

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第6997772号

(P6997772)

(45)発行日 令和4年1月18日(2022.1.18)

(24)登録日 令和3年12月21日(2021.12.21)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6806(2018.01)

C 1 2 Q 1/6806

Z

C 1 2 Q 1/6855(2018.01)

C 1 2 Q 1/6855

Z

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

Z

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10

Z Z N A

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 P 19/34

請求項の数 35 (全55頁)

(21)出願番号 特願2019-514776(P2019-514776)

(86)(22)出願日 平成29年9月15日(2017.9.15)

(65)公表番号 特表2019-531072(P2019-531072
A)

(43)公表日 令和1年10月31日(2019.10.31)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/051924

(87)国際公開番号 WO2018/053362

(87)国際公開日 平成30年3月22日(2018.3.22)

審査請求日 令和2年9月15日(2020.9.15)

(31)優先権主張番号 62/395,339

(32)優先日 平成28年9月15日(2016.9.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者 521194035

アーチャーディーエックス, エルエル
シーアメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1
0 3, サン フランシスコ, シックス
ティーンズ ストリート 1 4 0 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸サンプル調製の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 1またはこれより多くのヌクレオチドを、標的ヌクレオチド配列を含む2本鎖核酸の3'末端に付加する工程であって、ここで該1またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドであり、該捕捉部分は、該捕捉部分の結合パートナーと選択的に相互作用する部分である、工程；

(b) アダプター核酸を、該捕捉部分で修飾されたヌクレオチドが付加された該2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該アダプター核酸の3'末端における1またはこれより多くのヌクレオチドの配列は、工程(a)における該2本鎖核酸の3'末端に付加された該1またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；

(c) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの該結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；ならびに

(d) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって該ライゲーション生成物を増幅する工程、を包含する方法。

【請求項2】

工程(b)は、前記アダプター核酸、前記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが

該アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該 2 本鎖核酸と合わせられる該アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハング配列を含み、ここで該オーバーハング配列は、工程 (a) における前記 2 本鎖核酸の 3 ' 末端に付加された前記 1 またはこれより多くのヌクレオチドと相補的な、該アダプター核酸の前記 3 ' 末端における 1 またはこれより多くのヌクレオチドの配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (b) は、前記アダプター核酸、前記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該 2 本鎖核酸と合わせられる該アダプター核酸は、1 本鎖である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

(e) 第 2 のアダプタープライマーおよび第 2 の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって工程 (d) の増幅生成物を増幅する工程、をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 2 の標的特異的プライマーは、前記第 1 の標的特異的プライマーに対してネスト化される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 2 の標的特異的プライマーは、前記標的ヌクレオチド配列にアニールしない 5 ' テールを含む、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記第 2 の標的特異的プライマーの 5 ' テールと同一である 3 ' 部分を含むさらなるプライマーを添加する工程をさらに包含する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記捕捉部分は、ビオチン部分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ビオチン部分は、長さが 5 ~ 20 個の原子のリンカーを介して前記ヌクレオチドに共有結合的に連結されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、およびシトシン、またはこれらの誘導体からなる群より選択される核塩基を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン核塩基またはその誘導体を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記捕捉部分は、5 位、6 位、7 位または 8 位において、前記アデニン核塩基またはその誘導体に共有結合的に連結される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アデニン核塩基またはその誘導体の 7 位は、炭素原子である、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記結合パートナーは、ストレプトアビジンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ストレプトアビジンは、常磁性ビーズに付着される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

工程 (a) において、1 個のヌクレオチドが、前記標的ヌクレオチド配列を含む前記 2 本鎖核酸の前記 3 ' 末端に付加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

50

工程（a）の後でかつ工程（b）の前に洗浄工程をさらに包含する、請求項１に記載の方法。

【請求項１８】

工程（a）の前に、前記２本鎖核酸を５'リン酸化する工程をさらに包含する、請求項１に記載の方法。

【請求項１９】

工程（a）の前に：

i）テンプレートとしてRNA調製物を使用するランダムにプライムした第１鎖合成反応およびテンプレートとして該ランダムにプライムした第１鎖合成反応の生成物を使用する第２鎖合成反応を行うことによって、cDNAを調製する工程；ならびに

ii）該cDNAを末端修復して、平滑末端化した２本鎖核酸を生成する工程、をさらに包含する、請求項１に記載の方法。

10

【請求項２０】

工程（b）において、前記２本鎖核酸は、クラウディング剤の存在下で前記アダプター核酸にライゲーションされる、請求項１に記載の方法。

【請求項２１】

前記クラウディング剤は、（b）におけるライゲーション混合物の５％～５０％に相当する量のポリエチレングリコールである、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記２本鎖核酸は、平滑末端化される、請求項１に記載の方法。

20

【請求項２３】

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

（a）テンプレートとしてRNAを含む核酸調製物を使用するランダムにプライムした第１鎖合成反応およびテンプレートとして該ランダムにプライムした第１鎖合成反応の生成物を使用する第２鎖合成反応を行うことによって、cDNAを調製する工程であって、ここで該RNAは、標的ヌクレオチド配列を含む工程；

（b）該cDNAを末端修復して、該標的ヌクレオチド配列を含む平滑末端化した２本鎖核酸を生成する工程；

（c）該平滑末端化した２本鎖核酸を洗浄する工程；

（d）１またはこれより多くのヌクレオチドを工程（c）において洗浄した該核酸の３'末端に付加する工程であって、ここで該１またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドであり、該捕捉部分は、該捕捉部分の結合パートナーと選択的に相互作用する部分である、工程；

30

（e）工程（d）において生成した該核酸を洗浄する工程；

（f）ライゲーション可能な二重鎖部分およびオーバーハング配列を含むアダプター核酸を、工程（e）において洗浄した該核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該オーバーハング配列は、工程（d）において付加された該１またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；

（g）該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第１の標的的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第１のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程；

40

（h）第２のアダプタープライマーおよび第２の標的的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程（g）の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該第２の標的的特異的プライマーは、該第１の標的的特異的プライマーに対してネスト化される工程；ならびに

（i）該工程（h）の増幅生成物を洗浄する工程、を包含する方法。

【請求項２４】

前記方法は、工程（f）の後でかつ工程（g）の前に、前記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの固定化した前記結合パートナーを使用して前記ライゲーション生成物を捕捉する

50

工程をさらに包含する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記捕捉したライゲーション生成物を精製する工程をさらに含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記結合パートナーは、ストレプトアビジンである、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ストレプトアビジンは、常磁性ビーズに付着される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、およびシトシン、またはこれらの誘導体からなる群より選択される核塩基を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 9】

前記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン核塩基またはその誘導体を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記捕捉部分は、5 位、6 位、7 位または 8 位において、前記アデニン核塩基またはその誘導体に共有結合的に連結される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記アデニン核塩基またはその誘導体の 7 位は、炭素原子である、請求項 3 0 に記載の方法。

20

【請求項 3 2】

前記捕捉部分は、ビオチン部分である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記ビオチン部分は、長さが 5 ~ 2 0 個の原子のリンカーを介して前記ヌクレオチドに共有結合的に連結されている、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記洗浄する工程は、可逆的固相固定化技術を使用して行われる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

30

前記第 2 のアダプタープライマーは、前記第 1 のアダプタープライマーに対してネスト化される、請求項 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本願は、2 0 1 6 年 9 月 1 5 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 3 9 5 , 3 3 9 号の米国特許法第 1 1 9 条 (e) 項に基づく優先権を主張し、この出願は、その全体が参照によって本願明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

40

技術分野

本明細書で記載される技術は、分析用の核酸分子の調製において有用な方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

次世代シーケンシングする前の標的富化は、全ゲノム、全エキソーム、および全トランスクリプトームシーケンシングより費用効果が高く、従って、広い実行に関して；研究発見および臨床適用の両方に関してより実践的である。例えば、標的富化アプローチによって与えられる高カバレッジ深度 (h i g h c o v e r a g e d e p t h) は、アレル計数

50

のより広いダイナミックレンジ（遺伝子発現およびコピー数評価において）および低頻度変異の検出を可能にし、これは、がんにおける体細胞変異を評価するために有利である。次世代シーケンシングの現在の富化プロトコルの例としては、ハイブリダイゼーションベースの捕捉アッセイ（TruSeq Capture, Illumina; SureSelect Hybrid Capture, Agilent）およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）ベースのアッセイ（HaloPlex, Agilent; AmpliSeq, Ion Torrent; TruSeq Amplicon, Illumina; エマルジョン/デジタルPCR、Raindance）が挙げられる。ハイブリダイゼーションベースのアプローチは、捕捉プローブによって網羅される標的化された配列のみならず、シーケンシング能力を消耗する近くのオフターゲット塩基をも捕捉する。さらに、これらの方法は、比較的時間浪費型、労働集約的であり、特異性が比較的低レベルであるという欠点をもつ。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

要旨

本明細書で開示される技術の局面は、核酸を調製および分析するための方法に関する。いくつかの実施形態において、配列分析用の核酸サンプルの調製において（例えば、次世代シーケンシング（next-generating sequencing）を使用して）有用な方法および組成物は、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される技術は、核酸配列を決定するための方法に関する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法および組成物は、シーケンシング前に1またはこれより多くの標的ヌクレオチド配列を含む核酸を富化することに関する。いくつかの局面において、本開示は、1またはこれより多くの捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを核酸に付加する工程を包含する、核酸を調製するための（例えば、シーケンシング分析において使用するための）方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、アダプター核酸を、上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドが付加された核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、ライゲーション生成物と上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記ライゲーション生成物を、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応または別の適切な増幅アプローチによって増幅する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、1またはこれより多くのヌクレオチドを、標的ヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、2本鎖核酸）の3'末端に付加する工程を包含する核酸を調製するための方法が提供され、ここで上記1またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記核酸の3'末端に上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドが存在すると、上記核酸全体に修飾されたヌクレオチドが（例えば、ランダムに）組み込まれることを回避しながら、上記核酸の単離、精製および/または洗浄が促進される。いくつかの実施形態において、1またはこれより多くのヌクレオチドを、標的ヌクレオチド配列を含む核酸（例えば、2本鎖核酸）へと組み込む工程を包含する核酸を調製するための方法が提供され、ここで上記1またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、上記1またはこれより多くのヌクレオチドは、プライマー（例えば、逆転写プライマー）を使用して組み込まれる。いくつかの実施形態において、上記1またはこれより多くのヌクレオチドは、上記核酸を調製する先の工程の間に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態において、上記1またはこれより多くのヌクレオチドは、フラグメント化、ランダムプライミング、第1鎖合成、第2鎖合成、および/または末端修復の間に組み込まれる。

20

30

40

【0005】

50

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法を提供し、該方法は、
(a) 1またはこれより多くのヌクレオチドを、標的ヌクレオチド配列を含む2本鎖核酸の3'末端に付加する工程であって、ここで該1またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも1個は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドである工程；(b) アダプター核酸を、該捕捉部分で修飾されたヌクレオチドが付加された該2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該アダプター核酸の3'末端における1またはこれより多くのヌクレオチドの配列は、工程(a)における該2本鎖核酸の3'末端に付加された該1またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；(c) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；ならびに(d) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって該ライゲーション生成物を増幅する工程、を包含する。

【0006】

いくつかの実施形態において、工程(b)は、上記アダプター核酸、上記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含する。いくつかの実施形態において、該2本鎖核酸と合わせられる該アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハング配列を含む。いくつかの実施形態において、該オーバーハング配列は、工程(a)における上記2本鎖核酸の3'末端に付加された上記1またはこれより多くのヌクレオチドと相補的な、該アダプター核酸の上記3'末端における1またはこれより多くのヌクレオチドの配列を含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、工程(b)は、上記アダプター核酸、上記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該2本鎖核酸と合わせられる該アダプター核酸は、1本鎖である。

【0008】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供される方法は、(e) 第2のアダプタープライマーおよび第2の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって工程(d)の増幅生成物を増幅する工程、をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記第2の標的特異的プライマーは、上記第1の標的特異的プライマーに対してネスト化される。いくつかの実施形態において、上記第2の標的特異的プライマーは、上記標的ヌクレオチド配列にアニールしない5'テールを含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記第2の標的特異的プライマーの5'テールと同一である3'部分を含むさらなるプライマーを添加する工程をさらに包含する。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記捕捉部分は、ビオチン部分である。いくつかの実施形態において、上記ビオチン部分は、ビオチン-トリエチレングリコール、ビス-ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン-トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、およびシトシン、またはこれらの誘導体からなる群より選択される核塩基を含む。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン核塩基またはその誘導体を含む。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分は、5位、6位、7位または8位において、上記アデニン核塩基またはその誘導体に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分は、7位において上記アデニン核塩基に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、上記アデニン核塩基の7位は、炭素原子である。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態において、上記ピオチン部分は、任意の適切な長さのリンカーを介して、上記核塩基に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、上記ピオチン部分は、例えば、長さが 5 ~ 20 個の原子（例えば、長さが 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個の原子）のリンカーを介して、上記核塩基に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、ピオチン - n - d N T P であり、ここで n は、該ピオチン部分のカルボニル基と該 N T P の核塩基上の付着位置との間のリンカー原子の数を表す 5 ~ 20 の整数である。いくつかの実施形態において、

10

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、上記結合パートナーは、ストレプトアビジンである。いくつかの実施形態において、上記ストレプトアビジンは、常磁性ビーズに付着される。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、工程（ a ）において、1 個のヌクレオチドが、上記標的ヌクレオチド配列を含む上記 2 本鎖核酸の上記 3 ' 末端に付加される。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、上記方法は、非特異的核酸の精製をさらに包含する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程（ b ）の後でかつ工程（ c ）の前に反応クリーンアップまたは洗浄工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、工程（ c ）の後でかつ工程（ d ）の前に： i ）上記捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを含む上記 2 本鎖核酸を、常磁性基材または表面（例えば、ポリスチレン常磁性ビーズ）上に固定化する工程；および i i ）上記固定化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、工程（ i i ）の後に： i i i ）上記洗浄した固定化 2 本鎖核酸を上記常磁性基材または表面から放出する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記洗浄した固定化 2 本鎖核酸は、化学的試薬と接触させることおよび / または熱を適用することによって、上記常磁性基材または表面から放出される。いくつかの実施形態において、上記化学的試薬は、塩基または塩基性溶液である。いくつかの実施形態において、上記化学的試薬は、水酸化ナトリウム（ N a O H ）を含む。いくつかの実施形態において、接触させることが 2 種の溶液（例えば、塩基を含む溶液および洗浄した固定化核酸を含む溶液）を混合する工程、固体を溶液に添加する工程、または溶液を固体に添加する工程を包含し得ることは、認識されるべきである。いくつかの実施形態において、上記洗浄した固定化 2 本鎖核酸は、 N a O H と接触させることおよび加熱すること（例えば、室温より高く（例えば、 25 ~ 90 、 25 ~ 70 、 25 ~ 50 、 35 ~ 65 、 35 ~ 45 、 30 ~ 40 、 40 ~ 50 の範囲の温度）加熱すること）によって、上記常磁性基材または表面から放出される。いくつかの実施形態において、上記洗浄した固定化 2 本鎖核酸は、例えば、分析用のさらなる調製のために、上記常磁性基材または表面上に残存する。いくつかの実施形態において、上記洗浄した固定化 2 本鎖核酸は、分析用のさらなる調製の前に、上記常磁性基材または表面から放出される。

20

30

40

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程（ a ）の前に、上記 2 本鎖核酸を 5 ' リン酸化する工程をさらに包含する。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供される方法は、工程（ a ）の前に： i ）テンプレートとして R N A 調製物を使用するランダムにプライムした第 1 鎖合成反応およびテンプレートとして該ランダムにプライムした第 1 鎖合成反応の生成物を使用する第 2 鎖合成反応を行うことによって、 c D N A を調製する工程；ならびに i i ）該 c D N A を末端修復して、平滑末端化した 2 本鎖核酸を生成する工程、をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、工程 i i ）の後に： i i i ）上記捕捉部分で修飾され

50

たヌクレオチドを含む上記 2 本鎖核酸を、常磁性基材または表面上に固定化する工程； i v) 該固定化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程；および v) 該洗浄した固定化した 2 本鎖核酸を該常磁性基材または表面から放出する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記常磁性基材または表面は、被覆（例えば、ポリスチレン被覆）を含む。いくつかの実施形態において、c D N A は、遺伝子特異的にプライムされた第 1 鎖合成を行うことによって分析のために調製される。いくつかの実施形態において、末端修復する工程は、D N A 末端を平滑化および/またはリン酸化する工程を包含する。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態において、方法は、工程（ e ）の後に、（ f ）上記工程（ e ）の増幅生成物を常磁性基材または表面上に固定化する工程；（ g ）上記固定化した増幅生成物を洗浄する工程；および（ h ）上記洗浄した固定化増幅生成物を上記常磁性基材または表面から放出する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、1 またはこれより多くの間にある洗浄工程（例えば、本明細書で記載される方法のうちのいずれかの工程の間に増幅生成物を洗浄する工程）をさらに包含する。例えば、いくつかの実施形態において、上記方法は、工程（ e ）の後でかつ工程（ f ）の前に、洗浄工程をさらに包含する。

10

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、工程（ b ）において、上記 2 本鎖核酸は、クラウディング剤（ c r o w d i n g a g e n t ）の存在下で上記アダプター核酸にライゲーションされる。いくつかの実施形態において、上記クラウディング剤は、ライゲーション混合物の 5 % ~ 5 0 % に相当する量のポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、上記 2 本鎖核酸は、平滑末端化される。いくつかの実施形態において、上記 2 本鎖核酸は、オーバーハングを含む。

20

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法を提供し、該方法は、（ a ）テンプレートとして R N A 調製物を使用するランダムにプライムした第 1 鎖合成反応およびテンプレートとして該ランダムにプライムした第 1 鎖合成反応の生成物を使用する第 2 鎖合成反応を行うことによって、c D N A を調製する工程であって、ここで該 R N A 調製物は、標的ヌクレオチド配列を含む工程；（ b ）該 c D N A を末端修復して、該標的ヌクレオチド配列を含む平滑末端化した 2 本鎖核酸を生成する工程；（ c ）該平滑末端化した 2 本鎖核酸を常磁性基材または表面上に固定化する工程；（ d ）該固定化した平滑末端化 2 本鎖核酸を洗浄する工程；（ e ）該洗浄した固定化平滑末端化 2 本鎖核酸を該常磁性基材または表面から放出する工程；（ f ）1 またはこれより多くのヌクレオチドを該放出した平滑末端化 2 本鎖核酸の 3 ' 末端に付加する工程；（ g ）ライゲーション可能な二重鎖部分およびオーバーハング配列を含むアダプターを、工程（ f ）において生成した該核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該オーバーハング配列は、該 1 またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；（ h ）該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程；（ i ）工程（ h ）の増幅生成物を、第 2 のアダプタープライマーおよび第 2 の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって増幅する工程であって、ここで該第 2 の標的特異的プライマーは、該第 1 の標的特異的プライマーに対してネスト化される工程；（ j ）工程（ i ）の該増幅生成物を常磁性基材または表面に固定化する工程；（ k ）該固定化した増幅生成物を洗浄する工程；ならびに（ l ）該洗浄した固定化増幅生成物を該常磁性基材または表面から放出する工程、を包含する。いくつかの実施形態において、工程（ h ）は、上記ライゲーション生成物を洗浄することなしに行われる。

30

40

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法を提供し、該方法は、（ a ）テンプレートとして核酸調製物を使用するランダムにプライムした第 1 鎖合成

50

反応およびテンプレートとして該ランダムにプライムした第 1 鎖合成反応の生成物を使用する第 2 鎖合成反応を行うことによって、cDNA を調製する工程であって、ここで該核酸調製物は、標的ヌクレオチド配列を含む工程；(b) 該 cDNA を末端修復して、該標的ヌクレオチド配列を含む平滑末端化した 2 本鎖核酸を生成する工程；(c) 該平滑末端化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程；(d) 1 またはこれより多くのヌクレオチドを工程(c)において洗浄した該核酸の 3' 末端に付加する工程であって、必要に応じてここで該 1 またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つは、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドである工程；(e) 工程(d)において生成した該核酸を洗浄する工程；(f) ライゲーション可能な二重鎖部分およびオーバーハング配列を含むアダプター核酸を、工程(e)において洗浄した該核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該オーバーハング配列は、該 1 またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；(g) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程；(h) 第 2 のアダプタープライマーおよび第 2 の標的的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(g)の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該第 2 の標的的特異的プライマーは、該第 1 の標的的特異的プライマーに対してネスト化される工程；ならびに(j) 該工程(h)の増幅生成物を洗浄する工程、を包含する。

10

【0021】

20

いくつかの実施形態において、上記洗浄する工程は、可逆的固相固定化技術を使用して行われる。

【0022】

いくつかの実施形態において、上記 1 またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも 1 個は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドであり、上記方法は、工程(f)の後でかつ工程(g)の前に、該捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの捕捉部分の固定化した結合パートナーを使用して上記ライゲーション生成物を捕捉する工程；および該捕捉したライゲーション生成物を洗浄にする工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分は、ビオチン部分を含み、上記結合パートナーは、ストレプトアビジンを含む。

30

【0023】

いくつかの実施形態において、上記第 2 のアダプタープライマーは、上記第 1 のアダプタープライマーに対してネスト化される。いくつかの実施形態において、上記第 2 のアダプタープライマーは、上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする。

【0024】

本開示の他の利点および新規な特徴は、添付の図面とともに考慮される場合に、本発明の種々の非限定的実施形態の以下の詳細な説明から明らかになる。本明細書および参考として援用される文献が矛盾するおよび/または一致しない開示を含む場合には、本明細書が優先するものとする。

【0025】

40

本発明の非限定的実施形態は、添付の図面を参照して例示によって記載される。図面は、模式図であり、一定の縮尺で描かれることは意図されない。図面において、図示される各同一のまたはほぼ同一の構成要素は、代表的には、ひとつの数字によって表される。明瞭にする目的で、あらゆる構成要素があらゆる図においても表示されているわけではなく、当業者に本発明を理解させるために図示が必要でない場合には、本発明の各実施形態のあらゆる構成要素が示されるわけではない。図面において：

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】図 1 は、アダプターをライゲーションした核酸ライブラリーの捕捉を可能にするプロセスの図示である。

50

【 0 0 2 7 】

【図 2】図 2 は、分析用の高フィデリティー核酸サンプルを調製するための方法の図示である。

【 0 0 2 8 】

【図 3】図 3 は、テンプレート RNA 鎖を使用して 2 本鎖 cDNA を生成するプロセスを示す。

【 0 0 2 9 】

【図 4】図 4 は、捕捉したライゲーション生成物が増幅前に磁性ビーズから溶離される場合に、テンプレート RNA 鎖を使用して 2 本鎖 cDNA サンプルを生成するプロセスを示す。

10

【 0 0 3 0 】

【図 5】図 5 は、分析用の高フィデリティー核酸サンプルを調製するための方法の作業フローの描写である。

【 0 0 3 1 】

【図 6】図 6 は、ポリメラーゼ不活性化なしで末端修復されたライブラリーサンプルをおよびポリメラーゼの熱不活性化後に末端修復されたライブラリーサンプルを示すゲルの画像表示である。

【 0 0 3 2 】

【図 7】図 7 は、クラウディング剤の非存在下または存在下でライゲーションしたサンプルのアダプターライゲーション効率を示すゲルの画像表示である。

20

【 0 0 3 3 】

【図 8 A】図 8 A は、アダプター核酸を含み得る構成要素を図示する図表である。

【 0 0 3 4 】

【図 8 B】図 8 B は、第 2 の標的特異的プライマーを含み得る構成要素を図示する図表である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 5 】

詳細な説明

他の局面の中でも、本開示は、分析用の核酸サンプルライブラリーの調製に関する改善された技術を提供する。本明細書で記載されるように、アダプター核酸は、標的ヌクレオチド配列を含む核酸にライゲーションされ得る。アダプター核酸の使用は、ライブラリー調製およびシーケンシング分析の間に、例えば、プライマー結合部位および分子バーコードまたはインデックス配列を提供することによって、有用であり得る。いくつかの局面において、本開示は、アダプターライゲーションに関するプロセスにおける改善および分子バーコードフィデリティーを実質的に改善するアダプターをライゲーションしたサンプル単離に関する。

30

【 0 0 3 6 】

いくつかの局面において、本開示は、アダプターライゲーション後に、その後の PCR 反応へのライゲーションしなかったアダプターの持ち越しが分子バーコードの過剰存在量を生じ得るという認識に関する。分子バーコードのこの過剰存在量、またはインフレーションは、1 つの分子が 1 つのバーコードのみを含むべきであるので、偽陽性を生じ得る。いくつかの実施形態において、ライゲーションしなかったアダプターが、場合によっては、PCR の間に既存のフラグメントの中の共通領域をプライムオフ (prime off) し得ることは認識される。多数の反応サイクルにわたって、バーコードまたは他の人口配列のさらなるコピーは、単一の分子へと組み込まれ得る。よって、本発明者らは、アダプターのライゲーションおよびアダプターをライゲーションしたライブラリーフラグメントの単離に関する改善されたプロセスの必要性を認識および察知した。

40

【 0 0 3 7 】

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製するための方法を提供し、この方法は、(a) 捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを 2 本鎖核酸 (例えば、cDNA、g

50

DNA)の3'末端に付加する工程、アダプター核酸を、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを有する2本鎖核酸にライゲーションする工程、およびそのアダプターをライゲーションした核酸を、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの結合パートナーで捕捉する工程を包含する。

【0038】

いくつかの実施形態において、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、ビオチン部分で修飾されたヌクレオチドである。この方法の一般的描写は、図1に示され、これは、ビオチン部分で修飾されたヌクレオチドを要する方法の非限定的例を提供する。この実施液体において、平滑末端化した5'リン酸化2本鎖核酸のライブラリー102が提供される。ビオチン標識ATP104は、その2本鎖核酸の3'末端に付加されて、フラグメントの3'末端に捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを含むライブラリー106を生成する。そのライブラリーフラグメントは、アダプター108とライゲーションされて、アダプターをライゲーションしたライブラリーフラグメントとともにライゲーションしなかったアダプターを有するサンプル110を生成する。ライゲーションされたライブラリーフラグメントは、ストレプトアビジン被覆表面を使用してライゲーションしなかったアダプターから捕捉または単離されて、ライゲーションしなかったアダプター持ち越しの発生を最小化または排除するライブラリー112を生成する。この例は、ビオチン捕捉部分を利用するが、単離のために(例えば、結合パートナーとの相互作用を介して)特異的に標的化され得る任意の部分が、本明細書で記載される技術において適切であり得る。

【0039】

捕捉部分

本明細書で記載される技術の局面は、目的の分子(例えば、核酸、ライゲーション生成物など)を単離するための捕捉部分の使用に関する。本明細書で使用される場合、「捕捉部分(capture moiety)」とは、その目的の分子を捕捉する(例えば、単離する/精製する)目的で、結合パートナーと選択的に相互作用するように構成される部分をいう。

【0040】

捕捉部分およびその捕捉部分の結合パートナーは、任意の適切な結合対を含み得る。いくつかの実施形態において、結合対は、共有結合または非共有結合を通じて選択的に相互作用し得る。いくつかの実施形態において、結合対は、ハイブリダイゼーション、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス相互作用、またはこれらの力の任意の組み合わせによって選択的に相互作用し得る。いくつかの実施形態において、捕捉部分および/または結合パートナーは、例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、イノシン、アビジン、GST配列、改変GST配列、ビオチンリガーゼ認識(Bitag)配列、スタグ、SNAPタグ、エンテロキナーゼ部位、トロンピン部位、抗体もしくは抗体ドメイン、抗体フラグメント、抗原、レセプター、レセプタードメイン、レセプターフラグメント、またはこれらの組み合わせを含み得る。

【0041】

いくつかの実施形態において、捕捉部分は、ビオチン部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される技術は、分析用の核酸サンプルを調製するにあたって有用である。よって、いくつかの実施形態において、核酸分子は、ビオチン化捕捉部分を含む。いくつかの実施形態において、その核酸分子は、ビオチン部分を含む少なくとも1個の捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、式(I)の一般構造:

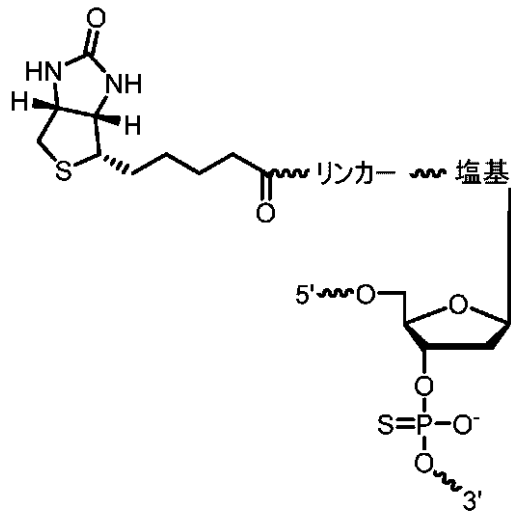
10

20

30

40

【化 1】



を含む。

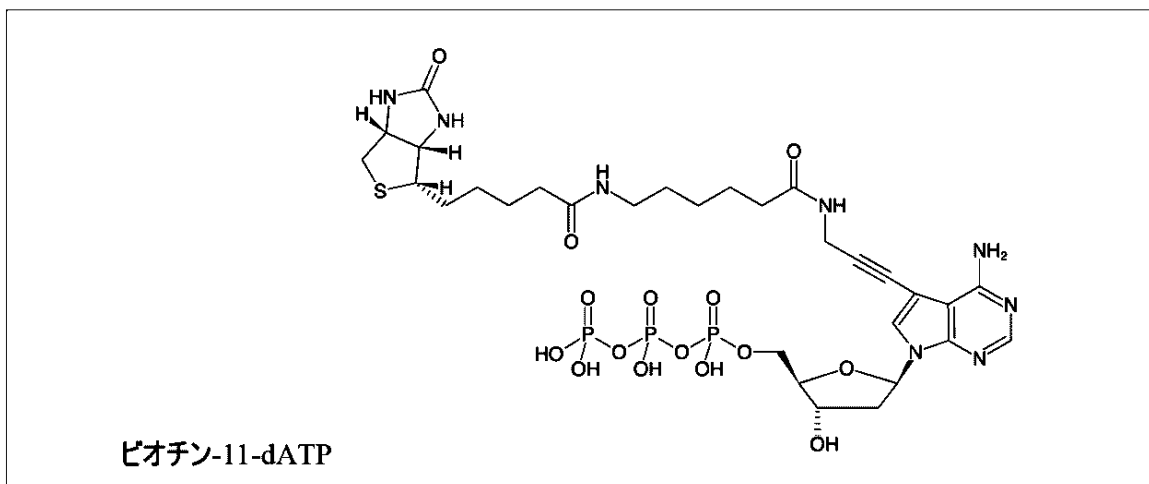
【 0 0 4 2 】

式 (I) に示されるように、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、ヌクレオチドの核塩基に付着したビオチン部分を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、そのビオチン部分は、ビオチン - トリエチレングリコール、ビス - ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン - トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む。捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの非限定的な例は、表 1 に示される。

【 0 0 4 3 】

【表 1 - 1】

表 1. 捕捉部分改変ヌクレオチドの例示的構造



10

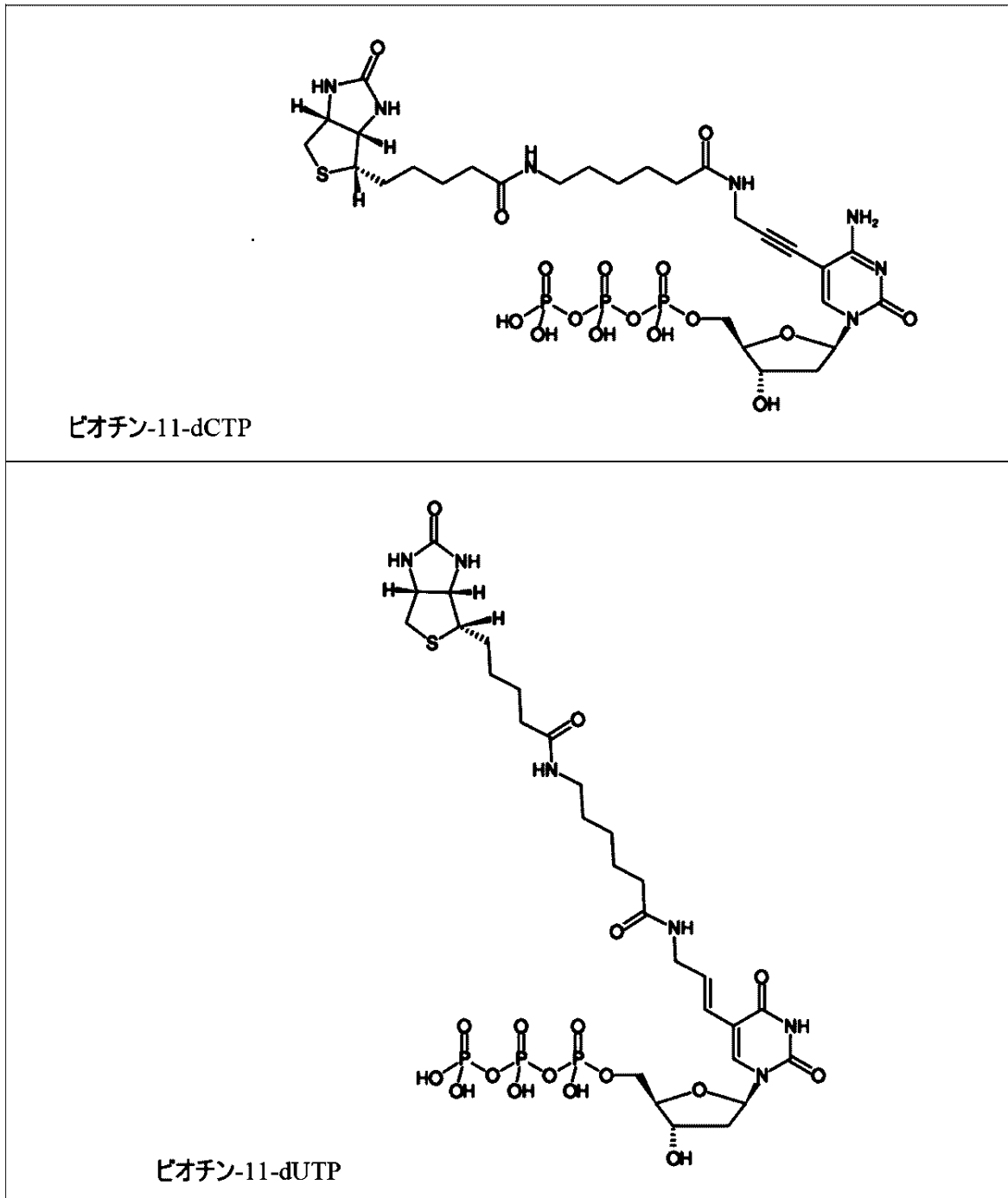
20

30

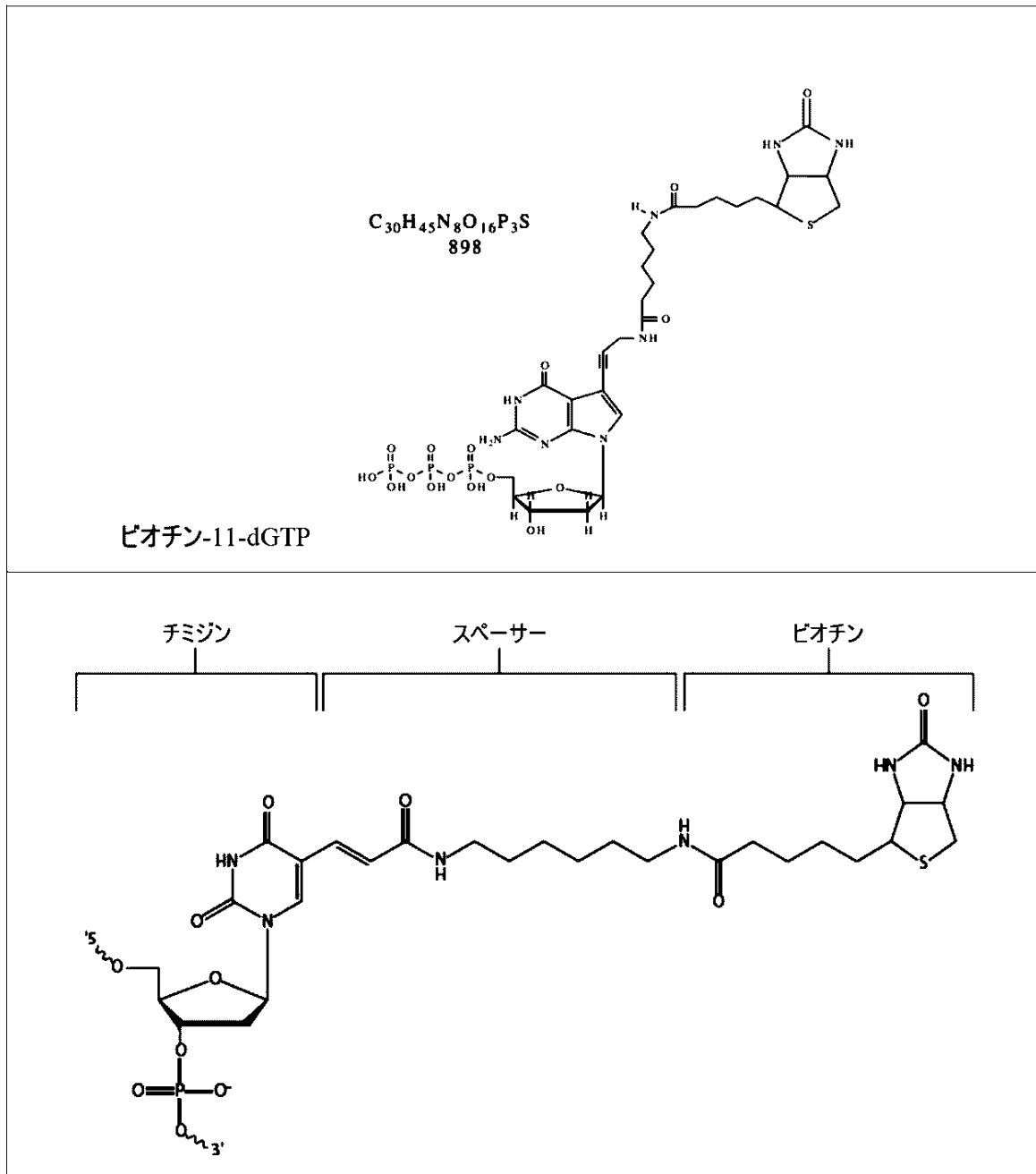
40

50

【表 1 - 2】



【表 1 - 3】



10

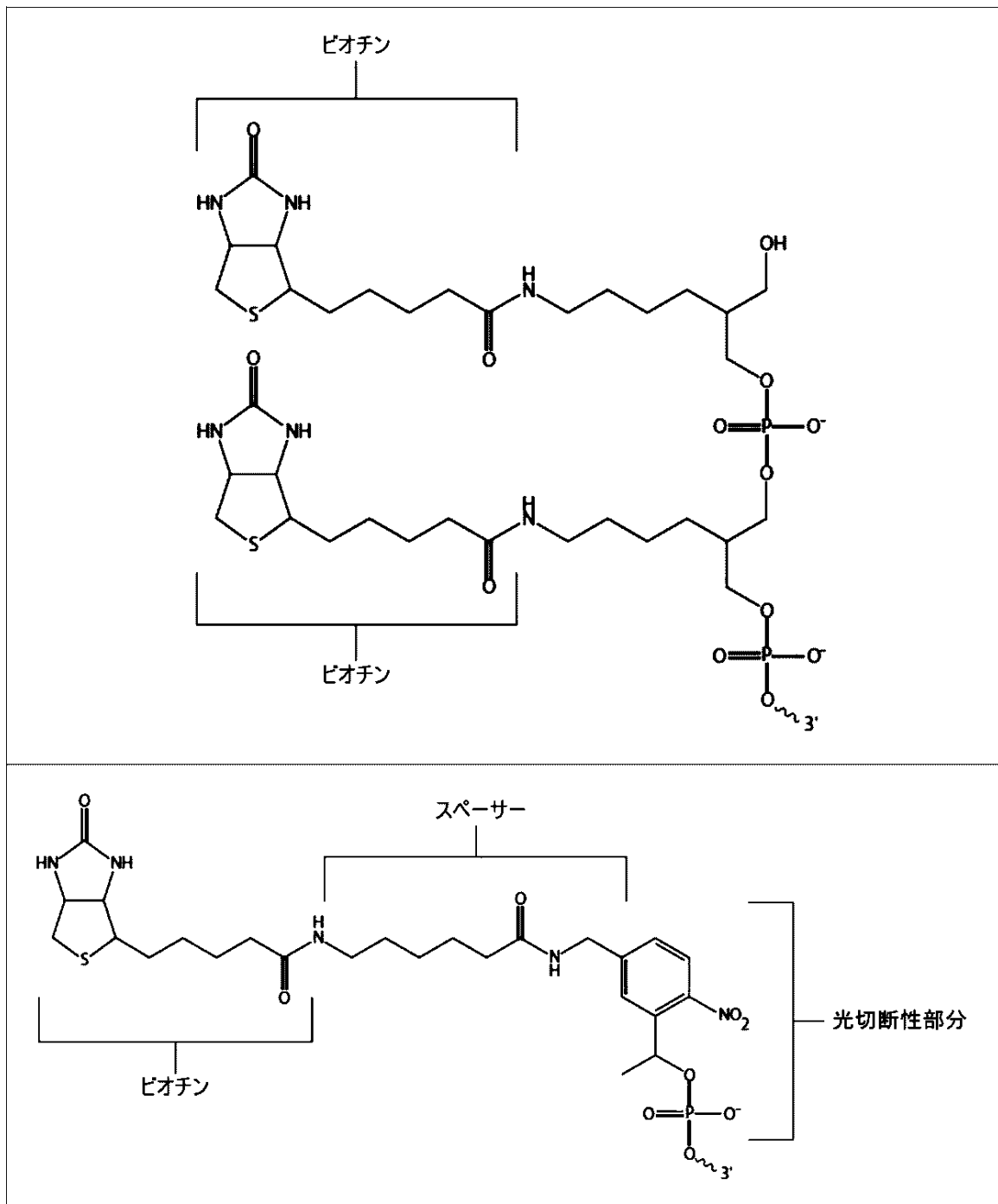
20

30

40

50

【表 1 - 4】



【0044】

いくつかの実施形態において、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、その捕捉部分とそのヌクレオチドの核塩基との間にリンカーを含む。いくつかの実施形態において、その捕捉部分は、任意の適切な長さのリンカーを介して、その核塩基に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、その捕捉部分は、長さが5～20個の原子のリンカーを介して、その核塩基に共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、そのリンカーは、脂肪族鎖を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2)_n-$ を含み、ここでnは、1～20の整数（両端の値を含む）である。いくつかの実施形態において、nは、1～10の整数（両端の値を含む）である。ある種の実施形態において、リンカーは、ヘテロ脂肪族鎖を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、ポリ

エチレングリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、ポリプロピレングリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含み、ここで n は、 $1 \sim 20$ の整数（両端の値を含む）である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含み、ここで n は、 $1 \sim 10$ の整数（両端の値を含む）である。ある種の実施形態において、リンカーは、 1 またはこれより多くのアリーレンを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 1 またはこれより多くのフェニレン（例えば、パラ置換されたフェニレン）を含む。ある種の実施形態において、リンカーは、キラル中心を含む。ある種の実施形態において、リンカーは、 1 またはこれより多くのホスフェート、脂肪族鎖、ヘテロ脂肪族鎖、および 1 またはこれより多くのアミド（例えば、 $-C(=O)NH-$ ）を含む。

10

【0045】

いくつかの実施形態において、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、ピオチン- n -dNTPであり、ここで n は、そのピオチン部分のカルボニル基とそのNTPの核塩基上の付着位置との間のリンカー原子の数を表す $5 \sim 20$ の整数である。

【0046】

いくつかの実施形態において、結合パートナーは、不溶性支持体に付着される。従って、いくつかの実施形態において、その目的の分子は、捕捉部分と不溶性支持体に付着された捕捉部分の結合パートナーとの間で形成される選択的結合相互作用を通じて、その不溶性支持体上に固定化され得る。

【0047】

いくつかの実施形態において、その不溶性支持体は、ビーズまたは他の固体表面を含む。例えば、いくつかの実施形態において、そのビーズは、常磁性ビーズである。単離するためにビーズを使用することは、当該分野で周知であり、任意の適切なビーズ単離法が、本明細書で記載される技術とともに使用され得る。いくつかの実施形態において、ビーズは、目的の分子がそのビーズに付着され得、そのビーズが洗浄されて、そのビーズに付着しなかった溶液構成要素を除去し得、精製および単離を可能にするという点で、単離に有用であり得る。いくつかの実施形態において、そのビーズは、サイズ、密度、または誘電特性、イオン特性、および磁性特性のような特性に基づいて、その溶液中の他の構成要素から分離され得る。

20

【0048】

いくつかの実施形態において、その不溶性支持体は、磁性ビーズである。ビーズの使用は、誘導体化された核酸捕捉部分が、遠心分離もしくは濾過によって、または磁性ビーズの場合には、磁場の印加によって、反応混合物から分離されることを可能にする。いくつかの実施形態において、磁性ビーズは、溶液へと導入、混合、除去、および磁場を使用して放出され得る。いくつかの実施形態において、磁性ビーズを利用するプロセスは、自動化され得る。いくつかの実施形態において、そのビーズは、周知の化学現象を使用して官能化されて、捕捉部分の結合パートナーを付着させるために適した官能化を有する表面を提供し得る。その捕捉部分の結合を可能にするための表面の誘導体化は、当該分野で従来からのものである。例えば、ストレプトアビジンでの表面の被覆は、ピオチン化捕捉部分の結合を可能にする。ストレプトアビジンでの表面の被覆は、例えば、米国特許第5,374,524号(Miller)に記載されている。いくつかの実施形態において、ビーズ以外の固体表面が使用され得る。いくつかの実施形態において、その固体表面は、平らな表面（例えば、ハイブリダイゼーションマイクロアレイのために使用されるもの）であり得るか、またはその固体表面は、分離カラムを充填したものであり得る。

30

40

【0049】

いくつかの実施形態において、捕捉部分の結合パートナーは、その捕捉部分を結合する前に、同時に、または後に、不溶性支持体に付着され得る。いくつかの実施形態において、捕捉部分とその捕捉部分の結合パートナーとを、両方が溶液中に存在する間に接触させることは、好ましいことであり得る。このような実施形態において、その捕捉部分：結合パートナー複合体は、次いで、その複合体と適切に誘導体化された表面とを接触させるこ

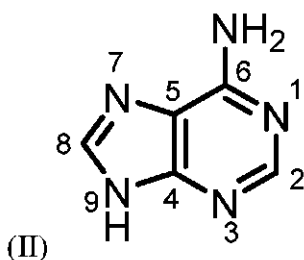
50

とによって、不溶性支持体上に固定化され得る。従って、いくつかの実施形態において、その目的の分子は、その目的の分子に付着した捕捉部分とその捕捉部分の結合パートナーとの間で形成される複合体を通じて単離され得る。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態において、その捕捉部分をヌクレオチドの核塩基に付着させることは、望ましいことであり得る。この様式では、その 3' 末端は、アダプター核酸に必要な応じてライゲーションされるように遊離のままである一方で、その捕捉部分は、結合パートナーによって捕捉されるために利用可能である。いくつかの実施形態において、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、ウラシル、およびシトシン、またはこれらの誘導体からなる群より選択される核塩基を含む。例えば、いくつかの実施形態において、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、アデニン核塩基またはその誘導体を含む。いくつかの実施形態において、その捕捉部分は、5 位、6 位、7 位または 8 位においてアデニン核塩基またはその誘導体へと共有結合的に連結される。いくつかの実施形態において、その捕捉部分は、7 位においてアデニン核塩基へと共有結合的に連結される。アデニン環の番号付けスキームは、式 (I I) に示される：

【 化 2 】



【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態において、捕捉部分に付着される核塩基上の 1 またはこれより多くの位置を改変することは、望ましいことであり得る。例えば、いくつかの実施形態において、アデニン核塩基の 7 位は、炭素原子である。しかし、さらなる共有結合を形成し得る任意の原子（例えば、C、O、N、S など）が捕捉部分の付着のために適した核塩基上の位置へと置換され得ることは、認識されるべきである。いくつかの実施形態において、そのアダプターをライゲーションしたフラグメントを捕捉した後に、そのライブラリーは、標的ヌクレオチド配列を富化するために増幅に供される。

【 0 0 5 2 】

分析用の核酸の調製

本開示の局面は、既知の標的ヌクレオチド配列に連続したヌクレオチド配列を決定する改善された方法を提供する。旧来のシーケンシング法は、配列情報を無作為に（例えば、「ショットガン (s h o t g u n) 」シーケンシング)、またはプライマーをデザインするために使用される 2 つの既知の配列の間で生成する。対照的に、本明細書で開示される方法のうちのある種のものは、いくつかの実施形態において、高レベルの特異性および感度で既知の配列のうちの 1 つの領域の上流または下流にあるヌクレオチド配列を決定する（例えば、シーケンシングする）ことを可能にする。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態において、本開示は、例えば、自動化様式で、次世代シーケンシング技術を使用して特定のヌクレオチド配列を決定する前に、その特定のヌクレオチド配列を富化する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、デオキシリボ核酸 (D N A) を含むサンプルを富化することに関し得る。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、(a) 1 またはこれより多くのヌクレオチドを、標的ヌクレオチド配列を含む 2 本鎖核酸の 3' 末端に付加する工程であって、ここでその 1 またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも 1 個（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個またはこれより多く）は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドである

工程；(b) アダプター核酸を、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドが付加された2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここでそのアダプター核酸の3'末端における1またはこれより多くのヌクレオチドの配列は、工程(a)において2本鎖核酸の3'末端に付加された1またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；(c) そのライゲーション生成物とその捕捉部分で修飾されたヌクレオチドの捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、そのライゲーション生成物を捕捉する工程；および(d) その標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーおよびそのアダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、そのライゲーション生成物を増幅する工程を包含する。

10

【0054】

いくつかの実施形態において、その方法は、(e) 第2のアダプタープライマーおよび第2の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(d)の増幅生成物を増幅する工程をさらに包含する。例えば、図2は、この実施形態が進められ得る非限定的プロセス200を示す。標的ヌクレオチド配列を含む2本鎖核酸202は、1またはこれより多くの捕捉部分で修飾されたヌクレオチド204を、その3'末端に付加する(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、またはこれより多くの捕捉部分で修飾されたヌクレオチド)ことによってテール付加され得る。その捕捉部分が標識された核酸は、アダプター206とライゲーションされて、アダプターをライゲーションしたライブラリーフラグメント208を生成する。そのアダプターをライゲーションしたフラグメントは、その捕捉部分の結合パートナーを導入することによって単離され、そのうちの前者は、磁性支持体210に付着される。磁場212の印加は、アダプターをライゲーションした核酸をライゲーションしなかったアダプターから単離した。その捕捉したライゲーション生成物は、その標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマー214およびそのアダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマー216を使用する第1のPCRラウンドに供される。このようにして、その第1のアダプタープライマー216は、その第1の標的特異的プライマー214によって生成される鎖をプライムオフする。第2のPCRラウンドは、第2の標的特異的プライマー218および第2のアダプタープライマー220を使用して行われる。示されるように、その第2の標的特異的プライマー218は、その第1の標的特異的プライマー214に対してネスト化される。また示されるように、その第2の標的特異的プライマーは、その標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズしない5'領域でテール付加される。その第1のPCRラウンドに類似の様式で、その第2のアダプタープライマー220は、その第2の標的特異的プライマー218によって生成される鎖をプライムオフする。この第2のPCRラウンドでは、さらなるプライマー222が含まれ、これは、(i) その第2の標的特異的プライマー218のテール付加された5'領域のうちの少なくとも一部と同一である3'領域、および(ii) シーケンシングに有用なさらなる要素(例えば、インデックスまたはバーコード配列およびプライマー結合部位)を含み得る5'領域を含む。その第2のアダプタープライマー220がその第2の標的特異的プライマー218によって生成される相補鎖からセンス鎖を生成した後に、そのさらなるプライマー222は、次いで、シーケンシングの準備ができた生成物224を生成するために、そのテール付加された領域の目下の相補的配列をプライムオフする。

20

30

40

【0055】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される技術は、核酸サンプルからの標的ヌクレオチド配列の富化を可能にする。いくつかの実施形態において、その核酸サンプルは、ゲノムDNAを含む。いくつかの実施形態において、その核酸サンプルは、cDNAを含む。いくつかの実施形態において、cDNAは、テンプレートとしてランダムにプライムした第1鎖合成反応の生成物を使用するそのランダムにプライムした第1鎖合成反応を行うことによって調製され得、ここでそのRNA調製物は、標的ヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸シーケンシングライブラリーは、RNA調製物から

50

調製される。例えば、図 3 は、2 本鎖核酸ライブラリーフラグメントが RNA テンプレートから調製されるプロセス 300 を概して記載する。

【0056】

示されるように、RNA テンプレート 302 は、ランダムプライマー 304（例えば、ランダムヘキサマー）とハイブリダイゼーションに適した条件下でアニールされる。ランダムプライミングの後に、第 1 鎖 cDNA 合成は、DNA/RNA ハイブリッド 306 を生成するために、逆転写酵素を使用するテンプレート依存性伸長によって達成される。その DNA/RNA ハイブリッドの RNA 鎖は、酵素によりまたは化学的に切断される。DNA 鎖 310 にハイブリダイズしたままである RNA 308 の得られるフラグメントは、ポリメラーゼの作用を介する第 2 鎖 cDNA 合成のためのプライマーとして働く。いくつかの実施形態において、第 2 鎖 cDNA 合成後のポリメラーゼの不活性化は、例えば、末端修復の間に 5' 3' および/または 3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を防止するために望ましいことであり得る。第 2 鎖 cDNA 合成後に、その 2 本鎖 cDNA 312 は、平滑末端化した 5' リン酸化 cDNA 314 を生成するために、末端修復に供される。いくつかの実施形態において、SPRI クリーンアップ（例えば、AMPure）は、末端修復後に行われる。そのプロセスにおけるその後の工程は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドをその核酸の 3' 末端に付加する工程を包含し得るので、サンプル中の任意の残りの dNTP を除去することは、好ましいことであり得る。従って、溶液から dNTP を除去し得る任意のクリーンアップ法は、この技術において適切であると想定される。いくつかの実施形態において、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドは、核酸を調製するための先の工程（例えば、フラグメント化、ランダムもしくは特異的プライミング、第 1 鎖合成、第 2 鎖合成、および/または末端修復）において核酸に付加および/または組み込まれ得る。従って、このような実施形態において、その捕捉部分で修飾されたヌクレオチドを添加および/または組み込む工程の前に、クリーンアップ工程を行うことは、望ましいことであり得る。

【0057】

平滑末端化した 5' リン酸化 cDNA 314 は、その 3' 末端においてチオエート結合（例えば、ホスホロチオエート結合）を含むビオチン標識 dATP 316（ビオチン-11-ATP）でテール付加され、アダプターをライゲーションしたライブラリーフラグメント 318 を生成するために、アダプター核酸とライゲーションされる前に、SPRI クリーンアップに供される。クラウディング剤（20%）を含めると、アダプターライゲーション効率を増大させることが示された。そのアダプターをライゲーションしたフラグメント 318 は、ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ 320 を導入することによって捕捉される。非共有結合的なビオチン-ストレプトアビジン複合体が一旦形成された後、磁場 322 の印加は、アダプターをライゲーションした核酸を捕捉して、その所望の生成物をライゲーションしなかったアダプターから単離する。

【0058】

図 3 に示されるように、いくつかの実施形態において、その捕捉したアダプターをライゲーションした核酸は、ビーズ固定化生成物の形成において第 1 の PCR ラウンド 324 に供される。さらに他の実施形態において、図 4 に示されるように、その捕捉したアダプターをライゲーションした核酸は、第 1 の PCR ラウンド 324 の前に、常磁性ビーズ 320 から溶離される。そのビーズからの捕捉したアダプターをライゲーションした核酸の溶離は、例示によれば（そして限定ではない）、化学的試薬および/または熱を使用して行われ得る。いくつかの実施形態において、その化学的試薬は、塩基（例えば、NaOH）である。いくつかの実施形態において、捕捉したアダプターをライゲーションした核酸は、低濃度（例えば、1 M 未満、0.5 M 未満、0.1 M 未満、0.05 M 未満、0.01 M 未満、0.001 M 未満、0.0001 M 未満）の NaOH で溶離される。いくつかの実施形態において、捕捉したアダプターをライゲーションした核酸は、低濃度の NaOH および熱で溶離される。

【0059】

その固定化された（例えば、図 3 にあるように）または溶離された（例えば、図 4 にあ

るように)アダプターをライゲーションした核酸は、その標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の遺伝子特異的プライマー(「GSP1」)およびそのアダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマー(「P5__1」)を使用する第1のPCRラウンド324に供される。このようにして、P5__1は、GSP1によって生成される鎖をプライムオフする。示されるように、いくつかの実施形態において、GSP1(例えば、第1の標的特異的プライマー)は、その標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズしない5'領域でテール付加される。いくつかの実施形態において、5'テール領域は、例えば、プライマーダイマーの発生を最小化する配列内容物を有することによって、プライマーダイマーを防止し得る。いくつかの実施形態において、GSP1は、その5'テール付加領域でテール付加されない。図3にさらに示されるように、第2のPCRラウンド326は、第2の遺伝子特異的プライマー(「GSP2」)および第2のアダプタープライマー(「P5__2」)を使用して行われる。示されるように、GSP2は、GSP1に対してネスト化される。また示されるように、GSP2は、その標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズしない5'領域でテール付加される。第1のPCRラウンドに類似の様式で、P5__2は、GSP2によって生成される鎖をプライムオフする。この第2のPCRラウンドでは、さらなるプライマー(「SINGLE PRIMER」)が含まれ、このプライマーは、(i)GSP2のテール付加された5'領域のうちの少なくとも一部と同一の3'領域、および(ii)シーケンシングに有用なさらなる要素(例えば、シーケンシングプライマー結合部位およびサンプルインデックス)を含む5'領域を含む。P5__2がGSP2によって生成される相補鎖からセンス鎖を生成した後に、そのさらなるプライマーは、次いで、シーケンシングの準備ができた生成物328を生成するために、GSP2テール付加された領域の目下の相補的配列をプライムオフする。

【0060】

サンプル精製

いくつかの実施形態において、標的核酸および/またはその増幅生成物は、1つの方法のうちの任意の適切な工程の前および/または後で、酵素、プライマー、または緩衝液構成要素から単離され得る。核酸を単離するための任意の適切な方法が、使用され得る。いくつかの実施形態において、その単離は、固相可逆的固定法(Solid Phase Reversible Immobilization(SPRI))クリーンアップを含み得る。SPRIクリーンアップのための方法は、当該分野で周知である(例えば、Agencourt AMPure XP - PCR Purification(カタログ番号A63880、Beckman Coulter; Brea, CA))。いくつかの実施形態において、酵素は、加熱処理によって不活性化され得る。いくつかの実施形態において、非標識dNTPは、酵素処理によって除去される。

【0061】

いくつかの実施形態において、ハイブリダイズしなかったプライマーは、適切な方法(例えば、精製、消化など)を使用して核酸調製物から除去され得る。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼ(例えば、エキソヌクレアーゼI)は、調製物からプライマーを除去するために使用される。いくつかの実施形態において、このようなヌクレアーゼは、プライマー消化後に熱不活性化される。そのヌクレアーゼが一旦不活性化されると、プライマーのさらなるセットが、さらなる増幅反応を行うために、他の適切な構成要素(例えば、酵素、緩衝液)と一緒に添加され得る。

【0062】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法の工程は、必要に応じて、間にあるサンプル精製工程を含む。いくつかの実施形態において、サンプル精製工程は、洗浄工程を含む。いくつかの実施形態において、サンプル精製工程は、SPRIクリーンアップ(例えば、AMPure)を含む。例えば、分析用の核酸を調製するための方法は、(a)テンプレートとしてRNA調製物を使用するランダムにプライムした第1鎖合成反応およびテンプレートとしてそのランダムにプライムした第1鎖合成反応の生成物を使用する第2鎖合成反応を行うことによって、cDNAを調製する工程であって、ここでその

R N A 調製物は、標的ヌクレオチド配列を含む工程；（ b ）その c D N A を末端修復して、その標的ヌクレオチド配列を含む平滑末端化した 2 本鎖核酸を生成する工程；（ c ）その平滑末端化した 2 本鎖核酸を常磁性基材または表面上に固定化する工程；（ d ）その固定化した平滑末端化 2 本鎖核酸を洗浄する工程；（ e ）その洗浄した固定化平滑末端化 2 本鎖核酸をその常磁性基材または表面から放出する工程；（ f ） 1 またはこれより多くのヌクレオチドを、その放出した平滑末端化 2 本鎖核酸の 3 ' 末端に付加する工程；（ g ）ライゲーション可能な二重鎖部分およびオーバーハング配列を含むアダプターを工程（ f ）において生成した核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここでそのオーバーハング配列は、その 1 またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；（ h ）そのライゲーション生成物を洗浄することなしに、その標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的的特異的プライマーおよびそのアダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、そのライゲーション生成物を増幅する工程；（ i ）第 2 のアダプタープライマーおよび第 2 の標的的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程（ h ）の増幅生成物を増幅する工程であって、ここでその第 2 の標的的特異的プライマーは、その第 1 の標的的特異的プライマーに対してネスト化される工程；（ j ）工程（ i ）の増幅生成物を常磁性基材または表面に固定化する工程；（ k ）その固定化した増幅生成物を洗浄する工程；ならびに（ l ）その洗浄した固定化増幅生成物をその常磁性基材または表面から放出する工程を包含し得る。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法の工程は、必要に応じて、 1 またはこれより多くのヌクレオチドを核酸に付加する工程であって、ここでその 1 またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも 1 個は、捕捉部分を含む工程、およびその捕捉部分とその捕捉部分の結合パートナーとの間の相互作用を介してその核酸を捕捉する工程を包含する。例えば、分析用の核酸を調製するための方法は、（ a ）テンプレートとして核酸調製物を使用するランダムにプライムした第 1 鎖合成反応およびテンプレートとしてそのランダムにプライムした第 1 鎖合成反応の生成物を使用する第 2 鎖合成反応を行うことによって、c D N A を調製する工程であって、ここでその核酸調製物は、標的ヌクレオチド配列を含む工程；（ b ）その c D N A を末端修復して、その標的ヌクレオチド配列を含む平滑末端化した 2 本鎖核酸を生成する工程；（ c ）その平滑末端化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程；（ d ） 1 またはこれより多くのヌクレオチドを、工程（ c ）において洗浄した核酸の 3 ' 末端に付加する工程であって、必要に応じてここで、その 1 またはこれより多くのヌクレオチドのうちの少なくとも 1 個は、捕捉部分で修飾されたヌクレオチドである工程；（ e ）工程（ d ）において生成した核酸を洗浄する工程；（ f ）ライゲーション可能な二重鎖部分およびオーバーハング配列を含むアダプター核酸を、工程（ e ）で生成した核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここでそのオーバーハング配列は、その 1 またはこれより多くのヌクレオチドと相補的である工程；（ g ）その標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的的特異的プライマーおよびそのアダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、そのライゲーション生成物を増幅する工程；（ h ）第 2 のアダプタープライマーおよび第 2 の標的的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程（ g ）の増幅生成物を増幅する工程であって、ここでその第 2 の標的的特異的プライマーは、その第 1 の標的的特異的プライマーに対してネスト化される工程；ならびに（ j ）工程（ h ）の増幅生成物を洗浄する工程を包含し得る。

【 0 0 6 4 】

核酸アダプター

本明細書で使用される場合、用語「核酸アダプター（n u c l e i c a c i d a d a p t e r）」または「アダプター（a d a p t e r）」とは、標的ヌクレオチド配列の増幅および/またはシーケンシングの間に有用な 1 またはこれより多くの要素を提供する、その標的ヌクレオチド配列を含む核酸にライゲーションされ得る核酸分子をいう。いく

つかの実施形態において、アダプターは、1本鎖である。いくつかの実施形態において、アダプターは、2本鎖である。いくつかの実施形態において、2本鎖アダプターは、第1のライゲーション可能な二重鎖末端および第2の不对末端を含む。いくつかの実施形態において、アダプターは、増幅鎖およびブロッキング鎖を含む。いくつかの実施形態において、その増幅鎖は、5' 不对部分および3' 二重鎖部分を含む。いくつかの実施形態において、その増幅鎖は、3' オーバーハングをさらに含む。いくつかの実施形態において、その3' オーバーハングは、3' Tオーバーハングである。いくつかの実施形態において、その増幅鎖は、第1のおよび第2のアダプタープライマーと同一のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、そのアダプターのブロッキング鎖は、5' 二重鎖部分および伸長不能な3' 部分を含む。いくつかの実施形態において、そのブロッキング鎖は、3' 不对部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、その増幅鎖およびそのブロッキング鎖の二重鎖部分は、実質的に相補的であり、そしてその二重鎖部分は、ライゲーション温度において二重鎖形態を保持するために十分な長さである。

10

【0065】

いくつかの実施形態において、第1のおよび第2のアダプタープライマーと同一のヌクレオチド配列を含む増幅鎖の一部は、少なくとも部分的に、その増幅鎖の5' 不对部分によって含まれ得る。

【0066】

いくつかの実施形態において、そのアダプターは、「Y」形状を有し得る、すなわち、その第2の不对末端は、増幅鎖の5' 不对部分およびブロッキング鎖の3' 部分を含む。そのブロッキング鎖の3' 不对部分は、その増幅鎖の5' 不对部分より短くてもよいし、長くてもよいし、長さが等しくてもよい。いくつかの実施形態において、そのブロッキング鎖の3' 不对部分は、その増幅鎖の5' 不对部分より短い可能性がある。Y形状のアダプターは、そのブロッキング鎖の不对部分がPCRレジメンの間の3' 伸長に左右されないという利点を有する。

20

【0067】

いくつかの実施形態において、そのアダプターのブロッキング鎖は、その増幅鎖の5' 不对部分に実質的に相補的でない3' 不对部分をさらに含み得る；ここでそのブロッキング鎖の3' 不对部分は、プライマーのうちのいずれにも実質的に相補的でないか、または実質的に同一でない。いくつかの実施形態において、そのブロッキング鎖は、その増幅鎖の5' 不对部分にアニーリング温度で特異的にアニールしない3' 不对部分をさらに含み得る；ここでそのブロッキング鎖の3' 不对部分は、プライマーまたはその相補体のうちのいずれにも、アニーリング温度で特異的にアニールしない。いくつかの実施形態において、アダプター核酸は、最低でも、多重化のためのサンプルインデックス配列を含む。しかし、いくつかの実施形態において、そのアダプター核酸は、ランダム分子バーコードをさらに含む。

30

【0068】

増幅

本開示の局面は、1またはこれより多くの増幅ラウンドを含み得る技術に関する。いくつかの実施形態において、第1の増幅ラウンドは、第1の標的特異的プライマーおよび第1のアダプタープライマーを使用して行われる。

40

【0069】

本明細書で使用される場合、「第1の標的特異的プライマー (first target-specific primer)」とは、適したアニーリング条件下で、テンプレート核酸の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールし得る核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。増幅の間に、その第1の標的特異的プライマーは、そのテンプレートに相補的な鎖を生成し、この相補鎖は、第1のアダプタープライマーとハイブリダイズされ得る。

【0070】

本明細書で使用される場合、「第1のアダプタープライマー (first adapter primer)」は、適したアニーリング条件下で、アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールし得る核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。このように、その第1の

50

アダプタープライマーは、そのアダプターのうちの少なくとも一部と同一であるので、それは、その第1の標的特異的プライマーによって生成される相補鎖にアニールして、増幅が進むことを可能にする。

【0071】

いくつかの実施形態において、第1の増幅工程の第1のPCR増幅サイクルでは、第1の標的特異的プライマーは、標的ヌクレオチド配列を含む核酸のテンプレート鎖に特異的にアニールし得る。いくつかの実施形態において、その第1の標的特異的プライマーがデザインされた配向に依存して、その標的ヌクレオチド配列の上流または下流にある配列は、そのテンプレート鎖に相補的な鎖として合成される。いくつかの実施形態において、PCRの伸長相の間に、テンプレート鎖の5'末端がライゲーションされたアダプターで終結する場合、その新たに合成された相補鎖の3'末端は、第1のアダプタープライマーとハイブリダイズし得る配列を含む。その後のPCR増幅サイクルでは、その第1の標的特異的プライマーおよびその第1のアダプタープライマーの両方が、その標的核酸配列の適切な鎖に特異的にアニールし得、その既知のヌクレオチド標的配列とそのアダプターとの間の配列は、増幅され得る。いくつかの実施形態において、第2の増幅ラウンドは、第2の標的特異的プライマーおよび第2のアダプタープライマーを使用して行われる。

10

【0072】

本明細書で使用される場合、「第2の標的特異的プライマー(second target-specific primer)」は、適したアニリング条件下で、先の増幅工程から生じるアンプリコンによって含まれるその標的ヌクレオチド配列の一部に特異的にアニールし得る核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。増幅の間に、その第2の標的特異的プライマーは、そのテンプレートに相補的な鎖を生成し、この相補鎖は、第2のアダプタープライマーとハイブリダイズされ得る。

20

【0073】

本明細書で使用される場合、「第2のアダプタープライマー(second adapter primer)」とは、適したアニリング条件下で、アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールし得る核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。このように、その第1のアダプタープライマーは、そのアダプターのうちの少なくとも一部と同一であるので、それは、その第2の標的特異的プライマーによって生成される相補鎖にアニールして、増幅が進むことを可能にする。

30

【0074】

いくつかの実施形態において、第2の標的特異的プライマーは、第1の標的特異的プライマーに対してネスト化される。いくつかの実施形態において、ネスト化したアダプタープライマーを使用すると、増幅可能である(例えば、ブリッジPCRまたはエマルジョンPCRの間に)が、シーケンシングできない(半ネスト化法の間に生じ得る状況)最終アンプリコンを生成する可能性を排除する。他の状況において、シーケンシングプライマーと同一のプライマーを使用する半ネスト化アプローチは、第1のPCR工程から第2のPCR工程への望ましくない増幅生成物の持ち越しを生じ得、最終的には、人工シーケンシングリードを生じる。いくつかの実施形態において、第2の標的特異的プライマーは、第1の標的特異的プライマーに関して少なくとも1ヌクレオチド、例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはこれより多くのヌクレオチドがネスト化される。いくつかの実施形態において、第2の標的特異的プライマーは、約5ヌクレオチド~約10ヌクレオチドが、約10ヌクレオチド~約15ヌクレオチドが、約15ヌクレオチド~約20ヌクレオチドが、または約20個もしくはこれより多くのヌクレオチドが第1の標的特異的プライマーに関してネスト化される。

40

【0075】

他の局面の中でも、本明細書で記載される技術は、1またはこれより多くのネスト化プライマーの使用を包含し得る。いくつかの実施形態において、ネスト化プライマーを使用すると、予測外のプライマー結合部位の増幅に起因して、PCR生成物における非特異的に結合が低減し得る。本明細書で使用される場合、用語「ネスト化される(nested

50

）」は、1つのプライマー対の1つのプライマーのアニール部位と別のプライマー対の別のプライマーのアニール部位との間の位置的关系性を記載するために使用される。例えば、いくつかの実施形態において、第2のプライマーは、1個、2個、3個またはこれより多くのヌクレオチドが第1のプライマーに対してネスト化され、このことは、1個、2個、3個またはこれより多くのヌクレオチドがフレームシフトされるそのテンプレート鎖上の部位にその第2のプライマーが結合することを意味する。

【0076】

いくつかの実施形態において、第2の標的特異的プライマーは、標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分およびその標的ヌクレオチド配列にアニールしない5'テールを含む。いくつかの実施形態において、その5'テールは、第2のシーケンシングプライマーと同一の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、反応中に存在する多数のプライマー（例えば、1もしくはこれより多くの標的特異的プライマーおよび/または1もしくはこれより多くのアダプタープライマー）は、同一の5'テール配列部分を含み得る。

10

【0077】

いくつかの実施形態において、5'テールは、GCリッチ配列であり得る。いくつかの実施形態において、5'テール配列は、少なくとも50% GC含量、少なくとも55% GC含量、少なくとも60% GC含量、少なくとも65% GC含量、少なくとも70% GC含量、少なくとも75% GC含量、少なくとも80% GC含量、またはより高いGC含量を含み得る。いくつかの実施形態において、5'テール配列は、少なくとも60% GC含量を含み得る。いくつかの実施形態において、5'テール配列は、少なくとも65% GC含量を含み得る。

20

【0078】

いくつかの実施形態において、第2の増幅ラウンドは、5'テールを含む第2の標的特異的プライマー、第1のアダプタープライマー、およびさらなるプライマーを含む。いくつかの実施形態において、そのさらなるプライマーは、その第2の標的特異的プライマーの5'テールと同一の3'部分を含む。いくつかの実施形態において、そのさらなるプライマーは、バーコード、インデックス、アダプター配列、またはシーケンシングプライマー部位を含み得るハイブリダイゼーション配列の5'側にさらなる配列を含み得る。いくつかの実施形態において、そのさらなるプライマーは、包括的なシーケンシングアダプター/インデックスプライマーである。

30

【0079】

いくつかの実施形態において、その第1のおよび第2の標的特異的プライマーは、その標的核酸の同じ鎖に実質的に相補的である。いくつかの実施形態において、その既知の標的配列に特異的にアニールするその第1のおよび第2の標的特異的プライマーの一部は、合計で、その既知の標的ヌクレオチド配列の少なくとも20個の特有の塩基、例えば、20個もしくはこれより多くの特有の塩基、25個もしくはこれより多くの特有の塩基、30個もしくはこれより多くの特有の塩基、35個もしくはこれより多くの特有の塩基、40個もしくはこれより多くの特有の塩基、または50個もしくはこれより多くの特有の塩基を含み得る。いくつかの実施形態において、その既知の標的配列に特異的にアニールするその第1のおよび第2の標的特異的プライマーの一部は、合計で、その既知の標的ヌクレオチド配列の少なくとも30個の特有の塩基を含み得る。

40

【0080】

いくつかの実施形態において、その第1のアダプタープライマーは、そのアダプターの増幅鎖の約20個の最も5'側の塩基と同一の核酸配列を含み得、その第2のアダプタープライマーは、そのアダプターの増幅鎖の約30個の塩基と同一の核酸配列と、その増幅鎖の5'末端の3'側にある少なくとも1個のヌクレオチドである5'塩基とを含み得る。

【0081】

いくつかの実施形態において、アダプターをライゲーションした核酸（例えば、ライゲーション生成物）は、最小限である。このような実施形態において、第1のアダプタープラ

50

イマーが使用され得、これは、その3'末端においてアダプター核酸配列の一部、および次いで、その5'末端にシーケンサーにとって重要なさらなる情報を含む。このような実施形態において、第2のアダプタープライマーが使用され得、これは、その3'末端において、その第1のアダプタープライマーの5'末端を含む。このような実施形態において、その第2のアダプタープライマーはまた、その5'末端においてシーケンシングを可能にするヌクレオチド配列を有し得る。このような実施形態において、PCRを使用して、シーケンサー適合性であるライブラリーを生成することは、可能である。

【0082】

プライマー

いくつかの実施形態において、プライマー（例えば、第1のおよび第2の標的特異的プライマー、ならびに第1のおよび第2のアダプタープライマー）を、これらが、約61~72、例えば、約61~69、約63~69、約63~67、約64~66のアニーリング温度において、これらの相補的配列に特異的にアニールするように、デザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが72未満のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが70未満のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが68未満のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが約65のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムは、容器温度を（例えば、種々の温度範囲の間でサイクリングすることによって）変更して、プライマーアニーリングを促進するように構成される。

【0083】

いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする標的特異的プライマーの一部は、約61~72、例えば、約61~69、約63~69、約63~67、約64~66の温度で特異的にアニールする。いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする標的特異的プライマーの一部は、約65の温度で、PCR緩衝液中で特異的にアニールする。

【0084】

核酸伸長、増幅、およびPCR

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、伸長レジメンまたは工程を含む。このような実施形態において、伸長は、1つまたはこれより多くのハイブリダイズしたランダムプライマーから、プライマーがテンプレートに関してハイブリダイズされる核酸分子を使用して、進み得る。伸長工程は、本明細書で記載される。いくつかの実施形態において、1つまたはこれより多くのランダムプライマーは、サンプル中の核酸の實質的に全てにハイブリダイズし得、そのうちの多くは、標的ヌクレオチド配列を含まなくてもよい。よって、いくつかの実施形態において、ランダムプライマーの伸長は、標的ヌクレオチド配列を含まないテンプレートとのハイブリダイゼーションに起因して起こり得る。

【0085】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅レジメンを包含し得る（1つまたはこれより多くの増幅サイクルを包含する）。本明細書で記載される方法の増幅工程は、各々PCR増幅レジメンを、すなわち、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅サイクルのセットを含み得る。本明細書で使用される場合、用語「増幅レジメン（amplification regimen）」とは、目的の核酸を特異的に増幅する（その存在量を増大させる）プロセスをいう。いくつかの実施形態において、指数関数的増幅は、以前のポリメラーゼ伸長の生成物が連続する伸長ラウンドにわたってテンプレートとして働く場合に起こる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法に従うPCR増幅レジメンは、少なくとも1回、およびいくつかの場合には、少なくとも5回またはこれより多くの反復サイクルを含み得る。いくつか

10

20

30

40

50

の実施形態において、各反復サイクルは、１）鎖分離（例えば、熱変性）；２）テンプレート分子へのオリゴヌクレオチドプライマーアニーリング；および３）そのアニールしたプライマーの核酸ポリメラーゼ伸長という工程を含み得る。これらの工程の各々に関与する任意の適切な条件および時間が使用され得ることは、認識されるべきである。いくつかの実施形態において、選択される条件および時間は、長さ、配列の内容、融解温度、二次構造特徴、または反応において使用される核酸テンプレートおよび／もしくはプライマーに関する他の因子に依存し得る。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法に従う増幅レジメンは、サーマルサイクラー（そのうちの多くは市販されている）で行われる。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、線形的増幅を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、ネスト化プライマーを使用して行われる増幅工程は、線形的増幅を使用して行われ得る。いくつかの実施形態において、増幅は、核酸配列ベースの増幅（NASBA）を使用して行われ得る。例えば、いくつかの実施形態において、増幅は、T7媒介性NASBA反応を含む。

【0086】

いくつかの実施形態において、核酸伸長反応は、核酸ポリメラーゼの使用を包含する。本明細書で使用される場合、語句「核酸ポリメラーゼ（nucleic acid polymerase）」とは、ヌクレオシド三リン酸のテンプレート依存性重合を触媒して、テンプレート核酸配列に相補的なプライマー伸長生成物を形成する酵素をいう。核酸ポリメラーゼ酵素は、アニールしたプライマーの3'末端における合成を開始し、そのテンプレートの5'末端に向かう方向で進む。多くの核酸ポリメラーゼは、当該分野で公知であり、市販されている。核酸ポリメラーゼのうちの1グループは、熱安定性である。すなわち、それらは、相補的な核酸のアニールした鎖を変性させるために十分な温度（例えば、94、または時にはより高い）に供された後に機能を保持する。増幅のためのプロトコルの非限定的な例は、以下の条件下でポリメラーゼ（例えば、Phoenix Taq、Veraseq）を使用することを包含する：98 で30秒間、続いて、以下を含む14～22回のサイクル（98 で10秒間での融解、続いて、68 で30秒間のアニーリング、続いて、72 で3分間の伸長、続いて、4 での反応の保持）。しかし、他の適切な反応条件が使用されてもよい。いくつかの実施形態において、アニーリング／伸長温度は、塩濃度における差異を考慮するために調節され得る（例えば、より高い塩濃度に対して3 高い）。いくつかの実施形態において、例えば、98 から65 への傾斜率を（例えば、1 /秒、0.5 /秒、0.28 /秒、0.1 /秒またはよりゆっくりと）遅らせることは、より多重化したサンプル中でプライマー性能および適用範囲の均一性を改善する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムは、容器温度を（例えば、種々の温度範囲の間でサイクルさせ、制御された上昇率または下降率を有することによって）変更して、増幅を促進するように構成される。

【0087】

いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼは、その酵素がテンプレート依存性伸長を行う条件下で使用される。いくつかの実施形態において、その核酸ポリメラーゼは、DNAポリメラーゼI、Taqポリメラーゼ、Phoenix Taqポリメラーゼ、Phusionポリメラーゼ、T4ポリメラーゼ、T7ポリメラーゼ、Klenowフラグメント、Klenow exo-、phi29ポリメラーゼ、AMV逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素、HIV-1逆転写酵素、Veraseq ULtraポリメラーゼ、Veraseq HF 2.0ポリメラーゼ、EnzScript、または別の適切なポリメラーゼである。いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼは、逆転写酵素ではない。いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼは、DNAテンプレートに対して作用する。いくつかの実施形態において、その核酸ポリメラーゼは、RNAテンプレートに対して作用する。いくつかの実施形態において、伸長反応は、相補的なDNA分子を生成するために、RNAに対して行われる逆転写を包含する（RNA依存性DNAポリメラーゼ活性）。いくつかの実施形態において、逆転写酵素は、マウスのモロニー Maus 白血病ウイルス（M-MuLV）ポリメラーゼ、AMV逆転写酵素、RSV逆転写酵素、HIV

10

20

30

40

50

- 1 逆転写酵素、H I V - 2 逆転写酵素、または別の適切な逆転写酵素である。

【0088】

いくつかの実施形態において、核酸増幅反応は、反応混合物の加熱を概して要する鎖分離工程を包含するサイクルを要する。本明細書で使用される場合、用語「鎖分離 (strand separation)」または「鎖を分離する (separating the strand)」とは、相補的な2本鎖分子が、オリゴヌクレオチドプライマーにアニールするために利用可能な2本の単一の鎖へと分離されるようにする核酸サンプルの処理を意味する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法に従う鎖分離は、核酸サンプルをその融解点 (T_m) を上回って加熱することによって達成される。いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼに適した反応調製物における核酸分子を含むサンプルに関しては、94 °C への加熱は、鎖分離を達成するために十分である。いくつかの実施形態において、適切な反応調製物は、1種またはこれより多くの塩 (例えば、1 ~ 100 mM KCl、0.1 ~ 10 mM MgCl₂)、少なくとも1種の緩衝化剤 (例えば、1 ~ 20 mM Tris-HCl)、およびキャリア (例えば、0.01 ~ 0.5 % BSA) を含む。適切な緩衝液の非限定的な例は、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (25 °C で pH 8.8)、0.5 ~ 3 mM MgCl₂、および 0.1 % BSA を含む。適切な緩衝液のさらなる非限定的な例は、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (25 °C において pH 8.8)、0.5 ~ 5 mM (例えば、およそ 0.5 mM、およそ 1 mM、およそ 2 mM、およそ 3 mM、およそ 4 mM、およそ 5 mM) MgCl₂、および 0.1 % BSA を含む。

【0089】

いくつかの実施形態において、核酸増幅は、標的核酸に特徴的な鎖を有する核酸テンプレートにプライマーをアニールさせることを包含する。いくつかの実施形態において、標的核酸の鎖は、テンプレート核酸として働き得る。本明細書で使用される場合、用語「アニールする (anneal)」とは、2つの核酸の間での1つまたはこれより多くの相補的塩基対の形成をいう。いくつかの実施形態において、アニーリング (annealing) は、2つの相補的または実質的に相補的な核酸鎖が一緒にハイブリダイズすることを要する。いくつかの実施形態において、伸長反応の状況では、アニーリングは、テンプレート依存性ポリメラーゼ酵素のプライマー伸長基質が形成されるように、テンプレートへのプライマーのハイブリダイゼーションを要する。いくつかの実施形態において、アニーリング (例えば、プライマーと核酸テンプレートとの間) の条件は、プライマーの長さおよび配列に基づいて変動し得る。いくつかの実施形態において、アニーリングの条件は、プライマーの T_m (例えば、計算された T_m) に基づく。いくつかの実施形態において、伸長レジメンのアニーリング工程は、鎖分離工程後の温度を、プライマーの T_m (例えば、計算された T_m) に基づく温度へと、このようなアニーリングを可能にするために十分な時間にわたって低下させることを要する。いくつかの実施形態において、 T_m は、多くのアルゴリズム (例えば、OLIGOTM (Molecular Biology Insights Inc., Colorado) プライマーデザインソフトウェアおよび VENTROTM (Invitrogen, Inc., California) プライマーデザインソフトウェアおよびインターネット上で入手可能なプログラム (Primer3、Oligo Calculator、および NetPrimer (Premier Biosoft; Palo Alto, CA; およびワールドワイドウェブ上で (例えば、atpremierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/Help/xnetprlaunch.html において) 無料で入手可能なものが挙げられる) のうちのいずれかを使用して決定され得る。いくつかの実施形態において、プライマーの T_m は、以下の式を使用して計算され得る (これは、NetPrimer ソフトウェアによって使用され、Freier, PNAS 1986 83:9373-9377 (これは、その全体において本明細書に参考として援用される) により詳細に記載される)。

【数1】

$$T_m = \Delta H / (\Delta S + R \cdot \ln(C/4)) + 16.6 \log ([K^+]/(1 + 0.7 [K^+])) - 273.15$$

ここで： Hは、ヘリックス形成のエンタルピーであり； Sは、ヘリックス形成のエントロピーであり； Rは、モル気体定数（ $1.987 \text{ cal} / \text{mol}$ ）であり； Cは、核酸濃度であり；そして $[K^+]$ は、塩濃度である。大部分の増幅レジメンに関して、アニーリング温度は、推定 T_m より約 5 °C 低いように選択されるが、例えば、推定 T_m より 5 °C より大きく低い温度（例えば、6 °C 低い、8 °C 低い、10 °C 低い、またはより低い）であり得るように、 T_m により近く、 T_m を上回る温度（例えば、推定 T_m より 1 °C ~ 5 °C の間または低い、推定 T_m より 1 °C ~ 5 °C の間高い）が使用され得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度が T_m に近いほど、アニーリングはより特異的になる。いくつかの実施形態において、伸長反応の間（例えば、PCR 増幅レジメンの状況内で）プライマーアニーリングに使用される時間は、少なくとも部分的に、反応の容積に基づいて決定される（例えば、容積が大きいほど、より長い時間を要する）。いくつかの実施形態において、伸長反応の間に（例えば、PCR 増幅レジメンの状況内で）プライマーアニーリングに使用される時間は、少なくとも部分的に、プライマーおよびテンプレート濃度に基づいて決定される（例えば、テンプレートに対するプライマーの相対的濃度が高いほど、より低い相対的濃度より、より短い時間を要する）。いくつかの実施形態において、容積および相対的プライマー/テンプレート濃度に依存して、伸長反応における（例えば、増幅レジメンの状況内での）プライマーアニーリング工程は、1 秒 ~ 5 分、10 秒 ~ 2 分、または 30 秒 ~ 2 分の範囲内であり得る。本明細書で使用される場合、「実質的にアニールする（*substantially anneal*）」とは、相補的塩基対が、PCR 増幅レジメンの状況において使用される場合に、特異的に増幅された生成物の検出可能なレベルを生じるために十分である 2 つの核酸の間で形成する程度を指す。

【0090】

本明細書で使用される場合、用語「ポリメラーゼ伸長（*polymerase extension*）」とは、核酸ポリメラーゼによる、核酸テンプレートにアニールされるプライマーの 3' 末端への少なくとも 1 個の相補的ヌクレオチドのテンプレート依存性付加をいう。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼ伸長は、例えば、テンプレートの全長に相当するヌクレオチドまでおよびそれを含む 1 個より多くのヌクレオチドを付加する。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼ伸長の条件は、少なくとも部分的に、使用されるポリメラーゼが何であるかに基づく。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼ伸長に使用されるテンプレートは、その酵素の既知の活性特性に基づく。アニーリング温度がその酵素の至適温度を下回るいくつかの実施形態において、より低い伸長温度を使用することは、許容可能であり得る。いくつかの実施形態において、酵素は、それらの至適伸長温度より下で少なくとも部分的活性を保持し得る。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼ伸長（例えば、Taq ポリメラーゼおよびその改変体のような熱安定性ポリメラーゼで行われる）は、65 °C ~ 75 °C または 68 °C ~ 72 °C で行われる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、PCR 増幅レジメンの各サイクルにおいて核酸テンプレートにアニールされるプライマーのポリメラーゼ伸長を要する。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼ伸長は、比較的強い鎖置換活性を有するポリメラーゼを使用して行われる。いくつかの実施形態において、強い鎖置換を有するポリメラーゼは、融合物（例えば、5' 融合物）を検出する目的で核酸を調製するために有用である。いくつかの実施形態において、5' ~ 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ（例えば、Taq ポリメラーゼ）は、長いライブラリーフラグメントを生成するために有用である。

【0091】

いくつかの実施形態において、プライマー伸長は、アニールしたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長を可能にする条件下で行われる。本明細書で使用される場合、用語「伸長生成物が生成されるようにアニールしたオリゴヌクレオチドの伸長を可能にする条件（*conditions that permit the extension of an a*）

annealed oligonucleotide such that extension products are generated)」とは、核酸ポリメラーゼがプライマー伸長を触媒する条件のセット（例えば、温度、塩および補因子濃度、pH、ならびに酵素濃度）をいう。いくつかの実施形態において、このような条件は、少なくとも部分的に、使用されている核酸ポリメラーゼに基づく。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、適切な反応調製物中でプライマー伸長反応を行い得る。

【0092】

いくつかの実施形態において、適切な反応調製物は、1つまたはこれより多くの塩（例えば、1~100mM KCl、0.1~10mM MgCl₂）、少なくとも1つの緩衝化剤（例えば、1~20mM Tris-HCl）、キャリア（例えば、0.01~0.5% BSA）、および1つまたはこれより多くのNTP（例えば、dATP、dTTP、dCTP、およびdGTPの各々が10~200μM）を含む。条件の非限定的なセットは、ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）がプライマー伸長を触媒する72において50mM KCl、10mM Tris-HCl（25でpH8.8）、0.5~3mM MgCl₂、200μM 各dNTP、および0.1% BSAである。

【0093】

いくつかの実施形態において、適切な反応調製物は、1種またはこれより多くの塩（例えば、1~100mM KCl、0.5~5mM MgCl₂）、少なくとも1種の緩衝化剤（例えば、1~20mM Tris-HCl）、キャリア（例えば、0.01~0.5% BSA）、および1つまたはこれより多くのNTP（例えば、dATP、dTTP、dCTP、およびdGTPの各々が50~350μM）を含む。条件の非限定的なセットは、72において、50mM KCl、10mM Tris-HCl（25においてpH8.8）、3mM MgCl₂、200μM 各dNTP、および0.1% BSAであり、このセットの下で、ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）がプライマー伸長を触媒する。条件のさらなる非限定的なセットは、72において、50mM KCl、10mM Tris-HCl（25においてpH8.8）、3mM MgCl₂、266μM dATP、200μM dCTP、133μM dGTP、200μM dTTP、および0.1% BSAであり、このセットの下で、ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）がプライマー伸長を触媒する。

【0094】

いくつかの実施形態において、開始および伸長の条件は、適切な緩衝液中に、1種、2種、3種または4種の種々のデオキシリボヌクレオシド三リン酸（例えば、dATP、dTTP、dCTP、およびdGTPから選択される）および重合誘導剤（例えば、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素）の存在を含み得る。いくつかの実施形態において、「緩衝液（buffer）」とは、溶媒（例えば、水性溶媒）に加えて、pH、イオン強度などに影響を及ぼす適切な補因子および試薬を含み得る。いくつかの実施形態において、その2種、3種または4種の異なるデオキシリボヌクレオシド三リン酸は、等モルの、またはおよそ等モルの濃度で存在する。いくつかの実施形態において、その2種、3種または4種の異なるデオキシリボヌクレオシド三リン酸は、その技術の特定の実行に適していると経験的に決定された異なる濃度で存在する。

【0095】

いくつかの実施形態において、核酸増幅は、5回まで、10まで、20まで、30まで、40まで、またはこれより多くのラウンド（サイクル）の増幅を要する。いくつかの実施形態において、核酸増幅は、長さが5サイクル~20サイクルのPCR増幅レジメンのサイクルのセットを含み得る。いくつかの実施形態において、増幅工程は、長さが10サイクル~20サイクルのPCR増幅レジメンのサイクルのセットを含み得る。いくつかの実施形態において、各増幅工程は、長さが12サイクル~16サイクルのPCR増幅レジメンのサイクルのセットを含み得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、70未満であり得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、72未満であり得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、約65であり得る

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、約 61 ~ 約 72 であり得る。

【0096】

種々の実施形態において、本明細書で記載される方法および組成物は、本明細書で記載されるプライマーのタイプのうちの1つまたはこれより多くを用いてPCR増幅レジメンを行うことに関する。本明細書で使用される場合、「プライマー (primer)」とは、核酸テンプレートに特異的にアニーリングし、テンプレート依存性ポリメラーゼの基質として働く3'末端を提供して、そのテンプレートに相補的な伸長生成物を生成し得るオリゴヌクレオチドをいう。いくつかの実施形態において、プライマーは、プライマーおよびその相補体が一対を形成して2つの鎖を形成し得るようにする1本鎖である。本明細書に記載される方法および組成物に従うプライマーは、長さが300ヌクレオチド以下であり、例えば、300以下、または250、または200、または150、または100、または90、または80、または70、または60、または50、または40、または30、またはこれより少ない、または20もしくはこれより少ない、または15もしくはこれより少ないが、長さが少なくとも6ヌクレオチドであるハイブリダイゼーション配列 (例えば、核酸テンプレートとアニーリングする配列) を含み得る。いくつかの実施形態において、プライマーのハイブリダイゼーション配列は、長さが6 ~ 50ヌクレオチド、長さが6 ~ 35ヌクレオチド、長さが6 ~ 20ヌクレオチド、長さが10 ~ 25ヌクレオチドであり得る。

10

【0097】

任意の適切な方法が、オリゴヌクレオチドおよびプライマーを合成するために使用され得る。いくつかの実施形態において、市販の供給源は、本明細書で記載される方法および組成物における使用のためのプライマーを提供するために適したオリゴヌクレオチド合成サービス (例えば、INVITROGENTM Custom DNA Oligos (Life Technologies, Grand Island, NY) またはIntegrated DNA Technologies (Coralville, IA) からの特注のDNA Oligo) を提供する。

20

【0098】

標的核酸

本明細書で使用される場合、用語「標的核酸 (target nucleic acid)」および「標的ヌクレオチド配列を含む核酸 (nucleic acid comprising a target nucleotide sequence)」とは、目的の核酸分子 (例えば、分析されるべき核酸) をいう。いくつかの実施形態において、標的核酸は、標的ヌクレオチド配列 (例えば、既知のまたは所定のヌクレオチド配列) および決定されるべき隣接するヌクレオチド配列 (これは、未知の配列といわれ得る) の両方を含む。標的核酸は、任意の適切な長さのものであり得る。いくつかの実施形態において、標的核酸は、2本鎖である。いくつかの実施形態において、標的核酸は、DNAである。いくつかの実施形態において、標的核酸は、ゲノムDNAまたは染色体DNA (gDNA) を含む。いくつかの実施形態において、その標的核酸は、相補的DNA (cDNA) を含む。いくつかの実施形態において、その標的核酸は、1本鎖である。いくつかの実施形態において、標的核酸は、RNA (例えば、mRNA、rRNA、tRNA、cfDNA、cfRNA、長い非コードRNA、マイクロRNA) を含む。

30

40

【0099】

本明細書で記載される方法における使用に適したシーケンシング法のうちの多くは、数十から数百のヌクレオチド塩基の至適リード長でのシーケンシング実行を提供する (例えば、Ion Torrent technologyは、200 ~ 400bpのリード長を生成し得る)。例えば、ゲノムDNAまたはmRNAによって含まれる標的核酸は、この至適リード長より実質的に長い核酸分子によって含まれ得る。第2の増幅工程から生じる増幅された核酸部分が特定のシーケンシング技術における使用のための適切な長さ (例えば、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、1kb、2kb) のものであるために、その既知の標的ヌクレオチド配列とアダプターがライゲーション

50

され得る標的核酸の末端との間の平均距離は、選択された技術の至適リード長に可能な限り近くであるべきである。例えば、所定のシーケンシング技術の至適リード長が200bpである場合、本明細書で記載される方法に従って増幅される核酸分子は、約400bpまたはこれより短い平均長を有するべきである。しかし、いくつかの実施形態において、核酸分子が長さ400bpを超える場合に本明細書で記載される技術が実行され得ることは、認識されるべきである。例えば、いくつかの実施形態において、核酸フラグメントは、およそ400個またはこれより多くのヌクレオチド、500個またはこれより多くのヌクレオチド、600個またはこれより多くのヌクレオチド、700個またはこれより多くのヌクレオチド、800個またはこれより多くのヌクレオチド、900個またはこれより多くのヌクレオチド、1000個またはこれより多くのヌクレオチド、1500個またはこれより多くのヌクレオチド、2000個またはこれより多くのヌクレオチド、2500個またはこれより多くのヌクレオチド、3000個またはこれより多くのヌクレオチド、4000個またはこれより多くのヌクレオチド、5000個またはこれより多くのヌクレオチド、10000個またはこれより多くのヌクレオチドであり得る。

10

【0100】

例えば、ゲノムDNAまたはmRNAによって含まれる標的核酸は、任意の所望のサイズのフラグメントを生成するために、切断され得る（例えば、機械的にまたは酵素により切断され得る）。機械的切断プロセスの非限定的な例としては、超音波処理、ネブライゼーション、およびCovaris (Woburn, MA) から市販されるAFATM切断技術が挙げられる。いくつかの実施形態において、ゲノムDNAによって含まれる標的核酸は、超音波処理によって機械的に切断され得る。

20

【0101】

いくつかの実施形態において、その標的核酸がRNAによって含まれる場合、そのサンプルは、DNAテンプレートを生成するために逆転写酵素レジメンに供され得る。いくつかの実施形態において、次いで、そのDNAテンプレートは、切断され得る。いくつかの実施形態において、そのDNAテンプレートは、切断されない。例えば、いくつかの実施形態において、逆転写酵素レジメンの間に使用されるプライマーの濃度は、生成物cDNAが適切な「フラグメント化(fragmented)」された長さのものであるように調節され得る。いくつかの実施形態において、標的RNAは、逆転写酵素レジメンを行う前に切断され得る。いくつかの実施形態において、標的RNAを含むサンプルは、新鮮なまたは分解された標本のいずれかから抽出された全核酸を使用して；cDNAシーケンシングのためにゲノムDNAを除去する必要性なしに；cDNAシーケンシングのためにリボソームRNAを枯渇させる必要性なしに；工程のうちのいずれかにおける機械的切断または酵素による切断の必要性もなしに；ランダムヘキサマーを使用して2本鎖cDNA合成のためにRNAを供することによって；およびその核酸を末端修復、リン酸化、およびアデニル化に供することによって、本明細書で記載される方法において使用され得る。

30

【0102】

いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列は、遺伝子再編成によって含まれ得る。本明細書で記載される方法は、遺伝子再編成の存在および/または何であるかを決定するために適合される。なぜならその遺伝子再編成の半分のみが何であるかが、先に決定されなければならないからである（すなわち、遺伝子特異的プライマーによって標的化されるべき遺伝子再編成の半分）。いくつかの実施形態において、その遺伝子再編成は、発がん遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態において、その遺伝子再編成は、融合発がん遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態において、その遺伝子再編成は、V(D)J組換え生成物を含み得る。

40

【0103】

本明細書で使用される場合、用語「既知の標的ヌクレオチド配列(known target nucleotide sequence)」または「標的ヌクレオチド配列(target nucleotide sequence)」とは、その配列（例えば、その核酸が何であるかおよびその核酸のヌクレオチド塩基の順序）が既知である標的核酸の一部

50

をいう。例えば、いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列は、既知であるかまたはその核酸の隣接する未知の配列のインターロゲーションより先に決定された核酸のヌクレオチド配列である。既知の標的ヌクレオチド配列は、任意の適切な長さであり得る。

【0104】

いくつかの実施形態において、標的ヌクレオチド配列（例えば、既知の標的ヌクレオチド配列）は、10個もしくはこれより多くのヌクレオチド、30個もしくはこれより多くのヌクレオチド、40個もしくはこれより多くのヌクレオチド、50個もしくはこれより多くのヌクレオチド、100個もしくはこれより多くのヌクレオチド、200個もしくはこれより多くのヌクレオチド、300個もしくはこれより多くのヌクレオチド、400個もしくはこれより多くのヌクレオチド、500個もしくはこれより多くのヌクレオチド、600個もしくはこれより多くのヌクレオチド、700個もしくはこれより多くのヌクレオチド、800個もしくはこれより多くのヌクレオチド、900個もしくはこれより多くのヌクレオチド、1000個もしくはこれより多くのヌクレオチド、1500個もしくはこれより多くのヌクレオチド、2000個もしくはこれより多くのヌクレオチド、2500個もしくはこれより多くのヌクレオチド、3000個もしくはこれより多くのヌクレオチド、4000個もしくはこれより多くのヌクレオチド、5000個もしくはこれより多くのヌクレオチド、10000個もしくはこれより多くのヌクレオチドの長さを有する。いくつかの実施形態において、標的ヌクレオチド配列（例えば、既知の標的ヌクレオチド配列）は、10～100個のヌクレオチド、10～500個のヌクレオチド、10～1000個のヌクレオチド、100～500個のヌクレオチド、100～1000個のヌクレオチド、500～1000個のヌクレオチド、500～5000個のヌクレオチドの範囲の長さを有する。

【0105】

いくつかの実施形態において、方法は、核酸の連続する（または隣接する）部分の配列を決定するために、本明細書で提供される。本明細書で使用される場合、用語「に連続するヌクレオチド配列（*nucleotide sequence contiguous to*）」とは、別のヌクレオチド配列（例えば、既知のヌクレオチド配列）の直ぐ上流または下流にある核酸分子（例えば、標的核酸）のヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列に連続するヌクレオチド配列は、任意の適切な長さのものであり得る。いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列に連続するヌクレオチド配列は、1 kb またはこれより短いヌクレオチド配列、例えば、1 kb またはこれより短いヌクレオチド配列、750 bp またはこれより短いヌクレオチド配列、500 bp またはこれより短いヌクレオチド配列、400 bp またはこれより短いヌクレオチド配列、300 bp またはこれより短いヌクレオチド配列、200 bp またはこれより短いヌクレオチド配列、100 bp またはこれより短いヌクレオチド配列を含む。サンプルが既知の標的ヌクレオチド配列を含む種々の標的核酸（例えば、既知の標的ヌクレオチド配列が、そのゲノムに、または別個の同一でない染色体上に何度も出現する細胞）を含むいくつかの実施形態において、その既知の標的ヌクレオチド配列「に連続するヌクレオチド配列」を含む多数の配列が存在し得る。本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド配列（またはそのヌクレオチド配列）を決定する（*determining a (or the) nucleotide sequence*）」とは、核酸のヌクレオチド塩基が何であるかおよびその相対的位置を決定することを指す。

【0106】

いくつかの実施形態において、既知の標的核酸は、遺伝子再編成から生じる融合配列を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、遺伝子再編成の存在および／または何であるかを決定するために適している。いくつかの実施形態において、遺伝子再編成の1つの部分が何であるかは、先に既知であり（例えば、遺伝子特異的プライマーによって標的化されるべき遺伝子再編成の一部）、他の部分の配列は、本明細書で開示される方法を使用して決定され得る。いくつかの実施形態において、遺伝子再編

10

20

30

40

50

成は、発がん遺伝子を要し得る。いくつかの実施形態において、遺伝子再編成は、融合発がん遺伝子を含み得る。

【0107】

分子バーコードおよびインデックス配列

いくつかの実施形態において、プライマーおよび/またはアダプターは、識別子配列（例えば、バーコード、インデックス）、シーケンシングプライマーハイブリダイゼーション配列（例えば、Rd1）、およびアダプター配列のようなさらなる配列を含み得る。いくつかの実施形態において、そのアダプター配列は、次世代シーケンシングシステムとともに使用される配列である。いくつかの実施形態において、そのアダプター配列は、Illuminaベースのシーケンシング技術のためのP5およびP7配列である。いくつかの実施形態において、そのアダプター配列は、Ion Torrentシーケンシング技術と適合性のP1およびAである。

10

【0108】

いくつかの実施形態において、本明細書で使用される場合、「バーコード (barcode)」、「分子バーコード (molecular barcode)」、および「分子バーコードタグ (molecular barcode tag)」とは、交換可能に使用され得、そして一般に、その特定の核酸に関する識別子として有用であるアダプター核酸（その特定の核酸にアダプター核酸がライゲーションされる）の領域を指す。いくつかの実施形態において、分子バーコードは、その核酸に関して特有の識別子を提供するランダム化した核酸配列（その核酸に対してそのランダム化した核酸配列がライゲーションされる）を含む。いくつかの実施形態において、分子バーコードは、特有のフラグメントを同定し、サンプルに由来するシーケンシングリードを「重複削除する (deduplicate)」ために使用され得る。いくつかの実施形態において、分子バーコードは、PCR重複を同定および除去するために使用され得る。いくつかの実施形態において、分子バーコードは、長さが2~25ヌクレオチド、長さが2~15ヌクレオチド、長さが2~10ヌクレオチド、長さが2~6ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、分子バーコードは、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、または少なくとも25個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、分子バーコードは、8個のヌクレオチドを含む。

20

30

【0109】

いくつかの実施形態において、本明細書で使用される場合、「インデックス (index)」、「インデックス配列 (index sequence)」、「インデックス領域 (index region)」、および「サンプルインデックス (sample index)」とは、交換可能に使用され得、そして一般に、そのライゲーションされた核酸が属する集団に関する識別子として有用であるアダプター核酸の領域を指す。いくつかの実施形態において、インデックスは、共通するライブラリーに属する配列の集まりを同定するために使用され得る固定された核酸配列を含む。例えば、インデックスは、核酸に対応するサンプルを同定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、インデックスは、例えば、共有されるかまたは共通する特性（例えば、ライブラリーの他の核酸の間で共通する）に関連する核酸の供給源識別子、位置識別子、日付もしくは時間識別子（例えば、サンプリングまたは処理の日付もしくは時間）、または他の識別子として使用され得る。いくつかの実施形態において、このようなインデックス配列は、核酸の集団に存在する核酸の異なる局面を同定するために有用である。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、標的核酸に関する供給源または位置識別子を提供し得る。例えば、インデックス配列は、核酸が得られる患者を同定するように働き得る。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、1つの反応（例えば、1つのフローセルで行われる）での多数の異なるサンプルのシーケンシングを可能にする。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、個々のシーケンシング反応を検出する目的で配列イメージャーを配向するために使用され得る。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、長さが

40

50

2 ~ 25ヌクレオチド、長さが2 ~ 15ヌクレオチド、長さが2 ~ 10ヌクレオチド、長さが2 ~ 6ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、インデックスは、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、または少なくとも25個のヌクレオチドを含む。

【0110】

いくつかの実施形態において、テール付加ランダムプライマーの集団が、本明細書で記載される方法に従って使用される場合、多数の区別可能な増幅生成物は、増幅後に存在し得る。いくつかの実施形態において、テール付加ランダムプライマーは、サンプルの核酸分子全体を通じて種々の位置においてハイブリダイズするので、標的特異的プライマーのセットは、1回より多くのハイブリダイゼーション事象によって作られる伸長生成物をハイブリダイズ（および増幅）し得る。例えば、1つのテール付加ランダムプライマーは、標的特異的プライマーハイブリダイゼーション部位から第1の距離（例えば、100ヌクレオチド）においてハイブリダイズし得、別のテール付加ランダムプライマーは、標的特異的プライマーハイブリダイゼーション部位から第2の距離（例えば、200ヌクレオチド）においてハイブリダイズし得、それによって、2つの増幅生成物（例えば、約100bpを含む第1の増幅生成物および約200bpを含む第2の増幅生成物）を生じ得る。いくつかの実施形態において、これらの多数の増幅生成物は各々、次世代シーケンシング技術を使用してシーケンシングされ得る。いくつかの実施形態において、これらの多数の増幅生成物のシーケンシングは、増幅またはシーケンシングプロセスの間に導入される配列エラーを検出するために互いと比較され得る多数の重なり合う配列リードを提供することから有利である。いくつかの実施形態において、個々の増幅生成物（例えば、単一の分子に由来する）が整列され得、それらが特定の塩基において存在する配列の中で異なる場合、PCRおよび/またはシーケンシングのアーチファクトまたはエラーが存在し得る。

【0111】

DNA剪断/フラグメント化

本明細書で記載される核酸分子は、任意の所望のサイズのフラグメントを生成するために、剪断され得る（例えば、機械的にまたは酵素により剪断され得るか、ネブライザーにより剪断され得る）。機械的剪断プロセスの非限定的な例としては、超音波処理、ネブライゼーション、およびCovaris (Woburn, MA) から市販されるAFATM剪断技術が挙げられる。いくつかの実施形態において、核酸は、超音波処理によって機械的に剪断され得る。いくつかの実施形態において、標的核酸は、剪断も消化もされない。いくつかの実施形態において、調製工程の核酸生成物（例えば、伸長生成物、増幅生成物）は、剪断も酵素消化もされない。

【0112】

いくつかの実施形態において、標的核酸配列がRNAを含む場合、そのサンプルは、DNAテンプレートを生成するために逆転写酵素レジメンに供され得、次いで、そのDNAテンプレートは、剪断され得る。いくつかの実施形態において、標的RNAは、逆転写酵素レジメンを行う前に剪断され得る。いくつかの実施形態において、標的RNAを含むサンプルは、新鮮なまたは分解された標本のいずれかから抽出された全核酸を使用して；cDNAシーケンシングのためにゲノムDNAを除去する必要性なしに；cDNAシーケンシングのためにリボソームRNAを枯渇させる必要性なしに；工程のうちのいずれかにおける機械的剪断または酵素による剪断の必要性もなしに；ランダムヘキサマーを使用して2本鎖cDNA合成のためにRNAを供することによって、本明細書で記載される方法において使用され得る。

【0113】

シーケンシング

いくつかの局面において、本明細書で記載される技術は、オリゴヌクレオチドシーケンシングのために核酸サンプルを富化するための方法に関する。いくつかの実施形態において、そのシーケンシングは、次世代シーケンシング法によって行われ得る。本明細書で使用

10

20

30

40

50

される場合、「次世代シーケンシング (next-generation sequencing)」とは、数千から数百万のシーケンシング反応を並行して行いかつ読み取ることにより起因して、従来のシーケンシング法 (例えば、サンガーシーケンシング法) で可能な速度を上回る速度でオリゴヌクレオチドをシーケンシングする能力を有するオリゴヌクレオチドシーケンシング技術をいう。次世代シーケンシング法/プラットフォームの非限定的な例としては、以下が挙げられる: 大規模並行シグネチャーシーケンシング (Massively Parallel Signature Sequencing) (Lynx Therapeutics); 454パイロシーケンシング (454 Life Sciences/Roche Diagnostics); 固相可逆的ダイターミネーターシーケンシング (solid-phase, reversible dye-terminator sequencing) (Solexa/Illumina); SOLiD技術 (Applied Biosystems); イオン半導体シーケンシング (Ion semiconductor sequencing) (ION Torrent); DNAナノボールシーケンシング (Complete Genomics); ならびに Pacific Biosciences、Intelligen Bio-systems、および Oxford Nanopore Technologies から入手可能な技術。いくつかの実施形態において、そのシーケンシングプライマーは、選択された次世代シーケンシング法と適合性の部分を含み得る。次世代シーケンシング技術およびその制約、ならびに関連したシーケンシングプライマーのデザインパラメーターは、当該分野で周知である (例えば、Shendureら, 「Next-generation DNA sequencing」, Nature, 2008, vol. 26, No. 10, 1135-1145; Mardis, 「The impact of next-generation sequencing technology on genetics」, Trends in Genetics, 2007, vol. 24, No. 3, pp. 133-141; Suら, 「Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics」 Expert Rev Mol Diagn, 2011, 11(3): 333-43; Zhangら, 「The impact of next-generation sequencing on genomics」, J Genet Genomics, 2011, 38(3): 95-109; (Nyrén, P.ら Anal Biochem 208: 17175 (1993); Bentley, D. R. Curr Opin Gene t Dev 16: 545-52 (2006); Strausberg, R. L.ら, Drug Disc Today 13: 569-77 (2008); 米国特許第7, 282, 337号; 米国特許第7, 279, 563号; 米国特許第7, 226, 720号; 米国特許第7, 220, 549号; 米国特許第7, 169, 560号; 米国特許第6, 818, 395号; 米国特許第6, 911, 345号; 米国公開番号2006/0252077; 同2007/0070349; および同20070070349を参照のこと; これらは、それらの全体において本明細書に参考として援用される)。

【0114】

いくつかの実施形態において、そのシーケンシング工程は、第1のおよび第2のシーケンシングプライマーの使用に依拠する。いくつかの実施形態において、その第1のおよび第2のシーケンシングプライマーは、本明細書に記載されるとおりの次世代シーケンシング法と適合性であるように選択される。

【0115】

シーケンシングリードをゲノムおよび/またはcDNA配列の既知の配列データベースに整列させるための方法は、当該分野で周知であり、ソフトウェアは、このプロセスのために市販される。いくつかの実施形態において、それらの全体において、野生型配列データベースにマッピングされないリード (より小さいシーケンシングプライマーおよび/またはアダプターヌクレオチド配列) は、ゲノム再編成または大きなインデル変異であり得る

。いくつかの実施形態において、ゲノム中の多数の位置にマッピングされる配列を含むリード（より小さいシーケンシングプライマーおよび／またはアダプターヌクレオチド配列）は、ゲノム再編成であり得る。いくつかの実施形態において、連続する配列、または「コンティグ（contig）」に重なり合うリードのデノボアセンブリが構築され得、シーケンシングリードのアラインメントにおいて利用され得る。いくつかの実施形態において、公にアクセス可能なゲノミクスデータベースに依拠しないホットスポット参照が利用され得る。

【0116】

サンプル

いくつかの実施形態において、核酸（例えば、標的核酸、標的ヌクレオチド配列を含む核酸）は、適切なサンプル（例えば、食品サンプル、環境サンプル、生物学的サンプル、例えば、血液サンプルなど）中に存在するかまたはこれらサンプルから得られる。いくつかの実施形態において、その標的核酸は、被験体から得られる生物学的サンプルである。いくつかの実施形態において、サンプルは、被験体から得られる診断サンプルであり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、タンパク質、細胞、流体、生物学的流体、保存剤、および／または他の物質をさらに含み得る。非限定的な例によれば、サンプルは、口内スワブ、血液、血清、血漿、喀痰、脳脊髄液、尿、涙液、肺胞単離物、胸膜液、心膜液、囊胞液、腫瘍組織、組織、生検物、唾液、吸引物、またはこれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、切除物または生検物によって得られ得る。

【0117】

いくつかの実施形態において、そのサンプルは、遺伝子変化（genetic alteration）と関連する疾患（例えば、がんまたは遺伝性疾患）の処置の必要性のある被験体から得られ得る。いくつかの実施形態において、既知の標的配列は、疾患関連遺伝子に存在する。

【0118】

いくつかの実施形態において、サンプルは、がんの処置の必要性のある被験体から得られる。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、腫瘍細胞の集団、例えば、少なくとも1個の腫瘍細胞を含む。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、腫瘍生検物（非処理の生検組織物または処理生検組織物（例えば、ホルマリン固定および／またはパラフィン包埋した生検組織）が挙げられるが、これらに限定されない）を含む。

【0119】

いくつかの実施形態において、そのサンプルは、新たに集められる。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、本明細書で記載される方法および組成物において使用される前に貯蔵される。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、非処理サンプルである。本明細書で使用される場合、「非処理サンプル（untreated sample）」とは、溶液中での希釈および／または懸濁を除いて、いかなる事前のサンプル事前処理をも有しなかった生物学的サンプルをいう。いくつかの実施形態において、サンプルは、被験体から得られ、本明細書で記載される方法および組成物において利用される前に保存または処理される。非限定的な例によれば、サンプルは、パラフィンワックス中に包埋され得るか、冷蔵され得るか、または凍結され得る。凍結サンプルは、本明細書で記載される方法および組成物に従って、核酸の存在を決定する前に融解され得る。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、処理された（processed or treated）サンプルであり得る。サンプルを処理する（treating or processing）ための例示的な方法としては、遠心分離、濾過、超音波処理、ホモジナイゼーション、加熱、凍結および融解、保存剤（例えば、抗凝固剤またはヌクレアーゼインヒビター）との接触、ならびにこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、サンプルは、化学的および／または生物学的試薬で処理され得る。化学的および／または生物学的試薬は、処理および／または貯蔵の間に、サンプルの安定性またはそのサンプルによって含まれる核酸を保護および／または維持

10

20

30

40

50

するために使用され得る。さらに、または代わりに、化学的および/または生物学的試薬は、そのサンプルの他の構成要素から核酸を放出するために使用され得る。非限定的な例によれば、血液サンプルは、本明細書で記載される方法および組成物において利用される前に、抗凝固剤で処理され得る。核酸分析のためのサンプルの処理、保存、または処理に適切な方法およびプロセスは、本明細書で開示される方法において使用され得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、清澄にした流体サンプルであり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、その清澄にされる流体サンプルを含む上清の低速遠心分離（例えば、 $3,000 \times g$ またはこれより小さい）および収集によって清澄にされ得る。

【0120】

いくつかの実施形態において、サンプル中に存在する核酸は、本明細書で記載される方法および組成物において利用される前に単離され得るか、富化され得るか、または精製され得る。サンプルから核酸を単離、富化、または精製するために適した方法は、使用され得る。例えば、ゲノムDNAを種々のサンプルタイプから単離するためのキットは、市販されている（例えば、カタログ番号51104、51304、56504、および56404；Qiagen；Germantown，MD）。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、例えば、標的核酸のシーケンシングの前に、標的核酸を富化するための方法に関する。いくつかの実施形態において、富化されるべき標的核酸の一方の末端の配列は、シーケンシングの前には知られていない。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、次世代シーケンシング技術を使用してヌクレオチド配列を決定する前に、特定のヌクレオチド配列を富化するための方法に関する。いくつかの実施形態において、特定のヌクレオチド配列を富化するための方法は、ハイブリダイゼーション富化を含まない。

【0121】

標的遺伝子および治療適用

本明細書で記載される技術のいくつかの実施形態において、既知のオリゴヌクレオチド標的配列に連続する配列の決定は、疾患の処置と直接関連する情報を提供し得る。従って、いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法は、疾患を処置することを補助するために使用され得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、遺伝的变化と関連する疾患の処置の必要性のある被験体に由来し得る。いくつかの実施形態において、既知の標的配列は、疾患関連遺伝子、例えば、発がん遺伝子の配列である。いくつかの実施形態において、既知のオリゴヌクレオチド標的配列に連続する配列および/またはその既知のオリゴヌクレオチド標的配列は、疾患に関連する変異または遺伝的異常（例えば、SNP、挿入、欠失、および/または遺伝子再編成）を含み得る。いくつかの実施形態において、サンプル中に存在する既知の標的配列に連続する配列および/または既知の標的配列は、遺伝子再編成生成物の配列を含んだ。いくつかの実施形態において、遺伝子再編成は、発がん遺伝子、例えば、融合発がん遺伝子であり得る。

【0122】

がんのある種の処置は、ある種の発がん遺伝子を含む腫瘍に対して特に有効である。例えば、所定の融合発がん遺伝子の作用または発現を標的化する処置薬剤は、その融合発がん遺伝子を含む腫瘍に対して有効であり得るが、その融合発がん遺伝子を欠く腫瘍に対しては有効でない。本明細書で記載される方法は、発がん遺伝子状態（例えば、変異、SNP、および/または再編成）を明らかにする特定の配列の決定を促進し得る。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、隣接する領域の配列が既知である場合に、特定の配列の決定をさらに可能にし得る。例えば、本明細書で記載される方法は、精密な位置および/または再編成パートナーが、本明細書で記載される方法が行われる前に既知ではない既知の遺伝子（例えば、発がん遺伝子）を要する遺伝子再編成の存在および何であるかを決定し得る。

【0123】

いくつかの実施形態において、被験体は、（例えば、標的化がん治療であるEGFR-TKIを用いた）肺がんの処置の必要性がある。いくつかの実施形態において、例えば、そ

10

20

30

40

50

のサンプルが、肺がんの処置の必要性のある被験体から得られる場合、その既知の標的配列は、A L K、R O S 1、およびR E Tの群から選択される遺伝子に由来する配列を含み得る。よって、いくつかの実施形態において、遺伝子再編成は、A L K、R O S 1、またはR E Tを含む融合物を生じる。A L K、R O S 1、またはR E Tを含む遺伝子再編成の非限定的な例は、例えば、以下に記載される：Sodaら Nature 2007 448 561 - 6；Rikovaら Cell 2007 131:1190 - 1203；Kohnら Nature Medicine 2012 18:375 - 7；Takouchiら Nature Medicine 2012 18:378 - 81；これらは、それらの全体において本明細書に参考として援用される。しかし、再編成に関与する第2の遺伝子の遺伝子再編成の精密な位置および何であるかが予め既知でなくてもよいことは、認識されるべきである。よって、本明細書で記載される方法において、このような再編成の存在および何であるかは、遺伝子再編成に関与する第2の遺伝子の再編成の位置または何であるかを知る必要なしに検出され得る。

【0124】

いくつかの実施形態において、その既知の標的配列は、A L K、R O S 1、およびR E Tの群から選択される遺伝子に由来する配列を含み得る。

【0125】

いくつかの実施形態において、被験体における腫瘍から得られるサンプル中のA L Kの遺伝子再編成の存在は、その腫瘍が以下からなる群より選択される処置での処置に影響を受けやすいことを示し得る：A L Kインヒビター；E G F R；クリゾチニブ（P F - 02341066）；A P 26113；L D K 378；3 - 39；A F 802；I P I - 504；A S P 3026；A P - 26113；X - 396；G S K - 1838705A；C H 5424802；A L Kキナーゼ活性のジアミノおよびアミノピリミジンインヒビター（例えば、N V P - T A E 684およびP F - 02341066（例えば、Galkinら，Proc Natl Acad Sci USA，2007，104:270 - 275；Zouら，Cancer Res，2007，67:4408 - 4417；Hallberg and Palmer F1000 Med Reports 2011 3:21；Sakamotoら，Cancer Cell 2011 19:679 - 690；およびW O 04/079326で開示される分子を参照のこと）。前述の参考文献の全ては、それらの全体において本明細書に参考として援用される。A L Kインヒビターは、A L Kまたはその一部の発現および/またはキナーゼ活性を低減する任意の薬剤（A L Kまたはその一部の発現および/または活性を低減する例えば、オリゴヌクレオチド、低分子、および/またはペプチドを含む）を含み得る。本明細書で 사용되는場合「未分化リンパ腫キナーゼ（anaplastic lymphoma kinase）」または「A L K」とは、代表的には野生型形態におけるニューロン調節に関与する膜貫通チロシンキナーゼ（tyrosine kinase）をいう。A L K遺伝子およびmRNAのヌクレオチド配列は、多くの種（ヒトを含む）に関して公知である（例えば、NCBI Gene ID:238の下で註釈されるとおり）。

【0126】

いくつかの実施形態において、被験体における腫瘍から得られるサンプル中のR O S 1の遺伝子再編成の存在は、腫瘍がR O S 1インヒビターおよび上記で記載されるとおりのA L Kインヒビター（例えば、クリゾチニブ）からなる群より選択される処置での処置に影響を受けやすいことを示し得る。R O S 1インヒビターは、R O S 1またはその一部の発現および/またはキナーゼ活性を低減する任意の薬剤（R O S 1またはその一部の発現および/または活性を低減する、例えば、オリゴヌクレオチド、低分子、および/またはペプチドを含む）を含み得る。本明細書で 사용되는場合「c - r o s発癌遺伝子1（c - r o s oncogene 1）」または「R O S 1」（当該分野ではr o s - 1ともいわれる）とは、sevenlessサブファミリーの膜貫通チロシンキナーゼを指し、これは、P T P N 6と相互作用する。R O S 1遺伝子およびmRNAのヌクレオチド配列は、多くの種（ヒトを含む）に関して公知である（例えば、NCBI Gene ID:6

10

20

30

40

50

098の下で註釈されるとおり)。

【0127】

いくつかの実施形態において、被験体における腫瘍から得られるサンプル中のRETの遺伝子再編成の存在は、その腫瘍が以下からなる群より選択される処置での処置に影響を受けやすいことを示し得る：RETインヒビター；DP-2490、DP-3636、SU5416；BAY 43-9006、BAY 73-4506（レゴラフェニブ）、ZD6474、NVP-AST487、ソラフェニブ、RPI-1、XL184、パンデタニブ、スニチニブ、イマチニブ、バゾパニブ、アキシチニブ、モテサニブ、ゲフィチニブ、およびウィザフェリンA（例えば、Samadira, Surgery 2010 148: 1228-36；Cuccurura, JNCI 2004 13:1006-1014；Akeno-Stuart, Cancer Research 2007 67: 6956；Grazma, J Clin Oncol 2010 28:15s 5559；Mologni, J Mol Endocrinol 2006 37:199-212；Calmomagnora, Journal NCI 2006 98:326-334；Mologni, Curr Med Chem 2011 18:162-175；ならびにWO 06/034833で開示される化合物；米国特許公開2011/0201598および米国特許第8,067,434号で開示される化合物を参照のこと）。前述の参考文献の全ては、それらの全体において本明細書に参考として援用される。RETインヒビターは、RETまたはその一部の発現および/またはキナーゼ活性を低減する任意の薬剤（RETまたはその一部の発現および/または活性を低減する、例えば、オリゴヌクレオチド、低分子、および/またはペプチドを含む）を含み得る。本明細書で使用される場合、「トランスフェクションの間に再編成（rearranged during transfection）」または「RET」とは、神経堤発生に関与し、グリア細胞由来神経栄養因子ファミリーシグナル伝達分子を認識するカドヘリンスーパーファミリーのレセプターチロシンキナーゼをいう。RET遺伝子およびmRNAのヌクレオチド配列は、多くの種（ヒトを含む）に関して公知である（例えば、NCBI Gene ID: 5979の下で註釈されるとおり）。

【0128】

いくつかの実施形態において、その既知の標的配列は、表2から選択される遺伝子を含み得る。

【0129】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2. 既知の標的配列

遺伝子	転写物 NCBI 参照配列 (RefSeq)	エキソン	方向	タイプ
AKT3	NM_005465	1、2、3	5'	融合
ALK	NM_004304	19、(イントロン 19)、20、 21、22	5'	融合
ARHGAP26	NM_015071	2、10、11、12	5'	融合
AXL	NM_021913	19、20	3'	融合
BRAF	NM_004333	7、8	3'	融合
BRAF	NM_004333	7、8、9、10、11、12	5'	融合

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

BRAF	NM_004333	15	5'	融合
BRAF	NM_004333	V600E	n/a	変異
BRD3	NM_007371	9、10、11、12	3'	融合
BRD4	NM_014299	10、11	3'	融合
EGFR	NM_005228	7、9、16、20	5'	融合
EGFR	NM_005228	8 (エキソン 2～7 スキッピング事象)	n/a	変異
EGFR	NM_005228	24、25	3'	融合
ERG	NM_004449	2、3、4、5、6、7、8、9、 10、11	5'	融合
ESR1	NM_001122742	3、4、5、6	3'	融合
ETV1	NM_004956	3、4、5、6、7、8、9、10、 11、12、13	5'	融合
ETV4	NM_001986	2、4、5、6、7、8、9、10	5'	融合
ETV5	NM_004454	2、3、7、8、9	5'	融合
ETV6	NM_001987	1、2、3、4、5、6	3'	融合
ETV6	NM_001987	2、3、5、6、7	5'	融合
EWSR1	NM_005243	4、5、6、7、8、9、10、11、 12、13、14	3'	融合
FGFR1	NM_015850	2、8、9、10、17	5'	融合

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

FGFR2	NM_000141	2、8、9、10	5'	融合
FGFR2	NM_000141	17	3'	融合
FGFR3	NM_000142	17、イントロン 17	3'	融合
FGFR3	NM_000142	8、9、10	5'	融合
FGR	NM_005248	2	5'	融合
INSR	NM_000208	20、21、22	3'	融合
INSR	NM_000208	12、13、14、15、16、17、 18、19	5'	融合
MAML2	NM_032427	2、3	5'	融合
MAST1	NM_014975	7、8、9、18、19、20、21	5'	融合
MAST2	NM_015112	2、3、5、6	5'	融合
MET	NM_000245	13	3'	融合
MET	NM_000245	13、15 (エキソン 14 スキッピング事象)	n/a	変異
MSMB	NM_002443	2、3、4	3'	融合
MUSK	NM_005592	7、8、9、11、12、13、14	5'	融合
MYB	NM_001130173	7、8、9、11、12、13、14、 15、16	3'	融合
NOTCH1	NM_017617	2、4、29、30、31	3'	融合

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

NOTCH1	NM_017617	26、27、28、29 (内部 エキソン 3~27 欠失)	5'	融合
NOTCH2	NM_024408	5、6、7	3'	融合
NOTCH2	NM_024408	26、27、28	5'	融合
NRG1	NM_004495	1、2、3、6	5'	融合
NTRK1	NM_002529	8、10、11、12、13	5'	融合
NTRK2	NM_006180	11、12、13、14、15、16、 17	5'	融合
NTRK3	NM_002530	13、14、15、16	5'	融合
NTRK3	NM_001007156	15	5'	融合
NUMBL	NM_004756	3	5'	融合
NUTM1	NM_175741	3	5'	融合
PDGFRA	NM_006206	7 (エキソン 8 欠失)	n/a	変異
PDGFRA	NM_006206	10、11、12、13、14、	5'	融合
PDGFRA	NM_006206	T674I、D842V	n/a	変異
PDGFRB	NM_002609	8、9、10、11、12、13、14	5'	融合
PIK3CA	NM_006218	2	5'	融合
PKN1	NM_002741	10、11、12、13	5'	融合

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

PPARG	NM_015869	1、2、3	5'	融合
PRKCA	NM_002737	4、5、6	5'	融合
PRKCB	NM_002738	3	5'	融合
RAF1	NM_002880	4、5、6、7、9	3'	融合
RAF1	NM_002880	4、5、6、7、9、10、11、12	5'	融合
RELA	NM_021975	3、4	5'	融合
RET	NM_020630	8、9、10、11、12、13	5'	融合
ROS1	NM_002944	31、32、33、34、35、36、 37	5'	融合
RSPO2	NM_178565	1、2	5'	融合
RSPO3	NM_032784	2	5'	融合
TERT	NM_198253	2	5'	融合
TFE3	NM_006521	2、3、4、5、6	3'	融合
TFE3	NM_006521	2、3、4、5、6、7、8	5'	融合
TFEB	NM_007162	1、2	5'	融合
THADA	NM_022065	28	3'	融合
TMPRSS2	NM_005656	1、2、3、4、5、6	3'	融合
TMPRSS2	NM_001135099	1	3'	融合

【0130】

本明細書で記載される方法の適用のさらなる非限定的な例としては、造血悪性腫瘍マーカーおよびその一団の検出（例えば、リンパ腫および白血病においてゲノム再編成を検出するものが挙げられる）、肉腫関連ゲノム再編成およびその一団の検出；ならびにリンパ腫検査のためのIGH/TCR遺伝子再編成およびその一団の検出が挙げられる。

【0131】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、例えば、がんを有するまたはがんを有すると診断された被験体を、がんの処置で処置することに関する。がんを有する被験体は、がんを診断するための現在の方法を使用して医師によって同定され得る。

例えば、肺がんの状態を特徴付けかつ診断を補助する、肺がんの症状および/または合併症は、当該分野で周知であり、呼吸の虚弱 (weak breathing)、鎖骨上リンパ節腫脹、肺の異常音、胸部を軽くたたいた場合の濁音 (dullness) および胸痛が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、肺がんの診断を補助し得る検査としては、x線、高レベルのある種の物質 (例えば、カルシウム) に関する血液検査、CTスキャン、および腫瘍生検が挙げられるが、これらに限定されない。肺がんの家族歴、または肺がんのリスク因子への曝露 (例えば、喫煙または煙および/もしくは空気汚染への曝露) はまた、被験体が肺がんを有するようであるか否かを決定するか、または肺がんの診断を行うことを補助し得る。

【0132】

がんとしては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：癌腫 (腺がん、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、白血病、扁平細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、消化管がん、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、脾臓がん、膠芽腫、基底細胞がん、胆管がん、膀胱がん、脳のがん (膠芽腫および髄芽腫が挙げられる) が挙げられる)；乳がん、子宮頸がん、絨毛がん；結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、子宮内膜がん；食道がん、胃がん；種々のタイプの頭頸部がん、上皮内新生物 (ボーエン病およびバジネット病が挙げられる)；血液新生物 (急性リンパ性白血病および骨髄性白血病が挙げられる)；カポジ肉腫、ヘアリーセル白血病；慢性骨髄性白血病、AIDS 関連白血病および成人 T 細胞白血病リンパ腫；腎臓がん (例えば、腎細胞がん)、T 細胞急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫、リンパ腫 (ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫が挙げられる)；肝臓がん (例えば、肝臓癌腫および肝細胞がん)、メル血細胞がん、黒色腫、多発性骨髄腫；神経芽腫；口腔がん (扁平上皮がんが挙げられる)；卵巣がん (上皮細胞に由来するものが挙げられる)、肉腫 (平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫 (fibrosarcoma)、および骨肉腫が挙げられる)；脾臓がん；皮膚がん (黒色腫、間質細胞、胚細胞および間葉系細胞が挙げられる)；前立腺がん (prostate cancer)、直腸がん；外陰部がん (vulval cancer)、腎がん (腺癌を含む)；精巣がん (胚細胞腫瘍 (例えば、精上皮腫、非精上皮腫 (奇形腫、絨毛がん)、間質腫瘍、および胚細胞腫瘍が挙げられる)；甲状腺がん (甲状腺腺がんおよび髄様がんを含む)；食道がん、唾液腺がん、およびウィルムス腫瘍。いくつかの実施形態において、そのがんは、肺がんであり得る。

【0133】

多重方法

本明細書で記載される方法は、多重形式で使用され得る。本明細書で記載される方法の実施形態において、多重適用は、1つまたはこれより多くの既知の標的ヌクレオチド配列に連続するヌクレオチド配列を決定することを含み得る。本明細書で使用される場合、「多重増幅 (multiplex amplification)」とは、1つまたはこれより多くの反応容器において1より多くの標的核酸の同時増幅を包含するプロセスをいう。いくつかの実施形態において、方法は、プライマーの1つまたはこれより多くのセットを使用して、多重増幅生成物の配列のその後の決定を包含する。多重とは、約 2 ~ 1,000 個の間の異なる標的配列を1つの反応において検出することを指し得る。しかし、いくつかの実施形態において、多重とは、1つの反応での約 1,000 ~ 10,000 個の間の異なる標的配列の検出に指し得る。いくつかの実施形態において、多重とは、1つの反応での約 10,000 ~ 100,000 個の間の異なる標的配列の検出を指し得る。本明細書で使用される場合、多重とは、2 ~ 1,000 個の間の任意の範囲、例えば、5 ~ 500 個、25 ~ 1,000 個、または 10 ~ 100 個などの間の異なる標的配列を1つの反応において検出することを言う。PCR に当てはまる場合の用語「多重 (multiplex)」とは、同じ PCR 反応において少なくとも2個の異なる標的配列に特異的なプライマーが存在することを示唆する。

【0134】

いくつかの実施形態において、サンプル中の標的核酸、またはサンプルの別個の部分は、

10

20

30

40

50

複数のプライマー（例えば、複数の第1のおよび第2の標的特異的プライマー）で増幅され得る。いくつかの実施形態において、その複数のプライマー（例えば、複数の第1のおよび第2の標的特異的プライマー）は、1つの反応混合物中に存在し得る。例えば、多数の増幅生成物は、同じ反応混合物中で生成され得る。いくつかの実施形態において、その複数のプライマー（例えば、第1のおよび第2の標的特異的プライマーの複数のセット）は、別個の遺伝子によって含まれる既知の標的配列に特異的にアニールし得る。いくつかの実施形態において、少なくとも2セットのプライマー（例えば、少なくとも2セットの第1のおよび第2の標的特異的プライマー）は、既知の標的配列の異なる部分に特異的にアニールし得る。いくつかの実施形態において、少なくとも2セットのプライマー（例えば、少なくとも2セットの第1のおよび第2の標的特異的プライマー）は、1つの遺伝子によって含まれる既知の標的配列の異なる部分に特異的にアニールし得る。いくつかの実施形態において、少なくとも2セットのプライマー（例えば、少なくとも2セットの第1のおよび第2の標的特異的プライマー）は、既知の標的配列を含む遺伝子の異なるエクソンに特異的にアニールし得る。いくつかの実施形態において、その複数のプライマー（例えば、第1の標的特異的プライマー）は、同一の5'タグ配列部分を含み得る。

【0135】

本明細書で記載される方法の実施形態において、多重適用は、1つのシーケンシング反応またはシーケンシング実行において多数のサンプル中の1つまたはこれより多くの既知の標的ヌクレオチド配列に連続するヌクレオチド配列を決定する工程を包含し得る。いくつかの実施形態において、多数のサンプルは、異なる起源のもの、例えば、異なる組織および/または異なる被験体由来のものであり得る。このような実施形態において、プライマー（例えば、テール付加ランダムプライマー）は、バーコード部分をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、特有のバーコード部分を有するプライマー（例えば、テール付加ランダムプライマー）は、各サンプルに添加され得、その中の核酸にライゲーションされ得る；そのサンプルはその後、プールされ得る。このような実施形態において、増幅生成物の各得られたシーケンシングリードは、増幅生成物が由来するテンプレート核酸を含むサンプルを同定するバーコードを含む。

【実施例】

【0136】

以下の実施例は、本発明のある種の局面を含め、本明細書で記載されるある種の実施形態を例証することが意図されるが、本発明の全範囲を例示するわけではない。

【0137】

実施例1：技術特異的アダプター核酸のデザイン

種々の次世代シーケンシング技術における使用に適したアダプター核酸および相当するアダプタープライマーを、デザインし生成した。

Illumina特異的適用において使用され得るアダプター核酸およびアダプタープライマーの例は、以下に示される：

Illumina特異的アダプター核酸およびアダプタープライマー

トップ（増幅）鎖（5' 3'）：

AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACATCCGTACACA
CTCTTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNA
CCGCCAGGAG* T（配列番号1）（ここで「N」は、分子バーコード配列のヌクレオチドを表し、「* T」は、ホスホチオエート結合を有するTを表す）

ボトム（ブロッキング）鎖（5' 3'）：

5phosCTCCTGGCGGTTt（配列番号2）（ここで「t」は、改変チミン核塩基（例えば、逆方向チミン（inverted thymine）を表す）

第1のアダプタープライマー（5' 3'）：

AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTA（配列番号3）

第2のアダプタープライマー（5' 3'）：

ATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACAC（配列番号4）

【0138】

示されるように、その第1のおよび第2のアダプタープライマーは、そのトップ（増幅）鎖の一部と同一の配列を含む。このデザインの結果として、各プライマーは、第1のおよび第2のPCR工程の間に、それぞれ、第1のおよび第2の標的特異的プライマーによって生成される相補鎖をプライムオフし得る。この実施例における第2のアダプタープライマーは、2個のさらなるヌクレオチドを含み、その第1のアダプタープライマーに対してネスト化される。

【0139】

イオン半導体特異的適用において使用され得るアダプター核酸およびアダプタープライマーの例は、以下に示される：

10

イオン特異的アダプター核酸およびアダプタープライマー

トップ（増幅）鎖（5' 3'）：

CCATCTCATCCCTGCGTGTCCTCCGACTCAGCTAAGGTAAC
NNNNNNNNNGCTCTTCCGATC* T（配列番号5）（ここで「N」は、分子
バーコード配列のヌクレオチドを表し、「* T」は、ホスホチオエート結合を有するTを
表す）

ボトム（ブロッキング）鎖（5' 3'）：

5phosGATCGGAAGAGCt（配列番号6）（ここで「t」は、改変チミン核
塩基（例えば、逆方向チミン）を表す）

第1のアダプタープライマー（5' 3'）：

20

CCATCTCATCCCTGCGTGTC（配列番号7）

第2のアダプタープライマー（5' 3'）：

CCATCTCATCCCTGCGTGTCCTCCGACTCAG（配列番号8）

【0140】

示されるように、その第1のおよび第2のアダプタープライマーは、そのトップ（増幅）鎖の一部と同一の配列を含む。このデザインの結果として、各プライマーは、第1のおよび第2のPCR工程の間に、それぞれ、第1のおよび第2の標的特異的プライマーによって生成される相補鎖をプライムオフし得る。この実施例における第2のアダプタープライマーは、10個のさらなるヌクレオチドを含み、その第1のアダプタープライマーに対してネスト化される。

30

【0141】

実施例2：分析用の核酸サンプルの調製

分析用の核酸サンプルを調製するための方法を図示する作業フローの例は、図5に示される。RNA分子のサンプルを、ランダムプライマーとアニールする。このアニーリングは、例えば、ランダムヘキサマーをそのサンプルに添加し、続いて、65℃において5分間加熱することによって達成され得る。アニーリング後に、第1鎖cDNA合成を、プライマー伸長によって（例えば、室温において）逆転写酵素を使用して達成して、DNA/RNAハイブリッドを生成する。

【0142】

この点において、「PreSeq」RNA-QCアッセイを行って、ライブラリー複雑性を評価し得る。このアッセイを使用して、600ngのランダムヘキサマー（65℃において5分間アニールされる）を、100ngのランダムヘキサマー（65℃において5分間アニールされる）の使用と比較した。「Ct」値の決定は、ライブラリー複雑性の示度および後の工程の間の分子バーコードインフレーションの確率の推定を提供する。一般に、28という閾値Ctが、ベンチマークとして使用され、この閾値未満の値が最も望ましい。ランダムプライマー濃度を増大させることは、有利なことには、Ctを最小化することが見出された。

40

【0143】

選択肢的なPreSeqアッセイ後に、例えば、そのサンプルをRnaseHで処理することによってDNA/RNAハイブリッドのRNAを切断する。そのDNAにハイブリ

50

ダイズしたままのRNAの得られたフラグメントは、第2鎖cDNA合成のプライマーとして働く。これは、DNA Pol Iを使用し、そのサンプルを例えば、16 で60分間インキュベートして達成される。この期間の後に、DNA Pol Iを熱によって（例えば、そのサンプルを75 で20分間インキュベートすることによって）不活性化する。DNA Pol Iの熱不活性化は、その後のサンプル調製工程においてサンプル完全性を大きく増大させることが見出された。

【0144】

図6に示されるように、DNA Pol Iの熱不活性化は、熱不活性化なしと比較した場合に、第2鎖合成後のゲルクロマトグラフィーによって遙かによりはっきりとしたバンドを示すサンプルを生じた。DNA Pol Iは、末端修復の間に活性になり、その5' 3' および/または3' 5' エキソヌクレアーゼ活性に起因してフラグメントを損傷していると仮定される - 第2鎖合成後のDNA Pol Iの熱不活性化は、これが起こることを防止する。

【0145】

その2本鎖cDNAサンプルは、末端修復に供されて、そのcDNAを平滑末端化し、5' 末端をリン酸化する。この工程では、過剰のT4 DNAポリメラーゼおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを、十分なdNTPとともにサンプルに添加し、インキュベートすることを可能にする（例えば、25 で30分間）。この期間後のAMPureクリーンアップ（2.5x）は重要である。なぜならそれは、ビオチン標識dATPでテール付加する前に、残りのdATPをそのライブラリー調製物から除去するからである。このクリーンアップ工程は、ライブラリーフラグメントをビオチン-dATPの代わりにdATPで標識することを防止し、これは、捕捉工程の間に誤って標識されたフラグメントの喪失を生じる。

【0146】

そのライブラリーフラグメントは、Klenowフラグメント（3' - 5' エキソ - ）を使用する第1のライゲーション工程において、3' 末端にビオチン標識dATPでAテール付加される。これは、例えば、そのサンプルおよび必要な構成要素を37 で15分間インキュベートすることによって達成され得る。Aテール付加後のAMPureクリーンアップ（2.5x）は重要である。なぜならそれは、その捕捉工程の前に、そのライブラリー調製物から残りのビオチン標識dATPを除去するからである。このクリーンアップは、遊離ビオチン-dATPを、ストレプトアビジン結合部位を飽和させることから防止し、捕捉の間のライブラリーフラグメントの喪失を生じる。

【0147】

第2のライゲーション工程では、アダプター核酸は、ビオチン-Aテール付加ライブラリーフラグメントにDNAリガーゼを使用してライゲーションされる。興味深いことに、クレンジング剤をそのライゲーション混合物に添加すると、全ての末端塩基にわたってライゲーション効率が大きく増大されることを見出した。図7に示されるように、5' 末端塩基に関係なく、10% PEGを含めると、二重にライゲーションしたフラグメント（L2）を増大させると同時に、ライゲーションしなかったフラグメント（なし）および1つライゲーションしたフラグメント（L1）がさらに最小化された。さらに、10% PEGでのアダプターライゲーションは、60分間で行われる「標準」プロトコルと比較して、5分間で達成された。さらなるデータは、20% PEGがライゲーション効率をさらにもっと改善することを示した（示さず）。

【0148】

図8Aは、これらの実験において使用される核酸アダプターを示す。示されるように、そのトップ鎖（増幅鎖）は、5' 3' において、ユニバーサルアダプタープライマー部位領域、サンプルインデックス領域、シーケンシングプライマー部位領域、分子バーコード領域、3' 二重鎖部分、および3' Tオーバーハングを含む。そのボトム鎖（ブロッキング鎖）は、そのトップ鎖の3' 二重鎖部分と二重鎖化される共通領域、5' リン酸化末端、およびその鎖の伸長を防止する逆方向dT塩基を含む。

10

20

30

40

50

【0149】

アダプターライゲーション後に、ライゲーションクリーンアップは、ストレプトアビジン被覆ビーズを介するライブラリーフラグメントの捕捉によって行われる。これは、M - 280 ストレプトアビジンダイナビーズ (PBS + 0.1% BSA + 0.02% アジド中で貯蔵された 10 mg/mL 濃度) を使用して行われる。その貯蔵緩衝液は、そのサンプルにそのビーズを添加する前に、ライゲーションクリーンアップ緩衝液 (1M NaCl、1mM EDTA、0.1% Tween、10mM Tris pH8) と交換される。そのライゲーションされたDNA生成物 (50 µL) は、ライゲーションクリーンアップビーズと混合される (合計 100 µL に対して 50 µL)。磁場は、その後、そのサンプルに印加されて、ライブラリーフラグメントを捕捉し、この上清は除去される。次いで、ライブラリーが結合したビーズは、第1のPCR工程のために別個の構成要素混合物に移される。

10

【0150】

第1のPCRラウンドは、第1の標的特異的プライマーおよび第1のアダプタープライマーを使用して行われる。その第1のアダプタープライマーは、これがその第1の標的特異的プライマーによって生成される相補鎖にアニールするように、その増幅鎖のうちの少なくとも一部と同一である。第2のPCRラウンドは、第2の標的特異的プライマーおよび第2のアダプタープライマーを使用して行われ、そのうちの後者は同様に、その増幅鎖の一部と同一である。その第2の標的特異的プライマーは、その第1の標的特異的プライマーに対してネスト化され、さらなるプライマーによってさらに接触される。

20

【0151】

図8Bに示されるように、その第2の標的特異的プライマーは、標的特異的領域にハイブリダイズしない5'テールを含む。5'テールと同一の領域とともに、第2のサンプルインデックス領域およびシーケンシングアダプター領域を含むさらなるプライマーが、含まれる。このようにして、その第2の標的特異的プライマーは、共通しないテール付加領域を有する相補鎖を生成するために、そのテンプレート鎖をプライムオフする。その第1のPCRラウンドにおけるように、その第2のアダプターは、そのテンプレート鎖のコピーを生成するために、この相補鎖をプライムオフする。そのテンプレート鎖のこのコピーは、その5'テール配列に相補的な領域を含むので、その第2のサンプルインデックス領域およびシーケンシングアダプター領域を含むさらなるプライマーは、シーケンシングの準備のできたボトム鎖を生成するために、この配列をプライムオフする。

30

【0152】

均等物

いくつかの発明の実施形態は、本明細書で記載および例証されてきたが、当業者は、その機能を行うならびに/または結果および/もしくは本明細書で記載される利点のうちの1つもしくはこれより多くを得るための、種々の他の手段および/または指示を容易に想定し得、このようなバリエーションおよび/または改変の各々は、本明細書に記載される本発明の実施形態の範囲内にあると見做される。より一般には、当業者は、本明細書で記載される全てのパラメーター、寸法、物質、および構成が、例示的であることが意味され、その実際のパラメーター、寸法、物質、および/または構成が、本発明の教示が使用される特定の適用に依存することを容易に認識する。当業者は、慣用的に過ぎない実験を使用して、本明細書で記載される発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するかまたは確認し得る。従って、前述の実施形態が例示によって提示されるに過ぎず、そして添付の請求項およびその均等物の範囲内で、本発明の実施形態が具体的に記載されかつ請求項に記載されるとおりのもの以外の方法で実施され得ることは、理解されるべきである。本開示の発明の実施形態は、本明細書で記載される各個々の特徴、システム、物品、物質、キット、および/または方法に関する。さらに、2つまたはこれより多くのこのような特徴、システム、物品、物質、キット、および/または方法の任意の組み合わせは、このような特徴、システム、物品、物質、キット、および/または方法が相互に矛盾しなければ、本開示の発明の範囲内に含まれる。

40

50

【0153】

全ての定義（本明細書で定義され使用されるとおり）は、辞書の定義、参考として援用される文書中の定義、および／またはその定義された用語の通常の意味に優先すると理解されるべきである。

【0154】

本明細書で開示される全ての参考文献、特許および特許出願は、各々が引用される、いくつかの場合には、その文書の全体を包含し得る主題に関して参考として援用される。

【0155】

不定冠詞「1つの、ある（a）」および「1つの、ある（an）」は、本明細書においておよび特許請求の範囲においてここに使用される場合、そうでないことが明確に示されなければ、「少なくとも1」を意味することが理解されるべきである。

10

【0156】

語句「および／または（and / or）」は、本明細書においておよび特許請求の範囲においてここに使用される場合、そのように結合された要素のうちの「いずれかまたは両方（either or both）」、すなわち、いくつかの場合には結合的に存在し、他の場合には分離して存在する要素を意味することが理解されるべきである。「および／または」とともに列挙される多数の要素は、同じ様式で、すなわち、そのように結合されたその要素のうちの「1またはこれより多く」と解釈されるべきである。他の要素は、必要に応じて、具体的に識別されるそれら要素に関連しようが関連しまいが、その「および／または」節によって具体的に識別される要素以外に存在し得る。従って、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」への言及は、「含む（comprising）」のような制約のない文言とともに使用される場合、一実施形態において、Aのみ（必要に応じて、B以外の要素を含む）；別の実施形態において、Bのみ（必要に応じて、A以外の要素を含む）；さらに別の実施形態においてAおよびBの両方（必要に応じて、他の要素を含む）；などを言及し得る。

20

【0157】

本明細書においておよび特許請求の範囲においてここに使用される場合、「または（or）」は、上記で定義されるとおりの「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リストの中で項目を分離する場合、「または」または「および／または」は、包括的である、すなわち、多くの要素または要素のリストのうちの少なくとも1（しかし1より多くを含む）、そして必要に応じて、さらなる列挙されない項目をも包含すると解釈されるものとする。そうでないことが明確に示される用語のみ、例えば、「のうちの1のみ（only one of）」もしくは「のうちの正確に1（exactly one of）」、または請求項において使用される場合に、「からなる（consisting of）」は、多くの要素または要素のリストのうちの正確に1つの要素の包含に言及する。一般に、用語「または」は、本明細書で使用される場合、排他的な用語（例えば、「いずれか（either）」、「のうちの1（one of）」、「のうちの1のみ」、または「のうちの正確に1」が先行する時に排他的な選択肢（すなわち、「一方または他方であるが、両方ではない（one or the other but not both）」を示すと解釈されるに過ぎないものとする。「から本質的になる（consisting essentially of）」とは、特許請求の範囲において使用される場合、特許法の分野で使用されるとおりのその通常の意味を有するものとする。

30

40

【0158】

本明細書においておよび特許請求の範囲においてここに使用される場合、1つまたはこれより多くの要素のリストへの言及において語句「少なくとも1（at least one）」とは、要素のリスト中にある要素のうちのいずれか1つまたはこれより多くから選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであるが、要素のリスト内に具体的に列挙される各要素およびあらゆる要素のうちの少なくとも1を必ずしも含むわけではなく、要素のリスト中にある要素の任意の組み合わせを排除しない。この定義はまた、具体的に識別されるそれら要素に関連しようが関連しまいが、要素のリスト（これに対

50

して文言「少なくとも1」が指す)内で具体的に識別される要素以外の要素が必要に応じて存在し得ることを可能にする。従って、非限定的な例としては、「AおよびBのうちの少なくとも一方(at least one of A and B)」、「または、等しくは、「AまたはBのうちの少なくとも一方(at least one of A or B)」、または、等しくは、「Aおよび/またはBのうちの少なくとも一方(at least one of A and/or B)」は、一実施形態において、少なくとも1つの(必要に応じて、1つより多くを含む)AであってBは存在しない(および必要に応じて、B以外の要素を含む)に；別の実施形態において、少なくとも1つの(必要に応じて、1つより多くを含む)Bであって、Aは存在しない(および必要に応じて、A以外の要素を含む)；さらに別の実施形態において、少なくとも1つの(必要に応じて、1つより多くを含む)A、および少なくとも1つの(必要に応じて、1つより多くを含む)B(および必要に応じて、他の要素を含む)；などを指し得る。

10

【0159】

そうでないと明らかに示されなければ、1より多くの工程または行為を含む本明細書で請求項に記載される任意の方法において、その方法の工程または行為の順序は、その方法の工程または行為が記載される順序に必ずしも限定されないことはまた、理解されるべきである。

【0160】

請求項において、上記の明細書においても同様に、全ての移行句(例えば、「含む、包含する(comprising)」、「含む、包含する(including)」、「有する(carrying)」、「有する(having)」、「含む、含有する(containing)」、「包含する(involving)」、「保持する(holding)」、「から構成される(composed of)」などは、制約がないこと、すなわち、が挙げられるが、これらに限定されないことを意味すると理解されるべきである。移行句「からなる」および「から本質的になる」のみが、米国特許審査基準2111.03節に示されるように、それぞれ、制約のあるまたは半制約の移行句であるものとする。制限のない移行句(例えば、「含む、包含する」)を使用するこの文書中で記載される実施形態が、代替の実施形態において、その制限のない移行句によって記載される「からなる(constituting of)」および「から本質的になる(constituting essentially of)」の特徴としても企図されることは、認識されるべきである。例えば、本開示が「AおよびBを含む組成物(composition comprising A and B)」を記載する場合、本開示はまた、代替の実施形態、「AおよびBからなる組成物(composition consisting of A and B)」および「AおよびBから本質的になる組成物(composition consisting essentially of A and B)」を企図する。

20

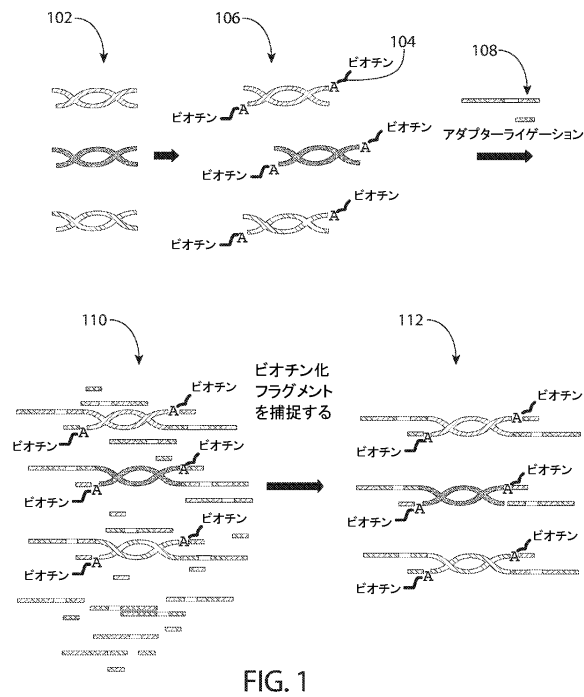
30

40

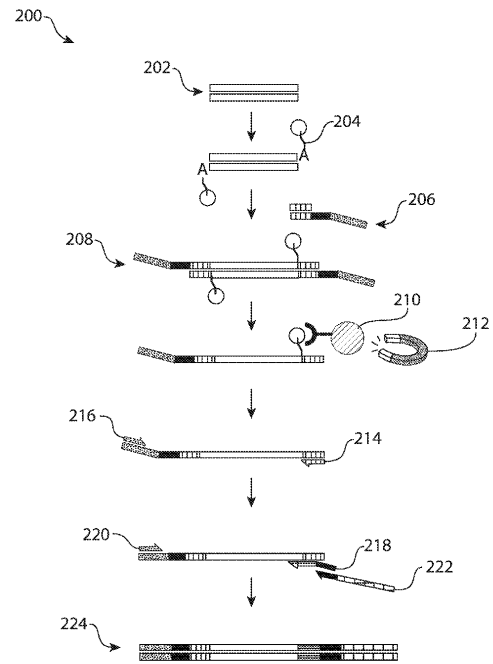
50

【図面】

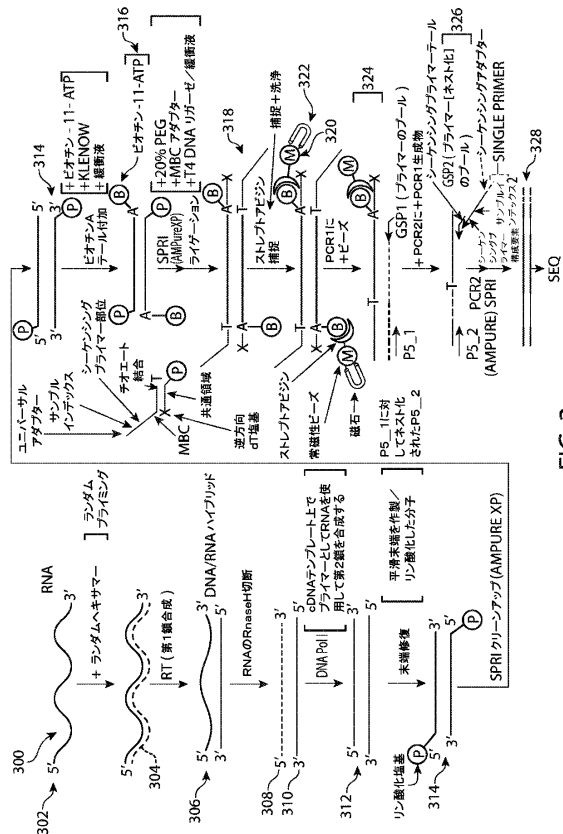
【図 1】



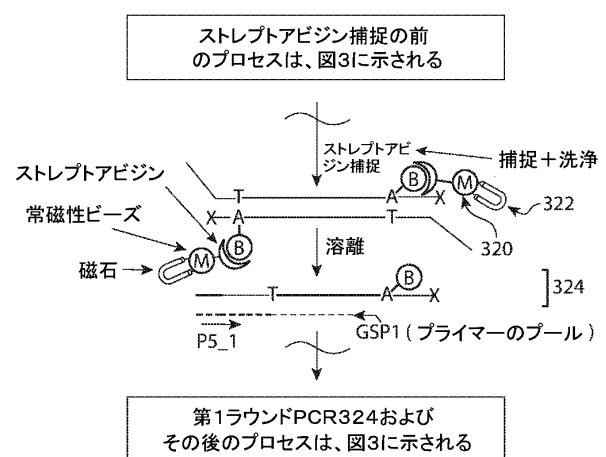
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

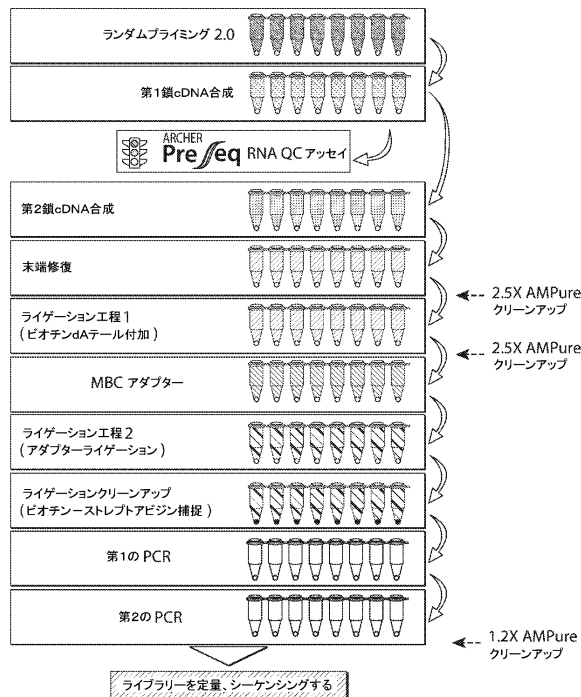


FIG. 5

【図 6】

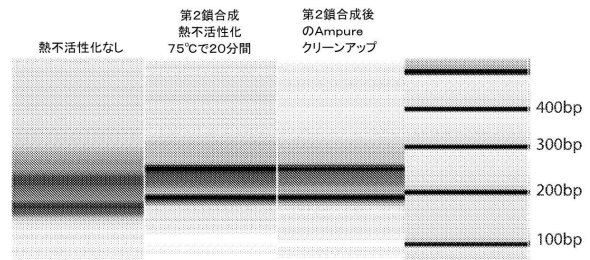


FIG. 6

【図 7】

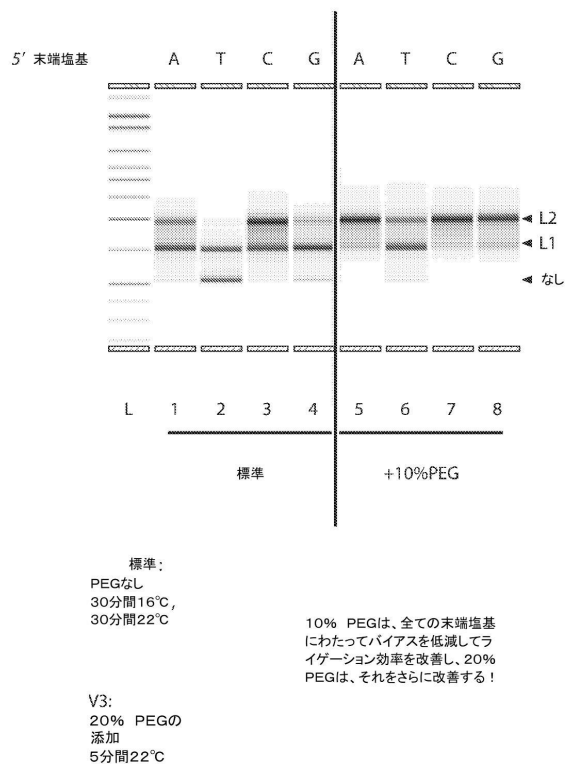


FIG. 7

【図 8 A】

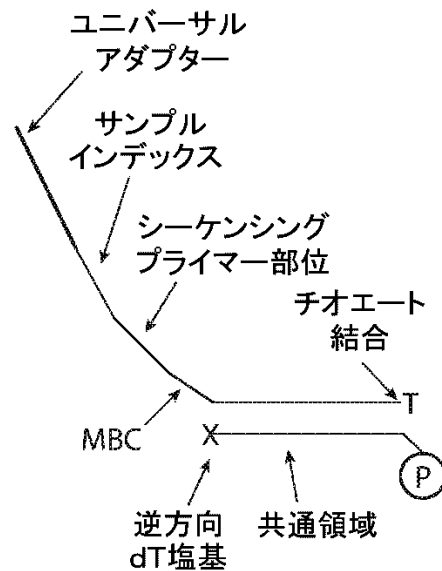


FIG. 8A

【 図 8 B 】

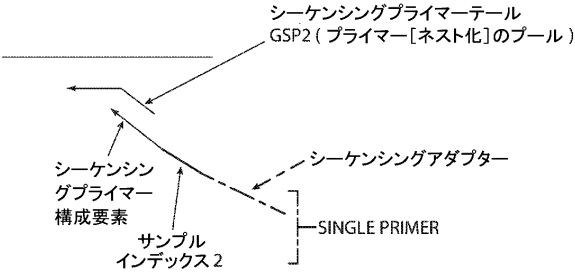


FIG. 8B

10

【 配列表 】

0006997772000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁護士 山本 健策
- (72)発明者 スタール, ジョシュア
アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202
- (72)発明者 マイヤーズ, ジェイソン
アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202
- (72)発明者 カルバー, ブレイディ
アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202
- (72)発明者 クドロー, ブライアン
アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボールダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202
- 審査官 原 大樹
- (56)参考文献 特開2001-333800(JP, A)
国際公開第2009/032167(WO, A1)
国際公開第2015/089496(WO, A1)
国際公開第2014/047678(WO, A1)
Journal of Visualized Experiments, 2010年, Issue39, e1869, p.1-7
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N
C12Q
C12M
MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS/WPIX/CAPLUS(
STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)