(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2004-504810
(P2004-504810A)
(43)公表日　平成16年2月19日(2004.2.19)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/00	C12Q 1/00	Z	4B063
C12Q 1/68	C12Q 1/68	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 32 頁）

(21)出願番号　特願2001-573045(P2001-573045)
(86)(22)出願日　平成13年4月3日(2001.4.3)
(85)翻訳文提出日　平成14年10月3日(2002.10.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/010668
(87)国際公開番号　WO2001/075173
(87)国際公開日　平成13年10月11日(2001.10.11)
(31)優先権主張番号　09/542,718
(32)優先日　平成12年4月4日(2000.4.4)
(33)優先権主張国　米国(US)
(81)指定国　EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),CA,JP

(71)出願人　391008788
アボット・ラボラトリーズ
ＡＢＢＯＴＴ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＩＥＳ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４－６０５０、アボツト・パーク、アボツト・パーク・ロード・１００、チヤド・０３７７／エイ・ピー・６・デイー２
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100105131
弁理士　井上　満
(74)代理人　100113332
弁理士　一入　章夫
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真

最終頁に続く

(54)【発明の名称】β２アドレナリン多型の検出

(57)【要約】
β２アドレナリン受容体遺伝子から標的配列を増幅及び検出するための増幅プライマー及びハイブリダイゼーションプローブとして有用な核酸が提供される。これらのプライマー及びプローブは被験サンプル中の標的配列の存在を検出するために増幅に基づく方法で使用できる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列２及び配列３から成る物質組成物。
【請求項２】
標的配列を検出するための配列２と配列３と配列４及び配列５から成るグループから選択された配列とを含む物質組成物。
【請求項３】
（ａ）核酸増幅試薬と請求項１に記載の物質組成物と標的配列を含有する疑いのある被験サンプルとから成る反応混合物を形成する段階と、
（ｂ）混合物に増幅条件を作用させて標的配列の少なくとも１つのコピーを生じさせる段階と、
から成るβ２アドレナリン受容体の標的配列の増幅方法。
【請求項４】
（ａ）核酸増幅試薬と請求項１に記載の物質組成物と標的配列を含有する疑いのある被験サンプルとから成る反応混合物を形成する段階と、
（ｂ）混合物に増幅条件を作用させて標的配列の少なくとも１つのコピーを生じさせる段階と、
（ｃ）配列４及び配列５から成るグループから選択されたプローブを増幅産物にハイブリダイズさせてハイブリッドを形成する段階と、
（ｄ）ハイブリッドを被験サンプル中の標的配列の存在の指標として検出する段階と、
から成る被験サンプル中の標的配列の検出方法。
【請求項５】
（ａ）配列２及び配列３と、
（ｂ）増幅試薬と、
から成るβ２アドレナリン受容体の標的配列の増幅用キット。
【請求項６】
配列４、配列５、配列６及び配列７から成るグループから選択されたプローブを更に含む請求項６に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（技術分野）
本発明は核酸多型性に関する。より特定的には本発明は核酸増幅技術を使用する単一ヌクレオチドの多型の検出に関する。
【０００２】
（発明の背景）
ヒトゲノムの配列を決定するために設計された試験、及び、ヒトゲノム配列を比較するために設計された試験から、ヒトゲノムの多型性に関する情報が得られた。ヒトゲノムが広範な多型性を有することは以前から報告がある。様々なヒトの遺伝的多型性には、単一塩基の置換；挿入または欠失；可変数のタンデム反復配列；１つの遺伝子全体またはその大部分の欠失；遺伝子増幅；及び、染色体転位；などがある。一般に、単一ヌクレオチドが関与する多型は単一ヌクレオチド多型（“ＳＮＰ”）と呼ばれている。
【０００３】
最近になってβ２アドレナリン受容体遺伝子のコドン１６のＳＮＰが報告され、βアゴニスト治療に対する反応が一様でない理由はこのＳＮＰに関係があると考えられている（Ｄｒａｚｅｎ，Ｊ．Ｍ．ら，Ｔｈｏｒｚｘ，１９９６，５１：１１６８；Ｌｉｇｇｅｔｔ，Ｓ．Ｂ．，Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．，１９９７，１５６：ＳＩ５６－６２；Ｍａｒｔｉｎｅｚ，Ｆ．Ｄ．ら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１９９７，１００：３１８４－８）。アドレナリン受容体は種々の細胞の表面のホルモン受容体である。ホルモンはアドレナリン受容体部位に結合するとカスケード式の細胞イベントを開始させる。従って、アドレナリン受容体及び該受容体に結合するホルモンは細胞イ

ベントを分子レベルで制御するメカニズムの大部分を形成する。多くの薬理学的化合物はアドレナリン受容体部位に結合する分子を模倣し、このようにして細胞機能を臨床的に調節する。例えば、βアゴニストとして知られた薬物のクラスはβ２アドレナリン受容体部位に結合し、喘息薬として広く使用されている。しかしながら、β２アドレナリン遺伝子のコドン１６にＳＮＰをもつ個体では、受容体と薬物またはホルモンとの間の親和性を低下させる構造変化またはその他の変化が受容体に生じているので、このような治療方法に反応しない。

【０００４】

従って、多型性の結果として有効性を喪失するであろう薬物を処方する前にβ２アドレナリン受容体遺伝子のコドン１６の多型を検出する手段を提供することは有益であろう。

【０００５】

（発明の概要）

全自動化に適した方法で多型核酸配列を分析し得る方法がここに提供される。本発明は、被験サンプル中のβ２アドレナリン受容体遺伝子のコドン１６に多型性を有している標的配列を増幅及び分析するための試薬、方法及びキットを提供する。特に、本文中で配列１として示す標的配列を増幅するための増幅プライマーとして配列２及び配列３を使用し得る。これらのプライマーは配列４及び配列５による検出が可能な増幅産物を特異的にかつ高感度に産生することが知見された。配列４は野生型配列に特異的な内部ハイブリダイゼーションプローブであり、配列５は多型配列に特異的な内部ハイブリダイゼーションプローブである。

【０００６】

本文中で配列１として示す標的配列は、核酸増幅試薬と標的配列を含有している被験サンプルと配列２及び配列３で示されるプライマーとから成る反応混合物を形成することによって増幅できる。増幅後、増幅された標的配列を検出できる。例えば、配列４及び配列５で示されるプローブを使用し、増幅された標的配列にハイブリダイズさせてプローブ／増幅産物ハイブリッドを形成させる。ハイブリッドは多様な公知の技術のいずれかを使用して検出できる。従って、配列４をプローブとしたプローブ／増幅産物ハイブリッドの検出は野生型配列の存在を示す。他方、配列５をプローブとしたプローブ／増幅産物ハイブリッドの検出は多型配列の存在を示すであろう。

【０００７】

（詳細な説明）

上述のように、本発明は、被験サンプル中の標的配列を増幅及び検出するための試薬、方法及びキットを提供する。特に配列２及び配列３はβ２アドレナリン受容体遺伝子のコドン１６に多型性を含む可能性をもつ核酸配列を増幅するための増幅プライマーとして使用できる。従って、野生型標的配列及び多型標的配列の双方を配列２及び配列３を使用して増幅できる。配列１は代表的な標的配列として示したものである。配列２及び配列３で示されるプライマーによって産生された増幅産物を検出または識別するために（例えば、被験サンプル中の野生型配列または多型配列の存在を示すために）配列４及び配列５を有するプローブ配列を使用できる。

【０００８】

本文中に開示されたプライマー配列及びプローブ配列は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、または、核酸類似体例えば国際特許出願ＷＯ９２／２０７０２に開示されているペプチド核酸（ＰＮＡ）を非限定例とする非電荷核酸類似体、または、米国特許第５，１８５，４４４号、第５，０３４，５０６号及び第５，１４２，０４７号に記載されているモルホリノ類似体から成りうる。これらの特許はいずれも参照によって本発明に含まれるものとする。このような配列は様々な現行の技術を使用して常法で合成できる。例えば、ＤＮＡ配列は慣用のヌクレオチドホスホラミジット化学及びＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）；ＤｕＰｏｎｔ，（Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＤＥ）；またはＭｉｌｌｉｇｅｎ，（Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ）から入手可能な器具を使用して合成できる。また所望の場合には、米国特許出願第５，４

６４，７４６号；第５，４２４，４１４号及び第４，９４８，８８２号に記載されているような当業界で公知の方法を使用して配列を標識できる。これらの米国特許出願はいずれも参照によって本発明に含まれるものとする。しかしながら、プライマーとして使用される配列が少なくとも配列の３′端にＤＮＡを含んでいなければならないこと、好ましくは完全にＤＮＡから構成されていなければならないことは理解されよう。

【０００９】

本文中で使用された“標的配列”という用語は、検出されるか、増幅されるか、検出及び増幅される核酸配列を意味するかまたは本発明で提供される配列の１つに相補的な核酸配列を意味する。標的配列という用語がときには一本鎖配列に対して使用されるが、標的配列が実際には二重鎖であることは当業者に理解されよう。

【００１０】

本文中で使用された“被験サンプル”という用語は、標的配列を含むと推測される任意のサンプルを意味する。被験サンプルはいかなる生物ソースに由来してもよく、例えば、血液、気管支肺胞洗浄液、唾液、咽喉スワブ、眼球水晶体液、脳脊髄液、汗、痰、尿、乳、腹水、粘液、滑液、腹膜液、羊膜液、心組織液のような組織液など、または、発酵ブロス、細胞培養物、化学反応混合物などである。被験サンプルは、（ｉ）ソースから得られたものを直接使用してもよく、または、（ｉｉ）サンプルの特性を変性する前処理後に使用してもよい。従って使用に先立って被験サンプルを、例えば、血液から血漿を調製する、細胞を破壊する、固体材料から液体を調製する、粘性流体を希釈する、液体を濾過する、液体を蒸留する、液体を濃縮する、干渉成分を失活させる、試薬を添加する、核酸を精製する、などによって前処理できる。最も典型的な被験サンプルは全血であろう。

【００１１】

配列２及び配列３は、標的配列を増幅させるために当業界で公知の増幅手順に従って増幅プライマーとして使用できる。好ましくは、本発明で提供された配列を米国特許第４，６８３，１９５号及び第４，６８３，２０２号に記載のポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）の原理に従って使用する。これらの特許は参照によって本発明に含まれるものとする。標的配列がＲＮＡであるときは標的配列の増幅に逆転写段階が含まれることが当業者には理解されよう。逆転写活性を有している酵素がＲＮＡ鋳型からＤＮＡ配列を産生する能力を有していることは公知である。逆転写ＰＣＲ（ＲＴ　ＰＣＲ）は当業界で公知であり、米国特許第５，３１０，６５２号及び第５，３２２，７７０号に記載されている。これらの特許は参照によって本発明に含まれるものとする。

【００１２】

従って本発明の増幅方法は一般に、核酸増幅試薬と増幅プライマー（即ち配列２または配列３）と標的配列を含む疑いのある被験サンプルとから成る反応混合物を形成する段階を含む。反応混合物の形成後、このように形成された反応混合物に増幅条件を作用させて標的配列の少なくとも１つのコピーを産生させる。当業界で公知のように例えば反応混合物を熱サイクル処理することによって反応混合物を数回反復処理し得ることは理解されよう。

【００１３】

上述のように、反応混合物は“核酸増幅試薬”を含有する。このような試薬は公知であり、その非限定例は、ポリメラーゼ活性（及び必要ならば逆転写活性）をもつ酵素、マグネシウム及びマンガンのような酵素補因子；塩類；ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ＮＡＤ）；及びデオキシヌクレオチド三リン酸（ｄＮＴＰ）例えばデオキシアデニン三リン酸、デオキシグアニン三リン酸、デオキシシトシン三リン酸及びデオキシチミジン三リン酸である。

【００１４】

“増幅条件”は一般に、標的配列に対するプライマー配列のハイブリダイズまたはアニーリングとその後のプライマー配列の伸長とを促進する条件であると定義される。このようなアニーリングが温度、イオン強度、配列鎖長、相補性及び配列のＧ：Ｃ含量のような複数のパラメーターにかなり予測可能に依存することは当業界で公知である。例えば、相補

的核酸配列の環境の温度低下はアニーリングを促進する。所与の配列セットについて、融解温度即ちＴｍは複数の公知の方法のいずれかによって推定できる。典型的には、診断用途には融解温度に近い（即ち融解温度から１０℃以内の）ハイブリダイゼーション温度を使用する。イオン強度または“塩”濃度もまた、融解温度に影響を与える。その理由は、少量のカチオンはホスホジエステル主鎖の負電荷を消去することによって二重鎖の形成を安定させ易いからである。典型的な塩濃度はカチオンの種類及び原子価に依存するが当業者はこのような塩濃度を容易に推測できるであろう。同様に、高いＧ：Ｃ含量及び長い配列鎖長も二重鎖形成を安定させることが公知である。その理由は、Ａ：Ｔ対は２個の水素結合しか有していないのに比べてＧ：Ｃ対合は３個の水素結合を有しており、配列が長いほど配列を相互保持する水素結合の数が多くなるからである。従って、高いＧ：Ｃ含量及び長い配列鎖長は、融解温度を上昇させることによってハイブリダイゼーション条件に影響を与える。

【００１５】

所与の診断用途に用いる配列が選択されれば、Ｇ：Ｃ含量及び鎖長は既知の値となり、これらに基づいて正確なハイブリダイゼーション条件を決定できる。イオン強度は典型的には酵素活性に最適化されるので、残っている唯一の可変パラメーターは温度である。一般に、ハイブリダイゼーション温度はプライマーまたはプローブのＴｍに近い温度またはＴｍの温度に選択される。従って、特定のプライマー、プローブ、または、プライマーとプローブのセットに適当なハイブリダイゼーション条件を得ることは、当業者の通常の知識の範囲内である。

【００１６】

上述のようにして産生された増幅産物を標的配列の増幅中または増幅後に検出できる。配列４及び配列５を有するプローブ配列を使用して配列２及び配列３で産生される増幅産物を検出するために使用できる検出プラットフォームは、当業界で公知のよく知られた均一技術または不均一技術のいずれかを含む。均一検出プラットフォームの例は、プローブに結合され標的配列の存在下でシグナルを発するＦＲＥＴラベルの使用を含む。米国特許第５，２１０，０１５号（参照によって本発明に含まれるものとする）に記載された所謂ＴａｑＭａｎアッセイ及び米国特許第５，９２５，５１７号（参照によって本発明に含まれるものとする）に記載されたＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎアッセイは、核酸配列を不均一に検出するために使用できる技術の例である。更に、このようなプラットフォームは増幅産物の産生をリアルタイムで検出するために使用できる。使用される特定の検出プラットフォームに応じて使用できるようにプローブを修飾できることは理解されよう。

【００１７】

増幅反応の完了後、分子量マーカーを使用して増幅反応産物を検出するために例えばゲル電気泳動を使用できる。しかしながら、標識プローブ及び固体支持体を使用すると増幅産物を不均一に検出できる。従って、増幅された標的配列の検出方法は、（ａ）標的配列に相補的な核酸配列に少なくとも１つのハイブリダイゼーションプローブ（即ち、配列４及び配列５）をハイブリダイズさせて、プローブとプローブに相補的な核酸配列とから成るハイブリッドを形成する段階と、（ｂ）ハイブリッドを被験サンプル中の標的配列の存在の指標として検出する段階とから成る。

【００１８】

上述のように形成されたハイブリッドは、このようなハイブリッドを分離及び検出するために使用できる微粒子及びラベルを使用して検出できる。好ましくは、市販のＡｂｂｏｔｔ　ＬＣｘ^{ＲＴＭ}器具（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ；Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，ＩＬ）によって使用されるプロトコルに従って検出を行う。

【００１９】

本文中で使用された“ラベル”という用語は、検出可能であるという特性または特徴を有している分子または部分を意味する。ラベルは、例えば放射性同位体、フルオロホア、ケミルミノホア、酵素、コロイド粒子、蛍光微粒子などのような直接に検出可能なラベルでもよい。または、ラベルが例えば特異的結合成分によって間接に検出可能なラベルでもよ

い。直接検出可能ラベルが例えば基質、トリガ試薬、光などのようなラベルを検出可能にする追加成分を必要とすることは理解されよう。間接検出可能ラベルを使用するとき、これらのラベルは典型的には“コンジュゲート”と組合せて使用される。コンジュゲートは典型的には、直接検出可能ラベルに付着または結合させた特異的結合成分である。コンジュゲートを合成するための結合化学は当業界で公知であり、例えば特異的結合成分の特異的結合特性またはラベルの検出可能特性を破壊しない任意の化学的手段及び／または物理的手段を含む。本文中で使用した“特異的結合成分”という用語は、結合対の一方の成分、即ち、一方の分子が例えば化学的または物理的手段を介して他方の分子に特異的に結合するような異なる２つの分子のうちの１つを意味する。抗原と抗体は特異的結合対を構成するが、それ以外の特異的結合対の非限定例としては、アビジンとビオチン；ハプテンとハプテン特異的抗体；相補的ヌクレオチド配列；酵素の補因子または基質と酵素；などがある。

【００２０】

“固体支持体”という用語は、不溶性であるかまたは以後の反応によって不溶性になる任意の物質を意味する。従って、固体支持体は、ラテックス、プラスチック、誘導プラスチック、磁性または非磁性の金属、ガラス、シリコンなどである。また固体支持体の多様な形態が公知であり、その非限定例はビーズ、薄片、粗粒、粒子、薄板または管などである。

【００２１】

１つの実施態様によれば、検出を容易にするためにプライマー配列及び／またはプローブ配列にラベルを組込むことによってハイブリッドを検出できる。従って、例えば微粒子にハイブリッドを固定させ微粒子上のハイブリッドの存在をコンジュゲートによって検出するためにプライマーまたはプローブに結合された第一及び第二の特異的結合成分を使用できる。

【００２２】

別の実施態様によれば、ハイブリッドを検出するために特異的結合成分と直接検出可能ラベルとの組合せを使用できる。例えば、特異的結合成分で標識したプライマーを使用して特異的結合成分をハイブリッドに導入できる。直接検出可能ラベルは、直接検出可能ラベルで標識しておいたプローブを使用してハイブリッドに組込むことができる。従って、ハイブリッドが特異的結合成分を使用して微粒子に固定されプローブ上のラベルによって直接検出され得る。その他の検出形態が当業者の選択事項であることは理解されよう。

【００２３】

好ましい実施態様によれば、標的配列を検出するために、１９９５年８月１４日出願の米国特許出願Ｎｏ．０８／５１４，７０４に記載の“オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションＰＣＲ”（あるいは、本文中で“ＯＨＰＣＲ”と呼ぶ）を使用する。該特許出願は参照によって本発明に含まれるものとする。簡単に説明すると、好ましい方法で使用される試薬は少なくとも１つの増幅プライマーと少なくとも１つの内部ハイブリダイゼーションプローブと増幅反応を実行させる増幅試薬とを含む。プライマー配列は、標的配列（またはその相補配列）のコピーの伸長をプライムするために使用され、捕獲ラベルまたは検出ラベルによって標識されている。プローブ配列はプライマー配列によって産生された配列とハイブリダイズするために使用され、典型的にはプライマー配列を含まない配列とハイブリダイズする。プライマー配列と同様に、プローブ配列もまた捕獲ラベルまたは検出ラベルによって標識されているが、プライマーが捕獲ラベルによって標識されているときはプローブが検出ラベルによって標識され、プライマーが検出ラベルによって標識されているときはプローブが捕獲ラベルによって標識されなければならない。検出ラベルは先に定義した“ラベル”と同じ定義を有しており、“捕獲ラベル”は典型的には、伸長産物及びこのような産物に結合したプローブを別の増幅反応体から分離するために使用される。特異的結合成分（先に定義）はこの目的に極めて好適である。また、この方法に従って使用されるプローブは好ましくは、ハイブリダイゼーション条件下で伸長しないように３′端でブロックされている。プローブの伸長を阻止する方法は公知であり、当業者の選択事

項である。典型的には、プローブの３′端にリン酸塩基を付加するだけでプローブの伸長をブロックする目的を十分に果たし得る。

【００２４】

プローブが最初から反応混合物の一部である上記の好ましい実施態様では、反応混合物を増幅条件下においたときに標的配列またはその相補配列のコピーがプローブのＴｍよりも高い温度で産生されるように、プライマー、プローブ及び増幅条件はプローブ配列がプライマー配列よりも低い融解温度を有するように選択するのが好ましい。このようなコピーが合成された後、これらのコピーを変性し、混合物を冷却すると、プローブとターゲットまたはその相補配列のコピーとのハイブリッドが形成され得る。温度を変性温度からプローブが一本鎖コピーに結合する温度まで低下させるときの降温速度は極めて速い（例えば８－１５分）のが好ましく、特に、ポリメラーゼ活性を有する酵素がプライマー伸長に活性であるような温度範囲を経由する。このような速やかな冷却は、プライマー／コピー配列のハイブリダイゼーション及び伸長よりもコピー配列／プローブのハイブリダイゼーションを促進する。

【００２５】

以下の実施例は本発明をより十分に説明するために提示されたものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【００２６】

実施例

以下の実施例は、本文中に提示されたＤＮＡオリゴマーのプライマー及びプローブを使用したβ－２アドレナリン受容体遺伝子中の単一ヌクレオチドの多型の検出を証明する。これらのＤＮＡプライマー及びプローブは配列２、配列３、配列４及び配列５として示される。β－２アドレナリン受容体遺伝子の代表的配列の一部分を本文中で配列１として示す。

【００２７】

以下の実施例において、配列２及び配列３は野生型及び突然変異型の双方のβ－２アドレナリン受容体遺伝子の一部分に特異的な増幅プライマーとして使用される。配列４はβ－２アドレナリン受容体遺伝子増幅産物の野生型対立遺伝子を検出する内部ハイブリダイゼーションプローブである。配列５はβ－２アドレナリン受容体遺伝子増幅産物の突然変異対立遺伝子を検出する内部ハイブリダイゼーションプローブである。

【００２８】

実施例１

β－２アドレナリン受容体遺伝子のプライマー及びプローブの調製

Ａ．β－２アドレナリン受容体のプライマー

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションＰＣＲによってβ－２アドレナリン受容体遺伝子の野生型及び突然変異型の双方の対立遺伝子を含有する標的配列に結合し該配列を増幅させ得るプライマーを設計した。これらのプライマーは配列２及び配列３であった。標準オリゴヌクレオチド合成法を使用してプライマー配列を合成した。更に、米国特許第５，４２４，４１４号に記載されたような標準シアノエチルホスホラミジット結合化学を使用し、配列３の５′端をカルバゾールでハプテン化した。該特許は参照によって本発明に含まれるものとする。

【００２９】

Ｂ．野生型及び突然変異型のβ－２アドレナリン受容体のプローブ

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによってβ－２アドレナリン受容体遺伝子中の野生型対立遺伝子または突然変異対立遺伝子の増幅標的配列とハイブリダイズするようにプローブを設計した。野生型対立遺伝子に対するプローブは配列４を有しており、突然変異対立遺伝子に対するプローブは配列５を有していた。標準オリゴヌクレオチド合成法を使用してプローブ配列を合成した。配列４の５′端をアダマンタンでハプテン化し、１０個のチミジンを結合させ、３′端をリン酸塩でブロックした。配列５の５′端をダンシルでハプテン化し、１０個のチミジンを結合させ、３′端をリン酸塩でブロックした。す

べての合成には米国特許第５，４６４，７４６号に記載された標準シアノエチルホスホラミジット結合化学を使用した（該特許は参照によって本発明に含まれるものとする）。

【００３０】

実施例２

β－２アドレナリン受容体の多型の検出

Ａ．全体手順

ＱＩＡａｍｐ^{ＲＴＭ} Ｂｌｏｏｄ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（２００μｌ以下のサンプルの場合）またはＱＩＡａｍｐ^{ＲＴＭ} Ｂｌｏｏｄ Ｍａｘｉ Ｋｉｔ（２００μｌ－１０ｍｌのサンプル量の場合）（双方のキットはＱｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ製）を製造業者の指示通りに使用して全血からＤＮＡを抽出した。全部のサンプルの遺伝子型を配列決定によって確認した。この結果、これらのサンプル中の本発明で試験されるβ－２アドレナリン受容体遺伝子の対立遺伝子がホモ接合野生型、ホモ接合突然変異またはヘテロ接合のいずれであるかを判定した。幾つかの場合には、精製したＤＮＡを分光光度法によって定量した。

【００３１】

配列２及び配列３のプライマーを実施例１で調製した配列４（野生型）及び配列５（突然変異）のプローブと共に使用して、上記サンプルに由来のＤＮＡをＰＣＲ増幅し検出した。

【００３２】

５０ｍＭのＮ，Ｎ，－ビス［２－ヒドロキシエチル］グリシン（Ｂｉｃｉｎｅ），ｐＨ８．１、１５０ｍＭの酢酸カリウム、０．１ｍＭのエチレンジアミン四酢酸、０．０２％のナトリウムアジド、０．００１％のウシ血清アルブミン及び８％（ｗ／ｖ）のグリセロールを含有する１ＸＯＨのバッファ中でＰＣＲを実施した。組換えＴｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓのＤＮＡポリメラーゼを５単位／反応の濃度で、各々が最終濃度１５０μＭで存在するｄＮＴＰ（ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ及びｄＣＴＰ）と共に使用した。配列２及び配列３のプライマーと配列４の野生型プローブとは各々１１０ｎＭの濃度で使用し、配列５の突然変異プローブは５０ｎＭの濃度で使用した。最終濃度３．２５ｍＭの塩化マンガンも反応混合物中に存在させた。総反応容量は０．２ｍｌであり、サンプル容量は２０μｌであった。

【００３３】

反応混合物をＬＣｘ^{ＲＴＭ}サーマルサイクラーで増幅した。反応混合物を先ず９７℃で２分間インキュベートし、次いで９４℃で４０秒、５５℃で４０秒、７２℃で４０秒のＰＣＲ増幅サイクルを４５回反復した。反応混合物を熱サイクル処理した後、混合物を９７℃で５分間維持し、温度を１２℃まで急激に降下させることによってプローブオリゴハイブリダイゼーションを完了した。サンプルを１２℃で少なくとも１０分間維持し、その後は反応生成物を分析し検出するまでこの温度に維持した。

【００３４】

反応生成物をＡｂｂｏｔｔ ＬＣｘ^{ＲＴＭ}システム（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，ＩＬから入手可能）で検出した。反応生成物を捕獲し検出するために抗カルバゾールコーティングした微粒子と抗アダマンタン抗体／アルカリホスファターゼコンジュゲートと抗ダンシル抗体／β－ガラクトシダーゼコンジュゲート（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，ＩＬから入手可能）との懸濁液をＬＣｘ^{ＲＴＭ}と共に使用した。酵素基質として４－メチル－ウンベリフェリルホスフェート（ＭＵＰ）及び７－β－Ｄ－ガラクトピラノシルオキシクマリン－４－酢酸－（２－ヒドロキシエチル）アミド（ＡＵＧ）を使用し、基質から生成物への変換速度を測定しカウント数／秒／秒（ｃ／ｓ／ｓ）として記録した。

【００３５】

Ｂ．ターゲットＤＮＡ滴定

配列決定によって確認した３つの遺伝子型（ホモ接合野生型、ヘテロ接合及びホモ接合突然変異）の各々に由来のＤＮＡを単離し、定量し、サンプル中で反応あたり２５ｎｇから

５００ｎｇの範囲の種々の量のＤＮＡを使用して上記の手順で試験した。

【００３６】

この実験で得られたデータを表１に示す。該データは、野生型プローブがホモ接合野生型及びヘテロ接合のβ－２アドレナリン受容体遺伝子型を検出したが、ホモ接合突然変異β－２アドレナリン受容体遺伝子型を陽性として検出しなかったことを示す。突然変異プローブはホモ接合突然変異及びヘテロ接合の双方のβ－２アドレナリン受容体遺伝子型を検出したが、ホモ接合野生型のβ－２アドレナリン受容体遺伝子型を陽性として検出しなかった。双方のプローブが１つの野生型対立遺伝子と１つの突然変異対立遺伝子とを含むので双方のプローブがヘテロ接合サンプルを検出したことは予想通りであった。更に、ヘテロ接合サンプルのＬＣｘ反応速度はホモ接合サンプルのほぼ１／２であったが、その理由は、適正なホモ接合サンプル中に２つの対立遺伝子が存在するのにヘテロ接合サンプル中にはプローブと反応できる対立遺伝子が１つしか存在しないからである。従って、全部のプローブが優れた特異性を示した。全部の陽性サンプルで少なくとも反応当たり２５ｎｇという少量までのＤＮＡが検出可能であった。

【００３７】

【表１】

表１

β-2アドレナリン受容体遺伝子型	野生型プローブDNA(ng)のLCx^{RTM}速度(c/s/s)						
	25	50	100	200	300	400	500
ホモ接合野生型	747.3	794.8	819.2	931.4	924.8	882.0	831.5
ヘテロ接合	438.4	502.9	530.8	497.8	558.8	567.3	529.0
ホモ接合突然変異	52.5	51.9	56.5	55.9	62.8	82.4	66.7
	突然変異プローブDNA(ng)のLCx^{RTM}速度(c/s/s)						
	25	50	100	200	300	400	500
ホモ接合野生型	46.9	48.7	87.4	59.6	53.2	54.9	54.2
ヘテロ接合	566.2	662.9	668.1	679.1	746.3	768.6	737.3
ホモ接合突然変異	964.8	1068.8	1105.9	1128.5	1209.9	1195.7	1206.4

【００３８】

Ｃ．未知サンプルの遺伝子型の決定

上記のＡ．に記載の手順を使用して２０のサンプルのβ－２アドレナリン受容体遺伝子型を決定した。次にこの結果を配列決定によって決定した結果に比較した。

【００３９】

表２から明らかなように、サンプルは明らかに、野生型プローブとだけ反応するか（ホモ接合野生型）、突然変異プローブとだけ反応するか（ホモ接合突然変異）、または、双方のプローブと反応した（ヘテロ接合）。これらの結果を配列決定によって確認した。従って、ＬＣｘフォーマットでこれらのプライマー及びプローブを使用してβ－２アドレナリン受容体の遺伝子型を決定するこの方法は、配列決定方法と同様に正確であり、しかも配列決定方法よりも容易である。

【００４０】

【表２】

表２

サンプル番号	野生型プローブ LCx^{RTM}速度	突然変異プローブ LCx^{RTM}速度	遺伝子型
1	68.6	1115.5	ホモ接合突然変異
2	74.9	1118.1	ホモ接合突然変異
3	67.6	1109.2	ホモ接合突然変異
4	65.4	1118.0	ホモ接合突然変異
5	70.4	1173.7	ホモ接合突然変異
6	68.5	1061.3	ホモ接合突然変異
7	69.7	1061.6	ホモ接合突然変異
8	70.3	1083.7	ホモ接合突然変異
9	70.8	1194.2	ホモ接合突然変異
10	75.7	1163.6	ホモ接合突然変異
11	77.4	1166.2	ホモ接合突然変異
12	597.8	692.2	ヘテロ接合
13	564.6	675.0	ヘテロ接合
14	578.6	630.6	ヘテロ接合
15	637.5	677.1	ヘテロ接合
16	595.0	685.6	ヘテロ接合
17	594.1	663.1	ヘテロ接合
18	963.2	52.6	ホモ接合野生型
19	878.6	51.6	ホモ接合野生型
20	897.6	50.6	ホモ接合野生型

【００４１】
本発明を特定実施態様に基づいて詳細に説明してきたが、本発明の要旨及び範囲を逸脱することなくこれらの実施態様の変更及び修正が可能であることは当業者に明らかであろう。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/75173 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/10668

(22) International Filing Date: 3 April 2001 (03.04.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/542,718 4 April 2000 (04.04.2000) US

(71) Applicant: **ABBOTT LABORATORIES** [US/US]; D377/AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(72) Inventors: **YU, Hong**; 5356 RFD, Long Grove, IL 60047 (US). **MERCHANT, Barbara, T.**; 3101 Hill Lane, Wilmette, IL 60091 (US).

(74) Agents: **YASGER, Paul, D.** et al.; D377/AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(81) Designated States *(national)*: CA, JP.

(84) Designated States *(regional)*: European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/75173 A2

(54) Title: β 2 ADRENERGIC POLYMORPHISM DETECTION

(57) Abstract: Nucleic acid sequences are provided that are useful as amplification primers and hybridization probes for amplifying and detecting target sequence from the β2 adrenergic receptor gene. The primers and probes can be employed in amplification based methods for detecting the presence of the target sequence in a test sample.

β2 ADRENERGIC POLYMORPHISM DETECTION

Technical Field

The present invention relates to nucleic acid polymorphisms and, in particular, relates to detecting a single nucleotide polymorphism using nucleic acid amplification technology.

Background of the Invention

Studies designed to determine the sequence of the human genome, as well as studies designed to compare human genomic sequences, have elicited information regarding polymorphisms in the human genome. A wide variety of polymorphisms in the human genome have previously been described. The various types of human genetic polymorphsims include single base substitutions; insertions or deletions; variable numbers of tandem repeats; deletions of all or a large part of a gene; gene amplifications; and chromosomal rearrangements. Generally, polymorphisms that involve a single nucleotide are called single nucleotide polymorphisms ("SNPs").

Recently, a SNP in codon 16 of the β2 adrenergic receptor gene has been reported and associated with a variation in response to β agonist therapy (Drazen, JM et al, Thorzx, 1996, 51:1168; Liggett, S.B., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997, 156:S156-62; Martinez, F.D. et al, J. Clin. Invest., 1997, 100:3184-8). Adrenergic receptors are hormone receptors on the surfaces of various cells. When bound to an adrenergic receptor site, a hormone can trigger a cascade of cellular events. Hence, adrenergic receptors and the hormones that bind to them, in large part form the mechanism that controls cellular events at a molecular level. Many pharmacological compounds mimic molecules that bind to adrenergic receptor sites and, in this manner, clinically regulate cellular function. For example, a class of drugs known as beta-agonists bind to β2 adrenergic receptor sites and are widely used as a medication for aesthma. Individuals with a SNP in codon 16 of the β2 adrenergic gene, however, may not respond to such therapies do to a conformational, or other, change in the receptor that causes a decrease in the affinity between the receptor and the medication or hormone.

It would therefore be advantageous to provide a means for detecting the polymorphism in codon 16 of the β2 adrenergic receptor gene prior to prescribing medications that would not be efficacious as a result of the polymorphism.

Brief Description of the Invention

Provided herein are methods capable of analyzing polymorphic nucleic acid sequences in a manner suitable for automation. The present invention provides reagents, methods, and kits for amplifying and detecting a target sequence having a polymorphism at codon 16 of the β2 adrenergic receptor gene in a test sample. In particular, SEQ. ID. Nos. 2 and 3 can be employed as amplification primers to amplify the target sequence designated herein as SEQ. ID. NO.1. It was discovered that these primers specifically and sensitively produce an amplification product that is amenable to detection with SEQ. ID. NO. 4 and SEQ. ID. NO. 5. SEQ. ID. NO. 4 is an internal hybridization probe specific for the wild-type sequence and SEQ. ID. NO. 5 is an internal hybridization probe specific for the polymorphic sequence.

The target sequence, designated herein as SEQ. ID. NO. 1, can be amplified by forming a reaction mixture comprising nucleic acid amplification reagents, a test sample containing a target sequence, and a primers designated SEQ ID NOs. 2 and 3. Following amplification, the amplified target sequence can be detected. For example, the probes designated SEQ ID NOs. 4 and 5 can be employed to hybridize to the amplified target sequence to form a probe/amplification product hybrid which then can be detected using any of a variety of well known techniques. Hence, detecting a probe/amplification product hybrid wherein the probe is SEQ. ID. NO. 4 indicates the presence of the wild-type sequence. On the other hand, detecting of a probe/amplification product hybrid wherein the probe is SEQ. ID. NO. 5 would indicate the presence of the polymorphic sequence.

Detailed Description of the Invention

As previously mentioned, the present invention provides reagents, methods, and kits for amplifying and detecting a target sequence in a test sample. In particular, SEQ. ID. Nos. 2 and 3 can be employed as amplification primers to amplify a nucleic acid sequence potentially comprising the polymorphism in codon 16 of the β2 adrenergic receptor gene. Hence, both the wild-type and polymorphic version of the target sequence can be amplified using SEQ. ID. NOs. 2 and 3. SEQ. ID. NO. 1 is presented as a representative target

sequence. Probe sequences, having SEQ. ID. Nos. 4 and 5 can be employed to detect or distinguish the amplification product produced by primers designated SEQ. ID. NOs. 2 and 3 (e.g. indicate the presence of the wild-type or polymorphic sequence in the test sample).

The primer and probe sequences disclosed herein, may comprise deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA) or nucleic acid analogs such as uncharged nucleic acid analogs including but not limited to peptide nucleic acids (PNAs) which are disclosed in International Patent Application WO 92/20702 or morpholino analogs which are described in U.S. Patents Numbered 5,185,444, 5,034,506, and 5,142,047 all of which are herein incorporated by reference. Such sequences can routinely be synthesized using a variety of techniques currently available. For example, a sequence of DNA can be synthesized using conventional nucleotide phosphoramidite chemistry and the instruments available from Applied Biosystems, Inc, (Foster City, CA); DuPont, (Wilmington, DE); or Milligen, (Bedford, MA). Similarly, and when desirable, the sequences can be labeled using methodologies well known in the art such as described in U.S. Patent Applications Numbered 5,464,746; 5,424,414; and 4,948,882 all of which are herein incorporated by reference. It will be understood, however, that sequences employed as primers should at least comprise DNA at the 3' end of the sequence and preferably are completely comprised of DNA.

A "target sequence" as used herein means a nucleic acid sequence that is detected, amplified, both amplified and detected, or otherwise is complementary to one of the sequences herein provided. While the term target sequence is sometimes referred to as single stranded, those skilled in the art will recognize that the target sequence may actually be double stranded.

The term "test sample" as used herein, means anything suspected of containing the target sequence. The test sample can be derived from any biological source, such as for example, blood, bronchial alveolar lavage, saliva, throat swabs, ocular lens fluid, cerebral spinal fluid, sweat, sputa, urine, milk, ascites fluid, mucous, synovial fluid, peritoneal fluid, amniotic fluid, tissues such as heart tissue and the like, or fermentation broths, cell cultures, chemical reaction mixtures and the like. The test sample can be used (i) directly as obtained from the source or (ii) following a pre-treatment to modify the character of the sample. Thus, the test sample can be pre-treated prior to use by, for example, preparing plasma from blood, disrupting cells, preparing liquids from solid materials, diluting viscous fluids, filtering liquids, distilling liquids, concentrating liquids, inactivating interfering components, adding reagents, purifying nucleic acids, and the like. Most typically, the test sample will be whole blood.

SEQ. ID. NOs. 2 and 3 can be used as amplification primers according to amplification procedures well known in the art to amplify the target sequence. Preferably, the sequences provided herein are employed according to the principles of the polymerase chain reaction (PCR) described in U.S. Patents 4,683,195 and 4,683,202 which are herein incorporated by reference. It will be understood by those skilled in the art that in the event that the target sequence is RNA, a reverse transcription step can be included in the amplification of the target sequence. Enzymes having reverse transcriptase activity are well known for their ability to produce a DNA sequence from an RNA template. Reverse transcription PCR (RT PCR) is well known in the art and described in U.S. Patent Numbers 5,310,652 and 5,322,770 which are herein incorporated by reference.

Thus, amplification methods of the present invention generally comprise the steps of forming a reaction mixture comprising nucleic acid amplification reagents, amplification primers (i.e. SEQ. ID.NO. 2 or 3), and a test sample suspected of containing a target sequence. Upon formation of the reaction mixture, the so-formed reaction mixture is subjected to amplification conditions to generate at least one copy of the target sequence. It will be understood that subjecting the reaction mixture may be repeated several times such as by thermal cycling the reaction mixture as is well known in the art.

As stated above, the reaction mixture comprises "nucleic acid amplification reagents" that include reagents which are well known and may include, but are not limited to, an enzyme having polymerase activity (and, as necessary, reverse transcriptase activity), enzyme cofactors such as magnesium or manganese; salts; nicotinamide adenine dinucleotide (NAD); and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) such as for example deoxyadenine triphosphate, deoxyguanine triphosphate, deoxycytosine triphosphate and deoxythymine triphosphate.

"Amplification conditions" are defined generally as conditions which promote hybridizing or annealing of primer sequences to a target sequence and subsequent extension of the primer sequences. It is well known in the art that such annealing is dependent in a rather predictable manner on several parameters, including temperature, ionic strength, sequence length, complementarity, and G:C content of the sequences. For example, lowering the temperature in the environment of complementary nucleic acid sequences promotes annealing. For any given set of sequences, melt temperature, or Tm, can be estimated by any of several known methods. Typically, diagnostic applications utilize hybridization temperatures which are close to (i.e. within 10°C) the melt temperature. Ionic strength or "salt" concentration also impacts the melt temperature, since small cations tend to stabilize the formation of duplexes by negating the negative charge on the phosphodiester backbone.

Typical salt concentrations depend on the nature and valency of the cation but are readily understood by those skilled in the art. Similarly, high G:C content and increased sequence length are also known to stabilize duplex formation because G:C pairings involve 3 hydrogen bonds where A:T pairs have just two, and because longer sequences have more hydrogen bonds holding the sequences together. Thus, a high G:C content and longer sequence lengths impact the hybridization conditions by elevating the melt temperature.

Once sequences are selected for a given diagnostic application, the G:C content and length will be known and can be accounted for in determining precisely what hybridization conditions will encompass. Since ionic strength is typically optimized for enzymatic activity, the only parameter left to vary is the temperature. Generally, the hybridization temperature is selected close to or at the Tm of the primers or probe. Thus, obtaining suitable hybridization conditions for a particular primer, probe, or primer and probe set is well within ordinary skill of one practicing this art.

Amplification products produced as above can be detected during or subsequently to the amplification of the target sequence. Detection platforms that can be employed to detect the amplification products produced with SEQ. ID. NOs. 2 and 3 using probe sequences having SEQ. ID. NOs. 4 and 5 include any of the well known homogeneous or heterogeneous techniques well known in the art. Examples of homogeneous detection platforms include the use of FRET labels attached to probes that emit a signal in the presence of the target sequence. So-called TaqMan assays described in U.S. Patent Number 5,210,015 (herein incorporated by reference) and Molecular Beacon assays described in U.S. Patent Number 5,925,517 (herein incorporated by reference) are examples of techniques that can be employed to homogeneously detect nucleic acid sequences. Additionally, such platforms can be employed to detect the production of amplification product in a real-time manner. It will be understood that the probes can be modified to such that they are suitable for use according to the particular detection platform employed.

Gel electrophoresis, for example, can be employed to detect the products of an amplification reaction after its completion using molecular weight markers. However, amplification products can be detected heterogeneously using labeled probes and solid supports. Hence, methods for detecting the amplified target sequence include the steps of (a) hybridizing at least one hybridization probe (i.e. SEQ. ID. NOs. 4 and 5) to the nucleic acid sequence complementary to the target sequence, so as to form a hybrid comprising the probe and the nucleic acid sequence complementary to the probe; and (b) detecting the hybrid as an indication of the presence of the presence of the target seuquence in the test sample.

Hybrids formed as above can be detected using microparticles and labels that can be used to separate and detect such hybrids. Preferably, detection is performed according to the protocols used by the commercially available Abbott LCx® instrumentation (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL).

The term "label" as used herein means a molecule or moiety having a property or characteristic which is capable of detection. A label can be directly detectable, as with, for example, radioisotopes, fluorophores, chemiluminophores, enzymes, colloidal particles, fluorescent microparticles and the like; or a label may be indirectly detectable, as with, for example, specific binding members. It will be understood that directly detectable labels may require additional components such as, for example, substrates, triggering reagents, light, and the like to enable detection of the label. When indirectly detectable labels are used, they are typically used in combination with a "conjugate". A conjugate is typically a specific binding member which has been attached or coupled to a directly detectable label. Coupling chemistries for synthesizing a conjugate are well known in the art and can include, for example, any chemical means and/or physical means that does not destroy the specific binding property of the specific binding member or the detectable property of the label. As used herein, "specific binding member" means a member of a binding pair, i.e., two different molecules where one of the molecules through, for example, chemical or physical means specifically binds to the other molecule. In addition to antigen and antibody specific binding pairs, other specific binding pairs include, but are not intended to be limited to, avidin and biotin; haptens and antibodies specific for haptens; complementary nucleotide sequences; enzyme cofactors or substrates and enzymes; and the like.

A "solid support", refers to any material which is insoluble, or can be made insoluble by a subsequent reaction. Thus, a solid support can be can be latex, plastic, derivatized plastic, magnetic or non-magnetic metal, glass, silicon or the like. A vast array of solid support configurations are also well known and include, but are not intended to be limited to, beads, shavings, grains, particles, plates, or tubes.

According to one embodiment, hybrids can be detected by incorporating labels in the primer and/or probe sequences to facilitate detection. Hence, first and second specific binding members attached to the primers and probes can be employed to immobilize the hybrids to, for example, microparticles and detect the presence of the hybrids on the microparticles with the assistance of a conjugate.

According to another embodiment, a combination of specific binding members and directly detectable labels can be employed to detect hybrids. For example, specific binding

members can be introduced in the hybrids using primers labeled with specific binding members. A directly detectable label can be incorporated into the hybrids using a probe that has been labeled with a directly detectable label. Hence, hybrids can be immobilized to a microparticle using the specific binding member and directly detected by virtue of the label on the probe. It will be understood that other detection configurations are a matter of choice for those skilled in the art.

According to a preferred embodiment, "oligonucleotide hybridization PCR" (variably referred to herein as "OH PCR") amplification reaction as described in U.S. Patent Application Serial No. 08/514,704, filed August 14, 1995, that is herein incorporated by reference, is employed to detect the target sequence. Briefly, the reagents employed in the preferred method comprise at least one amplification primer and at least one internal hybridization probe, as well amplification reagents for performing an amplification reaction. The primer sequence is employed to prime extension of a copy of a target sequence (or its complement) and is labeled with either a capture label or a detection label. The probe sequence is used to hybridize with the sequence generated by the primer sequence, and typically hybridizes with a sequence that does not include the primer sequence. Similarly to the primer sequence, the probe sequence is also labeled with either a capture label or a detection label with the caveat that when the primer is labeled with a capture label the probe is labeled with a detection label and vice versa. Detection labels have the same definition as "labels" previously defined and "capture labels" are typically used to separate extension products, and probes associated with any such products, from other amplification reactants. Specific binding members (as previously defined) are well suited for this purpose. Also, probes used according to this method are preferably blocked at their 3' ends so that they are not extended under hybridization conditions. Methods for preventing extension of a probe are well known and are a matter of choice for one skilled in the art. Typically, adding a phosphate group to the 3' end of the probe will suffice for purposes of blocking extension of the probe.

According to the above preferred embodiment the probe initially is part of the reaction mixture, it is preferable to select primers, probes and amplification conditions such that the probe sequence has a lower melt temperature than the primer sequences so that upon placing the reaction mixture under amplification conditions copies of the target sequence or its complement are produced at temperature above the Tm of the probe. After such copies are synthesized, they are denatured and the mixture is cooled to enable the formation of hybrids between the probes and any copies of the target or its complement. The rate of

temperature reduction from the denaturation temperature down to a temperature at which the probes will bind to single stranded copies is preferably quite rapid (for example 8 to 15 minutes) and particularly through the temperature range in which an enzyme having polymerase activity is active for primer extension. Such a rapid cooling favors copy sequence/probe hybridization rather that primer/copy sequence hybridization and extension.

The following examples are provided to further illustrate the present invention and not intended to limit the invention.

Examples

The following examples demonstrate detection of a single nucleotide polymorphism in the beta-2 adrenergic receptor gene using the DNA oligomer primers and probes herein provided. These DNA primers and probes are identified as SEQUENCE ID NO. 2, SEQUENCE ID NO. 3, SEQUENCE ID NO. 4 and SEQUENCE ID NO. 5. A portion of a representative sequence from the beta-2 adrenergic receptor gene is designated herein as SEQUENCE ID NO. 1.

In the following examples, SEQ ID NO. 2 and SEQ ID NO. 3 are used as amplification primers specific for a portion of both the wild type and mutant beta-2 adrenergic receptor gene. SEQ ID NO. 4 is an internal hybridization probe that detects the wild type allele of the beta-2 adrenergic receptor gene amplification product. SEQ ID NO. 5 is an internal hybridization probe that detects the mutant allele of the beta-2 adrenergic receptor gene amplification product.

Example 1

Preparation of beta-2 Adrenergic Receptor Gene Primers and Probes

A. beta-2 Adrenergic Receptor Primers Primers were designed to bind and allow amplification of the target sequence containing both wild type and mutant alleles of the beta-2 adrenergic receptor gene by oligonucleotide hybridization PCR. These primers were SEQ ID NO. 2 and SEQ ID NO. 3. Primer sequences were synthesized using standard oligonucleotide synthesis methodology. Additionally, SEQ ID NO. 3 was haptenated with carbazole at the 5' end using standard cyanoethyl phosphoramidite coupling chemistry as described in U.S. Patent No. 5,424,414 incorporated herein by reference.

B. Wild Type and Mutant beta-2 Adrenergic Receptor Probes Probes were designed to hybridize with the amplified target sequence of either the wild type or mutant allele in the beta-2 adrenergic receptor gene by oligonucleotide hybridization. These probes were SEQ ID NO. 4 for the wild type allele, and SEQ ID NO. 5 for the mutant allele. Probe sequences were synthesized using standard oligonucleotide synthesis methodology. SEQ ID NO. 4 was haptenated with an adamantane at the 5' end followed by 10 thymidines, and blocked with phosphate at the 3' end. SEQ ID NO. 5 was haptenated with a dansyl at the 5' end followed by 10 thymidines, and blocked with phosphate at the 3' end. All syntheses used standard cyanoethyl phosphoramidite coupling chemistry as described in U.S. Patent No. 5,464,746 (herein incorporated by reference).

Example 2
Detection of beta-2 Adrenergic Receptor Polymorphism

A. General Procedure DNA was extracted from whole blood using either the QIAamp® Blood Mini Kit (for samples less than or equal to 200 µl) or the QIAamp® Blood Maxi Kit (for sample volumes from 200 µl to 10 ml) (both kits from Qiagen, Valencia, CA) per the manufacturer's directions. The genotype of all samples was verified by sequencing. This allowed samples to be identified as either homozygous wild type, homozygous mutant or heterozygous at the beta-2 adrenergic receptor gene allele being tested for herein. In some cases, the purified DNA was quantitated by spectrophotometry.

DNA from the above samples was PCR amplified and detected using SEQ ID NO. 2 and SEQ ID NO. 3 primers with SEQ ID NO. 4 (wild type) and SEQ ID NO. 5 (mutant) probes as prepared in Example 1.

PCR was performed in 1XOH buffer containing 50 mM N,N,-bis[2-Hydroxyethyl] glycine (Bicine), pH 8.1, 150 mM potassium acetate, 0.1 mM ethylene diaminetetra-acetic acid, 0.02 % sodium azide, 0.001 % bovine serum albumin and 8 % (w/v) glycerol. Recombinant *Thermus thermophilus* DNA polymerase was used at a concentration of 5 units/reaction, with dNTPs (dATP, dGTP, dTTP and dCTP) present at a final concentration of 150 µM each. SEQ ID NO. 2 and SEQ ID NO. 3 primers and the SEQ ID NO. 4 wild type probe were used at a concentration of 110 nM each, and the SEQ ID NO. 5 mutant probe was used at a concentration of 50 nM. A final concentration of 3.25 mM manganese chloride was also present in the reaction mixture. The total reaction volume was 0.2 ml, with a sample volume of 20 µl.

Reaction mixtures were amplified in an LCx® Thermal Cycler. Reaction mixtures were first incubated at 97°C for 2 minutes, followed by 45 cycles of PCR amplification at 94°C for 40 seconds, 55°C for 40 seconds then 72°C for 40 seconds. After the reaction mixtures were thermal cycled, the mixtures were maintained at 97°C for 5 minutes and probe oligo hybridization was accomplished by rapidly lowering the temperature to 12°C. Samples were held at 12°C for a minimum of 10 minutes, and thereafter until reaction products were analyzed and detected.

Reaction products were detected on the Abbott LCx® system (available from Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). A suspension of anti-carbazole coated microparticles, an anti-adamantane antibody/alkaline phosphatase conjugate and an anti-dansyl antibody/β-galactosidase conjugate (available from Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) were used in conjunction with the LCx® to capture and detect the reaction products. The enzyme substrates used were 4-methyl-umbelliferyl phosphate (MUP) and 7-β-D-galactopyranosyloxy coumarin-4-acetic acid-(2-hydroxyethyl) amide (AUG) with the rate of conversion of substrate to product measured and reported as counts/second/second (c/s/s).

B. Target DNA Titration DNA from each of the 3 genotypes (homozygous wild type, heterozygous and homozygous mutant), verified by sequencing, was isolated, quantitated and tested by the procedure above using varying amounts of DNA, from 25 ng per reaction to 500 ng per reaction, in the sample.

Data from this experiment is presented in TABLE 1 and shows that the wild type probe detected both the homozygous wild type and heterozygous beta-2 adrenergic receptor genotypes but did not detect the homozygous mutant beta-2 adrenergic receptor genotype as positive. The mutant probe detected both homozygous mutant and heterozygous beta-2 adrenergic receptor genotypes but did not detect the homozygous wild type beta-2 adrenergic receptor genotype as positive. As expected, both probes detected the heterozygous samples since they contain one wild type and one mutant allele. Additionally, the LCx reaction rate of the heterozygous samples was approximately half that of the homozygous samples, since the probe would have only one allele to react with rather than the 2 alleles present in the appropriate homozygous sample. Thus, all probes showed excellent specificity. All positive samples were detectable down to at least 25 ng of DNA per reaction.

TABLE 1

beta-2 Adrenergic Receptor Genotype	LCx® rate (c/s/s) of Wild Type Probe DNA (ng)						
	25	50	100	200	300	400	500
Homozygous wild type	747.3	794.8	819.2	931.4	924.8	882.0	831.5
Heterozygous	438.4	502.9	530.8	497.8	558.8	567.3	529.0
Homozygous mutant	52.5	51.9	56.5	55.9	62.8	82.4	66.7
	LCx® rate (c/s/s) of Mutant Probe DNA (ng)						
	25	50	100	200	300	400	500
Homozygous wild type	46.9	48.7	87.4	59.6	53.2	54.9	54.2
Heterozygous	566.2	662.9	668.1	679.1	746.3	768.6	737.3
Homozygous mutant	964.8	1068.8	1105.9	1128.5	1209.9	1195.7	1206.4

C. Genotype Determination of Unknown Samples The procedure described in A. above was used to determine the beta-2 adrenergic receptor genotype of 20 samples. This result was then compared to that determined by sequencing.

As can be seen in TABLE 2, samples clearly reacted with only the wild type probe (homozygous wild type), only the mutant probe (homozygous mutant) or both probes (heterozygous). These results were verified by sequencing. Thus this method, using these primers and probes in the LCx format, is as accurate for determining the genotype at the beta-2 adrenergic receptor as sequencing, while being easier to perform.

TABLE 2

Sample No.	Wild Type Probe LCx® rate	Mutant Probe LCx® rate	Genotype
1	68.6	1115.5	Homozygous mutant
2	74.9	1118.1	Homozygous mutant
3	67.6	1109.2	Homozygous mutant
4	65.4	1118.0	Homozygous mutant
5	70.4	1173.7	Homozygous mutant
6	68.5	1061.3	Homozygous mutant
7	69.7	1061.6	Homozygous mutant
8	70.3	1083.7	Homozygous mutant
9	70.8	1194.2	Homozygous mutant
10	75.7	1163.6	Homozygous mutant
11	77.4	1166.2	Homozygous mutant
12	597.8	692.2	Heterozygous
13	564.6	675.0	Heterozygous
14	578.6	630.6	Heterozygous
15	637.5	677.1	Heterozygous
16	595.0	685.6	Heterozygous
17	594.1	663.1	Heterozygous
18	963.2	52.6	Homozygous wild type
19	878.6	51.6	Homozygous wild type
20	897.6	50.6	Homozygous wild type

While the invention has been described in detail and with reference to specific embodiments, it will be apparent to one skilled in the art that various changes and modifications may be made to such embodiments without departing from the spirit and scope of the invention.

Claims

What is claimed is:

(1) A composition of matter comprising SEQ ID NO 2 and SEQ ID NO 3.

(2) A composition of matter for detecting a target sequence comprising SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, and a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO 4 and SEQ ID NO 5.

(3) A method of amplifying a β2 adrenergic receptor target sequence comprising the steps of:
   (a) forming a reaction mixture comprising nucleic acid amplification reagents, the composition of matter of claim 1, and a test sample suspected of containing a target sequence; and
   (b) subjecting the mixture to amplification conditions to generate at least one copy of the target sequence.

(4) A method for detecting a target sequence in a test sample comprising the steps of:
   (a) forming a reaction mixture comprising nucleic acid amplification reagents, the composition of matter of claim 1, and a test sample suspected of containing a target sequence;
   (b) subjecting the mixture to amplification conditions to generate at an amplification product;
   (c) hybridizing a probe selected from the group consisting of SEQ ID NO 4 and SEQ ID NO 5 to the amplification product to form a hybrid; and
   (d) detecting the hybrid as an indication of the presence of the target sequence in the test sample.

(5) A kit for amplifying a β2 adrenergic receptor target sequence comprising:
   (a) SEQ ID NO 2 and SEQ ID NO 3; and
   (b) amplification reagents.

(6) The kit of claim 6 further comprising a probe selected from the group consisting of SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, and SEQ ID NO 7.

SEQUENCE LISTING

<110> Abbott Laboratories
Yu, H.
Merchant, B.

<120> BETA2 ANDRENERGIC POLYMORPHISM DETECTION

<130> 6687.PC.01

<150> US 09/542,718
<151> 2000-04-04

<160> 5

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 106
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 1
aacggcagcg ccttcttgct ggcacccaat agaagccatg cgccggacca cgacgtcacg 60
cagcaaaggg acgaggtgtg ggtggtgggc atgggcatcg tcatgt 106

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 2
aacggcagcg ccttcttgc 19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 3
acatgacgat gcccatgcc 19

<210> 4
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 4
caatagaagc catgc 15

<210> 5
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 5
cccaatggaa gcc 13

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/075173 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68, C07K 14/705

(21) International Application Number: PCT/US01/10668

(22) International Filing Date: 3 April 2001 (03.04.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/542,718 4 April 2000 (04.04.2000) US

(71) Applicant: ABBOTT LABORATORIES [US/US]; D377/AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(72) Inventors: YU, Hong; 5356 RFD, Long Grove, IL 60047 (US). MERCHANT, Barbara, T.; 3101 Hill Lane, Wilmette, IL 60091 (US).

(74) Agents: YASGER, Paul, D. et al.; D377/AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-6050 (US).

(81) Designated States *(national)*: CA, JP.

(84) Designated States *(regional)*: European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
9 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/075173 A3

(54) Title: β 2 ADRENERGIC POLYMORPHISM DETECTION

(57) Abstract: Nucleic acid sequences are provided that are useful as amplification primers and hybridization probes for amplifying and detecting target sequence from the β2 adrenergic receptor gene. The primers and probes can be employed in amplification based methods for detecting the presence of the target sequence in a test sample.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/10668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 C07K14/705

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)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIMA JOHN J ET AL: "Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics." CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, vol. 65, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 519-525, XP008008579 ISSN: 0009-9236 page 521, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1 --- -/--	1-6

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2002	11/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mata Vicente, T.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/10668

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AYNACIOGLU A S ET AL: "Population frequency, mutation linkage and analytical methodology for the Arg16Gly, Gln27Glu and Thr164Ile polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor among Turks." BRITISH JOURNAL OF CLINICAL PHARMACOLOGY, vol. 48, no. 5, November 1999 (1999-11), pages 761-764, XP002215090 ISSN: 0306-5251 Primer AB3 page 762, left-hand column, paragraph 3 ---	1-6
A	JIA HAIYAN ET AL: "beta2-Adrenoceptor gene polymorphisms and blood pressure variations in East Anglian Caucasians." JOURNAL OF HYPERTENSION, vol. 18, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 687-693, XP008008578 ISSN: 0263-6352 (Upstream primer) page 688, right-hand column, paragraph 4 ---	1-6
A	WO 98 39477 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 11 September 1998 (1998-09-11) SEQ ID NO:4 -----	1-6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/10668

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9839477 A	11-09-1998	US 6156503 A	05-12-2000
		EP 0968308 A2	05-01-2000
		JP 2001513649 T	04-09-2001
		WO 9839477 A2	11-09-1998
		US 2002119474 A1	29-08-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(74)代理人 100117053
弁理士 相馬 貴昌
(72)発明者 ユイ，ホン
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４７、ロング・グローブ、アール・エフ・デイー・５３５６
(72)発明者 マーチヤント，バーバラ・テイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００９１、ウイルメツト、ヒル・レーン・３１０１

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA02 CA09 CA20 HA12
4B063 QA01 QA12 QQ03 QQ15 QQ43 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34
QX01