

(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2014-526892

(P2014-526892A)

(43) 公表日 平成26年10月9日(2014.10.9)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁)

(21) 出願番号	特願2014-526257 (P2014-526257)	(71) 出願人	599132904 ネステク ソシエテ アノニム スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ 5 5
(86) (22) 出願日	平成24年8月17日 (2012. 8. 17)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月15日 (2014. 4. 15)	(74) 代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/051442	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(87) 国際公開番号	W02013/026027	(74) 代理人	100140453 弁理士 戸津 洋介
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)		
(31) 優先権主張番号	61/525, 137		
(32) 優先日	平成23年8月18日 (2011. 8. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/588, 151		
(32) 優先日	平成24年1月18日 (2012. 1. 18)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 対立遺伝子多型を検出するための組成物及び方法

(57) 【要約】

本発明は、異なる対立遺伝子の間で配列の多様性を識別するための組成物、方法、及びキットを提供する。より詳細には、一部の実施形態では、本発明は、一塩基多型 (SNP)、又はヌクレオチドの挿入若しくは欠失など、希少な (例えば、突然変異体の) 対立遺伝子多型の存在及び/又はレベルを、豊富な (例えば、野生型の) 対立遺伝子多型を含む試料中で、高い感度及び/又は特異性により決定する (例えば、定量化する) ための組成物、方法、及びキットを提供する。したがって、特定の実施形態では、本発明は、体細胞突然変異を、例えば、極めて低レベルの突然変異体対立遺伝子と比較して豊富なレベルの野生型対立遺伝子を含む試料中で検出するための、高度に選択的な方法を提供する。

【選択図】 図 1

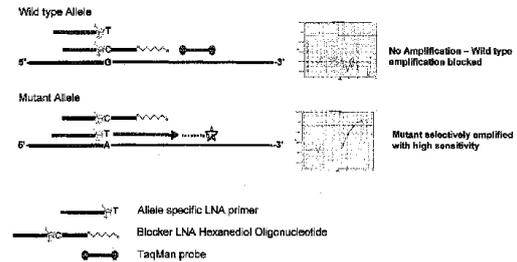


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的配列の少なくとも第 2 の対立遺伝子多型を有することが疑われる核酸試料中で、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型を検出又は定量化するための方法であって、

(a) (i) 核酸試料、

(i i) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであり、少なくとも 1 つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、

(i i i) 第 2 の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロッカープローブであり、伸長不可能なブロッカー部分及び少なくとも 1 つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ、

(i v) 検出用プローブ、並びに

(v) 第 1 の対立遺伝子多型の 3 ' 側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマー

を組み合わせることにより反応混合物を形成するステップと、

(b) 遺伝子座特異的プライマー及び対立遺伝子特異的プライマーを用いて反応混合物に対して増幅反応を実行して単位複製配列を形成するステップと、

(c) 検出用プローブの検出可能な特性の変化を検出することにより単位複製配列を検出し、これにより、核酸試料中の標的遺伝子の第 1 の対立遺伝子多型を検出するステップと

を含む方法。

【請求項 2】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも 1 つの核酸修飾のうちの 1 つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも 1 つの核酸修飾のうちの 1 つが、対立遺伝子特異的プライマーの 5 ' 端及び / 又は 3 ' 端に配置される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対立遺伝子特異的プライマーが、2 つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

対立遺伝子特異的プライマー内の核酸修飾が、ロックド核酸 (L N A)、ペプチド核酸 (P N A)、トレオース核酸 (T N A)、ジップ核酸 (Z N A)、トリアゾール核酸 (T z N A)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の少なくとも 1 つの核酸修飾のうちの 1 つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の少なくとも 1 つの核酸修飾のうちの 1 つが、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の内部位置に配置される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、2 つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の核酸修飾が、ロックド核酸 (L N A)、ペプチド核酸 (P N A)、トレオース核酸 (T N A)、ジップ核酸 (Z N A)、トリアゾール

10

20

30

40

50

核酸 (T z N A)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

伸長不可能なブロッカー部分が、ポリメラーゼによる 3' 端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの 3' 端への修飾を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい C₁ ~ C_{2,4} アルキルジオール、置換されていてもよい C₂ ~ C_{2,4} アルケニルジオール、置換されていてもよい C₂ ~ C_{2,4} アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 12】

伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブへの 3' - ヘキサンジオール修飾を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

検出用プローブが、タックマン (T a q M a n) (登録商標) プローブを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

核酸試料が、血液、血清、血漿、微細針吸引物、腫瘍組織、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 15】

第 1 の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第 2 の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

増幅反応の間の第 2 の対立遺伝子多型のバックグラウンドシグナルを低減する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

(a) 核酸分子、
 (b) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、少なくとも 1 つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、
 (c) 第 2 の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、伸長不可能なブロッカー部分及び少なくとも 1 つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ、
 (d) 検出用プローブ、並びに
 (e) 第 1 の対立遺伝子多型の 3' 側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーを含む反応混合物。

30

【請求項 18】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも 1 つの核酸修飾のうちの 1 つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項 17 に記載の反応混合物。

40

【請求項 19】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも 1 つの核酸修飾のうちの 1 つが、対立遺伝子特異的プライマーの 5' 端及び / 又は 3' 端に配置される、請求項 17 又は 18 に記載の反応混合物。

【請求項 20】

対立遺伝子特異的プライマーが、2 つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項 21】

対立遺伝子特異的プライマー内の核酸修飾が、ロックド核酸 (L N A)、ペプチド核酸

50

(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項17~20のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項22】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の少なくとも1つの核酸修飾のうちの1つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項17~21のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項23】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の少なくとも1つの核酸修飾のうちの1つが、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の内部位置に配置される、請求項17~22のいずれか一項に記載の反応混合物。

10

【請求項24】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項17~23のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項25】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項17~24のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項26】

伸長不可能なブロッカー部分が、ポリメラーゼによる3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの3'端への修飾を含む、請求項17~25のいずれか一項に記載の反応混合物。

20

【請求項27】

伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項17~26のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項28】

伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブへの3'-ヘキサンジオール修飾を含む、請求項17~27のいずれか一項に記載の反応混合物。

30

【請求項29】

検出用プローブが、タックマン(登録商標)プローブを含む、請求項17~28のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項30】

核酸分子が、血液、血清、血漿、微細針吸引物、腫瘍組織、及びこれらの組合せからなる群から選択される試料から得られる、請求項17~29のいずれか一項に記載の反応混合物。

【請求項31】

第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である、請求項17~30のいずれか一項に記載の反応混合物。

40

【請求項32】

(a) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、少なくとも1つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、並びに

(b) 第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、伸長不可能なブロッカー部分及び少なくとも1つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブを含む組成物。

【請求項33】

50

(c) 検出用プローブ、及び/又は(d)第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーをさらに含む、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも1つの核酸修飾のうちの1つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項32又は33に記載の組成物。

【請求項35】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも1つの核酸修飾のうちの1つが、対立遺伝子特異的プライマーの5'端及び/又は3'端に配置される、請求項32～34のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項36】

対立遺伝子特異的プライマーが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項32～35のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項37】

対立遺伝子特異的プライマー内の核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項32～36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項38】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の少なくとも1つの核酸修飾のうちの1つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項32～37のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項39】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の少なくとも1つの核酸修飾のうちの1つが、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の内部位置に配置される、請求項32～38のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項40】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項32～39のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項41】

対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項32～40のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項42】

伸長不可能なブロッカー部分が、ポリメラーゼによる3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの3'端への修飾を含む、請求項32～41のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項43】

伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項32～42のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項44】

伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブへの3'-ヘキサンジオール修飾を含む、請求項32～43のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項45】

第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である、請求項32～44のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項46】

50

2つ以上の容器のうちの一つに独立に分配された以下の構成要素

(a) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、少なくとも一つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、並びに

(b) 第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、伸長不可能なブロック部分及び少なくとも一つの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロックプローブ

を含む2つ以上の容器を含むキット。

【請求項47】

(c) 検出用プローブ、及び/又は(d)第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーをさらに含む、請求項46に記載のキット。

10

【請求項48】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも一つの核酸修飾のうちの一つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項46又は47に記載のキット。

【請求項49】

対立遺伝子特異的プライマー内の少なくとも一つの核酸修飾のうちの一つが、対立遺伝子特異的プライマーの5'端及び/又は3'端に配置される、請求項46~48のいずれか一項に記載のキット。

【請求項50】

対立遺伝子特異的プライマーが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項46~49のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項51】

対立遺伝子特異的プライマー内の核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項46~50のいずれか一項に記載のキット。

【請求項52】

対立遺伝子特異的ブロックプローブ内の少なくとも一つの核酸修飾のうちの一つが、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される、請求項46~51のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項53】

対立遺伝子特異的ブロックプローブ内の少なくとも一つの核酸修飾のうちの一つが、対立遺伝子特異的ブロックプローブ内の内部位置に配置される、請求項46~52のいずれか一項に記載のキット。

【請求項54】

対立遺伝子特異的ブロックプローブが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む、請求項46~53のいずれか一項に記載のキット。

【請求項55】

対立遺伝子特異的ブロックプローブ内の核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項46~54のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項56】

伸長不可能なブロック部分が、ポリメラーゼによる3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロックプローブの3'端への修飾を含む、請求項46~55のいずれか一項に記載のキット。

【請求項57】

伸長不可能なブロック部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~

50

C₂₄ アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 46 ~ 56 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 58】

伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープロブへの 3' - ヘキサンジオール修飾を含む、請求項 46 ~ 57 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 59】

第 1 の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第 2 の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である、請求項 46 ~ 58 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 60】

標的配列の第 2 の対立遺伝子多型を有することが疑われる核酸試料中で、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型を検出又は定量化するための、対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロッカープロブの使用のための指示書をさらに含む、請求項 46 ~ 59 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[関連出願の相互参照]

[0001] 本出願は、それらの開示が全ての目的についてそれらの全体において参照により本明細書に組み込まれる、2011年8月18日に出願された米国特許仮出願第61/525,137号、及び2012年1月18日に出願された米国特許仮出願第61/588,151号の優先権を主張する。

【0002】

[発明の背景]

[0002] 一塩基多型 (SNP) は、ヒトゲノムにおける遺伝子多様性の最も一般的なタイプであり、ヒトゲノム DNA 内の 1,000 ヌクレオチド中に約 1 つ以下の SNP の頻度で生じる (Kwok, Ann. Rev. Genom. Hum. Genet., 2: 235 ~ 258 (2001))。SNP は、遺伝子障害、異なる疾患への感受性、薬物に対する有害反応への素因に関与しており、法医学的探索において用いられている。したがって、SNP (又は希少な突然変異) の検出は、血液中の循環腫瘍細胞の検出など、早期疾患の診断において大きな可能性をもたらす。出産前診断法のほか、混合細胞集団内での疾患に関連する突然変異の検出にも大きな可能性をもたらす。

【0003】

[0003] SNP 遺伝子型決定のための多数の手法が、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、又は DNA ポリメラーゼを伴う方法に基づき開発されている (Chenら、Pharmacogenomics J., 3: 77 ~ 96 (2003))。例えば、対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (AS-PCR) は、DNA 配列の変異を検出するために広く用いられている戦略である (Wuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2757 ~ 2760 (1989))。その名称が含意する通り、AS-PCR とは、プライマーの一方又は両方を配列変異の部位にアニールするようにデザインする PCR ベースの方法であり、これにより、同じ遺伝子の異なる対立遺伝子を区別する能力がもたらされる。AS-PCR は、マッチした 3' 側塩基を有するプライマーの 100 ~ 100,000 分の 1 とはるかに低い効率で mismatch した 3' 側塩基を有するプライマーを伸長させる DNA ポリメラーゼの忠実性を利用する (Chenら、Pharmacogenomics J., 3: 77 ~ 96 (2003))。mismatch したプライマーを伸長させることが困難である結果として、PCR 増幅は減弱し、これは容易に検出することができる。

【0004】

[0004] しかし、AS-PCR の特異性及び選択性は、PCR の指数関数的増幅の性質に大部分が依存し、このために、対立遺伝子識別力の減衰は急速となる。プライマーを、特異的な変異体にマッチして、この変異体だけを選択的に増幅するようにデザインしても、

10

20

30

40

50

実際には、著しいミスマッチ増幅の生じることが多い。さらに、AS-PCRの対立遺伝子多型を区別する能力は、突然変異の種類又は突然変異若しくはSNPの周囲の配列(Ayyadevaraら、Anal. Biochem.、284:11~18(2000))、試料中に存在する対立遺伝子多型の量のほか、代替的な対立遺伝子間の比に影響される可能性がある。まとめると、これらの因子は、偽陽性結果の頻繁な出現の一因となることが多く、多くの研究者に、AS-PCRの信頼性を増大させようと試みることを促している(Orouら、Hum. Mut.、6:163~169(1995); Imyanitovら、Biotechniques、33:484~490(2002); McKinnieら、Mut. Res.、517:209~220(2002); Latorraら、Hum. Mut.、22:79~85(2003))。

10

【0005】

[0005]対立遺伝子多型を識別するために用いられるプローブハイブリダイゼーション法を伴う別の技法は、タックマン(TaqMan)(登録商標)遺伝子型決定である。しかし、AS-PCRと同様に、この方法を用いる選択性は限定されたものであり、混合試料中の希少な(1,000のうち1つの)対立遺伝子又は突然変異を検出するには適さない。

【0006】

[0006]したがって、当技術分野では、野生型対立遺伝子のバックグラウンドに対する単一点の置換(例えば、SNP)、挿入、又は欠失を、1000倍以上の感度及び特異性で検出するための、改善された組成物及び方法が必要とされている。本発明は、この必要を満たし、関連する利点ももたらす。

20

【0007】**[発明の概要]**

[0007]本発明は、異なる対立遺伝子の間で配列の変異を識別するための組成物、方法、及びキットを提供する。より詳細には、一部の実施形態では、本発明は、一塩基多型(SNP)、又はヌクレオチドの挿入若しくは欠失など、希少な(例えば、突然変異体の)対立遺伝子多型の存在及び/又はレベルを、豊富な(例えば、野生型の)対立遺伝子多型を含む試料中で、高い感度及び/又は特異性によって決定する(例えば、定量化する)ための組成物、方法、及びキットを提供する。したがって、特定の実施形態では、本発明は、体細胞突然変異を、例えば、極めて低レベルの突然変異体対立遺伝子と比較して高レベルの野生型対立遺伝子を含む試料中で検出するための、高度に選択的な方法を提供する。

30

【0008】

[0008]一態様では、本発明は、核酸試料中の対立遺伝子多型の同定及び/又は定量化において用いられる組成物を提供する。特定の実施形態では、本発明の組成物が、(a)対立遺伝子特異的プライマー、(b)対立遺伝子特異的ブロッカープローブ、(c)検出用プローブ、及び/又は(d)遺伝子座特異的プライマーのうちの一つ、二つ、三つ以上を含みうる。

【0009】

[0009]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、標的特異的部分と、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分とを含む。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、テールをさらに含みうる。一部の例示的な実施形態では、テールが、対立遺伝子特異的プライマーの5'端に配置される。他の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーのテールで、グアニン残基及びシトシン残基が反復される(「GCに富む」)。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー全体の融解温度(「Tm」)が、約50~約67の範囲である。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー濃度が、約20~900nMの間である。

40

【0010】

[0010]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、3'末端に配置される。非限定的な例として述べると、「A」が突然変異体

50

対立遺伝子である多型部位を検出及び/又は定量化する場合は、「T」が、対立遺伝子特異的プライマーの3'側の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる。別の非限定的な例として述べると、「G」が突然変異体対立遺伝子である多型部位を検出及び/又は定量化する場合は、「C」が、対立遺伝子特異的プライマーの3'側の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる。

【0011】

[0011]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープロープが、3'末端において伸長不可能なブロッカー部分を含む。ブロッカー部分は、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチド配列の3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、オリゴヌクレオチドのリボース環3'-OHの任意の修飾を含みうる。一部の例示的な実施形態では、限定なしに述べると、伸長不可能なブロッカー部分には、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオール、副溝結合剤(MGB)、アミン(NH₂)、ピオチン、PEG、PO₄、及びこれらの組合せが含まれる。好ましい実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)を含む。特定の場合には、対立遺伝子特異的ブロッカープロープの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープロープのブロッカー部分から、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15ヌクレオチドなど、約5~約15又は約5~約10ヌクレオチド隔てて配置される。他の特定の場合には、対立遺伝子特異的ブロッカープロープが、PCR増幅時において切断されない。さらなる場合には、対立遺伝子特異的ブロッカープロープのT_mが、約58~約66の範囲である。

10

20

【0012】

[0012]特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤(MGB)を含まないか、又はこれらを包含しない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、PO₄基を含まないか、又はこれらを包含しない。さらなる実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、又は置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオールから本質的になるか、又はこれらからなる。

30

【0013】

[0013]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーが、少なくとも1、2、3、4、5、若しくは6つの(例えば、不連続な)塩基修飾、糖修飾、及び/又は骨格修飾を含む。特定の場合には、(1又は複数の)修飾によって、マッチした標的配列とミスマッチした標的配列とのT_m差を増大させ、及び/又はミスマッチプライミングの効率を低下させ、これによって、アッセイの特異性及び/又は選択性を改善することができる。このような修飾の非限定的な例には、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸、5'メチル-デオキシシチジン、2'-フルオロ、8-アザ-7-デアザ-dA(ppA)、8-アザ-7-デアザ-dG(ppG)、2'-デオキシシュードイソシチジン(イソdC)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(fdU)、及び2'-O、4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)修飾、及びこれらの修飾の組合せが含まれる。好ましい実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーにおいて存在する修飾が、1又は複数のLNA修飾を含む。特定の実施形態では、修飾が、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマー内の(a)3'端、(b)5'端、(c)内部位置、又は(a)、(b)、若しくは(c)の任意の組合せに配置される。一部の好ましい実施形態では、修飾残基のヌクレオシドが、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、修飾(例えば、LNA)が、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。他の好ましい実施形態では、修飾残基のヌクレオシドが、対

40

50

立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、修飾（例えば、LNA）が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。

【0014】

[0014] 一部の実施形態では、検出用プローブが、配列ベースの検出用プローブ又は遺伝子座特異的検出用プローブを含む。他の実施形態では、検出用プローブが、5'ヌクレアーゼプローブを含む。一部の例示的な実施形態では、検出用プローブが、MGB部分、レポーター部分（例えば、FAM（商標）、TET（商標）、JOE（商標）、VIC（商標）、又はサイバー（SYBR）（登録商標）グリーン（Green）、消光剤部分（例えば、ブラックホールクエンチャー（Black Hole Quencher）（商標）又はTAMRA（商標））、及び/又はパッシブリファレンス（例えば、ROX（商標））を含む。一部の実施形態では、検出用プローブが、その開示が参照によってその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,727,356号において記載される方法及び原理に従ってデザインされる。特定の実施形態では、検出用プローブが、タックマン（登録商標）プローブ（Applied Biosystems、Foster City、CA）を含む。

10

【0015】

[0015] 一部の実施形態では、本発明の組成物が、ポリメラーゼ；デオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTP）；増幅に適する他の試薬及び/若しくは緩衝液；並びに/又は鋳型配列若しくは核酸試料をさらに含む。一部の実施形態では、ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼでありうる。一部の他の実施形態では、ポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼなど、熱安定性でありうる。他の実施形態では、鋳型配列又は核酸試料が、ゲノムDNA（gDNA）又は相補的DNA（cDNA）などのDNAでありうる。他の実施形態では、鋳型配列又は核酸試料が、メッセンジャーRNA（mRNA）などのRNAでありうる。

20

【0016】

[0016] 別の態様では、本発明は、対立遺伝子特異的配列を増幅するための方法を提供する。これらの方法のうちの一部は、（a）対立遺伝子特異的プライマーを、第1の対立遺伝子（対立遺伝子1）を含む第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップ、（b）対立遺伝子特異的ブロッカープローブを、第2の対立遺伝子（対立遺伝子2）を含む第2の核酸分子とハイブリダイズさせるステップであって、対立遺伝子2が、対立遺伝子1と同じ遺伝子座に対応するステップ、（c）検出用プローブを、第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップ、（d）遺伝子座特異的プライマーを、対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物とハイブリダイズさせるステップ、及び（e）対立遺伝子1を含む第1の核酸分子をPCR増幅するステップのうちの一部又は複数を含む。

30

【0017】

[0017] さらに別の態様では、本発明は、他の対立遺伝子を含むプールされた試料中又は混合試料中で、対立遺伝子多型を検出及び/又は定量化するための方法を提供する。これらの方法のうちの一部は、（a）第1の対立遺伝子特異的プライマーを、第1の反応混合物中の、第1の対立遺伝子（対立遺伝子1）を含む第1の核酸分子とハイブリダイズさせ、第2の対立遺伝子特異的プライマーを、第2の反応混合物中の、第2の対立遺伝子（対立遺伝子2）を含む第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップであって、対立遺伝子2が、対立遺伝子1と同じ遺伝子座に対応するステップ、（b）第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブを、第1の反応混合物中の、対立遺伝子2を含む第2の核酸分子とハイブリダイズさせ、第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブを、第2の反応混合物中の、対立遺伝子1を含む第2の核酸分子とハイブリダイズさせるステップ、（c）第1の検出用プローブを、第1の反応混合物中の、第1の核酸分子とハイブリダイズさせ、第2の検出用プローブを、第2の反応混合物中の、第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップ、（d）第1の遺伝子座特異的プライマーを、第1の反応混合物中の、第1の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物とハイブリダイズさせ、第2の遺伝子座特異的プラ

40

50

イマーを、第2の反応混合物中の、第2の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物とハイブリダイズさせるステップ、(e)第1の核酸分子をPCR増幅して、単位複製配列の第1のセット又は試料を形成し、第2の核酸分子をPCR増幅して、単位複製配列の第2のセット又は試料を形成するステップ、並びに(f)単位複製配列の第1のセットを、単位複製配列の第2のセットと比較して、対立遺伝子2を含む試料中の対立遺伝子1及び/又は対立遺伝子1を含む試料中の対立遺伝子2を定量化するステップのうちの1又は複数を含みうる。

【0018】

[0018]一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーが、標的特異的部分と、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分とを含む。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーが、テールをさらに含みうる。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマー全体の T_m が、約50 ~ 約67の範囲である。場合によって、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーの濃度は、約20 ~ 900 nMの間である。

10

【0019】

[0019]一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分と、第2の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分とが、同じ配列を含む。他の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分と、第2の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分とが同じ配列である。

20

【0020】

[0020]一部の実施形態では、テールが、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーの5'端に配置される。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールと、第2の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールとが、同じ配列を含む。他の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールと、第2の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールとが、同じ配列である。他の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーのテール及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーのテールが、GCに富む。

【0021】

[0021]一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、SNPの第1の対立遺伝子(対立遺伝子1)に特異的であり、第2の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、同じSNPの第2の対立遺伝子(対立遺伝子2)に特異的である。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、3'末端に配置される。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の選択が、識別性の高い塩基の使用を伴う。

30

【0022】

[0022]他の特定の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、伸長不可能なブロッカー部分を3'末端において独立に含む。ブロッカー部分は、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチド配列の3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、オリゴヌクレオチドのリボース環3'-OHの任意の修飾を含みうる。例示的な実施形態では、限定なしに述べると、伸長不可能なブロッカー部分には、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオール、副溝結合剤(MGB)、アミン(NH_2)、ピオチン、PEG、 PO_4 、及びこれらの組合せが含まれる。好ましい実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)を含む。特定の場場合には、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ

40

50

の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープのブロッカー部分から約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15ヌクレオチドなど、約5～約15又は約5～約10ヌクレオチド隔てて配置される。他の特定の場合には、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープが、PCR増幅時において切断されない。さらなる場合には、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープの T_m が、約58～約66の範囲である。

【0023】

[0023] 特定の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内の伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤(MGB)及び/又は PO_4 基を含まないか、又はこれらを包含しない。他の特定の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内の伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオールから本質的になるか、又はこれらからなる。

【0024】

[0024] 一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/若しくは第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ並びに/又は第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/若しくは第2の対立遺伝子特異的プライマーが、少なくとも1つの核酸修飾を含む。一部の実施形態では、(1又は複数の)修飾により、マッチした標的配列と mismatchesした標的配列との T_m 差を増大させ、及び/又は mismatchesプライミングの効率を低下させ、これにより、アッセイの特異性及び/又は選択性を改善することができる。限定なしに述べると、このような(1又は複数の)修飾の例には、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、及びトリアゾール核酸($TzNA$)など、本明細書に記載される修飾塩基、核酸類似体、及びリボース修飾核酸が含まれる。特定の実施形態では、1又は複数の(例えば、2～6つの、又は2、3、4、5、又は6つの)LNAなどの核酸修飾が、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーにおいて存在する。好ましい実施形態では、プロープ又はプライマーにおける複数の修飾が、不連続又は非隣接である、例えば、2つのLNAなどの修飾が、プロープ配列内又はプライマー配列内で互いと隣り合わない。特定の実施形態では、(1又は複数の)核酸修飾が、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内及び/若しくは第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内並びに/又は第1の対立遺伝子特異的プライマー内及び/若しくは第2の対立遺伝子特異的プライマー内の(a)3'端、(b)5'端、(c)内部位置、又は(a)、(b)、若しくは(c)の任意の組合せに配置される。一部の好ましい実施形態では、1つの修飾(例えば、LNA)が、この修飾が、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。他の好ましい実施形態では、1つの修飾(例えば、LNA)が、この修飾が、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。

【0025】

[0025] 一部の実施形態では、対立遺伝子識別の特異性を、第1の対立遺伝子特異的プライマー内及び/若しくは第2の対立遺伝子特異的プライマー内並びに/又は第1の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内及び/若しくは第2の対立遺伝子特異的ブロッカープロープ内に核酸修飾を含めることによって、非修飾の対立遺伝子特異的プライマープロープ又は対立遺伝子特異的ブロッカープロープの使用と比較して改善する。一部の実施形態では、特異性の改善が、少なくとも約2倍(例えば、少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍

10

20

30

40

50

、10倍、15倍、20倍など)である。

【0026】

[0026]他の実施形態では、対立遺伝子識別の特異性が、Morlanら、PLOS ONE、4:e4584(2009)において記載されるブロック試薬(ASB-PCR)法による対立遺伝子特異的PCRを用いる対立遺伝子識別の特異性の、少なくとも約2倍(例えば、少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍など)である。

【0027】

[0027]一部の実施形態では、方法が、2段階のサイクリングプロトコルをさらに含む。一部の実施形態では、2段階のサイクリングプロトコルの第1段階におけるサイクル数が、第2段階において用いられるサイクル数より少ないサイクルを含む。他の実施形態では、第1段階におけるサイクル数が、第2段階におけるサイクル数より約90%少ないサイクルである。さらに他の実施形態では、第1段階におけるサイクル数が、3~7サイクルの間であり、第2段階におけるサイクル数が、42~48サイクルの間である。

10

【0028】

[0028]一部の実施形態では、2段階のサイクリングプロトコルの第1のサイクリング段階において用いられるアニーリング温度/伸長温度が、第2段階において用いられるアニーリング温度/伸長温度より約1~3の間低い。特定の実施形態では、2段階のサイクリングプロトコルの第1のサイクリング段階において用いられるアニーリング温度/伸長温度が、56~59の間であり、第2段階において用いられるアニーリング温度/伸長温度が、60~62の間である。

20

【0029】

[0029]一部の実施形態では、方法が、前増幅ステップをさらに含む。特定の実施形態では、前増幅ステップが、対立遺伝子特異的プライマー及び遺伝子座特異的プライマーの少なくとも2つの完全なセットであって、各セットが、対象の特異的なポリヌクレオチドを増幅するのに適するか又は作動的なセットを用いるマルチプレックスの増幅反応を含む。他の実施形態では、マルチプレックスの増幅反応の産物が、副次的なシングルプレックスの増幅反応であって、各シングルプレックスの反応が、マルチプレックスの反応において既に用いられた少なくとも1つのプライマーセットを含有する反応に分けられる。さらに他の実施形態では、マルチプレックスの増幅反応が、複数の対立遺伝子特異的ブロッカープローブをさらに含む。一部の実施形態では、マルチプレックスの増幅反応が、反応を増幅の直線相内に保つのに適する多数のサイクルにわたり実行される。

30

【0030】

[0030]一部の実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが同じである。一部の実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが異なる。一部の実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが、配列ベースの検出用プローブ又は遺伝子座特異的検出用プローブである。他の実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが、5'ヌクレアーゼプローブである。一部の例示的な実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが、MGB部分、レポーター部分(例えば、FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、VIC(商標)、又はサイバー(登録商標)グリーン)、消光剤部分(例えば、ブラックホールクエンチャー(商標)又はTAMRA(商標))、及び/又はパッシブリファレンス(例えば、ROX(商標))を含む。一部の実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが、その開示が参照によってその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第6,727,356号において記載される方法及び原理に従ってデザインされる。詳細な実施形態では、第1の検出用プローブ及び/又は第2の検出用プローブが、タックマン(登録商標)プローブ(Applied Biosystems、Foster City、CA)を含む。

40

【0031】

[0031]一部の実施形態では、第1の遺伝子座特異的プライマーと、第2の遺伝子座特異

50

的プライマーとが、同じ配列を含む。一部の実施形態では、第1の遺伝子座特異的プライマーと、第2の遺伝子座特異的プライマーとが、同じ配列である。

【0032】

[0032]一部の実施形態では、第1の反応混合物及び/又は第2の反応混合物が、ポリメラーゼ；dNTP；他のPCR増幅に適する試薬及び/若しくは緩衝液；並びに/又は鑄型配列若しくは核酸試料をさらに含みうる。一部の実施形態では、ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼでありうる。一部の実施形態では、ポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼなど、熱安定性でありうる。一部の実施形態では、鑄型配列又は核酸試料が、gDNA又はcDNAなどのDNAでありうる。他の実施形態では、鑄型配列又は核酸試料は、mRNAなどのRNAでありうる。

10

【0033】

[0033]一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、第2の対立遺伝子特異的プライマーと同じ鎖又は配列に結合するのに対し、第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブは、第1の対立遺伝子特異的プライマーと同じ鎖又は配列に結合する。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブを用いて、第2の対立遺伝子及び/又は第1の対立遺伝子のそれぞれから発生するバックグラウンドシグナルの量を低減する。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び/又は第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが伸長不可能であり、第2の対立遺伝子又は第1の対立遺伝子のそれぞれへと優先的にアニールし、これによって、例えば、伸長可能な第1の対立遺伝子特異的プライマーの第2の対立遺伝子へのアニーリング、及び/又は伸長可能な第2の対立遺伝子特異的プライマーの第1の対立遺伝子へのアニーリングをブロックする。

20

【0034】

[0034]一部の例示的な実施形態では、第1の対立遺伝子が、希少な（例えば、低頻度の）対立遺伝子又は突然変異体対立遺伝子である。他の例示的な実施形態では、第2の対立遺伝子が、豊富な（例えば、高頻度の）対立遺伝子又は野生型対立遺伝子である。

【0035】

[0035]別の態様では、本発明は、第2の対立遺伝子多型を含む試料中で、第1の対立遺伝子多型を検出又は定量化するためのキットであって、(a)第1の対立遺伝子特異的プライマー、(b)第2の対立遺伝子特異的プライマー、(c)第1の遺伝子座特異的プライマー、(d)第2の遺伝子座特異的プライマー、(e)第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ、(f)第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ、(g)第1の遺伝子座特異的検出用プローブ、及び(h)第2の遺伝子座特異的検出用プローブのうち1又は複数を含むキットを提供する。

30

【0036】

[0036]一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーが、標的特異的部分と、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分とを含む。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーが、テールをさらに含みうる。本発明のキット内の第1の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は第2の対立遺伝子特異的プライマーに関する他の実施形態は、上記に記載されている。

40

【0037】

[0037]一部の実施形態では、本発明の組成物、方法、及びキットが、対立遺伝子の識別における高度な特異性及び選択性を提供する。一部の実施形態では、特異性及び/又は選択性の定量的な決定が、単位複製配列（アンプリコン）の第1のセットと単位複製配列の第2のセットとの間のCt値の比較を含む。一部の実施形態では、選択性が、別の1又は複数の対立遺伝子の約100万のコピー中で、所与の対立遺伝子の単一のコピーが検出されるレベルにある。

【0038】

[0038]特定の実施形態では、本発明の組成物、方法、及びキットが、以下の構成要素（

50

a) 識別塩基の位置において、ロックド核酸 (LNA) などの核酸修飾を含む対立遺伝子特異的プライマー (例えば、多型部位において 3' 端の LNA を含有する対立遺伝子特異的プライマー)、(b) 3' 末端において、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール (例えば、ヘキサンジオール) 修飾などの伸長不可能なブロッカー部分を含み、且つ、識別塩基の位置において、ロックド核酸 (LNA) などの核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ (例えば、3' 端において、ヘキサンジオール化学基を含有し、且つ、例えば、ブロッカープローブの中央部のブロッキング部分から約 5 ~ 15 (例えば、約 10) ヌクレオチド離れた位置にある多型部位において、単一の LNA を含有するブロッカーオリゴヌクレオチド)、(c) タックマン (登録商標) プローブ (例えば、タックマン (登録商標) MGB FAM プローブ) などの検出用プローブ、及び (d) リバースプライマーなどの遺伝子座特異的プライマーのうちの一つ、二つ、三つ以上を用いて、対立遺伝子多型の検出及び識別の改善を提供する。特定の場合には、ブロッカー部分が、ホスホルアミダイト連結を介して対立遺伝子特異的ブロッカーオリゴヌクレオチド配列の 3' 端へとコンジュゲートされた $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール (例えば、ヘキサンジオール) を含む。他の特定の場合には、当業者に知られる任意の種類のリアルタイム PCR 装置を用いるが、本発明のアッセイ法は、ABI 7900HT リアルタイム PCR インストゥルメント (ABI 7900HT Real Time PCR Instrument) で実施される。特定の実施形態では、反応特徴が、以下：段階 1：95.0 で 10：00 分間；段階 2：40 回にわたる反復：95.0 で 0：20 分間、60.0 で 0：45 分間を含む。

10

20

【0039】

[0039] 以下の詳細な説明及び図面から、当業者には本発明の他の目的、特色、及び利点が明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図 1】 [0040] 本発明の体細胞突然変異検出アッセイの一実施形態を描示する図である。

【図 2】 [0041] 3' 端においてロックド核酸 (LNA) 修飾 (「G12S ASP-LNA」における「+A」) を含む対立遺伝子特異的プライマー、並びにオリゴヌクレオチド配列の中央部における LNA 修飾 (「G12S ブロッカー-LNA」における「+G」) 及び 3' - ヘキサンジオール修飾 (「G12S ブロッカー-LNA」における「C6」) を含む対立遺伝子特異的プライマーの使用によって、KRAS G12S SNP における対立遺伝子多型の識別が改善されることを例示する図である。

30

【図 3】 [0042] 3' 端における LNA 修飾 (「G12R ASP-LNA」における「+C」) を含む対立遺伝子特異的プライマー、並びにオリゴヌクレオチド配列の中央部における LNA 修飾 (「G12R ブロッカー-LNA」における「+G」) 及び 3' - ヘキサンジオール修飾 (「G12R ブロッカー-LNA」における「C6」) を含む対立遺伝子特異的プライマーの使用によって、KRAS G12R SNP における対立遺伝子多型の識別が改善されることを例示する図である。

【図 4】 [0043] 3' 端における LNA 修飾 (「H1047R ASP-LNA」における「+G」) を含む対立遺伝子特異的プライマー、並びにオリゴヌクレオチド配列の中央部における LNA 修飾 (「H1047R ブロッカー-LNA」における「+A」) 及び 3' - ヘキサンジオール修飾 (「H1047R ブロッカー-LNA」における「C6」) を含む対立遺伝子特異的プライマーの使用によって、PIK3CA H1047R SNP における対立遺伝子多型の識別が改善されることを例示する図である。

40

【図 5】 [0044] 本発明の LNA で修飾された対立遺伝子特異的プライマー及びプローブを用いる、EGFR T790M 多型部位における対立遺伝子多型の識別の改善を例示する図である。

【図 6】 [0045] 本発明の LNA で修飾された対立遺伝子特異的プライマー及びプローブを用いる、EGFR L858R 多型部位における対立遺伝子多型の識別の改善を例示する図である。

50

【図7】[0046]全血液に由来する豊富な量の野生型DNAの、H1047R陽性KPL4細胞におけるPIK3CA H1047R変異体対立遺伝子の検出の干渉に対する作用を例示する図である。

【図8】[0047]全血液に由来する豊富な量の野生型DNAの、G12R陽性PSN1細胞におけるKRAS G12R変異体対立遺伝子の検出の干渉に対する作用を例示する図である。

【図9】[0048]150例のCRC組織試料のスクリーニングによって、陰性試料からの干渉は観察されず、弱いシグナルの検出を滴定によって検証しうることが明示されたことを示す図である。

【図10】[0049]DxS/Qiagen製のスコルピオン(Scorpion)アッセイが、SW1116(G12A陽性)細胞の希釈系列でスパイクされた全血液の混合物中の、1000個の細胞を検出しうるに過ぎないことを示す図である。

【図11】[0050]Inostics製のビーミング(BEAMing)アッセイが、不正確な判定を下し、突然変異体試料15例中14例を野生型の試料として同定したことを例示する図である。

【図12】[0051]本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイが、全血液混合物中に50~100個という低量の陽性細胞のシグナルも検出可能であったことを例示する図である。

【図13】[0052]本発明の例示的な実施形態であって、本明細書に記載される方法を用いて、希少な対立遺伝子は選択的に増幅されるが、野生型対立遺伝子は選択的に増幅されない実施形態を例示する図である。LNA修飾(図13におけるC)及びヘキサンジオール修飾を伴うブロッカープローブが野生型対立遺伝子とハイブリダイズするために、野生型対立遺伝子は増幅産物を産生せず、これによって、リアルタイムPCR増幅が妨害される。LNA修飾(図13におけるT)を伴う対立遺伝子特異的プライマーは、ブロッカープローブではなく、突然変異体対立遺伝子と好んでハイブリダイズし、これにより、リアルタイムPCRによる増幅産物の産生を容易にする。

【図14】[0053]これもまた、対立遺伝子特異的プライマーが、野生型(陰性対照)対立遺伝子及び突然変異体(陽性対照)対立遺伝子の両方を増幅しうることを示す図である。増幅プロットは、対立遺伝子特異的LNAプライマーによるアッセイが高感度であることを例示する。LNAを伴うプライマーは、突然変異体の対立遺伝子多型を選択的に増幅する。

【図15】[0054]対立遺伝子特異的プライマーに戦略的に配置されたLNA修飾によって、増幅が改善され、Ct値が低下することを示す図である。アッセイの性能は、複数のLNAの使用によって改善されうる。

【図16】[0055]対立遺伝子特異的プライマーにLNA修飾を3つ以上連続で配置すると、増幅産物が産生されないことを示す図である。

【図17】[0056]本発明で用いる例示的なLNA分子及び他の修飾LNAを示す図である。本発明の対立遺伝子特異的プライマーは、2つ~6つのLNAを含みうる。

【図18】[0057]例示的なPNA-DNA二重鎖(左)及びPNA修飾(図18におけるT;右)を伴う例示的な対立遺伝子特異的プライマーを示す図である。

【図19】[0058]例示的なTNAを含有するオリゴヌクレオチド(左)及びTNA修飾(図19におけるT;右)を伴う例示的な対立遺伝子特異的プライマーを示す図である。

【図20】[0059]例示的なZNAオリゴヌクレオチド(左)及び例示的なZNA修飾(右;図20におけるT)された対立遺伝子特異的プライマーを示す図である。

【図21】[0060]例示的なTzDNA分子(左)及びTzDNA修飾(右;図21におけるT)を伴う例示的な対立遺伝子特異的プライマーを示す図である。

【図22】[0061]本発明のG12AKRASアッセイのための例示的なブロッカープローブを例示する図である。ブロッカープローブ(オリゴヌクレオチド)は、野生型対立遺伝子とハイブリダイズし、対立遺伝子多型の増幅に影響を及ぼすことなしに、とりわけ夾雑する野生型のゲノムDNAの増幅を効率的且つ選択的に阻害するようにデザインする。

10

20

30

40

50

【図23】[0062] LNAプライマーとヘキサジオールを伴うブロッカープローブとを含むKRAS G12Aアッセイによって、対立遺伝子多型(A)が特異的に増幅され、野生型対立遺伝子(G)の増幅が阻害されたことを例示する図である。アッセイの選択性は、対立遺伝子特異的プライマーにおけるLNAの存在と組み合わせたブロッカーの使用により改善される。

【図24】[0063]ヘキサジオール修飾(3'炭素テール)を伴うブロッカープローブとリン酸基を伴うブロッカープローブとの比較を示す図である。ヘキサジオールを伴うブロッカープローブは、リン酸化されたブロッカーのCtである31.2と比較して、28.4という低いCtでより良好に機能した。

【図25】[0064]LNA修飾を伴うブロッカープローブのCt値が、LNAを伴わないブロッカープローブの場合と比較して低いことを示す図である。図25はまた、LNAを伴うブロッカープローブを使用する本発明の方法によって、突然変異体が効率的且つ選択的に増幅され、優れた対立遺伝子の識別が示されることも例示する。

【図26】[0065]LNAを含有する対立遺伝子特異的プライマー及びLNAを含有するブロッカープローブを用いる本発明の例示的な方法によって、突然変異体対立遺伝子に対する高度な特異性がもたらされ、特異的な増幅産物が産生されることを示す図である。図26はまた、野生型対立遺伝子が増幅されなかったことも示す。

【図27】[0066]同じ配列及び3'ヘキサジオール修飾を伴うが、ブロッカー配列におけるLNAの位置が異なる2つのブロッカープローブの間の融解温度差(Tm)及びCt値を示す図である。これは、ブロッカー配列内のLNAの位置が、アッセイの性能にどのように影響するかを例示する。対立遺伝子多型を有する塩基に配置されたLNAは、LNAが対立遺伝子多型ヌクレオチドから隔てて配置されたブロッカーと比較してCtを低下させることによって、アッセイの性能を改善する。

【図28】[0067]図28A:ブロッカープローブのTmの、アッセイの性能に対する影響を示す図である。図28B:また、LNAを伴わないブロッカーのTm及びCt値と、2つのLNAを伴うブロッカーのTm及びCt値との差も示す図である。LNAが存在するためにTmが上昇する結果として、本発明のアッセイの感度及び選択性が改善される。Tmが高ければ、ブロッカープローブは、伸長時において、その標的へのアニーリングを維持し、これによって、野生型対立遺伝子が増幅に干渉することを効率的にブロッキングし、変異体が優先的且つ選択的に増幅されることを可能とする。2つのLNAを付加したところ、同じブロッカー配列のTmが、59.9から68へと上昇した。

【図29】[0068]ブロッカープローブの対立遺伝子特異的ヌクレオチド位置に配置されたLNAを含め、6つの連続LNA修飾を配置したところ、PCRサイクリングにおける増幅が完全に停止したことを示す図である。

【図30】[0069]Ct値を用いて、アッセイの実行可能性及びその選択性を決定しうることを示す図である。LNAを含有するプライマー及びプローブによって得られるCt値の増大は、本発明のアッセイの実行可能性及び選択性を示す。

【図31】[0070]Ct値を、多様な体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイに由来するCt値からどのように計算するかを示す図である。LNAを含有するプライマー及びブロッカーによってデザインされた本図のアッセイAは、連続LNAを伴うプライマー及びプローブを含有する他のアッセイより良好に機能した。

【図32】[0071]未知の試料中に存在する突然変異体の百分率を定量化するための、本発明のPIK3CA E545Kアッセイの使用を例示する図である。図32A:PIK3CA E545K対立遺伝子多型及びMCF7細胞株についての検量線を示す図である。検量線は、本明細書に記載される方法を用いて創出した。図32B:結腸直腸がんを伴う患者に由来する2つの未知の試料(試料A及びB)及び陽性対照(MCF7細胞株)についての遺伝子型決定アッセイを用いて作成した増幅曲線を示す図である。図32C:演算子によって決定される、試料中に存在する突然変異体であるE545Kの量及び百分率(突然変異パーセント)を示す図である。

【図33】[0072]未知の試料中に存在する突然変異体の百分率を定量化するための、本発

10

20

30

40

50

明の K R A S G 1 2 D アッセイの使用を例示する図である。図 3 3 A : K R A S G 1 2 D 遺伝子型決定アッセイ及び L S 1 7 4 T 細胞株についての増幅プロット及び検量線を示す図である。図 3 3 B : 膵臓がんを伴う患者に由来する 2 つの未知の試料 (試料 A 及び B) 及び陽性対照 (L S 1 7 4 T 細胞株) について本発明の方法を用いて作成した増幅プロットを示す図である。図 3 3 C : 突然変異体を発現させる試料 A 中の D N A の量が、演算子を用いて、3 . 2 5 n g 又は陽性対照と比べて 9 . 6 % であると決定されることを示す図である。

【図 3 4】[0073] 未知の試料中に存在する突然変異体の百分率を定量化するための、本発明の E G F R E 7 4 6 - A 7 5 0 欠失 E G F アッセイの使用を例示する図である。図 3 4 A : H 1 6 5 0 細胞株の E G F R 遺伝子の E 7 4 6 - A 7 5 0 欠失についての増幅プロット及び検量線を示す図である。図 3 4 B : 肺がんを伴う患者に由来する未知の試料 (試料 A) 及び陽性対照 (H 1 6 5 0 細胞株) について本発明の方法を用いて作成した増幅プロットを示す図である。図 3 4 C : E G F R 欠失変異体を発現させる試料 A 中の D N A の量が、演算子を用いて、3 . 2 5 n g 又は陽性対照と比べて 9 . 6 % であると決定されることを示す図である。

【図 3 5】[0074] 未知の試料中に存在する対立遺伝子多型の百分率を定量化するための、本発明の V 6 0 0 E B R A F アッセイの使用を例示する図である。図 3 5 A : H T 2 9 細胞株の B R A F V 6 0 0 E 対立遺伝子多型についての増幅プロット及び検量線を示す図である。図 3 5 B : 肺がんを伴う患者に由来する未知の試料 (試料 A) 及び陽性対照 (H 1 6 5 0 細胞株) について本発明の方法を用いて作成した増幅プロットを示す図である。図 3 5 C : B R A F の V 6 0 0 E 変異体を発現させる試料 A 中の D N A の量が、0 . 1 8 n g 又は陽性対照と比べて 1 . 2 % と計算されたことを示す図である。

【図 3 6】[0075] H & E 染色された非小細胞肺がん (N S C L C) 腫瘍試料の凍結切片を示す図である。図 3 6 A : 高百分率の腫瘍細胞 (白色矢印は、腫瘍細胞を示す) を有する切片を示す図である。図 3 6 B : 腫瘍細胞 (白色矢印) と、血管 (黒色矢印) を伴う間質と、炎症性細胞 (例えば、リンパ球 ; 赤色矢印) と、マクロファージで満たされた肺胞 (緑色矢印) との混合物からなる切片を示す図である。

【図 3 7】[0076] 胃がん試料中又は膵臓がん試料中のサイトケラチン (C K) レベルと対立遺伝子多型の発現との関係を例示する図である。図 3 7 A : 胃がん試料 # 1、2、及び 4 では、C K レベルが高いが、E G F R T 7 9 0 M 対立遺伝子多型、K R A S G 1 2 V 対立遺伝子多型、K R A S Q 6 1 H 対立遺伝子多型、又は P I K 3 C A E 5 4 5 K 対立遺伝子多型についての突然変異パーセントが低いことを例示する図である。これらの結果は、試料 # 1、2、及び 4 中では、E G F R T 7 9 0 M S N P、K R A S G 1 2 V S N P、K R A S Q 6 1 H S N P、又は P I K 3 C A E 5 4 5 K S N P を保有する可能性が高い腫瘍細胞が少ないことを示す。しかし、試料 # 5 中では、C K レベルが高く、K R A S G 1 2 D 突然変異についての突然変異パーセントも高かった (例えば、9 0 %)。この結果は、試料 # 5 中の腫瘍細胞の大半が、G 1 3 D 突然変異を保有する可能性が高いことを示す。図 3 7 B : 膵臓がん試料 # 1 では、C K レベルが高く、K R A S G 1 2 D 変異体についての突然変異パーセントも高く (1 0 0 %)、これによって、腫瘍細胞の大半が、突然変異体対立遺伝子を保有する可能性が高いことが表示されることを示す図である。これに対し、膵臓がん試料 # 3 では、C K レベルは高いが、K R A S G 1 2 D S N P についての突然変異パーセントは低い (例えば、5 %)。少数の腫瘍細胞試料 # 3 は、G 1 2 D 突然変異を保有する可能性が高い。

【図 3 8】[0077] 本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ (例えば、K R A S G 1 2 A アッセイ) の感度を、L i f e T e c h n o l o g i e s 製のキャスト P C R (c a s t P C R) (商標) 突然変異アッセイと比較して例示する図である。図 3 8 A : 本発明の遺伝子型決定アッセイの増幅曲線を例示する図である。図 3 8 B : 同じ被験試料に対して実施された L i f e T e c h n o l o g i e s 製のキャスト P C R (商標) 突然変異アッセイの増幅曲線を例示する図である。図 3 8 C : 本発明のアッセイによって、被験試料の含有する陽性腫瘍細胞が 2 5 0 個という少数の場合にも、G 1 2 A 突然変異が検

10

20

30

40

50

出されたことを示す図である。比較により、Life Technologies製のキャストPCR（商標）突然変異アッセイを用いて突然変異を検出するためには、より大きな数の腫瘍細胞が必要とされた。

【図39】[0078]本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ（例えば、KRAS G12Aアッセイ）の感度を、Life Technologies製のキャストPCR（商標）突然変異アッセイと比較して例示する図である。図39A：本発明の遺伝子型決定アッセイを用いる被験試料の増幅曲線を示す図である。図39B：Life Technologies製のキャストPCR（商標）アッセイの増幅曲線を示す図である。図39C：本発明のアッセイでは、100個という少数の陽性腫瘍細胞中でもG12S KRAS対立遺伝子多型が検出されたのに対し、Life Technologies製のキャストPCR（商標）突然変異アッセイでは、検出が不可能であったことを示す図である。

【図40】[0079]本発明の方法を用いて、乳がん試料中の以下のSNP：PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、PIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R；KRAS G12A、KRAS G12C、KRAS G12D、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12V、及びKRAS G13D；並びにBRAF V600Eを検出（例えば、存在又は非存在を）及び/又は定量化（例えば、突然変異パーセントを）することにより得られる結果を示す図である。この図は、乳がん試料において、PIK3CA H1047R SNPが、異なる百分率で発現したことを示す。

【図41】[0080]乳がん試料のさらなるセットにおいて、PIK3CAのSNP（E542K、E545D、E545K、及びH1047R）もまた、検出及び定量化（例えば、突然変異パーセント）されたことを示す図である。45例の乳がん試料を、PIK3CA E542K対立遺伝子多型、PIK3CA E545D対立遺伝子多型、PIK3CA E545K対立遺伝子多型、及びPIK3CA H1047R対立遺伝子多型についてスクリーニングした。

【図42】[0081]本発明の方法を用いて、肺がん試料を、SNPについてスクリーニングしうることを示す図である。この実施形態では、25例の肺がん試料中で、多様なSNPの存在及び突然変異パーセントを決定した。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13C、KRAS G13D、及びKRAS Q61H；並びにBRAF V600Eが含まれた。

【図43】[0082]さらなる32例のヒト肺がん試料に対して本発明の方法を用いることから得られる結果を例示する図である。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、及びKRAS G13D；並びにBRAF V600Eが含まれた。

【図44】[0083]胃がん試料を、本発明の方法を用いてスクリーニングして、多様なSNPの存在及び突然変異パーセントを検出しうることを示す図である。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13D、及びKRAS Q61H；並びにBRAF V600Eが含まれた。この実施形態では、各アッセイを、40ngの試料（例えば、DNA）により実行した。

【図45】[0084]異種移植片試料に対して本発明の方法を用いて、多様なSNPの存在及び突然変異パーセントを検出することから得られる結果を示す図である。SNPには、P

10

20

30

40

50

IK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13C、KRAS G13D、及びKRAS Q61H；並びにBRAF V600Eが含まれた。EGFR E746欠失は、試料#585～588中に存在し、試料中の細胞の100%中に存在することが予測された。PIK3CA H1047R対立遺伝子は、試料#581～584中に、それぞれ、3.4%、1.2%、1%、及び1.8%の突然変異の百分率で検出された。

【図46】[0085]本発明の方法を用いて、結腸直腸がん試料中で、KRAS、BRAF、及びPIK3CAの対立遺伝子多型を検出及び定量化（例えば、突然変異パーセント）しうることを例示する図である。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、及びKRAS G13D；並びにBRAF V600Eが含まれた。

10

【図47】[0086]本発明の方法を用いて、さらなる結腸直腸がん試料中で、KRAS、BRAF、及びPIK3CAの対立遺伝子多型を検出及び定量化しうることを例示する図である。

【図48】[0087]本発明の方法を用いて、結腸直腸がんを伴う患者に由来する肝臓がん組織及び結腸がん組織を、KRAS、BRAF、及びPIK3CAの対立遺伝子多型についてスクリーニングしうることを例示する図である。結果は、試料のうちの一部が、複数のSNPを有したことを示す。

20

【図49】[0088]膵臓がんを伴う患者に由来する試料は、本発明の方法に従って、SNPについてスクリーニングし、突然変異パーセントを決定しうることを例示する図である。この実施形態では、微細針吸引物試料を患者から得、本明細書に記載されるSNP遺伝子型決定アッセイを用いてスクリーニングした。被験膵臓がん試料では、多様なKRAS突然変異が検出されたが、PIK3CA（例えば、E542K、E545D、E545K、H1047R）突然変異、EGFR（例えば、T790M、L858R）突然変異、及びBRAF（例えば、V600E）突然変異は検出されなかった。

30

【0041】

[発明の詳細な説明]

I. 序説

[0089]対象の対立遺伝子の選択的増幅は、ミスマッチした対立遺伝子特異的プライマーの、代替的な対立遺伝子におけるミスプライミング及び伸長を含めた因子により複雑化されることが多い。このようなミスプライミング及び伸長は、過剰な別の対立遺伝子多型を多く含む試料中に存在する、希少な対立遺伝子の検出においてとりわけ問題となりうる。十分に過剰な場合、他の対立遺伝子多型のミスプライミング及び伸長は、対象の対立遺伝子の検出を遮る可能性がある。PCRベースの方法を用いる場合、代替的な対立遺伝子多型を含有する試料における特定の対立遺伝子の識別は、試料中に存在する他の対立遺伝子の増幅を最小化又は阻止しながらの、対象の対立遺伝子の選択的増幅に依拠する。

40

【0042】

[0090]単独で又は組み合わせられて、対立遺伝子特異的PCRの識別力の増強に寄与する多数の因子が同定されている。本明細書で開示される通り、ミスマッチした対立遺伝子特異的プライマーとマッチした対立遺伝子特異的プライマーとの間のCt値を増大させる因子は、対立遺伝子多型のより大きな識別力を示す。本発明の方法を用いて対立遺伝子多型の識別を改善することが見出されたこのような因子には、例えば、(a)テールを付加した対立遺伝子特異的プライマー、(b)低濃度の対立遺伝子特異的プライマー、(c)Tmが低くなるようにデザインされた対立遺伝子特異的プライマー、(d)識別塩基を標的とするようにデザインされた対立遺伝子特異的プライマー、(e)試料における代替的

50

で潜在的により豊富な対立遺伝子多型からの増幅を阻止するようにデザインされた対立遺伝子特異的ブロッカープローブ、並びに(f)マッチした標的配列とミスマッチした標的配列との間のデルタT_mを増大させるために、例えば、修飾塩基、核酸類似体、及び/若しくはリボース修飾核酸などの核酸修飾を含むようにデザインされた対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び/若しくは対立遺伝子特異的プライマーのうちの1又は複数の使用が含まれる。

【0043】

[0091]上述の因子は、とりわけ組み合わせて用いられる場合、対立遺伝子特異的PCRの、試料中に存在する異なる対立遺伝子の間における識別能に影響しうる。したがって、本発明は、上記の因子のうちの1又は複数を使用して、PCR時における対立遺伝子多型の識別を、例えば、C_t値を増大させることによって改善する新規の増幅法に一般に關する。

10

【0044】

[0092]特定の態様では、本発明は、野生型対立遺伝子の増幅を阻止するためのヘキサンジオール3'修飾を含有するブロッカーオリゴヌクレオチドによる対立遺伝子特異的リアルタイムPCRを用いるロックド核酸(LNA)化学反応に基づく。本発明の方法の検出限界は、2~10DNAコピーであると有利である。本発明はまた、体細胞突然変異の大規模なパネルの選択的で頑健な検出も提供する。非限定的な例として述べると、本発明は、全血液バックグラウンド中で、極めて低コピー数の突然変異体対立遺伝子(例えば、0.01%~0.1%)の検出を可能とする。一部の 경우에는、本明細書に記載される突然変異アッセイにおいて用いられるサロゲート試料に、血液、血清、血漿、組織(例えば、FNA、CTC、コア生検、FFPE組織)、及びこれらの混合物が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0045】

[0093]特定の態様では、本発明の突然変異アッセイが、対立遺伝子特異的PCRに基づく。特定の形態では、検出が、タックマンプローブ法を用いるリアルタイム法である。好ましい形態では、単一のLNA塩基の突然変異をその3'端に含有する対立遺伝子特異的プライマー(ASP)を、とりわけ、突然変異体対立遺伝子を検出するのに用いることができる。これらの形態では、野生型配列と相補的なブロッキングオリゴヌクレオチド(ブロッカー)を、任意の非特異的な野生型対立遺伝子の増幅を抑制するのに用いることができる。このブロッカーは、野生型のヌクレオチド位置に位置する単一のLNA変異体を含有しうる。場合によって、任意の伸長を阻止するために、ブロッカーが、3'端においてヘキサンジオール化学基を含む。他の場合には、本発明は、反応を完了させるためのリバースプライマーをさらに含む。特定の理論に束縛されることなしに述べると、LNA修飾塩基の存在は、野生型対立遺伝子と突然変異体対立遺伝子との識別を増大させることから、標的対立遺伝子に対するより大きな特異性及びブロッキングの有効性を可能とする。特定の形態では、LNAが、PCRプローブの特異性及び二重鎖の熱安定性を増大させるのに用いられる修飾塩基である。LNA修飾塩基は、単一のヌクレオチドの識別が可能であり、これによって、ASPプライマーと野生型対立遺伝子との可能なミスマッチを最小化する。特定の形態では、対立遺伝子特異的プライマー及び/又はブロッキングオリゴヌクレオチドが、対立遺伝子多型の位置におけるLNA修飾塩基、1、2、3、4、5、6、7つ以上のさらなる不連続若しくは非隣接のLNA修飾、及び/又は5'端におけるLNA修飾塩基を含む。

30

40

【0046】

[0094]したがって、本発明の組成物及び方法は、血液、血漿、血清、及び/又は組織(FNA、CTC、コア生検、FFPE組織など)を含めた試料中で、極めて低レベルの突然変異体(体細胞)DNAの検出を有利に可能にする。特に、本発明のアッセイは、新規のブロッキングオリゴヌクレオチドデザインと組み合わせたLNA化学反応を用いることによって、既に記載された対立遺伝子特異的PCR突然変異の検出に対する著しい改善である。したがって、本発明は、感度がピーミング(ピーズ、エマルジョン、増幅、及び磁

50

気)アッセイ(Inostics)、Scorpions/ARMS反応(Qiagen)、及びキャストPCRアッセイ(Life Technologies)など、当技術分野で知られる検出法の10~100倍の突然変異解析を提供する。加えて、本発明は、EGFR T790M、EGFR E746-A750欠失、KRAS G12A、KRAS G12D、KRAS G12S、E545K PIK3CA、及びV600E BRAFなど、発がん性の抵抗性突然変異体を検出する能力を伴う方法も提供する。

【0047】

定義

[0095]本明細書で用いられる以下の用語は、別段に指定されない限りにおいて、それらに帰せられている意味を有する。

【0048】

[0096]本明細書で用いられる「対立遺伝子」という用語は、例えば、相同染色体などのDNAセグメントの同じ物理的遺伝子座(Physical locus)における代替的なDNA配列を含む。対立遺伝子は、単一の細胞内又は生物内の相同染色体において見出される同じ物理的遺伝子座の間で異なるDNA配列を指す場合もあり、複数の細胞又は生物の同じ物理的遺伝子座において異なるDNA配列を指す場合もある(「対立遺伝子多型」)。ある場合には、対立遺伝子が、特定の物理的遺伝子座における単一のヌクレオチドの差違に対応しうる。他の場合には、対立遺伝子が、ヌクレオチド(単一又は複数の)の挿入又は欠失に対応しうる。

【0049】

[0097]「対立遺伝子特異的プライマー」という用語は、対象の対立遺伝子を含む配列とハイブリダイズさせ、PCRにおいて用いると、伸長して第1鎖のcDNAの合成をもたらすオリゴヌクレオチド配列を含む。対立遺伝子特異的プライマーは、所与の標的DNA又は遺伝子座の特定の対立遺伝子に特異的であり、標的配列内の1ヌクレオチドという小さな差違を検出するようにデザインすることができる。対立遺伝子特異的プライマーは、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分、標的特異的部分、及び/又はテールを含みうる。

【0050】

[0098]本明細書で用いられる「対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分」又は「対立遺伝子特異的標的ヌクレオチド」という用語は、対立遺伝子特異的プライマー内の1又は複数のヌクレオチドであって、同じ遺伝子座における他の対立遺伝子(例えば、対応する高頻度の対立遺伝子又は野生型対立遺伝子)を排除して、所与の遺伝子座における1つの対立遺伝子(例えば、低頻度の対立遺伝子又は突然変異体対立遺伝子)に選択的にハイブリダイズしてここから伸長しうるヌクレオチドを含む。

【0051】

[0099]「標的特異的部分」という用語は、標的のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする対立遺伝子特異的プライマーの領域を含む。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分が、検出される対立遺伝子多型の5'側のプライミング領域において標的配列と相補的なプライミングセグメントである。対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含みうる。他の場合には、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分が、3'側の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分と隣接する。

【0052】

[0100]本明細書で用いられる「テール」又は「5'テール」という用語は、プライマーの3'端以外を含む。この領域は、解析される標的のポリヌクレオチド配列と相補的でない配列を典型的には含有するがこれを含有する必要はない。5'テールは、約2~30、2~5、4~6、5~8、6~12、7~15、10~20、15~25、若しくは20~30ヌクレオチドのうちのいずれか、又は任意の中間の長さの範囲でありうる。

【0053】

[0101]「対立遺伝子特異的ブロッカープローブ」又は「ブロッカープローブ」又は「ブロッカー」という用語は、対立遺伝子特異的プライマーが結合する鎖と同じ鎖、逆鎖、又

10

20

30

40

50

は相補鎖に配置される特定の対立遺伝子多型を含むDNA鎖に結合するオリゴヌクレオチド配列を含み、この特定の対立遺伝子多型の増幅を低減又は阻止する。本明細書で論じられる通り、対立遺伝子特異的ブロッカープローブは、修飾、例えば、リボース環の3'-OHを一般に含み、これによって、ポリメラーゼによるプライマーの伸長を阻止する。対立遺伝子特異的ブロッカープローブは、対立遺伝子特異的プライマーがアニールする鎖と同じ鎖又は逆鎖へとアニールするようにデザインすることができ、その3'末端におけるブロッキング基（例えば、「伸長不可能なブロッカー部分」）で修飾することができる。したがって、ブロッカープローブは、例えば、対立遺伝子特異的プライマーの伸長によって突然変異体対立遺伝子（例えば、希少な対立遺伝子多型）を含む同じ鎖又は逆鎖において増幅を生じさせながら、野生型対立遺伝子の増幅を抑制するために、野生型対立遺伝子（例えば、豊富な対立遺伝子多型）に厳密に結合するようにデザインすることができる。例示的な例では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブは、蛍光標識、放射性標識、又は化学発光標識などの標識を含まない。

10

【0054】

[0102]本明細書で用いられる「伸長不可能なブロッカー部分」又は「ブロッカー部分」という用語は、例えば、PCR反応においてその相補的配列とハイブリダイズさせると、ポリメラーゼによる伸長を不可能とする、プローブ及び/又はプライマーなどのオリゴヌクレオチド配列における修飾を含む。ブロッカー部分の例には、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチド配列の3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、オリゴヌクレオチドのリボース環の3'-OHの修飾が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、限定なしに述べると、伸長不可能なブロッカー部分には、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール（例えば、3'-ヘキサジオール修飾）、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオール、副溝結合剤(MGB)、アミン(NH₂)、ピオチン、PEG、PO₄、及びこれらの組合せが含まれる。MGBの例には、CC1065類似体、レキシトロプシン、ジスタマイシン、ネトロプシン、ベレニル、デュオカルマイシン、ペンタミジン、4、6-ジアミノ-2-フェニルインドール、及びピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン、及びDPI₃が含まれる。

20

【0055】

[0103]本明細書で用いられる「修飾塩基」という用語は、自然発生の核酸において見出される塩基とは構造が異なる、核酸内の任意の塩基の修飾又は塩基の化学的連結を含む。このような修飾は、核酸内の塩基の化学構造の変化、若しくは塩基の化学的連結の変化、又は核酸の骨格構造の変化を含みうる。例えば、Latorraら、Hum. Mut., 2:79~85(2003); Nakiandweら、Plant Method, 3:2(2007)を参照されたい。

30

【0056】

[0104]「ロックド核酸」又は「LNA」という用語は、リボース環が、2'-O原子と4'-C原子とをつなぐメチレン架橋によって「ロックされた」核酸類似体のクラスを含む。LNAヌクレオシドは、一般的な核酸塩基(T、C、G、A、U、及びmC)を含有し、標準的なWatson-Crick塩基対合規則に従って塩基対を形成することが可能である。しかし、分子をメチレン架橋で「ロックする」ことによって、Watson-Crick結合に理想的なコンフォメーションにおいてLNAを束縛する。

40

【0057】

[0105]「ペプチド核酸」、「ペプチド性核酸」、又は「PNA」という用語は、アミド結合により連結された反復N-(2-アミノエチル)-グリシン単位の骨格と接合させた、多様な自然発生又は非自然発生の核酸塩基を含む、自然発生でなく人工的に合成された核酸類似体又は核酸模倣体を含む。プリン塩基及びピリミジン塩基は、メチレンカルボニル連結を介して非帯電骨格と接合させる。DNAと同様に、Watson-Crick塩基対合規則は、ペプチド核酸にも当てはまる。

【0058】

50

[0106]「ジップ核酸」又は「ZNA」という用語は、標的核酸鎖との静電斥力を減少させ、オリゴヌクレオチドのそれらの標的に対するアフィニティーを増大させる、カチオン性スベルミン部分のうちの1又は複数とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを含む。

【0059】

[0107]「トリアゾール核酸」、「TzNA」、「トリアゾールデオキシ核酸」、「TzDNA」、「デオキシリボ核酸のトリアゾール連結類似体」、又は「TLDNA」という用語は、非自然発生のトリアゾール連結を含むオリゴヌクレオチドを含む。

【0060】

[0108]「(3'-2')-L-トレオース核酸」、「トレオース核酸」、又は「TNA」という用語は、Watson-Crick塩基対合規則に従い、代替的な糖-リン酸骨格に結合する核酸の探索において発見された非自然発生の核酸を含む(例えば、Ichidaら、Nucleic Acids Res.、33:5219~5225(2005)を参照されたい)。TNAは、天然の核酸より1原子短い反復配列単位を有するが、DNA、RNA、及びTNA自体と塩基対合しうる。特定の理論に束縛されることを欲しないが、TNAは、DNAのA形態及びRNAの良好な模倣体であるため、DNAと強くハイブリダイズし、RNAとはなおより強くハイブリダイズすると考えられる。TNA-DNA二重鎖の、類似のDNA-DNA複合体と比較した安定性の増大は、対立遺伝子多型のミスマッチの識別の改善を結果としてもたらす。

【0061】

[0109]本明細書で用いられる「検出用プローブ」という用語は、増幅を示す多様なシグナル伝達分子のうちのいずれかを含む。例えば、サイバー(登録商標)グリーン及び他のDNA結合色素は、検出用プローブである。一部の検出用プローブは、配列ベースのプローブ(本明細書ではまた、「遺伝子座特異的検出用プローブ」とも称する)、例えば、5'ヌクレアーゼプローブでありうる。当技術分野では、多様な検出用プローブが知られており、これらには、本明細書で記載される(また、米国特許第5,538,848号も参照されたい)タックマン(登録商標)プローブ、多様なステムループ型分子ビーコン(例えば、米国特許第6,103,476号、及び同第5,925,517号;Tyagiら、Nature Biotech.、1996、14:303~308を参照されたい)、ステムレスビーコン又は直鎖状ビーコン(例えば、国際出願PCT国際公開第99/21881号パンフレットを参照されたい)、PNAモレキュラービーコン(PNA Molecular Beacons)(商標)(例えば、米国特許第6,355,421号、及び同第6,593,091号を参照されたい)、直鎖状PNAビーコン(例えば、Kubistaら、2001、SPIE、4264:53~58を参照されたい)、非FRETPローブ(例えば、米国特許第6,150,097号を参照されたい)、サンライズ(Sunrise)(登録商標)/アンプリフルオル(Amplifluor)(登録商標)プローブ(例えば、米国特許第6,548,250号を参照されたい)、ステムループ型スコルピオン(商標)プローブ及び二重鎖型スコルピオン(商標)プローブ(例えば、Solinaら、2001、Nucl. Acids Res.、29:E96;米国特許第6,589,743号を参照されたい)、バルジループ型プローブ(例えば、米国特許第6,590,091号を参照されたい)、シュードノット型プローブ(例えば、米国特許第6,589,250号を参照されたい)、サイクリコン(例えば、米国特許第6,383,752号を参照されたい)、MGBエクリプス(MGB Eclipse)(商標)プローブ(Epoch Biosciences)、ヘアピン型プローブ(例えば、米国特許第6,596,490号を参照されたい)、ペプチド核酸(PNA)ライトアッププローブ、自己組織化ナノ粒子プローブ、並びに、例えば、米国特許第6,485,901号;Mhianagaraら、2001、Methods、25:463~471;Whitcombeら、1999、Nature Biotechnol.、17:804~807;Isacssonら、2000、Molecular Cell Probes、14:321~328;Svanvikら、2000、Anal Biochem.、2

10

20

30

40

50

81:26~35; Wolffsら、2001、Biotechniques、766:769~771; Tsourkasら、2002、Nucleic Acids Research、30:4208~4215; Riccellisら、2002、Nucleic Acids Research、30:4088~4093; Zhangら、2002、Shanghai、34:329~332; Maxwellら、2002、J. Am. Chem. Soc.、124:9606~9612; Broudeら、2002、Trends Biotechnol.、20:249~56; Huangら、2002、Chem Res. Toxicol.、15:118~126; 及びYuら、2001、J. Am. Chem. Soc.、14:11155~11161において記載されるフェロセン修飾プローブが含まれるがこれらに限定されない。検出用プローブは、例えば、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)又はテトラクロロフルオレセイン(TET)などのレポーター色素を含みうる。検出用プローブはまた、テトラメチルローダミン(TAMRA)、ブラックホールクエンチャー(Biosearch)、アイオワブラック(Iowa Black)(IDT)、QSY消光剤(Molecular Probes)、並びにダブシル(Dabsyl)スルホネート/カルボキシレート消光剤及びダブセル(Dabcyl)スルホネート/カルボキシレート消光剤(Epoch Biosciences)などの消光剤部分も含みうる。一部の実施形態では、検出用プローブが、例えば、蛍光体を一方のプローブに置き、消光剤を他方のプローブに置く2つのプローブであって、標的において2つのプローブが一体となるハイブリダイゼーションによりシグナルをクエンチングするか、又は標的へのハイブリダイゼーションによる蛍光の変化を介してシグナルシグネチャーを変化させるプローブを含みうる。検出用プローブはまた、カルボキシレート基でなくSO₃による、フルオレセイン色素のスルホン酸誘導体、フルオレセインのホスホルアミダイト形態、CY5(Amersham Biosciences-GE Healthcare)のホスホルアミダイト形態も含みうる。

【0062】

[0110]「遺伝子座特異的プライマー」という用語は、PCR反応において第1のプライマー(対立遺伝子特異的プライマーなど)の伸長に由来する産物とハイブリダイズし、この産物の第2の鎖であるcDNAの合成をもたらさうるオリゴヌクレオチド配列を含む。したがって、一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、フォワードPCRプライマーとして用いられ、遺伝子座特異的プライマーが、リバースPCRプライマーとして用いられるか、又はこの逆が成り立つ。一部の好ましい実施形態では、遺伝子座特異的プライマーを、対立遺伝子特異的プライマーと比較して高濃度で存在させる。

【0063】

[0111]本明細書で用いられる「希少な対立遺伝子多型」という用語は、別の対立遺伝子多型と比較して、試料中に低レベルで存在する標的ポリヌクレオチドを含む。希少な対立遺伝子多型はまた、「低頻度の対立遺伝子多型」及び/又は「突然変異体の対立遺伝子多型」とも称しうる。例えば、希少な対立遺伝子多型は、所与のSNP又は遺伝子について、別の対立遺伝子多型と比較して約1/10、1/100、1/1,000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000、又は1/1,000,000未満の頻度で見出すことができる。代替的に、希少な対立遺伝子多型は、例えば、試料容量又は反応容量1、10、100、又は1,000マイクロリットル当たり約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、250、500、750、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000、又は1,000,000コピー未満でありうる。

【0064】

[0112]「豊富な対立遺伝子多型」という用語は、別の対立遺伝子多型と比較して、試料中に高レベルで存在する標的ポリヌクレオチドを含む。豊富な対立遺伝子多型はまた、「高頻度の対立遺伝子多型」及び/又は「野生型対立遺伝子多型」とも称しうる。例えば、

豊富な対立遺伝子多型は、所与のSNP又は遺伝子について、別の対立遺伝子多型と比較して約10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、100,000,000倍、又は1,000,000,000倍を超える頻度で見出すことができる。代替的に、豊富な対立遺伝子多型は、例えば、試料容量又は反応容量1、10、100、1,000マイクロリットル当たり約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、250、500、750、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000、1,000,000コピーを超えうる。

【0065】

[0113] 特定の実施形態では、「第1の」及び「第2の」という用語は、第1の反応の構成要素（例えば、「第1の」反応；「第1の」対立遺伝子特異的プライマー）と、第2の反応の構成要素（例えば、「第2の」反応；「第2の」対立遺伝子特異的プライマー）とを区別するのに用いられる。慣例により、第1の反応により、第1の（例えば、希少な）対立遺伝子多型を増幅し、第2の反応により、（例えば、豊富な）対立遺伝子多型を増幅するか、又はこの逆が成り立つ。

【0066】

[0114] 本明細書で用いられる「第1の対立遺伝子多型」及び「第2の対立遺伝子多型」のいずれも、同じ生物に由来する所与の遺伝子座の対立遺伝子に関しうる。例えば、これは、野生型対立遺伝子を含むヒト試料（例えば、細胞）であって、野生型対立遺伝子の一部が突然変異して、低頻度の対立遺伝子又は希少な対立遺伝子を形成しているヒト試料における場合でありうるだろう。場合によって、第1の対立遺伝子多型と第2の対立遺伝子多型とは、異なる生物に由来する対立遺伝子を指す。例えば、第1の対立遺伝子は、遺伝子改変生物の対立遺伝子である可能性があり、第2の対立遺伝子は、野生型生物の対応する対立遺伝子でありうる。特定の場合には、第1の対立遺伝子多型及び第2の対立遺伝子多型が、gDNAのほか、mRNA及びcDNA、並びに、一般に任意の標的核酸であって、例えば、（1又は複数の）SNP又はヌクレオチドの挿入突然変異及び/又は欠失突然変異に起因する配列可変性を呈示する標的核酸に含有されうる。

【0067】

[0115] 「熱安定性の」又は「熱安定性ポリメラーゼ」という用語は、熱に安定性であるか又は熱に抵抗性であり、核酸鎖と相補的なプライマーの伸長産物を形成するデオキシリボヌクレオチドの重合化を触媒する酵素を含む。本明細書において有用な熱安定性のDNAポリメラーゼは、PCR増幅時に一本鎖核酸の不安定化又は二本鎖核酸の変性をもたらすのに必要な時間にわたり高温下に置かれても不可逆的には不活化されない。酵素の不可逆的な変性とは、酵素活性の実質的な喪失を指す。熱安定性のDNAポリメラーゼは、PCR増幅に典型的には要求されるような条件下、約90 ~ 100 で不可逆的に変性しないことが好ましい。

【0068】

[0116] 本明細書で用いられる「PCR増幅すること」又は「PCR増幅」という用語は、例えば、Innisら、「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」、Academic Press (1990)において記載される通り、相補鎖とハイブリダイズするプライマーを使用する、ポリメラーゼを介する核酸の指数関数的増幅のサイクリングを含む。指定された波長の光線を発することが可能な蛍光指示薬を含有する組成物と共に熱サイクリング反応を実施し、蛍光色素の強度を読み取り、各サイクル後における蛍光の強度を表示しうるデバイスが開発されている。サーマルサイクラー、光線エミッター、及び蛍光シグナル検出器を含むデバイスは、例えば、米国特許第5,928,907号；同第6,015,674号；同第6,174,670号；及び同第6,814,934号において記載されており、ABIプリズム (ABI Prism) (登録商標) 7700シークエンステクニクシステム (Sequence Detection System) (Applied B

10

20

30

40

50

iosystems、Foster City、CA)、ABIジーンアンプ(ABI GeneAmp)(登録商標)5700シークエンスディテクションシステム(Applied Biosystems)、ABIジーンアンプ(登録商標)7300シークエンスディテクションシステム(Applied Biosystems)、ABIジーンアンプ(登録商標)7500シークエンスディテクションシステム(Applied Biosystems)、ステップワン(Step One)(商標)リアルタイムPCRシステム(Real-Time PCR System)(Applied Biosystems)、及びABIジーンアンプ(登録商標)7900シークエンスディテクションシステム(Applied Biosystems)が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0069】

[0117]「前増幅」又は「前増幅する」という用語は、複数のプライマー対がマルチプレックスのPCR増幅反応に含まれる工程を含み、PCRベースの前増幅反応は、PCRのプラトー及び/又は試薬の枯渇の前に終了するように、マルチプレックスの増幅反応が限定されたサイクル数を経る。「PCRベースの前増幅」という用語は、典型的にはPCRベースの前増幅反応よりプレックスレベルの低い副次的増幅反応をその後を実施することを示すと考えることができる。この副次的増幅反応、典型的には複数の個別の副次的増幅反応では、マルチプレックスのPCRベースの前増幅反応において用いられるプライマーによってコードされるプライマー対を使用することができる。しかし、各副次的増幅反応は、典型的には、単一又は少数のプライマー対を含む。PCRベースの前増幅手法のさらなる例は、例えば、それらの開示が全ての目的についてそれらの全体において参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第6,605,451号及び米国特許出願公開第10/723,520号において見出すことができる。

20

【0070】

[0118]本明細書で用いられるオリゴヌクレオチドの「 T_m 」又は「融解温度」という用語は、一本鎖オリゴヌクレオチドの集団内の分子のうちの50%が、それらの相補的配列とハイブリダイズし、集団内の分子のうちの50%が、前記相補的配列とハイブリダイズしない温度(摂氏度)を含む。プライマー又はプローブの T_m は、融解曲線により経験的に決定することができる。一部の実施形態では、 T_m はまた、当技術分野でよく知られた式(例えば、Maniatisら、「Molecular cloning: a laboratory manual」、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY:1982を参照されたい)を用いて計算することもできる。

30

【0071】

[0119]本明細書で用いられる「感度」という用語は、所与のアッセイにより検出される鑄型の最小量(コピー数又は重量)を含む。

【0072】

[0120]本明細書で用いられる「特異性」という用語は、マッチした鑄型からの増幅を、ミスマッチした鑄型からの増幅と対比させて区別するアッセイの能力を含む。特異性は、 $Ct = Ct_{\text{mismatch}} - Ct_{\text{match}}$ として表されることがしばしばである。本明細書では、特異性の改善又は「特異性改善」又は「倍数差」が、 $2^{(Ct_{\text{condition 1}} - Ct_{\text{condition 2}})}$ として表される。

40

【0073】

[0121]「選択性」という用語は、AS-PCRアッセイを用いて、混合物中の低頻度の(突然変異体であることが多い)対立遺伝子を、高頻度の(野生型であることが多い)対立遺伝子からの干渉なしに決定しうる程度を含む。選択性は、比又は百分率として表されることが多い。例えば、1つの突然変異体の鑄型を、100の野生型の鑄型の存在下で検出しうるアッセイは、1:100又は1%の選択性を有するという。本明細書で用いられるアッセイの選択性はまた、 $1/2^{Ct}$ としても計算することができる、 $(1/2^{Ct} \times 100)$ を用いて百分率としても計算することができる。

50

【 0 0 7 4 】

[0122]「Ct」又は「Ct値」という用語は、閾値サイクルを含み、単位複製配列の生成を示すレポーターからのシグナル（例えば、蛍光）が、初めてバックグラウンドレベルを上回って検出可能となる、PCR増幅アッセイのサイクルを意味する。一部の実施形態では、閾値サイクル又は「Ct」が、PCR増幅が指数関数的となるサイクル数である。

【 0 0 7 5 】

[0123]本明細書で用いられる「デルタCt」又は「Ct」という用語は、2つの異なる試料又は反応の間の、シグナルが一定の閾値を超えるサイクル数の数値による差を含む。一部の実施形態では、デルタCtが、数値によるサイクル数の差であって、2つの異なる試料又は反応の間の、指数関数的増幅が達せられるサイクル数の差である。一部の実施形態では、デルタCtを用いて、対応する標的核酸配列にマッチしたプライマーと、同じ対応する標的核酸配列にミスマッチしたプライマーとの間の特異性を同定することができる。

10

【 0 0 7 6 】

[0124]一部の実施形態では、ミスマッチしたプライマーとマッチしたプライマーとの間のデルタCt値の計算を、対立遺伝子特異的PCRの識別力の1つの尺度として用いる。一般に、標的配列（例えば、対象の対立遺伝子多型を含む配列）にマッチしたプライマーを用いる増幅反応についてのCt値と、ミスマッチしたプライマーのCt値との差を増大させる任意の因子は、より大きな対立遺伝子の識別力を結果としてもたらず。

【 0 0 7 7 】

[0125]多様な実施形態によれば、Ct値は、PCR曲線の導関数を用いて決定することができる。例えば、Ct値を決定するために、PCR曲線に対して一次導関数法、二次導関数法、又はn次導関数法を実施することができる。多様な実施形態では、導関数の特徴を、Ct値の決定に用いることができる。このような特徴には、二次導関数の正の変曲、二次導関数の負の変曲、二次導関数のゼロ交差、又は一次導関数の正の変曲が含まれうるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、Ct値を、閾値化法及びベースライン化法を用いて決定することができる。例えば、PCR曲線の指数関数相の上界は、導関数法を用いて確立しうるのに対し、PCR曲線の指数関数相の下界は、PCR曲線のベースラインを決定して確立することができる。PCR曲線の上界及び下界から閾値を確立ことができ、閾値からCt値を決定する。当技術分野で知られる、Ct値を決定するための他の方法は、例えば、フィットポイント（fit point）法の多様な実施形態、及びシグモイド法の多様な実施形態であるがこれらに限定されない。例えば、それらの開示が全ての目的についてそれらの全体において参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第6,303,305号；同第6,503,720号；同第6,783,934号、7,228,237号；及び米国特許出願公開第2004/0096819号を参照されたい。

20

30

【 0 0 7 8 】

[0126]本明細書で用いられる「試料」という用語は、患者から得られる任意の生物学的検体を含む。限定なしに述べると、試料には、全血液、血漿、血清、赤血球、白血球（例えば、末梢血単核細胞）、乳管洗浄液、乳首吸引物、リンパ（例えば、リンパ節の播種性腫瘍細胞）、骨髓吸引物、腹水、胸膜流出物、唾液、尿、大便（すなわち、糞便）、痰、気管支洗浄液、涙液、微細針吸引物（FNA）（例えば、乳輪周囲におけるランダムな微細針吸引により採取される）、他の任意の体液、腫瘍生検（例えば、注射針生検）又はリンパ節生検（例えば、前哨リンパ節生検）などの組織試料（例えば、腫瘍組織）、手術による腫瘍の切除などの組織試料（例えば、腫瘍組織）、及びこれらの細胞抽出物が含まれる。一部の実施形態では、試料が、全血液又は血漿、血清、若しくは細胞ペレットなどのその画分成分である。他の実施形態では、試料を、当技術分野で知られている任意の技法を用いて、充実性腫瘍の循環細胞又はそれらの細胞画分を全血液から単離することによって得る。さらに他の実施形態では、試料が、例えば、充実性腫瘍に由来する、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍組織試料である。

40

50

【 0 0 7 9 】

[0127]「対象」又は「患者」又は「個体」という用語は、典型的にはヒトを含むが、また、例えば、他の霊長動物、齧歯動物、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなど、他の動物も含む。

【 0 0 8 0 】

I I I . 実施形態についての記載

[0128]一態様では、本発明は、核酸試料中の対立遺伝子多型の同定及び/又は定量化において用いられる組成物を提供する。これらの組成物のうちの一部は、(a)対立遺伝子特異的プライマー、(b)対立遺伝子特異的ブロックプローブ、(c)検出用プローブ、(d)遺伝子座特異的プライマー、及び(e)任意のこれらの組合せを含みうる。一部の実施形態では、組成物が、ポリメラーゼ、dNTP、PCR増幅に適する試薬及び/若しくは緩衝液、並びに/又は鋳型配列若しくは核酸試料をさらに含みうる。場合によって、ポリメラーゼが、熱安定性でありうる。

10

【 0 0 8 1 】

[0129]別の態様では、本発明は、核酸試料中の対立遺伝子多型の同定及び/又は定量化において用いられる組成物であって、(i)対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、及び/又は(ii)対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第2の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、核酸修飾を含み、3'末端において伸長不可能なブロック部分を含む、対立遺伝子特異的ブロックプローブを含みうる組成物を提供する。

20

【 0 0 8 2 】

[0130]一部の例示的な実施形態では、組成物が、第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーをさらに含みうる。さらに他の実施形態では、組成物が、検出用プローブをさらに含む。

【 0 0 8 3 】

[0131]別の態様では、本発明は、対立遺伝子特異的配列を増幅するための方法を提供する。これらの方法のうちの一部は、(a)対立遺伝子特異的プライマーを、標的対立遺伝子を含む第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップと、(b)対立遺伝子特異的ブロックプローブを、別の対立遺伝子を含む第2の核酸分子とハイブリダイズさせるステップであって、別の対立遺伝子が、標的対立遺伝子と同じ遺伝子座に対応するステップと、(c)遺伝子座特異的検出用プローブを、第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップと、(d)遺伝子座特異的プライマーを、対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物とハイブリダイズさせるステップと、(e)標的対立遺伝子をPCR増幅するステップとを含みうる。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロックプローブが、3'末端において伸長不可能なブロック部分を含む。他の特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロックプローブの両方が、例えば、修飾塩基(例えば、LNA、PNA、TNA、ZNA、及びTzDNA)、核酸類似体、又はリボース修飾核酸などの核酸修飾を、標的対立遺伝子及び別の対立遺伝子のそれぞれの位置において独立に含む。

30

40

【 0 0 8 4 】

A . プライマー及び/又はプローブのためのオリゴヌクレオチドのLNA修飾、PNA修飾、TNA修飾、ZNA修飾、又はTzNA修飾

[0132]一態様では、本発明は、オリゴヌクレオチドが、3'末端において、少なくとも1つの核酸修飾及び/又は伸長不可能なブロック部分を含む、オリゴヌクレオチド組成物を提供する。

【 0 0 8 5 】

[0133]非限定的な核酸修飾の例には、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せが含まれる。

50

【0086】

[0134] 好ましい実施形態では、本発明は、少なくとも1つのロックド核酸(LNA)を含むオリゴヌクレオチドを含む。LNAは、リボース環が、2'-O原子と4'-C原子とをつなぐメチレン架橋により「ロックされた」核酸類似体のクラスを含む。LNAヌクレオチドは、一般的な核酸塩基(T、C、G、A、U、及びmC)を含有し、標準的なWatson-Crick塩基対合規則に従って塩基対を形成することが可能である。DNAオリゴヌクレオチドへと組み込まれると、LNAは、相補的なヌクレオチド鎖とより急速に対合し、結果としてもたらされる二重鎖の安定性を増大させる。LNAの単量体のオリゴヌクレオチドへの組み込みによるアフィニティー増強効果は、LNA単量体1個当たり2~8の二重鎖融解温度の上昇によって裏付けられる。場合によって、LNAとは、オキシ-LNA、チオ-LNA、及びアミノ-LNAなどであるがこれらに限定されないLNAの修飾を指す。例えば、Johnsonら、Nucl. Acid Res.、2004、32、e55；Latorraら、Hum. Mut.、2003、22、79；Chouら、Biotech.、2005、39、644を参照されたい。

10

【0087】

[0135] 一部の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのペプチド核酸(PNA)を含むオリゴヌクレオチドを含む。PNAとは、自然発生でなく、人工的に合成された、核酸類似体又は核酸模倣体であって、アミド結合によって連結されたN-(2-アミノエチル)-グリシン単位を反復する骨格と接合させた多様な自然発生又は非自然発生の核酸塩基を含む、核酸類似体又は核酸模倣体である。PNA-DNA二重鎖は、PNA鎖とDNA鎖との静電斥力が欠如するために、類似するDNA-DNA二重鎖と比較してより大きな強度で、より高い安定性で、より迅速に、より大きな特異性で結合することが当業者によって理解される。より大きな安定性は、類似するDNA-DNA二重鎖と対比したPNA-DNA二重鎖のT_mの高さにより反映される。PNA複合体は、熱安定性が大きく、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、及びペプチダーゼによる分解に対する感受性が小さい。PNA-DNA二重鎖のT_mは、塩濃度から部分的に独立であることが示されている。加えて、単一塩基のミスマッチは、15マーのPNA/DNA内の単一のミスマッチが、融点(T_m)を、15マーのDNA/DNA二重鎖についての4~16と対比して8~20低下させるために、PNA/DNAハイブリダイゼーションによって決定しうる可能性がいっそう高い。これは、マッチした配列とミスマッチした配列との識別を改善する効果を及ぼす。例えば、Nielsen, P. E. 及びEgholm, M., Current Issues Molec. Biol. 1; 89~104 (1999); Orumら、「Peptide Nucleic Acid」、「Laboratory Methods for the Detection of Mutation and Polymorphisms in DNA」、Graham R. Taylor編、CRC Press、1997; Nielsen, P. E. 及びEgholm, M., Current Issues Molec. Biol. 1; 89~104 (1999); Gaylorら、Proc. Natl. Acad. Sci.、102: 34~39 (2005)を参照されたい。

20

30

【0088】

[0136] PNAは、鋳型におけるミスマッチした塩基との反応には干渉せずに、完全にマッチした鋳型におけるプライマーのアニーリング及び鎖伸長をとりわけブロッキングしうる。PNAを用いて、非対称PCRクランプ法、融解曲線解析(例えば、Ohら、J. Mol. Diagn.、12: 418~424 (2010); Orumら、Nucleic Acids Res.、21: 5332~5336 (1993); Luoら、Nucleic Acids Res.、34: e12 (2006); Karkareら、Appl. Microbiol. Biotechnol.、71: 575~586 (2006)を参照されたい)などであるがこれらに限定されないSNP解析における野生型対立遺伝子の増幅を抑制することによって、突然変異の検出を改善することができる。

40

【0089】

50

[0137]一部の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのジップ核酸(ZNA)を含むオリゴヌクレオチドを含みうる。ZNAとは、1又は複数のカチオン性スベルミン部分とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドである。この構造は、その標的核酸鎖との静電斥力を減少させ、その標的に対するオリゴヌクレオチドのアフィニティーを増大させる。オリゴヌクレオチドの任意の位置に接合させたカチオン単位の数により、分子の全体的な電荷を調節することができ、これにより、ZNA二重鎖(例えば、ZNA-ZNA二重鎖、ZNA-DNA二重鎖、及びZNA-RNA二重鎖)の対応する T_m を、直線的且つ予測可能な形で上昇させることができる。ZNAは、低いマグネシウム濃度及び高いアニーリング温度で効果的であり、これは、対立遺伝子多型を正確に検出するために有利でありうる。ZNAは、蛍光部分及び蛍光消光剤で単一標識されるか又は二重標識されうる。ZNAは、例えば、Sigma-Aldrichから市販されている。例えば、Voirinら、*Nat. Protoc.*、2:1360~1367(2007)、Noirら、*J. Am. Chem. Soc.*、130:13500~13505(2008)、Moreauら、*Nucleic Acids Res.*、37:e130(2009); Parisら、*Nucleic Acids Res.*、38:e95(2010)を参照されたい。

10

【0090】

[0138]他の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのトリアゾール核酸(TzNA)を含むオリゴヌクレオチドを含む。TzNAオリゴヌクレオチドは、クリック化学反応(例えば、銅触媒型アジド-アルキン付加環化反応)を用いて合成することができる。AZTベースのトリアゾール連結を含有するオリゴヌクレオチドは、増幅のための多様なポリメラーゼを伴うPCR鑄型として用いることができる(El-Sagheerら、*J. Am. Chem. Soc.*、131:3958~3964(2009))。また、トリゾールリンカーを含有する遺伝子も、大腸菌(*Escherichia coli*)中で機能的でありうる(El-Sagheerら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*、108:11338~11343(2011))。例えば、Isobeら、*Org. Lett.*、10:3729~3732(2008); Fujinoら、*Tetrahedron Lett.*、50:4101~4103(2009); von Mattら、*Bioorg. Med. Chem. Letts.*、7:1553~1556(1997)を参照されたい。

20

30

【0091】

[0139]さらに他の実施形態では、本発明は、少なくとも1つのトレース核酸(TNA)を含むオリゴヌクレオチドを含む。TNAは、天然の核酸より1原子短い、DNA、RNA、及びそれ自体と塩基対合しうる反復単位を有する。特定の理論に束縛されることを欲しないが、TNAは、DNAのA形態及びRNAの良好な模倣体であるため、DNAと強くハイブリダイズし、RNAとはなおより強くハイブリダイズすると考えられる。TNA-DNA二重鎖の、類似のDNA-DNA複合体と比較した安定性の増大は、対立遺伝子多型のミスマッチの識別の改善を結果としてもたらす。例えば、Ichidaら、*Nucleic Acids Res.*、33:5219~5225(2005)を参照されたい。

40

【0092】

[0140]修飾塩基は、1又は複数の官能基の付加又は欠失、ヘテロ環構造の差違(すなわち、炭素のヘテロ原子への置換、又はこの逆)、及び/又は1又は複数のリンカーアーム構造の塩基への接合によって自然発生の塩基と異なる塩基であると考えられる。一部の実施形態ではまた、自然発生塩基、修飾塩基、及び塩基類似体の全ての互変異性形態も、本発明のオリゴヌクレオチドプライマー及びオリゴヌクレオチドプローブに含まれうる。

【0093】

[0141]さらなる実施形態では、本発明に従うオリゴヌクレオチドのヌクレオチドサブユニットのうち1又は複数において、修飾された糖又は糖類似体が存在しうる。糖修飾には、糖の2'、3'及び/又は4'側炭素原子への置換基の接合、糖の異なるエピマー形

50

態、グリコシド結合の - 立体配置又は - 立体配置の差違、及び他のアノマー変化が含まれるがこれらに限定されない。糖部分には、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、リボース、デオキシリボース、ブドウ糖、アラビノース、ペントフラノース、キシロース、リキソース、及びシクロペンチルが含まれるがこれらに限定されない。

【0094】

[0142] 特定の実施形態では、1又は複数の修飾インターヌクレオチド連結又は修飾骨格連結を、本発明のオリゴヌクレオチドに存在させることができる。このような修飾連結には、ペプチド、リン酸、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、リン酸アルキル、アルカンホスホネート、チオリン酸、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、置換されたホスホルアミデートなどが含まれるがこれらに限定されない。当業者には、プローブ及び/又はプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドにおけるそれらの使用と適合可能な、塩基連結、糖連結、及び/又はインターヌクレオチド連結のさらなる修飾が明らかであろう。

【0095】

[0143] 伸長不可能なブロッカー部分は、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチド配列の3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、ブロッカープローブのリボース環3'-OHの任意の修飾を含みうる。一部の実施形態では、限定なしに述べると、ブロッカー部分には、置換されていてもよいC₁~C_{2,4}アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)、置換されていてもよいC₂~C_{2,4}アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~C_{2,4}アルキニルジオール、副溝結合剤(MGB)、アミン(NH₂)、ピオチン、PEG、PO₄、及びこれらの混合物が含まれうる。特定の実施形態では、置換されていてもよいC₁~C_{2,4}アルキルジオールが、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの3'端へのメタンジオール修飾、エタンジオール修飾、1,3-プロパンジオール修飾、1,4-ブタンジオール修飾、1,5-ペンタンジオール修飾、1,6-ヘキサンジオール修飾、1,7-ヘプタンジオール修飾、又は1,8-オクタンジオール修飾を含む。一部の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C_{2,0}、C₁~C_{1,2}、C₂~C_{2,0}、C₂~C_{1,2}、C₄~C_{1,2}、C₄~C_{1,0}、C₄~C₈、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、又はC_{1,2}アルキルジオールを含む。他の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₂~C_{2,0}、C₂~C_{1,2}、C₄~C_{1,2}、C₄~C_{1,0}、C₄~C₈、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、若しくはC_{1,2}アルケニルジオール、又は置換されていてもよいC₂~C_{2,0}、C₂~C_{1,2}、C₄~C_{1,2}、C₄~C_{1,0}、C₄~C₈、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、若しくはC_{1,2}アルキニルジオールを含む。

【0096】

[0144] 特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤(MGB)及び/若しくはPO₄基を含まないか、又はこれらを包含しない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C_{2,4}アルキルジオール(例えば、メタンジオール修飾、エタンジオール修飾、1,3-プロパンジオール修飾、1,4-ブタンジオール修飾、1,5-ペンタンジオール修飾、1,6-ヘキサンジオール修飾、1,7-ヘプタンジオール修飾、若しくは1,8-オクタンジオール修飾、又は置換されていてもよいC₁~C_{2,0}、C₁~C_{1,2}、C₂~C_{2,0}、C₂~C_{1,2}、C₄~C_{1,2}、C₄~C_{1,0}、C₄~C₈、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、又はC_{1,2}アルキルジオール修飾)、置換されていてもよいC₂~C_{2,4}アルケニルジオール、若しくは置換されていてもよいC₂~C_{2,4}アルキニルジオール(例えば、置換されていてもよいC₂~C_{2,0}、C₂~C_{1,2}、C₄~C_{1,2}、C₄~C_{1,0}、C₄~C₈、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、若しくはC_{1,2}アルケニルジオール修飾、又は置換されていてもよいC₂~C_{2,0}、C₂~C_{1,2}、C₄~C_{1,2}、C₄~C_{1,0}、C₄~C₈、C₂、C₃、C₄、

10

20

30

40

50

C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、若しくはC₁₂アルキニルジオール修飾)、又はこれらの混合物から本質的になるか、又はこれらからなる。

【0097】

[0145]「置換されていてもよい」という用語は、少なくとも1つの水素原子の置換基による置きかえを含む。「オキソ」置換基(=O)の場合、2つの水素原子を置きかえる。置換基の非限定的な例には、オキソ、ハロゲン、ヘテロ環、-CN、-OR^x、-NR^xR^y、-NR^xC(=O)R^y、-NR^xSO₂R^y、-C(=O)R^x、-C(=O)OR^x、-C(=O)NR^xR^y、-SO_nR^x、及び-SO_nNR^xR^y[式中、nは、0、1、又は2であり、R^x及びR^yは、同じであるか又は異なり、独立に水素、アルキル、又はヘテロ環であり、アルキル置換基及びヘテロ環置換基の各々を、本明細書で記載される置換基のうち1又は複数でさらに置換することができる]が含まれる。置換基のリストの前で用いられる場合の「置換されていてもよい」という用語は、リスト中の置換基の各々を、場合によって、本明細書に記載される通りに置換しうることを意味する。

10

【0098】

[0146]特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープロープの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープロープのブロッカー部分から、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15ヌクレオチドなど、約5~約15又は約5~約10ヌクレオチド隔てて配置される。他の特定の場合には、PCR増幅時において、対立遺伝子特異的ブロッカープロープが切断されない。さらなる場合には、対立遺伝子特異的ブロッカープロープのT_mが、約58~約66の範囲である。

20

【0099】

[0147]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーが、少なくとも約1、2、3、4、5、又は6つ(例えば、2~6つ)の核酸修飾を含む。特定の場合には、1又は複数の修飾が、マッチした標的配列とミスマッチした標的配列とのT_m差を増大させ、及び/又はミスマッチプライミングの有効性を低下させ、これによって、アッセイの特異性及び/又は選択性を改善することができる。他の特定の場合には、1又は複数の修飾が、循環腫瘍細胞試料の対立遺伝子の識別を改善する。このような修飾の非限定的な例には、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TZNA)、5'-メチル-デオキシシチジン、2'-フルオロ修飾核酸、8-アザ-7-デアザ-dA(ppA)、8-アザ-7-デアザ-dG(ppG)、1H-ピラゾロ[4,4-d]ピリミジン-4(5H)-6(7H)-ジオン(ppX)、2'-デオキシシュードイソシチジン(イソdC)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(fdU)、及び2'-O、4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)修飾、及びこれらの修飾の組合せが含まれる。特定の実施形態では、2つのLNA塩基が配列中で互いと隣り合わないように、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーにおいて存在するLNA修飾が、不連続又は非隣接である。

30

【0100】

[0148]好ましい実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーにおいて存在する核酸修飾が、1又は複数のLNAヌクレオチドを含む。特定の実施形態では、修飾を、対立遺伝子特異的ブロッカープロープ及び/又は対立遺伝子特異的プライマー内の(a)3'端、(b)5'端、(c)内部位置、又は(a)、(b)、若しくは(c)の任意の組合せに配置する。一部の好ましい実施形態では、この修飾が、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、1つの修飾(例えば、LNA)が、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。他の好ましい実施形態では、この修飾が、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、1つの修飾(例えば、LNA)が、対立遺伝子特異的ブロッカープロープの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。さらに他の好ましい実施形態では、核酸修飾(例えば、LNA)が、対立遺伝子特異的プライマー及び/又は対立遺伝子特異的ブロッカープロープの連続位置又は隣接位置に配置されない。

40

50

【0101】

[0149] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び/又は対立遺伝子特異的プライマーにおいて存在する核酸修飾が、1又は複数の(少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、11、12、13、14、15、又は全ての)PNAヌクレオチド、ZNAヌクレオチド、TNAヌクレオチド、及び/又はTzDNAヌクレオチドを独立に含む。

【0102】

[0150] 本発明で用いる核酸修飾の他の例は、例えば、その開示が参照によってその全体において全ての目的で本明細書に組み込まれる、米国特許第7,517,978号において記載されている。

10

【0103】

[0151] 例えば、LNA、PNA、ZNA、TNA、TzDNA、ppA、ppG、及び5-フルオロ-dU(fdU)を含めた多くの修飾核酸部分は市販されており、当技術分野でよく知られているオリゴヌクレオチド合成法において用いることができる。一部の実施形態では、修飾プライマー及びプローブの合成は、これもまた当技術分野でよく知られている標準的な化学的手段を用いて実行することができる。例えば、修飾部分又は修飾塩基は、(a)DNA合成支持体としての修飾ヌクレオシド、(b)ホスホルアミダイトとしての修飾ヌクレオシド、(c)DNA合成時における試薬(例えば、DNA配列へと組み込む場合の、転換可能なアミダイトのベンジルアミン処理)、又は(d)合成後修飾を用いることによって導入することができる。

20

【0104】

[0152] 加えて、一部の実施形態では、本発明の対立遺伝子特異的プライマー及び/又は対立遺伝子特異的ブロッカープローブのオリゴヌクレオチドへと組み込まれるヌクレオチド単位が、塩基のうち1又は複数に、例えば、連結アームを介して共有結合的に結合する架橋形成官能基(アルキル化剤)も有しうる。

【0105】

[0153] さらに別の態様では、本発明は、混合試料中の対立遺伝子多型を検出及び/又は定量化するための方法を提供する。これらの方法のうちの一部は、(a)第1の対立遺伝子特異的プライマーを、第1の反応混合物中の、第1の対立遺伝子(対立遺伝子1)を含む第1の核酸分子とハイブリダイズさせ、第2の対立遺伝子特異的プライマーを、第2の反応混合物中の、第2の対立遺伝子(対立遺伝子2)を含む第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップであって、対立遺伝子2が、対立遺伝子1と同じ遺伝子座に対応するステップと、(b)第1の対立遺伝子特異的ブロッカープローブを、第1の反応混合物中の、対立遺伝子2を含む第2の核酸分子とハイブリダイズさせ、第2の対立遺伝子特異的ブロッカープローブを、第2の反応混合物中の、対立遺伝子1を含む第2の核酸分子とハイブリダイズさせるステップと、(c)第1の検出用プローブを、第1の反応混合物中の、第1の核酸分子とハイブリダイズさせ、第2の検出用プローブを、第2の反応混合物中の、第1の核酸分子とハイブリダイズさせるステップと、(d)第1の遺伝子座特異的プライマーを、第1の反応混合物中の、第1の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物とハイブリダイズさせ、第2の遺伝子座特異的プライマーを、第2の反応混合物中の、第2の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物とハイブリダイズさせるステップと、(e)第1の核酸分子をPCR増幅して、単位複製配列の第1のセット又は試料を形成し、第2の核酸分子をPCR増幅して、単位複製配列の第2のセット又は試料を形成するステップと、(f)単位複製配列の第1のセットを、単位複製配列の第2のセットと比較して、対立遺伝子2を含む試料中の対立遺伝子1及び/又は対立遺伝子1を含む試料中の対立遺伝子2を定量化するステップとを含む。

30

40

【0106】

[0154] さらに別の態様では、本発明は、標的配列の少なくとも第2の対立遺伝子多型を含むことが疑われる核酸試料中で、標的配列の第1の対立遺伝子多型を検出するための方法を提供する。このような方法の非限定的な例は、以下の構成要素(i)核酸試料、(i

50

i) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、本明細書に記載される核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、(iii) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含する、第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、本明細書に記載される伸長不可能なブロック部分及び核酸修飾を含む対立遺伝子特異的ブロックプローブ、(iv) 第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマー、並びに/又は(v) 検出用プローブのうちの1若しくは複数を組み合わせることによって、反応混合物を形成するステップを含む。特定の場合には、第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子を含み、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子を含む。

10

【0107】

[0155]次に、遺伝子座特異的プライマー及び対立遺伝子特異的プライマーを用いて、反応混合物に対して増幅反応、典型的にはPCR増幅反応を実行して単位複製配列を形成する。次いで、単位複製配列を、単位複製配列へと結合したときの検出用プローブの検出可能な特性の変化によって検出し、これによって、核酸試料中の標的遺伝子の第1の対立遺伝子多型を検出する。例示的な実施形態における検出用プローブは5'ヌクレアーゼプローブであり、例示的な実施形態における検出可能な特性は蛍光である。

【0108】

[0156]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの5'側標的領域の3'側ヌクレオチド位置が、対立遺伝子特異的ヌクレオチドの位置である。他の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロックプローブの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を、対立遺伝子特異的ブロックプローブの中央部に配置する。

20

【0109】

[0157]特定の実施形態では、第1の対立遺伝子多型の量を、検出用プローブの検出可能な特性の変化を評価することによって決定する。

【0110】

[0158]一部の実施形態では、核酸試料中の標的配列内の対立遺伝子多型を検出するための本発明の方法が、以下のサイクリングプロトコール

(a) 以下の構成要素

30

(i) 核酸試料、

(ii) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、本明細書に記載される第1の対立遺伝子多型の位置に核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、

(iii) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含する、第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、ブロック部分及び本明細書に記載される第2の対立遺伝子多型の位置における核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロックプローブ、

(iv) 第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマー、及び

40

(v) 検出用プローブ

のうちの1又は複数をを含む反応混合物を形成するステップ、

(b) アニリング温度/伸長温度で実行されるいくつかのサイクルを含むサイクリングプロトコールを用いて標的配列をPCR増幅するステップ、並びに

(c) ステップ(b)により産生される標的配列の増幅産物中の検出用プローブの検出可能な特性の変化を検出するステップを含む。

【0111】

[0159]本発明の方法には、いくつかの主要な利点が存在する。まず、本明細書に記載さ

50

れる遺伝子型決定アッセイは、マッチした標的又は対立遺伝子についての Ct 値を低下させることによって検出感度を改善する。次に、本明細書で記載される遺伝子型決定アッセイは、マッチした配列の Ct 値とミスマッチした配列の Ct 値との間の Ct を増大させることによって、特異性を改善する。加えて、本明細書で記載される遺伝子型決定アッセイは、多様なアッセイにわたる有効性の均一性を改善する。

【0112】

[0160]他の実施形態では、本発明の方法は、2段階のサイクリングプロトコールを含みうる。一部の実施形態では、核酸試料中の標的配列内の対立遺伝子多型を検出するための方法が、

(a) 以下の構成要素

(i) 核酸試料、

(ii) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、本明細書で記載される第1の対立遺伝子多型の位置に核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、

(iii) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含する、第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、ブロッキング部分及び本明細書で記載される第2の対立遺伝子多型の位置における核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的ブロックプローブ、

(iv) 第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマー、及び

(v) 検出用プローブ

のうちの1又は複数を含む反応混合物を形成するステップと、

(b)

(i) 第1のアニーリング温度/伸長温度で実行される第1のサイクル数を含む第1の増幅ステップ、及び

(ii) 第2のアニーリング温度/伸長温度で実行される第2のサイクル数を含む第2の増幅ステップ

を含む2段階のサイクリングプロトコールを用いて標的配列をPCR増幅するステップと、

(c) ステップ(b)により産生される標的配列の増幅産物中の検出用プローブの検出可能な特性の変化を検出するステップと

を含む。

【0113】

[0161]場合によって、ステップ(b)における第1のサイクル数が、第2のサイクル数より少なく、第1のアニーリング温度/伸長温度が、第2のアニーリング温度/伸長温度より低い。一部の実施形態では、サイクリングプロトコールの第1段階において用いられるサイクル数が、第2段階において用いられるサイクル数全体の約2%~20%、4%~18%、6%~16%、8%~14%、10%~12%、又は任意の中間の百分率である。他の実施形態では、第1段階において、約1~10サイクル、2~8サイクル、3~7サイクル、4~6サイクルの間、又は任意の中間のサイクル数、例えば、2、3、4、5、6、又は7サイクルを使用する。

【0114】

[0162]一部の実施形態では、サイクリングプロトコールの第2段階において用いられるサイクル数が、第1段階において用いられるサイクル数の約5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、18倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍である。一部の実施形態では、第2段階において、約30~50サイクル、35~48サイクル、40~46サイクルの間、又は任意の中間のサイクル数、例えば、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、又は46サイクルを使用する。

【0115】

10

20

30

40

50

[0163]一部の実施形態では、第1のサイクリング段階において用いられる低いアニーリング温度/伸長温度が、第2のサイクリング段階において用いられるアニーリング温度/伸長温度より約1、約2、約3、約4、又は約5低い。場合によって、第1段階のアニーリング温度/伸長温度が、約50～60、52～58、又は54～56の間、例えば、53、54、55、又は55である。他の特定の実施形態では、第2段階のアニーリング温度/伸長温度が、約56～66、58～64、又は60～62の間、例えば、58、60、62、又は64である。

【0116】

[0164]別の態様では、本発明は、以下の構成要素(i)核酸分子、(ii)対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、(iii)対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第2の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、核酸修飾を含み、オリゴヌクレオチド配列の3'端にブロック部分を含む対立遺伝子特異的ブロックプローブ、(iv)第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマー、及び/又は(v)検出用プローブを含む反応混合物を提供する。

【0117】

[0165]一部の実施形態では、本発明の方法が、所与のSNP又は遺伝子について、第2の対立遺伝子多型の約1/10、1/100、1/1,000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000、又は1/1,000,000未満、及びこれらの間の任意の部分範囲(fractional range)の頻度で存在する第1の対立遺伝子多型を検出するのに用いられる。他の実施形態では、本発明の方法が、試料容量又は反応容量1、10、300、500、又は1,000マイクロリットル当たり約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、250、500、750、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000、又は1,000,000コピー未満、及びこれらの間の任意の部分範囲で存在する第1の対立遺伝子多型を検出するのに用いられる。

【0118】

[0166]特定の実施形態では、第1の対立遺伝子多型が突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である。一部の実施形態では、本発明の方法が、少なくとも約1,000～1,000,000など、約1,000～10,000、約10,000～100,000、又は約100,000～1,000,000個の野生型分子のバックグラウンド中に1個、又はこれらの間の任意の部分範囲にある突然変異体分子を検出するステップを伴いうる。一部の実施形態では、方法が、タックマン(登録商標)ベースのアッセイと少なくとも同等な高感度及び有効性をもたらさうる。

【0119】

[0167]別の態様では、本発明は、別の第2の対立遺伝子多型を含む試料中の第1の対立遺伝子多型を定量化するためのキットであって、(a)対立遺伝子特異的プライマー、(b)対立遺伝子特異的ブロックプローブ、(c)遺伝子座特異的プライマー、(d)検出用プローブ、及び/又は(e)ポリメラーゼを含むキットを提供する。

【0120】

[0168]さらに別の態様では、本発明は、2つ以上の容器のうちの1つに独立に分配された以下の構成要素(i)対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、本明細書に記載される核酸修飾を含む、対立遺伝子特異的プライマー、(ii)対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含する、第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、伸長不可能なブロック部分及び本明細書に記載される核酸修飾を含む、対立遺伝子特異

10

20

30

40

50

的ブロッカープローブを含む2つ以上の容器を含むキットを提供する。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、標的配列の第2の対立遺伝子多型と相補的な対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分であって、核酸修飾を含む対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含み、ここで、対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、オリゴヌクレオチド配列の3'端においてブロッカー部分を含む。

【0121】

[0169]一部の実施形態では、キットが、第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーをさらに含む。他の実施形態では、キットが、検出用プローブをさらに含む。さらに他の実施形態では、キットが、前増幅に用いられるさらなる構成要素をさらに含む。

10

【0122】

[0170]一部の実施形態では、本発明の組成物、方法、及び/又はキットが、早期のがん診断のための血液又は微細針吸引物(FNA)など、試料中の腫瘍細胞を検出するのに有用である。他の実施形態では、本発明の組成物、方法、及び/又はキットが、がん又は疾患に関連する遺伝子変異又は体細胞突然変異の検出及び検証に有用である。さらに他の実施形態では、組成物、方法、及び/又はキットを、二対立遺伝子性のSNP、三対立遺伝子性のSNP、又は四対立遺伝子性のSNPを遺伝子型決定するために用いることができる。他の実施形態では、本発明の組成物、方法、及び/又はキットを、単一又は複数のヌクレオチドの挿入突然変異又は欠失突然変異を同定するために用いることができる。一部の実施形態では、本発明の組成物、方法、及び/又はキットを、QCアッセイ及びヒト同定アッセイ、細胞汚染についての細胞株QC、対立遺伝子発現解析、ウイルスタイピング/希少病原体の検出、プールされた試料からの突然変異の検出、血液中の循環腫瘍細胞の検出、並びに/又は出産前診断法のための混合DNA試料からのDNAタイピングのために用いることができる。

20

【0123】

B. 対立遺伝子特異的プライマー

[0171]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、約16~28、約17~26、約18~24、若しくは約20~22ヌクレオチドの長さ、又は任意の中間の範囲など、約15~30ヌクレオチドの長さの範囲の短いオリゴマーである。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーのT_mが、約52~68、約54~66、約56~64、約58~62、又は任意の中間の温度(例えば、53、54、55、56)など、約50~70の範囲である。他の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーのT_mが、増幅時に使用されるPCRサイクリング条件のアニール/伸長温度より約3~6高い。特定の場合には、低いT_mでデザインされる対立遺伝子特異的プライマーが、対立遺伝子多型の識別力を増大させる。

30

【0124】

[0172]本発明の一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー濃度を低くすることにより、選択性を改善する。特定の場合には、対立遺伝子特異的プライマーの濃度を、900nMを下回って低減することにより、マッチした配列とミスマッチした配列との間のデルタC_tを増大させる。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの濃度が、約50nM~700nM、約100nM~500nM、約200nM~400nM、約200nM~300nM、約400nM~500nM、又は任意の中間の範囲など、約20nM~900nMの範囲である。

40

【0125】

[0173]一部の実施形態では、本発明の対立遺伝子特異的プライマーが、標的である対象の対立遺伝子に特異的な対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含む。対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、遺伝子の1つの対立遺伝子と相補的であるが、その遺伝子の別の対立遺伝子とは相補的でない。言い換えれば、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、遺伝子の異なる対立遺伝子多型に異なるヌクレオチドを含むことが知られたヌクレオチド位置である、遺伝子の1又は複数の可変的なヌクレオチド位

50

置に結合する。対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、少なくとも1つのヌクレオチドの長さである。例示的な実施形態では、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、1ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を、対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に配置する。他の実施形態では、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を、対立遺伝子特異的プライマーの最3'端から約1~2、3~4、5~6、7~8、9~11、12~15、又は16~20ヌクレオチドに配置する。

【0126】

[0174] 識別塩基を標的とするようにデザインされた対立遺伝子特異的プライマーはまた、対立遺伝子多型の識別も改善しうる。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分のヌクレオチドが、識別性の高い塩基（例えば、A/A、A/G、G/A、G/G、A/C、又はC/A対立遺伝子を検出するための塩基）を標的とする。識別性が低い塩基は、例えば、C/C、T/C、G/T、T/G、C/T対立遺伝子の検出を伴いうる。一部の実施形態では、例えば、検出される対立遺伝子が、A/G SNP又はC/T SNPを伴う場合、A又はGを、対立遺伝子特異的プライマーの3'側の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いることもでき（例えば、A又はTが、高頻度の対立遺伝子である場合）、C又はTを、対立遺伝子特異的プライマーの3'側の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いることもできる（例えば、C又はGが、高頻度の対立遺伝子である場合）。他の実施形態では、A/T SNPを検出及び/又は定量化する場合、Aを、対立遺伝子特異的プライマーの3'端におけるヌクレオチド特異的部分（例えば、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分）として用いることができる。さらに他の実施形態では、C/G SNPを検出及び/又は定量化する場合、Gを、対立遺伝子特異的プライマーの3'端におけるヌクレオチド特異的部分として用いることができる。

【0127】

[0175] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、対象のポリヌクレオチド配列（又は遺伝子座）に特異的な標的特異的部分を含みうる。他の実施形態では、標的特異的部分が、対象の標的であるポリヌクレオチド配列と約75~85%、85~95%、95~99%、又は100%相補的である。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分が、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含みうる。他の実施形態では、標的特異的部分を、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に対して5'側に配置する。標的特異的部分は、約4~30、約5~25、約6~20、約7~15、又は約8~10ヌクレオチドの長さでありうる。一部の実施形態では、標的特異的部分のT_mが、PCRサイクリングに用いられるアニール/伸長温度を約5℃下回る。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分のT_mが、約53~60、約52~59、約53~58、約54~57、約55~56、又は約50~約60の範囲である。

【0128】

[0176] 2つの対立遺伝子特異的プライマーを用いる実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分と第2の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分とが、同じ配列を含むか、又は同じ配列である。

【0129】

[0177] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、自然発生の塩基（すなわち、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシル）と異なる1又は複数の修飾核酸塩基又はヌクレオシド塩基を含みうる。一部の実施形態では、修飾塩基が、アデニン部分、グアニン部分、シトシン部分、ウラシル部分、又はチミン部分を含有する核酸単位と有効にハイブリダイズすることがやはり可能である。一部の実施形態では、（1又は複数の）修飾塩基によって、マッチした標的配列とミスマッチした標的配列とのT_m差を増大させ、及び/又はミスマッチプライミングの効率を低下させ、これによって、アッセイの特異性、選択性、及び再現性を改善することができる。一部の実施形態では、（1又は複数の）修飾塩基によって、対立遺伝子特異的プライマーの、その相補的DNA標的に対

10

20

30

40

50

する結合アフィニティーを増大させることができる。

【0130】

[0178] 特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、少なくとも1つ、2つ、又はこれを超える修飾塩基を含む。修飾塩基の例には、限定なしに述べると、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)及びトリアゾールDNA(TzDNA)、8-アザ-7-デアザ-dA(ppA)、8-アザ-7-デアザ-dG(ppG)、2'-デオキシシュードイソシチジン(イソdC)、5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(fdU)、2'-O, 4'-C-エチレン架橋核酸(ENA)塩基、及びこれらの組合せが含まれる。

【0131】

[0179] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、2つ~6つのLNA、PNA、TNA、ZNA、又はリボース修飾核酸を含む。これらの修飾塩基は、相補的DNA及びRNAに対する熱安定性を呈示し、これによって、本発明の方法における優れたミスマッチ識別が可能となる。これらの修飾塩基の高度な結合アフィニティーは、高度な特異性、選択性、及び/又は再現性を要求するハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いることができる。

【0132】

[0180] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーにおいて存在する修飾塩基が、1又は複数のLNA修飾を含む。これらの実施形態では、LNA修飾を、対立遺伝子特異的プライマーにおける連続位置に配置しない。特定の実施形態では、修飾塩基を、対立遺伝子特異的プライマー内の(a)3'端、(b)5'端、(c)内部位置、又は(a)、(b)、若しくは(c)の任意の組合せに配置する。一部の実施形態では、LNAヌクレオシドが、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、修飾塩基(例えば、LNAヌクレオシド)が、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。

【0133】

[0181] 好ましい実施形態では、LNA修飾を、対立遺伝子特異的プライマーの3'端に配置する。対立遺伝子多型の3'端にLNAを伴うと、対立遺伝子特異的プライマーの融解温度(T_m)が上昇し、これによって、本発明のアッセイの対立遺伝子多型に対する選択性が増強される。加えて、選択的対立遺伝子多型の増幅は、PCRサイクリング時の増幅温度が高いときにも生じうる。場合によって、3'端におけるLNAの存在はまた、DNAポリメラーゼの3'→5'プルーフリーディングのエクソヌクレアーゼ活性を緩徐化する一助ともなる。他の場合には、端部から2番目の位置におけるLNAの存在が、DNAポリメラーゼの3'→5'エクソヌクレアーゼ活性に対する保護をもたらさう(例えば、Giusto, D及びKing, G, Nucleic Acids Res., 32: 3, e 32, 1~8 (2004)を参照されたい)。

【0134】

[0182] 一部の実施形態では、複数のLNAをプライマー内に存在させ、3'端から5~10塩基の間のいずれかの位置に間隔をあけて配置する。他の実施形態では、プライマーが、3'端から2、3、4、5、6、7、8、9、又は10塩基の間のいずれかの位置に間隔をあけて配置された1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11のLNAを含有しうる。さらに他の実施形態では、LNA修飾が、このプライマーの3'端に対して端部から2番目の位置、3'端、5'端、及びこれらの組合せに配置される。これらの実施形態では、LNA修飾が、典型的には、プライマー配列の連続位置に配置されない。

【0135】

[0183] オリゴヌクレオチドにおけるLNA修飾は、相補的DNA標的に対する結合アフィニティーを増大させる。高アフィニティーは、リボースのロックされた3'端コンフォメーションのコンフォメーション的な柔軟性の低減と関連する。DNA塩基と同様に、LNA塩基は、同じリン酸骨格によって連結され、これによって、LNA-DNAプライマーがその相補的DNAに効率的に結合することを可能とし、これによって、二重鎖のT_m

10

20

30

40

50

の上昇を結果としてもたらず。識別効果は、プライマーが、ゲノムDNAへと結合し、PCRサイクリング時において、結合を維持する能力に依存する。これは、LNA-DNAプライマーの高度な結合アフィニティーによって達成される。LNA-DNA二重鎖の高いT_mは、その結合アフィニティーと良好に相関する。LNAを伴う対立遺伝子特異的プライマーは、PCRサイクリング時における高い反応温度を可能とし、T_mが低い非LNAプライマーと比較して、遺伝子型決定アッセイの特異性を増強する。

【0136】

[0184] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー、ブロッカープローブ及び/又は検出用プローブが、PNA修飾を含む。対立遺伝子特異的プライマーにおけるPNA修飾は、そのDNA標的に対する高度な特異性及び感度をもたらす。PNAの高度な結合アフィニティー及び高いT_mは、本明細書に記載される方法に高度な特異性及び再現性をもたらす。

10

【0137】

[0185] PNA-DNA二重鎖は、PNA鎖とDNA鎖との静電斥力が欠如するために、DNA-DNA二重鎖と比較してより大きな強度で、より高い安定性で、より迅速に、より大きな特異性で結合することが当業者によって理解される。安定性の増大は、類似するDNA-DNA二重鎖と対比したPNA-DNA二重鎖のT_mの高さによって反映される。PNA複合体は、熱安定性が大きく、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、及びペプチダーゼによる分解に対する感受性が小さい。PNA-DNA二重鎖のT_mは、塩濃度から部分的に独立であることが示されている。一部の実施形態では、PNAを伴う対立遺伝子特異的プライマー及び/又はブロッカープローブが、塩の非存在下において、二次構造の存在にもかかわらず、その核酸標的に結合しうる。例えば、それらの各々の開示が全ての目的についてそれらの全体において参照によって本明細書に組み込まれる、Nielsen, P. E. 及びEgholm, M., Current Issues Molec. Biol. 1; 89~104 (1999); Gaylordら、Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 34~39 (2005)を参照されたい。

20

【0138】

[0186] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、ジップ核酸(ZNA)分子のうちの1又は複数を含む。ZNAプライマーは、核酸鎖間の静電斥力を減少させるために、その相補的な標的DNAに対するアフィニティーを増大させる。対立遺伝子特異的プライマーにおけるZNA修飾のうちの1又は複数の存在は、ZNA-DNA二重鎖のT_mを上昇させ、本発明の方法における対立遺伝子の識別を改善しうる。

30

【0139】

[0187] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、(3'-2')-L-トレオース核酸(TNA)のうちの1又は複数を含む。TNAは、DNAと強くハイブリダイズすることが可能であり、DNA及びRNAのA形態の良好な模倣体である。類似するDNA-DNA複合体と比較して、TNA-DNA二重鎖の安定性が増大するため、TNAを、本発明の対立遺伝子特異的プライマー法において用いることによって、対立遺伝子多型のミスマッチ識別を改善することができる。

40

【0140】

[0188] 他の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、トリアゾール連結されるDNA(TzDNA)分子のうちの1又は複数を含む。TzDNAは、類似するDNAプライマーと比較して、マッチしたそのDNA標的に対する熱安定性を増大させているので、TzDNA対立遺伝子特異的プライマーを、対立遺伝子多型の識別を改善するための本発明の方法において用いることができる。

【0141】

[0189] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、テールを含む。場合によって、対立遺伝子特異的プライマーは、プライマーの全長を短縮することを可能とし、これにより、アッセイ感度に対する著しい影響を伴わずに、T_mを低下させるテールを含む。場合によって、テールは、対立遺伝子特異的プライマーの5'末端に存在する。他の場

50

合には、テールを、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分及び/又は対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の5'側に配置する。一部の実施形態では、テールが、対象の標的であるポリヌクレオチド配列と約65~75%、約75~85%、約85~95%、約95~99%、又は約100%非相補的である。一部の実施形態では、テールが、約4~30、約5~25、約6~20、約7~15、又は約8~10ヌクレオチドの長さなど、約2~40ヌクレオチドの長さでありうる。一部の実施形態では、テールが、GCに富む。例えば、一部の実施形態では、テール配列が、約50~100%、約60~100%、約70~100%、約80~100%、約90~100%、又は約95~100%のGヌクレオチド及び/又はCヌクレオチドを含む。

【0142】

[0190]対立遺伝子特異的プライマーのテールは、テール領域が、プライマーの伸長後に、プライマーの伸長産物内の相補的配列(存在する場合)とハイブリダイズすることが可能な立体配置が含まれるがこれに限定されない、多数の異なる様態で構成することができる。非限定的な例として述べると、対立遺伝子特異的プライマーのテールは、遺伝子座特異的プライマーの伸長から結果として生じる伸長産物内の相補的配列とハイブリダイズしうる。

【0143】

[0191]2つの対立遺伝子特異的プライマーを用いる実施形態では、第1の対立遺伝子特異的プライマーのテールと、第2の対立遺伝子特異的プライマーのテールとが、同じ配列を含むか、又は同じ配列である。

【0144】

C. 対立遺伝子特異的ブロッカープローブ

[0192]一部の実施形態では、本発明の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、第1の対立遺伝子とハイブリダイズし、第2の対立遺伝子(the second variant)の増幅に影響を及ぼすことなしに、とりわけ第1の対立遺伝子の増幅を効率的且つ選択的に阻害するようにデザインされる。本発明の一部の態様では、ブロッカープローブが、野生型対立遺伝子とハイブリダイズし、突然変異体対立遺伝子の増幅に影響を及ぼすことなしに、とりわけ野生型対立遺伝子の増幅を阻害するようにデザインされる。

【0145】

[0193]対立遺伝子特異的ブロッカープローブは、一本鎖であり、長さが約100ヌクレオチド以下、約50ヌクレオチド以下、約30ヌクレオチド以下、約20ヌクレオチド以下、又は約5~20ヌクレオチドの、短いオリゴマーとしてデザインすることができる。

【0146】

[0194]一部の実施形態では、ブロッカープローブの T_m が、58~70、61~69、62~68、63~67、64~66、若しくは約60~約63、又は任意の中間の範囲である。さらに他の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの T_m が、増幅時に使用されるPCRサイクリング条件内のアニール/伸長温度より約3~6高い。

【0147】

[0195]一部の実施形態では、ブロッカープローブが、PCR増幅時において切断されない。一部の実施形態では、ブロッカープローブが、それらの3'端において伸長不可能なブロッカー部分を含む。他の実施形態では、ブロッカープローブが、さらなる伸長不可能なブロッカー部分、消光剤部分、蛍光の部分などが含まれるがこれに限定されない他の部分を、それらの3'端、5'端、及び/又は任意の中間の内部位置においてさらに含む。他の特定の実施形態では、対立遺伝子位置を、それらの標的配列とハイブリダイズすると伸長不可能な対立遺伝子特異的ブロッカープローブのブロッカー部分から、約5~15など、約5~11、約6~10、約7~9、約7~12、又は約9~11など、約6、約7、約8、約9、約10、又は約11ヌクレオチド隔てて配置される。一部の実施形態では、限定なしに述べると、伸長不可能なブロッカー部分には、置換されていてもよい C_1 ~ C_2 アルキルジオール(例えば、3'-ヘキサンジオール修飾)、置換されていてもよ

10

20

30

40

50

い $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、又は $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオール、副溝結合剤 (MGB)、アミン (NH_2)、ビオチン、PEG、 PO_4 、及びこれらの混合物が含まれる。本明細書で開示される通り、例えば、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の 3' - ヘキサジオール修飾など、伸長不可能なブロッカー部分の使用によって、対立遺伝子特異的 PCR の特異性を増大させることができる。伸長不可能なブロッカー部分に対立遺伝子特異的ブロッカープローブへとコンジュゲートするのに適する方法は、当業者に知られている。例えば、 $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール (例えば、ヘキサジオール) を含むブロッカー部分は、ホスホルアミダイト連結を介して、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの 3' 端へとコンジュゲートすることができる。

【0148】

[0196] 一部の態様では、ヘキサジオール修飾を伴うブロッカープローブは、リン酸化を伴うブロッカープローブより良好に機能する。炭素鎖の柔軟性及び疎水性は、ブロッカーが、立体障害されることなく、その野生型の標的とハイブリダイズすることを可能とする。3' 端のリン酸基は、野生型配列の標的に結合するが、効率は、リン酸基のバルク性及びイオン性の性質により減弱しうる。

【0149】

[0197] 特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤 (MGB) を含まないか、又はこれらを包含しない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、 PO_4 基を含まないか、又はこれらを包含しない。さらなる実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール (例えば、3' - ヘキサジオール修飾)、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオールから本質的になるか、又はこれらからなる。

【0150】

[0198] 一部の実施形態では、ブロッカープローブが、DNA ポリメラーゼによる 3' 側伸長を阻止する 3' 側の連鎖停止剤である、ジデオキシシチジン (ddC) 部分を有する。

【0151】

[0199] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、自然発生の塩基 (すなわち、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及びウラシル) と異なる 1 又は複数の修飾核酸塩基又はヌクレオシド塩基を含みうる。一部の実施形態では、修飾塩基が、アデニン部分、グアニン部分、シトシン部分、ウラシル部分、又はチミン部分を含有する核酸単位と有効にハイブリダイズすることがやはり可能である。一部の実施形態では、(1 又は複数の) 修飾塩基によって、マッチした標的配列とミスマッチした標的配列との T_m 差を増大させ、及び / 又はミスマッチプライミングの効率を低下させ、これによって、アッセイの特異性及び選択性を改善することができる。

【0152】

[0200] 当業者によって、プローブのミスマッチ識別能は、マッチしたプローブ - 標的ニ重鎖とミスマッチしたプローブ - 標的ニ重鎖との融解温度差 (T_m) に依拠することが理解される。ミスマッチは、ニ重鎖に対してより大きな不安定化効果を及ぼすために、プローブサイズが減少する場合は、典型的には T_m は増大する。一般に、マッチした配列とミスマッチした配列との識別が良好な対立遺伝子特異的プローブほど、 T_m 値も大きい。

【0153】

[0201] 特定の実施形態では、本発明の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも 1 つ、2 つ以上の修飾塩基を含む。修飾塩基の非限定的な例には、ロックド核酸 (LNA)、8 - アザ - 7 - デアザ - dA (ppA)、8 - アザ - 7 - デアザ - dG (ppG)、2' - デオキシシュードイソシチジン (イソ dC)、5 - フルオロ - 2' - デオキシウリジン (fdU)、2' - O, 4' - C - エチレン架橋核酸 (ENA) 塩基、及びこれらの組合せが含まれる。好ましい実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブに

10

20

30

40

50

において存在する修飾塩基が、1又は複数のLNA修飾を含む。特定の実施形態では、修飾塩基を、(a)3'端、(b)5'端、(c)内部位置、又は対立遺伝子特異的ブロッキングプロープ内の(a)、(b)、若しくは(c)の任意の組合せに配置する。一部の好ましい実施形態では、LNAヌクレオシドが、対立遺伝子多型を識別するのに用いられる核酸塩基を含むように、修飾塩基(例えば、LNAヌクレオシド)が、対立遺伝子特異的ブロッキングプロープの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。

【0154】

[0202]一部の実施形態では、ブロッキングプロープの T_m が上昇するにつれて、ブロッキングプロープの阻害効果が増大する。ブロッキング内のLNAの位置に応じて、 T_m を1~8上昇させることができる(例えば、Koshkinら、Tetrahedron、54:3607~3630(1998)、Obikara、Tetrahedron Lett.、39:5401~5404(1998)、Wangら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、9:1147~1150(1999)を参照されたい)。 T_m の高いブロッキングは、伸長時間における野生型対立遺伝子へのアニーリングを維持し、これによって、効率的なPCR増幅を阻害しうる。二重鎖形成についての反応速度研究は、LNAを含有するDNA二重鎖の解離速度が、天然DNAの二重鎖の場合と比較して遅いことを示している。また、LNAの強固な構造が、そのTaq DNAポリメラーゼとの相互作用に影響を及ぼすことも示されている。(Larottaら、Molecular and Cellular Probes、17:253~259(2003))。

10

【0155】

[0203]本発明の一部の態様では、ブロッキングプロープが、1又は複数のLNA修飾を保有しうる。一部の実施形態では、LNAを、ブロッキング配列の中央位置、端部から2番目の位置、5'端、ブロッキング配列の異なる区間、及び/又はこれらの組合せに配置する。一部の実施形態では、LNAが、野生型対立遺伝子(the wild-type variant)と相補的な変異体ヌクレオチドに配置される。他の実施形態では、ブロッキングプロープが、連続LNAを含有しない。

20

【0156】

[0204]2つの対立遺伝子特異的ブロッキングプロープを用いる実施形態では、第1の対立遺伝子特異的ブロッキングプロープが、第1の対立遺伝子特異的プライマーと同じ鎖又は配列に結合するのに対し、第2の対立遺伝子特異的ブロッキングプロープは、第1の対立遺伝子特異的プライマーと逆鎖又は相補的配列に結合する。

30

【0157】

[0205]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー及びブロッキングプロープの両方が、LNAを含む。プライマー及びブロッキングプロープの両方における修飾塩基の存在は、本発明のアッセイの特異性を増強する。二重鎖形成についての反応速度研究では、LNAを含有する複合体の解離速度が遅いのは、天然DNAのハイブリダイゼーション能と比較したそのハイブリダイゼーション能の差違に起因することが示されている。LNA分子の強固な構造であれば、それがTaq DNAポリメラーゼと相互作用する様態を変化させうるであろう(Larottaら、Mol. Cell. Probes、17:253~259(2003))。

40

【0158】

D. 検出用プロープ

[0206]一部の態様では、本発明の方法が、融解温度が高くても長さが短い検出用プロープの使用を要求する。 T_m が高くても長さが短いプロープは、良好な対立遺伝子の識別、とりわけ、G A又はG Tなどの困難な突然変異を取り扱う場合に必要である。検出用プロープの例には、副溝結合(MGB)プロープ、Zenプロープ(IDT、Coralville、IA)、ジップ核酸(ZNA)プロープ、及びペプチド核酸(PNA)プロープが含まれるがこれらに限定されない。

【0159】

[0207]一部の実施形態では、検出用プロープが、約16、約18、約22、約24、約

50

30、又は中間の任意の数のヌクレオチドなど、約15～30ヌクレオチドの範囲の短いオリゴマーとしてデザインされる。一部の実施形態では、検出用プローブのT_mが、約60～70、約61～69、約62～68、約63～67、約64～66、又は任意の中間の温度の範囲である。

【0160】

[0208]一部の実施形態では、検出用プローブが、遺伝子座特異的検出用プローブ(LST)である。他の実施形態では、検出用プローブが、5'ヌクレアーゼプローブである。一部の実施形態では、検出用プローブが、MGB部分、レポーター部分(例えば、FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、VIC(商標)、又はサイバー(登録商標)グリーン)、消光剤部分(例えば、ブラックホールクエンチャー(商標)又はTAMRA(商標))、及び/又はパッシブリファレンス(例えば、ROX(商標))を含みうる。一部の例示的な実施形態では、検出用プローブが、その開示が参照によってその全体において全ての目的で本明細書に組み込まれる米国特許第6,727,356号において記載される方法及び原理に従ってデザインされる。

10

【0161】

[0209]特定の実施形態では、検出用プローブが、タックマン(登録商標)プローブ(Applied Biosystems, Foster City, CA)である。タックマンプローブは、このプローブが、その相補的DNA標的と共に超安定化された二重鎖を形成する一助となるように、MGBリガンドと共にデザインする(例えば、Afoninら、Nucleic Acid Res., 25:2657～2660(1997)を参照されたい)。二重鎖の安定性の増大は、T_mの上昇と関連する。例えば、MGBを伴う12マーのタックマンプローブのT_m(65)は、MGBを伴わない27マーのDNAプローブのT_m(66)とほぼ同一である。短いプローブを伴うMGBは、プローブ全体の安定性により大きく寄与することが示されている。3'-MGB DNAプローブは、PCRサイクリング時における配列特異性を増大させることが示されている(Kutyavinら、Nucleic Acid Res., 28:655～661(2000))。本発明のMGBプローブは、対立遺伝子多型に特異的であるか、対立遺伝子多型に近いか、又は対立遺伝子多型から隔たったゲノム配列を検出するようにデザインする。例えば、MGBプローブによって、対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブを用いるPCRサイクリングによって生成させた増幅産物の3'端を検出することができる。

20

30

【0162】

[0210]他の実施形態では、検出用プローブが、ZENプローブ(IDT, Coralville, IA)である。ZEN二重消光プローブが、オリゴヌクレオチドプローブ、5'FAMフルオロフォア、3'IBFq消光剤、及び内部ZEN消光剤を含む。ZEN消光剤は、バックグラウンドを低下させ、従来の色素-消光剤プローブ(例えば、5'FAM-3'TAMRA、5'FAM-3'IBFQ、5'FAM-3'エクリプス、5'FAM-3'BHQ1と比較して高度なシグナルを発生させる。内部ZEN消光剤は、色素と消光剤との間の長さをわずかに9塩基対へと短縮し、これにより、バックグラウンドの蛍光が著しく低減され、より完全な消光がもたらされる。終点シグナルが増大し、Ct(閾値サイクル; 閾値を上回ると蛍光が増大するサイクル数の比)値が低減されるにつれて、ZENプローブの感度が増大する。

40

【0163】

[0211]さらに他の実施形態では、検出用プローブが、1又は複数のジップ核酸(ZNA)修飾及び/又はペプチド核酸(PNA)修飾を含む。ZNAプローブのカチオン電荷の安定性が増大するために、本発明の方法は、短い二重標識されたZNAプローブを含みうる。ZNAプローブは、標準的な検出用プローブを超えて、標的認識の増強、感度の増大、高度な特異性、及びT_mの上昇を示す。別の実施形態では、検出用プローブが、PNAプローブである。PNA修飾によって、単一塩基レベルにおける高レベルの識別がもたらされるために、本発明の短いPNAプローブは、高度な特異性をもたらす。

50

【0164】

[0212]一部の実施形態では、検出用プローブに、2つ～6つのLNA、PNA、TNA、ZNA、又はリボース修飾核酸を含む修飾塩基又は核酸類似体を伴うオリゴヌクレオチドを用いる。これらの修飾塩基は、相補的DNA及びRNAに対する熱安定性を呈示し、これによって、本発明の方法における優れたミスマッチ識別が可能となる。

【0165】

[0213]他の実施形態では、遺伝子座特異的検出用プローブが、その開示が参照によりその全体において全ての目的で本明細書に組み込まれる、米国特許第6,727,356号において記載される原理及び方法に従ってデザインされる。例えば、蛍光発生プローブは、一本鎖DNAの3'末端における消光剤及び5'末端におけるフルオロフォアにより調製することができる。このような例では、Taq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により、DNA鎖を切断し、これにより、フルオロフォアを消光剤から分離し、蛍光シグナルを発光させることができる。一部の実施形態では、PCR増幅のプライマーの伸長ステップにおいて、検出用プローブを鑄型鎖とハイブリダイズさせる(例えば、60～65で)。他の実施形態では、MGBを、遺伝子座特異的検出用プローブの消光剤部分と共有結合的に接合させる(例えば、リンカーを介して)。

10

【0166】

[0214]2つの検出用プローブを用いる実施形態では、第1の検出用プローブと第2の検出用プローブとが同じであるか、及び/又は同じ配列を含むか、又は同じ配列である。

【0167】

20

E. 遺伝子座特異的プライマー

[0215]一部の実施形態では、遺伝子座特異的プライマーを、約16、約18、約22、約24、約30、又は中間の任意の数のヌクレオチドなど、約15～30ヌクレオチドの範囲の短いオリゴマーとしてデザインする。一部の実施形態では、遺伝子座特異的プライマーのTmが、約60～70、約61～69、約62～68、約63～67、若しくは約64～66、又は任意の中間の範囲にわたる。

【0168】

[0216]2つの遺伝子座特異的プライマーを用いる実施形態では、第1の遺伝子座特異的プライマー及び/又は第2の遺伝子座特異的プライマーが、同じ配列を含むか、又は同じ配列である。

30

【0169】

F. さらなる構成要素

[0217]当技術分野では、本発明を実施するのに適するポリメラーゼ酵素がよく知られており、多数の供給源に由来しうる。熱安定性ポリメラーゼは、例えば、市販されている(例えば、American Type Culture Collection、Rockville、Md.から)多様な好熱性細菌から、当業者によく知られている方法を用いて得ることができる。例えば、米国特許第6,245,533号を参照されたい。細菌細胞は、当業者によく知られている特定の種の活性培養物を増殖させるのに適する培養培地及びインキュベーション条件を用いる標準的な微生物学法に従って増殖させることができる。例えば、Brockら、J. Bacteriol.、98(1):289～297(1969); Oshimaら、Int. J. Syst. Bacteriol.、24(1):102-112(1974)を参照されたい。熱安定性ポリメラーゼの供給源としての使用に適するのは、好熱性細菌であるテルムス・アクアティクス(Thermus aquaticus)、テルムス・テルモフィルス(Thermus thermophilus)、テルモコックス・リトラリス(Thermococcus litoralis)、ピロコックス・フリオスス(Pyrococcus furiosus)、ピロコックス・ウォーシー(Pyrococcus woosii)、及びピロコックス(Pyrococcus)属の他の種、バチルス・ストレアロテルモフィルス(Bacillus stearothermophilus)、スルホロブス・アチドカルダリウス(Sulfolobus acidocaldarius)、テルモプラズマ・アチドフ

40

50

イルム (*Thermoplasma acidophilum*)、テルムス・フラブス (*Thermus flavus*)、テルムス・ルベル (*Thermus ruber*)、テルムス・ブロキアヌス (*Thermus brockianus*)、テルモトガ・ネアポリタナ (*Thermotoga neapolitana*)、テルモトガ・マリティマ (*Thermotoga maritima*) 及びテルモトガ (*Thermotoga*) 属の他の種、並びにメタノバクテリウム・テルモアウトロフィクム (*Methanobacterium thermoautotrophicum*)、並びにこれらの種の各々の突然変異体である。好ましい熱安定性ポリメラーゼには、Taq DNAポリメラーゼ、Tne DNAポリメラーゼ、Tma DNAポリメラーゼ、又はこれらの突然変異体、誘導体、若しくは断片が含まれうるがこれらに限定されない。

10

【0170】

G. 対立遺伝子多型の定量化

[0218] 特定の態様では、核酸試料中の標的配列の対立遺伝子多型を定量化する方法が、対立遺伝子多型について陽性の細胞株から確立された検量線を用いて、試料中に存在する対立遺伝子多型の量及び/又は百分率を決定するステップを含む。特定の実施形態では、試料中に存在するDNAの量(例えば、対立遺伝子多型を保有する核酸の量)を、Ct値を用いる検量線から計算する(例えば、ナノグラム(ng)又は他の任意の重量単位で)。場合によって、検量線が、対立遺伝子多型について100%の突然変異を保有する細胞株に基づく。他の場合には、検量線に由来するDNAの量(例えば、試料中の対立遺伝子多型を保有する核酸の量)を、細胞株に基づく対立遺伝子多型の突然変異パーセントへと変換する。

20

【0171】

[0219] 本発明のアッセイは、高度な選択性を有し、希少な変異体対立遺伝子を野生型対立遺伝子から差別化し、定量化しうる。アッセイによるデータはまた、直線状でもあり、対立遺伝子多型の定量的情報を導出する、例えば、試料中に存在する対立遺伝子多型の量又は百分率を検出、決定、又は計算するのに用いることができる。

【0172】

[0220] 一部の態様では、対立遺伝子 (the variant) について陽性の細胞株に由来する対立遺伝子多型についての検量線を作成する。一部の実施形態では、以下の陽性細胞株に由来するKRAS対立遺伝子多型: SW1116細胞株に由来するG12A; NCI-H23細胞株に由来するG12C; LS174T細胞株に由来するG12D; PSN1細胞株に由来するG12R; A549細胞株に由来するG12S; SW403細胞株に由来するG12V; H1734細胞株に由来するG13C; T84細胞株に由来するG13D; 及び/又はH460細胞株に由来するQ61Hについての検量線を作成する。他の実施形態では、以下の陽性細胞株に由来するPIK3CAの対立遺伝子多型: SW948細胞株に由来するE542K; SupT1細胞株に由来するE545D; MCF7細胞株に由来するE545K; 及び/又はKPL4細胞株に由来するH1047Rについての検量線を作成する。さらに他の実施形態では、以下の陽性細胞株に由来するEGFR対立遺伝子多型: H1975細胞株に由来するT790M及びL858R、並びに/又はH1650細胞株に由来するE746-A750欠失 (E746 del) についての検量線を作成する。さらに他の実施形態では、HT29細胞株に由来するBRAFV600E変異体についての検量線を作成する。場合によって、陽性細胞株に由来するDNA(例えば、100、10、1、0.1、及び/又は0.01ng)の希釈系列に対して本発明のアッセイを実施することから検量線を創出する。

30

40

【0173】

[0221] 他の態様では、核酸試料中の標的配列の対立遺伝子多型を定量化する方法が、試料中に存在する対立遺伝子多型の量及び/又は百分率を、対立遺伝子多型について陽性の細胞株から確立された検量線に基づく演算子を用いて決定するステップを含む。特定の実施形態では、対立遺伝子多型に特異的な突然変異パーセント演算子を、対立遺伝子多型の検量線から確立する。演算子を用いて、核酸試料中の突然変異の量を、本発明の方法から

50

得られる Ct 値から計算することができる。場合によって、対立遺伝子多型の突然変異パーセントを、陽性細胞株の突然変異パーセントは、対立遺伝子多型について 100%であるという仮定に基づき計算することもできる。

【0174】

[0222] 特定の実施形態では、試料中に存在する対立遺伝子多型の量又は百分率を、本明細書に記載される遺伝子型決定アッセイを、試料から得られる核酸に対して実施する場合に得られる Ct 値を決定することによって定量化することができる。対立遺伝子多型についての検量線は、対立遺伝子多型について陽性の細胞株に由来する核酸試料の希釈系列に対して、本明細書に記載される遺伝子型決定アッセイを実施することによって作成することができる。次いで、検量線を用いて、陽性対照（例えば、細胞株）試料中に存在する特異的な核酸の量についての Ct 値を決定することができる。検量線はまた、陽性対照試料について得られる Ct 値を、陽性対照反応 1 回当たりの DNA 量の関数としてプロットする場合の直線の傾き及び / 又は直線の切片の値を決定するのにも用いることができる。

10

【0175】

[0223] 図 3 2 ~ 3 5 は、検量線及び / 又は増幅曲線から得られる情報に基づき、試料中に存在する対立遺伝子多型の量及びパーセント（例えば、突然変異パーセント）を定量化するための検量線プロット（例えば、陽性対照試料について）、増幅曲線（例えば、未知の（被験）試料及び陽性対照試料についての）、及び演算子の非限定的な例を提示する。特定の実施形態では、突然変異パーセントを、試料中の出発核酸の量（例えば、DNA）に対する突然変異の量から計算する。試料中の出発核酸の量（例えば、DNA）は、10^{g₁₀} 値（例えば、ナノグラム単位の）として表すことができる。他の実施形態では、演算子により、本明細書に記載される遺伝子型決定アッセイを用いて作成した検量線及び / 又は増幅曲線から得られる Ct 値、直線の傾きの値、及び / 又は直線の切片の値などの情報に基づき、試料中に存在する対立遺伝子多型の量及び / 又はパーセント（例えば、突然変異パーセント）を定量化する。さらなる実施形態では、未知の（被験）試料中に存在する対立遺伝子多型について計算される突然変異パーセントが、陽性対照と比べた（例えば、対立遺伝子多型について突然変異パーセントが 100%の陽性細胞株と比較した）突然変異パーセントである。

20

【0176】

IV. 例示的な実施形態

30

[0224] 一態様では、本発明は、標的配列の少なくとも第 2 の対立遺伝子多型を有することが疑われる核酸試料中で、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型を検出又は定量化するための方法であって、

(a) (i) 核酸試料、

(ii) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであり、少なくとも 1 つの核酸修飾（例えば、1 又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的プライマー、

(iii) 第 2 の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的プロッカープローブであり、伸長不可能なプロッカー部分及び少なくとも 1 つの核酸修飾（例えば、1 又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的プロッカープローブ、

40

(iv) 検出用プローブ、及び

(v) 第 1 の対立遺伝子多型の 3' 側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマー

を組み合わせることによって反応混合物を形成するステップと、

(b) 遺伝子座特異的プライマー及び対立遺伝子特異的プライマーを用いて反応混合物に対して増幅反応を実行して単位複製配列を形成するステップと、

(c) 検出用プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって単位複製配列を検出し、これによって、核酸試料中の標的遺伝子の第 1 の対立遺伝子多型を検出するステップと

を含む方法を提供する。

50

【0177】

[0225]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の（1又は複数の）核酸修飾が、対立遺伝子特異的プライマーの5'端、及び/又は対立遺伝子特異的プライマーの3'端の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の（1又は複数の）核酸修飾が、ロックド核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）、ジップ核酸（ZNA）、トリアゾール核酸（TzNA）、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0178】

[0226]他の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の（1又は複数の）核酸修飾が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分及び/又は内部位置に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む。場合によって、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の（1又は複数の）核酸修飾が、ロックド核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）、ジップ核酸（ZNA）、トリアゾール核酸（TzNA）、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

10

【0179】

[0227]一部の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、ポリメラーゼによる3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの3'端への修飾を含む。特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される。好ましい実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブへの3'-ヘキサジオール修飾を含む。

20

【0180】

[0228]特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤（MGB）を含まないか、又はこれらを含まない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、PO₄基を含まないか、又はこれらを含まない。さらなる実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール（例えば、3'-ヘキサジオール修飾）、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、又は置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオールから本質的になるか、又はこれらからなる。

30

【0181】

[0229]一部の実施形態では、検出用プローブが、タックマン（登録商標）プローブを含む。特定の実施形態では、核酸試料が、血液、血清、血漿、微細針吸引物、腫瘍組織、及びこれらの組合せからなる群から選択される。他の実施形態では、第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である。特定の実施形態では、方法が、増幅反応の間の第2の対立遺伝子多型のバックグラウンドシグナルを低減する。

【0182】

[0230]特定の実施形態では、標的遺伝子の第1の対立遺伝子多型を、閾値サイクル又はC_t値を決定することにより定量化することができるが、この場合、検出用プローブの検出可能な特性の変化が、初めてバックグラウンドレベルを上回って検出可能となる。一部の実施形態では、第1の対立遺伝子多型についての検量線を、本発明の方法を対立遺伝子多型について陽性の細胞株に由来する核酸試料の希釈系列に対して実施することにより作成することができる。場合によって、第1の対立遺伝子多型を、試料について得られるC_t値を、検量線によるC_t値と比較することにより定量化する。詳細な実施形態では、検量線を用いて、対立遺伝子多型について陽性の細胞株に由来する核酸試料の希釈系列に対して本発明の方法を実施することにより得られる1又は複数のC_t値（例えば、陽性対照試料中の出発核酸の量と比べて）、直線の傾きの値、及び/又は直線の切片の値を決定す

40

50

る。他の実施形態では、以下：試料中の出発核酸の量（例えば、ng 単位又は他の任意の重量単位の \log_{10} 値として表しうる反応 1 回当たりの DNA 量）；Ct 値；直線の傾きの値（例えば、検量線による）；直線の切片の値（例えば、検量線による）；及びこれらの組合せのうち少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つに基づき、試料中に存在する第 1 の対立遺伝子多型の量及び / 又はパーセント（例えば、突然変異パーセント）を計算する。

【0183】

[0231]別の態様では、本発明は、

- (a) 核酸分子、
- (b) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第 1 の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、少なくとも 1 つの核酸修飾（例えば、1 又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的プライマー、
- (c) 第 2 の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、伸長不可能なブロッカー部分及び少なくとも 1 つの核酸修飾（例えば、1 又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ
- (d) 検出用プローブ、並びに
- (e) 第 1 の対立遺伝子多型の 3' 側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーを含む反応混合物を提供する。

10

【0184】

[0232]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の（1 又は複数の）核酸修飾が、対立遺伝子特異的プライマーの 5' 端、及び / 又は対立遺伝子特異的プライマーの 3' 端の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、2 つ以上の不連続核酸修飾を含む。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の（1 又は複数の）核酸修飾が、ロックド核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）、ジップ核酸（ZNA）、トリアゾール核酸（TzNA）、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

20

【0185】

[0233]他の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の（1 又は複数の）核酸修飾が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分及び / 又は内部位置に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、2 つ以上の不連続核酸修飾を含む。場合によって、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の（1 又は複数の）核酸修飾が、ロックド核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、トレオース核酸（TNA）、ジップ核酸（ZNA）、トリアゾール核酸（TzNA）、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

30

【0186】

[0234]一部の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、ポリメラーゼによる 3' 端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロッカープローブの 3' 端への修飾を含む。特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される。好ましい実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカープローブへの 3' - ヘキサンジオール修飾を含む。

40

【0187】

[0235]特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤（MGB）を含まないか、又はこれらを含まない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、 PO_4 基を含まないか、又はこれらを含まない。さらなる実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール（例えば、3' - ヘキサンジオール修飾）、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオールから本質的になるか

50

、又はこれらからなる。

【0188】

[0236] 一部の実施形態では、検出用プローブが、タックマン（登録商標）プローブを含む。特定の実施形態では、核酸分子が、血液、血清、血漿、微細針吸引物、腫瘍組織、及びこれらの組合せからなる群から選択される試料から得られる。他の実施形態では、第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である。

【0189】

[0237] さらに別の態様では、本発明は、

(a) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、少なくとも1つの核酸修飾（例えば、1又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的プライマー、並びに

(b) 第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロッカークロップであって、伸長不可能なブロッカー部分及び少なくとも1つの核酸修飾（例えば、1又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的ブロッカークロップを含む組成物を提供する。

【0190】

[0238] 一部の実施形態では、組成物が、(c) 検出用プローブ；並びに/又は(d) 第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーをさらに含む。

【0191】

[0239] 一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の(1又は複数の)核酸修飾が、対立遺伝子特異的プライマーの5'端、及び/又は対立遺伝子特異的プライマーの3'端の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の(1又は複数の)核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0192】

[0240] 他の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカークロップ内の(1又は複数の)核酸修飾が、対立遺伝子特異的ブロッカークロップ内の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分及び/又は内部位置に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロッカークロップが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む。場合によって、対立遺伝子特異的ブロッカークロップ内の(1又は複数の)核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0193】

[0241] 一部の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、ポリメラーゼによる3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロッカークロップの3'端への修飾を含む。特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジオール、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される。好ましい実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、対立遺伝子特異的ブロッカークロップへの3'-ヘキサジオール修飾を含む。

【0194】

[0242] 特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、副溝結合剤(MGB)を含まないか、又はこれらを包含しない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、PO₄基を含まないか、又はこれらを包含しない。さらなる実施形態では、伸長不可能なブロッカー部分が、置換されていてもよいC₁~C₂₄アルキルジオール（例えば、3'-ヘキサジオール修飾）、置換されていてもよいC₂~C₂₄アルケニルジ

10

20

30

40

50

オール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオールから本質的になるか、又はこれらからなる。

【0195】

[0243]さらなる実施形態では、第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である。

【0196】

[0244]別の態様では、本発明は、2つ以上の容器のうちの1つに独立に分配された以下の構成要素

(a) 対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第1の対立遺伝子多型と相補的である対立遺伝子特異的プライマーであって、少なくとも1つの核酸修飾（例えば、1又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的プライマー、並びに

(b) 第2の対立遺伝子多型を含む標的配列の領域と相補的な対立遺伝子特異的ブロックャープローブであって、伸長不可能なブロックャー部分及び少なくとも1つの核酸修飾（例えば、1又は複数の核酸修飾）を含む、対立遺伝子特異的ブロックャープローブを含む2つ以上の容器を含むキットを提供する。

【0197】

[0245]一部の実施形態では、キットが、(c) 検出用プローブ；並びに/又は(d) 第1の対立遺伝子多型の3'側にあり、逆鎖に存在する、標的配列の領域と相補的な遺伝子座特異的プライマーをさらに含む。

【0198】

[0246]一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の(1又は複数の)核酸修飾が、対立遺伝子特異的プライマーの5'端、及び/又は対立遺伝子特異的プライマーの3'端の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む。一部の実施形態では、対立遺伝子特異的プライマー内の(1又は複数の)核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0199】

[0247]他の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロックャープローブ内の(1又は複数の)核酸修飾が、対立遺伝子特異的ブロックャープローブ内の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分及び/又は内部位置に配置される。特定の実施形態では、対立遺伝子特異的ブロックャープローブが、2つ以上の不連続核酸修飾を含む。場合によって、対立遺伝子特異的ブロックャープローブ内の(1又は複数の)核酸修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、トレオース核酸(TNA)、ジップ核酸(ZNA)、トリアゾール核酸(TzNA)、及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【0200】

[0248]一部の実施形態では、伸長不可能なブロックャー部分が、ポリメラーゼによる3'端へのさらなる塩基の付加を阻止する、対立遺伝子特異的ブロックャープローブの3'端への修飾を含む。特定の実施形態では、伸長不可能なブロックャー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオール、及びこれらの組合せからなる群から選択される。好ましい実施形態では、伸長不可能なブロックャー部分が、対立遺伝子特異的ブロックャープローブへの3'-ヘキサジオール修飾を含む。

【0201】

[0249]特定の実施形態では、伸長不可能なブロックャー部分が、副溝結合剤(MGB)を含まないか、又はこれらを含まない。他の特定の実施形態では、伸長不可能なブロックャー部分が、 PO_4 基を含まないか、又はこれらを含まない。さらなる実施形態では、伸長不可能なブロックャー部分が、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{24}$ アルキルジオール（例えば、3'-ヘキサジオール修飾）、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルケニルジオール、又は置換されていてもよい $C_2 \sim C_{24}$ アルキニルジオールから本質的になるか

10

20

30

40

50

、又はこれらからなる。

【0202】

[0250] 一部の実施形態では、第1の対立遺伝子多型が、突然変異体対立遺伝子であり、第2の対立遺伝子多型が、野生型対立遺伝子である。他の実施形態では、キットが、標的配列の第2の対立遺伝子多型を有することが疑われる核酸試料中で、標的配列の第1の対立遺伝子多型を検出又は定量化するための、対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロックプローブの使用のための指示書をさらに含む。

【実施例】

【0203】

[0251] 本発明を、特定の例によりいっそう詳細に記載する。以下の実施例は、例示を目的として示されるものであり、いかなる形であれ、本発明を限定することを意図するものではない。当業者は、本質的に同じ結果をもたらすように変化させるか又は改変しうる多様なそれほど重要でないパラメータを容易に認識するであろう。

10

【0204】

実施例1 体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ法

[0252] 図1は、本発明の体細胞突然変異検出アッセイの一実施形態を描示する。血液試料又は微細針吸引物(FNA)試料などの試料において各一塩基多型(SNP)を解析するために、対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロックプローブを用いる。対立遺伝子特異的プライマーが、3'端において変異体(例えば、突然変異体)対立遺伝子に特異的なロックド核酸(LNA)を含みうるのに対し、対立遺伝子特異的ブロックプローブは、3'端においてヘキサンジオールブロック部分を含み、野生型対立遺伝子に特異的なブロック部分(例えば、オリゴヌクレオチド配列の中央部における)の5'側の約5~15ヌクレオチドの間の位置にLNAを含みうる。

20

【0205】

[0253] 本発明のアッセイ方法は、ABI 7900HTリアルタイムPCRインストゥルメント上で実施することができるが、当業者に知られる任意の種類の実時間PCR装置を用いることができる。例示的な反応条件には、以下：段階1：95.0で10：00分間；段階2：反復：40回、95.0で0：20分間、及び60.0で0：45分間が含まれる。

【0206】

[0254] 図1に描示する通り、対立遺伝子特異的ブロックプローブ(例えば、「ブロック-LNAヘキサンジオールオリゴヌクレオチド」)の、野生型対立遺伝子とのハイブリダイゼーションが、野生型対立遺伝子の増幅を阻止するのに対し、対立遺伝子特異的プライマー(例えば、「対立遺伝子特異的LNAプライマー」)の、突然変異体対立遺伝子とのハイブリダイゼーションは、突然変異体対立遺伝子が高感度及び低バックグラウンドで選択的に増幅されることを可能とする。特定の実施形態では、LNAヌクレオチドの使用によって、シグナル対ノイズ比が改善され、野生型のバックグラウンドシグナルが実質的に低減される。

30

【0207】

実施例2 SNPを検出するための例示的な体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ

[0255] 本実施例は、修飾塩基を含有する対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロックプローブの使用によって、対立遺伝子多型の識別が改善されることを例示する。

40

【0208】

[0256] 特に、図2は、3'端におけるLNA修飾(「G12S ASP-LNA」における「+A」)を含む対立遺伝子特異的プライマー、並びにオリゴヌクレオチド配列の中央部におけるLNA修飾(「G12Sブロック-LNA」における「+G」)及び3'-ヘキサンジオール修飾(「G12Sブロック-LNA」における「C6」)を含む対立遺伝子特異的ブロックプローブの使用によって、KRAS G12S多型部位における対立遺伝子多型の識別が改善されることを示す。LNA修飾を伴わない対立遺伝子特異

50

的プライマー及びブロッカープローブを用いて実施された対立遺伝子特異的リアルタイムPCRは、突然変異体対立遺伝子について陰性の細胞株（すなわち、H1975細胞株、H1993細胞株、U87MG細胞株、A375細胞株、PC3細胞株、A431NS細胞株、#28細胞株、及び#29細胞株）の8つ全てにおいて、KRAS G12S突然変異体対立遺伝子の存在の検出が不正確であった。これに対し、LNA修飾及びヘキサンジオール修飾を含む本発明の対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブを用いて実施された対立遺伝子特異的リアルタイムPCRは、これらの細胞株を、KRAS G12S突然変異について陰性として正確に同定した。LNA修飾を伴わない対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブは、KRAS G12S陽性A549細胞株におけるKRAS G12S突然変異を同定したが、Ct値は9（#29についての「Ct」値を、A549についての「Ct」値と対比して比較されたい）であり、これは、観察される本明細書に記載されるLNA修飾及びヘキサンジオール修飾を伴うプライマー及びプローブのCt値である12より著しく低かった。特定の理論に束縛されることなしに述べると、Ct値の増大は、PCR時における対立遺伝子多型の識別の改善を示す。加えて、本発明の修飾プライマー及び修飾プローブの使用によって、多量の野生型対立遺伝子を含む試料中であっても、野生型のバックグラウンドシグナルが実質的に低減される。

10

【0209】

[0257]同様に、図3は、3'端におけるLNA修飾（「G12R ASP-LNA」における「+C」）を含む対立遺伝子特異的プライマー、並びにオリゴヌクレオチド配列の中央部におけるLNA修飾（「G12Rブロッカー-LNA」における「+G」）を含む対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び3'-ヘキサンジオール修飾（「G12Rブロッカー-LNA」における「C6」）の使用によって、KRAS G12R多型部位における対立遺伝子多型の識別が改善されることを示す。LNA修飾を伴わない対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブを用いて実施された対立遺伝子特異的リアルタイムPCRは、突然変異体対立遺伝子について陰性の細胞株のうちの一つにおいて、KRAS G12R突然変異体対立遺伝子の存在の検出が不正確であった。これに対し、LNA修飾及びヘキサンジオール修飾を含む本発明の対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブを用いて実施された対立遺伝子特異的リアルタイムPCRは、これらの細胞株の全てを、KRAS G12R突然変異について陰性として正確に同定した。

20

30

【0210】

[0258]同様に、図4は、3'端におけるLNA修飾（「H1047R ASP-LNA」における「+G」）を含む対立遺伝子特異的プライマー、並びにオリゴヌクレオチド配列の中央部におけるLNA修飾（「H1047Rブロッカー-LNA」における「+A」）を含む対立遺伝子特異的ブロッカープローブ及び3'-ヘキサンジオール修飾（「H1047Rブロッカー-LNA」における「C6」）の使用によって、PIK3CA H1047R多型部位における対立遺伝子多型の識別が改善されることを示す。LNA修飾を伴わない対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブは、PIK3CA H1047R陽性KPL4細胞株におけるPIK3CA H1047R突然変異を同定した。しかし、本発明のLNA修飾及びヘキサンジオール修飾を施されたプライマー及びプローブの使用は、LNA修飾を伴わないPCRについて約4~6のCt値の、LNA修飾を伴うPCRについて10を超えるCt値との比較に基づき、Ct値を実質的に増大させた（ここで、Ct値は、KPL4細胞株のCt値を、H1975細胞株、H1993細胞株、U87MG細胞株、A375細胞株、PC3細胞株、A431NS細胞株、#28細胞株、又は#29細胞株のうちの一つのCt値から減じることによって計算した）。本明細書で論じられる通り、Ct値の増大は、PCR時における対立遺伝子多型の識別の改善を示す。加えて、本発明の修飾プライマー及び修飾プローブの使用によって、多量の野生型対立遺伝子を含む試料中であっても、野生型のバックグラウンドシグナルが実質的に低減される。

40

【0211】

50

[0259] 図5及び6は、本発明のLNAで修飾された対立遺伝子特異的プライマー及びプローブを用いる、EGFR T790M多型部位及びEGFR L858R多型部位のそれぞれにおける対立遺伝子多型の識別の改善の例を例示する。LNA修飾を伴わない対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブを用いて実施された対立遺伝子特異的リアルタイムPCRは、突然変異体対立遺伝子について陰性の細胞株（すなわち、H1993細胞株、U87MG細胞株、A375細胞株、PC3細胞株、#29細胞株、#31細胞株、及び#32細胞株）の7つ全てにおいて、EGFR突然変異の両方の存在の検出が不正確であった。これに対し、LNA修飾及びヘキサジオール修飾を含む本発明の対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブを用いて実施された対立遺伝子特異的リアルタイムPCRは、これらの細胞株の7つ全てを、EGFR突然変異の両方について陰性と正確に同定し、EGFR T790M陽性H1975細胞株及びEGFR L858R陽性H1975細胞株を、突然変異体対立遺伝子の両方を含有すると正確に同定した。

10

20

30

40

50

【0212】

[0260] 図7は、全血液に由来する豊富な量の野生型DNAの、H1047R陽性KPL4細胞におけるPIK3CA H1047R変異体対立遺伝子など、対象の突然変異体対立遺伝子の検出の干渉に対する作用を例示する。図8は、全血液に由来する豊富な量の野生型DNAの、G12R陽性PSN1細胞におけるKRAS G12R変異体対立遺伝子など、対象の突然変異体対立遺伝子の検出の干渉に対する作用を例示する。図8において示される通り、スパイクされた全血液試料中の、100個という低量（全血液カウントのうちの0.01%を表す）のG12R陽性PSN1細胞でも、G12Rシグナルはやはり検出可能である。

【0213】

実施例3 体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ法による結腸直腸がん試料のスクリーニング

[0261] 本実施例は、PIK3CA H1047R変異体対立遺伝子の存在についての、結腸直腸がん（CRC）組織試料のスクリーニングであって、LNA修飾を含めた修飾塩基を含有する本発明の対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロッカープローブを用いるスクリーニングを例示する。

【0214】

[0262] 図9は、150例のCRC組織試料のスクリーニングによって、陰性試料からの干渉は観察されず、弱いシグナルの検出を滴定によって検証しうることが明示されたことを示す。H1047R陽性試料#532及び#528は、滴定によって検証されたが、H1047R陰性試料#94、#95、及び#96のH1047R変異体対立遺伝子レベルは、全ての被験濃度において検出不能であった。

【0215】

[0263] まとめると、本実施例は、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイが高感度であり、極めて特異的であり、高度に選択的であり、且つ頑健であり、臨床試料を調べて、KRAS、PIK3CA、及びEGFRなどの遺伝子中の対立遺伝子多型を検出及び/又は定量化するのに用いることを裏付ける。

【0216】

実施例4 体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ法の、スコルピオンアッセイ及びビーミングアッセイとの比較

[0264] 本実施例は、量を変化させたSW1116（G12A陽性）細胞でスパイクされた全血液におけるKRAS G12Aの検出についての、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイと、Qiagen製のスコルピオンアッセイ又はInostics製のビーミングアッセイとの比較を例示する。

【0217】

[0265] 図10は、SW1116（G12A陽性）細胞の希釈系列でスパイクされた全血液の混合物中の、DxS/Qiagen製のスコルピオンアッセイは、1000個の細胞を検出しうるに過ぎないことを示す。100個の細胞では感度が低下する。これに対し、

本発明の遺伝子型決定アッセイ（「本発明のアッセイ」）を用いれば、全血液混合物中の、10～100個という低量のSW1116陽性細胞でも、G12Aシグナルはやはり検出可能である。100個の細胞とは、全血液カウントのうちの0.01%を表す。1000個の細胞の場合でも、DxS/Qiagen製のスコルピオンアッセイでは、Ct曲線が厳密ではなかった。

【0218】

[0266]図11は、全血液(WB)中に10、50、100、250、及び500個の細胞でスパイクされたKPL4(H1047R)細胞、A549(G12S)細胞、及びPSN1(G12R)細胞の希釈系列を示す。注目すべきは、Inostics製のビーミングアッセイが、不正確な判定を下し、突然変異体試料15例中14例を野生型の試料として同定したことである。実際、Inostics製のアッセイが突然変異を検出したのは、全血液中に1000個の細胞が存在する場合に過ぎず、500個以下の細胞では感度を提示しなかった。これに対し、図12は、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ（「本発明のアッセイ」）には、WB混合物中に50～100個という低量の陽性細胞によるシグナルも検出可能であったことを示す。100個の細胞とは、全血液カウントのうちの0.01%を表す。

10

【0219】

[0267]まとめると、本実施例は、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイによって、対立遺伝子PCRアッセイが、Qiagen製のスコルピオンアッセイ及びInostics製のビーミングアッセイと比較して劇的に改善されることを裏付ける。特に、弱いシグナルは、滴定によって検証することができ、本発明のアッセイによって、豊富なレベルの野生型対立遺伝子を伴うバックグラウンドの全血液中に0.01%という低量の、突然変異体対立遺伝子を伴う細胞を検出することができる。したがって、本明細書に記載される方法は、全血液などの試料中で、スコルピオンアッセイ及びビーミングアッセイを凌駕する。

20

【0220】

実施例5 核酸修飾を用いる体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ法

[0268]本実施例は、本発明の体細胞突然変異検出アッセイの複数の実施形態を例示する。本実施例には、KRAS G12Aアッセイを、本発明の方法を例示するための例示的なアッセイとして選択した。特に、本明細書に記載される実験は、アッセイの以下の構成要素(1) LNAを伴う対立遺伝子特異的プライマー、及びLNAを伴わない対立遺伝子特異的プライマー、(2) ブロッカープロープにおける3'端修飾、(3) Tmが異なるブロッカープロープ、(4) LNAを伴うブロッカープロープ、及びLNAを伴わないブロッカープロープ、並びに(5) LNAを伴う対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープロープの組合せ、並びにLNAを伴わない対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープロープの組合せに取り組む。

30

【0221】

[0269]本実施例において記載される方法は、遺伝子座特異的プライマー、対立遺伝子特異的プライマー、ブロッカープロープ、及び検出用プロープと組み合わせたリアルタイムの対立遺伝子特異的PCRに基づく。方法は、突然変異体対立遺伝子の存在を野生型の対立遺伝子から差別化して定量化するのに高度に選択的であり高感度であるようにデザインした。特に、例示的なアッセイは、Applied Biosystems (Foster City, CA)製のGTエクスプレス(GTExpress) (商標)マスターミックス(Master Mix)を用いて実施した。リアルタイムPCR反応には、以下のサイクリング条件：段階1：95.0 で10:00分間、並びに段階2：反復：40回、95.0 で0:20分間、及び60.0 で0:45分間を用いた。

40

【0222】

[0270]実験1は、LNAを伴う対立遺伝子特異的プライマーを含む本発明のKRAS G12Aアッセイが、突然変異体対立遺伝子を高度な選択性及び感度で増幅するのに成功したことを示す。本発明の本実施形態では、対立遺伝子特異的プライマーの変異体ヌクレ

50

オチド (T) がロックド核酸 (LNA) であり、このプライマーの 3' 端に配置した。ブロッカープローブは、3' 端に LNA 修飾及びヘキサンジオール修飾を有した。検出用プローブは、タックマンプローブ (Life Technologies) であった。リアルタイム PCR アッセイの結果は、ブロッカープローブが、野生型対立遺伝子とハイブリダイズし、その増幅をブロックしたことを示す (図 13)。加えて、突然変異体対立遺伝子は、アッセイによって高感度で選択的に増幅された (図 13)。

【0223】

[0271] 実験 2 は、本発明の SNP 遺伝子型決定アッセイによって、対立遺伝子特異的プライマーが、ロックド核酸 (LNA) を含む場合、対立遺伝子の識別のための選択性及び感度が改善されたことを示す。図 14 は、対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブにおいて LNA を伴わない KRAS G12A アッセイが、陽性対照 (突然変異体対立遺伝子) 試料及び陰性対照 (野生型対立遺伝子) 試料から増幅産物を生成させたことを示す。本発明の本実施形態は、対立遺伝子多型に十分な選択性を示さなかった。しかし、KRAS G12A アッセイによる対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープローブにおける LNA 修飾は、陽性対照試料は選択的に増幅することが可能であったが、陰性対照試料は選択的に増幅することが可能でなかった。図 14 は、変異体ヌクレオチド (T) において LNA を伴うアッセイによって、突然変異体対立遺伝子が高感度で増幅されたことを示す。

10

【0224】

[0272] 実験 3 は、SNP 遺伝子型決定アッセイの対立遺伝子特異的プライマーに 2 つの LNA を存在させることによって、アッセイの性能が改善されたことを示す。本発明の本実施形態では、2 つの対立遺伝子特異的プライマーのデザインを比較した。一方のプライマーは、変異体ヌクレオチド (T) において LNA を有した。他方のプライマーは、第 2 の LNA (A) を、変異体ヌクレオチドの 5' 側に位置させた。戦略的に配置された 2 つの LNA を伴う対立遺伝子特異的プライマーを含むアッセイは、良好な増幅及び Ct 値の低下を示した (図 15)。LNA は、対立遺伝子特異的プライマーの 3' 端及び 3' 端から 2、3、4、5、又は 6 塩基に配置することができる。LNA は、対立遺伝子特異的プライマーの 5' 端及び 3' 端に配置することができる。

20

【0225】

[0273] 実験 4 は、本発明の対立遺伝子特異的プライマーにおける連続 LNA が、アッセイにおいて増幅産物を発生させなかったことを示す。図 16 は、連続 LNA (GAT) [配列中、T は変異体ヌクレオチドである] を伴う対立遺伝子特異的プライマーを描示し、KRAS G12A の突然変異体対立遺伝子を増幅させなかったことを示す。図 16 はまた、6 つの連続 LNA (変異体ヌクレオチドの T 及び T の上流における、突然変異体対立遺伝子と相補的な 5 つの LNA) を伴う対立遺伝子特異的プライマーも描示する。このプライマーは、アッセイにおいて試料中の突然変異体対立遺伝子を検出せず、増幅産物を生成させなかった。

30

【0226】

[0274] 本実施例は、本発明の対立遺伝子特異的プライマー、ブロッカープローブ、及び検出用プローブが、ロックド核酸 (LNA)、ペプチド核酸 (PNA)、 β -L-トレオース核酸 (TNA)、ジップ核酸 (ZNA) 及びトリアゾール DNA (TzDNA) など、(1 又は複数の) 修飾塩基を含みうることを示す。図 17 は、例示的な LNA 分子及び他の修飾 LNA を示す。図 18 は、例示的な PNA-DNA 二重鎖 (左) 及び例示的な PNA (図 18 における T; 右) を伴う対立遺伝子特異的プライマーを示す。図 19 は、オリゴヌクレオチドを含有する例示的な TNA (左) 及び TNA (図 19 における T; 右) を伴う例示的な対立遺伝子特異的プライマーを示す。図 20 は、例示的な ZNA オリゴヌクレオチド (左) 及び例示的な ZNA 修飾 (右; 図 20 における T) 対立遺伝子特異的プライマーを示す。図 21 は、例示的な TzDNA 分子 (左) 及び TzDNA (右; 図 21 における T) を伴う例示的な対立遺伝子特異的プライマーを示す。

40

【0227】

50

[0275]実験5は、3'端にヘキサジオール修飾を伴うブロッカープロープによって、本発明のアッセイの選択性が改善されることを示す。ブロッカープロープを伴わずにアッセイを実施したところ、野生型対立遺伝子及び突然変異体対立遺伝子のいずれもが同様に増幅され、識別することが不可能であった(図22のI部)。ブロッカープロープを伴う本発明の実施形態では、ヘキサジオールを伴うブロッカープロープを、KRAS G12A SNPの野生型対立遺伝子とハイブリダイズさせ、リアルタイムPCR増幅を妨害した(図22のII部)。このアッセイでは、突然変異体対立遺伝子が選択的に増幅された(図22のIII部)。

【0228】

[0276]実験6は、LNAを伴う対立遺伝子特異的プライマー、ヘキサジオールを伴うブロッカープロープ、タックマンプロープ、及びリバースプライマーを含む本発明のKRAS G12Aアッセイが、突然変異体対立遺伝子(陽性対照)に特異的な増幅産物を生成させたが、野生型対立遺伝子は生成させなかったことを示す。図23のI部は、突然変異体対立遺伝子特異的プライマーによって、KRAS G12A SNPの野生型対立遺伝子及び突然変異体対立遺伝子のいずれもが増幅されたことを示す。図23のII部は、その3'端に位置する変異体ヌクレオチドにおいて単一のLNAを伴う突然変異体対立遺伝子特異的プライマーによって、突然変異体対立遺伝子は増幅されたが、野生型対立遺伝子は増幅されなかったことを示す。

【0229】

[0277]実験7は、変異体ヌクレオチドにおけるLNAを伴う対立遺伝子特異的プライマーを含む本発明のKRAS G12Aアッセイにおいて、オリゴヌクレオチドの3'端においてヘキサジオール(C6)修飾を伴うブロッカープロープが、3'側リン酸基(PO₄)を伴うプロープより良好に機能したことを裏付ける。図24は、ヘキサジオールブロッカープロープによるアッセイが、PO₄ブロッカープロープによるアッセイより、低いCt(28.4のCt対31.2のCt)でより良好に機能したことを示す。炭素鎖の柔軟性及び疎水性によって、ヘキサジオールブロッカーを、立体障害されることなく良好にハイブリダイズさせることが可能となる。ブロッカープロープの3'端におけるリン酸基はまた、野生型対立遺伝子にも結合しうるが、結合の有効性は、リン酸基のバルク性及びイオン性の性質によって減弱しうる。

【0230】

[0278]実験8は、本発明のアッセイにおいて、LNAを伴うブロッカープロープが、LNAを伴わないブロッカープロープと比較してより良好に機能したことを裏付ける。図25は、ブロッカーLNAプロープのCt値が、LNAを伴わないブロッカープロープのCt値より低かったことを例示する。LNAを伴うブロッカープロープ及びヘキサジオール修飾を含む本発明の方法は、対立遺伝子多型の効果的で選択的な増幅をもたらし、これにより、対立遺伝子の識別を改善しうる。

【0231】

[0279]実験9は、本発明の突然変異体対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープロープにおけるLNAが、KRAS G12A SNPの突然変異体対立遺伝子の高度に特異的な増幅を結果としてもたらしたことを示す。図26は、LNAプライマー及びLNAブロッカーを伴うアッセイが、突然変異体対立遺伝子(陽性対照)は増幅したが、野生型対立遺伝子(陰性対照)は増幅しなかったことを示す。

【0232】

[0280]実験10は、ブロッカープロープ配列においてLNAを戦略的に配置して、本発明のSNPアッセイの性能を改善しうることを示す。図27Aは、実験において調べられるアッセイの構成要素を示す。図27Bにおいて描示される通り、ブロッカー・1・LNAとブロッカー・4・LNAとは、同じブロッカー配列を有するが、LNA修飾の位置が異なる。ブロッカー・1・LNAが、5'端及び対立遺伝子多型ヌクレオチドにLNAを有するのに対し、ブロッカー・4・LNAは、この配列の5'端及び3'端においてLNAを有する。ブロッカー・1・LNAによるアッセイは、ブロッカー・4・LNAによる

10

20

30

40

50

アッセイと比較してより良好な対立遺伝子の識別及びCtの低下を提示した(図27C)。

【0233】

[0281]図28Aは、ブロッカープロブのTmのアッセイの性能に対する影響を示す。ブロッカー・1・LNAのTmは、59.9である。ブロッカー・4・LNAのTmは、68である。図28Bはまた、LNAを伴わないブロッカーのTm及びCt値と、2つのLNAを伴うブロッカーのTm及びCt値との差も示す。本発明のアッセイにおいて、LNAを伴い、Tmの高いブロッカープロブは、対立遺伝子多型に対する良好な特異性、良好な感度、及び野生型の効果的な阻害を示す。

【0234】

[0282]実験11は、本発明のブロッカープロブにおける連続LNAが、突然変異体の増幅を完全にブロッキングし、これによって、アッセイの性能を著しく低下させることを示す。図29は、ブロッカープロブに6つの連続LNA(野生型(G)と相補的なシトシン(C)及び野生型の対立遺伝子と相補的な上流の5塩基)を配置したところ、PCRサイクリングにおける増幅が完全に停止したことを示す。

【0235】

[0283]図30は、Ct値を用いて、アッセイの実行可能性及びその選択性を決定することを示す。LNAを含有するプライマー及びプロブによって得られるCt値の増大は、本発明のアッセイの実行可能性及び選択性の増大を示す。図31は、Ct値を、多様な体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイに由来するCt値からどのように計算するかを示す。LNAを含有するプライマー及びブロッカーによってデザインされた図のアッセイAは、連続LNAを伴うプライマー及びプロブを含有する他のアッセイより良好に機能した。

【0236】

[0284]まとめると、本実施例は、対立遺伝子特異的プライマー及びブロッカープロブにおける修飾塩基(例えば、LNA)など、核酸修飾の使用が、本発明の遺伝子型決定アッセイの性能を改善することを示す。同様に、対立遺伝子多型の識別についての選択性及び感度も増大する。

【0237】

実施例6 体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイを用いる未知の試料中に存在する対立遺伝子多型の百分率の定量化

[0285]本実施例は、PIK3CAの遺伝子のE545K、KRAS遺伝子のG12D、EGFR遺伝子のE746-A750欠失、又はBRAF遺伝子のV600Eについて、対立遺伝子多型を定量化するための修飾塩基を含有する対立遺伝子特異的プライマー、対立遺伝子特異的ブロッカープロブ、及び検出用プロブの使用を例示する。本実施例はまた、本発明の方法が、突然変異体を野生型から差別化及び定量化するのに高度に選択的であることも例示する。加えて、本実施例は、本発明のアッセイが直線的であり、対立遺伝子多型の定量的情報を決定するのに用いることも示す。

【0238】

[0286]本明細書に記載される方法を用いて、体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイを実施した。修飾塩基、核酸類似体、及び/又はブロッカー部分を含有する、本発明の対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的ブロッカープロブを用いて、PIK3CA遺伝子、EGFR遺伝子、KRAS遺伝子、及びBRAF遺伝子の多様な対立遺伝子多型の存在について検出した。表1で、前出の遺伝子突然変異を一覧する。

【0239】

10

20

30

40

【表 1】

表1

遺伝子	突然変異	陽性細胞株	供給源
PIK3CA	E542K	SW 948	ATCC
	E545D	Sup T1	ATCC
	E545K	MCF 7	ATCC
	H1047R	KPL 4	ATCC
EGFR	T790M	H1975	ATCC
	L858R	H1975	ATCC
	E746-A750欠失	H1650	ATCC
KRAS	G12A	SW 1116	ATCC
	G12C	NCI-H23	ATCC
	G12D	LS 174T	ATCC
	G12R	PSN1	ATCC
	G12S	A 549	ATCC
	G12V	SW 403	ATCC
	G13C	H 1734	ATCC
BRAF	G13D	T 84	ATCC
	Q61H	H 460	ATCC
	V600E	HT 29	ATCC

10

【0240】

20

[0287] 所与の試料中に存在する対立遺伝子多型の量を定量化するために、検量線を作成した。検量線は、この特異的な突然変異について陽性の細胞株に由来する各突然変異について作成した。検量線は直線状であるために、未知の試料中の対立遺伝子多型を定量化するのに用いることができる。表1は、検量線を創出するのに用いられる対立遺伝子多型及び陽性細胞株を示す。細胞株に由来するDNAは、Qiagen製のDN イージープラッド&ティシューキット(DNeasy Blood & Tissue Kit)を用いて抽出した。各陽性細胞株に由来するDNAの希釈系列(例えば、100、10、1、0.1、及び0.01ng)を作製して、対立遺伝子特異的検量線を創出した。本実施例では、PIK3CAのE545K、KRASのG12D、EGFRのE746-A750欠失、及びBRAFのV600Eについての検量線を作成した。

30

【0241】

[0288] 対立遺伝子特異的演算子(例えば、数学的解析)は、作成された検量線から、陽性細胞株の突然変異パーセントが100%であると仮定して確立した。細胞株のうちの一部については、突然変異%を、野生型対立遺伝子と優先的にハイブリダイズする対立遺伝子特異的プライマーを用いることによって決定した。

【0242】

[0289] 未知の試料中の突然変異の量を決定するため、本発明の方法を用いて試料をアッセイした。次いで、突然変異パーセント演算子を用いて試料の対立遺伝子多型についてのCt値を解析して、試料中に存在する変異体の量及びパーセントを決定した。

【0243】

40

[0290] 図32Aは、PIK3CA E545K対立遺伝子多型及びMCF7細胞株についての検量線を示す。検量線は、本明細書に記載される方法を用いて創出した。DNA量と対比させたCt値の検量線プロットは、 \log_{10} スケールで直線状となった。図32Bは、結腸直腸がんを伴う患者に由来する2つの未知の試料(試料A及びB)及び陽性対照(MCF7細胞株)についての遺伝子型決定アッセイを用いて作成した増幅曲線を示す。図32Cは、試料中に存在する突然変異体であるE545Kの量及び百分率(突然変異パーセント)を示す。試料中に存在する対立遺伝子多型の量及びパーセント(突然変異パーセント)は、演算子を用いて決定した(図32C)。特に、突然変異パーセントは、試料中の出発DNA量に対する突然変異の量から計算した。試料Aの突然変異パーセントは、PIK3CA E545K変異体について、陽性対照と比べて15%であることが

50

決定された。試料Bの突然変異パーセントは、同じ変異体について、陽性対照と比べて7.3%である。注目すべきことに、試料Bに由来する20ngのDNA中で、突然変異体対立遺伝子が検出された。

【0244】

[0291]図33は、未知の試料中に存在する突然変異体の百分率を定量化するための、本発明のKRAS G12Dアッセイの使用を例示する。検量線プロットは、 \log_{10} スケールで直線状であり、未知の試料の突然変異の量及びパーセントを定量化するのに用いた。図33Aは、KRAS G12D遺伝子型決定アッセイ及びLS 174T細胞株についての増幅プロット及び検量線を示す。図33Bは、膵臓がんを伴う患者に由来する2つの未知の試料(試料A及びB)及び陽性対照(LS 174T細胞株)について本発明の方法を用いて作成した増幅プロットを示す。図33Cは、突然変異体を発現させる試料A中のDNAの量が、3.25ng又は陽性対照と比べて9.6%と計算されたことを示す。

10

【0245】

[0292]図34は、未知の試料中に存在する突然変異体の百分率を定量化するための、本発明のEGFR E746-A750欠失EGFアッセイの使用を例示する。図34Aは、H1650細胞株のEGFR遺伝子のE746-A750欠失についての増幅プロット及び検量線を示す。図34Bは、肺がんを伴う患者に由来する未知の試料(試料A)及び陽性対照(H1650細胞株)について本発明の方法を用いて作成した増幅プロットを示す。図34Cは、EGFR欠失変異体を発現させる試料A中のDNAの量が、3.25ng又は陽性対照と比べて9.6%と計算されたことを示す。

20

【0246】

[0293]図35は、未知の試料中に存在する対立遺伝子多型の百分率を定量化するための、本発明のV600E BRAFアッセイの使用を例示する。図35Aは、HT 29細胞株のBRAF V600E対立遺伝子多型についての増幅プロット及び検量線を示す。図35Bは、肺がんを伴う患者に由来する未知の試料(試料A)及び陽性対照(H1650細胞株)について本発明の方法を用いて作成した増幅プロットを示す。図35Cは、BRAFのV600E変異体を発現させる試料A中のDNAの量が、0.18ng又は陽性対照と比べて1.2%と計算されたことを示す。

30

【0247】

[0294]本実施例は、本発明のアッセイ(例えば、PIK3CA E545K、KRAS G12D、EGFR E746-A750欠失、及びBRAF V600E遺伝子型決定アッセイ)が \log_{10} スケールで直線状であり、このアッセイを用いて患者の組織試料中の対立遺伝子多型についての定量的情報を決定しうることを示す。

【0248】

実施例7 腫瘍の遺伝子異質性の決定

[0295]本実施例は、がんバイオマーカーのレベルと発がん性遺伝子の特定の対立遺伝子多型についての突然変異パーセントとの相関を例示する。胃がん試料では、協同的酵素増強反応(Collaborative Enzyme Enhanced Reactive)(CEER)イムノアッセイを用いて検出される高レベルのサイトケラチン(CK)が、KRAS G13D対立遺伝子多型についての高い突然変異パーセントに対応した。膵臓がん試料では、高いCKレベルが、KRAS G12D対立遺伝子多型について100%の突然変異パーセントと相関した。本実施例は、組織試料の腫瘍含量は、本発明の遺伝子型決定アッセイ及びCEERイムノアッセイを用いて評価しうることを例示する(また、COPIAとしても知られている;例えば、それらの開示が全ての目的についてそれらの全体において参照によって本明細書に組み込まれる、国際出願PCT特許国際公開第2008/036802号及び同国際公開第2009/108637号を参照されたい)。

40

【0249】

[0296]腫瘍組織試料は、腫瘍細胞と非腫瘍細胞(例えば、血液又は隣接する非腫瘍組織

50

)の混合物であることが多い。固形腫瘍の組織試料中の腫瘍細胞は、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)染色によって評価することができる。図36は、H&E染色された、非小細胞肺癌(NSCLC)腫瘍試料の凍結切片を示す。図36Aは、高百分率の腫瘍細胞を伴う切片(白色矢印は、腫瘍細胞を示す)を示す。図36Bは、腫瘍細胞(白色矢印)と、血管(黒色矢印)を伴う間質と、炎症性細胞(例えば、リンパ球;赤色矢印)と、マクロファージで満たされた肺胞(緑色矢印)との混合物からなる切片を示す。

【0250】

[0297]サイトケラチンを、腫瘍細胞を検出するためのバイオマーカーとして用いた。腫瘍試料では、高いCKレベルが観察されたが、隣接する正常組織では、低レベルが検出された。本発明者らは、高いCKレベルが、特定の突然変異体対立遺伝子についての高い突然変異パーセントと相関するかどうかを決定するため、CKレベル、並びに多様な胃がん試料及び膵臓がん試料における、KRAS、EGFR、及びPIK3CAの対立遺伝子多型の突然変異パーセントを評価した。

10

【0251】

[0298]図37Aは、胃がん試料では、高いCKレベル、及びEGFR T790M変異体、KRAS G12V変異体、KRAS Q61H変異体、又はPIK3CA E545K変異体についての低い突然変異パーセントの両方によって、腫瘍細胞の全てがSNPを保有する可能性が高いとは限らないと示されることを例示する。図37Aはまた、KRAS G13Dの高い突然変異パーセント(例えば、90%)を伴う高いCKレベルによって、試料中の腫瘍細胞の大半が、突然変異を保有する可能性が高いと示されたことも示す。図37Bは、高レベルのCKが、膵臓がん試料中のKRAS G12D変異体について、高い突然変異パーセント(100%)と相関することを示す。

20

【0252】

[0299]まとめると、本実施例は、本発明の遺伝子型決定アッセイを用いて、患者の腫瘍試料の突然変異パーセントを計算しうることを示す。本実施例は、発がん性遺伝子の特異的な対立遺伝子多型の突然変異パーセントが、がんバイオマーカーの発現レベルと相関しうることをさらに例示する。

【0253】

実施例8 全血液試料中の腫瘍細胞の識別における体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイの感度

30

[0300]本実施例では、突然変異を保有する腫瘍細胞でスパイクされた全血液試料に対して、KRASのG12A突然変異又はG12S突然変異についてのアッセイを実施することによって、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイの感度を決定した。LNA修飾など修飾塩基を含有する本発明の対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的プロックプローブを用いて、KRAS G12A変異体対立遺伝子又はKRAS G12S変異体対立遺伝子の存在を検出した。本実施例ではまた、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイの感度とLife Technologies製のキャストPCR(商標)突然変異アッセイの感度との比較も行う。

【0254】

[0301]本発明のKRAS G12Aアッセイ(例えば、「本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ」)の感度は、全血液試料中のKRAS突然変異を検出するために必要とされる陽性腫瘍細胞(例えば、SW116細胞株)の最小量を決定することによって調べた。被験試料は、SW116細胞株の細胞(例えば、試料1例当たり、100,000;10,000;1,000;500;250;100;50;10;又は0個の腫瘍細胞)でスパイクされた全血液を含んだ。被験試料に由来するゲノムDNAは、Qiagen製のDNイージープラッド&ティッシュキットを用いて抽出した。本発明のアッセイは、本明細書で示される方法を用いて実施した。図38Aは、本発明のKRAS G12Aアッセイから作成された増幅曲線を例示する。図38Bは、同じ被験試料に対して実施されたLife Technologies製のキャストPCR(商標)突然変異アッセイによる増幅曲線を例示する。

40

50

【0255】

[0302] 図38Cにおいて示される通り、本発明の遺伝子型決定アッセイは、被験試料の含有する陽性腫瘍細胞が250個という少数の場合にも、G12A突然変異を検出した。比較により、キャストPCR(商標)アッセイには、試料中に最小1,000個の腫瘍細胞が必要とされた。結果は、本発明のアッセイが、全血液試料中のG12A KRAS突然変異を検出するために、キャストPCR(商標)アッセイより大きな感度を有することを示す。

【0256】

[0303] 本発明のKRAS G12Sアッセイを評価するために、全血液試料を、A549細胞株の細胞(例えば、被験全血液試料中に100,000; 10,000; 1,000; 500; 250; 100; 50; 10; 又は0個の陽性腫瘍細胞)でスパイクした。Qiagen製のDNイージブラッド&ティッシュキットを用いて、被験試料のゲノムDNAを抽出した。KRAS G12S変異体の存在を、本発明のアッセイ及びLife Technologies製のキャストPCR(商標)アッセイを用いて検出した。アッセイの感度を比較した。図39Aは、本発明のアッセイを用いる被験試料の増幅曲線を示す。図39Bは、Life Technologies製のキャストPCR(商標)アッセイについての増幅曲線を示す。

【0257】

[0304] 本発明のアッセイは、100個という少数の腫瘍細胞を伴う試料中でG12S突然変異を検出した(図39C)。キャストPCR(商標)は、10分の1の感度であり、アッセイは、1,000個以上の陽性腫瘍細胞を含有する被験試料の突然変異を検出した。図39Cは、本発明の遺伝子型決定アッセイが、全血液試料中のG12S KRAS突然変異を検出するために、キャストPCR(商標)より大きな感度を有することを例示する。

【0258】

[0305] まとめて、本実施例は、本発明の体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイが、対立遺伝子PCRアッセイを、Life Technologies製のキャストPCR(商標)アッセイと比較して劇的に改善することを裏付ける。

【0259】

実施例9 試料中の対立遺伝子多型を検出し、変異体の百分率を決定するための、例示的な体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイ

[0306] 本実施例は、試料中の発がん性一塩基多型(SNP)を検出し、試料中のSNPの突然変異パーセントを定量化するための本発明の方法を例示する。本実施例はまた、修飾塩基を含有する本発明の対立遺伝子特異的プライマー及び対立遺伝子特異的プロックアプローブを用いる、希少な(例えば、突然変異体)変異体の対立遺伝子の存在についての試料(例えば、がんを伴う患者に由来するがん細胞株及びがん組織)のスクリーニングも例示する。特に、対立遺伝子特異的プライマーは、3'端において、変異体対立遺伝子に特異的なロックド核酸(LNA)を含み、対立遺伝子特異的プロックアプローブは、3'端において、ヘキサンジオールプロック部分を含み、野生型対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド配列の中央部の位置において、LNAを含む。本実施例では、検出される対立遺伝子多型に、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R; EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失; KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13C、KRAS G13D、及びKRAS Q61H; 並びにBRAF V600Eが含まれる。本実施例はまた、本発明の方法を、乳がん、結腸直腸がん、肺がん、胃がん、肝臓がん、結腸がん、及び膵臓がんなどのがん及び腫瘍; 細胞株(例えば、結腸直腸がん細胞株)及び異種移植組織に由来する多様な試料と共に用いることも示す。

【0260】

10

20

30

40

50

[0307]対立遺伝子特異的リアルタイムPCRアッセイなど、本発明の方法を用いて、変異体を発現させる細胞株に対して実施されたアッセイから検量線を確認し、各変異体についての突然変異パーセント演算子を創出して、試料中の多様なSNPの存在を決定し、試料中で検出される変異体の百分率を定量化した。略述すると、対立遺伝子多型についての検量線を確認するために、本発明のSNP検出アッセイを、対立遺伝子多型について陽性の細胞株の希釈系列を用いて実施した。アッセイの結果を用いて、検量線を作成し、次いで、試料について得られるSNP検出アッセイからのデータに基づき、試料中に存在する対立遺伝子多型の量を予測しうる、対立遺伝子多型についての突然変異パーセント演算子を創出した。

【0261】

[0308]図40は、乳がん試料中の以下のSNP：PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、PIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R；KRAS G12A、KRAS G12C、KRAS G12D、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12V、及びKRAS G13D；並びにBRAF V600Eを検出（例えば、存在又は非存在を）及び/又は定量化（例えば、突然変異パーセントを）するための本発明の方法を用いることにより得られる結果を示す。PIK3CA H1047R SNPは、試料において異なる百分率で発現することが決定された。例えば、試験1が、H1047R対立遺伝子を12%で発現させたのに対し、試験33は、同じSNPを41%で発現させた。試験2は、突然変異体を1%で発現させた。試験34は、別のPIK3CAのSNP（例えば、E545K）を100%で発現させたが、これによって、被験試料中の全ての細胞がE545K変異体を有することが予測される。

【0262】

[0309]図41は、乳がん試料の別のセットではまた、PIK3CAのSNP（E542K、E545D、E545K、及びH1047R）も検出及び定量化されることを示す。45例の乳がん試料を、PIK3CA E542K対立遺伝子多型、PIK3CA E545D対立遺伝子多型、PIK3CA E545K対立遺伝子多型、及びPIK3CA H1047R対立遺伝子多型についてスクリーニングした。変異体の突然変異パーセントは、上記の方法及び実施例6における方法を用いて定量化した。結果は、試料#744が、極めて低い百分率（例えば、0.13%）でE542Kを発現させ、試料#743が、高百分率の100%でH1047Rを発現させたことを示す。E542K変異体を発現させた他の試料は、試料#762が2%であり、試料#767が3.55%であった。H1047R変異体を発現させた他の試料は、89%の突然変異を伴う試料#746、51.8%の突然変異を伴う#775、6.8%の突然変異を伴う#740、及び5.9%の突然変異を伴う#769であった。

【0263】

[0310]図42は、肺がん試料が、本発明の方法を用いて、SNPについてスクリーニングしうることを示す。この実施形態では、25例の肺がん試料中の多様なSNPの存在及び突然変異パーセントを決定した。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13C、KRAS G13D、及びKRAS Q61H；並びにBRAF V600Eが含まれた。試料#352～355は全て、PIK3CA E545Kを100%で発現させ、これは、これらの試料中の全ての細胞が突然変異体を有することを示す。試料#371～375及び381は全て、EGFR L848Rを100%で発現させた。EGFR E746欠失変異体は、2つの試料（#164及び#381）において極めて低い割合（それぞれ0.1%及び0.2%）で検出された。セット中でBRAF V600E変異体を発現させた唯一の試料は試料#213であり、その突然変異百分率は、0.2%であった。

10

20

30

40

50

【0264】

[0311] 図43は、さらなる32例のヒト肺がん試料に対して本発明の方法を用いることから得られる結果を例示する。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、及びKRAS G13D；並びにBRAF V600Eが含まれた。このセットの試料#9は、KRAS突然変異であるG12Sを0.3%で、G12Vを2%で、G13Dを0.3%で発現させた。試料#3及び12は、PIK3CA E545K変異体を、100%で発現させた。試料#25は、PIK3CA E545Dを、0.2%で発現させ、試料#6は、PIK3CA H1047Rを、0.06%で発現させた。試料#13及び19が、KRAS G12Cを、100%で有したのに対し、試料#22は、同じ変異体を2%だけ有した。また、試料#22も、BRAF V600E変異体を54%で発現させた。KRAS G12V変異体は、試料#14中に、100%の百分率で存在し、試料#15中に、0.1%で存在した。BRAF V600E変異体は、試料#4及び31中に、それぞれ、47%及び34%で検出された。

10

【0265】

[0312] 図44は、胃がん試料が、本発明の方法を用いてスクリーニングしうることを示す。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13D、及びKRAS Q61H；並びにBRAF V600Eが含まれた。この実施形態では、各アッセイを、40ngの試料（例えば、DNA）で実行した。アッセイされた17例の試料のうち、試料#233は、0.001%のG12R、2.3%のG12V、「低」百分率のG13D、及び0.5%のQ61Hなど、4つのKRAS突然変異を発現させた。KRAS G12C変異体は、試料#241中に「低い」百分率で検出した。PIK3CA E542K対立遺伝子は、試料#253中に0.6%で検出し、EGFR T790M対立遺伝子は、試料#223中に0.2%で検出した。乳がん及び肺がんなど、他の腫瘍試料と比較して、被験胃がん試料におけるSNPの突然変異パーセントは、スクリーニングされる任意の対立遺伝子多型について100%を超えなかった。

20

30

【0266】

[0313] 図45は、異種移植片試料と共に本発明の方法を用いることから得られる結果を示す。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；EGFR T790M、EGFR L858R、及びEGFR E746欠失；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、KRAS G13C、KRAS G13D、及びKRAS Q61H；並びにBRAF V600Eが含まれた。EGFR E746欠失は、試料#585～588中に存在し、試料中の細胞の100%において存在することが予測された。PIK3CA H1047R対立遺伝子は、試料#581～584中にそれぞれ、3.4%、1.2%、1%、及び1.8%の突然変異百分率で検出された。

40

【0267】

[0314] 図46は、本発明の方法を用いて、KRAS、BRAF、及びPIK3CAの対立遺伝子多型を、結腸直腸がん試料中で検出及び定量化しうることを例示する。SNPには、PIK3CA E542K、PIK3CA E545D、PIK3CA E545K、及びPIK3CA H1047R；KRAS G12C、KRAS G12R、KRAS G12S、KRAS G12D、KRAS G12A、KRAS G12V、及びKRAS G13D；並びにBRAF V600Eが含まれた。データは、試料#121が、KRAS G13D変異体を6%で発現させ、PIK3CA E545K変異体を58

50

%で発現させたことを示す。試料# 130は、KRAS G13V変異体を54%で発現させ、PIK3CA E542K変異体を5%で発現させた。

【0268】

[0315]図47はまた、本発明の方法を用いて、KRAS、BRAF、及びPIK3CAの対立遺伝子多型を、さらなる結腸直腸がん試料中で検出及び定量化しうることも例示する。データは、試料# 147が、KRAS G12D変異体及びPIK3CA変異体を100%で発現させたことから、試料中の全ての細胞が、変異体を発現させると予測されることが明示されることを示す。試料# 149は、KRAS G13D変異体を24%で発現させ、PIK3CA H1047R変異体を0.1%で発現させた。試料# 163は、KRAS G12Dを34%で発現させ、PIK3CA E542Kを3%で発現させた。

10

【0269】

[0316]図48は、本発明の方法を用いて、結腸直腸がんを伴う患者に由来する肝臓がん組織及び結腸がん組織を、KRAS、BRAF、及びPIK3CAの対立遺伝子多型についてスクリーニングしうることを例示する。結果は、試料のうちの一部が、複数のSNPを有したことを示す。例えば、試料# 207及び# 208は、KRAS G12S及びPIK3CA E545Kを発現させた。本発明の方法を用いてまた、試料# 207が、G12Sを22%で発現させ、試料# 208が、同じ変異体を63%発現させることも決定された。試料# 207は、E545K変異体を40%で発現させ、試料# 208は、同じ変異体を79%で発現させた。試料# 215は、BRAF V600Eを1%で有し、PIK3CA E545Kを5%で有した。試料# 216は、BRAF V600Eを9%で有し、PIK3CA E545Kを23%で有した。試料# 217は、KRAS G12Vを2%で発現させ、PIK3CA E545Kを5%で発現させた。試料# 217は、KRAS G12Vを4%で有し、PIK3CA E545Kを9%で有した。

20

【0270】

[0317]図49は、膵臓がんを伴う患者に由来する試料を、本発明の方法に従って、SNPについてスクリーニングし、突然変異パーセントを決定しうることを例示する。この実施形態では、微細針吸引物試料を患者から得、本明細書に記載されるSNP遺伝子型決定アッセイを用いてスクリーニングした。被験膵臓がん試料では、多様なKRAS突然変異が検出されたが、PIK3CA(例えば、E542K、E545D、E545K、H1047R)突然変異、EGFR(例えば、T790M、L858R)突然変異、及びBRAF(例えば、V600E)突然変異は検出されなかった。試料# 28は、KRAS G12C変異体を発現させた。KRAS G12V変異体は、# 19、21、26、27、及び35中に、それぞれ、63%、0.2%、4%、1%、及び3%の突然変異百分率で存在した。試料# 9及び11は、KRAS G12D変異体を、100%で発現させた。この変異体はまた、試料# 2、6、12、23、24、37、39、及び40中にも、それぞれ、1.1%、29%、7.4%、5%、5%、32%、5.4%、及び0.9%で発現した。スクリーニングされたSNPは、セット内の他の膵臓がん試料中では検出されなかった。

30

【0271】

[0318]まとめると、本実施例は、本発明の体細胞遺伝子型決定アッセイを用いて、KRAS、PIK3CA、EGFR、及びBRAFなど、遺伝子中の対立遺伝子多型を検出及び/又は定量化しうることを裏付ける。本実施例は、本発明の方法を用いて、患者に由来するがん試料中及び腫瘍組織試料中の複数の対立遺伝子多型を検出しうることを示す。さらに、試料中の対立遺伝子多型の百分率も、決定することができる。

40

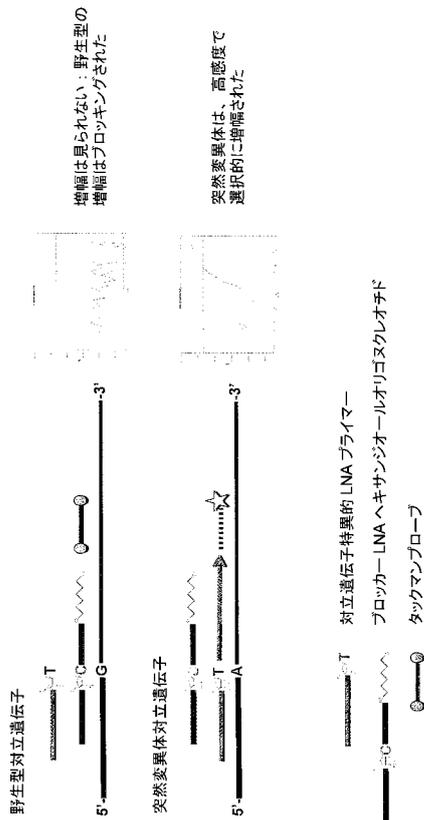
【0272】

[0319]前出の本発明を、理解を明確にする目的で例示及び例によりある程度詳細に記載してきたが、当業者は、付属の特許請求の範囲内で、特定の変更及び改変を実施しうることを理解するであろう。加えて、本明細書で提示される各参考文献は、各参考文献が参照により個別に組み込まれると仮定した場合と同じ程度に、参照によりその全体において組

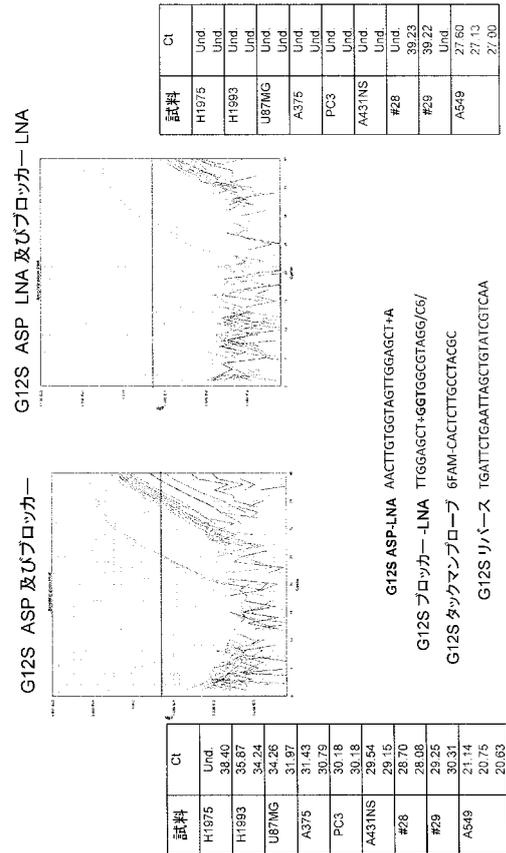
50

み込まれる。

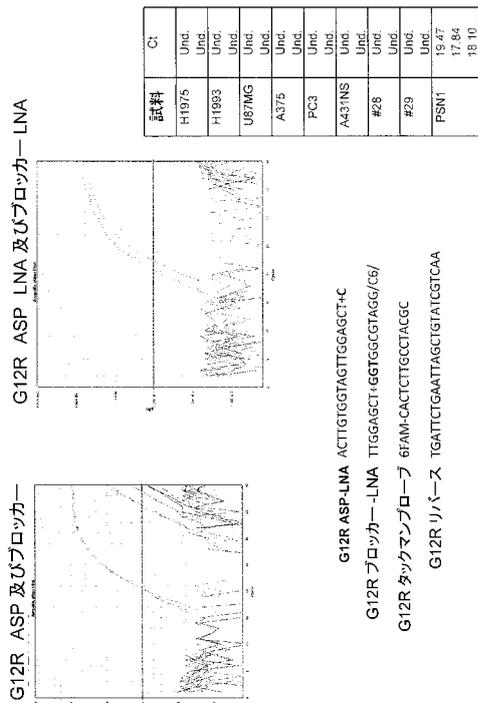
【 図 1 】



【 図 2 】

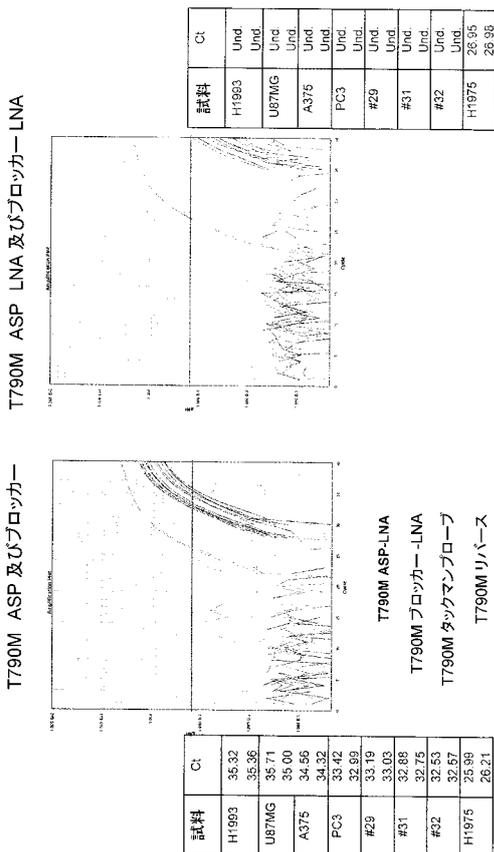


【 図 3 】



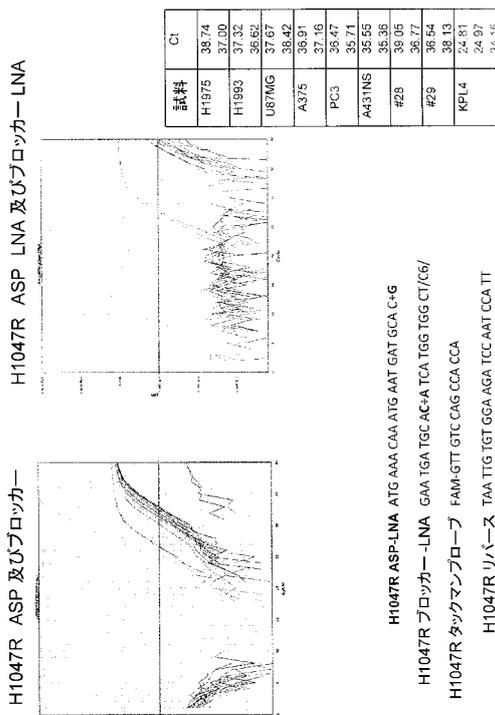
試料	Ct
H1975	36.82
Und.	Und.
H1993	Und.
Und.	Und.
U87MG	Und.
Und.	Und.
A375	Und.
Und.	Und.
PC3	Und.
Und.	Und.
A431NS	35.29
Und.	Und.
#28	37.07
Und.	Und.
#29	38.01
Und.	Und.
PSN1	33.15
Und.	Und.
PSN1	33.14
Und.	Und.
PSN1	17.24
Und.	Und.
PSN1	17.03
Und.	Und.
PSN1	18.00

【 図 5 】



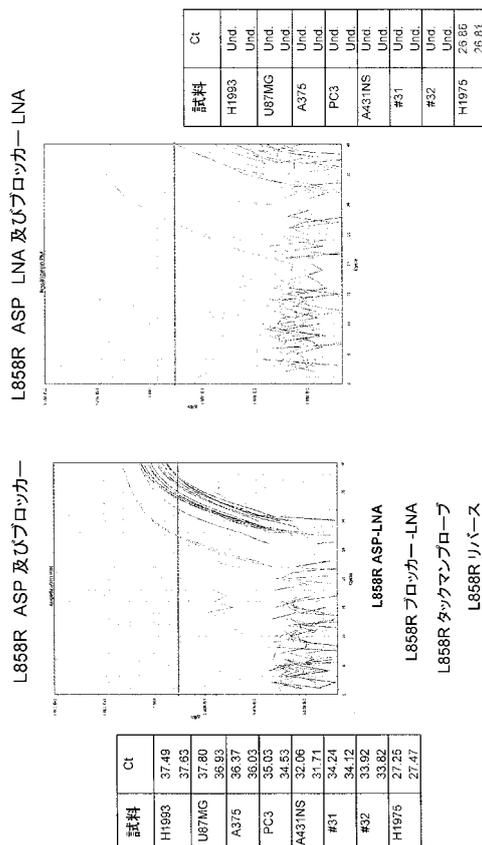
試料	Ct
H1993	Und.
Und.	Und.
U87MG	Und.
Und.	Und.
A375	Und.
Und.	Und.
PC3	Und.
Und.	Und.
#29	37.07
Und.	Und.
#31	33.15
Und.	Und.
#32	33.14
Und.	Und.
H1975	17.24
Und.	Und.
H1975	17.03
Und.	Und.
H1975	18.00

【 図 4 】



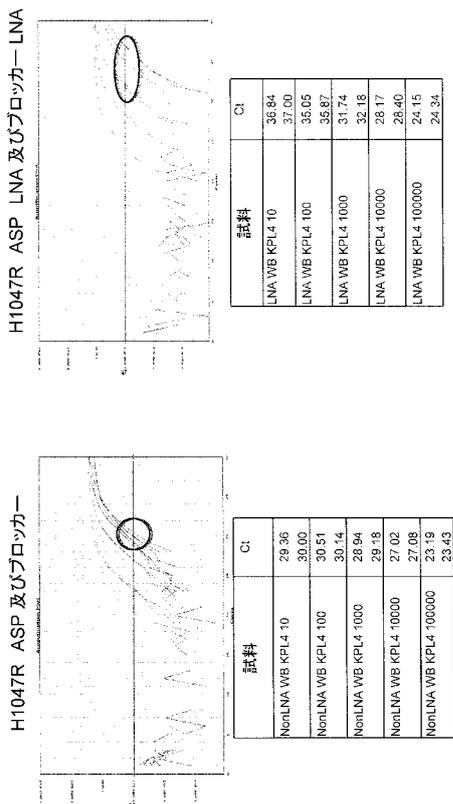
試料	Ct
H1975	27.71
Und.	Und.
H1993	29.06
Und.	Und.
U87MG	28.63
Und.	Und.
A375	28.67
Und.	Und.
PC3	25.87
Und.	Und.
PC3	27.37
Und.	Und.
A431NS	27.46
Und.	Und.
A431NS	25.14
Und.	Und.
#28	27.25
Und.	Und.
#28	28.17
Und.	Und.
#29	29.01
Und.	Und.
#29	26.16
Und.	Und.
KPL4	27.92
Und.	Und.
KPL4	22.19
Und.	Und.
KPL4	22.67
Und.	Und.
KPL4	22.60

【 図 6 】



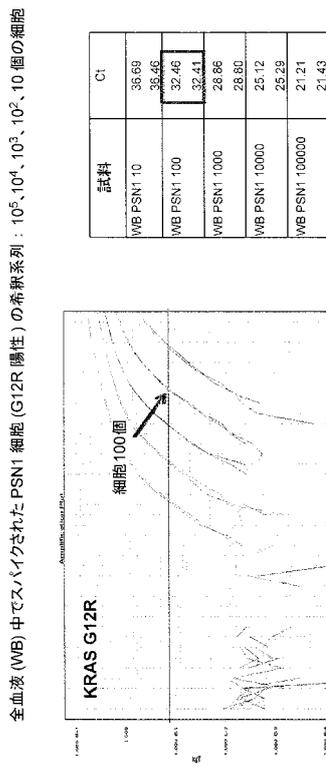
試料	Ct
H1975	37.49
Und.	Und.
H1993	37.80
Und.	Und.
U87MG	36.93
Und.	Und.
A375	36.37
Und.	Und.
PC3	36.03
Und.	Und.
A431NS	35.03
Und.	Und.
A431NS	34.53
Und.	Und.
#31	31.71
Und.	Und.
#32	34.24
Und.	Und.
#32	34.12
Und.	Und.
H1975	33.92
Und.	Und.
H1975	33.82
Und.	Und.
H1975	27.25
Und.	Und.
H1975	27.47

【 図 7 】



全血液中でスバイクされたKPL4細胞(H1047R陽性)の希釈系列：10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10個の細胞

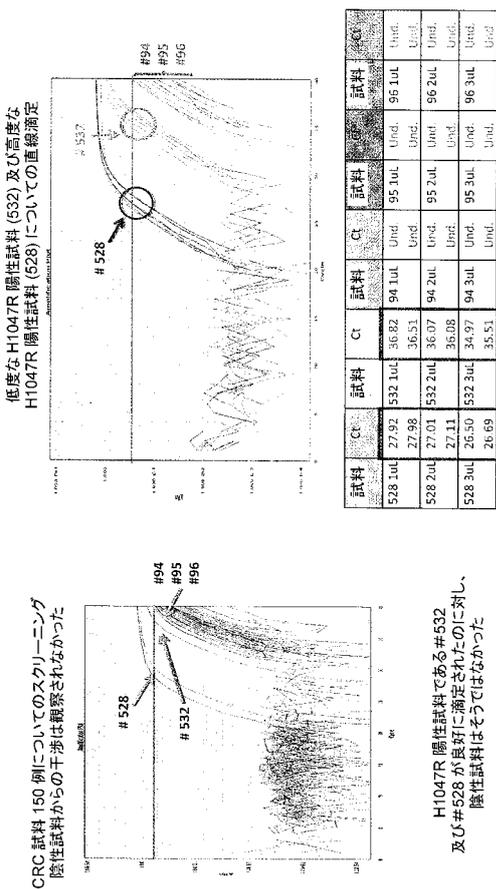
【 図 8 】



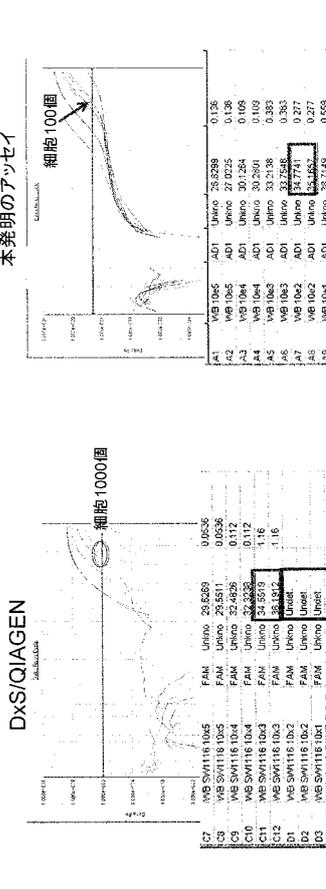
全血液(WB)中でスバイクされたPSN1細胞(G12R陽性)の希釈系列：10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10個の細胞

G12Rシグナルは、WBミックス中に100個という低量のPSN1陽性細胞でもなお検出可能である(細胞100個は、全血液カウントの0.01%を表す)

【 図 9 】



【 図 10 】



Dxs 取のアッセイは、ミックス中に1000個の細胞を検出するに過ぎない。細胞100個では感度が失われる。

本発明のアッセイでは、G12Aシグナルが、WBミックス中に10~100個という低量のSW116陽性細胞でもなお検出可能である。細胞100個は、全血液カウントの0.01%を表す。

細胞1000個であっても、Dxsでは、Ct曲線が厳密ではない。

【 図 1 1 】

全血液 (WB) 中でスライクされた KPL4(H1047R)、A549(G12S)、及び PSN1(G12R) の希釈系列：
10、50、100、250、500 個の細胞

総 DNA 量 (GE)	遺伝子	細胞	突然変異	WB 中に混ぜた細胞数
1	22349	KRAS G12S	834b	A549 10細胞
2	40374	KRAS G12S	834b	A549 50細胞
3	60624	KRAS G12S	834b	A549 100細胞
4	39712	KRAS G12S	834b	A549 250細胞
5	12411	KRAS G12S	834b	A549 500細胞
6	11273	KRAS G12S	834b	A549 0細胞
7	29284	PIK3CA H1047R	83140g	KPL4 10細胞
8	5217	PIK3CA H1047R	83140g	KPL4 50細胞
9	25339	PIK3CA H1047R	83140g	KPL4 100細胞
10	5535	PIK3CA H1047R	83140g	KPL4 250細胞
11	34603	PIK3CA H1047R	83140g	KPL4 500細胞
12	9885	PIK3CA H1047R	83140g	KPL4 0細胞
13	101949	KRAS G12R	834c	PSN-1 100細胞
14	207276	KRAS G12R	834c	PSN-1 100細胞
15	189448	KRAS G12R	834c	PSN-1 100細胞

Inostics 製のアッセイは、全血液中に 1000 個の細胞が存在する場合に限り突然変異を検出した。

まとめ
KRAS 遺伝子において合計 1 つの突然変異を見出すことができた。
この突然変異は、要求される 1% の突然変異頻度を提示しなかった (*で印をつけた) が、突然変異の明確な表徴を示し、よって、突然変異と称した。

【 図 1 2 】

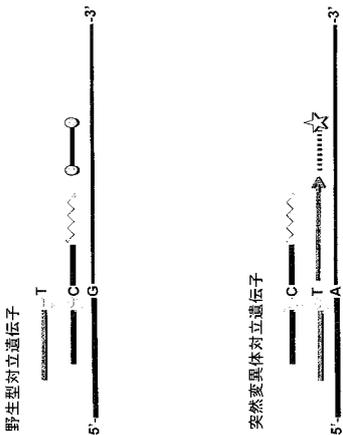
全血液 (WB) 中でスライクされた KPL4(H1047R)、A549(G12S)、及び PSN1(G12R) の希釈系列：
10、50、100、250、500 個の細胞

H1047R		G12S		G12R	
本発明のアッセイ	Inostics	本発明のアッセイ	Inostics	本発明のアッセイ	Inostics
KPL4 0細胞	36.00	A549 0細胞	36.20	PSN-1 0細胞	35.37
KPL4 10細胞	35.70	A549 10細胞	36.15	PSN-1 10細胞	34.43
KPL4 50細胞	35.77	A549 50細胞	35.00	PSN-1 100細胞	30.54
KPL4 100細胞	34.18	A549 100細胞	34.70	PSN-1 1000細胞	26.87
KPL4 250細胞	34.39	A549 250細胞	34.35		
KPL4 500細胞	33.97	A549 500細胞	33.65		

- Inostics 製のアッセイは、ミックス中に 1000 個の細胞を検出するに過ぎない。Inostics 製のアッセイは、細胞 500 個で感度を有さない。
- 本発明のアッセイでは、WB ミックス中に 50 ~ 100 個という低量の陽性細胞のシグナルも検出可能である。
- 細胞 100 個は、全血液カウンットの 0.01% を表す。

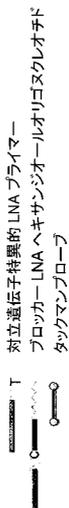
【 図 1 3 】

実験 1：突然変異体対立遺伝子の検出と対比させた野生型対立遺伝子の検出



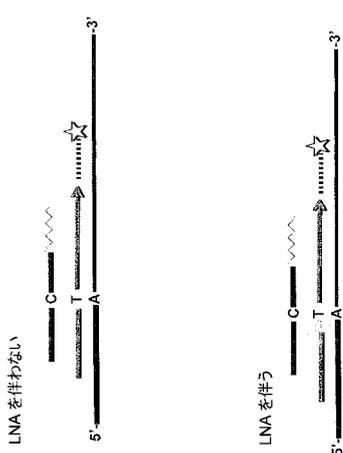
増幅は早れない：野生型の増幅はブロックされた

突然変異体は、高感度で選択的に増幅された



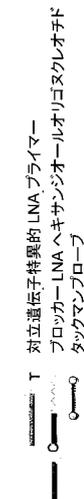
【 図 1 4 】

実験 2：LNA を伴わないオリゴヌクレオチドプライマーと対比させた、LNA を伴うオリゴヌクレオチドプライマー



LNA を伴わない

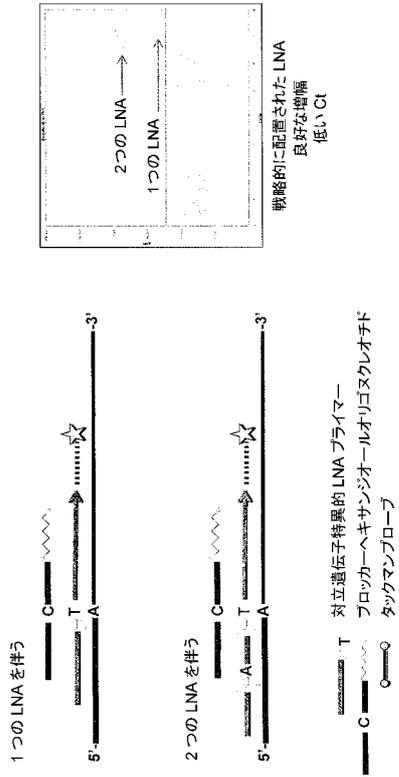
LNA を伴うならば、全てが増幅される
選択性は見られない



突然変異体は、高感度で選択的に増幅される

【 図 1 5 】

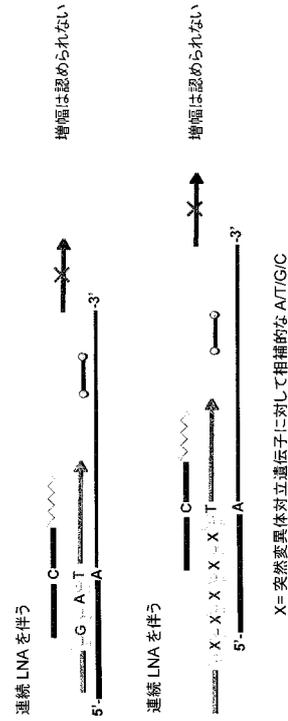
実験 3 : 2 つの LNA を伴う対立遺伝子特異的プライマーと対比させた、1 つの LNA を伴う対立遺伝子特異的プライマー



3'端における LNA に加えて、3'端から 2、3、4、5、又は 6 塩基の位置に LNA を配置することもでき、及び/又は 3'端における LNA に加えて、5'端に LNA を配置することもできる。

【 図 1 6 】

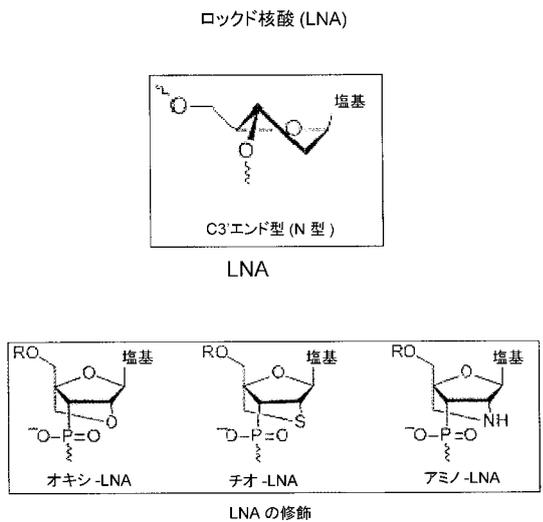
実験 4 : 連続 LNA を伴う対立遺伝子特異的プライマー



連続 LNA を伴う対立遺伝子特異的 LNA プライマー
ブロック-ヘキサジオールオリゴヌクレオチド
タックマンブロープ

3 つ以上の連続 LNA を伴う対立遺伝子特異的プライマーからは、増幅産物が検出されない。

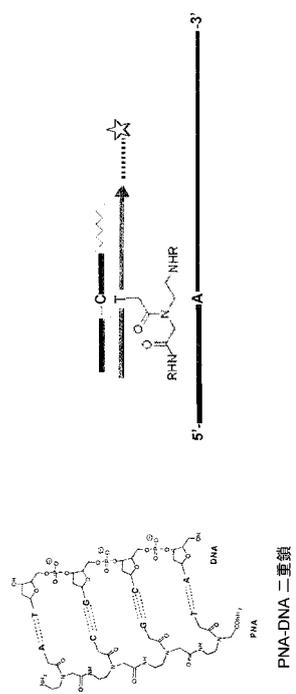
【 図 1 7 】



- ・ LNA とは、非天然で、コンフォメーション的に制約されたオリゴヌクレオチド類似体であって、DNA との緊密な構造的類似性を伴うオリゴヌクレオチド類似体であり、2'-O-4'-C-メチレン架橋を伴う単量体単位を保有する。
- ・ 二環式構造が、分子を C3' エンド型糖 (N 型) の立体配置にロックすることから、オリゴヌクレオチドは、二重鎖の安定性の高さに関連する A 型らせんを採用することが確保される。

【 図 1 8 】

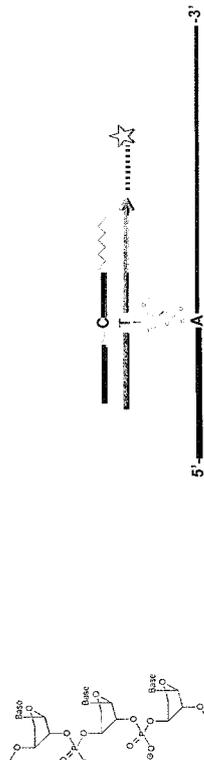
ペプチド核酸 (PNA) を伴う対立遺伝子特異的プライマー



- ・ DNA 及び RNA と異なり、PNA の骨格は帯電しない。
- ・ PNA がその標的核酸配列へハイブリダイズしても、静電斥力は生じないことから、PNA-DNA 二重鎖には、天然のホモ二重鎖又はヘテロ二重鎖より高い安定性がもたらされる。
- ・ 安定性の増大は、融解温度 (Tm) の上昇によって反映される。
- ・ これらの修飾塩基の結合アフィニティの上昇及び Tm の上昇によって、アッセイに、高度な特異性及び再現性がもたらされる。

【 図 1 9 】

α-L-トレオース核酸 (TNA) を伴う対立遺伝子特異的プライマー



(L)-α-トレオ- フランシル-(β-2)
-オリゴヌクレオチド (TTNAJ)

- ・トレオース核酸 (TNA) とは、RNA の進化的代替物として作用した可能性があった、潜在的な天然核酸である。
- ・TNA は、A 型の DNA 及び RNA の良好な模倣体であると考えられる。この観察結果は、なぜ TNA が DNA と強くハイブリダイズし、RNA とより強くハイブリダイズするのかについての説明をもたらす。
- ・本図で提示される塩基修飾は、相補的な DNA 及び RNA に対する熱安定性を呈示し、これによって、優れたミスマッチの識別が可能となる。

【 図 2 0 】

ジップ核酸 (ZNA) を伴う対立遺伝子特異的プライマー

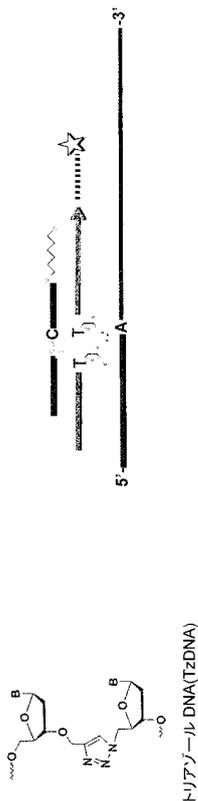


ジップ核酸 (ZNA)

- ・ジップ核酸 (ZNA) とは、その標的に対するアフィニティを増大させるカチオン性スベルミニユニット、コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドである。
- ・カチオン性残基の存在によって、オリゴヌクレオチド識別特性に影響を及ぼさず、 T_m を上昇させることから、PCR をより高温で実行することが可能となる。
- ・ZNA 修飾は、相補的な DNA 及び RNA に対する熱安定性を呈示し、これによって、優れたミスマッチの識別が可能となる。

【 図 2 1 】

トリアゾール DNA (TzDNA) を伴う対立遺伝子特異的プライマー



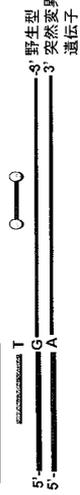
トリアゾール DNA (TzDNA)

- ・TzDNA オリゴヌクレオチドは、通常のリン酸骨格の代わりに、トリアゾール連結を有する。
- ・1、2、3-トリアゾールユニットによる単一の修飾又は二重の修飾を伴うオリゴマーは、DNA 複合体の融解温度の上昇を示す。
- ・非天然連結はまた、プライマーを、5'-エクソヌクレアーゼ活性性からも保護する。
- ・TzDNA 修飾は、相補的な DNA に対する熱安定性を呈示し、これによって、優れたミスマッチの識別が可能となる。

【 図 2 2 】

実験 5

I. ブロッカーを伴わない野生型 / 突然変異体対立遺伝子



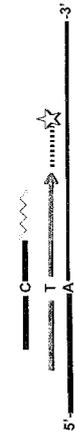
ブロッカーがないと、識別がなされない。野生型対立遺伝子及び突然変異体対立遺伝子のいずれもが増幅される。

II. ブロッカーを伴う野生型対立遺伝子

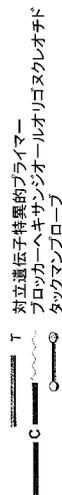


増幅は認められない
野生型の増幅はプロッキングされる

III. ブロッカーを伴う突然変異体対立遺伝子



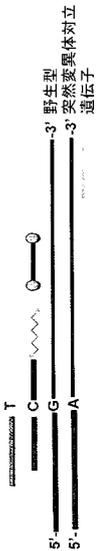
突然変異体対立遺伝子が選択的に増幅される



【 図 2 3 】

実験 6：対立遺伝子特異的プライマー及びヘキサジオールを伴うプロッカーブローブ

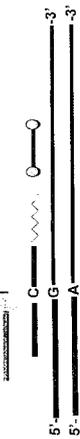
I. LNAを伴わない突然変異体対立遺伝子特異的プライマー、及びヘキサジオールを伴うプロッカー



LNA プライマーを伴わない突然変異体対立遺伝子に対する特異性が失われる



II. LNAを伴う突然変異体対立遺伝子特異的プライマー、及びヘキサジオールを伴うプロッカー



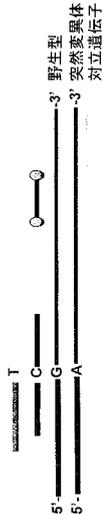
LNA プライマー突然変異体対立遺伝子の特異的増幅



【 図 2 5 】

実験 8：LNA を伴うプロッカーブローブ

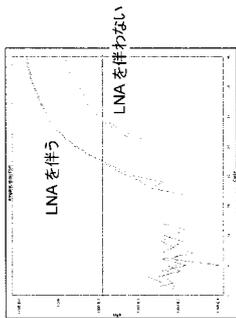
I. LNA を伴わないプロッカー



II. LNA を伴うプロッカー



プロッカー-LNA 効果的で選択的な増幅より良好な識別



T 対立遺伝子特異的プライマー
T 対立遺伝子特異的 LNA プライマー
T 対立遺伝子特異的 LNA プライマー
プロッカー-ヘキサジオールオリゴヌクレオチド
タックマンブローブ
リバーズプライマー

【 図 2 4 】

実験 7：対立遺伝子特異的プライマー及び3'端における修飾を伴うプロッカーブローブ

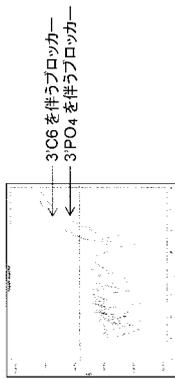
I. 3'-ヘキサジオールを伴うプロッカー



II. 3'-PO4 を伴うプロッカー



3'-C6を伴うプロッカーは、3'-PO4 修飾を伴うプロッカーの 31.2 の Ct と比較して、28.4 という低い Ct でより良好に機能する。

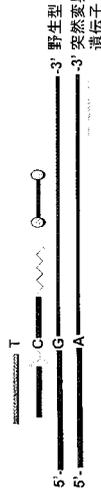


・ 硫素鎖の柔軟性及び疎水性は、プロッカーが、立体障害されることなく、良好にハイブリダイズすることを可能とする。3'端のリン酸基は、野生型配列に結合するが、効率は、リン酸基のバルク性及びイオン性の性質によって減弱しうる。

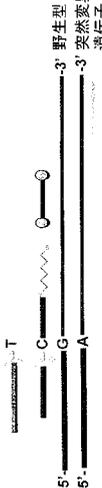
【 図 2 6 】

実験 9：LNA を伴う対立遺伝子特異的プライマー及び LNA を伴うプロッカーブローブ

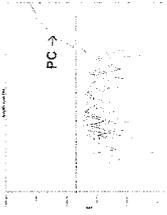
I. プロッカー-LNAと共に、LNAを伴わない対立遺伝子特異的プライマー



II. プロッカー-LNAと共に、LNAを伴う突然変異体対立遺伝子特異的プライマー



LNA プライマーを伴わない突然変異体対立遺伝子に対する特異性が失われる

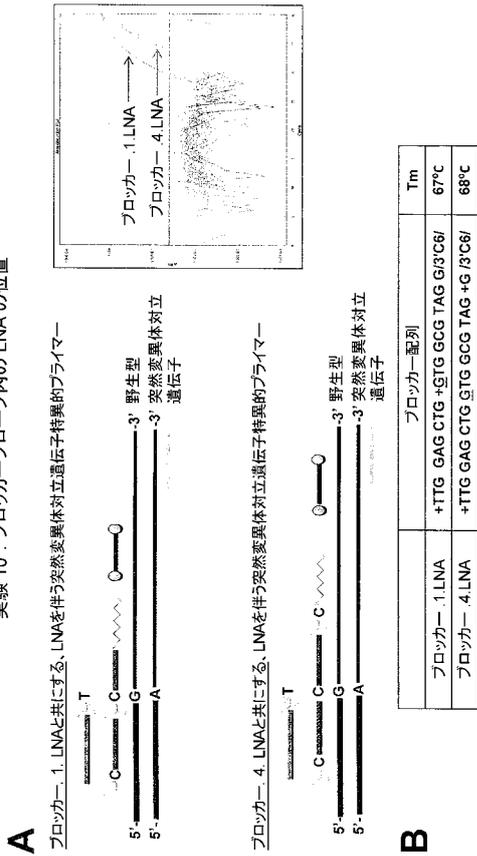


LNA プライマー及び LNA プロッカー突然変異体対立遺伝子の特異的増幅の増大

T 対立遺伝子特異的プライマー
T 対立遺伝子特異的 LNA プライマー
T 対立遺伝子特異的 LNA プライマー
プロッカー-LNA ヘキサジオールオリゴヌクレオチド
タックマンブローブ
リバーズプライマー

【 図 2 7 】

実験 10 : ブロッカープローブ内の LNA の位置



【 図 2 8 】

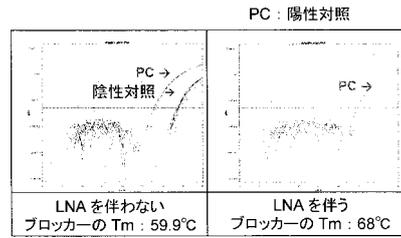
ブロッカープローブ及び融解温度 (Tm)

A

ブロッカー-配列	Tm
TTG GAG CTG GTC GCG TAG G /3'C6/	59.9°C
+TTG GAG CTG GTC GCG TAG +G /3'C6/	68°C

+は、LNAを示す；Tm：融解温度

B



LNAを伴うブロッカーとTmの上昇

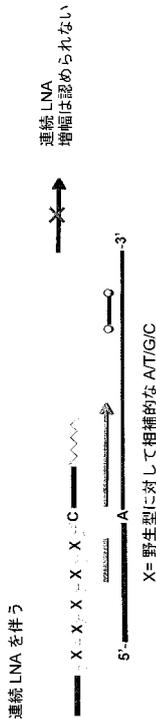
a) 対立遺伝子多型に対する特異性が増大

b) 感度の増大

c) 野生型の効率的な阻害

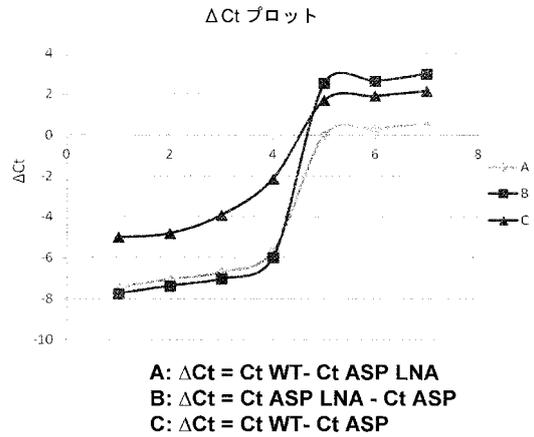
【 図 2 9 】

連続 LNA を伴うブロッカープローブ



2つのLNAを互いに隣り合わせて配置したところ、性能が著しく低下した。連続で2つを超えてLNAを配置したところ、増幅は完全に停止した。

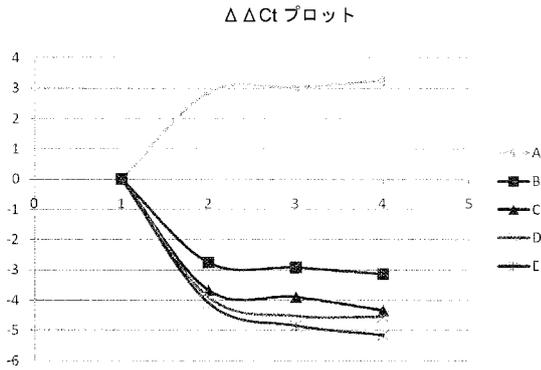
【 図 3 0 】



野生型プライマーのCt値と対立遺伝子特異的プライマー(ASP)のCt値との間のCtの差(ΔCt)とは、アッセイの選択性の近似である。ΔCtは、LNAを伴うASP/LNAを伴わないASP/多様なブロッカーLNAを伴う野生型(WT)プライマーについてのアッセイに由来するCt値から計算した。

ASP及びブロッカーにおけるLNAの使用によって、ΔCtの増大が得られたことから、アッセイの実行可能性及び選択性が示される。

【 図 3 1 】



ΔΔCtは、多様な体細胞突然変異遺伝子型決定アッセイに由来するCt値から計算した。

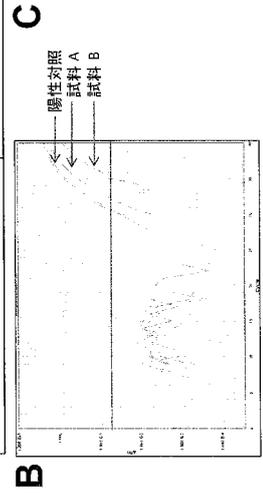
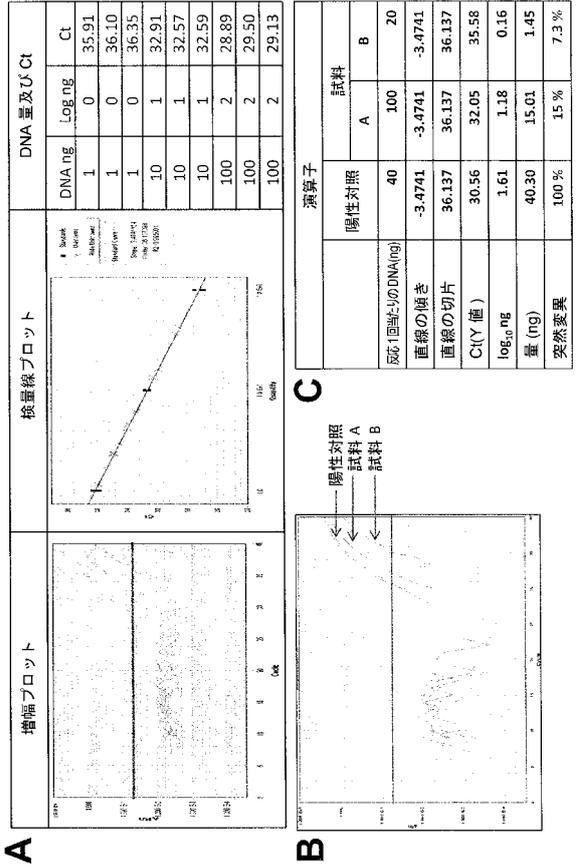
$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{WT} - Ct_{ASP}) - (Ct_{ASP} - Ct_{ASP\ LNA})$$

アッセイは、LNAを伴う対立遺伝子特異的プライマー(ASP)、LNAを伴わないASP、又は野生型(WT)プライマー、及び多様なブロッカーLNAプローブを含む。

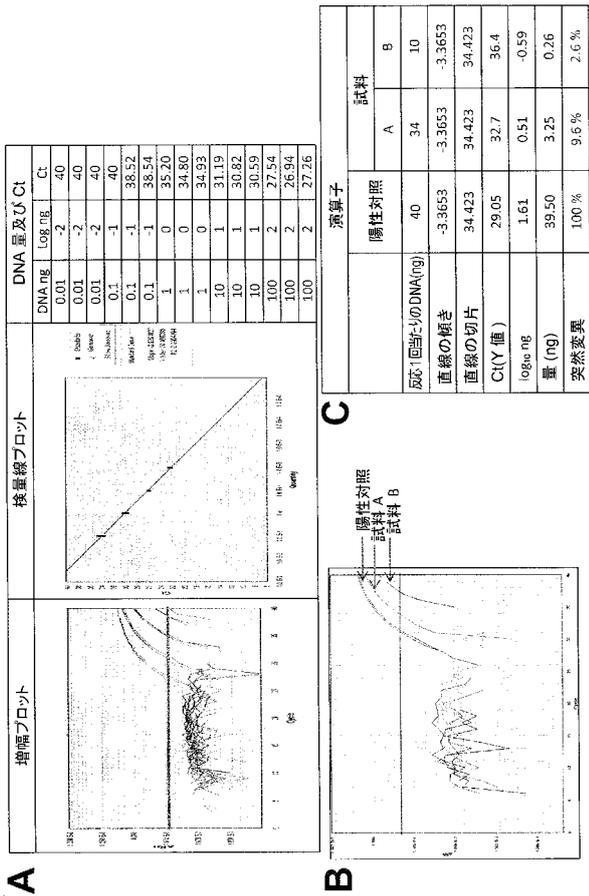
アッセイAは、ASPにおけるLNA及びブロッカープローブによってデザインした。アッセイAは、LNAを伴わないブロッカープローブ及びWTプライマー又はLNAを伴わないASPによるアッセイより良好に機能した。

アッセイB、C、D、及びDは、機能しなかった。これらのアッセイでは、ASP及び/又はブロッカープローブに、複数のLNAが連続で配置された。

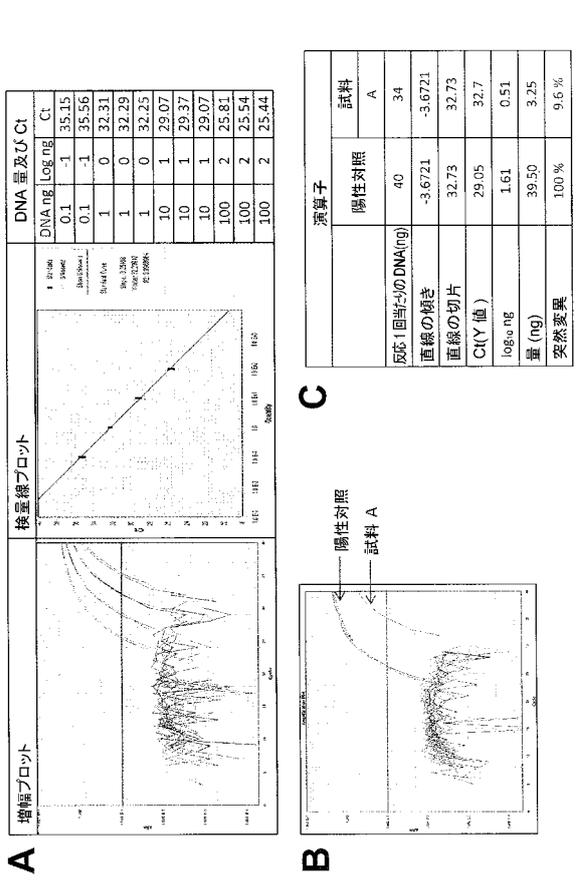
【 図 3 2 】



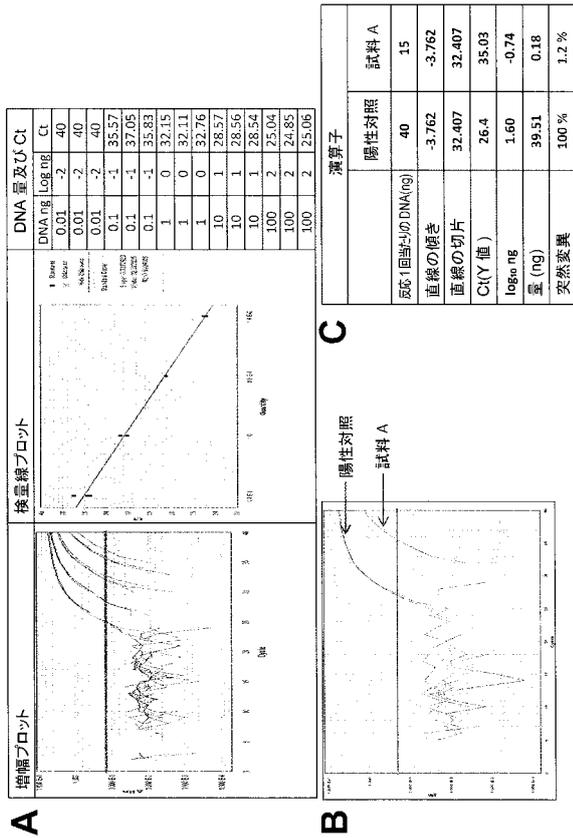
【 図 3 3 】



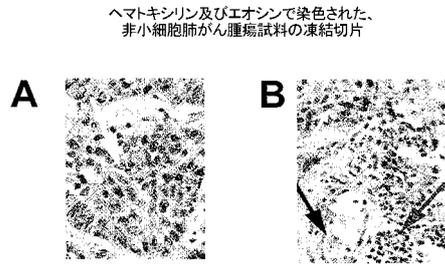
【 図 3 4 】



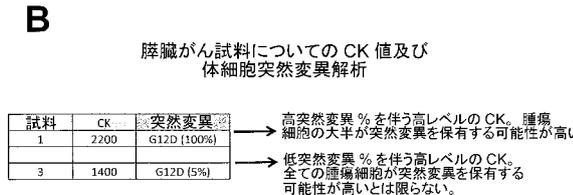
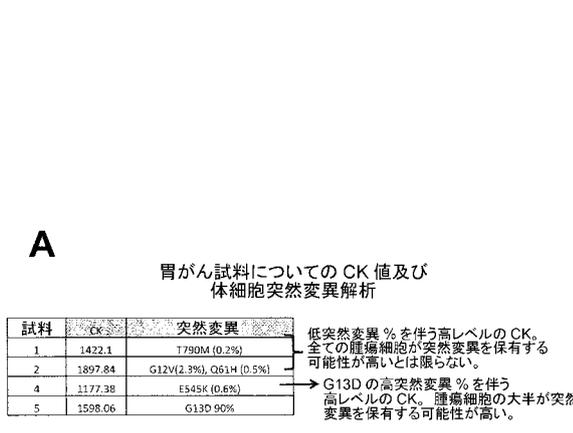
【 図 3 5 】



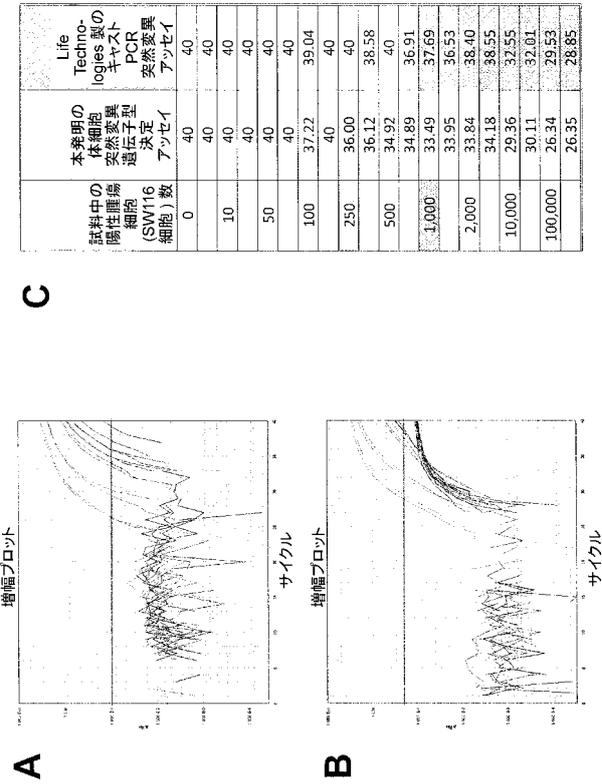
【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



【配列表】

2014526892000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, 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	WO 2010/111682 A2 (LIFE TECHNOLOGIES CORP [US]; CHEN CAIFU [US]; TAN RUOYING [US]) 30 September 2010 (2010-09-30) the whole document paragraph [0162] - paragraph [0171]; claims 1,7,10; figure 1; example 15 paragraph [0030] - paragraph [0031] claims 25,26,28,31 paragraph [0007] - paragraph [0011]; claims 32,33,34,36,39 paragraph [0033] - paragraph [0038]; claims 40-46 paragraph [0091]	1-11, 13-27, 29-43, 45-57, 59,60
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 January 2013		Date of mailing of the international search report 01/02/2013
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 Quirin, Katharina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051442

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 554 516 A (KACIAN DANIEL L [US] ET AL) 10 September 1996 (1996-09-10) the whole document column 9	11,12, 27,28, 43,44, 57,58
A	US 2011/086354 A1 (TZUBERY TZVI [IL] ET AL) 14 April 2011 (2011-04-14) the whole document	11,12, 27,28, 43,44, 57,58
A	RÉGIS NOIR ET AL: "Oligonucleotide-Oligospermine Conjugates (Zip Nucleic Acids): A Convenient Means of Finely Tuning Hybridization Temperatures", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 130, no. 40, 8 October 2008 (2008-10-08), pages 13500-13505, XP055050143, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja804727a the whole document	5,9,21, 25,37, 41,51,55
A	HIROYUKI ISOBE ET AL: "Triazole-Linked Analogue of Deoxyribonucleic Acid (TL DNA): Design, Synthesis, and Double-Strand Formation with Natural DNA", ORGANIC LETTERS, vol. 10, no. 17, 4 September 2008 (2008-09-04), pages 3729-3732, XP055050147, ISSN: 1523-7060, DOI: 10.1021/o1801230k the whole document	5,9,21, 25,37, 41,51,55
A	WO 2005/017181 A2 (INVESTIGEN INC [US]; KOSHINSKY HEATHER [US]; ZWICK MICHAEL S [US]; CHO) 24 February 2005 (2005-02-24) the whole document paragraph [0007]; claims 1-4	5,9,21, 25,37, 41,51,55
A	LATORRA D ET AL: "ENHANCED ALLELE-SPECIFIC PCR DISCRIMINATION IN SNP GENOTYPING USING 3' LOCKED NUCLEIC ACID (LNA) PRIMERS", HUMAN MUTATION, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 22, no. 1, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 79-85, XP009043978, ISSN: 1059-7794, DOI: 10.1002/HUMU.10228 the whole document	1-60
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/051442

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHN MORLAN ET AL: "Mutation Detection by Real-Time PCR: A Simple, Robust and Highly Selective Method", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 4, no. 2, 25 February 2009 (2009-02-25), pages e4584-1, XP008155203, ISSN: 1932-6203 the whole document -----	1-60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/051442

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2010111682 A2	30-09-2010	CN 102428190 A	25-04-2012		
		EP 2411543 A2	01-02-2012		
		JP 2012523821 A	11-10-2012		
		US 2010285478 A1	11-11-2010		
		WO 2010111682 A2	30-09-2010		

US 5554516 A	10-09-1996	AT 307898 T	15-11-2005		
		AU 681082 B2	21-08-1997		
		AU 4222493 A	29-11-1993		
		AU 4523897 A	19-02-1998		
		CA 2135073 A1	11-11-1993		
		DE 69333891 D1	01-12-2005		
		DE 69333891 T2	27-07-2006		
		DK 0587266 T3	05-12-2005		
		EP 0587266 A1	16-03-1994		
		ES 2250960 T3	16-04-2006		
		JP 4137996 B2	20-08-2008		
		JP H07506255 A	13-07-1995		
		KR 100249110 B1	01-04-2000		
		US 5554516 A	10-09-1996		
		US 5888729 A	30-03-1999		
		WO 9322461 A1	11-11-1993		

US 2011086354 A1	14-04-2011	AU 2010307991 A1	10-05-2012		
		CA 2777446 A1	21-04-2011		
		EP 2488664 A2	22-08-2012		
		US 2011086354 A1	14-04-2011		
		WO 2011045744 A2	21-04-2011		

WO 2005017181 A2	24-02-2005	AT 488604 T	15-12-2010		
		AU 2004265581 A1	24-02-2005		
		BR PI0410780 A	27-06-2006		
		CA 2528843 A1	24-02-2005		
		CN 1894423 A	10-01-2007		
		EA 200501837 A1	27-10-2006		
		EP 1631677 A2	08-03-2006		
		GB 2422196 A	19-07-2006		
		JP 4633716 B2	23-02-2011		
		JP 2007525948 A	13-09-2007		
		MX PA05012482 A	03-07-2006		
		US 2006147958 A1	06-07-2006		
		US 2011008905 A1	13-01-2011		
		WO 2005017181 A2	24-02-2005		
		ZA 200510299 A	30-05-2007		

フロントページの続き

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

(72)発明者 プリンセン, フレッド

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ラ ホーヤ, クリックウッド プレイス 610

(72)発明者 セルバラジ, ファビヨラ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サン ディエゴ, レン ブラッフ ドライブ 9704

(72)発明者 シン, シャラット

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ランチョ サンタ フェ, トップ オブ ザ モーニング ウェー 8171

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 HA08 HA11

4B063 QA01 QA17 QQ42 QR55 QR62 QS25 QS34 QS36 QX02