

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-510151

(P2025-510151A)

(43)公表日 令和7年4月14日(2025.4.14)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6811(2018.01)	C 1 2 Q 1/6811	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 4 0 B 40/06 (2006.01)	C 4 0 B 40/06	
C 1 2 Q 1/6848(2018.01)	C 1 2 Q 1/6848	Z
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全42頁)

(21)出願番号	特願2024-556472(P2024-556472)	(71)出願人	522329087 バイオオーサイエンティフィックコーポレーション BIOOSCIENTIFICCORPORATION アメリカ合衆国 78744 テキサス州, オースティン, バーレンソンロード 7050
(86)(22)出願日	令和5年3月24日(2023.3.24)	(74)代理人	110000774 弁理士法人 もえぎ特許事務所
(85)翻訳文提出日	令和6年11月13日(2024.11.13)	(72)発明者	アレン, ケビン ディー . アメリカ合衆国 78744 テキサス州, オースティン, バーレンソンロード 7050, バイオオーサイエンティフィックコーポレーション内
(86)国際出願番号	PCT/US2023/016295		
(87)国際公開番号	WO2023/183611		
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		
(31)優先権主張番号	63/323,778		
(32)優先日	令和4年3月25日(2022.3.25)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)		

最終頁に続く

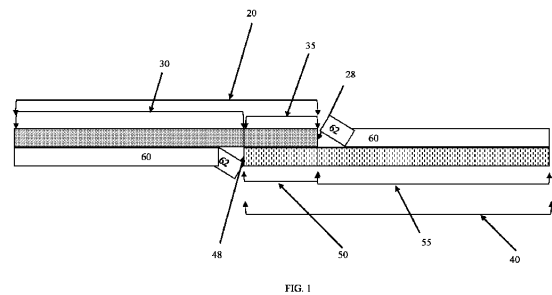
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アダプターダイマーの形成を阻害するための方法、組成物、及びキット

(57)【要約】

シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が、本開示の態様により提供され、当該方法は、以下を含む:過剰な3'アダプターがアダプターダイマーの形成に利用できないように、過剰な3'アダプターをブロッカーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしてハイブリダイズ複合体を形成すること;ハイブリダイズ複合体は以下を含む:第1の非連結型3'アダプターの5'末端のアデニル化ヌクレオチドに隣接する第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端;及び第2の非連結型3'アダプターの5'末端のアデニル化ヌクレオチドに隣接する第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端、ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチドは、第1の非連結型3'アダプターに相補的であり且つハイブリダイズする5'部分を有し、第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは、第2の非連結型3'アダプターに相補的であり且つハイブリダイズする5'部分を有し、第1ブロッカーオリゴヌクレオチドは、第2ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的であり且つハイブリダイズする3'部分を有する。

【選択図】図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法であって、以下を含む方法:

それぞれが5'末端及び3'末端を有するサンプル核酸群と、それぞれが少なくとも8ヌクレオチド長の5'末端部分及びアデニル化ヌクレオチドである5'末端を有する3'アダプター群と、リガーゼと、をライゲーション反応条件下において混合物中で混合し、1)それぞれが3'アダプターの5'末端にライゲーションしたサンプル核酸の3'末端を含む第1ライゲーション生成物群と、2)前記混合物中の過剰な非連結型3'アダプター群と、を生成すること;

10

以下を含むブロッカーオリゴヌクレオチド群を前記混合物に添加すること:

a) 以下を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド:

i) 少なくとも8ヌクレオチド長の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分、及び  
ii) 少なくとも1乃至20ヌクレオチド長を有し且つ第1オリゴヌクレオチド3'末端を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分、ここで、1乃至20ヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然由来のヌクレオチド類似体である;及び

b) 以下を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド:

iii) 少なくとも8ヌクレオチド長の第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分、  
iv) 少なくとも1乃至20ヌクレオチド長を有し且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分、ここで、1乃至20個のヌクレオチドのうち少なくとも1つは、非天然由来のヌクレオチド類似体である;

20

ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分は、長さが等しく且つ互いに相補的であり;

ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分は、いずれも、3'アダプターの5'末端部分に対して相補的であり;

ハイブリダイゼーション条件下で前記混合物をインキュベートし、それにより第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分を第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分とハイブリダイズし、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分を過剰な非連結型3'アダプター群とハイブリダイズし、且つ、それにより第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分を過剰な非連結型3'アダプター群とハイブリダイズし、以て、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第1の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接すると共に第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第2の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接するハイブリダイズ複合体を生成し、それにより前記混合物中の過剰な非連結型3'アダプター群を低減して精製混合物を生成すること。

30

## 【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が、いずれも、過剰な非連結型3'アダプター群の5'末端のアデニル化ヌクレオチドにライゲーション可能であり;

更に、以下を含む方法:

40

前記ハイブリダイズ複合体の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を、第1の非連結型3'アダプターの5'末端の隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションすること、及び前記ハイブリダイズ複合体の第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を第2の非連結型3'アダプターの5'末端の隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションすることで、ライゲーション複合体を生成し、それにより、前記混合物中の過剰な非連結型3'アダプター群を低減して精製混合物を生成すること。

## 【請求項3】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が、非天然由来のヌクレオチド類似体であり、第2ブロッカーオリゴヌクレオチ

50

ド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が、非天然由来のヌクレオチド類似体である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分がそれぞれ2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチド長を有する場合に、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分が、それぞれ、回文ヌクレオチド配列を含み、ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列は、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列と同一である、請求項1、2、又は3のいずれかに記載の方法。

10

【請求項5】

請求項1乃至4のいずれかに記載の方法であって、更に以下を含む方法：

3'末端を有する5'アダプターを前記混合物に添加すること、

ここで、第1ライゲーション生成物群が、それぞれ、3'アダプターの5'末端にライゲーションしたサンプル核酸の3'末端と、5'アダプターの3'末端にライゲーションしたサンプル核酸の5'末端と、を含み、それにより、5'アダプターと3'アダプターとの間に配置され且つそれらに結合したサンプル核酸インサートを含むシーケンスライブラリ分子を生成する。

【請求項6】

20

請求項1乃至5のいずれかに記載の方法であって、更に以下を含む方法：

5'アダプターを前記精製混合物に添加すること；及び

前記精製混合物をライゲーション反応条件下でインキュベートすること、

それにより、1) 5'アダプターを第1ライゲーション生成物にライゲーションして、5'アダプターと3'アダプターとの間に配置され且つそれらに結合したサンプル核酸インサートを含むシーケンスライブラリ分子を生成する。

【請求項7】

請求項1乃至6のいずれかに記載の方法であって、

過剰な非連結型3'アダプター群は、低減されるが除去されず、ライゲーションは、過剰な非連結型3'アダプター群の少なくとも一部への5'アダプターのライゲーションを含み、5'アダプターと3'アダプターとの界面で3'アダプターに結合した5'アダプターを含むアダプターダイマー群を生成し；

30

更に、以下を含む方法：

シーケンスライブラリ分子がアダプターダイマー群と比較して選択的にエンリッチされるように、増幅反応におけるアダプターダイマー群の増幅を阻害すること。

【請求項8】

アダプターダイマー群の増幅を阻害することが、増幅前に、アダプターダイマー群の少なくとも一部を除去することを含む、請求項1乃至7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

請求項7又は8に記載の方法であって、

40

アダプターダイマー群の増幅を阻害することが、以下の1つ又は複数を含む方法：

酵素によるアダプターダイマーの特異的切断；

CRISPR/Cas9に基づくアダプターダイマーの切断；

ゲル精製；

SPRIビーズ法に基づくサイズ選択；及び

アダプターダイマーの増幅阻害に有効なアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの、前記混合物への添加。

【請求項10】

アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが、アダプターダイマーの1つ又は複数の隣接部分と相補的であり、当該1つ又は複数の隣接部分が、5'アダプターと3'アダ

50

プターとの界面で、5'アダプターの少なくとも1つのヌクレオチドを含み、3'アダプターの隣接部分が、増幅プライマー結合部位を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドが、同じヌクレオチド配列を有する、請求項1乃至10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

請求項1に記載の方法であって、  
サンプル核酸が、RNAであるか又はRNAを含み、  
更に、以下を含む方法：

RNAを逆転写し、逆転写されたシーケンスライブラリ分子を生成すること。

10

【請求項13】

サンプル核酸が、DNAであるか又はDNAを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

更に、前記シーケンスライブラリ分子を増幅することを含む、請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

シーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減させるためのオリゴヌクレオチド対であって、以下を含むオリゴヌクレオチド対：

a)以下を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド：

i)少なくとも8ヌクレオチド長を有する第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分

20

、及び

ii)少なくとも1乃至20ヌクレオチド長を有し且つ第1オリゴヌクレオチド3'末端を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分、ここで、当該1乃至20個のヌクレオチドのうち少なくとも1つは、非天然由来のヌクレオチド類似体である；及び

b)以下を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド：

iii)少なくとも8ヌクレオチド長を有する第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分、及び

iv)少なくとも1乃至20ヌクレオチド長を有し且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分、ここで、当該1乃至20個のヌクレオチドのうち少なくとも1つは、非天然由来のヌクレオチド類似体である；

30

ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分は、長さが等しく且つ互いに相補的であり；

ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分は、いずれも、3'アダプターの5'末端部分と相補的である。

【請求項16】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端が、いずれも、過剰な非連結型3'アダプターの5'末端のアデニル化ヌクレオチドにライゲーション可能である、請求項15に記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【請求項17】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が、非天然由来のヌクレオチド類似体であり、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が、非天然由来のヌクレオチド類似体である、請求項15又は16に記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減するためのオリゴヌクレオチド対。

40

【請求項18】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分が、それぞれ、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17

50

、18、19、又は20ヌクレオチド長を有する場合に、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分が、それぞれ、回文ヌクレオチド配列を含み、ここで、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列が、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列と同一である、請求項15、16、又は17のいずれかに記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【請求項19】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドが、それぞれ、約11乃至約50ヌクレオチドの範囲の長さを有する、請求項15乃至18のいずれかに記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減するためのオリゴヌクレオチド対。

10

【請求項20】

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドが、同じヌクレオチド配列を有する、請求項15乃至19のいずれかに記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【請求項21】

請求項15乃至20のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド対を含む、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマー群を低減するためのキット。

【請求項22】

アダプターダイマー群の増幅阻害に有効なアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドを更に含む、請求項21に記載のキット。

20

【請求項23】

アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが、アダプターダイマーの1つ又は複数の隣接部分と相補的であり、当該1つ又は複数の隣接部分が、5'アダプターと3'アダプターとの界面において5'アダプターの少なくとも1つのヌクレオチドを含み、且つ、3'アダプターの隣接部分が、増幅プライマー結合部位を含む、請求項22に記載のキット。

【請求項24】

第1ブロッカー及び第2ブロッカーが、同一の核酸配列を有する、請求項1乃至14のいずれかに記載の方法、又は、請求項21乃至23のいずれかに記載のキット。

【請求項25】

第1ブロッカー及び第2ブロッカーが、異なる核酸配列を有する、請求項1乃至14のいずれかに記載の方法、又は、請求項21乃至24のいずれかに記載のキット。

30

【請求項26】

本明細書において実質的に示された又は記載された方法、キット、又はオリゴヌクレオチド対。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年3月25日に提出された、米国仮特許出願番号63/323,778号に基づく優先権を主張し、その内容の全体は参照により本明細書に組み込まれる。

40

配列表

本出願には、XML形式のファイルとして電子的に提出された配列表が含まれており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2023年3月24日に作成された当該XML形式ファイルは、16NEN27152WO.xmlというファイル名で、サイズは12,732バイトである。

本開示はシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するための方法、組成物、及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

遺伝子分析はますます一般的になり、様々な分子生物学的応用に役立つ。例えば、個人の遺伝子検査は遺伝性疾患の早期発見に特に役立ち、特定の疾患や症状に対する治療法の選択に役割を果たすことができる。

【0003】

大規模並列核酸シーケンシング技術は標的核酸の遺伝子解析において重要な役割を果たすが、非標的核酸を標的核酸と共にシーケンシングする場合には、最適な結果を得られない。

【0004】

シーケンシング結果への非標的配列の混入を減らすために、大規模並列核酸シーケンシング技術ではターゲットエンリッチメント法がよく使用される。このようなエンリッチメント法の1つは、標的核酸シーケンスライブラリ分子のハイブリダイゼーションキャプチャに依存する。

【0005】

しかし、大規模並列核酸シーケンシングのためのシーケンスライブラリには、核酸シーケンスライブラリ分子内の挿入配列に結合したアダプター配列が含まれる。アダプターには、伸長プライマー結合部位、サンプル識別のための1つ又は複数のインデックス配列、シーケンシングプライマー結合部位、及び増幅プライマー結合部位などの様々な機能特性を持つ核酸配列が含まれる。シーケンスライブラリの作成プロセス中に、アダプターは目的の挿入配列にライゲーションされる。挿入配列へのアダプターライゲーションの望ましくない副生成物は、アダプターが互いにライゲーションしてアダプターダイマーを生成し

【0006】

ることである。目的の挿入配列をエンリッチすることを目的とする増幅反応により、アダプターダイマーが有効に増幅されうるため、少数のアダプターダイマーであってもシーケンシングの品質に悪影響を与える可能性がある。

【0007】

更に、アダプターダイマーはエンリッチステップ中にハイブリダイゼーションキャプチャによって保持される可能性があり、それによりアダプターダイマーをキャプチャし、アダプターダイマーの配列決定に試薬と時間を費やす。

【0008】

大規模並列シーケンシングのためにシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するための組成物及び方法が継続的に必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、それらは以下を含む:5'末端及び3'末端をそれぞれが有するサンプル核酸群と、少なくとも8ヌクレオチド長の5'末端部分及びアデニル化ヌクレオチドである5'末端をそれぞれが有する3'アダプター群と、リガーゼと、をライゲーション反応条件下で混合物中に混合し、1)3'アダプターの5'末端にライゲーションしたサンプル核酸の各3'末端を含む第1ライゲーション生成物、及び2)混合物中の過剰な非連結型3'アダプターを生成すること;ブロッカーオリゴヌクレオチドを混合物へ添加すること、当該ブロッカーオリゴヌクレオチドは以下を含む:a)以下を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド:i)少なくとも8ヌクレオチド長の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分、及びii)少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、且つ第1オリゴヌクレオチド3'末端を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分であって、ここで1乃至20ヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然ヌクレオチド;及びb)以下を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド:iii)少なくとも8ヌクレオチド長の第2オリゴヌクレオチド5'部分、及びiv)少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を含む第2ブロッ

10

20

30

40

50

カーオリゴヌクレオチド3'部分であって、ここで1乃至20ヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然ヌクレオチドであり;ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分は長さが等しく、且つ互いに相補的であり;ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分と第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分はいずれも、3'アダプターの5'末端部分と相補的である;及び混合物をハイブリダイゼーション条件下でインキュベートすること、それにより第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分を第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分とハイブリダイズして、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分を過剰な非連結型3'アダプターとハイブリダイズし、それにより第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分を過剰な非連結型3'アダプターとハイブリダイズし、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第1の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接し、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第2の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接するハイブリダイズ複合体を生成し、それにより混合物中の過剰な非連結型3'アダプターを減らして、精製混合物を生成すること。

10

**【0010】**

本開示の態様によれば、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端はいずれも、過剰な非連結型3'アダプターの5'末端のアデニル化ヌクレオチドにライゲーション可能であり;更に、本開示の方法に含まれるのが、ハイブリダイズ複合体の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を、第1の非連結型3'アダプターの5'末端に位置する隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションし、且つハイブリダイズ複合体の第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を、第2の非連結型3'アダプターの5'末端に位置する隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションして、ライゲーション複合体を生成し、それにより混合物中の過剰な非連結型3'アダプターを減らして精製混合物を生成することである。

20

**【0011】**

本開示の態様によれば、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチドであり、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチドである。

30

**【0012】**

本開示の態様によれば、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分はそれぞれ2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチド長であり、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分はそれぞれ、回文ヌクレオチド配列を含み、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列は、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列と同一である。

**【0013】**

本発明の態様によれば、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドはそれぞれ、11乃至50ヌクレオチドの範囲の長さを有する。

40

**【0014】**

本発明の態様によれば、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは同じヌクレオチド配列を有する。

**【0015】**

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法は、混合物に5'アダプターを追加することを更に含み、当該5'アダプターは3'末端を有し、ここで第1ライゲーション生成物はそれぞれ、3'アダプターの5'末端にライゲーションされたサンプル核酸の3'末端と、5'アダプターの3'末端にライゲーションされたサン

50

ブル核酸の5'末端と、を含み、それによりシーケンスライブラリ分子を生成し、当該シーケンスライブラリ分子は5'アダプターと、3'アダプターと、の間に配置され、且つこれらに結合したサンプル核酸インサートを含む。

【0016】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法には、更に、精製混合物に5'アダプターを添加すること;及び、精製混合物をライゲーション反応条件下でインキュベートすることを含み、それにより1)5'アダプターを第1ライゲーション生成物にライゲーションしてシーケンスライブラリ分子を生成し、当該シーケンスライブラリ分子には5'アダプターと、3'アダプターと、の間に配置され、且つこれらに結合するサンプル核酸インサートが含まれる。

10

【0017】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、この方法では過剰な非連結型3'アダプターは低減されるが除去されず、その結果ライゲーションには、5'アダプターを過剰な非連結型3'アダプターの少なくとも一部へライゲーションすることが含まれ、5'アダプターと、3'アダプターと、の界面で3'アダプターと結合している5'アダプターを含むアダプターダイマーを生成する。したがって、本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、これらは増幅反応においてアダプターダイマー増幅を阻害することを更に含み、その結果シーケンスライブラリ分子が増幅反応により、アダプターダイマーと比較して選択的にエンリッチされる。アダプターダイマー増幅の阻害には以下の1つ又は複数を含んでもよい:増幅前にアダプターダイマーの少なくとも一部を除去すること;酵素によるアダプターダイマーの特異的切断;CRISPR/Cas9によるアダプターダイマーの切断;アダプターダイマーを除去するゲル精製;アダプターダイマーを除去するSPRIビーズ法に基くサイズ選択;及びアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの混合物への添加、当該アダプターダイマーブロッカーはアダプターダイマーの増幅を阻害するのに有効である。

20

【0018】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、これらはアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの混合物への添加を含み、アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドはアダプターダイマー増幅を阻害するのに有効であり、ここでアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドは、アダプターダイマーの1つ又は複数の隣接部分と相補的であり、当該1つ又は複数の隣接部分には5'アダプターと、3'アダプターと、の界面の5'アダプターの少なくとも1つのヌクレオチドが含まれ、3'アダプターの隣接部分には増幅プライマー結合部位が含まれる。

30

【0019】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、ここではサンプル核酸がRNAであるか、又はRNAを含む。

【0020】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、ここではサンプル核酸がRNAであるか、又はRNAを含み、これらの方法はRNAを逆転写し、逆転写されたシーケンスライブラリ分子を生成することを含む。

40

【0021】

本開示の態様によれば、更にシーケンスライブラリ分子又は逆転写されたシーケンスライブラリ分子を増幅することを含む、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供される。

【0022】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのオリゴヌクレオチド対が提供され、これはa)以下を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド:i)少なくとも8ヌクレオチド長の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分、及びii

50

)少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、第1オリゴヌクレオチド3'末端を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分、ここで1乃至20個のヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然ヌクレオチド;及びb)以下を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド:iii)  
 )少なくとも8ヌクレオチド長の第2オリゴヌクレオチド5'部分、及びiv)少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分、ここで1乃至20個のヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然ヌクレオチドであり;ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分はいずれも、3'アダプターの5'末端部分に相補的である、を含む。

10

## 【0023】

本開示の態様によれば、第1ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端はいずれも、過剰な非連結型3'アダプターの5'末端のアデニル化ヌクレオチドにライゲーションされうる。

## 【0024】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのブロッカーオリゴヌクレオチド対が提供され、ここでは第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチドであり、且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチドである。

20

## 【0025】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのブロッカーオリゴヌクレオチド対が提供され、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分がそれぞれ、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチド長である場合に、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分がそれぞれ、回文ヌクレオチド配列を含み、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列は第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列と同一である。

30

## 【0026】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのブロッカーオリゴヌクレオチド対が提供され、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドはそれぞれ約11乃至約50ヌクレオチドの範囲の長さを有する。

## 【0027】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのブロッカーオリゴヌクレオチド対が提供され、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する。

40

## 【0028】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのキットが提供され、これはシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するための1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチド対を含む。

## 【0029】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのキットには、アダプターダイマーの増幅を阻害するのに有効なアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが更に含まれる。

## 【0030】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するため

50

のキットが提供され、ここでアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが、アダプターダイマーの1つ又は複数の隣接部分と相補的であり、1つ又は複数隣接部分には、5'アダプターと、3'アダプターと、の界面における5'アダプターの少なくとも1つのヌクレオチドが含まれ、3'アダプターの隣接部分には増幅プライマー結合部位が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、本開示の態様による、ブロッカーオリゴヌクレオチド群及び3'アダプター群を含むハイブリダイズ複合体の概略図であり；図1は以下を含むハイブリダイズ複合体の特徴を示す番号付けを含む：第1ブロッカーオリゴヌクレオチド20；第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端28；第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分30；第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分35；第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分55；第2ブロッカーオリゴヌクレオチド40；第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端48；第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分50；3'アダプター60；及び3'アダプターの5'アデニル化末端62。

10

【図2A】図2Aは「単一アダプターシステム」を示す模式図であり、この図においてブロッカーオリゴヌクレオチド群は同じ配列を持ち、ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分(濃い灰色)を含み、且つパリンδροームブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分(薄い灰色)を含むので、パリンδροームブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分群は相補的であり、且つ示すようにアニールする；「単一アダプターシステム」は、例えば、単一タイプのアダプターが含まれるシーケンスライブラリを生成する方法で使用される。

20

【図2B】図2Bは少なくとも2種類のブロッカーオリゴヌクレオチドを含む「複数アダプターシステム」を示す模式図であり、この図において異なる種類の各ブロッカーオリゴヌクレオチドは異なる配列を持ち、異なるブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分群(左上が濃い灰色；及び左下が中程度の灰色)を含み、且つ同一のパリンδροームブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分群(薄い灰色)を含むため、パリンδροームブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分群は相補的であり、且つ示すようにアニールする；「複数アダプターシステム」は例えば、複数の種類のアダプター、例えば異なるインデックス配列を含む各アダプターが含まれるシーケンスライブラリを生成する方法で使用される。

【図2C】図2Cは少なくとも2種類のブロッカーオリゴヌクレオチドを含む「単一アダプターシステム」を示す模式図であり、この図において異なる種類の各ブロッカーオリゴヌクレオチドは異なる配列を有し、同一のブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分(濃い灰色)を含み、且つ異なる非パリンδροームブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分(上部に薄い灰色；下部に点描灰色)を含むので、非パリンδροームブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分群は相補的であり、且つ示すようにアニールする；「単一アダプターシステム」は、例えば、単一種類のアダプターが含まれるシーケンスライブラリを生成する方法で使用される。

30

【図3】図3は本開示の態様によるアダプターダイマー形成の阻害を示すグラフである。図3はa)シーケンスライブラリ分子に正常に組み込まれた所望のRNAの割合(濃い灰色)；b)形成され、シーケンスライブラリ分子に組み込まれたアダプターダイマー(標準的なダイマー)の割合(中程度の灰色)；及びc)シーケンスライブラリ分子に組み込まれたその他の分子の割合(薄い灰色)を、以下を用いるシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法において示す：#1)アダプターダイマーの形成を阻害しない方法；#2)本開示の態様による1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチドの使用を含む方法；#3)増幅前に少なくとも一部のアダプターダイマーを除去することを含む方法；又は#4)本開示の態様による1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチドの使用を含み、更に増幅前に少なくとも一部のアダプターダイマーを除去することを含む方法。

40

【図4】図4は、発明の態様による1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチドの使用を含む方法を用いて、シーケンスライブラリに組み込まれたアダプターダイマーの割合が大幅に減少したため、従来の方法と比較して、シーケンシングされたダイマーの割合が大幅に低下したことを証明する結果を示すグラフである。更に、本発明の態様による1つ又

50

は複数のブロックオリゴヌクレオチドの使用を含む方法を用いて、シーケンスライブラリに組み込まれたアダプターダイマーの割合が大幅に減少したため、従来の方法と比較して、シーケンシングされた成熟miRNAの割合が増加したことが示される。図4において、明るい灰色の棒1は本発明の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドの使用を含む方法を用いて得られたデータを表し、暗い灰色の棒2は従来の方法を用いて得られたデータを表す。

【図5】図5は本開示の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドの使用を含む方法を用いて得られた結果を示すグラフであり、濃い灰色の棒2は従来の方法を用いて得られたデータを表す。その結果は配列データに表される固有のmiRNA数の比較を示しており、即ち、従来の方法を少なくとも1回使用して検出されたわずか509個の固有の単一配列に対して、本開示の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドを含む方法を少なくとも1回使用して検出された600個の固有の単一配列;従来の方法を少なくとも3回使用して検出されたわずか424個の固有の単一配列に対して、本開示の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドを含む方法を少なくとも3回使用して検出された471個の固有の配列;従来の方法を少なくとも5回使用して検出された370個の固有の単一配列に対して、本開示の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドを含む方法を少なくとも5回使用して検出された407個の固有の単一配列;従来の方法を少なくとも10回使用して検出されたわずか295個の固有の単一配列に対して、本開示の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドを含む方法を少なくとも10回使用して検出された339個の固有の単一配列。

【図6】図6は検出された固有のmiRNAの数と、本発明の態様による1つ又は複数のブロックオリゴヌクレオチドの使用を含む方法を用いた3回の反復(大きな灰色の円)と、従来の方法を用いて得られた3回の反復(中程度の大きさの中灰色の円)と、の間で同じである5個の閾値と、の比較を示すベン図である。最も小さい黒円は両方法に共通する固有のmiRNAの数を表す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者に一般的に理解されている意味を有するものとする。このような用語は、様々な標準的な参考文献において定義され、文脈内で使用されており、例としては、J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5th Ed., 2002; B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th Ed., Garland, 2002; D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004; Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, 21st Ed., 2005; L.V. Allen, Jr. et al., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8th Ed., Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004; and L. Brunton et al., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Professional, 12th Ed., 2011を含む。

【0033】

単数形用語「a」、「an」、及び「the」は限定を意図するものではなく、そうではないと明示的に記載されていない限り、或いは、そうではないと文脈が明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。

【0034】

「約」という用語及びその文法的同義語は、本明細書において参照数値に関連して使用されるように、参照数値及び当該参照数値の10%以内の数値を指し、当該参照数値のプ

ラス又はマイナス(+/-)1%、+/-2%、+/-3%、+/-4%、+/-5%、+/-6%、+/-7%、+/-8%、+/-9%、又は+/-10%である数値を含む。参照数値の記載された範囲の文脈において、「約」という用語及びその文法的同義語は、本明細書で使用されるように、当該数値範囲の参照下限値の+/-1%、+/-2%、+/-3%、+/-4%、+/-5%、+/-6%、+/-7%、+/-8%、+/-9%、又は+/-10%である数値、及び当該数値範囲の参照上限値の+/-1%、+/-2%、+/-3%、+/-4%、+/-5%、+/-6%、+/-7%、+/-8%、+/-9%、又は+/-10%である数値を含む範囲を指す。更に、特に指定のない限り、本明細書の数値の項目には一覧表示された数値の全ての間接値及び小数値が含まれるものと理解され、例えば50%、60%、75%には55%、64.5%、74%が含まれるものと理解される。

【0035】

本明細書では「第1」、「第2」などの用語は要素群又は要素群の組み合わせに関連して使用されてもよく、これらの用語は第1の要素及び第2の要素が互いに同一であるか、又は異なるかについて限定することなく、そのような要素群又は要素群の組み合わせを指定するために使用される。

【0036】

特定の特徴の組み合わせが請求項に記載され、及び/又は明細書に開示され、これらの特徴の組み合わせは様々な態様の開示を制限することを意図するものではない。このような特徴の全ての可能な組み合わせが請求項に具体的に記載されている、及び/又は明細書に開示されているわけではない。以下に列挙される各従属請求項は、直接的には1つの請求項にのみ依存してもよいが、様々な態様の開示には請求項セット内の他の全ての請求項と組み合わせられている各従属請求項を含む。本明細書で使用されているように、「少なくとも1つの」項目のリストを指す語句は単一の項目を含む、それらの項目の任意の組み合わせを指す。例として、「以下のうちの少なくとも1つ:a、b、又はc」はaのみ;bのみ;cのみ、aとb、aとbとc、bとc、aとc、同様にaとa;aとaとa;aとaとb;aとaとc;aとbとb;aとcとcなどの複数の同じ要素の任意の組み合わせ;及びa、b、及びcのその他の任意の組み合わせ又は順序をカバーすることを意図する。

【0037】

本開示の態様によればシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法が提供され、これは以下を含む:過剰な3'アダプターをブロッカーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせてハイブリダイゼーション複合体を形成し、過剰な3'アダプターをアダプターダイマーの形成に利用できないようにすること:ここで、ハイブリダイゼーション複合体は第1の非連結型3'アダプターに相補的且つハイブリダイズした5'部分を有する第1ブロッカーオリゴヌクレオチドと、第2の非連結型3'アダプターに相補的且つハイブリダイズした5'部分を有する第2ブロッカーオリゴヌクレオチドと、を含み、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチドは、第2ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的且つハイブリダイズする3'部分を有する。

【0038】

必要に応じて、3'アダプターはハイブリダイゼーション複合体中のブロッカーオリゴヌクレオチドにライゲーションによって共有結合され、それにより、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第1の非連結型3'アダプターの5'末端に位置する隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションされ、且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第2の非連結型3'アダプターの5'末端に位置する隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションされているライゲーション複合体を形成し、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチドは第1の非連結型3'アダプターに相補的且つハイブリダイズする5'部分を有し、第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは第2の非連結型3'アダプターに相補的且つハイブリダイズする5'部分を有し、ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチドは第2ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的且つハイブリダイズする3'部分を有する。

【0039】

本明細書において互換的に使用される「ブロッカーオリゴヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチドブロッカー」という用語は、i)5'末端に隣接する、少なくとも8ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド長のブロック-オリゴヌクレオチド5'部分、及びii)3'末端に隣接する、少なくとも1乃至20ヌクレオチド長のブロック-オリゴヌクレオチド3'部分を含む合成オリゴヌクレオチドを指す。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチドは約9ヌクレオチド乃至約50ヌクレオチドの範囲の全長を有する。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチドは約9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、21ヌクレオチド、22ヌクレオチド、23ヌクレオチド、24ヌクレオチド、25ヌクレオチド、26ヌクレオチド、27ヌクレオチド、28ヌクレオチド、29ヌクレオチド、30ヌクレオチド、31ヌクレオチド、32ヌクレオチド、33ヌクレオチド、34ヌクレオチド、35ヌクレオチド、36ヌクレオチド、37ヌクレオチド、38ヌクレオチド、39ヌクレオチド、40ヌクレオチド、41ヌクレオチド、42ヌクレオチド、43ヌクレオチド、44ヌクレオチド、45ヌクレオチド、46ヌクレオチド、47ヌクレオチド、48ヌクレオチド、49ヌクレオチド、又は約50ヌクレオチドの全長を有し、それより短くても、又は長くてもよい。

10

【0040】

本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個は、非天然ヌクレオチドである。

【0041】

本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個は $T_m$ 増加ヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体である。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個はLNAモノマー、PNAモノマー、BNAモノマー、その他の $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体、又はそれらの任意の2つ以上である。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個はLNAモノマーである。

20

【0042】

本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分のヌクレオチドの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上は非天然ヌクレオチドである。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分のヌクレオチドの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上は $T_m$ 増加ヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体である。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分のヌクレオチドの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上はLNAモノマー、PNAモノマー、BNAモノマー、その他の $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体、又はそれらの任意の2つ以上である。本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分のヌクレオチドの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上はLNAモノマー

30

40

【0043】

本開示の態様によれば、ブロック-オリゴヌクレオチドの3'部分は回文ヌクレオチド配列であるか、又は回文ヌクレオチド配列を含む。

【0044】

本開示の態様によれば、オリゴヌクレオチドは例えば、Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004に詳述されているように、化学合成技術及び/又は組み換え分子生物学技術を使用して合成的に生成される。

【0045】

50

ブロッカーオリゴヌクレオチドの一例は、5'-CACCCGAGAATTCCA--C//iisodG//iMe-isodC//iisodG//iMe-isodC/G-3'(配列番号1)である。

【0046】

図1は、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド20及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド40を図式的に示している。第1ブロッカーオリゴヌクレオチド20は5'部分30及び3'部分35を有する。第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端は28で示される。第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは5'部分55及び5'部分50を有する。第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端は48で示される。第1及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは、3'アダプター60及びその末端62と等しい長さで示されているが、第1及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは、3'アダプター60及びその末端62よりも短くても、又は長くてもよい。

【0047】

図1は、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分35が第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分50とハイブリダイズしているハイブリダイズ複合体を示す。更に、5'アデニル化末端62をそれぞれが持つ3'アダプター60も示される。3'アダプター60が、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド30の5'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドの5'部分にハイブリダイズしていることが示されている。第1ブロッカーオリゴヌクレオチド28の3'末端に隣接する3'アダプターの5'アデニル化末端62と、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド48の3'末端に隣接する3'アダプターの5'アデニル化末端62と、もまた示される。

【0048】

必要に応じてライゲーション反応が実行され、3'アダプターの5'アデニル化末端62及び第1ブロッカーオリゴヌクレオチド28の隣接3'末端のライゲーションがライゲーション条件下、リガーゼ存在下で起こり、3'アダプターの5'アデニル化末端62及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド48の隣接3'末端のライゲーションがライゲーション条件下、リガーゼ存在下で起こり、ライゲーション複合体を形成する。

【0049】

本開示の態様によれば、第1及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは配列が同一である。

【0050】

本開示の態様によれば、第1及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドは配列が異なる。

【0051】

本開示のブロッカーオリゴヌクレオチドの5'部分は3'アダプターと相補的であり、ブロッカーオリゴヌクレオチドの5'部分はハイブリダイゼーション条件下で3'アダプターとハイブリダイズする。ブロッカーオリゴヌクレオチドは3'アダプターより長くても、短くても、同じ長さでもよい。ブロッカーオリゴヌクレオチドの5'部分は3'アダプターと完全に相補的であることができ、又はハイブリダイゼーション複合体の形成及びそれに続くライゲーションによるライゲーション複合体の形成に適したハイブリダイゼーション条件を用いて50%、60%、70%、80%、90%、又はそれ以上の相補性であることができる。

【0052】

本明細書に記載の方法、ブロッカーオリゴヌクレオチド、及びキットは、様々なソースのいずれかに由来するサンプル核酸からシーケンスライブラリを生成するために使用してもよい。サンプル核酸、DNA又はRNAなど、は通常、生体サンプル中に存在し、生体サンプルは例えば血液、リンパ液、頬粘膜スワブ、皮膚組織、尿、唾液、組織、痰、腹水、糞便、胃液、精液、脳脊髄液、生検材料、創傷滲出液などの身体サンプル、及びそれらから得られる細胞株など、個体から得ることができる。出生前生体サンプル核酸は、羊水、受胎生成物、胚盤胞及び胚盤胞、絨毛膜絨毛、胎児細胞、胎児DNA、及び/又は母体血液中を循環する胎児RNAから得ることができる。サンプル核酸は、細胞株などのインビトロソースからも得ることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 3 】

本明細書に記載の方法、ブロッカーオリゴヌクレオチド、及びキットは、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、及びヒツジを含むがこれらに限定されない、様々な生物のいずれかから得られたサンプル核酸からシーケンスライブラリを生成するために使用してもよい。サンプル核酸の非哺乳類ソースも使用でき、例としては、魚類及びその他の水生生物、鳥類、家禽類、細菌、ウイルス、植物、昆虫、爬虫類、両生類、真菌、及びマイコバクテリアを含む。したがって、サンプルDNA又はサンプルRNAなどのサンプル核酸は、これらのソースのいずれかから取得してもよい。

## 【 0 0 5 4 】

DNA又はRNAなどのサンプル核酸は、ヒト、ヒト以外の哺乳動物、脊椎動物、無脊椎動物、微生物、植物などを含むが、これらに限定されない任意のソースから取得できる。DNA又はRNAなどのサンプル核酸は1つ又は複数の細胞からエキスピボ又はインピボで取得できる。例えば、DNA又はRNAなどのサンプル核酸は、細胞株、初代細胞、又は組換え細胞などの実験室で操作された細胞などを含むが、これらに限定されない培養細胞から取得できる。

## 【 0 0 5 5 】

本開示の態様によれば、サンプル核酸は「低分子RNA」である。本明細書において使用される「低分子RNA」という用語は、約10ヌクレオチド長乃至約300ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNAを指し、例えば、約10ヌクレオチド長乃至約250ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約200ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約150ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約100ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約90ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約80ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約70ヌクレオチド長の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約60ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約50ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、約10ヌクレオチド長乃至約40ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA、又は約10ヌクレオチド長乃至約30ヌクレオチド長の範囲の長さを有するRNA。低分子RNAは以下のいずれかであってもよい:RNA断片、rRNA、ウイルスRNA、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、転移RNA(tRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、リピート関連RNA(rasiRNA)、低分子核小体RNA(snoRNA)、Piwi相互作用RNA(piRNA)、低分子カハール体RNA(scaRNA)、ヘテロクロマチンsiRNA(hc-siRNA)、及びトランスアクティングRNA(ta-siRNA)が含まれる。

## 【 0 0 5 6 】

本明細書で使用されるように「シーケンスライブラリ」という用語は、同じソースに由来してもよいし、又は由来しなくてもよいサンプル核酸に由来する目的のシーケンシングターゲットであるインサートを含む、複数の線状二本鎖DNA断片を指す。シーケンスライブラリのDNA断片には、例えばバーコード又はインデックスシーケンスなどのDNA断片の識別、増幅プライマーの結合、シーケンシングプライマーの結合、又は目的のターゲットへの特定の結合などを提供する機能要素がインサートの両側に更に含まれており、シーケンシング方法、特に大規模並列シーケンシング方法において効果的な処理が可能になる。シーケンスライブラリには5'アダプターと3'アダプターの2つのアダプターが両側に並んだインサートを含んでもよく、5'アダプターはインサートの5'末端に直接的又は間接的に共有結合し、3'アダプターはインサートの3'末端に直接的又は間接的に共有結合する。アダプターのインサートへの間接的な結合とは、インサートと、アダプターと、の間に別のDNA配列が配置される構成を指す。

## 【 0 0 5 7 】

「大規模並列シーケンシング」という用語は「合成によるシーケンシング」を含み、「次世代シーケンシング」及び「ハイスループットシーケンシング」も指し、多数の核酸シーケンスライブラリ分子、例えば数千の核酸シーケンスライブラリ分子を同時に又はほぼ

10

20

30

40

50

同時にシーケンシングするプロセスを示す。本開示の態様により提供されるオリゴヌクレオチドブロックのセットは、一部のケースでは特にイルミナネクステラ及び/又はTruSeqプラットフォーム及び構成を参照して本明細書に記載されるが、これらに限定されない。むしろ、本開示の組成物及び方法は様々なシーケンシングプロトコルのいずれかで、且つトントレントシステムを含むがこれに限定されない様々なシーケンシング機器とともに使用してもよい。

【0058】

「アダプター」という用語は、例えばDNA断片の識別、増幅、又は所望の標的への特異的結合を提供し、シーケンシング法において効果的な処理を可能にする機能要素を含む、線状、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖のDNA断片を指す。アダプターには、シーケンシングプライマー結合配列(シーケンシングプライマー結合部位とも呼ばれる)、伸長プライマー結合配列(伸長プライマー結合部位とも呼ばれる)、及びインデックス配列(バーコード配列又はユニーク分子識別子(UMI)とも呼ばれる)などの1つ又は複数の機能的要素が含まれる。「5'アダプター」という用語は、直接的又は間接的にインサートの5'末端に共有結合される、又は共有結合されることが意図されるアダプターを指す。「3'アダプター」という用語は、直接的又は間接的にインサートの3'末端に共有結合される、又は共有結合されることが意図されるアダプターを指す。アダプターは通常、約10乃至150ヌクレオチド長であり、例えば約10乃至25、15乃至30、25乃至40、30乃至50、45乃至75、50乃至100、90乃至125、又は120乃至150など。「アダプター」という用語は「adaptor」と綴られることもあると留意されたい。

10

20

【0059】

本開示の態様によれば、3'アダプターは、3'アダプターの5'末端で5'アデニル化され、3'アダプターのサンプル核酸及びブロックオリゴヌクレオチドへのライゲーションが容易になる。

【0060】

本開示の態様によれば、方法、組成物、及び/又はキットに含まれる5'アデニル化3'アダプターは、2',3'-ジデオキシヌクレオチド又は3'(C3)プロピルスパーサーなどによって3'末端で阻害される。

【0061】

本明細書において核酸分子に関して使用される用語「末端」は、線状核酸分子の末端を指し、本明細書では用語「terminus」又は「termini」などの文法的に適切な変形と互換的に使用される。本明細書において核酸分子に関して使用される用語「末端部分」は、核酸分子の末端及び隣接する連続核酸配列を含む核酸配列を指すが、核酸分子の核酸配列の全長を指すものではない。本開示の態様によれば、核酸分子の「末端部分」は、核酸分子の末端及び核酸分子の核酸配列の全長の約半分又はそれ以下を構成する隣接連続核酸配列を含む核酸配列を指す。

30

【0062】

「アダプターダイマー」という用語は、シーケンスライブラリを生成するプロセスにおいて、5'アダプター及び3'アダプターをサンプル核酸の5'末端及び3'末端にライゲーションする際に形成される、望ましくない副生成物を指す。具体的にはアダプターダイマーは、3'アダプターの5'アデニル化末端及び5'アダプター3'末端のライゲーション生成物である。アダプターダイマーは、シーケンスライブラリを生成するプロセスにおいて増幅され、シーケンスライブラリを生成するプロセスの態様において、シーケンスライブラリ分子と競合し、フローセル内の結合部位をめぐって競合し、シーケンシング品質を著しく低下させるかもしれないので、望ましくない。

40

【0063】

本明細書で使用される用語「ライゲーション」は、リガーゼ酵素によって媒介され、より長い線状核酸分子を形成する2つの線状核酸分子の共有結合を指す。

【0064】

「リガーゼ酵素」及び「リガーゼ」という用語は、本明細書では互換的に使用され、隣

50

接する2個の核酸を共有結合して、ホスホジエステル結合などの2つの核酸間の結合、又は末端ヌクレオチドの種類に応じて、ホスホロチオエート結合、ホスホアミデート結合などの、ただしこれらに限定されない、修飾共有結合を形成することができる酵素を指す。リガーゼ酵素には、T7リガーゼ、T4リガーゼ、E.coliリガーゼ、及びTaqリガーゼを含むが、これらに限定されない。リガーゼ酵素はATP依存性リガーゼ、NAD<sup>+</sup>依存性リガーゼを含み、且つ国際生化学分子生物学連合によって定義されたEC6.5.1.1(ATP依存性リガーゼ)、EC6.5.1.2(NAD<sup>+</sup>依存性リガーゼ)、EC6.5.1.3(RNAリガーゼ)、EC6.5.1.6 DNAリガーゼ(ATP又はNAD<sup>+</sup>)、EC6.5.1.7 DNAリガーゼ(ATP、ADP 又は GTP)、及びEC6.5.1.8 3'-リン酸/5'-ヒドロキシ核酸リガーゼを含むが、これらに限定されない酵素クラスEC6.5の一部である、DNAリガーゼ及びRNAリガーゼを含む。

10

**【0065】**

リガーゼ酵素の使用条件は周知されている。

**【0066】**

ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、非天然ヌクレオチド。

**【0067】**

「ヌクレオチド」という用語は、核酸塩基、糖、及びリン酸を含む分子を指す。ヌクレオチドは例えばDNA配列又はRNA配列などの核酸配列のモノマー単位である。ヌクレオチドという用語には、ATP、TTP、UTP、CTP及びGTPなどのリボヌクレオシド三リン酸と、dATP、dCTP、dUTP、dGTP、及びdTTPなどのデオキシリボヌクレオシド三リン酸と、が含まれる。ヌクレオチドは核酸塩基に関連して、一般にA、T、G、C、又はUの略語で示される(表Iを参照)。

20

**【0068】**

表Iに示されるように、本明細書では標準IUPACヌクレオチドコードが使用される。

30

40

50

【表 I】

表I						
記号	説明	表している塩基				相補的
A	アデニン	A				T
C	シトシン		C			G
G	グアニン			G		C
T	チミン				T	A
U	ウラシル				U	A
W	弱い	A			T	W
S	強い		C	G		S
M	アミノ(aMino)	A	C			K
K	ケト(Keto)			G	T	M
R	プリン(puRine)	A		G		Y
Y	ピリミジン(pYrimidine)		C		T	R
B	Aではない		C	G	T	V
D	Cではない	A		G	T	H
H	Gではない	A	C		T	D
V	Tではない	A	C	G		B
N	任意のヌクレオチド (ギャップではない)	A	C	G	T/U	N

10

20

30

40

## 【0069】

「核酸」、「ヌクレオチド配列」、及び「核酸配列」という用語は、RNA、DNA、又は線状、一本鎖、二本鎖、オリゴヌクレオチド、又はポリヌクレオチドを含むあらゆる形態の1つ又は複数のヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体を有するRNA/DNA分子を指す。

## 【0070】

「ヌクレオチド類似体」という用語は、修飾ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチド、特に、核酸ポリメラーゼによって触媒される鋳型指向性核酸重合又は非鋳型指向性核酸重合によって、天然ヌクレオチド及び/又は非天然ヌクレオチドと重合することができるヌク

50

レオチド類似体を指す。「ヌクレオチド類似体」という用語は、参照標準ヌクレオチドと比較して、ヌクレオチド類似体の化学的性質の少なくとも1面を修飾し、一方でヌクレオチド類似体が意図された機能を果たすことを可能にする他の特性を保持する、塩基部分及び/又は糖部分、及び/又はリン酸部分に1つ又は複数の修飾を含むヌクレオチドを指す。ヌクレオチド類似体、及びそれらの核酸への組み込みは、当技術分野でよく知られており、標準的な手順にしたがって合成、及び/又は市販品を取得してもよい。

【0071】

特定のヌクレオチド類似体は水素結合を介して、相補的なヌクレオチドとワトソン・クリック対合することが可能であり、例示的には、置換プリン又は置換ピリミジン、デアザプリン、メチルプリン、メチルピリミジン、アミノプリン、アミノピリミジン、チオプリン、チオピリミジン、インドール、ピロール、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、7-メチルグアニン、ヒポキサンチン、プソイドシトシン、プソイドイソシトシン、イソシトシン、イソグアニン、2-チオピリミジン、4-チオチミン、6-チオグアニン、ニトロピロール、ニトロインドール、及び4-メチルインドールなどのヌクレオチド塩基類似体を含むものを含む、天然及び非天然のヌクレオチド及びそれらの類似体が含まれるが、これらに限定されない。ヌクレオチド類似体には、置換デオキシリボース、置換又は非置換のアラビノース、置換又は非置換のキシロース、及び置換又は非置換のピラノースなどのデオキシリボース類似体を含むものが含まれる。ヌクレオチド類似体には、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニリデート、ホスホロアミデート、ポロノホスフェート、ホスホトリエステル、及びメチルホスホネートなどのアルキルホスホネートなどのリン酸エステルの類似体を含むものが含まれる。

10

20

【0072】

イソ-dG及びイソ-dCなどの非天然ヌクレオチドは、互いに固有の塩基対合を形成し、非天然ヌクレオチドと、天然ヌクレオチド塩基と、の間には塩基対合(又はハイブリダイゼーション)を形成せず、例えばイソ-dGはdCと対合せず、イソ-dCはdGと対合しない。「イソ-dG」という用語はイソグアノシンを指す。「iisodG」という用語もまた本明細書で、例えば配列に組み込まれているイソグアノシンを指すために使用されていることに留意されたい。「イソ-dC」という用語はイソシトシンを指す。「iMe-isodC」という用語もまた本明細書で、例えば配列に組み込まれているイソシトシンを指すために使用されていることに留意されたい。

30

【0073】

「 $T_m$ 」及び「融解温度」という用語は、二本鎖核酸分子の集団の50%(半分)が分離、即ち一本鎖になる温度を指す。 $T_m$ を計算する方法は当該技術分野で周知である。

【0074】

「 $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体」という用語は、ヌクレオチド類似体を含む二本鎖オリゴヌクレオチドの融解温度( $T_m$ )を、ヌクレオチド類似体を含まない同じ二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して増加させるヌクレオチド類似体を指す。 $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体には、修飾核酸塩基、修飾糖、修飾リン酸、又は任意の2つ又は複数のそのような修飾の組み合わせを含んでもよい。

40

【0075】

$T_m$ 増加ヌクレオチド類似体には、ロックド核酸(LNA)モノマー、ペプチド核酸(PNA)モノマー、及びブリッジ核酸(BNA)モノマーが含まれるが、これらに限定されない。

【0076】

LNAモノマー、PNAモノマー、BNAモノマー、又はこれらの2つ又は複数のいずれかを含むが、これらに限定されない。本明細書によれば、様々な $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体のいずれかを、使用することができる。

【0077】

「LNAモノマー」という用語は、本明細書では「LNAヌクレオチド」及び「LNA塩基」という用語と互換的に使用され、且つリボース環の2'酸素と、4'炭素と、の間におけ

50

る共有結合の存在のためにロックされたりボースを含むヌクレオチド類似体、即ち、オリゴヌクレオチドに組み込むことが可能であり、「ロックド核酸」を生成する2'-O、4'-C-メチレン-D-リボフラノシルモノマー、を含むヌクレオチド類似体を指す。LNAモノマーは、従来のヌクレオチドと比較して、同様の又は改善されたワトソン-クリック塩基対形成選択性を有する。LNAモノマーの例には、アデニンピシクロヌクレオシドモノマー、シトシンピシクロヌクレオシドモノマー、グアニンピシクロヌクレオシドモノマー、5-メチルシトシンピシクロヌクレオシドモノマー、チミンピシクロヌクレオシドモノマー、及びウラシルピシクロヌクレオシドモノマーが含まれるが、これらに限定されない。1つ又は複数のLNAモノマーを含むオリゴヌクレオチドの $T_m$ は、塩基スタッキングの向上などの特性の向上により増加する。通常、LNAオリゴヌクレオチドに組み込まれた各LNAモノマーのために $a$ の $T_m$ は2乃至8増加する。LNAモノマーは、周知の方法を使用して合成、又は市販のものを取得してもよい。「ロックド核酸」及びLNAという用語は本明細書では、1つ又は複数のLNAモノマーを含むオリゴヌクレオチドを指すために互換的に使用される。本開示の態様によれば、5-メチルdC、2,6-ジアミノプリン、プロピニル-デオキシウリジン、5-ヒドロキシブチニル-2'-デオキシウリジン、及びそれらの任意の2つ以上の組み合わせを含むがこれらに限定されない、様々な $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体のいずれかを使用することができる。任意の $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体、及び/又はそれらの誘導体は、誘導体がヌクレオチド類似体を含む二本鎖オリゴヌクレオチドの融解温度( $T_m$ )を、ヌクレオチド類似体を含まない同様の二本鎖オリゴヌクレオチドと比較して上昇させる機能を保持する限り、含めることができる。

10

20

#### 【0078】

本開示の態様によれば、ブロッカーオリゴヌクレオチドは55乃至100の範囲の $T_m$ を有し、例えば60乃至100、例えば65乃至100、例えば70乃至100、例えば75乃至99、例えば75乃至90、例えば75乃至85、例えば55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100。

#### 【0079】

本開示の態様によれば、ブロッカーオリゴヌクレオチドのセットは55乃至100の範囲の $T_m$ を有し、例えば60乃至100、例えば65乃至100、例えば70乃至100、例えば75乃至99、例えば75乃至90、例えば75乃至85、例えば55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100。

30

#### 【0080】

本開示の態様によれば、1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端は任意に修飾され、例えばポストハイブリダイゼーションキャプチャPCRステップにおいて、3'末端からのポリメラーゼ伸長を阻止する。1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端を修飾して3'末端からのポリメラーゼ伸長を妨げるための様々な技術のいずれかを使用することができ、これはオリゴヌクレオチド3'末端のヒドロキシル基の除去又は修飾、例えば3'ジデオキシ-C(ddC)、リン酸基、又は3'スペーサーを含有することを含むが、これらに限定されない。本開示の態様によれば、スペーサーはブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端に存在する。非限定的な例は3'スペーサーC3(略称3SpC3)、オリゴヌクレオチドブロッカーの末端3'ヒドロキシル基に結合した3炭素鎖(C3)である。或いは、例えばポストハイブリダイゼーションキャプチャPCRステップ、又はポストハイブリダイゼーションキャプチャの他のポリメラーゼ媒介伸長ステップを使用しない場合、ブロッカーオリゴヌクレオチドの3'末端は3'末端からのポリメラーゼ伸長を防ぐために修飾はされない。

40

#### 【0081】

「ハイブリダイゼーション」及び「ハイブリダイズされた」という用語は、相補的な核

50

酸群の対合及び結合を指す。ハイブリダイゼーションは、当該技術分野で周知のように、核酸の相補性の程度、核酸の融解温度 $T_m$ 、及びハイブリダイゼーション条件及びポストハイブリダイゼーション洗浄条件の厳しさなどの要因に応じて、2つの核酸間において様々な程度で発生する。「ハイブリダイゼーション条件の厳しさ」という用語は、ホルムアミド、ベタイン、及びポリエチレングリコールなど特定の一般的な添加剤に関する、ハイブリダイゼーション媒体の温度、イオン強度、及び組成の条件を指す。「ポストハイブリダイゼーション洗浄条件の厳しさ」という用語は、ハイブリダイゼーション媒体の温度、イオン強度、及び組成の条件を指すが、界面活性剤、ホルムアミド、ベタイン、及びポリエチレングリコールなどの添加剤は、洗浄条件では一般的に使用されない。使用できる特定の界面活性剤として、例えばSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、ラウロイルサルコシン酸ナトリウム(サルコシル)、及びCTAB(セチルトリメチルアンモニウム臭化物)を含む。特定の核酸に関する特定のハイブリダイゼーション条件及びハイブリダイゼーション後の洗浄条件の決定はルーティンであり、例えば、J. Sambrook and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; and F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5th Ed., 2002に記載されているように、当該技術分野では周知である。ハイストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件とは、実質的に相補的な核酸のハイブリダイゼーションのみを可能にする条件である。ハイストリンジェンシーポストハイブリダイゼーション洗浄条件とは、実質的に相補的な核酸のハイブリダイゼーションのみを維持する条件である。本明細書で使用されているように「アニーリング」という用語は、オリゴヌクレオチドの標的核酸とのペアリング及び結合を指す。「アニーリング」及び「ハイブリダイズ」の用語の間には意図的な区別はない。

#### 【0082】

本明細書で使用されているように「相補的」という用語は、ヌクレオチド間、ヌクレオチド類似体間、又はヌクレオチド及びヌクレオチド類似体間のワトソン・クリック塩基対形成を含むがこれらに限定されず、ここでヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体は、例えば、2つの水素結合によってアデニン残基に結合したチミン又はウラシル残基、及び3つの水素結合によって結合したシトシン及びグアニン残基を用いて互いに水素結合する。一般に、核酸は特定の第2ヌクレオチド配列に対して「パーセント相補性」を持つと説明されるヌクレオチド配列を含む。例えば、ヌクレオチド配列は特定の第2ヌクレオチド配列に対して80%、90%、又は100%の相補性を持ってよく、これは、配列のヌクレオチドの10個中8個、10個中9個、又は10個中10個が、特定の第2ヌクレオチド配列に相補的であることを示す。例えば、ヌクレオチド配列3'-TCGA-5'はヌクレオチド配列5'-AGCT-3'に対して100%相補的である。更にヌクレオチド配列3'-TCGA-5'は、ヌクレオチド配列5'-TTAGCTGG-3'の領域に対して100%、つまり完全に相補的である。本明細書で使用される「相補」という用語は、所定のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を指す。

#### 【0083】

通常、約85乃至100%の相補性を持つ核酸は高度に相補的であると考えられ、ハイストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。中程度のストリンジェンシー条件は、中程度の相補性、約50乃至84%の相補性を持つ核酸、及び高い相補性を持つ核酸がハイブリダイズする条件によって例示される。対照的に、ローストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、相補性が低い核酸群がハイブリダイズする条件である。「特異的ハイブリダイゼーション」及び「特異的にハイブリダイズする」という用語は、サンプル中の標的核酸以外の核酸と実質的にハイブリダイズすることなく、特定の核酸が標的核酸とハイブリダイズすることを指す。

#### 【0084】

「回文ヌクレオチド配列」という用語は、5'から3'方向に読んだ場合でも、相補鎖上で5'から3'方向に読んだ場合でも同じヌクレオチド配列になるような、逆方向反復であるヌクレオチド配列を指す。例えば、5'から3'に読み取られる回文ヌクレオチド配列は5

'-GGATCC-3'であり、相補鎖上で5'から3'に読み取られた場合、つまり3'-CCTAGG-5'と同じである。

【0085】

アニーリング温度で、ブロッカーオリゴヌクレオチドの過剰なアダプターへのアニーリングは実行される。アニーリング温度は、ブロッカーオリゴヌクレオチドの核酸配列及び標的核酸を含む要因と、塩濃度及びホルムアミド、ベタイン、ポリエチレングリコール、SDSなどの界面活性剤、及びDMSOなどの添加剤の濃度などの要因と、を含む反応媒体の組成に依存する。通常、アニーリング温度は30乃至65の範囲であるが、これより高くても低くてもよい。アニーリング温度はブロッカーオリゴヌクレオチドの融点( $T_m$ )より高くても低くてもよいが、通常、本開示の態様によるブロッカーオリゴヌクレオチドはアニーリング温度より高い $T_m$ を有し、アニーリング中にブロッカーオリゴヌクレオチドが標的に結合すること、即ちハイブリダイズすることを確実にする。同様に1回又は複数のハイブリダイゼーション後洗浄は、ブロッカーオリゴヌクレオチド(群)の $T_m$ より低い温度で実行されてもよい。

10

【0086】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを過剰なアダプターにアニーリングした後、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第1の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接し、且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端が第2の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接する、ハイブリダイズ複合体が生成され、これにより過剰な非連結型3'アダプターが低減される。

20

【0087】

必要に応じて、ハイブリダイズ複合体の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端は、第1の非連結型3'アダプターの5'末端の隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションされ、且つハイブリダイズ複合体の第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端は、第2の非連結型3'アダプターの5'末端の隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションされて、ライゲーション複合体が生成され、それにより過剰な非連結型3'アダプターが低減される。

【0088】

ハイブリダイズ複合体又はライゲーション複合体は、所望のシーケンスライブラリ分子から分離することができる。ハイブリダイズ複合体又はライゲーション複合体の所望のシーケンスライブラリ分子からの分離は、カラム単位の分離、フィルター単位の分離、ゲル単位の分離、ライゲーション複合体又は所望のシーケンスライブラリ分子のいずれかを固体又は半固体の支持体に結合し、続いて非結合物質を結合物質から分離するなどのサイズ単位の分離であってもよい。本開示の態様によれば、固体支持体には磁性ビーズが含まれる。

30

【0089】

鋳型DNA増幅はインビトロ増幅法を用いて達成される。「増幅する」、「増幅」、及び「増幅している」という用語は、一般的に、鋳型核酸を複製し、それにより鋳型核酸の全て又は一部の複製を含む核酸を生成する方法又は技術を指すために用いられ、当該生成核酸はアンプリコンとも呼ばれる。本発明の実施の形態に含まれる増幅方法は、核酸ポリメラーゼに触媒され、標的核酸を挟む一对のプライマーを用いる鋳型指向性プライマー伸長を含む増幅方法であり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR(RT-PCR)、ライゲーション媒介PCR(LM-PCR)、phi-29PCR、リアルタイム定量PCR(qPCR)、全ゲノム増幅、及びC.W. Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; V. Demidov et al., DNA Amplification: Current Technologies and Applications, Taylor & Francis, 2004; and Kroneis, T. (Ed.), Whole Genome Amplification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), 2015, Humana Press ISBN-10: 1493929895で説明されている他の核酸増幅方法を例示的に含むが、これらに限定されない。

40

【0090】

50

「等温増幅」という用語は単一温度増幅を含む核酸増幅を指し、したがって熱サイクリング(PCRにおけるような)の必要性を免れる。等温増幅の例には、環状ヘリカーゼ依存性増幅(cHDA)、ゲノム指数関数的増幅反応(GEAR)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、等温多重置換増幅(IMDA)、ループ介在等温増幅(LAMP)、多重置換増幅(MDA)、ニックキング酵素増幅反応(NEAR)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、分岐増幅(RAM)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)、ローリングサークル増幅(RCA)、自己持続性配列複製(3SR)、シグナル介在RNA増幅技術(SMART)、鎖置換増幅(SDA)、単一プライマー等温増幅(SPIA)、及び転写介在増幅(TMA)を含むが、これらに限定されない。

【0091】

「増幅核酸」、「増幅DNA」及び「アンプリコン」という用語、並びにそれらの複数形は、標的核酸鋳型の複製プロセスの生成物を指す。

10

【0092】

増幅核酸には、当該プライマーに存在するが元の核酸鋳型には存在しない核酸配列、化学反応のための官能基、検出可能なラベルなどの追加的な材料が任意に含まれるが、これらに限定されない。アンプリコンに組み込むことができ、それにより生成ライブラリに組み込まれるプライマー由来の核酸配列の非限定的な例は、ユニバーサル配列、アダプター、インデックス配列、識別配列、検出配列、ソート配列、キャプチャ配列、制限酵素切断部位、シーケンシングプライマー結合部位配列、及び増幅プライマー結合部位配列を含む。

【0093】

「ユニバーサル配列」という用語は、複数の核酸分子に共通しない核酸配列も含む複数の核酸分子中に存在する核酸配列を指す。ユニバーサル配列により、当該複数の核酸分子は、特定のプライマー又はキャプチャ部分への結合などの、共通の機能的側面を共有することができる。ユニバーサル伸長プライマー結合部位の非限定的な例は、P5プライマー及びP7プライマーと同一又は相補的な配列を含む。P5プライマー及びP7プライマー、それらの相補体、及び次世代シーケンシング(NGS)用のフローセル基板上での捕捉用フローセルにおけるような用途は、例えばWO2015106941で詳述されているように、本技術分野で既知である。

20

【0094】

本開示の態様によれば、インデックス配列はライブラリ調製中にアンプリコンに組み込まれる。インデックス配列は、アンプリコンのセットに共通する固有の核酸配列であって、例えばアンプリコンのセットが特定のソースに由来することを証明する。異なるソース由来の複数の核酸を配列決定のためにプール可能であり、必要に応じて、後でデータ分析のために「デマルチプレキシング化」が可能であるので、インデックス配列はマルチプレキシングを可能にする。

30

【0095】

「プライマー」という用語は、鋳型核酸に相補的なオリゴヌクレオチドプライマー伸長生成物の合成が誘導される条件下で、鋳型指向性プライマー伸長生成物の合成開始点として作用することが可能なオリゴヌクレオチドを指す。このような条件には、適切な温度及びpHにおける、ヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体、及び適切なポリメラーゼの存在を含む。

40

【0096】

プライマーは通常、約10個乃至30個の連続ヌクレオチド長であり、より長くても短くてもよい。オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の領域と完全に又は実質的に相補的であるため、ハイブリダイゼーション条件下で、当該オリゴヌクレオチドプライマーは当該鋳型核酸の相補的領域にアニールする。本開示の態様によるプライマー伸長生成物の合成に適した反応条件には、ポリメラーゼ;及びヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体を含むが、これに限定されない、適切な反応物成分の存在を含む。

【0097】

本開示の態様による方法において、増幅プライマー、シーケンシングプライマー及び逆

50

転写プライマーなど、様々なプライマーを使用してもよい。

【0098】

プライマー設計は当業者に周知されており、周知の方法及び基準にしたがって設計される。例えば、増幅反応などにおいてプライマーのペアを使用する場合、プライマーのアニール温度は数度以内でほぼ同じでなければならない。一般にプライマーは互いに二量体を形成してはならず、プライマーはヘアピンなどの二次構造を形成してはならない。プライマー設計及び増幅手順の方法及び考慮事項は、Yuryev, A., PCR Primer Design, Methods in Molecular Biology, vol. 42, Human Press, 2007; CW Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; V. Demidov et al., DNA Amplification: Current Technologies and Applications, Taylor & Francis, 2004で詳述されている。

10

【0099】

第1鎖相補的DNAを生成するプライマー伸長は、相補鎖を生成するポリメラーゼ活性に適合する伸長反応条件下で、ポリメラーゼ酵素を用いて達成される。プライマー伸長のための特定の条件及びプロトコルはJ.Sambrook and D.W.Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; and F.M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002で詳述される。

【0100】

本開示の態様によれば、サンプル核酸はRNA、即ちサンプルRNAであり、サンプルRNAは逆転写されてcDNAを生成する。サンプルRNAはアダプターの添加前又は添加後に逆転写されてもよい。

20

【0101】

本開示の方法の態様によれば、当該方法は、RNAを含む標的核酸へ逆転写プライマーをアニールすること;及びRNAを逆転写してRNAに相補的な第1鎖相補的DNA(cDNA)を生成することを含む。

【0102】

逆転写プライマー又は逆転写プライマーセットの標的核酸へのアニールは、一定のアニール温度で行われる。アニール温度は、逆転写プライマー又はプライマー群の核酸配列と、標的核酸群と、塩濃度及びホルムアミド、ベタイン、ポリエチレングリコール、SDS、DMSO等(但しこれらに限定されない)の添加剤の濃度等の要素を含む反応媒体の組成と、を含む要素に依存する。通常、アニール温度は30°C乃至65°Cの範囲であるが、より高くても、又は低くてもよい。アニール温度は、逆転写プライマーの融解温度( $T_m$ )より高くても、又は低くてもよい。多くの場合、アニール温度は逆転写プライマーの $T_m$ より高く、反応のストリンジェンシーを向上させる。

30

【0103】

本開示によりシーケンスライブラリを生成する方法が提供され、これは標的RNAの逆転写を含み、第1鎖相補的DNA(cDNA)を生成し、標的RNAを転写する逆転写酵素活性反応に適合する反応条件下で逆転写酵素を使用することで達成される。逆転写の特定の条件及びプロトコルは、J. Sambrook and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd Ed., 2001; and F.M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002で詳述される。

40

【0104】

本開示によれば、第1鎖cDNAに相補的な第2鎖DNAを重合させ二本鎖cDNAを生成することを更に含む、シーケンスライブラリの生成方法が提供される。第1鎖cDNAに相補的な第2鎖DNAの重合には適切なDNAポリメラーゼの提供、及び二本鎖cDNAを生成するDNAポリメラーゼ活性に適合する反応条件下で二本鎖cDNAを生成する重合を含んでもよい。

【0105】

50

適切なポリメラーゼに、細菌DNAポリメラーゼ、真核生物30DNAポリメラーゼ、古細菌DNAポリメラーゼ、ウイルスDNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、T4DNAポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、及びファージDNAポリメラーゼを含んでもよく、中でもDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE1.0及びSEQUENASE2.0(US Biochemical)、T5DNAポリメラーゼ、及びPhi29DNAポリメラーゼを含む。

【0106】

アンブリコンシーケンスは、従来のサンガーシーケンス及び大規模並列シーケンス法(「次世代シーケンス」)を含む様々なシーケンス方法のいずれかを使用して達成される。

【0107】

有利なことに、ペアエンドリードが実行される。「ペアエンドリード」という用語は、アンブリコンの両端から「読まれて」シーケンシングされる1つの配列を含むシーケンス技術を指す。これによりシーケンスデータ収量の増加、及びシーケンス結果の信頼性の向上が可能となる。

【0108】

本開示の態様によれば、ハイブリダイズ複合体又はライゲーション複合体の形成によって、過剰な非連結型3'アダプターは減少するが除去されないため、5'アダプターをライブラリ挿入物にライゲーションさせるステップは、5'アダプターを過剰な非連結型3'アダプターの一部とライゲーションさせることも含み、5'アダプターと、3'アダプターとの界面で、5'アダプターがライゲーションによって3'アダプターと共有結合するアダプターダイマーを生成する。したがって、本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを減らす方法は、シーケンスライブラリ分子が増幅反応によってアダプターダイマーと比較して選択的にエンリッチされるように、増幅反応におけるアダプターダイマー増幅を阻害することを更に含む。

【0109】

本開示の態様によれば、アダプターダイマー増幅の阻害には、アダプターダイマーの少なくとも一部の増幅前除去を含む。

【0110】

本開示の態様によれば、増幅前の少なくとも一部のアダプターダイマーの除去は以下の1つ又は複数を含む:1)酵素によるアダプターダイマーの特異的切断;2) CRISPR/Cas9に基くアダプターダイマーの切断;3)ゲル精製;4)SPRIビーズによるサイズ選択;及び5)混合物へのアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの添加(アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドはアダプターダイマー増幅の阻害に有効)。

【0111】

酵素によるアダプターダイマーの特異的切断とは、制限エンドヌクレアーゼを用いてアダプターダイマーを2つ以上の断片に切断し、それによりアダプターダイマーの数を減らすことを指す。アダプターダイマーのヌクレオチド配列を分析して、どの制限エンドヌクレアーゼ(群)がアダプターダイマーを切断するかを決定することが可能であり、又は様々な制限エンドヌクレアーゼをアッセイし、どの制限エンドヌクレアーゼがアダプターダイマーを切断するのに効果的かを決定することが可能であり、アダプターダイマーの増幅を防ぐ。

【0112】

CRISPR/Ceria slurryによる切断とは、CRISPR/Casシステムを用いてアダプターダイマーを2つ以上の断片に切断し、それによりアダプターダイマーの数を減らすことを指す。本開示の態様によれば、アダプターダイマーはCRISPRステムループを含み、Casタンパク質はステムループを認識し、アダプターダイマーを切断せずに又はアダプターダイマーを切断せずにステムループに高い親和性で結合し、それによりアダプターダイマー増幅を防ぐ。

【0113】

アダプターダイマーを固体支持体上に固定し、固定されたアダプターダイマーと共に当

10

20

30

40

50

該固体支持体を混合物中から除去すること、又はシーケンスライブラリ分子を固体支持体上に固定し、固定されたシーケンスライブラリ分子と共に当該固体支持体を除去することのいずれかによって、固体支持体からのシーケンスライブラリ分子の溶出が結果として生じ、アダプターダイマーを混合物中のシーケンスライブラリ分子から分離するために可逆的固相固定法(SPRI)ビーズによるサイズ選択を使用できる。

【0114】

「アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチド」という用語は、増幅プライマー結合部位を含むアダプターダイマーの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズし、それによってアダプターダイマーの増幅を防ぐオリゴヌクレオチドを指す。アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの長さは、アダプターダイマーのサイズや使用するハイブリダイゼーション条件などの要因に左右され、約10乃至約300ヌクレオチド長の範囲である。本開示の態様によれば、アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの長さは、約10乃至約300ヌクレオチド長、約10乃至約200ヌクレオチド長、約10乃至約100ヌクレオチド長、約10乃至約75ヌクレオチド長、約10乃至約50ヌクレオチド長、約10乃至約40ヌクレオチド長、約10乃至約30ヌクレオチド長、又は約10乃至約20ヌクレオチド長の範囲である。本開示の態様によれば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドのヌクレオチドは非天然ヌクレオチドである。本開示の態様によれば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドのヌクレオチドは、 $T_m$ 増加ヌクレオチド及び/又はヌクレオチド類似体である。本開示の態様によれば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの各ヌクレオチドがLNAモノマー、PNAモノマー、BNAモノマー、その他の $T_m$ 増加ヌクレオチド類似体、又はそれらのいずれか2つ以上である。本開示の態様によれば、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドのヌクレオチドがLNAモノマーである。

【0115】

アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの一例は、5'-C+G+AG+AA+T+T+CC+A+GA+T+CG+T+C+G+GA+C+T+G-3'(配列番号2)であり、ここで+はLNA塩基(即ち組み込まれたLNAモノマー)を示す。好ましい例では3SpC3(3'(C3)プロピルスペーサー)が3'末端に存在する。

【0116】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減させるためのキットが提供され、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを減らすための1つ以上のブロッカーオリゴヌクレオチド及び/又はブロッカーオリゴヌクレオチド対を含む。

【0117】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマー低減させるためのキットには、更にアダプターダイマー増幅の阻止に有効な1つ又は複数のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが含まれる。

【0118】

本開示の態様によれば、シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのキットが提供され、1つ又は複数のアダプターダイマー隣接部分と、5'アダプターと、3'アダプターと、の界面において5'アダプターのヌクレオチドを少なくとも1つ含む、1つ又は複数の隣接部分と、増幅プライマー結合部位を含む3'アダプター隣接部分と、に相補的なアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドを含む。

【0119】

本開示の態様によるキットには、水性、緩衝液、又は凍結乾燥の形態で、1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチド及び/又は、1つ又は複数のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが含まれる。1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチド及び

/又は1つ又は複数のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドは、共に又は別々にパッケージ化されてもよい。1つ又は複数のブロッカーオリゴヌクレオチド及び/又は、1つ又は複数のアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドは、シーケン斯拉イブラリの調製での使用に適切な量に分注されてもよく、又はユーザーが分注できるようにバルクでパッケージ化されてもよい。追加のキットコンポーネントには、緩衝液、希釈剤、安定剤、防腐剤、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、及び酵素などの試薬を含んでもよいがこれらに限定されない。

【0120】

本開示の態様による組成物及び方法は、多数の用途において有用性を有し、シーケンシングプロトコル、特に小さな挿入物を含むシーケン斯拉イブラリにおいてシーケンシングされたアダプターダイマーの低減を含むがこれに限定されない。

10

【0121】

本開示の態様による組成物及び方法は、サンプル中に存在する希少核酸をより頻繁に検出できるような高感度を提供する。希少核酸を確実に検出することで、患者サンプル中の核酸を分析する診断方法及び治療方法が可能になる。

【0122】

本発明の組成物及び方法の実施の形態を以下の実施例で説明する。これらの実施例は説明目的で提供されており、本発明の組成物及び方法の範囲を制限するものではない。

【実施例】

【0123】

実施例1

20

【0124】

3'アダプターライゲーション

a. 以下の成分を氷上で混合する:

i. 投入RNA 1  $\mu$ L (1 ng/ $\mu$ L)

ii. ヌクレアーゼフリー水 9.5  $\mu$ L

iii. 3'アダプターC3/5rApp/TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/3SpC3/ (配列番号3) 1  $\mu$ L (5  $\mu$ M)

iv. 3'ライゲーションバッファー 7  $\mu$ L

v. 3'ライゲーション酵素ミックス 1.5  $\mu$ L

vi. 総反応容量 20  $\mu$ L

30

b. 次のようにインキュベートする:

i. 25 °C で1時間

ii. 4 °C で保持する

【0125】

非連結型3'アダプターの不活性化

a. 氷上で回文3'末端を有するオリゴヌクレオチドブロッカー1  $\mu$ L (10  $\mu$ M)を反応に加え、5'-CACCCGAGAATTCCAC/iisodG//iMe-isodC//iisodG//iMe-isodC/G-3' (配列番号1)が均一になるまで混ぜる。この例では、オリゴヌクレオチドブロッカーの回文3'末端により、2つのオリゴヌクレオチドブロッカー分子の3'部分が互いにハイブリダイズし、ブロッカーオリゴヌクレオチドの5'部分がハイブリダイゼーション条件下で過剰な3'アダプターとハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション複合体を形成することに留意する。

40

b. 次のようにインキュベートする:

i. 70 °C で10分

ii. 4 °C で保持する。

【0126】

5'アダプターライゲーション

a. 氷上で以下の成分を混合する:

i. 前のステップ由来の反応物 21  $\mu$ L

50

ii. 5' アダプター 5'-rGrUrUrCrArGrArGrUrCrUrArCrArGrUrCrCrGrArCrGrArUrC-3' (配列番号4) 1.5  $\mu$ L (2.5  $\mu$ M) - 示されているヌクレオチドがリボヌクレオチドであることを強調するためにここで「r」を使用している。

iii. ATP 1.5  $\mu$ L (10mM) (NEB cat#P0756L)

iv. 5'ライゲーション酵素ミックス 2  $\mu$ L

v. 総反応容量 26  $\mu$ L

b. 次のようにインキュベートする:

i. 20 で1時間

ii. 4 で保持する。

#### 【0127】

10

##### 逆転写

a. サーマルサイクラー上の前のステップ由来の5'ライゲーション反応物26  $\mu$ Lから始める。

b. サーマルサイクラーを次のようにプログラムする:

i. 70 で2分

ii. 50 で30分

iii. 90 で5分

iv. 4 で保持。

c. RTマスターミックスを次のように調製する:

i. RTバッファー 13  $\mu$ L

ii. RTプライマー5'-CCTTGGCACCGAGAATTCCA-3' (配列番号5) 1  $\mu$ L (25  $\mu$ M)

iii. EnzScript逆転写酵素(Enzymatics) 2  $\mu$ L

iv. 総容量 16  $\mu$ L

20

d. 上記5'アダプターライゲーションセクションのa.由来混合物26  $\mu$ Lをサーマルサイクラーにセットし、プログラムを開始する。

e. サーマルサイクラーが50 まで低下したら、サーマルサイクラーにRTマスターミックス16  $\mu$ Lを加えて混ぜる。反応物をサーマルサイクラーから取り出さない。

f. インキュベーションを完了し、4 まで温度を下げる。

#### 【0128】

##### ビーズのクリーンアップ

30

a. アダプターダイリューション溶液40  $\mu$ Lを加えて混ぜる。

b. NEXTFLEXクリーンアップビーズ40  $\mu$ Lを加えて混ぜる。

c. イソプロパノール90  $\mu$ Lを加えて混ぜる。

d. 室温で5分間インキュベートする。

e. 5分間又は溶液が透明になるまで磁気スタンド上に置く。

f. 吸引し上清を除去する。

g. 80%エタノールを200  $\mu$ L加え、30秒間インキュベートし、上清を吸引除去して洗浄する。

h. 上記の手順を繰り返して合計2回洗浄する。

i. 合計3分間磁気スタンド上で乾燥させる。1分後にウェルの底に溜まった液体を吸引及び除去する。

40

j. 磁気スタンドから取り出し、ヌクレアーゼフリー水40  $\mu$ Lに再懸濁する。

k. 2分間インキュベートする。

l. 磁気スタンド上に置く。

m. ビーズがペレットを形成したら18  $\mu$ Lを取り、ストリップチューブに追加する。このクリーンなcDNAをバックアップとして保持する。

n. 更に18  $\mu$ Lを取り、新しいウェルに移す。このcDNAは次のステップで増幅する。

#### 【0129】

##### PCR

a. 以下の成分を氷上で混合する:

50

- i. 前のステップ5n由来のcDNA 18  $\mu$ L
- ii. NEXTFLEX UDIバーコードプライマーミックス 2  $\mu$ L
- iii. NEXTFLEX PCR マスターミックス 5  $\mu$ L
- iv. long dblock02C3(又は水) 5'-C+G+AG+AA+T+T+CC+A+GA+T+CG+T+C+G+GA+C+T+G/3SpC3/ (配列番号2) 1  $\mu$ L(10  $\mu$ M)
- v. 総反応容量 26  $\mu$ L
- b. 反応物を次のようにインキュベートする:
  - i. 98 で30秒
  - ii. 98 で10秒
  - iii. 65 で20秒、これを合計22サイクル繰り返す
  - iv. 72 で15秒
  - v. 72 で2分
  - vi. 4 で保持。

10

## 【0130】

## ビーズのクリーンアップ

- a. 前のステップ由来のPCR反応液25  $\mu$ Lを取る。
- b. NEXTFLEXクリーンアップビーズ48.6  $\mu$ Lを加えて混ぜる。
- c. 室温で5分間インキュベートする
- d. 磁気スタンド上に5分間置又は溶液が透明になるまで置く。
- e. 上清を吸引除去する。
- f. 80%エタノール200  $\mu$ Lを加え、30秒間インキュベートし、上清を吸引除去して洗淨する。
- g. 上記の手順を繰り返して合計2回洗淨する。
- h. 磁気スタンド上で合計3分間乾燥させる。1分後にウェルの底に溜まった液体を吸引除去する。
- i. 磁気スタンドから取り出し、ヌクレアーゼフリー水20  $\mu$ Lに再懸濁する。
- j. 2分間インキュベートする。
- k. 磁気スタンド上に置く。
- l. ビーズがペレットを形成したら、18  $\mu$ Lを取り出す。これがシーケンスライブラリである。

20

30

## 【0131】

## シーケンスパラメータ(MiSeq)

- a. 2%phiX
- b. 1x76。

## 【0132】

結果は図3に示される。

## 【0133】

## 実施例2

## 【0134】

## 1. 3'アダプターライゲーション

- a. 氷上で以下の成分を混合する:
  - i. 投入RNA 「X」  $\mu$ L(総RNA 1ng)
  - ii. tRNA/YRNAプロッカー 1  $\mu$ L
  - ii. ヌクレアーゼフリー水 「Y」  $\mu$ L
  - iv. 3'アデニル化アダプター 5'-rApp/TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/ 3SpC3/-3' (配列番号3) 1  $\mu$ L
  - v. 3'ライゲーションバッファー 12.5  $\mu$ L
  - vi. 3'ライゲーション酵素ミックス 1.5  $\mu$ L
  - vii. 総反応量 20  $\mu$ L(水及びRNAは総量4  $\mu$ Lに相当)
  - viii. 均質化するまで粘性のある反応物を少なくとも3秒間ボルテックスにより混

40

50

ぜる。

c. 次のようにインキュベートする:

- i. 25 で1時間
- ii. 4 で保持。

2. 非連結型3'アダプターの不活性化

a. 氷上で、回文3'末端オリゴヌクレオチドブロッカーを有するオリゴヌクレオチドブロッカーを含むアダプター不活性化ミックス4  $\mu$ L:5'-CACCCGAGAATTCCAC/iisodG//iMe-isodC//iisodG//iMe-isodC/G-3'(配列番号1)を反応物に加え、均質化するまで混ぜる。

b. 次のようにインキュベートする:

- i. 70 で2分
- ii. 4 で保持。

(反応物は黄色に変わるはずである)

3. 5'アダプターライゲーション

a. 氷上で以下の成分を混合する:

- i. 前のステップ由来の反応物 24  $\mu$ L
- ii. 5'アダプター 5'-UCUUUCCCUACACGACGCUCUUCGGAUCU-3'(配列番号

6) 1  $\mu$ L

- iii. 5'ライゲーションバッファー 3  $\mu$ L
- iv. 5'ライゲーション酵素ミックス 2  $\mu$ L
- v. 総反応容量 30  $\mu$ L

b. 次のようにインキュベートする:

- i. 20 で1時間
- ii. 4 で保持。

(反応物はオレンジ色に変わるはずである)

4. 逆転写

a. 氷上で以下の成分を混合する:

- i. RTバッファー 7  $\mu$ L
- iii. RT酵素ミックス 2  $\mu$ L
- iv. RTプライマー 5'-CCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'(配列番号5) 1  $\mu$ L(25

$\mu$ M)

v. 総反応容量 40  $\mu$ L

b. 次のようにインキュベートする:

- ii. 50 で60分
- iii. 90 で5分
- iv. 4 で保持。

c. インキュベーションを完了し、4 まで温度を低下させる。

5. ビーズのクリーンアップ

a. アダプターダイリューション溶液40  $\mu$ Lを加えて混ぜる。

b. NEXTFLEXクリーンアップビーズ40  $\mu$ Lを加えて混ぜる。

c. イソプロパノール90  $\mu$ Lを加えて混ぜる。

d. 室温で5分間インキュベートする。

e. 5分間又は溶液が透明になるまで磁気スタンド上に置く。

f. 上清を吸引除去する。

g. 80%エタノールを200  $\mu$ L加え、30秒間インキュベートし、上清を吸引除去して洗浄する。

h. 上記の手順を繰り返して合計2回洗浄する。

i. 磁気スタンド上で合計3分間乾燥させる。1分後、ウェルの底に溜まった液体を吸引除去する。

j. 磁気スタンドから取り出し、ヌクレアーゼフリー水18  $\mu$ Lに再懸濁する。

10

20

30

40

50

- k. 2分間インキュベートする。
- l. 磁気スタンド上に置く。
- m. 16  $\mu$ L取って新しいウェルに移す。このcDNAは次のステップで増幅される。

## 6. PCR

- a. 氷上で以下の成分を混合する：
  - i. 上記のビーズクリーンアップセクション由来の前ステップからのcDNA 16  $\mu$ L
  - ii. RNAUDIバーコードプライマー 4  $\mu$ L(12.5  $\mu$ M)
  - iii. NEXTFLEX Small RNA PCRマスターミックス 6  $\mu$ L
  - iv. 総反応容量 26  $\mu$ L

次のように反応物をインキュベートする：

- i. 98 °C で30秒
- ii. 98 °C で10秒
- iii. 65 °C で20秒
- iv. 72 °C で15秒
- ii、iii、及びivを合計22サイクル繰り返す
- v. 72 °C で2分
- vi. 4 °C で保持。

10

## 7. 両面ビーズのクリーンアップ

- a. 前のステップからPCR反応液26  $\mu$ Lを取る。
- b. NEXTFLEXクリーンアップビーズ34  $\mu$ Lを加えて混ぜる。
- c. 室温で5分間インキュベートする。
- d. 上清56  $\mu$ Lを新しいウェルに移す。
- e. 13  $\mu$ LのNEXTFLEXクリーンアップビーズを加えて混ぜる。
- d. 磁気スタンド上に5分間又は溶液が透明になるまで置く。
- e. 上清を吸引除去する。
- f. 80%エタノール200  $\mu$ Lを加え、30秒間インキュベートし、上清を吸引除去して洗淨する。
- g. 上記の手順を繰り返して合計2回洗淨する。
- h. 磁気スタンド上で合計3分間乾燥させる。ウェルの底に溜まった液体を1分後に吸引して除去する。
- i. 磁気スタンドから取り出し、ヌクレアーゼフリー水17  $\mu$ Lに再懸濁する。
- j. 2分間インキュベートする。
- k. 磁気スタンド上に置く。
- l. ビーズがペレットを形成したら、15  $\mu$ Lを取り出す。これがシーケンスライブラリである。

20

30

## 8. シーケンスパラメータ(MiSeq)

- a. 2% phiX
- b. 1x75。

結果を図4に示す。

【0135】

項目

40

【0136】

項目1.シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減する方法であって以下を含む方法：

各5'末端及び各3'末端を有するサンプル核酸群と、少なくとも8ヌクレオチド長である各5'末端部分と、アデニル化ヌクレオチドである5'末端を有する3'アダプターと、リガーゼとを、ライゲーション反応条件下において混合物中で混合し、1)3'アダプターの5'末端にライゲーションされたサンプル核酸の3'末端をそれぞれが含む第1ライゲーション生成物群と、2)混合物中に過剰な未ライゲーション3'アダプターと、を生成すること；

ブロッカーオリゴヌクレオチドを混合物に添加すること、当該ブロッカーオリゴヌクレ

50

オチドは以下を含む：

a) 以下を含む第1ブロック-オリゴヌクレオチド：

i) 少なくとも8ヌクレオチド長の第1ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分、及びii) 少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、第1オリゴヌクレオチド3'末端を含む第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分、ここでの1乃至20ヌクレオチドの少なくとも1つは非天然ヌクレオチド類似体であり；

b) 以下を含む第2ブロック-オリゴヌクレオチド：

iii) 少なくとも8ヌクレオチド長の第2オリゴヌクレオチド5'部分、及び iv) 少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端を含む第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分であり、ここでの1乃至20ヌクレオチドのうち少

10

なくとも1つは非天然ヌクレオチド類似体であり；  
ここで第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分は長さが等しく互いに相補的であり；

第1ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分及び第2ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分は、いずれも、3'アダプターの5'末端部分に対して相補的であり；

ハイブリダイゼーション条件下で混合物をインキュベートし、それにより第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分を第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分とハイブリダイズし、第1ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分を過剰な非連結型3'アダプターとハイブリダイズし、それによって第2ブロック-オリゴヌクレオチド5'部分を過剰な非連結型3'アダプターとハイブリダイズし、第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端が第1の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接し、第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端が第2の非連結型3'アダプターのアデニル化5'末端ヌクレオチドに隣接するハイブリダイズ複合体を生成し；それによって混合物中の過剰な非連結型3'アダプターを減らし、精製混合物を生成すること。

20

【0137】

項目2. 第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端及び第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端がいずれも、過剰な非連結型3'アダプター5'末端のアデニル化ヌクレオチドにライゲーション可能であり；更にハイブリダイズ複合体の第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端を、第1の非連結型3'アダプターの5'末端に位置する隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションし、ハイブリダイズ複合体の第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'末端を、第2の非連結型3'アダプター5'末端に位置する隣接アデニル化ヌクレオチドにライゲーションしてライゲーション複合体を生成し、それにより混合物中の過剰な非連結型3'アダプターを減らし、精製混合物を生成することを含む、項目1に記載の方法。

30

【0138】

項目3. 第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチド類似体であり、第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20個のヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチド類似体である、項目1又は2に記載の方法。

40

【0139】

項目4. 第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分がそれぞれ2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチド長である場合に、第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分はそれぞれ回文ヌクレオチド配列を含み、第1ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列は第2ブロック-オリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列と同一である、項目1、2、又は3のいずれかに記載の方法。

【0140】

項目5. 項目1乃至4のいずれかに記載の方法であって更に以下を含む方法：5'アダプタ

50

ーを混合物へ添加すること、3'末端を有する5'アダプター、ここで第1ライゲーション生成物はそれぞれ3'アダプターの5'末端に結合したサンプル核酸の3'末端と、5'アダプターの3'末端に結合したサンプル核酸の5'末端と、を含み、それによりシーケンスライブラリ分子を生成し、当該シーケンスライブラリ分子が5'アダプターと、3'アダプターとの間に配置され且つこれらに結合したサンプル核酸インサートを含む。

【0141】

項目6.項目1乃至5のいずれかに記載の方法であって更に以下を含む方法:精製混合物に5'アダプターを添加し;精製混合物を結合反応条件下でインキュベートし、それにより1)5'アダプターを第1ライゲーション生成物にライゲーションさせてシーケンスライブラリ分子を生成し、当該シーケンスライブラリ分子は5'アダプターと、3'アダプターとの間に配置され、且つこれらに結合したサンプル核酸インサートを含む。

10

【0142】

項目7.過剰な3'アダプターが低減されるが除去されず、その結果5'アダプターが少なくとも一部の過剰な非連結型3'アダプターにライゲーションし、5'アダプターと、3'アダプターと、の界面で3'アダプターに結合した5'アダプターを含むアダプターダイマーを生成すること;更にシーケンスライブラリ分子が増幅反応によってアダプターダイマーと比較して選択的にエンリッチされるように、増幅反応においてアダプターダイマーの増幅が妨げられることを含む、項目1乃至6のいずれかに記載の方法。

【0143】

項目8.アダプターダイマー増幅の障害に、アダプターダイマーの少なくとも一部を増幅前に除去することを含む、項目1乃至7のいずれかに記載の方法。

20

【0144】

項目9.項目7又は項目8に記載の方法であって、アダプターダイマー増幅の障害に以下の1つ又は複数を含む:酵素によるアダプターダイマーの特異的切断;CRISPR/Cas9に基づくアダプターダイマーの切断;ゲル精製;SPRIビーズ法に基づくサイズ選択;及び混合物へのアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドの添加、アダプターダイマー増幅の障害に有効なアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチド。

【0145】

項目10.アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドが1つ又は複数のアダプターダイマー隣接部分と相補的であり、その1つ又は複数の隣接部分が5'アダプターと、3'アダプターと、の界面に5'アダプターヌクレオチドを少なくとも1つ含み、3'アダプター隣接部分が増幅プライマー結合部位を含む、項目9に記載の方法。

30

【0146】

項目11.第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する、項目1乃至10のいずれかに記載の方法。

【0147】

項目12.サンプル核酸が、RNAであるか、又はRNAを含み、更にRNAを逆転写して、逆転写された配列決定ライブラリ分子の生成を含む、項目1に記載の方法。

【0148】

項目13.サンプル核酸がDNAであるか、又はDNAを含む、項目1に記載の方法。

40

【0149】

項目14.更にシーケンスライブラリ分子の増幅を含む、項目12又は13に記載の方法。

【0150】

項目15.シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減させるためのオリゴヌクレオチド対であって以下を含むオリゴヌクレオチド対:

a) 以下を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド:

i) 少なくとも8ヌクレオチド長の第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分、及びii) 少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり且つ第1オリゴヌクレオチド3'末端を含む第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分であって、1乃至20個のヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然ヌクレオチド類似体;及び

50

b) 以下を含む第2のブロッカーオリゴヌクレオチド:

iii) 少なくとも8ヌクレオチド長である第2オリゴヌクレオチド5'部分、及び iv) 少なくとも1乃至20ヌクレオチド長であり、且つ第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端を含む第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分であり、ここで1乃至20ヌクレオチドのうち少なくとも1つは非天然ヌクレオチド類似体;

ここで第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分は長さが等しく、互いに相補的であり;

第1ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド5'部分はいずれも、3'アダプターの5'末端部分と相補的である。

【0151】

項目16. 第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'末端がいずれも、過剰な非連結型3'アダプターの5'末端のアデニル化ヌクレオチドに結合可能な、項目15に記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【0152】

項目17. 第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20ヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチド類似体であり、第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の少なくとも1乃至20ヌクレオチドのうち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個が非天然ヌクレオチド類似体である、項目15又は16に記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【0153】

項目18. 第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分がそれぞれ2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20ヌクレオチド長である場合に、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分がそれぞれ回文ヌクレオチド配列を含み、第1ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列が第2ブロッカーオリゴヌクレオチド3'部分の回文ヌクレオチド配列と同一である、項目15、16、又は17のいずれかに記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【0154】

項目19. 第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドのそれぞれが約11乃至約50ヌクレオチドの範囲の長さを有する、項目15乃至18のいずれかに記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【0155】

項目20. 第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する、項目15乃至19のいずれかに記載のシーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのオリゴヌクレオチド対。

【0156】

項目21. シーケンスライブラリ内のアダプターダイマーを低減するためのキットであって、項目15乃至20のいずれかに記載のオリゴヌクレオチド対を含む。

【0157】

項目22. 更にアダプターダイマー増幅を阻害するのに有効なアダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドを含む、項目21に記載のキット。

【0158】

項目23. アダプターダイマーブロッカーオリゴヌクレオチドがアダプターダイマーの1つ又は複数の隣接部分と相補的であり、1つ又は複数の隣接部分は5'アダプターと、3'アダプターと、の界面に位置する5'アダプターの少なくとも1つのヌクレオチドを含み、3'

10

20

30

40

50

アダプターの隣接部分が増幅プライマー結合部位を含む、項目22に記載のキット。

【0159】

項目24.第1ブロッカー及び第2ブロッカーが同一の核酸配列を有する、項目1乃至14のいずれかに記載の方法、又は項目21乃至23のいずれかに記載のキット。

【0160】

項目25.第1ブロッカー及び第2ブロッカーが異なる核酸配列を有する、項目1乃至14のいずれかに記載の方法、又は項目21乃至24のいずれかに記載のキット。

【0161】

項目26.本明細書に実質的に示される又は記載される方法、キット、又はオリゴヌクレオチド対。

【0162】

項目27.第1ブロッカーオリゴヌクレオチド及び第2ブロッカーオリゴヌクレオチドがそれぞれ約11乃至約50ヌクレオチドの範囲の長さを有する、項目1乃至14のいずれかに記載の方法。

【0163】

本明細書で言及した特許又は刊行物は、いずれも、個々の刊行物がそれぞれ具体的且つ個別的に参照により組み込まれることが示されているかの如く、参照により本明細書に組み込まれる。

【0164】

本明細書に記載された組成物及び方法は、現時点で好適な実施の形態を表すものであり、例示的であり、本発明の範囲の制限を意図したものではない。当業者であれば、その変更及び他の使用を想起し得よう。斯かる変更及び他の使用は、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲から逸脱することなく、為し得る。

【符号の説明】

【0165】

[図2A、2B、2C]

Single adapter System: 単一アダプターシステム

annealing: アニールリング

Multiple adapter System: 複数アダプターシステム

non-palindromic: 非回文

[図3]

1 ng MCF7 total RNA input: 1ngのMCF7全RNA投入

% of reads: 読取りの百分率

other: その他

canonical dimer: 標準的なダイマー

[図4]

1 ng Human Brain Input: 1ngヒト脳投入

Percent Representation: 提示の百分率

% dimer: ダイマー百分率

% mature miRNA: 成熟miRNA百分率

[図5]

1 ng Human Brain Input: 1ngヒト脳投入

# of Unique microRNA's: 独自のマイクロRNAの数

Threshold: 閾値

[図6]

Threshold of 5: 351: 5の閾値は351

of 407 = 86.2%: 407のうち=86.2%

miRNA's in common between replicates: 反復間において共通なmiRNA

Threshold of 5: 296: 5の閾値は296

of 370 = 80%: 370のうち=80%

10

20

30

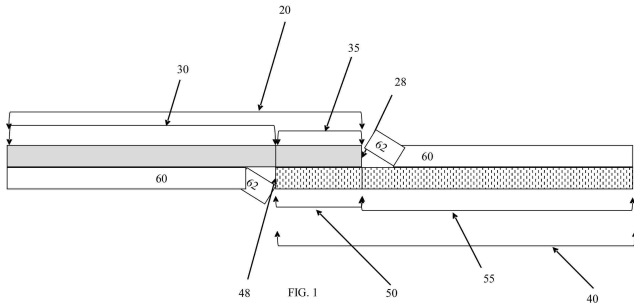
40

50

miRNAs in common between 1 and 2 / 256: 1と2の間において共通なmiRNAは256

【図面】

【図1】



【図2A】

Single adapter System



FIG. 2A

10

【図2B】

Multiple adapter System

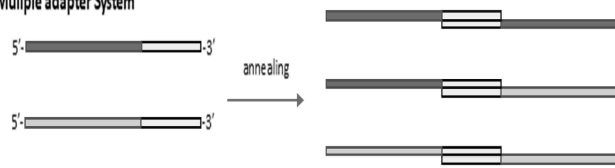


FIG. 2B

【図2C】

Single adapter System (non-palindromic)

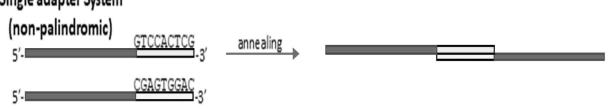
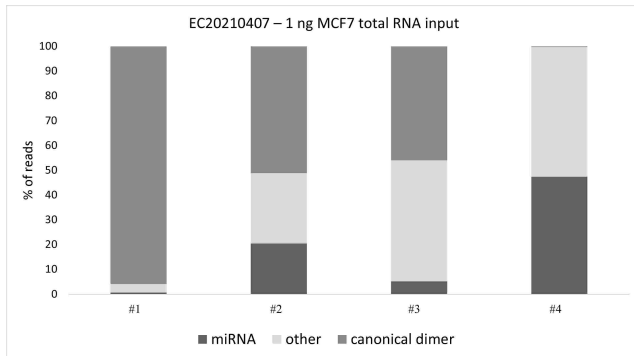


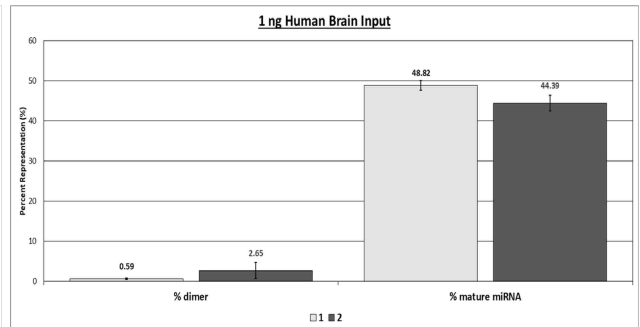
FIG. 2C

20

【図3】



【図4】



30

40

50

【 5 】

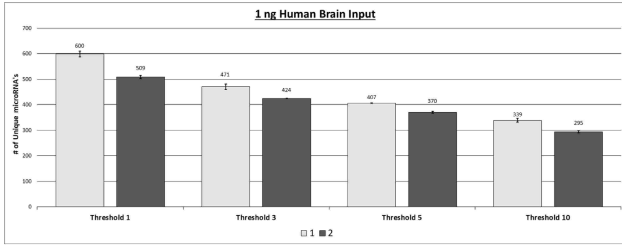


FIG. 5

【 6 】

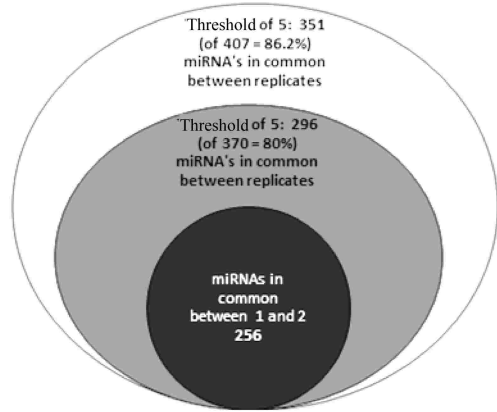


FIG. 6

10

20

30

40

50

【 配列表 】

2025510151000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2023/016295

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/6806 C12Q1/6855 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C12Q</b> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>EPO-Internal</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/033687 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS INC [US]; MCREYNOLDS LARRY A [US] ET AL.) 15 March 2012 (2012-03-15)	26
A	figure 1	1-14
X	WO 2022/046797 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORP [US]) 3 March 2022 (2022-03-03)	26
A	paragraphs [0092] - [0093], [0095]	1-14
X	WO 2021/232023 A2 (SWIFT BIOSCIENCES INC [US]) 18 November 2021 (2021-11-18)	15-21, 24-26
Y	paragraphs [0031], [0040], [0146]; figure 10A	22,23
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 July 2023		27/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Knudsen, Henrik

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2023/016295

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p><b>MITSUOKI KAWANO ET AL: "Reduction of non-insert sequence reads by dimer eliminator LNA oligonucleotide for small RNA deep sequencing", BIOTECHNIQUES, INFORMA HEALTHCARE, UNITED STATES, vol. 49, no. 4, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 751-755, XP002667963, ISSN: 1940-9818, DOI: 10.2144/000113516</b></p>	26
Y	<p><b>figure 1</b></p>	22,23
A	<p>-----</p> <p><b>WO 2016/164866 A1 (HUDSONALPHA INST FOR BIOTECHNOLOGY [US]) 13 October 2016 (2016-10-13) pages 8-13</b></p>	1-25
A	<p>-----</p> <p><b>WO 2020/247950 A1 (BIO RAD LABORATORIES [US]) 10 December 2020 (2020-12-10) paragraphs [0026], [0117]</b></p> <p>-----</p>	1-25

10

20

30

40

1

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2023/016295

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
    - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/US2023/016295**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>WO 2012033687 A1</b>	<b>15-03-2012</b>	<b>EP 2614154 A1</b>	<b>17-07-2013</b>
		<b>US 2013157869 A1</b>	<b>20-06-2013</b>
		<b>US 2015072870 A1</b>	<b>12-03-2015</b>
		<b>WO 2012033687 A1</b>	<b>15-03-2012</b>
-----			
<b>WO 2022046797 A1</b>	<b>03-03-2022</b>	<b>US 2022106586 A1</b>	<b>07-04-2022</b>
		<b>WO 2022046797 A1</b>	<b>03-03-2022</b>
-----			
<b>WO 2021232023 A2</b>	<b>18-11-2021</b>	<b>AU 2021270596 A1</b>	<b>15-12-2022</b>
		<b>CA 3178211 A1</b>	<b>18-11-2021</b>
		<b>CN 116249775 A</b>	<b>09-06-2023</b>
		<b>EP 4150106 A2</b>	<b>22-03-2023</b>
		<b>JP 2023525880 A</b>	<b>19-06-2023</b>
		<b>KR 20230012554 A</b>	<b>26-01-2023</b>
		<b>WO 2021232023 A2</b>	<b>18-11-2021</b>
-----			
<b>WO 2016164866 A1</b>	<b>13-10-2016</b>	<b>AU 2016246820 A1</b>	<b>30-11-2017</b>
		<b>BR 112017021854 A2</b>	<b>10-07-2018</b>
		<b>CA 2982369 A1</b>	<b>13-10-2016</b>
		<b>EP 3280805 A1</b>	<b>14-02-2018</b>
		<b>JP 6791875 B2</b>	<b>25-11-2020</b>
		<b>JP 2018513685 A</b>	<b>31-05-2018</b>
		<b>US 2018073066 A1</b>	<b>15-03-2018</b>
		<b>US 2020024652 A1</b>	<b>23-01-2020</b>
		<b>WO 2016164866 A1</b>	<b>13-10-2016</b>
-----			
<b>WO 2020247950 A1</b>	<b>10-12-2020</b>	<b>CN 114040975 A</b>	<b>11-02-2022</b>
		<b>EP 3980536 A1</b>	<b>13-04-2022</b>
		<b>US 2020385791 A1</b>	<b>10-12-2020</b>
		<b>WO 2020247950 A1</b>	<b>10-12-2020</b>
-----			

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ガニング, ケリー  
アメリカ合衆国 7 8 7 4 4 テキサス州, オースティン, バーレソン ロード 7 0 5 0, バイオ  
オーサイエンティフィック コーポレーション内

(72)発明者 ラバス, アリソン  
アメリカ合衆国 7 8 7 4 4 テキサス州, オースティン, バーレソン ロード 7 0 5 0, バイオ  
オーサイエンティフィック コーポレーション内

(72)発明者 カストロ, エリック  
アメリカ合衆国 7 8 7 4 4 テキサス州, オースティン, バーレソン ロード 7 0 5 0, バイオ  
オーサイエンティフィック コーポレーション内

Fターム(参考) 4B063 QA13 QQ41 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34