

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-500936

(P2018-500936A)

(43) 公表日 平成30年1月18日(2018.1.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 4 0 B 40/06 (2006.01)	C 4 0 B 40/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2017-551376 (P2017-551376) (86) (22) 出願日 平成27年12月22日 (2015.12.22) (85) 翻訳文提出日 平成29年8月15日 (2017.8.15) (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/054125 (87) 国際公開番号 W02016/102956 (87) 国際公開日 平成28年6月30日 (2016.6.30) (31) 優先権主張番号 1422982.7 (32) 優先日 平成26年12月22日 (2014.12.22) (33) 優先権主張国 英国 (GB)	(71) 出願人 516311685 ディーエヌエーイー グループ ホールデ イングス リミテッド イギリス ダブリュー 1 2 7 エスビー グレーター・ロンドン ロンドン ウッド ・レーン 5 6 ウグリ・キャンパス・ブ ロック・シー (74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎 (74) 代理人 100118902 弁理士 山本 修 (74) 代理人 100106208 弁理士 宮前 徹 (74) 代理人 100120112 弁理士 中西 基晴
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バブルプライマー

(57) 【要約】

ヌクレオチド配列のすぐにシーケンシングできるフラグメントを生成するための方法であって、標的にハイブリダイズする第1および第3の部分と、ハイブリダイズしないループを形成する、第2の部分に自己相補的な部分とを包含する「バブルプライマー」を利用する、上記方法が記載される。ループは、シーケンシングプライマーの使用を可能にする汎用の配列を含有する。第1の部分は、第3の部分と第2の部分の汎用の配列とを端部に有する目的とする配列のアンプリコンを生成するように、分解可能であってもよい。好ましい実施態様において、第2の部分、または第2の部分と第3の部分との間の領域はまた、ヌクレオチド A、C、G、T の四つ組も含み、シーケンス反応の調整を可能にする。

【選択図】 図 2

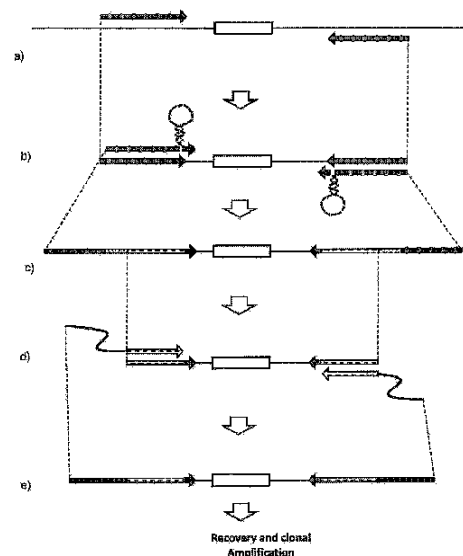


Figure 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

開始のテンプレートポリヌクレオチドからポリヌクレオチドフラグメントを生成するための方法であって、

a) 第 1 のプライマー対を使用して、開始のテンプレートから関心領域を増幅して、該関心領域を取り込んだアンプリコンを形成すること、

b) 第 2 のプライマーを用いた核酸増幅反応を使用して、工程 a) で生成された第 1 のアンプリコンから該関心領域を増幅して、第 2 のプライマーを取り込んだアンプリコンを形成すること

を含み、

10

第 2 のプライマーは、該開始のテンプレートの第 1 の部分に相補的な第 1 の部分、該開始のテンプレートに相補的ではない第 2 の部分、および該開始のテンプレートの第 2 の部分に相補的な第 3 の部分を有する核酸配列を含み；

該開始のテンプレートの第 1 および第 2 の部分は、隣接しているかまたは互いに近接しており；

第 2 のプライマーの第 1、第 2、および第 3 の部分は、該開始のテンプレートへのハイブリダイゼーションにおいて、該プライマーの第 2 の部分がハイブリダイズしないままであり、第 1 の部分と第 3 の部分との間にループを形成するように、5' から 3' の順番で並べられ；

それによって第 2 のプライマーの配列を端部に有する関心領域を含む増幅産物が生成される、上記方法。

20

【請求項 2】

工程 b) の増幅反応が、第 2 のプライマー対を用いて行われ、第 2 のプライマー対のそれぞれは、第 2 のプライマーの形態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 2 のプライマーの第 2 の部分が、汎用の配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記汎用の配列が、シーケンシングプライマー配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

30

前記汎用の配列が、第 2 のプライマーの第 3 の部分に隣接している、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記汎用の配列が、定義された塩基配列によって、第 3 の部分から隔てられている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記汎用の配列が、あらゆる定義された順番で 4 種のヌクレオチド塩基 A、T、G および C のそれぞれを含む配列によって、第 3 の部分から隔てられている、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

40

第 2 のプライマーまたはその各々の第 1 の部分の少なくとも一部が、分解されやすく、該プライマーの少なくとも第 3 の部分および第 2 の部分の少なくとも一部が、分解されにくく、前記方法は、

c) 該アンプリコンからの該プライマーまたはその各々の分解されやすい部分を分解する工程

をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

d) 第 3 のプライマー対を用いて b) の産物および / または c) の産物を増幅する工程であって、各プライマーは、第 2 のプライマーまたはその各々の第 2 の部分の少なくとも一部に実質的に同一な核酸配列を含む、工程

50

をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

請求項 3 ~ 7 のいずれか一項によってなされる場合、b) の産物および / または c) の産物が増幅され、第 3 のプライマーの核酸配列の少なくとも一部が、第 2 のプライマーまたはその各々の第 2 の部分の前記汎用の配列に実質的に同一である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記テンプレートが、ゲノムのフラグメントである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記テンプレートが、ゲノムの遺伝子座である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記対における各第 2 のプライマーの第 2 の部分が異なっている、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記テンプレートの第 1 の部分と第 2 の部分とが、0 ~ 20 個のヌクレオチド、好ましくは 1 ~ 10、より好ましくは 1 ~ 6、最も好ましくは 1、2、3、4、5、または 6 個のヌクレオチドによって隔てられている、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

第 2 のプライマーの第 1 の部分が、最大 15、20、25、30、35、50 個のヌクレオチドの長さであり、好ましくは 20 ~ 35 個のヌクレオチド、より好ましくは 25 個のヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

第 2 のプライマーの第 2 の部分が、自己相補的な領域を含み、それによりハイブリダイゼーションで形成されたループは、該自己相補的な領域がステムを形成するステム - ループ構造をとる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

第 2 のプライマーの第 2 の部分が、第 1 の分解性部分および第 2 の耐性部分を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

第 2 のプライマーの第 3 の部分が、2、4、5、6、7、8、9、または 10 個以下のヌクレオチドの長さであり、好ましくは 4 ~ 6 個、最も好ましくは 6 個のヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

第 2 のプライマーの第 2 の部分、または第 2 および第 3 の部分が共に、ヌクレオチド塩基の 4 種全て (A、C、G、T) を含むヌクレオチドの四つ組を包含するように選択される、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

工程 d) における第 3 のプライマー対が、5' 末端に追加の非テンプレート配列をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 21】

工程 b) の増幅が、ネステッド PCR である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

シーケンシングプライマーが、第 2 のプライマーの第 2 の部分の前記汎用の配列の相補物にハイブリダイズされる、請求項 3 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

生成された増幅産物をシーケンシングする工程をさらに含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

工程 a) および / または工程 b) の増幅が、多重増幅である、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

核酸増幅のためのプライマーであって、

増幅のための標的配列の第 1 の部分に相補的な第 1 の部分、該標的配列に相補的ではなく、汎用の配列を含む第 2 の部分、および該標的配列の第 2 の部分に相補的な第 3 の部分を有する核酸配列を含み；

該標的配列の第 1 および第 2 の部分は、隣接しているかまたは互いに近接しており；

該プライマーの第 1、第 2、および第 3 の部分は、標的配列へのハイブリダイゼーションにおいて、該プライマーの第 2 の部分がハイブリダイズしないままであり、第 1 の部分と第 3 の部分との間にループを形成するように 5 ' から 3 ' の順番で並べられる、上記プライマー。

10

【請求項 2 6】

前記汎用の配列の相補物が、シーケンシングプライマーにハイブリダイズ可能である、請求項 2 5 に記載のプライマー。

【請求項 2 7】

前記汎用の配列が、第 3 の部分に隣接している、請求項 2 5 または 2 6 に記載のプライマー。

【請求項 2 8】

前記プライマーの第 1 の部分が、最大 1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、5 0 個のヌクレオチドの長さであり、好ましくは 2 0 ~ 3 5 個のヌクレオチド、より好ましくは 2 5 個のヌクレオチドの長さである、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のプライマー。

20

【請求項 2 9】

前記プライマーの第 2 の部分が、自己相補的な領域を含み、それによりハイブリダイゼーションで形成されたループは、該自己相補的な領域がステムを形成するステム - ループ構造をとる、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載のプライマー。

【請求項 3 0】

前記プライマーの第 3 の部分が、2、4、5、6、7、8、9、または 1 0 個以下のヌクレオチドの長さであり、好ましくは 4 ~ 6 個、最も好ましくは 6 個のヌクレオチドの長さである、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれか一項に記載のプライマー。

30

【請求項 3 1】

前記プライマーの第 2 の部分、または第 2 および第 3 の部分が共に、4 種のヌクレオチド塩基 (A、C、G、T) のそれぞれを含むヌクレオチドの配列を包含するように選択される、請求項 2 5 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のプライマー。

【請求項 3 2】

請求項 2 5 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のプライマーの対であって、該対における各プライマーの第 2 の部分が異なっている、上記プライマーの対。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載のプライマー対であって、第 2 のプライマー対と組み合わせられ、第 2 のプライマー対の各メンバーが、第 1 のプライマー対のそれぞれのメンバーの少なくとも一部に相補的な核酸配列を含む、プライマー対。

40

【請求項 3 4】

複数の請求項 3 3 に記載のプライマー対を含むプライマー対のライブラリーであって、各対は、それぞれ第 1 および第 2 の第 2 の部分を含む第 1 および第 2 のプライマーを有し、ここで各第 1 の第 2 の部分は同一であり、各第 2 の第 2 の部分は同一である、上記ライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、開始のテンプレートから、DNA シーケンシング分析に対応できるポリヌク

50

レオチドフラグメントを生成するための方法に関する。該フラグメントは、次世代シーケンシング方法において有用である。本発明の形態は、このような方法で使用するための核酸プライマーに関する。

【背景技術】

【0002】

概要ヒトゲノム配列の解析が完了してから、現時点において（2014年）、都会のシカゴ（人口2,700万人）では、機器1つにつき29時間当たり1つの完全ゲノムの速度で、ヒト、女性および子供それぞれ個々のゲノム配列を、ありとあらゆるゲノム領域の30倍のカバー率で生成することが可能になるところまで、元のゲノムにかかった経済的支出に相当する程度にDNAシーケンシング分析の生化学および機器が進歩し続けている。この驚異的な能力の増加は、ゲノムの各部分が同時に同じ生化学に晒される汎用の方式で、シーケンシングされるDNAフラグメントの全部を処理する能力によるものである。「大規模並列」DNAシーケンシングは、ゲノムDNAをランダムにフラグメント化すること、次いで人工配列である「アダプター」をフラグメント化したDNAの断片の各末端に酵素によって接続することにより可能になる。

10

【0003】

ゲノムDNAからのシーケンシング「ライブラリー」の生成は、時間がかかり、アダプターの2種の異なる「フレーバー」の接続がランダムな性質を有するために、実際にはテンプレートの約半分が分析に対応できないフラグメントを生成する。多くの産物は、フラグメントの末端において同一な「タイプA」または「タイプB」アダプターが接続されると予想されるが、それに対して必要なことは、偶然の非対称接続であり、すなわち一方の末端にはアダプターの一方のフレーバー（タイプA）および他方の末端にはアダプターの他方のフレーバー（タイプB）を有することである。これらの非対称な産物は、クローニングによって増幅することが可能であり、シーケンス反応が始まるとすぐにゲノムテンプレートから有用な配列情報を生成するのに理想的である。

20

【0004】

NGSのためのシーケンシングライブラリー調製における現在の技術は、

- ・テンプレートDNAをランダムにフラグメント化する工程、
- ・そのようなフラグメントのうち望ましい長さを有するものをサイズ選択する工程、
- ・フラグメント末端を酵素により「末端修復」して、タイプAおよびタイプBアダプターの平滑末端ライゲーションを可能にする工程、
- ・アダプターをライゲートして、所定比率の「A/A」および「B/B」の余分な産物と、所定数の「A/B」の望ましい産物とを生成する工程、
- ・アダプターによって改変されたライブラリーフラグメントをクローニングによって増幅する工程

を包含する。

30

【0005】

ゲノムの再シーケンシングにかかるコストが急落し、シーケンシングの速さが増加するにつれて、NGSの適用は、ますます診療施設に対して向けられつつある。しかしながら、ゲノムの32億塩基全ての読み取りに対応する環境がほとんどないと予想され、具体的な条件に関連する（または恐らくそれを確認する）限られた数の遺伝学的配置の調査によって療法の方向性を決めることによる、より一層標的化されたアプローチが実用的である可能性がある。ゲノムの塩基の全てを読み取ることが必ずしも必要ではない場合、当然ながらまさにそれを達成するように最適化された技術および手法を適用することが最適ではない可能性がある。

40

【0006】

具体的な領域の標的化されたシーケンシングは、最も効率的には、バルクのテンプレートからそのような配列を単離することを必要とし、バルクのテンプレートは極めて多様で複雑な可能性がある。効果的には、これは、他の非増幅領域に数で勝るレベルに標的領域を増幅することによって達成できる。このような増幅産物は、そのNGS末端アダプター

50

(上述の通り)の接続には対応できると予想されるが、これらはやはり、配列の実質的な比率が、NGSシーケンシングのためのクローニングによる増幅を維持するには不適切な「A/A」および「B/B」の形態である混成の集団であると予想される。深刻なことに、タイプA/Bのコンストラクトでさえも、アダプター配列と、シーケンシングのために標的化されたゲノムDNAの領域との間に挿入された「プライマー残部」の大きい領域の存在を有すると予想される。アダプター配列がシーケンシングプライマーのための結合部位を提供する場合、これらのプライマー残部は、生成される第1のデータであり、すなわち不必要であり情報価値がないと予想される。目的とする未知の配列に達する前に、既知の配列の実質的な領域を、NGS方法によって処理しなければならない。これは不必要な資源を使用するだけでなく、典型的には、シーケンシング方法は、読み取り開始に近いほど最も正確であるが、そのため後半の未知の配列はより低い忠実度で読み取られる。不必要なシーケンシングが行われる量を低減し、生成される目的とする未知の配列の忠実度を改善するために、より短い既知の領域を有する配列フラグメントを生産できるようにすることが望ましいと予想される。

10

20

30

40

50

【0007】

ライゲーションベースのアダプター戦略のさらなる不利益は、アダプターの非対称な統合を得ること(すなわち、配列フラグメントの各末端に異なるアダプターを有すること)が必要である点である。しかしながら、ライゲーション反応は典型的には非指向性であるため、フラグメントの一部のみが必要な非対称アダプターを包含し、その他のものが、どちらの末端にも同一なアダプターを包含することとなる。アダプターの本来的に非対称な統合を可能にする方法を提供することが望ましいと予想される。

【発明の概要】

【0008】

本発明の第1の形態によれば、開始のテンプレートポリヌクレオチドからポリヌクレオチドフラグメントを生成するための方法であって、

a) 第1のプライマー対を使用して、開始のテンプレートから関心領域を増幅して、該関心領域を取り込んだアンプリコンを形成すること、

b) 第2のプライマーを用いた核酸増幅反応を使用して、工程a)で生成された第1のアンプリコンから該関心領域を増幅して、第2のプライマーを取り込んだアンプリコンを形成すること

を含み、

第2のプライマーは、該開始のテンプレートの第1の部分に相補的な第1の部分、該開始のテンプレートに相補的でない第2の部分、および該開始のテンプレートの第2の部分に相補的な第3の部分を有する核酸配列を含み；

該開始のテンプレートの第1および第2の部分は、隣接しているかまたは互いに近接しており；

第2のプライマーの第1、第2、および第3の部分は、該開始のテンプレートへのハイブリダイゼーションにおいて、該プライマーの第2の部分がハイブリダイズしないままであり、第1の部分と第3の部分との間にループを形成するように5'から3'の順番で並べられ；

それによって第2のプライマーの配列を端部に有する関心領域を含む増幅産物が生成される、上記方法が提供される。

【0009】

このようにして生成された増幅産物は、第2のプライマーの部分を含み、それゆえに本方法は、シーケンス反応に使用できる(すなわち、産物を「すぐにシーケンシングできる」)既知の配列を取り込んだアンプリコンを生成するのに使用することができる。

【0010】

好ましくは、工程b)の増幅反応は、第2のプライマー対を用いて行われ、第2のプライマー対のそれぞれは、第2のプライマーの形態である。この方式で、増幅産物は、各末端にプライマー配列を包含する。

【0011】

第2のプライマーの第2の部分は、汎用の配列、例えば、シーケンシングプライマー配列に少なくとも実質的に同一な配列を含んでいてもよい。この汎用の配列は、アンプリコンをシーケンス反応に使用できるようにするために、多くのまたは全ての可能な第2のプライマーに共通であってもよい。

【0012】

汎用の配列はさらに、4種のヌクレオチド塩基A、C、G、およびTのそれぞれを含む配列に隣接していてもよい。これは、4種のヌクレオチドの単純な四つ組（例えば、ATCG）であってもよいし、または各塩基の2つ、3つ、またはそれより多くを包含していてもよい（例えば、AACCTTGG）。このヌクレオチドは、どのような順番でもよい。この配列は、汎用の配列を、プライマーの第3の部分から隔てていてもよい。

10

【0013】

好ましくは、第2のプライマーまたはその各々の第1の部分および第2の部分の少なくとも一部は、分解されやすく、該プライマーの少なくとも第3の部分および第2の部分の少なくとも一部は、分解されにくく、本方法は、

c) 該アンプリコンからの該プライマーまたはその各々の分解されやすい部分を分解する工程

をさらに含む。

【0014】

これは、アンプリコンから既知の配列の領域を除去し、アンプリコン中の第2のプライマー残部の第2の部分におけるステムの再形成（ステム・ループ構造が存在する場合）を防ぐ。このステムの再形成は、別の方式で、このプライマーまたはプライマー対の3'末端におけるさらなるプライマーまたはプライマー対の意図したプライマー結合部位への接近を妨げることができる。

20

【0015】

本方法は、

d) 第3のプライマーまたはプライマー対を用いてb)の産物および/またはc)の産物を増幅する工程であって、第3のプライマーまたはその各々は、第2のプライマーまたはその各々の少なくとも一部に実質的に同一な（好ましくは同一な）3'核酸配列を含む、工程

30

をさらに含んでいてもよい。

【0016】

好ましくは、第3のプライマーの実質的に同一な核酸配列は、第2のプライマーまたはその各々の分解されていない分解されにくい部分に実質的に同一であり、それによって、関心領域と第2のプライマーまたはその各々の分解されなかった部分の配列とを含む増幅産物が生成される。実質的に同一な部分は、第2のプライマーの第2の部分内に含まれる汎用の配列に実質的に同一であってもよい。

【0017】

この方法は、従来技術の方法に固有の問題点に対処する。特定には、第2のプライマーまたはプライマー対（ハイブリダイゼーションで形成されるループまたはバブルに起因して、「バブルプライマー」と称される）は、2つの領域、すなわち既知であるが可変の配列（標的に相補的であり、したがって標的に応じて変化する）と、標的に相補的ではない固定された配列の領域とを取り込んでいてもよい。固定された配列は、ライゲーション反応を必要とすることなく、シーケンシングアダプターまたは実用的な他の配列を増幅した領域に導入するのに使用することができる。固定された配列は、テンプレートに相補的ではない人工配列または別の生物から誘導された配列であり得る。好ましい実施態様において、固定された配列は、汎用の配列、例えばシーケンシングプライマー配列を含んでいてもよい。

40

【0018】

部分または配列が、標的または別の配列に「実質的に同一ではない」と説明される場合

50

、好ましくはその部分または配列は、増幅反応で使用される条件下においてその部分または配列が標的に相補的な配列にハイブリダイズしないように、標的または他の配列に類似していない。同様に、配列が標的に「相補的ではない」場合、増幅反応で使用される条件下においてその配列が標的にハイブリダイズしない程度に類似していない。

【0019】

また「分解されやすい」部分は、本明細書では「分解性部分」と称される場合もあり、一方で、前記分解されにくい部分は、本明細書では「耐性部分」と称される場合もある。これらの用語は、同義的に使用される。

【0020】

テンプレートは、ゲノムのポリヌクレオチドであり得る。テンプレートは、真核性、原核性、または古細菌のテンプレートであってもよい。1種またはそれより多くのテンプレートが提供されてもよい。テンプレートの代表例としては、ゲノムのフラグメント；例えば、単一の染色体、または単一のゲノム遺伝子座（例えば、対立遺伝子多型の迅速なシーケンシングのための）を挙げることができる。

【0021】

第2のプライマー対（すなわち、プライマーAおよびBからなる）が存在する場合、プライマーAの第1および第3の部分は、プライマーBの第1および第3の部分とは異なると予想され、一方で第2の部分は別個であってもよいし、または同一であってもよいが、好ましくは別個である。異なる第2のプライマー対（すなわち、プライマーAおよびB；およびプライマーA'およびB'）において、対応するプライマー（AおよびA'；BおよびB'）の第2の部分は、同一であると予想されるが、それでもなお各対の中では別個であってもよい。第1および第3の部分は、標的特異性を付与し、プライマーの非対称な統合を可能にする。

【0022】

さらに、第2のプライマーの第1および第3の部分（またはプライマー対）の使用は、非特異的なハイブリダイゼーションおよび増幅の機会を低減するために、第1および第3の部分が近接して、プライマーが標的への高度な特異性を保持するようにバブル部分を生成することを可能にする。

【0023】

好ましくは、テンプレートの第1の部分と第2の部分とは、0～20個のヌクレオチド、好ましくは1～10、より好ましくは1～6、および最も好ましくは1、2、3、4、5、または6個のヌクレオチドによって隔てられている。

【0024】

第2のプライマー（またはプライマー対）の第1の部分は、最大15、20、25、30、35、50個のヌクレオチドの長さであってもよく、好ましくは20～35個のヌクレオチド、より好ましくは25個のヌクレオチドの長さであってもよい。

【0025】

第2のプライマー（またはプライマー対）の第2の部分は、第1の分解性部分および第2の耐性部分を含んでもよい。第1の分解性部分は、好ましくは、該プライマーの第1の部分と隣接しており、第2の耐性部分は、該プライマーの第3の部分と隣接している。

【0026】

第2のプライマー（またはプライマー対）の第2の部分は、好ましくは、自己相補的な領域を含み、それによりハイブリダイゼーションで形成されたループは、自己相補的な領域がステムを形成するステム-ループ構造をとる。ステムの形成は、プライマーの第1および第3の部分を近づけて、第3の部分の相補的配列がテンプレートDNAの第2の部分として存在する場合、第3の部分をそれと密接に接触させる。ループは、最小の長さであってもよいが（典型的には、およそ4個のヌクレオチドが、ループを形成するのに必要である）、好ましくは、第2の領域は、より大きいループを形成する非自己相補的領域をさらに含む。第2の部分が分解性部分および耐性部分を含む場合、分解性部分は、好ましく

10

20

30

40

50

は、ステムの半分を形成し、耐性部分は、ステムの他方の半分 + ループを形成する。

【 0 0 2 7 】

第 2 のプライマー（またはプライマー対）の第 3 の部分は、好ましくは 2、4、5、6、7、8、9、または 10 個以下のヌクレオチドの長さである。好ましいサイズは、6 個以下であり、好ましくは 4 ~ 6 個、最も好ましくは 6 個のヌクレオチドである。この長さは、プライマーに（第 1 の部分と共に）十分な特異性を提供しつつ、後続のシーケンス反応でシーケンシングしなければならない情報価値のないヌクレオチドの合計の長さも低減させるような長さであると考えられる。

【 0 0 2 8 】

好ましくは、第 2 のプライマー（またはプライマー対）の第 2 の部分、または第 2 および第 3 の部分は共に、ヌクレオチド塩基の 4 種全て（A、C、G、T）を含むヌクレオチドの四つ組を包含するようなものであるか、またはそのように選択される。ヌクレオチドの順番は、重要ではない。これは、シーケンシングしようとする領域の開始部分に 4 種全てのヌクレオチドを有する既知の配列を提供することによって、シーケンス反応の調整を可能にする。四つ組は、第 2 の部分と第 3 の部分とを隔てていてもよい。第 2 の部分が分解性部分および耐性部分を含む場合、四つ組は、耐性部分中に存在していてもよいし、または第 3 の部分と共に耐性部分中に存在していてもよい。ヌクレオチドの四つ組は、好ましくは、シーケンシングプライマー配列の 3' 末端に直接隣接して配置される。各ヌクレオチドが既知の数で存在するという条件で、4 個より多くのヌクレオチドが包含されていてもよい（例えば、配列は、A A G G C C T T であり得る）。

【 0 0 2 9 】

第 2 のプライマー対の分解性部分は、RNA を含んでいてもよく、一方で耐性部分は、DNA を含む。代替として、分解性部分は、チミンがウラシルで置き換えられた DNA を含んでいてもよい。したがって分解性部分は、いずれも通常の DNA は耐性を有する RNA アーゼ H もしくはアルカリ熱分解（RNA の場合）またはウラシル - N - グリコシラーゼ（U を含有する DNA の場合）によって、分解され得る。

【 0 0 3 0 】

工程 d) における第 3 のプライマー対は、5' 末端に追加の非テンプレート配列をさらに含んでいてもよく、それによりアンプリコンに追加の機能的な配列を取り込むことが可能になる。例えば、追加の配列は、選択可能マーカー、精製または検出のためのタグ、アンプリコンの物理的な捕獲のための成分、クローニングによる増幅配列などを包含していてもよい。

【 0 0 3 1 】

第 1 のプライマー対は、各プライマーの 3' 末端が、第 2 のプライマーまたはプライマー対のそれぞれ個々の対応するプライマーの第 3 の部分に対応する領域の 5' 方向になるように選択され得る。すなわち、第 2 のプライマー（「バブルプライマー」とも称される）は、ネステッドであり、増幅は、ネステッド PCR である。

【 0 0 3 2 】

本発明のさらなる形態は、増幅のための開始のテンプレートの第 1 の部分に相補的な第 1 の部分、該開始のテンプレートに相補的でない第 2 の部分、および該開始のテンプレートの第 2 の部分に相補的な第 3 の部分を有する核酸配列を含むプライマーであって、

該開始のテンプレートの第 1 および第 2 の部分は、隣接しているかまたは互いに近接しており；

該プライマーの第 1、第 2、および第 3 の部分は、該開始のテンプレートへのハイブリダイゼーションにおいて、該プライマーの第 2 の部分がハイブリダイズしないままであり、第 1 の部分と第 3 の部分との間にループを形成するように 5' から 3' の順番で並べられる、プライマーを提供する。

【 0 0 3 3 】

ここで開始のテンプレートは、このプライマーによって増幅されると予想される配列であって、上記で定義された方法で、最初に従来のプライマー対によって増幅されてアンブ

10

20

30

40

50

リコンを生成することになる配列を指す。

【0034】

また、各プライマーの第1の部分および第2の部分の少なくとも一部は、分解されやすく、該プライマーの少なくとも第3の部分および第2の部分の少なくとも一部は、分解されにくいことも好ましい。

【0035】

また、上述したようなプライマーの一对を含むプライマー対も提供される。

【0036】

PCRは、最も広く使用される可能性がある増幅方法であり、ここで一例として使用されているが、熱サイクリングではない他の増幅方法も想定することができる。

10

【0037】

本発明のなおさらなる形態は、本明細書に記載されるプライマー対のライブラリーであって、該ライブラリーは、複数のプライマー対を含み、各対は、それぞれ第1および第2の第2の部分 (first and second second portions) を含む第1および第2のプライマーを有し、ここで各第1の第2の部分は同一であり、各第2の第2の部分は同一である、上記ライブラリーを提供する。第1および第3の部分は、プライマー対間で異なってもよい (プライマー対の各プライマーで異なると予想される)。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、本明細書で説明される方法で使用するためのプライマーの概略図を示す。

20

【図2】図2は、すぐにシーケンシングできるポリヌクレオチドフラグメントを生成するための方法を例示する。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本明細書で開示される方法は、元のテンプレートDNAサンプル中に存在する全DNAの標的化されたサブセットである、NGS (次世代シーケンシング) の「すぐにシーケンスできる」DNAフラグメントの生成を可能にする。生産されたアンプリコンが、既知の配列を有する末端部分を端部に有する目的とするテンプレートDNAを有するように、目的とするまさにその遺伝子座が例えばポリメラーゼ連鎖反応によって増幅される。これらの既知の配列は、生成された全てのアンプリコンにおいて同一であるかまたは実質的に同一であり、計画的および制御可能に非対称であり、2つの異なる配列が、増幅されたフラグメントの2つの末端のそれぞれに適用される。このようにして生産されたアンプリコンは、従来のNGS方法で生産されたアダプターがライゲートしたフラグメントと機能的に同等であるが、生産の容易さ、時間およびコストに加えて、その後生産されるシーケンシングデータの品質の観点で別個の利点を提供する。アンプリコンの末端部分は、それに続くNGS操作、例えばクローニングによる増幅およびDNAシーケンシング中における汎用の「全てに適用可能な (one-size-fits-all)」生化学に対応できる。

30

【0040】

さらに、本方法の実施態様は、部位特異的なプライマーの相対的に短い3'末端 (発明の要約では「第3の部分」) を、それよりかなり大きい安定してハイブリダイズされる同じプライマーの5'エレメント (発明の要約に記載の「第1の部分」) に近接してハイブリダイズさせることができ、これらの2つの標的相補的領域は、プライマー伸長が成功したときにドーターアンプリコンの一部になると予想される非テンプレート配列 (発明の要約に記載の第2の部分) によって隔てられる。非テンプレート配列は、次世代シーケンシングにおいて有用な配列を、シーケンス反応をそのポイントから始めることができるように取り込んでいると予想される。これは、必然的に直接の「アダプターライゲーション」戦略により無駄に生成されると予想される既知のDNA配列データの量を最小化して、増幅プライマー残部の実質的な「関心のない領域」によるシーケンシングを回避する。

40

【0041】

50

加えて、本方法の実施態様は、複合的なDNAテンプレート源中からの特定の遺伝子座の標的化分析のためにNGSを使用することを可能にする。現在の大規模並列「全ゲノムショットガンシーケンシング」ではなく、効率的な標的化されたパネルシーケンシングが可能である（例えば、特定の1つの遺伝子座または複数の遺伝子座から）。

【0042】

図1に、本方法で使用するためのプライマーの例示を示す。プライマー10は、第1の部分12、第2の部分14、および第3の部分16を包含する。第1の部分12は、増幅しようとする標的ゲノム配列の一部に相補的になるように設計され、一方で第3の部分16はまた、標的配列の隣接する部分に相補的になるように設計される。第1の部分は、約25個のヌクレオチドの長さであり、第3の部分は、約6個のヌクレオチドである。第1の部分に相補的な配列と第3の部分に相補的な配列との間の標的に、0～4個のヌクレオチドのギャップが存在していてもよい。このギャップは、第1の部分12と第3の部分16とが標的鎖にハイブリダイズされたときに、プライマーの非相補的な第2の部分14（ステム-ループ構造）を受け入れることになる。

【0043】

第2の部分14は、標的に相補的ではなく、配列がステム-ループヘアピン構造を形成するように自己相補的な領域を包含する。第2の部分のループ部分およびステム部分は、選ばれたシーケンス反応で使用されるシーケンシングプライマーに実質的に同一な配列を包含する。留意すべきことに、使用される特定のシーケンシングの化学的現象はほとんど無関係であり、本明細書に記載の方法は、一般的な適応性を有し、関連するシーケンシングプライマー配列をアンプリコンに取り込むことを可能にすることが期待される。ある特定の実施態様において、第2の部分は、あらゆる順番で4種のヌクレオチドA、C、G、Tのそれぞれを含む配列をさらに含むかまたはそれと隣接していてもよい。好ましくは、上記配列は四つ組（例えば、ACGT）であるが、上記配列は、各ヌクレオチドの複数のコピーを典型的には（必ずではないが）等しい数で包含していてもよい（例えば、AAGGCGCTT）。

【0044】

プライマー10は、2つのタイプの核酸を包含していてもよい。プライマーの5'末端における第1の領域は、選択された技術による分解に感受性であってもよく、一方でプライマーの3'末端における第2の領域は、その技術による分解に非感受性である。例えば、プライマーの5'末端は、RNAから形成されていてもよく、一方で3'末端は、DNAから形成され、RNA部分は、RNAアーゼHまたはアルカリ熱分解によって分解されてもよく、DNA部分は、その分解に対して耐性である。代替として、プライマーの5'末端は、チミンの代わりにウラシルを取り込んだDNAから形成されていてもよく、これは、ウラシル-N-グリコシラーゼによって分解可能であると予想される。好ましい実施態様において、分解性部分は、酵素によって分解可能である。

【0045】

この実施例において、分解性部分は、プライマーの第1の部分12の全部、および第2の部分14の第1のセクション（第2の部分において二重の点線で示される）を包含する。プライマーの残部は、非分解性である。第2の部分の分解性セクションは、ステム-ループ構造のステムの半分を形成する領域を包含し、非分解性部分（単一の点線で示される）は、ループと、第3の部分に隣接するステムの第2の半分とを形成する。非分解性部分は、シーケンシングプライマーの配列に少なくとも実質的に同一な配列を含む。シーケンシングプライマーは、他方の鎖を生成するDNA重合（典型的にはクローニングによる増幅）のときに生産されたこの配列の相補物にハイブリダイズする。

【0046】

プライマー10は、フォワードおよびリバースプライマーからなる対で使用されてもよい。フォワードおよびリバースプライマーは、異なる第1および第3の部分（これらが増幅しようとするテンプレートの領域の終点に相補的になるように選択される場合）を包含し、第2の部分のアンプリコンへの非対称な統合を可能にすることが目的である場合、異

なる第2の部分（結果的に異なるフォワードおよびリバースシーケンシングプライマーが使用されることになる）を包含する。しかしながら、複数のプライマー対が提供される場合、各対の第2の部分は同一であってもよく、それにより共通のシーケンシングプライマーを全てのアンプリコンの配列に使用できるようになる。

【0047】

図2に、プライマーを使用してアンプリコンを生成する方法を示す。この図は、調査される残ったプライマー配列の量が最小であるシーケンス反応のための汎用のテンプレートを生成するために実行される逐次工程を詳述する。

【0048】

本方法は、複数の別々のテンプレート標的を、迅速に汎用のシーケンシングのワークフローに対応でき、（最終的に）高い感受性と特異性を有する産物に変換することを可能にする。逐次的な増幅工程は、別々の増幅チャンバーで、物理的に離れたプライマー種で個別に行うことができるが、当業者は、プライマー結合温度の選択、プライマー濃度の慎重な制御（ある特定のプライマー種が枯渇するまで消費されるように）を介して、さらにプロセス全体への参加から個々の段階を一時的に離す特異的な熱サイクリング計画の適用によって、より少数のチャンバー（理想的には1つのみ）でこれらの反応を実行することが可能であることを理解しているものと予想される。

【0049】

第1の工程[図2a]において、従来のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して標準的なPCR反応を行い、増幅の標的を有するテンプレート集団を富化する。有利には、この反応を、多数の異なる標的の相対的に低い特異性の多重増幅を達成する異なるプライマー対を用いて多重的に行い、希少な種の効率的な増幅を確実にすることができる。この最初の相における低い特異性のプライマーはまた、標的化されたプライマー結合部位内に、例えばがん関連遺伝子からの標的DNA中およびその周辺で遭遇する可能性があるようなある程度の非相補的な塩基対を受け入れることもできる。この最初の増幅相2aは、感受性強化のために特異性を犠牲にしてもよく、これは、プライマーの二量体人工産物などのあらゆる不適切に増幅された種は、それに続く段階中にさらなる増幅物から取り除かれると予想されるため許容できる。この工程は、プライマー配列を端部に有する第1のアンプリコンを生成する。ここで留意すべきことに、これらのプライマーは、それ自身分解可能であってもよい（例えば、RNAから、またはTの代わりにUを取り込んだDNAから形成される）。これらのプライマーは、

- ・高い T_m 、後半のサイクルをより低いアニーリング温度で行うこと；
- ・このプライマーの最初の濃度が低いこと

の1つまたはこれらの組合せにより、非効率的になる前にそれらが限られた量のアンプリコンを生産するように設計されてもよい。

【0050】

工程b)において、工程a)からのアンプリコンは次いで、上述したような「バブルプライマー」またはループプライマーを使用して増幅される。図2bにおいて、新規のバブルプライマーは、最初の工程2a中に生成されたテンプレートの富化されたプールを利用して、正しい標的から生成された2aからのアンプリコンだけを効率的に増やすことから、最初の増幅が相対的に低い特異性を有していた可能性があってもそれを修正する。それゆえにこの増幅は、最初の低い特異性の増幅の高い感受性を利用するアンプリコンのプールを生成するが（図2a）、バブルプライマーの3'末端は正しいアンプリコンによってのみ受け入れられると予想されるため、この第2の段階で高い特異性が再び確立される（図2b）。バブルプライマーの「バブル配列」を含有するアンプリコンのみが、この時点で高い感受性（2a）および高い特異性（2b）の反応（の組合せ）から生成される。生成される他のあらゆる非標的アンプリコンまたは人工産物は、バブルプライマーの非テンプレート（人工）のバブル内に定義された必要な汎用の配列を欠いていると予想されるため、それらは、反応スキームを先に進めないと予想される。

【0051】

10

20

30

40

50

バブルプライマーの配列は、工程 a) における増幅に関して増幅がネステッドになるように選択され、すなわち、バブルプライマーの第 1 の部分は、工程 a) のプライマーに実質的に同一であり、一方で第 3 の部分は、工程 a) のプライマーの 3 ' 末端の 3 ' 方向である。これは、第 3 の部分が工程 a) のプライマーに提示されない配列を含有しており、最初の増幅中に正確に生成されたアンプリコンのみの選択的な「ネステッド」PCR を可能にすることを意味し、したがってある程度の特異性の低減を受け入れることができる。第 2 および / または第 3 の部分の配列はまた、理想的には、それが 4 種のヌクレオチド (A 、 C 、 G 、 T) のそれぞれを包含する四つ組を含有するようにも選択される。ヌクレオチドの四つ組は、好ましくは、シーケンシングプライマーに少なくとも実質的に同一な領域の 3 ' 末端に直接隣接して配置される。またプライマーは、例えば産物を同定および標識するために、ステムループ構造のステム内に「インデックスコード」を包含していてもよい。一例として、インデックスコードは、特異的な個々のテンプレートから特異的な産物を同定するのに使用することができる。代替として、または加えて、バブルプライマーの第 3 の部分の 6 つの塩基は、シーケンシングされる場合、適度なサイズの多様性でシーケンシングされた特異的な標的を同定するのに一般的に十分であると予想される。

【 0 0 5 2 】

工程 c) は、工程 b) で生成されたアンプリコンを示す。増幅産物は、標的 DNA 配列に近接して提示される非テンプレート配列 (すなわち、バブルプライマーの第 2 の部分の配列) を有する。この産物は、最初の標的特異的な PCR 結合部位から誘導された分解性配列 (例えば、RNA) 、および非テンプレートループの RNA を含有する残部を有する可能性がある。

【 0 0 5 3 】

工程 d) において、工程 c) の産物を分解して (例えば、RNAアーゼ H および / または RNAアーゼ A を使用することによって) 、存在する場合、アンプリコンから分解性配列を除去してもよい。またこの分解は、アンプリコンに取り込まれないあらゆる過量の分解性プライマーも除去し、あらゆるさらなる活性からこれらを機能的に除去する。それゆえに残存するアンプリコンは、プライマーからの第 2 の部分および第 3 の部分の非分解性の非標的配列を取り込んだ増幅された標的配列のみを包含する。任意選択で、この段階において、汎用の PCR 増幅はまた、バブルプライマーの非標的配列に標的化されたプライマー (上記の「発明の要約」の章では第 3 のプライマー対と称される) を用いて行われてもよい。これらのさらなるプライマーは、加えて、配列捕獲タグ、クローニングによる増幅、または産物の増幅後 - 増幅前の増幅に使用される領域として使用するための非テンプレートの人工 5 ' 伸長部分を有していてもよい。

【 0 0 5 4 】

生成されたアンプリコンの 5 ' の分解されやすい末端が消化されて切り離されたかどうかにかかわらず、増幅スキームの次の段階は、バブルプライマーの非テンプレート (人工) 配列に少なくとも実質的に同一なプライマーを使用する標的アンプリコンの増幅に依存する。多重反応中に生成される全てのアンプリコンは、バブルプライマーの非テンプレート領域内に提供される人工配列に少なくとも実質的に同一なこのプライマーを使用した汎用の様式での増幅に対応できる。この汎用のプライマーは、増幅プライマーとして作用し、それに対して同一なまたは実質的に同一な配列を有するプライマーは、シーケンス反応中の最終的な「シーケンシングプライマー」として使用することができ、シーケンシングプライマーの 3 ' 末端は、調査しようとする標的アンプリコンの領域に近接して (一般的に) 設置され、これらは少数の標的特異的な塩基 (理想的には 4 から 10 塩基の間の数であり、このテンプレートで定義された領域の GC 含量に応じて 6 塩基、7 塩基または 8 塩基が最も望ましい) によってのみ隔てられる。汎用のシーケンシングプライマーの 3 ' 末端と標的特異的な塩基との間の領域は、ヌクレオチド A 、 T 、 G および C の四つ組を包含するように設計されるかまたは選択されて、これらの単一の塩基の取り込み事象のそれぞれから生成されたシグナルのレベルのプライマーとして作用することができる。このヌクレオチドの四つ組は、各ヌクレオチドタイプのポリヌクレオチドの繰り返し (representa

10

20

30

40

50

tion) (例えば、A A、T T、G GおよびC C、またはA A A、T T T、G G G、もしくはC C C)として提供されてもよい。四つ組プライマー内の塩基の繰り返し(representation)の順番は重要ではなく、各塩基の提示の数は様々であってもよい(例えばA A、T T T、G G、C C C)。

【0055】

工程e)は、最終産物を示す。最終産物としては、任意選択で捕獲/クローニングによる増幅に利用可能な配列(工程d)での増幅で導入される)を端部に有する標的配列;汎用のシーケンシングプライマーのハイブリダイゼーションに利用可能な領域(バブルプライマーの第2の部分中から誘導された)、およびシーケンシング中の各塩基の取り込みに対して生成されたシグナル強度の参照として作用することができるA、T、GおよびCを有する領域(第3の部分中から、またはバブルプライマーの第2の部分と第3の部分との間から誘導された)が挙げられる。次いで最終産物を回収して、シーケンス反応で使用する
10

【0056】

バブルプライマーの非テンプレート配列に少なくとも実質的に同一なプライマーを使用した標的配列の汎用の増幅は、多重的なアンプリコンのプールの個々の分子を捕獲して、(再度)汎用の様式でこれら個々の分子のクローニングによる増幅を容易にするのに使用できる汎用の5'タグテールの伸長部分を包含することによって利益を得ることができる。当業者であれば、人工配列をベースとした増幅に依存することによって、これらの増幅を、標的特異的または一般的に最適化する多大な余地を与えること、および全体のスキームが、NGS技術を選ばないシーケンシングに対応できるアンプリコンの集団を生産すると予想されることを認識していると予想される。
20

【0057】

本明細書に記載の方法は、アダプターライゲーション戦略によって達成される約50%のランダムに対称的な産物とは対照的に、一貫した(信頼できる非対称の)アダプター配列が末端に接続された「末端が改変された」フラグメントのプールを提供するものであり、対称的な産物は、NGSシーケンシングのための支持的なクローニングによる増幅に対応しないため、本発明は、NGSで有用性のある利用可能なテンプレートの低減を効果的になくす。

【0058】

本方法は、短いDNAフラグメントのプールを迅速に生成することを可能にするものであって、ここで上記フラグメントの内部は、NGSによって決定しようとする目的のDNA配列であり、上記フラグメントの末端は、実質的に汎用であり、そのためシグナル強化に必要なクローン集団の生成中に並行処理が可能になる。
30

【0059】

本方法は、一実施態様において、望ましい産物の効率的な生産に有利なように、チミン塩基をウラシル塩基で置き換えてこれらの配列の機能的な除去を可能にすることを採用するプライマー設計を使用する。別の実施態様において、本発明は、DNAにハイブリダイズした場合のRNA要素の消化とこの要素の機能的な除去を可能にする、プライマーの5'末端ではRNAのハイブリッドであり、プライマーの3'末端ではDNAであるプライマー設計を使用する。
40

【0060】

バブルプライマーの3'末端、第3の部分は、DNAポリメラーゼの接続と伸長を受け入れるのに十分な程度の限られた数のテンプレート特異的な塩基を包含するが、NGS反応に使用される最終産物で「無駄に」提示され、シーケンシングされると予想される塩基の数は制限される。

【0061】

本明細書に記載の方法およびプライマーは、従来技術を超える多数の利点を有する。一部の実施態様において、DNAの具体的な領域の末端へのDNAの配列の接続は、並行処理でNGSシーケンシングを実行する同じ生化学的手法を適用して、これらの異なる領域
50

を多重的に分析することを可能にする。本方法およびプライマーは、標的化されたDNA領域の末端に汎用の領域を提供するものであり、この汎用の領域は、様々な固相および/または水相で様々な標的化された領域の捕獲およびクローニングによる増幅を支持するのに利用可能である。さらに、本方法およびプライマーは、DNA増幅によって生成されたDNAフラグメントの末端へのDNAアダプターのライゲーションを使用する必要性を回避し、さらに、効率的なシーケンシングに対応できるテンプレートを提供する。

【0062】

本方法およびプライマーは、それに続くクローニングによる増幅産物のプール（表面上、ビーズ上または溶液中のいずれにおけるクローン集団の生成に対応できる）を生成する操作を選ばない。本技術はまた、その後NGSデータを生成するのに使用される技術も選ばず、（例えば）イルミナSBS（Illumina SBS）技術、イオン Torrent（Ion Torrent）またはロシュ454（Roche 454）の「同時の1塩基（one base at a time）」技術、または他のNGS技術、例えばナノポアシーケンシングと共に使用することができる。一般的に、本明細書に記載の方法は、特異的な増幅産物の1つの末端または複数の末端に定義された配列を導入することが望ましい場合、有利であり得る。

【0063】

本方法およびプライマーは主として、かなり大きい利用可能なDNA配列プールから選択されるDNA標的のパネルの分析において有用性がある。

【図1】

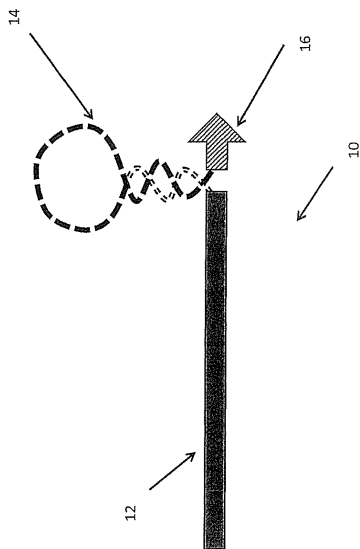
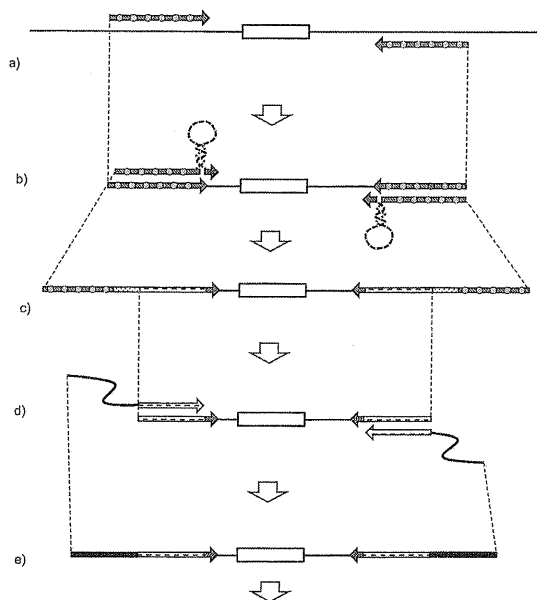


Figure 1

【図2】



回収およびクローニングによる増幅

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/054125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 770 090 A1 (BGI SHENZHEN CO LTD [CN]; BGI SHENZHEN [CN]) 27 August 2014 (2014-08-27) see whole doc. esp. claims and Fig. 1 -----	1-34
Y	US 2007/077570 A1 (LAO KAI Q [US] ET AL) 5 April 2007 (2007-04-05) see whole doc. esp. Fig. 3 ----- -/--	1-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2016

Date of mailing of the international search report

17/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, Frank

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/054125

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAIFU CHEN ET AL: "Real-time quantification of Micro-RNAs by stem-loop RT-PCR", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, INFORMATION RETRIEVAL LTD, GB, vol. 33, no. 20, 1 January 2005 (2005-01-01), page E179, XP008132134, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GNI178 see whole doc. esp. Fig. 1 -----	1-34
A	US 2013/184165 A1 (SCHNABLE PATRICK S [US] ET AL) 18 July 2013 (2013-07-18) see whole doc. esp. Fig. 4 and claims -----	1-34
A	WO 2012/103154 A1 (NUGEN TECHNOLOGIES INC [US]; KURN NURITH [US]; STAPLETON MARK [US]; WA) 2 August 2012 (2012-08-02) the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/054125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2770090	A1	27-08-2014	CN 103060924 A 24-04-2013
			EP 2770090 A1 27-08-2014
			TW 201321518 A 01-06-2013
			US 2014296084 A1 02-10-2014
			WO 2013056640 A1 25-04-2013

US 2007077570	A1	05-04-2007	AU 2006341607 A1 18-10-2007
			EP 1896617 A1 12-03-2008
			JP 4879975 B2 22-02-2012
			JP 2008545430 A 18-12-2008
			US 2007077570 A1 05-04-2007
			US 2011251083 A1 13-10-2011
			US 2013184171 A1 18-07-2013
			US 2014303017 A1 09-10-2014
			WO 2007117256 A1 18-10-2007

US 2013184165	A1	18-07-2013	CN 104334739 A 04-02-2015
			EP 2802666 A1 19-11-2014
			HK 1204337 A1 13-11-2015
			US 2013184165 A1 18-07-2013
			US 2015344947 A1 03-12-2015
			WO 2013106737 A1 18-07-2013

WO 2012103154	A1	02-08-2012	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 マキューン, ブライアン・ジェームズ

イギリス国ロンドン ダブリュー 1 2 ・ 7 エスビー, ウッド・レーン 5 6 , ウグリ・キャンパス・ブロック・シー, ケア・オブ・ディーエヌエーイー

(72)発明者 マケルガン, キャサル・ジョゼフ

イギリス国ロンドン ダブリュー 1 2 ・ 7 エスビー, ウッド・レーン 5 6 , ウグリ・キャンパス・ブロック・シー, ケア・オブ・ディーエヌエーイー

Fターム(参考) 4B063 QA13 QQ42 QR62 QS25 QS34 QS39