

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6847496号
(P6847496)

(45) 発行日 令和3年3月24日(2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月5日(2021.3.5)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/6855	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6855	Z
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 4 O B	50/06	(2006.01)	C 4 O B	50/06	

請求項の数 9 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2018-505473 (P2018-505473)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成28年8月3日(2016.8.3)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2018-521675 (P2018-521675A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成30年8月9日(2018.8.9)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/068546		T
(87) 国際公開番号	W02017/021449		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成29年2月9日(2017.2.9)		グレンツァーヘルストラツセ124
審査請求日	令和1年7月19日(2019.7.19)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	62/201,727		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成27年8月6日(2015.8.6)	(74) 代理人	100118902
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
		(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一プローブプライマー伸長による標的濃縮

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的配列核酸を増幅する方法であって、以下の工程：

a) 該標的核酸をプライマーおよびポリメラーゼと接触させる工程、ここで、該プライマーは、標的結合部位および固有分子同定タグ(UID)を含む；

b) ポリメラーゼ伸長反応および停止反応を実施して、一本鎖プライマー伸長産物を作製する工程、ここで、該停止反応は、温度シフト、特異的酵素阻害剤の添加、キレート剤の添加、およびウリジン含有塩基の組み込みとそれに続くウラシル-N-DNAグリコシラーゼ処理からなる群から選択される方法により達成される；

c) アダプターを該一本鎖プライマー伸長産物のそれぞれの末端にライゲーションしてライゲーション産物を作製する工程、ここで、該アダプターは、少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位を含み、該一本鎖プライマー伸長産物の3'末端にライゲーションされる該アダプターは、配列非依存的一本鎖ライゲーション法によってライゲーションされる；ならびに、

d) 該ライゲーション産物を、該少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位に結合する少なくとも1種類のプライマーを利用する増幅反応において増幅して、該増幅された標的配列核酸を作製する工程；

を含む、前記方法。

【請求項2】

該一本鎖プライマー伸長産物の5'末端にライゲーションされたアダプターが、該プラ

イマーのユニバーサルライゲーション部位に相補的なユニバーサルライゲーション部位を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該標的結合部位が、予め設計された標的特異的配列である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該標的結合部位が、ランダム配列である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも一方のアダプターが、バーコードを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

該バーコードが、多重試料 I D (M I D) である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

該増幅が、線形増幅である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

該増幅が、指數的増幅である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

さらに該工程 b) および c) の少なくとも一方の後に精製工程を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本開示は、概して試料中の標的核酸の濃縮に、より詳細には高スループット配列決定を含む核酸配列決定のための標的の濃縮に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明は、使用者に配列決定されるべき核酸中の目的の領域に注目させることを可能にする技術分野に属する。これは、配列決定反応およびそれに続くデータ分析に関するコストを低減する。現在、試料中に存在する核酸中の目的の領域を選択的に捕捉する 3 つの一般的なタイプの技術が存在する。第 1 の技術は、目的の領域が捕捉表面に選択的に結合することができるプローブのハイブリダイゼーションにより捕捉される、ハイブリダイゼーション捕捉である。この捕捉は、捕捉された標的分子の放出および回収に続く非標的核酸の除去を可能にする。このタイプの技術は、エキソームサイズの領域および未知の構造バリエーションを含有する領域を捕捉する能力を含むという利点を有する。欠点は、完了するのに 8 時間を超える時間がかかる、長く複雑なプロトコルを含む点である。複雑さは、主にハイブリダイゼーションの前にランダムに断片化されたショットガンライブラリーを調製する必要により引き起こされる。ハイブリダイゼーション工程だけでも、完了するのに 3 日間に至るまでの時間がかかり得る。このタイプの技術の例は、SeqCap EZ (Nimble Gen、ウィスコンシン州マディソン) および SureSelect Target Enrichment System (Agilent、カリフォルニア州サンタクララ) が挙げられる。

30

40

【0003】

標的濃縮の別の方法は、二重標的プライマーベースの増幅である。この方法では、目的の領域は、標的的境界上の 2 つのプローブを用いて濃縮される。この方法は、8 時間未満で完了し、ハイブリダイゼーション捕捉法よりも単純である。しかし、二重プライマーベースの技法は、未知の構造バリエーションを有する配列を濃縮することはできない。最も確立された二重プライマーアプローチは、多重 PCR である。それは、非常に単純な 1 工程プロセスであるが、反応チューブあたり数十の標的しか増幅することができない。単一の反応チューブ中で数百 ~ 数千の標的を増幅することができ、わずかな操作工程しか必要としない TruSeq Amplicon (Illumina、カリフォルニア州サンデ

50

イエゴ)およびIon Torrent Ampliseq(Life Technologies、ニューヨーク州グランドアイランド)製品を含む他のより新しい技術が、現在利用可能である。

【0004】

第3の技術は、単一標的プライマーベースの増幅である。この方法では、標的は、単一の標的プライマーおよび末端にライゲーションされたユニバーサルプライマーにより定められる領域の増幅により濃縮される。ハイブリダイゼーションベースのアプローチに類似して、これらの技法は、標的オリゴヌクレオチドの選択的ハイブリダイゼーションの前にランダムに断片化されたショットガンライブラリーが生成されることを必要とする。しかし、標的を捕捉して非標的分子を洗い流すためにこのオリゴヌクレオチドを用いる代わりに、ランダムに生成された末端および標的的特異的オリゴヌクレオチドの間の領域を選択的に増幅する増幅工程が用いられる。この技術の利点は、二重プライマー技術とは異なり、それが未知の構造バリエーションを有する配列の検出を可能にすることである。それはまた、ハイブリダイゼーションベースの技術よりも速く、かつ単純である。しかし、このタイプの技術は、二重プライマーベースのアプローチよりもさらに遅く、より複雑化されている。このタイプの技術の例は、Archer's Anchored Multiplex PCR(Archer Dx、コロラド州ボルダー)およびOvation(登録商標)Target Enrichment System(NuGen、カリフォルニア州サンカルロス)である。

10

【0005】

標的配列核酸中の未知の構造バリエーションにも適応するであろう標的濃縮の、迅速かつ単純な方法に関する未だ対処されていない必要性が存在する。

20

【発明の概要】

【0006】

一態様において、本発明は、以下の工程を含む標的配列核酸を増幅する方法である：標的核酸をプライマーおよびポリメラーゼと接触させる工程、ここで、プライマーは、標的結合部位および固有分子同定タグ(UID)を含む；ポリメラーゼ伸長反応および停止反応を実施して一本鎖プライマー伸長産物を作製する工程；一本鎖プライマー伸長産物のそれぞれの末端にアダプターをライゲーションさせてライゲーション産物を作製する工程、ここで、該アダプターは、少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位を含む；その少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位に結合する少なくとも1種類のプライマーを利用する増幅反応においてライゲーション産物を増幅して増幅された標的配列核酸を作製する工程。ある態様において、プライマーおよびアダプターの少なくとも一方は、相互利用可能なユニバーサルライゲーション部位を含む。ある態様において、標的結合部位は、予め設計された標的的特異的配列である。ある態様において、標的結合部位は、ランダム配列である。ある態様において、停止反応は、温度シフト、特異的酵素阻害剤の添加、キレート剤の添加、およびウリジン含有塩基の組み込みとそれに続くウラシル-N-DNAグリコシラーゼ処理からなるリストから選択される方法により達成される。ある態様において、少なくとも一方のアダプターは、バーコードを含む。バーコードは、多重試料ID(MID)であることができる。増幅は、線形増幅または指数的増幅であることができる。ある態様において、本発明の方法は、さらにプライマー伸長およびライゲーションの少なくとも一方の後に精製工程を含む。

30

40

【0007】

他の態様において、本発明は、以下を含む標的配列核酸を増幅するためのキットである：標的結合部位、固有分子同定タグ(UID)、およびユニバーサルライゲーション部位を含むプライマー；少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位、多重試料ID(MID)およびユニバーサルライゲーション部位を含む少なくとも1種類のアダプター。ある態様において、キットは、異なるユニバーサルプライミング部位を有する2種類のアダプターを含むが、一方のアダプターのみがユニバーサルライゲーション部位およびMIDを含む。ある態様において、キットは、さらに以下の1以上を含む：核酸ポリメラーゼ、

50

リガーゼ、熱安定性DNAポリメラーゼ、およびユニバーサルプライマー。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1A】図1は、方法の工程の概略的表現である。

【図1B】図1は、方法の工程の概略的表現である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

定義

本明細書で用いられる際、“プローブ”は、明確に意図された標的生体分子、例えばプローブにより結合、捕捉またはハイブリダイズされるべき目的の核酸配列に選択的に結合することができるあらゆる分子を意味する。

10

【0010】

本明細書で用いられる際、“アダプター”は、別の配列に、追加の特性をその配列に持ち込むために付加されることができるヌクレオチド配列を意味する。アダプターは、一本鎖もしくは二本鎖であることができ、または一本鎖部分および二本鎖部分の両方を有することもできる。

【0011】

本明細書で用いられる際、“バーコード”は、分子に識別性を与えるヌクレオチド配列を意味する。バーコードは、個々の分子（およびそのコピー）に固有の識別性を与えることができる。そのようなバーコードは、固有のID（UID）である。バーコードは、同じ源（例えば患者）由来の分子（およびそれらのコピー）の集団全体に識別性を与えることができる。そのようなバーコードは、多重ID（MID）である。

20

【0012】

本明細書で用いられる際、“ライゲーション部位”は、ライゲーションを促進することができる（二本鎖分子の平滑末端以外の）核酸分子の部分である。2つの分子上に存在する“利用可能なライゲーション部位”は、その2つの分子の互いとの優先的なライゲーションを可能にする。

【0013】

本明細書で用いられる際、“一本鎖ライゲーション”は、少なくとも1つの一本鎖基質を用いて開始し、典型的には1以上の二本鎖または部分的に二本鎖のアダプターを含むライゲーション手順である。

30

【0014】

本明細書で用いられる際、“ユニバーサルプライマー”および“ユニバーサルプライミング部位”は、標的配列核酸中に天然に存在しないプライマーおよびプライミング部位を指す。典型的には、ユニバーサルプライミング部位は、アダプターまたは標的特異的プライマー中に存在する。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライミング部位に結合してそこからのプライマー伸長を方向付けることができる。

【0015】

本発明の方法は、高スループット単一分子配列決定プロトコルを含む配列決定プロトコルの一部として用いられることができる。本発明の方法は、配列決定されるべき標的核酸のライブラリーを生成する。ライブラリー中の標的核酸は、分子同定および試料同定のためのバーコードを組み込むことができる。

40

【0016】

標的特異的プライマー伸長

本発明は、標的特異的プライマーに関する線形プライマー伸長工程を含む。線形伸長工程は、当該技術で実施されている指數的増幅を上回るいくつかの利点を有する。それぞれの標的核酸は、標的特異的プライマーのアニリングの速度およびポリメラーゼが特定の標的配列核酸を読み通すことができる速度に依存する固有の合成速度により特性付けられる。伸長の速度および合成の速度における違いは、バイアスを作り出し、それは、結果として合成の単一周回におけるわずかな違いをもたらす。しかし、そのわずかな違いは

50

、PCRの間に指数関数的に増幅された状態になる。結果としてもたらされるギャップは、PCRバイアスと呼ばれる。そのバイアスは、試料中のそれぞれの配列の最初の量におけるあらゆる違いを不明瞭にし、あらゆる定量的分析を妨げ得る。

【0017】

本発明は、標的特異的プライマー（遺伝子特異的プライマーおよび偶然にゲノム内の結合部位に特異的である縮重プライマーを含む）の伸長を単一工程に制限する。あらゆる指数的増幅は、鋳型依存性のバイアスに左右されない、または標的特異的プライマーよりも小さいバイアスに左右されるユニバーサルプライマーを用いて実施される。

【0018】

図1に記載のとおり、本発明の方法は、プライマー伸長を含む。当該方法は、反応設定工程（工程1、プライマーハイブリダイゼーション）、続いてポリメラーゼ添加工程（工程2、プライマー伸長）を含む。場合により、プライマーハイブリダイゼーションおよび伸長工程は、同時に、すなわち同じ反応条件下での単一の工程として実施される。他の態様において、当該工程は、異なる反応条件を有する2工程プロセスとして別々に実施される。

10

【0019】

プライマーハイブリダイゼーション工程は、プライマーの標的特異的領域により媒介される。ある態様において、標的特異的領域は、遺伝子のエキソン、イントロン、もしくは翻訳されない部分中に、または遺伝子の転写されない部分、例えばプロモーターもしくはエンハンサー中に位置する遺伝子の領域にハイブリダイズすることができる。ある態様において、遺伝子はタンパク質をコードする遺伝子であるが、他の態様において、遺伝子はタンパク質をコードする遺伝子ではなく、例えばRNAをコードする遺伝子または偽遺伝子である。さらに他の態様において、標的特異的領域は、遺伝子間領域中に位置している。RNA標的に関して、プライマーは、オリゴdT配列を含むことができる。

20

【0020】

予め設計された標的特異的領域の代わりに、プライマーは、縮重配列、すなわちランダムに組み込まれたヌクレオチドの一続きを含有することができる。そのようなプライマーも、ゲノム内の結合部位を見つけてその結合部位に関して標的特異的プライマーとして作用することができる。

【0021】

標的特異的領域に加えて、プライマーは追加の配列を含むことができる。ある態様において、これらの配列は、標的特異的領域の5'末端に位置している。他の態様において、標的特異的領域が下記のように標的にハイブリダイズしてプライマー伸長反応を駆動することができる限り、プライマー内の他の箇所にもこれらの配列を含めることができる可能性がある。プライマー内の追加の配列は、1以上のバーコード配列、例えば固有の分子同定配列（UID）または多重試料同定配列（MID）を含むことができる。バーコード配列は単一の配列として、または2以上の配列として存在することができる。

30

【0022】

ある態様において、追加の配列は、プライマーの5'末端へのライゲーションを促進する配列を含む。プライマーは、以下の節において記載されるアダプターのライゲーションを可能にするユニバーサルライゲーション配列を含有することができる。

40

【0023】

ある態様において、追加の配列は、1以上のユニバーサル増幅プライマーに関する1以上の結合部位を含む。

プライマー伸長工程は、核酸ポリメラーゼにより実施される。分析されている核酸のタイプに応じて、ポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼ（“DNAポリメラーゼ”）またはRNA依存性DNAポリメラーゼ（“逆転写酵素”）であることができる。

【0024】

ある態様において、プライマー伸長反応において合成される核酸鎖の長さを制御することが望ましい（図1、伸長工程）。下記で説明するように、この鎖の長さは、本発明の方

50

法のその後の工程およびあらゆる下流の適用を受ける核酸の長さを決定する。伸長反応は、当該技術で既知のあらゆる方法により停止させることができる。反応は、例えば温度におけるシフトまたはポリメラーゼ阻害剤の添加により物理的に停止させることができる。ある態様において、反応は氷上に置くことにより停止させることができる。他の態様において、反応は温度を上げて非熱安定性ポリメラーゼを不活性化することにより停止させることができる。さらに他の態様において、反応は酵素に関する決定的に重要な補因子を隔離することができるキレート剤、例えばEDTA、または酵素を可逆的もしくは不可逆的に不活性化することができる別の化学的もしくは生物学的物質、化合物の添加により停止させることができる。

【0025】

プライマー伸長産物の長さを制御する別の方法は、重要な構成要素（例えばdNTP）を制限することにより伸長反応を停止させて伸長の長さを直接制限する、またはMg²⁺を制限して伸長の速度を遅くして伸長停止点を制御する能力を向上させることである。当業者は、制限されたプライマー伸長を可能にして所望の長さの産物を主に生成する重要な構成要素の適切な量を経験的または理論的に決定することができる。

【0026】

プライマー伸長産物の長さを制御する別の方法は、可逆的ターミネーターヌクレオチドを含むターミネーターヌクレオチドの添加である。当業者は、制限されたプライマー伸長を可能にして所望の長さの産物を主に生成するターミネーターおよび非ターミネーターヌクレオチドの適切な比率を経験的または理論的に決定することができる。ターミネーターヌクレオチドの例は、ジデオキシヌクレオチド、2'-ホスフェートヌクレオチド（米国特許第8163487号において記載されているようなもの）、3'-Oブロックされた可逆的ターミネーター、および3'がブロックされていない可逆的ターミネーター（例えば米国特許出願公開第20140242579号およびGuo, J., et al., Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides, P.N.A.S. 2008 105 (27) 9145-9150において記載されているようなもの）を含む。プライマー伸長産物の長さを制御するさらに別の方法は、プライマー伸長反応への限られた量のウラシル（dUTP）の添加である。ウラシル含有DNAは、次いで脱塩基部位を生成するためにウラシル-N-DNAグリコシラーゼで処理されることができる。脱塩基部位を有するDNAは、米国特許第8669061号において記載されているように分解の効率を向上させるためにアルカリを任意で添加して熱処理により分解されることができる。当業者は、制限されたdUTPの包含を可能にしてエンドヌクレアーゼ処理の際に所望の長さの産物を主に生成する伸長反応におけるdUTP対dTTPの適切な比率を経験的または理論的に決定することができる。

【0027】

ある態様において、伸長産物の長さは、入力核酸の長さにより本質的に制限される。例えば、母体血漿中に存在するセルフリーDNAは、長さが200bp未満であり、大部分は166bpの長さである。Yu, S.C.Y., et al., Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing, PNAS USA 2014; 111(23):8583-8。健康な人および癌患者の血漿中にあるセルフリーDNAの長さの中央値は、約185~200bpである。Giacona, M.B., et al., Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls, Pancreas 1998; 17(1):89-97。不十分に保存された、または化学処理された試料は、化学的または物理的に分解された核酸を含有し得る。例えば、ホルマリン固定されパラフィン包埋された組織（FFPET）は、典型的には長さが平均150bpである核酸を生じる。

【0028】

精製

ある態様において、本発明の方法は、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素によるプライマー伸長後に1以上の精製工程を含む。精製は、未使用のプライマー分子およびプライマー伸長産物を作り出すために用いられた鋳型分子を除去するであろう。ある態様におい

10

20

30

40

50

て、鋳型核酸および伸長されたプライマー以外の全ての核酸フラグメントは、エキソヌクレアーゼ消化により除去される。その態様において、プライマー伸長において用いられるプライマーには、プライマーおよびあらゆる伸長産物をエキソヌクレアーゼ消化に抵抗性にする5'末端修飾を付与することができる。そのような修飾の例は、ホスホロチオエート結合を含む。他の態様において、RNA鋳型は、DNAに危害を与えないであろう酵素処理、例えばRNAアーゼH消化を含むRNAアーゼ消化により除去されることができる。さらに他の態様において、プライマーおよび大きいサイズの鋳型DNAは、伸長産物からサイズ排除法、例えばゲル電気泳動、クロマトグラフィーまたは等速電気泳動により分離される。

【0029】

ある態様において、精製は親和性結合による。この態様のバリエーションにおいて、親和性は、特定の標的配列核酸に対するものである（配列捕捉）。他の態様において、プライマーは親和性タグを含む。当該技術で既知のあらゆる親和性タグ、例えばビオチンまたは抗体または特異的抗体が存在する抗原を用いることができる。親和性タグに関する親和性パートナーは、溶液中に、例えば懸濁された粒子もしくはビーズ上に存在することができる、または固体支持体に結合させることもできる。親和性精製の過程において、反応混合物の未結合の構成要素は洗い流される。ある態様において、未使用のプライマーを除去するために追加の工程が採用される。

【0030】

ユニバーサルプライミング配列のライゲーション

ある態様において、本発明は、ライゲーション工程を含む。例えば、核酸の3'末端にホモポリマー尾部を付加することが可能である。この態様において、ホモポリマーは、（mRNAに関するポリA尾部とポリTプライマーに類似の）逆相補性ホモポリマーに関する結合部位の役目を果たすことができる。ライゲーションは、1以上のアダプター配列を先行する工程において生成されたプライマー伸長産物に付加する。アダプター配列は、（増幅または配列決定のための）1以上のユニバーサルプライミング部位および場合により1以上のバーコードを供給する。アダプターをライゲーションする正確な方式は、アダプターがプライマー伸長産物と会合した状態になり下記のその後の工程を可能にする限り、重要ではない。

【0031】

上記のある態様において、本発明の方法は、ユニバーサルプライミング配列（“プライミング部位”）を含み、単一のプライミング部位を用いてプライマー伸長産物を生成する標的的特異的プライマーを含む。そのような態様において、1つの追加のプライミング配列（“プライミング部位”）のみが、指数的増幅を可能にするために提供される必要がある。他の態様において、標的的特異的プライマーは、ユニバーサルプライミング部位を含まない。そのような態様において、2つのプライミング部位が、指数的増幅を可能にするために提供される必要がある。ユニバーサルプライミング部位を有するアダプターは、当該技術で利用可能なあらゆる一本鎖ライゲーション法により付加されることができる。

【0032】

一本鎖ライゲーションの一例は、伸長プライマーがユニバーサルライゲーション部位を含む態様において用いられることができる。そのような態様において、二本鎖領域およびプライマー中のユニバーサルライゲーション部位に相補的な一本鎖オーバーハングを有するアダプターは、図1、工程4において示されているようにアニーリングおよびライゲーションされることができる。アダプターの一本鎖3'オーバーハングのプライマーの5'末端におけるユニバーサルライゲーション部位へのアニーリングは、プライマー伸長産物を含有する鎖中にニックを有する二本鎖領域を作り出す。2つの鎖は、ニックにおいて、プライマー伸長産物の5'ホスフェートおよびアダプターの3'-OHの間の反応を触媒することができるDNAリガーゼもしくは別の酵素または非酵素性試薬によりライゲーションされることができる。アダプターを連結することにより、ライゲーションは、プライマー伸長産物の一方の末端においてユニバーサルプライミング部位を提供する。

10

20

30

40

50

【0033】

一本鎖ライゲーション法の別の例は、ユニバーサルプライミング部位をプライマー伸長産物の反対側の末端に付加するために（または、伸長プライマーが伸長産物の両側に対してユニバーサルライゲーション部位を含まない態様において）用いることができる。この態様に関して、ライゲーションされるべきプライマー伸長産物の一方または両方の末端は、ユニバーサルライゲーション部位を有しない。さらに、ある態様において、ライゲーションされるべきプライマー伸長産物の少なくとも一方の末端は、（例えば、ランダム停止事象または未知の配列バリエーションにより）未知の配列を有する。そのような態様において、配列非依存的一本鎖ライゲーション法が用いられる。典型的な方法が、米国出願公開第20140193860号において記載されている。本質的には、その方法は、一本鎖3'末端オーバーハングがユニバーサルライゲーション部位を有する代わりにランダム配列、例えばランダムヘキサマー配列を有するアダプターの集団を用いる。その方法のある態様において、アダプターは、ヘアピン構造も有する。別の例は、Acceler-NGS（商標）1S DNA Library Kit（Swift Biosciences、ミシガン州アナーバー）により可能になる方法である。

10

【0034】

本発明の方法のライゲーション工程は、リガーゼもしくは類似の活性を有する別の酵素または非酵素性試薬を利用する。リガーゼは、例えばウイルスもしくは細菌由来のDNAもしくはRNAリガーゼ、例えばT4もしくは大腸菌リガーゼ、または熱安定性リガーゼであるAfu、Taq、TflもしくはTfhである。ある態様において、代替の酵素、例えばトポイソメラーゼを用いることができる。さらに、非酵素性試薬が、米国特許出願公開第20140193860号において記載および参照されているように、プライマー伸長産物の5'ホスフェートおよびアダプターの3'-OHの間でホスホジエステル結合を形成するために用いることができる。

20

【0035】

任意のプライマー伸長および平滑末端ライゲーション

方法のある態様において、アダプターの最初のライゲーションの後、任意のプライマー伸長が行われる。ライゲーションされたアダプターは、伸長されて二本鎖核酸を作り出すことができる遊離の3'末端を有する。次いで、アダプターの反対側の末端は、別のアダプターの平滑末端ライゲーションに適した状態になるであろう。一本鎖ライゲーション手順に関する必要性を回避して、分子のこの二本鎖末端は、あらゆるリガーゼまたは別の酵素的もしくは非酵素的な手段により二本鎖アダプターにライゲーションされることができる。二本鎖アダプター配列は、（増幅または配列決定のための）1以上のユニバーサルプライミング部位および場合により1以上のバーコードを付与する。

30

【0036】

精製

ある態様において、本発明の方法は、ライゲーション工程の後に1以上の精製工程を含む。精製は、未使用のアダプター分子を除去するであろう。アダプターおよび大きいサイズのライゲーション産物は、伸長産物からサイズ排除法、例えばゲル電気泳動、クロマトグラフィーまたは等速電気泳動により分離される。

40

【0037】

ある態様において、精製は、親和性結合による。この態様のバリエーションにおいて、親和性は、特定の標的配列核酸に対するものである（配列捕捉）。他の態様において、アダプターは親和性タグを含む。当該技術で既知のあらゆる親和性タグ、例えばビオチンまたは抗体または特異的抗体が存在する抗原を用いることができる。親和性タグに関する親和性パートナーは、溶液中に、例えば懸濁された粒子もしくはビーズ上に存在することができ、または固体支持体に結合していてもよい。親和性精製の過程において、反応混合物の未結合の構成要素は洗い流される。ある態様において、未使用のアダプターを除去するために追加の工程が採用される。

【0038】

50

増幅

ある態様において、本発明は増幅工程を含む。この工程は、線形または指数的増幅、例えばPCRを含むことができる。増幅のためのプライマーは、増幅されている核酸内に存在しているあらゆる配列を含むことができ、一方または両方の鎖の合成を支持することができる。増幅は等温であることができ、または熱サイクリングを含むこともできる。

【0039】

ある態様において、増幅は指数的であり、PCRを含む。PCR増幅バイアスを低減することが望ましい。1以上の遺伝子に特異的なプライマーが用いられる場合、バイアスを低減するために、本発明の方法は限られた数の増幅サイクル、例えば約10以下のサイクルを含む。これらの態様の他のバリエーションにおいて、ユニバーサルプライマーが、両方の鎖を合成するために用いられる。ユニバーサルプライマー配列は、一方または両方のライゲーションされたアダプターの元の伸長プライマーの一部であってもよい。1種類または2種類のユニバーサルプライマーを用いることができる。上記の伸長プライマーおよび一方または両方のアダプターは、同じプライマー結合部位を有するように設計することができる。その態様において、単一のユニバーサルプライマーを、両方の鎖を合成するために用いることができる。他の態様において、増幅されるべき分子の一方の側における伸長プライマー（またはアダプター）および他方の側におけるアダプターは、異なるユニバーサルプライマー結合部位を含有する。ユニバーサルプライマーは、（同じまたは異なる配列の）別のユニバーサルプライマーと対になっていることができる。他の態様において、ユニバーサルプライマーは、遺伝子特異的プライマーと対になっていてもよい。ユニバーサルプライマーを用いたPCRは、低減した配列バイアスを有するため、増幅サイクルの数は、遺伝子特異的プライマーを用いたPCRにおけるものと同程度まで制限される必要はない。ユニバーサルプライマーが用いられる場合の増幅サイクルの数は、低くてもよいが、約20、30、またはより多くのサイクルほどに高くてもよい。

【0040】

バーコード

本発明は、分子バーコードの使用を含む。バーコードは、典型的には4～36ヌクレオチドからなる。ある態様において、バーコードは、互いの10以内またはより小さい範囲内の融点を有するように設計される。バーコードは、最小限に交差ハイブリダイズするセット、すなわち所望の反応条件下で互いと可能な限り少ない安定なハイブリッドを形成する配列の組み合わせを形成するように設計することができる。配列同定および計数のためのバーコードの設計、配置および使用は、当該技術で既知である。例えば、米国特許第7,393,665号、第8,168,385号、第8,481,292号、第8,685,678号、および第8,722,368号を参照。

【0041】

バーコードは、試料中のそれぞれの核酸分子およびその子孫（すなわち、元の核酸分子を用いて生成される核酸分子のセット）を同定するために用いることができる。そのようなバーコードは、“固有のID”（UID）である。

【0042】

バーコードは、分析されている核酸分子が由来する試料を同定するために用いることもできる。そのようなバーコードは、“多重試料ID”（“MID”）である。同じ試料に由来する全ての分子は、同じMIDを共有する。

【0043】

バーコードは、それぞれのバーコードに特徴的なヌクレオチドの固有の配列を含む。ある態様において、バーコードの配列は予め設計されている。他の態様において、バーコード配列はランダムである。バーコード内の全てまたは一部のヌクレオチドはランダムであってもよい。既知の配列内のランダム配列およびランダムヌクレオチド塩基は、それぞれ“縮重配列”および“縮重塩基”と呼ばれる。ある態様において、分子は2以上のバーコード：分子同定のためのバーコード（UID）および試料同定のためのバーコード（MID）を含む。場合により、UIDまたはMIDは、それぞれが、一緒になった際に分子ま

10

20

30

40

50

たは試料の同定を可能にするいくつかのバーコードを含む。

【0044】

ある態様において、反応中のUIDの数は、標識されるべき分子の数を上回ることができる。ある態様において、1以上のバーコードが、配列をグループ分けまたは貯蔵する(bin)ために用いられる。例えば、ある態様において、1以上のUIDが、配列をグループ分けまたは貯蔵するために用いられ、ここで、それぞれの貯蔵所(bin)中の配列は、同じUIDを含有し、すなわち、単一の標的分子由来のアンプリコンである。ある態様において、UIDが、配列をアラインメントするために用いられる。他の態様において、標的特異的領域が、配列をアラインメントするために用いられる。本発明のある態様において、UIDは、最初のプライマー伸長事象において導入され、一方で試料バーコード(MID)は、ライゲーションされたアダプター中に導入される。

10

【0045】

配列決定

ライゲーションが実施された後、すなわち工程4または任意の工程5(図1)の後、核酸産物を配列決定することができる。配列決定は、当該技術で既知のあらゆる方法により実施されることができる。高スループット単一分子配列決定が、特に好適である。そのような技術の例は、454 Life Sciences GS FLXプラットフォーム(454 Life Sciences、コネチカット州ブランフォード)、Illumina HiSeqプラットフォーム(Illumina、カリフォルニア州サンディエゴ)、Ion Torrentプラットフォーム(Life Technologies、ニューヨーク州グランドアイランド)、SMRTを利用するPacific Biosciencesプラットフォーム(Pacific Biosciences、カリフォルニア州メンローパーク)および合成による配列決定を含む、または含まないあらゆる他の現在存在する、または将来の単一分子配列決定技術を含む。これらの態様のバリエーションにおいて、配列決定は、一方もしくは両方のアダプター配列中に、または一方もしくは両方のプライマー配列中に存在するユニバーサルプライマー部位を利用する。これらの態様のさらに他のバリエーションにおいて、遺伝子特異的プライマーが、配列決定のために用いられる。しかし、ユニバーサルプライマーは、遺伝子特異的プライマーと比較して低減した配列決定バイアスと関係していることが特徴である。

20

【0046】

ある態様において、配列決定工程は配列の整列(Aligning)を含む。ある態様において、整列は、複数の配列、例えば同じ固有の分子ID(UID)を有する複数からコンセンサス配列を決定するために用いられる。ある態様において、整列は、配列のバリエーション、例えば一塩基バリエーション(SNV)を同定するために用いられる。ある態様において、コンセンサス配列は、全てが同一のUIDを有する複数の配列から決定される。他の態様において、UIDは、人為産物、すなわち(特定のUIDにより特性付けられる)単一の分子の子孫中に存在するバリエーションを排除するために用いられる。PCRエラーまたは配列決定エラーの結果もたらされるそのような人為産物は、UIDを用いて排除することができる。

30

【0047】

ある態様において、試料中のそれぞれの配列の数は、同じ多重試料ID(MID)を有する集団内のそれぞれのUIDを有する配列の相対的な数を定量化することにより、定量化することができる。それぞれのUIDは、元の試料中の単一の分子を表し、それぞれの配列バリエーションと関係する異なるUIDの計数は、元の試料中のそれぞれの配列バリエーションの割合を決定することができ、ここで、全ての分子は、同じMIDを共有する。当業者は、コンセンサス配列を決定するために必要な配列の読みの数を決定することができるであろう。ある態様において、関連する数は、正確な定量的結果に必要なUIDあたりの読み(“配列深度”)である。ある態様において、所望の深度は、UIDあたり5~50回の読みである。

40

【0048】

50

試料

本発明の方法において用いられる試料は、核酸を含有するあらゆる個人（例えばヒト、患者）または環境試料を含む。ポリヌクレオチドは、試料から抽出されることができ、または試料は、本発明の方法を直接施されることができる。出発試料は、抽出または単離された核酸、DNAまたはRNAであることもできる。試料は、生物から得られたあらゆる組織または流体を構成することができる。例えば、試料は、腫瘍生検または血液または血漿試料であることができる。ある態様において、試料は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された（FFPE）試料である。試料は、1以上の源、例えば1人以上の患者からの核酸を含むことができる。ある態様において、組織は、病原体に感染している可能性があり、従って宿主の核酸および病原体の核酸を含有している可能性がある。

10

【0049】

DNA抽出の方法は、当該技術で周知である。J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 1989, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press: (ニューヨーク州ニューヨーク)を参照。様々なキットが、生物学的試料から核酸(DNAまたはRNA)を抽出するために商業的に入手可能である(例えば、BD Biosciences Clontech(カリフォルニア州パロアルト)、Epicentre Technologies(ウィスコンシン州マディソン); Gentra Systems, Inc.(ミネソタ州ミネアポリス); およびQiagen, Inc.(カリフォルニア州バレンシア)、Ambion, Inc.(テキサス州オースティン); BioRad Laboratories(カリフォルニア州ハーキュリーズ); 等)。

20

【0050】

ある態様において、本発明の方法において用いられる出発試料は、複数のヌクレオチドを含むライブラリー、例えばゲノムライブラリーまたは発現ライブラリーである。他の態様において、ライブラリーは、本発明の方法により作製される。生物学的試料である出発物質を用いて、本発明の方法は、増幅ライブラリー、または多様性もしくは配列を表すアンプリコンの集合を作り出す。ライブラリーは、保管され、ライブラリー中の核酸のさらなる増幅または配列決定のために複数回用いることができる。

【実施例】

【0051】

実施例1 遺伝子特異的プライマーおよび線形増幅を用いた(予言的)標的濃縮

30

核酸は、ヒト血漿試料からDNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen、カリフォルニア州バレンシア)を用いて単離する。遺伝子特異的プライマーを添加する。プライマーは、ヒトEGFR遺伝子のエキソン19にハイブリダイズする遺伝子特異的部分を有するように設計される。プライマーは、6塩基長の固有の同定配列(UID)およびユニバーサルライゲーション配列も有する。プライマーは、エキソヌクレアーゼ消化を防ぐために5'末端において修飾されている。プライマーは、Isothermal Amplification Buffer(New England Biolabs、マサチューセッツ州イプスウィッチ、“NEB”)中で60°Cにおいて20分間ハイブリダイズさせられ、Bst Polymerase 2.0(NEB)(非熱安定性DNAポリメラーゼ)が添加され、65°Cで20秒間インキュベートされる。反応は、ポリメラーゼを95°Cで3分間熱失活させることにより終了させることができる。核酸の鑄型鎖は、5' ssDNA特異的エキソヌクレアーゼRecJF(NEB)および5' dsDNA特異的ラムダエキソヌクレアーゼの組み合わせにより消化される。伸長されなかったプライマーは、Ampureビーズ精製(Beckman Coulter、カリフォルニア州ブレア)を用いて除去される。

40

【0052】

プライマー伸長の結果生じる一本鎖は、精製され、ライゲーション反応中に添加される。2種類のライゲーションアダプターが添加される。5'アダプターは、ユニバーサルライゲーション部位、増幅のためのユニバーサルプライマー部位および配列決定のためのユニバーサルプライマー部位を含有するように設計されている。5'アダプターは、多重試

50

料ID (MID) も含有する。3'アダプターは、増幅のためのユニバーサルプライマー部位および配列決定のためのユニバーサルプライマー部位を含有するように設計されている。一本鎖ライゲーションは、Accel-NGS (商標) 1S DNA Library Kit (Swift Biosciences、ミシガン州アナーバー) からの試薬を用いて実施される。

【0053】

ライゲーションしなかったアダプターは、ライゲーション産物から上記のように Ampure 精製により分離される。

線形増幅のため、ライゲーション産物は、3'末端アダプター中のプライマー結合部位に対応する単一のユニバーサルプライマーを含む反応混合物と接触させることができる。増幅後、反応混合物の試料は、ユニバーサル配列決定プライマーを含む配列決定反応中に移される。

10

【0054】

実施例2 縮重プライマーおよび指数的増幅を用いた(予言的)標的濃縮

核酸は、ヒト血漿試料から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen、カリフォルニア州バレンシア) を用いて単離される。縮重配列を含有するプライマーを添加する。プライマーは、6ヌクレオチドのランダム配列、6塩基長の固有の同定配列 (UID) およびユニバーサルライゲーション配列を有するように設計されている。プライマーは、エキソヌクラーゼ消化を防ぐ (present) ために 5'末端において修飾されている。プライマーは、Isothermal Amplification Buffer (NEB) 中で 60 において 20 分間ハイブリダイズさせられ、Bst Polymerase 2.0 (NEB) (非熱安定性 DNA ポリメラーゼ) が添加され、65 で 20 秒間インキュベートされる。反応は、ポリメラーゼを 95 で 3 分間熱失活させることにより終了させることができる。核酸の鋳型鎖は、5' ssDNA 特異的エキソヌクラーゼ RecJF (NEB) および 5' dsDNA 特異的ラムダエキソヌクラーゼの組み合わせにより消化される。伸長されなかったプライマーは、実施例1において記載されたように Ampure ビーズ精製を用いて除去される。

20

【0055】

プライマー伸長の結果生じる一本鎖は、精製され、ライゲーション反応中に添加される。2種類 (kids) のライゲーションアダプターが、添加される。5'アダプターは、ユニバーサルライゲーション部位、増幅のためのユニバーサルプライマー部位および配列決定のためのユニバーサルプライマー部位を含有するように設計されている。5'アダプターは、多重試料ID (MID) も含有する。3'アダプターは、増幅のためのユニバーサルプライマー部位および配列決定のためのユニバーサルプライマー部位を含有するように設計されている。一本鎖ライゲーションは、本質的に米国特許出願公開第20140193860号において記載されているように実施される。

30

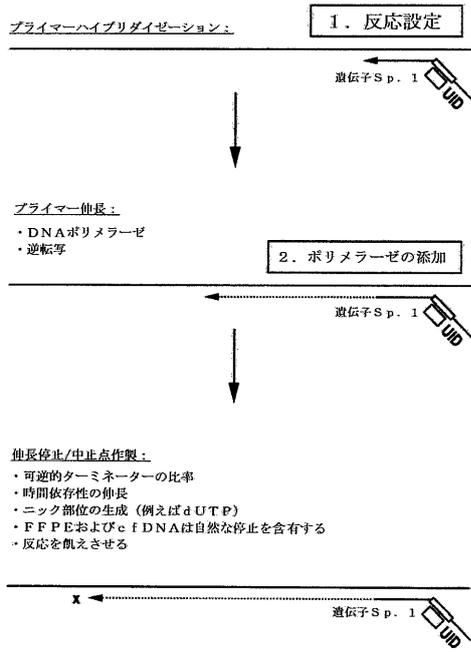
【0056】

ライゲーションされなかったアダプターは、実施例1において記載されたように Ampure ビーズ精製を用いて除去される。

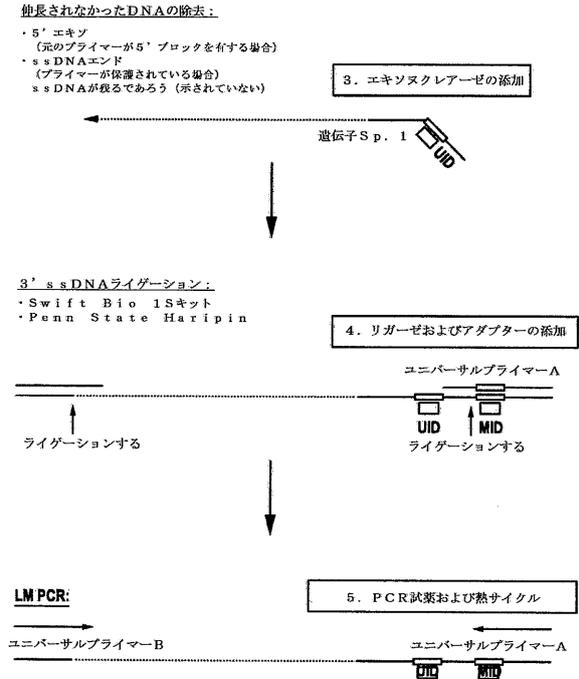
指数的増幅のため、ライゲーション産物は、ユニバーサル増幅プライマーの対を含む PCR 反応混合物と接触させることができる。増幅後、反応混合物の試料は、ユニバーサル配列決定プライマーを含む配列決定反応中に移される。

40

【図 1 A】



【図 1 B】



フロントページの続き

(72)発明者 ゴッドウィン, ブライアン

アメリカ合衆国コネチカット州06473, ノース・ヘヴン, エルム・ストリート 79

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開2000-325079(JP, A)

米国特許出願公開第2007/0020640(US, A1)

米国特許出願公開第2012/0289414(US, A1)

国際公開第2014/071361(WO, A1)

国際公開第2015/002908(WO, A1)

米国特許出願公開第2014/0193860(US, A1)

Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2011, Vol.108, No.50, pp.20166

-20171

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed