

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5285090号
(P5285090)

(45) 発行日 平成25年9月11日 (2013. 9. 11)

(24) 登録日 平成25年6月7日 (2013. 6. 7)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01) C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 29 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2010-550029 (P2010-550029)	(73) 特許権者	510243333
(86) (22) 出願日	平成21年3月10日 (2009. 3. 10)		クアンティバクト エー/エス
(65) 公表番号	特表2011-512850 (P2011-512850A)		デンマーク王国 ビドブレ ケッテゴルズ
(43) 公表日	平成23年4月28日 (2011. 4. 28)		アレ 3 O ビドブレ ホスピタル内
(86) 国際出願番号	PCT/DK2009/050051		エイエフディー 4 4 5 /ヘンリック ウ
(87) 国際公開番号	W02009/112032		エシュ
(87) 国際公開日	平成21年9月17日 (2009. 9. 17)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成22年10月19日 (2010. 10. 19)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	PA200800366	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成20年3月10日 (2008. 3. 10)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

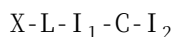
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 三重鎖形成モノマー単位を含むプライマーを用いた標的増幅およびシーケンシングの方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 鋳型核酸を提供する工程、
 b. 第一のオリゴヌクレオチドを提供する工程、
 c. ポリメラーゼを提供する工程、
 d. ヌクレオチド三リン酸を提供する工程、
 e. 工程a～dの成分を混合して、プライマーが鋳型にアニーリングすることを可能とする条件を提供する工程であって、第一のオリゴヌクレオチドが式ZのTINAモノマーを含む長さ5～60ntのオリゴヌクレオチドであり、Zが一般式：



によって表され、式中、

Xがオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド類似体、またはPNAもしくはPNA類似体の骨格モノマー単位であり、Xがアルキレンジオールを含み、

Lがアルキル鎖、オキサアルキル鎖、アザアルキル鎖、チアアルキル鎖、カルボキサミド基、チオカルボキサミド基、スルホンアミド基、またはそれらの組み合わせを含むリンカーであり、かつ0～60個の原子を含み、

I₁がベンゼン、ナフタレン、アズレン、および二環式芳香族複素環系からなる群より選択される単環式または多環式芳香族環系であり、

I₂が二環式芳香族環系、三環式芳香族環系、四環式芳香族環系、五環式芳香族環系、ならびにそれらの複素環式芳香族類似体およびそれらの置換型の群より選択され、

10

20

Cが、25個以下の炭素および／または窒素原子の長さを有する、1～12個の炭素のアルキル、2～12個の炭素のアルケニル、2～25個の炭素のアルキニルもしくはジアゾ、またはそれらの組み合わせの群から選択されるコンジュゲーターである、工程、

f. プライマーの伸長を可能とする条件下で、鋳型にアニーリングした第一のオリゴヌクレオチドを伸長する工程を含む方法。

【請求項 2】

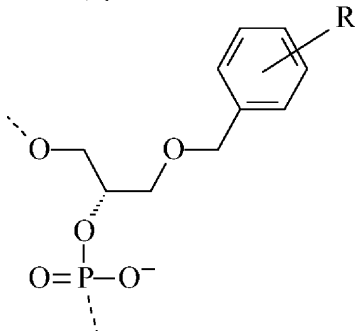
Zがオリゴヌクレオチドの5'末端に位置する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

I₁およびI₂が、コンジュゲート系を介して直接連結される、請求項1または2記載の方法 10

【請求項 4】

Zが式：



20

によって表すことができ、式中、Rがアリールエチニルの群より選択される、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

オリゴヌクレオチドが、DNA単位、RNA単位、LNA単位および2'-OH-修飾単位からなる群より選択される修飾されたヌクレオチドモノマー単位をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

オリゴヌクレオチドの3'末端が、近接する一続きの3デオキシヌクレオチドを含む、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項 7】

オリゴヌクレオチドが、制限部位をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

オリゴヌクレオチドが、FAM（商標）、TET（商標）、JOE（商標）、VIC（商標）、SYBR（登録商標）Green、6 FAM、HEX、TET、TAMRA、JOE、ROX、Fluorescein、Cy3、Cy5、Cy5.5、Texas Red、Rhodamine、Rhodamine Green、Rhodamine Red、6-CarboxyRhodamine 6G、Oregon Green 488、Alexa Fluor、Oregon Green 500またはOregon Green 514からなる群より選択されるフルオロフォアをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。 40

【請求項 9】

オリゴヌクレオチドが、TAMRA（商標）、Black Hole Quencher（商標）、DABCYL、BHQ-1、BHQ-2、DDQ I、DDQ IIおよびEclipse Dark Quencherからなる群より選択されるクエンチング色素をさらに含む、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

オリゴヌクレオチドまたはヌクレオチド三リン酸が蛍光的に標識される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

ヌクレオチド三リン酸の画分がジデオキシヌクレオチド三リン酸である、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。 50

【請求項 1 2】

g. 工程fの第一の伸長産物に相補的である第二のオリゴヌクレオチドを提供する工程、
h. 工程fの産物を変性させる工程、
i. プライマーの伸長を可能とする条件下で、第一の伸長産物にアニーリングした第二のオリゴヌクレオチドを伸長する工程
をさらに含む、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

第二のオリゴヌクレオチドが請求項1～11のいずれか一項記載のTINAモノマーを含むオリゴヌクレオチドである、請求項12に記載の方法。

【請求項 1 4】

変性、アニーリングおよび伸長の少なくとも10回の反復を含む、請求項12または13記載の方法。

【請求項 1 5】

ポリメラーゼが熱安定性である、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 6】

第一または第二のオリゴヌクレオチドが、転写が介在する増幅を可能とするRNAプロモーター配列を含む、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 7】

第三および第四のオリゴヌクレオチド、ならびに等温鎖置換増幅反応を可能とする制限酵素も含む、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 8】

反応混合物が、第一または第二の伸長産物の第一および第二のプライマー結合部位の間の領域に相補的である配列を含む検出プローブをさらに含む、請求項12～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 9】

プローブがステムループ構造を形成することができる、請求項18記載の方法。

【請求項 2 0】

反応混合物が、第一または第二の伸長産物の第一および第二のプライマー結合部位の間の領域に相補的である第二の検出プローブをさらに含み、第一および第二のプローブが隣接する部位に塩基対を形成し、それによって一方のプローブの3'末端がもう一方のプローブの5'末端に接近する、請求項12～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 1】

反応混合物が、SYBR green I、SYBR green II、およびSYBR Goldのような二本鎖の特異的レポーター色素をさらに含む、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 2】

反応混合物が、二本鎖の伸長産物と三重鎖を形成することができる三重鎖形成プローブをさらに含む、請求項1～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 3】

三重鎖形成プローブが、ステムループ構造を形成することができる、請求項22に記載の方法。

【請求項 2 4】

反応混合物が、第一の三重鎖プローブと共に形成される三重鎖に隣接して三重鎖を形成する第二の三重鎖形成プローブを含む、請求項22または23記載の方法。

【請求項 2 5】

第一および第二の三重鎖形成プローブがリンカーによって連結される、請求項24項記載の方法。

【請求項 2 6】

第一および／または第二の三重鎖形成プローブが、請求項1～11のいずれか一項記載のTINAモノマーを含むオリゴヌクレオチドである、請求項22～25のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

第一および／または第二の三重鎖形成プローブが、近接する一続きの少なくとも3個のピリミジンを含む、請求項22～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

第一および／または第二の三重鎖形成プローブが、近接する一続きの少なくとも3個のプリンを含む、請求項22～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

反応が、鋳型鎖に塩基対を形成する第一のオリゴヌクレオチドまたは鋳型鎖に塩基対を形成する第二のオリゴヌクレオチドと共に三重鎖を形成することができる三重鎖形成オリゴヌクレオチドをさらに含み、それによってオリゴヌクレオチドの鋳型鎖への結合が安定化される、請求項1～28のいずれか一項記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

核酸の検出、標的増幅およびシーケンシングは、分子生物学、研究および臨床診断学における中心的な方法であり、このような方法における重要な試薬はプライマーおよび／またはプローブとして作用するオリゴヌクレオチドである。

【0002】

プライマーおよびプローブの主な重要性はそれらの配列特異性であり、さらに相補性の核酸に対するそれらの親和性である。これらの特徴はオリゴヌクレオチドに固有の要因およびオリゴヌクレオチドに固有でない要因によって調節することができる。固有の要因は、例えば、オリゴヌクレオチドの長さおよび核酸配列組成である。非天然のヌクレオチドまたは骨格修飾物の使用も固有の要因である。しかしながら、非天然のヌクレオチドおよび骨格単位の数に限られている。従って、分子生物学の方法で使用する可以使用新規の修飾物を伴うオリゴヌクレオチドが必要である。

20

【0003】

特許出願W0 2006/125447は式Z（後述）の三重鎖形成モノマー単位について記載しており、二本鎖の核酸を用いた三重鎖の形成に関して三重鎖形成モノマー単位を含むオリゴヌクレオチドの好ましい特性を実証した。三重鎖形成特性に基づいて、前記特許出願の発明者らは検出、診断および治療におけるこのオリゴヌクレオチドの使用を示唆している。これらの用途の詳細またはデータは提示されなかった。

30

【0004】

Filichevら(Filichev VV, 2005)はW0 2006/125447と同一の三重鎖形成モノマー単位について記載しており、三重鎖形成モノマー単位を組み込むことによって平行二重鎖および平行三重鎖が安定化することを見出した。さらに、同発明者らは、三重鎖形成モノマー単位がオリゴヌクレオチドに挿入されると、本来のオリゴヌクレオチドに比べてWatson-Crick型のRNA/DNAおよびDNA/DNA二重鎖が不安定化することを見出した。

【発明の概要】

【0005】

40

本発明者らは、三重鎖形成モノマー単位（本明細書ではTINAモノマーとも呼ぶ）のオリゴヌクレオチドへの組み込みは意外にもオリゴヌクレオチドに多くの好ましい特性を与えることを発見した。さらに、本発明者らは三重鎖形成モノマーを含むオリゴヌクレオチドはプライマー伸長のような酵素的操作において基質として用いることができることを発見した。

【0006】

従って、本発明の第一の局面は、式Zの少なくとも1つのTINAモノマー単位を含む長さ5～60nt（ヌクレオチド）のオリゴヌクレオチドであり、該TINAモノマーはオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも1モノマーの位置に位置付けられる。

【0007】

50

このようなオリゴヌクレオチドは様々な分子生物学の方法で用いることができる。

【0008】

従って、本発明の第二の局面は以下の工程を含む方法であって、プライマーは好ましくは本発明のオリゴヌクレオチドである：

- (a) 鋳型核酸を提供する工程、
- (b) 第一のプライマーを提供する工程、
- (c) ポリメラーゼを提供する工程、
- (d) ヌクレオチド三リン酸を提供する工程、
- (e) 工程a～dの成分を混合して、プライマーを鋳型にアニーリングさせる工程。

【0009】

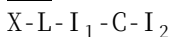
工程は、シーケンシング反応、転写反応、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、核酸配列をベースとする増幅(Nucleic Acid Sequence Based Amplification)(NASBA)、転写介在増幅(Transcription Mediated Amplification)(TMA)、鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification)(SDA)もしくはリガーゼ連鎖反応(LCR)のような核酸標的増幅法(NAT)のような分子生物学の手法の一部であってもよい。工程がNAT反応の一部である場合、NAT反応は単に鋳型核酸の標的領域を増幅するために実施され得る。または、NATは鋳型核酸の標的領域の量を調べるために定量的に実施されることがある。定量的NAT(例えば、PCR)反応は本発明のオリゴヌクレオチドであり得る検出プローブを含んでよい。

【0010】

本発明のオリゴヌクレオチドは、それらがオリゴヌクレオチドの融解温度の調節を可能にし、それらが配列特異性を高め、かつそれらが二本鎖の核酸とのフーグスティーンまたは逆フーグスティーン塩基対形成によって三重鎖を形成することができることから、有利である。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドのいくつかの態様は有用な蛍光特性を持つ。

[請求項1001]

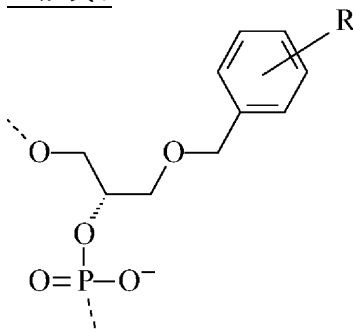
式ZのTINAモノマーを含む長さ5～60ntのオリゴヌクレオチドであって、該TINAモノマーがオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも1モノマーの位置に位置付けられ、Zが一般式：



によって表され、式中、Xがオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド類似体、またはPNAもしくはPNA類似体の骨格に組み込むことができる骨格モノマー単位であり、Lがリンカーであり、 I_1 がDNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基とコストッキング(co-stacking)することができる少なくとも一つの本質的にフラットなコンジュゲートされた系を含む第一のインターカラーター(intercalator)であり、Cが任意のコンジュゲーターであり、 I_2 がDNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基とコストッキングすることができる少なくとも1つの本質的にフラットなコンジュゲートされた系を含む第二のインターカラーターである、オリゴヌクレオチド。

[請求項1002]

Zが式：



によって表すことができ、式中、Rがアリールエチニルの群より選択される、請求項1001

記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1003]

2、3、4、5、6および7からなる群より選択される多くのTINAモノマーを含むオリゴヌクレオチドであって、該TINAモノマーがオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも1モノマーの位置に位置付けられる、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1004]

DNA単位、RNA単位、LNA単位および2'-OH-修飾単位からなる群より選択される修飾されたヌクレオチドモノマー単位をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1005]

オリゴヌクレオチドの3'末端が、近接する一続きの3デオキシヌクレオチドを含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1006]

TINAモノマー単位がオリゴヌクレオチドの5'末端から3モノマー以下の位置に位置付けられる、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1007]

制限部位をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1008]

FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、VIC(商標)、SYBR(登録商標)Green、6 FAM、HEX、TET、TAMRA、JOE、ROX、Fluorescein、Cy3、Cy5、Cy5.5、Texas Red、Rhodamine、Rhodamine Green、Rhodamine Red、6-CarboxyRhodamine 6G、Oregon Green 488、Alexa Fluor、Oregon Green 500またはOregon Green 514からなる群より選択されるフルオロフォアをさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1009]

TAMRA(商標)、Black Hole Quencher(商標)、DABCYL、BHQ-1、BHQ-2、DDQ I、DDQ IIおよびEclipse Dark Quencherからなる群より選択されるクエンチング色素をさらに含む、請求項1008記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1010]

C18スペーサー、PEGスペーサー、C9スペーサー、C7スペーサー、C6スペーサー、シクロヘキサンスペーサー、シクロオクタンスペーサー、エチレンオキサイドスペーサー、またはこれらの任意の組み合わせのような内部スペーサーを含み、かつオリゴヌクレオチドの5'末端から少なくとも3ヌクレオチドおよび3'末端から少なくとも3ヌクレオチドに位置付けられる、前記請求項のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチド。

[請求項1011]

a. 鋳型核酸を提供する工程、
b. 第一のプライマーを提供する工程、
c. ポリメラーゼを提供する工程、
d. ヌクレオチド三リン酸を提供する工程、
e. 工程a～dの成分を混合して、プライマーが鋳型にアニーリングすることを可能とする条件を提供する工程
を含む方法。

[請求項1012]

f. プライマーの伸長を可能とする条件下で、鋳型にアニーリングした第一のプライマーを伸長する工程
をさらに含む、請求項1011記載の方法。

[請求項1013]

第一のプライマーが請求項1001～1010のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチドである、請求項1011～1012のいずれか一項記載の方法。

[請求項1014]

プライマーまたはヌクレオチド三リン酸が蛍光的に標識される、請求項1011～1013のい

10

20

30

40

50

いずれか一項記載の方法。

[請求項1015]

ヌクレオチド三リン酸の画分がジデオキシヌクレオチド三リン酸である、請求項1011～1014のいずれか一項記載の方法。

[請求項1016]

g. 工程fの第一の伸長産物に相補的である第二のプライマーを提供する工程、

h. 工程fの産物を変性させる工程、

i. プライマーの伸長を可能とする条件下で、第一の伸長産物にアニーリングした第二のプライマーを伸長する工程

をさらに含む、請求項1011～1015のいずれか一項記載の方法。

10

[請求項1017]

第二のプライマーが請求項1001～1010のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチドである、請求項1016記載の方法。

[請求項1018]

変性、アニーリングおよび伸長の少なくとも10回の反復を含む、請求項1017記載の方法。

[請求項1019]

ポリメラーゼが熱安定性である、請求項1018記載の方法。

[請求項1020]

第一または第二のプライマーが、転写が介在する増幅を可能とするRNAプロモーター配列を含む、請求項1011および1013のいずれか一項記載の方法。

20

[請求項1021]

第三および第四のプライマー、ならびに等温鎖置換増幅反応を可能とする制限酵素も含む、請求項1011～1013のいずれか一項記載の方法。

[請求項1022]

反応混合物が、第一または第二の伸長産物の第一および第二のプライマー結合部位の間の領域に相補的である配列を含む検出プローブをさらに含む、請求項1016～1021のいずれか一項記載の方法。

[請求項1023]

プローブがステムループ構造を形成することができる、請求項1022記載の方法。

30

[請求項1024]

反応混合物が、第一または第二の伸長産物の第一および第二のプライマー結合部位の間の領域に相補的である第二の検出プローブをさらに含み、第一および第二のプローブが隣接する部位に塩基対を形成し、それによって一方のプローブの3'末端がもう一方のプローブの5'末端に接近する、請求項1022記載の方法。

[請求項1025]

反応混合物が、SYBR green I、SYBR green II、およびSYBR Goldのような二本鎖の特異的レポーター色素をさらに含む、請求項1011～1024のいずれか一項記載の方法。

[請求項1026]

反応混合物が、二本鎖の伸長産物と三重鎖を形成することができる三重鎖形成プローブをさらに含む、請求項1011～1025のいずれか一項記載の方法。

40

[請求項1027]

三重鎖形成プローブが、ステムループ構造を形成することができる、請求項1026記載の方法。

[請求項1028]

反応混合物が、第一の三重鎖プローブと共に形成される三重鎖に隣接して三重鎖を形成する第二の三重鎖形成プローブを含む、請求項1026記載の方法。

[請求項1029]

第一および第二の三重鎖形成プローブがリンカーによって連結される、請求項1028記載の方法。

50

[請求項1030]

第一および/または第二の三重鎖形成プローブが、請求項1001～1010のいずれか一項記載のオリゴヌクレオチドである、請求項1026～1029のいずれか一項記載の方法。

[請求項1031]

第一および/または第二の三重鎖形成プローブが、近接する一続きの少なくとも3個のピリミジンを含む、請求項1030記載の方法。

[請求項1032]

第一および/または第二の三重鎖形成プローブが、近接する一続きの少なくとも3個のプリンを含む、請求項1030記載の方法。

[請求項1033]

反応が、鋳型鎖に塩基対を形成する第一のプライマーまたは鋳型鎖に塩基対を形成する第二のプライマーと共に三重鎖を形成することができる三重鎖形成オリゴヌクレオチドをさらに含み、それによってプライマーの鋳型鎖への結合が安定化される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【図面の簡単な説明】【0011】

【図1】1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル基を含む挿入核酸モノマーの合成。

【図2】Sonogahira型修飾を含む挿入核酸モノマーの合成。(i) いずれもPd(PPh₃)₄、Cu I、DMF/Et₃N、Arを用いた8と3の反応または9と2の反応。(ii) トリス(2-アミノエチル)アミンの32% NH₄OHまたは50%エタノール性溶液、室温で2時間、続いて55℃で一晩。(iii) RP-HPLC; 80%水性AcOH、3M水性AcONa、99%EtOH。

【図3】(R)-1-0-フェニルメチルグリセロールのパラ-およびオルト-の位置への2-および4-エチニルピレンの合成、ならびにそれらのオリゴヌクレオチドへの組み込み。合成のための試薬および条件：(i) H₂ (160atm)、10% Pd/C、EtOAc、60℃、24時間；(ii) Ac₂O₂、AlCl₃、CH₂Cl₂、5℃；(iii) 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン (DDQ)、トルエン、110℃、1時間；(iv) DMF、POCl₃；(v) KOH、ジオキサン、還流、2時間。

【図4】1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル基。

【発明を実施するための形態】【0012】

発明の開示

本発明のオリゴヌクレオチド

第一の局面において、本発明は、式ZのTINAモノマーを含む長さ5～60ntのオリゴヌクレオチドを提供して、該TINAモノマーはオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも1モノマーの位置に位置付けられる。

【0013】

8～50ntの長さがより好ましく、10～40ntの長さが最も好ましい。

【0014】

三重鎖形成モノマー単位、Z

Zは次の一般的構造によって示すことができる：

X-L-I₁-C-I₂

式中、Xはオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド類似体、またはPNAもしくはPNA類似体の骨格に組み込まれることができる骨格モノマー単位であり、Lはリンカーであり、I₁はDNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基とコスタッキング (co-stacking) することができる少なくとも一つの本質的にフラットなコンジュゲート系を含む第一のインターカレーター (intercalator) であり、Cは任意のコンジュゲーターであり、I₂はDNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基とコスタッキングすることができる少なくとも一つの本質的にフラットなコンジュゲート系を含む第二のインターカレーターである。

【0015】

柔軟性の塩基スタッキングモノマー (Z) は、必須の構造的な剛性およびねじれ柔軟性

10

20

30

40

50

を提供するコンジュゲーターCによって連結される少なくとも二つの挿入系である I_1 および I_2 を含む。後者は、インターカレーターが自身を核酸らせん内部の適切な位置に調節することを助けるために重要であると考えられる。

【0016】

好ましい態様において、骨格Xを、DNA、RNA、HNA、MNA、ANA、LNA、CAN、INA、CeNA、TNA、(2'-NH)-TNA、(3'-NH)-TNA、 α -L-リボ-LNA、 α -L-キシロ-LNA、 β -D-リボ-LNA、 β -D-キシロ-LNA、[3.2.1]-LNA、バイシクロ-DNA、6-アミノ-バイシクロ-DNA、5-エピ-バイシクロ-DNA、 α -バイシクロ-DNA、トリシクロ-DNA、バイシクロ[4.3.0]-DNA、バイシクロ[3.2.1]-DNA、バイシクロ[4.3.0]アミド-DNA、 β -D-リボピラノシル-NA、 α -L-リキソピラノシル-NA、2'-R-RNA、2'-OR-RNA、2'-AE-RNA、 α -L-RNA、 β -D-RNA、ならびにそれらの組み合わせおよび修飾物のオリゴヌクレオチドに組み込むことができる。

10

【0017】

もう一つの態様において、骨格モノマー単位Xは、グリコンのような環系に部分的に含まれるアルキレンジオールを任意で持つエチレングリコールまたは1-0-メチレングリセロールのようなアルキレンジオールを含む。例えば、骨格モノマーXは、最終的には窒素、硫黄、リンおよび酸素から選択されるヘテロ原子を持つ四、五または六員環の一部であり得る。好ましくは、アルキレンジオールはオリゴヌクレオチドの隣接するモノマー単位に直接連結して、この態様において、アルキレンジオールは依然、例えばグリコンのような環系の一部であり得ることが理解されるべきである。

20

【0018】

一つの態様において、柔軟性の塩基スタッキングモノマーのリンカーLは0~60個の原子を含む。

【0019】

もう一つの態様において、Lは鎖もしくは環、またはそれらの組み合わせおよび／もしくはそれらの置換型を含む。

【0020】

さらにもう一つの態様において、Lはアルキル鎖またはオキサアルキル鎖もしくはアザアルキル鎖もしくはチアアルキル鎖、またはカルボキサミド基もしくはチオカルボキサミド基もしくはスルホンアミド基、またはそれらの組み合わせを含む。

30

【0021】

XおよびLの組み合わせは、核酸の塩基とスタッキングする能力を持つ核酸らせんの芯に I_1 -C- I_2 の挿入系を配置する系を提供する。

【0022】

柔軟性の塩基スタッキングモノマーの I_1 は、DNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基とコスタッキングすることができる少なくとも一つの本質的にフラットなコンジュゲート系を含む第一のインターカレーターである。

【0023】

一つの態様において、 I_1 は、ベンゼン、ナフタレン、アズレン、二環式芳香族複素環系およびそれらの置換型の群より任意で選択される単環式または多環式芳香族環系である。

【0024】

好ましい態様において、 I_1 は単環式または多環式芳香族複素環系の1、2の位置にLおよびCを有して位置付けられる。

40

【0025】

さらにもう一つの態様において、 I_1 は単環式または多環式芳香族複素環系の1、3の位置にLおよびCを有して位置付けられる。

【0026】

もう一つの態様において、 I_1 は単環式または多環式芳香族複素環系の1、4の位置にLおよびCを有して位置付けられる。

【0027】

より好ましい態様において、 I_1 はオルト-またはパラ-の位置にLおよびCを持つベンゼン

50

環である。

【0028】

柔軟性の塩基スタッキングモノマーのCは任意のコンジュゲーターである。Cが任意でない好ましい態様において、Cは1~12個の炭素のアルキル、2~12個の炭素のアルケニル、2~25個の炭素のアルキニルもしくはジアゾ、またはそれらの組み合わせの群から選択されて、25個以下の炭素および／または窒素原子の長さを有する。

【0029】

一つの代替となる態様において、柔軟性の塩基スタッキングモノマーはいかなるコンジュゲーターも含まない。従って、 I_1 および I_2 は、例えばコンジュゲート系を介して、直接連結され得る。

10

【0030】

もう一つの態様において、Cは、窒素、硫黄、リンおよび酸素より選択されるヘテロ原子を最終的に有する直鎖もしくは分岐鎖または単環式の芳香環およびそれらの置換型からなる群より選択される。

【0031】

さらにもう一つの態様において、Cのアルケニルはアセチレンまたは反復アセチレンである。

【0032】

好ましい態様において、リン原子を含む骨格モノマー単位Xの単位長は6原子よりも少なく、骨格単位長は一つのモノマーから次のモノマーまでの最短距離である。

20

【0033】

好ましい態様において、連結部分Lは少なくとも原子2個の長さを有し、最終的には窒素、硫黄、リンおよび酸素から選択されるヘテロ原子を有する。好ましくは、連結部分Lは原子2~10個の長さを有し、より好ましくは原子2個~5個の長さを有する。最も好ましい態様において、連結部分はXと I_1 の間に5つの結合に一致する原子3個の長さを有する。

【0034】

柔軟性の塩基スタッキングモノマーの I_2 は、DNA、RNAまたはそれらの類似体の核酸塩基とコストッキングすることができる少なくとも一つの本質的にフラットなコンジュゲート系を含む第二のインターカレーターである。

【0035】

30

好ましい態様において、 I_2 は二環式芳香族環系、三環式芳香族環系、四環式芳香族環系、五環式芳香族環系、ならびにそれらの複素環式芳香族類似体およびそれらの置換型の群より選択される。

【0036】

特定の態様において、 I_2 は1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル基またはピレンである（図4）。

【0037】

好ましい態様において、柔軟性の塩基スタッキングモノマーはオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の一部である。

【0038】

40

もう一つの好ましい態様において、柔軟性の塩基スタッキングモノマーはオリゴヌクレオチドへの組み込みのために適応される。

【0039】

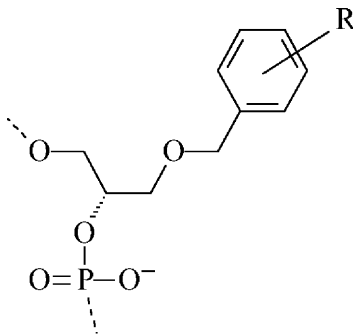
好ましい態様において、オリゴヌクレオチドへの組み込みのために適応される柔軟性の塩基スタッキングモノマーは、ホスホロアミダイト、ホスホロジアミダイト、ホスホロジエステル、ホスホロトリエステル、ホスホネート、H-ホスホネート、ホスファイト、クロロホスファイト、クロロホスホロアミタイド、ホスホンアミダイト、ホスホンクロリダイト、トリホスフェート、ジホスフェートの群より選択される。

【0040】

最も好ましい態様において、柔軟性の塩基スタッキングモノマー（Z）は次式によって

50

表すことができる：



式中、Rはアリールエチニル、ピレンエチニル、および1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル基の群より選択されて、Rはベンゼンのオルト、メタまたはパラの位置に置換され得る。より好ましくはオルトおよびパラの位置である。

【0041】

オリゴヌクレオチドの態様

本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のその他の局面および実施例から明らかであるように、様々な驚くべき有益な用途を有している。このようなオリゴヌクレオチドの主な利用法は、核酸標的増幅（例えば、PCR）または核酸シーケンシングのような分子生物学の手法におけるプライマー伸長のためである。

【0042】

好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6および7からなる群より選択される多くのTINAモノマーを含んでおり、該TINAモノマーはオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも1モノマーの位置に位置付けられる。つまり、オリゴヌクレオチドの第一のモノマーはTINAモノマーではない。

【0043】

好ましくは、TINAモノマーは互いに隣接して配置されず、即ち、それらはオリゴヌクレオチドの少なくとも1つのヌクレオチドモノマーによって隔てられる。より好ましくは、2または3ヌクレオチドモノマー単位の隔たりである。さらに好ましくは、それぞれ、1/2らせん回転または1らせん回転に対応する5もしくは6、または10、11もしくは12の隔たりである。

【0044】

ポリメラーゼは典型的には鋳型にアニーリングされるプライマーの特性を感知するので、TINAモノマーは好ましくはオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも1モノマーに位置付けられる。そうでない場合は、ポリメラーゼはオリゴヌクレオチドをプライマーと見なさない。許容可能な位置はポリメラーゼによって変化し得る。

【0045】

従って、好ましい態様において、TINAモノマーは、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも2モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも3モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも4モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも5モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも6モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも7モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも8モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも9モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも10モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも11モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも12モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも13モノマー、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも14モノマー、およびオリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも15モノマーからなる群より選択される位置に位置付けられる。

【0046】

最も好ましくは、オリゴヌクレオチドの3'末端から少なくとも6モノマーの位置である。

【0047】

もう一つの態様において、TINAモノマー単位は、オリゴヌクレオチドの5'末端から4、3、2および1モノマーのように、オリゴヌクレオチドの5'末端から5モノマー以内の位置に位置付けられる。一つの態様において、TINAモノマーはオリゴヌクレオチドの5'末端に位置する。

【0048】

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、DNA単位、RNA単位、LNA単位および2'-OH-修飾単位からなる群より選択されるモノマー単位をさらに含む。理解されるように、モノマー単位という用語はオリゴヌクレオチドの反復単位、つまり典型的にはヌクレオチドに関して用いられる。モノマー単位はPNAモノマー（ペプチド核酸モノマー）でもあり得る。

10

【0049】

LNAモノマー、PNAモノマーまたは2-OH-修飾単位のような非天然のモノマー単位の組み込みは、相補性の鋳型鎖にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの融解温度を高めるために望ましい場合がある。いくつかのモノマー単位は、相補性の鋳型鎖にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの融解温度を下げるためにも使用することができる。オリゴヌクレオチドが細胞抽出物中で用いられる場合、修飾モノマー単位はオリゴヌクレオチドの酵素的分解を阻止または抑制するために用いることもできる。

【0050】

好ましい態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは修飾されていないいかなるRNAモノマー単位も含まない。オリゴヌクレオチドにおけるRNAモノマー単位の存在はしばしば安定性を低下させ、即ち、オリゴヌクレオチドはヌクレオチド溶解性の分解をより受け易くなる。

20

【0051】

一つの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドは、重合の適切な開始を保証する3'末端に近接する一続きの3個のデオキシヌクレオチドを含む。これは、いくつかのDNAおよびRNAポリメラーゼがプライマーの3'領域末端にDNAモノマーの必要性を有しているので、望ましい。しかし、大半のポリメラーゼはこの必要性を有さない。

【0052】

本発明のオリゴヌクレオチドは制限部位を含み得る。制限は、制限酵素がオリゴヌクレオチドを開裂することを可能とする配列である。典型的には、制限配列は回文構造であり、典型的に制限酵素は二本鎖の核酸を開裂して、そのため、オリゴヌクレオチドは制限消化のために相補的なオリゴヌクレオチドに対して塩基対を形成しなければならない。いくつかの制限酵素は一本鎖の核酸も消化することができる。例示的な制限酵素は、EcoRI、BamHI、およびXhoIである。本発明のオリゴヌクレオチドがポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）において用いられる場合、PCR産物のクローニングを促進するために本発明のオリゴヌクレオチドに制限部位が組み込まれ得る。制限部位は通常、オリゴヌクレオチドの5'末端に存在する。

30

【0053】

標識

本発明のオリゴヌクレオチドはレポーター色素を含むことができる。好ましくは、レポーター色素は、FAM（商標）、TET（商標）、JOE（商標）、VIC（商標）、SYBR（登録商標）Green、6 FAM、HEX、TET、TAMRA、JOE、ROX、Fluorescein、Cy3、Cy5、Cy5.5、Texas Red、Rhodamine、Rhodamine Green、Rhodamine Red、6-CarboxyRhodamine 6G、Alexa Fluor、Oregon Green 488、Oregon Green 500およびOregon Green 514からなる群より選択される。

40

【0054】

好ましくは、オリゴヌクレオチドはクエンチング色素も含む。好ましい態様において、クエンチング色素は、TAMRA（商標）、Black Hole Quencher（商標）、DABCYL、BHQ-1、BHQ-2、DDQ I、DDQ IIおよびEclipse Dark Quencherからなる群より選択される。

50

【0055】

レポーターおよびクエンチング色素の使用は、本発明のオリゴヌクレオチドがプライマーとして用いられる場合および本発明のオリゴヌクレオチドがNAT過程中または過程後に検出プローブとして用いられる場合のいずれも、様々な種類の定量を可能とするので、望ましい。

【0056】

典型的には、レポーター色素およびクエンチャー色素は本発明のオリゴヌクレオチドにおいて互いに近くに位置付けられて、レポーターによって放出されるレーザーに誘起される蛍光がクエンチャー色素によってクエンチングされることを可能とする。オリゴヌクレオチドが相補性の鋳型鎖に結合すると、レポーター色素およびクエンチャー色素は互いに分離して、クエンチャーはレポーターからのシグナルをもはやクエンチングしない。

10

【0057】

従って、一つの態様において、オリゴヌクレオチドはステムループ構造を形成することができ、クエンチャーおよびレポーター色素がステム内で接近する。一つの態様において、オリゴヌクレオチドはいわゆる分子ビーコンである。分子ビーコンが鋳型鎖と塩基対を形成すると、クエンチャーおよびレポーターはもはや近位ではない。従って、レポーター色素からのレーザーに誘起されるシグナルはもはやクエンチングされない。もう一つの態様において、オリゴヌクレオチドはいわゆるスコープオリゴヌクレオチドである。スコープオリゴヌクレオチドは、プライマーが伸長すると改めて折り畳まれるステムループを含む。それによって、レポーター色素およびクエンチャー色素はもはや至近距離ではなく、レポーター色素からのシグナルはもはやクエンチングされない。

20

【0058】

一つの代替となる態様において、レポーター色素およびクエンチャー色素は2つの異なるオリゴヌクレオチド上に存在する。この態様において、2つのオリゴヌクレオチドが鋳型鎖上の隣接した部位に塩基対を形成すると、レポーターおよびクエンチャー色素は接近する。好ましくは、2つのオリゴヌクレオチドは3ヌクレオチド以下まで分離する。

【0059】

さらにもう一つの態様において、オリゴヌクレオチドはいわゆるtaqmanプローブである。taqmanプローブは鋳型核酸の2つのプライマー結合部位の間の領域に相補性であり、従って、この領域に塩基対を形成する。ポリメラーゼがプライマーを伸長すると、それはtaqmanプローブに遭遇して、5-3'エキソヌクレアーゼ活性を介してtaqmanプローブを消化する。それによって、taqmanプローブのレポーターおよびクエンチャー色素は互いに分離する。

30

【0060】

レポーター色素およびクエンチャー色素を使用する代わりに、供与体フルオロフォアおよび受容体フルオロフォアを含むいわゆるFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）ペアを用いることができる。供与体フルオロフォアが外部光源によって励起されると、それは受容体フルオロフォアを励起させる波長の光を発して、今度はそれが検出および測定されることができる異なる波長の光を発する。供与体フルオロフォアおよび受容体フルオロフォアが至近距離であれば、エネルギーは許容体から受容体に移動するだけである。

40

【0061】

好ましいFRETペアには、BFP-YFP、CFP-YFP、GFP-DsRed、GFP-Cy3、GFP-mOrange、YFP-RFP、FAM-ROX、FAM-Cy5、FAM-Hex、FAM-TAMRAおよびCy3-Cy5が含まれる。

【0062】

さらにもう一つの態様において、本発明のオリゴヌクレオチドはT7 RNAポリメラーゼプロモーター配列、T3 RNAポリメラーゼプロモーター配列またはSP6 RNAポリメラーゼプロモーター配列などのRNAプロモーター配列を含む。このようなオリゴヌクレオチドは、それが相補性の鋳型鎖にハイブリダイズしてRNAポリメラーゼが介在する鋳型鎖のRNA転写を方向付けることができるので、関心対象である。従って、オリゴヌクレオチドは転写介在増幅（TMA）に用いることができる。

50

【0063】

本発明の方法

本発明の第二の局面は次の工程を含む方法である：

- a. 鋳型核酸を提供する工程、
- b. 第一のプライマーを提供する工程、
- c. ポリメラーゼを提供する工程、
- d. ヌクレオチド三リン酸を提供する工程、
- e. 工程a～dの成分を混合して、プライマーが鋳型にアニーリングすることを可能とする条件を提供する工程。

【0064】

10

好ましくは、第一の局面の態様において記載したように、第一のプライマーはオリゴヌクレオチドである。明らかなように、第二の局面の方法の様々な態様が第一の局面において記載されるオリゴヌクレオチドの異なる態様を必要とするまたは必要とし得る。

【0065】

好ましい態様において、方法は次の工程をさらに含む：

- f. プライマーの伸長を可能とする条件下で、鋳型にアニーリングした第一のプライマーを伸長する工程。

【0066】

以下により詳細に記載される代替となる態様において、プライマーは伸長されない。その代わり、鋳型核酸に塩基対を形成したプライマーはRNA転写を可能とする。従って、プライマーはRNAポリメラーゼプロモーター配列を含む。

20

【0067】

核酸のシーケンシング

好ましい態様において、プライマーは蛍光的に標識される。

【0068】

もう一つの態様において、ヌクレオチド三リン酸の画分はジデオキシヌクレオチド三リン酸からなる。好ましい態様において、含まれるジデオキシヌクレオチド三リン酸は、好ましくは異なる蛍光標識で蛍光的に標識される。当業者が認識するように、蛍光プライマーまたは蛍光的に標識されたジデオキシヌクレオチドの使用は核酸のシーケンシングにおいて有用である。

30

【0069】

関連する態様において、このような標識はピロシーケンシングにとっては不要であるので、プライマーもジデオキシヌクレオチドも蛍光的に標識されない。

【0070】

標的増幅

好ましい態様において、方法は次の工程をさらに含む：

- g. 工程fの第一の伸長産物に相補的である第二のプライマーを提供する工程、
- h. 工程fの産物を変性させる工程、
- i. プライマーの伸長を可能とする条件下で、第一の伸長産物にアニーリングした第二のプライマーを伸長する工程。

40

【0071】

従って、工程g～iは第二の鎖の合成と呼ぶこともできる。

【0072】

一つの態様において、鋳型核酸はRNAであり、そのため、ポリメラーゼは逆転写酵素である。

【0073】

好ましい態様において、第二のプライマーは本発明のオリゴヌクレオチドであり、さらにもう一つの態様において、第一および第二の双方のプライマーが本発明のオリゴヌクレオチドである。

【0074】

50

変性、アニーリングおよび伸長の工程が反復される場合、このようなサイクルは標的配列の増幅を可能とし、かつPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）として認識される。

【0075】

好ましくは、変性、アニーリングおよび伸長の少なくとも10回の反復が実施される。典型的には、30～45回のサイクルが実施される。

【0076】

温度を循環させる場合はポリメラーゼが熱安定性であることが重要である。そうでない場合は、ポリメラーゼは各変性工程の後に加えられなければならない。

【0077】

転写介在増幅（TMA）

10

前記のように、本発明の一つの態様は転写を伴う。従って、第一または第二のプライマーは転写を可能とするRNAプロモーター配列を含む。鋳型核酸はDNAまたはRNAいずれであってもよい。鋳型がRNAである場合は、第一の鎖の合成に逆転写酵素が用いられる。第一の鎖の合成の後、二本鎖のプロモーター配列を作製するために第二の鎖の合成が行われ得る。または、二本鎖のプロモーター配列は第一のプライマーのRNAプロモーター配列に相補性のオリゴヌクレオチドを加えることによって作製することもできる。

【0078】

鎖置換増幅（SDA）

好ましい態様において、NATの過程は等温鎖置換増幅反応である。この態様において、方法は、第三および第四のプライマーならびに制限酵素も含む。第三および第四のプライマーは、インナープライマー（第一および第二のプライマー）の伸長産物を置換するために用いられる、いわゆるバンパープライマーである。インナープライマーの伸長産物が鋳型鎖から外れると、それらは伸長のためにもう一つの（インナー）プライマーを結合することができる。このプライマーが伸長されると、二本鎖の産物の一方の鎖が制限酵素によってニックを入れられる。インナープライマーが制限部位を含むので、ニックングが可能となる。しかし、プライマーにおける修飾の存在のため、または伸長産物が制限酵素の元々のプライマー（修飾されていないヌクレオチドを含む）の開裂のみを可能とする修飾されたヌクレオチド（例えば、dCTP α S）を含むために、鎖の一方のみが開裂する。修飾は、例えば、ホスホロチオエート結合であり得る。この方法では、指数関数的な等温核酸増幅が可能である。プライマーの1、2、3または4は本発明のオリゴヌクレオチドであり得る。

20

30

【0079】

好ましい態様において、4つのすべてのプライマーが本発明のオリゴヌクレオチドである。

【0080】

リガーゼ連鎖反応（LCR）

リガーゼ連鎖反応（LCR）はPCRに類似したDNA増幅の方法である。LCRは、それがヌクレオチドの重合を介して単位複製配列を産生するのではなくプローブ分子を増幅するので、PCRとは異なる。単一のプローブを形成するために、各々のDNA鎖に対して2つのプローブが用いられて互いにライゲーションされる。LCRは、反応を進めるためにDNAポリメラーゼ酵素およびDNAリガーゼ酵素の双方を用いる。PCR同様、LCRは反応を進めるためにサーマルサイ클ラーを必要として、各サイクルの結果、標的核酸分子が倍加する。LCRはPCRよりも高い特異性を有することができる。

40

【0081】

LCRという用語は、従来のLCR、ギャップLCR、非対称性ギャップLCR、およびそれらの変異型を網羅する。

【0082】

一つの態様において、DNA鎖についてLCRプローブの一つの少なくとも一つは本発明のオリゴヌクレオチドである。

【0083】

50

本発明の特定の態様において、4つのLCRプローブが本発明のオリゴヌクレオチドである。

【0084】

定量的PCR

定量的PCR (qPCR) を実施する方法を提供することは本発明の目的である。従って、一つの態様において、反応混合物は、第一もしくは第二の伸長産物の第一および第二のプライマー結合部位の間の領域、または第一もしくは第二のプライマー結合部位に相補的である配列を含む検出プローブをさらに含む。

【0085】

好ましい態様において、プローブはポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレオリティック (exonucleolytic) な活性によって消化される二重標識プローブである。このようなプローブはしばしばTaqmanプローブと呼ばれる。前記のように、プローブの標識は典型的にはレポーター色素およびクエンチャー色素である。従って、双方の標識が同一プローブ上に存在する場合、クエンチャー色素はレポーター色素からのシグナルをクエンチングする。プローブが消化されると、レポーター色素からのシグナルはもはやクエンチングされない。従って、レポーター色素からのシグナルは反応における鋳型鎖の量に相関する。つまり、シグナルは増幅反応の経過を追跡するために用いることができる。

【0086】

もう一つの態様において、プローブはステムループ構造を形成することができる。同じく前記の通り、レポーター色素およびクエンチャー色素は、クエンチャーがレポーター色素からのシグナルをクエンチングするようにステム内に位置付けることができる。プローブが鋳型鎖に塩基対を形成するとレポーター色素およびクエンチャー色素は分離されて、そのためにレポーター色素からのシグナルはもはやクエンチングされない。このようなプローブはしばしば分子ビーコンと呼ばれる。

【0087】

関連するタイプのプローブはいわゆるスコーピオンプローブである。これらのプローブは実際にプライマーとして機能して、それらは伸長されると再び折り畳まれて、それによってクエンチャー色素はレポーター色素から分離される。従って、本発明の方法の第一または第二のプライマーはqPCRを促進するためのスコーピオンプローブであり得る。

【0088】

鋳型鎖にプローブのレポーター色素およびクエンチャー色素の分離を引き起こさせるもう一つの選択肢として、鋳型鎖はそれらを近接させてもよい。このような態様において、標識は2つの別々のプローブに位置付けることができる。従って、好ましい態様において、反応混合物は、第一または第二の伸長産物の第一および第二のプライマー結合部位の間の領域に相補的である第二のプローブをさらに含んで、第一および第二のプローブは隣接した部位に塩基対を形成して、それによって一方のプローブの3'末端がもう一方のプローブの5'末端に接近する。

【0089】

前記の通り、レポーター色素およびクエンチャー色素を使用する代わりに、供与体フルオロフォアおよび受容体フルオロフォアを含むいわゆるFRET (蛍光共鳴エネルギー移動) ペアを用いてもよい。

【0090】

前記の任意の検出プローブが本発明のオリゴヌクレオチドであり得、従って、Z単位を含む。

【0091】

PCR反応の産物を検出するためにプローブを用いる代わりに、二本鎖の特異的なレポーター色素を用いることもできる。従って、好ましい態様において、反応混合物は、SYBR green I、SYBR green IIおよびSYBR Goldのような二本鎖の特異的なレポーター色素をさらに含む。

【0092】

三重鎖検出プローブ

好ましい態様において、反応混合物は、伸長産物（例えば、PCR産物）と共に三重鎖を形成することができる三重鎖形成プローブ（TF0）をさらに含む。三重鎖形成プローブがZモノマー単位を含む場合、三重鎖の形成はレーザー／外部光源に励起される発光によって直接測定され得る。

【0093】

しかし、FRETペアを含む上記の任意のレポーター色素の系を三重鎖形成検出プローブと関連付けて用いてもよい。従って、好ましい態様において、三重鎖形成プローブは分子ビーカーに類似してステムループ構造を形成することができる。

【0094】

さらに前記の検出プローブに類似して、反応混合物は、第一の三重鎖プローブを用いて形成された三重鎖に隣接して三重鎖を形成する第二の三重鎖形成プローブを含んでもよい。好ましくは、第一および第二の三重鎖形成プローブは、それぞれ、レポーター色素およびクエンチャー色素を含む。または、それらは好ましくはFRETペアを含む。

【0095】

二つの三重鎖形成プローブは、C18リンカー、PEGリンカー、C9、C7、C6、シクロヘキサン、シクロオクタン、エチレンオキサイドまたはそれらの任意の組み合わせのようなリンカーによって連結され得る。

【0096】

もう一つの態様において、三重鎖の形成は二つの分離したオリゴヌクレオチド検出プローブおよび一本鎖の伸長産物によって達成される。一つのオリゴヌクレオチド検出プローブは第一または第二のいずれかのプライマーからの一本鎖の伸長産物と共に逆平行の二本鎖を形成して、第二のオリゴヌクレオチド検出プローブは一本鎖の伸長産物および第一のオリゴヌクレオチド検出プローブからなる逆平行二重鎖と共に平行三重鎖を形成する。

【0097】

さらにもう一つの態様において、TF0は01-L-02としてデザインされ、01および02はオリゴヌクレオチドであり、Lは01および02の間のリンカー（例えば、前記のような）である。01は、第一または第二のいずれかのプライマーからの一本鎖の伸長産物と共に逆平行二重鎖を形成して、02は逆平行二重鎖上で折り返して平行三重鎖を形成する。

【0098】

さらにもう一つの態様において、TF0は二本鎖の伸長産物と共に平行三重鎖を形成する。

【0099】

前記の任意の検出プローブが本発明のオリゴヌクレオチドであり得、従って、相補性の配列に塩基対を形成する検出プローブの配列特異性の向上または融解温度の上昇のために式ZのTINAモノマーを含む。一つの態様において、TINAモノマーは検出プローブの融解温度を下げるために用いることができる。

【0100】

検出プローブが三重鎖形成プローブである場合、それは近接する一続きの少なくとも3個のピリミジン、好ましくは15個以下のピリミジンを含むことが好ましい。もう一つの好ましい態様において、検出プローブは、近接する一続きの少なくとも3個のプリン、および好ましくは15個以下のプリンを含む。

【0101】

プライマーアニーリングの三重鎖安定化

NATに関する一つの好ましい態様において、反応は、鋳型鎖と塩基対を形成する第一のプライマーまたは鋳型鎖と塩基対を形成する第二のプライマーと共に三重鎖を形成することができる三重鎖形成オリゴヌクレオチドをさらに含む。

【0102】

従って、三重鎖形成オリゴヌクレオチドはプライマーおよび鋳型の間の塩基対形成を安定化させる。

10

20

30

40

50

【0103】

好ましい態様において、プライマーの3'末端は三重鎖の形成に関与しない多くのヌクレオチドを有し、該数は少なくとも5ヌクレオチド、少なくとも7ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも13ヌクレオチド、および少なくとも16ヌクレオチドからなる群より選択される。

【0104】

もう一つの好ましい態様において、三重鎖の形成に関与しないヌクレオチドの数は3以上25nt以下であり、好ましくは5以上20nt以下であり、より好ましくは7以上18nt以下である。

【0105】

プライマーおよびTF0を用いることのもう一つの選択肢として、双方の官能基が同一のオリゴヌクレオチドに含まれてもよい。従って、オリゴヌクレオチドの第一の部分は鋳型核酸と逆平行の二重鎖を形成して、オリゴヌクレオチドの第二の部分は折り重なって三重鎖を形成する。好ましくは、オリゴヌクレオチドの第一の部分はオリゴヌクレオチドの3'末端を含む。このオリゴヌクレオチドは式01-L-02を有し得、01および02はオリゴヌクレオチドであり、Lは01および02の間のリンカーである。

【0106】

参照文献

Filichev VV, P. E. (2005). Stable and selective formation of hoogsteen-type triplexes and duplexes using twisted intercalating nucleic acids (TINA) prepared via postsynthetic Sonogashira solid-phase coupling reactions. *J Am Chem Soc*, Oct 26;127(42):14849-58.

Osman A.M.A. et al. Using an aryl phenanthroimidazole moiety as a conjugated flexible intercalator to improve the hybridization efficiency of a triplex-forming oligonucleotide. *Bioorg Med Chem*. 2008 Dec 1;16(23):9937-47. Epub 2008 Oct 17.

Filichev VV. et al. 1-, 2-, and 4-ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids: structure, thermal stability, and fluorescence relationship. *Chemistry*. 2008;14(32):9968-80.

Géci I et al. Synthesis of twisted intercalating nucleic acids possessing acridine derivatives. Thermal stability studies. *Bioconjug Chem*. 2006 Jul-Aug;17(4):950-7.

【実施例】

【0107】

実施例1

捻れた挿入核酸 (TINA) は驚くべきことにPCRにおいてTaおよび Δ Taを増加させる緒言：

捻れた挿入核酸 (TINA) はフーフスティーン三重鎖DNAを安定化させるためにデザインされたインターカレーターであるが、特別な条件下では意外にもWatson-Crickの逆平行二重鎖の構成を安定させることもできる。予想はされなかったが、TINA-DNAプライマーが、任意のPCR反応またはその変異型 (例えば、古典的な (「エンドポイント」) の) 定性的PCR / RT-PCR、古典的な (「エンドポイント」) の) 定量的PCR / RT-PCR、リアルタイム定性的P

10

20

30

40

50

CR/RT-PCR、リアルタイム定量的PCR/RT-PCR) のアニーリング温度 (T_a) およびデルタ T_a (ΔT_a) を上昇させることもできるかどうかを調べるために計画された。 T_a および ΔT_a におけるこの上昇の効果は二倍である： T_a の上昇は単独ではPCRプライマーのアニーリングの全般的な可能性を非特異的に下げて、 ΔT_a の上昇は同様に非特異的な結合の可能性を下げる。この特異的なプライマーのアニーリングの増加は所与のアッセイの全体の特異性を高めるために利用することができる。または、プライマーアニーリングのストリンジェンシーを「緩和する」ことによって、TINA-DNAを用いない同一のアッセイに比べて特異性を損なうことなく感度の向上を達成することができる。同様に、リアルタイムPCR反応における内部プローブに関して、 T_a の上昇は単独でPCRプローブのアニーリングの全般的な可能性を非特異的に下げて、 ΔT_a の上昇は同様に非特異的な結合の可能性を下げる。

10

【0108】

材料および方法：

逆平行二重鎖DNA/TINA-DNAプライマーPCR：

モデルPCRの系として、Section for Molecular Biology, Department of Clinical Microbiology, Hvidovre Hospital, Copenhagen Denmarkにおける内部陽性対照の系が選択された。アザラシのアルファヘルペスウイルスであるアザラシヘルペスウイルス1 (PhHV-1) に由来する核酸は次のように抽出された：ウイルス培養懸濁液 200ulは、「Total NA Serum Plasma Blood」プロトコルを用いて、製造業者の取り扱い説明書に従ってMagNA Pure LC装置 (Roche、カタログ番号12236931001) をMagNA Pure LC Total Nucleic Isolation Kit (Roche、カタログ番号 03038505001) と組み合わせて使用して精製した。(簡潔に記載すると、試料の材料を試料カートリッジのウェルに適用する一溶解/結合緩衝液を試料に加えて、完全な細胞溶解および核酸の遊離を得る一ヌクレアーゼを変性させる一プロテイナーゼKを試料に加えて、タンパク質を消化する一溶解/結合緩衝液の攪乱性の塩条件、イソプロパノールおよび高イオン強度のために、核酸は加えたMGPのシリカ表面に結合する一結合した核酸を有するMGPを残りの溶解試料から磁氣的に分離する一タンパク質 (ヌクレアーゼ)、細胞膜、ヘパリンまたはヘモグロビンなどのPCR阻害物質のような未結合の物質を除去するため、および攪乱性の塩濃度を下げるために、結合した核酸を有するMGPを洗浄緩衝液で繰り返し洗う一改めて、結合した全核酸を有するMGPを残余試料細片を含む洗浄緩衝液から磁氣的に分離する一精製された核酸は溶出カートリッジのウェルにおいてMGPから70°Cで溶出して、MGPは反応チップに保持されて廃棄される)。精製された核酸は、約300,000ウイルスコピー/mlの濃度に相当する液量100 μ lに溶出した。

20

30

【0109】

1. DNA-PCR：

まず、PhHV-1の3,000コピー、ならびに2つのプライマー (プライマー1：

5'GGGCGAATCACAGATTGAATCT3' (SEQ ID NO: 1)

プライマー2：

5'GCGGTTCCAAACGTACCAA3' , (SEQ ID NO: 2)

) の異なる濃度、 $MgCl_2$ 、およびTaqポリメラーゼを用いて最適化を実施した。最適PCR変数を選択した後、Eppendorf MasterCyclerグラジエントサーモサイクラーを用いて次のPCRパラメータで最高アニーリング温度 (T_a) を特定した：94°Cにて30秒間の42サイクル、2分間かけて60~72°Cの温度勾配、その後、50 μ l PCR産物の7.5 μ lを4%アガロースゲル上で3V/cmにて30分間、電気泳動により可視化。その後、一点の点突然変異プライマーを構築して (MutPrimer 1：

40

5'GGGCGAATCACAGATTGAGTCT3' , (SEQ ID NO: 3)

MutPrimer 2：

5'GCGGTTCCAAACGTATCAA3' , (SEQ ID NO: 4)

50

太文字＝突然変異）、突然変異における ΔT_a を求めた。

【0 1 1 0】

2. TINA-PCR：

前記のように古典的なDNA-PCRに最適なPCR条件を用いて、5'TINA-DNAプライマー（TINA修飾プライマー1：

5'XGGGCGAATCACAGATTGAATCT3'，(SEQ ID NO: 5)

TINA修飾プライマー2：

5'XGCGGTTCCAAACGTACCAA3'，(SEQ ID NO: 6)

-X=TINA）における最高 T_a を測定した。続いて、一点の点突然変異プライマーを構築して（TINA修飾MutPrimer 1：

5'XGGGCGAATCACAGATTGAGTCT3'，(SEQ ID NO: 7)

TINA修飾MutPrimer 2：

5'XGCGGTTCCAAACGTATCAA3'，(SEQ ID NO: 8)

-X=TINA、太字＝突然変異）、突然変異の ΔT_a を求めた。

【0 1 1 1】

結果：

最適PCR条件：

アガロースゲル電気泳動の強度によって、50 μ l 反応液量におけるPhHV-1 PCR反応のために次の変数の組み合わせが選択された：1×TaqMan Buffer A (Applied Biosystems)、3.5mM $MgCl_2$ 、200 μ M 各dNTP、1U/50 μ l AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)。

【0 1 1 2】

Taおよび ΔT_a ：

逆平行二重鎖PCR：

DNAプライマーの最高 T_a は66.5℃であり、突然変異における ΔT_a は1.6℃であった。TINA-DNAプライマーにおける最高 T_a は71.6℃であり、突然変異における ΔT_a は3.5℃であった。

【0 1 1 3】

結論：

逆平行二重鎖PCR：

TINAの組み込みは最高 T_a を5.1℃（66.5℃から71.6℃へ）上昇させて、一点の突然変異における ΔT_a は1.9℃（1.6℃から3.5℃へ）上昇した。

【0 1 1 4】

実施例2

1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル基を含む挿入核酸モノマーの合成

挿入核酸モノマー（6a、b）の合成経路を図1に示す。主な中間体3a、bは、(S)-2-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-イル)エタノール（1）から、Mitsunobuの条件32（DEAD、T HF、およびPh3P）において4-ヒドロキシベンズアルデヒド（2a）または4-ヒドロキシ-1-ナフタルデヒド（2b）との反応によって、それぞれ、81%および92%の高い収率で合成された（図1）。フェナントレン-9,10-ジオン（4）および熱水酢酸中酢酸アンモニウムを用いた3a、bのその後の処理によってモノマー6a、bが得られた。3aから開始した場合は、産物の混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離されて、脱保護された(S)-4-(4-(1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル)フェノキシ)ブタン-1,2-ジオール（6a）が72%の収率で得られて、対応する微量のジオール（5）は依然、イソプロピリデン基で保護されていた。イミダゾールプロトンの交換のために、（5）の1H NMRスペクトルにはラインの広幅化が観察された。この結果、C-4およびC-11の位置でフェナントレン環の隣接するプロトンの幅広の一重線が得られた。対応する化合物である(S)-4-(4-(1H

10

20

30

40

50

-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル)ナフアレ-1-イロキシ)ブタン-1,2-ジオール (6b) が、クロマトグラフによる精製を行うことなく80%の収率で沈殿によって完全に脱保護されて単離された。化合物 (6a, b) の第一級ヒドロキシ基は、N₂大気下において室温で無水ピリジン中の4,4'-ジメトキシトリチルクロライド (DMT-Cl) との反応によって保護された。シリカゲル精製によって、DMT保護された化合物7a, bが、それぞれ、79%および56%の収率で得られた。これらの化合物の第二級ヒドロキシ基は、無水CH₂Cl₂中において活性化剤であるジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドの存在下で、2-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピルホスホロジアミダイトを用いて一晩ホスフィチル化して、8a, bがそれぞれ86%および81%の収率で得られた (図1)。

【0115】

1H-フェナントロ[9,10-d]イミダゾール-2-イル基を含む挿入核酸モノマーの合成はOsmann (Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008) において見出すことができる。

【0116】

実施例3

Sonogashira型修飾を含む挿入核酸モノマーの合成

固相上での合成後のSonogashira型修飾のために、中央および5'末端に(R)-1-0-(4-ヨードベンジル)グリセロール (8) または(R)-1-0-(4-エチニルベンジル)グリセロール (9) の挿入を有するONを用いた。DMT-onのON 8または9を有するCPG支持体は、それぞれ、エチニルアクリジン3またはヨードアクリジン2を有する新たに調製したSonogashiraカップリング試薬で処理した (図2)。いずれの場合も、固相支持体上に同一の産物10が得られた。しかし、化合物9の調製が容易であるので、方法Bが好ましい。新たに調製したSonogashira混合物を用いたCPG結合オリゴヌクレオチドの二重処理がカップリング効率を高めることは既に調べられている。

【0117】

Sonogashira型修飾を含む挿入核酸モノマーの合成はGecir (Bioconjugate Chem, 2006) において考察されている。

【0118】

実施例4

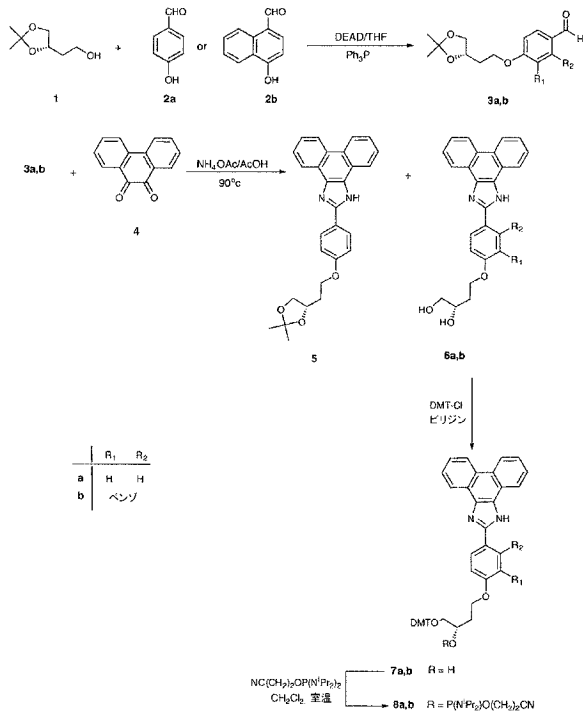
2-および4-エチニルピレンの合成、ならびにオリゴヌクレオチドへのそれらの組み込み

2-および4-置換型のピレンは、ピレン (図3の8) の求電子置換が電子豊富な1の位置を指向するため、容易には得られない。2および4の位置で置換されたピレン誘導体は、求電子置換およびその後の芳香族化によって、それぞれ、4,5,9,10-テトラヒドロピレン (9) および1,2,3,6,7,8-ヘキサヒドロピレン (10) から調製することができる。10は市販されているが、それはかなり高価である。テトラヒドロピレン (9) は、シリカ上でのカラムクロマトグラフィーによって精製するか、または反応前にRaneyニッケル上で硫黄を除去しなければならない市販のピレンのPd/C水素化分解によって調製することができる。Raneyニッケルによって硫黄を除去したピレンの水素化分解からは、9および10の混合物が得られる (図3)。混合物は、酸化アルミニウム上でのクロマトグラフィーによって容易に分離することができる。化合物9および10は、連続したアセチル化、芳香族化、Vilsmeier-Haack-Arnoldトランスフォーメーション、およびBodendorf断片化を用いることによって、対応する2-エチニルピレン (11) および4-エチニルピレン (12) に転換される。

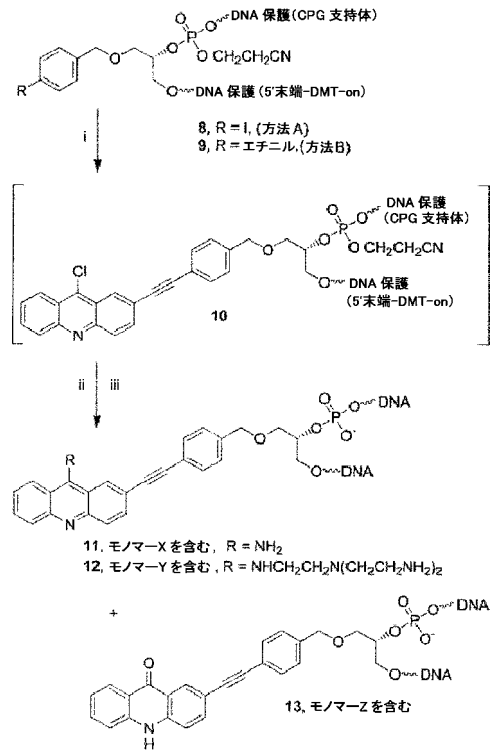
【0119】

(R)-1-0-フェニルメチルグリセロールのパラ-およびオルト-の位置への2-および4-エチニルピレンの合成、ならびにオリゴヌクレオチドへのそれらの組み込みに関するより詳細な考察はFilichevら (Chem. Eur. J, 2008) に見出すことができる。

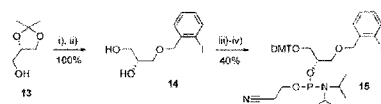
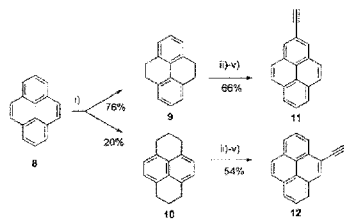
【図 1】



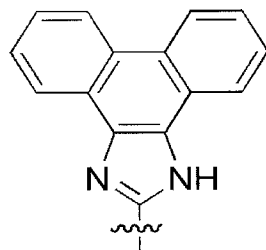
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0005285090000001.app

0005285090000002.xml

フロントページの続き

- (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 リスビー ゴルム
デンマーク王国 ベクソ ジーランド ブロンステッド 319

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 国際公開第2006/125447 (WO, A2)
国際公開第2006/112818 (WO, A2)
Nucleic acids research. 2008 Jun(Epub 2008 May), Vol.36, No.10, p.3494-3507
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq