

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-200405

(P2005-200405A)

(43) 公開日 平成17年7月28日(2005.7.28)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C07H 21/00	C07H 21/00 ZNA	4B024
C07H 21/04	C07H 21/04 A	4B063
C12N 15/09	C12Q 1/68 A	4C057
C12Q 1/68	C12N 15/00 A	
	C12N 15/00 F	

審査請求 有 請求項の数 6 OL 外国語出願 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2004-348896 (P2004-348896)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成16年12月1日 (2004. 12. 1)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	03027753.7		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成15年12月2日 (2003. 12. 2)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラツセ124
		(74) 代理人	100095832
			弁理士 細田 芳徳
		(72) 発明者	ディーター ハインドル
			ドイツ連邦共和国 ベール 82396
			シュテルンシュトラッセ 4
		(72) 発明者	アストリート ライザー
			ドイツ連邦共和国 アントドルフ 823
			87 シュライエル-ヴェーク 20
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子ロッドを含むオリゴヌクレオチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】改良された融解曲線挙動を持つオリゴヌクレオチド、特にFRETハイブリダイゼーションプローブを提供すること。

【解決手段】自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドを合成するための方法であって、制御孔ガラス粒子を提供する工程、およびホスホルアミナイト化学作用により合成する工程を含む、方法ならびに自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドであって、該ロッドが5'末端残基の5'位にまたは3'末端残基の3'位にリン酸塩部分を介して共有結合されており、プライマー伸長反応用または核酸増幅反応用のプライマーとして使用でき、ハイブリダイゼーションの温度依存性がリアルタイムでモニターされるハイブリダイゼーションプローブとして使用できるオリゴヌクレオチド。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドを合成するための方法であって、

- 制御孔ガラス粒子を提供する工程
- ホスホルアミダイト化学作用により該オリゴヌクレオチドを合成する工程

を含む、方法。

**【請求項 2】**

自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドであって、該ロッドが5'末端残基の5'位にまたは3'末端残基の3'位にリン酸塩部分を介して共有結合されている、オリゴヌクレオチド。

10

**【請求項 3】**

請求項 2 記載のオリゴヌクレオチドを含む組成物。

**【請求項 4】**

請求項 2 記載のオリゴヌクレオチドを含むキット。

**【請求項 5】**

ハイブリダイゼーションプローブとしての、自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドの使用であって、ハイブリダイゼーションの温度依存性がリアルタイムにモニターされる、使用。

**【請求項 6】**

固体支持体に固定されている、請求項 2 記載のオリゴヌクレオチド。

20

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドの分野に関する。より正確には、本発明は、リアルタイムPCRまたは核酸アレイ技術いずれかにおいてハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる化学的に修飾されたオリゴヌクレオチドを供給する分野に関する。

**【背景技術】**

30

**【0002】**

ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) によるDNAの増幅は分子生物学の基本的な技術である。PCRによる核酸分析には試料の調製、増幅および生成物の分析が必要である。これらの工程は通常は順に行われるが、増幅および分析は同時に行うことができる。DNA色素または蛍光プローブは増幅前にPCR混合物に添加し、それを用いて、増幅の間にPCR産物を分析することができる。試料の分析は、同一機器内の同一チューブ中での増幅と同時に行われる。この組合せアプローチは試料の取扱を減少させ、時間を節約し、そしてその後の反応のための生成物の汚染の危険性を大いに低下させる。というのは、さらなる分析用に密閉容器から試料を取り出す必要がないからである。増幅を生成物の分析と組み合わせる概念は「リアルタイム」PCRとして知られるようになった。例えば、特許文献 1 参照。

40

**【0003】**

リアルタイムPCR検出様式

キネティックリアルタイムPCRにおいては、PCR産物の形成はPCRの各サイクルにおいてモニターされる。増幅は、通常、増幅反応の間に蛍光シグナルを測定するためのさらなるデバイスを有するサーモサイクラーで測定される。

**【0004】**

DNA結合色素の様式：二本鎖増幅産物の量は、通常、分析される試料にもともと存在する核酸の量を超えるので、適切な波長で励起させると、それらが二本鎖DNAに結合している場合にのみ強い蛍光を示す二本鎖DNA特異的色素を用いることができる。好ましくは、S ybrGreenIIのような、例えば、PCR反応の効率に影響を与えない色素のみを用いることが

50

できる。

【0005】

当該分野で知られている全ての他の様式には、その標的核酸に結合した場合にのみ蛍光を発する蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブの設計が必要である。

【0006】

TaqManプローブ：一本鎖ハイブリダイゼーションプローブは2つの成分で標識される。第一の成分を適切な波長の光で励起させると、蛍光共鳴エネルギー移動の原理に従って、吸収されたエネルギーは第二の成分、いわゆる消光剤、へと移動させられる。PCR反応のアニリング工程の間に、ハイブリダイゼーションプローブは標的DNAに結合し、その後の伸長期の間にTaqポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によって分解される。その結果、励起された蛍光成分および消光剤は互いに空間的に離され、したがって、第一の成分の蛍光発光は測定され得る。TaqManプローブアッセイは特許文献2、特許文献3および特許文献4に詳細に開示されている。TaqManハイブリダイゼーションプローブおよび試薬混合物は特許文献5に開示されている。

10

【0007】

分子ビーコン(Beacon)：これらのハイブリダイゼーションプローブは第一の成分で、および消光剤でも標識され、該標識は、好ましくはプローブの両末端に位置する。プローブの二次構造の結果として、両成分は溶液中で空間的に接近している。標的核酸へのハイブリダイゼーションの後に、適切な波長の光での励起の後、第一の成分の蛍光発光を測定することができるように、両成分は互いに離れている(特許文献6)。分子ビーコンを、特異的対立遺伝子または多形を同定するために融解曲線分析に用いることができる(後記参照)。

20

【0008】

FRETハイブリダイゼーションプローブ：FRETハイブリダイゼーションプローブのテスト様式は、全ての種類のホモジニアスハイブリダイゼーションアッセイに特に有用である(非特許文献1)。それは、同時に用いられ、増幅された標的核酸の同じ鎖の隣接している部位に相補的である2つの一本鎖ハイブリダイゼーションプローブによって特徴付けられる。双方のプローブは異なる蛍光成分で標識される。適切な波長の光で励起させられると、第一の成分は、両方のハイブリダイゼーションプローブが検出されるべき標的分子の隣接している位置に結合すると、第二の成分の蛍光発光を検出できるように、蛍光共鳴エネルギー移動の原理に従って、吸収したエネルギーを第二の成分に移動させる。

30

【0009】

標的配列にアニリングすると、ハイブリダイゼーションプローブはヘッド-テイル配置にて互いに極めて接近して存在しなければならない。通常、第一のプローブの標識された3'末端と第二のプローブの(or)標識された5'末端との間のギャップはできる限り小さい、即ち、1~5塩基である。これにより、FRETドナー化合物とFRETアクセプター化合物を極めて接近させ、これは、典型的には、10~100オングストロームである。

【0010】

ハイブリダイゼーション事象の定量的な測定として、FRETアクセプター成分の蛍光の増加をモニターする代わりにFRETドナー成分の蛍光減少をモニターすることも可能である。

40

【0011】

特に、増幅された標的DNAを検出するためにFRETハイブリダイゼーションプローブ様式をリアルタイムPCRで用いることができる。リアルタイムPCRの分野で知られている全ての検出様式の中で、FRET-ハイブリダイゼーションプローブ様式は感度が高く、正確であって信頼性があることが証明されている(特許文献7、特許文献8、特許文献9)。しかし、適切なFRETハイブリダイゼーションプローブ配列の設計は、検出すべき標的核酸配列の特殊な特徴によって時々制限されることもある。

【0012】

2つのFRETハイブリダイゼーションプローブを用いる代わりとして、蛍光-標識プライマーおよび一つだけが標識されたオリゴヌクレオチドプローブを用いることも可能である

50

(非特許文献2)。この点に関しては、プライマーがFRETドナーで標識されるか、またはFRETアクセプター化合物で標識されるかを任意に選択することができる。

【0013】

本発明によると、主として、FRETドナー/FRETアクセプターの対として一緒に作用することができる、当該分野で知られている蛍光色素の多くの異なる対が存在する。しかしながら、本発明に先立っては、4つの異なるFRET対が多重検出アッセイで成功して用いられたことを特徴とする機能的な例は開示されていない。他の理由の中では、これは適切な装置がないため、さらには、特異的なFRET対のFRETプロセスの機能性が、同じ反応混合物中に存在する他の蛍光化合物によって妨害されるという事実によるものであろう。

【0014】

PCRおよびリアルタイムPCR以外に、FRETハイブリダイゼーションプローブおよび分子ビーコンが融解曲線分析で用いられる。そのようなアッセイにおいては、標的核酸は、まず、適切な増幅プライマーとの典型的なPCR反応で増幅される。ハイブリダイゼーションプローブは、増幅反応の間に既に存在させることができるか、あるいは引き続いて添加することができる。PCR-反応の完了後、試料の温度は恒常的に上昇し、ハイブリダイゼーションプローブが標的DNAに結合している限りは蛍光が検出される。融解温度においては、ハイブリダイゼーションプローブはそれらの標的から放出され、蛍光シグナルは直ちにバックグラウンドレベルまで低下する。この低下は、蛍光減少の最大が観察される一次微分値を検出できるように、適切な蛍光対温度-時間プロットでモニターされる。

【0015】

しかしながら、ある場合には、FRETハイブリダイゼーションプローブ、または分子ビーコンのようなハイブリダイゼーションプローブの設計に依存して、そのような温度・時間プロットの一次微分は予測された釣鐘形状の曲線を有しないが、一次配列分析によって説明することができないショルダーを含む。現在のところ、DNAハイブリッドの融解の時間経過の基礎となる物理化学的プロセスは、どの数学モデルによっても正確には予測することができない。したがって、実際には、当業者は、程度の差はあるが理想的な釣鐘型形状の曲線を有する融解曲線を生じることができる適切な対を同定し、それを選択するためには、いくつかの同様のハイブリダイゼーションプローブまたはFRETハイブリダイゼーションプローブの対を設計し、それをテストする必要がある。

【0016】

この問題を克服する1つの可能性は、特許文献10に開示されているような、人工的なミスマッチの導入である。しかしながら、ある場合にはミスマッチの導入の結果、特に、同一反応容器中でいくつかのハイブリダイゼーションプローブまたはFRETハイブリダイゼーションプローブのいくつかの対を用いる多重分析の場合には、理想的な形状の融解曲線は得られない。

【特許文献1】米国特許第6,174,670号明細書

【特許文献2】米国特許第5,210,015号明細書

【特許文献3】米国特許第5,538,848号明細書

【特許文献4】米国特許第5,487,972号明細書

【特許文献5】米国特許第5,804,375号明細書

【特許文献6】米国特許第5,118,801号明細書

【特許文献7】国際公開第97/46707号パンフレット

【特許文献8】国際公開第97/46712号パンフレット

【特許文献9】国際公開第97/46714号パンフレット

【特許文献10】国際公開第97/46711号パンフレット

【非特許文献1】Matthews, J.A. およびKricka, L.J., 「Analytical Biochemistry」1988年, 169巻, p.1-25

【非特許文献2】Bernard, P.S.ら, 「Analytical Biochemistry」1998年, 255巻, p.101-107

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

## 【0017】

したがって、当該分野においては、改良された融解曲線挙動を持つオリゴヌクレオチド、特にFRETハイブリダイゼーションプローブを提供する必要性が存在する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0018】

本発明の要旨は以下の通りである：

[1]自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドを合成するための方法であって、

- 制御孔ガラス粒子を提供する工程

- ホスホルアミダイト化学作用により該オリゴヌクレオチドを合成する工程

10

を含む、方法；

[2]軸分子ロッドを含むホスホルアミダイトを提供することにより前記軸分子ロッドが前記オリゴヌクレオチドに組み込まれる、[1]記載の方法；

[3]軸分子ロッドを含む制御孔ガラス粒子を提供することにより前記軸分子ロッドが提供される、[1]記載の方法；

[4]自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドであって、該ロッドが5'末端残基の5'位にまたは3'末端残基の3'位にリン酸塩部分を介して共有結合されている、オリゴヌクレオチド；

[5][4]記載のオリゴヌクレオチドを含む組成物；

[6][4]記載のオリゴヌクレオチドを含むキット；

20

[7]プライマー伸長反応用のプライマーまたは核酸増幅反応用のプライマーとしての、自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドの使用であって、該ロッドが5'末端残基に共有結合されていることを特徴とする使用；

[8]ハイブリダイゼーションプローブとしての、自身では湾曲できない剛直構造である軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドの使用であって、ハイブリダイゼーションの温度依存性がリアルタイムにモニターされる、使用；

[9]固体支持体に固定されている、[4]記載のオリゴヌクレオチド；ならびに

[10]前記分子ロッドが前記固体支持体とヌクレオチド残基の鎖を接続している、[9]記載のオリゴヌクレオチド。

## 【発明の効果】

30

## 【0019】

本発明によれば、改良された融解曲線挙動を持つオリゴヌクレオチド、特にFRETハイブリダイゼーションプローブが提供され得る。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0020】

発明の簡単な説明

この問題は、本発明のオリゴヌクレオチドを供することによって解決される。

## 【0021】

より正確には、本発明は、軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドに関する。

## 【0022】

40

第一の態様では、分子ロッドはオリゴヌクレオチド鎖の第一の部分および第二の部分に結合し、分子ロッドは該鎖の第一の部分の3'末端残基である第一のヌクレオチド残基の3'末端を該鎖の第二の部分の5'末端である第二のヌクレオチド残基の5'末端を共有結合させることを特徴とする。

## 【0023】

第二の態様では、分子ロッドは5'末端残基の5'位置または3'末端残基の3'位置に共有結合する。好ましくは、分子ロッド(molecular rod)はリン酸部位を介してオリゴヌクレオチドの5'または3'末端(ebd)に結合する。

## 【0024】

別の局面では、本発明は上記に開示されているようなオリゴヌクレオチドを含む組成物

50

に関する。

【0025】

第三の局面では、本発明は上記に開示されているようなオリゴヌクレオチドを含むキットに関する。

【0026】

さらなる局面では、本発明は分子ロッドを含むホスホル - アミダイトに関する。

【0027】

本発明の分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドは、例えば、プライマー伸長反応用のプライマー、または核酸増幅反応用のプライマーとして用いることができる。

【0028】

あるいは、本発明の分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。特定の態様では、本発明のハイブリダイゼーションプローブを用いて、ハイブリダイゼーションの温度依存性が、例えば、融解曲線分析を行うことによってモニターされる。

【0029】

また、本発明の分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドを固体支持体に固定化させることもできる。好ましくは、それは、ヌクレオチド残基の鎖を固体支持体に結合させる分子ロッドである。

【0030】

発明の詳細な説明

本発明は軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドに関する。分子ロッドについての詳細な概要は、「Chem.Rev.」(Schwabら、99(1999)1863-1933)(明細書中の本発明の開示においてその内容は参考としてその全体が援用される)によって与えられる。

【0031】

本発明の文脈においては、軸分子ロッドは、ロッド構造に寄与する炭素原子の各々の相対的位置が相互に対して固定されるように、二つの分子(例えば、オリゴヌクレオチドの二つの部分)を結合させるリンカーとして定義することができる。換言すると、分子ロッドは、自身では湾曲できない剛直構造である。その結果として、ロッド構造に共有結合した二つの分子の原子の間の距離は固定され、変えることができない。

【0032】

本発明の範囲内では、オリゴヌクレオチド合成プロトコルに適合するいずれの種類の分子ロッドも用いることができる。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドの合成に用いられるロッドは、わずか数個の炭素原子よりなる小さな単純な化学構造である。また、好ましいのは、好ましくは商業的に入手可能な基本的化合物から出発する有機化学の従来の方法によって非常に安価にかつ容易に合成することができるタイプの分子ロッドである。

【0033】

好ましい態様では、ロッドは単結合された軸分子ロッドである。定義すると、単結合された軸分子ロッドは、ロッドによって接続された二つの分子の各々に単一の共有結合によって結合している。例えば、分子ロッドは、単純に、エチレンによって連結された二つの炭素原子よりなる。本発明の範囲を限定しない単結合された分子ロッドについての他の例はビシクロペンタン、ビシクロオクタン(bicyclooctane)、クバン、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ピレン、ピリジン、またはポルフィリンである。ロッド構造に共有結合した二つの分子の原子の間の距離は固定されるけれども、単独に連結する軸分子ロッドによって連結された分子、特にオリゴヌクレオチドは相互に対して相対的に回転することができる。

【0034】

かなり好ましい態様では、単結合された軸分子ロッドはエチレン部位あるいはフェニレン部位のいずれかを含むか、またはそれから構成される。

【0035】

別のかなり好ましい態様では、単結合された軸分子ロッドは以下の分子構造を含むか、

10

20

30

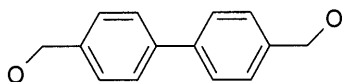
40

50

またはそれからなる。

【0036】

【化1】



【0037】

代替的な態様では、ロッドは二重結合した軸方向分子ロッドである。定義すると、二重結合した軸分子ロッドは、ロッドによって連結された2つの分子の各々に2つの共有結合によって連結されている。二重結合された軸分子ロッドの例は、エチレン、シクロブタン、シクロヘキサン、およびシクロヘキサジエンである。二重に連結する軸分子ロッドによって連結された分子、特にオリゴヌクレオチドは、ロッド構造に共有結合された2つの分子の原子の間の距離が固定されているという事実に加えて、相互に対して相対的に回転することができない。

10

【0038】

オリゴヌクレオチドの軸分子ロッドがポリエチレンなどのようないくつかのモジュールから構成されている場合もまた、本発明の範囲内である。従って、用いるモジュールの数に依存して、軸分子ロッドの長さはそれに従って必要に応じて調整することができる。

20

【0039】

分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドの合成は、従来のオリゴヌクレオチド合成化学に従って行うことができる。

【0040】

1つの態様では分子ロッドは3'末端残基の3'-OH位置、または3'末端残基の3'位置に共有結合される。この態様では、軸分子ロッドは、三官能性スペーサーを含む適切なCPG(Controlled Pore Glass(細孔性ガラス))を用いて、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドの3'末端に導入することができる。これは、米国特許第5,290,925号に開示された化合物および方法に類似した分子ロッドを既に担持しているCPGを適用することによって行うことができる。

30

【0041】

別の態様では、分子ロッドは5'末端残基の5'-位置に共有結合される。この他の態様では、軸分子ロッドは、適切なホスホル-アミダイトを用いることによって、未完成のオリゴヌクレオチド鎖に連結することができる。任意に、ロッドの遊離末端にアミノ基を導入することができ、これは、その後の従来のポストラベリングストラテジーの基礎として働くことができる。

【0042】

ホスホル-アミダイト化学方法はいずれの当業者によってもよく知られている。1つのヌクレオチドの3'-リン酸基(phosphorous)は別のヌクレオチドの5'-ヒドロキシル部分と反応する。溶液中に遊離させられた5'-ジメトキシトリチル保護モノマーを持つ各ホスホル-アミダイトと、不活性な基材に結合した伸長している途中の3'反応性オリゴヌクレオチドの間で、反応は3'から5'方向に進行する。他の方法と比較して、固有のカップリング収率は、通常、 $98 \pm 0.5\%$ 程度であり、その結果、容易に精製される付加物が得られる。高い収率の合成を確実にする重要な要因はキャッピング工程であり、これは、5'-ヒドロキシル部分にあるカップリングされていない塩基のアセチル化である。各合成の最後に回収された粗反応混合物は、少量の副産物と共に所望の付加物よりなる。これらの欠失配列は1塩基からn-1塩基までのサイズの範囲であり、nは所望の産物中の塩基数である。カップリングの失敗により形成された欠失配列は、その後の塩基付加の前に化学的にキャッピングされなければならない。そうでなければ、これらの失敗した配列はホスホル-アミダイトに対して全長付加物と競合するであろう。また、所望の産物からの(n-1)マーの分離

40

50

は、より短い長さの他の切形配列の分離よりはかなり挑戦的である。

【0043】

未完成のオリゴヌクレオチドは、未完成のオリゴヌクレオチド鎖の反応性5'OH基を生じさせるために、各合成サイクルの後に除去されなければならないジメトキシトリチル(DMT)基によって保護された5'-ヒドロキシル位置を有する。生成物であるオリゴヌクレオチドについては、DMT基は合成の間に除去することができ(トリチルオフ)、またはもし逆相HPLCが選択できる精製方法であれば残すことができる(トリチルオン)。合成されたオリゴヌクレオチドが支持体から切断されると遊離3'-ヒドロキシル部分が作り出され、従って、さらなる脱保護は必要ない。

【0044】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、内部分子ロッドを含むハイブリダイゼーションプローブが、融解曲線分析実験において改変されたかつより予測可能な挙動を有することを見い出した。従って、本発明の1つの重要な態様では、分子ロッドがオリゴヌクレオチド鎖の第一の部分および第二の部分と連結し、分子ロッドが該鎖の第一の部分の3'末端残基である第一のヌクレオチド残基の3'末端を該鎖の第二の部分の5'末端である第二のヌクレオチド残基の5'末端と共有結合することを特徴とする。

10

【0045】

内部軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドを作り出せる容易な可能性が存在する。適切に保護されたヒドロキシル基を担持している軸分子ロッドを含む適切なホスホル-アミダイトを導入することができる。これは、次の合成サイクルの間に、別のデオキシヌクレオチド-ホスホル-アミダイトと反応することができるように脱保護できる。

20

【0046】

フェニレンホスホル-アミダイトの合成の例は図1および実施例1に示される。他の分子ロッドホスホル-アミダイトは、それに対応して、例えば、反応性基として2つのヒドロキシル基を含むロッド足場から出発して合成することができる。

【0047】

別の態様では、適切な長さの内部ロッドを含むオリゴヌクレオチドを作り出すために複数のロッドを担持しているホスホル-アミダイトを次々と未完成のオリゴヌクレオチド鎖にカップリングさせることができる。

【0048】

別の局面では、本発明は、上記で開示された軸分子ロッドを持つ少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。

30

【0049】

さらに別の局面では、本発明は、上記で開示されたオリゴヌクレオチドを含むキットに関する。

【0050】

一般に、本発明の軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドは、種々の用途に、例えば、プライマー伸長反応用のプライマーとして、核酸増幅反応用のプライマーとして、またはハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。

【0051】

1つの態様では、軸分子ロッドは、オリゴヌクレオチド鎖および標識部分の間の標識されたオリゴヌクレオチドのリンカーとして働くことができる。その結果、ロッドの剛直構造は、標識部分とオリゴヌクレオチド鎖との間の部分的な接近を防ぐことになる。標識が蛍光部分である場合、そのような回避はかなり有利である。というのは、G残基と蛍光部分との間の制御できない相互作用による望まない消光効果が回避されるからである。

40

【0052】

別の重要な態様では、本発明の内部軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドはハイブリダイゼーションプローブとして用いられる。軸分子ロッドはTaqManプローブ、分子ビーコンのようなあらゆる種類のハイブリダイゼーションプローブの一体化部分であってよく、また、FRETハイブリダイゼーションプローブの対の一方または双方のメンバーの一体化部

50

分中であってもよい。本発明のハイブリダイゼーションプローブは、プロット、マイクロタイタープレート、マイクロアレイでのハイブリダイゼーションに、および特に、リアルタイムPCRに用いることができる。

【0053】

特定の態様では、本発明のハイブリダイゼーションプローブまたはFRETハイブリダイゼーションプローブの対を用い、例えば、融解曲線分析を行うことによって、ハイブリダイゼーションの温度依存性がモニターされる。

【0054】

リアルタイムPCR融解曲線分析は、通常、PCR反応の完了後に行われる。初期の変性および冷却工程の後に、アンプリコンの温度は恒常的に上昇し、ハイブリダイゼーションプローブが標的DNAに結合する限りは、蛍光が検出可能である。FRETハイブリダイゼーションプローブ様式の場合には、蛍光シグナルを生じさせるためには、双方のプローブは標的核酸にハイブリダイズしたままであることが必要である。融解温度では、ハイブリダイゼーションプローブ(FRET様式の場合には：ハイブリダイゼーションプローブの該対の少なくとも1つのメンバー)がその標的から遊離させられ、蛍光シグナルは直ちにバックグラウンドレベルまで低下する。

10

【0055】

この低下が、適切な蛍光対温度 - 時間プロットでモニターされ、蛍光低下の最大が観察される一次微分値を決定することができる。以下の実施例に示されるように、本発明の内部軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドは、この特定の態様にかなり有利であろう。

20

【0056】

軸分子ロッドの剛直性質のため、オリゴヌクレオチドの融解特性を実質的に変えることができ、したがって、必要な条件に調整することができる。

【0057】

まず、内部分子ロッドの導入の結果、通常は中程度の温度低下であるオリゴヌクレオチドの融解温度 $T_m$ の中程度のシフトが起こり得る。そのような低下は、特に、複数の $T_m$ を分析し、相互に区別しなければならない多重融解曲線アプローチに有利であり得る。

【0058】

第二に、内部分子ロッドの導入は、通常、塩基対合ミスマッチを伴うハイブリダイゼーション事象と伴わないハイブリダイゼーション事象とを比較した場合に検出することができる融解温度の差を大きくする。従って、本発明のオリゴヌクレオチドは、リアルタイムPCRにおいて、固体支持体を用いる態様と同様に、対立遺伝子の区別、および単一ヌクレオチド多形分析の解析を有意に改良する。

30

【0059】

第三に、これまでに研究した全ての場合における内部分子ロッドの導入の結果、一次微分の温度対時間プロットを作成すると、シャープで、スレンダーで、かつ最適な釣鐘形状の融解ピークが得られる。これは、軸分子ロッドの剛直な性質によって説明することができ、これは、それぞれのハイブリダイゼーションプローブが標的DNAに依然として完全にハイブリダイズしているか、または反応溶液中でその一本鎖形態で完全に遊離している状況を生じさせる。言い換えると：ショルダーを持つ釣鐘形状ではない融解曲線を生じる部分的にハイブリダイゼーションした中間体が回避される。

40

【0060】

第四に、内部軸分子ロッドを含むプローブの使用の結果、多くの場合に、アッセイ特異性の改良が得られる。

【0061】

最後の局面では、本発明の軸分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドを固体支持体、例えば、核酸マイクロアレイに固定することができる。好ましくは、それは、ヌクレオチド残基の鎖を固体支持体に連結する分子ロッドである。そのような用途は非常に有用である。なぜならば、ロッドの剛直構造は、オリゴヌクレオチド自体と固体支持体との間の限定された、規定された、制御可能な空間的分離を生じるからである。その結果、固体支持体へ

50

の接近によって引き起こされる固定されたオリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションについて推定される立体障害が回避される。

【0062】

核酸アレイの使用については、最適化されたマッチ/ミスマッチ区別を達成することが特に重要であるので、本発明による内部分子ロッドの導入はかなり有利である。なぜならば、これは、塩基対合ミスマッチを伴うハイブリダイゼーション事象とそれを伴わないハイブリダイゼーション事象とを比較した場合に、検出可能な融解温度の差を大きくするからである。

【0063】

固体支持体への分子ロッドのカップリングの適切な態様は、実際に使用すべき固体支持体のタイプに依存する。例えば、ロッドのアミノ基はガラスまたはプラスチックのような表面のエポキシ基と反応することができる。あるいは、アルコキシ-シラン化ロッドをガラス表面にカップリングさせることができる。反応性C-OH基を担持している表面では、従来のホスホルアミデート化学を用いて結合を得ることができる。

10

【0064】

インサイチュ合成によって固体支持体上に固定されたオリゴヌクレオチドの密度を制御するためには、第一の工程において、オリゴヌクレオチド合成によって延長することができる(exendable)軸分子ロッドおよび延長することができない軸分子ロッドの混合溶液と固体支持体とを反応させる。次いで、延長することができないロッド化合物の濃度を補正することによって密度を調整することができる。

20

【0065】

以下の実施例、文献、配列表および図面は本発明の理解を助けるために掲げるものであり、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載される。本発明の精神を逸脱することなく、記載される手順に変更を加えることができる。

【実施例】

【0066】

実施例1

分子ロッドを含むオリゴヌクレオチドの合成

本発明のオリゴヌクレオチドの合成の例として、内部ロッドを担持している本発明のオリゴヌクレオチドを、図1に示したストラテジーに従って以下のように合成した。

30

【0067】

A)4-(p,p'-ジメトキシトリチル-メチルオキシ)ベンジルアルコール

1時間以内に、300mlの乾燥ピリジン中の51.5gの塩化ジメトキシトリチルの溶液を、室温にて、100mlの乾燥ピリジン中の20gの1,4ビスヒドロキシメチルベンゼンの溶液に滴下した。一晩攪拌した後、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を蒸発させた。残渣を800mlの酢酸エチルエステルに溶解させ、400mlの水で1回、次いで200mlの水で2回洗浄した。有機相を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、ロータリーエバポレーターを用いて、溶媒を除去した。

【0068】

シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによって精製を行った。これにより、0.1%のトリエチルアミンを含有するトルオール/酢酸エチルエステル/メタノールの4:1:1混合液に10グラムの粗生成物を溶解させた。シリカゲル60(0.063~0.200mm)を充填した40cm/d=6.9cmカラムに溶液を加えた。0.1%トリエチルアミンを含有するトルオール/酢酸エチルエステル/メタノールの4:1:1混合液で生成物を溶出した。

40

【0069】

TLC:0.1%トリエチルアミンを含有するトルオール/酢酸エチルエステル/メタノールの4:1:1混合液 Rf:0.56

【0070】

B)ジイソプロピル-ホスホルアミド酸4-[ビス-(4-メトキシ-フェニル)-フェニル-メトキシ]-ベンジルエステル2-シアノ-エチルエステル

50

室温にて、アルゴン下、0.78グラムのジソプロピルアンモニウムテトラゾールを、乾燥した15mlの塩化メチレン中の2グラムの1-(0-ジメトキシトリチル-ヒドロキシメチル)4-ヒドロキシメチル-ベンゼンの溶液に添加した。10mlの乾燥塩化メチレン中の1.37gの2-シアノエチル-テトライソプロピル-ホスホルジアミダイトの溶液を30分以内に滴下により添加した。室温にて2時間攪拌した後、懸濁液を濾過した。ロータリーエバポレーターを用いることによって、濾液から溶媒を除去した。残渣を50mlの酢酸エチルエステルに溶解させ、10mlの5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回洗浄した。有機相を分離し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。濾過後、ロータリーエバポレーターを用いて、溶媒を除去した。

【0071】

精製は、シリカゲル上でのカラムクロマトグラフィーによって行った。これにより、0.1%トリエチルアミンを含有する酢酸エチルエステル/ヘキサンの1:1混合液に粗生成物を溶解させた。シリカゲル60(0.063~0.200mm)を充填した $l=32\text{cm}/d=4.5\text{cm}$ カラムに溶液を加えた。0.1%トリエチルアミンを含有する酢酸エチルエステル/ヘキサン1:1混合液で生成物を溶出した。

【0072】

TLC:0.1%トリエチルアミンを含有する酢酸エチルエステル/ヘキサンの1:1混合液 Rf:0.80

【0073】

NMR  $^1\text{H}$ (300MHz):1.21t[12H], 2.76t[2H], 3.7m[2H], 3.78s[6H], 3.88m[2H], 4.16s[2H], 4.75m[2H], 6.91d[4]7.23-7.67m,s[13] NMR  $^{31}\text{P}$ (300MHz):149.19

【0074】

ホスホルアミデート化学を用いる従来のオリゴヌクレオチド合成によって、得られたホスホルアミデートをオリゴヌクレオチドに取り込んだ。上記で合成したオリゴヌクレオチド中の分子ロッドを以下の実施例では「フェニレンリンカー」という。

【0075】

実施例2

プロトロンピンプラスミドDNAのリアルタイム突然変異分析

本発明の有効性を示すために、ハイブリダイゼーションプローブを用いることによるプロトロンピン(G20210A)点突然変異の遺伝子型決定をテスト系として選択した。

【0076】

野生型および突然変異体プロトロンピン配列の部分断片を別々のpCR<sup>T</sup>M 2.1プラスミドベクター(Invitrogen)にクローニングした。プラスミドDNAの濃度は分光測定によって見積もった。ヘテロ接合性DNAを得るためのプロトロンピンプラスミドDNA希釈物ならびに野生型および突然変異体プラスミドの混合物は、10mMトリス-HCl(pH8.3)中のMS2 RNA(10ng/ $\mu\text{l}$ )よりなる希釈剤を用いることによって調製した。

【0077】

PCRは、LightCycler機器(Roche Molecular Biochemicals)で行った。典型的なPCRアッセイは、1つの反応キャピラリー中において20 $\mu\text{l}$ 容量になるよう水で調整した、2 $\mu\text{l}$ のDNA、1 $\times$ 検出ミックス、1 $\times$ 反応緩衝液、4mMの塩化マグネシウムおよび1.6ユニットのTaqポリメラーゼ(全て、Roche Diagnostics, Mannheim, Germany製)よりなるものであった。

【0078】

突然変異分析には、LightCycler-DNAマスターハイブリダイゼーションプローブキット(Roche Molecular Biochemical, カタログ番号2015102)からの反応緩衝液および修飾されていないTaqポリメラーゼを用いた。

【0079】

プロトロンピン用の10 $\times$ 検出ミックスは、10mMトリス-HCl(pH8.3)緩衝液中の5 $\mu\text{M}$ の各プライマー(正方向および逆方向)、2 $\mu\text{M}$ の突然変異プローブ(フルオレセイン-標識)、4 $\mu\text{M}$ のアンカープローブ(LC Red 640-標識)、0.05%Brij-35よりなるものであった。

【0080】

以下のプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブ配列を用いた：

10

20

30

40

50

プロトロンピン正方向プライマー:

5' CCAATCCCGTGAAAGAATTAT-3' (配列番号:1)

プロトロンピン逆方向プライマー:

5' -AGGTGGTGGATTCTTAAGTC-3' (配列番号:2)

プロトロンピンプローブ1:

5' -LCRed640-CACTTTTATTGGGAACCATAGTTTTAGAAACACAA-リン酸-3' (配列番号:3)

プロトロンピンプローブ2:

5' -GCATTGAGGCTCGCTGAGAG-フルオレセイン-3' (配列番号:4)

プロトロンピンプローブ3:

5' -GCATTGTGGCTCGCTGAGAG-フルオレセイン-3' (配列番号:5)

プロトロンピンプローブ4:

5' -GCATTGxGGCTCGCTGAGAG-フルオレセイン-3' (配列番号:6)

x=フェニレンリンカー

【0081】

通常のPCRサイクル条件は30秒間の初期の95°Cのインキュベーション、続いての、45サイクルの0秒間の95°C、10秒間の55°C、および5秒間の72°Cよりなるものであり、30秒間の40°Cで終了した。

【0082】

各反応についての融解温度は、バックグラウンドを差し引き(substraction)、多項計算方法を用いるLightCycler解析ソフトウェアによって決定した。

【0083】

実施例3

プロトロンピン(G20210A)点突然変異の遺伝子型決定は、完全マッチ突然変異プローブでは可能でない。

1ngの野生型、ヘテロ接合および突然変異体プロトロンピンDNAのリアルタイムPCRは実施例1の設定で行った。結果を図2に示す。分かるように、完全マッチ突然変異プローブで融解曲線分析を行った後に、プロトロンピン遺伝子型を正確に決定することは可能でない。なぜなら、ホモ接合野生型およびヘテロ接合遺伝子型は正確には区別できないからである。

【0084】

実施例4

人工的なミスマッチを持つ突然変異プローブを用いて、プロトロンピン(G20210A)点突然変異の遺伝子型を決定することは可能であるが、完全ではない。

1ngの野生型、ヘテロ接合および突然変異体プロトロンピンDNAのリアルタイムPCRは実施例1の設定で行った。結果を図3に示す。分かるように、プロトロンピン遺伝子型の正しい決定は人工的なミスマッチを持つ突然変異プローブを用いて原理的に可能であるが、野生型融解ピークは依然として非常に幅が広く明らかなショルダーを示す。加えて、ヘテロ接合試料の二つの融解ピークの間最小は高いシグナルレベルを有し、従って、ピーク間の最小および野生型融解ピークの最大の間には大きな差はない。

【0085】

実施例5

フェニレンリンカーが挿入されている突然変異プローブを用いて、プロトロンピン(G20210A)点突然変異の完全な遺伝子型決定を行うことができる。

1ngの野生型、ヘテロ接合および突然変異体プロトロンピンDNAのリアルタイムPCRは実施例1の設定で行った。結果を図4に示す。分かるように、プロトロンピン遺伝子型は、フェニレンリンカーが挿入されている突然変異プローブを用いて完全に決定することができる。全ての融解ピークは非常にシャープであって、ショルダーは全くない。

【0086】

実施例6

異なる突然変異プローブを用いるプロトロンピン突然変異融解ピークの融解温度のシフト

10

20

30

40

50

1ngの突然変異体プロトンピンDNAのリアルタイムPCRは、実施例1の設定で行った。結果を図5に示す。分かるように、プロトンピン突然変異融解ピークの融解温度は、用いた突然変異プローブに依存してシフトする。以下の表は異なる融解温度を示す。

【0087】

【表1】

	$T_M$ (°C)	$\Delta T_M$ (°C)
完全にマッチする突然変異プローブ	57.80	5.67
人工的なミスマッチを持つ突然変異プローブ	52.13	
Hauber リンカーが挿入されている突然変異プローブ	46.28	5.85

10

【0088】

実施例7

EBVプラスミドDNAのリアルタイムPCR

本発明の有効性を示すために、しばしばEBVと言われるエプスタイン-バーウイルス(ヘルペスウイルスファミリーのメンバーであって、最も一般的なヒトウイルスの一つである)を第二のテスト系として選択した。

20

【0089】

EBVの部分的断片をpT3T7プラスミドベクター(Roche Molecular Biochemicals)にクローニングした。プラスミドDNAのコピー数は、1モルが $6 \times 10^{23}$ コピーに等しいと仮定して分光測定によって見積もった。EBVプラスミドDNA希釈物は、10mMのトリス-HCl(pH8.3)中のMS2 RNA(10ng/ $\mu$ l)よりなる希釈剤を用いることによって調製した。

【0090】

PCRはLightCycler機器(Roche Molecular Biochemicals)で行った。典型的なPCRアッセイは、1つの反応キャピラリー中において20 $\mu$ l容量になるよう水で調整した、5 $\mu$ lのDNA、1 $\times$ 検出ミックス、1 $\times$ 反応緩衝液、3.5mM塩化マグネシウム、および1.6ユニットの修飾されたTaqポリメラーゼ(全て、Roche Diagnostics, Mannheim, Germany製)よりなるものであった。

30

【0091】

PCRには、LightCycler-Fast Start DNAマスターハイブリダイゼーションプローブキット(Roche Molecular Biochemical, カタログ番号3003248)による反応緩衝液および修飾されたTaqポリメラーゼを用いた。

【0092】

EBV用の10 $\times$ 検出ミックスは、10mMトリス-HCl(pH8.3)緩衝液中の5 $\mu$ Mの各プライマー(正方向および逆方向)、2 $\mu$ Mの各ハイブリダイゼーションプローブ(フルオレセインおよびLC Red640で標識)、0.05% Brij-35よりなるものであった。

【0093】

以下のプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブ配列を用いた:

EBV正方向プライマー:

5'-ATGAGGAACGTGAATCTAATGA-3'(配列番号:7)

EBV逆方向プライマー:

5'-TACAGATAGATGGCACTCTTACCTT-3'(配列番号:8)

EBVプローブ1:

5'-GGGATTGCAACACGACGGGAATGACG-フルオレセイン-3'(配列番号:9)

EBVプローブ2:

5'-LCRed640-GCTCCCTCCCCCTCCCTACTCTC-リン酸-3'(配列番号:10)

EBVプローブ3:

40

50

5'-LCRed640-GCTCCCTCCCCCTCCTACTCTC-リン酸-3' (配列番号:11)

x=フェニレンリンカー

【0094】

通常のPCRサイクル条件は、10分間の初期の95°Cのインキュベーション、続いての45サイクルの10秒間の95°C、15秒間の55°Cおよび15秒間の72°Cよりなるものであり、30秒間の40°Cで終えた。

【0095】

各反応についての融解温度は、バックグラウンドを差し引き(substraction)、多項計算方法を用いるLightCycler分析ソフトウェアによって決定した。

【0096】

実施例 8

完全マッチハイブリダイゼーションプローブでは、二重融解ピークが生じる。

10<sup>4</sup>個のコピーのEBVのリアルタイムPCRは実施例6の設定で行った。結果を図6に示す。分かるように、完全マッチハイブリダイゼーションプローブでの融解曲線分析を行うと二重ピークが生じ、予想された単一の融解ピークは生じなかった。

【0097】

実施例 9

フェニレンリンカーが挿入されているハイブリダイゼーションプローブを用い、単一融解ピークが生じる。

10<sup>4</sup>個のコピーのEBVのリアルタイムPCRは実施例6の設定で行った。結果を図7(6)に示す。分かるように、もしT<sub>m</sub>を決定したハイブリダイゼーションプローブにフェニレンリンカーが挿入されている場合に、融解曲線分析を行った後に予期された単一融解ピークが生じた。

【0098】

参考文献一覧

Bernard, P. S., et al., Analytical Biochemistry 255 (1998) 101-107

Matthews, J.A., and Kricka, L.J., Analytical Biochemistry 169 (1988) 1-25

Schwab et al., In Chem. Rev. 99 (1999) 1863-1933

US 5,118,801

US 5,141,837

US 5,210,015

US 5,290,925

US 5,487,972

US 5,538,848

US 5,804,375

US 6,174,670

WO 97/46707

WO 97/46711

WO 97/46712

WO 97/46714

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図1】分子ロッドを含むホスホル - アミダイトの合成 この図は、従来のオリゴヌクレオチド合成化学によってオリゴヌクレオチド(oligonucleotidy)に内部に一体化させることができる、本発明の分子ロッドを含むホスホル - アミダイトの作成のための合成ストラテジーを示す。詳細は実施例1において説明される。

【図2】プロトンピンの突然変異分析 1ngのプロトンピンホモ接合野生型、ヘテロ接合およびホモ接合突然変異体プラスミドDNAを増幅した。突然変異部位をまたぐハイブリダイゼーションプローブ(突然変異プローブ)はホモ接合野生型プラスミドDNAに対して100%相同性を有した。

10

20

30

40

50

【図3】人工的なミスマッチを含むプロトロンビン突然変異分析 1ngのプロトロンビンホモ接合野生型、ヘテロ接合およびホモ接合突然変異体プラスミドDNAを増幅した。突然変異部位をまたぐハイブリダイゼーションプローブ(突然変異プローブ)は人工的ミスマッチを担持した。

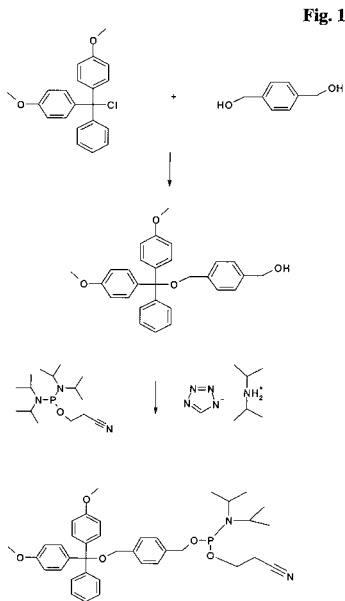
【図4】挿入されたフェニレンリンカーでのプロトロンビン突然変異分析 1ngのプロトロンビンホモ接合野生型、ヘテロ接合およびホモ接合突然変異体プラスミドDNAを増幅した。突然変異部位をまたぐハイブリダイゼーションプローブ(突然変異プローブ)は、挿入されたフェニレンリンカーを担持しているものであった。

【図5】プロトロンビン突然変異分析：修飾された突然変異プローブを用いる融解ピークのT<sub>M</sub>シフト 1ngのプロトロンビンホモ接合突然変異体プラスミドDNAを増幅した。3つの異なる突然変異プローブをテストした：1つはホモ接合野生型プラスミドDNAに対して100%相同性を持ち、1つは人工的なミスマッチを持ち、および1つはフェニレンリンカーが挿入されているものであった。

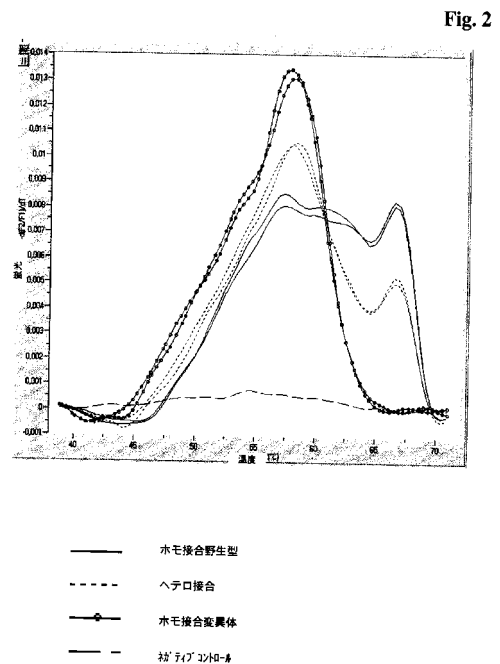
【図6】完全マッチハイブリダイゼーションプローブでのEBV検出 EBVプラスミドDNAの10<sup>4</sup>個のコピーを増幅した。T<sub>M</sub>を決定したLC Red 640標識ハイブリダイゼーションプローブはEBVプラスミドDNAに対して100%相同性を示した。

【図7】挿入されたフェニレンリンカーを担持しているハイブリダイゼーションプローブでのEBV検出 EBVプラスミドDNAの10<sup>4</sup>個のコピーを増幅した。T<sub>M</sub>を決定したLC Red 640標識ハイブリダイゼーションプローブは挿入されたフェニレンリンカーを担持しているものであった。

【図1】



【図2】

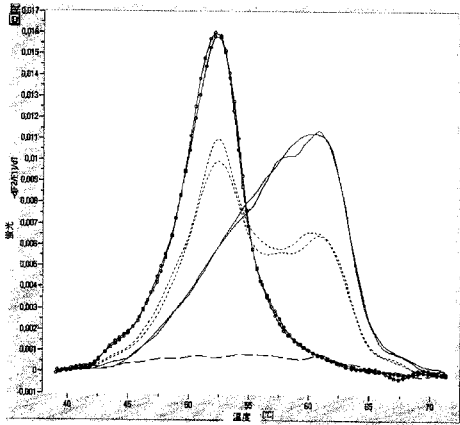


10

20

【 図 3 】

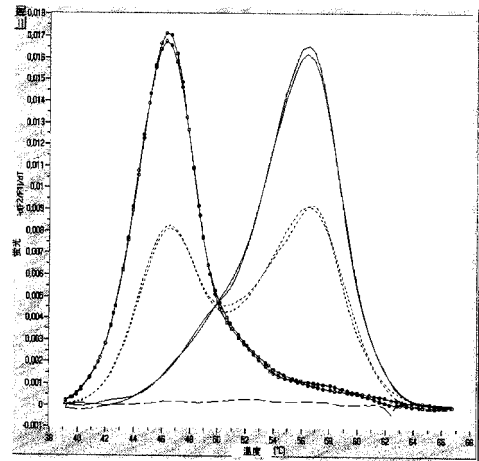
Fig. 3



——— ホモ接合野生型  
 - - - - - ヘテロ接合  
 —○— ホモ接合変異体  
 - - - 標 747 コトH-A

【 図 4 】

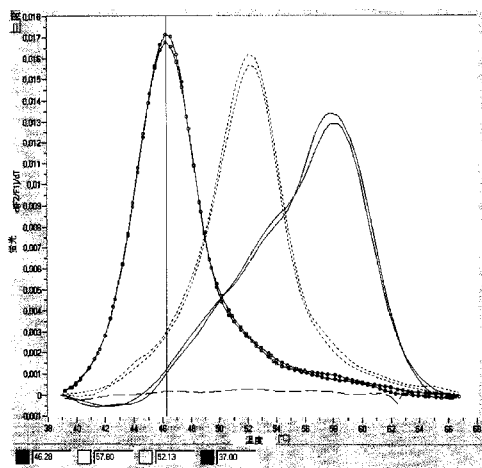
Fig. 4



——— ホモ接合野生型  
 - - - - - ヘテロ接合  
 —○— ホモ接合変異体  
 - - - 標 747 コトH-A

【 図 5 】

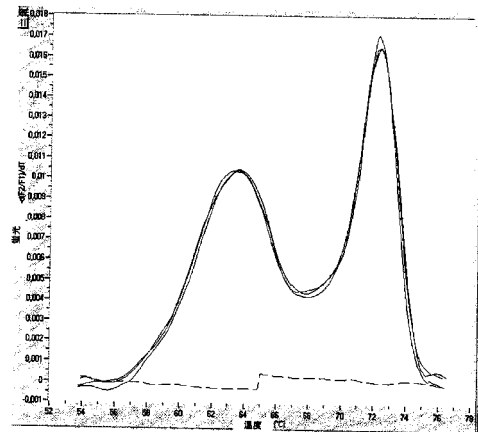
Fig. 5



	$T_m$
——— 完全マッチ	57.80°C
- - - - - ざらなるミスマッチ	52.13°C
—○— フェニレンリンカー	46.28°C
- - - 標 747 コトH-A	

【 図 6 】

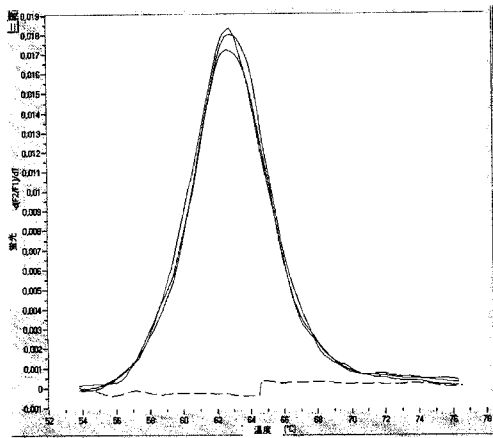
Fig. 6



———  $10^6$  EBV コピー  
 - - - 標 747 コトH-A

【 図 7 】

Fig. 7



— 10<sup>5</sup> EBV コピー  
- - 参照サンプル

【 配列表 】

[2005200405000001.app](#)

---

フロントページの続き

(72)発明者 カーリム タビチ

ドイツ連邦共和国 ベキング 8 2 3 4 3 ガルテンシュトラッセ 2 6 ツェー

(72)発明者 マルティーナ ユーニウス

ドイツ連邦共和国 トゥーツィング 8 2 3 2 7 ハルベルガー アレー 1 1

(72)発明者 アレクサンダー ハウバー

ドイツ連邦共和国 ヴィーレンバッハ 8 2 4 0 7 シュヴァルベンヴェーク 2

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62 QR84 QS25

QS34 QS36 QX02

4C057 BB02 BB05 CC03 DD03 MM01 MM02 MM04 MM05 MM09

【外国語明細書】

2005200405000001.pdf