

(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2016-508713

(P2016-508713A)

(43) 公表日 平成28年3月24日(2016.3.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
<b>C O 7 D 495/04 (2006.01)</b>	C O 7 D 495/04 1 O 3	4 C O 5 5
<b>C O 7 D 213/53 (2006.01)</b>	C O 7 D 213/53	4 C O 7 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2015-548545 (P2015-548545)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月2日 (2015.6.2)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/077282		E AKTIENGESSELLSCHAF
(87) 国際公開番号	W02014/096126		T
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	61/740,895		グレンツァーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成24年12月21日 (2012.12.21)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			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】 混合物からの変異核酸の富化のための化合物及び方法

## (57) 【要約】

生物学的サンプルからの希体細胞変異の存在の検出はしばしば、大過剰の野生型DNAの同時存在のために困難である。本発明は、増幅する野生型DNAを枯渇することにより、変異DNAの富化を可能にする新規化合物及び方法を記載する。

## 【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 2 つの変異体配列の形態で存在する標的核酸配列の変異体の富化方法であり、ここで前記変異体は単一ヌクレオチド位置で異なり；

前記標的核酸配列を含むサンプルを供給し、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体のうちで少量においてサンプルに存在し；

前記標的核酸配列の 1 つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給し、ここで前記オリゴヌクレオチドは富化されるべき変異体と単一ヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして他方の変異体と単一ヌクレオチド位置で完全に一致し；

前記オリゴヌクレオチド、及び前記標的核酸配列の何れかの変異体の 1 つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、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；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収することを含んで成る方法。

## 【請求項 2】

親和性標識を有する前記ミスマッチインターカレーション化合物が、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記富化されるべき変異体の変異対立遺伝子であり、そして前記他方の変異体が野生型対立遺伝子である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記変異対立遺伝子が変異 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 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異対立遺伝子の検出方法であって、ここで前記変異対立遺伝子は、単一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間で少量でサンプルに存在し；

前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化し、ここで前記富化は、

前記標的核酸配列の 1 つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給し、ここで前記オリゴヌクレオチドは変異対立遺伝子と単一ヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして野生型対立遺伝子と単一ヌクレオチド位置で完全に一致し；

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 1 つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、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；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして

10

20

30

40

50

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記富化された変異対立遺伝子を含む溶出された緩衝液を回収することにより実施され；

前記富化された変異対立遺伝子を増幅し；そして

前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された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方法。

【請求項 6】

親和性標識を有する前記ミスマッチインターカレーション化合物が、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

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 又は 6 に記載の方法。 10

【請求項 8】

前記増幅段階が、対立遺伝子特異的プライマーにより行われる、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

サンプルからの核酸の混合物中の 2 つの変異体配列の形態で存在する標的核酸配列の変異体の富化方法であり、ここで前記変異体は単一ヌクレオチド位置で異なり；

前記標的核酸配列を含むサンプルを供給し、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体のうちで少量においてサンプルに存在し；

前記核酸の混合物が変性されるよう、前記サンプルを加熱し； 20

前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供し、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、1 つの変異体配列の 1 つの鎖と、他方の変異体配列の 1 つの鎖との間で形成され、変異体異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成され；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして 30

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収することを含んで成る方法。

【請求項 10】

親和性標識を有する前記ミスマッチインターカレーション化合物が、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記富化されるべき変異体の変異対立遺伝子であり、そして前記他方の変異体が野生型対立遺伝子である、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

【請求項 12】 40

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 11 に記載の方法。

【請求項 13】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異対立遺伝子の検出方法であって、ここで前記変異対立遺伝子は、単一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間で少量でサンプルに存在し；

前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化し、ここで前記富化は；

前記核酸の混合物が変性されるよう、前記サンプルを加熱し；

前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供し、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、前記変異対立遺伝子の 1 つの鎖と、野生型対立遺伝子の 1 つの鎖との間で 50

形成され、対立遺伝子が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成され；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収することにより実施され；

前記富化された変異対立遺伝子を増幅し；そして

前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された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方法。

#### 【請求項 14】

親和性標識を有する前記ミスマッチインターカレーション化合物が、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、請求項 13 に記載の方法。

#### 【請求項 15】

前記変異対立遺伝子が変異 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 13 又は 14 に記載の方法。

#### 【請求項 16】

前記増幅段階が、対立遺伝子特異的プライマーにより行われる、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項記載の方法。

#### 【請求項 17】

$\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、希対立遺伝子 D N A を富化するための化合物。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

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することができる化合物及び方法を用いて低量変異標的核酸の富化に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

ほとんどのヒト遺伝性疾患及び癌は、核遺伝子中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ヌクレオチドの差異であり得る。細胞及び組織レベルで、特異的遺伝子座での多型性は、有意に変更された細胞挙動性を生ぜしめることができる。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 D N A 分子を含むことができるので、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でき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、大過剰の野生型 D N A の同時存在のために多大な課題を提示する。

#### 【0003】

従って、低コピー変異 D N A の存在が増幅反応、例えば P C R の実施に従って検出できるよう、それらの低コピー変異 D N A を選択的且つ正確に富化する方法が当業界において必要である。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

本発明は、低量対立遺伝子の続く検出を可能にするサンプル中のそのような対立遺伝子

10

20

30

40

50

(例えば、変異DNA)を富化するための方法及び組成物に向けられる。第一の側面によれば、本発明は、サンプルからの核酸の混合物中の2つの変異体配列の形態で存在する標的核酸配列の、単一ヌクレオチド位置で異なる変異体の富化方法に関し、ここで前記方法は、前記標的核酸配列を含むサンプルを供給し、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体のうちで少量においてサンプルに存在し；前記標的核酸配列の1つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給し、ここで前記オリゴヌクレオチドは富化されるべき変異体と単一ヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして他方の変異体と単一ヌクレオチド位置で完全に一致し；前記オリゴヌクレオチド、及び前記標的核酸配列の何れかの変異体の1つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、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；  
反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収することを含んで成る。

10

20

#### 【0005】

第二の側面によれば、本発明は、サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の、単一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間で少量でサンプルに存在する変異対立遺伝子の検出方法に関し、ここで前記方法は、前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化し、ここで前記富化は、前記標的核酸配列の1つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給し、ここで前記オリゴヌクレオチドは変異対立遺伝子と単一ヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして野生型対立遺伝子と単一ヌクレオチド位置で完全に一致し；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1つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、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；  
反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記富化された変異対立遺伝子を含む溶出された緩衝液を回収することにより実施され；前記富化された変異対立遺伝子を増幅し；そして前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された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。

30

40

#### 【0006】

第三の側面によれば、本発明は、サンプルからの核酸の混合物中の2つの変異体配列の形態で存在する標的核酸配列の、単一ヌクレオチド位置で異なる変異体の富化方法に関し、ここで前記方法は、前記標的核酸配列を含むサンプルを供給し、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体のうちで少量においてサンプルに存在し；前記核酸の混合物が変性されるよう、前記サンプルを加熱し；前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供し、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、1つの変異体配列の1つの鎖と、他方の変異体配列の1つの鎖との間で形成され、変異体が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成され；反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチ

50

ドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収することを含んで成る。

#### 【0007】

10

第四の側面によれば、本発明は、サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の、単一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間で少量でサンプルに存在する変異対立遺伝子の検出方法に関し、ここで前記方法は、前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化し、ここで前記富化は；前記核酸の混合物が変性されるよう、前記サンプルを加熱し；前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供し、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、前記変異対立遺伝子の1つの鎖と、野生型対立遺伝子の1つの鎖との間で形成され、対立遺伝子が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成され；反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触し、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、そしてミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができず；前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給し；前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離し；そして前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収することにより実施され；前記富化された変異対立遺伝子を増幅し；そして前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された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。

20

#### 【0008】

30

第五の側面によれば、本発明は、図2の化合物である、希対立遺伝子DNAを富化するための化合物に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

【図1】図1は、ロジウム系インターカレーター、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$  (左側) 及び  $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$  (右側)の構造を示す。

【図2】図2は、本発明のピオチン系ロジウムインターカレーター、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ピオチン})^{3+}$ の構造を示す。

【図3】図3は、ヒトEGFR遺伝子におけるT790M変異部位についての完全に一致した変異二重鎖(M-PM)及びC:Aミスマッチ二重鎖に対する $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$  及び  $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi}-\text{CO}_2\text{H})^{3+}$ の切断効率のUPLC分析を示す。

40

【図4】図4は、UV照射時間の関数としての $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi}-\text{CO}_2\text{H})^{3+}$  ( $\text{Rh}(\text{カルボキシル})$ )、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$  ( $\text{Rh}(\text{Barton})$ ) 及び  $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ピオチン})^{3+}$  ( $\text{Rh}(\text{bio})$ )の切断効率のグラフ表示である。

【図5】図5は、各ロジウムキレーターの濃度の関数としての、30分のUV照射後の $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$  ( $\text{Rh}(\text{Barton})$ ) 及び30分又は60分のUV照射後の $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ピオチン})^{3+}$  ( $\text{Rh}(\text{bio})$ )の切断効率のグラフ表示である。

【図6】図6は、 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi}-\text{CO}_2\text{H})](\text{Cl})_3$ の合成に關与する化合物の構造を示す(実施例5を参照のこと)。

【図7】図7は、 $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG}_3\text{-ピオチン})](\text{Cl})_3$ の合成に關与する化合物の構造

50

を示す（実施例 6 を参照のこと）。

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明の詳細な説明

定義

特にことわらない限り、本明細書に使用されるすべての技術及び科学用語は、本発明が属する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、本発明に使用される多くの用語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、以下の用語は、特に断らない限り、それらに与えられた意味を有する。

10

【0011】

用語「核酸」(nucleic acid)とは、ヌクレオチド（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）のポリマー、及び直鎖状又は分岐鎖状で一緒に共有結合されるヌクレオチドを含む、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、アダマー、ペプチド核酸(PNA)、PNA-DNA接合体、PNA-RNA接合体、等を含むポリマーを言及する。核酸は典型的には、単鎖又は二本鎖であり、そして一般的に、ホスホジエステル結合を含むが、但しある場合、他の主鎖、例えばホスホラミド(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-メチルホスホロアミダイト結合(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)を有する核酸類似体が包含される。他の類似核酸は、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号に記載されるそれらを包含する。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)、そして類似体もまた、例えばRawls, C & E News Jun. 2, 1997 page 35に記載されている。リボース-リン酸主鎖のそれらの修飾は、追加の成分、例えば標識の付加を促進するために、又は生理学的環境下でそのような分子の安定性及び半減期を変更するために実施され得る。

20

30

【0012】

典型的には核酸に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。ヌクレオチド類似体に使用される一定の塩基が、融解温度(T<sub>m</sub>)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）、及び同様のものを包含する。例えば、米国特許第5,990,303号を参照のこと。他の代表的複素環式塩基は、例えばヒポキサンチン、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-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；

40

50

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 - メトキシメチルウラシル; 5 - エチニルウラ  
シル; 5 - プロピニルウラシル、及び同様のものを包含する。

【 0 0 1 3 】

「ヌクレオシド」(nucleoside)とは、糖成分(リボース糖又はデオキシリボース糖)に共有結合される塩基又は塩基性基(少なくとも1つの同素環、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/又は同様のものを含む)、糖の誘導体又は糖成分の機能的同等物(例えば、炭素環)を含む核酸成分を言及する。例えば、ヌクレオシドが糖成分を含む場合、塩基は典型的には、その糖成分の1位に結合される。上記に記載されるように、塩基は、天然に存在する塩基であっても、又は天然に存在しない塩基であっても良い。典型的なヌクレオシドは、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。

10

【 0 0 1 4 】

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

【 0 0 1 5 】

用語「ポリヌクレオチド」(polynucleotide)及び「オリゴヌクレオチド」(oligonucleotide)とは、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、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、又は指定されるヌクレオチド配列の領域に対応する少なくとも約15 - 30個のヌクレオチドから構成され得る。

20

【 0 0 1 6 】

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増加すること、及びサンプルにおいて所望しない変異体に対して所望する変異体の比率を高めることを言及する。一般的に、富化される所望する変異体は、所望しない変異体よりも、核酸サンプルにおいてはあまり一般的ではなく、そして標的核酸配列のすべての変異体の合計量の50%以下を占める。多くの場合、所望する変異体は変

30

【 0 0 1 7 】

本明細書において使用される場合、用語「野生型」(wild type)とは、1つの遺伝子又は対立遺伝子を言及し、それは、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徴を有する。野生型遺伝子又は野生型対立遺伝子は、最も頻繁には、集団で観察され、そして遺伝子又は対立遺伝子の「通常」又は「野生型」形態として任意には呼ばれるそれらである。

【 0 0 1 8 】

対照的に、用語「変異体」(mutant)又は「変異された」(mutated)とは、野生型遺伝子又は対立遺伝子に比較される場合、配列の修飾を示す遺伝子又は対立遺伝子を意味する。用語「変異」(mutation)とは、通常(未変更)又は野生型配列から分化される場合、変異体の形態をもたらす、通常に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。変異は一般的に、2つの一般的な種類、すなわち塩基対置換(例えば、単一ヌクレオチド置換)及びフレームシフト変異に分けられ得る。後者は、1~数個のヌクレオチド対の挿入又は欠失を伴う。

40

【 0 0 1 9 】

用語「対立遺伝子」(allele)とは、わずか1つ又は少数の塩基により異なる2つの配列を言及する。

【 0 0 2 0 】

用語「ミスマッチ」(mismatch) DNA又は「ヘテロ二重鎖」(heteroduplex) DNA

50



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、すなわちTとA又はGとCの1つを形成することができない反対の塩基の特定対を言及する。ヘテロ二重鎖DNAは、1つの鎖における1又は2以上の塩基が反対の鎖における塩基又は複数塩基を補足するか又は補足しない二本鎖DNA、及び何れかの鎖の1又は2以上の塩基が、反対の鎖に比較して、1つの鎖における挿入又は欠失のために、反対の塩基を有するか又は有さない二本鎖DNAを含む。対照的に、ホモ二重鎖DNAは、各鎖が他の鎖の完全な相補体であり、そして各塩基が反対の塩と、水素結合された塩基対を形成する二本鎖DNAを言及する。

#### 【0021】

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、典型的には生物分子対を言及する。非制限的例としては、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に、「親和性標識」と「親和性マトリックス」との間に発生する結合によっても表され得る。

10

#### 【0022】

「親和性」(affinity)標識は、その分子結合パートナーに対して特異的に結合することができる分子である。結合は、共有又は非共有(例えば、イオン、水素、等)結合を通してであり得る。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。

20

#### 【0023】

「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することが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通してであり得る。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磁気ラテックス粒子は、親和性標識、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。

#### 【0024】

「PCR増幅」(PCR amplification)又は単純に「PCR」とは、核酸配列に対する多数の相補体を生成するための鋳型としてのそ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、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、オリジナル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拡張される。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、各プライマーは、核酸鎖の1つ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、加熱することにより変性され、そしてその工程が反復され、そして前の段階の新しく合成された鎖が続く段階において鋳型として作用する。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拡張反応の少数~多くのサイクルを包含することができる。

30

40

#### 【0025】

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1つ以上の変異体にハイブリダイズするが、しかし変異体の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十分に拡張されることで、標的配列の変異体間を区別することができるプライマーを意味する。標的配列の他方の変異体によれば、拡張は効果的ではなく、非効率であり、又は検出できない。

#### 【0026】

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を意味する。共通プライマーは、対立遺伝子-特

50

異的ではなく、すなわち対立遺伝子 - 特異的プライマーが識別する、標的配列の変異体間を識別しない。

【 0 0 2 7 】

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・クリック対合を有し、すなわちポリヌクレオチド二重鎖における任意の2つの塩基間にミスマッチが存在しない相補的配列を意味する。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%、完全ではない(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)、逆平行ポリヌクレオチド鎖間の塩基の任意のアライメントを意味する。部分的に相補的鎖間の二重鎖は一般的に、完全な相補的鎖間の二重鎖よりも低い安定性である。

10

【 0 0 2 8 】

用語「サンプル」(sample)とは、核酸を含むか又は含まれると推定される任意の組成物を言及する。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、及びまた、個人から採取された細胞から確立されたインビトロ培養物、例えばホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPET)及びそれらから単離される核酸のサンプルを言及する。

20

【 0 0 2 9 】

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を言及する。ヌクレオチド修飾、例えば窒素含有塩基修飾、糖修飾又は他の主鎖修飾は、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ないが、しかし修飾及び標識に関しては異なることができる。

【 0 0 3 0 】

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、そして核酸の相補的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を言及する。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、検出可能的に標識されるオリゴヌクレオチドを言及する。プローブは、修飾、例えば核酸ポリメラーゼ、及び1又は2以上の発光団によりプローブを非延長性にする3'-末端修飾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つのアッセイにおいてプライマーとして、及び異なったアッセイにおいてプローブとして作用することができる。

30

【 0 0 3 1 】

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「標的物」(target)とは、増幅されるか、検出されるか、又は両者である核酸配列の一部を言及する。

40

【 0 0 3 2 】

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を言及する。2つの核酸は、ハイブリダイゼーションを達成するために、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。

【 0 0 3 3 】

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核酸に対する核酸の主な(ハイブリダイズする分子の50%又はそ

50

れ以上)又はほぼ独占的な(ハイブリダイズする分子の90%又はそれ以上)ハイブリダイゼーションを言及する。例えば、典型的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を除いて、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、標的核酸の増幅を駆動し、少なくとも最も主要な増幅生成物であり、そして好ましくは、ほぼ独占的(例えば、サンプルにおける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。好ましくは、非特異的増幅生成物は、検出できないか、又は特異的増幅生成物から容易に区別できるよう少量で検出されるような少量で存在する。同様に、プローブは、反応混合物にも存在する非標的核酸を除いて、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、少なくとも最も主要なシグナルであり、そして好ましくは、ほぼ独占的(例えば、サンプルにおける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。

10

#### 【0034】

臨床及び診断用途に直面する主要な懸念は、臨床学的に有意に低いレベルの突然変異及び少数対立遺伝子を検出する能力である。突然変異を検出する能力は、多くの患者領域において重要であるが、しかし特に、組織検体及び体液、例えば血漿又は血清からの初期癌検出のために重要である。希な突然変異又は対立遺伝子の検出が有意である他の領域は、患者の病期分類及び予後のための分子プロファイリング、又は個々の患者への治療の適応化、及び治療結果及び疾患の寛解/再発のモニターリングを包含する。癌関連突然変異の効果的検出は、使用される技法及び方法の選択性を依存する。腫瘍遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子の検出及び同定は、種々のタイプのサンプル、例えば前癌又は癌組織、痰、尿、便及び血液中の循環性細胞外DNAの分析を必要とする。サンプルは典型的には、野生型及び変異DNAの両者から成り、そして野生型DNAの量はしばしば、それらの低存在量の変異の検出及び同定を、非常に困難にする、 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 又は $10^{-9}$ 倍、変異DNAの量を越える。

20

#### 【0035】

多くの方法が、突然変異を検出するために使用されて来た。一組の方法においては、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)は、検出システムの構成要素である。PCRは、非常に多くの他の配列(例えば、野生型DNA)間に存在する標的核酸配列(例えば、変異DNA)を特異的に増幅することができる。対立遺伝子-特異的PCR(AS-PCR)は、単一のヌクレオチドほど異なる配列間を区別できる方法である。PCR及びAS-PCRの感度及び特異性は、核酸の標的変異体(例えば、変異体)が非常に多量の非標的変異体(例えば、野生型)の存在下でさえ、選択的に増幅され得るようなものである。多くのAS-PCRアッセイに関しては、変異DNAは、その変異DNA集団よりも $100 \sim 1,000$ 倍の集団を有する過剰の野生型DNA下で検出され得る。しかしながら、この感度レベルは、野生型DNAに対して $10^{-3} \sim 10^{-6}$ の比率で変異体が存在する非常に低い濃度の変異を正確に検出し、そして同定するためには不十分である。従って、富化方法の使用はしばしば、正確且つ精度の高い検出が達成され得るレベルに、変異体濃度を高めるのに有益であり、又は必要である。

30

40

#### 【0036】

米国特許第6,031,098号において、Bartonなどは、一対の大きなインターカレディングリガンド、すなわち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)に基づいて2つのファミリーのミスマッチ-特異的ロジウム系インターカレーター-の合成及び機能を記載している。それらの分子の構造は、図1に示されている。両化合物においては、立体的拡張性リガンドは通常のB形DNAの塩基スタック中に容易にインターカレートするには大き過ぎる。しかしながら、前記化合物は、熱力学的に不安定化されたミスマッチ部位に高い親和性で結合することができる。結合親和性は、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})^{3+}$ については $10^6 \text{ M}^{-1}$ 及び $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ については $10^8 \text{ M}^{-1}$ の順である。親和性は、ミスマッチに関連した不安定化と相関

50

する。親和性とミスマッチ安定化との間の相関関係は、金属錯体が塩基対スタック中に挿入される場合、ミスマッチ塩基を押し出す容易さに基づいて理解され得る。最も不安定化される部位が金属錯体により最も容易に結合される。すべてにおいて、化合物は、すべての可能な配列において、ミスマッチ部位の80%以上を結合する。それらのロジウム系インターカレーターは、ワトソン・クリック塩基対DNA部位上のミスマッチDNA部位に対して1,000倍又はそれよりも高い選択性を示す。ミスマッチを、強く且つ選択的に結合する他に、錯体は光活性化に基づいてミスマッチ部位で直接的な鎖切断を促進する。2 kbのプラスミド内の単一のミスマッチがそれらのインターカレーター分子により結合され、そして切断され得ることが示された。

#### 【0037】

本発明は、ロジウム系インターカレーターのミスマッチ結合性質を利用し、そして固体支持体へのその固定化を可能にする、より高い結合親和性化合物、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})^{3+}$ の新規修飾バージョンの合成を記載している。そのような修飾されたロジウムキレーター化合物の1つの例が、図2上に示されている。低量の変異体DNAが、単一の塩基ミスマッチを含むヘテロ二重鎖として存在する条件を生成することにより、変異体DNAはその固定された(phzi)インターカレーターを用いて捕獲され、そしてミスマッチを含まず、そして(phzi)インターカレーターに結合できない過剰量の野生型DNAから分離され得る。次に、富化された変異体DNA集団が、検出のために増幅反応(例えば、対立遺伝子-特異的PCR)を受けることができる。

#### 【0038】

以下の実施例及び図は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載されている。

#### 【実施例】

#### 【0039】

実施例1:メチル5,6-ジヒドロ-5,6-ジオキソベンゾ[a]フェナジン-9-カルボキシレートの合成

2,3-ジクロロナフタレン-1,4-ジオン(4,5g、20mmol)、メチル3,4-ジアミノベンゾエート(3,32g、20mmol)及びピリジン150mlを、250mlの丸底フラスコに添加し、そして還流冷却器に1時間、置いた。溶液は暗赤褐色であるように見えたが、しかし沈殿の兆候を形成しなかった。何れかの沈殿物が室温で形成される場合、溶液を観察のために一晩、放置した。

#### 【0040】

反応物を一晩、冷却した後、沈殿物が形成し、そして予め計量した焼結ガラス漏斗で濾過し、赤褐色の固形物を生成した。中間体をピリジンによりすすぎ、そして真空デシケターにおいて一晩、乾燥した。漏斗を次のモニターリングのために再び計量し、そして5,7gの中間体が単離されたことを示した。次に、この全量を、下記に記載される酸化工程にゆだねた。

#### 【0041】

酸化工程においては、中間体を250mlの丸底フラスコに配置し、そして50mlの酢酸、3.0mlの脱イオン水及び5mlの濃硝酸を、激しい磁気攪拌下で、順に注意して添加した。次に、その反応混合物を、煮沸槽に配置し、そして還流した。明るい黄色の沈殿物が、加熱に基づいて形成し始めた。重度の沈殿物のために、攪拌棒が動かなくなった。これを軽減するために、さらなる10mlのアリコートの氷酢酸を添加した。反応混合物を1時間、還流し、そして次に、室温に冷却し、そして濾過し、黄金色の粉末状固形物を得た。この生成物をまた、各20mlのエタノール及びジエチルエーテルによりすすぎ、そして乾燥のために一晩、放置した。

#### 【0042】

実施例2:合成: $[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$

$[\text{Rh}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$ を、Zeglis, B.M. & Barton, J.K. Nat. Protoc. 2007, 2, 122-134に従って調製した。手短に言及すると、 $\text{RhCl}_3$ (0.64g、2.8mmol)及びヒ

10

20

30

40

50

ドラジーン塩酸塩 ( 5 0 m g 、 7 . 3 5 m m o l ) を、 5 0 m l の丸底フラスコにおいて 1 2 . 4 m l の脱イオン水に溶解した。 2 0 m l のエタノールに 0 . 8 5 g ( 5 . 6 m m o l ) の 2 , 2 - ビピリジルを溶解することにより製造された、別々に調整された溶液をまた同じ 5 0 m l の丸底フラスコに添加した。溶解された酸素を、真空の反復した適用、続いてアルゴンガスによる逆充填により除去した。これに続いて、すべての材料が溶解するまで、その反応混合物を還流した。 2 0 分の還流の後、反応は鮮やかなオレンジ色の溶液になり、そして焼結ガラスフィルター漏斗により濾過した。溶液に存在する生成物のみを単離し、そして何れかの不溶性不純物を除去するために、溶液を暖めながら濾過することが重要である。次に、炉液を 4 で一晚、貯蔵し、結晶化を促進した。

【 0 0 4 3 】

冷却された濾液を濾過し、黄色の結晶性固形物を得た。得られる  $[Rh(bpy)_2Cl_2]Cl$  の質量は 7 8 0 m g であり、そして乾燥チャンバーにおいて周囲温度で貯蔵した。

【 0 0 4 4 】

実施例 3 : 合成 :  $[Rh(bpy)_2(OTf)_2]OTf$

$[Rh(bpy)_2Cl_2]Cl$  ( 5 0 0 m g 、 1 . 0 m m o l ) を、 1 4 / 2 0 ジョイントを有する 3 口丸底フラスコに配置した。 2 つのゴム製セプタムを、フラスコの左右首端上に配置し、そしてアダプターを、その中央に配置し、塩酸をバージした。フラスコを、含まれる任意の空気を排気し、続いてアルゴンガスを充填することにより脱酸素化した。次に、トリフリック酸を注意して添加、そしてすばやく  $[Rh(bpy)_2Cl_2]Cl$  を溶解し、黄色の透明な溶液を得た。文献は反応溶液の 1 6 時間の攪拌を示しているもので、それを一晚、放置した。

【 0 0 4 5 】

アセトン/ドライアイス槽を、次の工程のために調製し、ここで 3 0 0 m l のジエチルエーテルを、乾燥管を備えた、 1 0 0 0 m l の丸底フラスコ中に注ぎ、そしてドライアイス槽下で冷却した。その反応混合物の溶液を、添加管中に注ぎ、そして冷ジエチルエーテル溶液に滴下した。反応混合物は、フラスコの底で沈殿した淡黄色固形物として濁って見えた。その沈殿した生成物を、計量された中位の焼結ガラス漏斗を通して濾過し、そして湿気に対して非常に敏感であることが見出されたので、真空デシケーターに、すぐに配置した。 7 5 0 m g の収量のすべての材料を、次の工程のために使用した。

【 0 0 4 6 】

実施例 4 :  $[Rh(bpy)_2(NH_3)_2](OTf)_3$  の合成

前の反応で得られたすべての  $[Rh(bpy)_2(OTf)_2]OTf$  を、 2 5 0 m l の丸底フラスコに配置した。次に、 3 0 m l の水酸化アンモニウムを、そのフラスコに添加し、そして攪拌した。次に、その混合物を還流し、そしてすべての成分が淡黄色の溶液に見えるまで、約 1 5 分間、煮沸した。次に、過剰水酸化アンモニウムを、回転蒸発により除去し、黄白色の固形物を得た。この生成物 ( 最終収量 7 2 0 m g ) を、真空デシケーターにおいて一晚、乾燥した。

【 0 0 4 7 】

実施例 5 :  $[Rh(bpy)_2(phzi-CO_2H)](Cl)_3$  の合成

キノリリガンド

メチル 5 , 6 - ジヒドロ 5 , 6 - ジオキソベンゾ [ a ] フェナジン - 9 - カルボキシレート、

メチル 5 , 6 - ジヒドロ 5 , 6 - ジオキソベンゾ [ a ] フェナジン - 1 0 - カルボキシレート、の混合物

【 0 0 4 8 】

5 0 0 m g ( 0 . 5 m m o l ) の  $[Rh(bpy)_2(NH_3)_2](OTf)_3$  及び図 6 に記載されるようなキノリリガンド 1 9 8 . 7 5 m g ( 0 . 6 2 5 m m o l ) を、周囲温度で 2 5 0 m l のアセトニトリルに溶解した。その後まもなく、 0 . 4 M の水酸化ナトリウム 1 0 m l を、反応に添加し、そして密封溶液において 3 時間、攪拌した。色の変化が観察され、これは、反応が起こったことを知らせる。反応混合物の LC - MS 分析は、アルカリ性接合条件下で、所望する化合物が、メチルエステル中間体の現場加水分解により得られたことを示し

10

20

30

40

50

た。次に、反応を、中性 pH が達成されるまで、増分量の 0.4 M の塩酸を添加することにより、pH 7 に中和した。反応に含まれるアセトニトリルを、周囲温度での回転蒸発により除去した。

#### 【0049】

得られる残渣はフラスコを覆い、そして褐色で黄色の外観を有し、次にこれを少量の脱イオン水 ( ~ 25 ml ) に溶解した。次に、この溶液を、4 で一晩、貯蔵した。粗生成物を、次の条件下で半 - 分取カラムを用いて、逆相 HPLC により精製した。

カラム :

Waters Symmetry Shield RP8、5um、7.8x300mm、P/N WAT248000、 L/N M90845D01

緩衝液 :

A : 100 mM の TEAA

B : アセトニトリル

流速 : 6 ml / 分

#### 【0050】

カラムを、100 % A 緩衝液において平衡化し、そして全サンプル量 ( 53 ml ) を、6 ml / 分の流速でポンプを通して注入した。100 % A により 5 分間、さらに洗浄した後、勾配が開始し、そして 30 秒 ( 3 ml ) 画分を集めた。

#### 【0051】

画分を LC - MS 分析により分析し、そして最も純粋な画分をプールし、そして凍結乾燥した。LC - MS 分析は、所望する生成物に関して、715 の M / e で予想される親イオンピーク、及び親ロジウム錯体に非常に類似する UV スペクトルを示した。

#### 【0052】

実施例 6 : [Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)(PEG<sub>3</sub>-ビオチン)](Cl)<sub>3</sub> の合成

図 7 に記載されるように、Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi-COOH)Cl<sub>3</sub> ( 160 mg、195 μmol ) を、250 ml の丸底フラスコにおいて、激しい磁気攪拌下で 20 ml の DMF に溶解し、これとは別に、100 mg ( 239 μmol ) の EZ-Link Amine-PEG3-ビオチン (Thermo Scientific, 製品 # 21347) を、40 ml のアセトニトリルに溶解した。注意 : 少量の材料が未溶解のまま存続した。EZ-Link Amine-PEG3-ビオチン溶液を、攪拌下で前記フラスコに添加した。それとは別に、TBTU [O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート] (Alfa Aesar, 在庫番号 L13470) の 0.5 M 溶液を、2 ml のアセトニトリルにその 321 mg を溶解することにより、アセトニトリル下で調製し、そしてこれを、攪拌下で反応に添加した。反応を室温で 30 分間、進行せしめ、そしてその進行を、アリコートを取り出し、そして LC - MS により分析することによりモニターした。この分析は、出発材料のすべてが消費され、そして主要反応生成物が所望する標的分子、[Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)(PEG<sub>3</sub>-ビオチン)](Cl)<sub>3</sub> ( 図 2 ) であるように思えたことを明白に示した。さらに、密接に溶出するマイナー副産物もまた観察された。反応を 90 分間、攪拌した。いくつかの不溶性物質がこの時点で認められ、そして反応混合物を、ひだ付きフィルター紙を通して濾過した。濾液を、脱イオン水により 500 ml に希釈し、そして 0.45 ミクロンのフィルターを通して再び濾過した。この物質を、下記のように逆相 HPLC による精製のために必要とされるまで、冷蔵庫に貯蔵した。

#### 【0053】

LC - MS 分析

上記反応を、C-8 逆相カラム及び 20 分間にわたっての 10 mM の TEAA 中、15 - 30 % アセトニトリルの直線勾配を用いて、LC - MS により分析した。

精製

分取逆相 HPLC に基づく方法を、下記のようにして開発した。

カラム :

Waters Symmetry Shield RP8、5um、7.8x300mm、P/N WAT248000、 L/N M90845D01

緩衝液 :

10

20

30

40

50

A : 100 mM の T E A A

B : アセトニトリル

流速 : 3 ml / 分

【0054】

カラムを、100% A 緩衝液において平衡化し、そして粗生成物の 1/5 (100 ml) を、4 ml / 分の流速でポンプを通して注入した。100% A により 5 分間、さらに洗浄した後、勾配が開始し、そして 60 秒 (3 ml) 画分を集めた。

【0055】

画分を LC - MS 分析により分析し、そして最も純粋な画分をプールし、そして凍結乾燥した。

【0056】

実施例 7 : ロジウムキレーターを用いてのミスマッチ DNA の光切断

アッセイを、ミスマッチ部位を含む DNA 二重鎖の光活性化に基づいて、インターカレートし、そして鎖切断を促進する、ロジウムキレーターの能力を試験するために企画した。ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子の T790M 点突然変異に及び蛍光色素により結合されるオリゴヌクレオチドを、次の特徴により合成した。アミノ酸位置 790 で「C」対立遺伝子を有する野生型遺伝子のセンス鎖のためのオリゴヌクレオチドを、FAM 蛍光団 (WT - S - FAM) により結合した。野生型遺伝子 (「G」残基を有する) のアンチセンス鎖のための相補的オリゴヌクレオチドを、J A 270 蛍光団 (WT - AS - J A 270) により結合した。「T」対立遺伝子を有する T790M 変異遺伝子のセンス鎖のためのオリゴヌクレオチドを、HEX 蛍光団 (M - S - HEX) により結合した。T790M 変異遺伝子 (「A」残基を有する) のアンチセンス鎖のための相補的オリゴヌクレオチドを、Cy5 . 5 蛍光団 (M - AS - Cy5 . 5) により結合した。野生型オリゴヌクレオチドと変異オリゴヌクレオチドとの間で生成される二本鎖は完全にマッチされるが、ところが 1 つの野生型オリゴヌクレオチドと 1 つの変異オリゴヌクレオチドとの間で生成される二本鎖は点突然変異の部位でミスマッチを担持する。例えば、WT - S - FAM オリゴヌクレオチドと M - AS - Cy5 . 5 オリゴヌクレオチドとの間での二本鎖は、ロジウムキレーターにより認識され、そして光活性化に基づいて切断される C : A ミスマッチを含むであろう。

【0057】

10  $\mu$  M の親ロジウムキレーター、Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)<sup>3+</sup> (図 1) 又はカルボキシル中間体ロジウムキレーター (実施例 5 におけるプロトコルに従って合成された) の何れかを、完全にマッチした変異二重鎖を生成するための M - S - HEX 及び M - AS - Cy5 . 5、又は C : A ミスマッチ二重鎖を生成するための WT - S - FAM 及び M - AS - Cy5 . 5 の何れかから成る、2  $\mu$  M のオリゴヌクレオチド対と共にインキュベートした。インキュベーションに続いて、その溶液を、UV Stratalinker (登録商標) 1800 (Stratagene) を用いて、0 ~ 60 分間、365 nm の波長で照射し、そして切断の有無について、Waters UPLC カラム及び蛍光検出器を用いて分析した。実験の結果は、図 3 に示されている。両ロジウムキレーターは、完全にマッチした変異二本鎖に存在する切断を示さない (M - PM カラム)。対照的に、効率的な切断が、損なわれていないオリゴヌクレオチドピークの消出、及び UV 照射に続いての切断されたオリゴヌクレオチドピークの出現を伴って、C : A ミスマッチ二重鎖に観察された。類似する結果が、キレーターが野生型の完全にマッチしたオリゴヌクレオチド二重鎖と共にインキュベートされる場合、観察されたが、ところがカルボキシル中間体ロジウムキレーターは、わずかな量の非特異的切断を示した (データは示されていない)。

【0058】

実施例 8 : ロジウムキレーターの比較

実施例 7 に記載される実験と同じ条件を用いての実験を行い、C : A ミスマッチを含むオリゴヌクレオチド二重鎖の切断における、親ロジウムキレーター Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)<sup>3+</sup>、カルボキシル中間体キレーター Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi-CO2H)<sup>3+</sup> 及びビオチン結合ロジウムキレータ

10

20

30

40

50

−Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)(PEG<sub>3</sub>-ビオチン)<sup>3+</sup>の性能を比較した。2 μMのC:A mismatches二重鎖を、10 μMのロジウムキレーターと共にインキュベートし、続いて、0、15、30、45及び60分間の光活性化にゆだねた。この実験の結果は、図4上に示される。ビオチン結合ロジウムキレーターは、他の2つのロジウムキレーターにより示される90-98%の切断に比較して、UV照射の60分後、二重鎖の約60%の切断を示した。

#### 【0059】

次に、異なった濃度のキレーターを用いてのビオチン結合ロジウムキレーターの切断活性を、調査し、そして同じ濃度範囲での親ロジウムキレーターの切断活性と比較した。その結果は図5に示されている。5 μM及び10 μMの濃度で、親ロジウムキレーターは、ビオチン結合ロジウムキレーターよりも高い切断効率を示した。しかしながら、15 μM以上の濃度で、親キレーターは一貫性のない切断効率を示したが、ところがビオチン結合ロジウムキレーターは、60分のUV照射に続いて、25 μMの濃度で観察される90%以上の切断を伴って、それらの高い濃度で効果的切断を示した。

10

#### 【0060】

実施例9: Rh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)(PEG<sub>3</sub>-ビオチン)<sup>3+</sup>を用いて変異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提供する。サンプルは、組織、例えば皮膚、器官、及び腫瘍から、又は体液、例えば血液、血漿、血液、尿から、又は核酸を含むか又は含むと思わ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、興味ある標的遺伝子、例えばヒトEGFR遺伝子は、一定の変動、例えば非変異体又は野生型遺伝子であろう、大過剰の遺伝子の他方の変異体中で低量で存在する点突然変異を含むことができる。

20

#### 【0061】

標的遺伝子の低存在量の変異対立遺伝子を富化するために、標的遺伝子の野生型対立遺伝子の鎖(例えば、センス鎖又は鎖S)の1つに対して相補的であり、そして完全にマッチする過剰のオリゴヌクレオチド(オリゴC)を、抽出されたゲノムDNAを含む溶液に添加する。次に、この溶液を、90℃又はそれ以上の温度で加熱し、二本鎖ゲノムDNAを変性し、そして次に、一本鎖DNAの再アニーリングの発生を可能にする温度に徐々に冷却する。アニーリング工程の間、いくらかの鎖S:オリゴC二本鎖が形成することができ、ここで野生型DNA-鎖S:オリゴCハイブリッドが完全にマッチされるが、しかし変異DNA-鎖S:オリゴC二本鎖は点突然変異の位置で mismatches を有するであろう。

30

#### 【0062】

次に、ビオチン結合ロジウムキレーターRh(bpy)<sub>2</sub>(phzi)(PEG<sub>3</sub>-ビオチン)<sup>3+</sup>を、前記溶液に添加し、そしてキレーターが mismatches の位置で変異DNA-鎖S:オリゴC二本鎖に結合できるようインキュベートする。そのような固体マトリックスの例は、ストレプトタビジン被覆磁気粒子、例えばInvitrogenからのストレプトタビジン-カップリングされたDynabeads(登録商標)、PromegaからのストレプトタビジンMagneSphere(登録商標) Paramagnetic Particles、及びSolulinkからのNanoLink(登録商標)及びMagnaLink(登録商標)ストレプトタビジン磁気ビーズである。インキュベーション(例えば、40℃、1時間)に続いて、磁石を用いて、粒子を分離し、そして野生型DNA及び過剰のオリゴCを含む、前記粒子に結合されていないすべての核酸を洗浄する。次に、結合された変異DNA-鎖Sを、適切な溶離緩衝液を用いて、磁気粒子から溶離し、そして次に、増幅反応への使用のための鋳型として作用することができる。EGFR遺伝子を例として用いて、種々の変異EGFR対立遺伝子を、米国特許出願番号第13/324,705号に開示されるリアルタイムPCR条件下で対立遺伝子-特異的プライマー及びTaqMan(登録商標)プローブを用いて増幅することができる。

40

#### 【0063】

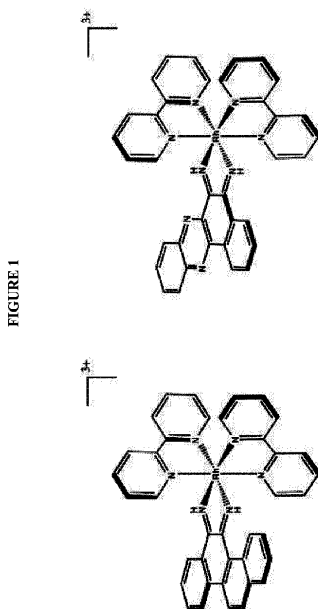
標的遺伝子の低存在量変異対立遺伝子を富化するための別の方法において、サンプルを、核酸の混合物の一本鎖分子への変性のために十分な高温(例えば、95℃)で加熱した。次に、温度を下げ、各一本鎖のその相補鎖との再アニーリングを可能にする。変異対立遺伝子を担持する、すべて又はほとんどすべての一本鎖を、野生型対立遺伝子を含む相補

50

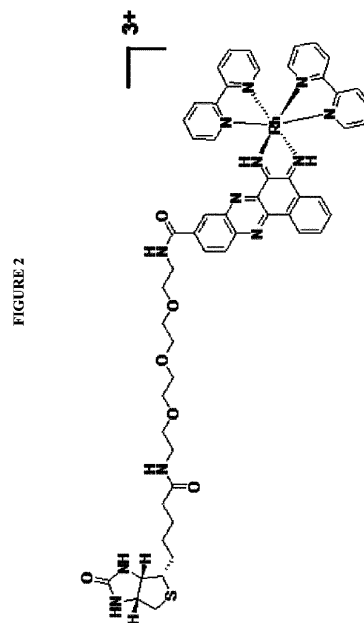


鎖にアニーリングし、変異体：野生型ミスマッチ二本鎖を形成する。次に、ビオチン結合ロジウムキレーター-h(bpy)<sub>2</sub>(phzi)(PEG3-ビオチン)<sup>3+</sup>を、前記溶液に添加し、そしてキレーターがミスマッチ二本鎖に対して特異的に結合できるようにインキュベートする。実験の残りを、上記のようにして実施し、検出のために増幅反応に使用され得る変異DNAの富化された集団をもたらす。

【 図 1 】



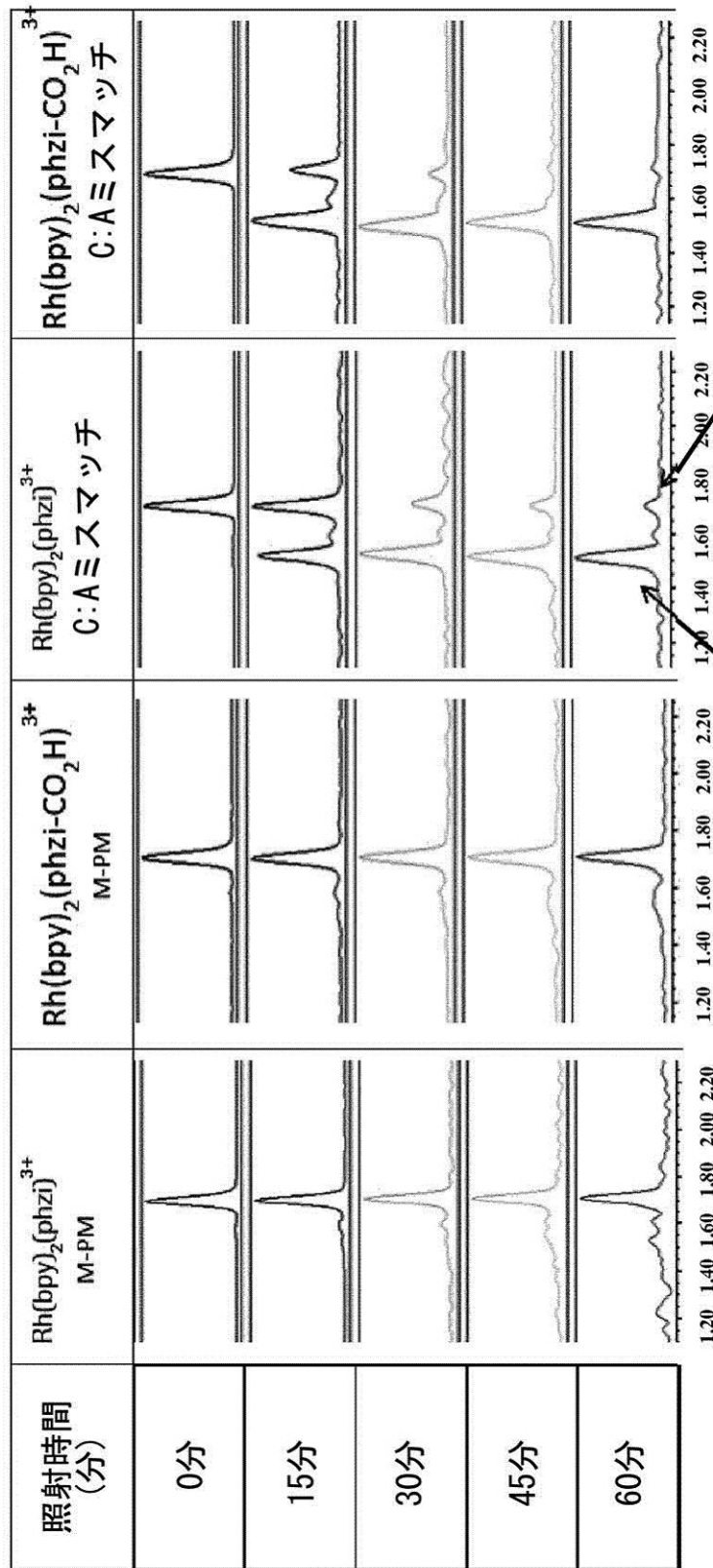
【 図 2 】



【図 3】

FIGURE 3

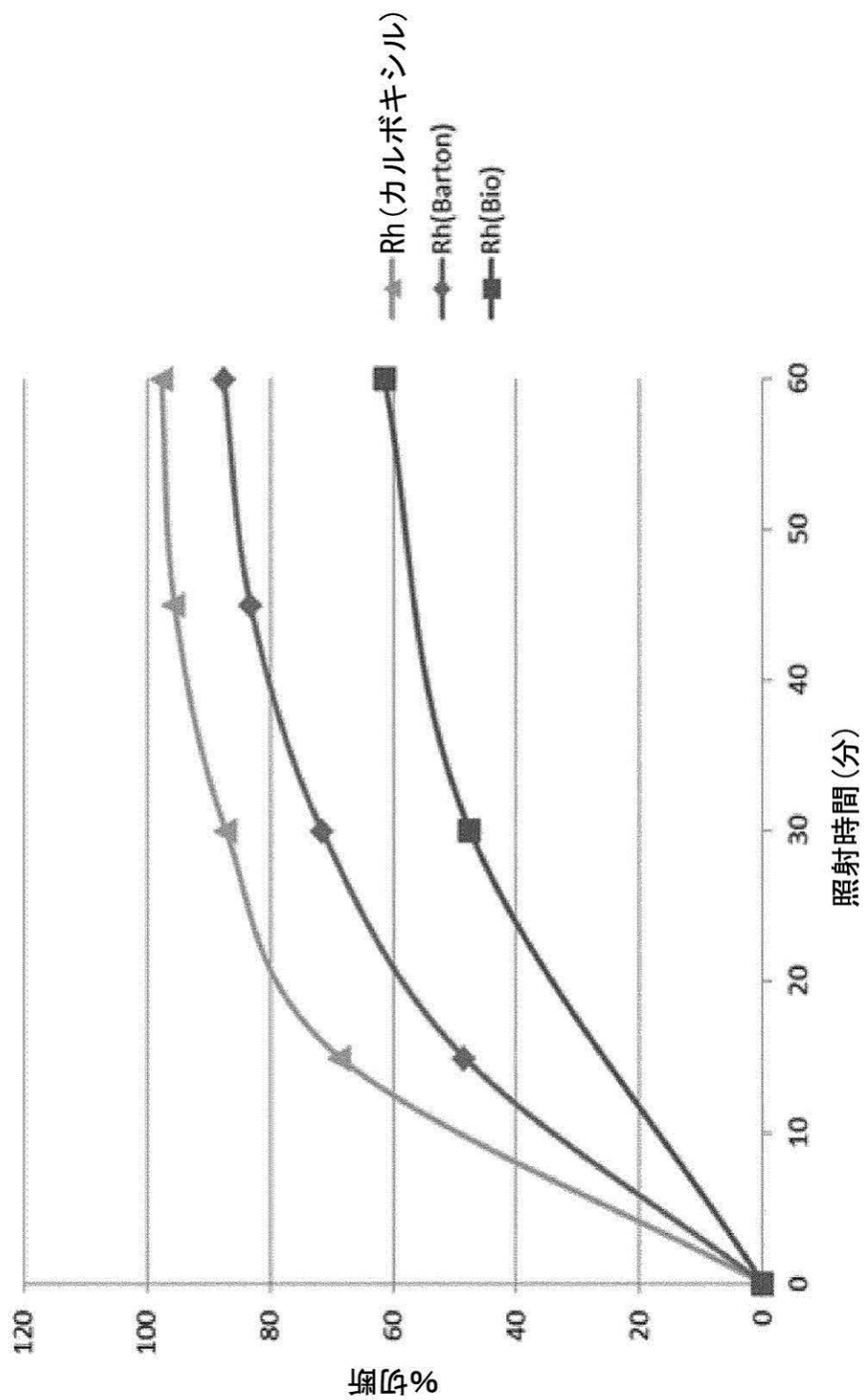
UPLA切断分析



切断されたオリゴピーク      損なわれていないオリゴピーク

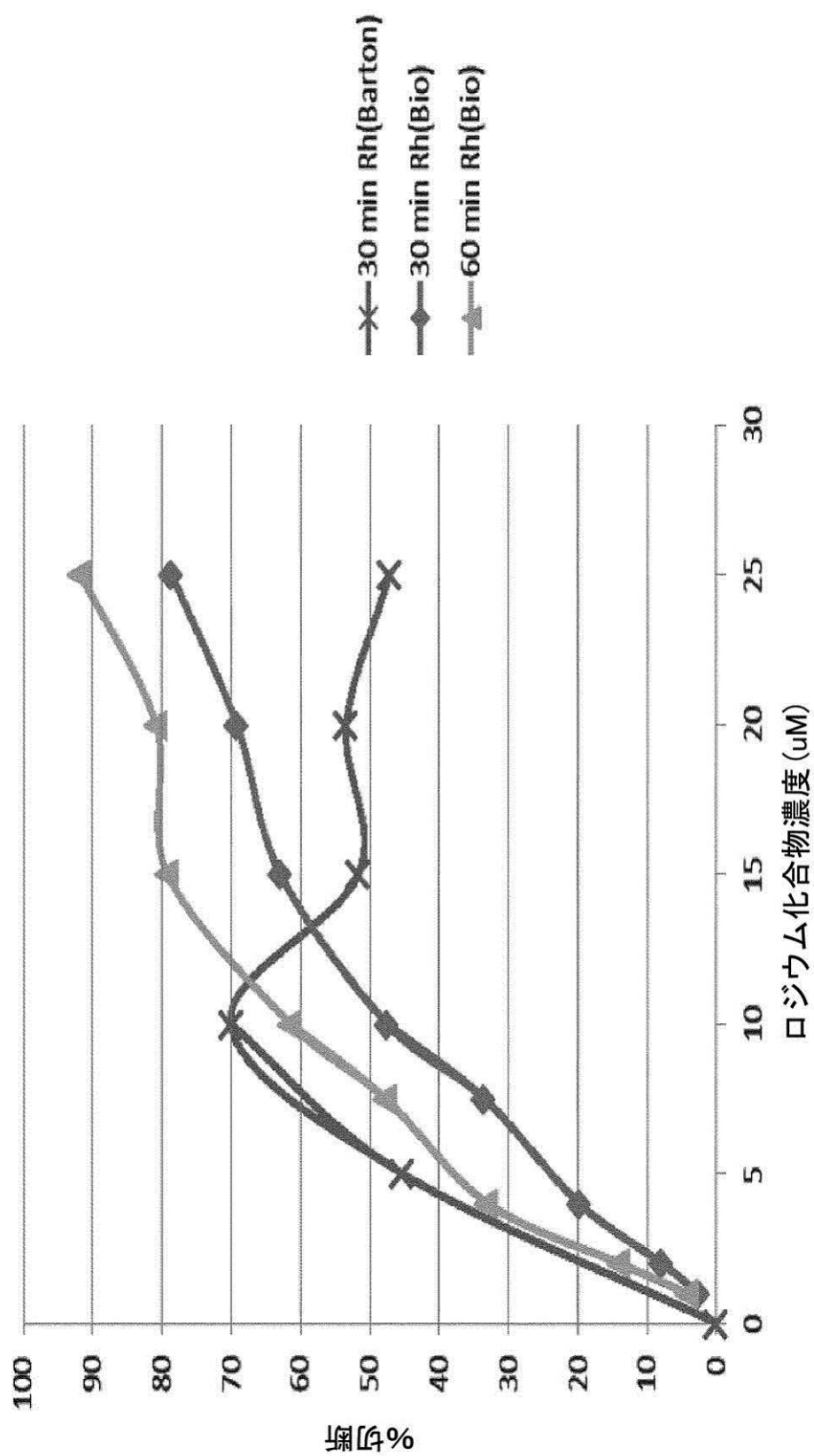
【 図 4 】

FIGURE 4



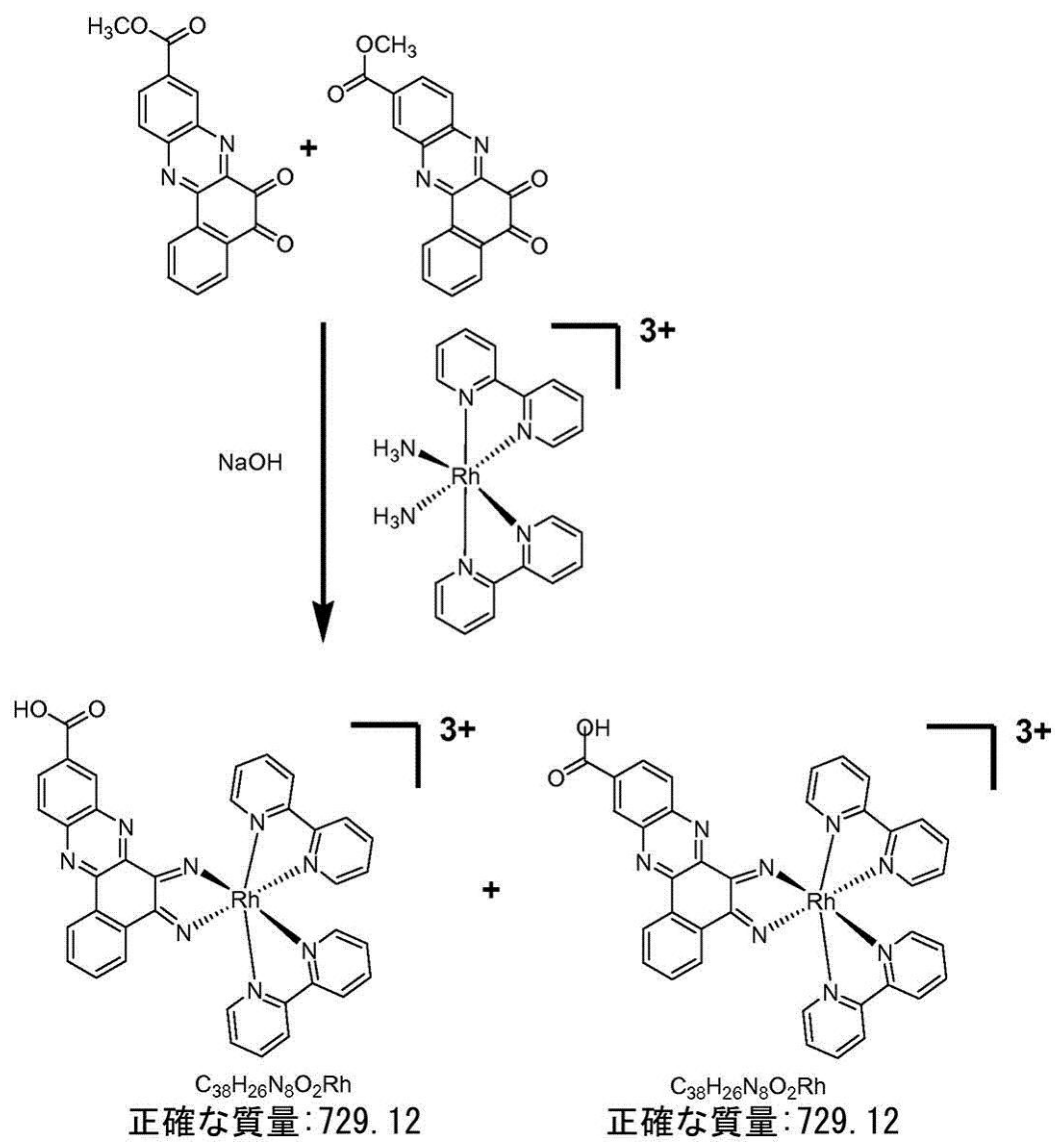
【 図 5 】

FIGURE 5



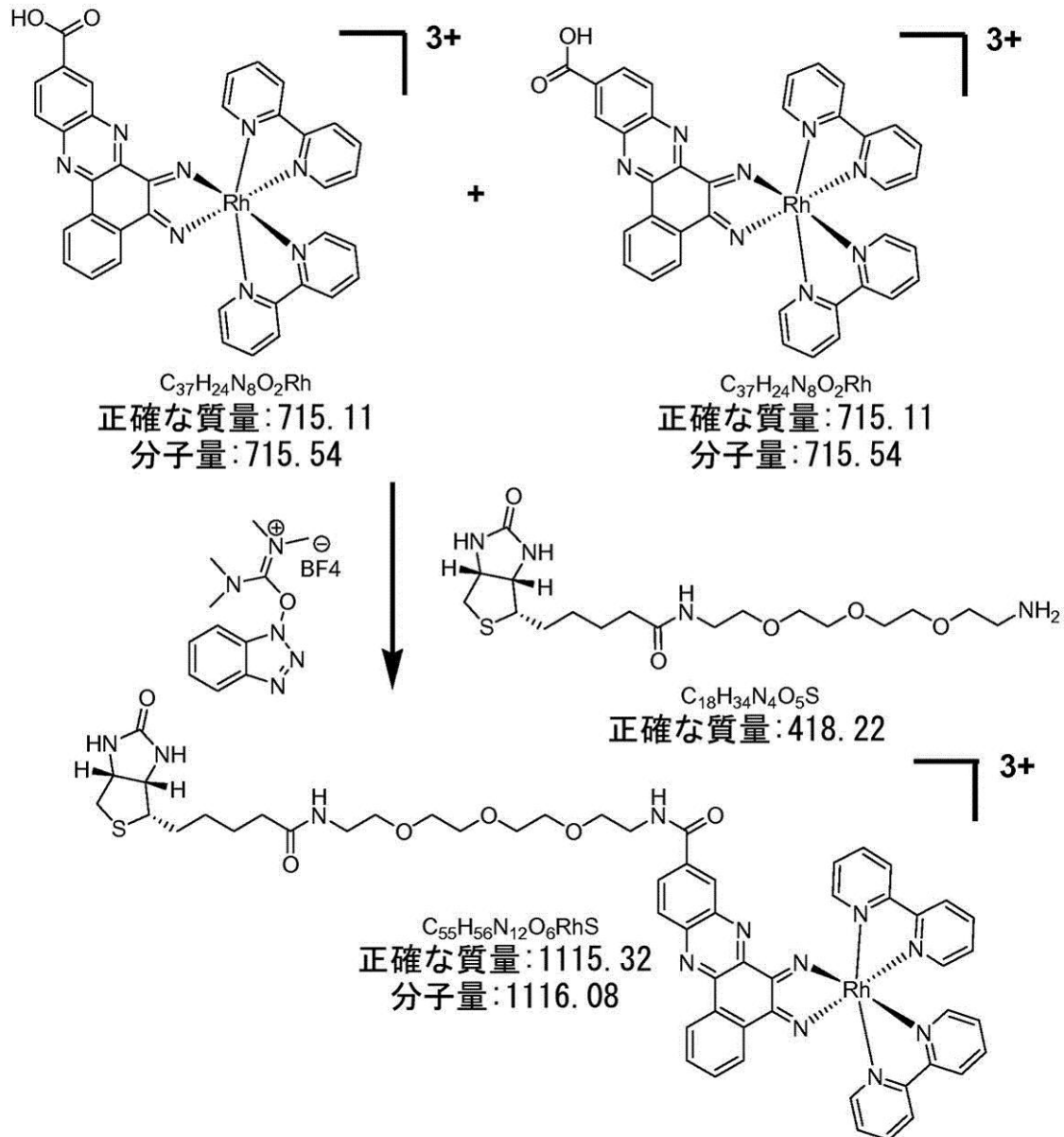
【 図 6 】

FIGURE 6



【図 7】

FIGURE 7



【手続補正書】

【提出日】平成26年9月15日(2014.9.15)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異体を富化する方法であって、前記標的核酸は2つの変異体配列の形態で存在し、前記変異体は単一のヌクレオチド位置で異なり、前記方法は：

前記標的核酸配列を含むサンプルを供給する工程であって、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体の中で少量においてサンプル中に存在する、工程；

前記標的核酸配列の1つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給する工程であって、ここで前記オリゴヌクレオチドは富化されるべき変異体と単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして他方の変異体と単一のヌクレオチド位置で完全に一致する、工程；

前記オリゴヌクレオチド、及び前記標的核酸配列の何れかの変異体の1つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、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する工程；

前記核酸の混合物が変性されるように前記サンプルを加熱する工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ピオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

#### 【請求項2】

前記富化されるべき変異体が変異対立遺伝子であり、そして前記他方の変異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が変異EGFR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EGFR対立遺伝子である、請求項2に記載の方法。

#### 【請求項4】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異対立遺伝子を検出するための方法であって、前記変異対立遺伝子は、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、かつ大過剰の野生型対立遺伝子の中で少量においてサンプル中存在し、前記方法は：

前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化する工程であって、ここで前記富化は、

前記標的核酸配列の1つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給する工程であって、ここで前記オリゴヌクレオチドは変異対立遺伝子と単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして野生型対立遺伝子と単一のヌクレオチド位置で完全に一致する工程；

前記核酸の混合物が変性されるよう前記サンプルを加熱する工程；

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1つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、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する工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材

料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記富化された変異対立遺伝子を含む溶出された緩衝液を回収する工程により行われる、工程、

前記富化された変異対立遺伝子を増幅する工程；及び

前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された変異対立遺伝子から生成されるシグナルを検出する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項 5】

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 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記増幅工程が、対立遺伝子特異的プライマーにより行われる、請求項 4 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異体を富化する方法であって、前記標的核酸は 2 つの変異体配列の形態で存在し、前記変異体は単一のヌクレオチド位置で異なり、前記方法は：

前記標的核酸配列を含むサンプルを供給する工程であって、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体の中で少量においてサンプルに存在する、工程；

前記核酸の混合物が変性されるように、前記サンプルを加熱する工程；

前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供する工程であって、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、1 つの変異体配列の 1 つの鎖と、他方の変異体配列の 1 つの鎖との間で形成され、変異体が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成される、工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項 8】

前記富化されるべき変異体の変異対立遺伝子であり、そして前記他方の変異体が野生型対立遺伝子である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

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 8 に記載の方法。

【請求項 10】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異対立遺伝子を検出するための方法であって、ここで前記変異対立遺伝子は、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少量においてサンプルに存在し、前記方法は：

前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化する工程であって、ここで前記富化は；



前記核酸の混合物が変性されるように、前記サンプルを加熱する工程；

前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供する工程であって、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、前記変異対立遺伝子の1つの鎖と、野生型対立遺伝子の1つの鎖との間で形成され、対立遺伝子が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成される、工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収する工程により行われる、工程；

前記富化された変異対立遺伝子を増幅する工程；及び

前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された変異対立遺伝子から生成されるシグナルを検出する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、 $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項 1 1】

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 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記増幅工程が、対立遺伝子特異的プライマーにより行われる、請求項 1 0 ~ 1 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

$\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、希対立遺伝子 D N A を富化するための化合物。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/077282

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68 C07F15/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q C07F

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 031 098 A (BARTON JACQUELINE K [US] ET AL) 29 February 2000 (2000-02-29) cited in the application abstract, and col. 1 to col. 2 -----	1-17
A	US 6 120 992 A (WAGNER ROBERT E JR [US]) 19 September 2000 (2000-09-19) abstract and col. 10 -----	1-17
Y	WO 01/05800 A2 (KEMPER BORRIES [DE]; GOLZ STEFAN [DE]) 25 January 2001 (2001-01-25) abstract, and p.7 l. 11-36 -----	1-17
Y	WO 2007/084380 A2 (CALIFORNIA INST OF TECHN [US]; BARTON JACQUELINE K [US]; LAU IRVIN H []) 26 July 2007 (2007-07-26) the whole document -----	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2014

Date of mailing of the international search report

24/02/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lapopin, Laurence

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/077282

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6031098	A	29-02-2000	US 6031098 A	29-02-2000
			US 6306601 B1	23-10-2001
			US 6444661 B1	03-09-2002
			US 2003018020 A1	23-01-2003
-----				
US 6120992	A	19-09-2000	US 6120992 A	19-09-2000
			US 6329147 B1	11-12-2001
-----				
WO 0105800	A2	25-01-2001	AU 6694800 A	05-02-2001
			WO 0105800 A2	25-01-2001
-----				
WO 2007084380	A2	26-07-2007	US 2007224612 A1	27-09-2007
			WO 2007084380 A2	26-07-2007
-----				

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210  
弁理士 池田 達則

(72)発明者 アマー グブタ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 2 6 , ダンビル, ガードナー プレイス 1 1 5

(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 0 2 1 2 9 , チャールズタウン, モニュメント スクエア  
9 エー

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA20 HA08 HA14  
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QR08 QR40 QR41 QR42 QR55 QR62  
QS25 QS34 QX01  
4C055 AA01 BA02 BA25 CA01 DA01 EA01 GA02  
4C071 AA01 BB01 CC02 CC21 DD06 EE12 FF04 GG06 HH08 JJ05  
LL10