

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7161991号
(P7161991)

(45)発行日 令和4年10月27日(2022.10.27)

(24)登録日 令和4年10月19日(2022.10.19)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q	1/6869 (2018.01)	F I	C 1 2 Q	1/6869	Z
C 1 2 N	15/10 (2006.01)		C 1 2 N	15/10	1 1 0 Z
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/10	1 1 4 Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	
C 1 2 P	19/34 (2006.01)		C 1 2 N	15/13	Z N A

請求項の数 42 (全84頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-522907(P2019-522907)
 (86)(22)出願日 平成29年11月2日(2017.11.2)
 (65)公表番号 特表2019-537439(P2019-537439)
 A)
 (43)公表日 令和1年12月26日(2019.12.26)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/059804
 (87)国際公開番号 WO2018/085599
 (87)国際公開日 平成30年5月11日(2018.5.11)
 審査請求日 令和2年10月30日(2020.10.30)
 (31)優先権主張番号 62/416,677
 (32)優先日 平成28年11月2日(2016.11.2)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 521194035
 アーチャーディーエックス、エルエル
 シー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
 03, サン フランシスコ, シックス
 ティーンズ ストリート 1400
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫レパートリーシーケンシングのための核酸サンプル調製の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行つて、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(d) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、該捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；

(e) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；および

(f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該捕捉したライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程、

を包含する方法。

【請求項2】

(g) 前記標的特異的プライマーの 5' テール部分の相補的配列に特異的にアニールする 3' 部分を含むテールプライマーおよび前記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 2 のアダプターブライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (f) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない 5' 部分を含む工程、をさらに包含する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (d) は、前記アダプター核酸、前記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該 2 本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハンギング配列を含み、ここで該オーバーハンギング配列は、該 2 本鎖核酸の 3' 末端におけるオーバーハンギング配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む；または

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

【請求項 4】

前記捕捉部分改変プライマーは、少なくとも 1 つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記捕捉部分はビオチン部分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記結合パートナーは、ストレプトアビシンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

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

【請求項 8】

前記第 2 鎖合成反応は、前記第 1 鎖合成反応の生成物にハイブリダイズした前記核酸分子のフラグメントによってプライムされる；または

前記第 2 鎖合成は、複数のランダムプライマーを使用してランダムにプライムされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記核酸分子は m R N A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記核酸分子は、T 細胞、B 細胞、白血球またはこれらの混合物を含むサンプルから得られるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプルは、T 細胞悪性腫瘍または B 細胞悪性腫瘍を有するかまたは有すると疑われる被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、移植を受けた被験体または移植を受ける予定の被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、処置に対する免疫応答が評価されている最中である被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、白血球悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得られるものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記被験体はヒトまたは脊索動物である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的ヌクレオチド配列は、T 細胞レセプター (T C R) 遺伝子または B 細胞レセプター (B C R) 遺伝子の一部に相当するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記捕捉部分改変プライマーは、免疫レセプター遺伝子または免疫グロブリン遺伝子に相補的であるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記標的特異的プライマーは、 C D R 3 の下流にある定常領域または J セグメントに特異的にアニールする；あるいは

前記標的特異的プライマーは、定常領域と J セグメントとの間に形成されるエキソン - エキソン接合部に特異的にアニールし、ここで該エキソン - エキソン接合部は、 C D R 3 の下流にある、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 のアダプタープライマーおよび前記第 2 のアダプタープライマーは同じである；または

前記第 1 のアダプタープライマーおよび前記第 2 のアダプタープライマーは異なる；または

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

【請求項 17】

前記テールプライマーの 5' 部分は、サンプルインデックス領域、分子バーコード領域、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 18】

前記ビオチン部分は、ビオチン - トリエチレングリコール、ビス - ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン - トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ストレプトアビシンは、基材に付着している、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 20】

前記基材は固体表面を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記固体表面は、常磁性ビーズを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記複数のランダムプライマーは、6 塩基長～15 塩基長の間である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 23】

前記 T 細胞悪性腫瘍または前記 B 細胞悪性腫瘍は、リンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ球性白血病、および慢性リンパ性白血病からなる群より選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 24】

前記捕捉部分改変プライマーは、相補性決定領域 3 (C D R 3) の下流にある定常領域に特異的にアニールする、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 25】

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する鎖合成反応を行うことによって、核酸鎖を合成して、捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を生成する工程；

(c) アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションして、該捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；および

(d) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによ

10

20

30

40

50

つて、該ライゲーション生成物を捕捉する工程、
を包含する方法。

【請求項 2 6】

(e) ポリメラーゼ連鎖反応によって、前記捕捉したライゲーション生成物を増幅する工程

をさらに包含する請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

(f) ポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (e) の増幅生成物を増幅する工程
をさらに包含する請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

工程 (c) は、前記アダプター核酸、前記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼ
が該アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含す
る、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 2 本鎖核酸と合わされた前記アダプター核酸が、1 本鎖である、請求項 2 8 に記載
の方法。

【請求項 3 0】

前記捕捉部分改変プライマーは、少なくとも 1 つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む、
請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記捕捉部分はビオチン部分である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記結合パートナーは、ストレプトアビジンである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 3】

工程 (d) において、前記 2 本鎖核酸は、クラウディング剤の存在下で前記アダプター
核酸にライゲーションされる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記核酸分子は、T 細胞、B 細胞、白血球またはこれらの混合物を含むサンプルから得
られるか、または由来するものである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記サンプルは、T 細胞悪性腫瘍またはB 細胞悪性腫瘍を有するかまたは有すると疑わ
れる被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、移植を受けた被験体または移植を受ける予定の被験体から得られるも
のである；あるいは

前記サンプルは、処置に対する免疫応答が評価されている最中である被験体から得られ
るものである；あるいは

前記サンプルは、白血球悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得ら
れるものである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記被験体はヒトまたは脊索動物である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記標的ヌクレオチド配列は、T 細胞レセプター (T C R) 遺伝子またはB 細胞レセプ
ター (B C R) 遺伝子の一部に相当するヌクレオチド配列を含む、請求項 2 5 に記載の方
法。

【請求項 3 8】

前記ビオチン部分は、ビオチン - トリエチレングリコール、ビス - ビオチン、光切断性
ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン - トリエチレングリコール、またはアジ
化ビオチンを含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記ストレプトアビジンは、基材に付着している、請求項 3 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 0】

前記基材は固体表面を含む、請求項3_9に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記固体表面は、常磁性ビーズを含む、請求項4_0に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 T 細胞悪性腫瘍または前記 B 細胞悪性腫瘍は、リンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病、および慢性リンパ性白血病からなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

【0 0 0 1】**関連出願**

本願は、2016年11月2日に出願された米国仮特許出願第 62 / 416,677 号の米国特許法第 119 条 (e) 項に基づく優先権を主張し、この出願は、その全体が参照によって本願明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】**技術分野**

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

【背景技術】

20

【0 0 0 3】**背景**

適応免疫系は、非常に専門化された全身の細胞および病原体増殖を排除または防止することを目的としたプロセスから構成される。T 細胞および B 細胞は、それらの抗原レセプター遺伝子座の遺伝的組換えおよび体細胞変異を通じて抗原結合分子の広い多様性を生成することによって適応免疫応答を駆動する適応免疫系の主な細胞構成成分と見做され得る。未成熟 T 細胞および B 細胞は、選択的プロセスを受けて、主として自己反応性を欠く集団を生じる。抗原結合分子（例えば、T 細胞レセプターおよび免疫グロブリン）のこの最初のレパートリーを用意して、ナイーブ T 細胞および B 細胞は、身体全体を循環し、そこでそれら細胞は、抗原と接触した状態になり得る。

【0 0 0 4】

30

コグネット抗原への曝露の際に、および十分な共刺激シグナルとともに、抗原特異的 T 細胞または B 細胞は、活性化されて増殖し、B 細胞の場合には、それらの免疫レセプター遺伝子座のさらなる配列編集を（例えば、体細胞超変異および / またはさらなる組換えを通じて）受け得る。

【0 0 0 5】

これらの選択的プロセスの結果として、個々のサンプル中の結合特異性のレパートリーは、過去の抗原曝露の履歴を提供し得、同様に、固有のレパートリー能力および制限の情報を与える。

【発明の概要】

40

【課題を解決するための手段】**【0 0 0 6】****要旨**

本明細書で開示される技術の局面は、核酸を調製および分析するための方法に関する。本明細書で提供される方法は、いくつかの実施形態において、免疫レセプターおよび免疫グロブリンをコードする核酸配列の多様な状況を含む免疫レパートリーを表す配列を含め、核酸調製物中で超低頻度核酸バリエント（例えば、スプライスバリエント、融合物、一ヌクレオチドバリエント、挿入および欠失、コピー数バリエント、体細胞組換えされた免疫レセプター遺伝子座に由来する m R N A 、および発現レベルバリエント）を検出するために有用である。本明細書で提供される方法は、いくつかの実施形態において、以前に起

50

こっている組換えおよび／またはスプライシング事象を反映する転写された核酸に相当するヌクレオチド配列を有する核酸分子を富化するライゲーションベースの捕捉を包含する。いくつかの実施形態において、特有の分子捕捉は、個体（例えば、腫瘍を有する個体または免疫が障害された個体）から抽出された核酸に関する従来の方法を超えて非常に改善している。いくつかの実施形態において、捕捉効率は、個体（例えば、腫瘍を有する個体または免疫が障害された個体）から抽出された核酸に関する従来の方法と比較して少なくとも倍加される。いくつかの実施形態において、改善された深度は、改善されたフロントエンド捕捉化学現象の結果として達成される。

【0007】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、シーケンシングを介して RNA 免疫レパートリーを評価するために有用である。いくつかの実施形態において、（例えば、次世代シーケンシング（next - generating sequencing）を使用する）配列分析用の核酸サンプルの調製において有用な方法および組成物は、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される技術は、核酸配列を決定する方法に関する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法および組成物は、シーケンシング前に 1 またはこれより多くの標的ヌクレオチド配列を含む核酸を富化することに関する。いくつかの局面において、本開示は、第 1 の核酸鎖を合成するために捕捉部分改変プライマーの使用を包含するか、または 1 またはこれより多くの捕捉部分改変ヌクレオチドを核酸に付加する工程を包含する、核酸を（例えば、シーケンシング分析において使用するために）調製するための方法を提供する。

10

【0008】

いくつかの実施形態において、上記方法は、アダプター核酸を上記核酸にライゲーションする工程をさらに包含し、上記核酸に対して、上記捕捉部分改変プライマーが、ライゲーション生成物を生成するために上記核酸の第 1 鎖を合成するにあたって使用されている。いくつかの実施形態において、上記方法は、アダプター核酸を、上記捕捉部分改変ヌクレオチドが付加された核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記ライゲーション生成物と上記捕捉部分改変プライマーの捕捉部分の結合パートナーまたは上記捕捉部分改変ヌクレオチドの捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する。

20

【0009】

いくつかの実施形態において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法であって、上記方法は、（a）標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；（b）ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ上記核酸分子をテンプレートとして使用する第 1 鎖合成反応を行う工程；（c）上記第 1 鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第 2 鎖合成反応を行って、捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を生成する工程；（d）アダプター核酸を上記 2 本鎖核酸にライゲーションして、上記捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；（e）上記ライゲーション生成物と上記捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程；および（f）上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む標的特異的プライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、上記捕捉したライゲーション生成物を增幅する工程であって、ここで上記標的特異的プライマーは、上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程、を包含する方法を提供する。

30

【0010】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、（g）上記標的特異的プライマーの 5' テール部分の相補的配列に特異的にアニールする 3' 部分を含むテールプライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 2 のアダプター

40

50

プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (f) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで上記テールプライマーは、上記標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない 5' 部分を含む工程、をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記テールプライマーの 5' 部分は、サンプルインデックス領域、P C R プライマー結合領域、分子バーコード領域、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも 1 つを含む。いくつかの実施形態において、上記第 1 のアダプタープライマーおよび上記第 2 のアダプタープライマーは同じである。例えば、いくつかの実施形態において、上記第 1 のおよび第 2 のアダプタープライマーは、同じヌクレオチド配列からなる。いくつかの実施形態において、上記第 1 のアダプタープライマーおよび上記第 2 のアダプタープライマーは異なる（例えば、異なるヌクレオチド配列からなる、および / または 1 またはこれより多くの異なる部分を含む）。いくつかの実施形態において、上記第 2 のアダプタープライマーは、上記第 1 のアダプタープライマーに対してネスト化される。いくつかの実施形態において、上記第 2 のアダプタープライマーは、上記第 1 のアダプタープライマーに対してネスト化されない。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態において、工程 (d) は、上記アダプター核酸、上記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、上記リガーゼが上記アダプター核酸を上記 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで上記 2 本鎖核酸と合わされた上記アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハング配列を含み、ここで上記オーバーハング配列は、上記 2 本鎖核酸の 3' 末端におけるオーバーハング配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、上記アダプター核酸は、サンプルインデックス領域、P C R プライマー結合領域、分子バーコード領域（例えば、入力分子を特有に同定する領域）、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、工程 (d) は、上記アダプター核酸、上記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、上記リガーゼが上記アダプター核酸を上記 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで上記 2 本鎖核酸と合わされた上記アダプター核酸は、1 本鎖である。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、上記捕捉部分改変プライマーは、少なくとも 1 つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分改変プライマーは、捕捉部分に付着した第 2 の化学カップリング基に結合するように構成された第 1 の化学カップリング基を含む。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分はビオチン部分である。いくつかの実施形態において、上記ビオチン部分は、ビオチン - トリエチレングリコール、ビス - ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン - トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む。いくつかの実施形態において、上記補足部分の上記結合パートナーは、ストレプトアビジンである。いくつかの実施形態において、上記ストレプトアビジンは、基材に付着している。いくつかの実施形態において、上記基材は固体表面を含む。いくつかの実施形態において、上記固体表面は、常磁性ビーズを含む。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、上記捕捉したライゲーション生成物を上記捕捉部分の結合パートナーから放出する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記捕捉されたライゲーション生成物は、化学的試薬と接触させることおよび / または熱を適用することによって、上記捕捉部分の結合パートナーから放出される。いくつかの実施形態において、上記化学的試薬は、塩基または塩基性溶液である。いくつかの実施形態において、上記化学的試薬は、水酸化ナトリウム (N a O H) を含む。いくつかの実施形態において、接触させることが、2 種の溶液（例えば、塩基を含む溶液および洗浄した固定化核酸を含む溶液）を混合する工程、固体を溶液に添加する工程、または溶液を固体に添加する工程を包含し得ることは、認識されるべきである。いく

つかの実施形態において、上記捕捉したライゲーション生成物は、NaOHと接触されることおよび加熱すること（例えば、室温より高く（例えば、25～90、25～70、25～50、35～65、35～45、30～40、40～50の範囲の温度）加熱すること）によって、上記捕捉部分の結合パートナーから放出される。いくつかの実施形態において、上記捕捉したライゲーション生成物は、上記捕捉部分の結合パートナーに、例えば、分析用のさらなる調製のために結合したままである。いくつかの実施形態において、上記捕捉したライゲーション生成物は、分析用のさらなる調製の前に、上記捕捉部分の結合パートナーから放出される。

【0015】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程(d)の後でかつ工程(e)の前に洗浄工程をさらに包含する。

10

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程(e)の後でかつ工程(f)の前に：i)上記捕捉部分を含む上記2本鎖核酸を常磁性基材上に固定化する工程；およびii)その固定化した2本鎖核酸を洗浄する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程ii)の後に：iii)上記洗浄した固定化2本鎖核酸を上記常磁性基材から放出する工程をさらに包含する。

【0017】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程(c)の後でかつ工程(d)の前に、上記2本鎖核酸を5'リン酸化する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、5'リン酸化する工程は、上記2本鎖核酸の鎖の5'末端においてホスフェート基を生成する工程を包含する。例えば、いくつかの実施形態において、ホスフェート基は、上記鎖の5'末端において（例えば、ポリヌクレオチドキナーゼの作用を介して）ヒドロキシル基に付加され得る。

20

【0018】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程(c)の後でかつ工程(d)の前に、上記2本鎖核酸を末端修復して、平滑末端化した2本鎖核酸を生成する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、末端修復は、平滑末端化を含む。いくつかの実施形態において、平滑末端化は、末端の不対ヌクレオチド（例えば、オーバーハング配列）を、上記2本鎖核酸の鎖から除去することによって達成される。例えば、いくつかの実施形態において、末端の不対ヌクレオチドは、2本鎖核酸の鎖から、エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素（例えば、Klenowフラグメント）を使用する（例えば、末端ホスホジエステル結合を加水分解し、それによって、上記オーバーハングの1塩基を一度に除去するために）ことによって除去され得る。いくつかの実施形態において、平滑末端化は、ヌクレオチド三リン酸の存在下で、重合酵素（例えば、DNAポリメラーゼ）で凹んだ末端を埋めることによって達成される。

30

【0019】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、上記平滑末端化した2本鎖核酸の3'末端に1またはこれより多くのヌクレオチドを付加する（例えば、ライゲーティングする、テイリングする(tailing)）工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記1またはこれより多くのヌクレオチドは、デオキシアデノシンヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態において、上記方法は、上記2本鎖核酸の3'末端を、（例えば、Klenowフラグメントを使用して）dAテール付加する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記アダプター核酸は、上記平滑末端化した2本鎖核酸の3'末端に付加した上記1またはこれより多くのヌクレオチドに相補的な1またはこれより多くのヌクレオチドを含む3'末端においてヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、上記アダプター核酸の3'末端における上記ヌクレオチド配列は、1またはこれより多くのデオキシチミジンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、上記アダプター核酸は、上記3'末端において上記ヌクレオチド配列を含む増幅鎖にアニールしたブロッキング鎖をさらに含み、上記3'末端における上記ヌクレオチド配列は、上記又

40

50

クレオチド配列がオーバーハング配列を形成するように不対化される。

【0020】

いくつかの実施形態において、上記方法は、末端修復の後に：i) 上記捕捉部分を含む上記2本鎖核酸を常磁性基材上に固定化する工程；ii) 上記固定化した2本鎖核酸を洗浄する工程；およびiii) 上記洗浄した固定化2本鎖核酸を上記常磁性基材から放出する工程をさらに包含する。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記方法は、末端修復の後に：i) 上記捕捉部分を含む上記2本鎖核酸を常磁性基材上に固定化する工程；およびii) 上記固定化した2本鎖核酸を洗浄する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、末端修復の後でかつ工程i)の前に、洗浄工程をさらに包含する。

10

【0022】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、(h)工程(g)の增幅生成物を常磁性基材上に固定化する工程；(i)上記固定化した增幅生成物を洗浄する工程；および(j)上記洗浄した固定化增幅生成物を上記常磁性基材から放出する工程、をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、工程(g)の後でかつ工程(h)の前に、洗浄工程をさらに包含する。

【0023】

いくつかの実施形態において、工程(d)では、上記2本鎖核酸は、クラウディング剤の存在下で、上記アダプター核酸にライゲーションされる。いくつかの実施形態において、上記クラウディング剤は、ライゲーション混合物のうちの5%～50%を表す量のポリエチレングリコールである。

20

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法は、工程(b)の後でかつ工程(c)の前に、上記核酸分子とリボヌクレアーゼ酵素とを接触させる工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記リボヌクレアーゼ酵素は、フラグメントが上記第1鎖合成反応の生成物にアニールしたままであるように、上記核酸分子の一部を分解する。いくつかの実施形態において、上記第2鎖合成反応は、上記第1鎖合成反応の生成物にハイブリダイズした上記核酸分子のフラグメントによってプライムされる。

30

【0025】

いくつかの実施形態において、上記第2鎖合成は、複数のランダムプライマーを使用してランダムにプライムされる。いくつかの実施形態において、上記複数のランダムプライマーは、6塩基長～15塩基長の間である。

【0026】

いくつかの実施形態において、上記核酸分子は、mRNAを含む。いくつかの実施形態において、上記核酸分子は、T細胞、B細胞、またはこれらの混合物を含むサンプルから得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、1もしくはこれより多くのT細胞、1もしくはこれより多くのB細胞、またはこれらの混合物を含む。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、T細胞およびB細胞の混合物を含む。いくつかの実施形態において、T細胞およびB細胞の上記混合物は、1またはこれより多くの非血球タイプをさらに含む。いくつかの実施形態において、T細胞およびB細胞の上記混合物は、白血球（例えば、好中球、好酸球、好塩基球、ナチュラルキラー（NK）細胞、单球、組織球、樹状細胞、マスト細胞、ミクログリアなど）のうちの1またはこれより多くのタイプをさらに含む。

40

【0027】

いくつかの実施形態において、上記サンプルは、T細胞悪性腫瘍もしくはB細胞悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、リンパ腫または白血病（例えば、多発性骨髄腫、急性リンパ球性白血病、または慢性リンパ性白血病）を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、固形腫瘍（例えば、肉腫、癌腫

50

、リンパ腫、または非悪性免疫細胞を含んでいても含んでいなくてもよい非リンパ系起源の任意の腫瘍）を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、移植を受けた被験体または移植を受ける予定の被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、処置に対する免疫応答が評価されている最中である被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、白血球悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、自己免疫状態を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる。例えば、いくつかの実施形態において、上記免疫状態は、自己反応性T細胞、自己反応性B細胞、またはこれらの組み合わせによって駆動される任意の状態である。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、T細胞悪性腫瘍および/またはB細胞悪性腫瘍（例えば、リンパ腫およびそのサブタイプ、多発性骨髄腫など）を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、固形腫瘍を有する被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記被験体はヒトである。いくつかの実施形態において、上記被験体は脊索動物である。いくつかの実施形態において、上記核酸分子は、白血球を含むサンプルから得られる。いくつかの実施形態において、上記標的ヌクレオチド配列は、T細胞レセプター（TCR）遺伝子またはB細胞レセプター（BCR）遺伝子の一部に相当するヌクレオチド配列を含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、上記捕捉部分改変プライマーは、免疫レセプター遺伝子または免疫グロブリン遺伝子に相補的であるヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、上記捕捉部分改変プライマーは、相補性決定領域3（CDR3）の下流にある定常領域に特異的にアニールする。いくつかの実施形態において、上記標的特異的プライマーは、CDR3の下流にある定常領域またはJセグメントに特異的にアニールする。いくつかの実施形態において、上記標的特異的プライマーは、定常領域とJセグメントとの間に形成されるエキソン-エキソン接合部に特異的にアニールし、ここで上記エキソン-エキソン接合部は、CDR3の下流にある。

【0029】

いくつかの実施形態において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法であって、上記方法は、（a）既知の標的ヌクレオチド配列および未知の標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と、上記既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；（b）ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ上記核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；（c）上記核酸分子のフラグメントによってプライムされかつ上記第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；（d）上記2本鎖核酸を末端修復して、上記捕捉部分を含む平滑末端化した2本鎖核酸を生成する工程；（e）アダプター核酸を上記平滑末端化した2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで上記ライゲーション生成物は、上記アダプター核酸および上記捕捉部分に隣接した上記未知の標的ヌクレオチド配列を含む工程；（f）上記ライゲーション生成物と上記捕捉部分の固定化した結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程；（g）上記既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む標的特異的プライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、上記ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで上記標的特異的プライマーは、上記既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；ならびに（h）上記標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールするテールプライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程（g）の増幅生成物を増幅する工程、を包含する方法を提供する。いくつかの実施形態にお

いて、本明細書で記載される方法は、工程(e)の後でかつ工程(f)の前に、上記ライゲーション生成物を洗浄する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、工程(f)の後でかつ工程(g)の前に、捕捉したライゲーション生成物を洗浄する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、(i)工程(h)の増幅生成物を洗浄する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、工程(c)の第2鎖合成反応は、上記核酸分子を含むサンプルに存在する任意の核酸フラグメントによってプライムされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、上記サンプルは、相補鎖から解離し上記混合物内に存在する異なる鎖に再度アニールし得る核酸の複雑な混合物を含む。

【0030】

10

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法であって、上記方法は、(a)標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；(b)ハイブリダイズした第1の標的特異的プライマーによってプライムされかつ上記核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；(c)上記核酸分子のハイブリダイズしたフラグメント(例えば、ハイブリダイズした一部またはハイブリダイズした一部分)によってプライムされかつ上記第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、2本鎖核酸を生成する工程；(d)アダプター核酸を上記2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程；(e)上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む第2の標的特異的プライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、上記ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで上記第2の標的特異的プライマーは、上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；ならびに(f)上記第2の標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールする3'部分を含むテールプライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(e)の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで上記テールプライマーは、上記第2の標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む工程、を包含する方法を提供する。いくつかの実施形態において、工程(c)の第2鎖合成反応は、上記核酸分子を含むサンプルに存在する任意の核酸フラグメントによってプライムされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、上記サンプルは、相補鎖から解離し上記混合物内に存在する異なる鎖に再度アニールし得る核酸の複雑な混合物を含む。

20

30

【0031】

いくつかの実施形態において、上記第1の標的特異的プライマーは、捕捉部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、工程(d)の後でかつ工程(e)の前に、上記ライゲーション生成物と上記捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する。

【0032】

40

いくつかの実施形態において、上記第1鎖合成反応は、捕捉部分改变ヌクレオチドの少なくとも1つのタイプを使用して行われ、上記第1鎖合成反応の生成物は、少なくとも1つの捕捉部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、工程(d)の後でかつ工程(e)の前に、上記ライゲーション生成物と上記少なくとも1つの捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する。

【0033】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、工程(c)の後でかつ工程(d)の前に、上記2本鎖核酸と上記少なくとも1つの捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、上記2本鎖核酸を捕捉する工程をさらに包含する。

【0034】

50

いくつかの局面において、本開示は、サンプル中の免疫レパートリーを決定する方法であって、上記方法は、(a)免疫レセプターおよび免疫グロブリンのうちの少なくとも一方をコードする核酸分子を含むサンプルを得る工程；(b)上記サンプルからの上記核酸分子と上記核酸分子の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；(c)ハイブリダイズした第1の標的特異的プライマーによってプライムされかつ上記核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；(d)上記第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、2本鎖核酸を生成する工程；(e)アダプター核酸を上記2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程；ならびに(f)上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む第2の標的特異的プライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、上記ライゲーション生成物を增幅する工程であって、ここで上記第2の標的特異的プライマーは、上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；(g)上記第2の標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールする3'部分を含むテールプライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(f)の増幅生成物を增幅する工程であって、ここで上記テールプライマーは、上記第2の標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む工程；ならびに(h)第1のおよび第2のシーケンシングプライマーを使用して、工程(g)の増幅生成物をシーケンシングする工程、を包含する方法を提供する。

【0035】

いくつかの実施形態において、上記免疫レセプターは、TCRを含む。いくつかの実施形態において、上記免疫グロブリンは、BCRを含む。いくつかの実施形態において、上記標的ヌクレオチド配列は、遺伝的に組換えられた配列に相当する。いくつかの実施形態において、上記標的ヌクレオチド配列は、TCR遺伝子座(例えば、TCRA、TCRB、TCRG、またはTCRD)のうちの少なくとも1つに相当する。いくつかの実施形態において、上記標的ヌクレオチド配列は、BCR遺伝子座(例えば、IGH、IGK、またはIGL)のうちの少なくとも1つに相当する。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、T細胞、B細胞、またはこれらの混合物を含む。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、被験体から得られる。いくつかの実施形態において、上記被験体はヒトである。いくつかの実施形態において、上記被験体は齧歯類である。例えば、いくつかの実施形態において、上記被験体は、マウス、ラット、アレチネズミ、ハムスター、モルモット、チンチラ、リス、またはいずれかのこののような齧歯類のヒト化形態(例えば、ヒトTCRおよび/またはヒトBCRを発現する齧歯類)である。

【0036】

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法であって、上記方法は、(a)標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーとを、プライマーがハイブリダイズした核酸分子を生成する条件下で接触させる工程；(b)上記プライマーがハイブリダイズした核酸分子と、上記核酸分子に相補的である第1鎖へと組み込むための複数のタイプのヌクレオチドとを接触させる工程であって、ここで上記複数のタイプのヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、捕捉部分を含む工程；(c)上記プライマーがハイブリダイズした核酸分子の上記第1の標的特異的プライマーによってプライムされかつ上記プライマーがハイブリダイズした核酸分子の上記核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程であって、ここで上記第1鎖合成反応の生成物は、少なくとも1つの捕捉部分を含む工程；(d)上記核酸分子のフラグメントによってプライムされかつ上記第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、上記少なくとも1つの捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；(e)アダプター核酸を上記2本鎖核酸にライゲーションして、上記少なくとも1つの捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成

10

20

30

40

50

する工程；ならびに(f)上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む第 2 の標的特異的プライマーおよび上記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプターブライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、上記ライゲーション生成物を增幅する工程であって、ここで上記第 2 の標的特異的プライマーは、上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程、を包含する方法を提供する。いくつかの実施形態において、工程(d)の第 2 鎖合成反応は、上記核酸分子を含むサンプルに存在する任意の核酸フラグメントによってプライムされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、上記サンプルは、相補鎖から解離し上記混合物内に存在する異なる鎖に再度アニールし得る核酸の複雑な混合物を含む。

【 0 0 3 7 】

10

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、工程(e)の後でかつ工程(f)の前に、上記ライゲーション生成物と上記捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、上記ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される方法は、工程(d)の後でかつ工程(e)の前に、上記 2 本鎖核酸と上記捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、上記 2 本鎖核酸を捕捉する工程をさらに包含する。

【 0 0 3 9 】

20

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製する方法であって、上記方法は、(a)標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と、ハイブリダイゼーション条件下で上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分および上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む捕捉部分改変プライマーとを、接触させる工程；(b)ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ上記核酸分子をテンプレートとして使用する第 1 鎖合成反応を行う工程；(c)上記第 1 鎖合成反応の生成物と複数のランダムプライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、ここで上記複数のランダムプライマーの各々は、共通配列を含む非ランダム 5' テール部分を含む工程；(d)上記複数のランダムプライマーのうちの少なくとも 1 つによってプライムされかつ上記第 1 鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第 2 鎖合成反応を行って、上記捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を生成する工程；(e)上記 2 本鎖核酸と上記捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、上記捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を捕捉する工程；(f)第 1 のテールプライマーおよび上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、上記 2 本鎖核酸を増幅する工程であって、ここで上記第 1 のテールプライマーは、上記共通配列の相補体に特異的にアニールする 3' 部分および上記共通配列の相補体に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程；ならびに(g)第 2 の標的特異的プライマー 上記第 1 のテールプライマーの 5' テール部分の相補体に特異的にアニールする第 2 のテールプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(f)の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで上記第 2 の標的特異的プライマーは、上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分および上記標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程、を包含する方法を提供する。

30

【 0 0 4 0 】

40

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

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a)標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニ

50

ールする捕捉部分改変プライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；
 (b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；
 (c) 該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行つて、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；
 (d) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、該捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；
 (e) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによつて、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；および
 (f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプターブライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該捕捉したライゲーション生成物を増幅する工程であつて、ここで該標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程、
 を包含する方法。

(項目2)

(g) 前記標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールする3'部分を含むテールプライマーおよび前記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダプターブライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によつて、工程(f)の増幅生成物を増幅する工程であつて、ここで該テールプライマーは、該標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む工程、
 をさらに包含する項目1に記載の方法。

(項目3)

前記テールプライマーの5'部分は、サンプルインデックス領域、分子バーコード領域、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも1つを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

工程(d)は、前記アダプター核酸、前記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該2本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハンギング配列を含み、ここで該オーバーハンギング配列は、該2本鎖核酸の3'末端におけるオーバーハンギング配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む、前述の項目のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

工程(d)は、前記アダプター核酸、前記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該2本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、1本鎖である、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

前記捕捉部分改変プライマーは、少なくとも1つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

前記捕捉部分改変プライマーは、捕捉部分に付着した第2の化学カップリング基に結合するように構成された第1の化学カップリング基を含む、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目8)

前記捕捉部分はビオチン部分である、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目9)

前記ビオチン部分は、ビオチン-トリエチレングリコール、ビス-ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン-トリエチレングリコール、またはアジ

10

20

30

40

50

化ビオチンを含む、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記結合パートナーは、ストレプトアビシンである、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 11)

前記ストレプトアビシンは、基材に付着している、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記基材は固体表面を含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記固体表面は、常磁性ビーズを含む、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

工程 (d) の後でかつ工程 (e) の前に洗浄工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 15)

工程 (e) の後でかつ工程 (f) の前に：

i) 前記捕捉部分を含む前記 2 本鎖核酸を、常磁性基材上に固定化する工程；および

i i) 該固定化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程、

をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 16)

工程 i i) の後に：

i i i) 前記洗浄した固定化 2 本鎖核酸を前記常磁性基材から放出する工程、

をさらに包含する、項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

工程 (c) の後でかつ工程 (d) の前に、前記 2 本鎖核酸を 5' リン酸化する工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 18)

工程 (c) の後でかつ工程 (d) の前に、前記 2 本鎖核酸を末端修復して、平滑末端化した 2 本鎖核酸を生成する工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 19)

前記平滑末端化した 2 本鎖核酸の 3' 末端に 1 またはこれより多くのヌクレオチドを付加する工程をさらに包含する、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記 1 またはこれより多くのヌクレオチドは、デオキシアデノシンヌクレオチドを含む項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記アダプター核酸は、前記平滑末端化した 2 本鎖核酸の 3' 末端に付加した前記 1 またはこれより多くのヌクレオチドに相補的な 1 またはこれより多くのヌクレオチドを含む 3' 末端においてヌクレオチド配列を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

前記アダプター核酸の 3' 末端における前記ヌクレオチド配列は、1 またはこれより多くのデオキシチミジンヌクレオチドを含む、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記アダプター核酸は、前記 3' 末端において前記ヌクレオチド配列を含む增幅鎖にアニールしたブロッキング鎖をさらに含み、該 3' 末端における該ヌクレオチド配列は、該ヌクレオチド配列がオーバーハング配列を形成するように不对化される、項目 21 に記載の方法。

(項目 24)

末端修復後に、

i) 前記捕捉部分を含む前記 2 本鎖核酸を、常磁性基材上に固定化する工程；

10

20

30

40

50

i i) 該固定化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程；および
i i i) 該洗浄した固定化 2 本鎖核酸を該常磁性基材から放出する工程、
をさらに包含する、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 5)

末端修復後に、

i) 前記捕捉部分を含む前記 2 本鎖核酸を、常磁性基材上に固定化する工程；および
i i) 該固定化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程、
をさらに包含する、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 6)

末端修復の後でかつ工程 i) の前に、洗浄工程をさらに包含する、項目 2 4 または項目 10
2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

(h) 工程 (g) の增幅生成物を常磁性基材上に固定化する工程；
(i) 該固定化した增幅生成物を洗浄する工程；および
(j) 該洗浄した固定化增幅生成物を該常磁性基材から放出する工程、
をさらに包含する、いずれか 1 項の項目 2 ~ 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

工程 (g) の後でかつ工程 (h) の前に、洗浄工程をさらに包含する、項目 2 7 に記載
の方法。

(項目 2 9)

工程 (d) において、前記 2 本鎖核酸は、クラウディング剤の存在下で前記アダプター
核酸にライゲーションされる、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

20

(項目 3 0)

工程 (b) の後でかつ工程 (c) の前に、前記核酸分子とリボヌクレアーゼ酵素とを接
触させる工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記第 2 鎮合成反応は、前記第 1 鎮合成反応の生成物にハイブリダイズした前記核酸分
子のフラグメントによってプライムされる、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記第 2 鎮合成は、複数のランダムプライマーを使用してランダムにプライムされる、
前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 3 3)

前記複数のランダムプライマーは、6 塩基長 ~ 15 塩基長の間である、項目 3 2 に記載
の方法。

(項目 3 4)

前記核酸分子は m R N A を含む、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 5)

前記核酸分子は、T 細胞、B 細胞、またはこれらの混合物を含むサンプルから得られる
前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 6)

前記サンプルは、T 細胞悪性腫瘍または B 細胞悪性腫瘍を有するかまたは有すると疑わ
れる被験体から得られる、項目 3 5 に記載の方法。

40

(項目 3 7)

前記 T 細胞悪性腫瘍または前記 B 細胞悪性腫瘍は、リンパ腫、多発性骨髄腫、急性リン
パ芽球性白血病、および慢性リンパ性白血病からなる群より選択される、項目 3 6 に記載
の方法。

(項目 3 8)

前記サンプルは、移植を受けた被験体または移植を受ける予定の被験体から得られる、
項目 3 5 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 3 9)

50

前記サンプルは、処置に対する免疫応答が評価されている最中である被験体から得られる、項目35～37のいずれか1項に記載の方法。

(項目40)

前記サンプルは、白血球悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる、項目35～37のいずれか1項に記載の方法。

(項目41)

前記被験体はヒトである、項目36～40のいずれか1項に記載の方法。

(項目42)

前記被験体は脊索動物である、項目36～40のいずれか1項に記載の方法。

(項目43)

前記核酸分子は、白血球を含むサンプルから得られる、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目44)

前記標的ヌクレオチド配列は、T細胞レセプター(TCR)遺伝子またはB細胞レセプター(BCR)遺伝子の一部に相当するヌクレオチド配列を含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目45)

前記捕捉部分改変プライマーは、免疫レセプター遺伝子または免疫グロブリン遺伝子に相補的であるヌクレオチド配列を含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目46)

前記捕捉部分改変プライマーは、相補性決定領域3(CDR3)の下流にある定常領域に特異的にアニールする、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記標的特異的プライマーは、CDR3の下流にある定常領域またはJセグメントに特異的にアニールする、項目45または46に記載の方法。

(項目48)

前記標的特異的プライマーは、定常領域とJセグメントとの間に形成されるエキソン-エキソン接合部に特異的にアニールし、ここで該エキソン-エキソン接合部は、CDR3の下流にある、項目45または46に記載の方法。

(項目49)

前記第1のアダプタープライマーおよび前記第2のアダプタープライマーは同じである、項目2～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目50)

前記第1のアダプタープライマーおよび前記第2のアダプタープライマーは異なる、項目2～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目51)

前記第2のアダプタープライマーは、前記第1のアダプタープライマーに対してネスト化される、項目2～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目52)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 既知の標的ヌクレオチド配列および未知の標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と、該既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該核酸分子のフラグメントによってプライムされかつ該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(d) 該2本鎖核酸を末端修復して、該捕捉部分を含む平滑末端化した2本鎖核酸を生成する工程；

10

20

30

40

50

(e) アダプター核酸を該平滑末端化した 2 本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該ライゲーション生成物は、該アダプター核酸および該捕捉部分に隣接した該未知の標的ヌクレオチド配列を含む工程；

(f) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の固定化した結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；

(g) 該既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該標的特異的プライマーは、該既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程；

(h) 該標的特異的プライマーの 5' テール部分の相補的配列に特異的にアニールするテールプライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 2 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (g) の増幅生成物を増幅する工程；ならびに

(i) 工程 (h) の増幅生成物を洗浄する工程、
を包含する方法。

(項目 5 3)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的特異的プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした第 1 の標的特異的プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第 1 鎮合成反応を行う工程；

(c) 該核酸分子のハイブリダイズしたフラグメントによってプライムされかつ該第 1 鎮合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第 2 鎮合成反応を行って、2 本鎖核酸を生成する工程；

(d) アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程；

(e) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む第 2 の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該第 2 の標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程；ならびに

(f) 該第 2 の標的特異的プライマーの 5' テール部分の相補的配列に特異的にアニールする 3' 部分を含むテールプライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 2 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (e) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該第 2 の標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない 5' 部分を含む工程、
を包含する方法。

(項目 5 4)

前記第 1 の標的特異的プライマーは、捕捉部分を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

工程 (d) の後でかつ工程 (e) の前に、前記ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記第 1 鎮合成反応は、捕捉部分改変ヌクレオチドの少なくとも 1 つのタイプを使用して行われ、該第 1 鎮合成反応の生成物は、少なくとも 1 つの捕捉部分を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 7)

10

20

30

40

50

工程 (d) の後でかつ工程 (e) の前に、前記ライゲーション生成物と前記少なくとも1つの捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する、項目56に記載の方法。

(項目58)

工程 (c) の後でかつ工程 (d) の前に、前記2本鎖核酸と前記少なくとも1つの捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該2本鎖核酸を捕捉する工程をさらに包含する、項目56に記載の方法。

(項目59)

サンプル中の免疫レパートリーを決定する方法であって、該方法は、

(a) 免疫レセプターおよび免疫グロブリンのうちの少なくとも一方をコードする核酸分子を含むサンプルを得る工程；

10

(b) 該サンプルからの該核酸分子と該核酸分子の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(c) ハイブリダイズした第1の標的特異的プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(d) 該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行つて、2本鎖核酸を生成する工程；

(e) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程；

20

(f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む第2の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を增幅する工程であって、ここで該第2の標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；

(g) 該第2の標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールする3'部分を含むテールプライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (f) の增幅生成物を增幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該第2の標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む工程；ならびに

30

(h) 第1のおよび第2のシーケンシングプライマーを使用して、工程 (g) の增幅生成物をシーケンシングする工程、
を包含する方法。

(項目60)

前記免疫レセプターはTCRを含み、前記免疫グロブリンはBCRを含む、項目59に記載の方法。

(項目61)

前記標的ヌクレオチド配列は、遺伝的に組み換えた配列に相当する、項目59に記載の方法。

(項目62)

40

前記サンプルは、T細胞、B細胞、またはこれらの混合物を含む、項目59に記載の方法。

(項目63)

前記サンプルは被験体から得られる、項目62に記載の方法。

(項目64)

前記被験体はヒトである、項目63に記載の方法。

(項目65)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーとを、プライマーがハイブリダイズした核酸分子を

50

生成する条件下で接触させる工程；

(b) 該プライマーがハイブリダイズした核酸分子と、該核酸分子に相補的である第1鎖へと組み込むための複数のタイプのスクレオチドとを接触させる工程であって、ここで該複数のタイプのスクレオチドのうちの少なくとも1つは、捕捉部分を含む工程；

(c) 該プライマーがハイブリダイズした核酸分子の該第1の標的特異的プライマーによってプライムされかつ該プライマーがハイブリダイズした核酸分子の該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程であって、ここで該第1鎖合成反応の生成物は、少なくとも1つの捕捉部分を含む工程；

(d) 該核酸分子のフラグメントによってプライムされかつ該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、該少なくとも1つの捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(e) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、該少なくとも1つの捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；ならびに

(f) 該標的スクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む第2の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該第2の標的特異的プライマーは、該標的スクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程、を包含する方法。

(項目 6 6)

工程(e)の後でかつ工程(f)の前に、前記ライゲーション生成物と前記捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する、項目65に記載の方法。

(項目 6 7)

工程(d)の後でかつ工程(e)の前に、前記2本鎖核酸と前記捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該2本鎖核酸を捕捉する工程をさらに包含する、項目65に記載の方法。

(項目 6 8)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的スクレオチド配列を含む核酸分子と、ハイブリダイゼーション条件下で該標的スクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分および該標的スクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む捕捉部分改変プライマーとを、接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該第1鎖合成反応の生成物と複数のランダムプライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、ここで該複数のランダムプライマーの各々は、共通配列を含む非ランダム5'テール部分を含む工程；

(d) 該複数のランダムプライマーのうちの少なくとも1つによってプライムされかつ該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、該捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(e) 該2本鎖核酸と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該捕捉部分を含む2本鎖核酸を捕捉する工程；

(f) 第1のテールプライマーおよび該標的スクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該2本鎖核酸を増幅する工程であって、ここで該第1のテールプライマーは、該共通配列の相補体に特異的にアニールする3'部分および該共通配列の相補体に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；ならびに

(g) 第2の標的特異的プライマーおよび該第1のテールプライマーの5'テール部分の相補体に特異的にアニールする第2のテールプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(f)の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該第2の標的特異的

10

20

30

40

50

プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分および該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程、
を包含する方法。

【0041】

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

【図面の簡単な説明】

10

【0042】

【図1】図1は、捕捉部分改変プライマーを使用して分析用の核酸分子を調製するためのストラテジーの図示である。

【0043】

【図2】図2は、捕捉部分改変ヌクレオチドを使用して分析用の核酸分子を調製するためのストラテジーの図示である。

【0044】

【図3】図3は、捕捉部分改変プライマーまたは捕捉部分改変ヌクレオチドのいずれかを使用する核酸調製ストラテジーの比較を図示する。

【0045】

20

【図4】図4は、投入量に関して複製物間のクローン型重複を示す図である。全サンプルの共通部分 (intersection) は、66の重複するクローン型を生じる。

【0046】

【図5】図5は、複製サンプルのペアワイズ分析がそのアッセイの高度に再現性のある性質を示すことを図示するチャートである。

【0047】

【図6A】図6Aおよび6Bは、全クローン間の比較 (図6A) および重複するクローン間の比較 (図6B) を示す。

【図6B】図6Aおよび6Bは、全クローン間の比較 (図6A) および重複するクローン間の比較 (図6B) を示す。

30

【0048】

【図7】図7は、投入量が観察の複雑性および多様性を決めるなどを図示し、サンプルサイズに関する多様性は上に示され、Shannon多様度指数を示すチャートは、下に示される。

【0049】

【図8】図8は、高度に再現性のあるかつ定量的なクローン追跡を示すグラフである。

【0050】

【図9】図9は、希釈にわたるクローン追跡が独立した実験間で高度に再現性があることを図示する。

【0051】

40

【図10】図10は、Jurrkatサンプル希釈シリーズを使用する実験内再現性を示すグラフである。

【0052】

【図11】図11は、Jurrkatサンプル希釈シリーズを使用する実験間再現性を示すグラフである。

【0053】

【図12】図12は、概してT細胞レセプタープライマー位置を示す模式図 (縮尺どおりに示されていない) である。

【0054】

【図13】図13は、概して免疫グロブリン重鎖 (IGH) プライマー位置を示す模式図

50

(縮尺どおりに示されていない)である。

【0055】

【図14】図14は、逆転写酵素(RT)プライマーの構造を示す模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0056】

詳細な説明

とりわけ、本開示は、免疫レパートリー分析用の核酸ライブラリーの調製に関する改善された技術を提供する。本明細書で記載されるように、既知の標的ヌクレオチド配列を含む標的核酸分子(例えば、mRNA)は、標的特異的プライマーと接触され、その核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応において伸長される。いくつかの実施形態において、その第1鎖合成反応は、その第1鎖合成反応の生成物が捕捉部分を含むように行われ得、その捕捉部分の結合パートナーは、その生成物を捕捉する(例えば、単離する)ために使用され得る。よって、本開示の局面は、その標的核酸分子(例えば、mRNA)を含む初期投入物に相補的である第1鎖合成の生成物を富化するために有用な技術を提供する。

10

【0057】

いくつかの局面において、本開示は、ライブラリー調製の間に標的核酸分子(例えば、RNA)から合成される第1鎖への捕捉部分の組み込みが、標的ヌクレオチド配列を含む核酸を富化する間に非標的核酸の存在を最小限にするという認識に関する。このことは、免疫レパートリーシーケンシング用の核酸ライブラリーを調製する場合に、特に有利であり得る。例えば、TCRおよびBCRゲノム配列は全ての細胞に存在するが、そのTCRおよびBCR mRNAは、それぞれ、T細胞およびB細胞において発現されるに過ぎない。免疫レパートリーの評価は、システムに存在する配列状況を評価するために処理(例えば、組換え、スプライシングなど)した後に、これらの遺伝子を分析することに依拠する。よって、いくつかの実施形態において、本明細書で提供される技術は、組み換えられた免疫遺伝子座から発現されるmRNAの選択的捕捉を可能にする。例えば、本明細書で記載されるように、第1鎖が標的核酸から直接合成される場合、その捕捉部分は、非標的核酸持ち越しを最小限にしながら所望の生成物の富化を可能にする。

20

【0058】

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製するための方法を提供し、上記方法は、捕捉部分改変プライマーおよびテンプレートとしての標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子を使用する第1の核酸鎖を合成する工程、アダプター核酸をその第1の核酸鎖にライゲーションする工程、ならびにそのアダプターがライゲーションされた第1の核酸鎖をその捕捉部分の結合パートナーで捕捉する工程を包含する。

30

【0059】

いくつかの実施形態において、その捕捉部分改変プライマーは、ビオチン部分改変プライマーである。この方法の説明は、図1に示され、これは、ビオチン部分改変プライマーを包含する方法の非限定的な例を提供する。この実施形態において、RNA分子(例えば、mRNA)は、ビオチン部分を含むように改変されたDNAプライマーとアニールされる。そのビオチン部分改変プライマーは、第1鎖合成反応において伸長されて、DNA/RNAハイブリッドを生成する。そのDNA/RNAハイブリッドのうちのRNAは、リボヌクレアーゼの作用を介して分解に供され、そのDNAにアニールしたままであるRNAフラグメントは、2本鎖cDNAを生成するために第2鎖合成反応においてプライマーとして働く。いくつかの実施形態において、その第2鎖合成反応は、その核酸分子を含むサンプルに存在する任意の核酸フラグメントによってプライムされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、そのサンプルは、相補鎖から解離しその混合物内に存在する異なる鎖に再度アニールし得る核酸の複雑な混合物を含む。その2本鎖cDNAは、ライゲーション反応に適した3'オーバーハングを生成するために、末端修復およびdAテール付加に供される。アダプター核酸をその2本鎖cDNAへとライゲーションした後、これらのライブラリー分子は、ストレプトアビジン被覆基材(例えば、常磁性基材)を使用してラ

40

50

イゲーションされていないアダプターから捕捉されるか、または単離される。

【0060】

いくつかの実施形態において、その捕捉後に、その基材に固定化した、捕捉されたアダプターがライゲーションされた2本鎖cDNAの第1のPCR増幅ラウンドが行われる。さらに他の実施形態において、その捕捉した、アダプターがライゲーションされた2本鎖cDNAは、第1のPCRラウンドの前に、その常磁性基材から溶離される。常磁性基材からの捕捉した、アダプターがライゲーションされた核酸の溶離は、例示であって限定ではないが、化学的試薬および/または加熱を使用して行われ得る。いくつかの実施形態において、その化学的試薬は、塩基(例えば、NaOH)である。いくつかの実施形態において、捕捉した、アダプターがライゲーションされた2本鎖cDNAは、低濃度(例えば、1M未満、0.5M未満、0.1M未満、0.05M未満、0.01M未満、0.001M未満、0.0001M未満)のNaOHで溶離される。いくつかの実施形態において、捕捉した、アダプターがライゲーションされた2本鎖cDNAは、低濃度のNaOHおよび加熱で溶離される。

10

【0061】

その固定化したかまたは溶離した、アダプターがライゲーションされた2本鎖cDNAは、そのアダプターの相補体にアニールする第1のアダプタープライマーおよび標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズしあつ共通配列を含むハイブリダイズしないテール領域を有する標的特異的プライマーを使用する第1のPCR増幅ラウンドに供される。このようにして、その第1のアダプタープライマーは、その標的特異的プライマーによって生成される鎖をプライムオフする。第2のPCR増幅ラウンドは、その共通配列の相補体にアニールするテールプライマーおよびそのアダプターの相補体にアニールする第2のアダプタープライマーを使用して行われる。示されるように、そのテールプライマーは、インデックス1バーコードプライマーを含む。いくつかの実施形態において、そのテールプライマーは、インデックス2バーコードプライマーを含み得。いくつかの実施形態において、そのアダプター核酸は、インデックス1プライマーを含み、そのテールプライマーは、インデックス2プライマーを含む。

20

【0062】

いくつかの局面において、本開示は、分析用の核酸を調製するための方法を提供し、上記方法は、プライマーがハイブリダイズした標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と、新たに合成された鎖への組み込みのための捕捉部分改変ヌクレオチドとを接触させる工程、その混合物を伸長条件に供して、少なくとも1つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む第1の核酸鎖を合成する工程、アダプター核酸をその第1の核酸鎖にライゲーションする工程、ならびにそのアダプターがライゲーションされた第1の核酸鎖をその捕捉部分の結合パートナーで捕捉する工程。

30

【0063】

いくつかの実施形態において、その捕捉部分改変ヌクレオチドの捕捉部分は、ビオチン部分である。例えば、図2は、ビオチン改変ヌクレオチドの使用を包含する方法の非限定的実施形態を示す。この実施形態において、RNA分子(例えば、mRNA)は、DNAプライマーとアニールされる。第1鎖合成反応は、ビオチン化ヌクレオチドを使用して行われて、ビオチン化DNA/RNAハイブリッドを生成する。そのDNA/RNAハイブリッドのうちのRNAは、リボヌクレアーゼの作用を介して分解に供され、そのDNAにアニールしたままであるRNAフラグメントは、第2鎖合成反応においてプライマーとして働いて、2本鎖cDNAを生成する。いくつかの実施形態において、その第2鎖合成反応は、その核酸分子を含むサンプルに存在する任意の核酸フラグメントによってプライムされ得る。例えば、いくつかの実施形態において、そのサンプルは、相補鎖から解離しその混合物内に存在する異なる鎖に再度アニールし得る核酸の複雑な混合物を含む。その2本鎖cDNAは、ライゲーション反応に適した3'オーバーハングを生成するために、末端修復およびdAテール付加に供される。アダプター核酸をその2本鎖cDNAにライゲーションした後に、これらのライブラリー分子は、ライゲーションしていないアダプターか

40

50

ら、ストレプトアビシン被覆常磁性ビーズを使用して捕捉されるかまたは単離される。

【0064】

前述において記載されるように、本開示の局面は、調製プロセスの間に生成される核酸生成物を捕捉するために捕捉部分の使用を包含し得る、分析用の核酸分子を調製するための技術を提供する。図3は、捕捉部分を使用する核酸調製のための異なるストラテジーを比較する図である。捕捉部分改変プライマーを使用して捕捉部分を核酸生成物へと組み込む第1のプロセス310（例えば、図1に図示されるとおり）および捕捉部分改変ヌクレオチドを使用して捕捉部分を核酸生成物へと組み込む第2のプロセス320（例えば、図2に図示されるとおり）のための選択された調製工程が、示される。第1のプロセス310および第2のプロセス320の各々では、核酸分子は、プライマーハイブリダイゼーション（工程i₁）を促進する条件下で標的特異的プライマーに曝される。示されるように、その第1のプロセス310の標的特異的プライマーは、捕捉部分改変プライマー312である一方で、その第2のプロセス320の標的特異的プライマーは、捕捉部分改変を含まない第1の標的特異的プライマー322を利用する。

10

【0065】

プライマーハイブリダイゼーション後に、第1鎖合成反応（工程i₁）は、その核酸分子をテンプレートとして使用して、新たに合成された第1鎖316への組み込みのために、複数のタイプのヌクレオチド314を使用して、その第1のプロセス310において行われる。比較によって、第1鎖合成反応（工程i₁）は、複数のタイプのヌクレオチド324を使用して、第2のプロセス320において行われ、その複数のタイプのヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、捕捉部分改変ヌクレオチドである。例示であって限定ではないが、Cヌクレオチドは、捕捉部分改変を有すると示される。このようにして、その核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成の間に、その捕捉部分改変ヌクレオチドは、その核酸分子におけるGヌクレオチドに相補的な位置において、新たに合成された第1鎖326へと組み込まれる。

20

【0066】

第1のプロセス310または第2のプロセス320のうちのいずれかにおける第1鎖合成の後に、その捕捉部分を含む核酸は必要に応じて、その核酸に対してさらなる改変を包含するさらなる処理（工程i₁i₂）に供される。さらなる処理の例としては、第2鎖合成、末端修復、アダプターライゲーション、および本明細書の他の箇所で記載される他の処理工程が挙げられるが、これらに限定されない。その第1のプロセス310または第2のプロセス320において選択肢的なさらなる処理後に、その捕捉部分を含む核酸生成物は、いずれかのプロセスから生成された核酸生成物を捕捉する目的で、その捕捉部分の結合パートナーと接触される（工程i₁v₁）。示されるように、生成物捕捉は、その捕捉部分の結合パートナー352を使用して行われ得、この結合パートナーは必要に応じて、基材354に固定化され得る。その基材354が常磁性基材である場合、その核酸生成物は、磁場356への曝露によって単離され得る。

30

【0067】

いくつかの局面において、本開示は、免疫レパートリーの分析用の核酸ライブラリーを調製するための方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態において、その核酸ライブラリーは、免疫レセプター（例えば、TCR）、免疫グロブリン（例えば、BCR）、またはこれらの混合物をコードする核酸配列を含むサンプルから調製される。

40

【0068】

免疫レパートリー

適応免疫系は特有の抗原結合分子を発現する細胞のクローン性拡大によって一部機能するので、各T細胞またはB細胞クローンの合計存在量の変化を正確に測定することは、適応免疫応答のダイナミクスの理解にとって重要である。ハイスループットシーケンシングにおける進歩を利用して、広大なTCRおよびBCRレパートリーをプロファイルする分子免疫学の新たな分野が近年出現してきた。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される技術は、免疫細胞クローン型を分析するために有用である。

50

【0069】

本明細書で記載される場合、「クローン型 (clone type)」とは、免疫レセプター鎖またはその一部をコードする 1 またはこれより多くの遺伝子の再配列プロセスの間に生じる成功裡に組換えられるヌクレオチド配列をいう。いくつかの実施形態において、「成功裡に組換えられたヌクレオチド配列 (successfuly recombin ed nucleotide sequence)」とは、mRNAによって構成され、かつ遺伝的組換えを受けて特有のクローン型を生じるヌクレオチド配列をいう。よって、いくつかの実施形態において、本開示で提供される技術は、mRNAとして発現されるが、それ自体は IR 再配列ではない IR 遺伝子座の成功裡の再配列を検出するために有用であり得る。いくつかの実施形態において、クローン型とは、単一レセプター鎖をコードする mRNA に相当するヌクレオチド配列をいう。いくつかの実施形態において、本開示で提供される技術は、1 またはこれより多くの体細胞超変異を検出するために有用であり得る。いくつかの実施形態において、本開示で提供される技術は、TCR および / または BCR アイソタイプ（例えば、A、D、E、G、M IgH アイソタイプ、ならびにその選択されたサブクラス）を検出するために有用であり得る。いくつかの実施形態において、クローン型は、T 細胞または B 細胞の組換えられたヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態において、クローン型は、TCR もしくは BCR、またはその一部をコードする。いくつかの実施形態において、クローン型は、IgH の VDJ 再配列、IgH の DJ 再配列、IgK の VJ 再配列、IgL の VJ 再配列、TCR の VDJ 再配列、TCR の DJ 再配列、TCR の VJ 再配列、TCR の VJ 再配列、TCR の VDJ 再配列、TCR の VD 再配列、欠失エレメント (KDE) 再配列などの全てまたは一部をコードし得る。いくつかの実施形態において、クローン型は、これらが由来する免疫分子の多様性を表すかまたは反映するために十分長い配列を有する。よって、いくつかの実施形態において、クローン型は、長さが広く変動し得る。いくつかの実施形態において、本開示の方法は、クローン型プロファイルを決定するために有用である。

【0070】

本明細書で記載される場合、「クローン型プロファイル (clone type profile)」とは、リンパ球の集団に由来する別個のクローン型の列挙およびそれらの相対的存在量に言及する。いくつかの実施形態において、そのリンパ球の集団は、組織サンプルから得られる。クローン型プロファイルは、「免疫レパートリー (immune repertoire)」という免疫学の概念に関する。いくつかの実施形態において、クローン型プロファイルは、再配列された免疫レセプターコード核酸の広く種々の列挙および存在量を含み、これら免疫レセプターコード核酸は、リンパ球の選択されたサブセット（例えば、組織浸潤リンパ球、免疫表現型サブセットなど）に由来し得るか、または完全免疫レセプターと比較して、低減した多様性を有する免疫レセプターの一部をコードし得る。いくつかの実施形態において、クローン型プロファイルは、少なくとも 10^3 の別個のクローン型、少なくとも 10^4 の別個のクローン型、少なくとも 10^5 の別個のクローン型、少なくとも 10^6 の別個のクローン型、または少なくとも 10^7 の別個のクローン型を含み得る。いくつかの実施形態において、クローン型プロファイルは、約 1 ~ 500,000 の間の別個のクローン型を含み得る。いくつかの実施形態において、クローン型は、約 1 ~ 1,000,000 の間の別個のクローン型（例えば、約 1 ~ 約 100,000 の間、約 100,000 ~ 約 200,000 の間、約 200,000 ~ 約 300,000 の間、約 300,000 ~ 約 400,000 の間、約 400,000 ~ 約 500,000 の間、約 500,000 ~ 約 600,000 の間、約 600,000 ~ 約 700,000 の間、約 700,000 ~ 約 800,000 の間、約 800,000 ~ 約 900,000 の間、約 900,000 ~ 約 1,000,000 の間の別個のクローン型）を含み得る。いくつかの実施形態において、このようなクローン型プロファイルは、その別個のクローン型の各々の存在量または相対的頻度をさらに含み得る。一局面において、クローン型プロファイルは、個体のリンパ球の集団において、TCR もしくは BCR、またはこれらのフラグメントを、それぞれコードする別個の組換えられたヌクレオチド配列（とそれら

10

20

30

40

50

の存在量)のセットであり、ここでそのセットのヌクレオチド配列は、その集団のリンパ球の実質的に全てに関して、別個のリンパ球またはそれらのクローン亜集団と1対1対応を有する。一局面において、クローン型を規定する核酸セグメントは、それらの多様性(例えば、そのセットの中の別個の核酸配列の数)が、個体における実質的にあらゆるT細胞もしくはB細胞またはそれらのクローンがこのようなレパートリーの特有の核酸配列を有するほどに十分大きくあるように選択される。すなわち、サンプルの好ましくは各異なるクローンが、異なるクローン型を有する。他の局面において、レパートリーに相当するリンパ球の集団は、循環するB細胞であってもよいし、循環するT細胞であってもよいし、前述の集団のうちのいずれかの亜集団(CD4+T細胞、またはCD8+T細胞、または細胞表面マーカーによって規定される他の亜集団などが挙げられるが、これらに限定されない)であってもよい。いくつかの実施形態において、このような亜集団は、特定の組織(例えば、骨髄、またはリンパ節など)からサンプルを採取することによって、またはサンプル(例えば、末梢血)から、1もしくはこれより多くの細胞表面マーカー、サイズ、形態などに基づいて細胞をソートもしくは富化することによって、獲得され得る。なお他の局面において、レパートリーに相当するリンパ球の集団は、疾患組織(例えば、腫瘍組織、感染組織など)に由来し得る。いくつかの実施形態において、TCRおよび/もしくはBCR鎖またはこれらのフラグメントに相当する核酸を含むクローン型プロファイルは、約1～約25、約25～約50、約50～約100、約11～約250、約250～約500、約500～約1000、約1000～約2500、約2500～約5000、約5000～約7500、約7500～約10000、約10000～約25000、約25000～約50000、約50000～約75000、約75000～約100000、約100000～約250000、約250000～約500000、約500000～約1000000、約1000000～約2500000、約2500000～約5000000、約5000000～約10000000の範囲において多くの別個のヌクレオチド配列を含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、クローン型プロファイルは、BCR(例えば、IGH鎖)のV(D)J領域の実質的に全てのセグメントをコードするヌクレオチド配列のセットを含む。一局面において、「実質的に全て(substantially all)」とは、本明細書で使用される場合、0.0001%以上、0.0005%以上、0.001%以上、0.005%以上、0.01%以上、0.05%以上、もしくは0.1%以上の相対的存在量を有するあらゆるセグメントを意味する;または別の局面において、「実質的に全て」は、本明細書で使用される場合、0.0001%以上の相対的存在量を有するあらゆるセグメントを意味する。いくつかの実施形態において、V、D、およびJセグメントの全てが表されるわけではない。別の実施形態において、クローン型プロファイルは、TCR(例えば、TCR鎖、TCR鎖)のV(D)J領域の実質的に全てのセグメントをコードするヌクレオチド配列のセットを含む。別の実施形態において、クローン型プロファイルは、1～25、1～50、1～100、1～200、1～300、1～400、1～450、1～500、25～100、25～200、25～300、25～400、25～450、25～500、100～200、100～300、100～400、100～450、100～500、100～500、200～300、200～400、200～450、200～500、300～400、300～450、300～500、400～450、400～500、450～500、またはこれより多くのヌクレオチドの範囲の長さを有し、TCR(例えば、TCR鎖、TCR鎖)のV、D、およびJ領域のセグメントを含むヌクレオチド配列のセットを含む。別の実施形態において、クローン型プロファイルは、1～25、1～50、1～100、1～200、1～300、1～400、1～450、1～500、25～100、25～200、25～300、25～400、25～450、25～500、100～200、100～300、100～400、100～450、100～500、200～300、200～400、200～450、200～500、300～400、300～450、300～500、400～450、400～500、450～500、またはこれより多くのヌクレオチドの範囲の長さを有し、BCR(例えば、IGH鎖)のV、D、およびJ領域のセグメントを含むヌクレオチド配列のセ

10

20

30

40

50

トを含む。別の実施形態において、クローン型プロファイルは、別個の BCR (例えば、IgH鎖、IgK鎖、IgL鎖) を発現するリンパ球の数に実質的に等しい多くの別個のヌクレオチド配列を含む。別の実施形態において、クローン型プロファイルは、別個の TCR (例えば、TCR鎖、TCR鎖、TCR鎖、TCR鎖) を発現するリンパ球の数に実質的に等しい多くの別個のヌクレオチド配列を含む。さらに別の実施形態において、「実質的に等しい (substantially equivalent) 」とは、99 % の確率で、クローン型プロファイルが、個体の集団のあらゆるリンパ球が有するかまたは発現する BCR (例えば、IgH、IgK、IgL) もしくは TCR (例えば、TCR、TCR、TCR、TCR) またはこれらの一部をコードするヌクレオチド配列を含むことを意味する。さらに別の実施形態において、「実質的に等しい」とは、99 % の確率で、ヌクレオチド配列のレパートリーが、サンプルに存在するあらゆるリンパ球が有するかまたは発現する BCR (例えば、IgH、IgK、IgL) もしくは TCR (例えば、TCR、TCR、TCR、TCR) またはこれらの一部をコードするヌクレオチド配列を含むことを意味する。

【 0072 】

いくつかの実施形態において、クローン型プロファイルは、免疫細胞 (これは、広く種々の組織に存在する) のサンプルから得られる。いくつかの実施形態において、目的の免疫細胞としては、T細胞および / またはB細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、T細胞 (Tリンパ球) としては、例えば、TCRを発現する細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、B細胞 (Bリンパ球) としては、例えば、BCRを発現する細胞が挙げられる。いくつかの実施形態において、T細胞としては、ヘルパーT細胞 (エフェクターT細胞またはTh細胞) 、細胞傷害性T細胞 (CTL) 、メモリーT細胞、および調節性T細胞 (これらは、細胞表面マーカーによって区別され得る) が挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫細胞のサンプルはまた、B細胞を含み得る。いくつかの実施形態において、B細胞としては、例えば、プラズマB細胞、メモリーB細胞、B1細胞、B2細胞、辺縁帯B細胞、および濾胞性B細胞が挙げられる。B細胞は、免疫グロブリン (本明細書で抗体またはB細胞レセプターともいわれる) を発現し得る。

【 0073 】

T細胞レセプター

適応免疫系は、潜在的病原体の母集団を認識するために十分な多様性を有する T 細胞および B 細胞抗原レセプター (例えば、適応免疫レセプター) のレパートリーを生成するためにいくつかのストラテジーを使用する。T 細胞が、種々のがんまたは感染性生物と関連する抗原の母集団を認識する能力は、その TCR によって与えられ、この TCR は、TCRA 遺伝子座に由来する (アルファ) 鎖および TCRB 遺伝子座に由来する (ベータ) 鎖のヘテロダイマー、または TCRG 遺伝子座に由来する (ガンマ) 鎖および TCRD 遺伝子座に由来する (デルタ) 鎖のヘテロダイマーである。これらの鎖を構成するタンパク質は、DNA によってコードされ、これはリンパ様細胞において、その TCR のおびただしい多様性を生成するために、特有の再配列機構を使用する。このマルチサブユニット免疫認識レセプターは、CD3 複合体と関連し、抗原提示細胞 (APC) の表面上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I または MHC クラス II タンパク質のいずれかによって提示されるペプチドに結合する。その APC 上の抗原性ペプチドへの TCR の結合は、T細胞活性化における中心的な事象であり、これは、T細胞と APCとの間の接触点の免疫学的シナプスにおいて起こる。

【 0074 】

各 TCR ペプチドは、可変性相補性決定領域 (CDRs) 、ならびにフレームワーク領域 (FR) および定常領域を含む。T細胞の配列多様性は主に、鎖および鎖可変ドメインの第3の相補性決定領域 (CDR3) ループのアミノ酸配列によって決定され、その多様性は、それぞれ、鎖遺伝子座における可変性 (V) と多様性 (D) と接合 (J) 遺伝子セグメントとの間の、および鎖遺伝子座における類似の J と J 遺伝子セグメントとの間の組換えの結果である。TCR鎖および鎖遺伝子座における多数

10

20

30

40

50

のこのような遺伝子セグメントの存在は、多数の別個の C D R 3 配列がコードされることを可能にする。 C D R 3 配列多様性は、 T C R 遺伝子再配列のプロセスの間に V - D 、 D - J 、および V - J 接合部においてスクレオチドの独立した付加および欠失によってさらに増大される。この点では、免疫適格性は、 T C R の多様性に由来する。

【 0 0 7 5 】

T C R ヘテロダイマーは、このヘテロダイマーが先天的免疫系と密に相互作用するレセプターをコードし、非 H L A 依存性様式で抗原を認識するという点で T C R との区別を示す。 T C R は、発生の初期で発現され、特殊な解剖学的分布、特有の病原体および低分子特異性、ならびに先天的および適応性細胞相互作用の広い範囲を有する。 T C R V および J セグメント発現の偏ったパターンは、個体発生の早期に確立される。結論として、成体組織における多様な T C R レパートリーは、病原体および毒性分子への環境的曝露による刺激後の広範な末梢拡大の結果である。

【 0 0 7 6 】

T C R の多様性を生成するためのプロセスは、免疫グロブリンに関して記載されるものと同様である。 T C R 鎖は、 V J 組換えによって生成される一方で、鎖は、 V (D) J 組換えによって生成される。同様に、 T C R 鎖の生成は、 V J 組換えを包含する一方で、 T C R 鎖の生成は、 V (D) J 組換えによって起こる。これら特定の領域(鎖または鎖については V および J 、または鎖については V D および J)の共通部分は、抗原 - M H C 認識にとって重要である C D R 3 領域に相当する。それは、 T C R 結合レパートリーの説明となるパリンドロームの、ならびにランダム N スクレオチドおよび P スクレオチドの付加とともに、この領域でのセグメントの特有の組み合わせである。さらに、その C D R 3 領域は、遺伝子の 3' 領域における第 2 の保存されたシステインで始まり、遺伝子の 5' 領域によってコードされる保存されたフェニルアラニンで終わる。従って、増幅された配列は、その保存されたシステインの位置を特定するために、介在ペプチド配列を得るために、およびサンプル中の各特有のクローンの数を表にまとめるために、情報的に翻訳され得る。

【 0 0 7 7 】

B 細胞レパートリー

免疫グロブリン (I g) (本明細書では B 細胞レセプター (B C R) ともいわれる) は、 H 2 L 2 構造を形成する 4 種のポリペプチド鎖 (I G H 遺伝子座に由来する 2 つの重鎖 (H 鎖) および I G K 遺伝子座もしくは I G L 遺伝子座のいずれかに由来する 2 つの軽鎖 (L 鎖)) からなる B 細胞によって発現されるタンパク質である。 H 鎖および L 鎖は各々、抗原認識に関与する 3 つの C D R 、ならびにフレームワーク領域および T C R に類似の定常ドメインを含む。 I g の H 鎖は最初に、 I G M または I G D 定常領域エキソンのいずれかを使用する膜結合アイソフォームとして発現され、抗原認識後に、その定常領域がいくつかのさらなるアイソタイプ (I G G 、 I G E および I G A を含む) へとクラススイッチされ得る。 T C R と同様に、個体内のナイーブ I g の多様性は主に、超可変 C D R によって決定される。 T C R B と同様に、 H 鎖の C D R 3 ドメインは、 V H 、 D H 、および J H 遺伝子セグメントのコンビナトリアル接合によって作られる。超可変ドメイン配列多様性は、 I g 遺伝子再配列のプロセスの間に、 V H - D H 、 D H - J H 、および V H - J H 接合部におけるスクレオチドの独立した付加および欠失によってさらに増大される。 T C R とは別個に、 I g 配列多様性は、ナイーブ B 細胞が最初に抗原を認識した後に、その再配列された I G 遺伝子全体を通じた体細胞超変異 (S H M) によってさらに増大される。 S H M のプロセスは、 C D R 3 に制限されず、従って、フレームワーク領域、 C D R 1 および C D R 2 において、ならびに体細胞再配列された (s o m a t i c a l l y r e a r r a n g e d) C D R 3 において、生殖細胞系統配列に変化を導入し得る。

【 0 0 7 8 】

いくつかの局面において、本明細書で記載される方法において分析される D N A および R N A は、定常領域 (、 、 、 または μ) を有する重鎖免疫グロブリン (I g H) または定常領域 (または) を有する軽鎖免疫グロブリン (I g K または I g L) をコ

10

20

30

40

50

ードする配列に相当し得る。各抗体は、2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖を有する。各鎖は、定常領域（C）および可変領域から構成される。重鎖に関しては、その可変領域は、可変性（V）、多様性（D）、および接合（J）セグメントから構成される。これらのセグメントの各タイプをコードするいくつかの別個の配列は、ゲノムに存在する。特定のVDJ組換え事象は、B細胞の発生の間に起こり、その細胞に特定の重鎖を生成させる。その軽鎖における多様性は、D領域が存在しないので、VJ組換えのみが存在することを除いて、類似の様式で生成される。体細胞変異はしばしば、いくつかのヌクレオチドの付加または欠失を引き起こし、B細胞によって生成される重鎖および軽鎖の多様性をさらに増大させて、組換えの部位の近くで起こる。次いで、B細胞によって生成される抗体の考えられる多様性は、その異なる重鎖および軽鎖の積である。その重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原認識（または結合）領域または部位を形成するために寄与する。同じエピトープに対して特異的な応答が高まられた後に起こり得る体細胞超変異というプロセスが、この多様性に加えられる。

【0079】

いくつかの実施形態において、抗体は、B系統細胞において組換えられたゲノムIg配列によって生成される。免疫グロブリン軽鎖は、遺伝子または遺伝子のいずれかに由来する。その遺伝子は、4つの定常性（C）遺伝子およびおよそ30の可変性（V）遺伝子から構成される。対照的に、その遺伝子は、1つのC遺伝子および250のV遺伝子から構成される。その重鎖遺伝子ファミリーは、数百のV遺伝子、15のD遺伝子、および4つの接合（J）遺伝子から構成される。B細胞分化の間の体細胞組換えは、重鎖において1つのV-D-J組み合わせおよび軽鎖または軽鎖のいずれかにおいて1つのV-J組み合わせをランダムに選択する。非常に多くの遺伝子が存在することから、数百万もの特有の組み合わせが可能である。そのV遺伝子はまた、組換え後に体細胞超変異を受け、さらなる多様性を生成する。この根底にある複雑性にも拘わらず、保存された配列を標的化する数ダースのプライマーを使用して、いくつかの多重化反応において、完全重鎖および軽鎖相補体をシーケンシングすることが可能である。

【0080】

免疫レパートリー分析

いくつかの局面において、本明細書で記載される技術は、目的の状態の存在を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、目的の状態の存在の決定は、診断適用に関連し得、ここで被験体は、その状態を有するかまたは有すると疑われる。いくつかの実施形態において、目的の状態の存在の決定は、防止的処置の目的で推測的測定に有用であり得る。いくつかの実施形態において、免疫レパートリーの分析は、目的の状態の存在を示し得る。例えば、いくつかの実施形態において、がんの病歴は、1またはこれより多くのがん抗原に結合する免疫レセプター配列の存在下で反映され得る。いくつかの実施形態において、自己免疫疾患の存在は、自己抗原に結合する免疫レセプター配列の存在下で反映され得る。いくつかの実施形態において、自己免疫に関する状態は、本明細書で記載される技術を使用して、特定の時点で評価され得るかまたはある期間にわたって追跡され得る。いくつかの実施形態において、自己免疫に関する状態としては、多発性硬化症（MS）、セリアック病、1型糖尿病、サルコイドーシス、全身性エリテマトーデス（SEL）、シェーグレン症候群、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、橋本甲状腺炎、グレーブス病、特発性血小板減少性紫斑病、アジソン病、関節リウマチ（RA）、強直性脊椎炎、多発性筋炎（PM）、および皮膚筋炎（DM）が挙げられる。よって、いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、状態の処置が適切であるか否かを決定するために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、悪性T細胞およびB細胞の存在量は、特定のCDR3配列を介して経時的に追跡され得る。

【0081】

いくつかの局面において、本開示によって提供される方法は、最適な治療的処置を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、最適な治療的処置は、サンプル中の免疫レパートリーを分析し、そしてその情報に基づいて、標的化した免疫応答を刺激

10

20

30

40

50

または抑制するために最適であると同時に、望ましくない毒性を最小限にする適切な治療、用量または処置モダリティーを選択することによって、決定され得る。いくつかの実施形態において、処置は、有効な活性を提供すると同時に、望ましくない毒性を最小限にする処置の選択によって最適化される。例えば、いくつかの実施形態において、被験体（例えば、患者）は、自己免疫疾患に直接関連する免疫レパートリーに関して評価され得、全身性または標的化された免疫抑制レジメンが、その情報に基づいて選択され得る。

【 0 0 8 2 】

いくつかの局面において、本開示によって提供される技術は、被験体における状態の進行を評価するために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、免疫レパートリーの分析は、状態の進行、停滞、または退縮を評価するために使用され得る。このような実施形態において、その免疫レパートリーは有利なことには、状態を処置するにあたって治療剤の有効性を評価するために、その治療剤での処置の前、その間、および／またはその後に評価され得る。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、疾患経路（例えば、発がん経路、炎症経路など）にそって最速の変化を検出するために、ならびに／または種々の治療的介入および防止的介入の有効性をモニターするために、有用であり得る。

10

【 0 0 8 3 】

いくつかの局面において、本明細書で開示される方法はまた、免疫系の細胞に対する薬剤の効果を分析するために利用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、1またはこれより多くの試験化合物への曝露後の免疫レパートリーにおける変化の分析は、個体に対するその試験化合物の効果を分析するために行われ得る。このような実施形態において、これらの分析は、多数の目的のために、例えば、免疫抑制治療または免疫増強治療の開発において、有用であり得る。いくつかの実施形態において、潜在的な治療価値に関して分析されるべき薬剤は、任意の化合物、低分子、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、または治療的使用に適した他の薬剤であり得る。いくつかの実施形態において、試験は、免疫レパートリーに対する効果を決定するために、例えば、動物モデルを使用してインビボで行われる。

20

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態において、免疫レパートリーの分析は、生物における抗原チャレンジの効果を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、核酸は、生物を抗原でチャレンジした後に（例えば、ワクチン接種後に）、その生物から得られる。いくつかの実施形態において、核酸は、生物を抗原でチャレンジする前に、その生物から得られる。いくつかの実施形態において、チャレンジ前後に存在する免疫レパートリーの多様性を比較することは、そのチャレンジに対するその生物の応答の分析を補助し得る。

30

【 0 0 8 5 】

捕捉部分

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

40

【 0 0 8 6 】

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

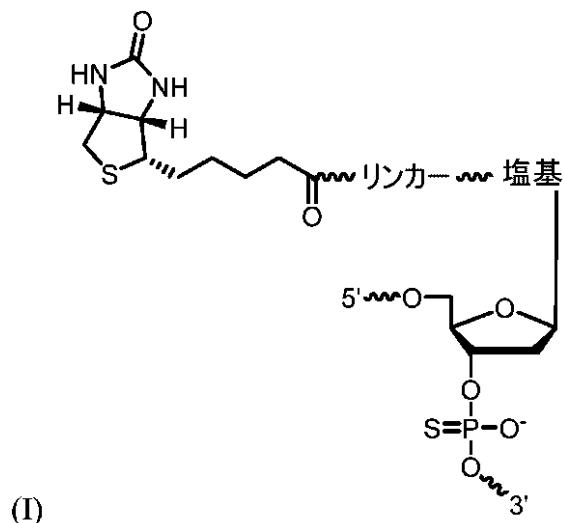
50

は抗体ドメイン、抗体フラグメント、抗原、レセプター、レセプタードメイン、レセプターフラグメント、またはこれらの組み合わせを含み得る。

【0087】

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

【化1】



10

20

を含む。

【0088】

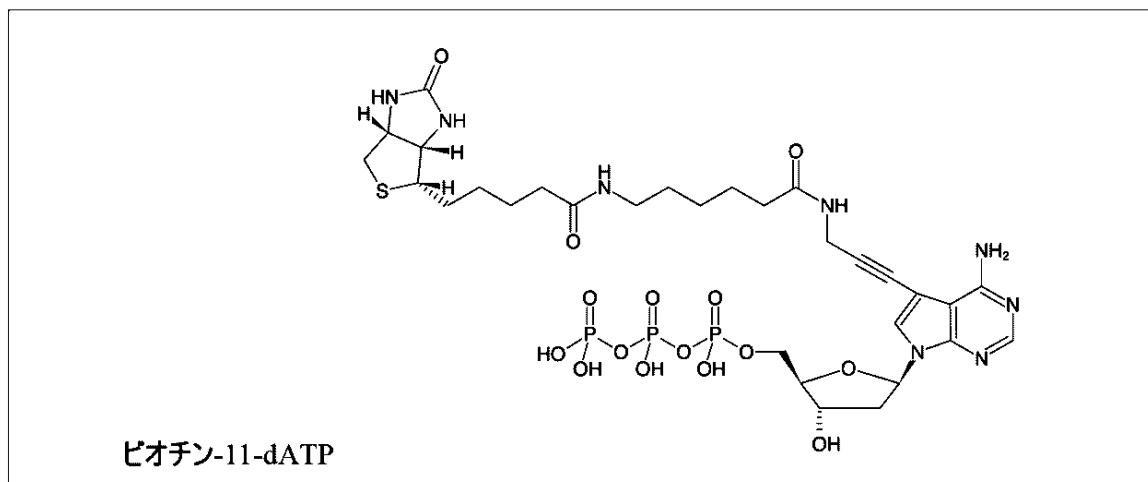
式(I)に示されるように、捕捉部分改変ヌクレオチドは、ヌクレオチドの核塩基に付着したビオチン部分を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、そのビオチン部分は、ビオチン-トリエチレングリコール、ビス-ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン-トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む。捕捉部分改変ヌクレオチドの非限定的な例は、表1に示される。

30

【0089】

【表1-1】

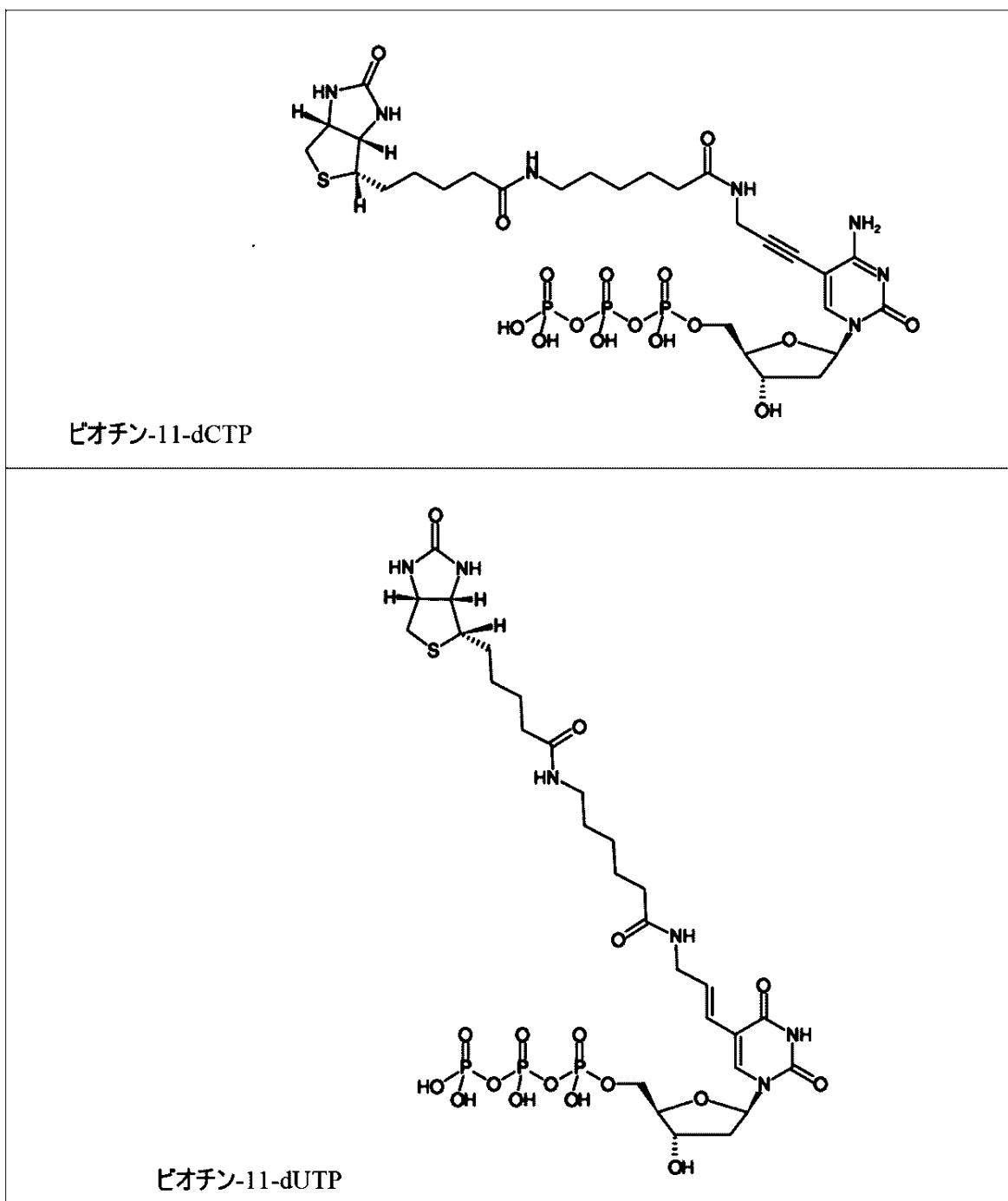
表1. 捕捉部分改変ヌクレオチドの例示的構造



40

50

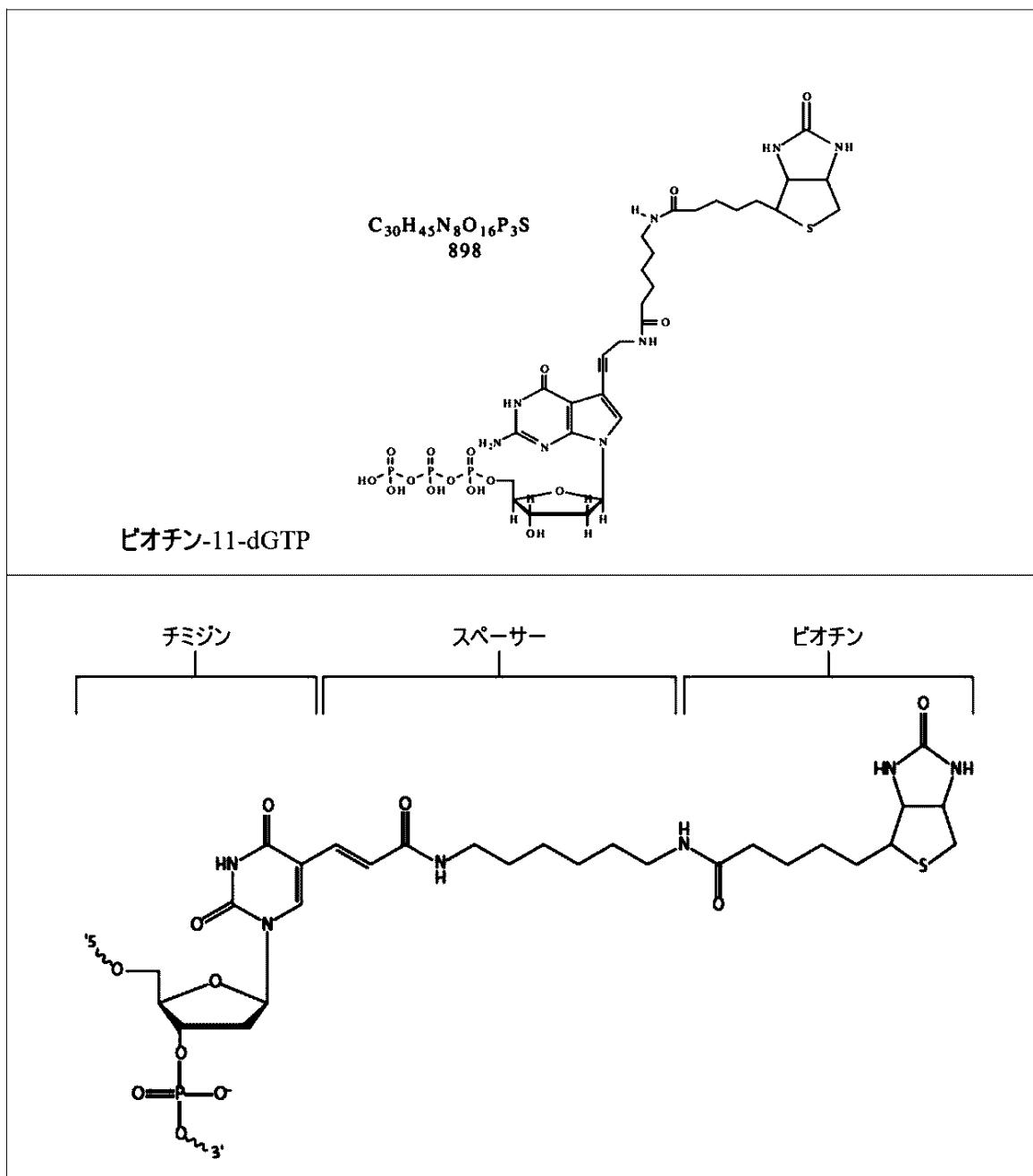
【表 1 - 2】



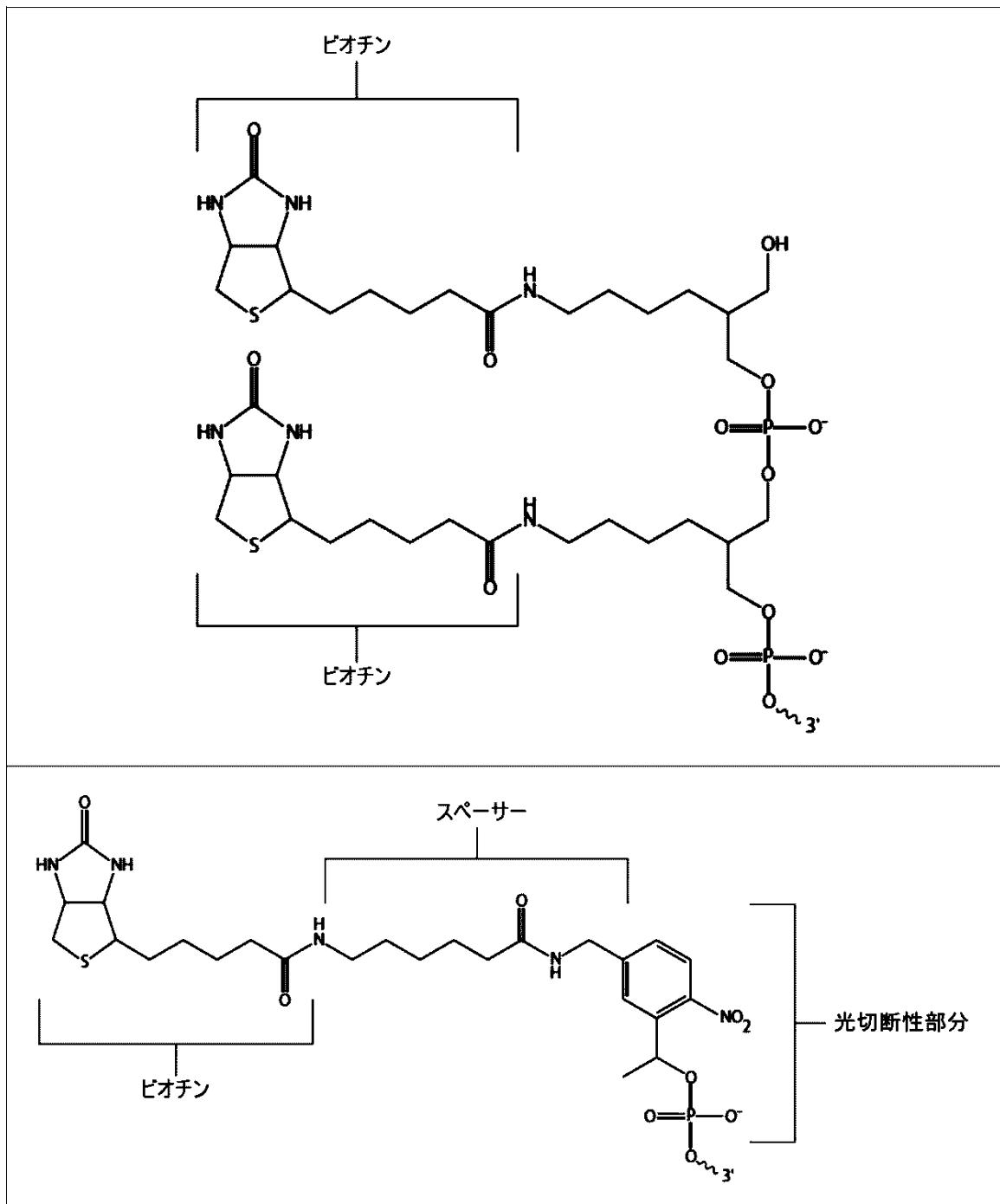
40

50

【表 1 - 3】



【表1-4】



【0090】

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

グリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、ポリプロピレングリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ を含み、ここで n は、1~20の整数（両端の値を含む）である。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ を含み、ここで n は、1~10の整数（両端の値を含む）である。ある種の実施形態において、リンカーは、1またはこれより多くのアリーレンを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、1またはこれより多くのフェニレン（例えば、パラ置換されたフェニレン）を含む。ある種の実施形態において、リンカーは、キラル中心を含む。ある種の実施形態において、リンカーは、1またはこれより多くのホスフェート、脂肪族鎖、ヘテロ脂肪族鎖、および1またはこれより多くのアミド（例えば、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ）を含む。

10

【0091】

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

【0092】

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

20

【0093】

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

30

【0094】

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

40

【0095】

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

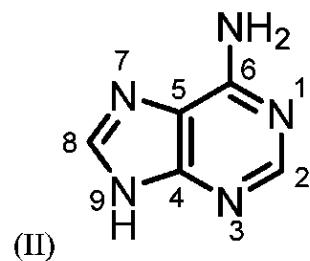
50

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

【0096】

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

【化2】



10

20

30

【0097】

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

【0098】

分析用の核酸の調製

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

40

【0099】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される技術は、核酸サンプルからの標的ヌクレオチド配列の富化を可能にする。いくつかの実施形態において、その核酸サンプルは、ゲノムDNAを含む。いくつかの実施形態において、その核酸サンプルは、cDNAを含む。いくつかの実施形態において、cDNAは、標的核酸にアニールする捕捉部分改変プライマーを使用する第1鎖合成反応を行い、プライマーとしてその標的核酸のフラグメントを使用する第2鎖合成反応を行うことによって、調製され得る。

【0100】

50

サンプル精製

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

【0101】

いくつかの実施形態において、SPRIクリーンアップは、DNAに結合する常磁性ビーズの使用に関する。例えば、いくつかの実施形態において、SPRIクリーンアップは、磁鉄鉱の薄い層（これは、ビーズを常磁性にする）によって囲まれたポリスチレンコアを有するビーズを利用する（すなわち、ビーズは、磁場に曝した場合にのみ凝集する）。いくつかの実施形態において、そのビーズは、DNA結合のために荷電した基を提供するカルボキシル基を含む分子によって被覆される。いくつかの実施形態において、SPRIクリーンアップは、ポリエチレングリコール（PEG）および塩（これらはクラウディング剤として一緒に働いて、そのビーズを活性化してDNAを可逆的に結合する）の存在下で行われる。いくつかの実施形態において、SPRIは、DNAサンプルと常磁性ビーズとを混合する工程およびそのビーズをそのDNAに結合させる工程、磁場を印加して、そのDNAに結合したビーズを凝集させる工程、そのビーズをエタノール（例えば、70%エタノール）ですすぐ工程、ならびにそのDNAをその常磁性ビーズから溶離する工程を包含する。

【0102】

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

【0103】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される方法の工程は、必要に応じて、間にあるサンプル精製工程を含む。いくつかの実施形態において、サンプル精製工程は、洗浄工程を含む。いくつかの実施形態において、サンプル精製工程は、SPRIクリーンアップ（例えば、AMPure）を含む。例えば、分析用の核酸を調製するための方法は、(i) 基材に固定化した核酸を洗浄する工程；および(ii) その洗浄した固定化核酸をその常磁性基材または表面から放出する工程を包含し得る。

【0104】

核酸アダプター

本明細書で使用される場合、用語「アダプター核酸（adapter nucleic acid）」、「核酸アダプター（nucleic acid adapter）」または「アダプター（adapter）」とは、標的ヌクレオチド配列の増幅および／またはシーケンシングの間に有用な1またはこれより多くの要素を提供する、その標的ヌクレオチド配列を含む核酸にライゲーションされ得る核酸分子をいう。いくつかの実施形態において

10

20

30

40

50

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

【0105】

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

【0106】

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

【0107】

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

【0108】

伸長および増幅

本開示の局面は、1またはこれより多くの伸長反応（例えば、第1鎖合成、第2鎖合成）および/または1またはこれより多くの増幅ラウンドを含み得る技術に関する。本明細書で記載されるように、伸長反応および増幅は、1またはこれより多くの標的特異的プライマーを使用して行われ得る。

【0109】

本明細書で記載される場合、「標的特異的プライマー（target-specific primer）」とは、標的ヌクレオチド配列に相補的な配列を含むプライマーをいう。いくつかの実施形態において、標的特異的プライマーは、第1鎖合成反応をプライムするために使用される。例えば、いくつかの実施形態において、その標的特異的プライマーは、標的ヌクレオチド配列を含むmRNA分子にアニールする逆転写酵素プライマーである。いくつかの実施形態において、本明細書で記載されるように、捕捉部分改変プライマーは、第1鎖合成反応をプライムするために使用され得る標的特異的プライマーである。いくつかの実施形態において、標的特異的プライマーは、増幅反応をプライムするため

に使用される。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、その標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む標的特異的プライマーを使用する増幅工程を含み得る。いくつかの実施形態において、本開示は、1 より多くの工程において標的特異的プライマー（例えば、同一または異なる標的特異的プライマー）の使用を含み得る方法を提供する。

【0110】

よって、本明細書で記載される方法のいくつかの実施形態において、用語、標的特異的プライマーが1より多くの工程において出現し、別個のプライマーをいう場合、さらなる用語法が、明確にするために含められ得る。例えば、いくつかの実施形態において、初期標的特異的プライマーは、第1鎖合成反応において使用されて、異種類の標的特異的プライマーを使用してその後に増幅される cDNA を生成し得る。このような実施形態において、その初期標的特異的プライマーは、「捕捉部分改变プライマー（capture moiety modified primer）といわれ得る一方で、後者の標的特異的プライマーは、「標的特異的プライマー」といわれ得る。あるいは、いくつかの実施形態において、その初期標的特異的プライマーおよび後者の標的特異的プライマーは、それぞれ、「第1の（first）」および「第2の（second）」標的特異的プライマーといわれ得る。

10

【0111】

いくつかの実施形態において、その用語「第1の」、「第2の」、「第3の（third）」などの使用は、相対的に使用され得、その結果、これらの用語は、記載されている技術の状況に依存して、プライマーの異なるクラスに言及し得ることは、認識されるべきである。例えば、いくつかの実施形態において、標的特異的逆転写酵素プライマーは、mRNA 分子とともに使用されて、cDNA を生成し、これはさらに、さらなる標的特異的プライマーを使用して PCR 反応に供される。このような実施形態において、その標的特異的逆転写酵素プライマーは、「第1の標的特異的プライマー（first target-specific primer）といわれ得、既知の標的配列に結合するその後の PCR プライマーは、「第2の標的特異的プライマー（second target-specific primer）」、および「第3の標的特異的プライマー（third target-specific primer）」などといわれる。いくつかの実施形態において、複数のランダム逆転写酵素プライマーは、mRNA 分子とともに使用されて、cDNA を生成し、これはさらに、標的特異的プライマーを使用する PCR 反応に供される。このような実施形態において、その複数のランダムプライマーは、「標的特異的（target-specific）」とはいわれない；よって、その後の PCR 反応が標的特異的プライマーを利用する場合、用語「第1の標的特異的プライマー」、「第2の標的特異的プライマー」などは、別個の反応に従って（例えば、シーケンシング用の核酸を調製するための方法において）使用され得る。

20

【0112】

いくつかの局面において、本開示は、第1の標的特異的プライマー（例えば、捕捉部分改变プライマー）を使用する第1鎖合成反応を行う工程を包含し得る方法を提供する。いくつかの実施形態において、第1の増幅ラウンドは、第2の標的特異的プライマー（例えば、標的特異的プライマー）および第1のアダプタープライマーを使用して行われる。

30

【0113】

いくつかの実施形態において、「標的特異的プライマー」は、適切なアニーリング条件下で、核酸分子（例えば、テンプレート核酸）の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールし得る核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、順序を示す用語（例えば、第1、第2、第3）は、マルチ工程の方法の異なる工程において使用される、一方の標的特異的プライマーをもう一方から区別するために使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、第2の標的特異的プライマーは、第1の標的特異的プライマーの使用を包含する以前の第1鎖合成を含むプロセスにおいて、増幅反応において使用するための標的特異的プライマーである。このような実施形態において、増幅の間

40

50

に、その第2の標的特異的プライマーは、そのテンプレートに相補的である鎖を生成し、この相補鎖は、第1のアダプタープライマーとハイブリダイズされ得る。

【0114】

本明細書で記載される場合、「アダプタープライマー (a d a p t e r p r i m e r)」とは、適切なアニーリング条件下で、アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールし得る核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、アダプタープライマー（例えば、第1のアダプタープライマー）は、そのアダプターのうちの少なくとも一部と同一であり、それは、標的特異的プライマー（例えば、第2の標的特異的プライマー）によって生成される相補鎖とアニールして、増幅が進むことを可能にする。

【0115】

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

【0116】

本明細書で記載される場合、「テールプライマー (t a i l p r i m e r)」とは、適切なアニーリング条件下で、先の増幅工程から生じるアンブリコンによって含まれる標的特異的プライマー（例えば、第2の標的特異的プライマー）の5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールし得る3'部分を含む核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、テールプライマーは、その標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む。いくつかの実施形態において、そのテールプライマーの5'部分は、サンプルインデックス領域、P C Rプライマー結合領域、分子バーコード領域、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも1つを含む。テールプライマーは概して、本明細書で記載される場合、第2のP C Rラウンドにおいて使用されるプライマーに関するが、この用語が、先の反応において使用されるプライマーの5'テール部分に相補的である配列とハイブリダイズする任意のプライマーをいうために使用され得ることは、認識されるべきである。

【0117】

いくつかの実施形態において、アダプタープライマー（例えば、第2のアダプタープライマー）は、そのアダプターのうちの少なくとも一部と同一であり、そしてそれは、そのテールプライマーによって生成された相補鎖にアニールして、増幅が進むことを可能にする。

【0118】

いくつかの実施形態において、第2のアダプタープライマーは、第1のアダプタープライマーに対してネスト化される。いくつかの実施形態において、ネスト化したアダプタープライマーを使用すると、増幅可能である（例えば、ブリッジP C RまたはエマルジョンP C Rの間に）が、シーケンシングできない（半ネスト化法の間に生じ得る状況）最終アンブリコンを生成する可能性を排除する。他の状況において、シーケンシングプライマーと同一のプライマーを使用する半ネスト化アプローチは、第1のP C R工程から第2のP

10

20

30

40

50

C R 工程への望ましくない増幅生成物の持ち越しを生じ得、最終的には、人工シーケンシングリードを生じる。いくつかの実施形態において、第 2 のアダプタープライマーは、第 1 のアダプタープライマーに関して少なくとも 1 ヌクレオチド、例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、またはこれより多くのヌクレオチドがネスト化される。いくつかの実施形態において、第 2 のアダプタープライマーは、約 5 ヌクレオチド～約 10 ヌクレオチドが、約 10 ヌクレオチド～約 15 ヌクレオチドが、約 15 ヌクレオチド～約 20 ヌクレオチドが、または約 20 個もしくはこれより多くのヌクレオチドが第 1 のアダプタープライマーに関してネスト化される。

【 0 1 1 9 】

他の局面の中でも、本明細書で記載される技術は、1 またはこれより多くのネスト化プライマーの使用を包含し得る。いくつかの実施形態において、ネスト化プライマーを使用すると、予測外のプライマー結合部位の増幅に起因して、P C R 生成物における非特異的に結合が低減し得る。本明細書で使用される場合、用語「ネスト化される (n e s t e d) 」は、1 つのプライマー対の 1 つのプライマーのアニーリング部位と別のプライマー対の別のプライマーのアニーリング部位との間の位置的関係性を記載するために使用される。例えば、いくつかの実施形態において、第 2 のプライマーは、1 個、2 個、3 個またはこれより多くのヌクレオチドが第 1 のプライマーに対してネスト化され、このことは、1 個、2 個、3 個またはこれより多くのヌクレオチドがフレームシフトされるそのテンプレート鎖上の部位にその第 2 のプライマーが結合することを意味する。

【 0 1 2 0 】

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

【 0 1 2 1 】

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

【 0 1 2 2 】

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

【 0 1 2 3 】

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

10

20

30

40

50

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

【0124】

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

10

【0125】

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

20

【0126】

プライマー

一般に、目的の配列（例えば、標的配列またはアダプター配列）に相補的である配列を含むプライマーは、相補的配列のみからなり得るか、またはその目的の配列に相補的でないさらなる配列（例えば、テール配列、アダプター配列、インデックス配列など）をも含み得るかのいずれかである。いくつかの実施形態において、プライマーは、非ヌクレオチド部分（例えば、捕捉部分など）をも含み得る。

【0127】

いくつかの実施形態において、プライマー（例えば、第1のおよび第2の標的特異的プライマー、第1のおよび第2のアダプタープライマー、テールプライマー、捕捉部分改変プライマー）を、これらが、約61～72、例えば、約61～69、約63～69、約63～67、約64～66のアニーリング温度において、これらの相補的配列に特異的にアニールするように、デザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが72未満のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが70

30

未満のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが68未満のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、プライマーは、これらが約65のアニーリング温度でこれらの相補的配列に特異的にアニールするようにデザインされる。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムは、容器温度を（例えば、種々の温度範囲の間でサイクリングすることによって）変更して、プライマーアニーリングを促進するように構成される。

40

【0128】

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

50

【0129】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載されるプライマー（例えば、ランダムプライマー、標的特異的プライマー）は、逆転写酵素プライマーを含む。いくつかの実施形態において、逆転写酵素プライマーは、mRNA分子に、約50～52、約51～53、約52～54、約53～55、約54～56、約55～57、約56～58、約57～59、約58～60の温度において特異的にアニールする。例えば、いくつかの実施形態において、逆転写酵素プライマーは、約53、約53.5、約54、約54.5、約56のアニーリング温度を有する。いくつかの実施形態において、逆転写酵素プライマーは、1またはこれより多くの捕捉部分（例えば、本明細書で記載されるとおり）を含む。いくつかの実施形態において、その1またはこれより多くの捕捉部分は、そのプライマー核酸の5'末端において、逆転写酵素プライマーに付着され得る。いくつかの実施形態において、逆転写酵素プライマーは、最も5'側の塩基を、その隣の最も5'側から2番目の塩基に連結するホスホロチオエート結合を含む。

【0130】

核酸伸長、増幅、およびPCR

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

【0131】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅レジメンを包含し得る（1つまたはこれより多くの増幅サイクルを包含する）。本明細書で記載される方法の増幅工程は、各々PCR増幅レジメンを、すなわち、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅サイクルのセットを含み得る。本明細書で使用される場合、用語「増幅レジメン（amplification regimen）」とは、目的の核酸を特異的に増幅する（その存在量を増大させる）プロセスをいう。いくつかの実施形態において、指数関数的増幅は、以前のポリメラーゼ伸長の生成物が連続する伸長ラウンドにわたってテンプレートとして働く場合に起こる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法に従うPCR増幅レジメンは、少なくとも1回、およびいくつかの場合には、少なくとも5回またはこれより多くの反復サイクルを含み得る。いくつかの実施形態において、各反復サイクルは、1)鎖分離（例えば、熱変性）；2)テンプレート分子へのオリゴヌクレオチドプライマーアニーリング；および3)そのアニールしたプライマーの核酸ポリメラーゼ伸長という工程を含み得る。これらの工程の各々に関与する任意の適切な条件および時間が使用され得ることは、認識されるべきである。いくつかの実施形態において、選択される条件および時間は、長さ、配列の内容、融解温度、二次構造特徴、または反応において使用される核酸テンプレートおよび／もしくはプライマーに関する他の因子に依存し得る。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法に従う増幅レジメンは、サーマルサイクラー（そのうちの多くは市販されている）で行われる。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、線形的増幅を含み得る。例えば、いくつかの実施形態において、ネスト化プライマーを使用して行われる増幅工程は、線形的増幅を使用して行われ得る。いくつかの実施形態において、増幅は、核酸配列ベースの増幅（NASBA）を使用して行われ得る。例えば、いくつかの実施形態において、増幅は、T7媒介性NASBA反応を含む。

【0132】

いくつかの実施形態において、核酸伸長反応は、核酸ポリメラーゼの使用を包含する。

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、語句「核酸ポリメラーゼ (n u c l e i c a c i d p o l y m e r a s e) 」とは、ヌクレオシド三リン酸のテンプレート依存性重合を触媒して、テンプレート核酸配列に相補的なプライマー伸長生成物を形成する酵素をいう。核酸ポリメラーゼ酵素は、アニールしたプライマーの 3' 末端における合成を開始し、そのテンプレートの 5' 末端に向かう方向で進む。多くの核酸ポリメラーゼは、当該分野で公知であり、市販されている。核酸ポリメラーゼのうちの 1 グループは、熱安定性である。すなわち、それらは、相補的な核酸のアニールした鎖を変性させるために十分な温度（例えば、94 、または時にはより高い）に供された後に機能を保持する。増幅のためのプロトコルの非限定的な例は、以下の条件下でポリメラーゼ（例えば、P h o e n i x T a q 、V e r a S e q ）を使用することを包含する：98 で 30 秒間、続いて、以下を含む 14 ~ 22 回のサイクル（98 で 10 秒間での融解、続いて、68 で 30 秒間のアニーリング、続いて、72 で 3 分間の伸長、続いて、4 での反応の保持）。しかし、他の適切な反応条件が使用されてもよい。いくつかの実施形態において、アニーリング / 伸長温度は、塩濃度における差異を考慮するために調節され得る（例えば、より高い塩濃度に対して 3 高い）。いくつかの実施形態において、例えば、98 から 65 への傾斜率を（例えば、1 / 秒、0.5 / 秒、0.28 / 秒、0.1 / 秒またはよりゆっくりと）遅らせることは、より多重化したサンプル中でプライマー性能および適用範囲の均一性を改善する。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるシステムは、容器温度を（例えば、種々の温度範囲の間でサイクルさせ、制御された上昇率または下降率を有することによって）変更して、増幅を促進するように構成される。

【 0133 】

いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼは、その酵素がテンプレート依存性伸長を行う条件下で使用される。いくつかの実施形態において、その核酸ポリメラーゼは、D N A ポリメラーゼ I 、 T a q ポリメラーゼ、 P h o e n i x T a q ポリメラーゼ、 P h u s i o n ポリメラーゼ、 T 4 ポリメラーゼ、 T 7 ポリメラーゼ、 K l e n o w フラグメント、 K l e n o w e x o - 、 p h i 2 9 ポリメラーゼ、 A M V 逆転写酵素、 M - M u L V 逆転写酵素、 H I V - 1 逆転写酵素、 V e r a S e q U L t r a ポリメラーゼ、 V e r a S e q H F 2 . 0 ポリメラーゼ、 E n z S c r i p t 、または別の適切なポリメラーゼである。いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼは、逆転写酵素ではない。いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼは、D N A テンプレートに対して作用する。いくつかの実施形態において、その核酸ポリメラーゼは、R N A テンプレートに対して作用する。いくつかの実施形態において、伸長反応は、相補的なD N A 分子を生成するために、R N A に対して行われる逆転写を包含する（R N A 依存性D N A ポリメラーゼ活性）。いくつかの実施形態において、逆転写酵素は、マウスのモロニーマウス白血病ウイルス (M - M L V) ポリメラーゼ、 A M V 逆転写酵素、 R S V 逆転写酵素、 H I V - 1 逆転写酵素、 H I V - 2 逆転写酵素、または別の適切な逆転写酵素である。

【 0134 】

いくつかの実施形態において、核酸増幅反応は、反応混合物の加熱を概して要する鎖分離工程を包含するサイクルを要する。本明細書で使用される場合、用語「鎖分離 (s t r a n d s e p a r a t i o n) 」または「鎖を分離する (s e p a r a t i n g t h e s t r a n d) 」とは、相補的な 2 本鎖分子が、オリゴヌクレオチドプライマーにアニールするために利用可能な 2 本の単一の鎖へと分離されるようにする核酸サンプルの処理を意味する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法に従う鎖分離は、核酸サンプルをその融解点 (T m) を上回って加熱することによって達成される。いくつかの実施形態において、核酸ポリメラーゼに適した反応調製物における核酸分子を含むサンプルに関しては、94 への加熱は、鎖分離を達成するために十分である。いくつかの実施形態において、適切な反応調製物は、1 種またはこれより多くの塩（例えば、1 ~ 10 0 m M K C l 、 0.1 ~ 10 m M M g C l 2 ）、少なくとも 1 種の緩衝化剤（例えば、1 ~ 2 0 m M T r i s - H C l ）、およびキャリア（例えば、0.01 ~ 0.5 % B S A ）を含む。適切な緩衝液の非限定的な例は、5 0 m M K C l 、 1 0 m M T r i s - H

10

20

30

40

50

C1 (25でpH 8.8)、0.5~3 mM MgCl₂、および0.1% BSAを含む。適切な緩衝液のさらなる非限定的な例は、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (25においてpH 8.8)、0.5~5 mM (例えば、およそ0.5 mM、およそ1 mM、およそ2 mM、およそ3 mM、およそ4 mM、およそ5 mM) MgCl₂、および0.1% BSAを含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、核酸增幅は、標的核酸に特徴的な鎖を有する核酸テンプレートにプライマーをアニールさせることを包含する。いくつかの実施形態において、標的核酸の鎖は、テンプレート核酸として働き得る。本明細書で使用される場合、用語「アニールする (anneal)」とは、2つの核酸の間での1つまたはこれより多くの相補的塩基対の形成をいう。いくつかの実施形態において、アニーリング (annealing) は、2つの相補的または実質的に相補的な核酸鎖が一緒にハイブリダイズすることを要する。いくつかの実施形態において、伸長反応の状況では、アニーリングは、テンプレート依存性ポリメラーゼ酵素のプライマー伸長基質が形成されるように、テンプレートへのプライマーのハイブリダイゼーションを要する。いくつかの実施形態において、アニーリング (例えば、プライマーと核酸テンプレートとの間) の条件は、プライマーの長さおよび配列に基づいて変動し得る。いくつかの実施形態において、アニーリングの条件は、プライマーのT_m (例えば、計算されたT_m) に基づく。いくつかの実施形態において、伸長レジメンのアニーリング工程は、鎖分離工程後の温度を、プライマーのT_m (例えば、計算されたT_m) に基づく温度へと、このようなアニーリングを可能にするために十分な時間にわたって低下させることを要する。いくつかの実施形態において、T_mは、多くのアルゴリズム (例えば、OLIGOTM (Molecular Biology Insights Inc. Colorado) プライマーデザインソフトウェアおよびVENTRO NTITM (Invitrogen, Inc. California) プライマーデザインソフトウェアおよびインターネット上で入手可能なプログラム (Primer 3、Oligo Calculator、およびNetPrimer (Premier Biosoft; Palo Alto, CA; およびワールドワイドウェブ上で (例えば、at premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/Help/xnetprlaunch.htmlにおいて) 無料で入手可能なものが挙げられる) のうちのいずれかを使用して決定され得る。いくつかの実施形態において、プライマーのT_mは、以下の式を使用して計算され得る (これは、NetPrimerソフトウェアによって使用され、Frieir,ら PNAS 1986 83: 9373-9377 (これは、その全体において本明細書に参考として援用される) により詳細に記載される)。

【数1】

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

ここで: Hは、ヘリックス形成のエンタルピーであり; Sは、ヘリックス形成のエントロピーであり; Rは、モル気体定数 (1.987 cal / × mol) であり; Cは、核酸濃度であり; そして [K⁺]は、塩濃度である。大部分の增幅レジメンに関して、アニーリング温度は、推定T_mより約5低いように選択されるが、例えば、推定T_mより5より大きく低い温度 (例えば、6低い、8低い、10低い、またはより低い) であり得るように、T_mにより近く、T_mを上回る温度 (例えば、推定T_mより1~5の間または低い、推定T_mより1~5の間高い) が使用され得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度がT_mに近いほど、アニーリングはより特異的になる。いくつかの実施形態において、伸長反応の間 (例えば、PCR增幅レジメンの状況内で) プライマーハニーリングに使用される時間は、少なくとも部分的に、反応の容積に基づいて決定される (例えば、容積が大きいほど、より長い時間を要する)。いくつかの実施形態において、伸長反応の間に (例えば、PCR增幅レジメンの状況内で) プライマーハニーリングに使用される時間は、少なくとも部分的に、反応の容積に基づいて決定される (例えば、容積が大きいほど、より長い時間を要する)。

10

20

30

40

50

リングに使用される時間は、少なくとも部分的に、プライマーおよびテンプレート濃度に基づいて決定される（例えば、テンプレートに対するプライマーの相対的濃度が高いほど、より低い相対的濃度より、より短い時間を要する）。いくつかの実施形態において、容積および相対的プライマー／テンプレート濃度に依存して、伸長反応における（例えば、増幅レジメンの状況内での）プライマーアニーリング工程は、1秒～5分、10秒～2分、または30秒～2分の範囲内であり得る。本明細書で使用される場合、「実質的にアニールする（substantially anneal）」とは、相補的塩基対が、PCR増幅レジメンの状況において使用される場合に、特異的に増幅された生成物の検出可能なレベルを生じるために十分である2つの核酸の間で形成する程度を指す。

【0136】

10

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

20

【0137】

30

いくつかの実施形態において、プライマー伸長は、アニールしたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長を可能にする条件下で行われる。本明細書で使用される場合、用語「伸長生成物が生成されるようにアニールしたオリゴヌクレオチドの伸長を可能にする条件（conditions that permit the extension of an annealed oligonucleotide such that extension products are generated）」とは、核酸ポリメラーゼがプライマー伸長を触媒する条件のセット（例えば、温度、塩および補因子濃度、pH、ならびに酵素濃度）をいう。いくつかの実施形態において、このような条件は、少なくとも部分的に、使用されている核酸ポリメラーゼに基づく。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、適切な反応調製物中でプライマー伸長反応を行い得る。

40

【0138】

いくつかの実施形態において、適切な反応調製物は、1つまたはこれより多くの塩（例えば、1～100mM KCl、0.1～10mM MgCl₂）、少なくとも1つの緩衝化剤（例えば、1～20mM Tris-HCl）、キャリア（例えば、0.01～0.5% BSA）、および1つまたはこれより多くのNTP（例えば、dATP、dTTP、dCTP、およびdGTPの各々が10～200μM）を含む。条件の非限定的なセットは、ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）がプライマー伸長を触媒する72において50mM KCl、10mM Tris-HCl（25でpH 8.8）、0.5～3mM MgCl₂、200μM 各dNTP、および0.1% BSAである。

50

【0139】

いくつかの実施形態において、適切な反応調製物は、1種またはこれより多くの塩（例えば、1~100 mM KCl、0.5~5 mM MgCl₂）、少なくとも1種の緩衝化剤（例えば、1~20 mM Tris-HCl）、キャリア（例えば、0.01~0.5% BSA）、および1またはこれより多くのNTP（例えば、dATP、dTTP、dCTP、およびdGTPの各々が50~350 μM）を含む。条件の非限定的なセットは、72において、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl（25においてpH 8.8）、3 mM MgCl₂、200 μM 各dNTP、および0.1% BSAであり、このセットの下で、ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）がプライマー伸長を触媒する。条件のさらなる非限定的なセットは、72において、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl（25においてpH 8.8）、3 mM MgCl₂、266 μM dATP、200 μM dCTP、133 μM dGTP、200 μM dTTP、および0.1% BSAであり、このセットの下で、ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）がプライマー伸長を触媒する。

【0140】

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

【0141】

いくつかの実施形態において、核酸增幅は、5回まで、10まで、20まで、30まで、40まで、またはこれより多くのラウンド（サイクル）の増幅を要する。いくつかの実施形態において、核酸增幅は、長さが5サイクル~20サイクルのPCR增幅レジメンのサイクルのセットを含み得る。いくつかの実施形態において、増幅工程は、長さが10サイクル~20サイクルのPCR增幅レジメンのサイクルのセットを含み得る。いくつかの実施形態において、各増幅工程は、長さが12サイクル~16サイクルのPCR增幅レジメンのサイクルのセットを含み得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、70未満であり得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、72未満であり得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、約65であり得る。いくつかの実施形態において、アニーリング温度は、約61~約72であり得る。

【0142】

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

10

20

30

30

40

50

プライマーのハイブリダイゼーション配列は、長さが 6 ~ 50 ヌクレオチド、長さが 6 ~ 35 ヌクレオチド、長さが 6 ~ 20 ヌクレオチド、長さが 10 ~ 25 ヌクレオチドであり得る。

【 0 1 4 3 】

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

【 0 1 4 4 】

標的核酸

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

〔 0 1 4 5 〕

チド、10000個またはこれより多くのヌクレオチドであり得る。

【0146】

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

【0147】

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

10

20

【0148】

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

30

【0149】

本明細書で使用される場合、用語「既知の標的ヌクレオチド配列 (known target nucleotide sequence)」または「標的ヌクレオチド配列 (target nucleotide sequence)」とは、その配列（例えば、その核酸が何であるかおよびその核酸のヌクレオチド塩基の順序）が既知である標的核酸の一部をいう。例えば、いくつかの実施形態において、既知の標的ヌクレオチド配列は、既知であるかまたはその核酸の隣接する未知の配列のインターロゲーションより先に決定された核酸のヌクレオチド配列である。既知の標的ヌクレオチド配列は、任意の適切な長さであり得る。

40

【0150】

いくつかの実施形態において、標的ヌクレオチド配列（例えば、既知の標的ヌクレオチド配列）は、10個もしくはこれより多くのヌクレオチド、30個もしくはこれより多くのヌクレオチド、40個もしくはこれより多くのヌクレオチド、50個もしくはこれより多くのヌクレオチド、100個もしくはこれより多くのヌクレオチド、200個もしくはこれより多くのヌクレオチド、300個もしくはこれより多くのヌクレオチド、400個もしくはこれより多くのヌクレオチド、500個もしくはこれより多くのヌクレオチド、600個もしくはこれより多くのヌクレオチド、700個もしくはこれより多くのヌクレオチド、800個もしくはこれより多くのヌクレオチド、900個もしくはこれより多く

50

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

10

【0151】

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

20

【0152】

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

30

【0153】

分子バーコードおよびインデックス配列

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

40

【0154】

50

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

【0155】

いくつかの実施形態において、本明細書で使用される場合、「インデックス (index)」、「インデックス配列 (index sequence)」、「インデックス領域 (index region)」、および「サンプルインデックス (sample index)」とは、交換可能に使用され得、そして一般に、そのライゲーションされた核酸が属する集団に関する識別子として有用であるアダプター核酸の領域を指す。いくつかの実施形態において、インデックスは、共通するライプラリーに属する配列の集まりを同定するために使用され得る固定された核酸配列を含む。例えば、インデックスは、核酸に対応するサンプルを同定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、インデックスは、例えば、共有されるかまたは共通する特性（例えば、ライプラリーの他の核酸の間で共通する）に関連する核酸の供給源識別子、位置識別子、日付もしくは時間識別子（例えば、サンプリングまたは処理の日付もしくは時間）、または他の識別子として使用され得る。いくつかの実施形態において、このようなインデックス配列は、核酸の集団に存在する核酸の異なる局面を同定するために有用である。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、標的核酸に関する供給源または位置識別子を提供し得る。例えば、インデックス配列は、核酸が得られる患者を同定するように働き得る。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、1 つの反応（例えば、1 つのフローセルで行われる）での多数の異なるサンプルのシーケンシングを可能にする。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、個々のシーケンシング反応を検出する目的で配列イメージヤーを配向するために使用され得る。いくつかの実施形態において、インデックス配列は、長さが 2 ~ 25 ヌクレオチド、長さが 2 ~ 15 ヌクレオチド、長さが 2 ~ 10 ヌクレオチド、長さが 2 ~ 6 ヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、インデックスは、少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、または少なくとも 25 個のヌクレオチドを含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、テール付加ランダムプライマーの集団が、本明細書で記載される方法に従って使用される場合、多数の区別可能な增幅生成物は、增幅後に存在し得る。いくつかの実施形態において、テール付加ランダムプライマーは、サンプルの核酸分子全体を通じて種々の位置においてハイブリダイズするので、標的特異的プライマーのセットは、1 回より多くのハイブリダイゼーション事象によって作られる伸長生成物をハイブリダイズ（および增幅）し得る。例えば、1 つのテール付加ランダムプライマーは、標的特異的プライマーハイブリダイゼーション部位から第 1 の距離（例えば、100 ヌク

10

20

30

40

50

レオチド)においてハイブリダイズし得、別のテール付加ランダムプライマーは、標的特異的プライマーハイブリダイゼーション部位から第2の距離(例えば、200ヌクレオチド)においてハイブリダイズし得、それによって、2つの増幅生成物(例えば、約100bpを含む第1の増幅生成物および約200bpを含む第2の増幅生成物)を生じ得る。いくつかの実施形態において、これらの多数の増幅生成物は各々、次世代シーケンシング技術を使用してシーケンシングされ得る。いくつかの実施形態において、これらの多数の増幅生成物のシーケンシングは、増幅またはシーケンシングプロセスの間に導入される配列エラーを検出するために互いと比較され得る多数の重なり合う配列リードを提供することから有利である。いくつかの実施形態において、個々の増幅生成物(例えば、単一の分子に由来する)が整列され得、それらが特定の塩基において存在する配列の中で異なる場合、PCRおよび/またはシーケンシングのアーチファクトまたはエラーが存在し得る。

【0157】

DNA剪断/フラグメント化

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

【0158】

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

【0159】

シーケンシング

いくつかの局面において、本明細書で記載される技術は、オリゴヌクレオチドシーケンシングのために核酸サンプルを富化するための方法に関する。いくつかの実施形態において、そのシーケンシングは、次世代シーケンシング法によって行われ得る。本明細書で使用される場合、「次世代シーケンシング(next-generation sequencing)」とは、数千から数百万のシーケンシング反応を並行して行いかつ読み取ることに起因して、従来のシーケンシング法(例えば、サンガーシーケンシング法)で可能な速度を上回る速度でオリゴヌクレオチドをシーケンシングする能力を有するオリゴヌクレオチドシーケンシング技術をいう。次世代シーケンシング法/プラットフォームの非限定的な例としては、以下が挙げられる：大規模並行シグネチャーシーケンシング(Massively Parallel Signature Sequencing)(Lynx Therapeutics)；454バイロシーケンシング(454 Life Sciences/Roche Diagnostics)；固相可逆的ダイターミネーターシーケンシング(solid-phase, reversible dye-terminator sequencing)(Solexa/Illumina)；SOLID技術(Applied Biosystems)；イオン半導体シーケンシング(Ion semiconductor sequencing)(ION Torrent)；DN

10

20

30

40

50

Aナノボールシーケンシング(Complete Genomics)；ならびにPacific Biosciences、Intelligent Bio-systems、およびOxford Nanopore Technologiesから入手可能な技術。いくつかの実施形態において、そのシーケンシングプライマーは、選択された次世代シーケンシング法と適合性の部分を含み得る。次世代シーケンシング技術およびその制約、ならびに関連したシーケンシングプライマーのデザインパラメーターは、当該分野で周知である（例えば、Shendureら、「Next-generation DNA sequencing」, *Nature*, 2008, vol. 26, No. 10, 1135-1145；Mardis, 「The impact of next-generation sequencing technology on genetics」, *Trends in Genetics*, 2007, vol. 24, No. 3, pp. 133-141；Suら, 「Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics」, *Expert Rev Mol Diagn*, 2011, 11(3):333-43；Zhangら, 「The impact of next-generation sequencing on genomics」, *J Genet Genomics*, 2011, 38(3):95-109；(Nyren, P.ら *Anal Biochem* 208: 17175 (1993)；Bentley, D. R. *Curr Opin Genet Dev* 16:545-52 (2006)；Strausberg, R. L.ら, *Drug Disc Today* 13:569-77 (2008)；米国特許第7,282,337号；米国特許第7,279,563号；米国特許第7,226,720号；米国特許第7,220,549号；米国特許第7,169,560号；米国特許第6,818,395号；米国特許第6,911,345号；米国公開番号2006/0252077；同2007/0070349；および同20070070349を参照のこと；これらは、それらの全体において本明細書に参考として援用される）。

【0160】

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

【0161】

シーケンシングリードをゲノムおよび/またはcDNA配列の既知の配列データベースに整列させるための方法は、当該分野で周知であり、ソフトウェアは、このプロセスのために市販される。いくつかの実施形態において、それらの全体において、野生型配列データベースにマッピングされないリード（より小さいシーケンシングプライマーおよび/またはアダプタースクレオチド配列）は、ゲノム再編成または大きなインデル変異であり得る。いくつかの実施形態において、ゲノム中の多数の位置にマッピングされる配列を含むリード（より小さいシーケンシングプライマーおよび/またはアダプタースクレオチド配列）は、ゲノム再編成であり得る。いくつかの実施形態において、連続する配列、または「コンティグ（contig）」に重なり合うリードのデノボアセンブリが構築され得、シーケンシングリードのアラインメントにおいて利用され得る。いくつかの実施形態において、公にアクセス可能なゲノミクスデータベースに依拠しないホットスポット参照が利用され得る。

【0162】

サンプル

いくつかの実施形態において、核酸（例えば、標的核酸、標的スクレオチド配列を含む核酸）は、適切なサンプル（例えば、食品サンプル、環境サンプル、生物学的サンプル、例えば、血液サンプルなど）中に存在するかまたはこれらサンプルから得られる。いくつかの実施形態において、その標的核酸は、被験体から得られる生物学的サンプルである。

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、サンプルは、被験体から得られる診断サンプルであり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、タンパク質、細胞、流体、生物学的流体、保存剤、および／または他の物質をさらに含み得る。非限定的な例によれば、サンプルは、口内スワブ、血液、血清、血漿、喀痰、脳脊髄液、尿、涙液、肺胞単離物、胸膜液、心膜液、囊胞液、腫瘍組織、組織、生検物、唾液、吸引物、またはこれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、切除物または生検物によって得られ得る。

【0163】

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

【0164】

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

【0165】

いくつかの実施形態において、そのサンプルは、新たに集められる。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、本明細書で記載される方法および組成物において使用される前に貯蔵される。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、非処理サンプルである。本明細書で使用される場合、「非処理サンプル (untreated sample)」とは、溶液中の希釈および／または懸濁を除いて、いかなる事前のサンプル事前処理をも有しなかった生物学的サンプルをいう。いくつかの実施形態において、サンプルは、被験体から得られ、本明細書で記載される方法および組成物において利用される前に保存または処理される。非限定的な例によれば、サンプルは、パラフィンワックス中に包埋され得るか、冷蔵され得るか、または凍結され得る。凍結サンプルは、本明細書で記載される方法および組成物に従って、核酸の存在を決定する前に融解され得る。いくつかの実施形態において、そのサンプルは、処理された (processed or treated) サンプルであり得る。サンプルを処理する (treating or processing) ための例示的な方法としては、遠心分離、濾過、超音波処理、ホモジナイゼーション、加熱、凍結および融解、保存剤 (例えば、抗凝固剤またはスクレアーゼインヒビター) との接触、ならびにこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、サンプルは、化学的および／または生物学的試薬で処理され得る。化学的および／または生物学的試薬は、処理および／または貯蔵の間に、サンプルの安定性またはそのサンプルによって含まれる核酸を保護および／または維持するために使用され得る。さらに、または代わりに、化学的および／または生物学的試薬は、そのサンプルの他の構成要素から核酸を放出するために使用され得る。非限定的な例によれば、血液サンプルは、本明細書で記載される方法および組成物において利用される前に、抗凝固剤で処理され得る。核酸分析のためのサンプルの処理、保存、または処理に適切な方法およびプロセスは、本明細書で開示される方法において使用され得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、清澄にした流体サンプルであり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、その清澄にされる流体サンプルを含む上清の低速遠心分離 (例えば、3,000 × g またはこれより小さい) および収集によって清澄にされ得る。

【0166】

いくつかの実施形態において、サンプル中に存在する核酸は、本明細書で記載される方法および組成物において利用される前に単離され得るか、富化され得るか、または精製され得る。サンプルから核酸を単離、富化、または精製するためには適した方法は、使用され得る。例えば、ゲノム DNA を種々のサンプルタイプから単離するためのキットは、市販

10

20

30

40

50

されている（例えば、カタログ番号 51104、51304、56504、および 56404； Qiagen； Germantown, MD）。

【0167】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、例えば、標的核酸のシーケンシングの前に、標的核酸を富化するための方法に関する。いくつかの実施形態において、富化されるべき標的核酸の一方の末端の配列は、シーケンシングの前には知られていない。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、次世代シーケンシング技術を使用してスクレオチド配列を決定する前に、特定のスクレオチド配列を富化するための方法に関する。いくつかの実施形態において、特定のスクレオチド配列を富化するための方法は、ハイブリダイゼーション富化を含まない。

10

【0168】

標的遺伝子および治療適用

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

20

【0169】

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

30

【0170】

いくつかの実施形態において、被験体は、（例えば、標的化がん治療である EGFR-TKI を用いた）肺がんの処置の必要性がある。いくつかの実施形態において、例えば、そのサンプルが、肺がんの処置の必要性のある被験体から得られる場合、その既知の標的配列は、ALK、ROS1、および RET の群から選択される遺伝子に由来する配列を含み得る。よって、いくつかの実施形態において、遺伝子再編成は、ALK、ROS1、または RET を含む融合物を生じる。ALK、ROS1、または RET を含む遺伝子再編成の非限定的な例は、例えば、以下に記載される：Sodaら Nature 2007 448561-6； Rikovaら Cell 2007 131: 1190-1203； Kohnoら Nature Medicine 2012 18: 375-7； Takouchiら Nature Medicine 2012 18: 378-81；これらは、それらの全体において本明細書に参考として援用される。しかし、再編成に関する第 2 の遺伝子の遺伝子再編成の精密な位置および何であるかが予め既知でなくてもよいこ

40

50

とは、認識されるべきである。よって、本明細書で記載される方法において、このような再編成の存在および何であるかは、遺伝子再編成に関する第2の遺伝子の再編成の位置または何であるかを知る必要なしに検出され得る。

【0171】

いくつかの実施形態において、その既知の標的配列は、ALK、ROS1、およびRETの群から選択される遺伝子に由来する配列を含み得る。

【0172】

いくつかの実施形態において、被験体における腫瘍から得られるサンプル中のALKの遺伝子再編成の存在は、その腫瘍が以下からなる群より選択される処置での処置に影響を受けやすいことを示し得る：ALKインヒビター；EGFR；クリゾチニブ(PF-02341066)；AP26113；LDK378；3-39；AF802；IPI-504；ASP3026；AP-26113；X-396；GSK-1838705A；CH5424802；ALKキナーゼ活性のジアミノおよびアミノピリミジンインヒビター(例えば、NVP-TAE684およびPF-02341066(例えば、Galkinら, Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104:270-275; Zouら, Cancer Res, 2007, 67:4408-4417; Hallberg and Palmer F1000 Med Reports 2011 3:21; Sakamotoら, Cancer Cell 2011 19:679-690; およびWO 04/079326で開示される分子を参照のこと)。前述の参考文献の全ては、それらの全体において本明細書に参考として援用される。ALKインヒビターは、ALKまたはその一部の発現および/またはキナーゼ活性を低減する任意の薬剤(ALKまたはその一部の発現および/または活性を低減する例えば、オリゴヌクレオチド、低分子、および/またはペプチドを含む)を含み得る。本明細書で使用される場合「未分化リンパ腫キナーゼ(anaplastic lymphoma kinase)」または「ALK」とは、代表的には野生型形態におけるニューロン調節に関する膜貫通チロシンキナーゼ(tyROS1ine kinase)をいう。ALK遺伝子およびmRNAのヌクレオチド配列は、多くの種(ヒトを含む)に関して公知である(例えば、NCBI Gene ID: 238の下で註釈されるとおり)。

【0173】

いくつかの実施形態において、被験体における腫瘍から得られるサンプル中のROS1の遺伝子再編成の存在は、腫瘍がROS1インヒビターおよび上記で記載されるとおりのALKインヒビター(例えば、クリゾチニブ)からなる群より選択される処置での処置に影響を受けやすいことを示し得る。ROS1インヒビターは、ROS1またはその一部の発現および/またはキナーゼ活性を低減する任意の薬剤(ROS1またはその一部の発現および/または活性を低減する、例えば、オリゴヌクレオチド、低分子、および/またはペプチドを含む)を含み得る。本明細書で使用される場合「c-ros発癌遺伝子1(c-ros oncogene 1)」または「ROS1」(当該分野ではros-1ともいわれる)とは、sevenlessサブファミリーの膜貫通チロシンキナーゼを指し、これは、PTPN6と相互作用する。ROS1遺伝子およびmRNAのヌクレオチド配列は、多くの種(ヒトを含む)に関して公知である(例えば、NCBI Gene ID: 6098の下で註釈されるとおり)。

【0174】

いくつかの実施形態において、被験体における腫瘍から得られるサンプル中のRETの遺伝子再編成の存在は、その腫瘍が以下からなる群より選択される処置での処置に影響を受けやすいことを示し得る：RETインヒビター；DP-2490、DP-3636、SUS5416；BAY 43-9006、BAY 73-4506(レゴラフェニブ)、ZD6474、NVP-AST487、ソラフェニブ、RPI-1、XL184、パンデタニブ、スニチニブ、イマチニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、モテサニブ、ゲフィチニブ、およびウイザフェリンA(例えば、Samadiら, Surgery 2010 148:1228-36; Cuccurull, JNCI 2004 13:1006-101

10

20

20

30

40

50

4 ; Akeno - Stuartら, Cancer Research 2007 67 : 6956 ; Grazmaら, J Clin Oncol 2010 28 : 15s 559 ; Mologniら, J Mol Endocrinol 2006 37 : 199 - 212 ; Calmomagnola, Journal NCI 2006 98 : 326 - 334 ; Mologni, Curr Med Chem 2011 18 : 162 - 175 ; ならびにWO 06/034833で開示される化合物；米国特許公開2011/0201598および米国特許第8,067,434号で開示される化合物を参照のこと）。前述の参考文献の全ては、それらの全体において本明細書に参考として援用される。RETインヒビターは、RETまたはその一部の発現および/またはキナーゼ活性を低減する任意の薬剤（RETまたはその一部の発現および/または活性を低減する、例えば、オリゴヌクレオチド、低分子、および/またはペプチドを含む）を含み得る。本明細書で使用される場合、「トランスフェクションの間に再編成（rearranged during transfection）」または「RET」とは、神経堤発生に関与し、グリア細胞由来神経栄養因子ファミリーシグナル伝達分子を認識するカドヘリンスーパー・ファミリーのレセプターチロシンキナーゼをいう。RET遺伝子およびmRNAのヌクレオチド配列は、多くの種（ヒトを含む）に関して公知である（例えば、NCBI Gene ID: 5979の下で註釈されるとおり）。

【0175】

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

【0176】

【表2-1】

表2. 既知の標的配列

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

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

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

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

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

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

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

10

20

30

40

50

【表2-5】

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

10

20

30

40

【0177】

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

【0178】

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

50

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

【0179】

10

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

20

【0180】

30

多重方法

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

40

【0181】

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

50

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

【0182】

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

【実施例】

【0183】

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

【0184】

実施例1：核酸サンプル調製

分析用の核酸サンプルを調製するための方法を図示するプロトコルの一例は、図1に示される。

【0185】

ビオチン化レセプター特異的プライマーを、サンプルRNAとアニールさせる。サーマルサイクラーを、65に加熱し、精製された全核酸またはRNA（20～250ng）を、レセプター特異的プライマーと合わせる前に氷上にある間に、ヌクレアーゼ非含有水と合わせる。次いで、そのサンプルを、サーマルサイクラーへと移し、加熱したふた（100）を用いて65において5分間インキュベートし、次いで、4で保持する。一旦終了した後、そのサンプルを氷上に少なくとも2分間置く。

【0186】

アニーリング後、その第1鎖cDNAを、逆転写酵素の作用によるレセプター特異的プライマーの伸長によって合成して、DNA/RNAハイブリッドを生成する。そのサンプルを、加熱したふた（100）付きのサーマルサイクラーの中で、50において30分間、続いて、80において20分間インキュベートし、次いで、4で保持する。

【0187】

その得られたDNA/RNAハイブリッドのRNA鎖を、リボヌクレアーゼの作用を介して部分的に分解し、これを、第2鎖合成反応のためのプライマーとして働くその第1鎖

にアニールされるRNAフラグメントを後ろに残す。その第2鎖cDNAを、DNA-P_{0.1I}とのインキュベーション後に、加熱したふた(100)付きのサーマルサイクラーの中で、16において60分間、続いて、75において20分間合成し、次いで、4で保持する。

【0188】

その2本鎖cDNAサンプルを、末端修復に供して、そのcDNAを平滑末端化し、その5'末端をリン酸化する。この工程では、過剰なT4DNAポリメラーゼおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを、十分なdNTPとともにそのサンプルに添加し、サーマルサイクラー(加熱したふたなし)の中で、25において30分間インキュベートさせた。そのDNAを、AMPure(登録商標)XPビーズ(2.5×)を使用するクリーンアップ工程に供する。そのビーズを、ボルテックスすることによって完全に再懸濁し、各反応に混合しながら添加して、均質な混合物を担保する。次いで、その反応を、5分間、室温(20~25)においてインキュベートする。次いで、そのチューブを遠心分離し、チューブ壁に対してそのビーズが完全にペレットにされることを担保するように、4分間磁石上に置く。その上清を、ビーズペレットを乱すことなく廃棄し、より大きな倍率を必要に応じて使用して、そのビーズを再度ペレットにする。そのビーズを、上清を廃棄する前に磁石上になおある間に、70%エタノールで30秒間洗浄する。その洗浄を2回反復する。最終洗浄後に、その認識できる上清の残余部分を完全に除去し、そのビーズを5分間、室温においてふたを開けたままにして乾燥させる。このことが核酸の全体的な収量を有意に減少させるほどには、そのビーズを過剰に乾燥するべきではない。そのビーズを10mMTris-HCl(pH8.0)中で再懸濁することによって、そのDNAを溶離する。次いで、そのチューブを磁石の上に戻して2分間置く。

10

20

30

【0189】

第1のライゲーション工程では、その精製したDNAを次いで、加熱したふた(100)付きのサーマルサイクラーの中で15分間、37においてインキュベートする間に、dAMPをそのDNA鎖の3'末端上に組み込むAテール付加反応に供し、次いで、4で保持する。次いで、その反応を遠心分離し、氷上に置く。

【0190】

そのAテール付加後に、そのサンプルを、上記の同じ手順に従ってAMPure(登録商標)XPビーズ(2.5×)を使用して清浄にする。そのDNAを、ヌクレアーゼ非含有水を使用して溶離する。

30

【0191】

第2のライゲーション工程では、特有のヌクレオチド配列または分子バーコード(MBC)を、サーマルサイクラー(加熱したふたなし)の中で15分間、25においてインキュベートした後に、DNAリガーゼの作用を介してそのDNAにライゲーションし、次いで、4で保持する。次いで、そのサンプルを、ストレプトアビジン被覆ビーズを使用して精製する。そのサンプルを、磁石の上に1分間またはそのビーズがペレットになるまで置く。その上清を、そのビーズペレットを乱すことなくピペットを使用して除去する。次いで、そのビーズを、ライゲーションクリーンアップ緩衝液(1MNaCl、1mM EDTA、0.1%Tween、10mMTris(pH8))中で再懸濁する。そのライゲーションしたDNA生成物(50μL)を、ライゲーションクリーンアップビーズ(合計100μLに対して50μL)と混合し、その反応物を、室温において5分間インキュベートし、続いて、混合し、さらに5分間インキュベートする。そのサンプルを遠心分離し、そのビーズがチューブ壁に対して完全にペレットにされることを担保するよう、磁石の上に1分間置く。その上清を、そのビーズを乱すことなく廃棄し、そのビーズをライゲーション緩衝液で洗浄し、磁石の上に1分間置く。そのスラリーがいったん清浄にされた後に、その上清を廃棄する。次いで、そのビーズを、緩衝液で2回洗浄し、次いで、ヌクレアーゼ非含有水で1回洗浄する。次いで、そのMBCアダプターが結合したビーズを、第1のPCR工程に関する構成要素の別個の混合物へと移す。

40

【0192】

50

第1のPCRラウンドを、第1の遺伝子特異的プライマーおよび第1のアダプタープライマーを使用して行う。その反応を氷上で維持し、その後、加熱したふた（100）付きのサーマルサイクラーの中で、表3に記載されるプログラムを使用して第1のPCRを行う。その反応がいったん4度に達した後、その反応物を短時間遠心分離し、氷上に置く。

【0193】

【表3】

表3: 第1のPCR反応に関するPCR条件

工程	温度(°C)	時間(分)	サイクル	10
1	95	3分間	1	
2	95	30秒		
3	65	3分間(100%傾斜率)	24	
4	72	3分間	1	
5	4	保持	1	

【0194】

次いで、そのPCR反応を、AMPure (登録商標) XPビーズ (1.2×) を使用して清浄にし、5分間、室温 (20~25) においてインキュベートする。次いで、そのチューブを短時間遠心分離し、そのビーズがチューブ壁に対して完全にペレットにされることを担保するように、磁石の上に4分間置く。その上清を、そのビーズペレットを乱すことなく廃棄する。次いで、そのチューブを、磁石上に残っている間に、70%エタノールで30秒間洗浄する。その洗浄を2回反復する。最終洗浄後に、その上清をピペットで除去し、そのチューブを3分間、室温において乾燥させる。このことが核酸の全体的な収量を有意に減少させるほどには、そのビーズを過剰に乾燥するべきではない。10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中でそのビーズを再懸濁することによって、そのDNAを溶離する。次いで、そのチューブを、磁石の上に2分間置き、その後、その上清を第2のPCR工程のための構成要素の別個の混合物に移す。

【0195】

第2のPCRラウンドは、第2の遺伝子特異的プライマーおよび第2のアダプタープライマーを使用して行われる。その第2のPCR工程は、P7-テールを組み込み、このテールは、図1に示されるように、その第2の遺伝子特異的プライマーの5'テール付加した領域として組み込まれる。インデックス1 (P7) タグの配列を表4に示す。

【0196】

【表4】

表4: インデックス1(P7)配列表

サンプル番号	Illumina インデックス1 P7/i7 配列	40
1	TAAGGCGA	
2	CGTACTAG	
3	AGGCAGAA	
4	TCCTGAGC	
5	GGACTCCT	
6	TAGGCATG	
7	CTCTCTAC	
8	CAGAGAGG	

【0197】

その第1のPCRから精製したライブラリーDNAを、その第2の遺伝子特異的プライ

50

マーおよび第2のアダプタープライマー、ならびにPCR構成要素と混合し、その第2のPCRを、表5に記載されるプログラムを使用して、加熱したふた(100)付きのサーマルサイクラーの中で行う。反応がいったん4に達した後に、その反応物を短時間遠心分離し、氷上に置く。

【0198】

【表5】

表5:第2のPCR反応に関するPCR条件

工程	温度(°C)	時間	サイクル
1	95	3分間	1
2	95	30秒間	
3	65	3分間(100%傾斜率)	6
4	72	3分間	1
5	4	保持	1

10

【0199】

次いで、そのPCR反応を、第1のPCR反応において概説した同じ手順に従って、AMPure (登録商標) XPビーズ(1.2×)を使用して清浄にする。そのビーズを10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中で再懸濁し、磁石の上で2分間インキュベートすることによって、そのDNAを溶離する。次いで、そのライプラリータグ化DNAを、貯蔵、定量、または正規化およびシーケンシングのために新たなPCRチューブに移す。

20

【0200】

実施例2:多様性および再現性

シーケンシング情報を、上記で記載される方法を使用する反復実験にわたって、種々の投入量(25 ng、100 ng、200 ng、400 ng、800 ng、および1600 ng)のサンプルから得た。図4に示されるように、反復実験間のクローン型重複は、投入量とともに増大する。複製サンプルのペアワイズ分析を、256,000リードからのデータを使用してさらに行つた。その結果(これは、そのアッセイの非常に再現性のある性質を示した)は、図5において800 ngおよび1600 ngの投入サンプルに関して示される。図6Aおよび6Bは、全クローン(図6A) 対 重複するクローン(図6B)の完全なサイドバイサイド分析(side-by-side analysis)を示す。図7は、多様性 対 サンプルサイズのプロット(上)および投入サイズによるShannon多様度指数のチャート(下)を示し、これらは、投入量が、観察の複雑性および多様性を決めるることを示す。

30

【0201】

図8~10に示されるように、Jurkat希釈シリーズを使用して、実験内および実験間の再現性を試験した。TCR: レセプターを発現するJurkat細胞株を、健康なドナー末梢血リンパ球(PBL) RNAに添加し、T細胞レセプター鎖(TRB)検出の限界を決定し、実験間アッセイバリエーションを評価した。PBL RNAへのJurkat全RNAの段階希釈を、二連において、1:10希釈~1:10,000[ng Jurkat / (ng Jurkat + ng PBL)]の範囲で行った。

40

【0202】

その段階希釈物を、1つの希釈あたり2つのアリコートに分け、そのライプラリーを調製し、シーケンシングした。図11の結果は、両方の実験間の強い相関を示す。

【0203】

全ライプラリーを、600,000に対して正規化し、重複排除し、誤差を較正した。その予測頻度を、1:10希釈物のクローン型頻度に10をかけて、その得られた数字をそれぞれの希釈係数で除算することによって決定した(例えば、係数 = 0.5 (1:10希釈) × 10 = 5.5 / 希釈係数 = 所定の希釈係数に関する実験的頻度)。

50

【0204】

実施例3：プライマー

図12は、T C R (/) レパートリーの分析に関する F F P E 最適化ストラテジーを示す。示されるように、逆転写酵素 (R T) プライマー結合部位は、定常ドメインエキソンの 5' 領域に相当する。その第1の P C R 遺伝子特異的プライマー (G S P) を、Jセグメントの 3' 領域または Jセグメント : Cエキソンの共通部分にわたる領域のいずれかに相当する領域に結合させるためにデザインする。その R T プライマーの 5' 末端から C D R 3 の 5' 末端までの平均距離は、100 塩基対未満である。プライマーのパネルを、T C R (/) および T C R (/) の免疫レパートリーシーケンシングのためにデザインし、それぞれ、表6 および表7 に列挙した。

10

【0205】

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表6:T細胞レセプター(β/γ)プライマーパネル

逆転写酵素プライマー	
プライマー名称	配列(改変ヌクレオチドを有する配列が各々の下に示される)
TRAC_RT_19_60.7_BI	CACTGGATTTAGAGTCTCTCAGC (配列番号 1)
OTIN_リデザイン	/52-Bio/C*ACTGGATTTAGAGTCTCTCAGC (配列番号 2)
	GAACACCTTGTTCAGGTCT (配列番号 3)
TRBC1_RT_2_59.8_ビ オチン	/52-Bio/G*AACACCTTGTTCAGGTCT (配列番号 4)
	GAACACGTTTTCAAGTCCTC (配列番号 5)
TRBC2_RT_1_59.8_ビ オチン	/52-Bio/G*AACACGTTTTCAAGTCCTC (配列番号 6)
	TCTTATATCCTTGGGGTAGAATTCC (配列番号 7)
TRDC_RT_37_59_ビオ チン	/52-Bio/T*CTTATATCCTTGGGGTAGAATTCC (配列番号 8)
	GGGAAACATCTGCATCAAGTTG (配列番号 9)
TRGC_RT_24_univ_60. 6_ビオチン	/52-Bio/G*GGAAACATCTGCATCAAGTTG (配列番号 10)
第1のPCR遺伝子特異的プライマー	
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)
	CAGGTCCTCTACAACTGTGAGTCTGG (配列番号 11)
TRBJ1-1*01_12_69.7	AGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGTCTCTACAACTGTGAGTCTGG (配列番号 12)
	GGTCCTCTACAAACGGTTAACCTGGTC (配列番号 13)
TRBJ1-2*01_3_70.1	AGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCTCTACAAACGGTTAACCTGGTC (配列番号 14)
	GGTCCTCTACAAACAGTGAGCCAACTT (配列番号 15)
TRBJ1-3*01_10_70.1	AGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCTCTACAAACAGTGAGCCAACTT (配列番号 16)
TRBJ1-4*01_11_70.1	GGTCCTCCAAGACAGAGAGCTGG (配列番号 17)

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

AGACGTGTGCTCTCCGATCTGGCCTCCAAGACAGAGAGCTGG (配列番号 18)		
GGTCCTCTAGGATGGAGAGTCGAGTC (配列番号 19)		
TRBJ1-5*01_9_70.4	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGGCCTCTAGGATGGAGAGTCGAGTC (配列番号 20)	10
GGTCCTCTGTCACAGTGAGCCTG (配列番号 21)		
TRBJ1-6_7_70.5	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGGCCTCTGTCACAGTGAGCCTG (配列番号 22)	
TCTAGCACGGTGAGCCGT (配列番号 23)		
TRBJ2-1*01_1_70.1	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTAGCACGGTGAGCCGT (配列番号 24)	20
CAGTACGGTCAGCCTAGAGCCTTC (配列番号 25)		
TRBJ2-2*01_6_70.0	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGTACGGTCAGCCTAGAGCCTTC (配列番号 26)	
TTCAGGTCCTCGAGCACTGTCAG (配列番号 27)		
TRBJ2-3*01_2_70.0	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTCAGGTCCCTCGAGCACTGTCAG (配列番号 28)	
TTCAGGTCCTCCAGCACTGAGAG (配列番号 29)		30
TRBJ2-4*01_2_69.5	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTCAGGTCCCTCAGCACTGAGAG (配列番号 30)	
CAGGTCCCTCGAGCACCAGGA (配列番号 31)		
TRBJ2-5*01_1_69.9	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGGTCCCTCGAGCACCAGGA (配列番号 32)	
TRBJ2-6*01_1_69.5	CAGCACGGTCAGCCTGCT (配列番号 33)	40

【表 6 - 3】

	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGCACGGTCAGCCTGCT (配列番号 34)	
	TTCAGGT CCTCTGTGACCGTGAG (配列番号 35)	
TRBJ2-7*01_2_69.7 9.5	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTCAGGT CCTCTGTGACCGTGAG (配列番号 36)	10
	ACATCTGCATCAAGTTGTTATCTGTGACAAC (配列番号 37)	
TRGJ1_2_C_Ex1_20_6 9.5	AGACGTGTGCTCTCCGATCTACATCTGCATCAAGTTGTTATCTGT GACAAC (配列番号 38)	
	TGTTTATCTGTAATGATAAGCTTGTTCCGGGA (配列番号 39)	20
TRGJP*01_C_Ex1_1_6 9.6	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTGTTATCTGTAATGATAAGCTTGTT CCGGGA (配列番号 40)	
	TCAGGTGAAGTTACTATGAGCTTAGTCCCT (配列番号 41)	
TRGJP1*01_C_Ex1_8 69.8	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGGTGAAGTTACTATGAGCTTAGT CCCT (配列番号 42)	
	GCGAAGTTACTATGAGCCTAGTCCCTT (配列番号 43)	30
TRGJP2*01_C_Ex1_5 69.3	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCGAAGTTACTATGAGCCTAGTCCCT T (配列番号 44)	

【0 2 0 6】

【表 7】

表7:T細胞レセプター(α/β)プライマーパネル

逆転写酵素プライマー	
プライマー名称	配列(改変ヌクレオチドを有する配列が各々の下に示される)
TRAC_RT_19_60.7_ビ オチン_リデザイン	CACTGGATTAGAGTCTCTCAGC(配列番号 1) /52-Bio/C*ACTGGATTAGAGTCTCTCAGC(配列番号 2)
TRBC1_RT_2_59.8_ビ オチン	GAACACCTTGTTCAGGTCCT(配列番号 3) /52-Bio/G*AACACCTTGTTCAGGTCCT(配列番号 4)
TRBC2_RT_1_59.8_ビ オチン	GAACACGTTTCAGGTCCTC(配列番号 5) /52-Bio/G*AACACGTTTCAGGTCCTC(配列番号 6)
TRDC_RT_37_59_ビオ チン	TCTTATATCCTGGGGTAGAATTCC(配列番号 7) /52-Bio/T*CTTATATCCTGGGGTAGAATTCC(配列番号 8)
TRGC_RT_24_univ_60. 6_ビオチン	GGGAAACATCTGCATCAAGTTG(配列番号 9) /52-Bio/G*GGAAACATCTGCATCAAGTTG(配列番号 10)
第1のPCR遺伝子特異的プライマー	
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)
TRAC_PCR_9_69	TCTCTCAGCTGGTACACGGCA(配列番号 45) AGACGTGTGCTCTCCGATCTCTCTCAGCTGGTACACGGCA (配列番号 46)
TRDC_PCR_21_69	TCACCAGACAAGCGACATTGTTCC(配列番号 47) AGACGTGTGCTCTCCGATCTCACCAAGACAAGCGACATTGTTCC (配列番号 48)

10

20

30

【0207】

そのB C R I g H プライマーパネルは、T C R パネルと比較して、クローン型(C D R 3)同定の他にいくつかのさらなる要件を有する。なぜならそのI g H パネルは、そのアイソタイプ(A、D、E、G、M)を決定し、サブクラスを選択するからである。そのクローンが体細胞超変異を受けたか否かもまた、決定する(Vセグメント分析)。そのI g H プライマー位置を、図13に示す。そのR T プライマーおよび第1のP C R 遺伝子特異的プライマーは、それぞれのアイソタイプ定常領域のC H 1 エキソンに相当する領域に結合して、選択されたアイソタイプサブクラスを区別する。プライマーのパネルを、B C R (I g H)およびB C R (I g K / I g L)の免疫レパートリーシーケンシングのためにデザインし、それぞれ、表8および表9に列挙した。

40

【0208】

50

【表 8 - 1】

表8:B細胞レセプター(IgH)プライマーパネル

逆転写酵素プライマー	
プライマー名称	配列(変異スクレオチドを有する配列が各々の下に示される)
IGHA_RT_4_59_ビオチン	GGCTCCTGGGGAAAGA(配列番号 49) /52-Bio/G*GCTCCTGGGGAAAGA(配列番号 50)
IGHD_RT_40_59_ビオチン	GTACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 51) /52-Bio/G*TACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 52)
IGHE_RT_33_60_ビオチン	AGTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 53) /52-Bio/A*GTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 54)
IGHG_RT_18_59_ビオチン	GACACCGTCACCGGTT(配列番号 55) /52-Bio/G*ACACCGTCACCGGTT(配列番号 56)
IGM_RT_27_58_ビオチン	GAAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 57) /52-Bio/G*AAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 58)
IGLC_RT_72_メジャー_60_ビオチン	TTGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 59) /52-Bio/T*TGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 60)
IGLC_RT_72_マイナー_59_ビオチン	ACGGGGCTGCCATCT(配列番号 61) /52-Bio/A*CGGGGCTGCCATCT(配列番号 62)
IGKC_RT_10_59_ビオチン	CAGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 63) /52-Bio/C*AGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 64)
逆転写酵素プライマー(代替デザイン1)	
プライマー名称	配列(変異スクレオチドを有する配列が各々の下に示される)
IGHA_RT_4_59_ビオチン	GGCTCCTGGGGAAAGA(配列番号 49) /52-Bio/G*GCTCCTGGGGAAAGA(配列番号 50)
IGHD_RT_40_59_ビオチン	GTACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 51) /52-Bio/G*TACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 52)
IGHE_RT_33_60_ビオチン	AGTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 53) /52-Bio/A*GTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 54)
IGHG_PCR_4_58_ビオチン	GGGAAGTAGTCCTTGACCA(配列番号 65) /52-Bio/G*GGAAAGTAGTCCTTGACCA(配列番号 66)
IGM_RT_27_58_ビオチン	GAAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 57) /52-Bio/G*AAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 58)
IGLC_RT_72_メジャー_60_ビオチン	TTGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 59)

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

IGLC_RT_72_マイナ -59_ビオチン	/52-Bio/T*TGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 60) ACGGGGCTGCCATCT(配列番号 61)
IGKC_RT_10_59_ビオ チン	/52-Bio/A*CGGGGCTGCCATCT(配列番号 62) CAGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 63)
第 1 の PCR 遺伝子特異的プライマー	/52-Bio/C*AGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 64)
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)
IGHA_PCR_4_69	AGGCTCAGCGGAAAGACCT(配列番号 67)
IGHA_PCR_4_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTAGGCTCAGCGGAAAGACCT (配列番号 68)
	CAGGGCTGTTATCCTTGGGTGTC(配列番号 69)
IGHD_PCR_27_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGGGCTGTTATCCTTGGGTGTC (配列番号 70)
	GAGGTGGCATTGGAGGGAATGT(配列番号 71)
IGHE_PCR_24_68	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGAGGTGGCATTGGAGGGAATGT (配列番号 72)
	TTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCA(配列番号 73)
IGHG_PCR_4_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTCGGGAAAGTAGTCCTTGACCA (配列番号 74)
	GGTTCTGGGAAGTAGTCCTTGACCA(配列番号 75)
IGHG_PCR_4_マイナ -69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGGTTCTGGGAAGTAGTCCTTGACCA (配列番号 76)
	TCGTATCCGACGGGAATTCTCAC(配列番号 77)
IGM_PCR_17_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCGTATCCGACGGGAATTCTCAC (配列番号 78)
	TGCTCATCAGATGGCGGAAAGAT(配列番号 79)
IGKC_PCR_22_70	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCTCATCAGATGGCGGAAAGAT (配列番号 80)
	CCTTGTGGCTTGAAGCTCCTCA(配列番号 81)
IGLC_PCR_17_メジャ -69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCCTTGTGGCTTGAAGCTCCTCA (配列番号 82)
	CTTGTGGCTTGGAGCTCCTCA(配列番号 83)
IGLC_PCR_17_マイナ -68	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTGTGGCTTGGAGCTCCTCA (配列番号 84)
第 1 の PCR 遺伝子特異的プライマー (代替デザイン 1)	
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)
IGHA_PCR_4_69	AGGCTCAGCGGAAAGACCT(配列番号 67)

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

	AGACGTGTGCTCTCCGATCTAGGCTCAGCGGAAAGACCT (配列番号 68)	
	CAGGGCTGTTATCCTTGGGTGTC(配列番号 69)	
IGHD_PCR_27_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGGGCTGTTATCCTTGGGTGTC (配列番号 70)	
	GAGGTGGCATTGGAGGAAATGT(配列番号 71)	
IGHE_PCR_24_68	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGAGGTGGCATTGGAGGAAATGT (配列番号 72)	10
	CCCAGAGGTGCTTGGAGGAG(配列番号 85)	
IGHG1_p38_70.2	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCCCAGAGGTGCTTGGAGGAG (配列番号 86)	
	GCTGTGCTCTGGAGGTGCT(配列番号 87)	
IGHG2_4_p48_71.1	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGCTCTGGAGGTGCT (配列番号 88)	
	CGGAGGTGCTCCTGGAGCA(配列番号 89)	
IGHG3_p40_70.6	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGGAGGTGCTCCTGGAGCA (配列番号 90)	20
	TCGTATCCGACGGGAATTCTCAC(配列番号 77)	
IGM_PCR_17_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCGTATCCGACGGGAATTCTCAC (配列番号 78)	
第 1 の PCR 遺伝子特異的プライマー (代替デザイン 2)		
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)	
	GCGA/ideoxyI/GACCACGTTCCCATCT(配列番号 91)	
IGHA_ユニバーサル	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCGA/ideoxyI/GACCACGTTCCCATCT (配列番号 92)	
	GCGATGACCACGTTCCCATCT(配列番号 93)	
IGHA1_p54_69.0	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCGATGACCACGTTCCCATCT (配列番号 94)	30
	GCGATGACCACGTTCCCATCTG(配列番号 95)	
IGHA1_p54_69.7	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCGATGACCACGTTCCCATCTG (配列番号 96)	
	GCGACGACCACGTTCCCATCT(配列番号 97)	
IGHA2_p54_71.1	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCGACGACCACGTTCCCATCT (配列番号 98)	
	GCGACGACCACGTTCCCATC(配列番号 99)	
IGHA2_p54_70	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCGACGACCACGTTCCCATC	40

【表 8 - 4】

(配列番号 100)	
TTCCCATCTGGCTGGGTGCT(配列番号 101)	
IGHA1_p43_70.1	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTCCCATCTGGCTGGGTGCT (配列番号 102)
TTCCCATCTGGGGGTGCT(配列番号 103)	
IGHA2_p43_70.2	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTCCCATCTGGGGGTGCT (配列番号 104)
第1のPCR 遺伝子特異的プライマー(代替デザイン3)	
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)
	CAGGGCTGTTATCCTTGGGTGTC(配列番号 69)
IGHD_PCR_27_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCAGGGCTGTTATCCTTGGGTGTC (配列番号 70)
	GAGGTGGCATTGGAGGAAATGT(配列番号 71)
IGHE_PCR_24_68	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGAGGTGGCATTGGAGGAAATGT (配列番号 72)
	CCAGAGGTGCTTTGGAGGAG(配列番号 85)
IGHG1_p38_70.2	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCCAGAGGTGCTTTGGAGGAG (配列番号 86)
	GCTGTGCTCTGGAGGTGCT(配列番号 87)
IGHG2_4_p48_71.1	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGCTGTGCTCTGGAGGTGCT (配列番号 88)
	CGGAGGTGCTCCTGGAGCA(配列番号 89)
IGHG3_p40_70.6	AGACGTGTGCTCTCCGATCTGGAGGTGCTCCTGGAGCA (配列番号 90)
	TCGTATCCGACGGGAATTCTCAC(配列番号 77)
IGM_PCR_17_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCGTATCCGACGGGAATTCTCAC (配列番号 78)

【0 2 0 9】

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表9: B細胞レセプター(IgK/IgL)プライマーパネル

逆転写酵素プライマー	
プライマー名称	配列(変異ヌクレオチドを有する配列が各々の下に示される)
IGHA_RT_4_59_ビオチン	GGCTCCTGGGGGAAGA(配列番号 49) /52-Bio/G*GCTCCTGGGGGAAGA(配列番号 50)
IGHD_RT_40_59_ビオチン	GTACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 51) /52-Bio/G*TACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 52)
IGHE_RT_33_60_ビオチン	AGTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 53) /52-Bio/A*GTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 54)
IGHG_RT_18_59_ビオチン	GACACCGTCACCGGTT(配列番号 55) /52-Bio/G*ACACCGTCACCGGTT(配列番号 56)
IGM_RT_27_58_ビオチン	GAAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 57) /52-Bio/G*AAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 58)
IGLC_RT_72_メジャー_60_ビオチン	TTGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 59) /52-Bio/T*TGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 60)
IGLC_RT_72_マイナー_59_ビオチン	ACGGGGCTGCCATCT(配列番号 61) /52-Bio/A*CGGGGCTGCCATCT(配列番号 62)
IGKC_RT_10_59_ビオチン	CAGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 63) /52-Bio/C*AGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 64)
逆転写酵素プライマー(代替デザイン 1)	
プライマー名称	配列(変異ヌクレオチドを有する配列が各々の下に示される)
IGHA_RT_4_59_ビオチン	GGCTCCTGGGGGAAGA(配列番号 49) /52-Bio/G*GCTCCTGGGGGAAGA(配列番号 50)
IGHD_RT_40_59_ビオチン	GTACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 51) /52-Bio/G*TACCCAGTTATCAAGCATGC(配列番号 52)
IGHE_RT_33_60_ビオチン	AGTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 53) /52-Bio/A*GTCACGGAGGTGGCAT(配列番号 54)
IGHG_PCR_4_58_ビオチン	GGGAAGTAGTCCTTGACCA(配列番号 65) /52-Bio/G*GGAAAGTAGTCCTTGACCA(配列番号 66)
IGM_RT_27_58_ビオチン	GAAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 57) /52-Bio/G*AAGGAAGTCCTGTGCGA(配列番号 58)
IGLC_RT_72_メジャー_60_ビオチン	TTGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 59)

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

	/52-Bio/T*TGACGGGGCTGCTATCT(配列番号 60)	
IGLC_RT_72_マイナ _59_ビオチン	ACGGGGCTGCCATCT(配列番号 61)	
	/52-Bio/A*CGGGGCTGCCATCT(配列番号 62)	
IGKC_RT_10_59_ビオ チン	CAGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 63)	
	/52-Bio/C*AGATTCAACTGCTCATCAGA(配列番号 64)	
第 1 の PCR 遺伝子特異的プライマー		
プライマー名称	配列(テールを有する配列が各々の下に示される)	10
	TGCTCATCAGATGGCGGGAAAGAT(配列番号 79)	
IGKC_PCR_22_70	AGACGTGTGCTCTCCGATCTTGCTCATCAGATGGCGGGAAAGAT(配 列番号 80)	
	CCTTGTGGCTTGAAGCTCCTCA(配列番号 81)	
IGLC_PCR_17_メジャ ー_69	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCCTGTGGCTTGAAGCTCCTCA(配列 番号 82)	
	CTTGTGGCTTGGAGCTCCTCA(配列番号 83)	
IGLC_PCR_17_マイナ ー_68	AGACGTGTGCTCTCCGATCTCTTGTGGCTTGGAGCTCCTCA(配列 番号 84)	20

【0210】

表 6 ~ 9 の中の R T プライマーのヌクレオチド配列は代わりに、 I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s (I D T) 命名法に従う表記法で示される改変とともに列挙される(ここで「*」は、配列中の「*」の前にあるヌクレオチドと「*」の後ろにあるヌクレオチドとの間のホスホロチオエート結合を示し、「/ 5 2 - B i o /」は、5' 二重ビオチン部分を示す)。図 14 は、最も 5' 側の塩基(「A」)と最も 5' 側から 2 番目の塩基(「C」)との間のホスホロチオエート結合とともに、最も 5' 側の塩基に連結した 5' 二重ビオチン部分を有する R T プライマーの一例を示す。その二重ビオチン部分は、 R T の生成物の選択を可能にし、より高い捕捉効率を担保する。しかし、1 個のビオチンを使用することも可能である。ホスホロチオエート連結は、そのビオチン含有塩基が除去されないことを担保するために、エキソヌクレアーゼによる分解を防止する。

【0211】

均等物

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

な特徴、システム、物品、物質、キット、および／または方法の任意の組み合わせは、このような特徴、システム、物品、物質、キット、および／または方法が相互に矛盾しなければ、本開示の発明の範囲内に含まれる。

【0212】

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

【0213】

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

10

【0214】

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

【0215】

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

20

【0216】

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

30

【0217】

本明細書においておよび特許請求の範囲においてここに使用される場合、1つまたはこれより多くの要素のリストへの言及において語句「少なくとも1（at least one）」とは、要素のリスト中にある要素のうちのいずれか1つまたはこれより多くから選択される少なくとも1つの要素を意味すると理解されるべきであるが、要素のリスト内に具

40

50

体的に列挙される各要素およびあらゆる要素のうちの少なくとも 1 を必ずしも含むわけではなく、要素のリスト中にある要素の任意の組み合わせを排除しない。この定義はまた、具体的に識別されるそれら要素に関連しようが関連しまいが、要素のリスト（これに対して文言「少なくとも 1 」が指す）内で具体的に識別される要素以外の要素が必要に応じて存在し得ることを可能にする。従って、非限定的な例としては、「A および B のうちの少なくとも一方 (at least one of A and B)」（または、等しくは、「A または B のうちの少なくとも一方 (at least one of A or B)」、または、等しくは、「A および / または B のうちの少なくとも一方 (at least one of A and / or B)」は、一実施形態において、少なくとも 1 つの（必要に応じて、1 つより多くのを含む）A であって B は存在しない（および必要に応じて、B 以外の要素を含む）に；別の実施形態において、少なくとも 1 つの（必要に応じて、1 つより多くのを含む）B であって、A は存在しない（および必要に応じて、A 以外の要素を含む）；さらに別の実施形態において、少なくとも 1 つの（必要に応じて、1 つより多くのを含む）A、および少なくとも 1 つの（必要に応じて、1 つより多くのを含む）B（および必要に応じて、他の要素を含む）；などを指し得る。

【0218】

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

【0219】

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

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

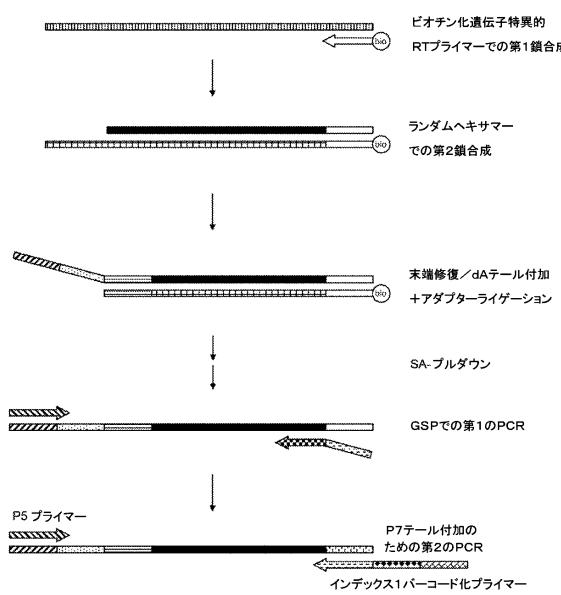


FIG. 1

【図 2】

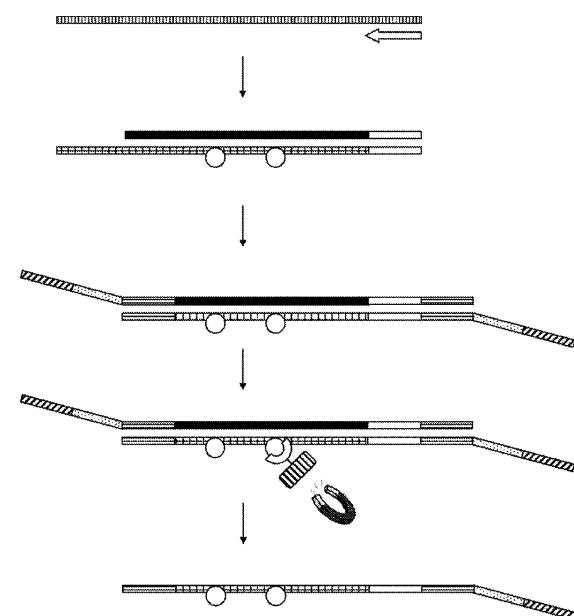


FIG. 2

10

20

30

40

【図 3】

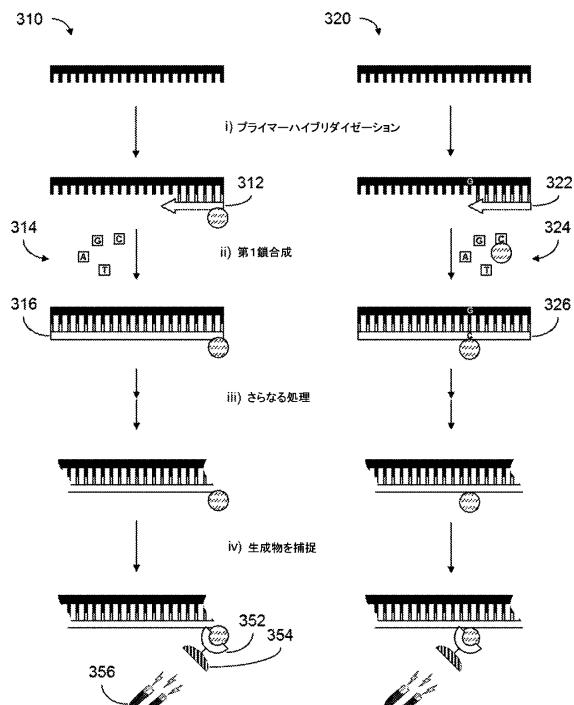


FIG. 3

【図 4】

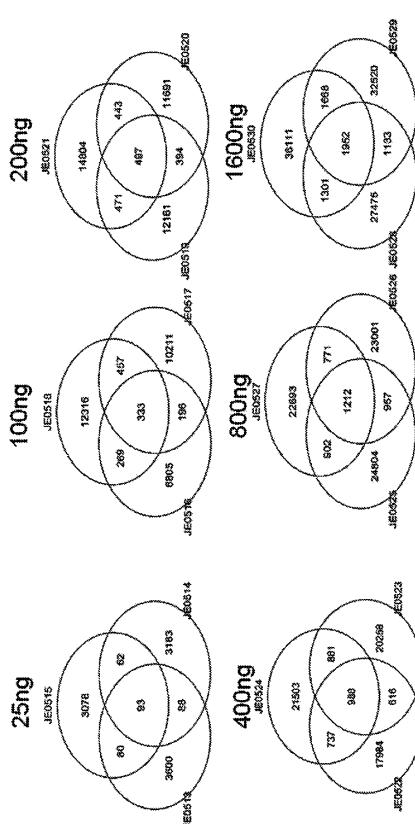


FIG. 4

10

20

30

40

50

【図5】

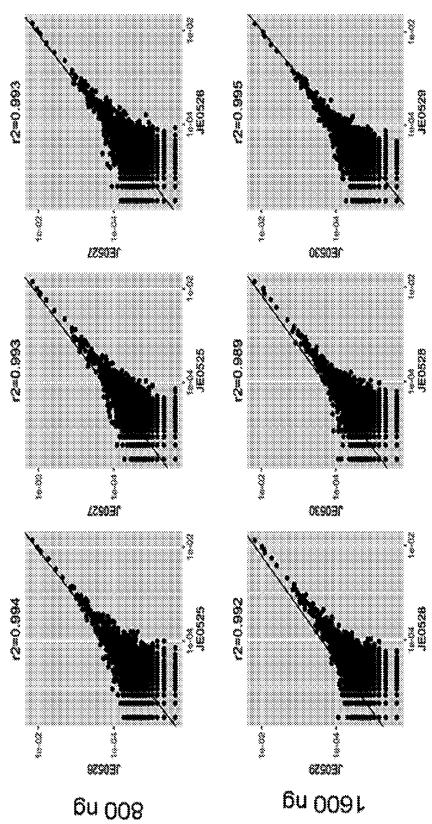


FIG. 5

【図 6 A】

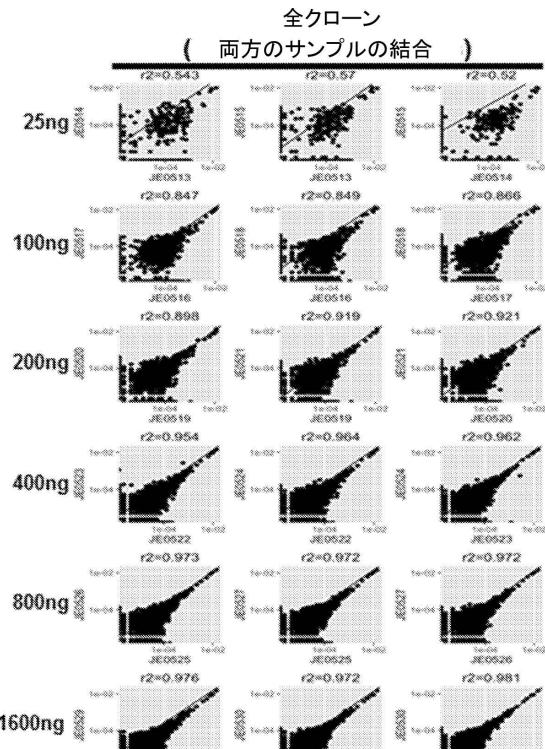


FIG. 6A

【図 6 B】

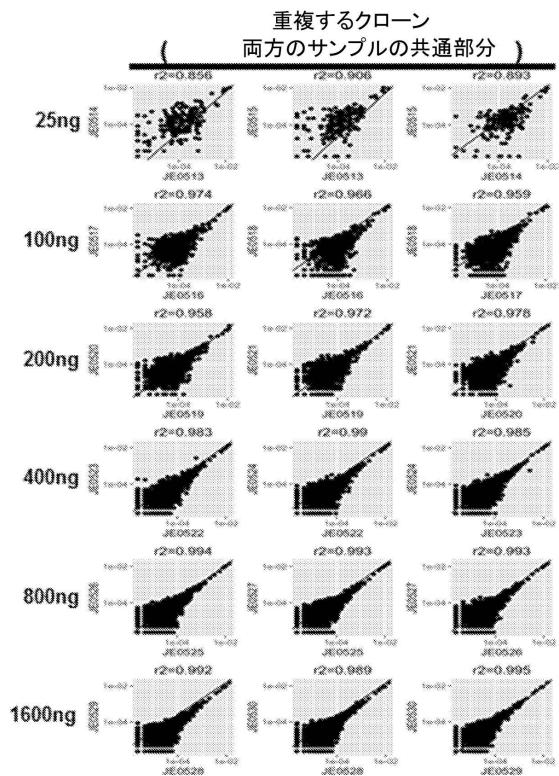
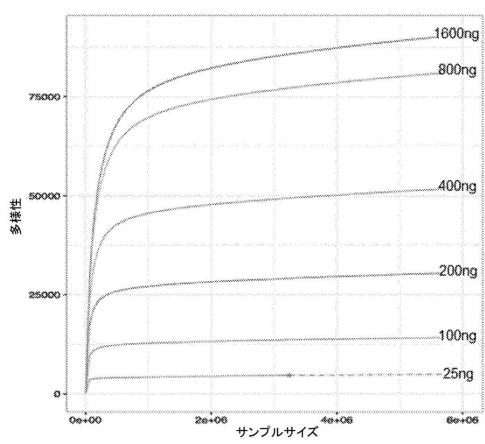


FIG. 6B

【図7】



投入 [mg]	Shannon 多様度指數
25	7.2
100	7.8
200	8.0
400	8.2
800	8.4
1600	8.6

FIG. 7

【図 8】

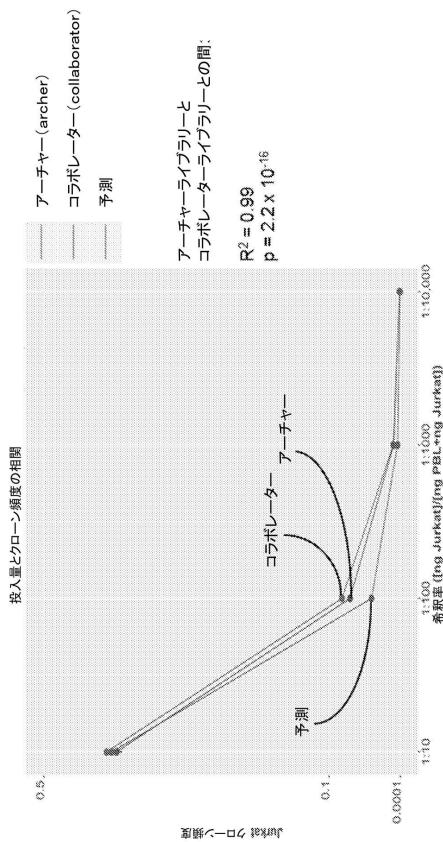


FIG. 8

【図 9】

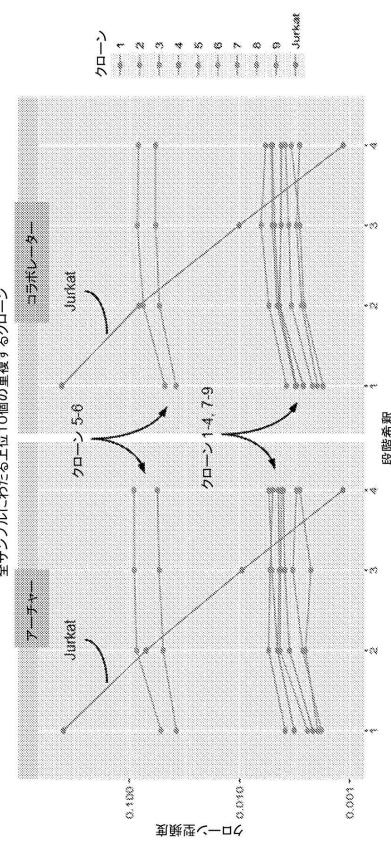


FIG. 9

10

20

30

【図 10】

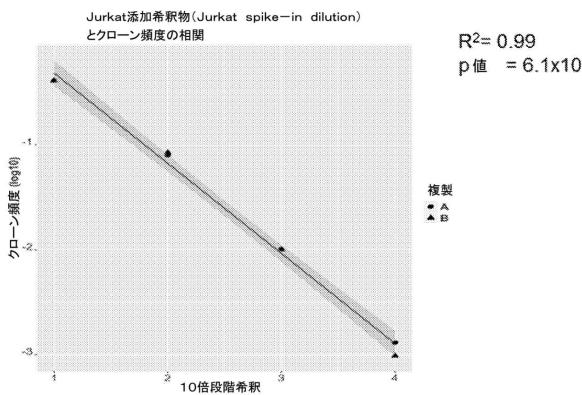


FIG. 10

【図 11】

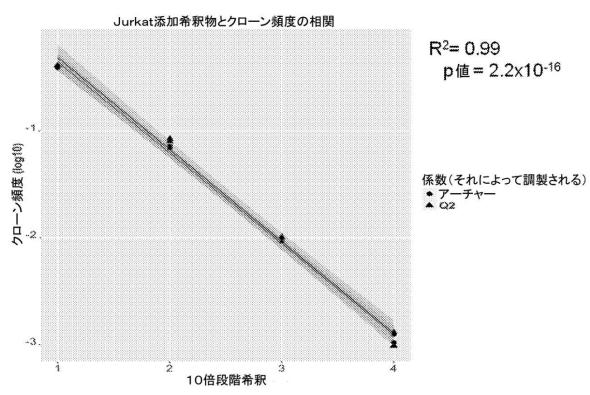


FIG. 11

40

50

【図 1 2】

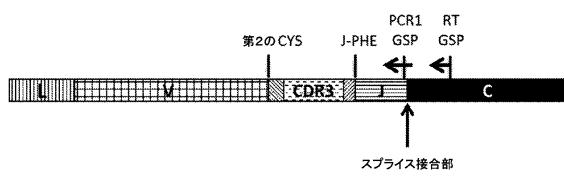


FIG. 12

【図 1 3】

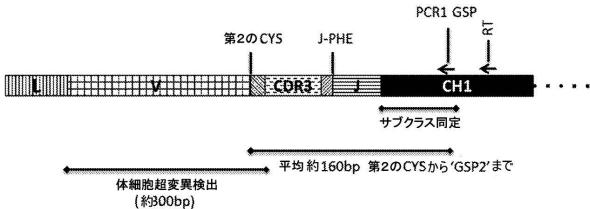
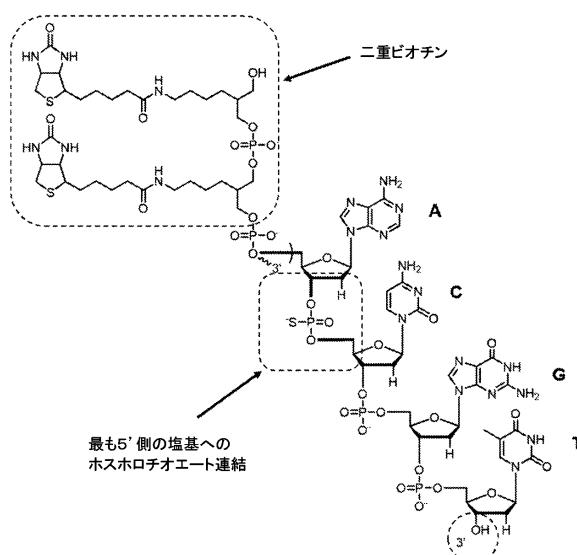


FIG. 13

10

【図 1 4】



20

FIG. 14

30

【配列表】

0007161991000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 19/34

A

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マイヤーズ, ジェイソン

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボルダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202

(72)発明者 スタール, ジョシュア

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボルダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202

(72)発明者 カルバー, ブレイディ

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボルダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202

(72)発明者 クドロー, ブライアン

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボルダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202

(72)発明者 エバーライン, ジェンス

アメリカ合衆国 コロラド 80301, ボルダー, 55ティーエイチ ストリート 2477,
スイート 202

審査官 中村 俊之

(56)参考文献 特表2015-517307 (JP, A)

特表2002-537817 (JP, A)

国際公開第2016/044227 (WO, A1)

国際公開第2015/200334 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 1 2 Q 1/00 - 3/00

C 1 2 P 19/34

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d