

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-532079

(P2023-532079A)

(43)公表日 令和5年7月26日(2023.7.26)

| | | |
|-------------------------|----------------|-------------------|
| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード(参考) |
| C 1 2 Q 1/6851(2018.01) | C 1 2 Q 1/6851 | Z Z N A 4 B 0 6 3 |
| C 4 0 B 40/06 (2006.01) | C 4 0 B 40/06 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全25頁)

| | | | |
|-------------------|---|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願2022-580775(P2022-580775) | (71)出願人 | 500358711 イルミナ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イルミナ ウェイ 5 2 0 0 |
| (86)(22)出願日 | 令和3年7月2日(2021.7.2) | (74)代理人 | 100106518 弁理士 松谷 道子 |
| (85)翻訳文提出日 | 令和5年1月20日(2023.1.20) | (74)代理人 | 100132263 弁理士 江間 晴彦 |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2021/040245 | (72)発明者 | ウー, イア - シュアン アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニ ア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0、イルミナ・インコーポレイテッ ド |
| (87)国際公開番号 | WO2022/006495 | (72)発明者 | ゴルベ - ヤサル, フィリス |
| (87)国際公開日 | 令和4年1月6日(2022.1.6) | | |
| (31)優先権主張番号 | 63/047,817 | | |
| (32)優先日 | 令和2年7月2日(2020.7.2) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| (81)指定国・地域 | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く | | 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 フローセルにおける核酸ライブラリ播種効率を校正する方法

(57)【要約】

本開示は、フローセルにおけるポリヌクレオチド播種効率を校正する方法を提供する。

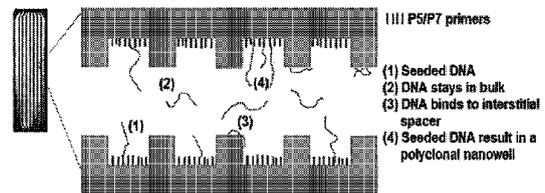


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率を評価する方法であって、

フローセルにポリヌクレオチドを少なくとも 1 分間播種することと、

(i) 前記フローセルを、播種されたポリヌクレオチドに結合するか、若しくはそれに組み込む標識剤と接触させ、前記フローセルに存在する標識の量を判定し、それによって前記播種効率を判定すること、あるいは

(i i) 上清を回収して、工程 (a) 又は (b) :

(a) q P C R 及び / 若しくは液滴 P C R を使用して、前記上清中の前記ポリヌクレオチドを増幅する工程、又は

(b) 第 2 のフローセルを使用して、前記上清を再播種し、前記ポリヌクレオチドのブリッジ増幅後に生成されたクラスタをカウントする工程、を使用することによって、前記上清中の前記ポリヌクレオチドを定量化し、

(c) 前記上清中で定量化された前記ポリヌクレオチドの数と前記フローセルに播種するために使用された前記ポリヌクレオチドの数とを比較することによって、前記フローセルの播種効率を判定することと、を含む、方法。

10

【請求項 2】

フローセルの 1 つのチャンネルが、ポリヌクレオチド播種効率について評価される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

フローセルの 2 つ以上のチャンネルが、ポリヌクレオチド播種効率について評価される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記フローセルが、前記フローセルの表面に結合した複数のプライマーを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記結合したプライマーが、配列番号 1 の配列を有する P 5 プライマーを含み、及び / 又は配列番号 2 の配列を有する P 7 プライマーである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記複数のプライマーが、前記フローセルの表面にランダムに結合している、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記複数のプライマーが、フローセルの特定の領域に結合している、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記複数のプライマーが、前記フローセル表面上にパターン化されているウェルのアレイの表面に結合している、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記フローセルが、次世代配列決定デバイスで使用される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記ポリヌクレオチドが、アダプタを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記アダプタが、ブリッジ P C R 適合性である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ポリヌクレオチドが、D N A ライブラリを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 D N A ライブラリが、ライブラリ調製キットを使用して生成される、請求項 12 に

50

記載の方法。

【請求項 14】

前記 DNA ライブラリが、

(A) 同時に断片化して、トランスポソームを使用して単離 DNA にプライマーを付加する工程と、

(B) 低減サイクル PCR を使用して、前記断片化された DNA を増幅する工程であって、前記 PCR 増幅プライマーが、インデックス及びアダプタ配列を含む、工程と、

(C) 前記増幅された DNA 断片を洗浄及びプールして、DNA ライブラリを形成する工程と、を含む、方法に従って調製される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記トランスポソームが、ビーズに連結している、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 DNA ライブラリが、ヒト対象から単離されたゲノム DNA から生成される、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドが、前記フローセルに 5 分 ~ 60 分間播種される、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記ポリヌクレオチドが、前記フローセルに 10 分 ~ 40 分間播種される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 qPCR が、蛍光のレベルに基づく二本鎖増幅産物の定量化を可能にする二本鎖結合色素を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記二本鎖結合色素が、SYBR (登録商標) Green I、BRYT Green (登録商標) Dye、PicoGreen、YOYO-1 ヨウ化物、及び SYBR (登録商標) Gold から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 qPCR が、蛍光レポータ及び DNA 鋳型に結合するクエンチャ分子で標識される配列特異的プローブを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記クエンチャ分子が、複数の波長にわたって光を吸収し、光を放出しないダーククエンチャである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ダーククエンチャが、Dabsyl、Black Holeクエンチャ、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、IRDye QC-1、及び Qx1クエンチャから選択される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記上清中の前記ポリヌクレオチドを定量化するために使用される前記第 2 のフローセルが、ポリヌクレオチドが播種されている前記フローセルとは異なる、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 2 のフローセルが、ラン当たり最大 12 Gb の配列データを提供し、ポリヌクレオチドが播種されている前記フローセルが、ラン当たり最大 120 Gb の配列データを提供する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記方法が、同じ濃度のポリヌクレオチドを用いて、しかし異なる播種時間長で播種したフローセルを使用して複数回実施される、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

10

20

30

40

50

ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率が、時間経過的に様々な時点にわたって評価される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記標識剤が、ポリメラーゼによって、播種されたポリヌクレオチドに組み込まれている標識された dNTP を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記標識剤が、播種されたポリヌクレオチド上の相補的オリゴヌクレオチドに結合する標識されたナノ粒子又は標識された dendrimer を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記標識剤が、播種されたポリヌクレオチドに対する標識されたアダプタ又は標識された相補的オリゴを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 31】

前記標識剤が、播種されたポリヌクレオチドの末端から成長した標識された構造を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

前記標識が、発光又は蛍光検出可能な標識である、請求項 1 又は 28 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記播種効率が不十分である場合、前記フローセルが再播種され、前記播種効率が再び測定される、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 34】

ポリヌクレオチドの改善された播種効率を有するフローセル表面を操作するための、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、2020年7月2日に出願された米国特許仮出願第 63 / 047, 817 号に対する優先権を主張するものである。

【0002】

本開示は、フローセルにおけるポリヌクレオチド播種効率を較正する方法を提供する。 30

【背景技術】

【0003】

配列決定（シーケンシング）のためのフローセルは、小さな流体チャネルを含有するスライドガラスであり、そのチャネルを通してポリメラーゼ、dNTP、及び緩衝液を循環させることができる。チャネル内部のガラスは、標的核酸上のアダプタ配列に相補的な短いオリゴヌクレオチドで装飾される。アダプタを含有する標的核酸を希釈し、これらのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせ、個々の DNA 鎖をフローセル上に一時的に固定化する（「ポリヌクレオチド播種」）。次いで、例えば、プライマー伸長、その後の化学変性のサイクルを用いた「ブリッジ-PCR」ストラテジを使用して、ライブラリ鎖を増幅する。インサイチュ増幅プロセスを通して、鎖は、数千単位で増幅される。標的核酸は、低モル量（6 ~ 20 pM）でフローセルにハイブリダイズする。これにより、鋳型 DNA 鎖間の物理的分離が大きくなる。増幅の終わりに、同一の DNA の小さなクラスターは、2D 表面に固定化された分子として残され、まとめて配列決定され得る。 40

【発明の概要】

【0004】

フローセルにおけるポリヌクレオチド播種の効率は、典型的には、最終的なクラスター数をカウントすることによって判定される。本開示は、フローセルにおけるポリヌクレオチド播種の効率を判定するための新たな、かつ改善された方法を提供する。

【0005】

本開示は、ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率を評価する方法であって、フローセルにポリヌクレオチドを少なくとも1分間播種することと、(i)フローセルを、播種されたポリヌクレオチドに結合するか、若しくはそれに組み込む標識剤と接触させ、フローセルに存在する標識の量を判定し、それによって播種効率を判定すること、あるいは(ii)上清を回収して、工程(a)又は(b):工程(a)又は(b):(a)qPCR及び/若しくは液滴PCRを使用して上清中のポリヌクレオチドを増幅する工程、又は(b)第2のフローセルを使用して上清を再播種し、ポリヌクレオチドのブリッジ増幅後に生成されたクラスタをカウントする工程、を使用することによって、上清中のポリヌクレオチドを定量化し、(c)上清中で定量化されたポリヌクレオチドの数とフローセルに播種するために使用されたポリヌクレオチドの数とを比較することによってフローセルの播種効率を判定することと、を含む、方法を提供する。一実施形態では、標識剤は、ポリメラーゼによって、播種されたポリヌクレオチドに組み込まれている標識されたdNTPを含む。別の実施形態では、標識剤は、播種されたポリヌクレオチド上の相補的オリゴヌクレオチドに結合する標識されたナノ粒子又は標識されたデンドリマーを含む。更に別の実施形態では、標識剤は、播種されたポリヌクレオチドに対する標識されたアダプタ又は標識された相補的オリゴを含む。更に別の実施形態では、標識剤は、播種されたポリヌクレオチドの末端から成長した標識された構造を含む。別の又は更なる実施形態では、標識は、発光又は蛍光検出可能な標識である。

10

【0006】

一実施形態では、方法は、表面上に捕捉されずにバルク播種溶液中に残るポリヌクレオチドを見ることによって、播種効率を判定する。播種プロセスの終わりにフローセルチャンネルから上清を回収して分析することによって、播種プロセスに関するより詳細な情報を判定することができる。本明細書に開示する方法は、パターン化フローセル上の播種を確認するために特に有用であり、この場合、クラスタ数は、限定されないが、(1)多クローン性、(2)事前増幅複製、及び(3)ウェル間の間質領域でのライブラリ吸着に起因して播種されたポリヌクレオチドの数と直接相関しない。

20

【0007】

特定の実施形態では、本開示は、ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率を評価するための方法であって、フローセルにポリヌクレオチドを少なくとも1分間播種して、上清を回収することと、工程(a)又は(b)を使用することによって上清中のポリヌクレオチドを定量化することであって、(a)が、qPCR及び/若しくは液滴PCRを使用して上清中のポリヌクレオチドを増幅することを含み、又は(b)が、第2のフローセルを使用して上清を再播種し、ポリヌクレオチドのブリッジ増幅後に生成されたクラスタをカウントすることを含む、定量化することと、上清中で定量化されたポリヌクレオチドの数とフローセルに播種するために使用されたポリヌクレオチドの数とを比較することによってフローセルの播種効率を判定することと、を含む、方法を提供する。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、フローセルの1つのチャンネルが、ポリヌクレオチド播種効率について評価される。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、フローセルの2つ以上のチャンネルが、ポリヌクレオチド播種効率について評価される。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、フローセルは、フローセルの表面に結合した複数のプライマーを含む。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、結合したプライマーは、配列番号1の配列を有するP5プライマーを含み、及び/又は配列番号2の配列を有するP7プライマーである。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、複数のプライマーは、フローセルの表面にランダムに結合している。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、複数のプライマーは、フローセルの特定の領域に結合している。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、複数のプライマーは、フローセル表面上にパターン化されているウェルのアレイの表面に結合している。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、フローセルは、次世代配列決定デバイスで使用される。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、ポリ

30

40

50

ヌクレオチドは、アダプタを含む。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、アダプタは、ブリッジPCR適合性である。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAライブラリを含む。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、DNAライブラリは、ライブラリ調製キットを使用して生成される。本明細書に開示するいずれかの実施形態の更なる実施形態では、DNAライブラリは、(A)同時に断片化して、トランスポソームを使用して単離DNAにプライマーを付加する工程と、(B)低減サイクルPCRを使用して、断片化されたDNAを増幅する工程であって、PCR増幅プライマーが、インデックス及びアダプタ配列を含む、工程と、(C)増幅されたDNA断片を洗浄及びプールして、DNAライブラリを形成する工程と、を含む、方法に従って調製される。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、トランスポソームは、ビーズに連結している。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、DNAライブラリは、ヒト対象から単離されたゲノムDNAから生成される。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、ポリヌクレオチドは、フローセルにおいて5分～60分間播種される。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、ポリヌクレオチドは、フローセルにおいて10分間～40分間播種される。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、qPCRは、蛍光のレベルに基づく二本鎖増幅産物の定量化を可能にする二本鎖結合色素を使用することを含む。二本鎖結合色素の例としては、SYBR(登録商標)Green I、BRYT Green(登録商標)Dye、PicoGreen、YOYO-1ヨウ化物、及びSYBR(登録商標)Goldが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、qPCRは、蛍光レポート及びDNA鑄型に結合するクエンチャ分子で標識される配列特異的プローブを含む。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、クエンチャ分子は、複数の波長にわたって光を吸収し、光を放出しないダーククエンチャである。ダーククエンチャの例としては、Dabsyl、Black Holeクエンチャ、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、IRDye QC-1、及びQx1クエンチャが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、上清中のポリヌクレオチドを定量化するために使用される第2のフローセルは、ポリヌクレオチドが播種されているフローセルとは異なる。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、第2のフローセルは、ラン当たり最大12Gbの配列データを提供し、ポリヌクレオチドが播種されているフローセルは、ラン当たり最大120Gbの配列データを提供する。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、方法は、同じ濃度のポリヌクレオチドを用いて、しかし播種時間長で播種したフローセルを使用して複数回実施される。本明細書に開示する別の又は更なる実施形態では、ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率は、時間経過的に様々な時点にわたって評価される。

【0008】

ある特定の実施形態では、本開示は、ポリヌクレオチドの改善された播種効率を有するフローセル表面の操作のための本明細書に開示する方法の使用を提供する。

【0009】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細が、添付の図面及び以下の説明に記載されている。他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】パターン化フローセルにおけるDNA播種プロセスの図解を提供する。DNA分子の複数の目的により、播種プロセスを較正するための最も効果的な方法は、上清を回収し、それを分析することである。

【図2】(1)既知の濃度ライブラリをフローセルに装填する工程、(2)ライブラリを播種する工程、及び(3)定量化のために残りの上清を除去する工程を含む実験ワークフローの実施形態を提供する。

【図 3】ライブラリ播種効率を定量化するための 2 つの方法：(a) q P C R 又は液滴 P C R、及び (b) M i s e q フローセル上の上清の再播種を図示する。

【図 4 A】M i s e q フローセルを使用したライブラリ播種の定量化結果を示す。5 分間の播種後にパターンフローセルから播種されていない残りのライブラリが、通常のフローセルからの残りよりもはるかに多いことを示す。

【図 4 B】M i s e q フローセルを使用したライブラリ播種の定量化結果を示す。5 分間の播種後にパターンフローセルから播種されていない残りのライブラリが、通常のフローセルからの残りよりもはるかに多いことを示す。

【図 4 C】M i s e q フローセルを使用したライブラリ播種の定量化結果を示す。パターンフローセルは、播種中のインキュベーションを長くすると、播種されていない残りのライブラリ断片を低減することができることを示す。

【図 4 D】M i s e q フローセルを使用したライブラリ播種の定量化結果を示す。パターンフローセルは、播種中のインキュベーションを長くすると、播種されていない残りのライブラリ断片を低減することができることを示す。

【図 5】上清分析によるパターン化 F C (青色データセット) 及び非パターン化 F C (緑色データセット) におけるリアルタイムの播種プロセスを実証する。5 分間の播種時間内に、非パターン化 F C レーンの場合、D N A ライブラリの大部分が播種されて、上清に残存する D N A の量が非常に少なくなり (緑色)、パターン化 F C の場合、約 5 0 % の D N A ライブラリが播種されず、5 分後に上清中に留まる (青色)。この新しいツールは、播種プロセスを時間経過的に監視するのに役立つ。

【図 6 A】標識捕捉又はアセンブリを使用してフローセル播種を判定するための本開示の方法を示す。低フローセルの播種占有が判定され、その後、所望の播種占有まで更に播種を繰り返すプロセスを示す。

【図 6 B】標識捕捉又はアセンブリを使用してフローセル播種を判定するための本開示の方法を示す。高フローセルの播種占有が生じ、その後、クラスタ及び配列決定に続くプロセスを示す。

【図 7】本開示の方法で使用され得る様々なシグナル生成ストラテジを示す (例えば、図 6 A ~ 図 6 B を参照)。

【 0 0 1 1 】

本明細書に組み込まれ、かつ本明細書の一部を構成する添付図面は、本開示の 1 つ以上の実施形態を図解し、詳細な説明と共に、本開示の原理及び実装を説明する役割を果たす。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「 a 」、 「 a n 」、及び「 t h e 」は、文脈がそうでない旨を明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「フローセル (a f l o w c e l l) 」への言及は、複数のそのようなフローセルを含み、「 D N A ライブラリ (t h e D N A l i b r a r y) 」への言及は、1 つ以上の D N A ライブラリへの言及などを含む。

【 0 0 1 3 】

また、別途記載のない限り、「又は」の使用は「及び / 又は」を意味する。同様に、「含む (c o m p r i s e) 」、「含む (c o m p r i s e s) 」、「含む (c o m p r i s i n g) 」、「含む (i n c l u d e) 」、「含む (i n c l u d e s) 」、「含む (i n c l u d i n g) 」、「有する (h a v e) 」、「有する (h a v e s) 」、「有する (h a v i n g) 」は、交換可能であり、限定することを意図するものではない。

【 0 0 1 4 】

様々な実施形態の説明が「含む (c o m p r i s i n g) 」という用語を使用する場合、当業者であれば、いくつかの具体的な事例において、ある実施形態が、「から本質的になる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f) 」又は「からなる (c o n s i s t i n g o f) 」という語句を使用して代替的に説明することができることを理解するであろうことを、更に理解されたい

10

20

30

40

50

【0015】

別途定義されない限り、本開示書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は同等の方法及び材料を本開示の方法及び組成物の実施に使用することができるが、例示的な方法、デバイス、及び材料が、本明細書に記載されている。

【0016】

本明細書における「増幅する」又は「増幅」という用語は、鋳型のコピーを生成することによって鋳型ポリヌクレオチド配列の数を増加させるプロセスを意味することを意図する。増幅プロセスは、指数関数的又は線形のいずれかであり得るが、典型的には指数関数的である。指数関数的増幅において、鋳型ポリヌクレオチド配列から作製されたコピーの数は、指数関数的速度で増加する。例えば、30ラウンドの理想的な増幅反応では、鋳型DNAの1つのコピーが 2^{30} 又は1,073,741,824個のコピーを産生する。しかしながら、本明細書に記載のブリッジ増幅は、典型的には理想的な条件下では生じず、30サイクルの「指数関数的」反応は、主に表面結合プライマーの限定された局所濃度及び鋳型再ハイブリダイズとの競合に起因して、元の鋳型の数百～数千のコピーのみを産生し得る。線形増幅では、鋳型ポリヌクレオチド配列から作製されたコピーの数は、線形速度で増加する。例えば、1分当たり2000コピーのコピー速度の理想的な4時間増幅反応では、鋳型DNAの各コピーは480,000コピーを産生する。

【0017】

「変性する」及び「変性」という用語は、主に、一本鎖ポリヌクレオチド配列及びその相補体のワトソン-クリックDNA二本鎖内で相互作用するDNA塩基の物理的分離を指す幅広い用語である。これらの用語はまた、これらの鎖の両方の物理的分離を指す。最も広い意味では、これらの用語は、二本鎖の鎖の一方又は両方への別のプライマーオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列のアニーリングが可能になる状況を生み出すプロセスを指す。

【0018】

本明細書で使用される場合、「フローセル」という用語は、1つ以上の流体試薬を流すことができる表面を有するチャンバを意味することを意図する。一般に、フローセルは、流体の流れを容易にするために、少なくとも1つの進入開口部及び少なくとも1つの出口開口部を有する。本開示の方法において容易に使用することができるフローセル及び関連する流体システム及び検出プラットフォームの例は、例えば、Bentley et al., Nature 456: 53-59 (2008)、国際公開第04/018497号、米国特許第7,057,026号、国際公開第91/06678号、国際公開第07/123744号、米国特許第7,329,492号、米国特許第7,211,414号、米国特許第7,315,019号、米国特許第7,405,281号、及び米国特許出願公開第2008/0108082号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0019】

いくつかの実施形態では、フローセルは、アレイを収容し得る。核酸配列決定に使用されるアレイは、多くの場合、核酸特徴のランダムな空間パターンを有する。例えば、Illumina Inc. (San Diego, Calif.) から入手可能なHiSeq (商標) 又はMiSeq (商標) 配列決定プラットフォームは、核酸アレイがランダムな播種、その後のブリッジ増幅によって形成されるフローセルを利用する。しかしながら、パターン化されたアレイは、核酸配列決定又は他の分析用途にも使用することができる。例示的なパターン化されたアレイ、その製造方法、及びその使用方法は、米国特許出願公開第13/787396号、米国特許出願公開第13/783043号、米国特許出願公開第13/784368号、米国特許出願公開第2013/0116153 (A1) 号、及び米国特許出願公開第2012/0316086 (A1) 号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。このようなパターン化されたアレイの

特徴を使用して、単一の核酸鋳型分子を捕捉して、例えば、ブリッジ増幅を介して、均質なコロニーの後続の形成を播種することができる。このようなパターン化されたアレイは、核酸配列決定用途に特に有用である。

【0020】

本明細書で使用される「等温」という用語は、システム又はデバイスの温度が一定のままである、すなわち、 $T = 0$ である、プロセスを指す。これは、任意選択的に、システム/デバイスが外側の熱リザーバ（例えば、ヒータ、熱浴、熱電コントローラ（thermo electric controller、TEC）など）と接触し、システム/デバイスが熱交換を通じてリザーバの温度に継続的に調整することを可能にする速度で、システム/デバイス内で作用又は変化が生じるときに、生じる。

10

【0021】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid、DNA）を指し、しかしながら、適切な場合には、当業者は、本明細書のシステム及びデバイスをリボ核酸（ribonucleic acid、RNA）と共に利用することもできることを認識するであろう。これらの用語は、同等物として、ヌクレオチド類似体から作製されるDNA又はRNAのいずれかの類似体を含むと理解されるべきである。本明細書で使用するこれらの用語はまた、例えば逆転写酵素の作用によって、RNA鋳型から生成される相補的又はコピーDNAであるcDNAも包含する。

【0022】

「プライマーオリゴヌクレオチド」又は「プライマー」は、等温増幅反応の各サイクルのプライマーアニーリング工程で遭遇する条件下で増幅される一本鎖ポリヌクレオチド配列に特異的にアニールすることができるオリゴヌクレオチド配列である。一般に、増幅反応は、多くの場合「順方向」及び「逆方向」プライマーと表される少なくとも2つの増幅プライマーを必要とする。ある特定の実施形態では、順方向及び逆方向プライマーは、同一であり得る。プライマーオリゴヌクレオチドは、アニーリング工程中に増幅される一本鎖ポリヌクレオチド分子（又は鋳型が一本鎖と見なされるときにその相補体）中のプライマー結合配列にアニーリングすることができるヌクレオチドの配列である、「鋳型特異的部分」を含み得る。プライマー結合配列は、一般に、既知の配列であり、したがって、一本鎖ポリヌクレオチド分子の既知の配列 - 1 及び既知の配列 - 2 内の配列に特に相補的である。プライマー結合配列の長さは、既知の配列 - 1 又は - 2 の長さと同じである必要はなく、より短くてもよく、例えば、16 ~ 50ヌクレオチド長、16 ~ 40ヌクレオチド長、又は20 ~ 30ヌクレオチド長であり得る。プライマーオリゴヌクレオチドの最適な長さは、多くの要因に依存し、プライマー結合配列以外の配列へのアニーリングの可能性が非常に低くなるように、プライマーが十分な長い（複合体）であることが一般的である。ある特定の実施形態では、「プライマーオリゴヌクレオチド」は、ランダムな方式でのフローセル（非パターン化フローセル）の表面に結合しているか、又はウェルの表面などのフローセル（パターン化フローセル）の特定の領域に結合している。更なる実施形態では、フローセルに結合したプライマーは、以下の配列を有するP5及び/又はP7プライマーを含む。

20

30

P5 : 5' A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A 3' (配列番号1)

P7 : 5' C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T 3' (配列番号2)

40

【0023】

増幅されるポリヌクレオチド分子は、典型的には、ssDNA若しくはRNAのような一本鎖形態、又は二本鎖DNA（double-stranded DNA、dsDNA）形態である（例えば、ゲノムDNA断片、PCR、及び増幅産物など）。したがって、一本鎖ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド二重鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。標準的な技術を使用した本開示のシステム/デバイスにおける使用に好適な一本鎖ポリヌクレオチド分子の調製方法は、当該技術分野で既知である。例えば、ポリヌクレオチドの複合体混合物からの一本鎖ポリヌクレオチドは、水酸化物による加熱又は処理、その後の希釈に

50

よって生成され得る。一次ポリヌクレオチド分子の正確な配列は、一般に、本開示に重要ではなく、既知又は不明であり得る。一本鎖ポリヌクレオチド分子は、イントロン及びエクソン配列（コード配列）の両方、並びにプロモーター及びエンハンサー配列などの非コード調節配列を含む、ゲノムDNA分子（例えば、ヒトゲノムDNA）を表し得る。特定の実施形態では、増幅されるポリヌクレオチド分子は、DNAライブラリを含む。更なる実施形態では、DNAライブラリは、ライブラリ調製キットを使用して生成される。また更なる実施形態では、ライブラリ調製キットは、Illumina, Inc.からのものである（例えば、Ampliseq（商標）キット、COVIDSeq（商標）キット、Illumina DNA prepキット、Illumina RNA prepキット、Nextera（商標）キット、SureCell WTA（商標）キット、TruSeq（商標）キット、及びTruSight（商標）キット）。

10

【0024】

本明細書で使用する「固相増幅」は、形成時に増幅産物の全て又は一部が固体支持体上に固定化されるように、フローセルのチャンネルの表面上で実行される核酸増幅反応を指す。

【0025】

本明細書に記載のシステム/デバイスを使用して核酸を増幅している間、固相増幅のためのプライマーは、プライマーの5'末端又はその近くでのフローセルの固体支持体への共有付着によって固定化され、プライマーの鑄型特異的部分がその同族鑄型にアニーリングするために遊離のままであり、3'ヒドロキシル基が、プライマー伸長のために遊離である。選択された付着化学は、固体支持体の性質、及びそれに適用される任意の官能化又は誘導体化に依存する。プライマー自体は、付着を促進するために非ヌクレオチド化学修飾であり得る部分を含み得る。プライマーは、5'末端にホスホロチオエート又はチオホスフェートなどの硫黄含有求核剤を含み得る。固体に支持されたポリアクリルアミドヒドロゲルの場合、この求核剤は、ヒドロゲルに存在するプロモアセトアミド基に結合し得る。例えば、プライマーは、重合アクリルアミド及びN-(5-プロモアセトアミジルペンチル)アクリルアミド(5-bromoacetamidylpentyl)acrylamide、BRAPA)から構成されるヒドロゲルに5'チオホスフェート付着を介して固体支持体に付着し得る。

20

【0026】

簡単に言えば、等温増幅について、二本鎖「アダプタ」配列は、増幅されるDNAセグメント（例えば、ランダムに断片化されたゲノム二本鎖DNA）の各末端にライゲーションされる。次いで、DNA-アダプタ分子をフローセルに流し、そこでそれらがフローセルチャンネルの表面にランダムに付着して単一分子のアレイを形成する。ライゲーションされたアダプタ配列が表面付着のための部分を含有する場合、DNA-アダプタ配列は、表面に直接付着し得る。そのような場合、付着は、一般に、ライゲーションされたセグメントの各末端のアダプタ配列のうちの1つの少なくとも一部分に相補的な過剰のプライマーで実施される。したがって、アレイは、増幅に好適な別個の単一分子の分散を伴う、ポリメラーゼ伸長に好適なプライマーのローンである。必要に応じて、プライマー付着は、増幅のための単一分子の分散アレイの形成後に実施することができる。DNA-アダプタ分子は、二本鎖形態が、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかで付着し得るが、但し、二本鎖形態は、増幅に好適な遊離一本鎖分子をもたらすように処理され得る。

30

40

【0027】

代替の実施形態では、プライマーの表面結合ローンは、本開示のシステム/デバイスで使用するためのフローセル表面上で調製され、その後、DNA-アダプタ配列を表面固定化プライマーにハイブリダイズして、ハイブリダイズされたDNA-アダプタの単一分子アレイを形成する。プライマーのローンがフローセルの表面上にランダムに位置する場合、フローセルは「非パターン化フローセル」である。プライマーのローンが、互いに分離されたウェルのアレイ又は同様の構造に編成される場合（これらの間質領域にプライマーが結合していない場合）、フローセルは、「パターン化フローセル」である。ハイブリダイズした鎖をコピーするためのポリメラーゼ及びdNTPを用いた伸長のサイクル、その

50

後の元のDNA-アダプタ配列の変性は、等温増幅のサイクルに供され得る一本鎖形態の付着した単一DNA分子の所望のアレイを生成する。したがって、フローセルの表面は、一本鎖プライマー配列のローンを含み、「ブリッジ増幅」の発生を可能にする。ブリッジ増幅では、表面がハイブリダイズに好適な条件に曝されるとき、増幅される一本鎖核酸分子は、それらの遊離末端上のアダプタ配列がフローセルの表面に結合したその相補的な一本鎖プライマー配列とハイブリダイズするように、ブリッジを形成する。次いで、ヌクレオチド及びDNAポリメラーゼをフローセルに輸送して、増幅される核酸の相補鎖を作成する。次いで、作成された二本鎖配列は、変性試薬中に流すことによって変性され、プロセスは再び開始し、したがって、増幅サイクル中にシステムの温度を変化させることなく増幅された核酸のクラスタを作成する。典型的な実施形態では、クラスタの大部分は、モノクロナルであり、単一の元の核酸配列の増幅からもたらされる。

10

【0028】

一般に、DNAクラスタを作成するために使用されるプライマーオリゴヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドである。それらはまた、天然及び非天然塩基の混合物、並びに天然及び非天然骨格連結を含有し得るが、但し、任意の非天然修飾は、プライマーとしての機能（すなわち、増幅反応の条件中に鋳型ポリヌクレオチド鎖にアニールする能力、及び鋳型鎖に相補的な新しいポリヌクレオチド鎖の合成の開始点として作用する能力）を排除しない。プライマーのうちの1つは、プライマーを表面から除去（切断）して一本鎖クラスタの形成を可能にする修飾を含有し得る。そのような線形化されたクラスタは、更なるプライマー鎖とのハイブリダイズを受けて、配列決定反応が生じることを可能にし得る。

20

【0029】

増幅されるポリヌクレオチドは、適切な割合で固定化され、フローセルの固体支持体に付着したときに、適切な密度の付着した一本鎖ポリヌクレオチド分子及びプライマーオリゴヌクレオチドが得られるようにする（「ポリヌクレオチド播種」）。直接固定化されたDNA-アダプタ配列の場合、固定化反応に使用される溶液混合物中のプライマーオリゴヌクレオチドの割合は、一本鎖ポリヌクレオチド分子の割合よりも高い。次いで、固定化反応は、DNA-アダプタ配列の別個の単一分子を有するプライマーのローンを得ることができる。ハイブリダイズされたDNA-アダプタ反応について、クラスタの密度は、プライマーのローンにハイブリダイズするために使用されるDNAアダプタ配列の濃度によって制御される。プライマーオリゴヌクレオチドの一本鎖ポリヌクレオチド分子に対する比率は、典型的には、固体支持体に固定化されるときに、フローセルチャネルの全体又は定義された領域にわたってほぼ均一な密度で位置する複数のプライマーオリゴヌクレオチドを含み、1つ以上の一本鎖ポリヌクレオチド分子が、プライマーオリゴヌクレオチドのローン内で間隔をおいて個別に固定化されている、プライマーオリゴヌクレオチドのローンが形成される。

30

【0030】

個々のプライマーオリゴヌクレオチドと一本鎖ポリヌクレオチド分子との間の距離（ひいては、プライマーオリゴヌクレオチド及び一本鎖ポリヌクレオチド分子の密度）は、フローセル表面に固定化されているプライマーオリゴヌクレオチド及び一本鎖ポリヌクレオチド分子の濃度を変化させることによって制御することができる。

40

【0031】

十分に制御されたポリヌクレオチド播種プロセスは、クラスタ密度及び配列決定品質の一貫性を確保することができる。全てのタイプの配列決定フローセルは、異なるチャネル幾何学的寸法、表面プライマー密度、パターン化材料、及び結合方法を有し、これらの全ての因子は、ポリヌクレオチド（例えば、DNAライブラリ）が表面上に播種することができる効率性に影響を及ぼす。特にポリヌクレオチド投入が限定される場合、又は連結された長い読み取りが必要とされる場合、ポリヌクレオチド播種プロセスを理解及び最適化することが重要である。播種効率は、可能な限り100%近くであるべきである。

【0032】

50

プライマーオリゴヌクレオチド及び一本鎖ポリヌクレオチドが、適切な密度で固体支持体上に播種及び固定化されると、次いで、共有結合した一本鎖ポリヌクレオチド分子上で等温増幅のサイクルを実行することによって伸長産物を生成することができ、各コロニーが元の固定化された一本鎖ポリヌクレオチド分子（及びその相補的な配列）の複数のコピーを含むようになる。増幅の1つのサイクルは、ハイブリダイズ、伸長、及び変性の工程からなる。そのような工程は、一般に、試薬成分（例えば、緩衝液、など）の観点から、PCRなどの従来の核酸増幅手順と同等である。核酸を増幅する（例えば、ハイブリダイズ、伸長、など）ための好適な試薬は、当該技術分野において周知である。例示的な試薬は、以下により詳細に記載される。

【0033】

10

したがって、中和/ハイブリダイズ緩衝液は、表面結合した一本鎖ポリヌクレオチド分子の非結合末端が表面結合プライマーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズして複合体を形成するように、一本鎖ポリヌクレオチド分子及び複数のプライマーオリゴヌクレオチドに適用することができる（プライマーオリゴヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチド分子の領域又は鑄型特異的部分にハイブリダイズし、それに対して相補的である）。このプロセスは、「ブリッジ」構造を作成する。また、ブリッジ増幅に関する更なる考察については、国際公開第0246456号、米国特許出願第60/783,618号、国際公開第9844151号、及び国際公開第0018957号を参照されたい。

【0034】

20

好適な中和/ハイブリダイズ緩衝液は、当該技術分野において周知である（Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Current Protocols, eds. Ausubel et al. 参照）並びに以下の増幅を説明する図解セクション。好適な緩衝液は、異なる鑄型配列の溶融温度を正規化するために、ベタイン又は有機溶媒などの添加剤と、洗剤と、を含み得る。例示的なハイブリダイズ緩衝液は、2Mベタイン、20mMトリス、10mM硫酸アンモニウム、2mM硫酸マグネシウム、0.1%トリトン、1.3% DMSO、pH 8.8を含む。

【0035】

30

次に、ポリメラーゼ活性及びdNTPを有する酵素を含む伸長溶液をブリッジ複合体に適用することによって伸長反応を行う。複合体のプライマーオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドを連続的に付加することによって伸長されて、一本鎖ポリヌクレオチド分子に相補的な伸長産物を生成する。好適な伸長緩衝液/溶液は、当該技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Current Protocols, eds. Ausubel et al. 参照）及び以下の実施例。

【0036】

40

本開示のシステム/デバイスで使用され得るポリメラーゼ活性を有する酵素の例としては、DNAポリメラーゼ（クレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ）及び様々な耐熱性バクテリアからの熱安定性DNAポリメラーゼ（Taq、VENT、Pfu、Bst、及びTfl DNAポリメラーゼなど）、並びにそれらの遺伝子修飾誘導体（Taq Gold、VENT exo、Pfu exoなど）が挙げられる。フローセル上で実施される増幅反応が等温であるため、追加の及び/又は代替のDNAポリメラーゼを熱サイクル増幅のためのポリメラーゼと比較して使用することができ、ほとんどの実施形態では、ポリメラーゼが熱安定性である特定の要件が存在しないことを理解されたい。また、Bstポリメラーゼなどの鎖置換活性を有する酵素は、配列決定のための成長効果クラスタにおいて優れた性能を示すが、任意のDNAポリメラーゼを使用することができる。

【0037】

DNAクラスタを作成するために使用されるヌクレオシド三リン酸分子は、典型的には

50

、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、例えば d A T P、d T T P、d C T P、d G T P である。ヌクレオチド三リン酸分子は、天然発生又は非天然発生であり得る。

【0038】

ハイブリダイズ工程及び伸長工程の後、支持体及び付着した核酸は、変性条件に供される。好適な変性緩衝液は、当該技術分野で周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Current Protocols, eds. Ausubel et al. 参照）。本開示のシステム/デバイスは、等温核酸増幅を生成し、したがって、本明細書の核酸鎖は、温度上昇又は操作によって変性されないが、むしろ他の方法（例えば、化学的、物理的、など）によって変性される。例として、pHの変化及び低イオン強度溶液が、実質的に等温温度で核酸を変性させ得ることが知られている。ホルマミド及び尿素は、ワトソン-クリック塩基対合をもたらす水素結合を破壊する核酸の塩基との新しい水素結合を形成する。これらは、一本鎖核酸分子をもたらす。代替的に、鎖は、低塩及び高pH (> 12) の溶液での処理によって、又はカオトロピック塩（例えば、塩酸グアニジニウム）を使用することによって分離され得る。特定の実施形態では、水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液は、約 0.25 M ~ 約 0.1 M の濃度で使用される。代替の実施形態では、水中 95% ホルムアミド、又は 100% ホルムアミドが使用される。そのようなホルムアミドの実施形態は、水酸化物処理が表面を損傷し、いくつかの事例ではより低い強度のクラスタをもたらし得るため、追加の利点を示す。使用される他の試薬と同様に、そのような変性試薬は、流動チャンネルを通過する。

【0039】

変性後、2つの固定化された核酸が存在し、1つ目は、最初の固定化された一本鎖ポリヌクレオチド分子であり、2つ目は、固定化されたプライマーオリゴヌクレオチドのうちの1つから伸長するその相補体である。次いで、元の固定化された一本鎖ポリヌクレオチド分子及び固定化された伸長プライマーオリゴヌクレオチド（相補体）の両方が、支持体をハイブリダイズ、伸長、及び変性の更なるサイクルに供することによって、更なる増幅ラウンドを開始することができる。そのような更なる増幅ラウンドは、一本鎖ポリヌクレオチド配列及びその相補的な配列の複数の固定化されたコピーを含む、核酸コロニー又は「クラスタ」をもたらす。一本鎖ポリヌクレオチド分子の最初の固定化は、一本鎖ポリヌクレオチド分子が一本鎖ポリヌクレオチド分子の全長内の距離に位置するプライマーオリゴヌクレオチドとのみハイブリダイズすることができることを意味する。したがって、形成された核酸コロニー又はクラスタの境界は、最初の一本鎖ポリヌクレオチド分子が固定化された比較的局所的な領域に限定される。「クラスタ」及び「コロニー」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、複数の同一の固定化された核酸鎖及び複数の同一の固定化された相補的核酸鎖から構成される、固体支持体上の別個の部位を指す。「クラスタ化アレイ」又は「クラスタアレイ」という用語は、そのようなクラスタ又はコロニーから形成されるアレイを指す。この文脈では、「アレイ」という用語は、クラスタの順序付けられた配置を必要とするものとして理解されるべきではない。

【0040】

典型的な実施形態では、増幅される核酸は、フローセル内のチャンネルの表面上に固定化される。本明細書で使用される「固定化された」という用語は、明示的又は文脈によって別途示されない限り、直接的又は間接的な、共有付着又は非共有付着を包含することを意図する。本発明のある特定の実施形態では、共有付着が典型的であるが、一般に、必要とされるのは、例えば、増幅の用途において、支持体を使用することが意図される条件下で、分子（例えば、核酸）が、支持体に固定化又は付着したままであるということだけである。増幅のための固定化された核酸分子は、好適に修飾された核酸分子（一本鎖又は二本鎖のいずれか）を好適に反応性の表面に直接付着させるか、又は表面固定化プライマーへのハイブリダイズ、その後の、ポリメラーゼ及び d N T P による伸長サイクルによってハイブリダイズした鎖をコピーすることによって得ることができる。次いで、伸長された鎖又

は化学的に付着した二本鎖は、変性条件に供されて、所望の固定化された一本鎖核酸分子を生成することができ、これは、次いで、本明細書に記載の器具類によって等温増幅のサイクルに供され得る。DNAを溶液からフローセル上にハイブリダイズする最初の工程は、後続の増幅反応よりも高い温度で実施することができ、次いで、実質的に等温の温度で行うことができる。ハイブリダイズ工程はまた、増幅温度で実行され得る、但し、投入される核酸鎖は、一本鎖形態で表面に供給される。

【0041】

鋳型核酸を調製するいくつかの実施形態は、標的核酸を断片化することを含み得る。いくつかの実施形態では、バーコード化又はインデックス付きアダプタは、断片化された標的核酸（例えば、DNAライブラリ）に付着している。アダプタは、ライゲーション（酵素的又は化学的）、タグメンテーション、ポリメラーゼ伸長などの当該技術分野で既知の任意の数の方法を使用して付着し得る。いくつかの実施形態では、非連続的なトランスポゾン配列を含むトランスポソームの挿入は、標的核酸の断片化をもたらし得る。ループトランスポソームを含むいくつかの実施形態では、トランスポゾン配列を含む標的核酸は、トランスポゾン配列の断片化部位で断片化され得る。本明細書で提供される実施形態に有用な標的核酸を断片化するのに有用な方法の更なる例は、例えば、米国特許出願公開第2012/0208705号、米国特許出願公開第2012/0208724号、及び国際特許出願公開第2012/061832号に見出すことができ、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0042】

Illumina, Inc. 製のフローセルデバイス（例えば、HiSeqデバイス、NovaSeqデバイス、MiSeqデバイス、及びNextSeqデバイス）F. Hoffmann - La Roche Ltd. 製のフローセルデバイス（例えば、GS FLXデバイス、及びGS Juniorデバイス）、及びLife Sciences製のフローセルデバイス（例えば、SOLID/Ion Torrentデバイス）を含む、様々なフローセルデバイスを使用して、本開示の方法を実行することができる。特定の実施形態では、本開示の方法を実行するために使用されるフローセルデバイスは、Illumina Inc. 製のフローセルデバイスである。

【0043】

フローセルは、典型的には、1つ以上の流体チャネルを含む。更なる実施形態では、フローセルの1、2、3、4、5、6、7、8、又はそれ以上の流体チャネルは、本明細書に開示する方法を使用してポリヌクレオチド播種効率について評価することができる。既に本明細書において示されているように、プライマーは、フローセルの表面に結合又は固定化され得る。典型的には、フローセルに結合したプライマーは、既知の配列を含有する一本鎖DNA含有プライマーである。ブリッジPCR増幅を実施するために、異なるが既知の配列を有するプライマーの複数の集団（例えば、2、3、4、など）を有することが有益である。例えば、Illuminaフローセルは、フローセルの表面に結合したP5（配列番号1）及びP7（配列番号2）プライマーを含み、標的ポリヌクレオチドのブリッジ増幅を可能にする。これらの標的ポリヌクレオチドは、P5及びP7プライマーに相補的な配列を有するポリヌクレオチドの末端にアダプタ配列を含むことによってブリッジ増幅される。そのようなアダプタは、上記配列を含有するプライマーを用いて、低減したコピーPCRを使用してポリヌクレオチドの末端に付加することができる。これらのプライマーは、バーコード又はインデックス配列を更に含み得る。プライマーは、シラン化学を含む標準的な化学を使用することによって、又はフローセル表面上に堆積されたポリマーへの付着によって、フローセルの表面に付着し得る（例えば、米国特許出願公開第2012/0316086（A1）号、及び国際公開第2017/201198（A1）号参照）。プライマーは、ランダムな様式で、又は編成されたアレイ（すなわち、パターン化フローセル）として、フローセルの表面に付着又は固定化され得る。例えば、フローセル表面は、結合した固定化プライマーを含有するマイクロ又はナノウェルの規則アレイを含み得る。本明細書に記載のフローセルに播種するために使用されるポリヌクレオチドは、

異なる系統発生界からの様々な生物を含む任意の供給源に由来し得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ヒト対象から単離された断片化ゲノムDNAであり得る。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAライブラリの形態である。DNAライブラリをゲノムDNA源から作製するプロセスは、当該技術分野で既知であり、多くのライブラリ調製キットが市販されている。特定の実施形態では、ライブラリ調製キットは、Illumina, Inc.からのものである(例えば、Ampliseq(商標)キット、COVIDSeq(商標)キット、Illumina DNA prepキット、Illumina RNA prepキット、Nextera(商標)キット、SureCell WTA(商標)キット、TruSeq(商標)キット、及びTruSight(商標)キット)。ライブラリ調製キットの工程は、(A)同時に断片化して、トランスポソームを使用して単離DNAにプライマーを付加することと、(B)低減サイクルPCRを使用して断片化されたDNAを増幅することと、(C)増幅されたDNA断片を洗浄及びプールして、DNAライブラリを形成することと、を含むことができる。トランスポソームは、ビーズのような販売された基板に結合することができる。ポリヌクレオチドは、10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分、20分、21分、22分、23分、24分、25分、26分、27分、28分、29分、30分、31分、32分、33分、34分、35分、36分、37分、38分、39分、40分、41分、42分、43分、44分、45分、46分、47分、48分、49分、50分、51分、52分、53分、54分、55分、56分、57分、58分、59分、60分、90分、120分、又はそれらの端数増分を含む、前述の時点のうちのいずれか2つを含むか、若しくはそれらの間にある範囲(例えば、5分~60分、10分~40分、など)を含む、定義された時間長の間、フローセルに播種され得る。

【0044】

通常、ポリヌクレオチド播種効率(例えば、DNAライブラリ播種効率)の調査は、最終的なクラスタ数をカウントすることによって、どの程度ポリヌクレオチドが捕捉されるかを見ることによって行われる。本開示は、播種効率を判定する方法を提供する。

【0045】

本開示は、一実施形態では、表面上に捕捉されずにバルク播種溶液中に残るポリヌクレオチドを見ることによって、ポリヌクレオチド播種効率を判定するための方法を提供する。播種プロセスの終わりにフローセルチャネルから上清を回収して分析することによって、播種プロセスに関するより詳細な情報を判定することができる。本明細書に開示する方法は、パターン化フローセル上の播種を確認するのに有用であり、この場合、クラスタ数は、例えば、(1)多クローン性、(2)事前増幅複製、及び(3)ウェル間の間質領域でのライブラリ吸着と直接相関しない(図1参照)。

【0046】

特定の実施形態では、本開示は、ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率を評価するための方法であって、フローセルにポリヌクレオチドを少なくとも1分間播種して、上清を回収することと、工程(a)又は(b): (a) qPCR及び/若しくは液滴PCRを使用して上清中のポリヌクレオチドを増幅する工程、又は(b)第2のフローセルを使用して上清を再播種し、ポリヌクレオチドのブリッジ増幅後に生成されたクラスタをカウントする工程、を使用することによって、上清中のポリヌクレオチドを定量化することと、上清中で定量化されたポリヌクレオチドの数とフローセルに播種するために使用されたポリヌクレオチドの数とを比較することによってフローセルの播種効率を判定すること、を含む、方法を提供する。

【0047】

上清は、播種プロセス後に回収され、ポリヌクレオチドは、qPCR又は液滴PCRの使用を含む、本明細書に開示する方法を使用して、又は別のフローセルに播種することによって定量化される。定量的ポリメラーゼ連鎖反応(quantitative polymerase cha

in reaction、qPCR)としても既知であるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(リアルタイムPCR)は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく分子生物学の実験室技術である。それは、従来のPCRのようにその終わりではなく、PCR中に(すなわち、リアルタイムで)標的DNA分子の増幅を監視する。リアルタイムPCRは、定量的に(定量的リアルタイムPCR)、及び半定量的に(すなわち、ある特定の量のDNA分子超/それ未満)(半定量的リアルタイムPCR)に使用することができる。リアルタイムPCRでPCR産物を検出するための2つの一般的な方法は、(1)任意の二本鎖DNAにインターカレートする非特異的蛍光色素と、(2)その相補的な配列とのプローブのハイブリダイズ後にのみ検出が可能である蛍光レポートで標識されるオリゴヌクレオチドからなる配列特異的DNAプローブと、である。本明細書に記載のqPCR反応は、そのようなPCR反応に使用される任意の市販の熱安定性ポリメラーゼを利用することができ、定量化のための二本鎖結合色素、又はプローブ/クエンチャシステムの使用のいずれかを使用することができる。二本鎖結合色素の例としては、SYBR(登録商標)Green I、BRYT Green(登録商標)Dye、PicoGreen、YOYO-1ヨウ化物、及びSYBR(登録商標)Goldが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書に開示するqPCR反応は、蛍光レポート及びDNA鋳型に結合するクエンチャ分子で標識される配列特異的プローブを利用する。典型的には、クエンチャ分子は、複数の波長にわたって光を吸収し、光を放出しないダーククエンチャである。ダーククエンチャの例としては、Dabsyl、Black Holeクエンチャ、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、IRDye QC-1、及びQx1クエンチャが挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

代替の実施形態では、本開示は、上清中のポリヌクレオチドが、別のフローセルに上清を播種することから生成されたクラスタをカウントすることによって定量化されることを提供する。例えば、HiSeq又はNextSeqフローセル(最大120Gbの配列データ)から得られた上清は、定量化のためにMiseqフローセル(最大12Gbの配列データ)と使用することができる。市販のフローセルとその他の順列/組み合わせもまた、そのようなプロセスを使用して想定される。

【0049】

本開示はまた、ライブラリ媒介フルオロフォア捕捉又はアセンブリ(Library-Mediated Fluorophore Capture又はAssembly、LMFCA)を介したフローセル播種を定量化する方法を提供する。本開示のLMFCA方法では、播種効率は、検出可能な標識を使用してフローセルにおいて測定される。例えば、本開示は、ポリヌクレオチドを用いたフローセルの播種効率を評価する方法であって、フローセルにポリヌクレオチドを少なくとも1分間播種することと、フローセルにおける結合/播種されたポリヌクレオチドを検出可能で標識することと、フローセルにおける標識されたポリヌクレオチドを定量化することと、播種効率に応じて、標識を除去してフローセルに再播種することか(例えば、図6B参照)、又は標識を除去してクラスタ及び/若しくは配列に進む(例えば、図6A参照)ことと、を含む、方法を提供する。

【0050】

フローセル上のヌクレオチドを標識する方法としては、(i)標識されたヌクレオチド及びポリメラーゼの使用、(ii)フルオロフォア標識を有するDNAデンドリマー又は標識ナノ粒子、及び播種されたポリヌクレオチドへのハイブリダイズのための相補的なオリゴの使用、(iii)播種されたポリヌクレオチドから標識された構造を成長させること、並びに(iv)播種されたポリヌクレオチドに結合する標識されたアダプタ(図7参照)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】

好適な標識としては、蛍光標識、発光標識、放射性標識、発色標識などが挙げられる。典型的には、標識は、CCDカメラなどを使用して検出及び定量化され得るように、蛍光性又は発光性である。

10

20

30

40

50

【0052】

一実施形態では、ポリヌクレオチドをフローセルに「播種する」ことを可能にするのに好適な、条件下及び所望の時間で、フローセルは、少なくとも1つのアダプタ領域を含むポリヌクレオチドを含む組成物で播種される。ポリヌクレオチドは、10秒、20秒、30秒、40秒、50秒、1分、2分、3分、4分、5分、6分、7分、8分、9分、10分、11分、12分、13分、14分、15分、16分、17分、18分、19分、20分、21分、22分、23分、24分、25分、26分、27分、28分、29分、30分、31分、32分、33分、34分、35分、36分、37分、38分、39分、40分、41分、42分、43分、44分、45分、46分、47分、48分、49分、50分、51分、52分、53分、54分、55分、56分、57分、58分、59分、60分、90分、120分、又はそれらの端数増分を含む、前述の時点のうちいずれか2つを含むか、若しくはそれらの間にある範囲（例えば、5分～60分、10分～40分、など）を含む、定義された時間長の間、フローセルに播種され得る。図6に示すように、フローセルが最初の播種を受けると、フローセルは、フローセル上に播種及び保持されているポリヌクレオチドを標識する組成物と接触する。典型的には、フローセル上に播種されたポリヌクレオチドを標識する組成物と接触させる前に、フローセルを洗浄して、いずれの非結合ポリヌクレオチドも除去する。図7に描写されるように、フローセルに結合したポリヌクレオチドを標識するための様々な技術が描写される。次いで、播種の効率を判定するために、フローセルを画像化するか、又は選択されたフローセルの領域を画像化して、存在する標識又は「シグナル」（例えば、蛍光）の量を判定する。「シグナル」は、典型的には、実験測定 of 播種効率を判定するために、特定の播種効率を含む既知のシグナルと比較される。図6Aに示すように、測定されたシグナルに基づいて十分な播種が存在する場合、それは、フローセル又はフローセル上の部位の特定の占有を示すことができる。フローセルの占有が所望の量である場合、そのフローセルは、クラスタ化を誘導するため、及び/又は配列分析のために処理される。図6Bに描写されるように、播種効率が測定シグナルに基づいて低過ぎるか、又は不十分である場合、最初の播種から得られた、回収された非結合ポリヌクレオチドを使用して、フローセルに「再播種」し、シグナル測定を再度実施して、播種効率を判定することができる。このプロセスは、クラスタ化及び/又は配列決定を実施するために、フローセル上に所望の播種が存在するまで繰り返され得る。

10

20

30

【0053】

図7に描写されるように、標識された（例えば、蛍光標識された）ヌクレオチドを組み込んで、播種されたポリヌクレオチドを標識することは、標識されたヌクレオチドの存在下で、播種されたポリヌクレオチドの相補鎖を伸長する条件下でポリメラーゼの結合を可能にするのに十分なアダプタを使用して実施することができる。標識された相補鎖は、フローセルにおけるシグナルの量の定量化後まで脱ハイブリダイズしない。シグナルの定量化が完了すると、標識された相補的核酸は、熱及び/又は塩含有量によって除去され得る。

【0054】

図7の別の実施形態では、フローセルにおいて播種されたポリヌクレオチドは、例えば、播種されたポリヌクレオチド上のアダプタ配列に相補的な配列を含む標識された構造を使用して標識され得る。標識された構造に連結されたアダプタ配列に相補的な配列は、播種されたポリヌクレオチド上のアダプタ配列にハイブリダイズし、ひいては、標識された構造を播種されたポリヌクレオチドに「連結」する。標識された構造は、蛍光部分を含むナノ粒子、又はより多くの蛍光部分のうちの一つを含む dendrimer であり得る。標識された構造は、フローセル内のシグナルの量の定量化後まで除去されない。シグナルの定量化が完了すると、標識された構造は、例えば、アダプタ配列を切断すること、及び/又はアダプタ配列にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを脱ハイブリダイズ/変性させることによって除去され得る。

40

【0055】

50

図7の更に別の実施形態では、播種されたポリヌクレオチドを標識する方法が描写され、播種されたオリゴヌクレオチドの末端から標識された構造を成長させることを含む。本実施形態では、播種されたポリヌクレオチド上のアダプタ配列に対するオリゴヌクレオチド又は同族体は、播種されたポリヌクレオチドに結合し、オリゴヌクレオチド構造は、アダプタから成長し、この構造は検出可能に標識される。成長した構造は、フローセルにおけるシグナルの量の定量化後まで除去されない。シグナルの定量化が完了すると、構造は、例えば、アダプタ配列を切断すること、及び/又はアダプタ配列にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを脱ハイブリダイズさせることによって除去され得る。

【0056】

図7の更に別の実施形態では、標識されたアダプタを、播種されたポリヌクレオチドに 10
附着させ、次いで定量化して、標識の量を判定し、それによってフローセルにおける播種されたポリヌクレオチドの量を判定することができる。標識されたアダプタは、最初の鎖延長後に切断又は除去され得る。標識されたアダプタは、ポリヌクレオチド上の同族アダプタヌクレオチド酸配列に相補的な配列を含むか、又はポリヌクレオチド上の結合パートナーに同族体を含む(例えば、ピオチン/ストレプトアビジンなど)。アダプタは、蛍光標識などの検出可能な標識を含む。

【0057】

本明細書に記載のフローセル用途で使用するために、キット及び製品も提供される。そのようなキットは、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器を受容するように区画化されたキャリア、パッケージ、又は容器を含み得、容器の各々は、本明細書に記載の方法で 20
使用される別々の要素のうちの一つを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

【0058】

例えば、容器は、本明細書に記載の1つ以上のqPCR及び/又はMiseq試薬を含み得る。容器は、任意選択的に、滅菌アクセスポートを有する(例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する溶液バッグ又はバイアルであり得る)。そのようなキットは、任意選択的に、識別用の説明若しくはラベル又は本明細書に記載の方法 30
におけるその使用に関する説明書と共に試薬を含む。

【0059】

キットは、典型的には、本明細書に記載の方法の使用のための商業的観点及びユーザ観点から望ましい、様々な材料(任意選択的に濃縮形態の追加の試薬及び/又はデバイスなど)のうちの一つ以上を各々が有する、1つ以上の追加の容器を含む。そのような材料の非限定的な例としては、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、キャリア、パッケージ、容器、バイアル、内容物を列挙したバイアル及び/若しくは管用ラベル、並びに/ 又は使用説明書、及び使用説明書を有するパッケージ挿入物が挙げられるが、これらに限定されない。一連の説明書もまた、典型的に含まれる。

【0060】

説明書ラベルは、容器上にあるか、又は容器と関連付けられ得る。ラベルを形成する文字、数字、又は他の符号が容器自体に取り付けられ、成形され、又はエッチングされるとき、ラベルは容器上に存在し得、ラベルが例えば、パッケージ挿入物として、容器も保持する入れ物又はキャリア内に存在するとき、ラベルは容器に関連付けられ得る。ラベルを使用して、内容物が特定のフローセル用途に使用されることを示すことができる。ラベルはまた、本明細書に記載の方法などの内容物を使用するための指示を示し得る。

【0061】

実施例

フローセルデバイスにおけるライブラリ播種の定量化の概要。フローセルに、既知のDNAライブラリ濃度を装填した(図2参照)。ライブラリ播種後、上清をフローセルレーンから除去し、播種されていないライブラリ断片を定量化した。回収された上清から播種されていないライブラリ断片を定量化するための2つの方法が開発された(図3参照)。

10

20

30

40

50

一方の方法は、qPCR又は液滴PCRを使用して、上清中の播種されていないライブラリ濃度を判定し、他方の方法は、IlluminaのMiseqフローセルを使用して配列決定クラスタカウント結果を判定する。

【0062】

Miseqを使用したライブラリ播種上清の定量化。異なる播種時間によるパターン化HiSeqFC又は通常のHiSeqFCのいずれかから回収された播種上清の結果は、図4に提示されたMiseqクラスタ画像に提示される。5分間の播種時間内に、パターン化HiSeqチャンネルから回収された上清中により多くのDNAが存在し、これは、通常のパターン化フローセルと比較して、パターン化HiSeqフローセルにおいて播種効率がより低いことを示す(図4A~図4B参照)。ライブラリ播種時間が60分まで延長される場合、上清中に残存するDNAはより少ないが、クラスタ化のために表面上に捕捉されることができないDNA断片の集団が依然として存在する(図4C参照)。したがって、時間基準を含む、播種プロセスの効率を判定することができる。更に、パターン化及び非パターン化フローセルに対する播種効率も比較することができるが、これは、現在の方法の使用では不可能である。

10

【0063】

qPCRを使用したライブラリ播種上清の定量化。フローセルの播種効率の定量化もqPCRで試験した。パターン化フローセルレーン及び非パターン化フローセルレーンに、同じ濃度のDNAライブラリを播種した。その後、異なるレーンからの上清を、分析のために特定の時点で回収した。qPCR分析は、特定のフローセル表面に播種された/播種されていないことが、時間経過的に監視され得ることを実証する。更に、DNAライブラリは、非パターン化フローセルの表面よりも、パターン化フローセル上のp5/p7表面によって捕捉されるのにより長く時間がかかる(図5参照)。前述の技術を使用して、パターン化フローセル上でより効率的なポリヌクレオチド播種を提供する表面を操作するように、表面引力動態を評価することができる。

20

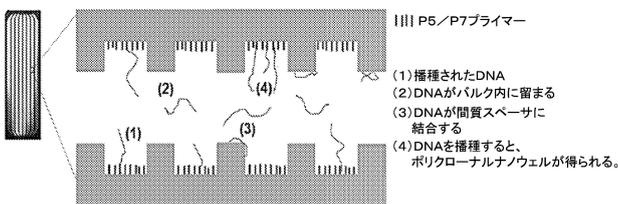
【0064】

本開示の多くの実施形態を説明してきた。しかしながら、本開示の趣旨及び範囲を逸脱することなく、様々な修正が行われ得ることを理解されたい。したがって、他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内にある。

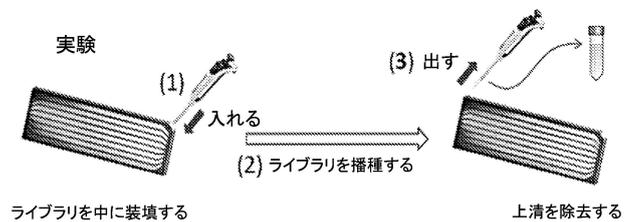
【図面】

30

【図1】



【図2】

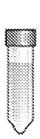


40

50

【 図 3 】

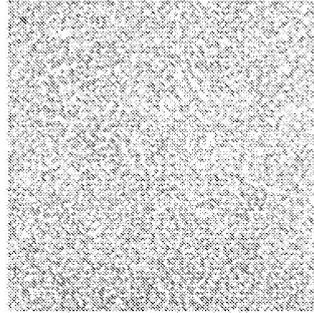
定量化



(a) ライブラリを定量化するためのqPCR及び/又は液滴PCR

(b) Miseqフローセル上の上澄みを再播種し、クラスタをカウントする

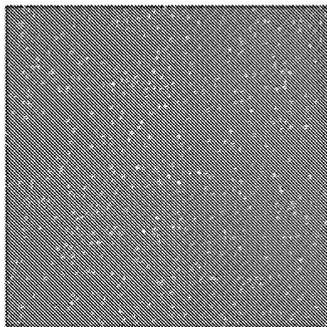
【 図 4 A 】



40°Cで5分インキュベーション後のパターンFCからの上清

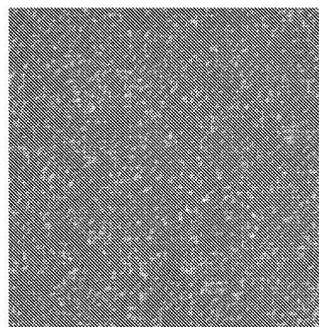
10

【 図 4 B 】



40°Cで5分インキュベーション後の通常FCからの上清

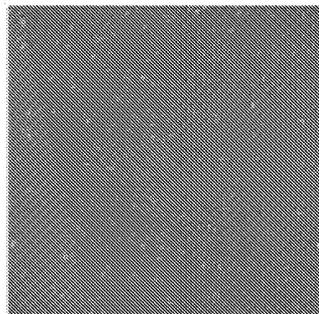
【 図 4 C 】



40°Cで60分インキュベーション後のパターンFCからの上清

20

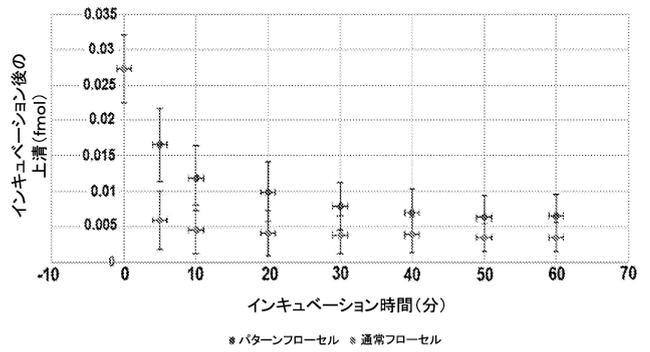
【 図 4 D 】



40°Cで60分インキュベーション後の通常FCからの上清

【 図 5 】

インキュベーション後のハイブリダイズされていないDNA

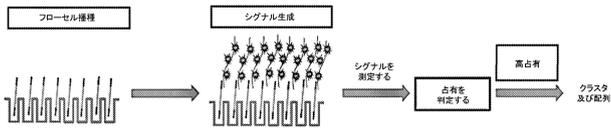


30

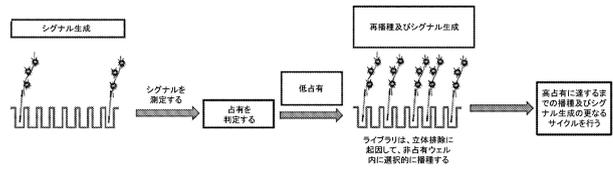
40

50

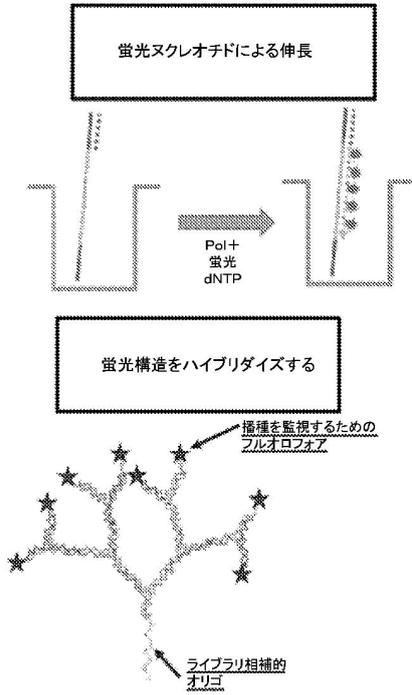
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

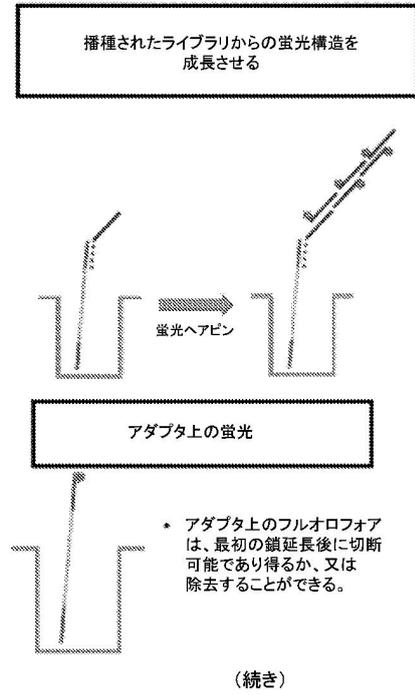


【 図 7 - 1 】



- * DNAデンドリマーがここに示されているが、任意の蛍光ナノ粒子であり得る。
- * ライブラリ播種のためのDNAデンドリマーは、IP-1935でカバーされている

【 図 7 - 2 】



- * アダプタ上のフルオロフォアは、最初の鎖延長後に切断可能であり得るか、又は除去することができる。

(続き)

【 配列表 】

2023532079000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/040245

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6806 ADD. | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2015/189621 A1 (ILLUMINA CAMBRIDGE LTD [GB]) 17 December 2015 (2015-12-17) pages 1-4; claims 1,10 ----- | 1-34 |
| X | QUAIL MICHAEL A ET AL: "A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system", NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 5, no. 12, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 1005-1010, 1, XP002572504, ISSN: 1548-7105, DOI: 10.1038/NMETH.1270 [retrieved on 2008-11-25] the whole document ----- | 1,19-27 |
| A | WO 2018/161019 A1 (COUNSYL INC) 7 September 2018 (2018-09-07) claims 1-7 ----- | 1 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 12 October 2021 | | Date of mailing of the international search report 21/10/2021 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Gabriels, Jan |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/040245

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/040245

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2015189621 A1 | 17-12-2015 | AU 2015273218 A1 | 15-12-2016 |
| | | CA 2951005 A1 | 17-12-2015 |
| | | EP 3155122 A1 | 19-04-2017 |
| | | ES 2709395 T3 | 16-04-2019 |
| | | US 2017145473 A1 | 25-05-2017 |
| | | WO 2015189621 A1 | 17-12-2015 |
| ----- | | | |
| WO 2018161019 A1 | 07-09-2018 | US 2020082908 A1 | 12-03-2020 |
| | | WO 2018161019 A1 | 07-09-2018 |
| ----- | | | |

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0、イルミナ・インコーポレイテッド

(72)発明者 フィッシャー, ジェフ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0、イルミナ・インコーポレイテッド

(72)発明者 プロディン, ジェフ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0、イルミナ・インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ42 QR08 QR42 QR62 QR66 QS25 QS34 QX02