

(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2012-511927

(P2012-511927A)

(43) 公表日 平成24年5月31日(2012.5.31)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12Q 1/68 C 12N 15/09	C 12Q 1/68 C 12N 15/00	4 B 0 2 4 4 B 0 6 3
(2006.01) (2006.01)		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2011-542142 (P2011-542142)	(71) 出願人	502221282 ライフ テクノロジーズ コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成21年12月17日 (2009.12.17)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92008, カールスバッド, バン アレン ウェイ 5791
(85) 翻訳文提出日	平成23年8月8日 (2011.8.8)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/006652	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(87) 國際公開番号	W02010/077324	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開日	平成22年7月8日 (2010.7.8)	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	61/253,501		
(32) 優先日	平成21年10月20日 (2009.10.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/164,230		
(32) 優先日	平成21年3月27日 (2009.3.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/138,521		
(32) 優先日	平成20年12月17日 (2008.12.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】対立遺伝子変種を検出するための方法、組成物、およびキット

(57) 【要約】

いくつかの態様において、本発明は全体として、異なる対立遺伝子間の配列バリエーションの識別に用いるための組成物、方法およびキットに関する。より具体的には、いくつかの態様において、本発明は、豊富な（例えば、野生型）対立遺伝子変種を含む試料中のSNPなどのまれな（例えば、変異体）対立遺伝子変種またはヌクレオチド(NT)の挿入もしくは欠失を定量するための、高い特異性および選択性を有する組成物、方法、およびキットを提供する。特に、いくつかの態様において、本発明は、競合的対立遺伝子特異的TaqMan PCR (competitive allele-specific TaqMan PCR) (「cast-PCR」)と呼ばれる選択性の高い変異検出法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、標的配列の少なくとも第二の対立遺伝子変種を含むことが疑われる核酸試料中の該標的配列の第一の対立遺伝子変種を検出するための方法：

(a) i. 核酸試料；

ii. 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該標的配列の該第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；

iii. 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダー(minor groove binder)を含む、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；

iv. 該標的配列の領域に対して相補的である、第一の座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第一の座特異的プライマー；および

v. 第一の検出プローブ

を混合することによって、第一の反応混合物を形成する段階；

(b) 該第一の座特異的プライマーと該第一の対立遺伝子特異的プライマーとを用いて該第一の反応混合物に対して增幅反応を行い、第一のアンプリコンを形成する段階；ならびに

(c) 該第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって該第一のアンプリコンを検出し、それによって該核酸試料中の標的遺伝子の該第一の対立遺伝子変種を検出する段階。

【請求項2】

前記第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を用いて、前記第一の対立遺伝子変種を定量する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

(d) (i) 核酸試料；

(ii) 第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、前記標的配列の前記第二の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第二の対立遺伝子特異的プライマー；

(iii) 前記第一の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；

(iv) 該標的配列の領域に対して相補的である、第二の座特異的プライマーであって、該領域が、該第二の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第二の座特異的プライマー；および

(v) 第二の検出プローブ

を混合することによって、第二の反応混合物を形成する段階；

(e) 該第二の対立遺伝子特異的プライマーと該座特異的プライマーとを用いて該第二の反応混合物に対して増幅反応を行い、第二のアンプリコンを形成する段階；ならびに

(f) 該検出プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって該第二のアンプリコンを検出し、それによって該核酸試料中の標的遺伝子の該第二の対立遺伝子変種を検出する段階。

【請求項4】

前記第一の反応混合物における前記第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を、前記第二の反応混合物における前記第二の検出プローブの検出可能な特性の変化と比較する

10

20

30

40

50

段階をさらに含む、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項 6】

前記テールがGCに富む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

前記テールが、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項5記載の方法。 10

【請求項 9】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーのTmが50～55である、請求項1または3記載の方法。

【請求項 10】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、請求項1または3記載の方法。

【請求項 11】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項1または3記載の方法。 20

【請求項 12】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項1または3記載の方法。

【請求項 13】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項12記載の方法。 30

【請求項 14】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーならびに／または前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項 15】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、請求項14記載の方法。 40

【請求項 16】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

前記改変塩基が、マッチ (matched) 標的配列および／またはマッチヌクレオチドとミスマッチ (mismatched) 標的配列および／またはミスマッチヌクレオチドとの間のTmを増加させる任意の改変塩基である、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブが、前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ内および 50

/ または前記第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブ内の3'端、5'端、および/または内部位置にMGB部分を含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項19】

前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記MGB部分が、前記增幅反応中に前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブから切断されない、請求項18記載の方法。

【請求項21】

前記第一の検出プローブおよび/または前記第二の検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項1または3記載の方法。

【請求項22】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記核酸試料がゲノムDNA(gDNA)である、請求項1記載の方法。

【請求項24】

前記第一の反応混合物および/または前記第二の反応混合物が、ポリメラーゼ、dNTP、および/またはPCR增幅に適した他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項25】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記增幅反応がリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、請求項1または3記載の方法。

【請求項27】

前記核酸試料が腫瘍試料から得られる、請求項1記載の方法。

【請求項28】

前記核酸試料が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、請求項1記載の方法。

【請求項29】

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、請求項27記載の方法。

【請求項30】

前記腫瘍が、Ras、EGFR、Kit、pTEN、および/またはp53における変異を含む、請求項27記載の方法。

【請求項31】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項30記載の方法。

【請求項32】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および/またはコドン13中にある、請求項31記載の方法。

【請求項33】

(a) 核酸分子；

(b) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該対立遺伝子特異的プライマー；

(c) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、対立遺伝子特異的プロッカープローブ；

(d) 該標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマー；お

10

20

30

40

50

よび

(e) 検出プローブ
を含む、反応混合物。

【請求項 3 4】

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 3 5】

前記テールがGCに富む、請求項34記載の反応混合物。

【請求項 3 6】

前記テールが長さ2~30ヌクレオチドである、請求項34記載の反応混合物。

【請求項 3 7】

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項34記載の反応混合物。

【請求項 3 8】

前記対立遺伝子特異的プライマーのTmが50 ~ 55 である、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 3 9】

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20~900 nMである、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 0】

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 1】

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 2】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項41記載の反応混合物。

【請求項 4 3】

前記対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第一のおよび/または前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 4】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、請求項43記載の反応混合物。

【請求項 4 5】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項43記載の反応混合物。

【請求項 4 6】

前記改変塩基が、マッチ標的配列および/またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および/またはミスマッチヌクレオチドとの間のTmを増加させる任意の改変塩基である、請求項43記載の反応混合物。

【請求項 4 7】

前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが、該対立遺伝子特異的プロッカープローブ内の3'端、5'端、および/または内部位置にMGB部分を含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 8】

前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項47記載の反応混合物。

【請求項 4 9】

10

20

30

40

50

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 0】

前記座特異的検出プローブが標識を含む、請求項49記載の反応混合物。

【請求項 5 1】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項49記載の反応混合物。

【請求項 5 2】

前記核酸分子がゲノムDNA (gDNA) である、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 3】

ポリメラーゼ、dNTP、および／または他の試薬もしくは緩衝液を含む、請求項33記載の反応混合物。 10

【請求項 5 4】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項53記載の反応混合物。

【請求項 5 5】

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いられる、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 6】

前記核酸分子が腫瘍試料から得られる、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 7】

前記核酸分子が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、請求項33記載の反応混合物。 20

【請求項 5 8】

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、請求項56記載の反応混合物。

【請求項 5 9】

前記腫瘍が、Ras、EGFR、Kit、pTEN、および／またはp53における変異を含む、請求項56記載の反応混合物。

【請求項 6 0】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項59記載の反応混合物。

【請求項 6 1】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および／またはコドン13中にある、請求項60記載の反応混合物。 30

【請求項 6 2】

(a) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー：

(b) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ

を含む、組成物。

【請求項 6 3】

前記標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、前記第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 4】

検出プローブをさらに含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 6】

50

前記テールがGCに富む、請求項65記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記テールが長さ2~30ヌクレオチドである、請求項65記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項65記載の組成物。
。

【請求項 6 9】

前記対立遺伝子特異的プライマーのTmが50 ~ 55 である、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 0】

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20~900 nMである、請求項62記載の組成物。 10

【請求項 7 1】

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 3】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項72記載の組成物。 20

【請求項 7 4】

前記対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第一のおよび/または前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、請求項74記載の組成物。

【請求項 7 6】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項74記載の組成物。 30

【請求項 7 7】

前記改変塩基が、マッチ標的配列および/またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および/またはミスマッチヌクレオチドとの間のTmを増加させる任意の改変塩基である、請求項74記載の組成物。

【請求項 7 8】

前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが、該対立遺伝子特異的プロッカープローブ内の3'端、5'端、および/または内部位置にMGB部分を含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 9】

前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項78記載の組成物。 40

【請求項 8 0】

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項64記載の組成物。

【請求項 8 1】

前記座特異的検出プローブが標識を含む、請求項80記載の組成物。

【請求項 8 2】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項64記載の組成物。

【請求項 8 3】

核酸分子、ポリメラーゼ、dNTP、および/または他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 8 4】

50

前記核酸分子がゲノムDNA (gDNA) である、請求項83記載の組成物。

【請求項 8 5】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項84記載の組成物。

【請求項 8 6】

前記核酸分子が腫瘍試料から得られる、請求項83記載の組成物。

【請求項 8 7】

前記核酸分子が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、請求項83記載の組成物。

【請求項 8 8】

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、請求項86記載の組成物。

10

【請求項 8 9】

前記腫瘍がRas、EGFR、Kit、pTEN、および / またはp53における変異を含む、請求項86記載の組成物。

【請求項 9 0】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項89記載の組成物。

【請求項 9 1】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および / またはコドン13中にある、請求項90記載の組成物。

【請求項 9 2】

2つまたはそれより多い容器の1つに独立して分配される以下の構成要素を含む該2つまたはそれより多い容器を含む、キット：

20

a) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；および

b) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ。

【請求項 9 3】

30

前記標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、前記第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含む、請求項92記載のキット。

【請求項 9 4】

検出プローブをさらに含む、請求項92記載のキット。

【請求項 9 5】

前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが標識を含まない、請求項92記載のキット。

【請求項 9 6】

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項92記載のキット。

40

【請求項 9 7】

前記テールがGCに富む、請求項96記載のキット。

【請求項 9 8】

前記テールが長さ2~30ヌクレオチドである、請求項96記載のキット。

【請求項 9 9】

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項96記載のキット。

50

【請求項 1 0 0】

前記対立遺伝子特異的プライマーのTmが50 ~ 55 である、請求項92記載のキット。

【請求項 1 0 1】

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、請求項92記載のキット。

【請求項 102】

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項92記載のキット。

【請求項 103】

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項92記載のキット。

【請求項 104】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項103記載のキット。

10

【請求項 105】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項92記載のキット。

【請求項 106】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、請求項105記載のキット。

【請求項 107】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項105記載のキット。

20

【請求項 108】

前記改変塩基が、マッチ標的配列および／またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および／またはミスマッチヌクレオチドとの間のTmを増加させる任意の改変塩基である、請求項105記載のキット。

【請求項 109】

前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが、該対立遺伝子特異的プロッカープローブ内の3'端、5'端、および／または内部位置にMGB部分を含む、請求項92記載のキット。

【請求項 110】

前記対立遺伝子特異的プロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項10記載のキット。

30

【請求項 111】

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項94記載のキット。

【請求項 112】

前記座特異的検出プローブが標識を含む、請求項111記載のキット。

【請求項 113】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項111記載のキット。

。

【請求項 114】

ポリメラーゼ、dNTP、および／または他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、請求項92記載のキット。

40

【請求項 115】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項114記載のキット。

【請求項 116】

Ras、EGFR、Kit、pTEN、および／またはp53における変異を検出するために使用される、請求項92～94のいずれか1項記載のキット。

【請求項 117】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項117記載のキット。

【請求項 118】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および／またはコドン13中にある、請求項118記載のキット。

50

【請求項 119】

少なくとも1:1000、1:10,000、1:100,000、または1:1,000,000の検出選択性を有する、請求項1または3記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

関連出願の相互参照

本出願は、その全ての全内容が参照により本明細書に組み入れられる、2009年12月17日に提出された米国特許仮出願第61/138,521号、2009年11月5日に提出された同第61/258,582号；2009年10月20日に提出された同第61/253,501号；2009年10月14日に提出された同第61/251,623号；2009年6月12日に提出された同第61/186,775号；および2009年3月27日に提出された同第61/164,230号に対して35 U.S.C. 119の下で優先権の恩典を主張する。

【背景技術】

[0 0 0 2]

背景

一塩基多型 (SNP) は、ヒトゲノムにおける遺伝子多様性の最も一般的なタイプであり、ヒトゲノムDNAにおいてヌクレオチド1,000個またはそれ未満においてSNP約1個の頻度で出現する (Kwok, P-Y, Ann Rev Genom Hum Genet 2001, 2:235-258) (非特許文献1)。SNPは、遺伝的障害、異なる疾患に対する感受性、薬物に対する有害反応に対する素因、および法医学研究での使用に関係している。このように、SNP (またはまれな変異) の検出は、血液中の循環性腫瘍細胞の検出、出生前診断のみならず、混合細胞集団における疾患関連変異の検出などの、初期段階の疾患の診断において大きな可能性を提供する。

〔 0 0 0 3 〕

ハイブリダイゼーション、ライゲーション、またはDNAポリメラーゼを含む方法に基づいて、SNP遺伝子型決定に関する多数のアプローチが開発されている(Chen, X., and Sullivan, PF, *The Pharmacogenomics Journal* 2003; 3: 77-96. (非特許文献2))。例えば、対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応(AS-PCR)は、DNA配列のバリエーションを検出するために広く用いられる戦略である(Wu DY, Uguzzoli L, Pal BK, Wallace RB., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2757-2760 (非特許文献3))。AS-PCRはその名前が暗示する通り、1つまたは双方のプライマーが、同じ遺伝子の異なる対立遺伝子を識別することができる配列バリエーション部位でアニールするように設計される、PCRに基づく方法である。AS-PCRは、ミスマッチ3'塩基を有するプライマーを、マッチする3'塩基を有するプライマーよりかなり低い効率で、つまり100~100,000倍低い効率で伸長させるDNAポリメラーゼの忠実度を利用している(Chen, X., and Sullivan, PF, *The Pharmacogenomics Journal* 2003; 3:77-96 (非特許文献2))。ミスマッチプライマーを伸長させることが難しいことによって、容易に検出することができるPCR増幅の減損が起こる。

[0 0 0 4]

しかし、AS-PCRの特異性および選択性は、対立遺伝子識別力を急速に減衰させるPCRの指標的増幅という性質に大きく依存する。たとえプライマーを、その変種のみを選択的に増幅するために特異的変種にマッチするように設計しても、実際には、有意なミスマッチ増幅がしばしば起こる。その上、AS-PCRの対立遺伝子変種の識別能は、変異のタイプまたは変異もしくはSNP周囲の配列 (Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ., Anal Biochem 2000;284: 11-18 (非特許文献4))、試料中に存在する対立遺伝子変種の量のみならず、別の対立遺伝子との比率によって影響を受けうる。集合的に、これらの要因はしばしば、疑陽性結果が頻繁に出現する原因であり、そのために多くの研究者たちはAS-PCRの信頼性を増加させようと試みている (Orou A, Fechner B, Utermann G, Menzel HJ., Hum Mutat 1995;6:163-169 (非特許文献5)) (Imyanitov EN, Buslov KG, Suspitsin EN, Kuligina ES, Belogubova EV, Grigoriev MY, et al., Biotechniques 2002;33:484-490 (非特許文献6)) (McKinzie PB, Parsons BL. Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR. Mutat Res 2002; 517:209-222 (非特許文献7))。

0 (非特許文献7)) (Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM., Hum Mutat 2003; 22:79-85 (非特許文献8))。

【0005】

いくつかの場合において、AS-PCRの選択性は、ロックド核酸 (LNA) (Latorra, D., et al., Hum Mut 2003, 2:79-85 ; Nakiandwe, J. et al., Plant Method 2007, 3:2 (非特許文献9))、または改変塩基 (Koizumi, M. et al. Anal Biochem. 2005, 340:287-294 (非特許文献10))を含有するSNPに基づくPCRプライマーを用いることによって、対立遺伝子10個中1個から対立遺伝子100,000個中1個の検出まで増加している。しかし、これらの塩基の「模倣体」または改変は、全体的な分析コストを増加させ、かつしばしば大量の最適化を必要とする。

10

【0006】

対立遺伝子のバリエーションを識別するために用いられるプローブハイブリダイゼーション法を含む別の技術は、TaqMan (登録商標) 遺伝子型決定である。しかし、AS-PCRと同様に、この方法を用いる選択性は、限られており、混合試料中のまれな (1,000個中1個) 対立遺伝子または変異の検出には適さない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Kwok, P-Y, Ann Rev Genom Hum Genet 2001, 2:235-258

20

【非特許文献2】Chen, X., and Sullivan, PF, The Pharmacogenomics Journal 2003, 3, 77-96

【非特許文献3】Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB., Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:2757-2760

【非特許文献4】Ayyadevara S, Thaden JJ, Shmookler Reis RJ., Anal Biochem 2000;284: 11-18

【非特許文献5】Orou A, Fechner B, Utermann G, Menzel HJ., Hum Mutat 1995;6:163-169

【非特許文献6】Imyanitov EN, Buslov KG, Suspitsin EN, Kuligina ES, Belogubova E V, Grigoriev MY, et al., Biotechniques 2002;33:484-490

【非特許文献7】McKinzie PB, Parsons BL. Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR. Mutat Res 2002; 517:209-220

30

【非特許文献8】Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM., Hum Mutat 2003;22:79-85

【非特許文献9】Latorra, D., et al., Hum Mut 2003, 2:79-85 ; Nakiandwe, J. et al., Plant Method 2007, 3:2

【非特許文献10】Koizumi, M. et al. Anal Biochem. 2005, 340:287-294

【発明の概要】

【0008】

概要

いくつかの態様において、本発明は全体として、異なる対立遺伝子間の配列バリエーションの識別に用いるための組成物、方法、およびキットに関する。より具体的には、いくつかの態様において、本発明は、特異性が高い豊富な (例えば、野生型) 対立遺伝子変種を含む試料中のSNPまたはヌクレオチド (NT) の挿入もしくは欠失などのまれな (例えば、変異体) 対立遺伝子変種を定量するための組成物、方法、およびキットを提供する。特に、いくつかの態様において、本発明は、競合的対立遺伝子特異的TaqMan PCR (competitive allele-specific TaqMan PCR) (「cast-PCR」) と呼ばれる選択性の高い変異検出法に関する。

40

【0009】

1つの局面において、本発明は、核酸試料中の対立遺伝子変種の同定および / または定量に用いるための組成物を提供する。これらの組成物のいくつかは、(a) 対立遺伝子特

50

異的プライマー；(b) 対立遺伝子特異的プロッカープローブ；(c) 検出プローブ；および／または(d) 座特異的プライマーを含みうる。

【0010】

組成物のいくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーは、標的特異的部分と対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分とを含む。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーは、テールをさらに含んでもよい。いくつかの例示的な態様において、テールは対立遺伝子特異的プライマーの5'端に位置する。他の態様において、対立遺伝子特異的プライマーのテールはグアニンとシトシン残基の反復を有する（「GCに富む」）。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマー全体の融解温度（「T_m」）は、約50～66の範囲である。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマー濃度は約20～900nMである。10

【0011】

組成物のいくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、3'末端に位置する。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の選択は、識別性の高い塩基（例えば、A/A、A/G、G/A、G/G、A/C、またはC/A対立遺伝子を検出するため）を用いることを含む。いくつかの態様において、例えば検出される対立遺伝子がA/GまたはC/T SNPを含む場合、AもしくはGが、対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる（例えば、AもしくはTが標的対立遺伝子である場合）か、またはCもしくはTが対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる（例えば、CもしくはGが標的対立遺伝子である場合）。他の態様において、Aは、A/T SNPを検出および／または定量する場合に、対立遺伝子特異的プライマーの3'端における識別塩基として用いられる。他の態様において、GはC/G SNPを検出および／または定量する場合に、対立遺伝子特異的プライマーの3'端における識別塩基として用いられる。20

【0012】

組成物のいくつかの態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブは、3'末端に伸長不可能なプロッカー部分を含む。いくつかの例示的態様において、伸長可能なプロッカー部分は、副溝バインダー（minor groove binder）（MGB）である。いくつかの態様において、標的対立遺伝子の位置は、対立遺伝子特異的プロッカープローブの伸長不可能なプロッカー部分から約6、約7、約8、約9、または約10ヌクレオチドなどの約6～10ヌクレオチド離れて位置する。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブは、5'末端にMGB部分を含む。いくつかの例示的な態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブは、PCR增幅中に切断されない。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブのT_mは約60～66の範囲である。30

【0013】

組成物のいくつかの態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび／または対立遺伝子特異的プライマーは、少なくとも1つの改変塩基を含む。いくつかの態様において、改変塩基は、マッチ（matched）標的配列とミスマッチ（mismatched）標的配列との間のT_mの差を増加させ、かつ／またはミスマッチプライミング効率を低下させ、それによってアッセイ法の特異性のみならず選択性を改善しうる。そのような改変塩基は、例えば8-アザ-7-デアザ-dA（ppA）、8-アザ-7-デアザ-dG（ppG）、ロックド核酸（LNA）、または2'-O,4'-C-エチレン核酸（ENA）塩基（図4b）を含んでもよい。40

【0014】

組成物のいくつかの態様において、検出プローブは、配列に基づく検出プローブまたは座特異的検出プローブである。他の態様において、検出プローブは5'ヌクレアーゼプローブである。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、MGB部分、レポーター部分（例えばFAM（商標）、TET（商標）、JOE（商標）、VIC（商標）、またはSYBR（登録商標）Green）、クエンチャーパーティ（例えば、Black Hole Quencher（商標）またはTAMRA（商標））、および／またはパッシブリファレンス（例えば、ROX（商標））を含みうる。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、米国特許第6,727,356号（その開示50

の全内容が参照により本明細書に組み入れられる)に記載される方法および原理に従って設計される。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、TaqMan(登録商標)プローブ(Applied Biosystems, Foster City)である。

【0015】

組成物のいくつかの態様において、組成物は、ポリメラーゼ; デオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP); 増幅に適した他の試薬および/または緩衝液; および/または鑄型配列または核酸試料をさらに含みうる。いくつかの態様において、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼでありうる。いくつかの他の態様において、ポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼなどの熱安定性でありうる。他の態様において、鑄型配列または核酸試料は、ゲノムDNA(gDNA)または相補的DNA(cDNA)などのDNAでありうる。他の態様において、鑄型配列または核酸試料は、メッセンジャーRNA(mRNA)などのRNAでありうる。

10

【0016】

別の局面において、本開示は、対立遺伝子特異的配列を増幅するための方法を提供する。これらの方法のいくつかは、以下の段階の1つまたは複数を含みうる:(a)第一の対立遺伝子(対立遺伝子-1)を含む第一の核酸分子に、対立遺伝子特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階;(b)第二の対立遺伝子(対立遺伝子-2)を含む第二の核酸分子に対立遺伝子特異的プロッカープローブをハイブリダイズさせる段階であって、対立遺伝子-2が対立遺伝子-1と同じ座に対応する段階;(c)該第一の核酸分子に検出プローブをハイブリダイズさせる段階;(d)該対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物に座特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階、および(e)対立遺伝子-1を含む第一の核酸分子をPCR増幅する段階。

20

【0017】

別の局面において、本発明は、他の対立遺伝子を含むプールされた試料中または混合試料中の対立遺伝子変種を検出および/または定量するための方法を提供する。これらの方法のいくつかは、以下の段階の1つまたは複数を含みうる:(a)第一の反応混合物において、第一の対立遺伝子(対立遺伝子-1)を含む第一の核酸分子に、第一の対立遺伝子特異的プライマーをハイブリダイズさせ、かつ第二の反応混合物において、第二の対立遺伝子(対立遺伝子-2)を含む第一の核酸分子に、第二の対立遺伝子特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階であって、対立遺伝子-2が対立遺伝子-1と同じ座に対応する段階;(b)該第一の反応混合物において、対立遺伝子-2を含む第二の核酸分子に、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、対立遺伝子-1を含む第二の核酸分子に、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブをハイブリダイズさせる段階;(c)該第一の反応混合物において、該第一の核酸分子に第一の検出プローブをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、該第一の核酸分子に第二の検出プローブをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、該第一の核酸分子に第二の検出プローブをハイブリダイズさせる段階;(d)該第一の反応混合物において、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物に第一の座特異的プライマーをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、該第二の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物に第二の座特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階;ならびに(e)該第一の核酸分子をPCR増幅して第一の組または試料のアンプリコンを形成し、かつ第二の核酸分子をPCR増幅して第二の組または試料のアンプリコンを形成する段階;ならびに(f)該第一の組のアンプリコンを該第二の組のアンプリコンと比較して、対立遺伝子-2を含む該試料中の対立遺伝子-1、および/または対立遺伝子-1を含む該試料中の対立遺伝子-2を定量する段階。

30

【0018】

方法のいくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーは、標的特異的部分と対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分とを含む。いくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーはテールをさらに含んでもよい。いくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマー全体のTmは約50~66の範囲である。いくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマー濃度は約20~900nMである。

40

50

【0019】

方法のいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および第二の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、同じ配列を含む。他の態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および第二の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、同じ配列である。

【0020】

方法のいくつかの態様において、テールは、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'端に位置する。いくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールおよび第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールは、同じ配列を含む。他の態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールおよび第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールは、同じ配列である。他の態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーのテールはGCに富む。

10

【0021】

方法のいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、SNPの第一の対立遺伝子（対立遺伝子-1）に対して特異的であり、第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立電子特異的ヌクレオチド部分は、同じSNPの第二の対立遺伝子（対立遺伝子-2）に対して特異的である。方法のいくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、3'末端に位置する。いくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の選択は、識別性の高い塩基（例えば、A/A、A/G、G/A、G/G、A/C、またはC/A対立遺伝子を検出するため）を用いることを含む。いくつかの態様において、例えば検出される対立遺伝子がA/GまたはC/T SNPを含む場合、AもしくはGが、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる（例えばA/Tが標的対立遺伝子である場合）か、またはCもしくはTが、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる（例えば、C/Gが標的対立遺伝子である場合）。他の態様において、Aは、A/T SNPを検出および/または定量する場合に、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'端における識別塩基として用いられる。他の態様において、Gは、C/G SNPを検出および/または定量する場合に、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'端における識別塩基として用いられる。

20

【0022】

方法のいくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、3'末端に伸長不可能なプロッカー部分を含む。いくつかの例示的な態様において、伸長不可能なプロッカー部分はMGBである。いくつかの態様において、標的対立遺伝子の位置は、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブの伸長不可能なプロッカー部分から、約6、約7、約8、約9、または約10ヌクレオチドなどの約6～10ヌクレオチド離れて位置する。いくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、5'末端にMGB部分を含む。他の態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、PCR增幅中に切断されない。いくつかの態様において、第一および/または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブのTmは約60～66の範囲である。

30

【0023】

方法のいくつかの態様において、第一および/もしくは第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび/または第一および/もしくは第二の対立遺伝子特異的プライマーは、少なくとも1つの改変塩基を含む。いくつかの態様において、改変塩基は、マッチ標的配列とミスマッチ標的配列との間のTmの差を増加させ、かつ/またはミスマッチプライミング効率を低下させ、それによってアッセイ法の特異性のみならず選択性を改善しうる。そのような改変塩基は、例えば8-アザ-7-デアザ-dA (ppA)、8-アザ-7-デアザ-dG (ppG)、ロックド核酸 (LNA)、または2'-O,4'-C-エチレン核酸 (ENA) 塩基（図4b）を含んでも

40

50

よい。

【0024】

方法のいくつかの態様において、第一および／または第二の検出プローブは同じである。いくつかの態様において、第一および／または第二の検出プローブは異なる。いくつかの態様において、第一および／または第二の検出プローブは、配列に基づく検出プローブまたは座特異的検出プローブである。他の態様において、第一および／または第二の検出プローブは5'ヌクレアーゼプローブである。いくつかの例示的な態様において、第一および／または第二の検出プローブは、MGB部分、レポーター部分（例えばFAM（商標）、TET（商標）、JOE（商標）、VIC（商標）、またはSYBR（登録商標）Green）、クエンチャー部分（例えば、Black Hole Quencher（商標）またはTAMRA（商標））、および／またはパッシブリファレンス（例えば、ROX（商標））を含む。いくつかの例示的な態様において、第一および／または第二の検出プローブは、米国特許第6,727,356号（その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる）に記載される方法および原理に従って設計される。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、TaqMan（登録商標）プローブである。

10

【0025】

方法のいくつかの態様において、第一の座特異的プライマーおよび第二の座特異的プライマーは、同じ配列を含む。いくつかの態様において、第一の座特異的プライマーおよび第二の座特異的プライマーは、同じ配列である。

20

【0026】

方法のいくつかの態様において、第一および／または第二の反応混合物は、ポリメラーゼ；dNTP；PCR增幅に適した他の試薬および／または緩衝液；ならびに／または錆型配列または核酸試料をさらに含みうる。いくつかの態様において、ポリメラーゼは、DNAポリメラーゼでありうる。いくつかの態様において、ポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼなどの熱安定性でありうる。いくつかの態様において、錆型配列または核酸試料は、gDNAまたはcDNAなどのDNAでありうる。他の態様において、錆型配列または核酸試料は、mRNAなどのRNAでありうる。

【0027】

方法のいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、第二の対立遺伝子特異的プライマーと同じ鎖または配列に結合する一方で、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは第一の対立遺伝子特異的プライマーと同じ鎖または配列に結合する。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、第二の対立遺伝子および／または第一の対立遺伝子のいずれかからそれぞれ生成されたバックグラウンドシグナルの量を低減させるために用いられる。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、伸長不可能であり、選択的に第二の対立遺伝子または第一の対立遺伝子にそれぞれアニールし、それによって例えば伸長可能な第一の対立遺伝子特異的プライマーの第二の対立遺伝子へのアニーリング、および／または伸長可能な第二の対立遺伝子特異的プライマーの第一の対立遺伝子へのアニーリングを遮断する。

30

【0028】

いくつかの例示的な態様において、第一の対立遺伝子は、まれな（例えば、少数の）対立遺伝子または変異体対立遺伝子である。他の例示的な態様において、第二の対立遺伝子は、豊富な（例えば、多数の）対立遺伝子または野生型対立遺伝子である。

40

【0029】

別の局面において、本発明は、(a)第一の対立遺伝子特異的プライマー；(b)第二の対立遺伝子特異的プライマー；(c)第一の座特異的プライマー；(d)第二の座特異的プライマー；(e)第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；(f)第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；および(g)第一の座特異的検出プローブ；および(h)第二の座特異的検出プローブを含む、第二の対立遺伝子変種を含む試料中の第一の対立遺伝子変種を定量するためのキットを提供する。

50

【0030】

キットのいくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーは、標的特異的部分と対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分とを含む。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーは、テールをさらに含んでもよい。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマー全体のT_mは、約50～66の範囲である。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマー濃度は約20～900nMである。

【0031】

キットのいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および第二の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、同じ配列を含む。他の態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および第二の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、同じ配列である。

10

【0032】

キットのいくつかの態様において、テールは、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'端に位置する。いくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールおよび第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールは、同じ配列を含む。他の態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールおよび第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールは、同じ配列である。他の態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーのテールはGCに富む。

20

【0033】

キットのいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、SNPの第一の対立遺伝子（対立遺伝子-1）に対して特異的であり、第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、同じSNPの第二の対立遺伝子（対立遺伝子-2）に対して特異的である。開示される方法のいくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、3'末端に位置する。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の選択は、識別性の高い塩基（例えば、A/A、A/G、G/A、G/G、A/C、またはC/A対立遺伝子を検出するため）を用いることを含む（図2）。いくつかの態様において、例えば検出される対立遺伝子がA/GまたはC/T SNPを含む場合、AもしくはGが、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる（例えば、A/Tが標的対立遺伝子である場合）か、またはCもしくはTが、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチドとして用いられる（例えば、C/Gが標的対立遺伝子である場合）。他の態様において、Aは、A/T SNPを検出および／または定量する場合に、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'端における識別塩基として用いられる。他の態様において、Gは、C/G SNPを検出および／または定量する場合に、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'端における識別塩基として用いられる。

30

【0034】

キットのいくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、3'末端に伸長不可能なプロッカー部分を含む。いくつかの例示的態様において、伸長不可能プロッカー部分はMGBである。いくつかの態様において、標的対立遺伝子の位置は、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブの伸長不可能なプロッcker部分から約6、約7、約8、約9、または約10ヌクレオチドなどの約6～10ヌクレオチド離れて位置する。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、5'末端にMGB部分を含む。他の態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、PCR増幅中に切断されない。いくつかの態様において、第一および／または第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブのT_mは約60～66の範囲である。

40

【0035】

50

キットのいくつかの態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび／または第一および／または第二の対立遺伝子特異的プライマーは、少なくとも1つの改変塩基を含む。いくつかの態様において、改変塩基は、マッチ標的配列とミスマッチ標的配列の間のT_mの差を増加させ、かつ／またはミスマッチプライミング効率を低下させ、それによってアッセイ法の特異性のみならず選択性を改善しうる。そのような改変塩基は、例えば8-アザ-7-デアザ-dA (ppA)、8-アザ-7-デアザ-dG (ppG)、ロックド核酸 (LNA)、または2'-O,4'-C-エチレン核酸 (ENA) 塩基 (図4b) を含んでもよい。

【0036】

キットのいくつかの態様において、第一および／または第二の検出プローブは同じである。開示されるキットのいくつかの態様において、第一および／または第二の検出プローブは異なる。開示されるキットのいくつかの態様において、第一および／または第二の検出プローブは、配列に基づく検出プローブまたは座特異的検出プローブである。他の態様において、第一および／または第二の検出プローブは5'スクレアーゼプローブである。いくつかの例示的な態様において、第一および／または第二の検出プローブは、MGB部分、レポーター部分 (例えばFAM (商標)、TET (商標)、JOE (商標)、VIC (商標)、またはSYBR (登録商標) Green)、クエンチャ部分 (例えば、Black Hole Quencher (商標) またはTAMRA (商標))、および／またはパッシブリファレンス (例えば、ROX (商標)) を含む。いくつかの例示的な態様において、第一および／または第二の検出プローブは、米国特許第6,727,356号 (その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる) に記載される方法および原理に従って設計される。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、TaqMan (登録商標) プローブである。

10

20

30

【0037】

キットのいくつかの態様において、第一の座特異的プライマーおよび第二の座特異的プライマーは、同じ配列を含む。いくつかの態様において、第一の座特異的プライマーおよび第二の座特異的プライマーは、同じ配列である。

【0038】

キットのいくつかの態様において、第一および／または第二の反応混合物は、ポリメラーゼ；dNTP；PCR增幅に適した他の試薬および／または緩衝液；および／または錆型配列または核酸試料をさらに含みうる。いくつかの態様において、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼでありうる。いくつかの他の態様において、ポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼなどの熱安定性でありうる。

30

【0039】

いくつかの態様において、本発明の組成物、方法、およびキットは、高い対立遺伝子識別特異性および選択性を提供する。いくつかの態様において、特異性および／または選択性の定量的な判定は、第一の組のアンプリコンと第二の組のアンプリコンの間のC_t値の比較を含む。いくつかの態様において、選択性は、別の1つの対立遺伝子または複数の対立遺伝子の約100万コピー中所定の対立遺伝子1コピーが検出されうるレベルにある。

【0040】

上記は、以下の1つまたは複数を用いて対立遺伝子変種の改善された検出および識別を提供する本発明の様々な態様を説明している：(a) テールを有する対立遺伝子特異的プライマー；(b) 低い対立遺伝子特異的プライマー濃度；(c) より低いT_mを有するように設計された対立遺伝子特異的プライマー；(d) 識別塩基を標的とするように設計された対立遺伝子特異的プライマー；(e) 試料中の別のかつおそらくより豊富な対立遺伝子変種からの增幅を防止するように設計された、MGBを含有する対立遺伝子特異的プロッカープローブ；ならびに(f) マッチ標的配列とミスマッチ標的配列との間でデルタT_mを増加させるために、改変塩基を含むように設計された対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび／または対立遺伝子特異的プライマー。

40

【0041】

上記の改善のいくつかを使用する特定の態様が本明細書において論述されるが、調べられる試料の性質に応じて、好都合の結果に達するように、上記の改善の様々な組み合わせ

50

を組み合わせることは当業者に明らかであると考えられる。このように、例えば、デルタTmを増加させるために改変塩基を含有する対立遺伝子特異的プライマーを使用する方法を含む態様について、非MGBプロッカープローブを用いることができ；そのようなプライマーはまた識別塩基を標的とするように設計されることができ；かつプライマーは低いプライマー濃度で用いられる。よって、本開示に基づく代替の態様を用いて対立遺伝子検出の適したレベルに到達することができる。

【0042】

本開示は、特定の状況において、列挙された改善の任意の組み合わせが当業者によって使用されうるという長所を提供する。例えば、本発明は、改善a、c、d、およびf；改善b、c、およびe；または改善を使用する方法または反応混合物を含みうる。

10

【0043】

前記の全般的な記載および以下の詳細な記載は、例示的であり、説明のためのものに過ぎず、特許請求の範囲によって請求される本発明を制限するものではないと理解されるべきである。

【0044】

本明細書に組み入れられ、本明細書の一部を構成する添付の図面は、本開示のいくつかの例示的な態様を明示し、記述と共に一定の教示を説明するために役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0045】

当業者は、添付の図面が例示目的にすぎないことを理解すると考えられる。図面は、本発明の教示の範囲をいかなるようにも限定するものではないと意図される。

20

【図1】cast-PCRの例示的な態様の概略図を図示する。いくつかの態様において、cast-PCRの構成要素は以下を含む：1つの座特異的TaqManプローブ（LST）；2つのMGBプロッカー：1つの対立遺伝子-1特異的MGBプロッカー（MGB1）および1つの対立遺伝子-2特異的MGBプロッカー（MGB2）；3つのPCRプライマー：1つの座特異的PCRプライマー（LSP）；1つの対立遺伝子-1特異的プライマー（ASP1）および1つの対立遺伝子-2特異的プライマー（ASP2）。

【図2】まれな対立遺伝子変種を検出するための識別性の高い塩基を含む対立遺伝子特異的プロッカープローブを用いるcast-PCRの例示的な態様の概略図を図示する。識別性の高い塩基は、例えばA/A、A/G、G/A、G/G、A/C、C/Aを含んでもよい。識別性の低い塩基は、例えばC/C、T/C、G/T、T/G、C/Tを含んでもよい。いくつかの態様において、例えばA-GまたはC-T SNPを検出するために、A//Tが対立遺伝子変種（例えば、変異体対立遺伝子）である場合に、AおよびGが識別塩基として用いられるか；またはC//Gが対立遺伝子変種（例えば、変異体対立遺伝子）である場合に、CおよびTが識別塩基として用いられる。

30

【図3】5'端にMGB部分を有する対立遺伝子特異的プロッカープローブを用いるcast-PCRの例示的な態様の概略図を図示する。いくつかの態様において、プローブの3'端のプロッカーパーティションは、例えばNH₂、ビオチン、MGB、PO₄、およびPEGを含んでもよい。

【図4A】MGBプロッカープローブまたは対立遺伝子特異的プライマーにおいて改変塩基を用いるcast-PCRの例示的な態様の概略図を図示する（G*はppGを表す）。

40

【図4B】MGBプロッカープローブまたは対立遺伝子特異的プライマーの改変塩基のいくつかの例を図示する。

【図5】cast-PCTの1つの例示的な態様のTaqMan様の感度およびダイナミックレンジを図示する。

【図6】cast-PCR法を用いて検出可能であるコドン12および13におけるKRAS変異の配列を図示する。コドン12および13におけるKRAS変異は、転移性結腸直腸癌におけるセツキシマブまたはパニツムマブに対する抵抗性に関連する（Di Nicolantonio F., et al., J Clin Oncol. 2008; 26:5705-12）。

【図7】1つの例示的な態様においてcast-PCRアッセイ法を用いてKRAS変異検出の特異性を図示する。

【図8】野生型DNA 10⁶コピー中変異体DNA 1コピーを検出するためにcast-PCR法を用いる

50

1つの例示的な態様を図示する。

【図9】cast-PCR法を用いて野生型試料にスパイクされた変異体試料(KRAS-G12A)の相対的コピー数の検出を図示する。

【図10】cast-PCRの1つの例示的な態様を用いて腫瘍試料において検出される多数の異なる腫瘍マーカー(SNP)を図示する。

【図11A】cast-PCRアッセイ法において用いた例示的な対立遺伝子特異的プライマーおよびプローブの一覧を示す。

【図11B】cast-PCRアッセイ法において用いた例示的な対立遺伝子特異的プライマーおよびプローブの一覧を示す。

【図11C】cast-PCRアッセイ法において用いた例示的な対立遺伝子特異的プライマーおよびプローブの一覧を示す。

【図11D】cast-PCRアッセイ法において用いた例示的な対立遺伝子特異的プライマーおよびプローブの一覧を示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

詳細な説明

I. 緒言

関心対象対立遺伝子の選択的増幅はしばしば、別の対立遺伝子上でのミスマッチ対立遺伝子特異的プライマーのミスプライミングおよび伸長を含む要因のために複雑である。そのようなミスプライミングおよび伸長は、別の対立遺伝子変種の過剰量が存在する試料中に存在するまれな対立遺伝子を検出する場合には特に問題となりうる。十分に過剰量存在する他の対立遺伝子変種のミスプライミングおよび伸長によって、関心対象の対立遺伝子の検出が曖昧になる可能性がある。PCRに基づく方法を用いる場合、別の対立遺伝子変種を含有する試料中の特定の対立遺伝子の識別は、試料中に存在する他の対立遺伝子の増幅を最小限にしながらまたは防止しながら、関心対象の対立遺伝子を選択的に増幅することに依存する。

【0047】

単独でまたは組み合わせて、対立遺伝子特異的PCRの識別力の増強に寄与する多数の要因が同定されている。本明細書において開示される通り、ミスマッチ対立遺伝子特異的プライマーとマッチ対立遺伝子特異的プライマーの間でより大きいデルタ C_t 値を提供する要因は、対立遺伝子変種の間の識別力がより大きいことを示している。本発明の方法を用いて対立遺伝子変種の識別を改善することが見いだされたそのような要因は、例えば、以下の1つまたは複数を用いることを含む：(a)テールを有する対立遺伝子特異的プライマー；(b)低い対立遺伝子特異的プライマー濃度；(c)より低いTmを有するように設計された対立遺伝子特異的プライマー；(d)識別塩基を標的とするように設計された対立遺伝子特異的プライマー；(e)試料中の別のかつおそらくより豊富な対立遺伝子変種からの増幅を防止するように設計された対立遺伝子特異的プロッカープローブ；および(f)マッチ標的配列とミスマッチ標的配列の間のデルタTmを増加させるために、改变塩基を含むように設計された対立遺伝子特異的プロッカープローブおよび/または対立遺伝子特異的プライマー。

【0048】

上記の要因は、特に組み合わせて用いられる場合、対立遺伝子特異的PCRが、試料中に存在する異なる対立遺伝子を識別する能力に影響を及ぼしうる。このように、本開示は全体として、デルタ C_t 値を増加させることによってPCR中の対立遺伝子変種の識別を改善するために先に言及された要因の組み合わせを使用する、cast-PCRと呼ばれる新規増幅法に関する。いくつかの態様において、本発明の方法は、野生型分子約1000～10,000個、約10,000～100,000個、もしくは約100,000～1,000,000個、またはその間の任意の端数範囲(fractional range)などの、野生型分子少なくとも1,000～1,000,000個のバックグラウンドにおいて変異体分子1個が検出されうる高レベルの選択性を含みうる。いくつかの態様において、開示される方法を含む第一の組のアンプリコンと第二の組のアンプリコンの比

10

20

30

40

50

較は、約1000～10,000倍、約10,000～100,000倍、もしくは約100,000～1,000,000倍の差、またはその間の任意の端数範囲などの、1,000倍の差から1,000,000倍の差まで特異性の改善を提供する。

【0049】

II. 定義

本明細書の説明のために、以下の定義を適用し、適切な場合はいつでも、単数形で用いられる用語には複数形が含まれ、その逆も含まれる。以下に説明するいかなる定義も、参照により本明細書に組み入れられる任意の文書が含まれる他の任意の文書におけるその言葉の使用と矛盾する場合には、反対の意味が明らかに意図される場合を除き、本明細書およびその関連する特許請求の範囲を解釈する目的で、以下に記載する定義が常に支配する。

【0050】

本明細書において用いられる場合、「対立遺伝子」という用語は通常、例えば相同染色体上などのDNAのセグメント上の同じ物理的座での別のDNA配列を指す。対立遺伝子は、単細胞もしくは生物内の相同染色体上で見いだされる同じ物理的座間で異なるDNA配列、または多細胞もしくは生物内の同じ物理的座で異なるDNA配列（「対立遺伝子変種」）を指しうる。いくつかの例において、対立遺伝子は、特定の物理的座で1ヌクレオチドの差に対応しうる。他の態様において、対立遺伝子はヌクレオチド（1つまたは多数の）の挿入または欠失に対応しうる。

【0051】

本明細書において用いられる場合、「対立遺伝子特異的プライマー」という用語は、関心対象対立遺伝子を含む配列にハイブリダイズして、PCRにおいて用いられる場合、第一鎖cDNA合成を実行するために伸長されうるオリゴヌクレオチド配列を指す。対立遺伝子特異的プライマーは、所定の標的DNAまたは座の特定の対立遺伝子に対して特異的であり、標的配列においてヌクレオチド1個という小さい差を検出するために設計されうる。対立遺伝子特異的プライマーは、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分、標的特異的部分および/またはテールを含んでもよい。

【0052】

本明細書において用いられる場合、「対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分」または「対立遺伝子特異的標的ヌクレオチド」という用語は、同じ座の他の対立遺伝子（例えば、対応する多数の対立遺伝子または野生型対立遺伝子）を除外して、所定の座で1つの対立遺伝子（例えば、少数の対立遺伝子または変異体対立遺伝子）に選択的にハイブリダイズし、そこから伸長されうる対立遺伝子特異的プライマーにおける1つのヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドを指す。

【0053】

本明細書において用いられる場合、「標的特異的部分」という用語は、標的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする対立遺伝子特異的プライマーの領域を指す。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、検出される対立遺伝子変種の5'のプライミング領域で標的配列に対して相補的であるプライミングセグメントである。対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含んでもよい。他の例において、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に隣接する。

【0054】

本明細書において用いられる場合、「テール」または「5'テール」という用語は、プライマーの非3'端を指す。この領域は典型的には、分析される標的ポリヌクレオチド配列に対して相補的でない配列を含有するが、必ずしも含有する必要はない。5'テールは、長さが約2～30、2～5、4～6、5～8、6～12、7～15、10～20、15～25、もしくは20～30ヌクレオチド、またはその間の任意の範囲の任意の長さでありうる。

【0055】

本明細書において用いられる場合、「対立遺伝子特異的プロッカープローブ」（同様に

本明細書において「プロッカープローブ」、「プロッカー」と呼ばれる)という用語は、対立遺伝子特異的プライマーによって結合される鎖と同じ、反対、または相補的鎖上に位置する特定の対立遺伝子変種を含むDNAの鎖に結合し、その特定の対立遺伝子変種の増幅を低減または防止する、オリゴヌクレオチド配列を指す。本明細書においてより詳細に論述される場合、対立遺伝子特異的プロッカープローブは通常、ポリメラーゼによるプライマーの伸長を防止する改変を、例えばリボース環の3'-OHにおいて含む。対立遺伝子特異的プロッカープローブは、対立遺伝子特異的プライマーがアニールする同じ鎖または反対鎖にアニールするように設計されることが可能、かつその3'末端端部でプロッキング基(例えば、「伸長不可能なプロッカー部分」)によって改変されることができる。このように、プロッカープローブは、対立遺伝子特異的プライマーの伸長によって変異体対立遺伝子(例えば、まれな対立遺伝子変種)を含む同じ鎖上または反対鎖上で増幅を起こさせが、例えば野生型対立遺伝子の増幅を抑制するために野生型対立遺伝子(例えば豊富な対立遺伝子変種)に堅固に結合するように設計される。例示的な態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブには、蛍光標識、放射活性標識、または化学発光標識などの標識は含まれない。

10

【0056】

本明細書において用いられる場合、「伸長不可能なプロッカー部分」という用語は通常、例えばPCR反応においてその相補的配列にハイブリダイズしてもポリメラーゼによる伸長を不可能にするプローブおよび/またはプライマーなどのオリゴヌクレオチド配列上の改変を指す。プロッカー部分の一般的な例には、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチド配列の3'端へのさらなる塩基の付加を防止する、オリゴヌクレオチドのリボース環の3'-OHの改変が含まれる。そのような3'-OH改変は当技術分野において周知である(例えば、その開示の全内容が参考により本明細書に組み入れられる、Josefsen, M., et al., *Molecular and Cellular Probes*, 23 (2009):201-223; McKinzie, P. et al., *Mutagenesis*, 2006, 21(6):391-7; Parsons, B. et al., *Methods Mol Biol.* 2005, 291:235-45; Parsons, B. et al., *Nucleic Acids Res.* 1992, 20(10):2493-6; およびMorlan, J. et al., *PLoS One* 2009, 4 (2): e4584を参考されたい)。

20

【0057】

本明細書において用いられる場合、「MGB」、「MGB基」、「MGB化合物」、または「MGB部分」という用語は、副溝バインダーを指す。オリゴヌクレオチドの3'端にコンジュゲートされると、MGB基は伸長不可能なプロッカー部分として機能しうる。

30

【0058】

MGBは、二本鎖DNAの副溝内に結合する分子である。公知のMGB化合物は広く多様な化学構造を有することから、そのような化合物全てに関する一般的な化学式を提供することはできないが、DNAの副溝において結合することができる化合物は一般的に言えば、半月形の三次元構造を有する。ほとんどのMGB部分は、二本鎖DNAのB型のA-T(アデニンおよびチミン)に富む領域に対して強い選択性を有する。それにもかかわらず、C-G(シトシンおよびグアニン)に富む領域に対して選択性を示すMGB化合物もまた理論的に可能である。ゆえに、C-G領域に対して選択性を有する副溝バインダー分子に由来するラジカルまたは部分を含むオリゴヌクレオチドも同様に、本発明の範囲内である。

40

【0059】

いくつかのMGBは、 10^3 M^{-1} またはそれより大きい結合定数で二本鎖DNAの副溝内に結合することができる。このタイプの結合は、紫外線(UV)および核磁気共鳴(NMR)分光法などの十分に確立された分光光度法によって、および同様にゲル電気泳動によっても検出される。副溝バインダー分子の結合時のUVスペクトルのシフトおよび「核オーバーハウザー」(NOSEY)効果を利用するNMR分光法は、特に周知であり、この目的にとって有用な技術である。ゲル電気泳動は、そのような結合によって二本鎖DNAの移動度が変化することから、二本鎖DNAまたはその断片に対するMGBの結合を検出する。

【0060】

適した多様な副溝バインダーが文献において記載されている。例えばKutyavin, et al.

50

米国特許第5,801,155号 ; Wemmer, D. E., and Dervan P. B., *Current Opinion in Structural Biology*, 7:355-361 (1997) ; Walker, W. L., Kopka, J. L. and Goodsell, D. S., *Biopolymers*, 44:323-334 (1997) ; Zimmer, C. and Wahnert, U. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 47:31-112 (1986) および Reddy, B. S. P., Dondhi, S. M., and Lown, J. W., *Pharmacol. Therap.*, 84: 1-111 (1999) (その開示の全内容が参考により本明細書に組み入れられる)を参照されたい。本開示に従う好ましいMGBはDPI₃である。そのようなMGBの合成法および / または供給源も同様に当技術分野において周知である(例えば、その開示の全内容が参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,801,155号 ; 同第6,492,346号 ; 同第6,084,102号 ; および同第6,727,356号を参照されたい)。

【0061】

10

本明細書において用いられる場合、「MGBプロッカープローブ」、「MBGプロッカー」、または「MGBプローブ」という用語は、その3'および / または5'端において副溝バインダー部分にさらに付着されたオリゴヌクレオチド配列および / またはプローブである。MGB部分にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖のDNA標的と極めて安定な二重鎖を形成するため、より短いプローブをハイブリダイゼーションに基づくアッセイ法において用いることが可能となる。非変性DNAと比較すると、MGBプローブは、特にハイブリダイズした二重鎖のMGB領域近傍にミスマッチがある場合には、より高い融解温度(*T_m*)および増加した特異性を有する(例えば、Kutyavin, I. V., et al., *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, No. 2: 655-661を参照されたい)。

【0062】

20

本明細書において用いられる場合、「変性塩基」という用語は、天然に存在する核酸において見いだされる塩基とは構造が異なる、核酸中の塩基または塩基の化学的連結の任意の変化を指す。そのような変化には、核酸中の塩基の化学構造もしくは塩基の化学的連結、または核酸の骨格構造における変化が含まれる(例えば、Latorra, D. et al., *Hum Mut* 2003, 2:79-85. Nakiandwe, J. et al., *plant Method* 2007, 3:2を参照されたい)。

。

【0063】

30

本明細書において用いられる場合、「検出プローブ」という用語は、増幅を示す多様な任意のシグナル伝達分子を指す。例えば、SYBR(登録商標)Greenおよび他のDNA結合色素は検出プローブである。いくつかの検出プローブは配列に基づく(同様に本明細書において「座特異的検出プローブ」とも呼ばれる)、例えば5'ヌクレアーゼプローブでありうる。様々な検出プローブ、例えば本明細書において記載されるTaqMan(登録商標)プローブ(米国特許第5,538,848号も参照されたい)、様々なステムループ分子ビーコン(例えば、米国特許第6,103,476号および同第5,925,517号ならびにTyagi and Kramer, 1996, *Nature Biotechnology* 14:303-308)、ステムレスまたはリニアビーコン(例えばWO 99/21881を参照されたい)、PNA Molecular Beacons(商標)(例えば、米国特許第6,355,421号および同第6,593,091号を参照されたい)、リニアPNAビーコン(例えば、Kubista et al., 2001, *SPIE* 4264:53-58を参照されたい)、非FRETプローブ(例えば、米国特許第6,150,097号を参照されたい)、Sunrise(登録商標)/Amplifluor(登録商標)プローブ(米国特許第6,548,250号)、ステムループおよび二重鎖Scorpion(商標)プローブ(Solinas et al., 2001, *Nucleic Acids Research* 29:E96および米国特許第6,589,743号)、バルジループプローブ(米国特許第6,590,091号)、シュードノットプローブ(米国特許第6,589,250号)、サイクリコン(cyclicon)(米国特許第6,383,752号)、MGB Eclipse(商標)プローブ(Epoch Biosciences)、ヘアピンプローブ(米国特許第6,596,490号)、ペプチド核酸(PNA)ライトアッププローブ、自己アセンブルナノ粒子プローブ、ならびに例えば米国特許第6,485,901号; Mhlanga et al., 2001, *Methods* 25:463-471; Whitcombe et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17:804-807; Isacsson et al., 2000, *Molecular Cell Probes* 14:321-328; Svanvik et al., 2000, *Anal Biochem* 281:26-35; Wolffs et al., 2001, *Biotechniques* 766:769-771; Tsourkas et al., 2002, *Nucleic Acids Research* 30:4208-4215; Riccelli et al., 2002, *Nucleic Acids Research* 30:4088-4093; Zha

40

50

ng et al., 2002 Shanghai. 34:329-332 ; Maxwell et al., 2002, J. Am. Chem. Soc. 124:9606-9612 ; Broude et al., 2002, Trends Biotechnol. 20:249-56 ; Huang et al., 2002, Chem Res. Toxicol. 15:118-126 ; およびYu et al., 2001, J. Am. Chem. Soc. 124:1155-1161において記載されるフェロセン改変プローブが、当技術分野において公知である。検出プローブは、6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM)、またはテトラクロロフルオレセイン(TET)などのレポーター色素を含みうる。検出プローブはまた、テトラメチルローダミン(TAMRA)、Black Hole Quenchers(Bioscience)、アイオワブラック(IDT)、QSYクエンチャー(Molecular Probes)、ならびにDabsylおよびDabcylスルホネート/カルボキシレートクエンチャー(Epoch)などのクエンチャー部分を含みうる。検出プローブはまた、2つのプローブを含むことができ、例えば蛍光体が一方のプローブ上にあり、かつクエンチャーが他方のプローブ上にあり、標的上で2つのプローブが共にハイブリダイズするとシグナルを消光するか、または標的上でハイブリダイズすると、蛍光の変化によってシグナルサインが変化する。検出プローブはまた、カルボキシレート基の代わりにSO₃を有するフルオレセイン色素のスルホネート誘導体、フルオレセインのホスホラミダイト型、CY5のホスホラミダイト型(例えば、Amersham Biosciences-GE Healthcareから入手可能)も含むことができる。

10

【0064】

本明細書において用いられる場合、「座特異的プライマー」という用語は、PCR反応における第一のプライマー(対立遺伝子特異的プライマーなどの)の伸長に由来する産物にハイブリダイズして、該産物の第二鎖cDNA合成を実行することができるオリゴヌクレオチド配列を指す。従って、いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーは、フォワードPCRプライマーとして働き、かつ座特異的プライマーは、リバースPCRプライマーとして働くか、またはその逆である。いくつかの好ましい態様において、座特異的プライマーは、対立遺伝子特異的プライマーと比較してより高濃度で存在する。

20

【0065】

本明細書において用いられる場合、「まれな対立遺伝子変種」という用語は、別の対立遺伝子変種と比較して試料中より低レベルで存在する標的ポリヌクレオチドを指す。まれな対立遺伝子変種はまた、「少数の対立遺伝子変種」および/または「変異体対立遺伝子変種」とも呼ばれることがある。例えば、まれな対立遺伝子変種は、所定のSNPまたは遺伝子に関する別の対立遺伝子変種と比較して1/10、1/100、1/1,000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000、1/10,000,000、1/100,000,000、または1/1,000,000,000未満の頻度で見いだされる場合がある。または、まれな対立遺伝子は例えば、試料または反応体積1、10、100、1,000マイクロリットルあたり2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、250、500、750、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000、または1,000,000コピー未満でありうる。

30

【0066】

本明細書において用いられる場合、「豊富な対立遺伝子変種」という用語は、別の対立遺伝子変種と比較して試料中より高レベルで存在する標的ポリヌクレオチドを指してもよい。豊富な対立遺伝子変種はまた、「多数の対立遺伝子変種」および/または「野生型対立遺伝子変種」と呼ばれることがある。例えば、豊富な対立遺伝子変種は、所定のSNPまたは遺伝子に関する別の対立遺伝子変種と比較して10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍、1,000,000倍、10,000,000倍、100,000,000倍、または1,000,000,000倍より大きい頻度で見いだされる場合がある。または、豊富な対立遺伝子変種は例えば、試料または反応体積1、10、100、1,000マイクロリットルあたり2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、250、500、750、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000、または1,000,000コピーより多く存在しうる。

40

【0067】

本明細書において用いられる場合、「第一」とおよび「第二」という用語は、第一の反応(例えば、「第一の」反応；「第一の」対立遺伝子特異的プライマー)、および第二の反

50

応（例えば、「第二の」反応；「第二の」対立遺伝子特異的プライマー）の構成要素を識別するために用いられる。慣例によって、本明細書において用いられる場合、第一の反応は第一の（例えば、まれな）対立遺伝子変種を増幅して、第二の反応は第二の（例えば、豊富な）対立遺伝子変種を増幅するか、またはその逆である。

【0068】

本明細書において用いられる場合、「第一の対立遺伝子変種」および「第二の対立遺伝子変種」はいずれも同じ生物からの所定の座の対立遺伝子に関係しうる。例えば、野生型対立遺伝子を含むヒト試料（例えば、細胞）の場合と同様に、そのいくつかは、少数のまたはまれな対立遺伝子を形成するように変異している。本発明の教示の第一および第二の対立遺伝子変種は、また、異なる生物由来の対立遺伝子を指しうる。例えば、第一の対立遺伝子は、遺伝子改変された生物の対立遺伝子であることができ、第二の対立遺伝子は、野生型生物の対応する対立遺伝子であることができる。本教示の第一の対立遺伝子変種および第二の対立遺伝子変種は、gDNAのみならずmRNAおよびcDNAに含有されることができ、通常、例えばSNPまたはヌクレオチド挿入および／または欠失変異により配列の多様性を示す任意の標的核酸であることができる。

10

【0069】

本明細書において用いられる場合、「熱安定な」または「熱安定ポリメラーゼ」という用語は、熱安定性または熱抵抗性であり、デオキシリボヌクレオチドの重合化を触媒して、核酸鎖に対して相補的であるプライマー伸長産物を形成する酵素を指す。本明細書において有用な熱安定性DNAポリメラーゼは、PCR増幅中に一本鎖核酸の脱安定化または二本鎖核酸の変性を行うために必要な時間、上昇した温度に供されても不可逆的に不活化されない。酵素の不可逆的な変性は、酵素活性の実質的な喪失を指す。好ましくは、熱安定性DNAポリメラーゼは、PCR増幅に典型的に必要とされるなどの条件の下で、約90～100ににおいて不可逆的に変性しないと考えられる。

20

【0070】

本明細書において用いられる場合、「PCR増幅する」または「PCR増幅」という用語は通常、例えばInnis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)において記載されるように相補鎖にハイブリダイズするプライマーを使用する核酸のポリメラーゼ媒介指数的増幅の繰り返しを指す。明記された波長の光線を放射することができる蛍光指示薬を含有する組成物によってサーマルサイクリング反応を行うことができ、蛍光色素の強度を読み取ることができ、および各サイクル後に蛍光強度を表示することができる装置が開発されている。サーマルサイクラー、光線エミッター、および蛍光シグナル検出器を含む装置は、例えば米国特許第5,928,907号；同第6,015,674号；同第6,174,670号；および同第6,814,934号において記載されており、これにはABI Prism (登録商標) 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California)、ABI GeneAmp (登録商標) 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California)、ABI GeneAmp (登録商標) 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California)、ABI GeneAmp (登録商標) 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California)、StepOne (商標) Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California)、およびABI GeneAmp (登録商標) 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, California)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

30

【0071】

本明細書において用いられる場合、「T_m」または「融解温度」という用語は、一本鎖オリゴヌクレオチドの集団中の分子の50%がその相補的配列にハイブリダイズして、集団中の分子の50%が該相補的配列にハイブリダイズしない温度（セ氏での温度）を指す。プライマーまたはプローブのT_mは、融解曲線によって経験的に決定されうる。いくつかの場合において、それはまた、当技術分野において周知の式を用いても計算されうる（例えば、Maniatis, T., et al., Molecular cloning: a laboratory manual / Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.: 1982を参照されたい）。

40

50

【0072】

本明細書において用いられる場合、「感度」という用語は、所定のアッセイ法によって検出されうる鑄型の最少量（コピー数または質量）を指す。本明細書において用いられる場合、「特異性」という用語は、マッチ鑄型対ミスマッチ鑄型からの増幅を識別するアッセイ法の能力を指す。しばしば、特異性は $C_t = C_{t\text{ミスマッチ}} - C_{t\text{マッチ}}$ として表記される。特異性の改善または「特異性改善」または「倍率差」は、本明細書において $2^{(C_t - \text{条件1}) - (C_t - \text{条件2})}$ として表記される。「選択性」という用語は、AS-PCRアッセイ法を用いて、多数の（しばしば野生型）対立遺伝子によって干渉されることなく、混合物中の少数の（しばしば変異体）対立遺伝子を決定することができる程度を指す。選択性はしばしば、比率または百分率として表記される。例えば、野生型鑄型100個の存在下で変異体鑄型1個を検出することができるアッセイ法は、1:100または1%の選択性を有すると言われる。本明細書において用いられる場合、アッセイ法の選択性はまた、 $1/2^{C_t}$ として、または $(1/2^{C_t} \times 100)$ を用いて百分率として計算されうる。

【0073】

本明細書において用いられる場合、「 C_t 」または「 C_t 値」という用語は閾値サイクルを指し、アンプリコンの生成を示すレポーターからのシグナル（例えば、蛍光）が初めてバックグラウンドレベルより上で検出可能となる、PCR増幅アッセイ法のサイクルを意味する。いくつかの態様において、閾値サイクルまたは「 C_t 」は、PCR増幅が指数的になるサイクル数である。

【0074】

本明細書において用いられる場合、「デルタ C_t 」または「 ΔC_t 」という用語は、異なる2つの試料または反応の間の固定閾値をシグナルが通過するサイクル回数の差を指す。いくつかの態様において、デルタ C_t は異なる2つの試料または反応の間で指数的増幅に達したサイクル回数の差である。デルタ C_t は、対応する標的核酸配列に対するマッチプライマーと、同じ対応する標的核酸配列に対するミスマッチプライマーの間の特異性を同定するために用いられる。

【0075】

いくつかの態様において、ミスマッチプライマーとマッチプライマーの間のデルタ C_t 値の計算は、対立遺伝子特異的PCRの識別力の1つの測定として用いられる。一般的に、標的配列（例えば、関心対象対立遺伝子変種を含む配列）にマッチするプライマーを用いる増幅反応の C_t 値と、ミスマッチプライマーを用いる増幅反応の C_t 値の差を増加させるいかなる因子によっても、より大きい対立遺伝子識別力が得られると考えられる。

【0076】

様々な態様に従って、 C_t 値は、PCR曲線の導関数を用いて決定されてもよい。例えば、 C_t 値を決定するために、PCR曲線において第一次、第二次、または第n次の微分法を行ってもよい。様々な態様において、 C_t 値の決定に導関数の特徴を用いてもよい。そのような特徴には、第二次導関数の正の変曲、第二次導関数の負の変曲、第二次導関数のゼロ交差、または第一次導関数の正の変曲が含まれてもよいがこれらに限定されるわけではない。様々な態様において、 C_t 値は、閾値決定およびベースライン決定法を用いて決定されてもよい。例えば、PCR曲線の指数相に対する上限を、微分法を用いて確立してもよく、PCR曲線の指数相に対する下限を確立するために、PCR曲線のベースラインを決定してもよい。PCR曲線の上限および下限から閾値を確立してもよく、そこから C_t 値を決定する。例えば、フィットポイント（fit point）法の様々な態様およびシグモイド法の様々な態様に限定されない、当技術分野において公知の C_t 値を決定するための他の方法（例えば、その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,303,305号；同第6,503,720号；同第6,783,934号；同第7,228,237号；および米国特許出願第2004/0096819号を参照されたい）。

【0077】

III. 組成物、方法、およびキット

1つの局面において、本発明は、核酸試料中の対立遺伝子変種の同定および／または定

10

20

30

40

50

量に用いるための組成物を提供する。これらの組成物のいくつかは、(a) 対立遺伝子特異的プライマー、(b) 対立遺伝子特異的プロッカープローブ、(c) 検出プローブ、および／または(d) 座特異的プライマーを含みうる。組成物のいくつかの態様において、組成物は、ポリメラーゼ、dNTP、PCR増幅に適した試薬および／または緩衝液、ならびに／または鑄型配列または核酸試料をさらに含んでもよい。いくつかの態様において、ポリメラーゼは熱安定でありうる。

【0078】

別の局面において、本発明は、(i) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；および(ii) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブを含む、組成物を提供する。

10

【0079】

いくつかの例示的な態様において、組成物は、標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含みうる。

20

【0080】

さらなる態様において、組成物は、検出プローブをさらに含みうる。

【0081】

別の局面において、本発明は、対立遺伝子特異的配列を増幅するための方法を提供する。これらの方法のいくつかは、以下の段階を含みうる：(a) 標的対立遺伝子を含む第一の核酸分子に、対立遺伝子特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階；(b) 該標的対立遺伝子と同じ座に対応する別の対立遺伝子を含む第二の核酸分子に、対立遺伝子特異的プロッカープローブをハイブリダイズさせる段階；(c) 該第一の核酸分子に座特異的検出プローブをハイブリダイズさせる段階；(d) 該対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物に、座特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階；および(e) 該標的対立遺伝子をPCR増幅する段階。

30

【0082】

別の局面において、本発明は、混合試料中の対立遺伝子変種を検出および／または定量するための方法を提供する。これらの方法のいくつかは、以下の段階を含みうる：(a) 第一の反応混合物において、第一の対立遺伝子(対立遺伝子-1)を含む第一の核酸分子に第一の対立遺伝子特異的プライマーをハイブリダイズさせ、かつ第二の反応混合物において、第二の対立遺伝子(対立遺伝子-2)を含む第一の核酸分子に第二の対立遺伝子特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階であって、該対立遺伝子-2が対立遺伝子-1と同じ座に対応する段階；(b) 該第一の反応混合物において、対立遺伝子-2を含む第二の核酸分子に第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、対立遺伝子-1を含む第二の核酸分子に第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブをハイブリダイズさせる段階；(c) 該第一の反応混合物において、該第一の核酸分子に第一の検出プローブをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、該第一の核酸分子に第二の検出プローブをハイブリダイズさせる段階；(d) 該第一の反応混合物において、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物に第一の座特異的プライマーをハイブリダイズさせ、かつ該第二の反応混合物において、該第二の対立遺伝子特異的プライマーの伸長産物に第二の座特異的プライマーをハイブリダイズさせる段階；ならびに(e) 該第一の核酸分子をPCR増幅して第一の組または試料のアンプリコンを形成し、かつ該第二の核酸分子をPCR増幅して第二の組または試料のアンプリコンを形成する段階；ならびに(f) 該第一の組のアンプリコンを該第二の組のアンプリコンと比較して、対立遺伝子-2を含む試料中の対立遺伝子-1、および／または対立遺伝子-1を含む

40

50

試料中の対立遺伝子-2を定量する段階。

【0083】

さらに別の局面において、本発明は、対立遺伝子変種を検出および/または定量するための方法を提供する。これらの方法のいくつかは、以下の段階を含みうる：(a) (i) 低濃度の第一の対立遺伝子特異的プライマー、(ii) 第一の座特異的プライマー、および(iii) 第一のプロッカープローブを含む第一の反応において、第一の対立遺伝子変種をPCR増幅して、第一のアンプリコンを形成する段階；(b) (i) 低濃度の第二の対立遺伝子特異的プライマー、(ii) 第二の座特異的プライマー、および(iii) 第二のプロッカープローブを含む第二の反応において、第二の対立遺伝子変種をPCR増幅して、第二のアンプリコンを形成する段階、ならびに(d) 該第一のアンプリコンを該第二のアンプリコンと比較して、第二の対立遺伝子変種を含む試料中の該第一の対立遺伝子変種を定量する段階。

10

【0084】

さらに別の局面において、本発明は、標的配列の少なくとも第二の対立遺伝子変種を含むことが疑われる核酸試料中の該標的配列の第一の対立遺伝子変種を検出するための方法を提供する。この局面の方法は、以下の段階を含む：(i) 核酸試料；(ii) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該標的配列の該第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；(iii) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；(iv) 該標的配列の領域に対して相補的である、第一の座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第一の座特異的プライマー；および(v) 第一の検出プローブを混合することによって、第一の反応混合物を形成する段階。

20

【0085】

次に、第一の座特異的プライマーと第一の対立遺伝子特異的プライマーとを用いて第一の反応混合物に対して、増幅反応、典型的にはPCR増幅反応を行い、第一のアンプリコンを形成する。次に、アンプリコンに結合した場合の第一の検出プローブの検出可能な特性の変化によって第一のアンプリコンを検出し、それによって核酸試料中の標的遺伝子の第一の対立遺伝子変種を検出する。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは5'ヌクレアーゼプローブである。いくつかの例示的な態様において、検出可能な特性は蛍光である。

30

【0086】

いくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'標的領域の3'ヌクレオチド位置は、対立遺伝子特異的ヌクレオチド位置である。第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'標的領域の3'ヌクレオチド位置が対立遺伝子特異的ヌクレオチド位置である態様を含む、ある他の例示的な態様において、対立遺伝子特異的プライマーのプロッキング領域は、対立遺伝子特異的ヌクレオチド位置を包含する。さらに、例示的な態様において、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、副溝バインダーを含む。さらに、ある例示的な態様において対立遺伝子特異的プロッカープローブは、標識、例えば蛍光標識またはクエンチャーを有しない。

40

【0087】

ある例示的な態様において、第一の対立遺伝子変種の量は、第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を評価することによって決定される。

【0088】

ある例示的な態様において、方法は、以下の段階をさらに含む：(i) 核酸試料；(ii) 第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第二の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第二の対立遺伝子特異的プライマー；

50

(iii) 第一の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；(iv) 該標的配列の領域に対して相補的である、第二の座特異的プライマーであって、該領域が、該第二の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第二の座特異的プライマー；および(v) 第二の検出プローブを混合することによって、第二の反応混合物を形成する段階。次に、第二の対立遺伝子特異的プライマーと座特異的プライマーとを用いて第二の反応混合物に対して増幅反応を行い、第二のアンプリコンを形成する。次に、第二のアンプリコンを検出プローブの検出可能な特性の変化によって検出する。

10

【0089】

ある態様において、方法は、第一の反応混合物における第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を、第二の反応混合物における第二の検出プローブの検出可能な特性の変化と比較する段階をさらに含む。

【0090】

さらに別の局面において、本発明は、(i) 核酸分子：(ii) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該対立遺伝子特異的プライマー；(iii) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、対立遺伝子特異的プロッカープローブ；(iv) 該標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマー；および(v) 検出プローブを含む、反応混合物を提供する。

20

【0091】

ある態様において、本発明の方法は、所定のSNPまたは遺伝子に関する第二の対立遺伝子変種の1/10未満、1/100未満、1/1,000未満、1/10,000未満、1/100,000未満、1/1,000,000未満、1/10,000,000未満、1/100,000,000未満、または1/1,000,000,000未満、およびその間の任意の端数範囲の頻度で存在する第一の対立遺伝子変種を検出するために用いられる。他の態様において、方法は、試料または反応体積1、10、100、1,000マイクロリットルあたり2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、250、500、750、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000、または1,000,000コピー未満、およびその間の任意の端数範囲で存在する第一の対立遺伝子変種を検出するために用いられる。

30

【0092】

いくつかの態様において、第一の対立遺伝子変種は変異体である。いくつかの態様において、第二の対立遺伝子変種は野生型である。いくつかの態様において、本発明の方法は、野生型分子約1000～10,000個、約10,000～100,000個、もしくは約100,000～1,000,000個、またはその間の任意の端数範囲などの、野生型分子少なくとも1,000～1,000,000個のバックグラウンドにおいて変異体分子1個を検出する段階を含みうる。いくつかの態様において、方法は、TaqMan(登録商標)に基づくアッセイ法と少なくとも同等である高い感度および効率を提供することができる。

40

【0093】

いくつかの態様において、開示された方法を含む第一のアンプリコンと第二のアンプリコンの比較は、約1000～10,000倍、約10,000～100,000倍、もしくは約100,000～1,000,000倍の差、またはその間の任意の端数範囲などの、1,000倍の差から1,000,000倍の差まで特異性の改善を提供する。いくつかの態様において、アンプリコンのサイズは長さが約60～120ヌクレオチドの範囲である。

50

【0094】

別の局面において、本発明は、(a)第一の対立遺伝子特異的プライマー；(b)第二の対立遺伝子特異的プライマー；(c)第一の座特異的プライマー；(d)第二の座特異的プライマー；(e)第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；(f)第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブ；および(g)ポリメラーゼを含む、別の第二の対立遺伝子変種を含む試料中の第一の対立遺伝子変種を定量するためのキットを、提供する。開示されたキットのいくつかの態様において、キットは、第一の座特異的検出プローブと第二の座特異的検出プローブとをさらに含む。

【0095】

別の局面において、本発明は、2つまたはそれより多い容器の1つに独立して分配された以下の構成要素を含む2つまたはそれより多い容器を含む、キットを提供する：(i)第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；および(ii)第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブ。

【0096】

いくつかの例示的な態様において、キットは、標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含みうる。

【0097】

他の態様において、キットは、検出プローブをさらに含みうる。

【0098】

いくつかの態様において、組成物、方法、および/またはキットは、診断において循環性細胞を検出するために用いられる。1つの態様において、組成物、方法、および/またはキットは、初期癌診断のために血液中の腫瘍細胞を検出するために用いられる。いくつかの態様において、組成物、方法、および/またはキットは、癌または疾患関連遺伝子バリエーションまたは体細胞変異の検出および検証のために用いられる。いくつかの態様において、組成物、方法、および/またはキットは、四対立遺伝子、三対立遺伝子、および二対立遺伝子のSNPを遺伝子型決定するために用いられる。いくつかの態様において、組成物、方法、および/またはキットは、QCおよびヒト同定アッセイ法のために混合DNA試料からのDNA型決定のために、細胞混入に関する細胞株QCのために、対立遺伝子遺伝子発現分析のために、ウイルス型決定/まれな病原体検出のために、プールされた試料からの変異検出のために、血液中の循環性腫瘍細胞の検出のために、および/または出生前診断のために用いられる。

【0099】

いくつかの態様において、組成物、方法、および/またはキットは、例えばApplied Biosystems (Foster City, CA) のSDS機器などの様々な機器と適合性である。

【0100】

対立遺伝子特異的プライマー

低いT_mを有する設計された対立遺伝子特異的プライマー(ASP)は、対立遺伝子変種の識別の増加を示した。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーは、ヌクレオチド約16~28、約17~26、約18~24、もしくは約20~22個、またはその間の任意の範囲などの約15~30個の範囲の長さを有する短いオリゴマーである。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーのT_mは、約52~68(例えば、53)、約54~66、約56~64、約58~62、またはその間の任意の範囲などの約50~70の範囲である。他の態様において、対立遺伝子特異的プライマーのT_mは、增幅中に使用されるPCRサイクリング条件のアニール/伸長温度より約3~6高い。

10

20

30

40

50

【0101】

低い対立遺伝子特異的プライマー濃度もまた、選択性を改善することができる。対立遺伝子特異的プライマーの濃度を900 nMより下に低減させると、マッチ配列とミスマッチ配列の間のデルタCtを増加させることができる。開示される組成物のいくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの濃度は、約50 nM～700 nM、約100 nM～500 nM、約200 nM～300 nM、約400 nM～500 nM、またはその間の任意の範囲などの約20 nM～900 nMの範囲である。いくつかの例示的な態様において、対立遺伝子特異的プライマーの濃度は約200 nM～400 nMである。

【0102】

いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーは、関心対象の標的対立遺伝子に対して特異的な対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含みうる。対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、遺伝子の1つの対立遺伝子に対して相補的であるが、遺伝子の別の対立遺伝子に対しては相補的でない。言い換えれば、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、遺伝子の異なる対立遺伝子変種に関して異なるヌクレオチドを含むことが知られているヌクレオチド位置である、遺伝子の1つまたは複数の可変ヌクレオチド位置に結合する。対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、長さが少なくとも1ヌクレオチドである。例示的な態様において、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、長さが1ヌクレオチドである。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する。他の態様において、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分は、対立遺伝子特異的プライマーの最も3'の端部から約1～2、3～4、5～6、7～8、9～11、12～15、または16～20ヌクレオチドに位置する。

10

20

30

【0103】

識別塩基を標的とするように設計された対立遺伝子特異的プライマーもまた、対立遺伝子変種の識別を改善することができる。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分のヌクレオチドは、識別性の高い塩基（例えば、A/A、A/G、G/A、G/G、A/C、またはC/A対立遺伝子を検出するため）を標的とする。識別性の低い塩基は、例えばC/C、T/C、G/T、T/G、C/T対立遺伝子の検出を含む可能性がある。いくつかの態様において、例えば、検出される対立遺伝子がA/GまたはC/T SNPを含む場合、AもしくはGが対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられても（例えば、A/Tが標的対立遺伝子である場合）、またはCもしくはTが対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられてもよい（例えば、C/Gが標的対立遺伝子である場合）。他の態様において、A/T SNPを検出および/または定量する場合、対立遺伝子特異的プライマーの3'端において、Aをヌクレオチド特異的部分（例えば、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分）として用いてよい。他の態様において、C/G SNPを検出および/または定量する場合、対立遺伝子特異的プライマーの3'端においてGをヌクレオチド特異的部分として用いてよい。

40

【0104】

いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーは、関心対象のポリヌクレオチド配列（または座）に対して特異的な標的特異的部分を含みうる。いくつかの態様において、標的特異的部分は、関心対象の標的ポリヌクレオチド配列に対して約75～85%、85～95%、95～99%、または100%相補的である。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分を含みうる。他の態様において、標的特異的部分は、対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分に対して5'に位置する。標的特異的部分は、長さが約4～30、約5～25、約6～20、約7～15、または約8～10ヌクレオチドありうる。いくつかの態様において、標的特異的部分のTmは、PCRサイクリングのために用いられるアニール／伸長温度より約5℃低い。いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分のTmは、約51～60℃、約52～59℃、約53～58℃、約54～57℃、約55～56℃、または約50～約60℃の範囲である。

50

【0105】

開示された方法およびキットのいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および第二の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、同じ配列を含む。他の態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および第二の対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分は、同じ配列である。

【0106】

いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プライマーはテールを含む。テールを含む対立遺伝子特異的プライマーは、プライマーの全長を低減させることができ、それによってアッセイ法の感度に有意な影響を及ぼすことなくTmを低下させる。

【0107】

いくつかの例示的な態様において、テールは対立遺伝子特異的プライマーの5'末端にある。いくつかの態様において、テールは、対立遺伝子特異的プライマーの標的特異的部分および/または対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の5'に位置する。いくつかの態様において、テールは、関心対象の標的ポリヌクレオチド配列に対して約65~75%、約75~85%、約85~95%、約95~99%、または約100%非相補的である。いくつかの態様において、テールは長さが、約4~30、約5~25、約6~20、約7~15、または約8~10ヌクレオチドなどの約2~40ヌクレオチドでありうる。いくつかの態様において、テールはGCに富む。例えば、いくつかの態様において、テール配列は、約50~100%、約60~100%、約70~100%、約80~100%、約90~100%、または約95~100%のGおよび/またはCヌクレオチドを含む。

10

【0108】

対立遺伝子特異的プライマーのテールは、プライマー伸長産物における相補的配列（存在すれば）にハイブリダイズするためにプライマーの伸長後にテール領域が利用可能である立体配置を含むが、これらに限定されるわけではない、多数の異なる様式で構成されてもよい。このように、例えば、対立遺伝子特異的プライマーのテールは、座特異的プライマーの伸長に起因する伸長産物における相補的配列にハイブリダイズすることができる。

20

【0109】

開示される方法およびキットのいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーのテールおよび第二の対立遺伝子特異的プライマーのテールは、同じ配列を含む。他の態様において、第一の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールおよび第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'テールは、同じ配列である。

30

【0110】

対立遺伝子特異的プロッカープローブ

対立遺伝子特異的プロッカープローブ（またはASB）（本明細書において時に「プロッカープローブ」と呼ばれる）は、一本鎖であり、長さが100ヌクレオチドまたはそれ未満、より好ましくは50ヌクレオチドまたはそれ未満、さらにより好ましくは30ヌクレオチドまたはそれ未満、および最も好ましくは20ヌクレオチドまたはそれ未満であり、下限がおよそ5ヌクレオチドである短いオリゴマーとして設計されてもよい。

【0111】

いくつかの態様において、プロッカープローブのTmは、60 ~ 70 、 61 ~ 69 、 62 ~ 68 、 63 ~ 67 、 64 ~ 66 、もしくは約60 ~ 約63 の範囲、またはその間の任意の範囲である。さらに他の態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブのTmは、增幅中に使用されるPCRサイクリング条件においてアニール/伸長温度より約3 ~ 6 高い。

40

【0112】

いくつかの態様において、プロッカープローブは、PCR增幅中に切断されない。いくつかの態様において、プロッカープローブは、その3'端に伸長不可能なプロッカー部分を含む。いくつかの態様において、プロッカープローブは、その3'端、5'端、および/またはその間の任意の内部位置に他の部分（追加の伸長不可能なプロッカー部分、クエンチャー部分、蛍光部分等を含むがこれらに限定されるわけではない）を含みうる。いくつかの態様において、対立遺伝子の位置は、その標的配列にハイブリダイズした場合に対立遺伝子

50

特異的プロッカープローブの伸長不可能なプロッカー部分から約5~11、約6~10、約7~9、約7~12などの約5~15ヌクレオチド離れて、または約6、約7、約8、約9、約10、もしくは約11ヌクレオチドなどの約9~11ヌクレオチド離れて位置する。いくつかの態様において、伸長不可能なプロッカー部分は、アミン (NH_2)、ビオチン、PEG、DPI₃、またはPO₄でありうるが、これらに限定されない。いくつかの好ましい態様において、プロッカー部分は副溝バインダー (MGB) 部分である。(本発明のオリゴヌクレオチド-MGBコンジュゲートは、以下、「MGBプロッカープローブ」または「MGBプロッカー」と呼ばれる場合もある)。

【0113】

本明細書において開示される通り、対立遺伝子特異的プロッカープローブにおけるMGB部分の使用は、対立遺伝子特異的PCRの特異性を増加させることができる。この効果の1つの可能性は、一本鎖または二本鎖の核酸の相補的配列にハイブリダイズして強く結合するその強い親和性により、MGBが、連結したオリゴヌクレオチドのTmを低下させることができるという点である(例えば、Kutyavin, I., et al., *Nucleic Acids Res.*, 2000, Vol. 28, No. 2: 655-661を参照されたい)。オリゴヌクレオチドとMGB部分との間のリンカーは、DNA二重鎖形成後に副溝にMGBを配置するために十分に柔軟でなければならないことから、MGB部分を含むオリゴヌクレオチドは厳密な幾何学的必要条件を有する。このように、MGBプロッカープローブは、従来のDNAプロッカープローブと比較してマッチ対立遺伝子対ミスマッチ対立遺伝子の間でより大きいTmの差を提供することができる。

【0114】

一般的に、MGB部分は、二本鎖DNAの副溝内に結合する分子である。公知のMGB化合物は広く多様な化学構造を有することから、そのような化合物全てに関する一般的な化学式を提供することはできないが、DNAの副溝において結合することができる化合物は一般的に言えば、半月形状の三次元構造を有する。ほとんどのMGB部分は、二本鎖DNAのB型のA-T(アデニンおよびチミン)に富む領域に対して強い選択性を有する。それにもかかわらず、C-G(シトシンおよびグアニン)に富む領域に対して選択性を示すMGB化合物も同様に、理論的に可能である。ゆえに、C-G領域に対して選択性を有する副溝バインダー分子に由来するラジカルまたは部分を含むオリゴヌクレオチドも同様に、本発明の範囲内である。

【0115】

いくつかのMGBは、10³ M⁻¹またはそれより大きい結合定数で二本鎖DNAの副溝内に結合することができる。このタイプの結合は、紫外線(UV)および核磁気共鳴(NMR)分光法などの十分に確立された分光光度法によって、かつゲル電気泳動によっても検出される。副溝バインダー分子の結合時のUVスペクトルのシフトおよび「核オーバーハウザー」(NOSEY)効果を利用するNMR分光法は、この目的のために特に周知で有用な技術である。ゲル電気泳動は、そのような結合によって二本鎖DNAの移動度が変化することから、二本鎖DNAまたはその断片に対するMGBの結合を検出する。

【0116】

適した多様な副溝バインダーが文献に記載されている。例えばKutyavin, et al. 米国特許第5,801,155号; Wemmer, D. E., and Dervan P. B., *Current Opinion in Structural Biology*, 7:355-361 (1997); Walker, W. L., Kopka, J. L. and Goodsell, D. S., *Biopolymers*, 44:323-334 (1997); Zimmer, C. and Wahnert, U. *Prog. Biophys. Molec. Bio.* 47:31-112 (1986)およびReddy, B. S. P., Dondhi, S. M., and Lown, J. W., *Pharmacol. Therap.*, 84:1-111 (1999)を参照されたい。1つの群の態様において、MGBは、CC1065類似体、レキシトロプシン、ジスタマイシン、ネトロプシン、ベレニル、デュオカルマイシン、ペントミジン、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール、およびピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピンからなる群より選択される。本開示に従う好ましいMGBは、DPI₃である(その開示の全内容が参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,727,356号を参照されたい)。

【0117】

リンカーを通してMGBをオリゴヌクレオチドまたはプローブに付着させるために適した

10

20

30

40

50

方法は、例えば米国特許第5,512,677号；同第5,419,966号；同第5,696,251号；同第5,585,481号；同第5,942,610号；同第5,736,626号；同第5,801,155号；および同第6,727,356号において記載されている（その各々の開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる）。例えば、切断可能なリンカーを有する固相支持体から自動オリゴヌクレオチド合成法を用いて、MGB-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを合成することができる。他の例において、MGBプローブを、実質的にLukhtanov et al. Bioconjugate Chern., 7: 564-567 (1996)（その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる）の方法に従ってMGB改変固相支持体から調製することができる。これらの方法に従って、1つまたは複数のMGB部分をオリゴヌクレオチドの5'端、3'端、および／または任意の内部部分に付着させることができる。

10

【0118】

MGB-オリゴヌクレオチドコンジュゲート内でのMGBの位置は、そのようなコンジュゲートの識別特性に影響を及ぼしうる。二重鎖内の非対形成領域によっておそらく、ミスマッチ塩基の近傍での副溝の形状の変化が起こると考えられる。MGBは完全にマッチしたDNA二重鎖の副溝内で最も適合することから、副溝内での形状の変化が起こるミスマッチは、ミスマッチを含有する領域に対するMGBの結合強度を低減させると考えられる。よって、MGBがそのようなハイブリッドを安定化させる能力は低下し、それによって完全にマッチした二重鎖からミスマッチを識別するMGB-オリゴヌクレオチドコンジュゲートの能力を増加させると考えられる。一方、ミスマッチがMGB-オリゴヌクレオチドコンジュゲートに対して相補的な領域外にある場合、等しい長さの非コンジュゲートおよびMGB-コンジュゲートオリゴヌクレオチドの識別能は、ほぼ同じであると予想される。1塩基対ミスマッチを識別するオリゴヌクレオチドプローブの能力はその長さに依存することから、より短いオリゴヌクレオチドはミスマッチの識別においてより有効である。この状況においてMGB-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを用いる第一の長所は、MGBコンジュゲーションの顕著な安定化効果により、当技術分野において用いられるオリゴヌクレオチド（すなわち、20量体またはそれより短い）と比較してかなり短い、より大きい識別力を有するオリゴヌクレオチドを用いることができるという事実にある。その結果、対立遺伝子特異的プロッカープローブのより大きいデルタT_mは、AS-PCRアッセイ法の特異性および選択性を改善することができる。

20

【0119】

5'末端にMGBを有するプロッカープローブは、3'末端のみにプロッカー部分（例えば、MGB、PO₄、NH₂、PEG、またはビオチン）を有する他のプロッカープローブに対して追加の長所を有する場合がある。これは、少なくとも、5'末端にMGBを有するプロッカープローブ（伸長を防止する3'端におけるプロッキング部分に加えて）が、PCR増幅中に切断されないためである。このように、プローブ濃度は、PCRを通して一定レベルで維持されうるが、これは非特異的プライミングを遮断する有効性を維持するために役立つ可能性があり、それによって、cast-PCRアッセイ法の特異性および選択性を増加させる（図3）。

30

【0120】

いくつかの態様において、対立遺伝子特異的プロッカープローブは、天然に存在する塩基であるアデニン、シトシン、グアニン、チミン、およびウラシルに加えて1つまたは複数の改変塩基を含みうる。いくつかの態様において、改変塩基は、マッチ標的配列とミスマッチ標的配列の間のT_mの差を増加させ、かつ／またはミスマッチプライミング効率を低下させ、それによってアッセイ法の特異性のみならず選択性を改善する可能性がある（図4A）。

40

【0121】

改変塩基は、1つまたは複数の官能基の付加または欠失、複素環構造の差（すなわち、ヘテロ原子の代わりに炭素を用いる、またはその逆）、および／または塩基への1つまたは複数のリンカーアーム構造の付着によって、天然に存在する塩基とは異なる塩基であると考えられる。そのような改変塩基は、例えば、8-アザ-7-デアザ-dA (ppA)、8-アザ-7-デアザ-dG (ppG)、ロックド核酸 (LNA)、または2'-O,4'-C-エチレン核酸 (ENA) 塩基を

50

含んでもよい(図4B)。改変塩基の他の例は、一般的なクラスの塩基類似体である7-デアザプリンおよびその誘導体、ならびにピラゾロピリミジンおよびその誘導体(その各々の開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、PCT WO 90/14353および米国特許出願第09/054,630号において記載される)を含むがこれらに限定されるわけではない。これらの塩基類似体は、オリゴヌクレオチドに存在する場合、ハイブリダイゼーションを強化して、ミスマッチ識別を改善する。天然に存在する塩基、改変塩基、および塩基類似体の全ての互変異性型が、本発明のオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブに含まれてもよい。

【0122】

同様に、改変糖または糖の類似体が、本発明によるオリゴヌクレオチドコンジュゲートのヌクレオチドサブユニットの1つまたは複数に存在しうる。糖改変は、糖の2'、3'および/または4'炭素原子への置換基の付着、糖の異なるエピマー型、グリコシド結合の-立体配置または-立体配置の差、および他のアノマー変化を含むがこれらに限定されるわけではない。糖部分は、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、リボース、デオキシリボース、グルコース、アラビノース、ペントフラノース、キシロース、リキソース、およびシクロペンチルを含むがこれらに限定されるわけではない。

【0123】

改変ヌクレオチド間連結もまた、本発明のオリゴヌクレオチドコンジュゲートに存在しうる。そのような改変された連結は、ペプチド、ホスフェート、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、アルキルホスフェート、アルカンホスホネート、チオホスフェート、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、メチルホスホネート、ホスホラミデート、置換ホスホラミデート等を含むがこれらに限定されるわけではない。プローブおよび/またはプライマーとして役立つオリゴヌクレオチドにおけるその使用と適合性である塩基、糖、および/またはヌクレオチド連結のいくつかのさらなる改変は、当業者に明らかであると考えられる。

【0124】

加えて、いくつかの態様において、本発明のMGBプロッカープローブのオリゴヌクレオチドに組み入れられるヌクレオチド単位は、連結アームを通して塩基の1つまたは複数に共有結合する架橋機能(アルキル化剤)を有してもよい。

【0125】

本発明のMGBプロッカープローブのいくつかの態様の「糖」またはグリコシド部分は、デオキシリボース、リボース、2-フルオロリボース、2-Oアルキルまたはアルケニルリボースを含んでもよく、アルキル基は炭素1~6個を有してもよく、アルケニル基は炭素2~6個を有してもよい。天然に存在するヌクレオチドならびに本明細書において記載される改変および類似体において、デオキシリボース部分またはリボース部分は、フラノース環を形成する。グリコシド連結は、立体配置の連結であり、プリン塩基は9位によって糖部分に付着し、ピリミジンは1位によって、およびピラゾロピリミジンは1位によって付着する。オリゴヌクレオチドのヌクレオチド単位は、当技術分野において周知であるように、「ホスフェート」骨格によって相互接続される。本発明のオリゴヌクレオチド-MGBコンジュゲート(MGBプロッカープローブ)のオリゴヌクレオチドは、「天然の」ホスホジエステル連結に加えて、ホスホロチオエートおよびメチルホスホネートを含んでもよい。

【0126】

方法およびキットのいくつかの態様において、第一の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、第一の対立遺伝子特異的プライマーと同じ鎖または配列に結合するが、第二の対立遺伝子特異的プロッカープローブは、第一の対立遺伝子特異的プライマーと反対の鎖および/または相補的配列に結合する。

【0127】

検出プローブ

いくつかの態様において、検出プローブは、約16、約18、約22、約24、約30、またはそ

10

20

30

40

50

の間の任意の数などの約15～30ヌクレオチドの範囲の短いオリゴマーとして設計される。いくつかの態様において、検出プローブのT_mは、約60～70、約61～69、約62～68、約63～67、もしくは約64～66、またはその間の任意の範囲である。

【0128】

いくつかの態様において、検出プローブは、座特異的検出プローブ(LST)である。他の態様において、検出プローブは5'ヌクレアーゼプローブである。いくつかの例示的な態様において、検出プローブはMGB部分、レポーター部分(例えば、FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、VIC(商標)、またはSYBR(登録商標)Green)、クエンチャーパーティ(例えば、Black Hole Quencher(商標)またはTAMRA(商標))、および/またはパッシブリファレンス(例えば、ROX(商標))を含みうる。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、米国特許第6,727,356号(その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる)に記載される方法および原理に従って設計される。いくつかの例示的な態様において、検出プローブは、TaqMan(登録商標)プローブ(Applied Biosystems, Foster City)である。例示的な態様において、座特異的検出プローブは米国特許第6,727,356号(その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる)に記載される原理および方法に従って設計されうる。例えば、1つのDNA鎖の3'末端にクエンチャーパーティを有し、かつ5'末端に蛍光体を有する、蛍光発生プローブを調製することができる。そのような例において、Taq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性はDNA鎖を切断して、それによってクエンチャーパーティから蛍光体を分離して蛍光シグナルを放出することができる。いくつかの態様において、検出プローブは、PCR增幅のプライマー伸長段階(例えば、60～65)中に鑄型鎖にハイブリダイズする。さらに他の態様において、MGBは座特異的検出プローブのクエンチャーパーティに共有的に付着される(例えば、リンカーを通して)。

10

20

20

【0129】

開示される方法およびキットのいくつかの態様において、第一および第二の検出プローブは同じであり、かつ/または同じ配列を含むかまたは同じ配列である。

【0130】

座特異的プライマー

いくつかの態様において、座特異的プライマー(LSP)は、約16、約18、約22、約24、約30個、またはその間の任意の数などの約15～30ヌクレオチドの範囲の短いオリゴマーとして設計される。いくつかの態様において、座特異的プライマーのT_mは、約60～70、約61～69、約62～68、約63～67、もしくは約64～66、またはその間の任意の範囲である。

30

【0131】

開示される法およびキットのいくつかの他の態様において、第一の座特異的検出プローブおよび/または第二の座特異的検出プローブは、同じ配列を含むか、または同じ配列である。

【0132】

追加の構成要素

本発明の実践に適したポリメラーゼ酵素は、当技術分野において周知であり、多数の供給源に由来しうる。例えば市販されている多様な好熱性細菌(例えば、American Type Culture Collection, Rockville, Md.から)から、当業者に周知である方法を用いて熱安定性ポリメラーゼを得てもよい(例えば、米国特許第6,245,533号を参照されたい)。細菌細胞を、当業者に周知である特定の種の活性な培養物を生育させるために適した培養培地およびインキュベーション条件を用いて、標準的な微生物学技術に従って生育させてもよい(例えば、Brock, T. D., and Freeze, H., J. Bacteriol. 98(1):289-297 (1969); Ohshima, T., and Imahori, K, Int. J. Syst. Bacteriol. 24(1): 102-112 (1974)を参照されたい)。熱安定性ポリメラーゼ供給源として用いるために適しているのは、好熱性細菌サーマス・アクアティクス(*Thermus aquaticus*)、サーマス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*)、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)、パイロコッカス・ウーシイ(*Pyrococcus*

40

50

woosii) およびパイロコッカス属の他の種、バシラス・ステアロサーモフィラス (Bacillus stearothermophilus) 、スルホロブス・アシドカウダリウス (Sulfolobus acidocaldarius) 、サーモプラズマ・アシドフィラム (Thermoplasma acidophilum) 、サーマス・フラブス (Thermus flavus) 、サーマス・ルベル (Thermus ruber) 、サーマス・プロキアヌス (Thermus brockianus) 、サーモトガ・ネアポリタナ (Thermotoga neapolitana) 、サーモトガ・マリティマ (Thermotoga maritima) およびサーモトガ属の他の種、ならびにメタノバクテリウム・サーモオートトロフィクム (Methanobacterium thermoautotrophicum) 、ならびにこれらの種の各々の変異体である。好ましい熱安定ポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼ、Tne DNAポリメラーゼ、Tma DNAポリメラーゼ、またはその変異体、誘導体、もしくは断片を含みうるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0133】

核酸の様々な供給源および/または調製法

開示される組成物、方法、および/またはキットにおける核酸試料の供給源は、循環血液、口腔内上皮細胞、培養細胞および腫瘍細胞などのヒト細胞を含むがこれらに限定されるわけではない。同様に他の哺乳動物組織、血液、および培養細胞も、適した鑄型核酸供給源である。加えて、ウイルス、バクテリオファージ、細菌、真菌、および他の微生物は、分析のための核酸源でありうる。DNAはゲノムDNAであっても、またはプラスミド、バクテリオファージ、細菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC) もしくは他のベクターにおいてクローニングされてもよい。RNAは、関連する細胞から直接単離されても、または適したRNAプロモーターからのインビトロプライミングによって、もしくはインビトロ転写によって産生されてもよい。本発明はまた、ヒト、動物、またはその他であるか否かによらず、ゲノムDNAにおけるバリエーションを検出するために用いられてもよい。本発明は、遺伝性または後天性の疾患または障害の分析において特に用途を見いだす。特定の用途は遺伝子疾患の検出である。

20

【0134】

いくつかの態様において、鑄型配列または核酸試料は、gDNAでありうる。他の態様において、鑄型配列または核酸試料はcDNAでありうる。さらに他の態様において、RT-PCRによる遺伝子発現の同時分析の場合と同様に、鑄型配列または核酸試料はRNAでありうる。DNAまたはRNA鑄型配列または核酸試料は、例えばホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍標本を含む任意のタイプの組織から抽出されうる。

30

【0135】

以下の実施例は、本発明を説明するものであるが制限するものではないことを意図される。

【実施例】

【0136】

I. 一般的アッセイ法の設計：

以下の実施例において用いられるcast-PCRアッセイ法の一般的な概略を図1に明示する。分析された各SNPに関して、対立遺伝子特異的プライマーを、第一の対立遺伝子（すなわち、対立遺伝子-1）および第二の対立遺伝子（すなわち、対立遺伝子-2）を標的とするように設計した。対立遺伝子-1分析のためのcast-PCRアッセイ反応混合物には、テールを有する対立遺伝子-1特異的プライマー (ASP1)、1つのMGB対立遺伝子-2ブロッカープローブ (MGB2)、1つの共通の座特異的TaqManプローブ (LST)、および1つの共通の座特異的プライマー (LSP) が含まれた。対立遺伝子-2分析のためのcast-PCRアッセイ反応混合物には、テールを有する対立遺伝子-2特異的プライマー (ASP2)、1つのMGB対立遺伝子-1ブロッカープローブ (MGB1)、1つの共通の座特異的TaqManプローブ (LST)、および1つの共通の座特異的プライマー (LSP) が含まれた。

40

【0137】

II. 反応条件：

各アッセイ反応混合物（全体で10 μl）は、1×TaqMan Genotyping Master Mixture (Applied Biosystems, Foster City, CA; P/N 437135)、0.5 ng/ μLゲノムDNAまたはプラス

50

ミドDNA 100万コピー（表記の通り）、300 nM（特に明記していなければ）のテールを有するまたはいくつかの場合においてテールを有しない対立遺伝子特異的プライマー（対立遺伝子-1を検出するためのASP1、または対立遺伝子-2を検出するためのASP2）、200 nM T aqManプローブ（LST）、900 nM座特異的プライマー（LSP）、150 nM対立遺伝子特異的MGB プロッカープローブ（対立遺伝子2を検出するためのMGB1または対立遺伝子-1を検出するためのMGB2）を含有した。反応物を384ウェルプレートにおいて95 で10分間インキュベートした後、95 で各15秒間の後に58 で1分間を5サイクル、次に95 で各15秒間の後に60 で1分間を45サイクル行った。反応は全て、ABI PRISM 7900HT（登録商標）Sequence Detection Systemにおいて、製造元の説明書に従って、2通りまたはそれより多く行われた。

10

【0138】

III. 核酸試料：

特異的SNP配列を含有するプラスミドを設計しBlueHeron（Bothell, WA）に注文した（以下の実施例において用いられるSNPを含むプラスミドの一覧に関しては表1を参照されたい）。プラスミドを、TaqMan RNase P Assay（Applied Biosystems, Foster City, CA; P/N 4316838）を用いて製造元の説明書に従って定量して、所定のアッセイ法の感度、直線性のダイナミックレンジ、特異性、および選択性を検証するために鑄型として用いた（表1、RNアーゼP対照を参照されたい）。

【0139】

ゲノムDNAをCoriell Institute for Medical Research（Camden, NJ; NA17203, NA17129, NA17201）から購入した。標的SNPの遺伝子型を、TaqMan SNP Genotyping Assay（Applied Biosystems, Foster City, CA; P/N 4332856）によって製造元の説明書に従って検証した。

20

【0140】

（表1）プラスミドSNP配列（標的対立遺伝子を括弧内に示す）

CV11201742	GCTCTGTTCATTCCTGCTGAAGAAGGGCAGATAGTTGGCTGCTCCTGTG[C/T]TGTCACCTGCAATTCTCCCTTATCAGGGCCATTGGCCTCTCCCTCTGTGAGGGATATTTCTCTGACTTGTCAATCCACATCTTCC
CV11349123	GGCTTGCAATGGCTCCAACCGGAAGGGCGGTGCTCGAGCTGTGGTGCCTGC[C/T]GCTAAGTTGTGCCTGC
CV1207700	CAGGGTGCACTCGC
CV25594064	GCAACTATACCCCTTGATGGATGGAGATTAA[C/T]GCAATGTGTTTACTGGTAGAGTGACAGACCTTCTCTGAACCTATTTGCAAGAGCGATGACTCTTAAATTACTATCTGGAAATTATATTATTTAGAATCTGCCAATTACCTAGATCCCCCT[C/G]AACATTGTTACCAAGGAACCTCCTGAA
CV25639181	GAATTGGTTGTCTCCTTATGGGAACTGGAAGTATTTGACA[G/T]CTTTACACATTCTCATGGGATAGTAAGTGTAAACAGCTCTGAGCCATTATTACAGTACTTGTAAATTAGCAGTAGAAATTATTTATTTAAGCTGTAAGTGGGCAGTTACCTTTGAGAGGAATACCTATAG
RNアーゼP対照	GCGGAGGGAAGCTCATCAGTGGGCCACGAGCTGAGTGCCTGTCACTCCACTCCATGTCCTGGGAAGGTCTGAGACTAGGG
BRAF-1799TA	TAATCACCTCAGATATATTCTCATGAAGACCTCACAGTAAAGAGTTGATTTGGTCTAGCTACAG[T/A]GAAATCTCGATGGAGTGGTCCCACAGTTGAACAGTTGCTGGATCCATTGTGGATGGTAAGAATTGAGGCTATTTCACGTAAATTGGCCCTGAGATGCTGCTGAGTT

30

CTNNB1-121AG	TGCTAATACTGTTCTGATTAGCTGATTGATGGAGTTGGACATGGCATGGAACCAGACAGAAAAGC GGCTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGATCCATTCTGGTCCACT[A/G]CCACAG CTCCTCTGAGTGGAAAGGAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCAAAGTC
CTNNB1-134CT	TTTGTGGAGTTGGACATGGCATGGAACCAGACAGAAAAGCGGTGTTAGTCAGTGGCAGCAACAGTC CTCTGGACTCTGGATCCATTCTGGTCCACTACCACAGTCCT[C/T]TCTGAGTGGTAAAGGAATCCT GAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCAAAGTCCTGTATGAGTGGGAA
EGFR-2369CT	GTGGACACCCCCACGTGTGCCCTGCTGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGAGCTCATCA[C/T]GCA GCTCATGCCCTCGCTGCCCTCTGGACTATGTCGGAAACACAAAGACAATATTGGCTCCAGTACCTGCT CAACTGGTGTGCAAGATCGCAAAAGGAATCAGGGAAAGGA
EGFR-2573TG	GCATGAACACTGGAGGACCGTCGTTGGTGCACCGCAGCCAGGAACGTACTGGTAAAAC ACCGCAGATGTCAAGATCACAGATTTGGG[T/T/G]GCCAAACTGCTGGTGCAGAAGAGAAAAGAAC CATGCAGAAGGAGGCAAAGTAAGGAGGTG
KRAS-176CG	CAGGATCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCCTGGATATTCTGACACAG[C/G] JAGGTCAAGAGGAGTACAGTCAATGAGGGACCACTACATGAGGACTGGGAGGGCTTCTTGTGATT GCCATAATAATAACTAAATCATTGAAGATATT
KRAS-183AC	ACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCCTGGATATTCTGACACAGCAGGTCA[A/C]GA GGAGTACAGTCAATGAGGGACCACTACATGAGGACTGGGAGGGCTTCTTGTGATTGCCATAATA ATACTAAATCATTGAAGATATTCAACCATATAGGTGGGTTAAATGAATATAAGCTGACATTAA
KRAS-34GA	TATTAACCTTATGTGTGACATGTTCAATATAGTCACATTTTCAATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAAT GACTGAATATAAAACTGTGGTAGTTGGAGCT[G/G]GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTGACGATACAGCTA ATTCAAGATCATTGTGGACGAATATGA
KRAS-35GA	TATTAACCTTATGTGTGACATGTTCAATATAGTCACATTTTCAATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAAT GACTGAATATAAAACTGTGGTAGTTGGAGCT[G/G]GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTGACGATACAGCTA ATTCAAGATCATTGTGGACGAATATGA
KRAS-38GA	CATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTGTGGTAGTTGGAGCTGGT[G/G]C GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAAGATCATTGTGGACGAATATGATCCAACAAATAGA GGTAAATCTTGTGTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATCTTGTGACAGATAAAGGTTCTGAC CATTTCATGAGTACTTAT
NRAS-181CA	ATTCTTACAGAAAACAAGTGGTATAGATGGAAACCTGTTGGACATACTGGATACAGCTGG[A/C] AAGAGAGTACAGTGCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGGCTCTGTGATTGCC TCAATAATAGCAAGTCATTGCGGATATTAAACCTCTACAGGTACTAGGAGCATTATTTCTGAAAGGATG
NRAS-183AT	TTACAGAAAACAAGTGGTATAGATGGAAACCTGTTGGACATACTGGATACAGCTGG[A/T]G AAGAGTACAGTGCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGGCTCTGTGATTGCC AATAGCAAGTCATTGCGGATATTAAACCTCTACAGGTACTAGGAGCATTATTTCTGAAAGGATG
NRAS-35GA	TGGTTCCAACAGGTTCTGCTGGTGTGAAATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGAGCAGGT[G/G]A TGGTGGAAAAGCCCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACTTGTAGATGAATATGATCCCACCATAG AGGTGAGGCCAGTGGTAGCCC
NRAS-38GA	TTTCCAACAGGTTCTGCTGGTGTGAAATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGAGCAGGT[G/G]A TGGTGGAAAAGCCCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACTTGTAGATGAATATGATCCCACCATAG TGAGGCCAGTGGTAGCCC
TP53-524GA	GGCACCCCGTCCCGGCCATGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGC[G/G]C GCCGCCACCATGAGCGCTGTCAGATAGCGATGGTGGAGCAGCTGGGCTGGAGAGACGACAGGGCTGGT GCCAGGGTCCCCAGGCCCTGATTCTCACTGATTCCTAGGTCTGGCC
TP53-637CT	CCTCCTCAGCATTTATCCGAGTGGAAAGGAAATTGCGTGTGGAGTATTGGATGACAGAAACACTTT[C/C] T[G/T]GACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCCTGAGGGCTGGTTGCAACTGGGCTCTGGAGGAGGG GTTAAGGGTGGTGTCACTGGCCCTC
TP53-721TG	CTTGGGCTGTTATCTCTAGGTTGGCTGACTGTACCACTACACTACATGTGAAACAGTCTGCACTGGG[G/G]C T[G/T]CTGCACTGGCGCATGAAACGGAGGCCATCTCACCACATCACACTGGAAAGACTCCAGGTCA AGCCACTTGCCACCTGCAACTGGCCTGCTGTGCCCCAGCCTC
TP53-733GA	TAGGTTGGCTGACTGTACCACTACACTACATGTGAAACAGTCTGCACTGGG[G/G]CAGCTGGC GAACCGGAGGCCATCTCACCACATCACACTGGAAAGACTCCAGGTCAAGGAGCCACTTGCACACCCTGCAC ACTGGCCTGCTGTGCCCCAGCCTC
TP53-742CT	CTGACTGTACCACTACACTACATGTGAAACAGTCTGCACTGGG[G/G]CAGCTGGC CCCACATCTCACCACATCACACTGGAAAGACTCCAGGTCAAGGAGCCACTTGCACACCCTGCACACTGGCCTGC TGTGCCCCAGCCTGCTGCTGCTC
TP53-743GA	TGACTGTACCACTACACTACATGTGAAACAGTCTGCACTGGG[G/G]CAGCTGGC CCACATCTCACCACATCACACTGGAAAGACTCCAGGTCAAGGAGCCACTTGCACACCCTGCACACTGGCCTGC GTGCCCCAGCCTGCTGCTGCTC
TP53-817CT	CCTCTGCTCTCTTCTATCTGAGTAGTGGTAACTACTACTGGGACGGAACAGCTTGTGAGGT[G/G]C TTTGTGCTGCTGCTGGAGAGACCGGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCGCAAGAAAGGGAGCCTCACCA CGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGGTAAGCAA

【 0 1 4 1 】

データ分析 :

自動のベースラインおよびマニュアル閾値0.2を用いて、蛍光が固定閾値を通過するフラクショナルサイクル数 (fractional cycle number) として定義される閾値サイクル (C_t) を計算した。マッチ配列対ミスマッチ配列についての増幅反応間の C_tを、cast-PCR

10

20

30

40

50

の特異性として定義する（ $C_t = C_t \text{ミスマッチ} - C_t \text{マッチ}$ ）。ミスマッチ標的とマッチ標的との間の C_t が大きくなればなる程、アッセイ法の特異性はより良好となる。 $1/2^{C_t}$ に等しい、またはいくつかの場合では% ($1/2^{C_t} \times 100$) として計算される識別力（または選択性）を、 2^{C_t} 値を用いて推定した。

【0142】

実施例1

テールを有するプライマーは対立遺伝子変種の識別を改善する

以下の実施例は、テールを含む対立遺伝子特異的プライマーを適用することにより、対立遺伝子変種の識別が有意に改善されることを証明する。

【0143】

従来のAS-PCRにおいて、3'ヌクレオチドミスマッチの識別は、SNP周囲の配列および対立遺伝子の性質に大きく依存する。マッチプライマーとミスマッチプライマーとの増幅反応間の CT は多様である。マッチ配列とミスマッチ配列の増幅の識別を改善するために、その5'末端にテールを含むように対立遺伝子特異的プライマーを設計して、AS-PCRアッセイ法におけるその適切性に関して試験した。

【0144】

先に示した（プロッカーブロープが含まれないことを除いて）一般的な実験設計および反応条件を用いて、核酸錠型として3つの対立遺伝子（A、C、またはT）の1つを含む *hsv11711720* SNP（表2を参照されたい）を含有する $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ゲノムDNAを用いてアッセイ法を行った。表2Aに3つの遺伝子型を示す。プライマーおよびプロープを表3に示される配列に従って設計した。

【0145】

（表2）*hsv11711720* SNPについてのゲノムDNA配列（標的対立遺伝子を括弧内に示す）

AGAAAATAACTAAGGGAAGGAGGAAAGTGGGGAGGAAGGAAGAACAGTGTGAAG	10
ACAATGGCCTGAAAAGTCTGTTAAAGTTAATTATCAGTTTGAGTCCA	
AGAACTGGCTTGCTACTTCTGTAAGTTCTAATTACTGAATAAGCATGAAAAG	
ATTGCTTGAGGAATGGTTATAAACACATTCTAGAGCATAGTAAGCAGTAGGGAGT	20
AACAAAATAACACTGATTAGAATACTTACTCTACTTAATTCAATCATATTAG	
TTTGACTCACCTTCCCAG[A/C/T]ACCTTCTAGTTCTTATCTTCAGTGCTTGTC	30
CAGACAAACATTTCAACAACTCCTGCTATTGCAATGATGGGTACAATTGCTA	
AGAGTAACAGTGTAGTTGCCAACCATAGATGAAGGATATAATTATTCTGTCCAA	
GATTGCTATATTCTGGGTAAATTACAGCAAGCCTGGAACCTATAGCCTGCAAAACAA	
AACAAATTAGAGAAATTAAAAATTATCTTCACAACTCATGCTTCTATTTCTGA	40
AAACTCACCTTCATGAGACTATATTCAATTATTAT	

【0146】

（表2A）*hsv11711720* SNPについてのゲノムDNA配列の遺伝子型

ゲノムDNA ID	遺伝子型
NA17203	AA
NA17129	CC
NA17201	TT

【 0 1 4 7 】

(表3) プライマーおよびプローブの一覧および配列

10

プライマー／ プローブID	配列(5'から3')	Tm (°C)
17129-ASP	ATATTTAGTTGACTCACCTTCCCAGC	63.2
17129-テールASP	acc ACTCACCTTCCCAGC	63.0
17203-ASP	ATATTTAGTTGACTCACCTTCCCAGA	62.0
17203-テールASP	acc ACTCACCTTCCCAGA	63.7
17201-ASP	ATATTTAGTTGACTCACCTTCCCAGT	62.2
17201-テールASP	acc ACTCACCTTCCCAGT	64.0
LST	(6-FAM)-TGGACAAGCACTGAAAGA-(MGB)	67.4
LSP	GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATGTTG	62.5

20

30

30

40

従来の対立遺伝子特異的プライマー（「ASP-テール」）；テールを有する対立遺伝子特異的プライマー（「ASP」）；座特異的TaqManプローブ（LST）；座特異的プライマー（LSP）。小文字で示されるヌクレオチドはプライマーのテールを有する部分である。各対立遺伝子特異的プライマーのヌクレオチド特異的部分は、各プライマーの最も3'側の末端である（太字で示される）。

【 0 1 4 8 】

表4に示される通り、テールを有しないASP（「ASP-テール」）を用いる場合、3'ヌクレオチドミスマッチの識別は、Ct値のかなりの範囲が3'末端塩基の同一性に応じて観察されることから、対立遺伝子の性質に大きく依存する。マッチヌクレオチドとミスマッチヌクレオチド（「NT」）との間のCt値の範囲は、-0.1~10であった。しかし、テールを有するASPでは、3'ヌクレオチドミスマッチの識別は有意に改善された。実際に、表4に示される通り、マッチヌクレオチドとミスマッチヌクレオチドとの間のCt値は、テールを有するASPを用いた場合には、一貫して10に等しいかまたはそれより大きかった。テールを有するASPを用いた場合のマッチ配列の増幅に関するCt値は、従来のASPまたはテールを有しないASPを用いた場合のCt値と同等であった。これらの結果は、テールを有するASPがAS-PCRの特異性を改善することができるが、検出感度を改善しない可能性があることを示している。

【 0 1 4 9 】

(表4) テールを有する対立遺伝子特異的プライマー（「ASP」）は、対立遺伝子変種の識別を有意に改善する

CA	0.9	11.5	1552.1
CT	1.2	11.5	1278.3
AC	10.0	11.9	3.7
AG	9.8	11.9	4.3
TG	2.3	11.5	588.1
TC	-0.1	11.5	3104.2
平均値	4.0	11.6	1088.5

テールを有するプライマー対テールを有しないプライマーを用いたCt値の差に基づいて特異性（「倍率差」）を計算した（ $2^{(Ct(ASP) - (Ct(ASP - テール))}$ ）。ASP（+/-テール）と標的対立遺伝子の3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分のミスマッチヌクレオチドも同様に示す（「NTミスマッチ」）。

【0150】

実施例2

低いプライマー濃度は対立遺伝子変種の識別を改善する

先に示した一般的な実験設計および反応条件を用いて、様々なSNP標的配列を含有するプラスミドDNA（表1を参照されたい）100万コピー、および200 nMまたは800 nMテールを有するASP（表記の通り）の存在下でアッセイ法を行った。アッセイプライマーおよびプローブを、図11A～Dに示される配列に従って設計した。

【0151】

対立遺伝子変種の識別に対するテールを有するASP濃度の効果を表5に要約する。マッチプライマーとミスマッチプライマーとの増幅反応間の Ctは、より低いテールを有するASP濃度が対立遺伝子変種の識別を改善することを証明している。

【0152】

（表5）テールを有する対立遺伝子特異的プライマーの異なる濃度を用いるアッセイ法結果

CV11201742	14.1	15.2	2.14
CV11349123	8.2	10	3.48
CV1207700	5.2	6.6	2.64
CV25594064	20.1	19.1	0.5
CV25639181	11.9	12.9	2
平均値	12.6	13.44	2.14

【 0 1 5 3 】

実施例3

低減されたT_mを有する設計されたプライマーは、対立遺伝子変種の識別を改善する

先に示した一般的な実験設計および反応条件を用いて、様々なSNP標的配列を含有するプラスミドDNA（表1を参照されたい）100万コピーの存在下で、T_mがより高い（～57）テールを有するASPまたはT_mがより低い（～53）テールを有するASPを用いて、アッセイ法を行った。アッセイプライマーおよびプローブを、図11A～Dに示される配列に従って設計した。

【 0 1 5 4 】

対立遺伝子変種の識別に対する対立遺伝子特異的プライマーT_mの効果を表6に要約する。T_mがより低い対立遺伝子特異的プライマーのC_tは、T_mがより高い対立遺伝子特異的プライマーのC_tより有意に高い。T_mを低減するように設計された対立遺伝子特異的プライマーは、いくつかの場合では118倍の差ほどで、または平均約13倍の差で、対立遺伝子変種の識別を改善した。

10

【 0 1 5 5 】

（表6）T_mがより低い（約53）またはT_mがより高い（約57）テールを有するASPを用いたC_t値

BRAF-1799TA	12.2	19.1	118.9
CTNNB1-121AG	11.6	14.9	10.0
KRAS-176CG	18.8	22.5	13.1
NRAS-35GA	13.0	14.0	1
TP53-721TG	14.7	19.1	20.6
CTNNB1-134CT	8.6	14.1	44.8
EGFR-2369CT	9.7	10.7	2
KRAS-183AC	22.2	23.1	1.8
NRAS-38GA	14.0	14.3	1.2
TP53-733GA	13.6	13.5	1.0
EGFR-2573TG	16.7	20.2	10.9
KRAS-34GA	14	14.8	1.8
KRAS-38GA	11.2	14.4	8.9
NRAS-181CA	24.0	27.1	8.6
TP53-742CT	9.1	8.0	0.5
KRAS-35GA	11.5	15.1	12.3
NRAS-183AT	23.6	22.7	0.5
TP53-524GA	11.4	13.5	4.6
TP53-637CT	11.4	14.4	7.8
TP53-743GA	10.1	13.2	8.4
TP53-817CT	13.6	13.9	1.2
平均値	14.1	16.3	13.3

【 0 1 5 6 】

実施例4

プロッカープローブの使用は対立遺伝子変種の識別を改善する

以下の実施例は、MGBプロッカープローブを用いることがPCR反応において標的配列に対

10

20

30

40

50

する3'ヌクレオチドのミスマッチプライマーおよびマッチプライマー間の識別を改善することを例証している。

【0157】

先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、様々なSNP標的配列を含有するプラスミドDNA（表1を参照されたい）100万コピーを用いて、MGBプロッカープローブの存在下またはMGBプロッカープローブの非存在下でアッセイ法を行った。アッセイプライマーおよびプローブを図11A～Dに示される配列に従って設計した。

【0158】

AS-PCRの選択性を改善するために、その3'末端にMGB基を含むプロッカープローブを合成した（例えば、Kutyavin, I. V., et al., Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 2: 655-661、米国特許第5,512,677号；同第5,419,966号；同第5,696,251号；同第5,585,481号；同第5,942,610号、および同第5,736,626号を参照されたい）。

【0159】

MGBプロッカープローブを用いたcast-PCRの結果を表7に要約する。MGBプロッカープローブ有りのcast-PCRの Ctは、MGBプロッカープローブ無しのcast-PCRの Ctより大きい。示される通り、MGBプロッカープローブは、対立遺伝子変種の識別を改善する。

【0160】

（表7）MGBプロッカープローブは対立遺伝子変種の識別を改善する

BRAF-1799TA	11.4	14.9	11.5
CTNNB1-121AG	11.6	14.1	5.4
KRAS-176CG	17.8	20.9	9
NRAS-35GA	13.9	14.3	1.4
TP53-721TG	12.5	14.7	4.4
CTNNB1-134CT	6.7	10.2	11.6
EGFR-2369CT	7.7	10.1	5.3
KRAS-183AC	22.4	23	1.5
NRAS-38GA	14.5	14.6	1.1
TP53-733GA	13.2	14.4	2.3
EGFR-2573TG	18.2	21.8	11.6
KRAS-34GA	14.4	15.1	1.7
KRAS-38GA	11.9	15.1	1.7
NRAS-181CA	19.3	24.2	30.2
TP53-742CT	12.7	13.6	1.9
KRAS-35GA	11.0	13.7	6.5
NRAS-183AT	20.2	21.7	2.9
TP53-524GA	13.5	13.5	1
TP53-637CT	9.3	12.1	7.0
TP53-743GA	9.9	11.5	3.1
TP53-817CT	12.6	13.2	1.5
平均値	13.6	15.5	6.0

【0161】

実施例5

識別塩基を標的とするように設計されたプライマーは、対立遺伝子変種の識別を改善する
先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、SNP標的配列を含有する
プラスミドDNA（表1を参照されたい）100万コピーの存在下で、アッセイ法を行った。図11A
～Dに示される配列に従ってアッセイプライマーおよびプローブを設計した。

【0162】

10

20

30

40

50

表8に要約されるデータに従って、cast-PCRの識別は、分析される対立遺伝子の性質に依存した。表8に示される通り、対立遺伝子-1についてのミスマッチ配列とマッチ配列との間の ΔCt は、対立遺伝子-2についてのミスマッチ配列とマッチ配列との間の ΔCt とは異なった。しかし、T塩基と比較した場合にA塩基およびG塩基はいずれも、調べた4つ全てのSNPにおいて対立遺伝子-1と対立遺伝子2とを高度に識別した。

【 0 1 6 3 】

(表8)識別塩基を標的とするように設計されたプライマーは、対立遺伝子変種の識別を改善する

SNP ID	ASPの設計		SNP対立遺伝子-1			SNP対立遺伝子-2		
	ASP1の 3' ヌクレ オチド	ASP2の 3' ヌク レオチド	対立 遺伝子 ヌクレ オチド	ΔCt (Ct_ミスマッチ - Ct_マッチ)	特異性 (倍率差)	対立 遺伝子 ヌクレ オチド	ΔCt (Ct_ミスマッチ- Ct_マッチ)	特異性 (倍率差)
KRAS-38GA	G	A	C	13.4	10809	T	8.2	294
NRAS-181CA	C	A	G	27.5	189812531	T	9.8	891
NRAS-183AT	A	T	T	17.9	244589	A	23.4	11068835
TP53-742CT	C	T	G	12.3	5043	A	8.3	315

【 0 1 6 4 】

実施例6

cast-PCRのための感度およびダイナミックレンジの決定

本実施例において、cast-PCRの感度およびダイナミックレンジを、様々なコピー数の標的プラスミドを用いてcast-PCRを行うことによって決定した。

【 0 1 6 5 】

先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、NRAS-181CA SNP標的配列を含有するプラスミドDNA(表1を参照されたい) 1×10^0 (1コピー) ~ 1×10^7 コピーを用いてアッセイ法を行った。アッセイプライマーおよびプローブを図11A~Dに示される配列に従って設計した。

【 0 1 6 6 】

表5に示される通り、テールを有するプライマーおよびMGBプロッカープローブの使用は、cast-PCRの感度がテールを有するプライマーまたはプロッカープローブを用いないTaqManアッセイ法と同等であることから、cast-PCRの感度に有害な影響を及ぼさない。さらに、図5は、cast-PCRアッセイ法が少なくとも7つの対数にわたって直線性のダイナミックレンジを示すことを示している。

【 0 1 6 7 】

実施例7

cast-PCRの特異性の判定

本実施例において、対応するプロッカープローブの存在下での、マッチASPまたはミスマッチASPのいずれかを用いたKRASの特定の対立遺伝子の増幅を、所定の対立遺伝子と比較することによって、cast-PCRの特異性を判定した。

【 0 1 6 8 】

先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、NRAS-181CA SNP標的配列の2つの対立遺伝子のいずれか1つを含有するプラスミドDNA(表1を参照されたい) 1×10^6 コピーを用いたアッセイ法を行った。アッセイ法のプライマーおよびプローブを図11A~Dに示される配列に従って設計した。

【 0 1 6 9 】

10

20

30

40

50

図7の左側のパネルは、A2ブロッカープローブの存在下でマッチ（A1）プライマーまたはA1ブロッカープローブの存在下でミスマッチ（A2）プライマーを用いた、対立遺伝子-1DNAに関するcast-PCRの増幅プロットを示す。右側のパネルは、cast-PCRを対立遺伝子-2DNAについて行った同様の実験を示す。図7のデータ要約に示される通り、20を超える強いC_t値が、調べたKRAS-183ACの双方の対立遺伝子上でのcast-PCRに関して観察された。これは、対立遺伝子A1およびA2に関してそれぞれ 9×10^6 および 2×10^6 の 2^{-C_t} の計算によって決定される場合の特異性に対応する。さらに、選択性の計算（ $1/2^{-C_t}$ ）は、対立遺伝子A1およびA2に関してそれぞれ $1/1.1 \times 10^7$ および $1/5.0 \times 10^7$ の値が観察されることを示している。

【0170】

10

実施例8

cast-PCRは野生型DNA 100万コピー中1コピーの変異体DNAを検出することができる。

本実施例において、cast-PCRの選択性を、すなわち、cast-PCRが過剰な野生型DNA中のまれな変異体DNAを検出できるか否かを判定した。

【0171】

20

先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、野生型KRAS-183ACプラスミドDNA（表1を参照されたい） 1×10^6 コピーと混合した様々なコピー数の変異体KRAS-183ACプラスミドDNA（1コピー～ 1×10^6 コピー）を用いて、アッセイ法を行った。アッセイ法のプライマーおよびプローブを図11A～Dに示される配列に従って設計して、野生型または変異体ASPおよび対応するMGBブロッカープローブを用いてcast-PCR反応を行った。

【0172】

図8は、cast-PCRが、100万倍過剰量の野生型配列に取り囲まれた場合であっても、1コピーという少ない変異体DNA配列を検出できることを示している。

【0173】

実施例9

腫瘍細胞DNAと正常細胞DNAとの識別におけるcast-PCRの選択性

本実施例において、様々な量の腫瘍細胞ゲノムDNAを、正常細胞からのゲノムDNAに混合または「スパイク」した試料についてアッセイ法を行うことによって、cast-PCRの選択性を判定した。DNA試料を QIAamp DNA Mini Prep Kits (Qiagen) を用いて抽出した。野生型DNAをSW48細胞株から抽出して、変異体DNAをH1573細胞株から抽出した。

30

【0174】

変異体DNAはKRAS-G12A変異を含有した。スパイクした試料中の腫瘍細胞DNAの百分率は、0.5～100%まで多様であった。cast-PCRを用いて、これらの百分率で存在する腫瘍細胞DNAの存在を検出した。

【0175】

先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、1反応あたりgDNA 30 ngを用いてアッセイ法を行った。アッセイ法のプライマーおよびプローブを、図11A～Dに示される通りKRAS-G12A SNP IDに対応する配列に従って設計した。

【0176】

図9に示される通り、腫瘍細胞DNAは、正常細胞DNAと比較してわずか0.5%のレベルで存在する場合であっても、cast-PCRを用いて容易に検出される。

【0177】

実施例10

腫瘍試料中の腫瘍細胞を検出するためのcast-PCRの使用

本実施例において、cast-PCRを用いて、腫瘍試料中の腫瘍細胞を検出してその百分率を決定した。様々な正常および腫瘍試料を得て、図10に示される通り、癌に関連する多数のSNPの存在に関してcast-PCRによってアッセイした。

【0178】

40

先に示した一般的なcast-PCR概略および反応条件を用いて、正常試料または腫瘍試料のいずれかから得られたgDNA 5 ngまたはcDNA 1.5 ngを用いてアッセイ法を行った。図10に

50

示されるSNPに対応するアッセイプライマーおよびプローブを図11A～Dに示される配列に従って設計した。

【0179】

図10に示される結果は、cast-PCRが正常試料中の変異体細胞の存在を検出できなかったことにより示されるように、cast-PCRが低い疑陽性率を有することを示している。対照的に、cast-PCRは、NRAS-183AT SNPを含有する腫瘍試料に関してほんの2%未満から、EGFR-2573TG SNPを含有する試料に関して80%までの範囲で、様々な腫瘍試料中の腫瘍細胞の百分率の決定を提供することができた。

【0180】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形「1つの」、「1つの(an)」、および「その」には、明白におよび無条件に1つの指示対象に限定される場合を除き、複数形が含まれることに注意されたい。「または」の使用は、特に明記していなければ「および/または」を意味する。「含む」「含む(comprises)」「含む(comprising)」「含む(include)」「含む.includes)」、および「含む(including)」の使用は、互換的であり、限定的であることを意図されない。さらに、1つまたは複数の態様の記載が「含む」という用語を用いる場合、当業者は、いくつかの特異的な例において、その態様または複数の態様が、「本質的にからなる」および「または「からなる」という言語を用いて代わりに記載されうることを理解すると考えられる。

10

【0181】

本明細書において用いられる見出しへは、系統立てる目的のために過ぎず、記載の主題を限定すると解釈されるべきではない。特許、特許出願、記事、書籍、および学術論文が含まれるがこれらに限定されるわけではない、本出願において引用された全ての文書、または文書の一部は、任意の目的に関してその全内容が明白に参照により本明細書に組み入れられる。組み入れられた文書の1つまたは複数が、本出願におけるその用語の定義と矛盾する用語を定義する場合、本出願が支配する。

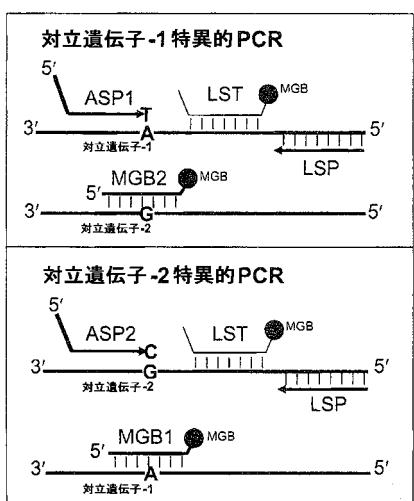
20

【0182】

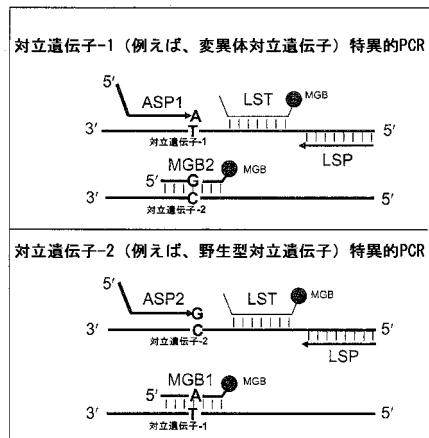
特許、特許出願、論文、教本等、およびその中で引用された参考文献が含まれる本明細書において引用された全ての参考文献は、それらが既に組み入れられていない程度に、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる。組み入れられた文献および類似の材料の1つまたは複数が異なる場合。

30

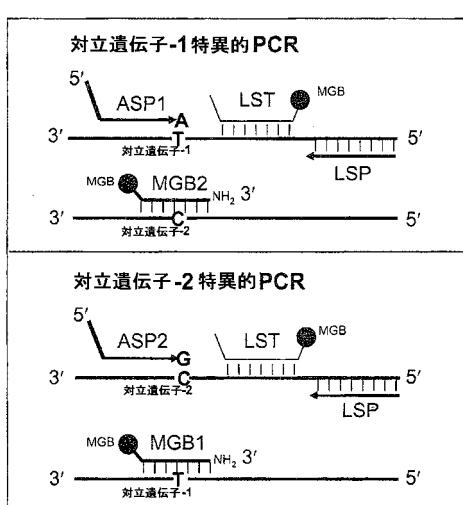
【図1】
cast-PCRの概略



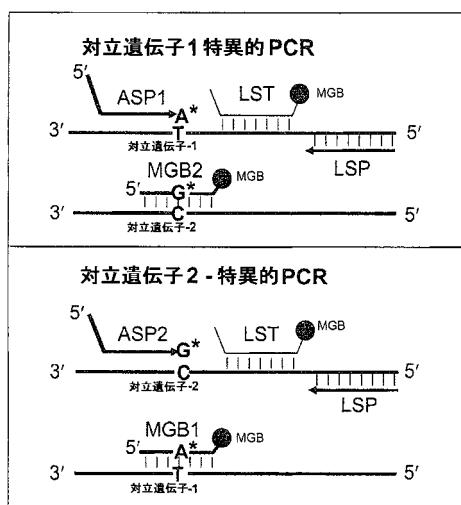
【図2】
対立遺伝子（例えば、変異体対立遺伝子）検出のための識別性の高い塩基の使用



【図3】
プロッキングプローブの5'端におけるMGBの使用

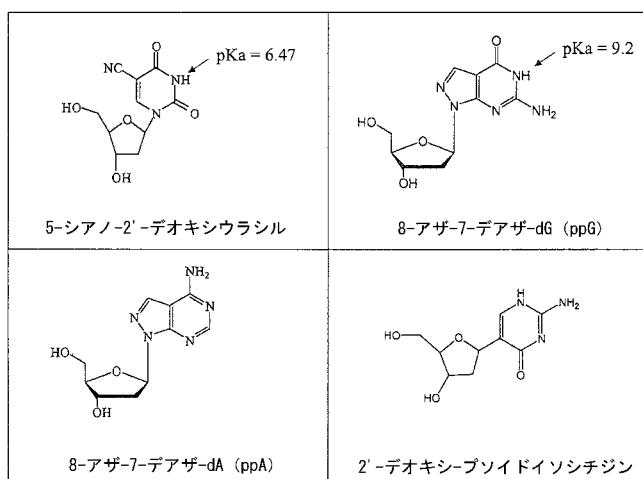


【図4 A】
MGBプロッckerおよび対立遺伝子特異的PCRプライマー（ASP1およびASP2）における改変塩基の使用



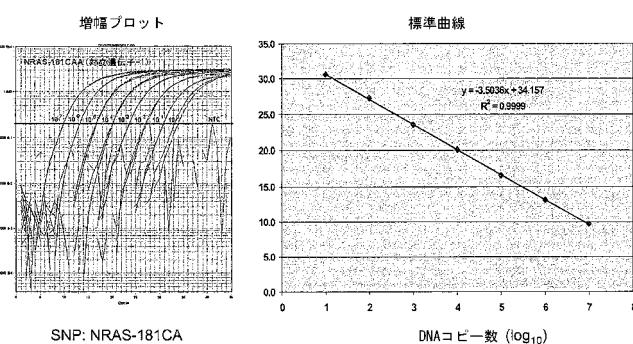
〔 図 4 B 〕

改変ヌクレオシドの例



〔 5 〕

cast-PCRのTaqMan様の感度および ダイナミックレンジ

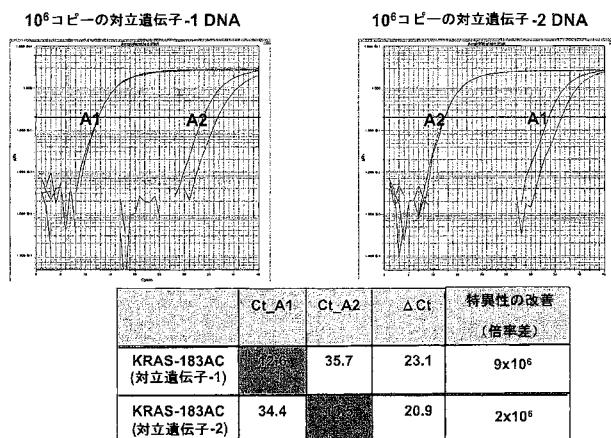


【 図 6 】

KRAS 变异

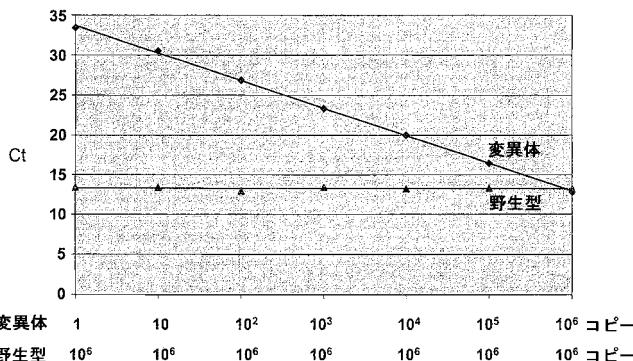
〔 図 7 〕

KRAS-183AC cast-PCRアッセイ法の特異性



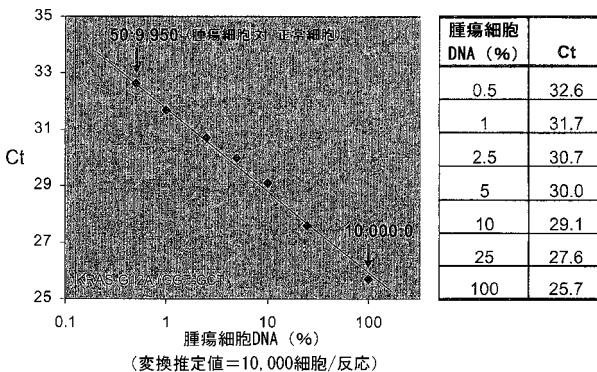
〔 図 8 〕

cast-PCRアッセイ法は野生型DNA 10^6 コピー中
変異体DNA 1 コピーを検出することができる



〔 図 9 〕

cast-PCRアッセイ法の特異性—腫瘍細胞のDNAスパイク



変異細胞株DNA (KRAS-G12A) の野生型細胞株DNAへのスパイク

【図10】

cast-PCRによる腫瘍試料からの変異DNAの検出

SNP ID	試験ID	試験名	性別	年齢	試験用DNA(%)
BRAF-1997A	正常-1	BRAF-1997A	女	22.9	40.0
BRAF-1997A	腫瘍-02	BRAF-1997A	女	27.7	25.4
EGFR-2573TG	正常-1	EGFR-2573TG	女	17.1	0.00
EGFR-2573TG	腫瘍-02	EGFR-2573TG	女	80.0	80.00
KRAS-35GA	正常-1	KRAS-35GA	女	23.8	40
KRAS-35GA	腫瘍-04	KRAS-35GA	女	16.2	0
KRAS-35GA	腫瘍-04	KRAS-35GA	女	50.00	50.00
NRAS-183AT	正常-1	NRAS-183AT	女	24.2	40
NRAS-183AT	腫瘍-06	NRAS-183AT	女	5.9	40.0
NRAS-183AT	腫瘍-06	NRAS-183AT	女	1.65	1.65

【図11A】

cast-PCRアッセイ法において用いられるプライマーおよびプローブの一覧

SNP ID	出発基準の 対立遺伝子特異的 プライマー(ASPr)	ASPrの配列	出発基準の 対立遺伝子特異的 プライマー(ASPr)	ASPrの配列
CV11201742	ASPr	ccggCTGCTCTCTGTC	ASPr2	ccggCTGCTCTCTGTC
CV11349123	ASPr1	ccggAAACCACACTTACGG	ASPr2	ccggAAACCACACTTACGG
CV1207700	ASPr1	ccggCTCTGATGGATGAAATTTCAC	ASPr2	ccggCTCTGATGGATGAAATTTCAC
CV2554004	ASPr1	gtggCCCTGGTGGAAAATTGTTG	ASPr2	gtggCCCTGGTGGAAAATTGTTG
CV26369181	ASPr1	cggAACTGGAAATTTTGACAG	ASPr2	cggAACTGGAAATTTTGACAG
CV11201742	LSP	TATCCGTCACAGAGAGAGGGAG	LST	(6-FAM)ATGGCCCTGATAAGGAGAG(MGB)
CV11349123	LSP	GCTTGCATGGCTTCAACC	LST	(6-FAM)AGGGGGTCTCGAGGAG(MGB)
CV1207700	LSP	GGAGCCATGGAAAGGCAAG	LST	(6-FAM)GTGCACTCTACCCAGTA(AAGB)
CV2554004	LSP	TGGCAAGACGGATGGTACTC	LST	(6-FAM)AGAACTCTCCAAATACCTAGA(MGB)
CV26369181	LSP	CTCTCAAAGGGTAAACTGCCACCTTA	LST	(6-FAM)ACAGTACCTGATAAAATG(MGB)
CV11201742	MGB1	CTCCCTGTCCTGTCACCC(MGB)	MGB2	GTCTCTGTCCTGTCACCC(MGB)
CV11349123	MGB1	CTTACCGCAGCAGC(MGB)	MGB2	CTTAGCACACCCAC(MGB)
CV1207700	MGB1	GGAGATTACCAAAATGAG(MGB)	MGB2	TGGAGATTATGCCAAATG(MGB)
CV2554004	MGB1	ACAAATTGTTGAGGGGG(MGB)	MGB2	ACAAATTGTCAGGGGG(MGB)
CV26369181	MGB1	AAGTATTITTOACACCTTAC(MGB)	MGB2	AAGTATTITTOACACCTTAC(MGB)

【図11B】

SNP ID	出発基準の 対立遺伝子特異的 プライマー(ASPr)	ASPrの配列	出発基準の 対立遺伝子特異的 プライマー(ASPr)	ASPrの配列
BRAF-1997A	ASPr1	GCGTGTATTGCTAGCTACAGA	ASPr2	CGCGATTTTGCTAGCTACAGA
CTNNB1-121AG	ASPr1	GGCGAGAAAGGAGCTGGGT	ASPr2	GGCGAGAAAGGAGCTGGGT
CTNNB1-134CT	ASPr1	CGCGTCCCTTACACCTACAGA	ASPr2	CGCGTCCCTTACACCTACAGA
EGFR-2369CT	ASPr1	CGCGCGTCAGCTCATCAC	ASPr2	GGCGCTGCACTGCTCATCAT
EGFR-2573TG	ASPr1	CGCGAGCAGTTGGGCC	ASPr2	CGCGACACGATTGGGCC
KRAS-176CG	ASPr1	GGCGGATAATTCTCACACAGC	ASPr2	CGCTGGATAATTCTGCGACAGCG
KRAS-183AC	ASPr1	GGCGACACAGCAGCTGCA	ASPr2	GGCGACACAGCAGCTGCA
KRAS-183AT	ASPr1	GGCGACACAGCAGCTGCA	ASPr2	GGCGACACAGCAGCTGCA
KRAS-343A	ASPr1	CGCCCTTGCTCAACGCACT	ASPr2	GGCTTGCCTACGGCAC
KRAS-343C	ASPr1	CGCTGCTTACACGCCAG	ASPr2	GGTGTGCTTACACGCCAG
KRAS-347	ASPr1	GGGTGCTCTACGCCAC	ASPr2	GGGTGCTCTACGCCAC
KRAS-350A	ASPr1	CGCCCTTGCTCAGGCCAT	ASPr2	GGCTTGCCTACGGCAC
KRAS-350C	ASPr1	GGGTCTGCTTACACGCCAG	ASPr2	GGGTCTGCTTACACGCCAG
KRAS-350T	ASPr1	GGGTCTTGCTTACGGCAC	ASPr2	GGGTCTTGCTTACGGCAC
KRAS-3GA	ASPr1	CGCGTGTGGTGGCTGGTA	ASPr2	GGCTAGTGGAACTGGTGG
NRAS-181CA	ASPr1	CGCGATACGATACACCTGAA	ASPr2	CGGATACGATACACCTGAA
NRAS-181AT	ASPr1	CGCTGGATACACGTGACAA	ASPr2	CGCTGGATACACGTGACAA
NRAS-35GA	ASPr1	CGCGGGTGGTGGACAGCA	ASPr2	CGCGTGTGGAGGAGCA
NRAS-38GA	ASPr1	CGCGGTGGTGGACAGGTTG	ASPr2	CGCGTGTGGACAGGTTG
TP53-324GA	ASPr1	CGCGGGAGGTGTGGCGCA	ASPr2	CGCGAAGGTGTGGCGCA
TP53-637CT	ASPr1	GGCGGATGACAGAACACCTTTC	ASPr2	GGCTGGATGACAGAACACCTTTC
TP53-721TG	ASPr1	GCCTACAACTACATGTGAACTG	ASPr2	GGCTCTAACACTACATGTGAACTG
TP53-731GA	ASPr1	GCCTCTCTGCTGATGGCGA	ASPr2	GGCTCTGCTGATGGCGA
TP53-742CT	ASPr1	GGCGCGGGCGATGAAAC	ASPr2	GGCGCGGGCGATGAAAC
TP53-743GA	ASPr1	GGCGCGCGATGAAACCA	ASPr2	GGCGCGCGATGAAACCG
TP53-817CT	ASPr1	GGCAACAGCTTGAAGTCC	ASPr2	GGCGAACAGCTTGAAGTCC

【図11C】

SNP ID	出発基準の 対立遺伝子 プライマー (ASPr)	ASPrの配列	出発基準の 対立遺伝子 プライマー (ASPr)	ASPrの配列
BRAF-1997A	LSP	AGCGTCAATTCTCACCTACCAAAA	LST	(6-FAM)CAGACAACTGTCACAACTQ(MGB)
CTNNB1-121AG	LSP	CATGGAACCGACAGAAGAAGG	LST	(6-FAM)CTGGCACACACAGCTG(MGB)
CTNNB1-134CT	LSP	GTCACTGGCGACACAGCTTCA	LST	(6-FAM)TAATGCGACCCAGAAATGQ(MGB)
EGFR-2369CT	LSP	TGGGAGCGCAATTATGCTTGTGTT	LST	(6-FAM)CCCTTCGCTGCTGCTGCTG(MGB)
EGFR-2573TG	LSP	AGGAACCTACTGTGAAACAC	LST	(6-FAM)CAAGCACTGTCAGAACATQ(MGB)
KRAS-176CG	LSP	CCCTCCCGACGCTCTCATGTA	LST	(6-FAM)CTGTCCTGTCATTGCAQ(MGB)
KRAS-183AC	LSP	TCTTCAAATGATTGATTTATGCGAACATAACAAA	LST	(6-FAM)CCCCTCCCGACGCTGCTG(MGB)
KRAS-183AT	LSP	TCTTCAAATGATTGATTTATGCGAACATAACAAA	LST	(6-FAM)CCCCTCCCGACGCTGCTG(MGB)
KRAS-343A	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
KRAS-343C	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
KRAS-347	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
KRAS-350A	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
KRAS-350C	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
KRAS-350T	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
KRAS-3GA	LSP	TGTGTGACATTTCTAATATGTCACAT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGAAATGQ(MGB)
NRAS-181CA	LSP	GGCTCTAACACCTGATGTCACAA	LST	(6-FAM)CTTCGCTCTTCTCTCATQ(MGB)
NRAS-181AT	LSP	GGAAATGGCTGCTTATGATGQCAA	LST	(6-FAM)CTTCGCTCTTCTCTCATQ(MGB)
NRAS-35GA	LSP	AGGTGTTCTGATGAGGTGGATG	LST	(6-FAM)CAGTCGCGCTTTCQ(MGB)
NRAS-38GA	LSP	GTGTTCTGCGATGAGGTGGATG	LST	(6-FAM)CAGTCGCGCTTTCQ(MGB)
TP53-324GA	LSP	GGCAACAGCCCTGTGCT	LST	(6-FAM)CTGTCCTACCATGCGATQ(MGB)
TP53-637CT	LSP	AGACCGCAAGTGGCAACACAG	LST	(6-FAM)CTTCAGGGGGCTCATQ(MGB)
TP53-721TG	LSP	CTGGATCTCTGGCTGATGATG	LST	(6-FAM)ATGGCTCCGGGGCTCATQ(MGB)
TP53-731GA	LSP	CTGGAGCTCTGGCTGATGATG	LST	(6-FAM)ACCGGGGGCTCATQ(MGB)
TP53-742CT	LSP	TGTCAGGGTGGCGCAAGT	LST	(6-FAM)CAACCTGAGAGACTCCQ(MGB)
TP53-743GA	LSP	TGTCAGGGTGGCGCAAGT	LST	(6-FAM)CAACCTGAGAGACTCCQ(MGB)
TP53-817CT	LSP	CTTCTCTCGCGAGATCTCTCCT	LST	(6-FAM)CTGTCGTCGCTGQ(MGB)

【図 11D】

品目名	品目名	品目名	品目名
BRAF-179VA	MGB1	GCTACAGAAAATCTC(MGB)	MGB2
CTNNB1-121AQ	MGB1	GAGCTGCTGAGTGCGA(MGB)	MGB2
CTNNB1-134CT	MGB1	CACTCAGAAGAAGGAC(MGB)	MGB2
EGFR-2369CT	MGB1	CATCACCGCACTCTCATG(MGB)	MGB2
EGFR-2373TG	MGB1	AGTTTGGCCGCCAA(MGB)	
KRAS-195CG	MGB1	CTGGACACACAGGCTCA(MGB)	MGB2
KRAS-181AC	MGB1	GCAGGTCAGAGAAGTAC(MGB)	MGB2
KRAS-181AT	MGB1	GCAGGTCAGAGGAGTAC(MGB)	MGB2
KRAS-340A	MGB1	CCGCACTACTCTCA(MGB)	MGB2
KRAS-340C	MGB1	CCACCACTCTCAA(MGB)	MGB2
KRAS-340GT	MGB1	ACGCCACCCAGCTCC(MGB)	MGB2
KRAS-330A	MGB1	CGGACATGAGCTCC(MGB)	MGB2
KRAS-331GC	MGB1	CGGACAGCGCTCC(MGB)	MGB2
KRAS-350T	MGB1	CCGCAACAGCTCTCA(MGB)	MGB2
KRAS-350A	MGB1	GCTGGTGCCTAGGCG(MGB)	MGB2
NRAS-181CA	MGB1	GCTGAAAAGAAAGACTA(MGB)	MGB2
NRAS-181AT	MGB1	CAGCTGAGCACAAACAG(MGB)	MGB2
NRAS-195A	MGB1	TTGGAGCAGATGGTTT(MGB)	MGB2
NRAS-380A	MGB1	TGGACCGAGTGTGTT(MGB)	MGB2
TP53-524GA	MGB1	TGAGGCACTGCC(MGB)	MGB2
TP53-637CT	MGB1	GAACACCTTTGACATAGTGTGTT(MGB)	MGB2
TP53-721TO	MGB1	TGTGTAAACAGTGCCTCAT(MGB)	MGB2
TP53-733QA	MGB1	GCATGGCAACATG(MGB)	MGB2
TP53-742CT	MGB1	GCATGAAACCCGAGGC(MGB)	MGB2
TP53-743GA	MGB1	CATGAAACAGAGGCC(MGB)	MGB2
TP53-817CT	MGB1	TTGAAGTCCGTTGTT(MGB)	MGB2

【手続補正書】

【提出日】平成23年11月9日(2011.11.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2012511927000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2009/006652
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12Q 1/68; C07H 21/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Korean utility models and applications for utility models		
Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: allelic variant, allele specific primer, allele specific blocker, locus specific primer, detector probe		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAGE B. MCKINZIE et al. Detection of rare K-ras codon 12 mutations using allele-specific competitive blocker PCR, Mutation Research 517, 27 May 2002, pp.209-220; See abstract and pages 209-219.	1-31,33-60,62-90 ,92-116,119
A	BARBARA L. PARSONS et al. Detection of a mouse H-ras codon 61 mutation using a modified allele-specific competitive blocker PCR genotype selection method Mutagenesis, November 1998, Vol.13, No.6, pp.581-588 See abstract and pages 581-587.	1-31,33-60,62-90 ,92-116,119
A	TOSHIO SEYAMA et al. A novel blocker-PCR method for detection of rare mutant alleles in the presence of an excess amount of normal DNA, Nucleic Acids Research, 25 May 1992, Vol.20, No.10, pp.2493-2496 See abstract and pages 2493-2496.	1-31,33-60,62-90 ,92-116,119
A	ANDREAS OROU et al. Allele-specific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening, Human Mutation, 1995, Vol.6, pp.163-169; See abstract and pages 163-168.	1-31,33-60,62-90 ,92-116,119
A	US 2003/0082549 A1 (XIANGJUN LIU) 1 May 2003 See abstract; paragraphs [0017]-[0082]; figures 1-4.	1-31,33-60,62-90 ,92-116,119
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 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 novel or 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, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 31 AUGUST 2010 (31.08.2010)	Date of mailing of the international search report 31 AUGUST 2010 (31.08.2010)	
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer KIM, Gyeong Hwan Telephone No. 82-42-481-5390	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/006652

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1905842 A1 (DIASORIN S.P.A.) 2 April 2008 See abstract; paragraphs [0001]-[0063]; claims 1, 9, 20-25; figures 1, 5-6.	1-31,33-60,62-90 ,92-116,119

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/006652

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

 2. Claims Nos.: 32, 61, 91, 117, 118
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 32, 61, 91, 118 contain references to the drawings. According to PCT Rule 6.2(a), claims should not contain such references except where absolutely necessary, which is not the case here.
Claims 117-118 are not clear because claims 117-118 refer to itself respectively.

 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/006652

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003-0082549 A1	01.05.2003	US 2006-0008826 A1	12.01.2006
EP 1905842 A1	02.04.2008	CA 2666442-A1 EP 2066804 A1 US 2010-0190157 A1 WO 2008-037694 A1	03.04.2008 10.06.2009 29.07.2010 03.04.2008

フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 61/186,775
(32) 優先日 平成21年6月12日(2009.6.12)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/251,623
(32) 優先日 平成21年10月14日(2009.10.14)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/258,582
(32) 優先日 平成21年11月5日(2009.11.5)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,S,K,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72) 発明者 チェン カイフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロアルト サン アントニオ ロード 777 #91
(72) 発明者 タン ルオイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロアルト グリア ロード 3543
F ターム(参考) 4B024 AA11 AA12 CA02 CA09 HA12 HA14
4B063 QA01 QA19 QQ43 QR32 QR55 QR56 QR62 QS25 QS34 QX02
QX10