の中で結合され得る。簡単には、単一の第 1 の部分 1 3 0、単一の第 2 の部分 1 5 0、及び単一の標的 1 6 0 が、各ウェル内にあるものとして示されているが、任意の好適な数の第 1 及び第 2 の部分並びに標的が各ウェル内で結合されてもよく、かつ各ウェルはその中に結合された同じ数若しくは異なる数の部分又は標的を有してもよいことが理解されるであろう。図 1 B に示されるような例では、捕捉プライマー 1 1 1、1 1 2 は、標的 1 6 0 とは別にウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 に結合され得る。

【0059】

図 1 C に示すような様式で、システム 1 0 0 は、複数のアダプター候補 1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4 を含み、かつウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 の各々と接触する流体を含み得る。アダプター候補 1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4 の各々は、図 1 H を参照して以下に記載されるような様式で、増幅のためにそのアダプター候補を捕捉プライマー 1 1 1 又は 1 1 2 にそれぞれ結合することができる、アダプター 1 8 1、1 8 2 を含み得る。標的に対して選択的である任意のアダプター候補が標的 1 6 0 に結合される。例えば、図 1 D に示すように、アダプター候補 1 7 4 はウェル 1 2 4 内の標的 1 6 0 に結合されるが、一方でアダプター候補 1 7 1、1 7 2、1 7 3 はウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3 内の標的 1 6 0 に結合されないままであり、例えば、ウェル 1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 2 4 に緩衝液を流すことによって、図 1 E に示すような様式で除去することができる。いくつかの例では、標的 1 6 0 に対して選択的である任意のアダプター候補は、標的に結合したときに変化する三次構造を有し得る。図 1 D によって示唆されるように、アダプター候補 1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4 の少なくともいくつかは、アダプター候補がその標的に対して選択的である場合に標的 1 6 0 に結合され得る、一本鎖ループ及び一本鎖ステムを含むヘアピン構造を含み得る。

【0060】

アンプリコンは、標的に対して選択的である任意のアダプター候補から生成され得る。例えば、標的に対して選択的である任意のアダプター候補のアンプリコンを生成すること

は、そのアプタマー候補を標的から分離することと、PCRを使用して、そのアプタマー候補を用いてアンプリコンを生成することと、を含み得る。例えば、図1Eに示すアプタマー候補174を標的160から分離し、PCRを実行して、そのアプタマー候補のアンプリコンを生成してもよい。アプタマー候補174と標的160との間のそのような分離は、標的とアプタマーとの間の相互作用を破壊する任意の好適な反応条件（複数可）、例えば、アプタマーの三次構造に対して、又はアプタマー-標的界面を安定化する力に対して塩濃度又はpHが好ましくないようにされる熱又は緩衝液交換などを用いて実行され得る。いくつかの例では、装置100は、PCRを実行するためにウェル121、122、123、124とは別個の増幅チャンバを含み得る。次に、図1Fに示すような様式で、各ウェル121、122、123、124内の標的160を、アプタマー候補174のアンプリコン174を含む流体と接触させる。アンプリコン174及びアプタマー候補174は、それらが等価な構造であるので、本明細書では同じ参照番号を用いて言及されることに留意されたい。例えば、アンプリコン174もまた標的160に対するアプタマー候補であり、アプタマー候補174と同様にそれに結合すると予想される。図1Dを参照して記載されたものと同様の様式で、例えば図1Gに示されるように、複数のアンプリコン174がそれぞれの標的160に結合されるなど、標的に対して選択的である任意のアンプリコン174が標的に結合されるようになる。しかしながら、標的からアプタマー候補を分離し、そのアプタマー候補を用いてPCRを用いてアンプリコンを生成するための追加の操作を省略してもよいことに注意されたい。

10

20

【0061】

次いで、装置100を使用して、アプタマー候補174（その任意のアンプリコンを含む）をシーケンシングしてもよい。例えば、標的160に結合していないアプタマー候補を除去した後、標的150に結合したままである任意のアプタマー候補をシーケンシングしてもよい。図1Gに示されるアプタマー候補174（その任意のアンプリコンを含む）は、図1Eを参照して記載されるような様式で標的160から分離されてもよく、クラスタ増幅は、標的に対して選択的である任意のアンプリコンの追加的なアンプリコンを生成することを含む、アプタマー候補174のアンプリコンを生成するために使用され得る。例えば、図1Aを参照して上述したように、捕捉プライマー111、112をウェル121、122、123、124内に配置してもよい。捕捉プライマー111及び捕捉プライマー112は互いに直交していてもよく、例えば、捕捉プライマー111はP5プライマーを含んでいてもよく、捕捉プライマー112はP7プライマーを含んでいてもよい。捕捉プライマー111、112は、標的160に結合されなかった任意のアプタマー候補（及びアンプリコン）が除去された後に残る、任意のアプタマー候補（その任意のアンプリコンを含む）174に結合され得る。例えば、図1Aを参照して上述したように、アプタマー候補171、172、173、174は、そのアプタマー候補を増幅のために捕捉プライマー111又は112へとそれぞれ結合することができる、アダプター（複数可）181、182を含み得る。

30

【0062】

図1Iに示されるような様式で、アプタマー候補174（又はそのアンプリコン）のアダプター181は、捕捉プライマー111に結合されてもよく、アプタマー候補のアダプター182は、捕捉プライマー112に結合されてもよい。ブリッジ増幅、又は他の好適な表面ベースの増幅プロセスを使用して、図1Iに示すような様式でアプタマー候補（又はアンプリコン）174のアンプリコン174、174'のクラスタを生成してもよい。第2の部分150及び標的160は、簡単には図1Iから省略されており、かつウェル内に残っていてもよいが、又は例えば、リンカーテザリング標的160を部分130に切断するか、若しくはリンカー切断部分130を表面に切断することによって除去されてもよいかのいずれかであることに留意されたい。検出回路190は、例えば当技術分野で公知のような様式で合成によるシーケンシングを用いて、捕捉プライマーに結合されたアンプリコン174、174'をシーケンシングし得る。例示的には、ポリメラーゼを使用して、それぞれのアンプリコン174、174'の配列に基づいて標識（例えば、蛍光標

40

50

識された)ヌクレオチドを用いてプライマー111又は112を伸長することができ、検出回路190は、それらのヌクレオチドの標識によって生成されたシグナルを用いてそのようなヌクレオチドが付加されている配列を同定することができる。シーケンシングされたアダプター候補(又はそのアンプリコン174)は、例えば、そのようなアダプター候補が複数の操作によって標的160に結合されており、標的に対する選択性を示しているので、標的160に対するアダプターであると見なされ得る。

【0063】

図1Aを参照して上述したように、アダプター選択プロセスのための標的は、捕捉プライマーを用いるなどの任意の好適な様式でウェル内に結合され得る。例えば、図2A～図2Fは、シーケンシングを用いてアダプターを選択するための代替プロセスフローで使用される、例示的な装置及び操作を概略的に示す。図2Aに示す例では、第1の部分は捕捉プライマーによって各ウェル内で結合され、例えば、第1の部分230は、捕捉プライマー211を介して基板210に結合される一方で、第1の部分230'は、捕捉プライマー212を介して基板210に結合される。捕捉プライマー211及び捕捉プライマー212は互いに直交していてもよく、例えば、捕捉プライマー211はP5プライマーを含んでいてもよく、捕捉プライマー212はP7プライマーを含んでいてもよい。第1の部分230、230'は、図1Aを参照して説明したような様式で、第2の部分150及び標的160を含む、分子140を含む流体と接触させることができる。図2Bに示されるように、第2の部分150は、標的分子160を、捕捉プライマー211(例えば、ウェル内、具体的には図示せず)を介して基板210に結合するように第1の部分230に結合され得る一方で、別の第2の部分150は、標的分子160を捕捉プライマー212(例えば、同じウェル又は別のウェル内であり、具体的に示されていない)を介して基板210に結合するように、第1の部分230'に結合され得る。図2Cに示すように、標的160に対して選択的であるアダプター候補(又はそのアンプリコン)174は、例えば、図1D及び図1Gを参照して説明したような様式で、それに結合され得る。図2Dに示すように、アダプター候補174は、図1Eを参照して説明したような様式で、増幅のために標的160から分離され得る。

【0064】

いくつかの例では、第1の部分230、230'は、捕捉プライマー211、212から脱離可能であってもよい。したがって、図2Eに示されるような様式で、第1の部分230、230'、第2の部分150、及び標的160は、第1の部分230、230'をそれぞれのその捕捉プライマー211、212から分離することによって基板210から脱離され得る。例示的には、捕捉プライマー211、212は、シーケンシングを実行する前に、切断されて、第1の部分230、230'及びそれに結合した任意の要素を脱離することができる、8-オキソーGなどの切断可能な部分を含み得る。例えば、図2Fに示されるように、アダプター候補174及びそのアンプリコン174'のアダプター181、181'は、それぞれの捕捉プライマー211にハイブリダイズされてもよく、アダプター候補及びそのアンプリコンのアダプター182、182'は、図1H～図1Iを参照して記載されるような増幅及びシーケンシングのために、それぞれの捕捉プライマー212にハイブリダイズされ得る。あるいは、本開示を通して提供されるような例では、標的160、リンカー(複数可)、第1の部分、及び第2の部分の任意の好適なものは、プロテイナーゼを用いて、消化され、したがって基板及び/又は捕捉プライマーから分離され得るタンパク質を含み得る。

【0065】

標的と接触するアダプター候補は、任意の好適な配列及び構成成分を含み得ることが理解されよう。例えば、図3は、図1A～図1I又は図2A～図2Fを参照して説明したような装置又はプロセスフローで使用するための、例示的なアダプター候補を概略的に示す。図3に示す非限定的な例では、アダプター候補171、172、173、174は、各々、標的に対して潜在的に選択的であり得るオリゴヌクレオチド部分配列(領域)171'、172'、173'、174'と、オリゴヌクレオチド部分配列に結合したアダプター 150

8 1 及び 1 8 2 とを含む。オリゴヌクレオチド部分配列 1 7 1 ”、1 7 2 ”、1 7 3 ”、1 7 4 ” は、互いに異なってもよい。各アダプター 1 8 1 は、任意選択のスペーサー 3 0 0 と、捕捉プライマー 1 1 1 に相補的である捕捉プライマーアダプター 3 1 1 と、適切な場合、及びそのような操作がプロセスフローに含まれる場合には、アダプター候補の P C R 増幅を実行するために使用され得る任意選択の P C R アダプター 3 2 0 と、を含み得る。同様に、各アダプター 1 8 2 は、任意選択のスペーサー 3 0 0 と、捕捉プライマー 1 1 2 に相補的である捕捉プライマーアダプター 3 1 2 と、適切な場合、及びそのような操作がプロセスフローに含まれる場合には、アダプター候補の P C R 増幅を実行するために使用され得る任意選択の P C R アダプター 3 2 0 と、を含み得る。スペーサー 3 0 0 は、捕捉プライマーアダプター 3 1 1 がオリゴヌクレオチド部分配列の標的 1 6 0 への好適な結合を阻害しないように、オリゴヌクレオチド部分配列 1 7 1 ”、1 7 2 ”、1 7 3 ”、1 7 4 ” と、捕捉プライマーアダプター 3 1 1 又は 3 1 2 との間に好適な距離を提供し得る。例示的には、スペーサー 3 0 0 は、5 個以上のヌクレオチド、1 0 個以上のヌクレオチド、又は 1 5 個以上のヌクレオチドを含み得る。

【0066】

任意の好適なシステム、方法、及び構成物を使用して、本教示に基づいてアダプターを選択することができることが理解されよう。例えば、図 4 は、シーケンシングを用いてアダプターを選択するためのプロセスフローにおける、例示的な操作を概略的に示す。図 4 に示す方法 4 0 0 は、基板内に配置された複数のウェルの各ウェル中に標的を結合することを含む（操作 4 1 0）。例えば、図 1 A を参照して記載される標的 1 6 0 は、例えば、図 2 A を参照して記載されるような様式で、捕捉プライマーなどの好適なリンカーを介して、各ウェル内の基板に直接結合され得る。又は、例えば、標的 1 6 0 は、図 1 A ～ 図 1 B を参照して説明したような様式で、基板に結合された第 1 の部分と、標的に結合され、かつ第 1 の部分に結合されるようになる第 2 の部分とを介して、各ウェル内の基板に間接的に結合され得る。図 4 に示す方法 4 0 0 はまた、ウェルの各々を、複数のアダプター候補を含む流体と接触させることを含む（操作 4 2 0）。例えば、ウェルは、図 1 C を参照して記載されるような様式でアダプターライブラリ 1 7 1、1 7 2、1 7 3、1 7 4 と接触され得るか、又は図 1 F を参照して記載されるような様式でアダプター 1 7 4 のアンプリコンと接触され得る。図 4 に示す方法 4 0 0 は、ウェルの少なくとも 1 つの中で、標的に対して選択的である任意のアダプター候補を標的に結合させることを含む（操作 4 3 0）。例えば、アダプター候補 1 7 4（又はその任意のアンプリコン）は、図 1 D、図 1 G、又は図 2 C を参照して説明したような様式で、標的 1 6 0 に結合され得る。図 4 に示す方法 4 0 0 は、標的に結合されていない任意のアダプター候補を除去することを含む（操作 4 4 0）。例えば、図 1 E を参照して説明したような様式で、アダプター候補 1 7 1、1 7 2、1 7 3 はウェルを通して緩衝液を流すことによって除去され得るが、一方でアダプター候補 1 7 4 は、そのような流れにもかかわらず標的 1 6 0 に結合したままである。図 4 に示す方法 4 0 0 は、標的に対して選択的である任意のアダプターを同定するために、除去後に残る任意のアダプター候補をウェル内でシーケンシングすることを含む（操作 4 5 0）。例えば、アダプター候補 1 7 4 のアンプリコン（又はそのアンプリコン）が生成されてもよく、そのようなアンプリコンがシーケンシングされてもよい。

【0067】

更なるコメント

本明細書に記載されている利益を実現するため、本明細書に記載されている本開示の態様の各々の任意の個々の特徴／例は、任意の好適な組み合わせと一緒に実施されてもよいこと、及びこれらの態様のいずれか 1 つ以上からの任意の特徴／例は、任意の好適な組み合わせで、本明細書に記載されている他の態様の特徴のいずれかと一緒に実施されてもよいことを理解すべきである。

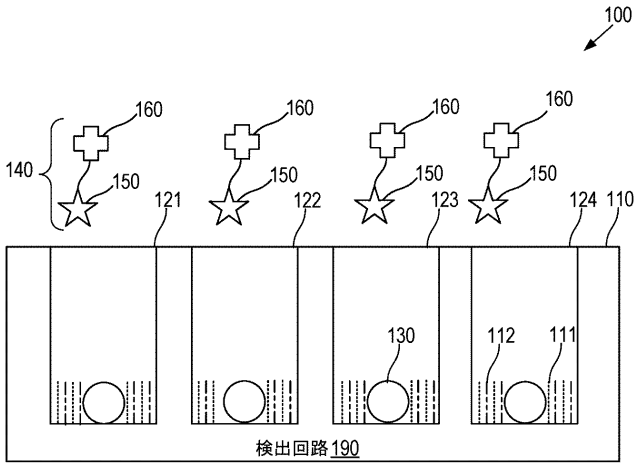
【0068】

様々な例示的な例が上に記載されているが、様々な変更及び改変が、本発明から逸脱することなく、本明細書において行われ得ることは、当業者に明白であろう。添付の特許請

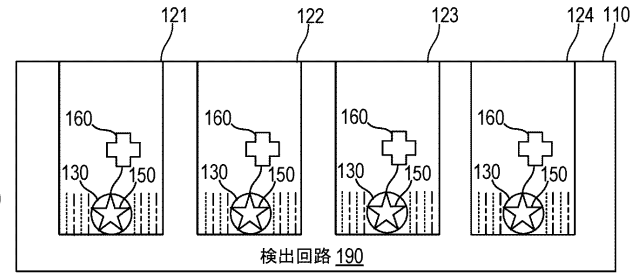
求の範囲は、本発明の真の趣旨及び範囲内に収まる、このような変更及び改変の全てを包含することが意図される。

【図面】

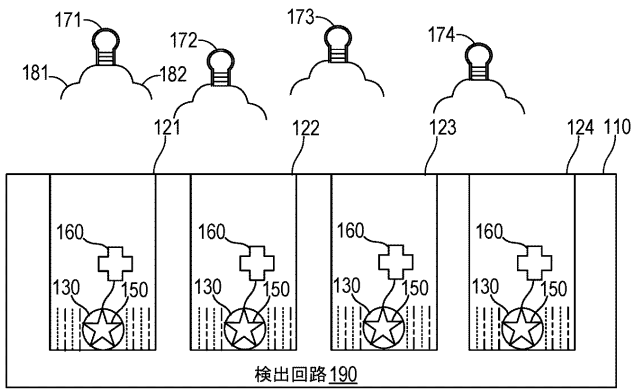
【図 1 A】



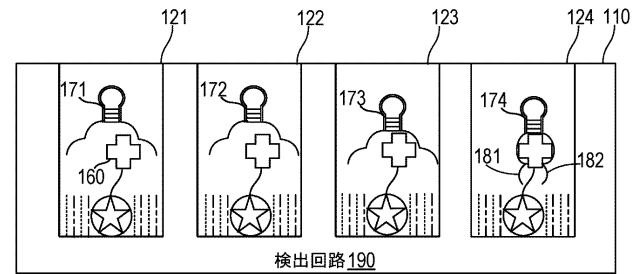
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



10

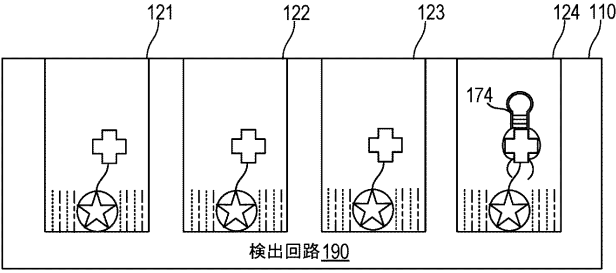
20

30

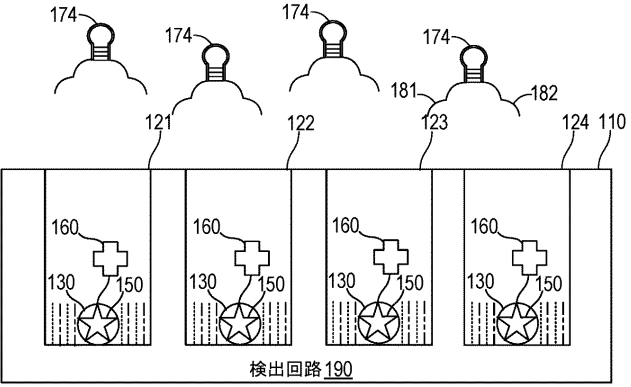
40

50

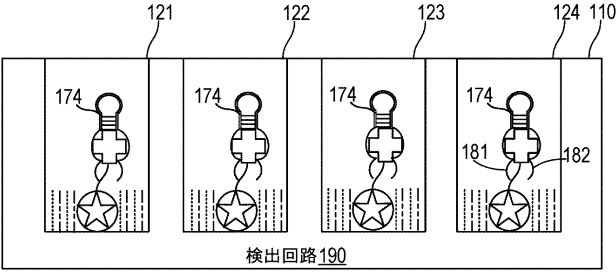
【図 1 E】



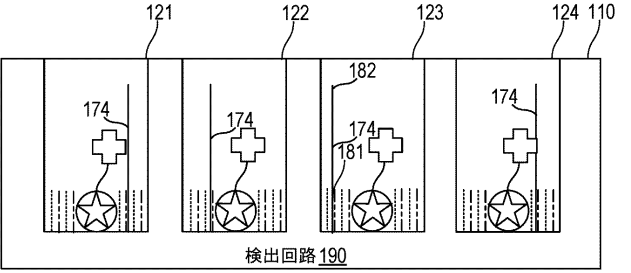
【図 1 F】



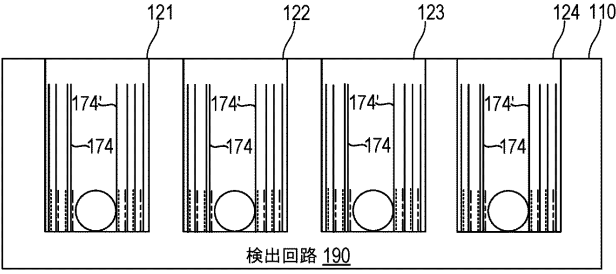
【図 1 G】



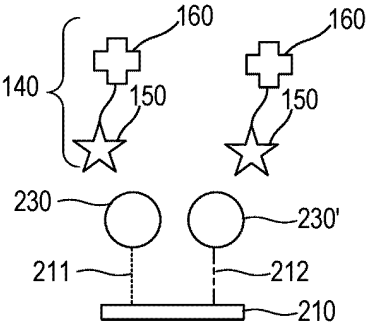
【図 1 H】



【図 1 I】



【図 2 A】



10

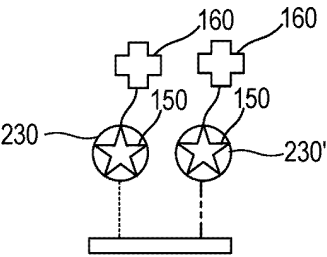
20

30

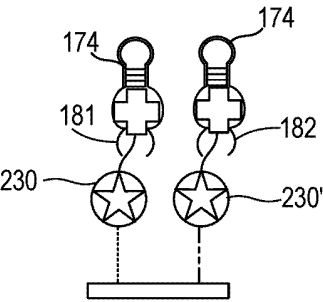
40

50

【図 2 B】

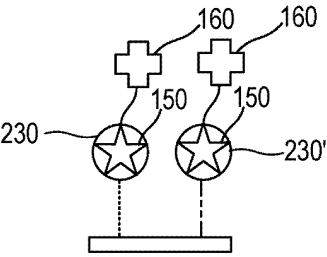


【図 2 C】

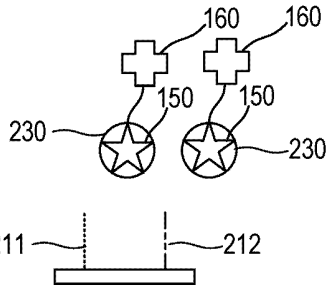


10

【図 2 D】

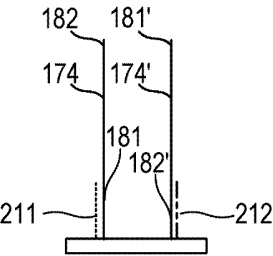


【図 2 E】

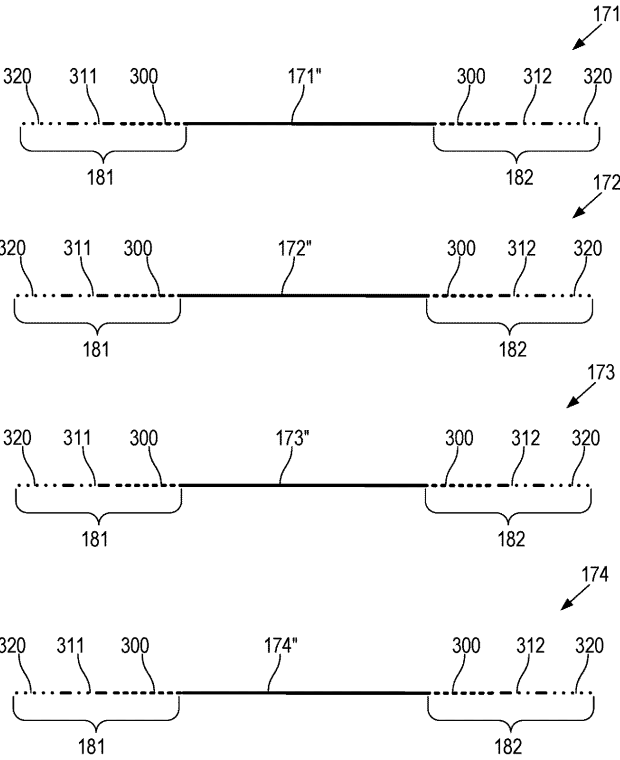


20

【図 2 F】



【図 3】

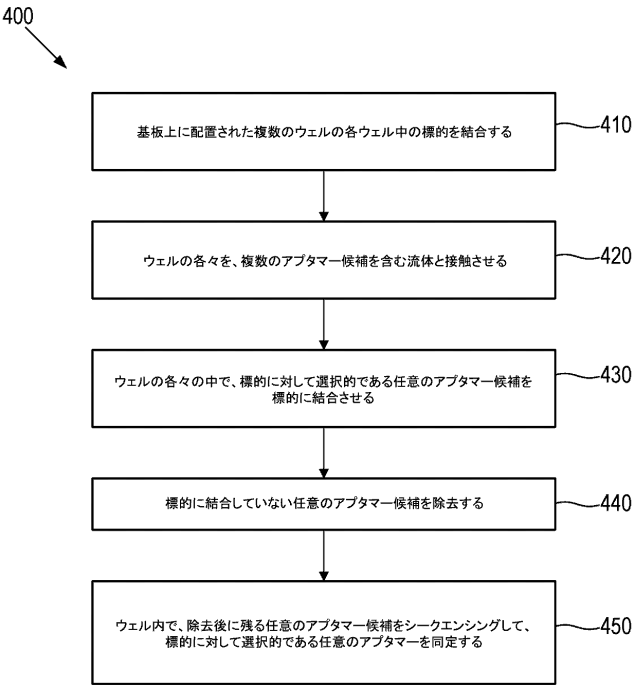


30

40

50

【図 4】



【配列表】

2024500261000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

CORRECTED VERSION

International application No

PCT/US2021/063835

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6811 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/151688 A2 (UNIV SYRACUSE [US]; BORER PHILIP N [US]; MCPHIE MARK P [US]) 17 December 2009 (2009-12-17) see whole doc. esp. claims, Figure 6, -----	1-42
X	WO 2019/236548 A1 (CHAN ZUCKERBERG BIOHUB INC [US]; UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 12 December 2019 (2019-12-12) see whole doc. esp. claims, Figures and par. 4 -----	1-42
X	US 2014/303030 A1 (REINEMANN CHRISTINE [DE] ET AL) 9 October 2014 (2014-10-09) see whole doc., esp. claims and Figures 1 and 5 -----	1-42
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 May 2022		Date of mailing of the international search report 09/05/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mueller, Frank

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

CORRECTED VERSION

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/063835

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

CORRECTED VERSION

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/063835

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2009151688	A2	17-12-2009	AU	2009258033 A1		17-12-2009
			CA	2718337 A1		17-12-2009
			CN	102066562 A		18-05-2011
			EP	2260103 A2		15-12-2010
			US	2011263459 A1		27-10-2011
			WO	2009151688 A2		17-12-2009

WO 2019236548	A1	12-12-2019	US	2021324374 A1		21-10-2021
			WO	2019236548 A1		12-12-2019

US 2014303030	A1	09-10-2014	DE 102011085473	A1		02-05-2013
			DK	2771485 T3		29-10-2018
			EP	2771485 A1		03-09-2014
			ES	2691734 T3		28-11-2018
			HK	1200499 A1		07-08-2015
			JP	6387302 B2		05-09-2018
			JP	2014532396 A		08-12-2014
			PT	2771485 T		07-11-2018
			US	2014303030 A1		09-10-2014
			WO	2013060777 A1		02-05-2013

フロントページの続き

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

F ターム (参考) 4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR48 QR62 QR65 QS15
 QS25 QX01