(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2006-511191
(P2006-511191A)
(43)公表日　平成18年4月6日(2006.4.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	2G045
C09K 11/06	(2006.01)	C09K	11/06		4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063
G01N 33/58	(2006.01)	G01N	33/58	ZNAA	

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 64 頁）

(21)出願番号　特願2003-562312 (P2003-562312)
(86)(22)出願日　平成14年12月10日 (2002.12.10)
(85)翻訳文提出日　平成16年9月22日 (2004.9.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/039564
(87)国際公開番号　WO2003/062445
(87)国際公開日　平成15年7月31日 (2003.7.31)
(31)優先権主張番号　60/351,637
(32)優先日　平成14年1月23日 (2002.1.23)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　10/165,410
(32)優先日　平成14年6月6日 (2002.6.6)
(33)優先権主張国　米国(US)

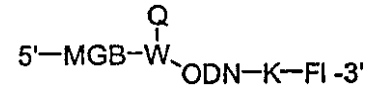
(71)出願人　500461572
エポック・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ワシントン　９８０２１　ボセル　トゥエンティサード・ドライブ　サウス・イースト　２１７２０　スイート　１５０
２１７２０２３ＲＤ　ＤＲＩＶＥ，Ｓ．Ｅ．，ＳＵＩＴＥ　１５０，ＢＯＴＨＥＬＬ，ＷＡＳＨＩＮＧＴＯＮ　９８０２１，ＵＮＩＴＥＤ　ＳＴＡＴＥＳ　ＯＦ　ＡＭＥＲＩＣＡ
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リアルタイム直鎖状検出プローブ：５’－副溝バインダーを含む感度のよいＰＣＲ分析用プローブ

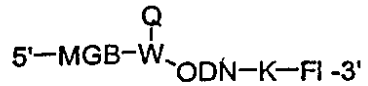
(57)【要約】
オリゴヌクレオチドプローブ／複合体を、増幅をモニターするアッセイにおけるそれらの使用方法と共に提供する。ここで、生じたシグナルは、５'ヌクレアーゼ消化には依存しない。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリヌクレオチド増幅を連続的にモニタリングするための方法であって、
(a)標的配列を含むサンプルを、標的配列の領域と相補的な１以上のオリゴヌクレオチドプライマー、重合化酵素、ヌクレオチド基質、および以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と合わせ、混合物を提供すること、
【化１】



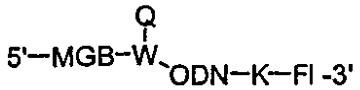
[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアであり、そして該ODN部分は、増幅される標的配列の一部に相補的な配列を有する]
(b)該ポリヌクレオチドの増幅に好ましい条件下で該混合物をインキュベーションすること、および
(c)増幅した標的にハイブリダイゼーションした複合体に生ずる蛍光をモニタリングすることにより該増幅を連続的にモニターすること
を含む該方法を提供する。
【請求項２】
該オリゴヌクレオチド複合体はヌクレアーゼ耐性であり、溶液中で蛍光を発し、そしてハイブリダイゼーション前の蛍光は、該標的配列へのハイブリダイゼーション後の蛍光の50%未満である、請求項1の方法。
【請求項３】
該MGB部分が、CC1065類似体、レクシトロプシン、ディスタマイシン、ネトロプシン、ベレニル、デュオカルマイシン、ペンタミジン、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドールおよびピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピンからなる群から選択される、請求項2の方法。
【請求項４】
該Fl部分が、約400nmから約800nmの放射波長を有するフルオロフォアであり、該フルオロフォアは、クマリン、レゾルフィン、キサンテン、ベンゾキサンテン、シアニンおよびbodipy類似体からなる群から選択される、請求項2の方法。
【請求項５】
該Q部分は、モノアゾおよびビスアゾ色素からなる群から選択されるメンバーである、請求項2の方法。
【請求項６】
該複合体の該ODN部分は8-25ヌクレオチドの長さである、請求項2の方法。
【請求項７】
該複合体の該ODN部分は8-15ヌクレオチドの長さであり、Kは、C、O、N、S、PおよびSiからなる群から選択される10-50主鎖原子の長さを有するリンカーである、請求項2の方法。
【請求項８】
該ODN部分が12ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコールリンカーである；該ODN部分が13から15ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコール、リボースまたはデオキシリボースリンカーである；および該ODN部分が16-20ヌクレオチドを有するとき、該Kは1から20主鎖原子を有するリンカーであり、但し、該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも20%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項7の方法。
【請求項９】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも50%の蛍光の増加を提

供するのに十分である、請求項8の方法。
【請求項１０】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも100%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項8の方法。
【請求項１１】
遺伝子発現をモニターする方法であって、
(a)種々の配列のオリゴヌクレオチドプローブのアレイを提供すること、
(b)ハイブリダイゼーション条件下、該アレイと共にポリヌクレオチド群をインキュベーションすること、および
(c)該アレイ中のどのオリゴヌクレオチドプローブが該ポリヌクレオチド群とハイブリダイズするか測定すること、ここで、オリゴヌクレオチドプローブの１以上は式:
【化２】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである]
を有するオリゴヌクレオチド複合体である、
を含む該方法。
【請求項１２】
該MGB部分は、CC1065類似体、レクシトロプシン、ディスタマイシン、ネトロプシン、ベレニル、デュオカルマイシン、ペンタミジン、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドールおよびピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピンからなる群から選択され、該Fl部分は約400nmから約800nmの放射波長を有するフルオロフォアであり、該フルオロフォアはクマリン、レゾルフィン、キサンテン、ベンゾキサンテン、シアニンおよびbodipy類似体からなる群から選択され、そして該Q部分はモノアゾおよびビスアゾ色素からなる群から選択されるメンバーである、請求項11の方法。
【請求項１３】
該ODN部分が12ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコールリンカーである; 該ODN部分が13から15ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコール、リボースまたはデオキシリボースリンカーである; および該ODN部分が16-20ヌクレオチドを有するとき、該Kは1から20主鎖原子を有するリンカーであり、但し、該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも20%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項12の方法。
【請求項１４】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも50%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項13の方法。
【請求項１５】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも100%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項14の方法。
【請求項１６】
単一のヌクレオチドが相違しているポリヌクレオチド間で識別する方法であって、
(a)少なくとも2つのポリヌクレオチドのそれぞれを以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と共に別々にインキュベーションすること、

【化３】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアであり、該複合体はハイブリダイゼーション条件で特定の配列を有し、ここで、ポリヌクレオチドの１つは該オリゴヌクレオチド複合体に完全に相補的である標的配列を有し、他のポリヌクレオチドの少なくとも１つは該オリゴヌクレオチド複合体と一ヌクレオチドのミスマッチを有する標的配列を有する]、および
(b)該ポリヌクレオチドのそれぞれとオリゴヌクレオチド複合体との間のハイブリダイゼーションの強さを測定すること、
を含む該方法。

【請求項１７】
該MGB部分は、CC1065類似体、レクシトロプシン、ディスタマイシン、ネトロプシン、ベレニル,デュオカルマイシン、ペンタミジン、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドールおよびピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピンからなる群から選択され、該Fl部分は約400nmから約800nmの放射波長を有するフルオロフォアであり、該フルオロフォアはクマリン、レゾルフィン、キサンテン、ベンゾキサンテン、シアニンおよびBODIPY類似体からなる群から選択され、そして該Q部分はモノアゾおよびビスアゾ色素からなる群から選択されるメンバーである、請求項16の方法。

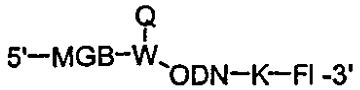
【請求項１８】
該ODN部分が12ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコールリンカーである; 該ODN部分が13から15ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコール、リボースまたはデオキシリボースリンカーである; および該ODN部分が16-20ヌクレオチドを有するとき、該Kは1から20主鎖原子を有するリンカーであり、但し、該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも20%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項17の方法。

【請求項１９】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも50%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項18の方法。

【請求項２０】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも100%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項19の方法。

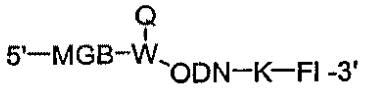
【請求項２１】
ポリヌクレオチド中の標的配列を検出する方法であって、ここで、該ポリヌクレオチドは他のポリヌクレオチドの混合物中に存在し、そして該混合物中の他のポリヌクレオチドの１以上は該標的配列とは同一ではないが関連する配列を含む、
(a)ポリヌクレオチドの混合物を、以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と接触させること:

【化４】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、

ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである；ここで、該複合体は、該複合体のODN部分と完全に相補的である該標的配列とのみ安定にハイブリッドを形成し、該複合体は、他のポリヌクレオチドの何れとも安定なハイブリッドを形成することはない]、および
(b)ハイブリッド形成により生ずる蛍光を測定すること、それによりハイブリッド形成が該標的配列の存在を示す、
を含む該方法。
【請求項２２】
該MGB部分は、CC1065類似体、レクシトロプシン、ディスタマイシン、ネトロプシン、ベレニル,デュオカルマイシン、ペンタミジン、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドールおよびピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピンからなる群から選択され、該Fl部分は約400nmから約800nmの放射波長を有するフルオロフォアであり、該フルオロフォアはクマリン、レゾルフィン、キサンテン、ベンゾキサンテン、シアニンおよびBODIPY類似体からなる群から選択され、該Q部分はモノアゾおよびビスアゾ色素からなる群から選択されるメンバーである、請求項21の方法。
【請求項２３】
該ODN部分が12ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコールリンカーである；該ODN部分が13から15ヌクレオチドを有するとき、該Kは8から25主鎖原子の長さを有するポリアルキレングリコール、リボースまたはデオキシリボースリンカーである；および該ODN部分が16-20ヌクレオチドを有するとき、該Kは1から20主鎖原子を有するリンカーであり、但し、該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも20%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項22の方法。
【請求項２４】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して50%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項23の方法。
【請求項２５】
該リンカーは、Kが結合である同一の複合体と比較して少なくとも100%の蛍光の増加を提供するのに十分である、請求項24の方法。
【請求項２６】
野生型、変異およびヘテロ接合標的ポリヌクレオチドを識別する方法であって、
(a)標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを２つのプローブと接触させること、ここで、第一のプローブは該野生型標的ポリヌクレオチドに特異的であり、第二のプローブは該変異標的ポリヌクレオチドに特異的であり、該プローブのそれぞれは以下の式を有する：
【化５】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである；ここで、該第一および第二のプローブは異なるフルオロフォアを有し、該プローブのそれぞれは、該プローブのODN部分に完全に相補的である標的配列とのみ安定にハイブリッドを形成する]、および
(b)ハイブリッド形成により生ずる蛍光を測定すること、それにより、ハイブリッド形成が、野生型、変異およびヘテロ接合の標的ポリヌクレオチドのそれぞれの存在または非存在を示す、
を含む該方法。
【請求項２７】
該第一および第二のプローブとそのそれぞれの標的の間で生ずるそれぞれのハイブリッ

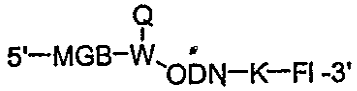
ドの融解温度(Tm)が互いに5℃以内である、請求項26の方法。
【請求項２８】
該プローブのそれぞれのODN部分が、8から18塩基または修飾塩基を有するオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドである、請求項26の方法。
【請求項２９】
該プローブのそれぞれのODN部分が、10から15塩基または修飾塩基を有するオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドである、請求項26の方法。
【請求項３０】
該プローブのそれぞれのフルオロフォア部分は、5-FAM(商標)、6-FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、HEX(商標)、VIC(商標)、NED(商標)、TAMRA(商標)、ROX(商標)およびYY(商標)からなる群から選択される、請求項26の方法。
【請求項３１】
該プローブのそれぞれのODN部分は、少なくとも１つの修飾塩基を含む、請求項26の方法。
【請求項３２】
それぞれの修飾塩基が、6-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4(5H)-オン、4-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、1H-ピラゾロン[5,4-d]ピリミジン-4(5H)-6(7H)-ジオン、6-アミノ-3-プロプ-1-イニル-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、6-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)1-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、6-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、4-アミノ-3-(プロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、4-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、4-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、3-プロプ-1-イニル-4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、2-(4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)エチノ-1-オール、3-(2-アミノエチニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、5-プロプ-1-イニル-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、6-アミノ-5-プロプ-1-イニル-3-ジヒドロピリミジン-2-オン、6-アミノ-5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、6-アミノ-5-(3-アミノプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、5-[4-アミノ-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)ピラゾール[3,4-d]ピリミジニル]-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オール、6-アミノ-l-[4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、4-(4,6-ジアミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)-ブチ-3-イノ-1-オール、6-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、5-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1H-ピリミジン-2,4-ジオン、3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミン、3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミンおよび3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミンからなる群から独立して選択される、請求項31の方法。
【請求項３３】
該サンプルを、増幅条件下、プライマーの一群と更に接触させ、それぞれのプライマーは、6-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4(5H)-オン、4-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、1H-ピラゾロ[5,4-d]ピリミジン-4(5H)-6(7H)-ジオン、6-アミノ-3-プロプ-1-イニル-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、6-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)1-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、6-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、4-アミノ-3-(プロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、4-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、4-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、3-プロプ-1-イニル-4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、2-(4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)エチノ-1-オール、3-(2-アミノエチニル)ピラゾロ[3,4-d]ピ

リミジン-4,6-ジアミン、5-プロプ-1-イニル-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、6-アミノ-5-プロプ-1-イニル-3-ジヒドロピリミジン-2-オン、6-アミノ-5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、6-アミノ-5-(3-アミノプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、5-[4-アミノ-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)ピラゾール[3,4-d]ピリミジニル]-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オール、6-アミノ-1-[4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、4-(4,6-ジアミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)-ブチ-3-イノ-1-オール、6-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、5-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1H-ピリミジン-2,4-ジオン、3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミン、3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミンおよび3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミンからなる群から選択される1から10の修飾塩基を含む、請求項26の方法。

【請求項３４】

式:

【化６】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである; ここで該ODNは少なくとも3連続のグアニンヌクレオチドを伴う6から18ヌクレオチドを有し、該グアニンヌクレオチド塩基の少なくとも１つはPPGで置換されている]

を有するオリゴヌクレオチド複合体。

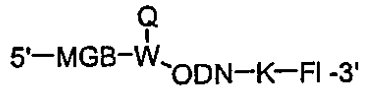
【請求項３５】

該ODN部分は、RNA、キメラ、PNAまたはロックされた核酸である、請求項34のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項３６】

式:

【化７】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである; ここで該ODN部分は、アデニンおよびチミン塩基を少なくとも30%有する標的配列に相補的である6から18ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを有し、但し、該ODN部分は、修飾塩基のない複合体と比較して、二重鎖形成の安定性を少なくとも3℃高めるのに十分である修飾塩基を少なくとも１つ含む]

を有するオリゴヌクレオチド複合体。

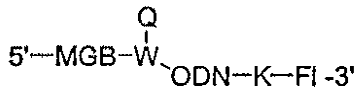
【請求項３７】

該ODN部分がRNA、キメラ、PNAまたはロックされた核酸である、請求項36のオリゴヌクレオチド複合体。

【請求項３８】

該標的配列はアデニンおよびチミン塩基を少なくとも50%有し、該複合体は、修飾塩基のない複合体と比較して、二重鎖形成の安定性を少なくとも5℃高めるのに十分な修飾塩

基置換を有する、請求項36のオリゴヌクレオチド複合体。
【請求項３９】
2種類のオリゴヌクレオチド複合体を該サンプルと合わし、ここで該複合体のそれぞれは種々のフルオロフォアを有する、請求項1の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本出願の関連出願
本出願は、２００２年１月２３日出願の仮出願60/351,637、および２００２年６月６日出願のUSSN 10/165,410の利益を主張する。それらの何れの開示も引用により本明細書に加える。
【０００２】
連邦政府後援の研究または開発によりなされた発明の権利に関する陳述
適用されず。
【０００３】
「配列表」、表またはコンパクトディスクで提出のコンピュータープログラムリスト添付物についての言及
なし。
【０００４】
発明の背景
リアルタイムDNA増幅および検出方法は標的の配列の同定および定量化に重要である。事前のハイブリダイゼーション増幅を必要としないからである。増幅およびハイブリダイゼーションは一度のステップに組み合わされ、完全な自動化のもと、ラージスケールであり、閉管型で行われ得る。
【０００５】
リアルタイムPCRにハイブリダイゼーション-誘発蛍光プローブを使用する方法は、DNAポリメラーゼにより消化されたプローブのクエンチ-リリース蛍光(quench-release fluorescence)(例えば、TaqMa71、MGB-TaqManを用いる方法)または完全プローブのハイブリダイゼーション-誘発蛍光(例えば、分子標識、および直鎖状プローブ、米国特許6,030,787、および米国特許5,723,591参照)の何れかに基づいている。一般に、該プローブは、アニーリング段階でPCR産物の内部領域とハイブリダイズするように設計する。TaqManおよびMGB-TaqManを用いるこれらの方法では、接近するDNAポリメラーゼの5'-エキソヌクレアーゼ活性により、フルオロフォア(fluorophore)とクエンチャー(quencher)の間でプローブが切断され、それによって蛍光を発する。
【０００６】
当分野に必要なものは、「リアルタイム」増幅法に有用であり、短い長さの種々のヌクレオチド塩基で調製され得る、新規ヌクレオチドおよび複合体(conjugate)である。本発明は、そのようなプローブおよび複合体ならびにそれらを使用する方法を提供する。
【０００７】
本発明の要約
１つの態様では、本発明は、最も一般的には5'-MGB-Q-ODN-Fl-3'プローブまたは複合体と示されるオリゴヌクレオチドプローブ(またはオリゴヌクレオチド複合体、以下、「プローブ／複合体」、「プローブ」または「複合体」)を提供する。
【０００８】
実施態様の１つでは、該5'-MGB-Q-ODN-Fl-3'プローブまたは複合体は、式：
【化１】

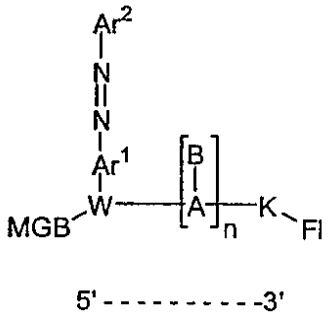


[式中、MGBは副溝バインダー(minor groove binder)であり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである]
を有する。

【０００９】

更に好ましい実施態様では、該オリゴヌクレオチドプローブ／複合体は式：

【化２】



[式中、MGB、W、KおよびFlは上記定義の通りであり、$[A\text{-}B]_n$は、核酸オリゴマー(例えば、DNA、RNA、PNAまたはそれらの任意の組合せであり、修飾塩基および糖を伴うものも含まれる)を示し、ここで、Aは糖リン酸バックボーン、修飾糖リン酸バックボーン、ロックされた(locked)核酸バックボーン、ペプチドバックボーンまたは核酸調製に使用するそれらの変異型を示し、そしてBは核酸塩基、修飾塩基または以下でより詳細に記載するような塩基類似体を示す]
を有する。下付きのnは、約3から約100、好ましくは6から約50、およびより好ましくは8から約20の整数である。

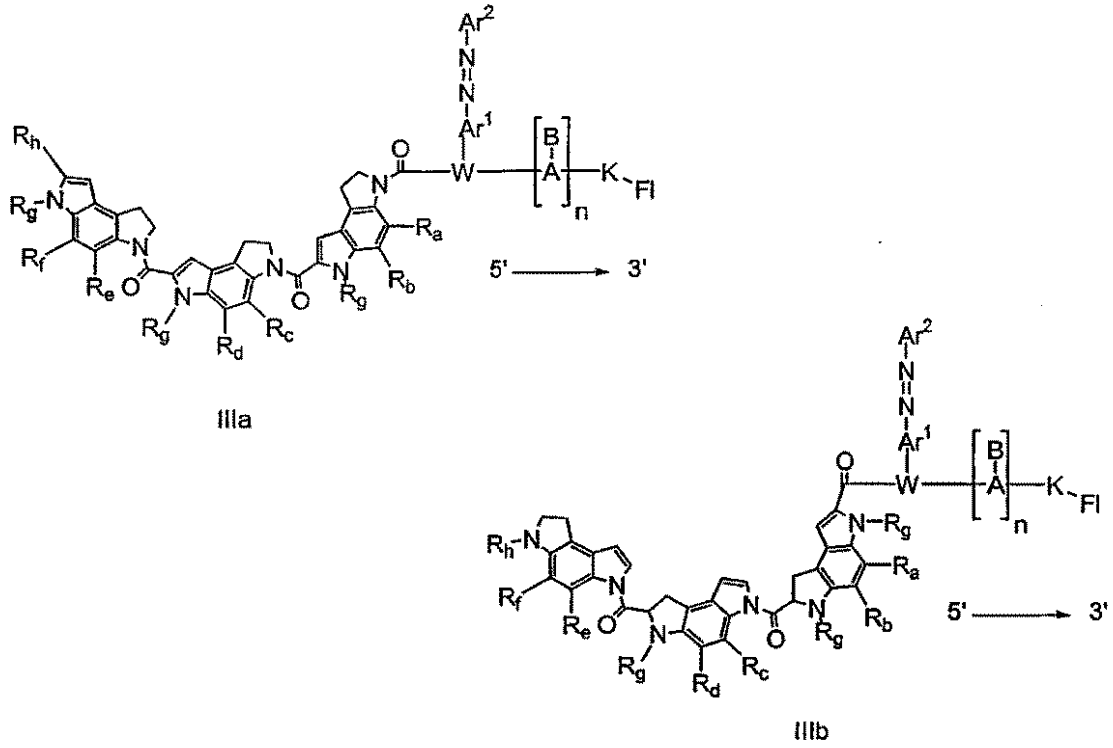
【００１０】

再び式IIについて、記号Ar^1およびAr^2はそれぞれ置換または非置換アリール基を示す。特定の好ましい実施態様では、Ar^1は、例えば、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノなどのような１以上の電子供与基で置換されており、そしてAr^2は、例えば、ニトロ、シアノ、カルボキシ、スルホニル、ハロゲンなどのような１以上の電子吸引基で置換されている。また他の実施態様では、Ar^2は式$-U=U-Ar^3$[式中、それぞれのUはCH、C(R)およびNから独立して選択され、ここでRは$(C_1\text{-}C_8)$アルキル基であり、そしてAr^3は置換または非置換アリール基である]を有する基で置換されている。Ar^1、Ar^2およびAr^3のそれぞれの好ましいアリール基はフェニル基である。

【００１１】

また更に好ましい実施態様では、該オリゴヌクレオチドプローブ／複合体は、

【化３】

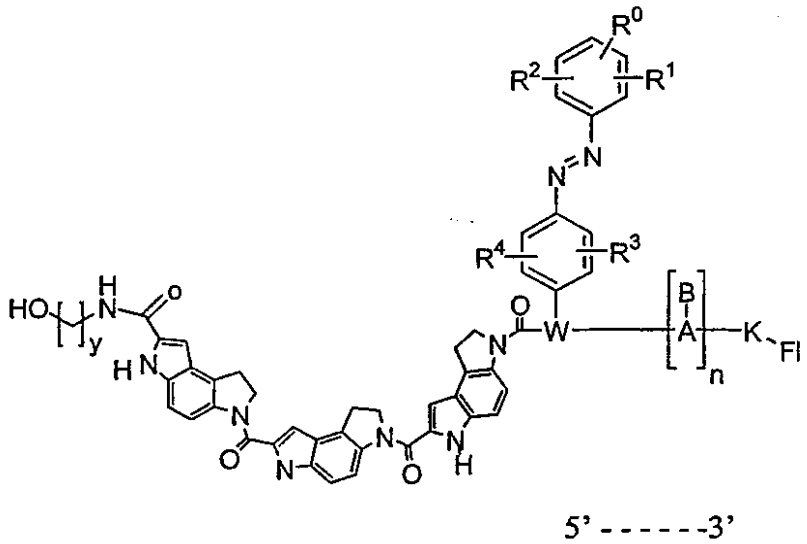


[式中、Ar^1、Ar^2、W、K、Fl、A、Bおよび下付きのnは上記定義の通りであり、記号R_a、R_b、R_c、R_d、R_eおよびR_fはH、ハロゲン、$(C_1\text{-}C_8)$アルキル、OR_g、$N(R_g)_2$、$N^+(R_g)_3$、SR_g、COR_g、CO_2R_g、$CON(R_g)_2$、$(CH_2)_mSO_3^-$、$(CH_2)_mCO_2^-$、$(CH_2)_mOPO_3^{-2}$、および$NHC(O)(CH_2)_mCO_2^-$、ならびにそれらのエステルおよび塩から選択される置換基を示し、ここで、それぞれのR_gは独立してHまたは$(C_1\text{-}C_8)$アルキルであり、そして下付きのmは0から6の整数である]から選択される式を有する。記号R_hはH、または環式、非環式またはそれらの組合せの何れかであるC、N、O、PおよびSから選択される1-30原子を有し、利用し得る原子価を埋める更なる水素原子を有する基(典型的に、固相合成に使用した連結基の痕跡)を示す。

【００１２】

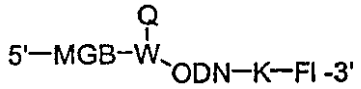
また更に好ましい実施態様では、該オリゴヌクレオチドプローブ／複合体は式：

【化４】

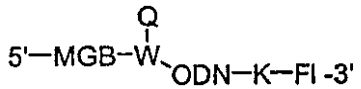


[式中、W、K、Fl、A、Bおよび下付きのnは上記定義の通りであり、記号R^0、R^1およびR^2はHまたは電子吸引基を示し、記号R^3およびR^4はHまたは電子供与基を示し、そして下付きの

mは1から20の整数である]
を有する。特に好ましい実施態様では、Wは-$(CH_2)_3$N(-)-$(CH_2)_3$-; R^0 = NO_2、R^1 = Cl; R^2 = R^3 =R^4 = H; Kは(C_1-C_6)アルキレンリンカーおよびy=5である。
【００１３】
上記で提供の該プローブまたは複合体は、有用性、特にリアルタイムPCR増幅法において有用性を有する。
【００１４】
従って、本発明は、更に、ポリヌクレオチド増幅を連続的にモニタリングするための方法であって、以下を含む該方法を提供する：
(a)標的配列を含むサンプルを、標的配列の領域と相補的な１以上のオリゴヌクレオチドプライマー、重合化酵素(polymerizing enzyme)、ヌクレオチド基質、および以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と合わせ、混合物を提供すること、
【化５】

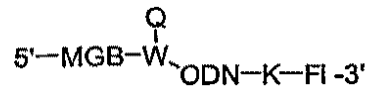


【００１５】
ここで、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基でありそしてFlはフルオロフォアであり、そしてODN部分は、増幅される標的配列の一部に相補的な配列を有する、
(b)重合化に好ましい条件下で該混合物をインキュベーションすること、および
(c)増幅した標的にハイブリダイゼーションした複合体に生ずる蛍光をモニタリングすることにより増幅を連続的にモニターすること。
【００１６】
関連の態様では、本発明は遺伝子発現をモニターする方法であって、以下を含む該方法を提供する：
(a)種々の配列のオリゴヌクレオチドプローブのアレイを提供すること、
(b)ハイブリダイゼーション条件下、該アレイと共にポリヌクレオチド群をインキュベーションすること、および
(c)該アレイ中のどのオリゴヌクレオチドプローブが該ポリヌクレオチド群とハイブリダイズするか測定すること。
【００１７】
ここで、オリゴヌクレオチドプローブの１以上は式:
【化６】



を有する。
【００１８】
該式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである。
【００１９】
また他の態様では、本発明はポリヌクレオチド中の標的配列を検出する方法を提供し、ここで、該ポリヌクレオチドは他のポリヌクレオチド混合物中に存在し、そして該混合物中の他のポリヌクレオチドの１以上は該標的配列とは同一ではないが関連する配列を含み、該方法は、以下を含む:
(a)ポリヌクレオチドの混合物を、以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と接触させること:

【化７】



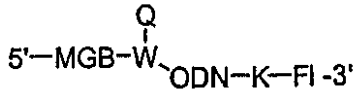
【００２０】

式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである；ここで、該複合体は、該複合体のODN部分と完全に相補的である該標的配列とのみ安定にハイブリッドを形成し、そして該複合体は、他のポリヌクレオチドの何れとも安定なハイブリッドを形成することはない；および
(b)ハイブリッド形成により生ずる蛍光を測定し、それによりハイブリッド形成が該標的配列の存在を示す。

【００２１】

また他の態様では、本発明は野生型、変異およびヘテロ接合の標的ポリヌクレオチドを識別する方法であって、以下を含む該方法を提供する：
(a)標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを２つのプローブと接触させること、ここで、第一のプローブは該野生型標的ポリヌクレオチドに特異的であり、第二のプローブは該変異標的ポリヌクレオチドに特異的であり、該プローブのそれぞれは以下の式を有する：

【化８】



【００２２】

式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである；ここで、該第一および第二のプローブは異なるフルオロフォアを有し、該プローブのそれぞれは、該プローブのODN部分に完全に相補的である標的配列とのみ安定にハイブリッドを形成する；および
(b)ハイブリッド形成により生ずる蛍光を測定すること、それにより、ハイブリッド形成が、野生型、変異およびヘテロ接合の標的ポリヌクレオチドのそれぞれの存在または非存在を示す。

【００２３】

上記に加えて、本発明は、更に、１以上のプライマー、好ましくはAT-リッチ配列またはG-リッチ配列(3連続以上のG)に使用し得る修飾塩基を有するものおよび上記提供の式を有する１以上のプローブを含む、プローブキットを提供する。

【００２４】

図面の簡単な説明

図1は、a)5'-MGB-Q-ODN-Fl複合体の構造およびb)5'-MGB-Q-ODN-F1プローブによるDNA標的の検出を示す。ここで、該プローブは消化されていない。

【００２５】

図2は、MGB Eclipse(商標)(A)、Molecular Beacon(B)およびTaqMan MGB(C)プローブの蛍光の様子および5'-ヌクレアーゼ耐性を示す。リアルタイムPCRは、Light Cycler (Idaho Technology)の鋳型としてヒト「66 son」系統DNAで述べられているように、Light CyclerにおいてRRM1プライマーおよびMGB Eclipse(商標)(A, i)、Molecular Beacon(B, i)、およびTaqMan(登録商標) MGB(C, i) FAM-標識化または^{32}P-標識化プローブ(A, ii; B, ii; C, ii)を用い行った。蛍光の読み取りは該反応の変性ステップ(９５℃)およびアニーリングステップ(５６℃)で行った。放射性プローブの対照反応物はTaqポリメラーゼを有していなかった(酵素なしのレーン)。PCRの完了後、放射性反応物を電気泳動し、オートラジオグラフし、そしてホスホイメージャー(phosphoimager)で分析した。それぞれのイメージをリアルタイム蛍光プロットの右に示している。

【００２６】
図3はMGB-Q-ODN-Flプローブの感度を示す。HSV DNA標的(5・10^6→5・10^0コピーの範囲)の測定(titration)は、単一コピーの検出能力が優れているダイナミックレンジを示す。
【００２７】
図4は、CYP2D6遺伝子のプローブを含むスーパーGを伴う4 C/T多形のリアルタイム検出を示す。「C」プローブはFAMで標識されている;「T」プローブはYakima Yellow(商標)で標識されている。左の曲線は陽性曲線の「C」DNAおよび陰性曲線の「T」DNA(平らなまま)を伴う「FAM」チャンネルである。右の曲線は陽性曲線の「T」DNAおよび陰性曲線の「C」DNAを伴う「Yakima Yellow」チャンネルである。また、陰性は両チャンネルにおいて鋳型なしの対照である。
【００２８】
図5はDNAサンプル中のCYP2D6対立遺伝子のリアルタイムMGB-Eclipse(商標)プローブ検出の散布図である。
【００２９】
図6はc-myc遺伝子発現のRT-PCR検出を示す。
【００３０】
図7は、融解曲線分析による野生型、変異およびヘテロ接合のMTHFR対立遺伝子の検出を示す。それぞれのチューブは、プローブおよびヒトゲノムDNA 10ngの両方を含む。融解曲線はPCR増幅後、適当な放射チャンネルのそれぞれのプローブで得られた。
【００３１】
図8は、AT-リッチ領域のアッセイを行うために、幾つかの通常の塩基が修飾塩基で置換されたプライマーおよびプローブの使用を示す。
【００３２】
図9はCapA標的配列(pOX2プラスミド、Bacillus anthracisゲノム)の測定曲線を示し、ここで、それぞれの希釈物は、適当なプライマーセットと共に一定量の共通の内部対照を含む。
【００３３】
図10は好ましいMGB-Eclipse(商標)プローブおよび関連のMGBTaqMan(登録商標)プローブの構造を提供する。Flは、以下でより詳細に記載するような市場で入手可能なフルオロフォアであって、ホスホアミダイト結合法を使用し結合し得るものを示す。
【００３４】
本発明の詳細な説明
定義
以下(および上記)の反応スキームおよび記載において、略語MGB、FL、Q、CPGおよびODNは、それぞれ、「副溝バインダー(minor groove binder)」、「蛍光標識」または「フルオロフォア(fluorophor)」、「クエンチャー(quencher)」、「コントロールされた多孔性ガラス(controlled pore glass)」(固体支持体の例として)および「オリゴヌクレオチド」部分または分子、および前後関係から明らかであるものを意味する。特定の式では、基$[A-B]_n$は「n」塩基(B)を有し、「n」の糖、修飾糖またはアミノ酸(A)のバックボーンとして連結する、オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、またはペプチド-核酸をいうのに使用する。用語「プローブ」および「複合体」は互換的に使用し、結合した副溝バインダー、フルオロフォアおよびクエンチャーを有するオリゴヌクレオチドをいう。
【００３５】
特記しない限り、明細書および特許請求の範囲で使用する以下の用語は以下の意味を有する。
【００３６】
用語「蛍光標識」または「フルオロフォア」は約400から900nmの間で蛍光放射が最大となる化合物をいう。これらの化合物には、Cy2(商標)(506)、GFP(赤方にシフトした)(507)、YO-PRO(商標)-1(509)、YOYO(商標)-1(509)、カルセイン(517)、FITC(518)、FluorX(商標)(519)、Alexa(商標)(520)、ローダミン110(520)、5-FAM(522)、Oregon Green(商標)50

0(522)、Oregon Green(商標)488(524)、RiboGreen(商標)(525)、Rhodamine Green(商標)(527)、ローダミン123(529)、Magnesium Green(商標)(531)、Calcium Green(商標)(533)、TO-PRO(商標)-1(533)、TOTO(登録商標)-1(533)、JOE(548)、BODIPY(登録商標)530/550(550)、Dil(565)、BODIPY(登録商標)TMR(568)、BODIPY(登録商標)558/568(568)、BODIPY(登録商標)564/570(570)、Cy3(商標)(570)、Alexa(商標)546(570)、TRITC(572)、Magnesium Orange(商標)(575)、フィコエリトリンR&B(575)、ローダミンファロイジン(575)、Calcium Orange(商標)(576)、ピロニンY(580)、ローダミンB(580)、TAMRA(582)、Rhodamine Red(商標)(590)、Cy3.5(商標)(596)、ROX(608)、Calcium Crimson(商標)(615)、Alexa(商標)594(615)、Texas Red(登録商標)(615)、Nile Red(628)、YO-PRO(商標)-3(631)、YOYO(商標)-3(631)、R-フィコシアニン(642)、C-フィコシアニン(648)、TO-PRO(商標)-3(660)、TOTO(登録商標)-3(660)、DiD DilC(5)(665)、Cy5(登録商標)(670)、チアジカルボシアニン(671)、Cy5.5(694)が含まれる(括弧内はこれらの最大放射(nm)である)。

【００３７】

用語「リンカー」は、分子の種々の部分をアセンブルするかまたは固体支持体に分子(またはその部分)を共有結合させるのに使用する部分をいう。典型的に、リンカーまたは連結基は、本明細書に記載しおよび本明細書で使用する複合体のリガンドまたはコンポーネント(例えば、フルオロフォア、オリゴヌクレオチド、副溝バインダー、またはクエンチャー)中の官能基との相互作用および該官能基との共有結合の形成に用いられる官能基を有する。連結基(他のコンポーネントと相互作用前)の官能基の例には、$-NH_2$、$-NHNH_2$、$-ONH_2$、$-NHC=(O)NHNH_2$、-OHまたは-SHが含まれる。該連結基はまた、他の基(例えば、ホスホアミダイト部分など)を該複合体に結合させる分子の部分である。更に、リンカーは、直鎖または非環式部分、環式部分、芳香環またはそれらの組合せを含み得る。

【００３８】

用語「固体支持体」はオリゴヌクレオチド合成に適合する任意の支持体をいい、例えば、ガラス、コントロールされた多孔性ガラス、ポリマー物質、ポリスチレン、ビーズ、被覆ガラスなどが含まれる。

【００３９】

用語「アルキル」は、接頭辞に示した炭素数を有する直鎖状、分枝状または環状の飽和一価炭化水素基、または環状および直鎖状または分枝状の飽和一価炭化水素基の組合せをいう。例えば、(C_1-C_8)アルキルは、メチル、エチル、n-プロピル、2-プロピル、tert-ブチル、ペンチル、シクロペンチル、シクロプロピルメチルなどが含まれることを意味する。本明細書のそれぞれの定義(例えば、アルキル、アルケニル，アルコキシ、アラルキルオキシ)として、接頭辞がなく、アルキル部分の主鎖炭素原子の数を示さないとき、その基または部分は８以下の主鎖炭素原子を有する。

【００４０】

用語「アルキレン」は、接頭辞に示した炭素数を有する直鎖状飽和二価炭化水素基または分枝状飽和二価炭化水素基を意味する。例えば、(C_1-C_6)アルキレンは、メチレン、エチレン、プロピレン、2-メチルプロピレン、ペンチレンなどを含むことを意味する。

【００４１】

用語「アリール」は、非置換であるか、または以下に提供する基から選択される１から４つの置換基、好ましくは１、２、または３置換基で独立して置換される６から１０環原子の、一価または二価(例えば、アリーレン)の単環式または二環式芳香族炭化水素基を意味する。該用語「アリール」はまた上記の基であって、１以上のヘテロ原子またはヘテロ原子官能基が環の炭素と置換されているが、芳香族性は保持されており、例えば、ピリジル、キノリニル、キナゾリニル、チエニルなどである基を含む。より具体的に用語アリールには、以下に限らないが、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、チエニルおよびベンゾチアゾリル、およびそれらの置換型が含まれる。

【００４２】

アリール基の置換基は様々なものがあり、-ハロゲン、-OR'、-OC(O)R'、-NR'R''、-SR'、-R'、-CN、$-NO_2$、$-CO_2R'$、-CONR'R''、-C(O)R'、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR''C(

$O)_2R'$、-NR'-C(O)NR''R'''、-NH-C(NH_2)=NH、-NR'C(NH_2)=NH、-NH-C(NH_2)=NR'、-S(O)R'、-$S(O)_2R'$、-$S(O)_2NR'R''$、-N_3、-$CH(Ph)_2$、ペルフルオロ(C_1-C_4)アルコキシ、およびペルフルオロ(C_1-C_4)アルキル(0から芳香環系の開口価(open valence)の総数の範囲の数となる)から選択される；ここでR'、R''およびR'''は独立して水素、(C_1-C_8)アルキルおよびヘテロアルキル、非置換アリールおよびヘテロアリール、(非置換アリール)-(C_1-C_4)アルキル、および(非置換アリール)オキシ-(C_1-C_4)アルキルから選択される。

【００４３】

アリールまたはヘテロアリール環の原子に接する２つの置換基は、所望により、式-T-C(O)-(CH_2)$_q$-U-の置換基で置換され得、ここで、TおよびUは独立して-NH-、-O-、-CH_2-または単一の結合であり、qは０から２の整数である。更に、アリールまたはヘテロアリール環の原子に隣接する２つの置換基は、所望により、式-A-(CH_2)$_r$-B-の置換基で置換され得、ここで、AおよびBは独立して-CH_2-、-O-、-NH-、-S-、-S(O)-、-$S(O)_2$-、-$S(O)_2NR'$-または単一の結合であり、rは１から３の整数である。そのように形成された新規環の単一の結合の１つは、所望により、二重結合に置換され得る。更に、アリールまたはヘテロアリール環の原子に隣接する２つの置換基は、所望により、式-(CH_2)s-X-(CH_2)t-の置換基で置換され得、ここで、sおよびtは独立して０から３の整数であり、そしてXは-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-$S(O)_2$-、または-$S(O)_2NR'$-である。-NR'-および-$S(O)_2NR'$-中の置換基R'は水素または非置換(C_1-C_6)アルキルから選択される。また更に、アリール環(以下、Ar^1およびAr^2)の１つが、他の置換アリール基で置換され得、-(CR'=CR')$_n$-および-(C=C)$_n$-のような基(式中、nは0から5)により直接的または間接的に芳香系の共鳴能を向上し、波長吸収の最大値を増大する。

【００４４】

置換基を記載するのに使用する際、接頭辞「ハロ」および用語「ハロゲン」とは、F、-Cl、-Brおよび-Iをいう。

【００４５】

本発明の特定の化合物またはオリゴヌクレオチドは塩型で存在し得る。その塩には、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機性アミノ、またはマグネシウム塩のような塩基付加塩、または同様の塩が含まれる。本発明の化合物または修飾オリゴヌクレオチドが比較的塩基性の官能性を有するとき、酸付加塩は、酸が純粋なものかまたは適当な不活性溶媒中の何れかで、十分な量の望ましい酸と中性の該化合物とを接触させることにより、得られ得る。許容される酸付加塩の例には、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、一水素炭酸(monohydrogencarbonic acid)、リン酸、一水素リン酸(monohydrogenphosphoric acid)、二水素リン酸(dihydrogenphosphoric acid)、硫酸、一水素硫酸(monohydrogen sulfuric acid)、ヨー化水素酸、亜リン酸などの無機酸から誘導されるもの、および酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、乳酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などのような有機酸から誘導される塩が含まれる。アルギニン酸などのようなアミノ酸の塩、およびグルクロン酸、またはガラクツロン酸(galactunoric acid)などのような有機酸の塩もまた含まれる(例えば、Berge, S.M., et al, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19参照)。本発明の特定の特異的化合物は、該化合物を塩基または酸付加塩の何れにも変換し得る塩基および酸官能性の両方を含む。

【００４６】

中性の該化合物は、通常の方法で、該塩と塩基または酸と接触させることにより、および親化合物を単離することにより再生し得る。親型の化合物は、極性溶媒中での溶解性のような特定の物理的特性について種々の塩と異なるが、他の点については、該塩は、本発明の目的の親型の化合物に等価である。

【００４７】

本発明の特定の化合物は非溶媒型および溶媒型で存在し得、水和型を含む。一般に、溶媒型は非溶媒型と等価であり、それは本発明の範囲内に含まれることが意図される。本発

明の特定の化合物は、多結晶(multiple crystalline)または非結晶質形で存在し得る。一般に、すべての物理的形態は、本発明により意図される使用に適当(equivalent)であり、本発明の範囲内にあると意図される。

【００４８】

本発明の特定の化合物は不斉炭素原子(光学的中心)または二重結合を有する；ラセミ化合物、ジアステレオマー、幾何異性体および各異性体はすべて本発明の範囲内に含まれることを意図する。立体化学の決定および異性体の分離の方法は当分野で既知である("Advanced Organic Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992の４章の考察参照)。

【００４９】

本発明の化合物はまた、そのような化合物を構成する１以上の原子において天然とは違う比率の同位元素(atomic isotopes)を含有するものであってよい。例えば、該化合物は、例えば、チタン(^{3}H)、ヨウ素-125(^{125}I)または炭素-14(^{14}C)のような放射性同位体で標識され得る。本発明の化合物の全ての同位体変種(放射性があろうがなかろうが)(例えば、^{2}H)は本発明の範囲内に含まれることが意図される。

【００５０】

「保護基」または「それらの保護型」とは、分子中の反応基に結合すると、反応性をマスクし減少または妨げる原子の群をいう。保護基の例は、T. W. Greene and P. G. Futs, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2nd ed. 1991)およびHarrison and Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons. 1971-1996)に見られる。典型的なアミノ保護基には、ホルミル、アセチル、トリフルオロアセチル、ベンジル、ベンジルオキシカルボニル(CBZ)、tert-ブトキシカルボニル(Boc)、トリメチルシリル(TMS)、2-トリメチルシリル-エタンスルホニル(SES)、トリチルおよび置換トリチル基、アリルオキシカルボニル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)、ニトロ-ベラトリルオキシカルボニル(NVOC)などが含まれる。典型的なヒドロキシ保護基には、ベンジルおよびトリチルエーテルならびにアルキルエーテル、テトラヒドロピラニルエーテル、トリアルキルシリルエーテルおよびアリルエーテルのような、ヒドロキシ基がアシル化またはアルキル化、何れかされているものが含まれる。一般に、好ましい保護基は、酸性条件下または塩基性条件下で除かれ得るものであるか、または特定の光源の使用により除かれ得る(例えば、「光感受性」保護基)基である。更に、適当な保護基の選択は、保護基の組み込みまたは除去が該分子の他の部分を妨げないかまたは他に顕著に影響を与えないように、該分子の他の官能性を考慮しつつ行う。

【００５１】

上記定義中の「所望の」または「所望により」は、その直後に記載の事項(event)または状況が(必要ないが)生じ得、該記載には、該事項または状況が生じる例およびそれが生じない例が含まれることを意味する。例えば、「所望によりアルキル基でモノ-またはジ-置換されたアリール」は、アルキル基が(必要ないが)存在し得、その記載には、該アリール基がアルキル基でモノ-またはジ-置換されている状態および該アリール基はアルキル基で置換されていない状態が含まれることを意味する。

【００５２】

他に示さない限り、本発明の実施では、有機化学、生物化学、オリゴヌクレオチド合成および修飾、生体結合化学(bioconjugate chemistry)、核酸ハイブリダイゼーション、分子生物学、微生物学、遺伝学、組み換えDNA、および当業者の属する関連の分野における通常の技術が用いられるだろう。これらの技術は文献で十分に解説されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons (1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996); Gait (ed.), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1984); Eckstein (ed.), OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1991)参照。

【００５３】
用語「Eclipse(商標)プローブ」とは、一般に、5'-MGB-Q-ODN-F1プローブをいう。対照的に、「TaqMan(登録商標)MGBプローブ」とは、3'-MGB-Q-ODN-F1プローブをいう。Eclipse(商標)およびMGB(商標)はEpoch Biosciences, Inc., Bothell, WAの商標である; およびTaqMan(登録商標)はApplied Biosystems, Inc., Foster City, CAの登録商標である。
【００５４】
全般
副溝バインダーオリゴヌクレオチド複合体(または「プローブ」)については、近年、開示された(WO99/51621参照)。これらの複合体は、非常に安定した、相補性DNAとの二本鎖を形成する。特に、短いMGBプローブの配列特異性は、PCRのような高温での適用に優れている。非常に驚くべきことに、5'-末端に副溝バインディング-クエンチャー化合物および3'-末端にフルオロフォアを含むプローブは、特に蛍光発生性2'-デオキシヌクレオチドを使用するアッセイ方法に有用である。これらのプローブは相補性標的とのハイブリダイゼーションによって蛍光を発する。同一物の増幅の間のTaqポリメラーゼによる5'-ヌクレアーゼ消化が妨げられることが5'-MGB-クエンチャー基でこの度発見された。更に、本明細書に記載する5'-MGB-クエンチャー-オリゴヌクレオチド-フルオロフォア(5'-MGB-Q-ODN-Fl)プローブは、7桁のダイナミックレンジを示し、リアルタイムPCR増幅反応においてサンプルあたり5を超えるコピーで最高の感度を有する。5'-MGB-Q-ODN-F1複合体の例を図1Aに示す。標的に対するハイブリダイゼーションにおいて、該プローブは図1Bに示すように蛍光を発する。
【００５５】
本発明のプローブ/複合体は、ハイブリダイズしないとき該プローブが少なくとも１つの一本鎖形態で存在するように、構成される。ハイブリダイズしていないランダムコイル型では、クエンチャーは、フルオロフォアに非常に近接しており、該フルオロフォアの蛍光を消す。該プローブ／複合体が、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすると、該クエンチャーは該フルオロフォアに近接しなくなり、その蛍光を消さない形態となる。これらのハイブリダイズした、およびハイブリダイズしていない形態となることにより、該プローブの該フルオロフォアおよびクエンチャー部分は、該プローブのハイブリダイズおよび非ハイブリダイズによって、異なる蛍光性シグナル強度を示す。結果として、該プローブの蛍光強度の変化に基づき該プローブがハイブリダイズしているかハイブリダイズしていないか決定することが可能であり、そのプローブの使用により、DNA増幅反応のモニタリングが可能となる。
【００５６】
本発明の副溝バインダー-クエンチャー-オリゴヌクレオチド-フルオロフォア複合体は、直鎖状の配置(式5'-MGB-Q-ODN-F1-3'により提案されるように)かまたは分枝状の配置となり得、ここで、クエンチャー(Q)および副溝バインダー(MGB)は、ODN、QおよびMGBに結合する役割をする連結基に結合する。更に、該クエンチャーは、副溝バインダー(例えば、5'-Q-MGB-ODN-F1)の遠位(ODNとの結合部分からみて)の末端に結合し得る。直鎖の略号(linear abbreviation)(MGB-Q-ODN-F1)を使用するときにはそれぞれの該配置が含まれる。更に、MGBおよびQ部分はオリゴヌクレオチドの5'末端に結合する一方、該フルオロフォア部分は3'末端に結合し得るか、または該オリゴヌクレオチドの内部位置に結合し得る(その結合が該複合体の消光機構により妨げられない限り)。一般に、これは、適当な連結基(以下の実施例参照)の使用により行い得る。結果として、本発明は、オリゴヌクレオチド部分のハイブリダイゼーション能力は妥協せずに、ODNおよびFl間の結合が、クエンチャーおよびフルオロフォア部分の間で適当な距離、離れるように選択した多くの好ましい実施態様を提供する。
【００５７】
上記のように、本発明の複合体は、種々のハイブリダイゼーションに基づく検出アッセイに有用であるが、オリゴヌクレオチド増幅(PCRによりしばしば構成される)の「リアルタイム」検出において特別の有用性も見られる。

【００５８】
図2は、蛍光の挙動およびMGB Eclipse(商標)(A)、Molecular Beacon(B)およびTaqMan(登録商標) MGB(C)プローブの5'-ヌクレアーゼ耐性を示す。リアルタイムPCRで使用する蛍光発生性プローブは、蛍光レポーターの検出および定量に依存し、そのシグナルは、反応物中のPCR産物の量の結果として、およびその量に直接比例して生ずる事項による消光の終了(release)により増加する。図2は、PCR中に3種の蛍光発生性プローブから生ずる蛍光シグナルの別個のパターンを示す。PCRは、RRM1特異的プライマー(実施例2の表5参照)および蛍光発生性プローブ(MGB Eclipse(商標)プローブ、Molecular Beacon、またはTaqMan(登録商標)MGB)を用いるLight Cyclerで構成した。それぞれの反応は、10μl反応物中、鋳型として「66 son」ヒトゲノムDNA 10 ngで開始した。蛍光測定は変性およびアニーリングステップで行った。

【００５９】
変性温度で生ずるMGB Eclipse(商標)プローブの蛍光性は低く、PCR中では増加せず(図2、Ai)、これは、プローブ消化が生じないことを示す。該5'-MGB-Q部分は、Taq DNAポリメラーゼによるヌクレアーゼ消化を効果的に妨げる。PCRのアニーリングステップで測定したMGB Eclipse(商標)プローブの蛍光性は時間と共に増大し、これは、MGB Eclipse(商標)プローブがハイブリダイズする標的アンプリコンの量の増大を示す。

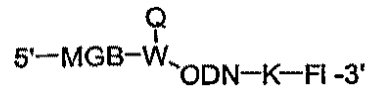
【００６０】
MGB Eclipse(商標)プローブのようなMolecular Beaconsは、増幅反応の間、未処理のままであり、シグナル測定のサイクル毎に標的に再結合するように、設計する。変性温度で生ずるMolecular Beaconの蛍光性は高く、PCRの間、約20%増加し、これは、該プローブの部分的な消化を示す。これは、「ヌクレアーゼ作用」はプローブ配列およびPCRの条件に依存し、通常、全シグナルの10%-40%となる。PCRのアニーリングステップで測定したMolecular Beacon蛍光は、PCR産物の量に従って、時間と共に増大する(Fig. 2、Bi)。MGB Eclipse(商標)プローブの蛍光バックグラウンドは、非常に長いMolecular Beaconプローブよりも顕著に低く、ノイズに対するシグナルの比は同程度である。

【００６１】
TaqMan(登録商標)MGBプローブの蛍光パターンは先の２つのプローブとは異なる(Fig. 2、Ci)。ハイブリダイズする産物が全くないPCRの最初のステップでの該プローブの蛍光性は、56℃および95℃の何れにおいても低い。これは、短いMGBプローブのすべての典型である。PCRの進行に伴うヌクレアーゼ消化により、両温度におけるシグナル蓄積および蛍光増加が生ずる。PCRの最後のサイクルでは、TaqMan(登録商標)MGBプローブの様子により「ハイブリダイゼーション蛍光性機能」が証明される：56℃での蛍光性は95℃よりも高い。おそらく、該プローブの非消化画分は、ハイブリダイゼーションで蛍光を発するハイブリダイゼーションプローブのような働きをする(behave)。

【００６２】
実施態様の詳細
プローブおよび複合体
１つの態様では、本発明は、一般的に5'-MGB-Q-ODN-F1-3'プローブまたは複合体のように記載されるオリゴヌクレオチドプローブ(またはオリゴヌクレオチド複合体、以下、「プローブ／複合体」、「プローブ」または「複合体」)を提供する。上記のように、該プローブのこの直鎖の描写は、副溝バインダーおよびクエンチャーまたは消光剤は該オリゴヌクレオチド部分の5'末端に結合し、フルオロフォアは該オリゴヌクレオチド部分の3'末端に結合することを示す。これらの共有結合部分の何れも、結合は直接かまたは連結基を介するか何れかであり得る。幾つかの実施態様では、連結基は、相互作用部分(例えば、フルオロフォアおよびクエンチャー)と反応部分(例えば、標的配列にハイブリダイズするプローブにより形成される副溝に非共有結合的に結合する副溝バインダー)との間に十分なスペースを与えるものが好ましい。

【００６３】
従って、１つの実施態様では、5'-MGB-Q-ODN-Fl-3'プローブまたは複合体は式:

【化９】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである]
を有する。

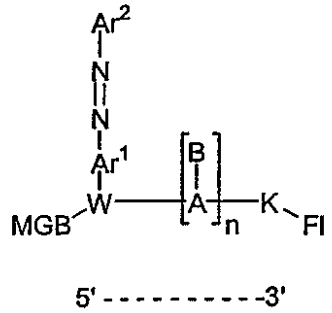
【００６４】

より好ましくは、Kが連結基であるとき、それは、C、O、N、S、PおよびSiから選択される1から30の主鎖原子(実線で結合しているODNコンポーネントとFlコンポーネントとの間の原子のみをカウントし、全ての環原子を含むが、いずれのペンダント(pendant)原子または基も含まない)を一般的に有するであろう。該連結基Wは、一般的に、C、O、N、S、PおよびSiから選択される約3から100の主鎖原子を有する三価リンカーを示す。更に、Wは、分枝状脂肪族鎖、ヘテロアルキル鎖、１以上の置換環構造、またはそれらの組合せを含み得る。幾つかの実施態様では、Wは、ペンデント(pendent)官能化連結基を伴うかまたは伴わないアミノ基のような三官能性部分を示し、それによって、Q-Wは、例えば、商業的に入手(以下のクエンチャーの表1参照)したクエンチャーを示す。従って、Wは連結基として提供するが、それは、幾つかの実施態様では、Qの一部とみなされ得るアミノ基となるであろう。連結基および他のコンポーネントのそれぞれについて以下でより詳細に考察することとする。

【００６５】

更に好ましい実施態様では、該オリゴヌクレオチドプローブ/複合体は式：

【化１０】



5'----------3'

[式中、MGB、W、KおよびFlは上記定義の通りであり、$[A-B]_n$は核酸オリゴマー(例えば、DNA、RNA、PNAまたはその任意の組合せであり、修飾塩基および糖を伴うものを含む)を示し、ここで、Aは糖リン酸バックボーン、修飾糖リン酸バックボーン、ロックされた核酸バックボーン、ペプチドバックボーンまたは核酸調製に使用するそれらの変異形を示し、Bは核酸塩基、修飾塩基または以下でより詳細に記載する塩基類似体を示す]
を有する。下付きのnは、約3から約100、好ましくは6から約50、およびより好ましくは8から約25の整数である。

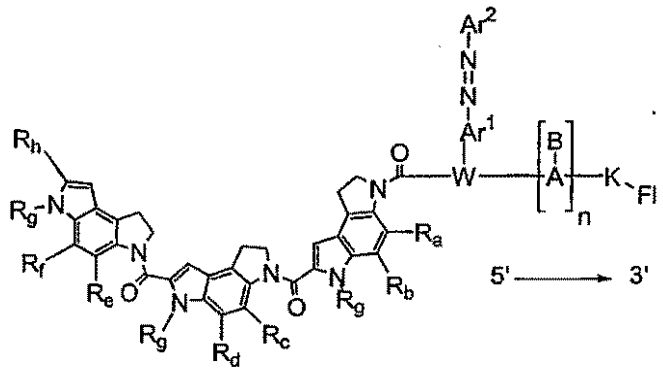
【００６６】

再び式IIについて、記号Ar^1およびAr^2はそれぞれ置換または非置換アリール基を示す。特定の好ましい実施態様では、Ar^1は、例えば、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノなどのような１以上の電子供与基で置換されており、そしてAr^2は、例えば、ニトロ、シアノ、カルボキシ、スルホニル、ハロゲンなどような１以上の電子吸引基で置換されている。また他の実施態様では、Ar^2は式$-U=U-Ar^3$[式中、それぞれのUはCH、C(R)およびNから独立して選択され、ここでRは(C_1-C_8)アルキル基であり、そしてAr^3は置換または非置換アリール基である]を有する基で置換されている。Ar^1、Ar^2およびAr^3のそれぞれの好ましいアリール基はフェニル基である。

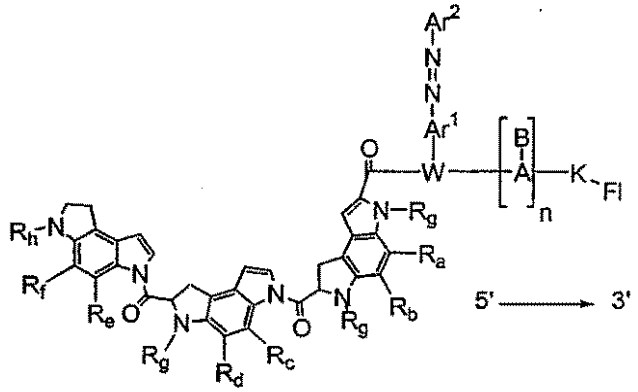
【００６７】

また更に好ましい実施態様では、該オリゴヌクレオチドプローブ／複合体は式：

【化１１】



IIIa



IIIb

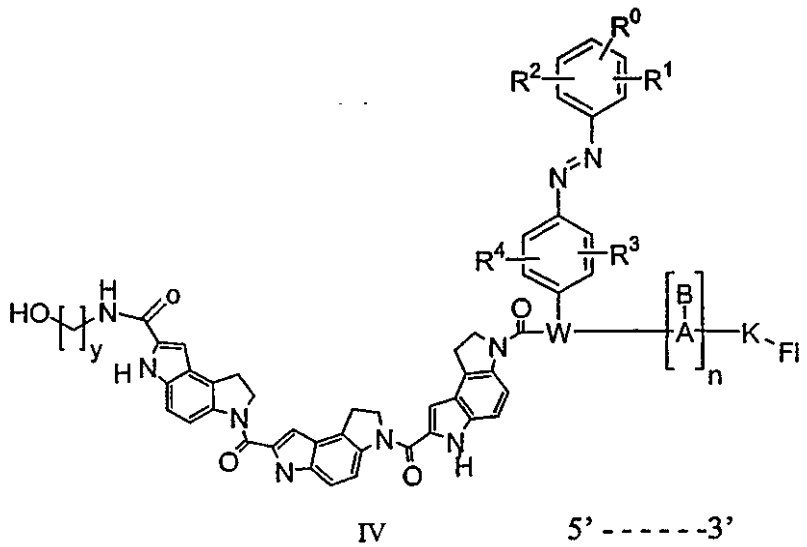
[式中、Ar^1、Ar^2、W、K、Fl、A、Bおよび下付きのn は上記定義の通りであり、記号R_a、R_b、R_c、R_d、R_eおよびR_fはH、ハロゲン、$(C_1\text{-}C_8)$アルキル、OR_g、$N(R_g)_2$、$N^+(R_g)_3$、SR_g、COR_g、CO_2R_g、$CON(R_g)_2$、$(CH_2)_mSO_3^-$、$(CH_2)_mCO_2^-$、$(CH_2)_mOPO_3^{-2}$、および$NHC(O)(CH_2)_mCO_2^-$、ならびにそれらのエステルおよび塩から選択される置換基を示し、ここで、それぞれのR_gは独立してHまたは$(C_1\text{-}C_8)$アルキルであり、そして下付きのmは0から6の整数である]

を有する。記号R_hはH、または環式、非環式、またはそれらの組合せの何れかであるC、N、O、P、およびSから選択される1-30原子を有し、利用し得る原子価を埋める更なる水素原子を有する基(典型的に、固相合成中に使用した連結基の痕跡)を示す。

【００６８】

また更に好ましい実施態様では、該オリゴヌクレオチドプローブ／複合体は式：

【化１２】



IV 5'------3'

[式中、W、K、Fl、A、Bおよび下付きのnは上記定義の通りであり、記号R^0、R^1およびR^2は

Hまたは電子吸引基を示し、記号R^3およびR^4はHまたは電子供与基を示し、そして下付きのmは1から20の整数である]
を有する。特に好ましい実施態様では、Wは$-(CH_2)_3N(-)-(CH_2)_3-$; $R^0 = NO_2$;$R^1 = Cl$; $R^2 = R^3 = R^4 = H$; Kは(C_1-C_6)アルキレンリンカーおよびy=5である。

【００６９】

上記基のそれぞれの特定の好ましい実施態様では、Kは、プローブ／複合体の特定の蛍光性を増強するように選択し、それぞれ該プローブのオリゴヌクレオチド部分の長さに依存するだろう。従って、18以上のヌクレオチド(修飾ヌクレオチドまたは類似体を含む)を有するプローブの場合、Kは、結合または約20原子までの長さの連結基であり得る。より好ましくは、Kはポリアルキレングリコールリンカーまたはリボースまたはデオキシリボースリンカーである(より詳細には以下で考察する)。特定の好ましい実施態様では、Kは、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリブチレングリコールリンカーのようなポリアルキレングリコールリンカーである。最も好ましいのは、ポリエチレングリコール、および市場で入手できる官能化ポリエチレングリコールリンカーである。

【００７０】

他の好ましいプローブまたは複合体は、式I、II、IIIaおよびIIIbのそれぞれであり、ここで、該ODN部分は3連続以上のグアニン塩基(少なくとも１つのグアニン塩基は修飾塩基、好ましくはPPGで置換される)を有するように選択される。またより好ましくは、該ODN部分はRNA、キメラ、PNAまたはロックされた核酸である。

【００７１】

また他の好ましいプローブまたは複合体は、式I、II、IIIaおよびIIIb、およびIVのそれぞれであり、ここで該ODN部分はAおよびT塩基を30%以上有する標的配列に相補的となるように選択される(該ODNは、二重鎖(プローブ／標的ハイブリッド)の安定性が少なくとも約3℃上昇するのに十分な少なくとも１つの修飾塩基を含む)。より好ましくは、該ODN部分はAおよびT塩基を50%以上有する標的配列に相補的となるように選択される(該ODNは、二重鎖(プローブ/標的ハイブリッド)の安定性が少なくとも約5℃上昇するのに十分な修飾塩基を含む)。またより好ましくは、該ODN部分はRNA、キメラ、PNAまたはロックされた核酸である。

【００７２】

本発明の該プローブおよび複合体は、一般的に、当業者に既知の固相法を使用し調製される。アセンブリは、例えば、ODNモノマー、フルオロフォア、クエンチャーおよび副溝バインダーの結合に適当なホスホアミダイト試薬を使用し、5'から3'方向、または3'から5'方向の何れかで行い得る。アセンブリの他の方法には、既知の官能基縮合が含まれ、例えば、エステル結合、アミド結合、ジスルフィド結合、エーテル結合、チオエーテル結合などを作成する。一般に、出発物質は市場で入手可能であるか、または例えば、March, et al., ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY-Reactions, Mechanisms and Structures, 4th ed., John Wiley & Sons, New York, NY, (1992)に記載のような適当な官能基操作により、市場で入手可能な出発物質から直接的な方法で調製し得る。

【００７３】

再び、本発明のプローブ／複合体のより一般的な調製について、以下の考察は、本明細書で使用し得る、オリゴヌクレオチド、消光剤またはクエンチャー、副溝バインダー、フルオロフォアおよび連結基の型を示す。

【００７４】

オリゴヌクレオチドおよび修飾オリゴヌクレオチド

用語オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよび核酸は、DNAまたはRNA(またはその両方)の一本または二本鎖ポリマー(修飾または非天然ヌクレオチドを含むポリマーを含む)、または以下に限らないが、Nielsen et al. Science 254: 1497-1500 (1991)に開示のペプチド-核酸；ビシクロDNAオリゴマー(Bolli et al., Nucleic Acids Res. 24: 4660-4667 (1996))および関連の構造を含むDNAまたはRNAと安定して塩基対を形成し得る他の任

意の型のポリマーをいうべく、互換的に使用する。本発明の複合体の場合、MGB部分および消光剤はオリゴマーの5'末端に結合し、フルオロフォアまたは蛍光標識はオリゴマーの3'末端または内部部分に結合する。

【００７５】

本発明で好ましいのは、一本鎖であり、そして100ヌクレオチド未満、より好ましくは50ヌクレオチド未満、またより好ましくは30ヌクレオチド未満および最も好ましくは20ヌクレオチド未満、より低い限界、おおよそ5ヌクレオチドの長さを有するDNAオリゴヌクレオチドである。

【００７６】

副溝バインダーを伴うフルオロフォア/クエンチャー対を含むオリゴヌクレオチド複合体はまた、天然塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミンおよびウラシルに加えて、１以上の修飾塩基を含み得る。修飾塩基は、１以上の官能基の追加または欠失により、複素環構造の相違(すなわち、ヘテロ原子への炭素原子の置換またはその逆)により、および／または該塩基への１以上のリンカーアーム構造の結合により、天然塩基とは相違するものが考えられる。好ましい修飾ヌクレオチドは、ピリミジン構造またはプリン構造に基づくものであり、後者はより好ましくは7-デアザプリンおよびその誘導体およびピラゾロンピリミジン(PCT WO90/14353に記載されている)である；また米国特許6,127,121にも記載されている。

【００７７】

本発明に使用する最も好ましい修飾塩基には、グアニン類似体6-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4(5H)-オン(ppGまたはPPG、またSuper G)およびアデニン類似体4-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン(ppAまたはPPA)が含まれる。キサンチン類似体1H-ピラゾロ[5,4-d]ピリミジン-4(5H)-6(7H)-ジオン(ppX)もまた使用し得る。オリゴヌクレオチドに存在するとき、これらの塩基類似体は、強固にハイブリダイゼーションし、ミスマッチ識別を改善する。天然の塩基、修飾塩基および塩基類似体の互変異性体はすべて本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含まれ得る。本発明に有用な他の修飾塩基には、6-アミノ-3-プロプ-1-イニル-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、PPPG; 6-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、HOPPPG; 6-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、NH_2PPPG; 4-アミノ-3-(プロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、PPPA; 4-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、HOPPPA; 4-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、NH_2PPPA; 3-プロプ-1-イニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミノ、$(NH_2)_2$PPPA; 2-(4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)エチノ-1-オール、$(NH_2)_2$PPPAOH; 3-(2-アミノエチニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、$(NH_2)_2$PPPANH_2; 5-プロプ-1-イニル-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、PU; 5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、HOPU; 6-アミノ-5-プロプ-1-イニル-3-ジヒドロピリミジン-2-オン、PC; 6-アミノ-5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、HOPC; および6-アミノ-5-(3-アミノプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、NH_2PC; 5-[4-アミノ-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)ピラゾール[3,4-d]ピリミジニル]-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オール、CH_3OPPPA; 6-アミノ-1-[4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、CH_3OPPPG; 4,(4,6-ジアミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)-ブチ-3-イノ-1-オール、Super A; 6-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン; 5-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1H-ピリミジン-2,4-ジオン、Super T; 3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン($(NH_2)_2$PPAI); 3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン($(NH_2)_2$PPABr); 3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン($(NH_2)_2$PPACl); 3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミン(PPAI); 3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミン(PPABr); および3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミン(PPACI)が含まれ

る。

【００７８】

上記修飾塩基の他に、本発明のオリゴヌクレオチドは糖またはグリコシド部分のバックボーン、好ましくは、2-デオキシリボフラノシド(ここで、全てのヌクレオチド間結合(internucleotide linkages)は天然のホスホジエステル結合である)を有し得る。しかし、更なる実施態様では、2-デオキシ-β-D-リボフラノース基は他の糖、例えば、β-D-リボフラノースで置換されている。更に、β-D-リボフラノースが存在し得、ここで、該リボース部分の2-OHは、C_{1-6}アルキル基(2-(O-C_{1-6}アルキル)リボース)またはC_{2-6}アルケニル基(2-(O-C_{2-6}アルケニル)リボース)でアルキル化されているか、またはフルオロ基(2-フルオロリボース)により置換されている。本発明に有用な関連のオリゴマー形成糖は、「ロックされて」おり、すなわち、C-4'とC-2'の酸素原子間にメチレンブリッジを含むものである。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに適合する他の糖部分も使用し得、当業者に既知であり、以下に限らないが、α-D-アラビノフラノシド、α-2'-デオキシリボフラノシドまたは2',3'-ジデオキシ-3'-アミノリボフラノシドが含まれる。α-D-アラビノフラノシドを含むオリゴヌクレオチドは、米国特許5,177,196に記載のように作成し得る。2',3'-ジデオキシ-3'-アミノリボフラノシドを含むオリゴヌクレオチドはChen et al. Nucleic Acids Res. 23:2661-2668 (1995)に記載されている。ロックされた核酸(Singh et al, Chem.Comm., 455-456 (1998); Wengel J., Acc. Chem. Res., 32: 301-310 (1998))、および2'-ハロゲン-2'-デオキシリボフラノシドを含むオリゴヌクレオチド(Palissa et al., Z Chem.. 27: 216 (1987))の合成手順もまた記載されている。本明細書に記載のような修飾オリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンはまた、オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオエート結合および／またはメチルホスホネートおよび／またはホスホロアミデート(Chen et al., Nucl. Acids Res., 23: 2662-2668 (1995))を含むように、修飾し得る。オリゴヌクレオチド結合の組合せもまた本発明の範囲内である。また他のバックボーン修飾が当業者に既知である。

【００７９】

他の実施態様では、本明細書に記載の修飾塩基は、PNAおよびDNA/PNAキメラに組み込まれ、Tmのバランスをとり、ミスマッチ識別が向上した修飾オリゴヌクレオチドを提供する。DNAおよびDNA類似体の種々の修飾型において、プローブおよびプライマーとしてDNA分子を使用する際の幾つかの不利点を克服する試みがなされた。これらの中にはペプチド核酸がある(ポリアミド核酸としても知られるPNA)。Nielsen et al. Science 254: 1497-1500 (1991)。PNAは、DNAおよびRNAに特徴的な糖-ホスフェートバックボーンの代わりにポリアミドバックボーンで連結する、DNAおよびRNAで見られるような、複素環式塩基単位を含む。PNAはハイブリダイゼーション可能であり、DNAおよびRNA標的配列に相補的であり、事実、対応する核酸プローブよりも強力にハイブリダイズする。PNAオリゴマーの合成およびPNAオリゴマーの合成に使用する反応性モノマーは米国特許5,539,082; 5,714,331; 5,773,571; 5,736,336および5,766,855に記載されている。PNAおよびDNA/PNAキメラ合成への他のアプローチおよびPNA合成用のモノマーは要約されている。Uhlmann et al. Angew. Chem. Int. Ed. 37: 2796-2823 (1998)。従って、DNA、PNAまたはDNA/PNAキメラのTmのバランスをとるための、通常塩基、非置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン塩基(例えば、PPGおよびPPA)、3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、修飾プリン、修飾ピリミジン、5-置換ピリミジン、ユニバーサル塩基(universal base)、糖修飾、バックボーン修飾、または副溝バインダーの任意の組合せの使用は本発明の範囲内である。核酸、PNAおよびPNA/DNAキメラ合成に必須の修飾塩基のモノマー単位の合成に必要な合成方法が当分野で使用可能であり、本出願およびUhlmann et al. Angew. Chem. Int. Ed. 37: 2796-2823 (1998)の方法参照。

【００８０】

本明細書に記載の使用の場合、および上記のように、オリゴヌクレオチドおよび修飾オリゴヌクレオチドは、好ましくは5から100塩基、より好ましくは5から50塩基、またより好ましくは、5から30塩基、および更により好ましくは、5から20塩基を有するだろう。幾

つかの実施態様では、プローブ／複合体のオリゴヌクレオチド部分は5から15塩基を有するであろう。幾つかの実施態様では、オリゴヌクレオチド部分は、6、7、8、9、10、11、12、13または14塩基または修飾塩基を有するであろう。

【００８１】

熱力学的特性に基づき、修飾塩基、副溝バインダー、フルオロフォアおよび／またはクエンチャーの使用または組み込みを指示し得る、アルゴリズムを使用する予測可能な方法でプローブおよびプライマーを設計する能力は、２００１年１２月２１日出願の同時係属出願10/032,307に記載されている。従って、核酸、PNAまたはDNA/PNAキメラとハイブリダイズする産物のTm(例えば、約5-8℃以内)のバランスをとるための、通常塩基、非置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン塩基(例えば、PPGおよびPPA)、3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、修飾プリン、修飾ピリミジン、5-置換ピリミジン、ユニバーサル塩基、糖修飾、バックボーン修飾または副溝バインダーの任意の組合せの使用が、本発明により予測される。

【００８２】

副溝バインダー

本発明のプローブ／複合体はまた、副溝バインダー(MGB)に共有結合するであろう。種々の適当な副溝バインダーが文献に記載されている。例えば、Kutyavin, et al. 米国特許5,801,155; Wemmer, D.E., and Dervan P.B., Current Opinon in Structural Biology, 7: 355-361 (1997); Walker, W.L., Kopka, J.L. and Goodsell, D.S., Biopolyzners, 44: 323-334 (1997); Zimmer, C & Wahnert, U. Prog. Biophys. Molec. Bio. 47: 31-112 (1986)およびReddy, B.S.P., Dondhi, S.M., and Lown, J.W., Pharmacol.Therap., 84: 1-111 (1999)参照。

【００８３】

リンカーによりMGB(および以下に記載するフルオロフォアおよびクエンチャーのようなレポーター基)をオリゴヌクレオチドに結合させる適当な方法は、例えば、米国特許5,512,677; 5,419,966; 5,696,251; 5,585,481; 5,942,610および5,736,626に記載されている。

【００８４】

MGBは、一般的に、適当な連結基によりオリゴヌクレオチド部分の5'位に結合している。5'末端での結合により、ハイブリッドの安定化(オリゴヌクレオチド二重鎖の融解は末端で始まるためである)、また増幅反応でのプローブのヌクレアーゼ消化の減少および／または防止の両方が得られる。

【００８５】

MGB-オリゴヌクレオチド複合体内のMGBの位置はまた、その複合体の識別特性に影響し得る。二重鎖内で対となっていない領域では、誤対合塩基付近の副溝の形が変形するであろう。MGBは、完全にマッチするDNA二重鎖の副溝内で最もよく適合するため、副溝内の形を変形するミスマッチにより、ミスマッチを含む領域に対するMGBの結合力は低下する。ここで、MGBのハイブリッド安定化能は低下し、それにより、完全にマッチする二本鎖とミスマッチとを識別するMGB-オリゴヌクレオチド複合体の能力が向上する。他方、ミスマッチが、MGB-オリゴヌクレオチド複合体に相補的な領域の外側にあるならば、等しい長さの非結合およびMGB-結合オリゴヌクレオチドの識別能力は恐らく同じであると予測される。単一の塩基対ミスマッチを識別するオリゴヌクレオチドプローブの能力は、その長さに依存するため、より短いオリゴヌクレオチドがミスマッチの識別により効果的である。このような状況においてMGB-オリゴヌクレオチド複合体を使用する主な利点は、より識別能を有する、従来使用されていたオリゴヌクレオチドよりももっと短いオリゴヌクレオチド(すなわち、20-merまたはそれより短い)が、MGB結合の、顕著な安定化作用に基づき、使用し得るという事実にある。

【００８６】

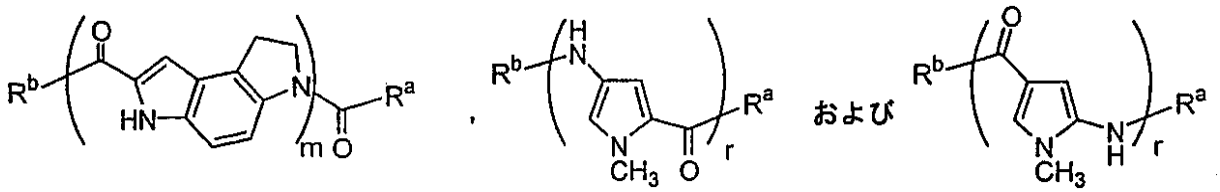
実施態様の１つでは、MGBは、CC1065類似体、レクシトロプシン(lexitropsin)、ディスタマイシン(distamycin)、ネトロプシン(netropsin)、ベレニル(berenil)、デュオカルマイシン(duocarmycin)、ペンタミジン、4,6-ジアミノ-2-フェニルインドールおよびピロロ

[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピンからなる群から選択される。

【００８７】

更に好ましい副溝バインダーは以下の式から選択されるものである：

【化１３】



下付きのmは2から5の整数である；下付きのrは2から10の整数である；およびR^aおよびR^bはそれぞれ、独立して、オリゴヌクレオチドに対する連結基(直接的か、またはクエンチャーによる間接的か何れか)、H、$-OR^C$、$-NR^CR^d$、$-COOR^C$または$-CONR^CR^d$であり、ここで、R^CおよびR^dはそれぞれ、H、(C_1-C_{12})ヘテロアルキル、(C_2-C_{12})ヘテロアルケニル、(C_2-C_{12})ヘテロアルキニル、(C_1-C_{12})アルキル、(C_2-C_{12})アルケニル、(C_2-C_{12})アルキニル、アリール(C_1-C_{12})アルキルおよびアリールから選択され、但し、R^aおよびR^bのうちの１つはODNまたはQに対する連結基を示す。

【００８８】

特に好ましい副溝バインダーには、3-カルバモイル-1,2-ジヒドロ-(3H)-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボキシレート(CDPI$_3$)のトリマー、N-メチルピロール-4-カルボキシ-2-アミド(MPCs)のペンタマーおよびミスマッチ識別が向上する他の副溝バインダーが含まれる。本発明の実施に使用される更なるMGB部分は共有米国特許5,801,155に開示されている。特定の実施態様では、MGBは、水溶性を促進する基(例えば、糖、アミノ酸、カルボン酸またはスルフォン酸置換基など)に結合され得る。２００２年３月１１日出願の同時係属出願60/363,602参照。

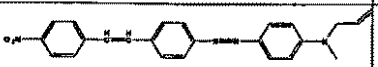
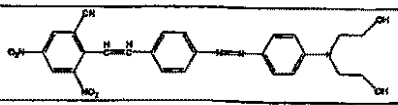
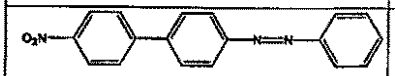
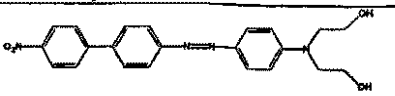
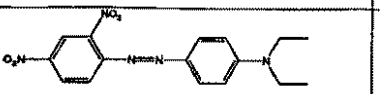
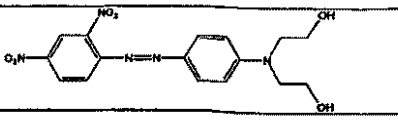
【００８９】

クエンチャー

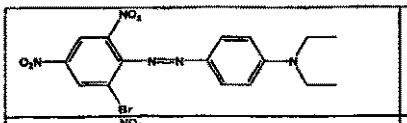
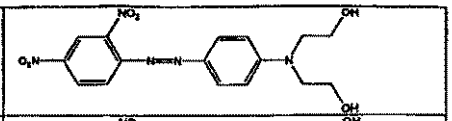
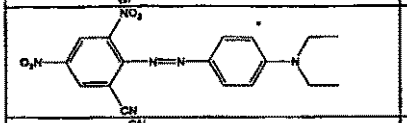
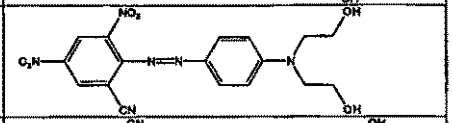
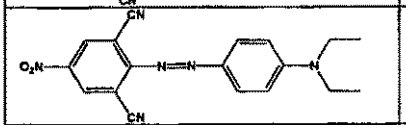
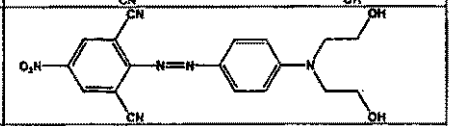
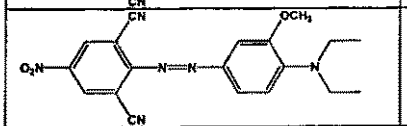
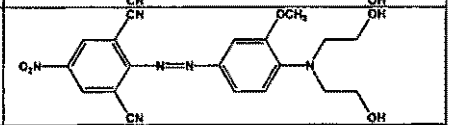
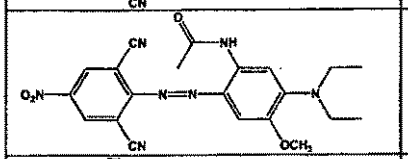
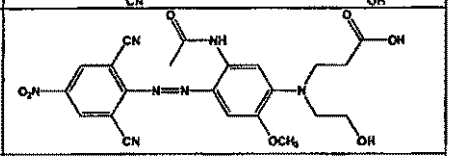
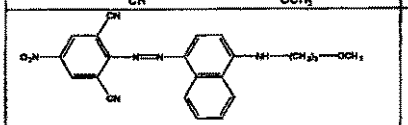
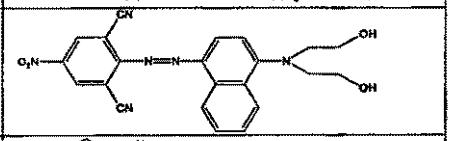
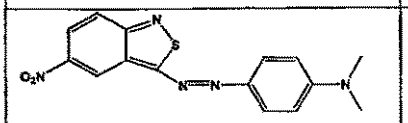
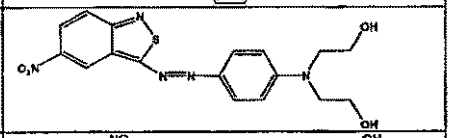
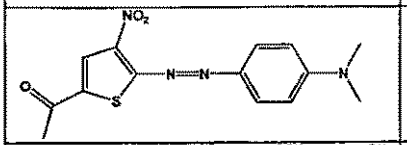
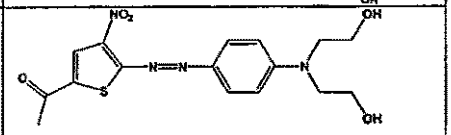
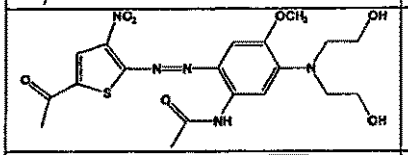
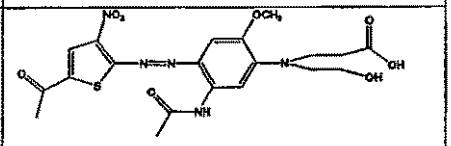
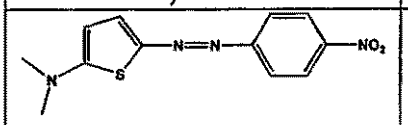
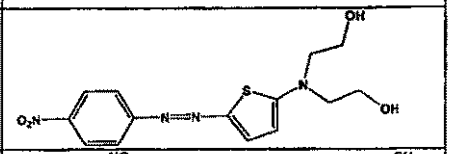
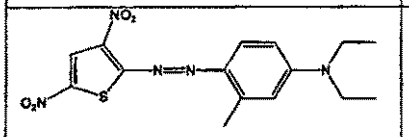
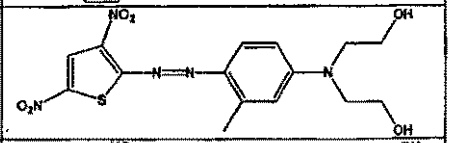
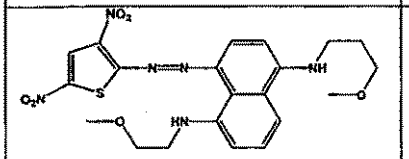
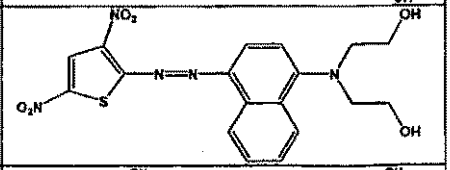
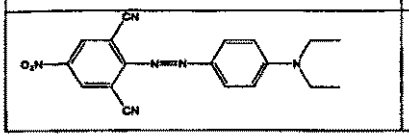
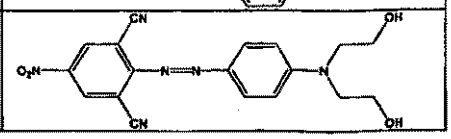
近年の開発された検出方法は、蛍光強度の直接の検出以外に、プローブハイブリダイゼーションを検出するための蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer)(FRET)の方法を用いている。このタイプのアッセイでは、クエンチャー分子の吸収スペクトルがドナーフルオロフォアの放射スペクトルとオーバーラップし、その２つの分子が非常に近接するとき、ドナーフルオロフォア(レポーター)とアクセプター分子(クエンチャー)との間でFRETが生ずる。ドナーフルオロフォアの励起状態のエネルギーは、共鳴双極子-誘導性双極子相互作用(resonance dipole-induced dipole interaction)により近隣のアクセプターへと転移し、その結果、ドナー蛍光は消光する。該アクセプター分子がフルオロフォアであるならば、その蛍光が、増加する場合もある。該ドナーとアクセプター分子との間のエネルギー転移の効率は、分子間の距離に非常に依存する。この関係を説明する等式が知られている。Forster距離(R_o)は、該エネルギー転移が50%効率の場合のドナーとアクセプター分子との間の距離として説明される。蛍光を消光する他の機構も知られており、例えば、衝突および荷電転移消光である。クエンチャーおよびフルオロフォアの対の選択およびオリゴヌクレオチドへの結合のための手引き書が多数ある(Haugland, R.P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, OR1996; 米国特許3,996,345および4,351,760など)。好ましいクエンチャーは、共有の米国特許09/457,616(１９９９年１２月８日出願)に記載されており、それは、引用により本明細書に含める。より特に、以下の表1は、引用の既知の化学反応に基づき、プローブ中への導入に適当な官能基(例えば、ODNおよびMGB部分の結合部位を伴うQ-W)を有する構造に容易に修飾し得るクエンチャー構造を含んでいる(例えば、Thiel, et al., J. fur prakt. Chemie, 328: 497-514(1986); 米国特許4,324,721および4,054,560; Timm, Melliand Textilbericlate, 9: 1090-1096 (1969); Hallas, J.S.D.C. 285-294 (1979); Beyer, et al., J Prakt. Chem., 24: 100-104 (1964); Hutchings, et a

l., Chem. Europ. J. 3: 1719-1727(1997)およびMorley, et al., J. Phys. Chem. A., 102: 5802-5808 (1998); Haak, et al., J. Chem. Res. Miniprint 10: 2701-2735 (1998)およびRuggli et al., Helv. Chim. Acta, 26: 814-826 (1943)参照)。種々の位置に種々の組合せの置換基を有する更なる構造(例えば、モノ-およびビス-アゾ色素)が、色素化学の分野で既知の化合物および方法に基づき調製され得る(CD-ROMのthe Color Index, Issue 3, pages 4009-4324に要約; Society of Dyers and Colourists, Bradford, England; http://www.sdc.org.uk; またWO 01/86001参照)。

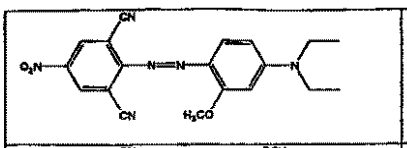
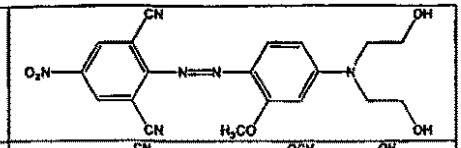
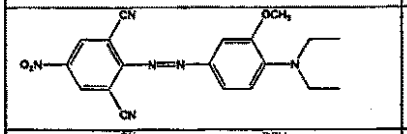
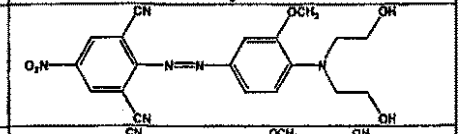
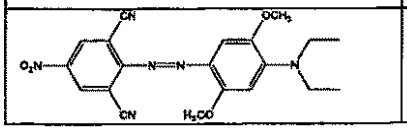
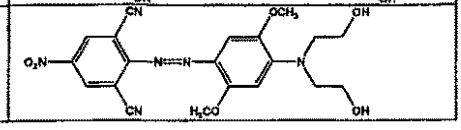
【表１】

文献に記載の構造	λ_{max} nm; ε $M^{-1}cm^{-1}$; 溶媒	リンカー修飾構造 Q-W
	464	
	440	
	540; 40,000 MeOH	

【表２】

	549 37,000 EtOH	
	590 48,978 $CHCl_3$	
	601 40,738 $CHCl_3$	
	623 48,000 $CHCl_3$	
	656 100,000 $CHCl_3$	
	656 53,043	
	598	
	582	
	652	
	554 50,000	
	673.5	
	809	
	592 46,000	

【表３】

	601 51,000	
	623 48,000	
	632 予想値	

【００９０】

上記のクエンチャーは、約400-800nmの範囲をカバーし、MGBに結合するとき消光が向上することが多い。修飾型では、オリゴヌクレオチドにクエンチャーを結合するのに使用される好ましい連結基として-N(CH_2CH_2OH)$_2$が示される一方、MGBまたは固体支持体、他の適当なリンカーの例は当分野に既知であるか、または本明細書で提供する。

【００９１】

本明細書の発明のそれぞれの態様の好ましいクエンチャーは、上記表に記載のもの、およびBiosearch Technologies, Inc.のビスアゾクエンチャー(Black Hole(商標) Quenchers: BH-1、BH-2およびBH-3として提供される)、Dabcyl、TAMRAおよびカルボキシテトラメチルローダミンから選択される。

【００９２】

フルオロフォア

本発明で有用のフルオロフォアは、一般的に、オリゴヌクレオチドプローブの5'末端炭素に結合するように、好ましくは、連結基を介するように誘導された蛍光性有機色素である。当業者ならば、典型的に有機性色素でもあるクエンチャー(蛍光性を有しても有しなくてもよい)と組み合わせて適当なフルオロフォアが選択されると認識するであろう。

【００９３】

特定のプローブに適当なフルオロフォア-クエンチャーの対を選択するための文献から入手可能な実施手引き書が多く存在する。例えば、Clegg (上記で引用); Wu et al. (上記で引用); Pesce et al., editors, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970)など参照。該文献はまた、蛍光性および発色性(消光)分子の完全なリストおよびフルオロフォア-クエンチャーの対を選択するための関連の光学的特性を提供する引用文献を含み、例えば、Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ND EDITION (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949);など。更に、通常の反応基を介した共有結合のためのフルオロフォアおよびクエンチャーを誘導する方法も既知である。例えば、Haugland (上記で引用); Ullman et al., 米国特許3,996,345; Khanna et al., 米国特許4,351,760など参照。

【００９４】

好ましいフルオロフォアはキサンテン色素に基づくものであり、種々のそれらは市場で入手可能であり、連結基を介するかまたは直接か何れかでのオリゴヌクレオチドへの結合に有用な置換基を伴う。蛍光化合物の他の群は、α-またはβ-位置にアミノ基を有するナフチルアミンである。そのナフチルアミノ化合物に含まれるものには、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネートおよび2-p-トルイジニ

ル(toluidinyl)-6-ナフタレンスルホネートがある。他の色素には、3-フェニル-7-イソシアネートクマリン、アクリジン、9-イソチオシアネートアクリジンなど、およびアクリジンオレンジ;N-(p-(2-ベンゾオキサゾリル)フェニル)マレイミド; ベンゾオキサジアゾール、スチルベン、ピレンなどが含まれる。また他の適当なフルオロフォアには、レゾルフィン色素(resorufin dye)、ローダミン色素、シアニン色素およびBODIPY色素が含まれる。

【００９５】

これらの色素およびオリゴヌクレオチドへの結合のための適当な結合法は多くの参考文献に記載されている。例えば、Khanna et al.(上記で引用); Marshall, Histochemical J., 7: 299-303 (1975); Menchen et al., 米国特許5,188,934; Menchen et al., 欧州特許出願87310256.0; およびBergot et al., 国際出願PCT/US90/05565。

【００９６】

より特に、本明細書に記載のフルオロフォアは、例えば、化学的または酵素学的方法を用いオリゴヌクレオチド部分に結合し得る。一例として、オリゴヌクレオチド中、特定部位へ反応性化学基を組み込む方法は当業者に既知である。特定部位に位置して反応性化学基を含むオリゴヌクレオチドを、相補的反応基(例えば、求核性反応基を含むオリゴヌクレオチドは、親電子的反応基に結合する標識と反応し得る)に結合する標識と組み合わし、化学的技術によりプローブに標識を結合し得る。例示的な標識およびオリゴヌクレオチドに標識を結合する方法は、例えば、米国特許5,824,796; 米国特許5,210,015; Kessler (ed.), Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules, Springer-Verlag, Berlin, 1992; Kricka (ed.) Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press, San Diego, 1992; Howard (ed.) Methods in Nonradioactive Detection, Appleton & Lange, Norwalk, 1993に記載されている。オリゴヌクレオチドの非特異的な化学的標識は、例えば、ヌクレオチド塩基の特定の官能基と反応する化学物質と該オリゴヌクレオチドを組み合わせ、そして同時にまたは後に、該オリゴヌクレオチドを標識と反応させることにより行い得る。例えば、Draper et al. (1980) Biochemistry 19:1774-1781参照。オリゴヌクレオチド中への標識の酵素学的組み込みは、標識前駆体を使用する酵素的修飾またはオリゴヌクレオチドの重合化することによるか、または既に存在しているオリゴヌクレオチドに標識を酵素学的に加えることにより、行い得る。例えば、米国特許5,449,767参照。修飾酵素の例には、以下に限らないが、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNAポリメラーゼなどが含まれる。既に存在しているオリゴヌクレオチドに標識を加え得る酵素の例には、以下に限らないが、キナーゼ、ターミナル・トランスフェラーゼ、リガーゼ、グリコシラーゼなどが含まれる。

【００９７】

本発明のそれぞれの態様の場合、好ましいフルオロフォアは、シアニン、BODIPY類似体、5-FAM(商標)、6-FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、HEX(商標)、VIC(商標)、NED(商標)、TAMRA(商標)、ROX(商標)、Bothell Blue(商標)およびYakima Yellow(商標)(YY)から選択される。これらのフルオロフォアは、一般的に、Applied Biosystems Inc., Foster City, CAおよびEpoch Biosciences, Inc., Bothell, WAのような市場の源から入手可能である。

【００９８】

連結基

種々の連結基および連結方法が、フルオロフォア、クエンチャーおよび副溝バインダーとオリゴヌクレオチドの5'または3'末端とを結合する当業者に既知である。例えば、Eckstein, editor, OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., Nucleic Acids Research, 15: 5305-5321 (1987); Sharma et al., Nucleic Acids Research, 19: 3019 (1991); Giusti et al., PCR Methods and Applications, 2: 223-227 (1993), Fung et al., 米国特許4,757,141; Stabinsky, 米国特許4,739,044; Agrawal et al., Tetrahedron Letters, 31: 1543-1546 (1990); Sproat et al., Nucleic Acids Research, 15: 4837 (1987); Nelson et al., Nucleic Ac

ids Research, 17: 7187-7194 (1989)など参照。また他に市場で入手可能な連結基を使用し得、合成の間にオリゴヌクレオチド(例えば、Clontech Laboratories (Palo Alto, Calif.)から入手可能)に結合し得る。フルオロフォアをオリゴヌクレオチド部分に結合するための他の方法には、固相合成の最後にホスホアミダイト化学を使用するものであり、ホスホアミダイト部分で色素を誘導体化することによる方法がある。例えば、Woo et al., 米国特許5,231,191; Hobbs, Jr., 米国特許4,997,928; Reed, et al., PCT publication No. WO01/42505; USSN 09/876,830; USSN 10/084,818; およびUSSN 10/026,374参照。

【００９９】

多くの一般的な連結法が利用可能であるが、オリゴヌクレオチド長さ、副溝バインダー、フルオロフォア-クエンチャーの対などのような他の要因と組み合わせて選択するとき、特定の連結基の選択は本発明の一態様を構成することとなる。例えば、本発明では、副溝バインダーの使用により、少数ヌクレオチド塩基を有するプローブを調製し得る。一般的に、約15塩基未満の少数塩基のプローブは、シグナリングおよび／または標的ポリヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションが弱いことから使用できないと考えられる。更に、より小さなプローブ(例えば、15またはそれより少ない塩基のもの)は、しばしばクエンチャー/フルオロフォアが十分に離れておらずハイブリダイゼーションにおいて適当なシグナリングを供しないため、ビーコンアッセイでは避けられる。

【０１００】

本発明では、副溝バインダーに結合するより短いプローブが有用であることがわかり、フルオロフォアとクエンチャーとの間の十分なスペーシングは適当な連結基を選択することにより得られ得る。従って、本発明は、効率よく、安価であり、かつリアルタイムで利用可能である新規プローブ/複合体を提供する。

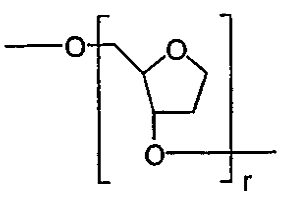
【０１０１】

本発明の該プローブおよび複合体は、一般に、1または2の連結基型を有するであろう。式Iで提供するように、文字Kは二価連結基を示し、その一方、文字Wは三価連結基を示す。特定の連結基は、一般に、合成の容易性、固相合成での有用性、プローブの構成および使用における安定性から選択され、それぞれの物理的パラメーターは、該プローブまたは複合体が、フルオロフォアとクエンチャーとが十分に離れるような；またはプローブハイブリダイゼーションで形成された副溝と副溝バインダー部分とが非共有結合的に相互作用し得るのに適当な長さのテザー(tether)となるような値とする。

【０１０２】

より特に、Kは、フルオロフォアと、プローブ/複合体のオリゴヌクレオチド部分との間の直接の結合となるか、またはC、O、N、S、PおよびSiから選択される1から30主鎖原子を有する二価連結基である。適当な連結基の選択は、一般に、該プローブのODNの長さを考慮して行われる。典型的に、より短い連結基は、ODNが約15-18ヌクレオチドよりも長いときに使用され得、その一方、より長い連結基は、短いプローブが望ましく、および／または構成されるときに、より有用となる。好ましい１つの実施態様では、Kは、$-(O-(CH_2)_p)_q-$(式中、下付きのpは2から14の整数であり、下付きのqは1から10の整数であり、但し、K全体の長さは約50原子未満である)から選択される式を有する連結基である。好ましくは、Kは、$-(OCH_2CH_2)_3-$、$-(OCH_2CH_2)_6-$、$-(O(CH_2)_{12})-$および$-(O(CH_2)_{12})_2-$から選択される。他の実施態様では、Kは、好ましくは、式：

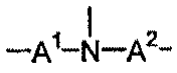
【化１４】



[式中、下付きのrは1から5の整数、好ましくは 1または2、最も好ましくは2である]

を有する連結基である。

【０１０３】
該三価連結基Wは、ODN、QおよびMGB間での適当な結合およびフレキシビリティを提供するため種々の構造を含み得る。実施態様の１つでは、Wは、式：
【化１５】



[式中、窒素原子は、モノアゾ-またはビスアゾ-色素(クエンチャー、Q)の芳香環に直接結合し、典型的に、クエンチャーの一部と見なされ、コンポーネントA^1およびA^2は、結合、またはC、N、S、P、Siおよび0から選択された1から約50原子を有する連結/スペーサー部分、および利用可能な原子価を埋める更なる水素原子から独立して選択される]
を有する三価の官能性である。更に、A^1およびA^2のそれぞれは環式コンポーネント、非環式(直鎖状または分枝状)コンポーネント、またはそれらの組合せを有し得る。
【０１０４】
使用方法
本発明のプローブ／複合体は、今あるプローブおよび複合体を上まわる利点を多く有しており、それには、優れたミスマッチ識別も含まれる。本発明のプローブ／複合体は、標的配列とのハイブリダイゼーションが、増幅方法で、例えばPCRのような方法でリアルタイムに(または同時的に)検出されるのに特に有用である。更に、本発明のプローブ／複合体は、5'-ヌクレアーゼ活性によって消化されることはない。従って、該増幅反応が行われ得、融解曲線分析により再評価され得る。
【０１０５】
本発明のプローブ／複合体は、他の核酸とオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが含まれる他の技術において有用である。これらには、以下に限らないが、標的核酸とオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが評価項目(endpoint)である技術；標的核酸と１以上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが、プライマーとしてオリゴヌクレオチドを、鋳型として標的核酸を使用する１以上のポリメラーゼ仲介伸張ステップを行う技術；標的核酸とオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを用い、他のプライマーの伸張を阻止する技術；および２以上のオリゴヌクレオチドが標的核酸にハイブリダイズさせ、複数のオリゴヌクレオチド間での相互作用を測定する技術が含まれる。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの条件、および温度、イオン強度および溶媒組成物のようなハイブリダイゼーションの程度および特異性に影響する要因は当業者に既知である。例えば、Sambrook et al., 上記; Ausubel, et al., 上記; M.A. Innis et al. (eds.) PCR Protocols, Academic Press, San Diego, 1990; B.D. Hames et aL (eds.) Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1985; および van Ness et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:5143-5151参照。また他の方法では、複数のプローブを使用し、他の標的部位領域を検出できる(例えば、困難な配列を同定すること、または該標的の種および亜種を区別すること)。
【０１０６】
標的配列とプローブおよび／またはプライマーとのハイブリダイゼーションは、既知の、および当分野で認識されている塩基対の特性により行われ、それによって、アデニンはチミンまたはウラシルと塩基対をなし、およびグアニンはシトシンと塩基対をなす。それぞれ第二のヌクレオチドと塩基対となし得るヌクレオチドの特性は相補性と呼ばれる。そのため、アデニンはチミンおよびウラシルの両方と相補的であり、そしてその逆でもある；同様に、グアニンはシトシンと相補的であり、そしてその逆でもある。あるオリゴヌクレオチドが全長にわたってある標的配列と相補的であるならば、完全に相補的である、好ましくはマッチしている、または標的配列に完全に相補的であるといい、またはその逆もいえる。オリゴヌクレオチドおよびその標的配列が関連している配列である場合、その２つの配列中の主な塩基は相補的であるが、１以上の塩基は相補的ではないか、またはミスマッチである。その場合、該配列は、互いに実質的に相補的であるといえる。オリゴヌク

レオチドおよび標的配列の配列が、１つを除き全てのヌクレオチド位置で相補的であるならば、該オリゴヌクレオチドおよび該標的配列は、互いに単一のヌクレオチドミスマッチを有する。

【０１０７】

修飾塩基を組み込むプローブ／複合体の場合であっても、該修飾塩基は、その天然類似体の塩基対特異性を保持しているであろうと理解される。例えば、PPPG 類似体はシトシンと相補的であり、PPPA類似体はチミンおよびウラシルと相補的である。PPPGおよびPPPA類似体には、グアニンおよびアデニンと比較して、非相補的塩基とのいわゆる「揺らぎ(wobble)」塩基対形成を減少する傾向があるだけでなく、3-置換基は二重鎖の結合親和性を増大する。同様に、修飾ピリミジンは、その天然のカウンターパートナーに特異的にハイブリダイズする。

【０１０８】

ハイブリダイゼーション条件は当業者に既知であり、比較的広い範囲内で変化させ得る。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーとは、ハイブリダイゼーション条件により、ミスマッチのヌクレオチドを含むハイブリッドの形成が避けられ、それにより完全にマッチしたハイブリッドまたはより少ないミスマッチを含むハイブリッドの形成が促進される度合をいう；より高いストリンジェンシーは、ミスマッチハイブリッドの許容差の低下をともなう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要因には、以下に限らないが、温度、ｐＨ、イオン強度、ホルムアミドおよびジメチルスルフォキシドのような有機溶媒およびカオトロープが含まれる。

【０１０９】

従って、プローブ/複合体とその標的配列との間のハイブリッド(二重鎖)の形成において、該プローブ/複合体は、ハイブリダイゼーションに好ましい温度、イオン強度、ｐＨなどの条件下、すなわち、ハイブリダイゼーション条件下、該標的配列を含むポリヌクレオチドと共に、溶液中でインキュベーションされる。ハイブリダイゼーション条件は、ある場合には、ハイブリダイズする配列中にミスマッチを１以上有する核酸の対と比較して、完全にマッチした配列を有する２つの核酸間でのハイブリダイゼーションが有利となるように選択される。他の場合には、ハイブリダイゼーション条件はミスマッチの配列間でハイブリダイゼーションし得、より少ないミスマッチを有する核酸間でのハイブリダイゼーションが有利となるように選択される。

【０１１０】

標的配列とオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの程度(ハイブリダイゼーション強度としても知られる)は、当分野に既知の方法により決定される。好ましい方法で、ハイブリッド二重鎖のTmを決定する。これは、上記のように、溶液中で二重鎖の温度を段階的に上げ、該二重鎖の変性を例えば、紫外線の吸収(変性される塩基対のアンスタッキングにより増加する)によりモニターすることにより、行う。Tmは、一般的に、変性を伴う紫外線吸収の移行の温度中間点として決められる。あるいは、Tmが判れば、ハイブリダイゼーション温度(イオン強度、ｐＨおよび溶媒濃度は固定)は、望ましい二重鎖のTmより下であり、望ましくない二重鎖のTmは超えるように選択し得る。この場合、ハイブリダイゼーションの程度の決定は、ハイブリダイズしたプローブの存在を試験することにより簡単に行われる。

【０１１１】

幾つかの実施態様では、該プローブ/複合体はプライマーとして機能し得、プローブ/複合体のハイブリダイゼーションの程度はまた、該プライマーの伸張産物の量を測定することにより測定し得る。この実施態様では、プライマーは標識され得るか、または重合化用の１以上の前駆体(通常、ヌクレオシド三リン酸)が標識され得るか、何れかである。伸張産物は、例えば、大きさ(例えば、ゲル電気泳動)、リアルタイムPCRにおけるごとき、ハイブリダイゼーションプローブとの親和性方法、または当業者に既知の任意の他の技術により、検出され得る。

【０１１２】

プライマー伸張(「ミニシーケンシング」、「ジェネティックビット分析(genetic bit analysis)」)アッセイは、通常、SNP分類に使用され、また、他の遺伝子型解析および変異スクリーニングの応用に使用され得る(Pastinen T. et al., Genome Res., 10: 1031-42 (2000))。本発明では、副溝バインダーの存在および、ある場合には修飾塩基の存在によりプライマー伸張アッセイが改善し得る。例えば、MGB、または5-置換ピリミジンまたは3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンにより付加された二重鎖安定性により、高温での伸張が可能となる。これは、標的分子で問題となる二次構造が高温で排除されるために利点となる。また、プライマーと標的とのハイブリダイゼーションは高温でより早くなる。Taqポリメラーゼおよび Bst DNAポリメラーゼのような熱安定性ポリメラーゼはそのような反応に使用し得る。MGBおよび修飾塩基は上記のような利点があるプローブおよびプライマーを提供し、修飾塩基の使用は、典型的に、プライマー伸張阻害を避けるため、3'-末端位置以外の位置となるだろう。

【０１１３】

更に、MGBおよび修飾塩基は、１つのクラスの偽陽性シグナルを排除することにより、アッセイの特異性を向上する。ヘアピン構造またはホモジダイマーを形成するプライマー配列は、鋳型独立の伸張(プライマーの5'末端は鋳型として機能する)をする傾向があり、偽陽性シグナルを生ずる。「鋳型」におけるMGBおよび修飾塩基は、DNAポリメラーゼによる伸張を阻害する。そのため、プライマーの5'末端のMGB、またはプライマーの5'末端または中部の修飾塩基は、プライマーヘアピンまたはプライマーダイマーからの伸張(偽陽性)を阻止し得る。最終的に、PPGは、G-リッチオリゴヌクレオチドにより形成される非標準的な構造の除去に使用され得、その配列のプライマー伸張アッセイを可能とする。

【０１１４】

本修飾オリゴヌクレオチドが特に有用である他のアッセイは、米国特許6,312,894に記載されている。

【０１１５】

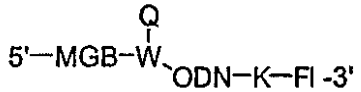
本プローブ／複合体が有用である、また他の増幅アッセイには、フラップエンドヌクレアーゼ(Lyamichev et al., Nature Biotechnol., 17: 292-296 (1999))によるオリゴヌクレオチドプローブの侵襲的な切断に基づく増幅アッセイ；自己配列複製型アッセイ(Mueller et al, Histochem. Cell Biol., 108: 431-437 (1997))などが含まれる。驚くべきことに、非天然塩基は、切断に基づくアッセイのインベーダーおよびゲノムプローブの両方において置換され得る。これらの修飾には、以下に限らないが、ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンおよび5-置換ピリミジンが含まれる。非天然のバックボーンもまた含まれ、例えば、ペプチド-核酸、ロックされた核酸などに使用されるモノマーである。

【０１１６】

上記の観点から、本発明は、ポリヌクレオチド増幅を連続的にモニタリングするための方法であって、

(a)標的配列を含むサンプルを、標的配列の領域と相補的な１以上のオリゴヌクレオチドプライマー、重合化酵素、ヌクレオチド基質、および以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と合わせ、混合物を提供すること

【化１６】



ここで、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基でありそしてFlはフルオロフォアであり、そしてODN部分は、増幅される標的配列の一部に相補的な配列を有する、

(b)重合化に好ましい条件下で該混合物をインキュベーションすること、および

(c)増幅した標的にハイブリダイゼーションした複合体に生ずる蛍光をモニタリングすることにより増幅を連続的にモニターすること
を含む該方法を提供する。

【０１１７】

増幅手順は、多数のコピーの標的核酸配列を、指数的に、連続的な重合化および/またはライゲーション反応により、作成するものである。以下に考察するより典型的な増幅反応の他に、本発明は、三元連結(three-way junctures)(WO 99/37085参照)、シグナル増幅(Capaldi, et al., Nuc. Acids Res., 28: E21 (2000)参照)、T7ポリメラーゼ、逆転写酵素、RNase H、RT-PCR、ローリングサークル、クリバーゼ(cleavase)などを含む増幅に有用である。

【０１１８】

PCRのような多くの増幅反応は、繰り返しプライマー-依存重合化反応を利用する。プライマーは、第二の鋳型核酸にハイブリダイズできる核酸であり、一旦ハイブリダイズすると、鋳型として二番目の核酸を用い、重合化酵素により伸張できるもの(ヌクレオチド基質の存在下)である。重合化酵素には、以下に限らないが、DNAおよびRNAポリメラーゼおよび逆転写酵素などが含まれる。種々の重合化酵素による重合化に好ましい条件は当業者に既知である。例えば、Sambrook et al., 上記; Ausubel, et al., 上記; Innis et al., 上記、参照。一般的に、重合化酵素により伸張するため、プライマーは、ブロックされていない3'-末端、好ましくは遊離3'ヒドロキシル基を有しなければならない。増幅反応の生成物は、伸張したプライマーであり、ここで、該プライマーは重合化酵素により伸張される。

【０１１９】

そのため、本発明の好ましい実施態様では、本明細書で開示および特許請求の方法および組成物は、PCRのような増幅反応の向上およびモニタリングに有用である。例えば、米国特許4,683,202; 4,683,195および4,800,159; Mullis and Faloona, 上記 ; および Saiki et al., 上記、参照。PCRの重合化ステップの触媒には、PCRの変性ステップには高温が必要であるため、好熱性細菌から単離のDNAポリメラーゼのような熱安定性重合化酵素が最もよく使用される。上記で考察のように、PCRの実施と関連する先の問題の１つは、PCRを行う高温でプライマーとして役割をするために十分なハイブリッド安定性を有する、比較的長いオリゴヌクレオチドプライマーが必要であることである。本発明の該プローブ／複合体は、MGBがハイブリッド安定性を増し、それにより、有効なプローブ長の下限を顕著に下げるため、特に有用である。更に、MGB-修飾オリゴヌクレオチド複合体は、プローブ長が更に短いのが望ましい特別のPCRプロトコールに有用である。これらには、以下に限らないが、最適のプライマーまたはプローブの長さが10ヌクレオチド未満であるディファレンシャルディスプレイ、DNA(RAPD)技術における多形のランダム増幅、および増幅長多形分析(amplification length polymorphism analyses)が含まれる。Liang et al, 上記 ; Williams et al, 上記。

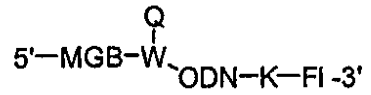
【０１２０】

本明細書に記載する該プローブおよびプライマーは、PCRおよび関連の増幅技術に用いられる任意のアッセイおよび方法に適用可能であり、そのアッセイ等には、例えば、以下に限らないが、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)によるプライミング、フラグメント長多型分析(fragment length polymorphism analysis)、一塩基変異多型(SNP)分析およびマイクロサテライト分析が含まれる。これらのおよび他の技術は、遺伝子マッピングに、疾患が関連する遺伝子の同定およびスクリーニングに、および薬理遺伝的応用において、ほんの少しの検体を同定するのに有用である。

【０１２１】

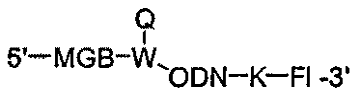
関連の態様では、本発明は遺伝子発現をモニターする方法であって、以下を含む該方法を提供する：
(a)種々の配列のオリゴヌクレオチドプローブのアレイを提供すること,
(b)ハイブリダイゼーション条件下、該アレイと少なくとも１つのポリヌクレオチド群を

インキュベーションすること、および
(c)該アレイ中のどのオリゴヌクレオチドプローブが該ポリヌクレオチド群とハイブリダイズするか測定すること。
ここで、１以上のオリゴヌクレオチドプローブは式:
【化１７】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである]
を有する。
【０１２２】
実施態様の１つでは、該方法は、複数の細胞型または組織から発現した複数の遺伝子で行う。一般に、ポリヌクレオチド群の数は、1から約10、より好ましくは、1から約5、およびまたより好ましくは、1、2、3もしくは４のポリヌクレオチド群である。
【０１２３】
これらの手順では、種々の既知配列のプローブ／複合体を複数含む秩序だったアレイを、試験するポリヌクレオチド、核酸または核酸群の１以上にハイブリダイゼーションするためのプラットフォームとして使用する。ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの決定および既知配列のアライメントにより、試験するポリヌクレオチドの配列を再構成し得る。例えば、米国特許5,492,806; 5,525,464; 5,556,752; およびPCT公開公報WO92/10588およびWO 96/17957参照。アレイを構成する物質には、以下に限らないが、ニトロセルロース、ガラス、シリコンウエハー、ポリマー性物質、光ファイバーおよび当業者に既知の、アレイの構成に適当な他の物質が含まれる。
【０１２４】
実施態様の１つでは、本発明のプローブは、ハイブリダイゼーション相互作用(該ハイブリッドの該副溝でのMGB結合を含む)が該支持体により妨げられることのないように、支持体と該プローブとの間に適当なスペーサーを使用する通常の固定化技術を用い、該固体支持体に固定化する。他の実施態様では、本発明の該プローブはサンドイッチアッセイ形式に使用される。
【０１２５】
現在のアレイによる配列決定および分析の方法の問題点は、アレイ中の種々のオリゴヌクレオチドがそれぞれ異なるTmを有するということである。一塩基のミスマッチを識別する能力を保持しつつ感度が最大となるストリンジェンシー条件を決定するのは難しい。これは、殆ど(すべてではないにせよ)のアレイ技術で考慮すべき重要な点である。アレイによる配列決定および分析技術で、本発明のプローブおよび複合体を使用すると、この問題は解決する。驚くべきことに、修飾オリゴヌクレオチドにおけるMGB部分により、塩基組成物とは比較的独立して、Tmが決定される。そのため、所定の長さの修飾オリゴヌクレオチドおよびMGB-修飾オリゴヌクレオチド複合体の群の場合、完全にハイブリッドするTmは、配列にかかわらず、比較的限られた温度範囲内に含まれることとなる。この時、一塩基ミスマッチのTmは、完全マッチのTmよりも相当に低くなる。そのため、すべての修飾塩基を幾つか含むオリゴヌクレオチドの長さが同じとなるように、そしてMGB複合体として存在するよう設計したアレイでは、該アレイ中のそれぞれのオリゴヌクレオチドのTmの変動が最小となり、これにより、アレイ全体においてより均一なハイブリダイゼーション条件が可能となる。これらの技術で修飾オリゴヌクレオチドおよびMGB-修飾オリゴヌクレオチド複合体を使用する更なる利点は、より高感度となることであり、これは、より短いオリゴヌクレオチドをより高い温度(よりストリンジェンシーが高い条件で)で使用することが可能である一方、単一ヌクレオチドのレゾリューションは維持されるためである。

【０１２６】
本発明がアレイ技術に更に適用されるのは、特定細胞または組織における遺伝子発現のパターンの決定である(一般にはEisen, et al., METHODS IN ENZYMOLOGY, 303: 179-205 (1999)参照)。この場合には、本発明の該プローブ／複合体は、ある表面上でアレイされており、特定細胞または組織由来の核酸サンプルは、ハイブリダイゼーション条件下、該アレイと共にインキュベーションする。ハイブリダイゼーションしている該アレイ上の部位を決定することにより、どのプローブがハイブリダイズしたかが判り、更に、該サンプルを生ずる特定の細胞または組織中でどの遺伝子が機能するかが判る。
【０１２７】
アレイ法はまた、変異または多形の同定に使用することができ、ここで、野生型および変異体配列は、ある表面上に秩序だったアレイで置かれる(Hacia, et al., J. Mol. Genet., 36: 730-736 (1999)参照)。ストリンジェントな条件下でのポリヌクレオチドサンプルと該アレイとのハイブリダイゼーション、および該アレイ中のどのオリゴヌクレオチドが該ポリヌクレオチドとハイブリダイズするかという知見より、野生型配列または変異型配列の何れを有するかが判明する。本明細書に記載の該プローブおよび複合体の識別能力が向上したことにより、その能力はアレイ技術でのこの適用に特に有用となる。
【０１２８】
また他の態様では、本発明はポリヌクレオチド中の標的配列を検出する方法を提供し、ここで、該ポリヌクレオチドは他のポリヌクレオチドの混合物中に存在し、該混合物中の他のポリヌクレオチドの１以上は該標的配列とは同一ではないが関連する配列を含み、該方法は、
(a)ポリヌクレオチドの混合物を、以下の式を有するオリゴヌクレオチド複合体と接触させること:
【化１８】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである; 該複合体は、該複合体のODN部分と完全に相補的である該標的配列とのみ安定にハイブリッドを形成し、該複合体は他のポリヌクレオチドの何れとも安定なハイブリッドを形成することはない]; および
(b)ハイブリッド形成により生ずる蛍光を測定し、それによりハイブリッド形成が該標的配列の存在を示すこと、
を含む。
【０１２９】
好ましくは、他のポリヌクレオチドの少なくとも１つは、塩基のミスマッチを１以上、より好ましくは塩基のミスマッチを１つのみ有する標的配列を有する。
【０１３０】
上記のように、標的配列とは、プローブまたはプライマーとハイブリダイゼーションする部位を含むヌクレオチド配列をいう。標的配列は、以下に限らないが、ゲノムDNA、cDNA、RNAおよびそれら任意の増幅産物を含む任意の核酸で見られ得、野生型遺伝子配列、変異型遺伝子配列、非コーディング配列、調節配列などを含み得る。標的配列の長さは、一般に、100ヌクレオチド未満、好ましくは50ヌクレオチド未満、および最も好ましくは、21ヌクレオチド未満となる。
【０１３１】
本発明のこの態様に使用する該複合体は、本明細書で述べるものと実質的に同じであり、該ポリヌクレオチドは、どのポリヌクレオチドが該オリゴヌクレオチド複合体にハイブリダイズするか判明することにより、識別され得る。オリゴヌクレオチド複合体またはプローブのハイブリダイゼーション条件は当業者に既知である。例えば、Sambrook et al.,

上記; Ausubel et al., 上記; Innis et al., 上記; Hames et al.. 上記; and van Ness et al., 上記、参照。

【０１３２】

当業者に既知の方法のうちの１つによって、ハイブリダイズしたプローブを遊離プローブから識別することにより、ハイブリダイゼーションがアッセイされ得る(すなわち、ハイブリダイズした核酸が同定され得る)。その方法には、以下に限らないが、直接かまたは間接的な標的核酸の固相への結合(第二の、支持体結合プローブとのハイブリダイゼーションまたは表面結合リガンドとプローブ結合リガンドとの間の相互作用による)、その後のプローブとの直接または間接的なハイブリダイゼーション、およびハイブリダイズしていないプローブを除去するための洗浄；ヌクレアーゼ耐性の決定；浮遊密度の測定；核酸二重鎖に特異的なアフィニティー法(例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー)；同一の標的核酸にハイブリダイズする複数のプローブ間での相互作用などが含まれる。例えば、Falkow et al., 米国特許4,358,535; Urdea et al., 米国特許4,868,105および5,124,246; Freifelder, Physical Biochemistry, Second Edition, W. H. Freeman & Co. , San Francisco, 1982; Sambrook,et al., 上記;Ausubel et al., 上記;Hames et al., 上記; および他の関連の参考文献参照。ここで記載のオリゴヌクレオチド複合体の二重鎖安定化能により、よりストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションが可能となり、ここで該標的核酸中で生じる可能性のある二次構造が最少となり得る。従って、そのオリゴヌクレオチド複合体は、本発明のこの態様で特に好ましい。

【０１３３】

好ましい実施態様では、オリゴヌクレオチド複合体は、少なくとも１つのピラゾロ[3,4-d]ピリミジンおよび／または3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン塩基を有する。この実施態様では、該複合体は、標的および／または標的の伸張産物にハイブリダイズし、ハイブリダイゼーションの結果、フルオロフォア/クエンチャー対の物理的状態が変化する。

【０１３４】

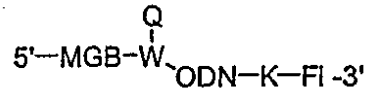
この方法および関連する方法における本発明(5'-MGB-Q-ODN-F1-3')のプローブおよび複合体の使用により、アッセイの、スピードがアップし、高感度となり、識別能が高まる。特に、完全なハイブリッドと単一塩基のミスマッチを含むハイブリッドとを識別し得る該プローブおよび複合体の能力が向上すると、例えば、一塩基変異多型の同定などにリアルタイム増幅アッセイがより使用されることとなる。当業者ならば、本発明のような組成物および方法は、一塩基ミスマッチを識別でき、また、配列どうし互いの、2、3、4、5、または更に6またはそれより多くのミスマッチを識別することができると認識する。

【０１３５】

また他の態様では、本発明は、野生型、変異およびヘテロ接合標的ポリヌクレオチドを識別する方法であって、

(a)標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを２つのプローブと接触させること、ここで、第一のプローブは野生型標的ポリヌクレオチドに特異的であり、第二のプローブは変異標的ポリヌクレオチドに特異的であって、それぞれのプローブは以下の式を有する:

【化１９】



[式中、MGBは副溝バインダーであり、Qはクエンチャーであり、Wは三価の連結基であり、ODNはオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドであり、Kは結合または連結基であり、そしてFlはフルオロフォアである; 第一および第二のプローブは異なるフルオロフォアを有しており、それぞれの該プローブは、該プローブの該ODN部分に完全に相補的である該標的配列に対してのみ安定なハイブリッドを形成する]; および

(b)ハイブリッド形成により生ずる蛍光を測定し、そのハイブリッド形成により、野生型、変異およびヘテロ接合の標的ポリヌクレオチドのそれぞれの存在または非存在が示されること

を含む該方法を提供する。

【０１３６】

本発明のこの態様では、第一および第二のプローブとそれぞれの標的との間で生ずるそれぞれのハイブリッドの該融解温度(Tm)は、好ましくは、互いに5℃以内である。好ましい実施態様では、それぞれのプローブの該ODN部分は、8から18塩基または修飾塩基を有するオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチド、より好ましくは10から15塩基または修飾塩基を有するオリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチドである。他の好ましい実施態様では、該プローブのそれぞれの該フルオロフォア部分は、シアニン、BODIPY類似体、5-FAM(商標)、6-FAM(商標)、TET(商標)、JOE(商標)、HEX(商標)、VIC(商標)、NED(商標)、TAMRA(商標)、ROX(商標)、Bothell Blue(商標)およびYakima Yellow(商標)(YY)から選択される。これらのフルオロフォアは、Applied Biosystems Inc., Foster City, CAおよびEpoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手可能である。

【０１３７】

また他の好ましい実施態様では、該プローブのそれぞれの該ODN部分は少なくとも１つの修飾塩基を含む。好ましくは、それぞれの修飾塩基は、6-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4(5H)-オン、4-アミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、1H-ピラゾロン[5,4-d]ピリミジン-4(5H)-6(7H)-ジオン、6-アミノ-3-プロプ-1-イニル-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、6-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)1-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、6-アミノ-3-(3-アミノプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、4-アミノ-3-(プロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、4-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、4-アミノ-3-(3-アミノプロプ-l-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、3-プロプ-1-イニル-4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、2-(4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)エチノ-1-オール、3-(2-アミノエチニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、5-プロプ-1-イニル-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、6-アミノ-5-プロプ-1-イニル-3-ジヒドロピリミジン-2-オン、6-アミノ-5-(3-ヒドロキシプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、6-アミノ-5-(3-アミノプロプ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、5-[4-アミノ-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)ピラゾール[3,4-d]ピリミジニル]-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オール、6-アミノ-1-[4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]-3-(3-メトキシプロプ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、4-(4,6-ジアミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)-ブチ-3-イノ-1-オール、6-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、5-(4-ヒドロキシ-ブチ-1-イニル)-1H-ピリミジン-2,4-ジオン、3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、3-ヨード-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミン、3-ブロモ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジニ-4-イルアミンおよび3-クロロ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イルアミンから独立して選択される。

【０１３８】

他の好ましい実施態様では、該サンプルを、増幅条件下、プライマーの一群と更に接触させ、それぞれのプライマーは、上記提供の基から選択される1から10の修飾塩基を含む。従って、本発明の他の態様では、増殖反応のためのプライマーと共に上記のようなプローブ／複合体が含まれるキットを提供し、ここで、該プライマーは、プライマーあたり１以上の修飾塩基、より好ましくは1から10の修飾塩基を有する。

【実施例】

【０１３９】

実施例

実施例1

この実施例は、本発明の5'-MGB-Q-ODN-Fl-3'プローブに関連する調製および特性を解説

、特に3'-MGB-QTaqMan(登録商標)プローブのような関連のプローブと比較して解説する。

【０１４０】

材料および方法

1.1 鋳型

ある家系のファミリーナンバー６６由来のヒトゲノムDNA(RRM1(リボヌクレオチドレダクターゼのヒトM1サブユニット)対立遺伝子１母に対してホモ接合性であり；RRM1対立遺伝子２父に対してホモ接合性であり、およびホモ接合性の子)をCoriell Institute of Medical Research, Camden, NYから購入した。遺伝子型決定を、我々の研究室で、制限断片長多型(restriction length polymorphism)およびTaqMan法を用い、事前に行った。

【０１４１】

単純性疱疹ウイルス(HSV)1型のグリコプロテインD遺伝子の一部の配列を含むDNAフラグメントを、PCRにより、感染細胞(ATCC #VR-733のF株)から単離したDNAから得た。PCRフラグメントはゲル精製し、UV吸収で定量した。

【０１４２】

ヒトDNAサンプルを得(Coriell Institute of Medical Research, Camden, NY)、CYP2D6およびCYP2D6*4対立遺伝子に分類した。

【０１４３】

1.2 オリゴヌクレオチド

使用するオリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。標準的なホスホアミダイト化合物を用い合成した。5'-MGB-Q Eclipse(商標)プローブは、5'-3'方向にオリゴヌクレオチドセグメントを合成する用に設計した、MGB-Q-修飾ガラス支持体(調製におけるマニュスクリプト)上で5'-β-シアノエチルホスホアミダイト(Glen Research, VA)を用いる自動DNA合成を行うことにより調製した。オリゴヌクレオチド合成は、ABI 394合成装置で、製造者により供されるプロトコールに従って、0.02M ヨード液を用いて行った。PPGホスホアミダイトは文献の方法に基づき合成したが、Glen Research, Sterling, VAから購入することもできる。6-カルボキシフルオレセイン(FAM)、Yakima Yellow(登録商標)(YY、Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手)および6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン(TET)のレポーティング色素を、対応するホスホアミダイト(Glen Research, Sterling, VA)を用い、合成の最後のステップで導入した。RRM1対立遺伝子1SNPに対応する3'-MGB-QTaqMan(登録商標)プローブは、MGB Eclipse(登録商標)プローブの調製の用に、既述のように合成した。この場合、標準の5'-DMTホスホアミダイトを使用した。オリゴヌクレオチドはすべて逆相HPLCで精製した。

【表４】

表2. プライマーおよび蛍光発生性プローブの配列

	5'- 末端	配列	3'-末端
RRM1 (120 bp アンプリコン)	**受入番号 XM_006065**		
プライマー1 (センス)		ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA	
プライマー2 (アンチセンス)		GTA CTT TCA ATT CAT GGA GCA TAC CT	
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (センス)	MGB-Q	ATA TCT AGC TGT GTT GA**	FAM
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 2 (センス)	MGB-Q	ATA TCG AGC TGT GTT GA	TET
MGB-TaqMan 対立遺伝子 1 (センス)	FAM	ATA TCT AGC TGT GTT G	MGB-Q
CYP2D6*4 (127 bp アンプリコン)	**受入番号 M33388**		
プライマー1 (センス)		TGA TGG GCA GAA GGG CAC AA	
プライマー2 (アンチセンス)		ATC ACG TTG CTC ACG GCT TTG TC	
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (WT)	MGB-Q	CGT CCT GgG GgT G	FAM
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (変異体)	MGB-Q	GGC GTC TTG gGg GT	YY
ヒトヘルペスウィルス1,2 (142 bp アンプリコン)	**受入番号 AF333383**		
プライマー1 (センス)		ATC CGA ACG CAG CCC CGC TG	
プライマー2 (アンチセンス)		TCT CCG TCC AGT CGT TTA TCT TC	
Eclipse™ プローブ(アンチセンス)	MGB-Q	CCC AGG TTA TCC TCG CT	FAM

gはPPGである。**イタリック文字は、グアニンによるFAM蛍光の消光をさけるべく導入した不対塩基を示す。アンダーラインを引いた太字はSNPを示す。

【０１４４】

1.3 Tm予測

MGB Eclipse(登録商標) Design Software 1.0(Epoch Biosciences, Bothell, WA)を使用し、5'-MGB-Q-ODN-F1プローブを設計した。該ソフトウェアの特徴の１つに、G:G自己会合によりプローブの検出が低下することが知られる、3を超える連続のGを含むプローブであってGとPPGとの適当な置換が見られるプローブを設計する能力がある。更に、該ソフトウェアは、二重鎖安定性を向上するべくAT-リッチ配列にスーパーAおよびスーパーT修飾塩基を組み込んだプローブを設計し得る。該TaqMan(登録商標)プローブは、Primer Express(登録商標)(AB Biosystems, Foster City, CA)を用い設計した。

【０１４５】

1.4 リアルタイムPCR

リアルタイムPCRは、ABI Prism(登録商標)7700(Applied Biosystems, Foster City, CA)、RotorGene、(Phenix Research Products, Hayward, CA)、またはLight Cycler LC 24(Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT)サーモサイクリング蛍光計の何れかにより為した。

【０１４６】

ABI Prism 7700装置では、50℃2分および95℃2分の後に3ステップのPCR(95℃30秒、56℃30秒および76℃30秒)を50サイクル行った。該反応物は、10μl反応物において、1X PCR緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 8.7、40 mM NaCl、5 mM $MgCl_2$)中、0.25μM MGB Eclipse(商標)プローブ、該プローブと同一の鎖に相補的な100 nMプライマー、1μM反対鎖プライマー、125μM dATP、125μM dCTP、125μM TTP、250μM dUTP、0.25U JumpStart DNAポリメラーゼ(Sigma)、AmpEraseウラシルN-グリコシラーゼ(Applied Biosystems) 0.125Uを含んだ。PCR反応すべてにおいて、AmpEraseウラシルN-グリコシラーゼを、dUTP(TTPの代わりに)と共に使用した。添加した鋳型の量を結果のセクションで示す。蛍光シグナルが該反応のアニーリングステップで増加するのが記録された。

【０１４７】

Light Cyclerで行った実験では、該PCR混合物は上記と同一であるが、但し、非アセチル化ウシ血清アルブミンを加え、最終濃度250μg/μlとした。サイクリングは以下: 50℃

2分、95℃2分、その後、95℃0秒、56℃20秒および76℃20秒を50サイクルとするか、適宜示したように行った。蛍光発生性プローブ(MGB Eclipse(登録商標)およびMGB-TaqMan)の最終濃度は0.25 pMであった。MGB Eclipse(商標)プローブのプライマー濃度はABI 7700の場合と同じであった。MGB-TaqManのプライマー濃度はそれぞれ0.50μMであった。蛍光シグナルの増加は該反応のアニーリングステップでまたは適宜示したように記録した。その結果をスクリーンから直接得るか、または製造者が示すようにExcelフォーマットとした。

【０１４８】

RotorGeneで行った実験では、該Light Cyclerで用いた条件と同様の条件を用いたが、但し、サイクリングは以下:50℃2分、95℃2分、その後に95℃1秒、56℃10秒および76℃4秒の50サイクルとするか、適宜他に示したように行った。

【０１４９】

1.5 MGB Eclipse(登録商標)プローブのダイナミックレンジ

リアルタイムPCR技術の利点には、広いダイナミックレンジおよび高感度がある。ウイルスおよび他の源由来の多くのDNAフラグメントを測定し、MGB Eclipse(商標)プローブの感度およびダイナミックレンジを測定した。典型的に、反応あたりのコピー数が$5x10^7$から5の範囲で良好な再現性を示した。代表として示す増幅プロット(図3)は、$5x10^6$から5コピーのHSV 1型の測定である。これら反応のスレッシュホールドサイクル(C_t)値はそれぞれ16から37であった。C_tをLogN(Nは、投入した標的コピーの数である)に対してプロットすると、得られる標準曲線は、相関係数0.999であり、7桁を超える直線となる。MGB Eclipse(商標)プローブによる定量PCR分析により、広範囲で直線となる、増幅のダイナミックレンジが得られ、感度は数コピーに低下する。

【０１５０】

1.6 5連続のグアニンを含むCYP2D6*4対立遺伝子特異的プローブの設計

臨床的に重要な薬物の超速(ultrarapid)代謝に応答する多形性シトクロムP450 2D6(CYP2D6)は、異人種間で明らかに異なる。対立遺伝子CYP2D6*4は、白人で多数あり一番よくある異常遺伝子である。G/Aのミスマッチは、5'-末端の5連続のGおよび3'-末端の4連続のCの間にある(is flanked by)。驚くことではないが、両鎖に対する通常の識別プローブの設計の最初の試みは失敗した。反復性の4連続以上のGを有する配列は避けるべきことが十分証明された(Primer Express(登録商標), AB Biosystems, Foster City, CA)。MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareでは、3を超える連続のGを含む配列は検討され、G:G自己会合を回避するための適当なPPG置換が示唆される。G-リッチのCYP2D6*4標的を選択し、プローブおよびプライマー設計の有効性を示した。

【０１５１】

MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareによるプローブおよびプライマーの設計の最初のステップは、目的の標的配列をインポートすることである。CYPD6*4遺伝子の一部を以下に示す。この配列をGenebank Accession number M33388からインポートする。

【化２０】

3001 gggtcttccc tgagtgcaaa ggcggtcagg gtgggcagag acgaggtggg gcaaagcctg

3061 ccccagccaa gggagcaagg tggatgcaca aagagtgggc cctgtgacca gctggacaga

3121 gccagggact gcgggagacc agggggagca tagggttgga gtgggtggtg gatggtgggg

3181 ctaatgcctt catggccacg cgcacgtgcc cgtcccaccc ccaggggtgt tcctggcgcg

3241 ctatgggccc gcgtggcgcg agcagaggcg cttctccgtg tccaccttgc gcaacttggg

3301 cctgggcaag aagtcgctgg agcagtgggt gaccgaggag gccgcctgcc tttgtgccgc

3361 cttcgccaac cactccggtg ggtgatgggc agaagggcac aaagcgggaa ctgggaaggc

3421 gggggacggg gaaggcgacc ccttacccgc atctcccacc ccca[g/a]gacgc ccctttcgcc

3481 ccaacggtct cttggacaaa gccgtgagca acgtgatcgc ctccctcacc tgcgggcgcc

3541 gcttcgagta cgacgaccct cgcttcctca ggctgctgga cctagctcag gagggactga

3601 aggaggagtc gggctttctg cgcgaggtgc ggagcgagag accgaggagt ctctgcaggg

3661 cgagctcccg agaggtgccg gggctggact ggggcctcgg aagagcagga tttgcataga

【化２１】

3721 tgggtttggg aaaggacatt ccaggagacc ccactgtaag aagggcctgg aggaggaggg

3781 gacatctcag acatggtcgt gggagaggtg tgcccgggtc agggggcacc aggagaggcc

3841 aaggactctg tacctcctat ccacgtcaga gatttcgatt ttaggtttct cctctgggca

【０１５２】

CYP2D6*4遺伝子配列の一部。該ミスマッチを括弧で示す。

【０１５３】

該ソフトウェアは、関連するプライマーにより対立遺伝子特異的プローブを多数決定する。プローブ、プライマーおよびアンプリコンは全て、パラメーターの最少および最大の限界点(constraint)について評価する。該プローブ、プライマーまたはアンプリコンが限界内に収まらない場合、該評価プロセスは終了する。最適のパラメーター限界が最も適合するか否かにより、該プローブおよびプライマーをランク付けする(MGB Eclipse(登録商標) Design Software Manual, Epoch Bioscience, Bothell, WA.)。表3では、該ソフトウェアにより測定される、プライマーおよびプローブを3セット列挙する。列挙した該プローブおよびプライマーの並びは、理想のパラメーター限界にどれだけ近いかによって決まっている。該3つのプローブおよびプライマーのセットの構成(design)は似ており、第一の構成セットが合成され、図4に示すように、野生型と変異体との識別に使用された。

【表５】

表 3
MGB Eclipse™ Design Software により設計したプローブおよびプライマー
ここで CおよびT はミスマッチを示し g=PPG である。

ODN	T_m	GC%	長さ	配列
WT	67.3	77	13	CGTCCGgGgGTG
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.6	55	20	TGATGGGCAGAAGGGCACAA
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.9	52	23	ATCACGTTGCTCACGGCTTTGTC
WT	67.3	77	13	CGTCCTGGgGgTG
変異体	67.8	71	14	GGCGTCTTGgGgGT
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.6	55	20	TGATGGGCAGAAGGGCACAA
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	678	55	22	TCACGTTGCTCACGGCTTTGTC
WT	67.3	77	13	CGTCCTGgGgGTG
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT
ﾌﾟﾗｲﾏｰ1	68.7	52	21	TGATGGGCAGAAGGGCACAAA
ﾌﾟﾗｲﾏｰ2	67.9	52	23	ATCACGTTGCTCACGGCTTTGTC

2つのPPGを含むプローブは、その対応の標的を特異的に検出する。対照的に、すべて天然の塩基であるプローブは、その標的を検出することができない。

【０１５４】

1.7 CYP2D6およびCYP2D6*4対立遺伝子の識別

CYP2D6対立遺伝子用に設計したプローブ(表2)を使用し、２回、34のCEPH DNAサンプル(1 鋳型対照なし、26 野生型、7 ヘテロ接合体および1 変異体)の遺伝子型を決める能力を評価した。遺伝子型決定は、図5に示すようなMGB Eclipse(登録商標)プローブアッセイにより、正確となる。両チャンネルの、最後の増幅サイクルで生ずる蛍光シグナル(バックグラウンドを差し引いた後)をプロットした。散布図(図5)から、ホモ接合体、ヘテロ接合体および変異体サンプルの、非常によいクラスターが見られる。

【０１５５】

1.8 問題のプライマーの設計

増幅反応にあまり関与しないGC-リッチプライマーもある。4を超える連続のGを含むプライマーのパフォーマンスは低く、その低いパフォーマンスはGがPPGで適当に置換されることによって避けられ得る。4連続のGを含む、MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareにより設計されたプライマーの例を、β-アクチン遺伝子発現アッセイに関して図４で示し、ここで、１つのGはPPGで置換される。増幅および検出が、表4に列挙するプライマーおよび検出プローブを用い、成功した(データ示さず)。

【表６】

表 4

β－アクチン遺伝子検出のためのプライマーおよびプローブ

ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1: GCG TGA TGG TGG GCA T センス

ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2: GAT GgG GTA CTT CAG GGT アンチセンス

ﾌﾟﾛｰﾌﾞ: MGB-Q- GGA TTC CTA TGT GGG CGA -FAM センス

【０１５６】

1.9 考察

本発明の5'-MGB-Q-ODN-F1 (MGB Eclipse(登録商標))プローブは、増幅した標的のリアルタイムの検出と置き換え得る感度のよいものである。三日月形副溝バインダー(図1)は、AT-リッチ配列を安定化し、好ましくは、プローブのTmを20℃ぐらい上昇させ、短い特異的プローブの使用が可能となる。この特性は、一塩基変異多型(SNP)検出におよびウイルス性ゲノムまたは複数遺伝子ファミリーの短い保存配列のプローブ設計に特に利点となる。新規のMGB Eclipse(商標)プローブは、MGBおよびEclipseクエンチャー技術の有益な見込みを実現する。溶液中のプローブは効果的に消光されるが、増幅標的にハイブリダイズするとき蛍光を発する(図1B)。図2Aは、5'-MGB-Q-ODN-F1プローブが、3'-MGB-Q-ODN-Fl, TaqMan(登録商標)プローブとは対照的に、増幅中に切断されないことを示す(図2B)。該未処理の5'-MGB-Q-ODN-F1プローブには、競争物を上まわる多くの利点がある。該MGB Eclipses(登録商標)プローブを、他の非5'-ヌクレアーゼアッセイで使用し、標的を検出することができる。更に、二重鎖は増幅後融解し、ウイルス型のTmを測定することができる。

【０１５７】

該MGB Eclipse(商標)プローブの高感度および広範囲のダイナミックレンジを図3に示す。単純性疱疹ウイルス(HSV)1型を含むDNAフラグメントを、$5X10^6$から5コピーまで測定した。これら反応の該C_t(スレッシュホールドサイクル)値はそれぞれ26から37である。Ctを、投入した標的コピーの数であるLogNに対してプロットすると、得られる標準曲線は相関係数0.999であり、7桁の直線である。

【０１５８】

新規のMGB Eclipse(登録商標) Design Softwareは5'-MGB-Q-オリゴヌクレオチドの設計をし得るばかりでなく、4を超える連続のGを含む標的のプローブおよびプライマーの設計を初めて可能ならしめたものである。4を超える連続のGは殆どのソフトウェアプログラムで使用できない。該対立遺伝子CYP2D6*4は、白人で多数あり一番よくある異常遺伝子であり、G/Aミスマッチは、アンチセンス鎖における3'-末端の5連続のGおよび5'-末端の4連続のGの間にある。両鎖に使用するこの対立遺伝子の通常のプローブ設計は失敗した。しかし、該MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareを用い、この領域内で設計されたプライマーとプローブの3つのセットを表3に示す。3つのプローブは全て5連続のGを含み、該ソフトウェアは、5連続のGのうちの2つをPPGに置換することを示す。設計したプローブおよびプライマーの第一のセットを増幅反応に使用し、特異的に野生型および変異体CYP2D6*4対立遺伝子(図4)を検出し、G:G自己会合を排除するGのPPG置換の能力を確認した。種々のCYP2D6対立遺伝子に対し34サンプルの遺伝子型決定を正確にする、これらMGB Eclipse(商標)プローブの能力を図5に示す。密なクラスター化により、SNP分析におけるMGB Eclipse(商標)プローブシステムの有用性を確認した。

【０１５９】

感度の高いMGB Eclipse(商標)プローブ検出システム用のプローブおよびプライマーは、今、新規のMGB Eclipse(商標) Design Softwareを用い日常的に設計し得る。このソフトウェアは5'-MGB-Q-ODN-Fl (Eclipse(商標))プローブの設計ができるばかりでなく、明示されたとき、設計されたプローブ中へのPPGの組み込みを初めて可能ならしめたものである。パフォーマンスを低下することが知られる、4を超える連続のGを含むプローブおよびプライマーは、今、容易に設計でき、高感度で特異的なプローブを作ることができる。該プライマーの設計におけるPPGおよびMGBの使用により、パフォーマンスが向上したプライマー設計が簡単となる。該Eclipseプローブが増幅反応で切断されないという事実から、そのプローブは、他の増幅システムにおける検出プローブとして魅力あるものとなる。

【０１６０】

実施例2

この実施例は、3つのタイプの蛍光発生性プローブを用いる増幅のリアルタイムなモニタリングを解説する。その結果の考察は、図2を参照しつつ、上記している。

【０１６１】

PCR中のプローブ崩壊(または喪失)の証明をサポートするため、該蛍光標識を放射活性を有するものに置換した。予想されるように、MGB Eclipse(商標)プローブは、PCR終了後

崩壊はトレースされなかった(図2、Aii)。30%を上回るMolecular Beaconプローブが Taqポリメラーゼによって消化された(図2、Bii)。TaqMan(登録商標) MGBは、ほぼ完全に消化された(図2、Cii)。プローブはPCRで熱崩壊しない(図2、iiの酵素なし対照参照)。

【０１６２】

オリゴヌクレオチドの放射活性標識

PCRにおける、TaqポリメラーゼによるTaqMan(登録商標) MGB、Molecular BeaconおよびMGB Eclipse(商標)プローブの消化をモニターするため、対応するオリゴヌクレオチドを^{32}Pで標識した。TaqMan(登録商標) MGB プローブおよびMolecular Beaconの5'-末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(Promega, Madison, WI, ISA)および[γ-^{32}P] ATP (5000 Ci/mmol, lOmCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech)でリン酸化した。MGB Eclipse(商標)プローブの3'-末端を末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(Promega, Madison, WI, USA)および[α-^{32}P]コルジセピントリホスフェート(Perkin Elmer Life Sciences Inc., USA)で標識した。

【０１６３】

放射性プローブによるPCR

放射性プローブによるPCR条件は、リアルタイムPCRと同一であるが、但し、対照反応はTaqポリメラーゼを含んでいなかった。PCR終了後、それぞれのサンプルのアリコートを変性ポリアクリルアミドゲルで分離した。リン光体イメージングを用い、該プローブの崩壊を評価した。

【０１６４】

Light CyclerでのPCRの場合、該PCR混合物は同じであるが、但し、非アセチル化ウシ血清アルブミンを加え、最終濃度250μg/μlとした。サイクリングは以下のように行った:50℃2分、95℃1分、その後、95℃0秒、56℃20秒および76℃30秒を50サイクル。蛍光発生性プローブ(MGB Eclipse(商標)、Molecular BeaconおよびTaqMan(登録商標) MGB)の最終濃度は250 nMであった。MGB Eclipse(商標)プローブのプライマー濃度はABI 7700の場合と同じであった。Molecular BeaconおよびTaqMan(登録商標) MGBのプライマー濃度はそれぞれ0.50μMであった。蛍光が該反応のアニーリングおよび変性ステップで生じた。

【０１６５】

結果は、スクリーンから直接得るか、または切り取ったファイルを製造者による指示どおりにExcelに移した。

【０１６６】

表5は、この実施例で使用し、図2で示した、プライマーおよび蛍光発生プローブの配列を示す。

【表７】

表 5 プライマーおよび蛍光発生性プローブの配列

	5'-末端	配列	3'-末端
RRM1 T1037G変異; 受け入れ番号XM 006065			
ﾌﾟﾗｲﾏｰ1 (ｾﾝｽ)		ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA	
ﾌﾟﾗｲﾏｰ2 (ｱﾝﾁｾﾝｽ)		GTA CTT TCA ATT CAT GGA GCA TAC CT	
MGB Eclipse™ ﾌﾟﾛｰﾌﾞ 対立遺伝子 1 (ｾﾝｽ)	MGB-Q	ATA TCT AGC TGT GTT G*A***	FAM
MGB Eclipse™ ﾌﾟﾛｰﾌﾞ 対立遺伝子 2 (ｾﾝｽ)	MGB-Q	ATA TCG AGC TGT GTT G*A*	TET
Molecular beacon 対立遺伝子 1 (ｾﾝｽ)	FAM	cca acc AT CCA CAT ATC TAG CTG TGT TG ggt tgg*	Dabcyl
TaqMan® MGB 対立遺伝子 1 (ｾﾝｽ)	FAM	ATA TCT AGC TGT GTT G	MGB-Q

【０１６７】

実施例3

この実施例は、5'-MGB-Q-ODN-F1-3'プローブを用いるc-myc遺伝子発現のリアルタイム検出を解説する。リアルタイムRT-PCRは2ステップ(個々のチューブおよび反応条件における逆転写およびPCR)または1ステップ(RTとPCRとを組み合わせる)で行った。

【０１６８】

2ステップRT PCRはClontech Advantage RT-for-PCRキットを用い行った。ヒトの胎盤由

来のトータルRNAおよびランダムプライマーを作成し加えた。反応終了したRT反応物1μLは、上記のように適当なプライマーおよびFAM-標識RTLプローブを用いたリアルタイムPCR反応物10μL中で鋳型として使用した。

【０１６９】

1チューブの反応は、ヒトの胎盤由来のトータルRNAを反応あたり種々の量(100ngから1ng)を用いQIAGEN One-Step RT-PCRキットで行った。多少異なるが、製造者により示唆されるプロトコールに従った。それぞれの遺伝子特異的プライマーは0.6μMが推奨されているが、アンチセンスプライマーは1μMおよびセンスプライマーは0.1μMを使用した。MGB-Q-ODN-F1プローブ(センス)を加え、最終濃度をリアルタイムな検出が可能な0.2μMとした。RNaseインヒビターは反応あたり5ユニット使用した。サーマルサイクラー条件は、推奨範囲内であり、逆転写の50℃30分、最初のPCR開始ステップの95℃15分、および変性(94℃30秒)、アニーリング(56℃30秒)、伸張(76℃30秒)の3ステップの40サイクルが含まれた。伸張時間は、アンプリコンの大きさが小さいことから、1分から30秒に短くした。伸張温度は72℃から76℃への上げ、すべてのMGB-Q-ODN-F1プローブが増幅中のDNA鎖から融解分離し、PCRが停止(clamp)しないようにした。最終伸張ステップは省略した。蛍光の読み取りはPCRのアニーリング段階で行った。図6は、c-myc標的のRT-PCR遺伝子発現検出を示す。

【０１７０】

実施例4

この実施例は、本発明に使用するプローブのバックグラウンド蛍光の測定を解説する。

【０１７１】

種々のクエンチャーを有するFAM-標識したオリゴヌクレオチドのバックグラウンド蛍光は、Applied Biosystems LS50-Bスペクトロフォトメーターを用い、1XPCR緩衝液(20mM Tris-HCl pH 8.7、50mM NaCl、5mM $MgCl_2$)中、濃度0.2μMで3回測定した。励起波長488 nmでスリット孔2.5であった。放射波長522 nmでスリット孔5.5であった。プローブは、Eclipse(商標) クエンチャー(同時係属出願09/457,616参照)、Dabcyl、またはMGB-クエンチャーを用いる自動化DNA合成により調製した。該プローブ配列は5'-tcctgattttacであった。

【０１７２】

実施例5

この実施例は、融解曲線分析によるMTHFR遺伝子のSNP検出を解説する。

【０１７３】

この実施例では、一塩基のミスマッチ検出は、本発明の一対のプローブにより行う。増幅は、同一チューブ中、フルオロフォア1で標識した対立遺伝子1のプローブ、フルオロフォア2で標識した対立遺伝子2のプローブで行う。これらのプローブは類似の融解温度となるように設計する。PCR増幅は、それぞれのサンプルチューブ中の両対立遺伝子のプローブで行う。増幅が終了すると、それぞれのプローブ二重鎖の融解温度(Tm)を2波長(１つはフルオロフォア1および１つはフルオロフォア2)で測定する。同種の対立遺伝子1標的のみが存在するならば、フルオロフォア1標識プローブのみによる融解曲線が得られる(図7A; FAMチャンネルのみの融解曲線)。同様に、同種の対立遺伝子2標的のみが存在するならば、フルオロフォア2標識プローブのみによる融解曲線が得られる(図7B; YYチャンネルのみの融解曲線)。しかし、ヘテロ接合標的の場合、融解曲線はフルオロフォア1-およびフルオロフォア2-標識プローブの両方により得られる(図7Aおよび7B参照; 両チャンネルにより生ずる融解曲線)。RotorGene, Corbett Instruments, Australiaのような装置は、図に示すように1チャンネルで種々のサンプルをコンパイルする能力を有する。

【０１７４】

MTHFR遺伝子の場合、野生型対立遺伝子の該プローブ配列はMGB-Q-ATC GGC TCC CGC-FAMであり、変異体対立遺伝子の該プローブ配列MGB-Q-AAT CGA CTC CCG C-YY(Yakima Yellow(商標))である。野生型、変異体およびヘテロ接合体のサンプルの融解曲線は図7A(FAMチャンネル)および図7B(YYチャンネル)のようにコンパイルされる。

【０１７５】

実施例6

この実施例は、AT-リッチ領域でのSNP検出における、プライマーおよびプローブの両方にある修飾塩基の利用を解説する。

【０１７６】

以下、目的のAT-リッチ配列を示す。プライマーおよびプローブの両方が、スーパーAおよびスーパーT修飾塩基(市場でEpoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手可能)により多くが置換される必要があり、これによりポリメラーゼ増幅に必要な安定性が得られる。より長いオリゴヌクレオチドにより、PCR効率を低下する二次構造およびプライマーダイマーの形成が増大する。必然的に要求される安定性のため、AおよびTをスーパーAおよびスーパーTに自動的に置換するMGB Eclipse(商標) Software 2.0によりプローブおよびプライマーを設計した。プローブ配列はアンダーラインを引いた太字で示し、プライマー配列は太字のみで示す。

【化２２】

TTAACAAAAGTATTAGTAATCATATTACTTTTCTTAATCTGTGTGGTGAGTACGTA
AGTGTTCATTTCCATTCCATTAGTATTATATTTGAAAACTAAAAACTCCTGCGTA
AGTCTCAATATAACTGCTTATGTCCATGTTCTATTTAATACACCTTATAACCCAT
GTGTAGTGTGAACCAATAGCTGTGTTTTAATATTTTTG[C/T]TAAATATATTATAC
ATTCACTATAACCTCTACAGTTTTAAAGAATGTTAAAATGAACCTGAATACCTA
GTTTCCTCTACCCACACCCTTCTCCCCCATACCAATCTTTACTTCACAATTCTGTC
AATTACAGCTTAGGAAGGTACT

【０１７７】

プローブおよびプライマー配列を以下に示す。ここで、「a」はスーパーAであり、「t」はスーパーTである。修飾塩基の使用によって、図8に示すようにミスマッチ識別が向上したより短いプローブおよびプライマーの設計が可能となる。

【化２３】

センスプライマー1: CCt GCG tAt GtC tCa ATA T

アンチセンスプライマー2: CtG tAG aGG TTA TAG TG

【化２４】

プローブ"T" MGB-Q-TtG tTa AaT aTa TTa t-TET

プローブ"C" MGB-Q-ttG CTa AaT aTa TTa T-FAM

【０１７８】

実施例7

この実施例は、PCR阻害をモニターする内部対照の使用を解説する。

【０１７９】

この実施例では、内部対照は、プライマーのセットおよび該対照用のスクランブル化C. elegans配列ともに使用する。

【０１８０】

サンプルすべてを、少量(約10から10^4コピー)の内部対照の鋳型でスパイク(spike)し、偽PCR陰性をスクリーニングする。全体の内部対照配列は、任意の既知生物と顕著な相同性が全くなく作成された。結果として、別々のプライマーのセットが目的の遺伝子の内部対照から必要となる。

【０１８１】

１つの実施態様では、a)標的の増幅に使用されるプライマーセットとは異なるプライマーのセット、b)内部対照プライマーの合計よりも長い内部対照標的、およびc)内部対照プローブを含む内部対照システムを使用し、ここで、該内部対照プライマーおよび内部対照プローブの配列は既知配列のものとは実質的に異なる。

【化２５】

試験に使用した内部対照鋳型 *(IC)* 配列

共通 IC (スクランブルした *C.elegans* 配列)

CTCAGGTGTCCGTGTGTTCCATCTGTTCTAGGCAAAGTCCCATCGTT

TCCACCAGTTACTTTACGGACCAC

フォワードユニバーサル ICﾌﾟﾗｲﾏｰ CTCAGGTGTCCGTGTGTTCCAT

フォワードユニバーサル ICﾌﾟﾗｲﾏｰ GTGGTCCGTAAAGTAACTGGT

プローブMGB-Q-GGCAAAGTCCCATCGTT-Yakima Yellow 色素

【０１８２】

内部対照PCRは、フルオロフォア1標識特異的プローブおよびフルオロフォア2標識内部対照プローブを一緒に混合しそれを使用することにより典型的に二重化(bi-plex)される。フルオロフォアlおよびフルオロフォア2は任意の適当な蛍光色素であり得る。実施では、PCRインヒビターを含むサンプルはIC鋳型を繰り返し増幅することはなく、「不十分なPCR」となることがわかった。図9は、CapA標的配列(pOX2プラスミド、Bacillus anthracisゲノム)の測定曲線であり、それぞれの希釈物は、適当なプライマーセットと共に共通の内部対照を一定量含んでいた。図9に示すように、内部対照はすべて十分に増幅していた。

【０１８３】

実施例8

この実施例は、本発明のEclipseプローブのパフォーマンスにおけるリンカー(K)の影響を解説する。

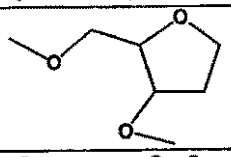
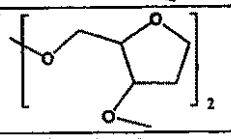
【０１８４】

プローブは上記の方法で構成し、表6に示す配列を有していた。特定リンカーで見られる蛍光増加は、プローブと関連し、ここで、該フルオロフォアは直接オリゴヌクレオチド部分に結合している(例えば、Kは式Iで結合である)。それぞれのプローブでKが結合である場合、増加を測定する対照として、蛍光を0%に設定する。

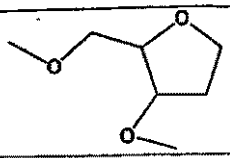
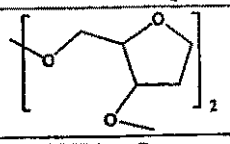
【表８】

表 6
リアルタイムＰＣＲにおけるプローブのパフォーマンスへのリンカーＫの影響

W=-O-$(CH_2)_3$-N-$(CH_2)_2$-C(=O)-

#	配列、Eclipse プローブの5'から3'	K	オリゴマー	% 蛍光増加
1	MGB W-(Q)-CGT CAC ACC CGA AGG AAT-K-FAM	なし	18-mer	0%
2	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	18-mer	15%
3	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	18-mer	20%
4	同じ		18-mer	0%
5	同じ		18-mer	10%
6	同じ	-O-$(CH_2)_{12}$-O-	18-mer	-20%
7	同じ	-[O-$(CH_2)_{12}$]$_2$-O-	18-mer	-50%
8	MGB W-(Q)-CTC GGT CCT TGC CCT-K-FL	なし	15-mer	0%
9	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	15-mer	50%
10	MGB W-(Q)-CGA CTC GGC CCT TG-K-Fl	-	14-mer	0%
11	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	14-mer	100%
12	MGB W-(Q)-AGG CGA GGA ATA C-K-Fl	-	13-mer	0%
13	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	13-mer	70%
14	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	13-mer	150%

【表９】

15	同じ		13-mer	10%
16	同じ		13-mer	70%
17		-O-$(CH_2)_{12}$-O-	13-mer	20%
18	同じ	-[O-$(CH_2)_{12}$]$_2$-O-	13-mer	-20%
19	MGB W-(Q)-AAT CGA CTC CCG C –K-FL	なし	13-mer	0%
20	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	13-mer	70%
21	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	13-mer	130%
22	MGB W-(Q)-ATC GGC TCC CGC-K-FFL	なし	12-mer	0%
23	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	12-mer	70%
24	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	12-mer	115%

【０１８５】

個々の刊行物または特許出願を引用により含めることを特定的におよび個々に示すかのように、本明細書で引用するすべての刊行物および特許出願を引用によりすべて本明細書に含める。上記本発明は、理解を容易ならしめるため例示し開示することによって詳細に記載しているが、本願に添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく一定の変化または修飾を本発明に行い得ることは、本発明の教示を鑑みれば当業者に容易に

明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【０１８６】

【図１】a)5'-MGB-Q-ODN-Fl複合体の構造およびb)5'-MGB-Q-ODN-Flプローブによる DNA標的の検出を示す。

【図２】蛍光の様子およびMGB Eclipse(商標)(A)、Molecular Beacon(B)およびTaqMan MGB(C)プローブの5'-ヌクレアーゼ耐性を示す。

【図３】MGB-Q-ODN-Flプローブの感度を示す。

【図４】CYP2D6遺伝子中のプローブを含むGが過剰の4 C/T多形のリアルタイム検出を示す。

【図５】DNAサンプル中のCYP2D6対立遺伝子のリアルタイムMGB-Eclipse(商標)プローブ検出の散布図である。

【図６】c-myc遺伝子発現のRT-PCR検出を示す。

【図７】融解曲線分析による野生型、変異およびヘテロ接合のMTHFR対立遺伝子の検出を示す。

【図８】AT-リッチ領域中のアッセイを行うための、修飾塩基で置換される幾つかの通常の塩基を有するプライマーおよびプローブの使用を示す。

【図９】CapA標的配列(pOX2プラスミド、Bacillus anthracisゲノム)の測定曲線を示す。

【図１０】好ましいMGB-Eclipse(商標)プローブおよび関連のMGBTaqMan(登録商標)プローブの構造を示す。

【図１】

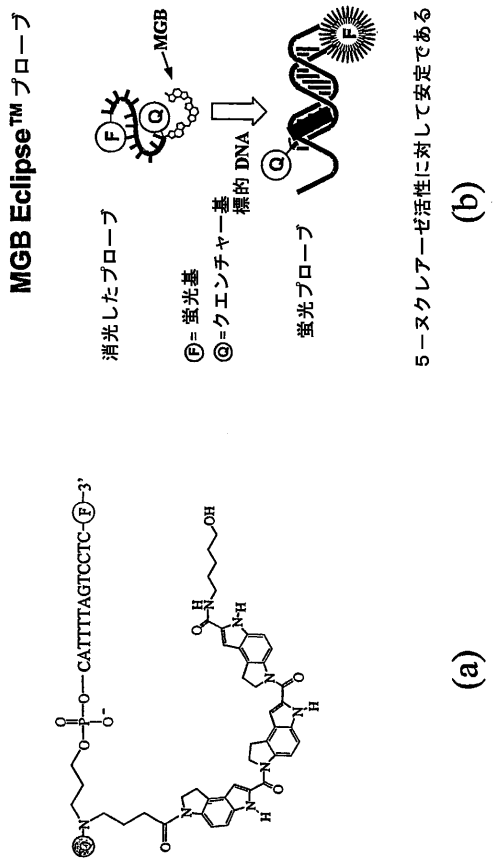


FIG. 1

【図２】

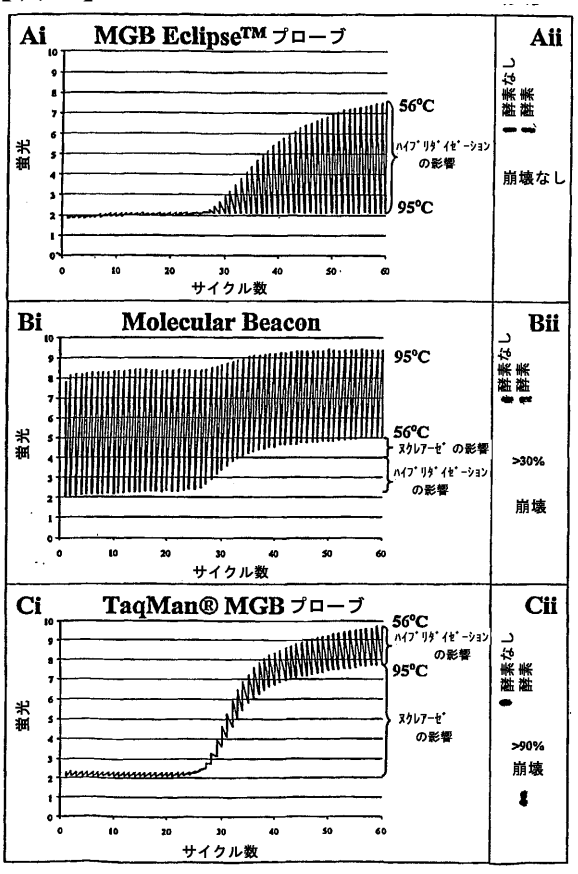


FIG. 2

【図３】

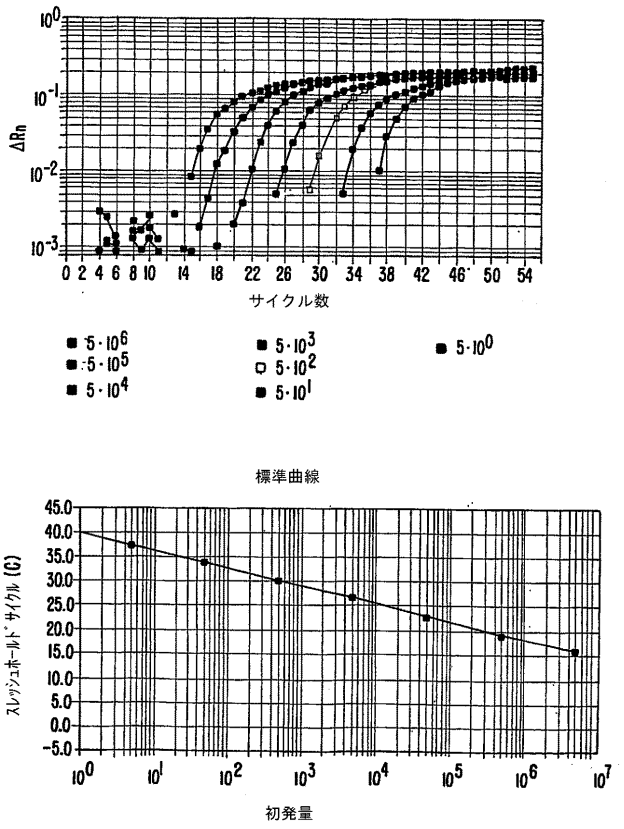


FIG. 3

【図４】

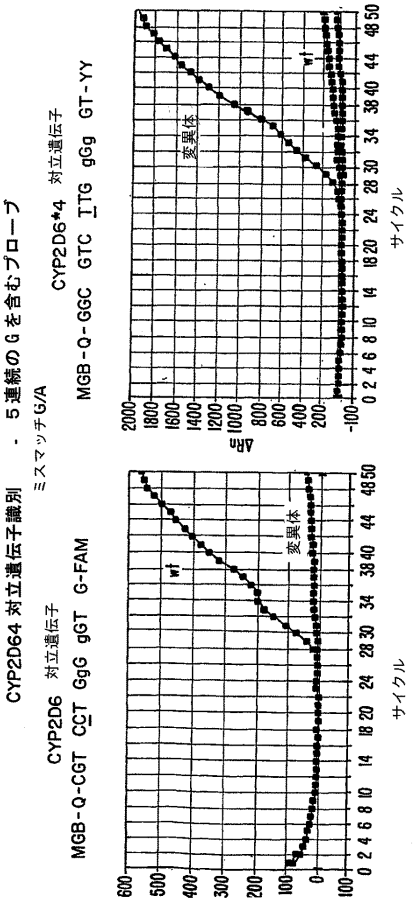


FIG. 4

【図５】

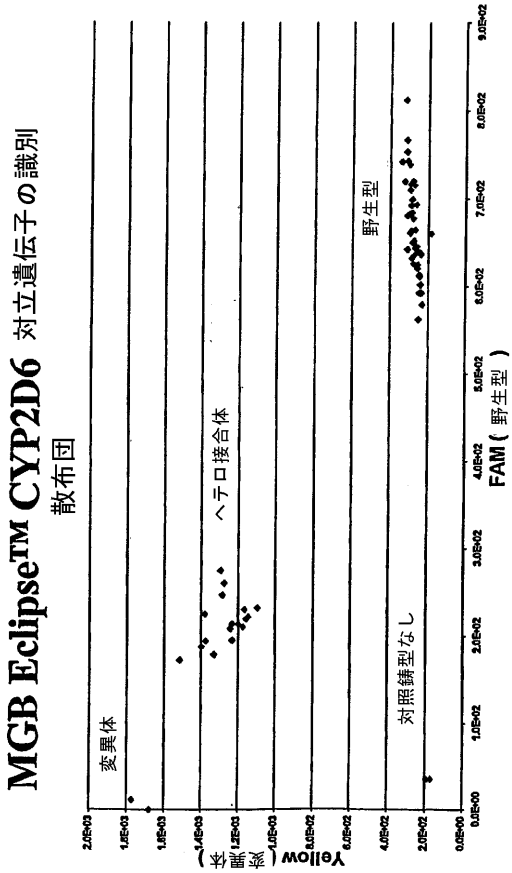


FIG. 5

【図６】

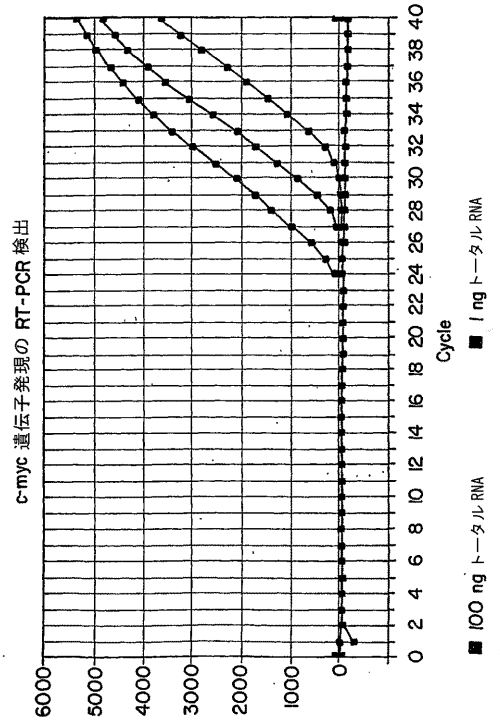


FIG. 6

【図７】

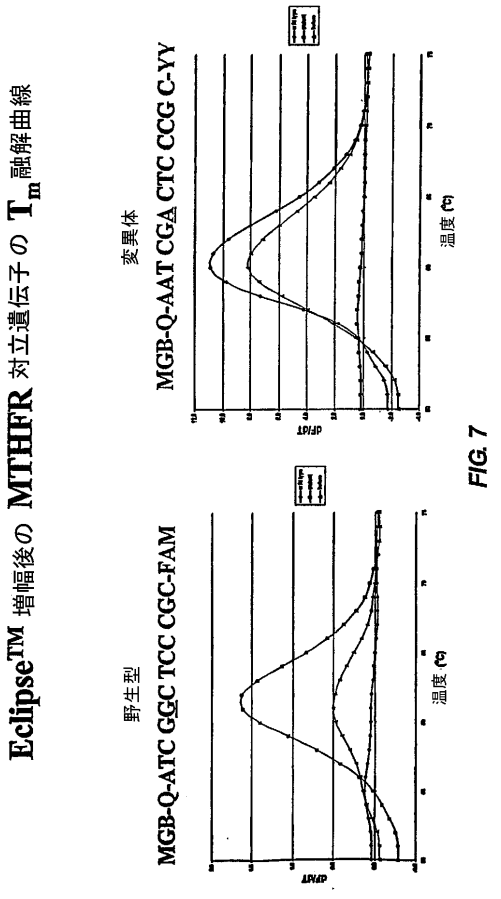


FIG. 7

【図８】

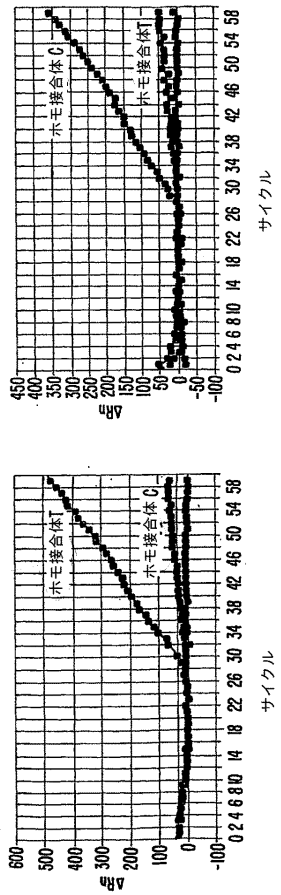


FIG. 8

【図９】

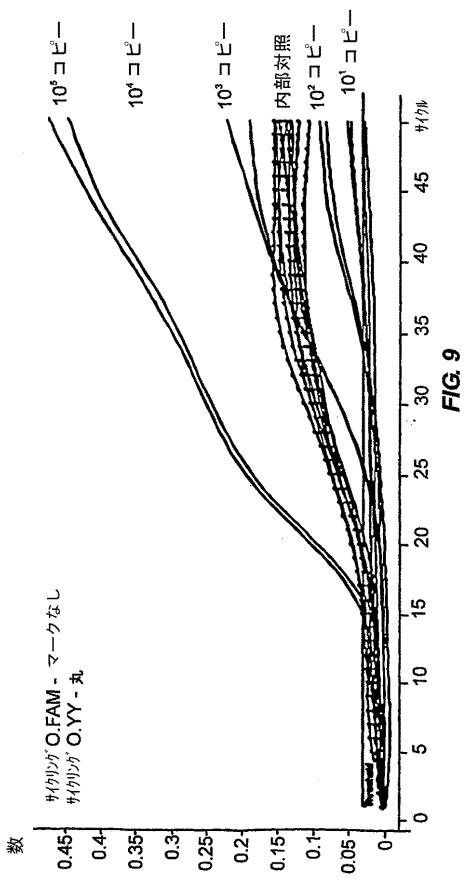


FIG. 9

【図１０】

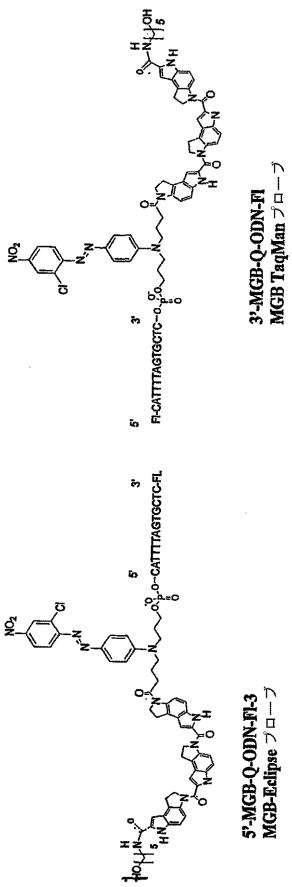


FIG. 10

【手続補正書】
【提出日】平成17年12月7日(2005.12.7)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2006511191000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成17年12月26日(2005.12.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２４】
図面の簡単な説明
図1は、a)5'-MGB-Q-ODN-Fl複合体(配列番号１)の構造およびb)5'-MGB-Q-ODN-F1プローブによるDNA標的の検出を示す。ここで、該プローブは消化されていない。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２７】
図4は、CYP2D6遺伝子のプローブを含むスーパーGを伴うC/T多形のリアルタイム検出を示す。「C」プローブ(配列番号２)はFAMで標識されている;「T」プローブ(配列番号３)はYakima Yellow(商標)で標識されている。左の曲線は陽性曲線の「C」DNAおよび陰性曲線の「T」DNA(平らなまま)を伴う「FAM」チャンネルである。右の曲線は陽性曲線の「T」DNAおよび陰性曲線の「C」DNAを伴う「Yakima Yellow」チャンネルである。また、陰性は両チャンネルにおいて鋳型なしの対照である。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３０】
図7は、融解曲線分析による野生型、変異およびヘテロ接合のMTHFR対立遺伝子の検出を示す。それぞれのチューブは、プローブ(配列番号４および５)およびヒトゲノムDNA 10ngの両方を含む。融解曲線はPCR増幅後、適当な放射チャンネルのそれぞれのプローブで得られた。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３３】
図10は好ましいMGB-Eclipse(商標)プローブ(配列番号６)および関連のMGBTaqMan(登録商標)プローブ(配列番号７)の構造を提供する。Flは、以下でより詳細に記載するような

市場で入手可能なフルオロフォアであって、ホスホアミダイト結合法を使用し結合し得るものを示す。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１４３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１４３】
1.2 オリゴヌクレオチド
使用するオリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。標準的なホスホアミダイト化合物を用い合成した。5'-MGB-Q Eclipse(商標)プローブは、5'-3'方向にオリゴヌクレオチドセグメントを合成する用に設計した、MGB-Q-修飾ガラス支持体(調製におけるマニュスクリプト)上で5'-β-シアノエチルホスホアミダイト(Glen Research, VA)を用いる自動DNA合成を行うことにより調製した。オリゴヌクレオチド合成は、ABI 394合成装置で、製造者により供されるプロトコールに従って、0.02M ヨード液を用いて行った。PPGホスホアミダイトは文献の方法に基づき合成したが、Glen Research, Sterling, VAから購入することもできる。6-カルボキシフルオレセイン(FAM)、Yakima Yellow(登録商標)(YY、Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手)および6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン(TET)のレポーティング色素を、対応するホスホアミダイト(Glen Research, Sterling, VA)を用い、合成の最後のステップで導入した。RRM1対立遺伝子1SNPに対応する3'-MGB-QTaqMan(登録商標)プローブは、MGB Eclipse(登録商標)プローブの調製の用に、既述のように合成した。この場合、標準の5'-DMTホスホアミダイトを使用した。オリゴヌクレオチドはすべて逆相HPLCで精製した。

【表４】

表２．プライマーおよび蛍光発生性プローブの配列

	5'-末端	配列	3'-末端	配列番号
RRM1 (120 bp アンプリコン)		受入番号XM_006065		
プライマー 1 (センス)		ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA		8
プライマー 2 (アンチセンス)		GTA CTT TCA ATT CAT GGA GC A TAC CT		9
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (センス)	MGB-Q	ATA TCT AGC TGT GTT GA**	FAM	10
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 2 (センス)	MGB-Q	ATA TCG AGC TGT GTT GA	TET	11
MGB-TaqMan 対立遺伝子 1 (センス)	FAM	ATA TCT AGC TGT GTT G	MGB-Q	12
CYP2D6*4 (127 bp アンプリコン)		受入番号M33388		
プライマー 1 (センス)		TGA TGG GCA GAA GGG CAC AA		13
プライマー 2 (アンチセンス)		ATC ACG TTG CTC ACG GCT TT G TC		14
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (WT)	MGB-Q	CGT CCT GgG gGT G	FAM	2
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (変異体)	MGB-Q	GGC GTC TTG gGg GT	YY	3
ヒトヘルペスウィルス 1,2 (142 bp アンプリコン)		受入番号AF333383		
プライマー 1 (センス)		ATC CGA ACG CAG CCC CGC TG		15
プライマー 2 (アンチセンス)		TCT CCG TCC AGT CGT TTA TC T TC		16
Eclipse™ プローブ (アンチセンス)	MGB-Q	CCC AGG TTA TCC TCG CT	FAM	17

gはPPGである。**イタリック文字は、グアニンによるFAM蛍光の消光をさけるべく導入した不対塩基を示す。アンダーラインを引いた太字はSNPを示す。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５１】
MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareによるプローブおよびプライマーの設計の最初のステップは、目的の標的配列をインポートすることである。CYPD6*4遺伝子の一部を以下に示す(配列番号１８)。この配列をGenebank Accession number M33388からインポートする。

【化２０】

3001 gggtcttccc tgagtgcaaa ggcggtcagg gtgggcagag acgaggtggg gcaaagcctg

3061 ccccagccaa gggagcaagg tggatgcaca aagagtgggc cctgtgacca gctggacaga

3121 gccagggact gcgggagacc agggggagca tagggttgga gtgggtggtg gatggtgggg

3181 ctaatgcctt catggccacg cgcacgtgcc cgtcccaccc ccaggggtgt tcctggcgcg

3241 ctatgggccc gcgtggcgcg agcagaggcg cttctccgtg tccaccttgc gcaacttggg

3301 cctgggcaag aagtcgctgg agcagtgggt gaccgaggag gccgcctgcc tttgtgccgc

3361 cttcgccaac cactccggtg ggtgatgggc agaagggcac aaagcgggaa ctgggaaggc

3421 gggggacggg gaaggcgacc ccttacccgc atctcccacc ccca[g/a]gacgc ccctttcgcc

3481 ccaacggtct cttggacaaa gccgtgagca acgtgatcgc ctccctcacc tgcgggcgcc

3541 gcttcgagta cgacgaccct cgcttcctca ggctgctgga cctagctcag gagggactga

3601 aggaggagtc gggctttctg cgcgaggtgc ggagcgagag accgaggagt ctctgcaggg

3661 cgagctcccg agaggtgccg gggctggact ggggcctcgg aagagcagga tttgcataga

【化２１】

3721 tgggtttggg aaaggacatt ccaggagacc ccactgtaag aagggcctgg aggaggaggg

3781 gacatctcag acatggtcgt gggagaggtg tgcccgggtc aggggcacc aggagaggcc

3841 aaggactctg tacctcctat ccacgtcaga gatttcgatt ttaggtttct cctctgggca

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５３】
該ソフトウェアは、関連するプライマーにより対立遺伝子特異的プローブを多数決定する。プローブ、プライマーおよびアンプリコンは全て、パラメーターの最少および最大の限界点(constraint)について評価する。該プローブ、プライマーまたはアンプリコンが限界内に収まらない場合、該評価プロセスは終了する。最適のパラメーター限界が最も適合するか否かにより、該プローブおよびプライマーをランク付けする(MGB Eclipse(登録商標) Design Software Manual, Epoch Bioscience, Bothell, WA.)。表3では、該ソフトウェアにより測定される、プライマーおよびプローブを3セット列挙する。列挙した該プローブおよびプライマーの並びは、理想のパラメーター限界にどれだけ近いかによって決まっている。該3つのプローブおよびプライマーのセットの構成(design)は似ており、第一の構成セットが合成され、図4に示すように、野生型と変異体との識別に使用された。

表 3
MGB Eclipse^{TM} Design Softwareにより設計したプローブおよびプライマー
ここで C および T はミスマッチを示しg=PPGである

【表５】

ODN	T_m	GC%	長さ	配列	配列番号
WT	67.3	77	13	CGTCCTGgGgGTG	19
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT	20
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.6	55	20	TGATGGGCAGAAGGGCACAA	13
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.9	52	23	ATCACGTTGCTCACGGCTTTGTC	14
WT	67.3	77	13	CGTCCTGGgGgTG	21
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT	20
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.6	55	20	TGATGGGCAGAAGGGCACAA	13
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.8	55	22	TCACGTTGCTCACGGCTTTGTC	22
WT	67.3	77	13	CGTCCTGgGgGTG	19
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT	20
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.7	52	21	TGATGGGCAGAAGGGCACAAA	23
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.9	52	23	ATCACGTTGCTCACGGCTTTGTC	14

2つのPPGを含むプローブは、その対応の標的を特異的に検出する。対照的に、すべて天然の塩基であるプローブは、その標的を検出することができない。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５５】
1.8 問題のプライマーの設計

増幅反応にあまり関与しないGC-リッチプライマーもある。4を超える連続のGを含むプライマーのパフォーマンスは低く、その低いパフォーマンスはGがPPGで適当に置換されることによって避けられ得る。4連続のGを含む、MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareにより設計されたプライマーの例を、β-アクチン遺伝子発現アッセイに関して図４で示し、ここで、１つのGはPPGで置換される。増幅および検出が、表4に列挙するプライマーおよび検出プローブを用い、成功した(データ示さず)。

【表６】

表４

β－アクチン遺伝子検出のためのプライマーおよびプローブ

ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1: GCG TGA TGG TGG GCA T センス（配列番号２４）

ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2: GAT GgG GTA CTT CAG GGT アンチセンス（配列番号２５）

ﾌﾟﾛｰﾌﾞ: MGB-Q- GGA TTC CTA TGT GGG CGA -FAM センス（配列番号２６）

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０１６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１６６】
表5は、この実施例で使用し、図2で示した、プライマーおよび蛍光発生プローブの配列を示す。
【表７】

表５プライマーおよび蛍光発生性プローブの配列

	5'-末端	配列	3'-末端	配列番号
RRM1 T1037G変異; 受け入れ番号XM 006065				
ﾌﾟﾗｲﾏｰ1（ｾﾝｽ）		ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA		8
ﾌﾟﾗｲﾏｰ2（ｱﾝﾁｾﾝｽ）		GTA CTT TCA ATT CAT GGA GCA TAC CT		9
MGB Eclipse™ﾌﾟﾛｰﾌﾞ対立遺伝子1（ｾﾝｽ）	MGB-Q	ATA TCT AGC TGT GTT GA**	FAM	10
MGB Eclipse™ﾌﾟﾛｰﾌﾞ対立遺伝子2（ｾﾝｽ）	MGB-Q	ATA TCG AGC TGT GTT GA	TET	11
Molecular beacon対立遺伝子1（ｾﾝｽ）	FAM	cca acc AT CCA CAT ATC TAG CTG TGT TG ggt tgg*	Dabcyl	27
TaqMan®MGB対立遺伝子1（ｾﾝｽ）	FAM	ATA TCT AGC TGT GTT G	MGB-Q	12

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７１】
種々のクエンチャーを有するFAM-標識したオリゴヌクレオチドのバックグラウンド蛍光は、Applied Biosystems LS50-Bスペクトロフォトメーターを用い、1XPCR緩衝液(20mM Tris-HCl pH 8.7、50mM NaCl、5mM $MgCl_2$)中、濃度0.2μMで3回測定した。励起波長488 nmでスリット孔2.5であった。放射波長522 nmでスリット孔5.5であった。プローブは、Eclipse(商標) クエンチャー(同時係属出願09/457,616参照)、Dabcyl、またはMGB-クエンチャーを用いる自動化DNA合成により調製した。該プローブ配列は5'-tcctgattttac(配列番号２８)であった。
【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７４】
MTHFR遺伝子の場合、野生型対立遺伝子の該プローブ配列はMGB-Q-ATC GGC TCC CGC-FAM(配列番号４)であり、変異体対立遺伝子の該プローブ配列MGB-Q-AAT CGA CTC CCG C-YY(Yakima Yellow(商標))(配列番号５)である。野生型、変異体およびヘテロ接合体のサンプルの融解曲線は図7A(FAMチャンネル)および図7B(YYチャンネル)のようにコンパイルされる。
【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７６】
以下、目的のAT-リッチ配列(配列番号２９)を示す。プライマーおよびプローブの両方が、スーパーAおよびスーパーT修飾塩基(市場でEpoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手可能)により多くが置換される必要があり、これによりポリメラーゼ増幅に必要な安定性が得られる。より長いオリゴヌクレオチドにより、PCR効率を低下する二次構造およびプライマーダイマーの形成が増大する。必然的に要求される安定性のため、Aおよ

びTをスーパーAおよびスーパーTに自動的に置換するMGB Eclipse(商標) Software 2.0によりプローブおよびプライマーを設計した。プローブ配列はアンダーラインを引いた太字で示し、プライマー配列は太字のみで示す。

【化２２】

TTAACAAAAGTATTAGTAATCATATTACTTTTCTTAATCTGTGTGGTGAGTACGTA
AGTGTTCATTTCCATTCCATTAGTATTATATTTGAAAACTAAAAACTCCTGCGTA
AGTCTCAATATAACTGCTTATGTCCATGTTCTATTTAATACACCTTATAACCCAT
GTGTAGTGTGAACCAATAGCTGTGTTTTAATATT**TTTG[C/T]TAAATAT**ATTATAC
ATT**CACTATAACCTCTACAG**TTTTAAAGAATGTTAAAATGAACCTGAATACCTA
GTTTCCTCTACCCACACCCTTCTCCCCCATACCAATCTTTACTTCACAATTCTGTC
AATTACAGCTTAGGAAGGTACT

【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７７】
プローブおよびプライマー配列を以下に示す。ここで、「a」はスーパーAであり、「t」はスーパーTである。修飾塩基の使用によって、図8に示すようにミスマッチ識別が向上したより短いプローブおよびプライマーの設計が可能となる。

【化２３】

センスプライマー1: CCt GCG tAt GtC tCa ATA T （配列番号３０）

アンチセンスプライマー2: CtG tAG aGG TTA TAG TG（配列番号３１）

【化２４】

プローブ“T” MGB-Q-TtG tTa AaT aTa TTa t-TET（配列番号３２）

プローブ“C” MGB-Q-ttG CTa AaT aTa TTa T-FAM（配列番号３３）

【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１８１】
１つの実施態様では、a)標的の増幅に使用されるプライマーセットとは異なるプライマーのセット、b)内部対照プライマーの合計よりも長い内部対照標的、およびc)内部対照プローブを含む内部対照システムを使用し、ここで、該内部対照プライマーおよび内部対照プローブの配列は既知配列のものとは実質的に異なる。

【化２５】

試験に使用した内部対照鋳型 *(IC)* 配列

ユニバーサルIC(スクランブルした *C.elegans* 配列)

CTCAGGTGTCCGTGTGTTCCATCTGTTCTAGGCAAAGTCCCATCGTT

TCCACCAGTTACTTTACGGACCAC (配列番号３４)

フォワードユニバーサル ICﾌﾟﾘﾏｰ CTCAGGTGTCCGTGTGTTCCAT (配列番号３５)

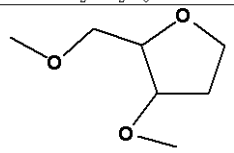
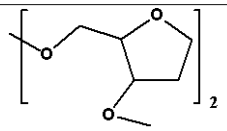
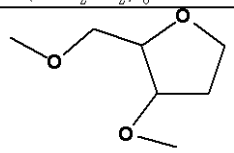
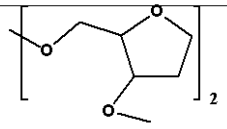
フォワードユニバーサル ICﾌﾟﾘﾏｰ GTGGTCCGTAAAGTAACTGGT (配列番号３６)

Probe MGB-Q-GGCAAAGTCCCATCGTT-Yakima Yellow **色素** (配列番号３７)

【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１８４】
プローブは上記の方法で構成し、表6に示す配列を有していた。特定リンカーで見られる蛍光増加は、プローブと関連し、ここで、該フルオロフォアは直接オリゴヌクレオチド部分に結合している(例えば、Kは式Iで結合である)。それぞれのプローブでKが結合である場合、増加を測定する対照として、蛍光を0%に設定する。

表 6
リアルタイムPCRにおけるプローブのパフォーマンスへのリンカーKの影響
W=-O-$(CH_2)_3$-N-$(CH_2)_2$-C(=O)-

【表８】

#	配列、Eclipse ﾌﾟﾛｰﾌﾞの5'から3'	K	ｵﾘｺﾞﾏｰ	% 蛍光増加
1	MGB W-(Q)-CGT CAC ACC CGA AGG AAT-K-FAM (配列番号38)	なし	18-mer	0%
2	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	18-mer	15%
3	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	18-mer	20%
4	同じ		18-mer	0%
5	同じ		18-mer	10%
6	同じ	-O-$(CH_2)_{12}$-O-	18-mer	-20%
7	同じ	-[O-$(CH_2)_{12}$]$_2$-O-	18-mer	-50%
8	MGB W-(Q)-CTC GGT CCT TGC CCT-K-F1 (配列番号39)	-なし	15-mer	0%
9	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	15-mer	50%
10	MGB W-(Q)-CGA CTC GGC CCT TG-K-F1 (配列番号40)	-	14-mer	0%
11	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	14-mer	100%
12	MGB W-(Q)-AGG CGA GGA ATA C-K-F1 (配列番号41)	-	13-mer	0%
13	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	13-mer	70%
14	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	13-mer	150%
15	同じ		13-mer	10%
16	同じ		13-mer	70%
17	同じ	-O-$(CH_2)_{12}$-O-	13-mer	20%
18	同じ	-[O-$(CH_2)_{12}$]$_2$-O-	13-mer	-20%
19	MGB W-(Q)-AAT CGA CTC CCG C –K-F1 (配列番号42)	なし	13-mer	0%
20	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	13-mer	70%
21	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	13-mer	130%
22	MGB W-(Q)-ATC GGC TCC CGC-K-F1 (配列番号43)	なし	12-mer	0%
23	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	12-mer	70%
24	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	12-mer	115%

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/39564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/04
US CL : 435/6, 91.2, 91.21; 536/ 24.31, 24.33
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 435/6, 91.2, 91.21; 536/ 24.31, 24.33

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,312,894 B1 (HEDGPETH et al) 06 November 2001 (6.11.2001), entire document, especially columns 84, 112-116	1-39
X	US 6,492,346 B1 (HEDGPETH et al) 10 December 2002, entire document.	34-38
Y	US 5,801,155 B1 (KUTYAVIN et al) 01 September 1998 (1.9.1998), entire document.	1-39

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent 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	Date of mailing of the international search report
20 February 2003 (20.02.2003)	28 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Suryaprabha Chunduru Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/39564

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Biosis, Medline, Embase, Caplus, Lifesci, EAST databases
search terms: MGB conjugate primer, amplification, real time PCR

フロントページの続き

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

(74)代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
(74)代理人 100116311
弁理士 元山 忠行
(74)代理人 100122301
弁理士 冨田 憲史
(74)代理人 100127638
弁理士 志賀 美苗
(72)発明者 イェフジェニー・エス・ベロウソフ
アメリカ合衆国９８０１２ワシントン州ミル・クリーク、１４４コート・サウスイースト２７１７番
(72)発明者 イリーナ・エイ・アフォニナ
アメリカ合衆国９８０１２ワシントン州ミル・クリーク、１４４コート・サウスイースト２７１７番
(72)発明者 ロバート・オー・デンプシー
アメリカ合衆国９８０３３ワシントン州カークランド、ノースイースト・１１５コート１１４２１番
(72)発明者 イゴール・ヴェー・クトヤヴィン
アメリカ合衆国９８０７７ワシントン州ウッディンビル、２０３アベニュー・ノースイースト１８９４３番
(72)発明者 セルゲイ・ゲー・ロホフ
アメリカ合衆国９８０３４ワシントン州カークランド、ノースイースト・１２３ストリート１３２１５番、ナンバー３１２
(72)発明者 エウジェニー・アー・ルフタノフ
アメリカ合衆国９８０２１ワシントン州ボゼル、４９アベニュー・サウスイースト２１０１３番

Ｆターム(参考) 2G045 BA11 DA12 DA13 DA14 FB02 FB07 FB12 FB15 GC15
4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 CA12 CA20 HA08 HA11 HA13
HA14 HA20
4B063 QA01 QA13 QA17 QQ42 QQ52 QQ53 QR08 QR32 QR35 QR38
QR42 QR51 QR56 QR62 QR84 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36
QX02