

(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2004-520815
(P2004-520815A)

(43) 公表日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int.Cl. ⁷		F 1	テーマコード (参考)	
C12N	15/09	C 12 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
C12Q	1/68	C 12 Q 1/68	A	4 B O 2 4
GO1N	33/483	GO 1 N 33/483	F	4 B O 6 3
GO1N	33/53	GO 1 N 33/53	M	
GO1N	33/566	GO 1 N 33/566		
		審査請求 有	予備審査請求 有	(全 71 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2002-529538 (P2002-529538)	(71) 出願人	501377276 インジェネウス コーポレイション Ingenueus Corp. バルバドス国 ブリッジタウン ハイ ス トリート チャンセリー ハウス	
(86) (22) 出願日	平成13年9月10日 (2001.9.10)	(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣	
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月19日 (2003.3.19)	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠	
(86) 國際出願番号	PCT/IB2001/001643	(72) 発明者	ダクシス、ジャスミン アイ. カナダ国 L 4 C 2 N 2 オンタリオ州 リッチモンド ヒル カルティエ クレ セント 36	
(87) 國際公開番号	W02002/024946			
(87) 國際公開日	平成14年3月28日 (2002.3.28)			
(31) 優先権主張番号	09/664,827			
(32) 優先日	平成12年9月19日 (2000.9.19)			
(33) 優先権主張国	米国(US)			

(54) 【発明の名称】四重鎖DNAおよび二本鎖プローブシステム

(57) 【要約】

核酸塩基の第1の配列を含む第1鎖；核酸塩基の第2の配列を含み、ワトソン-クリック結合により前記第1鎖と結合している第2鎖；核酸塩基の第3の配列を含む第3鎖；および核酸塩基の第4の配列を含み、ワトソン-クリック結合により前記第2鎖および前記第3鎖と結合している第4鎖；を含む、核酸四重鎖を始めとする多重鎖構造。多重鎖構造の形成は一価陽イオン(例えばナトリウムおよびカリウム)、二価陽イオン、多価陽イオン、挿入剤および/または核酸の小溝内に結合することが知られている分子により促進される。多重鎖構造と多重鎖構造を形成する方法は、診断、治療、予防、およびナノ工学への用途を有している。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多重鎖構造であって、

核酸塩基の第1の配列を含む第1鎖；

核酸塩基の第2の配列を含み、ワトソン・クリック結合により前記第1鎖と結合している第2鎖；

核酸塩基の第3の配列を含む第3鎖；および

核酸塩基の第4の配列を含み、ワトソン・クリック結合により前記第2鎖および前記第3鎖と結合している第4鎖；

を含む多重鎖構造。

10

【請求項 2】

前記多重鎖構造が、単離された、精製された、人工の、または合成の四重鎖である、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 3】

前記鎖の各々が独立して核酸または核酸類似体から成る、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 4】

前記鎖の各々が独立してDNAまたはRNAから成る、請求項3に記載の多重鎖構造。

【請求項 5】

前記鎖の各々が独立して非荷電のまたは部分的に荷電したバックボーンを含む核酸類似体から成る、請求項3に記載の多重鎖構造。

20

【請求項 6】

前記第2鎖または前記第4鎖の一方はDNAから成り、前記第2鎖または前記第4鎖の他方はRNA、mRNA、hnRNA、rRNA、tRNAまたはcDNAから成る、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 7】

前記第2鎖と前記第4鎖は互いに逆平行である、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 8】

前記第1鎖と前記第2鎖の主溝は前記第3鎖と前記第4鎖の主溝に配置される、請求項7に記載の多重鎖構造。

【請求項 9】

前記第2鎖と前記第4鎖は互いに平行である、請求項1に記載の多重鎖構造。

30

【請求項 10】

前記第1鎖と前記第2鎖の主溝は前記第3鎖と前記第4鎖の小溝に配置される、請求項9に記載の多重鎖構造。

【請求項 11】

各核酸塩基は2つの他の核酸塩基にのみ結合する、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 12】

どの鎖も別の鎖と連続していない、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 13】

前記多重鎖構造には本質的にHoogsteen結合が存在しない、請求項1に記載の多重鎖構造。

40

【請求項 14】

前記多重鎖構造にはG-G四つ組が本質的に存在しない、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 15】

前記第1鎖と前記第2鎖は5～50の塩基対の長さである、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 16】

前記第3鎖と前記第4鎖はゲノムDNAである、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 17】

前記第3鎖と前記第4鎖はゲノムDNA内にハプロタイプを含む、請求項1に記載の多重

50

鎖構造。

【請求項 1 8】

前記第3鎖と前記第4鎖はP C R増幅産物である、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 1 9】

前記多重鎖構造は固相支持体を必要としない、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 0】

前記多重鎖構造が固相支持体に結び付けられる、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 1】

前記固相支持体は非電気伝導性である、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 2】

前記固相支持体は電気伝導性である、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 3】

前記第1鎖、前記第2鎖、前記第3鎖および前記第4鎖の少なくとも1つに結び付けられた治療薬、予防薬、または診断薬をさらに含む、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 4】

前記第1鎖と前記第2鎖は各々5～30塩基の長さであり、第3鎖と前記第4鎖は各々8～3.3×10⁹塩基対の長さである、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 5】

前記第4の配列は25%～75%のプリン塩基と75%～25%のピリミジン塩基を任意のオーダーで含む、請求項1に記載の多重鎖構造。

【請求項 2 6】

請求項1に記載の多重鎖構造を提供する方法であつて、

前記第1鎖、前記第2鎖、前記第3鎖、前記第4鎖、水、緩衝液、および少なくとも1つのプロモータを含むハイブリダイゼーション媒体を提供する工程；および

前記多重鎖構造を提供すべく、前記第4鎖に前記第2鎖をハイブリダイズするのに有効なインキュベーション時間の間、前記ハイブリダイゼーション媒体をインキュベートする工程；から成る方法。

【請求項 2 7】

前記ハイブリダイゼーション媒体は約5～約9のpHに緩衝される、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記少なくとも1つのプロモータは挿入剤である、請求項26に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記少なくとも1つのプロモータは挿入用フルオロフォアであり、前記多重鎖構造を含む試験媒体の蛍光強度は前記第4鎖に対する前記第2鎖の結合親和性と正相関する、請求項28に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記挿入用フルオロフォアは、Y O Y O - 1、T O T O - 1、臭化工チジウム、エチジウムホモニ量体-1、エチジウムホモニ量体-2およびアクリジンから成る群より選択されたメンバーである、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記少なくとも1つのプロモータは、前記第1鎖、前記第2鎖、前記第3鎖および前記第4鎖の少なくとも1つに結び付けられる、請求項26に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記少なくとも1つのプロモータは一価陽イオンである、請求項26に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記少なくとも1つのプロモータは1よりも大きい結合価を有する陽イオンである、請求項26に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記陽イオンはアルカリ金属陽イオン、アルカリ土類金属陽イオン、遷移金属陽イオン、

10

20

30

40

50

$\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ 、三価スペルミジンおよび四価スペルミンから成る群より選択された少なくとも1つのメンバーである、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記陽イオンは、50mM～125mMの濃度で提供された K^+ または Na^+ である、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

前記第3鎖および前記第4鎖が前記第1鎖と第2鎖の前に前記ハイブリダイゼーション媒体中に供給され、前記第1鎖と前記第2鎖は前記ハイブリダイゼーション媒体との接触による再水和に先立ち、脱水した形で提供される、請求項26に記載の方法。

【請求項37】

前記インキュベーション時間は約2時間以下である、請求項26に記載の方法

【請求項38】

前記インキュベートする工程は室温で行なわれる、請求項26に記載の方法。

【請求項39】

前記第4鎖に対する前記第2鎖のハイブリダイゼーションは、蛍光シグナル、化学発光シグナル、または電気化学発光シグナルの変化として検知される、請求項26に記載の方法。

【請求項40】

前記シグナルの強度は、前記第2鎖と前記第4鎖の間の結合親和性と相関がある、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記第1鎖と前記第2鎖の少なくとも1つは、非挿入のフルオロフォアで共有結合で標識され、前記強度は前記結合親和性と逆相関がある、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

非挿入のフルオロフォアはビオチン、ローダミンおよびフルオレセインから成る群より選択されたメンバーである、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記標的配列上または前記プローブ上にシグナル消光剤を提供せずに行われる相同的測定法である、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記第4鎖に対する前記第2鎖のハイブリダイゼーションは、前記第3鎖と前記第4鎖の少なくとも1つに関連する活性を不活性化する、請求項26に記載の方法。

【請求項45】

前記第1鎖と前記第2鎖の少なくとも1つはさらに医薬を含み、前記第4鎖に対する前記第2鎖のハイブリダイゼーションは、前記第3鎖上、第4鎖上、または前記第3鎖および前記第4鎖の少なくとも1つに結合した別の分子上の標的から前記医薬を有効な距離に配置する、請求項26に記載の方法。

【請求項46】

前記医薬は、臨床に関連する遺伝子のプロモータ配列を結び付けるように設計された核酸、臨床に関連する遺伝子を結び付けるように設計された核酸、または病原体の複製起点部位を結び付けるように設計された核酸から成る群より選択されたメンバーである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記第3鎖と前記第4鎖に対する前記第1鎖と前記第2鎖の比は、約10:1である、請求項26に記載の方法。

【請求項48】

前記第1鎖、前記第2鎖、前記第3鎖および前記第4鎖の各濃度が 5×10^{-10} M以下である、請求項26に記載の方法。

【請求項49】

前記少なくとも1つのプロモータは、挿入しない様式で結合しあつ少なくとも 10^3 M⁻¹。

10

20

30

40

50

¹ の結合定数で結合する核酸小溝結合分子である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記第 1 鎖がワトソン - クリック結合により前記第 3 鎖と結合している、請求項 1 に記載の多重鎖構造。

【請求項 5 1】

請求項 1 の多重鎖構造を含む電気回路。

【請求項 5 2】

結合を測定する方法であって、

少なくとも 1 つのプリン塩基と少なくとも 1 つのピリミジン塩基を含む標的配列を有する標的核酸または核酸類似体を提供する工程；

核酸配列または核酸類似体配列を含む二本鎖プローブを提供する工程；

ハイブリダイゼーションプロモータを提供する工程；

標的配列に結び付けられたプローブを含むワトソン - クリック三本鎖または四重鎖を含む試験試料を提供するために、媒体に前記プローブ、前記標的および前記ハイブリダイゼーションプロモータを加える工程；

試験試料に蛍光放射線を発させるために励起放射線で前記試験試料を照射する工程；

前記蛍光放射線の強度を検出する工程であって、該強度は前記プローブと前記標的配列間の結合親和性と相關する工程；および

前記強度から前記プローブと前記標的配列間の対合の程度を決定する工程；から成る方法。

10

20

20

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(発明の背景)

1. 発明の属する技術分野

本発明は核酸多重鎖に関し、より詳細には二本鎖核酸プローブと二本鎖核酸標的配列との間の特異的結合により四重鎖を形成する方法に関する。

【0 0 0 2】

2. 関連技術の記載

核酸二本鎖は最も広く研究されている多重鎖核酸構造の種類であるが、核酸は、ある条件下では、三本鎖や四重鎖構造も形成することが見出されている。

30

最近まで、三本鎖を形成する 3 つの核酸鎖の間のハイブリダイゼーションは、非常に限られた核酸の種類（例えばポリプリンまたはポリピリミジン配列）に限定されると広く考えられていた。例えば Florisら、「原子価塩混合溶液におけるプリン - プリン - ピリミジン三重らせん形成に対する陽イオンの影響 (Effect of cations on purine-purine-pyrimidine triple helix formation in mixed-valence salt solutions)」、260 Eur. J. Biochem. 801 - 809 (1999) を参照されたい。さらに、そのような三本鎖形成やハイブリダイゼーションは、ワトソン - クリック塩基対形成ではなく、隣接する核酸塩基の限定的な種類間の Hoogsteen 結合に基づいていると考えられていた。例えば Florisらおよび Derivanらに付与された米国特許第 5,874,555 号を参照されたい。しかしながら、最近、発明者らはいくつかの特許出願において、ワトソン - クリック塩基対形成に基づく三本鎖核酸を作成することができ、それを特異的結合に関する非常に正確で感度の高い測定法の基礎として使用することができる事を明らかにした。2000 年 7 月 10 日と 1999 年 12 月 21 日にそれぞれ出願された米国特許出願番号第 09/613,263 号および第 09/468,679 号を参照されたい。

40

【0 0 0 3】

三本鎖核酸の場合と同様に、四重鎖核酸に関する一般通念は、そのような特有の構造は核酸の比較的狭いクラスで比較的極端な条件下でのみ存在するというものであった。特に、Senら (Nature 334: 364 - 366 (1988)) は、グアニンに富んだ

50

オリゴヌクレオチドがインビトロで四本鎖ヘリックスに自発的に自己集合できることを明らかにした。Senら(Biochemistry 31: 65-70 (1992))は、そのような四本鎖複合体が8、12または16個のオリゴマーから構成された超構造にさらに会合できることを明らかにした。

【0004】

Marshら(Biochemistry 33: 10718-10724 (1994)およびNucleic Acids Research 23: 696-700 (1995))は、いくつかのグアニンに富んだオリゴヌクレオチドが、位置がずれた平行アラインメントにも集合し、長い「G(グアニン)-ワイヤ」を形成することを明らかにした。このような高次構造は1つの平面内に整列され、Hoogsteen塩基対形成によりひとつにまとめられた4つのグアノシン残基から成るG-四つ組により安定化される。Senら(Biochemistry 31: 65-70 (1992))によれば、オリゴマー内に存在する少なくとも3つの近接するグアニンが、そのような高次構造の構成に重要である。

10

【0005】

四本鎖DNAは、HIV-1インテグラーゼの阻害(Mazumderら、Biochemistry 35: 13762-13771 (1996))、減数分裂中のシナプシス形成(Senetら、Nature 334: 364-366 (1988))、テロメアの維持(Williamsonら、Cell 59: 871-880 (1989)、Baranら、Nucleic Acids Research 25: 297-303 (1997))のような様々な生物学的プロセスにおいて役割を果たすことが示唆されている。

20

【0006】

グアニンに富んだ四重鎖の生成の制御がそのような生物学的プロセスの制御の鍵となり得ることもさらに示唆されている。例えば、Hardinらに付与された米国特許第6,017,709号は、グアニン四つ組の形成を阻害する薬によりテロメラーゼ活性が制御され得ることを示唆している。

20

【0007】

Pittnerらに付与された米国特許第5,888,739号は、G-四つ組に基づく四重鎖を、核酸を検知する測定法に使用できることを明らかにしている。相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイゼーションしている時、G-四つ組構造は広がっているか線状になっているため、G-四つ組構造の異なる部分上の供与体と受容体の間の距離が増加し、その結果、それらの相互作用が減少し、構造から発せられるシグナル(例えば蛍光)の検出可能な変化が減少する。

30

【0008】

Agarwalらに付与された米国特許第5,912,332号は、合成オリゴヌクレオチドを所望の完全長オリゴヌクレオチドと特異的にハイブリダイズさせ、同時に四重鎖DNAのようなマルチマー集合物を形成する、合成オリゴヌクレオチドの精製方法を開示している。その後、精製すべきオリゴヌクレオチドを含むマルチマー集合物はサイズ排除技術を用いて単離される。

40

【0009】

上述の発展にもかかわらず、四重鎖核酸の完全な可能性は十分には理解されておらず、また、十分に活用されてもいいない。

本明細書に引用した参考文献はすべて、参照によりその全体が本明細書に組込まれる。

【0010】

(発明の概要)

本発明は、核酸塩基の第1の配列を含む第1鎖；

核酸塩基の第2の配列を含み、ワトソン-クリック結合により第1鎖と結合している第2鎖；

核酸塩基の第3の配列を含む第3鎖；

50

および

核酸塩基の第4の配列を含み、ワトソン-クリック結合により第2鎖および第3鎖と結合している第4鎖；
を含む多重鎖構造を提供する。

【0011】

さらには、本発明の多重鎖構造を提供する方法も提供する。

該方法は、

第1鎖、第2鎖、第3鎖、第4鎖、水、緩衝液、および少なくとも1つのプロモータを含むハイブリダイゼーション媒体を提供する工程；

および

多重鎖構造を提供すべく、第4鎖に第2鎖をハイブリダイズするのに有効なインキュベーション時間の間、ハイブリダイゼーション媒体をインキュベートする工程；から成る。

【0012】

またさらには、二本鎖プローブを使用する一本鎖および二本鎖標的の測定法も提供する。本発明を、同様な参照数字が同様な要素のことを指す図面に関連付けて説明する。

【0013】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

上記の背景のセクションで論じた四重鎖とは異なり、本発明の好ましい多重鎖構造は、伝統的なワトソン-クリック結合規則に従ってひとつに結合した少なくとも4本の核酸鎖を含んでいる。

【0014】

本明細書に使用する場合、用語「ワトソン-クリック結合」とは、対合した対向塩基を介した、対向する核酸（または核酸類似体）鎖の対（ペア）の間の特異的結合を定義するものとする。ワトソン-クリックの四重鎖形成は、本明細書ではハイブリダイゼーションの事象と称することもあるが、それは単に便宜のためであって、ワトソン-クリックの四重鎖形成がどのように最良に特徴づけられるかに関して本発明の範囲を制限するものではない。

【0015】

本発明の多重鎖構造は好ましくは四重鎖である。多重鎖の各鎖は独立して核酸または核酸類似体から成る。適切な核酸には、例えばDNAやRNAが含まれる。好ましい核酸類似体は非荷電のまたは部分的に荷電したバックボーン（すなわち天然のDNAバックボーンほどには陰性でない電荷を有するバックボーン）を含む。

【0016】

ある実施形態では、四本鎖の第2鎖と第4鎖の一方はDNAから成り、第2鎖と第4鎖の他方はRNA、mRNA、hnRNA、rRNA、tRNAまたはcDNAから成る。

【0017】

ある実施形態では、第2鎖と第4鎖は互いに逆平行である。これらの実施形態は鏡像相補性を有するものとして定義される。これらの実施形態では、第1と第2鎖の主溝が第3鎖と第4鎖の主溝に配置される。

【0018】

別の実施形態では、第2鎖と第4鎖は互いに平行である。入れ子式（nest ed）の相補性を有するこれらの実施形態では、第1鎖と第2鎖の主溝が第3鎖と第4鎖の小溝に配置される。

【0019】

ある実施形態では、各核酸塩基が2つの他の核酸塩基にのみ結合する。これらの実施形態のうちのいくつかでは、第2鎖の塩基は第1鎖の対合塩基および第4鎖の対合塩基に（ワトソン-クリック規則により）特異的に結合し、第4鎖の塩基が第3鎖の対合塩基および第2鎖の対合塩基に（ワトソン-クリック規則により）特異的に結合し、第1鎖と第3鎖の塩基は、1つの他の塩基にのみ各々結合する。したがって、伝統的なワトソン-クリック塩基対に加えて、そのような実施形態は次のワトソン-クリック塩基トリプレットを含

10

20

30

40

50

んでいる：A - T - A、T - A - T、U - A - T、T - A - U、A - U - A、U - A - U、G - C - G、および／またはC - G - C (C⁺ - G - C および／または任意の他のイオン化塩基種も含む)。

【0020】

ある実施形態では、第1鎖と第3鎖の対向する塩基が、(a)第1鎖と第2鎖の対向する塩基間の結合；(b)第3鎖と第4鎖の対向する塩基間の結合；および(c)第2鎖と第4鎖の対向間の結合に加えて、さらに互いに結合する。

【0021】

本発明の多重鎖構造のある実施形態では、どの鎖も別の鎖と連続していない。すなわち、少なくとも4つの別個の鎖が存在する。折り曲げられた構成やそれと同様な構成(例えばヘアピンターンなど)も本発明の範囲内にあるが、一本鎖の折り曲げられた部分は、最小数の4つの別個の鎖に対して鎖の数を複数回形成しない。

【0022】

わずかな量のHoogsteen結合および／またはG-G四つ組が存在することはあり得るが、本発明の多重鎖構造は、多重鎖構造の維持のためにHoogsteen結合またはG-G四つ組に依存しないことが好ましい。すなわち、本発明の多重鎖構造には本質的にHoogsteen結合が存在せず、G-G四つ組が本質的に存在しないことが好ましい。

【0023】

ある実施形態では、多重鎖の第1鎖と第2鎖は5～50の塩基対の長さであり(好ましくは5～30の塩基長)、第3鎖と第4鎖は8～3.3×10⁹塩基対長である。例えば、第1鎖と第2鎖が二本鎖プローブを構成し、第3鎖と第4の鎖がハプロタイプを含み得るゲノムDNAのような二本鎖標的を構成し得る。

【0024】

実施形態では、第3鎖および第4鎖はPCR增幅産物である。

本発明の多重鎖は、溶液中、固相支持体上、インビトロ、またはインビボで存在し得る。固相支持体は電気伝導性であってもよいし(例えば電極)、または非電気伝導性であってもよい。

【0025】

本発明による四重鎖形成は様々な用途に適している。例えば、二本鎖核酸開裂剤に共有結合で結合された二本鎖プローブは、二本鎖核酸の標的配列を特異的に開裂させるために使用することができる。化学療法薬に共有結合で結合された二本鎖プローブは、二本鎖核酸の標的配列を特異的に処理するために使用することができる。したがって、本発明は、第1鎖、第2鎖、第3鎖、第4鎖の少なくとも1つに結合された治療薬、予防薬、または診断薬をさらに含む多重鎖構造を包含する。

【0026】

さらに、本発明の多重鎖は、分子(つまりナノスケール)レベルの電気回路の提供というような、ナノ工学で使用するのに適している。核酸を用いたナノ工学に関するさらなる詳細は、Senらに付与された米国特許第5,948,897号およびそこに引用された文献に見出すことができる。

【0027】

本発明の多重鎖構造は、第1鎖、第2鎖、第3鎖、第4鎖、水、緩衝液、および少なくとも1つのプロモータを含むハイブリダイゼーション媒体を提供する工程；および第4鎖に第2鎖をハイブリダイズするのに有効なインキュベーション時間の間、ハイブリダイゼーション媒体をインキュベートする工程；から成る方法により提供することができる。

【0028】

ハイブリダイゼーション媒体は、核酸の保存に適していることが知られているいかななる従来の媒体であってもよい。例えばSambrookら、"Molecular Cloning: A Lab Manual,"第2巻(1989年)を参照されたい。例えば、媒体には、ヌクレオチド、水、緩衝液および標準塩濃度が含まれ得る。四重鎖構成を

10

20

30

40

50

促進するために二価陽イオンが専ら使用される場合には、EDTAやEGTAのようなキレート化剤が反応混合物に含まれるべきではない。

【0029】

相補的塩基間の特異的結合は、温度、塩濃度、静電気強度、および緩衝液組成を変化させた、種々の条件下で起こる。そのような条件と、該条件を適用する方法は、当該技術分野で周知である。

【0030】

約7.6を超えるpHレベルでは不安定であるか存在しない多くのHoogsteen型の多重鎖とは異なり、本発明のワトソン-クリック多重鎖は、広範囲のpHレベルにわたって、好ましくは約pH5～約pH9で安定している。

10

【0031】

さらに、本発明の多重鎖は、特定の先行技術の四重鎖とは異なり、ホモピリミジン配列またはホモプリン配列の存在を必要としない。例えば標的配列は、25%～75%のプリン塩基と75%～25%のピリミジン塩基を任意の順序で含み得る。

【0032】

多重鎖は、約5～25の温度で、約2時間かまたはそれより短い時間に形成されることが好ましい。インキュベーション時間は、室温であっても、5分未満であることが好ましい。それより長い反応時間は要求されないが、多くの場合で24時間以内のインキュベーションは四重鎖に悪影響を及ぼさなかった。本発明のワトソン-クリック四本鎖の迅速な結合時間は、Hoogsteen四重鎖にかかるはるかに長い結合時間とは対照的である。

20

【0033】

ハイブリダイゼーション媒体中のプロモータは、好ましくは挿入剤または陽イオンである。挿入剤は、例えば、YOYO-1、TOTO-1、臭化エチジウム、エチジウムホモ二量体-1、エチジウムホモ二量体-2、およびアクリジンから成る群より選択されたメンバーのようなフルオロフォアである。

【0034】

適当な陽イオンには、Na⁺（好ましくは50mM～125mMの濃度）、K⁺および他のアルカリ金属イオンのような一価陽イオン；アルカリ土類金属イオン（例えばMg²⁺およびCa²⁺）および二価遷移金属イオン（例えばMn²⁺、Ni²⁺、Cd²⁺、Co²⁺およびZn²⁺）のような二価陽イオン；ならびにCo(NH₃)₆³⁺、3価のスペルミジンおよび4価のスペルミンのような、少なくとも3つの陽電荷を有する陽イオン；が含まれる。Mn²⁺は、10mM～30mMの濃度で提供されることが好ましい。Mg²⁺は、15mM～20mMの濃度で提供されることが好ましい。Ni²⁺は、約20mMの濃度で提供されることが好ましい。ある実施形態では、Mg²⁺とMn²⁺が、各々10mM、各々15mM、各々20mM、または各々30mM（つまり各10～30mM）の濃度で共に提供される。

30

【0035】

多重鎖を形成する媒体に加えられる陽イオンの量は、陽イオンの性質、プローブの濃度、標的の濃度、追加の陽イオンの存在、ならびにプローブおよび標的の塩基含量を含む多くの要因によって決まる。好ましい陽イオン濃度と混合物は実験的に常法で検出することができる。

40

【0036】

必須ではないが、他のプロモータとして、例えば、RecAタンパク質、T4遺伝子32タンパク質、大腸菌一本鎖結合タンパク質、核酸主溝または核酸小溝結合タンパク質などの一本鎖結合タンパク質や、ビオロゲン、ならびにアクチノマイシンD、ソラレンおよびアンゲリシンなどのさらなる挿入用物質が含まれる。そのような促進試薬は、例えば異常なpHレベルや極端な高温下での、極端な操作条件において有用であることが判明し得る。

【0037】

50

本発明は、第4鎖に対する第2鎖のハイブリダイゼーションが第3鎖と第4鎖の少なくとも1つに関連する活性を不活性化する方法も可能にする。したがって、第1鎖と第2鎖の少なくとも1つはさらに医薬を含み、第4鎖に対する第2のハイブリダイゼーションは、第3鎖上、第4鎖上、または第3鎖および第4鎖の少なくとも1つに結合した別の分子上の標的から医薬を有効な距離に配置する。医薬は好ましくは、臨床に関連する遺伝子のプロモータ配列を結び付けるように設計された核酸、臨床に関連する遺伝子を結び付けるように設計された核酸、または病原体の複製起点部位を結び付けるように設計された核酸から成る群より選択されたメンバーである。

【0038】

好ましい実施形態では、本発明は、核酸配列または核酸類似体配列を含む一本鎖または二本鎖標的と、核酸配列または核酸類似体配列を含む二本鎖プローブとの間の、迅速で、感度が高く、環境にやさしく、安全な結合測定法を提供する。

【0039】

本発明の測定法は、例えば、折り畳まれたヌクレオチド配列中のアクセス可能な領域を同定したり、ハイブリダイゼーション複合体中の誤対合塩基対の数を決定したり、ゲノム地図を作成したりするために使用可能である。

【0040】

本発明はプローブと標的間の特異的結合の存在を検出するだけでなく、プローブと標的間の相互作用の性質に関する定性的・定量的情報も提供する。従って、従事者は、本発明により二本鎖プローブ中の配列と二本鎖標的の鎖中の配列との間に生じる完全対合、1つの塩基対誤対合、2つの塩基対誤対合、3つの塩基対誤対合、1つの塩基対欠失、2つの塩基対欠失および3つの塩基対欠失を、本発明によって区別することができる。

【0041】

本発明の実施形態は、第1のプローブ-標的混合物について測定したシグナル（例えば蛍光、化学発光、電気化学発光、または電気的性質）を、同じ標的と結合させた、各々が少なくとも1つの塩基だけ第1のプローブと異なる他のプローブによって示された同じ型のシグナルに対して較正することを含む。

【0042】

測定したシグナル（例えば蛍光強度）の大きさが標的とプローブ間の結合親和性の関数である検量線を生成することが可能である。標的と複数の異なるプローブ間の結合親和性は、誤対合塩基の数、誤対合の性質（A-G対A-C対T-G対T-Cなど）、四重鎖の内部の誤対合の位置などに応じて変化するため、本発明の測定方法を、標的の配列決定を行うために使用することが可能である。

【0043】

ある実施形態では、測定するシグナルを、試験試料に含まれるフルオロフォアの蛍光強度とすることができます。そのような実施形態では、フルオロフォアがシグナル消光あるいはシグナル増幅のいずれによりハイブリダイゼーションのシグナルを送るか否かにより、プローブと標的間の結合親和性は強度と正相関または逆相関の関係となる。選択条件下で、挿入剤により発生する蛍光強度はプローブ-標的結合親和性と正相関し、プローブに共有結合により結合される挿入されないフルオロフォアを使用する好ましい実施形態の強度はプローブ-標的結合親和性と逆相関する。プローブと標的との間の対合の程度が、好ましくは0-2の誤対合および/または欠失を含む範囲において、より好ましくは0-3の誤対合および/または欠失を含む範囲において増加するにつれて、非挿入のフルオロフォアに関する蛍光強度は減少する。

【0044】

本発明はプローブと標的間の結合親和性の定量化を可能にする。そのような情報は、最適化された結合特性を有するアンチセンス薬を設計することを含めた様々な用途に有用であり得る。

【0045】

本発明の測定法は好ましくは相同的である。測定は、測定シグナルの大きさの検出に先立

10

20

30

40

50

って自由プローブと自由標的からプローブ標的複合体を分離せずに行うことが可能である。測定はゲル分離ステップを必要としないため、試験のスループットの大きな増加を可能にする。定量分析は単純かつ正確である。従って、この結合測定法は、多くの時間と費用を節約し、容易に自動化できる。さらに、この結合測定法は、緩衝液、pH、イオン濃度、温度、インキュベーション時間、プローブ配列と標的配列の相対濃度、挿入剤濃度、標的配列の長さ、プローブ配列の長さ、および考えられる補因子の必要条件のような結合変数を、速やかに決定することを可能にする。

【0046】

測定法は例えばウェル内またはマイクロチャネル内の溶液中、不浸透性表面上またはバイオチップ上で実行することができる。ある実施形態では、第3鎖と第4鎖が第1鎖と第2鎖の前にハイブリダイゼーション媒体中に供給され、第1鎖と第2鎖はハイブリダイゼーション媒体との接触による再水和に先立ち、脱水した形で提供される。

【0047】

さらに、本発明の測定法は好ましくは、標的上のまたはプローブ上にシグナル消光剤を提供せずに行われる。

発明者らはハイブリダイゼーションに対する蛍光強度測定法の利点を先に開示したが（例えば1998年12月31日出願の米国特許出願第09/224,505号を参照）、本発明の測定法の特定の実施形態は、プローブと二本鎖標的間の四重鎖を特異的に検出し、標的を変性する必要性をなくす。

【0048】

例えばPitnerら（前掲）の四重鎖ハイブリダイゼーションの非常に限定的なHoggsteenモデルではなくワトソン-クリック塩基対合にプローブと標的の間の相互作用に基づいている（少なくともAがT（またはRNAの場合のU）に結合し、GがCに結合するという意味で）二本鎖核酸プローブと二本鎖核酸標的との間に形成された四重鎖を、本願発明者が特異的に測定できることは驚くべきことである。

【0049】

本発明の測定法に使用される適切なプローブには、例えばdsDNA（二本鎖DNA）、dsRNA（二本鎖RNA）、DNA:RNAハイブリッド、dsPNA、PNA:DNAハイブリッド、および非荷電のバックボーンまたは部分的に荷電したバックボーンを有する他の二本鎖核酸類似体が含まれる。8個から20個までの塩基の長さを有するプローブ配列が好まれる。なぜならそれが、原核生物および真核生物のうちの最小の固有DNA配列が見出される範囲だからである。12～18個の塩基から成るプローブは、ヒトゲノムにおける最小の固有配列の長さであるので、特に好ましい。ある実施形態では、5～30塩基から成るプローブが最も好ましい。しかしながら、ヌクレオチド配列を固有に識別するために結合する複数の非固有の標的配列を有するヌクレオチド配列を検出するためには、複数のより短いプローブを使用してもよい。プローブの長さは標的の長さと対合するように選択することができる。

【0050】

本発明は、危険で、労力を要し、かつ使用に時間がかかり、常に再生されなければならない放射性のプローブの使用を必要としない。本発明のプローブは、好ましくは、安全に使用でき、何年も安定している。従って、プローブを多量に作成または注文し、保存することが可能である。

【0051】

ある実施形態では、プローブは、多分子シグナリング複合体または酸化還元対で、もしくは化学発光特性または電気化学発光特性を引き起こす標識で標識される。

【0052】

蛍光性の挿入剤がハイブリダイゼーション媒体の中にはない場合、プローブまたは標的（好ましくはプローブ）は、共有結合で結び付けられた蛍光標識を有することが好ましい。標識は好ましくは非挿入のフルオロフォアまたは挿入用フルオロフォアである。そのような実施形態では、フルオロフォアは、プローブのいずれかの端部に結び付けられることが好

10

20

30

40

50

ましい。好ましい蛍光マーカーには、ビオチン、ローダミン、アクリジンおよびフルオレセイン、ならびに励起エネルギーで照射された時に蛍光を発する他のマーカーが含まれる。

【0053】

励起波長は、使用されているフルオロフォアの励起最大値に対応させるために、(日常的な実験および/または慣習的な知識によって)選択され、好ましくは200~1000nmである。フルオロフォアは200~1000nmの発光波長を有するように好ましくは選択される。好ましい実施形態では、400~540nmの波長を有する光でフルオロフォアを照射するためには、アルゴンイオンレーザーが使用され、蛍光の放出は500~750nmの範囲で検出される。

10

【0054】

本発明の測定法は、例えば5~85のような種々の温度にわたって行うことが可能である。ある先行技術の測定法では、高い温度が必要とされるため、測定のコストと遅れを増すこととなっている。他方、本発明は室温またはそれより低い温度(例えば25未満の温度)で行うことが可能である。

【0055】

本発明の信頼性は、前記標的中のゲアニン・シトシン含量には依存しない。A-T塩基対が2つの水素結合しか形成しない一方でG-C塩基対は3つの水素結合を形成するため、より高いGまたはC含量を有する標的配列およびプローブ配列は、より高い溶融温度を有し、より安定している。従って、完全に対合したハイブリッド中に存在するG-C含量よりも、ハイブリダイズしたプローブおよび標的領域のG-C含量が増加した塩基対誤対合は、誤対合プローブに付随する結合の弱さを相殺し得る。

20

【0056】

本発明の測定法は非常に感度が高く、そのため、標的のPCR增幅を行う必要性がない。例えば、約10フェムトモルの標的と約10フェムトモルのプローブを含む、体積が約20μlの試験試料を測定することが可能である。本発明の実施形態は、 5×10^{-9} Mの濃度、好ましくは 5×10^{-10} M以下の濃度の標的を測定するのに十分な程度に感度が高い。本発明の実施形態は 5×10^{-9} Mの濃度、好ましくは多くて 5×10^{-10} Mの濃度のプローブを使用するように十分な程度に感度が高い。上記の値が、該方法がそれより高い濃度を検出できないことを示唆する意味ではないことは言うまでもない。

30

【0057】

プローブ(例えば第1鎖と第2鎖)対標的(例えば第3鎖と第4鎖)の比は、30:1~1:1、好ましくは約10:1である。

本発明を以下の実施例を参照しながらより詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されないことを理解すべきである。

【0058】

実施例

実施例1

ヒト肺囊胞性線維症遺伝子のエクソン10に由来し(Nature 380 207(1996年))、G-C含量パーセントが30%から52%に変わるように改変したセンスおよびアンチセンス50mer ssDNA標的配列を、DNA合成装置(Expedite 8909, PerSeptive Biosystems)で合成し、HPLCにより精製した。等モルの量の相補的オリゴヌクレオチドを95度で10分間変性し、温度が21まで1.5時間にわたって冷却されるにつれて、徐々にアニールさせた。二本鎖DNA(dsDNA)オリゴヌクレオチドを、1pmole/μlの濃度でddH₂Oに溶解した。

40

【0059】

野生型dsDNA標的Aのセンス鎖の配列(配列番号1)は以下の通りであった: 5' - GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG - 3'。

50

【0060】

野生型 d s D N A 標的 A のアンチセンス鎖の配列（配列番号 2）は以下の通りであった：

5' - C A G A G T C A T C G T A G G A C A C A C C A G A G A T
G A C A G T G T C T G T C A T G G T G C T C - 3'。

【0061】

標的 B は野生型塩基 C A T と A T G がそれぞれ塩基 C G T と A C G に置き換わったセンス鎖とアンチセンス鎖上の 1 塩基対変異（下線）を除くと野生型標的 D N A と同一の、 50 m e r 变異型 d s D N A 標的であった。

【0062】

変異型標的 B のセンス鎖の配列（配列番号 3）は以下の通りであった： 5' - G A G C 10
A C C A T G A C A G A C A C T G T C G T C T C T G G T G T G
T C C T A C G A T G A C T C T G - 3'。

【0063】

変異型標的 B のアンチセンス鎖の配列（配列番号 4）は以下の通りであった： 5' - C A G A G T C A T C G T A G G A C A C A C C A G A G A C G A C A G T G T C T G T C A T G G T G C T C - 3'。

【0064】

標的 C は野生型塩基 C A T と A T G がそれぞれ塩基 C T T と A A G に置き換わったセンス鎖とアンチセンス鎖上の 1 塩基対変異（下線）を除くと野生型標的 D N A と同一の、 50 m e r 变異型 d s D N A 標的であった。

【0065】

変異型標的 C のセンス鎖の配列（配列番号 5）は以下の通りであった： 5' - G A G C 20
A C C A T G A C A G A C A C T G T C T T C T C T G G T G T G
T C C T A C G A T G A C T C T G - 3'。

【0066】

変異型標的 C のアンチセンス鎖の配列（配列番号 6）は以下の通りであった： 5' - C A G A G T C A T C G T A G G A C A C A C C A G A G A A G A C A G T G T C T G T C A T G G T G C T C - 3'。

【0067】

標的 D は野生型塩基 C T C と G A G がそれぞれ塩基 C T T と A A G に置き換わったセンス鎖とアンチセンス鎖上の 1 塩基対変異（下線）を除くと野生型標的 D N A と同一の、 50 m e r 变異型 d s D N A 標的であった。

【0068】

変異型標的 D のセンス鎖の配列（配列番号 7）は以下の通りであった： 5' - G A G C 30
A C C A T G A C A G A C A C T G T C A T C T T T G G T G T G
T C C T A C G A T G A C T C T G - 3'。

【0069】

変異型標的 D のアンチセンス鎖の配列（配列番号 8）は以下の通りであった： 5' - C A G A G T C A T C G T A G G A C A C A C C A A A G A T G A C A G T G T C T G T C A T G G T G C T C - 3'。

【0070】

標的 E は野生型塩基 C T C と G A G がそれぞれ塩基 C C C と G G G に置き換わったセンス鎖とアンチセンス鎖上の 1 塩基対変異（下線）を除くと野生型標的 D N A と同一の、 50 m e r 变異型 d s D N A 標的であった。

【0071】

変異型標的 E のセンス鎖の配列（配列番号 9）は以下の通りであった： 5' - G A G C 40
A C C A T G A C A G A C A C T G T C A T C C C T G G T G T G
T C C T A C G A T G A C T C T G - 3'。

【0072】

変異型標的 E のアンチセンス鎖の配列（配列番号 10）は以下の通りであった： 5' - C 50

A G A G T C A T C G T A G G A C A C A C C A G G G A T G A C
A G T G T C T G T C A T G G T G C T C - 3'.

【0073】

プローブ A は、 5' 位置にフルオレセイン部分が取り付けられた 15mer dsDNA プローブであり、 50mer 野生型標的 A の中心付近でセンス鎖およびアンチセンス鎖の 15 ヌクレオチドセグメントに鏡像相補性となるよう設計された。そのようなプローブの鎖は、上述の DNA 合成装置で合成し、 HPLC により精製した。等モル量のプローブ鎖を 95 °C で 10 分間変性し、温度が 21 °C まで 1.5 時間にわたって冷却されるにつれて、徐々にアニールさせた。 dsDNA プローブは、 1 pmole / μl の濃度で ddH₂O に溶解した。

10

【0074】

プローブ A のセンス鎖の配列（配列番号 11）は以下の通りであった： 5' - F1u - C T G T C A T C T C T G G T G - 3'。

プローブ A のアンチセンス鎖の配列（配列番号 12）は以下の通りであった： 5' - F1u - C A C C A G A G A T G A C A G - 3'。

【0075】

各ハイブリダイゼーション反応混合物（40 μl）は以下を含有していた： 0.4 pmole の標的 dsDNA 、 4 pmole の 5' フルオレセイン標識した dsDNA プローブ 、 10 mM Tris - HCl 、 pH 7.5 および 100 mM NaCl 。反応混合物は予め変性せずに室温（21 °C）で 1 時間インキュベートした。試料を石英キュベットに入れ、 488 nm の波長を有するアルゴンイオンレーザービームで照射し、蛍光の放出をモニターした。最大蛍光強度は、フルオレセインの放射波長である 525 nm の波長で生じた。図 1 は、分析した各試料の波長の関数としてプロットした蛍光の強度を示す。

20

【0076】

KCl の不在下では、 dsDNA 標的とプローブ A 間のハイブリダイゼーションは検出されず、野生型 dsDNA 標的 A または変異型 dsDNA 標的 D が dsDNA プローブ A と混合された時か dsDNA プローブのみが存在する時に観察されるのと同様の蛍光強度が得られた（データは図示しない）。

【0077】

100 mM KCl の存在下で 21 °C で 1 時間インキュベーションした後では、 dsDNA 標的 A と dsDNA プローブ A の上の完全に相補的な配列から成る dsDNA 標的 : dsDNA - F 四重鎖が容易に生じ、 dsDNA プローブ A (標識 dsDNA - F) のみによって発せられた蛍光強度と比較して、蛍光放出の強度が 62 % 減少した（図 1）。対照的に、 1 つの塩基対 G - T 誤対合を含む不完全に相補的な dsDNA 標的 D : dsDNA - F プローブ A 四重鎖は、上記の反応条件では安定性が低く、 dsDNA プローブ A のみによって示された蛍光強度と比較して蛍光強度が 18 % しか減少しなかった。

30

【0078】

特定の濃度の K⁺ のような一価陽イオンの含有は、予め変性せずに dsDNA 標的とフルオレセイン標識 dsDNA プローブとの間の四重鎖を形成するのに十分であった。四重鎖の形成は、ワトソン - クリックの塩基対親和性に基づいて起こり、完全に相補的な相同的二本鎖間では測定可能でかなり多量の四本鎖が生じた。さらには反応は、天然 dsDNA を使用して、 10 対 1 のプローブ対標的の比で、たった 1 時間以内の室温でのインキュベーションで起こった。この実施例で使用した dsDNA 標的と dsDNA プローブは相同で、 53 % の GC 含量を含んでおり、どの DNA 鎖にもホモプリンやホモピリミジンの延長部を含んでいなかった。四重鎖の形成では二本鎖プローブがその右旋性キラリティを犠牲にする必要があるという推論にもかかわらず、 DNA 四重鎖は容易に生じた。本発明のハイブリダイゼーション測定法は、 dsDNA を使用して、完全に相補的 DNA 配列と、 1 塩基誤対合を含む DNA 配列とを区別することができた。

40

【0079】

実施例 2

50

実施例1で行った四重鎖DNA測定法は、反応混合物中に一価陽イオンを添加することによって促進された。この測定法の特異性を、53%のGC含量を有するdsDNA標的とdsDNA-Fプローブによる四重鎖DNA形成を促進するために二価陽イオンを使用して、さらに詳しく調べた。

【0080】

各ハイブリダイゼーション反応混合物(40μl)は以下を含有していた：0.4pmoleの標的dsDNA、4pmoleの5'フルオレセイン標識したdsDNAプローブ、10mM Tris-HCl、pH 7.5および20mM MnCl₂と20mM MgCl₂。反応混合物は予め変性せずに室温(21)で1時間インキュベートした。試料を石英キュベットに入れ、488nmの波長を有するアルゴンイオンレーザービームで照射し、蛍光の放出をモニターした。図2は、分析した各試料の波長の関数としてプロットした蛍光の強度を示す。

【0081】

20mM MnCl₂と20mM MgCl₂の存在下でdsDNA-FプローブA(53%のGC含量)を50mer野生型dsDNA標的Aまたは変異型dsDNA標的Dとインキュベートすると、四重鎖が非変性条件下で室温にて形成された。完全対合DNA四重鎖は蛍光強度の最大の減少(34%の減少)を生じたが、1塩基対T-G誤対合を含むより安定性の低いdsDNA:dsDNA-F四重鎖(dsDNA標的D+dsDNAプローブA)は、プローブAのみで観察される蛍光強度とほぼ同じ蛍光強度を生じた(図2)。

【0082】

Mn²⁺やMg²⁺のような二価陽イオンの存在は、非変性条件下での四重鎖の形成を促進し、相同つまり鏡像相補性であるdsDNA標的とdsDNAプローブの四重鎖と、誤対合の1塩基対を含む四重鎖配列との間の間の正確な区別を可能にした。

【0083】

二価陽イオンは、四重鎖の形成では二本鎖プローブがその右旋性キラリティを犠牲にする必要があるという推論にもかかわらず、鏡像相補的なワトソン-クリック四重鎖の形成を促進した。

【0084】

実施例3

実施例1, 2で行なった四重鎖DNA測定法は、反応混合物中に一価陽イオンまたは二価陽イオンのいずれかを追加することによって促進された。以下の実施例は、DNA挿入剤を使用した時の四重鎖DNA測定法の特異性を実証する。

【0085】

プローブBは、フルオレセインマーカーを取り付けないプローブAと同一の15mer dsDNAプローブであり、同様に調製した。

各ハイブリダイゼーション反応混合物(40μl)は以下を含有していた：0.4pmoleの標的dsDNA、4pmoleのdsDNAプローブB、0.5×TBE、および100nMのDNA挿入剤YOYO-1(Molecular Probes社、アメリカ合衆国オレゴン州ユージーン)。反応混合物を21で5分間インキュベートし、測定した。試料を石英キュベットに入れ、488nmの波長を有するアルゴンイオンレーザービームで照射した。YOYO-1の挿入を示す535nmの波長で最大の蛍光強度が生じた。

【0086】

標的かプローブが存在しなかった時(YOYO-1のみ)に観察された蛍光強度を、図3に示す。図3はまた、反応混合物で、dsDNAプローブBを、相同な配列を有する野生型50mer dsDNA標的Aと、または1誤対合塩基対を除くとdsDNAプローブBの塩基配列と相同な配列を含む4つの他のdsDNA標的と組み合わせた時に観察された蛍光強度も示す。dsDNAプローブBと共に反応混合物中に存在する時、相同つまり鏡像相補性である野生型標的dsDNAは、最大の蛍光強度を生じた。反応混合物中でd

10

20

30

40

50

s DNA プローブ B と共にインキュベートされた時、誤対合 d s DNA 標的は、完全に対合した四重鎖により達成される蛍光強度と比較して、d s DNA 標的 C に対する 20 % 低い値から d s DNA 標的 E に対する 80 % 低い値までの中のより低い蛍光強度の値を生じた(図 3)。

【0087】

YOYO-1 挿入により安定化されたワトソン-クリック四重鎖は、そのプローブが完全に相同的な配列つまり鏡像相補的な配列を含んでいた時に、相同でないつまり d s 標的の配列に鏡像相補的でない 1 つの塩基対が存在した時よりも、d s DNA 標的と d s DNA プローブ間でより容易に生成した。ワトソン-クリック四重鎖は、四重鎖の形成では二本鎖プローブがその右旋性キラリティを犠牲にする必要があるという推論にもかかわらず、容易に生成した。

【0088】

実施例 4

この実施例では、50mer d s DNA 標的を 53 % GC 含量の 15mer d s DNA プローブ C に曝露した。二本鎖プローブの主溝が二本鎖標的の小溝に配置された時に、プローブの鎖の塩基と標的の鎖の塩基との間には、入れ子式相補性と本明細書で称するワトソン-クリック相補性が存在する。二本鎖プローブ中の塩基の配列は相同ではなく、二本鎖標的中の配列に対して逆になっている。

【0089】

プローブの鎖は、上述の DNA 合成装置で合成し、HPLC により精製した。等モル量のプローブ鎖を 95 °C で 10 分間変性し、温度が 21 °C まで 1.5 時間にわたって冷却されるにつれて、徐々にアニールさせた。d s DNA プローブは、1 pmole / μl の濃度で ddH₂O に溶解した。

【0090】

d s DNA プローブ C のセンス鎖の配列(配列番号 13) は以下の通りであった： 5' - G A C A G T A G A G A C C A C - 3'。

d s DNA プローブ C のアンチセンス鎖の配列(配列番号 14) は以下の通りであった： 5' - G T G G T C T C T A C T G T C - 3'。

【0091】

各ハイブリダイゼーション反応混合物(40 μl)は以下を含有していた： 0.4 pmole の標的 d s DNA、4 pmole の d s DNA プローブ C、0.5 × TBE、および 100 nM の DNA 挿入剤 YOYO-1。反応混合物を室温(21 °C)で 5 分間インキュベートし、石英キュベットに入れ、488 nm の波長を有するアルゴンイオンレーザービームで照射した。YOYO-1 の挿入を示す 535 nm の波長で最大の蛍光強度が生じた。

【0092】

図 4 は、予め変性がない状態で、野生型 50mer d s DNA 標識 A を、d s DNA 標的 A に入れ子式相補性に基づいて完全に対合する 15mer d s DNA プローブ C と反応させた時に、最大の蛍光強度が達成されることを示している。蛍光強度は DNA の結合、この場合には d s DNA 標的と入れ子式相補的 d s DNA プローブとの間の四重鎖形成、が起こったことを示す。

【0093】

対合を入れ子式相補性の逆相同に基づいて評価した時、1 塩基対だけ二本鎖プローブと誤対合した変異型 d s DNA 標的は、完全に相補的な野生型 d s DNA 標的よりも、かなり少ない d s DNA プローブとの四重鎖複合体を生成した。実施例 3 で鏡像相補性に基づいて測定した様々な誤対合を、この実施例において入れ子式相補性に基づいて測定した。

【0094】

図 4 に示すように、1 塩基対誤対合 d s DNA 標識と d s DNA プローブ C により形成された四重鎖により生じた蛍光強度は、完全対合の四重鎖(d s DNA 標的 A + d s DNA プローブ C)により達成される蛍光強度よりも 8 % ~ 16 % 低かった。

10

20

30

40

50

【0095】

実施例3では完全対合四重鎖と誤対合四重鎖との間により大きな蛍光の区別が観察された。これは、完全に相補的なdsDNAプローブまたは1塩基対誤対合のdsDNAプローブが、dsDNA標的に対して鏡像相補的な配向よりも、むしろ入れ子式に相補的な配向で優勢に結合することを示唆している。

この実施例は、入れ子式に相補的な二本鎖DNAの間のワトソン-クリック四重鎖結合がYOYO-1の存在下で容易に生じることを示している。この容易さの一部は入れ子式に相補的な四重鎖結合により、相互作用するそれぞれの二本鎖の右旋性キラリティが維持されるという事実から生じている。

【0096】

10

実施例5

ヒト膀胱癌細胞系遺伝子のエクソン10に由来し(Nature 380 207(1996年))、GC含量パーセントが30%から52%に変わるように改変した50mer ssDNA標的配列を、DNA合成装置(Expedite 8909, Perspective Biosystems)で合成し、HPLCにより精製した。

【0097】

50mer野生型ssDNA標的Fである鎖の配列(配列番号2)は以下の通りであった: 5' - CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC T C - 3'。

【0098】

20

標的Gは、1塩基の変異(下線)を除いて野生型ssDNA標的Fと同一の50mer変異型ssDNA標的であった。

変異型ssDNA標的Gの鎖の配列(配列番号4)は以下の通りであった: 5' - CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC T C - 3'。

【0099】

標的Hは、1塩基の変異(下線)を除いて野生型ssDNA標的Fと同一の50mer変異型ssDNA標的であった。

変異型ssDNA標的Hの鎖の配列(配列番号6)は以下の通りであった: 5' - CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC T C - 3'。

【0100】

標的Iは、1塩基の変異(下線)を除いて野生型ssDNA標的Fと同一の50mer変異型ssDNA標的であった。

変異型ssDNA標的Iの鎖の配列(配列番号8)は以下の通りであった: 5' - CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAA AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC T C - 3'。

【0101】

30

標的Jは、1塩基の変異(下線)を除いて野生型ssDNA標的Fと同一の50mer変異型ssDNA標的であった。

変異型ssDNA標的Jの鎖の配列(配列番号10)は以下の通りであった: 5' - CA G AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA TGA CA G TGT CTG TCA TGG TGC T C - 3'。

【0102】

40

標的Kは、1塩基の変異(下線)を除いて野生型ssDNA標的Fと同一の50mer変異型ssDNA標的であった。

変異型ssDNA標的Kの鎖の配列(配列番号15)は以下の通りであった: 5' - CA G AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG CGA TGA CA G TGT CTG TCA TGG TGC T C - 3'。

【0103】

50

プローブBは、フルオレセインマーカーを取り付けないプローブAと同一の15mer d s DNAプローブであり、同様に調製した。プローブBの鎖の1つ(つまり配列番号11)は、50mer野生型ssDNA標的Fの中心付近の15個のヌクレオチドセグメントに相補的であった。

【0104】

各ハイブリダイゼーション反応混合物(40μl)は以下を含有していた: 0.4pmoleの標的ssDNA、4pmoleのdsDNAプローブB、0.5×TBE、および100nMのYOYO-1。反応混合物は予め変性せずに室温(21)で5分間インキュベートした。試料を石英キュベットに入れ、488nmの波長を有するアルゴンイオンレーザービームで照射し、蛍光の放出をモニターした。すべてのレーザー照射の積算時間は80ミリ秒であった。最大蛍光強度は、YOYO-1の挿入を示す535nmの波長で生じた。図5は、分析した各試料の波長の関数としてプロットした蛍光の強度を示す。

【0105】

標的ssDNAがない状態では、dsDNAプローブ間のいくつかのハイブリダイゼーションが、鏡像相補的に基づいて起こった(図5)。相同的二本鎖DNA間のそのような結合は、先の実施例で開示されている。YOYO-1のみでインキュベートしたssDNA標的では、放射強度の値が低く、YOYO-1とインキュベートしたdsDNAプローブだけの放射強度の値の2分の1未満であった(データは図示しない)。

【0106】

100mM YOYO-1の存在下で21で5分間インキュベーションした後に、ssDNA標的FはdsDNAプローブB上の完全に相補的な配列と容易に結合複合体を形成し、dsDNAプローブBのみにより発せられた蛍光強度と比較して、放射蛍光強度が79%増加した。対照的に、種々の1塩基誤対合を含む不完全に相補的なssDNA標的は、上記の反応条件では安定性が低く、dsDNAプローブBのみによって示された蛍光強度と比較して蛍光強度が19%~31%しか増加しなかった(図5)。

【0107】

YOYO-1(インターラーカー)の存在は、予め変性せずにdsDNAプローブとssDNA標的の間の結合を可能にするのに十分であった。結合はワトソン-クリックの塩基対親和性に基づいて起こり、完全に相補的な相同二本鎖間では測定可能でかなり多量の四本鎖が生じた。反応は、天然dsDNAを使用して、10対1のプローブ対標的の比で、たった5分以内の室温でのインキュベーションで起こった。この実施例で使用したssDNA標的とdsDNAプローブは53%のGC含量を含んでおり、どのDNA鎖にもホモプリンやホモピリミジンの延長部を含んでいなかった。本発明の測定法は、dsDNAを使用して、完全に相補的なssDNA配列と、誤対合塩基を含むssDNA配列とを区別することができた。

【0108】

本発明の測定法は、完全に自己相補的なすなわち相同な鎖配列を有する二本鎖プローブであって互いに鏡像相補的な様式でつまり主溝と主溝の様式で結合する間で結合する二本鎖プローブ間では、結合がかなりの程度で起こるという事実にも拘わらず機能した。

【0109】

本発明を詳細かつその特定の例を参照しながら説明してきたが、当業者には、種々の変更および改変を、本発明の範囲の精神及び範囲から逸脱せずに行い得ることが明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】分析した各試料の波長の関数としてプロットされた蛍光強度の複合グラフである。

【図2】分析した各試料の波長の関数としてプロットされた蛍光強度の複合グラフである。

【図3】分析した各試料の波長の関数としてプロットされた蛍光強度の複合グラフである。

10

20

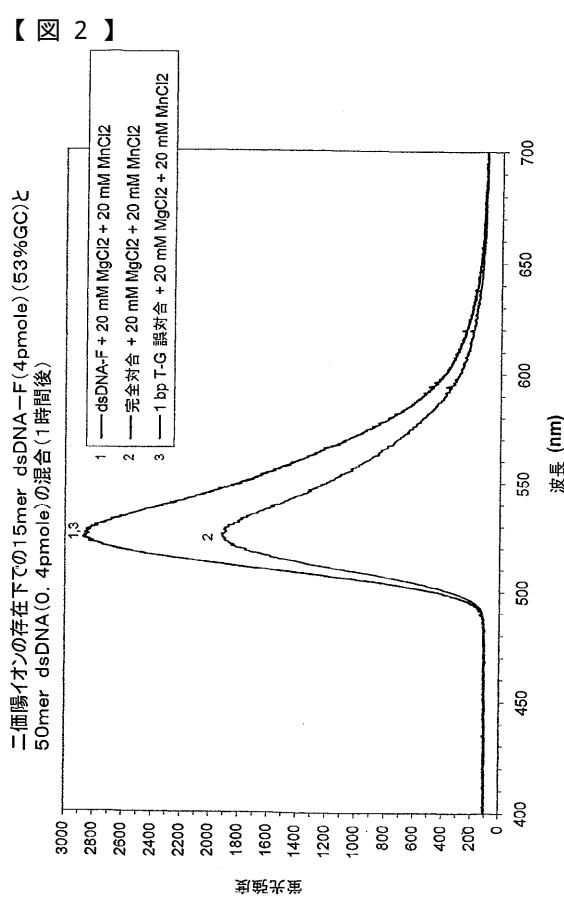
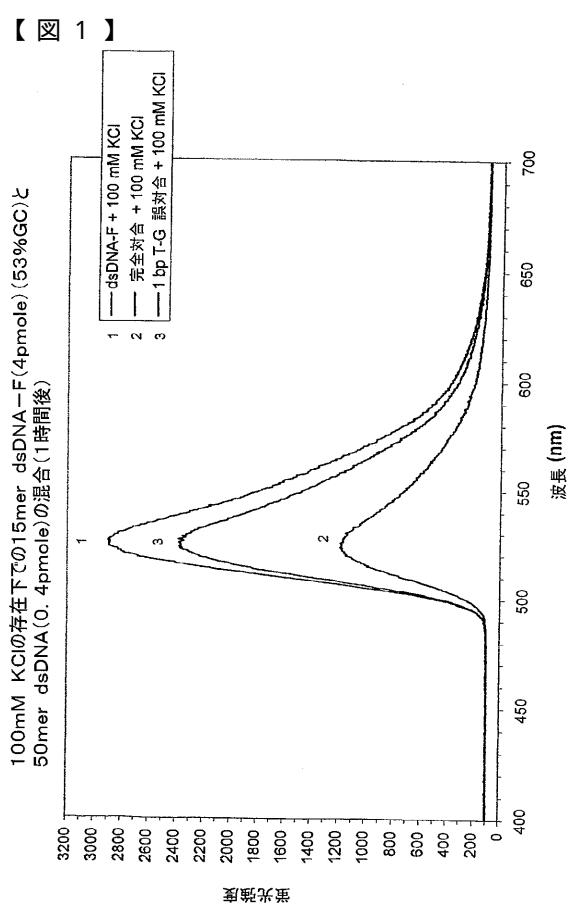
30

40

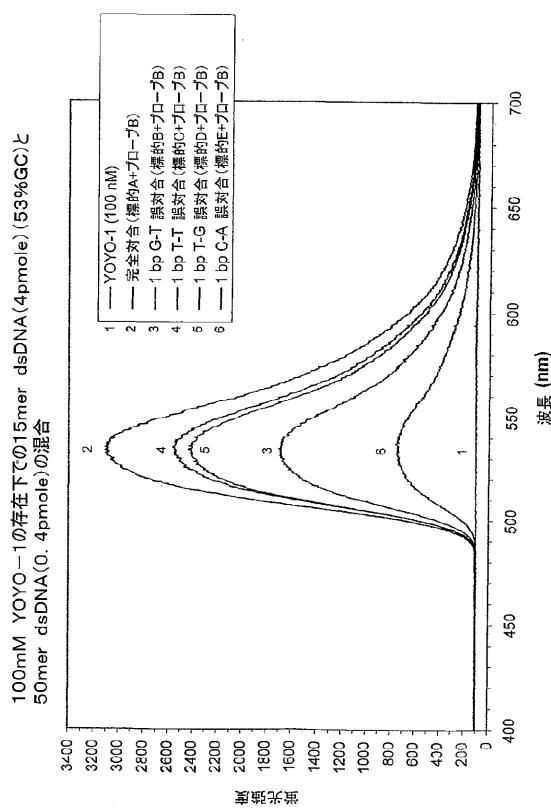
50

【図4】分析した各試料の波長の関数としてプロットされた蛍光強度の複合グラフである。

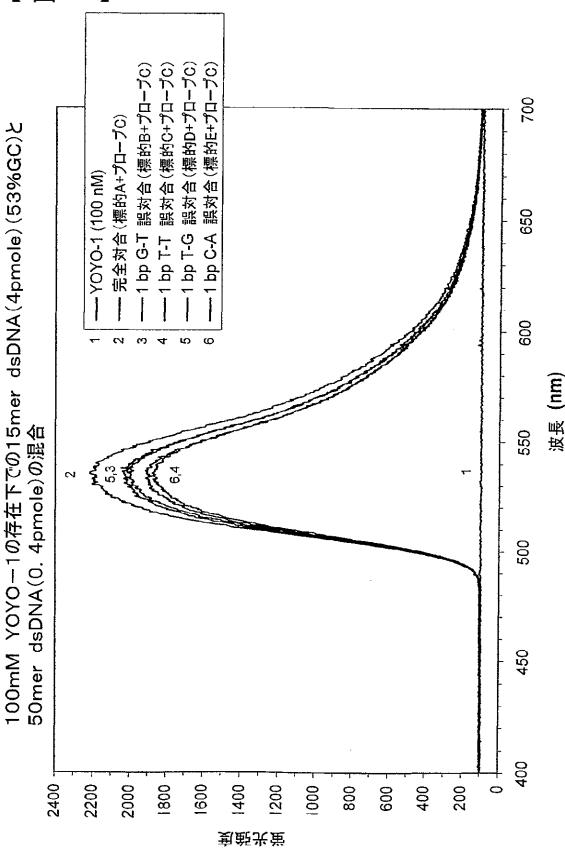
【図5】分析した各試料の波長の関数としてプロットされた蛍光強度の複合グラフである。



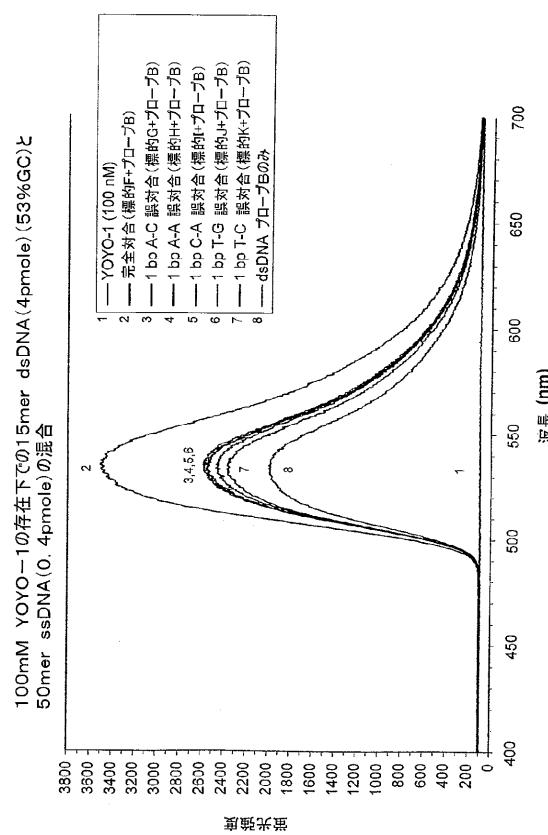
【図3】



【図4】



【図5】



【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
28 March 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/24946 A2(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68

(74) Agent: TENER, David, M.; Caesar, Rivise, Bernstein, Cohen & Pokotilow, Ltd., 12th Floor, Seven Penn Center, 1635 Market Street, Philadelphia, PA 19103-2212 (US).

(21) International Application Number: PCT/IB01/01643

(22) International Filing Date:
10 September 2001 (10.09.2001)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Publication Language: English

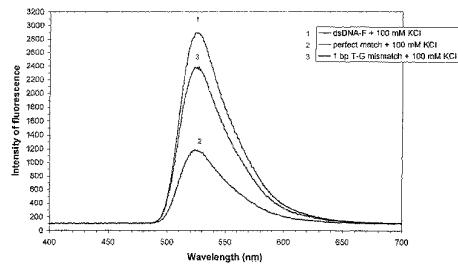
(75) Inventors/Applicants (for US only): DAKSIS, Jasmine, I. [CA/CA]; 36 Cartier Crescent, Richmond Hill, Ontario L4C 2N2 (CA). ERIKSON, Glen, H. [CA/—]; P.O. Box 799, Providenciales (TC).

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

[Continued on next page]

(54) Title: QUADRUPLEX DNA AND DUPLEX PROBE SYSTEMS

Mix of 15-mer dsDNA-F (4 pmole) (53% GC) and 50-mer dsDNA (0.4 pmole) in the presence of 100 mM KCl (after 1 hr)



(57) Abstract: A multiplex structure, such as a nucleic acid quadruplex, includes: a first strand containing a first sequence of nucleobases; a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein the second strand is associated with the first strand by Watson-Crick bonding; a third strand containing a third sequence of nucleobases; and a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases, wherein the fourth strand is associated with the second strand and the third strand by Watson-Crick bonding. Formation of the multiplex structure is promoted by monovalent cations (e.g., sodium and potassium), divalent cations, multivalent cations, intercalating agents and/or molecules known to bind within the minor grooves of nucleic acids. The multiplex structure and the process of forming it have diagnostic, therapeutic, prophylactic and nanoengineering applications.

WO 02/24946 A2

WO 02/24946 A2

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.

QUADRUPLEX DNA AND DUPLEX PROBE SYSTEMSSPECIFICATIONBACKGROUND OF THE INVENTION1. Field of Invention

The invention relates to nucleic acid multiplexes, and more particularly to methods wherein quadruplexes are formed by specific binding between double-stranded nucleic acid probes and double-stranded nucleic acid target sequences.

2. Description of Related Art

Although nucleic acid duplexes are the most widely studied type of multiple-strand nucleic acid structures, it has been discovered that nucleic acids also form triplex and quadruplex structures under certain conditions.

Until recently, hybridization among three nucleic acid strands to form a triplex was widely believed to be confined to very limited species of nucleic acids (e.g., polypurine or polypyrimidine sequences). See, e.g., Floris et al., "Effect of cations on purine-purine-pyrimidine triple helix formation in mixed-valence salt solutions," 260 Eur. J. Biochem. 801-809 (1999). Moreover, triplex formation or hybridization was thought to be based on Hoogsteen binding between limited varieties of adjacent nucleobases, rather than Watson-Crick base pairing. See, e.g., Floris et al. and U.S. Patent No. 5,874,555 to Dervan et al. However, the inventors have recently disclosed in several patent applications that triplex nucleic acids based on Watson-Crick base pairing can be created and used as the basis for a highly accurate and sensitive assay for specific binding. See U.S. Patent Applications Nos. 09/613,263 and 09/468,679, respectively filed July 10, 2000 and December 21, 1999.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

As was the case with triplex nucleic acids, the conventional wisdom regarding quadruplex nucleic acids has been that such peculiar structures only exist under relatively extreme conditions for a relatively narrow class of nucleic acids. In particular, Sen et al. (Nature 334:364-366 (1988)) disclosed that guanine-rich oligonucleotides can spontaneously self-assemble into four-stranded helices *in vitro*. Sen et al. (Biochemistry 31:65-70 (1992)) disclosed that these four-stranded complexes can further associate into superstructures composed of 8, 12, or 16 oligomers.

Marsh et al. (Biochemistry 33:10718-10724 (1994), and Nucleic Acids Research 23:696-700 (1995)) disclosed that some guanine-rich oligonucleotides can also assemble in an offset, parallel alignment, forming long "G-wires". These higher-order structures are stabilized by G-quartets that consist of four guanosine residues arranged in a plane and held together through Hoogsteen base pairings. According to Sen et al. (Biochemistry 31:65-70 (1992)), at least three contiguous guanines within the oligomer are critical for the formation of these higher order structures.

It has been suggested that four-stranded DNAs play a role in a variety of biological processes, such as inhibition of HIV-1 integrase (Mazumder et al., Biochemistry 35:13762-13771 (1996)), formation of synapsis during meiosis (Sen et al., Nature 334:364-366 (1988)), and telomere maintenance (Williamson et al., Cell 59:871-880 (1989)); Baran et al., Nucleic Acids Research 25:297-303 (1997)).

It has been further suggested that controlling the production of guanine-rich quadruplexes might be the key to controlling such biological processes. For example, U.S. Patent No. 6,017,709 to Hardin et al. suggests that

telomerase activity might be controlled through drugs that inhibit the formation of guanine quartets.

5 U.S. Patent No. 5,888,739 to Pitner et al. discloses that G-quartet based quadruplexes can be employed in an assay for detecting nucleic acids. Upon hybridization to a complementary oligonucleotide, the G-quartet structure unfolds or linearizes, thereby increasing the distance between a donor and an acceptor on different parts of the G-quartet structure, resulting in a decrease in their interaction and a detectable change in a signal (e.g., fluorescence) emitted from the structure.

10 U.S. Patent No. 5,912,332 to Agrawal et al. discloses a method for the purification of synthetic oligonucleotides, wherein the synthetic oligonucleotides hybridize specifically with a desired, full-length oligonucleotide and concomitantly form a multimer aggregate, such as quadruplex DNA. The multimer aggregate containing the oligonucleotide to be purified is then isolated using size-exclusion techniques.

15 20 Despite the foregoing developments, the full potential of quadruplex nucleic acid has neither been fully appreciated nor fully exploited.

All references cited herein are incorporated herein by reference in their entireties.

25 SUMMARY OF THE INVENTION
30 The invention provides a multiplex structure comprising: a first strand containing a first sequence of nucleobases; a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein the second strand is associated with the first strand by Watson-Crick bonding; a third strand containing a third sequence of nucleobases; and a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases,

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

4

wherein the fourth strand is associated with the second strand and the third strand by Watson-Crick bonding.

Also provided is a method for providing the multiplex structure of the invention. The method comprises: 5 providing a hybridization medium comprising the first strand, the second strand, the third strand, the fourth strand, water, a buffer and at least one promoter; and incubating the hybridization medium for an incubation time effective to hybridize the second strand to the fourth strand to provide the multiplex structure.

Still further provided is an assay for single-stranded and double-stranded targets employing a double-stranded probe.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

15 The invention will be described in conjunction with the following drawings in which like reference numerals designate like elements and wherein:

20 Figs. 1, 2, 3, 4 and 5 are composite graphs of fluorescent intensity plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

25 Unlike the quadruplexes discussed in the Background Section above, the preferred multiplex structures of the invention contain at least four strands of nucleic acid bonded together according to traditional Watson-Crick bonding rules.

30 As used herein, the term "Watson-Crick bonding" is intended to define specific association between opposing pairs of nucleic acid (and/or nucleic acid analogue) strands via matched, opposing bases. While the formation of a Watson-Crick quadruplex may sometimes be referred to as a hybridization event herein, that is merely for convenience and is not intended to limit the scope of the

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

5

invention with respect to how the formation of a Watson-Crick quadruplex can be best characterized.

5 The multiplex structures of the invention are preferably quadruplexes. Each strand of the multiplex independently comprises a nucleic acid or a nucleic acid analogue. Suitable nucleic acids include, e.g., DNA or RNA. Preferred nucleic acid analogues contain an uncharged or partially charged backbone (i.e., a backbone having a charge that is not as negative as a native DNA backbone).

10 In certain embodiments, one of the second and fourth strands of the four-stranded quadruplex comprises DNA and the other of the second and fourth strands comprises RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA or cDNA.

15 In certain embodiments, the second strand and the fourth strand are anti-parallel to each other. These embodiments are defined as having mirror complementarity. In these embodiments, a major groove of the first and second strands is placed in a major groove of the third and fourth strands.

20 In other embodiments, the second and fourth strands are parallel to each other. In these embodiments, which possess "nested complementarity," a major groove of the first and second strands is placed in a minor groove of the third and fourth strands.

25 In certain embodiments, each nucleobase binds to no more than two other nucleobases. In some of these embodiments, the bases of the second strand specifically bond (via Watson-Crick rules) to the matching bases of the first strand and to the matching bases of the fourth strand, and the bases of the fourth strand specifically bond (via Watson-Crick rules) to the matching bases of the third strand and to the matching bases of the second strand, wherein the bases of the first and third strands

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

6

bind to no more than one other base each. Thus, in addition to the traditional Watson-Crick base pairs, such embodiments include the following Watson-Crick base triplets: A-T-A, T-A-T, U-A-T, T-A-U, A-U-A, U-A-U, G-C-G and/or C-G-C (including C⁺-G-C, and/or any other ionized species of base).

In certain embodiments, it is believed that opposing bases of the first and third strands also bind to each other, in addition to: (a) the binding between opposing bases of the first and second strands; (b) the binding between opposing bases of the third and fourth strands; and (c) the binding between opposing bases of the second and fourth strands.

In certain embodiments of the multiplex structure of the invention, no strand is contiguous with another strand. That is, there are at least four separate strands. Although folded conformations and the like (e.g., hairpin turns, etc.) are within the scope of the invention, folded portions of a single strand do not make the strand count more than once toward the minimum of four separate strands.

Multiplex structures of the invention preferably do not rely on Hoogsteen bonding or G-G quartets for maintenance of the multiplex structure, although insignificant amounts of Hoogsteen bonding and/or G-G quartets may be present. That is, multiplex structures of the invention are preferably substantially free of Hoogsteen bonding, and substantially free of G-G quartets.

In certain embodiments, the first and second strands of the multiplex are 5 to 50 bases long (more preferably 5 to 30 bases long) and the third and fourth strands are 8 to 3.3 X 10³ base pairs long. For example, the first and second strands can constitute a double-stranded probe and the third and fourth strands can constitute a

double-stranded target, such as genomic DNA, which can contain a haplotype.

In embodiments, the third strand and the fourth strand are PCR amplified products.

5 The multiplexes of the invention can be present in solution, on a solid support, *in vitro* or *in vivo*. The solid support can be electrically conductive (e.g., an electrode) or non-conductive.

10 Quadruplex formation according to the invention is suitable for a variety of uses. For example, double-stranded probes covalently bound to a double-stranded nucleic acid cleaving agent can be used to specifically cleave target sequences of double-stranded nucleic acids. Double-stranded probes covalently bound to 15 a chemotherapeutic agent can be used to specifically treat target sequences of double-stranded nucleic acids. Thus, the invention encompasses multiplex structures further comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent bound to at least one of the first, second, third and 20 fourth strands.

25 In addition, multiplexes of the invention are suitable for use in nanoengineering, such as to provide electrical circuitry on a molecular (i.e., nanoscale) level. Further details regarding nanoengineering with nucleic acids can be found in U.S. Patent No. 5,948,897 to Sen et al. and the references cited therein.

30 Multiplex structures of the invention can be provided by a method comprising: providing a hybridization medium comprising the first strand, the second strand, the third strand, the fourth strand, water, a buffer and a promoter; and incubating the hybridization medium for an incubation time effective to hybridize the second strand to the fourth strand.

5 The hybridization medium can include any conventional medium known to be suitable for preserving nucleotides. See, e.g., Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Lab Manual," Vol. 2 (1989). For example, the medium can comprise nucleotides, water, buffers and standard salt concentrations. When divalent cations are used exclusively to promote quadruplex formation, chelators such as EDTA or EGTA should not be included in the reaction mixtures.

10 Specific binding between complementary bases occurs under a wide variety of conditions having variations in temperature, salt concentration, electrostatic strength, and buffer composition. Examples of these conditions and methods for applying them are known in the art.

15 Unlike many Hoogsteen-type multiplexes, which are unstable or non-existent at pH levels above about 7.6, the Watson-Crick multiplexes of the invention are stable over a wide range of pH levels, preferably from about pH 5 to about pH 9.

20 Moreover, the inventive multiplexes do not require the presence of homopyrimidine sequences or homopurine sequences, as in certain prior art quadruplexes. For example, the target sequence can contain 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order.

25 It is preferred that multiplexes be formed at a temperature of about 5°C to about 25°C for about two hours or less. The incubation time is preferably less than five minutes, even at room temperature. Longer reaction times are not required, but incubation for up to 24 hours in most cases did not adversely affect the quadruplexes. The fast binding times of Watson-Crick quadruplexes of the invention contrast with the much longer binding times for Hoogsteen quadruplexes.

The promoter in the hybridization medium is preferably an intercalating agent or a cation. The intercalating agent can be, e.g., a fluorophore, such as a member selected from the group consisting of YOYO-1, TOTO-1, 5 ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2 and acridine.

Suitable cations include, e.g., monovalent cations, 10 such as Na^+ (preferably at a concentration of 50mM to 125mM), K^+ , and other alkali metal ions; divalent cations, such as alkaline earth metal ions (e.g., Mg^{+2} and Ca^{+2}) and 15 divalent transition metal ions (e.g., Mn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} and Zn^{+2}); and cations having a positive charge of at least three, such as $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$, trivalent spermidine and tetravalent spermine. Mn^{+2} is preferably provided at a 20 concentration of 10mM to 30mM. Mg^{+2} is preferably provided at a concentration of 15mM to 20mM. Ni^{+2} is preferably provided at a concentration of about 20mM. In embodiments, Mg^{+2} and Mn^{+2} are provided in combination at a concentration of 10mM each, 15mM each, 20mM each, 25mM each or 30mM each (i.e., 10-30 mM each).

The amount of cation added to the medium in which the 25 multiplex forms depends on a number of factors, including the nature of the cation, the concentration of probe, the concentration of target, the presence of additional cations and the base content of the probe and target. The preferred cation concentrations and mixtures can routinely be discovered experimentally.

Although not required, other promoters include, e.g., 30 single stranded binding proteins such as Rec A protein, T4 gene 32 protein, E. coli single stranded binding protein, major or minor nucleic acid groove binding proteins, viologen and additional intercalating substances such as actinomycin D, psoralen, and angelicin. Such facilitating

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

10

reagents may prove useful in extreme operating conditions, for example, under abnormal pH levels or extremely high temperatures.

5 The invention also enables a method in which hybridization of the second strand to the fourth strand inactivates an activity associated with at least one of the third strand and the fourth strand. Thus, at least one of the first strand and the second strand further comprises a pharmaceutical agent, wherein hybridization of the second strand to the fourth strand places the pharmaceutical agent an effective distance from a target on the third strand, the fourth strand or on another molecule associated with at least one of the third strand and the fourth strand. The pharmaceutical agent is preferably a member selected from the group consisting of nucleic acids designed to bind promoter sequences of clinically relevant genes, nucleic acids designed to bind clinically relevant genes, or nucleic acids designed to bind origin of replication sites of pathogens.

10

15

20 In preferred embodiments, the invention provides a rapid, sensitive, environmentally friendly, and safe method for assaying binding between a single-stranded or double-stranded target and a double-stranded probe, wherein the target comprises a nucleic acid sequence or a nucleic acid analogue sequence and the probe comprises a nucleic acid sequence or a nucleic acid analogue sequence.

25

30 The inventive assay can be used to, e.g., identify accessible regions in folded nucleotide sequences, to determine the number of mismatched base pairs in a hybridization complex, and to map genomes.

The invention not only detects the presence of specific probe-target binding, but also provides qualitative and quantitative information regarding the

5 nature of interaction between a probe and target. Thus, the invention enables the practitioner to distinguish among a perfect match, a one base pair mismatch, a two base pair mismatch, a three base pair mismatch, a one base pair deletion, a two base pair deletion and a three base pair deletion arising between a sequence in the double-stranded probe and in a sequence in the double-stranded target.

10 Embodiments of the invention comprise calibrating the measured signal (e.g., fluorescence, chemiluminescence, electrochemiluminescence or electrical properties) for a first probe-target mixture against the same type of signal exhibited by other probes combined with the same target, wherein each of the other probes differs from the first probe by at least one base.

15 A calibration curve can be generated, wherein the magnitude of the measured signal (e.g., fluorescent intensity) is a function of the binding affinity between the target and probe. As the binding affinity between the target and a plurality of different probes varies with the 20 number of mismatched bases, the nature of the mismatch(es) (A-G vs. A-C vs. T-G vs. T-C, etc.), the location of the mismatch(es) within the quadruplex, etc., the assay of the invention can be used to sequence the target.

25 In embodiments, the signal measured can be the fluorescent intensity of a fluorophore included in the test sample. In such embodiments, the binding affinity between the probe and target can be directly or inversely correlated with the intensity, depending on whether the fluorophore signals hybridization through signal quenching 30 or signal amplification. Under selected conditions, the fluorescent intensity generated by intercalating agents can be directly correlated with probe-target binding affinity, whereas the intensity of preferred embodiments employing a

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

12

5 non-intercalating fluorophore covalently bound to the probe can be inversely correlated with probe-target binding affinity. The fluorescent intensity decreases for non-intercalating fluorophores as the extent of matching between the probe and target increases, preferably over a range inclusive of 0-2 mismatches and/or deletions, more preferably over a range inclusive of 0-3 mismatches and/or deletions.

10 The invention enables quantifying the binding affinity between probe and target. Such information can be valuable for a variety of uses, including designing antisense drugs with optimized binding characteristics.

15 The assay of the invention is preferably homogeneous. The assay can be conducted without separating the probe-target complex from the free probe and free target prior to detecting the magnitude of the measured signal. The assay does not require a gel separation step, thereby allowing a great increase in testing throughput. Quantitative analyses are simple and accurate.

20 Consequently the binding assay saves a lot of time and expense, and can be easily automated. Furthermore, it enables binding variables such as buffer, pH, ionic concentration, temperature, incubation time, relative concentrations of probe and target sequences, intercalator

25 concentration, length of target sequences, length of probe sequences, and possible cofactor (i.e., promoter) requirements to be rapidly determined.

30 The assay can be conducted in, e.g., a solution within a well or microchannel, on an impermeable surface or on a biochip. In certain embodiments, the third and fourth strands are provided in the hybridization medium before the first and second strands, and the first and second strands

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

13

are provided in dehydrated form prior to rehydration by contact with the hybridization medium.

Moreover, the inventive assay is preferably conducted without providing a signal quenching agent on the target or on the probe.

Although the inventors have previously disclosed the advantages of fluorescent intensity assays for hybridization (see, e.g., U.S. Patent Application No. 09/224,505, filed December 31, 1998), certain embodiments of the inventive assay specifically detect quadruplexes of the probe and the double-stranded target, thus obviating the need to denature the target. It is surprising that the inventors have been able to specifically assay quadruplexes formed between double-stranded probes and double-stranded targets, wherein the interaction between the probes and targets is based on Watson-Crick base pairing (at least in the sense that A binds to T (or U, in the case of RNA) and G binds to C), rather than the very limited Hoogsteen model of quadruplex hybridization of, e.g., Pitner et al., *supra*.

Suitable probes for use in the inventive assay include, e.g., dsDNA, dsRNA, DNA:RNA hybrids, dsPNA, PNA:DNA hybrids and other double-stranded nucleic acid analogues having uncharged or partially-charged backbones. Probe sequences having any length from 8 to 20 bases are preferred since this is the range within which the smallest unique DNA sequences of prokaryotes and eukaryotes are found. Probes of 12 to 18 bases are particularly preferred since this is the length of the smallest unique sequences in the human genome. In embodiments, probes of 5 to 30 bases are most preferred. However, a plurality of shorter probes can be used to detect a nucleotide sequence having a plurality of non-unique target sequences therein, which combine to uniquely identify the nucleotide sequence. The

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

14

length of the probe can be selected to match the length of the target.

5 The instant invention does not require the use of radioactive probes, which are hazardous, tedious and time-consuming to use, and need to be constantly regenerated. Probes of the invention are preferably safe to use and stable for years. Accordingly, probes can be made or ordered in large quantities and stored.

10 In embodiments, the probe is labeled with a multi-molecule signaling complex or a redox pair, or with a label that elicits chemiluminescent or electrochemiluminescent properties.

15 When a fluorescent intercalator is not present in the hybridization medium, it is preferred that the probe or target (preferably the probe) have a fluorescent label covalently bound thereto. The label is preferably a non-intercalating fluorophore or an intercalating fluorophore. In such embodiments, the fluorophore is 20 preferably bound to the probe at either end. Preferred fluorescent markers include biotin, rhodamine, acridine and fluorescein, and other markers that fluoresce when irradiated with exciting energy.

25 The excitation wavelength is selected (by routine experimentation and/or conventional knowledge) to correspond to this excitation maximum for the fluorophore being used, and is preferably 200 to 1000 nm. Fluorophores are preferably selected to have an emission wavelength of 30 200 to 1000 nm. In preferred embodiments, an argon ion laser is used to irradiate the fluorophore with light having a wavelength in a range of 400 to 540 nm, and fluorescent emission is detected in a range of 500 to 750 nm.

5 The assay of the invention can be performed over a wide variety of temperatures, such as, e.g., from 5 to 85°C. Certain prior art assays require elevated temperatures, adding cost and delay to the assay. On the other hand, the invention can be conducted at room temperature or below (e.g., at a temperature below 25°C).

10 The reliability of the invention is independent of guanine and cytosine content in said target. Since G-C base pairs form three hydrogen bonds, while A-T base pairs form only two hydrogen bonds, target and probe sequences with a higher G or C content are more stable, possessing higher melting temperatures. Consequently, base pair mismatches that increase the GC content of the hybridized probe and target region above that present in perfectly 15 matched hybrids may offset the binding weakness associated with a mismatched probe.

20 The inventive assay is extremely sensitive, thereby obviating the need to conduct PCR amplification of the target. For example, it is possible to assay a test sample having a volume of about 20 microliters, which contains about 10 femtomoles of target and about 10 femtomoles of probe. Embodiments of the invention are sensitive enough 25 to assay targets at a concentration of 5×10^{-9} M, preferably at a concentration of not more than 5×10^{-10} M. Embodiments of the invention are sensitive enough to employ probes at a concentration of 5×10^{-9} M, preferably at a concentration of not more than 5×10^{-10} M. It should go without saying that the foregoing values are not intended to suggest that the method cannot detect higher concentrations.

30 The ratio of probe (e.g., first and second strands) to target (e.g., third and fourth strands) is 30:1 to 1:1, preferably about 10:1.

The invention will be illustrated in more detail with reference to the following Examples, but it should be understood that the present invention is not deemed to be limited thereto.

5

EXAMPLESExample 1

Sense and antisense 50-mer ssDNA target sequences, derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene (*Nature* 380, 207 (1996)) and modified such that the percent GC content was changed from 30% to 52%, were synthesized on a DNA synthesizer (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems) and purified by HPLC. Equimolar amounts of complementary oligonucleotides were denatured at 95°C for 10 minutes and allowed to anneal gradually as the temperature cooled to 21°C over 1.5 hours. DsDNA oligonucleotides were dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/μl.

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:1) of the wild-type dsDNA Target A: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

20

Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:2) of the wild-type dsDNA Target A: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

25

Target B was a 50-mer mutant dsDNA target identical to the wild-type target DNA except for a one base pair mutation (underlined) on the sense and antisense strands, wherein the wild-type bases CAT and ATG were replaced by bases CGT and ACG, respectively.

30

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:3) of mutant Target B: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:4) of mutant Target B: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

Target C was a 50-mer mutant dsDNA target identical to the wild-type target DNA except for a one base pair mutation (underlined) on the sense and antisense strands, wherein the wild-type bases CAT and ATG were replaced by bases CTT and AAG, respectively.

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:5) of mutant Target C: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CTT CTC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:6) of mutant Target C: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

Target D was a 50-mer mutant dsDNA target identical to the wild-type DNA except for a one base pair mutation (underlined) on the sense and antisense strands, wherein the wild-type bases CTC and GAG were replaced by bases CTT and AAG, respectively.

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:7) of mutant Target D: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CTT TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:8) of mutant Target D: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAA AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

Target E was a 50-mer mutant dsDNA target identical to the wild-type DNA except for a one base pair mutation (underlined) on the sense and antisense strands, wherein the wild-type bases CTC and GAG were replaced by bases CCC and GGG, respectively.

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:9) of mutant Target E: 5'-GAG CAC CAT GAC AGA CAC TGT CAT CCC TGG TGT GTC CTA CGA TGA CTC TG-3'.

Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:10) of mutant Target E: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

18

Probe A was a 15-mer dsDNA probe with an attached fluorescein moiety at each 5' position and was designed to be mirror complementary to 15 nucleotide segments of the sense strand and antisense strand near the center of the 50-mer wild-type Target A. The strands of the probe were synthesized on the DNA synthesizer mentioned above and purified by HPLC. Equimolar amounts of the probe strands were denatured at 95°C for 10 min and allowed to anneal as the temperature cooled to 21°C over 1.5 hours. DsDNA probe was dissolved in ddH₂O at a concentration of 1 pmole/μl.

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:11) of Probe A: 5'-Flu-CTG TCA TCT CTG GTG-3'.

Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:12) of Probe A: 5'-Flu-CAC CAG AGA TGA CAG-3'.

Each hybridization reaction mixture (40μl) contained the following: 0.4 pmoles of target dsDNA, 4 pmoles of 5'-fluorescein labeled dsDNA probe, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 100 mM KCl. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 1 hour, without prior denaturation. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. The maximum fluorescent intensities occurred at a wavelength of 525 nm, the emission wavelength for fluorescein. Fig. 1 shows the intensity of fluorescence plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

In the absence of KCl, no hybridization between the dsDNA targets and the Probe A was detected, resulting in similar fluorescent intensities observed when wild-type dsDNA Target A or mutant dsDNA Target D were mixed with dsDNA Probe A or when dsDNA Probe A was present alone (data not shown).

After a 1 hour incubation at 21°C in the presence of 100 mM KCl, dsDNA target:dsDNA-F quadruplexes consisting of perfectly complementary sequences on dsDNA Target A and dsDNA Probe A formed readily, resulting in a 62% decrease 5 in the intensity of fluorescent emission compared to that emitted by dsDNA Probe A alone (labeled dsDNA-F) (Fig. 1). In contrast, incompletely complementary dsDNA Target D:dsDNA-F Probe A quadruplexes, containing a 1 base pair G-T mismatch, were less stable in these reaction 10 conditions, yielding only an 18% decrease in fluorescent intensity compared to that exhibited by dsDNA Probe A alone.

The presence of monovalent cations, such as K⁺, at specific concentrations was sufficient to allow quadruplex formation between dsDNA targets and dsDNA probes labeled 15 with fluorescein in the absence of prior denaturation. Quadruplex formation occurred on the basis of Watson-Crick base pair affinities, with a measurable and significantly greater amount of quadruplex formation between fully 20 complementary homologous duplex strands. Moreover, the reaction occurred at room temperature within just 1 hour of incubation at a ratio of probe to target of 10 to 1, using natural dsDNA. The dsDNA targets and dsDNA probe used in this example were homologous, contained 53% GC content, and 25 did not contain homopurine or homopyrimidine stretches on any DNA strand. DNA quadruplexes formed readily despite the inferred conclusion that the formation required the duplex probe to give up its right-handed chirality. The assay of the invention was able to identify perfectly 30 complementary dsDNA sequences and those containing a pair of mismatched bases, using dsDNA probe.

Example 2

5 The quadruplex DNA assays performed in Example 1 were facilitated by the addition of monovalent cations to the reaction mixtures. The specificity of the assay was further examined utilizing divalent cations to facilitate quadruplex DNA formation with dsDNA targets and dsDNA-F probes possessing 53% GC content.

10 Each hybridization reaction mixture (40 μ l) contained the following: 0.4 pmoles of target dsDNA, 4 pmoles of 5'-fluorescein labeled dsDNA probe, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 20mM MnCl₂ and 20 mM MgCl₂. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 1 hour, without prior denaturation. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. Fig. 2 shows the intensity of fluorescence plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

20 When dsDNA-F Probe A (with a 53% GC content) was incubated with 50-mer wild-type dsDNA Target A or mutant dsDNA Target D in the presence of 20 mM MnCl₂ and 20 mM MgCl₂, quadruplexes were formed at room temperature under non-denaturing conditions. While perfectly matched DNA quadruplexes yielded the maximum decrease in fluorescent 25 intensity, a 34% decrease, the less favorable dsDNA:dsDNA-F quadruplexes containing a 1 bp T-G mismatch (dsDNA Target D + dsDNA Probe A) produced a fluorescent intensity that was about the same as that observed with dsDNA Probe A alone (Fig. 2).

30 The presence of divalent cations, such as Mn²⁺ and Mg²⁺, facilitated quadruplex formation under non-denaturing conditions to allow accurate discrimination between

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

21

homologous, that is mirror complementary, dsDNA target and dsDNA probe quadruplexes, and quadruplex sequences containing a pair of bases which are mismatched.

5 Divalent cations facilitated the formation of mirror complementary Watson-Crick quadruplexes despite the inferred conclusion that the formation required the duplex probe to give up its right-handed chirality.

Example 3

10 The quadruplex DNA assays performed in Examples 1 and 2 were facilitated by the addition of either monovalent cations or divalent cations in the reaction mixtures. The next Examples demonstrate the specificity of the quadruplex DNA assays when a DNA intercalator is employed.

15 Probe B was a 15-mer dsDNA probe identical to probe A, without the attached fluorescein marker, and was prepared similarly.

20 Each hybridization reaction mixture (40 μ l) contained the following: 0.4 pmoles of dsDNA target, 4 pmoles of dsDNA Probe B, 0.5 x TBE and 100 nM of the DNA intercalator YOYO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The reaction mixtures were incubated at 21°C for 5 minutes and then assayed. Samples were placed into a quartz cuvette, and irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm. The maximum fluorescent intensity occurred at 25 a wavelength of 535 nm, indicative of intercalation of YOYO-1.

25 The fluorescent intensities observed when no target or probe was present (YOYO-1 only) are shown in Fig. 3. Fig. 3 also shows the fluorescent intensities observed when the reaction mixtures combined dsDNA Probe B with wild-type 30-mer dsDNA Target A, which contained homologous sequences, or with four other dsDNA targets which, but for one mismatched pair of bases, contained sequences which

were homologous to the base sequences in the dsDNA Probe B. Homologous, that is to say mirror complementary, wild-type target dsDNA when present in the reaction mixture with the dsDNA Probe B produced the greatest fluorescent intensity. 5 Mismatched dsDNA targets when incubated with dsDNA Probe B in the reaction mixture yielded lesser fluorescent intensity values ranging from 20% less for dsDNA Target C to 80% less for dsDNA Target E, compared to that achieved by perfectly matched quadruplexes (Fig. 3).

10 It was observed that Watson-Crick quadruplexes, stabilized by YOYO-1 intercalation, formed more readily between dsDNA target and dsDNA probe when that probe contained perfectly homologous, that is to say mirror complementary sequences, than when there was a single pair of bases which were not homologous, that is to say not mirror complementary to sequences in the dsDNA targets. Watson-Crick quadruplexes formed readily despite the inferred conclusion that the quadruplex formation required the duplex probe to give up its right-handed chirality.

15 20 Example 4
In this example, 50-mer dsDNA targets were exposed to the 53% GC 15-mer dsDNA Probe C, whose Watson-Crick complementarity exists between bases of the strands of the probe and bases of the strands of the target when the major groove of the duplex probe is placed in the minor groove of the duplex target, herein referred to as nested complementarity. The sequences of bases in the duplex probe are not homologous but inverted in relation to those in the duplex target.

25 30 The strands of the probe were synthesized on the DNA synthesizer mentioned above and purified by HPLC. Equimolar amounts of the probe strands were denatured at 95°C for 10 min and allowed to anneal as the temperature

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

23

cooled to 21°C over 1.5 hours. DsDNA probe was dissolved in ddH₂O at a concentration of 1pmole/μl.

Sequence for the sense strand (SEQ ID NO:13) of dsDNA Probe C: 5'-GAC AGT AGA GAC CAC-3'.

5 Sequence for the antisense strand (SEQ ID NO:14) of dsDNA Probe C: 5'-GTG GTC TCT ACT GTC-3'.

10 Each hybridization reaction mixture (40 μl) contained the following: 0.4 pmoles of target dsDNA, 4 pmoles of dsDNA Probe C, 0.5 x TBE and 100 nM of the DNA intercalator YOYO-1. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 5 minutes, placed in a quartz cuvette, and irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm. The maximum fluorescent intensity occurred at a wavelength of 535 nm, indicative of 15 intercalation of YOYO-1.

20 Fig. 4 illustrates that in the absence of prior denaturation, the highest fluorescent intensities were achieved when wild-type 50-mer dsDNA Target A was reacted with 15-mer dsDNA Probe C, which was a perfect match on a nested complementary basis to dsDNA Target A. The fluorescent intensity is indicative of DNA binding taking place, in this case quadruplex formation between the dsDNA target and nested complementary dsDNA probe.

25 Mutant dsDNA targets which were mismatched with the duplex probe by a single pair of bases when matching was assessed on the inverted homology basis of nested complementarity, formed measurably fewer quadruplex complexes with the dsDNA probe, than did the fully complementary wild-type dsDNA target. The various 30 mismatches, which were assayed on a mirror complementary basis in Example 3 were assayed on a nested complementary basis in this example.

As shown in Fig. 4, the fluorescent intensities produced by the quadruplexes formed with the 1 bp mismatched dsDNA targets plus dsDNA Probe C, ranged from 8% to 16% less than that achieved by perfectly matched quadruplexes (dsDNA Target A + dsDNA Probe C).

Greater discrimination in fluorescence was observed between perfectly matched and mismatched quadruplexes in Example 3. This suggests that fully complementary or 1 base pair mismatched dsDNA probes prefer binding in a nested complementary orientation rather than a mirror complementary orientation to dsDNA target.

This example shows that Watson-Crick quadruplex binding between nested complementary duplex DNA readily occurs in the presence of YOYO-1. This facility arises in part from the fact that nested complementary quadruplex binding allows the right-handed chirality of each interacting duplex to be maintained.

Example 5

50-mer ssDNA target sequences, derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene (*Nature* 380, 207 (1996)) and modified such that the percent GC content was changed from 30% to 52%, were synthesized on a DNA synthesizer (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems) and purified by HPLC.

Sequence for the strand (SEQ ID NO:2) being the 50-mer wild-type ssDNA Target F: 5'- CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

Target G was a 50-mer mutant ssDNA target identical to wild-type ssDNA Target F except for a one base mutation (underlined).

Sequence for the strand (SEQ ID NO:4) of mutant ssDNA Target G: 5'- CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA CGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

Target H was a 50-mer mutant ssDNA target identical to wild-type ssDNA Target F except for a one base mutation (underlined).

Sequence for the strand (SEQ ID NO:6) of mutant ssDNA
5 Target H: 5'- CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG AGA
AGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

Target I was a 50-mer mutant ssDNA target identical to wild-type ssDNA Target F except for a one base mutation (underlined).

10 Sequence for the strand (SEQ ID NO:8) of mutant ssDNA
Target I: 5'- CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAA AGA
TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

15 Target J was a 50-mer mutant ssDNA target identical to wild-type ssDNA Target F except for a one base mutation (underlined).

Sequence for the strand (SEQ ID NO:10) of mutant ssDNA
Target J: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG GGA
TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

20 Target K was a 50-mer mutant ssDNA target identical to wild-type ssDNA Target F except for a one base mutation (underlined).

Sequence for the strand (SEQ ID NO:15) of mutant ssDNA
Target K: 5'-CAG AGT CAT CGT AGG ACA CAC CAG CGA
TGA CAG TGT CTG TCA TGG TGC TC-3'.

25 Probe B was a 15-mer dsDNA probe identical to Probe A without the fluorescein marker, and was prepared accordingly. One of the strands of Probe B (i.e., SEQ ID NO:11) was complementary to a 15 nucleotide segment near the center of 50-mer wild-type ssDNA Target F.

30 Each hybridization reaction mixture (40μl) contained the following: 0.4 pmoles of target ssDNA, 4 pmoles of dsDNA probe, 0.5 x TBE and 100 nM YOYO-1. The reaction mixtures were incubated at room temperature (21°C) for 5

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

26

minutes, without prior denaturation. Samples were placed into a quartz cuvette, irradiated with an argon ion laser beam having a wavelength of 488 nm and monitored for fluorescent emission. Integration time of all laser irradiation was 80 msec. The maximum fluorescent intensities occurred at a wavelength of 535 nm, indicative of intercalation of YOYO-1. Fig. 5 shows the intensity of fluorescence plotted as a function of wavelength for each sample analyzed.

In the absence of target ssDNA, some hybridization between the dsDNA probes occurred on a mirror complementary basis (Fig. 5). Such binding between homologous duplex DNA is disclosed in prior examples. SsDNA targets incubated alone with YOYO-1 resulted in low intensity emission values, which were less than one-half the value of the intensity emission of the dsDNA probes alone incubated with YOYO-1 (data not shown).

After a 5 minute incubation at 21°C in the presence of 100mM YOYO-1, ssDNA Target F readily formed binding complexes with perfectly complementary sequences on dsDNA Probe B, resulting in a 79% increase in the intensity of fluorescent emission compared to that emitted by dsDNA Probe B alone (Fig 5). In contrast, incompletely complementary ssDNA targets containing various one base pair mismatches were less stable in these reaction conditions, yielding only a 19% to 31% increase in fluorescent intensity compared to that exhibited by dsDNA Probe B alone (Fig. 5).

The presence of YOYO-1, an intercalator, was sufficient to allow binding between dsDNA probes and ssDNA targets in the absence of prior denaturation. Binding occurred on the basis of Watson-Crick base pair affinities, with a measurable and significantly greater amount of

binding between fully complementary strands. The reaction occurred at room temperature within just 5 minutes of incubation at a ratio of probe to target of 10 to 1, using natural DNA. The ssDNA targets and dsDNA probe used in this example contained 53% GC content and did not contain homopurine or homopyrimidine stretches on any DNA strand. The assay of the invention was able to identify perfectly complementary ssDNA sequences and those containing mismatched bases, using dsDNA probes.

The assay of the invention functioned notwithstanding that binding occurred to a substantial extent between duplex probes which were fully self-complementary, i.e., of homologous strand sequence and which bound to one another in a mirror complementary fashion, that is to say major groove to major groove.

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

CLAIMS

1. A multiplex structure comprising:
 - a first strand containing a first sequence of nucleobases;
 - 5 a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein said second strand is associated with said first strand by Watson-Crick bonding;
 - a third strand containing a third sequence of 10 nucleobases; and
 - a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases, wherein said fourth strand is associated with said second strand and said third strand by Watson-Crick bonding.
- 15 2. The multiplex structure of claim 1, wherein said multiplex structure is an isolated, purified, artificial or synthetic quadruplex.
3. The multiplex structure of claim 1, wherein each 20 said strand independently comprises a nucleic acid or a nucleic acid analogue.
4. The multiplex structure of claim 3, wherein each said strand independently comprises DNA or RNA.
5. The multiplex structure of claim 3, wherein each 25 said strand independently comprises a nucleic acid analogue containing an uncharged or partially charged backbone.
6. The multiplex structure of claim 1, wherein one of said second strand or said fourth strand comprises DNA and the other of said second strand or said fourth strand comprises RNA, mRNA, hnRNA, rRNA, tRNA or cDNA.
7. The multiplex structure of claim 1, wherein said 30 second strand and said fourth strand are anti-parallel to each other.

8. The multiplex structure of claim 7, wherein a major groove of said first strand and said second strand is placed in a major groove of said third strand and said fourth strand.

5 9. The multiplex structure of claim 1, wherein said second strand and said fourth strand are parallel to each other.

10 10. The multiplex structure of claim 9, wherein a major groove of said first strand and said second strand is placed in a minor groove of said third strand and said fourth strand.

11. The multiplex structure of claim 1, wherein each nucleobase binds to no more than two other nucleobases.

15 12. The multiplex structure of claim 1, wherein no strand is contiguous with another strand.

13. The multiplex structure of claim 1, wherein said multiplex structure is substantially free of Hoogsteen bonding.

20 14. The multiplex structure of claim 1, wherein said multiplex structure is substantially free of G-G quartets.

15. The multiplex structure of claim 1, wherein said first strand and said second strand are 5 to 50 base pairs long.

25 16. The multiplex structure of claim 1, wherein said third strand and said fourth strand are genomic DNA.

17. The multiplex structure of claim 1, wherein said third strand and said fourth strand include a haplotype in genomic DNA.

30 18. The multiplex structure of claim 1, wherein said third strand and said fourth strand are PCR amplified products.

19. The multiplex structure of claim 1, wherein said multiplex structure is free of solid support.

20. The multiplex structure of claim 1, wherein said multiplex structure is bound to a solid support.

21. The multiplex structure of claim 1, wherein said solid support is not electrically conductive.

5 22. The multiplex structure of claim 1, wherein said solid support is electrically conductive.

10 23. The multiplex structure of claim 1, further comprising a therapeutic, prophylactic or diagnostic agent bound to at least one of said first strand, said second strand, said third strand and said fourth strand.

15 24. The multiplex structure of claim 1, wherein said first strand and said second strand are each 5 to 30 bases long and said third strand and said fourth strand are each 8 to 3.3×10^9 base pairs long.

25. The multiplex structure of claim 1, wherein said fourth sequence contains 25% to 75% purine bases and 75% to 25% pyrimidine bases in any order.

26. A method for providing the multiplex structure of claim 1, said method comprising:

20 providing a hybridization medium comprising said first strand, said second strand, said third strand, said fourth strand, water, a buffer and at least one promoter; and
25 incubating said hybridization medium for an incubation time effective to hybridize said second strand to said fourth strand to provide said multiplex structure.

30 27. The method of claim 26, wherein said hybridization medium is buffered to a pH of about 5 to about 9.

28. The method of claim 26, wherein said at least one promoter is an intercalating agent.

29. The method of claim 28, wherein said at least one promoter is an intercalating fluorophore, and a fluorescent intensity of a test medium containing said multiplex structure is directly correlated with a binding affinity of said second strand for said fourth strand.

30. The method of claim 29, wherein said intercalating fluorophore is a member selected from the group consisting of YOYO-1, TOTO-1, ethidium bromide, ethidium homodimer-1, ethidium homodimer-2 and acridine.

10 31. The method of claim 26, wherein said at least one promoter is tethered to at least one of said first strand, said second strand, said third strand and said fourth strand.

15 32. The method of claim 26, wherein said at least one promoter is a monovalent cation.

33. The method of claim 26, wherein said at least one promoter is a cation having a valency greater than one.

20 34. The method of claim 33, wherein said cation is at least one member selected from the group consisting of alkali metal cations, alkaline earth metal cations, transition metal cations, $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{+3}$, trivalent spermidine and tetravalent spermine.

35. The method of claim 33, wherein said cation is K^+ or Na^+ provided at a concentration of 50mM to 125mM.

25 36. The method of claim 26, wherein said third strand and said fourth strand are provided in said hybridization medium before said first strand and said second strand, and wherein said first strand and said second strand are provided in dehydrated form prior to rehydration by contact with said hybridization medium.

30 37. The method of claim 26, wherein said incubation time is not more than about two hours.

38. The method of claim 26, wherein said incubating is conducted at room temperature.

39. The method of claim 26, wherein hybridization of said second strand to said fourth strand is detected as a change in a fluorescent, chemiluminescent, electrochemiluminescent or electrical signal.

40. The method of claim 39, wherein an intensity of said signal is correlated with a binding affinity between said second strand and said fourth strand.

41. The method of claim 40, wherein at least one of said first strand and said second strand is covalently labeled with a non-intercalating fluorophore and said intensity is inversely correlated with said binding affinity.

42. The method of claim 41, wherein said non-intercalating fluorophore is a member selected from the group consisting of biotin, rhodamine and fluorescein.

43. The method of claim 41, wherein said method is a homogeneous assay conducted without providing a signal quenching agent on said target sequence or on said probe.

44. The method of claim 26, wherein hybridization of said second strand to said fourth strand inactivates an activity associated with at least one of said third strand and said fourth strand.

45. The method of claim 26, wherein at least one of said first strand and said second strand further comprises a pharmaceutical agent, and wherein hybridization of said second strand to said fourth strand places said pharmaceutical agent an effective distance from a target on said third strand, said fourth strand or on another molecule associated with at least one of said third strand and said fourth strand.

46. The method of claim 45, wherein said pharmaceutical agent is a member selected from the group consisting of nucleic acids designed to bind promoter sequences of clinically relevant genes, nucleic acids designed to bind clinically relevant genes, or nucleic acids designed to bind origin of replication sites of pathogens.

47. The method of claim 26, wherein a ratio of said first strand and said second strand to said third strand and said fourth strand is about 10:1.

48. The method of claim 26, wherein concentrations of each of said first strand, said second strand, said third strand and said fourth strand are not more than 5×10^{-10} M.

49. The method of claim 26, wherein said at least one promoter is a minor groove nucleic acid binding molecule, which binds in a non-intercalating manner and binds with an association constant of at least 10^3 M⁻¹.

50. The multiplex structure of claim 1, wherein said first strand is associated with said third strand by Watson-Crick bonding.

51. An electrical circuit comprising the multiplex structure of claim 1.

52. A method for assaying binding, said method comprising:

25 providing a target nucleic acid or nucleic acid analogue having a target sequence, wherein said target sequence contains at least one purine base and at least one pyrimidine base;
providing a double-stranded probe comprising a
30 nucleic acid sequence or a nucleic acid analog sequence;
providing a hybridization promoter;

adding said probe, said target and said hybridization promoter to a medium to provide a test sample containing a Watson-Crick triplex or quadruplex comprising said probe bound to said target sequence;

5 irradiating said test sample with exciting radiation to cause test sample to emit fluorescent radiation;

detecting an intensity of said fluorescent radiation,

10 wherein said intensity is correlated with a binding affinity between said probe and said target sequence; and

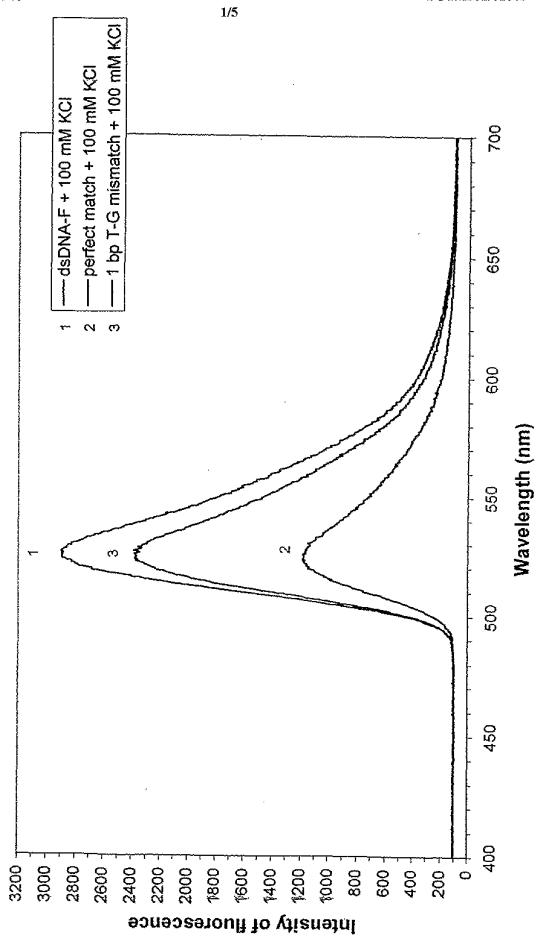
determining from said intensity an extent of matching between said probe and said target sequence.

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

1/5

FIG. 1. Mix of 15-mer dsDNA-F (4 pmole) (53% GC) and 50-mer dsDNA (0.4 pmole) in the presence of 100 mM KCl (after 1 hr)

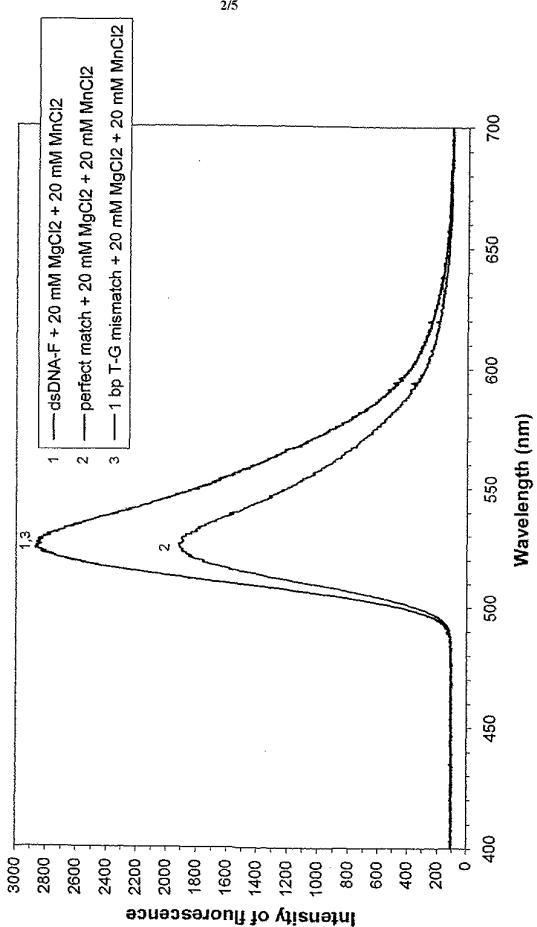


WO 02/24946

PCT/IB01/01643

2/5

FIG. 2. Mix of 15-mer dsDNA-F (4 pmole) (53% GC) and 50-mer dsDNA (0.4 pmole) in the presence of divalent cations (after 1 hr)

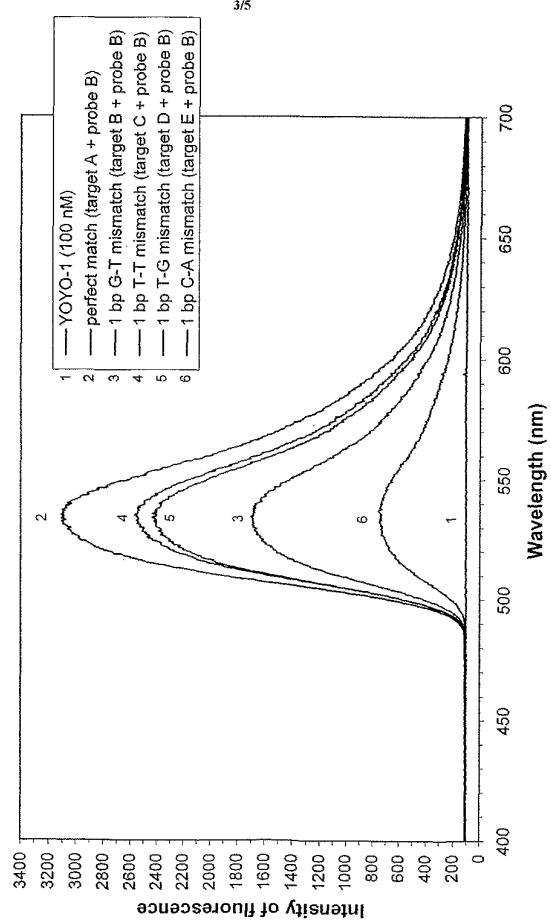


WO 02/24946

PCT/IB01/01643

3/5

FIG. 3. Mix of 15-mer dsDNA (4 pmole) (53% GC) and 50-mer dsDNA (0.4 pmole) in the presence of 100 nM YOYO-1

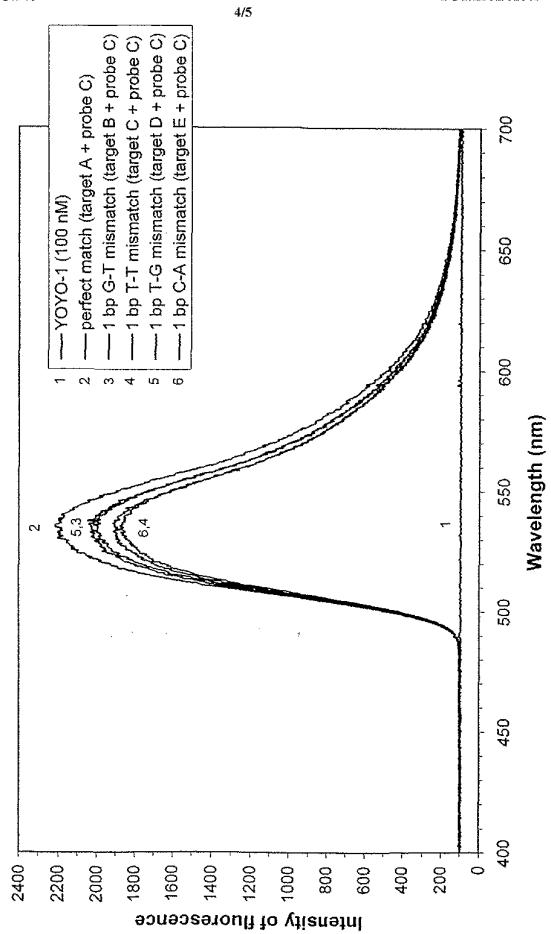


WO 02/24946

PCT/IB01/01643

4/5

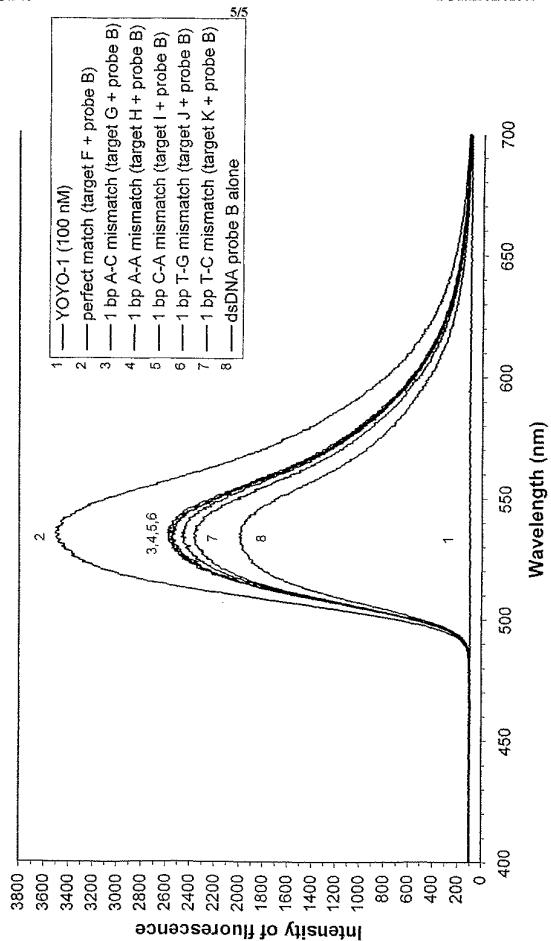
FIG. 4. Mix of 15-mer dsDNA (4 pmole) (53% GC) and 50-mer dsDNA (0.4 pmole) in the presence of 100 nM YOYO-1



WO 02/24946

PCT/IB01/01643

FIG. 5. Mix of 15-mer dsDNA (4 pmole) (53% GC) and 50-mer ssDNA (0.4 pmole) in the presence of 100 nM YOYO-1



WO 02/24946

PCT/IB01/01643

E104720071-SeqListing.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Erikson, Glen
<120> QUADRUPLEX DNA SYSTEM AND DUPLEX PROBE SYSTEMS
<130> E1047/20044
<140> US 09/664,827
<141> 2000-09-19
<160> 15
<170> PatentIn version 3.0
<210> 1
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene
<400> 1
gagcaccatg acagacactg tcatctctgg tgtgtctac gatgactctg
50

<210> 2
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene
<400> 2
cagagtcatc gtaggacaca ccagagatga cagtgtctgt catggtgctc
50

<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

E104720071-SeqListing.ST25.txt

<400> 3
gagcaccatg acagacactg tcgtctctgg tgtgtcctac gatgactctg
50

<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 4
cagagtcatc gtaggacaca ccagagacga cagtgtctgt catggtgctc
50

<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 5
gagcaccatg acagacactg tcttctctgg tgtgtcctac gatgactctg
50

<210> 6
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 6
cagagtcatc gtaggacaca ccagagaaga cagtgtctgt catggtgctc
50

<210> 7
<211> 50
<212> DNA

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

E104720071-SeqListing.ST25.txt

<213> Artificial

<220>

<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 7
gaggcaccatg acagacactg tcatcttgg tgtgtcctac gatgactctg
50

<210> 8
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 8
cagagtcata gtaggacaca ccaaagatga cagtgtctgt catggtgctc
50

<210> 9
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 9
gaggcaccatg acagacactg tcatccctgg tgtgtcctac gatgactctg
50

<210> 10
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 10
cagagtcata gtaggacaca ccagggatga cagtgtctgt catggtgctc
50

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

E104720071-SeqListing.ST25.txt

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 11
ctgtcatctc tggtg
15

<210> 12
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 12
caccagagat gacag
15

<210> 13
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 13
gacagtagag accac
15

<210> 14
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

WO 02/24946

PCT/IB01/01643

E104720071-SeqListing.ST25.txt

<400> 14
gtggtctcta ctgtc
15

<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from exon 10 of the human cystic fibrosis gene

<400> 15
cagagtcatc gtaggacaca ccagcgatga cagtgtctgt catggtgctc
50

【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
28 March 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/024946 A3(51) International Patent Classification⁵: C12Q 1/68.

G01N 27/447

(21) International Application Number: PCT/IB01/01643

(22) International Filing Date:
10 September 2001 (10.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/664,827 19 September 2000 (19.09.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): IN-
GENEUS CORPORATION [BB/BB]; Trident House,
Broad Street, Bridgetown (BB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAKSIS, Jasmine,
L. [CA/CA]; 36 Carter Crescent, Richmond Hill, Ontario
L4C 2N2 (CA). ERIKSON, Glen, H. [CA/—]; P.O. Box
799, Providenciales (TC).(74) Agent: TENER, David, M.; Caesar, Rivise, Bernstein,
Cohen & Pokotilow, Ltd., 12th Floor, Seven Penn Center,
1635 Market Street, Philadelphia, PA 19103-2212 (US).(81) Designated States (national): A1, AG, A1_a, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI_a, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BH, BJ, CI,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
13 March 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/024946 A3

(54) Title: QUADRUPLEX DNA AND DUPLEX PROBE SYSTEMS

(57) Abstract: A multiplex structure, such as a nucleic acid quadruplex, includes: a first strand containing a first sequence of nucleobases; a second strand containing a second sequence of nucleobases, wherein the second strand is associated with the first strand by Watson-Crick bonding; a third strand containing a third sequence of nucleobases; and a fourth strand containing a fourth sequence of nucleobases, wherein the fourth strand is associated with the second strand and the third strand by Watson-Crick bonding. Formation of the multiplex structure is promoted by monovalent cations (e.g., sodium and potassium), divalent cations, multivalent cations, intercalating agents and/or molecules known to bind within the minor grooves of nucleic acids. The multiplex structure and the process of forming it have diagnostic, therapeutic, prophylactic and nanoengineering applications.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte al Application No PCT/IB 01/01643
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C1201/68 GOIN27/447		
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 GOIN		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 43543 A (DADE BEHRING INC. (US); KURN NURITH; LIU YEN PING; LISHANSKI ALLA) 27 July 2000 (2000-07-27) the whole document ---	1-7, 11-21, 23, 25-34, 37,39, 40,50,52
X	LISTHANSKI A. ET AL.: "Branch migration inhibition in PCR-amplified DNA: homogeneous mutation detection" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 9, 1 May 2000 (2000-05-01), pages e42 i-e42 vii, XP002224005 the whole document ---	1-7, 11-14, 16-19, 23, 25-34, 37,39, 40,50,52 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*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</p> <p>*X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*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, and the combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
11 December 2002	13/01/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2233 RA, The Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Macchia, G	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IB 01/01643
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ECKHART L. ET AL.: "Reverse transcription-polymerase chain reaction products of alternatively spliced mRNAs form DNA heteroduplexes and heteroduplex complexes" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 5, 29 January 1999 (1999-01-29), pages 2613-2615, XP002224006 abstract page 2614; figure 3C</p>	1-7, 11-15, 18,19, 25-28
A	<p>DENG H. AND BRAUNLIN W.H.: "Duplex to quadruplex equilibrium of the self-complementary oligonucleotide d(GGGGCCCG)" BIOPOLYMERS, vol. 35, no. 6, 1995, pages 677-681, XP001127483</p>	-----

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Information on patent family members			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0043543	A 27-07-2000	WO 0043543 A1	27-07-2000

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

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
G 01N 33/58 G 01N 33/58 Z

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R0,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72) 発明者 エリクソン、グレン エイチ .

英國領西インド諸島 タークス アンド カイコス諸島 プロビデンシャルズ ピー.オー.ボックス 799

F ターム(参考) 2G045 AA25 BB51 DA12 DA13 DA14 DA77 FB02 FB05 FB07 FB12
FB13 GC15
4B024 AA11 BA80 CA01 CA04 CA11 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QR82 QS25
QS34 QS36 QX02