

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6496665号  
(P6496665)

(45) 発行日 平成31年4月3日 (2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日 (2019.3.15)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/6848 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6848 Z N A Z
C 1 2 Q 1/6853 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6853 Z
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 15 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2015-548650 (P2015-548650)  
(86) (22) 出願日 平成25年12月20日 (2013.12.20)  
(65) 公表番号 特表2016-500275 (P2016-500275A)  
(43) 公表日 平成28年1月12日 (2016.1.12)  
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/077763  
(87) 国際公開番号 W02014/096394  
(87) 国際公開日 平成26年6月26日 (2014.6.26)  
審査請求日 平成28年12月9日 (2016.12.9)  
(31) 優先権主張番号 12199315.8  
(32) 優先日 平成24年12月23日 (2012.12.23)  
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
(31) 優先権主張番号 13175199.2  
(32) 優先日 平成25年7月4日 (2013.7.4)  
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 515171950  
ハーエス ダイアグノミクス ゲーエムベ  
ーハー  
ドイツ国 ベルリン 10961 シュラ  
イアーマッハーストラッセ 14  
(74) 代理人 100149032  
弁理士 森本 敏明  
(72) 発明者 リッター, ユリアーマリー  
ドイツ国 ベルリン 12157 トルヴ  
アルトゼンストラッセ 16  
(72) 発明者 ザイツ, フォルクハルト  
ドイツ国 ベルリン 12167 ヴィオ  
ンフィレストラッセ 12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイスループットPCRシーケンシングのための方法及びプライマーのセット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列断片  $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$  に含まれる標的核酸配列  $t_c - t_v - t_c'$  を増幅するための、複数の増幅反応を含む方法であって、  
前記増幅反応の各々は、

i. 配列  $m_a - K - p_c$  を含む、左側の（フォワード）第1段階目のプライマーと、

ii. 配列  $m_a' - K' - p_c'$  を含む、右側の（リバース）第1段階目のプライマーと、

を用いて前記標的核酸配列を増幅して、第1の増幅産物を生成する第1段階目の増幅反応、及び

iii. 配列  $a_L - a_P - a_K$  を含む、左側の（フォワード）アダプタープライマーと、

iv. 配列  $a_L' - a_P' - a_K'$  を含む、右側の（リバース）アダプタープライマーと、

を用いて前記第1の増幅産物を増幅して、第2の増幅産物を生成する第2段階目の増幅反応を含み、

ここで、

$t_v$  は、前記標的核酸配列における可変領域であり、

$p_c$  は配列要素  $t_c$  と同一の配列を有し、かつ  $p_c'$  は  $t_c'$  に対する逆相補配列を

10

20

有し、

Kは配列要素  $k_1$  及び3'末端配列要素 s を含み、かつ K' は配列要素  $k_1'$  及び3'末端配列要素  $s'$  を含み、

ここで、

$k_1$  及び  $k_1'$  の長さは、それぞれ独立して、2から9ヌクレオチド長であり、

s 及び  $s'$  は、配列要素  $t_n$  及び  $t_n'$  とハイブリッドを形成する連続的配列が存在しないように選択されたミスマッチ配列であり、s 及び  $s'$  の長さは、それぞれ独立して、1、2、3、4又は5ヌクレオチド長であり、

$a_K$  の配列は配列要素  $k_1$  の配列と同一の配列であり、かつ  $a_K'$  の配列は配列要素  $k_1'$  の配列と同一の配列であり、

$a_P - a_K$  は  $m_a - K$  内の連続した配列とハイブリッドを形成し、 $a_P' - a_K'$  は  $m_a' - K'$  内の連続した配列とハイブリッドを形成し、

$p_c$ 、 $p_c'$ 、 $m_a - K$  及び  $m_a' - K'$  の配列の長さは、それぞれ独立して、10から40ヌクレオチド長であり、 $a_L$  及び  $a_L'$  はそれぞれ独立して任意の配列を有し、

ここで、

前記複数の増幅反応の各々には、特有のプライマーのセットを用い、該プライマーのセットの各々において、

$k_1$  は、他のプライマーセットの  $k_1$  と異なるものである、

及び/又は

$k_1'$  は、他のプライマーセットの  $k_1'$  と異なるものであり、

$a_P$  配列と  $m_a$  配列が同一であり、及び  $a_P'$  配列と  $m_a'$  配列が同一であり、

第1段階目の増幅反応に使用するプライマーと、第2段階目の増幅反応に使用するプライマーの間で、 $k_1$  は、他のプライマーセットの  $k_1$  と異なるものである場合、及び/又は  $k_1'$  は、他のプライマーセットの  $k_1'$  と異なるものである場合、第2の増幅産物の生成が抑制される。

#### 【請求項2】

Kは3'末端配列  $k_1 - k_2 - s$  を含み、かつ K' は3'末端配列  $k_1' - k_2' - s'$  を含み、

ここで、 $k_2$  の長さ及び  $k_2'$  の長さは、それぞれ独立して、2から7ヌクレオチド長であり、

$a_K$  及び  $a_K'$  はそれぞれ、 $k_2$  及び  $k_2'$  とハイブリッドを形成しないように設計されたものである、

前記プライマーのセットの各々の間で、 $k_2$  及び  $k_2'$  はそれぞれ、他の  $k_2$  及び  $k_2'$  とは異なるものである、及び

$k_1$ 、 $k_1'$ 、s 及び  $s'$  は前記されたものである、

請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

前記プライマーのセットは、

配列番号001から045から選択される  $p_c$  を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号046から058から選択される  $p_c'$  を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー、及び/又は

配列番号189から232から選択される  $p_c$  を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号233から246から選択される  $p_c'$  を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー、及び/又は

配列番号059から085から選択される  $m_a$  を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号086から117から選択される  $m_a'$  を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー、及び/又は

配列番号118から149から選択される  $a_L - a_P$  を含む左側（フォワード）アダプタープライマーと、配列番号150から182から選択される  $a_L' - a_P'$  を含む右側（リバース）アダプタープライマーを含む、

請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 段階目の増幅及び / 又は前記第 2 段階目の増幅において、3' 末端から 5' 末端方向のエキソヌクレアーゼ活性（校正活性）を有する DNA ポリメラーゼを使用する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

配列断片  $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$  に含まれる標的核酸配列  $t_c - t_v - t_c'$  をシーケンシングする方法であって、

a) 請求項 1、3 又は 4 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて前記標的核酸配列を増幅する工程、及び

b) 配列要素  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a' - K'$  を含む前記第 2 の増幅産物をシーケンシングして、読み取った配列のセットを生成する工程を含む、方法。

【請求項 6】

更に、

c) 前記配列のセットに含まれる各配列を、第 1 段階目のプライマーに含まれる  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a' - K'$  とアライメントする工程、及び

d) コンタミネーションの指標として、前記配列のセットに含まれる各配列に対し 0 又は 1 の値を割り当てる工程であって、前記配列のセットに含まれる配列（配列のセットに含まれるある特定の配列）が  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a' - K'$  と完全にアライメントした場合は値 0 を割り当て、前記配列のセットに含まれる配列（配列のセットに含まれるある特定の配列）と  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a' - K'$  とのアライメントが不完全だった場合は値 1 を割り当てる工程

を含み、

ここで、

(i) 工程 d) で割り当てた値を全て加算し、読み取った全配列数で前記加算値を除算して、コンタミネーション物の百分率を算出する、及び / 又は

(ii) 前記配列のセットから、値 1 を割り当てた配列を削除する、

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の、配列断片  $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$  に含まれる標的核酸配列  $t_c - t_v - t_c'$  を増幅又はシーケンシングする方法に使用するためのプライマーのセットのコレクションであって、

前記プライマーのセットの各々において、

i. 配列  $m_a - K - p_c$  を含む第 1 段階目の左側プライマー及び配列  $m_a' - K' - p_c'$  を含む第 1 段階目の右側プライマーを含む第 1 段階目の PCR プライマー対、及び

ii. 配列  $a_L - a_P - a_K$  を含む左側のアダプタープライマー及び配列  $a_L' - a_P' - a_K'$  を含む右側のアダプタープライマーを含むアダプター PCR プライマー対を含む、

ここで、

$p_c$  は標的配列の  $t_c$  に対し相補的な配列を有し、かつ  $p_c'$  は  $t_c'$  に対する逆相補配列を有し、

$K$  は配列要素  $k_1$  及び 3' 末端配列要素  $s$  を含み、かつ  $K'$  は、配列要素  $k_1'$  及び 3' 末端配列要素  $s'$  を含み、

ここで、

$k_1$  及び  $k_1'$  の長さは、それぞれ独立して、2 から 9 ヌクレオチド長であり、

$s$  及び  $s'$  は、配列要素  $t_n$  及び  $t_n'$  とハイブリッドを形成する連続的配列が存在しないように選択されたミスマッチ配列であり、 $s$  及び  $s'$  の長さは、それぞれ独立して、1、2、3、4 又は 5 ヌクレオチド長であり、

$a_K$  の配列は配列要素  $k_1$  の配列と同じあり、かつ  $a_K'$  の配列は配列要素  $k_1'$

10

20

30

40

50

の配列と同じであり、

$a_p - a_k$  は  $m_a - K$  内の連続した配列とハイブリッドを形成し、 $a_p' - a_k'$  は  $m_a' - K'$  内の連続した配列とハイブリッドを形成する、及び

$p_c$ 、 $p_c'$ 、 $m_a - K$  及び  $m_a' - K'$  の配列の長さは、それぞれ独立して、10 から 40 ヌクレオチド長であり、 $a_L$  及び  $a_L'$  はそれぞれ独立して任意の配列を有し、  
ここで、

前記コレクションに含まれる前記プライマーのセット全てにおいて、全ての  $p_c$  は同じ配列を有し、かつ全ての  $p_c'$  は同じ配列を有し、

前記プライマーのセットの各々において、

$k_1$  は、他のプライマーのセットの  $k_1$  と異なるものである、及び / 又は

$k_1'$  は、他のプライマーのセットの  $k_1'$  と異なるものである、  
プライマーのセットのコレクション。

#### 【請求項 8】

前記第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーである  $p_c$  は配列番号 001 から 045 から選択され、かつ前記第 1 段階目の右側（リバース）プライマーである  $p_c'$  は配列番号 046 から 058 から選択され、及び / 又は

前記第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーである  $p_c$  は配列番号 189 から 232 から選択され、かつ前記第 1 段階目の右側（リバース）プライマーである  $p_c'$  は配列番号 233 から 246 から選択され、及び / 又は

前記第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーである  $m_a$  は配列番号 059 から 085 から選択され、かつ前記第 1 段階目の右側（リバース）プライマーである  $m_a'$  は配列番号 086 から 117 から選択され、及び / 又は

前記左側（フォワード）アダプタープライマーである  $a_L - a_p$  は配列番号 118 から 149 から選択され、かつ前記右側（リバース）アダプタープライマーである  $a_L' - a_p'$  は配列番号 150 から 182 から選択される、

請求項 7 に記載のプライマーのセットのコレクション。

#### 【請求項 9】

$K$  は 3' 末端配列  $k_1 - k_2 - s$  を含み、かつ  $K'$  は 3' 末端配列  $k_1' - k_2' - s'$  を含み、

ここで、 $k_2$  の長さ及び  $k_2'$  の長さは、それぞれ独立して、2 から 7 ヌクレオチド長であり、

$a_k$  及び  $a_k'$  はそれぞれ、 $k_2$  及び  $k_2'$  とハイブリッドを形成しないように設計されたものであり、

前記プライマーのセットの各々において、

$k_2$  は、他のプライマーのセットの  $k_2$  と異なるものである、及び / 又は

$k_2'$  は、他のプライマーのセットの  $k_2'$  と異なるものであって、

$k_1$ 、 $k_1'$ 、 $s$  及び  $s'$  は前記されたものである、

請求項 8 に記載のセットのコレクション。

#### 【請求項 10】

4、8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、160、200、256 又は 1024 個の相異なるプライマーのセットを含む、

請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のセットのコレクション。

#### 【請求項 11】

$k_1$  及び  $k_1'$  並びに / 又は  $k_2$  及び  $k_2'$  は、 $t_n$  及び  $t_n'$  とはハイブリッドを形成しないように設計されたものである、

配列要素  $a_p$  の配列は全て同じであり、配列要素  $a_p'$  の配列は全て同じである、及び / 又は

$a_k$  及び  $a_k'$  はそれぞれ、 $k_2$  及び  $k_2'$  とハイブリッドを形成しないように設計されたものである、

10

20

30

40

50

請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のセットのコレクション。

【請求項 12】

請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のプライマーのセットのコレクションを複数含む、コレクション集合であって、前記コレクションの各々は、相異なる  $p_c$  及び  $p_c'$  の組み合わせによって特徴付けられる、コレクション集合。

【請求項 13】

各  $p_c$  は、配列番号 001 から 045 から選択される配列を含む、若しくは各  $p_c$  の配列は配列番号 001 から 045 から選択される配列であり、かつ、各  $p_c'$  は配列番号 046 から 058 から選択される配列を含む、若しくは各  $p_c'$  の配列は配列番号 046 から 058 から選択される配列である、又は、

各  $p_c$  は、配列番号 189 から 232 から選択される配列を含む、若しくは各  $p_c$  の配列は配列番号 189 から 232 から選択される配列であり、かつ、各  $p_c'$  は配列番号 233 から 246 から選択される配列を含む、若しくは各  $p_c'$  の配列は配列番号 233 から 246 から選択される配列である、

請求項 12 に記載のコレクション集合。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の、配列断片  $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$  に含まれる標的核酸配列  $t_c - t_v - t_c'$  を増幅又はシーケンシングする方法に使用するための、複数のプライマーのセットのコレクションであって、ここでプライマーのセットの各々は、

i. 配列  $m_a - K - p_c$  を含む第 1 段階目の左側プライマー及び配列  $m_a' - K' - p_c'$

' を含む第 1 段階目の右側プライマーを含む第 1 段階目の PCR プライマー対、及び

ii. 配列  $a_L - a_P - a_K$  を含む左側のアダプタープライマー及び配列  $a_L' - a_P' - a_K'$  を含む右側のアダプタープライマーを含むアダプター PCR プライマー対

を含み、

ここで、

$p_c$  は標的配列の  $t_c$  に対し相補的な配列を有し、かつ  $p_c'$  は  $t_c'$  に対する逆相補配列を有し、

$K$  は配列要素  $k_1$  及び 3' 末端配列要素  $s$  を含み、かつ  $K'$  は、配列要素  $k_1'$  及び 3' 末端配列要素  $s'$  を含み、

ここで、

$k_1$  及び  $k_1'$  の長さは、それぞれ独立して、2 から 9 ヌクレオチド長であり、

$s$  及び  $s'$  は、配列要素  $t_n$  及び  $t_n'$  とハイブリッドを形成する連続的配列が存在しないように選択されたミスマッチ配列であり、 $s$  及び  $s'$  の長さは、それぞれ独立して、1、2、3、4 又は 5 ヌクレオチド長であり、

$a_K$  の配列は配列要素  $k_1$  の配列と同じであり、かつ  $a_K'$  の配列は配列要素  $k_1'$  の配列と同じであり、

$a_P - a_K$  は  $m_a - K$  内の連続した配列とハイブリッドを形成し、 $a_P' - a_K'$  は  $m_a' - K'$  内の連続した配列とハイブリッドを形成する、及び

$p_c$ 、 $p_c'$ 、 $m_a - K$  及び  $m_a' - K'$  の配列の長さは、それぞれ独立して、10 から 40 ヌクレオチド長であり、 $a_L$  及び  $a_L'$  はそれぞれ独立して任意の配列を有し、

ここで、

前記コレクションに含まれる前記プライマーのセット全てにおいて、配列要素  $K$  及び  $K'$  は全て同じであり、

前記プライマーのセットの各々において、

$p_c$  は他のプライマーのセットの  $p_c$  と異なる、及び / 又は

$p_c'$  は他のプライマーのセットの  $p_c'$  と異なる、

複数のプライマーのセットのコレクション。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

患者のT細胞受容体 鎖のレパトアを *ex vivo* で分析する方法であって、  
請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法、又は請求項 7 ～ 14 のいずれか 1 項に記載  
のプライマーのセットのコレクションを使用する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ハイスループット（高処理能）PCRシーケンシングのための方法及びプライ  
マーのセットに関する。

【背景技術】

10

【0002】

近年、1回のランにおいて膨大な数のシーケンシング（配列決定又は配列読み取り）を  
並行して行える、進歩的な技術が開発されている。この「次世代型」シーケンシング（N  
GS）又は「ハイスループット（高処理能）」シーケンシング（HTS）から得られる多  
次元データは、従来にはないデータの正確さと深さを有し、個人又はある人口における生  
物学的多様性の把握に用いることができる。しかし、この技術は非常に高い感度を有する  
ため、多様な材料からの（クロス）コンタミネーション物生成のリスクが高い。そこで、  
NGS又はHTSデータの誤読を防ぐために、（i）コンタミネーション物があった場合  
その配列増幅を防止し、（ii）コンタミネーション物の配列の有無を検出することができ  
る方法が求められている。高感度で信頼性のあるNGS診断のためには、コンタミネーシ  
ョンを防止するとともに、残留した可能性のあるコンタミネーション物の有無の識別を行  
うことが肝要である。

20

【0003】

コンタミネーションを発生させる主な原因の1つとして、NGSシーケンシングに適し  
たPCRライブラリの作製に頻繁に使用される、2ステップPCRによる増幅が挙げられ  
る（非特許文献1）。2ステップPCRでは、第1段階目の増幅反応において、尾部配列  
（tail sequence、本発明の文脈においては $m_n$ と表記され、例えば尾部M13又はT7  
と表記される）で挟まれた特異的プライマーを使用して標的核酸配列を増幅する。続いて  
、第2段階目のプライマー（アダプタープライマー）を用いて、第1段階目の増幅産物の  
増幅を行い、シーケンシングに使用する第2段階目の増幅産物を得るが、この第2段階目  
の増幅反応においては、第1段階目の増幅用プライマーの尾部配列と相補的な配列を3'  
末端部分に有するプライマーを用いることで、NGSシーケンシングに必要な核酸配列が  
導入される。この方法のコスト効率をより高めるために、第2段階目の増幅用プライマー  
の中間域又は5'末端近傍に、バーコード配列又は多重識別子と呼ばれる配列を導入する  
ことで、NGSシーケンシング用の複数の試料を多重に解析することができる（非特許文  
献1）。

30

【0004】

次の表は、コンタミネーション発生源を概観するためのものである。本発明に最も関連  
があるのは、（C）及び（D）欄である。2ステップPCRによる増幅においては、第1  
段階目の増幅で生成される増幅産物が多数であるために、第1段階目の増幅（PCR）で  
生成された増幅産物が再増幅反応（C）へと持ち越されてしまうことで、クロスコンタミ  
ネーションが発生する可能性が高い。更に、第2段階目のPCR産物（増幅産物）が、他  
の第2段階目の増幅反応（D）にとってのコンタミネーション物となる可能性もある。ゲ  
ル抽出法又はPCR精製キットを使用して増幅産物を単離する場合、コンタミネーション  
のリスクは更に高くなる。

40

【表 1】

コンタミネーション物の種類	コンタミネーションの発生	
	第 1 段階目の増幅のPCR溶液	第 2 段階目の増幅のPCR溶液
第 1 段階目の増幅のPCR産物	(A) <u>防止策</u> : UTP/UNGを用いたシステム <u>検出法</u> : 第 1 段階目の増幅の尾部特異的なプライマーを用いたPCR	(C) <u>防止策及び検出法</u> : 二重のコンタミネーション抑制法 (本発明)
第 2 段階目の増幅のPCR産物	(B) <u>検出法</u> : 第 1 段階目又は第 2 段階目の増幅の尾部又はアダプター特異的なプライマーを用いたPCR <u>防止策</u> : UTP/UNGを用いたシステム	(D) <u>防止策及び検出法</u> : 二重のコンタミネーション抑制法 (本発明)

10

表 1: クロスコンタミネーションの発生、及び NGS ライブラリ作成のための 2 ステップ PCR におけるクロスコンタミネーションの防止。A 及び B: 第 1 段階目の増幅における、他の第 1 段階目又は第 2 段階目の増幅に由来する PCR 産物のコンタミネーションは、UTP や UNG を用いることで防止可能であり、尾部又はアダプターに特異的なプライマーを用いて検出可能である。(US 5 0 3 5 9 9 6 (又は EP 0 4 0 1 0 3 7、US 6 8 4 4 1 5 5 B 2、US 7 9 1 4 9 8 6 B 2) としても公開) を参照)。C 及び D: 第 2 段階目の増幅における、他の第 1 段階目又は第 2 段階目の増幅に由来する PCR 産物のコンタミネーションは、本発明による「二重のコンタミネーション防止技術」によって防止及び検出が可能である。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Baetens et al., Human Mutation 32, 1053-1062 (2011)

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、大量並列シーケンシング (NGS / HTS) 技術を利用した技術において、PCR に由来するコンタミネーションを (i) 防止する及び / 又は (ii) 検出することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題は、独立請求項に記載する特徴によって解決される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

40

【図 1】本発明の方法に係る、プライマー、標的並びに第 1 段階目及び第 2 段階目の増幅産物を示す図である。配列断片  $m_a - K$  は配列要素  $k_1$  を含み、配列断片  $m_a - K'$  は配列要素  $k'_1$  を含む。逆相補配列断片には下線が引かれている。

【図 2】本発明の方法に係る、プライマー、標的並びに第 1 段階目及び第 2 段階目の増幅産物を示す図である。配列断片  $m_a - K$  は、配列要素  $k_1$  に加え配列要素  $k_2$  を更に含み、配列断片  $m_a - K'$  は、配列要素  $k'_1$  に加え配列要素  $k'_1$  を更に含む。逆相補配列断片には下線が引かれている。

【図 3】本発明の方法に係る、プライマー、標的並びに第 1 段階目及び第 2 段階目の増幅産物を示す図である。配列断片  $m_a - K$  は、配列要素  $k_1$  及び配列要素  $k_2$  に加え、配列要素  $s$  を更に含み、配列断片  $m_a - K'$  は、配列要素  $k'_1$  及び配列要素  $k'_2$  に加え、配

50

列要素  $s'$  を更に含む。逆相補配列断片には下線が引かれている。

【図 4】本発明の方法に係る、プライマー、標的並びに第 1 段階目及び第 2 段階目の増幅産物を示す図である。配列断片  $m_a - K$  は、配列要素  $k_1$  に加え配列要素  $s$  を更に含み、配列断片  $m_a - K'$  は、配列要素  $k'_1$  に加え配列要素  $s'$  を更に含む。逆相補配列断片には下線が引かれている。

【発明を実施するための形態】

【0009】

#### 用語と説明

核酸配列は 5' 末端から 3' 末端の方向で表記される。本明細書の文脈において、配列断片とは、ひとまとまりの連続した配列を意味する。配列断片は、下付き文字又は上付き文字を適宜伴う文字によって表される。 $k_1$ 、 $k'_1$ 、 $k_2$ 、 $k'_2$ 、 $s$  及び  $s'$  は、配列断片の表記例である。配列がこれら配列表記で表される場合、そのような配列は、5' 末端から 3' 末端の方向で記載されている。配列断片は、配列要素とも称される。

【0010】

標的配列の核酸は、DNA 又は RNA であってよい。増幅及びシーケンシングの標的が RNA の場合、その RNA は、増幅に先立って cDNA に転写される（逆転写酵素による）。

【0011】

本明細書の文脈において、「プライマー」とは、ブロックオリゴマーを形成する一本鎖の DNA 又は核酸類縁体であって、8 から 100 ヌクレオチド長を有するものである。

【0012】

本発明の文脈において、「ハイブリッドを形成可能」とは、PCR 反応又はシーケンシング反応のための条件下（例えば、10 mmol/l の Tris-HCl (pH 8.3) : 100 mmol/l の KCl ; 1.5 mmol/l の  $MgCl_2$  ; 0.2 mmol/l の dNTP を用いて、各プライマーのアニーリング温度が 40 から 68 であるという条件）で、標的配列と選択的に結合可能な配列に関する表現である。このようなハイブリッド形成可能な配列は、標的配列に対して連続的な逆相補配列であってもよく、ギャップ又はミスマッチを含んでもよい。又は、このようなハイブリッドを形成可能な配列は、マッチしないヌクレオチドが更に追加されてよい。ハイブリッド形成可能な配列の取り得る最短の長さは、C 又は G 塩基が A 又は T/U に比べ結合エネルギーが高いことから、その組成に依存する。又は、当該最短の長さは、LNA のような高い結合エネルギーをもたらす修飾によって、DNA の場合に比べハイブリッド形成可能な配列の取り得る最短の長さが短くなることから、配列骨格の化学的性質に依存する。

【0013】

本発明の文脈において、「ヌクレオチド」とは、RNA 又は DNA 配列と、塩基同士の塩基対形成によって選択的にハイブリッドを形成可能な纏まりとしてのオリゴマーを構成する核酸又は核酸類縁体を意味する。この文脈において、「ヌクレオチド」なる用語は、アデノシン、グアノシン、ウリジン（及びリボシルチミン）及びシチジンの纏まりを構成する従来知られたリボヌクレオチド、並びにデオキシアデノシン、デオキシグアノジン、チミジン、デオキシウリジン及びデオキシシチジン等の従来知られたデオキシリボヌクレオチドを含む。「ヌクレオチド」なる用語は更に、ホスホロチオエート、2'-O-メチルホスホロチオエート、ペプチド核酸（PNA；ペプチド結合による N-（2-アミノエチル）-グリシンユニットであり、グリシンの炭素に核酸塩基が結合している）、又はロックド核酸（locked nucleic acid、LNA；2'-O と 4'-C とのメチレン架橋によってブロックを形成する RNA）等の核酸類縁体も含む。本明細書の文脈において、「プライマー配列」とは、上記核酸のいずれか又はそれらの混合物で構成されてよい。いくつかの実施態様では、プライマー配列は、デオキシヌクレオチドで構成され、その最後の（3' 末端から数えて）1、2、3 又は 4 個のヌクレオチド間結合がホスホロチオエートである。また、いくつかの実施態様では、（3' 末端から数えて）4、3、2 又は 1 ヌクレオチドが核酸類縁体の LNA である。また、いくつかの実施態様では、3' 末

10

20

30

40

50



端から数えて2番目3番目のヌクレオチドが核酸類縁体のLNAである。また、いくつかの実施態様では、3'末端から数えて2番目及び3番目のヌクレオチドが核酸類縁体のLNAである。

【0014】

本明細書に記載の番号によって特定される全ての米国特許及び米国特許出願は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0015】

発明の概要

本発明は、相乗作用を有する3種のプライマー要素（まとめて大文字Kを用いてK-ボックスと表記され、フォワード（順方向）プライマーに含まれるk-ボックス（小文字のkを用いる）及びリバース（逆方向）プライマーに含まれるk'-ボックスとに分類できる）であって、組み合わせて使用することで、次世代シーケンシング（NGS）を含むがこれに限定されない方法を用いて解析可能なPCRライブラリの正確性を顕著に向上させるプライマー要素の、設計指針を提供するものである。

【0016】

本発明に係る方法は、2つのプライマー対を使用する。第1又は第1段階目のプライマー対を用いて、標的配列を増幅し第1の増幅産物を生成する。次いで、入れ子である第2（アダプター）プライマー対を用いて、第1の増幅産物を増幅し、シーケンシングに使用される第2の増幅産物を生成する。

【0017】

本発明は、複数の試料を並行して解析するにあたって、複数のプライマー対を含む相異なるプライマーのセットを第1段階目の増幅及び第2段階目の増幅に使用すること、すなわち試料ごとに異なるプライマーのセットを使用することで、クロスコンタミネーションを防止する。あるプライマーのセット特有の第1段階目の（第1の）プライマー対とのみ協働するように設計された、そのプライマーのセット特有の第2段階目の（第2の）プライマー対が含まれる。各プライマーのセットに含まれる第1のプライマー対及び第2のプライマー対は、K-ボックス（K）と名付けられた、特別に設計された配列断片を含む。各K-ボックスは、各プライマーのセットに特有のものである。第1段階目の増幅用の（第1の）プライマーに含まれるK-ボックスは、複数の要素 $k_1$ 、 $k_1'$ 、 $k_2$ 、 $k_2'$ 、 $s$ 及び $s'$ を含んでよい。後に詳述するとおり、 $s/s'$ はPCRバイアスを防止し、 $k_2/k_2'$ はコンタミネーション物の検出に使用され、第2段階目の増幅用プライマーのK-ボックスにも含まれる $k_1/k_1'$ は、コンタミネーションを防止する。重要なことは、 $k_1/k_1'$ の配列同士のマッチングを利用することで、マッチングする $k_1/k_1'$ 配列が、第1の増幅産物生成に既に用いたセットに含まれる第1のプライマーに含まれている場合にのみ、当該セットに含まれる第2のプライマー対による第1の増幅産物の増幅が可能となるという点である。プライマーのセットには、対応する又はマッチするプライマー対が含まれる。複数のセット（例えばセット1からセット300）によって、コレクションが構成される。N個のセットを含むコレクションは、第2段階目の増幅反応において、クロスコンタミネーションを発生させずにN個の相異なる試料の処理を可能にする。

【0018】

1個のコレクションに含まれる第1段階目の増幅用の第1のプライマーは全て、同じ標的配列の増幅に用いられる。相異なる標的配列を増幅する（つまりマルチプレックスPCR）ための相異なるコレクションは、組み合わせて1個のコレクション集合としてよい。

【表 2】

用語	説明
セット	各セットにおいて、そのセットに特有の第2のプライマー対は、そのセットに特有の第1のプライマー対のみと協働するように設計されている。
コレクション	コレクションは複数のセットで構成される。
コレクション集合	様々な標的配列を増幅する複数のコレクションの集合を意味する。

10

【0019】

## 発明の詳細な説明

【表 3】

略語	説明
標的配列の断片	
$t_n-t_c-t_v-t_c'-t_n'$	標的核酸配列の種々の配列断片
$t_c/t_c'$	標的特有的なプライマーが結合する標的配列の配列断片
$t_v$	目的の標的核酸配列
$t_n/t_n'$	それぞれ、 $t_c$ の5'末端及び $t_c'$ の3'末端に配置される配列断片
第1の増幅に使用されるプライマーの配列断片	
$m_a/m_a'$	第1段階目の増幅用プライマーの尾部配列（例えば、M13）
$m_a-K/m_a-K'$	第1段階目の増幅用プライマーの、尾部配列とK-ボックスとを合わせた断片
$p_c/p_c'$	標的に対する特異性を有する、第1段階目の増幅用プライマーの配列断片

20

標的配列断片及びプライマー配列断片

プライマーの簡単な説明及び配列断片を表す略語

30

【表 4】

第2の増幅に使用されるプライマーの配列断片	
$a_p/a_p'$	$m_a/m_a'$ とハイブリダイズする、第2の増幅用プライマーの配列断片
$a_L/a_L'$	NGSシーケンシングのための、第2の増幅用プライマーの配列断片
K-ボックス	
K-ボックス	配列断片 $k_1/k_1'$ 、 $k_2/k_2'$ 及び $s/s'$ を含む
k-ボックス	第1の増幅用プライマー及び第2の増幅用プライマーの左側（上流）にあるK-ボックス
k'-ボックス	第1の増幅用プライマー及び第2の増幅用プライマーの右側（下流）にあるK-ボックス
$k_1/k_1'$	コンタミネーションを抑制するための、第1の増幅用プライマー及び第2の増幅用プライマーのK-ボックスの要素
$k_2/k_2'$	コンタミネーションを検出するための、第1の増幅用プライマー及び第2の増幅用プライマーのK-ボックスの要素
$s/s'$	$k_1/k_1'$ 及び $k_2/k_2'$ が起こす可能性のあるPCRバイアスを防止するための、第1の増幅用プライマーが有するK-ボックスの要素

40

【0020】

50

プライム記号又はアポストロフィー（'）は、その配列断片又は配列要素が、プライム記号又はアポストロフィーなしで表記される相似物と類似の機能的特徴を有し、かつ、その相似物に対し標的配列において反対側に位置して逆方向に作用することを示す。

#### 【0021】

増幅される標的核酸配列は、 $t_c - t_v - t_c'$ と表記され、 $t_c / t_c'$ は、それぞれフォワード（左側）プライマー及びリバース（右側）プライマーがハイブリッドを形成する配列断片である。 $t_v$ は、標的核酸配列中の、目的の配列領域（シーケンシングによって解明したい多様性を有する可能性のある配列部分）である。また、標的核酸配列の要素 $t_n$ 及び $t_n'$ は、それぞれ $t_c - t_v - t_c'$ の5'末端及び3'末端に連結されるものである。標的配列の構造は、 $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$ とも表記される。

10

#### 【0022】

本発明に係る方法又はプライマーのコレクションに使用されるプライマーは、少なくとも2種の配列断片を含む。

#### 【0023】

第1段階目の増幅に使用される左側の第1又は第1段階目のプライマーは、（5'末端から3'末端のOHに向かって）配列断片 $m_a - K$ ボックス（ $m_a - K$ とも表記される）及び配列断片 $p_c$ を含む（図1）。配列断片 $p_c$ は標的に対する特異性を有するものであり、 $m_a - K$ は標的特異性を有さない配列断片であって、その一部又は全体が、第2の「アダプター」プライマーとのハイブリダイゼーションに用いられ得る。 $m_a - K$ ボックスにおいて、配列断片 $m_a$ は、シーケンシングに必要な配列を含んでもよく、M13のような配列からなるものでもよい。 $K -$ ボックスは、 $K -$ ボックスの要素（ $k_1 / k_1'$ 、 $k_2 / k_2'$ 及び $s / s'$ ）を含む。

20

#### 【0024】

左側のアダプター（第2の）プライマーは、第2段階目の増幅に使用される、 $a_L$ 及び $a_p - a_K$ と表記される複数の配列断片を含む。 $a_L$ 及び $a_p$ は、ハイスループットシーケンシングのための機能的特徴を与えるものであり、例えば、シーケンシングプライマーの鋳型配列となるもの、及び/又は、スライドガラスやビーズ等の固体表面に増幅産物を付着させるための機能的特徴を与えるものである。更に、 $a_p$ は、M13のような配列からなるものであってもよい。配列断片 $a_K$ は、 $K -$ ボックスの要素である $k_1$ を含む。

#### 【0025】

右側の第1のプライマー又は右側のリバースプライマー、及び右側のアダプタープライマー又はアダプターリバースプライマーは、 $m_a' - K'$ と表記され（ $m_a - K'$ ボックスとも表記される）、右側の第1の（第1段階目の）プライマーのものと類似の性質を有する配列断片及び $p_c'$ と表記される配列断片を含む。右側のアダプター（第2段階目の又は第2の）プライマーは、 $a_L'$ 及び $a_p' - a_K'$ と表記される配列断片を含む（図1）。

30

#### 【0026】

配列要素 $a_L$ 及び $a_p$ は、各種シーケンシングに使用される。各種シーケンシングの例として、プライマーとハイブリッドを形成する部位及び/又は固体支持体に付着部位のシーケンシングが挙げられるが、これらに限定されない。ハイスループットシーケンシング法は、本発明の技術分野において広く知られるものであり、特にUS2011045541A1、US2005100900A1及びUS2002055100A1に記載される「イルミナ」架橋PCRシーケンシング法、特にUS6,274,320、US7,244,567、US7,264,929、US7,323,305及びUS7,575,865に記載されるパイロシーケンシング法、及び「2塩基コーディング（2 Base Encoding）」技術（US4883750、US5750341）等を含む。ハイスループットシーケンシングと関連する更なる方法は、下記の文献に記載されている。

40

#### 【0027】

Robustness of Amplicon Deep Sequencing Underlines Its Utility in Clinical Applications. Grossmann et al. J Mol Diagn. 2013年5月14日 doi:pii: S1525-1578(13)00057-3. PMID:23680131 ;

50

Solid-State and Biological Nanopore for Real-Time Sensing of Single Chemical and Sequencing of DNA. Haque et al. Nano Today. 2013年2月;8(1):56-74. PMID:23504223 ;

Next-generation sequencing - feasibility and practicality in haematology. Kohlmann et al. Br J Haematol. 2013年3月;160(6):736-53. doi: 10.1111/bjh.12194. Epub 2013 Jan 7. PMID:23294427 ;

Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. Merriman et al. Electrophoresis. 2012年12月;33(23):3397-417. doi: 10.1002/elps.201200424. Erratum in: Electrophoresis. 2013年2月;34(4):619. PMID:23208921 ;

Comparison of next-generation sequencing systems. Liu et al. J Biomed Biotechnol. 2012年;2012:251364. doi: 10.1155/2012/251364. PMID:22829749 ;

Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research. T hudi M et al. Brief Funct Genomics. 2012年1月;11(1):3-11. doi: 10.1093/bfpg/elr045. PMID:22345601 ; 及び

Integration of next-generation sequencing into clinical practice: are we there yet? Kohlmann A et al. Semin Oncol. 2012年2月;39(1):26-36. doi:10.1053/j.seminoncol. 2011.11.008. PMID:22289489

#### 【 0 0 2 8 】

本発明のプライマーは、上述のようなコンタミネーションの発生を防止し、かつシーケンシング結果に含まれるコンタミネーションの有無の識別を可能にする、特有の配列要素（K - ボックス）を提供する。K - ボックスの要素は、 $k_1$ 、 $k_1'$ 、 $k_2$ 、 $k_2'$ 、 $s$  及び  $s'$  と表記され、バイオインフォマティクス技術によってひと纏まりのK - ボックスとして選択されるものであり、この選択は、使用するプライマーの3'末端においてミスマッチが存在しないように行われる。これらの作用機序については、以下に、3種のK - ボックスの要素のそれぞれに分けて詳述する。

#### 【 0 0 2 9 】

K - ボックスの要素  $k_1$  及び  $k_1'$  の役割と作用機序

$k_1 / k_1'$  の配列は、既に行われた増幅に由来するコンタミネーションを防止するように設計されている。図1に示すように、第1段階目のPCRに使用されるフォワードプライマーは、(i) 標的特異的な部分  $p_c$ 、(ii) 各プライマーのセットに特異的な、K - ボックスの要素  $k_1$ 、及び (iii) 配列要素  $m_a$  を含む。第1段階目のPCRに使用されるリバースプライマーは、これらと同じように、しかし逆相補配列となるように構成されている。

#### 【 0 0 3 0 】

各  $k_1$  及び  $k_1'$  はある特定の増幅反応に使用されるものであり、増幅反応を複数回行う場合には多様な（多種類の） $k_1$  及び  $k_1'$  が使用される。つまり、ルーチンの診断増幅反応（例えば、T細胞受容体（TCR）の再構成分析又は癌関連遺伝子分析）を同一の研究室内で複数回行うような場合には、全ての種類の  $k_1 / k_1'$  を使用するよう、相異なる要素  $k_1 / k_1'$  を個々の試験に使用することができる。各第2の（アダプター）プライマーの3'末端部分は、それぞれ  $k_1$  又は  $k_1'$  とハイブリッドを形成するように、 $k_1$ （又は  $k_1'$ ）の全長に沿って選択される。このようにして、第1段階目のプライマー対及び第2段階目のプライマー対が作成される。ここで、「左側」のアダプタープライマーは、「左側」の第1段階目のプライマーによって生成した配列断片  $k_1$  とハイブリッドを形成し、「右側」のアダプタープライマーは、「右側」の第1段階目のプライマーによって生成した配列断片  $k_1'$  とハイブリッドを形成する。完全なハイブリダイゼーションを叶えるためには、アダプタープライマーは、必ずしも  $k_1$ （又は  $k_1'$ ）によって生成された断片のみとハイブリッドを形成する必要はなく、もし  $k_1$ （又は  $k_1'$ ）が、選択されたハイブリダイゼーション温度においてハイブリダイゼーション断片として十分な長さを有さない場合には、 $k_1$ （又は  $k_1'$ ）の5'末端において  $k_1$ （又は  $k_1'$ ）と隣接する配列断片、つまり  $m_a$  及び  $m_a'$  とともに、ハイブリッドを形成してよい。

## 【0031】

例えば、それぞれ要素 $k_1$  /  $k_1'$ を含む第1の(第1段階目の)プライマー及び第2の(アダプター)プライマーを含む、5種の相異なるセットを、5つの試料それぞれに特異的に使用して、5種の試料を並行して処理する場合、試料2の第2段階目のPCRにおいて、試料1の第1段階目のPCRに由来するコンタミネーションがあっても、試料1のPCR産物に含まれる $k_1$ 及び/又は $k_1'$ と、試料2用のプライマーに含まれる $k_1$ 及び/又は $k_1'$ との間のミスマッチによって、コンタミネーション物の増幅が防止されることになる。

## 【0032】

$k_1$ も $k_1'$ も、1、2、3、4、5、6、7、8、9塩基長又はそれより長い塩基長を有してよい。後述する表4に記載の原理試験の実施例に示すように、 $k_1$  /  $k_1'$ の配列長さが1塩基長であったとしても、コンタミネーションを軽減することができるが、パーミテーションが小さいこと、また1塩基ミスマッチの識別力(コンタミネーション抑制有無についての識別力)はより長いミスマッチの識別力に比べて低いことから、要素 $k_1$ 及び $k_1'$ がより長い塩基長、例えば2、3、4、5、6、7、8又は9塩基長を有する方が、適用可能範囲が広がる(そういった例は表16~19を参照のこと)。

## 【0033】

K - ボックス要素 $k_2$ 及び $k_2'$ の役割と作用機序

更なるK - ボックス要素 $k_2$ 及び $k_2'$ は、それぞれ第1のプライマーの配列断片 $m_a$  - K及び $m_a' - K'$ に含まれるが、これら配列断片に対応する第2の(アダプター)プライマーの配列断片には含まれないものである(図2)。従って $k_2$ 及び $k_2'$ は、第1のプライマーのみに存在する特徴である。 $k_2$ (又は $k_2'$ )及び $k_1$ (又は $k_1'$ )が第1のプライマーに含まれる実施態様においては、要素 $k_2$ (又は $k_2'$ )は、要素 $k_1$ (又は $k_1'$ )の下流(3'末端側)に位置する。

## 【0034】

$k_1$ 及び $k_1'$ がコンタミネーションを抑制するのに対し、 $k_2$ 及び $k_2'$ は、既に行われた増幅反応からのコンタミネーション物を検出するように設計されている。

## 【0035】

$k_1$ (又は $k_1'$ )と同様に、同じルーチンの設定において複数回又は異なる試料に使用される複数のプライマーのセットが、多様な $k_2$ (又は $k_2'$ )(表20に例示される)を含むことによって、コンタミネーション物を検出すること、及び $k_1$  /  $k_1'$ によるコンタミネーション抑制を相乗効果的に制御することができる。

## 【0036】

K - ボックス要素 $s$ 及び $s'$ の役割と作用機序

K - ボックス要素 $s$  /  $s'$ は、以下に概説するように、 $k_1$  /  $k_1'$ 及び $k_2$  /  $k_2'$ の配列に依存して起こり得るPCRバイアスを防止する。

## 【0037】

$s$ は、左側の第1段階目のプライマーに含まれる、標的特異的な配列 $p_c$ と配列断片 $k_2$ 及び/又は $k_1$ とを離隔するものであり、 $s'$ は、右側の第1段階目のプライマーの標的特異的な配列 $p_c'$ と配列断片 $k_2'$ 及び/又は $k_1'$ とを離隔するものである(図3、4)。連続して行うPCRにおいては、 $k_1$  /  $k_1'$ 及び $k_2$  /  $k_2'$ はプライマー間で異なるために、偶然に、いくつかの $k_2$  /  $k_2'$ 及び $k_1$  /  $k_1'$ の3'末端部分の複数のヌクレオチドと、第1のプライマーに含まれる $p_c$ 又は $p_c'$ がハイブリダイゼーションする標的領域に隣在する配列と、がマッチしてしまう可能性がある。ある第1段階目のプライマーにおいて、ある標的配列とマッチする長さは、他の標的配列とマッチする長さよりも長い可能性があり、このことが、アニーリング温度の上昇及びそれに起因するPCRバイアスを引き起こす。

## 【0038】

この問題は、本発明のいくつかの実施態様で示されるように、コレクション集合を用いる場合により顕著に現れる。コレクション集合に含まれる各セットは、マルチプレックス

10

20

30

40

50

PCRに使用するため相異なる標的配列のそれぞれに使用されるものであり、かつ、同じ  $k_1$  (及び  $k_1'$ )、そして任意に同じ  $k_2$  (及び  $k_2'$ ) を含むものである。ここで、アニリング温度が様々である場合、試験結果の定量的解析結果を顕著に歪める可能性のあるPCRバイアスを起こすことがある。

#### 【0039】

従って、いくつかの実施態様では、短い(1、2、3又は4ヌクレオチド長の)離隔用配列  $s$  ( $s'$ ) を、配列断片  $p_c / p_c'$  のすぐ上流、つまり  $k / k'$  の3'末端側に導入する。このように、 $s$  及び  $s'$  は、図3、4で概観するように、プライマーがハイブリッドを形成する配列断片  $t_c / t_c'$  に隣接する鋳型(標的)配列の  $t_n / t_n'$  とのハイブリダイゼーションを防止するように設計されている。

10

#### 【0040】

$k_1$ 、 $k_2$  及び  $s$  を組み合わせること、並びに  $k_1'$ 、 $k_2'$ 、及び  $s'$  を組み合わせることの利点について

これら3種のK-ボックス要素は、相乗作用によって、NGS/HTS技術を使用した増幅におけるPCRに起因するコンタミネーションを防止する効果を奏する。

#### 【0041】

$k_2 / k_2'$  は第1段階目の増幅用プライマーにしか含まれないので、第2の増幅産物を見れば、最終的にコンタミネーションが発生したかどうかを識別することができる。従って、要素  $k_2 / k_2'$  は、 $k_1 / k_1'$  によるコンタミネーション抑制効果がどの程度か決定することができ、従って当該抑制効果を制御することができる。

20

#### 【0042】

また、 $s / s'$  は、K-ボックスの要素の一つであって、 $k_1 / k_1'$  及び  $k_2 / k_2'$  の配列に依存したPCRバイアスの発生問題を解決するものである。

#### 【0043】

そして、これら3種のK-ボックス要素の設計は、3種を1個の纏まりとしてバイオインフォマティクスに基づいてまとめて行われ、かつ、使用するプライマーの配列、特に3'末端部分の配列以外とのミスプライミングを引き起こす可能性のあるハイブリッド(例えば10bp以下6bp以上マッチする)を形成しないように行われなければならない。

#### 【0044】

本発明の様々な観点

30

本発明の第1の観点によると、配列断片  $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$  に含まれる標的核酸配列  $t_c - t_v - t_c'$  を増幅する方法であって、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による複数の増幅反応を行う工程を含む方法が、提供される。換言すれば、本発明は、同じ標的配列(ただし、 $t_v$  と表記される目的の配列断片に多様性があってもよい)を繰り返し増幅又はシーケンシングする方法に関する。各増幅反応は、PCRによる2個の増幅工程を含む。第1段階目の増幅工程は、第1の(第1段階目の)プライマー対を用いた標的核酸配列の増幅を行う工程であり、PCR反応に必要な、ヌクレオシド三リン酸(ATP、GTP、TTP、CTP)、適切な緩衝液及びTaqポリメラーゼのような耐熱性ポリメラーゼ等の、当業者によく知られる反应用物質が必要に応じて使用される。この第1のプライマー対は、2個の配列要素  $m_a - K$  及び  $p_c$  を5'末端から3'末端の方向で有する配列  $m_a - K - p_c$  を含む第1の(第1段階目の)左側(フォワード)PCRプライマーと、同様に5'末端から3'末端の方向で配置される配列  $m_a - K' - p_c'$  を含む第1の右側(リバーズ)PCRプライマーと、を含む。第1段階目の増幅産物を第1の増幅産物と称し、第1の増幅産物は、その配列断片  $m_a - K$  及び  $m_a - K'$  が両側に隣在する、標的核酸配列を含む(図1)。

40

#### 【0045】

配列要素  $t_c - t_v - t_c'$  は、標的において増幅される領域を構成する。短い配列要素  $t_n$  及び  $t_n'$  は、フランキング(隣接)領域であり、プライマーのセットの配列要素  $s$  及び  $s'$  をどのように設計するかを決定づける領域である。

#### 【0046】

50

本発明の方法は、更に第2段階目のPCR増幅工程を含み、この第2段階目の増幅工程では、配列要素 $a_L$ 、 $a_P$ 及び $a_K$ を5'末端から3'末端の方向で有する配列 $a_L - a_P - a_K$ を含む第2の(第2段階目の)左側(フォワード)PCRプライマーと、配列 $a_L' - a_P' - a_K'$ を含む第2の右側(リバース)(アダプター)PCRプライマーと、を含む第2の(アダプター)プライマー対を用いて、第1の増幅産物の増幅を行う。上述のとおり、PCR反応に必要な、ヌクレオシド三リン酸、適切な緩衝液及びTaqポリメラーゼのような耐熱性ポリメラーゼ等の、当業者によく知られる反应用物質が使用される。第2段階目の増幅産物を、第2の増幅産物と称する(図1)。

#### 【0047】

第1のプライマー対において、 $p_c$ は標的配列の $t_c$ に対して相補的な配列を有し、 $p_c'$ は $t_c'$ に対する逆相補配列を有する。つまり $p_c$ 及び $p_c'$ は、標的特異的なプライマー配列であり、標的にハイブリッドを形成して増幅を可能にするものである。 $p_c$ 及び $p_c'$ の長さは、それぞれ独立して、8から40ヌクレオチド長である。

#### 【0048】

第1のプライマー対において、 $m_a - K$ は、配列要素 $k_1$ を含む $k$ -ボックスを含み、 $m_a - K'$ は、配列要素 $k_1'$ を含む $k'$ -ボックスを含む。 $k_1$ 及び $k_1'$ の長さは、それぞれ独立して、2、3、4、5、6、7、8又は9ヌクレオチド長である。 $k_1$ 及び $k_1'$ は、標的配列とハイブリッドを形成するためのものではない。それぞれ独立した $k_1$ 及び $k_1'$ を含む第1段階目のプライマー対及び第2段階目のプライマー対は、1個のセットを構成する。 $k_1$ 及び $k_1'$ は、各プライマーのセットを他のプライマーのセットと区別可能にする配列要素といえる。1個のセットにおいて、第1の(第1段階目の)プライマー対の $k_1$ 及び $k_1'$ は、及び第2の(アダプター)プライマー対の $k_1$ 及び $k_1'$ とマッチする。換言すれば、第1のプライマー対の $k_1$ 及び $k_1'$ は、それぞれ第2のプライマー対の配列要素 $a_K(k_1)$ 及び $a_K'(k_1')$ に対応するものである(図1)。

#### 【0049】

また、 $m_a - K$ は、その3'末端部分に配列要素 $s$ を含み、 $m_a - K'$ は、その3'末端部分に配列要素 $s'$ を含む。 $s$ 及び $s'$ は、配列要素 $t_n$ 及び $t_n'$ とハイブリッドしてしまうような連続的配列が存在しないように選択された、ミスマッチ配列である。 $s$ 及び $s'$ の長さは、それぞれ独立して、1、2、3、4又は5ヌクレオチド長である。既に詳述したように、 $s$ 及び $s'$ は、 $m_a - K$ 及び/又は $m_a - K'$ の配列に依存して発生する、 $p_c$ 及び $p_c'$ と標的とのアニーリング温度の意図しない上昇を防止するためのものであり、PCRバイアスを防止することができる(図3、4)。

#### 【0050】

配列断片 $a_P - a_K$ は、配列要素 $m_a - K$ 内の連続した配列とハイブリッドを形成し、配列断片 $a_P' - a_K'$ は、配列要素 $m_a - K'$ 内の連続した配列とハイブリッドを形成する。つまり、 $a_P - a_K$ (及びその相似物といえる $a_P' - a_K'$ )は、アダプタープライマーの3'末端部分にあり、かつ第1のプライマーを認識する配列断片である。

#### 【0051】

$m_a - K$ 及び $m_a - K'$ は、これらの使用目的が叶えられればどのような長さを有してもよいが、通常、プライマー標的配列の長さ以内の長さを有する。すなわち、 $m_a - K$ 及び $m_a - K'$ の長さは、通常、それぞれ独立して10から40ヌクレオチド長であり、いくつかの実施態様においては、15から30ヌクレオチド長であると想定される。

#### 【0052】

$a_L$ 及び $a_L'$ 、並びに $a_P$ 及び $a_P'$ は、これらの全般的な使用目的である、第2の増幅産物のシーケンシングに有用な配列の提供を叶えるものであれば、どのような配列を有していてもよい。例えば、プライマーをアニーリングさせるための配列でもよく、チップやビーズ等NGS/HTSシーケンシングに有用と考えられる結合性の表面構造との結合のための配列であってもよい。

#### 【0053】

$t_v$ は、標的核酸配列内の、多様性を有してよい領域である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 4 】

加えて、本発明の第1の観点によれば、複数の増幅反応のそれぞれに特異的に使用されるプライマーのセットが提供される。あるプライマーのセットの $k_1$ 及び $k_1'$ の配列は、それぞれ他のプライマーのセットの $k_1$ 及び $k_1'$ の配列と異なる。換言すれば、どのセットにおいても、 $k_1$ 及び/又は $k_1'$ の配列は1回しか出現しない。

## 【 0 0 5 5 】

いくつかの実施態様において、 $a_L$ 及び $a_L'$ の長さは、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65又は70ヌクレオチド長である。いくつかの実施態様においては、 $p_c$ 及び $p_c'$ の長さは、それぞれ独立して、8、10、12、14、16、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、34、36、38又は40ヌクレオチド長である。

10

## 【 0 0 5 6 】

ある実施態様においては、 $m_a - K$ は3'末端配列 $k_1 - s$ を含み、 $m_a - K'$ は3'末端配列 $k_1' - s'$ を含む。

## 【 0 0 5 7 】

ある実施態様においては、 $m_a - K$ は配列要素 $k_1$ の3'末端に連結する配列要素 $k_2$ を含み、 $m_a - K'$ は配列要素 $k_1'$ の3'末端に連結する配列要素 $k_2'$ を含む(図2)。 $k_2$ 及び $k_2'$ の長さは、それぞれ独立して、2、3、4、5、6又は7ヌクレオチド長である。 $k_2$ 及び $k_2'$ は、あるプライマーのセットの第1の(第1段階目の)プライマーと、他の第1の(第1段階目の)プライマーとを区別するものである。 $k_2$ 及び $k_2'$ は、第2の(アダプター)プライマーの配列に対し相補的な配列は含まない。1個のセットにおいて、第2のプライマーの $k_1$ 及び $k_1'$ は、第1のプライマーと相補的な配列を有する。

20

## 【 0 0 5 8 】

いくつかの実施態様において、プライマーのセットは、 $k_1 / k_1'$ 、 $k_2 / k_2'$ 及び $s / s'$ 3個の要素全てを含む(図3)。この場合、 $m_a - K$ は3'末端配列 $k_1 - k_2 - s$ を含み、 $m_a - K'$ は3'末端配列 $k_1' - k_2' - s'$ を含む。いくつかの実施態様においては、 $m_a - K$ は3'末端配列 $k_1 - k_2 - s$ を含み、 $m_a - K'$ は3'末端配列 $k_1' - k_2' - s'$ を含み、かつ、第1のプライマー対及び/又は第2のプライマー対は、それらの3'末端から数えて1、2、3又は4個目のヌクレオチド間結合にホスホロチオエート部分を有する。

30

## 【 0 0 5 9 】

ある実施態様において、 $K$ は3'末端配列 $k_1 - k_2 - s$ を含み、 $K'$ は3'末端配列 $k_1' - k_2' - s'$ を含み、ここで、

$k_1$ 及び $k_1'$ の長さは、それぞれ独立して2から9ヌクレオチド長であり、

$k_2$ 及び $k_2'$ の長さは、それぞれ独立して2から7ヌクレオチド長であり、

$s$ 及び $s'$ は、配列要素 $t_n$ 及び $t_n'$ とハイブリッドを形成する連続的な配列が存在しないように選択されたミスマッチ配列であり、 $s$ 及び $s'$ の長さは、それぞれ独立して、1、2、3、4又は5ヌクレオチド長であり、

$a_K$ の配列は配列要素 $k_1$ の配列と同じであり、 $a_K'$ の配列は配列要素 $k_1'$ の配列と同じであり、

40

$a_K$ 及び $a_K'$ は、それぞれ $k_2$ 及び $k_2'$ とハイブリッドを形成しないように設計され、

$a_P - a_K$ は $m_a - K$ 内の連続した配列とハイブリッドを形成し、 $a_P' - a_K'$ は $m_a - K'$ 内の連続した配列とハイブリッドを形成し、

$p_c$ 、 $p_c'$ 、 $m_a - K$ 及び $m_a - K'$ の配列の長さは、それぞれ独立して、10から40ヌクレオチド長であり、 $a_L$ 及び $a_L'$ はそれぞれ独立して任意の配列を有する。

## 【 0 0 6 0 】

ある実施態様において、 $k_1$ 及び $k_1'$ の配列の長さは、それぞれ独立して5、6、7、8又は9ヌクレオチド長であり、 $s$ 及び $s'$ の配列の長さは、それぞれ独立して2、3

50



又は4ヌクレオチド長であり、 $k_2$ 及び $k_2'$ の配列の長さは、それぞれ独立して2、3、4、5又は6ヌクレオチド長である。

【0061】

ある実施態様においては、各プライマーのセットにおいて、

各 $k_1$ が互いに異なり、かつ各 $k_1'$ が互いに異なることで、各セットに特有の $k_1$ 及び $k_1'$ の組み合わせが存在する、及び/又は

各 $k_2$ が互いに異なり、かつ各 $k_2'$ が互いに異なることで、各セットに特有の $k_1$ 及び $k_1'$ の組み合わせが存在する。

【0062】

ある実施態様において、プライマーのセットは、以下を含む：

配列番号001から045から選択される $p_c$ を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号046から058から選択される $p_c'$ を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー、及び/又は

配列番号189から232から選択される $p_c$ を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号233から246から選択される $p_c'$ を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー、及び/又は

配列番号059から085から選択される $m_a$ を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号086から117から選択される $m_a$ を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー、及び/又は

配列番号118から149から選択される $a_L - a_P$ を含む第1段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号150から182から選択される $m_a$ を含む第1段階目の右側（リバース）プライマー

【0063】

いくつかの実施態様において、 $k_1$ 及び $k_1'$ 並びに/又は $k_2$ 及び $k_2'$ （ $k_2$ 及び $k_2'$ が配列中に含まれていれば）は、増幅する配列断片に隣接する $t_n$ 及び $t_n'$ とはハイブリッドを形成しないように設計される。つまり、 $k_1$ 及び $k_1'$ 並びに/又は $k_2$ 及び $k_2'$ （ $k_2$ 及び $k_2'$ が配列中に含まれていれば）の配列は、プライマーに含まれる、標的の増幅に関与する配列と離隔して存在し、かつ標的の増幅に関与する配列とは異なるものである。 $k$ -ボックスの全ての要素はそれぞれ、各プライマーのセットを互いに区別する目的で使用され、そのことによって、上述のとおり、増幅産物中のコンタミネーション物の増幅を防止する。

【0064】

いくつかの実施態様において、左側の第1段階目のプライマー、右側の第1段階目のプライマー、左側のアダプタープライマー及び右側のアダプタープライマーは、これらプライマーの3'末端又はその近傍（3'末端から数えて1、2、3及び/又は4番目）に存在する、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチド又はヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオシド間結合によって特徴づけられる。換言すれば、このような各プライマーの3'末端にエキソヌクレアーゼ活性を阻害する又は当該活性に耐性を有する結合を配置することで、3'末端からのエキソヌクレアーゼによる分解から保護する。

【0065】

いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート結合である。いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオシド間結合は、2-O-メチル化リボヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチドは、ブロックを形成しているLNA（2' Oと4' Cとがメチレン架橋されてブロックを形成するRNA）である。いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチドは、2-F-デオキシリボヌクレオチドである。いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチドは、2-プロピン-デオキシリボヌクレオチドである。

【0066】

いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチド又はヌクレアー

10

20

30

40

50

ゼ耐性を有するヌクレオシド間結合は、上記プライマーのちょうど3'末端に存在する。いくつかの実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオチド又はヌクレアーゼ耐性を有するヌクレオシド間結合は、上記プライマーの3'末端から - 1、 - 2、 - 3 及び / 又は - 4 番目の位置に存在し、いくつかの実施態様では、上記プライマーの3'末端から - 1 番目及び - 2 番目に存在し、いくつかの実施態様では、上記プライマーの3'末端から - 1 番目、 - 2 番目及び - 3 番目に存在し、いくつかの実施態様では、上記プライマーの3'末端から - 1 番目、 - 2 番目、 - 3 番目及び - 4 番目に存在する。

#### 【0067】

誤解を防ぐために説明すると、配列 5' G p A p T x G y C 3' において、y は 3' 末端から - 1 番目のヌクレオシド間結合を、x は 3' 末端から - 2 番目のヌクレオシド間結合を、p は 3' 末端から - 3 番目及び - 4 番目のヌクレオシド間結合を示し、C は 3' 末端から - 1 番目のヌクレオチド、G は 3' 末端から - 2 番目のヌクレオチドである。

#### 【0068】

本発明の第1の観点の他の態様によると、配列断片  $t_n - t_c - t_v - t_c' - t_n'$  に含まれる標的配列  $t_c - t_v - t_c'$  をシーケンシングする方法であって、以下の工程を含む方法が提供される。

a . 上述の観点のいずれかにおいて説明した方法を用いて上記標的配列を増幅する工程、及び

b . 配列要素  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a - K'$  を含む第2の増幅産物をシーケンシングして、読み取った配列で構成される配列のセットを生成する工程

#### 【0069】

シーケンシングを行う方法は、当業者に公知であり、上述の公知文献に記載の方法も含まれる（ただしそれらには限定されない）。

#### 【0070】

いくつかの実施態様において、標的配列をシーケンシングする方法は、更に以下の工程を含む。

c . 上記配列のセットに含まれる各配列を、第1段階目のプライマーに含まれる  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a - K'$  とアライメントする工程、及び

d . コンタミネーションの指標として、上記配列のセットに含まれる各配列に対し 0 又は 1 の値を割り当てる工程、ここで、上記配列のセットに含まれる配列（配列のセットに含まれるある特定の配列）が  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a - K'$  と完全にアライメントした場合は値 0 が割り当てられ（この特定の配列を有するコンタミネーション物が存在しないことを意味する）、上記配列のセットに含まれる配列（配列のセットに含まれるある特定の配列）と  $m_a - K$  及び / 又は  $m_a - K'$  とのアライメントが不完全だった場合は値 1 が割り当てられ（この特定の配列を有するコンタミネーション物の配列が読み取られたことを意味する）、ここで、

(i) 工程 d) で割り当てられた値を全て加算し、読み取った全配列数で当該加算値を除算して、コンタミネーション物の百分率を算出する、及び / 又は

(ii) 上記配列のセットから、値 1 が割り当てられた配列を削除する

#### 【0071】

配列のセットに含まれる読み取った配列が 10,000 個であって、 $m_a - K$  及び / 又は  $m_a - K'$  に対応する 32 個の配列断片が、あるランにおいてアライメントすると予期された（選択された）配列とアライメントしなかった場合、コンタミネーション物の百分率は、 $32 / 10,000$  を計算して得られた 0.0032 から、0.32% となる。

#### 【0072】

換言すれば、標的配列をシーケンシングする方法は、妥当性検証（バリデーション）又は品質管理（quality control）を行う工程を含む。ここで、得られた全ての配列は、上記識別力を有する配列である  $k_2$  及び  $k_2'$ 、並びに / 又は  $k_1$  及び  $k_1'$  の有無によって検証される（実施例の原理試験で詳述するように、第2段階目の増幅用プライマーに含まれる  $k_1$  及び  $k_1'$  が、第2段階目の増幅において、校正活性を有するポリメラーゼによ

10

20

30

40

50

って部分的に分解され得ることから、 $k_1$  及び  $k_1'$  は、第 1 段階目の増幅に関する識別子となり得る)。想定外の識別子配列やこれらの組み合わせは、コンタミネーション物が存在することを意味する。

#### 【0073】

各増幅反応において、 $k_1$ 、 $k_1'$ 、 $k_2$  及び  $k_2'$  又はこれらの組み合わせの相違によって区別可能な、相異なるプライマーで構成されるプライマーのセットが使用される。換言すれば、この方法は、複数のサンプルそれぞれに対し 1 個のプライマーのセットを使用する工程を含み、ここで、各プライマーのセットは、配列  $m_a - K - p_c$  を含む第 1 段階目の左側プライマー及び配列  $m_a - K' - p_c'$  を含む第 1 段階目の右側プライマーを含む第 1 段階目の PCR プライマー対と、配列  $a_L - a_P - a_K$  を含む左側のアダプタープライマー及び配列  $a_L' - a_P' - a_K'$  を含む右側のアダプタープライマーを含むアダプター PCR プライマー対と、を含む。

10

#### 【0074】

本発明の他の観点によれば、本発明に係る、標的核酸配列を増幅又はシーケンシングするための方法に用いるプライマーのセットが提供され、ここで、前述のコレクションに含まれる各プライマーのセットは、以下を含む：

i. 配列  $m_a - K - p_c$  を含む第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列  $m_a - K' - p_c'$  を含む第 1 段階目の右側（リバース）プライマーと、を含む第 1 のプライマーのセット、及び

ii. 配列  $a_L - a_P - a_K$  を含む左側のアダプタープライマー及び配列  $a_L' - a_P' - a_K'$  を含む右側のアダプタープライマーと、を含むアダプター PCR プライマー対

20

ここで、配列の各表記は前述のとりの意味を持つ。具体的には以下のとおりである。

$p_c$  は標的配列の  $t_c$  に対し相補的な配列を有し、 $p_c'$  は  $t_c$  に対する逆相補配列を有する。

$K$  は配列要素  $k_1$  及び 3' 末端の配列要素  $s$  を含み、 $K'$  は配列要素  $k_1'$  及び 3' 末端の配列要素  $s'$  を含み、ここで、

$k_1$  及び  $k_1'$  の長さは、それぞれ独立して 2 から 9 ヌクレオチド長であり、

$s$  及び  $s'$  は配列要素  $t_n$  及び  $t_n'$  とハイブリッドを形成する連続的配列が存在しないように設計されたミスマッチ配列であり、 $s$  及び  $s'$  の長さは、それぞれ独立して、1、2、3、4 又は 5 ヌクレオチド長であり、

30

$a_K$  の配列は配列要素  $k_1$  の配列に対して相補的であり、 $a_K'$  の配列は配列要素  $k_1'$  の配列に対して相補的であり、

$a_K$  及び  $a_K'$  は、それぞれ  $k_2$  及び  $k_2'$  とハイブリッドを形成しないように設計され、

$a_P - a_K$  は  $m_a - K$  内の連続した配列とハイブリッドを形成し、 $a_P' - a_K'$  は  $m_a - K'$  内の連続した配列とハイブリッドを形成し、

$p_c$ 、 $p_c'$ 、 $m_a - K$  及び  $m_a - K'$  の配列の長さは、それぞれ独立して、10 から 40 ヌクレオチド長であり、 $a_L$  及び  $a_L'$  はそれぞれ独立して任意の配列を有する。

#### 【0075】

いくつかの実施態様において、 $K$  は 3' 末端配列  $k_1 - k_2 - s$  を含み、 $K'$  は 3' 末端配列  $k_1' - k_2' - s'$  を含み、ここで、 $k_2$  及び  $k_2'$  の長さは、それぞれ独立して 2 から 7 ヌクレオチド長であり、 $a_K$  及び  $a_K'$  は、それぞれ  $k_2$  及び  $k_2'$  とハイブリッドを形成しないように設計される。

40

#### 【0076】

ある実施態様において、1 個のコレクションにおいて、配列要素  $a_P$  の配列は全て同じであり、配列要素  $a_P'$  の配列は全て同じである。

#### 【0077】

1 つの実施態様において、本発明に係る（そして本発明に係る方法に使用される）プライマーのセットは、以下を含む。

配列番号 001 から 045 から選択される  $p_c$  を含む第 1 段階目の左側（フォワード）

50

プライマーと、配列番号 0 4 6 から 0 5 8 から選択される  $p_c'$  を含む第 1 段階目の右側（リバース）プライマー、及び / 又は

配列番号 1 8 9 から 2 3 2 から選択される  $p_c$  を含む第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号 2 3 3 から 2 4 6 から選択される  $p_c'$  を含む第 1 段階目の右側（リバース）プライマー、及び / 又は

配列番号 0 5 9 から 0 8 5 から選択される  $m_a$  を含む第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号 0 8 6 から 1 1 7 から選択される  $m_a$  を含む第 1 段階目の右側（リバース）プライマー、及び / 又は

配列番号 1 1 8 から 1 4 9 から選択される  $a_L - a_P$  を含む第 1 段階目の左側（フォワード）プライマーと、配列番号 1 5 0 から 1 8 2 から選択される  $m_a$  を含む第 1 段階目の右側（リバース）プライマー

10

【 0 0 7 8 】

本発明の他の観点によれば、これまで述べた観点又は実施態様のいずれかに係る、標的核酸配列を増幅又はシーケンシングするための方法に使用するためのプライマーのセットのコレクションが提供される。ここで、当該プライマーのセットは、これまで述べた本発明の観点によって定義されるもの（本発明に係るプライマーのセット）である。そして、コレクションに含まれるプライマーのセット全てにおいて、配列要素  $p_c$  の配列は全て同じであり、配列要素  $p_c'$  の配列は全て同じである。また、各プライマーのセットは、 $k_1$  及び  $k_1'$  の組み合わせによって、他のプライマーのセットと区別される。

【 0 0 7 9 】

20

換言すれば、プライマーのセット間で、 $k_1$  は互いに異なる、及び / 又は  $k_1'$  は互いに異なる。つまり、プライマーのセットの各々は、特有の  $k_1 / k_1'$  の組み合わせを有する。

【 0 0 8 0 】

本発明に係るこの観点におけるいくつかの実施態様では、 $k_2$  及び  $k_2'$  が存在する場合、プライマーのセット間で、 $k_2$  は互いに異なり、 $k_2'$  は互いに異なる。換言すれば、各プライマーのセットは、 $k_1$ 、 $k_1'$ 、 $k_2$  及び  $k_2'$  の組み合わせの違いによって、他のプライマーのセットと区別される。

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施態様において、本発明に係るプライマーのセットのコレクションは、4、8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、160、200、256 又は 1024 個の相異なるプライマーのセットを含む。

30

【 0 0 8 2 】

本発明の更に他の観点によれば、本発明に係るプライマーのセットのコレクションを複数含む、コレクション集合（プライマーライブラリ）が提供される。ここで、各コレクションは、 $p_c$  及び  $p_c'$  の組み合わせによって区別される。

【 0 0 8 3 】

コレクション集合において、セット集合は、コレクション集合の構成要素と定義される。つまり、1 個のセット集合とは、本発明の方法に使用される複数のプライマーのセットの集合 1 個を指し、ここで、プライマーのセットが複数あるということは、各セット間で  $p_c$  及び  $p_c'$  の組み合わせが異なり、かつ全てのセットにおいて  $k_1$  及び  $k_1'$  が同じ（ $k_2$  及び  $k_2'$  も存在すればこれらも同じ）である、ということ意味する。従って、コレクション集合の構成要素は、同じマルチプレックス PCR において併用することができ、コレクション集合に含まれる相異なる構成要素（相異なる K - ボックスによって区別される）は、各 PCR / 各シーケンシングにおいて繰り返し使用されることになる。

40

【 0 0 8 4 】

本発明の効果を示すため、PCR を用いた、T 細胞受容体（TCR）遺伝子再構成の分析を行った。

【 0 0 8 5 】

通常、TCR の分析には 2 ステップ PCR が有用である。それは、TCR に特異的なブ

50

ライマーを用いた第1段階目の増幅でたった数回のPCRサイクルを行えばよく、PCRバイアスが最小化され、次の増幅工程において、アダプタープライマーによって第1の増幅産物が均等に増幅されるためである。また、第2段階目の増幅では、様々なNGSプラットフォームのそれぞれに適した相異なるアダプターを使用することができる。

#### 【0086】

1つの実施態様において、第1の左側プライマーに含まれる、標的にハイブリッドを形成する断片( $p_c$ )の配列は、配列番号001から045で表され、第1の右側プライマーに含まれる、標的にハイブリッドを形成する断片( $p_c'$ )の配列は、配列番号046から058で表される。他の実施態様においては、第1の左側プライマーに含まれる、標的にハイブリッドを形成する断片( $p_c$ )の配列は、配列番号189から232で表され、第1の右側プライマーに含まれる、標的にハイブリッドを形成する断片( $p_c'$ )の配列は、配列番号233から246で表される。配列番号001から058及び配列番号189から246で表されるプライマーは、1)アニーリング温度を近接させる、及び2)自己プライミングを最小限にする、という観点から最適化されたものである。

#### 【0087】

ここに記載される方法、プライマーのセット、コレクション及びコレクション集合は、ヒト患者におけるTCRのレパトア(repertoire)をin vitroで分析するにあたって使用される。

#### 【0088】

なお、ここに「実施態様」として開示された各特徴の代替となり得るいかなる事物も、他の実施態様を構成するために任意に組み合わせることができる。

#### 【0089】

以下の実施例及び図面によって、本発明の実施態様及び利点が更に例示されるが、これらの実施例は、本発明を例示するものであって本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0090】

実施例に記載する原理試験において、配列断片 $k_1/k_1'$ (小文字のkで表記される)は大文字を用いて $K_1$ とも表記され、配列断片 $k_2/k_2'$ (小文字のkで表記される)は大文字を用いて $K_2$ とも表記される。また、以降、配列断片 $s_1/s_1'$ は、大文字を用いてSとも表記される。プライム記号又はアポストロフィー(')は、それを含んで表記される配列断片又は配列要素が、プライム記号又はアポストロフィーなしで表記される対応物と類似の機能的特徴を有し、かつ標的配列において反対側に位置して逆方向に作用することを示す。

#### 【0091】

##### 実施例1： $K_1$ の機能の原理試験

コンタミネーションの抑制効果を確認するための原理試験の設計の概要は、下記のとおりである。

1) 第1段階目の増幅のPCR産物を、その100%がコンタミネーション物であると見なして第2段階目の増幅の鋳型として使用した。配列断片 $K_1$ の、このコンタミネーション物の増幅抑制機能及び効果を確認するため、プライマー並びに第1の増幅産物及び第2の増幅産物における、 $K_1$ 間の様々な長さ( $N=1, 2, 3, 4, 6$  bp)のミスマッチを確認した。更に、コンタミネーション抑制効果を確認するため、(i)校正活性を有するポリメラーゼ及び校正活性を有さないポリメラーゼ、並びに(ii)ホスホロチオエート結合又はLNAを含むプライマー及びホスホロチオエート結合もLNAも含まないプライマーを使用した。

2) コンタミネーション抑制をしない場合との比較、及びコンタミネーション抑制をしない場合のシミュレーションを行うため、完全にマッチする配列を有する $K_1$ を含むプライマーを用いたPCRも同時に行った。

3) 1)及び2)に記載の増幅によって得られたPCR産物の量を、後に詳述するように定量及び標準化した。統計的な信頼度を確保するため、各実験について反復実験を行い

、PCR産物量の平均及び標準偏差を算出した。

【0092】

第1段階目の増幅用プライマーに含まれる配列断片 $K_1$ と第2段階目の増幅用プライマーに含まれる配列断片 $K_1$ との間にミスマッチがある場合は、第2段階目の増幅によってPCR産物が得られなければ、第1段階目の増幅からのコンタミネーションが完全に抑制されたことになる。

【0093】

第1段階目の増幅用プライマーに含まれる配列断片 $K_1$ と第2段階目の増幅用プライマーに含まれる配列断片 $K_1$ との間にミスマッチがある場合にPCR産物が得られたならば、第1段階目の増幅からのコンタミネーションが完全には抑制されなかったことになる。

10

【0094】

この方法の詳細は以下のとおりである。

【0095】

DNAサーマルサイクラー(PE9700、パーキンエルマー社製、ロートガウ、ドイツ)を用いてPCRを行った。第1段階目の増幅反応の鋳型として、V-4及びJ-2.1断片によるTCR再構成が生じていることが知られる、T細胞リンパ腫細胞株PeerのDNA100ngを用いた。

【0096】

第1段階目の増幅に、5'末端から3'末端の方向で、配列断片 $m_a$ -K及び $p_c$ を含む第1段階目のプライマーを用いた(図1)。配列断片 $p_c$ は標的特異性を有する部分であり、一方で配列断片 $m_a$ -Kは、その配列全体で第2のアダプタープライマーとハイブリダイゼーションするものであり、標的特異性を有さない。第1段階目の左側プライマーは、配列 $m_a$ -K- $p_c$ を含み、ここで $p_c$ の配列(配列番号183;TTATTCTTCACCTACACACCTGC)はV-4断片とマッチする配列である。第1段階目の右側プライマーは、配列 $m_a$ -K- $p_c$ 'を含み、ここで $p_c$ 'の配列(配列番号186;TGCTCTTCCGATCT)はJ-2.1断片とマッチする配列である。

20

【0097】

ここで、第1のフォワードプライマーは、そのk-ボックスの3'末端部分に、2個のヌクレオチドGGからなる配列要素sを含む。第1のリバースプライマーは、そのk'-ボックスの3'末端部分に、2個のヌクレオチドTAからなる配列要素s'を含む。

30

【0098】

また、第1のフォワードプライマーのk-ボックスは、その5'末端部分に配列要素 $m_a$ (配列番号185;CGCTCTTCCGATCT)を更に含み、第1のリバースプライマーのk'-ボックスは、その5'末端部分に配列要素 $m_a$ '(配列番号186;TGCTCTTCCGATCT)を含む(これら配列要素は図3で概観できる)。

【0099】

表2に記載されるように、第1のフォワードプライマーに含まれる各k-ボックスは、様々な $k_1$ 及び $k_2$ 配列を含み、第1のリバースプライマーに含まれる各k'-ボックスも、様々な $k_1$ '及び $k_2$ '配列を含む。

【表5】

40

k-ボックス名	$k_1$ の配列	$k_2$ の配列	k'-ボックス名	$k_1$ 'の配列	$k_2$ 'の配列
1bpV1	G	G	1bpJ1	C	C
1bpV2	A	C	1bpJ2	T	G
2bpV1	AC	G	2bpJ1	TG	C
2bpV2	CA	C	2bpJ2	GT	G
3bpV1	ACC	G	3bpJ1	TGG	C
3bpV2	CAG	C	3bpJ2	GTC	G

表2:フォワードプライマーまたはリバースプライマーの5'末端から3'末端の方向で記載した、k-ボックス及びk'-ボックスの要素の配列

【0100】

第1段階目の増幅は、最終濃度3mMのMgCl<sub>2</sub>、各0.2mMのdNTP、1.0

50

$\mu\text{M}$ のフォワードプライマー、 $1.0\ \mu\text{M}$ のリバースプライマー及び1ユニットのAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ（アプライドバイオシステムズ社製、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国）を含む $1\times\text{PCR}$ バッファーを $50\ \mu\text{l}$ 使用して行った。増幅反応条件は、 $15$ 分間 $95^\circ\text{C}$ とするサイクルを1サイクル行い、次いで $95^\circ\text{C}$ を $30$ 秒、 $65^\circ\text{C}$ を $45$ 秒、 $72^\circ\text{C}$ を $45$ 秒のサイクルを $34$ サイクル繰り返した後、最後に $72^\circ\text{C}$ で $10$ 分間伸長反応を行うこととした。そして、第1の増幅産物の精製を、QIAquick PCR精製キット（キアゲン社製、ヒルデン、ドイツ）を用い、製造者によるマニュアルに従って行った。次に、DNA濃度を、Qubit（登録商標） $1.0$ フルオロメーター（インビトロジェン、ダルムシュタット、ドイツ）を使用して測定した。第2段階目の増幅の鋳型として、精製した第1の増幅産物 $500\ \text{pg}$ を使用した。

10

#### 【0101】

第2の増幅には、配列 $a_L - a_P - a_K$ を含む左側のアダプタープライマーと、配列 $a_L' - a_P' - a_K'$ を含む右側のアダプタープライマーと、を含むアダプターPCRプライマー対を使用した。

#### 【0102】

ここで、左側のアダプタープライマーは配列要素 $a_L - a_P$ （配列番号187）を含み、右側のアダプタープライマーは、配列要素 $a_L' - a_P'$ （配列番号188）を含む。

#### 【0103】

また、フォワードアダプタープライマーに含まれる $k$ -ボックスは、様々な $k_1$ 配列を含み、リバースアダプタープライマーに含まれる $k'$ -ボックスも、様々な $k_1'$ 配列を含む（表2に記載）。

20

#### 【0104】

第2段階目の増幅中には、 $3'$ 末端から $5'$ 末端の方向にエキソヌクレアーゼ活性を有する、校正活性を有するポリメラーゼによって、第2段階目の増幅用プライマーの有する $K_1$ のミスマッチが、プライマーの $3'$ 末端において除去され得る。そこで、第2段階目の増幅用の左側（フォワード）プライマー及び右側（リバース）プライマーそれぞれの、 $3'$ 末端から数えて（i）1番目、（ii）1番目及び2番目、並びに（iii）1番目から3番目にホスホロチオエートを配置して、その保護効果を、このホスホロチオエート結合による保護が施されていないプライマーの場合と比較することによって確認した。

#### 【0105】

30

第2段階目の増幅は、（i）校正活性を有するポリメラーゼ（Phusion High Fidelity DNAポリメラーゼ（フィンザイム社製、エスポー、フィンランド））、又は（ii）校正活性を有さないポリメラーゼ（AmpliTaq Gold）を用いて行った。

#### 【0106】

校正活性を有するポリメラーゼを用いたPCRにおいては、第2段階目の増幅反応を、最終濃度 $1.5\ \text{mM}$ の $\text{MgCl}_2$ 、各 $0.05\ \text{mM}$ の $\text{dNTP}$ 、 $1.0\ \mu\text{M}$ のフォワードプライマー、 $1.0\ \mu\text{M}$ のリバースプライマー及び1ユニットのPhusion High Fidelity DNAポリメラーゼ（アプライドバイオシステムズ製、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国）を含む $1\times\text{Phusion HF}$ バッファーを $50\ \mu\text{l}$ 使用して行った。第2段階目の増幅の反応条件は、 $30$ 秒間 $98^\circ\text{C}$ とするサイクルを1サイクル行い、次いで $98^\circ\text{C}$ を $10$ 秒間、 $58^\circ\text{C}$ を $30$ 秒間、 $72^\circ\text{C}$ を $30$ 秒間のサイクルを $12$ サイクル繰り返した後、最後に $72^\circ\text{C}$ で $5$ 分間伸長反応を行うこととした。

40

#### 【0107】

AmpliTaq Goldポリメラーゼを用いたPCRにおいては、第2段階目の増幅反応を、最終濃度 $3\ \text{mM}$ の $\text{MgCl}_2$ 、各 $0.2\ \text{mM}$ の $\text{dNTP}$ 、 $1.0\ \mu\text{M}$ のフォワードプライマー、 $1.0\ \mu\text{M}$ のリバースプライマー及び1ユニットのAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼを含む $1\times\text{PCR}$ バッファーを $50\ \mu\text{l}$ 使用して行った。第2段階目の増幅の反応条件は、 $15$ 分間 $98^\circ\text{C}$ とするサイクルを1サイクル行い、次いで $95^\circ\text{C}$ を $15$ 分間、 $54^\circ\text{C}$ を $30$ 秒間、 $72^\circ\text{C}$ を $30$ 秒間のサイクルを $23$ サイクル繰

50

り返した後、最後に 72 で 5 分間伸長反応を行うこととした。

#### 【0108】

PCR産物の分析には、6%アクリルアミドゲルを使用し、バイオラッド社の Gel doc 2000 (ミュンヘン、ドイツ)を用い、初期設定条件 (default condition) で Tif ファイルを得た。PCR産物のバンドを、Fusion-Capt アドバンスソフトウェア (ヴィルバー・ルーマット (Vilber Lourmat) 社製、エバーハルツェル、ドイツ)を用いて定量した。PCR産物の定量には、(i) 各分析においてコンタミネーション 100%と定義される、ゲルを用いた定量用スタンダード (つまり Peer の PCR産物、8  $\mu$ l)、(ii) PCR産物、(iii) ネガティブコントロール (no template control、NTC) 及び (iv) バックグラウンド部分から、同じ面積のゲルを供した。各バックグラウンドバンドのゲルの中央部分に対し、Fusion-Capt アドバンスソフトウェアのパラメータによるバックグラウンドの線形減法を行った。ここでは、「転がるボール」 (rolling ball) アルゴリズムによるバックグラウンド減法 (サイズ = 11) を採用した。マイクロソフトエクセルを用いて、反復実験の平均値及び標準偏差 (SDN) を求めた。

10

#### 【0109】

##### 結果

表3は、ホスホロチオエート結合の数の影響を含む K - ボックスのミスマッチによる、 $K_1$  によるコンタミネーション抑制に関する実験の結果を単一値で表したものである。表4は、表3の簡易統計である。上記試験において、第2段階目の増幅反応用プライマーは、0から3個のホスホロチオエート結合を含むものであった。コンタミネーション物 (Peer の DNA を鋳型として、Peer に特異的な第1段階目の増幅用プライマーを用いて得た PCR産物) が 100%存在するという状況を、第1段階目の増幅で得られた PCR産物を第2段階目の増幅に供することで模擬的に作り出した。第2段階目の増幅は、マッチする第2段階目の増幅用プライマー (つまり  $K_1$  のミスマッチが 0 (ゼロ) である)、及び 1 bp 又は 2 bp (フォワードプライマーの  $K_1$  間のミスマッチとリバースプライマーの  $K_1$  間のミスマッチとの合計) のミスマッチを含む  $K_1$  を含む 2 番目の増幅用プライマーを用いた。

20

#### 【0110】

K - ボックスがミスマッチを含むことで増幅が顕著に抑制され、ミスマッチが 2 塩基の場合の方が、ミスマッチが 1 塩基の場合よりも増幅が抑制された。この結果は、我々の技術的思想の妥当性を支持するものである (表3及び4)。

30



【表 6】

分析試料又は FAプライマーの 組み合わせ	SAプライマー の組み合わせ	K <sub>1</sub> 間 ミスマッチ (bp)	Vol. % (3 PT)	Vol. % (2 PT)	Vol. % (1 PT)	Vol. % (0 PT)
ゲル定量用スタンダード			100.0	100.0	100.0	100.0
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	0	136.7	163.1	152.4	176.9
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV1 1bpJ2	1	28.7	38.4	63.6	171.8
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV2 1bpJ1	1	41.6	40.9	69.6	169.9
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV2 1bpJ2	2	17.0	12.2	28.7	127.7
NTC 1bpV1 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	0	13.7	10.8	11.6	14.0
バックグラウンド			12.0	9.7	8.8	15.7
ゲル定量用スタンダード			100.0	100.0	100.0	100.0
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV1 1bpJ1	1	8.9	20.1	18.6	109.3
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV1 1bpJ2	0	84.8	119.5	100.5	122.0
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	2	7.8	12.7	10.8	76.7
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	1	13.9	22.0	25.8	104.3
NTC 1bpV1 1bpJ2	1bpV1 1bpJ1	1	9.5	12.0	7.5	9.6
バックグラウンド			7.7	11.0	8.0	7.9
ゲル定量用スタンダード			100.0	100.0	100.0	100.0
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	1	19.3	28.2	45.1	87.0
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ2	2	10.6	11.9	14.2	80.5
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV2 1bpJ1	0	82.4	83.9	86.8	101.3
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV2 1bpJ2	1	11.7	16.8	21.3	78.0
NTC 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	1	9.2	8.5	8.9	7.8
バックグラウンド			7.0	12.0	6.8	8.2
ゲル定量用スタンダード			100.0	100.0	100.0	100.0
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV1 1bpJ1	2	10.1	10.2	11.8	81.7
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV1 1bpJ2	1	22.7	22.5	38.2	113.8
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	1	11.4	11.3	13.1	103.0
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV2 1bpJ2	0	94.0	81.1	78.7	96.9
NTC 1bpV2 1bpJ2	1bpV1 1bpJ1	2	9.3	8.2	8.1	10.0
バックグラウンド			9.7	7.9	8.2	10.2

表 3 : 3、2、1 又は 0 個のホスホロチオエート結合を 3' 末端部分に含む第 2 段階目の増幅用プライマー及び校正活性を有するポリメラーゼを使用した場合の、K<sub>1</sub> 間のミスマッチ (1 bp 又は 2 bp) の数がコンタミネーション抑制割合に与える影響。PCR 産物の量を標準化するために、ゲルを用いた定量用スタンダード (ゲル定量スタンダード) として、各ゲルに同じ Peer の PCR の PCR 産物を使用し、この PCR 産物量を 100 % とした。よって、Vol. % が 100 % を超える場合もある。コンタミネーション抑制効果は簡易統計として表 4 に示される。(FA = 第 1 段階目の増幅、SA = 第 2 段階目の増幅、NTC = ネガティブコントロール、bp = 塩基対、Vol. % = Fusion-Capt アドバンスソフトウェアを用いて求めた容量パーセント、PT = ホスホロチオエート結合)

【表 7】

K <sub>1</sub> 間 ミスマッチ (bp)	Vol. % (3 PT) Mean	Vol. % (3 PT) SDN	Vol. % (2 PT) Mean	Vol. % (2 PT) SDN	Vol. % (1 PT) Mean	Vol. % (1 PT) SDN	Vol. % (0 PT) Mean	Vol. % (0 PT) SDN
0	99.5	21.9	111.9	33.2	104.6	28.7	124.3	31.8
1	19.8	10.3	25.0	9.6	36.9	19.7	117.1	32.9
2	11.4	3.4	11.8	0.9	16.4	7.2	91.7	20.9

表 4 : 表 3 の簡易統計 (bp = 塩基対、Vol. % = 容量パーセント (百分率)、SDN = 標準偏差、PT = ホスホロチオエート結合)。100 付近の Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起らなかったことを意味する。小さい Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こったことを意味する。

【0 1 1 1】

表 3 において、全 NTC の平均は 9.7 (標準偏差 1.9) であり、バックグラウンドの平均は 9.4 (標準偏差 2.3) であった。

【0 1 1 2】

表 3 及び 4 を要約すると、第 2 段階目の増幅において校正活性を有するポリメラーゼを

使用した場合、再増幅（第2段階目の増幅）に使用したk - ボックス及びk' - ボックスの3'末端部分に含まれるホスホロチオエート結合によって、コンタミネーション抑制効果が高まった。更に、 $K_1$ 間のミスマッチの数が多いほど、コンタミネーション抑制効果が高かった。例えば、 $K_1$ 間のミスマッチが2bpであり、2個のホスホロチオエート結合があった場合のコンタミネーションの値（平均11.8、標準偏差0.9）は、NTC又はバックグラウンドと同程度であった。

【0113】

更に、 $K_1$ がより長いミスマッチを含むことでコンタミネーションが完全に抑制されることを示す実験を行った。 $K_1$ 間のミスマッチの全長が2、3、4及び6bpであることで、コンタミネーションがどれほど抑制されるか、ミスマッチを含まない $K_1$ をコントロールとして、比較試験を行った。この試験においては、3個のホスホロチオエート結合を含む第2段階目の増幅用プライマーを用いた。結果を表5に示す。表5の結果の平均及び標準偏差を含む簡易統計は、表6に示される。

【表 8】

分析試料又は FAプライマーの 組み合わせ	SAプライマーの 組み合わせ	Vol. % (3 PT)	K <sub>1</sub> 間ミスマッチ (bp)
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 2bpV1 2bpJ1	2bpV1 2bpJ1	113.8	0
Peer 2bpV1 2bpJ1	2bpV1 2bpJ2	11.5	2
Peer 2bpV1 2bpJ1	2bpV2 2bpJ1	10.4	2
Peer 2bpV1 2bpJ1	2bpV2 2bpJ2	10.9	4
NTC 2bpV1 2bpJ1	2bpV1 2bpJ1	10.6	0
バックグラウンド		9.5	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 2bpV1 2bpJ2	2bpV1 2bpJ1	9.8	2
Peer 2bpV1 2bpJ2	2bpV1 2bpJ2	99.3	0
Peer 2bpV1 2bpJ2	2bpV2 2bpJ1	8.5	4
Peer 2bpV1 2bpJ2	2bpV2 2bpJ2	8.9	2
NTC 2bpV1 2bpJ2	2bpV1 2bpJ1	7.6	2
バックグラウンド		8.0	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 2bpV2 2bpJ1	2bpV1 2bpJ1	11.2	2
Peer 2bpV2 2bpJ1	2bpV1 2bpJ2	8.1	4
Peer 2bpV2 2bpJ1	2bpV2 2bpJ1	88.9	0
Peer 2bpV2 2bpJ1	2bpV2 2bpJ2	8.5	2
NTC 2bpV2 2bpJ1	2bpV1 2bpJ1	7.7	2
バックグラウンド		9.4	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 2bpV2 2bpJ2	2bpV1 2bpJ1	10.8	4
Peer 2bpV2 2bpJ2	2bpV1 2bpJ2	13.1	2
Peer 2bpV2 2bpJ2	2bpV2 2bpJ1	9.6	2
Peer 2bpV2 2bpJ2	2bpV2 2bpJ2	98.5	0
NTC 2bpV2 2bpJ2	2bpV1 2bpJ1	11.8	4
バックグラウンド		11.1	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 3bpV1 3bpJ1	3bpV1 3bpJ1	70.1	0
Peer 3bpV1 3bpJ1	3bpV1 3bpJ2	12.1	3
Peer 3bpV1 3bpJ1	3bpV2 3bpJ1	22.4	3
Peer 3bpV1 3bpJ1	3bpV2 3bpJ2	12.8	6
NTC 3bpV1 3bpJ1	3bpV1 3bpJ1	19.0	0
バックグラウンド		9.9	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 3bpV1 3bpJ2	3bpV1 3bpJ1	10.0	3
Peer 3bpV1 3bpJ2	3bpV1 3bpJ2	79.8	0
Peer 3bpV1 3bpJ2	3bpV2 3bpJ1	9.2	6
Peer 3bpV1 3bpJ2	3bpV2 3bpJ2	17.5	3
NTC 3bpV1 3bpJ2	3bpV1 3bpJ1	8.4	3
バックグラウンド		8.2	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 3bpV2 3bpJ1	3bpV1 3bpJ1	8.6	3
Peer 3bpV2 3bpJ1	3bpV1 3bpJ2	7.0	6
Peer 3bpV2 3bpJ1	3bpV2 3bpJ1	71.5	0
Peer 3bpV2 3bpJ1	3bpV2 3bpJ2	7.6	3
NTC 3bpV2 3bpJ1	3bpV1 3bpJ1	6.8	3
バックグラウンド		7.8	
ゲル定量用スタンダード		100.0	
Peer 3bpV2 3bpJ2	3bpV1 3bpJ1	7.2	6
Peer 3bpV2 3bpJ2	3bpV1 3bpJ2	7.4	3
Peer 3bpV2 3bpJ2	3bpV2 3bpJ1	9.2	3
Peer 3bpV2 3bpJ2	3bpV2 3bpJ2	61.4	0
NTC 3bpV2 3bpJ2	3bpV1 3bpJ1	8.0	6
バックグラウンド		8.8	

表 5 : 3 個のホスホロチオエート結合を 3' 末端部分に含む第 2 段階目の増幅用プライマ

10

20

30

40

50

ー及び校正活性を有するポリメラーゼを使用した場合の、 $K_1$ 間のミスマッチ（全長2、3、4又は6bp）の数がコンタミネーション抑制割合に与える影響。PCR産物の量を標準化するために、ゲルを用いた定量用スタンダード（ゲル定量スタンダード）として、各ゲルに同じPeerのTCRのPCR産物を使用し、このPCR産物量を100%とした。よって、Vol.%が100%を超える場合もある。100付近のVol.%の値は、コンタミネーションの抑制が起こらなかったことを意味する。小さいVol.%の値は、コンタミネーションの抑制が起こったことを意味する。（FA = 第1段階目の増幅、SA = 第2段階目の増幅、NTC = ネガティブコントロール、bp = 塩基対、Vol.% = 容量パーセント、PT = ホスホロチオエート結合）

【表9】

$K_1$ 間 ミスマッチ	Vol. % Mean	Vol. % SDN
0	85.4	16.7
2	10.4	1.4
3	11.9	5.0
4	9.6	1.3
6	9.1	2.3

表6：表5の簡易統計。100付近のVol.%の値は、コンタミネーションの抑制が起こらなかったことを意味する。小さいVol.%の値は、コンタミネーションの抑制が起こったことを意味する。（bp = 塩基対、Vol.% = 容量パーセント（百分率）、SDN = 標準偏差）

【0114】

表5において、全NTCの平均は10.0（標準偏差3.7）であり、バックグラウンドの平均は9.1（標準偏差1.0）であった。

【0115】

表5及び6を要約すると、第2の増幅において校正活性を有するポリメラーゼを使用し、第2の増幅用プライマーのk-ボックス及びk'-ボックスの3'末端部分に3個のホスホロチオエート結合があり、 $K_1$ 間のミスマッチが4bp（平均9.6、標準偏差1.3）及び6bp（平均9.1、標準偏差2.3）である場合、NTC及びバックグラウンドに匹敵する値を取り、コンタミネーションが完全に抑制されていた。

【0116】

また、ホスホロチオエート結合を用いず、かつ校正活性のないポリメラーゼ（AmpliTaq Goldポリメラーゼ）を用いた試験によって、 $K_1$ 間のミスマッチの数（1及び2bp）がコンタミネーション抑制に及ぼす影響を確認した（表7）。表7の結果の簡易統計は表8に示される。

【表 10】

分析試料又は FAプライマーの 組み合わせ	SAプライマーの 組み合わせ	Vol. %	K <sub>1</sub> 間 ミスマッチ
ゲル定量用スタンダード	-	100	
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	155.7	0
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV2 1bpJ1	92.1	1
Peer 1bpV1 1bpJ1	1bpV2 1bpJ2	54.9	2
NTC 1bpV1 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	13.8	0
NTC 1bpV1 1bpJ1	1bpV2 1bpJ1	14.2	1
NTC 1bpV1 1bpJ1	1bpV2 1bpJ2	11.9	2
バックグラウンド	-	13.2	
ゲル定量用スタンダード	-	100	
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	51.0	2
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV1 1bpJ2	115.0	0
Peer 1bpV1 1bpJ2	1bpV2 1bpJ2	84.7	1
NTC 1bpV1 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	10.3	2
NTC 1bpV1 1bpJ2	1bpV1 1bpJ2	10.8	0
NTC 1bpV1 1bpJ2	1bpV2 1bpJ2	9.4	1
バックグラウンド	-	9.8	
ゲル定量用スタンダード	-	100	
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	104.6	1
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV2 1bpJ1	120.3	0
Peer 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ2	77.8	2
NTC 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ1	38.0	1
NTC 1bpV2 1bpJ1	1bpV2 1bpJ1	30.2	0
NTC 1bpV2 1bpJ1	1bpV1 1bpJ2	20.3	2
バックグラウンド	-	14.5	
ゲル定量用スタンダード	-	100	
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV1 1bpJ1	50.1	2
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	62.7	1
Peer 1bpV2 1bpJ2	1bpV2 1bpJ2	89.1	0
NTC 1bpV2 1bpJ2	1bpV1 1bpJ1	12.5	2
NTC 1bpV2 1bpJ2	1bpV2 1bpJ1	16.5	1
NTC 1bpV2 1bpJ2	1bpV2 1bpJ2	15.0	0
バックグラウンド	-	11.2	

表 7 : 3 個のホスホロチオエート結合含まない第 2 段階目の増幅用プライマー及び校正活

性を有さないポリメラーゼを使用した場合の、 $K_1$  間のミスマッチ（全長 1 又は 2 bp）の数がコンタミネーション抑制割合に与える影響。PCR 産物の量を標準化するために、ゲルを用いた定量用スタンダード（ゲル定量スタンダード）として、各ゲルに同じ Peer の TCR の PCR 産物を使用し、この PCR 産物量を 100% とした。よって、Vol. % が 100% を超える場合もある。100 付近の Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こらなかったことを意味する。小さい Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こつたことを意味する。（FA = 第 1 段階目の増幅、SA = 第 2 段階目の増幅、NTC = ネガティブコントロール、bp = 塩基対、Vol. % = 容量パーセント）

【表 11】

$K_1$ 間 ミスマッチ	Vol. % Mean	Vol. % SDN
0	120.0	23.7
1	86.0	15.2
2	58.5	11.3

10

表 8：表 7 の簡易統計。100 付近の Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こらなかったことを意味する。小さい Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こつたことを意味する。（bp = 塩基対、Vol. % = 容量パーセント（百分率）、SDN = 標準偏差）

20

【0117】

表 7 において、全 NTC の平均は 16.9（標準偏差 8.0）であり、バックグラウンドの平均は 12.2（標準偏差 1.8）であった。

【0118】

表 7 及び表 8 を要約すると、校正活性を有さないポリメラーゼを使用し、かつ第 2 の増幅用プライマーの k - ボックス及び k' - ボックスの 3' 末端部分にホスホロチオエート結合が存在しない場合においても、 $K_1$  間のミスマッチの数が増えるほど、コンタミネーションの抑制効果は高まった。

【0119】

30

TCR コレクション集合を用いた場合における  $K_1$  のコンタミネーション抑制

$K_1$  がコンタミネーションを抑制できることを示すため、コレクション集合（TCR コレクション集合と称する）を用いた試験を行った。ここで、この TCR コレクション集合は、TCR の V 断片に特異的な 44 個のプライマー（ $p_c$  は配列番号 189 から 232 で表されるものである）と、TCR の J 断片に特異的な 14 個のプライマー（ $p_c$  は配列番号 233 から 246 で表されるものである）とを含む。これらプライマーのそれぞれは、5' 末端部分に 2 ヌクレオチド長の配列 S を含む（S の配列が「GG」のものは配列番号 189 から 193、195、197、198、201 から 211、213 から 221、223 から 229、231、233 から 241 及び 243 から 246 で表され、S の配列が「TG」のものは配列番号 194、200 及び 230 で表され、S の配列が「GT」のものは配列番号 196、199、212、222 及び 242 で表され、S の配列が「TT」のものは配列番号 232 で表され、ここで、S の配列は 5' 末端から 3' 末端に向かって表記されている。）。

40

【0120】

また、この TCR コレクション集合において、第 1 段階目のフォワードプライマーの k - ボックスは、その 5' 末端部分に尾配列（tail sequence）要素  $m_a$ （配列番号 247、GCTCTTCCGATCT）を含み、第 1 段階目のリバースプライマーの k' - ボックスは、その 5' 末端部分に配列要素  $m_a'$ （配列番号 247、GCTCTTCCGATCT）を含む。

【0121】

50

(i) 3'末端部分に2個のホスホロチオエート結合を含む第2の増幅用プライマーを用いた試験と、(ii) 3'末端から数えて2番目にLNAを含む第2の増幅用プライマーを用いた試験と、を行った。表9に記載される、特有の $K_1$ 及び $K_2$ 配列を含む3個のプライマーのセット(セット1~3)を使用した。

【表12】

セット	$k_1$ の配列	$k_2$ の配列	$k_1'$ の配列	$k_2'$ の配列
セット1	CACCCAA	GAC	GTTGGTT	CGT
セット2	AGTTTTG	CGG	GGTCATG	TGG
セット3	CTTTAGA	GTG	GCCATTT	TAA

10

表9：フォワードプライマーまたはリバースプライマーの5'末端から3'末端の方向で記載した、 $k$ -ボックス及び $k'$ -ボックスの要素の配列

【0122】

100ngの扁桃由来DNAを鋳型として、上述したとおりに、第1段階目の増幅(AmpliTaq Goldを用いた)及び第2段階目の増幅(校正活性を有するPhusion High-Fidelity DNAポリメラーゼを用いた)を行った。増幅で得られたものは、前述のとおり、Fusion-Captアドバンスソフトウェアを用いて定量した。

【0123】

20

行った増幅反応(セット1~3で可能な、全9個の、 $K_1$ のマッチ及びミスマッチの組み合わせ)及びその結果を表10に示す。

【表 1 3】

分析試料又は FAプライマーセット	SAプライマー セット	Vol. % (PT)	Vol. % (LNA)	K <sub>1</sub> 間の マッチ又は ミスマッチ
ゲル定量用スタンダード	-	100	100	-
セット 1	セット 1	113.6	62.8	マッチ
セット 1	セット 2	29.5	28.6	ミスマッチ
セット 1	セット 3	28.8	34.3	ミスマッチ
NTCセット 1	NTCセット 1	24.1	26.9	マッチ
NTCセット 1	NTCセット 2	24.1	31.0	ミスマッチ
NTCセット 1	NTCセット 2	22.1	31.3	ミスマッチ
バックグラウンド	-	25.5	34.0	-
ゲル定量用スタンダード	-	100	100	-
セット 2	セット 2	83.5	102.1	マッチ
セット 2	セット 1	25.1	21.7	ミスマッチ
セット 2	セット 3	23.5	24.2	ミスマッチ
NTCセット 2	NTCセット 2	21.0	19.0	マッチ
NTCセット 2	NTCセット 1	23.9	20.4	ミスマッチ
NTCセット 2	NTCセット 3	29.0	23.0	ミスマッチ
バックグラウンド	-	23.6	20.7	-
ゲル定量用スタンダード	-	100	100	-
セット 3	セット 3	104.8	50.9	マッチ
セット 3	セット 1	28.7	14.4	ミスマッチ
セット 3	セット 2	23.8	18.1	ミスマッチ
NTCセット 3	NTCセット 3	26.8	18.3	マッチ
NTCセット 3	NTCセット 1	21.3	20.0	ミスマッチ
NTCセット 3	NTCセット 2	22.0	17.1	ミスマッチ
バックグラウンド	-	26.8	21.5	-

表 1 0 : T C R コレクション集合を用いた場合の、K<sub>1</sub>によるコンタミネーション抑制効果。P C R産物の量を標準化するために、ゲルを用いた定量用スタンダード（ゲル定量スタンダード）として、各ゲルに同じP e e rのT C RのP C R産物を使用し、このP C R産物量を100%とした。よって、V o l . %が100%を超える場合もある。100付近のV o l . %の値は、コンタミネーションの抑制が起こらなかつたことを意味する。小さいV o l . %の値は、コンタミネーションの抑制が起こつたことを意味する。（F A = 第1段階目の増幅、S A = 第2段階目の増幅、V o l . % = 容量パーセント、P T = ホスホロチオエート結合、L N A = ロックド核酸）

## 【0124】

表 1 0 の結果の簡易統計を表 1 1 に示す。これらの結果から、K<sub>1</sub>同士がマッチするものである場合にはコンタミネーション物が増幅され、K<sub>1</sub>間にミスマッチがある場合にはコンタミネーション物は増幅されなかつた（S D Nを鑑みると、バックグラウンドと同等の値であった）。



【表 1 4】

	Vol. % Mean (PT)	Vol. % SDN (PT)	Vol. % Mean (LNA)	Vol. % SDN (LNA)
マッチ	100.6	12.6	71.9	21.9
ミスマッチ	26.6	2.5	23.6	6.6
NTC	23.8	2.5	23.0	5.1
バックグラウンド	25.3	1.3	25.4	6.1

表 1 1 : 表 1 0 の簡易統計。1 0 0 付近の Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こらなかつたことを意味する。小さい Vol. % の値は、コンタミネーションの抑制が起こつたことを意味する。( Vol. % = 容量パーセント ( 百分率 ) 、 S D N = 標準偏差、 P T = ホスホロチオエート結合、 L N A = ロックド核酸 )

## 【 0 1 2 5 】

実施例 2 :  $k_2$  及び  $k_2'$  の機能の原理試験

短い配列要素として、 $k_2$  は配列要素  $k_1$  の 3' 末端に連結され、 $k_2'$  は配列要素  $k_1'$  の 3' 末端に連結される ( 図 2 、 3 ) 。  $K_2$  は、セットにおいて第 1 のプライマー対を特定する機能を有し、第 2 の ( アダプター ) プライマーの配列要素と相補的な配列は有さないものである。  $K_2$  の配列は、これまでの増幅反応に由来するコンタミネーション物を検出するよう設計されており、従って  $K_1$  の、上述の抑制効率を制御するものである。

## 【 0 1 2 6 】

本実施例においては、5 個の P C R チューブからなるストライプ P C R チューブを用いて、第 1 段階目の増幅反応を 5 種の試料に対し並行して行い、第 2 段階目の増幅反応を、5 個の P C R チューブからなる他のストライプ P C R チューブ及び 5 種の相異なるプライマーのセットを用いて行った。本実施例において、「チューブ 1 」とは、特有の  $k_2$  及び / 又は  $k_2'$  が第 1 段階目の増幅用プライマーに使用され、かつ第 1 段階目の増幅用プライマー及び第 2 段階目の増幅用プライマーとマッチする配列を有する  $k_1$  及び  $k_1'$  を使用したものである。ここで、「チューブ 2 」中の第 2 の増幅産物に、「チューブ 1 」中の増幅産物の要素  $k_2 / k_2'$  が含まれ、かつ「チューブ 2 」中の第 2 の増幅産物の配列  $k_1$  及び  $k_1'$  が含まれない場合、要素  $k_2$  ( 又は  $k_2'$  ) 間のミスマッチによって、コンタミネーション物があるかないかを明確に識別することができる。この場合、コンタミネーション物は、「チューブ 2 」中の第 2 段階目の増幅用プライマーに含まれる要素  $k_1$  及び  $k_1'$  が、「チューブ 1 」中の第 1 の増幅産物に含まれる要素  $k_1$  及び  $k_1'$  にミスプライミングすることで生じる。また、コンタミネーション物の増幅は、校正活性を有するポリメラーゼによって「チューブ 2 」中の要素  $k_1$  及び  $k_1'$  が一部又は完全に分解されることによって生じ得る。それでも、要素  $k_2 / k_2'$  は第 1 段階目の増幅用プライマーにしか存在しないため、第 2 の増幅産物中にコンタミネーション物があるかないかの識別が可能である。従って、要素  $k_2 / k_2'$  は、上述のようなコンタミネーションを抑制に対する  $k_1 / k_1'$  の効果を補完する、コンタミネーション物の検出のための有用な安全鍵の機能を果たすといえる。  $k_2 / k_2'$  は、 $k_1 / k_1'$  に対し、 $k_1 / k_1'$  のコンタミネーション抑制効果を 1 0 0 % にする相乗効果を奏するものである。

## 【 0 1 2 7 】

配列断片  $k_2 / k_2'$  の機能及び効果を実証するために、上述した P e e r の T C R に特異的な、第 1 段階目の増幅用プライマー及び第 2 段階目の増幅用プライマーを用いた。ここで、第 1 段階目の増幅用フォワードプライマーの  $k$  - ボックス及び  $k'$  - ボックスは、表 2 に記載されるものである。

「チューブ 1 」 ( セット 1 ) の第 1 段階目の増幅 : フォワードプライマー 1 b p V 1 及びリバースプライマー 1 b p J 1

「チューブ 2 」 ( セット 2 ) の第 2 段階目の増幅 : フォワードプライマー 1 b p V 2 及

びリバースプライマー 1 b p J 1

【 0 1 2 8 】

つまり、「チューブ 1」の第 1 段階目の増幅用プライマー ( $k_1 = G$ ) と、「チューブ 2」の第 2 段階目の増幅用プライマー ( $k_1 = A$ ) との間に、1 b p の  $k_1$  間ミスマッチが存在する。また、「チューブ 1」の第 1 段階目の増幅用プライマーは、G である  $k_2$  も含むものである。

【 0 1 2 9 】

「チューブ 1」における第 1 段階目の増幅は、「チューブ 2」における第 2 段階目の増幅にとって、「コンタミネーション物が 100% (チューブ 1 中の第 1 の増幅産物)」である、と定義されるものである。従って、第 2 段階目の増幅は、「チューブ 2」中の第 2 段階目の増幅用プライマー、及び鋳型としての「チューブ 1」中の第 1 の増幅産物を用いて行われた。 $k_1$  間のミスマッチの長さがたった 1 b p だったために、最終的に得られた第 2 の増幅産物のゲル分析において増幅産物が検出された。つまり、この「チューブ 1」のコンタミネーションは、第 2 段階目の増幅 (「チューブ 2」の第 2 段階目の増幅用プライマーを用いた) において完全には抑制されなかったことを意味する。

【 0 1 3 0 】

増幅産物のサンガー法によるシーケンシングによって、増幅産物に、「チューブ 1」の第 1 段階目の増幅用フォワードプライマーの識別子である  $k_2$  ( $k_2 = G$ ) が含まれていたことが検出された。よって、「チューブ 1」に特有の  $k_2$  ' の配列 ( $k_2 = G$ ) によって、「チューブ 2」における第 2 段階目の増幅において「チューブ 1」中の第 1 の増幅産物由来のコンタミネーション物が存在することが識別されたことになる (「チューブ 2」中の  $k_2$  の配列は、「チューブ 2」の  $k$  - ボックスが表 2 に記載する 1 b p V 2 であることから、C であるはずであった)。

【 0 1 3 1 】

このコンタミネーション検出及び防止システムをより理解するために、この第 2 段階目の増幅試験を、上述の PCR 条件に従って、校正活性を有するポリメラーゼを使用した試験と、校正活性を有さないポリメラーゼを使用した試験とに分けて行った。そして、サンガー法によるシーケンシングの結果、どちらの試験においても、コンタミネーション発生を示す  $k_2$  の配列 ( $k_2 = G$ ) が存在し、よってコンタミネーション物 (「チューブ 1」の試料) が存在することを識別することができた。

【 0 1 3 2 】

このシーケンシング結果から、校正活性を有するポリメラーゼを使用した場合には、コンタミネーションした試料 (「チューブ 1」) の  $k_1$  の配列が検出された一方で、校正活性を有さないポリメラーゼを使用した第 2 段階目の増幅においては、第 2 段階目の増幅用プライマーの  $k_1$  の配列 (「チューブ 2」における増幅) が存在したことが確認された。これは、第 1 の増幅用リバースプライマーと第 2 の増幅用リバースプライマーとの間に  $k_1$  のミスマッチがあったこと、及び、第 2 段階目の増幅用プライマーが 2 個のホスホロチオエート結合を含んでいたにも関わらず、第 2 段階目の増幅中に、校正活性を有するポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によって、第 2 段階目の増幅用プライマーの 3' 末端が除去 (分解) されたことによるものである。一方で、第 2 段階目の増幅用プライマーの要素  $k_1$  は、校正活性を有さないポリメラーゼを使用したため、除去されなかった。

【 0 1 3 3 】

従って、上記サンガー法によるシーケンシングによって、 $k_2 / k_2$  ' のコンタミネーション物検出機能が確認された。また、校正活性を有する又は有さないポリメラーゼを第 2 段階目の増幅に用いることができる。重要なのは、要素  $k_2 / k_2$  ' が要素  $k_1 / k_1$  ' の上記機能を評価及び制御することが可能だということである。この実施例試験において同様に重要なのは、校正活性を有するポリメラーゼを使用した場合、バイオインフォマティクスに基づく方法によってシーケンシングすると想定外の  $k_1 / k_1$  ' ハイブリッドを含む配列が検出され、このような配列はコンタミネーションとして除去することが可能ということである。

## 【 0 1 3 4 】

## 実施例 3 : S の機能の原理試験

上記  $k_1$  ( 及び  $k_1'$  ) 並びに  $k_2$  ( 及び  $k_2'$  ) の機能を向上させるのが、短い離隔用配列を有する  $s$  及び  $s'$  である ( 図 3、4 )。  $s$  は第 1 段階目のプライマー間で不変の配列断片  $p_c$  と配列断片  $k_1$  及び  $k_2$  とを離隔し、  $s'$  は第 1 段階目のプライマー間で不変の配列断片  $p_c'$  と配列断片  $k_1'$  及び  $k_2'$  とを離隔するものである。ここで、連続する増幅反応において、  $k_1 / k_1'$  及び  $k_2 / k_2'$  はプライマー間で異なるので、いくつかの  $k_1 / k_1'$  及び  $k_2 / k_2'$  においては、その 3' 末端部分が、標的配列において第 1 段階目のプライマーがハイブリッドを形成する領域である  $p_c$  及び  $p_c'$  に隣接する配列と、偶然にマッチする可能性がある。従って、第 1 段階目のプライマー内の標的配列にマッチする断片が長くなる可能性があり、アニーリング温度の上昇や、PCR バイアスを引き起こす可能性がある。

10

## 【 0 1 3 5 】

S が PCR バイアスを軽減することを確認する原理試験として、  $k$  - ボックス及び  $k'$  - ボックスの 6 bp が標的配列とマッチするよう設計した第 1 段階目の増幅用プライマーであって、1、2 及び 3 bp の長さを有する S を含む、及び比較例として S を含まない第 1 段階目の増幅用プライマーを用いた試験を行った。

## 【 0 1 3 6 】

第 1 段階目の増幅には、T 細胞リンパ腫細胞株である Peer 由来の DNA 100 ng を鋳型として使用した。増幅反応条件は、15 分間 95 とするサイクルを 1 サイクル行い、次いで 95 を 30 秒、68 を 45 秒、72 を 45 秒のサイクルを 29 サイクル繰り返した後、最後に 72 で 10 分間伸長反応を行った。

20

## 【 0 1 3 7 】

第 1 段階目の増幅用左側プライマーは、配列要素  $m_a - K - p_c$  を含み、ここで  $p_c$  ( 配列番号 248 ; A C C T A C A C A C C C T G C ) は V - 4 断片とマッチするものである。また、第 1 段階目の増幅用右側プライマーは、配列要素  $m_a' - K' - p_c'$  を含み、ここで  $p_c'$  ( 配列番号 249 ; A G C C G G G T G C C T G G ) は J - 2 . 1 断片とマッチするものである。また、第 1 段階目の増幅用左側プライマーに含まれる  $k$  - ボックスは、その 5' 末端部分に配列要素  $m_a$  ( 配列番号 250 ; C G C T C T T C C G A T C T ) を有し、第 1 段階目の増幅用右側プライマーに含まれる  $k'$  - ボックスは、その 5' 末端部分に配列要素  $m_a'$  ( 配列番号 251 ; T G C T C T T C C G A T C T ) を有するものとした。

30

## 【 0 1 3 8 】

$K$  - ボックスにおける、V - 4 断片又は J - 2 . 1 断片とマッチする 6 bp の配列、及び様々な長さを有する  $s$  の配列を、表 12 に示す。

【表 1 5】

プライマー	K-ボックスの配列	鑄型配列とマッチするか	Sの配列
VKM	TCCTTC	する	なし
VKMS1	TTCCTT	する	G
VKMS2	ATTCCT	する	GG
VKMS3	TATTCC	する	AGG
VKMM	CAACGT	しない	なし
VKMMS1	GGTTCA	しない	G
VKMMS2	GGAGTA	しない	GG
VKMMS3	GCACTT	しない	AGG
JKM	ACTGTC	する	なし
JKMS1	CACTGT	する	T
JKMS2	GCACTG	する	GT
JKMS3	AGCACT	する	CGT
JKMM	TGACGA	しない	なし
JKMMS1	GTTGAC	しない	T
JKMMS2	ATGACT	しない	GT
JKMMS3	GTTGAG	しない	CGT

10

20

表 1 2 : S の配列及び 6 塩基長を有する k - ボックスの配列。k - ボックスの配列のいくつかは、鑄型配列とマッチする K - ボックスを使用する試験のために、V - 4 断片又は J - 2 . 1 断片と完全にマッチするものである。最初の列 (「プライマー」の列) の記載において、最初の文字「V」及び「J」はそれぞれ、各 K - ボックスが含まれる T C R の V - 4 断片用プライマー及び T C R の J - 2 . 1 断片用プライマーを意味し、「K M」は K - ボックスが鑄型とマッチするものであることを意味する。また、「K M M」は K - ボックスが鑄型に対しミスマッチを有することを意味する。S 1、S 2 及び S 3 は、離隔用要素 S の配列の長さを意味する (つまり 1 から 3 ヌクレオチド長)。

30

【表 1 6】

番号	試料	プライマー	Vol. % E1	Vol. % E2	Vol. % E3	Vol. % E4	Vol. % E5	Mean	SDN
1	Gel-St.	-	100	100	100	100	100	100.0	0.0
2	Peer	VKM JKM	67.1	56.4	54.2	48.9	65.8	58.5	7.0
3	Peer	VKMM JKMM	27.6	13.6	15.1	14.9	16.7	17.6	5.1
4	Peer	VKMS1 JKMS1	30.7	24.5	27.7	22.0	29.2	26.8	3.2
5	Peer	VKMS2 JKMS2	39.8	20.5	19.5	26.6	14.9	24.3	8.6
6	Peer	VKMS3 JKMS3	27.1	14.5	16.9	16.2	17.3	18.4	4.5
7	Peer	VKMMS1 JKMMS1	16.6	11.4	14.6	13.4	13.7	13.9	1.7
8	Peer	VKMMS2 JKMMS2	24.2	14.3	13.6	13.4	12.9	15.7	4.3
9	Peer	VKMMS3 JKMMS3	21.0	9.6	21.3	14.4	21.4	17.5	4.8
10	バック グラウンド	-	11.3	8.5	10.9	10	11.1	10.4	1.0
11	Gel-St.	-	100	100	100	100	100	100.0	0.0
12	NTC	VKM JKM	7.2	8	9.3	6.3	7.3	7.6	0.9
13	NTC	VKMM JKMM	9.5	7.8	9.4	6.8	6.9	8.1	1.1
14	NTC	VKMS1 JKMS1	9.5	8.5	9.7	7.8	8.7	8.8	0.6
15	NTC	VKMS2 JKMS2	9.2	9.1	10.8	6.8	7.7	8.7	1.3
16	NTC	VKMS3 JKMS3	8.6	8.2	9.2	6.7	7.1	8.0	0.8
17	NTC	VKMMS1 JKMMS1	9.1	9.1	9.7	6.9	7.9	8.5	0.9
18	NTC	VKMMS2 JKMMS2	7.3	7.2	9.7	7.6	7.7	7.9	0.8
19	NTC	VKMMS3 JKMMS3	7.7	9.1	9.5	6.7	7.7	8.1	0.9
20	バック グラウンド	-	8	9.1	8.6	5.8	7.5	7.8	1.0

表 1 3 : 試験番号、及び、各番号の試験において、S が、鋳型に対して K - ボックスがマッチすることを防ぐことで、プライマーのアニーリング温度が多様になること及増幅速度が多様になることを防止して、PCR バイアスを軽減することを示す原理試験。Gel-St. は、ゲル定量用スタンダードを意味し、各ゲルに同じ Peer の TCR の PCR 産物を使用し、この PCR 産物量を 100 % とした。Vol. % は容量パーセント（百分率）を意味する。E1 から E5 は、試験 1 から 5（反復試験）をそれぞれ意味する。SDN は、標準偏差を意味する。第 3 番目の列（「プライマー」列）は、PCR に用いたプライマー対を記載するものである。また、最初の文字「V」及び「J」はそれぞれ、各 K - ボックスが含まれる TCR の V - 4 断片用プライマー及び TCR の J - 2 . 1 断片用プライマーを意味し、「KM」は K - ボックスが鋳型とマッチするものであることを意味する。また、「KMM」は K - ボックスが鋳型に対しミスマッチを有することを意味する。S1、S2 及び S3 は、離隔用要素 S の配列の長さを意味する（つまり 1 から 3 ヌクレオチド長）。

【0139】

表 1 3 は、S の有する配列によって、偶然に標的とマッチする k - ボックス及び k' - ボックスの配列の存在に関わらず、似た増幅を引き起こすことを示すものである。つまり

、例えば表 13 の 6 行目に記載の、3 b p の長さの配列を有する S 並びに標的とマッチする配列を有する k - ボックス及び k' - ボックスを使用した増幅の値 (Vol. %) の平均は 18.4 (標準偏差 4.5) であったが、これは、同表の 3 行目に記載の、標的とマッチする配列を有さない k - ボックス及び k' - ボックスを使用した増幅の値の平均 17.6 (標準偏差 5.1) に匹敵するものである。

#### 【0140】

よって、この実施例は、K - ボックスの配列が鋳型と偶然にマッチしアニーリング温度が変化する場合であっても、S が相乗効果的に PCR バイアスを軽減することを確認した原理試験であるといえる。

#### 【0141】

実施例 4 : TCR コレクション集合及び NGS 分析における、K<sub>1</sub> によるコンタミネーション抑制及び K<sub>2</sub> によるコンタミネーション検出

K<sub>1</sub> によるコンタミネーション抑制効果及び K<sub>2</sub> によるコンタミネーション物検出効果を分析するため、前述のとおりこれら効果に関連する配列を有する S を含む、TCR コレクション集合 (配列番号 189 から 246) を用いた試験を行った。セット 1 から 3 に使用した要素 K<sub>1</sub> 及び K<sub>2</sub> は、表 9 に記載したものである。

#### 【0142】

表 14 に記載される 2 種類の分析を 2 連 (duplicate) で行った。これらの分析試験においては、扁桃由来 DNA 及び 2 種類の T 細胞株 (Jurkat 及び Karpas 299) 由来の DNA を、第 1 段階目の増幅の鋳型として使用した。第 2 段階目の増幅の鋳型としては、第 1 の増幅における増幅産物の混合物として、精製した 500 pg の第 1 の増幅産物を使用した。

#### 【0143】

2 連のうちの 1 つ (試料 1 及び 2、表 14) においては、第 2 段階目の増幅の鋳型として使用した第 1 の増幅産物混合物は、50% の扁桃 DNA 増幅産物 (セット 1)、25% の Jurkat DNA 増幅産物 (セット 1)、及び 25% の Karpas 299 DNA 増幅産物 (セット 1) を含んでいた。第 2 段階目の増幅用プライマーは、セット 1 のものを用いた。

#### 【0144】

2 連のうちのもう 1 つ (試料 3 及び 4、表 14) においては、第 2 段階目の増幅の鋳型として使用した第 1 の増幅産物混合物は、50% の扁桃 DNA 増幅産物 (セット 1)、25% の Jurkat DNA 増幅産物 (セット 2)、及び 25% の Karpas 299 DNA 増幅産物 (セット 3) を含んでいた。第 2 段階目の増幅用プライマーは、セット 1 のものを用いた。

#### 【0145】

つまり、2 連のうち一方においては、TCR はコンタミネーション抑制なし、かつスパイクした 2 種類のコンタミネーション物 (Jurkat の TCR 及び Karpas 299 の TCR) の存在下で増幅を行い、2 連のうちのもう一方においては、TCR は、コンタミネーションを抑制したうえで、スパイクした同じ 2 種類のコンタミネーション物 (Jurkat の TCR 及び Karpas 299 の TCR) の存在下で増幅を行った。

10

20

30

40

【表 1 7】

試料 (バーコード) 番号	第2段階目の増幅に用いた増幅型	特徴
1	50%は第1段階目の増幅による扁桃DNA増幅産物(セット1)	Jurkat及びKarpas 299によるコンタミネーション(コンタミネーション抑制なし)
2	25%は第1段階目の増幅によるJurkatのDNA増幅産物(セット1)	
	25%は第1段階目の増幅によるKarpas299のDNA増幅産物(セット1)	
3	50%は第1段階目の増幅による扁桃DNA増幅産物(セット1)	Jurkat及びKarpas 299によるコンタミネーション(コンタミネーション抑制あり)
4	25%は第1段階目の増幅によるJurkatのDNA増幅産物(セット2)	
	25%は第1段階目の増幅によるKarpas299のDNA増幅産物(セット3)	

10

表 1 4 : T C R コレクション集合及び N G S 解析を用いた場合の、 $K_1$  によるコンタミネーション抑制、及びに  $K_2$  による検出を分析するための試験設計。N G S 多重解析を可能にするために、4 個の試料のそれぞれには、第 2 段階目の増幅用プライマーによって、イルミナの相異なるバーコードが増幅産物に導入された。

## 【0 1 4 6】

M I S E Q (イルミナ社製) のペアエンドモジュール (paired end modulus) (  $2 \times 150 \text{ bp}$  ) によって、得られた 4 個の N G S ライブラリのシーケンシングを行った。目的に応じて設計したバイオインフォマティクスのアルゴリズムを用いて、使用した K - ボックスの要素及び鑄型に着目して、読み取った配列に対しクラスタリング及び分類を行った。扁桃及び各細胞株、並びに各プライマー ( セット 1 から 3 ) に由来する読み取り配列の出現頻度を計算し、表にまとめた ( 表 1 5 ) 。

20

## 【0 1 4 7】

表 1 5 に示されるように、コンタミネーションを抑制しない場合 ( 試料 1 及び 2 ) 、2 種類の細胞株由来のコンタミネーションが、想定どおりである約 2 5 % の百分率で検出された。一方で、驚くべきことに、 $K_1$  によるコンタミネーション抑制を行った試料 3 及び 4 においては、2 種類の細胞株由来のコンタミネーションは、完全に抑制されたか ( 細胞株 1 ) 、又は 0 . 0 1 % にまで抑制された ( 細胞株 2 ) 。細胞株 2 において残存したコンタミネーションは、 $K_2$  によって検出することができたものである。

30

## 【表 1 8】

試料	セット	扁桃	細胞株1 (Jurkat)	細胞株2 (Karpas299)	読み取った 全配列数
1	(1/1/1)	48.79%	23.70%	27.51%	180226
2	(1/1/1)	49.74%	23.30%	26.96%	272669
3	(1/2/3)	99.99%	0.00%	0.01%	314388
4	(1/2/3)	99.99%	0.00%	0.01%	311956

40

表 1 5 : 表 1 4 に記載のコンタミネーション抑制分析における、N G S の結果。セットに関する情報は、上記のように 3 連で記載した ( 扁桃 / 細胞株 1 / 細胞株 2 ) 。

## 【0 1 4 8】

 $k_1 / k_1'$  及び  $k_2 / k_2'$  の好適な配列の設計

$k_1$  及び  $k_1'$  の配列の好適な例を示す。それら好適な配列は、( a ) 後述の表 1 6 から 1 9 のいずれかに記載される全ての  $k_1$  及び  $k_1'$  の配列間でクロスハイブリダイゼーションしないように、( b )  $k_1$  及び  $k_1'$  の配列のアニーリング温度幅を小さくするよ

50

うに、及び (c) 塩基の多様性が低くならないように全塩基の 3 分の 2 超の塩基が同じヌクレオチド (A、C、G、T) にならないように、設計された。

【0149】

表 16 から 19 はそれぞれ、フォワードプライマー及びリバースプライマーの、ある特定の同じ長さ (4、5、6、7 又は 8 ヌクレオチド長) を有する  $k_1$  及び  $k_1'$  を列挙している。

【0150】

詳述すると、上述の特徴 (a) から (c) は、特定の長さ (4、5、6、7 又は 8 bp) を有する  $k_1$  及び  $k_1'$  が有し得る全ての配列を互いに比較し、これら特定の長さを有する  $k_1$  及び  $k_1'$  のある配列に対する逆相補配列を除くことによって得られたものである。更に好適な  $k_1$  及び  $k_1'$  の配列を得るために、設計用アルゴリズムを用いて、ある長さ (4、5、6、7 又は 8 bp) を有する  $k_1$  及び  $k_1'$  が取り得る全ての配列と、それら配列に対する逆相補配列であり、かつ同じ長さを有する  $k_1$  及び  $k_1'$  の全ての配列と、を比較して、3'末端部分において他の  $k_1$  若しくは  $k_1'$  の配列と共通する塩基を 2 個を超える個数有するもの、又は、他の  $k_1$  若しくは  $k_1'$  の配列と共通する塩基を配列全体の 60% 超含むものを除いた。

【0151】

このように最終的に得られた  $k_1$  及び  $k_1'$  の好適配列が、表 16 から 19 に記載されている。ここで、これらの好適配列は例であって、他のクライテリアに従って選択された好適配列を有する  $K_1$  - ボックスを用いてもよい。

【0152】

また、好適な  $k_2 / k_2'$  の配列例も列挙する (表 20)。これらの配列は、 $k_2 / k_2'$  の配列集合から、互いに逆相補配列である全ての配列を除くことで得た。例えば要素  $k_2$  の配列が A T C である場合、 $k_2'$  の配列集合から、G A T は自動的に除かれる。

【0153】

また、プライマーの設計は、使用するプライマーの 3'末端部分におけるクロスハイブリダイゼーションを出来るだけ起こさないように、 $K$  - ボックス全体をまとめて行う。

10

20



【表 19】

プライマー位置	$k_1$ 又は $k_1'$ の配列	融解温度
A	CTGA	12
A	AGTG	12
A	CAAC	12
A	GGAA	12
A	GTCA	12
A	AAGC	12
A	ATTA	8
A	AGCC	14
A	CGAG	14
A	AGGA	12
A	TAGA	10
B	GCGA	14
B	ACGG	14
B	CGTA	12
B	ACTC	12
B	CTTC	12
B	ACCA	12
B	GCAC	14
B	GACC	14
B	ATAC	10
B	CGGC	16
B	GATA	10

表 16 : 最適化された、4 塩基長の  $k_1$  の配列及び  $k_1'$  の配列。例えば、「プライマー位置」で「A」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「B」と記されたものは左側のプライマーに使用可能である。また、「B」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「A」と記されたものは左側のプライマーに使用可能でもある。

10

20

30

【表 20】

プライマー位置	k <sub>1</sub> 又はk <sub>1</sub> 'の配列	融解温度
A	CTCTA	14
A	ATCAG	14
A	ATTGG	14
A	ATACG	14
A	ACGCA	16
A	ACCAA	14
A	AATGC	14
A	AAGGA	14
A	TCACA	14
A	ATATA	10
A	ATGTC	14
A	AGCTG	16
A	CAACC	16
B	GTTTA	12
B	GCTCC	18
B	CTTAA	12
B	GAGGC	18
B	ACACT	14
B	AATCG	14
B	CATCA	14
B	GTAGA	14
B	CTTTC	14
B	AAGCC	16
B	AAAGT	12
B	CGGAA	16
B	CTCAC	16
B	CGGAA	16
B	CTCAC	16

表 17：最適化された、5塩基長の k<sub>1</sub> の配列及び k<sub>1</sub>' の配列。例えば、「プライマー位置」で「A」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「B」と記されたものは左側のプライマーに使用可能である。また、「B」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「A」と記されたものは左側のプライマーに使用可能でもある。

10

20

30

【表 2 1】

プライマー位置	$k_1$ 又は $k_1'$ の配列	融解温度[°C]
A	CTCTGA	18
A	GGTTAA	16
A	GCCTTA	18
A	CGGACG	22
A	GTCAAA	16
A	GATCGA	18
A	CTTGTA	16
A	AACTTG	16
A	AATCAT	14
A	ACTATG	16
A	GCAACA	18
A	CGAAGC	20
A	GAGTCC	20
A	GGCAAC	20
A	AAATGT	14
A	CTATCA	16
B	AAGCTG	18
B	GCCCAA	20
B	ATCAGA	16
B	ACTCAG	18
B	GGTATA	16
B	AAAGGG	18
B	AATGCT	16
B	CCAAGG	20
B	ACGCGG	22
B	GACGGA	20
B	GCGCAC	22
B	GTAAGG	16
B	ACCGCA	20
B	AAACCC	18
B	AGAACT	16
B	GAGCTA	18

表 1 8 : 最適化された、6 塩基長の  $k_1$  の配列及び  $k_1'$  の配列。例えば、「プライマー位置」で「A」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「B」と記されたものは左側のプライマーに使用可能である。また、「B」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「A」と記されたものは左側のプライマーに使用可能でもある。

【表 2 2】

K1 “A 7 nt”	K1 “B 7 nt”	K1 “A 8 nt”	K1 “B 8 nt”
AACCAAC	GAGCACA	CGTGTCGC	AGGCACCA
CATGACC	CACCCAA	ATGATGAC	GCTTCTTA
CATGACC	CACCCAA	ATGATGAC	GCTTCTTA
AAATGGC	CTTCCTA	AAACCTGT	ATACTTCG
AGGTAGC	AGTTTTG	GAATGATA	ACGATTGG
TATGTCA	CTGTAA	ATCGGTGC	GGCAGCGA
CTATGTA	CTTTAGA	GATGTTCA	ATGTTTCG
CATTGCG	AAGACGG	CTGCGACA	GGTGGCTA
AGAAGGA	AGCGGCC	CATCTAGA	CAATACCC
GATCTCC	CAGTAGG	AACGCTGA	CTATTTAC
ACTATGC	AGTGCCA	ATGCTGTG	TGCGAAAA
GACGCAC	GAGCACA	GAACACAA	CAAGCGAG
ACTTGAA	GAGCACA	CTTAAGTC	CAGCCGAA
CGGTGAC	CACCCAA	GAGAAGGC	CCCAAAAC
GAAGTGA	AGTTTTG	GGATGTAA	AGGCACCA
CGGATTA	AGTTTTG	AGCAAGGA	AGGCACCA
GTATAAA	CTGTAA	ACTCAGTA	GCTTCTTA

表 1 9 : 最適化された 7 又は 8 塩基長の  $k_1$  の配列及び  $k_1'$  の配列。例えば、「A」と

記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「B」と記されたものは左側のプライマーに使用可能である。また、「B」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「A」と記されたものは左側のプライマーに使用可能でもある。

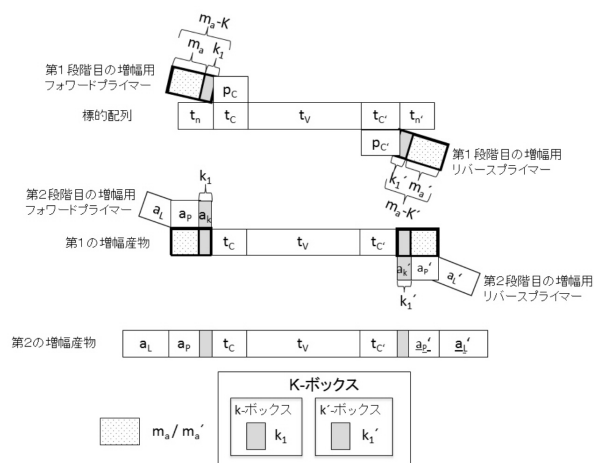
【表 2 3】

プライマー位置	$k_2$ 又は $k_2'$ の配列	プライマー位置	$k_2$ 又は $k_2'$ の配列
A	ACG	B	GAC
A	CCA	B	CGG
A	TTA	B	GTG
A	TCG	B	TGT
A	GGT	B	AAG

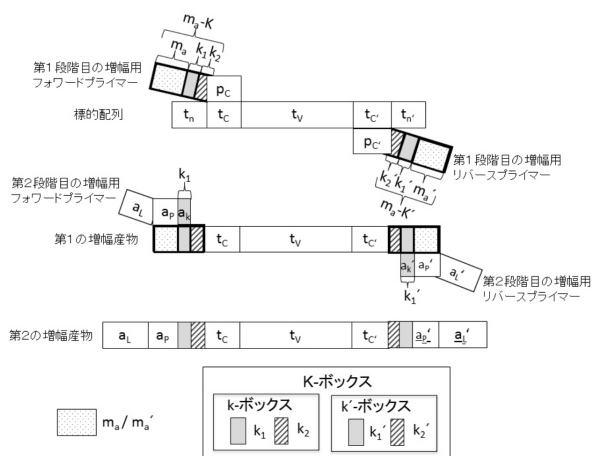
10

表 2 0 : 3 塩基長の  $k_2$  の配列及び  $k_2'$  の配列。例えば、「A」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「B」と記されたものは左側のプライマーに使用可能である。また、「B」と記されたものは右側のプライマーに使用可能であり、「A」と記されたものは左側のプライマーに使用可能でもある。

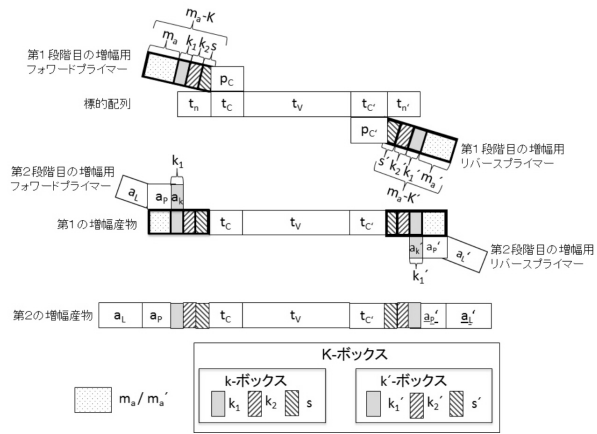
【図 1】



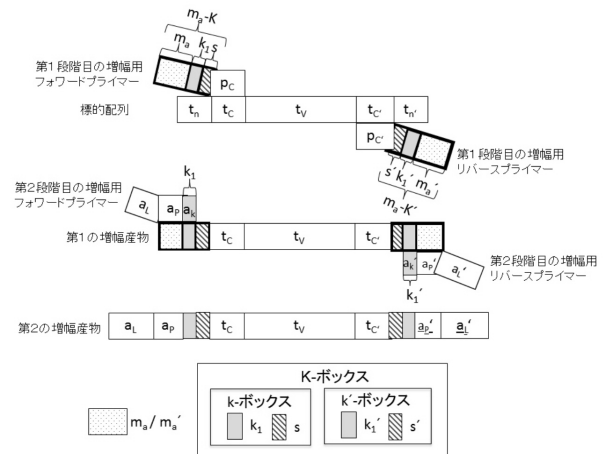
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0006496665000001.app

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ヘニツヒ, シュテツフェン  
ドイツ国 ベルリン 10961 シュライアーマッハーストラッセ 14  
(72)発明者 フンメル, ミヒャエル  
ドイツ国 ベルリン 12105 カイザーストラッセ 4

審査官 吉門 沙央里

- (56)参考文献 特表2013-528058(JP, A)  
特表2012-508011(JP, A)  
Human Mutation, 2011年, Vol.32, No.9, pp.1053-1062  
Nature Biotechnology, 2000年, Vol.18, pp.233-234  
Nucleic Acids Research, 2015年, Vol.43, No.20, #e135  
Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2008年, Vol.9, pp.387-402  
実験医学, 2016年, Vol.34, No.16, pp.2722-2728

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
C12Q 1/00 - 3/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
PubMed