

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501836

(P2006-501836A)

(43) 公表日 平成18年1月19日(2006.1.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 5 4
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N 21/78 C	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁)

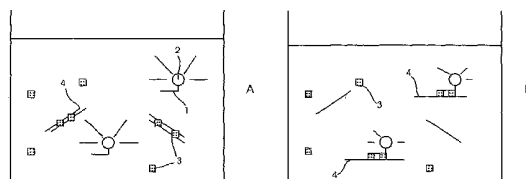
(21) 出願番号	特願2004-542659 (P2004-542659)	(71) 出願人	390040604
(86) (22) 出願日	平成15年10月10日 (2003.10.10)		イギリス国
(85) 翻訳文提出日	平成17年5月31日 (2005.5.31)		THE SECRETARY OF ST
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/004412		ATE FOR DEFENCE IN
(87) 国際公開番号	W02004/033726		HER BRITANNIC MAJES
(87) 国際公開日	平成16年4月22日 (2004.4.22)		TY'S GOVERNMENT OF
(31) 優先権主張番号	0223563.8		THE UNETED KINGDOM
(32) 優先日	平成14年10月10日 (2002.10.10)		OF GREAT BRITAIN AN
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		D NORTHERN IRELAND
			イギリス国 ウィルシャー エスピー4
			ोजェイキュー ソールズベリー ポート
			ンダウン ディーエステーエル
		(74) 代理人	100062007
			弁理士 川口 義雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検出システム

(57) 【要約】

(a) 標的核酸配列を含有していると思われる試料に、前記標的配列に対して特異的な蛍光標識されたプローブと、該プローブ上の前記蛍光標識から生じる蛍光エネルギーを吸収することができる可視光を発しないDNA二重鎖結合物質とを添加すること、(b) このようにして形成された混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供すること、(c) 前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること、(d) 前記試料から得られる蛍光をモニターすることを含む、試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法。この方法は、試料中に存在する標的配列の量が測定できるように、例えば、PCR反応等の増幅反応をモニターするのに使用できる。これに加えて又はこれに代えて、増幅をモニタリングするための又は多型若しくは対立遺伝子変異を検出若しくは低了するための融解ヒステシス情報等の二重鎖の不安定化データを作成するのに使用できるため、遺伝子診断に役に立つ。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 標的核酸配列を含有していると思われる試料に、前記標的配列に対して特異的な蛍光標識されたプローブと、該プローブ上の前記蛍光標識から生じる蛍光エネルギーを吸収することができるが可視光を発しない DNA 二重鎖結合物質とを添加すること、

(b) このようにして形成された混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供すること、

(c) 前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること、

(d) 前記試料から得られる蛍光をモニターすること、
を含む、試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法。

10

【請求項 2】

前記 DNA 二重鎖結合物質が縮合共役環系を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 DNA 二重鎖結合物質が、ミトキサントロン(1, 4 - ジヒドロキシ 5, 8 - ビス[[2 - [(2 - ヒドロキシエチル)アミノ]エチル]アミノ] - 9, 10 - アントラセンジオン)又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、ノガラマイシン(2R - (2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 14) - 11 - [6 - デオキシ - 3 - C - メチル - 2, 3, 4 - トリ - O - メチル - L - マンノピラノシル)オキシ] - 4 - (ジメチルアミノ) - 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 16 - デカヒドロ - 3, 5, 8, 10, 13 - ペンタヒドロキシ - 6, 13 - ジメチル - 9, 16 - ジオキソ - 2, 6 - エポキシ - 2H - ナフタセノ[1, 2 - b]オキソシン - 14 - カルボン酸メチルエステル)又はダウノマイシン(8S, - シス) - 8 - アセチル - 10 - [3 - アミノ - 2, 3, 6 - トリデオキシ - L - lyxo - ヘキソピラノシル)オキシ] - 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 6, 8, 11 - トリヒドロキシ - 1 - メトキシ - 5, 12 - ナフタセンジオン)である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

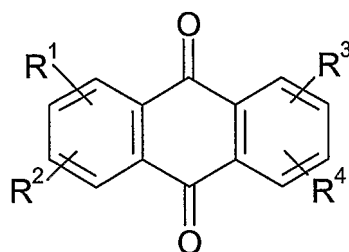
前記 DNA 結合物質がミトキサントロンである請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 DNA 結合物質が式 (I)

30

【化 1】



(IA)

40

[式中、R¹、R²、R³及びR⁴は、水素、X、NH - ANHR及びNH - A - N(O)R'R''から独立に選択される(式中、Xはヒドロキシ、ハロ、アミノ、C₁ - 4アルコキシ又はC₂ - 8アルカノイルオキシであり、AはNHとNHR又はN(O)R'R''との間の鎖長が少なくとも2炭素原子であるC₂ - 4アルキレン基であり、R、R'及びR''は、C₁ - 4アルキル及びC₂ - 4ヒドロキシアルキル及びC₂ - 4ジヒドロキシアルキルから各々独立に選択される(但し、窒素原子に結合した炭素原子はヒドロキシ基を有しておらず、何れの炭素原子も2個のヒドロキシ基によって置換されていないものとする。)、又はR'とR''は、両者で、C₂ - 6アルキレン基であり、R'及びR''が結合する窒素原子とともに、3ないし7個の原子を有する複素環を形成しており、但し、R¹、R²、R³及びR⁴のうち少なくとも1個はNH - A - N(O)R'R''基である。]

50

）。】

の化合物である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (c) におけるプローブへのハイブリダイゼーションに先立って前記標的核酸が一鎖にされる、請求項 1 から 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である、請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記増幅反応のすべてのサイクル中に前記プローブが前記標的核酸とハイブリダイズする、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 9】

前記増幅反応全体を通して前記試料から生じた蛍光がモニターされる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

生成された蛍光データがプローブハイブリダイゼーションの割合を測定するために使用される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記蛍光データが前記試料中に存在する標的核酸の量を定量するために使用される、請求項 8 から 10 の何れか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 12】

前記蛍光標識がローダミン色素、Cy5、フルオレセイン又はフルオレセイン誘導体である、請求項 1 から 11 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記蛍光標識が前記プローブの末端領域に結合されている、請求項 1 から 12 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記蛍光標識が前記プローブの 3' 末端に結合されており、ポリメラーゼによるプローブの伸長を防止する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記プローブが伸長段階以外の増幅工程の段階の間に前記標的配列から無傷の状態で放出されるように、前記プローブが設計されている、請求項 1 から 14 の何れか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 16】

前記プローブが、増幅工程の伸長段階の間に、前記ポリメラーゼの作用によって前記標的配列から無傷の状態で放出され、前記増幅反応が 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いたポリメラーゼを用いて行われる、請求項 1 から 14 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

(a) 核酸ポリメラーゼと、(b) 標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズできる少なくとも一つのプライマーと、(c) 前記標的ポリヌクレオチド配列に結合でき、蛍光標識を含有するオリゴヌクレオチドプローブと、(d) 前記蛍光標識から蛍光エネルギーを吸収することができ且つスペクトルの可視域で光を発しない DNA 二重鎖結合物質と、の存在下において、標的ポリヌクレオチドに対して核酸増幅を実施すること、及び増幅反応中の蛍光の変化をモニターすることを含む、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 18】

1 対の増幅プライマーを使用して前記増幅が好適に実施される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記核酸ポリメラーゼが耐熱性ポリメラーゼである、請求項 17 又は 18 に記載の方法。 50

【請求項 20】

さらなる工程において、ハイブリダイゼーションアッセイが実施され、前記配列に特有のハイブリダイゼーション条件が測定される、請求項 1 から 19 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記条件が温度、電気化学的ポテンシャル又は酵素若しくは化学物質との反応である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記条件が温度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

標的配列中の対立遺伝子変異又は多型を検出するために使用される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

a) 配列を含有すると思われる試料に、標的配列に対して特異的な蛍光標識プローブと、該プローブ上の蛍光標識から生じる蛍光を吸収することができるがスペクトルの可視域において放射を発しない DNA 二重鎖結合物質とを添加すること、

(b) 前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること

(c) 前記試料から生じる蛍光をモニターし、前記プローブの前記試料へのハイブリダイゼーションの結果として又は前記プローブと前記標的核酸配列との間で形成された前記二重鎖の不安定化の結果として蛍光が変化する、前記配列に特有の反応条件を決定すること、

を含む、配列の特徴を決定する方法。

【請求項 25】

前記配列に特有の前記反応条件が、温度、電気化学的ポテンシャル又は酵素若しくは化学物質との反応である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記条件が温度である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

2 個の配列から得られた結果が、の間の多型又は変異の存在を決定するために比較される、請求項 24 から 26 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 DNA 二重鎖結合物質が、ミトキサントロン (1, 4 - ジヒドロキシ 5, 8 - ビス [[2 - [(2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エチル] アミノ] - 9, 10 - アントラセンジオン) 又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、ノガラマイシン (2 R - (2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 14)) - 11 - [6 - デオキシ - 3 - C - メチル - 2, 3, 4 - トリ - O - メチル - L - マンノピラノシル] オキシ] - 4 - (ジメチルアミノ) - 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 16 - デカヒドロ - 3, 5, 8, 10, 13 - ペンタヒドロキシ - 6, 13 - ジメチル - 9, 16 - ジオキソ - 2, 6 - エポキシ - 2 H - ナフタセノ [1, 2 - b] オキソシン - 14 - カルボン酸メチルエステル) 又はダウノマイシン (8 S, - シス) - 8 - アセチル - 10 - [3 - アミノ - 2, 3, 6 - トリデオキシ - L - l y x o - ヘキソピラノシル] オキシ] - 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 6, 8, 11 - トリヒドロキシ - 1 - メトキシ - 5, 12 - ナフタセンジオン) である、請求項 24 から 27 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 DNA 二重鎖結合物質が請求項 5 に定義した式 (I A) の化合物である、請求項 24 から 27 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

(i) 蛍光エネルギーを吸収することができるがスペクトラムの可視域で放射を発しない DNA 二重鎖結合物質と、(i i) 標的ヌクレオチド配列に特異的な蛍光標識プローブ

10

20

30

40

50

又は (i i i) 増幅反応を実施するのに必要な 1 若しくは複数の試薬のうち何れかと、を備えた、請求項 1 から 29 の何れか 1 項に記載の方法で使用するためのキット。

【請求項 31】

(i i i) を含有し、前記試薬がプライマー、DNA ポリメラーゼ、緩衝液、又は PCR を改良することが知られた補助剤から選択される、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

前記 DNA 二重鎖結合物質が、ミトキサントロン (1 , 4 - ジヒドロキシ 5 , 8 - ビス [[2 - [(2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エチル] アミノ] - 9 , 10 - アントラセンジオン) 又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、ノガラマイシン (2 R - (2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 11 , 13 , 14)] - 11 - [6 - デオキシ - 3 - C - メチル - 2 , 3 , 4 - トリ - O - メチル - L - マンノピラノシル) オキシ] - 4 - (ジメチルアミノ) - 3 , 4 , 5 , 6 , 9 , 11 , 12 , 13 , 14 , 16 - デカヒドロ - 3 , 5 , 8 , 10 , 13 - ペンタヒドロキシ - 6 , 13 - ジメチル 1 - 9 , 16 - ジオキソ - 2 , 6 - エポキシ - 2 H - ナフタセノ [1 , 2 - b] オキソシン - 14 - カルボン酸メチルエステル) 又はダウノマイシン (8 S , - シス) - 8 - アセチル - 10 - [3 - アミノ - 2 , 3 , 6 - トリデオキシ - L - lyxo - ヘキソピラノシル) オキシ] - 7 , 8 , 9 , 10 - テトラヒドロ - 6 , 8 , 11 - トリヒドロキシ - 1 - メトキシ - 5 , 12 - ナフタセンジオン) である、請求項 30 又は 31 に記載のキット。

10

【請求項 33】

前記 DNA 二重鎖結合物質が請求項 5 に定義した式 (I A) の化合物である、請求項 30 又は 31 に記載のキット。

20

【請求項 34】

(i) 及び (i i) の両方を備えた、請求項 28 から 33 の何れか 1 項に記載のキット。

【請求項 35】

試料中の標的核酸配列の存在を検出するための方法における、蛍光エネルギーを吸収できるが可視光を発しない DNA 二重鎖結合物質の使用。

【請求項 36】

前記 DNA 二重鎖結合物質が共役芳香環系を含む、請求項 35 に記載の使用。

【請求項 37】

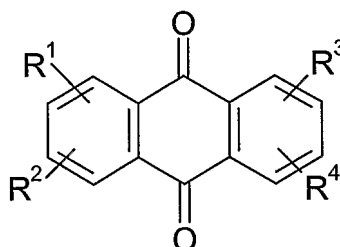
前記 DNA 二重鎖結合物質がアントラサイクリン又はアントラキノンを含む、請求項 36 に記載の使用。

30

【請求項 38】

前記 DNA 二重鎖結合物質が必要に応じて置換された構造 (I) のアントラキノン

【化 2】



(I)

40

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、水素、官能基、又は例えば官能基によって必要に応じて置換されたヒドロカルビル基から独立に選択されるか、又は、 R^1 と R^2 又は R^3 と R^4 が、必要に応じて互いに結合されて、ヘテロ原子を必要に応じて含有し及び / 又は官能基又はヒドロカルビル基によって必要に応じて置換された環を形成する。) である、請求項 35 乃至 37 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 39】

50

前記DNA二重鎖結合物質が、ミトキサントロン(1, 4-ジヒドロキシ5, 8-ビス[[2-[(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エチル]アミノ]-9, 10-アントラセンジオン)又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、ノガラマイシン(2R-(2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 14))-11-[6-デオキシ-3-C-メチル-2, 3, 4-トリ-O-メチル-L-マンノピラノシル]オキシ]-4-(ジメチルアミノ)-3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 16-デカヒドロ-3, 5, 8, 10, 13-ペンタヒドロキシ-6, 13-ジメチル-9, 16-ジオキソ-2, 6-エポキシ-2H-ナフタセノ[1, 2-b]オキソシン-14-カルボン酸メチルエステル)又はダウノマイシン(8S, -シス)-8-アセチル-10-[3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ-L-lyxo-ヘキソピラノシル]オキシ]-7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-1-メトキシ-5, 12-ナフタセンジオン)である、請求項35から38の何れか1項に記載の使用。

10

【請求項40】

前記DNA二重鎖結合物質が請求項5に定義した式(IA)の化合物である、請求項35から38の何れか1項に記載の使用。

【請求項41】

前記DNA二重鎖結合物質がミトキサントロンである、請求項39に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、例えば、増幅反応を定量的にモニターすることによって、試料中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法、並びにこれらの方法で使用するためのプローブ及びキットを提供する。本方法は、多型又は対立遺伝子変異を検出するのに特に適しており、従って、診断方法に使用することができる。

【背景技術】

【0002】

公知の蛍光ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)モニタリング技術は、第二世代PCRの僅かなサーマルサイクリング装置上で使用できる、ストランド特異的なDNAインターカレーター技術と非特異的なDNAインターカレーター技術とがある。これらの反応は、サーマルサイクラー上において閉管形式で均一に実行される。反応は、蛍光計を用いてモニターされる。アッセイの正確な形態は様々であるが、増幅生成物の存在を示すシグナルを発生させるために、システム内の2つの蛍光成分間で行われる蛍光エネルギー転移、すなわちFETに依存することが多い。

30

【0003】

WO 99/28500は、試料中の標的核酸配列の存在を検出するための極めて優れたアッセイについて記述している。この方法では、DNA二重鎖結合物質と前記標的配列に特異的なプローブとを試料に添加する。このプローブは、前記DNA二重鎖結合物質から生じる蛍光を吸収することができるか、又は前記DNA二重鎖結合物質に蛍光エネルギーを供与できる反応性分子を備えている。次に、標的核酸を増幅する増幅反応にこの混合物を供し、前記プローブが標的配列にハイブリダイズする増幅過程期間の間又は期間後に、条件を誘導する。前記試料から生じる蛍光をモニターする。

40

【0004】

プローブが標的配列にハイブリダイズすると、インターカレート色素等のDNA二重鎖結合物質がストランド間に捕捉される。通常、これにより、前記色素に伴う波長の蛍光が増加する。しかし、反応性分子が色素から生じた蛍光を吸収できる場合には(すなわち、アクセプター分子である場合)、反応性分子は、FET、特にFRETを用いて、色素から生じた発光エネルギーを受容するので、特有の波長で蛍光を発する。色素の蛍光とは波長が異なるため、アクセプター分子から生じる蛍光の波長が増加することは、プローブが二重鎖で結合することを示唆する。

【0005】

50

同様に、反応性分子が色素に蛍光を供与できる場合（すなわちドナー分子である場合）には、FRETの結果としてドナー分子からの発光が減少し、この減少を検出することができる。色素の蛍光は、これらの状況下では、予測された以上に増加する。

【0006】

プローブ上の反応性分子から生じるシグナルはストランド特異的なシグナルであり、試料内に標的が存在することの指標となる。このように、プローブを含む二重鎖の形成又は不安定化の指標となる、反応性分子から生じる蛍光のシグナル変化をモニターすることが好ましい。

【0007】

本方法に使用し得るDNA二重鎖結合物質（DNA duplex binding agent）は、それ自体二重鎖の形態のDNAに接着又は会合し且つエネルギードナー又はアクセプターとして作用することができる任意の物質である。具体例は、本分野において周知であるインターカレート色素である。

【0008】

二重標識されたプローブが必要とされる他のアッセイに比べて、これらの成分はずっと経済的である点で、単一標識されたインターカレート色素やプローブなどのDNA二重鎖結合物質を使用することは有利である。ただ1つのプローブを用いることによって、プローブの基礎を形成するために必要な公知の配列の長さを比較的短くすることができるので、本方法は、困難な診断状況においても使用することが可能である。

【0009】

前記アッセイで使用されるDNA二重鎖結合物質は、典型的には、インターカレート色素、例えば、それ自身蛍光性であるSYBR Green I、SYBR Gold、臭化エチジウム及びYOYO-1等のSYBR Greenである。

【0010】

反応性分子と色素の間にFRETなどのEFTが生じるためには、前記ドナー（インターカレート色素又はプローブ上の反応性分子のうち何れでもよい）の蛍光発光は、アクセプター（すなわち、色素又は反応性分子のうち残りの一方）より波長が短くなければならない。ドナー及び/又はアクセプターとして使用される分子によって生じた蛍光シグナルは、可視スペクトル中のピークとして表れ得る。

【0011】

一般的には、発光の波長には重複が少なくとも幾らか存在するであろう。シグナルが先鋭なピークである場合でさえ、蛍光分子からシグナルが幾らか「漏出」するので、プローブによって生成されたストランド特異的なピークを、DNA二重鎖結合物質のシグナルから分離する必要があるのが一般的である。これは、例えば、ドナーとアクセプターのスペクトル間の関係を経験的に決定し、この関係を使用してドナー及びアクセプターからのシグナルを標準化することによって、行うことができる。

【0012】

本出願人は、この種のアッセイを実施する改良法を発見するに至った。

【0013】

本発明は、

（a）標的核酸配列を含有していると思われる試料に、前記標的配列に対して特異的な蛍光標識したプローブと、該プローブ上の前記蛍光標識から生じる蛍光エネルギーを吸収できるが可視光を発しないDNA二重鎖結合物質を添加すること、

（b）このようにして形成された混合物を標的核酸が増幅される増幅反応に供すること、

（c）前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること、

（d）前記試料から得られる蛍光をモニターすること、を含む試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法を提供する。

【0014】

本明細書で使用する「可視光」という表現は、スペクトルの可視域にある放射 (r a d i a t i o n) を表し、すなわち、390nmないし750nmの範囲にある波長の放射である。

【0015】

スペクトルの可視域で光を発しないDNA二重鎖結合物質を使用することによって、プローブのシグナルと重複し得るシグナルを与えるという問題が回避される。このように、DNA二重鎖結合物質から生じるシグナルからプローブのシグナルを分離する必要性はなくなり、意味のあるシグナルが測定できるバンド幅をさらに広く利用することが可能である。つまり、装置、又は少なくとも装置に配置される計算条件 (c o m p u t a t i o n a l r e q u i r e m e n t) を簡素化することができる。

10

【0016】

従って、前記アッセイは、より広範な機器で実行できる。

【0017】

或いは、2個以上の標的を同時にモニターできるように、異なる波長で蛍光を発する様々な標識を含むプローブをさらに取り込ませることによって、可視スペクトル中の使用されていないバンド幅の任意の領域を活用することができる。これは、多重PCR反応の場合では特に有益であると考えられる。

【0018】

DNA二重鎖結合物質がスペクトルの可視部分で放射を発しなれば、使用するDNA二重鎖結合物質は二重鎖に結合する任意の化合物とすることができる。従って、前記DNA二重鎖結合物質は、インターカレート剤、副溝結合剤、DNAの主溝と結合する化合物、又はプローブの末端塩基上に結合するか若しくは堆積する化合物、並びにこれらの組み合わせとすることができる。特定の実施形態では、前記DNA二重鎖結合物質はインターカレート剤又は副溝結合剤を含むであろう。前記DNA二重鎖結合物質は、スペクトルの可視域外の波長、例えば、赤外線範囲で放射を発することがある。しかし、本発明の方法においては、このような発光は検出できないと思われるので、事実上、DNA二重鎖結合物質は、「暗消光剤 (D a r k Q u e n c h e r) 」として働くにすぎない。

20

【0019】

このような化合物は蛍光インターカレート色素よりずっと経済的であることが多いので、本発明の費用対効果はさらに高いものとなる。

30

【0020】

このように使用することができる適切なDNA結合剤の例には、共役芳香環系を有するDNA結合剤がある。環は、フェニル、ナフチル若しくはアントラセン環等のアリール環、又は、例えば、原子を最大20個含有し、そのうち最大5個が酸素、硫黄及び窒素等のヘテロ原子である複素芳香環であり得る。このような系の例として、アントラサイクリン又はアントラキノンが挙げられる。これらは、適切なDNA結合特性を提供するために、置換してもよい。

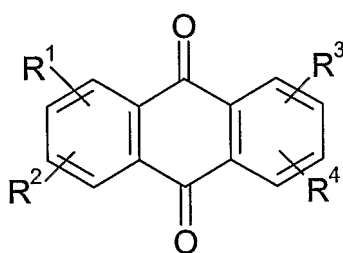
【0021】

特に、この化合物は、必要に応じて置換された構造 (I) のアントラキノンを含み、

【0022】

40

【化3】



(I)

50

【0023】

式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は水素、官能基、若しくは例えば官能基によって必要に応じて置換されたヒドロカルビル基から独立に選択され、又は R^1 と R^2 又は R^3 と R^4 は、必要に応じて互いに結合して、ヘテロ原子を必要に応じて含有し及び/又は官能基又はヒドロカルビル基によって必要に応じて置換された環を形成する。

【0024】

本明細書において使用する「官能基」という用語は、反応性の基、好適にはヘテロ原子を含有する反応性の基を表す。官能基の例には、ハロ、シアノ、ニトロ、オキソ、 $-OC(O)R^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $S(O)_tR^a$ 、 NR^bR^c 、 $OC(O)NR^bR^c$ 、 $C(O)NR^bR^c$ 、 $OC(O)NR^bR^c$ 、 $-NR^7C(O)_nR^6$ 、 $-NR^aCONR^bR^c$ 、 $-C= NOR^a$ 、 $-N=CR^bR^c$ 、 $S(O)_tNR^bR^c$ 、 $C(S)_nR^a$ 、 $C(S)OR^a$ 、 $C(S)NR^bR^c$ 又は $-NR^bS(O)_tR^a$ (式中、 R^a 、 R^b 及び R^c は、独立に、水素又は必要に応じて置換されたヒドロカルビルから選択されるか、又は R^b と R^c の両方で、必要に応じて置換され、 $S(O)_s$ 、酸素及び窒素などのヘテロ原子を必要に応じてさらに含有する環を形成し、 n は 1 又は 2 の整数であり、 s は 0、1 又は 2 の整数であり、 t は 0 又は 1 - 3 の整数である。) が含まれる。

10

【0025】

ヒドロカルビル基に対する適切な置換基 R^a 、 R^b 及び R^c は、官能基としてもよい。

【0026】

本明細書において使用する「ヒドロカルビル」という用語は、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール又はアラルキルなど、炭素と水素原子を有する有機性の基を表す。「アルキル」という用語は、好適には最大 20、より好適には最大 10、好ましくは最大 6 の炭素原子を含有する直鎖又は分枝鎖アルキル基を表す。「アルケニル」又は「アルキニル」という用語は、2 ないし 10 の炭素原子を有する不飽和の直鎖又は分枝鎖を表す。「シクロアルキル」という用語は、少なくとも 3 つの炭素原子を有し、構造が環状であるアルキル基を表す。「アリール」という用語は、フェニル及びナフチルなどの芳香環を表す。アラルキルという用語は、ベンジルなどのアリール基によって置換されたアルキル基を表す。

20

【0027】

R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 の置換基の具体例は、ケトエノール互変異性を生じるヒドロキシ基である。

30

【0028】

好ましくは、前記化合物は、DNA への結合を補助する電荷を提供するために 1 つ以上のヘテロ原子を含有する。酸素、窒素又は硫黄等のヘテロ原子は置換基の側鎖に含まれていてもよい。ある種の実施例では、式 (I) の化合物は、置換基 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 内に少なくとも 1 つの窒素原子を含む。

【0029】

このような化合物の例は、製薬分野で、特に DNA 結合機能の結果としての抗癌又は抗菌用途において見出すことができる。例えば、本発明のアッセイで DNA 結合剤としての使用に適した特性を有すると思われる化合物については、米国特許第 4197249 号、米国特許第 3183157 号、米国特許第 4012284 号及び米国特許第 3997662 号に記述がある。

40

【0030】

他の具体的な化合物は式 (IA) の化合物であり、米国特許 513327 に記載されている。これらの化合物は、上記式 (I) の化合物であるが、この化合物の場合、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、水素、X、NH-ANHR 及び NH-A-N(O) R' R'' から独立に選択され (式中、X はヒドロキシ、ハロ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ又は C_{2-8} アルカノイルオキシであり、A は NH と ANHR 又は N(O) R' R'' との間の鎖長が少なくとも 2 炭素原子である C_{2-4} アルキレン基であり、 R 、 R' 及び R'' は、 C_{1-4} アルキル及び C_{2-4} ヒドロキシアルキル及び C_{2-4} ジヒドロキシアルキルから各々独立

50

に選択されるか（但し、窒素原子に結合した炭素原子はヒドロキシ基を有しておらず、何れの炭素原子も2個のヒドロキシ基によって置換されていないものとする。）、又はR'とR''は、両者で、C₂-6アルキレン基であり、R'及びR''が結合する窒素原子とともに、3ないし7個の原子を有する複素環を形成している。）、但し、R¹、R²、R³及びR⁴のうち少なくとも1個はNH-A-N(O)R'R''基である。具体例は米国特許第5132,327号に記載されており、その内容を参照により本明細書に援用する。

【0031】

本発明においてDNA二重鎖結合物質として使用するのに適切な可能性がある化合物は、例えば、従来の方法を用いて、特定の標識、又は多種類の標識からの蛍光エネルギーを吸収するか否かを確認するため、試験することができる。特に、消光特性を試験するため、また、増幅反応そのものの進行を妨害させないようにするため、標識プローブ、又はある場合にはSybr Green若しくはSybr Gold等の蛍光インターカレート剤であり得る蛍光剤を用いたPCR反応に、前記化合物を導入してもよい。この試験を実行するのに適したプロトコルは本明細書の実施例3に記載されている。

10

【0032】

具体例は、ミトキサントロン（1,4-ジヒドロキシ5,8-ビス[[2-[(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エチル]アミノ]-9,10-アントラセンジオン）又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、ノガラマイシン（2R-(2,3,4,5,6,11,13,14)-11-[6-デオキシ-3-C-メチル-2,3,4-トリ-O-メチル-L-マンノピラノシル)オキシ]-4-(ジメチルアミノ)-3,4,5,6,9,11,12,13,14,16-デカヒドロ-3,5,8,10,13-ペンタヒドロキシ-6,13-ジメチル1-9,16-ジオキソ-2,6-エポキシ-2H-ナフタセノ[1,2-b]オキソシン-14-カルボン酸メチルエステル）又はダウノマイシン（8S,-シス)-8-アセチル-10-[3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-lyxo-ヘキソピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオン）がある。

20

【0033】

その他の具体例には、米国特許第5132327号（EP-A-0450021）に記載されている化合物があり、特に、Biosstatusの商標名で販売されている細胞浸透性DNA化合物、「Draq5」、及び「Apopttrak」の商標名で販売されているNオキシド誘導体が挙げられる。

30

【0034】

本発明で使用するDNA二重鎖結合物質の具体的なグループは、ミトロキサノン（mitroxanone）、ダウノマイシン、Draq5（TM）及びApopttrak（TM）である。

【0035】

特定の実施形態では、前記DNA二重鎖結合物質はミトキサントロンである。

【0036】

これに代えて又はこれに加えて、4-(4-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸（DABCYL）等の消光成分を、公知のDNA結合剤、インターカレート剤、又は副溝若しくは主溝結合剤に結合、好ましくは共有結合させてもよい。この場合、前記消光成分によって完全に消光されるのであれば、前記DNA結合剤はある程度の蛍光を有してもよい。これらの化合物は、二重鎖安定化効果を有する。これは、2つの点で有利である。第一に、プローブの標的への結合を向上させるため増幅時の温度変化に要する時間が短縮され、このため、反応をさらに迅速に実行できるようになる。第二に、さらに短い核酸配列をプライマー及びプローブに使用できる。プローブが短いほどミスマッチが原因で生じる融点の差が著しくなるので、これは、一般的に、例えば融点分析を行う場合に有用である。プローブ及びプライマーのアニリングに必要とされ得る温度が低いために長いプライマー及びプローブが反応の特異性を低減させることがある、例えばATリッチな標的におい

40

50

て特に有益であろう。

【0037】

一重鎖形態の場合でも、プローブは前記DNA二重鎖結合物質の消光効果のある程度知覚することができる。しかし、二重鎖DNAの場合には、著しくかつ区別可能なように、消光がさらに顕著なものとなるであろう。リガンド間では会合が形成されないの、一般的に、本システム中に存在する何れの遊離標識も、前記DNA二重鎖結合物質による消光の対象にはならないであろう。

【0038】

好適には、反応混合物に添加されるDNA二重鎖結合物質の量は、蛍光標識から生じたシグナルを測定可能に消光させるには十分であるが、増幅を阻害するには十分でない量である。これを達成する濃度の範囲は、使用した厳密なDNA二重鎖結合物質により異なり、下記に例示されている慣用の方法で測定することができる。ミトキサントロン又はダウノマイシン等のDNA二重鎖結合物質の場合、 $1\mu\text{M}$ ないし $100\mu\text{M}$ のオーダーの濃度、好適には約 $10\mu\text{M}$ ないし $25\mu\text{M}$ の濃度が使用されるであろう。Draq5の場合は、 $1\mu\text{M}$ ないし $100\mu\text{M}$ の範囲の濃度、好ましくは約 $50\mu\text{M}$ の濃度が単一標識されたフルオレセインプローブの消光に有効である。フルオレセイン標識されたプローブを十分に消光するためには、さらに高濃度（例えば、 1mM ）のApopttrak(TM)が必要となる場合がある。

10

【0039】

本発明の方法は極めて多用途に使用できる。詳細は後述するが、試料中の標的核酸配列の定量及び定性的なデータの作成に本方法を使用できる。特に、本発明は定量的増幅を提供するだけでなく、これに加えて又はこれに代えて、二重鎖を不安定にする温度又は融点等の特徴的データを得るためにも使用できる。

20

【0040】

本発明の方法では、前記試料は、増幅反応の前、間又は後で、プローブが試料にハイブリダイズする条件に供することができる。従って、最初に単一の容器に全試薬を加えて増幅及びモニターができる点で、本方法は均一な様式での検出を可能とする。その後、試薬を添加する工程は不要である。固体支持体の存在下で本方法を行う必要もない（これも選択可能である。）。

【0041】

プローブは、標的核酸配列にハイブリダイズすると思われるDNA又はRNA（RNAの場合は一本鎖の形態のRNA）等の核酸分子を含むことができる。この例では、工程(c)は、標的核酸を一本鎖とする条件を使用することを含むことになるであろう。

30

【0042】

プローブは、溶液中に遊離させてもよいし、固相支持体上に、例えば、磁気ビーズ（産物を分離するのに有用である）などのビーズの表面に又は表面プラズモン共鳴検出器の導波管などの検出装置の表面に固定してもよい。何れを選択するかは、観察しているアッセイの性質や使用している検出手段に応じて決められるであろう。

【0043】

特に、用いる増幅反応には、試料中に存在する標的核酸配列のすべてが一本鎖となる条件に前記試料を供する工程が含まれることになるであろう。このような増幅反応にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又はリガーゼ連鎖反応(LCR)があるが、PCR反応が好ましい。

40

【0044】

ハイブリダイゼーション条件が適切であれば、増幅反応の経過中にプローブはハイブリダイズすることが可能である。

【0045】

好ましい実施形態では、増幅反応の各サイクルの最中にこれらの条件を満たすように、プローブを設計することも可能である。このように、増幅反応の各サイクル中のある時点で、プローブは標的配列にハイブリダイズし、それにより、プローブと標的配列間に捕捉

50

されたDNA二重鎖結合物質に近接した結果として蛍光シグナルは消光するであろう。増幅が進行するにつれて、標的配列からプローブは分離されるか、又は融解され、プローブによって生じたシグナルは回復されるであろう。すなわち、増幅の各サイクルにおいて、プローブがアニールされる時点で蛍光標識から蛍光ピークを発生する。プローブの結合にさらに多くの標的配列を利用できるようになるため、ピークの強度は増幅が進行するにつれて低下するであろう。

【0046】

各サイクル中で試料中の蛍光標識の蛍光をモニタリングすることによって、様々な方法で増幅反応の進行をモニターすることができる。例えば、融解ピークによって与えられるデータは、例えば、融解ピーク下の面積を計算し、このデータをサイクル数に対してプロットすることによって分析することができる。

10

【0047】

蛍光は、公知の蛍光計を用いて適切にモニターされる。これらから生じたシグナルは、例えば光電子増倍管電流の形で、データ処理基盤に送られ、各試料管に伴うスペクトルに変換される。例えば96チューブの複数のチューブを同時に検査することが可能である。このようにして、反応中ずっとデータを頻繁に（例えば、10ms毎に）収集することができる。

【0048】

本データによって、試料中に存在する標的核酸の量を定量する機会が提供される。

【0049】

さらに、プローブハイブリダイゼーションの速度論によって、標的配列の濃度を絶対的に決定することが可能であろう。試料から得られた蛍光の変化によってプローブの試料へのハイブリダイゼーションの割合を算出できる。ハイブリダイゼーションの割合の増加は、試料中に存在する標的配列の量と関連があるであろう。

20

【0050】

増幅反応が進行するにつれて標的配列の濃度は増加するので、プローブのハイブリダイゼーションはさらに急速に起こるであろう。このように、このパラメータは定量化の基礎としても使用できる。このデータ処理方法は、情報を提供するシグナルの強度に依存しないので有益である。

【0051】

適切な蛍光標識は、ローダミン色素、又はCy5、Cy3、Cy5.5、フルオレセイン又はそれらの誘導体等のその他の色素である。具体的な誘導体は、FAMという商標名で販売されている5-カルボキシフルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、又はそれらのサクシジミニルエステル等のカルボキシフルオレセイン化合物である。

30

【0052】

蛍光標識の選択は通常、吸収剤の選択に係するであろう。前記標識は、インターカレート剤によって吸収され得る範囲内にその蛍光がなければならないことは明白である。

【0053】

ミトキサントロン、ダウノマイシン、Draq5及びApopttrakは、フルオレセインとその誘導体、特にFAM化合物のとりわけ優れた消光剤である。

40

【0054】

前記標識は従来の方法でプローブと結合することができる。一般的に蛍光標識は、プローブの末端領域に位置するであろうが、プローブ上の蛍光標識の位置は重要ではない。

【0055】

標識はその後立体的又は化学的遮断剤として作用すると思われるので、増幅時にポリメラーゼによってプローブの伸長を防ぐために、プローブの3'末端に位置するのが好ましい。これによって、増幅反応時のプローブの3'末端を遮断するために、リン酸化等の他の処置を講じる必要がなくなる可能性がある。

【0056】

増幅反応に使用したDNAポリメラーゼによって前記プローブが加水分解され、それに

50

よって蛍光標識を放出するように、プローブ及びアッセイ条件を設計することが可能である。

【0057】

この場合、プローブはPCR反応のアニーリング段階と伸長段階との間で結合するように設計され、アッセイで使用されるポリメラーゼは5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するものであろう。DNA二重鎖結合物質によって消光されることはなくなったので、放出された蛍光標識はより多くのシグナルを産生することができる。従って、この場合、遊離の蛍光標識のシグナルの増加を観察することによって前記反応をモニターできる。プローブが標的又は産物と相互作用する場合よりも高温で前記シグナルをモニターする必要がある。

10

【0058】

しかし、プローブを解離させずにシグナルを生成させることができるので、このアッセイではこのようにプローブを消費する必要はない。

【0059】

反応の各段階に存在する増幅産物の量に直接関連する完全に可逆的なシグナルを得るために、及び/又は、反応速度(例えば迅速PCRの反応速度)が最も重要な場合には、標的配列から無傷(intact)で放出されるようにプローブを設計するのが好ましい。これは、例えば、増幅反応の伸長段階の間とすることができる。しかし、前記シグナルはプローブの加水分解に依存していないので、増幅サイクル中であれば何れの段階においても、標的配列をハイブリダイズし、標的配列から融解されるように前記プローブを設計することが可能である。例えば、前記サイクルの伸長相以外の段階で最も強力にハイブリダイズするプローブは、増幅反応への干渉が最小限になるであろう。

20

【0060】

伸長温度以下で強力に結合するプローブを使用する場合、増幅反応中のポリメラーゼと同様に、Taq又はPwoのStoffleフラグメント等の5' - 3' エキソヌクレアーゼ欠損酵素を用いることによって標的配列からの前記プローブを無傷で放出することができる。

【0061】

次いで、プローブは再び反応に関与することが可能となるので、プローブは経済的に利用できる。

30

【0062】

可逆的に標的にハイブリダイズするが加水分解されないプローブを用いて、このように取得されたデータは、様々に解釈され得る。その最も簡潔な形では、増幅反応の経過中又は終了時に、蛍光標識の蛍光がプローブのアニーリング温度で減少するが、これは存在する標的配列の量の増加を意味しており、増幅反応が進行したこと、従って、実際に標的配列は試料中に存在したことを示唆している。

【0063】

しかし、上記のように、増幅反応を通じてモニタリングを行うことによって、定量化することもできる。

【0064】

最後に、後に詳述するように、配列に関する情報を取得するために、終点時の測定、又は期間全体を通じた測定として、特性データ、特に融点分析を取得することができる。

40

【0065】

このように、本発明の好ましい実施例には、核酸増幅の検出方法を含み、(a)核酸ポリメラーゼと、(b)標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズできる少なくとも一つのプライマーと、(c)標的ポリヌクレオチド配列に結合でき、蛍光標識を含有するオリゴヌクレオチドプローブと、(d)前記蛍光標識から蛍光エネルギーを吸収でき、スペクトルの可視域で光を発しないDNA二重鎖結合物質との存在下において、標的ポリヌクレオチドに対して核酸増幅を実施すること、及び増幅反応中の蛍光の変化をモニタリングすることを含む、核酸増幅を検出する方法が包含される。

50

【 0 0 6 6 】

本分野において周知であるように、DNA鎖内の標的ヌクレオチド配列のみが増幅されるように設計されている1対のプライマーを用いて、好適に増幅が実行される。核酸ポリメラーゼは、好適にはTaqポリメラーゼ等の耐熱性ポリメラーゼである。

【 0 0 6 7 】

増幅反応が実行できる適切な条件は本分野において周知である。最適な条件は、使用される具体的なアンプリコン、使用するプライマーの性質及び使用する酵素に応じて、各事例で異なる可能性がある。最適な条件は、当業者によって事例ごとに決定してよい。典型的な変性温度は約95のオーダーであり、典型的なアニーリング温度は55のオーダー及び伸長温度は72のオーダーである。

10

【 0 0 6 8 】

好適には、増幅過程を通して蛍光をモニターし、好ましくは、少なくとも各増幅サイクル中の同じ点でモニターする。特に、プローブが標的にアニールする時の温度で蛍光をモニターする必要がある。例えば、約60の温度でこれを行い得る。

【 0 0 6 9 】

さらに多くの標的が形成されるにつれて、より多くのプローブが前記標的にアニールされるようになり、DNA二重鎖結合物質に近接する結果、消光される。この蛍光の減少が、増幅の進行の指標となる。

【 0 0 7 0 】

試料中に存在するTAQ(TM)ポリメラーゼ等のポリメラーゼは、標的からプローブを除去する効果を有するであろう。この効果は低いレベルで起こり、プローブのアニーリング温度等、ポリメラーゼの最適以下の温度で起こる。このため、この温度では、これらの2つの反応、すなわちそのアニーリング温度でのプローブの結合と標的からプローブを除去するポリメラーゼの効果とが競合することになる。一般的に、反応が多数繰り返すにつれて、前者の反応が優越するため、増幅反応のモニターが可能となる。しかし、最終的には、バランスがシフトし、ポリメラーゼの効果がさらに優勢になると、蛍光の上昇が観察されるであろう。すなわち、この結果により、蛍光の増加によって増幅反応の最後に引き起こされる「フック(hook)」効果が明らかになり得る。

20

【 0 0 7 1 】

本発明の方法を使用して取得したデータは、増幅反応の進行をモニターするために処理することができ、従って、試料中に存在する標的の量を定量するために使用できる。

30

【 0 0 7 2 】

取得したデータを解釈するために、何らかの調整を行う必要があるであろう。例えば、WO 99/28500に記述されている従来のPCRモニタリング反応では、PCR反応が蛍光の指数関数的な増加を招くため、取得した最低値からバックグラウンド蛍光のベースライン補正を導き出す必要があるであろう。

【 0 0 7 3 】

これに対して、本出願の方法では、DNA二重鎖結合物質によって、次第により多くの標識プローブが消光されるにつれて、PCR反応の進行が蛍光を指数関数的に減少させるであろう。このため、達成した蛍光の最高レベルに基づいてベースラインの補正が必要となる。

40

【 0 0 7 4 】

これは、好適にはサンプル反応からデータを採取し、各データポイントに次の式を適用することによって行う。

【 0 0 7 5 】

$$y = 1 / x$$

$$z = y - MIN$$

式中、xはLightCycler等のPCR装置から得られるデータポイントであり、Zはベースライン補正したデータポイントであり、MINは全データセットを通したyの最小値である。zをサイクル数に対してプロットすると、適切なベースライン補正が計算

50

できるであろう。

【0076】

特定の配列の特性を決定するためにハイブリダイゼーションアッセイで本方法を使用することができる。

【0077】

このように別の側面において、本発明は、

a) 配列を含有すると思われる試料に、前記標的配列に対して特異的な蛍光標識プローブと、該プローブ上の蛍光標識から生じる蛍光を吸収することができるがスペクトルの可視域において放射を発しないDNA二重鎖結合物質とを添加すること、

(b) 前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること

10

(c) 前記試料から生じる蛍光をモニターし、前記プローブの前記試料へのハイブリダイゼーションの結果として又は前記プローブと前記標的核酸配列との間で形成された前記二重鎖の不安定化の結果として蛍光が変化する、前記配列に特有の反応条件を決定すること、

を含む、配列の特徴を決定する方法を提供する。

【0078】

好適な反応条件には、温度、電気化学、又は特定の酵素若しくは化学物質の存在に対する反応がある。これらの特性が変化する時の蛍光の変化をモニタリングすることによって、配列の正確な性質に特有な情報を決定できる。例えば、温度の場合、プローブが標的配列から分離又は「融解(melt)」する時の温度を決定できる。これは、例えば、遺伝子診断における対立遺伝子変異(allelic variation)を含む配列の多型を検出し、所望であれば定量化するためには、極めて有益となり得る。「多型」に関しては、配列中、特に天然に生じる可能性がある転移、塩基転換、挿入、欠失又は逆位が含まれる。

20

【0079】

標的配列が一塩基対のみによって変化すれば、プローブ融解のヒステシスは、違ってくるであろう。このように、試料が単一の対立遺伝子変異体のみを含む場合、プローブの融解温度は、別の対立遺伝子変異体のみを含有する試料で認められたものとは異なる特定の値となるであろう。両対立遺伝子変異体を含有する試料は、対立遺伝子変異体の各々に

30

【0080】

電気化学的特性に関して、又は酵素若しくは化学物質の存在下にも同様の考えが当てはまる。プローブは電気化学的ポテンシャルを適用できる固体の表面上に固定できる。標的配列は、前記配列の正確な性質に応じて、特定の電気化学値でプローブと結合することもあるし、あるいはプローブから拒絶されることもある。

【0081】

この実施形態は、上述したPCR反応等の増幅反応と共に実行することも可能であるし、単独で使用することも可能である。

【0082】

本発明の別の側面には、本発明の方法で使用するためのキットが含まれる。これらのキットは、プローブ上に認められることのある蛍光標識から生じる蛍光エネルギーを吸収することができるが、スペクトルの可視域の光を発光しないDNA二重鎖結合物質を含有する。その他に使用可能なキットの成分には、DNAポリメラーゼ(「ホットスタート」反応のために化学修飾されたTAQを含む。)、プライマー、緩衝液、PCR進行を改良することが知られた抗TAQ抗体等の「ホットスタート」試薬等の補助剤、又は同時係属出願である国際特許出願PCT/GB02/01861に記載されているピロリン酸及びピロホスファターゼ等の、増幅反応で使用する試薬がある。前記キットは、これに加えて又はこれに代えて、蛍光標識される標的配列に対するプローブを装備することも可能である。

40

50

【0083】

前記キットは、単一の容器に全ての試薬と一緒に含んでもよいし、又は現場で混合するために一部の試薬を別個の容器に入れてもよい。

【0084】

別の側面において、本発明は、蛍光エネルギーを吸収できるが試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法において可視光を発光しないDNA二重鎖結合物質の使用を提供する。

【0085】

好適な方法は上記のとおりである。DNA二重鎖結合物質の具体例も上述されている。

【0086】

ここで、添付の図面を参照しながら、一つの例として、本発明をさらに具体的に説明する。

【0087】

図1は、本発明の方法を用いて発生する相互作用を図示する。

図2は、本発明に記載の増幅反応時の段階を図説する。

図3は、本発明に記載の増幅反応の結果を図示する図は、サイクル数に対して、アニーリング段階の最後に発生する蛍光の逆関数をプロットしたグラフであり、1:100の0.0193Mミトキサントロンがヒト胎盤のDNAの10倍希釈液3つに及ぼす効果を示す。

図4は、純粋な(0.0193M)ミトキサントロンの複数の10倍希釈液がCTW19プローブに及ぼす消光効果を示すグラフである。

図5は、純粋な(5mM)ダウノマイシンの複数の10倍希釈液がCTW19プローブに及ぼす消光効果を図示するグラフである。

図6は、様々な濃度の暗消光剤を含む蛍光がFAM標識プローブの存在下で実行されるPCR反応に及ぼす効果を示すグラフである。

【0088】

本発明の方法の要素は、好ましくは3'末端に蛍光標識(2)を保有するプローブ(1)である。標的配列と特異的に結合するこのプローブは、DNA二重鎖結合物質(3)とともに、標的配列を含むとされる試料に添加される。

【0089】

プローブ(1)が溶液中に遊離していれば、蛍光標識(2)は蛍光を発するであろう。DNA二重鎖結合物質の中には、プローブと会合してシグナルをわずかに消光できるものもあるが、その消光レベルは低い(図1A)。しかし、プローブ(1)が、一本鎖の標的配列(4)とハイブリダイズして図1Bに図説したように二重鎖を形成すると、DNA二重鎖結合物質(3)は二重鎖と会合するようになり、従って蛍光標識に近接する。前記標識から発せられた蛍光エネルギーは、DNA二重鎖結合物質(3)に伝わるため、前記試料から生じる蛍光は減少するか又は消光する。このように、標識の蛍光が減少することは、プローブの標的配列へのハイブリダイゼーションの指標となるであろう。

【0090】

例えば、温度が低下する時に標識の蛍光の減少を測定することによって、ハイブリダイゼーションが行われる時点を検出できる。同様に、この標識はDNA二重鎖結合物質から受ける影響を受けなくなるので、プローブ(1)が標的配列(4)から融解する温度に上昇するにつれて、標識の蛍光が増加するであろう。

【0091】

融解温度はプローブ及び標的配列のハイブリダイゼーション特性に応じて、変化するであろう。例えば、標的配列に完全に相補的なプローブは、前記標的配列とハイブリダイズするが、1個以上のミスマッチを含むプローブとは異なる温度で融解するであろう。

【0092】

図2は、本発明の方法をPCR反応等の増幅反応で使用方法について図説する。プローブ(1)は、DNA二重鎖結合物質(3)と共に一本鎖DNAにハイブリダイズする

10

20

30

40

50

ので、標識シグナルは消光されることになる（図 2 A）。図説の実施形態では、これは、プライマー（5）がアニールしている間のサイクルのアニール段階で起こる。増幅の結果として標的配列の量が増加するにつれて、プローブ及び DNA 二重鎖結合物質も取り込んだ二重鎖をさらに多く形成することによって消光が増加する結果、アニール段階中に標識により発生するシグナルが減少することになるであろう。

【0093】

伸長段階の間に、DNA ポリメラーゼがプローブを置換するので、プローブは前記標的配列から除去される。この時点で、プローブが DNA 二重鎖結合物質から離れるので標識シグナルが増加する（図 2 B）。

【0094】

標識から生じる蛍光をモニタリングすることによって、増幅反応の進行を追跡することができ、元の試料中に存在する標的配列の量の測定が可能になるであろう。

【実施例 1】

【0095】

PCR 増幅反応

本発明の方法は、Carl Wittwer のアッセイを用いて、ヒト グロビン遺伝子を試験した。何れの実施例でも、下記の実験プロトコルに従った。

【0096】

第一に、下記の成分を含む 10 ml の 2 倍濃度のマスターミックスを調製した。

【0097】

2 倍濃度のマスターミックス：

2000 μ l のトリス、pH 8.8、500 mM

2000 μ l の dUTP スクレオチド、2 mM

250 μ l の B.S.A、20 mg/ml

1600 μ l のグリセロール

200 μ l のウラシル-N-グリコシラーゼ、1 ユニット/ μ l

160 μ l の Taq ポリメラーゼ、5 ユニット/ μ l

3190 μ l の HPLC グレードの水

600 μ l の塩化マグネシウム溶液、0.1 M

【0098】

次に、Carl Wittwer アッセイの実行に好適な PCR ミックスを調製して下記の成分を含めた。

PCR ミックス： 50 μ l の 2 倍濃度のマスターミックス、3 mM Mg^{2+}

10 μ l のフォワードプライマー（PC03）、10 μ M

10 μ l のリバースプライマー（PC04）、10 μ M

10 μ l のプローブ（CTW19）、2 μ M

5 μ l の HPLC グレードの水

5 μ l のミトキサントロン、10 μ M concs

プライマー配列（PC03）： A C A C A A C T G T G T T C A C T A G C

プライマー配列（PC04）： C A A C T T C A T C C A C G T T C A C C

CTW19： C A A A C A G A C A C C A T G G T G C A C C T G A C T C C T G A G G A T（3' 蛍光）。

【0099】

この PCR ミックス調合物は全部で 90 μ l であった。次に前記ミックスを徹底的にボルテックスし、45 μ l ずつになるよう 2 つに分けた。テンプレートを加えない対照（NTC；No Template Control）とするため、このうちの一つに 5 μ l の HPLC グレードの水を添加し、もう一つには、正の対照として機能するように 5 μ l のヒト胎盤の DNA（様々な濃度）を添加した。次にこれらの 2 つの 50 μ l をさらに 4

10

20

30

40

50

つの $20\ \mu\text{l}$ に分け、2 個の NTC と 2 個の + (陽性対照) を作成するために Light cycler 毛細管にピペットで分注した。

【0100】

各実験で試験する変数の各数値について上記混合物を作成する。

【0101】

次に毛細管を遠心沈殿し、下記のサイクルプログラム上で Roche Light cycler で実行する。

【0102】

持ち越し予防 x 1

50 で 60 秒間

95 で 15 秒間

サイクル x 50

95 で 5 秒間

60 で 5 秒間。蛍光は F1 チャンネルでこの段階で採集した (530 nm)。

74 で 5 秒間

融解分析 x 1

50 で 15 秒間

0.1 / 秒で 95 まで緩やかな勾配をなす。蛍光は F1 チャンネルでこの段階で採集した (530 nm)。図 3 に代表的な結果を示す。

【0103】

図 3 は、10 倍の希釈系列について、バックグラウンドのシグナルを上回る、識別可能なシグナルが示されている。最適な PCR 中の標的鋳型の 10 倍希釈は、指数関数的な増幅が生じるように増幅する場合には、サイクル毎に単位複製配列の数が増加して 2 倍になる。標的の初期量を推測することによってアンプリコンの濃度を検出するために使用されるプローブシステムは、各 10 倍希釈について PCR の機能的範囲内から約 3.31 サイクル過ぎた任意のサイクル値においてバックグラウンドを超えて上昇するシグナルを生成するはずである。図 3 には、これが明白に示されている。

【実施例 2】

【0104】

DNA 二重鎖結合物質の最適濃度の測定

様々な濃度の DNA 二重鎖結合物質であるミトキサントロン及びダウノマイシンを用いて実施例 1 に記述したとおりに PCR 反応を繰り返した。結果はそれぞれ図 4 及び図 5 に示す。開始材料のミトキサントロン (0.0193 M) を $1/20$ に希釈した前記反応混合物に添加する前に、1:100 まで効率的に希釈して最終濃度を約 $10\ \mu\text{M}$ にした場合に、これらの図から、増幅反応を示す明瞭なシグナルが表れたことは明らかである。

【0105】

同様に、開始材料の 5 mM のダウノマイシンを 1:10 まで希釈し、その後さらに PCR 反応混合物中で希釈した (1:20)。この例の最終濃度は $25\ \mu\text{M}$ であった。

【実施例 3】

【0106】

別の消光 DNA 結合剤の特定

段階 1

吸収剤の特定

下記の方法を用いて、蛍光エネルギーを吸収するために使用できる多数の別の DNA 二重鎖結合物質を特定した。

【0107】

消光剤の候補を有する多数の 10 倍の希釈液を調製し、各希釈液 $5\ \mu\text{l}$ を下記の PCR 反応ミックスに添加した。

【0108】

PCR ミックス: 実施例 1 で定義されたとおりに $50\ \mu\text{l}$ の 2x マスターミックス

10

20

30

40

50

、但し 3 mM Mg^{2+} 。

10 μ l のフォワードプライマー (PC03)、10 μ M。

10 μ l のリバースプライマー (PC04)、10 μ M。

5 μ l の Sybr Gold。

10 μ l の HPLC グレードの水。

様々な濃度の 5 μ l の暗消光剤 (Dark Quencher)。

【0109】

次にこれを実施例 1 に記述通りに増幅反応に供した。この実験の目的は 2 つある。第 1 に、混合物中に消光剤の候補を加えると PCR が抑制されるか否か、抑制される場合にはどの濃度で抑制されるかを確立する。第二に、(前記ミックス中に消光剤の候補を加えると、消光剤を含有しない対照を用いて実行した場合のベースライン及び最大蛍光の比較によって)、Sybr Gold の蛍光が減少 (消光剤) するかどうかを知ることができる。比較したこれら 2 つの結果によって、前記候補分子が DNA 二重鎖結合物質として特に有益であり得、暗消光剤として作用できる濃度範囲を決定できる。

10

【0110】

しかし、Sybr Gold のシグナルの減少の原因は、副溝中の結合部位について Sybr Gold を凌ぐ前記消光剤候補によるものであると考えられる。これと消光の違いを識別するのは難しいが (或いは恐らく両方)、有益な観察でもあり、前記消光剤候補が実際にインターカレートできることを意味すると考えられる。

【0111】

20

次に、この方法で特定した消光剤の候補を、これを明確にするために下記の実験に供した。

【0112】

段階 2

FAM 標識プローブを用いて完全な暗消光剤 (Dark Quencher) 型中の分子候補を試験する。

【0113】

実験 1) で確立した消光剤の候補の濃度の範囲を狭め、選択した消光剤の候補 5 μ l を下記の混合物に添加した。

【0114】

30

PCR ミックス:

50 μ l の 2x マスターミックス、3 mM Mg^{2+}

10 μ l のフォワードプライマー (PC03)、10 μ M

10 μ l のリバースプライマー (PC04)、10 μ M

10 μ l のプローブ (CTW19)、2 μ M

5 μ l の HPLC グレードの水

実験 1) で範囲を狭めた様々な濃度の 5 μ l の暗消光剤 (Dark Quencher)

次にこれを実施例 1 に記述どおりに増幅に供し、蛍光をモニターした。指数関数的に良好な直線の配分を用いて、図 6 で例証した種類の結果を出した前記消光剤を、さらに評価を行うために選択した。

40

【0115】

効果が観察されなかった場合、Cy3 (565 nm で蛍光する) 及び Cy5 . 5 (694 nm で蛍光する) 等の別の色素を用いてさらに試験を行うため前記消光剤候補を確保した。

【0116】

PCR 装置のベースライン補正機能は反応の「誤った」結果を除去するので、曲線を斜めにする (図 6 参照)。生データをエクスポートし、前述通りに蛍光の増加よりもむしろ減少を補正するベースライン補正の式を適用することによって補正することができる。

【0117】

50

段階 3効果を定量化

実験 2 で成功した消光剤候補を標的 DNA の 10 倍希釈液シリーズを用いた実験に使用した。追加した希釈液間の CT 値の差 3.3 サイクルは、その効果が標的 DNA の量と直接関係があり、従って PCR プロセスにも関連することを明らかにした。

【0118】

PCR ミックス：

50 μ l の 2x マスターミックス、3 mM Mg^{2+}
10 μ l のフォワードプライマー (PC03)、10 μ M
10 μ l のリバースプライマー (PC04)、10 μ M
10 μ l のプローブ (CTW19)、2 μ M
5 μ l の HPLC グレード水

実験 1) 及び 2) で定義した濃度の 5 μ l の暗消光剤

次に、標的 DNA の濃度である変化に応じた変数を用いて、このミックスを実施例 1 に記述どおりに増幅した (本明細書の 10 倍希釈液)。テンプレートを加えない対照 (NTC) は 1 組のみを実行した。

【0119】

このプロトコルを使用して、有益な暗消光剤として、ミトキサントロン、ダウノマイシン、DRAQ5 (TM) 及び Apopttrak (TM) を特定した。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図 1】本発明の方法を用いて発生する相互作用を図示する。

【図 2 A】本発明に記載の増幅反応時の段階を図説する。

【図 2 B】本発明に記載の増幅反応時の段階を図説する。

【図 3】本発明に記載の増幅反応の結果を図示する。図は、サイクル数に対して、アニーリング段階の最後に発生する蛍光の逆関数をプロットしたグラフであり、1:100 の 0.0193 M ミトキサントロンがヒト胎盤の DNA の 10 倍希釈液 3 つに及ぼす効果を示す。

【図 4】純粋な (0.0193 M) ミトキサントロンの複数の 10 倍希釈液が CTW19 プローブに及ぼす消光効果を示すグラフである。

【図 5】純粋な (5 mM) ダウノマイシンの複数の 10 倍希釈液が CTW19 プローブに及ぼす消光効果を図示するグラフである。

【図 6】様々な濃度の暗消光剤を含む蛍光が FAM 標識プローブの存在下で実行される PCR 反応に及ぼす効果を示すグラフである。

10

20

30

【図 1】

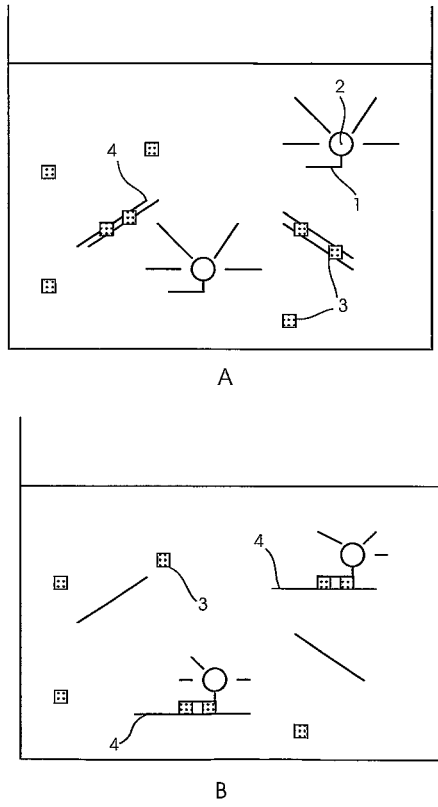


Fig. 1

【図 2 A】



Fig. 2A

【図 2 B】

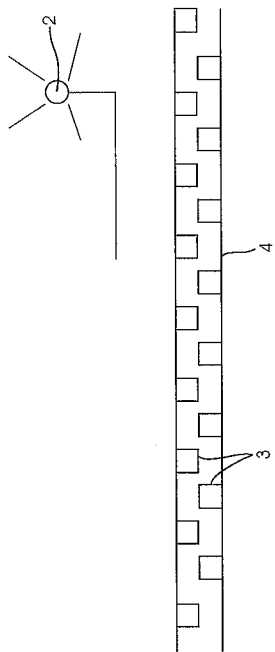


Fig. 2B

【図 3】

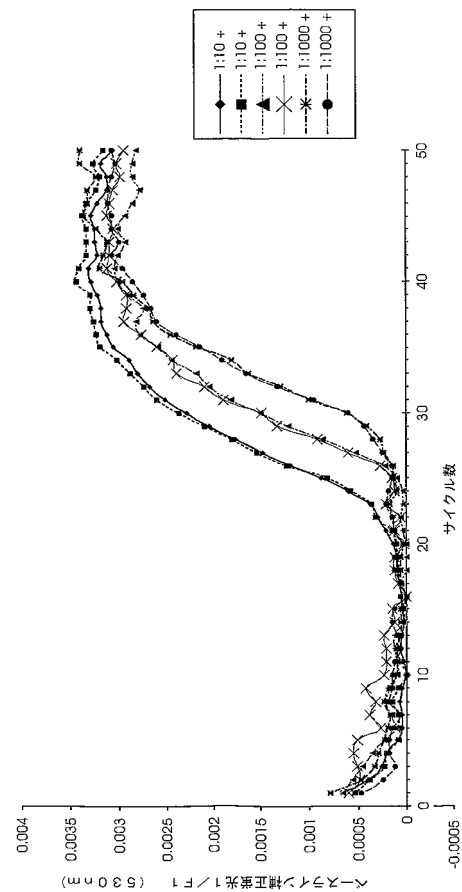


Fig. 3

【 図 4 】

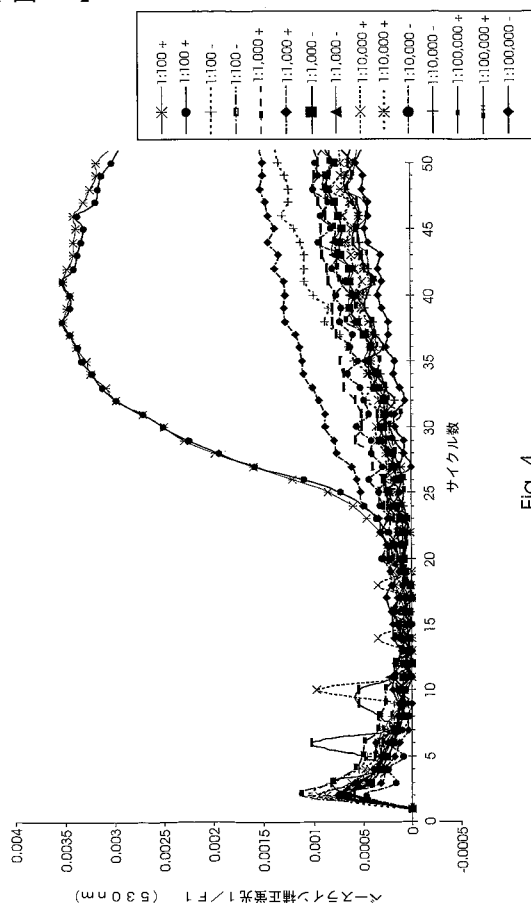


Fig. 4

【 図 5 】

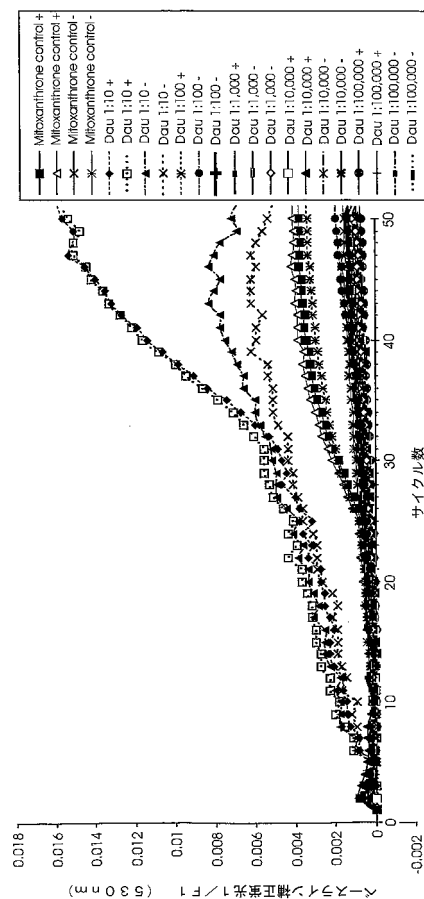


Fig. 5

【 図 6 】

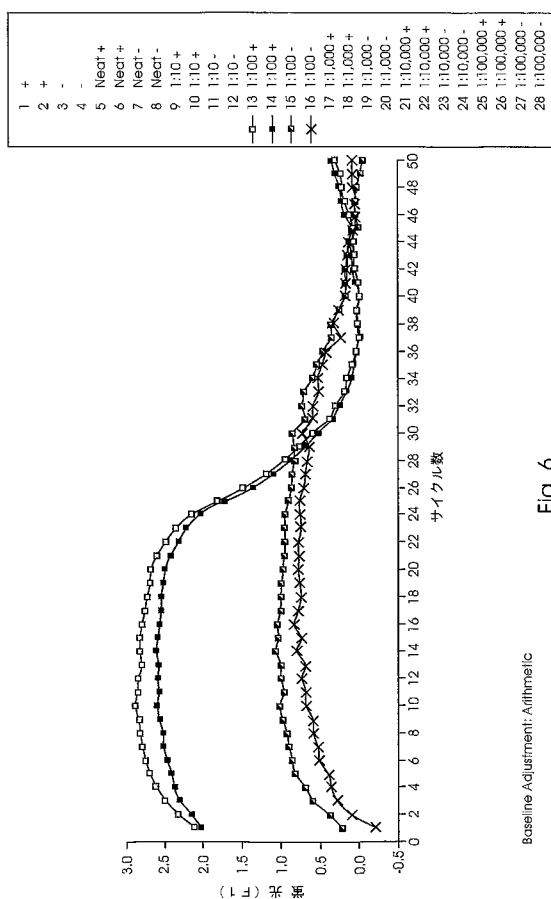


Fig. 6

Baseline Adjustment: Arithmetic

【手続補正書】

【提出日】平成16年11月22日(2004.11.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 標的核酸配列を含有していると思われる試料に、前記標的配列に対して特異的な蛍光標識されたプローブと、該プローブ上の前記蛍光標識から生じる蛍光エネルギーを吸収することができるが可視光を発しないDNA二重鎖結合物質とを添加すること、

(b) このようにして形成された混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供すること、

(c) 前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること、

(d) 前記試料から得られる蛍光をモニターすること、
を含む、試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法。

【請求項2】

前記DNA二重鎖結合物質が縮合共役環系を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記DNA二重鎖結合物質が、トキサントロン(1,4-ジヒドロキシ5,8-ビス[[2-[(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エチル]アミノ]-9,10-アントラセンジオン)又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、又はノガラマイシン(2R-(2,3,4,5,6,11,13,14)-11-[6-デオキシ-3-C-メチル-2,3,4-トリ-O-メチル-L-マンノピラノシル)オキシ]-4-(ジメチルアミノ)-3,4,5,6,9,11,12,13,14,16-デカヒドロ-3,5,8,10,13-ペンタヒドロキシ-6,13-ジメチル-9,16-ジオキソ-2,6-エポキシ-2H-ナフタセノ[1,2-b]オキソシン-14-カルボン酸メチルエステル)である、請求項1又は2に記載の方法。

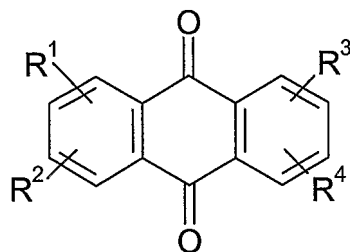
【請求項4】

前記DNA結合物質がミトキサントロンである請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記DNA結合物質が式(I)

【化1】



(IA)

[式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、水素、X、NH-A-NHR及びNH-A-N(O)R' R''から独立に選択される(式中、Xはヒドロキシ、ハロ、アミノ、 C_{1-4} アルコキシ又は C_{2-8} アルカノイルオキシであり、AはNHとNHR又はN(O)R' R''との間の鎖長が少なくとも2炭素原子である C_{2-4} アルキレン基であり、R、R'及びR''は、 C_{1-4} アルキル及び C_{2-4} ヒドロキシアルキル及び C_{2-4} ジヒドロキシアルキルから各々独立に選択される(但し、窒素原子に結合した炭素原子はヒドロキシ基

を有しておらず、何れの炭素原子も2個のヒドロキシ基によって置換されていないものとする。)、又はR'とR''は、両者で、C₂ - 6アルキレン基であり、R'及びR''が結合する窒素原子とともに、3ないし7個の原子を有する複素環を形成しており、但し、R¹、R²、R³及びR⁴のうち少なくとも1個はNH-A-N(O)R'R''基である。)
)。]

の化合物である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】

工程(c)におけるプローブへのハイブリダイゼーションに先立って前記標的核酸が一本鎖にされる、請求項1から5の何れか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である、請求項1から6の何れか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記増幅反応のすべてのサイクル中に前記プローブが前記標的核酸とハイブリダイズする、請求項1から7の何れか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記増幅反応全体を通して前記試料から生じた蛍光がモニターされる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

生成された蛍光データがプローブハイブリダイゼーションの割合を測定するために使用される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記蛍光データが前記試料中に存在する標的核酸の量を定量するために使用される、請求項8から10の何れか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記蛍光標識がローダミン色素、Cy5、フルオレセイン又はフルオレセイン誘導体である、請求項1から11の何れか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記蛍光標識が前記プローブの末端領域に結合されている、請求項1から12の何れか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記蛍光標識が前記プローブの3'末端に結合されており、ポリメラーゼによるプローブの伸長を防止する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記プローブが伸長段階以外の増幅工程の段階の間に前記標的配列から無傷の状態で放出されるように、前記プローブが設計されている、請求項1から14の何れか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記プローブが、増幅工程の伸長段階の間に、前記ポリメラーゼの作用によって前記標的配列から無傷の状態で放出され、前記増幅反応が5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を欠いたポリメラーゼを用いて行われる、請求項1から14の何れか1項に記載の方法。

【請求項17】

(a)核酸ポリメラーゼと、(b)標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズできる少なくとも一つのプライマーと、(c)前記標的ポリヌクレオチド配列に結合でき、蛍光標識を含有するオリゴヌクレオチドプローブと、(d)前記蛍光標識から蛍光エネルギーを吸収することができ且つスペクトルの可視域で光を発しないDNA二重鎖結合物質と、の存在下において、標的ポリヌクレオチドに対して核酸増幅を実施すること、及び増幅反応中の蛍光の変化をモニターすることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

1対の増幅プライマーを使用して前記増幅が好適に実施される、請求項17に記載の方

法。

【請求項 19】

前記核酸ポリメラーゼが耐熱性ポリメラーゼである、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

【請求項 20】

さらなる工程において、ハイブリダイゼーションアッセイが実施され、前記配列に特有のハイブリダイゼーション条件が測定される、請求項 1 から 19 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記条件が温度、電気化学的ポテンシャル又は酵素若しくは化学物質との反応である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記条件が温度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

標的配列中の対立遺伝子変異又は多型を検出するために使用される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

a) 配列を含有すると思われる試料に、標的配列に対して特異的な蛍光標識プローブと、該プローブ上の蛍光標識から生じる蛍光を吸収することができるがスペクトルの可視域において放射を発しない DNA 二重鎖結合物質とを添加すること、

(b) 前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること

、
(c) 前記試料から生じる蛍光をモニターし、前記プローブの前記試料へのハイブリダイゼーションの結果として又は前記プローブと前記標的核酸配列との間で形成された前記二重鎖の不安定化の結果として蛍光が変化する、前記配列に特有の反応条件を決定すること、

を含む、配列の特徴を決定する方法。

【請求項 25】

前記配列に特有の前記反応条件が、温度、電気化学的ポテンシャル又は酵素若しくは化学物質との反応である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記条件が温度である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

2 個の配列から得られた結果が、その間の多型又は変異の存在を決定するために比較される、請求項 24 から 26 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 DNA 二重鎖結合物質が、ミトキサントロン(1, 4 - ジヒドロキシ 5, 8 - ビス[[2 - [(2 - ヒドロキシエチル) アミノ] エチル] アミノ] - 9, 10 - アントラセンジオン) 又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、又はノガラマイシン(2R - (2, 3, 4, 5, 6, 11, 13, 14)) - 11 - [6 - デオキシ - 3 - C - メチル - 2, 3, 4 - トリ - O - メチル - L - マンノピラノシル] オキシ] - 4 - (ジメチルアミノ) - 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 16 - デカヒドロ - 3, 5, 8, 10, 13 - ペンタヒドロキシ - 6, 13 - ジメチル - 9, 16 - ジオキソ - 2, 6 - エポキシ - 2H - ナフタセノ[1, 2 - b] オキソシン - 14 - カルボン酸メチルエステル) である、請求項 24 から 27 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 DNA 二重鎖結合物質が請求項 5 に定義した式 (I A) の化合物である、請求項 24 から 27 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

(i) 蛍光エネルギーを吸収することができるがスペクトラムの可視域で放射を発しな

いDNA二重鎖結合物質と、(ii)標的ヌクレオチド配列に特異的な蛍光標識プローブ又は(iii)増幅反応を実施するのに必要な1若しくは複数の試薬のうち何れかと、を備えた、請求項1から29の何れか1項に記載の方法で使用するためのキット。

【請求項31】

(iii)を含有し、前記試薬がプライマー、DNAポリメラーゼ、緩衝液、又はPCRを改良することが知られた補助剤から選択される、請求項30に記載のキット。

【請求項32】

前記DNA二重鎖結合物質が、ミトキサントロン(1,4-ジヒドロキシ5,8-ビス[[2-[(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エチル]アミノ]-9,10-アントラセンジオン)又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、又はノガラマイシン(2R-(2,3,4,5,6,11,13,14)-11-[6-デオキシ-3-C-メチル-2,3,4-トリ-O-メチル-L-マンノピラノシル)オキシ]-4-(ジメチルアミノ)-3,4,5,6,9,11,12,13,14,16-デカヒドロ-3,5,8,10,13-ペンタヒドロキシ-6,13-ジメチル1-9,16-ジオキソ-2,6-エポキシ-2H-ナフタセノ[1,2-b]オキソシン-14-カルボン酸メチルエステル)である、請求項30又は31に記載のキット。

【請求項33】

前記DNA二重鎖結合物質が請求項5に定義した式(IA)の化合物である、請求項30又は31に記載のキット。

【請求項34】

(i)及び(ii)の両方を備えた、請求項30から33の何れか1項に記載のキット。

【請求項35】

標的核酸を増幅することによって試料中の標的核酸配列の存在を検出するための方法における、蛍光エネルギーを吸収できるが可視光を発しないDNA二重鎖結合物質の使用。

【請求項36】

前記DNA二重鎖結合物質が共役芳香環系を含む、請求項35に記載の使用。

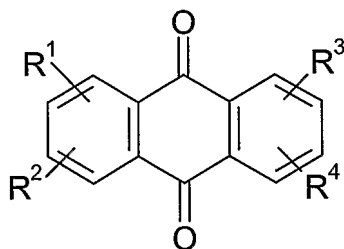
【請求項37】

前記DNA二重鎖結合物質がアントラサイクリン又はアントラキノンを含む、請求項36に記載の使用。

【請求項38】

前記DNA二重鎖結合物質が必要に応じて置換された構造(I)のアントラキノン

【化2】



(I)

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は、水素、官能基、又は例えば官能基によって必要に応じて置換されたヒドロカルビル基から独立に選択されるか、又は、 R^1 と R^2 又は R^3 と R^4 が、必要に応じて互いに結合されて、ヘテロ原子を必要に応じて含有し及び/又は官能基又はヒドロカルビル基によって必要に応じて置換された環を形成す。)である、請求項35乃至37の何れか1項に記載の使用。

【請求項39】

前記DNA二重鎖結合物質が、ミトキサントロン(1,4-ジヒドロキシ5,8-ビス[[2-[(2-ヒドロキシエチル)アミノ]エチル]アミノ]-9,10-アントラセ

ンジオン)又は塩酸塩若しくは二塩酸塩等のその塩類、又はノガラマイシン(2R-(2,3,4,5,6,11,13,14))-11-[6-デオキシ-3-C-メチル-2,3,4-トリ-O-メチル-L-マンノピラノシル]オキシ]-4-(ジメチルアミノ)-3,4,5,6,9,11,12,13,14,16-デカヒドロ-3,5,8,10,13-ペンタヒドロキシ-6,13-ジメチル-9,16-ジオキソ-2,6-エポキシ-2H-ナフタセノ[1,2-b]オキソシン-14-カルボン酸メチルエステル)である、請求項35から38の何れか1項に記載の使用。

【請求項40】

前記DNA二重鎖結合物質が請求項5に定義した式(IA)の化合物である、請求項35から38の何れか1項に記載の使用。

【請求項41】

前記DNA二重鎖結合物質がミトキサントロンである、請求項39に記載の使用。

【請求項42】

(a)標的核酸配列を含有していると思われる試料に、前記標的配列に対して特異的な蛍光標識されたプローブと、ダウノマイシン(8S,-シス)-8-アセチル-10-[3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-lyxo-ヘキソピラノシル]オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオンとを添加すること、

(b)このようにして形成された混合物を、標的核酸が増幅される増幅反応に供すること、

(c)前記プローブが前記標的配列にハイブリダイズする条件に前記試料を供すること、

(d)前記試料から得られる蛍光をモニターすること、
を含む、試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 03/04412
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 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) IPC 7 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 practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 699 768 A (HOFFMANN LA ROCHE) 6 March 1996 (1996-03-06) claims 5-6; page 3, line 55 - page 4, line 8; page 6, lines 34, 41-42 and 47-52 ---	1-3, 6-12, 17-22, 24-26, 28, 30-32, 34-39
X	EP 0 872 562 A (HOFFMANN LA ROCHE) 21 October 1998 (1998-10-21) page 8, lines 29-33; page 9, lines 21-30 ---	30-32, 34
P, X	WO 02 097132 A (LEE MARTIN ALAN ; SEC DEP DSTL (GB)) 5 December 2002 (2002-12-05) page 21, lines 34-36 --- -/--	1, 24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 10 February 2004		Date of mailing of the international search report 04/03/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epe nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hennard, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/04412

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 28500 A (FUERST RODERICK ; LEE MARTIN ALAN (GB); SECR DEFENCE (GB); BIO GENE) 10 June 1999 (1999-06-10) cited in the application the whole document	1-41
X	US 5 208 323 A (PAGE MICHEL ET AL) 4 May 1993 (1993-05-04) example 1	30-32, 34
X	US 2002/106682 A1 (KIM TAE HAN ET AL) 8 August 2002 (2002-08-08) claim 5; figures 6	30-32, 34-39
X	US 5 858 397 A (CHANG CHARMAINE W ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) column 9, lines 46-50	30-32, 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB 03/04412

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0699768	A	06-03-1996	US 5491063 A AT 243759 T CA 2157200 A1 DE 69531133 D1 DK 699768 T3 EP 0699768 A1 JP 8070876 A PT 699768 T	13-02-1996 15-07-2003 02-03-1996 31-07-2003 20-10-2003 06-03-1996 19-03-1996 31-10-2003
EP 0872562	A	21-10-1998	US 5994056 A EP 1256631 A1 EP 0872562 A1 AT 184322 T AT 223970 T AU 665185 B2 AU 1513892 A BR 9201618 A CA 2067909 A1 CA 2218818 A1 DE 1256631 T1 DE 69229929 D1 DE 69229929 T2 DE 69232773 D1 DE 69232773 T2 DK 512334 T3 DK 872562 T3 EP 0512334 A2 ES 2137164 T3 ES 2183256 T3 JP 3136129 B2 JP 10201464 A JP 3007477 B2 JP 5184397 A NO 921731 A NZ 242565 A US 6171785 B1 ZA 9202990 A	30-11-1999 13-11-2002 21-10-1998 15-09-1999 15-09-2002 21-12-1995 05-11-1992 15-12-1992 03-11-1992 03-11-1992 27-11-2003 14-10-1999 18-05-2000 17-10-2002 07-08-2003 03-04-2000 30-12-2002 11-11-1992 16-12-1999 16-03-2003 19-02-2001 04-08-1998 07-02-2000 27-07-1993 03-11-1992 26-07-1994 09-01-2001 27-01-1993
WO 02097132	A	05-12-2002	WO 02097132 A2	05-12-2002
WO 9928500	A	10-06-1999	AU 743543 B2 AU 1342599 A CA 2311952 A1 EP 1049802 A1 GB 2346972 A ,B WO 9928500 A1 GB 2333359 A JP 2003500001 T NZ 504818 A US 2002119450 A1	31-01-2002 16-06-1999 10-06-1999 08-11-2000 23-08-2000 10-06-1999 21-07-1999 07-01-2003 25-10-2002 29-08-2002
US 5208323	A	04-05-1993	CA 2021942 A1 WO 9101757 A1	11-02-1991 21-02-1991
US 2002106682	A1	08-08-2002	KR 2002064805 A	10-08-2002
US 5858397	A	12-01-1999	AT 238038 T AU 7123296 A	15-05-2003 30-04-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 03/04412

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5858397	A	WO 9713499 A1	17-04-1997
		DE 69627690 D1	28-05-2003
		DE 69627690 T2	11-12-2003
		EP 0859599 A1	26-08-1998
		ES 2194114 T3	16-11-2003
		JP 11513392 T	16-11-1999

フロントページの続き

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

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 リー , マーティン・アラン

イギリス国、ウILTトシャー・エス・ピー・4・0・ジエイ・キュー、ソールズベリ、ポートン・
ダウン、デー・エス・ティー・エル

(72)発明者 バシエ , マーク

イギリス国、ウILTトシャー・エス・ピー・4・0・ジエイ・キュー、ソールズベリ、ポートン・
ダウン、デー・エス・ティー・エル

(72)発明者 ブラウン , トム

イギリス国、サザンプトン・エス・オー・17・1・ピー・ジエイ、ハイフィールド、ユニバーシ
ティ・オブ・サザンプトン

F ターム(参考) 2G054 BB13 CA22 CE02 EA03 GA04 GB02

4B024 AA11 CA01 HA12

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR08 QR42 QR55 QR62 QR66 QS11 QS16

QS25 QS34 QX02