

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6448534号
(P6448534)

(45) 発行日 平成31年1月9日(2019.1.9)

(24) 登録日 平成30年12月14日(2018.12.14)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12Q 1/6827 (2018.01)
C 12Q 1/6886 (2018.01)C 12Q 1/6827 Z N A Z
C 12Q 1/6886 Z

請求項の数 25 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2015-515106 (P2015-515106)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月28日 (2013.5.28)
 (65) 公表番号 特表2015-518727 (P2015-518727A)
 (43) 公表日 平成27年7月6日 (2015.7.6)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/042817
 (87) 國際公開番号 WO2013/181125
 (87) 國際公開日 平成25年12月5日 (2013.12.5)
 審査請求日 平成28年5月19日 (2016.5.19)
 (31) 優先権主張番号 13/840,142
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/652,827
 (32) 優先日 平成24年5月29日 (2012.5.29)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507051972
 アボット・モレキュラー・インコーポレイ
テッド
 アメリカ合衆国、イリノイ・60018、
 デス・プレーンズ、イースト・トウイ・ア
ベニュー・1300
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口國際特許事務所
 (72) 発明者 ホワン、シーハイ・エックス
 アメリカ合衆国、イリノイ・60069、
 リンカーンシャー、シェアウッド・ドライ
ブ・3

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒトB R A Fのコドン600における一塩基多型(S N P)を検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト由来の核酸の試料中のB R A F遺伝子のエクソン15におけるアミノ酸位置600のバリンをコードするコドンの少なくとも1つの突然変異(X)(V600X)を検出する方法であって、

(a) 核酸の試料を用いて増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、かつ3'末端から4番目のヌクレオチドがアデニン(A)以外の塩基を含有し、配列番号8、9、17、18、20および21から成る群より選択される配列を有するプライマーを含み、Xが存在する場合は、該プライマーはXにアニーリングし、

ここで、核酸の試料がm R N Aである場合、段階(a)は、前記増幅反応を実施する前にm R N Aから逆転写されたc D N Aを得ることまたはm R N Aからc D N Aを逆転写することをさらに含み、

Xが存在する場合は、該増幅反応はXを含有する増幅産物を生成する、段階と、

(b) Xを含有する増幅産物を検出し、任意選択的に定量化する段階を含み、

ここで、Xが2以上のコドンによってコードされる場合、前記増幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含み、

ヒト由来の核酸の試料中のB R A F遺伝子のエクソン15におけるV600X突然変異が検出される、方法。

10

20

【請求項 2】

前記増幅反応が、少なくとも 1 つのペプチド核酸 (P N A) クランプをさらに含み、ここで該少なくとも 1 つの P N A クランプが野生型標的からの増幅をブロックし、前記増幅反応が 1 以上の他の P N A クランプを含む場合、前記 P N A が、望ましくない標的に結合し、プライマーが望ましくない標的から増幅するのを妨げることによって検出可能オリゴヌクレオチドおよび / またはプライマーを捕捉する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 X を含有する増幅産物を検出する段階が、標識プライマーを検出すること、または前記増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、かつ前記 X を含有する増幅産物への前記検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記増幅反応が内部対照プライマーをさらに含み、この場合前記増幅反応が前記内部対照を含有する増幅産物も生成し、この場合段階 (b) が、前記内部対照を含有する増幅産物を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記内部対照を含有する増幅産物を検出する段階が、標識プライマーを検出すること、または前記増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、前記内部対照を含有する増幅産物への前記検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含む、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

X が、E 、 K および D から成る群より選択される少なくとも 1 個のアミノ酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

X が E である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

X が、E および K であるか、または E および D であるか、または K および D である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

X が E 、 K および D である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法であって、前記方法が 2 以上の X を検出する段階を含む場合、前記方法が、各々の X についての D N A の試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含み得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

いずれの X が D N A の試料中に存在するかを決定する段階をさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ヒト由来の核酸の試料中の B R A F 遺伝子のエクソン 1 5 における V 6 0 0 X の増幅のためのプライマーのセットであって、前記プライマーのセットが、

40

(a) 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A A [配列番号 : 5 9] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A G [配列番号 : 6 0] を含むオリゴヌクレオチド、

(b) 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A A [配列番号 : 4 6] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A G [配列番号 : 4 7] を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A T [配列番号 : 4 8] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A C [配列番号 : 4 9] を含むオリゴヌクレオチド、

(d) 3 ' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A T [配列番号 : 5 0]

50

] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A C [配列番号 : 51] を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G T [配列番号 : 52] を含むオリゴヌクレオチド、 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G C [配列番号 : 53] を含むオリゴヌクレオチド、 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G A [配列番号 : 54] を含むオリゴヌクレオチド、 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G G [配列番号 : 55] を含むオリゴヌクレオチド、 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A G A [配列番号 : 56] を含むオリゴヌクレオチド、 および 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A G G [配列番号 : 57] を含むオリゴヌクレオチド、

- (d) および (e)、
- (a) および (b)、
- (a) および (c)、
- (b) および (c)、
- (a)、 (b) および (c)、

(d) とのさらなる組合せで、 (a)、 (b) および (c) のいずれか、
 (e) とのさらなる組合せで、 (a)、 (b) および (c) のいずれか、 ならびに
 (d) および (e) とのさらなる組合せで、 (a)、 (b) および (c) のいずれか
 から成る群より選択される少なくとも 1 つのプライマーを含み、

ここで N は、アデニン (A) 以外の塩基を含むヌクレオチドであり、

前記オリゴヌクレオチドは、約 15 ヌクレオチドから約 35 ヌクレオチドを含む、
 プライマーのセット。

【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチドが、ヌクレオチド配列の 5' 末端の G と隣接して、ヌクレオチド配列の 3' 末端の T から始まるヌクレオチド配列 5' - A A T A G G T G A T T T T 3' [配列番号 : 58] の 1 以上の連続するヌクレオチドをさらに含む、請求項 12 に記載のプライマーのセット。

【請求項 14】

約 15 ヌクレオチドから約 35 ヌクレオチドを含むプライマーをさらに含み、ここで、
 逆プライマーが 15 から 27 ヌクレオチドを含む場合、該逆プライマーが配列番号 : 10
 の 15 から 27 個の連続するヌクレオチドを含む、請求項 12 に記載のプライマーのセット。

【請求項 15】

約 15 ヌクレオチドから約 35 ヌクレオチドを含む検出可能オリゴヌクレオチドをさらに含み、ここで、該検出可能オリゴヌクレオチドが 15 から 20 ヌクレオチドを含む場合、該検出可能オリゴヌクレオチドが配列番号 : 11 の 15 から 20 個の連続するヌクレオチドを含む、請求項 12 に記載のプライマーのセット。

【請求項 16】

キットであって、

(i) ヒト由来の核酸の試料中の B R A F 遺伝子のエクソン 15 における V 6 0 0 X の検出のためのプライマーのセットであって、該プライマーのセットは、

(a) 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A A [配列番号 : 59] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A G [配列番号 : 60] を含むオリゴヌクレオチド、

(b) 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A A [配列番号 : 46] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A G [配列番号 : 47] を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A T [配列番号 : 48] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N G A C [配列番号 : 49] を含むオリゴヌクレオチド、

10

20

30

40

50

(d) 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A T [配列番号: 50] を含むオリゴヌクレオチドおよび / または 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A A C [配列番号: 51] を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G T [配列番号: 52] を含むオリゴヌクレオチド、3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G C [配列番号: 53] を含むオリゴヌクレオチド、3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G A [配列番号: 54] を含むオリゴヌクレオチド、3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G G [配列番号: 55] を含むオリゴヌクレオチド、3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A G A [配列番号: 56] を含むオリゴヌクレオチド、および 3' 末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A G G [配列番号: 57] を含むオリゴヌクレオチド、

(d) および (e)、

(a) および (b)、

(a) および (c)、

(b) および (c)、

(a)、(b) および (c)、

(d) とのさらなる組合せで、(a)、(b) および (c) のいずれか、

(e) とのさらなる組合せで、(a)、(b) および (c) のいずれか、ならびに

(d) および (e) とのさらなる組合せで、(a)、(b) および (c) のいずれかから成る群より選択される少なくとも 1 つのプライマーを含み、

ここで N は、アデニン (A) 以外の塩基を含むヌクレオチドであり、

前記オリゴヌクレオチドは、約 15 ヌクレオチドから約 35 ヌクレオチドを含む、プライマーのセット、ならびに

(i) ヒト由来の核酸の試料中の B R A F 遺伝子のエクソン 15 におけるアミノ酸位置 600 のバリンをコードするコドンの少なくとも 1 つの変異 (X) (V 600 X) を検出する方法についての指示書であって、前記方法は、

(a) 核酸の試料を用いて增幅反応を実施する段階であって、該增幅反応は、3' 末端の最後の 3 個のヌクレオチドが X をコードし、かつ 3' 末端から 4 番目のヌクレオチドがアデニン (A) 以外の塩基を含有するプライマーであって、X が存在する場合は、該プライマーは X にアニーリングするプライマーと、少なくとも 1 つのペプチド核酸 (PNA) クランプであって、野生型標的からの增幅をブロックする少なくとも 1 つの PNA クランプを含み、

ここで、核酸の試料が m R N A である場合、段階 (a) は、前記增幅反応を実施する前に m R N A から逆転写された c D N A を得ることまたは m R N A から c D N A を逆転写することをさらに含み、

X が存在する場合は、前記增幅反応は X を含有する増幅産物を生成する、段階と、

(b) X を含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、X が 2 以上のコドンによってコードされる場合、前記增幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含み、

前記方法が 2 以上の X を検出する段階を含む場合、前記方法は、各々の X についての核酸の試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含むことができ、

前記方法は、いずれの X が核酸の試料中に存在するかを決定する段階もさらに含む、指示書

を含む、キット。

【請求項 17】

前記 (i) のオリゴヌクレオチドが、ヌクレオチド配列の 5' 末端の G と隣接して、ヌクレオチド配列の 3' 末端の T から始まるヌクレオチド配列 5' A A T A G G T G A T T T T 3' [配列番号: 58] の 1 以上の連続するヌクレオチドをさらに含む、請求項 16 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

約 15 ヌクレオチドから約 35 ヌクレオチドを含むプライマーをさらに含み、ここで、該プライマーが 15 から 27 ヌクレオチドを含む場合、該プライマーが配列番号：10 の 15 から 27 個の連続するヌクレオチドを含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 19】

約 15 ヌクレオチドから約 35 ヌクレオチドを含む検出可能オリゴヌクレオチドをさらに含み、ここで、該検出可能オリゴヌクレオチドが 15 から 20 ヌクレオチドを含む場合、検出可能オリゴヌクレオチドが配列番号：11 の 15 から 20 個の連続するヌクレオチドを含む、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 20】

X が、E、K、D、R および N から成る群より選択される少なくとも 1 個のアミノ酸である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 21】

X が、E、K および D から成る群より選択される少なくとも 1 個のアミノ酸である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 22】

X が E である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 23】

X が、E および K であるか、または E および D であるか、または K および D である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 24】

X が E、K および D である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 25】

核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも 1 つの突然変異 (X) を検出するためのプライマーを設計する方法であって、3' 末端の最後の 3 個のヌクレオチドが X をコードし、かつ 3' 末端から 4 番目のヌクレオチドが野生型遺伝子中に存在する塩基以外の塩基を含有するプライマーを合成して、核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも 1 つの突然変異 (X) を検出するためのプライマーを設計することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、プライマーを設計する方法、一塩基多型 (S N P) を検出 / 区別する方法、プライマー伸長 (例えばポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) および等温伸長)、ペプチド核酸 (P N A)、P C R クランプとしての P N A の使用、プライマー、検出可能オリゴヌクレオチドならびにキットに関する。

【背景技術】

【0002】

多くの遺伝的変異 (生殖細胞系および体細胞突然変異を含む。) は、遺伝性異常、疾患進行および治療効果についての重要なマーカーである。様々な技術に基づく分子診断アッセイが一塩基多型 (S N P) を検出するために開発されており、また現在も開発が進められている。広く採用されている方法の 1 つは対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (A S - P C R) であり、この反応では、対立遺伝子特異的プライマーを、プライマーとこの鑄型との間の 3' マッチングに従ったポリメラーゼによる選択的伸長に基づき、変異体特異的標的を増幅するように設計する。具体的には、P C R 増幅はプライマーの 3' 末端またはこの近傍でプライマーとこの鑄型との間にミスマッチが全くまたはほとんど存在しない場合にのみ十分に有効であり、プライマーの 3' またはこの近傍のミスマッチの数がプライマーの鑄型への有効な結合を分断するのに十分である場合は、P C R 増幅は検出不能である。

【0003】

このような方法の感度および特異性は、関心対象の S N P を含む鑄型と他の配列を含む

10

20

30

40

50

非標的鑄型との間のディファレンシャルPCRの効率に有意に依存し、前記他の配列には、生殖細胞系変異の場合は他の対立遺伝子および体細胞変異の場合は野生型（または他の変異）が含まれる。標的鑄型と非標的鑄型との間のPCR効率の差が十分でない場合、非標的鑄型に関する検出可能な増幅（非特異的シグナル）が存在することがあり、より低い効率であっても、非特異的増幅シグナル（例えばCtまたはシグナル強度）が特異的シグナル（例えばCtまたはシグナル強度）に近すぎると、低レベルの特異的標的を非特異的標的から十分に分離することができない。このような場合、高レベルの感度と特異性の両方を達成するアッセイカットオフ値を確立することが困難である。十分に差別化されたPCR効率の技術的要件は、多くの腫瘍関連細胞変異のような、非常に低い変異体含量を試料から検出する必要がある領域において特に重要である。

10

【0004】

腫瘍関連細胞変異を有する遺伝子の一例であるBRAF遺伝子は、セリン/トレオニンプロテインキナーゼのraf/milファミリーに属するタンパク質（即ちセリン/トレオニンプロテインキナーゼB-raf）をコードする。B-rafは、細胞分裂、細胞分化および分泌に影響を及ぼすMAPK（マイトジエン活性化プロテインキナーゼ）シグナル伝達経路を調節するうえで役割を果たす。BRAF遺伝子の生殖細胞系変異は、心臓欠陥、独特の顔の外観および精神遅滞を特徴とする、心臓・顔・皮膚症候群に関連する。BRAF遺伝子の変異は、肺の腺癌、結腸直腸癌、悪性黒色腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌および甲状腺癌を含む様々な種類の癌にも関連する。

【0005】

20

スクレオチド1796位のチミンのアデニンへの変異が肺癌および頭頸部癌において検出されている（米国特許第7,378,233号明細書；T1799Aについては米国特許第7,442,507号明細書参照）。BRAF遺伝子のエクソン15におけるT1796Aの検出は、報告によれば、悪性甲状腺乳糖癌を良性甲状腺試料から区別することを可能にし（米国特許第7,378,233号明細書）、またHNPPC腫瘍を散発性結腸直腸腫瘍から区別することも可能にすると報告されている（国際公開第2005/071109号）。T1799Aの検出は、報告によれば転移性黒色腫の存在を示す（米国特許出願第2006/0246476号、現在は米国特許第7,442,507号明細書）。

【0006】

癌に関連するBRAF遺伝子の大部分の変異は、活性化ドメインに位置するアミノ酸位置600で起こる。アミノ酸位置600は、文献ではアミノ酸位置599とも称されてきた。アミノ酸位置600のバリン（V）のグルタミン酸（E）への変異（例えば米国特許出願公開第2007/0020657号明細書、Davies, et al., Nature 417: 949-954 (2002)、この中ではV599Eと表されている、およびKimura, et al., Cancer Res. 63: 1454-1457 (2003)参照）、リシン（K）への変異またはアスパラギン酸（D）への変異は、BRAF遺伝子のすべての突然変異の90%以上を占める。結腸直腸癌の存在は、1以上の便潜血マーカーと共にBRAFなどの剥離上皮マーカーの点突然変異を検出することによって決定できると報告されている（米国特許出願公開第2011/0236916号明細書参照）。BRAF変異の分析は、マイクロサテライト安定性と共に、癌を有する患者の生存率の予後判定ならびに患者における癌の重症度の分類を可能にすると報告されている（国際公開第2007/009013号および米国特許出願公開第2009/0181371号明細書参照）。一般的にBRAF突然変異の検出については、例えば米国特許出願公開第2011/0269124号明細書および国際公開第2011/019704号参照。BRAFのエクソン15のコドン599の突然変異は、報告によれば悪性黒色腫の検出を可能にする（米国特許出願公開第2007/0087350号明細書参照；また国際公開第2010/097020号、同第2005/027710号、同第2005/059171号および同第2005/066346号も参照のこと）。BRAFのコドン600の変異を検出するための、ペプチド核酸（PNA）に基づくリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）クランピングの使用が国際公開第2011/093606号に記載され

30

40

50

ており、一方B R A F のV 6 0 0 E 変異を検出するための、ロックド核酸プライマーおよびビーコン検出可能オリゴヌクレオチドを用いた対立遺伝子特異的リアルタイム定量P C R (A S - Q P C R) は国際公開第2 0 1 1 / 1 0 4 6 9 4 号に記載され、B R A F 遺伝子の変異を検出するための蛍光定量P C R の使用は国際公開第2 0 1 1 / 1 0 3 7 7 0 号に記載されている。B R A F 遺伝子のV 6 0 0 E 変異を検出するための液体チップは国際公開第2 0 1 1 / 1 3 1 1 4 6 号に記載されている。このため、V 6 0 0 / V 5 9 9 の変異を導く一塩基多型(S N P) を検出する能力は、癌の診断および予後について重要な情報を提供する。

【 0 0 0 7 】

癌の診断および予後についての情報を提供することに加えて、V 6 0 0 / V 5 9 9 の変異を導くS N P を検出する能力は、M A P K 経路を標的とする薬剤の治療効果についての重要な情報も提供する。V 6 0 0 E などのB R A F のコドン6 0 0 の変異を、V 6 0 0 E を含むポリヌクレオチド配列の増幅によって検出することは、B - r a f キナーゼ阻害剤に対する癌細胞の感受性の測定を可能にすると報告されている(米国特許出願公開第2 0 1 0 / 0 1 7 3 2 9 4 号明細書および同第2 0 1 1 / 0 2 1 2 9 9 1 号明細書参照)。ホモ接合/ヘテロ接合V 6 0 0 E もしくはV 6 0 0 D 遺伝子型またはB R A F の機能獲得表現型を特徴とする任意の遺伝子型の検出は、報告によれば、E R K 1 / E R K 2 / M E K 阻害剤に対する悪性/腫瘍細胞の感受性の評価を可能にする(米国特許出願公開第2 0 1 1 / 0 1 5 8 9 4 4 号明細書参照;また国際公開第2 0 0 9 / 0 7 3 5 1 3 号も参照のこと)。V 6 0 0 E などのB R A F の変異の検出は、報告によれば、結腸癌を有する患者のセツキシマブまたはパニツムマブによる治療についての個人別報告の作成を可能にする(米国特許出願公開第2 0 1 1 / 0 2 3 0 3 6 0 号明細書参照)。Sh in o z a k i , e t a l . , C l i n . C a n c e r R e s . 1 3 : 2 0 6 8 - 2 0 7 4 (2 0 0 7) は、生物化学療法を受けている黒色腫患者を観測するための血清中の循環B - R A F D N A 変異の分析を開示する。B R A F 突然変異に基づく癌の治療を最適化する方法ならびに他の方法は、国際公開第2 0 1 1 / 1 0 6 2 9 8 号に記載されている。

【 0 0 0 8 】

シークエンス法、ピロシークエンス法、アレイ、シフトターミネーションアッセイ(S T A)、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)とこれに続く二重プライミングオリゴヌクレオチド(D P O) P C R 、および対立遺伝子特異的プライマーまたは対立遺伝子特異的検出可能オリゴヌクレオチドのいずれかを用いたリアルタイムP C R などの、B R A F 変異を検出するための既存の方法は、様々な不都合を伴う(結腸直腸癌でのB R A F V 6 0 0 E 変異の検出における自動シークエンス法とリアルタイム化学法の比較については、例えばB e n l l o c h , e t a l . , J . M o l . D i a g n . 8 : 5 4 0 - 5 4 3 (2 0 0 6) 参照;メラノサイト病変および甲状腺乳頭癌試料中のB R A F 変異を同定するのに使用されるP C R 産物の融解曲線分析については、例えばH a y , e t a l . , A r c h . P a t h o l . L a b . M e d . 1 3 1 : 1 3 6 1 - 1 3 6 7 (2 0 0 7) 参照;B R A F V 6 0 0 E の検出におけるリアルタイム対立遺伝子特異的増幅については、例えばJ a r r y , e t a l . , M o l . C e l l . D e t e c t a b l e o l i g o n u c l e o t i d e s 1 8 : 3 4 9 - 3 5 2 (2 0 0 4) 参照;甲状腺乳頭癌におけるB R A F 変異を検出するための変異対立遺伝子特異的P C R 増幅(M A S A)の使用については、例えばS a p i o , e t a l . , E u r . J . E n d o c r i n o l . 1 5 4 : 3 4 1 - 3 4 8 (2 0 0 6) 参照;ならびにメラノサイト病変におけるB R A F V 6 0 0 E を検出するためのリガーゼ検出反応の使用については、例えばT u r n e r , e t a l . , J . C u t a n . P a t h o l . 3 2 : 3 3 4 - 3 3 9 (2 0 0 5) 参照)。シークエンス法およびピロシークエンス法は感度が限られており、検出可能な最小変異体含量は約1 0 から2 0 % (全バックグラウンドに対する変異体%) である。対立遺伝子特異的検出可能オリゴヌクレオチドを利用するリアルタイムP C R 、S T A 、アレイおよびP C R / D P O などの他の方法も感度が限られている。理想的には、1 % 以上の感度が望ましい。

10

20

30

40

50

【0009】

リアルタイムPCRなどの十分な特異性を有さない既存方法は、V600EとV600Kのような特定の種類の突然変異を区別することができない。V600Eはこのアミノ酸位置で認められるすべての変異の90%を占めるが、黒色腫におけるV600Kなどの臨床的に重要な他のアミノ酸置換が、時として高い頻度で、様々な癌において認められている。従って、特定の種類の突然変異を区別する能力はますます重要になりつつある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

- 【特許文献1】米国特許第7,378,233号明細書 10
 【特許文献2】米国特許第7,442,507号明細書
 【特許文献3】米国特許第7,378,233号明細書
 【特許文献4】国際公開第2005/071109号
 【特許文献5】米国特許出願第2006/0246476号(米国特許第7,442,507号明細書)
 【特許文献6】米国特許出願公開第2007/0020657号明細書
 【特許文献7】米国特許出願公開第2011/0236916号明細書
 【特許文献8】国際公開第2007/009013号
 【特許文献9】米国特許出願公開第2009/0181371号明細書
 【特許文献10】米国特許出願公開第2011/0269124号明細書 20
 【特許文献11】国際公開第2011/019704号
 【特許文献12】米国特許出願公開第2007/0087350号明細書
 【特許文献13】国際公開第2010/097020号
 【特許文献14】国際公開第2005/027710号
 【特許文献15】国際公開第2005/059171号
 【特許文献16】国際公開第2005/066346号
 【特許文献17】国際公開第2011/093606号
 【特許文献18】国際公開第2011/104694号
 【特許文献19】国際公開第2011/103770号
 【特許文献20】国際公開第2011/131146号 30
 【特許文献21】米国特許出願公開第2010/0173294号明細書
 【特許文献22】米国特許出願公開第2011/0212991号明細書
 【特許文献23】米国特許出願公開第2011/0158944号明細書
 【特許文献24】国際公開第2009/073513号
 【特許文献25】米国特許出願公開第2011/0230360号明細書

【非特許文献】

【0011】

- 【非特許文献1】Davies, et al., Nature 417: 949-954 (2002)
 【非特許文献2】Kimura, et al., Cancer Res. 63: 1454-1457 (2003) 40
 【非特許文献3】Shinozaki, et al., Clin. Cancer Res. 13: 2068-2074 (2007)
 【非特許文献4】Benlloch, et al., J. Mol. Diagn. 8: 540-543 (2006)
 【非特許文献5】Hay, et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 131: 1361-1367 (2007)
 【非特許文献6】Jarry, et al., Mol. Cell. Detectable oligonucleotides 18: 349-352 (2004)
 【非特許文献7】Sapiro, et al., Eur. J. Endocrinol. 155 50

4 : 3 4 1 - 3 4 8 (2 0 0 6)

【非特許文献 8】Turner, et al., J. Cutan. Pathol. 32 : 334 - 339 (2 0 0 5)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

アッセイの作業の流れおよび自動化は、あらゆる診断方法の重要な局面である。シークエンス法などの特定の技術に関して、既存のアッセイ手順は時間が長くかかり、複雑である。PCR / DPO (二重プライミングオリゴ) およびアレイに基づく方法などの他の技術は、PCR 後に広範な試料の取り扱いを必要とし得るが、これはアンプリコン汚染を生じやすい。特定の場合には、多数の変異の区別された検出を達成するために付加的な段階を含めなければならない。10

【0013】

本開示は、生殖細胞系および体細胞突然変異、特に遺伝性異常、疾患進行および治療効果に関する変異を検出する現在使用可能な方法に付随する不都合の一部を克服しようとするものである。この目的および他の目的および利点ならびに発明の特徴は、本明細書で提供する詳細な説明から明らかになる。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、生物学的異常に直接関与するのは突然変異タンパク質であるため、アミノ酸置換の状況下で SNP が維持されることである。もう 1 つの洞察は、SNP 自体が、スプライシング事象の阻害などの、遺伝子調節の過程に直接関与することである。また、SNP の一部は生物学的機能に明らかなまたは公知の影響を及ぼさないが、一次ヌクレオチド配列において関心対象の SNP と共に局在することも可能である。20

【0015】

従って、本発明は、SNP (即ち標的 SNP) の改善された検出に適する組成物および方法を対象とする。本発明によって提供される SNP の改善された検出は、プライマー設計への新しいアプローチの新規で非自明の発見に基づく。SNP の検出に適するプライマー設計 (以下で論じる。) を図 2 および 3 に要約する。ここで注目すべきは、すべての設計に共通する特徴が、対立遺伝子特異的プライミングを可能にするために天然のミスマッチの 5' 側に 1 以上の付加的なミスマッチ塩基を導入することである。この設計特徴の理論的根拠は以下のとおりである：天然のミスマッチは、ミスマッチの含量、数および位置に依存して、時としてポリメラーゼに許容され得る。導入される付加的なミスマッチは、特異的標的に有意の影響を及ぼさずに非特異的標的についての PCR 効率をさらに低減するように設計される。結果として、関心対象の突然変異を有する標的は効率良く増幅されるが、非特異的標的は、プライマーの 3' 末端またはこの近傍に 2 以上のミスマッチが存在するため効率的に増幅されない。この設計特徴は、対立遺伝子特異的プライミングを可能にするために正プライマーまたは逆プライマーのいずれかに適用することができる。図 2 および 3 に記載されているように、このような設計は、既に対立遺伝子特異的検出および / または同定を達成するのに十分であり得る。実際の SNP パターンに依存して、例えば 2 つの個別 SNP が遠く離れて存在する場合、正プライマーと逆プライマーの両方を対立遺伝子特異的に設計すれば特定の SNP を検出することが実行可能となり得る (図 5 参照)。関心対象の SNP に加えて、臨床的に関連性がなく、アッセイで許容される必要がある他の既存の SNP が近接して存在することがある。1 つの解決法は、これらの位置に縮重塩基 (図 2、実施例 2 参照) または無差別的な結合を許容する他の修飾されたヌクレオチド塩基を設計することである。30

【0016】

上記で説明し、以下で例示する設計原理および方法は、單一アミノ酸変異を検出するコドンベースの AS - PCR での使用に採用することができる。遺伝子コドン表において、終止コドン (TGA / UGA) を含むあらゆるアミノ酸が 3 個のヌクレオチドの異なる配40

置によってコードされる。他のアミノ酸変異および／または試料中に潜在的に存在し得る名目上の配列からの非特異的シグナルを最小限に抑えるため、全コドンについての S N P 領域をプライマー設計に含める必要がある。関心対象の 1 つのアミノ酸変異に対応する複数のコドン（特定のアミノ酸に依存する。）または複数のアミノ酸変異を検出するため、各々が関心対象のコドンの 1 つに特異的な 3' 末端配列を担持する、複数の対立遺伝子特異的プライマーを使用する（プールとしてまたは別々に）。これらの対立遺伝子特異的プライマーは、3' 末端の最後の 3 個のヌクレオチドで意図する標的と完全にマッチするが、任意の他のコドンと比較した場合に同じ領域内に少なくとも 1 つのミスマッチを有する。上記で論じたように、プライマーの最後の 3 個のヌクレオチドの間での 1 つのミスマッチは時としてポリメラーゼによって許容され得る；従って関心対象のコドンの 5' 側のヌクレオチド位置に導入された付加的なミスマッチは、特異的標的に有意の影響を及ぼさず 10 に非特異的標的についての P C R 効率をさらに低減する。結果として、関心対象のアミノ酸変異だけを有する標的は増幅されるが、他の非特異的標的は、プライマーの 3' 末端またはこの近傍に 2 以上のミスマッチが存在するため増幅されない。この方法は、関心対象のアミノ酸をコードするすべての可能な遺伝的変異をカバーするだけでなく、すべての他の潜在的アミノ酸からの非特異的シグナル（変異配列または野生型配列からの）も排除する。

【 0 0 1 7 】

当業者は、本明細書の教示から、任意の所望標的についての S N P 検出において使用するためのプライマーを設計することができる。以下の一例は、ヒト由来の核酸の試料中の B R A F 遺伝子のエクソン 15 におけるアミノ酸位置 600 のバリンをコードするコドンの少なくとも 1 つの変異（X）（V 600 X）を検出する方法を教示し、前記方法を提供する。この方法は、

（a）核酸の試料を用いて増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応は、3' 末端の最後の 3 個のヌクレオチドが X をコードし、かつ 3' 末端から 4 番目のヌクレオチドがアデニン（A）以外の塩基を含有するプライマーを含み、X が存在する場合は、該プライマーは X にアニーリングし、

ここで、核酸の試料が m R N A である場合、段階（a）は、前記 増幅反応を実施する前に m R N A から逆転写された c D N A を得ることまたは m R N A から c D N A を逆転写することをさらに含み、

X が存在する場合は、該増幅反応は X を含有する増幅産物を生成する、段階と、

（b）X を含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、X が 2 以上のコドンによってコードされる場合、前記 増幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含む。増幅反応は少なくとも 1 つのペプチド核酸（P N A）クランプをさらに含むことができ、ここで少なくとも 1 つの P N A クランプは野生型であり、および増幅反応が 1 以上の他の P N A クランプを含む場合、P N A は検出可能オリゴヌクレオチドおよび／またはプライマーを捕捉し、P N A は、望ましくない標的に結合し、プライマーが望ましくない標的から増幅するのを妨げることによって検出可能オリゴヌクレオチドおよび／またはプライマーを捕捉する。X を含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、X を含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。増幅反応は、内部対照プライマーをさらに含むことができ、この場合、増幅反応は内部対照を含有する増幅産物も生成し、この場合、段階（b）は、内部対照を含有する増幅産物を検出することを含む。内部対照を含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、内部対照を含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。X は、E、K、D、R および N から成る群より選択される少なくとも 1 個のアミノ酸である。例えば、X は、E、K および D から成る群より選択される少なくとも 1 個のアミノ酸であり得る。X は、E、E および K、E および D 40 45 50

、KおよびD、またはE、KおよびDであり得る。この方法が2以上のXを検出する段階を含む場合、この方法は、各々のXについてのDNAの試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含み得る。これに関して、この方法はまた、いずれのXが核酸の試料中に存在するかを決定する段階もさらに含み得る。

【0018】

本発明はまた、ヒト由来の核酸の試料中のBRADF遺伝子のエクソン15におけるV600Xの増幅のためのプライマーのセットも対象とし、このセットを提供する。プライマーのセットは、

(a) 3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAA [配列番号: 59]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAG [配列番号: 60]を含むオリゴヌクレオチド、

(b) 3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAA [配列番号: 46]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAG [配列番号: 47]を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAT [配列番号: 48]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAC [配列番号: 49]を含むオリゴヌクレオチド、

(d) 3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAT [配列番号: 50]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAC [配列番号: 51]を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNCGT [配列番号: 52]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNCGC [配列番号: 53]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNCGA [配列番号: 54]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNCGG [配列番号: 55]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAGA [配列番号: 56]を含むオリゴヌクレオチド、および3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAGGG [配列番号: 57]を含むオリゴヌクレオチド、

(d) および(e)、

(a) および(b)、

(a) および(c)、

(b) および(c)、

(a)、(b) および(c)、

(d)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれか、

(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれか、ならびに

(d) および(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれかから成る群より選択される少なくとも1つのプライマーを含み、

ここでNは、アデニン(A)以外の塩基を含むヌクレオチドであり、および

ここでオリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列の5'末端のGと隣接して、ヌクレオチド配列の3'末端のTから始まるヌクレオチド配列5' AATAGGTGATTTT 3' [配列番号: 58]の1以上の連続するヌクレオチドをさらに含み得る。プライマーのセットは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む、逆プライマーなどのプライマーをさらに含むことができ、ここで、プライマーが15から27ヌクレオチドを含む場合、プライマーは配列番号: 10の15から27個の連続するヌクレオチドを含む。検出可能オリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含むことができ、ここで、検出可能オリゴヌクレオチドが15から20ヌクレオチドを含む場合、検出可能オリゴヌクレオチドは配列番号: 11の15から20個の連続するヌクレオチドを含む。

【0019】

キットも提供される。キットは、

10

20

30

40

50

(i) ヒト由来の核酸の試料中のB R A F 遺伝子のエクソン15におけるV 6 0 0 Xの検出のためのプライマーのセットであって、該プライマーのセットは、

(a) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A A [配列番号：59]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A G [配列番号：60]を含むオリゴヌクレオチド、

(b) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A A [配列番号：46]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A G [配列番号：47]を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A T [配列番号：48]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A C [配列番号：49]を含むオリゴヌクレオチド、

(d) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A T [配列番号：50]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A C [配列番号：51]を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N C G T [配列番号：52]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N C G C [配列番号：53]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A C N C G A [配列番号：54]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N C G G [配列番号：55]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A G A [配列番号：56]を含むオリゴヌクレオチド、および3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A G G [配列番号：57]を含むオリゴヌクレオチド、

(d) および(e)、

(a) および(b)、

(a) および(c)、

(b) および(c)、

(a)、(b) および(c)、

(d)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれか、

(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれか、ならびに

(d) および(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれかから成る群より選択される少なくとも1つのプライマーを含み、

ここでNは、アデニン(A)以外の塩基を含むヌクレオチドであり、

前記オリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む、プライマーのセット、ならびに

(i i) ヒト由来の核酸の試料中のB R A F 遺伝子のエクソン15におけるアミノ酸位置600のバリンをコードするコドンの少なくとも1つの変異(X)(V 6 0 0 X)を検出する方法についての指示書であって、前記方法は、

(a) 核酸の試料を用いて增幅反応を実施する段階であって、該增幅反応は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、かつ3'末端から4番目のヌクレオチドがアデニン(A)以外の塩基を含有するプライマーであって、Xが存在する場合は、プライマーはXにアニーリングするプライマーと、少なくとも1つのペプチド核酸(P N A)クランプであって、野生型標的からの增幅をブロックする少なくとも1つのP N Aクランプを含み、

ここで、核酸の試料がm R N Aである場合、段階(a)は、前記增幅反応を実施する前にm R N Aから逆転写されたc D N Aを得ることまたはm R N Aからc D N Aを逆転写することをさらに含み、

Xが存在する場合は、前記增幅反応はXを含有する増幅産物を生成する、段階と、

(b) Xを含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、Xが2以上のコドンによってコードされる場合、前記增幅反応は各々のコドン

10

20

30

40

50

についてのプライマーを含み、

前記方法が2以上のXを検出する段階を含む場合、前記方法は、各々のXについての核酸の試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含み得る。

前記方法はまた、いずれのXが核酸の試料中に存在するかを決定する段階もさらに含み得る。オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列の5'末端のGと隣接して、ヌクレオチド配列の3'末端のTから始まるヌクレオチド配列5' A A T A G G T G A T T T 3' [配列番号：58] の1以上の連続するヌクレオチドをさらに含み得る。キットは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む、逆プライマーなどのプライマーをさらに含むことができ、ここで、プライマーが15から27ヌクレオチドを含む場合、プライマーは配列番号：10の15から27個の連続するヌクレオチドを含む。キットは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む検出可能オリゴヌクレオチドをさらに含むことができ、ここで、検出可能オリゴヌクレオチドが15から20ヌクレオチドを含む場合、検出可能オリゴヌクレオチドは配列番号：11の15から20個の連続するヌクレオチドを含む。Xは、E、K、D、RおよびNから成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸であり得る。Xは、E、KおよびDから成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸、例えばE、EおよびK、EおよびD、KおよびD、またはE、KおよびDであり得る。

【0020】

本発明はB R A F変異の検出に限定されず、当業者は、本明細書の教示に基づき、任意の所望標的S N Pの検出のためのプライマーおよびアッセイを設計することができる。従って、本発明はまた、核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも1つの突然変異(X)を検出する方法も対象とし、この方法も提供する。この方法は、

(a) 核酸の試料を用いて増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、かつ3'末端から4番目のヌクレオチドがアデニン(A)以外の塩基を含有するプライマーを含み、Xが存在する場合は、該プライマーはXにアニーリングし、

ここで、核酸の試料がm R N Aである場合、段階(a)は、前記増幅反応を実施する前にm R N Aから逆転写されたc D N Aを得ることまたはm R N Aからc D N Aを逆転写することをさらに含み、

この後、Xが存在する場合は、増幅反応はXを含有する増幅産物を生成する、

(b) Xを含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、Xが2以上のコドンによってコードされる場合、前記増幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含む。増幅反応は少なくとも1つのペプチド核酸(P N A)クランプをさらに含むことができ、ここで少なくとも1つのP N Aクランプは野生型標的からの増幅をロックし、およびここで、増幅反応が1以上の他のP N Aクランプを含む場合、P N Aは、好ましくは検出可能オリゴヌクレオチドおよび/またはプライマーを捕捉する。Xを含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、Xを含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。増幅反応は、内部対照プライマーをさらに含むことができ、この場合増幅反応は内部対照を含有する増幅産物も生成し、この場合段階(b)は、内部対照を含有する増幅産物を検出することを含む。内部対照を含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、内部対照を含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。この方法が2以上のXを検出する段階を含む場合、この方法は、各々のXについての核酸の試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含み得る。これに関して、この方法はまた、いずれのXが核酸の試料中に存在するかを決定する段階もさらに含み得る。

【0021】

核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも1つの突然変異(X)を検出するた

10

20

30

40

50

めのプライマーを設計する方法も提供される。この方法は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、および3'末端から4番目のヌクレオチドが、野生型遺伝子中に存在する塩基以外の塩基を含有するプライマーを合成することを含み、核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも1つの突然変異(X)を検出するためのプライマーを設計する。

【0022】

本発明はまた、二重対立遺伝子特異的プライマーの設計方法も対象とする。1つの位置につき1つのSNPで、複数の位置に複数の関心対象のSNPが存在する状況では、例えば、所与の試料中に複数のSNPが同時に存在することが検出される。单一SNPは検出されないはずである。二重対立遺伝子特異的プライマー設計方法の一例を図5に示す。これに関して、図2に例示するプライマー設計は、本発明の二重対立遺伝子特異的プライマー設計方法において正プライマーまたは逆プライマーのいずれかに適用することができる。

10

【0023】

本発明はまた、関心対象の標的一塩基多型(SNP)(関心対象の1番目のSNP)を含む核酸の配列を検出するための方法も企図し、前記方法は、a)i)標的SNPを含むことが疑われる核酸の配列、ii)標的SNPを含む配列に相補的なプライマー、を提供する段階、ここで標的SNPに相補的なプライマースクレオチドから3塩基5'側に位置する塩基は、標的SNP配列を含む核酸の対応する塩基に相補的ではない塩基であり、これによりプライマー中にミスマッチ塩基を作製する；b)標的SNPを含むことが疑われる試料を、標的SNPへのプライマーの結合を許容する条件下でプライマーと接触させ、存在する場合は、結合した標的SNPを作製する段階；ならびにc)結合した標的SNPを検出する段階を含む。本発明はまた、核酸の試料がmRNAである場合、段階b)は、mRNAから逆転写されたcDNAを得ることまたはmRNAからcDNAを逆転写することをさらに含むことも企図する。

20

【0024】

本発明はまた、核酸の配列が2以上のSNP(関心対象の2番目のSNP)を含む場合、関心対象の2番目のSNPを検出するために別個のプライマーを使用することも企図する。

【0025】

30

本発明はまた、関心対象の標的SNPを含む核酸の配列が1以上の非標的変異を含む場合、プライマーは前記1以上の非標的変異に相補的なヌクレオチドを含むことも企図する。

【0026】

本発明はまた、関心対象の標的SNP(関心対象の1番目のSNP)を含む核酸の配列が、同じ配列位置に1以上の付加的な関心対象の標的SNPを含む場合、本発明の方法は、各々の付加的な1以上の関心対象のSNPに相補的な塩基を含有するプライマーを付加的に含むことも企図する。

【0027】

40

本発明はまた、関心対象の標的SNP(関心対象の1番目のSNP)を含む核酸の配列が、関心対象の1番目のSNPの配列位置とは異なる1つまたは複数の配列位置に1以上の付加的な関心対象の標的SNPを含む場合、プライマーは、1以上の付加的な関心対象のSNPに相補的な1つまたは複数の塩基を付加的に含むことも企図する。

【0028】

本発明はまた、1以上の関心対象の標的一塩基多型(SNP)を含む核酸の配列を検出するための方法も企図し、ここでSNPは核酸の配列上の1以上の位置に存在し、前記方法は、a)i)1以上のSNPを含む1番目の配列が第一配列であり、および最も5'側のSNPが第一標的SNPであり、少なくとも1つのSNPが第一配列の1以上のSNPとは異なる1以上のSNPを含む2番目の配列が第二配列であり、および最も5'側のSNPが第一標的SNPである、等々のように、1以上の標的SNPを含むことが疑われる

50

核酸の配列、i i) 1 以上の標的 S N P を含む各々の配列に相補的なプライマーを提供する段階、ここで各々のプライマーについて、第一標的 S N P に相補的なプライマーヌクレオチドから 3 塩基 5' 側に位置する塩基は、標的 S N P 配列を含む核酸の対応する塩基に相補的ではない塩基であり、これによりプライマー中に 1 番目のミスマッチ塩基を作製する；b) 1 以上の標的 S N P を含む配列を含むことが疑われる試料を、1 以上の標的 S N P への 1 つまたは複数のプライマーの結合を許容する条件下で 1 つまたは複数のプライマーと接触させ、存在する場合は、結合した標的 S N P を作製する段階；ならびに c) 結合した標的 S N P を検出する段階を含む。本発明はまた、核酸の試料が m R N A である場合、段階 b) は、m R N A から逆転写された c D N A を得ることまたは m R N A から c D N A を逆転写することをさらに含むことも企図する。

10

【 0 0 2 9 】

本発明はまた、ヌクレオチド配列中の複数の標的 S N P の検出のために正プライマーと逆プライマーの両方を作製する、二重対立遺伝子特異的プライマー方法（図 5 参照）も企図する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 - 1 】プライマーの設計を例示し、V 6 0 0 コドンに下線を付している。

【 図 1 - 2 】プライマーの設計を例示し、V 6 0 0 コドンに下線を付している。

【 図 2 - 1 】本発明の複数のプライマーの設計方法を示す。

【 図 2 - 2 】本発明の複数のプライマーの設計方法を示す。

20

【 図 2 - 3 】本発明の複数のプライマーの設計方法を示す。

【 図 2 - 4 】本発明の複数のプライマーの設計方法を示す。

【 図 2 - 5 】本発明の複数のプライマーの設計方法を示す。

【 図 2 - 6 】本発明の複数のプライマーの設計方法を示す。

【 図 3 】モデル標的として B R A F V 6 0 0 E を用いたアミノ酸特異的プライマーについての設計原理を説明する概略図を示す。

【 図 4 】モデル標的としての B R A F V 6 0 0 E についてのアミノ酸特異的プライマー設計を示す。

【 図 5 】本発明の二重対立遺伝子特異的プライマー設計方法を示す。

【 図 6 A 】 B R A F V 6 0 0 E 検出のための 2 つの異なるプライマー設計の比較を示す。各プライマー設計におけるミスマッチ塩基の数も示す。配列番号：1、2、6 1 および 2 2 のそれぞれを順に開示する。

30

【 図 6 B 】 B R A F V 6 0 0 E 検出のための 2 つの異なるプライマー設計の比較を示す。各プライマー設計におけるミスマッチ塩基の数も示す。

【 図 7 A 】 C T として提示した B R A F V 6 0 0 E 検出のための 2 つの異なるプライマー設計の比較を示す。

【 図 7 B 】 P C R 曲線として提示した B R A F V 6 0 0 E 検出のための 2 つの異なるプライマー設計の比較を示す。

【 図 8 】 V 6 0 0 E または V 6 0 0 K のいずれかに特異的なプライマーを用いた S N P 検出の結果を示す。

40

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 1 】

本開示は、少なくとも一部には、一塩基多型または多塩基多型（ S N P ）のリアルタイム增幅および検出のためのオリゴヌクレオチドプライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドに基づく。 B R A F のアミノ酸位置 6 0 0 における S N P の検出は一例である。この S N P は、例えば、グルタミン酸（本明細書では V 6 0 0 E と称される。）、リシン（本明細書では V 6 0 0 K と称される。）、アスパラギン酸（ V 6 0 0 D ）、アルギニン（ V 6 0 0 R ）またはアスパラギン（ V 6 0 0 N ）によるバリンの置換をもたらし得る。アミノ酸位置 6 0 0 のバリンのグルタミン酸、リシンおよび / またはアスパラギン酸への変異はすべての B R A F 変異の 9 0 % 以上を占めるので、本明細書で提供されるプライマーお

50

および検出可能オリゴヌクレオチドは、数ある中でも特に、癌の予後判定およびMAPK経路を標的とする薬剤の治療効果の評価を可能にする。

【0032】

SNPを検出するために対立遺伝子特異的増幅とポリメラーゼ連鎖反応（PCR）クランピングを組み合わせる。この組合せは、卓越した特異性で約0.5%以下の変異体含量の感度を可能にする。

【0033】

以下の定義は本開示に関する：

(a) 「約」は、指定される値から±10%の変動を指す。このような変動は、具体的な言及が為されているか否かに関わらず、本明細書で提供される所与の値に常に包含されることが理解されるべきである。 10

【0034】

(b) 本開示に関連して「対立遺伝子特異的プライマー」は、プライマーの3'末端、通常は3'ヌクレオチドが関心対象の部位、例えばBRAFのコドン600における3番目のヌクレオチドであるヌクレオチド1800と並列するように標的配列にハイブリダイズし、およびSNPのコドンの野生型対立遺伝子または変異対立遺伝子のいずれかに正確に相補的であるプライマー（「プライマー」参照）を指す。対立遺伝子特異的プライマーの使用は、核酸、例えばDNA増幅の間の伸長産物の区別的形成に基づき対立遺伝子間を識別することを可能にする。

【0035】

(c) 「検出可能オリゴヌクレオチド」は、適切な条件下で標的核酸に選択的にハイブリダイズし、検出され得るオリゴヌクレオチドを指す。 20

【0036】

(d) 「高親和性核酸類似体」は、同じ塩基配列を有する非修飾核酸よりも高い親和性で、デオキシリボ核酸（DNA）などの相補的核酸にハイブリダイズする修飾核酸を指す。高親和性核酸には、ロックド核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、ヘキシトール核酸（HNA）、ホスホルアミデート等が含まれるが、これらに限定されない。

【0037】

(e) 「ハイブリダイゼーション」は、2つの一本鎖核酸の間の相補的塩基対合による二重鎖構造の形成を指す。ハイブリダイゼーションは、正確に相補的な核酸鎖の間でまたは低い数のミスマッチを含む相補的核酸鎖の間で起こり得る。 30

【0038】

(f) 「ロックド核酸（LNA）」は、リボース環に余分な2H-O, 4H-C-メチレン架橋が付加されている立体配座的に拘束されたヌクレオチド類似体である1以上のモノマーの存在を特徴とする核酸類似体（プリンおよび/またはピリミジン塩基のポリマー）を指す。LNAは、1以上の2H-O, 4H-C-メチレン-（D-リボフラノシリル）ヌクレオチドモノマーを有するオリゴヌクレオチドと定義してきた。LNAはエキソヌクレアーゼおよび熱に耐性である。

【0039】

(g) 「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、長さに関わりなく、プライマー、検出可能オリゴヌクレオチドおよびオリゴマーを指し、ポリデオキシリボヌクレオチド、ポリリボヌクレオチドおよび修飾/非修飾プリン/ピリミジン塩基の任意の他のN-グリコシドを包含する。例としては、一本鎖DNA（ssDNA）、二本鎖DNA（dsDNA）、一本鎖RNA（ssRNA）および二本鎖RNA（dsRNA）が含まれる。このような分子は、ホスホジエステル結合またはホスホトリエステル、ホスホルアミデート、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチルエステル、アセトアミデート、カルバメート、チオエーテル、架橋ホスホルアミデート、架橋メチレンホスホネート、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオエート、架橋ホスホロチオエートもしくはスルホン架橋およびこれらの組合せが含まれるが、これらに限定されない修飾された結合を含むことができる。このような分子は、アデニン、グアニン、チ 40

ミン、シトシンおよび/またはウラシル、ならびに他の修飾塩基、非標準塩基または誘導体化塩基を含み得る。またはもしくは加えて、このような分子は1以上の修飾糖部分を含み得る。

【0040】

(h) 「ペプチド核酸(PNA)」は、通常のホスホジエステル骨格がN-(2-アミノエチル)グリシン鎖で置換された合成DNA類似体を指す。このヌクレオ塩基は、同じA-T(U)およびG-C方式でDNAまたはRNAに結合する(Nielsen, et al., Science 254: 1497-1500 (1991); Hanvey, et al., Science 258: 1481-1485 (1992); およびEgholm, et al., Nature 365: 566-568 (1993))。人工骨格はPNAをヌクレアーゼ耐性にする。PNAは当分野で公知の方法に従って合成することができる(例えばHyrup, et al., Bioorg. Med. Chem. 4: 5-23 (1996); 国際公開第92/20702号および同第92/20703号; ならびに米国特許第5,539,082号明細書参照、これらすべての内容は、これらの教示に関して参照により本明細書に組み込まれる。)。2つの重要な特徴により、PNAは特異的対立遺伝子についての優れたPCRクランプとなる。PNAは重合のためのプライマーとして機能することはできない。Taqポリメラーゼによるエキソヌクレアーゼ活性の基質として働くこともできない。加えて、完全にマッチするPNA-DNA二重鎖の融解温度は同じ長さのDNA-DNA二重鎖の融解温度より高い; 従って、PNA-DNA二重鎖はより安定である。PNA-DNAハイブリッドにおける単一のミスマッチは、融解温度の約10から18の低下を生じさせる(Kyger, et al., Anal. Biochem. 260: 142-148 (1998))。このため、適切な温度範囲にわたってPNAは、ミスマッチ塩基との鋳型上の反応を妨げることなく、完全にマッチする鋳型上のプライマー/検出可能オリゴヌクレオチドのアニーリングまたは鎖伸長を特異的にブロックすることができ(Sun, et al., Nat. Biotechnol. 20: 186-189 (2002); Thiede, et al., Nucleic Acids Res. 24: 983-984 (1996); およびTaback, et al., Int. J. Cancer 111: 409-414 (2004))、これはPNAを介したPCRクランピングと称される(Orum, et al., Nucleic Acids Res. 21: 5332-5336 (1993))。完全にマッチするハイブリッドとミスマッチハイブリッドの間での融解温度の大きな差により、PNAは点突然変異の良好なセンサーである(例えばKaradag, et al., Nucleic Acids Res. 32: e63 (2004); Taback, et al. (2004)前出; Hancock, et al., Clin. Chem. 48: 2155-2163 (2002); Takiya, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 68: 360-368 (2004); Kirishima, et al., J. Hepatol. 37: 259-265 (2002); およびOhishi, et al., J. Med. Virol. 72: 558-565 (2004)参照)。米国特許出願公開第2004/0014105号明細書は、低い存在率で試料中に存在するポリヌクレオチドの選択的富化のための方法を開示する。この方法は、酵素的に伸長不能なヌクレオ塩基オリゴマー(例えばPNA)をPCRクランプとして使用して、高い存在率で試料中に存在するポリヌクレオチドへのポリメラーゼ活性を選択的にブロックし、これにより試料中のより存在率の低い種の富化を生じさせる。「PNA」はPNAクランプを包含し得る。クランピングは、共通の標的部位についてのPNAとDNAプライマーまたはプローブとの間の物理的競合によって作用し、これによりプライマー伸長を妨げる。

【0041】

(i) 「ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)」は、DNA塩基配列のコピーを作製する方法である。この方法は熱サイクリング(即ち、それぞれDNAの変性(または融解)と複製のための加熱と冷却のサイクル)を利用する。コピーしようとするDNA配列に相補的

10

20

30

40

50

な配列を含む短いDNA断片であるプライマー、および熱に安定なDNAポリメラーゼ、例えば *Taq* ポリメラーゼと称されるサーマス・アクアチカス (*Thermus aquaticus*) からのものを使用して、DNA配列を選択し、これをコピーする（例えば米国特許第4,683,195号明細書；同第4,800,195号明細書および同第4,965,188号明細書参照、これらすべては、これらの教示に関して参照により本明細書に組み込まれる。）。反復サイクリングを用いて、作製されたコピーをさらなるコピーを生成するための鑄型として使用する（即ち連鎖反応）。PCR技術には、標準PCR、対立遺伝子特異的PCR、アセンブリPCR、非対称PCR、デジタルPCR、ホットスタートPCR、配列間特異的PCR、逆PCR、ライゲーション媒介性PCR、メチル化特異的PCR、ミニプライマーPCR、ネステッドPCR、オーバーラップ伸長PCR、リアルタイムPCR、逆転写PCR、固相PCR、熱非対称インターレースPCRおよびタッチダウンPCRが含まれるが、これらに限定されない。

【0042】

(j) 本明細書で使用される「プライマー」は、鑄型依存性核酸合成を開始するオリゴヌクレオチドを指す。核酸鑄型、ヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼおよび補因子の存在下に、温度およびpHの適切な条件下で、プライマーは、ポリメラーゼによるヌクレオチドの添加によって3'末端で伸長し、プライマー伸長産物を生成することができる。プライマーは、用いられる特定の条件および増幅の目的によって様々な長さであり得る。例えば、診断目的の増幅のためのプライマーは、典型的には約15から約35ヌクレオチド長である。プライマーは、所望の伸長産物の合成を開始させるために所望の鑄型に十分相補的でなければならない。言い換えると、プライマーは、ポリメラーゼによる合成の開始に使用するための適切に並置されたプライマーの3'ヒドロキシル部分を提供するのに十分な方法で所望の鑄型鎖とアニーリングすることができなければならない。プライマーが所望鑄型の正確な相補物である必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド配列が、さもなければ相補的なプライマーの5'末端に存在し得る。または、プライマー配列が、伸長産物の合成のための鑄型-プライマー複合体を提供するために所望鑄型鎖の配列と十分な相補性を有することを条件として、非相補的塩基がオリゴヌクレオチドプライマー中に散在し得る。

【0043】

(k) 本明細書で使用される「特異的にハイブリダイズする」とは、プライマーまたは検出可能オリゴヌクレオチドなどの所与の核酸の、別の核酸に特異的に結合する能力を指す。

【0044】

(l) 「ストリンジェントな」または「配列特異的」ハイブリダイゼーション条件は、正確に相補的な核酸鎖が選択的にハイブリダイズする条件を指す。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は当分野で周知である。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、種々の状況下で異なる。一般に、ストリンジェントな条件は、塩基対の50%が解離するpHおよびイオン強度の定義された条件下で特定の配列についての熱融点(T_m)より約5%低く選択される。

【0045】

(m) 「実質的に相補的」とは、ミスマッチの小さな領域を除いて相補的である配列を指す。典型的には、約15ヌクレオチド長の核酸中のミスマッチの総数は約3ヌクレオチド以下である。

【0046】

(n) 「標的配列」および「標的領域」は、検出しようとする、または検出して分析しようとする核酸の領域を指し、関心対象の多型部位、即ち本開示に関してはV600D、V600E、V600K、V600NまたはV600Rを含む。

【0047】

(o) 「V600D」は、バリンのアスパラギン酸による置換をもたらす、BRAFのヌクレオチド位置1799から始まるTGATまたはTGA变異を指す。

10

20

30

40

50

【0048】

(p) 「V600E」は、バリンのグルタミン酸による置換をもたらす、BRAFのヌクレオチド位置1799から始まるT AまたはTG AA変異を指す。V600Eは、以前の命名システムの下ではV599E (BRAFのヌクレオチド位置1796におけるT A変異) としても知られる (Kumar, et al., Clin. Cancer Res. 9: 3362 - 3368 (2003)).

【0049】

(q) 「V600K」は、バリンのリシンによる置換をもたらす、BRAFのヌクレオチド位置1798から始まるGT AAまたはG TG AAA変異を指す。

【0050】

(r) 「V600N」は、バリンのアスパラギンによる置換をもたらす、BRAFのヌクレオチド位置1798から始まるG TG AATまたはG TG AAC変異を指す。

【0051】

(s) 「V600R」は、バリンのアルギニンによる置換をもたらす、BRAFのヌクレオチド位置1798から始まるGT AG、GT CG、G TG AGA、G TG CGT、G TG CGCまたはG TG CGA変異を指す。

【0052】

本明細書で使用される用語は特定の実施形態を説明することだけを目的とし、限定を意図するものではない。

【0053】

検出の方法

被験者(例えばヒト被験者)からの核酸の試料中の、例えばBRAF遺伝子のエクソン15におけるアミノ酸位置600のバリンをコードするコドンの少なくとも1つの変異(X) (V600X)を検出する方法が提供される。この方法は、

(a) 核酸の試料を用いて増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、かつ3'末端から4番目のヌクレオチドがアデニン(A)以外の塩基を含有するプライマーを含み、Xが存在する場合は、該プライマーはXにアニーリングし、

ここで、核酸の試料がmRNAである場合、段階(a)は、前記増幅反応を実施する前にmRNAから逆転写されたcDNAを得ることまたはmRNAからcDNAを逆転写することをさらに含み、

Xが存在する場合は、該増幅反応はXを含有する増幅産物を生成する、段階と、

(b) Xを含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、Xが2以上のコドンによってコードされる場合、前記増幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含む。プライマーに関して、本明細書では3'末端のヌクレオチド(nt)を以下のように参照する：

n t - - n t - - n t - - n t 3'

位置： 4番目 3番目 2番目 1番目

増幅反応は少なくとも1つのペプチド核酸(PNA)クランプをさらに含むことができ、ここで少なくとも1つのPNAクランプは野生型標的からの増幅をブロックし、前記増幅反応が1以上の他のPNAクランプを含む場合、PNAは、好ましくは、望ましくない標的に結合し、プライマーが望ましくない標的に増幅するのを妨げることによって検出可能オリゴヌクレオチドおよび/またはプライマーを捕捉する。前記Xを含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出すること、または前記増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、かつ前記Xを含有する増幅産物への前記検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。増幅反応は、内部対照プライマーをさらに含むことができ、この場合増幅反応は内部対照を含有する増幅産物も生成し、この場合段階(b)は、内部対照を含有する増幅産物を検出することを含む。内部対照を含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅

10

20

30

40

50

産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、内部対照を含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。Xは、E、K、D、RおよびNから成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸である。例えば、Xは、E、KおよびDから成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸であり得る。Xは、E、EおよびK、EおよびD、KおよびD、またはE、KおよびDであり得る。Xはまた、野生型で認められるもの以外のコドン（即ちサイレント突然変異）または中途終止コドンによってコードされるVを含む、E、K、D、RまたはN以外の別のアミノ酸であり得る。好ましくは、しかし、Xは、前記のようにE、K、D、RまたはNの少なくとも1つである。

【0054】

10

この方法が2以上のXを検出する段階を含む場合、この方法は、各々のXについての核酸の試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含み得る。これに関して、この方法はまた、いずれのXが核酸の試料中に存在するかを決定する段階もさらに含み得る。

【0055】

増幅反応は、内部対照（IC）核酸およびIC核酸を増幅するためのプライマー対を含むことができ、好ましくはこれらを含む。増幅反応がIC核酸を含む場合、増幅を促進する条件は、IC核酸の増幅も促進する。

【0056】

20

従って、プライマーの選択が本開示に従った少なくとも1つの突然変異の検出を可能にする。これは、検出可能オリゴヌクレオチドの選択が突然変異の検出を可能にする先行技術の方法とは明らかに異なる。本発明の方法はまた、アミノ酸レベルでの突然変異にも特異的である（即ちプライマーを、特定のアミノ酸をコードするすべてのコドンを増幅するが、他のアミノ酸をコードするコドンは増幅しないように選択する。）。これは、核酸に特異的であり、コドンの1番目と2番目の位置のヌクレオチドが同じであるコドンによってコードされる複数のアミノ酸を検出する、先行技術の方法とは明らかに異なる。さらに、本発明の方法はDNAまたはRNAに関して実施することができ、本質的に定量的であり、同じ遺伝子中の他の位置のSNPならびに他の遺伝子中のSNPの検出に適合させることができる。

【0057】

30

組織または体液の任意の適切な試料を核酸、即ちDNAまたはRNAの試料の供給源として使用することができる。典型的には、供給源は腫瘍または転移部位からの細胞/組織または血液（もしくはこれらの成分）である。例えば血液、血漿、血清、リンパおよび腫瘍生検を使用することができる。他の試料には、尿、脳脊髄液、胸膜液、痰、腹腔液、膀胱洗浄液、分泌物（例えば乳房）、口腔洗浄液、タッチ標本および微細針吸引物が含まれる。血漿または全血は、例えばキレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）またはこの塩、例えば二ナトリウム塩もしくはカルシウム二ナトリウム塩の添加などによって保存することができる。望ましくないタンパク質を消化するためにプロテイナーゼKなどのプロテイナーゼを試料に添加することができる。

【0058】

40

組織試料は、一般にホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックとして保存することができる。5 μmなどの様々な厚さの組織切片を、標準的な手段によってこのような組織ブロックから切り出し、スライドガラスなどの固体支持体に取り付けるかまたはそのまま取り付けずにおく。組織試料の細胞形態を様々な固定液および/または染色液を用いて明らかにし、顕微鏡で視覚化する。組織試料中の細胞、例えば癌細胞、例えば黒色腫細胞の密度が十分である（約1%を上回る）場合は、切片をスライドガラスからこそげ取り、さらに精製することなくDNAを全組織試料から直接抽出することができる。または、組織試料中の細胞、例えば癌細胞、例えば黒色腫細胞の密度が低い（約1%未満）場合は、組織試料を黒色腫細胞に関して富化する付加的な手順を実施することができる。DNAはまた、新鮮/凍結組織、微細針吸引物または末梢血から単離することもできる。

50

【0059】

試料は、当分野で公知のように任意の適切な方法を用いてアッセイ用に調製し得る。望ましくは、この方法は核酸を抽出し、濃縮する。この方法はまた、望ましくは標的配列を增幅のためにアクセス可能にし、增幅の潜在的な阻害剤を抽出物から除去する。

【0060】

DNAは、例えばQiagen Inc. (Valencia, CA)からのDNeasy DNA単離キット、QIAamp DNA血液キットもしくはPAXgene血液DNAキットを用いて、または当業者に公知の他の方法を用いて末梢血から単離することができる。他の組織試料からのDNAも、DNeasy DNA単離キットを用いて得ることができる。任意の他のDNA抽出および精製技術も使用でき、例えばフェノール-クロロホルム抽出から自動磁気ビーズ核酸捕捉システムに及ぶ液-液抽出および固相技術が含まれる。RNAを単離して逆転写し、生じたcDNAを増幅することができる（例えば米国特許第5,310,652号明細書；同第5,322,770号明細書；同第5,561,058号明細書；同第5,641,864号明細書；および同第5,693,517号明細書に記載されている逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR））。

10

【0061】

核酸が得られれば、これを、試料中に変異配列が存在する場合は変異配列の特異的増幅を生じさせるプライマーと接触させることができる。「特異的増幅」は、プライマーが特定の変異配列を増幅し、他の変異配列または野生型配列は増幅しないことを意味する。例えばPCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, Editor, Freeman Press, NY (1992))；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al., Editors, Academic Press, San Diego, CA (1990))；Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1994-1999, 2004年4月までの補足更新を含む。)；およびMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook & Russell, 3rd ed., 2001) 参照。対立遺伝子特異的増幅に基づく方法または伸長に基づく方法は、国際公開第93/22456号ならびに米国特許第4,851,331号明細書；同第5,137,806号明細書；同第5,595,890号明細書；および同第5,639,611号明細書に記載されており、これらすべては、これらの教示に關して参照により本明細書に明確に組み込まれる。リガーゼ連鎖反応、鎖置換アッセイおよび様々な転写に基づく増幅方法などの方法が使用できるが（例えばAbramson and Myers, Current Opinion in Biotechnology 4:41-47 (1993)による総説参照）、PCR、特にPNAクランプなどのクランプを用いるPCRが好ましい。

20

【0062】

複数の変異対立遺伝子または野生型と変異対立遺伝子の様々な組合せなどの、複数の対立遺伝子特異的プライマーを単一増幅反応において同時に用いることができる。増幅産物は、異なる標識または大きさ（例えばゲル電気泳動を用いて）によって区別することができる。

30

【0063】

プライマーを、例えば分光、光化学的、生化学的、免疫化学的または化学的手段によって検出できる標識で検出可能に標識化することができる（例えばSambrook, et al. 参照）。有用な標識には、蛍光染料などの染料、³²Pなどの放射性標識、高電子密度試薬、ペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素、ビオチン、または抗血清もしくはモノクローナル抗体が使用可能なハプテンおよびタンパク質が含まれる。

40

【0064】

50

検出可能オリゴヌクレオチドも、フルオレセインなどで同様に標識することができる。これに関して、プライマーを染料で標識し、および検出可能オリゴヌクレオチドをフルオレセインで標識して、染料と反対側の新生鎖に結合するように設計した場合、DNAヘリックスを横切る蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)が起こり得る。他の検出可能オリゴヌクレオチドには、分子プローブ、T A Q M A N(登録商標)プローブ、一本鎖DNAプローブ、二本鎖DNAプローブ等が含まれる。

【0065】

任意の適切な配列をICとして使用することができる。IC標的配列の例には、本明細書の「実施例」で使用されるものが含まれる。

【0066】

核酸増幅試薬には、ポリメラーゼ活性を有する酵素(例えばAmplicaq Gold(登録商標))、1以上の酵素補因子(例えばMgCl₂)、ならびにデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP; 例えばdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP)が含まれる。

【0067】

増幅を促進する条件は、プライマーのアニーリングおよび核酸配列の伸長を促進する条件である。アニーリングは様々なパラメータ、例えば温度、イオン強度、増幅される配列の長さ、相補性、および増幅される配列のG:C含量などに依存する。例えば温度を低下させることは相補的核酸配列のアニーリングを促進する。高いG:C含量およびより長い長さは二重鎖形成を安定化する。一般に、約30bp以下であって、高いG:C含量を有するプライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドは良好に機能する。好みの増幅条件、プライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドを本明細書で例示する。

【0068】

増幅は、反応混合物を約10回から約100回、例えば約20回から約75回、例えば約25回から約50回熱サイクリングすることにより、任意の適切な回数反復することができる。

【0069】

増幅反応が完了すれば、任意の適切な方法を用いて増幅産物の存在を検出することができる。このような方法には、限定されることなく、当分野で公知の方法、例えば蛍光染料を用いるまたは用いない(産物を染料標識プライマーで増幅したかどうかに依存する。)ゲル電気泳動、インターラート染料での融解プロファイル(例えばPCR Technology, Principles, and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed., W.H. Freeman and Co., New York, 1992, Chapter 7参照)、および内部検出可能オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが含まれる。方法の他の例には、固相酵素結合免疫測定法(ELISA)、電気化学発光法、逆ドットプロット法、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)(例えばLazar, Genome Res. 4:S1-S14(1994))が含まれ、一本鎖PCR産物の一本鎖立体配座多型解析も使用できる(例えばOrita, et al., PNAS USA 86:2766-2770(1989)参照)。

【0070】

増幅された核酸は、反応混合物中の二本鎖DNA(dsDNA)の総量の増加を観測することによって検出できる(例えば米国特許第5,994,056号明細書ならびにEuropean Pat. Pub. No. 487,218および512,334参照)。SYBR GreenなどのDNA結合染料を使用する。dsDNAに結合した場合染料は蛍光を発し、蛍光の増大を用いてdsDNAの増加を測定する。

【0071】

ジデオキシ配列決定法およびオリゴヌクレオチド長の産物のPyrosequencing(商標)も増幅核酸を検出するために使用できる。別の配列決定法がKobayashi, et al., Mol. Cell. Detectable oligonucle

10

20

30

40

50

o t i d e s 9 : 1 7 5 - 1 8 2 (1 9 9 5)) によって記述されている。

【 0 0 7 2 】

P C R を実施する場合、本明細書の「実施例」に例示されているような条件が使用できる。標準的な P C R を用いる場合は、増幅が完了した後、例えば増幅の間に標識プライマーを使用した後は、増幅後に標識プライマーを検出可能オリゴヌクレオチドとして使用することによって、またはプライマーとは配列が異なる、増幅後に増幅された標的配列にハイブリダイズする検出可能オリゴヌクレオチドを使用することによって、検出を行うことができる。次に標識増幅産物を分離し、他の手段によって検出することができる。

【 0 0 7 3 】

または、増幅と検出をリアルタイム P C R アッセイにおいて組み合わせることができる。リアルタイム P C R を用いる場合、混合物は、核酸検出試薬、例えば任意の二本鎖 D N A とインターラートする非特異的蛍光染料、または検出可能オリゴヌクレオチドがこの相補的 D N A 標的とハイブリダイズした後でのみ検出を可能にする配列特異的 D N A 検出可能オリゴヌクレオチドをさらに含むことができ、これにより同時増幅と検出を可能にする。検出可能オリゴヌクレオチドが増幅の間に混合物中に存在する場合、検出可能オリゴヌクレオチドは、増幅を促進する条件下で安定であるべきであり、増幅を妨げてはならず、増幅条件下でこの標的配列に結合すべきであり、およびこの標的配列に結合した後でのみシグナルを発すべきである。これに関して特に適する検出可能オリゴヌクレオチドの例には、分子ビーコン検出可能オリゴヌクレオチド、T A Q M A N (登録商標) 検出可能オリゴヌクレオチド、およびA b r a v a y a , e t a l . (米国特許出願公開第2 0 0 5 / 0 2 2 7 2 5 7 号明細書) によって記述されているような線状検出可能オリゴヌクレオチドが含まれる。検出可能オリゴヌクレオチドは、単独でまたはシステム領域の一部とさらに組み合わせて、分子ビーコンのループ領域を形成することができる。検出可能オリゴヌクレオチドはまた、一方の末端に発蛍光団(例えばF A M)を有し、他方の末端にB l a c k H o l e Q u e n c h e r (B H Q (登録商標) ; B i o S e a r c h T e c h n o l o g i e s , I n c . , N o v a t o , C A)などの高効率消光剤を有する線状検出可能オリゴヌクレオチドとしても使用できる。

【 0 0 7 4 】

増幅産物の検出は、例えば特定の1つまたは複数の変異 B R A F 遺伝子(2以上の変異 B R A F 遺伝子が同時に検出されるか否かに依存する。)を含む細胞が試料中に存在したことを示すが、増幅産物が検出されないことは、特定の変異 B R A F 遺伝子を含む細胞が試料中に存在しなかったこと、例えば癌が存在するが転移していない場合を示す。これに関して、2以上の特定の変異 B R A F 遺伝子を同時に(または1以上の特定の変異 B R A F 遺伝子と野生型 B R A F)を増幅する場合は、各々の特定の変異 B R A F についてのプライマーを異なる検出可能標識で標識することができ、これにより2以上の特定の変異 B R A F 遺伝子(または1以上の特定の変異 B R A F 遺伝子と野生型 B R A F 遺伝子)の検出を区別することができる。変異体と野生型産物の相対的レベルは、特定の変異 B R A F 遺伝子を含む試料中の細胞の割合を示すことができる。変異 B R A F 配列を含む細胞の割合が低いことは転移のレベルが低いことを示し、変異配列を含む細胞の割合が高いことは転移のレベルが高いことを示し得る。

【 0 0 7 5 】

所望する場合、この方法は初期ユニバーサル増幅段階をさらに含み得る。例えば、1以上の変異 B R A F 遺伝子の特異的増幅の前に、単独でまたは野生型 B R A F もしくは内部対照配列とさらに組み合わせて、試料を縮重プライマーと接触させ、増幅することができる。

【 0 0 7 6 】

好ましくは、この方法はP N A クランプを用いる(例えばD e m e r s , e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 3 : 3 0 6 0 - 3 0 6 5 (1 9 9 5))。P N A クランプは、好ましくは野生型 B R A F または増幅しようとする特定の変異 B R A F 遺伝子に比べて最も高頻度な変異 B R A F 遺伝子の増幅を阻害するまたは妨げる。

10

20

30

40

50

【0077】

所望する場合は、核酸試料または検出可能オリゴヌクレオチドを固体支持体上に固定化することができる。固体支持体を利用するアッセイ形式の例には、ドットプロット形式および逆ドットプロット形式が含まれる（例えば米国特許第5,310,893号明細書；同第5,451,512号明細書；同第5,468,613号明細書；および同第5,604,099号明細書参照、これらすべては、これらの教示に関して参照により本明細書に明確に組み込まれる。）。

【0078】

増幅後、特異的増幅が起こったかどうかを判定するため、増幅産物を鋳型および過剰のプライマーから分離することが望ましいと考えられる。分離は、標準的な方法を用いてアガロース、アガロース-アクリルアミドまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって実施することができる（例えばSambrook, et al., Molecular Cloning, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) 参照）。または、クロマトグラフィを用いて分離を行うことができる。クロマトグラフィの種類の例には、吸着、分配、イオン交換および分子ふるいクロマトグラフィが含まれ、クロマトグラフィ技術の種類の例には、カラム、ペーパー、薄層およびガスクロマトグラフィが含まれる（例えばFreifelder, Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2nd ed., Wm. Freeman & Co., New York, NY (1982) 参照）。

【0079】

増幅は可視化によって確認される。例えば、臭化エチジウムで染色したゲルを紫外線で可視化することができる。放射性同位体で標識した増幅産物は、X線フィルムに露光し、現像することによって可視化でき、蛍光標識で標識した増幅産物は、増幅産物を刺激スペクトルに供することによって可視化できる。増幅の可視化の好ましい方法は、増幅産物にハイブリダイズする標識検出可能オリゴヌクレオチドの使用である。Qiagenから入手可能なもののような、手動カラムも使用できる。

【0080】

自動試料調製システム、例えば核酸の精製のために磁気微粒子工程を用いるように設計された自動試料調製システムの使用が好ましいと考えられる。自動試料調製システムの一例は、Abbott Laboratories, Abbott Park, IL から入手可能なm 2000 spである。または、m 24 sp自動試料調製システム（Abbott）を用いて試料を調製するか、もしくは手作業で調製することができる。自動試料調製はより一貫しているので、手作業での調製より好ましい。試料調製キットの別の例は、Qiagenから入手可能なQIAamp DNA FFPE組織キットである。

【0081】

Abbott mSample Preparation System_{DNA} (4 x 24 プレップ; Abbott) 試薬は、核酸を捕捉し、非結合試料成分を除去する。プロテイナーゼ K が、試料に結合したタンパク質を消化する溶解段階に含められる。結合核酸を溶出し、96 ウエルディーププレートに移す。これで核酸はいつでも増幅できる状態にある。工程が各試料について正しく進行したことを明らかにするための内部対照 (IC) として役立つ、無関係なDNA配列を試料調製手順に導入し、キャリブレータ、対照および標本と共に処理する。

【0082】

増幅 / 検出は当分野で公知のように、例えばm 2000 rt 装置 (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL) の使用によって実施することができる。標的核酸（例えばDNA、RNAまたは両方）を、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) および活性化剤、例えばマグネシウムまたはマンガンの存在下でDNAポリメラーゼ逆転写酵素によって増幅する。増幅試薬は、特定の変異体（例えば変異 B

10

20

30

40

50

R A F) および、好ましくは I C についての増幅プライマーの特定のセットを含む。 P C R 増幅の間、二本鎖 D N A の鎖を分離するために高温を用いる。反応物を D N A アニーリングが起こり得る温度に冷却した場合、分析物特異的な一本鎖 D N A オリゴヌクレオチドプライマーが分析物 D N A に結合する。プライマーは D N A ポリメラーゼによって伸長され、これにより分析物 D N A の短い標的ストレッチの正確なコピーを作製する。 D N A ポリメラーゼは、これを不活性にする分子によって活性部位で修飾された好熱性酵素であり得るが、そうである必要はない。 P C R の開始前に酵素を加熱する場合、阻害性分子は酵素から切断され、これにより酵素が活性を回復することが可能になる。このように、酵素は特定の D N A - D N A 相互作用が起こる温度でのみ活性である。これは、プライマーダイマーなどの非特異的 P C R アーティファクトを大きく低減する。各回の熱サイクリングの間に、増幅産物は高温で一本鎖に解離し、温度が低下すると共にプライマーのアニーリングおよび伸長が可能になる。高温と低温の反復サイクリングを通して標的の指数的増幅が達成される。特定の変異体（例えば変異 B R A F ）および、存在する場合は、 I C 標的の増幅は、同じ反応において同時に起こる。

【 0 0 8 3 】

この方法は、例えば B R A F 阻害剤、抗 E G F R モノクローナル抗体、 M E K 阻害剤等による治療選択肢を評価する目的で B R A F 変異状態を測定するために使用できる。例えば、 Z e l b o r a f (商標) (ベムラフェニブ ; R o c h e) は、報告によれば B R A F V 6 0 0 E 変異陽性の転移性黒色腫を有する人々において生存率を改善することが示された。

【 0 0 8 4 】

この方法はまた、黒色腫などの癌を有すると診断された患者についての転帰を予測するため、例えば黒色腫などの疾患の初期段階（ I / I I 期）を有する患者において転移の危険度を評価するため、および転移性黒色腫などの進行した転移性癌（ I I I / I V 期）を有する患者を観測するためにも使用できる。癌の転移拡大はしばしば血行性に起こるので、この方法は、末梢血を検定して再発を評価するためにも使用できる。他の癌には、甲状腺癌（例えば甲状腺乳頭癌（ P T C ））、卵巣癌、直腸結腸癌、胃癌、膵癌、バレット腺癌、胸膜中皮腫、非ホジキンリンパ腫、急性白血病、頭頸部の扁平上皮癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌（例えば低悪性度漿液性癌）、肝細胞癌、肉腫、下垂体癌、大腸癌、胆道癌、眼の癌、中枢神経系の癌、造血組織の癌、リンパ組織の癌、横紋筋肉腫、肉腫、神経膠腫、胆管癌および肺腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 5 】

上記を考慮して、 D N A の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも 1 つの変異（ X ）を検出する方法も提供される。この方法は、

(a) D N A の試料を用いて増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応は、 3' 末端の最後の 3 個のヌクレオチドが X をコードし、かつ 3' 末端から 4 番目のヌクレオチドがアデニン（ A ）以外の塩基を含有するプライマーを含み、 X が存在する場合は、該プライマーは X にアニーリングし、

X が存在する場合は、前記増幅反応は X を含有する増幅産物を生成する、段階と、

(b) X を含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、 X が 2 以上のコドンによってコードされる場合、前記増幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含む。増幅反応は、(i i i) 少なくとも 1 つのペプチド核酸（ P N A ）クランプをさらに含むことができ、ここで少なくとも 1 つの P N A クランプは野生型標的からの増幅をブロックし、増幅反応が 1 以上の他の P N A クランプを含む場合、 P N A は、好ましくは検出可能オリゴヌクレオチドおよび / またはプライマーを捕捉する。 X を含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、 X を含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。増幅反応は、内部対照プライマーをさらに含むことができ、この場合、増幅反応は内部対照を含有する増幅産

10

20

30

40

50

物も生成し、この場合、段階（b）は、内部対照を含有する増幅産物を検出することを含む。内部対照を含有する増幅産物を検出する段階は、標識プライマーを検出することまたは増幅産物を検出可能オリゴヌクレオチドと接触させ、内部対照を含有する増幅産物への検出可能オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出することを含み得る。前記方法が2以上のXを検出する段階を含む場合、前記方法は、各々のXについてのDNAの試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含み得る。これに関して、この方法はまた、DNAの試料中にいずれのXが存在するかを決定する段階もさらに含み得る。

【0086】

プライマー、検出可能オリゴヌクレオチドおよびプライマーを設計する方法

10

ヒト由来の核酸の試料中のBRAF遺伝子のエクソン15におけるV600Xの増幅のためのプライマーのセットも提供される。プライマーのセットは、正プライマーなどのプライマーを含み、これらの各々はオリゴヌクレオチドであり、前記オリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチド長であり、および3'末端にXをコードするヌクレオチド配列を含む。V600Eの増幅のためのプライマーを含むプライマーのセットは、3'末端にGAAをコードする1つのプライマーおよび3'末端にGAGをコードする別のプライマーを含む。V600Kの増幅のためのプライマーのセットは、3'末端にAAAをコードする1つのプライマーおよび3'末端にAAGをコードする別のプライマーを含む。V600Dの増幅のためのプライマーを含むプライマーのセットは、3'末端にGATをコードする1つのプライマーおよび3'末端にGACをコードする別のプライマーを含む。V600Nの増幅のためのプライマーのセットは、3'末端にATTをコードする1つのプライマーおよび3'末端にAACを含む別のプライマーを含む。V600Rの増幅のためのプライマーを含むプライマーのセットは、3'末端にCGTをコードする1つのプライマー、3'末端にCGCをコードするプライマー、3'末端にCGAをコードするプライマー、3'末端にGGGをコードするプライマーを含む。前記プライマーのすべてに関して、ヌクレオチド配列の残りの部分（即ち3'側終止コドンまでのヌクレオチド配列）は、プライマーとV600Xをコードする正確に相補的な対立遺伝子配列との間で安定な二重鎖が選択的に形成するようなヌクレオチド配列であるべきである。言い換えると、V600Eの増幅のためのプライマーはV600Eを選択的に増幅するが、これ以外、例えばV600、V600K、V600D、V600NおよびV600Rは増幅しない。V600Kの増幅のためのプライマーはV600Kを選択的に増幅するが、V600E、V600D、V600NおよびV600Rは増幅しない。V600Dの増幅のためのプライマーはV600Dを選択的に増幅するが、V600E、V600K、V600NおよびV600Rは増幅しない。V600Nの増幅のためのプライマーはV600Nを選択的に増幅するが、V600E、V600K、V600DおよびV600Rは増幅しない。好ましくは、EがGAAによってコードされるV600Eの増幅のためのプライマーは、EがGAGによってコードされるV600Eを選択的に増幅せず、および逆もまた同様であり、KがAAAによってコードされるV600Kの増幅のためのプライマーは、KがAAGによってコードされるV600Kを選択的に増幅せず、および逆もまた同様であり、DがGATによってコードされるV600Dの増幅のためのプライマーは、DがGACによってコードされるV600Dを選択的に増幅せず、および逆もまた同様であり、NがATTによってコードされるV600Nの増幅のためのプライマーは、NがAACによってコードされるV600Nを選択的に増幅せず、逆もまた同様である。同様に、RがCGTによってコードされるV600Rの増幅のためのプライマーは、RがCGC、CGA、CGG、AGAおよびAGGによってコードされるV600Rを選択的に増幅せず、RがCGCによってコードされるV600Rの増幅のためのプライマーは、RがCGT、CGA、CGG、AGAおよびAGGによってコードされるV600Rを選択的に増幅せず、RがCGAによってコードされるV600Rの増幅のためのプライマーは、RがCGT、CGC、CGG、AGAおよびAGGによってコードされるV600Rを選択

30

40

50

的に増幅せず、RがC G GによってコードされるV 6 0 0 Rの増幅のためのプライマーは、RがC G T、C G C、C G A、A G AおよびA G GによってコードされるV 6 0 0 Rを選択的に増幅せず、RがA G AによってコードされるV 6 0 0 Rの増幅のためのプライマーは、RがC G T、C G C、C G A、C G GおよびA G GによってコードされるV 6 0 0 Rを選択的に増幅せず、ならびにRがA G GによってコードされるV 6 0 0 Rの増幅のためのプライマーは、RがC G T、C G C、C G A、C G GおよびA G AによってコードされるV 6 0 0 Rを選択的に増幅しない。好ましくは、プライマーのセットは、

(a) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A A [配列番号：5 9]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A G [配列番号：6 0]を含むオリゴヌクレオチド、10

(b) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A A [配列番号：4 6]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A G [配列番号：4 7]を含むオリゴヌクレオチド、

(c) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A T [配列番号：4 8]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N G A C [配列番号：4 9]を含むオリゴヌクレオチド、

(d) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A T [配列番号：5 0]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A A C [配列番号：5 1]を含むオリゴヌクレオチド、

(e) 3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N C G T [配列番号：5 2]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N C G C [配列番号：5 3]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A C N C G A [配列番号：5 4]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N C G G [配列番号：5 5]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A G A [配列番号：5 6]を含むオリゴヌクレオチド、および3'末端にヌクレオチド配列G G T C T A G C T A C N A G G [配列番号：5 7]を含むオリゴヌクレオチド、20

(d) および(e)、

(a) および(b)、

(a) および(c)、30

(b) および(c)、

(a)、(b) および(c)、

(d)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれか、

(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれか、ならびに

(d) および(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b) および(c)のいずれかから成る群より選択される少なくとも1つのプライマーを含み、

ここでNは、アデニン(A)以外の塩基を含むヌクレオチドであり、およびここでオリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む。「(a)、(b) および(c)のいずれか」とは、(a)、(b)、(c)、(a) および(b)、(a) および(c)、(b) および(c)、ならびに(a)、(b) および(c)を意味する。オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列の5'末端のGと隣接して、ヌクレオチド配列の3'末端のTから始まるヌクレオチド配列5' A A T A G G T G A T T T T 3' [配列番号：5 8]の1以上の連続するヌクレオチドをさらに含み得る。プライマーのセットは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む、逆プライマーなどのプライマーをさらに含むことができ、ここで、プライマーが15から27ヌクレオチドを含む場合、プライマーは配列番号：10の15から27個の連続するヌクレオチドを含む。検出可能オリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含むことができ、ここで、検出可能オリゴヌクレオチドが15から20ヌクレオチドを含む場合、検出可能オリゴヌクレオチドは配列番号：11の15から20個の連続するヌクレオチドを含む。40

【0087】

オリゴヌクレオチドは、任意の適切な方法、通常は市販の試薬と装置を用いる化学合成（例えば固相合成）によって調製することができる（例えば Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA)、DuPont (Wilmington, DE) および Milligen (Bedford, MA) 参照）。または、オリゴヌクレオチドは商業的供給源を通して購入することができる。オリゴヌクレオチドを合成する方法は当分野で周知である（例えば Narang, et al., Meth. Enzymol. 68: 90-99 (1979)；Brown, et al., Meth. Enzymol. 68: 109-151 (1979)；Beaucag, et al., Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981)；および米国特許第4,458,066号明細書参照）。

【0088】

各々の変異アミノ酸の同定のための遺伝子コドンに基づき、複数の対立遺伝子特異的プライマーを使用する。1つのプライマーは、3'末端の関心対象の変異および3'末端から4番目のヌクレオチドの意図する変異をコードする各々の対応する遺伝子コドンのために設計する。対立遺伝子特異的正プライマーは、プライマーと鋳型の間の3'マッチに従って、TaqポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼによる選択的PCR增幅に基づきへ変異体特異的標的を増幅する。rTthなどの逆転写酵素-DNAポリメラーゼも本発明の方法に関連して使用することができる。これに関して、RNAポリメラーゼの混合、DNAポリメラーゼの混合物、またはRNAポリメラーゼとDNAポリメラーゼの混合物が使用できる。逆プライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドは、反応の間で共有されるコンセンサス配列に基づく。

【0089】

従って、上記を考慮して、核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも1つの変異(X)を検出するためのプライマーを設計する方法も提供される。この方法は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、および3'末端から4番目のヌクレオチドが、野生型遺伝子中に存在する塩基以外の塩基を含有するプライマーを合成することを含み、この後核酸の試料中の遺伝子におけるコドンの少なくとも1つの突然変異(X)を検出するためのプライマーを設計する。本明細書の教示に基づきプライマーを設計する方法は、2以上のSNPの検出のため、および他の非標的変異体も含有する、標的SNPを有する遺伝子を検出するためのプライマーを設計することも含む。このようなプライマー設計のための方法を表1に示す。

【0090】

ペプチド核酸(PNA)を、これらのDNA対応物よりも大きな特異性と安定性で相補的核酸配列に結合するPCRクランピング試薬として使用する(PNAに基づくPCRクランピングの考察については、例えば米国特許出願公開第2010/0009355号明細書参照)。PNAは正プライマーとオーバーラップし、ロックすべき非特異的配列と完全にマッチする。結果として、PNAは非特異的標的に結合し、同じ標的へのプライマーの結合を阻害して、これにより非特異的増幅を抑制する(図1参照)。

【0091】

所与のアミノ酸位置に対応するプライマーを、この位置の特定の変異のすべての可能な変異体を検出するアッセイにおいて使用するために混合することができる。例えば、それぞれ3'末端にGAGおよびGAAを担持する対立遺伝子特異的プライマーは、アミノ酸位置600のグルタミン酸に対するすべての可能な変異体を検出することができるので、すべてのV600E変異が検出される(図1および2参照)。

【0092】

閉管均質形式でこの方法を実施できることは、汚染の危険性を最小限に抑える(例えば Kreuzer, et al., Ann. Hematol. 82: 284-289 (2003) 参照)。試料を一対のPCRプライマーと接触させるために通常適用される任意の手段によって、試料を一対のプライマーと接触させることができる。例えば、試料とプラ

イマーを、少容量の混合物用に適合されたマイクロウェルプレート中またはマイクロバイアル中で接触させることができる。

【0093】

上記を考慮して、ヒトB R A F 遺伝子のエクソン15におけるすべての可能なV600E変異を変異特異的に増幅する、正プライマーなどのプライマー、ヒトB R A F 遺伝子のエクソン15におけるすべての可能なV600K変異を変異特異的に増幅する、正プライマーなどのプライマー、すべての可能なV600D変異を変異特異的に増幅する、正プライマーなどのプライマー、すべての可能なV600R変異を変異特異的に増幅する、正プライマーなどのプライマー、すべての可能なV600N変異を変異特異的に増幅する、正プライマーなどのプライマー、特異性と感度を高めるために非標的B R A F 配列の非特異的増幅をブロックする検出可能オリゴヌクレオチドおよびP N A、ならびに内部対照として役立つ（例えばD N Aの適切性、試料の抽出、増幅効率および変異の相対的定量化の標準化（例えば全野生型と変異対立遺伝子のパーセンテージとして））、エクソン15に近接するB R A F ゲノム配列を検出するためのプライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドが提供される。別々の反応またはプールされた反応においてヒトB R A F 遺伝子のエクソン15におけるV600変異を増幅し、検出するために前記プライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドを使用する、診断的リアルタイムP C R (r t P C R) 方法も提供される。

【0094】

本明細書で述べるプライマーと少なくとも約80%同一であるプライマーも使用できる。所望する場合は、一方または両方のプライマー（即ち正プライマーと逆プライマー）を標識するまたはラベルすることができる。標識プライマーの使用は、標識された増幅産物を生じさせる。蛍光標識された増幅産物は、例えばA B I 3100 G en e t i c A n a l y z e r およびG en e s c a n 3.1.2 ソフトウェア（A p p l i e d B i o s y s t e m s ）などの、蛍光を検出するように設計された任意の適切な装置を用いて検出することができる。

【0095】

本明細書で述べる方法はゲノムD N Aの検出に基づくが、R N Aベースのアッセイも使用できる。しかし、このようなアッセイは、全血からのm R N Aの逆転写およびこの後の増幅に基づく。m R N Aベースの方法の感度は一般に良好であるが、R N Aの分解および逆転写酵素の低い効率がこのようなアッセイの実用性を制限し、さらには大幅に制限することもある。加えて、関心対象のm R N Aの量が、例えば循環細胞の代謝状態に依存して、大きく変動し得るので、アッセイの結果を再現することが困難であり得る。

【0096】

所望する場合は、前述したプライマーを、もはやD N A合成のためのプライマーとしての機能を果たさないように改変することができ、標識して、検出可能オリゴヌクレオチドとして使用することができる。検出可能オリゴヌクレオチドは、D N Aなどの核酸の試料中のB R A F 遺伝子のエクソン15におけるアミノ酸位置600のバリンをコードするコドンの変異（X）（V600X）を検出するために異なるアッセイ形式で使用できる。例えば、検出可能オリゴヌクレオチドを5'-ヌクレアーゼアッセイにおいて使用することができる（例えば米国特許第5,210,015号明細書；同第5,487,972号明細書；および同第5,804,375号明細書；ならびにH o l l a n d , e t a l . , P N A S U S A 88:7276-7280 (1988) 参照、これらすべては、これらの教示に関して参照により本明細書に明確に組み込まれる。）。

【0097】

プライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドを、核酸に基づく増幅方法、例えばP C R、特にリアルタイムP C Rにおけるこれらの使用に関連して本明細書で説明したが、このようなプライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドは、他の核酸に基づく方法、例えばハイブリダイゼーション技術（例えば膜に基づくハイブリダイゼーション技術（サザンプロット法およびノーザンプロット法）、修飾核酸ハイブリダイゼーション技術（例えば

10

20

30

40

50

P andian, et al., 米国特許第5,627,030号明細書参照)、および固相酵素結合免疫測定法(ELISA)様の技術)における検出可能オリゴヌクレオチドとして有用であり得、これらの技術は、同一、類似および相補的ポリヌクレオチド配列を検出するために使用される。

【0098】

一本鎖線状DNAオリゴヌクレオチドである検出可能オリゴヌクレオチドは、当分野で公知の方法に従って検出可能に標識される。または、所望する場合は、プライマーを同様に標識することができる。任意の適切な標識、例えば発蛍光団、発光団、化学発光団、フォトルミノフォアまたは放射性同位体などが使用できる。例えば、蛍光部分を検出可能オリゴヌクレオチドの一方の末端に共有結合し、消光部分を他方の末端に共有結合することができる。適切な発蛍光団の例には、FAM(例えば6'-FAM)、フルオレセインおよびこの誘導体、ローダミン、クマリンおよびこの誘導体、TET、HEX、JOE、TAMA、TAMRA、NTB、ROX、VIC、NED、4,7-ジクロロフルオレセイン、4,7-ジクロロローダミン、DABCYL、DABSYL、マラカイトグリーン、LC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、ルシファーイエロー、TEXAS RED(登録商標)、テトラメチルローダミン、テトラクロロ-6-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、ならびにシアニン染料(例えばCy3およびCy5)およびこの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。FAMが好ましい標識である。消光剤の例には、DABCYL、DABSYL、DABMI、テトラメチルローダミン、TAMRAおよびBHQ(登録商標)染料が含まれる。前述のように、各回のリアルタイムPCR增幅の間に、検出可能に標識された検出可能オリゴヌクレオチドは、標的DNAが存在する場合は、増幅された標的DNAにアニーリングする。標的配列が存在しない場合は、検出可能オリゴヌクレオチドの各々は、蛍光を発することができる前に、励起された発蛍光団のエネルギーを吸収するのに十分なだけ消光剤を発蛍光団に近接させる立体配座をとる。標的配列の存在下では、各々の検出可能オリゴヌクレオチドは標的中の相補的配列に結合し、発蛍光団と消光剤は離れたままであり、蛍光発光および検出を可能にする。好ましくは、標的特異的検出可能オリゴヌクレオチドおよびIC特異的検出可能オリゴヌクレオチドを、標的DNAとIC DNAを区別することができるように異なって標識する。これに関して、標的特異的検出可能オリゴヌクレオチドを、好ましくはFAMで標識し、BHQ-1で消光する。

【0099】

キット

キットも提供される。キットは、

(i)ヒト由来の核酸の試料中のBRAF遺伝子のエクソン15におけるV600Xの検出のためのプライマーのセットであって、該プライマーのセットは、

(a)3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAA[配列番号:59]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAG[配列番号:60]を含むオリゴヌクレオチド、

(b)3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAA[配列番号:46]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAG[配列番号:47]を含むオリゴヌクレオチド、

(c)3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAT[配列番号:48]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNGAC[配列番号:49]を含むオリゴヌクレオチド、

(d)3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAT[配列番号:50]を含むオリゴヌクレオチドおよび/または3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNAAC[配列番号:51]を含むオリゴヌクレオチド、

(e)3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNCGT[配列番号:52]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列GGTCTAGCTACNCGC[配列番号:53]を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列GGT

10

20

30

40

50

C T A G C T A C N C G A [配列番号：54] を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N C G G [配列番号：55] を含むオリゴヌクレオチド、3'末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A G A [配列番号：56] を含むオリゴヌクレオチド、および3'末端にヌクレオチド配列 G G T C T A G C T A C N A G G [配列番号：57] を含むオリゴヌクレオチド、

- (d) および (e)、
- (a) および (b)、
- (a) および (c)、
- (b) および (c)、
- (a)、(b) および (c)、

(d)とのさらなる組合せで、(a)、(b)および(c)のいずれか、
(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b)および(c)のいずれか、ならびに
(d)および(e)とのさらなる組合せで、(a)、(b)および(c)のいずれか
から成る群より選択される少なくとも1つのプライマーを含み、

ここでNは、アデニン(A)以外の塩基を含むヌクレオチドであり、
ここでオリゴヌクレオチドは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む、プライマーのセット、ならびに

(i)ヒト由来の核酸の試料中のB R A F 遺伝子のエクソン15におけるアミノ酸位置600のバリンをコードするコドンの少なくとも1つの変異(X)(V600X)を検出する方法についての指示書を含み、ここで、前記方法は、

(a)核酸の試料を用いて増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応は、3'末端の最後の3個のヌクレオチドがXをコードし、かつ3'末端から4番目のヌクレオチドがアデニン(A)以外の塩基を含有するプライマーであって、Xが存在する場合は、該プライマーはXにアニーリングするプライマーと、少なくとも1つのペプチド核酸(PNA)クランプであって、野生型標的からの増幅をブロックする少なくとも1つのPNAクランプを含み、

ここで、核酸の試料がmRNAである場合、段階(a)は、前記増幅反応を実施する前にmRNAから逆転写されたcDNAを得ることまたはmRNAからcDNAを逆転写することをさらに含み、

Xが存在する場合は、前記増幅反応はXを含有する増幅産物を生成する、段階と、

(b) Xを含有する増幅産物を検出する段階

を含み、

ここで、Xが2以上のコドンによってコードされる場合、前記増幅反応は各々のコドンについてのプライマーを含み、

前記方法が2以上のXを検出する段階を含む場合、この方法は、各々のXについての核酸の試料を用いた増幅反応を一緒にまたは別々に実施することを含むことができ、

前記方法はまた、いずれのXが核酸の試料中に存在するかを決定する段階もさらに含み得る。オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列の5'末端のGと隣接して、ヌクレオチド配列の3'末端のTから始まるヌクレオチド配列 5' A A T A G G T G A T T T T 3' [配列番号：58] の1以上の連続するヌクレオチドをさらに含み得る。キットは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む、逆プライマーなどのプライマーをさらに含むことができ、ここで、プライマーが15から27ヌクレオチドを含む場合、プライマーは配列番号：10の15から27個の連続するヌクレオチドを含む。

【0100】

キットは、約15ヌクレオチドから約35ヌクレオチドを含む検出可能オリゴヌクレオチドをさらに含むことができ、ここで、検出可能オリゴヌクレオチドが15から20ヌクレオチドを含む場合、検出可能オリゴヌクレオチドは配列番号：11の15から20個の連続するヌクレオチドを含む。Xは、E、K、D、RおよびNから成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸であり得る。Xは、E、KおよびDから成る群より選択される少なくとも1個のアミノ酸、例えばE、EおよびK、EおよびD、KおよびD、またはE

10

20

40

50

、KおよびDであり得る。標識の一例はF A Mである。これに関して、標識F A Mは、好ましくは消光剤B H Q - 1と組み合わせて使用される。

【0101】

キットは、組織または体液の試料を保存するための容器または試料バイアルを含み得る。一対のプライマー、特に正プライマーおよび逆プライマーなどのプライマーは、変異配列の検出を可能にするのに有効な量で組成物中に存在し得る。変異配列の検出は、本明細書で述べる方法または試料中の特定の核酸分子を検出するための当分野で公知の方法のいずれかを用いて実施される。キットはまた、緩衝液、ヌクレオチド塩基、ならびにハイブリダイゼーションおよび/または增幅反応において使用される他の組成物も含み得る。

【0102】

キットはd N T Pをさらに含み得る。好ましくは、d N T Pは、標準染料と共に緩衝液中に供給される。

【0103】

プライマー、検出可能オリゴヌクレオチドおよびd N T Pは様々な形状で包装され得る。好ましくは、プライマー、検出可能オリゴヌクレオチドおよびd N T Pは単一容器中に存在する。容器は、好ましくはアジ化ナトリウムおよび/またはP r o C l i n (登録商標) 950などの防腐剤も含む。

【0104】

キットは、D N Aポリメラーゼ、R N Aポリメラーゼ、逆転写酵素、および前記の2つ以上の混合物をさらに含み得る。任意の適切なD N Aポリメラーゼが使用できる。好ましいD N Aポリメラーゼの一例はA m p l i T a q G o l d (登録商標) (L i f e T e c h n o l o g i e s C o r p . , C a r l s b a d , C A)である。同様に、任意の適切なR N Aポリメラーゼが使用できる。好ましい逆転写酵素-D N Aポリメラーゼの一例はr T t hである。ポリメラーゼは、場合により安定剤を含有する、および好ましくは安定剤を含有する緩衝液中に供給され得る。

【0105】

キットは、緩衝液中の、塩化マグネシウムなどの活性化試薬をさらに含み得る。緩衝液は、好ましくはアジ化ナトリウムおよび/またはP r o C l i n (登録商標) 950などの防腐剤を含有する。

【0106】

キットは、場合によりI Cをさらに含み得る。I Cは、工程が各試料について正しく進行したことを明らかにする無関係なD N A配列である。任意の適切な配列をI Cとして使用することができる。I C標的配列の例には、本明細書の「実施例」に示すものが含まれる。標的特異的検出可能オリゴヌクレオチドおよびI C特異的検出可能オリゴヌクレオチドは、標的D N AとI C D N Aを区別することができるように異なって標識される。I C特異的検出可能オリゴヌクレオチドについての標識の一例はC y 5である。好ましくは、標識C y 5は消光剤B H Q - 2と組み合わせて使用される。

【0107】

本明細書で言及されるすべての特許、特許出願公開、学術論文、テキストおよび他の公表文献は、本開示が属する分野の技術水準を示すものである。すべてのこのような公表文献は、各々個々の公表文献が、参照により本明細書に組み込まれることが具体的および個別に示されているのと同じように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0108】

本明細書で例示的に述べる本発明は、本明細書で具体的に開示されていない要素または限定が存在しない場合も適切も実施され得る。従って、例えば、本明細書中の各々の場合の「含む」、「から基本的に成る」および「から成る」という用語のいずれもが、その他の2つの用語のいずれによっても置き換えられ得る。同様に、単数形態の「1つの」および「この」は、文脈上明らかに異なる指示がない限り、複数の言及を包含する。従って、例えば、「この方法」への言及は、本明細書で記述されるおよび/または本開示の読了後に当業者に明らかになる、この種類の1以上の方法および/または段階を包含する。

10

20

30

40

50

【0109】

使用した用語および表現は説明の用語として使用するものであり、限定ではない。これに関して、特定の用語が「定義」の章で定義され、「発明を実施するための形態」の中の別の部分で異なって定義される、記述されるまたは論じられる場合、すべてのこのようない定義、記述および論述はこのような用語に帰することが意図されている。このような用語および表現の使用には、示され、記述される特徴またはこの部分の等価物を除外する意図はない。さらに、小見出し、例えば「定義」を「発明を実施するための形態」の中で使用するが、このような使用は単に参照の容易さのためであり、1つの章の中で為される開示をこの章だけに限定することを意図しない；むしろ、1つの小見出しの下で為される開示は、ありとあらゆる他の小見出しの下での開示を構成することが意図される。

10

【0110】

特許請求される本発明の範囲内で様々な修正が可能であることが認識される。従って、本発明を好ましい実施形態および選択的特徴に関連して具体的に開示したが、当業者は本明細書で開示される概念の修正および変形を用い得ることが理解されるべきである。このような修正および変形は、付属の特許請求の範囲によって提示される本発明の範囲内であるとみなされる。

【実施例】

【0111】

以下の実施例は本開示を例示する役割を果たす。実施例は、いかなる意味でも特許請求される本発明の範囲を限定することを意図しない。

20

【0112】

[実施例1]

この実施例は、DNA中のB R A F 遺伝子のエクソン15におけるV 6 0 0 の個々のS N P の検出のための反応を述べる。

【0113】

2つの対立遺伝子（即ちコドン）がV 6 0 0 E、V 6 0 0 K およびV 6 0 0 D 変異について可能である（即ちグルタミン酸（E）についてはG A G およびG A A、リシン（K）についてはA A G およびA A A、ならびにアスパラギン酸（D）についてはG A T およびG A C）。各々の正プライマーを、特定のコドンを選択的に増幅するように設計した。従って、各々のアミノ酸変異の完全な検出を確実にするために各反応には2つの正プライマーが含まれる。

30

【0114】

B R A F 逆プライマーおよび、使用する場合は、検出可能オリゴヌクレオチドはコンセンサス配列を標的とする。このため、B R A F 逆プライマーおよび、使用する場合は、検出可能オリゴヌクレオチドはすべての反応について同じであり得る。

【0115】

内部対照プライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドは、B R A F 遺伝子のエクソン13内の配列を標的とする。これらはすべての反応について同じであった。

【0116】

非常に短い、伸長不能なオリゴヌクレオチドであるP N A を、潜在的な非特異的増幅をブロックするために含める。これらは、高度に配列特異的な方法でこれらの相補的標的配列に結合する。P N A 配列は正プライマーと同じ鎖上にあるので、これらは正プライマーと競合して、非特異的増幅を妨げる。所与の変異特異的P C R について複数の非特異的S N P が存在するが、非特異的増幅を生じさせ得る最も高頻度のもの、例えばV 6 0 0 E 検出の場合は野生型とV 6 0 0 K、V 6 0 0 K 検出の場合は野生型とV 6 0 0 E、およびV 6 0 0 D 検出の場合は野生型を、P N A によってブロックする必要がある。

40

【0117】

この方法は、オリゴヌクレオチドと核酸増幅のために必須の他の成分（例えばd N T P 混合物、緩衝液、酵素、および活性化剤として二価イオン）を含む混合物を形成する段階、混合物を精製核酸と組み合わせる段階、ならびに反応混合物を特定の条件に供して標的

50

配列を増幅し、検出する段階から成了。工程は、熱サイクリングとシグナル検出を同時に実施できる装置によって閉管形式で実施した。細胞株から抽出したゲノムDNA、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）細胞株および臨床FFPE腫瘍試料を検定した。野生型または様々なBRAF変異を担持する細胞株から抽出したゲノムDNAを用いてアッセイの特異性を評価した。感度は、野生型BRAF細胞とV600E変異BRAF細胞の定義された比率の混合物を用いて評価した。

【0118】

【表1】

表1:V600Eの反応

オゴスクリオチド	配列および標識(DNAについては5'→3'およびPNAについてはN→C)	濃度**
BRAF V600E 正 ^フ ライマー1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACCGAG [配列番号:8]	0.2 μM
BRAF V600E 正 ^フ ライマー2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACCGAA [配列番号:9]	0.2 μM
BRAF 逆 ^フ ライマー	TAATCAGTGGAAAAATAGCCTCAATT [配列番号:10]	0.2 μM
BRAF 検出可能 オゴスクリオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]	0.2 μM
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG[配列番号:12]	1 μM
BRAF V600K PNA	GCTACAAAGAAATCTCG[配列番号:13]	1 μM
内部対照 エツン13 正 ^フ ライマー	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]	0.2 μM
内部対照 エツン13 逆 ^フ ライマー	ACAAGACATTTAACGAATGGAACCTACTC [配列番号:15]	0.2 μM
内部対照エツン13 検出可能 オゴスクリオチド	クエーサーGFAFGAFAGAFLGFAFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]	0.2 μM
PCR オゴスクリオチド緩衝液		0.632X
dNTPs		0.4mM
ROX		0.0147 μM
TaqGold		11 単位
MgCl ₂		4mM

*F=5-フロビニルdC, L=5-フロビニルdU

**標的25 μlおよびPCR試薬25 μlから成る反応物50 μl中の濃度

【0119】

10

20

30

【表2】

表2:V600Kの反応

オリゴヌクレオチド	配列および標識(DNAについては5' → 3' およびPNAについてはN→C)	濃度**
BRAF V600K 正 ^{プロ} ライマー1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTAAG [配列番号:17]	0.2 μM
BRAF V600K 正 ^{プロ} ライマー2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTAAA [配列番号:18]	0.2 μM
BRAF 逆 ^{プロ} ライマー	TAATCAGTGGAAAAATAGCCTCAATT [配列番号:10]	0.2 μM
BRAF 検出可能 オリゴヌクレオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]	0.2 μM
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG [配列番号:12]	1 μM
BRAF V600E PNA	GCTACAGAGAAATCTCG [配列番号:19]	1 μM
内部対照 エクリン13 正 ^{プロ} ライマー	GTATCACCCTCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]	0.2 μM
内部対照 エクリン13 逆 ^{プロ} ライマー	ACAAGACATTAAACGAATGGAACTTACTC [配列番号:15]	0.2 μM
内部対照エクリン13 検出可能 オリゴヌクレオチド	クエ-サー-GFAFGAFAGAFLGFAFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]	0.2 μM
PCR オリゴ ^{ヌクレオチド} 緩衝液		0.632X
dNTPs		0.4mM
ROX		0.0147 μM
TaqGold		11 単位
MgCl ₂		4mM

*F=5-プロポリニル dC、L=5-プロポリニル dU

**標的 25 μl および PCR 試薬 25 μl の反応物中の濃度

【0120】

【表3】

表3:V600Dの反応

オリゴヌクレオチド	配列および標識(DNAについては5' → 3' およびPNAについてはN→C)	濃度**
BRAF V600D 正 ^{プロ} ライマー1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTGAT [配列番号:20]	0.2 μM
BRAF V600D 正 ^{プロ} ライマー2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTGAC [配列番号:21]	0.2 μM
BRAF 逆 ^{プロ} ライマー	TAATCAGTGGAAAAATAGCCTCAATT [配列番号:10]	0.2 μM
BRAF 検出可能 オリゴヌクレオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]	0.2 μM
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG[配列番号:12]	1 μM
内部対照 エクソン13 正 ^{プロ} ライマー	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]	0.2 μM
内部対照 エクソン13 逆 ^{プロ} ライマー	ACAAGACATTAAACGAATGGAACCTTACTC [配列番号:15]	0.2 μM
内部対照 エクソン13 検出可能 オリゴヌクレオチド	クエーサー-GFAFGAFAGAFLGFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]	0.2 μM
PCR オリゴ緩衝液		0.632X
dNTPs		0.4mM
ROX		0.0147 μM
TaqGold		11 単位
MgCl ₂		4mM

*F=5-プロモビニル dC, L=5-プロモビニル dU

**標的 25 μl および PCR 試薬 25 μl の反応物中の濃度

【0121】

PCRサイクリングは、92度で10分間の1サイクル(TaqGoldの活性化)ならびに88度/5秒間、92度/15秒間、67度/5秒間および63度/35秒間の55サイクル(サイクル数は変更できる。)(DNA增幅および蛍光の読み取り)を含んだ。または、PCRサイクリングは、92度で10分間の1サイクル(TaqGoldの活性化)ならびに92度で15秒間および65度で35秒間の55サイクル(DNA增幅および蛍光の読み取り)を含み得る。

【0122】

V600EアッセイおよびV600Kアッセイを用いたゲノムDNA 10ngに関する線形性試験は、良好な線形関係を明らかにした。V600Eアッセイを用いた、FFPE細胞株から抽出したゲノムDNA 2.5ngに関する線形性試験も、良好な線形関係を示した。

【0123】

他の変異も同じようにして検出することができる。対立遺伝子特異的プライマーを、V600E/K/D SNPに関して前述したのと同じようにして他の変異について設計することができる。

【0124】

[実施例2]

この実施例は、BRAF遺伝子のエクソン15におけるV600の複数のSNPの検出のためのプールされた反応を述べる。

【0125】

BRAF V600E、V600KおよびV600D変異の2以上も、プールされた反応において検出することができる。

10

20

30

40

50

【0126】

【表4】

表4:V600E/K/Dのプールされた反応

オリゴヌクレオチド	配列および標識(DNAについては5'→3'およびPNAについてはN→C)	濃度**
BRAF V600E 正 ^{プロ} ライマー 1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACCGAG [配列番号:8]	0.2 μM
BRAF V600E 正 ^{プロ} ライマー 2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACCGAA [配列番号:9]	0.2 μM
BRAF V600K 正 ^{プロ} ライマー 1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTAAG [配列番号:17]	0.2 μM
BRAF V600K 正 ^{プロ} ライマー 2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTAAA [配列番号:18]	0.2 μM
BRAF V600D 正 ^{プロ} ライマー 1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTGAT [配列番号:20]	0.2 μM
BRAF V600D 正 ^{プロ} ライマー 2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTGAC [配列番号:21]	0.2 μM
BRAF 逆 ^{プロ} ライマー	TAATCAGTGAAAAATGCCTCAATT [配列番号:10]	0.2 μM
BRAF 検出可能 オリゴヌクレオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]	0.2 μM
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG [配列番号:12]	0.2 μM
内部対照 エクリン13 正 ^{プロ} ライマー	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]	0.2 μM
内部対照 エクリン13 逆 ^{プロ} ライマー	ACAAGACATTAAACGAATGGAACTTACTC [配列番号:15]	0.2 μM
内部対照 エクリン13 検出可能 オリゴヌクレオチド	クエーラー-GFAFGAFAGAFLGFAFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]	0.2 μM
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG [配列番号:12]	1 μM
PCR オリゴ緩衝液		0.632X
dNTPs		0.4mM
ROX		0.0147 μM
TaqGold		11 単位
MgCl ₂		4mM

*F=5-プロピニル dC、L=5-プロピニル dU

**標的 25 μl および PCR 試薬 25 μl の反応物中の濃度

【0127】

PCR サイクリングは、92℃で10分間の1サイクル(TaqGold の活性化)ならびに88℃/5秒間、92℃/15秒間、67℃/5秒間および63℃/35秒間の55サイクル(アッセイの性能に影響を及ぼさずにサイクル数を変更することができる。)(DNA增幅および蛍光の読み取り)を含んだ。または、PCR サイクリングは、92℃で10分間の1サイクル(TaqGold の活性化)ならびに92℃で15秒間および65℃で35秒間の55サイクル(DNA增幅および蛍光の読み取り)を含み得る。

【0128】

他の変異も同じようにして検出することができる。対立遺伝子特異的プライマーを、V600E/K/D SNPに関して前述したのと同じようにして他の変異について設計することができる。これに関して、プールされた反応は、1以上の他の変異と組み合わせてV600E、V600Kおよび/またはV600Dの1以上を検出することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 9 】

[実施例 3]

この実施例は、本発明の方法における使用のための選択的正プライマーおよび検出可能オリゴヌクレオチドを述べる。

【 0 1 3 0 】

【表5】

表5:選択的プライマーおよび検出可能オーバークレオチド

オーバーカレオチド	配列および標識 (5' → 3' および PNA については N→C)	BRAF の V600 で 検出された変異
BRAF 正プライマー FPd MU2	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACAAA [配列番号:22]	E,K,D,R,N
BRAF 正プライマー Fpd MU3	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACCGA [配列番号:23]	E,D
BRAF 正プライマー FPd MU4	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACCGA [配列番号:24]	E,D
BRAF 正プライマー MU-f1a	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACTGAG [配列番号:25]	E
BRAF 正プライマー MU-f1c	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACGGAG [配列番号:26]	E
BRAF 正プライマー MU-f2a	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACTGAA [配列番号:27]	E
BRAF 正プライマー MU-f2c	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACGGAA [配列番号:28]	E
BRAF 正プライマー MU-f3b	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACCAAG [配列番号:29]	K
BRAF 正プライマー MU-f3c	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACGAAG [配列番号:30]	K
BRAF 正プライマー MU-f4b	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACCAA [配列番号:31]	K
BRAF 正プライマー MU-f4c	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACGAAA [配列番号:32]	K
BRAF 正プライマー FPd MU9	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACAAAC [配列番号:33]	K,N
BRAF 正プライマー FPd MU10	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACAAAT [配列番号:34]	K,D,N
BRAF 正プライマー FPd MU11	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACAAAC [配列番号:35]	K,R,N
BRAF 正プライマー FPd MU12	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACGAA [配列番号:36]	K,N
BRAF 正プライマー FPd MU13	AATAGGTGATTTGGCTAGCTACCAA [配列番号:37]	K,N
内部対照 エクソン 17 正プライマー	GATCTCAGTAAGGTACGGAGTAAGTGT [配列番号:38]	
内部対照 エクソン 17 逆プライマー	TAGTCTGTTCTTTGGATAGCATGAAGCT [配列番号:39]	
内部対照 エクソン 17 検出可能 オーバーカレオチド	クエーラー-GALGAGAGAFFAFLFLFF-BHQ2-dT* [配列番号:40]	
内部対照 エクソン 14 正プライマー	CTAAATAAGCTTTACACCCCCAAGTATGTT [配列番号:41]	
内部対照 エクソン 14 逆プライマー	CTGTGGATGATTGACTTGGCGTGTAA [配列番号:42]	
内部対照 エクソン 14 検出可能オーバーカレオチド	クエーラー-AGALLLFGAGGFFAGAGLFF-BHQ2-dT* [配列番号:43]	

*F=5-アミドビニル dC、L=5-アミドビニル dU

【0131】

[実施例4]

この実施例は、mRNA中のBRAF遺伝子のエクソン15におけるV600の個々のSNPの検出のための反応を述べる。

10

20

30

40

50

【0132】

ヒト F F P E 腫瘍組織からの全核酸または R N A を、逆転写 / P C R 増幅反応のための
鑄型として使用する。全核酸は、 R N A ゼアゼ処理を行わずに Q I A m p F F P E D N
A 組織キット (Q i a g e n) などの精製キットを用いて F F P E 試料から単離し、精製
する。 R N A は、時として D N A ゼアゼ処理と共に、 R N e a s y キット (Q i a g e n)
などの R N A 精製キットを用いて F F P E 試料から単離し、精製することができる。 R N
A 検出のために、 B R A F 遺伝子のエクソン 1 5 内の配列にアニーリングする逆プライマー
- (B R A F - R 3) から逆転写を開始させる。この B R A F 配列エレメントは、転写産
物を含むすべての B R A F エクソン 1 5 に共通である；このため、単一の逆プライマーが
R N A からのすべての標的変異体の逆転写を促進することができる。生じた c D N A の P
C R 増幅は、 S N P 部位の B R A F V 6 0 0 E 、 V 6 0 0 K または V 6 0 0 D 配列に特
異的にアニーリングする複数の正プライマーと組み合わせて上記逆プライマーによって指
令される。同じプライマーを、標的変異体を含むゲノム D N A を増幅するためにも使用で
きる。
10

【0133】

全核酸または R N A から V 6 0 0 E 、 V 6 0 0 K または V 6 0 0 D を検出するプライマー / 検出可能オリゴヌクレオチドセットに加えて、内部対照として B R A F のエクソン 1
3 内の配列を検出するようにプライマー / 検出可能オリゴヌクレオチドセットを設計する。
B R A F エクソン 1 3 の増幅レベルを用いて、試料の適切性、試料の抽出工程、全 B R
A F R N A 発現レベルおよび増幅効率の変動に対して B R A F 変異体検出工程を基準化
する。 R N A とゲノム D N A の両方を増幅するため、 B R A F 内部対照プライマー 2 をエ
クソン 1 3 内に設計する。
20

【0134】

R N A および / または全核酸からの検出のための反応形式およびサイクリング条件は、
サイクリング条件が通常の熱サイクリングプログラムの前に逆転写段階を含み、および異
なる酵素を含んでもよいことを除き、 D N A S N P アッセイにおける V 6 0 0 E 、 V 6
0 0 K または V 6 0 0 D 反応のものと同じまたは類似であり得る（例えば実施例 1 参照）
。 P C R 反応は、表 6 、 7 および 8 に示すオリゴヌクレオチドを含んで構成される。

【0135】

B R A F V 6 0 0 変異および内部対照に関して、ゲノム D N A ではなく R N A だけを
検出することが時として望ましい。これを達成するため、 R N A 特異的試料調製物に加えて、逆プライマーを、隣接するエクソン、即ち V 6 0 0 変異についてはエクソン 1 6 およ
び内部対照についてはエクソン 1 4 に位置するように、例えばエクソン内にまたはエクソ
ン - エクソン接合部にまたがって位置するように設計することができる。エクソン 1 5 と
1 6 の間およびエクソン 1 3 と 1 4 の間の長いイントロン配列のために、このような P C
R オリゴ設計は、 B R A F V 6 0 0 変異および内部対照の両方に関して、 R N A (イン
トロンなし) だけを増幅することができ、ゲノム D N A (イントロンを含む。) は増幅し
ない。
30

【0136】

【表6】

表6:V600Eの反応

オリゴヌクレオチド	配列および標識(DNAについては5'→3'およびPNAについてはN→C)
BRAF V600E 正 ^{プロ} ライマー1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACCGAG [配列番号:8]
BRAF V600E 正 ^{プロ} ライマー2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACCGAA [配列番号:9]
BRAF 逆 ^{プロ} ライマー2	CACAAAATGGATCCAGACAACGTGTC [配列番号:44]
BRAF 検出可能 オリゴヌクレオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG [配列番号:12]
BRAF V600K PNA	GCTACAAAGAAATCTCG [配列番号:13]
内部対照正 ^{プロ} ライマー	GTATCACCCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]
内部対照逆 ^{プロ} ライマー	TCCATGCCCTGTGCAGTCTGTCGTG [配列番号:45]
内部対照検出可能 オリゴヌクレオチド	クエーサー-GFAFGAFAGAFLGFAFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]

*F=5-プロピニル dC、L=5-プロピニル dU

【0137】

10

【表7】

20

表7:V600Kの反応

オリゴヌクレオチド	配列および標識(DNAについては5'→3'およびPNAについてはN→C)
BRAF V600K 正 ^{プロ} ライマー1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTAAG [配列番号:17]
BRAF V600K 正 ^{プロ} ライマー2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTAAA [配列番号:18]
BRAF 逆 ^{プロ} ライマー2	CACAAAATGGATCCAGACAACGTGTC [配列番号:44]
BRAF 検出可能 オリゴヌクレオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG [配列番号:12]
BRAF V600E PNA	GCTACAGAGAAATCTCG [配列番号:19]
内部対照正 ^{プロ} ライマー	GTATCACCCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]
内部対照逆 ^{プロ} ライマー2	TCCATGCCCTGTGCAGTCTGTCGTG [配列番号:45]
内部対照検出可能 オリゴヌクレオチド	クエーサー-GFAFGAFAGAFLGFAFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]

*F=5-プロピニル dC、L=5-プロピニル dU

30

【0138】

40

【表8】

表8:V600Dの反応

オリゴヌクレオチド	配列および標識(DNAについては5'→3'およびPNAについてはN→C)
BRAF V600D 正 ^{プロ} ライマー1	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTGAT [配列番号:20]
BRAF V600D 正 ^{プロ} ライマー2	AATAGGTGATTTGGTCTAGCTACTGAC [配列番号:21]
BRAF 逆 ^{プロ} ライマー2	CACAAAATGGATCCAGACAACTGTTC [配列番号:44]
BRAF 検出可能 オリゴヌクレオチド	FAM-LGGAGLGGGLFFFALFAGLL-BHQ1-dT* [配列番号:11]
BRAF 野生型 PNA	GCTACAGTGAAATCTCG [配列番号:12]
内部対照正 ^{プロ} ライマー	GTATCACCATCTCCATATCATTGAGACC [配列番号:14]
内部対照逆 プロライマー2	TCCATGCCCTGTGCAGTCTGTCGTG [配列番号:45]
内部対照検出可能 オリゴヌクレオチド	クエ-サ- <u>G</u> FAFGAFAGAFLGFAFAGG-BHQ2-dT* [配列番号:16]

【0139】

[実施例5]

この実験で使用した配列は上記および図1に示されている。図8は実験からのデータを示し、これらの実験では、野生型BRAF、V600E変異を有するBRAFおよびV600K変異を有するBRAFを区別するようにプライマー(図1のプライマー)を作製した。最初の列に(列は左側から右側へ進む；縦行は上から下へ進む。)、標的配列についての野生型または変異体の名称を示す。標的配列の名称の下は、標的配列の3'末端のヌクレオチド配列である。配列に下線を付し、変異体ヌクレオチドを赤色で示す。配列の下は、示されている配列によってコードされるアミノ酸である。

【0140】

例えば、1番目の列の1番目のブロックにおいて、標的配列は「W T 1 7 9 9 a」と命名され、ヌクレオチド配列は「G T G」であり、この配列はバリン「V a l (V)」をコードする。

【0141】

図の1番目の縦行は、1) プライマーの名称およびプライマーの3'末端によってコードされる配列、2) 標的配列と比較したミスマッチの数、3) 対象配列の3'末端からのミスマッチの位置、および4) dCt(標的の濃度)で表したPCR結果を示す。

【0142】

従って、縦行2、列2に位置する箱は、BRAF-T1799aについてのプライマー(MUf1b)が2つのミスマッチを有し、これらのミスマッチが2番目と4番目のヌクレオチド上に位置し、およびdCt結果が、意図する標的T1799aについて同じプライマーを使用した結果と比較した場合、9.35であったことを示すと解釈できる。意図する標的についてプライマーを使用した場合のdCt値を恣意的にゼロと設定し、従ってすべての結果はこの値に対するものである。

【0143】

列2、縦行2と3の箱を比較した場合、2番目のミスマッチをプライマーに組み込むと、プライマーは、1つのミスマッチヌクレオチドしか存在しない、意図する標的である変異BRAFの検出ほど効率的には野生型標的を検出しないことがわかる。

【0144】

遺伝暗号は冗長性であり、1つのアミノ酸が2以上のヌクレオチド三量体によってコードされることを許容する。これに関して、特定のアミノ酸の変化が2以上の異なるヌクレオチド変異によってコードされ得る。図6は、同じアミノ酸変化(例えばV600E)を

10

20

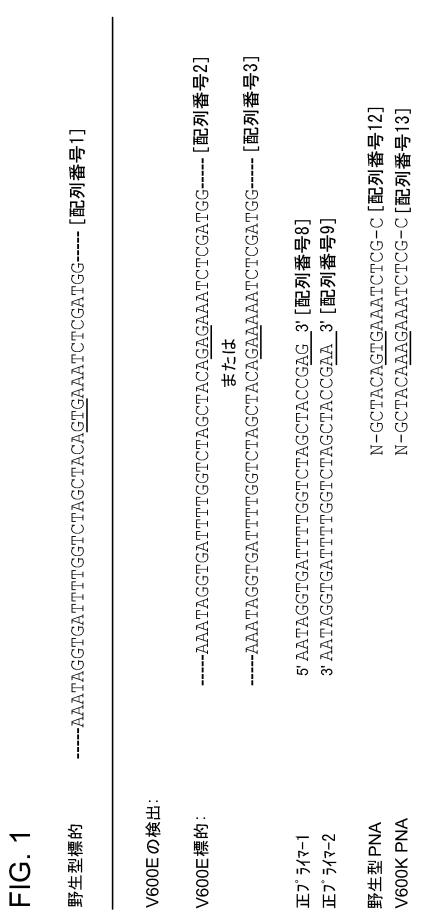
30

40

50

生じさせるヌクレオチド変異を検出するように設計されたプライマーは、1つのヌクレオチドミスマッチを有するプライマーと比較して、プライマーが特定の標的配列に関して2以上の変異を有する場合、これらの変異を効率的に検出しないことを示す。このため、このデータは、S N P の改善された検出に関して本明細書で述べる発明概念が、特定の配列または意図する標的に限定されず、むしろ、S N P の改善された検出に幅広く適用できる概念であることを示す。

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】

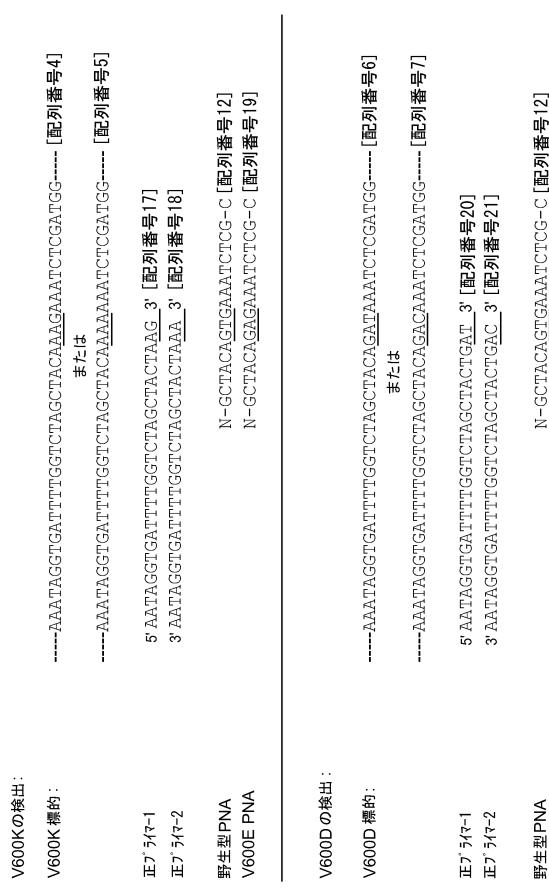


FIG. 1 続き

【図 2-1】

【図 2-2】

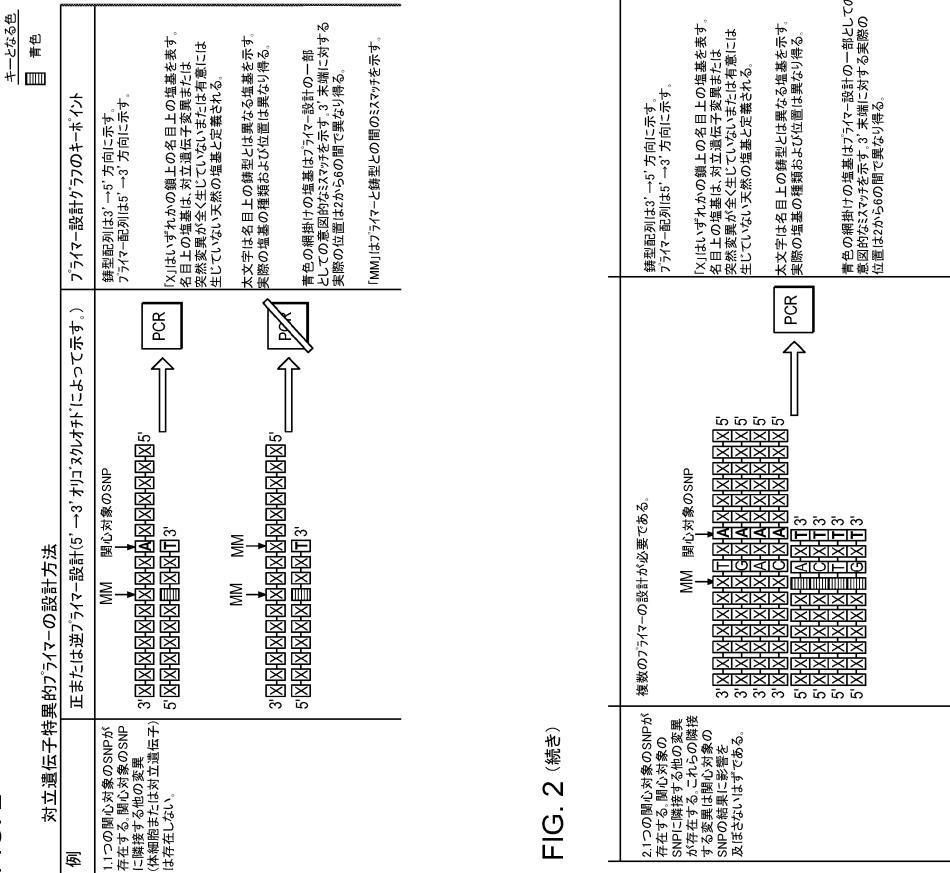


FIG. 2

【図 2-3】

【図 2-4】

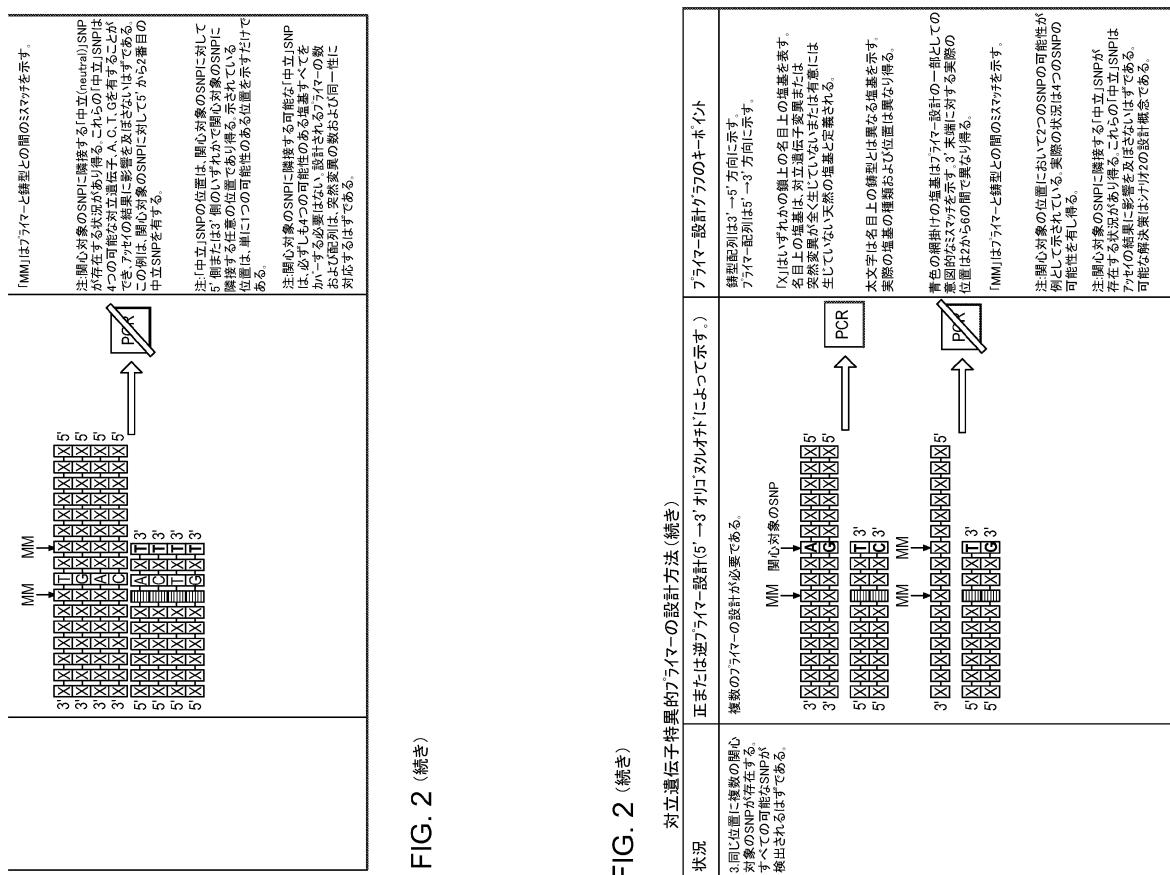


FIG. 2 (続き)

FIG. 2 (続き)

【図2-5】

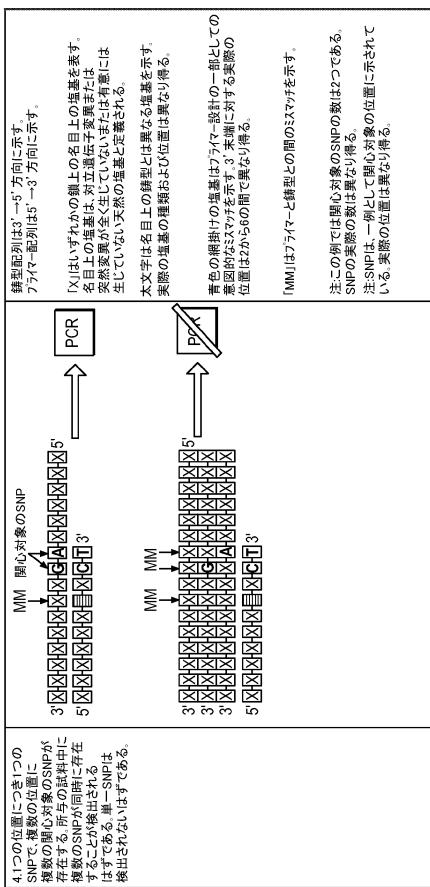


FIG. 2 (続き)

【 図 3 】

モデル標的としてBRAF V600Eを用いたアミノ酸特異的設計原理の概略図

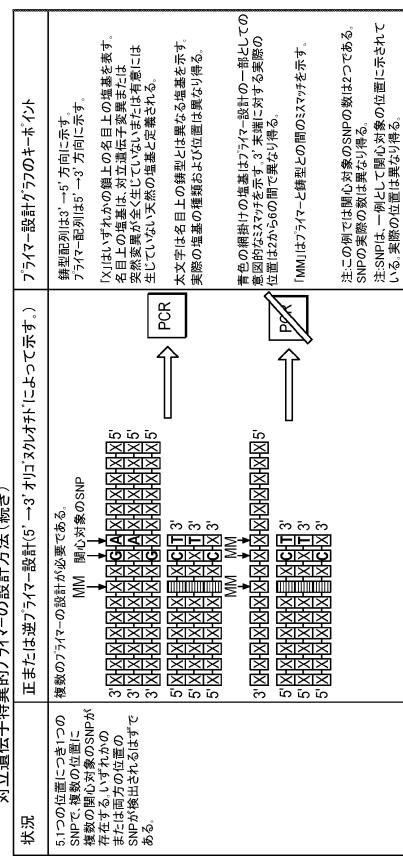


プライマー: 5' ..n**GAG** 3'
 5' ..n**GAA** 3'

注:nは、標的とする領域内の塩基以外の任意の塩基であり得る。

FIG. 3

【 図 2 - 6 】



【图4】

		灰色											
		特異的非特異的標的との間のミスマッチの数および位置						CBRAF-V600Eについてのアミノ酸特異的設計プライマー					
反応	配列	野生型			V600E			V600K			V600D		
		AAGT	-AGG-	-AGA-	AAAG	-AAA-	-AAT-	AGAT	-AGAC-	-AGG-	-AGAG-	-AGCT-	-AGCA-
1	V600E-1	-CGAG	2	1	2	2	3	2	2	3	4	4	4
	V600E-2	-CGAA	3	2	1	3	2	3	2	4	3	4	3
	フライマー-1	V600K	-TAG	3	2	3	1	2	3	3	2	3	4
	フライマー-2	V600R	-TAA	4	3	2	2	1	1	3	3	2	4
2	フライマー-1	V600K	-TAA	4	3	2	2	1	1	3	3	2	4
	フライマー-2	V600R	-TAA	4	3	2	2	1	1	3	3	2	4

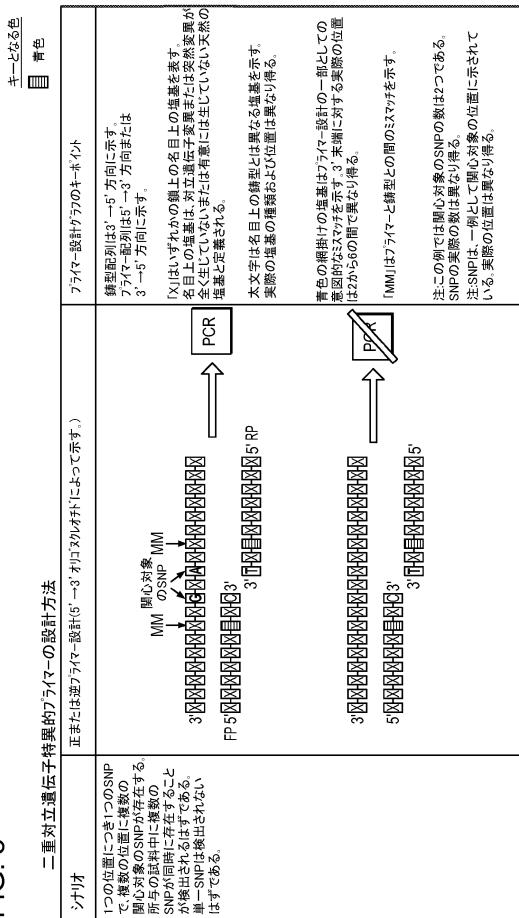
Fig 4

注:括弧の外側の数字はプライマーと標的との間の塩基ミスマッチの総数を示す。
括弧内の数字は、3'末端からの塩基数として表したミスマッチの位置を示す。
灰色で強調されているものは、PCR増幅産物を生成するフライ3'-標的の組合せ

PCR増幅産物を生成する^{7,13}。標的の組合せを示す。

ここに示されている例マージンの実質は、例の通り、実際の話題によって異なり得る。
2以上の例マージンを含む任意の設計においては、シルカラーレジスト形式については、
シルカラーレジストのための組合せを与えるように、アザを設けることができる。
シルカラーレジスト形式においては、SMT特異の組合せを用いる場合、検出のための組合せ結果を与えるように、アザを設けることができる。
アザは検出のための組合せ結果を与えるために、アザを設けることができる。
アザは検出のための組合せ結果を与えるために、アザを設けることができる。

【図5】



【図 6 B】

FIG. 5

IG. 6B

【図 6 A】

FIG. 6A

野生型標的
6/600E標的：
BRAF Fpd MU-1
BRAF Fpd MU-2

注：野牛型BRAF配列は太字で較大であり、ミスマッチ配列は斜体で普通字で表示する。

〔図 7 A 〕

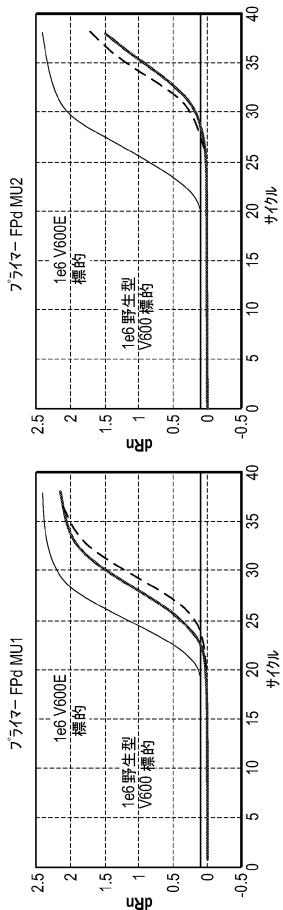
FIG. 7A

BRAF V600E検出のための2つの異なるフライマー設計の比較:0

75%~	野生型裸的	V600E裸的	C _差 *
BRAF FPd MU1	19.31	16.25	3.06
BRAF FPd MU2	26.06	17.05	9.01

【図 7 B】

FIG. 7B BRAF V600E検出のための2つの異なるプライマー設計の比較PCR曲線



【図 8】

FIG. 8	dCT @62°C	WT1799a		T1799a		V600Ea		V600Ka1		V600Ka2		V600Ra		V60115		V600Na	
		GTG Val(V)	GAG Glu(E)	GAG Glu(E)	GAA Glu(E)	AAG Lys(K)	AAA Lys(K)	AGG Arg(R)	GAT Asp(D)	AGG Arg(R)	GAT Asp(D)	AGG Arg(R)	GAT Asp(D)	AGG Arg(R)	GAT Asp(D)	AGG Arg(R)	GAT Asp(D)
MUf1b, ACC GAG ミスマッチの数 位置(3'からの) dCT	2 4.2 9.35	1 4 0	2 4 9.26	2 4.1 7.67	3 4.3 14.88	3 4.3 14.88	3 4.3 8.02	3 4.3 11.29	2 4.1 11.29	2 4.1 11.29	2 4.1 11.29	2 4.1 11.29	2 4.1 11.29	2 4.1 11.29	3 4.3 17.06	3 4.3 17.06	
MUf2b, ACC GAA ミスマッチの数 位置(3'からの) dCT	3 4.21 11.76	2 4.1 7.61	3 4 0	1 4 7.26	1 4.1 6.5	1 4.1 6.5	1 4.1 10.1	1 4.1 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	2 4.2 10.1	
MUf3c, ACG AGG ミスマッチの数 位置(3'からの) dCT	3 4.32 12.67	2 4.3 3.66	3 4.3 8.71	1 4 0	1 4 8.14	1 4 8.14	1 4 1.4	1 4 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	2 4.2 1.4	
MUf4a, ACT AAA dCT	4 4.32.1 13.18	3 4.3.1 13.21	2 4.3 6.93	2 4.1 3.7	1 4 0	1 4 0	1 4 9.47	1 4 9.47	3 4.3.1 16.60	3 4.3.1 16.60	3 4.3.1 16.60	3 4.3.1 16.60	3 4.3.1 16.60	3 4.3.1 16.60	2 4.1 7.08	2 4.1 7.08	

フロントページの続き

(72)発明者 スウ , ホン

アメリカ合衆国、イリノイ・60203、エバンストン、ドライク・アベニュー・9310

(72)発明者 エリクソン , ブライアン・ジェイ

アメリカ合衆国、ウィスコンシン・53142、ケノーシャ、ワンハンドレッドフィフティセカンド・アベニュー・6713

審査官 上條 肇

(56)参考文献 國際公開第2011/019704 (WO , A2)

特開2004-121087 (JP , A)

特表2010-528585 (JP , A)

臨床DNA診断法 , 金原出版株式会社 , 1995年 7月 1日 , 第1版 , 第175~177頁

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/68 - 1/6897

C12N 15/00 - 15/90

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

UniProt / GeneSeq

Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI-IDS (STN)