

(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2015-530113

(P2015-530113A)

(43) 公表日 平成27年10月15日(2015. 10. 15)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)** C 1 2 Q 1/68 Z N A 4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

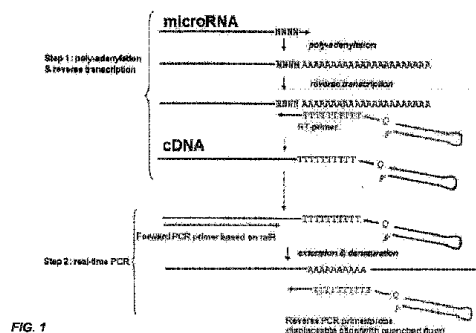
(21) 出願番号	特願2015-534628 (P2015-534628)	(71) 出願人	504019928 セファイド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニー ベイル カリビアン ドライブ 904
(86) (22) 出願日	平成25年9月25日 (2013. 9. 25)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月22日 (2015. 5. 22)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/061743	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(87) 国際公開番号	W02014/052487	(72) 発明者	ラッセル・ヒグチ アメリカ合衆国・カリフォルニア・940 89・サニーベール・カリビアン・ドライ ヴ・904
(87) 国際公開日	平成26年4月3日 (2014. 4. 3)		
(31) 優先権主張番号	61/707, 670		
(32) 優先日	平成24年9月28日 (2012. 9. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロRNA多重アッセイのための2プライマーPCR

## (57) 【要約】

本発明は、試料における特定のRNA分子を増幅するための方法であって、前記方法が、(a)試料におけるRNA分子にポリ(リボヌクレオチド)配列を付加する工程;(b)前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含むリバースプライマーを用いて、ポリアデニル化RNA分子を逆転写する工程;ならびに(c)同じリバースプライマー、および検出されるべきRNA分子に特異的なフォワードプライマーを用いて、cDNA分子を増幅および検出する工程を含み、フォワードプライマーおよびリバースプライマーの少なくとも1つがヘアピンプライマーを含む、方法を提供する。本発明はまた、この方法を実施するのに有用なキットを提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料における特定のRNA分子を増幅するための方法であって、前記方法が、

(a) 試料におけるRNA分子にポリ(リボヌクレオチド)配列を付加する工程；

(b) 前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含むリバースプライマーを用いて、ポリ(リボヌクレオチド)-RNA分子を逆転写する工程；ならびに

(c) 同じリバースプライマー、および検出されるべきRNA分子に特異的なフォワードプライマーを用いて、cDNA分子を増幅および検出する工程を含み、

フォワードプライマーおよびリバースプライマーの少なくとも1つが、

(i) 検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列および/または前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列；

(ii) 第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列；

(iii) 第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー；

(iv) 第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列；ならびに

(v) デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を含むヘアピンプライマーを含み、

リバースプライマーがヘアピンプライマーを含む場合、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、前記ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する、方法。

**【請求項 2】**

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加がポリアデニル化を含み、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列がオリゴ(dT)配列を含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加がポリウリジニル化を含み、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列がオリゴ(dA)配列を含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 4】**

リバースプライマーが、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列の3'末端において、検出されるべきRNA分子に特異的なヌクレオチド配列を追加として含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

フォワードプライマーがヘアピンプライマーを含み、リバースプライマーがヘアピンプライマーを含まない、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

リバースプライマーがヘアピンプライマーを含み、フォワードプライマーがヘアピンプライマーを含まない、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

少なくとも2個の特定のRNA分子に対応するcDNA分子が、検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である2つの異なるプライマー対を用いる多重増幅反応において増幅および検出される、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

少なくとも1つのプライマー対がヘアピンプライマーを含む、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の特定のRNA分子に対応するcDNA分子が、単一の多重反応において増幅および検出される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

方法に用いられる各プライマー対が、ヘアピンプライマーを含み、かつ検出されるべき各RNA分子に特異的である、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 1】

特定のRNA分子が非コードRNAを含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

非コードRNAが、核内低分子RNA(snRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、一時的低分子RNA(stRNA)、アンチジーンRNA(agRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、およびPiwi相互作用RNA(piRNA)からなる群から選択される、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

非コードRNAがmiRNAを含む、請求項12に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

非コードRNAが、miR-31、CTL23、miR-126、miR-1、miR-335、miR-139-5p、miR-210、miR-143、miR-10b、miR-181a、miR-28-5p、miR-127-5p、miR-125b、miR-222、miR-29a\*、miR-381、let7d、miR-93、miR-200-5p、miR-221、およびmiR-107のうちの1つまたは複数から選択される、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

多重反応において、非コードRNAと共に、1個または複数のmRNA分子を増幅および検出する工程を含む、請求項11から13のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記1個または複数のmRNA分子が、ヘアピンプライマーを含むプライマー対を用いて増幅および検出される、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記1個または複数のmRNA分子が、ヘアピンプライマーを含まないプライマー対を用いて増幅される、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

前記1個または複数のmRNA分子が、プローブを用いて検出される、請求項17に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

プローブがmRNA分子に特異的である、請求項18に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

シグナル放出手段がエネルギー供与体部分およびエネルギー受容体部分を含み、それぞれがヘアピンプライマーに結合しており、かつデュプレックスの鎖が分離した時のみシグナルが検出可能であるように間隔を置いて配置されている、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分が、約10～40ヌクレオチドの範囲内での距離を置いて配置されている、請求項20に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

受容体部分が、供与体部分によって放出された波長とは異なる波長で蛍光を放出するフルオロフォアである、請求項20に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

エネルギー供与体部分がフルオロフォアであり、エネルギー受容体部分がフルオロフォアクエンチャーである、請求項20に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

供与体部分が、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、ローダミン、5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、アントラニルアミド、クマリン、テルビウムキレート誘導体、およびReactive Red 4からなる群から選択され、受容体部分が、DABCYL、ローダミン、テトラメチルローダミン、酪酸ピレン、エオシニントロチロシン、エチジウム、フルオレセイン、マラカイトグリーン、およびテキサスレッドからなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

供与体部分がフルオレセインまたはその誘導体であり、受容体部分がDABCYLである、請

10

20

30

40

50

求項24に記載の方法。

【請求項 26】

エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分が、デュプレックスにおいて、5ヌクレオチドまたはそれ未満だけ離れている逆鎖ヌクレオチド上に位置している、請求項20に記載の方法。

【請求項 27】

エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分が、デュプレックスにおいて互いに反対側にある相補ヌクレオチド上に位置している、請求項20に記載の方法。

【請求項 28】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加および逆転写工程が単一の反応混合物において実行される、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 29】

前記増幅および検出工程が、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加および逆転写工程とは別の反応混合物において実行される、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加、逆転写工程、ならびに増幅および検出工程が全て、単一の反応混合物において実行される、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

単一の反応混合物が、ポリ(A)ポリメラーゼ、および逆転写および増幅のための単一酵素を含む、請求項30に記載の方法。 20

【請求項 32】

単一の反応混合物が、逆転写および増幅のための単一酵素、ならびにポリ(U)配列をRNA分子に付加する酵素であって、ウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼからなる群から選択される酵素を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

前記増幅および検出工程が定量的リアルタイムPCRを含む、請求項1から32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

(a)フォワードプライマーおよびリバープライマーであって、フォワードプライマーが、検出されるべきRNA分子に特異的であり、リバープライマーが、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含み、フォワードプライマーおよびリバープライマーの少なくとも1つが、 30

(i)検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列、および/または前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列;

(ii)第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列;

(iii)第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー;

(iv)第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列;ならびに

(v)デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を含むヘアピンプライマーを含み、 40

リバープライマーがヘアピンプライマーを含む場合、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、前記ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する、フォワードプライマーおよびリバープライマー;ならびに

(b)前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を含むキット。

【請求項 35】

フォワードプライマーおよびリバープライマーであって、フォワードプライマーが、検出されるべきRNA分子に特異的であり、リバープライマーが、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含み、フォワードプライマーおよびリバープライマーの少 50

なくとも1つが、

(i) 検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列、および/または前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列;

(ii) 第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列;

(iii) 第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー;

(iv) 第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列;ならびに

(v) デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を含むヘアピンプライマーを含み、

リバープライマーがヘアピンプライマーを含む場合、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、前記ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する、フォワードプライマーおよびリバープライマーを含むキットであって、

前記1個または複数の特定のRNA分子に対応するcDNA分子を増幅および検出するための追加のプライマーまたはプローブを含まないキット。

【請求項36】

リバープライマーが、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列の3'末端において、検出されるべきRNA分子に特異的なヌクレオチド配列を追加として含む、請求項34または35に記載のキット。

【請求項37】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、オリゴ(dT)配列を含む、請求項34から36のいずれか一項に記載のキット。

【請求項38】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、オリゴ(dA)配列を含む、請求項34から36のいずれか一項に記載のキット。

【請求項39】

フォワードプライマーがヘアピンプライマーを含み、リバープライマーがヘアピンプライマーを含まない、請求項34から38のいずれか一項に記載のキット。

【請求項40】

リバープライマーがヘアピンプライマーを含み、フォワードプライマーがヘアピンプライマーを含まない、請求項34から38のいずれか一項に記載のキット。

【請求項41】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を含む、請求項35に記載のキット。

【請求項42】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素が、ポリ(A)ポリメラーゼを含む、請求項34または請求項41に記載のキット。

【請求項43】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素が、ウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼからなる群から選択される酵素を含む、請求項34または請求項41に記載のキット。

【請求項44】

逆転写酵素を含む、請求項34から41のいずれか一項に記載のキット。

【請求項45】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素、および逆転写酵素が1つの容器で提供される、請求項44に記載のキット。

【請求項46】

DNAポリメラーゼを含む、請求項34から44のいずれか一項に記載のキット。

【請求項47】

逆転写酵素とDNAポリメラーゼを単一酵素の形として含む、請求項46に記載のキット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 48】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を、単一酵素の形をとる逆転写酵素とDNAポリメラーゼと一緒に含む、請求項47に記載のキット。

## 【請求項 49】

前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素が、単一酵素の形をとる逆転写酵素とDNAポリメラーゼと一緒に、1つの容器で提供される、請求項48に記載のキット。

## 【請求項 50】

検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である少なくとも2つの異なるプライマー対を含む、請求項34から46のいずれか一項に記載のキット。

10

## 【請求項 51】

少なくとも1つのプライマー対がヘアピンプライマーを含む、請求項50に記載のキット。

## 【請求項 52】

検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の異なるプライマー対を含む、請求項34から50のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 53】

キットにおける各ヘアピンプライマーが異なる検出可能なシグナルを生じる、請求項50から52のいずれか一項に記載のキット。

20

## 【請求項 54】

特定のRNA分子が非コードRNAを含む、請求項34から53のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 55】

非コードRNAが、核内低分子RNA(snRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、一時的低分子RNA(stRNA)、アンチジーンRNA(agRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、およびPiwi相互作用RNA(piRNA)からなる群から選択される、請求項34から54のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 56】

非コードRNAがmiRNAを含む、請求項34から55のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 57】

非コードRNAが、miR-31、CTL23、miR-126、miR-1、miR-335、miR-139-5p、miR-210、miR-143、miR-10b、miR-181a、miR-28-5p、miR-127-5p、miR-125b、miR-222、miR-29a\*、miR-381、let7d、miR-93、miR-200-5p、miR-221、およびmiR-107のうちの1つまたは複数から選択される、請求項56に記載のキット。

30

## 【請求項 58】

多重反応において、非コードRNAと共に、1個または複数のmRNA分子を増幅するための1つまたは複数のプライマー対を追加として含む、請求項54から56のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 59】

前記1個または複数のmRNA分子を増幅するための1つまたは複数のプライマー対がヘアピンプライマーを含まない、請求項58に記載のキット。

40

## 【請求項 60】

mRNA分子を検出するための1つまたは複数のプローブを追加として含む、請求項59に記載のキット。

## 【請求項 61】

プローブがmRNA分子に特異的である、請求項60に記載のキット。

## 【請求項 62】

シグナル放出手段がエネルギー供与体部分およびエネルギー受容体部分を含み、それぞれがヘアピンプライマーに結合しており、かつデュプレックスの鎖が分離した時のみシグナルが検出可能であるように間隔を置いて配置されている、請求項34から56のいずれか一

50

項に記載のキット。

【請求項 6 3】

エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分が、約10～40ヌクレオチドの範囲内での距離を置いて配置されている、請求項62に記載のキット。

【請求項 6 4】

受容体部分が、供与体部分によって放出された波長とは異なる波長で蛍光を放出するフルオロフォアである、請求項62に記載のキット。

【請求項 6 5】

エネルギー供与体部分がフルオロフォアであり、エネルギー受容体部分がフルオロフォアクエンチャーである、請求項62に記載のキット。

10

【請求項 6 6】

供与体部分が、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、ローダミン、5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、アントラニルアミド、クマリリン、テルビウムキレート誘導体、およびReactive Red 4からなる群から選択され、受容体部分が、DABCYL、ローダミン、テトラメチルローダミン、酪酸ピレン、エオシンニトロクロシン、エチジウム、フルオレセイン、マラカイトグリーン、およびテキサスレッドからなる群から選択される、請求項62に記載のキット。

【請求項 6 7】

供与体部分がフルオレセインまたはその誘導体であり、受容体部分がDABCYLである、請求項66に記載のキット。

20

【請求項 6 8】

エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分が、デュプレックスにおいて、5ヌクレオチドまたはそれ未満だけ離れている逆鎖ヌクレオチド上に位置している、請求項62から67のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6 9】

エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分が、デュプレックスにおいて互いに反対側にある相補ヌクレオチド上に位置している、請求項62から67のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、全体として参照により本明細書に組み入れられている、2012年9月28日に出版された米国仮特許出願第61/707,670号の恩典を主張する。

【0002】

連邦政府支援の研究および開発の下でなされた発明への権利に関する言明

適用なし。

【0003】

本発明は、一般的に、RNA分子の検出および定量化の領域に関する。特に、本発明は、マイクロRNAの検出および定量化のための方法およびキットに関する。

40

【背景技術】

【0004】

マイクロRNAは、およそ22ヌクレオチド非コードRNAの大量のクラスであり、動物、植物、およびウイルスの発生において重要な制御的役割を果たしている。マイクロRNAの認識は、約15年前にlin-4の発見から始まり、そのlin-4は、C.エレガンス(C. elegans)の生活環境および幼虫の発生における線虫のタイミングおよび発育に關与する低分子RNAをコードするが(Leeら1993 Cell 75:843～854頁、Wightmanら1993 Cell 75:855362)、マイクロRNAが、動物において幅広い制御的機能を有するリボ制御因子の主要なクラスを形成することは、つい最近になって認識されたばかりであった(Lagos-Quintanaら2001 Science 294:853858、Lauら2001 Science 294:858～862頁、LeeおよびAmbros. 2001 Science 294:862～8

50

64頁)。

【0005】

マイクロRNAは、メッセンジャーRNA標的の翻訳を分解または遮断することにより、転写後レベルにおける遺伝子発現の制御に関与し、ヒトゲノムのおよそ30%がマイクロRNAによって制御され得ることが推測されている。マイクロRNAは、発生、成長および増殖、アポトーシス、分化、ならびに癌および糖尿病などの様々なヒト疾患(<http://www.mir2disease.org/>)を含む様々な細胞プロセスにおいて役割を果たす。癌におけるマイクロRNAの重要性は、最近の論文(Barbarottoら2008 Int. J. Cancer. 122:969~977頁)において脚光を浴びており、その論文は以下のことを指摘している:(i)miRNAは、分析されたヒト癌のあらゆる型において変化している;(ii)miRNAは、癌遺伝子および腫瘍抑制因子として働く;(iii)miRNA変化は、癌素因の原因となる可能性がある;(iv)miRNAプロファイリングは、新しい癌診断ツールを表す;ならびに(v)miRNAプロファイリングは癌における診断ツールを表す。

10

【0006】

qRT-PCR手順によるマイクロRNAの定量化は、マイクロRNAの小さなサイズ(すなわち、PCRに通常、用いられるプライマーのサイズである、わずか約21~25ヌクレオチド)のために非常に困難である。この問題の解決は、RaymondらRNA. 2005 Nov;11(11): 1737~44頁; GiladらPLoS ONE. 2008 Sep 5;3(9):e3148; Sharbati-TehraniらBMC Molecular Biology. 2008; 9:34に発表されている。Raymondらは、遺伝子特異的逆転写工程、続いて、ロックド核酸(LNA)分子を含有する遺伝子特異的フォワードプライマーおよびユニバーサルリバー

20

【0007】

診断マイクロRNAアッセイは、Applied Biosystems, Inc.およびExiqonによって開発されている。ABI TaqmanマイクロRNAアッセイ設計は、多重化できる可能性があるが、複雑であり、かつ低い非効率的な温度での逆転写を必要とする。そのテクノロジーは、ステムループ逆転写(RT)プライマー、ならびに個々のマイクロRNAプローブおよびプライマーセットを用いる。標的あたり以下の合計4つのオリゴヌクレオチドがある:ループ化RTプライマー、フォワードPCRプライマー、リバー

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

40

【特許文献1】米国特許第6,794,499号

【特許文献2】米国特許第6,670,461号

【特許文献3】米国特許第6,262,490号

【特許文献4】米国特許第6,770,748号

【特許文献5】米国特許第6,027,998号

【特許文献6】米国特許第6,605,451号

【特許文献7】PCT公開第WO 97/31256号

【特許文献8】PCT公開第WO 01/92579号

【特許文献9】米国特許第5,830,711号

【特許文献10】米国特許第6,027,889号

50



- 【特許文献 1 1】米国特許第5,686,243号
- 【特許文献 1 2】PCT公開第WO0056927A3号
- 【特許文献 1 3】PCT公開第WO9803673A1号
- 【特許文献 1 4】PCT公開第WO 2010/985966号
- 【特許文献 1 5】PCT公開第WO 2010/085966号
- 【特許文献 1 6】米国特許第5,866,336号
- 【特許文献 1 7】米国特許第5,958,349号
- 【特許文献 1 8】米国特許第6,403,037号
- 【特許文献 1 9】米国特許第6,440,725号
- 【特許文献 2 0】米国特許第6,783,736号 10
- 【特許文献 2 1】米国特許第6,818,185号
- 【非特許文献】
- 【0 0 0 9】
- 【非特許文献 1】Leeら1993 Cell 75:843 ~ 854頁
- 【非特許文献 2】Wightmanら1993 Cell 75:855362
- 【非特許文献 3】Lagos-Quintanaら2001 Science 294:853858
- 【非特許文献 4】Lauら2001 Science 294:858 ~ 862頁
- 【非特許文献 5】LeeおよびAmbros、2001 Science 294:862 ~ 864頁
- 【非特許文献 6】Barbarottoら2008 Int. J. Cancer. 122:969 ~ 977頁
- 【非特許文献 7】RaymondらRNA. 2005 Nov;11(11);1737 ~ 44頁 20
- 【非特許文献 8】GiladらPLoS ONE. 2008 Sep 5;3(9):e3148
- 【非特許文献 9】Sharbati-TehraniらBMC Molecular Biology. 2008、9:34
- 【非特許文献 1 0】BergerおよびKimmel (1987) METHODS IN ENZYMOLOGY、152巻: GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES、San Diego: Academic Press, Inc.
- 【非特許文献 1 1】Sambrookら(1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、1 ~ 3巻、Cold Spring Harbor Laboratory
- 【非特許文献 1 2】AndersonおよびYoung、Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985)
- 【非特許文献 1 3】「A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics」John SantaLucia, Jr.、PNAS 1998年2月17日95巻4号1460 ~ 1465頁 30
- 【非特許文献 1 4】Ausbelら; PCR Primer: A Laboratory Manual、Difienbach編、Cold Spring Harbor Press (1995)
- 【非特許文献 1 5】The Electronic Protocol Book、Chang Bioscience (2002)
- 【非特許文献 1 6】Msuihら、J. Clin. Micro. 34:501 ~ 07頁(1996)
- 【非特許文献 1 7】The Nucleic Acid Protocols Handbook、R. Rapley編、Humana Press、Totowa、N.J. (2002)
- 【非特許文献 1 8】Abramsonら、Curr Opin Biotechnol. 1993年2月;4(1):41 ~ 7頁
- 【非特許文献 1 9】Dayら、Genomics、29(1): 152 ~ 162頁(1995)
- 【非特許文献 2 0】Ehrlichら、Science 252:1643 ~ 50頁(1991) 40
- 【非特許文献 2 1】Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press (1990)
- 【非特許文献 2 2】Favisら、Nature Biotechnology 18:561 ~ 64頁(2000)
- 【非特許文献 2 3】Rabenauら、Infection 28:97 ~ 102頁(2000)
- 【非特許文献 2 4】Belgrader、Barany、およびLubin、Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay、Sixth International Symposium on Human Identification、1995(ワールドワイドウェブ: [promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html](http://promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html)-で入手可能)
- 【非特許文献 2 5】LCR Kit Instruction Manual、カタログ#200520、参照#050002、Stratagene、2002

- 【非特許文献 2 6】Barany、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 188 ~ 93頁(1991)
- 【非特許文献 2 7】BiおよびSambrook、Nucl. Acids Res. 25:2924 ~ 2951頁(1997)
- 【非特許文献 2 8】Zirviら、Nucl. Acid Res. 27:e40i ~ viii (1999)
- 【非特許文献 2 9】Deanら、Proc Natl Acad Sci USA 99:5261 ~ 66頁(2002)
- 【非特許文献 3 0】BaranyおよびGelfand、Gene 109: 1 ~ 11頁(1991)
- 【非特許文献 3 1】Walkerら、Nucl. Acid Res. 20: 1691 ~ 96頁(1992)
- 【非特許文献 3 2】Polstraら、BMC Inf. Dis. 2:18頁 ~ (2002)
- 【非特許文献 3 3】Lageら、Genome Res. 2003年2月;13(2):294 ~ 307頁
- 【非特許文献 3 4】Landegrenら、Science 241 : 1077 ~ 80頁(1988)
- 【非特許文献 3 5】Demidov, V., Expert Rev Mol Diagn. 2002年11月;2(6):542 ~ 8頁 10
- 【非特許文献 3 6】Cookら、J Microbiol Methods. 2003年5月;53(2): 165 ~ 74頁
- 【非特許文献 3 7】Schweitzerら、Curr Opin Biotechnol. 2001年2月;12(1):21 ~ 7頁
- 【非特許文献 3 8】MartinおよびKeller (2007)「RNA-specific ribonucleotidyl transf  
erases」RNA 13:1834 ~ 1849頁
- 【非特許文献 3 9】Steinら、1988、Nucl. Acids Res. 16:3209頁
- 【非特許文献 4 0】Sarinら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 :7448 ~ 7451頁
- 【非特許文献 4 1】Juら、1995、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:4347 ~ 4351頁

# 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

### 【0010】

本発明の一つの態様は、試料における特定のRNA分子を増幅するための方法である。いくつかの実施形態において、方法は、

- (a) 試料におけるRNA分子にポリ(リボヌクレオチド)配列を付加する工程;
  - (b) 前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含むリバースプライマーを用いて、ポリ(リボヌクレオチド)-RNA分子を逆転写する工程;および
  - (c) 同じリバースプライマー、および検出されるべきRNA分子に特異的なフォワードプライマーを用いて、cDNA分子を増幅および検出する工程
- を必要とする。フォワードプライマーおよびリバースプライマーの少なくとも1つは、

(i) 検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列および/または前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列;

(ii) 第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列;

(iii) 第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー;

(iv) 第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列;ならびに

(v) デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を含むヘアピンプライマーを含み、リバースプライマーがヘアピンプライマーを含む場合、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、前記ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する。いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加は、ポリアデニル化を含み、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列は、オリゴ(dT)配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加はポリウリジニル化を含み、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列は、オリゴ(dA)配列を含む。いくつかの実施形態において、リバースプライマーは、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列の3'末端において、検出されるべきRNA分子に特異的なヌクレオチド配列を追加として含む。いくつかの実施形態において、フォワードプライマーはヘアピンプライマーを含み、リバースプライマーはヘアピンプライマーを含まない。いくつかの実施形態において、リバースプライマーはヘアピンプライマーを含み、フォワードプライマーはヘアピンプライマーを含まない。

### 【0011】

いくつかの実施形態において、少なくとも2個の特定のRNA分子に対応するDNA分子は、2つの異なるプライマー対を用いる多重増幅反応において増幅および検出され、その2つの

異なるプライマー対のそれぞれは、検出されるべき1個のRNA分子に特異的である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのプライマー対はヘアピンプライマーを含む。いくつかの実施形態において、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の特定のRNA分子に対応するcDNA分子は、単一の多重反応において増幅および検出される。いくつかの多重の実施形態において、方法に用いられる各プライマー対は、ヘアピンプライマーを含み、かつ検出されるべき各RNA分子に特異的である。

【0012】

いくつかの実施形態において、方法は、多重反応において、非コードRNAと共に、1個または複数のmRNA分子を増幅および検出する工程を必要とする。いくつかの実施形態において、1個または複数のmRNA分子は、ヘアピンプライマーを含むプライマー対を用いて増幅および検出される。いくつかの実施形態において、1個または複数のmRNA分子は、ヘアピンプライマーを含まないプライマー対を用いて増幅される。いくつかの実施形態において、1個または複数のmRNA分子は、プローブを用いて検出される。いくつかの実施形態において、プローブはmRNA分子に特異的である。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加および逆転写工程は、単一の反応混合物において実行される。いくつかの実施形態において、増幅および検出工程は、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加および逆転写工程とは別の反応混合物において実行される。いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加、逆転写工程、ならびに増幅および検出工程は全て、単一の反応混合物において実行される。いくつかの実施形態において、単一の反応混合物は、ポリ(A)ポリメラーゼ、ならびに逆転写および増幅のための単一の酵素を含む。いくつかの実施形態において、単一の反応混合物は、逆転写および増幅のための単一の酵素、ならびにポリ(U)配列をRNA分子に付加する酵素を含み、その付加する酵素がウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼから選択される。いくつかの実施形態において、増幅および検出工程は、定量的リアルタイムPCRを含む。

20

【0014】

本発明の他の態様は、キットを含む。いくつかの実施形態において、キットは、

(a) フォワードプライマーおよびリバープライマーであって、フォワードプライマーが、検出されるべきRNA分子に特異的であり、リバープライマーが、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含み、フォワードプライマーおよびリバープライマーの少なくとも1つが、

30

(i) 検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列、および/または前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列;

(ii) 第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列;

(iii) 第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー;

(iv) 第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列;ならびに

(v) デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を含むヘアピンプライマーを含み、リバープライマーがヘアピンプライマーを含む場合、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、前記ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する、フォワードプライマーおよびリバープライマー;ならびに

40

(b) 前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、キットは、

フォワードプライマーおよびリバープライマーであって、フォワードプライマーが、検出されるべきRNA分子に特異的であり、リバープライマーが、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含み、フォワードプライマーおよびリバープライマーの少

50

なくとも1つが、

(i) 検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列、および/または前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列;

(ii) 第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列;

(iii) 第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー;

(iv) 第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列;ならびに

(v) デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を含むヘアピンプライマーを含み、リバースプライマーがヘアピンプライマーを含む場合、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、前記ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、かつキットは、前記1個または複数の特定のRNA分子に対応するcDNA分子を増幅および検出するための追加のプライマーまたはプローブを含まない。いくつかの実施形態において、このキットは前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を追加として含むことができる。

10

#### 【0016】

キットのいくつかの実施形態において、リバースプライマーは、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列の3'末端において、検出されるべきRNA分子に特異的なヌクレオチド配列を追加として含む。キットのいくつかの実施形態において、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列は、オリゴ(dT)配列を含む。キットのいくつかの実施形態において、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列は、オリゴ(dA)配列を含む。キットのいくつかの実施形態において、フォワードプライマーはヘアピンプライマーを含み、リバースプライマーはヘアピンプライマーを含まない。キットのいくつかの実施形態において、リバースプライマーはヘアピンプライマーを含み、フォワードプライマーはヘアピンプライマーを含まない。

20

#### 【0017】

キットのいくつかの実施形態において、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素は、ポリ(A)ポリメラーゼを含む。キットのいくつかの実施形態において、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素は、ウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼからなる群から選択される酵素を含む。いくつかの実施形態において、キットは逆転写酵素を含む。いくつかの実施形態において、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素、および逆転写酵素は、1つの容器内で提供される。いくつかの実施形態において、キットはDNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、キットは、逆転写酵素とDNAポリメラーゼとを単一酵素の形として含む。いくつかの実施形態において、キットは、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を、単一酵素の形をとる逆転写酵素とDNAポリメラーゼと一緒に含む。いくつかの実施形態において、前記ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素は、単一酵素の形をとる逆転写酵素とDNAポリメラーゼと一緒に、1つの容器内で提供される。

30

#### 【0018】

いくつかの実施形態において、キットは、検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である少なくとも2つの異なるプライマー対を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのプライマー対はヘアピンプライマーを含む。いくつかの実施形態において、キットは、検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の異なるプライマー対を含む。いくつかの実施形態において、キットにおける各ヘアピンプライマーは、異なる検出可能なシグナルを生じる。

40

#### 【0019】

いくつかの実施形態において、キットは、多重反応において、非コードRNAと共に、1個または複数のmRNA分子を増幅するための1つまたは複数のプライマー対を追加として含む

50

。いくつかの実施形態において、1個または複数のmRNA分子を増幅するための1つまたは複数のプライマー対は、ヘアピンプライマーを含まない。いくつかの実施形態において、キットは、mRNA分子を検出するための1つまたは複数のプローブを追加として含む。いくつかの実施形態において、プローブは、mRNA分子に特異的である。

#### 【0020】

方法およびキットのいくつかの実施形態において、特定のRNA分子は非コードRNAを含む。いくつかの実施形態において、非コードRNAは、以下から選択される：核内低分子RNA(snrRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA)、一時的低分子RNA(small temporal RNA)(stRNA)、アンチジーンRNA(agRNA)、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、およびPiwi相互作用RNA(piRNA)。いくつかの実施形態において、非コードRNAは、以下のうちの1つまたは複数から選択される：miR-31、CTL23、miR-126、miR-1、miR-335、miR-139-5p、miR-210、miR-143、miR-10b、miR-181a、miR-28-5p、miR-127-5p、miR-125b、miR-222、miR-29a\*、miR-381、let7d、miR-93、miR-200-5p、miR-221、およびmiR-107。

10

#### 【0021】

方法およびキットのいくつかの実施形態において、シグナル放出手段は、エネルギー供与体部分およびエネルギー受容体部分を含み、それぞれがヘアピンプライマーに結合しており、かつデュプレックスの鎖が分離した時のみ、シグナルが検出可能であるように間隔をおいて配置されている。いくつかの実施形態において、エネルギー供与体部分および受容体部分は、約10~40ヌクレオチドの範囲内での距離を置いて配置されている。いくつかの実施形態において、受容体部分は、供与体部分によって放出された波長と異なる波長で蛍光を放出するフルオロフォアである。いくつかの実施形態において、エネルギー供与体部分はフルオロフォアであり、エネルギー受容体部分はフルオロフォアクエンチャーである。いくつかの実施形態において、供与体部分は、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、ローダミン、5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)、アントラニルアミド、クマリン、テルビウムキレート誘導体、およびReactive Red 4から選択され、受容体部分は、DABCYL、ローダミン、テトラメチルローダミン、酪酸ビレン、エオシンニトロチロシン、エチジウム、フルオレセイン、マラカイトグリーン、およびテキサスレッドから選択される。いくつかの実施形態において、供与体部分はフルオレセインまたはその誘導体であり、受容体部分がDABCYLである。いくつかの実施形態において、エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分は、デュプレックスにおいて5ヌクレオチドまたはそれ未満だけ離れている逆鎖ヌクレオチド上に位置している。いくつかの実施形態において、エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分は、デュプレックスにおいて互いに反対側にある相補ヌクレオチド上に位置している。

20

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0022】

【図1】リバープライマーがヘアピンプライマーである、本明細書に記載された方法の実施形態を示す図である。

【図2】フォワードプライマーがヘアピンプライマーである、本明細書に記載された方法の実施形態を示す図である。

【図3】標的の希釈系列に関して一重で、本明細書に記載された方法に従って行った定量的リアルタイムPCRマイクロRNAアッセイの結果を示す図である。蛍光はPCRサイクル数に対してプロットされている。

40

【図4A】多重定量的リアルタイムPCRマイクロRNAアッセイの結果を示す図である。蛍光はPCRサイクル数に対してプロットされている。miR31。

【図4B】多重定量的リアルタイムPCRマイクロRNAアッセイの結果を示す図である。蛍光はPCRサイクル数に対してプロットされている。CTL23。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0023】

本発明は、多重マイクロRNAアッセイにおける複数の標的に特異的に作製することができる、各標的についての2つのオリゴヌクレオチド(RT/リバープライマー/プローブとフ

50

ォワードプライマーの組み合わせ、またはRT/リバープライマーとフォワードプライマー/プローブの組み合わせ)を用いる、遺伝的状態のRNA(例えば、miRNA)マーカーの測定に関する。

【0024】

定義

特許請求の範囲および明細書に用いられる用語は、他に規定がない限り、下に示されたように定義される。

【0025】

用語「核酸」は、ヌクレオチドポリマーを指し、他に限定がない限り、天然に存在するヌクレオチドに類似した様式で機能する(例えば、ハイブリダイズする)ことができる天然ヌクレオチドの既知の類似体を含む。

10

【0026】

核酸という用語は、任意の型のDNAまたはRNAを含み、それには、例えば、ゲノムDNA; 相補DNA(cDNA)(通常、メッセンジャーRNA(mRNA)の逆転写により、または増幅により得られる、mRNAのDNA表現); 合成的に、または増幅により産生されたDNA分子;mRNA; および非コードRNAが挙げられる。

【0027】

核酸という用語は、一本鎖分子に加えて、二本鎖または三本鎖核酸複合体を包含する。二本鎖または三本鎖核酸複合体において、核酸鎖は、同一の広がりをもつ必要はない(すなわち、二本鎖核酸は、両方の鎖の全長に沿って二本鎖である必要はない)。

20

【0028】

核酸という用語はまた、メチル化による、および/またはキャッピングによるなどのその任意の化学修飾体も包含する。核酸修飾には、追加の電荷、分極率、水素結合、静電的相互作用を組み入れる化学基の付加、および個々の核酸塩基への、または全体としての核酸への機能性の付加を挙げることができる。そのような修飾には、2'位糖修飾、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、シトシン環外アミンにおける修飾などの塩基修飾、5-ブロモ-ウラシルの置換、糖-リン酸バックボーンの修飾、イソ塩基(isobase)、イソシチジン、およびイソグアニジンなどの異常な塩基対形成組み合わせが挙げられ得る。

【0029】

より具体的には、いくつかの実施形態において、核酸には、(2-デオキシ-D-リボースを含有する)ポリデオキシリボヌクレオチド、(D-リボースを含有する)ポリリボヌクレオチド、およびプリンまたはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドである任意の他の型の核酸、加えて、非ヌクレオチドのバックボーンを含有する他のポリマー、例えば、ポリアミド(例えば、ペプチド核酸(PNA))およびポリモルホリノポリマー(Neugeneとして、Anti-Virals, Inc.社、Corvallis社、Oregon社から市販されている)、ならびに、ポリマーが、DNAおよびRNAに見出されるような塩基対形成および塩基スタッキングを可能にする立体配置で核酸塩基を含有するとの条件での、他の合成配列特異的核酸ポリマーを挙げることができる。核酸という用語はまた、ロックド核酸(LNA)を包含し、そのロックド核酸は、LNAの開示として全体として参照により本明細書に組み入れられている、米国特許第6,794,499号、第6,670,461号、第6,262,490号、および第6,770,748号に記載されている。

30

40

【0030】

核酸は、固相媒介型化学合成などの完全化学合成プロセスに、核酸を産生する任意の種からの単離を通してなどの生物学的供給源に、もしくはDNA複製、PCR増幅、逆転写などの分子生物学ツールによる核酸の操作を含むプロセスに、またはそれらのプロセスの組み合わせに由来することができる。

【0031】

非コードRNAは、必ずしもタンパク質へ翻訳されないRNA種を含む。これらには、トランスファーRNA(tRNA)およびリボソームRNA(rRNA)、加えて、核内低分子RNA(snRNA)、核小体低分子RNA(snoRNA; 例えば、メチル化またはシュドウリジル化に関連づけられるもの)、一時的低分子RNA(stRNA)、アンチジーンRNA(agRNA)、マイクロRNA(miRNA; 遺伝子発現を制

50

御する)、低分子干渉RNA(siRNA;RNA干渉(RNAi)経路に関与し、それらは特定の遺伝子の発現に干渉するが、抗ウイルス剤として、およびゲノムの染色質構造を形作ることにおいて働くことも示されている)、およびPiwi相互作用RNA(piRNA;Piwiタンパク質との相互作用を通してRNA-タンパク質複合体を形成する;これらのpiRNA複合体は、レトロトランスポゾン、および生殖系列細胞、特に精子形成における生殖系列細胞における他の遺伝因子の転写性遺伝子サイレンシングに結びつけられている)、および長鎖非コードRNA(長鎖ncRNA;典型的には約200ヌクレオチドより長い非コード転写物である)が挙げられるが、それらに限定されない。

#### 【0032】

用語「マイクロRNA」、「miRNA」、および「miR」は、同意語として用いられ、動物および植物などの生きている生物体の内因性遺伝子に由来する非コードRNAを指す。「成熟」型において、これらのmiRNAは、典型的には、長さが21~25ヌクレオチドであり、生物活性がある。それらは、一般的に、およそ75ヌクレオチドの長さを有するpre-miRNA(pre-miR)と名付けられたより長いヘアピン様前駆体からプロセシングされる。pre-miRNAの前駆体は、約500~3000ヌクレオチドの長さを有するpri-miRNA(pri-miR)である。miRNAは、miRNPと名付けられた複合体に集合し、メッセンジャーRNAに結合して、翻訳効率に干渉することにより、重要な生物学的過程への主要な制御因子として働く。本明細書に記載された方法の標的マイクロRNAは、科学文献、およびmiRBaseデータベース(microrna.sanger.ac.uk/)(Sanger Institute、UKにより運営されたウェブ上のマイクロRNAデータのホームである)などの公開データベースから知られたマイクロRNAなどの全ての既知のマイクロRNAを指す。miRBaseリリース19は、そこに開示された全ての成熟miRNAおよび未熟miRNA配列を含め、参照により本明細書に組み入れられている。

#### 【0033】

「ポリアデニル化」は、RNA分子の3'末端におけるポリ(A)テール(全ての塩基がアデニンである、ひと続きのRNA)の付加を指す。ポリアデニル化は、生きている生物体において自然の生物学的過程であるが、市販の大腸菌(E.coli)ポリ(A)ポリメラーゼI(E-PAP)などの様々なポリメラーゼを用いてインビトロでも実行させることができる。

#### 【0034】

「ポリウリジニル化」は、RNA分子の3'末端におけるポリ(U)テール(全ての塩基がウリジンである、ひと続きのRNA)の付加を指す。ポリウリジニル化は、生きている生物体において自然の生物学的過程であるが、ウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼ(その後者はNew England Biolabsから市販されている)などの様々な酵素を用いてインビトロでも実行させることができる。

#### 【0035】

本明細書で用いられる場合、用語「相補的な」は、2つのヌクレオチド間の正確な対形成のための能力を指す;すなわち、核酸の所定の位置におけるヌクレオチドが、別の核酸のヌクレオチドと水素結合して正準の塩基対を形成する能力があるなら、その2つの核酸は、その位置において互いに相補的であるとみなされる。2つの一本鎖核酸分子間の相補性は、ヌクレオチドの一部のみが結合する「部分的」であってもよく、または全部の相補性が一本鎖分子間に存在する場合、それは完全であり得る。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強さに有意な効果を生じる。

#### 【0036】

「特異的ハイブリダイゼーション」は、規定されたストリンジェンシー条件下で、ハイブリダイゼーション混合物中に存在する他のヌクレオチド配列への実質的結合がない場合の核酸の標的ヌクレオチド配列への結合を指す。当業者は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを緩和することが、配列ミスマッチの許容を可能にすることを認識している。

#### 【0037】

いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で実行される。句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」

条件」は、一般的に、規定されたイオン強度およびpHにおいて特定の配列についての融解温度( $T_m$ )より低い約5 から約20 または25 までの範囲内の温度を指す。本明細書で用いられる場合、 $T_m$ は、二本鎖核酸分子の集団が、一本鎖へ半数が解離するようになる時点の温度である。核酸の $T_m$ を計算するための方法は、当技術分野において周知である(例えば、BergerおよびKimmel (1987) METHODS IN ENZYMOLOGY、152巻: GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES、San Diego: Academic Press, Inc.ならびにSambrookら(1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、第2版、1~3巻、Cold Spring Harbor Laboratory参照、どちらも、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の説明として参照により本明細書に組み入れられている)。標準的な参考文献によって示されているように、 $T_m$ 値の簡単な推定は、核酸が1M NaClでの水溶液中にある場合、方程式:  $T_m=81.5+0.41(\% G+C)$ によって計算されてもよい(例えば、AndersonおよびYoung、Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985)参照)。ハイブリッドの融解温度(および、したがって、ストリンジェントなハイブリダイゼーションについての条件)は、プライマーまたはプローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)、ならびに標的核酸の性質(DNA、RNA、塩基組成、溶液中に存在する、または固定化されているなど)、加えて塩および他の成分の濃度(例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコールの存在または非存在)などの様々な因子によって影響される。これらの因子の効果は周知であり、当技術分野における標準的な参考文献において論じられている。たいいていの配列の特異的ハイブリダイゼーションを達成するのに適した例証的なストリンジェントな条件は、少なくとも約60 の温度、およびpH7における約0.2モル濃度の塩濃度である。最近接熱力学に基づいたオリゴヌクレオチド配列についての $T_m$ 計算は、「A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics」John SantaLucia, Jr., PNAS 1998年2月17日95巻4号1460~1465頁(この説明として参照により本明細書に組み入れられている)に記載されているように、行うことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0038】

用語「オリゴヌクレオチド」は、比較的短い、一般的には200ヌクレオチド未満、より具体的には100ヌクレオチド未満、最も具体的には50ヌクレオチド未満である核酸を指すために用いられる。典型的には、オリゴヌクレオチドは一本鎖DNA分子である。

#### 【0039】

用語「プライマー」は、核酸とハイブリダイズする(「アニールする」とも呼ばれる)能力があり、かつ適切な緩衝液中、適した温度での適切な条件下(すなわち、4つの異なるヌクレオチド三リン酸、およびDNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合のための作用物質の存在下)で、ヌクレオチド(RNAまたはDNA)重合のための開始部位としての役割を果たすオリゴヌクレオチドを指す。プライマーの適切な長さは、そのプライマーの意図される使用に依存するが、プライマーは典型的には、少なくとも7ヌクレオチド長であり、いくつかの実施形態において、長さが、10ヌクレオチドから30ヌクレオチドまで、またはいくつかの実施形態において、15ヌクレオチドから30ヌクレオチドまでの範囲である。いくつかの実施形態において、プライマーは、若干より長く、例えば、30~50ヌクレオチド長であり得る。この関連において、「プライマー長」は、相補的な「標的」配列にハイブリダイズし、かつヌクレオチド合成をプライムする、オリゴヌクレオチドまたは核酸の部分の指す。短いプライマー分子は、一般的に、鋳型と十分安定なハイブリッド複合体を形成するためにより冷たい温度を必要とする。プライマーは、鋳型の正確な配列を反映する必要はないが、鋳型とハイブリダイズするのに十分相補的でなければならない。

#### 【0040】

プライマーは、そのプライマーまたはその一部が核酸内のヌクレオチド配列にハイブリダイズする場合には、別の核酸にアニールすると言われる。プライマーが特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズするという言明は、プライマーが、そのヌクレオチド配列と完全に、または排他的にハイブリダイズすることを意味するものではない。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に用いられる増幅プライマーは、ヌクレオチド配列に「



アニールする」、または「特異的である」と言われる。この記載は、ヌクレオチド配列へ全体的にアニールするプライマー、加えて、ヌクレオチド配列へ部分的にアニールするプライマーを包含する。

#### 【0041】

用語「プライマー対」は、増幅されるべきDNA配列の5'末端の相補体とハイブリダイズする5'「上流プライマー」または「フォワードプライマー」、および増幅されるべき配列の3'末端とハイブリダイズする3'「下流プライマー」または「リバースプライマー」を含む1セットのプライマーを指す。当業者によって認識されているように、用語「上流」および「下流」、または「フォワード」および「リバース」は、限定的であることを意図するものではなく、むしろ、いくつかの実施形態において、例証的な配向を提供する。

10

#### 【0042】

「プローブ」は、1つまたは複数の型の化学結合を通して、一般的には相補的塩基対形成を通して、通常には水素結合形成を通して、相補的配列の標的核酸に結合し、それにしたがって、デュプレックス構造を形成する能力がある核酸である。プローブは、特にプローブがその相補的標的にハイブリダイズした時点で、プローブの容易な検出を可能にするために検出可能な標識で標識することができる。しかしながら、代替として、プローブは標識されてなくてもよく、直接的かまたは間接的にかのいずれかで、標識されているリガンドとの特異的結合により、検出可能であり得る。プローブは、サイズがかなり異なり得る。一般的に、プローブは、長さが少なくとも7~15ヌクレオチドである。他のプローブは、少なくとも20、30、または40ヌクレオチド長である。さらに他のプローブは、若干より長く、少なくとも50、60、70、80、または90ヌクレオチド長である。またなお他のプローブは、さらにより長く、少なくとも100、150、200ヌクレオチド長、またはそれ以上である。プローブはまた、上記の値のいずれかによって境界される任意の範囲(例えば、長さが15~20ヌクレオチド)内にある任意の長さであり得る。

20

#### 【0043】

プライマーまたはプローブは、標的核酸配列に完全に相補的であり得、または完全な相補性には満たないことがあり得る。いくつかの実施形態において、プライマーは、少なくとも7ヌクレオチドの配列に関して、より典型的には10~30ヌクレオチドの範囲内での配列に関して、いくつかの実施形態において少なくとも14~25ヌクレオチドの配列に関して、標的核酸配列の相補体と少なくとも65%同一性を有し、いくつかの実施形態において、少なくとも75%同一性、少なくとも85%同一性、少なくとも90%同一性、または少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一性を有する。ある特定の塩基(例えば、プライマーの3'塩基)は、一般的に、望ましくは、標的核酸配列の対応する塩基に完全に相補的であることを理解されたい。プライマーおよびプローブは、典型的には、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列にアニールする。

30

#### 【0044】

本明細書で用いられる場合、プライマーの一部、またはプライマー内のヌクレオチド配列に関して、「検出されるべきRNA分子」などの核酸に「特異的な」という用語は、適切なアニリング条件下で標的核酸へ特異的にアニールすることができるプライマーまたはヌクレオチド配列を指す。

40

#### 【0045】

本教示による増幅は、核酸配列を直線的にかまたは指数関数的にかのいずれかで増幅するための幅広い技術を非限定的に含む、典型的には鋳型依存性様式で、少なくとも1つの標的核酸の少なくとも一部が再生される任意の手段を包含する。増幅工程を実施するための例証的手段には、リガーゼ連鎖反応(LCR)、リガーゼ検出反応(LDR)、ライゲーション、それに続いてのQ-レプリカーゼ増幅、PCR、プライマー伸長、鎖置換増幅(SDA)(strand displacement amplification)、超分岐鎖置換増幅(hyperbranched strand displacement amplification)、多置換増幅(MDA)(multiple displacement amplification)、核酸鎖に基づいた増幅(NASBA)(nucleic acid strand-based amplification)、2ステップ多重化増幅、ローリングサークル増幅(RCA)などが、それらの多重バージョンおよび組み合わせ、例え

50

ば、限定されるわけではないが、OLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、PCR/LCR(組み合わせ型連鎖反応 - CCRとしても公知である)などを含めて、挙げられる。そのような技術の説明は、とりわけ、Ausbelら; PCR Primer: A Laboratory Manual、Diffenbach編、Cold Spring Harbor Press (1995); The Electronic Protocol Book、Chang Bioscience (2002); Msuihら、J. Clin. Micro. 34:501~07頁(1996); The Nucleic Acid Protocols Handbook、R. Rapley編、Humana Press、Totowa、N.J. (2002); Abramsonら、Curr Opin Biotechnol. 1993年2月;4(1):41~7頁、米国特許第6,027,998号; 米国特許第6,605,451号、Baranyら、PCT公開第WO 97/31256号; Wenzら、PCT公開第WO 01/92579号; Dayら、Genomics、29(1): 152~162頁(1995)、Ehrlichら、Science 252:1643~50頁(1991); Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press (1990); Favisら、Nature Biotechnology 18:561~64頁(2000); ならびにRabenauら、Infection 28:97~102頁(2000); Belgrader、Barany、およびLubin、Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay、Sixth International Symposium on Human Identification、1995(ワールドワイドウェブ: promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html-で入手可能); LCR Kit Instruction Manual、カタログ#200520、参照#050002、Stratagene、2002; Barany、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 188~93頁(1991); BiおよびSambrook、Nucl. Acids Res. 25:2924~2951頁(1997); Zirviら、Nucl. Acid Res. 27:e40i~viii (1999); Deanら、Proc Natl Acad Sci USA 99:5261~66頁(2002); BaranyおよびGelfand、Gene 109: 1~11頁(1991); Walkerら、Nucl. Acid Res. 20: 1691~96頁(1992); Polstraら、BMC Inf. Dis. 2:18頁~(2002); Lageら、Genome Res. 2003年2月;13(2):294~307頁、ならびにLandegrenら、Science 241: 1077~80頁(1988)、Demidov、V.、Expert Rev Mol Diagn. 2002年11月;2(6):542~8頁、Cookら、J Microbiol Methods. 2003年5月;53(2): 165~74頁、Schweitzerら、Curr Opin Biotechnol. 2001年2月;12(1):21~7頁、米国特許第5,830,711号、米国特許第6,027,889号、米国特許第5,686,243号、PCT公開第WO0056927A3号、ならびにPCT公開第WO9803673A1号に見出すことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0046】

いくつかの実施形態において、増幅は、以下の逐次手順の少なくとも1サイクルを含む: 少なくとも1つの標的核酸における相補的な、または実質的に相補的な配列と少なくとも1つのプライマーをアニールさせる工程; ポリメラーゼを用いて、鋳型依存性様式で少なくとも1つのヌクレオチド鎖を合成する工程; および新しく形成された核酸デュプレックスを変性して鎖を分離する工程。サイクルは繰り返される場合もあるし、繰り返されない場合もある。増幅は、温度サイクリング工程を含むことができ、または等温で実施することができる。

#### 【0047】

「多重増幅反応」は、2つの核酸が同時に増幅され、識別可能な標識を用いて検出される反応である。

#### 【0048】

用語「qPCR」は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を指すために本明細書で用いられ、それはまた、「リアルタイムPCR」または「動態学的ポリメラーゼ連鎖反応」としても公知である; 全ての用語は、リアルタイムシグナル検出を含むPCRを指す。

#### 【0049】

「試薬」は、広くには、分析物(例えば、分析されることになっている核酸)以外の、反応において用いられる任意の作用物質を指す。核酸増幅反応のための例証的な試薬には、緩衝液、金属イオン、ポリメラーゼ、逆転写酵素、プライマー、鋳型核酸、ヌクレオチド、標識、色素、ヌクレアーゼ、dNTPなどが挙げられるが、それらに限定されない。酵素反応のための試薬には、例えば、基質、補助因子、緩衝液、金属イオン、阻害剤、および活性化剤が挙げられる。

#### 【0050】

本明細書で用いられる場合、用語「標識」は、検出可能な、および/または定量化可能

なシグナルを提供するために用いることができる任意の原子または分子を指す。特に、標識は、核酸またはタンパク質へ直接的に、または間接的に付着することができる。プローブに付着することができる適切な標識には、放射性同位元素、フルオロフォア、発色団、質量標識(mass labels)、高電子密度粒子、磁気粒子、スピン標識、化学発光を放出する分子、電気化学的活性分子、酵素、補助因子、および酵素基質が挙げられるが、それらに限定されない。

【0051】

本明細書で用いられる場合、用語「色素」は、一般的に、300nm以上の波長での電磁放射線を吸収する任意の有機または無機分子を指す。

【0052】

本明細書で用いられる場合、用語「蛍光色素」は、一般的に、ランプ、フォトダイオード、もしくはレーザー、または別の蛍光色素などの電磁放射線の供給源による照射での蛍光機構により、より長い波長の電磁放射線を放出する任意の色素を指す。

【0053】

特定のRNA分子を増幅するための方法

本発明の一つの態様は、試料における特定のRNA分子、典型的には、ポリ(A)テールを有しないRNA分子を増幅するための方法を含む。方法は、試料におけるRNA分子にポリ(リボヌクレオチド)配列を付加する工程、および結果として生じたRNA分子を、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含むリバースプライマーを用いて逆転写して、標的RNA分子が試料中に存在する場合には、少なくとも1つのcDNA分子を生じる工程を必要とする。cDNA分子は、そのcDNA分子を生成するために用いられたのと同じリバースプライマー、および検出されるべきRNA分子に特異的なフォワードプライマーを用いて、増幅および検出される。フォワードプライマーおよびリバースプライマーの少なくとも1つは、

- (i) 検出されるべきRNA分子に特異的な第1のヌクレオチド配列、および/またはポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列;
- (ii) 第1の配列の5'末端における第2のヌクレオチド配列;
- (iii) 第2の配列の5'末端における第3のヌクレオチド配列またはスペーサー;
- (iv) 第3の配列の5'末端における第4のヌクレオチド配列であって、二本鎖のデュプレックスを形成するように第2の配列に相補的である第4の配列;ならびに
- (v) デュプレックスの鎖が分離した時、検出可能なシグナルを放出するための手段を有するヘアピンプライマーを含み、

リバースプライマーがヘアピンプライマーである場合、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列が、ヘアピンプライマーの第1のヌクレオチド配列内に存在する。いくつかの実施形態において、リバースプライマーは、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列の3'末端において、検出されるべきRNA分子に特異的なヌクレオチド配列を追加として含む。

【0054】

いくつかの実施形態において、方法は、少なくとも2個の特定のRNA分子に対応するcDNA分子が、検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である2つの異なるプライマー対を用いる多重増幅反応において増幅および検出される多重形式で実行される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのプライマー対がヘアピンプライマーを含み、1つより多いプライマー対がヘアピンプライマーを含み、または反応における全てのプライマー対がヘアピンプライマーを含む。単一の多重反応における各ヘアピンプライマーは、一般的に、デュプレックスの鎖が分離した時、反応における他のもの全てから識別できる検出可能なシグナルを放出するための手段を含む。単一の多重反応において増幅および検出することができるcDNAの数は、一つには、1反応において互いに識別され得るシグナルの数に依存する。いくつかの実施形態において、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の特定のRNA分子に対応するcDNA分子は、単一の多重反応において増幅および検出される。

【0055】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、方法は、多重反応において、非コードRNAと共に、1個または複数のmRNA分子を増幅および検出する工程を含む。mRNAは、ヘアピンプライマーを含むプライマー対を用いて増幅および検出することができるが、必ずしも必要ではない。例えば、mRNA分子は、非標識プライマーにより増幅され、標識されている、またはアッセイ中に標識されるようになるプローブを用いて検出され得る。いくつかの実施形態において、プローブは、mRNA分子に特異的である。いくつかの実施形態において、mRNA分子は、非標識プライマーを用いて増幅され、DNA結合性色素を用いて検出され得る。mRNA分子を増幅するための適切なプライマーには、標的特異的プライマー、1つのプライマーがオリゴ(dT)配列または縮重配列を含むプライマー対が挙げられる。

【0056】

いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列はポリ(A)配列を含み、ポリ(A)配列にアニールする配列は、オリゴ(dT)配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリ(A)ポリメラーゼは、RNA分子をポリアデニル化するために用いられる。RNA分子をポリアデニル化および逆転写するための方法は周知であり、例えば、Sambrook, J., Fritsch, E.F., およびManiatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1巻、2巻、3巻(1989)に記載されている。いくつかの実施形態において、標的RNA分子は、単一の反応混合物においてポリアデニル化および逆転写される。適切な手順は、この説明のために参照により本明細書に組み入れられている、2010年8月5日に公開されたPCT公開第WO2010/985966号に記載されている。簡単に述べれば、ポリ(A)ポリメラーゼ、逆転写酵素、フォワードプライマーおよびリバースプライマー、dNTP、ATP、ならびにRNA試料が、ポリアデニル化および逆転写を可能にする適切な条件下で、適切な緩衝液(例えば、ポリ(A)ポリメラーゼ緩衝液)中、一緒にインキュベートされ、標的RNA分子に対応するcDNA分子を生じる。実施例1参照。

【0057】

いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列はポリ(U)配列を含み、ポリ(U)配列にアニールする配列は、オリゴ(dA)配列を含む。ポリウリジニル化の能力がある酵素には、ウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼが挙げられる。これらの酵素およびそれらの活性は、RNA特異的リボヌクレオチジルトランスフェラーゼの説明のために参照により組み入れられている、MartinおよびKeller (2007)「RNA-specific ribonucleotidyl transferases」RNA 13:1834~1849頁に記載されている。いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列は、リガーゼを用いて付加される。

【0058】

いくつかの実施形態において、cDNA分子の増幅および検出は、別個の反応混合物において、すなわち、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加および逆転写とは別に、実行することができる。いくつかの実施形態において、増幅および検出は、定量的リアルタイムPCRにより行われる。リアルタイムPCRを実施するための方法は周知である。いくつかの実施形態において、リアルタイムPCR反応は、ポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)、フォワードプライマーおよびリバースプライマー、dNTP、鋳型核酸、ならびに適切な緩衝液を含み、それらは、温度サイクリングに供されて、各プライマー対に対して単位複製配列を産生する。リアルタイムPCRは、当技術分野において入手可能な任意のPCR装置を用いて実施することができる。本明細書に記載された方法において、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加/逆転写のために用いられるのと同じフォワードプライマーおよびリバースプライマーが増幅/検出に用いられる。そのプライマーのうちの1つは、プローブとしての役割も果たすヘアピンプライマーであるため(下記参照)、2つのオリゴヌクレオチドだけ(すなわち、フォワードプライマーとリバースプライマーであり、別個のプローブはなし)が、標的RNA分子が単一の反応において検出され得るのに必要とされる。典型的には、リアルタイムPCRデータ収集および解析に用いられる装置は、サーマルサイクラー、蛍光励起および発光収集のための光学器械、ならびに任意で、コンピュータおよびデータ取得解析ソフトウェアを含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列の付加、逆転写、および増幅/検出は、単一の反応混合物において実行される。いくつかの実施形態において、単一の反応混合物は、ポリ(A)ポリメラーゼ、ならびに逆転写および増幅のための単一酵素、例えば、逆転写-PCR(RT-PCR)手順に用いることができる単一の熱安定性DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、単一酵素は、Roche社から市販されている、HAWKZ 05 FAST DNAポリメラーゼである。いくつかの実施形態において、単一の反応混合物は、逆転写および増幅のための単一の酵素、およびウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼなどのポリ(U)配列をRNA分子に付加する酵素を含む。

#### 【0060】

##### 試料

核酸含有試料の調製物は、生物学的供給源から得ることができ、当技術分野において公知の通常の方法を用いて調製することができる。特に、本明細書に記載された方法において有用なRNAは、ヒトに加えて、単細胞生物、ならびに植物または非ヒト動物、例えば、イヌ、ネコ、ウマ、霊長類、および他の非ヒト哺乳類などの高等生物を含む、任意の供給源から得ることができる。核酸は、様々な標準技術のいずれかにより、細胞、体液(例えば、血液、血液画分、尿など)、または組織試料から得ることができる。いくつかの実施形態において、方法は、血漿、血清、髄液、リンパ液、腹水、胸水、口腔液、および皮膚の外切片(external sections)の試料;気道、腸管、生殖管、および尿路からの試料;涙、唾液、血液細胞、幹細胞、または腫瘍の試料を用いる。試料は、生きている、もしくは死んだ生物体から、またはインビトロ培養物から得ることができる。例証的な試料には、単細胞、パラフィン包埋組織試料、および針生検を挙げることができる。

#### 【0061】

対象の核酸は、当技術分野において周知の方法を用いて単離することができ、供給源、核酸の性質、および類似した因子に応じて、特定の方法を選択する。試料核酸は純粋な形をとる必要はなく、典型的には、実施される本発明の方法の工程を可能にするのに十分、純粋である。

#### 【0062】

##### 標的RNA分子

ポリアデニル化および増幅することができる任意の標的RNA分子は、本明細書に記載された方法を用いて検出することができる。いくつかの実施形態において、標的RNA分子についての少なくともいくつかのヌクレオチド配列情報が公知であろう。例えば、増幅のために少なくとも適切なフォワードプライマーの設計を可能にするのに十分な配列情報が、一般的には、所定の標的RNA分子について入手できる。いくつかの実施形態において、標的RNA分子の3'末端における十分な配列が公知であり、この公知の配列へ部分的にアニールし、かつ方法の第1の工程において生じたポリ(A)テールへ部分的にアニールするプライマーの設計を可能にする。いくつかの実施形態において、標的には、過剰発現または過小発現が疾患を示しているRNA、組織特異的もしくは発生特異的様式で発現するRNA、または特定の刺激により誘導されるRNAを挙げることができる。

#### 【0063】

いくつかの実施形態において、少なくとも1個の標的RNA分子は、非コードRNAである。いくつかの実施形態において、適切な非コードRNA標的には、snRNA、snoRNA、stRNA、agRNA、miRNA、siRNA、piRNA、および長鎖ncRNAが挙げられる。いくつかの実施形態において、標的RNA分子には、科学文献およびmiRBaseデータベースリリース19 (microrna.sanger.ac.uk/)などの公開データベースから公知のマイクロRNAなど、そこに開示された全ての成熟miRNAおよび未熟miRNA配列を含め、任意の公知の、または未発見のマイクロRNAが挙げられる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法において検出および定量化することができるマイクロRNA標的には、乳癌において調節が解除されている、以下の表に示されたものが挙げられる。

#### 【0064】

10

20

30

40

【表 A】

マイクロRNA	配列	DCIS/IDC	P 値ウィルコクソン検定	配列番号
miR-126	TCGTACCGTGAGTAATAATGCG	下降	<0.0001	(配列番号 1)
miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	下降	<0.0001	(配列番号 2)
miR-335	TCAAGAGCAATAACGAAAAATG	下降	<0.0001	(配列番号 3)
miR-139-5p	TCTACAGTGACAGTGTCTCCAGT	下降	<0.0001	(配列番号 4)
miR-210	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA	上昇	<0.0001	(配列番号 5)
miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC	下降	<0.0001	(配列番号 6)
miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTGT	下降	<0.0001	(配列番号 7)
miR-181a	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT	上昇	<0.001	(配列番号 8)
miR-28-5p	AAGGAGCTCACAGTCTATTGA	上昇	<0.001	(配列番号 9)
miR-127-5p	CTGAAGCTCAGAGGGCTCTGAT	下降	<0.001	(配列番号 10)
miR-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	下降	<0.001	(配列番号 11)
miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGT	上昇	<0.001	(配列番号 12)
miR-29a*	ACTGATTTCTTTTGGTGTTCAGA	上昇	<0.001	(配列番号 13)
miR-381	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT	下降	<0.001	(配列番号 14)
let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	上昇	<0.001	(配列番号 15)
miR-93	CAAAGTGCTGTTCGTGCAGGTAG	上昇	<0.001	(配列番号 16)
miR-299-5p	TGGTTTACCGTCCCACATACAT	下降	<0.001	(配列番号 17)
miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT	上昇	<0.001	(配列番号 18)
miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTAT	上昇	<0.001	(配列番号 19)

## 【0065】

実施例1において、2つの標的miRNA分子、miR31およびCTL23が多重アッセイにおいて検出されている。

## 【0066】

## フォワードプライマー

いくつかの実施形態において、フォワードプライマーは、ヘアピンプライマーではなく、10～30もしくは12～25、または13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、もしくは25ヌクレオチドなどの10ヌクレオチドから100ヌクレオチドまでの範囲内の長さを有する。いくつかの実施形態において、フォワードプライマーの長さは、これらの値のいずれかによって境界される範囲内、例えば、20～23ヌクレオチドの範囲内に入る。本明細書に記載された方法に用いられるのに適した非ヘアピンフォワードプライマーを設計するための検討事項は、この説明のために参照により本明細書に組み入れられている、PCT公開第WO2010/085966号に示されている。

## 【0067】

## リバースプライマー

いくつかの実施形態において、方法に用いられるリバースプライマーは、ヘアピンプライマーではなく、15～50もしくは20～45、または21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、もしくは44ヌクレオチドの範囲内の長さなどの10ヌクレオチドから100ヌクレオチドまでの範囲内の長さを有する。いくつかの実施形態において、リバースプライマーの長さは、これらの値のいずれかによって境界される範囲内、例えば、30～45ヌクレオチドの範囲内に入る。本明細書に記載された方法に用いられるのに適した非ヘアピンリバースプライマーを設計するための検討事項は、この説明のために参照により本明細書に組み入れられている、PCT公開第WO2010/085966号に示されている(「伸長プライマー」の説明を参照)。

## 【 0 0 6 8 】

## ヘアピンプライマー

上記の方法において、特定のRNA分子を検出するためのプライマー対におけるプライマーのうちの少なくとも1つは、ヘアピンプライマーである。ヘアピンプライマーは、エネルギー供与体部分とエネルギー受容体部分との間のMETの原理を利用する。いくつかの実施形態において、METは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)であり、プライマーが供与体部分および受容体部分で標識されており、供与体部分によって放出される蛍光エネルギーが受容体部分によって吸収されるように、供与体部分がフルオロフォアであり、受容体部分がフルオロフォアであってもよい。いくつかの実施形態において、受容体部分は、供与体から吸収されたエネルギーを異なる波長で放出するフルオロフォアであり;その後、受容体の発光は、増幅反応の進行を評価するために測定されてもよい。いくつかの実施形態において、ヘアピンプライマーは、供与体-クエンチャーFRETペアで標識される。いくつかの実施形態において、ヘアピンプライマーは、受容体部分が、供与体の蛍光をクエンチするように構成される。プライマーが増幅産物の中へ取り込まれる場合、その立体配置は変化し、クエンチングは排除され(すなわち、プライマーは直線化され)、供与体部分の蛍光が検出され得る。

10

## 【 0 0 6 9 】

ヘアピンプライマーは任意の適切なサイズであり得、いくつかの実施形態において、20~100もしくは30~80もしくは35~60、または36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、もしくは59ヌクレオチドの範囲内である。いくつかの実施形態において、ヘアピンプライマーの長さは、これらの値のいずれかによって境界される範囲内、例えば、45~55ヌクレオチドの範囲内に入る。本明細書に記載された方法に用いられるのに適したヘアピンリバースプライマーを設計するための検討事項は、米国特許第5,866,336号(1999年2月2日発行)に示されている。

20

## 【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態において、ヘアピンプライマーは、以下の連続した配列を含み、または代わりに、それらからなる:(a)前記プライマーの3'末端における、前記標的配列を含む核酸鎖に相補的なヌクレオチド配列の核酸ポリメラーゼによる合成をプライムすることができるよう1つまたは複数の標的配列に十分相補的な配列を3'末端に含む8~40ヌクレオチドの第1の一本鎖ヌクレオチド配列;(b)第1の配列の5'末端における、6~30ヌクレオチドの第2のヌクレオチド配列であって、前記第1のヌクレオチド配列内のヌクレオチドが、分子エネルギー移動対の供与体部分および受容体部分からなる群から選択される第1の部分で標識されており、供与体部分が、励起された時、1つまたは複数の特定の波長のエネルギーを放出し、かつ受容体部分が、供与体部分によって放出された1つまたは複数の特定の波長でのエネルギーを吸収する、第2のヌクレオチド配列;(c)前記第2の配列の5'末端における、3~20ヌクレオチドの第3の一本鎖ヌクレオチド配列;(d)第3の配列の5'末端における、6~30ヌクレオチドの第4のヌクレオチド配列であって、前記第4のヌクレオチド配列内のヌクレオチドが、前記供与体部分および前記受容体部分からなる群から選択される第2の部分で標識されており、前記第2の部分が、前記第1のヌクレオチド配列を標識していない前記群のメンバーであり、前記第4のヌクレオチド配列が、デュプレックスが前記第4のヌクレオチド配列と前記第2のヌクレオチド配列との間で形成するように、前記第2のヌクレオチド配列に逆の順番で十分相補的であり、その結果、前記第1の部分と第2の部分が十分近接し、その結果、供与体部分が励起されてエネルギーを放出した時、受容体部分が、供与体部分によって放出されたエネルギーを吸収し、前記デュプレックスが形成されない場合、前記第1の部分と前記第2の部分が、前記第1の部分と第2の部分との間での分子エネルギー移動を妨げる距離で隔てられる、第4のヌクレオチド配列。ヌクレオチド配列の代わりに非ヌクレオチドスペーサーが用いられる実施形態において、スペーサーは、第2のヌクレオチド配列と第3のヌクレオチド配列との間に3~20ヌクレオチドと等価のスペーシングを提供し、かつヘアピンプライマーが、本明細書に記載されているように機能することを可能に

30

40

50

する任意の連結部分または1連の連結部分であり得る。適切なスペーサーは、当業者に公知である。例えば、Glen Research社は、本明細書に記載されたヘアピンプライマーにおいてスペーサーとして用いることができる、9-0-ジメトキシトリチル-トリエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホルアミダイト( $C_{36}H_{49}N_2O_7P$ )を販売している。

#### 【0071】

本明細書に記載された方法においてヘアピンプライマーがフォワードプライマーとして用いられる場合、1つまたは複数の標的配列に十分相補的である第1のヌクレオチド配列の部分は、検出されるべきRNA分子に特異的な配列を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法においてヘアピンプライマーがリバースプライマーとして用いられる場合、1つまたは複数の標的配列に十分相補的である第1のヌクレオチド配列の部分は、検出されるべきRNA分子に特異的な配列を含む。いくつかの実施形態において、方法においてヘアピンプライマーがリバースプライマーとして用いられる場合、1つまたは複数の標的配列に十分相補的である第1のヌクレオチド配列の部分は、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列(例えば、オリゴ(dT)配列またはオリゴ(dA)配列)を含む。いくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列は、長さが7~20、または7~15、または8、9、10、11、12、13、もしくは14ヌクレオチドの範囲である(または、これらの値のいずれかによって境界される範囲内の長さを有する)。いくつかの実施形態において、本明細書に記載された方法においてヘアピンプライマーがリバースプライマーとして用いられる場合、ヘアピンプライマーは、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列、およびこの配列の3'末端において(すなわち、プライマーの3'末端において)、検出されるべきRNA分子に特異的な配列を含む。いくつかの実施形態において、この標的特異的な配列は、長さが、2~10、または3、4、5、6、7、8、もしくは9ヌクレオチドの範囲である(またはこれらの値のいずれかによって境界される範囲内の長さを有する)。

#### 【0072】

供与体部分および受容体部分は、ヘアピンステム(デュプレックス領域)のいずれかの末端ヌクレオチド上に位置することができ、または内部に位置することができる。いくつかの実施形態において、供与体部分および受容体部分は、ステムの相補鎖に付着しており、一方の部分が5'末端に、他方の部分が相補鎖上で5bp離れて付着している。例えば、2つの部分は、ステムの2つの相補鎖によって形成される二重ヘリックスの5bp(180度)ターンによって相殺することができ、したがって、立体的に最も近接し、供与体の放出が受容体へ移動されるだろう(および、例えば、受容体によってクエンチされるだろう)。いくつかの実施形態において、2つの部分は、ヘアピンが閉じられた立体配置にある場合、1ヌクレオチド(3.4オングストローム)未満の距離だけ隔てられたステムの相補鎖上にあることができる。いくつかの実施形態において、2つの部分は、ヘアピンが閉じられた立体配置にある場合、ステムの相補ヌクレオチド上に、互いに正反対にある。

#### 【0073】

ヘアピンプライマーが直線化された場合、供与体部分は、METを実質的に妨げるのに十分な長い介在配列によって受容体(例えば、クエンチャー)部分から隔てられなければならない。供与体フルオロフォアおよび受容体フルオロフォアからなるFRET対が用いられる場合、2つのFRET部分は、(a)第1のステム配列の少なくとも一部、(b)ループ、および(c)第2のステム配列の少なくとも一部を含む介在配列によって隔てられる。いくつかの実施形態において、介在配列は、長さが15~25ヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、長さが20ヌクレオチドである。

#### 【0074】

いくつかの実施形態において、受容体部分は、供与体によって提供されたエネルギーを異なる波長で再放出するフルオロフォアである;すなわち、プライマーが閉じられた状態にある場合、受容体からの放出は検出されるだろうが、供与体からの放出は検出されないだろう。いくつかの実施形態において、受容体部分はクエンチャーであり、供与体によ



て放出されたエネルギーを、蛍光を発することなく吸収する。いずれの場合においても、供与体の蛍光は、プライマーが直線化された開口状態にある、すなわち、二本鎖増幅産物の中へ取り込まれた場合のみ、検出され得る。この状態におけるエネルギー移動は、最小であり、供与体からの強い放出シグナルが検出されるだろう。

【0075】

プライマーは、当技術分野において公知の標準方法により、例えば、自動DNAシンセサイザー(例えば、Biosearch社、Applied Biosystems社などから市販されているもの)の使用により、合成されてもよい。例として、ホスホロチオエートプライマーは、Steinら(1988、Nucl. Acids Res. 16:3209頁)の方法により合成されてもよく、メチルホスホネートプライマーは、多孔性ガラスポリマー支持体の使用により調製することができる(Sarinら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 :7448~7451頁)など。

【0076】

プライマーは、化学合成中に供与体部分および受容体部分で標識されてもよく、または標識を、当技術分野において公知の方法により、合成後に付着されてもよい。いくつかの実施形態において、供与体部分はフルオロフォアである。いくつかの実施形態において、供与体部分および受容体部分の両方がフルオロフォアである。

【0077】

当業者は、分光光度法の技術分野公知の技術を用いて、どのフルオロフォアが、適切な供与体-受容体FRET対にさせるかを容易に決定することができる。例えば、FAM(520nmの発光極大を有する)は、FRET対においてTAMRA、ROX、およびR6G(全て、514nmの発光極大を有する)についての適切な供与体である。プライマーは、好ましくは、合成中に修飾され、Juら(1995、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:4347~4351頁)によって記載されているように、修飾されたdT塩基がAmino-Modifier C6 dT (Glen Research)の使用により指定された位置へ導入され、修飾されたdT塩基上の第1級アミノ基が、取り込まれる。これらの修飾は、プライマーの指定された位置への蛍光色素のその後の取り込みに用いられてもよい。

【0078】

例示的な自動化およびシステム

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、自動試料ハンドリングおよび/または分析プラットフォームを用いて検出される。いくつかの実施形態において、市販の自動分析プラットフォームが利用される。例えば、いくつかの実施形態において、GeneXpert(登録商標)システム(Cepheid、Sunnyvale、CA)が利用される。

【0079】

本明細書に記載された方法は、GeneXpertシステムと共に用いるために例証されている。例示的な試料調製および分析方法は、下に記載されている。しかしながら、本発明は、特定の検出方法または分析プラットフォームに限定されない。当業者は、プラットフォームおよび方法のいくつでも利用され得ることを認識している。

【0080】

GeneXpert(登録商標)は、自己完結型の使い捨てカートリッジを利用する。試料抽出、増幅、および検出は全て、この自己完結型の「カートリッジ内実験室」内で行われてもよい(例えば、米国特許第5,958,349号、第6,403,037号、第6,440,725号、第6,783,736号、第6,818,185号参照;それぞれは、この説明のために全体として参照により本明細書に組み入れられている)。

【0081】

カートリッジの構成要素には、試薬を含有する処理チャンバー、フィルター、ならびに標的核酸を抽出し、精製し、および増幅するのに有用な捕獲テクノロジーが挙げられるが、それらに限定されない。パルプは、チャンバーからチャンバーへの液体移動を可能にし、核酸溶解構成要素および濾過構成要素を含有する。光学ウィンドウはリアルタイムの光学的検出を可能にする。反応チューブは、非常に迅速な温度サイクリングを可能にする。

【0082】

いくつかの実施形態において、GeneXpert(登録商標)システムは、拡張性のために複数

10

20

30

40

50

のモジュールを含む。各モジュールは、試料ハンドリング構成要素および分析構成要素と共に複数のカートリッジを含む。

【0083】

試料がカートリッジに加えられた後、試料は、溶解緩衝液に接触し、遊離した核酸は、シリカまたはガラス基質などの核酸結合性基質に結合する。その後、試料上清は除去され、核酸は、Tris/EDTA緩衝液などの溶出緩衝液中に溶出される。その後、溶出物は、カートリッジ内で処理され、本明細書に記載されているように標的遺伝子を検出されてもよい。いくつかの実施形態において、溶出物は、凍結乾燥粒子としてカートリッジ内に存在する試薬の少なくとも一部を再構成するために用いられる。

【0084】

いくつかの実施形態において、PCRが、1個または複数のRNA分子の存在を増幅および検出するために用いられる。いくつかの実施形態において、PCRは、AptaTaq (Roche)などのホットスタート機能をもつTaqポリメラーゼを用いる。

【0085】

いくつかの実施形態において、オフライン遠心分離が、細胞含有量が少ない試料に関してアッセイ結果を向上させるために用いられる。緩衝液が加えられた、または加えられていない試料が遠心分離され、上清が除去される。その後、ペレットは、より少ない体積の上清、緩衝液、または他の液体中に再懸濁される。その後、再懸濁されたペレットは、前に記載されているように、GeneXpert(登録商標)カートリッジへ加えられる。

【0086】

キット

本発明はまた、本明細書に記載された方法を実行するためのキットを提供する。そのようなキットは、これらの方法のいずれかを実施するために有用な1つまたは複数の試薬を含む。キットは、一般的に、試薬を、1つもしくは複数の別個の組成物として、または任意で、試薬の適合性が許容される場合、混合物として保持する1つまたは複数の容器を含むパッケージを含む。キットはまた、試料処理、洗浄、またはアッセイの任意の他の工程を行うのに有用な緩衝液、希釈液、標準液、および/または任意の他の材料などのユーザーの観点から望ましい可能性がある他の材料も含むことができる。

【0087】

キットは、好ましくは、本明細書に記載されたスクリーニング方法のうちの1つまたは複数を実行するための使用説明書を含む。本発明のキットに含まれる使用説明書は、包装材料に貼ることができ、またはパッケージ挿入物として含むことができる。使用説明書は、典型的には、文書または印刷物であるが、それらはそのようなものに限定されない。そのような使用説明書を記憶し、かつそれらをエンドユーザーへ伝達する能力がある任意の媒体が、本発明によって企図される。そのような媒体には、電子記憶媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CD ROM)などが挙げられるが、それらに限定されない。本明細書で用いられる場合、用語「使用説明書」は、使用説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含むことができる。

【0088】

いくつかの実施形態において、キットは以下を含む:(a)上記のようなフォワードプライマーおよびリバープライマーであって、フォワードプライマーが、検出されるべきRNA分子に特異的であり、リバープライマーがポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含み、上記のように、フォワードプライマーおよびリバープライマーのうちの少なくとも1つがヘアピンプライマーを含む、フォワードプライマーおよびリバープライマー;ならびに(b)ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素。

【0089】

いくつかの実施形態において、キットは、上記のようなフォワードプライマーおよびリバープライマーを含み、フォワードプライマーが、検出されるべきRNA分子に特異的であり、リバープライマーがポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列を含み、上記のように、フォワードプライマーおよびリバープライマーのうちの少なくとも1つが

10

20

30

40

50

ヘアピンプライマーを含み、キットが、前記1個または複数の特定のRNA分子に対応するcDNA分子を増幅および検出するための追加のプライマーまたはプローブを含まない。いくつかの実施形態において、このキットは、ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を含む。

【0090】

これらのキットのいくつかの実施形態において、リバープライマーは、ポリ(リボヌクレオチド)配列にアニールする配列の3'末端において、検出されるべきRNA分子に特異的なヌクレオチド配列を追加として含む。

【0091】

これらのキットのいくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列はポリ(A)配列であり、このポリ(A)配列にアニールする配列は、オリゴ(dT)配列を含む。いくつかの実施形態において、そのようなキットは、ポリ(A)配列をRNA分子に付加するためのポリ(A)ポリメラーゼを含む。

【0092】

これらのキットのいくつかの実施形態において、ポリ(リボヌクレオチド)配列はポリ(U)配列であり、このポリ(U)配列にアニールする配列は、オリゴ(dA)配列を含む。いくつかの実施形態において、そのようなキットは、ポリ(U)配列をRNA分子に付加するためのウリジリルトランスフェラーゼまたはポリ(U)ポリメラーゼを含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、フォワードプライマーはヘアピンプライマーを含み、リバープライマーはヘアピンプライマーを含まない。いくつかの実施形態において、リバープライマーはヘアピンプライマーを含み、フォワードプライマーはヘアピンプライマーを含まない。

【0094】

いくつかの実施形態において、キットは逆転写酵素を含む。いくつかの実施形態において、逆転写酵素は、ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素と同じ容器で提供される。いくつかの実施形態において、キットはDNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、単一酵素が、逆転写酵素とDNAポリメラーゼとして働く。いくつかの実施形態において、キットは、ポリ(リボヌクレオチド)配列をRNA分子に付加する能力がある酵素を、単一酵素の形をとる逆転写酵素とDNAポリメラーゼと共に含む。

【0095】

多重方法に有用ないくつかの実施形態において、キットは、検出されるべき1個のRNA分子にいずれも特異的である少なくとも2つの異なるプライマー対を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのプライマー対がヘアピンプライマーを含み、1つより多いプライマー対がヘアピンプライマーを含み、または反応における全てのプライマー対がヘアピンプライマーを含む。いくつかの実施形態において、各ヘアピンプライマーは、デュプレックスの鎖が分離した時、反応における全ての他のものから識別できる、検出可能なシグナルを放出するための手段を含む。いくつかの実施形態において、キットは、検出されるべき1つのRNA分子にいずれも特異的である少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個の異なるプライマー対を含む。

【0096】

いくつかの実施形態において、キットは、上記のように、非コードRNAを検出するための1つまたは複数のプライマー対を含む。いくつかの実施形態において、キットは、多重反応において、非コードRNAと共に、1個または複数のmRNA分子を増幅するための1つまたは複数のプライマー対を追加として含む。いくつかの実施形態において、1個または複数のmRNA分子を増幅するためのプライマー対は、ヘアピンプライマーを含む。いくつかの実施形態において、1個または複数のmRNA分子を増幅するためのプライマー対は、ヘアピンプライマーを含まない。ヘアピンプライマーがmRNA分子の検出に用いられない場合、キットは、mRNA分子を検出するための1つまたは複数のプローブを追加として含むことができ

る。いくつかの実施形態において、プローブはmRNA分子に特異的である。

【0097】

本明細書に記載された実施例および実施形態は、例証することをのみ目的とすること、ならびにそれらを鑑みれば、様々な改変または変化が当業者に示唆されるだろうし、この出願の精神と視野、および添付された特許請求の範囲の範囲内に含まれるはずであることは、理解されている。

【0098】

加えて、本明細書に引用された全ての他の刊行物、特許、および特許出願は、全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられている。

【実施例】

【0099】

(実施例1)

多重miRNAアッセイ

多重miRNAアッセイを、リバースプライマーがヘアピンプライマーである2つのプライマー対を用いて、上記のように行った。各リバースプライマーは、オリゴ(dT)配列、およびオリゴ(dT)配列の3'側に5塩基の標的特異的配列を含む。標的は、miR31およびCTL23であった。用いられたプライマーはTable 1(表1)に示されている。

【0100】

【表1】

Table1:オリゴヌクレオチド

オリゴ#	オリゴ名	5'		3'
13295	miR31-RT-FAM H	FAM	CGT GCG CGA AGC GCA CGG G(U01)C TCG ACT CGA CAG TTT TTT TTT TAG CT (配列番号 20)	
13282	miR31-F		AAA CAG GCA AGA TGC TGG CAT (配列番号 21)	
13969	CTL23-2-RT-CF4-1	CF4-CL4	CGC ACG CGA AGC GTG CGG G(U01)C AGG CGA CAA CTC TTT TTT TTT TCA GT (配列番号 22)	
13970	CTL23-2-F-1		AAACGAACCTT(A01)CT(A01)TGT(A01)GGCA (配列番号 23)	

注記:「U01」は dT-Dabcyl コンジュゲートである(Glen Research 社から市販されている);「A01」は、dT へのハイブリダイゼーション潜在能力が増加した dA の類似体である(2,6-ジアミノプリン)。

【0101】

ポリアデニル化および逆転写を以下のように行った:

【0102】

【表2】

Table2:ポリ(A)+RT 配合およびアッセイ条件

	濃度	体積(u1)
ポリ(A)ポリメラーゼ緩衝液(NEB)	10x	2
ATP	1mM	2
dNTP 混合物	1 mM	2
MuLV RT (NEB)	200U/u1	1
ポリ(A)ポリメラーゼ(NEB)	50U/u1	0.4
RT プライマー1	10uM	2
RT プライマー2	10uM	2
RNA 試料		2

RT:40°C-15 分間、90°C-4 分間

【 0 1 0 3 】

定量的リアルタイムPCRを以下のように行った：

【 0 1 0 4 】

【 表 3 】

Table3:PCR 配合およびアッセイ条件

PCR, 25 uL	lx
dNTP (10mM)	2.5
Taq ポリメラーゼ(5U/u1)	0.4
PCR 緩衝液(10x)	2.5
フォワードプライマー1 10uM	0.5
フォワードプライマー2 10uM	0.5
RT プライマー1 10uM	0.5
RT プライマー 2 10uM	0.5
cDNA	2.5
H2O	15.1
合計	25

93℃-6 秒間;60℃-35 秒間;93℃-6 秒間;64℃-35 秒間

10

20

【 0 1 0 5 】

結果は図3および図4に示されている。これらのグラフにおいて、蛍光は、PCRサイクル数に対してプロットされている。図3は、標的の希釈系列に関して一重で行った定量的リアルタイムPCRマイクロRNAアッセイの結果を示す。図4A～Bは、多重定量的リアルタイムPCRマイクロRNAアッセイの結果を示す。これらの結果は、miR31(A)およびCTL23(B)が多重で測定できることを実証している。

【図 1】

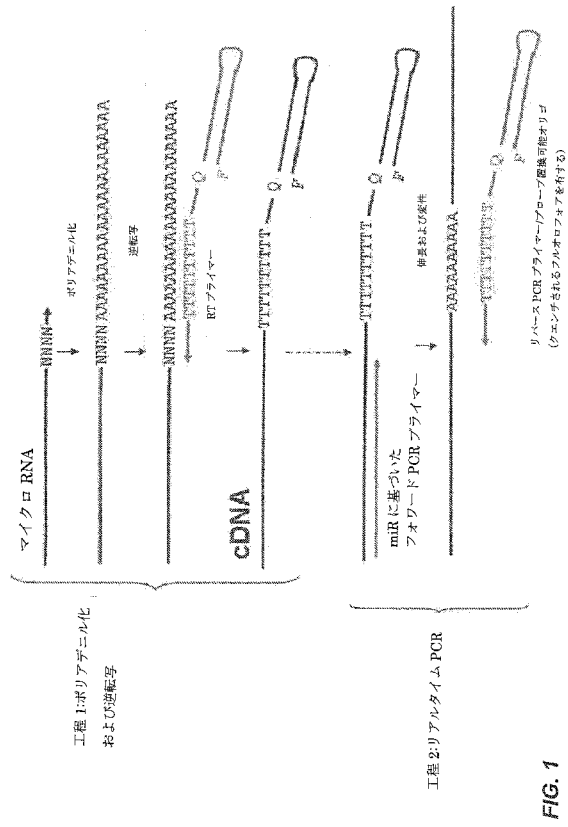


FIG. 1

【図 2】

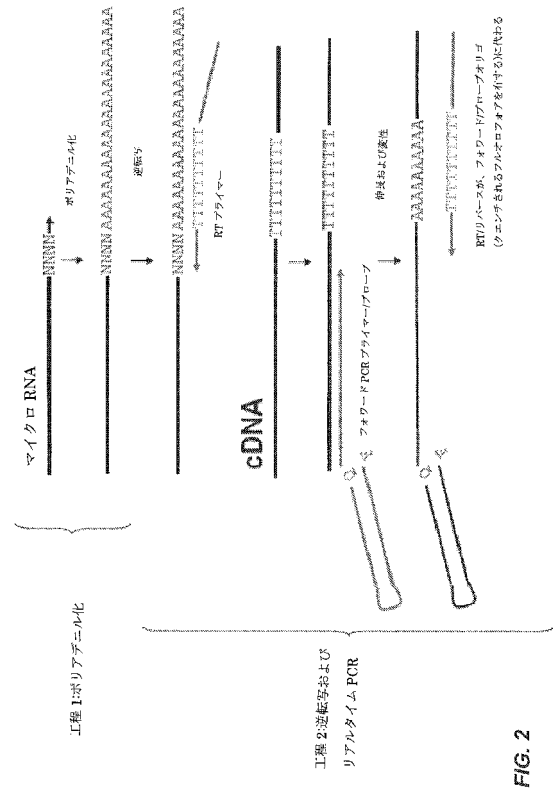


FIG. 2

【図 3】

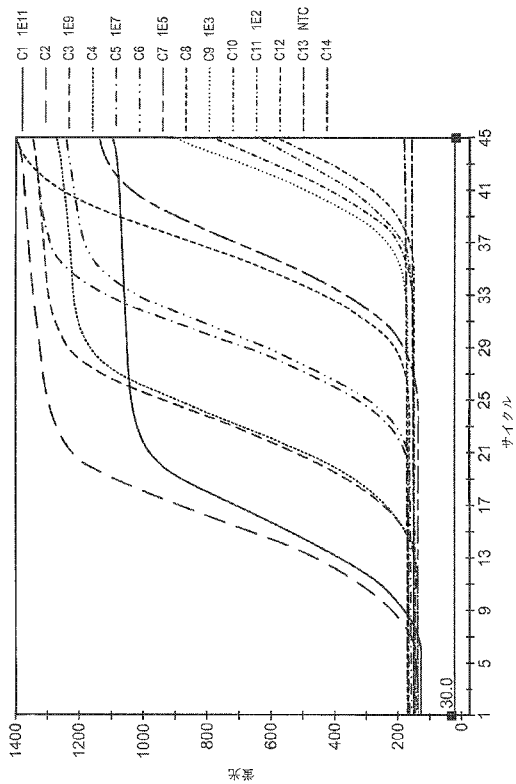


FIG. 3

【図 4 A】

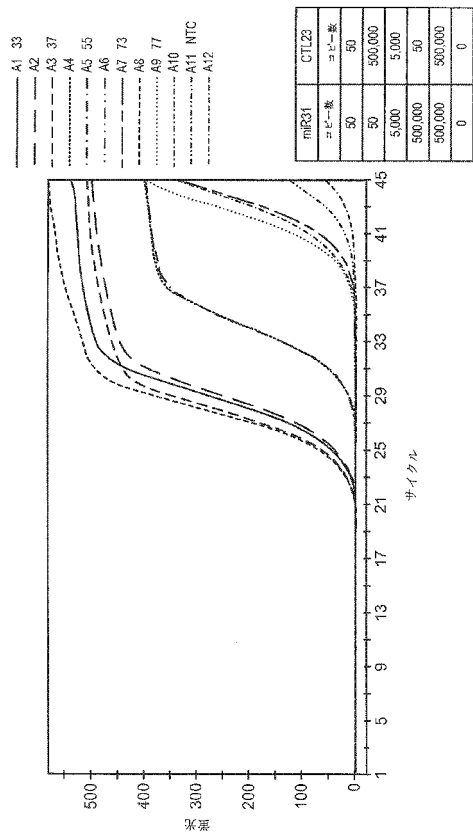


FIG. 4A

【図 4 B】

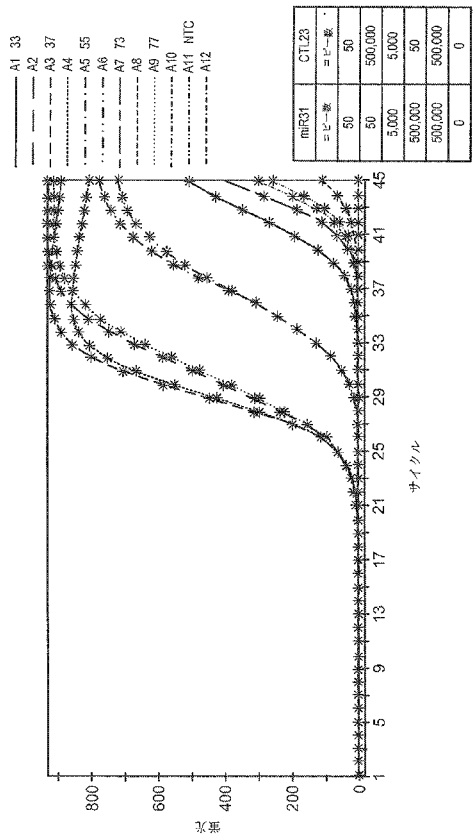

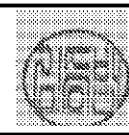


FIG. 4B

【配列表】

2015530113000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/061743
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i</b>  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68; C07H 21/04; C12P 19/34; C12P 019/34; C12Q 001/68; C12N 15/00; C12N 15/11  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: specific RNA molecule, poly ribonucleotide, forward primer, reverse primer		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010-085966 A2 (EXIQON A/S) 5 August 2010 See abstract and claim 1.	1-4, 34-36, 41-43
Y	US 2004-0259116 A1 (BECKMAN et al.) 23 December 2004 See abstract, claims 1, 2, 5 and pages 3, 23.	1-4, 34-36, 41-43
A	US 6090552 A (NAZARENKO et al) 18 July 2000 See abstract and claims 1, 6, 7, 19.	1-4, 34-36, 41-43
A	US 2005-0147975 A1 (SCHEMBRI et al.) 7 July 2005 See abstract, claims 1, 4 and figure 1.	1-4, 34-36, 41-43
A	US 2006-0188893 A1 (KUMAR et al.) 24 August 2006 See abstract, claims 1, 187.	1-4, 34-36, 41-43
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 December 2013 (19.12.2013)		Date of mailing of the international search report <b>20 December 2013 (20.12.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371 



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/061743

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

☐

on paper

☒

in electronic form

b. time of filing or furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/061743

**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.: 8,12-14,16-19,21-27,31,32,45,47-49,51,57,59-61,63-67  
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 8, 12-14, 16-19, 21-27, 31, 32, 45, 47-49, 51, 57, 59-61, 63-67 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
  
3. ☒ Claims Nos.: 5-7,9-11,15,20,28-30,33,37-40,44,46,50,52-56,58,62,68,69  
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 fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
  
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/US2013/061743**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010-085966 A2	05/08/2010	AU 2011-207826 A1 CA 2750029 A1 CN 102301011 A EP 2391736 A2 IL 214301 D0 JP 2012-516678 A SG 173506 A1 US 2012-0071332 A1 WO 2010-085966 A3	04/08/2011 05/08/2010 28/12/2011 07/12/2011 27/09/2011 26/07/2012 29/09/2011 22/03/2012 07/10/2010
US 2004-0259116 A1	23/12/2004	WO 2004-068112 A2 WO 2004-068112 A3	12/08/2004 25/11/2004
US 06090552 A	18/07/2000	AT 305476 T AU 1998-28597 A CA 2260973 A1 CA 2260973 C DE 69734283 D1 DE 69734283 T2 EP 0912597 A1 EP 0912597 A4 EP 0912597 B1 ES 2248852 T3 JP 03597869 B2 JP 2001-513623 A JP 2003-111599 A US 6117635 A WO 98-02449 A1	15/10/2005 09/02/1998 22/01/1998 18/03/2003 09/02/2006 06/07/2006 06/05/1999 11/04/2001 28/09/2005 16/03/2006 08/12/2004 04/09/2001 15/04/2003 12/09/2000 22/01/1998
US 2005-0147975 A1	07/07/2005	None	
US 2006-0188893 A1	24/08/2006	AT 469983 T AU 2004-297891 A1 CA 2512196 A1 DE 60332873 D1 EP 1585833 A2 EP 1585833 A4 EP 1585833 B1 JP 2006-512081 A US 2004-0126770 A1 US 6977153 B2 WO 2004-061119 A2 WO 2004-061119 A3	15/06/2010 29/07/2004 22/07/2004 15/07/2010 19/10/2005 14/02/2007 02/06/2010 13/04/2006 01/07/2004 20/12/2005 22/07/2004 11/11/2004

## フロントページの続き

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

(72)発明者 エドウィン・ウェイ・ルン・ライ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94089・サニーベール・カリビアン・ドライブ・904

(72)発明者 セルゲイ・ロコフ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94089・サニーベール・カリビアン・ドライブ・904

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ53 QR08 QR35 QR55 QR58 QR62 QS25 QS34 QX02