

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-507992
(P2013-507992A)

(43) 公表日 平成25年3月7日(2013.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2012-537019 (P2012-537019)	(71) 出願人	512110651 スウィフト バイオサイエンシーズ、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ミシガン 48103, アナーバー, ザ グレイド ストリー ト 3303
(86) (22) 出願日	平成22年10月27日 (2010.10.27)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成24年5月21日 (2012.5.21)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/054362	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02011/056687		
(87) 国際公開日	平成23年5月12日 (2011.5.12)		
(31) 優先権主張番号	61/255,461		
(32) 優先日	平成21年10月27日 (2009.10.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチドプライマー及びプローブ

(57) 【要約】

本発明は、改善されたプライマーデザインを含む新規な技術を提供する。これらのプライマー対は、広範囲な用途を有し、かつ高感度性かつ高選択性を提供する。1つの態様では、本開示は、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを提供し、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T₁)に相補的な配列を有する第1のドメイン(P_a)と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(P_c)を含み、第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T₂)に相補的である第1のドメイン(F_b)と、P_cとF_dとが適切な条件下でハイブリダイズするようにP_cに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(F_d)とを含む。

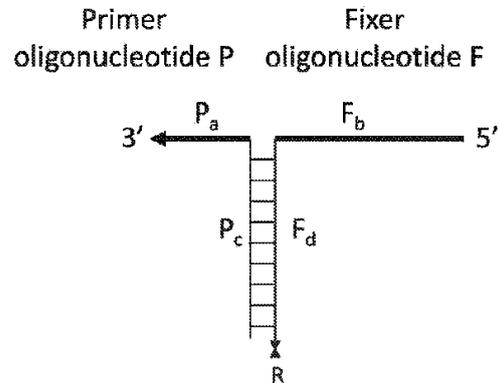


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであって、

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T₁) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (P a) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (P c) とを含み、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T₂) に相補的である第 1 のドメイン (F b) と、適切な条件下で P c と F d がハイブリダイズするように P c に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (F d) とを含む、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであり、

前記標的ポリヌクレオチドが、前記標的ポリヌクレオチドに対する F b のハイブリダイゼーションによって変性される二次構造を有する、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 2】

前記標的ポリヌクレオチドの前記二次構造が、F の不在下で、前記標的ポリヌクレオチドのポリメラーゼ伸張を阻害する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドプライマー。

【請求項 3】

前記 P 及び / 又は F が、修飾核酸を更に含む、請求項 1 又は 2 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 4】

第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであって、

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 のポリヌクレオチド領域 (T₁) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (P a) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (P c) とを含み、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T₂) に相補的である第 1 のドメイン (F b) と、適切な条件下で P c と F d がハイブリダイズするように P c に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (F d) とを含む、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであり、

P 及び / 又は F が、修飾核酸を更に含む、前記ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 5】

第 1 のポリヌクレオチドと、第 2 のポリヌクレオチドと、ブロッカーポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであり、

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T₁) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (P a) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (P c) とを含み、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T₂) に相補的である第 1 のドメイン (F b) と、適切な条件下で P c と F d がハイブリダイズするように P c に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (F d) とを含み、

前記ブロッカーポリヌクレオチドが、T₁ と T₂ の 5' 側に存在する第 3 の標的ポリヌクレオチド領域 (T₃) に相補的であるヌクレオチド配列を含む、前記ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 6】

P の 3' 末端におけるヌクレオチドと前記ブロッカーポリヌクレオチドの 5' 末端が重複する、請求項 5 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 7】

前記ブロッカーポリヌクレオチドが、P a の全長にわたって P a に重複する配列を有す

10

20

30

40

50

る、請求項 6 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 8】

前記 P の 3' 末端における前記ヌクレオチドと前記ブロッカーポリヌクレオチドの前記 5' 末端におけるヌクレオチドが異なる、請求項 6 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 9】

P、F 及び / 又は前記ブロッカーポリヌクレオチドが、修飾核酸を含む、請求項 5、6、又は 8 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 10】

第 1 のポリヌクレオチドと、第 2 のポリヌクレオチドと、プローブポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであって、

10

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (Pa) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Pc) とを含み、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (Fb) と、適切な条件下で Pc と Fd がハイブリダイズするように Pc に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Fd) とを含み、

前記プローブポリヌクレオチドが、 T_1 と T_2 の 5' 側に存在する第 3 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_4) に相補的であるヌクレオチド配列を含む、前記ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

20

【請求項 11】

前記プローブポリヌクレオチドが、標識とクエンチャーとを含む、請求項 10 に記載のポリヌクレオチドプライマー。

【請求項 12】

P、F 及び / 又は前記プローブポリヌクレオチドが、修飾核酸を含む、請求項 10 又は 11 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 13】

ブロッカーポリヌクレオチドを更に含み、前記ブロッカーポリヌクレオチドが、 T_1 及び T_2 の 5' 末端に存在し、かつ T_4 の 3' 末端に存在する第 4 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_3) に相補的であるヌクレオチド配列を含む、請求項 10、11 又は 12 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

30

【請求項 14】

前記ブロッカーが、修飾核酸を含む、請求項 13 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 15】

第 1 のポリヌクレオチドと、第 2 のポリヌクレオチドと、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせであって、

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (Pa) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Pc) と、その 5' 末端における標識とを含み、

40

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (Fb) と、2 つのポリヌクレオチド配列、Pc の 5' ポリヌクレオチド配列と Fd が適切な条件下でハイブリダイズするように Pc の 5' に対して十分に相補的である 5' ポリヌクレオチド配列、及び Fd の 3' ポリヌクレオチド配列とユニバーサルクエンチャーが適切な条件下でハイブリダイズするように、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドに対して十分に相補的である 3' ポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Fd) とを含み、

前記ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドが、クエンチャーと、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドと Fd の 3' ポリヌクレオチド配列が適切な条件下でハイブ

50

リダイズするように F d の 3' ポリヌクレオチド配列に対して十分に相補的であるヌクレオチド配列とを含む、前記ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 16】

P、F 及び / 又は前記ユニバーサルクエンチャーが、修飾核酸を含む、請求項 15 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 17】

上記請求項のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーが、逆方向プライマーを更に含み、前記逆方向プライマーが、T₁ に対してハイブリダイズする配列を含むポリヌクレオチド鎖に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 16 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマー。

10

【請求項 18】

P が修飾核酸を含む、請求項 3、4、9、12、14 又は 16 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 19】

F が修飾核酸を更に含む、請求項 3、4、9、12、14 又は 16 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 20】

前記修飾核酸が P a 内にある、請求項 18 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 21】

前記修飾核酸が F b 内にある、請求項 19 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

20

【請求項 22】

P が、P a 内に複数個の修飾核酸を含む、請求項 1 ~ 21 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 23】

F が、F b 内に複数個の修飾核酸を含む、請求項 1 ~ 22 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 24】

前記修飾核酸が、P の 3' 末端におけるヌクレオチドである、請求項 21 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

30

【請求項 25】

F d が、P c に対して少なくとも 70% 相補的である、請求項 1 ~ 24 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 26】

P c が、F d に対して少なくとも 70% 相補的である、請求項 1 ~ 25 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 27】

P c と F d が、前記鋳型ポリヌクレオチドの不在下で互いに対してハイブリダイズする、請求項 1 ~ 26 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

40

【請求項 28】

P が、DNA、修飾 DNA、RNA、修飾 RNA、ペプチド核酸 (PNA)、又はそれらの組み合わせである、請求項 1 ~ 27 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 29】

F が、DNA、修飾 DNA、RNA、修飾 RNA、ペプチド核酸 (PNA)、又はそれらの組み合わせである、請求項 1 ~ 28 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 30】

50

DNAポリメラーゼからの伸張をブロックする、Fにその3'末端において結合されているブロッキング基を更に含む、請求項1~29のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項31】

前記ブロッキング基が、3'リン酸塩基、3'アミノ基、ジデオキシヌクレオチド、及び逆位デオキシチミジン(dT)からなる群から選択される、請求項30に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項32】

Paが、長さ約5塩基~長さ約30塩基、長さ約5塩基~長さ約20塩基、長さ約5塩基~長さ約15塩基、長さ約5塩基~長さ約10塩基、長さ約5塩基~長さ約8塩基である、請求項1~30のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

10

【請求項33】

Pcが、長さ約5塩基~長さ約200塩基、長さ約5塩基~長さ約150塩基、長さ約5塩基~長さ約100塩基、長さ約5塩基~長さ約50塩基、長さ約5塩基~長さ約45塩基、長さ約5塩基~長さ約40塩基、長さ約5塩基~長さ約35塩基、長さ約5塩基~長さ約30塩基、長さ約5塩基~長さ約25塩基、長さ約5塩基~長さ約20塩基、長さ約5塩基~長さ約15塩基、長さ約10塩基~長さ約50塩基、長さ約10塩基~長さ約45塩基、長さ約10塩基~長さ約40塩基、長さ約10塩基~長さ約35塩基、長さ約10塩基~長さ約30塩基、長さ約10塩基~長さ約25塩基、長さ約10塩基~長さ約20塩基、又は長さ約10塩基~長さ約15塩基である、請求項1~32のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

20

【請求項34】

Fbが、長さ約10塩基~長さ約5000塩基、長さ約10塩基~長さ約4000塩基、長さ約10塩基~長さ約3000塩基、長さ約10塩基~長さ約2000塩基、長さ約10塩基~長さ約1000塩基、長さ約10塩基~長さ約500塩基、長さ約10塩基~長さ約250塩基、長さ約10塩基~長さ約200塩基、長さ約10塩基~長さ約150塩基、長さ約10塩基~長さ約100塩基、長さ約10塩基~長さ約95塩基、長さ約10塩基~長さ約90塩基、長さ約10塩基~長さ約85塩基、長さ約10塩基~長さ約80塩基、長さ約10塩基~長さ約75塩基、長さ約10塩基~長さ約70塩基、長さ約10塩基~長さ約65塩基、長さ約10塩基~長さ約60塩基、長さ約10塩基~長さ約55塩基、長さ約10塩基~50塩基、長さ約10塩基~長さ約45塩基、長さ約10塩基~長さ約40塩基、長さ約10塩基~長さ約35塩基、長さ約10塩基~長さ約30塩基、又は長さ約10塩基~長さ約100塩基である、請求項1~33のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

30

【請求項35】

Fdが、長さ約5塩基~長さ約200塩基、長さ約5塩基~長さ約150塩基、長さ約5塩基~長さ約100塩基、長さ約5塩基~長さ約50塩基、長さ約5塩基~長さ約45塩基、長さ約5塩基~長さ約40塩基、長さ約5塩基~長さ約35塩基、長さ約5塩基~30塩基、長さ約5塩基~長さ約25塩基、長さ約5塩基~長さ約20塩基、長さ約5塩基~長さ約15塩基、長さ約10塩基~長さ約50塩基、長さ約10塩基~長さ約45塩基、長さ約10塩基~長さ約40塩基、長さ約10塩基~長さ約35塩基、長さ約10塩基~長さ約30塩基、長さ約10塩基~長さ約25塩基、長さ約10塩基~長さ約20塩基、又は長さ約10塩基~長さ約15塩基である、請求項1~34のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

40

【請求項36】

Pが、標識を含む、請求項1~35のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項37】

前記標識が、P内にその5'末端において存在する、請求項36のうちのいずれか一項

50

に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 38】

前記標識が、消光可能である、請求項 36 又は 37 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 39】

F がクエンチャーを含む、請求項 36、37 又は 38 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 40】

前記クエンチャーが、F 内にその 3' 末端において存在する、請求項 39 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

10

【請求項 41】

前記クエンチャーが、Black Hole Quencher 1、Black Hole Quencher 2、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、及び Dabcyl-G-base からなる群から選択される、請求項 39 又は 40 に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 42】

前記ブロッカーポリヌクレオチド内の前記修飾核酸が、前記ブロッカーポリヌクレオチドの 5' 末端におけるヌクレオチドである、請求項 9、14 及び 18 ~ 41 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 43】

前記修飾核酸が、前記 P の 3' 末端におけるヌクレオチドである、請求項 3、4、9、12、13、16 又は 17 ~ 42 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

20

【請求項 44】

前記修飾核酸が、ロックド核酸である、請求項 3、4、9、12、14、16、18 ~ 24、42 又は 43 のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ。

【請求項 45】

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在を、プライマーの組み合わせを使用して検出する方法であって、前記プライマーの組み合わせが、第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含み、

30

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (Pa) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Pc) とを含み、Pa が、前記サンプル中の非標的ポリヌクレオチドに完全に相補的ではない配列を有し、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (Fb) と、適切な条件下で Pc と Fd がハイブリダイズするように Pc に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Fd) とを含み、

40

前記方法が、

前記標的ポリヌクレオチドが前記サンプル中に存在する場合、前記標的ポリヌクレオチドに相補的である Pa からの配列の伸張を許容する条件下で、前記サンプルを、前記プライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、

前記標的ポリヌクレオチドの存在を示す、Pa から伸張した前記配列を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 46】

前記方法が、標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出に対して、非標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出を変化させる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

50

P が T_1 に対して完全に相補的である第 1 のドメインを含み、P a がサンプル中の非標的ポリヌクレオチドに対して完全に相補的ではない、請求項 1 ~ 4 4 のうちのいずれか一項に記載されたプライマーの組み合わせを使用して、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在を検出する方法であって、

前記方法が、

標的ポリヌクレオチドが前記サンプル中に存在する場合、前記標的ポリヌクレオチドに対して相補的である P a からの配列の伸張を許容する条件下で、前記サンプルを、前記プライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、

検出が前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドの存在を示すような、P a からの前記配列を検出するステップとを含む、方法。

10

【請求項 4 8】

前記方法が、標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出に対して、非標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出を変化させる、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記検出するステップが、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて実行される、請求項 4 5 ~ 4 8 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、前記プライマーの組み合わせの P と逆方向プライマーとを使用し、前記逆方向プライマーが、P a から伸張した配列に相補的な配列を有する、請求項 4 9 に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、P a から伸張した配列に相補的な逆方向プライマーと、P a がハイブリダイズする前記標的ポリヌクレオチドの鎖に相補的な配列を有する順方向プライマーとを使用する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

検出がリアルタイムで実行される、請求項 4 5 ~ 5 1 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

プライマーの組み合わせを用いて、サンプル中の標的ポリヌクレオチド上でポリメラーゼ伸張を開始させる方法であって、前記プライマーの組み合わせが、第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含み、

30

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (P a) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (P c) とを含み、P a が、前記サンプル中の非標的ポリヌクレオチドに完全に相補的ではない配列を有し、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (F b) と、適切な条件下で P c と F d がハイブリダイズするように P c に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (F d) とを含む、プライマーの組み合わせであり、

40

前記サンプルが、(i) 前記 P a 内の配列に完全に相補的である第 1 の領域内の配列 (T_1) を有する標的ポリヌクレオチドと、(i i) P a に対して完全に相補的ではない第 1 の領域内の配列 (T_1^*) を有する非標的ポリヌクレオチドとの混合物を含み、

前記方法が、P a が T_1 に接触する場合、前記標的ポリヌクレオチドに対して相補的である P a からの配列の伸張を許容する条件下で、前記サンプルを前記プライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップを含む、方法。

【請求項 5 4】

前記標的ポリヌクレオチドの前記第 1 の領域 (T_1) 内の前記配列が、前記非標的ポリヌクレオチド内の前記第 1 の領域 (T_1^*) 内の前記配列と、1 つの塩基で異なる、請求項 5 3 に記載の方法。

50

【請求項 55】

P a から伸張した前記配列を検出するステップを更に含み、前記検出が、前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドの存在を示す、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 56】

請求項 1 ~ 44 のうちのいずれか一項に記載のプライマーの組み合わせを用いて、サンプル中の標的ポリヌクレオチド上で、ポリメラーゼ伸張を開始する方法であって、P が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に完全に相補的である第 1 のドメイン (P a) を含み、P a が、前記サンプル中の非標的ポリヌクレオチドに対して完全に相補的ではなく、

前記方法が、

前記標的ポリヌクレオチドが前記サンプル中に存在する場合、前記標的ポリヌクレオチドに相補的である P a からの配列の伸張を許容する条件下で、サンプルを前記プライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップを含む、方法。

【請求項 57】

前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドの存在を示す、P a から伸張した前記配列を検出するステップを更に含む、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記検出するステップが、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて実行される、請求項 55 ~ 57 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、前記プライマーの組み合わせの P と逆方向プライマーとを使用し、前記逆方向プライマーが、前記 P a から伸張した配列に相補的である配列を有する、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、前記 P a から伸張した配列に相補的である逆方向プライマーと、P a がハイブリダイズする標的ポリヌクレオチドの鎖に対して相補的な配列を有する順方向プライマーとを使用する、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

検出がリアルタイムで行われる、請求項 57 ~ 60 のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いて、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを増幅させる方法であって、前記プライマーの組み合わせが、第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含み、

前記第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (P a) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (P c) とを含み、P a が、前記サンプル中の非標的ポリヌクレオチドに完全に相補的ではない配列を有し、

前記第 2 のポリヌクレオチド (F) が、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (F b) と、適切な条件下で P c と F d がハイブリダイズするように P c に対して十分に相補的であるポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (F d) とを含む、プライマーの組み合わせであり、

前記サンプルが、(i) 前記 P a 内の配列に完全に相補的である第 1 の領域内の配列 (T_1) を有する標的ポリヌクレオチドと、(ii) P a に対して完全に相補的ではない、1 つまたはそれ以上の非標的ポリヌクレオチドとの混合物を含み、

前記方法が、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドが前記サンプル中に存在する場合、前記標的ポリヌクレオチドに相補的である P a からの配列の伸張を許容する条件下で、前記サンプルを前記プライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドからの前記 P c から伸張した配列を変性させるステッ

10

20

30

40

50

ブと、

(c) 前記標的ポリヌクレオチドを増幅させるために、ステップ(b)中の前記Paから伸張した配列内の領域に対して相補的な配列を有する逆方向プライマーの存在下で、ステップ(a)を繰り返すステップとを含み、

Paが前記Pa内の前記配列に対して完全に相補的である場合に、前記標的ポリヌクレオチドの伸張及び増幅が起こるが、前記標的ポリヌクレオチドの前記第1の領域が、前記Pa内の配列に対して完全に相補的ではない場合に、伸長及び増幅は効率が落ちるか又は全く起こらない、前記方法。

【請求項63】

請求項1~44のうちのいずれか一項に記載のポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いて、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを増幅させる方法であって、前記第1のポリヌクレオチド(P)が、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T₁)に対して完全に相補的である第1のドメイン(Pa)を含み、Paが、前記サンプル中の非標的ポリヌクレオチドに対して完全に相補的ではなく、

10

前記方法が、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドが前記サンプル中に存在する場合、前記標的ポリヌクレオチドに相補的であるPaからの配列の伸張を許容する条件下で、前記サンプルを前記プライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドからの前記Pcから伸張した配列を変性させるステップと、

20

(c) 前記標的ポリヌクレオチドを増幅させるために、ステップ(b)中の前記Paから伸張した配列内の領域に対して相補的な配列を有する逆方向プライマーの存在下で、ステップ(a)を繰り返すステップとを含む方法であり、

T₁が前記Pa内の配列に対して完全に相補的である場合に、前記標的ポリヌクレオチドの伸張及び増幅が起こるが、前記標的ポリヌクレオチドの前記第1の領域が、前記Pa内の配列に対して完全に相補的ではない場合に、伸長及び増幅は効率が落ちるか又は全く起こらない、前記方法。

【請求項64】

前記逆方向プライマーが、前記Paから伸張した配列内の領域に対して完全に相補的である配列を有する、請求項62又は63に記載の方法。

30

【請求項65】

前記逆方向プライマーが、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含むプライマーの組み合わせであり、

前記第1のポリヌクレオチド(PP)が、ステップ(a)の前記Paから伸張した配列内の第1の領域(TT₁)に完全に相補的である配列を有する第1のドメイン(PPa)と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(PPc)とを含み、

前記第2のポリヌクレオチド(FF)が、ステップ(a)の前記Paから伸張した配列内の第2の領域(TT₂)に対して相補的である第1のドメイン(FFb)と、PPcとFFdが適切な条件下でハイブリダイズするように、PPcに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(FFd)とを含む、請求項62又は63に記載の方法。

40

【請求項66】

前記逆方向プライマーが、請求項1~44のうちのいずれか一項に記載のプライマーの組み合わせである、請求項62又は63に記載の方法。

【請求項67】

前記方法で増幅された生成物を検出するステップを更に含む、請求項62~66のうちのいずれか一項に記載された方法。

【請求項68】

検出が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて実行される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

50

検出が、リアルタイムで実行される、請求項 6 7 又は 6 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2009年10月27日に出版された米国仮特許出願第61/255,461号への優先権を主張し、その開示を参照により全体を本明細書に援用する。

【0002】

本発明は、ポリヌクレオチドの組み合わせ及びそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0003】

従来より、核酸の検出及び増幅は、遺伝子解析、分子的診断法、及び新薬開発で重要な役割を果たしている。そのような用途の多くは、特定のDNA又はRNA分子、遺伝子発現、全ポリヌクレオチドの小フラクション中に存在するDNA突然変異又はDNAメチル化の特異的、高感度かつ安価な定量的検出を必要とする。多くの現行法は、非常に少量のDNA又はRNAを臨床サンプルから検出かつ定量化するために、ポリメラーゼ連鎖反応、又はPCR、並びに特にリアルタイムPCR法(定量的、すなわちqPCR)を用いる。

【0004】

現在のPCRアッセイの性能は、その感度が絶えず改善されてはいるが、特異性及びコストは、広範囲に許容可能な診断的テストになるためには未だほど遠い。ただし、当該技術分野で現在用いられている多くのPCR法は、その方法を多くの実際的な用途に対して不適切であるとするような技術的制限を受けている。例えば、標的分子が、1つ又は両プライマーの標的への結合を阻害又は完全に抑制するような二次構造を有する場合には、増幅が減少され得るか又は完全に排除され、このことが、例えば、診断的見地からすると、高感度であると期待される結合特性を備えた高度に特異的なプライマーの使用以外は有病誤診を引き起こす可能性がある。他の課題としては、それらが多数の非変異DNA分子と混合される状況での単一の塩基突然変異を備えた希少DNA分子の検出及び識別における現行のリアルタイムPCRアッセイの低感度、並びに複数の突然変異検出アッセイを1つの多重診断的アッセイに組み合わせるための能力が挙げられる。

【0005】

したがって、次世代配列決定プラットフォームを用いる診断法のためのPCRの新規な用途を含む、当該技術分野で認識されている技術的問題を克服するための能力を保持する高結合特異性を低合成コストに組み合わせた増幅プライマーの開発のための必要性が、当該技術分野において存在している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

1つの態様では、本開示は、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを提供し、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T_1)に相補的な配列を有する第1のドメイン(Pa)と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Pc)を含み、第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T_2)に相補的である第1のドメイン(Fb)と、PcとFdとが適切な条件下でハイブリダイズするようにPcに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Fd)とを含み、標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドへのFbのハイブリダイゼーションによって変性される二次構造を有する。1つの態様では、標的ポリヌクレオチドの二次構造は、Fの不在下において標的ポリヌクレオチドのポリメラーゼ伸長を阻害する。また、本開示は、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせP及び/又はFが、修飾核酸を更に含むような態様も意図している。

10

20

30

40

50

【0007】

本開示は、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを提供し、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T₁)に相補的である配列を有する第1のドメイン(Pa)と特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Pc)とを含み、第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T₂)に相補的である配列を有する第1のドメイン(Fb)と、PcとFdとが適切な条件下でハイブリダイズするようにPcに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Fd)とを含み、P及び/又はFは、修飾核酸を更に含む。

【0008】

第1のポリヌクレオチドと、第2のポリヌクレオチドと、並びにブロッカーポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマー組み合わせが更に提供され、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T₁)に相補的である配列を有する第1のドメイン(Pa)と特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Pc)とを含み、第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T₂)に相補的である配列を有する第1のドメイン(Fb)と、Pc及びFdが適切な条件下でハイブリダイズするようにPcに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Fd)とを含み、ブロッカーポリヌクレオチドは、T₁及びT₂の5'側に存在する第3の標的ポリヌクレオチド領域(T₃)に相補的であるヌクレオチド配列を含む。プライマーの組み合わせの1つの態様では、Pの3'末端のヌクレオチドとブロッカーポリヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドは重複する。別の態様では、ブロッカーポリヌクレオチドは、Paの全長にわたってPaに重複する配列を有する。更に別の態様では、Pの3'末端のヌクレオチドとブロッカーポリヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドとは異なっている。これら態様のそれぞれでは、P、F、及び/又はブロッカーポリヌクレオチドが修飾核酸を含むような実施形態が意図されている。

【0009】

本開示は、第1のポリヌクレオチドと、第2のポリヌクレオチドと、並びにプローブポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを更に提供し、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T₁)に相補的である第1のドメイン(Pa)と特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Pc)とを含み、第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T₂)に相補的である第1のドメイン(Fb)と、Pc及びFdが適切な条件下でハイブリダイズするようにPcに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Fd)とを含み、プローブポリヌクレオチドは、T₁及びT₂の5'末端に存在する第3の標的ポリヌクレオチド領域(T₄)に対して相補的であるヌクレオチドを含む。特定の態様では、プローブポリヌクレオチドは、標識及びクエンチャーを含む。他の態様では、P、F及び/又はプローブポリヌクレオチドは、修飾核酸を含む。ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせがブロッカーポリヌクレオチドを含むような実施形態も提供されていて、ブロッカーポリヌクレオチドは、T₁及びT₂の5'側とT₄の3'側に存在する第4の標的ポリヌクレオチド領域(T₃)に相補的であるヌクレオチド配列を含む。1つの態様では、ブロッカーポリヌクレオチドは、修飾核酸を含む。

【0010】

第1のポリヌクレオチドと、第2のポリヌクレオチドと、並びにユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドプライマーの組み合わせが更に提供され、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T₁)に相補的である第1のドメイン(Pa)と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Pc)と、その5'末端における標識とを含み、第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T₂)に相補的である第1のドメイン(Fb)と、2つのポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Fd)と、Pc及びFdの5'側ポリヌクレオチド配列が適切な条件下でハイブリダイズするように、Pcの5'側配列に十分に

10

20

30

40

50

相補的である 5' 側ポリヌクレオチド配列と、F d の 3' 側ポリヌクレオチド配列とユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチド配列が適切な条件下でハイブリダイズするように、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドに対して十分に相補的である 3' 側ポリヌクレオチド配列とを含み、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチド配列は、クエンチャーと、ユニバーサルポリヌクレオチドと F d の 3' 側ポリヌクレオチド配列が適切な条件下でハイブリダイズするように、F d の 3' 側ポリヌクレオチド配列に十分に相補的であるヌクレオチド配列とを含む。1つの態様では、P、F 及び / 又はユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、修飾核酸を含む。別の態様では、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせは、逆方向プライマーを更にも含み、逆方向プライマーは、T₁ にハイブリダイズする配列を含むポリヌクレオチド鎖に相補的なポリヌクレオチド配列を含む。

10

【0011】

本明細書で提供された任意のプライマーの組み合わせの種々の態様では、P は修飾核酸を含む。他の態様では、F が修飾核酸を更にも含み、これら態様のあるものでは、修飾核酸は P a 内に存在し、及び / 又は修飾核酸は F b 内にも存在する。

【0012】

本開示のそれぞれのポリヌクレオチドプライマーの組み合わせでは、態様で示されたように、P は複数個の修飾核酸を P a 内に含み、及び / 又は F は複数個の修飾核酸を F b 内に含み。態様で示されたように、P が修飾核酸を含む場合、修飾核酸は P の 3' 末端におけるヌクレオチドである。

【0013】

開示されたそれぞれのプライマーの組み合わせでは、F d が P c に対して少なくとも 70% 相補的であり、P c が F d に対して少なくとも 70% 相補的であり、鋳型ポリヌクレオチドの不在下中で P c と F d が互いにハイブリダイズし、P が DNA、修飾 DNA、RNA、修飾 RNA、ペプチド核酸 (PNA)、又はそれらの組み合わせであり、及び / 又は F が DNA、修飾 DNA、RNA、修飾 RNA、ペプチド核酸 (PNA)、又はそれらの組み合わせであるような態様が提供される。

20

【0014】

それぞれのプライマー対の組み合わせでは、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせは、ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせが、DNA ポリメラーゼからの伸張を遮断する、F にその 3' 末端で結合されたブロック基を更にも含むような態様が提供されている。本態様では、ブロック基が 3' リン酸塩基、3' アミノ基、ジデオキシヌクレオチド、及び逆位デオキシチミジン (dT) からなる群から選択される。

30

【0015】

それぞれのプライマー対の組み合わせの別の態様では、P a が長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 30 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 20 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 15 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 10 塩基、並びに長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 8 塩基である特定の実施形態が提供されている。他の態様では、P c が、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 200 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 150 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 100 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 50 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 45 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 40 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 35 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 30 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 25 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 20 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 15 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 50 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 45 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 40 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 35 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 30 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 25 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 20 塩基、又は長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 15 塩基である。更に他の態様では、F b が長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 5000 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 4000 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 3000 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 2000 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 1000 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 500 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 250 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 200 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 150 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 100 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 95 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 90 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 85 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長

40

50

長さ約 80 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 75 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 70 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 65 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 60 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 55 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 50 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 45 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 40 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 35 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 30 塩基、又は長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 100 塩基である。なお更らに他の態様では、F d が長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 200 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 150 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 100 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 50 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 45 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 40 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 35 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 30 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 25 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 20 塩基、長さ約 5 塩基 ~ 長さ約 15 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 50 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 45 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 40 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 35 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 30 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 25 塩基、長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 20 塩基、又は長さ約 10 塩基 ~ 長さ約 15 塩基である。

10

【0016】

プライマー対の組み合わせのそれぞれの態様では、実施形態として、P が標識を含むものが挙げられる。いくつかの態様では、標識は P の 5' 末端に位置し及び / 又は標識は消光可能である。これら実施形態のいくつかの態様では、F はクエンチャーを含み、及び / 又はクエンチャーは F の 3' 末端に存在する。特別な実施形態では、クエンチャーは、Black Hole Quencher 1、Black Hole Quencher 2、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、及び Dabcyl、G-base からなる群から選択される。

20

【0017】

特定のプライマー対の組み合わせは、修飾核酸を含み、ブロッカーポリヌクレオチド内の修飾核酸は、ブロッカーポリヌクレオチドの 5' 末端におけるヌクレオチドであり、修飾核酸は、P の 3' 末端におけるヌクレオチドであり、及び / 又は修飾核酸はロックド核酸である。

【0018】

本開示は、プライマーの組み合わせを使用して、サンプル内の標的ポリヌクレオチドの存在を検出する方法を更に提供し、プライマーの組み合わせは、第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含み、第 1 のポリヌクレオチド (P) は、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に対して完全に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (P a) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (P c) とを含み、この中で P a は、サンプル内の非標的ポリヌクレオチドに対して完全には相補的ではない配列を有し、並びに第 2 のポリヌクレオチド (F) は、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (F b) と、P c と F d が適切な条件下でハイブリダイズするように、P c に対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第 3 のドメイン (F d) とを含み、方法は、サンプル内に標的ポリヌクレオチドが存在する場合、標的ポリヌクレオチドに相補的である P a からの配列の伸張を可能にするような条件下で、サンプルをプライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、サンプル内の標的ポリヌクレオチドの存在を示す P a から伸張した配列を検出するステップとを含む。特定の態様では、方法は、標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出に対して、非標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出を変化させる。

30

40

【0019】

P が T_1 に完全に相補的である第 1 のドメインを含み、P a がサンプル内の非標的ポリヌクレオチドに完全に相補的ではない、本明細書に開示されたようなプライマーの組み合わせを用いて、サンプル内の標的ポリヌクレオチドの存在を検出する方法が更に提供され、方法は、標的ポリヌクレオチドがサンプル内に存在する場合、標的ポリヌクレオチドに相補的である P a からの配列の伸張を可能にするような条件下にて、プライマーの組み合わせとポリメラーゼをサンプルと接触させるステップと、P a から伸張された配列を検出するステップとを含み、この検出は、サンプル内の標的ポリヌクレオチドの存在を示す。

50

いくつかの態様では、方法は、標的ポリヌクレオチドを備えるサンプルからの配列検出に対して、非標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出を変化させる。

【0020】

これら方法のそれぞれにおいて、検出ステップがポリメラーゼ連鎖反応を用いて実行されるような実施形態が提供される。これら実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応がプライマーの組み合わせのPとPaから伸張された配列に相補的な配列を有する逆方向プライマーとを使用する態様、及び/又はポリメラーゼ連鎖反応がPaから伸張された配列に相補的な逆方向プライマーと、それに対してPaがハイブリダイズする標的ポリヌクレオチド鎖に相補的な配列を有する順方向プライマーとを使用する態様が提供されている。

【0021】

方法の別の態様において、検出はリアルタイムで実行される。

【0022】

本開示は、プライマーの組み合わせを用いて、サンプル内の標的ポリヌクレオチド上でポリメラーゼ伸張を開始させる方法を更に提供して、プライマーの組み合わせは、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含み、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領域(T_1)に完全に相補的である配列を有する第1のドメイン(Pa)と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン(Pc)とを含み、この中でPaは、サンプル内の非標的ポリヌクレオチドに完全には相補的でない配列を有し、並びに第2のポリヌクレオチド(F)は、第2の標的ポリヌクレオチド領域(T_2)に相補的である第1のドメイン(Fb)と、PcとFdが適切な条件下でハイブリダイズするように、Pcに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第3のドメイン(Fd)とを含み、サンプルは、(i) Pa内の配列に対して完全に相補的である第1の領域内の配列(T_1)を有する標的ポリヌクレオチドと、(ii) Paに対して完全に相補的ではない第1の領域内の配列(T_1^*)を有する非標的ポリヌクレオチドとを含み、方法は、Paが T_1 に接触する際に、標的ポリヌクレオチド鎖に対して相補的であるPaからの配列の伸張を可能にする条件下で、サンプルをプライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップを含む。特定の態様では、標的ポリヌクレオチド内の第1の領域(T_1)中の配列は、非標的ポリヌクレオチド内の第1の領域(T_1^*)中の配列とは、1つの塩基で異なる。他の態様では、方法は、Paから伸張された配列を検出するステップを更に含み、検出はサンプル内の標的ポリヌクレオチドの存在を示す。

【0023】

本開示は、Pが第1の標的ポリヌクレオチド領域(T_1)に完全に相補的である第1のドメイン(Pa)を含み、Paがサンプル内の非標的ポリヌクレオチドに完全に相補的ではない、本明細書で開示されたようなプライマーの組み合わせを用いて、サンプル内の標的ポリヌクレオチド上でポリメラーゼ伸張を開始させる方法を更に提供して、方法は、標的ポリヌクレオチドがサンプル内に存在する場合、標的ポリヌクレオチドに対して相補的であるPaからの配列の伸長を可能にする条件下において、サンプルをプライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップを含む。いくつかの態様では、方法は、サンプル内の標的ポリヌクレオチドの存在を示す、Paから伸張された配列を検出するステップを更に含む。種々の実施形態では、検出ステップは、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて実行され、並びに本実施形態の特定の態様では、ポリメラーゼ連鎖反応は、プライマーの組み合わせのPと、Paから伸張された配列に相補的な配列を有する逆方向プライマーとを使用し、及び/又はポリメラーゼ連鎖反応は、Paから伸張された配列に相補的な逆方向プライマーと、Paがそれにハイブリダイズする標的ポリヌクレオチドの鎖に相補的な配列を有する順方向プライマーとを使用する。方法のそれぞれの実施形態では、検出がリアルタイムで実行されるような態様が提供されている。

【0024】

ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いて、サンプル内の標的ポリヌクレオチドを増幅させる方法が更に提供され、プライマーは第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドを含み、第1のポリヌクレオチド(P)は、第1の標的ポリヌクレオチド領

10

20

30

40

50

域 (T_1) に完全に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (Pa) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (Pc) とを含み、この中で Pa は、サンプル内の非標的ポリヌクレオチドに完全には相補的ではない配列を有し、並びに第 2 のポリヌクレオチド (F) は、第 2 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_2) に相補的である第 1 のドメイン (Fb) と、 Pc と Fd が適切な条件下でハイブリダイズするように、 Pc に対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第 3 のドメイン (Fd) とを含み、サンプルは、(i) Pa 内の配列に対して完全に相補的である第 1 の領域 (T_1) 中の配列を有する標的ポリヌクレオチドと、(ii) 1 つまたはそれ以上の、 Pa に対して完全には相補的ではない非標的ポリヌクレオチドとを含み、方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドがサンプル内に存在する場合、標的ポリヌクレオチドに対して相補的である Pa からの配列の伸張を可能にする条件下において、サンプルをプライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、(b) 標的ポリヌクレオチドからの Pa からの伸張した配列を変性させるステップと、(c) ステップ (b) における Pa から伸張された配列内の領域に相補的な配列を有する逆方向プライマーの存在中で、ステップ (a) を繰り返して、標的ポリヌクレオチドを増幅させるステップと、とを含み、 Pa が Pa 内の配列に対して完全に相補的である場合に、標的ポリヌクレオチドの伸張及び増幅が生じるが、標的ポリヌクレオチド内の第 1 の領域が Pa 内の配列に対して完全に相補的でない場合は、伸張及び増幅の効率が落ちるか又は伸張及び増幅は生じない。

【0025】

本開示は、第 1 のポリヌクレオチド (P) が、第 1 の標的ポリヌクレオチド領域 (T_1) に完全に相補的である第 1 のドメイン (Pa) を含み、 Pa がサンプル内の非標的ポリヌクレオチドに対して完全に相補的ではない、本明細書で開示されたようなポリヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いて、サンプル内の標的ポリヌクレオチドを増幅させる方法をまた提供し、方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドがサンプル内に存在する場合、標的ポリヌクレオチドに対して相補的である Pa からの配列の伸張を可能にする条件下において、サンプルをプライマーの組み合わせとポリメラーゼとに接触させるステップと、(b) 標的ポリヌクレオチドからの Pa からの伸張した配列を変性させるステップと、(c) ステップ (b) での Pa から伸張された配列内の領域に相補的な配列を有する逆方向プライマーの存在中で、ステップ (a) を繰り返して、標的ポリヌクレオチドを増幅させるステップと、とを含み、標的ポリヌクレオチドの伸長及び増幅は、 T_1 が Pa 内の配列に対して完全に相補的である場合に生じるが、標的ポリヌクレオチド内の第 1 の領域が Pa 内の配列に完全には相補的でない場合には、伸長及び増幅の効率が落ちるか、又は伸長及び増幅が生じない。方法のいくつかの態様では、逆方向プライマーは、 Pa から伸張された配列内の領域に対して完全に相補的である配列を有する。他の態様では、逆方向プライマーは、第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとを含むプライマーの組み合わせであり、第 1 のポリヌクレオチド (PP) は、ステップ (a) で Pa から伸張された配列内の第 1 の領域 (TT_1) に完全に相補的である配列を有する第 1 のドメイン (PPa) と、特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (PPc) とを含み、第 2 のポリヌクレオチド (FF) は、ステップ (a) で Pa から伸張された配列内の第 2 の領域 (TT_2) に相補的である第 1 のドメイン (FFb) と、適切な条件下で PPc と Fd がハイブリダイズするように、 PPc に対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第 2 のドメイン (FFd) とを含む。特定の態様では、方法は、本方法で増幅された生成物を検出するステップを更に含み、検出は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて実行され、及び/又は検出はリアルタイムで実行される。

【0026】

開示のそれぞれの方法では、本明細書で開示されたように、逆方向プライマーがプライマーの組み合わせであるような態様が提供されている。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図 1】本明細書に開示された基本的なポリヌクレオチドの組み合わせ (すなわち、第 1

10

20

30

40

50

のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチド)の構造的関係を示す図である。

【図2】本発明の3つの標的結合ドメイン a、g 及び b を備えた2つの三方向接合部を含むプライマーの組み合わせを示す図である。

【図3】本発明の2つの標的結合ドメインを備えた安定な四方向(A)及び五方向(B)接合部を有するポリヌクレオチドの組み合わせを示す図である。

【図4】本発明のブロッカーポリヌクレオチドを有するプライマーの組み合わせを示す図である。図4Aに示されたように、ブロッカーポリヌクレオチドの5'側塩基は、第1のポリヌクレオチドの3'側塩基に重なり合い、第1のポリヌクレオチドの3'側塩基とは異なる。ブロッカーポリヌクレオチドの5'側塩基は、標的ポリヌクレオチドに対して相補的ではなく、ポリメラーゼによる第1のポリヌクレオチドの伸張の際に置き換えられる。図4Bに示したように、ブロッカーポリヌクレオチドの5'側塩基は、第1のポリヌクレオチドの3'側塩基に重なり合い、第1のポリヌクレオチドの3'側塩基とは異なる。ブロッカーポリヌクレオチドの5'側塩基は、非標的ポリヌクレオチドに対して100%相補的であるが、一方、第1のポリヌクレオチドの3'側塩基は、非標的ポリヌクレオチドに対して相補的ではない。この配置では、ブロッカーポリヌクレオチドは、ポリメラーゼによる第1のポリヌクレオチドの伸張を遮断する。

10

【図5】本発明のプロープポリヌクレオチドを備えたプライマーの組み合わせを示す図である。図5Aに示されたように、プロープポリヌクレオチドは、その5'末端に標識を含み並びにその3'末端にクエンチャーを含む。図5Bは、第1/第2のポリヌクレオチド対及びブロッカーポリヌクレオチドを組み合わせ、プロープポリヌクレオチドの構造的関係を示している。

20

【図6】本発明のユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドを備えた基本的なポリヌクレオチドの組み合わせを示す図である。図に示されたように、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して相補的であり、第1のポリヌクレオチドがその5'末端に標識を含むのに対し、その3'末端にクエンチャーを含む。

【図7A】本発明のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で用いられるようなポリヌクレオチドの組み合わせを示す概略図である。

【図7B】本発明のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で用いられるようなポリヌクレオチドの組み合わせを示す概略図である。

30

【図7C】本発明のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で用いられるようなポリヌクレオチドの組み合わせを示す概略図である。

【図7D】本発明のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で用いられるようなポリヌクレオチドの組み合わせを示す概略図である。

【図7E】本発明のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で用いられるようなポリヌクレオチドの組み合わせを示す概略図である。

【図7F】本発明のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で用いられるようなポリヌクレオチドの組み合わせを示す概略図である。

【図8A】本発明の基本的なポリヌクレオチドの組み合わせと逆方向プライマーとの構造的関係を示す図である。図8Aでは、逆方向プライマーは単一のポリヌクレオチドである。図8Bでは、逆方向プライマーは、第1及び第2のポリヌクレオチドの第2の部分である。

40

【図8B】本発明の基本的なポリヌクレオチドの組み合わせと逆方向プライマーとの構造的関係を示す図である。図8Aでは、逆方向プライマーは単一のポリヌクレオチドである。図8Bでは、逆方向プライマーは、第1及び第2のポリヌクレオチドの第2の部分である。

【図9A】図9Aは、本発明の非特異的RNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーが標識付された第1のポリヌクレオチド(プライマーA)と典型的な第2のポリヌクレオチド(フィクサーA)を示す図である。図9Bは、図9Aで示された組み合わせのPCRにおける使用を示している。プライマーAに反対の鎖が生成される場合、RNAアーゼHによ

50

るRNA-DNAハイブリッドの開裂が蛍光体（又はクエンチャー）を放出して、蛍光信号が検出される。図9Cは、部位特異的RNA-DNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーで標識された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す。図9Dは、図9Cで示された組み合わせのPCRにおける使用を示す。プライマーAを含むPCR生成物が変性される場合、RNA-DNAリンカーがプライマーの下流領域にハイブリダイズして、RNアーゼHがRNA-DNAハイブリッドを開裂し、かつ蛍光体を放出し、並びに配列に特異的な蛍光信号が検出される。

【図9B】図9Aは、本発明の非特異的RNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーが標識付された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す図である。図9Bは、図9Aで示された組み合わせのPCRにおける使用を示している。プライマーAに反対の鎖が生成される場合、RNアーゼHによるRNA-DNAハイブリッドの開裂が蛍光体（又はクエンチャー）を放出して、蛍光信号が検出される。図9Cは、部位特異的RNA-DNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーで標識された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す。図9Dは、図9Cで示された組み合わせのPCRにおける使用を示す。プライマーAを含むPCR生成物が変性される場合、RNA-DNAリンカーがプライマーの下流領域にハイブリダイズして、RNアーゼHがRNA-DNAハイブリッドを開裂し、かつ蛍光体を放出し、並びに配列に特異的な蛍光信号が検出される。

【図9C】図9Aは、本発明の非特異的RNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーが標識付された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す図である。図9Bは、図9Aで示された組み合わせのPCRにおける使用を示している。プライマーAに反対の鎖が生成される場合、RNアーゼHによるRNA-DNAハイブリッドの開裂が蛍光体（又はクエンチャー）を放出して、蛍光信号が検出される。図9Cは、部位特異的RNA-DNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーで標識された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す。図9Dは、図9Cで示された組み合わせのPCRにおける使用を示す。プライマーAを含むPCR生成物が変性される場合、RNA-DNAリンカーがプライマーの下流領域にハイブリダイズして、RNアーゼHがRNA-DNAハイブリッドを開裂し、かつ蛍光体を放出し、並びに配列に特異的な蛍光信号が検出される。

【図9D】図9Aは、本発明の非特異的RNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーが標識付された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す図である。図9Bは、図9Aで示された組み合わせのPCRにおける使用を示している。プライマーAに反対の鎖が生成される場合、RNアーゼHによるRNA-DNAハイブリッドの開裂が蛍光体（又はクエンチャー）を放出して、蛍光信号が検出される。図9Cは、部位特異的RNA-DNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーで標識された第1のポリヌクレオチド（プライマーA）と典型的な第2のポリヌクレオチド（フィクサーA）を示す。図9Dは、図9Cで示された組み合わせのPCRにおける使用を示す。プライマーAを含むPCR生成物が変性される場合、RNA-DNAリンカーがプライマーの下流領域にハイブリダイズして、RNアーゼHがRNA-DNAハイブリッドを開裂し、かつ蛍光体を放出し、並びに配列に特異的な蛍光信号が検出される。

【図10】本発明のリアルタイムPCRで用いられるための三方向又は四方向接合部を備えたプライマーの組み合わせを示す図である。三方向接合プライマーによって、プライマーポリヌクレオチド（すなわち、第1のポリヌクレオチド）が、その5'末端で蛍光体に標識され、並びにフィクサーポリヌクレオチド（すなわち、第2のポリヌクレオチド）が、その3'末端でクエンチャーに標識される。四方向接合プライマーによって、プライマーポリヌクレオチドが、その5'末端で蛍光体に標識され、並びにステーブルが、その

10

20

30

40

50

3'末端でクエンチャーに標識される。フィクサーポリヌクレオチドは標識されていない。プライマー及びフィクサーの双方の第2のドメイン領域は特徴的であるために、ステブルポリヌクレオチドは、「ユニバーサル」クエンチャーポリヌクレオチドとして用いられ得る。

【図11】(スキーム11)本発明の基本的プライマーと非共有結合で結合されたアンチプライマー(AP)を備えたフィクサーポリヌクレオチドを用いる3つの例を示す図である。

【図12】本発明の基本的なプライマーポリヌクレオチド("P0")と修飾フィクサーポリヌクレオチド構造("F1~F4")で構成されたポリヌクレオチドを示す図である。鑄型ポリヌクレオチドに結合する場合、特異性の増加したレベルをもたらすために、ステムループ構造(図式12の1~4)を含む修飾ポリヌクレオチドの組み合わせが用いられてもよい。

【図13A】本発明の修飾プライマーポリヌクレオチド("P1")と基本的フィクサーポリヌクレオチド("F")とで構成されたポリヌクレオチドの組み合わせを示す図である(図式13)。図式13では、右側に示された完全なポリヌクレオチドの組み合わせ(修飾プライマーポリヌクレオチドと基本的なフィクサーポリヌクレオチド)と共に、修飾プライマーポリヌクレオチドが左側に示されている。

【図13B】本発明の修飾プライマーポリヌクレオチド("P1")と基本的フィクサーポリヌクレオチド("F")とで構成されたポリヌクレオチドの組み合わせを示す図である(図式13)。図式13では、右側に示された完全なポリヌクレオチドの組み合わせ(修飾プライマーポリヌクレオチドと基本的なフィクサーポリヌクレオチド)と共に、修飾プライマーポリヌクレオチドが左側に示されている。

【図13C】本発明の修飾プライマーポリヌクレオチド("P1")と基本的フィクサーポリヌクレオチド("F")とで構成されたポリヌクレオチドの組み合わせを示す図である(図式13)。図式13では、右側に示された完全なポリヌクレオチドの組み合わせ(修飾プライマーポリヌクレオチドと基本的なフィクサーポリヌクレオチド)と共に、修飾プライマーポリヌクレオチドが左側に示されている。

【図14】(スキーム16)本発明の点突然変異を検出するための、本明細書で開示された基本的なポリヌクレオチドの組み合わせ(すなわち、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチド)を用いるための2つのシナリオを示す図である。上部シナリオでは、プライマーポリヌクレオチドの第1のドメインは、鑄型DNAポリヌクレオチドに対して100%相補的であり、伸張が起こり、生成物を得る。下部シナリオでは、プライマーポリヌクレオチドの第1のドメインが、鑄型DNAポリヌクレオチドに関してミスマッチを含有し、プライマーポリヌクレオチドの短い第1のドメイン内における不安定性のために、伸張が遮断される。この不安定性が、PCRの極めて低い効率をもたらし、並びに検出可能な生成物がほとんど又は全く得られない結果となる。

【図15】本発明の次世代配列決定(NGS)を実行するためのポリヌクレオチドの組み合わせ(すなわち、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチド)の使用を示す図である。

【図16】本明細書に開示された基本的なポリヌクレオチドの組み合わせ(すなわち、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチド)を用いる染色色素SYTO 9の存在中での定量的PCRの結果を示す図である。

【図17】本発明の蛍光体標識プローブプライマー(すなわち、第1のポリヌクレオチド)とクエンチャー標識フィクサー(すなわち、第2のポリヌクレオチド)による定量的PCRの結果を示す図である。

【図18】本発明の蛍光体標識プローブプライマー(すなわち、第1のポリヌクレオチド)とユニバーサルクエンチャーを用いるPCRアッセイの結果を示す図である。

【図19A】本発明の第1のポリヌクレオチド、フィクサー(すなわち、第2のポリヌクレオチド)、及びSYBR緑色染色色素を用いた、混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図19B】本発明の第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、及びSYBR緑色染色色素を用いた、混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。

【図20】本発明の第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）及びSYBR緑色染色色素を用いた、ホルムアルデヒドで固定されたサンプル内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。

【図21】本発明の第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）及びプローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）を用いた、混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。

【図22】本発明の第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。

【図23】本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。

【図24A】図24Aは、本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5コピー/KRAS G12V DNAの反応（統計的に決定）を備えた混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。図24Bは、本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNAのコピーを有さない混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。WT DNAサンプルの94%（16のうち15）が全く信号を示さず、このことは、改善されたKRAS G12V qPCRアッセイによる単一の変異体DNA検出の極めて高い選択性を示唆している。

【図24B】図24Aは、本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5コピー/KRAS G12V DNAの反応（統計的に決定）を備えた混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。図24Bは、本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNAのコピーを有さない混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。WT DNAサンプルの94%（16のうち15）が全く信号を示さず、このことは、改善されたKRAS G12V qPCRアッセイによる単一の変異体DNA検出の極めて高い選択性を示唆している。

【図24C】図24Aは、本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5コピー/KRAS G12V DNAの反応（統計的に決定）を備えた混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を示す図である。図24Bは、本発明のその3'末端がLNAで修飾された第1のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第2のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNAのコピーを有さない混合物内の変異体KRAS G12Vを検出するためのqPCRアッセイの結果を

10

20

30

40

50

示す図である。WT DNA サンプルの 94% (16 のうち 15) が全く信号を示さず、このことは、改善された KRAS G12V qPCR アッセイによる単一の変異体 DNA 検出の極めて高い選択性を示唆している。

【図 2 4 D】図 2 4 A は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5 コピー / KRAS G12V DNA の反応 (統計的に決定) を備えた混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。図 2 4 B は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNA のコピーを有さない混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。WT DNA サンプルの 94% (16 のうち 15) が全く信号を示さず、このことは、改善された KRAS G12V qPCR アッセイによる単一の変異体 DNA 検出の極めて高い選択性を示唆している。

10

【図 2 4 E】図 2 4 A は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5 コピー / KRAS G12V DNA の反応 (統計的に決定) を備えた混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。図 2 4 B は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNA のコピーを有さない混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。WT DNA サンプルの 94% (16 のうち 15) が全く信号を示さず、このことは、改善された KRAS G12V qPCR アッセイによる単一の変異体 DNA 検出の極めて高い選択性を示唆している。

20

【図 2 4 F】図 2 4 A は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5 コピー / KRAS G12V DNA の反応 (統計的に決定) を備えた混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。図 2 4 B は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNA のコピーを有さない混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。WT DNA サンプルの 94% (16 のうち 15) が全く信号を示さず、このことは、改善された KRAS G12V qPCR アッセイによる単一の変異体 DNA 検出の極めて高い選択性を示唆している。

30

【図 2 4 G】図 2 4 A は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5 コピー / KRAS G12V DNA の反応 (統計的に決定) を備えた混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。図 2 4 B は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー (すなわち、第 2 のポリヌクレオチド)、プローブポリヌクレオチド (すなわち、TaqMan)、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNA のコピーを有さない混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。WT DNA サンプルの 94% (16 のうち 15) が全く信号を示さず、このことは、改善された KRAS G12V qPCR アッセイによる単一の変異体 DNA

40

50

A 検出の極めて高い選択性を示唆している。

【図 2 4 H】図 2 4 A は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第 2 のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、0.5 コピー / KRAS G12V DNA の反応（統計的に決定）を備えた混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。図 2 4 B は、本発明のその 3' 末端が LNA で修飾された第 1 のポリヌクレオチド、フィクサー（すなわち、第 2 のポリヌクレオチド）、プローブポリヌクレオチド（すなわち、TaqMan）、及びブロッカーポリヌクレオチドを用いた、KRAS G12V DNA のコピーを有さない混合物内の変異体 KRAS G12V を検出するための qPCR アッセイの結果を示す図である。WT DNA サンプルの 94%（16 のうち 15）が全く信号を示さず、このことは、改善された KRAS G12V qPCR アッセイによる単一の変異体 DNA 検出の極めて高い選択性を示唆している。

10

【発明を実施するための形態】

【0028】

発明の詳細な説明

本発明は、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション中に、特に標的ポリヌクレオチドへの増幅プライマーハイブリダイゼーション中に遭遇する問題を克服する非連続的ポリヌクレオチドデザインの発見に基づく。これらの問題は、限定されるものではないが、標的ポリヌクレオチド内の困難な二次構造の克服と、標的ポリヌクレオチド内の単一塩基の変化に対する低い特異性とが挙げられる。

20

【0029】

本明細書に記載されたポリヌクレオチドの組み合わせは、効率的に増幅させることが難しいポリヌクレオチド鑄型を用いる場合、標準的 PCR プライマーと長い PCR プライマーの双方にわたる利点を提供する。このような鑄型としては、例えば、妨害するようなループ、ヘアピンなどを生み出す内部自己ハイブリダイゼーションを経て形成されたある程度の二次構造を含有するような鑄型が挙げられ、これがハイブリダイゼーションの効率を下げ又はそれを阻害する。鑄型の二次構造は、内部ハイブリダイゼーションを不安定化させることができず、従ってプライマー相補体へのハイブリダイズが不可能であるような標準的な PCR プライマーを使用時のプライミングを妨害し得る。本発明のポリヌクレオチドの組み合わせを用いることで、鑄型の二次構造がデハイブリダイズされて（又は溶解され）、相補的鑄型領域によるハイブリダイゼーションが、適切な条件下で起こる。本明細書で使用されたように、「標準鎖 PCR プライマー」の長さは、約 10 ~ 100 塩基であり得る。

30

【0030】

また、長鎖 PCR プライマーも、標的ポリヌクレオチド内の二次構造を解決することが可能であるが、プライマーの 3'（プライミング）末端近辺において、特異性又は感応性のいずれかを同時に提供することはできない。このことが、長鎖 PCR プライマーでは多くの部分が標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズされて、標的ポリヌクレオチドに関するプライマーの 3' 末端近辺のミスマッチが、プライミング効率を低下させるには不十分である理由である。結果的には、ミスマッチがあるにもかかわらず、PCR 生成物が合成されるであろう。

40

【0031】

本発明のポリヌクレオチドの組み合わせは他の利点を提供する。例えば、短鎖 PCR プライマーは、標的ポリヌクレオチドに対する正確な配列ハイブリダイゼーションのために有用であるが、PCR では望ましい標的ポリヌクレオチドに対するプライマー結合の高特異性を達成するために、典型的に可能な限り高いアニーリング温度が選択される。このアニーリング温度は、所与のプライマーの溶解温度に基づいて選択されて、短鎖プライマーに関しては、アニーリング温度は比較的低いであろう。しかしながら、低いアニーリング温度は、標的ポリヌクレオチドに対する短鎖プライマーの非特異的ハイブリダイゼーション

50

ンを許容するという不都合を有し、この結果、非特異的なPCR生成物の形成に至る。短鎖PCRプライマーがその標的ポリヌクレオチドに対してアニーリングするよう用いられるべき比較的低いアニーリング温度に基づいて、短鎖プライマーが標的ポリヌクレオチドと二重鎖を形成するが、それらが標的ポリヌクレオチド領域に対して100%相補的である場合でも、それは一般的に不安定である。更に、プライマーが100%未満で相補的(すなわち、プライマーと標的ポリヌクレオチドとの間の少なくとも1つのミスマッチ)である場合では、これら二重鎖は更により不安定である。本発明のポリヌクレオチドの組み合わせは、短鎖PCRプライマーを用いることに関連する不安定問題を克服するよう補助し、並びに所望の標的への高度に特異的な結合を可能にする。例えば、本開示の組み合わせは、わずか1つの塩基のみが異なるような標的配列の間を識別することが可能である。

10

【0032】

例えば、不連続的ポリヌクレオチドの組み合わせデザイン(図1参照)が、鋳型ポリヌクレオチドに対するフィクサーポリヌクレオチド(すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)の第1のドメイン[Fa]のハイブリダイゼーションと、フィクサーポリヌクレオチドの第2のドメイン[Fd]に対するプライマーポリヌクレオチド(すなわち、「第1のポリヌクレオチド」)の第2のドメイン[Pc]のハイブリダイゼーションを通して、短鎖PCRプライマー領域[Pa]の使用を可能にして、これによって、明白に「より長い」プライマー配列の効果的な結果を得ることができる。このより長くかつ不連続なハイブリダイゼーションが、たとえその領域が8塩基ほどの小さい領域であっても、プライマーポリヌクレオチドの第1の領域[Pa]間の結合を効果的に安定化させて、これによってPCRの効率を増大させることができる。

20

【0033】

他の実施形態では、プライマーポリヌクレオチドの第1のドメインに相補的である鋳型ポリヌクレオチドの領域とフィクサーポリヌクレオチドは、直接的に隣接する必要はない。本発明は、相補的領域が10個まで又はそれ以上のヌクレオチドによって分離されている(すなわち不連続的な)実施形態を意図して、鋳型ポリヌクレオチドへのフィクサーハイブリダイゼーションの際には、増幅される標的鋳型領域をプライマーポリヌクレオチドに近接するように持っていくために、介在する配列がループアウトされる。本態様では、次いでプライマーの組み合わせが、ループアウト構造の内部自己ハイブリダイゼーションの有無にかかわらず、鋳型ポリヌクレオチド内の二次構造を実際に誘導する。

30

【0034】

I. ポリヌクレオチドプライマーの組み合わせ

1つの実施形態では、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチドの組み合わせが提供され、第1のポリヌクレオチドは、第1の標的ポリヌクレオチド領域に相補的である第1のドメイン[Pa]と特徴的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン[Pc]とを含み、第2のポリヌクレオチドは、第2の標的ポリヌクレオチド領域に相補的である第1のドメイン[Fb]と、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインと第2のポリヌクレオチドの第2のドメインが適切な条件下でハイブリダイズするように、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して十分に相補的なポリヌクレオチドを含む第2のドメイン[Fd]とを含む。基本的なポリヌクレオチドの組み合わせの構造的関係が、図1に示されている。

40

【0035】

A. 三方向接合

三方向接合ポリヌクレオチドの組み合わせでは、プライマーポリヌクレオチドとフィクサーポリヌクレオチドが、第1のポリヌクレオチドの第2のドメイン(スキーム1中のPc)と第2のポリヌクレオチドの第2のドメイン(スキーム1中のFd)との間の相互作用を経て結合され、並びに図2(スキーム2A)に示したように、プライマーオリゴヌクレオチドの第1のドメイン(図1のPa)とフィクサーポリヌクレオチドの第1のドメイン(図1のFb)が、標的ポリヌクレオチド内のそれぞれの相補的な領域へとハイブリダイズされる。

50

【 0 0 3 6 】

B . 三方向超の接合

本発明は、プライマーの組み合わせが2つの三方向接合を含むような別の実施形態を更に意図する(図2、スキーム2B参照)。これら実施形態のいくつかでは、ドメイン「e」がドメイン[Pc]に対して相補的であり、ドメイン「f」がドメイン[Fd]に対して相補的であり、並びにドメイン「g」が第3の標的ポリヌクレオチド領域に対して相補的である。

【 0 0 3 7 】

本発明は、四方向接合を含むポリヌクレオチドの組み合わせを更に意図する。四方向接合ポリヌクレオチドの組み合わせでは、プライマーポリヌクレオチドとフィクサーポリヌクレオチドが、「ステーブル」ポリヌクレオチドを経て結合されている。(スキーム3A、下)。ステーブルポリヌクレオチドは、プライマーポリヌクレオチドとフィクサーポリヌクレオチドの双方の第2のドメインをハイブリダイズさせることが可能である。ステーブルポリヌクレオチドの構造は、適切な条件下でその領域がハイブリダイズし得るように、プライマーポリヌクレオチドの第2のドメイン[Pc]に対して十分に相補的である第1のドメイン[e]と、適切な条件下で領域がハイブリダイズし得るようにハイブリダイズすることが可能であるフィクサーポリヌクレオチドの第2のドメイン[Fd]に対して相補的である第2のドメイン[f]とを含む。本実施形態のいくつかの態様では、典型的な条件下で、PcドメインとFdドメインとの間のハイブリダイゼーションを許可するために、プライマーポリヌクレオチドの第2のドメインPcは、フィクサーポリヌクレオチドの第2のドメインFdに対して十分に相補的である必要はない。本態様では、ステーブル内の第1のドメイン[e]が、プライマーポリヌクレオチドの第2のドメインPcに対して十分に相補的であることによって、並びにステーブルの第2のドメイン[f]がフィクサーポリヌクレオチドの第2のドメイン[Fd]に対して十分に相補的であることによって、図3(スキーム3A)に示されたような、安定な四方向接合の形成が可能となる。

【 0 0 3 8 】

本明細書に記載されたように、ポリヌクレオチドの組み合わせ内で更なる「ステーブル」ポリヌクレオチドが意図されていて、これによって、ポリヌクレオチドの組み合わせ中のステーブルポリヌクレオチドの数に依存して、複数方向の接合が発生する。スキーム3Bは、五方向接合を示していて、当該技術分野の当業者は、五方向以上の接合がどのように構成されるかを容易に理解されることであろう。

【 0 0 3 9 】

更に、「ステーブル」ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されたように、修飾核酸を含んでもよい。更なる態様では、「ステーブル」ポリヌクレオチドは、標識及び/又はクエンチャーを含んでもよい。これら態様では、標識又はクエンチャーは、「ステーブル」ポリヌクレオチドの5'又は3'末端のいずれかにあってもよい。

【 0 0 4 0 】

C . ブロッカーポリヌクレオチドを含むプライマーの組み合わせ

本発明は、ブロッカーポリヌクレオチドがポリヌクレオチドの組み合わせに含有されるような実施形態も更に意図している。ブロッカーポリヌクレオチドは、第1の標的ポリヌクレオチド領域の5'側直近に配置された標的ポリヌクレオチド領域に相補的である配列を有する。このことは、図4に示されている。いくつかの実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインに重なっている。言い換えれば、第1のポリヌクレオチドの3'末端におけるヌクレオチドとブロッカーポリヌクレオチドの5'末端におけるヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの同一のヌクレオチドに対して相補的である可能性がある。種々の実施形態では、第1のポリヌクレオチドとブロッカーポリヌクレオチドの重複は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、又は15ヌクレオチドである。関連する実施形態では、第1のポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドの3'末端におけるヌクレオチドと、ブロッカーポリヌクレオチドの5'末端におけるヌクレオチドは異なる。これら実施形態では、第1のポリヌクレオチドの3'末端におけるヌクレオチドは、それらが標的ポリヌクレオチドに対して適切な位置で相補的である場合、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする可能性があり、従って、適切な条件下で、第1のポリヌクレオチドの伸張を許容する(図4a参照)。関連する実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドの5'末端におけるヌクレオチドは、それらが非標的ポリヌクレオチドに対して適切な位置で相補的である場合、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする可能性があり、従って、第1のポリヌクレオチドの伸張が遮断される(図4b参照)。種々の実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドの3'末端におけるヌクレオチドは、ポリメラーゼによる伸張を防止するために修飾されている。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドの重複する配列と第1ポリヌクレオチド(Pa)の第1のドメインは、少なくとも2塩基、少なくとも3塩基、少なくとも4塩基、少なくとも5塩基、少なくとも6塩基、少なくとも7塩基、少なくとも8塩基、少なくとも9塩基、又は少なくとも10塩基で異なる。異なる塩基は、重複部分のいかなる位置にもあり得る。

【0042】

D. プローブポリヌクレオチドを含むプライマーの組み合わせ

本発明は、上記ポリヌクレオチドの組み合わせにプローブポリヌクレオチドが含有されるような実施形態もまた意図している。プローブポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチド領域の5'側に配置された標的ポリヌクレオチド領域に相補的である配列を有する(図5a参照)。他の実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの伸張生成物に相補的である配列を有する(図5b参照)。明らかのように、本プローブポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの相補鎖に相補的であろう。プローブポリヌクレオチドを伴って、プライマーの組み合わせにブロックポリヌクレオチドが含有されるような実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、ブロッカーポリヌクレオチドに相補的な標的ポリヌクレオチド領域の5'側に配置された標的ポリヌクレオチド領域に対して相補的である。種々の実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、その5'末端に標識を含む。関連した実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、その3'末端にクエンチャーを更に含む。更に他の実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、限定されるものではないが、Zenクエンチャーのような内部クエンチャーを更に含む。

20

30

【0043】

E. ユニバーサルクエンチャーを含むプライマーの組み合わせ

種々の実施形態では、プライマーポリヌクレオチドの組み合わせは、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドを含む。ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、それが第2のポリヌクレオチドの第2のドメインにハイブリダイズするように、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して相補的である。これらの実施形態では、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインがハイブリダイズするところの領域の3'側に配置された第2のポリヌクレオチドの領域に対してハイブリダイズする(図6参照)。ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、その3'末端がクエンチャーによって標識されている。

40

F. 逆方向プライマーを含むプライマーの組み合わせ

【0044】

本発明は、逆方向プライマーポリヌクレオチドが上記ポリヌクレオチドの組み合わせに含有されるような実施形態を更に意図している。逆方向プライマーは、第1のポリヌクレオチドの伸張によって作り出されたポリヌクレオチド内の領域に対して相補的である(図8a参照)。いくつかの実施形態で明らかのように、標的ポリヌクレオチドが二重鎖ポリヌクレオチドの1本鎖である場合、逆方向プライマーは、標的ポリヌクレオチドの相補鎖に対してまた相補的である。いくつかの実施形態では、上述したように、逆方向プライマーは、組み合わせられた第1のポリヌクレオチド/第2のポリヌクレオチドである(図8b

50

参照)。

【0045】

II. ポリヌクレオチド

本明細書で使用する、用語「ポリヌクレオチド」は、ブロッカーポリヌクレオチド及びプローブを含むポリヌクレオチド対の組み合わせの構成成分としてか、或いは標的分子としてかのいずれかであり、用語「オリゴヌクレオチド」と互換的に使用される。

【0046】

本明細書で使用する、用語「ヌクレオチド」又はその複数形は、本明細書で説明したように、或いは当該技術分野で既知であるように、修飾形と互換的である。ある場合には、当業者は、重合化され得るヌクレオチドの修飾と同様に、天然発生型ヌクレオチドを包含する用語「ヌクレオベース」を用いる。

10

【0047】

所定の配列のポリヌクレオチドの製造法は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら著、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(第2版、1989年)及びF. Eckstein(編集)、「Oligonucleotide and Analogues」, 第1版(Oxford University Press, New York, 1991年)を参照されたい。固相合成法は、オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドの双方に好適である(DNAを合成するための周知の方法は、RNAを合成するためにも又有用である)。オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドは、酵素的に調製され得る。

20

【0048】

種々の態様では、提供された方法は、DNAオリゴヌクレオチド、RNAオリゴヌクレオチド、または2つのタイプの組み合わせであるポリヌクレオチドの使用を含む。オリゴヌクレオチドの修飾形は、少なくとも1つの修飾されたヌクレオチド間架橋結合を有するオリゴヌクレオチドを含むよう意図されている。修飾ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、以下の本明細書に詳細に記載されている。

【0049】

III. 修飾ポリヌクレオチド

オリゴヌクレオチドの特定の例としては、修飾された骨格を含有するオリゴヌクレオチド、又は非天然ヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。修飾された骨格を有するオリゴヌクレオチドとしては、リン原子を骨格内に保持するオリゴヌクレオチド及び骨格内にリン原子を有しないオリゴヌクレオチドが挙げられる。その骨格内にリン原子を有しない修飾オリゴヌクレオチドは、「オリゴヌクレオチド」の意味に含まれると考えられる。特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチドはホスホロチオエート結合を含む。

30

【0050】

リン原子を含有する修飾オリゴヌクレオチド骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラル体ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート及びボラノホスフェートが挙げられ、これらは通常3'-5'結合、これらの2'-5'結合同類体を有し、並びに1つまたはそれ以上のヌクレオチド間結合が3'~3'、5'~5'又は2'~2'結合であるような逆転した極性を有する。3'側のほとんどのヌクレオチド間結合で単一の3'~3'結合を含み、すなわち、無塩基部分であり得る単一の逆転したヌクレオチド残基を含む(ヌクレオチドが欠けているか、或いはその規定位置にヒドロキシル基を有する)逆転した極性を有するオリゴヌクレオチドもまた考えられる。塩、混合塩及び遊離酸も更に考えられる。上記リン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許は、その開示が参照により本明細書に組み込まれものとする、米国特許第3,687,808号、同第4,469,863号

40

50

、同第4, 476, 301号、同第5, 023, 243号、同第5, 177, 196号、同第5, 188, 897号、同第5, 264, 423号、同第5, 276, 019号、同第5, 278, 302号、同第5, 286, 717号、同第5, 321, 131号、同第5, 399, 676号、同第5, 405, 939号、同第5, 453, 496号、同第5, 455, 233号、同第5, 466, 677号、同第5, 476, 925号、同第5, 519, 126号、同第5, 536, 821号、同第5, 541, 306号、同第5, 550, 111号、同第5, 563, 253号、同第5, 571, 799号、同第5, 587, 361号、同第5, 194, 599号、同第5, 565, 555号、同第5, 527, 899号、同第5, 721, 218号、同第5, 672, 697号及び同第5, 625, 050号明細書が挙げられる。

10

【0051】

その中にリン原子を含有しない修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオチド間結合、混合された異種原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオチド間結合、又は1つまたはそれ以上の短鎖異種原子又は複素環式ヌクレオチド間結合によって形成される骨格を有する。これらは、モルホリノ結合を有する骨格、シロキサン骨格、スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格、ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格、リボアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格、スルホネート及びスルホンアミド骨格、アミド骨格、及び混合したN、O、S及びC_H₂成分部分を有する他の骨格が挙げられる。その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれたものとする、例えば、米国特許第5, 034, 506号、同第5, 166, 315号、同第5, 185, 444号、同第5, 214, 134号、同第5, 216, 141号、同第5, 235, 033号、同第5, 264, 562号、同第5, 264, 564号、同第5, 405, 938号、同第5, 434, 257号、同第5, 466, 677号、同第5, 470, 967号、同第5, 489, 677号、同第5, 541, 307号、同第5, 561, 225号、同第5, 596, 086号、同第5, 602, 240号、同第5, 610, 289号、同第5, 602, 240号、同第5, 608, 046号、同第5, 610, 289号、同第5, 618, 704号、同第5, 623, 070号、同第5, 663, 312号、同第5, 633, 360号、同第5, 677, 437号、同第5, 792, 608号、同第5, 646, 269号及び同第5, 677, 439号明細書を参照されたい。

20

30

【0052】

更に他の実施形態では、1つ又はそれ以上の糖及び/又は1つ又はそれ以上のヌクレオチド間結合単位が「非天然型」基で置換されているようなオリゴヌクレオチド擬似体を提供する。1つの態様では、本実施形態はペプチド核酸(PNA)を意図する。PNA化合物では、オリゴヌクレオチドの糖骨格が、アミド含有骨格で置換されている。例えば、その開示を参照により本明細書に組み込んだものとする、米国特許第5, 539, 082号、同第5, 714, 331号及び同第5, 719, 262号明細書、並びにNielsenら著、1991年、Science、254、1497~1500頁を参照されたい。

40

【0053】

更に他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート骨格及び異種原子骨格を備えたオリゴヌクレオチドを持ち、米国特許第5, 489, 677号及び同第5, 602, 240号明細書に記載された、 $-CH_2-NH-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$ 、 $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ 及び $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ が挙げられる。また、米国特許第5, 034, 506号明細書に記載された、モルホリノ骨格構造を備えたオリゴヌクレオチドも考えられる。

【0054】

種々の形態では、2~4個、望ましくは3個の基/原子からなるオリゴ中の2つの連続したモノマー間の結合は、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^H-$ 、 $>C=O$ 、 $>C=$

50

NR^{H} , $>\text{C}=\text{S}$, $-\text{Si}(\text{R}^{\text{H}})_2-$, $-\text{SO}-$, $-\text{S}(\text{O})_2-$, $-\text{P}(\text{O})_2-$,
 $-\text{PO}(\text{BH}_3)-$, $-\text{P}(\text{O}, \text{S})-$, $-\text{P}(\text{S})_2-$, $-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-$, $-\text{PO}(\text{OCH}_3)-$,
 及び $-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-$ から選択され、式中 RH は水素、及び C_{1-4}
 アルキルから選択され、並びに R^{H} は C_{1-6} -アルキル及びフェニルから選択される。
 このような結合の具体的な例は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$,
 $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,
 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=($ 連続するモノマーへの結合として用いられる場合、 R^{H} を含む) $,$
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$,
 $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{O}-$
 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CS}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{C}(=\text{NR}^{\text{H}})$
 $-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$
 $-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$,
 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-$,
 $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=($ 連続するモノ
 マーへの結合として用いられる場合、 R^{H} を含む) $)-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CO}$
 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CO}-$, $-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}$
 $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{NR}^{\text{H}}$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{C}$
 $\text{H}_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=($ 連続するモノマーへの
 結合として用いられる場合、 R^{H} を含む) $)-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{S}-\text{CH}_2$
 $-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{S}$
 $-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}$
 $-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{S}(\text{O})_2$
 $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{S})$
 $-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{O}$
 $-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{S}-$,
 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$, $-\text{S}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{S}-$, $-\text{S}-$
 $\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-$
 $\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}$
 $\text{O}(\text{BH}_3)-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{H}-$,
 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{O})_2-$
 $-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$, 及び $-\text{O}-\text{Si}(\text{R}^{\text{H}})_2-\text{O}-$ から選択され、こ
 の $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^{\text{H}}-$, $-\text{CH}_2-\text{NR}^{\text{H}}-\text{O}-$, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}$
 $(\text{O})_2-\text{O}-\text{O}-\text{P}(-\text{O}, \text{S})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$, $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{P}(\text{O})$
 $2-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{\text{H}})-\text{O}-$, $-\text{O}-\text{PO}(\text{CH}$
 $3)-\text{O}-$, 及び $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-\text{O}-$ の中で、 RH は水素、 C_{1-4} アルキ
 ルから選択され、 R^{H} は C_{1-6} -アルキル及びフェニルから選択されると考えられる。
 更なる具体例が、Mesmaekerら著、1995年、「Current Opinion in Structural Biology」5:343~355頁、及びSusan M. Freier及びKarl-Heinz Altmann著、1997年、「Nucleic Acids Research」, 第25巻、4429~4443
 40 頁で提供されている。

【0055】

オリゴヌクレオチドの更なる他の修飾形態は、その開示がに参照によりその全体が本明
 細書に組み込まれたものとする、米国特許出願公開第2004/0219565号明細書
 に詳細に記載されている。

【0056】

修飾オリゴヌクレオチドは、1つまたはそれ以上の置換された糖部分を含有してもよい。
 特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、2'位置において以下のうちの1つを含む。
 これらは OH ; F ; $\text{O}-$, $\text{S}-$ 、又は $\text{N}-$ アルキル; $\text{O}-$, $\text{S}-$ 又は $\text{N}-$ アルケニル; O
 $-$, $\text{S}-$ 又は $\text{N}-$ アルキニル; 若しくは $\text{O}-$ アルキル- $\text{O}-$ アルキルで、この中で、アル
 50

キル、アルケニル及びアルキニルは $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、又は $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル及びアルキニルで置換されていても置換されていなくてもよい。他の実施形態では、 $O[(CH_2)_n O]_m CH_3$ 、 $O(CH_2)_n OCH_3$ 、 $O(CH_2)_n NH_2$ 、 $O(CH_2)_n CH_3$ 、 $O(CH_2)_n ONH_2$ 、及び $O(CH_2)_n ON[(CH_2)_n CH_3]_2$ を含み、式中、 n 及び m は 1 ~ 約 10 である。他のオリゴヌクレオチドは、2' 位置において以下のうちの 1 つを含み、これらは、 $C_1 \sim C_{10}$ 低級アルキル、置換された低級アルキル、アルケニル、アルキニル、アルカリル、アラルキル、 O -アルカリル又は O -アラルキル、 SH 、 SCH_3 、 OCN 、 Cl 、 Br 、 CN 、 CF_3 、 OCF_3 、 $SOC H_3$ 、 $SO_2 CH_3$ 、 ONO_2 、 NO_2 、 N_3 、 NH_2 、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、 a_n RNA 開裂基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的性質を改善するための基、又はオリゴヌクレオチドの薬動学的性質を改善するための基、並びに同様な性質を有する他の置換基である。1 つの態様では、修飾としては、2' -メトキシエトキシ ($2' - O - CH_2 CH_2 OCH_3$ 、別名 2' - $O - (2$ -メトキシエチル) 又は 2' - (MOE) (Martínら著、1995年、「Helv. Chim. Acta」、78、486 ~ 504頁) が挙げられ、すなわち、アルコキシアルコキシ基である。他の修飾としては、本明細書の実施例で、以下に記載されたような 2' -ジメチルアミノオキシエトキシ、すなわち、 $O(CH_2)_2 ON(CH_3)_2$ 基、別名 2' -DMAOE、及び本明細書の実施例で、以下に更に記載されたような 2' -ジメチルアミノエトキシエトキシ (当該技術分野では、別名 2' - O -ジメチル - アミノ - エトキシ - エチル 又は 2' -DMAEOE)、すなわち $2' - O - CH_2 - O - CH_2 - N(CH_3)_2$ が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0057】

更に他の修飾として、2' -メトキシ ($2' - O - CH_3$)、2' -アミノプロポキシ ($2' - OCH_2 CH_2 CH_2 NH_2$)、2' -アリル ($2' - CH_2 - CH = CH_2$)、2' - O -アリル ($2' - O - CH_2 - CH = CH_2$) 及び 2' -フルオロ ($2' - F$) が挙げられる。2' -修飾は、アラビノ (上方) 位置にあってモリボ (下方) 位置にあってよい。1 つの態様では、2' -アラビノ修飾は、2' - F である。同様な修飾は、オリゴヌクレオチドの他の位置において生成されてもよく、例えば、3' 末端ヌクレオチド又は 2' - 5' 結合されたオリゴヌクレオチド上の糖の 3' 位置、及び 5' 末端ヌクレオチドの 5' 位置において生成されてもよい。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりのシクロブチル部分のような糖疑似体を有してもよい。例えば、その開示を本明細書に参照によりその全体が組み込まれたものとする、米国特許第 4,981,957号、同第 5,118,800号、同第 5,319,080号、同第 5,359,044号、同第 5,393,878号、同第 5,446,137号、同第 5,466,786号、同第 5,514,785号、同第 5,519,134号、同第 5,567,811号、同第 5,576,427号、同第 5,591,722号、同第 5,597,909号、同第 5,610,300号、同第 5,627,053号、同第 5,639,873号、同第 5,646,265号、同第 5,658,873号、同第 5,670,633号、同第 5,792,747号、及び同第 5,700,920号明細書を参照されたい。

【0058】

種々の態様では、糖の修飾は、2' -ヒドロキシル基が糖環の 3' 又は 4' 炭素原子に結合されていて、これによって二環式糖部分が形成されるようなロックド核酸 (LNAs) を含む。特定の態様における結合は、2' 酸素原子と 4' 炭素原子を架橋しているメチレン ($-CH_2-$) $_n$ 基であり、式中、 n は 1 又は 2 である。LNAs 及びその調製は、その開示を本明細書に参照によりその全体が引用されたものとする、国際公開第 98/39352号及び国際公開第 99/14226号に記載されている。種々の実施形態では、第 1 のポリヌクレオチドは、1 つのロックド核酸を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチドは、複数個のロックド核酸を含む。特定の実施形態では、第 1 のポリヌクレオチドの第 1 のドメインは、複数個のロックド核酸を含む。より特定な実施形態で

は、第1のポリヌクレオチドの3'末端におけるヌクレオチドは、1つのロックド核酸を含む。種々の実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、1つのロックド核酸を含む。他の実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、複数個のロックド核酸を含む。特定の実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドの5'末端におけるヌクレオチドが、1つのロックド核酸を含む。

【0059】

ポリヌクレオチドは、塩基修飾又は置換もまた含んでよい。本明細書で使用する、「非修飾」又は「天然型」塩基は、プリン塩基アデニン(A)及びグアニン(G)、並びにピリミジン塩基チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)を包含する。修飾塩基としては、5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニルウラシル及びシトシン並びにピリミジン塩基の他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン並びにチミン、5-ウラシル(疑似ウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換されたアデニン及びグアニン、5-ハロ特に5-プロモ、5-トリフルオロメチル及び他の5-置換されたウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン及び3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンのような他の合成及び天然型塩基が挙げられる。更なる修飾塩基として、フェノキサジンシチジン(1H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)のような三環式ピリミジン、フェノチアジンシチジン(1H-ピリミジド[5,4-b][1,4]ベンゾチアジン-2(3H)-オン)、置換されたフェノキサジンシチジン(例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド[5,4-b][1,4]ベンゾキサジン-2(3H)-オン)のようなGクランプ、カルバゾールシチジン(2H-ピリミド[4,5-b]インド-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)、ピリドインドールシチジン(H-ピリド[3',2':4,5]ピロロ[2,3-d]ピリミジン-2-オン)が挙げられる。修飾塩基は、プリン又はピリミジン塩基が他の複素環で置換されているような、例えば、7-デアザ-アデニン、7-セアザグアノシン、2-アミノピリジン及び2-ピリドンなどの修飾塩基を含んでもよい。更なる塩基としては、米国特許第3,687,808に開示されている修飾塩基、「The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」、858~859頁、Kroschwitz, J. I. 編、John Wiley & Sons, 1990年に開示されている修飾塩基、Englischら著、1991年、「Angewandte Chemie, International Edition, 30:613頁に開示されている修飾塩基、並びにSanghvi, Y. S. 著、第15章、「Antisense Research and Applications」289~302頁、Crooke, S. T. 及びLebleu, B. 編、CRC Press, 1993年に開示されている修飾塩基が挙げられる。これらの塩基のあるものは、結合親和性を増大させるために有用であり、並びに2-アミノプロピルアデニン、5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシンを含有する5-置換されたピリミジン、6-アザピリミジン及びN-2、N-6及び-6置換されたプリンを含む。5-メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2まで増加させることが確認されていて、特定の態様では、2'-O-メトキシエチル糖修飾と組み合わせられている。その開示が参照により本明細書に引用されたものとする、米国特許第3,687,808号、同第4,845,205号、同第5,130,302号、同第5,134,066号、同第5,175,273号、同第5,367,066号、同第5,432,272号、同第5,457,187号、同第5,459,255号、同第5,484,908号、同第5,502

、177号、同第5,525,711号、同第5,552,540号、同第5,587,469号、同第5,594,121号、同第5,596,091号、同第5,614,617号、同第5,645,985号、同第5,830,653号、同第5,763,588号、同第6,005,096号、同第5,750,692号及び同第5,681,941号明細書を参照されたい。

【0060】

「修飾塩基」又は他の同様な用語は、天然型塩基（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、及び/又はチミン）と対になることができる、及び/又は非天然型塩基と対になることができる組成物を指す。特定の態様では、修飾塩基は、15、12、10、8、6、4又は2 若しくはそれ未満の T_m 差を提供する。代表的な修飾塩基は、欧州特許第1072679号明細書及び国際公開第97/12896号に記載されている。

10

【0061】

「ヌクレオ塩基」は、天然型ヌクレオ塩基アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)及びウラシル(U)を意味し、並びにキサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ-N⁶-メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、N⁴, N⁴-エタノシトシン、N⁷, N⁷-エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン(mC)、5-(C³-C⁶)-アルキニル-シトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、疑似イソシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシン及びBennnerら著、米国特許第5,432,272号並びにSusan M. Freier及びKarl-Heinz Altmann著、1997年、「Nucleic Acids Research」、第25巻、4429~4443頁に記載されている「非天然型」ヌクレオ塩基のような非天然型ヌクレオ塩基を意味する。したがって、用語「ヌクレオ塩基」は、既知のプリン及びピリミジン複素環を含むのみならず、複素環式類似体及びそれらの互変異性体もまた含む。更なる天然型及び非天然型ヌクレオ塩基は、米国特許第3,687,808号明細書(Meriganら著)、Sanghvi著、Chapter 15、「Antisense Research and Application」S.T. Crooke及びB. Lebleu編、CRC Press, 1993年、Englischら著、1991年、「Angewandte Chemie, International Edition», 30:613~722頁(特に622頁と623頁、並びに双方ともに参照によりその全体を本明細書に引用したものとす「Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering」, J. I. Kroschwitz編、John Wiley & Sons, 1990年, 858~859頁、及びCook著、「Anti-Cancer Drug Design」1991年, 6, 587~607頁を参照されたい)に開示されているヌクレオ塩基が挙げられる。用語「ヌクレオシド塩基」又は「塩基単位」は、多くの古典的な感覚ではヌクレオシド塩基ではないが、ヌクレオシド塩基として働く特定の「ユニバーサル塩基」を含むヌクレオ塩基のように働く複素環式化合物のような化合物を包含することを更に意図している。特にユニバーサル塩基として既述したヌクレオシド塩基は、3-ニトロピロール、必要に応じて置換されたインドール(例えば、5-ニトロインドール)、並びに必要に応じて置換されたヒポキサンチンなどである。他の望ましいユニバーサル塩基としては、ピロール、ジアゾール又はトリアゾール誘導体で、当該技術分野で既知のユニバーサル塩基を包含する。

20

30

40

【0062】

IV. ポリヌクレオチド構造 - 長さ

1つの態様では、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインは、標的ポリヌクレオチド領域に対して相補的である5ヌクレオチドである。種々の態様では、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインは、標的ポリヌクレオチド領域に対して相補的である、少なくとも6ヌクレオチド、少なくとも7ヌクレオチド、少なくとも8ヌクレオチド、少なくとも9ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも11ヌクレオチド、少なくとも1

50

2ヌクレオチド、少なくとも13ヌクレオチド、少なくとも14ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも16ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも18ヌクレオチド、少なくとも19ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも21ヌクレオチド、少なくとも22ヌクレオチド、少なくとも23ヌクレオチド、少なくとも24ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド又はそれ以上のヌクレオチドである。関連する態様では、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインは、第2のポリヌクレオチドに対して十分に相補的であり、これによって適切な条件下で、これら2つの相補的配列間のハイブリダイゼーションが可能となるような特徴的なDNA配列内の10またはそれ以上のヌクレオチドを含む。種々の態様では、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインは、適切な条件下で、2つの相補的配列間のハイブリダイゼーションが許されるように、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して十分に相補的である特徴的なDNA配列の少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約45、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180、少なくとも約200、少なくとも約220、少なくとも約240、少なくとも約260、少なくとも約280、少なくとも約300、少なくとも約320、少なくとも約340、少なくとも約360、少なくとも約380、少なくとも約400、少なくとも約420、少なくとも約440、少なくとも約460、少なくとも約480、少なくとも約500またはそれ以上のヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0063】

別の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、約10ヌクレオチドを含有する第1のドメインを含み、第2のポリヌクレオチドのこの第1のドメインは、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインによって識別される標的領域とは異なるような標的DNA領域に対して相補的である。種々の態様では、第2のポリヌクレオチドは、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも41、少なくとも42、少なくとも43、少なくとも44、少なくとも45、少なくとも46、少なくとも47、少なくとも48、少なくとも49、少なくとも50、少なくとも約100、少なくとも約150、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約300、少なくとも約350、少なくとも約400、少なくとも約450、少なくとも約500、少なくとも約550、少なくとも約600、少なくとも約650、少なくとも約700、少なくとも約750、少なくとも約800、少なくとも約850、少なくとも約900、少なくとも約950、少なくとも約1000、少なくとも約1100、少なくとも約1200、少なくとも約1300、少なくとも約1400、少なくとも約1500、少なくとも約1600、少なくとも約1700、少なくとも約1800、少なくとも約1900、少なくとも約2000、少なくとも約2100、少なくとも約2200、少なくとも約2300、少なくとも約2400、少なくとも約2500、少なくとも約2600、少なくとも約2700、少なくとも約2800、少なくとも約2900、少なくとも約3000、少なくとも約3100、少なくとも約3200、少なくとも約3300、少なくとも約3400、少なくとも約3500、少なくとも約3600、少なくとも約3700、少なくとも約3800、少なくとも約3900、少なくとも約4000、少なくとも約410

0、少なくとも約4200、少なくとも約4300、少なくとも約4400、少なくとも約4500、少なくとも約4600、少なくとも約4700、少なくとも約4800、少なくとも約4900、少なくとも約5000又はそれ以上のヌクレオチドを含有する第1のドメインを含み、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインによって識別される標的領域とは異なっている標的DNA領域を識別し、かつそれに結合するように、この第2のポリヌクレオチドの第1のドメインは、相補的又は十分に相補的である。

【0064】

関連する態様では、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインは、適切な条件下、ハイブリダイゼーションを許容するために、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して十分に相補的である特徴的DNA配列の10ヌクレオチドを含む。種々の態様では、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインは、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180、少なくとも約200、少なくとも約220、少なくとも約240、少なくとも約260、少なくとも約280、少なくとも約300、少なくとも約320、少なくとも約340、少なくとも約360、少なくとも約380、少なくとも約400、少なくとも約420、少なくとも約440、少なくとも約460、少なくとも約480、少なくとも約500又はそれ以上の、適切な条件下、仏の十分に相補的な配列間のハイブリダイゼーションを許容するために、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインに十分に相補的である特徴的なDNA配列のヌクレオチドを含む。

10

20

【0065】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された組成物及び方法は、第1及び第2のポリヌクレオチドに関して上記の特徴を備えたポリヌクレオチドの第2のセットを含む。いくつかの実施形態では、複数個のセットが意図されている。第1及び第2のポリヌクレオチドのこれら追加のセットは、第1及び第2のセットに関して説明されたいかなる特徴も有することができる。

30

【0066】

図3(スキーム3A及び3B)で示されたような「ステーブル」ポリヌクレオチドは、1つの態様では、少なくとも20ヌクレオチドを含むと考えられる。他の態様では、「ステーブル」ポリヌクレオチドは、少なくとも21ヌクレオチド、又は少なくとも22ヌクレオチド、又は少なくとも23ヌクレオチド、又は少なくとも24ヌクレオチド、又は少なくとも25ヌクレオチド、又は少なくとも26ヌクレオチド、又は少なくとも27ヌクレオチド、又は少なくとも28ヌクレオチド、又は少なくとも29ヌクレオチド、又は少なくとも30ヌクレオチド、又は少なくとも約35ヌクレオチド、又は少なくとも約40ヌクレオチド、又は少なくとも約45ヌクレオチド、又は少なくとも約50ヌクレオチド、又は少なくとも約55ヌクレオチド、又は少なくとも約60ヌクレオチド、又は少なくとも約65ヌクレオチド、又は少なくとも約70ヌクレオチド、又は少なくとも約75ヌクレオチド、又は少なくとも約80ヌクレオチド、又は少なくとも約85ヌクレオチド、又は少なくとも約90ヌクレオチド、又は少なくとも約95ヌクレオチド、又は少なくとも約100ヌクレオチド、又は少なくとも約150ヌクレオチド、又は少なくとも約200ヌクレオチド、又は少なくとも約250ヌクレオチド、又は少なくとも約300ヌクレオチド、又は少なくとも約350ヌクレオチド、又は少なくとも約400ヌクレオチド、又は少なくとも約450ヌクレオチド、又は少なくとも約500ヌクレオチド又はそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。

40

【0067】

いくつかの実施形態では、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、約5ヌクレ

50

オチドの長さ～約100塩基の長さである。種々の態様では、ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチドは、適切な条件下、ハイブリダイゼーションを許可するために、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインに十分に相補的である特徴的DNA配列の少なくとも5ヌクレオチド、又は少なくとも6ヌクレオチド、又は少なくとも7ヌクレオチド、又は少なくとも8ヌクレオチド、又は少なくとも9ヌクレオチド、又は少なくとも10ヌクレオチド、又は少なくとも11ヌクレオチド、又は少なくとも12ヌクレオチド、又は少なくとも13ヌクレオチド、又は少なくとも14ヌクレオチド、又は少なくとも15ヌクレオチド、又は少なくとも16ヌクレオチド、又は少なくとも17ヌクレオチド、又は少なくとも18ヌクレオチド、又は少なくとも19ヌクレオチド、又は少なくとも20ヌクレオチド、又は少なくとも21ヌクレオチド、又は少なくとも22ヌクレオチド、又は少なくとも23ヌクレオチド、又は少なくとも24ヌクレオチド、又は少なくとも25ヌクレオチド、又は少なくとも26ヌクレオチド、又は少なくとも27ヌクレオチド、又は少なくとも28ヌクレオチド、又は少なくとも29ヌクレオチド、又は少なくとも30ヌクレオチド、又は少なくとも31ヌクレオチド、又は少なくとも32ヌクレオチド、又は少なくとも33ヌクレオチド、又は少なくとも34ヌクレオチド、又は少なくとも35ヌクレオチド、又は少なくとも約40ヌクレオチド、又は少なくとも約45ヌクレオチド、又は少なくとも約50ヌクレオチド、又は少なくとも約55ヌクレオチド、又は少なくとも約60ヌクレオチド、又は少なくとも約65ヌクレオチド、又は少なくとも約70ヌクレオチド、又は少なくとも約75ヌクレオチド、又は少なくとも約80ヌクレオチド、又は少なくとも約85ヌクレオチド、又は少なくとも約90ヌクレオチド、又は少なくとも約95ヌクレオチド、又は少なくとも約100ヌクレオチドを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、約5ヌクレオチドの長さ～約100塩基の長さである。種々の実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、適切な条件下、ハイブリダイゼーションを許可するために、標的ポリヌクレオチド領域に対して十分に相補的であるDNA配列の、少なくとも5ヌクレオチド、又は少なくとも6ヌクレオチド、又は少なくとも7ヌクレオチド、又は少なくとも8ヌクレオチド、又は少なくとも9ヌクレオチド、又は少なくとも10ヌクレオチド、又は少なくとも11ヌクレオチド、又は少なくとも12ヌクレオチド、又は少なくとも13ヌクレオチド、又は少なくとも14ヌクレオチド、又は少なくとも15ヌクレオチド、又は少なくとも16ヌクレオチド、又は少なくとも17ヌクレオチド、又は少なくとも18ヌクレオチド、又は少なくとも19ヌクレオチド、又は少なくとも20ヌクレオチド、又は少なくとも21ヌクレオチド、又は少なくとも22ヌクレオチド、又は少なくとも23ヌクレオチド、又は少なくとも24ヌクレオチド、又は少なくとも25ヌクレオチド、又は少なくとも26ヌクレオチド、又は少なくとも27ヌクレオチド、又は少なくとも28ヌクレオチド、又は少なくとも29ヌクレオチド、又は少なくとも30ヌクレオチド、又は少なくとも31ヌクレオチド、又は少なくとも32ヌクレオチド、又は少なくとも33ヌクレオチド、又は少なくとも34ヌクレオチド、又は少なくとも35ヌクレオチド、又は少なくとも36ヌクレオチド、又は少なくとも37ヌクレオチド、又は少なくとも38ヌクレオチド、又は少なくとも39ヌクレオチド、又は少なくとも40ヌクレオチド、又は少なくとも41ヌクレオチド、又は少なくとも42ヌクレオチド、又は少なくとも43ヌクレオチド、又は少なくとも44ヌクレオチド、又は少なくとも45ヌクレオチド、又は少なくとも約50ヌクレオチド、又は少なくとも約55ヌクレオチド、又は少なくとも約60ヌクレオチド、又は少なくとも約65ヌクレオチド、又は少なくとも約70ヌクレオチド、又は少なくとも約75ヌクレオチド、又は少なくとも約80ヌクレオチド、又は少なくとも約85ヌクレオチド、又は少なくとも約90ヌクレオチド、又は少なくとも約95ヌクレオチド、又は少なくとも約100ヌクレオチドを含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、約5ヌクレオチドの長さ～約100塩基の長さである。種々の態様では、ブロッカーポリヌクレオチドは、適切な条

件下、ハイブリダイゼーションを許可するために、標的ポリヌクレオチド領域に十分に相補的であるポリヌクレオチド配列の、少なくとも5ヌクレオチド、又は少なくとも6ヌクレオチド、又は少なくとも7ヌクレオチド、又は少なくとも8ヌクレオチド、又は少なくとも9ヌクレオチド、又は少なくとも10ヌクレオチド、又は少なくとも11ヌクレオチド、又は少なくとも12ヌクレオチド、又は少なくとも13ヌクレオチド、又は少なくとも14ヌクレオチド、又は少なくとも15ヌクレオチド、又は少なくとも16ヌクレオチド、又は少なくとも17ヌクレオチド、又は少なくとも18ヌクレオチド、又は少なくとも19ヌクレオチド、又は少なくとも20ヌクレオチド、又は少なくとも21ヌクレオチド、又は少なくとも22ヌクレオチド、又は少なくとも23ヌクレオチド、又は少なくとも24ヌクレオチド、又は少なくとも25ヌクレオチド、又は少なくとも26ヌクレオチド、又は少なくとも27ヌクレオチド、又は少なくとも28ヌクレオチド、又は少なくとも29ヌクレオチド、又は少なくとも30ヌクレオチド、又は少なくとも31ヌクレオチド、又は少なくとも32ヌクレオチド、又は少なくとも33ヌクレオチド、又は少なくとも34ヌクレオチド、又は少なくとも35ヌクレオチド、又は少なくとも36ヌクレオチド、又は少なくとも37ヌクレオチド、又は少なくとも38ヌクレオチド、又は少なくとも39ヌクレオチド、又は少なくとも40ヌクレオチド、又は少なくとも約45ヌクレオチド、又は少なくとも約50ヌクレオチド、又は少なくとも約55ヌクレオチド、又は少なくとも約60ヌクレオチド、又は少なくとも約65ヌクレオチド、又は少なくとも約70ヌクレオチド、又は少なくとも約75ヌクレオチド、又は少なくとも約80ヌクレオチド、又は少なくとも約85ヌクレオチド、又は少なくとも約90ヌクレオチド、又は少なくとも約95ヌクレオチド、又は少なくとも約100ヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、その5'末端にヌクレオチドとして修飾核酸を更に含む。種々の実施形態では、修飾核酸は、ロックド核酸である。いくつかの実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、ポリメラーゼによる伸張を防止するために、3'末端にブロッキング基を更に含む。

10

20

30

40

50

【0070】

いくつかの実施形態では、逆方向プライマーポリヌクレオチドは、約5ヌクレオチドの長さ～約100塩基の長さである。種々の態様では、逆方向プライマーポリヌクレオチドは、適切な条件下、ハイブリダイゼーションを許可するために、ポリメラーゼ伸張した第1のポリヌクレオチドの領域に十分に相補的であるポリヌクレオチド配列の少なくとも5ヌクレオチド、又は少なくとも6ヌクレオチド、又は少なくとも7ヌクレオチド、又は少なくとも8ヌクレオチド、又は少なくとも9ヌクレオチド、又は少なくとも10ヌクレオチド、又は少なくとも11ヌクレオチド、又は少なくとも12ヌクレオチド、又は少なくとも13ヌクレオチド、又は少なくとも14ヌクレオチド、又は少なくとも15ヌクレオチド、又は少なくとも16ヌクレオチド、又は少なくとも17ヌクレオチド、又は少なくとも18ヌクレオチド、又は少なくとも19ヌクレオチド、又は少なくとも20ヌクレオチド、又は少なくとも21ヌクレオチド、又は少なくとも22ヌクレオチド、又は少なくとも23ヌクレオチド、又は少なくとも24ヌクレオチド、又は少なくとも25ヌクレオチド、又は少なくとも26ヌクレオチド、又は少なくとも27ヌクレオチド、又は少なくとも28ヌクレオチド、又は少なくとも29ヌクレオチド、又は少なくとも30ヌクレオチド、又は少なくとも31ヌクレオチド、又は少なくとも32ヌクレオチド、又は少なくとも33ヌクレオチド、又は少なくとも34ヌクレオチド、又は少なくとも35ヌクレオチド、又は少なくとも36ヌクレオチド、又は少なくとも37ヌクレオチド、又は少なくとも38ヌクレオチド、又は少なくとも39ヌクレオチド、又は少なくとも40ヌクレオチド、又は少なくとも約45ヌクレオチド、又は少なくとも約50ヌクレオチド、又は少なくとも約55ヌクレオチド、又は少なくとも約60ヌクレオチド、又は少なくとも約65ヌクレオチド、又は少なくとも約70ヌクレオチド、又は少なくとも約75ヌクレオチド、又は少なくとも約80ヌクレオチド、又は少なくとも約85ヌクレオチド、又は少なくとも約90ヌクレオチド、又は少なくとも約95ヌクレオチド、又は少なくとも約100ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドが二重鎖ポリヌ

クレオチドである場合、逆方向プライマーは、標的ポリヌクレオチドの相補鎖に対して相補的である。いくつかの実施形態では、本明細書で定義したように、逆方向プライマーは、第1及び第2のポリヌクレオチドの組み合わせである。

【0071】

V. ポリヌクレオチド塩基構造

いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチドは、DNA、修飾DNA、RNA、修飾RNA、PNA、又はそれらの組み合わせで構成される。他の実施形態では、第2のポリヌクレオチドは、DNA、修飾DNA、RNA、修飾RNA、PNA、又はそれらの組み合わせで構成される。

【0072】

VI. ポリヌクレオチド構造 - ブロッキング基

ポリヌクレオチドの3'領域からのポリメラーゼ伸張が不必要な場合、ブロッキング基が必要に応じて組み込まれる。例えば、別の態様では、第2ポリヌクレオチドの第2のドメインが、核酸を合成可能である酵素による伸張を抑制するために、第2のドメインの3'末端に、ブロッキング基を更に含む。追加的態様では、ユニバーサルクエンチャーは、その3'末端にブロッキング基を含む。他の態様では、ブロッカーポリヌクレオチドは、その3'末端にブロッキング基を含む。ブロッキング基は、限定されるものではないが、3'リン酸塩基、3'アミノ基、ジデオキシヌクレオチド、6個の炭素のグリコールスパーサー（及び1つの態様では、6個の炭素のグリコールスパーサーはヘキサンジオールである）及び逆位デオキシチミジン（dT）を含む方法の実行で有用である。

【0073】

VII. ポリヌクレオチド構造 - 相補性

いくつかの実施形態では、第2ポリヌクレオチドの第2のドメインは、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して少なくとも約70%相補的である。関連する態様では、第2のポリヌクレオチドの第2のドメインは、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は約100%相補的である。

【0074】

1つの態様では、第3のポリヌクレオチドの第2のドメインは、第4のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して、少なくとも約70%相補的である。関連する態様では、第3のポリヌクレオチドの第2のドメインは、第4のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して、少なくとも約75%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約95%、又は約100%相補的である。

【0075】

別の態様では、ブロッカーポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド内の配列に対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は約100%相補的であり、更に別の態様では、プローブポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド内の配列に対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は約100%相補的である。

【0076】

VIII. ハイブリダイゼーション条件

いくつかの実施形態では、第1及び第2のポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドの不在下、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、第1及び第2のポリヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチドの不在下、ストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしない。本明細書で使用する、「ストリンジェントな条件」とは、技術分野における当業者によって経験的に決定され得、例えば、プライマーの長さ、プライマーの相補性、プライマーの濃度、ハイブリダイゼーション緩衝液中の塩濃度（すなわち、イオン強度）、ハイブリダイゼーションが実行される温度、ハイブリダイゼーションが実行される時間の長さ、並びにポリヌクレオチドの表面電荷に影響を及

10

20

30

40

50

ばす因子の存在に基づいて変化するであろう。一般的に、ストリンジェントな条件は、ポリヌクレオチドがその相補的配列に、標的上のいずれか他の領域に相対してより高い親和性で、優先的に結合することが可能な条件である。20塩基を有するポリヌクレオチドのその相補体に対するハイブリダイゼーションのための代表的なストリンジェントな条件としては、限定するものではないが、約50%のG+C含量、50mMの塩(Na⁺)、及び60℃のアニーリング温度が挙げられる。より長い配列に関しては、より高温において特異的なハイブリダイゼーションが達成される。一般的に、ストリンジェントな条件は、ポリヌクレオチドの融解温度より約5℃低い温度でアニーリングが行われるような条件である。「融解温度」は、標的ポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチドの50%が、一定のイオン強度、pH及びポリヌクレオチド濃度において平衡にあるような温度である。

10

【0077】

IX. 使用方法

A. PCR

本明細書に記載された標的ポリヌクレオチド増幅法では、第3のポリヌクレオチド及び第4のポリヌクレオチドが、上記のポリヌクレオチドの組み合わせと併用されて用いられると考えられ、第3のポリヌクレオチドは、第1の標的相補体ポリヌクレオチド領域における標的ポリヌクレオチドの相補鎖に対して相補的(第1のポリヌクレオチドの第1のドメインが相補的である鎖に関して)である第1のドメイン[Pa]と、特徴的なポリヌクレオチドを含む第2のドメイン[Fb]とを含み、第4のポリヌクレオチドは、第2の相補体標的ポリヌクレオチド領域における、標的ポリヌクレオチドの相補鎖に相補的である(第2のポリヌクレオチドが相補的である鎖に関して)第1のドメイン[Fb]と、第3のポリヌクレオチドの第2のドメインと第4のポリヌクレオチドの第2のドメインが、適切な条件下でハイブリダイズするために、第3のポリヌクレオチドの第2のドメインに対して十分に相補的なポリヌクレオチド配列を含む第2のドメイン[Fd]とを含む。これらの態様のいくつかでは、方法は、標的ポリヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドの相補体を、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドと第3のポリヌクレオチドと第4のポリヌクレオチドとに接触させることを更に含み、これは、第1の標的ポリヌクレオチド領域に対する第1ポリヌクレオチドの第1のドメインの標的ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションと、標的ポリヌクレオチドの第2標的ポリヌクレオチド領域に対する第2ポリヌクレオチドの第1のドメインのハイブリダイゼーションと、標的ポリヌクレオチドの相補鎖の第1の標的ドメインに対する第3のポリヌクレオチドの第1のドメインのハイブリダイゼーションと、第2の相補体標的ポリヌクレオチド領域に対する第4のポリヌクレオチドの第1のドメインのハイブリダイゼーションを許可するために十分な条件下で行われ、並びに方法は、第1のポリヌクレオチドと第3のポリヌクレオチドの伸張を許可する条件下で、DNAポリメラーゼを用いて、第1及び第4のポリヌクレオチドの第1のドメイン(すなわち、プライミングドメイン)を伸張させることを含む。

20

30

【0078】

いくつかの態様では、本明細書で上述されたようなブロッキング基が、第2のポリヌクレオチド及び/又は第4のポリヌクレオチドに、その3'末端で取り付けられて、これが、核酸を合成可能である酵素による伸張を遮断する。方法の実行で有用なブロッキング基としては、限定するものではないが、3'リン酸塩基、3'アミノ基、ジデオキシヌクレオチド、及び逆位デオキシチミジン(dT)が挙げられる。

40

【0079】

種々の実施形態では、標的ポリヌクレオチド、標的ポリヌクレオチドの相補体、又はその双方共に、第2のポリヌクレオチドの第1のドメイン及び/又は第4のポリヌクレオチドの第1のドメインの標的ポリヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションによって変性される二次構造を有する。

【0080】

1つの実施形態では、ポリヌクレオチドの組み合わせは、図7a~f(スキーム4~9

50

)で示されたように、PCRで用いるよう意図されている。スキーム4では、プライマーA(すなわち、本明細書に記載されたように、第1のポリヌクレオチド)及びB(すなわち、本明細書に記載されたように、第3のポリヌクレオチド)が、標的ポリヌクレオチドの反対鎖上で用いられ、これがW-(Watson)及びC-(Crick)鎖として示されている。図7f(スキーム9)で示されたように、ステップ12では、標的ポリヌクレオチドの増幅のために、プライマーAとプライマーBのみが必要とされる。

【0081】

本発明のポリヌクレオチドの組み合わせが、所与のPCRアンプリコンの一端または両端のいずれかをプライミングするために用いられ得ることを当業者は理解されるであろう。本明細書で使用する、「アンプリコン」は、増幅技術を用いて合成されたポリヌクレオチドの一部を意味すると考えられる。本明細書に記載したように、少なくとも1つのプライマーがポリヌクレオチドの組み合わせであるならば、少なくとも1つ以上のポリヌクレオチドの組み合わせを含む本発明の任意の方法が、標準プライマーとポリヌクレオチドの組み合わせの任意の組み合わせを用いる可能性があると考えられる。

10

【0082】

B. 単一第2鎖合成

別の実施形態では、第1及び第2のポリヌクレオチドを用いての標的ポリヌクレオチドの増幅の方法が提供され、本方法は、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインの標的ポリヌクレオチドの第1の標的ポリヌクレオチド領域に対するハイブリダイゼーション、並びに第2のポリヌクレオチドの第1のドメインの標的ポリヌクレオチドの第2の標的ポリヌクレオチド領域に対するハイブリダイゼーションを許可するのに十分な条件下で、標的ポリヌクレオチドを、本明細書で開示された第1及び第2のポリヌクレオチドに接触させるステップと、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインの伸張を許可するような条件下で、第1のポリヌクレオチドの第1のドメイン(すなわち、プライミングドメイン)をDNAポリメラーゼによって伸張させること、とを含む。いくつかの態様では、第1のポリヌクレオチド(それから伸張された関連するポリヌクレオチド生成物を備えた)及び第2のポリヌクレオチドが、次いで標的ポリヌクレオチドから変性されて、第1及び第2のポリヌクレオチドの別のセットが、標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることが許可される。

20

【0083】

1つの態様では、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドに順番にハイブリダイズする。別の態様では、第2のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする前に、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的にハイブリダイズする。更に別の態様では、第1のポリヌクレオチドが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする前に、第2のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。別の態様では、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインと第2のポリヌクレオチドの第1のドメインが、同時発生的に標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。

30

【0084】

種々の実施形態では、標的ポリヌクレオチドとしては、限定されるものではないが、染色体DNA、ゲノムDNA、プラスミドDNA、cDNA、RNA、合成ポリヌクレオチド、単鎖ポリヌクレオチド、又は二重鎖ポリヌクレオチドが挙げられる。1つの態様では、標的が二重鎖ポリヌクレオチドであり、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインと第2のポリヌクレオチドの第1のドメインが、二重鎖標的ポリヌクレオチドの同一の鎖にハイブリダイズする。別の態様では、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインと第2のポリヌクレオチドの第2のドメインが、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに先立って、標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズする。

40

【0085】

1つの実施形態では、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドが、同時発生

50

的に標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズし、並びに第3のポリヌクレオチドと第4のポリヌクレオチドが、同時発生的に標的ポリヌクレオチドの相補体に対してハイブリダイズし、第3のポリヌクレオチドと第4のポリヌクレオチドが標的ポリヌクレオチドの相補体に対してハイブリダイズすると同時に、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドが標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズしている。

【0086】

別の実施形態では、第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチド、第3のポリヌクレオチド及び第4のポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドの相補体に同時にはハイブリダイズしない。

【0087】

更に別の実施形態では、第1のポリヌクレオチドの第2のドメインと第2のポリヌクレオチドの第2のドメインが、標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするのに先立ってハイブリダイズする。別の実施形態では、第3のポリヌクレオチドの第2のドメインと第4のポリヌクレオチドの第2のドメインが、標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするのに先立ってハイブリダイズする。

【0088】

1つの実施形態では、第1ポリヌクレオチドの第2のドメインと第2ポリヌクレオチドの第2のドメインが、標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするのに先立ってハイブリダイズし、並びに第3のポリヌクレオチドの第2のドメインと第4のポリヌクレオチドの第2のドメインが、標的ポリヌクレオチドの相補体に対してハイブリダイズするのに先立ってハイブリダイズする。

【0089】

別の実施形態では、標的ポリヌクレオチドが、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする領域において突然変異を含有する。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする領域に対して完全に相補的である。いくつかの実施形態では、非標的ポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインが非標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする領域では完全に相補的ではない。別の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、第3のポリヌクレオチドの第1の領域が標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズする領域で突然変異を含有する。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの第3のドメインが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする領域では、完全に相補的である。いくつかの実施形態では、非標的ポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの第3のドメインが非標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする領域で、完全に相補的ではない。いくつかの態様では、突然変異は不安定化突然変異である。関連する態様では、不安定化突然変異は、第1のポリヌクレオチドの伸張、又は第3のポリヌクレオチドの伸張、若しくは双方共の伸張を抑制する。

【0090】

C. 多重性

1つの実施形態では、核酸を合成可能である酵素による伸張は、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的ポリヌクレオチド内の1つ以上の領域に対してハイブリダイズする性質を有するような多重伸張である。関連する実施形態では、核酸を合成可能である酵素による伸張は、第3のポリヌクレオチドの第1のドメインが標的ポリヌクレオチド内の1つ以上の座に対してハイブリダイズする性質を有するような多重伸張である。

【0091】

関連する実施形態では、1つ以上のポリヌクレオチド生成物を増幅させるために、少なくとも2つのプライマーを用いて、多重PCRが行われる。これら実施形態のいくつかの態様では、多重PCRのために用いられるそれぞれのポリヌクレオチドプライマーは、本明細書に記載されたようなポリヌクレオチドの組み合わせである。他の態様では、多重PCRのために用いられる少なくとも1つのポリヌクレオチドプライマーが、本明細書で記

10

20

30

40

50

載されたようなポリヌクレオチドの組み合わせである。

【 0 0 9 2 】

別の実施形態では、ゲノム反復配列に対して向けられている複数のフィクサーポリヌクレオチドを用いて、多重PCRが実行される。別の実施形態では、フィクサーポリヌクレオチドは、ランダム配列で構成されている。これらの態様のいくつかでは、複数のフィクサーポリヌクレオチドは、約10のポリヌクレオチド配列を指している。他の態様では、複数のフィクサーポリヌクレオチドは、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、約550、約600、約650、約700、約750、約800、約850、約900、約950、約1000又はそれ以上のポリヌクレオチド配列を指している。これらフィクサーポリヌクレオチド配列は、多数のプライマーポリヌクレオチドが次いで結合し得るようなゲノム内で多数の「固定された」位置を提供し、本明細書に記載したように、プライマーとフィクサーポリヌクレオチドの双方で存在する特徴的な相補的ポリヌクレオチド配列を活用する。

10

【 0 0 9 3 】

D. リアルタイムPCR

標準的三方向接合を備えたプライマーの組み合わせが、リアルタイムPCRのために有用である。希な転写物の解析及び定量化、病原体の検出、突然変異を備える希な癌細胞の診断、又は癌患者における異常な遺伝子メチル化の低レベルは、改善されたリアルタイムPCRアッセイによって解決し得る問題であり、この改善されたリアルタイムPCRアッセイは、高感度及び標的増幅の特異性、標的検出の高特異性、正常なDNAの数千ものコピーの存在下での少数の癌特異的突然変異対立遺伝子又は異常にメチル化したプロモーターを選択的に増幅かつ検出する能力、低コピー数RNA転写物の解析及び定量化、現行のリアルタイム熱サイクラーの能力を最大限に利用するための1つのアッセイで4~5の異なる標的を多重化させる能力である蛍光追跡を併せ持つ。蛍光体が、プライマーポリヌクレオチドの5'末端に配置され、並びにクエンチャーが、フィクサーポリヌクレオチドの3'末端に配置される。この配置では、プライマーとフィクサーポリヌクレオチドがハイブリダイズした場合に、蛍光は検出されない(蛍光体がクエンチャーに隣接して配置されているため)。しかしながら、PCR中のプライマーポリヌクレオチドの伸張に続いて、PCRの変性段階中に、プライマーポリヌクレオチドとフィクサーポリヌクレオチドが離れるようになり、これによって蛍光体とクエンチャーとの間の距離が作り出されて、検出可能な蛍光信号が得られる。

20

30

【 0 0 9 4 】

四方向接合を備えたプライマーの組み合わせもまた、リアルタイムPCRのために用いられ得る。プライマーポリヌクレオチドが、その5'末端で蛍光体に標識されて、並びにステープルが、その3'末端でクエンチャーに標識される。フィクサーポリヌクレオチドは非ラベルである。プライマーとフィクサーポリヌクレオチドの双方の第2のドメインは特徴的であるために、ステープルポリヌクレオチドは、「ユニバーサル」ポリヌクレオチドとして使用され得る(図10;スキーム10)。

40

【 0 0 9 5 】

二方向接合とプローブポリヌクレオチドを備えたプライマーの組み合わせもまた、リアルタイムPCRのために用いられ得る。プローブポリヌクレオチドが、その5'末端が蛍光体で標識され、クエンチャーでその3'末端が標識され、並びにいくつかの実施形態では、追加の内部クエンチャーに標識される。第1のポリヌクレオチドが、Taqポリメラーゼのような5'~3'エキソヌクレアーゼ活性を備えたポリメラーゼによって伸張される場合、標識が開裂されて、それ以上消光されることがなくなり、結果的に標識からの信号が増大する。いくつかの実施形態では、プローブポリヌクレオチドは、分子標識プローブである。要するに、分子標識プローブは、それらが相補的であり、標的ポリヌクレオチドの不在下で、ヘアピン構造を形成するような、その5'末端と3'末端に塩基を備えた

50

核酸配列で構成される。分子標識プローブは更に、標的ポリヌクレオチドが存在しない場合に、標識からの検出可能な信号がないように、その3'末端(又は5'末端)にクエンチャーを含み、その5'末端(又は3'末端)に蛍光体を含む。分子標識プローブは更に、標的の存在下で、標的ポリヌクレオチドに対するプローブのハイブリダイゼーションが、ヘアピン構造の分離とクエンチングの損失を引き起こすように、標的ポリヌクレオチドに相補的である配列を含む。

【0096】

二方向接合とブロッカーポリヌクレオチドを備えたプライマーの組み合わせもまた、リアルタイムPCRのために用いられ得る。プライマーポリヌクレオチド(すなわち「第1のポリヌクレオチド」)が、その5'末端において蛍光体で標識され、並びにフィクサーポリヌクレオチド(すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)が、その3'末端においてクエンチャーで標識される。ブロッカーポリヌクレオチドは、第1の標的ポリヌクレオチドの5'領域の直近に位置する標的ポリヌクレオチド領域に対して相補的である(図4に図示)。いくつかの実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドの第1のドメインに重複する。言い換えれば、第1のポリヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドとブロッカーポリヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの同一のヌクレオチドに対して相補的であろう。関連する実施形態では、第1のポリヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドと、ブロッカーポリヌクレオチドの5'末端のヌクレオチドは異なる。これら実施形態では、適切な位置において、第1のポリヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドが標的ポリヌクレオチドに対して相補的である場合、第1のポリヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするのである(図4a参照)。PCR中のプライマーポリヌクレオチドの伸張に続いて、PCRの変性段階中に、プライマーポリヌクレオチドとフィクサーポリヌクレオチドとが離れ離れになり、これによって、蛍光体とクエンチャーとの間の距離が作り出されて、結果的に検出可能な蛍光信号を得る。関連する実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドの5'末端におけるヌクレオチドが、それが適切な位置において非標的ポリヌクレオチドに対して相補的である場合、非標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするのである(図4b参照)。この配置では、プライマーとフィクサーポリヌクレオチドがハイブリダイズする場合、蛍光は全く検出されない(蛍光体がクエンチャーに隣接して配置されているため)。種々の実施形態では、ブロッカーポリヌクレオチドの3'末端におけるヌクレオチドは、ポリメラーゼによる伸張を抑制するように修飾されている。このシステムは、例えば、単一ヌクレオチド多形型のより高感度かつ高特異度での検出を可能にする。

【0097】

二方向接合、ブロッカーポリヌクレオチド、並びにプローブポリヌクレオチドを備えたプライマーの組み合わせもまた、リアルタイムPCRのための組み合わせで用いられ得る。関連する実施形態では、この組み合わせで用いられる第1のポリヌクレオチドは、その3'末端でのヌクレオチドのような修飾核酸を含み、ブロッカーポリヌクレオチドは、その5'末端でのヌクレオチドのような修飾核酸を含む。このシステムは、例えば、ヌクレオチド多形型のより高感度かつ高特異度での検出を可能にする。

【0098】

いくつかの実施形態では、上記実施形態は、逆方向プライマーを更に含む。逆方向プライマーは、第1のポリヌクレオチドの伸張によって作り出されたポリヌクレオチド内の領域に対して相補的である。図8を参照されたい。これから明らかなように、いくつかの実施形態では、逆方向プライマーは、標的ポリヌクレオチドが二重鎖ポリヌクレオチドの1本の鎖である場合、標的ポリヌクレオチドの相補鎖に対してもまた相補的である。逆方向プライマーの含有は、標的ポリヌクレオチドの増幅を可能にする。種々の態様では、逆方向プライマーの配列が、プライマーの全長にわたって標的配列に対してハイブリダイズするために、その全長にわたって十分に相補的であるようにデザインされる場合、逆方向プ

10

20

30

40

50

ライマーは、「単純な」プライマーである。1つの態様におけるこのタイプの単純なプライマーは、標的配列に対して100%相補的であるが、特定の環境及び条件下では、100%未満の相補性を備えた単純なプライマーが有用であることを理解されたい。

【0099】

他の態様では、逆方向プライマーは、第1の反応で用いられたプライマー対の組み合わせ内の第1のポリヌクレオチドの第1のドメインからのポリヌクレオチドの伸張によって産生された配列の領域に対して、特異的に結合するような分離ポリヌクレオチドプライマーである。

【0100】

種々の態様では、本明細書に記載された方法は、標的ポリヌクレオチドを備えるサンプルからの配列検出に比べて、非標的ポリヌクレオチドを備えたサンプルからの配列検出において変化を提供する。いくつかの態様では、この変化は、非標的ポリヌクレオチドを備えるサンプルからの配列検出に比べて、標的ポリヌクレオチドを備えるサンプルの検出においての増加である。いくつかの態様では、この変化は、非標的ポリヌクレオチドを備えるサンプルからの配列検出に比べて、標的ポリヌクレオチドを備えるサンプルの検出においての減少である。

【0101】

本明細書に記載したポリヌクレオチドの増大した特異度のために、TaqMan、分子標識プローブ又はScorpionプライマーを用いて達成される特異度と同等であるが、著しくコストが低減された特異度を達成するために、リアルタイムPCRがSYBR緑色染料の存在下で実行され得る。

【0102】

1つの実施形態では、その5'末端に蛍光分子によって標識されたプライマーポリヌクレオチド(すなわち、「第1のポリヌクレオチド」と、その3'末端にクエンチャーによって標識された第2のクエンチングポリヌクレオチド(すなわち、「ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチド」と)の双方が、DNAポリメラーゼからの伸張を抑制するために、その3'末端にブロッキング基を含むフィクサーポリヌクレオチド(すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)の第2のドメインに対してハイブリダイズされる。この複合体は、この状態では蛍光を有しないが、複合体が、それに続くDNAポリメラーゼによるプライマーポリヌクレオチドの伸張で置き換えられる(変性される)際に、蛍光を発するのであろう。

【0103】

別の実施形態では、その5'末端に蛍光体を含むプライマーポリヌクレオチド(すなわち、「第1のポリヌクレオチド」)が、その3'末端にクエンチャーを含むフィクサーポリヌクレオチド(すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)に対してハイブリダイズされている。ハイブリダイズされる際に、複合体は蛍光を有しないが、それに続くDNAポリメラーゼによるプライマーポリヌクレオチドの伸張で置き換えられる(変性される)際に、蛍光を発するのであろう。方法の別の態様では、ポリヌクレオチドの2つのセットを用いて、多重リアルタイムPCRが実行され、この中で、それぞれのプライマーセットのうちの1つのポリヌクレオチドが、蛍光体で標識されていて、並びに2つの蛍光体は互いに識別可能である。

【0104】

別の実施形態では、プライマーポリヌクレオチド(すなわち、「第1のポリヌクレオチド」)は、蛍光体、その3'末端上のクエンチャーを含み、これら2つの標識は、RNA又はRNA/DNAオリゴヌクレオチド(すなわち、「プローブポリヌクレオチド」)の伸張部によって分離されている(図9参照)。いくつかの態様では、プローブポリヌクレオチドは、内部Zenクエンチャーを更に含む。いくつかの態様では、熱安定性RNAアーゼHによるRNA/DNAハイブリッドの生成及び分解の際、並びに遊離蛍光体(又はクエンチャー)の溶液への放出の際に、蛍光信号は発生される。

【0105】

10

20

30

40

50

図9Aは、非特異的RNAリンカーを備えた、蛍光体-クエンチャーで標識された第1のポリヌクレオチド(プライマーA)と、典型的な第2のポリヌクレオチド(フィクサーA)を示している。特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチド(P)は、5'側の標識、続いてRNA配列、続いてクエンチャー、それに続いて本明細書に記載された第1ポリヌクレオチド(P)の典型的な配列を含む。他の実施形態では、第1のポリヌクレオチド(P)は、5'側のクエンチャー、続いてRNA配列、続いて標識、続いて本明細書に記載された第1のポリヌクレオチド(P)の典型的な配列を含む。図9Bは、図9Aで示された組み合わせのPCRにおける使用を図示している。Pと反対の鎖が発生された場合、RNAアーゼHによるRNA-DNAハイブリッドの開裂が蛍光体(クエンチャー)を放出し、これによって蛍光信号が検出される。

10

【0106】

図9Cは、部位特異的RNA-DNAリンカーを備えた蛍光体-クエンチャーで標識された第1のポリヌクレオチド(プライマーA)と、典型的な第2のポリヌクレオチド(フィクサーA)を示している。特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチド(P)は、5'側標識、続いてPの下流の配列に対して相補的であるRNA配列、続いてクエンチャー、本明細書に記載された第1のポリヌクレオチド(P)の典型的な配列を含む。特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチド(P)は、5'側のクエンチャー、続いてPの下流の配列に対して相補的であるRNA配列、続いて標識、続いて本明細書に記載された第1のポリヌクレオチド(P)の典型的な配列を含む。図9Dは、図9Cで示された組み合わせのPCRにおける使用を図示している。プライマーAを含むPCR生成物が変性される場合、RNA-DNAリンカーがプライマーAの下流の領域にハイブリダイズし、RNAアーゼHがRNA-DNAハイブリッドを開裂し、蛍光体を放出し、並びに蛍光信号が検出される。

20

【0107】

いくつかの実施形態では、リアルタイムPCRアッセイにおける数個の突然変異の同時発生的多重検出のために、1つのフィクサーポリヌクレオチド(すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)が、2、3、4、5つ又はそれ以上のプライマーポリヌクレオチド(すなわち、「第1のポリヌクレオチド」)の組み合わせの中で用いられてもよい。

【0108】

別の実施形態では、例えば、添付文書、4つの蛍光標識されたユニバーサルポリヌクレオチド分子、その3'末端にクエンチャーを含むユニバーサルポリヌクレオチド分子、蛍光標識されたプライマーポリヌクレオチドの組立てのための適切な緩衝液を備えた及びDNAリガーゼを含むキットが提供されている。キットは、必要に応じて、T4ポリヌクレオチドキナーゼ及び適切な緩衝液を更に含む。

30

【0109】

キットは、ライゲーションを通してポリヌクレオチドを蛍光的に標識付けするために用いられる。1つの態様では、プライマーポリヌクレオチドが、T4ポリヌクレオチドキナーゼによってリン酸化されて、続いてフィクサーポリヌクレオチドにハイブリダイズされる。蛍光体をその5'末端に含む第3のポリヌクレオチド(すなわち、蛍光標識されたユニバーサルポリヌクレオチド、上記参照)が、同様にフィクサーポリヌクレオチドにハイブリダイズされる。次いで、第3のポリヌクレオチドの3'末端が、プライマーポリヌクレオチドのリン酸化5'末端に連結されて、蛍光標識されたプライマーポリヌクレオチドが生成される。最後に、その3'末端にクエンチャーを含む万能ポリヌクレオチドが、フィクサーポリヌクレオチドにハイブリダイズされて、例えばリアルタイムPCRアッセイで使用可能な状態である、蛍光を有しないポリヌクレオチド複合体が得られる。

40

【0110】

E. プライマー伸張

本明細書で開示されたプライマー組成物は、プライマー伸張を必要とする又は使用するいかなる方法においても用いられ得る。例えば、プライマー伸張は、既知の遺伝子に関するRNA転写の開始部位を決定するために用いられ得る。本技術は、遺伝子の3'末端に近

50

い領域に相補的である、本明細書に記載された標識付されたプライマーポリヌクレオチドの組み合わせ（一般的に長さ20～50のヌクレオチド）を必要とする。ポリヌクレオチドの組み合わせは、RNAをアニーリングすることが可能であり、並びに相補体（cDNA）がRNAの5'末端に到達するまで、相補体をRNAに対して合成するために、逆転写酵素が用いられる。ポリアクリルアミドゲル上の生成物を分析することによって、開始部位から標識付されたプライマーまでの距離を表すゲル上の配列の長さとして、転写開始部位を決定することが可能である。

【0111】

本明細書に記載した進歩したポリヌクレオチド技術は、RNA内で遭遇する潜在的な二次構造を克服かつ解決するであろう。

10

【0112】

F．等温DNA増幅

等温DNA増幅は、本明細書に記載された進歩したポリヌクレオチド技術を用いて、米国特許第7,579,153号明細書で教示されたように実行されてもよい。つまり、等温DNA増幅は、以下の(i)1つの末端にヘアピンを、他の末端にポリヌクレオチドを有し、RNAポリメラーゼによる合成が、ヘアピンの方向に進むプロモーター配列を識別するように配向されたプロモーター配列がそれらの間に配置された、二重鎖DNAを提供するステップと、(ii)二重鎖DNAを、プロモーター配列を識別するRNAポリメラーゼで転写して、プロモーター配列のコピーとポリヌクレオチドとを含むRNA転写物を形成させるステップと、(iii)RNA転写物から相補的DNAを生成させるステップと、(iv)ヘアピンが再構成されるように、相補的DNAからRNA転写物の5'末端を取り外すこと、並びに(v)ヘアピンを伸張させて、再構成されたプロモーター配列、再構成されたプロモーター配列を識別するRNAポリメラーゼ、並びに合成RNA転写物を含む二重鎖DNAを生成させるステップとを含む。好適な実施形態では、相補的DNAを生成するステップが、前記の相補的DNA及び前記のRNA転写物のヘテロ二重鎖を形成することを含み、前記の取り外すステップが、ヘテロ二重鎖をヘリカーゼで置き換えることを含む。

20

【0113】

G．蛍光インサイテュハイブリダイゼーション(FISH)

また本明細書に記載された進歩したポリヌクレオチド技術は、FISHを実行するためにも用いられ得る。FISHは、染色体上の特異的DNAの存在又は不在を検出かつ特定するために用いられる細胞遺伝学的手法である。FISHは、高度の配列同一性を示す染色体の部分にのみ結合するような蛍光プローブを用いる。蛍光プローブがどこで染色体に結合したかを見出すために、蛍光顕微鏡が用いられ得る。FISHは、遺伝子カウンセリング、医薬及び種属同定分野での用途のために、DNA中の特異的特徴を見つけ出すために頻繁に用いられる。FISHは、組織サンプル内の特異的mRNAを検出かつ特定するためにも用いられ得る。このように、細胞及び組織内の遺伝子発現の空間的・時間的パターンを限定することに役立つ。

30

【0114】

H．ライゲーションプローブ

また、本明細書に記載された進歩したポリヌクレオチド技術は、ライゲーションプローブを用いる多重PCRを実行するために用いられ得る。ライゲーションプローブは、当該技術分野の当業者には既知である。簡単に言うと、ライゲーションプローブは、それぞれがPCRプライマー配列を含む、2つの分離したオリゴヌクレオチドで構成される。これら2つの半プローブが、共にそれらの隣接する標的にハイブリダイズする場合にのみ、それらはライゲーションされ得る。ライゲーションされたプローブのみが、PCR中で指数関数的に増幅される。したがって、プローブライゲーション生成物の数は、サンプル内の標的配列の数に依存する。

40

【0115】

いくつかの実施形態では、2つのライゲーションプローブは、約1～50ヌクレオチド

50

によって分離されていて、ライゲーションに先立って、第1のプローブが、鎖置換活性を欠如しているDNA熱安定性ポリメラーゼによって伸張される。鎖置換活性を欠如しているDNA熱安定性ポリメラーゼとしては、限定されるものではないが、Pfuポリメラーゼが挙げられる。伸張された鎖が、第2のライゲーションプローブの5'-リン酸塩基に到達する際に、重合化が停止し、かつニックが作り出される。このニックは、反応混合物中に存在する熱安定性リガーゼによって封鎖され得、単一の反応形態で全反応が発生することを可能にする。

【0116】

I. 次世代配列決定(NGS)

本発明のポリヌクレオチドの組み合わせは、NGS用途においても用いられ得る。図15に示したように、DNAプローブの順序的ライゲーションによる配列決定の代わりに、本明細書で開示されたプライマーの組み合わせが、ライゲーションなしの順序的なハイブリダイゼーションで用いられ得る。NGS技法の概要に関しては、本明細書にその全体を参照による組み込まれた、Morozovaら著、Genomics 92(5):255~64頁、2008年を参照されたい。NGSは、当該技術分野の当業者には容易に理解されるであろうし、以下の実施例2に記載された1つの実施形態で例示されている。

【0117】

X. 酵素

いくつかの態様では、伸張が核酸を合成可能である酵素によって実行され、それがリアルタイムで定量される。本発明の実行において有用である酵素としては、限定されるものではないが、DNAポリメラーゼ(熱安定性DNAポリメラーゼ、例えばTaq DNAポリメラーゼを挙げることができる)、RNAポリメラーゼ、及び逆転写酵素が挙げられる。本発明を実行するための用いられ得る酵素の非限定的な例としては、限定されるものではないが、Deep Vent R(登録商標) DNA Polymerase、Long Amp(登録商標) Taq DNA Polymerase、Phusion(登録商標) High-Fidelity DNA Polymerase、Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase、Vent R(登録商標) DNA Polymerase、DyNAzyme(登録商標) II Hot Start DNA Polymerase、Phire(登録商標) Hot Start DNA Polymerase、Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase、Crimson Long Amp Taq DNA Polymerase、DyNAzyme EXT DNA Polymerase、Long Amp Taq DNA Polymerase、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase、Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase、Taq DNA Polymerase with Standard Taq(Mg-free) Buffer、Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer、Taq DNA Polymerase with Termopol Buffer、Crimson Taq(登録商標) DNA Polymerase、Crimson Taq DNA Polymerase with(Mg-free) Buffer、Phire Hot Start DNA Polymerase、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase、Vent R DNA Polymerase、Vent R(exo-) DNA Polymerase、Phire Hot Start DNA Polymerase、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase、Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase、Hemo KlenTaq(登録商標)、Deep Vent R(exo-) DNA Polymerase、Deep Vent R DNA Polymerase、DyNAzyme EXT DNA Polymerase、Hemo KlenTaq、Long Amp Taq DNA Polymerase、Phusion

10

20

30

40

50

High-Fidelity DNA Polymerase、ProtoScript (登録商標) AMV First Strand cDNA Synthesis Kit、ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit、Bst DNA Polymerase、Full Length, Bst DNA Polymerase、Large Fragment, Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer、9 °Nm DNA Polymerase、Crimson Taq DNA Polymerase、Crimson Taq DNA Polymerase with (Mg-free) Buffer、Deep VentR (exo-) DNA Polymerase、Deep VentR DNA Polymerase、DyNAzyme EX T DNA Polymerase、DyNAzyme II Hot Start DNA Polymerase、Hemo KlenTaq、Phusion High-Fidelity DNA Polymerase、Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase、Sulfolobus DNA Polymerase IV、Therminator (登録商標) DNA Polymerase、Therminator DNA Polymerase、Therminator II DNA Polymerase、Therminator III DNA Polymerase、VentR DNA Polymerase、VentR (exo-) DNA Polymerase、Bsu DNA Polymerase、Large Fragment DNA Polymerase I (E. coli)、DNA Polymerase I、Large (Klenow) Fragment、Klenow Fragment (3' 5' exo-)、phi29 DNA Polymerase、T4 DNA Polymerase、T7 DNA Polymerase (unmodified)、Terminal Transferase、Reverse Transcriptase and RNA Polymerase、E. coli Poly(A) Polymerase、AMV Reverse Transcriptase、M-MuLV Reverse Transcriptase、pひ6 Rna Polymerase (RdRP)、Poly(U) Polymerase、SP6 RNA Polymerase、及び T7 RNA Polymerase が挙げられる。

【0118】

XI. 標識いくつかの態様では、第1のポリヌクレオチドは標識を含む。他の態様では、本明細書に記載された方法で用いられる任意のポリヌクレオチドは、標識を含む。いくつかの態様では、標識は蛍光体である。蛍光分子でオリゴヌクレオチドを標識付し、蛍光を測定する方法は、当業者に周知である。本発明の実行のために有用な蛍光標識としては、限定されるものではないが、1, 8-ANS (1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸)、1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸 (1, 8-ANS)、5-(及び-6)-カルボキシ-2', 7'-ジクロロフルオレセイン pH 9.0、5-FAM pH 9.0、5-ROX (5-カルボキシ-X-ローダミン、トリエチルアンモニウム塩)、5-ROX pH 7.0、5-TAMRA、5-TAMRA pH 7.0、5-TAMRA-MeOH、6-JOE、6, 8-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン pH 9.0、6-カルボキシローダミン 6G pH 7.0、6-カルボキシローダミン 6G 塩化物、6-HEX, SE pH 9.0、6-TET, SE pH 9.0、7-アミノ-4-メチルクマリン pH 7.0、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン pH 9.0、Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 555、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 647、Alexa 660、Alexa 680、Alexa 700、Alexa Fluor 430 抗体複合体 pH 7.2、Alexa Fluor 488 抗体複合体 pH 8.0、Alexa Fluor 488 ヒドラジド-水、Alexa Fluor 53

2抗体複合体 pH7.2、Alexa Fluor 555抗体複合体 pH7.2、
 Alexa Fluor 568抗体複合体 pH7.2、Alexa Fluor 6
 10 R-フィコエリスリン スレプトアビジン pH7.2、Alexa Fluor
 660抗体複合体 pH7.2、Alexa Fluor 680抗体複合体 pH
 7.2、Alexa Fluor 700抗体複合体 pH7.2、アロフィコシアニン
 pH7.5、AMCA複合体、アミノクマリン、APC(アロフィコシアニン)、At
 to 647、BCECF pH5.5、BCECF pH9.0、BFP(青色蛍光タン
 パク質)、BO-PRO-1-DNA、BO-PRP-3-DNA、BOBO-1-D
 NA、BOBO-3-DNA、BODIPY 650/665-X, MeOH, BODI
 PY FL複合体、BODIPY FL, MeOH、Bodipy R6G SE、BO
 DIPY R6G, MeOH、BODIPY TMR-X抗体複合体 pH7.2、Bo
 dipy TMR-X複合体、BODIPY TMR-X, MeOH、BODIPY T
 MR-X, SE、BODIPY TR-Xファラシジン pH7.0、BODIPY T
 R-X, MeOH、BODIPY TMR-X, SE、BORRO-1、BOPRO-3
 、カルセイン、カルセイン pH9.0、カルシウムクリムソン、カルシウムクリムソン
 Ca²⁺、カルシウムグリーン、カルシウムグリーン-1 Ca²⁺、カルシウムオレンジ、
 カルシウムオレンジCa²⁺、カルボキシナフトフルオレセイン pH10.0、カ
 スケードブルー、カスケードブルーBSA pH7.0、カスケードイエロー、カスケ
 ードイエロー抗体複合体 pH8.0、CFDA、CFP(シアン蛍光タンパク質)、CI
 -NERF pH2.5、CI-NERF pH6.0、シトリン、クマリン、Cy2、
 Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、CyQUANT GR-DNA、ダンシルカ
 ダベリン、ダンシルカダベリン, MeOH、DAPI、DAPI-DNA、ダボキシ(2
 -アミノエチル)スルホンアミド、DDAO pH9.0、Di-8 ANEPPS、D
 i-ANEPPS-リピッド、DiI、DiO、DM-NERF pH4.0、DM-N
 ERF pH7.0、DsRed、DTAF、dTomato、eCFP(強化シアン蛍
 光タンパク質)、eGFP(強化緑色蛍光タンパク質)、エオシン、エオシン抗体複合体
 pH8.0、エリスロシン-5-イソチオシアネート pH9.0、臭化エチジウム、
 エチジウムホモ二量体、エチジウムホモ二量体-1-DNA、eYFP(強化黄色蛍光タ
 ンパク質)、FDA、FITC、FITC抗体複合体 pH8.0、FlAsH、Fluo
 o-3、Fluo-3 Ca²⁺、Fluo-4、Fluor-Ruby、フルオレセイン
 、フルオレセイン 0.1M NaOH、フルオレセイン抗体複合体 pH8.0、フ
 ルオレセインデキストラン pH8.0、フルオレセイン pH9.0、フルオロ-エメ
 ラルド、FM1-43、FM1-43リピッド、FM4-64、2%CHAPS、Fura
 Red Ca²⁺、Fura Red, 高Ca、Fura Red, 低Ca、Fura
 -2 Ca²⁺、Fura-2, 高Ca、Fura-2, 無Ca、GFP(S65T)
 、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33258-DNA、H
 oechst 33342、Indo-1 Ca²⁺、Indo-1, Caフリー、In
 do-1, Ca飽和、JC-1、JC-1 pH8.2、リサミンローダミン、LOLO
 -1-DNA、ルシファーイエロー, CH、LysoSensorブルー、LysoSe
 nsorブルー pH5.0、LysoSensorグリーン、LysoSensorグ
 リーン pH5.0、LysoSensorイエロー pH3.0、LysoSens
 orイエローpH9.0、LysoTrackerブルー、LysoTrackerグリー
 ン、LysoTrackerレッド、マグネシウムグリーン、マグネシウムグリーン M
 g²⁺、マグネシウムオレンジ、Marinaブルー、mBanana、mCherry
 、mHoneydew、MitoTrackerグリーン、MitoTrackerグリー
 ン FM, MeOH、MitoTrackerオレンジ、MitoTrackerオレンジ
 、MeOHMitoTrackerレッド、MitoTrackerレッド, MeO
 H、mOrange、mPlum、mRFP、mStrawberry、mTangeri
 ne、NBD-X、NBD-X, MeOH、NeuroTrace 500/525、緑
 色蛍光Nissl stain-RNA、Nileブルー, EtOH、Nileレッド、

10

20

30

40

50

Nileレッド-リピッド、Nissl、Oregonグリーン488、Oregonグリーン488抗体複合体 pH8.0、Oregonグリーン514、Oregonグリーン514抗体複合体 pH8.0、Pacificブルー、Pacificブルー抗体複合体 pH8.0、フィコエリスリン、PO-PRO-1、PO-PRO-1-DNA、PO-PRO-3、PO-PRO-3-DNA、POPO-1、POPO-1-DNA、POPO-3、ヨウ化プロピジウム、ヨウ化プロピジウム-DNA、R-フィコエリスリン pH7.5、ReAsH、レソルフィン、レソルフィン pH9.0、Rhod-2、Rhod-2 Ca²⁺、ローダミン、ローダミン110、ローダミン110 pH7.0、ローダミン123、MeOH、ローダミングリーン、ローダミンファロイジン pH7.0、ローダミンレッド-X抗体複合体 pH8.0、ローダミングリーン pH7.0、Rhodolグリーン抗体複合体 pH8.0、Sapphire、SBFI-Na⁺、ナトリウムグリーンNa⁺、スルフォローダミン101、SYBRグリーンI、SYPROルビー、SYTO 13-DNA、SYTO 45-DNA、SYTOブルー-DNA、テトラメチルローダミン抗体複合体 pH8.0、テトラメチルローダミンデキストラン pH7.0、Texasレッド-X抗体複合体 pH7.2、TO-PRO-1-DNA、TO-PRO-3-DNA、TOTO-1-DNA、TOTO-3-DNA、TRITC、X-Rhod-1 Ca²⁺、YO-PRO-1-DNA、YO-PRO-3-DNA、YOYO-1-DNA、及びYOYO-3-DNAなどが挙げられる。

10

【0119】

ハイブリダイゼーションの際に、検出可能な信号又は検出可能な信号中の変化を提供するような化学発光分子、並びに放射活性分子などのような、蛍光分子より他の標識が用いられ得る。

20

【0120】

いくつかの実施形態では、第2のポリヌクレオチドが、標識の蛍光信号を減衰するクエンチャーを含む。他の実施形態では、第4のポリヌクレオチドが、標識の蛍光信号を減衰させるクエンチャーを含む。本発明の方法の実行での使用のために意図されるクエンチャーとしては、限定されるものではないが、Black Holeクエンチャー1、Black Holeクエンチャー-2、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、Zenクエンチャー、及びDabcyl-G-baseが挙げられる。

30

【0121】

XII. 修飾ポリヌクレオチドの組み合わせ

修飾特性を備えた部分的な二重鎖プライマーの組み合わせは、(1)基本的なプライマーポリヌクレオチドと基本的なフィクサーポリヌクレオチドのような2つのポリヌクレオチドによってと、(2)修飾プライマーポリヌクレオチドと基本的なフィクサーポリヌクレオチドのような2つのポリヌクレオチドによってと、(3)修飾プライマーポリヌクレオチドと修飾フィクサーポリヌクレオチドのような2つのポリヌクレオチドによってと、(4)基本的なプライマーポリヌクレオチドと、基本的なフィクサーポリヌクレオチドと、アンチプライマーポリヌクレオチドとのような3つのポリヌクレオチドによってと、並びに(5)修飾プライマーポリヌクレオチドと、基本的なフィクサーポリヌクレオチドと、アンチプライマーポリヌクレオチドとの3つのポリヌクレオチドによってと、とで形成され得る。

40

【0122】

部分的に二重鎖のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの直線状部分内又はループ領域内に配置され得るようなその単鎖領域によってのみ、ゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションを開始することができる。

【0123】

ポリヌクレオチドの単鎖領域内の非完全配列相補性(単一のヌクレオチドミスマッチを含む)は、ハイブリダイゼーションの開始を減速させることによって、ハイブリダイゼーションの効率を著しく低減させる。

【0124】

50

ポリヌクレオチドの二重鎖領域内の非完全配列相補性は、鎖置換ハイブリダイゼーション及び鑄型ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチドの結合を妨害するはずである。

【0125】

基本的なポリヌクレオチドよりは鑄型ポリヌクレオチド内の変化により感受性が高い修飾ポリヌクレオチドは、より特異的なPCR方式の診断的アッセイの開発及び例えば癌組織内での希少なDNA突然変異の高感度PCR検出のために用いられ得る。

【0126】

図11(スキーム11)は、非共有結合されたアンチプライマー(AP)を備える基本的プライマー及びフィクサーポリヌクレオチドを使用する3つの例を示している。

【0127】

別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、基本的プライマーポリヌクレオチド(「PO」)と修飾フィクサーポリヌクレオチド構造(「F1~F4」)で構成されてもよい(図12;スキーム12参照)。修飾フィクサーは左側に示されていて、それと共に完全なポリヌクレオチドの組み合わせ(基本的プライマーと修飾フィクサーポリヌクレオチド)が右側に示されている。

【0128】

ステム-ループ構造(スキーム12の1~4)を含む修飾ポリヌクレオチドの組み合わせは、鑄型ポリヌクレオチドへの結合の際に、特異性の増大したレベルを提供するために用いられてもよい。これら態様では、単鎖領域(すなわち、ループ構造)が鑄型ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。配列内で100%の相補性であれば、このハイブリダイゼーションは、フィクサーポリヌクレオチドの完全に相補的なステム部分を効果的に置換するであろう。関連する態様では、プライマーポリヌクレオチドは、完全にハイブリダイズされたフィクサーポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。修飾フィクサーポリヌクレオチドの単鎖ループ領域又は二重鎖ステム領域内におけるいかなる突然変異も、そのハイブリダイゼーション効率を低減するであろうし、結果的にポリヌクレオチドの組み合わせのプライミング効率も低減するであろう。別の実施形態では、ポリヌクレオチドの組み合わせは、修飾プライマーポリヌクレオチド(「P1」)と基本的なポリヌクレオチド(「F」)とから構成されてもよい(図13a;スキーム13参照)。スキーム13では、修飾プライマーポリヌクレオチドが左側に示され、それと共に完全なポリヌクレオチドの組み合わせ(修飾プライマーポリヌクレオチドと基本的フィクサーポリヌクレオチド)が右側に示されている。この実施形態では、プライマー1の5'セグメントをその3'セグメントにハイブリダイズさせるように、単鎖DNAリンカー(例えばポリdTなどで構成されている)が十分に長くあるべきである。

【0129】

別の実施形態では、ポリヌクレオチドの組み合わせは、修飾プライマーポリヌクレオチド(プライマー1、P1)と修飾フィクサーポリヌクレオチドとによって構成されてもよい(スキーム14参照)。このような2つの例は、図12b(スキーム14)に示されていて、図12(スキーム12)からのフィクサーポリヌクレオチドF1及びF4と共に示されている。

【0130】

別の実施形態では、修飾プライマー構造を備えたポリヌクレオチドの組み合わせは、非共有的に結合されたアンチプライマーを更に含む。1つの態様では、ポリヌクレオチドの組み合わせは、修飾プライマーポリヌクレオチド、基本的なフィクサーポリヌクレオチド及びアンチプライマーを含むように形成されてもよい。種々の態様では、アンチプライマーは、ポリヌクレオチドの基見合わせの異なる領域にハイブリダイズされてもよい(図12c;スキーム15参照)。

【0131】

アンチプライマーは、鑄型ポリヌクレオチドへのフィクサーポリヌクレオチドの第1のドメインの結合の特異性を更に増大させるように働く。ここでは、100%相補的鑄型ポリヌクレオチド領域のみが、アンチプライマーによってカバーされていない短いポリヌク

10

20

30

40

50

レオチド領域に対して効果的にハイブリダイズするであろう。フィクサーポリヌクレオチドの第1のドメインが鋳型ポリヌクレオチドにハイブリダイズするので、鋳型領域がフィクサーポリヌクレオチドに100%相補的であれば、それはアンチプライマーを置換するであろう。このことが、フィクサーポリヌクレオチド単独の場合に対する非常に高いレベルの特異性を提供する。

【0132】

本明細書の全体にわたって引用された引用文献は、本明細書に示された方法に例示的方法又は他の詳細な補足を提供する限りにおいて、全てが特に参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0133】

プライマー又はプライマーの組み合わせが「順」又は「逆」方向として指示されて場合、これら表示は、PCR反応及びプライマーと鋳型との間の関係の説明で用いられる任意の慣習であることを、当業者は理解されるであろう。したがって、当業者には明らかなように、それを180°反転させることによってPCR概略図の方向を変えることによって、「順方向」プライマーが「逆方向」プライマーになり、並びに「逆方向」プライマーが「順方向」プライマーになり、例えば順方向プライマー又は逆方向プライマーとしての1つのプライマーの組み合わせの表示などは、構造又は特別なプライマーの組み合わせの使用に関する制限ではない。

【実施例1】

【0134】

実施例1

本発明のポリヌクレオチドの組み合わせを用いる基本的な単一塩基突然変異検出PCR

その最も基本的な形態の1つでは、2つのポリヌクレオチドの組み合わせを用いて、PCRが実行される。1つのポリヌクレオチドの組み合わせは「順方向」複合体であり、並びに他方は「逆方向」複合体である。それぞれのポリヌクレオチドの組み合わせは、2つのポリヌクレオチド、プライマー及びフィクサーで構成される。プライマー及びフィクサーポリヌクレオチドは、スキーム2(図2)で示したように、互いに対して並びに鋳型DNAポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることが可能である。

【0135】

突然変異検出の場合には、順方向及び/又は逆方向プライマーポリヌクレオチドは、標的DNAポリヌクレオチド内の野生型配列からの変異体を識別することが可能である配列を含有する。プライマーポリヌクレオチド配列が野生型配列に向けられれば、次いでプライマーポリヌクレオチドは、ただ単に野生型鋳型に効果的に結合するであろうし、逆もまた同様である。この結果は、変異体配列がただ1つの塩基位置で野生型配列と異なっているためであり、本明細書に記載されたポリヌクレオチドの組み合わせの態様では、鋳型ポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーポリヌクレオチドの第1のドメインは短い(5~30ヌクレオチド)。ミスマッチがある場合、プライマーオリゴヌクレオチド結合が不安定になり、結果的にDNA合成をプライミングすることができないために、この長さは変異体と野生型配列との識別を可能にする。

【0136】

第1の工程は、反応容器内で試薬を組み立てることである。試薬は、順方向及び逆方向ポリヌクレオチド組み合わせ複合体、鋳型DNAポリヌクレオチド、熱安定性DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド基質、及び適切な緩衝液を含む。当業者によって容易に決定される最適な条件を用いて、当該技術分野で周知の方法に従って、PCRが行われた。

【0137】

プライマーポリヌクレオチドがどのようにデザインされるか(すなわち、変異体又は野生型対立遺伝子を検出するためにそれらがどのようにデザインされるか)に依存して、得られたPCR生成物は、サンプルが変異体を含有するか又は野生型対立遺伝子を含有する

10

20

30

40

50

か（又は双方とも含有するか）に関する情報を提供する。

【0138】

図14（スキーム16）は、2つのシナリオを示している。上部シナリオでは、プライマーポリヌクレオチドの第1のドメインが、鋳型DNAポリヌクレオチドに対して100%相補的であり、伸張が起こり、生成物を生じる。

【0139】

下部シナリオでは、プライマーポリヌクレオチドの第1のドメインが、鋳型DNAポリヌクレオチドに対してミスマッチを含有し、プライマーポリヌクレオチドの短い第1のドメイン内の不安定性のために、伸張がブロックされている。この不安定性が、PCRの非常に低い効率をもたらし、検出可能な生成物をわずかに生産するか又は全く生産しない結果となる。

10

【実施例2】

【0140】

次世代配列決定

次世代配列決定（NGS）を行うためのポリヌクレオチドの組み合わせの使用は、プローブライゲーション及又はポリメラーゼ伸張のいずれも用いることなく実行される（図15；スキーム17）。

【0141】

初めに、第1のフィクサーポリヌクレオチドと4つの蛍光標識付けされたポリヌクレオチドの混合物とが、ポリヌクレオチド鋳型にハイブリダイズされる。ポリヌクレオチドが結合した鋳型が、次いで洗浄され、信号が読み取られる。

20

【0142】

次いで、蛍光標識が開裂され、混合物が再度洗浄される。次に4つの2蛍光標識付されたポリヌクレオチドの混合物が、鋳型ポリヌクレオチドにハイブリダイズされて、混合物が洗浄され、信号が再度読み取られる。

【0143】

鋳型の末端が到達されるまで、初めの2つの工程が繰り返される。ついで、第1のフィクサーポリヌクレオチドとすべてハイブリダイズされたポリヌクレオチドが、鋳型ポリヌクレオチドから剥ぎ取られる。この工程の次に、第1のフィクサーポリヌクレオチドから上流の単一の塩基にハイブリダイズする第2のフィクサーポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションが続く。

30

【0144】

前と同じように、4つの蛍光標識付されたポリヌクレオチドの混合物が、鋳型ポリヌクレオチドにハイブリダイズされて、混合物が洗浄され、信号が読み取られる。次いで、蛍光標識が開裂され、混合物が洗浄され、並びに4つの蛍光標識付されたポリヌクレオチドが再びハイブリダイズされる。混合物が次いで洗浄されて、信号が読み取られる。

【0145】

これらの工程は、鋳型ポリヌクレオチドが到達するまで繰り返される。このように、DNAポリメラーゼを用いることなく、DNA配列が得られる。

40

【実施例3】

【0146】

染料色素SYTO9の存在下における定量的PCR

材料

基質：ラムダDNA New England Biolabs #N3011S

【0147】

P10-35（配列番号4）（すなわち、「第1のポリヌクレオチド」）

【0148】

F10-23（配列番号3）（すなわち、「第2のポリヌクレオチド」）

【0149】

順方向プライマー10-15（配列番号1）

50

【0150】

逆方向プライマー10-17 (配列番号2)

【0151】

Taq DNAポリメラーゼ New England Biolabs #M0320L

【0152】

Taq DNAポリメラーゼ緩衝液: 10mM Tris-HCl、50mM KCl pH8.3@25

【0153】

dNTPs: Invitrogen #10297028

10

【0154】

SYTO9 緑色蛍光核酸染料 Invitrogen #S34854

方法

【0155】

増幅を50µl容量のアリコート中、三組で実施した。

【0156】

通常増幅反応は、2x Taq DNAポリメラーゼ緩衝液12.5µl、3mM MgCl₂、通常順方向プライマー10-15 (配列番号1) 200nM、通常逆方向プライマー10-17 (配列番号2) 200nM、dNTPs 200µM、Taqポリメラーゼ1単位、ラムダDNA 0.1ng、及びSYTO9 2µMから構成された。以下の熱的サイクリングプロファイルを用いて、BioRad CFX96 Real Time System中で増幅が行われた。1サイクルが94で2分間、続いて50サイクルが94で15秒及び66で1分20秒間。

20

【0157】

プライマー組み合わせp10-35及びf10-23の増幅混合物は、2x Taq DNAポリメラーゼ緩衝液12.5µl、3mM MgCl₂、通常順方向プライマー10-15 (配列番号1) 200nM、P10-35 (配列番号4) 200nM、F10-23 (配列番号3) 400µM、dNTPs 200µM、Taqポリメラーゼ1単位、ラムダDNA 0.1ng、及びSYTO9 2µMから構成された。増幅パラメータは、通常プライマー増幅と同様であった。

30

【0158】

結果

2つの通常プライマー、10-15 (配列番号1) 及び10-17 (配列番号2) を使用した反応に関する平均増幅曲線と、順方向の通常プライマー10-15 (配列番号1)、P10-35 (配列番号4) 及びF10-23 (配列番号3) を使用した反応に関する平均増幅曲線が、図16に示されている。結果は、P10-35/F10-23ペアを含有するアッセイが通常プライマーを含有するアッセイとほぼ同じように行われたことを示唆している。

【実施例4】

【0159】

蛍光体標識付されたプライマー組み合わせとクエンチャー標識フィクサーを使用した定量的PCRアッセイ

40

材料

基質: ラムダDNA New England Biolabs #N3011S

【0160】

5'-フルオレセイン標識P10-74 (配列番号10) (すなわち、「標識を含む第1のポリヌクレオチド」)

【0161】

3'-Iowa Blackクエンチャー標識F10-73 (配列番号9) (すなわち「標識を含む第2のポリヌクレオチド」)

50

【0162】

順方向プライマー10-15 (配列番号1)

【0163】

Taq DNAポリメラーゼ New England Biolabs #M0320L

【0164】

Taq DNAポリメラーゼ緩衝液: 10mM Tris-Hcl、50mM KCl pH8.3@25

【0165】

Vent (エキソ-) DNAポリメラーゼ New England Biolabs #M0257L 10

【0166】

dNTPs: Invitrogen #10297018

【0167】

方法

P10-74による増幅反応は、2x Taq DNAポリメラーゼ緩衝液12.5μl、3mM MgCl₂、通常の順方向プライマー10-15 (配列番号1) 200nM、P10-74 (配列番号10) 200nM及びF10-73 (配列番号9) 400nM、dNTPs 200μM、Taqポリメラーゼ1単位、ラムダDNA 0.1ngを含有した。以下の熱的サイクリングプロファイルを用いて、BioRad CFX96 Real Time System中で増幅が行われた。1サイクルが94 で2分間、続いて50サイクルが94 で15秒間及び66 で1分20秒間、及び「読取り」サイクルが60 で10秒間。いくつかの反応が、Vent (エキソ-) ポリメラーゼ0.2単位が更に供給された。 20

結果

【0168】

増幅リアルタイムPCR曲線が図17に示されている。蛍光体標識P10-74によるアッセイは、Vent (エキソ-) ポリメラーゼの添加によりわずかに改善された、適度に強い信号を発生した。

結論

【0169】

標識及びクエンチャーを備えたP10-74/F10-73ペアによるqPCRアッセイは、それぞれ診断適用のための新規なツールを提示している。

【実施例5】

【0170】

蛍光体標識付プライマー及びユニバーサルプライマーを使用するqPCRアッセイ

材料

基質: ラムダDNA New England Biolabs #N3011S

【0171】

3' 蛍光体標識及び保護された結合を備えたP10-104 (配列番号13) (すなわち「標識を含む第1のポリヌクレオチド」) 40

【0172】

F10-79 (配列番号11) (すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)

【0173】

クエンチャーオリゴヌクレオチド10-80 (配列番号12) (すなわち、「ユニバーサルクエンチャーポリヌクレオチド」)

【0174】

順方向プライマー10-15 (配列番号1)

【0175】

Taq DNAポリメラーゼ New England Biolabs #M032 50

0 L

【0176】

Taq DNAポリメラーゼ緩衝液：10 mM Tris-HCl、50 mM KCl
pH 8.3 @ 25

【0177】

Vent (エキソ-) DNAポリメラーゼ New England Biolabs
M0257L

【0178】

dNTPs : Invitrogen # 10297018

方法

10

【0179】

増幅が、2 x Taq DNAポリメラーゼ緩衝液 12.5 μl、3 mM MgCl₂、通常の順方向プライマー 10-15 (配列番号 1) 200 nM、P10-104 (配列番号 13) 200 nM、F10-79 (配列番号 11) クエンチャー 10-80 (配列番号 12) 600 nM、dNTPs 200 μM、Taq ポリメラーゼ 1 単位、及びラムダ DNA を含む 25 μl 容量のアリコートにて三組で実施された。以下の熱的サイクリングプロファイルを用いて、BioRad CFX96 Real Time System 中で増幅が行われた。1 サイクルが 94 で 2 分間、続いて 50 サイクルが 94 で 15 秒間及び 66 で 1 分 20 秒間、更に「読取り」サイクルが 60 で 10 秒間。いくつかの反応では、Vent (エキソ-) ポリメラーゼの 0.2 単位が更に補充された。

20

【0180】

結果

平均の増幅リアルタイム PCR 曲線が図 18 に示されている。蛍光体標識 P10-104 とユニバーサルクエンチャーオリゴヌクレオチド 10-80 を使用したアッセイは、Vent (エキソ-) ポリメラーゼの添加によって著しく改善された強い信号を発生した。

【0181】

結論

蛍光体標識 P10-104 及びユニバーサルクエンチャーを使用した qPCR アッセイは、診断的用途のための新規な qPCR ツールを提示する。これは、ユニバーサルクエンチャー分子の使用のために、実施例 4 で記載された方法よりも、複数のアッセイをデザインすることがより安価である。

30

【実施例 6】

【0182】

SybrGreen 染料を使用した KRAS G12V 突然変異アッセイ

材料

0.1 x TE 緩衝液：10 mM Tris、0.1 mM EDTA pH = 8.0

【0183】

ゲノム DNA 単離キット：Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit # 69504

【0184】

野生型ヒトゲノム DNA 鑄型：Promega ヒトゲノム DNA # G1471

40

【0185】

変異体鑄型：新鮮に回収した SW480 結腸直腸腺癌細胞 (ATCC # CCL-228) から単離した (G12V) ゲノム DNA

【0186】

オリゴヌクレオチド：

【0187】

kras 通常の順方向プライマー 10-53 (配列番号 6)

【0188】

kras G12V 通常の逆方向プライマー 10-48 (配列番号 5)

50

【0189】

kras P10 - 56 (配列番号8) (すなわち「第1のポリヌクレオチド」)

【0190】

kras F10 - 54 (配列番号7) (すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)

【0191】

リアルタイムSYBR Green qPCR混合物: BioRad IQ Supermix #170 - 8882

方法

【0192】

ゲノムDNA単離: 製造業者のプロトコルに従って、Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kitを用いて、Kras G12VヒトゲノムDNAを、新鮮に回収したSW480細胞から単離し、0.1xTE緩衝液中に濃度10ng/μlで再懸濁し、小分けし、使用するまで-20℃にて保存した。

10

【0193】

鋳型調製: リアルタイムPCR反応のためのゲノムDNA鋳型を生成するために、変異体krasのコピーの数が、総DNAの50ng当たり1~14,000個のコピーで変化するように、Promega WTゲノムDNAが、表示量のkras G12VゲノムDNAでスパイクされて、次いで鋳型DNAが小分けされ、使用するまで-10℃で保存された。

【0194】

リアルタイム増幅反応: 増幅が、2x BioRad IQ SYBR Green Supermix 12.5μl、順方向プライマー10 - 53 (配列番号6) 200nM、通常のPCR反応のための通常の逆方向プライマー10 - 48 (配列番号5) 200nM又はプライマー組み合わせの増幅反応のためのkras P10 - 56 (配列番号8) 200nM及びプライマー組み合わせの増幅反応のためのkras F10 - 54 (配列番号7) 400nM、並びにBioRad CFX96 Real Time Systemを用いる鋳型DNA 50ngを含む25μlのアリコート中、三組で行われた。以下の熱的サイクリングを用いて増幅が実施された。1サイクルは94℃で3分間、続く60サイクルは94℃で15秒間及び66℃で1分20秒間。

20

結果

【0195】

変異体対立遺伝子G12Vの50% (7,000個の変異体のDNAコピー)、10% (1,400個の変異体のDNAコピー)、1% (140個の変異体のDNAコピー)、0.1% (14個の変異体のDNAコピー)、0.01% (1個の変異体のDNAコピー)、及び0%を含有する通常のDNAサンプル50ngに関する平均のプライマー組み合わせのqPCR曲線が図19aに示されている。図19bは、通常のプライマーを用いての同一のDNAサンプルの解析を示している。どちらも、プライマーは、kras P10 - 56又は通常のプライマーの3'末端に位置する塩基によるミスマッチを識別するようにデザインされた。

30

【0196】

結論

プライマー組み合わせKRAS G12V突然変異アッセイは、14,000個の正常のDNA配列の混合物中に存在する単一コピー変異体対立遺伝子を検出可能であったが、一方通常のプライマーを使用したアッセイは、変異体DNAの140個のコピー (1%) の検出にとどまった。プライマー組み合わせが希少突然変異検出に用いられた場合は、通常のプライマーを使用した場合と比較して、感度で100倍の改善が見られた。単一の変異体対立遺伝子から発生する信号は、バックグラウンド (2~3サイクル差) から識別される。

40

【実施例7】

【0197】

50

固定サンプルによるプライマー組み合わせ及び S y b r G r e e n を用いる突然変異の検出

材料

W T k r a s H T 2 9 結腸直腸腺癌細胞 A T C C # H T B - 3 8

【 0 1 9 8 】

G 1 2 V ゲノム D N A が新鮮に回収された S W 4 8 0 結腸直腸腺癌細胞 (A T C C # C L - 2 2 8) から単離された。

方法

【 0 1 9 9 】

細胞固定化： H T 2 9 細胞 (k r a s W T D N A 由来) 又は S W 4 8 0 細胞 (k r a s G 1 2 V D N A 由来) をトリプシン処理し、氷冷した P B S 中で 3 回洗浄し、4 % ホルムアルデヒド中で、室温で 1 0 分間固定し、再度 P B S 中で 4 回洗浄した。最後の洗浄後、実施例 5 に記載されたプロトコルに従って、細胞ペレットが、D N A を単離するために用いられた。

【 0 2 0 0 】

鋳型調製及び D N A 増幅：実施例に記載されたものと同様である。

【 0 2 0 1 】

結果

変異体対立遺伝子 G 1 2 V の 1 0 0 % (1 4 , 0 0 0 個の変異体の D N A コピー)、5 0 % (7 , 0 0 0 個の変異体の D N A コピー)、1 0 % (1 , 4 0 0 個の変異体の D N A コピー)、1 % (1 4 0 個の変異体の D N A コピー)、0 , 1 % (1 4 個の変異体の D N A コピー)、0 . 0 1 % (1 個の変異体の D N A コピー)、及び 0 % を含む固定 D N A サンプルに関する平均のプライマー組み合わせ q P C R 曲線が図 2 0 に示されている。非固定サンプルによる結果と同様に、検出限界は 0 . 0 1 % 又は 1 個の変異体 D N A 分子であった。

【 0 2 0 2 】

結論

プライマー組み合わせ K R A S G 1 2 V 突然変異 q P C R アッセイの感度および選択性は、細胞の固定化によって影響されず、このことは、本アッセイの実際の臨床サンプルへの実用性を示唆している。単一の変異体対立遺伝子から発生する信号は、バックグラウンド (3 サイクル差) から識別され得る。

【 実施例 8 】

【 0 2 0 3 】

プライマー組み合わせ及びプローブポリヌクレオチドを使用する K R A S G 1 2 V アッセイ

材料

鋳型 D N A :

【 0 2 0 4 】

P r o m e g a # G 1 4 7 1 からの野生型ヒトゲノム D N A、S W 4 8 0 細胞から単離された変異体 G 1 2 V D N A (実施例 6 参照)

【 0 2 0 5 】

オリゴ:

【 0 2 0 6 】

k r a s 通常の順方向プライマー 1 0 - 1 7 8 (配列番号 1 6)、

【 0 2 0 7 】

k r a s G 1 2 V P 1 0 - 1 7 1 (配列番号 1 4) (すなわち、「第 1 のポリヌクレオチド」)、

【 0 2 0 8 】

k r a s F 1 0 - 1 7 4 (配列番号 1 5) (すなわち、「第 2 のポリヌクレオチド」)、

10

20

30

40

50

【0209】

kras 特異的 Z e n 二重クエンチャー型プローブ 10 - 185 (配列番号 19) (すなわち、「標識及びクエンチャーを含むプローブポリヌクレオチド」)。

【0210】

リアルタイム q P C R 混合物 : B i o R a d I Q S u p e r m i x # 170 - 8862

【0211】

方法

リアルタイム増幅反応 : 増幅が、2 x B i o R a d I Q S u p e r m i x 12.5 μ l、順方向プライマー 10 - 178 (配列番号 16) 200 nM、kras G12V P10 - 171 (配列番号 14) 200 nM、kras F10 - 174 (配列番号 15) 400 nM、プローブ 10 - 185 (配列番号 19) 250 nM、並びに B i o R a d C F X 96 R e a l T i m e S y s t e m を用いる鋳型 DNA 50 ng を含む 25 μ l のアリコート中、三組で行われた。以下の熱的サイクリングプロファイルを用いて、増幅が行われた。1 サイクルは 94 で 3 分間、続いて 60 サイクルが 94 で 10 秒間及び 66.5 で 1 分 20 秒間。

10

【0212】

結果

変異体対立遺伝子 G12V の 100% (14,000 個の変異体の DNA コピー)、50% (7,000 個の変異体の DNA コピー)、10% (1,400 個の変異体の DNA コピー)、1% (140 個の変異体の DNA コピー)、0.1% (14 個の変異体の DNA コピー)、0.01% (1 個の変異体の DNA コピー)、及び 0% を含む DNA サンプルに関する平均のプライマー組み合わせ q P C R 曲線が図 21 に示されている。実施例 6 及び 7 に記載された結果と同様に、プローブポリヌクレオチドを用いての検出限界は、0.01% 又は 1 個の変異体 DNA 分子であった。信号強度は、変異体 DNA の低い量 (0.1% 及び 0.01%) で低下した。

20

【0213】

結論

プライマー組み合わせ K R A S G12V 変異体 q P C R アッセイの感度は、プローブポリヌクレオチドを用いることから著しく改善しなかった。単一の変異体対立遺伝子から発生する信号は、バックグラウンド (65 サイクルまでの平坦な線) から識別され得、プローブポリヌクレオチド含有アッセイで良好な選択性を示している。

30

【実施例 9】

【0214】

プライマー組み合わせ、プローブポリヌクレオチド、及びブリッカーポリヌクレオチドを使用する K R S G12V アッセイ

材料

鋳型 DNA :

【0215】

P r o m e g a # G1471 からの野生型ヒトゲノム DNA、SW480 細胞から単離した変異体 G12V DNA (実施例 6 参照)

40

【0216】

オリゴ :

【0217】

kras P10 - 184 (配列番号 18) (すなわち、「第 1 のポリヌクレオチド」)、

【0218】

kras F10 - 182 (配列番号 17) (すなわち、「第 2 のポリヌクレオチド」)、

【0219】

50

kras 特異的 Zen 二重クエンチャー型プローブ 10 - 210 (配列番号 21) (すなわち、「プローブポリヌクレオチド」)、

【0220】

kras 通常逆方向プライマー 10 - 208 (配列番号 20) (すなわち、「逆方向プライマー」)、

【0221】

ブロッキングオリゴ 10 - 213 (配列番号 22) (すなわち、「ブロッキングポリヌクレオチド」)

【0222】

リアルタイム qPCR 混合物: BIORad IQ Supermix #170 - 8862

【0223】

方法

リアルタイム増幅反応: 増幅が、2x BioRad IQ Supermix 12.5 μl、kras P10 - 184 (配列番号 18) 200 nM、kras F10 - 182 (配列番号 17) 50 nM、逆方向プライマー 10 - 208 (配列番号 20) 200 nM、プローブポリヌクレオチド 10 - 210 (配列番号 21) 250 nM、ブロッキングオリゴ 10 - 213 (配列番号 22) 2000 nM、並びに BioRad CFX96 Real Time System を用いる鑄型 DNA 50 ng を含む 25 μl のアリコート中、三組で行われた。以下の熱的サイクリングプロファイルを用いて、増幅が行われた。1 サイクルは 94 で 3 分間、続いて 60 サイクルが 94 で 10 秒間及び 65 で 1 分間。

【0224】

結果

変異体対立遺伝子 G12V の 100% (14,000 個の変異体の DNA コピー)、50% (7,000 個の変異体の DNA コピー)、10% (1,400 個の変異体の DNA コピー)、1% (140 個の変異体の DNA コピー)、0.1% (1 個の変異体の DNA コピー)、及び 0% を含む DNA サンプルに関する平均のプライマー組み合わせ qPCR 曲線が図 22 に示されている。

【0225】

結論

ブロッカーオリゴヌクレオチド 10 - 213 (配列番号 22) (プローブポリヌクレオチドと組み合わせた) の添加は、アッセイの特性を著しく改善した。実施例 4, 5 及び 6 に記載された結果と同様に、TaqMan プローブとブロッカーとを用いた検出限界は 0.01% であるか、又は 1 個の変異体 DNA 分子であったが、実施例 6 に記載したアッセイよりも単一の変異体の検出に関して、選択性において ~100 ~ 1000 倍の改善があった (単一の変異体コピーと 14,000 個の正常な DNA 分子から発生するバックグラウンドとの間で 5 ~ 7 サイクル差)。

【実施例 10】

【0226】

プローブポリヌクレオチド、ブロッカーポリヌクレオチド、及び 3' 側塩基 LNA 修飾を使用するのプライマー組み合わせ KRAS G12V アッセイ

材料

鑄型 DNA :

【0227】

Promega #G1471 からの野生型ヒトゲノム DNA、SW480 細胞から単離した変異体 G12V DNA (実施例 6 参照)。

【0228】

オリゴ:

【0229】

10

20

30

40

50

3' LNA (配列番号23)を伴うkras P10-236(すなわち、「その3'末端においてロックされた核酸を含む第1のポリヌクレオチド」)、

【0230】

kras F10-182(配列番号17)(すなわち、「第2のポリヌクレオチド」)、

【0231】

kras特異的Zen二重クエンチャー型プローブ10-210(配列番号21)(すなわち、「プローブポリヌクレオチド」)、

【0232】

kras通常逆方向プライマー10-208(配列番号20)(すなわち、「逆方向プライマー」)、

【0233】

ブロッキングオリゴ10-213(配列番号22)(すなわち、「ブロッキングポリヌクレオチド」)。

【0234】

リアルタイムqPCR混合物: BioRad IQ Supermix #170-8862

【0235】

方法

リアルタイム増幅反応: 増幅が、2x BioRad IQ Supermix 12.5 μl、kras P10-236(配列番号23)200 nM、kras F10-182(配列番号17)50 nM、逆方向プライマー10-208(配列番号20)200 nM、プローブポリヌクレオチド10-210(配列番号21)250 nM、ブロッキングオリゴ10-213(配列番号22)2000 nM、並びにBioRad CFX96 Real Time Systemを用いる鋳型DNA 50 ngを含む25 μlのアリコート中、三組で行われた。以下の熱的サイクリングプロファイルを用いて、増幅が行われた。1サイクルは94 で3分間、続いて60サイクルが94 で10秒間及び65 で1分間。

【0236】

結果

変異体対立遺伝子G12Vの1%(140個の変異体のDNAコピー)及び0%を含むDNAサンプルに関する平均のプライマー組み合わせqPCR曲線が、図23に示されている。

【0237】

結論

プローブポリヌクレオチド、ブロッカーポリヌクレオチド及びP10-236の3'側塩基LNA修飾を伴うプライマー組み合わせKRAS G12Vアッセイは、先の実施例と比べて、最良の感度(単一変異体対立遺伝子)及び最良の選択性(14,000個の野生型DNA分子からの信号なし)を示した。

【実施例11】

【0238】

WT DNAの14,000個のコピー当たりG12V DNAの0.5個のコピーにおける改善されたKRAS G12Vアッセイを用いた単一突然変異検出: 16サンプルの解析

材料実施例10と同様である。

【0239】

方法

鋳型調製:

【0240】

0.5コピーKRAS G12V DNA鋳型を生成するために、先に単離されたSW

10

20

30

40

50

480ゲノムDNAを、PromegaヒトゲノムDNA 10ng/μlで希釈し、WT DNAの10μl当たり1SW480DNA分子の最終濃度にした。

【0241】

リアルタイム増幅反応：

【0242】

増幅が、増幅混合物組成物及び実施例10に記載されたプロトコルを用いて、0.5コピーKRAS G12V DNA鋳型の5μlで、16アリコート中にて実行された。

【0243】

結果

実施例10からの改善されたKRAS G12V qPCR突然変異アッセイを用いた16回の反復実験、並びにWT DNA no14, 000コピー当たり0.5コピーG12V DNAを(統計的に)含むサンプルが、図24aに示されている。スパイクされ希釈されたDNAサンプルの50~60%(16回中8~10回)が単一変異体DNAの信号の存在を示唆し、スパイクされ希釈されたDNAサンプルの40~50%(16回中6~8回)が信号を示さず、統計的予測と一致した。

10

【0244】

実施例10からの改善されたKRAS G12V qPCR突然変異アッセイを用いた16回の反復実験、並びにWT DNAの14,000個のコピーを含む(変異体DNAが無添加)サンプルが、図24bに示されている。WT DNAサンプルの94%(16回中15回)が信号を示さず、このことは、改善されたKRAS G12Vプライマー組み合わせqPCR突然変異アッセイによる単一変異体DNA検出の非常に高い選択性を示唆している。

20

【0245】

結論

プローブポリヌクレオチド、ブロッカー及び3'側修飾されたLNA塩基を伴うプライマー組み合わせG12Vアッセイは、10,000個以上余りの非変異体DNA分子中の単一変異体対立遺伝子の検出に関して、100%の感受性及び94~100%の選択性を有した。G12Vアッセイのこのようなパラメータは、診断的アッセイのほとんどの要求特性を満足させるものである。本アッセイは、CRC及びNSCLC患者の効果的かつ非侵襲的管理にとって、血液中を循環する希少な癌細胞の検出のために理想的に有用である。

30

【 図 1 】

プライマーオリゴヌクレオチドP フィクサー オリゴヌクレオチドF

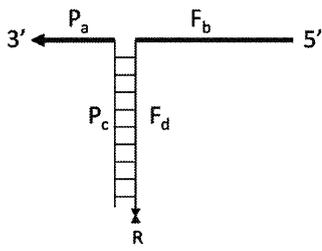


図 1

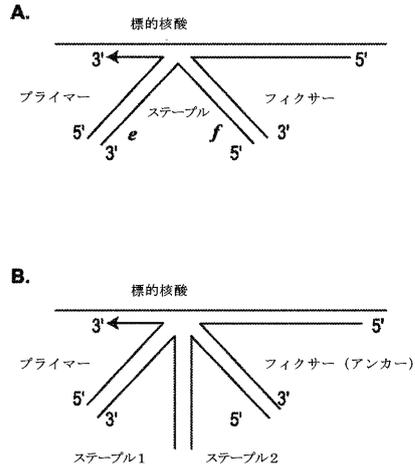
【 図 2 】

A. 単一の三方向接合を備えたプライマー
B. 2つの三方向接合を備えたプライマー



スキーム 2-図 2

【 図 3 】



スキーム 3-図 3

【 図 4 】

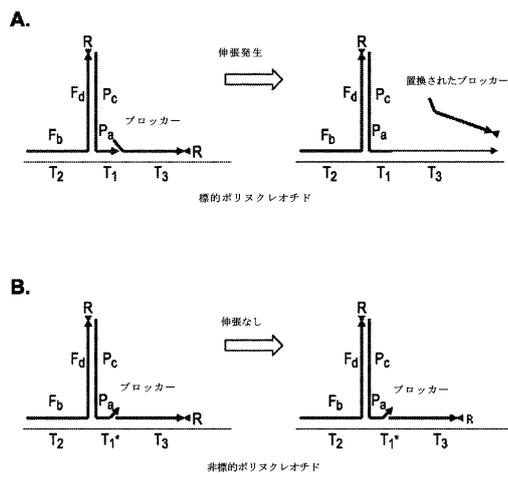


図 4

【 図 5 】

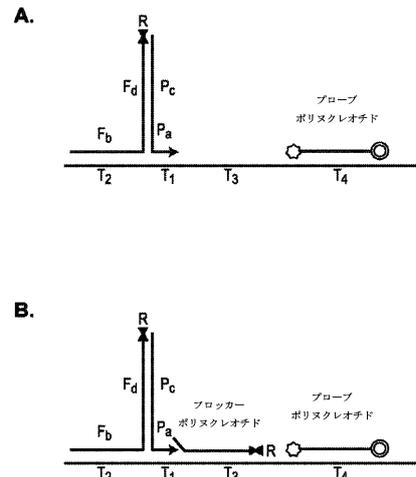


図 5

【 図 6 】

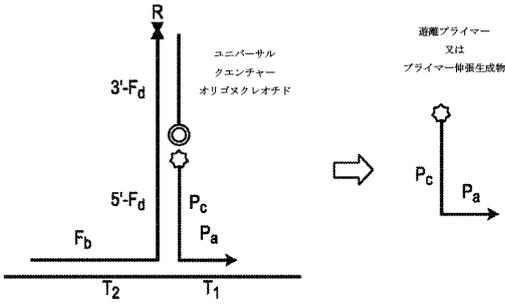
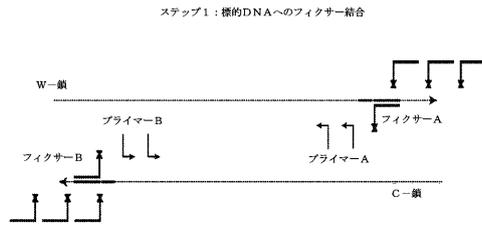


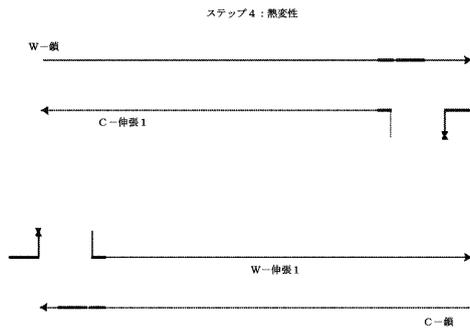
図 6

【 図 7 A 】



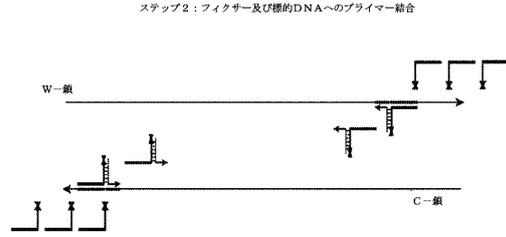
スキーム 4 - 図 7 A

【 図 7 D 】



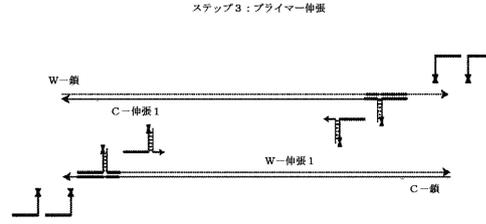
スキーム 7 - 図 7 D

【 図 7 B 】



スキーム 5 - 図 7 B

【 図 7 C 】



スキーム 6 - 図 7 C

【 図 7 E 】

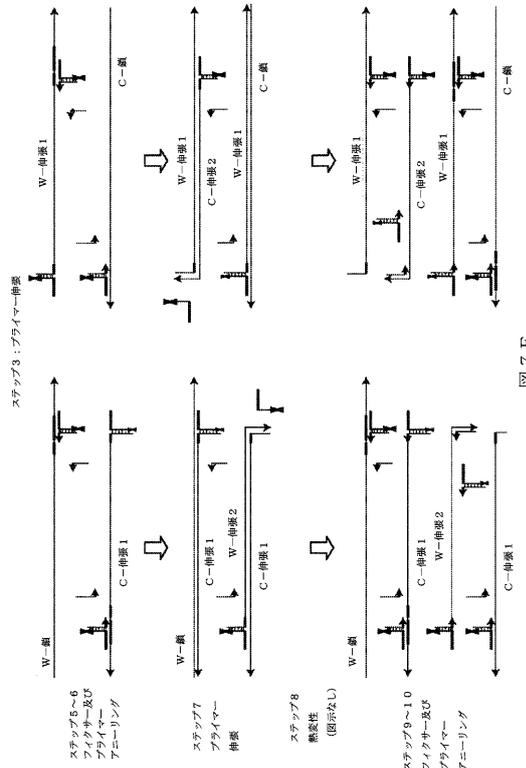
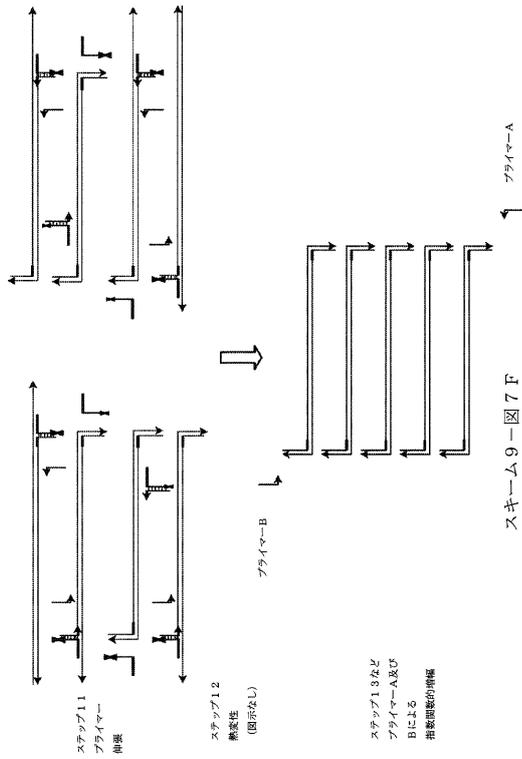


図 7 E

【 図 7 F 】



【 図 8 A 】

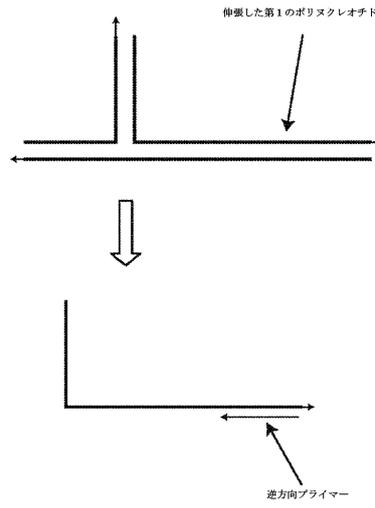


図 8 A

【 図 8 B 】

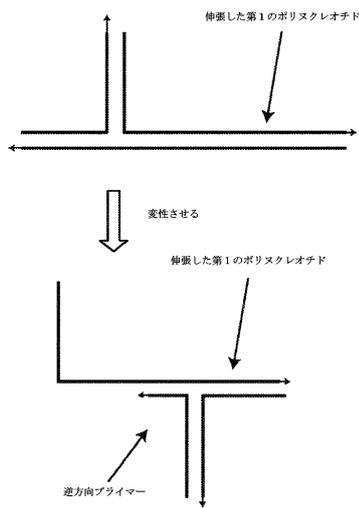


図 8 B

【 図 9 A 】

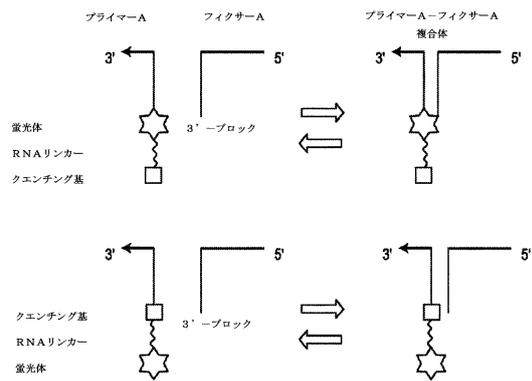
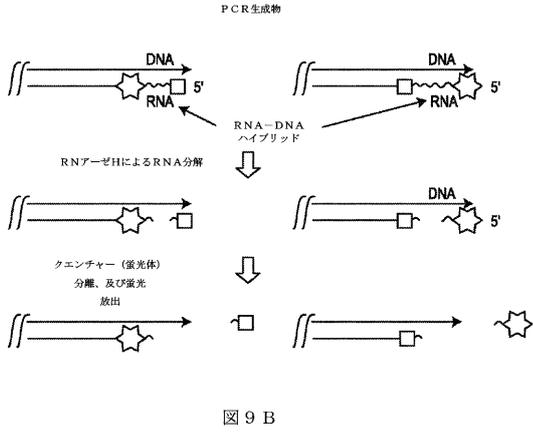
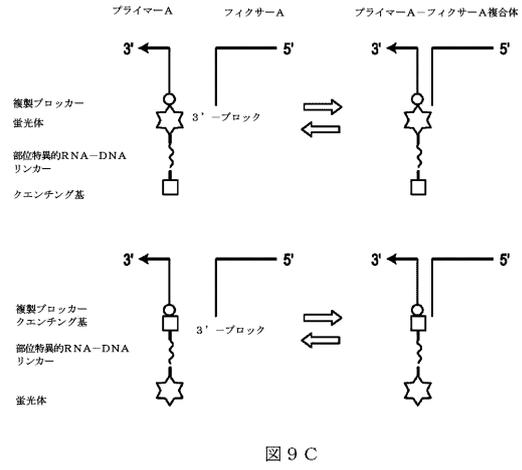


図 9 A

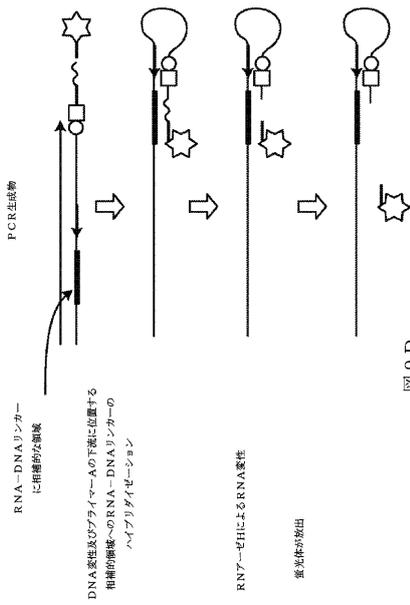
【 図 9 B 】



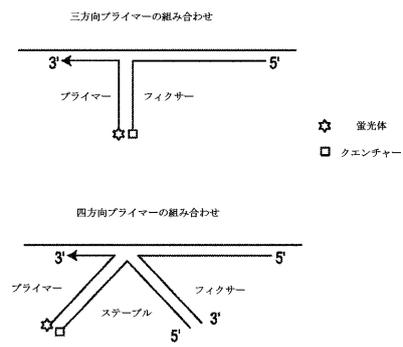
【 図 9 C 】



【 図 9 D 】

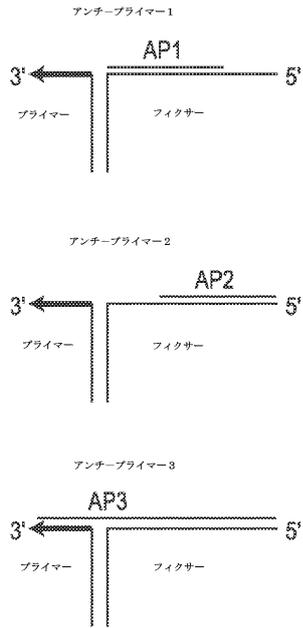


【 図 10 】



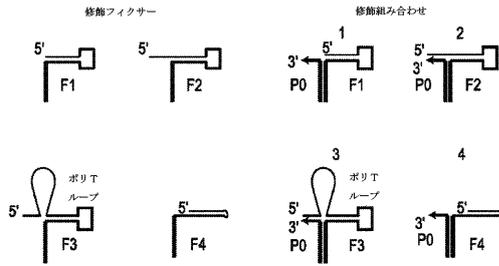
スキーム 10 - 図 10

【 図 1 1 】



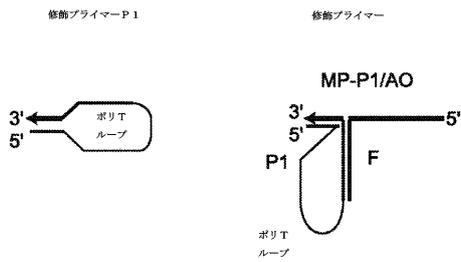
スキーム 11 - 図 11

【 図 1 2 】



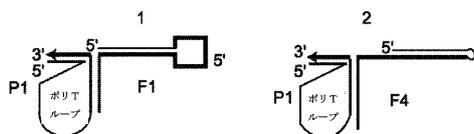
スキーム 12 - 図 12

【 図 1 3 A 】



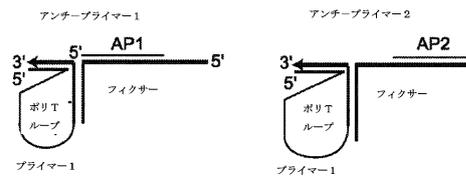
スキーム 13 - 図 13 A

【 図 1 3 B 】



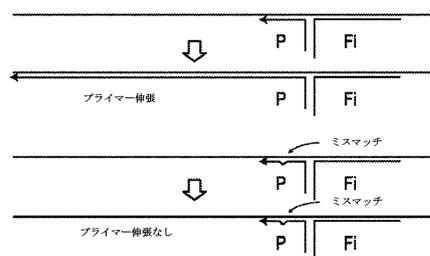
スキーム 14 - 図 13 B

【 図 1 3 C 】



スキーム 15 - 図 13 C

【 図 1 4 】



スキーム 16 - 図 14

【 図 15 】

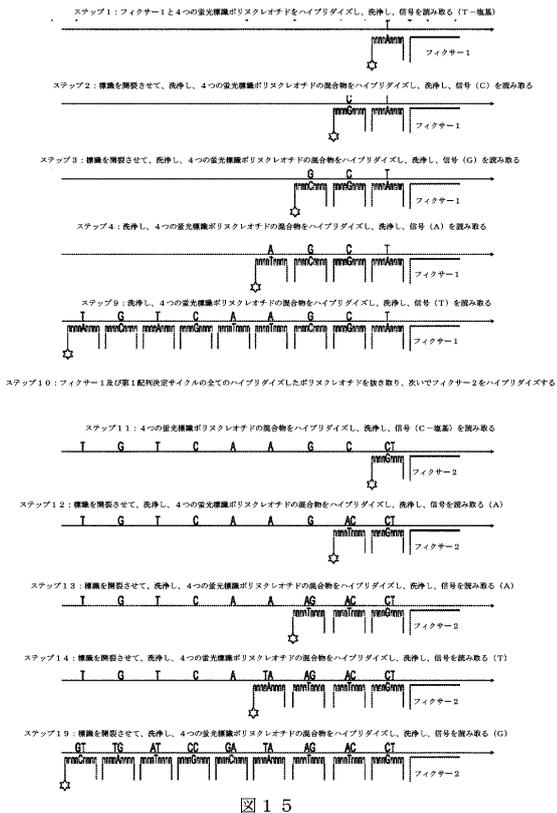


図 15

【 図 16 】

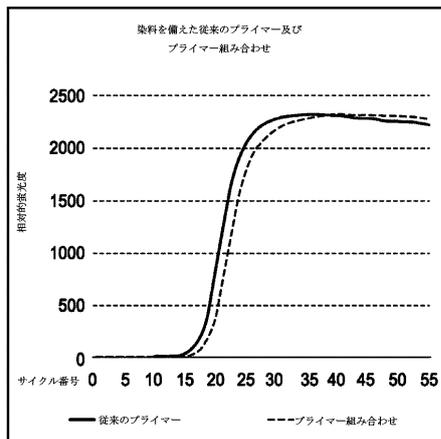


図 16

【 図 17 】

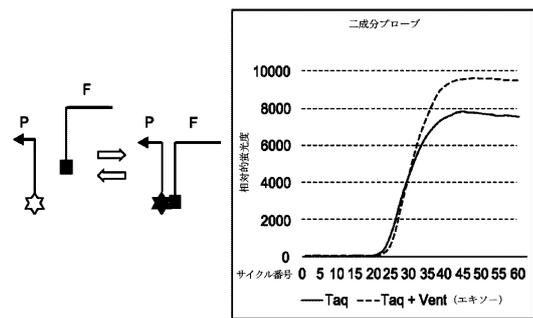


図 17

【 図 19 A 】

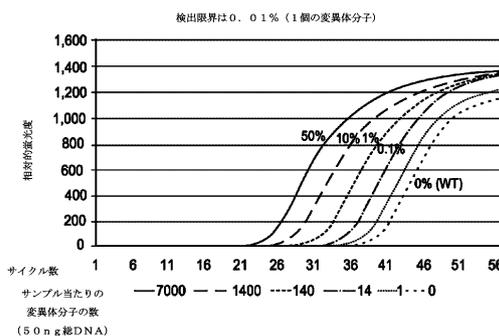


図 19 A

【 図 18 】

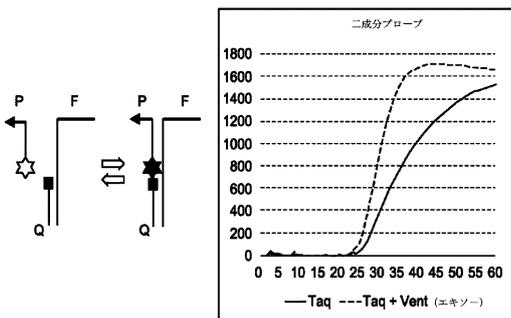


図 18

【 図 19 B 】

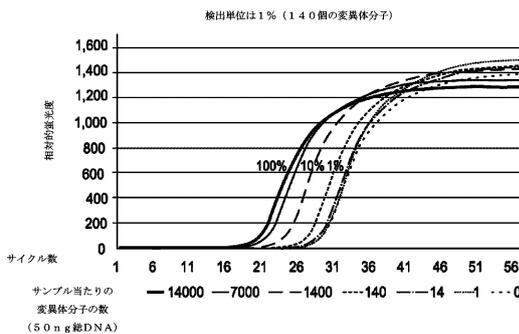


図 19 B

【 図 2 0 】

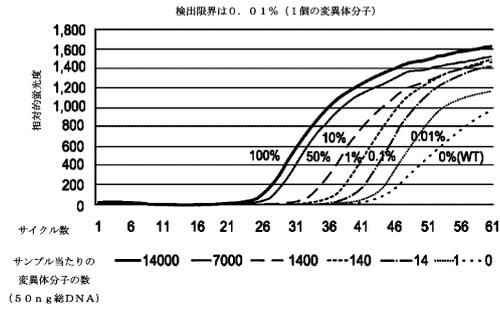


図 2 0

【 図 2 2 】

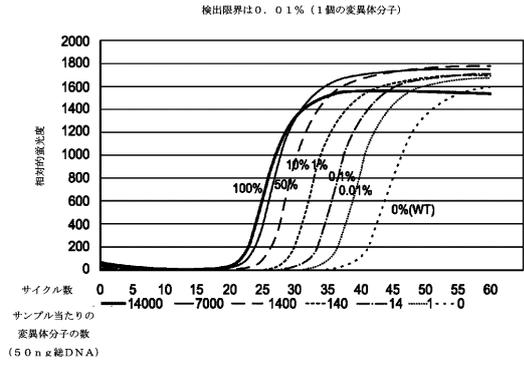


図 2 2

【 図 2 1 】

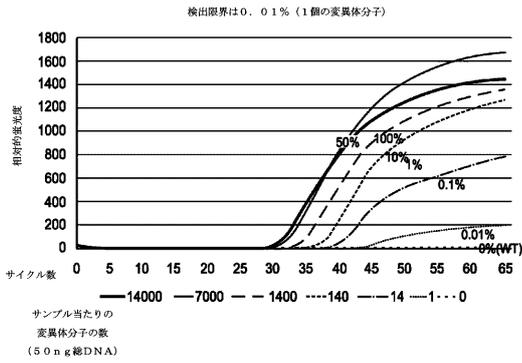


図 2 1

【 図 2 3 】

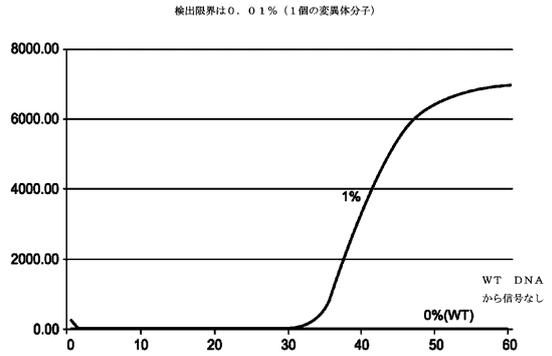


図 2 3

【 図 2 4 A 】

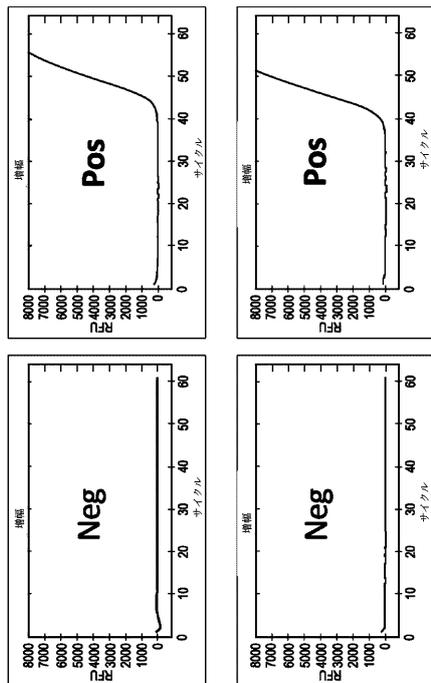


図 2 4 A

【 図 2 4 B 】

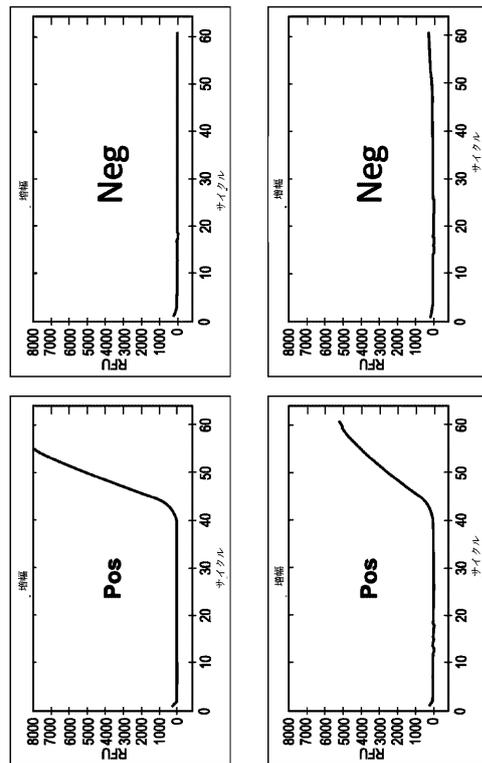


図 2 4 B

【 図 2 4 C 】

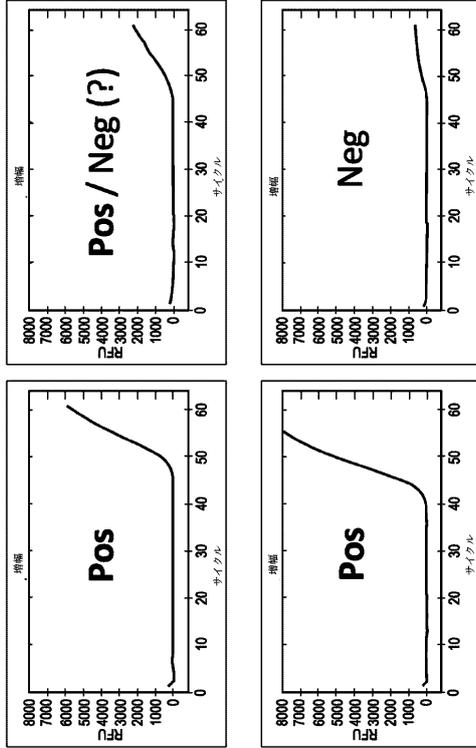


図 2 4 C

【 図 2 4 D 】

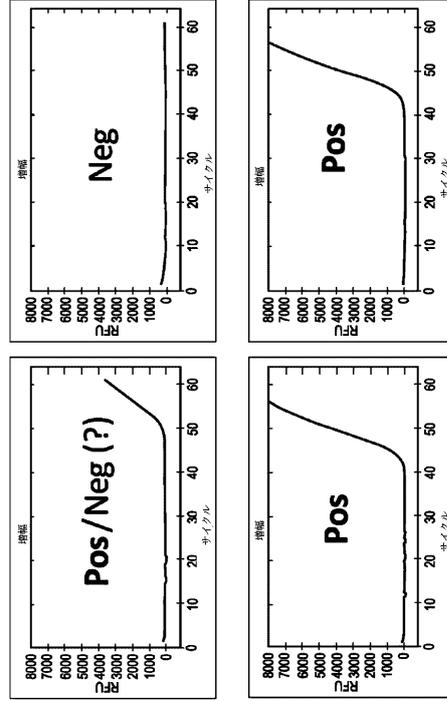


図 2 4 D

【 図 2 4 E 】

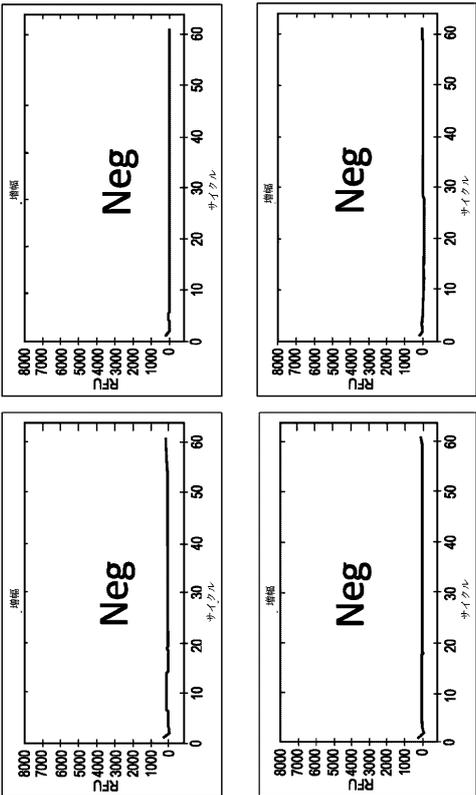


図 2 4 E

【 図 2 4 F 】

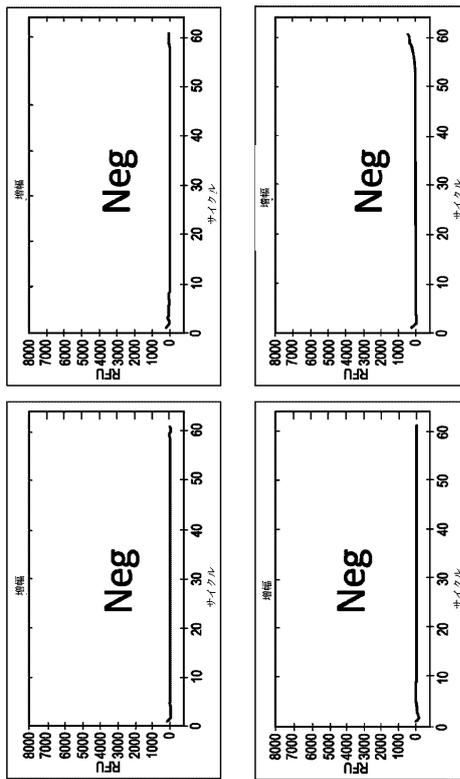


図 2 4 F

【 図 2 4 G 】

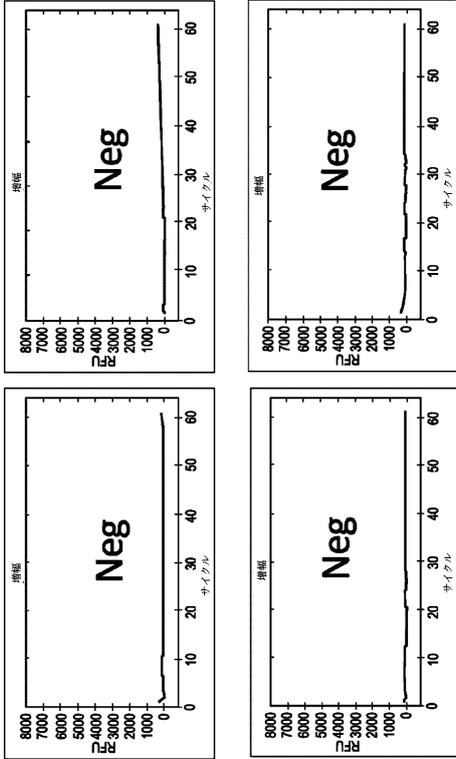


図 2 4 G

【 図 2 4 H 】

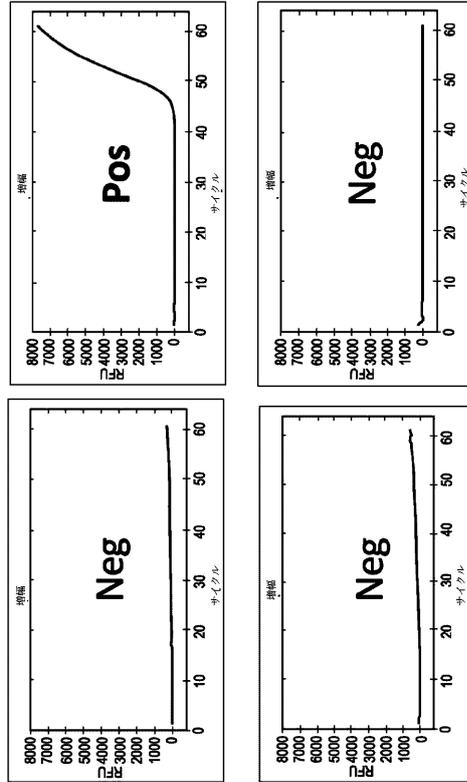


図 2 4 H

【 配 列 表 】

2013507992000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/054362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/119533 A1 (BROWN BOB D [US]) 29 August 2002 (2002-08-29)	1-3, 17-44, 47-52, 56-61, 63-69 56-61
Y	abstract page 1 - paragraph 7 page 2 - paragraph 25 figures 1,2,3 -----	
X	EP 0 745 690 A2 (NEW YORK HEALTH RES INST [US] PHRI PROPERTIES INC [US]) 4 December 1996 (1996-12-04)	30,31
Y	abstract	56-61
A	figures 1,2 line 20 - column 5, line 25 line 7 - column 11, line 40 -----	1-3, 17-29, 32-44, 47-52
<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 document 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 16 May 2011		Date of mailing of the international search report 22/06/2011
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 Celler, Jakob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/054362**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1, 56-61, 63-69(all partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2010/ 054362

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2(completely); 1, 3, 17-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 2

2. claims: 1, 3, 17, 41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 3

3. claims: 1, 17, 22, 41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 17

4. claims: 1, 22, 23, 25-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 22

5. claims: 1, 23, 25-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 23

6. claims: 1, 25-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 25

7. claims: 1, 26-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 26

8. claims: 1, 27-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 27

9. claims: 1, 28-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

International Application No. PCT/ US2010/ 054362

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 28

10. claims: 1, 29-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 29

11. claims: 1, 30-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 30

12. claims: 1, 32-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 32

13. claims: 1, 33-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 33

14. claims: 1, 34-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 34

15. claims: 1, 35-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 35

16. claims: 1, 36-41, 43, 44, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 36

17. claims: 1, 47-52, 56-61, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 47

18. claims: 1, 56-61(all partially)

International Application No. PCT/ US2010/ 054362

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 56 a posteriori.

19. claims: 1, 63-69(all partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 63

20. claims: 4(completely); 17-44, 47-52, 56-61, 63-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 4

21. claims: 5-9(completely); 17-44, 47-52, 56-61, 63-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 5

22. claims: 10-14(completely); 17-44, 47-52, 56-61, 63-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 10

23. claims: 15, 16(completely); 17-44, 47-52, 56-61, 63-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 15

24. claims: 45, 46(completely); 49-52, 56-61, 63-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 45

25. claims: 53-55(completely); 58-61(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 53

26. claims: 62(completely); 64-69(partially)

Subject matters of the above claims as characterised by the constellation of technical features of calim 62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/054362

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002119533 A1	29-08-2002	US 2004014129 A1	22-01-2004
EP 0745690 A2	04-12-1996	AT 412066 T	15-11-2008
		AU 702598 B2	25-02-1999
		AU 5232496 A	21-11-1996
		CA 2176266 A1	13-11-1996
		DK 0745690 T3	12-01-2009
		EP 2053134 A2	29-04-2009
		JP 3850914 B2	29-11-2006
		JP 9107996 A	28-04-1997
		PT 745690 E	30-01-2009

フロントページの続き

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

(72)発明者 マカロフ, ブラディミル

アメリカ合衆国 ミシガン 48108, アナーバー, ポンド ショア ドライブ 1601

(72)発明者 チュプリータ, サージー ブイ.

アメリカ合衆国 ミシガン 48105, アナーバー, ケロッグ ストリート 400, アパートメント 3

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA04 HA14 HA19

4B063 QA01 QA13 QQ20 QQ42 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34