

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5421112号
(P5421112)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年11月29日(2013.11.29)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 07 H 21/04 (2006.01)C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 H 21/04 B

請求項の数 7 (全 62 頁)

(21) 出願番号 特願2009-532720 (P2009-532720)
 (86) (22) 出願日 平成19年10月17日 (2007.10.17)
 (65) 公表番号 特表2010-506573 (P2010-506573A)
 (43) 公表日 平成22年3月4日 (2010.3.4)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2007/008997
 (87) 國際公開番号 WO2008/046602
 (87) 國際公開日 平成20年4月24日 (2008.4.24)
 審査請求日 平成22年7月29日 (2010.7.29)
 (31) 優先権主張番号 11/583,606
 (32) 優先日 平成18年10月18日 (2006.10.18)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCHE
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敏
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2' - 終止関連の加ビロリン酸分解活性化された重合

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オリゴヌクレオチドからのヌクレオチドを除去する方法であって、少なくとも1の標的核酸を、ヌクレオチド除去活性を含んでなる少なくとも第1生体触媒、及び前記標的核酸の少なくとも第1配列に対して少なくとも部分的に相補的である、2' - 終止ヌクレオチドを含んでなる少なくとも1のオリゴヌクレオチドとともに、前記第1生体触媒が前記オリゴヌクレオチドから少なくとも前記2' - 終止ヌクレオチドを除去し、除去された2' - 終止ヌクレオチド及び短縮オリゴヌクレオチドを生成するような条件下でインキュベートすることにより、前記オリゴヌクレオチドからヌクレオチドを除去することを含んでなる方法。

【請求項 2】

オリゴヌクレオチドが2' - 終止ヌクレオチドを3'末端に有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

2' - 終止ヌクレオチドが、G 4 6 E E 6 7 8 G C S 5 DNAポリメラーゼ、G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4 0 G S 6 7 1 F C S 5 DNAポリメラーゼ、G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4 0 G S 6 7 1 F E 6 7 8 G C S 5 DNAポリメラーゼ、G 4 6 E E 6 7 8 G C S 6 DNAポリメラーゼ、Z O 5 R ポリメラーゼ、E 6 1 5 G T a q DNAポリメラーゼ、サーマス 20

・ フラバス (*Thermus flavus*) ポリメラーゼ、T M A - 2 5 ポリメラーゼ、E 6 7 8 G T M A - 2 5 ポリメラーゼ、T M A - 3 0 ポリメラーゼ、E 6 7 8 G T M A - 3 0 ポリメラーゼ、T t h D N A ポリメラーゼ、サーマス種 S P S - 1 7 ポリメラーゼ、E 6 1 5 G T a q ポリメラーゼ、サーマス Z O 5 R ポリメラーゼ、T 7 D N A ポリメラーゼ、コーンバーグ (Kornberg) D N A ポリメラーゼ I、クレノウ D N A ポリメラーゼ、T a q D N A ポリメラーゼ、ミクロコッカス (Micrococcocal) D N A ポリメラーゼ、D N A ポリメラーゼ、逆転写酵素、A M V 逆転写酵素、M - M u L V 逆転写酵素、D N A ポリメラーゼ、R N A ポリメラーゼ、E . コリ R N A ポリメラーゼ、S P 6 R N A ポリメラーゼ、T 3 R N A ポリメラーゼ、T 4 D N A ポリメラーゼ、T 7 R N A ポリメラーゼ、R N A ポリメラーゼII、末端トランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リボヌクレオチド類似体 - 導入 D N A ポリメラーゼ、リボヌクレオチド導入 D N A ポリメラーゼ等から選択される 1 又は 2 以上のヌクレオチド導入生体触媒により伸長不能とされる、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

第 1 生体触媒がヌクレオチド導入活性を含んでなり、前記方法が、標的核酸を、第 1 生体触媒、短縮オリゴヌクレオチド及び少なくとも 1 の追加のヌクレオチドと共に、前記第 1 生体触媒が短縮オリゴヌクレオチド末端に追加のヌクレオチドを組込み、伸長されたオリゴヌクレオチドを生成する条件下でインキュベートすることを含んでなり、或いは、

前記方法が、標的核酸を、ヌクレオチド導入活性を含んでなる第 2 生体触媒、短縮オリゴヌクレオチド、及び少なくとも 1 の追加のヌクレオチドと共に、第 2 生体触媒が短縮オリゴヌクレオチド末端に追加のヌクレオチドを組込み、伸長されたオリゴヌクレオチドを生成する条件下でインキュベートすることを含んでなる、請求項 1 に記載の方法。 20

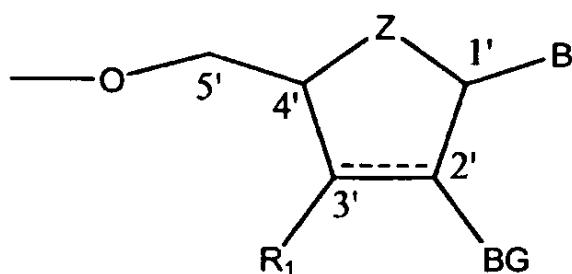
【請求項 5】

第 1 及び / 又は第 2 生体触媒が、ポリメラーゼ及び逆転写酵素からなる群より選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

2' - 終止ヌクレオチドが、下記式：

【化 1】



30

40

[式中、

Z は O 又は C H₂ であり；

B は、少なくとも 1 の単素環式環、少なくとも 1 の複素環式環、少なくとも 1 のアリール基又はそれらの組合せであり；

B G は、ブロッキング基であり；

R₁ は、O H であり；

【化 1 a】

~~-----~~

は、单又は二重結合を表し、

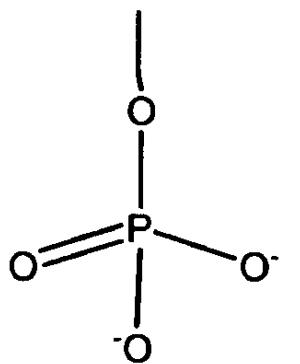
B G は、 C N、 N O₂、 リン酸基、 アルデヒド基、 又はそれらの組合せからなる群より選択される]

で表される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 7】

B G が、下記式：

【化 2】

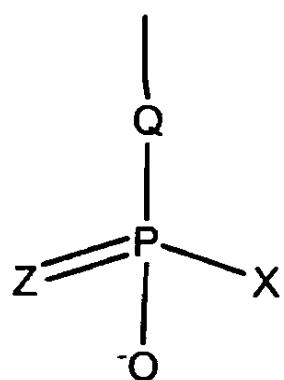


10

20

又は下記式：

【化 3】



30

40

[式中、

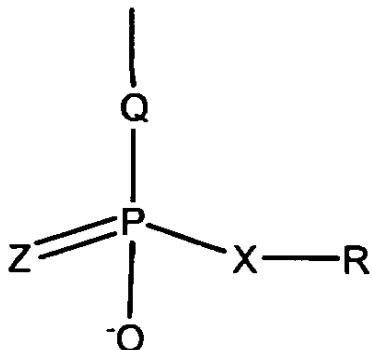
Q は、 O、 S 又は N H であり；

X は、 H、 O H、 C H₃、 B H₃、 F 又は S e H であり；

Z は、 O、 S 又は S e である]

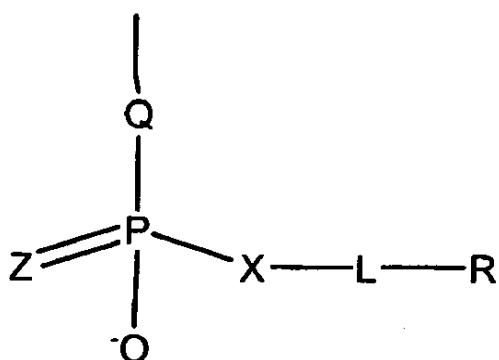
又は下記式：

【化4】



10

[式中、
Qは、O、S又はNHであり；
Xは、O、S又はNHであり；
Zは、O、S又はSeであり；
Rは、アルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である]
又は下記式：
【化5】



30

[式中、
Qは、O、S又はNHであり；
Xは、O、S又はNHであり；
Zは、O、S又はSeであり；
Lは、-CONH(CH₂)_nNH-、-CO(CH₂)_nNH-又は-COCONH(CH₂C₂H₂O)_nCH₂CH₂NH-であり；
nは、0よりも大きい整数であり；
Rは、NH₂、SH、COOH、消光剤成分、レポーター成分、ビオチン又は親和性成分である]
で表される、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して、核酸化学及び分子生物学に関する。より具体的には、本発明は、2'-終止を伴う核酸重合及び増幅に関する。

40

50

【背景技術】**【0002】**

加ピロリン酸分解活性化重合(P A P)は、標的又は鑄型核酸にハイブリダイズした加ピロリン酸分解活性化性プライマーの加ピロリン酸分解媒介活性化と、それに続く活性化プライマーの伸長とを伴う方法である。加ピロリン酸分解活性化性プライマーとして、通常は終止ヌクレオチド、例えば3'末端ジデオキシヌクレオチド(d d N M P)が挙げられる。終止ヌクレオチドは通常、かかるハイブリダイズ遮断プライマーから、加ピロリン酸分解反応によって酵素的に除去しなければならない。加ピロリン酸分解反応は、プライマー伸長を進行させるため、ピロリン酸を消費して活性化プライマーを生成する。プライマーの活性化には通常、プライマーと標的核酸との完全一致が必要となるので、プライマー形成や他の偽プライミングアーチファクト等のために、通常はそれらの反応による非特異的産物の生成は、たとえ生じるにしても限られたものとなる。P A P の用途の例として、とりわけ、核酸增幅法の新たな選択肢(例えば希少対立遺伝子検出法、体細胞突然変異検出アッセイ等の一部として)の提供が挙げられる。
10

【0003】

上述したように、既存のP A P関連アプローチは、d d N M P 終止プライマーと、効率的なd d N M P導入熱安定性D N Aポリメラーゼ(例えば "ヘリックスO" において "F Y" 突然変異を含む変異体酵素)とを用いて、プライマーの鑄型への結合 / アニーリング後、ピロリン酸(P P i)の存在下、プライマーの3'-末端d d N M P部分での加ピロリン酸分解を可能としている。かかるアプローチは通常、種々の欠点を有する。例えば、かかる手法では通常、極めて低い限られた濃度のd N T Pを用いるため、伸長速度(1分当たりの重合ヌクレオチド数)が低下する(遅くなる)。より具体的には、かかる反応で3'末端d d N M Pがd d N T Pとして放出されると、前述のようにd N T P濃度(すなわち「プールサイズ」)が極めて低いために、(有効なP C Rに必要な)全長プライマー伸長の前に、濃度が上昇してきたd d N T P(連續ラウンドのP A Pに起因する)を再び取り込んでしまう可能性が高くなる。かかる再取り込みは通常望ましくないため、組込まれたd d N M Pを除去するために追加のP A Pが必要となる。さらに、不完全なプライマー伸長を生じさせ、各サイクルでの全長伸長産物の効率を低める。さらに、かかる既存のP A Pアプローチの多くは、非常に短いアンプリコンしか生成することができない。得られるアンプリコンは、例えばプライマーダイマーよりも短い場合もある。すなわち、これら従来のアプローチのP C Rサイクル効率は通常は低下してしまうので、少量の標的を検出するには多数のサイクルが必要となる。
20
30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

以上の背景から、P A Pに関する更なる方法が所望されていることは明らかである。本発明は、2' - 終止ヌクレオチドを用いたP A Pに関する方法と、種々の追加の特徴を提供する。これらは以下の開示の全体を考慮すれば明らかになるであろう。

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明は、核酸重合及び増幅に関する。ある実施形態によれば、例えば本明細書で提供されるP A P関連方法は、加ピロリン酸分解及び重合の一連のカップリングを伴う。それらの方法には種々の用途があるが、とりわけS N P分析及び希体細胞突然変異検出に使用される。P A P関連方法に加えて、本発明は関連する反応混合物及び系も提供する。
40

【0006】

例を挙げると、本明細書に記載の方法及び他の観点は、オリゴヌクレオチド媒介合成反応の一般的特異性を増強する。例えば、他の「ホットスタート」法(例えば可逆的な化学修飾酵素、アプタマー又は抗体媒介「ホットスタート」)と同様に、「ゼロ番目のサイクル伸長」(プレP C R)が低減又は排除される。かかる他の方法とは異なり、個々の新たなオリゴヌクレオチド媒介合成工程毎に、プライマーの活性化が可能となる。これにより
50

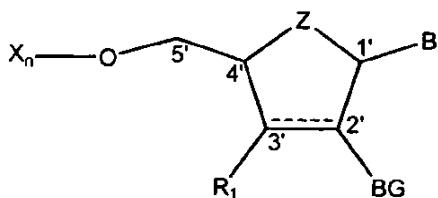
、反応の全体特異性が向上し、不所望の副生物の生成が最少に抑えられる。従って、低コピー配列、さらには單一コピー配列の検出が改善される。さらに、不意図及び不所望の非特異的合成産物（例えばPCRの場合はプライマーダイマー）の生成を低減又は排除することにより、多重（数個又は多数の異なる標的が増幅される）増幅反応の性能が改善される。

【0007】

一態様によれば、本発明は、2' - 終止ヌクレオチドを（例えば3'末端に）含んでなる少なくとも1のオリゴヌクレオチド（例えばプライマー核酸、プローブ核酸等）を含む反応混合物を提供する。ある態様によれば、前記オリゴヌクレオチドは、下記式：

【化1】

10



[式中、ZはO又はCH₂であり；Bは、少なくとも1の単素環式環、少なくとも1の複素環式環、少なくとも1のアリール基又はそれらの組合せであり；BGは、ブロッキング基であり；R₁は、H、OH、親水性基又は疎水性基であり；Xは、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体であり；nは、0以上の整数であり；

20

【化1a】

は、単又は二重結合を表す]を含んでなる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも1の標識を含んでいてもよい。ある態様によれば、オリゴヌクレオチドにおける少なくとも1のヌクレオチド位置が、標的核酸における多形ヌクレオチド位置に対応する。かかる態様の一部によれば、例えば2' - 終止ヌクレオチドは、標的核酸における多形ヌクレオチド位置に対応する。

30

【0008】

反応混合物は通常、反応混合物が利用される特定の用途に応じて、追加の試薬を含む。ある態様によれば、例えば、追加の試薬は、ヌクレオチド除去活性（例えば加ピロリン酸分解活性及び/又はヌクレアーゼ活性）を含んでなる第1生体触媒、ヌクレオチド導入活性を含んでなる第2生体触媒、前記オリゴヌクレオチドに対しては少なくとも部分的に相補的である少なくとも1の配列を含んでなる標的核酸、アンプリコン、プライマー核酸、プローブ核酸（例えばハイブリダイゼーションプローブ、5' - ヌクレアーゼプローブ、ヘアーピンプローブ等）、追加のヌクレオチド（例えば伸長可能ヌクレオチド、終止ヌクレオチド、リボヌクレオシド三リン酸、デオキシリボヌクレオシド三リン酸等）、追加のオリゴヌクレオチド（例えばプライマー核酸、プローブ核酸等）、可溶性発光修飾因子、共溶媒、インターカレート剤、臨床検体、試料、緩衝液、塩、金属イオン、ピロリン酸、グリセロール、ジメチルスルホキシド、ポリrA等から選択される。ある態様によれば、前記標的核酸、アンプリコン、プライマー核酸、プローブ核酸、追加のヌクレオチド、及び/又は追加のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1の標識を含んでなる。ある態様によれば、緩衝液は、少なくとも90mM（例えば約95mM、約100mM、約105mM等）の濃度のN-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシンを含んでなる。

40

【0009】

ある態様によれば、前記第1生体触媒は、ヌクレオチド導入活性を（すなわち、ヌクレ

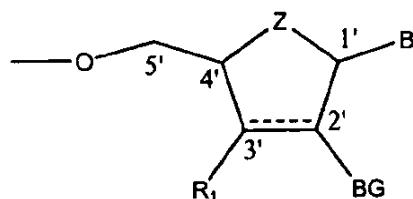
50

オチド除去活性の他に)含んでなる。第1及び/又は第2生体触媒のヌクレオチド導入活性は通常、ポリメラーゼ活性及び/又はリガーゼ活性を含んでなる。第1及び/又は第2生体触媒は、ヌクレアーゼ活性を含んでしてもよい。さらに例を挙げると、第1及び/又は第2生体触媒は、例えばポリメラーゼ、末端トランスフェラーゼ、逆転写酵素、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リガーゼ、APエンドヌクレアーゼ及びテロメラーゼから選択される酵素を含んでいてもよい。ある態様によれば、第1及び/又は第2生体触媒は、G46、L329、Q601、D640、I669、S671及びE678からなる群から選択されるアミノ酸位置で1又は2以上の突然変異を含んでなるCS5 DNAポリメラーゼを含んでなる。かかる態様の一部によれば、例えば前記突然変異は、G46E突然変異、L329A突然変異、Q601R突然変異、D640G突然変異、I669F突然変異、S671F突然変異及び/又はE678G突然変異を含んでなる。

【0010】

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドに利用される2'-終止ヌクレオチドは、種々の態様を包含する。ある態様によれば、例えば2'-終止ヌクレオチドは、2'-リン酸-3'-ヒドロキシヌクレオチドを含んでなる。さらに例を挙げると、ある態様によれば、前記2'-終止ヌクレオチドが、下記式：

【化2】



10

20

[式中、R₁は、H、OH、親水性基又は疎水性基であり；Bは、少なくとも1の単素環式環、少なくとも1の複素環式環、少なくとも1のアリール基又はそれらの組合せであり；BGは、ブロックキング基であり；ZはO又はCH₂であり；

【化2a】

30

は、单又は二重結合を表す]を含んでなる。さらに、2'-終止ヌクレオチドは通常、例えばG46E E678G CS5 DNAポリメラーゼ、G46E L329A E678G CS5 DNAポリメラーゼ、G46E L329A D640G S671F CS5 DNAポリメラーゼ、G46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼ、G46E E678G CS6 DNAポリメラーゼ、Z05Rポリメラーゼ、E615G Taq DNAポリメラーゼ、サーマス・フラバース(Thermus flavus)ポリメラーゼ、TMA-25ポリメラーゼ、E678G TMA-25ポリメラーゼ、TMA-30ポリメラーゼ、E678G TMA-30ポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、サーマス種SPS-17ポリメラーゼ、E615G Taqポリメラーゼ、サーマスZ05Rポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、コーンバーグ(Kornberg)DNAポリメラーゼI、クレノウDNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、ミクロコッカス(Micrococcocal)DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素、AMV逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、E.コリRNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼII、末端トランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リボヌクレオチド類似体-導入DNAポリメラーゼ、リボヌクレオチド導入DN

40

50

A ポリメラーゼ等から選択される 1 又は 2 以上のヌクレオチド導入生体触媒により伸長不能である。

【 0 0 1 1 】

別の態様によれば、本発明は、オリゴヌクレオチドからヌクレオチドを除去する方法を提供する。前記方法は、少なくとも 1 の標的核酸と、ヌクレオチド除去活性（例えば加ビロリン酸分解活性及び / 又はヌクレアーゼ活性）を含んでなる少なくとも第 1 生体触媒、及び前記標的核酸の少なくとも第 1 配列に対して少なくとも部分的に相補的である、2' - 終止ヌクレオチドを（例えば 3' 末端に）含んでなる少なくとも 1 のオリゴヌクレオチド（例えばプライマー核酸、プローブ核酸等）とを、前記第 1 生体触媒が前記オリゴヌクレオチドから少なくとも前記 2' - 終止ヌクレオチドを除去し、除去された 2' - 終止ヌクレオチドと短縮オリゴヌクレオチドとを生成する条件下でインキュベートし、それにより前記オリゴヌクレオチドからヌクレオチドを除去することを含んでなる。ある態様によれば、前記方法は標的核酸を、第 1 生体触媒、オリゴヌクレオチド、及び除去される 2' - 終止ヌクレオチドに付加されるピロリン酸と共にインキュベートすることを含む。10

【 0 0 1 2 】

ある実施形態によれば、標的核酸は少なくとも 1 の多形ヌクレオチド位置を含んでなり、前記方法は、オリゴヌクレオチドからの 2' - 終止ヌクレオチドの除去を検出することを包含し、前記除去は、多形ヌクレオチド位置に対応する少なくとも 1 のヌクレオチド位置を含んでなるオリゴヌクレオチドと相関を有する。かかる態様によれば、2' - 終止ヌクレオチドは通常、多形ヌクレオチド位置に対応する。ある態様によれば、オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 の標識を含んでなり、前記方法は前記標識から発せられる検出可能シグナルを検出することを含んでなる。かかる態様によれば、前記標識はドナー成分及び / 又は受容体成分を含んでなり、前記検出可能シグナルは発光を包含し、前記方法は標的核酸を、第 1 生体触媒、オリゴヌクレオチド、及び少なくとも 1 の可溶性発光修飾因子と共にインキュベートし、ドナー成分及び / 又は受容体成分からの発光を検出することを含んでなる。2' - 終止ヌクレオチドは、ドナー成分及び / 又は受容体成分を含んでいてもよい。20

【 0 0 1 3 】

さらに例を挙げると、ある態様によれば、第 1 生体触媒はヌクレオチド導入活性（すなわち、ヌクレオチド除去活性の他に）を含んでなり、前記方法は、標的核酸を、第 1 生体触媒、短縮オリゴヌクレオチド及び少なくとも 1 の追加のヌクレオチドと共に、前記第 1 生体触媒が短縮オリゴヌクレオチド末端に追加のヌクレオチドを組込み、伸長されたオリゴヌクレオチドを生成するような条件下でインキュベートすることを含んでなる。前記方法は、標的核酸を、ヌクレオチド導入活性を含んでなる第 2 生体触媒、短縮オリゴヌクレオチド、及び少なくとも 1 の追加のヌクレオチドと共に、第 2 生体触媒が短縮オリゴヌクレオチド末端に追加のヌクレオチドを組込み、伸長されたオリゴヌクレオチドを生成するような条件下でインキュベートすることを含んでいてもよい。例を挙げると、ヌクレオチド導入活性は通常、ポリメラーゼ活性及び / 又はリガーゼ活性を包含する。前記第 1 及び / 又は第 2 生体触媒は通常、例えばポリメラーゼ、末端トランスフェラーゼ、逆転写酵素、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リガーゼ、A P エンドヌクレアーゼ、テロメラーゼ及び同様のものから選択される酵素を含んでなる。30

【 0 0 1 4 】

ある態様によれば、第 1 及び / 又は第 2 生体触媒は、例えば G 4 6 、 L 3 2 9 、 Q 6 0 1 、 D 6 4 0 、 I 6 6 9 、 S 6 7 1 及び E 6 7 8 の選択されるアミノ酸位置で 1 又は 2 以上の突然変異を含んでなる C S 5 DNA ポリメラーゼを含んでなる。かかる態様の一部においては、突然変異は、G 4 6 E 突然変異、L 3 2 9 A 突然変異、Q 6 0 1 R 突然変異、D 6 4 0 G 突然変異、I 6 6 9 F 突然変異、S 6 7 1 F 突然変異及び / 又は E 6 7 8 G 突然変異を含んでなる。40

【 0 0 1 5 】

ある態様によれば、オリゴヌクレオチドと標的核酸とがハイブリダイズし、ハイブリダ50

イズ核酸を形成すると、オリゴヌクレオチドの 1 又は 2 以上のヌクレオチドが、標的核酸の末端の先に伸長する。ある態様によれば、少なくとも 1 の追加のオリゴヌクレオチドが、追加のヌクレオチドを含んでなる。その追加のヌクレオチドは、伸長可能ヌクレオチド及び / 又は終止ヌクレオチドを含んでなる。ある態様によれば、追加のヌクレオチドは、少なくとも 1 の標識を含んでなり、前記方法は、その標識から発せされる検出可能シグナルを検出することを含んでなる。例えば、標識は任意には、ドナー成分及び / 又は受容体成分を含んでなり、検出可能シグナルは発光を包含し、前記方法は、標的核酸を、少なくとも 1 の可溶性発光修飾因子と共にインキュベートし、前記標識からの発光を検出することを含んでなる。

【0016】

10

さらに例を挙げると、前記方法は、少なくとも 1 の標識を含んでなり、標的核酸の少なくとも第 2 配列に対して少なくとも部分的に相補的である少なくとも 1 のプローブ核酸と共に標的核酸をインキュベートし、前記プローブ核酸又はその断片の標識から発せされる検出可能シグナルを検出することを含んでいてもよい。ある態様によれば、検出可能シグナルは発光を含んでなり、前記方法はさらに、少なくとも 1 の可溶性発光修飾因子と共に標的核酸をインキュベートし、標識の発光を検出することを含んでなる。例えば、プローブ核酸は 5' - ヌクレアーゼを含んでしてもよく、前記第 1 及び / 又は第 2 生体触媒は短縮オリゴヌクレオチドを 5' 3' 方向に伸長し、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を含んでいてもよい。前記プローブ核酸は、ハイブリダイゼーションプローブ及び / 又はヘアーピンプローブを含んでいてもよい。

20

【0017】

ある態様によれば、標的核酸は、少なくとも 1 の多形ヌクレオチド位置を含んでなり、前記方法は、前記多形ヌクレオチド位置に対応する少なくとも 1 のヌクレオチド位置を含んでなる伸長されたオリゴヌクレオチドと相關を有する、短縮オリゴヌクレオチドの伸長を検出することを含んでなる。かかる態様の一部によれば、2' - 終止ヌクレオチドは、多形ヌクレオチド位置に対応する。

【0018】

30

別の態様によれば、本発明は、(a) 2' - 終止ヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチドを含んでなる少なくとも 1 の容器又は支持体を有する系を提供する。前記系はまた、(b) 前記容器内又は前記支持体上の温度を調節するために前記容器又は支持体と熱的に通じるよう構成された少なくとも 1 の熱モジュレータ；(c) 前記容器又は支持体に対して及び / 又はそれから液体を移動する少なくとも 1 の流体移送要素；及び (d) 前記容器内又は支持体上で生成される検出可能なシグナルを検出するよう構成された少なくとも 1 の検出器のうち、少なくとも 1 つを包含する。ある態様によれば、前記系は、前記熱モジュレータと作動式に連結されて、前記容器内又は支持体上の温度の調節を可能とし、前記流体移送要素と作動式に連結されて、前記容器又は支持体に対する、及び / 又は、前記容器又は支持体からの、液体の移動を可能とし、及び / 又は、前記検出器と作動式に連結されて、前記容器内又は支持体上で生成される検出可能シグナルの検出を可能とする、少なくとも 1 の制御器を含んでなる。

【図面の簡単な説明】

40

【0019】

【図 1】図 1 は、本発明の一実施形態に係る一塩基多型 (SNP) 検出アッセイを模式的に示す図である。

【図 2】図 2 A ~ D は、2' - 終止ヌクレオチドの例を示す図である。

【図 3】図 3 A 及び B は、2' - 終止ヌクレオチドの幾つかの実施形態を示す図である。

【図 4】図 4 は、代表的な系を示すブロック図である。

【図 5】図 5 は、本発明の一実施形態に係る遮断 (blocked) オリゴヌクレオチドを示す図である。

【図 6】図 6 は、本発明の一実施形態に係る遮断オリゴヌクレオチドの固相合成路を示す図である。

50

【図7】図7は、3'-O-TBDMS-2'-O-ホスホラミジットを示す図である。

【図8】図8は、PAP-関連のHIV DNA鑄型滴定を含む分析から得られたPCR産物の検出を示すゲルの写真である。

【図9】図9は、遮断(blocked)又は非遮断(unblocked)のプライマーによる増幅に使用される種々の変異K-Rasプライマーのコピー数に見られる限界サイクル(G)値を示すグラフである。

【図10】図10は、K-Rasプラスミド鑄型を含む増幅に使用される種々の酵素及び酵素濃度について観察される限界サイクル(C_T)値を示すグラフである。

【図11】図11は、G46EL329A E678G (GLE) CS5 DNAポリメラーゼを使用する加ピロリン酸分解活性化重合(PAP)反応における限界サイクル(C_T)値に対して酵素濃度が及ぼす効果を示す棒グラフである。y軸は C_T 値を表し、x軸は酵素濃度(nM)を表す。プロットに付された凡例は、グラフ内の各トレースに対応する鑄型核酸のコピー数を表す(鑄型核酸のコピーなし(鑄型なし)、鑄型核酸 $1e^4$ コピー($1E4/rxn$)、鑄型核酸 $1e^5$ コピー($1E5/rxn$)及び鑄型核酸 $1e^6$ コピー($1E6/rxn$))。

【図12】図12は、G46EL329A D640G S671F E678G (GLDSE) CS5 DNAポリメラーゼを使用する加ピロリン酸分解活性化された重合(PAP)反応における限界サイクル(C_T)値に対する酵素濃度の効果を示す棒グラフである。y軸は C_T 値を表し、x軸は酵素濃度(nM)を表す。プロットに付された凡例は、グラフ内の各トレースに対応する鑄型核酸のコピー数を表す(鑄型核酸のコピーなし(鑄型なし)、鑄型核酸 $1e^4$ コピー($1E4/rxn$)、鑄型核酸 $1e^5$ コピー($1E5/rxn$)及び鑄型核酸 $1e^6$ コピー($1E6/rxn$))。

【図13】図13は、HCV RNAに対するPAP逆転写反応のデータを示す棒グラフである。cDNA反応の産物は、HCV cDNAに特異的な定量PCRアッセイを用いて測定した。y軸は C_t 値を表し、x軸は反応に使用される酵素の単位を表す。図示のとおり、反応に使用した酵素は、Z05 DNAポリメラーゼ(Z05)又はG46EL329AQ601R D640G S671F E678G (GLQDSE)及びG46EL329AQ601R D640G S671F (GLQDS) CS5 DNAポリメラーゼのブレンドであった。

【図14】図14は、双方向PAPを実施して得られたBRAF腫瘍遺伝子増幅のPCR増殖曲線を示す。x軸は標準化及び蓄積された蛍光を示し、y軸はPAP PCR増幅のサイクル数を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

I. 定義:

本発明を詳細に説明する前提として、本発明が特定の方法、反応混合物又は系に限定されるものではなく、変更を加え得ると解すべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲において、単数形「一」及び「前記」("a" "an" 及び "the")は、文脈から明らかに異なる場合を除き、複数の対象も包含する。また、本明細書で用いる用語は、特定の態様を記載する目的のみに供され、限定を意図するものではないと解すべきである。また、別途定義しない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。本発明を記載及び請求するに当たって、以下の用語法及びその分法上の活用形は、以下に示す定義に従って使用するものとする。

【0021】

「2'-終止ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの糖成分の2'-位置にブロッキング基(BG)を含んでなるヌクレオチド類似体を指す。「ブロッキング基」とは通常、核酸の伸長を妨げる化学基又は部分を指す(すなわち、2'-終止ヌクレオチドは通常、1又は2以上のヌクレオチド導入生体触媒により伸長できない)。すなわち、2'-終止ヌクレオチドが核酸中に(例えば核酸の3'末端に)組込まれると、ブロッキング基が、ヌクレオチド導入生体触媒による核酸のさらなる伸長を阻害する。ヌクレオチド導入生体触媒

10

20

30

40

50

は、例えば G 4 6 E E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼ、 G 4 6 E L 3 2 9 A E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼ、 G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4 0 G S 6 7 1 F C S 5 DNA ポリメラーゼ、 G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4 0 G S 6 7 1 F E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼ、 G 4 6 E E 6 7 8 G C S 6 DNA ポリメラーゼ、 Z O 5 R ポリメラーゼ、 E 6 1 5 G T a q DNA ポリメラーゼ、 サーマス・フラバス (*Thermus flavus*) ポリメラーゼ、 T M A - 2 5 ポリメラーゼ、 T M A - 3 0 ポリメラーゼ、 T t h DNA ポリメラーゼ、 サーマス種 S P S - 1 7 ポリメラーゼ、 E 6 1 5 G T a q ポリメラーゼ、 サーマス Z O 5 R ポリメラーゼ、 T 7 DNA ポリメラーゼ、 コーンバーグ (Kornberg) DNA ポリメラーゼ I、 クレノウ DNA ポリメラーゼ、 T a q DNA ポリメラーゼ、 ミクロコッカス (*Micrococcocal*) DNA ポリメラーゼ、 DNA ポリメラーゼ、 逆転写酵素、 A M V 逆転写酵素、 M - M u L V 逆転写酵素、 DNA ポリメラーゼ、 R N A ポリメラーゼ、 E . コリ R N A ポリメラーゼ、 S P 6 R N A ポリメラーゼ、 T 3 R N A ポリメラーゼ、 T 4 DNA ポリメラーゼ、 T 7 R N A ポリメラーゼ、 R N A ポリメラーゼ II、 末端トランスクレオチド、 ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、 リボヌクレオチド又はリボヌクレオチド類似体導入DNAポリメラーゼ等から選択される、 少なくとも 1 つである。 ブロッキング基の例としては、 リン酸基が挙げられる。 他の代表的なブロッキング基として、 本明細書に記載のものも挙げられる。
。 2 ' - 終止ヌクレオチドの例としては、 2 ' - 一リン酸 - 3 ' - ヒドロキシル - 5 ' - 三リン酸ヌクレオシド及び 2 ' - 一リン酸 - 3 ' - ヒドロキシル - 5 ' - 二リン酸ヌクレオシドが挙げられる。 他の 2 ' - 終止ヌクレオチドとして、 本明細書に記載のものや、 引用により本明細書に組み込まれる、 Bodepudi 等の 2 0 0 4 年 6 月 2 8 日付提出願 “SYNTHESIS AND COMPOSITIONS OF 2'-TERMINATOR NUCLEOTIDES” (米国特許出願番号 1 0 / 8 7 9 , 4 9 4 号)、 及び、 Gelfand 等の 2 0 0 4 年 6 月 2 8 日付提出願 “2'-terminator nucleotide-related methods and systems” (米国特許出願番号 1 0 / 8 7 9 , 4 9 3 号) に記載のものが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

「 5 ' - ヌクレアーゼプローブ」とは、 分解されると、 検出可能なシグナル変化を生成し得る標識オリゴヌクレオチドを意味する。 例を挙げると、 ある態様によれば、 5 ' - ヌクレアーゼプローブは 2 種のラベリング成分を含んでなり、 標識の 1 つが切断され、 或いはオリゴヌクレオチドから分離された後、 高められた強度の放射線を発する。 かかる態様の一部によれば、 例えは 5 ' - ヌクレアーゼプローブは、 5 ' 末端消光成分及びレポーター成分により、 プローブの 3 ' 末端で標識される。 ある態様によれば、 5 ' - ヌクレアーゼプローブは、 それらの末端位置の代わりに、 或いはそれらの末端位置に加えて、 1 又は 2 以上の位置で標識される。 プローブが無傷であれば、 消光剤成分が受容体成分からの蛍光発光を少なくとも部分的に消光するよう、 通常はラベリング成分間でエネルギー移行が生じる。 ポリメラーゼ鎖反応の伸長段階の間、 例えは鑄型核酸に結合される 5 ' - ヌクレアーゼプローブは、 受容体成分からの蛍光発光がもはや消光されないよう、 T a q ポリメラーゼ又はこの活性を有するもう 1 つのポリメラーゼの 5 ' 3 ' ヌクレアーゼ活性により分解される。 さらに例を挙げると、 ある態様によれば、 5 ' - ヌクレアーゼプローブは自己相補性領域を有し、 所定の条件下でヘアーピンを形成し得るように構成される。 かかる態様においては、 5 ' - スクレアーゼプローブは、 本明細書では「ヘアーピンプローブ」とも呼ばれる。 本明細書に記載の方法での使用に適合し得る 5 ' - ヌクレアーゼの例は、 例えは 1 9 9 3 年 5 月 1 1 日付発行 “Homogeneous assay system using the nuclease activity of a nucleic acid polymerase”、 米国特許第 5 , 2 1 0 , 0 1 5 号 (Gelfand 等)、 1 9 9 9 年 1 1 月 3 0 日付発行 “Homogeneous methods for nucleic acid amplification and detection” (米国特許第 5 , 9 9 4 , 0 5 6 号 (Higuchi))、 及び、 2 0 0 1 年 1 月 9 日付発行 “Methods and devices for homogeneous nucleic acid amplification and detector” (米国特許第 6 , 1 7 1 , 7 8 5 号 (Higuchi 等)) にも記載されている。

【 0 0 2 3 】

10

20

30

40

50

「受容体成分」又は「受容体」とは、エネルギー源から移行されるエネルギーを受容又は吸収し得る成分を指す。ある態様によれば、受容体成分は、十分な量の移行エネルギーを吸収してエネルギー（例えば光、熱等）を発し得るものでもよい。かかる態様においては、受容体は「レポーター成分」又は「レポーター」としても知られている。受容体成分の例としては、これらに制限されるものではないが、とりわけ、種々の蛍光色素分子（fluorophore）、例えばLight Cycler（登録商標）- Red 610（LC-Red 610）、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、JA-270、CY5、CY5.5。

【0024】

「アルコール基」とは、少なくとも1のヒドロキシ基を含む有機基を指す。

10

【0025】

「アルデヒド基」とは、式 CHO を含む有機基を指す。

【0026】

「アルケニル基」とは、1又は2以上の炭素-炭素二重結合を有する、直鎖、分岐鎖又は環状の不飽和炭化水素成分を指す。アルケニル基としては、エテニル、2-プロペニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-2-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、3-メチル-3-ブテニル、1,1-ジメチル-2-プロペニル、1,2-ジメチル-2-プロペニル、1-エチル-2-プロペニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-メチル-2-ペンテニル、4-メチル-2-ペンテニル、1-メチル-3-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、2-メチル-4-ペンテニル、3-メチル-4-ペンテニル、4-メチル-4-ペンテニル、1,1-ジメチル-2-ブテニル、1,1-ジメチル-3-ブテニル、1,2-ジメチル-2-ブテニル、1,3-ジメチル-3-ブテニル、2,2-ジメチル-3-ブテニル、2,3-ジメチル-2-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル、2-エチル-2-ブテニル、2-エチル-3-ブテニル、1,1,2-トリメチル-2-プロペニル、1-エチル-1-メチル-2-プロペニル、1-エチル-2-メチル-2-プロペニル等が挙げられる。アルケニル基は通常約1~20個の炭素原子、より典型的には約2~15個の炭素原子を有する。アルケニル基は置換でも無置換でもよい。

20

【0027】

「アルケニルアミン基」とは、少なくとも1のアルケニル基を含んでなるアミノ基を指す。

【0028】

「アルコキシ基」とは、酸素原子を含んでなるアルキニル基を指し、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、ペントキシ、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ等を包含する。

40

【0029】

「アルキル基」とは、直鎖、分岐鎖又は環状の飽和炭化水素成分を指し、あらゆる位置異性体を包含する。例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、1-メチルエチル、1-メチルプロピル、2-メチルプロピル、1,1-ジメチルエチル、ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、2,2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピル、ヘキシル、1,1-ジメチルプロピル、1,2-ジメチルプロピル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、2,

50

3 - ジメチルブチル、3 , 3 - ジメチルブチル、1 - エチルブチル、2 - エチルブチル、1 , 1 , 2 - トリメチルプロピル、1 , 2 , 2 - トリメチルプロピル、1 - エチル - 1 - メチルプロピル及び1 - エチル - 2 - メチルプロピル、n - ヘキシリル、シクロヘキシリル、n - ヘプチル、n - オクチル、2 - エチルヘキシリル、n - ノニル、n - デシル等が挙げられる。アルキル基は通常約1 ~ 20個の炭素原子、より典型的には約2 ~ 15個の炭素原子を含んでなる。アルキル基は置換でも無置換でもよい。

【0030】

「アルキルアミン基」とは、少なくとも1のアルキル基を含んでなるアミノ基を指す。

【0031】

「アルキニル基」とは、1又は2以上の炭素 - 炭素三重結合を有する、直鎖、分岐鎖又は環状の不飽和炭化水素成分を指す。アルキニル基の例としては、2 - プロピニル、2 - ブチニル、3 - ブチニル、1 - メチル - 2 - プロピニル、2 - ペンチニル、3 - ペンチニル、4 - ペンチニル、1 - メチル - 2 - ブチニル、1 - メチル - 3 - ブチニル、2 - メチル - 3 - ブチニル、1 , 1 - ジメチル - 2 - プロピニル、1 - エチル - 2 - プロピニル、2 - ヘキシニル、3 - ヘキシニル、4 - ヘキシニル、5 - ヘキシニル、1 - メチル - 2 - ペンチニル、1 - メチル - 3 - ペンチニル、1 - メチル - 4 - ペンチニル、2 - メチル - 3 - ペンチニル、2 - メチル - 4 - ペンチニル、3 - メチル - 4 - ペンチニル、4 - メチル - 2 - ペンチニル、1 , 1 - ジメチル - 2 - ブチニル、1 , 1 - ジメチル - 3 - ブチニル、1 , 2 - ジメチル - 3 - ブチニル、2 , 2 - ジメチル - 3 - ブチニル、3 , 3 - ジメチル - 1 - ブチニル、1 - エチル - 2 - ブチニル、1 - エチル - 3 - ブチニル、2 - エチル - 3 - ブチニル、1 - エチル - 1 - メチル - 2 - プロピニル等が挙げられる。アルキニル基は通常約1 ~ 20個の炭素原子、典型的には約2 ~ 15個の炭素原子を含んでなる。アルキニル基は置換でも無置換でもよい。

【0032】

「アルキニルアミン基」とは、少なくとも1のアルキニル基を含んでなるアミノ基を指す。

【0033】

「アンプリコン」とは、例えば転写、クローニング及び / 又はポリメラーゼ鎖反応（「P C R」）（例えば鎖置換P C R增幅（S D A）、重複P C R增幅等）、又は他の核酸增幅法で生じるように、他の分子を複製又は転写して得られる分子を指す。アンプリコンは通常、選択される核酸（例えば錆型又は標的核酸）の複製であるか、又はそれらに対して相補的である。

【0034】

核酸との関連における用語「増幅する」又は「増幅」とは、通常は少量のポリヌクレオチド（例えば単一のポリヌクレオチド分子）から出発して、ポリヌクレオチド又はその一部の複数のコピーを生成することを言う。ここで増幅産物又はアンプリコンは通常は検出可能である。ポリヌクレオチドの増幅は種々の化学及び酵素工程を包含する。ポリメラーゼ鎖反応（P C R）又はリガーゼ鎖反応（L C R）の際に、1又は数コピーの標的又は錆型D N A分子から複数のD N Aコピーを生成するのは、いずれも増幅の一形態である。増幅は、出発分子の厳密な複製には限定されない。例えば、R T - P C Rを用いて試料中の限られた量のR N Aから複数c D N A分子を生成するのは、増幅の一形態である。さらには、転写工程において单一のD N A分子から複数R N A分子を生成するのも、増幅の一形態である。

【0035】

「アリール基」とは、芳香族化合物に由来する原子又は成分の置換基を指す。アリール基の例としては、例えばフェニル基、ベンジル基、トリル基、キシリル基等を包含する。アリール基は、複数の芳香族環を包含していてもよい（例えばジフェニル基等）。さらには、アリール基は置換でも無置換でもよい。

【0036】

「アリールオキシ基」とは、酵素原子を含んでなるアリール基を指す。フェノキシ、ク

ロロフェノキシ、メチルフェノキシ、メトキシフェノキシ、ブチルフェノキシ、ペンチルフェノキシ、ベンジルオキシ等が挙げられる。

【0037】

「生体触媒」とは、生体系（例えばインビトロ生体系、インビボ生体系等）において、他の化合物又は「基質」を伴う化学反応の活性化工エネルギーを低減する作用を有する触媒を指す。生体触媒は、1又は2以上の触媒活性、例えばヌクレオチド除去活性（例えば加ピロリン酸分解活性、ヌクレアーゼ活性（例えばエンドヌクレアーゼ及び／又はエキソヌクレアーゼ活性）等）、及び／又は、ヌクレオチド導入活性（例えばポリメラーゼ活性、リガーゼ活性、逆転写酵素活性等）を有する。

【0038】

核酸との関連における「補体」とは、核酸の少なくとも部分配列と、逆平行会合下で結合し、又はハイブリダイズし得る核酸又はそのセグメントを指す。逆平行会合は分子内でもよく（例えば核酸内のヘアーピンループの形態）、分子間でもよい（例えば複数の一本鎖核酸がお互いハイブリダイズする場合等）。天然の核酸には通常見られない特定の塩基も、本明細書で指す核酸に含まれる。例としては、ヒポキサンチン、7-デアザグアニンが挙げられる。相補性は完全ではなくてもよい。例えば、安定した二重体又は三重体が、ミスマッチの塩基対や不適合の塩基を含む場合もある。すなわち、逆平行会合は、核酸が単に「部分的に相補的」であっても、分子内にせよ分子間にせよ、一定の条件下で生じ得る。核酸化学の当業者であれば、種々の変数、例えば相補性領域の長さ、相補性領域の塩基組成及び配列、イオン強度、溶融温度（Tm）及びミスマッチの塩基対の発生率を実験で検証することにより、二重体又は三重体の安定性を決定することができる。

10

【0039】

用語「カルボン酸基」とは、式COOHを含む有機基を指す。

【0040】

用語「相關する」とは、複数の現象間の関係の確立を指す。ある様態によれば、所与の反応におけるプライマー伸長の検出は、標的核酸が特定の多形を有することを示唆する。

【0041】

用語「対応する」とは、核酸中の指定されたヌクレオチド位置又はヌクレオチド配列にと同一又は相補的であることを意味する。本用語の正確な用法は、本用語が使用される情況により、当業者には明らかであろう。

30

【0042】

「ドナー成分」とは、1又は2以上の受容体成分に、1又は2以上の形態の励起エネルギーを移行し、放出し、或いは供与し得る成分を指す。

【0043】

「エステル基」とは、一般式RCOOR'（式中、R及びR'はアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基又はそれらの組合せから独立して選択される）を有する有機化合物のクラスを指す。

【0044】

「エーテル基」とは、单一の酸素原子に結合される2個の炭素原子を含んでなる直鎖、分岐又は環状成分を指す。エーテル基の例としては、メトキシメチル、メトキシエチル、メトキシプロピル、エトキシエチル等が挙げられる。

40

【0045】

「伸長可能ヌクレオチド」とは、その伸長可能ヌクレオチドがヌクレオチドポリマー中に組込まれると、例えば生体触媒により触媒される反応で、少なくとも1の他のヌクレオチドが付加又は共有結合され得るヌクレオチドを指す。伸長可能ヌクレオチドの例としては、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドが挙げられる。伸長可能ヌクレオチドは通常、その伸長可能ヌクレオチドの糖成分の3'位置に、別のヌクレオチドを付加することにより伸長される。

【0046】

「ヘアーピンプローブ」とは、標的核酸検出を可能とするのに使用できるオリゴヌクレ

50

オチドであって、選択された条件下でプローブがヘアーピン又はループ構造を形成できるよう、少なくとも 1 の自己相補性領域を含むオリゴヌクレオチドを指す。ヘアーピンプローブは通常、1 又は 2 以上のラベリング成分を有する。実施態様の一例においては、消光剤成分及びレポーター成分は、その消光剤成分が、プローブがヘアーピン確認下にある場合、レポーター成分からの発光を少なくとも一部、消光するよう、ヘアーピンプローブにおいてお互いに對して配置される。対照的に、かかる態様におけるプローブがヘアーピン確認下に存在しない場合（例えばプローブが標的核酸によりハイブリダイズされる場合）、通常は受容体レポーター成分の発光が検出できる。かかる態様の一部によれば、ヘアーピンプローブは、分子ビーコンとしても知られている。ある態様によれば、ヘアーピンプローブは、5' - ヌクレアーゼプローブ又はハイブリダイゼーションプローブとしても機能し得る。10

【 0 0 4 7 】

「複素環式環」とは、飽和、不飽和又は芳香族のいずれかであり、窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される 1 又は 2 以上のヘテロ原子を含んでなる、単環式又は二環式環を指す。複素環式環は、ヘテロ原子又は炭素原子を介して本発明のヌクレオチドの糖成分又はその類似体に結合され得る。複素環式環の例としては、モルホリニル、ピロリジノニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ヒダントイニル、バレロラクタミル、オキシラニル、オキセタニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロピリジニル、テトラヒドロイミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロピリミジニル、テトラヒドロチオフェニル、テトラヒドロチオピラニル、フリル、ベンゾフラニル、チオフェニル、ベンゾチオフェニル、ピロリル、インドリル、イソインドリル、アザインドリル、ピリジル、キノリニル、イソキノリニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ベンズオキサゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、イソチアゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、シンノリニル、フタラジニル、キナゾリニル等が挙げられる。20

【 0 0 4 8 】

「単素環式環」とは、飽和又は不飽和の（しかし芳香族ではない）炭素環式環、例えばシクロプロパン、シクロブタン、シクロpentantan、シクロヘキサン、シクロヘプタン、シクロヘキセン等を指す。

【 0 0 4 9 】

「ハイブリダイゼーションプローブ」とは、標的核酸検出を可能とするのに使用し得る少なくとも 1 のラベリング成分を含むオリゴヌクレオチドを指す。ある態様によれば、ハイブリダイゼーションプローブは対で機能する。かかる態様の一部によれば、例えば対の第 1 ハイブリダイゼーションプローブは 3' 末端又はその近位に少なくとも 1 のドナー成分を含み、対の第 2 ハイブリダイゼーションプローブは 5' 末端又はその近位に少なくとも 1 の受容体成分（例えば L C - R e d 6 1 0 、 L C - R e d 6 4 0 、 L C - R e d 6 7 0 、 L C - R e d 7 0 5 、 J A - 2 7 0 、 C Y 5 又は C Y 5 . 5 等）を含む。プローブの設計は通常、両プローブが標的又は鑄型核酸とハイブリダイズする場合（例えば P C R の間）、第 1 ハイブリダイゼーションプローブが第 2 ハイブリダイゼーションプローブに対して 5' 末端側又は上流側に結合し、ドナーと受容体成分との間にエネルギー移行が生じ、検出可能シグナルを生成するのに十分な近位内に結合するように行われる。第 2 ハイブリダイゼーションプローブは通常、 P C R 時のプローブ伸長を予防するために、3' 末端にリン酸又は他の基を有する。3040

【 0 0 5 0 】

核酸は通常、一のポリヌクレオチドと別のポリヌクレオチド（通常は逆平行ポリヌクレオチド）との塩基対合相互作用によって「ハイブリダイズ」又は「アニーリング」し、重複体又は他の高次構造体を形成する。これはハイブリダイゼーション複合体と呼ばれる。逆平行ポリヌクレオチド間の主の相互作用は、通常は塩基特異的であり、例えば Watson / Crick 及び / 又は Hoogsteen 型相互作用によれば、A / T 及び G / C 特異的である。2 種のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを達成するには、その全長に亘って 1 0 0 %50

の相補性を有する必要はない。ある態様によれば、ハイブリダイゼーション複合体は分子間相互作用によって形成することができ、他方では分子内相互作用によって形成することができる。ハイブリダイゼーションを生じさせる種々の力はよく解明されている。例えば水素結合、溶媒排除、塩基スタッキング等がある。核ハイブリダイゼーションについての広範な指針が、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier (1993)に記載されている。

【0051】

「標識」とは、分子に(共有又は非共有)結合された、又は結合され得る成分であって、分子に関する情報(例えば説明、識別等)を提供する、又は提供し得る成分である。標識の例としては、ドナー成分、受容体成分、蛍光標識、非蛍光標識、比色標識、化学ルミネセンス標識、生物ルミネセンス標識、放射性標識、質量修飾基、抗体、抗原、ビオチン、ハプテン又は酵素(例えばペルオキシダーゼ、ホスファターゼ等)が挙げられる。

10

【0052】

「発光修飾因子」とは、混合物中の核酸と非共有結合するとともに、核酸と結合した放射線源に近接する場合に、前記放射線源からの放射線の検出可能放射を変更する物質を指す。ある態様によれば、例えば、本明細書に記載される特定の発光修飾因子は、その発光修飾因子がオリゴヌクレオチドと接触すると、少なくとも1の発光成分(例えば5'-ヌクレアーゼプローブ等)を含むオリゴヌクレオチドから発せられる発光(例えば基線発光)を減光又は消光する。発光修飾因子は通常は可溶性であり、かかる態様においては、「可溶性消光剤」又は「可溶性発光修飾因子」とも呼ばれる。さらに、発光修飾因子が所与のオリゴヌクレオチドからの発光を変更する程度は通常、オリゴヌクレオチド長に比例する。例えば、オリゴヌクレオチドが5'-ヌクレアーゼ反応で分解される場合、特定の発光修飾因子がオリゴヌクレオチドの標識断片からの発光を変更する程度は通常、無傷のオリゴヌクレオチドからの発光の場合よりも小さい。発光修飾因子の例としては、種々のジアジン及びチアジン色素が挙げられる。これらは本明細書に、また、例えばGupta等の2006年6月23日付出願“LIGHT EMISSION MODIFIERS AND THEIR USES IN NUCLEIC ACID DETECTION, AMPLIFICATION AND ANALYSIS”(米国特許出願番号11/474,062号)に記載されている。

20

【0053】

「混合物」とは、複数の異なった成分の組合せを指す。「反応混合物」とは、所与の反応に関与し、及び/又は、所与の反応を促進し得る分子を含んでなる混合物を指す。例を挙げると、增幅反応混合物は通常、增幅反応を実施するために必要な試薬を含む溶液を含み、通常はプライマー、生体触媒(例えば核酸ポリマー、リガーゼ等)、dNTP及び適切な緩衝液中、二価の金属カチオンを含む。反応混合物が反応を実施するために必要な全試薬を含む場合、完全であると呼ばれ、反応混合物が必要な試薬の一部しか含まない場合、不完全であると呼ばれる。当業者であれば当然認識するように、反応成分は通常、利便性や貯蔵安定性の観点から、或いは用途に応じて成分濃度を調節可能とするべく、個別の溶液(各々、全成分の一部を含む)として貯蔵され、反応の前に反応成分が混合されて完全な反応混合物が作成される。さらに、当業者であれば当然認識するように、反応成分は別々に包装されて市販され、市販の有用なキットは反応又はアッセイ成分のいずれを含んでいてもよく、かかる成分に本発明の生体分子が含まれる。

30

【0054】

「成分」又は「基」とは、分子等が分割される部分、或いは分割され得る部分の1つ(例えば官能基、置換基等)を指す。例えば、ある態様によれば、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、少なくとも1のドナー成分及び/又は少なくとも1の受容体成分を有する。

40

【0055】

用語「突然変異」とは、未変化又は天然形の核酸又はコード化タンパク質産物と比べて

50

、核酸配列が変更されている核酸、又はアミノ酸配列が変更されている核酸のコード化タンパク質産物を指す。かかる変更としては、例えば点突然変異又は置換、欠失及び挿入が挙げられる。

【0056】

「伸長不能」ヌクレオチドとは、核酸へ取り込まれた場合に、例えば少なくとも1の生体触媒等による、核酸の更なる伸長を阻止するヌクレオチドを指す。

【0057】

用語「核酸」又は「ポリヌクレオチド」とは、リボース核酸(RNA)又はデオキシリボース核酸(DNA)ポリマーと対応され得るポリマー、又はその類似体を指す。例としては、ヌクレオチド、例えばRNA及びDNAのポリマー及びそれらの修飾形、ペプチド核酸(PNA)、固定された核酸(LNA(商標))等を包含する。ある態様によれば、核酸は、複数種のモノマー、例えばRNA及びDNAサブユニットを含むポリマーであってもよい。核酸は、例えば染色体又は染色体セグメント、ベクター(例えば発現ベクター)、発現カセット、裸のDNA又はRNAポリマー、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)の産物、オリゴヌクレオチド、プローブ、プライマー等であってもよく、それらを包含してもよい。核酸は、例えば一本鎖、二本鎖、三本鎖等のいずれでもよく、特定の長さに限定されない。特に断らない限り、特定の核酸配列は、明示される任意の配列に加えて、相補的配列を含んいてもよく、相補的配列をコードしていくてもよい。

【0058】

核酸は、天然に存在するポリヌクレオチド配列又は構造体、天然に存在する主鎖、及び/又は天然に存在するヌクレオチド関連鎖を有する分子に制限されない。例えば、1又は2以上の炭素環式糖を含む核酸も、かかる定義に含まれる(Jenkins et al. (1995) Chem. Soc. Rev. pp169-176)。さらに例を挙げると、核酸は通常はホスホジエステル結合を含むが、場合により、他の主鎖を有する核酸類似体が挙げられる。例としては、これらに限定されるものではないが、ホスホラミド(Beaucage等(1993) Tetrahedron 49 (10): 1925)及びその引用文献; Letsinger(1970) J. Org. Chem. 35: 3800; Sprinzl等(1977) Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsinger等(1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawai等(1984) Chem. Lett. 805; Letsinger等(1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; 及びPauwels等(1986) Chemica Scripta 26: 1419)、ホスホロチオエート(Mag等(1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437; 及び米国特許第5,644,048号)、ホスホジチオエート(Briu等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 2321)、O-メチルホスホアミジット連鎖(Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992))、及びペプチド核酸主鎖及び連鎖(Egholm(1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 1895; Meier等(1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008; Nielsen(1993) Nature 365: 566; Carlsson等(1996) Nature 380: 207)。他の核酸類似体は、正に荷電された主鎖(Denpcy等(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097); 非イオン性主鎖(米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号及び第4,469,863号; Angew(1991) Chem. Int'l. Ed. English 30: 423; Letsinger等(1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; Letsinger等(1994) Nucleoside & Nucleotide 13: 1597; Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan Cook; Mesmaeker等(1994) Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395; Jeffs等(1994) J. Biomolecular NMR 34: 17; Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996))、及び非リボース主鎖を有するもの、例えば引用により本明細書に組込まれる米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号及びChapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan Cookに記載されるものが挙げられる。幾つかの核酸類似体が、Rawls、C&E News Jun. 2, 1997, page35にも記載されている。リボースリン酸主鎖の修飾を行うことにより、追加の成分、例えばラベリング成分の付加の促進、又は生理学的環境におけるかかる分子の安定性及び半減期の変更が可能である。

10

20

30

40

50

【0059】

核酸に典型的に見出される天然に存在する複素環式塩基（例えばアデニン、グアニン、チミン、シトシン及びウラシル）に加えて、核酸類似体は、天然に存在しない複素環式又は他の修飾塩基を有するものも包含する。さらなる例として、溶融温度（Tm）調節体として作用するヌクレオチドに使用される特定の塩基を挙げることもできる。その例としては、7-デアザプリン（例えば7-デアザグアニン、7-デアザアデニン等）、ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、プロピニル-dN（例えばプロピニル-dU、プロピニル-dC等）等を包含する。例えば、1999年11月23日付発行“SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINENUCLEOTIDES”（米国特許第5,990,303号）を参照のこと。
他の代表的な複素環式塩基は、ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン；2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシン及びキサンチンの8-アザ誘導体；アデニン、グアニン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、ヒポキサンチン、イノシン及びキサンチンの7-デアザ-8-アザ誘導体；6-アザシトシン；5-フルオロシトシン；5-クロロシトシン；5-ヨードシトシン；5-ブロモシトシン；5-メチルシトシン；5-ブロピニルシトシン；5-ブロモビニルウラシル；5-フルオロウラシル；5-クロロウラシル；5-ヨードウラシル；5-ブロモウラシル；5-トリフルオロメチルウラシル；5-メトキシメチルウラシル；5-エチニルウラシル；5-ブロピニルウラシル等を包含する。多くの天然に存在しない塩基は又、例えばSeela et al. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1790、Grein et al. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976、and Seela et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1640にも記載される。

【0060】

修飾された塩基及びヌクレオチドの追加の例がまた、1996年1月16日付発行“Oligonucleotides containing 5-propynyl pyrimidines”、米国特許第5,484,908号（Froehler等）、1997年7月8日付発行、“Enhanced triple-helix and double-helix formation with oligomers containing modified pyrimidines”、米国特許第5,645,985号（Froehler等）、1998年11月3日付発行、“Methods of using oligomers containing modified pyrimidines”、米国特許第5,830,653号（Froehler等）、2003年10月28日付発行、“Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleoside s”、米国特許第6,639,059号（Kochkine等）、2001年10月16日付発行、“One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples”、米国特許第6,303,314号（Skoulios等）、及び2003年5月15日公開の“Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides”、米国特許公開番号第2003/0092905号（Kochkine等）に記載されている。

【0061】

「ヌクレオシド」とは、糖成分（例えばリボース糖等）、糖成分の誘導体、又は糖成分の機能的同等物（例えば類似体、例えば单素環式環）に共有結合される塩基又は塩基性基（例えば少なくとも1の单素環式環、少なくとも1の複素環式環、少なくとも1のアリール基、及び/等を含んでなる）を含んでなる核酸成分を指す。例えば、ヌクレオシドが糖成分を含む場合、塩基は通常、その糖成分の1' - 位置に結合される。上記に記載されるように、塩基は、天然に存在するか（例えばプリン塩基、例えばアデニン（A）又はグアニン（G）、ピリミジン塩基、例えばチミン（T）、シトシン（C）又はウラシル（U））、又は天然に存在しない（例えば7-デアザプリン塩基、ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン塩基、プロピニル-dN塩基等）。典型的なヌクレオシドは、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオシド、ジデオキシリボヌクレオシド、炭素環式ヌクレオシド、等を包含する。

【0062】

「ヌクレオチド」とは、ヌクレオシドのエステル、例えばヌクレオシドのリン酸エステルを指す。例を挙げると、ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖成分の5'位置に共有結合される、1,2,3又はそれ以上のリン酸基を含んでいてもよい。

【0063】

「ヌクレオチド導入生体触媒」とは、核酸中へのヌクレオチドの導入を触媒する触媒を指す。ヌクレオチド導入生体触媒は通常酵素である。「酵素」は、他の化合物又は「基質」を含む化学反応の活性化エネルギーを低めるよう作用するタンパク質及び／又は核酸系触媒である。「ヌクレオチド導入酵素」とは、例えば核酸増幅等の間、核酸中へのヌクレオチドの導入を触媒する酵素を指す。典型的なヌクレオチド導入酵素は例えば、ポリメラーゼ、ターミナルトランスクレオチド、逆転写酵素、テロメラーゼ、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ等を包含する。「熱安定性酵素」とは、熱に対して安定し、耐熱性であり、高温に選択される時間ゆだねられる場合、十分な触媒活性を保持する酵素を指す。例えば、熱安定性ポリメラーゼは、二本鎖核酸の変性をもたらすのに必要な時間、高温にゆだねられる場合、プライマー伸長反応をもたらすのに十分な活性を保持する。核酸変性のために必要な加熱条件は、当業者に良く知られており、1987年7月28日付発行、“Process for amplifying nucleic acid sequences”、米国特許第4,683,202号(Mullis)及び1987年7月28日付発行、“Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences”、米国特許第4,683,195号(Mullis等)に例示されている(又は米国特許第4,965,188号も参照のこと)。さらに例証するためには、「熱安定性ポリメラーゼ」とは、温度周期反応、例えばポリメラーゼ鎖反応(「PCR」)への使用のために適切である酸素を指す。熱安定性ポリメラーゼに関しては、酵素活性は、錆型核酸に対して相補的であるプライマー伸長産物を形成するために適切な態様でのヌクレオチドの組合せの触媒を指す。

10

20

【0064】

「オリゴヌクレオチド」は、少なくとも2個の核酸モノマー単位(例えばヌクレオチド)、通常3個よりも多くの核酸モノマー単位及びより典型的には10個よりも多くの核酸モノマー単位を含む核酸を指す。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは通常、種々の要因、例えばオリゴヌクレオチドの究極的機能又は使用に依存する。通常、ヌクレオシドモノマーは、ホスホジエステル結合又はその類似体、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニリデート、ホスホラミデート等、例えば結合されるカウンターイオン、例えばH⁺、NH⁴⁺、Na⁺等(そのようなカウンターイオンが存在する場合)により結合される。オリゴヌクレオチドは任意には、いずれかの適切な方法、例えば存在する又は天然の配列の単利、DNA複製又は増幅、逆転写、適切な配列のクローニング及び制限消化、又は1つの方法、例えば当業界において知られている他の方法の中で、Narang等(1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99のホスホトリエステル方法；Brown等、(1979) Meth. Enzymol. 68:109-151のホスホジエステル方法；Beaucage等、(1981) Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862のジエチルホスホラミジット方法；Matteucci等、(1981) J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191のトリエステル方法；自動化された合成方法；又は1984年7月3日付発行“Process for preparing polynucleotides”、米国特許第4,458,066号(Caruthers等)の固体支持方法による直接的な化学合成により調製される(但しそれらだけには限定されない)。

30

40

【0065】

「多形」又は「多形ヌクレオチド位置」とは、多くの遺伝子型の1つを有する核酸の部位を指す。多形は、可能性ある突然変異、挿入又は欠失を包含する、当業者に知られているいのちの多形であり得る。多形は、核酸の1つの部位又は核酸の複数部位で存在することができる。本発明において「多形」とは、核酸の1つの部位で存在する多形、又は複数多形の1つの特定部位を指すことができる。ある態様によれば、多形は、当業者に良く知られている必要はないか又は知られる必要さえない。多形は単に、制御核酸と標的核酸との間のいのちの差異であり得る。

【0066】

「プライマー核酸」又は「プライマー」は、標的又は錆型核酸にハイブリダイズすることができ、例えばヌクレオチド導入生体触媒、例えば適切な反応条件下でのポリメラーゼ

50

を用いて鎖伸長又は延伸を可能にする核酸である。プライマー核酸は通常、天然又は合成オリゴヌクレオチド（例えば一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチド）である。他のプライマー核酸長が任意には使用されるが、それらは通常、約8～約100個の長さの範囲であるハイブリダイズする領域を含んでなる。短いプライマー核酸は通常、鑄型核酸と十分に安定したハイブリッド複合体を形成するためにより低い温度を必要とする。鑄型核酸の部分配列に対して少なくとも部分的に相補的であるプライマー核酸は通常、伸長のために鑄型とハイブリダイズするのに十分である。プライマー核酸は所望には、例えば分光法、光化学法、生化学法、免疫化学法、化学法は又は他の技法により、検出できる標識を組込むことにより標識され得る。例を挙げると、有用な標識は、ドナー成分、受容体成分、消光剤成分、放射性同位体、高電子密度試薬、酵素（ELISAの実施に通常使用されるもの等）、ビオチン、又はヘプテン及びタンパク質（抗血清又はモノクローナル抗体が利用できる）を包含する。かかる標識や他の多数の標識が、本明細書にさらに記載され、及び／又は、当業界で公知である。ある態様によれば、プライマー核酸が、プローブ核酸として使用され得ることも、当業者には公知であろう。

【0067】

用語「プローブ核酸」又は「プローブ」とは、適切な条件下で標的又は標識されていないオリゴヌクレオチドを指す。通常、プローブは、選択されるハイブリダイゼーション条件、例えば緊縮ハイブリダイゼーション条件（但し、それらだけには限定されない）下で、標的配列と共に安定したハイブリダイゼーション複合体を形成するために、核酸試料に含まれる特異的標的配列にたいして十分に相補的である。十分な緊縮ハイブリダイゼーション条件下でプローブを用いて実施されるハイブリダイゼーションアッセイは、特異的標的配列の選択的検出を可能にする。用語「ハイブリダイジング領域」とは、標的配列に対しても、正確に実質的に相補的であり、従って、それにハイブリダイズできる核酸のその領域を指す。配列における単一のヌクレオチド差異の識別のためのハイブリダイゼーションアッセイへの使用のためには、ハイブリダイズする領域は通常、約8～約100個の長さのヌクレオチドである。ハイブリダイズする領域は通常、完全なオリゴヌクレオチドを指すが、プローブは、例えば固体支持体へのプローブ配列の結合のための部位を供給するためにリンカー結合部位として機能する追加のヌクレオチド配列を含んでいてもよい。本発明のプローブは通常、1又は2以上の標識（例えばドナー成分、受容体成分及び／又は消光剤成分）、例えば5'-ヌクレアーゼプローブ、ハイブリダイゼーションプローブ、蛍光共鳴エネルギー移行（FRET）プローブ、ヘアーピンプローブ、又は分子ビーコンを含んでなる核酸に含まれる（前記プローブと試料における標的核酸との間でのハイブリダイゼーションを検出するためにも使用され得る）。しかしながら、一般的に完全な相補性は必ずしも必要ではなく（すなわち、核酸は別の核酸に対して部分的に相補的であり得る）；安定したハイブリダイゼーション複合体はミスマッチされた塩基又はミスマッチされていない塩基を含んでいてもよい。緊縮条件の修飾は、1又は2以上の塩基対ミスマッチ又はミスマッチされていない塩基との安定したハイブリダイゼーション複合体を可能にするために必要である。Sambrook et al.、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、3rd Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (2001)は、適切な修飾のためのガイドを提供する。標的／プローブハイブリダイゼーション複合体の安定性は、多くの変数、例えばオリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成及び配列、温度及びイオン状態に依存する。当業者は、通常、所与のプローブの正確な補体が同様にプローブとして有用であることを理解するであろう。当業者は、ある態様によれば、プローブ核酸がまた、プライマー核酸として使用され得ることを理解するであろう。

【0068】

用語「加ピロリン酸分解」とは、1又は2以上のヌクレオシド三リン酸を生成するために、ピロリン酸（PP_i）の存在下で核酸からの1又は2以上のヌクレオチドの除去を指す。

【0069】

「消光剤成分」又は「消光剤」とは、放射線、例えば蛍光又は発光放射線の検出できる

10

20

30

40

50

放射を、この放射線を放した源から低めることができる成分を指す。消光剤は通常、前記源により放たれる検出可能放射線を、少なくとも 50%、通常、少なくとも 80% 及びより典型的には少なくとも 90%、低める。一定の消光剤は、その消光剤についての特徴を示すシグナルにおける蛍光色素から吸収されるエネルギーを再び放すことができ、従って、消光剤はまた、受容体成分でもあり得る。この現象は通常、消光共鳴エネルギー移行又は FRET として知られている。他方では、消光剤は、光以外の形、例えば熱形で蛍光色素から吸引されるでエネルギーを消散することができる。FRET 用途に通常使用される分子は例えば、フルオレセイン、FAM、JOE、ローダミン、R6G、TAMRA、ROX、DABCYL 及び EDANS を包含する。蛍光色素が受容体であるか又は消光剤であるかどうかは、その励起及び発光スペクトル、並びに対応される蛍光色素により定義される。例えば、FAM は、488 nm の波長を有する光により最も効果的に励起され、500 ~ 650 nm のスペクトルを有する光を放し、525 nm の発光最大値を有する。FAM は、514 nm のその励起最大値を有する、例えば消光剤としての TAMRA との使用のための適切なドナー成分である。蛍光色素から吸収されるエネルギーを消散する典型的な非蛍光又はダーク消光剤は、Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA) より市販されている Black Hole Quenchers (商標) を包含する。Black Hole Quenchers (商標) は、置換された又は置換されていないアリール又はヘテロアリール化合物、又はそれらの組合せから選択される少なくとも 3 種の基を含んでなる構造体であり、ここで少なくとも 2 種の残基は環外ジアゾ結合を通して連結されている（例えば Cook et al. により 2001 年 11 月 15 日公開の “DARK QUENCHERS FOR DONOR-ACCEPTOR ENERGY TRANSFER”、国際公開番号 WO 01 / 86001 を参照のこと）。典型的な消光剤はまた、例えば 2002 年 10 月 15 日付発行、“OLIGONUCLEOTIDE PROBES BEARING QUENCHABLE FLUORESCENT LABELS, AND METHODS OF USE THEREOF”、米国特許第 6,465,175 号 (Horn 等) にも供給されている。
10
20

【0070】

生体ポリマーの「配列」とは、その生体ポリマーにおけるモノマー単位（例えばヌクレオチド等）の順序及び識別を指す。核酸の配列（例えば塩基配列）は通常、5' ~ 3' 方向で読み取られる。

【0071】

「シリル基」とは、一般式 $S_i R R_1 R_2$ (式中、R、R₁ 及び R₂ は独立して、H、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリール基、又はそのような基の組合せである) を包含する種類の化合物を指す。
30

【0072】

「部分配列」とは完全な生体ポリマー配列、例えば核酸配列のいずれかの部分を指す。

【0073】

分析計測における「系」とは、所望する目的を実施するためのネットワークを形成する物品及び/又は装置群を指す。

【0074】

「標的」とは、増幅され、検出され、/ 又は他方では、分析されるべき生体分子（例えば核酸等）、又はその一部を指す。
40

【0075】

「終止ヌクレオチド」とは、核酸中への導入に基づいて、例えば少なくとも 1 のヌクレオチド導入生体触媒により、核酸のさらなる伸長を妨げるヌクレオチドを指す。

【0076】

「チオエーテル基」とは、单一の硫黄原子に結合される 2 個の炭素原子を含んでなる、直鎖、分岐又は環状成分を指し、例えばメチルチオメチル、メチルチオエチル、メチルチオプロピル等を包含する。

【0077】

II : 序言
本発明は、2' - 終止ヌクレオチドを、通常それらの 3' 末端で含み、従って、プロッ
50

クされるオリゴヌクレオチドについての種々の適用に関する。すなわち、2' - 終止ヌクレオチドは通常、本明細書に言及される1又は2以上の生体触媒により伸長を妨げる。しかしながら、それらの遮断オリゴヌクレオチドは通常、それらが、2' - 終止ヌクレオチドが除去される場合、伸長され得るので、「活性化性」である。ある態様によれば、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは、単純には核酸重合の逆反応である、加ピロリン酸分解を通して活性化される。より具体的には、ピロリン酸の存在下で、2' - 終止ヌクレオチドは、重合反応において伸長され得る。ヌクレオシド三リン酸及び3'末端短縮オリゴヌクレオチドを生成するために重複核酸から除去され得る。PAP - 関連の用途における加ピロリン酸分解及び重合の一連のカップリングは通常、加ピロリン酸分解活性化を欠いている工程に関する改良された特異性を提供する。なぜならば、PAP条件下での非特異的増幅は、稀な現象である、生体触媒によるミスマッチ加ピロリン酸分解及び誤取り込みの両者を必要とするからである。さらに、本明細書に記載される一定の酵素生体触媒のブルーフリーディング3' - 5'エキソヌクレアーゼ活性は驚くべきことには、プライマーが溶液に存在するか、又は対応する錆型核酸にアニーリングされる場合、本明細書に記載されるプライマーからプロッキング基を除去しない(すなわち、プライマーを活性化する)。従って、それらの酵素のブルーフリーディング活性は通常、ブルーフリーディング活性を欠いている酵素を使用する種々の先存するPAP - 関連のアプローチよりも、プライマー伸長産物のより高い適合度の合成を提供する。この開示に例示されるように、本明細書に記載される遮断オリゴヌクレオチドは、実質的にいざれかの重合又は増幅工程、例えば当業者に明らかであろう多くの他の用途の中で、SNP分析及び希少体細胞突然変異検出に使用され得る。

【0078】

上記に言及されたように、本明細書に記載されるPAP - 関連のアプローチ(例えばリボヌクレオチド導入熱活性及び/又は熱安定性DNAポリメラーゼを包含する)は通常、先存するアプローチに関するオリゴヌクレオチド媒介合成反応の特異性を改良する。さらに、比較的高く且つ動的に制限しない濃度のdNTP及びNTPが一般的に許容される。これは通常、多くのこれまでのPAP - 関連のアプローチとは異なって、基質のための酵素を“消耗”しないことにより、より早い伸長速度に誘導する。さらに、これは通常、加ピロリン酸分解 - 放出された2' - 終止三リン酸の再導入の傾向がより低いことを意味する。さらに、本明細書に言及される酵素は通常、dNTP(及びNTP)に関して早い伸長速度を有する。これは、必要な伸長時間を短縮し、十分な長さのプライマー伸長の効率を高め、それらの方法のPCR効率を高める。それらの酵素に関する詳細はまた、2006年10月18日にBauer等により出願された“MUTANT DNA POLYMERASES AND RELATED METHODS”、米国特許出願番号60/852882号にも記載されている。さらに、本明細書に言及される遮断プライマーは、経済的に且つ容易に調製される。特に、それらの遮断オリゴヌクレオチドの合成はまた、2004年6月29日にBodepudi等により出願された“SYNTHESIS AND COMPOSITIONS OF NUCLEIC ACIDS COMPRISING 2' - TERMINATOR NUCLEOSIDES”、国際出願番号WO2005/026184号にも記載されている。

【0079】

さらに例を挙げると、図1は、典型的な一塩基多型(SNP)検出アッセイを図示する。反応Aに示されるように、プライマー核酸100は、錆型核酸102とハイブリダイズされる。プライマー100は、それが2' - 終止ヌクレオチド(T*)をその3'末端で組込むので、プロックされる。さらに、プライマー100の2' - 終止ヌクレオチドの位置は、錆型102における多形位置に対応し、示される場合、位置(A)におけるヌクレオチドに対して相補的である。ピロリン酸(PPi)及び加ピロリン酸分解を有する生体触媒の存在下で、2' - 終止ヌクレオチドが除去され、それによりプライマー100が活性化されるよう進行する。さらに示されるように、次に活性化されたプライマー100は、多形位置で対立遺伝子Aを有する錆型102と相關する、伸長されたプライマー104を生成するために重合反応において、生体触媒(例えば核酸ポリメラーゼ等)及びdNTP(dNTP及びNTP(すなわち、リボヌクレオチド)の混合物)の存在下で伸長され

得る。伸長されたプライマー 104 は、実質的にいずれかの入手できる検出技法を用いて、例えば 5' - ヌクレアーゼプローブ、ヘアーピンプローブ、ハイブリダイゼーションプローブ、質量分光法等の使用により検出され得る。ある態様によれば、T* は、レポーター成分により標識される。かかる態様の一部によれば、プライマー 100 における別の位置が、レポーター成分に対して十分に近位内の消光剤成分により標識され、レポーター成分からの発光が消光される。かかる態様においては、加ピロリン酸分解が進行する場合(例えば図 1 の反応 A に示されるような)、レポーター成分からの発光は、T* がプライマー 100 から除去され、消光剤成分から十分に分離されるので、検出できるであろう。反応 A に比較して、プライマー 100 の 2' - 終止ヌクレオチドは、反応 B における錆型核酸 106 における多形位置でのヌクレオチド (G) に対して相補的ではない。このミスマッチの結果として、ほとんど存在しないが、存在するなら、加ピロリン酸分解又は重合が生体触媒及び PP_i の存在下でされ生じ、ほとんど存在しないが、存在するなら、プライマー伸長が起こる。PAP - 関連工程の多くの他の変法がまた、本明細書に記載される加ピロリン酸分解活性化性オリゴヌクレオチドと共に利用され得る。それらのいくつかの追加の代表的な例示がさらい下記に記載される。

【0080】

種々の方法とは別に、本発明はまた、加ピロリン酸分解活性化性オリゴヌクレオチドを含む反応混合物、及び関連する系も提供する。本発明のそれらの及び多くの他の特徴が下記に記載される(実施例においても包含する)。

【0081】

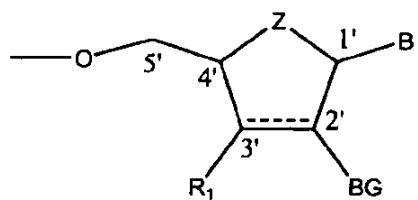
III. 2' - 終止ヌクレオチド :

本発明は、2' - 終止ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド(すなわち、2' - 終止遮断オリゴヌクレオチド)の使用を包含する、方法、反応混合物、系及び他の態様に関する。オリゴヌクレオチド合成及び関連する核酸合成試薬がさらに下記に記載されている。例を挙げると、本発明の種々の態様に使用されるヌクレオチドは通常、無傷の糖環の 3' - 位置でヒドロキシル基、及び糖成分の 2' - 位置でプロッキング基(例えば負に荷電されたプロッキング基、粗大プロッキング基及び / 等)を含む。本明細書に記載される一定の生体触媒は、錆型指示された態様で、それらの 2' - 終止ヌクレオチドによるプライマー核酸の伸長能力を包含する。プライマー核酸の 3' 末端での 2' - 終止ヌクレオチドの導入に基づいて、核酸は通常、生体触媒により非伸長性にされる。さらに、いくつかの生体触媒は、例えば加ピロリン酸分解を通してオリゴヌクレオチドから 2' - 終止ヌクレオチドを除去する能力を含む。2' - 終止ヌクレオチド、2' - 終止遮断オリゴヌクレオチド、合成及び / 又は関連する生体触媒に関する追加の詳細は、例えば 2006 年 10 月 18 日に Bauer 等により出願された、“MUTANT DNA POLYMERASES AND RELATED METHODS”、米国特許出願番号第 60 / 852882 号、2004 年 6 月 29 日に Bodepudi 等により出願された、“SYNTHESIS AND COMPOSITIONS OF NUCLEIC ACIDS COMPRISING 2' - TERMINATOR NUCLEOSIDES”、国際出願番号第 WO 2005 / 026184 号、2004 年 6 月 28 日に Gelfand 等により出願された、“2' - TERMINATOR NUCLEOTIDE-RELATED METHODS AND SYSTEMS”、米国特許出願番号第 10 / 879,493 号及び 2004 年 6 月 28 日に Bodepudi 等により出願された、“Synthesis and compositions of 2'-terminator nucleotides”、米国特許出願番号第 10 / 879,494 号にも記載される。

【0082】

本発明の方法及び他の態様に使用される 2' - 終止ヌクレオチドは、下記式：

【化3】



[式中、R₁は、H、OH、親水性基又は疎水性基であり；Bは、少なくとも1の単素環式環、少なくとも1の複素環式環（外部環ヘテロ原子を有するか又は有さない）、少なくとも1のアリール基又はそれらの組合せであり；BGは、ブロッキング基であり；ZはO又はCH₂であり；

【化3a】

は、単又は二重結合を表す]を包含する。ある態様によれば、それらのヌクレオシド及びヌクレオチドは標識される。さらに、それらの2'-終止ヌクレオチドは通常、5'-位置で結合される1、2、3又はそれ以上のリン酸基を含んでなる。一態様においては、例えば2'-終止ヌクレオチドは、2'-リン酸-3'-ヒドロキシリル-5'-三リン酸ヌクレオシドを含んでなる。

【0083】

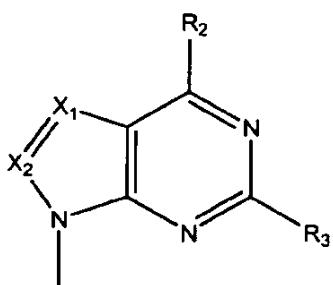
図2A-Dは、2'-終止ヌクレオチドの一定の態様を図示する。特に、図2Aは、アデノシン四リン酸終止ヌクレオチドを図示する。図2Bは、グアノシン四リン酸終止ヌクレオチドを図示する。図2Cは、ウリジン四リン酸終止ヌクレオチドを図示し、図2Dは、シチジン四リン酸終止ヌクレオチドを図示する。

【0084】

A：塩基：

水素結合又は塩基スタッキング機構を通して、別の核酸と塩基対合することができる実質的にいずれかの複素環式環又はアリール基（すなわち、塩基又はB基として）が任意には、2'-終止ヌクレオシド又はヌクレオチドの糖成分の1'位置で含まれる。従って、使用する可能性ある基のすべてを本明細書に記載することはそまお。しかし、特定の代表的B基を例示のために下記に提供する。ある態様によれば、例えばBは、下記式：

【化4】



[式中、X₁及びX₂は、CR₈及びNから独立して選択され；R₂は、H、OH又はR₄R₅であり；R₃は、H、OH又はNR₆R₇であり；R₄、R₅、R₆及びR₇は、H、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基、アリールオキシ基及びそれらの組合せから独立して選択され；R₈は、H、ハロ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ア

10

20

30

40

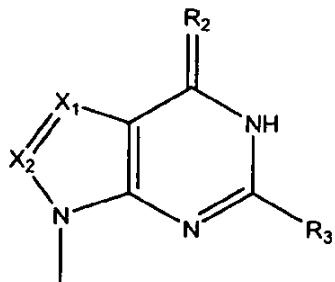
50

ルキルアミン基、アルケニルアミン基、アルキニルアミン基、アルキルアルコール基、アルケニルアルコール基、アルキニルアルコール基、置換されていないポリエチレングリコール又は置換されたポリエチレングリコールである]を包含する。

【0085】

他の態様においては、Bは、下記式：

【化5】



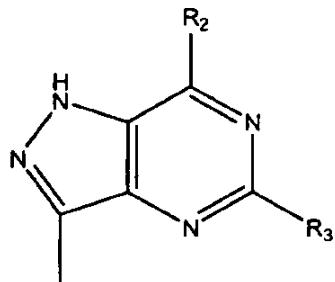
10

[式中、X₁及びX₂は、C H及びNから独立して選択され；R₂は、O又はSであり；R₃は、H、OH又はNR₄R₅であり；R₄及びR₅は、H、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基、及びそれらの組合せから独立して選択される]を包含する。

【0086】

ある態様によれば、Bは、下記式：

【化6】



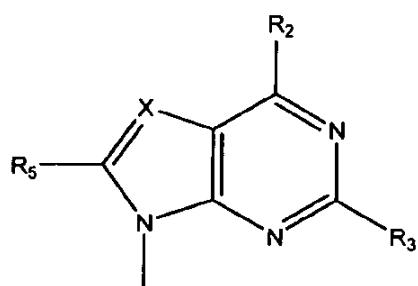
20

[式中、R₂は、H、OH又はNR₄R₅であり；R₃は、H、OH又はNR₆R₇であり；R₄、R₅、R₆及びR₇は、H、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ベンジル基、アリール基、及びそれらの組合せから独立して選択される]を包含する。

【0087】

ある態様によれば、Bは、下記式：

【化7】



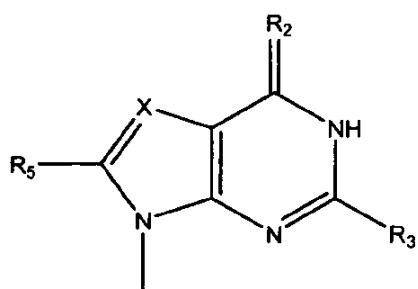
30

[式中、XはCH又はNであり；R₂及びR₃は、H、OH及びNHR₄から独立して選択され；R₄は、H、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基又はそれらの組合せであり；R₅は、OH、NH₂、SH、ハロ基、エーテル基、チオエーテル基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルアミン基、アルケニルアミン基、アルキニルアミン基又はそれらの組合せである]を包含する。

【0088】

他の態様においては、Bは、下記式：

【化8】



10

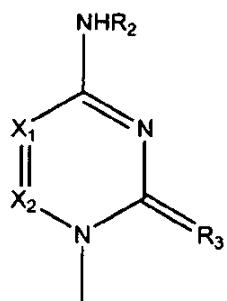
[式中、Xは、CH又はNであり；R₂は、O又はSであり；R₃は、H、OH又はNHR₄であり；R₄は、H、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基又はそれらの組合せであり；R₅は、OH、NH₂、SH、ハロ基、エーテル基、チオエーテル基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルアミン基、アルケニルアミン基、アルキニルアミン基又はそれらの組合せである]を包含する。

20

【0089】

ある態様によれば、Bは、下記式：

【化9】



30

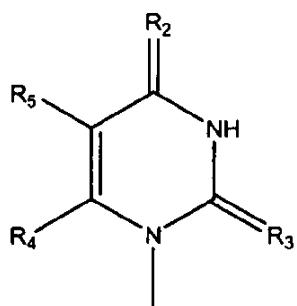
[式中、X₁及びX₂は、CH及びNから独立して選択され；R₂は、H、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基、アリールオキシ基及びそれらの組合せから独立して選択される；R₃は、O又はSである]を包含する。

40

【0090】

他の態様においては、Bは、下記式：

【化10】



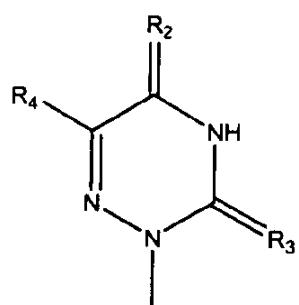
10

[式中、R₂及びR₃は、O及びSから独立して選択され；R₄及びR₅は、H、NH₂、SH、OH、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基、アリールオキシ基、アルコキシ基、ハロ基及びそれらの組合せから独立して選択される]を包含する。

【0091】

ある態様によれば、Bは、下記式：

【化11】



20

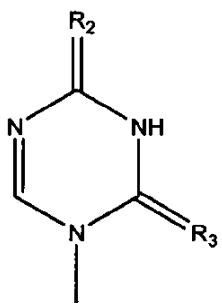
[式中、R₂及びR₃は、O及びSから独立して選択され；R₄及びR₅は、H、NH₂、SH、OH、アルキル基、アルケニル基、ベンジル基、アリール基、アリールオキシ基、アルコキシ基、ハロ基及びそれらの組合せから独立して選択される]を包含する。

30

【0092】

他の態様においては、Bは、下記式：

【化12】



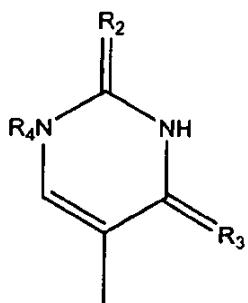
40

[式中、R₂及びR₃は、O及びSから独立して選択される]を包含する。

【0093】

ある態様によれば、Bは、下記式：

【化13】



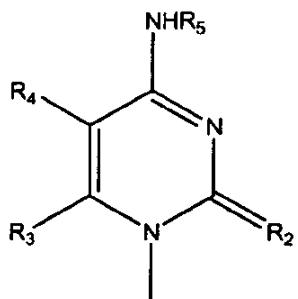
10

[式中、R₂及びR₃は、O及びSから独立して選択され；R₄は、H、アルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である]を包含する。

【0094】

他の態様においては、Bは、下記式：

【化14】



20

[式中、R₂は、O又はSであり；R₃及びR₄は、H、NH₂、SH、OH、COOH、COOCH₃、COOCH₂CH₃、CHO、NO₂、CN、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、ベンジル基、アリール基、アリールオキシ基、アルコキシ基、ハロ基及びそれらの組合せから独立して選択され；R₅は、アルキル基、アルケニル基、アリール基、ベンジル基又はそれらの組合せである]を包含する。

30

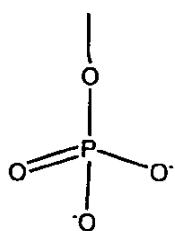
【0095】

B：プロッキング基：

糖成分の2'位置で使用されるプロッキング基(BG)はまた、種々の態様を包含する。ある態様によれば、例えばBGは、負に荷電された基及び/又はバルキング基である。さらに例を挙げると、BGは任意には、例えばCN、NO₂、N₃、ハロ基、エーテル基、アルキルエーテル基、アリールエーテル基、アルデヒド基、カルボン酸基、エステル基、アミノ基、OCH₃、OCH₂COOH、O-シリルエーテル基、ケト基、O-ラクトン基、O-アルキル基、O-環状アルキル基、O-アルケニル基、O-アルキニル基、カルバメート基、イミド基、アミド基、及びそれらの組合せから選択される。より具体的には、BGは任意には、下記式：

40

【化15】



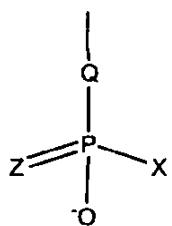
10

を含んでなる。

【0096】

他の態様においては、BGは、下記式：

【化16】



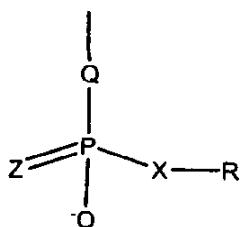
20

[式中、Qは、O、S又はNHであり；Xは、H、OH、CH₃、BH₃、F又はSeHであり；

Zは、O、S又はSeである]を含んでなる。図2Bは、この式を有するプロッキング基を含んでなる1つのヌクレオチドを図示する。さらに例を挙げると、BGは任意には、下記式：

【化17】

30

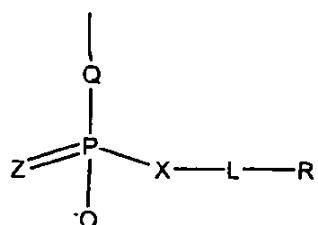


[式中、Qは、O、S又はNHであり；Xは、O、S又はNHであり；Zは、O、S又はSeであり；Rは、アルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である]を含んでなる。

図2Aは、この式を有するプロッキング基を含んでなる1つの2'-終止ヌクレオチドを図示する。別の実施態様の例においては、BGは、下記式：

40

【化18】



10

[式中、Qは、O、S又はNHであり；Xは、O、S又はNHであり；Zは、O、S又はSeであり；Lは、-CONH(CH₂)_nNH-、-CO(CH₂)_nNH-又は-CO(NH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂NH-であり；nは、0以上の整数であり；Rは、NH₂、SH、COOH、消光剤成分、レポーター成分、ビオチン又は親和性成分である]を含んでなる。

【0097】

IV：2' - 終止ヌクレオシド及びヌクレオチドの合成：

本明細書に記載のようにして使用されるオリゴヌクレオチドに包含される2' - 終止ヌクレオシド及びヌクレオチドは、種々の方法を用いて合成され得る。例えば、標識された非伸長性ヌクレオチドの1つの生成方法は、ヌクレオシド（例えばリボヌクレオシド、カルボン酸ヌクレオシド等）の糖成分の5' - 位置に少なくとも1のリン酸基を結合し、前記ヌクレオシドの糖成分の2' - 位置に少なくとも1のブロッキング基を結合することを包含する。この方法に使用されるヌクレオシドに任意には包含される典型的なブロッキング基及び塩基は、本明細書に記載される。この方法はまた、ヌクレオシドの糖成分、ブロッキング基及び/又は塩基に少なくとも1の標識を結合することを包含する。適切な標識がさらに下記に記載される。

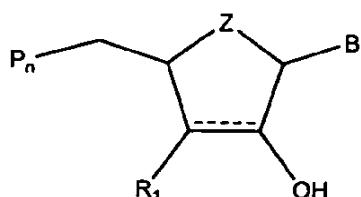
20

【0098】

さらに例を挙げると、任意に使用される2' - リン酸ヌクレオシドの1つの生成方法は、下記式：

【化19】

30



[式中、Pは、少なくとも1のリン酸基であり；nは、0以上の整数であり；R₁は、H、OH、親水性基、又は疎水性基であり；Bは少なくとも1の単素環式環、少なくとも1の複素環式環、少なくとも1のアリール基、又はそれらの組み合わせであり；Zは、O又はCH₂であり；

40

【化19a】

=====

は单又は二重結合を表す]で表されるヌクレオチドと、三ナトリウム三メタリン酸塩(Na₃PO₃)₃とを、2' - リン酸ヌクレオシドを生成するために効果的な条件下で反応す

50

ることを包含する。ある態様によれば、例えばヌクレオチドは、2個のリン酸基を含んでなり、他方では、ヌクレオチドは3個又はそれ以上のリン酸基を含んでなる。ヌクレオチドを生成するための効果的条件は通常、アルカリ性pHでの溶液において反応を実施することを包含する。例えば、合成は通常、約8.0以上のpHで、より典型的には約10.0以上のpHで及びさらにより典型的には約12.0以上のpHで(例えば約12.5、13.0、13.5又は14.0で)、実施される。種々の塩基性化合物、例えば当業界において広く知られている多くの化合物の中でKOH及びNaOHが、反応混合物のpHを調節するために使用され得る。ヌクレオチドは通常、制限試薬である。他の温度条件が任意には使用されるが、それらの合成反応は通常、室温で又は室温近くで(すなわち、約20~約30、例えば約23、24、25、26、等で)、実施される。さらに、それらの反応は通常、少なくとも約4時間、通常少なくとも約6時間、及びさらにより典型的には少なくとも約16時間、進行される。

【0099】

さらに、種々の位置特異的又は少なくとも位置選択的合成路がまた、完全に排除されない場合、産物の精製が一般的に最小化されるよう、使用され得る。それらの合成路は通常、糖成分の3'-位置で種々の保護基(例えばTBDMS、SiR、TOM、BOC等)の使用を包含する。2'-終止ヌクレオチドの合成、例えば位置特異的合成路がまた、例えばBodepudi等により、2004年6月28日付出願、“Synthesis and compositions of 2'-terminator nucleotides”、米国特許出願番号10/879,494号にも記載されている。

【0100】

本発明の合成プロトコールへの使用のために適合され得る種々の合成技法は一般的に知られており、例えば、March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc. (1992)、及び、Carey and Sundberg, Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanism, 4th Ed., Plenum Press (2000)に記載されている。本発明のヌクレオチドの合成において有用な化学出発材料及び他の反応成分は、種々の商業的供給者、例えばSigma-Aldrich, Inc. (St Louis, MO)から容易に入手できる。

【0101】

V: 2'-終止ヌクレオチドを含んでなるブロックされた核酸の合成:

2'-終止ヌクレオシドを含む遮断オリゴヌクレオチドの合成は、種々のタイプの核酸合成試薬を用いて達成され得る。例を挙げると、オリゴヌクレオチドは、例えばヌクレオチド導入生体触媒(例えばDNAポリメラーゼ、リガーゼ等)を用いて、酵素的に、又は例えばホスホラミジット方法又は亞リン酸トリエステル方法を用いて、化学合成により、合成され得る(Herdewijn, Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Humana Press (2005), Gait (Ed.), Oligonucleotide Synthesis, Oxford University Press (1984), Vorbrugge et al., Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, Inc. (2001)、及びHermanson, Bioconjugate Techniques, Elsevier Science (1996))。標識が、標識されたヌクレオシド三リン酸モノマー(例えば標識された伸長可能ヌクレオチド、標識された2'-終止ヌクレオチド等)を用いて、酵素合成の間、導入され得るか、又は標識された非ヌクレオチド又はヌクレオチドホスホラミジットを用いて、化学合成の間、導入され得るか、又は合成に続いて導入され得る。2'-終止遮断オリゴヌクレオチドの合成はまた、例えばBodepudi等により、2004年6月29日付出願、“SYNTHESIS AND COMPOSITIONS OF NUCLEIC ACIDS COMPRISING 2'-TERMINATOR NUCLEOSIDES”、国際出願番号WO2005/026184号にも記載されている。遮断オリゴヌクレオチドの合成は、下記例においても、さらに記載されている。

【0102】

標識されたオリゴヌクレオチドを酵素的に合成するための典型的な方法は、鋳型又は標的核酸の変性及び鋳型へのプライマー対のアニーリングを包含する。ある態様によれば、デオキシヌクレオシド三リン酸(例えばdGTP、dTTP、dATP、dCTP及びdCTP)の

10

20

40

50

混合物が、デオキシヌクレオチドの1つの少なくとも一部が、本明細書に記載のようにして標識されている反応混合物に添加される。次に、ヌクレオチド導入触媒、例えばDNAポリメラーゼ酵素が通常、酵素が活性的である条件下で反応混合物に添加される。標識されたオリゴヌクレオチドは、ポリメラーゼ鎖合成の間、標識されたデオキシヌクレオチドの導入により形成される。この方法に使用されるDNAポリメラーゼは一般的に熱安定性であり、反応温度は通常、変性温度と伸長温度との間で循環され、PCRによる標的核酸の標識された相補鎖の合成がもたらされる(Edwards et al. (Eds.), Real-Time PCR: An Essential Guide, Horizon Scientific Press (2004), Innis et al. (Eds.), PCR Strategies, Elsevier Science & Technology Books (1995), and Innis et al. (Eds.), PCR Protocols, Academic Press (1990))。その後、所望するアンプリコンが、当業者に知られている種々の精製技法を用いて、反応混合物の他の成分から分離される。次に、アンプリコンが変性され、2'-終止ヌクレオチドが所望する遮断オリゴヌクレオチドを生成するために各アンプリコン鎖の3'末端で組込まれる条件下で、鑄型核酸にアニーリングされる。他方では、2'-終止ヌクレオシドを含んでなるオリゴヌクレオチド(酵素的に又は化学的に合成された)が、アンプリコン鎖に連結され、所望する遮断オリゴヌクレオチドが精製される。遮断オリゴヌクレオチド合成へのそれらの酵素的アプローチの他の変法は、当業者に明らかであろう。

【0103】

化学合成を用いて製造された、遮断オリゴヌクレオチドは通常、他のアプローチがまた任意には使用されるが、ホスホラミジット方法を用いて生成される。ホスホラミジットに基づく合成は、通常、固体支持体に結合される増殖するオリゴヌクレオチド鎖により実施され、その結果、液体相に存在する過剰の試薬は濾過により容易に除去され得る。これは、循環間の他の精製段階の必要性を排除する。

【0104】

ホスホラミジット方法を使用する典型的な固相オリゴヌクレオチド合成循環を手短に記載すると、保護されたヌクレオチドモノマーを含む固体支持体が通常最初、酸(例えばトリクロロ酢酸)により処理され、5'-ヒドロキシリ保護基が除去され、続くカップリング反応のためのヒドロキシリが放出される。次に、活性化された中間体が通常、保護されたホスホラミジットヌクレオシドモノマー及び弱酸(例えばテトラゾール)を、反応に同時に添加することにより、形成される、弱酸は、ホスホラミジットの窒素を陽性化し、反応性中間体を形成する。成長する核酸鎖へのヌクレオシド付加は通常、30秒以内で完結される。その後、キャッピング段階が通常行われ、ヌクレオシド付加を受けなかついたいずれかのオリゴヌクレオチド鎖が終結される。キャッピングは、例えば無水酢酸、1-メチルイミダゾール等により実施され得る。次に、ヌクレオチドの間連鎖が、亜リン酸塩から、より安定したホスホトリエステルに、例えば酸化剤としてヨウ素及び酸素ドナーとして水を用いての酸化により転換される。酸化に続いて、ヒドロキシリ保護基は通常、プロトン性酸(例えばトリクロロ酢酸又はジクロロ酢酸)により除去され、循環は、鎖核張が完結するまで、反復される。合成の後、合成されたオリゴヌクレオチドは通常、塩基、例えば水酸化アンモニウム又はt-ブチルアミンを用いて、固体支持体から分解される。分解反応はまた、いずれかのリン酸保護基(例えばシアノエチル)を除去する。最終的に、塩基の環外アミン上の保護基及びラベリング成分上のヒドロキシリ保護基が、高温(例えば約55までの)での塩基性条件下でのオリゴヌクレオチド溶液の処理により除去される。

ホスホラミジット方法によりオリゴヌクレオチドを形成するために使用される化学の説明はまた、例えば1984年7月3日付発行、“Process for preparing polynucleotides”、米国特許第4,458,066号(Caruthers等)及び1983年11月15日付発行、“Phosphoramidite compounds and processes”、米国特許第4,415,732号(Caruthers等)にも提供されている。

【0105】

ホスホラミジットヌクレオシドモノマーのいずれかが、所望により標識され得る。ある態様によれば、オリゴヌクレオチドの5'末端が標識される予定である場合、標識された

非ヌクレオチドホスホラミジットが、最終縮合段階の間、使用され得る。オリゴヌクレオチドの内部位置が標識される予定である場合、標識されたヌクレオチドホスホラミジットが、縮合段階のいずれかの間、使用され得る。さらに、合成に続いて、オリゴヌクレオチドがまた、実質的に多くの位置で標識され得る (Eckstein et al. (Eds.), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992), Chu et al. (1983) "Derivatization of unprotected polynucleotides"、Nucleic Acids Res. 11(18): 6513-6529、及び 1992 年 6 月 2 日付発行 "Oligonucleotides possessing a primary amino group in the terminal nucleotide"、米国特許第 5,118,800 号 (Smith 等))。さらに例を挙げると、オリゴヌクレオチドはまた、それらのホスホジエステル主鎖上で (Eckstein 等, (1992), 前記), 又は 3' 末端でも標識され得る (Eckstein et al. (1992), supra) or at the 3'-terminus (Nelson et al. (1992) "Oligonucleotide labeling methods. 3. Direct labeling of oligonucleotides employing a novel, non-nucleosidic, 2-aminobutyl-1,3-propanediol backbone"、Nucleic Acids Res. 20(23):6253-6259、1995 年 3 月 28 日付発行、"Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide synthesis"、米国特許第 5,401,837 号 (Nelson 等)、及び 1992 年 8 月 25 日付発行、"Oligonucleotides possessing a primary amino group in the terminal nucleotide"、米国特許第 5,141,813 号 (Smith 等))。

〔 0 1 0 6 〕

ある態様によれば、修飾されたヌクレオチドは、本明細書に記載される遮断オリゴヌクレオチドに含まれる。例を挙げると、オリゴヌクレオチド配列中への修飾されたヌクレオチド置換の導入は、例えば所望により、オリゴヌクレオチドの溶融温度を変更することができる。ある態様によれば、これは、標的核酸と特定のオリゴヌクレオチドとの間の配列における1又は2以上のミスマッチの存在下でさえ、対応する修飾されていないオリゴヌクレオチドに関して高い感度を生成することができる。オリゴヌクレオチドにおいて置換されるか又は付加され得る典型的な修飾されたヌクレオチドは、例えばC 5 - エチル - d C、C 5 - メチル d C、C 5 - エチル - d U、2', 6 - ジアミノブリン、C 5 - プロピニル - d C、C 7 - プロピニル - d A、C 7 - プロピニル - d G、C 5 - プロパルギルアミノ - d C、C 5 - プロパルギルアミノ - d U、C 7 - プロパルギルアミノ - d A、C 7 - プロパルギルアミノ - d G、7 - デアザ - 2 - デオキシキサントシン、ピラゾロピリミジン類似体、疑似 - d U、ニトロピロール、ニトロインドール、2' - O - メチルリボ - U、2' - O - メチルリボ - C、8 - アザ - d A、8 - アザ - d G、7 - デアザ - d A、7 - デアザ - d G、N 4 - エチル - d C、及びN 6 - メチル d Aを包含する。さらに例を挙げると、修飾されたオリゴヌクレオチドの他の例は、1又は2以上のLNA(商標)モノマーを有するそれらを包含する。ヌクレオチド類似体、例えばそれらはまた、例えば2003年10月28日付発行、“Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides”、米国特許第6,639,059号(Kochkine等)、2001年10月16日付発行、“One step sample preparation and detection of nucleic acids in complex biological samples”、米国特許第6,303,315号(Skoulios等)、及びKochkine等により2003年5月15日公開の“Synthesis of [2.2.1]bicyclo nucleosides”、米国特許出願公開番号第2003/0092905号にも記載されている。LNA(商標)モノマーを含んでなるオリゴヌクレオチドは例えば、Exiqon A/S (Vedbaek, DK)を通して市販されている。追加のオリゴヌクレオチド修飾は、上記に提供される定義下に言及されている。

〔 0 1 0 7 〕

本明細書に記載されるようにして使用されるオリゴヌクレオチド（例えばプライマー、プローブ等）は、当業者に知られているいずれかのアプローチを実質的に用いて企画され得る。例を挙げると、オリゴヌクレオチドの企画への使用のために任意には適合される技法の例は、例えばChen等(2003) “Primer Design Assistant (PDA): a web-based primer design tool” Nucleic Acids Res. 31(13):3751-3754、Miura et al. (2005) “A novel strategy to design highly specific PCR primers based on the stability and unique sequence of the target DNA” Nucleic Acids Res. 33(13):e135 50

ueness of 3'-end subsequences" Bioinformatics 21(24):4363 - 4370、Hyyro et al. (2005) "Genome-wide selection of unique and valid oligonucleotides" Nucleic Acids Res. 33(13):e115、及び、Weckx et al. (2005) "SNPbox: a modular software package for large-scale primer design" Bioinformatics 21(3): 385 - 387に記載されている。

【0108】

VI：ラベリング：

本明細書に記載のオリゴヌクレオチド（例えばプライマー、プローブ等）は任意には、例えば続く検出を促進するために標識される。ある態様によれば、核酸合成試薬（例えば2' - 終止ヌクレオチドのホスホラミジット前駆体、他のヌクレオチドのホスホラミジット前駆体等）は、オリゴヌクレオチドの合成の前、標識される。例えば、標識は、例えばアミド、エステル、チオエステル、エーテル、チオエーテル、炭素 - 炭素、又は他のタイプの共有結合を通して、例えば単素環式環、複素環式環、又は2' - 終止ヌクレオチド又は他のヌクレオチドのアリール基に（ピリミジンのC⁵、シチジンのN⁴、プリンのN⁷、アデノシンのN⁶、プリンのC⁸、又は当業界において知られている別の結合部位を通して）、結合される。さらに、又は他方では、標識は、2' - 終止ヌクレオチド又は他のヌクレオチド（例えばd NTP等）の糖成分（例えばリボース糖等）、又はその類似体（例えば炭素環式環等）、及び／又は2' - 終止ヌクレオチド又は他のヌクレオチドのリン酸基に、例えばアミド、エステル、チオエステル、エーテル、チオエーテル、炭素 - 炭素、又は他の結合である共有結合により結合される。共有結合は通常、標識の求電子基及び求核基とヌクレオチドとの間での反応において形成される。確かな態様においては、標識及びヌクレオチドは、お互い直接的に結合される（例えば単、二重、三重又は芳香族炭素 - 炭素結合、又は炭素 - 窒素結合、窒素 - 窒素結合、炭素 - 酸素結合、炭素 - 硫黄結合、リン - 酸素結合、リン - 窒素結合、等を通して）。任意には、リンカーは標識を2' - 終止ヌクレオチド又は他のヌクレオチドに結合せしめる。広範囲の種類のリンカーが、標識及びヌクレオチドの結合への使用のために使用されるか、又は適合され得る。本明細書に言及されるようなリンカーは、非制限的な例示である。

【0109】

実質的にいずれかの標識が任意には、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドに使用されるヌクレオチド及びヌクレオシドを標識するために使用される。ある態様によれば、例えば標識は、蛍光色素、例えば、ローダミン色素（例えばR6G、R110、TAMRA、ROX等）、フルオレセイン色素（例えばJOE、VIC、TET、HEX、FAM等）、ハロフルオレセイン色素、シアニン色素（例えばCY3、CY3.5、CY5、CY5.5等）、BODIPY（登録商標）色素（例えばFL、530/550、TR、TMR等）、ALEXAFLUO（登録商標）色素（例えば488、532、546、568、594、555、653、647、660、680等）、ジクロロローダミン色素、エネルギー移行色素（例えばBIGDYE（商標）v1色素、BIGDYE（商標）v2色素、BIGDYE（商標）v3色素等）、Lucifer色素（例えばLuciferイエロー等）、CASCADE BLUE（登録商標）、Oregon Green等を含んでなる。蛍光色素に関する追加の詳細は、例えばHaugland、Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Ed. (2003)及びそこにおける最初データに提供される。蛍光色素は通常、種々の商業的供給者、例えばMolecular Probes, Inc. (Eugene, OR), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ), Applied Biosystems (Foster City, CA)、等から容易に入手できる。他の標識は、例えばビオチン、弱い蛍光標識(Yin等, (2003) Appl Environ Microbiol. 69(7): 3938, Bayendure等, (2003) Anal. Biochem. 317(1) 及びJankowiak等, (2003) Chem Res Toxicol. 16(3): 304)、非蛍光標識、非色標識、化学ルミネセント標識(Wilson等, (2003) Analyst. 128(5): 480 及びRoda等, (2003) Luminescence 18(2): 72)、Raman標識、電子化学標識、生物ルミネセント標識(Kitayama等, (2003) Photochem Photobiol. 77(3): 333, Arakawa等, (2003) Anal. Biochem. 314(2): 206, 及びMaeda (2003) J. Pharm. Biomed. Anal. 30(6): 1725)、非蛍光ドナー成分(Will等により2007年4月1

2日公開の“NON-FLUORESCENT ENERGY TRANSFER”、国際出願番号WO 2007 / 039301号に記載される)、及び例えば、2002年11月22日付出願米国仮特許出願第60 / 428,484号に記載されるような -メチル-PEGラベリング試薬を包含する(前記引例は、本明細書に組み込まれる)。

【0110】

確かな態様においては、標識は、放射性同位体、例えば³H、¹⁴C、²²Na、³²P、³³P、³⁵S、⁴²K、⁴⁵Ca、⁵⁹Fe、¹²⁵I、²⁰³Hg、等を含んでなる。さらなる例示によれば、標識はまた任意には、少なくとも1の質量修飾基を包含する。例えば、質量修飾基は任意には例えば重水素、F、Cl、Br、I、S、N₃、XY、CH₃、SPO₄、BH₃、SiY₃、Si(CH₃)₃、Si(CH₃)₂(C₂H₅)、Si(CH₃)(C₂H₅)₂、Si(C₂H₅)₃、(CH₂)_nCH₃、(CH₂)_nNY₂、CH₂CONY₂、(CH₂)_nO₁₀、CH₂F、CHF₂、CF₃及びホスホロチオエート基から選択され、ここでXは、O、NH、NY、S、NHC(S)、OCO(CH)_nCOO、NHCO(CH₂)_nCOO、OSO₂O、OCO(CH₂)_n、NHC(S)NH、OCO(CH₂)_nS、OCO(CH₂)S、NC₄O₂H₂S、OP(O-アルキル)、又はOP(O-アルキル)であり; nは1~20の整数であり; Yは、H、重水素、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、ポリオキシメチレン基、モノアルキル化されたポリオキシメチレン基、ポリエチレンイミン基、ポリアミド基、ポリエステル基、アルキル化されたシリル基、ヘテロオリゴ、ポリアミノ酸、ヘテロオリゴ/ポリアミノ酸基、又はポリエチレングリコール基である。核酸ラベリング及び配列分析に関する追加の詳細は、例えばSterky等、(2000)“Sequence analysis of genes and genomes”、J. Biotech. 76 (2000):1, Sensen (Ed.) Biotechnology, Volume5B, Genomics and Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc. (2001), 及びSensen (Ed.) Essentials of Genomics and Bioinformatics John Wiley & Sons, Inc. (2002)に提供される。₂₀

【0111】

多くの種類のリンカーが、核酸に標識を結合するために入手でき、当業者に明らかであろう。リンカーは通常、核酸中への導入のために立体的及び電子的に適切である構造のものである。リンカーは任意には、例えばエーテル、チオエーテル、カルボキサミド、スルホンアミド、ウレア、ウレタン、ヒドラジン又は他の成分を包含する。さらなる例示によれば、リンカーは通常、C、N、O、P、Si、S、等から選択される、約1~約25個の非水素原子を包含し、例えばエーテル、チオエーテル、アミン、エステル、カルボキサミド、スルホンアミド、ヒドラジド結合、及び芳香族又は複素芳香族結合のいずれかの組合せを実質的に含んでなる。ある態様によれば、例えばリンカーは、単一の炭素-炭素結合、及びカルボキサミド又はチオエーテル結合の組合せを含んでなる。リンカーのより長い線状セグメントが任意には使用されるが、最長の線状セグメントは通常、1又は2以上のヘテロ原子を包含する、約3~約15個の非水素原子を含む。₃₀

【0112】

リンカー成分の非制限的例は、置換された(例えば官能化された)又は置換されていない基、例えばイミダゾール/ビオチンリンカー、ポリメチレン基、アリーレン基、アルキルアリーレン基、アリーレンアルキル基、アリールチオ基、アミドアルキル基、アルキニルアルキル基、アルケニルアルキル基、アルキル基、アルコキシル基、チオ基、アミノアルキル基、モルホリン誘導されたホスフェート、ペプチド核酸(例えばN-(2-アミノエチル)グリシン等)等を包含する。それらの及び他のリンカーは、例えば米国特許第6,339,392号(Haugland等)、米国特許第5,047,519号(Hobbs, Jr.等)、米国特許第4,711,958号(Iizuka等)、米国特許第5,175,269号(Stavrianopoulos)、米国特許第4,711,955号(Ward等)、米国特許第5,241,060号(Engelhardt等)、米国特許第5,328,824号(Ward等)、及び米国特許出願番号2002/0151711号(Khan等による)に記載されている。核酸ラベリング及びリンカーに関する追加の詳細は、例えばHermanson, Bioconjugate Techniques, Elsevier Science (1996)に提供される。確かな態様においては、適切なリンカーは、光分₄₀₅₀

解性成分、例えば2-ニトロベンジル成分、置換2-ニトロベンジル成分(たとえば、1-(2-ニトロフェニル)エチル成分)、3,5-ジメトキシベンジル成分、チオヒドロキサム酸、7-ニトロインドリン成分、9-フェニルキサンチル成分、ベンゾイン成分、ヒドロキシフェナシル成分、NHS-ASA成分等を含んでなる。光分解性リンカーは、例えばOlejnik等による米国特許公開番号2003/0099972号にさらに記載される。ある態様によれば、リンカーは金属、例えば白金原子を包含する。それらはさらに、例えばHouthoff等による米国特許第5,714,327号に記載される。種々の長さの多くのリンカーは、種々の供給者、例えばQiagen-Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA, USA), BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA)及び Molecular BioSciences (Boulder, CO, USA)から市販されている。

10

【0113】

VII: 反応混合物:

本発明はまた、特に、核酸から2'-終止ヌクレオチドを除去し、ヌクレオチドを重合し、/又は核酸を増幅することが所望される広範囲の種類の用途に使用され得る多くの異なった反応混合物を提供する。ある態様によれば、例えば反応混合物は、均質増幅/検出アッセイ(例えば同時PCRモニターリング)の実施に、又は突然変異の検出又は核酸の遺伝子型決定に使用される。ある態様によれば、複数のプライマー及び/又はプローブが、多重型を包含する用途への使用のために反応混合物と一緒にプールされる。それらの用途の多くは、さらに下記に記載されるか、又は他方では、本明細書に言及される。

【0114】

本明細書に記載される遮断オリゴヌクレオチドの他に、反応混合物はまた通常、それらのオリゴヌクレオチドからの2'-ヌクレオチド除去(例えば活性化された又は伸長可能オリゴヌクレオチドを生成するために)、ヌクレオチド重合、核酸増幅及び検出反応(例えば同時PCRモニターリング又は5'-ヌクレアーゼアッセイ)、並びに同様のことの実施において有用である種々の試薬を含む。典型的なタイプのそれらの他の試薬は、例えば鋳型又は標的核酸(例えば実質的にいざれかの源から得られるか又はそれから誘導された)、ピロリン酸、発光修飾因子、生体触媒(例えばDNAポリメラーゼ等)、緩衝液、塩、アンブリコン、グリセロール、金属イオン(例えばMg²⁺等)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ポリrA(例えば低コピー数の標的のためのキャリヤー核酸として)、ウラシルN-グリコシラーゼ(UNG)(例えばキャリーオーバー汚染に対して保護するために)を包含する。いくつかの動物PCR-関連の用途においては、反応混合物はまた、増幅産物の検出を促進するプローブも包含する。それらの工程に使用されるプローブの例は、例えばハイブリダイゼーションプローブ、5'-ヌクレアーゼプローブ、及び/又はヘアーピンプローブを包含する。核酸増幅及び検出、並びに他の方法もまた、さらに下記に記載されている。

20

【0115】

本明細書に言及される場合、ある態様によれば、種々の発光修飾因子が本発明の反応混合物に使用される。通常、発光修飾因子は、他の適用の中で、標識された核酸からの基礎又は残留発光を低めるために、標識されたオリゴヌクレオチド、例えばプライマー、5'-ヌクレアーゼプローブ、ハイブリダイゼーションプローブ、ヘアーピンプローブ等からの発光を変性できる可溶性核酸結合化合物である。ある態様によれば、例えばそれらの発光修飾因子は、種々のジアジン及びチアジン色素を包含する。発光修飾因子として使用され得る典型的なジアジン色素は、例えばアゾカルミン色素(例えばアゾカルミンA、アゾカルミンB(C₂₈H₁₇N₃O₉S₃Na₂)、アゾカルミンG(C₂₈H₁₈N₃O₆S₂Na)等)、フェナジン色素、オキサジン色素(例えばセレスチンブルー(C₁₇H₁₈C₁N₃O₄)等)、ジエチルサフラニンアゾジメチルアニリン塩酸塩(すなわち、ヤヌスグリーンB又はジアジングリーン5(C₃₀H₃₁N₆C₁))等を包含する。さらに例を挙げると、発光修飾因子として使用され得る典型的なチアジン色素は例えば、メチレンブルー(C₁₆H₁₈C₁N₃S)、メチレングリーン(C₁₆H₁₇C₁N₄O₂S)、チオニン(C₁₂H₁₀C₁N₃S)、sym-ジメチルチオニン、トルイジンブルーO(C₁₅H₁₆N₃SC₁)、新メチ

30

40

50

レンブルー ($C_{18}H_{22}ClN_3S$)、メチレンバイオレット berntsen、アズレA ($C_{14}H_{14}ClN_3S$)、アズレB ($C_{15}H_{16}ClN_3S$)、アズレC ($C_{13}H_{12}ClN_3S$)等を包含する。発光修飾因子はまた、Gupta等により2006年6月23日付
出願“LIGHT EMISSION MODIFIERS AND THEIR USES IN NUCLEIC ACID DETECTION, AMPLIFICATION AND ANALYSIS”、米国特許出願番号第11/474,062号にも記載されてい
る。

【0116】

反応混合物は通常、上記のような選択されるヌクレオチド、プライマー及び/又はプローブと、選択される特定の用途を行うために十分である量の他の試薬とを組合すことにより生成される。所与の反応混合物に含まれるべき試薬の量は、実施される選択される方法の態様から当業者に明らかであろう。しかしながら、例を挙げると、プライマー核酸及び伸長可能ヌクレオチド(例えば4種のdNTP(dGTP、dCTP、dATP、dTTP))はそれぞれ通常、それらの反応混合物において高いモル過剰で存在する。さらに、4種の伸長可能NTPのいずれかが、本明細書に記載される一定の酵素と共に使用され得る。適切な伸長可能及び/又は終止ヌクレオチドは、多くの異なった商業的供給者、例えばRoche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA)及びApplied Biosystems (Foster City, CA, USA)から容易に入手できる。
10

【0117】

本明細書に記載される遮断オリゴヌクレオチドは通常、次のものから選択される少なくとも1の生体触媒により非伸長性である: G46E E678G CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E L329A E678G CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E L329A D640G S671F CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E E678G CS6 DNA ポリメラーゼ、Z05R ポリメラーゼ、E615G Taq DNA ポリメラーゼ、サーマス・フラバス(*Thermus flavus*)ポリメラーゼ、TMA-25 ポリメラーゼ、E678G TMA-25 ポリメラーゼ、TMA-30 ポリメラーゼ、E678G TMA-30 ポリメラーゼ、Tth DNA ポリメラーゼ、サーマス種SPS-17 ポリメラーゼ、E615G Taq ポリメラーゼ、サーマスZ05R ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、コーンバーグ(Kornberg)DNA ポリメラーゼI、クレノウDNA ポリメラーゼ、Taq DNA ポリメラーゼ、ミクロコッカス(*Micrococcus l.*)DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ、逆転写酵素、AMV逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、E.コリRNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼ、T4 DNA ポリメラーゼ、T7 RNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼII、末端トランスクレーバー、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、リボヌクレオチド類似体-導入DNA ポリメラーゼ、リボヌクレオチド導入DNA ポリメラーゼ等。さらに、それらの生体触媒の多くは、加ピロリン酸分解活性を包含し、従って、核酸からヌクレオチドの除去を触媒することができる(例えばある態様によれば、遮断オリゴヌクレオチドからの2'-終止ヌクレオチドの除去)。一定のそれらの生体触媒の配列は、種々の源、例えばGenBank(登録商標)等から公的に入手できる。
20
30
40

【0118】

上記に示されるように、ある態様によれば、酵素は修飾される。典型的な修飾された酵素は、例えばG46E E678G CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E L329A E678G CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E L329A D640G S671F CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNA ポリメラーゼ、G46E E678G CS6 DNA ポリメラーゼ、E615G Taq DNA ポリメラーゼ等を包含する。それらの修飾された酵素は通常、リボヌクレオチドのその導入を増強し、リボヌクレオチドの2'-修飾された類似体(例えば2'-終止ヌクレオチド)の導入を増強し、/又は5'-3'エキソヌクレアーゼ

活性を低めるか又は排除する突然変異を含んでなる（1又は2以上のそれらの突然変異を欠いている酵素に比較して）。有用な生体触媒に関する追加の詳細はまた、次のものに提供される：Bauer等による2006年10月18日付出願“MUTANT DNA POLYMERASES AND RELATED METHODS”、米国特許第出願番号60/852882号；Gelfand等による1999年8月17日付発行“THERMOSTABLE DNA POLYMERASES HAVING REDUCED DISCRIMINATION AGAINST (登録商標) TRIBO-NTPS”、米国特許第5,939,292号；Gelfand等による1989年12月26日付発行“PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME”、米国特許第4,889,818号；Gelfand等の1994年12月20日付発行“DNA ENCODING A THERMOTABLE NUCLEIC ACID POLYMERASE ENZYME FROM THERMOTOGAMARITIMA”、米国特許第5,374,553号；Gelfand等の1995年5月30日付発行“MUTATED THERMOTABLE NUCLEIC ACID POLYMERASE ENZYME FROM THERMOTOGA MARITIMA”、米国特許第5,420,029号；Abramson等の1995年10月3日付発行“MUTATED THERMOTABLE NUCLEIC ACID POLYMERASE ENZYME FROM THERMUS SPECIESZ05”、米国特許第5,455,170号；Abramson等の1995年11月14日付発行“5' TO 3' EXONUCLEASE MUTATIONS OF THERMOTABLE DNA POLYMERASES”、米国特許第5,466,591号；Gelfand等の1997年4月8日付発行“RECOMBINANT EXPRESSION VECTORS AND PURIFICATION METHODS FOR THERMUS THERMOPHILUS DNA POLYMERASE”、米国特許第5,618,711号；Gelfand等の1997年4月29日付発行“PURIFIED THERMOTABLE NUCLEIC ACID POLYMERASE ENZYME FROM THE RMUS SPECIESZ05”、米国特許第5,674,738号；Gelfand等の1998年8月4日付発行“RECOMBINANT EXPRESSION VECTORS AND PURIFICATION METHODS FOR THERMUS THERMOPHILUS DNA POLYMERASE”、米国特許第5,789,224号；Abramson等の1998年8月18日付発行“5' to 3' EXONUCLEASE MUTATIONS OF THERMOTABLE DNA POLYMERASES”、米国特許第5,795,762号；Smith等の2002年1月31日に公開された“HIGH TEMPERATURE REVERSE TRANSCRIPTION USING MUTANT DNA POLYMERASES”、米国特許第出願公開番号2002/0012970号；Schoenbrunner等の2004年1月8日に公開された“Thermostable or thermoactive DNA polymerase molecules with attenuated 3'-5' exonuclease activity”、米国特許第出願公開番号2004/0005599号及び2003年3月26日付出願米国特許第出願公開番号10/401,403号。

【0119】

2' - 終止ヌクレオチド又は他の所望する性質を組込むための増強された効率を有する修飾された酵素の生成は、種々の方法、例えば特定部位の突然変異誘発により達成され得る。例えば、Sambrook等、前記を参照のこと。より具体的には、特定部位の突然変異誘発は通常、部位 - 特異的プライマー指図された突然変異誘発により達成される。この技法は通常、所望する突然変異誘発を表わす制限されたミスマッチを除く、突然変異誘発されるべき一本鎖ファージDNAに対して相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われ得る。手短に言及すれば、合成オリゴヌクレオチドは、プラスミド又はファージに対して相補的な鎖の合成を指図するためのアプライマーとして使用され、その得られる二本鎖DNAは、ファージ支持の宿主細胞中に形質転換される。得たれる細菌は、所望する突然変異誘発された遺伝子配列を持持するそれらのプラーカーを同定するために、例えばDNA配列分析又はプローブハイブリダイゼーションによりアッセイされ得る。さらなる例示によれば、核酸を修飾するための多くの他のアプローチ、例えば「組換えPCR」方法がまた利用され得る。

【0120】

本発明の態様の実施（例えば修飾された酵素の生成、增幅反応の実施等）においては、分子生物学及び組換えDNAにおける多くの従来の技法が任意には使用される。それらの技法は良く知られており、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, Volumes I, II, and III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning 50

: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames and Higgins); Transcription and Translation, 1984 (Hames and Higgins eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory);及びMethods in Enzymology Vol. 154 and Vol. 155 (それぞれ, Wu and Grossman, and Wu, eds.,)に説明される。 10

【0121】

VII: PAP - 関連の方法 :

本発明はまた、本明細書に記載される遮断オリゴヌクレオチドの使用方法も提供する。ある態様によれば、それらのオリゴヌクレオチドは、それらの標的から由来する対象についての診断、遺伝子又は他の情報を提供するために、標的核酸の検出を包含するアッセイを実施するために使用される。かかる態様はまた、下記例においても例示される。

【0122】

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドは任意には、例えば加ビロリン酸分解工程を通して、それらの核酸から2' - 終止ヌクレオチドの除去を包含する実質的にいずれかの用途への使用のために使用されるか、又は適合される。核酸関連タイプの用途の例は、核酸の構造及びコンホメーションの分析、同時PCRアッセイ、及びSNP検出を包含する (Myakishev et al. (2001) "High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers," Genome Res 11:163-169, Lee et al. (1999) "Seven-color, homogeneous detection of six PCR products," Biotechniques 27:342-349, Thelwell et al. (2000) "Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection," Nucleic Acids Res 28:3752-3761, Whitcombe et al. (1999) "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence," Nat Biotechnol 17:804-807, Heid et al. (1996) "Real time quantitative PCR," Genome Res 6:986-994, Nazarenko et al. (1997) "A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer," Nucleic Acids Res 25:2516-2521); detection of nucleic acid hybridization (Parkhurst et al. (1995) "Kinetic studies by fluorescence resonance energy transfer employing a double-labeled oligonucleotide: hybridization to the oligonucleotide complement and to single-stranded DNA," Biochemistry 34:285-292, Tyagi et al. (1996) "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization," Nat Biotechnol 14:303-308, Tyagi et al. (1998) "Multicolor molecular beacons for allele discrimination," Nat Biotechnol 16:49-53, Sixou et al. (1994) "Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET)," Nucleic Acids Res 22:662-668, and Cardullo et al. (1988) "Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer," Proc Natl Acad Sci USA 85:8790-8794); primer-extension assays for detecting mutations (Chen et al. (1997) "Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method," Proc Natl Acad Sci USA 94:10756-10761); and automated DNA sequencing (Woolley et al. (1995) "Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips," Anal Chem 67:3676-3680, Hung et al. (1998) "Comparison of fluorescence energy transfer primers with different donor-acceptor dye combinations," Anal Biochem 255:32-38, and Ju et al. (1995) "Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis," Proc Natl Acad Sci 40 50

USA 92:4347-4351)。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドとの使用のために適合され得る、PAPに関連する態様はまた、例えば2006年4月25日付発行“Pyrophosphorolysis activated polymerization (PAP)”、米国特許第7,033,763号(Liu等)；2003年3月18日付発行“Pyrophosphorolysis activated polymerization (PAP): application to allele-specific amplification and nucleic acid sequence determination”、米国特許第6,534,269号(Liu等)；及びLiu等による2004年3月12日付出願“Pyrophosphorolysis activated polymerization (PAP)”、米国特許出願番号第10/798,844号に記載される。

【0123】

さらに例を挙げると、本発明の反応混合物における又はそれらからの標的核酸を分析するためには適合され得るか又は適合され得る一般型の核酸分析技法の例は、種々の核酸増幅アッセイを包含する。核酸増幅間の共通する特徴は、それらが通常、検出される生物に対して特異的である核酸配列を増幅するために企画されていることである。核酸増幅試験は通常、核酸分析に対して他のアプローチよりも高い感度を有する。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの使用によりさらに改良されるこの感度は通常、標的核酸の単一のコピーほど小さな陽性シグナル形を生成するそれらの能力に寄与することができる。標的核酸を検出するためには任意には使用されるか、又は適合される増幅方法は、例えば種々のポリメラーゼ、リガーゼ又は逆転写酵素媒介増幅方法、例えばポリメラーゼ鎖反応(PCR)、リガーゼ鎖反応(LCR)及び/又は逆転写PCR(RT-PCR)を包含する。それらの及び他の増幅方法の使用及びそれらのアッセイのための試料調製への種々のアプローチに関する追加の詳細は、種々の標的テキストのいずれか、例えば引用により本明細書に組込まれる、Berger, Sambrook, Ausubel 1 and 2, and Innisに見出され得る。

【0124】

本発明の試薬及び方法による使用のために任意には適合される種々の商業的核酸増幅は通常、それらの増幅方法及びそれらの標的核酸配列において異なる。それらの商業的試験の例は、ハイブリダイゼーションプローブアッセイ(例えばLightCycler(登録商標)系を使用する)、及びポリメラーゼ鎖反応(PCR)を使用するAmplicor(登録商標)及びCOBAS Amplicor(登録商標)アッセイ(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)；リガーゼ鎖反応を使用するLCX(登録商標)試験(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)；鎖置換増幅(SDA)を使用するBDProbeTec(商標)ET試験(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA)、及び転写媒介増幅(TMA)を使用するAPTIMA(商標)アッセイ(Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA)を包含する。核酸増幅及び検出はさらに下記に記載される。

【0125】

ある態様によれば、例えば5'-ヌクレアーゼプローブは、種々の5'-ヌクレアーゼ反応に使用される。多くの5'-ヌクレアーゼアッセイは当業者に良く知られている。そのような反応の例は、例えば2001年4月10日付発行“Homogeneous assay system”、米国特許第6,214,979号(Gelfand等)；1998年9月8日付発行“Reaction mixtures for detection of target nucleic acids”、米国特許第5,804,375号(Gelfand等)；1996年1月30日付発行“Nucleic acid detection by the 5'-3' exonuclease activity of polymerases acting on adjacently hybridized oligonucleotides”、米国特許第5,487,972号(Gelfand等)；及び1993年5月11日付発行“Homogeneous assay system using the nuclease activity of a nucleic acid polymerase”、米国特許第5,210,015号(Gelfand等)にも記載される。

【0126】

簡単な例を挙げると、5'-ヌクレアーゼ反応において、標的核酸がプライマー及びプローブ(例えば5'-ヌクレアーゼプローブ)と、そのプライマー及びプローブが標的核酸の鎖にハイブリダイズする条件下で接触される。標的核酸、プライマー及びプローブはまた、5'-3'ヌクレオアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼと接触される。5'-3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼは、プライマーの下流の標的核酸にハイブ

10

20

30

40

50

リダイズされるプローブを切斷することができる。プライマーの3'末端は、ポリメラーゼのための初期結合部位を供給する。結合されたポリメラーゼは、プローブの5'末端との遭遇に基づいて、プローブから断片を切斷する。

【0127】

プライマー及びプローブは、プライマーの3'末端への核酸ポリメラーゼの結合がプライマー伸長の不在下でプローブの5'末端と接触するよう、標的核酸にきわめて接近してアニーリングするよう企画され得る。用語「重合 - 無関係分解」とは、この工程を指す。他方では、プライマー及びプローブが標的核酸のより遠くに間隔をあけられた領域にアニーリングする場合、重合は通常、前記核酸ポリメラーゼがプローブの5'末端と遭遇する前に生じる。重合が続くにつれて、ポリメラーゼはプローブの5'末端から断片を前進的に分解する。この分解は、プローブの残りが錆型分子から解離する程度に不安定化されるまで続く。用語「重合依存性分解」とは、この工程を指す。10

【0128】

重合 - 無関係分解の1つの利点は、核酸の増幅の必要性の排除にある。プライマー及びプローブが核酸に隣接して供給される場合、連続したラウンドのプローブアニーリング及び断片の分解が生じ得る。従って、十分な量の断片が生成され、重合の不在下での検出を可能にする。

【0129】

いずれかの工程において、標的核酸を含むと思われる試料が供給される。試料に含まれる標的核酸は、必要なら、最初にcDNA中に逆転写され、次に、いずれかの適切な変性方法、例えば当業者に知られている、物理、化学又は酵素方法を用いて、変性される。鎖分離をもたらす典型的な物理的アプローチは、核酸が完全に(99%以上)変性されるまで、その核酸を加熱することを包含する。典型的な熱変性は、約1秒～約10分(例えば数秒～約1分)の範囲の時間、約85～約105(通常、約85～約98)、及びより典型的には約85～約95)の範囲の温度を包含する。変性に代わるものとして、核酸は、例えば試料が一本鎖RNA又はDNAウィルスを含んでなる場合、試料において一本鎖形で存在することができる。20

【0130】

変性された標的核酸鎖は、通常、プライマー及びプローブと共に、そのプライマー及びプローブが標的核酸鎖に結合するハイブリダイゼーション条件下でインキュベートされる。ある態様によれば、2種のプライマーが、標的核酸を増幅するために使用され得る。2種のプライマーは通常、標的核酸に沿ってのそれらの相対的位置が、1つのプライマーから合成される伸長産物が、その錆型(補体)から分離される場合、他のプライマーの伸長のための錆型として作用し、特定の長さの複製鎖を生成するように存在するよう選択される。30

【0131】

相補鎖は通常、プローブ又はプライマーのいずれかよりも長いので、前記鎖は複数点の接触を有し、従って、所与の時間にわたってお互いへの結合の機会を高める。従って、高モル過剰のプローブ及びプライマーが通常、錆型鎖の再アニーリングにわたってプライマー及びプローブアニーリングを助けるために使用される。多重形においては、複数のプローブが通常、複数の標的核酸を同時に検出するために、单一の反応容器に使用される。40

【0132】

プライマーは通常、十分な長さ及び相補性のものであり、その結果、それらは重合 - 無関係分解又は重合 - 依存性分解の進行を可能にする選択された条件下で標的核酸に対して選択的に結合する。プライマーの正確な長さ及び組成は、多くの因子、例えばアニーリング反応の温度、プライマーの源及び組成、プライマーアニーリング部位へのプローブアニーリング部位の近位性、及びプライマー：プローブ濃度の比率に依存するであろう。例えば、標的配列の複雑性に依存して、プライマーは通常、約15～30個のヌクレオチドを含むが、但しそれはそれ以上か又はそれよりも少なくないヌクレオチドを含んでいてもよい。

1020304050

【0133】

プローブは通常、その相補的標的核酸にアニーリングされ、その後、核酸ポリメラーゼが標的核酸のその領域に遭遇し、それにより、プローブから断片を分解する酵素の5' 3' ヌクレアーゼ活性を可能にする。プローブが、ポリメラーゼがハイブリダイゼーションのこの領域に達する前、標的核酸にアニーリングするであろう傾向を増強するために、種々の技法が使用され得る。例えば、短いプライマーは通常、核酸との十分に安定したハイブリッド複合体を形成するために、より低い温度を要する。従って、プローブはプライマーよりも長くあるよう企画され、その結果、プローブは、プライマー・アニーリングに対して高い温度で標的核酸に選択的にアニーリングする。さらに例を挙げると、プローブのヌクレオチド組成は、高いG / C含有率及び従ってプライマーよりも高い熱安定性を有するよう選択され得る。任意には、修飾されたヌクレオチドは、修飾されていないヌクレオチドのみを有するプライマー又はプローブに比較して、高いか又は低い熱安定性を可能とするのにプライマー又はプローブ中に組込まれ得る。典型的な修飾されたヌクレオチドは上記にさらに記載されている。熱循環パラメーターはまた、プローブ及びプライマーの特異的熱安定性を利用するために変更され得る。例えば、熱循環変性段階に統いて、プローブ結合を可能にするが、しかしプライマー結合を可能にしない中間温度が導入され得る。その後、温度はプライマーアニーリングを可能にするためにさらに低められ得る。プライマーの前、プローブの結合を選択的に助力するためには、高モル過剰のプローブ：プライマー濃度がまた使用され得る。そのようなプローブ濃度は通常、一般的に約0.5 ~ 5 × 10⁻⁷ Mである、それぞれのプライマー濃度よりも約2 ~ 約20倍高い範囲で存在する。

【0134】

プライマーの鋳型 - 依存性伸長は通常、適切な塩、金属カチオン及び緩衝液を含む反応混合物における適切な量の4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dATP、dTTP、dCTP及びdTTP)の存在下で、生体触媒(例えばポリメラーゼ)により触媒される。反応混合物は上記にさらに記載される。適切な生体触媒は、プライマー及び鋳型 - 依存性DNA合成を触媒することが知られている酵素であり、5' 3' ヌクレアーゼ活性を有する。このタイプの典型的なDNAポリメラーゼは、E.コリDNAポリメラーゼI、Tth DNAポリメラーゼ、バチルス・ステレオサーモフィラス(Bacillus stearothermophilus)DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、サーマス属(Thermus sp.)Z05 DNAポリメラーゼ、テルマトガ・マリチマ(Thermatoga maritima)DNAポリメラーゼ、テルマトガ・ネオポリタン(Thermatoga neopolitana)DNAポリメラーゼ、及びサーモシフォ・アフリカナス(Thermosiphon africanus)DNAポリメラーゼ、並びに本明細書に言及されるか又は他方では、当業者に知られている他のものを包含する。それらのDNAポリメラーゼによりDNA合成を触媒するための反応条件は、当業界に良く知られている。通常、生体触媒はプローブを効果的に分解し、標識された断片を放出し、その結果、検出可能シグナルは直接的に又は間接的に生成される。

【0135】

合成の産物は通常、鋳型鎖及びプライマー伸長鎖を含む重複体分子である。この合成の副産物は、モノ-、ジ- 及びそれよりも大きなヌクレオチド断片の混合物を包含するプローブ断片である。変性、プローブ及びプライマーアニーリング及びプライマー伸長及びプローブ分解の反復された循環は、プライマーにより定義される領域の指數的蓄積及び標識された断片の指數的生成をもたらす。十分な循環は、一般的にバックグラウンドシグナルよりも数倍高い大きさの程度である、検出できる量のプローブ断片を達成するために実施される。

【0136】

ある態様によれば、PCR反応が、熱安定性酵素を使用する自動化された方法として実施される。この工程においては、反応混合物が、変性段階、プローブ及びプライマーアニーリング段階、及び合成段階(ここで、分解及び置換がプライマー依存性鋳型伸長と同時に生じる)を通して循環される。ある態様によれば、本明細書に記載される方法は、系を用いて実施される。そのような系は、より詳細に下記に記載されている。任意には、熱サ

10

20

30

40

50

イクラー、例えば熱安定性酵素と共に使用するために企画されるApplied Biosystems (Foster City, CA, USA) から市販されているそれらが使用され得る。

【0137】

熱安定性ポリメラーゼは通常、PCRサイクルの間、それらを高温（例えば約95[°]C）に暴露することにより、二本鎖伸長産物の変性をもたらす自動化された方法に使用される。例えば、Gelfand等により1989年12月26日付発行、“Purified thermostable enzyme”、米国特許第4,889,818号は、サーマス・アクアチカス(*Thermus aquaticus*)から単離された代表的な熱安定性酵素を開示する。追加の代表的な熱安定性ポリメラーゼは、例えば熱安定性細菌サーマス・フラバス(*Thermus flavus*)、サーマス・ルベル(*Thermus ruber*)、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)、バチルス・ステアロサーモフィラス(*Bacillus stearothermophilus*)（列挙される他のものよりもいくらくらい温度最適性を有する）、サーマス・ラクテウス(*Thermus lacteus*)、サーマス・ルベンズ(*Thermus rubens*)、サーモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)、サーモトガ・ネオポリタナ(*Thermatoga neopolitana*)、サーモシフオ・アフリカヌス(*Thermosiphon africanus*)、サーモコーカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)及びメタノサーマス・フェルビダス(*Methanothermus fervidus*)から抽出されたポリメラーゼを包含する。10

【0138】

標的核酸へのプローブのハイブリダイゼーションは、適切なハイブリダイゼーション条件を選択することにより達成され得る。プローブ：標的核酸ハイブリッドの安定性は通常、アッセイ及び洗浄条件と適合できるよう選択され、その結果、安定した検出できるハイブリッドがプローブと標的核酸との間でのみ形成する。1又は2以上の異なったアッセイパラメーターの操作は、特定のハイブリダイゼーションのアッセイの正確な感度及び特異性を決定する。20

【0139】

より具体的には、核酸（例えばDNA、RNA、PNA、又はそれらの組合せ）の相補的塩基間のハイブリダイゼーションは、温度、塩濃度、静電強度、緩衝液組成等により変化する広範囲の種類の条件下で発生する。それらの条件及びそれらを適用するための方法の例は、例えばTijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Vol. 24, Elsevier Science (1993)及びHomes and Higgins, 前記に記載されている。ハイブリダイゼーションは通常、ハイブリダイズされる配列の性質及びその強度に依存して、約1分～約1時間、約0[°]～約70[°]Cで起こる。しかしながら、ハイブリダイゼーションは、反応の条件に依存して、数秒又は数時間、生じることが理解される。例示によれば、2つの20-マーの混合物についての典型的なハイブリダイゼーション条件は、混合物を68[°]Cにし、続けて室温(22[°]C)に5分間、冷却するか、又は2μlの混合物においては非常に低い温度、例えば2[°]Cで冷却することである。核酸間のハイブリダイゼーションは、緩衝液、例えばトリス-EDTA(TE)トリス-HCl及びHEPES、塩溶液（例えばNaCl、KCl、CaCl₂）、又は他の水溶液、試薬及び化学物質を用いて促進され得る。それらの試薬の例は、単鎖結合タンパク質、例えばRecAタンパク質、T4遺伝子32タンパク質、E. coli单鎖結合タンパク質及び主要又はマイナーな核酸グループ結合タンパク質を包含する。そのような試薬及び化学物質の他の例は、二価イオン、多価イオン及び挿入物質、例えば臭化工チジウム、アクチノマイシンD、プソラレン及びアンゲリシンを包含する。30

【0140】

標的核酸を検出するための実質的にいずれかの入手できる方法が本発明において使用され得る。共通アプローチは、5'-ヌクレアーゼプローブ、ハイブリダイゼーションプローブ又はヘアーピンプローブ（例えば分子ビーコン）による同時增幅検出、增幅プライマー又は増幅された核酸自体中に組込まれる標識の検出、例えば組込まれていない標識からの増幅産物の電気泳動分離に続く、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイ（例えばアレイに基づくアッセイ）、及び/又は核酸に結合する第2試薬の検出を包含する。それら4050

の一般的アプローチはまた、例えばSambrook, 及びAusubel 1及び2, 前記に記載されている。

【0141】

ヘアーピンプローブ、例えば分子ビーコンは、標的核酸の同時検出及び定量化のために企画されるオリゴヌクレオチドである。ヘアーピンプローブの5'及び3'末端は通常、プローブの検出可能性質を付与するラベリング成分を含んでなる。実施態様の例においては、末端の1つは、レポーター成分（例えば蛍光色素）に結合され、他の末端はレポーター成分からの蛍光を消光できる消光成分に結合される。ヘアーピンプローブが溶液に自由に存在する場合、すなわち第2核酸ハイブリダイズされない場合、プローブのステムは相補的塩基対合により安定化される。この自己相補的対合が、レポーター及び消光剤成分があ
互い近位に存在するプローブのための“ヘアーピンループ”構造をもたらす。この確認下で、消光剤成分はレポーター成分を消光する。ヘアーピンプローブのループは通常、標的核酸において検出されるべき配列に対して相補的である配列を含んでなり、その結果、標的におけるその相補的配列へのループのハイブリダイゼーションがシステムの解離を促進し、それにより、レポーター及び消光剤成分をお互い遠ざける。これはレポーター成分を消光せず、ヘアーピンプローブからの蛍光の上昇を引起す。
10

【0142】

ヘアーピンプローブを製造し、使用するための標準方法に関する詳細は通常、当業者に知られており、また、例えばLeone et al. (1995) “Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA,” Nucleic Acids Res. 26:2150-2155, Kostrikis et al. (1998) “Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles” Science 279:1228-1229, Fang et al. (1999) “Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies” J. Am. Chem. Soc. 121:2921-2922, 及びMarras et al. (1999) “Multiplex detection of single-nucleotide variation using molecular beacons” Genet. Anal. Biomol. Eng. 14:151-156にも記載される。次の種々の商業的供給者は、本明細書に記載される方法への使用のために適合され得る標準及び注文ヘアーピンプローブを生成する：Oswel Research Products Ltd. (UK), Research Genetics (a division of Invitrogen, Huntsville, AL, USA), 及びthe Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, USA)。ヘアーピンプローブを使用する種々のキット、例えばStratagene (La Jolla, CA, USA)からのSentinel(商標) Molecular Beacon Allelic Discriminationキット及びEurogentec SA (Belgium)及びIsogen Bioscience BV (Netherlands)からの種々のキットが市販されている。それらのキットはまた、本明細書に記載される方法への使用のために任意には適合される。
20
30

【0143】

ハイブリダイゼーションプローブは通常、対で機能し、種々のタイプの同時核酸検出、例えば安定化、突然変異検出、溶融温度（T_m）多重体化、及び色彩多重体化を可能とするのに使用し得る。一定のハイブリダイゼーションプローブアッセイの態様はまた、Bregia et al. (2004) “Real-time PCR for dihydrofolate reductase gene single-nucleotide polymorphisms in Plasmodium vivax isolates,” Antimicrob Agents Chemother. 48 (7):2581-2587, Perelle et al. (2004) “A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic Campylobacter,” Mol Cell Probes. 18(5):321-327, 及びWhiley et al. (2003) “Detection of Neisseria Meningitidis in clinical samples by a duplex real-time PCR targeting the porA and ctrA genes,” Mol Diagn. 7(3-4):141-145にも記載されている。
40

【0144】

ハイブリダイゼーションアッセイは通常、ラベリング成分間で発生するエネルギー移行のためにお互い十分に接近して存在する標的又は鑄型核酸により1対の標識されたプローブをハイブリダイズすることを包含する。より具体的には、前記対中の1つのハイブリダイゼーションプローブ（“トナープローブ”）は通常、少なくとも1のドナー成分を含み
50

、前記対中の他のハイブリダイゼーションプローブ（“受容体プローブ”）は少なくとも1の受容体成分（例えばLC-Red610、LC-Red640、LC-Red670、LC-Red705、JA-270、CY5又はCY5.5）を包含する。ハイブリダイゼーションプローブの受容体成分により放される蛍光は、種々の既知方法、例えばLightCycler（登録商標）系（Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA）を使用するそれらの方法を用いて検出され得る。

【0145】

本明細書に記載のオリゴヌクレオチドの使用の他の例示的態様においては、標識されたプライマーは、同時標的核酸検出を可能とするのに使用される。本明細書に記載のオリゴヌクレオチドとの使用のために適合され得る同時標的核酸検出へのプライマーに基づくアプローチはまた、例えばHuang et al. (2004) “Real-time quantitative assay of telomerase activity using the duplex scorpion primer,” Biotechnol Lett. 26(11):891-895, Asselbergs et al. (2003) “Rapid detection of apoptosis through real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction measurement of the small cytoplasmic RNA Y1,” Anal Biochem. 318(2):221-229, and Nuovo et al. (1999) “In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers,” J Histochem Cytochem. 47(3):273-280に記載される。

【0146】

IX：系：

本発明はまた、多くの異なったアッセイを実施するために使用され得る系も提供する。系は、2' - 終止ヌクレオチドを含んでなる1又は2以上のオリゴヌクレオチドを含む。ある態様によれば、オリゴヌクレオチドは固体支持体上に整列され、他においては、それらは例えば溶液において実施されるアッセイのために1又は2以上の容器に供給される。ある態様によれば、系はまた、容器内又は支持体上に生成される検出可能シグナルを検出するために構成される少なくとも1の検出装置又は検出成分（例えば分光計）を含む。さらに、系はまた任意には、容器内又は固体支持体上の温度を調節するために、容器又は固体支持体に作動式に連結される少なくとも1の熱モジュレータ（例えば熱循環装置）、及び／又は例えば容器内又は固体支持体上で1又は2以上の近位性アッセイを実施するために、容器又は固体支持体への及び／又はそれから流体を移行する少なくとも1の流体移行成分（例えば自動化されたピペット）を包含する。

【0147】

検出器は通常、所与のアッセイ系（例えば容器において及び／又は固体支持体上で）の別の成分において又はそれに対して近位に生成される検出可能シグナルを検出するために構成される。それらの系において、任意に使用されるか、又は使用のために適合される適切なシグナル検出器は、例えば蛍光、リン酸、放射能、吸光度、屈折率、発光、又は質量を検出する。検出器は任意には、例えば所与のアッセイ段階の実施の上流及び／又は下流からの1つの又は多数のシグナルをモニターする。例えば、検出器は任意には、“同時”結果に位置的に対応する多くの光シグナルをモニターする。検出器又はセンサーの例は、光倍増管、CCDアレイ、光センサー、温度センサー、圧力センサー、pHセンサー、導電率センサー、走査検出器等を包含する。任意には、本発明の方法の実施に使用される、より特定の典型的な検出器は例えば、共鳴光散乱検出器、放射分光器、蛍光分光器、リン光発光器、発光分光器、分光測定器、及び光度計を包含する。検出器はまた、例えばSkoog et al., Principles of Instrumental Analysis, 5th Ed., Harcourt Brace College Publishers (1998), Currell, Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality, John Wiley & Sons, Inc. (2000), Sharma et al., Introduction to Fluorescence Spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc. (1999), Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Inc. (2002), 及びGore, Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach, 2nd Ed., Oxford University Press (2000)にも記載されている。

【0148】

10

20

30

40

50

本発明の系はまた、通常、成分の操作を調節するために、系の 1 又は 2 以上の成分（例えば検出器、熱モジュレータ、及び / 又は液体移行成分）に作動式に連結されるコントローラーを包含する。より具体的には、コントローラーは通常、検出器からのデータを受けるために、容器における温度の調節をもたらし、/ 又はそれを調節するために、選択される容器への又は容器からの流体の流れをもたらし、/ 又はそれを調節するために使用される別々の又は統合の系成分として包含される。コントローラー及び / 又は他の系成分は任意には、前もってプログラムされた又は使用者入力の命令に従って、それらの計器の操作を説明し、それらの計器からのデータ及び情報を受け、解釈し、操作し、この情報を使用者に報告するよう機能する、適切にプログラムされたプロセッサー、コンピューター、デジタル装置又は他の情報アプライアンス、又は他の論理的装置（例えば必要な場合、アナログからデジタルへ、又はデジタルからアナログへのコンバーターを包含する）に連結される。10 適切なコントローラーは通常、当業界に知られており、種々の市販源から入手できる。

【 0 1 4 9 】

いずれかのコントローラー又はコンピューターは任意には、しばしばカソード線管（「CRT」）ディスプレー、フラットパネルディスプレー（例えば活性マトリックス液晶ディスプレー、液晶ディスプレー等）、又は他のものであるモニターを包含する。コンピューター回路はしばしば、多くの統合された回路チップ、例えばマイクロプロセッサー、メモリー、インターフェイス回路及び他のものを包含するボックスに配置される。このボックスはまた、任意には、ハードディスクドライブ、フロッピー（登録商標）ディスクドライブ、高能力の取りはずし可能なドライブ、例えば書き込みできるCD-ROM及び他の通常の端末要素を包含する。入力装置、例えばキーボード又はマウスは任意には、使用者からの入力を提供する。それらの成分は下記にさらに例示される。20

【 0 1 5 0 】

コンピューターは通常、例えばGUITにおける1組のパラメーターフィールド中への使用者の入力形で、又は例えば種々の異なった特定の操作のために予備プログラムされた命令の形で、使用者の命令を受けるための適切なソフトウェアを包含する。次に、ソフトウェアは、所望する操作を行うために1又は2以上のコントローラーの操作を命令するための適切な言語にそれらの命令を転換する。次に、コンピューターは、例えば系内に含まれるセンサー / 検出器からのデータを受け、そのデータを解析し、それを使用者の理解されるフォーマットで提供するか、又はプログラミング、例えば重量計量計等から受ける流体データに応答して流体の流れ調節器の調節に従って、さらなるコントローラー命令を開始するためにそのデータを使用する。30

【 0 1 5 1 】

図4は、本発明の種々の態様が実施され得る論理的装置を包含する代表的系を示す図である。本明細書に供給される教授から実施者により理解されるように、本発明は任意には、ハードウェア及び / 又はソフトウェアにおいて実施される。ある態様によれば、本発明の異なった態様は、クライアント側論理又はサーバー側論理のいずれかにおいて実施される。当業界において理解されるように、本発明又はその成分は、適切に構成された計算装置に負荷される場合、所望によりその装置の実施を引起す論理的命令及び / 又はデータを含むメディアプログラム成分（例えば固定されたメディア成分）に包含される。当業界においても理解されるように、論理的命令を含む固定されたメディアが、観察者のコンピューターに物理的に負荷するために固定されたメディア上の観察者に供給され、又は論理的命令を含む固定されたメディアが、プログラム成分をダウンロードするために、コミュニケーションメディアを通して観察者がアクセスする遠隔サーバー上に存在する。40

【 0 1 5 2 】

より具体的には、図4は、検出器402（例えば分光計、例えば蛍光分光光度計）、流体移行成分404、及び熱モジュレータ408が作動式に連結されるコンピューター400を図示する。任意には、それらの成分の1又は2以上の成分が、サーバー（図4には示されていない）を通してコンピューター400に作動式に連結される。操作の間、流体移50

行成分 404 は通常、反応混合物又はその成分を、多ウェル容器 406 に移行する。熱調節（例えば熱循環）は通常、多ウェル容器 406 と熱的に通じる熱モジュレータ 408 によりもたらされる。検出器 402 は通常、所与の近位性アッセイが系において実施される前、その間及び／又はその後、生成される検出可能シグナル（例えば発蛍光）を検出する。図 4 に図示される系中の 1 又は 2 以上の成分は、お互い規格に従って製造された完全体（例えば同じハウジングにおける）であってもよい。

【実施例】

【0153】

本明細書に記載される例及び態様は单なる例示目的のためであり、本発明の範囲を制限するものではないことが理解される。本明細書に記載される例及び態様における種々の修飾又は変更が当業者に示唆され、本出願の範囲内及び特許請求の範囲内に包含されることもまた理解される。10

【0154】

例 I：遮断オリゴヌクレオチドの合成：

2' - O - PO₃遮断オリゴヌクレオチド（図 5）を、標準の - シアノエチルホスホラミジット化学を用いて、自動 Applied Biosystems 394 合成機上で合成した（図 6）。それらのオリゴヌクレオチドの合成に使用される固体支持体は、オリゴヌクレオチドの 3' 末端でのリン酸基の導入を促進する、3' - リン酸 CPG (Glen Research, # 20-2900-41 からの) であった。合成の最初の循環においては、ChemGenes から購入されたリボヌクレオチド - 2' - O - ホスホラミジット（図 7、ここで B = 塩基；アデノシン（パート # ANP-5681）、シチジン（ANP-5682）、グアノシン（ANP-5683）及びウリジン（ANP-5684））が、固体支持体とのカップリングのために使用された。合成の第 2 循環において及びその後、標準のデオキシヌクレオチドホスホラミジットを使用した。合成の後、オリゴヌクレオチド固体支持体から分解し、室温で 24 ~ 48 時間、濃水酸化アンモニウムにより保護解除した。次に、水酸化アンモニウムをサイズ排除クロマトグラフィー（NAP-10 カラム；無菌水による溶出）により除去した。次に、オリゴヌクレオチドを、逆相 HPLC (PRP-1 カラム、トリエチル酢酸アンモニウム - アセトニトリル緩衝液) により精製した。精製されたオリゴヌクレオチドを濃縮し、次に、弗化カリウムにより処理し、オリゴヌクレオチドの 3' 末端で 3' - ヒドロキシル基のシリル保護を除去した。オリゴヌクレオチドをさらに、RP-HPLC (Xterra SB-18 カラム) により精製した。それらのオリゴヌクレオチドの純度及び同一性を、イオン交換 HPLC (Dionex, 60 で pH 8.0) 及び LC-MS 分析により確かめた。20

【0155】

例 II：HIV DNA 鑄型滴定：

PAP - 関連の HIV DNA 鑄型滴定を、ゲノム DNA の存在下で及びその不在下で実施した。図 8 は、この分析において使用される種々の反応条件下で PCR 産物の検出を示すゲルの写真である。このデータは、例えば本明細書に記載される遮断プライマーを用いないでの反応に対して、遮断プライマーを用いて達成され得る、改良された增幅特異性及び感度を示す。40

【0156】

より具体的には、反応を、次の温度プロファイルを用いて、ABI5700 Sequence Detection System により実施した：

50 、 2 分

93 、 1 分

93 、 15 秒 52 、 4 分 × 4 循環

90 、 15 秒 55 、 4 分 × 56 循環

【0157】

次の反応条件をすべての RT 反応に共通とした。

【表1】

マスター混合成分	濃度
トリシン (pH 8.0)	100mM
dATP	200μM
dCTP	200μM
dGTP	200μM
dTTP	30μM
dUTP	300μM
プライマー3又はプライマー1	200nM
プライマー4又はプライマー2	200nM
KOAc	110mM
SYBR Green I	0.2X
NaPPi	225μM
Mg(OAc) ₂	2.5mM
Tth貯蔵緩衝液 (0.2% Tween)	6%v/v
GLQDSE CS5 DNA ポリメラーゼ	10nM

10

【0158】

20

「QOQDSE CS5 DNAポリメラーゼ」とは、G46EL329A Q601R D640G S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼを指す。さらに、「Tth貯蔵緩衝液」は、0.2% Tween 20、20mM Tris pH 8.0、0.1mM EDTA、100mM KCl、1mM DTT及び50% v/v グリセロールを含んだ。さらに、各反応体積は、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理された水により、50μlにされた。

【0159】

30

種々の反応成分は、次の非遮断プライマー（図8において「非遮断プライマー」で示す反応参照）、

プライマー1 5' - TGAGACACCAAGGAATTAGATATCAGTACAA
TGT-3' (配列番号1)

プライマー2 5' - CTAAATCAGATCCTACATATAAGTCATCCA
TGT-3' (配列番号2)

及び次の遮断プライマー（図8において「遮断プライマー」で示す反応参照）：

プライマー3 5' - TGAGACACCAAGGAATTAGATATCAGTACAA
TGU*-3' (配列番号3)

プライマー4 5' - CTAAATCAGATCCTACATATAAGTCATCCA
TGU*-3' (配列番号4)

を含む。ここでU*は2' - リン酸 - U(すなわち、2'位置でリン酸基を含んでなる2' - 終止ヌクレオチド)を指す。反応はまた、混合物に添加される25ngのヒトゲノムDNAを含むか（図8で「25ngゲノムDNA」で示す反応参照）、又は欠いていた（図8で「クリーン標的」で示す反応参照）。図8にさらに示されるように、反応はまた、1μlのHIV検体希釈剤（10mMのトリス、0.1mMのEDTA、20μg/ml ポリア及び0.09% NaN₃）又は「負」の反応における1μlのHIV検体希釈剤により希釈された標的核酸を含む、線状化されたプラスミドDNAの10⁵、10⁴、10³、10²又は10¹コピーを含んだ。示されるプラスミドDNAから170個の塩基対産物を増幅した。

【0160】

40

例III：野生型K-RASプラスミド鑄型のバックグラウンドにおける変異体K-RASプラスミド鑄型の増幅：

50

野生型 K - R a s プラスミド鑄型のバックグラウンドにおける種々のコピー数の変異体 K - R o s プラスミド鑄型を包含する増幅、及びブロックされた及び非遮断プライマーの比較を実施した。図 9 は、それらの反応に使用される種々の変異体 K - R a s プラスミド鑄型コピー数 (x 軸) について観察される限界サイクル (G_T) 値 (y 軸) を示すグラフである。図 9 はさらに、本明細書に記載される遮断プライマーを用いて達成され得る改良された識別を例示する。

【0161】

反応を、次の温度プロフィールにより、A B I 5 7 0 0 配列検出系を用いて実施した：

5 0 、 2 分

9 3 、 1 分

9 2 、 1 5 秒 6 5 、 2 分 × 6 0 循環

10

【0162】

次の反応条件をすべての R T 反応に共通とした。

【表 2】

マスター混合成分	濃度
トリシン (pH 8. 0)	1 0 0 mM
d A T P	2 0 0 μM
d C T P	2 0 0 μM
d G T P	2 0 0 μM
d T T P	3 0 μM
d U T P	3 0 0 μM
プライマー 7 又はプライマー 5	2 0 0 nM
プライマー 8 又はプライマー 6	2 0 0 nM
S Y B R グリーン I	0. 1 X
N a P P i	2 2 5 μM
M g (O A c) ₂	2. 5 mM
U n g	2 U
T t h 貯蔵緩衝液 (0. 2% Tween)	6 % v/v
G D S E C S 5 D N A ポリメラーゼ	5 nM
線状化野生型プラスミドDNA	1 0 ⁶ コピー

20

30

【0163】

「G D S E C S 5 D N A ポリメラーゼ」とは、G 4 6 E D 6 4 0 G S 6 7 1 F E 6 7 8 G C S 5 D N A ポリメラーゼを指す。「貯蔵緩衝液」は、0. 2% Tween 2 0 、 2 0 mM トリス pH 8. 0 、 0. 1 mM E D T A 、 1 0 0 mM K C l 、 1 mM D T T 、 及び 5 0 % v / v グリセロールを含んだ。さらに、各反応体積は、D E P C 処理されて水により 5 0 μl にされた。

【0164】

40

種々の反応成分は、次の非遮断プライマー（図 9 において「非遮断プライマー」で示す反応参照）：

プライマー 5 5' - A A A C T T G T G G T A G T T G G A G C T C - 3' (配列番号 5)

プライマー 6 5' - G T T G G A T C A T A T T C G T C C A C A A - 3' (配列番号 6)、

及び次の遮断プライマー（図 9 において「遮断プライマー」で示す反応参照）：

プライマー 7 5' - A A A C T T G T G G T A G T T G G A G C T C * - 3' (配列番号 7)

プライマー 8 5' - G T T G G A T C A T A T T C G T C C A C A A * - 3' (配列番

50

号 8)

を含む。

【 0 1 6 5 】

ここで、C^{*}は2'-リン酸-Cを指し、A^{*}は2'-リン酸-A(すなわち、2'位置でリン酸基を含んでなる2'-終止ヌクレオチド)を指す。さらに、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹又は0個のコピー(NTC反応)(それぞれ、図19において、10e6c、10e5c、10e4c、10e3c、10e2c、10e1c、及びNTC)の線状化された変異体K-RasプラスミドDNAを、反応に添加した。変異体プラスミドDNAの関連する配列を、好ましくは、ブロックされた及び非遮断プライマー組に適合した。さらに、変異K-RasプラスミドDNAを、1μlのHIV検体希釈剤(上記を参照のこと)、又は「NTC」反応中、1μlのHIV検体希釈剤(上記を参照のこと)により希釈した。さらに、10⁶個のコピーの線状化された野生型K-RasプラスミドDNAがすべての反応に存在した。野生型K-RasプラスミドDNAは、変異体プラスミドDNAに対して配列において同一であるが、但しそれはプライマー5及び7における究極的3'塩基(dC)とC:Cミスマッチを創造する。ブロックされた及び非遮断プライマー対の両者は、線状化された変異体プラスミド鑄型上に92個の塩基対アンプリコンを創造した。

【 0 1 6 6 】

例IV：種々の濃度での種々の酵素によるK-Rasプラスミド鑄型の增幅：

種々の濃度での種々の酵素によるK-Rasプラスミド鑄型に関する增幅を行った。図10は、種々の酵素について観察される限界サイクル(C_T)値(y軸)及びそれらの反応に使用される濃度(x軸)を示すグラフである。反応を、次の温度プロフィールにより、ABI5700配列検出系を用いて実施した：

50、2分

93、1分

92、15秒 60、2分×60循環

【 0 1 6 7 】

次の反応条件をすべてのRT反応に共通とした。

【表3】

30

マスター混合成分	濃度
トリシン(pH 8.0)	100mM
dATP	200μM
dCTP	200μM
dGTP	200μM
dTTP	30μM
dUTP	300μM
プライマー9	200nM
プライマー10	200nM
SYBRグリーンI	0.1X
NaPPi	225μM
Mg(OAc) ₂	2.5mM
UNG	2U
Tth貯蔵緩衝液(0.2% Tween)	6%v/v
線状化K-RasプラスミドDNA	10 ⁴ コピー

40

【 0 1 6 8 】

「Tth貯蔵緩衝液」は、0.2% Tween 20、20mM Tris pH 8.0

50

、0.1 mM EDTA、100 mM KCl、1 mM DTT、及び50% v/vグリセロールを含んだ。さらに、反応成分は、次の遮断プライマー：

プライマー-9 5'-AAACCTTGTGGTAGTTGGAGCTGU*-3' (配列番号9)

プライマー-10 5'-GTTGGATCATATTCTGCCACAA*-3' (配列番号10)を含む。

【0169】

ここででU*は2'-リン酸-Uを指し、A*は2'-リン酸-A(すなわち、2'位置でリン酸基を含んでなる2'-終止ヌクレオチド)を指す。プライマー対は、線状化されたK-Rasプラスミド鑄型に基づいて92個の塩基対のアンプリコンを創造した。さらに、各反応体積は、ジエチルピロカーボネート(DEPC)で処理された水により50μlとした。

【0170】

ポリメラーゼ濃度及びKoAc濃度を次の通りに、それぞれ各ポリメラーゼについて最適化した。

【表4】

ポリメラーゼ	ポリメラーゼ濃度(nM)	KoAc(mM)
GLQDSE	5, 10, 15, 20, 30又は40nM	110
GLDSE	5, 10, 15, 20, 30又は40nM	25
GLE	5, 10, 15, 20, 30又は40nM	25

10

20

【0171】

「GLQDSE」(配列番号22)とはG46E L329A Q601R D640G S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼを指し、「GLDSE」(配列番号23)とはG46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼを指し、「GLE」とは、G46E L329A E678G CS5 DNAポリメラーゼを指す。

30

【0172】

例V: PAP - 関連の酵素比較:

加ビロリン酸分解活性化重合(「PAP」)を実施するG46E L329A E678G CS5 DNAポリメラーゼ及びG46E L329A D640S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼの能力を比較した。反応緩衝液は、100 mM Tricaine pH 8.0、0 mM (G46E L329A E678G CS5 DNAポリメラーゼ) 又は50 mM (G46E L329A D640S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼ) KoAc、10% v/v グリセロール、0.04 U/μl UNG、4 mM Mg(OAc)₂、0.2 X SYBR Green I、2.5% v/v 酵素貯蔵緩衝液 (50% v/v グリセロール、100 mM KCl、20 mM Triton pH 8.0、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% Tween 20)、0.2 mM 各dATP、dTTP及びdGTP、及び0.4 mM dUTP、及び100 μM ピロリン酸から成了。M13鑄型(GenBank Accession No. X02513)及び酵素を、交差-滴定した。使用されるM13濃度は、20 μlの反応当たり0、10⁴、10⁵及び10⁶個のコピーであった。使用される酵素濃度は、2.5 nM、5 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、35 nM及び50 nMであった。次の循環パラメーターを用いて、384 - ウェルサーモサイクラーにおいて三重反復して設定した：50℃、2分；90℃、1分；次に50℃、15秒、続く62℃の伸長温度、60秒(96循環)。

40

【0173】

50

使用されるプライマー配列は、5' - C G C C T G G T C T G T A C A C C G T T X A - 3' (プライマー 1 1、配列番号 1 0) 及び 5' - G G A A C G A G G G T A G C A A C G G C T A C E - 3' (プライマー 1 2、配列番号 1 1) であり、ここで X = 2' - アミノ - C、及び E = 2' - P O 4 - A (すなわち、2' - 終止ヌクレオチド)。それ 0.1 M で反応混合物に添加されるそれらのプライマーは、M 1 3 鑄型からの 3 8 4 bp の産物をもたらす。プライマーとして作用するためには、プライマー 1 2 は、末端残基の加ピロリン酸の分解除去により活性化されるべきである。

【0174】

蛍光データを分析し、エルボ (elbow) 値 (すなわち、C(t) (基線以上の蛍光出現)) を決定した。G 4 6 E L 3 2 9 A E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼについての C(t) 値が図 1 1 に示される。G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4 0 G S 6 7 1 F E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼについての C(t) 値が図 1 2 に示される。

10

【0175】

例 VI : ブロックされていない及びブロックされた RT プライマーを含んでなる cDNA 逆転写 (RT) に対する C 型肝炎ウィルス (HCV) RNA :

ブロックされていない HCV RT プライマーの伸長と、逆転写反応における HCV RNA 鑄型に基づく遮断プライマーの伸長とを比較した。それらの RT 比較を種々のポリメラーゼを用いて行った。例を挙げると、図 1 3 は、cDNA が 5' - ヌクレアーゼプローブを含む同時 PCR を用いて測定されるそれらの反応に使用される種々の酵素 (x 軸) について観察された限界サイクル (Ct) 値 (y 軸) を示すグラフである。

20

【0176】

次の反応条件をすべての RT 反応に共通とした。

【表 5】

RT 混合成分	濃度
トリシン pH 8.0	100 mM
KOAc	100 mM
DMSO	4% (v/v)
プライマー 1 又は 2	200 nM
dATP	200 μM
dCTP	200 μM
dGTP	200 μM
dTTP	30 μM
dUTP	300 μM
UNG	0.2 単位
Mn(OAc) ₂	1 mM
PPi	175 μM

30

【0177】

40

種々の反応成分は、次の 3' - OH 非遮断プライマー (図 1 3 において「3' OH プライマー (非遮断)」で示す反応参照) :

プライマー 1 5' - G C A A G C A C C C T A T C A G G C A G T A C C A C A A - 3' (配列番号 1 2)、

及び次の遮断プライマー (図 1 3 において「2' PO 4 (遮断)」で示す反応参照) :

プライマー 2 5' - G C A A G C A C C C T A T C A G G C A G T A C C A C A A * - 3' (配列番号 1 3)

を含み、ここで A* は、2' - リン酸 - A 又は 2' - 一リン酸 - 3' - ヒドロキシリアルデノシンヌクレオチド (すなわち、2' 位置でリン酸基を含んでなる 2' 末端ヌクレオチド) を指す。

50

【0178】

さらに、次のポリメラーゼ条件が cDNA 反応において比較された（図 13 も参照のこと）。

Z05 DNA ポリメラーゼ (13 nM)

GLQDS CS5 DNA ポリメラーゼ (25 nM) と組合わされる GLQDSE CS5 DNA ポリメラーゼ (100 nM)

GLQDS CS5 DNA ポリメラーゼ (50 nM) と共に組合わされる GLQDSE CS5 DNA ポリメラーゼ (50 nM)。

【0179】

ここで「GLQDSE CS5 DNA ポリメラーゼ」（配列番号 22）とは、G46E L329A Q601R D640G S671F E678G CS5 DNA ポリメラーゼを指し、「GLQDS CS5 DNA ポリメラーゼ」（配列番号 24）とは、G46E L329A Q601R D640G S671F CS5 DNA ポリメラーゼを指す。さらに各反応は、ジエチルピロカーボネート (DEPC) により処理された水により 20 μl にされた。10

【0180】

RT 反応を、ABI 9600 熱サイクラーにおいて 60 度 60 分間インキュベートした。RT インキュベーションの後、RT 反応を、DEPC 処理された水により 100 倍に希釈した。cDNA の存在を確かめ、RT 反応の HCV cDNA 産物を特異的に測定するため企画された、5' ヌクレアーゼプローブに基づく同時 HCV PCR 反応により定量化した。それらの反応を、次の温度プロフィールを用いて、ABI Prism 7700 配列検出器により実施した。20

50 、 2 分

95 、 15 秒 60 、 1 分 × 50 循環。

【0181】

例VII：BRAF 突然変異検出のための双方向 PAP：

図 14 は、双方向 PAP が実施される場合に生成された BRAF 腫瘍遺伝子增幅の PCR 増殖曲線を示す。x 軸は標準化された、蓄積された蛍光を示し、y 軸は PAP PCR 增幅の循環を示す。より具体的には、それらのデータは、BRAF 腫瘍遺伝子における V599E コドン変化を担当する T A 突然変異の突然変異 - 特異的増幅 (Brose 等 (2002) Cancer Res 62:6997-7000 を参照のこと) が、突然変異の正確な位置でのそれらの 3' 末端ヌクレオチドでオーバーラップする、2' - 終止遮断プライマーを用いて実施される場合に生成された。野生型配列に対して特異的なプライマーが野生型標的又は変異標的に対して反応せしめられる場合、野生型標的のみが検出された。逆にいえば、突然変異配列に対して特異的なプライマーが野生型標的又は変異標的に対して反応せしめられる場合、変異標的のみが検出された。30

【0182】

次の反応条件をすべての RT 反応に共通とした。

【表6】

成分	濃度
トリシンpH 8.0	100 mM
KOAc	100 mM
グリセロール	3.5% v/v
プライマーF5W又はF5M	200 nM
プライマーR5W又はR5M	200 nM
dATP	200 μM
dCTP	200 μM
dGTP	200 μM
dTTP	30 μM
dUTP	300 μM
UNG	1単位
PPi	175 μM
GLQDSE (配列番号22)	15 nM
SYBR I／カルボキシローダミン	1/100,000 (0.1x)
Mg(OAc) ₂	3.0 mM

10

【0183】

ここで、「GLQDSE」とは、G46E L329A Q601R D640G S671F E678G CS5 DNAポリメラーゼを指す。

【0184】

種々の反応成分は、次の野生型BRAFプライマー(図14では「F5W/R5W」と表示)：

F5W 5' - AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACAGU* - 3' (配列番号14)

R5W 5' - GGACCCACTCCATCGAGATTCA* - 3' (配列番号15)、

30

及び次の変異体BRAFプライマー(図14では「F5M/R5M」と表示)：

F5M 5' - AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACAGA* - 3' (配列番号16)

R5M 5' - GGACCCACTCCATCGAGATTCU* - 3' (配列番号17)を含み、ここでA*は2'-リン酸-A又は2'-一リン酸-3'-ヒドロキシルアデノシンヌクレオチドを指し、U*は2'-リン酸-U又は2'-一リン酸-3'-ヒドロキシルウリジンヌクレオチド(すなわち、2'位置でリン酸基を含んでなる2'-終止ヌクレオチド)を指す。

【0185】

さらに、各反応を、DEPC処理された水により50 μlにした。野生型反応(図14では「WT」と表示)はBRAF野生型配列の線状化されたDNAプラスミドを含み、変異体反応(図14では「MT」と表示)はBRAF突然変異配列の線状化されたDNAプラスミドで含んだ。負の反応(図14では「NEG」と表示)はHIV検体希釈剤(10 mMトリス、0.1 mM EDTA、20 μg/ml ポリア及び0.09% NaN₃)を含むが、DNAは含まなかった。PCRにおけるプライマーの組合せは、50 bpのアンブリコンを生成した。さらに、反応を、次の温度プロフィールを用いて、ABI Prism 7700配列検出器により実施した。

50、1分

93、1分

90、15秒

40

50

60、150秒 × 60循環。

【0186】

例VIII：蛍光PAP放出産物の検出：

この予測例は、遮断プライマーが、そのプライマーが活性化され、伸長されるにつれて、検出可能なシグナルの生成を導くPAP活性化を包含する同時モニタープロトコールを例示する。

【0187】

3'結合二重標識オリゴヌクレオチドプライマーの構成：

下記プライマーQ Xは、その3'末端から13番目のヌクレオチド(A)に結合される消光色素分子、Black Hole Quencher(登録商標)(BHQ)(Biosearch Technologies, Inc.)を含むDNAオリゴヌクレオチドである。

【0188】

Q Xのオリゴヌクレオチドプライマーを、相補的オリゴヌクレオチドR 1(下記参照のこと)と共に溶液において混合し、その結果、それらはハイブリッド重複体を形成する。この重複体をさらに、特にフルオレセイン-標識されたデオキシリボアデニン四リン酸(すなわち、フルオレセイン標識された2'-終止ヌクレオチド)及びそのような標識された四リン酸を組み込めることができるDNAポリメラーゼを含む、下記に提供される表IVにおける試薬と共に混合する。2004年6月28日付出願、“Synthesis and compositions of 2'-terminator nucleotides”、米国特許出願番号第10/879,494号、及び2004年6月28日付出願、“2'-TERMINATOR NUCLEOTIDE-RELATED METHODS AND SYSTEMS”、米国特許出願番号第110/879,493号を参考のこと。60で1時間の混合物のインキュベーションは、鋳型指示された態様での配列Q Xの3'末端での1つのヌクレオチドの伸長を引起し、プライマーQ X^{FAM}として下記に示される。フルオレセイン-標識されたオキシリボアデニン2'-リン酸ヌクレオチドにより、それらの3'末端で伸長されるQ Xオリゴヌクレオチドの少なくとも1部をもたらす。

【0189】

【表7】

表IV

混合成分	濃度
トリシンpH 8.3	50 mM
KOAc	100 mM
グリセロール	8% (w/v)
プライマーQ X	10 μM
オリゴヌクレオチドR 1	15 μM
フルオレセインdA 4P	15 μM
G 4 6 E L 3 2 9 A E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼ	50 nM
Mg (OAc) ₂	2.5 mM

30

【0190】

新たに伸長されたプライマーQ X^{FAM}を、当業者に知られているいづれかの数の精製方法を用いて、上記混合物から精製した。混合物からプライマーQ X^{FAM}を精製できるそのような方法の例は、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)である。HPLC精製パラメーターは、プライマーQ X^{FAM}の調製物が伸長されていないプライマーQ X及びフルオレセイン-標識されたアデニン四リン酸を実質的に有さないよう選択される。二重HPLC(逆相及びアニオン交換HPLC)は、そのような分子を精製するための方法として知られている。

【0191】

精製されると、分子、例えば同じオリゴヌクレオチド上にBHQ消光分子及びフルオレ

40

50

セイン分子を含むプライマー Q X^{FAM}は通常、BHQ2「消光剤」分子によるエネルギー吸収のために、抑制されたフルオレセインシグナルを示す。

【0192】

任意には、プライマー Q X^{FAM}は、本明細書に記載のようにして化学的に合成される。

【0193】

本実施例で言及される配列は、次の通りである：

プライマー Q X 5' - G C A A G C A C C C T A T C A^Q G G C A G T A C C A C A - 3' (配列番号 18)

(ここで、QはBHQ分子の存在を表す)

R 1 3' - P C G T T C G T G G G A T A G T C C G T C A T G G T G T T - 5' (10
配列番号 19)

(ここで、Pは3'リン酸分子を表す)

プライマー Q X^{FAM} 5' - G C A A G C A C C C T A T C A^Q G G C A G T A C C A C A F - 3' (配列番号 20)

(ここで、QはBHQ分子の存在を表し、Fはフルオレセイン - 標識された2'リン酸アデニンを表わす)

プライマー H C 2 5' - G C A G A A A G C G T C T A G C C A T G G C T T A - 3' (配列番号 21)。

【0194】

PCRへのプライマーの使用 :

20

上述のプライマー Q X^{FAM}を、表Vの試薬と組合せる。

【表8】

表V

成分	濃度
トリシン pH 8.0	100 mM
KOAc	100 mM
グリセロール	3.5% (v/v)
DMSO	5% (v/v)
プライマー Q X ^{FAM}	150 nM
プライマー H C 2	150 nM
dATP	200 μM
dCTP	200 μM
dGTP	200 μM
dTTP	30 μM
dUTP	300 μM
UNG	1単位
PPi	175 μM
GLQDSE	15 nM
標的配列	10 ⁶ コピー
Mg(OAc) ₂	3.0 mM

30

40

【0195】

さらに、各反応は、DEPC処理された水により50 μlとする。いくつかの反応はPCR增幅のための基質として作用する標的配列を含み、他は標的を含まない。例えば、標的はHCVゲノムの5'UTR領域と同一のDNA配列であり得る。PCRにおけるこれらのプライマーの組合せは、約244 bpのアンプリコンを生成することが予測される。

【0196】

反応を、次の温度プロフィールを用いて、ABI Prism7700配列検出器により実施するこ

50

とができる：

5 0 、 1 分

9 3 、 1 分

9 0 、 1 5 秒

6 0 、 1 5 0 秒 × 6 0 循環。

【 0 1 9 7 】

かかる P C R を進行させるには、フルオレセイン終止プライマー Q X F A M の P A P 活性化が必要であり、これによりフルオレセイン標識デオキシアデニン四リン酸分子の除去が生じる。かかる放出は、約 5 2 0 n m の波長でフルオレセインシグナルの上昇をもたらすことが予測される。P C R の進行につれ、約 5 2 0 n m の波長でのシグナルのモニタリングにより、標的核酸を含む反応ではフルオレセインの上昇が観察される一方で、標的を含まない反応ではフルオレセインの上昇は観察されないと予測される。
10

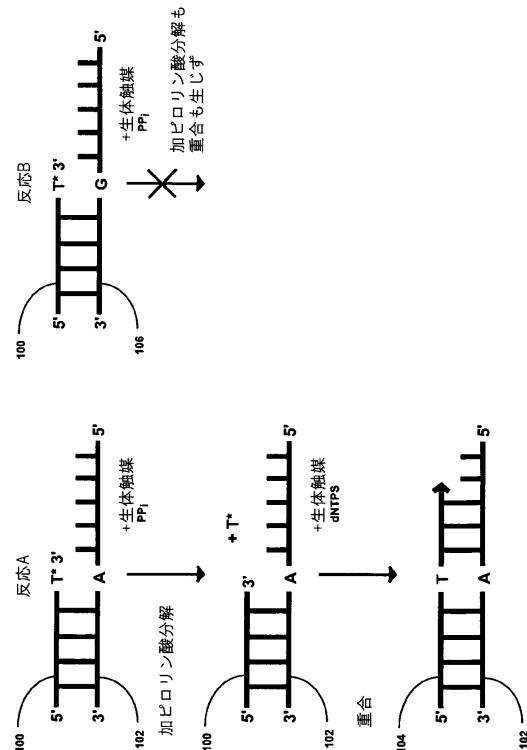
【 0 1 9 8 】

以上では発明の明確化及び理解のために幾分詳細に説明したが、本開示を読めば、本発明の範囲内で種々の変更を加えてもよいことは、当業者であれば当然に理解するであろう。例えば、上記の手法及び装置はいずれも、種々の組合せで使用することができる。

【 0 1 9 9 】

言及するプライマー又はヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列は、いずれも人工配列である。

【 図 1 】



【 図 2 A 】

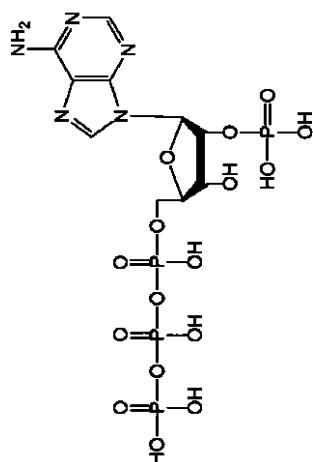


Figure 1

Fig. 2A

【図 2 B】

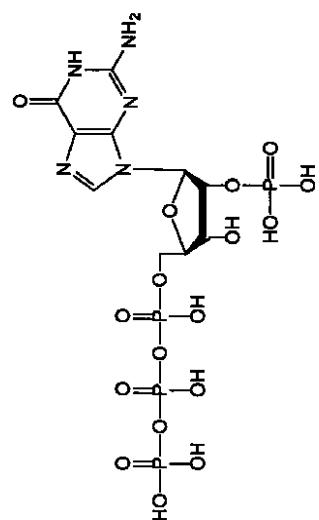


Fig. 2B

【図 2 C】

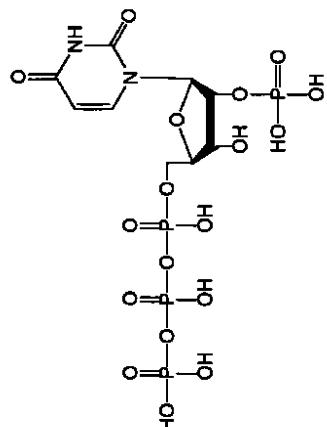


Fig. 2C

【図 2 D】

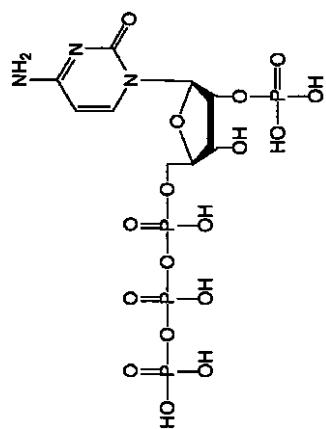


Fig. 2D

【図 4】

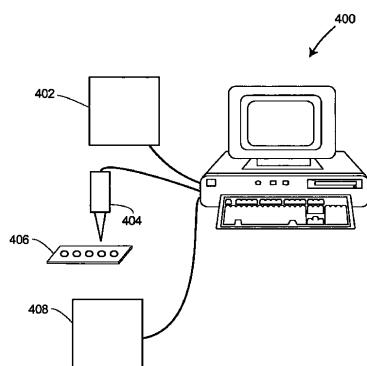


Figure 4

【図 3】

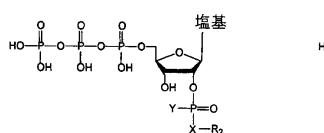


Fig. 3A

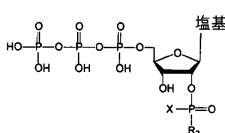


Fig. 3B

【図5】

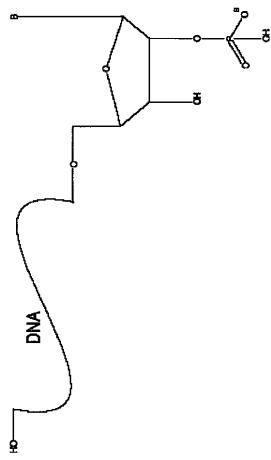


Figure 5

【図6】

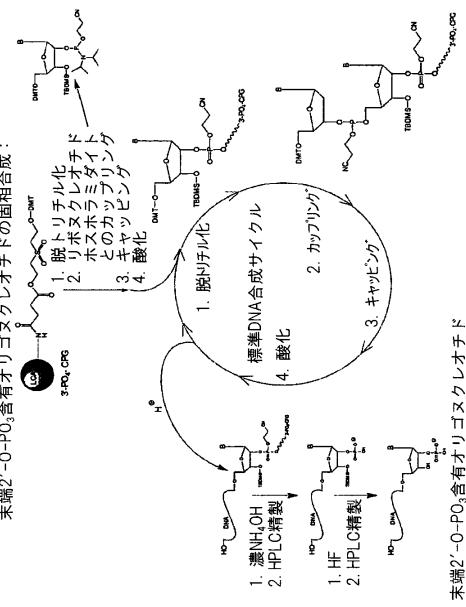


Figure 6

【図7】

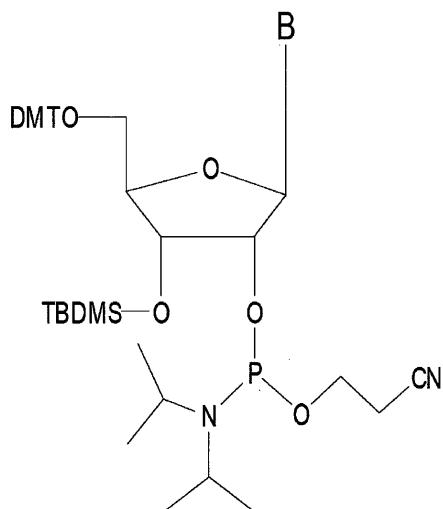


Figure 7

【図8】



Figure 8

【図9】

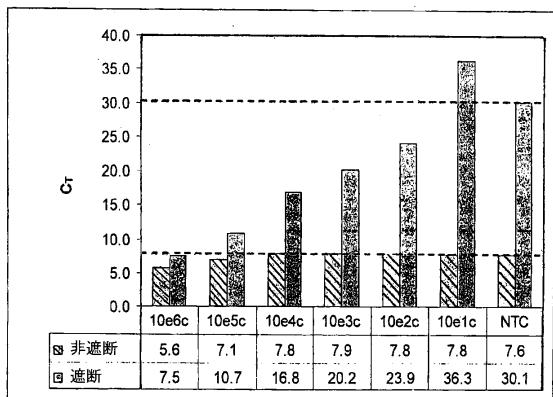


Figure 9

【図10】

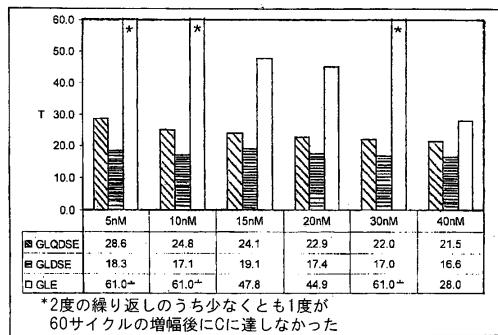


Figure 10

【図11】

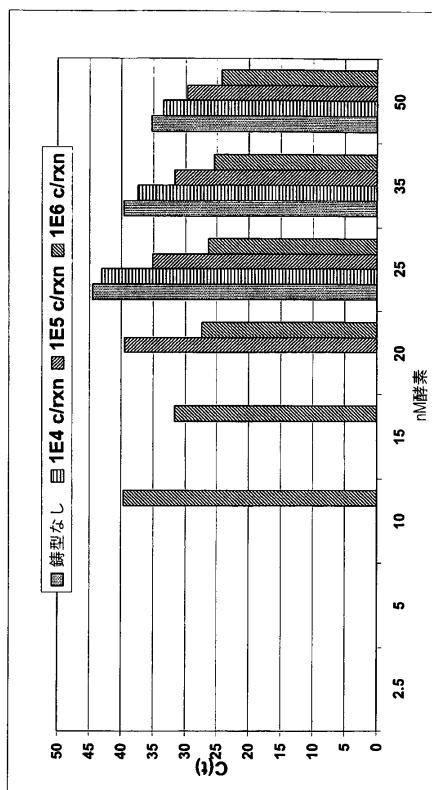


Figure 11

【図12】

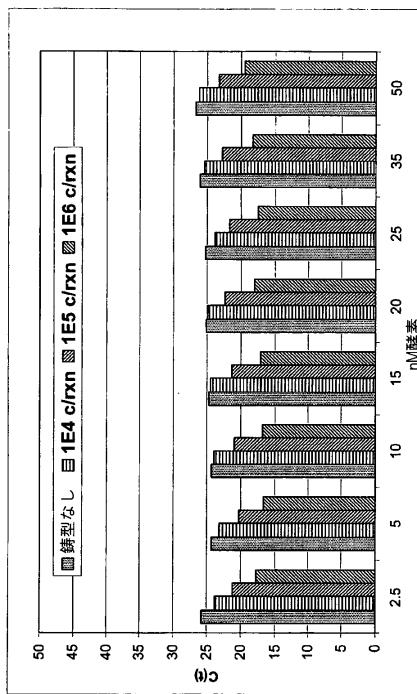


Figure 12

【図13】

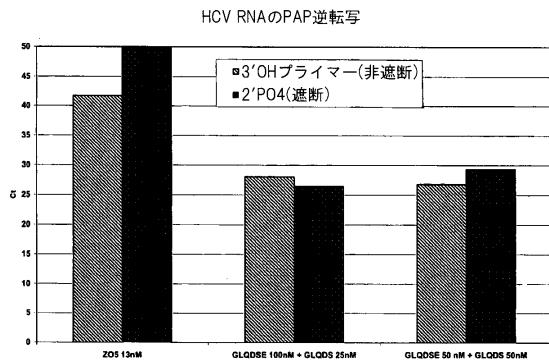


Figure 13

【図14】

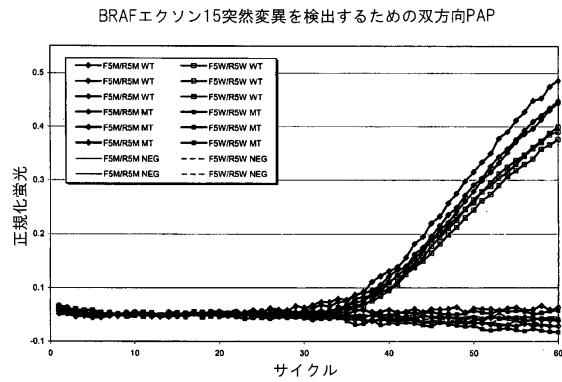


Figure 14

【配列表】

0005421112000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(72)発明者 ゲルファンド, デイビッド ハロウ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94111, オークランド, チェルトン ドライブ 6208
(72)発明者 バウアー, キース エー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94901, サン ラファエル, ウエスト クレセント ドラ
イブ 62
(72)発明者 グブタ, エイマー ピー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94526, ダンビル, ガードナー プレイス 115
(72)発明者 ボードプディ, ビーライナー
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94583, サンラモン, スイートゲート ドライブ 457
3
(72)発明者 ニーミーク, ジョン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94577, サン リンドロ, フォーチュナ アベニュー 5
57

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 国際公開第2005/118608 (WO, A1)
国際公開第2005/005667 (WO, A1)
Tricine, [online], 2013年 1月17日, Retrieved from the Internet, URL, http://
/www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5853856.htm
Trends Biotechnol., 2005年, Vol.23, No.2, p.92-96

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
P u b M e d
S c i e n c e D i r e c t