

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-506706
(P2024-506706A)

(43)公表日 令和6年2月14日(2024.2.14)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6834(2018.01)	C 1 2 Q	1/6834	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z
C 1 2 Q	1/6827(2018.01)	C 1 2 Q	1/6827	Z
C 1 2 Q	1/6886(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全94頁)				

(21)出願番号	特願2023-549569(P2023-549569)	(71)出願人	521027629
(86)(22)出願日	令和4年2月16日(2022.2.16)		バイオフィデリティ・リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年10月4日(2023.10.4)		イギリス国 シービー４ ０ダブリューエ
(86)国際出願番号	PCT/GB2022/050418		ヌ ケンブリッジ, ミルトン・ロード,
(87)国際公開番号	WO2022/175657		ケンブリッジ・サイエンス・パーク 3
(87)国際公開日	令和4年8月25日(2022.8.25)		3 0
(31)優先権主張番号	2102170.4	(74)代理人	100118902
(32)優先日	令和3年2月16日(2021.2.16)		弁理士 山本 修
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(74)代理人	100106208
			弁理士 宮前 徹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100196508
			弁理士 松尾 淳一
		(74)代理人	100157923
			弁理士 鶴喰 寿孝
		(72)発明者	ストラレクーヤヌツキーヴィッチ, マグ 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチド検出のためのパネルおよび方法

(57)【要約】

本発明は、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出するための分子学的システム、およびその使用方法に関する。

【選択図】 図 1

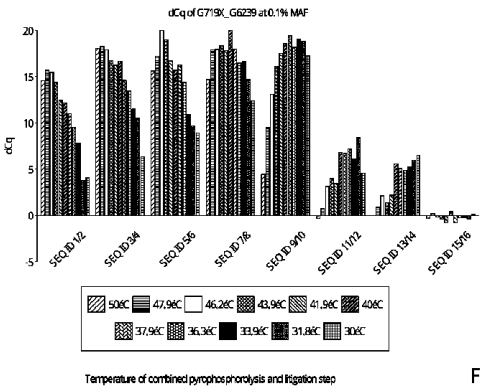


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

所定の核酸分析物中の複数の標的ポリヌクレオチド配列を検出するための複数の分子学的システムを含むパネルであって、複数の分子学的システムのそれぞれが、プローブ分子 (A_0) と、ハイブリダイズしたスプリント分子 (C) とを含み、

a. それぞれの A_0 が、標的ポリヌクレオチド配列のうちの 1 つと相補的な様々な 3' 末端、ループ領域、および 5' リン酸とを有し、

b. C が、 A_0 の 5' 末端とハイブリダイズし、様々な配列を有する一本鎖 3' オーバーハングを提供する、

一本鎖 3' オーバーハングが、 A_0 の 3' 末端から 5' 方向に 1 ~ 50 塩基のループ領域内に位置する領域とハイブリダイズすることができる、パネル。 10

【請求項 2】

A_0 の 5' 末端がエクソヌクレアーゼ分解に対して耐性である、請求項 1 に記載のパネル。

【請求項 3】

A_0 および C が、最小で 5 個の相補的ヌクレオチドを含む領域にわたって、 A_0 の 5' 末端でハイブリダイズする、請求項 1 または 2 に記載のパネル。

【請求項 4】

C の一本鎖 3' オーバーハングが、最小で 5 個の相補的ヌクレオチドを含む領域にわたって、 A_0 の 3' 末端から 5' 方向に 1 ~ 50 塩基に位置する領域と相補的である、請求項 1、2、または 3 に記載のパネル。 20

【請求項 5】

相補的領域が最小で 7 個のヌクレオチドの長さである、請求項 3 または 4 に記載のパネル。

【請求項 6】

A_0 の 3' 末端が、癌性腫瘍細胞の DNA または RNA 内の遺伝子または染色体の領域と相補的である、前述の請求項のいずれか一項に記載のパネル。

【請求項 7】

A_0 の 3' 末端が、非小細胞肺癌 (NSCLC) 中に見出される突然変異をコードしている遺伝子の領域と相補的である、請求項 6 に記載のパネル。 30

【請求項 8】

所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法であって、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の分子学的システムのパネルを採用し、

i) 試料を、分子学的システムのパネルを含む反応混合物に導入するステップと、

ii) A_0 を加ピロリン酸分解用の酵素で処理することによって、標的と完全にハイブリダイズしている相補的ヌクレオチドを A_0 の 3' 末端から除去して、短縮されたプローブ A_1 を形成するステップと、

iii) C を使用して A_1 の 3' 末端から標的を追放するステップと、

iv) A_1 の末端をライゲーションさせて、事前にハイブリダイズさせた C を使用して環を形成して、環状の A_2 を形成するステップと、 40

v) A_2 の存在を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 9】

標的ポリヌクレオチドが遺伝子突然変異の部位を含み、この突然変異が、野生型配列と比較して試料中に低レベルで存在する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

A_2 が 20 ~ 200 個のヌクレオチドの長さである、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

A_2 が 40 ~ 100 個のヌクレオチドの長さである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

(i v) の後、エクソヌクレアーゼを使用して、環状化されていないすべての核酸物質を消化する、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

A₀ が、エクソヌクレアーゼ分解に対して耐性である 5' 末端を有し、5' - 3' エクソヌクレアーゼを使用して、このエクソヌクレアーゼ分解に対する耐性が与えられていないすべての核酸分子を消化する、請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

使用するエクソヌクレアーゼが、5' リン酸基の存在に少なくとも部分的に依存する活性を有し、消化を、キナーゼおよびリン酸ドナーの存在下で実施する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ (i i) が、ホスファターゼの存在下で実施される、請求項 9 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

加ピロリン酸分解反応が、ステップ (i i) の後にピロホスファターゼの添加を通じて停止される、請求項 9 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ (i v) の後、A₂ の検出が核酸増幅を介するものである、請求項 9 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ (v) が、1 つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブを使用するステップを含む、請求項 9 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

複数の分子学的システムが用いられ、それぞれが異なる標的配列に対して選択的な A₀ を含み、それぞれの A₀ が同定領域を含む、請求項 9 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

同定領域が、分子プローブを使用してまたはシーケンシングを通じて特徴づけられる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

同定領域が、核酸増幅のためのプライミング部位として使用され、それにより A₂ の検出および同定が可能になる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

(v) が、

v i i i . 1 つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して、A₂ からの増幅産物を標識するステップと、

i x . 蛍光シグナルを測定するステップと、

x . A₂ からの増幅産物を一組の変性条件に曝露させるステップと、

x i . 変性条件への曝露中の蛍光シグナルの変化をモニタリングすることによって、分析物中のポリヌクレオチド標的配列を同定するステップとをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

異なるプローブ A₀ が、増幅のための共通のプライミング部位を含み、それにより単一または単一組の増幅プライマーを使用することが可能になる、請求項 9 から 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の分子学的システムと、

— リガーゼと、

— ピロホスホリル化酵素と、

— 加ピロリン酸分解反応を駆動するために適したイオン供給源と、

10

20

30

40

50

ー 適切な緩衝液と
を含むキット。

【請求項 25】

d N T P とポリメラーゼとをさらに含む、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

標的核酸配列を含む領域の増幅のためのプライマーをさらに含む、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

逆転写酵素をさらに含む、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】

d U T P および U D G をさらに含む、請求項 25 から 27 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出するための分子学的システム、およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）は、実験室および診断的試料中に存在する D N A または R N A を、信頼度高く検出および／または定量することができる程度まで増幅するための、周知かつ強力な技法である。しかし、そのような分子を低レベルで含有する分析物試料を調査する目的に適用した場合、これはいくつかの制限に苦しむ。第 1 に、この技法は、少なれば単一の標的分子を検出することができる一方で、試料中に存在する他の核酸配列の望まない増幅が原因で偽の陽性結果を生じやすい。これにより、反応を開始させるために使用するオリゴヌクレオチドプライマーの選択が重要となり、立ち代ってこれは、所要レベルの特異性を有するプライマーの設計を比較的複雑にする。その結果、現在市場で利用可能な多くの P C R に基づく試験は特異性が制限されている。

【0003】

第 2 の欠点は、P C R に基づく方法の複合化は、プライマー－プライマーの相互作用を回避するために、実際には最大で数十標的配列（しばしば 10 個を超えない）に制限されており、比較的狭い操作ウィンドウの必要性をもたらすことである。

【0004】

別の問題は、P C R 反応サイクルが指数関数的な様式であるため、標的の定量が困難であることである。反応効率の小さな変動が、生じる検出可能な材料の量に多大な影響を与える。したがって、適切な対照および較正を行った場合でも、定量は典型的には約 3 倍以内の正確さに制限される。

【0005】

最後に、P C R 増幅方法による調査の標的とされた領域中の突然変異は、望まない副作用を有する場合がある。たとえば、標的生物が、試験プライマーが標的とする遺伝子領域中に突然変異を起こし、多数の偽陰性を生じたため、F D A に認可された試験を撤回しなければならなかった事例がある。逆に、特定の一塩基多型（S N P）が増幅の標的とされている場合、野生型変異体が存在する場合は P C R 方法はしばしば偽陽性を示す。この回避には非常に注意深いプライマー設計を要し、複合化の有効性をさらに制限する。このことは、癌の試験／スクリーニングまたはコンパニオン診断における一般的な要件である、S N P のパネルを検索する際に特に関連性がある。

【発明の概要】

【0006】

本発明者らは今回、これらの制限の多くに打ち克つ、本発明者らの以前の特許（W O 2 0 0 1 6 5 9 0 A 1 号、P C T / G B 2 0 2 0 / 0 5 3 3 6 1 号、P C T / G B 2 0 2 0 / 0 5 3 3 6 2 号、P C T / G B 2 0 2 0 / 0 5 3 3 6 3 号、G B 2 0 2 0 5 3 9 . 9

10

20

30

40

50

号、および G B 2 1 0 1 1 7 6 . 2 号) において用いた加ピロリン酸分解反応を使用した本発明者らの経験に基づく、改善された方法を開発した。その際、これは、一本鎖オリゴヌクレオチド基質または遮断基もしくはヌクレオチドミスマッチを含む二本鎖基質では効率的に進行しない反応である加ピロリン酸分解の二本鎖特異性を利用する。この新しい方法は、低濃度の標的配列のより確信的なコールを可能にする。したがって、本発明によれば、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出するための分子学的システムであって、プローブ分子 (A_0) と、ハイブリダイズしたスプリント分子 (C) とを含み、

a. A_0 が、標的ポリヌクレオチド配列と相補的な 3' 末端、ループ領域、および 5' リン酸とを有し、

b. C が、 A_0 の 5' 末端とハイブリダイズし、一本鎖 3' オーバーハングを提供し、一本鎖 3' オーバーハングが、 A_0 の 3' 末端から 5' 方向に 1 ~ 50 塩基に位置する領域とハイブリダイズすることができる、分子学的システムが提供される。

【0007】

所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法であって、分子学的システムを採用し、

i) 分子学的システムを試料に導入するステップと、

ii) A_0 を加ピロリン酸分解用の酵素で処理することによって、標的と完全にハイブリダイズしている相補的ヌクレオチドを A_0 の 3' 末端から除去して、短縮されたプローブ A_1 を形成するステップと、

iii) C を使用して A_1 の 3' 末端を標的から追放するステップと、

iv) A_1 の末端をライゲーションさせて、事前にハイブリダイズさせた C を使用して環を形成して、環状の A_2 を形成するステップと、

v) A_2 の存在を検出するステップと

を含む方法がさらに提供される。

【0008】

本発明の方法を適用することができる分析物は、天然に存在するまたは合成の DNA または RNA 分子などの、探求中の標的ポリヌクレオチド配列を含めた核酸である。一実施形態では、分析物は、典型的には分析物および他の生体物質を含有する水溶液中に存在し、一実施形態では、分析物は、試験の目的のためには目的でない、他の背景核酸分子と共に存在する。一部の実施形態では、分析物は、これらの他の核酸成分と比較して低い量で存在する。好ましくは、たとえば、分析物が細胞物質を含有する生物学的検体に由来する場合は、方法のステップ (i) を行う前に、これらの他の核酸および外来生体物質の一部または全部を、濾過、遠心分離、クロマトグラフィー、または電気泳動などの試料調製技法を使用して除去する。適切には、分析物は、血液、血漿、痰、尿、皮膚、または生検などの、哺乳動物対象 (特にヒト患者) から採った生体試料に由来する。一実施形態では、生体試料を溶解に供して、存在するすべての細胞を破壊することによって分析物を放出させる。他の実施形態では、分析物は、血液または血漿中に循環する無細胞 DNA など、試料自体内に遊離形態で既に存在し得る。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図 1】実施例 1、加ピロリン酸分解反応の最適温度に対する、プローブと標的との間のアニーリング領域の長さの効果の結果を示す図であり、野生型と突然変異体含有試料との間で観察された Cq の相違 (dCq) の値を示す。加ピロリン酸分解反応を 30 ~ 50 °C で実行した。アニーリング領域の長さを表 1 中に要約する。プローブと標的分子との間のアニーリング領域の長さが長ければ長いほど、最適温度が高くなる。29 塩基対 (配列番号 1 / 2) の相補性では、最適は 46 ~ 50 °C であり、22 塩基対では 30 ~ 42 °C である。アニーリング領域が短すぎると、 dCq の減少をもたらす場合がある (配列番号 11 / 12 および 13 / 14)。19 塩基対の長さでは、標的分子の存在を示す陽性シグナルを検出することはできなかった (配列番号 15 / 16)。

【図 2】実施例 2、プローブと標的とスプリントとの間のアニーリング領域の長さの効果の結果を示す図であり、野生型と突然変異体含有試料との間で観察された dcq の相違 (dCq) の値を示す。試験した長さの要約は表 2 中に見つけることができる。プローブ配列番号 22 (図 2 A) では、最も性能のよいスプリント配列は配列番号 24 である。プローブ配列番号 23 (図 2 B) では、最も性能のよいスプリント配列は配列番号 31 である。ライゲーション点の位置がプローブ配列の開始点に近ければ近いほど、 dCq の値が大きくなる。配列番号 22 と比較して、プローブ配列番号 23 を使用した場合、17 塩基対と比較して 23 塩基対と、標的とより長い相補性領域を有するため、 dCq の値がより大きくなる。

【図 3】実施例 3 の結果を示す図であり、2 つの異なるプローブ／スプリントの組合せ、すなわち配列番号 22／配列番号 24 および配列番号 23／配列番号 44 の 2 つの異なる突然変異対立遺伝子画分 (AF) での、野生型と突然変異体含有試料との間で観察された Cq の相違 (dCq) の値を示す。プローブ配列番号 22 および 23 は、それぞれ標的分子と 17 および 35 塩基長の相補的領域を有する。相補的塩基数が高ければ高いほど／相補的領域の長さが長ければ長いほど、標的分子の 0.1% および 0.5% の AF 濃度について見られる dCq の値が高くなる。

【図 4】作動中の方法の略画を示す図である。事前にハイブリダイズさせたプローブ配列を標的に導入する。A0 の末端が完全に相補的である場合 (図 4 a)、末端は短縮される。短縮された A1 の末端は、配列 C によって分子内で追放することができる。C は、A1 の末端にわたるスプリントを形成し、A1 が環状となることが可能となり、環状生成物 A2 が形成される。A0 の末端が標的と完全に相補的でない場合 (図 4 b)、プローブはミスマッチまでしか短縮されない。C の末端は標的を A1 から追放することができず、環状生成物は形成されない。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明の一態様では、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出するための分子学的システムであって、プローブ分子 (A_0) と、ハイブリダイズしたスプリント分子 (C) とを含み、

a. A_0 が、標的ポリヌクレオチド配列と相補的な 3' 末端、ループ領域、および 5' リン酸とを有し、

b. C が、 A_0 の 5' 末端とハイブリダイズし、一本鎖 3' オーバーハングを提供し、一本鎖 3' オーバーハングが、 A_0 の 3' 末端から 5' 方向に 1~50 塩基に位置する領域とハイブリダイズすることができる、分子学的システムが提供される。

【0011】

一部の実施形態では、 A_0 の 5' 末端はエクソヌクレアーゼ分解に対して耐性である。

一部の実施形態では、 A_0 および C は、最小で 5 個の相補的ヌクレオチドを含む領域にわたって、 A_0 の 5' 末端でハイブリダイズする。

【0012】

一部の実施形態では、 C の一本鎖 3' オーバーハングは、最小で 5 個の相補的ヌクレオチドを含む領域にわたって、 A_0 の 3' 末端から 5' 方向に 1~50 塩基に位置する領域と相補的である。

【0013】

一部の実施形態では、相補的領域は最小で 7 個のヌクレオチドの長さである。

一部の実施形態では、 A_0 の 3' 末端は、癌性腫瘍細胞の DNA または RNA 内の遺伝子または染色体の領域と相補的である。

【0014】

一部の実施形態では、 A_0 の 3' 末端は、非小細胞肺癌 (NSCLC) 中に見出される突然変異をコードしている遺伝子の領域と相補的である。

一部の実施形態では、 A_0 の 3' 末端、または A_0 の 3' 末端の一部分は、続いて記載する遺伝子と相補的である。

10

20

30

40

50

【0015】

一実施形態では、複数の分子学的システムを含むパネルが提供される。

一実施形態では、所定の核酸分析物中の複数の標的ポリヌクレオチド配列を検出するための複数の分子学的システムを含むパネルであって、複数の分子学的システムのそれぞれが、プローブ分子 (A_0) と、ハイブリダイズしたスプリント分子 (C) とを含み、

a. それぞれの A_0 が、標的ポリヌクレオチド配列のうちの1つと相補的な様々な3'末端、ループ領域、および5'リン酸とを有し、

b. C が、 A_0 の5'末端とハイブリダイズし、様々な配列を有する一本鎖3'オーバーハングを提供する、

一本鎖3'オーバーハングが、 A_0 の3'末端から5'方向に1~50塩基のループ領域内に位置する領域とハイブリダイズすることができる、パネルが提供される。 10

【0016】

一実施形態では、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法であって、以前にまたは続いて記載した分子学的システムを採用し、

i) 試料を、分子学的システムを含む反応混合物に導入するステップと、

ii) A_0 を加ピロリン酸分解用の酵素で処理することによって、標的と完全にハイブリダイズしている相補的ヌクレオチドを A_0 の3'末端から除去して、短縮されたプローブ A_1 を形成するステップと、

iii) C を使用して A_1 の3'末端を標的から追放するステップと、

iv) A_1 の末端をライゲーションさせて、事前にハイブリダイズさせた C を使用して環を形成して、環状の A_2 を形成するステップと、 20

v) A_2 の存在を検出するステップとを含む方法が提供される。

【0017】

一実施形態では、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法であって、本明細書中に記載のように、分子学的システムのパネルを採用し、

i) 試料を、分子学的システムのパネルを含む反応混合物に導入するステップと、

ii) A_0 を加ピロリン酸分解用の酵素で処理することによって、標的と完全にハイブリダイズしている相補的ヌクレオチドを A_0 の3'末端から除去して、短縮されたプローブ A_1 を形成するステップと、 30

iii) C を使用して A_1 の3'末端を標的から追放するステップと、

iv) A_1 の末端をライゲーションさせて、事前にハイブリダイズさせた C を使用して環を形成して、環状の A_2 を形成するステップと、

v) A_2 の存在を検出するステップとを含む、方法が提供される。

【0018】

一部の実施形態では、分子学的システムを含む反応混合物は第1の反応混合物と呼ぶ。

一部の実施形態では、 A_2 の存在の検出は、ステップ (iv) の生成物を第2の反応混合物に添加することによって達成され、前記第2の反応混合物は A_2 の検出を可能にする試薬を含む。 40

【0019】

一部の実施形態では、分子学的システムを含む反応混合物は、加ピロリン酸分解酵素をさらに含む。一部の実施形態では、この反応混合物は、ピロリン酸イオン供給源をさらに含む。

【0020】

一部の実施形態では、生体試料中に存在するRNAの標的領域は、分子学的システムを含む反応混合物に導入する前に、逆転写酵素によってDNAへと逆転写される。一部の実施形態では、これは、逆転写酵素および適切なヌクレオチドの使用を介して達成される。

【0021】

一部の実施形態では、試料中に存在するRNAの標的領域は、試料中に存在する標的核 50

酸のPCRを介した増幅と同時に、DNAへと転写される。

一部の実施形態では、試料中に存在するRNAの任意の標的領域のDNAへの転写は、試料中に存在する標的核酸のPCRを介した任意の増幅とは別個のステップで起こる。

【0022】

以前にまたは続いて記載する方法のいずれかの一部の実施形態では、試料中に存在するRNAの標的領域はDNAへと転写されない。

そのような実施形態では、A₀は、RNA配列に対する加ピロリン酸分解を受けて、部分的に消化された鎖A₁を形成し、その後、方法は、以前にまたは続いて記載するように進行する。

【0023】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは遺伝子突然変異の部位を含み、この突然変異は、野生型配列と比較して試料中に低レベルで存在する。

一部の実施形態では、A₂は20～200個のヌクレオチドの長さである。

【0024】

一部の実施形態では、A₂は40～100個のヌクレオチドの長さである。

一部の実施形態では、(iv)の後、エクソヌクレアーゼを使用して、環状化されていないすべての核酸物質を消化する。

【0025】

一部の実施形態では、A₀は、エクソヌクレアーゼ分解に対して耐性である5'末端を有し、5'-3'エクソヌクレアーゼを使用して、このエクソヌクレアーゼ分解に対する耐性が与えられていないすべての核酸分子を消化する。

【0026】

一部の実施形態では、使用するエクソヌクレアーゼは、5'リン酸基の存在に少なくとも部分的に依存する活性を有し、消化は、キナーゼおよびリン酸ドナーの存在下で実施する。

【0027】

一部の実施形態では、ステップ(ii)は、ホスファターゼまたはジホスホヒドロラーゼの存在下で実施する。

一部の実施形態では、加ピロリン酸分解反応は、ステップ(ii)の後にピロホスファターゼの添加を通じて停止される。

【0028】

一部の実施形態では、ステップ(iv)の後、A₂の検出は核酸増幅を介するものである。

一部の実施形態では、ステップ(v)は、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブを使用するステップを含む。

【0029】

一部の実施形態では、複数の分子学的システムが用いられ、それぞれが異なる標的配列に対して選択的なA₀を含み、それぞれのA₀が同定領域を含む。

一部の実施形態では、同定領域は、分子プローブを使用してまたはシーケンシングを通じて特徴づけられる。

【0030】

一部の実施形態では、同定領域が、核酸増幅のためのプライミング部位として使用され、それによりA₂の存在および正体の決定が可能になる。

一部の実施形態では、(v)は、以下のステップ：

i. 1つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して、A₂からの増幅産物を標識するステップと、

ii. 蛍光シグナルを測定するステップと、

iii. A₂からの増幅産物を一組の変性条件に曝露させるステップと、

iv. 変性条件への曝露中の蛍光シグナルの変化をモニタリングすることによって、分析物中のポリヌクレオチド標的配列を同定するステップと

10

20

30

40

50

をさらに含む。

【0031】

一部の実施形態では、ステップ (i i) の前に、分析物を複数の反応体積へと分割し、それぞれの体積は、異なる標的配列を検出するために異なるプローブオリゴヌクレオチド A_0 が導入された、異なる分子学的システムを有し、ここで、異なるプローブ A_0 は、増幅のための共通のプライミング部位を含み、それにより単一または単一組の増幅プライマーを A_2 の検出に使用することが可能になる。

【0032】

一部の実施形態では、分子学的システムと：

- － リガーゼと、
- － ピロホスホリル化酵素と、
- － 加ピロリン酸分解反応を駆動するために適したイオン供給源と、
- － 適切な緩衝液と

を含むキットが提供される。

【0033】

一部の実施形態では、キットは、 $dNTP$ とポリメラーゼとをさらに含む。

一部の実施形態では、(i) の前に、試料を、1つまたは複数のプライマー、デオキシヌクレオチド三リン酸 ($dNTP$)、および増幅酵素を含む反応混合物に導入し、ステップ (i) の前に、試料中に存在する核酸分析物は増幅を受ける。一部の実施形態では、続いてこの増幅の産物を、(i) の前にプロテイナーゼで処理する。

【0034】

一部の実施形態では、試料をステップ (i) の前にプロテイナーゼで処理する。一部の実施形態では、試料をステップ (i) 中にプロテイナーゼで処理する。一部の実施形態では、試料をステップ (i) の後にプロテイナーゼで処理する。

【0035】

一部の実施形態では、プロテイナーゼをステップ (i) の前に熱失活させる。

一部の実施形態では、第2の反応混合物は、

- － 少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチド、デオキシヌクレオチド三リン酸 ($dNTP$)、および増幅酵素、または
- － ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) に適した試薬、または
- － ライゲーション連鎖反応 (LCR) に適した試薬

をさらに含み、加ピロリン酸分解酵素は、増幅を行うものと任意選択で同じ酵素である。

【0036】

一部の実施形態では、デオキシヌクレオチド三リン酸 ($dNTP$) はホットスタート $dNTP$ である。

ホットスタートデオキシヌクレオチド三リン酸 ($dNTP$) は、3' 末端で熱不安定性保護基で修飾された $dNTP$ である。この修飾の存在は、ヌクレオチド保護基が熱活性化ステップを使用して除去されるまで、DNAポリメラーゼヌクレオチドの取り込みを遮断する。

【0037】

一実施形態では、第2の反応混合物は、ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) のための成分をさらに含む。

本実施形態では、第2の反応混合物は、ヘアピンオリゴヌクレオチド1 (HO1) およびヘアピンオリゴヌクレオチド2 (HO2) をさらに含み、ヘアピンオリゴヌクレオチドのそれぞれがフルオロフォアおよびクエンチャーを含み、それぞれのオリゴヌクレオチドがヘアピン立体配置に保たれる場合に、フルオロフォアとクエンチャーは互いに接触している。HO1は、 A_2 がHO1とアニーリングし、「ヘアピン」構造を開いてフルオロフォアをクエンチャーから分離させるように設計されており、ここで今は「開いた」HO1は、今はHO2とアニーリングし、「ヘアピン」構造を開いてフルオロフォアをクエンチャーから分離させることができる。

10

20

30

40

50

【0038】

本実施形態では、1つのA₂の存在がヘアピンオリゴヌクレオチドの開口の連鎖反応を引き起こし、検出可能な蛍光シグナルの生成をもたらすことができるように、複数のヘアピンオリゴヌクレオチドが存在する。この方法は、文献中においてハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）として知られる。

【0039】

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対のフルオロフォアは、それだけには限定されないが、フルオレセインファミリー、カルボキシローダミンファミリー、シアニンファミリー、およびローダミンファミリーの色素から選択される。使用することができる他の色素ファミリーとしては、たとえば、ポリハロフルオレセインファミリー色素、ヘキサクロフルオレセインファミリー色素、クマリンファミリー色素、オキサジンファミリー色素、チアジンファミリー色素、スクアレインファミリー色素、キレート化ランタニドファミリー色素、Molecular Probesから商品名Alexa Fluor Jの下で入手可能な色素ファミリー、ATTO-TEC（ドイツSiegen）から商品名Attoの下で入手可能な色素ファミリー、およびInvitrogen（カリフォルニア州Carlsbad）から商品名Bodipy Jの下で入手可能な色素ファミリーが挙げられる。フルオレセインファミリーの色素としては、たとえば、6-カルボキシフルオレセイン（FAM）、2', 4', 1, 4, -テトラクロフルオレセイン（TET）、2', 4', 5', 7', 1, 4-ヘキサクロフルオレセイン（HEX）、2', 7'-ジメトキシ-4', 5'-ジクロ-6-カルボキシローダミン（JOE）、2'-クロ-5'-フルオロ-7', 8'-融合フェニル-1, 4-ジクロ-6-カルボキシフルオレセイン（NED）、2'-クロ-7'-フェニル-1, 4-ジクロ-6-カルボキシフルオレセイン（VIC）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、および2', 4', 5', 7'-テトラクロ-5-カルボキシフルオレセイン（ZOE）が挙げられる。カルボキシローダミンファミリーの色素としては、テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）、テトラプロパノ-6-カルボキシローダミン（ROX）、テキサスレッド、R110、およびR6Gが挙げられる。シアニンファミリーの色素としては、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、およびCy7が挙げられる。フルオロフォアは、たとえば、Perkin-Elmer（カリフォルニア州Foster City）、Molecular Probes, Inc.（オレゴン州Eugene）、およびAmersham GE Healthcare（ニュージャージー州Piscataway）から容易に購入される。

【0040】

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対のクエンチャーは、蛍光クエンチャーまたは非蛍光クエンチャーであり得る。蛍光クエンチャーとしては、それだけには限定されないが、TAMRA、ROX、DABCYL、DABSYL、ニトロチアゾールブルー（NTB）を含むシアニン色素、アントラキノン、マラカイトグリーン、ニトロチアゾール、およびニトロイミダゾール化合物が挙げられる。フルオロフォアから吸収されたエネルギーを消散させる例示的な非蛍光クエンチャーとしては、Biosearch Technologies, Inc.（カリフォルニア州Novato）から商品名Black Hole（商標）の下で入手可能なもの、Epoch Biosciences（ワシントン州Bothell）から商品名Eclipse（商標）Darkの下で入手可能なもの、Anaspec, Inc.（カリフォルニア州San Jose）から商品名Qx1 Jの下で入手可能なもの、Integrated DNA Technologies（アイオワ州Coralville）から商品名ZENおよびTAOの下で入手可能なもの、ならびにIntegrated DNA Technologies（アイオワ州Coralville）から商品名Iowa Black（商標）の下で入手可能なものが挙げられる。

【0041】

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対のフルオロフォアは、フルオレ

セイン、ルシファーイエロー、B-フィコエリスリン、9-アクリジンイソチオシアネート、ルシファーイエローVS、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン、スクシンイミジル(succinimide) 1-ピレンブチレート、および4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸誘導体であり得る。

【0042】

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対のフルオロフォアは、LC-Red 640、LC-Red 705、Cy5、Cy5.5、リサミンローダミンBスルホニルクロライド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ローダミンXイソチオシアネート、エリスロシンイソチオシアネート、フルオレセイン、ジエチレントリアミンペンタアセテート、またはランタニドイオン（たとえばユーロピウムもしくはテルビウム）の他のキレートであり得る。

10

【0043】

一部の実施形態では、本発明は、二重にクエンチされた蛍光標識したオリゴヌクレオチドを利用する。第2の内部クエンチャーを含めることは、色素とクエンチャーとの間の距離を短縮させ、第1のクエンチャーと協力して、より大きな全体的な色素クエンチングを提供し、背景を低下させ、シグナル検出を増加させる。第2および第1のクエンチャーは、以前に記載したクエンチャーのうちの任意のものであり得る。

【0044】

20

一実施形態では、第2の反応混合物は、

- 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドAと、
 - 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドBと、
 - フルオロフォアークエンチャー対を含む基質と
- をさらに含み、A₂の存在下でオリゴヌクレオチドAおよびBが組み合わされて触媒的に多成分の核酸酵素(MNAzyme)が形成されるように、オリゴヌクレオチドAおよびBのセンサーアームがA₂のフランキング領域と相補的である。本実施形態では、MNAzymeはA₂の存在下でのみ形成され、検出可能な蛍光シグナルが生成されるようにフルオロフォアークエンチャー対を含む基質を切断する。

30

【0045】

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対は、以前に記載した通りであり得る。

一部の実施形態では、加ピロリン酸分解、ライゲーション、および検出可能な蛍光シグナルの生成が、さらなる試薬の添加なしで起こるように、本発明の反応混合物を合わせる。

【0046】

一代替実施形態では、第2の反応混合物は、部分的に二本鎖の核酸構築体であって、

- 一方の鎖が、少なくとも1つのRNA塩基、少なくとも1つのフルオロフォアを含み、この鎖の一領域がA₂の一領域と相補的であり、この鎖を「基質」鎖と呼んでよく、
 - 他方の鎖が、少なくとも1つのクエンチャーを含み、この鎖の一領域が、A₂の存在下で部分的に二本鎖の核酸構築体を実質的により二本鎖となるように、基質鎖が相補的である領域に隣接するA₂の一領域と相補的であり、
- 実質的により二本鎖となるプロセスにおいて、二本鎖核酸構築体の基質鎖がRNA塩基で切断され、「他方の」鎖の少なくとも1つのクエンチャーが基質鎖の少なくとも1つのフルオロフォアにもはや十分近接しなくなることが原因で蛍光を生じる、核酸構築体をさらに含む。

40

【0047】

言い換えれば、部分的に二本鎖の核酸構築体は、A₂の存在下でより大きな二本鎖部分

50

を有する。

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対は、以前に記載した通りであり得る。

【0048】

一部の実施形態では、適切な緩衝液および／またはイオンなどのさらなる試薬が第2の反応混合物中に存在する。

一部の実施形態では、反応混合物は Mg^{2+} イオンをさらに含む。

【0049】

一部の実施形態では、反応混合物は Zn^{2+} イオンをさらに含む。

一部の実施形態では、反応混合物は X^{2+} イオンをさらに含み、 X は金属である。

10

一部の実施形態では、反応混合物は1つまたは複数の X^{2+} イオンをさらに含み、 X は金属である。

【0050】

一代替実施形態では、第2の反応混合物は、リガーゼ連鎖反応（LCR）のための試薬をさらに含む。

一部の実施形態では、第2の反応混合物は、

a. 1つまたは複数のリガーゼと、

b. A_2 上の隣接配列と相補的な2つ以上のLCRプローブオリゴヌクレオチドであって、プローブが、 A_2 とのアニールリングが成功しており、一方のLCRプローブの5'リン酸が他方のLCRプローブの3'OHと直接隣接している、LCRプローブオリゴヌクレオチドと

20

を含む。

【0051】

一部の実施形態では、 A_2 の存在下では、2つのLCRプローブは A_2 とのアニールリングが成功し、一緒にライゲーションされて、1つのオリゴヌクレオチド分子を形成し、続いてこれが、第2ラウンドの共有的ライゲーションの新しい標的として働き、目的の標的、この場合は A_2 の幾何学的増幅をもたらす。ライゲーションされた生成物、または単位複製配列は、 A_2 と相補的であり、次の増幅サイクルにおいて標的として機能する。したがって、特異的標的DNA配列の指数関数的増幅は、過剰なLCRプローブの存在下における変性、ハイブリダイゼーション、およびライゲーションの繰り返しサイクルを通じて達成される。このことから、 A_2 の存在、ひいては標的ポリヌクレオチド配列の存在が暗示される。

30

【0052】

一部の実施形態では、 A_2 の存在下では、2つのPCRプローブは A_2 とのアニールリングが成功し、一緒にライゲーションされて、1つのオリゴヌクレオチド分子を形成し、その後、これが第2ラウンドの共有的ライゲーションの新しい標的として働き、目的の標的、この場合は A_2 の幾何学的増幅をもたらす、その後、これを検出する。

【0053】

一部の実施形態では、ライゲーションされたオリゴヌクレオチド分子は、挿入色素を使用してリアルタイムで検出する。

40

一部の実施形態では、ライゲーションされたオリゴヌクレオチド分子は、ゲル電気泳動を使用して検出する。

【0054】

当業者には、ライゲーションされたオリゴヌクレオチド分子の検出を可能にするであろう数々の技法が存在することが理解されよう。

一部の実施形態では、デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）はホットスタートdNTPである。

【0055】

一部の実施形態では、1つまたは複数のリガーゼは熱安定性である。

一部の実施形態では、1つまたは複数のリガーゼは天然に存在する。

50

別の実施形態では、1つまたは複数のリガーゼは操作されている。

【0056】

一部の実施形態では、1つまたは複数のリガーゼは、以前にまたは続いて開示されている任意のリガーゼから選択される。

一部の実施形態では、1つまたは複数のポリメラーゼは熱安定性である。

【0057】

一部の実施形態では、1つまたは複数のポリメラーゼは、以前にまたは続いて開示されている任意のポリメラーゼから選択される。

一部の実施形態では、1つまたは複数のポリメラーゼは天然に存在する。

【0058】

別の実施形態では、1つまたは複数のポリメラーゼは操作されている。

一部の実施形態では、1つまたは複数のポリメラーゼは、加ピロリン酸分解に使用するものと同じである。

【0059】

一部の実施形態では、本発明の1つまたは複数の酵素はホットスタート酵素である。

一部の実施形態では、本発明の1つまたは複数の酵素は熱安定性である。

一代替実施形態では、第2の反応混合物は、

a. A_2 と相補的である、フルオロフォアークエンチャー対を含むスプリントオリゴヌクレオチドと、

b. 二本鎖特異的DNA消化酵素と、

を含み、 A_2 の存在下では、スプリントオリゴヌクレオチドは、フルオロフォアークエンチャー対が分離し、蛍光シグナル、ひいては A_2 の存在が検出可能となるように消化される。

【0060】

一部の実施形態では、フルオロフォアークエンチャー対は、以前に記載した通りであり得る。一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素はエクソヌクレアーゼである。別の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素は、校正活性を有するポリメラーゼである。別の実施形態では、反応混合物は、校正活性を有するエクソヌクレアーゼまたはポリメラーゼのうちの1つまたは複数の混合物を含む。

【0061】

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素はホットスタート酵素である。

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素は、本方法の加ピロリン酸分解反応が起こる温度で活性が低下している。

【0062】

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素は、本方法の加ピロリン酸分解反応が起こる温度で活性を有さない。

一部の実施形態では、 A_0 の3'末端は、標的ポリヌクレオチド配列と完全に相補的である。

【0063】

一部の実施形態では、リガーゼは、一本鎖ライゲーション活性を実質的に欠く。

一部の実施形態では、部分的に消化された鎖 A_1 を含む反応混合物を、検出ステップの前またはその間に、無機ピロホスファターゼに導入する。

【0064】

化学的科学的では、メチル化とは、メチル基の基質への付加、またはメチル基による原子もしくは基の置換を示す。メチル化は、より大きな炭素鎖ではなく、具体的にメチル基を用いて水素原子を置き換えた、アルキル化の形態である。これらの用語は、化学、生化学、土壌科学、および生物科学において一般的に使用される。

【0065】

生物系では、メチル化は酵素によって触媒される。そのようなメチル化は、重金属の修飾、遺伝子発現の制御、タンパク質機能の制御、およびRNA代謝に関与する場合がある

10

20

30

40

50

。重金属のメチル化は、生物系外で起こる場合もある。組織試料の化学的メチル化は、特定の組織学的染色人工産物を低下させるための一方法でもある。

【0066】

異常なDNAメチル化プロファイルは、多数の様々な複雑な病状に関連づけられている。腫瘍学では、血清DNA中の腫瘍抑制遺伝子の過剰メチル化は、小細胞肺癌の診断的マーカーとして使用することができる。糖尿病、関節リウマチ（RA）、および全身性エリテマトーデス（SLE）などの免疫疾患を有する患者では、免疫系の細胞の異常なDNAメチル化が見出される。反復要素ALU、LINE-1、およびSatellite 2における末梢血白血球（PBL）の示差的DNAメチル化（全DNAメチル化の測定）が、虚血性心疾患に関連していることが見出されている。

10

【0067】

脊椎動物におけるDNAメチル化は、典型的にはCpG部位（シトシン-リン酸-グアニン部位、すなわち、DNA配列中でシトシンの直後にグアニンがある場所）で起こり、このメチル化はシトシンから5-メチルシトシンへの変換をもたらす。Me-CpGの形成は酵素DNAメチルトランスフェラーゼによって触媒される。哺乳動物DNAの大部分はCpG部位の約40%がメチル化されているが、メチル化されたものが存在しない、GCに富むCpGアイランドとして知られる特定の領域（約65%のCG残基で構成される）が存在する。これらは、すべての普遍的に発現される遺伝子を含む、哺乳動物遺伝子の56%のプロモーターと関連している。ヒトゲノムの1~2%はCpGクラスターであり、CpGメチル化と転写活性との間に反比例関係が存在する。

20

【0068】

DNAメチル化は、シトシンピリミジン環の5位置またはアデニンプリン環の6窒素へのメチル基の付加を含む。この修飾は、細胞分裂を通じて遺伝することができる。DNAメチル化は、典型的には、接合体形成中に除去され、発生中の逐次的な細胞分裂を通じて再確立される。DNAメチル化は、高等生物における正常な生物発生および細胞分化の重要な部分である。DNAメチル化は、細胞が「どこに居たことがあるかを記憶する」ことができるように、細胞における遺伝子発現パターンを安定に変更させる。言い換えれば、胚発生中に腓島であるようにプログラミングされた細胞は、継続的なシグナルがそれらが腓島のままでいる必要があることを伝えなくても、生物の生涯にわたって腓島のままでいる。さらに、DNAメチル化は、時間と共に宿主のゲノム内に取り込まれた、ウイルス遺伝子および他の有害要素の発現を抑制する。DNAメチル化はまた、細胞が、単一のDNA不変配列から多細胞生命に必要な無数の特徴を形成することを可能にする、クロマチン構造の基礎も形成する。DNAメチル化はまた、ほぼすべての種類の癌の発生においても重要な役割を果たす。

30

【0069】

亜硫酸水素塩シーケンシングとは、DNAのメチル化パターンを決定するための、DNAの亜硫酸水素塩処理の使用である。DNAメチル化は最初に発見された後成的な印であり、依然として最も研究されている。これは、転写活性の抑圧にも関連づけられている。

【0070】

いくつかのmRNA修飾のうち、N6-メチルアデノシン（m6A）修飾が真核生物および核複製ウイルスにおける最も一般的な種類である。m6Aは、白血病、脳腫瘍、肝臓癌、乳癌、および肺癌を含む数々の癌種において顕著な役割を果たす。

40

【0071】

5-メチルシトシン（5mC）が最も研究されている後成的修飾である一方で、TET（10-11転座）酵素の触媒作用で5mCは5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）へと酸化される。研究により、5hmCの分布が組織特異的であり、様々な臓器および組織における5hmCの分布に相違があることが示されている。悪性組織における5hmCの発現の減少は、黒色腫を含む広範囲の様々な癌において一貫して示されている。ヒト乳房組織において合計15対の正常および癌腫試料を評価することによって、研究により、5hmCのレベルが健康な乳房組織と比較して癌群で劇的に低下していたことが示され

50

た。

【0072】

亜硫酸水素塩を用いたDNAの処理は、シトシン残基をウラシルへと変換するが、5-メチルシトシン残基は影響を受けないままである。したがって、亜硫酸水素塩処理は、DNA配列中に、個々のシトシン残基のメチル化状態に依存する特定の変化を導入し、DNAセグメントのメチル化状態に関する単一ヌクレオチド分解情報を与える。変更された配列に対して様々な分析を行って、この情報を取り出すことができる。したがって、目的の分析は、亜硫酸水素塩変換から生じる一塩基多型（シトシンおよびチミン）間を区別することに帰される。亜硫酸水素塩処理の際に5hmCが5mCへと変換され、これはシーケンシングするとCとして読み取られるため、5hmCと5mCとを識別することができない。5mCおよび5hmCの複合となるため、亜硫酸水素塩シーケンシングからのアウトプットはもはや単にDNAメチル化として定義することができない。TET支援の酸化的亜硫酸水素塩シーケンシングの開発は今回、単一の塩基分解で2つの修飾間を識別することができる。

10

【0073】

5hmCは、TET支援の亜硫酸水素塩シーケンシング（TAB-seq）を使用して検出することができる。断片化されたDNAは、逐次的T4ファージβ-グルコシルトランスフェラーゼ（T4-BGT）、その後、10-11転座（TET）ジオキシゲナーゼ処理、その後、亜硫酸水素ナトリウムの添加を使用して、酵素修飾される。T4-BGTが5hmCをグルコシル化してベータ-グルコシル-5-ヒドロキシメチルシトシン（5ghmC）を形成し、その後、TETを使用して5mCを5caCに酸化する。5ghmCのみが続く亜硫酸水素ナトリウムによる脱アミノ化から保護され、これにより、シーケンシングによって5hmCを5mCから識別することが可能となる。

20

【0074】

酸化的亜硫酸水素塩シーケンシング（oxBS）は、5mCと5hmCとを識別するための別の方法を提供する。酸化試薬過ルテニウム酸カリウムが5hmCを5-ホルミルシトシン（5fC）へと変換し、続く亜硫酸水素ナトリウム処理が5fCをウラシルへと脱アミノ化する。5mCは未変化のままであり、したがって、この方法を使用して同定することができる。

【0075】

APOBECとカップリングした後成的シーケンシング（ACE-seq）は、亜硫酸水素塩変換を完全に排除し、5hmCを検出するために酵素的変換に依存する。この方法では、T4-BGTが5hmCを5ghmCへとグルコシル化し、アポリポタンパク質BmRNA編集酵素サブユニット3A（APOBEC3A）による脱アミノ化からこれを保護する。シトシンおよび5mCはAPOBEC3Aによって脱アミノ化され、チミンとしてシーケンシングされる。

30

【0076】

TET支援の5-メチルシトシンシーケンシング（TAmC-seq）は5mC座位を富化させ、2つの逐次的酵素反応、次いで親和性プルダウンを利用する。断片化されたDNAをT4-BGTで処理し、これが5hmCをグルコシル化によって保護する。その後、酵素mTET1を使用して5mCを5hmCへと酸化し、T4-BGTが、新しく形成された5hmCを、修飾されたグルコース部分（6-N3-グルコース）を使用して標識する。クリックケミストリーを使用してビオチンタグを導入し、これが、検出および全ゲノムプロファイリングのための5mC含有DNA断片の富化を可能にする。

40

【0077】

メチローム分析方法は広く3つの群に分けられる：制限酵素に基づくもの、クロマチン免疫沈降に基づくもの（ChIP）、または親和性に基づくおよび亜硫酸水素塩変換（遺伝子に基づく）ものである。制限酵素に基づく方法は、DNA配列を知らずに任意のゲノムに適用される、全メチル化分析のためのメチル化感受性制限酵素実験手法（RLGS、DMHなど）の使用を組み合わせることによる、小／大スケールDNAメチル化分析のた

50

めのメチル化感受性制限酵素である。しかし、大量のゲノムDNAが必要であり、この方法は、少量のDNAが回収される試料の分析には不適切となる。他方では、ChIPに基づく方法は、タンパク質に向けられた抗体を使用することによる、溶液からのタンパク質抗原の沈降を通じた、腫瘍における示差的なメチル化領域の同定に有用である。これらの方法はタンパク質に基づいており、癌研究において広範に適用されている。

【0078】

親和性富化は、メチル化DNAを残りのDNA集団から単離するためにしばしば使用される技法である。これは通常、抗体免疫沈降方法によって、またはメチルCpG結合ドメイン(MBD)タンパク質を用いて達成される。

【0079】

メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)は、5-メチルシチジン抗体を利用してメチル化シトシンを特異的に認識する、抗体免疫沈降方法である。MeDIPキットは、5-メチルシチジン(5-mC)抗体が結合するために、インプットDNA試料が一本鎖であることを必要とする。

【0080】

メチル化DNA断片の富化のための別の方法は、組換えメチル結合タンパク質MBD2bまたはMBD2b/MBD3L1複合体を使用する。メチルCpG結合タンパク質富化戦略の一つの利点は、インプットDNA試料を変性させる必要がないことである。タンパク質は、メチル化DNAをそのネイティブ二本鎖形態で認識することができる。別の利点は、メチル化CpGDNAの富化を確実にするために、MBDタンパク質がCpG背景でメチル化されたDNAのみと結合することであり、これにより、この技法がCpGアイランドを研究するために理想的となる。

【0081】

一部の実施形態では、本発明の方法のステップ(i)の前またはその間に、1つまたは複数の核酸分析物が選択的に修飾される。

一部の実施形態では、ステップ(i)の前またはその間に、1つまたは複数の核酸分析物中のメチル化されていないシトシン塩基が化学的または酵素的に変換される。

【0082】

一実施形態では、未修飾のシトシン塩基は、メチルトランスフェラーゼ酵素によってウラシルへと変換される。

一実施形態では、この酵素はM.SssIである。

【0083】

一実施形態では、未修飾のシトシン塩基は、デアミナーゼ酵素によってウラシルへと変換される。

酵素的メチル-seqワークフローは、シトシンをウラシルへと脱アミノ化するAPOBECの能力に依存する。APOBECは5mCおよび5hmCも脱アミノ化し、シトシンとその修飾形態とを区別することが不可能となる。5mCおよび5hmCを検出するために、この方法は、5mCおよび5hmCをAPOBECの基質ではない形態へと酵素的に修飾する、TET2および酸化エンハンサーも利用する。TET2酵素は5mCを5caCへと変換し、酸化エンハンサーは5hmCを5ghmCへと変換する。最終的に、シトシンはチミンとしてシーケンシングされ、5mCおよび5hmCはシトシンとしてシーケンシングされ、それによって、元の5mCおよび5hmC配列情報の完全性が保護される。

【0084】

一実施形態では、ステップ(i)の前またはその間に、1つまたは複数の核酸分析物を、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼに導入する。

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼはMcrBCである。

【0085】

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼ

10

20

30

40

50

はM s p J Iファミリーのメンバーである。

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはA s p B H Iである。一実施形態では、エンドヌクレアーゼはF s p E Iである。

【0086】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはL p n P Iである。

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼはP v u R t s 1 I / A b a Sファミリーのメンバーである。

【0087】

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼはI I M型エンドヌクレアーゼである。

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはD p n Iである。

【0088】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはB i s Iである。

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼはI V型エンドヌクレアーゼである。

【0089】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはE c o K M c r B Cである。

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはS a u U S Iである。

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはG m r S Dである。

【0090】

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼは、D p n I I制限エンドヌクレアーゼファミリーから選択される。

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはD p n I Iである。

【0091】

一実施形態では、エンドヌクレアーゼはD p n Iである。

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼはH p a Iである。

【0092】

一実施形態では、後成的修飾感受性または後成的修飾依存性の制限エンドヌクレアーゼはH p a I Iである。

一部の実施形態では、ステップ(i)の前またはその間に、1つまたは複数の核酸分析物をメチル化感受性またはメチル化依存性制限のエンドヌクレアーゼに導入する。

【0093】

一部の実施形態では、ステップ(i)の前またはその間に、1つまたは複数の核酸分析物をメチル化感受性またはメチル化依存性制限のエンドヌクレアーゼに導入し、次いで、メチル化DNAのメチル化特異的多重鎖ライゲーション依存性プローブ増幅(M S - M L P A)を通じて、目的のメチル化状態を含有する標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅を行う。

【0094】

一部の実施形態では、ステップ(i)の前またはその間に、メチル化されたまたはメチル化されていない核酸分析物の集団を還元する。

一部の実施形態では、還元は、メチル化DNA免疫沈降(M e D I P)を使用して実施する。

【0095】

一部の実施形態では、還元は、M B D 2 bまたはM B D 2 b / M B D 3 L 1複合体などのメチル結合タンパク質を使用して実施する。

当業者には、本発明を任意の後成的修飾の検出に向けて拡張してよく、標的ポリヌクレオチド配列のメチル化状態の検出に制限されないことが明らかであろう。たとえば、本発明を、ヒドロキシメチル化を含む他の後成的修飾、たとえば5 m Cのヒドロキシル化形態(5 - h m C)の検出に、同等に適応させることができる。この最近認識された後成的修

10

20

30

40

50

飾の形態は、遺伝子発現に影響を与える重要な後成的マーカーであり、CpGメチル化とは明確に異なる。他の後成的修飾は、メチルアデノシンなどがRNA上に現れ、本発明の方法によって検出することができる。

【0096】

一部の実施形態では、本発明による方法は、後成的修飾がメチル化であるものである。さらなる実施形態では、後成的修飾は、CpGアイランドでのメチル化である、またはCpGアイランドでのヒドロキシメチル化によるものである。

【0097】

一部の実施形態では、後成的修飾は、RNAまたはDNAのいずれか中のアデニンのメチル化である。

一部の実施形態では、本発明の1つまたは複数のオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のクエンチャーの存在によって、加ピロリン酸分解および／またはエクソヌクレアーゼ消化に対する耐性が与えられている。

【0098】

一部の実施形態では、適切な洗浄緩衝液の添加後、生じる反応混合物を混合する。

一部の実施形態では、生じる反応混合物を渦攪拌によって混合する。

一部の実施形態では、生じる反応混合物を、混合物中に存在する1つまたは複数の磁気ビーズの運動によって混合する。

【0099】

一部の実施形態では、それぞれの洗浄ステップは、トリスHCL pH7.5~8.0、5~20mM、NaCL 0.4~2M、EDTA 0.1~1mM、および／またはTween20 0~0.1%のうちの1つまたは複数を含む洗浄緩衝液の使用を含む。

【0100】

以前にまたは続いて記載する方法のいずれかの一部の実施形態では、1つまたは複数の反応混合物を合わせ得る。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドCは、それを3'-5'エクソヌクレアーゼ消化から保護する3'または内部修飾をさらに含む。

【0101】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドCは、それを5'-3'エクソヌクレアーゼ消化から保護する5'修飾をさらに含む。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドCは、A₀に対する3'ミスマッチ、または3'修飾をさらに含み、オリゴヌクレオチドCの伸長を防止する。

【0102】

一部の実施形態では、方法は、ステップ(i v)および(v)の間に行う2ステップの増幅をさらに含む。一部の実施形態では、反応体積を、2回目の増幅の前に2つ以上の別々の体積へと分割する。

【0103】

当業者には、伸長を防止するために使用し得る大量の3'修飾が存在することが理解されよう。

一部の実施形態では、第2の反応混合物は、5'-3'エクソヌクレアーゼをさらに含み、A₀の5'末端は、5'-3'エクソヌクレアーゼ消化に対する耐性が与えられている。

【0104】

一部の実施形態では、最終ステップの前またはその間に、以前のステップの生成物をピロホスファターゼで処理する。

一部の実施形態では、最終ステップの前またはその間に、以前のステップの生成物をエクソヌクレアーゼで処理する。

【0105】

一部の実施形態では、検出は、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して達成する。

一部の実施形態では、A₂の単位複製配列の生成から生じる経時的なシグナルの増加を

10

20

30

40

50

使用して、分析物中の標的配列の濃度を推測する。

【0106】

一部の実施形態では、プローブ分子 A_0 を含む複数の分子学的システムが用いられ、それぞれの A_0 が、異なる標的配列に対して選択的であり、同定領域を含み、さらに、 A_2 の単位複製配列が同定領域を含み、したがって、同定領域の検出を通じて分析物中に存在する標的配列を推測する。

【0107】

複数のプローブ A_0 を用いる一部の実施形態では、複数の遮断オリゴヌクレオチドも用いる。

一部の実施形態では、同定領域の検出は、分子プローブを使用してまたはシーケンシングを通じて実施する。

【0108】

一部の実施形態では、同定領域をプライミング部位として使用し、 A_2 の検出および同定が可能となる。

一部の実施形態では、本方法の最終ステップは、以下のステップをさらに含む：

v. 1つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して、以前のステップの生成物を標識するステップと、

v i. 生成物の蛍光シグナルを測定するステップと、

v i i. 生成物を一組の変性条件に曝露させるステップと、

変性条件への曝露中の生成物の蛍光シグナルの変化をモニタリングすることによって、分析物中のポリヌクレオチド標的配列を同定するステップ。

【0109】

一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸分析物を複数の反応体積へと分割し、それぞれの体積は、様々な標的配列を検出するために導入された、1つまたは複数の分子学的システムを有する。

【0110】

一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸分析物を複数の反応体積へと分割し、それぞれの体積は、1つまたは複数の分子学的システムを有する。

一部の実施形態では、プローブ分子 A_0 を含む異なる分子学的システムは、共通のプライミング部位を含み、単一のプライマーまたは単一組のプライマーを、 A_2 の一領域の増幅に使用することを可能にする。

【0111】

一代替実施形態では、第2の反応混合物は、1つまたは複数の部分的に二本鎖のDNA構築体をさらに含み、それぞれの構築体は1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーを含有する。一部の実施形態では、構築体が部分的に二本鎖である場合、1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーは、1つまたは複数のフルオロフォアの十分なクエンチングが起こるように、互いに十分に近く近接して位置する。

【0112】

一部の実施形態では、構築体は、それ自身に折り重なる自己相補的領域を有する、DNAの一方の鎖である。

一部の実施形態では、構築体は、プライマー対の一方のプライマーを含む。

【0113】

一部の実施形態では、第2の反応混合物は、プライマー対の他方のプライマーをさらに含む。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、 A_2 とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって A_2 に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズする。その後、このプライマーが構築体に対して伸長し、自己相補的領域を追放する。したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、

10

20

30

40

50

反応混合物中の A_2 の存在が示される。

【0114】

そのような実施形態では、構築体はサンライズプライマー (Sunrise Primer) として知られ得る。

一部の実施形態では、構築体は2本の別々のDNA鎖を含む。

【0115】

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、 A_2 とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって A_2 に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズする。その後、このプライマーが構築体に対して二本鎖部分の方向に伸長し、DNA鎖のうちのより短い方を追放し、したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、反応混合物中の A_2 の存在が示される。

10

【0116】

そのような実施形態では、構築体は分子ジッパー (Molecular Zipper) として知られ得る。

当業者には、サンライズプライマーおよび分子ジッパーのどちらについても、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数のクエンチャーの対が、それぞれの対応する構築体内の様々な位置に位置することが可能であることが理解されよう。主要な特長は、それぞれの対が互いに十分に近接して位置しており、 A_2 の非存在下、すなわち伸長および鎖の追放が起こっていない場合は、蛍光シグナルが放射されないことである。

20

【0117】

以前にまたは続いて記載する方法のいずれかによる一部の実施形態では、試料中に存在するRNAはDNAへと転写されない。そのような実施形態では、 A_0 は、RNA配列に対する加ピロリン酸分解を受けて、部分的に消化された鎖 A_1 を形成し、その後、方法は、以前にまたは続いて記載するように進行する。

【0118】

以前にまたは続いて記載する方法のいずれかの一部の実施形態では、1つまたは複数の反応混合物を合わせ得る。本発明によれば、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法がさらに提供される。本発明の様々な方法を適用することができる分析物は、上に言及した生体試料から、分析物を増幅するために設計された一連の予備ステップによって調製し、これを、典型的には著しい過剰で存在する背景ゲノムDNAから分離し得る。

30

【0119】

一部の実施形態では、分析物中の標的ポリヌクレオチド配列は、癌性腫瘍細胞のDNAまたはRNA内の遺伝子または染色体領域であり、たとえば1つまたは複数の一塩基多型 (SNP) の形態の、1つまたは複数の突然変異の存在によって特徴づけられるであろう。したがって、本発明は、疾患再発のモニタリングおよび／または処置において有用となるであろう。処置の後に疾患がないと宣言された患者を、疾患の再発を検出するために経時的にモニタリングし得る。これは非浸潤的に行う必要があり、血液試料からの標的配列の高感度の検出を要する。同様に、一部の癌では、処置後に患者中に残る残留癌細胞が存在する。本発明を使用して、患者の血液中に存在するこれらの細胞（または無細胞DNA）のレベルをモニタリングすることにより、疾患の再発または現在の治療の失敗および代替方法へと切り替える必要性の検出が可能となる。

40

【0120】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列の検出は、疾患の処置中における患者試料の繰り返し試験を可能にして、治療に対する発生した耐性の早期検出を可能にする。たとえば、ゲフィチニブ、エルロチニブなどの表皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤は、非小細胞肺癌 (NSCLC) のファーストライン処置として一般的に使用される。処置中に、腫瘍はしばしばEGFR遺伝子中に突然変異を発生し（たとえば、T790M、C797S）、これが処置に対する耐性を与える。これらの突然変異の早期検出が、代替治

50

療へと患者を移行させることを可能にする。

【0121】

一部の実施形態では、分析物中の標的ポリヌクレオチド配列は、胎児由来のDNAまたはRNA内の遺伝子または染色体領域であり、たとえば1つまたは複数の一塩基多型（SNP）の形態の、1つまたは複数の突然変異の存在によって特徴づけられるであろう。したがって、本発明は、非常に低い対立遺伝子画分で、他の利用可能な試験技法よりも妊娠の初期段階で、突然変異を検出するために使用し得る。

【0122】

別の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、それ以外は健康な個体に由来する遺伝子またはゲノム領域であり得るが、得られた遺伝情報は、貴重なコンパニオン診断情報の生成を支援して、ヒト集団内の1つまたは複数の定義された群にわたって医学的または治療的結論を下すことを可能にし得る。

【0123】

さらに別の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、感染性疾患に特徴的、または特定の治療を用いた処置に対する感染性疾患の耐性に特徴的であってよく、たとえば、治療に対する耐性を与える、細菌もしくはウイルスの遺伝子もしくは染色体領域、またはその中の突然変異に特徴的なポリヌクレオチド配列である。

【0124】

一部の実施形態では、標的ポリヌクレオチド配列は、ドナーDNAに特徴的であり得る。移植した臓器が患者によって拒絶される場合、この臓器からのDNAは患者の血流内に流される。このDNAの早期検出は、拒絶の早期検出を可能にするであろう。これは、ドナーに特異的なマーカーのカスタムパネルを使用して、または、ドナー中に存在し、一部がレシピエント中に存在する、集団中で共通であることが知られている変異体のパネルを使用することによって、達成することができる。したがって、臓器レシピエントの経時的なルーチンのモニタリングが、特許請求した方法によって可能になる。

【0125】

臓器移植の成功は、ドナーにおけるいくつかの事象によって引き起こされる、臓器への累積傷害の全体的なレベルに依存する場合がある。これには、レシピエントにおける年齢、生活習慣、虚血／再灌流傷害（IRI）、および免疫応答が含まれる。研究により、IRIがドナー臓器における後成的変化を引き起こすことが示されている。C3遺伝子のプロモーター領域は腎臓において脱メチル化され、これは移植後の慢性腎症に関連している。DNAメチル化は、免疫系の細胞の機能を制御するため、移植片に対するバランスがとれた免疫応答の主要な貢献因子である。したがって、特定のDNA配列のメチル化状態の検出は、移植後合併症の危険性にある患者の同定を可能にすることができる。

【0126】

さらに別の実施形態では、分析物を、複数の標的配列、たとえば、癌の源、癌指示薬、または感染症の複数の源について同時にスクリーニングすることができるよう、プローブの様々な組合せを使用した本方法の様々なバージョン（以下を参照）を並行して用いる。この手法では、本方法の並行適用によって得られた増幅産物を、1つもしくは複数のオリゴヌクレオチド結合色素、または分子ビーコン、ヘアピンプローブなどの配列特異的分子プローブからなる検出パネルと接触させる。したがって、本発明の別の態様では、少なくとも1つのプローブおよび任意選択で1つのライゲーションオリゴヌクレオチドの、標的ポリヌクレオチド配列に選択的な1つもしくは複数の化学的および生物学的プローブと組み合わせた使用、または増幅されたプローブ領域を同定するためのシーケンシングの使用と組み合わせた使用が提供される。

【0127】

一部の実施形態では、分子学的システムのプローブオリゴヌクレオチドA₀は、プライミング領域と、検出する標的ポリヌクレオチド配列と相補的な3'末端とを含む。これによって、少なくとも部分的に二本鎖である第1の中間生成物が作り出される。一部の実施形態では、このステップは、過剰な分子学的システムの存在下、かつ分析物および任意の

10

20

30

40

50

他の核酸分子を含有する水性媒体中で実施する。

【0128】

ステップ (i i) 中、第1の中間生成物の二本鎖領域は、その A_0 鎖の3'末端から3'-5'方向で加ピロリン酸分解される。その結果、 A_0 鎖は進行的に消化されて部分的に消化された鎖を生じ、これを本明細書中で以降 A_1 と呼ぶ。プローブオリゴヌクレオチドが非標的配列と誤ってハイブリダイズする場合、加ピロリン酸分解反応はすべてのミスマッチで停止し、方法の続くステップが進行することを防止する。別の実施形態では、この消化は、 A_1 が、安定な二重鎖を形成するために十分な分析物またはその中の標的領域との相補性を欠くまで、続く。この時点では、様々な鎖はその後、融解によって分離し、それによって A_1 が生成される。典型的な加ピロリン酸分解条件下では、この分離は、分析物と A_0 との間に6~20個の相補的ヌクレオチドが存在する場合に起こる。

10

【0129】

別の実施形態では、消化は、 A_1 が、加ピロリン酸分解 (pyrophosphorylating) 酵素が結合するため、または加ピロリン酸分解 (pyrophosphorolysis) 反応が継続するために十分な、分析物またはその中の標的領域との相補性を欠くまで、継続する。これは、典型的には、分析物とプローブとの間に6~20個の相補的ヌクレオチドが残っている場合に起こる。一部の実施形態では、これは、6~40個の相補的ヌクレオチドが残っている場合に起こる。

【0130】

一実施形態では、消化は、 A_1 と標的との間の相補性の長さが、オリゴCが分析物分子を A_1 から追放することがエネルギー的に好都合となる点まで縮小するまで、継続する。これは、典型的には、 A_1 と分析物分子との間の相補性領域が、オリゴCと A_1 の3'末端との間の相補性領域と同様またはそれよりも短い長さである場合に起こるが、オリゴCの分子内ハイブリダイゼーションが好都合であることが原因で A_1 と分析物分子との間の相補性がこれよりも長い場合にも、起こり得る。

20

【0131】

適切には、加ピロリン酸分解は、反応媒体中、20~90℃の範囲の温度、少なくとも加ピロリン酸分解活性を示すポリメラーゼおよびピロリン酸イオン供給源の存在下で実施する。ポリヌクレオチドの消化に適用する加ピロリン酸分解反応に関するさらなる情報は、たとえば、J. Biol. Chem. 244 (1969) ページ3019~3028、または本発明者らの以前の特許出願中に見つけることができる。

30

【0132】

一部の実施形態では、加ピロリン酸分解ステップは、過剰なポリピロホスフェートの供給源の存在によって駆動され、適切な供給源としては、3個以上のリン原子を含有する化合物が挙げられる。

【0133】

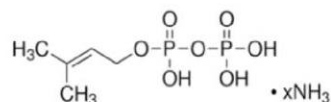
一部の実施形態では、第2の反応混合物は過剰なポリピロホスフェートの供給源を含む。

一部の実施形態では、加ピロリン酸分解ステップは、過剰な修飾ピロホスフェートの供給源の存在によって駆動される。適切な修飾ピロホスフェートとしては、架橋酸素の代わりに他の原子もしくは基で置換されているもの、または他の酸素上に置換もしくは修飾基を有するピロホスフェート（もしくはポリピロホスフェート）が挙げられる。当業者には、本発明における使用に適切であろう、修飾ピロホスフェートの多数のそのような例が存在することが理解されよう。その非限定的な選択肢は以下である：

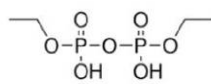
40

【0134】

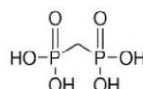
【化 1】



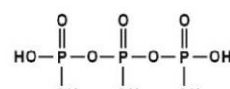
γ,γ -ジメチルアリルピロリン酸
アンモニウム塩



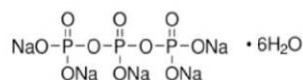
ジエチル酸
ピロホスフェート



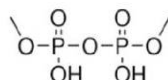
PCP



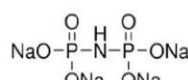
トリポリリン酸(PPPi)



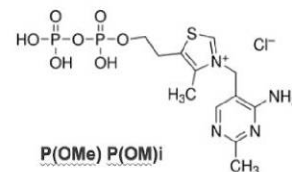
ペンタトリポリリン酸
ナトリウムヘキサ水和物



ジメチル酸
ピロホスフェート



PNP



P(OMe)P(OMe)i

10

【0135】

一部の実施形態では、第2の反応混合物は、過剰な修飾ポリピロホスフェートの供給源を含む。

好ましい一実施形態では、ピロリン酸イオン供給源は、PNP、PCP、またはトリポリリン(Tripolyphosphoric)酸(PPPi)である。

【0136】

さらに、制限はしないが、加ピロリン酸分解ステップ(c)において使用するためのピロリン酸イオン供給源の例は、WO2014/165210号およびWO00/49180中に見つけ得る。

【0137】

一部の実施形態では、過剰な修飾ピロホスフェートの供給源は、Y-Hとして表すことができ、Yは、一般式 $(X-O)_2P(=B)-(Z-P(=B)(O-X))_n$ に対応する[式中、nは、1~4の整数であり、それぞれのZは、-O-、-NH-、または-CH₂-から独立して選択され、それぞれのBは、独立してOまたはSのどちらかであり、X基は、-H、-Na、-K、アルキル、アルケニル、または複素環基から独立して選択され、ただし、ZおよびBがどちらも-O-に対応し、かつnが1である場合、少なくとも1つのX基はHではない]。

30

【0138】

一部の実施形態では、Yは、一般式 $(X-O)_2P(=B)-(Z-P(=B)(O-X))_n$ に対応する[式中、nは1、2、3、または4である]。別の実施形態では、Y基は、一般式 $(X-O)_2P(=O)-Z-P(=O)(O-H)-$ に対応する[式中、X基のうちの1つは-Hである]。さらに別の好ましい実施形態では、Yは、一般式 $(X-O)_2P(=O)-Z-P(=O)(O-X)-$ に対応する[式中、X基のうちの少なくとも1つは、メチル、エチル、アリル、またはジメチルアリルから選択される]。

【0139】

一代替実施形態では、Yは、一般式 $(H-O)_2P(=O)-Z-P(=O)(O-H)-$ [式中、Zは、-NH-もしくは-CH₂-のどちらかである] または $(X-O)_2P(=O)-Z-P(=O)(O-X)-$ [式中、X基は、すべて-Naもしくは-Kのどちらかであり、Zは-NH-もしくは-CH₂-のどちらかである] のどちらかに対応する。

40

【0140】

別の実施形態では、Yは、一般式 $(H-O)_2P(=B)-O-P(=B)(O-H)-$ に対応する[式中、それぞれのB基は、独立してOまたはSのどちらかであり、少なくとも1つはSである]。

【0141】

Yの好ましい実施形態の具体的な例としては、式 $(X_1-O)(HO)P(=O)-Z$

50

—P(=O)(O—X₂)のもの〔式中、Zは、O、NH、またはCH₂であり、(a) X₁はγ、γ-ジメチルアシルであり、X₂は—Hである、または(b) X₁およびX₂はどちらもメチルである、または(c) X₁およびX₂はどちらもエチルである、または(d) X₁はメチルであり、X₂はエチルであり、もしくはその逆である〕が挙げられる。

【0142】

一部の実施形態では、分子プローブを検出に使用する場合、分子学的システムのプローブオリゴヌクレオチドA₀成分は、標的配列と相補的な領域の5'側にオリゴヌクレオチド同定領域を含むように構成され、用いる分子プローブは、この同定領域とアニーリングするように設計されている。一部の実施形態では、A₀の3'領域のみが標的とアニーリングすることができる、すなわち、すべての他の領域は、加ピロリン酸分解ステップを実施する温度で安定な二重鎖が存在するために十分な分析物との相補性を欠く。ここおよび全体にわたって、用語「十分な相補性」とは、所定の領域が分析物上の所定の領域と相補性を有する範囲で、相補性領域が10ヌクレオチド長より長いことを意味する。

10

【0143】

本発明の方法のさらなる一態様では、任意の以前の実施形態の加リン酸分解ステップが、二本鎖特異的エクソヌクレアーゼを使用したエクソヌクレアーゼ消化ステップで置き換えられている代替実施形態が提供される。当業者には、二本鎖特異的エクソヌクレアーゼとしては、多数の他のもののうち、ExoIIIなどの3'—5'方向で読み取るもの、およびラムダExoなどの5'—3'方向で読み取るものが挙げられることが理解されよう。

20

【0144】

本発明の一部の実施形態では、エクソヌクレアーゼ消化ステップが二本鎖特異的5'—3'エクソヌクレアーゼを利用する場合、標的分析物と相補的であるのはA₀の5'末端であり、共通のプライミング配列および遮断基は、標的と相補的な領域の3'側上に位置する。さらなる実施形態では、分子プローブを検出に使用する場合、分子学的システムのプローブオリゴヌクレオチドA₀成分は、標的配列と相補的な領域の3'側オリゴヌクレオチド同定領域を含むように構成され、用いる分子プローブは、この同定領域とアニーリングするように設計されている。

【0145】

エクソヌクレアーゼ消化ステップが二本鎖特異的5'—3'エクソヌクレアーゼを利用する本発明の実施形態では、存在するすべての他の核酸分子を消化する一方で、A₀および部分的に消化された鎖A₁を含むすべての材料を未変化に残す目的で、3'から5'のエクソヌクレアーゼ活性を有するエクソヌクレアーゼを第2の反応混合物に任意選択で加えることができる。適切には、このエクソヌクレアーゼ分解に対する耐性は、本出願中の他の箇所に記載されているように達成される。

30

【0146】

本発明の好ましい一実施形態では、A₀の5'末端またはプライミング領域の5'側の内部部位に、エクソヌクレアーゼ分解に対する耐性が与えられている。これによって、および加ピロリン酸分解ステップの後またはそれと同時に、存在するすべての他の核酸分子を消化する一方で、A₀および部分的に消化された鎖A₁を含むすべての材料を未変化に残す目的で、5'—3'エクソヌクレアーゼ活性を有するエクソヌクレアーゼを反応媒体に任意選択で加えることができる。適切には、このエクソヌクレアーゼ分解に対する耐性は、1つまたは複数の遮断基をオリゴヌクレオチドA₀内の所要の点に導入することによって達成される。一部の実施形態では、これらの遮断基は、ホスホロチオエート連結および当分野において一般的に使用される他の主鎖修飾、C3スパーサー、リン酸基、修飾塩基などから選択され得る。

40

【0147】

一部の実施形態では、同定領域は、ユニークな配列を有するバーコード領域を含む、またはそれを内部に包埋しており、増幅した成分A₂に適用する配列特異的分子プローブを使用して間接的、またはこれらの成分のシーケンシングによって直接、同定されるように

50

適応されている。使用し得る分子プローブの例としては、それだけには限定されないが、分子ビーコン、TaqMan（登録商標）プローブ、Scorpion（登録商標）プローブなどが挙げられる。

【0148】

一部の実施形態では、 A_2 鎖またはその所望の領域は、複数の、典型的には数百万個のコピーが作製されるように、増幅を受ける。これは、 A_2 の一領域、続いてそれに由来する任意の単位複製配列を、たとえばそれ上の相補的領域とアニーリングすることができる順方向／逆方向またはセンス／アンチセンスの対の形態で提供される、一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドを用いたプライミングすることによって達成される。その後、プライミングされた鎖が増幅の起点となる。増幅方法としては、それだけには限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅、およびローリングサークル増幅などの熱サイクリングおよび等温方法が挙げられ、ローリングサークル増幅は、 A_2 が環状化されている場合に適用可能である。これらの手段のうちの任意のものによって、 A_2 の一領域および一部の例ではその配列相補体の、多数の単位複製配列コピーを容易に迅速に作製することができる。これらの増幅方法のうちの任意のものを行うための正確な方法は当業者に周知であり、用いる正確な条件および温度レジームは、読者に指示する一般的な文献中において容易に利用可能である。具体的には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の場合、方法は、一般に、プライマーオリゴヌクレオチドを、 A_2 鎖に対して、5'→3'方向で、ポリメラーゼおよび様々な単一ヌクレオシド三リン酸の供給源を使用して、相補鎖が生成されるまで伸長するステップと、生じた二本鎖生成物を脱ハイブリダイズさせて、 A_2 鎖および相補鎖を再生するステップと、 A_2 鎖およびそのすべての単位複製配列を再プライミングするステップと、それ以降、これらの伸長／脱ハイブリダイゼーション／再プライミングステップを複数回繰り返して、 A_2 単位複製配列を信頼度高く検出することができるレベルまで、 A_2 単位複製配列の濃度を蓄積するステップとを含む。

10

20

【0149】

一部の実施形態では、加ピロリン酸分解反応によって生じたヌクレオシド三リン酸を加水分解によって除去し、それによって、加ピロリン酸分解反応が継続することができ、順方向の重合反応に競合で負けないことを確実にするために、第2の反応混合物は、ホスファターゼまたはホスホヒドrolラーゼをさらに含む。

【0150】

一部の実施形態では、ピロリン酸イオンを加水分解し、さらなる加ピロリン酸分解が起こり、順方向の重合反応が有利になることを防止するために、ステップ（v）の前またはその間に、以前のステップの生成物をピロホスファターゼで処理する。一部の実施形態では、ステップ（v）の前またはその間に、以前のステップの生成物をエクソヌクレアーゼで処理する。

30

【0151】

一部の実施形態では、 A_0 の加ピロリン酸分解を行って部分的に消化された鎖 A_1 を形成する酵素は、 A_2 も増幅する。当業者には、多数のそのような酵素が存在することが理解されよう。

【0152】

オリゴヌクレオチド A_2 を検出し、得られた情報を、ポリヌクレオチド標的配列が元の分析物中に存在するかどうか、および／またはそれに関連する特性を推測するために使用することができる。たとえば、これによって、癌性腫瘍細胞に特徴的な標的配列を、探している具体的なSNPを参照して検出し得る。さらなる例として、癌性腫瘍細胞に特徴的な標的配列を、探している具体的なメチル化部位を参照して検出し得る。

40

【0153】

別の実施形態では、ウイルスまたは細菌のゲノムに特徴的な標的配列（その突然変異を含む）を検出し得る。単位複製配列または A_2 の同定領域を検出するための多数の方法を用いることができ、たとえば、オリゴヌクレオチド結合色素、蛍光標識分子ビーコンまたはヘアピンプローブなどの配列特異的分子プローブが挙げられる。あるいは、 A_2 または

50

その単位複製配列 (A_2 of the amplicons thereof) の直接シーケンシングを、用いたまたは当分野において報告されている直接シーケンシング方法のうちの1つを使用して行うことができる。オリゴヌクレオチド結合色素、蛍光標識したビーコンまたはプローブを用いる場合、刺激電磁放射源（レーザー、LED、ランプなど）と放射された蛍光を検出するように配置された光検出器とを含む配置を使用して生じるシグナルを検出し、特異的に設計されたアルゴリズムを使用してマイクロプロセッサまたはコンピュータによって分析することができるデータストリームを含むシグナルを、それから生成することが好都合である。

【0154】

一部の実施形態では、検出は、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して達成する。そのような実施形態では、 A_2 の単位複製配列の生成から生じる経時的なシグナルの増加を使用して、分析物中の標的配列の濃度を推測する。一部の実施形態では、本方法の最終ステップは、以下のステップをさらに含む：

i. 1つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して、ステップ (iv) の生成物を標識するステップと、

ii. 生成物の蛍光シグナルを測定するステップと、

iii. 生成物を一組の変性条件に曝露させるステップと、

変性条件への曝露中の生成物の蛍光シグナルの変化をモニタリングすることによって、分析物中のポリヌクレオチド標的配列を同定するステップ。

【0155】

本発明の別の態様では、複数コピーの A_2 または A_2 の一領域を、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド蛍光結合色素または分子プローブを使用して標識する、本発明の任意の以前の実施形態のステップを特徴とする、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を同定する方法が提供される。これらの複数コピーの蛍光シグナルを測定し、複数コピーを一組の変性条件に曝露させる。その後、変性条件への曝露中の複数コピーの蛍光シグナルの変化をモニタリングすることによって、標的ポリヌクレオチド配列を同定する。

【0156】

一部の実施形態では、変性条件は、温度を変動させる、たとえば、二本鎖が解離し始める点まで温度を増加させることによって提供し得る。それに加えてまたはその代わりに、変性条件は、条件が酸性もしくはアルカリ性であるように pH を変動させることによって、あるいは、強酸もしくは塩基、濃縮無機塩、または有機溶媒、たとえばアルコールなどの、添加剤または薬剤を加えることによって提供し得る。

【0157】

本発明の別の態様では、哺乳動物対象、特にヒト患者を、感染性疾患、癌の存在についてスクリーニングするため、またはコンパニオン診断情報を生成する目的の、上述の方法の使用が提供される。

【0158】

本発明のさらなる一態様では、上述の方法において使用するための対照プローブが提供される。本発明の実施形態には、特異的標的配列または複数の配列の存在が蛍光シグナルの生成によって解明されるものが含まれる。そのような実施形態では、試料中に存在する非標的 DNA から生成される一定レベルのシグナルが必然的に存在し得る。所定の試料では、この背景シグナルは「真」のシグナルよりも後の発生を有するが、この発生は試料間で変動し得る。したがって、低濃度の標的配列または複数の配列の存在の正確な検出は、標的配列の非存在下でどのシグナルが予想されるかの知識に依存する。人工的な試料では参照が利用可能であるが、患者からの真の「ブラインド」試料では、これは当てはまらない。対照プローブ (E_0) は、それぞれのアッセイプローブの予想される背景シグナルプロファイルを決定するために利用する。対照プローブは、試料中に存在すると予想されない配列を標的とし、このプローブから生成されるシグナルを、標的配列の非存在下における試料からのシグナル生成予測率を推測するために使用することができる。

【0159】

したがって、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 続いてまたは同時発生的のどちらかで、3'末端領域が標的配列と少なくとも部分的にミスマッチである一本鎖プローブオリゴヌクレオチドE₀を使用して、試料の別個のアリコートまたは同じアリコートのどちらかを使用して、第2の検出チャンネルを使用して、方法のステップを繰り返すステップと、

(b) 試料中にいかなる標的分析物も非存在である場合の、A₀を含む分子学的システムから生成されると予想される背景シグナルを推測するステップと、

(c) (a)で推測された予想される背景シグナルと、標的分析物の存在下で観察された実際のシグナルとの比較を通じて、分析物中のポリヌクレオチド標的配列の存在または非存在を推測するステップと

を特徴とする、以前に記載した方法のうちの任意のものによる、方法が提供される。

【0160】

一部の実施形態では、対照プローブ(E₀)とA₀を含む分子学的システムとを試料の別個の部分に加える一方で、別の実施形態では、E₀とA₀を含む分子学的システムとを試料の同じ部分に加え、異なる検出チャンネル(たとえば異なる色の色素)を使用してそれぞれのシグナルを測定する。その後、E₀によって生成されるシグナルを利用して、試料中のポリヌクレオチド標的配列の非存在下においてA₀を含む分子学的システムによって生成されると予想される背景シグナルを推測し、それを補正し得る。たとえば、背景シグナルの補正は、E₀から観察されるシグナルを、A₀を含む分子学的システムから観察されるものから減算することを含み得る、または、変動条件下でA₀を含む分子学的システムおよびE₀によって生成された相対的シグナルの検量線を使用した、A₀を含む分子学的システムから観察されるシグナルの較正を通じたものであり得る。

【0161】

一部の実施形態では、単一のE₀を使用して、生成され得るすべてのアッセイプローブを較正することができる。

一部の実施形態では、別個のE₀を使用して、初期増幅ステップで生成された試料DNAのそれぞれの単位複製配列を較正し得る。それぞれの単位複製配列は、複数の突然変異/目的の標的配列を含有し得るが、単一のE₀が、すべてのアッセイプローブを単一の単位複製配列に対して較正するために十分である。

【0162】

さらなる実施形態では、別個のE₀をそれぞれの標的配列に使用し得る。たとえば、C>T突然変異が標的とされている場合、患者において起こることが知られていない、同じ部位のC>G突然変異を標的とするE₀を設計することができる。様々な条件下でE₀によって生成されたシグナルプロファイルを、較正反応において評価することができ、これらのデータを使用して、C>T変異体が存在しない場合に、C>T変異体を標的とするアッセイプローブから予想されるシグナルを推測する。

【0163】

本発明の方法の特異性は、遮断オリゴヌクレオチドの導入によって改善させ得る。たとえば、遮断オリゴヌクレオチドを導入して、野生型DNAの少なくとも一部分とハイブリダイズし、A₀を含む分子学的システムの標的ポリヌクレオチド配列のみとのアニーリングを促進し、野生型とのアニーリングは促進しないようにすることができる。その代わりにまたはそれに加えて、遮断オリゴヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の特異性を改善させて、存在するすべての野生型配列の増幅を防止するために使用することができる。使用する一般的技法は、PCRプライマー間でアニーリングし、PCRポリメラーゼによって追放または消化することができないオリゴヌクレオチドを設計することである。オリゴヌクレオチドは、非標的の(通常は健康な)配列とアニーリングする一方で、標的(突然変異)配列とミスマッチである(しばしば単一の塩基で)ように設計される。このミスマッチは2つの配列に対する異なる融解温度をもたらし、オリゴヌクレオチドは、PCR伸長温度で非標的配列とアニーリングしたままである一方で、標的配列から解

10

20

30

40

50

離するように設計される。

【0164】

遮断オリゴヌクレオチドは、しばしば、PCRポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ活性によるその消化を防止するため、または標的と非標的配列との間の融解温度差異を増強させるために、修飾を有し得る。

【0165】

ロックド核酸（LNA）または他の融解温度を変更する修飾を遮断オリゴヌクレオチド内に取り込むことは、標的および非標的配列に対するオリゴヌクレオチドの融解温度の差異を顕著に増加させる場合がある。

【0166】

したがって、遮断オリゴヌクレオチドを使用する本発明の一実施形態が提供される。一部の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、消化または追放されないことを確実にするために、加ピロリン酸分解（PPL）反応に対して耐性でなければならない。これは、いくつかの様々な方法で、たとえば、その3'末端でのミスマッチを介して、またはホスホロチオエート結合もしくはスパーサーなどの修飾を通じて、達成することができる。

【0167】

遮断オリゴヌクレオチドを使用する本発明のそのような実施形態または一態様では、所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法は、一本鎖遮断オリゴヌクレオチドを、非標的ポリヌクレオチド配列の少なくとも部分組と、同じステップの前またはその間にアニーリングさせることを特徴とし、分析物標的配列が、プローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システムとアニーリングして、少なくとも部分的に二本鎖である第1の中間生成物を作り出し、A₀の3'末端が、分析物標的配列と二本鎖複合体を形成する。

【0168】

一部の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、その3'末端でのミスマッチを介して、加ピロリン酸分解反応に対して耐性となっている。別の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、3'遮断基の存在を介して耐性となっている。別の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、スパーサーまたは他の内部修飾の存在を介して耐性となっている。さらなる実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、融解温度を増加させる修飾または修飾ヌクレオチド塩基をどちらも含み、加ピロリン酸分解に対する耐性が与えられている。

【0169】

本発明の一態様では、以下のステップ：

（a）遮断オリゴヌクレオチドを、1つまたは複数の核酸分析物を含む第1の反応混合物に導入するステップであって、遮断オリゴヌクレオチドが、非標的ポリヌクレオチド配列の少なくとも部分組とアニーリングするステップと、

（b）以前にまたは続いて記載するものであり得る、（a）で生成された混合物を、分子学的システムを含む第2の反応に導入するステップと、

（c）A₀を加ピロリン酸分解用の酵素で処理することによって、標的と完全にハイブリダイズしている相補的ヌクレオチドをA₀の3'末端から除去して、短縮されたプローブA₁を形成するステップと、

（d）Cを使用してA₁の3'末端を標的から追放するステップと、

（e）A₁の末端をライゲーションさせて、事前にハイブリダイズさせたCを使用して環を形成して、環状のA₂を形成するステップと、

（f）A₂の存在を検出するステップと

を含む、試料中の所定の核酸分析物中のポリヌクレオチド標的配列を検出する方法が提供される。

【0170】

一部の実施形態では、第1の反応混合物は、1つまたは複数のプライマー、デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）、および増幅酵素をさらに含み、ステップ（a）中に、試料中に存在する核酸分析物は増幅を受け、所定の核酸分析物の増幅の後かつ（b）の前

10

20

30

40

50

に、試料をプロテイナーゼでさらに処理する。

【0171】

一部の実施形態では、ステップ（a）の前に、試料中に存在する核酸分析物を増幅し、所定の核酸分析物の増幅の後に、試料をプロテイナーゼでさらに処理する。

一部の実施形態では、ステップ（a）の前に試料をプロテイナーゼで処理する。一部の実施形態では、ステップ（a）中に試料をプロテイナーゼで処理する。一部の実施形態では、ステップ（a）の後に試料をプロテイナーゼで処理する。

【0172】

一部の実施形態では、方法が以下のステップ：

（a）1つまたは複数の核酸分析物を、

- i . 分子学的システムと、
- ii . 遮断オリゴヌクレオチドと、
- iii . 加ピロリン酸分解酵素と、
- iv . リガーゼと

を含む、合わせた反応混合物に導入するステップであって、遮断オリゴヌクレオチドが、非標的ポリヌクレオチド配列の少なくとも部分組とアニーリングし、標的分析物が、分子学的システムのプローブオリゴヌクレオチドA₀部分を含む分子学的システムとアニーリングして、少なくとも部分的に二本鎖である第1の中間生成物を作り出し、A₀の3'末端が二本鎖複合体を形成し、A₀が、3'末端から3'-5'方向で加ピロリン酸分解されて、少なくとも部分的に消化された鎖A₁を作り出し、A₁がライゲーションを受けてA₂を形成するステップと、

（b）以前のステップの生成物に由来するシグナルを検出するステップであって、生成物が、A₂もしくはその一部分、または複数コピーのA₂、または複数コピーのその一部分であり、それらから分析物中のポリヌクレオチド標的配列の存在または非存在を推測するステップと

を含むように、第1および第2の反応混合物を合わせる。

【0173】

本方法の一部の実施形態では、

非標的核酸分析物が遮断オリゴヌクレオチドと不完全にアニーリングして、非標的分子から融解するために必要な程度まで加ピロリン酸分解によって消化されることができない中間生成物を形成し、

標的核酸分析物が遮断オリゴヌクレオチドと完全にアニーリングして、遮断オリゴヌクレオチドの3'末端で少なくとも部分的に二本鎖である中間生成物を形成し、遮断オリゴヌクレオチドが3'-5'方向で加ピロリン酸分解され、標的核酸分析物を放出し、

標的核酸分析物が、分子学的システムのプローブオリゴヌクレオチドA₀部分を含む分子学的システムとアニーリングして、少なくとも部分的に二本鎖である第1の中間生成物を作り出し、A₀の3'末端が二本鎖複合体を形成し、A₀が、3'末端から3'-5'方向で加ピロリン酸分解されて、少なくとも部分的に消化された鎖A₁を作り出し、A₁がライゲーションを受けてA₂を形成し、

以前のステップの生成物に由来するシグナルを検出し、生成物が、A₂もしくはその一部分、または複数コピーのA₂、または複数コピーのその一部分であり、それらから分析物中のポリヌクレオチド標的配列の存在または非存在を推測する

ように、遮断オリゴヌクレオチドは、標的核酸分析物と完全に相補的であり、非標的核酸分析物とミスマッチである。

【0174】

一部の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、それにエクソヌクレアーゼ分解または加ピロリン酸分解による消化に対する耐性を与えるために、修飾を含む。

一部の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、それにエクソヌクレアーゼ分解または加ピロリン酸分解による消化に対する耐性を与えるために、3'修飾を含む。

【0175】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、遮断オリゴヌクレオチドは、それにエクソヌクレアーゼ分解による消化に対する耐性を与えるために、5'修飾を含む。

本明細書中における「ホスファターゼ酵素」への言及とは、本発明の方法によって生成されたヌクレオシド三リン酸を加水分解によって除去する能力を有する、任意の酵素またはその機能的断片をいう。これには、リン酸モノエステルをリン酸イオンおよびアルコールへと切断する能力を有する、任意の酵素またはその機能的断片が含まれる。

【0176】

本明細書中における「ピロホスファターゼ酵素」への言及とは、1個のピロリン酸イオンから2個のリン酸イオンへの変換を触媒する能力を有する、任意の酵素またはその機能的断片をいう。

【0177】

これには、無機ピロホスファターゼおよび無機ジホスファターゼも含まれる。非限定的な例は、熱安定性無機ピロホスフェート (TIPP) である。

一部の実施形態では、任意の以前に記載した実施形態の改変バージョンが提供され、ピロホスファターゼの使用は任意選択である。

【0178】

本発明の一部の実施形態では、試料中に存在する所定の核酸分析物中の標的ポリヌクレオチド配列を検出する方法において使用するためのキットであって、

(a) 標的ポリヌクレオチド配列と第1の中間生成物を形成することができるプローブオリゴヌクレオチド A_0 を含む分子学的システムであって、前記中間生成物が少なくとも部分的に二本鎖であるシステムと、

(b) リガーゼと、

(c) 第1の中間生成物を A_0 の末端から3' - 5' 方向で消化して、部分的に消化された鎖 A_1 を作り出すことができる、加ピロリン酸分解酵素と、

(d) 適切な緩衝液と

を含む、キットが提供される。

【0179】

一実施形態では、 A_0 の3'末端は標的配列と相補的である。

一実施形態では、 A_0 の3'末端は標的配列と完全に相補的である。

一実施形態では、キットは、 A_0 の一部分と実質的に相補的である少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドをさらに含む。

【0180】

一実施形態では、キットは増幅酵素をさらに含む。

一実施形態では、キットは、1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドをさらに含む。

一実施形態では、キットは、1つまたは複数のプライマーをさらに含み、プライマーのうちの1つまたは複数の、非相補的5'テイルを有する。

【0181】

一実施形態では、プライマーのうちの1つまたは複数の5'リン酸を有する。

一実施形態では、プライマーのうちの1つまたは複数の5'保護されている。

一実施形態では、 A_0 の3'末端は、標的ポリヌクレオチド配列と完全に相補的である。

【0182】

一実施形態では、リガーゼは、一本鎖ライゲーション活性を実質的に欠く。

一部の実施形態では、キットは、代わりに、

— A_1 上の隣接配列と相補的である、2つ以上のライゲーション連鎖反応 (LCR) プローブオリゴヌクレオチドであって、プローブのアニールリングが成功している場合は、一方のLCRプローブの5'リン酸が他方のLCRプローブの3'OHと直接隣接している、プローブオリゴヌクレオチドと、

— 1つまたは複数のリガーゼと

をさらに含み得る。

【0183】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、 A_2 の存在下では、2つのLCRプローブは A_2 とのアニーリングが成功し、一緒にライゲーションされて、1つのオリゴヌクレオチド分子を形成し、続いてこれが、第2ラウンドの共有的ライゲーションの新しい標的として働き、目的の標的、この場合は A_2 の幾何学的増幅をもたらす。ライゲーションされた生成物、または単位複製配列は、 A_2 と相補的であり、次の増幅サイクルにおいて標的として機能する。したがって、特異的標的DNA配列の指数関数的増幅は、過剰なLCRプローブの存在下における変性、ハイブリダイゼーション、およびライゲーションの繰り返しサイクルを通じて達成される。このことから、 A_2 の存在、ひいては標的ポリヌクレオチド配列の存在が暗示される。

【0184】

10

一部の実施形態では、 A_2 の存在下では、2つのPCRプローブは A_2 とのアニーリングが成功し、一緒にライゲーションされて、1つのオリゴヌクレオチド分子を形成し、その後、これが第2ラウンドの共有的ライゲーションの新しい標的として働き、目的の標的、この場合は A_2 の幾何学的増幅をもたらす、その後、これを検出する。

【0185】

一部の実施形態では、キットは、

- フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド1 (H O 1) であって、H O 1は A_2 と相補的であり、 A_2 とアニーリングした場合に、H O 1のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、H O 1と、

20

- フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド2 (H O 2) であって、H O 2は開いたH O 1と相補的であり、H O 1とアニーリングした場合に、H O 2のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、H O 2とをさらに含み得る。

【0186】

一部の実施形態では、キットは、複数のH O 1およびH O 2をさらに含み得る。

一部の実施形態では、キットは、代わりに、基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドAと、

- 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドBと、

30

- フルオロフォアークエンチャー対を含む基質と

をさらに含んでよく、 A_2 の存在下でオリゴヌクレオチドAおよびBが組み合わされて触媒的に多成分の核酸酵素 (M N A z y m e) が形成されるように、オリゴヌクレオチドAおよびBのセンサーアームが A_2 のフランキング領域と相補的である。

【0187】

一部の実施形態では、キットは、代わりに、部分的に二本鎖の核酸構築体であって、

- 一方の鎖が、少なくとも1つのRNA塩基、少なくとも1つのフルオロフォアを含み、この鎖の一領域が A_2 の一領域と相補的であり、この鎖を「基質」鎖と呼んでよく、

- 他方の鎖が、少なくとも1つのクエンチャーを含み、この鎖の一領域が、 A_2 の存在下で部分的に二本鎖の核酸構築体を実質的により二本鎖となるように、基質鎖が相補的である領域に隣接する A_2 の一領域と相補的である、核酸構築体をさらに含み得る。

40

【0188】

言い換えれば、部分的に二本鎖の核酸構築体は、 A_2 の存在下でより大きな二本鎖部分を有する。

一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つのRNA塩基を除去するための酵素をさらに含み得る。

【0189】

一部の実施形態では、酵素はウラシル-DNAグリコシラーゼ (U D G) であり、RNA塩基はウラシルである。

一部の実施形態では、キットは、代わりに、

50

ー その蛍光が、互いとまたは1つもしくは複数の蛍光クエンチャーのいずれかとのその近接によってクエンチされるように配置された、1つのまたは複数のフルオロフォアを含む、ライゲーション部位を含むA₂の一領域と相補的であるオリゴヌクレオチドと、

ー 二本鎖特異的DNA消化酵素と

をさらに含んでよく、A₂の存在下で、標識されたオリゴヌクレオチドは、フルオロフォアが互いからまたはその対応するクエンチャーから分離されており、蛍光シグナル、ひいてはA₂の存在が検出可能であるように、消化される。

【0190】

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素はエクソヌクレアーゼである。

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素は校正活性を有するポリメラーゼである。

【0191】

一部の実施形態では、キットのフルオロフォアは、フルオレセインファミリー、カルボキシローダミンファミリー、シアニンファミリー、ローダミンファミリー、ポリハロフルオレセインファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセインファミリー色素、クマリンファミリー色素、オキサジンファミリー色素、チアジンファミリー色素、スクアレインファミリー色素、およびキレート化ランタニドファミリー色素の色素から選択され得る。

【0192】

一部の実施形態では、キットのフルオロフォアは、市販の色素のうちの任意のものから選択され得る。

一部の実施形態では、キットのクエンチャーは、商品名Black Hole（商標）、Eclipse（商標）Dark、Qx1J、およびIowa Black（商標）の下で入手可能なものから選択され得る。

【0193】

一部の実施形態では、キットのクエンチャーは、市販のクエンチャーのうちの任意のものから選択され得る。

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数の部分的に二本鎖のDNA構築体をさらに含んでよく、それぞれの構築体は1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーを含有する。一部の実施形態では、構築体が部分的に二本鎖である場合、1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーは、1つまたは複数のフルオロフォアの十分なクエンチングが起こるように、互いに十分に近く近接して位置する。

【0194】

一部の実施形態では、構築体は、それ自身に折り重なる自己相補的領域を有する、DNAの一方の鎖である。

一部の実施形態では、構築体は、プライマー対の一方のプライマーを含む。

【0195】

一部の実施形態では、キットは、プライマー対の他方のプライマーをさらに含み得る。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、A₂とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによってA₂に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズする。その後、このプライマーが構築体に対して伸長し、自己相補的領域を追放する。したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、A₂の存在が示される。そのような実施形態では、構築体はサンライズプライマーとして知られ得る。

【0196】

一部の実施形態では、構築体は2本の別々のDNA鎖を含む。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、A₂とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによってA₂に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズする。その後、このプライ

10

20

30

40

50

マーが構築体に対して二本鎖部分の方向に伸長し、DNA鎖のうちのより短い方を追放し、したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、 A_2 の存在が示される。そのような実施形態では、構築体は分子ジッパーとして知られ得る。

【0197】

当業者には、サンライズプライマーおよび分子ジッパーのどちらについても、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数のクエンチャーの対が、それぞれの対応する構築体内の様々な位置に位置することが可能であることが理解されよう。主要な特長は、それぞれの対が互いに十分に近接して位置しており、 A_2 の非存在下、すなわち伸長および鎖の追放が起こっていない場合は、蛍光シグナルが放射されないことである。

10

【0198】

一実施形態では、キットはピロリン酸イオン供給源をさらに含む。適切なピロリン酸イオン供給源は以前に記載したとおりである。

一部の実施形態では、キットは、適切な陽性および陰性対照をさらに含む。一部の実施形態では、キットは、以前に記載したとおりである1つまたは複数の対照プローブ (E_0) をさらに含み得る。一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数の対照プローブ (E_0) および1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドをさらに含み得る。

【0199】

一部の実施形態では、 A_0 の5'末端は、5'-3'エクソヌクレアーゼ消化に対する耐性が与えられていてよく、キットは、5'-3'エクソヌクレアーゼをさらに含み得る。一部の実施形態では、 C は、それを3'-5'エクソヌクレアーゼ消化から保護する3'または内部修飾をさらに含み得る。

20

【0200】

一部の実施形態では、キットは、試料中に存在する標的ポリヌクレオチド配列の初期増幅のための、dNTP、ポリメラーゼ、プライマー、および適切な緩衝液をさらに含み得る。一部のような実施形態では、そのような初期増幅に使用する少なくとも1つのプライマーは、5'または内部遮断修飾を含み、キットは、5'-3'エクソヌクレアーゼをさらに含む。一部のような実施形態では、少なくとも1つの他のプライマーは5'リン酸基を含む。

【0201】

一部の実施形態では、キットは、高忠実度ポリメラーゼを取り込んだdUTP、dUTP、およびウラシル-DNA N-グリコシラーゼ (UDG) をさらに含み得る。

30

一部の実施形態では、キットは、ホスファターゼまたはホスホヒドロラーゼをさらに含み得る。一部の実施形態では、キットは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。ピロホスファターゼはホットスタートであり得る。

【0202】

一部の実施形態では、キットはプロテイナーゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブをさらに含み得る。

【0203】

一部の実施形態では、キットは、それぞれが異なる標的配列に対して選択的であり、それぞれが同定領域を含む、 A_0 を含む複数の分子学的システムをさらに含み得る。

40

一部の実施形態では、キットは、RNA鋳型からのDNAの形成のための酵素をさらに含み得る。

【0204】

一部の実施形態では、酵素は逆転写酵素である。

一部の実施形態では、キットの1つまたは複数の酵素はホットスタートであり得る。

一部の実施形態では、キットの1つまたは複数の酵素は熱安定性であり得る。

【0205】

一部の実施形態では、キットは、適切な洗浄および緩衝試薬をさらに含み得る。

50

一部の実施形態では、(e)の増幅酵素および加ピロリン酸分解酵素は同じである。

一部の実施形態では、増幅酵素および加ピロリン酸分解酵素は同じである。

【0206】

キットは、本明細書中に記載の処理に従った、ポリヌクレオチドの一部を単離および／または精製するための精製装置および試薬をさらに含み得る。適切な試薬は当分野で周知であり、ゲル濾過カラムおよび洗浄緩衝液が挙げられる。

【0207】

一部の実施形態では、キットは、A₀の一部と実質的に相補的である少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチド、増幅酵素、およびdNTPをさらに含む。

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブをさらに含む。

10

【0208】

一部の実施形態では、キットは、それぞれがA₀を含み、それぞれが異なる標的配列に対して選択的であり、それぞれが同定領域を含む、複数の分子学的システムをさらに含む。

【0209】

一部の実施形態では、キットは、

- － A₁上の隣接配列と相補的である、2つ以上のライゲーション連鎖反応(LCR)プローブオリゴヌクレオチドであって、プローブのアニールングが成功している場合は、一方のLCRプローブの5'リン酸が他方のLCRプローブの3'OHと直接隣接している、
 - － プローブオリゴヌクレオチドと、
 - － 1つまたは複数のリガーゼと
- をさらに含む。

20

【0210】

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数のポリメラーゼをさらに含む。

キットの一部の実施形態では、1つまたは複数のポリメラーゼは、加ピロリン酸分解酵素と同じである。

【0211】

一部の実施形態では、キットは、

- － フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド1(HO1)であって、HO1はA₂と相補的であり、A₂とアニールングした場合に、HO1のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、HO1と、
 - － フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド2(HO2)であって、HO2は開いたHO1と相補的であり、HO1とアニールングした場合に、HO2のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、HO2と
- をさらに含む。

30

【0212】

一部の実施形態では、キットは、複数のHO1およびHO2をさらに含む。

一部の実施形態では、キットは、

- － 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドAと、
 - － 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドBと、
 - － フルオロフォアークエンチャー対を含む基質と、
- をさらに含み、A₂の存在下でオリゴヌクレオチドAおよびBが組み合わされて触媒的に多成分の核酸酵素(MNAzyme)が形成されるように、オリゴヌクレオチドAおよびBのセンサーアームがA₂のフランキング領域と相補的である。

40

【0213】

一部の実施形態では、キットは、部分的に二本鎖の核酸構築体であって、

- － 一方の鎖が、少なくとも1つのRNA塩基、少なくとも1つのフルオロフォアを含

50

み、この鎖の一領域が A_2 の一領域と相補的であり、この鎖を「基質」鎖と呼んでよく、
－ 他方の鎖が、少なくとも1つのクエンチャーを含み、この鎖の一領域が、 A_2 の存在下で部分的に鎖となった核酸構築体を実質的により二本鎖となるように、基質鎖が相補的である領域に隣接する A_2 の一領域と相補的である
、核酸構築体をさらに含む。

【0214】

一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つのRNA塩基を除去するための酵素をさらに含む。

キットの一部の実施形態では、酵素はウラシル-DNAグリコシラーゼ(UDG)であり、RNA塩基はウラシルである。

【0215】

一部の実施形態では、キットは、

－ その蛍光が、互いとまたは1つもしくは複数の蛍光クエンチャーのいずれかとのその近接によってクエンチされるように配置された、1つのまたは複数のフルオロフォアを含む、ライゲーション部位を含む A_2 の一領域と相補的であるオリゴヌクレオチドと、

－ 二本鎖特異的DNA消化酵素と、
をさらに含み、 A_2 の存在下で、標識されたオリゴヌクレオチドは、フルオロフォアが互いからまたはその対応するクエンチャーから分離されており、蛍光シグナル、ひいては A_2 の存在が検出可能であるように、消化される。

【0216】

キットの一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素はエクソヌクレアーゼである。

キットの一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素は校正活性を有するポリメラーゼである。

【0217】

キットの一部の実施形態では、フルオロフォアは、フルオレセインファミリー、カルボキシローダミンファミリー、シアニンファミリー、ローダミンファミリー、ポリハロフルオレセインファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセインファミリー色素、クマリンファミリー色素、オキサジンファミリー色素、チアジンファミリー色素、スクアレインファミリー色素、およびキレート化ランタニドファミリー色素の色素から選択される。

【0218】

キットの一部の実施形態では、クエンチャーは、商品名Black Hole(商標)、Eclipse(商標)Dark、Qx1J、およびIowa Black(商標)の下で入手可能なものから選択される。

【0219】

一部の実施形態では、キットは、ホスファターゼまたはホスホヒドロラーゼをさらに含む。

一部の実施形態では、キットは、ピロホスファターゼをさらに含む。

【0220】

一部の実施形態では、キットは、RNA鋳型からのDNAの形成のための酵素をさらに含む。

キットの一部の実施形態では、酵素は逆転写酵素である。

【0221】

キットの一部の実施形態では、1つまたは複数の酵素はホットスタートである。

キットの一部の実施形態では、1つまたは複数の酵素は熱安定性である。

一部の実施形態では、キットは、適切な洗浄および緩衝試薬をさらに含む。

【0222】

一部の実施形態では、キットは、以前に記載した通りであり得る後成的感受性および／または後成的依存性制限酵素をさらに含む。

一部の実施形態では、キットは、メチル化感受性および／またはメチル化依存性制限酵

10

20

30

40

50

素をさらに含む。

【0223】

一部の実施形態では、キットは、1つまたはメチルCpG結合ドメイン(MBD)タンパク質をさらに含む。

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数の5-メチルシチジン(5-mC)抗体をさらに含む。

【0224】

一部の実施形態では、キットは、MBD2bタンパク質のうちの1つもしくは複数および/またはMBD2b/MBD3L1複合体のうちの1つもしくは複数をさらに含む。

一部の実施形態では、キットは、メチル化特異的多重鎖ライゲーション依存性プローブ増幅(MS-MLPA)に適切な試薬をさらに含む。

【0225】

本発明の一実施形態では、

第1の領域、第2の領域、および第3の領域の間の少なくとも1つの流路を含む装置であって、第1の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

dNTPと、

少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、

試料中に存在するDNAの初期増幅のための増幅酵素と

を含み、第2の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

標的ポリヌクレオチド配列と第1の中間生成物を形成することができるプローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システムであって、前記中間生成物が少なくとも部分的に二本鎖であるシステムと、

第1の中間生成物をA₀の末端から3' - 5'方向で消化して、部分的に消化された鎖A₁を作り出すことができる、加ピロリン酸分解酵素と

を含み、第3の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

dNTPと、

緩衝液と、

増幅酵素と、

A₂もしくはその一部分、または複数コピーのA₂、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と

を含み、第2の領域のウェルまたは第3の領域のウェルが、A₀の一部分と実質的に相補的である少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドをさらに含む、装置が提供される。

【0226】

一部の実施形態では、第1の領域の1つまたは複数のウェルは、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドを含む。

一部の実施形態では、第2の領域の1つまたは複数のウェルは、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドを含む。

【0227】

一部の実施形態では、第1の領域のウェルは、

— dNTPと、

— 1つまたは複数の一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、

— 試料中に存在するDNAの初期増幅のための増幅酵素と

を含み、プライマーのうちの1つまたは複数是非相補的5'テイルを有する。

【0228】

一部の実施形態では、プライマーのうちの1つまたは複数5'リン酸を有する。

一部の実施形態では、プライマーのうちの1つまたは複数5'保護されている。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、第3の領域の1つまたは複数のウェル内に位置する。

【0229】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の第3の領域内に位置する。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の隣接領域内に位置する。

【0230】

一部の実施形態では、第1の領域のそれぞれのウェルのdNTPは、dUTP、dGTP、dATP、およびdCTPであってよく、それぞれのウェルは、高忠実度ポリメラーゼを取り込んだdUTPおよびウラシル-DNA N-グリコシラーゼ(UDG)をさらに含み得る。

【0231】

一部の実施形態では、第3の領域のそれぞれのウェルのdNTPは、dUTP、dGTP、dATP、およびdCTPであってよく、それぞれのウェルは、高忠実度ポリメラーゼを取り込んだdUTPおよびウラシル-DNA N-グリコシラーゼ(UDG)をさらに含み得る。

【0232】

一部の実施形態では、第2の領域のそれぞれのウェルは、ピロリン酸イオン供給源をさらに含み得る。

一部の実施形態では、A₀の5'末端は、5'-3'エクソヌクレアーゼ消化に対する耐性が与えられていてよく、第2の領域のウェルは、5'-3'エクソヌクレアーゼをさらに含み得る。

【0233】

一部の実施形態では、dNTPはホットスタートであってよく、第2の領域のそれぞれのウェルは、ホスファターゼまたはホスホヒドロラーゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第2の領域のそれぞれのウェルは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。

【0234】

一部の実施形態では、ピロホスファターゼはホットスタートであり得る。

一部の実施形態では、第3の領域のそれぞれのウェルは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブをさらに含み得る。

【0235】

一部の実施形態では、第2の領域のそれぞれのウェルは、同定領域を含む標的配列に選択的なA₀を含む少なくとも1つまたは複数の異なる分子学的システムを含み得る。

一部の実施形態では、第2の領域中の増幅酵素および加ピロリン酸分解酵素は同じであり得る。

【0236】

一部の実施形態では、1つまたは複数のウェルを含む第4の領域が存在してよく、それぞれのウェルはプロテイナーゼを含んでよく、前記第4の領域は第1および第2の領域の間に位置し得る。

【0237】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルが、

dNTPと、

緩衝液と、

増幅酵素と、

A₁もしくはその一部分、または複数コピーのA₁、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と

をさらに含むように、装置の第2および第3の領域を合わせ得る。

【0238】

第2の領域のウェルは、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドをさらに含み得る。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、第2の領域の1つまたは複数

10

20

30

40

50

のウェル内に位置する。

【0239】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の第2の領域内に位置する。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の隣接領域内に位置する。

【0240】

一部の実施形態では、

第1の領域および第2の領域の間の流路を含む装置であって、第1の領域が1つまたは複数のウェルを含み、1つまたは複数のウェルが、

標的ポリヌクレオチド配列と第1の中間生成物を形成することができるプローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システムであって、前記中間生成物が少なくとも部分的に二本鎖であるシステムと、

第1の中間生成物をA₀の末端から3' - 5' 方向で消化して、部分的に消化された鎖A₁を作り出すことができる、加ピロリン酸分解酵素と、

A₁とライゲーションしてオリゴヌクレオチドA₂を作り出すことができる、1つまたは複数のリガーゼと

を含み、第2の領域が1つまたは複数のウェルを含む、装置が提供される。

【0241】

第1の領域のウェルは、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第1の領域の1つまたは複数のウェルは、加ピロリン酸分解反応を順方向に駆動するためのイオン供給源をさらに含み得る。

【0242】

一部の実施形態では、イオンはピロリン酸イオンである。

一部の実施形態では、A₀の5' 末端は、5' - 3' エクソヌクレアーゼ消化に対して耐性であり、第1の領域のウェルは、5' - 3' エクソヌクレアーゼをさらに含む。

【0243】

一部の実施形態では、装置は、流路によって第1の領域と連結された、1つまたは複数のウェルを含む第3の領域をさらに含んでよく、第3の領域の1つまたは複数のウェルは、

dNTPと、

一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、

増幅酵素と

を含む。

【0244】

第3の領域のウェルは、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第3の領域のdNTPは、dUTP、dGTP、dCTP、およびdATPであってよく、

増幅酵素は高忠実度ポリメラーゼを取り込んだdUTPであってよく、

第3の領域の1つまたは複数のウェルは、ウラシル-DNA N-グリコシラーゼをさらに含み得る。

【0245】

一部の実施形態では、装置は、1つまたは複数のウェルを含む第1および第3の領域の間に位置する第4の領域をさらに含んでよく、1つまたは複数のウェルはプロテイナーゼを含み得る。

【0246】

一部の実施形態では、第1または第2の領域の1つまたは複数のウェルは、リガーゼをさらに含み得る

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、第1の領域の1つまたは複数のウェルは、それぞれが異なる標的配列に対して選択的であり、それぞれが同定領域を含む、 A_0 を含む少なくとも1つまたは複数の異なる分子学的システムを含み得る。

【0247】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルは、

dNTPと、

緩衝液と、

増幅酵素と、

A_1 もしくはその一部分、または複数コピーの A_1 、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と

10

を含み得る。

【0248】

第2の領域のウェルは、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドをさらに含み得る。

本発明の実施形態は、dNTP、緩衝液、増幅酵素、などを含む1つまたは複数の領域中に位置する1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドを含み得る。

【0249】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、第2の領域の1つまたは複数のウェル内に位置する。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の第2の領域内に位置する。

20

【0250】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の隣接領域内に位置する。

一部の実施形態では、第2の領域の1つまたは複数のウェルは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブをさらに含み得る。

【0251】

一部の実施形態では、装置の増幅酵素および加ピロリン酸分解酵素は同じである。

一部の実施形態では、第2の領域のウェルは、

— A_1 上の隣接配列と相補的である、2つ以上のライゲーション連鎖反応(LCR)プローブオリゴヌクレオチドであって、プローブのアニールリングが成功している場合は、一方のLCRプローブの5'リン酸が他方のLCRプローブの3'OHと直接隣接している、プローブオリゴヌクレオチドと、

30

— 1つまたは複数のリガーゼと

をさらに含む。

【0252】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルは、

— フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド1(HO1)であって、HO1は A_2 と相補的であり、 A_2 とアニールリングした場合に、HO1のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、HO1と、

40

— フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド2(HO2)であって、HO2は開いたHO1と相補的であり、HO1とアニールリングした場合に、HO2のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、HO2と

をさらに含み得る。

【0253】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルは、複数のHO1およびHO2をさらに含み得る。

一部の実施形態では、第2の領域のウェルは、

— 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチドAと、

50

ー 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチド B と、

ー フルオロフォアクエンチャー対を含む基質と

をさらに含んでよく、 A_2 の存在下でオリゴヌクレオチド A および B が組み合わされて触媒的に多成分の核酸酵素 (MNAzyme) が形成されるように、オリゴヌクレオチド A および B のセンサーアームが A_2 のフランキング領域と相補的である。

【0254】

一部の実施形態では、第 2 の領域のウェルは、部分的に二本鎖の核酸構築体であって、

ー 一方の鎖が、少なくとも 1 つの RNA 塩基、少なくとも 1 つのフルオロフォアを含み、この鎖の一領域が A_2 の一領域と相補的であり、この鎖を「基質」鎖と呼んでよく、

ー 他方の鎖が、少なくとも 1 つのクエンチャーを含み、この鎖の一領域が、 A_2 の存在下で部分的に鎖となった核酸構築体を実質的により二本鎖となるように、基質鎖が相補的である領域に隣接する A_2 の一領域と相補的である

、核酸構築体を含み得る。

【0255】

一部の実施形態では、第 2 の領域のウェルは、少なくとも 1 つの RNA 塩基を除去するための酵素をさらに含み得る。

一部の実施形態では、酵素はウラシル-DNA グリコシラーゼ (UDG) であり、RNA 塩基はウラシルである。

【0256】

一部の実施形態では、第 2 の領域の 1 つまたは複数のウェルは、

その蛍光が、互いとまたは 1 つもしくは複数の蛍光クエンチャーのいずれかとのその近接によってクエンチされるように配置された、1 つのまたは複数のフルオロフォアを含む、ライゲーション部位を含む A_2 の一領域と相補的であるオリゴヌクレオチドと、

二本鎖特異的 DNA 消化酵素と

をさらに含んでよく、 A_2 の存在下で、標識されたオリゴヌクレオチドは、フルオロフォアが互いからまたはその対応するクエンチャーから分離されており、蛍光シグナル、ひいては A_2 の存在が検出可能であるように、消化される。

【0257】

一部の実施形態では、二本鎖特異的 DNA 消化酵素はエクソヌクレアーゼである。

一部の実施形態では、二本鎖特異的 DNA 消化酵素は校正活性を有するポリメラーゼである。

【0258】

一部の実施形態では、フルオロフォアは、フルオレセインファミリー、カルボキシローダミンファミリー、シアニンファミリー、ローダミンファミリー、ポリハロフルオレセインファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセインファミリー色素、クマリンファミリー色素、オキサジンファミリー色素、チアジンファミリー色素、スクアレインファミリー色素、およびキレート化ランタニドファミリー色素の色素から選択される。

【0259】

一部の実施形態では、装置のフルオロフォアは、市販の色素のうちの任意のものから選択され得る。

一部の実施形態では、装置のクエンチャーは、商品名 Black Hole (商標)、Eclipse (商標) Dark、Qx1J、Iowa Black (商標)、ZEN、および／または TAO の下で入手可能なものから選択される。

【0260】

一部の実施形態では、装置のクエンチャーは、市販のクエンチャーのうちの任意のものから選択され得る。

一部の実施形態では、第 2 の領域の 1 つまたは複数のウェルは、1 つまたは複数の部分的に二本鎖の DNA 構築体をさらに含んでよく、それぞれの構築体は 1 つまたは複数のフルオロフォアおよび 1 つまたは複数のクエンチャーを含有する。一部の実施形態では、構

10

20

30

40

50

築体が部分的に二本鎖である場合、1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーは、1つまたは複数のフルオロフォアの十分なクエンチングが起こるように、互いに十分に近く近接して位置する。

【0261】

一部の実施形態では、構築体は、それ自身に折り重なる自己相補的領域を有する、DNAの一方の鎖である。

一部の実施形態では、構築体は、プライマー対の一方のプライマーを含む。

【0262】

一部の実施形態では、第2の領域の1つまたは複数のウェルは、プライマー対の他方のプライマーをさらに含み得る。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、 A_2 とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって A_2 に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズして、 A_2 を表示する。その後、このプライマーが構築体に対して伸長し、自己相補的領域を追放する。したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、 A_2 の存在が示される。

【0263】

そのような実施形態では、構築体はサンライズプライマーとして知られ得る。

一部の実施形態では、構築体は2本の別々のDNA鎖を含む。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、 A_2 とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって A_2 に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズして、 A_2 を表示する。その後、このプライマーが構築体に対して二本鎖部分の方向に伸長し、DNA鎖のうちのより短い方を追放し、したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、 A_2 の存在が示される。

【0264】

そのような実施形態では、構築体は分子ジッパーとして知られ得る。

当業者には、サンライズプライマーおよび分子ジッパーのどちらについても、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数のクエンチャーの対が、それぞれの対応する構築体内の様々な位置に位置することが可能であることが理解されよう。主要な特長は、それぞれの対が互いに十分に近接して位置しており、 A_2 の非存在下、すなわち伸長および鎖の追放が起こっていない場合は、蛍光シグナルが放射されないことである。

【0265】

一部の実施形態では、1つまたは複数の領域の1つまたは複数のウェルは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域の1つまたは複数のウェルは、ホスファターゼまたはホスホヒドrolラーゼをさらに含み得る。

【0266】

一部の実施形態では、装置の第1の領域の1つまたは複数のウェルは、RNA鋳型からのDNAの形成のための酵素をさらに含み得る。

一部の実施形態では、酵素は逆転写酵素である。

【0267】

一部の実施形態では、装置中に存在する1つまたは複数の酵素はホットスタートである。

一部の実施形態では、装置中に存在する1つまたは複数の酵素は熱安定性である。

【0268】

一部の実施形態では、装置の第1および第2の領域を合わせる。

本発明の一部の実施形態では、

— 第1の領域、第2の領域、および第3の領域の間の少なくとも1つの流路を含む装置であって、第1の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

10

20

30

40

50

— d N T P と、
— 少なくとも 1 つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、
— 試料中に存在する D N A の初期増幅のための増幅酵素と
を含み、第 2 の領域が 1 つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、
— 標的ポリヌクレオチド配列と第 1 の中間生成物を形成することができるプローブオリゴヌクレオチド A₀ を含む分子学的システムであって、前記中間生成物が少なくとも部分的に二本鎖であるシステムと、
— 第 1 の中間生成物を A₀ の末端から 3' - 5' 方向で消化して、部分的に消化された鎖 A₁ を作り出すことができる、加ピロリン酸分解酵素と
を含み、第 3 の領域が 1 つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、
— d N T P と、
— 緩衝液と、
— 任意選択で増幅酵素と、
— 任意選択で、A₂ もしくはその一部分、または複数コピーの A₂、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と
を含み、第 2 の領域のウェルまたは第 3 の領域のウェルが、A₀ の一部分と実質的に相補的である少なくとも 1 つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドをさらに含む、装置が提供される。

10

【0269】

一部の実施形態では、第 2 の領域のウェルは、
— d N T P と、
— 1 つまたは複数の一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、
— 試料中に存在する D N A の初期増幅のための増幅酵素と
を含み、プライマーのうちの 1 つまたは複数是非相補的 5' テイルを有する。

20

【0270】

一部の実施形態では、プライマーのうちの 1 つまたは複数は 5' リン酸を有する。
一部の実施形態では、プライマーのうちの 1 つまたは複数は 5' 保護されている。
一部の実施形態では、第 2 の領域のウェルに存在していた加ピロリン酸分解酵素は第 3 の領域のウェルまで運ばれ、ここで加ピロリン酸分解酵素が d N T P および適切な緩衝液の存在下で A₂ の増幅を行う。

30

【0271】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、第 3 の領域の 1 つまたは複数のウェル内に位置する。
一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の第 3 の領域内に位置する。

【0272】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の隣接領域内に位置する。

一部の実施形態では、第 1 の領域のそれぞれのウェルの d N T P は、d U T P、d G T P、d A T P、および d C T P であってよく、それぞれのウェルは、高忠実度ポリメラーゼを取り込んだ d U T P およびウラシル-D N A N-グリコシラーゼ (U D G) をさらに含み得る。

40

【0273】

一部の実施形態では、第 2 の領域のそれぞれのウェルは、ピロリン酸イオン供給源をさらに含み得る。

一部の実施形態では、A₀ の 5' 末端は、5' - 3' エクソヌクレアーゼ消化に対する耐性が与えられていてよく、第 2 の領域のウェルは、5' - 3' エクソヌクレアーゼをさらに含み得る。

【0274】

一部の実施形態では、第 2 または第 3 の領域のそれぞれのウェルは、リガーゼをさらに

50

含み得る。

一部の実施形態では、d N T P はホットスタートであり得る。

【0275】

一部の実施形態では、第2の領域のそれぞれのウェルは、ホスファターゼまたはホスホヒドロラーゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第2の領域のそれぞれのウェルは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。

【0276】

一部の実施形態では、ピロホスファターゼはホットスタートである。

一部の実施形態では、第3の領域のそれぞれのウェルは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブをさらに含み得る。

【0277】

一部の実施形態では、第2の領域のそれぞれのウェルは、同定領域を含む標的配列に選択的な少なくとも1つまたは複数の異なるA₀を含み得る。

一部の実施形態では、第2の領域中の増幅酵素および加ピロリン酸分解酵素は同じであり得る。

【0278】

一部の実施形態では、1つまたは複数のウェルを含む第4の領域が存在してよく、それぞれのウェルはプロテイナーゼを含んでよく、前記第4の領域は第1および第2の領域の間に位置し得る。

【0279】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルが、

- d N T P と、
- 緩衝液と、
- 増幅酵素と、

A₁もしくはその一部分、または複数コピーのA₁、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と

をさらに含むように、装置の第2および第3の領域を合わせ得る。

【0280】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルが、

- 任意選択でd N T P と、
- 任意選択で増幅酵素と、
- 緩衝液と、
- 標識したオリゴヌクレオチドプローブと

をさらに含むように、装置の第2および第3の領域を合わせ得る。

【0281】

一部の実施形態では、第2の領域のウェルに存在していた加ピロリン酸分解酵素を利用して、d N T P および適切な緩衝液の存在下でA₂の増幅を行う。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、第2の領域の1つまたは複数のウェル内に位置する。

【0282】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の第2の領域内に位置する。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、装置の隣接領域内に位置する。

【0283】

一部の実施形態では、第1の領域は、流体界面を介して試料容器と流体接続し得る。

本発明の一部の実施形態では、

— 第1、第2、第3、および第4の領域の間の少なくとも1つの流路を含む装置であって、第1の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、核酸を選択的

10

20

30

40

50

に修飾するための手段を含み、

第2の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

- － dNTPと、
- － 少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、
- － 試料中に存在するDNAの初期増幅のための増幅酵素と

を含み、第3の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

－ 標的ポリヌクレオチド配列と第1の中間生成物を形成することができるプローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システムであって、前記中間生成物が少なくとも部分的に二本鎖であるシステムと、

－ 第1の中間生成物をA₀の末端から3'－5'方向で消化して、部分的に消化された鎖A₁を作り出すことができる、加ピロリン酸分解酵素と

を含み、第4の領域が1つまたは複数のウェルを含み、それぞれのウェルが、

- － dNTPと、
- － 緩衝液と、
- － 任意選択で増幅酵素と、
- － A₂もしくはその一部分、または複数コピーのA₂、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と

を含み、第3の領域のウェルまたは第4の領域のウェルが、A₀の一部分と実質的に相補的である少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドをさらに含む、装置が提供される。

【0284】

一部の実施形態では、核酸を選択的に修飾するための手段は、標的ポリヌクレオチド配列中の未修飾のシトシン塩基を変換することができる化学薬品であり得る。

一部の実施形態では、核酸を選択的に修飾するための手段は、標的ポリヌクレオチド配列中の未修飾のシトシン塩基を変換することができる酵素であり得る。

【0285】

一部の実施形態では、第2または第3の領域のウェルは、制限エンドヌクレアーゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第1および第2の領域の間に1つまたは複数のウェルを含む領域が位置していてよく、それぞれのウェルは、制限エンドヌクレアーゼを含み得る。

【0286】

一部の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは、未修飾のシトシン塩基の化学的または酵素的変換によって作製された標的ポリヌクレオチド配列中の配列を認識し得る。

一部の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼが認識し得る標的ポリヌクレオチド配列中の配列は、未修飾のシトシン塩基の化学的または酵素的変換によって除去される。

【0287】

一部の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは、メチル化感受性またはメチル化依存性制限のエンドヌクレアーゼであり得る。

一部の実施形態では、第2の領域のウェルは、後成的修飾したDNAの修飾特異的多重鎖ライゲーション依存性プローブ増幅(MS-MLP A)のための試薬を含み得る。

【0288】

一部の実施形態では、第1および第2の領域の間に1つまたは複数のウェルを含む領域が位置していてよく、それぞれのウェルは、PCRのための試薬を含み得る。

一部の実施形態では、第1および第2の領域の間に1つまたは複数のウェルを含む領域が位置していてよく、それぞれのウェルは、後成的修飾したまたは未修飾の標的配列の集団の還元のための試薬を含み得る。

【0289】

一部の実施形態では、後成的修飾したまたは未修飾の標的配列の集団の還元のための試薬は、後成的修飾したDNA免疫沈降、任意選択でメチル化DNA免疫沈降(MeDIP)のための試薬である。

10

20

30

40

50

【0290】

一部の実施形態では、後成的修飾したまたは未修飾の標的配列の集団の還元のための試薬は、MBD2bまたはMBD2b／MBD3L1複合体などのメチル結合タンパク質である。

【0291】

一部の実施形態では、後成的修飾したまたは未修飾の標的配列の集団の還元のための試薬は、第1の領域の1つまたは複数のウェル内に位置する。

装置の一部の実施形態では、後成的修飾はメチル化であり得る。一部の実施形態では、後成的修飾はCpGアイランドでのメチル化であり得る。一部の実施形態では、後成的修飾はCpGアイランドでのヒドロキシメチル化であり得る。

10

【0292】

一部の実施形態では、第2、第3、または第4の領域のウェルは、

- dNTPと、
- 少なくとも1つの一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドと、
- 増幅酵素と

を含み得る。

【0293】

一部の実施形態では、それぞれのウェルのdNTPは、dUTP、dGTP、dATP、およびdCTPであってよく、それぞれのウェルは、高忠実度ポリメラーゼを取り込んだdUTPおよびウラシル-DNA N-グリコシラーゼ(UDG)をさらに含み得る。

20

【0294】

一部の実施形態では、それぞれのウェルは、ピロリン酸イオン供給源をさらに含み得る。

一部の実施形態では、A₀の5'末端は、5'-3'エクソヌクレアーゼ消化に対する耐性が与えられていてよく、第2または第3の領域のウェルは、5'-3'エクソヌクレアーゼをさらに含み得る。

【0295】

一部の実施形態では、第3または第4の領域のそれぞれのウェルは、リガーゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、dNTPはホットスタートであり得る。

30

【0296】

一部の実施形態では、第3の領域のそれぞれのウェルは、ホスファターゼまたはホスホヒドロラーゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第3の領域のそれぞれのウェルは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。

【0297】

一部の実施形態では、第4の領域のそれぞれのウェルは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、ピロホスファターゼはホットスタートである。

【0298】

一部の実施形態では、第4の領域のそれぞれのウェルは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチド結合色素または分子プローブをさらに含み得る。

一部の実施形態では、第3の領域のそれぞれのウェルは、同定領域を含む標的配列に選択的な少なくとも1つまたは複数の異なるA₀を含み得る。

40

【0299】

一部の実施形態では、第4の領域中の増幅酵素および第3の領域中の加ピロリン酸分解酵素は同じであってよく、したがって、一部の実施形態では、第4の領域中の増幅酵素は不要である。

【0300】

一部の実施形態では、1つまたは複数のウェルを含む第5の領域が存在してよく、それ

50

そのウェルはプロテイナーゼを含んでよく、前記第 5 の領域は第 1 および第 2 の領域の間に位置し得る。

【0301】

一部の実施形態では、第 5 の領域は第 2 および第 3 の領域の間に位置し得る。

一部の実施形態では、第 3 の領域のウェルが、

- － dNTP と、
- － 緩衝液と、
- － 増幅酵素と、

A₁ もしくはその一部分、または複数コピーの A₁、または複数コピーのその一部分に由来するシグナルを検出するための手段と

10

をさらに含むように、装置の第 3 および第 4 の領域を合わせ得る。

【0302】

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、第 3 の領域内に位置する。

一部の実施形態では、シグナルを検出するための手段は、隣接領域内に位置する。

一部の実施形態では、第 3 または第 4 の領域のウェルは、

－ A₁ 上の隣接配列と相補的である、2 つ以上のライゲーション連鎖反応 (LCR) プローブオリゴヌクレオチドであって、プローブのアニールリングが成功している場合は、一方の LCR プローブの 5' リン酸が他方の LCR プローブの 3' OH と直接隣接している、プローブオリゴヌクレオチドと、

- － 1 つまたは複数のリガーゼと

20

をさらに含む得る。

【0303】

一部の実施形態では、装置の増幅酵素および加ピロリン酸分解酵素は同じである。

一部の実施形態では、第 3 の領域のウェルは、

－ フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド 1 (HO1) であって、HO1 は A₂ と相補的であり、A₂ とアニールリングした場合に、HO1 のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、HO1 と、

－ フルオロフォアークエンチャー対を含むヘアピンオリゴヌクレオチド 2 (HO2) であって、HO2 は開いた HO1 と相補的であり、HO1 とアニールリングした場合に、HO2 のヘアピン構造が開き、フルオロフォアークエンチャー対が分離する、HO2 と

30

をさらに含む得る。

【0304】

一部の実施形態では、第 3 の領域のウェルは、複数の HO1 および HO2 をさらに含む得る。

一部の実施形態では、第 3 の領域のウェルは、

－ 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチド A と、

－ 基質アーム、部分的触媒核、およびセンサーアームを含む、オリゴヌクレオチド B と、

- － フルオロフォアークエンチャー対を含む基質と

40

をさらに含んでよく、A₂ の存在下でオリゴヌクレオチド A および B が組み合わされて触媒的に多成分の核酸酵素 (MNzyme) が形成されるように、オリゴヌクレオチド A および B のセンサーアームが A₂ のフランキンク領域と相補的である。

【0305】

一部の実施形態では、第 3 の領域のウェルは、部分的に二本鎖の核酸構築体であって、

－ 一方の鎖が、少なくとも 1 つの RNA 塩基、少なくとも 1 つのフルオロフォアを含み、この鎖の一領域が A₂ の一領域と相補的であり、この鎖を「基質」鎖と呼んでよく、

－ 他方の鎖が、少なくとも 1 つのクエンチャーを含み、この鎖の一領域が、A₂ の存在下で部分的に鎖となった核酸構築体を実質的により二本鎖となるように、基質鎖が相補的である領域に隣接する A₂ の一領域と相補的である

50

、核酸構築体を含み得る。

【0306】

一部の実施形態では、第3の領域のウェルは、少なくとも1つのRNA塩基を除去するための酵素をさらに含み得る。

一部の実施形態では、酵素はウラシル-DNAグリコシラーゼ(UDG)であり、RNA塩基はウラシルである。

【0307】

一部の実施形態では、第3の領域の1つまたは複数のウェルは、

その蛍光が、互いとまたは1つもしくは複数の蛍光クエンチャーのいずれかとのその近接によってクエンチされるように配置された、1つのまたは複数のフルオロフォアを含む、ライゲーシオン部位を含むA₂の一領域と相補的であるオリゴヌクレオチドと、

二本鎖特異的DNA消化酵素と

をさらに含んでよく、A₂の存在下で、標識されたオリゴヌクレオチドは、フルオロフォアが互いからまたはその対応するクエンチャーから分離されており、蛍光シグナル、ひいてはA₂の存在が検出可能であるように、消化される。

【0308】

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素はエクソヌクレアーゼである。

一部の実施形態では、二本鎖特異的DNA消化酵素は校正活性を有するポリメラーゼである。

【0309】

一部の実施形態では、フルオロフォアは、フルオレセインファミリー、カルボキシローダミンファミリー、シアニンファミリー、ローダミンファミリー、ポリハロフルオレセインファミリー色素、ヘキサクロロフルオレセインファミリー色素、クマリンファミリー色素、オキサジンファミリー色素、チアジンファミリー色素、スクアレインファミリー色素、およびキレート化ランタニドファミリー色素の色素から選択される。

【0310】

一部の実施形態では、装置のフルオロフォアは、市販の色素のうちの任意のものから選択され得る。

一部の実施形態では、装置のクエンチャーは、商品名Black Hole(商標)、Eclipse(商標) Dark、Qx1J、Iowa Black(商標)、ZEN、および/またはTAOの下で入手可能なものから選択される。

【0311】

一部の実施形態では、装置のクエンチャーは、市販のクエンチャーのうちの任意のものから選択され得る。

一部の実施形態では、第3の領域のウェルは、1つまたは複数の部分的に二本鎖のDNA構築体を含んでよく、それぞれの構築体は1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーを含有する。一部の実施形態では、構築体が部分的に二本鎖である場合、1つまたは複数のフルオロフォアおよび1つまたは複数のクエンチャーは、1つまたは複数のフルオロフォアの十分なクエンチングが起こるように、互いに十分に近く近接して位置する。

【0312】

一部の実施形態では、構築体は、それ自身に折り重なる自己相補的領域を有する、DNAの一方の鎖である。

一部の実施形態では、構築体は、プライマー対の一方のプライマーを含む。

【0313】

一部の実施形態では、第3の領域のウェルは、プライマー対の他方のプライマーをさらに含み得る。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、A₂とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによってA₂に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズする。その後、このプライ

10

20

30

40

50

マーが構築体に対して伸長し、自己相補的領域を追放する。したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、反応混合物中の A_2 の存在が示される。

【0314】

そのような実施形態では、構築体はサンライズプライマーとして知られ得る。

一部の実施形態では、構築体は2本の別々のDNA鎖を含む。

一部の実施形態では、構築体の一本鎖部分の一部分は、 A_2 とハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって A_2 に対して伸長する。一部の実施形態では、その後、プライマー対の他方のプライマーが、伸長した構築体とハイブリダイズして、 A_2 を表示する。その後、このプライマーが構築体に対して二本鎖部分の方向に伸長し、DNA鎖のうちのより短い方を追放し、したがって、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数の色素が十分に隔てられて蛍光シグナルが検出され、反応混合物中の A_2 の存在が示される。

【0315】

そのような実施形態では、構築体は分子ジッパーとして知られ得る。

当業者には、サンライズプライマーおよび分子ジッパーのどちらについても、1つまたは複数のフルオロフォアと1つまたは複数のクエンチャーの対が、それぞれの対応する構築体内の様々な位置に位置することが可能であることが理解されよう。主要な特長は、それぞれの対が互いに十分に近接して位置しており、 A_2 の非存在下、すなわち伸長および鎖の追放が起こっていない場合は、蛍光シグナルが放射されないことである。

【0316】

一部の実施形態では、1つまたは複数の領域の1つまたは複数のウェルは、ピロホスファターゼをさらに含み得る。

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域の1つまたは複数のウェルは、ホスファターゼまたはホスホヒドロラーゼをさらに含み得る。

【0317】

一部の実施形態では、装置の第2の領域の1つまたは複数のウェルは、RNAからDNAへの転写のための酵素をさらに含み得る。

一部の実施形態では、酵素は逆転写酵素である。

【0318】

一部の実施形態では、装置中に存在する1つまたは複数の酵素はホットスタートである。

一部の実施形態では、装置中に存在する1つまたは複数の酵素は熱安定性である。

【0319】

一部の実施形態では、装置の第2および第3の領域を合わせる。

一部の実施形態では、装置の第3および第4の領域を合わせる。

一部の実施形態では、1つの領域の1つもしくは複数のウェルの間および／または装置の1つもしくは複数の領域の間に、1つまたは複数の流体経路が位置する。

【0320】

一部の実施形態では、第1の領域は、流体界面を介して試料容器と流体接続し得る。

一部の実施形態では、加熱および／または冷却要素が装置の1つまたは複数の領域に存在し得る。

【0321】

一部の実施形態では、加熱および／または冷却を、装置の1つまたは複数の領域に適用させ得る。

一部の実施形態では、装置のそれぞれの領域は、独立して少なくとも100または200個のウェルを含み得る。

【0322】

一部の実施形態では、装置のそれぞれの領域は、独立して、約100から300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500個、またはそれより多くのウェルを含み得る。ウェルは任意の形

10

20

30

40

50

状のものであってよく、その位置は、基質上の任意の形式またはパターンで配置され得る。

【0323】

一部の実施形態では、ウェル基質は、金属（たとえば、非限定来な例として、金、白金、もしくはニッケル合金）、セラミック、ガラス、または他のPCR適合性ポリマー材料、あるいは複合材料から構築することができる。ウェル基質は複数のウェルを含む。

【0324】

一部の実施形態では、ウェルは、ウェル基質中に止まり穴または通し穴として形成し得る。ウェルは、ウェル基質内に、たとえば、レーザードリル（たとえばエキシマーまたは固体レーザー）、超音波エンボス、熱エンボス加工リソグラフィー、ニッケル鑄型の電気鑄造、射出成形、および射出圧縮成形によって作製し得る。

10

【0325】

一部の実施形態では、個々のウェル体積は、0.1~1500 nL、一実施形態では0.5~50 nLの範囲であり得る。それぞれのウェルは、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、または500 nLの体積を有し得る。

20

【0326】

一部の実施形態では、ウェル寸法は、任意の形状、たとえば、環状、楕円形、正方形、長方形、卵形、六角形、八角形、錐体、および当業者に知られている他の形状のウェルを有し得る。

【0327】

一部の実施形態では、ウェル形状は、軸に沿って変動する断面領域を有し得る。たとえば、正方形の穴が、第1の大きさから第1の大きさのほんの一部である第2の大きさまで先細になり得る。

【0328】

一部の実施形態では、ウェル寸法は、直径および深度がほぼ等しい正方形であり得る。
一部の実施形態では、ウェルを定義する壁は非平行であり得る。
一部の実施形態では、ウェルを定義する壁は、一点に収束し得る。ウェル寸法は、ウェル基質の合計体積容量から誘導することができる。

30

【0329】

一部の実施形態では、ウェル深度は25 μm ~1000 μm の範囲であり得る。一実施形態では、ウェルは、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、または1000 μm の深度を有し得る。

【0330】

一部の実施形態では、ウェル直径は約25 μm ~約500 μm の範囲であり得る。一部の実施形態では、ウェルは、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、または500 μm の幅を有し得る。

40

【0331】

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域の一部分を、流体の接着を促すまたは妨げるために修飾し得る。ウェルを定義する表面を親水性材料でコーティングし（または親水性となるように修飾し）、したがって流体の保持を促し得る。

【0332】

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域の一部分を、疎水性材料でコーティ

50

ングし（または疎水性となるように修飾し）、したがってそれ上への流体の保持を妨げ得る。当業者には、過剰な流体の排出を促すために、流体が好ましくはウェル内に保たれるが上部表面上には保たれないように、他の表面処理を行い得ることが理解されよう。

【0333】

一部の実施形態では、ウェル基質のウェルは、整列した列とカラムの単純な幾何学的パターン、または斜めもしくは六角形に配置されるパターンを有するようにパターン形成し得る。一実施形態では、ウェル基質のウェルは、無秩序パターンまたはアイソジオメトリック設計パターンなどの複雑な幾何学的パターンを有するようにパターン形成し得る。

【0334】

一部の実施形態では、試薬の相互汚染の防止を助けるために、ウェルは、互いに幾何学的に隔てられているおよび／または大きな深度対幅の比を特長としてよい。

10

一部の実施形態では、装置は、油または他の化学的溶液などのプロセス流体を装置の領域のうちの1つまたは複数へと提供するために使用することができる、1つまたは複数の補助領域を含み得る。そのような補助領域は、金属箔または薄膜などの1つまたは複数の膜、弁、および／または圧力で切断可能な基質（すなわち、補助領域もしくは流路の隣接部分内の流体からの事前に決定された量の圧力に供された場合に破損する材料）を介して、装置の領域のうちの1つまたは複数と流体接続させ得る。

【0335】

一部の実施形態では、装置の流路は、非常に曲がりくねった部分を含み得る。流路の注入路と装置の領域のうちの1つまたは複数との間の曲がりくねった通路は、流体プロセスの制御および取扱いに役立つことができる。曲がりくねった通路は、流路を通る油の流れに干渉する場合があるガス気泡の形成を減らすことを助けることができる。

20

【0336】

一部の実施形態では、装置は、ガスを装置の1つまたは複数の領域のウェルから排出させる一方で、流体を通過させないことを可能にする、ガス透過膜をさらに含み得る。ガス透過膜は、ガス透過接着剤によって装置のウェル基質に接着させ得る。一実施形態では、膜はポリジメチルシロキサン（PDMS）から構築し、20～1000 μmの範囲の厚さを有し得る。一部の実施形態では、膜は100～200 μmの範囲の厚さを有し得る。

【0337】

一部の実施形態では、金属からウェルへの熱伝達を可能にするために、ウェル基質のすべてまたは一部分は伝導性金属部分（たとえば金）を含有し得る。一実施形態では、熱伝達を可能にするために、ウェルの内部表面を金属でコーティングし得る。

30

【0338】

一部の実施形態では、適切な試薬で装置の1つまたは複数の領域のウェルを充填した後、クロストークを防止するために、隔離油または熱伝導性液体を装置に適用し得る。

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域のウェルは、錐体と同様に、大きな直径からより小さな直径へと先細となるような形状にし得る。勾配壁を有する錐体形状のウェルは、試薬の非接触堆積方法（たとえばインクジェット）の使用を可能にする。錐体形状はまた、乾燥も助け、ガス透過膜が存在する場合に気泡および漏れを防止することが見出されている。

40

【0339】

一部の実施形態では、試料流体を（たとえば圧力を介して）装置の流路に沿って進めることによって、装置の1つまたは複数の領域のウェルを充填し得る。流体が装置の1つまたは複数の領域のウェルを通過する際、それぞれのウェルが流体で充填され、これは表面張力を介してウェル内に主に保持される。以前に記載したように、試料流体が通過する際のウェルの完全かつ均一な充填を促すために、装置のウェル基質の一部分を所望に応じて親水性／疎水性物質でコーティングし得る。

【0340】

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域のウェルを、充填後に油で「キャッピング」し得る。これは、ウェル基質を熱サイクリングに供する際に蒸発を減らすことを

50

助けることができる。一実施形態では、油キャッピングの後、熱伝導率を改善させるために水溶液を装置の1つまたは複数の領域に充填することができる。

【0341】

一部の実施形態では、流体およびすべての気泡の運動を停止させるために、静止水溶液を装置の1つまたは複数の領域内で加圧し得る。

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域のウェルの隔離のため、および熱伝導率を提供するために、鉱物油などの油を使用し得る。しかし、フッ化液体（たとえば3M F C - 40）などの任意の熱伝導性液体を使用することができる。本開示における油への言及には、当分野の当業者が適用可能であると理解するであろう代替物が含まれると理解されるべきである。

10

【0342】

一部の実施形態では、装置は1つまたは複数のセンサーアセンブリをさらに含み得る。

一部の実施形態では、1つまたは複数のセンサーアセンブリは、光ファイバー面板（FOPF）と連結させた電荷結合素子（CCD）／相補型金属酸化膜半導体（CMOS）検出器を含み得る。フィルターをFOPFの上部に重ね、ウェル基質に対してまたはそれに隣接して配置し得る。一実施形態では、フィルターをCCDの上部に直接重ね（結合させ）、その上にFOPFを配置することができる。

【0343】

一部の実施形態では、装置の1つまたは複数の領域が、100%までの湿度、または熱サイクリング中の過剰蒸発を防止するために少なくとも十分な湿度を有するように、蒸留水などの水和流体を、第1の領域または補助領域のうちの1つ内で加熱し得る。

20

【0344】

一部の実施形態では、装置の充填が完了した後、装置と熱接触している外部装置によってウェル基質を加熱して、PCRのための熱サイクリングを行い得る。

一部の実施形態では、RFID、キュリー点、誘導加熱、またはマイクロ波加熱などの非接触加熱方法を用い得る。これらおよび他の非接触加熱方法は当業者がよく知っているであろう。熱サイクリング中、装置は、以前に記載したセンサー配置を介して化学反応についてモニタリングし得る。

【0345】

一部の実施形態では、装置の領域のうちの1つまたは複数のウェルのうちの1つまたは複数中に堆積させる試薬は、事前に決定された配置で堆積される。

30

一部の実施形態では、

試料流体を装置の流路に提供するステップであって、装置が第1の領域、第2の領域、および第3の領域の間の少なくとも1つの流路を含み、第1、第2、および第3の領域が独立して1つまたは複数のウェルを含むステップと、

第2の領域の1つまたは複数のウェルが増幅した流体でコーティングされるように、第2の領域を、第1の領域からの増幅した流体で充填するステップと、

1つまたは複数のウェルが増幅した流体の少なくとも一部で湿ったままであるように、増幅した流体を第2の領域から排出するステップと、

第3の領域の1つまたは複数のウェルがこの流体でコーティングされるように、第3の領域を、第2の領域から排出された流体で充填するステップと、

40

1つまたは複数のウェルがこの流体の少なくとも一部で湿ったままであるように、流体を第3のチャンバーから排出するステップとを含む方法が提供される。

【0346】

本方法の一部の実施形態では、流路は無弁であり得る。

本方法の一部の実施形態では、排出された第2の領域を疎水性物質で充填し得る。

本方法の一部の実施形態では、排出された第3の領域を疎水性物質で充填し得る。

【0347】

本方法の一部の実施形態では、疎水性物質は、第2および第3の領域と流体連結してい

50

る油チャンバーから供給し得る。

本方法の一部の実施形態では、試料流体は、曲がりくねった様式の流路に沿って送り得る。

【0348】

一部の実施形態では、方法は、加熱および冷却サイクルを第1、第2、または第3の領域のうちの1つまたは複数に適用することをさらに含み得る。

本発明によれば、

a. 1つまたは複数の核酸分析物を含む試料を、

i. プローブ分子 (A_0) を含む分子学的システムと、ハイブリダイズしたスプリント分子 (C) であって、

A_0 が、標的ポリヌクレオチド配列と相補的な3'末端、ループ領域、および5'リン酸とを有し、

C が、 A_0 の5'末端とハイブリダイズし、一本鎖3'オーバーハングを提供し、

一本鎖3'オーバーハングが、 A_0 の3'末端から5'方向に1~50塩基に位置する領域とハイブリダイズすることができる、スプリント分子と、

ii. 標的核酸配列に隣接する領域と相補的な領域と、捕捉部分とを含む、捕捉オリゴヌクレオチド B_0 と、

iii. 固体支持体と

を含む富化反応混合物に導入するステップと、

b. 分子学的システムおよび B_0 を、核酸分析物とハイブリダイズさせるステップと、

c. 富化反応混合物を、加ピロリン酸分解酵素を含む第1の反応混合物に導入するステップであって、 A_0 が、3'末端から3'-5'方向で加ピロリン酸分解されて、少なくとも部分的に消化された鎖 A_1 を作り出し、 C が A_1 の3'末端を標的から追放するステップと、;

d. 部分的に消化された鎖 A_1 を、リガーゼを含む反応混合物に導入するステップであって、 A_1 がライゲーションを受けて A_2 を形成するステップと、

e. 以前のステップの生成物に由来するシグナルを検出するステップであって、生成物が、 A_2 もしくはその一部分、または複数コピーの A_2 、または複数コピーのその一部分であり、それらから分析物中のポリヌクレオチド標的配列の存在または非存在を推測するステップと

を含む、ポリヌクレオチド標的配列を検出するための方法が提供される。

【0349】

一部の実施形態では、リガーゼが加ピロリン酸分解酵素と同じ反応混合物中に存在するように、(d)の反応混合物を第1の反応混合物と合せる。

当業者には、他の実施形態のコンテキストにおける第1および第2の反応混合物の以前のまたは続く説明を上記実施形態に同等に適用してよく、本出願は、その範囲内にすべてのそのような変形を含むことが理解されよう。

【0350】

本方法の最終ステップは、以前にまたは続いて記載するように達成し得る。

一部の実施形態では、1つまたは複数の核酸分析物を複数の反応体積へと分割し、それぞれの体積は、様々な標的配列を検出するために導入された、プローブオリゴヌクレオチド A_0 と1つまたは複数の捕捉オリゴヌクレオチド B_0 とを含む、1つまたは複数の分子学的システムを有する。

【0351】

一部の実施形態では、ステップ (b) の前に B_0 を固体支持体に付着させる。

一部の実施形態では、ステップ (b) および (c) の間に B_0 を固体支持体に付着させる。

【0352】

一部の実施形態では、 B_0 の固体支持体への付着、ならびに A_0 および B_0 の標的とのハイブリダイゼーションに続いて、上清、したがって標的核酸分析物とハイブリダイズし

10

20

30

40

50

ていないすべての A_0 を反応混合物から除去する。

【0353】

この除去は、(c)の前に起こることができる。

この除去は、(d)の前に起こることができる。

一部の実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の10000、5000、2500、1000、500、250、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、または5ヌクレオチド以内である領域と相補的である。

【0354】

一部の実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の100ヌクレオチド以内である領域と相補的である。

一部の実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の50ヌクレオチド以内である領域と相補的である。

【0355】

一部の実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチドは、標的核酸配列の10ヌクレオチド以内である領域と相補的である。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチド A_0 および B_0 を一緒に結合して、単一のオリゴヌクレオチドを形成する。

【0356】

一部の実施形態では、固体支持体は、ポリマーおよび／または樹脂でコーティングした固体表面である。

一部の実施形態では、固体支持体はポリスチレン固体支持体である。

【0357】

一部の実施形態では、ポリスチレン (C_8H_8)_n とは、nが、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、5,500、6,000、6,500、7,000、7,500、8,000、8,500、9,000、9,500、10,000、11,000、12,000、12,500、15,000、16,000、17,000、17,500、18,000、19,000、20,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、もしくはそれより多くであるポリマーであり、または、nがこれらの点のうちの任意のものの間の任意の整数であるもの、もしくは、nがこれらの点のうちの任意の2つの間から誘導できる任意の範囲内であるポリマーものを利用する。

【0358】

一部の実施形態では、ポリスチレン固体支持体は、ポリスチレンポリマーを含む粒子、マイクロビーズ、磁気ビーズ、樹脂、または任意の粒子である。

一部の実施形態では、ポリスチレン支持体は、以下の官能基、すなわち、アミン、カルボン酸、スルホン酸、トリメチルアミン、および／またはエポキシドのうちの1つまたは複数を含むように修飾されている。

【0359】

一部の実施形態では、固体支持体は磁気ビーズである。

一部の実施形態では、磁気ビーズは、前記ビーズの表面積を最大限にする形状である。

一部の実施形態では、磁気ビーズは規則的な形状である。

【0360】

一部の実施形態では、磁気ビーズは不規則な形状である。

一部の実施形態では、磁気ビーズは、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、2.5、1、0.5、0.25、または0.1ミクロン以下の直径を有

10

20

30

40

50

する。

【0361】

一部の実施形態では、固体支持体は磁気ポリスチレンビーズである。

一部の実施形態では、磁気ポリスチレンビーズは酸化鉄を含む。

一部の実施形態では、磁気ポリスチレンビーズはストレプトアビジンとカップリングしている。

【0362】

一部の実施形態では、固体支持体は、ストレプトアビジンとカップリングした D y n a b e a d (R T M) である。

一部の実施形態では、固体支持体は、デキストランで修飾された表面である。

10

【0363】

一部の実施形態では、デキストランで修飾された表面は、デキストランポリマーを含む粒子、マイクロビーズ、磁気ビーズ、樹脂、または任意の粒子である。

一部の実施形態では、デキストランポリマーは、1000～410000の概算分子量を有する。

【0364】

一部の実施形態では、デキストランポリマーは、25000～約100000の概算分子量を有する。

一部の実施形態では、修飾されたデキストラン表面は、1つまたは複数の官能基を含むようにさらに修飾されている。

20

【0365】

一部の実施形態では、デキストランで修飾された表面は、以下の官能基、すなわち、アミン、カルボン酸、スルホン酸、トリメチルアミン、および／またはエポキシドのうちの1つまたは複数を含むように修飾されている。

【0366】

一部の実施形態では、固体支持体は磁気ビーズである。

一部の実施形態では、磁気ビーズは、前記ビーズの表面積を最大限にする形状である。

一部の実施形態では、磁気ビーズは規則的な形状である。

【0367】

一部の実施形態では、磁気ビーズは不規則な形状である。

30

一部の実施形態では、磁気ビーズは、1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5、2.5、1、0.5、0.25、または0.1ミクロン以下の直径を有する。

【0368】

一部の実施形態では、磁気ビーズは、N a n o m a g (登録商標)デキストラン (N D)、N a n o m a g (登録商標)デキストラン-S O 3 H (N D - S O 3 H)、B i o M a g (登録商標)デキストランコーティングチャコール、またはB i o M a g (登録商標)プラスデキストランから選択されるデキストラン磁気ビーズである。

【0369】

一部の実施形態では、固体支持体は、ポリエチレングリコール (P E G) またはP E Gで修飾された表面である。

一部の実施形態では、ポリエチレングリコール (P E G) またはP E Gで修飾された表面は、P E Gを含む粒子、マイクロビーズ、磁気ビーズ、樹脂、または任意の粒子である。

40

【0370】

本発明の一部の実施形態では、P E G、(C H 2 O) n とは、n が、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000

50

、3、500、4、000、4、500、5、000、5、500、6、000、6、500、7、000、7、500、8、000、8、500、9、000、9、500、10、000、11、000、12、000、12、500、15、000、16、000、17、000、17、500、18、000、19、000、20、000、25、000、30、000、40、000、50、000、60、000、70、000、80、000、90、000、100、000、もしくはそれより多くであるポリマーであり、または、nがこれらの点のうちの任意のものの間の任意の整数であるもの、もしくは、nがこれらの点のうちの任意の2つの間から誘導できる任意の範囲内であるポリマーものを利用する。

【0371】

一部の実施形態では、利用するPEGは、PEG-200、PEG-300、PEG-400、PEG-600、PEG-1000、PEG-1300-1600、PEG-1450、PEG-3000-3700、PEG-3500、PEG-6000、PEG-8000、またはPEG-17500である。

【0372】

ポリエチレングリコール（PEG）またはPEGで修飾された表面が磁気微粒子またはビーズである一部の実施形態では、微粒子またはビーズは、Nanomag（登録商標）PEG-300（プレーン）またはNanomag（登録商標）-Dから選択される。

【0373】

一部の実施形態では、固体支持体は、ポリビニルピロリドン（PVP）またはPVPで修飾された表面である。

一部の実施形態では、PVPまたはPVPで修飾された表面は、PVPを含む粒子、マイクロ粒子、磁気ビーズ、樹脂、または任意の粒子である。

【0374】

本発明の一部の実施形態では、PVP、n-ビニルピロリドンとは、nが、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000、4,500、5,000、5,500、6,000、6,500、7,000、7,500、8,000、8,500、9,000、9,500、10,000、11,000、12,000、12,500、15,000、16,000、17,000、17,500、18,000、19,000、20,000、25,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、もしくはそれより多くであるポリマーであり、または、nがこれらの点のうちの任意のものの間の任意の整数であるもの、もしくは、nがこれらの点のうちの任意の2つの間から誘導できる任意の範囲内であるポリマーものを利用する。

【0375】

一部の実施形態では、固体支持体は、多糖または多糖で修飾された表面である。

一部の実施形態では、多糖または多糖で修飾された表面は、多糖を含む粒子、マイクロ粒子、磁気ビーズ、樹脂、または任意の粒子である。

【0376】

一部の実施形態では、多糖は、デキストラン、フィコール、グリコーゲン、アラビアガム、キサンタンガム、カラゲナン、アミロース、寒天、アミロペクチン、キシラン、および／またはペクターグルカンのうちの1つまたは複数から選択される。

【0377】

一部の実施形態では、固体支持体は、化学的樹脂または化学的樹脂で修飾された表面である。

一部の実施形態では、化学的樹脂または化学的樹脂で修飾された表面は、以下の樹脂、すなわち、イソシアネート、グリセロール、ピペリジノーメチル、ポリDMA P（ポリマ

10

20

30

40

50

ー結合したジメチル 4-アミノピリジン)、DIPAM (ジイソプロピルアミノメチル、アミノメチル、ポリスチレンアルデヒド、トリス (2-アミノメチル) アミン、モルホリノ-メチル、BOBA (3-ベンジルオキシベンズアルデヒド)、トリフェニルホスフィン、またはベンジルチオメチルのうちの1つまたは複数から選択される。

【0378】

一部の実施形態では、B₀の捕捉部分を介してB₀を固体支持体に共有的に付着させる。

一部の実施形態では、ジスルフィド、アリル、またはアジドをマスキングしたヘミアミナルエーテルリンカーなどの化学的に切断可能なリンカーを介して、B₀の捕捉部分を固体支持体に共有的に付着させる。

【0379】

一部の実施形態では、アミドまたはホスホロチオエート結合を介して、B₀の捕捉部分を固体支持体に共有的に付着させる。

当業者には、オリゴヌクレオチドを固体支持体に共有的および非共有的に固定するための大量の技法が存在することが理解されよう。たとえば、Integrated DNA Technologies (IDT (登録商標)) によって作られた「オリゴヌクレオチドを固体支持体に付着させるための戦略 (Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports.)」(2014)を参照されたい。

【0380】

一部の実施形態では、B₀の捕捉部分を介してB₀を固体支持体に非共有的に付着させる。

当業者には、オリゴヌクレオチドを固体支持体に共有的および非共有的に固定するための大量の技法が存在することが理解されよう。たとえば、Integrated DNA Technologies (IDT (登録商標)) によって作られた「オリゴヌクレオチドを固体支持体に付着させるための戦略 (Strategies for Attaching Oligonucleotides to Solid Supports.)」(2014)を参照されたい。

【0381】

一部の実施形態では、B₀の捕捉部分はオリゴヌクレオチド配列を含み、固体支持体は、相補的配列を保有するオリゴヌクレオチドを含む。

一部の実施形態では、相補的配列の長さは、10、20、30、40、50、100、150、および200塩基の間である。

【0382】

一部の実施形態では、相補的配列の長さは、10、20、30、40、50、および100塩基の間である。

一部の実施形態では、相補的配列の長さは、10~20、10~30、10~40、および10~50塩基の間である。

【0383】

一部の実施形態では、相補的配列の長さは、10~20、10~30、および10~40塩基の間である。

一部の実施形態では、相補的配列の長さは、10~20および10~30塩基の間である。

【0384】

一部の実施形態では、相補的配列の長さは10~20塩基である。

一部の実施形態では、捕捉部分はB₀への化学修飾を含み、化学修飾と固体支持体との間の相互作用を介してB₀を固体支持体に付着させる。

【0385】

一部の実施形態では、化学修飾はビオチンであり、固体支持体はストレプトアビジンをさらに含む。

10

20

30

40

50

本方法の一部の実施形態では、第1の反応混合物は、複数の異なるオリゴヌクレオチド A₀ および B₀ を含み、ハイブリダイゼーションが成功した A₀ オリゴヌクレオチドは、同時に富化されている。

【0386】

一部の実施形態では、ステップ(c)の前に、A₀、標的核酸、および任意選択で B₀ が固体支持体から放出される。

一部の実施形態では、ステップ(c)の後に、A₁、任意選択で B₀、および任意選択で標的核酸が固体支持体から放出される。

【0387】

一部の実施形態では、ステップ(c)中に、A₁、任意選択で B₀、および任意選択で標的核酸が固体支持体から放出される。

A₀の放出への言及は、A₀が固体表面結合されている間に A₁ または A₂ へと変換され、その後放出される実施形態を包含することが理解されよう。

【0388】

一部の実施形態では、ジスルフィドリンカーではトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)もしくはジチオスレイトール(DTT)、またはパラジウム複合体もしくはアシルリンカー、またはアジドをマスキングしたヘミアミナルエーテルリンカーではTCEPの添加を通じた化学的リンカーの切断によって、A₀、B₀、および標的核酸が固体支持体から放出される。

【0389】

一部の実施形態では、非カノニカル塩基を A₀ または B₀ から除去し、生じる脱塩基部位で切断することによって、A₀、B₀、および標的核酸が固体支持体から放出される。

一部の実施形態では、非カノニカル塩基はウラシルであり、これはウラシルDNAグリコシラーゼによって除去される。一代替実施形態では、非カノニカル塩基は8-オキシグアニンであり、これはホルムアミドピリミジンDNAグリコシラーゼ(Fpg)によって除去される。

【0390】

一部の実施形態では、捕捉部分はオリゴヌクレオチド領域であり、反応混合物の加熱を通じて放出を行う。

一部の実施形態では、反応混合物を 37℃～100℃まで1～20分間かけて加熱する。

【0391】

一部の実施形態では、反応混合物を1～15分間かけて加熱する。

一部の実施形態では、反応混合物を1～10分間かけて加熱する。

一部の実施形態では、反応混合物を1～5分間かけて加熱する。

【0392】

一部の実施形態では、反応混合物を5分間かけて加熱する。

一部の実施形態では、反応混合物を37℃～85℃まで加熱する。

一部の実施形態では、反応混合物を37℃～75℃まで加熱する。

【0393】

一部の実施形態では、反応混合物を37℃～65℃まで加熱する。

一部の実施形態では、反応混合物を37℃～55℃まで加熱する。

一部の実施形態では、反応混合物を37℃～45℃まで加熱する。

【0394】

当業者には、相補的オリゴヌクレオチド領域の放出を成立させるために反応混合物を加熱する温度は、前記領域の長さに依存することが理解されよう。

一部の実施形態では、放出は、オリゴヌクレオチド B₀ の切断を通じて達成される。この切断は、以前に記載したもしくは続いて記載する手段のうちの任意のものによって、または当業者に知られている手段のうちの任意のものによって、達成することができる。

【0395】

- 一部の実施形態では、 B_0 は化学的に切断される。
- 一部の実施形態では、 B_0 は酵素的に切断される。
- 一部の実施形態では、 B_0 は制限酵素によって切断される。

【0396】

一部の実施形態では、 B_0 は、後成的修飾感受性または依存性制限酵素によって切断される。

一部の実施形態では、 B_0 は、メチル化感受性または依存性制限酵素によって切断される。

【0397】

一部の実施形態では、 B_0 は、ヒドロキシメチル化感受性または依存性制限酵素によって切断される。

一部の実施形態では、制限酵素はエンドヌクレアーゼである。

【0398】

一部の実施形態では、 B_0 は、フラップエンドヌクレアーゼによって切断される。

一部の実施形態では、 B_0 は光切断可能なリンカーを含み、このリンカーの切断によって、 A_0 、 B_0 、および標的核酸が固体支持体から放出される。

【0399】

一部の実施形態では、 B_0 はUV切断可能なリンカーを含み、このリンカーの切断によって、 A_0 、 B_0 、および標的核酸が固体支持体から放出される。

一部の実施形態では、放出は、メチル化感受性またはメチル化依存性制限の酵素を用いた A_0 の切断を通じて達成される。一部の実施形態では、放出は、 A_0 および核酸分析物の切断を通じて達成される。

【0400】

A_0 および B_0 が同じオリゴヌクレオチド C_0 の領域である一部の実施形態では、 C_0 はメチル化感受性またはメチル化依存性制限の酵素で切断され、 A_0 を含む部分および核酸分析物が固体支持体から放出される。

【0401】

一部の実施形態では、放出は加ピロリン酸分解の前に起こる。

一部の実施形態では、放出は加ピロリン酸分解と同時に起こる。一部の実施形態では、 A_0 とハイブリダイズした標的核酸配列は、固体支持体からの放出の前に、その3'末端での修飾またはミスマッチの存在によって、加ピロリン酸分解を受けることが阻止される。一部の実施形態では、切断は、これらの修飾またはミスマッチから5'方向で起こり、したがって遊離3'末端が作り出され、これにより加ピロリン酸分解反応の進行が可能となる。

【0402】

一部の実施形態では、切断および放出は、標的核酸配列中のメチル化の存在下でのみ起こる。

一部の実施形態では、切断および放出は、標的核酸配列中のメチル化の非存在下でのみ起こる。

【0403】

一部の実施形態では、切断および放出は、標的核酸配列中のヒドロキシメチル化の存在下でのみ起こる。

一部の実施形態では、切断および放出は、標的核酸配列中のヒドロキシメチル化の非存在下でのみ起こる。

【0404】

一部の実施形態では、切断および放出は、標的核酸配列中の後成的修飾の存在下でのみ起こる。

一部の実施形態では、切断および放出は、標的核酸配列中の後成的修飾の非存在下でのみ起こる。

【0405】

10

20

30

40

50

本発明の一部の実施形態では、

(a) 標的ポリヌクレオチド配列と第1の中間生成物を形成することができるプローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システムであって、前記中間生成物が少なくとも部分的に二本鎖であるシステムと、

(b) 標的核酸配列に隣接する領域と相補的な領域と、捕捉部分とを含む、捕捉オリゴヌクレオチドB₀と、

(c) 固体支持体と、

(d) リガーゼと、

(e) 第1の中間生成物をA₀の末端から3' - 5' 方向で消化して、部分的に消化された鎖A₁を作り出すことができる、加ピロリン酸分解 (pyrophosphorolysing) 酵素と、

(f) 適切な緩衝液とを含むキットが提供される。

【0406】

当業者には、キットは、本発明の方法のうちの1つまたは複数の実施形態中に以前に記載されている任意の試薬、成分、または構築体のうちの1つまたは複数をさらに含む得ることが理解されよう。

【0407】

本発明の一部の実施形態では、第1、第2、第3、第4、第5、および第6の領域の少なくとも1つの流路を含む装置であって、それぞれの領域が1つまたは複数のウェルを含む装置が提供される。

【0408】

一部の実施形態では、試料を第1の領域に導入する。

一部の実施形態では、第1、第2、第3、第4、第5、または第6の領域のうちの1つまたは複数と流路によって接続された、さらなる領域が存在する。一部の実施形態では、このさらなる領域は1つまたは複数のウェルを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のウェルは結合緩衝液を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のウェルは洗浄緩衝液を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のウェルは結合および洗浄緩衝液を含む。

【0409】

一部の実施形態では、第1の領域の1つまたは複数のウェルは、

— 標的核酸配列と相補的な領域を含むプローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システムと、

— 標的核酸配列に隣接する領域と相補的な領域と、捕捉部分とを含む、捕捉オリゴヌクレオチドB₀と、

— 固体支持体とを含む。

【0410】

一部の実施形態では、A₀は以前に記載した通りであり得る。

一部の実施形態では、B₀は以前に記載した通りであり得る。

一部の実施形態では、捕捉部分は以前に記載したとおりである。一部の実施形態では、第1の領域の1つまたは複数のウェルは、固体支持体からのB₀の放出に必要な試薬を含む。一部の実施形態では、装置は、剥離剤が1つまたは複数の別個のチャンバーからの1つまたは複数の領域に導入されるように配置されている。

【0411】

一部の実施形態では、固体支持体は以前に記載したとおりである。

一部の実施形態では、固体支持体は、1つまたは複数のウェルの表面である。

一部の実施形態では、装置は、1つまたは複数の磁石をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の磁石は、1つまたは複数の磁気ビーズを装置の1つの領域から別の領域へと移動させることができるように配置されている。

【0412】

当業者には、装置の1つまたは複数のウェルの1つまたは複数の領域は、以前にまたは続いて記載した通りであり得ることが理解されよう。本発明の様々なさらなる態様および実施形態は、本開示に鑑みて当業者に明らかとなるであろう。

【0413】

本明細書中で使用する場合、「および／または」とは、2つの指定した特長または成分のそれぞれの、他方を伴うまたは伴わない具体的な開示として解釈されるべきである。たとえば、「Aおよび／またはB」は、それぞれが本明細書中に個々に記載されている場合と同程度に、(i) A、(ii) B、ならびに (iii) AおよびBのそれぞれの具体的な開示であるとして解釈されるべきである。

10

【0414】

内容によりそうでないと指示されない限りは、上に記載した特長の説明および定義は、本発明のいかなる特定の態様または実施形態に限定されず、記載されているすべての態様および実施形態に同等に適用される。

【0415】

当業者には、本発明は、いくつかの実施形態を参照して例として記載されているが、本発明は開示した実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲中に定義されている本発明の範囲から逸脱せずに、代替実施形態を構築することができる。ことがさらに理解されよう。

【0416】

本明細書中で使用する「磁気微粒子」とは、磁場によって引き寄せられる磁気応答性の微粒子である。本発明の方法において使用する磁気微粒子は、DNA、RNA、またはPNAと結合することができる表面を作り出すポリマーコーティングによって全体的に囲まれる、磁性金属酸化物コアを含む。磁性金属酸化物コアは好ましくは酸化鉄であり、鉄は Fe^{2+} および Fe^{3+} の混合物である。好ましい Fe^{2+}/Fe^{3+} 比は好ましくは2/1であるが、約0.5/1から約4/1まで変動することができる。

20

【0417】

当業者には、用語「推測する」を使用する場合、たとえば、「特定の配列の存在または非存在を推測する」の場合、これは、A₂もしくはA₂のコピー、またはA₂の一領域もしくは領域A₂のコピーの存在または非存在に基づいて、特定の特長の存在または非存在を決定することをいうが理解されよう。

30

【0418】

当業者には、「プライマー」が記載されている実施形態は、その範囲内に、本文書中の以前にまたは続いて記載されているプライマーを含むことが理解されよう。

当業者には、「プライマー」が装置の特定の領域／ウェル内に位置する、または特定の反応混合物中に存在するとして記載されている実施形態は、その範囲内に、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドも同じ領域／ウェルまたは反応混合物内に存在する実施形態を含むことが理解されよう。

【0419】

当業者には、「プローブオリゴヌクレオチドA₀を含む分子学的システム」が装置の特定の領域／ウェル内に位置する、または特定の反応混合物中に存在するとして記載されている実施形態は、その範囲内に、以前にまたは続いて記載した1つまたは複数の遮断オリゴヌクレオチドも内部に存在する実施形態を含むことが理解されよう。

40

【実施例】

【0420】

実施例1：加ピロリン酸分解反応の最適温度に対する、プローブと標的との間のアニーリング領域の長さの効果

1. ポリメラーゼ連鎖反応

以下に対応する混合物を調製した：

1 × Q5U 緩衝液

50

400 nMのプライマーミックス1
20 U/mLのQ5 Uポリメラーゼ
10 U/mLの熱不安定性UDG
0.4 ng/uLの断片化されたヒトゲノムDNA
+/- 0.2 aMの突然変異オリゴヌクレオチド
合計体積 50 uL

その後、標準のサーマルサイクラーを使用して、この混合物を以下のようにインキュベートした：

37 °C 10 分間
98 °C 1 分間
98 °C 10 秒間
58 °C 15 秒間
72 °C 15 秒間 × 50
72 °C 5 分間
4 °C ∞

Q5 緩衝液

Q5 緩衝液は市販供給業者NEBから入手可能である。

プライマーミックス1：

順方向（配列番号36）：

5' - C* C* C* A A C C A A G C T C T C T T G A G G A T C T - 3' ,

逆方向（配列番号37）：

5' - / 5 P h o s / G G G A C C T T A C C T T A T A C A C C G T G C - 3' ,

〔式中、*はホスホロチオエート結合を表す〕

突然変異オリゴヌクレオチド（配列番号38）：

5' - C C C A A C C A A G C T C T C T T G A G G A T C T T G A A G G A A A C T G
A A T T C A A A A G A T C A A A G T G C T G G C C T C C G G T G C G T T C G G
C A C G G T G T A T A A G G T A A G G T C C C - 3' ,

太字かつ下線 - 突然変異部位

2. プロテイナーゼK処理

以下に対応する混合物を調製した：

1 × A7
20 U/mLのプロテイナーゼK
40 uLの混合物、第1ポイント
合計体積 90 uL

その後、この混合物を55 °Cで5分間、95 °Cで10分間インキュベートした。

1 × A7 組成物

トリスアセテート、pH = 8.0 10 mM

酢酸カリウム 25 mM

酢酸マグネシウム 5 mM

T r i t o n - X 0.01 %

3. 加ピロリン酸分解（PPL）およびライゲーション

以下に対応する混合物を調製した：

1 × B F F 1
10 U/mLのクレノウ（e x o -）
100 U/mLの大腸菌リガーゼ
1.2 U/mLのアピラーゼ
100 U/mLのラムダ e x o
0.25 mMのP P i

分子学的システム（20 nMのプローブオリゴヌクレオチド / 30 nMのスプリントオリゴヌクレオチド）

10

20

30

40

50

1. 25 uL の第 2 ポイントからの混合物。

合計体積 10 uL

その後、この混合物を 30 ~ 50 °C で 15 分間インキュベートした。

1 × B F F 1 組成物

トリスアセテート、pH = 7.0 10 mM

酢酸カリウム 30 mM

酢酸マグネシウム 17.125 mM

T r i t o n - X 0.01 %

プローブ（配列番号 1）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C C G A A C G C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3' ,

10

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号 2）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T G C G T T C G G C A T -
3' ,

プローブ（配列番号 3）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G G A A C G C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3' ,

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号 4）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T G C G T T C G G C A T -
3' ,

20

プローブ（配列番号 5）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A A A C G C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3' ,

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号 6）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T G C G T T C G G C A A -
3' ,

プローブ（配列番号 7）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A T A C G C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3' ,

30

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号 8）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T G C G T A T C G C A T -
3' ,

プローブ（配列番号 9）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A T T C G C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3' ,

40

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号 10）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T G C G A A T C G C A T -
3' ,

プローブ（配列番号 11）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A T T G G C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3' ,

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号 12）：T G T C A A A G C T C A T C G A A
C A T C C G G T G C C A A T C G C A T

プローブ（配列番号 13）：

50

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A T T G C C A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G - 3 '

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号14）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T G G C A A T C G C A T -
3 '

プローブ（配列番号15）：

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A C A T G C G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A T T G C G A C C G G A G G C
C A G C A C T T T G

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号16）：

5' - T G T C A A A G C T C A T C G A A C A T C C G G T C G C A A T C G C A T -
3 '

〔式中、*はホスホロチオエート結合を表し、/ 5 P h o s / は5'末端リン酸を表す〕

4. 検出 - R C A

以下に対応する混合物を調製した：

2. 66 × T h e r m o p o l 緩衝液（53.2 mMのトリス-H C l、26.6 mMの
(N H₄)₂ S O₄、26.6 mMのK C l、5.32 mMのM g S O₄、0.266 %
のT r i t o n（登録商標）X-100、p H 8.8）

0.28 u Mのプライマーミックス1

284.4 U / m LのB S T 2.0 W a r m S t a r t

14.67 U / m LのT I P P

1.06 mMのd N T P

S y t o 8 2 色素 3 u M

1.25 u Lの第3ポイントからの反応混合物。

合計体積 11.25 u L

プライマーミックス1：

順方向（配列番号17）：

5' - T * C * G C A A C A T C C T A T A T C T G C - 3 '

逆方向（配列番号18）：

5' - T * G * A G C T T T G A C A A T A C T T G A - 3 '

〔式中、*はホスホロチオエート結合を表す〕

その後、標準のリアルタイムPCR機器を使用して、混合物を50℃で90分間インキュベートした。蛍光測定を1分毎にとり、標準の機器製造者のソフトウェアを使用してCq値を得た。野生型と突然変異体含有試料との間のCqの相違は、図1中に見ることができる。

【0421】

アニーリング領域の長さを表1中に要約する。プローブと標的分子との間のアニーリング領域の長さが長ければ長いほど、最適温度が高くなる。29塩基対（配列番号1 / 2）の相補性では、最適は46～50℃であり、22塩基対では30～42℃である。

【0422】

アニーリング領域が短すぎると、d C qの減少をもたらす場合がある（配列番号11 / 12および13 / 14）。19塩基対の長さでは、標的分子の存在を示す陽性シグナルを検出することはできなかった（配列番号15 / 16）。

【0423】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. プローブと標的分子の間の相補的領域の長さ。

配列番号	プローブと標的分子の間の相補[bp]
1/2	29
3/4	25
5/6	24
7/8	23
9/10	22
11/12	21
13/14	20
15/16	19

10

【 0 4 2 4 】

実施例 2：プローブ、その標的、およびそのスプリントの間のアニーリング領域の長さの
効果

1．ポリメラーゼ連鎖反応

以下に対応する混合物を調製した：

- 1 × Q 5 U 緩衝液
- 4 0 0 n M のプライマーミックス 1
- 2 0 U / m L の Q 5 U ポリメラーゼ
- 1 0 U / m L の熱不安定性 U D G
- 0 . 4 n g / u L の断片化されたヒトゲノム D N A
- + / - 0 . 2 a M の突然変異オリゴヌクレオチド
- 合計体積 5 0 u L

20

その後、標準のサーマルサイクラーを使用して、この混合物を以下のようにインキュベ
ートした：

- 3 7 ° C 1 0 分間
- (9 8 ° C 1 分間
- 9 8 ° C 1 0 秒間
- 5 8 ° C 1 5 秒間
- 7 2 ° C 1 5 秒間) × 5 0
- 7 2 ° C 5 分間
- 4 ° C ∞
- Q 5 緩衝液

30

Q 5 緩衝液は市販供給業者 N E B から入手可能である。

プライマーミックス 1：

順方向（配列番号 1 9）：

5 ’ - A * C * G * T A C T G G T G A A A A C A C C G C - 3 ’

逆方向（配列番号 2 0）：

5 ’ - / 5 P h o s / G C C T C C T T C T G C A T G G T A T T C T - 3 ’

40

[式中、* はホスホロチオエート結合を表す]

突然変異オリゴヌクレオチド（配列番号 2 1）：

5 ’ - A C G T A C T G G T G A A A A C A C C G C A G C A T G T C A A G A T C A C
A G A T T T T G G G C T G G C C A A A C A G C T G G G T G C G G A A G A G A A A
G A A T A C C A T G C A G A A G G A G G C - 3 ’

太字かつ下線 - 突然変異部位

2．プロテイナーゼ K 処理

以下に対応する混合物を調製した：

- 1 × A 7
- 2 0 U / m L のプロテイナーゼ K

50

40 u L の混合物、第 1 ポイント

合計体積 90 u L

その後、この混合物を 55 °C で 5 分間、95 °C で 10 分間インキュベートした。

1 × A7 組成物

トリスアセテート、pH = 8.0 10 mM

酢酸カリウム 25 mM

酢酸マグネシウム 5 mM

T r i t o n - X 0.01 %

3. 加ピロリン酸分解 (P P L) およびライゲーション

以下に対応する混合物を調製した：

1 × B F F 1

10 U / m L のクレノウ (e x o -)

100 U / m L の大腸菌リガーゼ

1.2 U / m L のアピラーゼ

100 U / m L のラムダ e x o

0.25 mM の P P i

20 n M のプローブオリゴヌクレオチド

30 n M のスプリントオリゴヌクレオチド (o l i g o u c l e o t i d e)

1.25 u L の第 2 ポイントからの混合物。

合計体積 10 u L

その後、この混合物を 45 °C で 15 分間インキュベートした。

1 × B F F 1 組成物

トリスアセテート、pH = 7.0 10 mM

酢酸カリウム 30 mM

酢酸マグネシウム 17.125 mM

T r i t o n - X 0.01 %

プローブオリゴヌクレオチド (配列番号 22) :

5' - / 5 P h o s / A * T G T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G A T
C G A T G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A C G C A C C C A G C T G T T T G
G - 3'

プローブオリゴヌクレオチド (配列番号 23) :

5' - / 5 P h o s / A * T * G * T T C G A T G A G C T T T G A C A A T A C T T G
A T C G A T G C A G A T A T A G G A T G T T G C G A C G C A C C C A G C T G T T
T G G C C A G C C C A A A A T C T G T G A T - 3'

[式中、* はホスホロチオエート結合を表し、/ 5 P h o s / は 5' 末端のリン酸を表す]

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 24) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T T G G G T G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 25) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T G T C G C A A C A G A A G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 26) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T C G T C G C A A C G A A G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 27) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T G C G T C G C A A G A A G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 28) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T T G C G T C G C A G A A G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 29) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T G T G C G T C G C G A A G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 30) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T G G T G C G T C G G A A G T C G C A A C A T G - 3'

スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 31) : 5' - T G T C A A A G C T C A T C

10

20

30

40

50

G A A C A T G G G T G C G T C G A A G T C G C A A C A T G - 3 ' ,
スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 32) : 5 ' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T T G G G T G C G T G A A G T C G C A A C A T G - 3 ' ,
スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 33) : 5 ' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T C T G G G T G C G G A A G T C G C A A C A T G - 3 ' ,
スプリントオリゴヌクレオチド (配列番号 34) : 5 ' - T G T C A A A G C T C A T C
G A A C A T G C T G G G T G C G A A G T C G C A A C A T G - 3 ' ,

4. 検出 - RCA

以下に対応する混合物を調製した:

2.66 × Thermopol 緩衝液 (53.2 mM の トリス - HCl、26.6 mM の
(NH₄)₂SO₄、26.6 mM の KCl、5.32 mM の MgSO₄、0.266 %
の Triton (登録商標) X-100、pH 8.8)

0.28 uM の プライマーミックス 1

284.4 U/mL の BST 2.0 WarmStart

14.67 U/mL の TIPP

1.06 mM の dNTP

Syto 82 色素 3 uM

1.25 uL の 第 3 ポイントからの反応混合物。

合計体積 11.25 uL

プライマーミックス 1:

順方向 (配列番号 17):

5' - T* C* G C A A C A T C C T A T A T C T G C - 3' ,

逆方向 (配列番号 18):

5' - T* G* A G C T T T G A C A A T A C T T G A - 3' ,

[式中、* は ホスホロチオエート 結合を表す]

その後、標準のリアルタイム PCR 機器を使用して、混合物を 50 °C で 90 分間インキュベートした。蛍光測定を 1 分毎にとり、標準の機器製造者のソフトウェアを使用して Cq 値を得た。野生型および突然変異体含有試料について観察された Cq 値の相違 (dCq) は、図 2 中に見ることができる。

[0425]

試験した長さの要約は表 2 中に見つけることができる。プローブ配列番号 22 (図 2 A) では、最も性能のよいスプリント配列は配列番号 24 である。プローブ配列番号 23 (図 2 B) では、最も性能のよいスプリント配列は配列番号 31 である。ライゲーション点の位置がプローブ配列の開始点に近ければ近いほど、dCq の値が大きくなる。配列番号 22 と比較して、プローブ配列番号 23 を使用した場合、17 塩基対と比較して 23 塩基対と、標的とより長い相補性領域を有するため、dCq の値がより大きくなる。

[0426]

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. プローブと標的分子およびプローブとスプリントの間の相補、ならびにライゲーション点

プローブ 配列番号	プローブと標的 分子間の相補的 領域の長さ [bp]	スプリ ント配 列番号	ライゲーション 点 (プローブ配 列の開始からの 位置)	プローブ 3'末端で の、プローブとス プリント間の相補 的 領 域 の 長 さ [bp]
22	17	24	9	6
		25	16	9
		26	15	9
		27	13	10
		28	13	9
		29	12	9
		30	11	9
		31	10	9
		32	9	9
		33	8	9
		34	7	10
23	35	24	28	6
		25	35	9
		26	34	9
		27	32	10
		28	32	9
		29	31	9
		30	30	9
		31	29	9
		32	28	9
		33	27	9
		34	26	10

【 0 4 2 7 】

実施例 3：さらなるプローブ／スプリントの組合せ

1．ポリメラーゼ連鎖反応

以下に対応する混合物を調製した：

- 1 × Q 5 U 緩衝液
- 4 0 0 n M のプライマーミックス 1
- 2 0 U ／ m L の Q 5 U ポリメラーゼ
- 1 0 U ／ m L の熱不安定性 U D G
- 0 . 4 n g ／ u L の断片化されたヒトゲノム D N A
- + ／ − 0 . 2 a M の突然変異オリゴヌクレオチド

合計体積 5 0 u L

その後、標準のサーマルサイクラーを使用して、この混合物を以下のようにインキュベートした：

- 3 7 ° C 1 0 分間
- (9 8 ° C 1 分間
- 9 8 ° C 1 0 秒間
- 5 8 ° C 1 5 秒間
- 7 2 ° C 1 5 秒間) × 5 0
- 7 2 ° C 5 分間
- 4 ° C ∞

Q 5 緩衝液

Q 5 緩衝液は市販供給業者 N E B から入手可能である。

プライマーミックス 1：

順方向（配列番号 1 9）：

5 ′ − A * C * G * T A C T G G T G A A A C A C C G C − 3 ′

逆方向（配列番号20）：

5' - / 5 Phos / GCCTCCTTCTGCATGGTATTCT - 3'

〔式中、*はホスホロチオエート結合を表す〕

突然変異オリゴヌクレオチド（配列番号21）：

5' - ACGTACTGGTGAAACACCGCAGCATGTCAAGATCAC
AGATTTTGGGCTGGCCAAACAGCTGGGTGCGGAAGAGAAA
GAATACCATGCAGAAAGGAGGC - 3'

太字かつ下線 - 突然変異部位

2. プロテイナーゼK処理

以下に対応する混合物を調製した：

1 × A7

20 U / mL のプロテイナーゼK

40 uL の混合物、第1ポイント

合計体積 90 uL

その後、この混合物を55℃で5分間、95℃で10分間インキュベートした。

1 × A7 組成物

トリスアセテート、pH = 8.0 10 mM

酢酸カリウム 25 mM

酢酸マグネシウム 5 mM

Triton-X 0.01 %

3. 加ピロリン酸分解（PPL）およびライゲーション

以下に対応する混合物を調製した：

1 × BFF1

10 U / mL のクレノウ（exo-）

100 U / mL の大腸菌リガーゼ

1.2 U / mL のアピラーゼ

100 U / mL のラムダexo

0.25 mM のPPi

20 nM のプローブオリゴヌクレオチド

30 nM のスプリントオリゴヌクレオチド（oligonucleotide）

1.25 uL の第2ポイントからの混合物。

合計体積 10 uL

その後、この混合物を45℃で15分間インキュベートした。

1 × BFF1 組成物

トリスアセテート、pH = 7.0 10 mM

酢酸カリウム 30 mM

酢酸マグネシウム 17.125 mM

Triton-X 0.01 %

プローブオリゴヌクレオチド（配列番号22）：

/ 5 Phos / A * TGTTCGATGAGCTTTGACAATACTTGATCGA
TGCAGATATAGGATGTTGCGACGCAACCCAGCTGTTTGG

プローブオリゴヌクレオチド（配列番号23）：

/ 5 Phos / A * T * G * TTCGATGAGCTTTGACAATACTTGATC
GATGCGAGATATAGGATGTTGCGACGCAACCCAGCTG

〔式中、*はホスホロチオエート結合を表す〕

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号24）：

TTTGGCCAGCCCAAAATCTGTGAT

スプリントオリゴヌクレオチド（配列番号35）：

TGTCAAAGCTCATCGAACATGGGTGCGGAAGTCGCT

4. 検出 - RCA

10

20

30

40

50

以下に対応する混合物を調製した：

2.66×Thermopol緩衝液（53.2mMのトリス-HCl、26.6mMの
(NH₄)₂SO₄、26.6mMのKCl、5.32mMのMgSO₄、0.266%
のTriton（登録商標）X-100、pH8.8）

0.28uMのプライマーミックス1

284.4U/mLのBST2.0 WarmStart

14.67U/mLのTI PP

1.06mMのdNTP

Syto82色素 3uM

1.25uLの第3ポイントからの反応混合物。

合計体積 11.25uL

プライマーミックス1：

順方向（配列番号17）：

5' - T^{*}C*GCAACATCCTATATCTGC - 3'，

逆方向（配列番号18）：

5' - T^{*}G*AGCTTTGACAATACTTGA - 3'，

〔式中、*はホスホロチオエート結合を表す〕

その後、標準のリアルタイムPCR機器を使用して、混合物を50℃で90分間インキュベートした。蛍光測定を1分毎にとり、標準の機器製造者のソフトウェアを使用してCq値を得た。野生型と突然変異体含有試料との間のCqの相違（dCq）は、図3中に見ることができる。プローブ配列番号22および23は、それぞれ標的分子と17および35塩基長の相補的領域を有する。相補的塩基数が高ければ高いほど／相補的領域の長さが長ければ長いほど、標的分子の0.1%および0.5%のAF濃度について見られるdCqの値が高くなる。

〔0428〕

実施例4：本発明の方法のさらなる応用

ヒト癌における関連性の高いメチル化遺伝子（HRMG）のメチル化頻度

〔0429〕

10

20

30

40

50

【表 3】

臓器	1	2	3	4	5
頭頸部 SCC	HOXA9 (.81, 60%)	NID2 (.79, 71%)	UCHL1 (.78, 66%)	DCC (.77, 75%)	KIF1A (.76, 72%)
食道 SCC	ZNF582 (.95, 86%)	NEFH (.93, 86%)	CDO1 (.91, 84%)	NMDAR2B (.91, 78%)	PAX1 (.89, 100%)
食道腺癌	SFRP1 (96%)	CDO1 (95%)	APC (92%)	CDH1 (84%)	TIMP3 (74%)
肺	GHSR (1.0)	CDO1 (.87, 92%)	HOXA9 (96%)	SHOX2 (94%)	TAC1 (87%)
胃	CDO1 (.95, 87%)	DLEC1 (.87, 93%)	HOPX (.85, 84%)	Reprimo (.77, 69%)	FLNC (.72, 93%)
大腸	CDO1 (.96, 91%)	SFRP1 (.96, 85%)	GFRA1 (.95, 89%)	SEPT9 (.94, 100%)	DCLK1 (.93, 82%)
胆管	SFRP1 (.95, 84%)	OPCML (.93, 89%)	CDO1 (.91, 85%)	ZSCAN18 (.77, 65%)	DCLK1 (.75, 58%)
胆嚢	SEPT9 (.82, 77%)	CDO1 (.74, 72%)	14 - 3 - 3 シグマ (90%)	3 - OST - 2 (72%)	マスピン (70%)
膵臓	GHSR (1.00)	CDO1 (.97, 94%)	HOPX (.85, 83%)	NPTX2 (100%)	UCHL1 (100%)
乳房	GHSR (.98, 92%)	CDO1 (.84, 79%)	MAL (95%)	14 - 3 - 3 シグマ (91%)	VGF (89%)
子宮(頸部)	NKX6 - 1 (.97, 93%*)	SOX9 (.96, 92%)	SOX1 (.95, 88%*)	ZNF516 (.92, 90%)	LMX1A (.9, 89%*)
子宮(内膜)	GALR1 (.97, 100%)	COL14A1 (.96, 92%)	ZNF177 (.95, 92%)	ZNF154 (.94, 82%)	TMEFF2 (.90, 65%)
膀胱	CDO1 (.87, 78%)	APAF - 1 (100%)	ツイスト 1 (98%)	NID2 (96%)	PCDH17 (92%)
前立腺	RASSF1 (.99, 96%)	MDR1 (.98, 88%)	APC (.97, 90)	GHSR (.97)	GSTPI (.96, 93%)
(腫瘍を通常の対応物から区別するための受信者動作特性[ROC]曲線の曲線下面積[AUC]、陽性メチル化頻度)。 アスタリスクは掻爬試料によって評価した。 データの欠如が原因で、この表中で曲線下面積(AUC)を必ずしも与えることができなかった。 SCC、扁平細胞癌。					

10

20

30

40

【0430】

肺癌バイオマーカーのメチル化

肺癌は、その症状の顕在化が遅いおよび胸部 X 線撮影などのスクリーニング技法の感度が低いことを含めたいくつかの理由により、癌関連の死亡率の主な原因である。腫瘍細胞から落ちた DNA 断片が、癌の分子ポートレートへの好都合かつ最小限に浸潤性のアクセスを提供することができ、これらの DNA 断片は、癌患者の血液から単離した無細胞 DNA (cfDNA) 中に見出される。血漿中の無細胞循環腫瘍 DNA (ctDNA) は全癌ゲノムの代理を表し、ctDNA は、多くの癌患者において、特に疾患の初期において全 cfDNA の 0.05% 以下という低い割合を示す。これらの特性は、ctDNA の異常

50

なメチル化を有望な癌バイオマーカーにし、最近の高スループット調査により、対にした腫瘍組織からの c t DNA と DNA との間のメチル化プロファイルにおける変化の対応が実証されている。肺癌の診断学および予後診断のためのメチル化マーカーのリストを以下に示す。

【 0 4 3 1 】

【 表 4 】

遺伝子	マーカー	供給源	肺癌における変化
APC	大腸腺腫症ポリポーシス	血漿	健康な対象と比較して肺癌患者におけるメチル化レベルの有意な変化
CDH13	カドヘリン 13	*	*
DCLK1	ダブルコルチン様キナーゼ 1	*	*
DLEC1	肺および食道癌で欠失 1	*	*
LINE-1	LINE-1 レトロ転移因子 1	*	*
P16 (CDKN2A)	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 2A	*	*
RARB2	レチノイン酸受容体ベータ 2	*	*
SEPT9	セプチン 9	*	*
SHOX2	低身長ホメオボックス 2	*	*
BRMS1	乳癌転移抑制因子 1	*	生存に対して負の影響
DCLK1	ダブルコルチン様キナーゼ 1	*	生存に対して負の影響
LINE1	LINE-1 レトロ転移因子 1	*	抗腫瘍療法に応答したメチル化レベルの動的変化
APC	大腸腺腫症ポリポーシス	血清	健康な対象と比較して肺癌患者におけるメチル化レベルの有意な変化
CDH1	カドヘリン 1	*	*
DAPK	死関連プロテインキナーゼ	*	*
DCC	DCC ネットリン 1 受容体	*	*
GSTP1	グルタチオン S-トランスフェラーゼ パイ 1	*	*
MGMT	O-6-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ	*	*
P16 (CDKN2A)	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 2A	*	*
RASSF1A	Ras 関連ドメインファミリー1 アイソフォーム A	*	*
TMS1	PYD および CARD ドメイン含有	*	*
CHFR	フォークヘッドおよびリングフィンガードメインを有するチェックポイント	*	化学療法と比較して、セカンドライン EGFR-TKI を用いて生存に対して負の影響
SFN	ストラティフィン	*	白金に基づく化学療法を用いて生存に対して正の影響

【 0 4 3 2 】

T E R T および M G M T プロモーターのメチル化と脳癌に対する影響

O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (M G M T) 遺伝子は、D N A 修復に関与する、進化的に保存されており、遍在的に発現されるメチルトランスフェラ

ーゼをコードしている。MGMTは、グアニンのO6位置からアルキル付加物を除去して、DNA損傷を防止し、正常細胞に対して保護効果を与える。しかし、MGMTの内在性機能はまた、テモゾマイド(TMZ)などのアルキル化剤を用いた化学療法の、そうしなければ致死的である効果から、腫瘍細胞を保護する。その対応する遺伝子プロモーターのメチル化を通じたMGMTのサイレンシングまたは発現の低下が、グレードIV神経膠腫の50%において観察されており、DNA修復を損なわせ、その結果、TMZなどの薬剤に対する化学感受性が増加する。したがって、MGMTプロモーターのメチル化状態は、アルキル化化学療法に対する感度のバイオマーカーとしての潜在性を有し、最終的に臨床診療に影響を与える。予測的および予後的なバイオマーカーのどちらとしてのその能力も大規模に研究されているが、現在では、MGMT遺伝子プロモーターのメチル化の評価の最適方法に関するコンセンサスは存在しない。

10

【0433】

テロメア維持は染色体末端の完全性を保護し、ヒト癌の顕著な特徴である複製による不死化を可能にする。テロメア逆転写酵素(TERT)癌遺伝子は、テロメア維持を司っており、通常は幹細胞の部分組中でのみ発現される、テロメラーゼホロ酵素の律速触媒サブユニットをコードしている。TERT遺伝子は癌細胞のおよそ90%で再活性化され、これらの細胞種の無限の増殖および不死化が可能となる。TERT調節不全の根底にある様々な遺伝的および後成的機構が同定されており、TERTプロモーター領域の過剰メチル化が癌細胞のユニークな特徴を表す。興味深いことに、TERT遺伝子の転写開始部位の上流(UTSS)において、突然変異ではなくメチル化が、小児脳腫瘍におけるTERT発現の増加および予後不良に強く関連していることが見出された。多種多様な癌細胞種におけるTERTプロモーターの過剰メチル化の普及を考えると、この後成的修飾が有用な予後的バイオマーカーを表す。

20

遺伝子がメチル化されている／されていない、前立腺癌遺伝子などのメチル化

前立腺癌は、最も頻繁に診断される非皮膚悪性腫瘍であり、西洋の工業先進国における男性の癌関連の死の主な原因である。良性と癌性の前立腺組織の間に多数のDNAメチル化の変化が観察され、変化はしばしば初期および反復性であり、これは潜在的な機能的役割を示唆している。複数の全ゲノム研究によって、いくつかの遺伝子および遺伝子ファミリーが前立腺癌において反復的に過剰メチル化されていることが報告されている。この遺伝子および遺伝子ファミリーとしては、それだけには限定されないが、GSTP1、MGMT、AR、ER、VHL、RB1、APC、DAPK、CD44、AOX1、APC、CDKN2A、HOXD3、PTGS2、RARβ、WT1、ZNF154、C20orf103、EFS、HOXC11、LHX9、RUNX3、TBX15、BARHL2、BDNF、CCDC8、CYP27A1、DLX1、EN2、ESR1、FBLN1、FOXO3、GP5、FRSP、HHEX、HOXA3、HOXD4、HOXD8、IRX1、KIT、LBX1、LHX2、NKX2-1、NKX2-2、NKX2-5、PHOXRA、POU3F3、RHCG、SIX6、TBX3、TMEM106、VAX1、およびWNT2が挙げられる。

30

膵癌マーカーのメチル化

膵管腺癌(PDAC)は、最も致命的な癌種のうちの1つである。この形態の癌は、現在利用可能な初期診断試験がないため診断するのが困難であり、これは、診断が、疾患が既に進行した状態で起こることを意味する(診断された事例の75%を超える例がステージIII/IVの疾患である)。これは、高い死亡率の記録をもたらしている。PDACの初期の発生および／または進行を捕らえることができる信頼性のあるバイオマーカーの欠如が原因で、初期診断は困難と証明されている。現在、PDACを有する患者の予後的監視のための、唯一のFDA認可されたバイオマーカーは、炭水化物抗原19-9(CA19-9またはシアリル化ルイス抗原)である。この抗原は、疾患の検出について低い感度および特異性を示す。したがって、その使用は、他の循環バイオマーカーと組み合わせ使用しない限りは、診断目的には勧められない。

40

【0434】

50

最近の研究により、無細胞DNA（cfDNA）のメチル化分析が、診断的潜在性を有するバイオマーカーを発見するための有望な非浸潤性手法を表すことが示されている。cfDNAメチル化を、新生物発生前の病変または慢性膵炎（CP）における疾患特異的シグネチャの同定に利用することが可能であり得る。CPはしばしばPDACに先行するため、所定遺伝子組の動的DNAメチル化パターンが疾患の進行の根底にあり得る。導管細胞マーカーであるCUX2は、PDACにおけるシグナルの増加を示しており、導管およびエイシング（acining）細胞マーカーであるREG1Aは、慢性膵炎における漸増するシグナルを示している。バイオマーカーADAMTS1およびBNC1は、原発性PDACおよび新生物発生前の膵臓上皮内新形成（PIN）において高いメチル化頻度を有することが見られている（ADAMTS1およびBNC1についてそれぞれ25%および70%）。ADAMTS1およびBNC1の合わせたcfDNAメチル化を、膵癌の初期診断（すなわちステージIおよびII）に利用し得る。潜在的なバイオマーカーのリストを以下に示す。

【0435】

【表5】

循環外分泌膵臓 cfDNA を同定するために有用な遺伝子						
CUX2	導管細胞マーカー			PDAC におけるシグナルの増加		
REG1A	導管およびエイシング (acing)細胞マーカー			CP における漸増するシグナル		
cfDNA メチル化バイオマーカーの頻度(%)						
遺伝子	健康	CP	PIN	PDAC I	PDAC II	PDAC III/IV
ADAMTS1	<3	-	25	25-88	78-90	55
BNC1	3-7	5	70	63-95	56-95	100
CCND2	17	82	-	-	-	24
CDKN1C	60	90	-	-	-	27
MLH1	22	78	-	-	-	27
PGR (prox)	14	76	-	-	-	37
SYK	57	89	-	-	-	57

【0436】

KRAS 検出

KRAS 遺伝子は細胞増殖を制御し、これが突然変異した場合、この負のシグナル伝達が破壊され、細胞は連続的に増殖することができ、しばしば癌へと発達する。単一のアミノ酸の置換、特に単一のヌクレオチドの置換が、様々な癌、すなわち、肺腺癌、粘液性腺腫、膵臓腺管癌、および結腸直腸癌に関連づけられる活性化突然変異の原因である。KRAS 突然変異は、たとえば肺癌において予後的バイオマーカーとして使用されている。

【0437】

KRAS 中のドライバー突然変異は、20%までのヒト癌と関連づけられており、標的化治療がこの突然変異およびその関連する疾患に対して開発中であり、そのような治療の一部の非限定的なリストは、以下の表中に見ることができる。

【0438】

10

20

30

40

50

【表 6】

名称	標的	製造者	状態	商品名
AMG 510	KRAS ^{G12C}	Amgen	治験	N/A
MRTX-849	KRAS ^{G12C}	Mirati Therapeutics	治験	N/A
ARS-3248	KRAS ^{G12C}	Wellspring Biosciences, Inc./Janssen Biotech, Inc.	治験	N/A

10

【0439】

KRAS 突然変異の存在は、EGFR 阻害剤パニツムマブ（Vectibix）およびセツキシマブ（Erbix）に対して非常に乏しい応答を反映することが見出されている。KRAS をコードしている遺伝子中の活性化突然変異は結腸直腸癌の 30%～50% で起こり、研究により、その腫瘍が KRAS 遺伝子のこの突然変異したバージョンを発現する患者は、パニツムマブおよびセツキシマブに応答しないことが示されている。野生型 KRAS 遺伝子の存在は、患者がこれらの薬物に応答することの保証ではないが、研究により、セツキシマブが、野生型 KRAS 腫瘍を有する転移性結腸直腸癌患者において有意な有効性を有することが示されている。EGFR 拮抗剤エルロチニブまたはゲフィチニブについて、KRAS 突然変異を保有しない患者における 60% の応答率と比較して、KRAS 突然変異（野生型 EGFR）について陽性である肺癌患者は 5% 以下と推定される応答率を有する。

20

【0440】

結腸直腸癌におけるセツキシマブ治療（抗 EGFR 治療）に対する獲得耐性の頻繁な駆動因子である、KRAS 突然変異（活性化または過剰発現）の出現の早期検出は、遅延または逆方向耐性に対する処置の改変（たとえば、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ [MEK] 阻害剤の早期開始）を可能にし、したがって、本発明の方法が患者の KRAS 状態の素早く安価な検出を可能にすることは、有利である。

30

【0441】

突然変異の非限定的なリストは、G12D、G12A、G12C、G13D、G12V、G12S、G12R、A59T/E/G、Q61H、Q61K、Q61R/L、K117N、および A146P/T/V である。

【0442】

突然変異のさらなる非限定的なリストを以下の表に示す。

【0443】

40

【表 7】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
2	G12A	COSM522	c.35G>C
2	G12C	COSM516	c.34G>T
2	G12D	COSM521	c.35G>A
2	G12F	COSM512	c.34_35delinsTT
2	G12R	COSM518	c.34G>C
2	G12S	COSM517	c.34G>A
2	G12V	COSM520	c.35G>T
2	G12V	COSM515	c.35_36delinsTC
2	G13A	COSM533	c.38G>C
2	G13C	COSM527	c.37G>T
2	G13D	COSM532	c.38G>A
2	G13R	COSM529	c.37G>C
2	G13S	COSM528	c.37G>A
3	Q61E	COSM550	c.181C>G
3	Q61H	COSM1146992	c.183A>T
3	Q61H	COSM554/COSM1135364	c.183A>C
3	Q61K	COSM549/COSM1159597	c.181C>A
3	Q61L	COSM553	c.182A>T
3	Q61R	COSM552	c.182A>G

10

20

【0444】

B R A F 検出

30

B R A F は、細胞成長の指示に関与しているシグナルを細胞内に送ることに関与している、B - R a f と呼ばれるタンパク質をコードしているヒト遺伝子である。これは、一部のヒト癌において突然変異していることが示されている。B - R a f は、成長シグナル伝達プロテインキナーゼの R a f キナーゼファミリーのメンバーであり、数ある中でとりわけ細胞分裂に影響を与える、M A P キナーゼ／E R K シグナル伝達経路の制御において役割を果たす。

【0445】

特定の他の遺伝性の B R A F 突然変異が先天性欠損症を引き起こす。

ヒト癌に関連づけられている、30個を超える B R A F 遺伝子の突然変異が同定されている。90%の事例では、ヌクレオチド1799でチミンがアデニンで置換されている。これは、ヒト癌において見出される活性化セグメント中のコドン600でバリン（V）がグルタミン酸（E）によって置換されることをもたらす（ここでは V 6 0 0 E と呼ぶ）。この突然変異は、

40

- － 結腸直腸癌
- － 黒色腫
- － 乳頭甲状腺癌
- － 非小細胞肺癌
- － エナメル上皮腫

において広く観察されている。

【0446】

50

見出された他の突然変異の非限定的なリストは、R 4 6 1 I、I 4 6 2 S、G 4 6 3 E、G 4 6 3 V、G 4 6 5 A、G 4 6 5 E、G 4 6 5 V、G 4 6 8 A、G 4 6 8 E、N 5 8 0 S、E 5 8 5 K、D 5 9 3 V、F 5 9 4 L、G 5 9 5 R、L 5 9 6 V、T 5 9 8 I、V 5 9 9 D、V 5 9 9 E、V 5 9 9 K、V 5 9 9 R、V 6 0 0 K、および A 7 2 7 V である。

【0447】

B R A F 突然変異によって駆動される癌を処置する薬物が開発されている。ベムラフェニブおよびダブラフェニブは、後期黒色腫の処置のために F D A によって認可されている。以前の最良の化学療法剤ダカルバジンの 7 ~ 1 2 % と比較して、ベムラフェニブ (v u m e r a f e n i b) を用いた処置に対する応答率は転移性黒色腫について 5 3 % であった。

10

E R B B 2 / H E R 2 検出

ヒト表皮成長因子受容体 2 (H E R 2) は、C D 3 4 0 (表面抗原分類 3 4 0)、原癌遺伝子 N e u、E r b b 2 (げっ歯動物)、または E R B B 2 (ヒト) としても知られ、E R B B 2 遺伝子によってコードされているタンパク質である。この癌遺伝子の増幅または過剰発現は、侵襲性の乳癌の進行において重要な役割を果たす。E R B B 2 遺伝子の過剰発現はまた、卵巣、胃、肺腺癌、および侵襲性形態の子宮癌、ならびに 3 0 % の唾液腺管癌において起こることも知られている。過剰発現の非存在において受容体のリガンド非依存的発射を引き起こす構造的変更も同定されている。

20

【0448】

数々の標的化治療がこの突然変異およびその関連する疾患に対して認可され、開発中であり、そのような治療の一部の非限定的なリストは、以下の表中に見ることができる。

【0449】

【表 8】

名称	標的	製造者	状態	商品名
トラスツズマブ	HER2 過剰発現	Genentech	認可	Herceptin
ペルツズマブ	HER2 および HER3 受容体の二量体化	Genentech	認可	Perjeta
マルゲツキシマブ	HER2 過剰発現	Raven biotechnologies/MacroGenics	治験	N/A
NeuVax	ワクチン	Galena Biopharma	治験	N/A

30

【0450】

H E R 2 試験は、予後診断を評価し、処置に対する応答をモニタリングし、標的化治療 (トラスツズマブなど) の適合性を決定するために、乳癌患者においてルーチン的に行う。トラスツズマブは高価であり、重篤な副作用 (心毒性) に関連づけられているため、H E R 2 + 患者のみがそれを受けると選択することが重要であり、したがって、本発明の方法が患者の H E R 2 状態の素早く安価な検出を可能にすることは、有利である。

40

【0451】

一実施形態では、本発明の方法を使用して E R R B 2 エクソン 2 0 挿入突然変異の存在または非存在を検出する。

E R B B 2 突然変異のさらなる非限定的なリストを以下の表に示す。

【0452】

50

【表 9】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
20	A775_G776insYVMA	COSM12558	c.2324_2325ins>TTACGTGATGGC
	G778_P780dup	COSM12556	c.2332_2340dup>GGCTCCCCA
	G776delinsVC	COSM165173 9	c.2326_2327ins>TGT
	P780_Y781insGSP	COSM21607	c.2339_2340ins>TGGCTCCCC
	A775_G776insYVMA/Y772_A775 dup	COSM20959	c.2313_2324dup>ATACGTGATGG C
17	V659E_AA	COSM372456 6	c.1976_1977delinsTT>AA
	V659E_AG	COSM650326 2	? c.1976_1977delinsTT>AG

10

【0453】

EML4-ALK 検出

20

EML4-ALKは、棘皮動物微小管関連タンパク質様4（EML4）遺伝子と未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）遺伝子との異常な遺伝子融合である。この遺伝子融合はタンパク質EML4-ALKの生成をもたらし、これは癌細胞の悪性挙動を促進および維持すると考えられている。EML4-ALK陽性肺癌は、その細胞がこの突然変異を含有する原発性悪性肺腫瘍である。

【0454】

数々の標的化治療がこの突然変異およびその関連する疾患に対して認可され、開発中であり、そのような治療の一部の非限定的なリストは、以下の表中に見ることができる。

【0455】

【表10】

30

名称	世代	標的	製造者	状態	商品名
クリゾチニブ	1	EML4/ALK	Pfizer	FDA 認可 2011 年	Xalkori, Crizalk
セルチニブ (Certinib)	2	ALK	Novartis	FDA 認可 2014 年	Zykadia
アレクチニブ	2	ALK	Genentec	日本 2014 年、FDA 認可 2015 年	Alecensa
ブリガチニブ	2	ALK/ EGFR	Takeda	FDA 認可 2017 年	Alunbrig, Briganix
エンサルチニブ	2	ALK	XCovery	治験	N/A
ロルラチニブ	3	ROS1/ALK	Pfizer	治験	N/A

40

【0456】

EML4-ALK遺伝子融合は、非小細胞肺癌（NSCLC）のおよそ5%の原因であり、毎年米国で約9,000件および世界中で約45,000件の新規事例が存在する。

EML4-ALKの数々の変異体が存在し、すべての変異体が、形質転換活性に必要なEML4 N末端部分中およびALKエクソン20のキナーゼドメイン中に、必須のコイルドコイルドメインを有する。EML4のエクソン13とALKのエクソン20との融合

50

(変異体 1 : V 1)、E M L 4 のエクソン 2 0 と A L K のエクソン 2 0 との融合 (V 2)、および E M L 4 のエクソン 6 と A L K のエクソン 2 0 との融合 (V 3) が、より一般的な変異体の一部である。これらの様々な変異体の臨床的意義は、最近になってやっと明らかになっている。

【 0 4 5 7 】

V 3 は、化学療法および放射線療法などの非チロシンキナーゼ阻害剤 (T K I) 処置の後に、より短い無進行生存 (P F S) を有する可能性が高い患者の選択に適切なマーカーとして出現した。E M L 4 - A L K の V 1 および V 2 と比較して、V 3 が第一および第二世代処置ラインを受ける患者のより短い P F S およびより悪い全生存 (O S) に関連しているというさらなる証拠が存在する。

10

【 0 4 5 8 】

また、V 3 陽性患者が、耐性突然変異の発生を通じて発生し、野生型 V 3 のより高い I C 5 0 が原因の不完全な腫瘍細胞抑制によって促進される可能性が高い、第 1 および第 2 の処置ラインに対する耐性を発生することも見出された。不都合の V 3 の検出を使用して、より侵襲性の監視および処置戦略を要する患者を選択することができる。V 3 を有する患者に第三世代ロルラチニブを投与することは、V 1 を有するものを超える、より長い P F S を与える場合があり、したがって、本発明の方法が患者が有し得る変異体の素早く安価な検出を可能にすることは、有利であると考えられる。

【 0 4 5 9 】

本発明の方法はさらに、それだけには限定されないが、G 1 2 0 2 R、G 1 2 6 9 A、E 1 2 1 0 K、D 1 2 0 3、S 1 2 0 6 C、L 1 1 9 6 M、F 1 1 7 4 C、I 1 1 7 1 T、I 1 1 7 1 N / S、V 1 1 8 0 L、T 1 1 5 1 K、および C 1 1 5 6 Y などの耐性突然変異の検出を可能にする。

20

【 0 4 6 0 】

たとえば、G 1 2 0 2 R は、薬物結合との干渉を引き起こし、第一および第二世代の A L K 阻害剤に対する高レベルの耐性を与える、溶媒先端突然変異である。したがって、本発明の方法が、この突然変異を保有し得る患者の同定を可能にし、第一または第二ではなく第三世代処置での処置開始から恩恵を受けることが有利である。

【 0 4 6 1 】

E M L 4 - A L K 突然変異のさらなる非限定的なリストを以下の表に示す。

30

【 0 4 6 2 】

【表 1 1】

エクソン	突然変異	COSM 番号	突然変異配列
再編成(常にエクソン 20)	EML4-ALK	COSF408	E13_A20
		COSF474	E6ins33_A20
		COSF409	E20_A20
		COSF411	E6_A20

40

【 0 4 6 3 】

E G F R 検出

癌遺伝子としての表皮成長因子受容体 (E G F R) の同定は、肺癌のためのゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ブリガチニブ、およびイコチニブ、ならびに結腸癌のためのセツキシマブなどの標的化治療の開発をもたらした。しかし、多くの人がこれらの治療に対して耐性を生じる。2 つの主な耐性源は、T 7 9 0 M 突然変異および M E T 癌遺伝子である。

【 0 4 6 4 】

E G F R 突然変異は E G F R エクソン 1 8 ~ 2 1 中に起こり、エクソン 1 8、1 9、お

50

よび 21 中の突然変異は、EGFR-TKI（チロシンキナーゼ阻害剤）を用いた処置の適合性を示す。エクソン 20 中の突然変異（いくつかの突然変異を例外とする）は、腫瘍が EGFR-TKI 耐性であり、EGFR-TKI を用いた処置に適切でないことを示す。

【0465】

2 つの最も一般的な EGFR 突然変異は、エクソン 19 の短いインフレーム欠失およびエクソン 21 中のヌクレオチド 2573 での点突然変異（CTG から CGG）であり、コドン 858 でのロイシンのアルギニンによる置換（L858R）をもたらす。これら 2 つの突然変異は一緒になって、非小細胞肺癌（NSCLC）におけるすべての EGFR 突然変異の約 90% を占める。NSCLC を有する患者におけるこれらの突然変異のスクリーニングを使用して、どの患者が TKI に応答するかを予測することができる。

10

【0466】

したがって、本発明の方法が、これらの突然変異を保有し、TKI での処置開始から恩恵を受け得る患者の同定を可能にすることが、有利である。当業者には、本発明の方法が EGFR 突然変異の範囲の同定を可能にすることが理解されよう。そのような突然変異の網羅的でないリストは、G719X、Ex19Del、S768I、Ex20Ins、および L861Q である。

【0467】

突然変異のさらなる非限定的なリストを以下の表に示す。

20

【0468】

30

40

50

【表 1 2 - 1】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
エクソン 18	G719A	6239	c.2156G>C
	G719S	6252	c.2155G>A
	G719C	6253	c.2155G>T
エクソン 19	del_6210	6210	2240_2251del12
	del_6218	6218	2239_2247del9
	del_6220	6220	2238_2255del18
	del_6223	6223	2235_2249del15
	del_6225	6225	2236_2250del15
	del_6255	6255	2239_2256del18
	del_12367	12367	2237_2254del18
	del_12369	12369	2240_2254del15
	del_12370	12370	2240_2257del18
	del_12382	12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C
	del_12383	12383	2239_2251>C
	del_12384	12384	2237_2255>T
	del_12385	12385	2235_2255>AAT
	del_12386	12386	2237_2252>T
	del_12387	12387	2239_2258>CA
	del_12403	12403	2239_2256>CAA
	del_12416	12416	2237_2253>TTGCT
	del_12419	12419	2238_2252>GCA
	del_12422	12422	2238_2248>GC
	del_12678	12678	2237_2251del15
	del_12728	12728	2236_2253del18
	del_13550	13550	2235_2248>AATTC
	del_13551	13551	2235_2252>AAT
	del_13552	13552	2235_2251>AATTC
	del_13556	13556	2253_2276del24
	del_18427	18427	2237_2257>TCT
	del_26038	26038	2233_2247del15
	del_6256	6256	? c.2254_2277del24
	del_28517	28517	? c.2235_2246del12
	del_1190791	1190791	? c.2234_2248del15
	del_26718	26718	? c.2250_2264del15
	del_133189	133189	? c.2236_2256del21
	del_24970	24970	? c.2239_2262del24
	I740_K745dup	26443	c.2217_2234dup
	K745_E746insVPVAIK	26444	c.2219_2236dup

【 0 4 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

エクソン 20	T790M	6240	2369C>T
	S768I	6241	2303G>T
	p.A767_V769dup	12376	2307_2308ins9GCCAGCGTG
	p.H773dup	12377	2319_2320insCAC
	p.D770_N771insG	12378	2310_2311insGGT
	p.S768_D770dup	13428	2311_2312ins9GCGTGGACA
	p.A767_V769dup	13558	2309_2310AC>CCAGCGTGGAT
	A763_Y764insFQEA	26720	2284- 5_2290dupTCCAGGAAGCCT
	C797S_2389	6493937	2389T>A
	C797S_2390	5945664	2390G>C
エクソン 21	L858R	6224	c.2573T>G
	L858R	12429	2573_2574TG>GT
	L861Q	6213	c.2582T>A

【 0 4 7 0 】

R O S 1

R O S 1 は、未分化リンパ腫キナーゼ（A L K）タンパク質と構造的類似性を有する受容体チロシンキナーゼ（遺伝子 R O S 1 によってコードされている）であり、c - r o s 癌遺伝子によってコードされている。

【 0 4 7 1 】

R O S 1 突然変異の非限定的なリストを以下の表に示す。

【 0 4 7 2 】

【表 1 3】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
再編成	CD74-ROS1	COSF1202	C6_R32
		COSF1200	C6_R34
		COSF1478	C6_R35
	SLC34A2-ROS1	COSF1196	S4_R32
		COSF1198	S4_R34
		COSF1259	S13del2046_R32
		COSF126	S13del2046_R34
	SDC4-ROS1	COSF1265	S2_R32
		COSF1278	S4_R32
		COSF1671	S2_R34
		COSF1280	S4_R34
	EZR-ROS1	COSF1267	E10_R34
	GOPC-ROS1	-	G4_R35
		COSF1188	G4_R36
		COSF1139	G8_R35
	LRIG3-ROS1	COSF1269	L16_R35
	TPM3-ROS1	COSF1273	T8_R35

【 0 4 7 3 】

RET 原癌遺伝子

RET 原癌遺伝子は、細胞外シグナル伝達分子のグリア細胞系由来神経栄養因子（GDNF）ファミリーのメンバーのための受容体チロシンキナーゼをコードしている。

【 0 4 7 4 】

RET 突然変異の非限定的なリストを以下の表に示す。

【 0 4 7 5 】

【表 1 4】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
再編成	KIF5B-RET	COSF1232	K15-R12
		COSF1230	K16-R12
		COSF1253	K22-R12
		COSF1234	K23-R12
		COSF1255 (実際は 15_11del107)	K15-R11
		COSF1262	K24-R11
		COSF1242	K24-R8
			K24-R7
	CCDC6-RET	COSF1271	C1-R12
	NCOA4-RET	COSF1341	N6-R12
	TRIM33-RET		T14-R12

10

20

【0 4 7 6】

M E T エクソン 1 4

M E T エクソン 1 4 スキッピングは N S C L C においておよそ 5 % の頻度で起こり、扁平および腺癌の組織学のどちらにおいても見られる。

【0 4 7 7】

M E T 突然変異の非限定的なリストを以下の表に示す。

【0 4 7 8】

【表 1 5】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
スキッピング 14	MET-MET	COSM29312	M13_M15

30

【0 4 7 9】

N T R K 原癌遺伝子

N T R K 遺伝子融合は T R K 融合タンパク質と呼ばれる異常タンパク質をもたらし、これは癌細胞が成長することを引き起こし得る。N T R K 遺伝子融合は、脳、頭頸部、甲状腺、軟組織、肺、および結腸の癌を含めた一部の種類の癌において見つけ得る。神経栄養性チロシン受容体キナーゼ遺伝子融合とも呼ばれる。

【0 4 8 0】

N T R K 突然変異の非限定的なリストを以下の表に示す。

【0 4 8 1】

40

50

【表 16】

エクソン	突然変異名	COSM 番号	突然変異配列
NTRK1 再編成	CD74-NTRK1		C7-N10
	MPRIIP-NTRK1		M22-N12
	TFG-NTRK1	COSF1323	T5-N10
	TPM3-NTRK1	COSF1329	T8-N10
NTRK3 再編成	ETV6-NTRK3	COSF571	E5-N15
	ETV6-NTRK3	COSF1534	E4-N14
	ETV6-NTRK3	COSF823	E4-N15

10

【0482】

パネル

本発明の一実施形態では、それぞれの A_0 が標的突然変異と相補的である、複数のプローブ分子 (A_0) を含むパネルが提供される。突然変異は、以前に記載したもしくは続いて記載する、または知られている任意の突然変異から選択され得る。したがって、当業者には、本発明の範囲内には、以前に記載したもしくは続いて記載する、または知られている原癌遺伝子または癌遺伝子のうちの任意のものに対する1つまたは複数の突然変異の検出に有用であり得るパネルが含まれることが理解されよう。

20

【0483】

一実施形態では、パネルは、それぞれが特異的標的突然変異と相補的な、5～500個の個々のプローブ分子を含む。一実施形態では、パネルは、それぞれが特異的標的突然変異と相補的な、5～400個の個々のプローブ分子を含む。一実施形態では、パネルは、それぞれが特異的標的突然変異と相補的な、5～300個の個々のプローブ分子を含む。一実施形態では、パネルは、それぞれが特異的標的突然変異と相補的な、5～200個の個々のプローブ分子を含む。一実施形態では、パネルは、それぞれが特異的標的突然変異と相補的な、5～100個の個々のプローブ分子を含む。一実施形態では、パネルは、それぞれが特異的標的突然変異と相補的な、5～50個の個々のプローブ分子を含む。

30

【0484】

一実施形態では、同じ突然変異に特異的な複数のプローブ分子が存在し得る。一実施形態では、パネルのそれぞれの突然変異に対して特異的な1つのみのプローブ分子が存在し得る。

【0485】

一実施形態では、複数のプローブ分子を含み、1つまたは複数のプローブがEGFR突然変異と相補的である、1つまたは複数のプローブがKRAS突然変異と相補的である、1つまたは複数のプローブがERBB2/HER2突然変異と相補的である、1つまたは複数のプローブがEML4-ALK突然変異と相補的である、1つまたは複数のプローブがROS1突然変異と相補的である、および1つまたは複数のプローブがMET突然変異と相補的である、パネルが提供される。

40

【0486】

一実施形態では、複数のプローブ分子を含み、1つまたは複数のプローブがEGFR突然変異と相補的であり得る、1つまたは複数のプローブがKRAS突然変異と相補的であり得る、1つまたは複数のプローブがERBB2/HER2突然変異と相補的であり得る、1つまたは複数のプローブがEML4-ALK突然変異と相補的であり得る、1つまたは複数のプローブがROS1突然変異と相補的であり得る、1つまたは複数のプローブがMET突然変異と相補的であり得る、および1つまたは複数のプローブがMET突然変異

50

と相補的であり得る、パネルが提供される。

【0487】

一実施形態では、1つまたは複数のEGFR、KRAS、BRAF、ERBB2/HER2、EML4-ALK、ROS1、RET、MET突然変異に選択的なプローブのパネルが提供される。

【0488】

一実施形態では、EGFR突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

一実施形態では、KRAS突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

一実施形態では、BRAF突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

【0489】

一実施形態では、ERBB2/HER2突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

一実施形態では、EML4-ALK突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

【0490】

一実施形態では、ROS1突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

一実施形態では、RET突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

一実施形態では、NTRK突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

【0491】

一実施形態では、ROS1突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

一実施形態では、METエクソン14突然変異に選択的なプローブ分子のパネルが提供される。

【0492】

一実施形態では、1つまたは複数のコード配列(CDS)に選択的な複数のプローブ分子を含むパネルが提供される。

一実施形態では、以前に記載したパネルのうちの1つまたは複数を使用した、1つまたは複数の突然変異を検出する方法が提供される。

【0493】

一実施形態では、以前に記載したパネルのうちの1つまたは複数を使用した、1つもしくは複数の突然変異の存在もしくは非存在を検出する方法が提供される。

一実施形態では、以前にまたは続いて記載したものであり得るパネルを、以前にまたは続いて記載したものであり得る1つまたは複数の試薬と組み合わせて含むキットが提供される。

【0494】

当業者には、A₀を開示するキットの実施形態は、その範囲内に、複数のA₀を含むパネルが存在する実施形態を含むことが理解されよう。

当業者には、本出願の開示が、捕捉オリゴヌクレオチドB₀を含むパネルの実施形態をさらに包含することが理解されよう。これは、A₀およびB₀が同じオリゴヌクレオチドC₀の領域である実施形態を含む。

【0495】

一実施形態では、メチル化検出パネルが提供される。

一実施形態では、メチル化検出キットが提供される。

コンパニオン診断

本発明の方法は、適切な治療の選択の指導を助けるために使用し得る試料中の特定の遺伝子マーカーを検出するために、使用することができる。これらのマーカーは、腫瘍特異的な突然変異であってよい、または野生型ゲノム配列であってよく、組織、血液、または任意の他の種類の患者試料を使用して検出し得る。マーカーは後成的マーカーであり得る。

耐性のモニタリング

疾患の処置中における患者試料の繰り返し試験は、治療に対する発生した耐性の早期検

10

20

30

40

50

出を可能にし得る。この一例として、応用は非小細胞肺癌（NSCLC）においてあり、表皮成長因子受容体（EGFR）阻害剤（たとえば、ゲフィチニブ、エルロチニブ）をファーストライン処置として一般的に使用する。処置中に、腫瘍はしばしばEGFR遺伝子中に突然変異を発生することができ（たとえば、T790M、C797S）、これが薬物に対する耐性を与える。これらの突然変異の早期検出が、患者を代替治療（たとえばTagrisso）へと移行させることを可能にし得る。患者のDNAへの後成的変化が耐性の発生を示す場合がある。

【0496】

典型的には、耐性の発生についてモニタリングしている患者は、繰り返し組織生検を実施するには病気が重すぎる場合がある。また、繰り返し組織生検は、高価、浸潤性、かつ関連するリスクを抱える場合もある。血液から試験することが好ましいが、妥当な採血試料中に存在する目的の突然変異が非常に低いコピー数である場合がある。したがって、モニタリングは、定期的に行うことができるように方法の実施が単純かつ対費用効果が高い、本発明の方法を使用した血液試料からの高感度の試験を要する。

10

再発のモニタリング

本応用例では、処置の後に疾患がないと宣言された患者を、疾患の再発を検出するために経時的にモニタリングし得る。これは非浸潤的に行う必要があり、血液試料からの標的配列の高感度の検出を要する。本発明の方法を使用することによって、定期的に行うことができる単純かつ低価格な方法が提供される。標的とする配列は、目的の疾患において共通であることが知られている一般的な突然変異であり得る、または、寛解前の腫瘍組織中における変異体の検出に基づいた、具体的な患者のために設計された標的のカスタムパネルであることができる。

20

微小残存病変（MRD）のモニタリング

一部の癌では、処置後に患者中に残る残留癌細胞が存在し、これは癌および白血病における再発の主要な原因である。MRDのモニタリングおよび試験はいくつかの重要な役割を有する：処置が癌を根絶させたか、または微量が残っているかを決定すること、様々な処置の有効性を比較すること、患者の寛解状態をモニタリングすることおよび白血病の再発を検出すること、ならびにこれらのニーズを最も満たす処置を選択すること。

スクリーニング

疾患の早期検出のための集団スクリーニングは、特に癌診断学において長年の目標である。課題は二重である：多すぎない偽陰性で疾患の確信的な検出を可能にするマーカーのパネルの同定、ならびに十分な感度および十分に低い価格を有する方法の開発。本発明の方法を使用して、シーケンシングに基づく診断学よりもはるかに単純なワークフローおよび低い価格で、PCRに基づく試験よりも大きな突然変異のパネルに対処することができる。

30

臓器移植片拒絶

移植した臓器がレシピエントによって拒絶される場合、この臓器からのDNAはレシピエントの血流内に流される。このDNAの早期検出は、拒絶の早期検出を可能にするであろう。これは、ドナーに特異的なマーカーのカスタムパネルを使用して、または、ドナー中に存在し、一部がレシピエント中に存在する、集団中で共通であることが知られている変異体のパネルを使用することによって、達成することができる。臓器レシピエントの経時的なルーチンのモニタリングは、本明細書中に開示した本発明の低価格かつ単純なワークフローによって可能にすることができる。

40

非浸潤性出生前試験（NIPT）

胎児DNAが母体血中に存在することが長く知られており、NIPT市場は現在、突然変異を同定し、特定の染色体のコピー数を数えて胎児の異常の検出を可能にするためにシーケンシングを使用する企業ですっかり飽和している。本明細書中に開示した本発明の方法は、非常に低い対立遺伝子画分で突然変異を検出し、胎児DNAのより早期の検出を潜在的に可能にする能力を有する。所定の集団における共通の突然変異の同定は、母性もしくは胎児のDNAのどちらか中に存在し得る突然変異を標的とするアッセイを開発するこ

50

と、または妊娠の初期段階での異常の検出を可能にすることを可能にするであろう。

【0497】

本発明の様々なさらなる態様および実施形態は、本開示に鑑みて当業者に明らかとなるであろう。

本明細書中で使用する場合、「および／または」とは、2つの指定した特長または成分のそれぞれの、他方を伴うまたは伴わない具体的な開示として解釈されるべきである。たとえば、「Aおよび／またはB」は、それぞれが本明細書中に個々に記載されている場合と同程度に、(i) A、(ii) B、ならびに(iii) AおよびBのそれぞれの具体的な開示であるとして解釈されるべきである。

【0498】

内容によりそうでないと指示されない限りは、上に記載した特長の説明および定義は、本発明のいかなる特定の態様または実施形態に限定されず、記載されているすべての態様および実施形態に同等に適用される。

【0499】

当業者には、本発明は、いくつかの実施形態を参照して例として記載されているが、本発明は開示した実施形態に限定されず、添付の特許請求の範囲中に定義されている本発明の範囲から逸脱せずに、代替実施形態を構築することができることがさらに理解されよう。

【0500】

当業者には、「部分的に消化された鎖A₁」への言及は、標的分析物配列とハイブリダイズした場合に、3' - 5' 方向で、相補性の欠如が原因で鎖が解離するまで、αの進行的消化によって形成された一本鎖オリゴヌクレオチドをいい得ることが理解されよう。

【0501】

当業者には、「部分的に二本鎖の」核酸への言及は、1つまたは複数の部分が二本鎖であり、1つまたは複数の部分が一本鎖である核酸をいい得ることが理解されよう。

当業者には、「実質的に二本鎖」核酸への言及は、1つまたは複数の部分が二本鎖であり、1つまたは複数のより少ない部分が一本鎖である核酸をいい得ることが理解されよう。

10

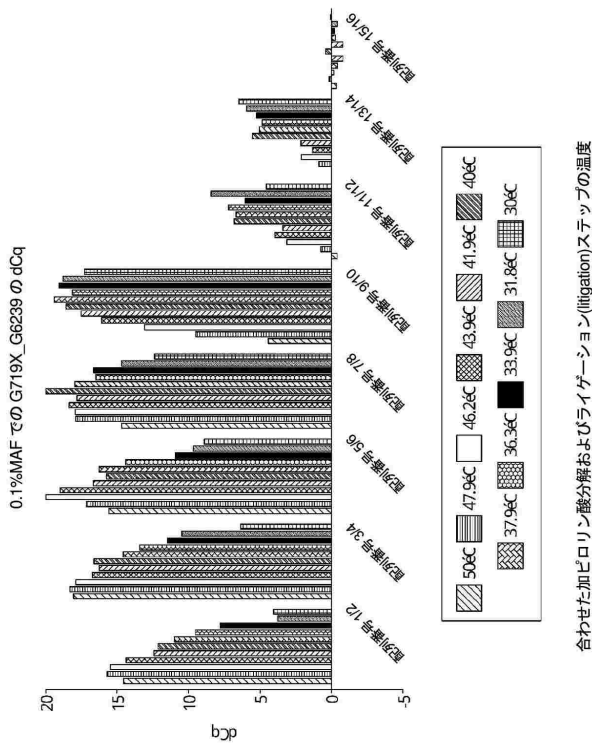
20

30

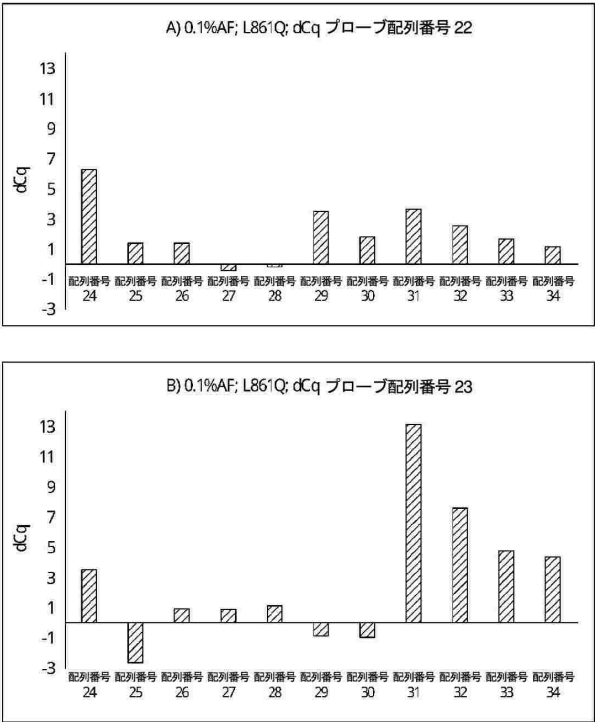
40

50

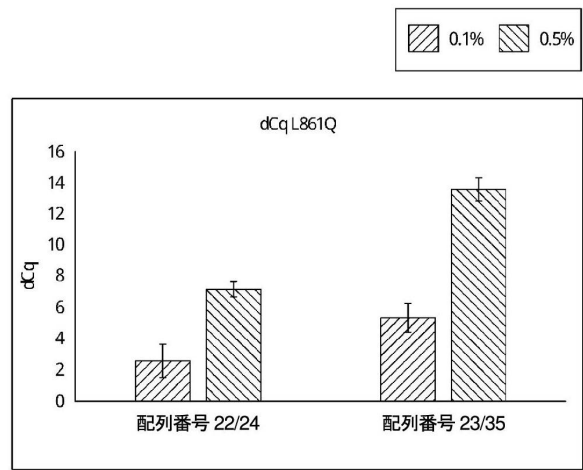
【図面】
【図 1】



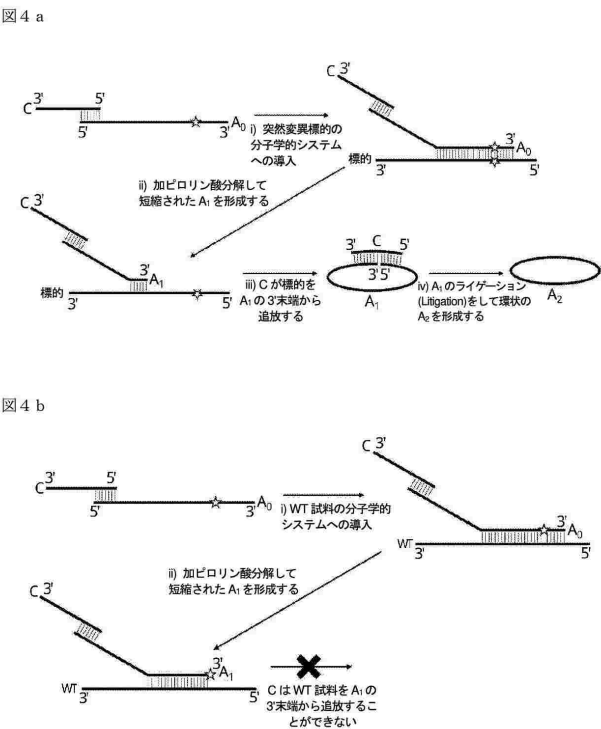
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024506706000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/050418

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6813 C12Q1/6816
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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

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

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/016590 A1 (BIOFIDELITY LTD [GB]) 23 January 2020 (2020-01-23) cited in the application the whole document specially figure 11 and page 21, 28-31 -----	1-28
X	WO 2010/120803 A2 (SOMAGENICS INC [US]; KAZAKOV SERGEI A [US] ET AL.) 21 October 2010 (2010-10-21) abstract; claim 1; figure 1 -----	1
Y	-----	3-5, 10, 11
X	EP 2 733 221 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO LTD [KR]) 21 May 2014 (2014-05-21) figure 1 -----	1
Y	-----	3-5, 10, 11
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 2022

Date of mailing of the international search report

30/05/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Costa Roldán, Nuria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/GB2022/050418
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:	
a.	☒ forming part of the international application as filed:	
	☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.	
	☐ on paper or in the form of an image file.	
b.	☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.	
c.	☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:	
	☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).	
	☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/050418

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIJUAN OU ET AL: "Rolling Circle Amplification-Based Biosensors", ANALYTICAL LETTERS, vol. 48, no. 8, 24 May 2015 (2015-05-24), pages 1199-1216, XP055340053, US ISSN: 0003-2719, DOI: 10.1080/00032719.2014.979354	1
Y	abstract; figures 1,6	3-5,10,11
A	----- R. INGRAM ET AL: "PAP-LMPCR for improved, allele-specific footprinting and automated chromatin fine structure analysis", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 36, no. 3, 21 January 2008 (2008-01-21), page e19, XP055755437, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkm1159 abstract; figure 1	1-28
A	----- US 2004/009515 A1 (LIU QIANG [US] ET AL) 15 January 2004 (2004-01-15) abstract; claims 1-4,19; figure 1	1-28

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2022/050418

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020016590	A1	23-01-2020	AU 2019307835 A1	28-01-2021
			CA 3103754 A1	23-01-2020
			CN 112424379 A	26-02-2021
			EP 3682030 A1	22-07-2020
			EP 3889273 A1	06-10-2021
			ES 2874753 T3	05-11-2021
			JP 6947464 B2	13-10-2021
			JP 2021524287 A	13-09-2021
			KR 20210033981 A	29-03-2021
			SG 11202100163T A	25-02-2021
			US 2020354786 A1	12-11-2020
			US 2021180122 A1	17-06-2021
			WO 2020016590 A1	23-01-2020
WO 2010120803	A2	21-10-2010	EP 2419537 A2	22-02-2012
			US 2012164651 A1	28-06-2012
			US 2015211046 A1	30-07-2015
			US 2016115523 A1	28-04-2016
			US 2017159106 A1	08-06-2017
			WO 2010120803 A2	21-10-2010
EP 2733221	A1	21-05-2014	CN 103820436 A	28-05-2014
			EP 2733221 A1	21-05-2014
			JP 6455864 B2	23-01-2019
			JP 2014100144 A	05-06-2014
			KR 20140064094 A	28-05-2014
			US 2014141418 A1	22-05-2014
US 2004009515	A1	15-01-2004	US 2004009515 A1	15-01-2004
			US 2005095608 A1	05-05-2005
			US 2007298428 A1	27-12-2007
			US 2009239283 A1	24-09-2009
			US 2010129871 A1	27-05-2010
			US 2011124051 A1	26-05-2011

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

ダレーナ

イギリス国 シービー4 0ダブリューエヌ ケンブリッジ, ミルトン・ロード, ケンブリッジ・サ
イエンス・パーク 330, バイオフィデリティ・リミテッド

(72)発明者 ダ シルバーウェザリー, アナ・ルイーザ・ブラス・ドス・サントス・リベイロ

イギリス国 シービー4 0ダブリューエヌ ケンブリッジ, ミルトン・ロード, ケンブリッジ・サ
イエンス・パーク 330, バイオフィデリティ・リミテッド

(72)発明者 バームフォース, バーナビー・ウィリアム

イギリス国 シービー4 0ダブリューエヌ ケンブリッジ, ミルトン・ロード, ケンブリッジ・サ
イエンス・パーク 330, バイオフィデリティ・リミテッド

F ターム (参考) 4B063 QA13 QA19 QQ42 QQ52 QR06 QR08 QR14 QR32 QR35 QR55
QR62 QR82 QR90 QS24 QS34 QS36 QX01