

(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2014-507950**  
(P2014-507950A)

(43) 公表日 平成26年4月3日(2014. 4. 3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b> (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 41 頁)

(21) 出願番号	特願2013-556801 (P2013-556801)	(71) 出願人	513217609 トランスゲノミック、インク。 アメリカ合衆国 68164 ネブラスカ 州 オマハ エミット・ストリート 12 325
(86) (22) 出願日	平成24年2月28日 (2012. 2. 28)	(74) 代理人	100082072 弁理士 清原 義博
(85) 翻訳文提出日	平成25年10月25日 (2013. 10. 25)	(72) 発明者	リチャードソン, キャサリン アメリカ合衆国 68164 ネブラスカ 州 オマハ エミット・ストリート 12 325
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/026938	(72) 発明者	ルジャンドル, ベンジャミン アメリカ合衆国 68136 ネブラスカ 州 オマハ エドナ・ストリート 166 03
(87) 国際公開番号	W02012/118802		
(87) 国際公開日	平成24年9月7日 (2012. 9. 7)		
(31) 優先権主張番号	61/532, 887		
(32) 優先日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/447, 490		
(32) 優先日	平成23年2月28日 (2011. 2. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

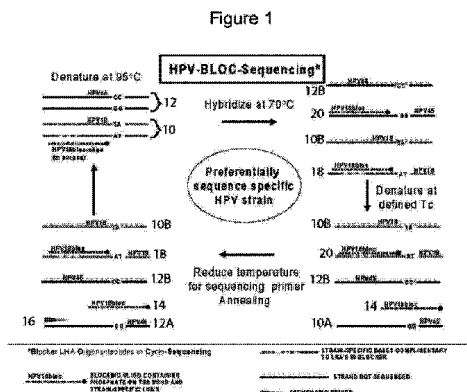
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 混合個体群における標的DNAを配列決定するためのキットおよび方法

(57) 【要約】

関連する参照配列を有するサンプル中の標的DNA配列を配列決定するための方法およびキットが本明細書で提供される。特に、癌または癌治療に関連付けられる変異を配列決定するためのキットおよび方法が記載されている。同様に、ミトコンドリア変異を検出するための、および、密接に関連するウイルス株を識別するためのキットおよび方法も提供される。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列決定プライマーとブロッキング核酸を含む、参照配列を有するサンプル中の標的 DNA 配列を配列決定するためのキットであって、

配列決定プライマーは、標的配列と参照配列の一本鎖の一部に相補的であり、ブロッキング核酸は、参照配列の一本鎖の少なくとも一部と完全に相補的であり、

配列決定プライマーとブロッキング核酸は、参照配列の同じ鎖に相補的であり、および、ブロッキング核酸は、ポリメラーゼでは伸長できないように、3'末端でブロックされる、ことを特徴とするキット。

## 【請求項 2】

標識化された連鎖停止ヌクレオチド三リン酸をさらに含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載のキット。

## 【請求項 3】

標的配列と参照配列は、標的鎖と参照鎖を形成するために変性可能であり、および、ブロッキング核酸は、ハイブリダイズが可能となると、完全に相補的な参照鎖を含むホモ二本鎖を、部分的に相補的な標的鎖を含むヘテロ二本鎖を形成することができる、ことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のキット。

## 【請求項 4】

ブロッキング核酸と相補的な標的鎖のヘテロ二本鎖は、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖よりも低い温度で変性する、ことを特徴とする請求項 3 に記載のキット。

## 【請求項 5】

配列決定プライマーは、臨界温度未満の温度で標的鎖にアニーリングされることが可能であることを特徴とする請求項 4 に記載のキット。

## 【請求項 6】

配列決定プライマーの 3'末端は、ブロッキング核酸の 5'末端と結合する参照配列の鎖上の塩基の近くで参照配列の鎖に結合することができ、あるいは、配列決定プライマーの 3'末端は、ブロッキング核酸の 5'末端と同じ参照配列の塩基の少なくとも 1 つに相補的である、ことを特徴とする請求項 1 - 5 のいずれか 1 つに記載のキット。

## 【請求項 7】

ブロッキング核酸の 5'末端は、DNA ポリメラーゼによる 5'から 3'のエキソヌクレオリシスを回避するヌクレオチドを含む、ことを特徴とする請求項 1 - 6 のいずれか 1 つに記載のキット。

## 【請求項 8】

ブロッキング核酸は一本鎖核酸である、ことを特徴とする請求項 1 - 7 のいずれか 1 つに記載のキット。

## 【請求項 9】

ブロッキング核酸は、DNA、RNA、ペプチド核酸、ロッド核酸、別の修飾されたヌクレオチド、あるいは、これらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 1 - 8 のいずれか 1 つに記載のキット。

## 【請求項 10】

ブロッキング核酸中のペプチド核酸、ロッド核酸、または、別の修飾されたヌクレオチドの位置は、参照配列と標的配列が異なる疑いのある位置と一致するように選択される、ことを特徴とする請求項 9 に記載のキット。

## 【請求項 11】

ブロッキング核酸と部分的に相補的な標的鎖のヘテロ二本鎖を変性させるために必要とされる温度と、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖を変性させるために必要とされる温度の差は最大化される、ことを特徴とする請求項 10 に記載のキット。

## 【請求項 12】

ブロッキング核酸中のペプチド核酸、ロッド核酸、または、別の修飾されたヌクレオチドの位置は、ブロッキング核酸全体で一定以上の融解温度をもたらすように選択される

10

20

30

40

50

、ことを特徴とする請求項 9 - 1 1 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 1 3】

5' - リン酸化プライマーをさらに含み、

5' - リン酸化プライマーは、配列決定プライマーと同じ鎖に相補的ではない、ことを特徴とする請求項 1 - 1 2 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 1 4】

5' - リン酸依存性のエキソヌクレアーゼをさらに含む、ことを特徴とする請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

標的配列または参照配列は、K - R A S エキソン 2、コドン 1 2、および / または 1 3 を含む、ことを特徴とする請求項 1 - 1 4 のいずれか 1 つに記載のキット。

10

【請求項 1 6】

標的配列または参照配列はミトコンドリア変異を含む、ことを特徴とする請求項 1 - 1 4 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 1 7】

ミトコンドリア変異は M E L A S に関連付けられる、ことを特徴とする請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

標的配列または参照配列は H P V 核酸を含む、ことを特徴とする請求項 1 - 1 4 のいずれか 1 つに記載のキット。

20

【請求項 1 9】

標的配列または参照配列は、B R A F エキソン 1 1 および / または エキソン 1 5 を含む、ことを特徴とする請求項 1 - 1 4 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 2 0】

配列決定のためにサンプル中の標的配列を調製するための方法であって、前記方法は、

a) 反応混合物を形成するために、D N A 配列決定反応混合物にサンプルを加える工程であって、

サンプルが参照配列を有し、1 以上の標的配列を有する疑いもあり、D N A 配列決定反応混合物が、配列決定プライマーと、参照配列の一本鎖の少なくとも一部と完全に相補的な過剰モル量のブロッキング核酸を含み、

30

ブロッキング核酸と配列決定プライマーが、参照配列の同じ鎖に相補的であり、および、

ブロッキング核酸が、ポリメラーゼによって伸長できないように 3' 末端でブロックされる、工程、

b) 変性した参照鎖と変成した標的鎖を形成するために、参照配列と標的配列の融解温度 ( $T_m$ ) よりも高い第 1 の変性温度に、標的配列を有している疑いのある反応混合物をさらす工程、

c) ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖の形成と、ブロッキング配列と標的鎖のヘテロ二本鎖の形成を可能にするために、反応混合物の温度を下げる工程、

40

d) ブロッキング核酸と相補的な標的鎖の前記ヘテロ二本鎖の変性を可能にするほどには十分であるが、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖を変性させるには不十分である臨界温度 ( $T_c$ ) まで、反応混合物の温度を上げる工程、

e) 配列決定プライマーが反応混合物中の遊離標的鎖および遊離参照鎖にアニーリングされることを可能にするために、反応混合物の温度を下げる工程、および、

f) 伸長生成物を生成するために配列決定プライマーを伸長する工程であって、伸長生成物が標的配列の核酸配列の決定を可能にするために解析可能である工程を含む、ことを特徴とする方法。

【請求項 2 1】

標的配列の核酸配列を決定する工程をさらに含む、ことを特徴とする請求項 2 0 に記載

50

の方法。

【請求項 2 2】

配列は、ジ - デオキシ配列決定、単一分子配列決定、パイロシーケンシング、または、第 2 世代ハイスループットシーケンシングによって決定される、ことを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

配列決定プライマーの 3' 末端は、ブロッキング核酸の 5' 末端に結合する参照鎖の塩基の近くで参照鎖に結合し、あるいは、配列決定プライマーの 3' 末端は、ブロッキング核酸の 5' 末端と同じ参照配列の塩基の少なくとも 1 つに相補的である、ことを特徴とする請求項 2 0 - 2 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 2 4】

配列決定プライマーの 3' 末端とブロッキング核酸の 5' 末端は、参照鎖の同じ塩基の 2 つ以上に相補的である、ことを特徴とする請求項 2 0 - 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 2 5】

ブロッキング核酸の 5' 末端は、DNA ポリメラーゼによる 5' から 3' のエキソヌクレオリシスを回避するヌクレオチドを含む、ことを特徴とする請求項 2 0 - 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 2 6】

工程 a) のブロッキング核酸は一本鎖核酸である、ことを特徴とする請求項 2 0 - 2 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 2 7】

ブロッキング核酸は、DNA、RNA、ペプチド核酸、ロックド核酸、別の修飾されたヌクレオチド、あるいは、これらの組み合わせを含む、ことを特徴とする請求項 2 0 - 2 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 2 8】

ブロッキング核酸中のペプチド核酸、ロックド核酸、または、別の修飾されたヌクレオチドの位置は、参照配列と標的配列が異なる疑いのある位置と一致するように選択される、ことを特徴とする請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

ブロッキング核酸中のペプチド核酸、ロックド核酸、または、別の修飾されたヌクレオチドの位置は、ブロッキング核酸全体で一定以上の融解温度をもたらすように選択される、ことを特徴とする請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法。

30

【請求項 3 0】

標的配列は参照配列に対して少なくとも 5 0 % の相同性を有する、ことを特徴とする請求項 2 0 - 2 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 1】

ブロッキング核酸は、参照配列と長さが等しいか、参照配列よりも短い、ことを特徴とする請求項 2 0 - 3 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 2】

配列決定プライマーは、臨界温度未満の温度で、参照配列の鎖にアニーリングされ得る、ことを特徴とする請求項 2 0 - 3 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【請求項 3 3】

配列決定プライマーは、ブロッキング核酸に対して過剰なモルで反応混合物に加えられ、ことを特徴とする請求項 2 0 - 3 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 4】

参照鎖とブロッキング核酸の二本鎖の融解温度は、標的鎖とブロッキング核酸のヘテロ二本鎖の融解温度よりも高い、ことを特徴とする請求項 2 0 - 3 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 5】

50

反応混合物中に増幅プライマーを含めることによって、工程 a ) のサンプルとして、増幅産物の少なくとも一部を用いる前に、サンプル中の標的配列の少なくとも1つを増幅する工程をさらに含む、ことを特徴とする請求項 20 - 34 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 36】

反応混合物中に増幅プライマーを含めることによって、サンプル中の標的配列の少なくとも1つを増幅する工程をさらに含む、ことを特徴とする請求項 20 - 34 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 37】

増幅産物の一本鎖を選択的に分解させる工程をさらに含む、ことを特徴とする請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

増幅プライマーが標識化されることによって、結果として生じる標識化された標的鎖が分解可能となる、ことを特徴とする請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

増幅プライマーは 5'リン酸によって標識化され、前記方法は、5'-リン酸依存性のエキソヌクレアーゼによって配列決定反応をインキュベートする、ことを特徴とする請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記方法はサイクル配列決定反応中の2以上のサイクルにわたって繰り返される、ことを特徴とする請求項 20 - 39 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 41】

前記反応混合物は核酸検出用色素を含む、ことを特徴とする請求項 20 - 40 のいずれか1つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

この特許出願は、2011年2月28日に出願された米国仮特許出願 61/447,490 と、2011年9月9日に出願された米国仮特許出願 61/532,887 の優先権の利益を請求し、両方の文献ともそのまま引用することによって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

(序論)

本発明は、他の参照配列を包含している核酸サンプル中の標的 DNA 配列の DNA 配列決定における改善に関する。参照配列と標的配列は密接に関連づけられることもあり、例えば、標的配列は、参照配列の対立遺伝子、参照配列の変異型、あるいは、別の株または種からの参照配列であってもよい。特に、本発明は、標的配列ではなく参照配列の配列決定を妨げるために、DNA 配列決定反応の間のブロッキング核酸の使用に関する。

【0003】

DNA の配列決定は、核酸の特定の領域に特異的な配列決定プライマーを用いることによって、特定の DNA 配列の同定を可能にする。その方法は非常に強力で、配列決定プライマーがサンプル中の1つの配列にのみ特異的である限り、配列情報を迅速に提供する。配列決定において一般に遭遇する問題は、適切に分離することができない2つの配列を配列決定プライマーが可能にするように、配列の個体群が混合されるときである。関連する参照配列の背景において、標的配列を同定し配列決定する必要性は、新しく高度に発達した配列決定方法とともに依然として存在している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

10

20

30

40

50

関連する参照配列を有するサンプル中の標的DNA配列を配列決定するためのキットおよび方法が、本明細書で提供されている。キットは、標的配列と参照配列の一本鎖の一部に相補的な配列決定プライマーと、参照配列の一本鎖の少なくとも一部と完全に相補的で、標的配列の鎖とは完全には相補的ではないブロッキング核酸 (BNA) を含んでいる。配列決定プライマーとブロッキング核酸は参照配列の同じ鎖に相補的であり、ブロッキング核酸は、ポリメラーゼでは伸長できないように、3'末端でブロックされる。キットは、標識化された連鎖停止 (chain terminating)ヌクレオチド三リン酸を含んでもよい。

#### 【0005】

別の態様では、標的配列を増幅し、標的配列を配列決定するためのキットも提供される。加えて、上に記載されたキットへの要素に、これらのキットは、配列決定プライマーと同じようには標的配列の鎖と結合しない5'-リン酸化増幅プライマーも含んでいる。キットは、5'-リン酸を含む増幅産物を分解するためにラムダエキソヌクレアーゼを含んでもよい。

10

#### 【0006】

さらに別の態様では、配列決定のためにサンプル中の標的配列を調製する方法が提供される。該方法は、参照配列を有し、1つ以上の標的配列を有する疑いのあるサンプルを、反応混合物を形成するためのDNA配列決定反応混合物に加える工程を含んでいる。DNA配列決定反応混合物は、配列決定プライマーと、過剰な量のブロッキング核酸を含んでいる。ブロッキング核酸は、参照配列の1つの鎖の少なくとも一部と完全に相補的であり、標的配列の一方の鎖と完全には相補的ではない。ブロッキング核酸は、ポリメラーゼで伸長できないように、3'末端でブロックされ、ブロッキング核酸および配列決定プライマーの両方は、参照配列の同じ鎖に相補的である。標的配列を有している疑いのある反応混合物は、変性した参照鎖と変性した標的鎖を形成するために、参照配列と標的配列の融解温度 ( $T_m$ ) 以上である第1の変性温度にさらされる。その後、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖の形成、およびブロッキング配列と標的鎖のヘテロ二本鎖の形成を可能にするために、反応混合物の温度は下げられる。その後、反応混合物は、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の変性二本鎖と比較して、ブロッキング核酸と相補的な標的鎖の前記ヘテロ二本鎖を優先的に変性させるのに十分な臨界温度 ( $T_c$ ) にさらされる。配列決定プライマーが反応混合物中の遊離標的鎖および遊離参照鎖にアニーリングされることを可能にするために、その後、反応混合物の温度は下げられる。最後に、標的配列の核酸配列の決定を可能にするために解析可能な伸長生成物を生成するべく、配列決定プライマーは伸長される。

20

30

#### 【0007】

さらに別の態様では、標的配列は、上に記載された配列決定方法よりも前に、またはその方法と同時に、PCRを使用して増幅されてもよい。1つの実施形態では、増幅された標的配列の1つの鎖が選択的に分解されてもよい。適切に、分解された鎖は配列決定プライマーに相補的な鎖である。1つの実施形態では、5'-リン酸化増幅プライマーが配列決定プライマーとともにPCR反応に加えられ、標的配列が増幅される。5'-リン酸を含む増幅された標的配列の鎖を、ラムダエキソヌクレアーゼによるインキュベーションによって分解することができる。

40

#### 【0008】

本発明の他の実施形態と利点は、図面と以下の詳細な記載を再検討すると当業者に明白になるものであってもよい。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

【図1】本明細書に記載の方法の描写である。

【図2】逆のM13プライマーを用いる、K-RAS G12Vと野生型のDNAの1組の配列決定電気泳動法である。サンプルは85%野生型で15%G12Vの変異DNAを包含している。

50

【図3】順方向M13プライマーを用いる、K-RAS G12Vと野生型のDNAの1組配列決定電気泳動法である。サンプルは85%野生型で15%G12Vの変異DNAを包含している。

【図4】K-RAS G12Rの最初のIce-COLD-PCRと、その後の逆方向のブロッキング核酸(BNA)と逆方向M13プライマーによるBlocker(商標)配列決定の後の、K-RAS G12Rと野生型のDNAの1組の配列決定電気泳動法である。PCR用の最初のサンプルは、99%野生型で1%G12Vの変異DNAを包含している。最上部のパネルは、配列決定反応中に0nM BNAを包含する反応の結果を示し、第2のパネルは、50nM BNAを包含する反応の結果を示し、第3のパネルは、75nM BNAを包含する反応の結果を示し、最下部のパネルは、100nM BNAを包含する反応の結果を示す。

【図5】K-RAS G12Rの最初のIce-COLD-PCRと、その後の順方向BNAおよび順方向M13プライマーによるBlocker配列決定の後の、K-RAS G12Rと野生型のDNAの1組の配列決定電気泳動法である。PCR用の最初のサンプルは、99%野生型で1%G12Vの変異DNAを包含している。最上部のパネルは、配列決定反応において0nM BNAを包含する反応物の結果を示し、第2のパネルは、50nM BNAを包含する反応物の結果を示し、第3のパネルは、75nM BNAの反応物の結果を示し、最下部パネルは、100nM BNAの反応物の結果を示している。

【図6】実施例4に述べられるような逆方向プライマーと逆方向BNAを用いる、ミトコンドリア変異の1組の配列決定電気泳動法である。

【図7】HPV18F BNA(0-75nMのBNA滴定、73.3°Cの $T_c$ )を用いる、HPV18とHPV45の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。

【図8】HPV18F BNA(75nMのBNA濃度、74.2-80.0°Cの変性温度( $T_c$ ))を用いる、HPV18とHPV45の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。

【図9】HPV45F BNA(0-75nMからBNA滴定、76.3°Cの変性温度( $T_c$ ))を用いる、HPV18とHPV45の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。

【図10】HPV45F BNA(50nMのBNA濃度、74.2-80.0°Cの変性温度( $T_c$ ))を用いる、HPV18とHPV45の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。

【図11】HPV56F BNA(0、50、75、および100nMからのBNA滴定、73.3°Cの変性温度( $T_c$ ))を用いる、HPV97とHPV56の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。暗く強調された部分は、BNAを含まない混合物の、予想される配列結果のそれへの整列を可能にした。明るく強調された部分は、シーケンスがHPV56とHPV97の間で異なる部分である。

【図12】HPV97F BNA(0、50、75、および100nMからのBNA滴定、73.3°Cの変性温度( $T_c$ ))を用いる、HPV56とHPV97の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。配列の暗く強調された部分は、BNAを含まない混合物の、予想される配列結果のそれへの整列を可能にした。配列の明るく強調された部分は、配列がHPV56とHPV97の間で異なる部分である。

【図13】BNAを含まない配列決定と比較して、HPV97FまたはHPV56F BNA(変性75nMのBNA濃度、73.3°Cの変性温度( $T_c$ ))のいずれかを用いる、HPV56とHPV97の混合物の1組の配列決定電気泳動法である。2つの株の間の配列の差が強調されている。

【図14】大量の野生型のK-RASという背景において、少量のK-RASエクソン2変異を増幅し、配列決定するために使用されるプライマーとBNAを含んでいる、Ice-COLD-PCRおよびBlocker配列決定の戦略を示す図である。ボールド体の配列は、K-RASエクソン2コード領域である。2つのイタリック体の領域は、PCRの第一ラウンドの中で使用される順方向および逆方向プライマーの位置を示す。下線を引

10

20

30

40

50

いた配列は、ICE COLD PCR増幅反応で使用される順方向および逆方向プライマーの位置を示す。括弧内の領域は、LNAのとり込みの位置を示す、下線(C)によるBNAの配列を示している。明るいグレー色の配列は、配列決定プライマーの位置を示す。

【図15】ICE-COLD PCR、Blocker配列決定、または標準サンガー配列決定の後に検知されるような、野生型のDNAの背景において、V600E変異の量の減少を示すBRAFエクソン15の1組の配列決定電気泳動法である。矢印はV600E変異の位置を示し、変異の検出限界が囲まれている。

【図16】ICE-COLD PCRおよびBlocker配列決定の後に検知されるような野生型のDNAの背景において、G469A変異の量の減少を示す、BRAFエクソン11の1組の配列決定電気泳動法である。矢印は、G469E変異の位置を示し、変異の検出限界が囲まれている。

【発明を実施するための形態】

【0010】

関連する参照配列を有するサンプル中の標的DNA配列を配列決定するためのキットおよび方法は、本明細書で提供される。キットと方法は、配列決定反応の間にブロッキング核酸を追加することによって、関連する参照配列の背景において、標的配列を配列決定することを可能にする。本明細書に記載のキットおよび方法は、PCR増幅と組み合わせられてもよい。

【0011】

本明細書に記載のキットおよび方法は、部分的に配列相同性を有する配列の混合個体群の内部から標的核酸を同定したい様々な状況下で使用されてもよい。とりわけ、該キットと方法は、変異解析、特に体細胞変異解析に役立つものであってもよく、例えば、癌の進行、癌の予後、または小分子薬剤および生物学的薬剤の有効性、モザイク性、またはミトコンドリアミオパチーに関連する変異を有する細胞または被験体を同定するために使用することができる。体細胞変異解析に用いるこの方法の他の潜在的な適用については、例えば、rickson RP. (2010) Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. Mutat Res. 705(2):96-106を参照のこと。

【0012】

実施例において、細胞の癌性の形質変換に関連することが知られているK-RASおよびBRAF中の変異を検知するためのアッセイと、MELAS(ミトコンドリア脳筋症、乳酸酸性症、および脳卒中のようなエピソード)(Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes)の進行に関連したミトコンドリアDNA中の変異を検知するためのアッセイが実証されている。該方法とキットは、他の種類の低レベルのミトコンドリアのヘテロプラスミーを同定するために使用されてもよい。加えて、該方法とキットは、感染などの間に、潜在的に混合する個体群における株または種の表示を決定するためにも役立つ。実施例において、ヒトパピローマウイルス(HPV)株18および45、または、該ウイルス株57および96は、混合個体群内で区別された。ウイルス(例えば、HIV)への感染または細菌感染の薬物療法中に進行する抗生物質耐性の変異を同定するために、該方法を使用することもできる。当業者には、本明細書に記載されたキットと方法の他の用途が理解されよう。

【0013】

図1は、本発明の方法およびキットによる配列決定のための標的配列の調製を例証している。まず初めに(図1、工程1、上方左隅)、核酸サンプルは、二本鎖の参照配列(10)(例えば、野生型の配列)と、二本鎖の標的配列(12)(例えば、変異配列)を含有している。配列決定反応混合物は、サンプル、配列決定プライマー(16)、他の配列決定成分、例えば、そのいくつかは標識化されるヌクレオチド三リン酸塩(NTP)、お

10

20

30

40

50



よび、連鎖停止 NTP またはジデオキシ NTP、DNA ポリメラーゼ、および、25 nM のような超過濃度レベルのブロッキング核酸 (14) を包含している。標的配列および参照配列と比較して、ブロッキング核酸は適切に、過剰なモル濃度レベルで存在する。

#### 【0014】

図1では、描かれたブロッキング核酸 (14) は、参照配列 (10) の鎖 (10A) の1つと相補的な一本鎖核酸配列である。ブロッキング核酸 (14) および配列決定プライマー (16) は、参照配列 (10) の同じ鎖に相補的であり、ブロッキング核酸 (14) は、ポリメラーゼによって伸長されることがないように3'末端でブロックされる。

#### 【0015】

図1の工程1の反応混合物は、第1の変性温度、例えば95°Cに15秒間さらされ、その結果、(参照鎖と標的鎖をもたらすために)参照配列 (10A)、(10B)と、標的配列 (12A)、(12B)の変性鎖がもたらされる。その後、反応混合物は、例えば、120秒間70°Cでハイブリダイゼーションを促進するために冷やされる。ブロッキング配列核酸 (14) が、参照配列の相補鎖 (10A) や標的配列の相補鎖 (12A) とも優先的にハイブリダイズすることが可能となるように、温度低下は、過剰な量のブロッキング核酸 (14) の存在下で起こる。図1の工程2は、70°Cでのハイブリダイゼーション後の反応混合物の状態を説明している。ブロッキング核酸 (14) と相補的な参照鎖 (10A) のホモ二本鎖 (18)、および、ブロッキング核酸 (14) と相補的な標的鎖 (12A) のヘテロ二本鎖 (20) に加えて、反応混合物は、参照配列と標的配列の変性したマイナス鎖 (10B) および (12B) をそれぞれ含有している。相補鎖と標的鎖のヘテロ二本鎖と同様に、相補鎖と標的鎖のホモ二本鎖もあってもよく、反応中の過剰なブロッキング核酸は、これらの複合体の量を最小化するために設計される。

#### 【0016】

図1の工程3では、反応混合物はその後、臨界温度「 $T_c$ 」(例えば、84.5°C)にさらされ、この温度は、標的鎖 (12A) とブロッキング核酸 (14) のヘテロ二本鎖 (20) の優先的な変性を可能にするために選ばれる。適切に、工程3の温度は、臨界温度まで上昇するように、工程2で使用される温度よりも高い。反応混合物が $T_c$ でインキュベートされる際に、ブロッキング核酸 (14) と相補的な参照鎖 (10A) の二本鎖 (18) がほとんど変性しないままであるように、臨界温度 ( $T_c$ ) を選択する。ブロッキング核酸 (14) と標的鎖 (10B) の二本鎖 (20) の融解温度は常に、ブロッキング核酸 (14) と相補的な参照鎖 (10A) の二本鎖 (18) の融解温度未満である。というのも、ブロッキング核酸 (14) は参照鎖 (10A) の少なくとも一部と完全に相補的であるため、標的鎖 (12A) と少なくとも1つのミスマッチがあるからである。

#### 【0017】

図1の工程4を参照すると、優先的な変性の後、反応混合物の温度は、反応混合物中の遊離標的鎖 (12A) にアニーリングされることが可能となるように、例えば、50°Cに下げられる。図1の工程4は、配列決定プライマー (16) が遊離参照鎖 (10B) または遊離標的鎖 (12B) には結合しないが、遊離標的鎖 (12A) にのみ結合することを例証している。配列決定プライマー (16) は、残りの遊離参照鎖 (10A) に有効にアニーリングされることができず、あるいは、残りの遊離参照鎖 (10A) の配列決定をかのうにするために伸長されること不可能である。なぜなら、参照鎖 (10A) はブロッキング核酸 (14) とハイブリダイズし、ブロッキング核酸 (14) にハイブリダイズされた参照鎖 (10A) の少なくとも一部が配列決定に利用できないからである。配列決定プライマーは、それが過剰なブロッキング核酸中に存在するように、反応混合物に適切に加えられ、配列決定プライマーは、標的鎖：配列決定プライマー二本鎖が優先的にブロッキング核酸配列二本鎖に対して形成されるように、BNAに対して過剰なモルで存在する。その後、アニーリングされた配列決定プライマー (16) を伸長するために、反応混合物の温度を例えば60°Cに上昇させてもよい。あるいは、サイクル配列決定反応は、伸長生成物を濃縮するために、図1の工程1-4を繰り返すことによって完成することができる。図1で示される方法は、個々のプロトコルについて最適化でき、かつ、最適化

10

20

30

40

50

されなければならない。

【0018】

最後に、標的配列の核酸配列は、当業者に既知のDNA配列決定方法を用いて決定されてもよい。例えば、標識化された連鎖停止ヌクレオチドは、サンガー配列決定またはジデオキシ配列決定のための伸長生成物を調製するために、DNA配列決定反応混合物に含まれてかまわない。Pyrosequencing（登録商標）、454（商標）Sequencing、SOLiD（登録商標）システム、Illumina HiSeq（登録商標）Systemsのような様々な次世代プラットフォーム、または第3世代の配列決定プラットフォームなどの他の配列決定方法が使用されてもよいことが当業者には理解されよう。提案されたパイロシーケンス方法は以下の工程を含む：（1）標的配列のPCR、（2）アルカリ変性、（3）一本鎖鋳型を精製、（4）ブロッキングプライマーを70°Cでアニーリング、（5） $T_c$ への温度上昇、（6）任意の非結合のブロッキングプライマーを取り除くための十分可能な洗浄工程、（7）配列決定プライマーをアニーリングするために温度を下げる、（8）室温まで冷まして、標準的なPyrosequencing反応で処理する。

10

【0019】

上に記載されたように、該キットと方法は、標的配列および参照配列の1つの鎖の一部に相補的な配列決定プライマーを含んでいる。配列決定プライマーは、標的配列の鎖の一部に完全に相補的であり、参照配列の鎖の一部に完全に相補的であってもよい核酸である。配列決定プライマーは、参照鎖と標的鎖にアニーリングされることができ、その結果、ポリメラーゼが配列決定プライマーに付けられ、配列決定プライマーを伸長することができる。配列決定プライマーは一般にDNAであるが、RNAであってもよく、修飾ヌクレオチドを包含してもかまわない。配列決定プライマーは、最小の二次構造を有し、かつ参照鎖と標的鎖の再アニーリングを阻害するために設計されてもよい。配列決定プライマーは、臨界温度（ $T_c$ ）未満のアニーリング温度を適切に有している。配列決定方法に精通している当業者は、該キットと方法に使用するための配列決定プライマーを設計することができる。コンピュータプログラムは、適切な配列決定プライマーおよびブロッキング核酸（例えば、オリゴおよびPrimer3）を設計するために使用するために当業者が利用可能である。

20

【0020】

標的配列は、混合サンプル、または、潜在的に参照配列を含む混合サンプル内で決定したい配列である。標的配列は、対応する参照配列ほどには核酸サンプル中では見られない核酸を指す。標的配列は、サンプル中で、参照配列+標的配列の総量の0.01%から99%以上までを構成してもよい。検出の下限はサンプルの大きさに基づき、その結果、サンプルは、標的配列を配列決定することができるために少なくとも1つの増幅可能な標的配列を包含していなければならない。実施例において示されるように、参照配列+標的配列の合計の50%、15%、1%、または0.5%存在する際にも、該方法を用いて標的配列を配列決定することができる。参照配列の背景において、標的配列の検出限界を増加させるために、標的配列の選択的な増幅の他の方法と、本明細書に記載される方法を組み合わせることができることが予想されよう。実施例において示されるように、本明細書に記載の方法は、国際特許公開公報WO2011/112534で記載されるような、ICE COLD-PCRにさらされたサンプル上で使用されてもよく、該文献はそのまま引用によって本明細書に組み込まれる。ICE COLD PCRを本明細書に記載のBLOCKER配列決定方法と組み合わせたときの実施例で示される検出限界は、それ自体で使用されるいずれかの方法よりも低い。例えば、検出限界は、参照配列の背景において、0.01%未満であってもよい。さらなる最適化によって、標的配列の単一配列が参照配列の背景において、検出可能な点まで、検出限界を下げることで我々は予想する。

30

40

【0021】

標的配列は、限定されないが、体細胞変異、ミトコンドリア変異、株、または種を含ん

50

でもかまわない。例えば、サンプル（例えば、血液サンプル）は、多くの正常細胞とわずかな癌細胞および/または遊離循環腫瘍DNAを含有してもよい。正常細胞は、変異体ではない対立遺伝子または野生型の対立遺伝子を含有するが、少数の癌細胞と低レベルの遊離循環腫瘍DNAは体細胞変異を含有する。この場合、変異体は標的配列であり、その一方で野生型の配列は参照配列である。標的配列は参照配列とは少なくとも1つのヌクレオチドが異ならなければならないが、対応する参照配列に対して少なくとも50%相同でなければならない。配列決定プライマーは、標的配列および参照配列の両方に結合することができなければならない。本明細書で使用されているように、「標的鎖」は、標的配列の1つの核酸鎖を指す。

#### 【0022】

参照配列は、核酸サンプル中に存在し、ブロッキング核酸を用いることなく従来の配列決定方法によって標的配列の有効な配列決定を阻害する、核酸を指す。参照配列は、本明細書に記載の方法の使用前に、サンプル中の参照配列と標的配列の合計の0.01%~99%を構成してもよい。検出の下限はサンプルの大きさに基づき、その結果、参照配列を配列決定することができるよう、サンプルは、少なくとも1つの増幅可能な参照配列を包含していなければならない。上述のとおり、検出限界は、ICE COLD PCRのような他の方法を用いて、本明細書に記載の方法を組み合わせることによって最適化されてもよい。本明細書で使用されているように、「参照鎖」は、参照配列の1つの核酸鎖を指す。

#### 【0023】

参照配列は野生型とも呼ばれることもある。用語「野生型」は、個体群中の特定の遺伝子に関して、最も一般的なポリヌクレオチド配列または対立遺伝子を指す。一般に、野生型対立遺伝子は正常細胞から得られる。

#### 【0024】

標的配列は変異配列と呼ばれることもある。用語「変異体」は、核酸配列中のヌクレオチドの変化（すなわち、1つまたは複数のヌクレオチドの置換、逆位、欠失、または挿入）を指す。変異に耐える核酸は、対応する野生型ポリヌクレオチド配列とは配列において異なる核酸配列（変異対立遺伝子）を有している。本発明は、体細胞変異と多型性に広く関連している。本明細書に記載の方法は、参照鎖と比較して、1つ以上のヌクレオチド配列変化を包含している標的鎖を選択的に濃縮する際に役立つ。標的配列は、病変組織または細胞から通常は得られ、疾患状態に関連付けられるか、疾患状態の前兆となるか、あるいは、与えられた処置の有効性の前兆となるものであってもよい。

#### 【0025】

標的配列と参照配列は、ゲノムDNA、cDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNAまたはRNA、哺乳動物のDNA、胎児DNA、寄生虫のDNA、または、細菌DNAを含む様々なソースから得ることができる。参照配列は一般に野生型で、標的配列は変異体であるが、逆もまた真実であることもある。変異体は1つ以上のどんなヌクレオチドの欠失、挿入、または変化を含んでもよい。標的配列は、細胞中の癌、異なる組織または血液中の変異を含む細胞の欠失による癌の転移、癌または別の疾患の予後、治療薬に対する薬物または化学療法感受性、治療薬に対する癌または微生物の耐性、またはミトコンドリアヘテロプラスミーなどの体細胞変異に関連する疾患の存在を示す配列であっててもかまわない。

#### 【0026】

ブロッキング核酸は、オリゴヌクレオチドなどの操作された一本鎖核酸配列であり、好ましくは標的配列よりも短い長さを有する。ブロッキング核酸は参照配列よりも適切に小さい。ブロッキング核酸は、ブロッキング核酸と標的鎖の二本鎖の融解温度と、ブロッキング核酸と参照鎖の二本鎖の溶解温度を区別することを可能にする組成でなければならない。ブロッキング核酸の3'-OH末端は、DNAポリメラーゼ伸長に対してブロックされ、5'-末端はDNAポリメラーゼによる5'から3'のエキソヌクレオリシス(exonucleolysis)を避けるために修飾されてもよい。ブロッキング核酸は、反

10

20

30

40

50

応混合物が臨界温度「 $T_c$ 」にさらされる際に、参照配列にアニーリングされたままの他の形状（例えば、一本鎖DNA、RNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、あるいは、別の修飾されたヌクレオチドの間のキメラなど）をとることもできる。ブロッキング核酸中のPNA、LNA、または他の修飾ヌクレオチドは、参照配列と標的配列が異なる疑いのある位置と一致するように選択されてもよい。そのような設計は、ブロッキング核酸と部分的に相補的な標的鎖のヘテロ二本鎖を変性させるために必要とされる温度と、ブロッキング核酸と完全に相補的な参照鎖の二本鎖を変性させるために必要とされる温度の間の差を最大限にする。代替的に、または、加えて、修飾ヌクレオチドの位置は、ブロッキング核酸全体で一定以上の融解温度を有するようにブロッキング核酸を設計するために選択されてもよい。

10

## 【0027】

ブロッキング核酸は多くの形態をとることができるが、好ましい形態は一本鎖の非伸長性のDNAである。適切に、配列決定プライマーの3'末端は、ブロッキング核酸の5'末端の近くの、あるいはブロッキング核酸の5'末端と同じ参照配列の塩基の少なくとも1つに相補的な位置に結合する。代替的な実施形態では、配列決定プライマーは、3-5の塩基によってブロッキング核酸に重複する。この実施形態では、配列決定するために使用されるDNAポリメラーゼは、鎖置換または非鎖置換DNAポリメラーゼであってもよい。別の代替案では、配列決定プライマーおよびブロッキング核酸は重複しない。配列決定プライマーおよびブロッキング核酸が重複しない場合、配列決定反応のために非鎖置換DNAポリメラーゼを使用することが好ましい。より具体的には、好ましいブロッキング核酸は以下の特徴を有する：

20

- (a) 一本鎖核酸を含む；
- (b) 参照配列の少なくとも一部と完全に相補的である；
- (c) 配列決定プライマーと同じ参照配列の鎖に相補的である；
- (d) DNAポリメラーゼ伸長にブロックされる3'-末端を含有している。

## 【0028】

ブロッキング核酸は、いくつかの方法の1つで合成可能である。まず、ブロッキング核酸は、配列の3'-末端の修飾を可能にする標準的なオリゴヌクレオチド合成方法を用いて、直接的な合成によって作ることができる。あるいは、ブロッキング核酸は、最終生成物として一本鎖DNAを生成するPCR反応の間に、ポリメラーゼ合成によって作ることができる。この場合、生成された一本鎖は、ブロッキング核酸に必要な正確な配列に相当する。ポリメラーゼ合成によって一本鎖DNAを合成する方法は、当業者に周知である。あるいは、一本鎖ブロッキング核酸は、固体の支持体上で二本鎖PCR生成物と結合することによって合成可能である。これは、ビオチン化されるプライマー対のひとつを用いて、標準的なPCR反応を行なうことにより遂行される。PCRの後、PCR生成物は、ストレプトアビジンでコーティングされた固体支持体（例えば、電磁ビーズ）でインキュベートされ、ビーズに結合することが可能となる。その後、温度を2-3分間95°Cに上げることで、DNAを変性して、固定化されたPCR生成物からビオチン化されていないDNA鎖を溶液に放出する。相補的DNA鎖を含む磁気ビーズはその後取り除かれ、溶液中に残っている一本鎖生成物は、ブロッキング核酸として役立つ。

30

40

## 【0029】

一本鎖ブロッキング核酸が使用される前に、3'-末端はポリメラーゼ伸長を防ぐためにブロックされる。3'-末端は、リン酸基、アミノ基、ジデオキシヌクレオチド、または、5'から3'のポリメラーゼ伸長をブロックする他の部分を含有することもある。これは当業者に周知のいくつかの方法で遂行することができる。例えば、一本鎖ブロッキング核酸の末端に単一のジデオキシヌクレオチド（ddNTP）を加えるために、末端デオキシヌクレオチド転移酵素（TdT）による反応は、溶液中のddNTPの存在下で用いられ得る。ddNTPは、ポリメラーゼ伸長をブロックする役目をする。あるいは、ブロッキング核酸の3'-末端に相補的なオリゴヌクレオチド鑄型は、一過性の二本鎖構造を提供するために使用することができる。その後、ポリメラーゼは、ハイブリダイズされた

50

オリゴヌクレオチドの逆のブロッキング核酸の3'-末端に、単一のddNTPを挿入するために使用され得る。

【0030】

ブロッキング核酸は、参照鎖と標的鎖の合計量を超えて（すなわち、モル過剰で）存在しなければならない。ブロッキング核酸の必要とされる量は、当業者によって経験的に決定されることもある。一般に、ブロッキング核酸の量は5 nMを超えている。実施例は、プロトコルで25 nM、50 nM、75 nM、および100 nMのブロッキング核酸を用いて、データを提供している。一般に、配列決定プライマーは、ブロッキング核酸と比較して、過剰モル濃度で反応混合物中に存在するように、加えられなければならない。

【0031】

融解温度または「 $T_m$ 」は、ポリヌクレオチドがその相補的配列から解離する温度を指す。一般的に、 $T_m$ は、二本核酸分子中のワトソクリック塩基対の半分が破壊または解離し（すなわち、「溶解している」）、その一方で、ワトソクリック塩基対のもう半分が二本鎖構造中でインタクトなままである、温度として定義されてもよい。言い換えれば、 $T_m$ は、2つの相補的配列のヌクレオチドの50%がアニーリングされ（二本鎖）、ヌクレオチドの50%が変性される（一本鎖）、温度として定義される。したがって、 $T_m$ は、二本鎖核酸分子から一本鎖核酸分子への移行時（または、逆に、一本鎖核酸分子から二本鎖核酸分子への移行時）の中間点を定義する。

【0032】

$T_m$ は、多くの方法、例えば、Wetmur 1991 (Wetmur, J. G. 1991. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. Crit Rev Biochem Mol Biol 26: 227-259) のように最近接計算 (a nearest-neighbor calculation)、および、Oligo Primer Designやインターネットで利用可能なプログラムを含む市販のプログラムによって、推定可能である。あるいは、 $T_m$ は実際の実験を介して決定可能である。例えば、二本鎖DNA結合、あるいは、臭化エチジウムまたはSYBR（登録商標）-green（分子プローブ）などの挿入色素は、核酸の実際の $T_m$ を決定するために、融解曲線アッセイで使用され得る。核酸の $T_m$ を決定するための追加の方法は、当該技術では周知である。

【0033】

用語「臨界温度」または「 $T_c$ 」は、標的鎖とブロッキング核酸の二本鎖を優先的に変性するために選択された温度を指す。反応混合物が $T_c$ でインキュベートされる際にブロッキング核酸と相補的な参照鎖からなる二本鎖はほとんど未変性のままであるが、ブロッキング核酸と標的鎖からなる二本鎖がほとんど変性するように、臨界温度（ $T_c$ ）は選択される。「ほとんど」という用語は、所定の変性型または未変性型の少なくとも60%、好ましくは少なくとも90%、または、さらに好ましくは少なくとも98%を意味する。

【0034】

(サンプル)

サンプルは、対象の核酸（標的配列と参照配列）を含有するまたは含有すると推定される任意の物質を含み、あるいは、それ自体は、対象の標的核酸を含有するまたは含有すると推定される核酸である。ゆえに、サンプルという用語は、核酸（ゲノムDNA、cDNA、RNA）、細胞、生物、組織、流体、または、限定されないが、例えば、血漿、血清、髄液、リンパ液、滑液、尿、涙、便、皮膚の外分泌物、気道、腸管、および、泌尿生殖器、唾液、血球、生検、腫瘍、器官、組織、インビトロの細胞培養物成分のサンプル、自然分離株（飲用水、海水、固形物など）、微生物標本、および、核酸トレーサー分子で「標識化」された標本を含む物質のサンプルを含む。

【0035】

本発明の核酸配列は、例えば、本明細書に記載の方法で使用する前に、ポリメラーゼ連鎖反応によって、増幅することができる。増幅産物は、増幅された標的配列の一本鎖を選

10

20

30

40

50

択的に分解することにより直接配列決定されてもよい。二本鎖DNA生成物の一本鎖を選択する1つの方法は、一本鎖のブロッキング核酸の調製に関して上に記載されており、すなわち、一本鎖はビオチン化されてもよく、ストレプトアビジンでコーティングされたカラムまたは固体支持体に結合されてもよい。その後、ビオチン化されていない鎖は、ビオチン化されていない鎖の配列決定を可能にするために、鎖を変性させることによって、および、アビジンでコーティングされた固体支持体に結合されたビオチン化された鎖を取り除くことによって、精製可能である。あるいは、実施例に述べられているように、PCR反応は、配列決定プライマーに加えて5'-リン酸化増幅プライマーを用いて実行可能であり、それによって、生成物の一本鎖は5'-リン酸を含む。その後、この鎖は、実施例で使用されたラムダエキソヌクレアーゼなどの5'-リン酸依存性のエキソヌクレアーゼによるインキュベーションによって分解され得る。

10

**【0036】**

核酸配列は、RNA、mRNA、cDNA、および/またはゲノムDNAからのものであってもよい。これらの核酸は、当業者に既知の方法によって、組織または細胞から分離することができる。相補的DNAまたはcDNAも、当業者に既知の方法によって生成されてもよい。あるいは、本発明の核酸配列は、当該技術で周知の方法によって血液から分離することができる。

**【0037】**

実施例で示されるように、K-RASエキソン2、コドン12、および/または13の変異を検知し、配列決定することができる方法およびキットが提供される。これらの変異の検知は、薬物耐性の腫瘍細胞の存在または発生を決定するのと同様に、癌の被験者の予後を決定するために重要である。セツキシマブおよびパニツムマブなどの上皮成長因子レセプター(EGFR)アンタゴニストは、結腸直腸癌(CRC)処置に有効になりうる治療薬である。CRC腫瘍の40%が活性化K-RASエキソン2、コドン12、および、13の変異を有しており、これらの変異がEGFRアンタゴニストに対する乏しい反応に関係づけられてもよいことが分かっている。そのような診断バイオマーカーの非常に高感度な検出は、薬物耐性の腫瘍細胞個体群の存在または発生を決定するのに必要である。

20

**【0038】**

実施例において、ブロッキング核酸は、位置3243(A G)で既知のミトコンドリア変異を配列決定および同定するのを可能にするために使用された。この変異は、ミトコンドリアゲノム中の9つの確認されたMELAS(ミトコンドリア脳筋症、乳酸酸性症、および脳卒中のようなエピソード)変異のうちの一つである。したがって、本発明の方法およびキットは、疾患に関連する低レベルの変異を有する被験体を同定するために使用することができる。

30

**【0039】**

同様に、実施例において、該方法はHPVの株を区別するためにも使用される。実施例は、HPV18および45、またはHPV56および97の混合物を含むサンプルが区別され得ることを実証している。そのような株の識別は、疫学的研究にとって重要なこともあり、処置の決定に影響を与えることもある。

40

**【0040】**

実施例は、0.5%の検出限界で2つのBRAF変異(V600E(エキソン15)およびG469A(エキソン11))を検知するために、該方法を使用することができることを実証している。これらのBRAF変異は特定のメラノーマ中の癌に関連付けられる。K-RASに関して上に記載されたように、これらの変異の検出は、癌の被験者の予後を決定するのに重要で、化学療法の有効性を決定するのに適切だと分かることもある。

**【0041】**

以下の実施例は、単に例証目的に過ぎず、本発明または添付の請求項の範囲を限定するものとは意味しない。本明細書で引用される文献はすべて、そのまま引用されることによって本明細書に組み入れられる。

**【0042】**

50

(実施例)

実施例 1 . K - R A S エキソン 2 逆方向 B N A を用いる標準 P C R の後の K - R A S B L O C k e r 配列決定

K - R A S エキソン 2、コドン 1 2、および、1 3 での変異は、いくつかの癌で見られ、特定の抗がん剤に対する耐性に関連付けられる。したがって、これらの K - R A S 変異を含むサンプルまたは被験体を同定するためのアッセイは有益であるとされる。多くの場合、個体群が混成であるので、これらの変異を同定するのは難しい。

【 0 0 4 3 】

ブロックング核酸 ( B N A ) は、野生型の K - R A S 配列に特異的に結合するように設計され、特に明記されない限り、E x i q o n によって作られた。この実験に使用された B N A および配列決定プライマーは、以下のとおりであった。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

	BNA	T <sub>c</sub> (°C)	配列決定プライマー
K-RAS <sub>2</sub> 逆方向	TCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACTC TTGCCTACGCCACCAG /3Phos/ (配列番号: 1)	81.0	AGGAAACAGCTATGACCAT (配列番号: 2)

【 0 0 4 5 】

ここで、下線を引いたヌクレオチドは L N A であり、他のヌクレオチドは従来のヌクレオチドである。

B N A と配列決定プライマーの間に重複はなかった。

【 0 0 4 6 】

核酸サンプルは標準的なプロトコルを用いて調製され、コドン 1 2 変異を含む核酸 ( K - R A S G 1 2 V ; G T T ; 5 ' - C G C C A A C A G C T - 3 ' ; 配列番号: 3 ; 下線を引いた塩基が変異部位である ) は、全核酸の 1 5 % を表し、サンプルの残りの 8 5 % は野生型のゲノム DNA ( G G T ; 5 ' - C G C C A C C A G C T - 3 ' ; 配列番号: 4 ; 下線を引いた塩基が変異の部位である ) であった。B N A ( 2 5 n M ) および核酸は、標準的なサイクル配列決定反応混合物 ( a s t a n d a r d c y c l e s e q u e n c i n g r e a c t i o n m i x u r e ) に加えられた。

【 0 0 4 7 】

配列決定反応混合物を 1 5 秒間 9 5 ° C で変性させ、次に、参照鎖と標的鎖に対する B N A のハイブリダイゼーションを可能にするために、温度を 4 5 秒間で 7 0 ° C に下げた。その後、B N A と標的鎖の二本鎖が変性することを可能にするために、3 0 秒間 8 1 ° C の T<sub>c</sub> に反応混合物をさらした。その後、配列決定プライマーが遊離標的鎖にアニーリングされ得るように、1 0 秒間 5 0 ° C の温度に反応混合物をさらした。最後に、伸長生成物を生成させるために、6 0 ° C で 2 5 秒間、配列決定プライマーの伸長を処理した。A B I S e q u e n c e r 上で読み取られるのに十分な配列を生成するために、上記のサイクルを 4 0 時間繰り返した。

【 0 0 4 8 】

図 2 に示されるように、G 1 2 V K - R A S 変異は、B N A を含まない配列決定反応中で合計 1 5 % に存在する場合には検知するのが難しかった ( 中央の痕跡の強調された塩基の小さなピークを参照 ) が、配列決定反応が野生型の配列を対象とする B N A を含んでいた場合、検出は増加した ( 最上部の痕跡において、2 つのピークが比較的等しい量で存在している ) 。顕著に、野生型のみでの配列決定反応に B N A を含めることは、配列決定する能力を完全にはブロックしなかったが、ピークの大きさ ( 規模 ) を減らしたただけであった。

【 0 0 4 9 】

実施例 2 : K - R A S エキソン 2 順方向 B N A を用いる標準的な P C R の後の K - R A S B L O C k e r 配列決定

10

20

30

40

50

ブロックング核酸 (BNA) は、特に野生型の K - R A S 配列の逆鎖に特異的に結合するように設計された。この実験に使用された BNA および配列決定プライマーは以下のとおりであった：

【 0 0 5 0 】

【 表 2 】

	BNA	T <sub>c</sub> (°C)	配列決定プライマー
K-RAS <sub>ex2</sub> 順方向	GCTGAAAATPGACTGAATATAAACTTGTG GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTA/3Phos/ (配列番号：5)	77.0	TGTAAAACGACGGCCAGT (配列番号：6)

10

【 0 0 5 1 】

ここで、下線を引いたヌクレオチドは LNA であり、他のヌクレオチドは従来のヌクレオチドである。BNA と配列決定プライマーの間に重複はなかった。

【 0 0 5 2 】

核酸サンプルは標準的なプロトコルを用いて調製され、コドン 1 2 変異を含有する核酸 (K - R A S G 1 2 V ; 5 ' - A G C T G T T G G C G - 3 ' ; 配列番号：7 ; 下線を引いた塩基は変異部位である) は、総核酸の 1 5 % を表し、サンプルの残りの 8 5 % は野生型のゲノム DNA (5 ' - A G C T G G T G G C G - 3 ' ; 配列番号：8 ; 下線を引いた塩基は変異の部位である) であった。BNA (2 5 n M) および核酸は標準的なサイクル配列決定反応混合物に加えられた。実施例 1 に上に述べられているように、サイクル配列決定反応は完了した。したがって、サイクル配列決定は、参照配列の各鎖に特異的な BNA の設計によって双方向の配列決定に使用され得る。

20

【 0 0 5 3 】

図 3 で示されるように、G 1 2 V K - R A S 変異は、BNA を含まない配列決定反応中に合計の 1 5 % で存在する場合、検出が困難であった (中央の痕跡中の強調された塩基の小さなピークを参照) が、配列決定反応が野生型のシーケンスを対象とした BNA を含んでいた場合、検出は増加した (最上部の痕跡中に 2 つのピークが明らかに存在する)。顕著に、野生型のみによる配列決定反応に BNA を含めることは、再度、配列決定する能力を完全にはブロックしなかったが、ピークの大きさ (規模) を減らすだけだった。

【 0 0 5 4 】

30

実施例 3 : K - R A S G 1 2 R 変異の C O L D - P C R 検出後の K - R A S B L O C k e r 配列決定の例

近年、I C E C O L D - P C R ( I m p r o v e d a n d C o m p l e t e E n r i c h m e n t C O - a m p l i f i c a t i o n a t L o w e r D e n a t u r a t i o n t e m p e r a t u r e P C R ; M i l b u r y e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 0 1 1 J a n 1 ; 3 9 ( 1 ) : e 2 . ) は、K - R A S エキソン 2 変異の検出限界を劇的に改善することが分かっている。国際特許公開広報 W O 2 0 1 1 / 1 1 2 5 3 4 も参照。I C E C O L D - P C R では、変異 DNA ( M u t ) は、野生型の ( W T ) DNA の存在下で優先的に増幅される。WT 鎖の 1 つに相補的な参照配列オリゴヌクレオチド ( R S - オリゴ) の使用により、WT 配列の直線的な増幅がもたらされるが、任意の M u t 配列の指数関数的な増幅が結果として生じる。RS - オリゴは、ロックド核酸 ( L N A ( 商 標 ) ) を包含してもよく、これは、RS - オリゴ : M u t DNA 二本鎖と比較して、RS - オリゴ : W T DNA 二本鎖間の変性温度の差を増加させる。PCR は、第一回 PCR 中の P h u s i o n ( 登 録 商 標 ) ポリメラーゼと、I C E C O L D - P C R 中の オプティマーゼを用いて、M i l b u r y らによって記載されたように実行された。K - R A S 配列内の I C E C O L D - P C R に使用されたプライマーおよび RS - オリゴの位置を描く図については、図 1 4 ( 配 列 番 号 : 1 4 ) を参照する。用いられるプライマーおよび RS - オリゴは以下のとおりである：

40

【 0 0 5 5 】

50



【表 3】

オリゴの使用	プライマー	配列番号:
第一ラウンドPCR 順方向プライマー	5'-TTAACCTTATGTGTGACATGTTT	9
第一ラウンドPCR 逆方向プライマー	5'-TCCTGCACCAGTAATATGC	10
ICE COLD 順方向プライマー	5'-GTGTGACATGTTCTAATATAG	11
ICE COLD 逆方向プライマー	5'-CTGAATTAGCTGTATCG	12
ICE COLD用の RS-オリゴ	5'-GCTGTATCGTCAAGGCACTCTTGC CTACACCACCAGCTCCAACCTACCAC	13

10

## 【0056】

ICE COLD-PCRの検出限界を高めるために、BNAの使用はサイクル配列決定反応にまで拡張される。ここで、LNAを包含するオリゴ(BNA)は、野生型のDNAの配列決定をブロックし、任意の変異を包含しているDNA配列決定(BLOCKER配列)を可能にする。ブロックを生じさせるためには、変性工程(臨界温度 $T_c$ での)と同様に追加のハイブリダイゼーション工程も、サイクル配列決定工程に加えらる。 $T_c$ は、BNA:WT DNA複合体がインタクトなままであるが、BNA:Mut DNA複合体は変性する温度である。この例ではBNAの5'末端に重複する配列決定プライマーは変異配列にアニーリングされ、その後に伸張する。

20

## 【0057】

ブロッキング核酸(BNA)は、野生型のK-RAS配列に特異的に結合するように設計された。

この実験に使用されるBNAおよび配列決定プライマーは以下のとおりであった。

## 【0058】

【表 4】

	BNA	$T_c$ (°C)	配列決定プライマー
順方向	<u>GAATA</u> TCAGTGAATATAAACTTGTG GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCA/3Phos/ (配列番号:15)	77.6	TTATTATAAGGCCTGCTGAAATG (配列番号:16)
逆方向	TTCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG CACTCTGCCTACGCCACCAGCTCC/3Phos/ (配列番号:17)	82.0	TATTCGTCCACAAAATGAATG (配列番号:18)

30

ここで、下線を引いたヌクレオチドはLNAであり、他のヌクレオチドは従来のヌクレオチドである。イタリック体の塩基は、配列決定プライマーとBNAの重複を表す。

## 【0059】

核酸サンプルは、標準的なプロトコルを用いて調製され、コドン12変異を包含する核酸(K-RAS G12R; 5'-GCCACG/CAGCTC-3'(配列番号:19)、および、5'-GAGCTC/GGTGGC-3'(配列番号:20));(下線を引いた塩基は、最初に列挙された標的または変異の配列とスラッシュの後の野生型の配列による変異の部位を示す)は、最初のPCR実験に加えられた全核酸の1%を表し、サンプルの残りの99%は野生型のゲノムDNAであった。ICE COLD-PCR反応からのBNA(50nM、75nM、または100nM)および核酸は、標準的なサイクル配列決定混合物に加えられた。ハイブリダイゼーション時間が120秒で、サイクル配列決定伸長時間が45秒であったことを除けば、サイクル配列決定反応は実施例1に上に述べられているように完了した。したがって、本発明の方法はPCR濃縮方法と組み合わせることができる。

40

50

## 【0060】

図4および5に示されるように、K-RAS変異は、全配列の1%しか存在しないとき、ICE COLD-PCRの後でさえBNAを含まない配列決定反応で検知するのは難しかった(0nM;最上部の痕跡中の強調された塩基の2つのピークを参照)が、配列決定反応が野生型の配列を対象としたBNAを包含していた場合、検出は増加した(大きな方のピークは次の3つの痕跡のそれぞれにおいて変異配列を表わす)。

## 【0061】

実施例4:ミトコンドリア体細胞変異の検出

BLOCKER配列決定は、位置3243(A G)で既知のミトコンドリアの変異を含むサンプル上で行なわれた。この変異は、ミトコンドリアゲノム中の9つの確認されたMELAS(ミトコンドリア脳筋症、乳酸酸性症、および脳卒中のようなエピソード)変異のうちの一つである。下記の実施例は、逆方向ブロッキング核酸を用いて逆方向に配列決定を反映する。

10

## 【0062】

ブロッキング核酸(BNA)は、野生型のミトコンドリア配列に特異的に結合するように設計された。この実験に使用されたBNAおよび配列決定プライマーは以下のとおりであった:

## 【0063】

## 【表5】

	BNA	T <sub>m</sub> (°C)	配列決定プライマー
3243 順方向	<u>CCCTGACTG</u> PAAAGTPTTAAGTTTT ATCGGATTACCGGGCTCTG/3Phos/ (配列番号:21)	79.0	TGTTGTTAAGAAGAGGAATTCGAACCTC (配列番号:22)

20

## 【0064】

ここで、下線を引いたヌクレオチドはLNAであり、他のヌクレオチドは従来のヌクレオチドである。イタリック体で示されるBNAと配列決定プライマーの間に4つの塩基の重複があった。

## 【0065】

核酸サンプルは、標準的なプロトコルを用いて調製され、変異を包含する核酸(5'-GGCAGGGCCCG;配列番号:23;下線を引いた変異)は、全核酸の10%を表し、サンプルの残りの90%は野生型のゲノムDNA(5'-GGCAGAGCCCG;配列番号:24;下線の野生型の塩基)であった。BNA(15および25nM)および核酸は、標準的なサイクル配列決定反応混合物に加えられた。サイクル配列決定反応は実施例1で上に述べられたように完了し、ハイブリダイゼーション時間は120秒、サイクル配列決定反応伸張時間は45秒で、サイクルの総数を50にまで増やした。

30

## 【0066】

図6で示されるように、ミトコンドリアの変異は、BNAを含まない配列決定反応中で検出することは困難であった(最下部の痕跡の強調された塩基の小さなピークを参照)が、配列決定反応が野生型の配列をブロックするBNAを含んでいた場合、検出は増加した(最上部の痕跡と最上部から三つ目の痕跡を参照)。LNAを含まないサンプルの配列決定と比較したGピーク(黒)の存在の増加は、変異の読みやすさの改善を示している。2番目、4番目、および最下部の痕跡は、野生型の配列がBNAの存在下または不在下で、容易に配列決定されたことを示している。

40

## 【0067】

実施例5:HPV株18および45を識別するための配列決定

HPVはしばしば様々な菌株の混合感染として現れる。どの株がサンプル中に存在しているかを特定するために、DNA配列決定を必要とする。様々な菌株の間のヌクレオチド変化が比較的少なく、かつ、1つの任意のサンプル中にどの株が存在しているかを特定す

50

る能力が欠けているため、株を識別することができる配列決定反応を設計することは有益である。

【0068】

ブロッキング核酸 (BNA) は、HPV18 または HPV45 配列のいずれかに特異的に結合するように設計された。この実験に使用された BNA および配列決定プライマーは以下のとおりであった：

【0069】

【表6】

	BNA	T <sub>c</sub> (°C)	配列決定プライマー
HPV18 順方向	TTTTTCAGATGGCTTTGTGGCGGCC TAGTGACAATACCGTATATC/3Phos/ (配列番号：25)	図を参照	CGATCGTAAACGTGTTCCTATTFFT (配列番号：27)
HPV45 順方向	TTTTTCAGATGGCTTTGTGGCGGCC TAGTGACAGTACCGTATATC/3Phos/ (配列番号：26)		

10

【0070】

ここで、下線を引いたヌクレオチドは LNA であり、他のヌクレオチドは従来のヌクレオチドである。イタリック体で示された BNA と配列決定プライマーの間に 3 つの塩基の重複があった。

【0071】

プラスミドのストック (Stock plasmids) (HPV 株の鋳型のクローン) は、本明細書に記載の実験で使用された (10,000 copies / μL)。核酸サンプルは、標準的なプロトコルを用いて調製され、Stratagene Brilliant (登録商標) IIMaster Mix を用いて PCR によって増幅された。最初の増幅に使用されるプライマーは、HPV の L1 領域のコンセンサスプライマーである。ユニバーサルタグ (UP) は、特定の配列決定をベースにしたプライマーを開発するために、順方向プライマーおよび逆方向プライマー (陰の領域) の両方に加えられた (表1を参照)。

20

【0072】

【表7】

表1 HPVコンセンサスプライマー配列 (順方向プライマーで強調されたUP1；逆方向プライマーで強調されたUP2)

HPV Cons w/UP F	<u>tcgaggctcgacgggtatogat</u> CGTAAACGTGTTCCTATTFFT (配列番号：28)
HPV Cons w/UP R	TCATACGGACTCGTGT <u>ta</u> TACCCTAAATACCCTATATTG (配列番号：29)

30

【0073】

PCR の後、核酸は混合され、その結果、HPV18 核酸が全核酸の 50% を表し、サンプルの残りの 50% が HPV45 DNA であった。その後、BNA (HPV18 用に 50 nM、および HPV45 用に 75 nM) および核酸は、標準的なサイクル配列決定反応混合物に加えられた。サイクル配列決定反応は実施例1に記載されたように完了し、ハイブリダイゼーション時間は 120 秒で、サイクル配列決定反応伸張時間は 45 秒であった。

40

【0074】

各 BNA の T<sub>c</sub> を決定するために、BNA の様々な濃度は、BNA (その参照配列を含む) の計算された T<sub>m</sub> に及ぶ温度勾配を用いて、サイクル配列決定される。各配列決定反応は、両方の株のピークの存在について、および、BNA によって配列決定をブロックされているサンプル中の参照配列のピークの優先的な消失について、配列決定電気泳動法を用いて評価される。その後、BNA に特異的な濃度および T<sub>c</sub> が決定され、この混合サンプル個体群の優先的なサイクル配列決定に、今後使用され得る。

50

## 【 0 0 7 5 】

HPV 18 BNA が HPV 18 株によって二重になったままである一方で、HPV 45 の配列解析を可能にする臨界温度を決定するために、様々な濃度の HPV 18 BNA は、勾配サーマルサイクラーとともに使用された。実験の第 2 の組では、HPV 45 BNA は、HPV 45 の配列決定をブロックする間に、優先的に HPV 18 を配列決定するために使用された。

## 【 0 0 7 6 】

図 7 および 9 でそれぞれ示されるように、HPV 18 (図 7 - 10 で示されるように、配列番号 : 30) と、HPV 45 (図 7 - 10 で示されるように、配列番号 : 31) 株は、BNA を含まない状態では配列決定することが困難であった (最上部の痕跡中の強調された塩基の重複するピークを参照) が、配列決定反応が参照配列をブロックする BNA を包含していれば標的配列の検出は増加した (より多くの HPV 18 に特異的な BNA が加えられると、HPV 45 配列は下部の痕跡で支配的なピークとなる。図 7 および 9 それぞれで、逆もまた同様である)。

10

## 【 0 0 7 7 】

図 8 および 10 は、反対の株からの BNA の変性が生じるはずの温度を変更する効果を示す。BNA を含まない最上部の痕跡が不明瞭であることが示されている。低すぎる変性温度は、参照配列の配列決定をブロックせず、両方のピークは見ることができる。中央の痕跡で温度が上昇すると、標的配列は支配的なピークとなる。最下部の痕跡では、温度は  $T_c$  よりも高く上げられ、参照配列の配列決定と混合したピークを再度可能にした。この実施例は、BNA の量と、変性のために選ばれた温度の両方が経験的に選択され得ることを実証している。

20

## 【 0 0 7 8 】

実施例 6 : HPV 56 および 97 を識別するための配列決定

ブロッキング核酸 (BNA) は、HPV 56 または HPV 97 のいずれかの配列に特異的に結合するように設計された。この実験に使用された BNA および配列決定プライマーは、以下のとおりであった :

## 【 0 0 7 9 】

## 【 表 8 】

	BNA	$T_c$ (°C)	配列決定プライマー
HPV56 順方向	<u>TTTTGCGAGATGGCGACGTTGGCGGCTAG</u> TGAAAATAAGGTGTATCTACC/3Phos/ (配列番号 : 32)	73.3	CGATCGTAAACGTTCTCCCTATTTTT (配列番号 : 34)
HPV97 順方向	<u>TTTTGCGAGATGGCCTTACTGGCGGCTAG</u> TGACAGTACGGTTTATCTGCC/3Phos/ (配列番号 : 33)		

30

## 【 0 0 8 0 】

ここで、下線を引いたヌクレオチドは LNA であり、他のヌクレオチドは従来のヌクレオチドである。イタリック体で示される BNA と配列決定プライマーの間に 3 つの塩基の重複があった。

40

## 【 0 0 8 1 】

プラスミドのストック (HPV 株の鋳型のクローン) は、本明細書に記載の実験で使用された (10,000 copies /  $\mu$ L)。核酸サンプルは、標準的なプロトコルを用いて調製され、Stratagene Brilliant II Master Mix を用いて、PCR によって増幅された。最初の増幅に使用されたプライマーは、HPV の L1 領域のコンセンサスプライマーである。普遍的なタグ (UP) は、特定の配列決定ベースのプライマーを開発するために、前方向と逆方向プライマーの両方に加えられた (表 1 を参照)。

## 【 0 0 8 2 】

PCR の後、核酸が混合され、その結果、HPV 56 核酸は全核酸の 50 % を表し、サ

50

ンプルの残りの50%はHPV97 DNAであった。その後、BNA (HPV56とHPV97の両方のために75 nM)と核酸は、標準的なサイクル配列決定反応混合物に加えられた。サイクル配列決定反応は、実施例1に記載されたように完了し、ハイブリダイゼーション時間は120秒で、サイクル配列決定反応伸張時間は45秒であった。

【0083】

各BNAの $T_c$ を決定するために、BNAの様々な濃度は、BNA (その参照配列を含む)の計算された $T_m$ に及ぶ温度勾配を用いて、サイクル配列決定される。各配列決定反応は、両方の株のピークの存在について、および、BNAによって配列決定をブロックされているサンプル中の参照配列のピークの優先的な消失について、配列決定電気泳動法を用いて評価される。その後、BNAに特異的な濃度および $T_c$ が決定され、この混合サンプル個体群の優先的なサイクル配列決定に、今後使用され得る。

10

【0084】

HPV56 BNAがHPV56株によってインタクトなままである一方で、HPV97の配列解析を可能にする臨界温度を決定するために、様々な濃度のHPV18 BNAが、勾配サーマルサイクラーとともに使用された。実験の第2の組では、HPV97 BNAは、HPV97の配列決定をブロックする間にHPV56を優先的に配列決定するために使用された。

【0085】

図11および12でそれぞれ示されるように、HPV97 (配列番号: 35)とHPV56 (配列番号: 36)の株は、BNAを含まない状態では配列決定するのが困難であった (最上部の痕跡の重複するピークを参照)が、配列決定反応が参照配列をブロックするBNAを含んでいると、標的配列の検出は増加した (より多くのHPV56に特異的なBNAが加えられると、HPV97配列は下部の痕跡で支配的なピークとなる。図11および12それぞれで逆もまた同様である)。図13は、BNAの随意の濃度と変性温度を用いて得られた痕跡と比較して (最上部と最下部の痕跡はHPV56および97それぞれの分離した配列を示している)、BNAを含まない配列決定反応の電気泳動法を示す (読みとることができない多くの領域を備えた中央の痕跡)。

20

【0086】

実施例7: 増幅と、BRAF変異を検出するためのその後の配列決定

ブロッキング核酸とプライマーは、2つのBRAF変異、V600EおよびG469Aを特異的に増幅し、配列決定を可能にするために設計された。配列決定プライマー、PCRの間に増幅プライマーとしても使用された。配列決定プライマーおよびBNAは、DNAの同じ鎖に結合するように設計された。増幅プライマーは、逆鎖または相補鎖を結合するように設計され、5'リン酸化された。

30

【0087】

BRAF V600Eの検出のために、プライマーまたはオリゴヌクレオチドは以下の配列および修飾を有する:

配列決定プライマー<sup>1</sup>

5' - A T G C T C A G A C A C A A T T A G C G C G A C C C T T A G A T C C A G A C A A C T G T T C A A A C - 3' (配列番号: 37)

40

5'リン酸化増幅プライマー<sup>2</sup>

/ 5 P h o s / T C C T T T A C T T A C T A C A C C T C A G - 3' (配列番号: 38)

ブロッキングオリゴ (BNA)<sup>3</sup>

5' - A A C T G T T C A A A C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C G A G A T T T + C + + C + T G T A G C T A G / 3 P h o s / (配列番号: 39)

【0088】

BRAF G469Aについては、プライマーまたはオリゴヌクレオチドは以下の配列および修飾を有する:

配列決定プライマー

50

5' - GGGACTCGAGTGATGATTGG - 3' (配列番号: 40)

5'リン酸化増幅プライマー

/5 Phos / /5 Phos / CCACATTACATACTTACCATGCC - 3'  
(配列番号: 41)

ブロッキングオリゴ (BNA)

5' - ACCATGCCACTTTCCCTTGTAGACTGTT + C + CAAATG  
AT + CCAGAT + CCAATTC / 3 Phos / (配列番号: 42);

ここで、/5 Phos / は5' - リン酸化を表し、「+」はロックド核酸 (LNA) を表し、および、/3 Phos / は3' - リン酸化を表している。

【0089】

プラスミドのストック (BRA Fのクローン) およびその希釈物は、本明細書に記載の実験で使用された (10,000 copies /  $\mu$ L)。核酸サンプルは、標準的なプロトコルを用いて調製され、PCRによって増幅され、および、反応当たり10  $\mu$ Lの全体積に対して、2.5  $\mu$ LのBetter Buffer (The Gel Company)、0.25  $\mu$ LのBig Dye v.3.1 (Applied Biosystems)、0.13  $\mu$ L、10 mMのdNTP、1  $\mu$ L、10  $\mu$ Mの配列決定プライマー、1  $\mu$ L、1  $\mu$ Mの5' - リン酸化増幅プライマー、1.6  $\mu$ L (または最適化された) 2.5  $\mu$ Mブロッキング核酸、および、1  $\mu$ LのDNA鋳型を含む反応混合物中で配列決定された。反応は、サーマルサイクラー内で以下に行なわれた: 15秒間95°C、2分間70°C、30秒間の臨界温度、10秒間の50°C、および、45秒間の60°Cを40サイクルと、その後の12°Cでのインキュベーション。その後、ラムダエキソヌクレアーゼ (5,000 U/mLで0.5  $\mu$ L) が反応混合物に加えられ、5' - リン酸を含む増幅された鎖を分解するために、30分間37°Cでインキュベートされた。配列決定用のV600Eの臨界温度は77.6°Cであり、ICE COLD PCRのための臨界温度は76.4°Cである。配列決定用のG469Aの臨界温度は74.6°Cであり、ICE COLD PCRのための臨界温度は73.2°Cである。最後に、材料は、CleanSEQプロトコル (Agencourt Biosciences) にしたがって、標準的な配列決定に関してはさらに精製される。T<sub>c</sub>が決定され、上に記載されたように、使用されるBNAの濃度が最適化された。

【0090】

図15は、過剰な野生型の配列 (配列番号: 43; 5' - CTACAGA / TGAATA - 3'; 下線を引いた塩基は変異の部位であり、最初の塩基は変異であり、スラッシュの後の塩基は野生型である) の背景において、V600E BRA Fエキソン15変異の検出のための電気泳動法を示す。その割合は、反応混合物に加えられた合計のDNA鋳型中の変異標的の割合を示す。第1の電気泳動法は、標的V600E変異の検出限界が、ICE COLD PCRによって0.05%であることを実証しており、中央の電気泳動法は、本明細書に記載の反応が、0.5%の検出限界を提供することを示しており、および、右側の電気泳動法で示された標準的な配列決定は、標準的な配列決定が10%の検出限界を提供することを示している。

【0091】

図16は、過剰な野生型の配列 (配列番号: 44; 5' - TTTGC / GAACAG - 3'; 下線を引いた塩基は変異の部位であり、最初の塩基は変異であり、スラッシュの後の塩基は野生型である) の背景において、G469A BRA Fエキソン11変異の検出のための電気泳動法を示す。その割合は、反応混合物に加えられた合計のDNA鋳型中の変異標的の割合を示す。左の電気泳動法は、標的G469A変異の検出限界がICE COLD PCRによって0.01%であることを実証している。右の電気泳動法は、本明細書に記載のBLOCKER配列決定反応が0.5%の検出限界を提供することを示している。我々は、ICE COLD PCRおよびBLOCKER配列決定の組み合わせが、本明細書に記載されるような従来のPCRとBLOCKER配列決定の代わりに、さらに低い検出の下限をもたらすものと予想する。

10

20

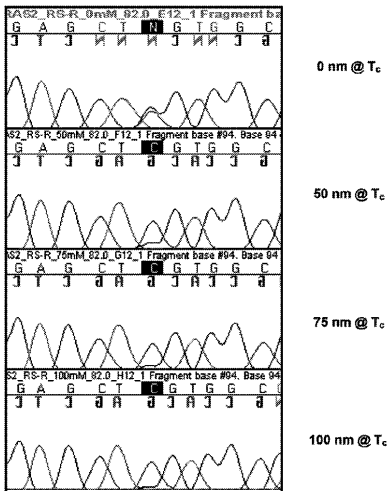
30

40

50

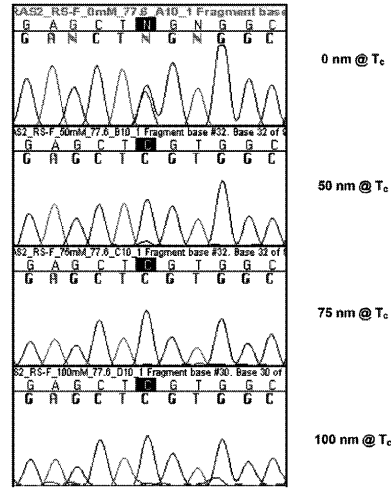
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5



【 図 1 4 】

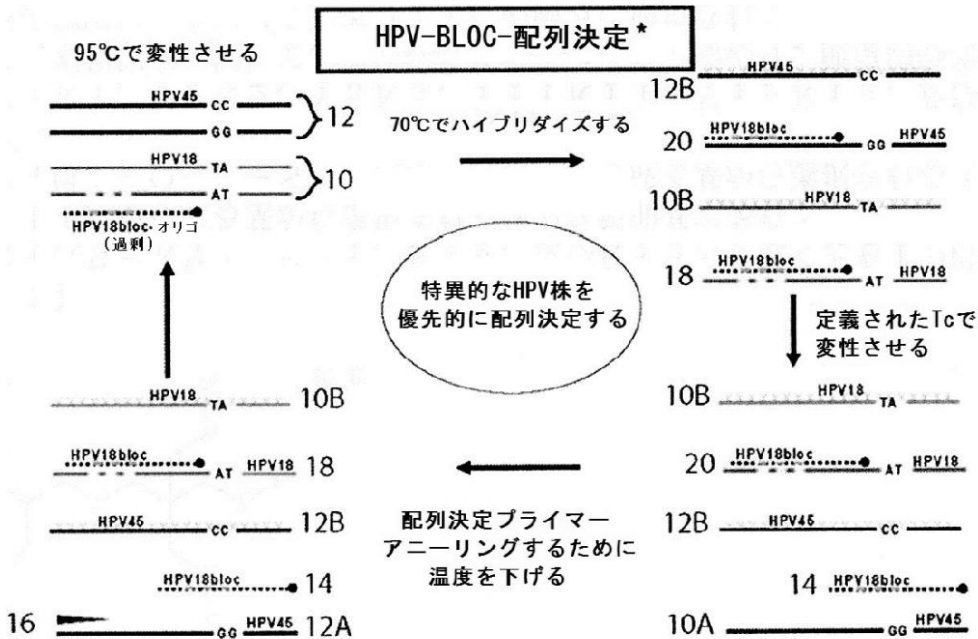
Figure 14

```

GTTTGATTAAGGTAAGTACTGGTGGAGTATTTGTAGTGTA
64-69PCR
TTAACCTTAT GTGTGACATGTC TAAATAGC
83-88PCR
TCGATTTTCATTTTITA TTTAA GCTGCTGAAATG ACTGAAAT
89-94PCR
AAACTGTGTAGTGGAGCTGGTGGT GTAGCCAGAGTGCCITGA CCAATCACCTAATTCAG
95-100PCR
(3'->CACCATCAACCTCGACCAACCAATCCGTTCTCACGGAACTGCTATGTC)
AATCATTTTGGACGAATATGATCCAAATAGG STAAATCTTGTTTAATAT
GCATATTAAGTGGCAGGA CCAATCTTGTGATACGATAAA
87-92PCR

```

【 図 1 】



\*サイクル配列決定におけるBlocker- LNA オリゴヌクレオチド

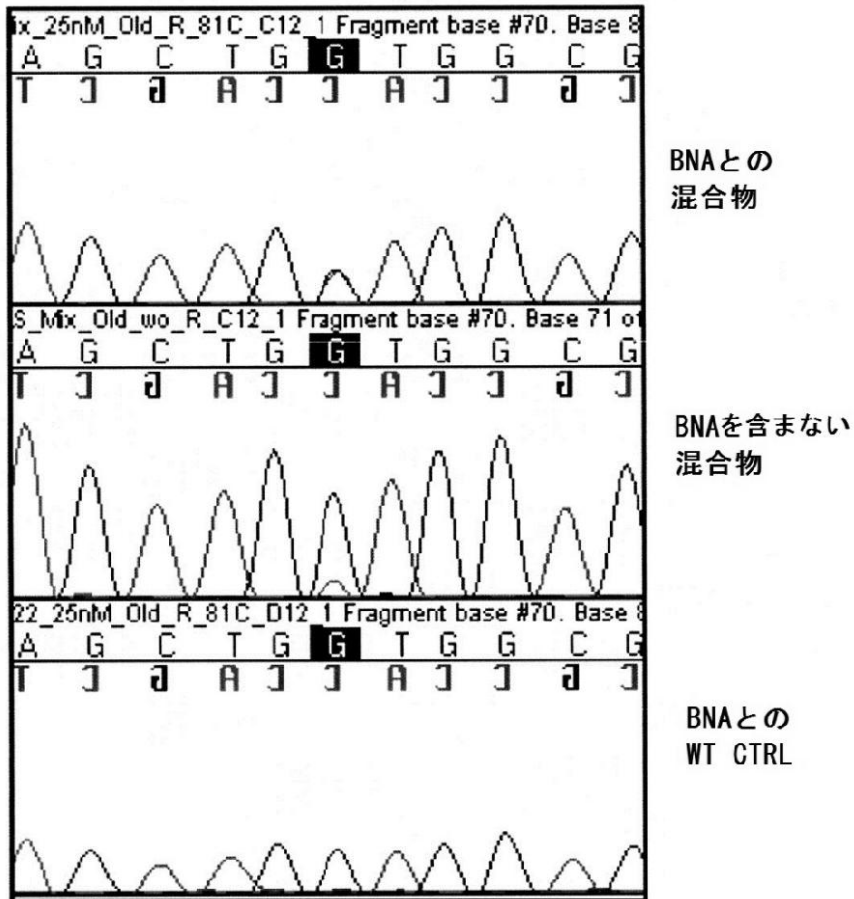
----- BLOCKERにおけるLNAに対して相補的な、株特異的な塩基

HPV18bloc 3'末端および株特異的なLNA上にリン酸を含有するオリゴをブロックする。

----- 配列決定されていない鎖

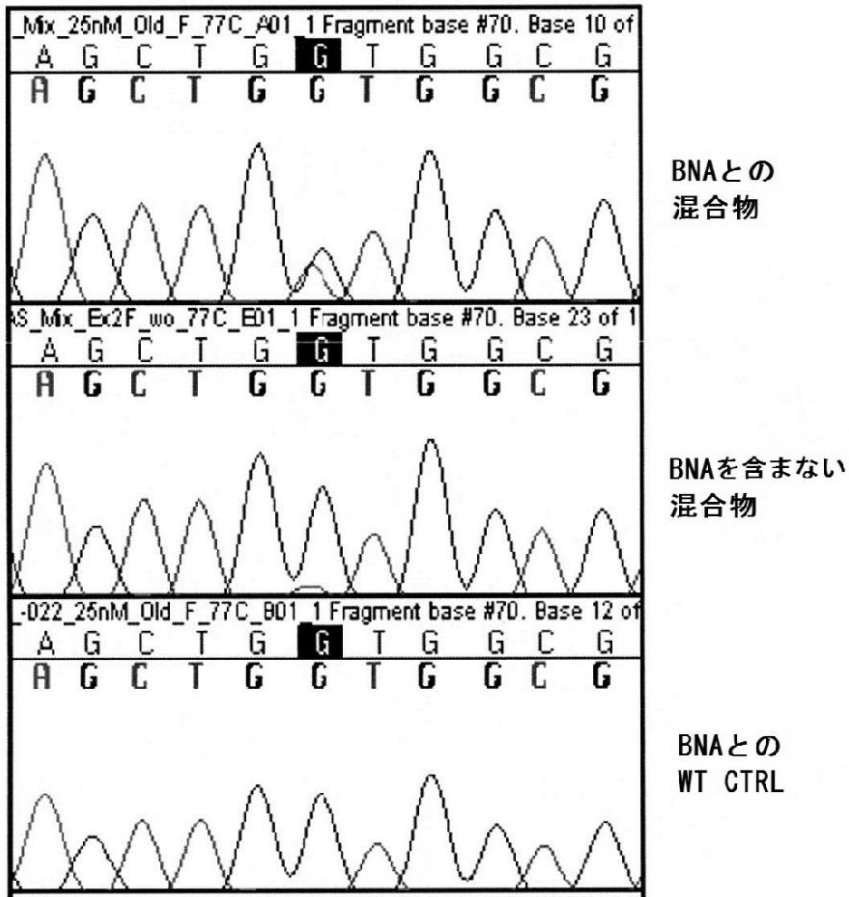
▶ 配列決定プライマー

【 図 2 】

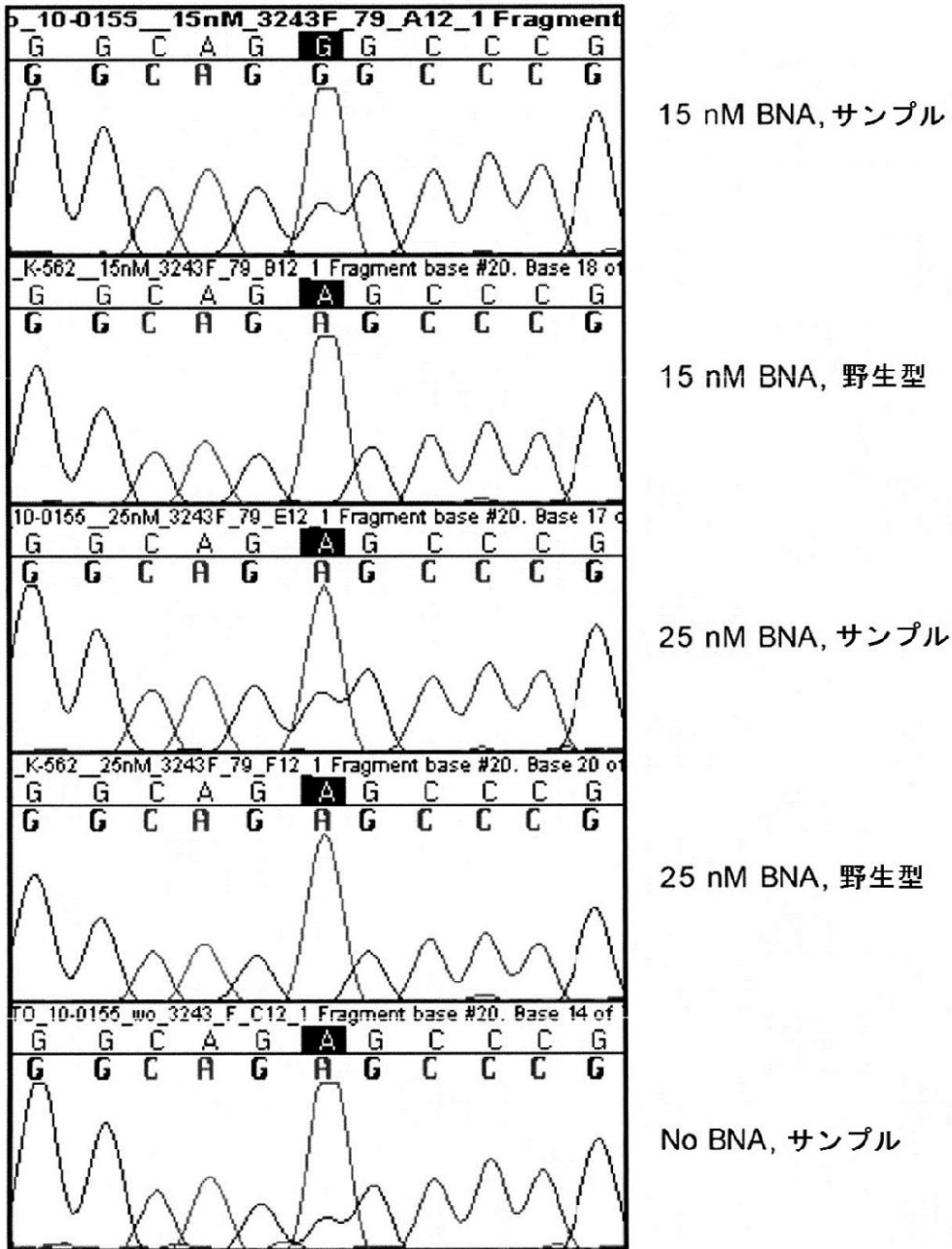




【 図 3 】

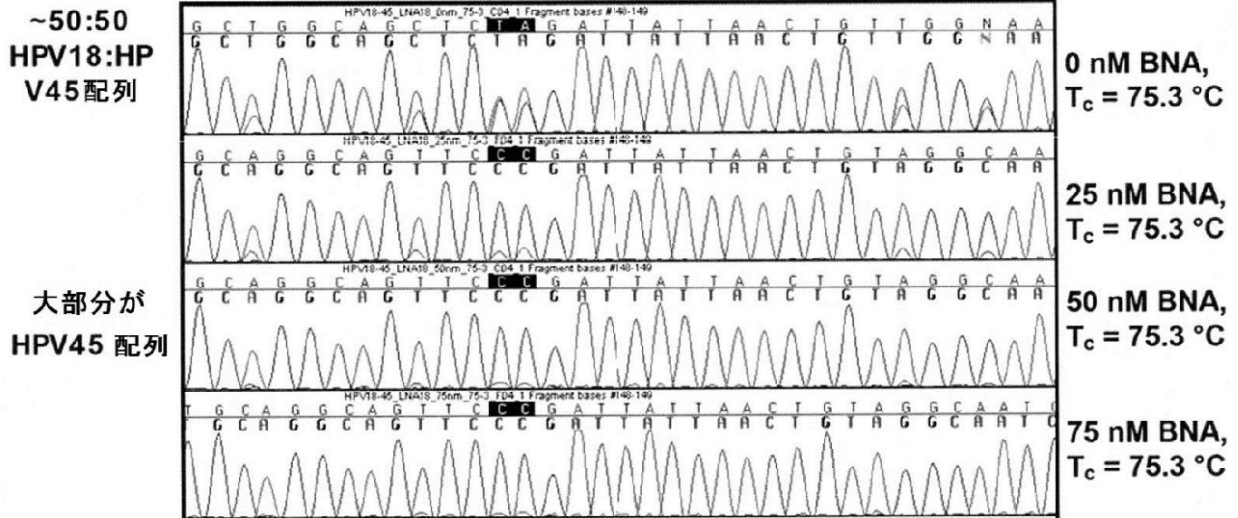


【 図 6 】



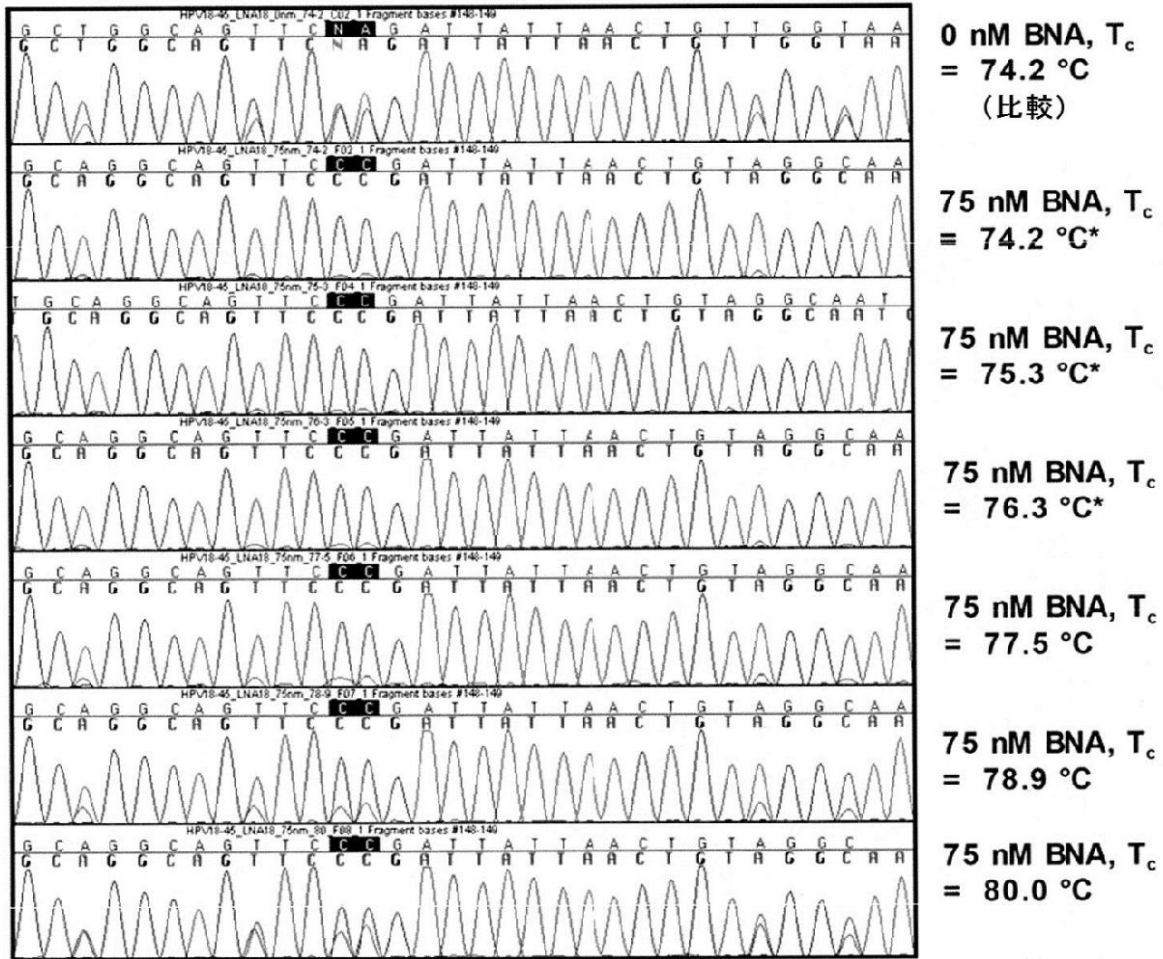
【 図 7 】

**gctggcagctctagattattaactgttggtaa** HPV18 配列  
**gcaggcagttccagattattaactgtaggtaa** HPV45 配列

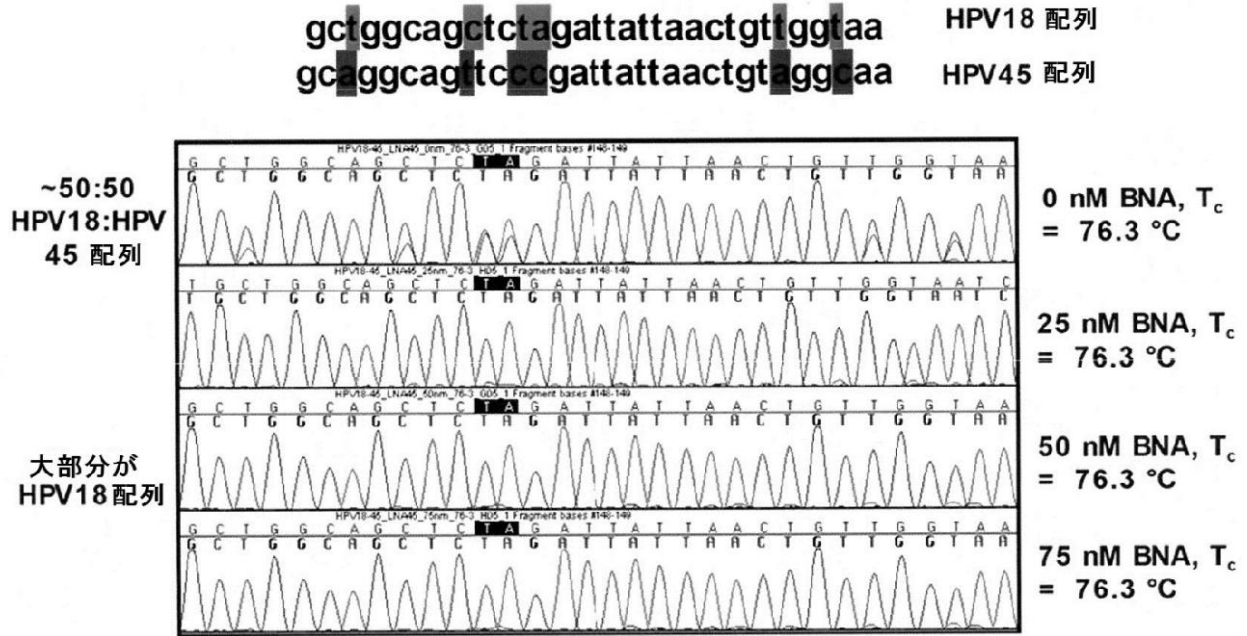


【 図 8 】

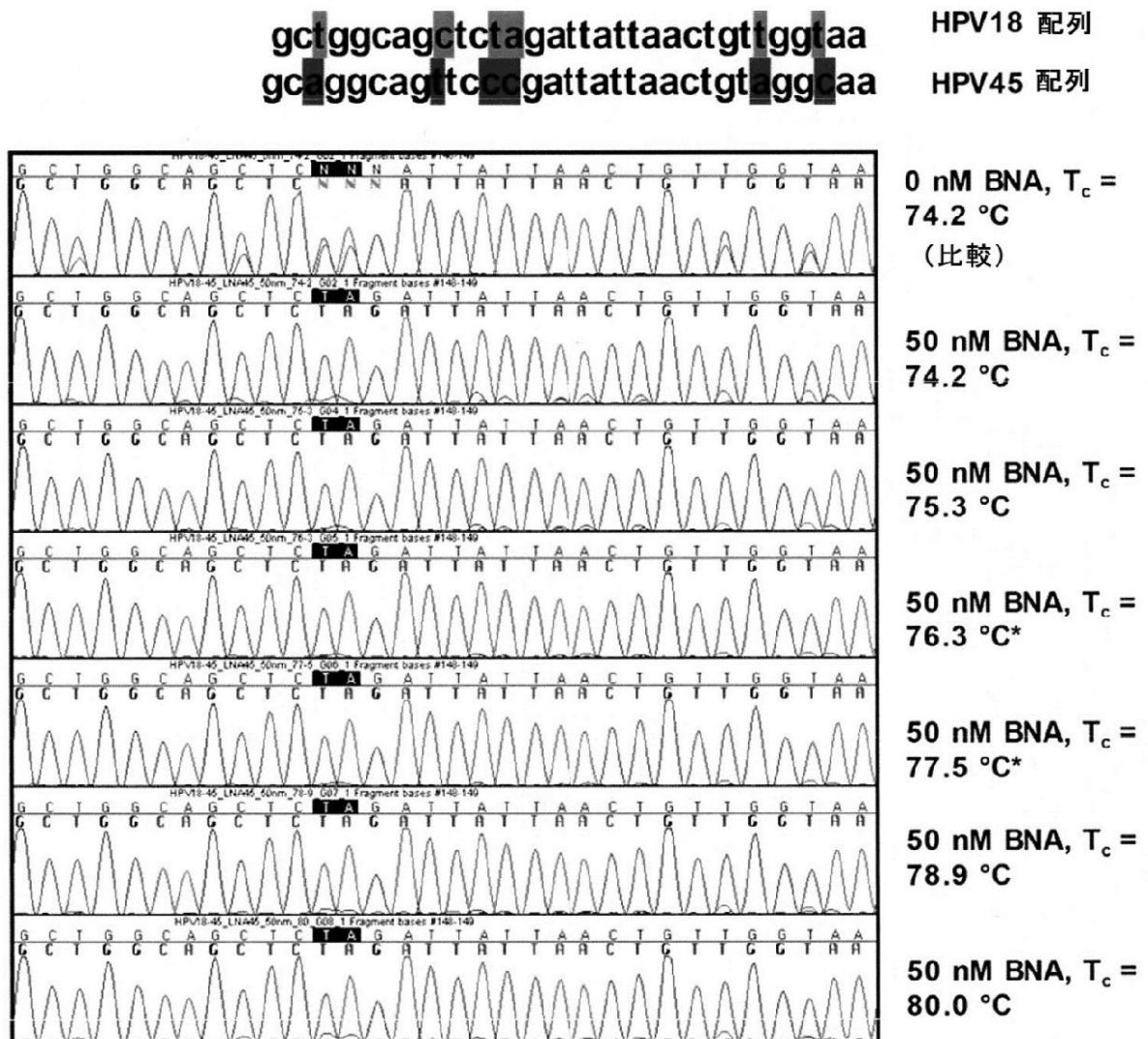
gc|ggcagctctagattattaactgt|ggtaa      HPV18 配列  
 gc|ggcag|tc|c|gattattaactgt|ggtaa      HPV45 配列



【 図 9 】

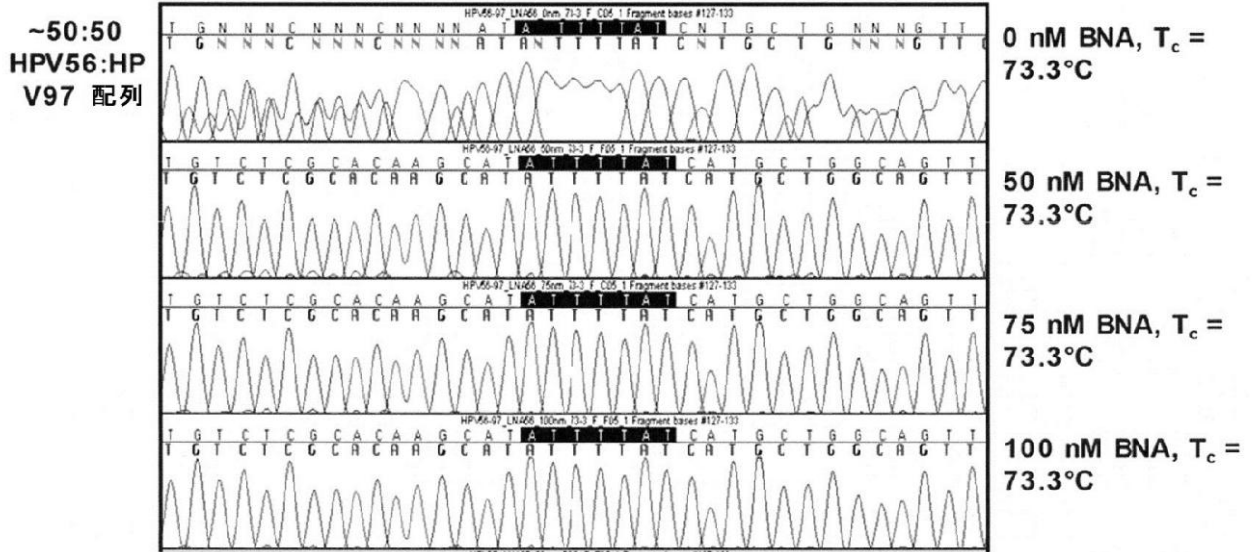


【 図 10 】



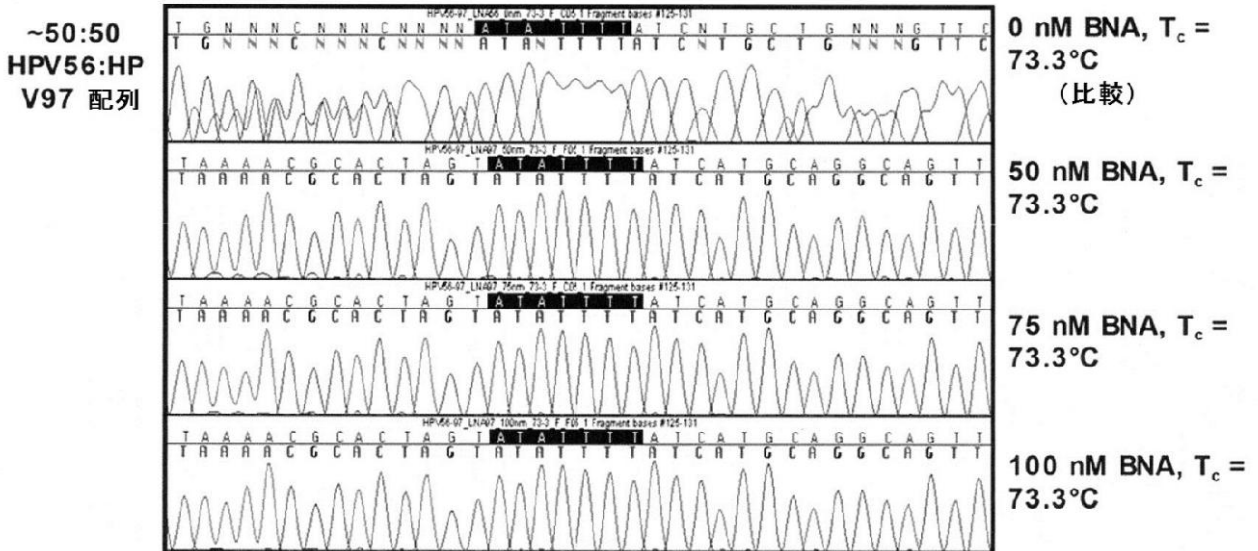
【 図 1 1 】

**taaaacgcactagtagatattttatcatgcaggcagtt** HPV56 配列  
**tgtctcgcaacaagcatattttatcatgctggcagtt** HPV97 配列



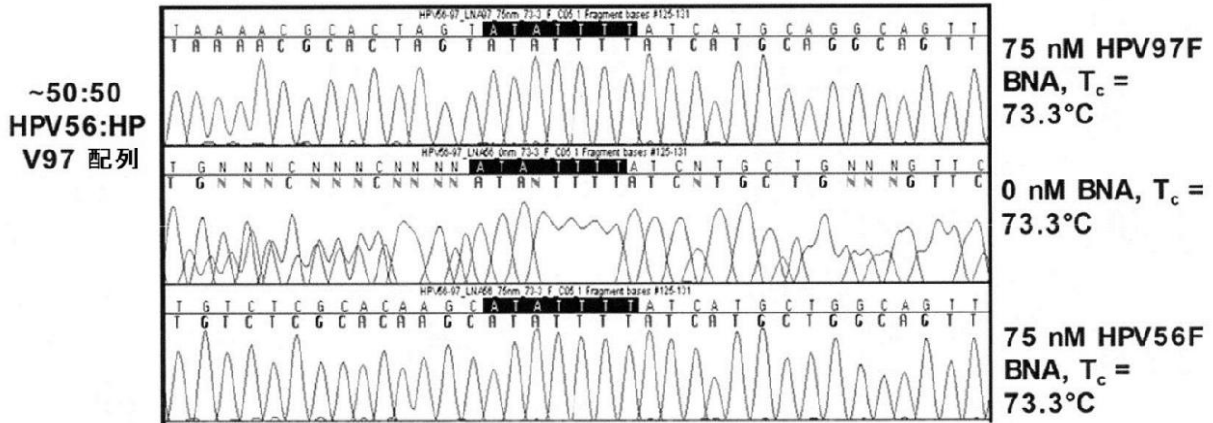
【 図 1 2 】

**taaaacgcactagtagatattttatcatgcaggcagtt** HPV56 配列  
**tgtctcgcaacaagcatattttatcatgctggcagtt** HPV97 配列

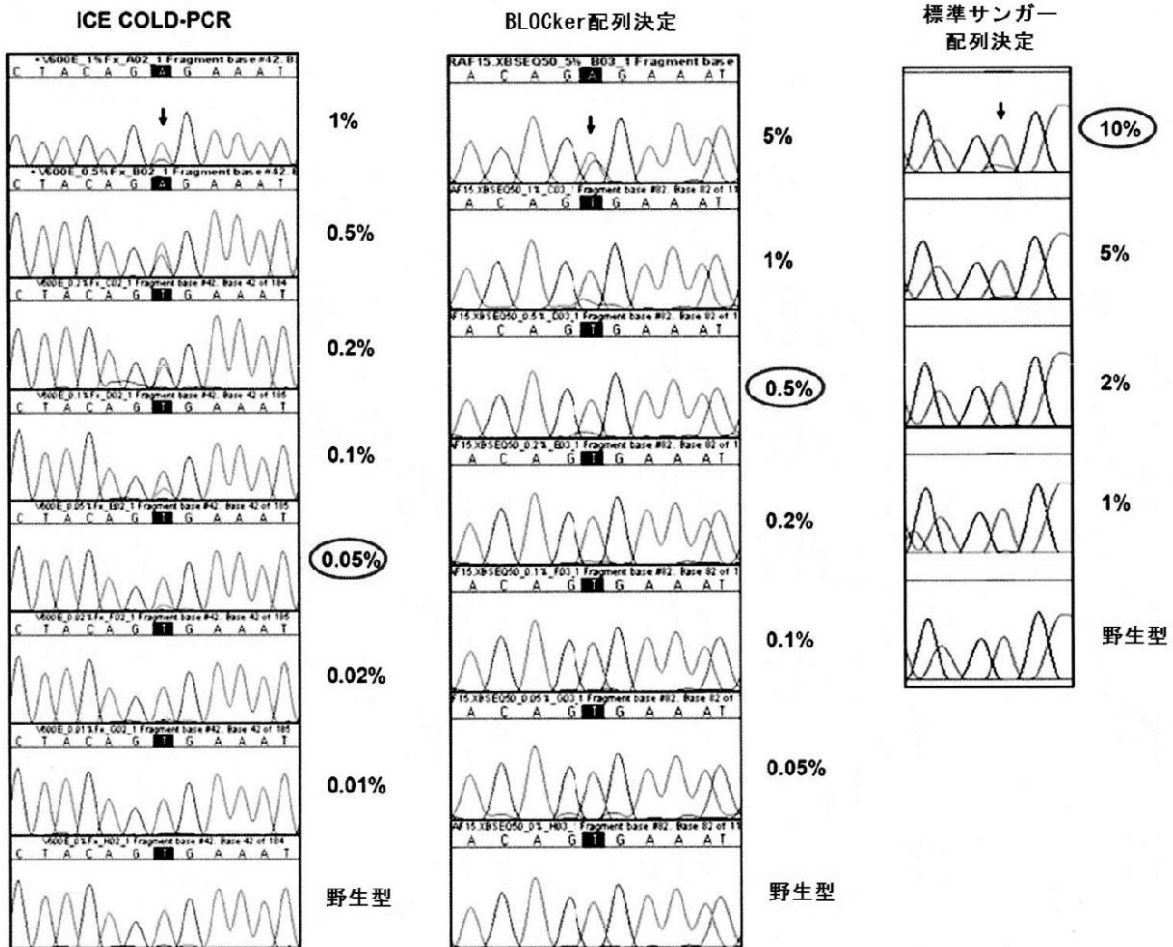


【 図 1 3 】

taaaacgcactaglatatattttatcatgcaggcagtt HPV56 配列  
 tgcctcgcacaglatatattttatcatcggcagtt HPV97 配列

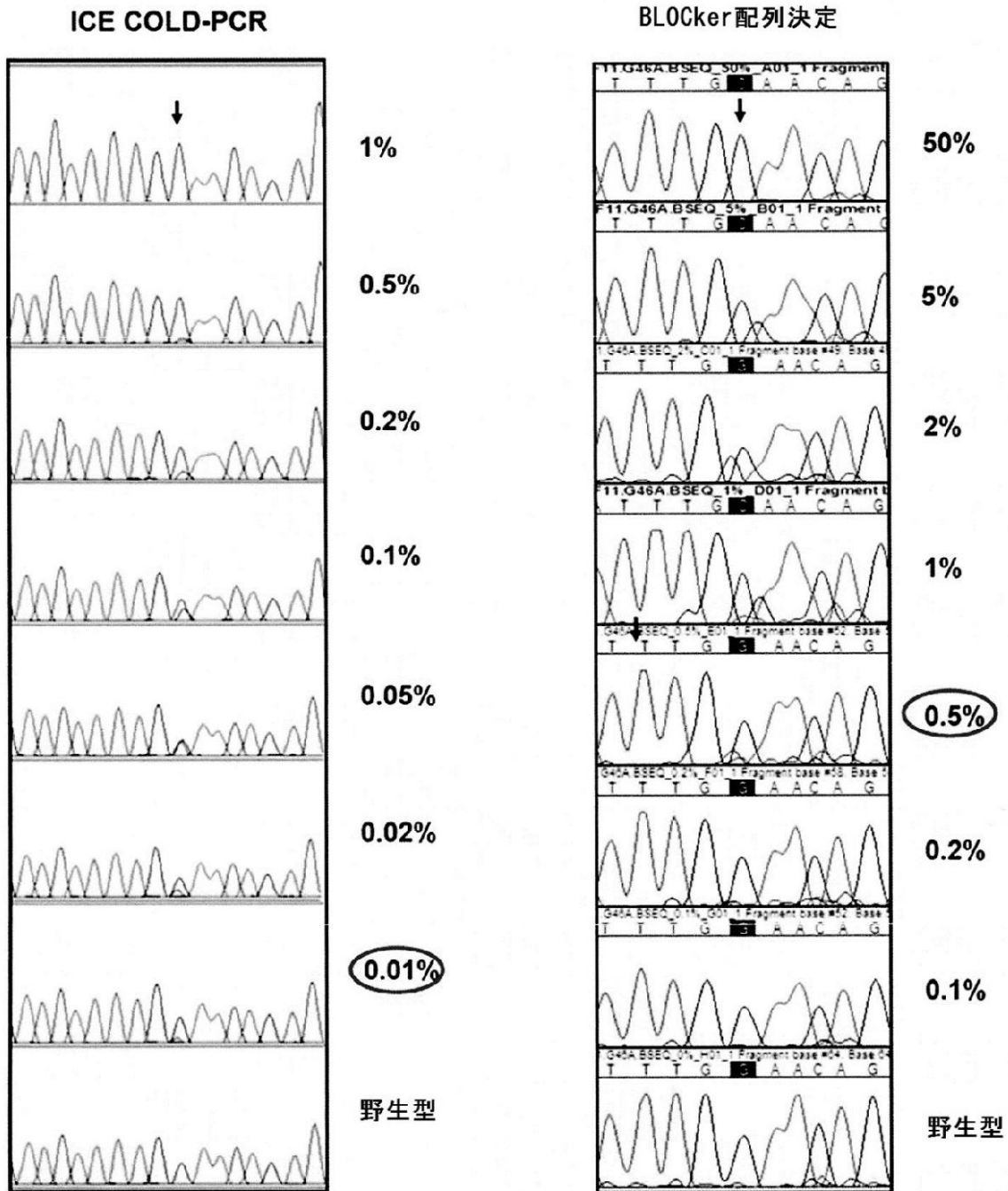


【 図 1 5 】





【 図 1 6 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年10月31日 (2013.10.31)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

配列決定プライマー、ブロッキング核酸、および、標識化された連鎖停止ヌクレオチド三リン酸を含む、参照配列を有するサンプル中の標的配列を配列決定するためのキットであって、



配列決定プライマーは、標的配列と参照配列の一本鎖の一部に相補的であり、ブロッキング核酸は、参照配列の一本鎖の少なくとも一部と完全に相補的であり、

配列決定プライマーとブロッキング核酸は、参照配列の同じ鎖に相補的であり、および、ブロッキング核酸は、ポリメラーゼでは伸長できないように、3'末端でブロックされる、ことを特徴とするキット。

【請求項2】

ブロッキング核酸は、ハイブリダイズが可能となると、完全に相補的な参照鎖を含むホモ二本鎖を、部分的に相補的な標的鎖を含むヘテロ二本鎖を形成することができ、その結果、ブロッキング核酸と相補的な標的鎖のヘテロ二本鎖は、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖よりも低い温度で変性し、配列決定プライマーは、臨界温度未満の温度で標的鎖にアニーリングされることが可能である、ことを特徴とする請求項1に記載のキット。

【請求項3】

配列決定プライマーの3'末端は、ブロッキング核酸の5'末端と結合する参照配列の鎖上の塩基の近くで参照配列の鎖に結合することができ、あるいは、配列決定プライマーの3'末端は、ブロッキング核酸の5'末端と同じ参照配列の塩基の少なくとも1つに相補的である、ことを特徴とする請求項1または2に記載のキット。

【請求項4】

ブロッキング核酸の5'末端は、DNAポリメラーゼによる5'から3'のエキソヌクレオリシスを回避するヌクレオチドを含む、ことを特徴とする請求項1-3のいずれか1つに記載のキット。

【請求項5】

ブロッキング核酸は、DNA、RNA、ペプチド核酸、ロクド核酸、別の修飾されたヌクレオチド、あるいは、これらの組み合わせを含み、随意に、ブロッキング核酸中のペプチド核酸、ロクド核酸、または、別の修飾されたヌクレオチドの位置は、参照配列と標的配列が異なる疑いのある位置と一致するように選択されるか、あるいは、ブロッキング核酸全体で一定以上の融解温度をもたらすように選択される、ことを特徴とする請求項1-4のいずれか1つに記載のキット。

【請求項6】

5'-リン酸化プライマーおよび/または5'-リン酸依存性のエキソヌクレアーゼをさらに含み、

5'-リン酸化プライマーは、配列決定プライマーと同じ鎖に相補的ではない、ことを特徴とする請求項1-5のいずれか1つに記載のキット。

【請求項7】

標的配列および参照配列は、K-RASエキソン2、コドン12、および/または13、ミトコンドリア変異、MELASに関連付けられるミトコンドリア変異、HPV核酸、および、BRAFエキソン11および/またはエキソン15の少なくとも1つを含む、ことを特徴とする請求項1-6のいずれか1つに記載のキット。

【請求項8】

配列決定のためにサンプル中の標的配列を調製するための方法であって、

前記方法は、

a) 反応混合物を形成するために、DNA配列決定反応混合物にサンプルを加える工程であって、

サンプルが参照配列を有し、1以上の標的配列を有する疑いもあり、DNA配列決定反応混合物が、配列決定プライマーと、参照配列の一本鎖の少なくとも一部と完全に相補的な過剰モル量のブロッキング核酸を含み、

ブロッキング核酸と配列決定プライマーが、参照配列の同じ鎖に相補的であり、および

ブロッキング核酸が、ポリメラーゼによって伸長できないように3'末端でブロックされる、工程、

b) 変性した参照鎖と変成した標的鎖を形成するために、参照配列と標的配列の融解温度 ( $T_m$ ) よりも高い第 1 の変性温度に、標的配列を有している疑いのある反応混合物をさらす工程、

c) ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖の形成と、ブロッキング配列と標的鎖のヘテロ二本鎖の形成を可能にするために、反応混合物の温度を下げる工程、

d) ブロッキング核酸と相補的な標的鎖の前記ヘテロ二本鎖の変性を可能にするほどには十分であるが、ブロッキング核酸と相補的な参照鎖の二本鎖を変性させるには不十分である臨界温度 ( $T_c$ ) まで、反応混合物の温度を上げる工程、

e) 配列決定プライマーが反応混合物中の遊離標的鎖および遊離参照鎖にアニーリングされることを可能にするために、反応混合物の温度を下げる工程、および、

f) 伸長生成物を生成するために配列決定プライマーを伸長する工程であって、伸長生成物が標的配列の核酸配列の決定を可能にするために解析可能である工程を含む、ことを特徴とする方法。

**【請求項 9】**

標的配列の核酸配列を決定する工程をさらに含み、

配列は、ジ・デオキシ配列決定、単一分子配列決定、パイロシーケンシング、または、第 2 世代ハイスループットシーケンシングによって随意に決定され、

前記方法はサイクル配列決定反応中の 2 以上のサイクルにわたって随意に繰り返され、

前記反応混合物は核酸検出用色素を随意に含む、ことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

配列決定プライマーの 3' 末端は、ブロッキング核酸の 5' 末端に結合する参照鎖の塩基の近くで参照鎖に結合し、あるいは、配列決定プライマーの 3' 末端は、ブロッキング核酸の 5' 末端と同じ参照配列の塩基の少なくとも 1 つに相補的であり、あるいは、配列決定プライマーの 3' 末端とブロッキング核酸の 5' 末端は、参照鎖の同じ塩基の 2 つ以上に相補的であり、あるいは、ブロッキング核酸の 5' 末端は、DNA ポリメラーゼによる 5' から 3' のエキソヌクレオリシスを回避するヌクレオチドを含む、ことを特徴とする請求項 8 または 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 11】**

ブロッキング核酸は、DNA、RNA、ペプチド核酸、ロックド核酸、別の修飾されたヌクレオチド、あるいは、これらの組み合わせを含み、ブロッキング核酸中のペプチド核酸、ロックド核酸、または、別の修飾されたヌクレオチドの位置は、参照配列と標的配列が異なる疑いのある位置と一致するように随意に選択されるか、あるいは、ブロッキング核酸全体で一定以上の融解温度をもたらすように選択される、ことを特徴とする請求項 8 - 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 12】**

標的配列は参照配列に対して少なくとも 50% の相同性を有する、ことを特徴とする請求項 8 - 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 13】**

配列決定プライマーは、臨界温度未満の温度で、参照配列の鎖にアニーリングされ得るか、あるいは、配列決定プライマーは、ブロッキング核酸に対して過剰なモルで反応混合物に加えられる、ことを特徴とする請求項 8 - 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 14】**

反応混合物中に増幅プライマーを含めることによって、工程 a) のサンプルとして、増幅産物の少なくとも一部を用いる前に、サンプル中の標的配列の少なくとも 1 つを増幅する工程、あるいは、反応混合物中に増幅プライマーを含めることによって、サンプル中の標的配列の少なくとも 1 つを増幅する工程をさらに含む、ことを特徴とする請求項 8 - 13 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 15】**

増幅産物の一本鎖を選択的に分解させる工程をさらに含み、

増幅プライマーが標識化されることによって、結果として生じる標識化された標的鎖が分解可能となり、増幅プライマーは5'リン酸によって随意に標識化され、および、前記方法は、5'-リン酸依存性のエキソヌクレアーゼによって配列決定反応をインキュベートする工程を含む、ことを特徴とする請求項14に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/026938

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, BIOSIS, CAB Data, Sequence Search, 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	GB 2 293 238 A (INCELTEC LTD [GB]; WAKEFIELD ANDREW JEREMY [GB]) 20 March 1996 (1996-03-20)	1,3-9
Y	the whole document	1,3-9
Y	----- WO 2005/093101 A1 (QIAGEN AS [NO]; LARSEN FRANK [NO]) 6 October 2005 (2005-10-06)	1,3-9, 20-24, 26,27, 31,32, 34-36, 40,41
	the whole document ----- ----- -/--	
<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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 June 2012	02/07/2012	
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  Hornig, Horst	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/026938

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/026938

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILBURY COREN A ET AL: "Ice-COLD-PCR enables rapid amplification and robust enrichment for low-abundance unknown DNA mutations", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 39, no. 1, 11 October 2010 (2010-10-11), pages E2-1, XP002638591, ISSN: 1362-4962, DOI: 10.1093/NAR/GKQ899	20-24, 26,27, 31,32, 34-36, 40,41
Y	the whole document	20-24, 26,27, 31,32, 34-36, 40,41
A	----- JIN LI ET AL: "Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing", NATURE MEDICINE, vol. 14, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 579-584, XP55001155, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm1708 the whole document	1-41
A	----- WO 2009/017784 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; MAKRIGIORGOS GERASSIMOS [US]) 5 February 2009 (2009-02-05) the whole document	1-41
A	----- WO 2009/019008 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; NEWTON NICOLAS [U]) 12 February 2009 (2009-02-12) the whole document	1-41
A	----- US 5 849 497 A (STEINMAN CHARLES [US]) 15 December 1998 (1998-12-15) the whole document	1-41
A	----- DOMINGUEZ PATRICK L ET AL: "Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens", ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 24, no. 45, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 6830-6834, XP002503989, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/SJ.ONC.1208832 [retrieved on 2005-08-22] the whole document	1-41
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/026938

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEYAMA T ET AL: "A novel blocker-PCR method for detection of rare mutant alleles in the presence of an excess amount of normal DNA", NUCLEIC ACIDS RESEARCH SPECIAL PUBLICATION, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 20, no. 10, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 2493-2496, XP002184221, ISSN: 0305-1048 the whole document -----	1-41
A	WO 02/18659 A2 (HAPLOGEN LLC [US]; LIU XIANGJUN [US]) 7 March 2002 (2002-03-07) the whole document -----	1-41
A,P	WO 2011/112534 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; MAKRIGIORGOS GERASSIMOS [US]) 15 September 2011 (2011-09-15) cited in the application the whole document -----	1-41
A,P	"BLOCKer-Sequencing: the next step from Sanger.", EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS MAY 2011 LNKD- PUBMED:21698824, vol. 11, no. 4, May 2011 (2011-05), page 359, XP009160476, ISSN: 1744-8352 the whole document -----	1-41
A	BI W AND STAMBROOK J: "Detection of known mutation by proof-reading PCR", NUCLEIC ACIDS RESEARCH SPECIAL PUBLICATION, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 12, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 3073-3075, XP002092520, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/26.12.3073 the whole document -----	1-41
A	WO 01/68900 A2 (VERMICON AG [DE]; WALCHER MARION [DE]; WAGNER MICHAEL [DE]; SNAIDR JIR) 20 September 2001 (2001-09-20) the whole document -----	1-41
A	WO 99/61661 A1 (BIO MERIEUX [FR]; MOUGIN BRUNO [FR]; LAAYOUN ALI [FR]) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document -----	1-41

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/026938

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2293238	A	20-03-1996	NONE	
WO 2005093101	A1	06-10-2005	EP 1737978 A1 JP 2007530026 A WO 2005093101 A1	03-01-2007 01-11-2007 06-10-2005
WO 2009017784	A2	05-02-2009	AU 2008282780 A1 CA 2695264 A1 CN 101815789 A EP 2183379 A2 JP 2010535031 A KR 20100044870 A US 2010203532 A1 WO 2009017784 A2	05-02-2009 05-02-2009 25-08-2010 12-05-2010 18-11-2010 30-04-2010 12-08-2010 05-02-2009
WO 2009019008	A1	12-02-2009	CA 2693384 A1 CN 101778952 A EP 2173910 A1 JP 2010535480 A US 2009053720 A1 WO 2009019008 A1	12-02-2009 14-07-2010 14-04-2010 25-11-2010 26-02-2009 12-02-2009
US 5849497	A	15-12-1998	NONE	
WO 0218659	A2	07-03-2002	AU 8917701 A CA 2421078 A1 CN 1501982 A JP 2004520812 A WO 0218659 A2	13-03-2002 07-03-2002 02-06-2004 15-07-2004 07-03-2002
WO 2011112534	A1	15-09-2011	US 2011217714 A1 WO 2011112534 A1	08-09-2011 15-09-2011
WO 0168900	A2	20-09-2001	AU 6209601 A DE 10012540 A1 WO 0168900 A2	24-09-2001 27-09-2001 20-09-2001
WO 9961661	A1	02-12-1999	AU 3935599 A EP 1082461 A1 FR 2779154 A1 JP 2002516666 A WO 9961661 A1	13-12-1999 14-03-2001 03-12-1999 11-06-2002 02-12-1999



## 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, MD, RU, T  
J, 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, R  
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,  
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H  
U, 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 シ, ヤング

アメリカ合衆国 20878 メリーランド州 ゲイザースバーグ サフィールド・ドライブ 7  
10

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA14

4B063 QA13 QQ42 QR08 QR14 QR32 QR35 QR56 QR62 QR66 QS25  
QS34 QS36 QS39 QX02