

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7291081号

(P7291081)

(45)発行日 令和5年6月14日(2023.6.14)

(24)登録日 令和5年6月6日(2023.6.6)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/10	1 0 0 Z
B 0 1 J	27/08	(2006.01)	B 0 1 J	27/08	Z
B 0 1 J	31/02	(2006.01)	B 0 1 J	31/02	1 0 2 Z
B 0 1 J	31/04	(2006.01)	B 0 1 J	31/04	Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P

請求項の数 17 (全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-565853(P2019-565853)

(86)(22)出願日 平成30年5月30日(2018.5.30)

(65)公表番号 特表2020-522246(P2020-522246 A)

(43)公表日 令和2年7月30日(2020.7.30)

(86)国際出願番号 PCT/EP2018/064161

(87)国際公開番号 WO2018/219997

(87)国際公開日 平成30年12月6日(2018.12.6)

審査請求日 令和3年5月26日(2021.5.26)

(31)優先権主張番号 62/512,324

(32)優先日 平成29年5月30日(2017.5.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 591003013

エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
F . HOFFMANN - LA ROCH
E AKTIENGESELLSCHA
FTスイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
・グレンツァーヘルストラッセ 1 2 4

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ホルムアルデヒド付加及び架橋を反転するための触媒

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホルムアルデヒドで架橋された生体試料内の1つ以上の成分を開放する方法であって、以下の工程：

十分な量の触媒と該生体試料を接触させて、該1つ以上の成分の少なくとも一部分を開放することによって、前記1つ以上の成分の解析における利用可能性を改善する接触工程；を含み、当該触媒が、2 - アミノフェニルボロン酸、環状フェニルボロン酸エステル、ホスホン酸ジエチルエステル、及びビスマス塩からなる群から選択され、かつ当該触媒の量が0.2 mM ~ 5.0 mMである、方法。

【請求項 2】

前記生体試料が動物の組織試料である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記生体試料及び触媒が10分間以上の間25 ~ 60 の温度で加熱される、請求項1又は2のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

開放された前記1つ以上の成分を検出する検出工程を更に含む、請求項1 ~ 3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記触媒が、前記検出工程の前に前記生体試料から実質的に除去される、請求項4に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

前記検出工程が前記開放された 1 つ以上の成分の定量を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記生体試料及び触媒が pH 4.5 ~ 8.0 の範囲で接触させられる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つ以上の開放された成分が核酸であり、前記方法が前記核酸を検出する核酸検出工程を更に含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記核酸検出工程が、ポリメラーゼ連鎖反応による核酸の増幅を含む、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記生体試料が前記接触工程の前にパラフィン中に包埋されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記触媒が、(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸、2-アミノフェニルボロン酸、(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸、1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアポロル-7-アミン、3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアポリン-7-アミン、(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル、臭化ビスマス(III)、ヨウ化ビスマス(III)、クエン酸ビスマス(III)、及びサリチル酸ビスマス(III)からなる群から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記生体試料をプロテアーゼと接触させて、該生体試料中のタンパク質を分解するタンパク質分解工程を更に含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

ホルムアルデヒドで架橋された生体試料の 1 つ以上の成分の利用可能性を改善するためのキットであって、以下：

触媒；及び

プロテアーゼ、又は核酸の増幅又は検出のための試薬、又は当該触媒を生体試料から除去するための装置、ここで当該装置は核酸精製用のカラムである；

30

を備え、当該触媒が、2-アミノフェニルボロン酸、環状フェニルボロン酸エステル、ホスホン酸ジエチルエステル、及びビスマス塩からなる群から選択される、キット。

【請求項 14】

前記キットが、核酸の増幅又は検出のための試薬、又は前記触媒を生体試料から除去するための装置、ここで当該装置は核酸精製用のカラムである、を備える、請求項 13 に記載のキット。

【請求項 15】

前記キットが、プロテアーゼ、ヌクレオチド及び/又は熱安定性ポリメラーゼを備える、請求項 13 に記載のキット。

40

【請求項 16】

前記触媒が、(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸、2-アミノフェニルボロン酸、(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸、1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアポロル-7-アミン、3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアポリン-7-アミン、(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル、臭化ビスマス(III)、ヨウ化ビスマス(III)、クエン酸ビスマス(III)、及びサリチル酸ビスマス(III)からなる群から選択される、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 17】

ホルムアルデヒドで架橋された生体試料内の 1 つ以上の成分を開放するための反応混合

50

物であって、該反応混合物が、以下；

ホルムアルデヒドで架橋された生体試料；及び

該1つ以上の架橋された成分の少なくとも一部を開放するための0.2 mM ~ 5.0 mMの量の触媒；

を備え、当該触媒が、(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸、2-アミノフェニルボロン酸、(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸、1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアポロル-7-アミン、3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアポリン-7-アミン、(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル、臭化ピスマス(III)、ヨウ化ピスマス(III)、クエン酸ピスマス(III)、及びサリチル酸ピスマス(III)からなる群から選択される、反応混合物。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

100年以上に渡り、病理学者は、組織試料等の生体試料を、それらをホルムアルデヒドで固定することによって、日常的に保存してきた。ホルムアルデヒド処理は組織の細胞的特徴を保存するが、試料の様々な生体成分を検出、定量及び特徴付けし難く又はし得なくする、化学的架橋ももたらす。ホルムアルデヒドは、組織又は細胞を、-CH₂-結合を通じて、タンパク質中の一次アミン基と、タンパク質又はDNA中の他の近傍の窒素原子とを、架橋することによって、保存又は固定する。従って、例えば、生体試料中の核酸を検出及び定量するのにポリメラーゼ連鎖反応が有用であっても、PCRは一般に、ホルムアルデヒドで架橋された試料中の、特に定量的結果が必要な核酸を解析するのに利用し難く、又は利用出来ない。

20

【0002】

従って、ホルムアルデヒドの作用による細胞成分と核酸との架橋は、核酸やタンパク質の検出を含む、様々な細胞成分の検出を困難にする。ホルムアルデヒドで架橋された試料由来の核酸の増幅を改善する方法が幾つか報告されているが、一般にそのような改善は単なる試料中のタンパク質の分解や、架橋を形成する共有結合を変化させない洗剤の提供に過ぎない。本発明はこの及び他の問題を解決するものである。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、ホルムアルデヒドで架橋された試料の1つ以上の成分を解析する方法を提供する。幾つかの態様において、前記方法は、前記試料を、架橋した成分の少なくとも一部を開放するのに十分な量の触媒と接触させることにより、前記1つ以上の成分が解析に利用出来る可能性を改善することを含む。

【課題を解決するための手段】

【0004】

幾つかの態様において、前記生体試料が動物の組織試料である。

【0005】

幾つかの態様において、前記触媒の量が、約0.2 mM ~ 約5.0 mMである。

40

【0006】

幾つかの態様において、前記試料及び触媒が10分間以上の間加熱される。

【0007】

幾つかの態様において、前記成分を検出する工程を更に含む。

【0008】

幾つかの態様において、前記触媒が、前記検出工程の前に試料から実質的に除去される。幾つかの態様において、前記触媒の濃度は、検出工程の前に約0.1 mM未満にまで減少させられる。

【0009】

50

幾つかの態様において、前記検出工程が成分の定量を含む。

【0010】

幾つかの態様において、前記成分が核酸である。幾つかの態様において、前記核酸がDNAである。幾つかの態様において、前記成分がRNAである。

【0011】

幾つかの態様において、前記核酸を検出する工程を更に含む。幾つかの態様において、前記検出工程が、核酸の増幅を含む。幾つかの態様において、前記核酸成分は、プローブと核酸の複合体の形成及び当該複合体の存在の検出が可能な条件下でプローブと接触させられる。幾つかの態様において、前記プローブが固体支持体と結合している。幾つかの態様において、前記増幅工程がポリメラーゼ連鎖反応を含む。

10

【0012】

幾つかの態様において、前記成分がタンパク質である。幾つかの態様において、前記方法がタンパク質を検出する工程を更に含む。幾つかの態様において、前記検出工程がマスマスペクトロメトリー又は電気泳動を含む。幾つかの態様において、前記マスマスペクトロメトリーが、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)を含む。

【0013】

幾つかの態様において、前記試料が前記接触工程の前にパラフィン中に包埋されている。

【0014】

幾つかの態様において、前記触媒が、(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸、2-アミノフェニルボロン酸、(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸、1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアボロル-7-アミン、3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアボリン-7-アミン、(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル、臭化ビスマス(III)、ヨウ化ビスマス(III)、クエン酸ビスマス(III)、及びサリチル酸ビスマス(III)からなる群から選択される。

20

【0015】

幾つかの態様において、解析に利用出来る成分の部分は、前記接触工程が実施されない場合の解析に利用出来る部分と比較して少なくとも約2倍に増大する。幾つかの態様において、解析に利用出来る成分の部分は、前記接触工程が実施されない場合の解析に利用出来る部分と比較して少なくとも約10倍に増大する。

30

【0016】

幾つかの態様において、前記方法は、前記試料をプロテアーゼと接触させて、試料中のタンパク質を分解することにより、核酸がより解析に利用できるようにする工程を更に含む。

【0017】

本発明は、ホルムアルデヒドで架橋された生体試料の1つ以上の成分の利用可能性を改善するためのキットも提供する。幾つかの態様において、触媒；及びプロテアーゼ又は当該触媒を生体試料から除去するための試薬若しくは装置；を備え、当該触媒が、アミノフェニルボロン酸、環状ボロン酸エステル、ホスホン酸エステル、及びビスマス塩からなる群から選択される。

40

【0018】

幾つかの態様において、前記キットが、前記触媒を生体試料から除去するための試薬又は装置を備える。幾つかの態様において、前記装置が核酸の精製用のカラムである。

【0019】

幾つかの態様において、前記キットがプロテアーゼを備える。幾つかの態様において、前記プロテアーゼがプロテイナーゼKである。

【0020】

幾つかの態様において、前記キットがヌクレオチド及び/又は熱安定性ポリメラーゼを更に備える。幾つかの態様において、前記熱安定性ポリメラーゼがTaqポリメラーゼである。

50

【 0 0 2 1 】

幾つかの態様において、前記触媒が、(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸、2-アミノフェニルボロン酸、(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸、1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアポロル-7-アミン、3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアポリン-7-アミン、(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル、臭化ビスマス(III)、ヨウ化ビスマス(III)、クエン酸ビスマス(III)、及びサリチル酸ビスマス(III)からなる群から選択される。

【 0 0 2 2 】

本発明は、反応混合物も提供する。幾つかの態様において、前記反応混合物は、ホルムアルデヒドで架橋された生体試料；及び架橋された成分の少なくとも一部を開放するのに十分な量の触媒；を備え、当該触媒が、アミノフェニルボロン酸、環状ボロン酸エステル、ホスホン酸エステル、及びビスマス塩からなる群から選択される。

10

【 0 0 2 3 】

幾つかの態様において、触媒の量は0.2mM~5.0mMである。幾つかの態様において、前記触媒は(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸、2-アミノフェニルボロン酸、(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸、1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアポロル-7-アミン、3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアポリン-7-アミン、(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル、臭化ビスマス(III)、ヨウ化ビスマス(III)、クエン酸ビスマス(III)、及びサリチル酸ビスマス(III)からなる群から選択される。幾つかの態様において、前記生体試料は動物の組織試料である。

20

【 0 0 2 4 】

定義

「ホルムアルデヒドで架橋された生体試料」は、ホルムアルデヒドで処理されたことにより、タンパク質又は核酸中の窒素と他の窒素含有タンパク質及び/又は核酸との間に架橋が形成されている、生体試料を意味する。典型的には、生体試料は細胞を含有する。例えば、生体試料は、動物、例えば人間由来の組織試料であり得る。ホルムアルデヒドで処理された試料は、多くの場合パラフィンに包埋することによって保存される。

30

【 0 0 2 5 】

本明細書中、「触媒」は、アルデヒドで固定された生体分子(例えばアルデヒドで固定された生体分子、ホルムアルデヒドで固定された生体分子)を有する試料(例えばPPE生体試料)と接触したとき、固定された生体分子から付加及び/又は架橋を取り除く反応を触媒する剤を意味する。触媒は、架橋に加え他の付加(例えばアルデヒド固定に関連する付加、ホルムアルデヒド固定に関連する付加)を取り除くと言える。幾つかの場合、触媒のpKaの範囲は2.5~9.0である。幾つかの態様において、触媒は表1に記載の化合物から選択される。当業者は、本発明において他の触媒も有用であることを理解する。

【 0 0 2 6 】

「成分を検出する」とは、少なくとも成分の存在又は不在を判定することを意味し、成分又は成分の部分の定量又は他の特定を更に含み得る。

40

【 0 0 2 7 】

生体試料の「成分」は、検出したい分子のクラス(例えばタンパク質や核酸等)又は特定の標的、例えば特定のタンパク質又は核酸配列を意味する。

【 0 0 2 8 】

本明細書中、「核酸」は、デオキシリボヌクレオチド(2-デオキシ-D-リボースを含む)のポリマー、(即ちDNA)、ポリリボヌクレオチド(D-リボースを含む)(即ちRNA)、及びプリン又はピリミジン塩基の、又は修飾されたプリン又はピリミジン塩基の他の任意のグルコシドアナログを意味する。

50

【 0 0 2 9 】

「架橋した成分の少なくとも一部を開放する」とは、生体試料の2つの成分（例えば核酸とタンパク質）の間に架橋を形成する共有結合を変化させることにより、当該成分が当該共有結合によって連結していないようにすることを意味する。この語句は、限定されないが、架橋プロセスの完全な反転を含む。

【 0 0 3 0 】

本明細書中、「解析に利用出来る」とは、特定の標的分子の存在又は不在及び/又は量を決定する検出方法が利用出来ることを意味する。例えば、様々な検出方法は、ホルムアルデヒドで架橋された生体試料中のタンパク質又は核酸を検出するのが少なくとも部分的に阻害されるため、幾らかの架橋された成分は、検出に「利用出来ない」。触媒処理によって架橋が解放されると、検出及び定量され得る成分の量が増大する（例えば約10%以上、典型的には約2倍以上、場合によっては約10～100倍以上）。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 1 】

【 図 1 】 図 1 は、ホルムアルデヒドが遊離アミンをそのヘミアミナル付加及びイミン中間体に変換し、更にそれが他のアミンと反応してアミナル架橋を形成する反応を図示している。

【 0 0 3 2 】

【 図 2 】 図 2 は、本発明の触媒による「脱架橋」の例を図示している。

【 0 0 3 3 】

【 図 3 】 図 3 は、触媒の非存在下、又は化合物 2 (2 A P B)、化合物 3 (2 A 5 M P B)、化合物 6 (A P M P D E) 及び化合物 7 (B i B r 3) の存在下、実施例 2 に記載の反応条件下の、d A M P ダイマーの d A M P モノマーへの反転を図示している。

20

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 4 】

発明の詳細な説明

I . 導入

図 1 に示すように、ホルムアルデヒドは、核酸（アデニン、グアニン）及びタンパク質（タンパク質骨格の - アミノ基又はリシンの - アミノ基）の窒素求核試薬と容易に反応する。ヘミアミナル付加物はイミン中間体を形成し、更に他のアミンと反応することにより、分子内及び分子間アミン架橋を形成する。斯かる架橋の結果、ホルムアルデヒドで架橋された試料中の様々な生体成分は、現代の検出方法に利用出来なくなる。本発明は、斯かる架橋を反転することにより、より多くの生体成分を検出に利用出来るようにする。

30

【 0 0 3 5 】

ホルムアルデヒドで処理された試料中の架橋の反転は、試料を十分な量の触媒と接触させて、架橋反応を開放することである。架橋の例は、図 1 に描かれている。

【 0 0 3 6 】

架橋された試料が触媒と接触すると、核酸及びタンパク質の架橋は減少又は消滅し、これらの成分の検出が改善する。

【 0 0 3 7 】

I I . 架橋した成分をより利用可能にする方法

本発明は、生体試料を触媒と接触させることによって、生体試料のホルムアルデヒドで架橋した成分をより利用可能にする方法を提供する。当該成分をより利用可能にするのに使用される触媒の量は様々であり得、使用される具体的な触媒、検出される成分、及び使用される検出方法に部分的に依存する。異なる検出方法は異なる検出感度を有し、利用可能な成分の要求量が増減し得るからである。

40

【 0 0 3 8 】

理想的には、特定の検出方法に利用可能になる成分の量は、試料中の成分の全量であり得る。しかしながら、一般に、検出に利用可能になる成分の量は、試料中の成分の全量よりも少ない。本発明の幾つかの態様において、試料が触媒で処理されなかった場合に（同

50

一の検出方法を用いて)利用可能となる筈の約2倍の量の成分が利用可能となる条件下で、十分な量の触媒が使用される。幾つかの態様において、試料が触媒で処理されなかった場合に(同一の検出方法を用いて)利用可能となる筈の約2、10、20、100倍の量の成分が利用可能となる条件下で、十分な量の触媒が使用される。幾つかの態様において、試料の架橋を開放するのに使用される触媒の濃度は、約0.2 mM~約5.0 mM(又はそれ以上)である。

【0039】

当業者は、試料と触媒が組み合わせられる条件(時間や温度等)が、架橋反転の能力及び量に影響し得ることを承知している。触媒処理は室温(例えば20~40又は50)で効果的であり、従って架橋を開放するのに加熱工程を必ずしも必要としない。これは、RNA等の比較的不安定な成分を検出するのに特に有用であり得る。とは言え、より高い温度(例えば80~100、90~100、90~99等)は、核酸やタンパク質の検出の利用可能性を更に改善し得る。

10

【0040】

更に、触媒が試料と共にインキュベーションされる時間は、検出に利用出来るようになる成分の量に影響し得る。例えば、試料は、約5、10、20、30、60、120分又はそれ以上の間、触媒と共にインキュベーションされ得る。インキュベーションの時間がより長いと架橋から解放される成分の量が増大し得るが、これは、特定の成分がどれ程不安定であるかとバランスが取られている必要がある。例えば、RNAのような不安定な成分が検出される場合、より短いインキュベーション時間が望ましい場合がある。一方、タンパク質やDNAのような安定な成分は、それらの成分を損なわずにより長いインキュベーションに供され得る。

20

【0041】

様々な触媒が架橋を開放するのに使用され得ることが認識されている。本発明の範囲を限定する意図は無いが、選択された触媒が、一般に、ホルムアルデヒドによる架橋から成分を開放し、その成分(例えば核酸及び/又はタンパク質)を、ホルムアルデヒド架橋の前に存在していたのと実質的に同じ成分に戻る。架橋反応は、ホルムアルデヒドと一次アミンが反応してヘミアミナルを形成し、脱水してイミンになることにより進行する、可逆的なプロセスである。イミンは第二アミンと反応してアミナルを生成する。このプロセスは、第二アミンの代わりに水とイミンが反応することによって出発材料に戻る。本発明の触媒は、イミン及びアミナルの形成における競合的反応物質として作用することにより、ホルムアルデヒド架橋から成分を開放すると考えられている。平衡プロセスの一部として架橋が解放されると、イミン中間体とホルムアルデヒドが触媒と反応することにより、ホルムアルデヒド架橋から成分が解放される。

30

【0042】

本発明の方法の実施に用いる触媒は、アミノフェニルボロン酸、環状ボロン酸エステル(ベンゾキシアボリン)、ホスホン酸エステル、及びビスマス塩及び錯体を含み得る。これらの触媒は、温和な反応条件下ホルムアルデヒド付加物と架橋の開裂を促進することにより、FFPET試料からの核酸の質を増大する。本発明に有用な触媒の具体的態様は、下記表1に示す化合物から選択される。

40

【表 1】

表 1

No.	化合物名	化学式	記述子	CAS 番号	分子量 [g/mol]
ボロン酸及びエステル					
1	(2-アミノ-5-フルオロフェニル)ボロン酸		2A5FPB	1040400-87-0	154.93
2	2-アミノフェニルボロン酸		2APB	5570-18-3 863753-30-4 (HCl)	173.40
3	(2-アミノ-5-メチルフェニル)ボロン酸		2A5MPB	948592-72-1	150.97
4	1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアボロル-7-アミン		BOB7A	947165-27-7	148.96
5	3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアボリン-7-アミン		BOBN	N/A	162.98
ホスホン酸エステル					
6	(アミノフェニルメチル)ホスホン酸ジエチルエステル		APMPDE	16814-08-7 16656-50-1 (HCl)	279.70
ビスマス塩及び錯体					
7	臭化ビスマス(III)	BiBr ₃	BiBr ₃	7787-58-8	448.69
8	ヨウ化ビスマス(III)	BiI ₃	BiI ₃	7787-64-6	589.69
9	クエン酸ビスマス(III)	Bi(citrate)	Bi(citrate)	813-93-4	398.08
10	サリチル酸ビスマス(III)		Bi(sal)OH	14882-18-9	362.09

【0043】

本発明に記載の触媒の重要な特徴は：アミナル開裂の触媒であること（即ち反転反応又は「脱架橋」）、核酸及び他の生体分子に対して有害な影響が無いこと、十分に水溶性であること、核酸精製プロトコルに適合すること、自動化に適していること、及び安全に扱えること（即ち毒性が無い）である。更に、核酸、タンパク質又は生体分子の損傷が最小限の反応条件（例えばpH 4.5 ~ 8.0、温度 25 ~ 60、10分 ~ 60分間）で触媒が用いられる。温和な反応条件下で実施される核酸及び他の生体分子の抽出を可能とする触媒の添加は、抽出された材料の質を顕著に改善することが期待される。また、これらの化合物は、手動及び自動の核酸及びタンパク質抽出及び回収プロトコルにおける広範な利用を見出し得る。

【0044】

本発明の方法において、ホルムアルデヒドで架橋された任意の種類生体試料が使用され得る。一般に、組織試料は動物組織に由来し得る。幾つかの態様において、試料はパラフィンに包埋され得る。例えば、前記試料はホルマリンで固定されパラフィンに包埋された組織（FFPET）である。幾つかの態様において、前記試料は動物（例えば人）から採取され、解析前に試料を安定化するためにホルマリン溶液中で保存したことにより、試

10

20

30

40

50

料中の核酸及び／又はタンパク質が架橋したものである。例えば、子宮頸部又は他の婦人科スワブ（例えば性感染症の検出）は、ホルムアルデヒドを含有する溶液中に保存されることにより、試料中の核酸及び／又はタンパク質が架橋されている。この架橋は、本発明の方法に従い、触媒を用いて実質的に反転され得る。

【 0 0 4 5 】

更に試料中の成分を解析に利用可能にするため、本発明の方法において、追加の精製又は他の工程が含まれ得る。例えば、試料の核酸成分を検出しようとする場合、試料をプロテアーゼで処理し（例えば触媒処理の前又は後に）、又は試料中のタンパク質を分解するのが有用である。プロテアーゼの例としてプロテイナーゼKが挙げられるが、様々な他のプロテアーゼに置き換えられ得ると理解され得る。

10

【 0 0 4 6 】

その後使用される検出方法に依存して、成分の検出の前に試料に結び付いた触媒を除去し、又は少なくともその量を減らすのが望ましい。例えば、発明者らは、試薬やスピнкаラム等のデバイスを用いて試料の他の部分から核酸を精製することにより、試料中の核酸を試料中の他の成分から又は触媒から精製することが有用であることを見出した。前記デバイスの例として、核酸に親和性のシリカベーススピнкаラム（例えばQ I A G E N社製Q i a q u i c k（商標）等）が挙げられるが、触媒を除去するため当然他の精製方法も使用され得る。

【 0 0 4 7 】

II . 架橋した生体試料の成分の検出

20

架橋された試料の成分を検出するため、上記触媒処理と組み合わせて任意の検出方法が使用され得る。下記で更に詳細に記載するように、架橋によって検出が阻害される試料の成分の例は、核酸及びタンパク質である。成分の検出は、それらの成分又はその部分（例えばタンパク質又は核酸の特定の配列）の存在又は不在を単純に判定することを含み得る。或いは、検出は、成分の定量及び／又は成分の特徴付けを含み得る。特徴付けは、例えば、ペプチド又は核酸のシーケンシング及び／又は例えばグリコシル化やリン酸化等の転写後又は翻訳語修飾の判定を含み得る。

【 0 0 4 8 】

A . 核酸

当該技術分野において、核酸を検出する様々な方法が知られている。DNA若しくはRNA（mRNA、rRNA等）又はそれら両方が検出され得る。検出は、例えばヌクレオチドシーケンシング又は配列特異的ハイブリダイゼーション技術（例えば一塩基多型（SNPs）等の検出に用いるもの）による、特定の配列の定量、及び／又は核酸の特徴付けを含み得る。

30

【 0 0 4 9 】

パラフィン包埋ホルムアルデヒド処理試料は多くの場合比較的小さいので、しばしば核酸の検出を補助するため特定の核酸を増幅する増幅方法の使用が望ましい。指数的増幅方法、線形増幅、サーモサイクル又は定温法等を含むにんいの種類の増幅方法が使用され得る。適切な増幅方法は、限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, including supplemental updates through April 2004; Sambrook & Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd Ed, 2001)、リガーゼ連鎖反応（LCR）（U.S. Patent Nos. 5,185,243, 5,679,524及び5,573,907; EP 0 320 308 B1; WO 90/01069; WO 89/12696;及びWO 89/09835）、サイクリングプローブ技術（U.S. Patent Nos. 5,011,769, 5,403,711, 5,660,988, 及び4,876,187,及びPCT published applications WO 95/05480, WO 95/1416,及びWO 95/00667）、Invader（商標）技術（U.S. Patent Nos. 5,846,717; 5,614,402; 5,719,028; 5,541,311;及び5,843,669）、Q - B e t aレプリカーゼ技術（U.

40

50

S. Patent No. 4,786,600)、N A S B A (U.S. Patent No. 5,409,818; EP-0 329 82 2)、T M A (U.S. Patent Nos. 5,399,491, 5,888,779, 5,705,365, 5,710,029)、S D A (U.S. Patent Nos. 5, 455,166 and 5,130,238)が挙げられる。本発明において、様々なポリメラーゼが使用され得る。Thermus aquaticusから単離された代表的な熱安定性酵素 (T a q) はU.S. Pat. No. 4,889,818に記載され、公知のP C Rにおけるその使用方法は、Saiki et al., 1988, Science 239:487-91に記載されている。他の代表的な熱安定性酵素は、Thermus種Z 0 5 D N Aポリメラーゼを含む、例えばU.S. Patent No. 5,674,738を参照されたい。任意で、特定の核酸配列を定量するため、リアルタイムP C R又は他の定量的増幅技術が使用され得る。定量的増幅の方法は、例えば、U.S. Patent Nos. 6,180,349; 6,033,854;及び5,972,602や、例えばGibson et al., Genome Research 6:995-1001 (1996); DeGraves, et al., Biotechniques 34(1):106-10, 112-5 (2003); Deiman B, et al., Mol Biotechnol. 20(2):163-79 (2002)等が開示されている。これは、1つ以上の遺伝子のR N Aレベルが試料内で測定され得るように逆転写反応 (R T - P C R) に続いて行われるのに特に有用である。R T - P C R法は当業者に周知であり (例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 2002))、定量的増幅方法に容易に適合される。

10

【0050】

他の方法も、核酸の検出に使用され得る。例えば、核酸は、試料から単離され、プローブにハイブリダイズされ得る。幾つかの例において、プローブは固相担体 (例えばマイクロアレイ) と連結され得る。

20

【0051】

B. タンパク質

試料のタンパク質成分が触媒処理後に検出される場合もある。本発明の方法において、任意の種類 of タンパク質検出及び特定方法が採用され得る。

【0052】

タンパク質検出方法の一例は、マスマススペクトロメトリーである。マスマススペクトロメトリーの例は、限定されないが、エレクトロスプレーイオン化及びマトリックス支援レーザー脱離/イオン化 (M A L D I)、飛行時間型M A L D I (M A L D I - T O F)法を含む。例えばKaras, M.; Hillencamp, F. Anal. Chem. 60:2301 (1988); Beavis, R. C. Org. Mass Spec. 27:653 (1992); Creel, H. S. Trends Poly. Sci. 1(11):336 (1993)を参照されたい。

30

【0053】

マスマススペクトロメトリーを用いた検出の一つの代替は、電気泳動による所望のタンパク質の分離及び検出である。電気泳動法は、二次元電気泳動法を含む。当該方法は、任意で、抗体を用いたタンパク質のウエスタンブロット検出を含む。

【0054】

他の選択肢は、タンパク質の免疫検出を含む。様々なE L I S A及び他のタンパク質の免疫検出のためのフォーマットは周知である。

【0055】

I I I . キット

本発明は、上記本発明の方法を採用するのに有用なキットも提供する。当該キットは、本明細書中に記載の1つ以上の試薬を含み得る。任意で、当該キットは、それらを使用するための書き付けられた (紙の) 又は電子文書の説明書を含み得る。

40

【0056】

幾つかの態様において、本発明のキットは、触媒と、核酸又はタンパク質を検出する又は検出を改善する1つ以上の追加の試薬を含み得る。例えば、幾つかの態様において、当該キットは、タンパク質を分解し、核酸がより検出に利用出来るようにするための、触媒及びプロテアーゼ (限定されないがプロテイナーゼKを含む)を含む。核酸又はタンパク質を検出する又は検出を改善する他の試薬は、例えば増幅に有用な試薬である。例えば、典型的なポリメラーゼ連鎖反応は、限定されないが、順及び逆プライマー、1つ以上の鋳

50

型、デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dATP、dCTP、dGTP、TTP、dUTP)、ポリメラーゼ酵素、緩衝剤、金属カチオン及び塩を含み得る。RT-PCR反応のためのキットは、逆転写酵素及び/又はプライマーも含み得る。定量的 (例えば「リアルタイム」) 増幅において、所望の標的とハイブリダイズする1つ以上のポリヌクレオチドプローブが採用される。当該プローブは、典型的には検出可能なラベル、例えば蛍光ラベルで標識される。プローブの一例はTaqman (商標) プローブであるが、他の種類のプローブが定量的増幅反応において標的をモニターするのに使用され得ることが認識されている。核酸配列ベース増幅 (NASBA) 反応は、プライマー、逆転写酵素、RNase H及びDNAポリメラーゼを含み得る。転写媒介性増幅 (TMA) 反応は、プライマー、逆転写酵素、及びRNAポリメラーゼを含む。鎖置換増幅 (strand displacement amplification) (SDA) 反応は、修飾されたヌクレオチド及び制限酵素を含み得る。幾つかの増幅反応は、付随的増幅試薬として、デオキシウリジンN-グリコシラーゼ (UNG) も含み得る (例えばAmperase (登録商標), Roche Molecular Sciences, Alameda, CA) (Kleiboeker, Virol J (2005) 11:29)

【0057】

核酸又はタンパク質の検出又は検出改善のための他の試薬は、例えば、タンパク質又は核酸を精製する試薬又はデバイスであり、それらは例えば本明細書中に記載されている。

【0058】

IV. 反応混合物

本発明は、反応混合物も提供する。反応混合物の一例は、任意でパラフィンを含むホルムアルデヒドで固定された試料、及び本明細書中に記載されるような触媒を含有し得る。反応混合物は、上記の濃度で触媒を含有し得る。更に、反応混合物は、任意で上記の温度で調製される。反応混合物は、任意で、更にプロテアーゼ (例えばプロテイナーゼK) を含有し得る。

【実施例】

【0059】

実施例1

本実施例は、モノヌクレオチドのホルムアルデヒド付加物の調製及び解析を例示する。

【0060】

材料及び試薬

デオキシアデノシンーリン酸 (dAMP)、過塩素酸リチウム、及び全ての有機触媒は、Sigma-Aldrich又はVWRから購入した。メタノール不含10%ホルムアルデヒド、EMグレードは、Thermo Fisher Scientificから購入した。溶媒及び試薬は、Sigma-Aldrich又はVWRから購入した。化合物の名称、CAS番号及び分子量を以下に示す。

【0061】

化合物1: (2-アミノ-5-フルオロフェニル) ボロン酸; CAS番号 1040400-87-00; 分子量 154.93

化合物2: 2-アミノフェニルボロン酸; CAS番号 5570-18-3/863753-30-4 (HCl); 分子量 173.40

化合物3: (2-アミノ-5-メチルフェニル) ボロン酸; CAS番号 948592-72-1; 分子量 150.97

化合物4: 1,3-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-2,1-ベンゾキシアボロル-7-アミン; CAS番号 947165-27-7, 分子量 148.96

化合物5: 3,4-ジヒドロ-1-ヒドロキシ-1H-2,1-ベンゾキシアボリン-7-アミン; CAS番号 N/A; 分子量 162.98

化合物6: (アミノフェニルメチル) ホスホン酸ジエチルエステル; CAS番号 16814-08-7/16656-50-1(HCl); 分子量 279.70

化合物7: 臭化ビスマス (III); CAS番号 7787-58-8; 分子量 448.69

化合物8: ヨウ化ビスマス (III); CAS番号 7787-64-6; 分子量 589.69

化合物 9 : クエン酸ビスマス (I I I) ; CAS番号 813-93-4; 分子量 398.08

化合物 10 : サリチル酸ビスマス (I I I) ; CAS番号 14882-18-9; 分子量 362.09

【 0 0 6 2 】

特徴付け

N⁶-ヒドロキシメチル-dAMPの形成はESI-MSによって確認され、これは文献に従って行われた。N⁶-ヒドロキシメチル-dAMPの高分解能質量は、362.0852であった([M+H]⁺, C₁₁H₁₇N₅O₇P, Calc. 362.0860)。

【 0 0 6 3 】

メチレン - b i s - デオキシアデノシン - 5' - モノリン酸 (ダイマー) の合成

dAMPの0.06M溶液(脱イオン水)及び0.2M酢酸ナトリウム緩衝剤(pH4.8)中10%ホルムアルデヒド(メタノール不含)0.3M溶液を、等体積で混合した。室温で数分間攪拌後、混濁していた反応混合物が透明になり、そのまま室温で2~3日攪拌を続行した。反応混合物を急冷し、-20℃で凍結して短時間保存した。溶解後、粗混合物をアセトン中2%LiClO₄から沈殿され、4℃で15分間遠心分離された。上澄みの液体を流し、更に(2回)氷冷アセトンで洗浄した。粗混合物を真空下で乾燥させて、白い固体を得た。粗混合物は、逆相HPLCによって精製された。

10

【 0 0 6 4 】

メチレン - b i s - デオキシアデノシン - 5' - モノリン酸 (ダイマー) の H P L C 精製

少量の(~30mg)粗混合物を~500μLの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝剤(pH7.0)中に溶解し、HPLCで精製した。0.1MTEAA緩衝剤(pH7.5)中のアセトニトリルの不連続線形勾配を用いた:最初の3分間0-1.0%、次の22分間1.0-8.0%、最後の3分間8.0-95.0%。溶出速度3ml/分を採用した。メチレン - b i s A M P の H P L C - 精製フラクション(保持時間 - 25~26分)が単離され、真空下で乾燥させられた。

20

【 0 0 6 5 】

メチレン - b i s - d A M P (ダイマー) の特性

MALDI-HRMS m/z 707.1339 ([M+H]⁺, C₂₁H₂₉N₁₀O₁₄P₂, Calc. 707.1340; ¹H NMR (D₂O): 8.35 (s, 2H, H₂), 8.20 (s, 2H, H₈), 5.95-5.97 (d, 2H, J = 5.6 Hz, H_{1'}), 5.24 (s, 2H, N₆-CH₂N₆), 4.61 (t, 2H, J = 5.3 Hz, H_{2'}), 4.39-4.41 (m, 2H, H_{3'}), 4.28-4.29 (m, 2H, H_{4'}), 4.04-4.07 (m, 4H, H_{5'})

30

【 0 0 6 6 】

実施例 2

この実施例は、触媒を用いたdAMPダイマーの架橋化学反応の反転を例示する。

【 0 0 6 7 】

メチレン - b i s - d A M P ダイマーの架橋の反転(図2に示す)を、HPLCによって追跡した。反応は、50mMリン酸緩衝剤、pH5.0、60℃で実施された。1.0mM濃度のdAMPダイマーを、触媒無しで、又は5.0mM濃度の化合物2、3、6及び7と混合した。各フラクション混合物において、アリコート(10μl)を10分、20分、40分、60分及び90分で採取した。図3はこの実験の結果を示し、全ての試験された触媒が、触媒不添加の場合よりも大幅に速い速度で架橋を反転することが出来た(生産されたdAMPの%として示す)。

40

【 図 面 】
【 図 1 】

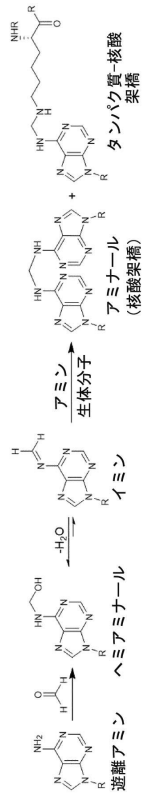


FIGURE 1

【 図 2 】

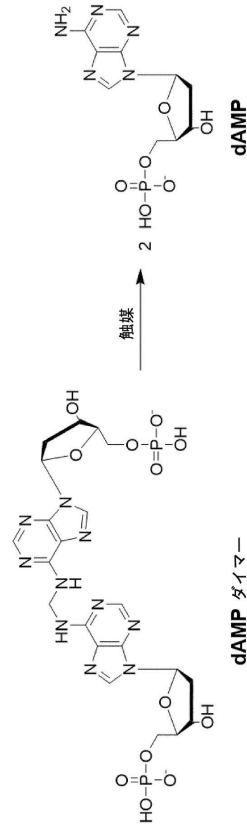


FIGURE 2

【 図 3 】

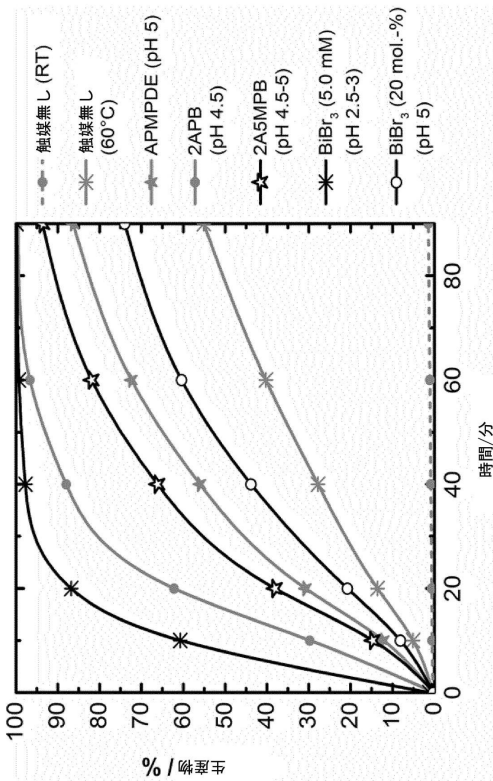


FIGURE 3

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

<i>G 0 1 N</i>	<i>33/48 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>33/48</i>	<i>R</i>
<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/686(2018.01)</i>	<i>C 1 2 Q</i>	<i>1/686</i>	<i>Z</i>
<i>C 1 2 M</i>	<i>1/00 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 M</i>	<i>1/00</i>	<i>A</i>
<i>G 0 1 N</i>	<i>21/78 (2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i>	<i>21/78</i>	<i>C</i>

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72)発明者 アレクサンダー ニアース

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第2016/044313(WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 00

C 1 2 Q 1 / 00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

PubMed