

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7083393号
(P7083393)

(45)発行日 令和4年6月10日(2022.6.10)

(24)登録日 令和4年6月2日(2022.6.2)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A

請求項の数 7 (全16頁)

(21)出願番号	特願2020-515076(P2020-515076)	(73)特許権者	591003013 エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(86)(22)出願日	平成30年10月4日(2018.10.4)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル ・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4
(65)公表番号	特表2020-537500(P2020-537500 A)	(74)代理人	100118902 弁理士 山本 修
(43)公表日	令和2年12月24日(2020.12.24)	(74)代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/076977	(74)代理人	100120112 中西 基晴
(87)国際公開番号	WO2019/068797	(72)発明者	ジョンソン, ジェニー・エイ アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5
(87)国際公開日	平成31年4月11日(2019.4.11)		最終頁に続く
審査請求日	令和2年4月24日(2020.4.24)		
(31)優先権主張番号	62/569,475		
(32)優先日	平成29年10月6日(2017.10.6)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 単一分子配列決定の試料調製のための環化方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸を配列決定する方法であって、

- a) アダプター配列を標的二本鎖核酸の 5' 末端および 3' 末端付けて、アダプター付加された標的二本鎖核酸を形成するステップであって、ここでアダプターが、ライゲーションにより標的二本鎖核酸の 5' 末端および 3' 末端付けられる、ステップ；
- b) アダプター付加された標的二本鎖核酸を二本鎖骨格核酸と接触させるステップ；
- c) 二本鎖骨格核酸と、アダプター付加された標的二本鎖核酸との両方に一本鎖オーバーハングを生成するステップ；
- d) 二本鎖骨格核酸の一本鎖オーバーハングを、アダプター付加された標的二本鎖核酸の一本鎖オーバーハングとハイブリダイズするステップ；
- e) 二本鎖骨格核酸の末端を、アダプター付加された標的二本鎖核酸の末端とライゲーションして、環状分子を形成するステップ；
- f) 環状分子の鎖同士を分離して、一本鎖環状分子を生成するステップ；
- g) 配列決定プライマーを一本鎖環状分子のそれぞれとアニーリングするステップ；および
- h) アニーリングされた配列決定プライマーを伸長し、それにより標的二本鎖核酸を配列決定するステップ

を含む方法。

【請求項 2】

アダプターが、配列決定プライマー結合部位を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アダプターまたは二本鎖骨格核酸が、少なくとも1つのバーコードを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

ステップf)における鎖同士が、熱または化学的手段により分離される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップf)における鎖同士が、一方の鎖に切れ目を入れることおよび切れ目が入った鎖をエキソヌクレアーゼ消化により除去することにより分離される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

二本鎖骨格核酸が、捕捉部分に対するリガンドを含み、ステップf)における鎖が、固体支持体上に捕捉される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップh)における配列決定するステップが、ナノポアデバイスを利用する、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、核酸分析の分野に、より具体的には核酸配列決定のために環状鋳型を調製することに関する。

20

【背景技術】**【0002】**

環状核酸鋳型は、核酸分析において複数の用途を有する。線状核酸は、例えばローリングサークル増幅(RCA)による増幅ならびに後続の検出および定量により環状形態に変換される。米国特許第RE44265号を参照されたい。配列決定における環状鋳型の使用も、当技術分野において公知である。米国特許第7,302,146号および同第8,153,375号を参照されたい。これらの戦略は、標的核酸の両方の鎖を含む環状鋳型を創出する。本発明は、標的核酸の各鎖からの環状一本鎖分子を含む、配列決定に適した鋳型のライブラリーを創出する新規な効率的な方法である。本方法は、事実上無制限の長さの鋳型の創出を可能にする。

30

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0003】**

本発明は、核酸の配列決定のための環状核酸分子または環状分子のライブラリーを形成する方法である。

一部の実施形態では、本発明は、標的核酸から環状分子を形成する方法であって、アダプター配列を標的核酸の末端に付けて、アダプター付加された標的核酸を形成するステップ；アダプター付加された標的核酸を二本鎖骨格核酸と接触させるステップ；骨格と、アダプター付加された標的核酸との両方に一本鎖オーバーハングを生成するステップ；骨格の一本鎖オーバーハングを、アダプター付加された標的核酸の一本鎖オーバーハングとハイブリダイズするステップ；骨格の末端を、アダプター付加された標的核酸の末端とライゲーションして、環状分子を形成するステップを含む方法である。一部の実施形態では、アダプターは、ライゲーションにより標的核酸の末端に付けられる。他の実施形態では、アダプターは、5'部分にアダプター配列を含む、標的に特異的な2部構成のプライマーの伸長により標的核酸の末端に付けられる。アダプター付加された標的核酸は、骨格と接触される前に増幅される。

40

【0004】

一部の実施形態では、アダプターおよび骨格は、相補的末端配列を含む。一本鎖オーバーハングは、ヌクレアーゼ消化により生成される。骨格およびアダプター配列は、ホスホロ

50

チオエート結合を有するヌクレオチドなどの、エキソヌクレアーゼのヌクレアーゼ耐性修飾を含む。一部の実施形態では、本方法は、ライゲーション前にポリメラーゼのフィルインステップをさらに含む。

【0005】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される標的核酸から環状分子を形成するステップを含む、標的核酸を配列決定する方法である。本方法は、アダプター配列を標的核酸の末端に付けて、アダプター付加された標的核酸を形成するステップ；アダプター付加された標的核酸を二本鎖骨格核酸と接触させるステップ；骨格と、アダプター付加された標的核酸との両方に一本鎖オーバーハングを生成するステップ；骨格の一本鎖オーバーハングを、アダプター付加された標的核酸の一本鎖オーバーハングとハイブリダイズするステップ；骨格の末端を、アダプター付加された標的核酸の末端とライゲーションして、環状分子を形成するステップ；環状分子の鎖同士を分離して、一本鎖環状分子を生成するステップ；配列決定プライマーを一本鎖環状分子のそれぞれとアニーリングするステップ；およびアニーリングされた配列決定プライマーを伸長し、それにより標的核酸を配列決定するステップを含み得る。アダプターは、配列決定プライマー結合部位および少なくとも1つのバーコードを含む場合がある。一部の実施形態では、骨格は、少なくとも1つのバーコードを含む。核酸の鎖同士は、熱もしくは化学的手段により、または一方の鎖に切れ目を入れることおよび切れ目が入った鎖をエキソヌクレアーゼ消化により除去することにより分離することができ、例えば、骨格が少なくとも1つのデオキシウラシルを含む場合、試料は、ウラシル-N-DNAグリコシラーゼにより接触される。一部の実施形態では、骨格は、捕捉部分に対するリガンドを含み、ライゲーションされた環状分子の一方の鎖が固体支持体上に捕捉される。

10

20

【0006】

一部の実施形態では、配列決定は、鎖置換型DNAポリメラーゼを利用する。一部の実施形態では、配列決定は、ナノポアデバイスを利用する。一部の実施形態では、本方法は、ライゲーションステップの後に精製ステップをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】配列決定のための環状鋳型を創出する先行技術の戦略を示す図である。

30

【図2】本方法のステップ1：ユニバーサルアダプターを配列決定プライマー部位とライゲーションするステップを示す図である。

【図3】本方法の代替的なステップ1：配列決定プライマー部位を有するタグ付き遺伝子特異的プライマーを用いた増幅を示す図である。

【図4】本方法のステップ2：エキソヌクレアーゼ消化および環化を示す図である。

【図5】本方法の代替的なステップ2：ギブソンアセンブリを使用する環化を示す図である。

【図6】本方法の代替的なステップ2：固体支持体上で捕捉した、ギブソンアセンブリを使用する環化を示す図である。

【図7】本方法の代替的なステップ1：配列決定プライマー部位を有さないユニバーサルアダプターをライゲーションするステップを示す図である。

40

【図8】本方法の代替的なステップ1：配列決定プライマー部位を有さないタグ付き遺伝子特異的プライマーを用いた増幅を示す図である。

【図9】本方法の代替的なステップ2：骨格が配列決定プライマー部位を含む、ギブソンアセンブリを使用する環化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

定義

以下の定義は、本開示の理解を助けるものである。

「試料」という用語は、標的核酸を含有するまたは含有すると推定される任意の組成物を

50

指す。これは、個体、例えば、皮膚、血漿、血清、髄液、リンパ液、滑液、尿、涙液、血球、器官および腫瘍から単離された組織または液体の試料、ならびにまた、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPET) およびそれから単離された核酸を含む、個体から採取された細胞から樹立された *in vitro* 培養物の試料を含む。試料はまた、無細胞性 DNA (cfDNA) または循環腫瘍 DNA (ctDNA) を含有する無細胞性血液画分などの無細胞材料を含む場合がある。

【0009】

「核酸」という用語は、DNA、RNA、および cDNA、mRNA などのそれらの下位区分を含む、ヌクレオチドのポリマー（例えば、天然および非天然の両方のリボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチド）を指す。核酸は、一本鎖または二本鎖の場合があり、一般的に 5' - 3' ホスホジエステル結合を含有するとはいえ、場合によりヌクレオチド類似体は、他の結合を有する場合がある。核酸は、天然塩基（アデノシン、グアノシン、シトシン、ウラシルおよびチミジン）ばかりでなく、非天然塩基も含む場合がある。非天然塩基のいくつかの例には、例えば、Seeleら、(1999年) Helv. Chim. Acta 82: 1640 に記載されたものが挙げられる。非天然塩基は、例えば、核酸二重鎖の安定性を増大させる、ヌクレアーゼ消化を阻害する、またはプライマー伸長もしくは鎖重合を遮断する、特定の機能を有する場合がある。

10

【0010】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖核酸である。オリゴヌクレオチドは、より短いポリヌクレオチドを記載するために時々使用される用語である。オリゴヌクレオチドは、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって、例えば、Narangら (1979年) Meth. Enzymol. 68: 90~99; Brownら (1979年) Meth. Enzymol. 68: 109~151; Beaucageら (1981年) Tetrahedron Lett. 22: 1859~1862; Matteucciら (1981年) J. Am. Chem. Soc. 103: 3185~3191 に記載されたような直接化学合成を含む方法によって調製される。

20

【0011】

「プライマー」という用語は、標的核酸中の配列（「プライマー結合部位」）とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチドであって、核酸の相補鎖に沿った合成の開始点として、このような合成に適した条件で作用することが可能な一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。

30

【0012】

「アダプター」という用語は、別の配列に追加的な性質を移入するようにヌクレオチド配列に付加される場合がある当該ヌクレオチド配列を意味する。アダプターは、典型的には一本鎖もしくは二本鎖であり得る、または一本鎖部分および二本鎖部分の両方を有する場合がある、オリゴヌクレオチドである。

【0013】

「ライゲーション」という用語は、ある分子の 5' - リン酸基が別の分子の 3' - ヒドロキシル基と反応する、2つの核酸鎖をつなぐ縮合反応を指す。ライゲーションは、典型的にはリガーゼまたはトポイソメラーゼによって触媒される酵素反応である。ライゲーションは、2つの一本鎖をつないで1つの一本鎖分子を創出する場合がある。ライゲーションはまた、それぞれ二本鎖分子に属する2つの鎖をつなぎ、したがって2つの二本鎖分子をつなぐ場合がある。ライゲーションはまた、二本鎖分子の両方の鎖を別の二本鎖分子の両方の鎖とつなぎ、したがって2つの二本鎖分子をつなぐ場合がある。ライゲーションはまた、二本鎖分子内の鎖の2つの末端をつなぎ、したがって二本鎖中のニックを修復する場合がある。

40

【0014】

「バーコード」という用語は、検出および同定できる核酸配列を指す。バーコードは、様々な核酸内に組み込むことができる。バーコードは、例えば、2、5、20ヌクレオチド

50

と十分に長いことにより、試料中で、バーコードを組み込んでいる核酸をバーコードにより識別または群分けすることができる。

【0015】

「多重識別子」または「MID」という用語は、標的核酸の起源（例えば、核酸が由来する試料）を同定するバーコードを指す。同じ試料からのすべてまたは実質的にすべての標的核酸は、同じMIDを共有する。異なる起源または試料からの標的核酸を混合し、同時に配列決定することができる。MIDを使用して、配列のリードを標的核酸の起源となる個別の試料に割り当てることができる。

【0016】

「ユニーク分子識別子」または「UID」という用語は、バーコードが付けられた核酸を同定する当該バーコードを指す。同じ試料からのすべてまたは実質的にすべての標的核酸は、異なるUIDを有する。同じ起源標的核酸に由来する子孫（例えば、アンプリコン）のすべてまたは実質的にすべては、同じUIDを共有する。

10

【0017】

「ユニバーサルプライマー」および「ユニバーサルプライミング結合部位」または「ユニバーサルプライミング部位」という用語は、異なる標的核酸に（典型的にはそれへの *in vitro* 付加により）存在するプライマーおよびプライマー結合部位を指す。ユニバーサルプライミング部位は、アダプターを使用して、または5'部分にユニバーサルプライミング部位を有する標的特定の（非ユニバーサル）プライマーを使用して、複数の標的核酸に付加される。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライミング部位と結合し、この部位からのプライマー伸長を指示することができる。

20

【0018】

より一般的には、「ユニバーサル」という用語は、任意の標的核酸に付加することができる、標的核酸配列とは無関係にその機能を果たすことができる、核酸分子（例えば、プライマーまたは他のオリゴヌクレオチド）を指す。ユニバーサル分子は、相補鎖とハイブリダイズすることによりその機能を果たす場合があり、例えば、ユニバーサルプライマー結合部位に対するユニバーサルプライマーまたはユニバーサルプライマー配列に対するユニバーサル環化オリゴヌクレオチドである。

【0019】

「標的配列」、「標的核酸」または「標的」という用語は、検出または分析すべき試料中の核酸配列の一部を指す。標的という用語は、標的配列のすべての変異体、例えば1つまたは複数の突然変異体および野生型変異体を含む。

30

【0020】

「増幅」という用語は、標的核酸の追加的なコピーを作製するプロセスを指す。増幅は、指数関数的増幅の1つよりも多いサイクル、例えば複数のサイクルを有し得る。増幅はまた、1つだけのサイクルを有する（標的核酸の単一のコピーを作製する）場合がある。コピーは、追加的な配列、例えば、増幅のために使用されるプライマー中に存在する配列を有する場合がある。

【0021】

「配列決定」という用語は、標的核酸中のヌクレオチドの配列を決定する任意の方法を指す。

40

「ギブソンアセンブリ」という用語は、例えば、Gibsonら、(2009年)、*Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*、*Nature Methods*、6(5):343~348および米国特許第8,968,999号に記載された、等温 *in vitro* 組み換え方法である。本方法は、一般的に、エキソヌクラーゼ消化して少なくとも部分的な付着末端を創出するステップ、末端同士をアニーリングするステップ、ポリメラーゼで埋めるステップおよび末端同士をライゲーションするステップによる、核酸をつなぐ（アセンブルする）ことを含む。

【0022】

50

「スティッチアダプター」という用語は、骨格オリゴヌクレオチドの末端の配列と相補的な配列を有するアダプターを指す。例えばエキソヌクレアーゼにより一本鎖にされた場合、アダプター付加された核酸の末端部分（末端）は、骨格の末端とハイブリダイズすることが可能である。スティッチアダプターは、バーコードおよびプライマー結合部位などの追加的な有用エレメントを含有する場合がある。スティッチアダプターはまた、修飾ヌクレオチドを含有する場合がある。

【0023】

「骨格」という用語は、別の核酸が自己ライゲーションして環になるのを容易にするオリゴヌクレオチドまたは核酸を指す。一般的に、骨格は、他方の核酸の末端における配列と相補的な配列、例えばアダプター配列を有するように設計される。例えばエキソヌクレアーゼにより一本鎖にされた場合、骨格の末端部分（例えば、3'末端部分）は、アダプター付加された核酸の3'-末端部分とハイブリダイズすることが可能である。骨格は、バーコードおよびプライマー結合部位などの追加的な有用エレメントを含有する場合がある。骨格はまた、修飾ヌクレオチドを含有する場合がある。骨格は、標的核酸の特定セットの環化にどれが最も適するかを基に、異なる長さ（例えば200、500、1000、2000bp）であることもできよう。

【0024】

本明細書に使用される二本鎖核酸に関連する「相補的」という用語は、相補的一本鎖を生成することが可能二本鎖核酸を指す。例えば、1つまたは複数のヌクレオチドが5'末端から除去された場合、露出した3'末端オーバーハングは、相互にハイブリダイズすることが可能である。

【0025】

本発明は、核酸配列決定などの下流の分析のための環状標的核酸分子およびこのような分子のライブラリーを作製する方法である。簡潔には、本方法は、アダプターライゲーションまたはタグ付き遺伝子特異的プライマーを用いた増幅のいずれかにより導入されたアダプター配列を有する、増幅された標的核酸を利用する。二本鎖の増幅された標的核酸は、骨格オリゴヌクレオチドと接触される。標的および骨格は、部分的に一本鎖にされる。部分的に一本鎖の標的核酸は、アニーリングおよびライゲーションされて、標的配列を含む環状核酸を創出する。二本鎖環の各鎖は、配列決定などの独立した下流の分析のためのプライマー結合部位を含む。

【0026】

本発明の方法は、単一分子配列決定（SMS）プラットフォームのための試料調製方法として使用される場合がある。二本鎖環状DNA分子は、両方の鎖上に配列決定プライマー結合部位を含有し、したがって、相互に独立したプラス鎖およびマイナス鎖の両方の環状配列決定を容易にする。

【0027】

本方法は、既存の環化方法と比べて利点を有する。米国特許第7,302,146号および同第8,153,375号を参照されたい。SMSのための一本鎖環状DNA鑄型を生成するための現在の方法は、それぞれ配列決定プライマー結合部位を含有する2つのヘアピン型アダプターへの二本鎖標的のライゲーションを伴う。このアプローチでは、一緒につながったプラス鎖およびマイナス鎖の配列決定から環状コンセンサス配列が得られる（図1）。

【0028】

本方法は、骨格オリゴヌクレオチドを利用して、例えばUS2012003657（その中の図1A参照）に使用された「ベクター」オリゴヌクレオチドに類似するライゲーションを容易にする。本発明の方法は、先行技術の二分子ライゲーションと比べて効率の大きな改善であり、それは、本方法が、部分的エキソヌクレアーゼ消化を含むギブソンアセンブリを利用してアセンブリまたは環を容易にするからである。

【0029】

本発明は、試料中の標的核酸を検出するステップを含む。一部の実施形態では、試料は、

10

20

30

40

50

対象または患者に由来する。一部の実施形態では、試料は、対象または患者から、例えば生検により得られた固形組織または固形腫瘍の断片を含む場合がある。試料はまた、体液（例えば、尿、喀痰、血清、血漿もしくはリンパ、唾液、喀痰、汗、涙液、脳脊髄液、羊水、滑液、心膜液、腹水、胸水、嚢胞液、胆汁、胃液、腸液、および/または糞便試料）を含む場合がある。試料は、腫瘍細胞が存在し得る全血または血液画分を含む場合がある。一部の実施形態では、試料、特に液体試料は、無細胞性腫瘍DNAまたは腫瘍RNAを含む無細胞性DNAまたはRNAなどの無細胞材料を含む場合がある。一部の実施形態では、試料は、無細胞性試料、例えば、無細胞性腫瘍DNAまたは腫瘍RNAが存在する無細胞性血液由来試料である。他の実施形態では、試料は、培養試料、例えば、感染病原体または感染病原体に由来する核酸を含有するまたは含有する疑いがある培養物または培養上清である。一部の実施形態では、感染病原体は、細菌、原生動物、ウイルスまたはマイコプラズマである。

10

【0030】

標的核酸は、試料中に存在し得る目的の核酸である。一部の実施形態では、標的核酸は、遺伝子または遺伝子断片である。他の実施形態では、標的核酸は、遺伝子変異体、例えば、一塩基多型もしくは一塩基変異体（SNVのSNP）を含む多型、または例えば遺伝子融合を結果としてもたらす遺伝子再配列を含有する。一部の実施形態では、標的核酸は、バイオマーカーを含む。他の実施形態では、標的核酸は、特定の生物に特徴的であり、例えば、病原生物または病原生物の特徴、例えば薬物感受性もしくは薬物耐性の同定を助ける。なお他の実施形態では、標的核酸は、ヒト対象の特徴、例えば対象の独特のHLAまたはKIR遺伝子型を定義するHLAまたはKIR配列である。なお他の実施形態では、試料中のすべての配列は、例えばショットガンゲノム配列決定での標的核酸である。

20

【0031】

本発明の実施形態では、二本鎖標的核酸は、本発明の鋳型構成に変換される。一部の実施形態では、標的核酸は、自然界で一本鎖形態（例えば、mRNA、マイクロRNA、ウイルスRNAを含むRNA；または一本鎖ウイルスDNA）で存在する。一本鎖標的核酸は、二本鎖形態に変換されて、請求された方法のさらなるステップを可能にする。

【0032】

より長い標的核酸は、断片化される場合があるとはいえ、一部の適用では、より長いリードを達成するためにより長い標的核酸が望ましい場合がある。一部の実施形態では、標的核酸は、自然に断片化され、例えば、保存された試料中に見出されるDNAのような循環無細胞性DNA（cfDNA）または化学分解DNAである。他の実施形態では、標的核酸は、例えば超音波処理などの物理的手段によって、またはエンドヌクレアーゼ消化、例えば制限酵素消化によって*in vitro*で断片化される。

30

【0033】

一部の実施形態では、本発明は、標的核酸を増幅するステップを含む方法である。増幅は、オリゴヌクレオチドプライマーを利用するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または任意の他の方法であり得る。様々なPCR条件が、PCR Strategies（M. A. Innis、D. H. Gelfand、およびJ. J. Sninsky編、1995年、Academic Press、San Diego、CA）の14章；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications（M. A. Innis、D. H. Gelfand、J. J. Sninsky、およびT. J. White編、Academic Press、NY、1990年）に記載されている。

40

【0034】

増幅は、二本鎖アンプリコンを生成するために、標的的特異的配列およびスティッチアダプターの配列を含む2部構成の増幅プライマーを利用する場合がある。一部の実施形態では、所定の標的または標的核酸の群が問い合わせられている。このような実施形態では、標的的特異的増幅プライマーが使用される場合がある。プライマーは、3'部分の標的的特異的配列および5'部分のアダプター配列から構成される2部構成の構造を有する場合がある。典型

50

的には、標的特異的プライマーは、異なるオリゴヌクレオチドの対、例えばフォワードプライマーおよびリバースプライマーとして使用される。後続のステップのために、本方法の後続のステップにおいて相補鎖（すなわち、（+）鎖および（-）鎖）を識別するために、フォワードプライマーおよびリバースプライマーに異なるユニバーサル配列を付加することができる。一部の実施形態では、2部構成のプライマーのユニバーサル配列は、配列決定プライマー結合部位を含む。

【0035】

アダプターは、プライマー伸長またはライゲーションのいずれかにより標的核酸中に導入される。一部の実施形態では、プライマー伸長は、1ラウンドである。他の実施形態では、プライマー伸長は、複数のサイクル、例えばPCR増幅を通じて行われる。

10

【0036】

結果として生じる標的核酸は、アダプター配列に挟まれた標的配列を含む。アダプターは、環化のために使用される部分（骨格配列とマッチ）を含む。一部の実施形態では、アダプターは、下流のステップのためにプライマー結合部位、例えば増幅プライマー結合部位および配列決定プライマー結合部位を含有する。

【0037】

一部の実施形態では、標的核酸は、アダプターとライゲーションされる。（図2、7）。ライゲーションは、平滑末端ライゲーションまたはより効率的な付着末端ライゲーションであり得る。標的核酸またはアダプターは、鎖フィリング、すなわち、DNAポリメラーゼにより3'末端を伸長して5'-オーバーハングを除くことまたは3'-オーバーハングを3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性により消化することにより平滑末端にされる場合がある。一部の実施形態では、平滑末端にされたアダプターおよび標的核酸は、例えば、DNAポリメラーゼまたはターミナルトランスフェラーゼによってアダプターの3'末端に単一のヌクレオチドを付加し、標的核酸の3'末端に単一の相補的ヌクレオチドを付加することにより付着性にされる場合がある。なお他の実施形態では、アダプターおよび標的核酸は、制限エンドヌクレアーゼを用いた消化によって付着末端（オーバーハング）を獲得する場合がある。制限酵素認識部位を含有することが分かっている公知の標的配列について、後者の選択肢の方が有利である。上記実施形態のそれぞれでは、アダプター分子は、さらに下に記載される合成アダプターオリゴヌクレオチドの設計により所望の末端（平滑、一塩基伸長または多塩基オーバーハング）を獲得する場合がある。

20

30

【0038】

一部の実施形態では、アダプター中のオーバーハング配列は、アダプターの末端と標的分子との間のハイブリダイゼーション複合体の安定性を改変する修飾ヌクレオチドを含有する。修飾塩基は、以下のうち1つまたは複数を含む場合がある：G-クランプ、イノシン、メチル-dC、プロピニル-ピリミジン（プロピニル-dUまたはプロピニル-dC）。

【0039】

一部の実施形態では、アダプター中のオーバーハング配列は、エキソヌクレアーゼ阻害剤、例えばホスホロチオエートヌクレオチドを含有する。

一部の実施形態では、ライゲーションを達成するために他の酵素的ステップが必要とされる場合がある。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドキナーゼを使用して、標的核酸分子およびアダプター分子に5'-ホスフェートを付加する場合がある。

40

【0040】

一部の実施形態では、アダプター分子は、*in vitro*合成された人工配列である。他の実施形態では、アダプター分子は、所望の二次構造を有することが分かっている、*in vitro*合成された天然配列である。なお他の実施形態では、アダプター分子は、単離された天然分子または単離された非天然分子である。

【0041】

一部の実施形態では、アダプター配列、例えばスティッチアダプター配列および配列決定プライマー結合部位は、プライマーの5'部分にこのような配列を含有する2部構成のプライマーの使用により標的核酸に付加される。（図3、8）。

50

【0042】

一部の実施形態では、本発明は、標的核酸へのバーコードの導入を含む。個別の分子の配列決定は、典型的には、例えば米国特許第7,393,665号、同第8,168,385号、同第8,481,292号、同第8,685,678号、および同第8,722,368号に記載されたように分子バーコードを必要とする。ユニーク分子バーコードは、典型的には *in vitro* 操作の最初期ステップの間に患者の試料などの試料中の各分子に付加される短い人工配列である。バーコードは、分子およびその子孫をマーキングする。ユニーク分子バーコード (UID) は、複数の用途を有する。バーコードは、試料中のそれぞれ個別の核酸分子を追跡して、例えば、生検なしにがんを検出およびモニタリングするために患者の血液中の循環腫瘍DNA (ctDNA) 分子の存在および量を評価することを可能にする。米国特許出願第14/209,807号および同第14/774,518号を参照されたい。ユニーク分子バーコードはまた、配列決定の誤差補正のために使用することができる。単一の標的分子の子孫全体が同じバーコードでマーキングされ、バーコードを付けられたファミリーを形成する。バーコードを付けられたファミリーのすべてのメンバーにより共有されない配列における変動は、アーチファクトであり真の突然変異ではないと見なされる。バーコードはまた、ファミリー全体が元の試料中の単一の分子を表すため、位置の重複排除および標的の定量化のために使用することができる。同文献を参照されたい。

10

【0043】

本発明の一部の実施形態では、2部構成の増幅プライマーは、1つまたは複数のバーコードを含む。他の実施形態では、アダプターは、1つまたは複数のバーコードを含む。バーコードは、試料が混合されている (多重化されている) 場合の試料源を同定するために使用される多重試料ID (MID) であり得る。バーコードはまた、それぞれの元の分子およびその子孫を同定するために使用されるユニーク分子ID (UID) として役立つ場合がある。バーコードはまた、UIDとMIDとの組合せであり得る。一部の実施形態では、単一のバーコードがUIDおよびMIDの両方として使用される。

20

【0044】

一部の実施形態では、それぞれのバーコードは、予め定められた配列を含む。他の実施形態では、バーコードは、ランダム配列を含む。バーコードは、1~20ヌクレオチド長であり得る。

30

【0045】

一部の実施形態では、本発明は、別の核酸が環に自己ライゲーションするのを容易にする骨格オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドまたは核酸を利用する。(図4、5、6)。一般的に、骨格は、他方の核酸の末端における配列と相補的な配列、例えばアダプター配列を有するように設計される。例えばエキソヌクレアーゼにより一本鎖にされた場合、骨格の末端配列は、アダプター付加された核酸の一本鎖末端配列とアニーリングすることが可能である。一部の実施形態では、一方の分子の一本鎖3'-末端配列は、他方の分子の一本鎖3'-配列と相補的であることにより、2つの一本鎖部分はアニーリングし、二本鎖構造を形成することができよう。骨格は、バーコードおよびプライマー結合部位などの有用なエレメントを含有する場合がある。(図4、5、6)。一部の実施形態では、骨格は、環化のために使用されるスティッチアダプター配列だけを含有する(図7)。一部の実施形態では、骨格は、配列決定プライマー結合部位を含む(図9)。

40

【0046】

一部の実施形態では、骨格は、修飾ヌクレオチドを含有する。骨格は、標的核酸の特定セットの環化にどれが最も適するかを基に、異なる長さ(例えば200、500、1000、2000bp)であることもできよう。

【0047】

一部の実施形態では、骨格は、本明細書の下記のように捕捉部分に対するリガンドを含む。図6。

一部の実施形態では、本方法は、標的核酸の2つの鎖のうち一方だけを調べる、または2

50

つの鎖を別々に分析する。本発明は、二本鎖アンプリコンの鎖同士を分離するステップを含む。2つの鎖は、物理的手段、すなわち、アルカリ変性または熱変性により分離される場合がある。

【0048】

他の実施形態では、一方の鎖が、例えばエンドヌクレアーゼとエキソヌクレアーゼとの組み合わせにより分解される場合、鎖同士は酵素的に分離される。一部の実施形態では、例えば骨格の一方の鎖に組み込まれたデオキシウラシルの使用により、切れ目Iが一方の鎖に導入される。次いで、ウラシルがウラシル-N-DNAグリコシラーゼ(UNG)により切除され、結果として生じた脱塩基部位にホスホジエステル結合を有する鎖が、例えば熱処理により破断され、切れ目を生じる。次いで、エキソヌクレアーゼが添加されて、切れ目が入った鎖を分解し、さらなる分析のために相補鎖を無傷に残す(図5)。

10

【0049】

なお他の実施形態では、所望の鎖は、鎖をアフィニティーリガンドと選択的に結合させることが可能なアフィニティー試薬により捕捉される。

一部の実施形態では、核酸の末端は、リン酸化される。一部の実施形態では、後続のライゲーションステップを可能にするために、一方のプライマーの5'末端がリン酸化される。プライマー、またはアダプターのリン酸化は、例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)などのPNKの使用により行うことができる。

【0050】

一部の実施形態では、核酸の末端は、鎖をヌクレアーゼ消化から保護する修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、鎖は、1つまたは複数のホスホロチオエートヌクレオチドを含む。

20

【0051】

本発明は、Gibsonら、(2009年) *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*, *Nature Methods*, 6(5): 343~348および米国特許第8,968,999号に記載された、等温*in vitro*組み換え方法であるギブソンアセンブリとして知られる、核酸分子をつなぐ方法を利用する。

【0052】

一部の実施形態では、本方法は、本明細書に記載の骨格オリゴヌクレオチドおよびアダプター付加された標的核酸などの相補的末端配列を有するDNA断片を組み立てることを含む。第1のステップでは、エキソヌクレアーゼは、核酸の末端から1つまたは複数のヌクレオチドを除去する。いくつかの例では、ヌクレオチドは、5'末端から除去される。一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼは、5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性を有する。一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼは、ウイルス性エキソヌクレアーゼまたはT5エキソヌクレアーゼなどの組み換え産生されたウイルス性エキソヌクレアーゼである。エキソヌクレアーゼ処置は、骨格とアダプター付加された標的核酸との間で相補的な一本鎖DNAオーバーハングを創出する。次に、相補性末端がアニーリングされる。一部の実施形態では、アニーリングされた構造は、ギャップを含み、ギャップは、DNAポリメラーゼにより埋められる。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性を有する高忠実度DNAポリメラーゼである。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Pfuポリメラーゼなどの古細菌ポリメラーゼまたはその誘導体である(またはその活性を有する)。

30

40

【0053】

本発明は、アニーリングされた(場合により伸長された)鎖の5'末端と3'末端とをライゲーションし、それによりアダプター配列、標的核酸配列および骨格配列を含む環状分子を形成することを含むライゲーションステップをさらに含む。一部の実施形態では、リガーゼは、Taq DNAリガーゼなどの大腸菌(*E. coli*)または古細菌リガーゼである。

【0054】

50

一部の実施形態では、本発明は、過剰の骨格オリゴヌクレオチドまたは環化されていないアダプター付加された標的核酸を含む可能性がある線状核酸が反応混合物から除去されるエキソヌクレアーゼ消化ステップを含む。一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼは、Exo III、Exo VIIまたはその混合物である。

【0055】

一部の実施形態では、骨格オリゴヌクレオチドは、捕捉部分を介して固体支持体に連結される。一部の実施形態では、リガンド-捕捉部分の対は、ビオチン-ストレプトアビジン、抗体-抗原またはコンジュゲート型オリゴヌクレオチド-相補的捕捉オリゴヌクレオチドから選択される。このような実施形態では、精製ステップは、固体支持体と結合していない任意の核酸の除去ステップを含む。

10

【0056】

一部の実施形態では、本発明は、試料中の多様な標的核酸の混合物から環状核酸のライブラリーを作製する方法である。本方法は、ライゲーションなどの配列非依存的方法でアダプターを試料中の標的核酸分子に付けるステップを含む。一部の実施形態では、アダプターは、後続のステップの前にライゲーション産物を増幅できるように、ユニバーサルプライマー結合部位を含む。

【0057】

一部の実施形態では、アダプターは、プライマー結合部位を含み、増幅プライマーは、プライマーの5'部分にスティッチアダプター配列を含む。結果として生じた、アダプター付加された標的分子またはそのアンプリコンは、スティッチアダプター配列に挟まれた標的配列を含む。骨格オリゴヌクレオチドは、アダプター中に含有される配列と相補的な末端配列を含む。次いで、アダプター付加された分子またはそのアンプリコンは、本明細書に記載される骨格オリゴヌクレオチドによる環化ステップのステップに供されて、環状標的核酸分子のライブラリーを生成する。

20

【0058】

一部の実施形態では、本発明は、試料中の標的核酸を核酸配列決定により検出することを含む。試料中のすべての核酸を含む、複数の核酸を本発明の鋳型構成に変換し、配列決定することができる。一部の実施形態では、鋳型は、本明細書に記載されるように形成され、核酸配列決定に供される、環状分子のライブラリーである。

【0059】

配列決定は、当技術分野において公知の任意の方法により行うことができる。ハイスループット単一分子配列決定が特に有利である。このような技法の例には、Illumina HiSeqプラットフォーム(Illumina, San Diego, Cal.)、Ion Torrentプラットフォーム(Life Technologies, Grand Island, NY)、SMRTを利用するPacific BioSciencesプラットフォーム(Pacific Biosciences, Menlo Park, Cal.)またはOxford Nanopore Technologies(Oxford, UK)もしくはRoche Sequencing Solutions(Santa Clara, Cal.)により製造されるものなどのナノポア技術を利用するプラットフォーム、および合成による配列決定を含むまたは含まない、任意の他の現存するまたは将来的なDNA配列決定技術が挙げられる。配列決定ステップは、プラットフォーム特異的配列決定プライマーを利用する場合がある。これらのプライマーに対する結合部位は、本明細書に記載されるように、すなわち、アダプターまたは増幅プライマーの一部であることにより、本発明の方法に導入される場合がある。一部の実施形態では、配列決定プラットフォームは、特異的伸長プライマーを必要としない。

30

40

【0060】

一部の実施形態では、本発明は、プライマー伸長により二本鎖標的核酸の配列を決定する方法である。このような実施形態では、配列決定プライマーは、環状分子中に存在する配列決定プライマー結合部位とアニーリングされ、配列決定ポリメラーゼが、プライマーを伸長することにより配列決定リードを行う。

50

【 0 0 6 1 】

特に、本発明の方法は、多種多様な標的核酸サイズに適用可能である。

一部の実施形態では、配列決定ステップは、誤差補正のステップを含む配列分析を伴う。一部の実施形態では、配列の整列は、複数の配列、例えば同じバーコード (U I D) を有する複数からコンセンサス配列を決定するために使用される。一部の実施形態では、バーコード (U I D) は、すべてが同一のバーコード (U I D) を有する複数の配列からコンセンサスを決定するために使用される。他の実施形態では、バーコード (U I D) は、アーチファクト、すなわち同一のバーコード (U I D) を有する配列のいくつかに存在するがすべてには存在しない変動を除去するために使用される。PCRの誤差または配列決定の誤差に起因するこのようなアーチファクトは、除去することができる。

10

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態では、試料中の各配列の数は、試料中の各バーコード (U I D) を有する配列の相対数を定量することによって定量することができる。各 U I D は、元の試料中の単一分子を表し、各配列変異体に関連する異なる U I D を計数することで元の試料中の各配列の割合を決定することができる。当業者は、コンセンサス配列を決定するために必要な配列のリード数を決定することができるであろう。一部の実施形態では、該当する数は、正確な定量結果に必要なリード / U I D (「配列深度」) である。一部の実施形態では、所望の深度は 5 ~ 5 0 リード / U I D である。

【 0 0 6 3 】

一部の実施形態では、本発明は、本発明の方法を行うためのキットである。キットは、以下のうち 1 つまたは複数を含む：アダプター、アダプター付加された標的核酸を生成するためのユニバーサル増幅プライマー、およびアダプター付加された標的核酸中の配列と相補的な配列を含む骨格オリゴヌクレオチド。キットはまた、DNAリガーゼ (一部の実施形態では、T4 DNA リガーゼ、Taq DNA リガーゼ、または大腸菌 (E . c o l i) DNA リガーゼが使用される) 、ポリヌクレオチドキナーゼおよび増幅ポリメラーゼまたは配列決定ポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼを含む場合がある。ポリメラーゼの非限定的な例には、原核生物DNAポリメラーゼ (例えば P o l I 、 P o l I I 、 P o l I I I 、 P o l I V および P o l V) 、真核生物DNAポリメラーゼ、古細菌DNAポリメラーゼ、テロメラーゼ、逆転写酵素およびRNAポリメラーゼが挙げられる。逆転写酵素は、RNA鋳型からDNAを合成するRNA依存性DNAポリメラーゼである。逆転写酵素のファミリーは、DNAポリメラーゼの機能性およびDNAと塩基対を形成したRNAを分解するRNアーゼHの機能性の両方を含有する。一部の実施形態では、キットはまた、T5エキソヌクレアーゼのように 5 ' - 3 ' - 活性を有するエキソヌクレアーゼを含む。

20

30

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態では、DNAポリメラーゼは、鎖置換活性を有し、5 ' - 3 ' - エキソヌクレアーゼ活性を有さない。一部の実施形態では、Phi 29 ポリメラーゼおよびその誘導体が使用される。米国特許第 5 , 0 0 1 , 0 5 0 号、同第 5 5 7 6 2 0 4 号、同第 7 8 5 8 7 4 7 号および同第 8 9 2 1 0 8 6 号を参照されたい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、アンプリコン鎖から 3 ' - A オーバーハングを有利に除去する 3 ' - 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

40

【 実施例 】

【 0 0 6 5 】

実施例 1 (予言的)

細菌全ゲノム配列決定のための一本鎖環状鋳型の生成

本実施例では、培養細菌単離株からDNAを抽出し、最初にDNA損傷修復に供し、続いて機械的または酵素的断片化を行う。断片化したDNAは、サイズ選択される場合またはされない場合がある。断片化に続き、DNAを末端修復し、A尾部を付加し、ギブソンアセンブリ配列を有するT尾部のアダプター (スティッチ) および配列決定プライマー結合部位を各末端にライゲーションする。次いで、アダプターとライゲーションした挿入部を

50

、挿入分子中に存在する配列と相補的なギブソンアセンブリアダプターに挟まれた二本鎖 DNA 骨格と混合する。ギブソンアセンブリの間、エキソヌクレアーゼは、骨格および挿入部の 5' 末端を連続的に切断し、相補的なギブソンアセンブリアダプター末端を露出させる。骨格および挿入分子の 2 つの末端をアニーリングさせ、次いで DNA ポリメラーゼでギャップを埋め、DNA リガーゼによるライゲーションによって共有結合で連結し、両方の鎖に配列決定プライマー結合部位を有する二本鎖環状分子を生成する。次いで、二本鎖 DNA を熱変性させて、単一分子配列決定プラットフォームを用いた配列決定の準備が整った一本鎖分子を創出する。

【0066】

実施例 2 (予言的)

PCR アンプリコンからの単一分子配列決定のための一本鎖環状鋳型の生成

本実施例では、PCR アンプリコンから開始して、単一分子配列決定プラットフォームを用いた配列決定のための一本鎖ライブラリーを生成する。DNA 損傷修復および断片化は、典型的には、PCR アンプリコンのために必要なく、ライブラリーの調製プロセスは、末端修復および A 尾部付加に続く、各末端へのギブソンアセンブリ配列 (スティッチ) および配列決定プライマー結合部位を有する T 尾部のアダプターのライゲーションからなる。次いで、アダプターとライゲーションした挿入部を、挿入分子中に存在する配列と相補的なギブソンアセンブリアダプターに挟まれた二本鎖 DNA 骨格と混合する。ギブソンアセンブリの間、エキソヌクレアーゼは、骨格および挿入部の 5' 末端を連続的に除去し、相補的なギブソンアセンブリアダプター末端を露出させる。骨格および挿入分子の 2 つの末端をアニーリングさせ、次いで DNA ポリメラーゼでギャップを埋め、DNA リガーゼによるライゲーションにより共有結合で連結し、両方の鎖に配列決定プライマー結合部位を有する二本鎖環状分子を生成する。次いで、二本鎖 DNA を変性させて、配列決定の準備が整った一本鎖分子を創出する。

【0067】

具体的な例を参照して本発明を詳細に説明してきたが、本発明の範囲内で様々な改変を行えることが当業者に明白であろう。したがって、本発明の範囲は、本明細書に記載された例により限定されるべきでなく、下に提示する特許請求の範囲により限定されるべきである。

10

20

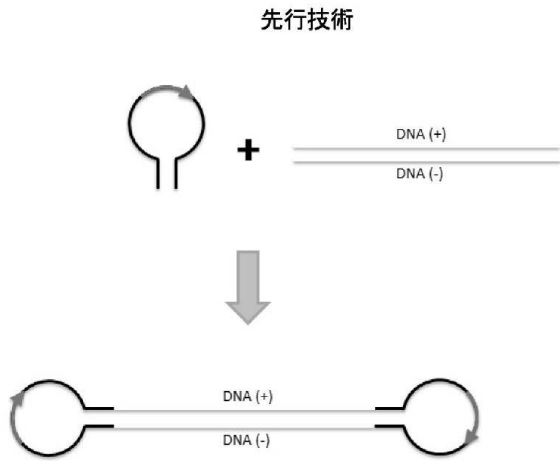
30

40

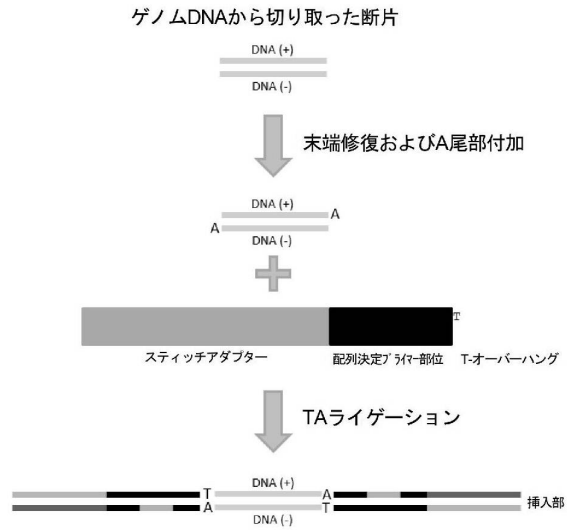
50

【 図 面 】

【 図 1 】

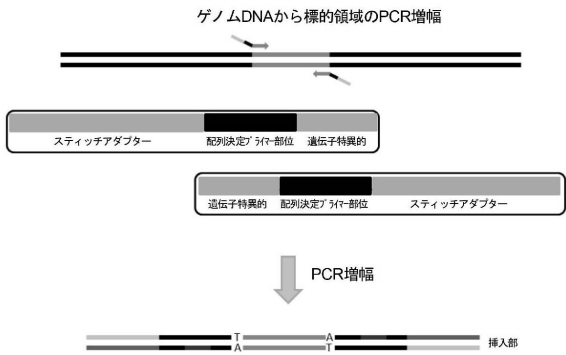


【 図 2 】

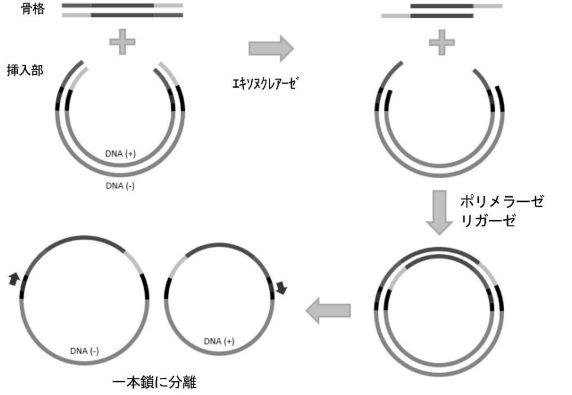


10

【 図 3 】



【 図 4 】



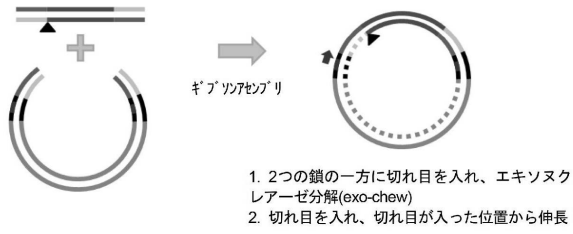
20

30

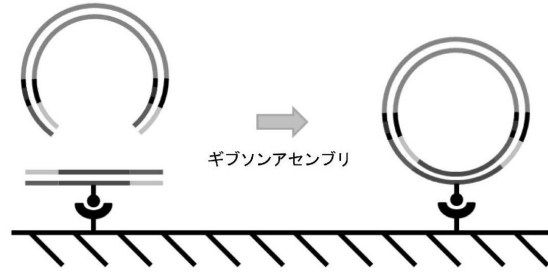
40

50

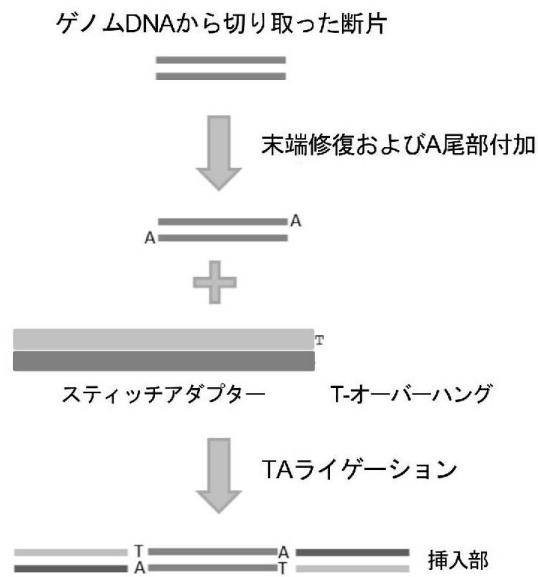
【 図 5 】



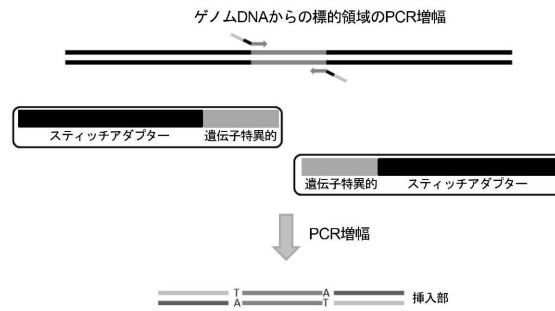
【 図 6 】



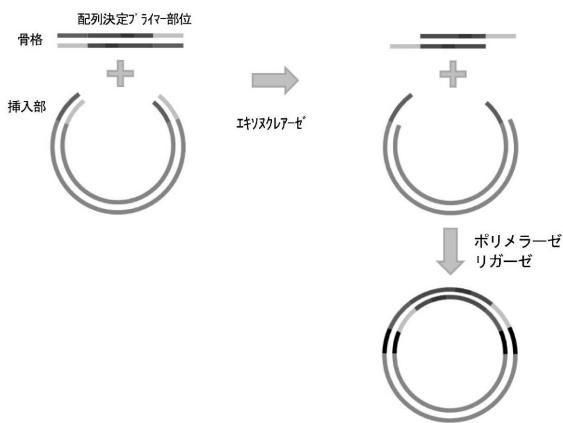
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 88, プレザントン, ハシエンダ・ドライブ 4300, ロシェ・シーケンシング・ソリューションズ, インコーポレーテッド
- (72)発明者 シュレヒト, ウルリヒ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94588, プレザントン, ハシエンダ・ドライブ 4300, ロシェ・シーケンシング・ソリューションズ, インコーポレーテッド
- (72)発明者 グエン, ドゥイリン
アメリカ合衆国カリフォルニア州94588, プレザントン, ハシエンダ・ドライブ 4300, ロシェ・シーケンシング・ソリューションズ, インコーポレーテッド
- (72)発明者 ジョージ, マイケル
アメリカ合衆国カリフォルニア州94588, プレザントン, ハシエンダ・ドライブ 4300, ロシェ・シーケンシング・ソリューションズ, インコーポレーテッド
- 審査官 白井 美香保
- (56)参考文献 国際公開第2013/036685(WO, A1)
米国特許出願公開第2012/0231508(US, A1)
特表2017-508471(JP, A)
米国特許出願公開第2004/0110153(US, A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N15/00-15/90
C12Q1/00-3/00
Pubmed
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)