

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6553598号
(P6553598)

(45) 発行日 令和1年7月31日 (2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日 (2019.7.12)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10 Z N A Z
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806 Z
C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6827 Z
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876 Z

請求項の数 9 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2016-521352 (P2016-521352)	(73) 特許権者	591003013
(86) (22) 出願日	平成26年11月25日 (2014.11.25)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(65) 公表番号	特表2016-539624 (P2016-539624A)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(43) 公表日	平成28年12月22日 (2016.12.22)		E AKTIENGESSELLSCHAF
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/075460		T
(87) 国際公開番号	W02015/078831		スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
(87) 国際公開日	平成27年6月4日 (2015.6.4)		グレンツァーヘルストラッセ１２４
審査請求日	平成29年11月13日 (2017.11.13)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	61/909,587		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成25年11月27日 (2013.11.27)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 混合物から変異された核酸の富化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸の変異体の富化方法であって、前記核酸は単一のヌクレオチド位置で異なる、２種の変異体配列の形で存在し；

前記標的核酸を含むサンプルを提供し、ここで富化されるべき変異体が大過剰の他の変異体中に低存在量でサンプルに存在し；

標的核酸に対してモル過剰で存在する濃度で標的核酸の一方の鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを提供し、ここで前記オリゴヌクレオチドは、親和性標的により結合され、そして、富化されるべき変異体と、単一のヌクレオチド位置で完全に一致し、そして他の変異体とは、単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し；

標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのために適切な条件を提供し、前記オリゴヌクレオチド及び前記標的核酸の何れかの変異体の一本鎖から成る二本鎖ポリヌクレオチドを形成させ；

前記二本鎖ポリヌクレオチドと、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドのみに対して選択的に結合するミスマッチ層間化合物とを接触させ、ここで前記化合物がさらに、前記ミスマッチ部位で前記二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の切断を光により触媒することができ；

前記二本鎖ポリヌクレオチドを光に供し、切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドを得；

切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドを、そのオリゴヌクレオチド上の

親和性標識を認識し、そしてそれに結合する親和性マトリックスに適用し；

切断された二本鎖ポリヌクレオチドのみが変性される条件を提供し、そして親和性マトリックスから前記変性された一本鎖を除去し；そして、

未切断ポリヌクレオチド二本鎖を変性する条件下で緩衝液を提供し、そして標的核酸の富化された変異体の一本鎖を含む緩衝液を回収すること、
を含み、

ミスマッチ層間化合物が、図 1 に示される、 $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 、又は $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ (ここで、N は窒素を示し、Rh はロジウムを示し、 R_1 、 R_2 及び R_3 は各々独立に、水素、アルキル、アリール、固体支持体、親和性標識に結合したリンカーからなる群より選ばれる) である、方法。

10

【請求項 2】

前記富化されるべき変異体の変異対立遺伝子であり、前記他の変体が野生型対立遺伝子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記変異対立遺伝子の変異 E G F R 対立遺伝子であり、前記野生型対立遺伝子が野生型 E G F R 対立遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記変異対立遺伝子を増幅し、そして検出する工程をさらに含む、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

20

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸の変異対立遺伝子の検出方法であって、前記変異対立遺伝子が単一のヌクレオチド位置で野生型対立遺伝子とは異なり、そして大過剰の野生型対立遺伝子中に低存在量でサンプルに存在し；

前記サンプル中の変異対立遺伝子を富化し、ここで前記富化が、

標的核酸に対してモル過剰で存在する濃度で標的核酸の一方の鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを提供し、ここが前記オリゴヌクレオチドは、親和性標的により結合され、そして、変異対立遺伝子と、単一のヌクレオチド位置で完全に一致し、そして野生型対立遺伝子とは、単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し；

標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのために適切な条件を提供し、前記オリゴヌクレオチド及び前記変異対立遺伝子又は野生型対立遺伝子の何れかの一本鎖から成る二本鎖ポリヌクレオチドを形成させ；

30

前記二本鎖ポリヌクレオチドと、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドのみに対して結合することができるミスマッチ層間化合物とを接触させ、ここで前記化合物がさらに、前記ミスマッチ部位で前記二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の切断を光により触媒することができ；

前記二本鎖ポリヌクレオチドを光に給し、切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドを得；

切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドを、そのオリゴヌクレオチド上の親和性標識を認識し、そしてそれに結合する親和性マトリックスに適用し；

切断された二本鎖ポリヌクレオチドのみが変性される条件を提供し、そして親和性マトリックスから前記野生型対立遺伝子の変性された一本鎖を除去し；

40

未切断ポリヌクレオチド二本鎖を変性する条件下で緩衝液を提供し；そして標的核酸の富化された変異対立遺伝子的一本鎖を含む緩衝液を回収すること
により実施され；そして、

富化された変異対立遺伝子の生成物、又はその増幅された富化変異対立遺伝子から生成されるシグナルを検出すること、
を含み、

ミスマッチ層間化合物が、図 1 に示される、 $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 、又は $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ (ここで、N は窒素を示し、Rh はロジウムを示し、 R_1 、 R_2 及び R_3 は各々独立に、水素、アルキル、アリール、固体支持体、親和性

50

標識に結合したリンカーからなる群より選ばれる)である、方法。

【請求項 6】

前記変異対立遺伝子の変異 E G F R 対立遺伝子であり、そして前記野生型対立遺伝子が野生型 E G F R 対立遺伝子である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記増幅工程が、対立遺伝子特異的プライマーにより実施される、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸の変異体を富化するための反応混合物であって、

前記標的核酸の一方の鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチド、ここで前記標的核酸は、単一のヌクレオチド位置で異なる 2 種の変異体配列の形で存在し、前記オリゴヌクレオチドは、親和性標識により結合され、そして、富化されるべき変異体と、単一のヌクレオチド位置で完全に一致し、そして他の変異体と単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し；及び

ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに対して選択的に結合するミスマッチ層間化合物、ここで前記化合物はさらに、光により前記ミスマッチ部位で二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の切断を触媒することができ、前記ミスマッチ層間化合物が図 1 に示される $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 、又は $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ (ここで、N は窒素を示し、Rh はロジウムを示し、 R_1 、 R_2 及び R_3 は各々独立に、水素、アルキル、アリール、固体支持体、親和性標識に結合したリンカーからなる群より選ばれる)である、

を含む、反応混合物。

【請求項 9】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸の変異体を富化するためのキットであって、前記標的核酸の一方の鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチド、ここで前記標的核酸は、単一のヌクレオチド位置で異なる 2 種の変異体配列の形で存在し、前記オリゴヌクレオチドは、親和性標識により結合され、そして、富化されるべき変異体と、単一のヌクレオチド位置で完全に一致し、そして他の変異体と単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し；及び

ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに対して選択的に結合するミスマッチ層間化合物、ここで前記化合物はさらに、光により前記ミスマッチ部位で二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の切断を触媒することができ、前記ミスマッチ層間化合物が図 1 に示される $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 、又は $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ (ここで、N は窒素を示し、Rh はロジウムを示し、 R_1 、 R_2 及び R_3 は各々独立に、水素、アルキル、アリール、固体支持体、親和性標識に結合したリンカーからなる群より選ばれる)である、

を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、核酸化学及び核酸増幅の分野に関する。特に、本発明は、核酸における塩基対ミスマッチを検出できる化合物及び方法を用いての低量変異標的核酸の富化に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ほとんどのヒト遺伝性疾患及び癌は、核遺伝子の突然変異により引起されることが知られている。一般的に、突然変異は、遺伝子座での特定の多型変異体であると思われる。突然変異は、しばしば点突然変異とも呼ばれる、単一のヌクレオチド差異であり得る。細胞

10

20

30

40

50

及び組織レベルで、特定の遺伝子座での多型現象は、有意に変更された細胞挙動性を生じさせる可能性がある。しかしながら、比較的小さな細胞又は組織サンプルは、特定の遺伝子座を含む、数百万又は数十億のDNAを含むので、遺伝子座での多型変異体の範囲及び頻度の表示は、非常に低い頻度で潜在的に存在する対立遺伝子を検出する必要がある。ほとんどの場合、生物学的サンプルからの希突然変異の存在の検出は、莫大な過剰量の野生型DNAの同時存在のために、多大な課題を提供する。

【0003】

従って、低コピー変異体DNAの存在が増幅反応、例えばPCRの実施に従って検出できるよう、それらの低コピー変異体DNAを、選択的に及び正確に富化するための方法が、当業界において必要とされる。

【発明の概要】

【0004】

発明の要約

本発明は、サンプル中の低量の対立遺伝子（例えば、変異体DNA）を富化し、そのような対立遺伝子の続く検出を可能にするための方法に向けられる。第1の側面によれば、本発明は、サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸の変異体の富化方法に関し、前記核酸は単一のヌクレオチド位置で異なる、2種の変異体配列の形で存在し、ここで前記方法は、前記標的核酸を含むサンプルを提供し、ここで富化されるべき変異体が大過剰の他の変異体の中で低存在量でサンプルに存在し；標的核酸に対してモル過剰で存在する濃度で標的核酸の一方の鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを提供し、ここが前記オリゴヌクレオチドは、親和性標的により結合され、そして好ましくは、富化されるべき変異体と、単一のヌクレオチド位置で一致し、そして他の変異体とは、単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し；標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのために適切な条件を提供し、前記オリゴヌクレオチド及び前記標的核酸の何れかの変異体の一本鎖から成る二本鎖ポリヌクレオチドを生成し；前記二本鎖ポリヌクレオチドと、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドのみに対して選択的に結合するミスマッチ層間化合物とを接触させ、ここで前記化合物がさらに、前記ミスマッチ部位で前記二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の切断を光により触媒することができ；前記二本鎖ポリヌクレオチドを光に供し、切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドをもたらす；切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドを、そのオリゴヌクレオチド上の親和性標識を認識し、そしてそれに結合する親和性マトリックスに適用し；切断された二本鎖ポリヌクレオチドのみが変性される条件を提供し、そして親和性マトリックスから前記変性された一本鎖を除去し；そして未切断ポリヌクレオチド二本鎖を変性する条件下で緩衝液を提供し；そして標的核酸の富化された変異体の一本鎖を含む緩衝液を集めることを含んで成る。1つの実施形態によれば、前記ミスマッチ層間化合物は、 $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 、 $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ 、又はそれらのそれぞれの類似体である。別の実施形態によれば、本発明は、標的核酸の富化された変異体を増幅し、そして検出する追加の工程に関する。

【0005】

第2の側面によれば、本発明は、サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸の変異対立遺伝子の検出方法に関し、前記変異対立遺伝子が単一のヌクレオチド位置で野生型対立遺伝子とは異なり、そして大過剰の野生型対立遺伝子の中で低存在量でサンプルに存在し、ここで前記方法は、前記サンプル中の変異対立遺伝子を富化し、ここで前記富化が、標的核酸に対してモル過剰で存在する濃度で標的核酸の一方の鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを提供し、ここが前記オリゴヌクレオチドは、親和性標的により結合され、そして、変異対立遺伝子と、単一のヌクレオチド位置で完全に一致し、そして野生型対立遺伝子とは、単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し；標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのために適切な条件を提供し、前記オリゴヌクレオチド及び前記変異対立遺伝子又は野生型対立遺伝子の何れか的一本鎖から成る二本鎖ポリヌクレオチドを生成し；前記二本鎖ポリヌクレオチドと、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドのみに対して結合することができる mismatch 層間化合物とを接触させ、ここで前記化合物がさらに、前記 mismatch 部位で前記二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖の切断を光により触媒することができ；前記二本鎖ポリヌクレオチドを光に供し、切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドをもたらす；切断された及び未切断の両二本鎖オリゴヌクレオチドを、そのオリゴヌクレオチド上の親和性標識を認識し、そしてそれに結合する親和性マトリックスに適用し；切断された二本鎖ポリヌクレオチドのみが変性される条件を提供し、そして親和性マトリックスから前記野生型対立遺伝子の変性された一本鎖を除去し；未切断ポリヌクレオチド二本鎖を変性する条件下で緩衝液を提供し；そして標的核酸の富化された変異対立遺伝子的一本鎖を含む緩衝液を集めることにより実施され；富化された変異対立遺伝子の生成物、又はその増幅された富化変異対立遺伝子から生成されるシグナルを検出することを含んで成る。1つの実施形態によれば、前記 mismatch 層間化合物は、 $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 、 $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ 、又はそれらのそれぞれの類似体である。

10

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、ロジウム系インターカレーター、 $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ （左側）、及び $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ （右側）の構造を示し、ここでNは窒素を表し、Rhはロジウムを表し、そして R_1 、 R_2 及び R_3 は水素、アルキル、アリール、固体支持体、及び親和性標識により結合されるリンカーから成る群から独立して選択される。

20

【図2】図2は、変異対立遺伝子的一本鎖の富化のための本発明の方法のグラフ的表示を示す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

定義

特にことわらない限り、本明細書において使用される全ての技術的及び科学的用語は、当業者により通常理解される意味を有する。次の参考文献は、本発明で使用される用語の多くの一般的定義を、当業者に提供する：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 及びHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書において使用される場合、次の用語は、特にことわらない限り、それらに与えられた意味を有する。

30

【0008】

用語「核酸(nucleic acid)」とは、直鎖状又は分岐鎖状の様式で一緒に共有結合されるヌクレオチドを含む、ヌクレオチドのポリマー（例えば、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、等）を言及し、そしてデオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、DNA-RNAハイブリッド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、アプタマー、ペプチド核酸(PNA)、PNA-DNA接合体、PNA-RNA接合体、等を包含する。核酸は典型的には、一本鎖又は二本鎖であり、そして一般的には、ホスホジエステル結合を含むが、但しある場合、別の主鎖、例えばホスホルアミド(Beaucage et al. (1993), Tetrahedron 49(10):1925)、ホスホロチオエート(Mag et al. (1991), Nucleic Acids Res. 19:1437; 及び米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート(Briu et al. (1989), J. Am. Chem. Soc. 111:2321)、O-メチルホスホルアミダイト結合(Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992)を参照のこと)、及びペプチド核酸主鎖及び結合(Egholm (1992), J. Am. Chem. Soc. 114:1895を参照のこと)を有することができる核酸類似体が包含される。他の類似体核酸は、正に荷電された主鎖(Denpcy et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097); 非イオン性主鎖(米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141

40

50

号及び第 4, 469, 863 号) 及び非リボース主鎖を有するそれら、例えば米国特許第 5, 235, 033 号及び第 5, 034, 506 号に記載されたそれらを包含する。1 又は 2 以上の炭素環式糖を含む核酸もまた、核酸の定義内に包含され (Jenkins et al. (1995), Chem. Soc. Rev. pp. 169-176 を参照のこと)、そして類似体はまた、例えば Rawls, C & E News Jun. 2, 1997, 35 頁に記載されている。リボース - リン酸主鎖の修飾は、追加の部分、例えば標識の付加を促進するか、又は生理学的環境下でそのような安定性及び半減期を変えるために行われ得る。

【0009】

核酸に、典型的には見出される天然に存在する複素環式塩基 (例えば、アデニン、グアニン、チミン、シストシン、及びウラシル) の他に、ヌクレオチド類似体はまた、天然に存在しない複素環式塩基、例えば、Seela et al. (1999), Helv. Chim. Acta 82:1640 に記載されるそれらも包含することができる。ヌクレオチド類似体に使用される特定の塩基は、融点 (T_m) モディファイアとして作用する。例えば、それらのいくつかは、7 - デアザプリン (例えば、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、等)、ピラゾロ [3, 4 - d] ピリミジン、プロピニル - dN (例えば、プロピニル - dU、プロピニル - dC、等)、及び同等のものを包含する。例えば、米国特許第 5, 990, 303 号を参照のこと。他の代表的な複素環式塩基は、例えば次のものを包含する：ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン；2 - アミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシン及びキサンチンの 8 - アザ誘導体；アデニン、グアニン、2 - アミノプリン、2, 6 - ジアミノプリン、2 - アミノ - 6 - クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシン及びキサンチンの 7 - デアザ - 8 - アザ誘導体；6 - アザシチジン；5 - フルオロシチジン；5 - クロロシチジン；5 - ヨードシチジン；5 - プロモシチジン；5 - メチルシチジン；5 - プロピニルシチジン；5 - プロモビニルウラシル；5 - フルオロウラシル；5 - クロロウラシル；5 - ヨードウラシル；5 - プロモウラシル；5 - トリフルオロメチルウラシル；5 - メトキシウラシル；5 - エチニルウラシル；5 - プロピニルウラシル、及び同等のもの。

【0010】

「ヌクレオシド (nucleoside)」とは、糖部分 (リボース糖又はデオキシリボース糖)、糖部分の誘導体、又は糖部分の機能的同等物 (例えば、炭素環) に対して共有結合される塩基又は塩基性基 (少なくとも 1 つの炭素環、少なくとも 1 つの複素環、少なくとも 1 つのアリール基、及び / 又は同様のものを包含する) を含む核酸成分を意味する。例えば、ヌクレオシドが糖部分を含む場合、塩基は典型的には、糖部分の 1 - 位置に結合される。上記のように、塩基は、天然に存在する塩基又は天然に存在しない塩基であり得る。典型的にヌクレオシドは、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド、ジデオキシリボヌクレオシド及び炭素環ヌクレオシドを包含する。

【0011】

「ヌクレオチド (nucleotide)」とは、ヌクレオシドのエステル、例えばヌクレオシドの糖部分の 5 - 位置に共有結合される、1, 2, 3 又はそれ以上のリン酸基を有するヌクレオシドのリン酸エステルを言及する。

【0012】

用語「ポリヌクレオチド (polynucleotide)」及び「オリゴヌクレオチド (oligonucleotide)」は、交換可能的に使用される。「オリゴヌクレオチド」は、より短いポリヌクレオチドを記載するために時々使用される用語である。オリゴヌクレオチドは、指定されたヌクレオチド配列の領域に対応する、少なくとも 6 個のヌクレオチド、例えば少なくとも約 10 ~ 12 個のヌクレオチド、又は少なくとも約 15 ~ 30 個のヌクレオチドを含んでも良い。

【0013】

用語「標的核酸配列の変異体を富化する (enriching a variant of a target nucleic acid sequence)」とは、標的核酸配列の所望する変異体の量を高めること、及びサンプル中の所望しない変異体に対する所望の変異体の比率を高めることを意味する。一般的に

10

20

30

40

50

、富化されるべき所望の変異体は、所望しない変異体よりも、核酸サンプルにおいてあまり優勢的ではなく、そして標的核酸配列の全ての変異体の合計量の50%未満を構成する。多くの場合、所望する変異体は、変異対立遺伝子を意味し、そして所望しない変異体は野生型対立遺伝子を意味する。

【0014】

用語「野生型(wild type)」とは、本明細書において使用される場合、天然に存在する源から単離される場合、その遺伝子又は対立遺伝子の特性を有する遺伝子又は対立遺伝子を意味する。野生型遺伝子又は野生型対立遺伝子とは、集団において、最も頻繁には観察され、そして遺伝子又は対立遺伝子の「正常」又は「野生型」として任意には企画されるものである。

10

【0015】

対照的には、用語「変異体(mutant)」又は「突然変異誘発された(mutated)」とは、野生型遺伝子又は対立遺伝子に比較される場合、配列において修飾を示す遺伝子又は対立遺伝子を意味する。用語「突然変異(mutation)」とは、正常(変更されていない)又は野生型配列から分化されるような変異体の形成をもたらす、通常保存された核酸配列のヌクレオチドの配列の変化を意味する。突然変異は一般的に、2種の一般的クラス、すなわち後者は、1~いくつかのヌクレオチド対の挿入又は欠失を伴う。

【0016】

用語「対立遺伝子(allele)」とは、わずか1個又は数個の塩基により異なる2種の配列を意味する。

20

【0017】

用語「ミスマッチ(mismatch)DNA又は「ヘテロ二本鎖(heteroduplex)」DNAとは、1又は2以上のミスマッチ塩基対を含むDNAを意味する。ミスマッチ塩基対は、DNA二重鎖の場合、水素結合された塩基対、TとA又はGとCの対の1つを形成することができない、反対側の塩基の特定対を意味する。ヘテロ二重鎖DNAは、反対側の鎖に比較して、1つの鎖における挿入又は欠失のために、1つの鎖における1又は2以上の塩基が反対側の鎖における塩基を補充するか又は補充していない二本鎖DNA、及び何れかの鎖中の1又は2以上の塩基が反対側の塩基を有するか又は有さない二本鎖DNAを包含する。対照的に、ホモ二本鎖DNAとは、各鎖が他の鎖の完全な補体であり、そして各塩基が反対側の塩基と水素結合された塩基対を形成する二本鎖DNAを意味する。

30

【0018】

用語「分子結合パートナー(molecular binding partners)」及び「特異的結合パートナー(specific binding partners)」とは、特異的結合を示す、分子対、典型的には、生体分子対を意味する。非制限的側として、受容体及びリガンド、抗体及び抗原、ビオチン及びアビジン、及びビオチン及びストレプトアビジンを挙げることができる。分子結合パートナーはまた、下記に定義されるような、「親和性標識(affinity label)」と「親和性マトリックス(affinity matrix)」との間の結合により表され得る。

【0019】

「親和性(affinity)」標識とは、その分子結合パートナーに対して特異的に結合する分子である。結合は、共有又は非共有(例えば、イオン、水素、等)結合を介してであり得る。本明細書において使用される場合、親和性標識、例えばビオチンは、親和性マトリックス、例えばストレプトアビジン被覆のビーズ又は粒子に対して選択的に結合することができる。親和性標識は、オリゴヌクレオチドの3'末端、5'又は内部位置に結合され得る。

40

【0020】

「親和性マトリックス(affinity matrix)」とは、本明細書において使用される場合、その分子結合パートナーに対して特異的に結合できる、固体支持体又は固体マトリックス(例えば、磁気ラテックス粒子、ガラスビーズ)の表面に結合される分子を言及する。結合は、共有又は非共有結合を介してであり得る。本明細書において使用される場合、親和性マトリックス、例えばストレプトアビジン被覆の磁気ラテックス粒子は、親和性標識、

50

例えばビオチンに対して、選択的に結合することができる。

【0021】

「アルキル基 (alkyl group)」とは、線状、分岐状、又は環状飽和炭化水素部分を言及し、そして全ての位置異性体、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、1 - メチルプロピル、2 - メチルプロピル、1, 1 - ジメチルエチル、ペンチル、1 - メチルブチル、2 - メチルブチル、3 - メチルブチル、2, 2 - ジメチルプロピル、1 - エチルプロピル、ヘキシル、1, 1 - ジメチルプロピル、1, 2 - ジメチルプロピル、1 - メチルペンチル、2 - メチルペンチル、3 - メチルペンチル、4 - メチルペンチル、1, 1 - ジメチルブチル、1, 2 - ジメチルブチル、1, 3 - ジメチルブチル、2, 2 - ジメチルブチル、2, 3 - ジメチルブチル、3, 3 - ジメチルブチル、1 - メチルブチル、2 - メチルブチル、1, 1, 2 - トリメチルプロピル、1, 2, 2 - トリメチルプロピル、1 - エチル - 1 - メチルプロピル及び1 - エチル - 2 - メチルプロピル、n - ヘキシル、シクロヘキシル、n - ヘプチル、n - オクチル、2 - エチルヘキシル、n - ノニル、n - デシル、及び同様のものを包含する。アルキル基は典型的には、約1 - 20個の炭素原子を含み、そしてより典型的には、約2 - 15個の炭素原子を含む。アルキル基は、置換されるか、又は非置換され得る。

10

【0022】

「アリール基 (aryl group)」とは、芳香族化合物に由来する原子又は部分の置換基を言及する。典型的なアリール基は、例えばフェニル基、又は同様のものを包含する。アリール基は任意には、複数の芳香族環 (例えば、ジフェニル基、等) を包含する。さらに、アリール基は、置換されるか、又は非置換され得る。

20

【0023】

「PCR増幅 (PCR amplification)」又は単純に、「PCR」とは、核酸配列に対する多数の補体を生成するための鋳型としての核酸配列の使用を包含するポリメラーゼ鎖反応を意味する。鋳型は、鋳型配列の一部に対して相補的な配列を有するプライマーにハイブリダイズされ得、そしてdNTP及びポリメラーゼ酵素を含む適切な反応混合物と接触され得る。プライマーは、元の鋳型に対して相補的な核酸を生成するポリメラーゼ酵素により伸長される。二本鎖核酸分子の両鎖の増幅のためには、2つのプライマーが使用され、それらの個々は、1つの核酸鎖の一部に対して相補的である配列を有することができる。核酸分子の鎖は、例えば加熱により変性され、そしてその工程が、今度は、続く工程において鋳型として作用する前の工程の新しく合成された鎖により反復される。PCR増幅プロトコルは、十分な量の標的核酸を生成するために、変性ハイブリダイゼーション及び伸長反応の少数～多数のサイクルを包含することができる。

30

【0024】

用語「対立遺伝子 - 特異的プライマー (allele-specific primer)」又は「ASプライマー (AS primer)」とは、標的配列の2つ以上の変異体に対してハイブリダイズするが、標的配列の変異体間を区別できるプライマーのことであり、ここで前記変異体の1つによってのみ、プライマーは適切な条件下で核酸ポリメラーゼにより効果的に延長される。標的配列の他の変異体によれば、その延長は低効率の又は非効率である。

【0025】

用語「共通プライマー (common primer)」とは、対立遺伝子特異的プライマーを含むプライマー対における第二プライマーのことである。共通プライマーは、対立遺伝子特異的ではなく、すなわち対立遺伝子特異的プライマーが区別する標的配列の変異体間を区別しない。

40

【0026】

用語「相補的 (complementary)」又は「相補性 (complementarity)」は、ワトソン - クリック塩基対規則により関連するポリヌクレオチドの逆平行鎖に関連して使用される。用語「完全に相補的」(perfectly complementary)又は「100%相補的」(100% complementary)とは、逆平行鎖間のすべての塩基のワトソン - クリック対を有する相補的配列のことであり、すなわちポリヌクレオチド二重鎖における任意の2つの塩基間にミ

50

スマッチは存在しない。しかしながら、二重鎖は、完全な相補性の不在下でさえ、逆平行鎖間で形成される。用語「部分的に相補的」(partially complementary)又は「不完全に相補的」(incompletely complementary)とは、100%未満、完全である逆平行ポリヌクレオチド鎖間の塩基の任意の配置のことである(例えば、ポリヌクレオチド二重鎖に少なくとも1つのミスマッチ又はマッチしない塩基が存在する)。部分的に相補的な鎖間の二重鎖は一般的に、完全に相補的な鎖間の二重鎖よりも低い安定性を有する。

【0027】

用語「サンプル(sample)」とは、核酸を含むか又は含むと推定される任意の組成物のことである。これは、個人から単離された組織又は体液、例えば皮膚、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、滑液、尿、涙、血液細胞、器官及び腫瘍のサンプル、並びに、ホルマリン

10

【0028】

用語「一次配列(primary sequence)」とは、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドにおけるヌクレオチドの配列のことである。ヌクレオチド修飾、例えば窒素含有塩基修飾、糖修飾又は他のバックボーン修飾は、一次配列の一部ではない。標識、例えばオリゴヌクレオチドに接合される発色団(chromophore)もまた、一次配列の一部ではない。従って、2つのオリゴヌクレオチドは、同じ一次配列を共有することができるが、修飾及び標識に関しては異なることができる。

20

【0029】

用語「プライマー(primer)」とは、標的核酸における配列とハイブリダイズし、そして核酸の相補鎖に沿って合成の開始点として、そのような合成のために適切な条件下で作用することができるオリゴヌクレオチドのことである。本明細書において使用される場合、用語「プローブ(probe)」とは、標的核酸における配列とハイブリダイズし、そして通常、検出可能に標識されるオリゴヌクレオチドのことである。プローブは、修飾、例えば核酸ポリメラーゼによってプローブを延長できなくさせる修飾、及び1つ又は2つ以上の発色団を有することができる。同じ配列を有するオリゴヌクレオチドは、1つのアッセイにおけるプライマーとして、及び異なったアッセイにおけるプローブとして作用することができる。

30

【0030】

本明細書において使用される場合、用語(「標的配列(target sequence)」、「標的核酸(target nucleic acid)」又は「標的(target)」)とは、増幅されるか、検出されるか、又はその両者がなされる核酸配列の一部を言及する。

【0031】

用語「ハイブリダイズされる(hybridized)」及び「ハイブリダイゼーション(hybridization)」とは、二重鎖の形成をもたらす、2つの核酸間の塩基対合相互作用のことである。2種の核酸は、ハイブリダイゼーション及び鎖伸長を達成するために、それらの全長にわたって100%の相補性を有することは必要条件ではない。

【0032】

40

用語「選択的ハイブリダイゼーション(selective hybridization)」及び「特異的ハイブリダイゼーション(specific hybridization)」とは、他の核酸もまた存在する複合混合物に存在する特定の核酸に対する、主に(ハイブリダイズする分子の50%又はそれ以上)、又はほぼ独占的に(ハイブリダイズする分子の90%又はそれ以上に)、核酸のハイブリダイゼーションを意味する。例えば、典型的なPCR条件下で、プライマーは、溶液にまた存在する非標的核酸の排除のために、標的核酸に対して特異的にハイブリダイズする。特異的にハイブリダイズされたプライマーは、少なくとも優勢的な増幅生成物であり、そして好ましくは、ほぼ独占的な(例えば、サンプル中のすべての増幅生成物の90%又はそれ以上を表す)増幅生成物である標的核酸の増幅生成物を生成するために標的核酸の増幅を駆動する。好ましくは、非特異的増幅生成物は、検出され得ないか、又は特

50

異的増幅生成物から容易に区別できるような少量で検出されるかどうかであるような少量で存在する。同様にプローブは、反応混合物にまた存在する非標的核酸の排除のために標的核酸に対して特異的にハイブリダイズする。特異的にハイブリダイズされたプローブは、少なくとも最も優勢的なシグナルであり、そして好ましくは、ほぼ独占的な（例えば、サンプル中のすべての増幅生成物の90%又はそれ以上を表す）シグナルである検出可能シグナルを生成するために、標的核酸の特異的検出を可能にする。

【0033】

高精度と感度を伴って、種々のタイプの癌に関連する希体細胞突然変異を検出できる新規方法を開発するための継続的な必要性がある。より感度の高い検出方法についての特定の必要性が、周辺流体、例えば血液、癌及び尿からの癌バイオマーカー検出の分野にある。過去数年の間、血液中の定義される突然変異をモニターすることにより、治療予測、薬剤耐性の開発の治療モニターリング、及び腫瘍力学及び癌再発についての血液ベースの癌バイオマーカー検出の価値を明確に確立して来た多くの研究が公開されている。さらに、周辺生物学的流体からの突然変異検出のための高感度方法は、いつか、癌スクリーニング及び早期癌検出のための「液体生検」アプローチの約束を果たすことができる。

【0034】

希突然変異検出の感度を高めるための多くの方法が、長年にわたって開発されて来た。それらの方法のほとんどは一般的に、対立遺伝子 - 特異的PCR (AS-PCR) と、通常、呼ばれる、PCRの間、プライマー又はプローブベースの識別を使用することにより、変異体と野生型との間の配列ベースの差異の活用 に焦点を当てて来た。それらの方法は、0.1 - 1%の変異体レベルまで成功しているが、しかしさらなる改良が、酵素に基づく制限又はPCR誤差により制限されている。Bert Vogelsteinにより今日まで開発されたデジタルPCRは、希対立遺伝子検出の感度を都合良く高める最も有望な技法となっている。これは、サンプルを、数千のより小さな増幅反応に分割することにより達成される。この方法は、実質的に野生型DNAを希釈し、そして野生型に対する変異体の比率を高める。現在、提案されている別のアプローチは、変異DNAを富化し、そしてそれにより、下流のアッセイにおいて検出の困難性を低減する先行サンプル調製方法を用いることである。

【0035】

PCRは、多くの異なった様式において、所望する配列の性質はバックグラウンドDNAとは有意に異なるが、多量のバックグラウンドDNAの存在下で特定の配列の単一のコピーを、文字通りに容易に検出できる強力な技法である。これは、過剰のヒトゲノムDNAをまた含む生物学的検体から外因性病原性配列の存在を検出しようとする場合の事例である。しかしながら、目的の配列が、希体細胞突然変異の検出の場合に良くあるが、バックグラウンドDNAに存在する配列に、ますます類似するようになる場合、問題がますます課題になっている。一般的に、突然変異状態は、大過剰の野生型配列をまた含むサンプルにおいて決定されるべきである。これは、現在利用できる突然変異検出のための方法は変異配列のために選択的であるが、それらは特異性において絶対的ではなく、そして変異体に対する野生型の比率が上昇するにつれて、野生型DNAから変異体を区別することは、ますます困難になっているので、課題である。

【0036】

本発明に記載される方法は、以下に開示されるように、バルキーロジウム(III)錯体の使用に基かている：米国特許第6,031,098号、第6,306,601号、Nature Protocols 2: 357-371, 2007、ここでBartonなどは、それぞれ、 $Rh(bpy)_2(chrysi)^{3+}$ 又は $Rh(bpy)_2(phzi)^{3+}$ を生成するために、1対のバルキー層間リガンド、5,6-クリセンキノンジイミン(chrysi)及び3,4-ベンゾ[a]フェナジンキノンジイミン(phzi)に基づく2つのファミリーのミスマッチ - 特異的ロジウム - ベースのインターカレーターの合成及び機能を記載している。それらの化合物は、DNA二重鎖内のヌクレオチドミスマッチにより創造される隆起中に選択的にそれ自体を挿入するそれらの能力について知られている。結合機構は、複数のNMR及び結晶学

に基く調査により評価されており、そして結果は顕著であった。結合剤が主要溝からDNA二重鎖に入り、そして塩基対間にインターカレートする従来の層間結合モードとは異なっていて、それらの新規化合物は、DNAのマイナーな溝に入り、バルキー芳香族リガンドを挿入し、そしてミスマッチされた塩基を、主要溝中に取り出す。光活性化に基いて、複合体は、二重鎖内の単一塩基ミスマッチ部位での直接的鎖切断を促進する。部位特異的切断は、ナノモル濃度で明白である。それらのロジウム化合物の使用についてのこれまでの主な焦点は、単一ヌクレオチド多型現象 (SNP) 及び新規化学療法の検出にあった (Boon, EM et al., Methods in Enzymology, 353:506-522, 2002, 米国特許第6,444,661号、米国特許第6,777,405号)。

【0037】

本発明においては、それらのロジウム化合物が、希対立遺伝子 (例えば、希変異対立遺伝子) の富化のために適用されて来た。この研究のために選択される化合物の構造は、図1に示されており、ここでR1、R2、R3は、H、アルキル、アリール又は固相、又は親和性標識を有するリンカー (例えば、ビオチン) であり得る。記載される化合物は、ミスマッチDNA二重鎖に結合し、そして光切断を触媒できることが、これまで示されて来たが、光切断は2本の鎖の1つのみの切断を単にもたらしこともまた、示されている。切断されていない野生型鎖はまだ存在し、そして増幅のための鋳型として機能できるので、これは、変異DNAの富化適用において少なからずとも有用である。

【0038】

本発明の全体的戦略は、図2上にグラフで示されており、そして目的の塩基ミスマッチ領域へのそれらのロジウム錯体化合物の結合する能力を活用し、そして光活性化に基いて、特定のホスホジエステル結合の切断を引起す。ここに記載される方法によれば、標的核酸が野生型対立遺伝子 (センス鎖「WT-S」上に「C」ヌクレオチドを、及びアンチセンス鎖「WT-A S」上に「G」ヌクレオチドを有するものとして図2に示される)、及び変異対立遺伝子 (センス鎖「M-S」上に「T」ヌクレオチドを、及びアンチセンス鎖「M-A S」上に「A」ヌクレオチドを有するものとして示される) の両者を含むサンプルが提供される。

【0039】

次に、富化されるべき変異対立遺伝子の1つの鎖に対応し、そして親和性リガンド (例えば、ビオチン) を含む一本鎖オリゴヌクレオチド (M-A S - ビオチンとして図2に示される) が、サンプル中の標的核酸の量に対して過剰に提供される。(図2は、その3末端上にビオチン標識を有するアンチセンス鎖に対応するオリゴヌクレオチドを示すが、その方法はまた、変異部位以外の任意の位置で結合されるビオチン標識を有する変異対立遺伝子のセンス鎖の配列を有するオリゴヌクレオチドによって実施され得る。) 次に、混合物は、すべての二本鎖サンプルDNAを変性するために、まず加熱され、そして次に、相補的一本鎖のアニールリングを可能にするために、冷却される。M-A S - ビオチンオリゴヌクレオチドは過剰に存在するので、標的核酸のほとんどすべてのセンス鎖 (野生型対立遺伝子、WT-S 及び変異対立遺伝子、M-S の両者) は、オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされるであろう。変異センス鎖二重鎖は好ましくは、一致するが、野生型センス鎖は突然変異の位置で単一の塩基ミスマッチを有するであろう。

【0040】

次に、ロジウム錯体化合物 (「Rh(bpy)₂」として図2に示される) が、混合物に添加される。光活性化に基いて、ミスマッチ - 含有二重鎖がM-A S - ビオチンオリゴヌクレオチド (図2に示されるような) 又は野生型センス鎖、WT-S 上で切断されるが、ところが変異センス鎖、M-S に結合されるM-A S - ビオチンオリゴヌクレオチドを有する二重鎖は、突然変異位置で、完全な一致のために切断されないであろう。オリゴヌクレオチドの親和性部分 (図2においてビオチンとして示される) を用いて、すべてのオリゴヌクレオチド結合配列 (すなわち、野生型及び変異センス鎖) が、固相 (ストレプタビジン被覆固体支持体として図2に示される) 上に捕捉され、そして全ての過剰野生型及び変異アンチセンス鎖が洗浄される。次の工程において、固相が適切な緩衝液に配置され

10

20

30

40

50

、そして温度が、捕捉された野生型センス鎖のみが、切断 - 含有二重鎖の低い溶融温度のために開放されるまで、高められる。次に、これが洗浄され、支持体上に変異センス鎖のみを残す。最終的に、変異センス鎖が、温度又はアルカリ性 pH 溶出工程の何れかにより、緩衝液に回収される。

【 0 0 4 1 】

図 2 は変異センス鎖の富化のためへのアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドの使用を示すと共に、同様に、センス鎖オリゴヌクレオチドが変異アンチセンス鎖の富化のために使用され得る。一般的に、オリゴヌクレオチドのために使用する鎖の選択は、最高の結合親和性を有する、最も熱力学的に不安定化されたミスマッチ部位と共に、ミスマッチ位置へのロジウム錯体化合物の結合親和性に依存する（さらなる詳細については、Jackson, B.A. and Barton, J.K., Biochemistry 39: 6176-6182, 2000を参照のこと）。

10

【 0 0 4 2 】

次の実施例及び図は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は、添付される請求の範囲に示される。修飾が、本発明の精神から逸脱することなく示される手順に従って行われ得ることが理解される。

【 実施例 】

【 0 0 4 3 】

実施例 1 : 一本鎖オリゴヌクレオチドを用いての制御実験

変異オリゴヌクレオチドに完全に一致し、そして野生型オリゴヌクレオチドと 1 塩基一致を有する、親和性標識されたアンチセンス鎖 (AL - AS) オリゴヌクレオチドを用いることにより、センス鎖野生型 (WT - S) オリゴヌクレオチドの存在下でセンス鎖変異 (MU - S) オリゴヌクレオチドを富化するために、次の実験を用いる。オリゴヌクレオチドの配列は次の通りである（ミスマッチ部位は太字である）：

20

【 0 0 4 4 】

【 表 1 】

WT-S: 5'-CGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTT-3' (配列番号 1)

MU-S: 5'-CGTGCAGCTCATCATGCAGCTCATGCCCTT-3' (配列番号 2)

30

AL-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCATGATGAGCTGCACG-Biotin-3' (配列番号 3)

【 0 0 4 5 】

10 μ l の 150 mM グリシン、pH 9.5、2 μ l の 5 M NaCl 及び 55 μ l の水により、反応混合物を調製する。この溶液に、10 μ l の 10 μ M WT - S、10 μ l の 10 μ M MU - S、及び 10 μ l の 50 μ M AL - AS 及び 3 μ l の 100 μ M Rh (bpy)₂ (phzi)³⁺ を添加する。この溶液をボルテックスし、そして室温で 5 分間インキュベートする。（最終濃度：15 μ M のグリシン pH 9.5、100 μ M の NaCl、1 μ M の WT - S、1 μ M の MU - S、5 μ M の AL - AS 及び 3 μ M の Rh (bpy)₂ phzi³⁺）。次に、反応混合物を、365 nm の電球を用いて、30 分間、Stratagene UV Stratalinker 1800 において照射し、ミスマッチを含むセンス - アンチセンス二重鎖の 1 つの鎖を切断する。

40

【 0 0 4 6 】

25 μ l の 10 mg / ml Solulink ストレプトアビジン磁気ビーズの別の溶液を、1 ml の 15 μ M グリシン (pH 9.5) 緩衝液により洗浄し、そしてビーズを、磁石を用いて、上清液から分離する。切断された及び切断されていないオリゴヌクレオチド二重鎖を有する反応混合物を、磁気ビーズペレットに添加し、そして混合する。得られる混合物を、室温で 30 分間インキュベートする。その後、その溶液を、60 に、又は切断された

50

AL - AS 鎖に結合される切断されていない WT - S 鎖（又は切断されていない AL - AS 鎖に結合される切断された WT - S 鎖）の決定された溶液温度に加熱し、磁氣的に分離し、そして上清液を除去し、その結果、切断されていない MU - S 鎖のみが磁気ビーズ上の切断されていない AL - AS 鎖にまだ結合されている。MU - S 鎖を、100 μ l の 20 μ M の NaOH により磁気ビーズを処理し、溶液を磁氣的に分離し、そしてさらなる分析のために、上清液を試験管中にデカントすることにより除去する。

【0047】

実施例 2：二本鎖オリゴヌクレオチドを用いて制御実験

MU - AS オリゴヌクレオチドに対して同一の配列を有し、そして WT - AS オリゴヌクレオチドと 1 塩基一致を有する、親和性標識されたアンチセンス鎖（AL - AS）オリゴヌクレオチドを用いることにより、センス鎖野生型（WT - S）オリゴヌクレオチド、アンチセンス鎖野生型（WT - AS）オリゴヌクレオチド及びアンチセンス鎖変異（WT - AS）オリゴヌクレオチドの存在下でセンス鎖変異（MU - S）オリゴヌクレオチドを富化するために、次の実験を用いる。オリゴヌクレオチドの配列は次の通りである（ミスマッチ部位は太字である）：

【0048】

【表 2】

WT-S: 5'-CGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCTT-3' (配列番号 1)

WT-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCGTGATGAGCTGCACG-3' (配列番号 4)

MU-S: 5'-CGTGCAGCTCATCATGCAGCTCATGCCCTT-3' (配列番号 2)

MU-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCATGATGAGCTGCACG-3' (配列番号 5)

AL-AS: 5'-AAGGGCATGAGCTGCATGATGAGCTGCACG-Biotin-3' (配列番号 3)

【0049】

反応混合物を、10 μ l の 150 mM グリシン pH 9.5 及び 57 μ l の水により調製する。この溶液に、10 μ M の WT - S 及び WT - AS の混合物 10 μ l、10 μ M の MU - S 及び MU - AS の混合物 10 μ l、及び 10 μ l の 100 μ M の AL - AS を添加する。得られる溶液を、95 °C で 5 分間インキュベートし、二本鎖オリゴヌクレオチドを一本鎖に解離し、そして次に、その溶液を室温に冷却し、一本鎖オリゴヌクレオチドの再アニーリングを可能にする。3 μ l の 100 μ l の Rh (bpy)₂phzi³⁺ を、溶液に添加し、その溶液をボルテックスし、そして室温で 5 分間インキュベートする。（最終濃度：15 μ M のグリシン pH 9.5、1 μ M の WT - S、1 μ M の WT - AS、1 μ M の MU - S、1 μ M の MU - AS、10 μ M の AL - AS 及び 3 μ M の Rh (bpy)₂phzi³⁺）。次に、反応混合物を、365 nm の電球を用いて、15 分間、Stratagene UV Stratalinker 1800において照射し、ミスマッチを含むセンス - アンチセンス二重鎖の 1 つの鎖を切断する。10 倍濃度過剰の AL - AS オリゴヌクレオチドは、MU - S 鎖のほとんどが MU - AS 鎖よりもむしろ AL - AS に結合する確率を高めるよう作用する。

【0050】

50 μ l の 10 mg / ml Solulink ストレプトタビジン磁気ビーズの別の溶液を、1 ml の 15 μ M グリシン (pH 9.5) 緩衝液により洗浄し、そしてビーズを、磁石を用いて、上清液から分離する。切断された及び切断されていないオリゴヌクレオチド二重鎖を

有する反応混合物を、磁気ビーズペレットに添加し、そして混合する。得られる混合物を、室温で30分間インキュベートする。その後、その溶液を、60℃に、又は切断されたAL-AS鎖に結合される切断されていないWT-S鎖（又は切断されていないAL-AS鎖に結合される切断されたWT-S鎖）の決定された溶液温度に加熱し、磁氣的に分離する。全てのWT-AS、MU-AS及びWT-S鎖を上清液により除去し、その結果、切断されていないMU-S鎖のみが磁気ビーズ上の切断されていないAL-AS鎖にまだ結合されている。MU-S鎖を、100µlの20µMのNaOHにより磁気ビーズを処理し、溶液を磁氣的に分離し、そしてさらなる分析のために、上清液を試験管中にデカントすることにより除去する。

【0051】

10

実施例3：EGFR変異DNAの富化及び検出

核酸、例えばヒトゲノムDNAの混合物が抽出され得るサンプルを供給する。サンプルは、組織、例えば皮膚、器官及び腫瘍、又は流体、例えば血液、血漿、血清、尿、又は核酸を含むか又は含むと推定される任意の組成物からであり得る。核酸のこの混合物から、目的の標的遺伝子、例えばヒトEGFR遺伝子は、特定の変動、例えば非変異又は野生型遺伝子である、大過剰の遺伝子の他の変異体中で少量で存在する点突然変異を含むことができる。癌の発生に臨床学的関連性を有するEGFR遺伝子変異の例は、T790Mの突然変異である。

【0052】

EGFR遺伝子の低量T790M変異対立遺伝子を富化するために、T790M変異対立遺伝子のセンス鎖に相補的であり、そして完全に一致する、過剰のビオチン標識アンチセンス鎖オリゴヌクレオチド（BL-AS）を、抽出されたゲノムDNAを含む溶液に添加する。次に、その溶液を、90℃又はより高い温度に加熱し、二本鎖ゲノムDNAを変性し、そして次に、室温に徐々に冷却し、発生する単一のDNA鎖のアニーリングを可能にする。アニーリング工程の間、BL-AS鎖は、完全に一致するT790変異センス鎖、及びまた、点突然変異の位置でミスマッチを有するであろう野生型センス鎖の両者で二重鎖を形成することができる。

20

【0053】

次に、ロジウムキレーターRh(bpy)₂(phzi)³⁺を、溶液に添加し、そしてインキュベートし、その結果、キレーターは、ミスマッチの位置でBL-AS：野生型センス鎖二重鎖に対してのみ結合できる。次に、反応混合物を、365nmの電球を用いて、15分間、Stratagene UV Stratalinker 1800において照射し、BL-AS：野生型センス鎖二重鎖の1つの鎖を切断する。次に、ストレプタビジンにより被覆された固体マトリックスを添加する。そのような固体マトリックスの例は、ストレプタビジン被覆磁気粒子、例えばInvitrogenからのストレプタビジン-カップリングされたDynabeads（登録商標）、PromegaからのストレプタビジンMagneSphere（登録商標）常磁性粒子、及びSolulinkからのNanoLink（登録商標）及びMagnaLink（登録商標）ストレプタビジン磁気ビーズであり得る。インキュベーション（例えば、40℃で1時間）に続いて、磁石を用いて、粒子を分離し、そして変異及び野生型アンチセンス鎖及び任意の余分なBL-ASを含む、粒子に結合されていないすべての核酸を洗浄する。野生型センス鎖（ミスマッチ部位で切断されるか、又は切断されたBL-ASオリゴヌクレオチドに結合されている）を、ミスマッチ二重鎖の溶融温度に対応する温度で、適切な溶出緩衝液を用いて、磁気粒子から溶出する。結果的に、T790Mセンス鎖のみが、切断されていないビオチン標識T790Mアンチセンスオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされることにより、磁気粒子に結合されたまま存続する。次に、粒子を、高温又はアルカリ性pH溶液のいずれかにゆだねることにより、T790Mセンス鎖は、BL-ASオリゴヌクレオチドから解離することができ、そして検出のための増幅反応への使用のために集められる。

30

40

【0054】

本発明は特定の実施例を参照して詳細に記載されて来たが、種々の修飾が本発明の範囲内で行われ得ることは、当業者に明らかであろう。従って、本発明の範囲は、本明細書に

50

【配列表】

0006553598000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ナンシー シェーンブルナー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 02129, チャールズタウン, モニュメント スクエア
9エー

(72)発明者 アマル グプタ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94526, ダンビル, ガードナー プレイス 115

(72)発明者 ケビン ジャンセン

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 19104, フィラデルフィア, パイン ストリート 394
6, アpartment 1フロア

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第2002/086169(WO, A1)

米国特許第06120992(US, A)

国際公開第2001/005800(WO, A1)

米国特許第06031098(US, A)

国際公開第2007/084380(WO, A1)

JACKSON, B.A. et al., "A versatile mismatch recognition agent: specific cleavage of plasmid DNA at a single base mispair.", BIOCHEMISTRY, 1999年 4月13日, Vol.38, No.
.15, pp.4655-4662, doi: 10.1021/bi990255t

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 3/00

PubMed