

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-531203

(P2014-531203A)

(43) 公表日 平成26年11月27日(2014.11.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	
<b>G O 1 N 33/543 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	
	G O 1 N 33/543 5 O 1 P	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 123 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2014-528802 (P2014-528802)	(71) 出願人	513119015 スピーデクス ピーティーワイ リミテッド
(86) (22) 出願日	平成24年9月10日 (2012.9.10)		オーストラリア連邦 ニューサウスウェールズ州 エベリー コーンウォリス ストリート 4 オーストラリアン テクノロジー パーク ナショナル イノベーション センター スイート ジー16
(85) 翻訳文提出日	平成26年3月27日 (2014.3.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/AU2012/001081	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02013/033792	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成25年3月14日 (2013.3.14)	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(31) 優先権主張番号	2011903686		
(32) 優先日	平成23年9月9日 (2011.9.9)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸酵素基質

(57) 【要約】

本発明は、触媒核酸酵素に対する核酸基質と、この基質の利用方法と、に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ポリヌクレオチド基質が、配列  $N_1 - N_2 - N_3 - N_4 - N_5 - N_6 - N_7 - N_8 - rR - rY - N_9 - N_{10} - N_{11} - N_{12} - N_{13} - N_{14} - N_{15}$

(式中、

$rR$  は、プリンリボヌクレオチドであり、

$rY$  は、ピリミジンリボヌクレオチドであり、

$N_1 \sim N_{15}$  のそれぞれは、ヌクレオチドであり、

$N_5 \sim N_{13}$  のうち 6 個以上は、シトシンヌクレオチドであり、かつ

$N_9 \sim N_{15}$  のうち 3 個未満は、グアニンヌクレオチドがある)

を含む、触媒核酸酵素に対する単離されたポリヌクレオチド基質。

10

## 【請求項 2】

前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号 25 ~ 27、29 ~ 30、33、72 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 3】

$N_5 \sim N_{13}$  のうち 7 個以上または 8 個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項 1 または請求項 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 4】

$N_5 \sim N_{13}$  のうち 7 個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号 29、73、76 ~ 80、82 ~ 83、85 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

20

## 【請求項 5】

$N_5 \sim N_{13}$  のうち 8 個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号 76、77、80、83、または 87 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 6】

$N_4 \sim N_{13}$  のうち 7 個以上または 8 個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項 1 または請求項 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

30

## 【請求項 7】

$N_4 \sim N_{13}$  のうち 7 個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号 27、29、73、76 ~ 83、85 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 8】

$N_4 \sim N_{13}$  のうち 8 個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号 76、77、79 ~ 80、82 ~ 83、87、88、または 90 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 6 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

40

## 【請求項 9】

$N_4 \sim N_{12}$  のうち 6 個以上、7 個以上、または 8 個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項 1 または請求項 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 10】

$N_4 \sim N_{12}$  のうち 7 個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号 27、29、73、76、77、79 ~ 83、85 ~ 88、90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 9 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 11】

50

$N_4 \sim N_{12}$ のうち8個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号76、77、80、83、87、または88のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項9に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項12】

$N_5 \sim N_{12}$ のうち6個以上、7個以上、または8個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1または請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項13】

$N_5 \sim N_{12}$ のうち7個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号29、73、76、77、80、83、85～88、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項12に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

10

【請求項14】

$N_5 \sim N_{12}$ のうち8個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号76、77、80、83、または87のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項12に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項15】

$N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_8$ 、および/または $N_9$ のいずれか1つ以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1～14のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

20

【請求項16】

$N_8$ および $N_9$ が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25～26、29～30、72～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項15に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項17】

$N_9 \sim N_{15}$ のうち2個、1個、または0個が、グアニンヌクレオチドである、請求項1～16のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項18】

$N_9 \sim N_{15}$ のうち1または0個が、グアニンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25～27、29～30、33、72～80、82～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項17に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

30

【請求項19】

$N_9 \sim N_{15}$ のうち0個が、グアニンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25、26、30、72、75、77～80、84～85、または89のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項17に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項20】

$N_1 \sim N_{15}$ のうち10個超、11個超、12個超、または13個超がピリミジンヌクレオチドである、請求項1～19のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

40

【請求項21】

$N_1 \sim N_{15}$ のうち11個、12個、または12個超が、ピリミジンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか1つの配列番号25～27、29、33、73～90、または173～175により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項20に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項22】

$N_1 \sim N_{15}$ のうち13個または14個が、ピリミジンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか1つの配列番号75、77～80、82～85、また

50

は 88 ~ 89 により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 20 または請求項 21 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項 23】

$N_1 \sim N_{14}$  のうち 8 個超、9 個超、10 個超または 11 個がシトシンヌクレオチドである、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項 24】

$N_1 \sim N_{14}$  のうち 10 個または 11 個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか 1 つの配列番号 33、76 ~ 80、82 ~ 83、85、87、88、または 89 により定義された配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 23 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

10

【請求項 25】

$N_1 \sim N_{14}$  のうち 11 個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか 1 つの配列番号 77 ~ 79 により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項 23 または請求項 24 に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項 26】

前記ポリヌクレオチド基質を検出するための検出可能標識をさらに含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項 27】

検出可能部分とクエンチャー部分とをさらに含み、前記検出可能部分により提供される検出可能作用が、前記触媒核酸酵素による前記ポリヌクレオチド基質の修飾により増大または低減される、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

20

【請求項 28】

前記プリンリボヌクレオチドがグアニンを含む、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項 29】

前記ピリミジンリボヌクレオチドがウラシルを含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項 30】

前記触媒核酸酵素に結合する前記基質の部分が、50 ~ 90、50 ~ 65、50 ~ 60、52 ~ 58、66 ~ 76、68 ~ 76、64 ~ 70、70 ~ 76、70 ~ 75、72 ~ 76、52、58、64、66、68、70、72、または 76 の融解温度 ( $T_m$ ) を有する、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

30

【請求項 31】

前記触媒核酸酵素が、

(a) 多成分核酸酵素 (MNA ザイム)、ここで、前記部分は、前記 MNA ザイムの少なくとも 1 つの基質アームに結合する、または

(b) DNA ザイム

である、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

40

【請求項 32】

(a) 2 つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムを提供することと、ただし、少なくとも第 1 のオリゴヌクレオチドパートザイムおよび第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムは、前記標的の存在下で自己集合して少なくとも第 1 の触媒活性多成分核酸酵素 (MNA ザイム) を形成する、

(b) 請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質を提供することと、前記ポリヌクレオチド基質は、前記第 1 の MNA ザイムによる修飾が可能であり、前記 MNA ザイムによる前記ポリヌクレオチド基質の修飾は、検出可能作用を提供する、

50

(c) (1) 前記少なくとも第1のMNAザイムの自己集合と、  
 (2) 前記少なくとも第1のMNAザイムの触媒活性と、  
 を可能にする条件下で、前記2つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムと前記標的を推  
 定上含有するサンプルとを接触させることと、  
 (d) 前記検出可能作用を検出することと、  
 を含む、少なくとも1つの標的の存在を検出する方法。

【請求項33】

前記標的が核酸である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記核酸が、DNA、メチル化DNA、アルキル化DNA、RNA、メチル化RNA、  
 マイクロRNA、siRNA、shRNA、tRNA、mRNA、snRNA、stR  
 NA、smRNA、プレもしくはプリマイクロRNA、他の非コードRNA、リボソーム  
 RNA、それらの誘導體、アンプリコン、またはそれらの任意の組合せからなる群から選  
 択される、請求項33に記載の方法。

10

【請求項35】

前記核酸が増幅される、請求項33または請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、ループ媒介等  
 温増幅(LAMP)、ローリングサークル増幅(RCA)、転写媒介増幅(TMA)、自  
 己保持配列複製(3SR)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、または逆転写ポリメ  
 ラーゼ連鎖反応(RT-PCR)の1つ以上を含む、請求項35に記載の方法。

20

【請求項37】

前記第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムが、  
 配列番号9および配列番号10、配列番号11および配列番号12、配列番号13およ  
 び配列番号14、配列番号16および配列番号14、配列番号17および配列番号18、  
 配列番号40および配列番号41、配列番号42および配列番号43、配列番号44およ  
 び配列番号45、配列番号46および配列番号45、配列番号47および配列番号63、  
 配列番号48および配列番号49、配列番号50および配列番号51、配列番号52およ  
 び配列番号51、配列番号38および配列番号55、配列番号56および配列番号57、  
 配列番号58および配列番号59、配列番号60および配列番号61、配列番号62およ  
 び配列番号63、配列番号64および配列番号65、配列番号66および配列番号67、  
 配列番号62および配列番号68、配列番号69および配列番号70、配列番号46およ  
 び配列番号55、配列番号46および配列番号59、配列番号38および配列番号45、  
 配列番号58および配列番号45、配列番号62および配列番号45、配列番号46およ  
 び配列番号63、配列番号71および配列番号68、配列番号98および配列番号99、  
 配列番号100および配列番号103、配列番号104および配列番号105、配列番号  
 106および配列番号107、配列番号108および配列番号109、配列番号110お  
 よび配列番号111、配列番号112および配列番号113、配列番号116および配列  
 番号117、配列番号118および配列番号119、配列番号120および配列番号12  
 1、配列番号122および配列番号119、配列番号155および配列番号156、配列  
 番号157および配列番号158、配列番号159および配列番号160、配列番号16  
 8および配列番号169、配列番号170および配列番号176、配列番号179およ  
 び配列番号180、配列番号181および配列番号182、配列番号183および配列番号  
 184、または配列番号185および配列番号186  
 により定義されるそれぞれの配列を含む、請求項32～36のいずれか一項に記載の方法  
 。

30

40

【請求項38】

前記ポリヌクレオチド基質が、50 ~ 90、50 ~ 65、50 ~ 60、5  
 2 ~ 58、66 ~ 76、68 ~ 76、64 ~ 70、70 ~ 76、7  
 0 ~ 75、72 ~ 76、52、58、64、66、68、70、7

50

2、または76の温度で前記MNAザイムの基質アームにハイブリダイズする、請求項32～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

前記方法が、

異なる標的の存在下で自己集合して第2の触媒活性MNAザイムを形成可能な2つ以上の追加のオリゴヌクレオチドパートザイムと、

少なくとも1つの追加のポリヌクレオチド基質と、

を提供することをさらに含み、

前記追加のポリヌクレオチド基質が、前記異なる標的の存在下で前記第2のMNAザイムによる修飾が可能である、

請求項32～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

前記追加のポリヌクレオチド基質が前記第1のMNAザイムによる修飾が可能でない、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

パート(d)での前記検出が、蛍光分光法、表面プラズモン共鳴法、質量分析法、NMR法、電子スピン共鳴法、偏光蛍光分光法、円二色性法、免疫アッセイ法、クロマトグラフィ法、放射測定法、電気化学的方法、測光法、シンチグラフィ法、電子的方法、UV、可視光、もしくは赤外の分光法、酵素法、またはそれらの任意の組合せの使用を含む、請求項32～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

パート(d)での前記検出が蛍光分光法の使用を含む、請求項32～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

パート(d)での前記検出がFRET検出可能作用の検出を含む、請求項32～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

触媒核酸酵素に対する基質としての、請求項1～31のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質の使用。

【請求項45】

前記触媒核酸酵素が、多成分核酸酵素(MNAザイム)であり、前記MNAザイムが、少なくとも2つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムを含み、少なくとも第1のオリゴヌクレオチドパートザイムおよび第2のオリゴヌクレオチドパートザイムが、MNAザイム集合促進剤の存在下で自己集合して触媒活性多成分核酸酵素(MNAザイム)を形成し、前記少なくとも第1および前記第2のオリゴヌクレオチドパートザイムのそれぞれは、基質アーム部分と、触媒コア部分と、センサーアーム部分と、を含み、

自己集合すると、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムのセンサーアーム部分が、MNAザイムのセンサーアームとして作用し、第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムの基質アーム部分が、MNAザイムの基質アームとして作用し、第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムの触媒コア部分が、MNAザイムの触媒コアとして作用し、

前記MNAザイムのセンサーアームが、第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムを近接して維持してそれらのそれぞれの触媒コア部分の会合によりMNAザイムの触媒コアを形成するように、前記MNAザイム集合促進剤と相互作用し、前記触媒コアが、前記ポリヌクレオチド基質の修飾が可能であり、前記MNAザイムの前記基質アームが、前記MNAザイムの前記触媒コアが前記ポリヌクレオチド基質を修飾できるように、前記ポリヌクレオチド基質に結合する、

請求項44に記載の使用。

【請求項46】

それぞれの前記オリゴヌクレオチドパートザイムの触媒コア部分がDNAまたはそのア

10

20

30

40

50

ナログを含む、請求項 4 5 に記載の使用。

【請求項 4 7】

前記集合促進剤が、同定、検出、または定量される標的である、請求項 4 5 または請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記ポリヌクレオチド基質が、5 0 ~ 9 0 、 5 0 ~ 6 5 、 5 0 ~ 6 0 、 5 2 ~ 5 8 、 6 6 ~ 7 6 、 6 8 ~ 7 6 、 6 4 ~ 7 0 、 7 0 ~ 7 6 、 7 0 ~ 7 5 、 7 2 ~ 7 6 、 5 2 、 5 8 、 6 4 、 6 6 、 6 8 、 7 0 、 7 2 、 または 7 6 の温度で前記触媒核酸酵素にハイブリダイズする、請求項 4 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質を含むキット。

【請求項 5 0】

前記ポリヌクレオチド基質の触媒修飾が可能な触媒核酸酵素をさらに含む、請求項 4 9 に記載のキット。

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質と、少なくとも 1 つの標的の検出が可能な多成分核酸酵素 ( M N A ザイム ) を集合するように設計された複数のオリゴヌクレオチドパートザイムと、を含み、前記 M N A ザイムが前記ポリヌクレオチド基質の触媒修飾が可能である、キット。

20

【請求項 5 2】

請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド基質に結合された固体担体を含む集合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照による組込み

本出願は、2 0 1 1 年 9 月 9 日出願の豪州仮特許出願第 2 0 1 1 9 0 3 6 8 6 号 ( その全内容が相互参照により本明細書に組み込まれる ) に基づく優先権を主張する。

30

【0 0 0 2】

本発明は、一般的には、核酸酵素の分野に関する。より特定的には、本発明は、核酸酵素の基質およびこの基質の利用方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

過去 2 0 年間、酵素活性または触媒活性を有する多種多様な核酸分子が発見されてきた。RNA 酵素 ( 「リボザイム」 ) は、天然に存在するが、標的 RNA 基質を特異的に認識および修飾するように工学操作することが可能である。in vitro 進化技術により、「デオキシリボザイム」、「DNA 酵素」、または「DNA ザイム」として参照されることが多いデオキシリボ核酸を含めて、多くのより触媒性の核酸の発見および開発が促進されてきた。核酸の切断、核酸のライゲーション、ポルフィリンのメタル化、および炭素 - 炭素結合、エステル結合、またはアミド結合の形成を含めて、広範にわたる反応系を触媒する能力を有する in vitro 進化した DNA ザイムおよび / またはリボザイムが発見されてきた。

40

【0 0 0 4】

特定的には、ワトソン・クリック塩基対合によりハイブリダイズした後に識別可能な核酸配列を特異的に切断する DNA ザイムおよびリボザイムが特徴付けられてきた。DNA ザイムは、RNA 分子または DNA 分子のいずれかを切断可能である。また、リボザイムは、RNA 標的配列および DNA 標的配列の両方を切断可能である。「1 0 - 2 3」および「8 - 1 7」DNA ザイムは、核酸基質の特異的 RNA ホスホジエステル結合を切断し

50

て、2' , 3' - 環状リン酸を有する反応産物と5' - ヒドロキシル基を有する反応産物とを形成可能である。2' , 3' - 環状リン酸産物と5' - ヒドロキシル産物とをライゲート可能なデオキシリボザイム (DNAザイム) の例としては、「7Z81」および「7Z48」リガーゼが挙げられる。

#### 【0005】

より最近になって、MNAザイム集合促進剤 (たとえば、検出される標的分子) の存在下で2つ以上のオリゴヌクレオチド成分 (本明細書では「パートザイム」としても参照される) から自己集合する能力を有する多成分核酸酵素 (MNAザイム) が記載されてきた。

#### 【0006】

触媒核酸の汎用性により、多種多様な適用でその使用が促進されてきた。触媒核酸をうまく使用する鍵となる要素は、適切な基質を修飾するその能力である。一般的には、基質は、触媒核酸のハイブリダイジングアームに実質的に相補的であり、特異的な配列または配列モチーフを触媒作用部位に含有する。所与の触媒核酸とその基質との相互作用の性質は、酵素がいかにか効率にその基質に結合しかつ/またはその基質を触媒修飾するかを決定する因子であるので、触媒核酸を利用するいずれの系を設計するうえでも、基本的要件である。

#### 【0007】

触媒核酸は、核酸、タンパク質、および小分子の検出で *in vitro* 診断用途を有する。この用途では、多くの場合、標的またはシグナルのいずれかを増幅して、対象のアナライトの口バスト検出に十分なシグナルを発生することが必要である。

#### 【0008】

触媒核酸を利用する方法は、触媒活性によりバックグラウンドノイズを上回る効果的な識別を可能にする十分な速度で修飾される基質を必要とする。異なる方法では、異なる反応温度の使用が必要となりうるので、所要の温度で効率的に修飾 (たとえば切断) される基質の必要性が存在する。MNAザイムおよびDNAザイムを利用するような方法では、単一反応で多くの標的を同時に多重分析することが可能であるが、多重化して複数の標的を区別する能力は、好適な一連の基質、通常、標的1つあたり少なくとも1つの基質の存在に依存する。高効率で修飾 (たとえば切断) される当技術分野で公知の基質の数は、現在のところ、多数の多重化を行うには不十分である。

#### 【0009】

当技術分野ですでに公知のDNAザイムおよびMNAザイムの基質は、可能性のある複数の基質をスクリーニングして最も効率的に切断されるものを経験的に決定することにより誘導された。多くの場合、このスクリーニングは、全長mRNA内の理論上可能性のある切断部位を切断することを目標とした多数のDNAザイムを用いて行われた。このスクリーニングは、通常、生理学的条件下 (温度ならびにイオン強度、組成、および緩衝液のpH) で行われた。これには、生理学的条件でmRNAの切断配列を効率的に見いだすことへの偏りが存在する。なぜなら、そのような研究は、*in vivo* でRNA発現の阻害剤としてDNAザイムを治療に使用することに重点がおかれていたからである。そのような研究は、多数の推定基質を経験的に測定してより効率的に切断される少数の基質を見いだすべく、一連の労力のかかるプロトコルを提供する (たとえば、Cairns et al., 1999 Nat Biotech 17: 480 - 486を参照されたい)。これらの研究は、効率的に切断される基質を選択するための限られた一群の設計ガイドラインをもたらし、多くの場合、DNAザイムは容易に調整可能でありmRNAはそうではないので、基質ではなくDNAザイムの設計に重点をおいたガイドラインをもたらした。これらの研究から作成された1つの共通したガイドラインでは、基質の切断部位のR-Yリボヌクレオチドモチーフの正確な配列が重要であり、切断効率は、次の順: GUAU > GC > > ACである。

#### 【0010】

*in vitro* 条件下での全長mRNAの切断効率は、細胞環境内での切断効率の絶

10

20

30

40

50

対的尺度ではない。なぜなら、後者には、リボ核タンパク質および *in vitro* で容易に模倣できない他の交絡因子が含まれるからである。

【0011】

DNA ザイムおよび MNA ザイムにより生理学的条件下で効率的に切断されうる長い mRNA 分子内の部位を選択するうえで、過去に作成された設計ガイドラインが役立つこともあるが、*in vitro* 診断用途での有用性に十分な効率でどの基質が切断されるかを予測する能力は、限られている。*in vitro* 診断用途では、当技術分野に存在する限られた基質設計ガイドラインを確立するために一般的にスクリーニングおよび使用される生理学的条件とは非常に異なる条件が必要になることもある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

*in vitro* 診断用途に好適な条件で MNA ザイムまたは DNA ザイムにより基質が効率的に切断されるかをより強い確信をもって予測する、基質配列に対する一群のガイドラインまたは配列モチーフの必要性が存在する。また、触媒核酸機能の改善を促進する性質を備えた触媒核酸基質の必要性も存在する。これらの性質としては、たとえば、一連の条件にわたり触媒核酸機能の改善を促進する能力および / または多重反応系で同時に検出可能な標的の数を拡大する能力が挙げられうる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

効率的な基質配列を一貫して生成する配列モチーフまたは一群の設計ガイドラインを確立すべく多くの試みがなされてきたが、これまでのところ、効果的な配列または一群のガイドラインは、特定されていない。本発明は、新しい効率的に切断される基質の開発を促進した一連の原理を提供する。したがって、本発明は、触媒核酸機能を促進する性質を備えた触媒核酸酵素基質を提供することにより、当技術分野に存在する必要性に対処する。

【0014】

第1の態様では、本発明は、触媒核酸酵素に対する単離されたポリヌクレオチド基質を提供する。前記ポリヌクレオチド基質は、配列  $N_1 - N_2 - N_3 - N_4 - N_5 - N_6 - N_7 - N_8 - rR - rY - N_9 - N_{10} - N_{11} - N_{12} - N_{13} - N_{14} - N_{15}$

(式中、

$rR$  は、プリンリボヌクレオチドであり、

$rY$  は、ピリミジンリボヌクレオチドであり、

$N_1 \sim N_{15}$  のそれぞれは、ヌクレオチドであり、

$N_5 \sim N_{13}$  のうち6個以上は、シトシンヌクレオチドであり、かつ

$N_9 \sim N_{15}$  のうち3個未満は、グアニンヌクレオチドがある)

を含む。

【0015】

第1の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 25 ~ 27、29 ~ 30、33、72 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0016】

第1の態様の一実施形態では、 $N_5 \sim N_{13}$  のうち7個以上または8個以上は、シトシンヌクレオチドである。

【0017】

第1の態様の一実施形態では、 $N_5 \sim N_{13}$  のうち7個以上は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 29、73、76 ~ 80、82 ~ 83、85 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0018】

第1の態様の一実施形態では、 $N_5 \sim N_{13}$  のうち8個以上は、シトシンヌクレオチド

10

20

30

40

50

であり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 76、77、80、83、または 87 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0019】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_4 \sim N_{13}$  のうち 7 個以上または 8 個以上は、シトシンヌクレオチドである。

【0020】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_4 \sim N_{13}$  のうち 7 個以上は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 27、29、73、76~83、85~90、または 172~175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含む。

【0021】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_4 \sim N_{13}$  のうち 8 個は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 76、77、79~80、82~83、87、88、または 90 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0022】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_4 \sim N_{12}$  のうち 6 個以上、7 個以上、または 8 個以上は、シトシンヌクレオチドである。

【0023】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_4 \sim N_{12}$  のうち 7 個以上は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 27、29、73、76、77、79~83、85~88、90、または 172~175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0024】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_4 \sim N_{12}$  のうち 8 個は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 76、77、80、83、87、または 88 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0025】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_5 \sim N_{12}$  のうち 6 個以上、7 個以上、または 8 個以上は、シトシンヌクレオチドである。

【0026】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_5 \sim N_{12}$  のうち 7 個以上は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 29、73、76、77、80、83、85~88、または 172~175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0027】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_5 \sim N_{12}$  のうち 8 個は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 76、77、80、83、または 87 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0028】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_8$ 、および / または  $N_9$  のいずれか 1 つ以上は、シトシンヌクレオチドである。

【0029】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_8$  および  $N_9$  は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 25~26、29~30、72~90、または 172~175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0030】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_9 \sim N_{15}$  のうち 2 個、1 個、または 0 個は、グアニンヌクレオチドである。

【0031】

第 1 の態様の一実施形態では、 $N_9 \sim N_{15}$  のうち 1 個または 0 個は、グアニンヌクレ

10

20

30

40

50

オチドであり、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 25 ~ 27、29 ~ 30、33、72 ~ 80、82 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0032】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>9</sub> ~ N<sub>15</sub> はいずれも、グアニンヌクレオチドではなく、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 25、26、30、33、72、75、77 ~ 80、84 ~ 85、または 89 のいずれか 1 つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0033】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>1</sub> ~ N<sub>15</sub> のうち 10 個超、11 個超、12 個超、または 13 個超は、ピリミジンヌクレオチドである。

10

【0034】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>1</sub> ~ N<sub>15</sub> のうち 11 個、12 個、または 12 超は、ピリミジンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、いずれか 1 つの配列番号 25 ~ 27、29、33、73 ~ 90、または 173 ~ 175 により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0035】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>1</sub> ~ N<sub>15</sub> のうち 13 個または 14 個は、ピリミジンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、いずれか 1 つの配列番号 75、77 ~ 80、82 ~ 85、または 88 ~ 89 により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

20

【0036】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>1</sub> ~ N<sub>14</sub> のうち 8 個超、9 個超、10 個超、または 11 個は、シトシンヌクレオチドである。

【0037】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>1</sub> ~ N<sub>14</sub> のうち 10 個または 11 個は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、いずれか 1 つの配列番号 33、76 ~ 80、82 ~ 83、85、87、88、または 89 により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

【0038】

第 1 の態様の一実施形態では、N<sub>1</sub> ~ N<sub>14</sub> のうち 11 個は、シトシンヌクレオチドであり、ポリヌクレオチド基質は、いずれか 1 つの配列番号 77 ~ 79 により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

30

【0039】

第 1 の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、ポリヌクレオチド基質を検出するための検出可能標識をさらに含む。

【0040】

第 1 の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、検出可能部分とクエンチャー部分とをさらに含み、検出可能部分により提供される検出可能作用は、前記触媒核酸酵素によるポリヌクレオチド基質の修飾により増大または低減される。

40

【0041】

第 1 の態様の一実施形態では、プリンリボヌクレオチドは、グアニンを含む。

【0042】

第 1 の態様の一実施形態では、ピリミジンリボヌクレオチドは、ウラシルを含む。

【0043】

第 1 の態様の一実施形態では、前記触媒核酸酵素に結合するポリヌクレオチド基質の部分は、50 ~ 90、50 ~ 65、50 ~ 60、52 ~ 58、66 ~ 76、68 ~ 76、64 ~ 70、70 ~ 76、70 ~ 75、72 ~ 76、52、58、64、66、68、70、72、または 76 の融解温度 (T<sub>m</sub>) を有する。

50

## 【0044】

第1の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、  
 (i) 多成分核酸酵素(MNAザイム)、ここで、前記部分は、前記MNAザイムの少なくとも1つの基質アームに結合する、または  
 (ii) DNAザイム  
 である。

## 【0045】

第1の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、MNAザイムによる触媒修飾が可能である。

## 【0046】

第1の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、DNAザイムによる触媒修飾が可能である。

## 【0047】

第1の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、蛍光分光法、表面プラズモン共鳴法、質量分析法、NMR法、電子スピン共鳴法、偏光蛍光分光法、円二色性法、免疫アッセイ法、クロマトグラフィー法、放射測定法、電気化学的方法、測光法、シンチグラフィ法、電子的方法、UV、可視光、もしくは赤外の分光法、酵素法、またはそれらの任意の組合せによる検出で検出可能な標識を含む。

## 【0048】

第1の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、蛍光分光法による検出で検出可能な標識を含む。

## 【0049】

第1の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)分光法による検出で検出可能な標識を含む。

## 【0050】

第2の態様では、本発明は、触媒核酸酵素に対する単離されたポリヌクレオチド基質を提供する。前記ポリヌクレオチド基質は、配列番号28により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される。

## 【0051】

第2の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、一对のオリゴヌクレオチドパートザイムを含むMNAザイムであり、前記対は、配列番号15および8、配列番号93および94、または配列番号114および115を含むかまたはそれらの配列で構成される。

## 【0052】

第2の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、配列番号138により定義される配列を含むかまたはその配列で構成されるDNAザイムである。

## 【0053】

第3の態様では、本発明は、  
 (a) 2つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムを提供することと、ただし、少なくとも第1のオリゴヌクレオチドパートザイムおよび第2のオリゴヌクレオチドパートザイムは、前記標的の存在下で自己集合して少なくとも第1の触媒活性多成分核酸酵素(MNAザイム)を形成する、  
 (b) 第1または第2の態様の単離されたポリヌクレオチド基質を提供することと、ただし、前記ポリヌクレオチド基質は、前記第1のMNAザイムによる修飾が可能であり、前記MNAザイムによる前記ポリヌクレオチド基質の修飾は、検出可能作用を提供する、  
 (c) (1) 前記少なくとも第1のMNAザイムの自己集合と、  
 (2) 前記少なくとも第1のMNAザイムの触媒活性と、  
 を可能にする条件下で、前記2つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムと前記標的を推定上含有するサンプルとを接触させることと、  
 (d) 前記検出可能作用を検出することと、  
 を含む、少なくとも1つの標的の存在を検出する方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 4 】

第3の態様の一実施形態では、標的は、MNAザイム集合促進剤である。

## 【 0 0 5 5 】

第3の態様の一実施形態では、標的は、核酸である。

## 【 0 0 5 6 】

第3の態様の一実施形態では、標的は、塩基対相補性により前記MNAザイムの1つ以上のセンサーアームにハイブリダイズする核酸である。

## 【 0 0 5 7 】

第3の態様の一実施形態では、核酸は、DNA、メチル化DNA、アルキル化DNA、RNA、メチル化RNA、マイクロRNA、siRNA、shRNA、tRNA、mRNA、snRNA、stRNA、smRNA、プレもしくはプリマイクロRNA、他の非コードRNA、リボソームRNA、それらの誘導体、アンプリコン、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

10

## 【 0 0 5 8 】

第3の態様の一実施形態では、核酸は、増幅される。

## 【 0 0 5 9 】

第3の態様の一実施形態では、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、ループ媒介等温増幅(LAMP)、ローリングサークル増幅(RCA)、転写媒介増幅(TMA)、自己保持配列複製(3SR)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)のうち1つ以上を含む。

20

## 【 0 0 6 0 】

第3の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、50 ~ 90、50 ~ 65、50 ~ 60、52 ~ 58、66 ~ 76、68 ~ 76、64 ~ 70、70 ~ 76、70 ~ 75、72 ~ 76、52、58、64、66、68、70、72、または76の温度で前記MNAザイムの基質アームにハイブリダイズする。

## 【 0 0 6 1 】

第3の態様の一実施形態では、本方法は、

(a)異なる標的の存在下で自己集合して第2の触媒活性MNAザイムを形成可能な2つ以上の追加のオリゴヌクレオチドパートザイムと、

30

(b)少なくとも1つの追加のポリヌクレオチド基質と、

を提供することをさらに含む。ただし、前記追加のポリヌクレオチド基質は、前記異なる標的の存在下で前記第2のMNAザイムによる修飾が可能である。

## 【 0 0 6 2 】

第3の態様の一実施形態では、追加のポリヌクレオチド基質は、前記第1のMNAザイムによる修飾が可能でない。

## 【 0 0 6 3 】

第3の態様の一実施形態では、パート(d)での検出は、蛍光分光法、表面プラズモン共鳴法、質量分析法、NMR法、電子スピン共鳴法、偏光蛍光分光法、円二色性法、免疫アッセイ法、クロマトグラフィー法、放射測定法、電気化学的方法、測光法、シンチグラフィ法、電子的方法、UV、可視光、もしくは赤外の分光法、酵素法、またはそれらの任意の組合せの使用を含む。

40

## 【 0 0 6 4 】

第3の態様の一実施形態では、パート(d)での検出は、蛍光分光法の使用を含む。

## 【 0 0 6 5 】

第3の態様の一実施形態では、パート(d)での検出は、FRET検出可能作用の検出を含む。

## 【 0 0 6 6 】

第3の態様の一実施形態では、前記MNAザイムの触媒コアは、DNAまたはそのアナログを含む。

50

## 【 0 0 6 7 】

第 4 の態様では、本発明は、触媒核酸酵素に対する基質として第 1 または第 2 の態様の単離されたポリヌクレオチド基質の使用を提供する。

## 【 0 0 6 8 】

第 4 の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、多成分核酸酵素 (MNA ザイム) であり、

前記 MNA ザイムは、少なくとも 2 つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムを含み、少なくとも第 1 のオリゴヌクレオチドパートザイムおよび第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムは、MNA ザイム集合促進剤の存在下で自己集合して触媒活性多成分核酸酵素 (MNA ザイム) を形成し、前記少なくとも第 1 および前記第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムのそれぞれは、基質アーム部分と、触媒コア部分と、センサーアーム部分と、を含み、

自己集合すると、前記第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムのセンサーアーム部分は、MNA ザイムのセンサーアームとして作用し、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムの基質アーム部分は、MNA ザイムの基質アームとして作用し、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムの触媒コア部分は、MNA ザイムの触媒コアとして作用し、

MNA ザイムのセンサーアームは、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムを近接して維持してそれらのそれぞれの触媒コア部分の会合により MNA ザイムの触媒コアを形成するように、前記 MNA ザイム集合促進剤と相互作用し、前記触媒コアは、前記ポリヌクレオチド基質の修飾が可能であり、前記 MNA ザイムの前記基質アームは、前記 MNA ザイムの前記触媒コアが前記ポリヌクレオチド基質を修飾できるように、前記ポリヌクレオチド基質に結合する。

## 【 0 0 6 9 】

第 3 または第 4 の態様の一実施形態では、それぞれの前記オリゴヌクレオチドパートザイムの触媒コア部分は、DNA またはそのアナログを含む。

## 【 0 0 7 0 】

第 4 の態様の一実施形態では、集合促進剤は、同定、検出、または定量される標的である。

## 【 0 0 7 1 】

第 3 または第 4 の態様の一実施形態では、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムは、配列番号 9 および配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 14、配列番号 16 および配列番号 14、配列番号 17 および配列番号 18、配列番号 40 および配列番号 41、配列番号 42 および配列番号 43、配列番号 44 および配列番号 45、配列番号 46 および配列番号 45、配列番号 47 および配列番号 63、配列番号 48 および配列番号 49、配列番号 50 および配列番号 51、配列番号 52 および配列番号 51、配列番号 38 および配列番号 55、配列番号 56 および配列番号 57、配列番号 58 および配列番号 59、配列番号 60 および配列番号 61、配列番号 62 および配列番号 63、配列番号 64 および配列番号 65、配列番号 66 および配列番号 67、配列番号 62 および配列番号 68、配列番号 69 および配列番号 70、配列番号 46 および配列番号 55、配列番号 46 および配列番号 59、配列番号 38 および配列番号 45、配列番号 58 および配列番号 45、配列番号 62 および配列番号 45、配列番号 46 および配列番号 63、配列番号 71 および配列番号 68、配列番号 98 および配列番号 99、配列番号 100 および配列番号 103、配列番号 104 および配列番号 105、配列番号 106 および配列番号 107、配列番号 108 および配列番号 109、配列番号 110 および配列番号 111、配列番号 112 および配列番号 113、配列番号 116 および配列番号 117、配列番号 118 および配列番号 119、配列番号 120 および配列番号 121、配列番号 122 および配列番号 119、配列番号 155 および配列番号 156、配列番号 157 および配列番号 158、配列番号 159 および配列番号 160、配列番号 168 および配列番号 169、配列番号 179 および配列番号 180、配列番号 18

1 および配列番号 1 8 2、配列番号 1 8 3 および配列番号 1 8 4、または配列番号 1 8 5 および配列番号 1 8 6 により定義されるそれぞれの配列を含む。

【0072】

第3または第4の態様の一実施形態では、前記オリゴヌクレオチド基質ならびに前記第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムは、表6、8、10、13、16、20、22、および/または24に示される配列の組合せにより定義される。

【0073】

第4の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、DNAザイムであり、DNAザイムおよびオリゴヌクレオチド基質は、表15に示される配列の組合せにより定義される。

【0074】

第4の態様の一実施形態では、標的は、塩基対相補性により前記MNAザイムの1つ以上のセンサーアームにハイブリダイズする核酸である。

【0075】

第4の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、50 ~ 90、50 ~ 65、50 ~ 60、52 ~ 58、66 ~ 76、68 ~ 76、64 ~ 70、70 ~ 76、70 ~ 75、72 ~ 76、52、58、64、66、68、70、72、または76の温度で前記触媒核酸酵素にハイブリダイズする。

【0076】

第5の態様では、本発明は、第1または第2の態様の単離されたポリヌクレオチド基質を含むキットを提供する。

【0077】

第5の態様の一実施形態では、キットは、前記ポリヌクレオチド基質の触媒修飾が可能な触媒核酸酵素をさらに含む。

【0078】

第5の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、多成分核酸酵素(MNAザイム)である。

【0079】

第6の態様では、本発明は、第1または第2の態様の単離されたポリヌクレオチド基質と、少なくとも1つの標的の検出が可能な多成分核酸酵素(MNAザイム)を集合するように設計された複数のオリゴヌクレオチドパートザイムと、を含むキットを提供する。ただし、前記MNAザイムは、ポリヌクレオチド基質の触媒修飾が可能である。

【0080】

第6の態様の一実施形態では、前記オリゴヌクレオチド基質および前記複数のオリゴヌクレオチドパートザイムは、表6、8、10、13、16、20、22、および/または24に示される配列の組合せにより定義される。

【0081】

第7の態様では、本発明は、第1または第2の態様のポリヌクレオチド基質に結合された固体担体を含む集合体を提供する。

【0082】

第1または第3~第7の態様の一実施形態では、 $N_1 \sim N_{15}$ のうちいずれか1個以上は、デオキシリボヌクレオチドである。

【0083】

第1または第3~第7の態様の一実施形態では、 $N_1 \sim N_{15}$ のうちいずれか1個以上は、リボヌクレオチドである。

【0084】

第1または第3~第7の態様の一実施形態では、 $N_1 \sim N_{15}$ はすべて、デオキシリボヌクレオチドである。

【0085】

第1または第3~第7の態様の一実施形態では、 $N_1 \sim N_{15}$ はすべて、リボヌクレオ

10

20

30

40

50

チドである。

【0086】

第1または第3～第7の態様の一実施形態では、 $N_1 \sim N_{15}$ は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドとの混合物を含む。

【0087】

第7の態様の一実施形態では、集合体は、複数の異なるポリヌクレオチド基質に結合された複数の異なる固体担体を含む。

【0088】

第1、第2、第4、または第5の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、DNAザイムである。

10

【0089】

第1、第2、第4、または第5の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、リボザイムである。

【0090】

第1、第2、第4、または第5の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、多成分核酸酵素(MNAザイム)である。

【0091】

以上の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、切断によるポリヌクレオチド基質の修飾が可能である。

【0092】

第1、第2、または第5の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムを含むMNAザイムであり、前記オリゴヌクレオチド基質および前記第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムは、表6、8、10、13、16、20、22、および/または24に示される配列の組合せにより定義される。

20

【0093】

第1、第2、または第5の態様の一実施形態では、触媒核酸酵素は、DNAザイムであり、DNAザイムおよびオリゴヌクレオチド基質は、表15に示される配列の組合せにより定義される。

【0094】

第1、第2、または第5の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、相補的塩基対合により前記触媒核酸酵素にハイブリダイズすることが可能である。

30

【0095】

第4の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、相補的塩基対合により前記触媒核酸酵素にハイブリダイズする。

【0096】

第3および第4の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、相補的塩基対合により前記MNAザイムにハイブリダイズする。

【0097】

第1、第2、第5、および第6の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質ポリヌクレオチド基質は、相補的塩基対合により前記MNAザイムにハイブリダイズすることが可能である。

40

【0098】

以上の態様の一実施形態では、単離されたポリヌクレオチド基質の部分は、前記MNAザイムの少なくとも1つの基質アームに結合する。

【0099】

以上の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、1つ超の異なるタイプの触媒核酸酵素による結合および触媒修飾が可能なユニバーサル基質である。

【0100】

以上の態様の一実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、1つ超の異なるタイプの多成分核酸酵素(MNAザイム)による結合および触媒修飾が可能なユニバーサル基質である

50

。

## 【0101】

以上の態様の一実施形態では、前記オリゴヌクレオチドパートザイム、集合促進剤、または基質の少なくとも1つは、DNAまたはそのアナログを含む。

## 【0102】

第3および第6の態様の一実施形態では、修飾は、MNAザイムによるポリヌクレオチド基質の切断である。

## 【0103】

次に、単なる例にすぎないが、添付の図面を参照しながら、本発明の好ましい実施形態を説明する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0104】

【図1】図1は、多成分核酸(MNAザイム)の例示的設計を示す図である。例示的開示によれば、MNAザイムは、2つのオリゴヌクレオチド成分(パートザイムAおよびパートザイムB)を含み、これらは、集合促進剤の存在下で自己集合する。集合促進剤の存在下で2つのパートザイムが集合した時、基質の修飾(たとえば切断またはライゲーション)が可能触媒活性MNAザイムを形成する。二成分パートザイムは、(i)集合促進剤に結合するセンサーアームと、(ii)基質に結合する基質アームと、(iii)部分的触媒コア配列と、を有する。集合促進剤分子(たとえば標的核酸配列)の存在は、変調に適したきわめて特異的な方式でパートザイム成分の集合を誘導する「入力」シグナルを提供する。いくつかの実施形態では、集合促進剤は、たとえば、試験サンプル中に存在する標的核酸配列でありうる。他の実施形態では、集合促進剤は、たとえば、検出可能な要素またはイベントの存在下でパートザイム成分の自己集合を誘導するように環境中に組み込まれた合成オリゴヌクレオチドでありうる。集合MNAザイムによる基質の修飾により、検出および/または定量されうる「検出可能作用」を提供可能である。たとえば、基質をフルオロフォア(F)およびクエンチャー(Q)で二重標識した場合、この「レポーター基質」が活性MNAザイムにより切断されると、フルオロフォアとクエンチャーとが分離され、それに付随して蛍光の増加がもたらされる。

【図2】図2は、MNAザイムを用いた標的検出方法の例示的用途を示すフロー図を提供する。MNAザイムは、(1)直接的検出、(2)標的増幅中または標的増幅後のいずれかで、たとえば、PCR、SDA、LAMP、RCA、TMA、3SR、またはNASBAにより産生されたアンプリコンの検出、および(3)シグナル増幅カスケードの開始に使用可能である。

【図3】図3は、例示的MNAザイムの描画図および担体にテザー連結された基質を切断するMNAザイムを用いた標的検出方法を提供する。この実施形態では、MNAザイムは、集合促進剤(標的)の存在下でのみ形成される。MNAザイムがフルオロフォアとクエンチャーとの間のテザー連結基質を切断した時、シグナルが発生される。ここに示されるように、フルオロフォアFとクエンチャーQとの間で切断すると、蛍光増加が得られる。一般的には、本方法は、切断が起こった後でフルオロフォアFまたはクエンチャーQのいずれかが担体に装着された状態を維持しうるように設計されうる。パネル(i)：示された担体は、それにテザー連結された1つの基質タイプ(基質1)のみを有する。パネル(ii)：異なる位置でテザー連結された複数の基質タイプが存在しうる。各基質は、特異的MNAザイム集合促進剤分子の存在下で形成されるMNAザイムによってのみ切断可能であり、ここでは、標的1および2は、それぞれ、MNAザイム1および2の自己集合を促進する。したがって、この例では、標的1の存在下でMNAザイム1のみが自己集合して基質1のみを切断する。同様に、標的2の存在下でMNAザイム2のみが自己集合して基質2のみを切断する。表面上に基質を配置することによりシグナルを局在化することが可能であるので、異なる集合促進剤の特異的検出が可能になる。パネル(ii)の例示的アッセイは、2つの識別可能な基質配列を必要とする。

【図4】図4は、MNAザイム集合促進剤成分として触媒修飾基質産物を使用する例示的

10

20

30

40

50

アッセイを示している。この戦略では、開始MNAザイム(Mt)は、標的(T)の存在下で形成される。開始MNAザイム(Mt)は、第1の基質(S1)を切断して第1の集合促進剤成分(S1f)を形成し、これは、第1のカスケードMNAザイム(カスケードMNAザイムMc1)の形成を誘導する。この例では、第1のカスケードMNAザイム(Mc1)は、2つのパートザイムと、F1、F2、およびS1fと称される3つの集合促進剤成分と、を含む。Mc1は、追加の基質(S2)を切断可能であるので、追加の集合促進剤成分(S2f)を遊離し、これは、第2のカスケードMNAザイム(カスケードMNAザイムMc2)の形成を誘導する。この例では、第2のカスケードMNAザイム(Mc2)は、2つのパートザイムと、F3、F4、およびS2fと称される3つの集合促進剤成分と、を含む。次いで、Mc2は、第1の基質(S1)をさらに切断可能であるので、第1の集合促進剤成分(S1f)がさらに形成される。これは、さらなる第1のカスケードMNAザイム(Mc1)の形成をもたらすことにより、増幅カスケードを形成する。この例示的アッセイは、2つの識別可能な基質配列を必要とする。

【図5】図5は、ヒトTFRC遺伝子の検出のために一連の異なるユニバーサル基質を用いてMNAザイムqPCRにより生成されたCt値を示すグラフを提供する。反応に使用したユニバーサル基質が何であるかは、x軸上に示される(ここで、「2」はSub2を意味し、「3」はSub3を意味し、以下同様である)。すべての反応に対して同一のプライマーセットおよびゲノムDNAを使用した。また、パートザイムはすべて、同一の標的センサー領域および触媒ドメインを有していた。反応間で唯一の異なる点は、パートザイムの基質センサーアームおよび蛍光標識ユニバーサル基質であった。したがって、反応間のCt値の差は、ユニバーサル基質の切断効率に相関付けられる。より低いCt値は、より少ないサイクル数で蛍光の閾値レベルに達することを示すので、より効率的に切断されるユニバーサル基質であることを示す。

【図6】図6は、等温方式で一連のユニバーサル基質のMNAザイム媒介切断から得られるシグナル対ノイズ比を示すグラフを提供する。標的は、合成オリゴヌクレオチドであった。シグナル対ノイズ比は、一連の反応温度で切断反応中に収集された規格化蛍光データから計算した。反応に使用したユニバーサル基質が何であるかは、x軸上に示される(ここで、「2」はSub2を意味し、「3」はSub3を意味し、以下同様である)。図6(i)では、異なる棒のデータは、異なる反応温度(凡例に52、54、56、および58で示される)での結果を意味する。図6(ii)は、y軸上にシグナル対ノイズ比を示す。図6(iii)は、試験したすべての4つの温度からのシグナル対ノイズ比の平均の標準偏差を示し、異なるシリーズの基質は、異なるシェーディングの棒により示される。

【図7】図7は、一連のヒト遺伝子の検出のために一連の異なるユニバーサル基質を用いてMNAザイムqPCRにより生成された線形増幅プロットを示すグラフを提供する。基質と標的との各組合せをa)52またはb)58のアニーリング温度で試験した。各遺伝子を用いて試験したユニバーサル基質は、各プロットの左上に位置する記号により示されており、(i)CYP2C9を用いてSub3およびSub61、(ii)TP53を用いてSub6、Sub72、Sub74、およびSub79、(iii)B2Mを用いてSub60、Sub61、およびSub79、(iv)HMBSを用いてSub49およびSub75、(v)TFRCを用いてSub2、Sub72、およびSub80、ならびに(v)RPL13aを用いてSub55、Sub80、およびSub88であった。それぞれ異なる遺伝子を用いたすべての反応に対して同一のプライマーセットおよびゲノムDNAを使用した。また、すべてのパートザイムは、特定の遺伝子にマッチした同一の触媒ドメインおよび標的センサー領域を有していた。反応間で唯一の異なる点は、パートザイムの基質センサーアームおよび蛍光標識ユニバーサル基質であった。したがって、同一の遺伝子に対する反応間の増幅プロットの形状およびCt値の差は、ユニバーサル基質の切断効率に相関付けられる。より急勾配の曲線およびより早期のCt値は、より少ないサイクル数で閾値蛍光に達することを示すので、より効率的に切断されるユニバーサル基質であることを示す。

10

20

30

40

50

【図 8】図 8 は、等温方式で一連のユニバーサル基質の DNA ザイム媒介切断から得られるシグナル対ノイズ比を示すグラフを提供する。シグナル対ノイズ比は、一連の反応温度で切断反応中に収集された規格化蛍光データから計算した。反応に使用したユニバーサル基質が何であるかは、x 軸上に示される（ここで、「2」は Sub 2 を意味し、「3」は Sub 3 を意味し、以下同様である）。図 8 (i) では、異なる棒のデータは、異なる反応温度（凡例に 50 ~ 60 で示される）での結果を意味し、y 軸上にシグナル対ノイズ比が示される。図 8 (ii) では、データの棒は、試験したすべての 6 つの温度からのシグナル対ノイズ比の平均の標準偏差を意味し、異なるシリーズの基質は、異なるシェーディングの棒により示される。

【図 9】図 9 は、ヒト RPL13a 遺伝子の検出のためにサブセットのパートザイム（基質センサーアームが Sub 44、Sub 55、Sub 72、および Sub 74 に相補的になるように設計された）を用いて非特異的切断活性を調べるべく一連の異なるユニバーサル基質（Sub 44、Sub 55、Sub 61、Sub 65、Sub 72、および Sub 74）を用いて行われた MNA ザイム qPCR からの線形増幅プロットを示すグラフを提供する。他の基質に十分な相補性で結合するように設計されたパートザイム対を用いて各ユニバーサル基質を個別に試験し、シグナルが検出可能であることを調べた。(i) Sub 72、(ii) Sub 74、(iii) Sub 55、および (iv) Sub 44 に相補的なパートザイムをすべての基質で試験した。パネル (a) では、表の下端の行は、実験でパートザイムが十分な相補性を呈する基質を示す。表の他の行は、各実験で試験した他の基質の配列のアライメントを示し、下端の基質と他の基質との配列差は、灰色および下線付きの文字により示される。パネル (b) では、線形増幅プロットが示される。サイクル数 (x 軸) に対して規格化蛍光 (y 軸) がプロットされる。増幅曲線が各基質に対応することを示すために、個々の増幅曲線には、プロットの右側に表示が付されている。閾値蛍光は、x 軸の上の水平実線により示される。閾値蛍光を超えて増大するシグナルは、ユニバーサル基質の切断を示す。

【図 10】図 10 は、等温方式で他の基質に十分な相補性で結合するように設計された DNA ザイムを用いて各ユニバーサル基質の DNA ザイム媒介切断から得られるシグナル対ノイズ比を個別に示すグラフを提供する。規格化シグナル対ノイズ比は、(i) 52 または (ii) 58 の反応温度で収集された規格化蛍光データから計算した。反応に使用したユニバーサル基質が何であるかは、x 軸上に示される。異なる棒のデータは、凡例に示される各 DNA ザイムでの切断結果を意味し、y 軸上にシグナル対ノイズ比が示される。

【図 11】図 11 は、2 つの多重 MNA ザイム qPCR 反応、すなわち、シリーズ 1 の基質 (Sub 2、Sub 3、Sub 4、Sub 6、および Sub 7) を用いた多重方式 1 と、シリーズ 2 および 3 の基質 (Sub 55、Sub 61、Sub 74、Sub 79、および Sub 80) を用いた多重方式 2 と、に対して、52 (パネル (i)) または 58 (パネル (ii)) のいずれかで増幅により生成された指数関数的増幅プロットを示している。両方の多重方式により、単一の反応槽内でヒト遺伝子 TFRC、HPRT、TP53、RPL13a、および CYP2C9 を測定した。2 つの多重方式で測定されるそれぞれの異なる遺伝子に対して、両方の温度でかつすべてのユニバーサル基質で同一のプライマーセットおよびゲノム DNA を使用した。また、すべてのパートザイムは、特定の遺伝子にマッチした同一の触媒ドメインおよび標的センサー領域を有していた。反応間の唯一の差は、パートザイムの基質センサーアームおよび蛍光標識ユニバーサル基質であった。各遺伝子を用いて試験したユニバーサル基質は、各プロットの左上に示される。2 つの異なる DNA 濃度、すなわち、100 ng (左側の x 印および 印のプロット) および 391 pg (右側の x 印および 印のプロット) で、2 つの多重方式間の直接比較を可能にするために、多重方式 1 (x 印) および多重方式 2 ( 印) の増幅プロットを重ね合わせた。増幅プロットの形状の差は、ユニバーサル基質の切断効率に相関付けられた。より急勾配の曲線およびより早期の Ct 値は、より少ないサイクル数で閾値蛍光に達することを示すので、より効率的に切断されるユニバーサル基質であることを示す。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0105】

## 定義

本明細書では、以下に示される意味を有するものとする特定の用語が用いられる。

## 【0106】

本明細書で用いられる場合、単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈上明らかに異なる場合を除いて、複数形の参照語を包含する。たとえば、「a polynucleotide substrate (ポリヌクレオチド基質)」という用語は、複数のポリヌクレオチド基質をも包含する。

## 【0107】

「comprising (～を含む)」という用語は、「必ずしも～のみを含むというわけではなく、主に～を含む」ということを意味する。さらに、「comprising (～を含む)」という単語の変化形、たとえば、「comprise (～を含む)」や「comprises (～を含む)」などは、変化形に対応する意味を有する。

## 【0108】

挙げられた数値に関して本明細書での「約」という用語の使用は、挙げられた1つおよび複数の数値が挙げられた値の $\pm 10$ パーセント以内にあるものを包含する。

## 【0109】

数値の範囲を参照する場合の本明細書での「～」という用語の使用は、範囲の各端点の数値を包含する。たとえば、10ヌクレオチド長～20ヌクレオチド長のポリヌクレオチドは、10ヌクレオチド長のポリヌクレオチドと20ヌクレオチド長のポリヌクレオチドとを包含する。

## 【0110】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、本明細書では同義的に用いられ、デオキシリボヌクレオチド塩基および/もしくはリボヌクレオチド塩基の一本鎖もしくは二本鎖のポリマー、および/またはそれらのアナログ、誘導体、変異体、断片、もしくは組合せを意味し、限定されるものではないが、DNA、メチル化DNA、アルキル化DNA、RNA、メチル化RNA、マイクロRNA、siRNA、shRNA、mRNA、tRNA、snRNA、stRNA、smRNA、プレもしくはプリマイクロRNA、他の非コードRNA、リボソームRNA、それらの誘導体、それらのアンプリコン、またはそれらの任意の組合せを包含する。限定されるものではないが、例として、核酸源は、合成源、哺乳動物源、ヒト源、動物源、植物源、菌類源、細菌源、ウイルス源、古細菌源、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

## 【0111】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、典型的には、DNA分子もしくはDNA含有核酸分子、またはRNA分子もしくはRNA含有分子、またはそれらの組合せのセグメントを意味する。したがって、オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド塩基および/もしくはリボヌクレオチド塩基、あるいは/またはそれらのアナログ、誘導体、変異体、断片、もしくは組合せを含むかまたはそれらで構成されうるし、限定されるものではないが、DNA、メチル化DNA、アルキル化DNA、RNA、メチル化RNA、マイクロRNA、siRNA、shRNA、mRNA、tRNA、snRNA、stRNA、smRNA、プレもしくはプリマイクロRNA、他の非コードRNA、リボソームRNA、それらの誘導体、それらのアンプリコン、またはそれらの任意の組合せを包含する。オリゴヌクレオチドの例としては、核酸標的、基質、たとえば、切断活性、リガーゼ活性、または他の酵素活性を有するDNAザイムまたはMNAザイムにより修飾可能なもの、プライマー、たとえば、PCRなどの方法によるin vitro標的増幅に使用されるもの、およびMNAザイムの成分、たとえば、限定されるものではないが、パートザイム、ならびに集合促進剤が挙げられる。

## 【0112】

「ピリミジンヌクレオチド」という用語は、限定されるものではないが、シトシン、チ

10

20

30

40

50

ミン、およびウラシルをはじめとするピリミジン塩基を含む任意のヌクレオチドを包含する。ピリミジンヌクレオチドは、リボース糖分子（つまり「ピリミジンリボヌクレオチド」）またはデオキシリボース糖分子（つまり「ピリミジンデオキシリボヌクレオチド」）を含みうる。

【0113】

「プリンヌクレオチド」という用語は、限定されるものではないが、アデニンおよびグアニンをはじめとするプリン塩基を含む任意のヌクレオチドを包含する。プリンヌクレオチドは、リボース糖分子（つまり「プリンリボヌクレオチド」）またはデオキシリボース糖分子（つまり「プリンデオキシリボヌクレオチド」）を含みうる。

【0114】

「核酸酵素」、「触媒核酸」、「触媒活性を有する核酸」、および「触媒核酸酵素」という用語は、本明細書では同義的に用いられ、少なくとも1つの基質に結合して少なくとも1つの基質の修飾（たとえばライゲーションまたは切断）を触媒しうる、DNA分子またはDNA含有の分子もしくは複合体、あるいはRNA分子またはRNA含有の分子もしくは複合体、あるいはDNA-RNAハイブリッドの分子または複合体であるそれらの組合せを意味するものとする。触媒核酸中のヌクレオチド残基は、塩基A、C、G、T、およびU、さらにはそれらの誘導体およびアナログを含みうる。以上の用語は、少なくとも1つの基質を認識して少なくとも1つ基質の修飾（たとえばライゲーションまたは切断）を触媒しうる、単一のDNA分子もしくはDNA含有分子（当技術分野では、「DNA酵素」、「デオキシリボザイム」、もしくは「DNAザイム」としても知られる）、またはRNA分子もしくはRNA含有分子（当技術分野では、「RNA酵素」もしくは「リボザイム」としても知られる）、またはDNA-RNAハイブリッド分子であるそれらの組合せを含みうる単分子核酸酵素を包含する。以上の用語は、少なくとも1つの基質を認識して少なくとも1つ基質の修飾（たとえばライゲーションまたは切断）を触媒しうる、DNA複合体もしくはDNA含有複合体、またはRNA複合体もしくはRNA含有複合体、またはDNA-RNAハイブリッド複合体であるそれらの組合せを含む核酸酵素を包含する。「核酸酵素」、「触媒核酸」、「触媒活性を有する核酸」、および「触媒核酸酵素」という用語は、それらの意味の範囲内にMNAザイムを包含する。

【0115】

本明細書で用いられる「MNAザイム」および「多成分核酸酵素」という用語は、同一の意味を有し、MNAザイム集合促進剤（たとえば標的）の存在下でのみ基質の触媒修飾が可能で活性核酸酵素を形成する2つ以上のオリゴヌクレオチド配列（たとえばパートザイム）を意味する。MNAザイムは、基質の切断、基質のライゲーション、および1つまたは複数の基質の他の酵素修飾をはじめとするある範囲内の反応を触媒可能である。切断活性を有するパートザイムAとパートザイムBとを含む例示的MNAザイムを図1に示す。エンドヌクレアーゼ活性または切断活性を有するMNAザイムはまた、「MNAザイムクリーパー」としても知られる。図1を参照して、パートザイムAおよびBは、それぞれ、ワトソン・クリック塩基対合により集合促進剤（たとえば、標的のDNA配列またはRNA配列）に結合する。パートザイムAおよびBのセンサーアームが集合促進剤上で互いに近接してハイブリダイズした時のみ、MNAザイムが形成される。MNAザイムの基質アームは、基質に結合し、その修飾（たとえば切断）は、パートザイムAおよびBの触媒ドメインの相互作用により形成されるMNAザイムの触媒コアにより触媒される。DNA/RNAキメラレポーター基質の切断を図に示す。MNAザイムは、フルオロフォアとクエンチャーとの色素対間で基質を切断するので、シグナルを発生する。「多成分核酸酵素」および「MNAザイム」という用語は、2つの分子を含むバイパータイト構造、または3つの核酸分子を含むトリパータイト構造、または他のマルチパータイト構造、たとえば、4つ以上の核酸分子により形成されるものを包含する。

【0116】

本明細書で用いられる「MNAザイム」および「多成分核酸酵素」という用語が、PCT国際公開第2007/041774号パンフレット、国際公開第2008/04009

10

20

30

40

50

5号パンフレット、国際公開第2008/122084号パンフレット、または関連する米国特許出願公開第2007-0231810号明細書、同第2010-0136536号明細書、および同第2011-0143338号明細書(これらの各文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)のいずれか1つ以上に開示されるものを含めて、すべての公知のMNAザイムおよび修飾MNAザイムを包含することは、理解されよう。「MNAザイム」および「多成分核酸酵素」という用語に包含されるMNAザイムおよび修飾MNAザイムの例としては、切断触媒活性を有するMNAザイム(本明細書に例示される)、1つ以上の集合阻害剤を含む脱集合MNAザイムまたは部分集合MNAザイム、1つ以上のアプタマーを含むMNAザイム(「アプタMNAザイム」)、1つ以上のトランケートセンサーアームと任意選択で1つ以上の安定化オリゴヌクレオチドとを含むMNAザイム、1つ以上の活性阻害剤を含むMNAザイム、多成分核酸不活性プロ酵素(MNAi)、およびリガーゼ触媒活性を有するMNAザイム(「MNAザイムリガーゼ」)が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、これらは、それぞれ、国際公開第2007/041774号パンフレット、国際公開第2008/040095号パンフレット、国際公開第2008/122084号パンフレット、米国特許出願公開第2007-0231810号明細書、米国特許出願公開第2010-0136536号明細書、および/または米国特許出願公開第2011-0143338号明細書の1つ以上に詳細に記載されている。

10

#### 【0117】

本明細書で用いられる場合、「パートザイム」、「成分パートザイム」、「パートザイム成分」、「成分オリゴヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド成分」、および「オリゴヌクレオチドパートザイム」という用語は、DNA含有またはRNA含有またはDNA-RNA含有のオリゴヌクレオチドであって、その2つ以上が、本明細書に定義されるMNAザイム集合促進剤の存在下でのみ、一緒になって「MNAザイム」を形成可能なものを意味する。特定の好ましい実施形態では、1つ以上、好ましくは少なくとも2つの成分パートザイムは、3つの領域またはドメイン、すなわち、修飾を触媒する触媒コアの部分を形成する「触媒」ドメインと、集合促進剤に会合および/または結合しうる「センサーアーム」ドメインと、基質に会合および/または結合しうる「基質アーム」ドメインと、を含みうる。これらの領域またはドメインの説明図を図1に示す。パートザイムは、限定されるものではないが、アプタマーをはじめとする少なくとも1つの追加成分を含みうる。本明細書では、「アプタパートザイム」として参照される。パートザイムは、限定されるものではないが、トランケートセンサーアームを有するパートザイム成分、および集合促進剤または基質のいずれかと相互作用することによるMNAザイム構造を安定化する安定化アーム成分を含めて、複数の成分を含みうる。

20

30

#### 【0118】

本明細書で用いられる「集合促進剤分子」、「集合促進剤」、「MNAザイム集合促進剤分子」、および「MNAザイム集合促進剤」という用語は、MNAザイムのセンサーアームとの相互作用により成分パートザイムの自己集合を促進して触媒活性MNAザイムを形成可能な要素を意味する。本明細書で用いられる場合、集合促進剤は、切断活性、リガーゼ活性、または他の酵素活性を有するMNAザイムの集合体を促進しうる。好ましい実施形態では、集合促進剤は、MNAザイムの自己集合に必要とされる。集合促進剤は、1つの分子を含みうるか、または1つ以上のオリゴヌクレオチド「パートザイム」のセンサーアームに対合もしくは結合しうる2つ以上の「集合促進剤成分」を含みうる。集合促進剤は、標的でありうる。標的は、DNA、メチル化DNA、アルキル化DNA、RNA、メチル化RNA、マイクロRNA、siRNA、shRNA、tRNA、mRNA、snRNA、stRNA、smRNA、プレもしくはプリマイクロRNA、他の非コードRNA、リボソームRNA、それらの誘導體、アンプリコン、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される核酸でありうる。核酸は、増幅されうる。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅、ループ媒介等温増幅、ローリングサークル増幅、転写媒介増幅、自己保持配列複製、リガーゼ連鎖反応、核酸配列ベース増幅、または逆転写

40

50

ポリマーゼ連鎖反応 ( R T - P C R ) の 1 つ以上を含みうる。

【 0 1 1 9 】

「集合促進剤成分」は、活性 M N A ザイムの集合の制御または不活性 M N A ザイム成分から活性 M N A ザイムへの遷移の促進に使用可能な分子である。

【 0 1 2 0 】

本明細書で用いられる「標的」という用語は、追加の増幅工程および/またはカスケードを用いてまたは用いずに、M N A ザイムなどの特定の核酸酵素を使用する方法により、検出、同定、または定量される対象となる任意の天然または合成の要素、成分、またはアナライトを包含する。したがって、標的は、高感度の検出、同定、および/または定量の方法が望まれる、最も広範囲の検出可能な要素、成分、またはアナライトを含む。いくつかの例示的標的としては、核酸、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖タンパク質、脂質、リポタンパク質、生物体、細胞、ウイルス、細菌、古細菌、酵母、菌類、抗体、代謝物、病原体、毒素、汚染物質、毒物、小分子、ポリマー、金属イオン、金属塩、プリオン、またはそれらの任意の誘導體、部分、もしくは組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。他の標的もまた、ここで使用されると考えられる。また、標的が集合促進剤または集合促進剤成分でありうることは、理解されよう。

10

【 0 1 2 1 】

「検出可能作用」とは、基質の修飾が起こった指標として検出または定量が可能な作用のことである。作用の大きさは、集合促進剤 (たとえば標的) などの入力量の指標となりうる。検出可能作用は、蛍光分光法、表面プラズモン共鳴法、質量分析法、N M R 法、電子スピン共鳴法、偏光蛍光分光法、円二色性法、免疫アッセイ法、クロマトグラフィー法、放射測定法、測光法、シンチグラフィー法、電子的方法、U V、可視光、もしくは赤外の分光法、酵素法、またはそれらの任意の組合せを含めて、さまざまな方法により検出されうる。

20

【 0 1 2 2 】

本明細書で用いられる「ポリヌクレオチド基質」および「基質」という用語は、触媒核酸酵素をはじめとする酵素による認識、作用、または修飾が可能な、デオキシリボヌクレオチド塩基もしくはリボヌクレオチド塩基の任意の一本鎖もしくは二本鎖のポリマー、またはそれらのアナログ、誘導體、変異体、断片、もしくは組合せを包含し、限定されるものではないが、D N A、メチル化 D N A、アルキル化 D N A、R N A、メチル化 R N A、マイクロ R N A、s i R N A、s h R N A、m R N A、t R N A、s n o R N A、s t R N A、s m R N A、プレもしくはプリマイクロ R N A、他の非コード R N A、リボソーム R N A、それらの誘導體、それらのアンプリコン、またはそれらの任意の組合せ (デオキシリボヌクレオチド塩基とリボヌクレオチド塩基との混合ポリマーを含む) を包含する。「ポリヌクレオチド基質」または「基質」は、限定されるものではないが、切断またはライゲーションを含めて、種々の酵素活性により修飾されうる。「ポリヌクレオチド基質」または「基質」の修飾は、酵素の触媒活性をモニターすべく「検出可能作用」を提供しうる。

30

【 0 1 2 3 】

本明細書で用いられる「レポーター基質」とは、触媒反応に関連する基質の消失または産物の出現のいずれかの測定を促進するようにとくに適合化された基質のことである。レポーター基質は、溶解状態で遊離しうるか、またはたとえば、表面もしくは他の分子に結合 (または「テザー連結」) されうる。レポーター基質は、たとえば、フルオロフォア (クエンチャーなどの 1 つ以上の追加成分を含むかまたは含まない)、放射性標識、ビオチン (たとえばビオチン化)、または化学発光標識を含めて、多種多様な手段のいずれかにより標識可能である。

40

【 0 1 2 4 】

本明細書で用いられる場合、「ジェネリック基質」または「ユニバーサル基質」とは、それぞれ異なる集合促進剤を認識可能な複数の M N A ザイムにより認識されて触媒作用を受ける基質たとえばレポーター基質のことである。そのような基質の使用は、すべてユニ

50

ユニバーサル基質を認識する構造的に関連付けられたMNAザイムを用いて多種多様な集合促進剤の検出、同定、または定量を行う個別のアッセイの開発を促進する。これらのユニバーサル基質は、それぞれ独立して、1つ以上の標識で標識可能である。好ましい実施形態では、独立して検出可能な標識を用いて1つ以上のユニバーサル基質を標識することにより、MNAザイムを用いてさまざまな集合促進剤を独立してまたは同時に検出するのに便利な系の作製が可能になる。いくつかの実施形態では、MNAザイムリガーゼまたはDNAザイムリガーゼを用いて、MNAザイムにより切断された基質を再構成することにより、再使用することが可能である。いくつかの実施形態では、MNAザイムにより切断またはライゲーションされた基質を、追加のMNAザイムまたはDNAザイムの成分または変調剤としてさらに使用することが可能である。

10

## 【0125】

いくつかの実施形態では、「ユニバーサル基質」を固体担体の異なる位置にテザー連結して、基質アレイを提供しうる。そのような実施形態では、テザー連結ユニバーサル基質はすべて、同一のフルオロフォアで標識されうる。特定の場合には、特異的MNAザイム集合促進剤分子の存在下で形成されたMNAザイムによってのみ、各ユニバーサル基質を切断することが可能であり、表面上に基質を配置することによりシグナルを局在化させることが可能であるので、異なる集合促進剤の特異的検出が可能になる。

## 【0126】

「産物」という用語は、基質の酵素修飾の結果として産生される1つまたは複数の新しい分子を意味する。本明細書で用いられる場合、「切断産物」という用語は、酵素により切断活性またはエンドヌクレアーゼ活性の結果として産生される新しい分子を意味する。「ライゲーション産物」という用語は、酵素により基質のライゲーションの結果として産生される新しい分子を意味する。

20

## 【0127】

本明細書で用いられる場合、本発明に係るポリヌクレオチド基質に関連する「融解温度」および「 $T_m$ 」という用語の使用は、とくに別段の指示がないかぎり、ウォーレス則すなわち  $T_m = 2 \quad (A + T) + 4 \quad (G + C)$  を用いて計算される融解温度 ( $T_m$ ) を意味すると理解されるものとする (Wallace et al., (1979) *Nucleic Acids Res.* 6 (11): 3543-3558 を参照されたい)。

## 【0128】

本明細書で用いられる場合、「塩基」という用語は、塩基が装着されたりボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドをすべて包含すると理解されるものとする。

30

## 【0129】

略号

ここではおよび本明細書全体を通じて、以下の略号が用いられる。

MNAザイム：多成分核酸酵素またはマルチパートタイト核酸酵素、

DNAザイム：デオキシリボ核酸酵素、

リボザイム：リボ核酸酵素、

パートザイム：オリゴヌクレオチドを含有する部分酵素、

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応、

40

qPCR：リアルタイム定量PCR、

NF-H<sub>2</sub>O：ヌクレアーゼフリー水、

LNA：ロックド核酸、

F：フルオロフォア、

Q：クエンチャー、

N = A、C、T/U、G、またはそれらの任意のアナログ、

N' = Nに相補的なまたはNに塩基対合可能な任意のヌクレオチド、

(N)<sub>x</sub>：任意の数のN、

(N')<sub>x</sub>：任意の数のN'、

W：AまたはT、

50

R : A、G、またはAA、  
 rN : 任意のリボヌクレオチド、  
 (rN)<sub>x</sub> : 任意の数のrN、  
 rR : AまたはGのリボヌクレオチド、  
 rY : CまたはUのリボヌクレオチド、  
 M : AまたはC、  
 H : A、C、またはT/U、  
 D : G、A、またはT/U、  
 JOEまたは6-JOE : 6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメ  
 トキシフルオレセイン、  
 FAMまたは6-FAM : 6-カルボキシフルオレセイン、  
 BHQ1 : Black Hole Quencher (登録商標) 1  
 BHQ2 : Black Hole Quencher (登録商標) 2  
 IB : Iowa Black (登録商標) FQ  
 IBR : Iowa Black (登録商標) RQ  
 shRNA : 低分子ヘアピンRNA  
 siRNA : 低分子干渉RNA  
 mRNA : メッセンジャーRNA  
 tRNA : トランスファーRNA  
 snRNA : 低分子核小体RNA  
 stRNA : 低分子一時的RNA  
 smRNA : 低分子変調RNA  
 プレマイクロRNA : 前駆体microRNA  
 プリマイクロRNA : 初期マイクロRNA  
 UV : 紫外

### 【0130】

例示的实施形態の詳細な説明

最初に、本明細書に提供される図面および実施例は、本発明およびその種々の実施形態を限定するものではなく例示するものであることを理解すべきである。

### 【0131】

触媒核酸機能の改善を促進する性質を備えた触媒核酸基質の必要性が存在する。特定的には、同一のまたは識別可能な標的特異性を有するさまざまなMNAザイムによる触媒修飾の能力が増大された新しいユニバーサル基質ファミリーが提供されれば、MNAザイムおよびDNAザイムを含む多くの用途にかなり有益であろう。たとえば、これらの基質ファミリーは、MNAザイムを含む多重アッセイの効率および/または確度を増大させるうえで有利であろう。追加されるユニバーサル基質は、基質を固体担体にテザー連結することにより基質アレイを作製する用途にとくに有用である。

### 【0132】

本発明は、高温で改善された性能を有して広い温度範囲にわたり効率的に触媒修飾（たとえば切断）される可能性がより高いユニバーサルオリゴヌクレオチド基質を産生するための一群のガイドラインを提供する。これらのガイドラインは、限定されるものではないが、(i) 2個の中心リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基中に7個以上のシトシンヌクレオチド、(ii) 2個の中心リボヌクレオチドに直接隣接した塩基(N<sub>8</sub>およびN<sub>9</sub>)がシトシンである、(iii) オリゴヌクレオチド基質の全ピリミジン含有率が64%超である、(iv) オリゴヌクレオチド基質の全Tmが66以上であり、核酸酵素によるオリゴヌクレオチド基質の触媒修飾（たとえば切断）の反応温度が50超であれば適用可能である、および/または(v) 2個の中心リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基中に少数個（たとえば、3、2、1、または0個）のグアニンヌクレオチド、のいずれか1つ以上を含む。

### 【0133】

10

20

30

40

50

これらのガイドラインの開発により、触媒核酸機能を拡張する特徴を有する触媒核酸酵素基質の開発が促進された。触媒修飾される部分に近接する特定の特異的ヌクレオチドの存在により、所与の核酸酵素の標的となる基質内のヌクレオチドの触媒修飾を促進可能であることが確認された。

#### 【0134】

したがって、本発明の特定の態様は、触媒核酸酵素に対するポリヌクレオチド基質に関する。ポリヌクレオチド基質は、基質を標的とする核酸酵素により触媒修飾されるヌクレオチドの5'側(すなわち上流側)および/または3'側(すなわち下流側)に一連のピリミジンヌクレオチドを含みうる。ピリミジンヌクレオチドは、シトシンヌクレオチドでありうる。

10

#### 【0135】

本発明の他の態様は、核酸酵素(たとえば、DNAザイム、リボザイム、またはMNAザイム)に対する基質としての本明細書に記載のポリヌクレオチド基質の使用に関する。特定の実施形態では、基質は、MNAザイムに対する基質として使用される。特定の実施形態では、基質は、DNAザイムに対する基質として使用される。

#### 【0136】

本発明のさらなる態様は、標的分子を検出する方法に関する。この方法は、検出可能作用を提供するように本明細書に記載のポリヌクレオチド基質を修飾することを含む。特定の実施形態では、この方法は、標的の検出が可能なMNAザイムを用いてポリヌクレオチド基質を修飾することを含む。

20

#### 【0137】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載の1つ以上のポリヌクレオチド基質を含むキットに関する。キットは、基質の触媒修飾が可能な核酸酵素を含みうる。特定の実施形態では、核酸酵素は、MNAザイムでありうる。

#### 【0138】

##### 1. 触媒核酸酵素基質

本発明は、触媒核酸酵素に対するポリヌクレオチド基質を提供する。本発明はまた、同一のまたは識別可能な標的特異性を有するさまざまな核酸(たとえばMNAザイム)による触媒修飾の能力が増大されたメンバーを含む基質ファミリーを提供する。

#### 【0139】

ポリヌクレオチド基質は、触媒核酸酵素により修飾可能な少なくとも1つの配列モチーフを含む。本発明に係るポリヌクレオチド基質を修飾しうる触媒核酸酵素の特定のタイプに関して、限定条件は存在しない。配列モチーフは、少なくとも1つのDNAヌクレオチド、少なくとも1つのRNAヌクレオチド、DNAヌクレオチドの少なくとも1つのアナログ、およびRNAヌクレオチドの少なくとも1つのアナログのいずれか1つ以上を含みうる。

30

#### 【0140】

好適な配列モチーフの例としては、DNAザイム(たとえば、10-23 DNAザイム、8-17 DNAザイム、「7Z81」、「7Z48」、および「7Q10」DNAザイムリガーゼ、「UV1C」チミン二量体光転換DNAザイム、「DAB22」炭素-炭素結合形成DNAザイム、およびそれらの誘導体)、リボザイム(たとえば、ハンマーヘッドリボザイム、ホモ二量体リボザイム、ヘテロ二量体リボザイム、およびそれらの誘導体)、およびMNAザイム(たとえば、PCT国際公開第2007/041774号パンフレット、国際公開第2008/040095号パンフレット、および国際公開第2008/122084号パンフレット、ならびに関連する米国特許出願公開第2007-0231810号明細書、同第2010-0136536号明細書、および同第2011-0143338号明細書(それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載のMNAザイムを参照されたい)により認識および修飾されるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

#### 【0141】

50

好適な配列モチーフの例としては、以下の表 1 に明記されるものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 1 4 2 】

【 表 1 】

表 1: 例示的触媒モチーフ

触媒酵素	基質触媒モチーフ
8-17 DNA ギャップ	$(N')_x (rN)_x G (N')_x$
10-23 DNA ギャップ	$(N')_x rR rY (N')_x$

$N = A, C, T, G$ , または任意のアナログ;  $N' = N$  に相補的な任意のヌクレオチド;  $(N)_x$  または  $(N')_x =$  任意の個数のヌクレオチド;  $W = A$  または  $T$ ;  $R = A, G$ , または  $AA$ ;  $rN =$  任意のリボヌクレオチド塩基;  $(rN)_x =$  任意の個数のリボヌクレオチド;  $rR = A$  または  $G$  リボヌクレオチド;  $rY = C$  または  $U$  リボヌクレオチド;  $M = A$  または  $C$ ;  $H = A, C$ , または  $T$ ;  $D = G, A$ , または  $T$

10

【 0 1 4 3 】

触媒核酸は、触媒コアを形成する領域の特定の修飾のみが許容されることが示されている (Perreault et al., 1990 Nature 344 (6266) : 565 - 7, Perreault et al., 1991 Biochemistry 30 (16) : 4020 - 5, Zaborowska et al., 2002 J Biol Chem. 277 (43) : 240617 - 22, Cruz et al., 2004 Chem Biol. Jan; 11 (1) : 57 - 6, Silverman, 2004 Chem Biol. Jan; 11 (1) : 7 - 8)。DNA ギャップの触媒活性に關与する配列の例を表 2 に列挙する。

20

【 0 1 4 4 】

【 表 2 】

表 2: いくつかの活性 DNA ギャップの例示的配列およびそれらの基質

DNA ギャップタイプ	DNA ギャップ配列	基質配列
8-17	$(N)_x TNNNAGCNNNWCGR(N)_x$ SEQ ID NO: 189	$(N')_x (rN)_x G (N')_x$
10-23	$(N)_x GGMTMGHNDNNNMGD(N)_x$ SEQ ID NO: 190	$(N')_x rR rY (N')_x$

DNA ギャップ配列に關して、 $N$  は、一般的には  $A, C, T$ , もしくは  $G$ , または任意のアナログであり、いくつかの場合には、 $N$  は  $U$  でありうる; 基質配列に關して、 $N = A, C, T/U, G$ , または任意のアナログ; ;  $N' = N$  に相補的な任意のヌクレオチド;  $(N)_x$  または  $(N')_x =$  任意の個数のヌクレオチド;  $W = A$  または  $T$ , いくつかの場合には、 $W$  は  $U$  でありうる;  $R = A, G$ , または  $AA$ ;  $rN =$  任意のリボヌクレオチド塩基;  $(rN)_x =$  任意の個数のリボヌクレオチド;  $rR = A$  または  $G$  リボヌクレオチド;  $rY = C$  または  $U$  リボヌクレオチド;  $M = A$  または  $C$ ;  $H = A, C$ , または  $T$ , いくつかの場合には、 $H$  は  $U$  でありうる;  $D = G, A$ , または  $T$ , いくつかの場合には、 $D$  は  $U$  でありうる。

30

40

【 0 1 4 5 】

ポリヌクレオチド基質は、複数の配列モチーフを含みうる。モチーフは、一タイプの触媒核酸酵素により認識および修飾されうる。他の選択肢として、異なるタイプの触媒核酸酵素により、基質内の異なる配列モチーフが認識および修飾されうる。

【 0 1 4 6 】

以上に述べたように、本発明に係るポリヌクレオチド基質は、触媒核酸酵素による修飾が可能な少なくとも 1 つの配列モチーフを含む。いくつかの実施形態では、配列モチーフ

50

に近接するヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドである。たとえば、配列モチーフに先行および/または後続する(すなわち続く)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドでありうる。ピリミジンヌクレオチドのいずれか1つ以上は、シトシンヌクレオチドでありうる。

【0147】

他の実施形態では、1つ以上のピリミジンヌクレオチドが、配列モチーフに直接(すなわち連続配列で)先行および/または後続する(すなわち続く)。たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上のピリミジンヌクレオチドの配列が、配列モチーフに直接先行および/または後続しうる。ピリミジンヌクレオチドのいずれか1つ以上は、シトシンヌクレオチドでありうる。

10

【0148】

さらなる実施形態では、配列モチーフの5'側(すなわち上流側)の10個のヌクレオチド内および/または3'側(すなわち下流側)の10個のヌクレオチド内の1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個、またはそれ以上のヌクレオチドは、ピリミジンヌクレオチドである。ピリミジンヌクレオチドのいずれか1つ以上は、シトシンヌクレオチドでありうる。

【0149】

そのほかのさらなる実施形態では、ポリヌクレオチド基質の9個超、10個超、または11個超のヌクレオチドは、シトシンヌクレオチドでありうる。たとえば、基質は、10、11、12、13、14、15個、または15個超のヌクレオチドを含みうるかまたはこれらのヌクレオチドで構成されうるし、これらのヌクレオチドのうち9、10、11個、または11個超は、シトシンヌクレオチドでありうる。

20

【0150】

追加としてまたは他の選択肢として、ポリヌクレオチド基質の5個未満、4個未満、3個未満、または2個未満のヌクレオチドは、グアニンヌクレオチドでありうる。たとえば、基質は、10、11、12、13、14、15個、または15個超のヌクレオチドを含みうるかまたはこれらのヌクレオチドで構成されうるし、これらのヌクレオチドのうち3、2、1、または0個は、グアニンヌクレオチドでありうる。

【0151】

本発明に係るポリヌクレオチド基質の長さに関して、特定の限定条件は存在しない。たとえば、基質は、100、75、50、40、30、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5ヌクレオチド長よりも短くてもよい。たとえば、基質は、5~30、10~15、10および20、10~25、10~30、16~23、16~21、16~18、18~21、18~23、または21~23ヌクレオチド長でありうる。

30

【0152】

本発明に係るポリヌクレオチド基質は、ウォーレス則すなわち $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$ を用いて計算される特異的融解温度( $T_m$ )を有するように設計されうる(Wallace et al., (1979) Nucl. Acids Res. 6(11): 3543-3558を参照されたい)。特定の実施形態では、基質は、MNAザイムにより認識および触媒修飾されうるし、MNAザイムのパートザイム基質アームが結合する塩基の $T_m$ は、約52~約76、約55~約75、約60~約70、約65~約70、約64~68、または64~70でありうる(ウォーレス則を用いて計算した場合)。

40

【0153】

他の実施形態では、基質は、MNAザイムまたはDNAザイムにより認識および触媒修飾されうるし、MNAザイムのパートザイム基質アームが結合する塩基の $T_m$ は、68~90の、66~76、68~76、64~70、70~76、70~75、72~76、52、58、64、66、68、70、72、または76でありうる。

50

## 【 0 1 5 4 】

限定されるものではなく単なる例として、本発明に係るポリヌクレオチド基質は、配列番号 25 ~ 27、29 ~ 30、72 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つ以上で定義される配列を含みうる。特定の実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 25 ~ 27、29 ~ 30、72 ~ 90、または 172 ~ 175 のいずれか 1 つ以上で定義される配列で構成されうる。

## 【 0 1 5 5 】

いくつかの実施形態では、本発明に係るポリヌクレオチド基質は、配列番号 28 により定義される配列を含みうる。他の実施形態では、ポリヌクレオチド基質は、配列番号 28 により定義される配列で構成されうる。

10

## 【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態では、本発明に係るポリヌクレオチド基質は、2 つのオリゴヌクレオチドパートザイムを含む MNA ザイムによる触媒修飾が可能である。ポリヌクレオチド基質およびオリゴヌクレオチドパートザイムの配列は、表 6、8、10、13、16、20、22、および / または 24 に示される 3 つの配列 ( 配列番号により示される ) のいずれかの特異的組合せでありうる。

## 【 0 1 5 7 】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチド基質は、DNA ザイムによる触媒修飾が可能である。ポリヌクレオチド基質および DNA ザイムの配列は、表 15 に示される配列 ( 配列番号により示される ) のいずれかの特異的対でありうる。

20

## 【 0 1 5 8 】

本発明に係るポリヌクレオチド基質は、1 つ以上の置換、たとえば、アナログ、誘導体、修飾または改変された塩基、リボヌクレオチドなど、糖またはリン酸骨格の改変、当業者に周知の種々の欠失、挿入、置換、複製、もしくは他の修飾、またはこれらの任意の組合せを含有しうる。

## 【 0 1 5 9 】

付加または置換の例としては、LNA ホスホロアミダイト、4 - アセチルシチジン、5 - ( カルボキシヒドロキシルメチル ) ウリジン、2' - O - メチルシチジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルチオウリジン、ジヒドロウリジン、2' - O - メチルプソイドウリジン、D - ガラクトシルクエオシン、2' - O - メチルグアノシン、イノシン、N6 - イソペンテニルアデノシン、1 - メチルアデノシン、1 - メチルプソイドウリジン、1 - メチルグアノシン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、2 - メチルアデノシン、2 - メチルグアノシン、3 - メチルシチジン、5 - メチルシチジン、N6 - メチルアデノシン、7 - メチルグアノシン、5 - メチルアミノメチルウリジン、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウリジン、D - マンノシルメチルウリジン、5 - メトキシカルボニルメチルウリジン、5 - メトキシウリジン、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデノシン、N - ( 9 - - リボフラノシル - 2 - メチルチオプリン - 6 - イル ) ( カルバモイル ) トレオニン、N - ( 9 - - リボフラノシルプリン - 6 - イル ) ( N - メチル - カルバモイル ) トレオニン、ウリジン - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウリジン - 5 - オキシ酢酸 ( v )、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、クエオシン、2 - チオシチジン、5 - メチル - 2 - チオウリジン、2 - チオウリジン、4 - チオウリジン、5 - メチルウリジン、N - ( 9 - - D - リボフラノシルプリン - 6 - イル ) ( カルバモイル ) トレオニン、2' - O - メチル - 5 - メチルウリジン、2' - O - メチルウリジン、ワイプトシン、3 - ( 3 - アミノ - 3 - カルボキシプロピル ) ウリジン、D - アラビノシルウリジン、および D - アラビノシルチミジンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

40

## 【 0 1 6 0 】

誘導体の例としては、一体化して産生された ( たとえば組換え手段により ) または合成後に付加された ( たとえば化学的手段により ) 任意の融合分子を含めて、機能的に等価な核酸またはヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。そのような

50

融合体は、RNAまたはDNAが付加された、あるいはポリペプチド（たとえば、ピューロマイシンもしくは他のポリペプチド）、小分子（たとえば、ソラレン）、マイクロ担体もしくはナノ担体、または抗体にコンジュゲートされた、本発明に係るオリゴヌクレオチドを含みうる。

【0161】

アナログの例としては、DNAもしくはRNAの分子もしくは残基に関連付けられる、またはDNAもしくはRNAの残基もしくはそれらのアナログと水素結合を形成可能でありうる（すなわち、DNAもしくはRNAの残基もしくはそれらのアナログにアニールして塩基対を形成可能である）、物理構造を有する化合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ただし、前記化合物が「アナログ」という用語の範囲内に包含されるううえで、そのような結合は、それほど必要とされない。そのようなアナログは、構造的に関連付けられるリボヌクレオチド残基またはデオキシリボヌクレオチド残基と異なる化学的および生物学的性質を有しうる。メチル化、ヨウ素化、臭素化、または、ビオチン化された残基は、アナログの例である。デオキシイノシン、C-5-イミダゾールデオキシウリジン、3-(アミノプロピニル)-7-デアザ-dATP、2'-O-メチルRNA、2'-O-メチルキャップを含めて、ヌクレオチドアナログを含有する活性DNAザイムが記載されてきた。他のアナログもまた、DNAザイムおよびMNAザイムの触媒活性に適合可能でありうる。触媒活性を有する核酸の改変、たとえば、1つの塩基による他の塩基の置換、アナログによる塩基の置換、または糖成分もしくはホスホジエステル骨格の改変は、当業者には容易でありうる。たとえば、改変は、合成中に行いうるか、または合成後に特異的塩基の修飾により行いうる。塩基変化や塩基アナログなどの改変を組み込む触媒核酸の経験的試験により、触媒活性に及ぼす改変配列または特異的アナログを影響の評価することが可能である。塩基A、C、G、T、およびUのアナログは、当技術分野で公知であり、サブセットは、表3に列挙される。

【0162】

【表3】

表3: 例示的ヌクレオチドアナログ

略号	名称
ac4c	4-アセチルシチジン
chm5u	5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウリジン
Cm	2'-O-メチルシチジン
Cmm5s2u	5-カルボキシメチルアミノメチルチオウリジン
D	ジヒドロウリジン
Fm	2'-O-メチルプソイドウリジン
Galq	$\beta$ , D-ガラクトシルクエオシン
Gm	2'-O-メチルグアノシン
I	イノシン
i6a	N6-イソペンテニルアデノシン
m1a	1-メチルアデノシン
m1f	1-メチルプソイドウリジン
m1g	1-メチルグアノシン
M1l	1-メチルイノシン
m22g	2,2-ジメチルグアノシン
m2a	2-メチルアデノシン
m2g	2-メチルグアノシン
m3c	3-メチルシチジン
m5c	5-メチルシチジン
m6a	N6-メチルアデノシン
m7g	7-メチルグアノシン
mam5u	5-メチルアミノメチルウリジン
mam5s2u	5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン
Manq	$\beta$ , D-マンノシルメチルウリジン
mcm5s2u	5-メトキシカルボニルメチルウリジン
Mo5u	5-メトキシウリジン

10

20

30

40

50

【 0 1 6 3 】

【 表 4 】

略号	名称
Ms2i6a	2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン
Ms2t6a	N-((9-β-リボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン
Mt6a	N-((9-β-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチル-カルバモイル)トレオニン
Mv	ウリジン-5-オキシ酢酸メチルエステル
o5u	ウリジン-5-オキシ酢酸 (v)
Osyw	ワイプトキソシン
P	プソイドウリジン
Q	クエオシン
s2c	2-チオシチジン
s2t	5-メチル-2-チオウリジン
s2u	2-チオウリジン
s4u	4-チオウリジン
T	5-メチルウリジン
t6a	N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン
Tm	2'-O-メチル-5-メチルウリジン
Um	2'-O-メチルウリジン
Yw	ワイプトシン
X	3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン, (acp3)u
AraU	β D-アラビノシルウリジン
AraT	β D-アラビノシルチミジン

10

20

【 0 1 6 4 】

本発明に係るポリヌクレオチド基質には、標識核酸、ナノ粒子、マイクロ粒子、タンパク質、抗体、RNA、DNA、核酸アナログ、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、ペプチド核酸、ロックド核酸、ペプチド-核酸キメラ、それらの任意の組合せなどの追加の要素を組み込みうる。ナノ粒子は、金ナノ粒子でありうる。

30

【 0 1 6 5 】

本発明に係るポリヌクレオチド基質は、触媒核酸酵素により触媒修飾されうる。可能性のある触媒修飾の例としては、核酸切断、核酸ライゲーション、核酸リン酸化、核酸キャッピング、アミノ酸アデニル化、補因子合成、RNA重合、鋳型指向重合、RNA-タンパク質コンジュゲーション、アルドール反応、アルコール酸化、アルデヒド還元、プリンおよびピリミジンのヌクレオチド合成、アルキル化、アミド合成、尿素合成、ペプチド結合形成、ペプチジルRNA合成、アシル転移、アミノアシル化、カーボネート加水分解、ホスホロチオエートアルキル化、ポルフィリンメタル化、炭素-炭素結合形成、Pdナノ粒子形成、ピフェニル異性化、エステル結合形成アミド結合形成、DNA脱グリコシル化、チミン二量体光転換、およびホスホロアミデート切断が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 1 6 6 】

特定の用途では、本発明に係るポリヌクレオチド基質の触媒修飾から生じる産物を検出することが望ましいこともある。これは、当技術分野で公知の任意の数の標準的技術を用いて達成可能である。

【 0 1 6 7 】

たとえば、基質は、検出可能部分とクエンチャー部分とを含みうる。この場合、触媒核酸により前記基質が修飾されると、前記検出可能部分により提供される検出可能作用は、増大または低減される。検出可能作用は、蛍光分光法、表面プラズモン共鳴法、質量分析法、NMR法、電子スピン共鳴法、偏光蛍光分光法、円二色性法、免疫アッセイ法、クロ

50

マトグラフィ法、放射測定法、電気化学的方法、測光法、シンチグラフィ法、電子的方法、UV、可視光、もしくは赤外の分光法、酵素法、またはそれらの任意の組合せにより検出されうる。

【0168】

追加としてまたは他の選択肢として、本発明に係るポリヌクレオチド基質の触媒修飾から生じる産物は、サイズ法（たとえば、標準的電気泳動法による）、核酸配列決定法、蛍光共鳴エネルギー移動法、化学発光法、電位差測定法、質量分析法、プラズモン共鳴法、比色法、旋光測定法、フローサイトメトリー法、走査測定法、およびDNA配列決定法、またはそれらの任意の組合せに基づいて検出されうる。

【0169】

本発明に係るポリヌクレオチド基質の触媒修飾から生じる核酸産物は、検出を支援するために、たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの技術を用いて増幅されうる。

【0170】

本発明に係るポリヌクレオチド基質は、酵素により修飾される基質と異なる標的を検出するように設計された触媒核酸酵素（たとえばMNAザイム）により認識および修飾されうる。したがって、本発明に係るポリヌクレオチド基質は、それぞれ異なる標的を認識可能な複数の触媒核酸酵素（たとえば複数のMNAザイム）により認識されて触媒作用を受ける「ジェネリック」基質または「ユニバーサル」基質でありうる。そのような基質の使用は、ユニバーサル基質を認識する触媒核酸酵素を用いて多種多様な標的の検出、同定、または定量を行う個別のアッセイの開発を促進しうる。ユニバーサル基質は、それぞれ独立して、1つ以上の標識で標識される。特定の実施形態では、独立して検出可能な標識を用いて1つ以上のユニバーサル基質を標識することにより、MNAザイムを用いてさまざまな標的を独立してまたは同時に検出することが可能である。たとえば、一連のユニバーサル基質を多重反応に使用して、複数の標的を同時に検出することが可能である。

【0171】

本発明に係るポリヌクレオチド基質は、種々の用途（たとえば、酵素カスケードまたは任意の他のシグナル伝達カスケード）に使用される不溶性または固体の担体に結合、装着、またはテザー連結された状態で、提供されうる。担体は、不溶性材料でありうるか、または基質を保持して反応混合物のバルク中を自由に移動しないようにするマトリックスでありうる。そのような担体は、核酸標的を含めて基質の固定化または局在化を行う当技術分野で公知である。マイクロアッセイに使用するのに便利なビーズさらには反応条件に適合可能な他の材料を含めて、さまざまな形態の多種多様なマトリックス、ポリマーなどから担体を選択することが可能であることは、当業者であればわかるであろう。特定の好ましい実施形態では、担体は、プラスチック材料、たとえば、プラスチックのビーズもしくはウエハまたは特定のアッセイが行われるウェルもしくはチューブのプラスチック材料でありうる。特定の実施形態では、担体は、マイクロ担体またはナノ担体でありうる。触媒核酸（たとえばMNAザイム）により基質が修飾（たとえば切断）された後、修飾基質の一部は、担体に装着された状態を維持し、一方、他方の部分は、遊離されて、装着された状態を維持する部分から離れて、反応混合物のバルク中を移動するように、担体への基質の装着を設計しうる。

【0172】

2. 例示的方法

本発明に係るポリヌクレオチド基質は、基質を認識/修飾する触媒核酸を利用する任意の数の潜在用途に使用されうる。

【0173】

たとえば、基質は、DNAザイム（たとえば、10-23 DNAザイム、8-17 DNAザイム、「7Z81」、「7Z48」、および「7Q10」DNAザイムリガーゼ、「UV1C」チミン二量体光転換DNAザイム、「DAB22」炭素-炭素結合形成DNAザイム、ならびにそれらの誘導体）、リボザイム（たとえば、ハンマーヘッドリボザイム、ホモ二量体リボザイム、ヘテロ二量体リボザイム、およびそれらの誘導体）、および

10

20

30

40

50

/またはMNAザイムを必要とする用途で使用されうる。

【0174】

本発明の特定の実施形態では、基質は、MNAザイムに対する基質として使用されうる。MNAザイムの特徴およびMNAザイムを用いる種々の用途は、PCT国際公開第2007/041774号パンフレット、国際公開第2008/040095号パンフレット、および国際公開第2008/122084号パンフレット、ならびに関連する米国特許出願公開第2007-0231810号明細書、同第2010-0136536号明細書、および同第2011-0143338号明細書(これらの各文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に詳細に記載されている。

【0175】

MNAザイムは、本明細書ではパートザイムとしても参照される2つ以上のオリゴヌクレオチド成分から自己集合可能である。パートザイムオリゴヌクレオチドは、MNAザイム自己集合促進剤の存在下で自己集合してMNAザイムを形成する。したがって、MNAザイムは触媒活性核酸酵素である。いくつかの実施形態では、MNAザイムの存在は、検出可能であり、標的が集合促進剤を含む場合、標的の存在下でのみMNAザイムが形成されるので、標的の存在の指標となる。

【0176】

好ましい実施形態では、MNAザイム構造は、1つ以上のDNAザイムおよび/またはリボザイムをベースとする。より好ましいのは、特定のDNAザイム構造をベースとするMNAザイム構造である。現時点で好ましい構造は、10-23および8-17DNAザイムを含むDNAザイムをベースとする。種々の実施形態では、MNAザイムは、リボヌクレオチド塩基およびデオキシリボヌクレオチド塩基の一方または両方を含む。より好ましい実施形態では、MNAザイム構造は、少なくとも部分的には、DNAザイムの構造をベースとする。他の好ましい実施形態では、MNAザイムは、少なくともいくつかのデオキシリボヌクレオチド塩基またはそのアナログを含む。より好ましい実施形態では、MNAザイムの触媒コアは、1つ以上のデオキシリボヌクレオチド塩基またはそのアナログを含む。さらにより好ましい実施形態では、1つ以上のデオキシリボヌクレオチド塩基またはそのアナログは、基質の触媒作用に関与する。他の実施形態では、触媒コア中の少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド塩基またはそのアナログは、触媒活性を改善する。さらに他の実施形態では、デオキシリボヌクレオチド塩基が存在しない同等のMNAザイムと対比して、測定可能な速度で触媒作用を起こすために、MNAザイムの触媒コア中の少なくとも1つデオキシリボヌクレオチド塩基またはそのアナログに課される厳密な要件が存在する。

【0177】

MNAザイムは、1つ以上の置換、たとえば、アナログ、誘導體、修飾または改変された塩基、リボヌクレオチドなど、糖またはリン酸骨格の改変、当業者に周知の種々の欠失、挿入、置換、複製、もしくは他の修飾、またはこれらの任意の組合せを含有しうる。そのような修飾、置換、欠失、挿入などは、分子が触媒活性を維持するように、センサーアームおよび/または基質アームおよび/または触媒コア部分で行いうる。基質または集合促進剤に結合するアームに対する置換および修飾は、十分に許容されうるし、實際上、さまざまな基質/集合促進剤に対して分子の調整を可能にする基礎となる。たとえば、センサーアームの修飾は、さまざまな集合促進剤に対する調整を可能にするであろう。一方、基質アームの修飾は、さまざまな基質に対する調整を可能にするであろう。

【0178】

MNAザイムは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか一方さらには両方を含みうる。少なくとも1つ、より好ましくはすべてデオキシリボヌクレオチド成分オリゴヌクレオチドを含むMNAザイムが好ましい。同様に好ましいのは、MNAザイムの触媒コア内に少なくとも1つのデオキシリボヌクレオチド塩基またはそのアナログを含むMNAザイムである。さらにより好ましいのは、そのような塩基が触媒活性に必要とされる実施形態である。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 9 】

また、MNAザイムの集合および脱集合は、マイクロ環境を変化させることにより制御されうる。そのような変化の例としては、温度、二価カチオンのタイプおよび濃度、塩濃度、pH、添加剤、ならびに活性MNAザイムの集合および/または活性に不可欠な重要成分の存在または不在が挙げられるが、これらに限定されるものではない。したがって、脱集合または部分集合されたMNAザイムは、マイクロ環境を変調することにより集合促進剤の存在下で触媒活性MNAザイムに集合するのを阻止しうるので、「分子スイッチ」を提供しうる。

## 【 0 1 8 0 】

MNAザイム構造の基本的な例を図1に示す。示された構造は、パートザイムAとパートザイムBとを含み、そのセンサーアーム(i)は、MNAザイム集合促進剤分子、たとえば、標的のDNAまたはRNAと塩基対合している。パートザイムAおよびBは、集合促進剤と相互作用することにより、部分触媒コア(iii)をごく近接した状態にして、単一の触媒コアを形成している。MNAザイムの基質アーム(ii)は、ここではレポーター基質として示された基質と相互作用している。したがって、MNAザイムは、自己集合しており、このプロセスは、MNAザイム集合促進剤分子の存在により促進される。集合促進剤の不在下では、MNAザイムは形成されない。本発明に係るポリヌクレオチド基質の修飾(この場合は切断)は、MNAザイムの触媒コアによりMNAザイム修飾部位(たとえば、x印(X)により表された基質内の切断部位)で触媒される。この特定の実施形態のポリヌクレオチド基質は、検出可能シグナルたとえばフルオロフォアFを有する検出可能部分と、クエンチャーQの作用により検出可能シグナルFに対してクエンチング作用を有するクエンチャー部分Qと、を含む。MNAザイム切断部位が切断されると、所望により容易に検出および定量が可能な検出可能シグナル(ここでは蛍光)が実質的に増加する。

## 【 0 1 8 1 】

図1はさらに、いくつかの実施形態では集合促進剤を含む標的を検出するためにMNAザイムを使用する基本的な方法の例を示すものとして理解することが可能である。より特定には、それぞれ基質アーム部分(ii)と触媒コア部分(iii)とセンサーアーム部分(i)とを含むパートザイムAおよびパートザイムBが図1に示される。標的の存在下では、パートザイムAおよびパートザイムBのセンサーアーム部分は、ハイブリダイズし始めて、標的たとえばDNA配列またはRNA配列の相補的部分と塩基対合することが可能である。このようにして標的に接触すると、MNAザイムは、自己集合して、基質アームにより結合された基質を修飾可能な触媒コアを形成する。好ましくは、MNAザイムの存在は、その触媒活性の検出または測定により検出される。このように集合されたMNAザイムの基質アームは、基質アーム上の相補的配列と基質との相互作用により本発明に係るポリヌクレオチド基質に結合可能である。基質がそのように基質アームに結合すると、触媒コアは、基質の修飾(たとえば切断)を促進することが可能であり、その結果、直接的または間接的に測定または検出を行うことが可能になる。

## 【 0 1 8 2 】

MNAザイム触媒の活性前、活性中、または活性後、本明細書に記載の方法が標的の増幅を必要としうることは、当業者であればわかるであろう。そのような標的増幅は、検出、同定、または定量される対象となる標的の量が、他の方法では検出できない可能性のあるシグナルを提供するような量である場合、本発明の実施形態で特定の用途に役立つ。そのような増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、ループ媒介等温増幅(LAMP)、ローリングサークル増幅(RCA)、転写媒介増幅(TMA)、自己保持配列複製(3SR)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)の1つ以上を含みうる。

## 【 0 1 8 3 】

図2は、MNAザイムを用いた標的検出方法の例示的用途を提供する。戦略1は、DNA、RNA、およびタンパク質を含む標的の検出に適合化されたMNAザイムを例示する

。以上に記載したように（図1の説明を参照されたい）、標的および基質の両方に対する認識配列を有する2つの個別のオリゴヌクレオチドを含むMNAザイムは、オリゴヌクレオチドが標的を認識してそれに結合した時に形成される。基質たとえばレポーター基質は、MNAザイムの触媒作用により修飾されて、直接（戦略1）、標的増幅中もしくは標的増幅後（戦略2）、またはシグナルカスケード（戦略3）のいずれかで、検出可能シグナルの発生を引き起こす。いくつかの実施形態では、標的およびシグナルの増幅は両方とも、同時にまたは逐次的に行われる。

#### 【0184】

図2に示される戦略2は、核酸標的の*in vitro*での増幅中または増幅後にアンプリコンの蓄積をモニターするように適合化されたMNAザイムの使用を例示している。核酸配列の*in vitro*増幅技術は、当技術分野で公知である。こうしたものとしては、DNAポリメラーゼにより媒介される技術、たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）（たとえば、米国特許第4,683,202号明細書、米国特許第4,683,195号明細書、米国特許第4,800,159号明細書、米国特許第4,965,188号明細書、米国特許第5,176,995号明細書を参照されたい）、鎖置換増幅（「SDA」）、ローリングサークル増幅（「RCA」）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、およびループ媒介等温増幅（「LAMP」）が挙げられる。他の標的増幅技術は、RNAポリメラーゼにより媒介されるものであり、たとえば、転写媒介増幅（「TMA」）、自己保持配列複製（「3SR」）、核酸配列複製ベース増幅（「NASBA」）である。PCR、RT-PCR、SDA、RCA、およびLAMPにより産生される増幅産物（「アンプリコン」）は、DNAを含み、一方、TMA、3SR、およびNASBAでは、RNAアンプリコンが産生される。

10

20

#### 【0185】

図2に示される戦略2をさらに参照して、本発明に係るポリヌクレオチド基質を認識および修飾するMNAザイムは、たとえば以上に挙げたPCR、RT-PCR、SDA、RCA、LAMP、TMA、3SR、およびNASBAをはじめとする標的増幅方法と組み合わせて、使用可能である。非対称プライマー比または対称プライマー比のいずれかを用いてPCRにより産生されたアンプリコンの蓄積は、MNAザイムを用いてモニター可能である。本明細書の実施例1、2、4、6、8、および9では、本発明に係る種々のポリヌクレオチド基質を触媒修飾するMNAザイムを利用してリアルタイムでPCRアンプリコンが検出されることを実証する。

30

#### 【0186】

再度、図2に示される戦略2を参照して、標的核酸は、その核酸（すなわちDNAまたはRNA）を増幅するための手順に従って増幅されうる。好ましくは、*in vitro*増幅の標準的方法が使用される。増幅中に産生されるアンプリコンは、MNAザイムに対する標的集合促進剤として役立つ。MNAザイムによる本発明に係るポリヌクレオチド基質の修飾により検出可能になるMNAザイム活性は、標的の存在の指標となる。標的核酸の増幅とMNAザイムの集合および触媒活性との両方を可能にする条件下で単一の槽内でこの性質のアッセイを実施可能であることは、当業者であればわかるであろう。追加としてまたは他の選択肢として、増幅反応終了時または増幅反応中にサンプルを取り出すことにより、標的核酸増幅に続いてまたは全体を通じた時間点で、実施可能である。

40

#### 【0187】

図2の戦略3は、シグナルカスケードの使用によりシグナルの増幅を開始するためにMNAザイムを使用する方法の概要を示している。本明細書の実施例3では、シグナルカスケードを開始するために使用可能な、本発明に係る種々のポリヌクレオチド基質を触媒修飾するMNAザイムを利用して、標的の等温直接検出が行われることを実証する。

#### 【0188】

標的増幅と触媒核酸活性とを組み合わせた方法またはプロトコルが、特異的反應条件（たとえば、本明細書の実施例1、2、4、6、8、および9に記載のもの）を必要とすることは、当業者であればわかるであろう。好ましくは、反應条件は、ポリメラーゼ活性

50

(増幅用)および基質の触媒核酸修飾(検出用)の両方に適合可能である。PCR中などに高温で同時に触媒活性およびポリメラーゼ活性を得るための条件を決定するプロトコルは、DNAザイムに関して記載されてきた。DNAザイムアーム長、緩衝液、温度、二価イオン濃度、および添加剤作用をはじめとする因子の影響は、当技術分野で公知である。DNA酵素は、*in vitro*増幅戦略と組み合わせて使用するのに適している。たとえば、それは、増幅中に高温への暴露により不可逆的に変性されない。

#### 【0189】

特定の実施形態では、MNAザイムによる認識および修飾が可能な本発明に係るポリヌクレオチド基質は、不溶性または固体の担体に結合、装着、またはテザー連結される。たとえば、図3のパネル(i)を参照して、MNAザイムと、担体に固定された本発明に係るポリヌクレオチド基質と、を用いて標的を検出する例示的方法が示されている。この実施形態では、基質は、好ましくは、検出可能シグナルたとえばフルオロフォアを含む検出可能部分と、検出可能シグナルを減少または排除するクエンチャー部分と、を有するとともに、たとえば基質が修飾されるまで(たとえば切断により)、基質の検出可能部分およびクエンチャー部分とごく近接した状態を維持する、基質である。基質は、担体に装着される。好ましくは、担体は、不溶性材料であるか、または基質を保持して反応混合物のバルク中を自由に移動しないようにするマトリックスである。MNAザイムにより基質が修飾(たとえば切断)された後、検出可能部分またはクエンチャー部分の一方(ただし、両方ではない)は、担体に装着された状態を維持し、他方は、遊離されて、装着された状態を維持する部分から離れて、反応混合物のバルク中を移動するように、担体への基質の装着を設計しうる。したがって、切断の実施例では、クエンチャー部分および検出可能部分が切断後に分離されるにつれて、検出可能シグナルは、大幅に増大する。図3のパネル(i)に示される実施形態では、フルオロフォアを含有する検出可能部分は、切断後、装着された状態を維持する。これは、担体上へのシグナルの局在化を可能にするという利点を有するが、特定の場合には、フルオロフォア/sは、溶解状態で放出される。たとえば、ライゲーションが行われるさらなる実施形態では、クエンチャーは、フルオロフォアにライゲートされて、検出可能シグナルを低減しうる。

#### 【0190】

特定の実施形態では、基質アレイを提供するために、複数のユニバーサル基質を固体担体中の異なる位置にテザー連結しうる。図3のパネル(ii)を参照して、2つの基質を固体表面上の規定位置に装着しうる。各ユニバーサル基質は、特異的MNAザイム集合促進剤分子(たとえば、標的1または標的2)の存在下で形成されたMNAザイムによってのみ切断可能であり、シグナルは、表面上に基質を配置することにより局在化可能であるので(位置1または位置2)、さまざまな集合促進剤の特異的検出が可能になる。そのような実施形態では、テザー連結ユニバーサル基質はすべて、同一のフルオロフォアで標識される。他の実施形態では、テザー連結ユニバーサル基質は、さまざまなフルオロフォアで標識される。図3(ii)に示される戦略は、固体表面上の規定位置に装着された多種多様なユニバーサル基質を有するユニバーサル基質アレイを形成するように拡張可能である。そのような実施形態では、アレイに使用するために利用可能なユニバーサル基質の数を増大させることにより、より複雑なアレイの形成を可能にするという利点を提供しうる。ユニバーサル基質のそのようなユニバーサルアレイは、標的アナライトの高多重化分析に使用するのに有用でありうる。本発明は、触媒活性機能を拡張しうるという特徴を有する追加のユニバーサル基質を提供する。これは、MNAザイムを用いて一層複雑な分析を行えるように能力を改善するのに有用と思われる。

#### 【0191】

特定の実施形態では、本発明に係るポリヌクレオチド基質は、MNAザイムにより認識および修飾されて、第2の異なるMNAザイム用の集合促進剤、集合促進剤成分、またはパートザイムを提供しうる。

#### 【0192】

図4を参照して、開始MNAザイム(Mt)は、標的(T)の存在下で形成される。

開始MNAザイム(Mt)は、本発明に係る(第1の)ポリヌクレオチド基質(S1)を切断して、第1の集合促進剤成分(S1f)を形成し、これは、第1のカスケードMNAザイム(カスケードMNAザイムMc1)の形成を誘導する。この例では、第1のカスケードMNAザイム(Mc1)は、2つのパートザイムと、F1、F2、およびS1fと称される3つの集合促進剤成分と、を含む。Mc1は、追加の基質(S2)を切断可能であるので、追加の集合促進剤成分(S2f)を遊離し、これは、第2のカスケードMNAザイム(カスケードMNAザイムMc2)の形成を誘導する。この例では、第2のカスケードMNAザイム(Mc2)は、2つのパートザイムと、F3、F4、およびS2fと称される3つの集合促進剤成分と、を含む。次いで、Mc2は、第1の基質(S1)をさらに切断可能であるので、第1の集合促進剤成分(S1f)がさらに形成される。これは、さらなる第1のカスケードMNAザイム(Mc1)の形成をもたらすことにより、増幅カスケードを形成する。活性MNAザイム集合を促進するために3つの集合促進剤成分が必要とされることが図4に示されていることは、当業者であればわかるであろう。多かれ少なかれ、類似のスキーマで集合促進剤成分を利用可能である。

10

#### 【0193】

標的の検出、同定、および/もしくは定量、ならびに/または触媒核酸(たとえば、MNAザイムまたはDNAザイム)による本発明に係るポリヌクレオチド基質の認識および触媒修飾を最適化するために、さまざまな実験パラメータを用いて本明細書に記載の方法を最適化しうることが、当業者であれば容易に理解されよう。最適化される特定の実験パラメータおよびそのような最適化のレベルは、利用される特定の方法ならびに関与する特定の標的および/または基質に依存するであろう。そのようなパラメータとしては、時間、温度、塩、洗浄剤、カチオン、および限定されるものではないがジメチルスルホキシド(DMSO)をはじめとする他の試薬の濃度、ならびに核酸の長さ、相補性、GC含有率、および融点(Tm)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、たとえば、配列変異の検出および/またはメチル化DNAの検出を必要とする方法では、それぞれ配列変異またはメチル化ヌクレオチドを含むまたは含まない標的核酸へのMNAザイム成分核酸の結合を識別するために、好ましくは、本方法が行われる温度を含めて、実験パラメータを最適化しうることが、当業者であれば容易に理解されよう。そのような方法が行われる温度は、約20~約96、約20~約75、20~約60、または約20~約55の範囲内でありうる。

30

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、MNAザイムおよびDNAザイムの使用方法を実施するための最適化反応を本明細書に提供する。そのような最適化反応では、触媒活性は、非最適化反応によりも最大10、20、または30%増大される。より好ましい反応条件では、触媒活性は、少なくとも35%または40%、好ましくは最大50%改善される。さらにより好ましい実施形態では、最適化反応は、触媒活性を50%超、最大66%、75%、さらには100%増大させる。さらにより好ましい実施形態では、完全最適化反応方法は、100、200、さらには300%以上の触媒活性の増加を提供するであろう。他の好ましい反応条件では、非最適化反応条件で実施された方法よりも触媒活性を最大1,000%以上改善することが可能である。本明細書に提供される方法の最適化にきわめて好ましい反応条件は、特定の二価カチオンの組込みである。ほとんどの核酸酵素の触媒活性は、二価カチオンの濃度により濃度依存的な影響を受けうる。好ましい最適化反応は、Ba<sup>2+</sup>、Sr<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、およびPb<sup>2+</sup>の1つ以上に対して、最適化される。

40

#### 【0196】

いくつかの実施形態では、核酸酵素(たとえば、MNAザイムまたはDNAザイム)を用いたアッセイで本発明に係るポリヌクレオチド基質を使用することにより、同一の条件下で同一のアッセイで公知の基質を用いて得られる検出可能作用を上回って、酵素による基質の触媒修飾から生じる検出可能作用を増大させうる(たとえば、蛍光シグナルの増加

50

または減少)。たとえば、検出可能作用は、公知の基質と比較して、2%超、3%超、4%超、5%超、6%超、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、または50%超増大されうる。

特定の実施形態では、検出可能作用は、蛍光シグナルである。

【0197】

いくつかの実施形態では、本発明に係る方法は、2つのオリゴヌクレオチドパートザイムを含むMNAザイムと組み合わせて、MNAザイムに対するポリヌクレオチド基質を使用することを必要とする。ポリヌクレオチド基質およびオリゴヌクレオチドパートザイムの配列は、表6、8、10、13、16、20、22、および/または24に示される3つの配列(配列番号により示される)のいずれかの特異的組合せでありうる。

10

【0198】

いくつかの実施形態では、本発明に係る方法は、DNAザイムと組み合わせてポリヌクレオチド基質を使用することを必要とする。ポリヌクレオチド基質およびDNAザイムの配列は、表15に示される配列(配列番号により示される)のいずれかの特異的対でありうる。

【0199】

### 3. キット

また、本発明に係る1つ以上のポリヌクレオチド基質を含むキットも、本明細書に提供される。

【0200】

キットは、本明細書に開示される方法を実施するための追加の試薬を含みうる。たとえば、キットは、基質の認識および修飾が可能な1つ以上の触媒核酸を含みうる。好適な触媒核酸の例としては、DNAザイム(たとえば、10-23 DNAザイム、8-17 DNAザイム、「7Z81」、「7Z48」および「7Q10」DNAザイムリガーゼ、「UV1C」チミン二量体光転換DNAザイム、「DAB22」炭素-炭素結合形成DNAザイム、ならびにそれらの誘導体)、リボザイム(たとえば、ハンマーヘッドリボザイム、ホモ二量体リボザイム、ヘテロ二量体リボザイム、およびそれらの誘導体)、およびMNAザイムが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0201】

本発明に係るキットは、「区画化」キットでありうる。区画化キットは、個別の容器、たとえば、小さいガラス容器、プラスチック製容器、またはプラスチックもしくは紙のストリップなどに試薬が提供される任意のキットを包含する。そのような容器は、サンプルおよび試薬の相互汚染を回避しつつ、一方の区画から他方の区画への試薬の効率的な移動を可能しうるし、かつ/または一方の区画から他方の区画への各容器の作用剤または溶液の定量的添加を可能にしうる。また、そのようなキットは、試験されるサンプルを収容する容器、アッセイで使用される試薬を含有する容器、洗浄試薬を含有する容器、および検出試薬を含有する容器を含みうる。

30

【0202】

特定の実施形態では、キットは、本発明に係る1つ以上のポリヌクレオチド基質と、標的の存在下でポリヌクレオチド基質の認識および触媒修飾が可能なMNAザイムを集合するように設計された複数のオリゴヌクレオチドパートザイムと、を含む。標的は、オリゴヌクレオチドパートザイムの集合を引き起こす集合促進剤として作用して、ポリヌクレオチド基質の認識および修飾が可能な触媒活性MNAザイムをもたらしうる。

40

【0203】

いくつかの実施形態では、キットは、本発明に係るポリヌクレオチド基質と、2つのオリゴヌクレオチドパートザイムを含むMNAザイムと、を含む。ポリヌクレオチド基質およびオリゴヌクレオチドパートザイムの配列は、表6、8、10、13、16、20、22、および/または24に示される3つの配列(配列番号により示される)のいずれかの特異的組合せでありうる。

【0204】

50

他の実施形態では、キットは、本発明に係るポリヌクレオチド基質とDNAザイムとを含む。ポリヌクレオチド基質およびDNAザイムの配列は、表15に示される配列（配列番号により示される）のいずれかの特異的対でありうる。

【0205】

個々のオリゴヌクレオチドパートザイムは、同一の容器内に存在しうる。他の選択肢として、個々のオリゴヌクレオチドパートザイムは、個別の容器内に存在しうる。カスケード反応の一部として成分を産生しうるので、必ずしも、所与の方法で使用することが意図されるすべてのMNAザイムに対してすべての成分をキットに提供する必要があるとは限らないことは、理解されよう。

【0206】

また、他の実施形態では、追加の触媒核酸、たとえば、切断活性またはリガーゼ活性のいずれかを有する触媒核酸に対する成分は、本発明に係るキットの一部を形成しうる。さらに他の実施形態では、本発明のキットは、DNAザイムまたはその成分を含みうる。

【0207】

本発明に係るキットは、所望の方法を行うためにキット成分を使用するための説明書を含みうる。

【0208】

本発明に係るキットおよび方法は、限定されるものではないが、リアルタイムPCR機を含めて、自動分析装置および系と組み合わせて使用可能である。

【0209】

本発明に係るキットは、たとえば、オリゴヌクレオチドプライマー、緩衝液、マグネシウムイオン、ポリメラーゼ酵素などを含めて、標的増幅反応（たとえばPCR）を行なうための追加の試薬を含みうる。

【0210】

本発明に係るキットは、1つ以上の固体担体と本発明に係る1つ以上のポリヌクレオチド基質とを含む1つ以上の集合体を含みうる。1つ以上の固体担体を1つ以上のポリヌクレオチド基質に結合しうる。特定の実施形態では、キットは、複数の異なる固体担体を含む1つ以上の集合体を含みうる。複数の異なる固体担体を本発明に係る複数の異なるポリヌクレオチド基質に結合させうる。

【実施例】

【0211】

以下の実施例では、ユニバーサル基質を効率的に切断する10-23DNAザイムベースのMNAザイムおよび10-23DNAザイムの能力を試験した。試験したユニバーサル基質は、当技術分野ですでに公知のものいくつか（表4）、および本発明の設計ガイドラインのすべてまたはサブセットのいずれかに従って設計された新規な基質（表5）を含んでいた。これらの実施例では、一連の条件での効率的な切断により示唆されるように、本発明の設計ガイドラインのすべてまたはサブセットに従って設計されたユニバーサル基質のロバスト性を実証する。

【0212】

10

20

30

【表 5】

表 4: 実施例で使用したすでに公知のユニバーサル基質

名称	配列*
Sub2 (配列番号 21)	AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA
Sub3 (配列番号 22)	CAGCACAACCguCACCAACCG
Sub6 (配列番号 23)	ATCACGCCTCguTCCTCCCAG
Sub7 (配列番号 24)	TTAACATGGCACguTGGCTGTGATA
Sub4 (配列番号 171)	CATGGCGCACguTGGGAGAAGTA

\*大文字は DNA を表し、小文字は RNA を表す。

【 0 2 1 3 】

【表 6】

表 5: 実施例で使用した本発明に基づく改善されたユニバーサル基質

名称	配列*
Sub44 (配列番号 25)	CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA
Sub45 (配列番号 26)	ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA
Sub46 (配列番号 27)	ACCGCACCTguCCCCAGCTC
Sub49 (配列番号 28)	TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA
Sub55 (配列番号 29)	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
Sub59 (配列番号 33)	CCTCCTCCCTguCCCTCCTCCT
Sub60 (配列番号 30)	GCCAACCACguCCAACACGAC
Sub60T (配列番号 72)	TGCCAACCACguCCAACACGAC
Sub61 (配列番号 73)	CTCGACCCCGuCTCCACGCCA
Sub65 (配列番号 74)	TCTCGACCTCguCTCCACGCCA
Sub72 (配列番号 75)	ATCAGCCTCguCTCCTCCAG
Sub73 (配列番号 76)	TGGCGTCCCCguCCCCTCGTG
Sub74 (配列番号 77)	ATCACTCCCCguCCCCTCCAG
Sub75 (配列番号 78)	TGACCCTCCTCguCTCCCCACTA
Sub77 (配列番号 79)	CTCCTCCCTCguCCCTCCTCCT
Sub79 (配列番号 80)	TCCTTCCCCguCCCCTTCAACC
Sub80 (配列番号 81)	AACCGCCCTCguCCCGTGAACC
Sub82 (配列番号 82)	CTCCTCCCTCguCCCTCGTCCA
Sub83 (配列番号 83)	TCCGCTCCCCguCCCCTGCAAC
Sub84 (配列番号 84)	ACCGCACCTCguCTCCTCCAG
Sub85 (配列番号 85)	ACCGCACCTCguCCCCTCCAG
Sub86 (配列番号 86)	ATCAGCCTCguCCCCAGCTC
Sub87 (配列番号 87)	ATCACTCCCCguCCCCAGCTC
Sub88 (配列番号 88)	CTCCTCCCTCguCCCCAGCTC
Sub89 (配列番号 89)	ACCGCACCTCguCCCTCCTCCT
Sub90 (配列番号 90)	CTCGACCCTCguCCCTCGTCCA
Sub55(16) (配列番号 172)	GCACCTCguCCCCAGC
Sub55(18) (配列番号 173)	CGCACCTCguCCCCAGCT
Sub55(23A) (配列番号 174)	AACCGCACCTCguCCCCAGCTCA
Sub55(23C) (配列番号 175)	CACCGCACCTCguCCCCAGCTCC

\*大文字は DNA を表し、小文字は RNA を表す。

【 0 2 1 4 】

実施例 1 : 52 のアニーリング温度でのリアルタイム定量 PCR ( q PCR ) における MNA ザイムと組み合わせたユニバーサル基質の使用。

MNA ザイム q PCR として参照される PCR などの *in vitro* 標的増幅方法を用いてリアルタイムで標的核酸の増幅をモニターするために、MNA ザイムを使用することが可

10

20

30

40

50

能である。さらに、フルオロフォアとクエンチャーとの対で標識されたMNAザイム基質を用いたqPCR中のリアルタイムモニタリングでは、反応の対数期にわたり任意のレベルの蛍光の閾値ラインを配置して、Ct(サイクル閾値)として知られる値を生成可能な曲線が作成される。より低いCt値を生じる反応は、そのような反応がより速く閾値サイクルに達するので、特異的基質のより効率的な切断の指標となる。この実施例では、増幅および検出は、PCR増幅およびMNAザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで実施される。発生されたCt値により測定される、閾値蛍光に達するのに要する時間量は、ユニバーサル基質の配列による影響を受けることもある。

#### 【0215】

この実施例では、シリーズ1(Sub 2、Sub 3、Sub 6、およびSub 7、表4参照)のすでに公知のユニバーサル基質と、本発明の対象であるシリーズ2(Sub 44、Sub 45、Sub 46、Sub 49、Sub 55、およびSub 60、表5参照)の新しい改善されたユニバーサル基質と、を比較して、シリーズ2の基質が、シリーズ1の基質に対して、リアルタイムPCRで同一の、より高い、またはより低い活性レベルを有するかを決定する。リアルタイムPCR中に個々の基質を含有する各反応で得られたCtにより、活性レベルを決定した。

#### 【0216】

##### 1.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

すでに公知のユニバーサル基質(表4)および新規なユニバーサル基質(表5)の切断効率をリアルタイムで測定すべく行った実験では、パートザイムオリゴヌクレオチドAおよびBはすべて、ヒトRPLPO遺伝子の同一の配列に相補的なセンサーアームを用いて設計した。AおよびBのパートザイムの配列は、以下では5' 3'方向に列挙されている。下線付き塩基は、それらのマッチ基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号1 パートザイムA RPLPOA / 2 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G A G G A A A C C T  
T

配列番号2 パートザイムB RPLPOB / 2 - P :

T G C C C A G G G A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T T C

配列番号3 パートザイムA RPLPOA / 3 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G G T T G T G C T G

配列番号4 パートザイムB RPLPOB / 3 - P :

C G G T T G G T G A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T T C

配列番号5 パートザイムA RPLPOA / 6 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G A G G C G T G A T

配列番号6 パートザイムB RPLPOB / 6 - P :

C T G G G A G G A A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T T C

配列番号7 パートザイムA RPLPOA / 7 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A A G T G C C A T G T T

A A

配列番号8 パートザイムB RPLPOB / 7 - P :

T A T C A C A G C C A A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T

T C

配列番号9 パートザイムA RPLPOA / 44 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G A G G A G A C C T

G

配列番号10 パートザイムB RPLPOB / 44 - P :

T C A C T A T A G G G A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T

T C

配列番号11 パートザイムA RPLPOA / 45 - P :

10

20

30

40

50

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G G G A C C C G T

配列番号12 パートザイムB RPLPOB / 45 - P : :

T T C C A A A G G A G A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T

T C

配列番号13 パートザイムA RPLPOA / 46 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A A G G T G C G G T

配列番号14 パートザイムB RPLPOB / 46 - P : :

G A G C T G G G A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T T C

配列番号15 パートザイムA RPLPOA / 49 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G A G C C A A G T T

10

T A

配列番号16 パートザイムA RPLPOA / 55 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G A G G T G C G G T

配列番号17 パートザイムA RPLPOA / 60 - P :

C A A A C G A G T C C T G G C C T T G T C T A C A A C G A G T G G T T G G C

配列番号18 パートザイムB RPLPOB / 60 - P : :

G T C G T G T T G G A G G C T A G C T G T G G A G A C G G A T T A C A C C T T

C

【0217】

### 1.2. レポーター基質

20

この実施例で試験したレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。本実施例では、Sub 60以外の基質は、5'末端を6-FAM部分で、3'末端をクエンチャー部分で、末端標識した。クエンチャー分子は、Black Hole Quencher 1 (以下の基質名では「B」により表される)またはIowa Black (登録商標)FQ (以下の基質名では「IB」により表される)のいずれかであった。Sub 60は、5'末端をクエンチャー部分で、3'末端をFAM部分で、末端標識した(FAM蛍光をクエンチすることが知られている「G」である5'末端塩基に基づく)。基質の切断は、450~490nmの励起(CFX96(BioRad)に基づくFAM励起波長領域)を用いて510~530nm(CFX96(BioRad)に基づくFAM発光波長範囲)でモニター

30

配列番号21 Sub 2 - FIB :

A A G G T T T C C T C g u C C C T G G G C A

配列番号22 Sub 3 - FB :

C A G C A C A A C C g u C A C C A A C C G

配列番号23 Sub 6 - FIB :

A T C A C G C C T C g u T C C T C C C A G

配列番号24 Sub 7 - FB :

T T A A C A T G G C A C g u T G G C T G T G A T A

配列番号25 Sub 44 - FIB :

C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A

配列番号26 Sub 45 - FIB :

A C G G G T C C C g u C T C C T T T G G A A

配列番号27 Sub 46 - FIB :

A C C G C A C C T g u C C C C A G C T C

配列番号28 Sub 49 - FB :

T A A A C T T G G C T C g u T G G C T G T G A T A

配列番号29 Sub 55 - FIB :

A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C

配列番号30 Sub 60 - IBF :

40

50

G C C A A C C A C g u C C A A C A C G A C

【0218】

1.3. RPLPO増幅用のPCRプライマー

この実施例のための標的PCRアンプリコンは、以下に列挙したオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用いて、ヒトゲノムDNAの*in vitro* PCR増幅により、産生した。プライマー配列は、5' 3'方向に書かれている。

配列番号31 フォワードプライマー 5RPLPO:

C C C A T T C T A T C A T C A A C G G G T A

配列番号32 リバースプライマー 3RPLPO:

G C C C A C T G T G G T C C T G G T G

10

【0219】

1.4. 標的配列

この実施例のための標的配列は、K562細胞から抽出したヒトゲノムDNAの*in vitro* PCR増幅により産生したRPLPO遺伝子のPCRアンプリコンであった。

【0220】

1.5. 反応成分: 標的配列の増幅および検出

標的配列のリアルタイムPCR増幅および検出は、25 $\mu$ Lの全反応空間内で行った。反応はすべて、CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)で行った。サイクルパラメーターは、95 $^{\circ}$ Cで10分間、95 $^{\circ}$ Cで15秒間と60 $^{\circ}$ Cで30秒間とを10サイクル(後者の温度に対しては1サイクルあたり-1)、95 $^{\circ}$ Cで15秒間と52 $^{\circ}$ Cで60秒間とを40サイクル(52 $^{\circ}$ Cの工程でデータを収集した)であった。表6のように、基質およびその関連パートザイムを用いて反応を構成した。反応条件の各セットは、二重試験方式で行われ、80nMの5RPLPOおよび400nMの3RPLPO、各200nMのパートザイムAおよびパートザイムB、200nMの基質、8mMのMgCl<sub>2</sub>、200 $\mu$ Mの各dNTP、10単位のRibosafe RNアーゼ阻害剤(Bioline)、1 $\times$ Immobuffer(Bioline)、2単位のImmolase(Bioline)、およびゲノムDNA鋳型(50ng)または無DNA標的(ヌクレアーゼフリーH<sub>2</sub>O(NF-H<sub>2</sub>O))のいずれかを含む。個別の反応を構成して、そのマッチパートザイムにより各基質を試験した。同一のPCRプライマーをすべての反応に使用した。また、パートザイムはすべて、同一の標的感知部分を有していた。したがって、反応効率に差があれば、基質の切断効率の差に帰属しうるであろう。

20

30

【0221】

## 【表 7】

表 6: 各ユニバーサル基質に対して使用したパートザイムの組合せ

基質	パートザイム A	パートザイム B
Sub2 配列番号 21	RPLPOA/2-P 配列番号 1	RPLPOB/2-P 配列番号 2
Sub3 配列番号 22	RPLPOA/3-P 配列番号 3	RPLPOB/3-P 配列番号 4
Sub6 配列番号 23	RPLPOA/6-P 配列番号 5	RPLPOB/6-P 配列番号 6
Sub7 配列番号 24	RPLPOA/7-P 配列番号 7	RPLPOB/7-P 配列番号 8
Sub44 配列番号 25	RPLPOA/44 配列番号 9	RPLPOB/44-P 配列番号 10
Sub45 配列番号 26	RPLPOA/45-P 配列番号 11	RPLPOB/45-P 配列番号 12
Sub46 配列番号 27	RPLPOA/46-P 配列番号 13	RPLPOB/46-P 配列番号 14
Sub49 配列番号 28	RPLPOA/49-P 配列番号 15	RPLPOB/7-P 配列番号 8
Sub55 配列番号 29	RPLPOA/55-P 配列番号 16	RPLPOB/46-P 配列番号 14
Sub60 配列番号 30	RPLPOA/60-P 配列番号 17	RPLPOB/60-P 配列番号 18

10

20

## 【0222】

1.6. 結果： 標的の増幅およびレポーター基質の切断

ヒトゲノムDNAを含有するそれぞれ異なる基質の各MNAザイムqPCR反応では、ヒトゲノムDNAからのRPLPOのリアルタイム検出で経時的に蛍光の増加を示した。すべての基質で、無DNA標的対照の蛍光は、DNA標的含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性MNAザイムの標的依存集合の後でユニバーサル基質の1つが切断されたことに起因することが実証される。

30

## 【0223】

シリーズ1および2の基質はすべて、表7に示されているように、閾値を通過してCt値を生成した。シリーズ1の基質は、16.9(Sub6)~18.4(Sub3およびSub7)の範囲内のCt値を有し、シリーズ2の基質は、17.1(Sub55)~19.2(Sub45)の範囲内のCt値を有していた。このことから、シリーズ2の基質は、きわめて活性であり、試験した反応条件下でシリーズ1の基質と同等であることが示唆される。これらの結果から、平均して、最大の効率(すなわち最小のCt)で切断された基質は、基質中のリボヌクレオチドを取り囲む8個の塩基(表7の下線部)中により多くのピリミジンを含むものであったことが実証される。

40

## 【0224】

【表 8】

表 7: ユニバーサル基質の切断効率 (Ct に基づいて切断効率の順に列挙した)

名称	配列 <sup>^</sup>	リボヌクレオチドを取り囲む 8 個の塩基中のピリミジン数	Tm*	Ct
Sub6	ATCACGCCTC <u>guTCCTCCCA</u> G 配列番号 23	8	64	16.9
Sub2	AAGGTTTCCTC <u>guCCCTGGG</u> CA 配列番号 21	8	66	17.0
Sub55	ACCGCACCTC <u>guCCCCAGCT</u> C 配列番号 29	8	68	17.1
Sub44	CAGGTCTCCTC <u>guCCCTATA</u> GTGA 配列番号 25	8	70	18.0
Sub46	ACCGCACCT <u>guCCCCAGCTC</u> 配列番号 27	7	64	18.1
Sub60	GCCAACCAC <u>guCCAACACG</u> AC 配列番号 30	5	64	18.3
Sub3	CAGCACAACC <u>guCACCAAC</u> CG 配列番号 22	5	64	18.4
Sub7	TTAACATGGC <u>ACguTGGCTG</u> TGATA 配列番号 24	4	68	18.4
Sub49	TAAACTTGGCTC <u>guTGGCTG</u> TGATA 配列番号 28	5	68	18.5
Sub45	ACGGGTCCC <u>guCTCCTTTGG</u> AA 配列番号 26	8	66	19.2 ~

<sup>^</sup> 大文字は DNA を表し、小文字は RNA を表す。

\* ここに示された Tm は、ウォーレス則を用いて計算された 2 つのパートザイムに結合された塩基の融解温度に等しい。基質が 10-23 DNA ザイムベースの MNA ザイムに結合した時、「g」リボヌクレオチドは、未結合の状態を維持するので、全結合 Tm に寄与しない。

~ 実験誤差のある唯一の反復試験。

## 【 0 2 2 5 】

実施例 2 : 58 のアニーリング温度における MNA ザイム qPCR と組み合わせたユニバーサル基質の使用。

PCR などの *in vitro* 標的増幅方法を用いてリアルタイムで標的核酸の増幅をモニターするために、MNA ザイムを使用することが可能である。さらに、フルオロフォアとクエンチャーとの対で標識された MNA ザイム基質を用いた qPCR 中のリアルタイムモニタリングでは、反応の対数期にわたり任意のレベルの蛍光の閾値ラインを配置して、Ct (サイクル閾値) として知られる値を生成可能な曲線が作成される。より低い Ct 値を生じる反応は、そのような反応がより速く閾値サイクルに達するので、特異的基質のより効率的な切断の指標となる。この実施例では、増幅および検出は、PCR 増幅および MNA ザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで実施される。他の反応条件がすべての同一である場合、Ct 値は、ユニバーサル基質の配列による影響を受けることもある。当技術分野で使用される MNA ザイム qPCR のアニーリング/検出温度は、50 ~ 54 である。この温度は、当技術分野で公知のユニバーサル基質が、効

10

20

30

40

50

率的に切断される温度に課される限定条件を有し、シリーズ1のユニバーサル基質では54が上限であるという事実により決定された。より高い温度でアニールするプライマーおよびパートザイムを設計するうえでより大きい柔軟が可能になるように、より高い温度で切断されるユニバーサル基質の必要性が存在する。プライマーおよびパートザイムに対するこの設計柔軟性は、特異的検出のためにより高い反応温度ひいてはより高いT<sub>m</sub>を有するパートザイムおよびプライマーを必要とする、配列中に高パーセントのG塩基およびC塩基を有する対象の遺伝子標的など、多くの用途にきわめて有益でありうる。

#### 【0226】

シリーズ1および2の基質の性能に基づく基質の切断効率についての研究は、第3ラウンドの基質設計を支援するガイドラインの開発につながり、結果的に、シリーズ3の基質をもたらし。これらのガイドラインは、限定されるものではないが、(i)リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基(N<sub>4</sub>~N<sub>13</sub>)中に7個以上のシトシンヌクレオチド、(ii)リボヌクレオチドに直接隣接した塩基(N<sub>8</sub>およびN<sub>9</sub>)がシトシンである、(iii)基質の全含有率が>64%ピリミジン有する、および(iv)オリゴヌクレオチドの全T<sub>m</sub>が66以上である(後者のガイドラインは、基質切断の反応温度が50超である場合のみ適用可能である)を含んでいた。

#### 【0227】

この実施例では、シリーズ1のユニバーサル基質(Sub 2、Sub 3、およびSub 6)と、シリーズ2のユニバーサル基質(Sub 44、サブ45、Sub 46、Sub 60T、およびSub 55)およびシリーズ3の基質(Sub 61、Sub 65、Sub 72、Sub 73、Sub 74、Sub 75、Sub 77、Sub 79、Sub 80、Sub 82、Sub 83、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、Sub 89、およびSub 90)と、を比較して、58のリアルタイムPCRですべての基質の切断効率を比較することにより、設計ガイドラインが、高温でのMNAザイムqPCRへの適用可能性が高いユニバーサル基質を生成することを確証する。切断効率レベルは、さまざまなユニバーサル基質を含有する反応に対してC<sub>t</sub>値を測定することにより決定した。

#### 【0228】

##### 2.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

シリーズ1、2、および3のユニバーサル基質の切断効率をリアルタイムで測定すべく行った実験では、パートザイムオリゴヌクレオチドAおよびBはすべて、ヒトTFRC遺伝子の同一の配列に相補的なセンサーアームを用いて設計した。AおよびBのパートザイムの配列は、以下では5'→3'方向に列挙されている。下線付き塩基は、それらのマッチユニバーサル基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号34 パートザイムA TFRCA/2-P:

GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGAGGAACCTT

配列番号35 パートザイムB TFRCB/2-P:

TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

配列番号36 パートザイムA TFRCA/3-P:

GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGTTGTGCTG

配列番号37 パートザイムB TFRCB/3-P:

CGGTTGGTGAAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

配列番号38 パートザイムA TFRCA/6-P:

GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGCGTGAT

配列番号39 パートザイムB TFRCB/6-P:

CTGGGAGGGAAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

配列番号40 パートザイムA TFRCA/44-P:

GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGAGACCTG

配列番号41 パートザイムB TFRCB/44-P:

10

20

30

40

50

T C A C T A T A G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A  
C T

配列番号 42 パートザイム A T F R C A / 45 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G G G A C C C G T

配列番号 43 パートザイム B T F R C B / 45 - P :  
T T C C A A A G G A G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A

C T  
配列番号 44 パートザイム A T F R C A / 46 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G T G C G G T

配列番号 45 パートザイム B T F R C B / 46 - P :  
G A G C T G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C T

配列番号 46 パートザイム A T F R C A / 55 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T G C G G T

配列番号 48 パートザイム A T F R C A / 60 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G T G G T T G G C

配列番号 49 パートザイム B T F R C B / 60 - P :  
G T C G T G T T G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T  
配列番号 50 パートザイム A T F R C A / 61 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G G G T C G A G

配列番号 51 パートザイム B T F R C B / 61 - P :  
T G G C G T G G A G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T  
配列番号 52 パートザイム A T F R C A / 65 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T C G A G A

配列番号 55 パートザイム B T F R C B / 72 - P :  
C T G G G A G G A G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T  
配列番号 56 パートザイム A T F R C A / 73 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G G G A C G C C A

配列番号 57 パートザイム B T F R C B / 73 - P :  
C A C G A G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C T

配列番号 58 パートザイム A T F R C A / 74 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G G G A G T G A T

配列番号 59 パートザイム B T F R C B / 74 - P :  
C T G G G A G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T  
配列番号 60 パートザイム A T F R C A / 75 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G A G G A G G G T C A

配列番号 61 パートザイム B T F R C B / 75 - P :  
T A G T G G G G A G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T  
配列番号 62 パートザイム A T F R C A / 77 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G A G G G A G G A G

配列番号 63 パートザイム B T F R C B / 77 - P :  
A G G A G G A G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T  
配列番号 64 パートザイム A T F R C A / 79 - P :  
G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G G G A G A G G A

配列番号 65 パートザイム B T F R C B / 79 - P :

10

20

30

40

50

GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC  
CT

配列番号66 パートザイムA TFRCA/80-P:

GGAAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGGCGGTT

配列番号67 パートザイムB TFRCB/80-P:

GGTTCACGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号68 パートザイムB TFRCB/82-P:

TGGACGAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号69 パートザイムA TFRCA/83-P:

GGAAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGGGAGCGGA

配列番号70 パートザイムB TFRCB/83-P:

GTTGCAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号71 パートザイムA TFRCA/90-P:

GGAAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGGTCGAG

【0229】

## 2.2. レポーター基質

この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。本実施例では、基質は、5'末端を6-FAM部分(以下の基質名では「F」により表される)で、3'末端をIowa Black(登録商標)FQクエンチャー部分(以下の基質名で「IB」により表される)で、末端標識した。Sub60の配列は、5'末端に「T」を含むように修飾することにより、6-FAMで5'末端標識できるようにした。パートザイムAの基質結合配列には変更を加えなかったため、切断効率は、5'末端に追加の「T」が欠如している実施例1のSub60配列と同等である。基質の切断は、450~490nmの励起(CFX96(BioRad)に基づくFAM励起波長領域)を用いて510~530nm(CFX96(BioRad)に基づくFAM発光波長範囲)でモニターした。

配列番号21 Sub2-FIB:

AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA

配列番号22 Sub3-FIB:

CAGCACAAACCGuCACCAACCG

配列番号23 Sub6-FIB:

ATCACGCCTCguTCCTCCAG

配列番号25 Sub44-FIB:

CAGGTCCTCguCCCTATAGTGA

配列番号26 Sub45-FIB:

ACGGGTCCCguCTCCTTTGGAA

配列番号27 Sub46-FIB:

ACCGCACCTguCCCCAGCTC

配列番号29 Sub55-FIB:

ACCGCACCTCguCCCCAGCTC

配列番号72 Sub60T-FIB:

TGCCAACCAACguCCAACACGAC

配列番号73 Sub61-FIB:

CTCGACCCguCTCCACGCCA

配列番号74 Sub65-FIB:

TCTCGACCTCguCTCCACGCCA

配列番号75 Sub72-FIB:

10

20

30

40

50

A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G  
 配列番号 76 Sub 73 - F I B :  
 T G G C G T C C C C g u C C C C T C G T G  
 配列番号 77 Sub 74 - F I B :  
 A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G  
 配列番号 78 Sub 75 - F I B :  
 T G A C C C T C C T C g u C T C C C C A C T A  
 配列番号 79 Sub 77 - F I B :  
 C T C C T C C C T C g u C C C T C C T C C T  
 配列番号 80 Sub 79 - F I B :  
 T C C T C T C C C C g u C C C C T T C A A C C  
 配列番号 81 Sub 80 - F I B :  
 A A C C G C C C T C g u C C C G T G A A C C  
 配列番号 82 Sub 82 - F I B :  
 C T C C T C C C T C g u C C C T C G T C C A  
 配列番号 83 Sub 83 - F I B :  
 T C C G C T C C C C g u C C C C T G C A A C  
 配列番号 84 Sub 84 - F I B :  
 A C C G C A C C T C g u C T C C T C C C A G  
 配列番号 85 Sub 85 - F I B :  
 A C C G C A C C T C g u C C C C T C C C A G  
 配列番号 86 Sub 86 - F I B :  
 A T C A C G C C T C g u C C C C A G C T C  
 配列番号 87 Sub 87 - F I B :  
 A T C A C T C C C C g u C C C C A G C T C  
 配列番号 88 Sub 88 - F I B :  
 C T C C T C C C T C g u C C C C A G C T C  
 配列番号 89 Sub 89 - F I B :  
 A C C G C A C C T C g u C C C T C C T C C T  
 配列番号 90 Sub 90 - F I B :  
 C T C G A C C C T C g u C C C T C G T C C A

10

20

30

## 【0230】

## 2.3. 標的配列およびTFRC増幅用のPCRプライマー

この実施例の標的配列は、以下に列挙したオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用いて、IM9細胞系から抽出されたヒトゲノムDNA (Promega) の *in vitro* 増幅により産生された、TFRC遺伝子のPCRアンプリコンであった。プライマー配列中のボールド体の配列は、遺伝子標的に対するプライマーの特異性に影響を及ぼすことなくプライマーのT<sub>m</sub>を増大させるユニバーサルタグ (U1またはU2) に対応する。このタグは、PCR反応の増幅効率を改善する。プライマー配列は、5' 3' 方向に列挙されている。

40

配列番号 91 フォワードプライマー 5 TFRC\_\_U1 :  
 G C T A A A A C A A T A A C T C A G A A C T T A C G  
 配列番号 92 リバースプライマー 3 TFRC\_\_U2 :  
 C A G C T T T C T G A G G T T A C C A T C C T A

## 【0231】

## 2.4. 反応成分： 標的配列の増幅および定量

標的配列のリアルタイムPCR増幅および検出は、25 μLの全反応空間内で行った。反応はすべて、CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)で行った。表8のように、基質およびその関連パートザイムを用いて反応を構成した。サイクルパラメーターは、95 で2分間、95 で15秒間と

50

58 で60秒間とを50サイクル(58の工程でデータを収集した)。反応条件の各セットは、二重試験方式で行われ、40nMの5TFRC\_U1、200nMの3TFRC\_U2、各200nMのパートザイムAおよびパートザイムB、200nMの基質、8mMのMgCl<sub>2</sub>、200μMの各dNTP、10単位のRiboSafe RNアーゼ阻害剤(Bioline)、1×Immobuffer(Bioline)、2単位のMyTaqHS(商標)DNAポリメラーゼ(Bioline)、およびゲノムDNA鋳型(50ng)または無標的(NF-H<sub>2</sub>O)のいずれかを含有していた。

【0232】

【表9】

**表8: ユニバーサル基質に対して使用したパートザイムの組合せ**

基質	パートザイム A	パートザイム B
Sub2 配列番号 21	TFRCA/2-P 配列番号 34	TFRCB/2-P 配列番号 35
Sub3 配列番号 22	TFRCA/3-P 配列番号 36	TFRCB/3-P 配列番号 37
Sub6 配列番号 23	TFRCA/6-P 配列番号 38	TFRCB/6-P 配列番号 39

10

20

【0233】

【表 1 0】

Sub44 配列番号 25	TFRCA/44 配列番号 40	TFRCB/44-P 配列番号 41
Sub45 配列番号 26	TFRCA/45-P 配列番号 42	TFRCB/45-P 配列番号 43
Sub46 配列番号 27	TFRCA/46-P 配列番号 44	TFRCB/46-P 配列番号 45
Sub55 配列番号 29	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/46-P 配列番号 45
Sub60T 配列番号 72	TFRCA/60-P 配列番号 48	TFRCB/60-P 配列番号 49
Sub61 配列番号 73	TFRCA/61-P 配列番号 50	TFRCB/61-P 配列番号 51
Sub65 配列番号 74	TFRCA/65-P 配列番号 52	TFRCB/61-P 配列番号 51
Sub72 配列番号 75	TFRCA/6-P 配列番号 38	TFRCB/72-P 配列番号 55
Sub73 配列番号 76	TFRCA/73-P 配列番号 56	TFRCB/73-P 配列番号 57
Sub74 配列番号 77	TFRCA/74-P 配列番号 58	TFRCB/74-P 配列番号 59
Sub75 配列番号 78	TFRCA/75-P 配列番号 60	TFRCB/75-P 配列番号 61
Sub77 配列番号 79	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/77-P 配列番号 63
Sub79 配列番号 80	TFRCA/79-P 配列番号 64	TFRCB/79-P 配列番号 65
Sub80 配列番号 81	TFRCA/80-P 配列番号 66	TFRCB/80-P 配列番号 67
Sub82 配列番号 82	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/82-P 配列番号 68
Sub83 配列番号 83	TFRCA/83-P 配列番号 69	TFRCB/83-P 配列番号 70
Sub84 配列番号 84	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/72-P 配列番号 55
Sub85 配列番号 85	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/74-P 配列番号 59
Sub86 配列番号 86	TFRCA/6-P 配列番号 38	TFRCB/46-P 配列番号 45
Sub87 配列番号 87	TFRCA/74-P 配列番号 58	TFRCB/46-P 配列番号 45
Sub88 配列番号 88	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/46-P 配列番号 45
Sub89 配列番号 89	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/77-P 配列番号 63
Sub90 配列番号 90	TFRCA/90-P 配列番号 71	TFRCB/82-P 配列番号 68

10

20

30

40

## 2.5. 結果： 標的の増幅およびレポーター基質の切断

ヒトゲノムDNAを含有する各MNAザイムqPCR反応では、ヒトゲノムDNAからのTFRCのリアルタイム検出で経時的に蛍光の増加を示した。すべての反応で、無DNA標的対照の蛍光は、DNA標的含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性MNAザイムの標的依存集合の後でユニバーサルレポーター基質の1つが切断されたことに起因することが実証される。

### 【0235】

各ユニバーサル基質のCt値の比較により(図5および表9)、シリーズ1の基質(Sub2、Sub3、およびSub6)およびシリーズ2の基質(Sub44、Sub45、Sub46、およびSub60T)はすべて、Ct値>27を有し、一方、試験した他のシリーズ2およびすべてのシリーズ3の基質(Sub55、Sub61、Sub65、Sub72、Sub73、Sub74、Sub75、Sub77、Sub79、Sub80、Sub82、Sub83、Sub84、Sub85、Sub86、Sub87、Sub88、Sub89、およびSub90)は、27未満のCt値であることが示される。このことから、試験した後者のシリーズ2のユニバーサル基質およびすべてのシリーズ3のユニバーサル基質は、MNAザイムqPCRでこれまで可能であったよりも高いアニーリング/検出温度でMNAザイム切断反応の効率の増大を示したことが示唆される。この改善された切断効率により、現時点で、これまで可能であったよりも高い温度でMNAザイムqPCRを用いた標的の効率的かつロバストな検出が可能である。また、これにより、より高い温度が増幅に必要とされるDNAポリメラーゼ処方を用いた場合に有益であることが実証されうる。

10

20

### 【0236】

注目に値するのは、これらの効率的に切断される基質のヌクレオチド配列の性質および基質のリボヌクレオチドに対する特異的ヌクレオチドの近接性が重要なことである。これらの特徴は、高温で効率的に切断される可能性がより高いユニバーサル基質をもたらす一群のガイドラインの根底をなす。これらの設計ガイドラインは、限定されるものではないが、(i)リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基(N4~N13)中に7個以上のシトシンヌクレオチド、(ii)リボヌクレオチドに直接隣接した塩基(N8およびN9)がシトシンである、(iii)基質の全含有率が>64%ピリミジンを含む、(iv)オリゴヌクレオチドの全Tmが66以上である(後者のガイドラインは、基質切断の反応温度が50超である場合のみ適用可能である)(表9)を含む(すべてが必要であるとは限らないこともありうる)。それに加えて、リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基中の少数個(たとえば、3、2、1、または0個)のグアニンヌクレオチドもまた、有益であることが観測された。

30

### 【0237】

58のアニーリング温度でCt<27を有していた図5のユニバーサル基質はすべて、これらの設計ガイドラインの3つ以上を満たした(表9)。

### 【0238】

【表 1 1】

表 9: ユニバーサル基質の切断効率 (Ctに基づいて切断効率の順に列挙した)

名称	配列 <sup>^</sup>	Cの数 N <sub>4</sub> -N <sub>13</sub>	CguC	%C/T <sup>+</sup>	Tm*	Ct	(i - iv)の数 <sup>~</sup>
Sub80	AACCGCCCTCguCCCGT GAACC 配列番号 81	7	あり	65	70	25.2	4
Sub55	ACCGCACCTCguCCCCA GCTC 配列番号 29	7	あり	74	68	25.4	4
Sub85	ACCGCACCTCguCCCCT CCCAG 配列番号 85	7	あり	75	72	25.4	4
Sub79	TCCTCTCCCCguCCCCTC CTACC 配列番号 80	8	あり	90	72	25.5	4
Sub61	CTCGACCCCguCTCCAC GCCA 配列番号 73	7	あり	74	68	25.5	4
Sub65	TCTCGACCTCguCTCCA CGCCA 配列番号 74	6	あり	75	68	25.5	3
Sub89	ACCGCACCTCguCCCTC CTCCT 配列番号 89	7	あり	85	70	25.7	4
Sub90	CTCGACCTCguCCCTC GTCCA 配列番号 90	8	あり	80	70	25.7	4
Sub87	ATCACTCCCCguCCCCA GCTC 配列番号 87	8	あり	79	66	25.7	4
Sub83	TCCGCTCCCCguCCCCT GCAAC 配列番号 83	8	あり	80	72	25.8	4
Sub86	ATCACGCCTCguCCCCA GCTC 配列番号 86	7	あり	74	66	25.9	4
Sub88	CTCCTCCCTCguCCCCA GCTC 配列番号 88	8	あり	89	68	26.2	4
Sub82	CTCCTCCCTCguCCCTCG TCCA 配列番号 82	8	あり	90	70	26.2	4
Sub74	ATCACTCCCCguCCCCT CCCAG 配列番号 77	8	あり	80	70	26.2	4
Sub84	ACCGCACCTCguCTCCT CCCAG 配列番号 84	6	あり	75	70	26.3	3

10

20

30

40

【表 1 2】

Sub75	TGACCCCTCCTCguCTCCC CACTA 配列番号 78	7	あり	81	70	26.3	4
Sub73	TGGCGTCCCCguCCCCT CGTG 配列番号 76	8	あり	74	70	26.3	4
Sub77	CTCCTCCCTCguCCCTCC TCCT 配列番号 79	8	あり	100	70	26.3	4
Sub72	ATCACGCCTCguCTCCT CCCAG 配列番号 75	6	あり	75	68	26.9	3
Sub2	AAGGTTTCCTCguCCCT GGGCA 配列番号 21	6	あり	60	66	27.2	2
Sub60 T <sup>s</sup>	TGCCAACCACguCCAAC ACGAC 配列番号 72	6	あり	53	64	27.3	2
Sub46	ACCGCACCTguCCCCAG CTC 配列番号 27	7	なし	72	64	27.5	2
Sub45	ACGGGTCCCguCTCCTT TGGAA 配列番号 26	6	あり	60	66	27.6	2
Sub3	CAGCACAACCguCACCA ACCG 配列番号 22	6	あり	53	64	28.2	1
Sub44	CAGGTCTCCTCguCCCT ATAGTGA 配列番号 25	6	あり	64	70	28.4	2
Sub6	ATCACGCCTCguTCCTC CCAG 配列番号 23	6	なし	74	64	29.0	1

△ 大文字の塩基はDNAを表し、小文字の塩基はRNAを表し、基質中の塩基の位置は (N<sub>x</sub>)-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-rR-rY-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-N<sub>15</sub>-(N<sub>x</sub>)により表される。

\* 各基質に対して以上に示された配列長さの% C/T (ピリミジン)は、リボヌクレオチドを含まない。

\* ここに与えられた T<sub>m</sub> は、ウォーレス則を用いて計算された結合塩基の融解温度に等しい  
- 相補配列にハイブリダイズする塩基についてのみ計算。基質が 10-23 DNA ザイムベースの MNA ザイムに結合した時、「g」リボヌクレオチドは、未結合の状態を維持するので、全結合 T<sub>m</sub> に寄与しない。

~ 基質配列が満たした設計ガイドライン(i)、(ii)、(iii)、および/または(iv)の数。

§ Sub60T 中の追加の「T」はパートザイムアームにより結合されないため、% C/T および T<sub>m</sub> の計算に含まれない。

## 【 0 2 4 0 】

実施例 3 : 核酸標的の直接検出方式で MNA ザイムと組み合わせたユニバーサル基質の使用。

シリーズ 1 および 2 の基質の性能に基づく基質の切断効率についての研究は、第 3 ラウンドのシリーズ 3 の基質設計を支援するガイドラインの開発につながる。これらのガイドラインは、限定されるものではないが、(i) リボヌクレオチドを取り囲む 10 個の塩基 (N<sub>4</sub> ~ N<sub>13</sub>) 中に 7 個以上のシトシンヌクレオチド、(ii) リボヌクレオチドに直接隣接した塩基 (N<sub>8</sub> および N<sub>9</sub>) がシトシンである、(iii) 基質の全含有率が > 64 % ピリミジンを有する、および (iv) オリゴヌクレオチドの全 T<sub>m</sub> が 66 以上であ

10

20

30

40

50

る（後者のガイドラインは、基質切断の反応温度が50 超である場合のみ適用可能である）を含んでいた。

【0241】

いかなる標的増幅も用いることなく等温反応で標的核酸を直接検出するために、MNA ザイムを使用することが可能である。この直接標的検出方法を用いて、基質の切断効率を評価することが可能である。一連の温度で遺伝子TFRCの直接検出と組み合わせた時の一連のユニバーサル基質の切断効率を試験するように、パートザイムを設計した。この実施例では、すでに公知のシリーズ1のユニバーサル基質(Sub 2、Sub 3、およびSub 6)と、シリーズ2のユニバーサル基質(Sub 44、Sub 45、Sub 46、Sub 49、Sub 55、およびSub 60T)およびシリーズ3の基質(Sub 61、Sub 65、Sub 72、Sub 73、Sub 74、Sub 75、Sub 77、Sub 79、Sub 80、Sub 82、Sub 83、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、Sub 89、およびSub 90)と、を比較して、シリーズ1および2の基質の分析から導かれた設計ガイドラインが、シリーズ1および2の基質と同一のまたはそれよりも高い活性レベルで切断されるシリーズ3の基質の開発に有用であるかを決定する。52、54、56、および58 の温度範囲にわたり10分後のシグナル対ノイズ比を計算することにより（鑄型含有「試験」反応および無鑄型対照反応の結果から）、切断効率レベルを決定した。また、この温度範囲にわたるシグナル対ノイズ比の標準偏差を温度に関する基質のロバスト性の尺度として計算した。

10

【0242】

20

3.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

直接標的検出を用いてシリーズ1、2、および3のユニバーサル基質の切断効率を測定すべく行った実験では、パートザイムオリゴヌクレオチドAおよびBはすべて、ヒトTFRC遺伝子の同一の配列に相補的なセンサーアームを用いて設計した。AおよびBのパートザイムの配列は、以下では5' 3'方向に列挙されている。下線付き塩基は、基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号34 パートザイムA TFRC A / 2 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G A A A C C T T

配列番号35 パートザイムB TFRC B / 2 - P :

T G C C C A G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C T

30

配列番号36 パートザイムA TFRC A / 3 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G T T G T G C T G

配列番号37 パートザイムB TFRC B / 3 - P :

C G G T T G G T G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C T

配列番号38 パートザイムA TFRC A / 6 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G C G T G A T

配列番号39 パートザイムB TFRC B / 6 - P :

C T G G G A G G A A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C T

配列番号40 パートザイムA TFRC A / 44 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G A G A C C T G

40

配列番号41 パートザイムB TFRC B / 44 - P :

T C A C T A T A G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A  
C T

配列番号42 パートザイムA TFRC A / 45 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G G A C C C G T

配列番号43 パートザイムB TFRC B / 45 - P :

T T C C A A A G G A G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A  
C T

配列番号44 パートザイムA TFRC A / 46 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A A G G T G C G G T

50

配列番号 45 パートザイム B TFRCB / 46 - P :  
GAGCTGGGGAAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

配列番号 93 パートザイム A TFRCA / 49 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGCCAAGTTT

A

配列番号 94 パートザイム B TFRCB / 49 - P :  
TATCACAGCCAAAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGA

CT

配列番号 46 パートザイム A TFRCA / 55 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGTGCGGT

10

配列番号 48 パートザイム A TFRCA / 60 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGTGGTTGGC

配列番号 49 パートザイム B TFRCB / 60 - P :  
GTCGTGTTGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号 50 パートザイム A TFRCA / 61 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGGGTCGAG

配列番号 51 パートザイム B TFRCB / 61 - P :  
TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

20

配列番号 52 パートザイム A TFRCA / 65 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGTCGAGA

配列番号 55 パートザイム B TFRCB / 72 - P :  
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号 56 パートザイム A TFRCA / 73 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGGGACGCCA

配列番号 57 パートザイム B TFRCB / 73 - P :  
CACGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

配列番号 58 パートザイム A TFRCA / 74 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGGGAGTGAT

30

配列番号 59 パートザイム B TFRCB / 74 - P :  
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号 60 パートザイム A TFRCA / 75 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGAGGGTCA

配列番号 61 パートザイム B TFRCB / 75 - P :  
TAGTGGGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号 62 パートザイム A TFRCA / 77 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGGAGGGAG

40

配列番号 63 パートザイム B TFRCB / 77 - P :  
AGGAGGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号 64 パートザイム A TFRCA / 79 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGGGAGAGGA

配列番号 65 パートザイム B TFRCB / 79 - P :  
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGA

CT

配列番号 66 パートザイム A TFRCA / 80 - P :

50

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G G C G G T T

配列番号67 パートザイムB TFRCB / 80 - P :

G G T T C A C G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T

配列番号68 パートザイムB TFRCB / 82 - P :

T G G A C G A G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

T

配列番号69 パートザイムA TFRCA / 83 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G G G G A G C G G A

配列番号70 パートザイムB TFRCB / 83 - P :

G T T G C A G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A A C A G A C

10

T

配列番号71 パートザイムA TFRCA / 90 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G G T C G A G

【0243】

3.2. レポーター基質

この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。本実施例では、基質は、5'末端を6-FAM部分(以下の基質名では「F」により表される)で、3'末端をIowa Black(登録商標)FQクエンチャー部分(以下の基質名で「IB」により表される)で、末端標識した。基質の切断は、450~490nmの励起(CFX96(BioRad))に基づくFAM励起波長領域)を用いて510~530nm(CFX96(BioRad))に基づくFAM発光波長範囲)でモニターした。

20

配列番号21 Sub2 - FIB :

A A G G T T T C C T C g u C C C T G G G C A

配列番号22 Sub3 - FIB :

C A G C A C A A C C g u C A C C A A C C G

配列番号23 Sub6 - FIB :

A T C A C G C C T C g u T C C T C C C A G

配列番号25 Sub44 - FIB :

C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A

30

配列番号26 Sub45 - FIB :

A C G G G T C C C g u C T C C T T T G G A A

配列番号27 Sub46 - FIB :

A C C G C A C C T g u C C C C A G C T C

配列番号28 Sub49 - FB :

T A A A C T T G G C T C g u T G G C T G T G A T A

配列番号29 Sub55 - FIB :

A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C

配列番号72 Sub60T - FIB :

T G C C A A C C A C g u C C A A C A C G A C

40

配列番号73 Sub61 - FIB :

C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A

配列番号74 Sub65 - FIB :

T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A

配列番号75 Sub72 - FIB :

A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G

配列番号76 Sub73 - FIB :

T G G C G T C C C C g u C C C C T C G T G

配列番号77 Sub74 - FIB :

50

A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G  
 配列番号78 Sub75 - F I B :  
 T G A C C C T C C T C g u C T C C C C A C T A  
 配列番号79 Sub77 - F I B :  
 C T C C T C C C T C g u C C C T C C T C C T  
 配列番号80 Sub79 - F I B :  
 T C C T C T C C C C g u C C C C T T C A A C C  
 配列番号81 Sub80 - F I B :  
 A A C C G C C C T C g u C C C G T G A A C C  
 配列番号82 Sub82 - F I B :  
 C T C C T C C C T C g u C C C T C G T C C A  
 配列番号83 Sub83 - F I B :  
 T C C G C T C C C C g u C C C C T G C A A C  
 配列番号84 Sub84 - F I B :  
 A C C G C A C C T C g u C T C C T C C C A G  
 配列番号85 Sub85 - F I B :  
 A C C G C A C C T C g u C C C C T C C C A G  
 配列番号86 Sub86 - F I B :  
 A T C A C G C C T C g u C C C C A G C T C  
 配列番号87 Sub87 - F I B :  
 A T C A C T C C C C g u C C C C A G C T C  
 配列番号88 Sub88 - F I B :  
 C T C C T C C C T C g u C C C C A G C T C  
 配列番号89 Sub89 - F I B :  
 A C C G C A C C T C g u C C C T C C T C C T  
 配列番号90 Sub90 - F I B :  
 C T C G A C C C T C g u C C C T C G T C C A

10

20

## 【0244】

## 3.3. 標的配列

この実施例の標的配列は、以下の5' 3'方向の配列を有する合成オリゴヌクレオチドAF-TFRCであった。この標的配列は、TFRC遺伝子のセクションと同一の配列を有する。

30

配列番号95 集合促進剤 AF-TFRC :

A G T C T G T T T T C C A G T C A G A G G G A C A G T C T C C T T C C A T A T  
 T C C

## 【0245】

## 3.4. 反応成分： 標的配列の直接等温検出

触媒活性MNAザイムによるレポーター基質の切断により引き起こされる蛍光シグナルの増加により、標的配列の検出を測定した。すべての反応の全体積は、25 $\mu$ Lであり、すべての反応をCFX96(商標)Real-Time PCR Detection Systems(BioRad)で行い、パートザイムと基質との各組合せ(表10)を52、54、56、58、および60で試験した。各反応の蛍光は、最初の50サイクルでは1秒後に読み取るようにプログラムし、その後、その次の50サイクルでは25秒後に読み取るようにプログラムした。すべての反応は、1 $\times$ PCR緩衝液II(Applied Biosystems)、10mMのMgCl<sub>2</sub>、0.2 $\mu$ MのパートザイムAおよびB、ならびに0.2 $\mu$ Mの基質を含有していた(表10のように組み合わせて試験した)。各反応は、10nM標的配列(AF-TFRC)または無鑄型対照(NF-H<sub>2</sub>O)のいずれかを用いた「試験」として二重試験方式で行った。

40

## 【0246】

【表 1 3】

**表 10: 各基質に対して使用したパートザイムの組合せ**

<b>基質</b>	<b>パートザイム A</b>	<b>パートザイム B</b>
Sub2 配列番号 21	TFRCA/2-P 配列番号 34	TFRCB/2-P 配列番号 35
Sub3 配列番号 22	TFRCA/3-P 配列番号 36	TFRCB/3-P 配列番号 37
Sub6 配列番号 23	TFRCA/6-P 配列番号 38	TFRCB/6-P 配列番号 39

10

【 0 2 4 7 】

【表 1 4】

Sub44 配列番号 25	TFRCA/44 配列番号 40	TFRCB/44-P 配列番号 41	
Sub45 配列番号 26	TFRCA/45-P 配列番号 42	TFRCB/45-P 配列番号 43	
Sub46 配列番号 27	TFRCA/46-P 配列番号 44	TFRCB/46-P 配列番号 45	
Sub49 配列番号 28	TFRCA/49-P 配列番号 93	TFRCB/49-P 配列番号 94	
Sub55 配列番号 29	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/46-P 配列番号 45	10
Sub60T 配列番号 72	TFRCA/60-P 配列番号 48	TFRCB/60-P 配列番号 49	
Sub61 配列番号 73	TFRCA/61-P 配列番号 50	TFRCB/61-P 配列番号 51	
Sub65 配列番号 74	TFRCA/65-P 配列番号 52	TFRCB/61-P 配列番号 51	
Sub72 配列番号 75	TFRCA/6-P 配列番号 38	TFRCB/72-P 配列番号 55	
Sub73 配列番号 76	TFRCA/73-P 配列番号 56	TFRCB/73-P 配列番号 57	20
Sub74 配列番号 77	TFRCA/74-P 配列番号 58	TFRCB/74-P 配列番号 59	
Sub75 配列番号 78	TFRCA/75-P 配列番号 60	TFRCB/75-P 配列番号 61	
Sub77 配列番号 79	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/77-P 配列番号 63	
Sub79 配列番号 80	TFRCA/79-P 配列番号 64	TFRCB/79-P 配列番号 65	
Sub80 配列番号 81	TFRCA/80-P 配列番号 66	TFRCB/80-P 配列番号 67	30
Sub82 配列番号 82	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/82-P 配列番号 68	
Sub83 配列番号 83	TFRCA/83-P 配列番号 69	TFRCB/83-P 配列番号 70	
Sub84 配列番号 84	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/72-P 配列番号 55	
Sub85 配列番号 85	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/74-P 配列番号 59	
Sub86 配列番号 86	TFRCA/6-P 配列番号 38	TFRCB/46-P 配列番号 45	40
Sub87 配列番号 87	TFRCA/74-P 配列番号 58	TFRCB/46-P 配列番号 45	
Sub88 配列番号 88	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/46-P 配列番号 45	
Sub89 配列番号 89	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/77-P 配列番号 63	
Sub90 配列番号 90	TFRCA/90-P 配列番号 71	TFRCB/82-P 配列番号 68	

### 3.5. 結果： 標的配列の直接等温検出

各ユニバーサル基質を用いた各反応は、合成鑄型 A F - T F R C ( T F R C 遺伝子の部分に対応する標的配列) を含有する反応で経時的に蛍光の増加を示した。すべての基質で、無鑄型対照の蛍光は、標的配列含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性 M N A ザイムの標的依存集合の後でユニバーサルレポーター基質が切断されたことに起因することが実証される。

#### 【0249】

各反応に対して、最初の読みで対をなす無鑄型反応で得られた値で各データ点を割り算することにより、C F X 9 6 から得られた生の蛍光データ点を規格化した。次いで、これ規格化データを用いて、試験データ点を無鑄型データ点で割り算することにより、約 1 0 10  
分間の時点でシグナル対ノイズ値を計算した。この計算を各反応温度で各基質に対して行った。シグナル対ノイズ値は、基質の切断効率の尺度を提供し(図6(i))、高いシグナル対ノイズは、効率的な切断を示す。また、温度範囲にわたり各基質に対してシグナル対ノイズ比の標準偏差を計算してプロットすることにより、試験温度範囲にわたり一貫して高い活性を有する基質を決定した(図6(ii))。この標準偏差の低い値は、温度間のシグナル対ノイズレベルの最小限の変化を示唆する。このことから、これら基質は温度に対してロバストであることが示唆される。

#### 【0250】

温度範囲にわたる各基質に対するシグナル対ノイズ比の分析(図6(i))から、シリーズ1の基質(Sub 2、Sub 3、およびSub 6)は、より低い測定温度でより高いシグナル対ノイズを有していたことが示される。しかしながら、これらの基質の切断効率は、反応温度を58 に上昇させた場合、劇的に低下した。シリーズ2の基質のサブセット(Sub 44、Sub 45、Sub 46、およびSub 60T)に対して、類似のパターンが見られた。シリーズ2の基質Sub 49は、より低い温度で不十分な性能を示し、より高い温度でわずかに改良されたが、全体的に他の基質よりも低いシグナル対ノイズを有していた。シリーズ2の基質Sub 60Tは、温度の増加に伴ってシグナル対ノイズの低下を示し、全体的により低い温度で他のシリーズ1および2の基質の大多数よりも低いシグナル対ノイズを示した。他のシリーズ2の基質(Sub 55)およびシリーズ3の基質のサブセット(Sub 61、Sub 65、Sub 74、Sub 79、Sub 80、Sub 82、Sub 83、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、Sub 89、およびSub 90)は、高い蛍光レベルを呈したので、試験したすべての温度にわたり効率的に切断された。シリーズ3の基質Sub 73、Sub 75、およびSub 77は、試験した温度にわたりほぼ同一のシグナル対ノイズ値を呈したが、全シグナル対ノイズレベルは低かった。これらの3つの基質はすべて、M N A ザイム q P C R で試験した時、比較的低いC t 値を有する好結果を与えた(実施例2参照)。実施例2および3のこれらの基質のデータの比較から、52~58 の範囲内の一定温度を用いた場合、これらの基質の代謝回転はより低いので、切断効率に影響を及ぼすことが示唆されうる。この低下した基質の代謝回転は、切断産物の「オフ」速度に関連付けられうる。実施例2では、P C R の熱サイクルプロファイルの一部として温度を90 超に上昇させた時、切断産物は、少なくとも1サイクルに1回、パートザイム基質アームから解離するであろう。 20  
30  
40

#### 【0251】

全体的に、設計ガイドラインに合致する基質(表9)は、これらガイドラインから外れる基質よりも試験した温度範囲にわたり高いシグナル対ノイズ比を示した(図6(i))。より特定的には、Sub 55、Sub 61、Sub 65、Sub 72、Sub 74、Sub 79、Sub 80、Sub 82、Sub 83、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、Sub 89、およびSub 90を用いた反応は、試験したすべての温度で高いシグナル対ノイズ値を呈したことから、温度範囲にわたりロバストな基質であることが実証される。この改善は、各基質に対して温度にわたりシグナル対ノイズ比から標準偏差を計算した時、さらに明白であった(図6(ii))。シグナル対ノイズの絶対値と組み合わせたこの変動測定から、試験した温度範囲にわたり、シリーズ2の基 50

質 Sub 55 ならびにシリーズ3の基質 Sub 61、Sub 65、Sub 74、Sub 79、Sub 80、Sub 82、Sub 83、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、Sub 89、および Sub 90 は、広い温度範囲にわたりほとんど変動がない高いシグナル対ノイズ比を有していたことが示唆される。4つの設計ガイドラインのうち3つだけに一致する3つのシリーズ3の基質 Sub 65、Sub 72、および Sub 84 が存在した。これらのうち2つの Sub 72 および Sub 84 は、表9に明記される設計ガイドラインの4つすべてに一致するシリーズ3の基質よりも、シグナル対ノイズがわずかに大きい標準偏差を有していた。

#### 【0252】

3つ以上の温度で1.6未満のシグナル対ノイズ値を有していた基質 (Sub 60、Sub 73、Sub 75、および Sub 77) は、試験した温度範囲に対してロバストでないと考えられた。

#### 【0253】

これらのデータから、これらの設計ガイドライン (表9) の4つすべてを満たせば、一般的には、温度範囲にわたり効率的かつロバストに切断される基質が得られるであろうと思われる。

#### 【0254】

シリーズ2および3のうち最も奏功し基質の配列を調べることにより、これらの基質が共通した特徴を共有することが示される。試験した温度にわたりシグナル対ノイズ比の変動がほとんどない基質 (図6(i) および (ii)) は、一般的には、塩基 N4 ~ N13 内に7個以上のシトシンヌクレオチドを含有していた。このことから、コア領域、すなわち、リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基は、基質活性にかなり影響を及ぼすことが示唆される。それに加えて、リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基中の少数個 (たとえば、3、2、1、または0個) のグアニンヌクレオチドもまた、有益であることが観測された。

#### 【0255】

実施例4: 52 および 58 のアニーリング温度でMNAザイムqPCRと組み合わせたユニバーサル基質の使用。

PCRなどの*in vitro* 標的増幅方法を用いてリアルタイムで標的核酸の増幅をモニターするために、MNAザイムを使用することが可能である。さらに、フルオロフォアとクエンチャーとの対で標識されたMNAザイム基質を用いてqPCR時にリアルタイムモニターすることにより、Ct値およびスティーブネス (反応速度) により反応効率を示唆しうる曲線が作成される。この実施例では、増幅および検出は、PCR増幅およびMNAザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで実施される。52 や 58 (データを収集する温度) などのさまざまなアニーリング温度でのシグナル生成速度 (反応曲線のCtおよびスティーブネスにより測定される) は、ユニバーサル基質の配列により影響を受けることもある。

#### 【0256】

当技術分野で使用されるMNAザイムqPCRのアニーリング/検出温度は、50~54である。この温度は、当技術分野で公知のユニバーサル基質が、効率的に切断される温度に課される限定条件を有し、シリーズ1のユニバーサル基質では54が上限であるという事実により決定された。より高い温度でアニーリングするプライマーおよびパートザイムを設計するうえでより大きい柔軟が可能になるように、より高い温度で切断されるユニバーサル基質の必要性が存在する。プライマーおよびパートザイムに対するこの設計柔軟性は、特異的検出のためにより高いTmを有するパートザイムおよびプライマーを必要とする、配列中に高パーセントのG塩基およびC塩基を有する対象の遺伝子標的など、多くの用途にきわめて有益であろう。52~58の温度範囲で効率的に切断される基質が存在すれば、ユニバーサル基質の有用性は、大幅に増大されるであろう。

#### 【0257】

この実施例では、表11にまとめられている一連の遺伝子を標的とするように、シリー

10

20

30

40

50

ズ1、2、および3のユニバーサル基質に対応するパートザイムを設計した。本明細書に記載されるように、任意の遺伝子配列もしくは遺伝子転写物または任意の他の核酸増幅産物を標的として使用可能であることは、当業者であればわかるであろう。qPCRにおいて52および58のアニリング温度で、パートザイムとその関連ユニバーサル基質との各組合せを試験した。この比較から得られる結果から、シリーズ1、2、および3の基質が、さまざまな遺伝子を標的として、リアルタイムPCRにおいてさまざまなアニリング温度で、同一の、より高い、またはより低い切断効率レベルを可能にするか、を決定する。切断効率レベルは、さまざまなユニバーサル基質を含有する反応に対して、Ct値を測定することにより、および反応曲線のステープネスを調べることにより、決定した。

10

【0258】

【表15】

表 11. MNA ザイム qPCR によるさまざまな遺伝子の検出に使用した基質

遺伝子	シリーズ1の基質	シリーズ2の基質	シリーズ3の基質
CYP2C9	Sub3	-	Sub61
TP53	Sub6	-	Sub72, Sub74, および Sub79
B2M	-	Sub60	Sub61 および Sub79
HMBS	-	Sub49	Sub75
TFRC	Sub2	-	Sub72 および Sub80
RPL13a	-	Sub55	Sub80 および Sub88

20

30

【0259】

## 4.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

リアルタイムPCRでユニバーサル基質の切断効率を測定すべく行った実験では、ヒトCYP2C9、TP53、B2M、HMBS、RPL13a、またはTFRC遺伝子に相補的なセンサーアームを用いて、パートザイムオリゴヌクレオチドAおよびBを設計した。AおよびBのパートザイムの配列は、以下では5' 3'方向に列挙されている。下線付き塩基は、基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号96 パートザイムA CYP2C9A/3-P:

GGGAAGAGGAGCATTTGAGGAACAACGAGGTTGTGCTG

40

配列番号97 パートザイムB CYP2C9B/3-P:

CGGTTGGTGAAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC

配列番号98 パートザイムA CYP2C9A/61-P:

GGGAAGAGGAGCATTTGAGGAACAACGAGGGGTCGAG

配列番号99 パートザイムB CYP2C9B/61-P:

TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC

配列番号100 パートザイムA TP53A/6-P:

GACGGAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGAGGCGTGAT

配列番号101 パートザイムB TP53B/6-P:

CTGGGAGGAAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG

50

配列番号 103 パートザイム B TP53B / 72 - P :  
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG

配列番号 104 パートザイム A TP53A / 74 - P :  
GACGGAAACAGCTTTGAGGTGACAAACGA GGGGAGTGAT

配列番号 105 パートザイム B TP53B / 74 - P :  
CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTGG

配列番号 106 パートザイム A TP53A / 79 - P :  
GACGGAAACAGCTTTGAGGTGACAAACGA GGGGAGAGGA

配列番号 107 パートザイム B TP53B / 79 - P :  
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCCTG

10

G

配列番号 108 パートザイム A B2MA / 60 - P :  
ATTCAGGTTTACTCACGTCATCACAAACGA GTGGTTGGC

配列番号 109 パートザイム B B2MB / 60 - P :  
GTCGTGTTGGAGGCTAGCTCAGCAGAGAAATGGAAAGTCA

AA

配列番号 110 パートザイム A B2MA / 61 - P  
ATTCAGGTTTACTCACGTCATCACAAACGA GGGGTCTGAG

配列番号 111 パートザイム B B2MB / 61 - P  
TGGCGTGGAAGAGGCTAGCTCAGCAGAGAAATGGAAAGTCA

20

AA

配列番号 112 パートザイム A B2MA / 79 - P  
ATTCAGGTTTACTCACGTCATCACAAACGA GGGGAGAGGA

配列番号 113 パートザイム B B2MB / 79 - P  
GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCAGCAGAGAAATGGAAAGTCA

AAA

配列番号 114 パートザイム A HMBSA / 49 - P :  
GCCATGTCCTGGTAACGGCAAAACAACGA GAGCCAAGTTTA

配列番号 115 パートザイム B HMBSB / 49 - P :  
TATCACAGCCAAGGCTAGCTTGC GGCTGCAACGGCGGTG

30

配列番号 116 パートザイム A HMBSA / 75 - P :  
GCCATGTCCTGGTAACGGCAAAACAACGA GAGGAGGGTCA

配列番号 117 パートザイム B HMBSB / 75 - P :  
TAGTGGGGAGAGGCTAGCTTGC GGCTGCAACGGCGGTG

配列番号 34 パートザイム A TFRCA / 2 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCCACAACGA GAGGAAACCTT

配列番号 35 パートザイム B TFRCB / 2 - P :  
TGCCCAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAACAGACT

配列番号 38 パートザイム A TFRCA / 72 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCCACAACGA GAGGC GTGAT

40

配列番号 55 パートザイム B TFRCB / 72 - P :  
CTGGGAGGAGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAACAGAC

T

配列番号 66 パートザイム A TFRCA / 80 - P :  
GGAATATGGAAGGAGACTGTCCACAACGA GAGGGCGGTT

配列番号 67 パートザイム B TFRCB / 80 - P :  
GGTTCAACGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAACAGAC

T

配列番号 118 パートザイム A RPL13aA / 55 - P  
TTGACAAATACACAGAGGTCACAACGA GAGGTGCGGT

50

配列番号 119 パートザイム B R P L 1 3 a B / 5 5 - P  
 G A G C T G G G G A G G C T A G C T C T C A A G A C C C A C G G A C T C C T

配列番号 120 パートザイム A R P L 1 3 a A / 8 0 - P  
 A A T T G A C A A A T A C A C A G A G G T C A C A A C G A G A G G G C G G T T

配列番号 121 パートザイム B R P L 1 3 a B / 8 0 - P  
 G G T T C A C G G G A G G C T A G C T C T C A A G A C C C A C G G A C T C C T

配列番号 122 パートザイム A R P L 1 3 a A / 8 8 - P  
 A A T T G A C A A A T A C A C A G A G G T C A C A A C G A G A G G G A G G A G

【 0 2 6 0 】

4 . 2 . レポーター基質

本実施例では、基質は、5'末端をフルオロフォアで標識し、3'末端をクエンチャー部分で標識した。表12は、基質 - フルオロフォア / クエンチャーの組合せを示している。いくつかの基質は、1つ超の特定のフルオロフォア / クエンチャーの組合せで試験した。種々の発光波長および励起波長で基質の切断をモニターした(表12)。

【 0 2 6 1 】

【表 1 6 】

表 12. 基質およびその蛍光標識

基質	名称	フルオロフォア	クエンチャー <sup>^</sup>	励起*	発光*
Sub49	Sub49-FB	6-FAM	BHQ1	450-490	510-530
Sub3	Sub3-FIB		IB		
Sub61	Sub61-FIB				
Sub75	Sub75-FIB	HEX	IB	515-535	560-580
Sub55	Sub55-HIB				
Sub80	Sub80-HIB				
Sub88	Sub88-HIB	Texas Red	BHQ2	560-590	610-650
Sub6	Sub6-TRB2		IBR		
Sub72	Sub72-TRIBR				
Sub74	Sub74-TRIBR				
Sub79	Sub79-TRIBR	Quasar 670	BHQ2	620-650	675-690
Sub2	Sub2-Q670B2				
Sub72	Sub72-Q670B2				
Sub80	Sub80-Q670B2	Quasar 705	BHQ2	672-684	705-730
Sub60	Sub60-Q705B2				
Sub61	Sub61-Q705B2				
Sub79	Sub79-Q705B2				

<sup>^</sup> BHQ1; black hole quencher 1, BHQ2; black hole quencher 2, IB; Iowa black® FQ, IBR; Iowa black® RQ

\*CFX96 Real-Time PCR Detection System (Biorad)は、各チャンネルに対して波長範囲にわたり各フルオロフォアを励起してその発光を測定する。

【 0 2 6 2 】

この実施例で試験したレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。

配列番号 21 Sub 2 :  
 A A G G T T T C C T C g u C C C T G G G C A

配列番号 22 Sub 3 :  
 C A G C A C A A C C g u C A C C A A C C G

配列番号 23 Sub 6 :  
 A T C A C G C C T C g u T C C T C C C A G

配列番号 28 Sub 49 :  
 T A A A C T T G G C T C g u T G G C T G T G A T A

配列番号 29 Sub 55 :  
 A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C  
 配列番号 30 Sub 60 :  
 G C C A A C C A C g u C C A A C A C G A C  
 配列番号 73 Sub 61 :  
 C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A  
 配列番号 75 Sub 72 :  
 A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G  
 配列番号 77 Sub 74 :  
 A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G  
 配列番号 78 Sub 75 :  
 T G A C C C T C C T C g u C T C C C C A C T A  
 配列番号 80 Sub 79 :  
 T C C T C T C C C C g u C C C C T T C A A C C  
 配列番号 81 Sub 80 :  
 A A C C G C C C T C g u C C C G T G A A C C  
 配列番号 88 Sub 88 :  
 C T C C T C C C T C g u C C C C A G C T C

10

## 【 0 2 6 3 】

4.3. 標的配列ならびに CYP2C9、TP53、B2M、HMBS、TFRC、および RPL13a 遺伝子の増幅用の PCR プライマー

20

IM9 細胞系から抽出したヒトゲノム DNA (Promega) を標的遺伝子の *in vitro* 増幅用の鋳型として使用した。以下に列挙したオリゴヌクレオチド PCR プライマーを用いて qPCR によりアンプリコンを産生した。プライマー配列は、5' 3' 方向に列挙されている。プライマー配列中のボールド体の配列は、遺伝子標的に対するプライマーの特異性に影響を及ぼすことなくプライマーの T<sub>m</sub> を増大させるユニバーサルタグ (U1、U2、または U3) に対応する。このタグは、PCR 反応の増幅効率を改善する。

配列番号 91 フォワードプライマー 5 TFRC\_\_U1  
 G C T A A A A C A A T A A C T C A G A A C T T A C G  
 配列番号 92 リバースプライマー 3 TFRC\_\_U2  
 C A G C T T T C T G A G G T T A C C A T C C T A  
 配列番号 123 フォワードプライマー 5 B2M\_\_U1  
 G C T A A T C T T T T C C C G A T A T T C C T C A G  
 配列番号 124 リバースプライマー 3 B2M\_\_U2  
 C A G C C C A G A C A C A T A G C A A T T C A G  
 配列番号 125 フォワードプライマー 5 TP53\_\_U3  
 C T A A C T T A C T G C C T C T T G C T T C T C  
 配列番号 126 リバースプライマー 3 TP53\_\_U2  
 C A G C T C T G T G C G C C G G T C T C T C  
 配列番号 127 フォワードプライマー 5 RPL13a\_\_U3  
 C T A A A C C G G A A G A A G A A A C A G C T C A  
 配列番号 128 リバースプライマー 3 RPL13a\_\_U2  
 C A G G A G G A A T T A A C A G T C T T T A T T G G  
 配列番号 129 フォワードプライマー 5 CYP2C9\_\_U3  
 C T A A C C T C A T G A C G C T G C G G A A  
 配列番号 130 リバースプライマー 3 CYP2C9\_\_U2  
 C A G A T A T G G A G T A G G G T C A C C C A  
 配列番号 131 フォワードプライマー 5 HMBS\_\_U3  
 C T A A A C C C A C A C A C A G C C T A C T T T C

30

40

50

配列番号 132 リバースプライマー 3HMBS\_\_U2  
CAGAGCCCAAGTGCTGGTCA

【0264】

4.4. 反応成分： 標的配列の増幅および定量

標的配列のリアルタイムPCR増幅および検出は、25 $\mu$ Lの全反応空間内で行った。反応はすべて、CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)で行った。表13のように、基質およびその関連パートザイムを用いて反応を構成した。サイクルパラメーターは、

1) 95 で2分間、95 で15秒間と52 で60秒間とを50サイクル(52の工程でデータを収集した)、または

2) 95 で2分間、95 で15秒間と58 で60秒間とを50サイクル(58の工程でデータを収集した)

のいずれかであった。

【0265】

反応条件の各セットは、二重試験方式で行われ、40nMのフォワードプライマー、200nMのリバースプライマー、各200nMのパートザイムAおよびパートザイムB、200nMの基質、8mMのMgCl<sub>2</sub>、200 $\mu$ Mの各dNTP、10単位のRiboSafe RNアーゼ阻害剤 (BioLine)、1x Immobilizer (BioLine)、2単位のMyTaqHS (商標) DNAポリメラーゼ (BioLine)、およびゲノムDNA鋳型 (100ng) または無標的 (NF-H<sub>2</sub>O) のいずれかを含有していた。

【0266】

10

20

【表 17】

表 13: 各ユニバーサル基質に対して使用したオリゴヌクレオチドの組合せ

基質	パートザイム A	パートザイム B	プライマー
Sub3 配列番号 22	CYP2C9A/3-P 配列番号 96	CYP2C9B/3-P 配列番号 97	5CYP2C9_U1 および 3CYP2C9_U2
Sub61 配列番号 73	CYP2C9A/61-P 配列番号 98	CYP2C9B/61-P 配列番号 99	それぞれ配列番号 129 および配列番号 130
Sub6 配列番号 23	TP53A/6-P 配列番号 100	TP53B/6-P 配列番号 101	5TP53_U1 および 3TP53_U2 それぞれ配列番号 125 および配列番号 126
Sub72 配列番号 75	TP53A/6-P 配列番号 100	TP53B/72-P 配列番号 103	
Sub74 配列番号 77	TP53A/74-P 配列番号 104	TP53B/74-P 配列番号 105	
Sub79 配列番号 80	TP53A/79-P 配列番号 106	TP53B/79-P 配列番号 107	
Sub60 配列番号 30	B2MA/60-P 配列番号 108	B2MB/60-P 配列番号 109	5B2M_U1 および 3B2M_U2 それぞれ配列番号 123 および配列番号 124
Sub61 配列番号 73	B2MA/61-P 配列番号 110	B2MB/61-P 配列番号 111	
Sub79 配列番号 80	B2MA/79-P 配列番号 112	B2MB/79-P 配列番号 113	
Sub49 配列番号 28	HMBSA/49-P 配列番号 114	HMBSB/49-P 配列番号 115	5HMBS_U1 および 3HMBS_U2 それぞれ配列番号 131 および配列番号 132
Sub75 配列番号 72	HMBSA/75-P 配列番号 116	HMBSB/75-P 配列番号 117	
Sub2 配列番号 21	TFRCA/2-P 配列番号 34	TFRCB/2-P 配列番号 35	5TFRC_U1 および 3TFRC_U2 それぞれ配列番号 91 および配列番号 92
Sub72 配列番号 75	TFRCA/72-P 配列番号 38	TFRCB/72-P 配列番号 55	
Sub80 配列番号 81	TFRCA/80-P 配列番号 66	TFRCB/80-P 配列番号 67	
Sub55 配列番号 29	RPL13aA/55-P 配列番号 118	RPL13aB/55-P 配列番号 119	5RPL13a_U1 および 3RPL13a_U2 それぞれ配列番号 127 および配列番号 128
Sub80 配列番号 81	RPL13aA/80-P 配列番号 120	RPL13aB/80-P 配列番号 121	
Sub88 配列番号 88	RPL13aA/88-P 配列番号 122	RPL13aB/55-P 配列番号 119	

10

20

30

40

## 【 0 2 6 7 】

4.5. 結果: 標的の増幅およびレポーター基質の切断

ヒトゲノムDNAを含有する各MNAザイムqPCR反応は、52 および58 の両方のアニーリング温度で、遺伝子CYP2C9、TP53、B2M、HMBS、RPL13a、およびTFRCのリアルタイム検出で、経時的な蛍光の増加を示した(図7)。すべてのユニバーサル基質で、無DNA標的対照の蛍光は、DNA標的含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性MNAザイムの標的依存集合の後でユニバーサルレポーター基質の1つが切断されたことに起因することが

50

実証される。

【0268】

CYP2C9およびTP53遺伝子のMNAザイムqPCR検出の結果から、試験したユニバーサル基質はすべて、52で等価な性能を呈することが示され、基質間のCt差は0.5未満であり、増幅曲線の傾きは類似していた(表14ならびにそれぞれ図7(i)aおよび(ii)a)。より高い58の温度では、試験したシリーズ1の基質(Sub3およびSub6)は、試験したシリーズ3の基質(Sub61、Sub72、Sub74、およびSub79)よりも劣った性能を呈し、基質間のCt差は1超であり、Sub3およびSub6は、増幅曲線の傾きがより緩やかであったことから、より低い効率の反応であることが示唆される(表14およびそれぞれ図7(i)bおよび(ii)b)。これらのデータから、これらのシリーズ3の基質(Sub61、Sub72、Sub74、およびSub79)の改善された設計は、58でより効率的な切断をもたらし、高温でのこの改善された性能は、より低温でのこれらの基質の効率的切断を阻害しないことが示される。

10

【0269】

B2MおよびHMB5遺伝子のMNAザイムqPCR検出の結果から、試験したユニバーサル基質はすべて、52で等価な性能を呈することが示され、基質間のCt差はわずか約0.5であり、増幅曲線の傾きは類似していた(表14ならびにそれぞれ図7(iii)aおよび(iv)a)。より高い58の温度では、試験したシリーズ2の基質(Sub60およびSub49)は、試験したシリーズ3の基質(Sub61およびSub75およびSub79)よりも劣った性能を呈し、基質間のCt差は1超であり、Sub60およびSub49は、増幅曲線の傾きがより緩やかであったことから、より低い効率の反応であることが示唆される(表14およびそれぞれ図7(iii)bおよび(iv)b)。これらのデータから、これらのシリーズ3の基質(Sub61、Sub75、およびSub79)の改善された設計は、58でより効率的な切断をもたらし、高温でのこの改善された性能は、より低温での基質の効率的切断を阻害しないことが示される。シリーズ2の基質と対比してシリーズ3の基質の58でのより良好な性能は、シリーズ3の基質が、高活性基質の設計ガイドラインすべてを満たし、シリーズ2の基質がそうではないという事実に起因しうる(表9参照)。

20

【0270】

TFRC遺伝子のMNAザイムqPCR検出の結果から、試験したユニバーサル基質はすべて、52で等価な性能を呈することが示され、基質間のCt差はわずか約0.5であり、増幅曲線の傾きは類似していた(表14および図7(v)a)。58では、試験したシリーズ3の基質(Sub72およびSub80)は両方とも、シリーズ1の基質(Sub2)よりも良好な性能を呈し、基質間のCt差は1超であり、Sub2は、増幅曲線の傾きがより緩やかであったことから、より低い効率の反応であることが示唆される(表14および図7(v)b)。58では、シリーズ3の基質Sub80は、シリーズ3の基質Sub72よりも良好な性能を呈し、基質間のCt差は1超であった。Sub80は、高活性基質の設計ガイドラインすべてを満たし、Sub72は、そうではない(表9参照)。

30

40

【0271】

RPL13a遺伝子のMNAザイムqPCR検出の結果から、52では、シリーズ2の基質Sub55およびシリーズ3の基質Sub88は、シリーズ3の基質Sub80よりも良好にあることが示された(表14および図7(vi)a)。58では、シリーズ3の基質Sub80およびシリーズ2のSub55は、同一の性能を呈し、これらの基質は両方とも、シリーズ3の基質Sub88よりも良好な性能であった(表14および図7(vi)b)。シリーズ2の基質Sub55は、高活性基質の設計ガイドラインのすべてを満たすので(表9参照)、良好な性能を呈することが期待されよう。シリーズ3のSub88もまた、高活性基質の設計ガイドラインのすべてを満たすが(表9)、Sub55と同様な性能を示さなかった。全体的に、設計ガイドラインは、MNAザイムqPCR

50

R条件下に効率的に切断される基質が得られる高い可能性を示す。

【0272】

全体的に、一連の異なる標的配列を用いて、シリーズ1、2、および3の基質は、52で行ったMNAザイムqPCRと同等の性能を呈した。58では、シリーズ3の基質は、以上で説明したように高活性基質の設計ガイドラインのすべてにあてはまるシリーズ2の基質Sub55を除いて、シリーズ1および2の基質を上回る性能を呈した。これらのデータから、設計ガイドラインは、一般的には、qPCRに使用される熱サイクルプロトコルに関連する温度範囲でロバストであるかつ効率的に切断される基質をもたらすことが示される。

【0273】

表14に(^)により示されたシリーズ3の基質のいくつかは、非常に高いT<sub>m</sub>を有するため、より低温では切断された基質の代謝回転が不十分になる可能性があり、したがって、たとえ活性が他の基質と同等であったとしても、最終蛍光値がより低くなることは、注目に値する。

【0274】

【表 18】

表 14. さまざまな遺伝子を標的とする MNA ザイムにより切断される基質。

遺伝子	基質	52°C			58°C		
		増幅曲線*	Ct	Ct 差	増幅曲線*	Ct	Ct 差
CYP2C9	Sub3	Sub3 = Sub61	22.9	< 0.5	Sub61 > Sub3	26.7	> 1.0
	Sub61		22.5			25.2	
TP53	Sub6	すべて等しい (^Sub79)	23.0	< 0.5	Sub79 > Sub74 > Sub72 >> Sub6	27.4	(Sub79 & Sub6) > 1.5
	Sub72		22.7			24.2	
	Sub74		22.7			25.1	
	Sub79		22.6			25.8	
B2M	Sub60	Sub60 = Sub61 >Sub79 (^Sub79)	24.0	(Sub60 & Sub61) 0.1	Sub61 = Sub79 >> Sub60	28.5	> 2.0
	Sub61		23.9			25.5	
	Sub79		24.6			25.7	
HMBS	Sub49	Sub49 = Sub75 (^Sub75)	25.1	0.1	Sub75 > Sub49	28.1	> 1.0
	Sub75		25.0			27.0	
TFRC	Sub2	Sub72 > Sub2 = Sub80 (^Sub80)	23.8	0.6	Sub80 > Sub72 >> Sub2	27.1	(Sub80 & Sub2) > 2.0
	Sub72		23.2			25.7	
	Sub80		23.4			24.8	
RPL13a	Sub55	Sub55 = Sub88 > Sub80 (^Sub80)	20.3	(Sub55 & Sub88) < 0.5	Sub80 > Sub55 > Sub88	22.6	(Sub55 & Sub88) > 2.0
	Sub80		21.0			22.3	
	Sub88		20.3			24.3	

\*増幅曲線(スティーブネスおよびプラトーに達するのに要する時間)の形状は反応効率を実証する。

^これらの基質の Tm は、より低い反応温度では高すぎる。この結果、基質の切断部分の代謝回転が不十分になるので、最終蛍光値が低くなる。

## 【0275】

実施例 5 : DNA ザイムと組み合わせたユニバーサル基質の使用

10-23 DNA ザイムは、基質配列に直接結合してそれを修飾可能な単分子構造である。10-23 DNA ザイムは、in vitro 診断用途に有用である。触媒領域の類似性に起因して、10-23 DNA ザイムは、10-23 DNA ザイムベースの MNA ザイムにより切断可能な基質に結合してそれを切断することが可能である。MNA ザイムと異なり、DNA ザイムは、活性コアを形成するための標的配列を必要としないので、10-23 DNA ザイムによる基質の結合および後続の切断は、標的配列により影響されず、分離した触媒コアを利用しない。シリーズ 1 のユニバーサル基質 (Sub 2、Sub 3、

10

20

30

40

50

およびSub 6)、シリーズ2のユニバーサル基質(Sub 44、Sub 45、Sub 49、Sub 55、およびSub 60T)、およびシリーズ3の基質(Sub 61、Sub 72、Sub 73、Sub 74、Sub 75、Sub 77、Sub 79、Sub 80、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、およびSub 89)を切断するマッチ10-23 DNAザイムの能力を測定することにより、本発明の設計ガイドラインが、温度範囲にわたり高活性を有してロバストに10-23 DNAザイムにより切断可能な基質の開発をもたらすかを決定した。

【0276】

5.1. 10-23 DNAザイムオリゴヌクレオチド

以上に記載されたならびに表4および5に列挙された基質に相補的なセンサーアームを用いて、一連の10-23 DNAザイムを設計した。DNAザイムの配列は、以下では5'→3'方向に列挙されており、下線付き塩基は、基質にハイブリダイズし、イタリック体の塩基は、触媒コアを形成する。以下のいくつかのDNAザイム配列は、まさしく5'および3'末端に追加のGを含有する(たとえば、Dz 55)。これらの追加された塩基は、基質にハイブリダイズせず、DNAザイムが基質を切断する効率に影響を及ぼさない。

- 配列番号133 DNAザイム Dz 2  
TGCCCAGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGAACCTT
- 配列番号134 DNAザイム Dz 3  
CGGTTGGTGAAGGCTAGCTACAAACGAGGGTTGTGCTG
- 配列番号135 DNAザイム Dz 6  
CTGGGAGGGAAGGCTAGCTACAAACGAGAGGGCGTGAT
- 配列番号136 DNAザイム Dz 44  
TCACTATAGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGAGACCTG
- 配列番号137 DNAザイム Dz 45  
TTCCAAGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGACCCGT
- 配列番号138 DNAザイム Dz 49  
TATCACAGCCAAAGGCTAGCTACAAACGAGAGGCCAAGTTTA
- 配列番号139 DNAザイム Dz 55  
GGAGCTGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGTGCGGTG
- 配列番号140 DNAザイム Dz 60  
GTCGTGTTGGAGGGCTAGCTACAAACGAGGTGGTTGGC
- 配列番号141 DNAザイム Dz 61  
GTGGCGTGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGGTTCGAGG
- 配列番号142 DNAザイム Dz 72  
GCTGGGAGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGCGTGATG
- 配列番号143 DNAザイム Dz 73  
GCACGAGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGGACGCCAG
- 配列番号144 DNAザイム Dz 74  
GCTGGGAGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGGAGTGATG
- 配列番号145 DNAザイム Dz 75  
GTAGTGGGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGAGGGTCAAG
- 配列番号146 DNAザイム Dz 77  
GAGGAGGAGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGGAGGAGG
- 配列番号147 DNAザイム Dz 79  
GGGTTGAAGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGGAGAGGAG
- 配列番号148 DNAザイム Dz 80  
GGGTTTCACGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGGC GGTTGG
- 配列番号149 DNAザイム Dz 84  
GCTGGGAGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGGTGC GGTTG

10

20

30

40

50

配列番号 150 DNAザイム Dz 85  
GCTGGGAGGGGAGGCTAGCTACAAACGAGAGGTTGCCGGTG  
 配列番号 151 DNAザイム Dz 86  
GGAGCTGGGGAGGCTAGCTACAAACGAGAGGCGTGATG  
 配列番号 152 DNAザイム Dz 87  
GGAGCTGGGGAGGCTAGCTACAAACGAGGGGAGTGATG  
 配列番号 153 DNAザイム Dz 88  
GGAGCTGGGGAGGCTAGCTACAAACGAGAGGGGAGGAGG  
 配列番号 154 DNAザイム Dz 89  
GAGGAGGAGGGAGGCTAGCTACAAACGAGAGGTTGCCGGTG

10

【0277】

5.2. レポーター基質

本実施例では、基質は、5'末端を6-FAM部分(以下の基質名では「F」により表される)で、3'末端をIowa Black(登録商標)FQクエンチャー部分(以下の基質名で「IB」により表される)で、末端標識した。基質の切断は、450~490nmの励起(CFX96(BioRad)に基づくFAM励起波長領域)を用いて510~530nm(CFX96(BioRad)に基づくFAM発光波長範囲)でモニターした。この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。

配列番号 21 Sub 2 - FIB :  
 AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA  
 配列番号 22 Sub 3 - FIB :  
 CAGCACAAACCGuCACCAACCG  
 配列番号 23 Sub 6 - FIB :  
 ATCACGCCTCguTCCTCCAG  
 配列番号 25 Sub 44 - FIB :  
 CAGGTCTCCTCguCCCTATAGTGA  
 配列番号 26 Sub 45 - FIB :  
 ACGGGTCCCGuCTCCTTTGGA  
 配列番号 28 Sub 49 - FB :  
 TAAACTTGGCTCguTGGCTGTGATA  
 配列番号 29 Sub 55 - FIB :  
 ACCGCACCTCguCCCAAGCTC  
 配列番号 72 Sub 60T - FIB :  
 TGCCAACCAACguCCAACACGAC  
 配列番号 73 Sub 61 - FIB :  
 CTCGACCCTCGuCTCCACGCCA  
 配列番号 75 Sub 72 - FIB :  
 ATCACGCCTCguCTCCTCCAG  
 配列番号 76 Sub 73 - FB :  
 TGGCGTCCCGuCCCTCGTG  
 配列番号 77 Sub 74 - FIB :  
 ATCACTCCCGuCCCTCCAG  
 配列番号 78 Sub 75 - FIB :  
 TGACCCTCCTCguCTCCCACTA  
 配列番号 79 Sub 77 - FB :  
 CTCCTCCTCguCCCTCCTCCT  
 配列番号 80 Sub 79 - FIB :  
 TCCTCTCCCGuCCCTTCAACC  
 配列番号 81 Sub 80 - FIB :

20

30

40

50

A A C C G C C C T C g u C C C G T G A A C C

配列番号 84 Sub 84 - F I B :

A C C G C A C C T C g u C T C C T C C C A G

配列番号 85 Sub 85 - F I B :

A C C G C A C C T C g u C C C C T C C C A G

配列番号 86 Sub 86 - F I B :

A T C A C G C C T C g u C C C C A G C T C

配列番号 87 Sub 87 - F I B :

A T C A C T C C C C g u C C C C A G C T C

配列番号 88 Sub 88 - F I B :

C T C C T C C C T C g u C C C C A G C T C

配列番号 89 Sub 89 - F I B :

A C C G C A C C T C g u C C C T C C T C C T

【 0 2 7 8 】

5.3. 反応成分： 50 ~ 60 の温度でのDNAザイムによる基質の切断

マッチDNAザイムによる結合および後続の切断により引き起こされる蛍光シグナルの増加により、基質の切断を測定した。マッチDNAザイムによる各基質の切断を測定すべく、個別の反応を構成した(表15のようなオリゴヌクレオチド)。反応は、25 $\mu$ Lの全体積中に1 $\times$ PCR緩衝液II(Applied Biosystems)、10mMのMgCl<sub>2</sub>、200nMの基質、およびNF-H<sub>2</sub>Oを含有するものであった。各反応は、「試験」(1nM DNAザイム添加)反応または「対照」(NF-H<sub>2</sub>O添加)反応のいずれかとして二重試験方式で行った。反応は、50、52、54、56、58、および60で、CFX96(商標)Real-Time PCR Detection System(BioRad)を用いて行った。各反応の蛍光は、最初の50サイクルでは1秒後に読み取るようにプログラムし、その後、その次の50サイクルでは25秒後に読み取るようにプログラムした。

【 0 2 7 9 】

10

20

【表 19】

表 15: マッチング基質を用いて試験した DNA ギャップ

基質	DNA ギャップ
Sub2 配列番号 21	Dz2 配列番号 133
Sub3 配列番号 22	Dz3 配列番号 134
Sub6 配列番号 23	Dz6 配列番号 135
Sub44 配列番号 25	Dz44 配列番号 136
Sub45 配列番号 26	Dz45 配列番号 137
Sub49 配列番号 28	Dz49 配列番号 138
Sub55 配列番号 29	Dz55 配列番号 139
Sub60T 配列番号 72	Dz60 配列番号 140
Sub61 配列番号 73	Dz61 配列番号 141
Sub72 配列番号 75	Dz72 配列番号 142
Sub73 配列番号 76	Dz73 配列番号 143
Sub74 配列番号 77	Dz74 配列番号 144
Sub75 配列番号 78	Dz75 配列番号 145
Sub77 配列番号 79	Dz77 配列番号 146
Sub79 配列番号 80	Dz79 配列番号 147
Sub80 配列番号 81	Dz80 配列番号 148
Sub84 配列番号 84	Dz84 配列番号 149
Sub85 配列番号 85	Dz85 配列番号 150
Sub86 配列番号 86	Dz86 配列番号 151
Sub87 配列番号 87	Dz87 配列番号 152
Sub88 配列番号 88	Dz88 配列番号 153
Sub89 配列番号 89	Dz89 配列番号 154

10

20

30

40

【0280】

5.5. 結果： 種々の温度での DNA ギャップによる基質の切断

マッチ基質と共に DNA ギャップを含有する各試験反応は、経時的に蛍光の増加を示した。水のみでの対照反応（DNA ギャップ無添加）の蛍光の増加はなかった。このことから、DNA ギャップ含有反応で生じた蛍光の増加は、DNA ギャップによる結合および後続のレポーター基質の触媒切断によるものであることが実証される。

【0281】

各基質データセット（試験反応および対照反応）で、生の蛍光データ点を Excel (Microsoft) にエクスポートし、二重試験値を平均し、次いで、規格化した。規格化は、各平均データ点を同一の基質を含有する反応の最初の読取り時の無 DNA ギャップ

50

反応の平均値で割り算することにより行った（たとえば、Sub 61の試験反応の平均データをSub 61の無DNAザイム対照反応の1サイクル目の平均蛍光で割り算し、Sub 61の無DNAザイム対照反応の平均データをSub 61の無DNAザイム対照反応の1サイクル目の平均蛍光で割り算した）。次いで、これら規格化データを用いて、10分間の時点での試験反応の規格化蛍光を10分間の時点での無DNAザイム反応の規格化蛍光で割り算することにより、反応開始の約10分間後のシグナル対ノイズ比を計算した。シグナル対ノイズのこの計算は、DNAザイムと基質との各組合せに対して試験した各温度で行った。次いで、種々の温度でそのマッチDNAザイムによる各基質の切断効率を比較するために、シグナル対ノイズ値を棒グラフ上にプロットした（図8(i)）。温度範囲にわたり各基質のシグナル対ノイズ比の標準偏差も計算してプロットし、試験した温度範囲にわたり一貫性のあるシグナル対ノイズを有する基質を決定した（図8(ii)）。このことから、これら基質は温度に対してロバストであることが示唆される。

10

**【0282】**

実験誤差に起因して、54でのSub 2のデータまたは58でのSub 79のデータは存在しないが、これがデータの全体的解釈に及ぼす影響はきわめて少ない。

**【0283】**

各基質に対するシグナル対ノイズ比の分析（図8(i)）から、シリーズ1の基質（Sub 2、Sub 3、およびSub 6）は、より低い測定温度で、より高いシグナル対ノイズを有していたことが示される。しかしながら、これらの基質の切断効率は、反応温度を上昇させた場合、劇的に低下した。シリーズ2の基質のサブセット（Sub 44、Sub 45、Sub 49、およびSub 60T）に対して、類似のパターンが見られた。他のシリーズ2の基質（Sub 55）および試験したシリーズ3の基質の大多数（Sub 61、Sub 72、Sub 74、Sub 75、Sub 79、Sub 80、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、およびSub 89）は、試験したすべての温度にわたり高いシグナル対ノイズを呈した。シリーズ3の基質Sub 73およびSub 77は、試験したすべての温度で様に低いシグナル対ノイズを有していたことから、新しい設計ガイドラインは、ロバストな基質の良好な設計可能性を提供するが（本出願では83%の成功率）、これらのガイドラインプトを満たしても、一部のMNAザイムおよび/またはDNAザイムの診断用途に適さない配列が、依然としていくつか存在することが示唆される。また、Sub 73およびSub 77の結果から、qPCR用途でロバストでありMNAザイムにより効率的に切断される基質の検出に関して、可能性のある基質配列の大量スクリーニングにDNAザイムを利用してMNAザイム診断用途に好適なものを見いだす方法は、見落としを生じる可能性があり、その逆も同様であることが明らかである（図5のMNAザイムqPCRにおけるSub 73およびSub 77の利用の成功例については、実施例2を参照されたい）。

20

30

**【0284】**

全体的に、設計ガイドラインのすべてを満たす基質の大多数（表9）は、これらのガイドラインの1つ以上にあてはまらない基質よりも、試験した温度範囲にわたり大きいシグナル対ノイズ比を示した（図8(i)）。より特定的には、Sub 55、Sub 61、Sub 72、Sub 74、Sub 75、Sub 79、Sub 80、Sub 84、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、およびSub 89を用いた反応は、試験したすべての温度で高いシグナル対ノイズ値を呈したことから、これらは、温度範囲にわたりロバストな基質であることが実証される。この改善は、各基質に対して温度にわたりシグナル対ノイズ比から標準偏差を計算した時、さらに明白であった（図8(ii)）。この変動測定では、試験した温度範囲にわたり、シリーズ2の基質Sub 55ならびにシリーズ3の基質Sub 61、Sub 72、Sub 74、Sub 75、Sub 79、Sub 80、Sub 82、Sub 83、Sub 85、Sub 86、Sub 87、Sub 88、およびSub 89は、試験した温度範囲にわたり類似のシグナル対ノイズを有することが示されたので、広い温度範囲にわたりロバストな基質であることが実証される。Sub 60T、Sub 73、およびSub 77は、温度範囲にわたりシグナル対ノイズの標準偏差が

40

50

小さいことが実証されるが、絶対的なシグナル対ノイズがすべての温度で非常に低いので、本出願ではこれらの基質がロバストな基質から除外されることに留意されたい。

【0285】

実施例6：MNAザイムqPCRを用いたユニバーサル基質の非特異的切断に関する試験。

MNAザイムは、PCRのような、*in vitro* 標的増幅方法を用いて、標的核酸の増幅をリアルタイムで観察するのに使われ得る。増幅と検出はPCR増幅およびMNAザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで実施される。個々の標的に特異的な標的センサーアームを有するパートザイムを用いて、単一の反応槽内で複数の標的を増幅および検出することが可能である。第1の標的を検出するためのパートザイムは、第1の基質に結合してそれを切断し、第2の標的を検出するためのパートザイムは、第2の基質に結合してそれを切断するであろう。標的の検出を特異的なものとするために、反応ミックス中の任意の他の基質を切断するように設計されたパートザイムによる基質の非特異的切断を存在させることはできない。

【0286】

MNAザイムパートザイムの基質センサーアームと反応時に存在する他の基質との相補度は、結合の特異性に影響を及ぼす。リボヌクレオチドに最も近い塩基の十分な相補性は、特異的切断により重要である。効率的に切断されるユニバーサル基質の形成の設計ガイドラインは、ユニバーサル基質の配列組成に関する制約を含む。すなわち、リボヌクレオチド(N4~N13)を取り囲む10個の塩基中7個以上はシトシンヌクレオチドであり、リボヌクレオチドに直接隣接した塩基(N8およびN9)はシトシンであり、基質の全含有率は>64%ピリミジン有する。これらの制約は、リボヌクレオチドの近くの基質の配列の類似性をもたらす可能性があり、とくに、一連のユニバーサル基質が単一の反応ミックス中にそれらの関連パートザイムと共に存在する多重方式では、部分的にマッチしたパートザイムによるユニバーサル基質の非特異的切断を引き起こす可能性がある。基質が、第2の基質を特異的に切断するように設計された部分的にマッチしたパートザイムにより非特異的に切断される場合、その特定の組合せの基質は、多重方式で使用するのに好適ではない可能性がある。

【0287】

この実施例では、Sub44、Sub55、Sub72、およびSub74に会合するパートザイムによる非特異的切断活性に関して、ユニバーサル基質Sub44、Sub55、Sub61、Sub65、Sub72、およびSub74を試験した。これは、他の基質に十分な相補性で結合するように設計されたパートザイム対を用いて各ユニバーサル基質を個別に試験して、シグナルがMNAザイムqPCR方式で検出されるかを調べることを含んでいた。それぞれの基質が3つの塩基のみ異なることから、Sub72およびSub74のパートザイムをこの試験に選択した(図9(i)aおよび(ii)a)。リボヌクレオチドの周りの中心領域(N4~N13)が非常に類似していることから、Sub55のパートザイムを選択してSub61およびSub65により試験した(図9(ii)a)。他の基質にそれほど類似していないことから、Sub44のパートザイムを対照として選択した(図9(iv)a)。

【0288】

6.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

非相補的パートザイムによる非特異的切断に関して試験すべく行った実験では、ヒトRPL13a遺伝子に相補的な標的センサーアームと以上で考察したユニバーサル基質のそれぞれに相補的な基質センサーアームとを有するパートザイムオリゴヌクレオチドAおよびBを設計した。AおよびBのパートザイムの配列は、以下では5' 3'方向に列挙されている。下線付き塩基は、基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号155 パートザイムA RPL13aA/44-P:

A A T T G A C A A A T A C A C A G A G G T C A C A A C G A G A G G A G A C C T

G

配列番号 156 パートザイム B RPL13aB / 44 - P :

T C A C T A T A G G G A G G C T A G C T C T C A A G A C C C A C G G A C T C C

## T

配列番号 118 パートザイム A RPL13aA / 55 - P

T T G A C A A A T A C A C A G A G G T C A C A A C G A G A G G T G C G G T

配列番号 119 パートザイム B RPL13aB / 55 - P

G A G C T G G G G A G G C T A G C T C T C A A G A C C C A C G G A C T C C T

配列番号 157 パートザイム A RPL13aA / 72 - P :

A A T T G A C A A A T A C A C A G A G G T C A C A A C G A G A G G C G T G A T

10

配列番号 158 パートザイム B RPL13aB / 72 - P :

C T G G G A G G A G A G G C T A G C T C T C A A G A C C C A C G G A C T C C T

配列番号 159 パートザイム A RPL13aA / 74 - P :

A A T T G A C A A A T A C A C A G A G G T C A C A A C G A G G G G A G T G A T

配列番号 160 パートザイム B RPL13aB / 74 - P :

C T G G G A G G G G A G G C T A G C T C T C A A G A C C C A C G G A C T C C T

## 【0289】

## 6.2. レポーター基質

本実施例では、基質は、5'末端を6-FAM部分(以下の基質名では「F」により表される)で、3'末端をIowa Black(登録商標)FQクエンチャー部分(以下の基質名で「IB」により表される)で、末端標識した。485nm(FAM励起波長)の励起を用いて530nm(FAM発光波長)で基質の切断をモニターした。この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。

20

配列番号 25 Sub44 - FB :

C A G G T C T C C T C g u C C C T A T A G T G A

配列番号 29 Sub55 - FB :

A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C

配列番号 73 Sub61 - FB :

C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A

30

配列番号 74 Sub65 - FB :

T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A

配列番号 75 Sub72 - FB :

A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G

配列番号 77 Sub74 - FB :

A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G

## 【0290】

## 6.3. 標的配列およびRPL13a増幅用のPCRプライマー

この実施例の標的配列は、以下に列挙したオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用いて、IM9細胞系から抽出されたヒトゲノムDNA(Promega)の*in vitro* PCR増幅により産生された、RPL13a遺伝子のPCRアンプリコンであった。この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。

40

配列番号 161 フォワードプライマー 5RPL13a :

A C C G G A A G A A G A A A C A G C T C A

配列番号 162 リバースプライマー 3RPL13a :

G A G G A A T T A A C A G T C T T T A T T G G

## 【0291】

6.4. 反応成分: 増幅およびユニバーサル基質の特異的および非特異的な切断の測定

標的配列のリアルタイムPCR増幅および検出は、25μLの全反応空間内で行った。

50

すべての反応をMx3005P QPCRシステム(Stratagene)で行った。サイクルパラメーターは、95 で2分間、95 で15秒間と52 で60秒間とを40サイクル(52 でデータを収集した)。表16の基質およびパートザイムを用いて反応を構成した。反応条件の各セットは、二重試験方式で試験され、40nMの5RPL13aおよび200nMの3RPL13a、200nMのパートザイムA、200nMのパートザイムB、200nMの基質、8mMのMgCl<sub>2</sub>、200μMの各dNTP、10単位、RNasin(Promega)、1×Immobuffer(Bioline)、2単位のMyTaqHS(商標)DNAポリメラーゼ(Bioline)、およびゲノムDNA鋳型(50ng)または無標的(NF-H2O)のいずれかを含有していた。

【0292】

【表 2 0】

表 16: 各ユニバーサル基質に対して使用したパートザイムの組合せ

パートザイム	基質	試験の対象
RPL13aA/44-P 配列番号 155 および RPL13aB/44-P 配列番号 156	Sub44 配列番号 25	特異的切断
	Sub55 配列番号 29	非特異的切断
	Sub61 配列番号 73	非特異的切断
	Sub65 配列番号 74	非特異的切断
	Sub72 配列番号 75	非特異的切断
	Sub74 配列番号 77	非特異的切断
RPL13aA/55-P 配列番号 118 および RPL13aB/55-P 配列番号 119	Sub44 配列番号 25	非特異的切断
	Sub55 配列番号 29	特異的切断
	Sub61 配列番号 73	非特異的切断
	Sub65 配列番号 74	非特異的切断
	Sub72 配列番号 75	非特異的切断
	Sub74 配列番号 77	非特異的切断

10

20

30

40

【 0 2 9 3 】

【表 2 1】

RPL13aA/72-P 配列番号 157 および RPL13aB/72-P 配列番号 158	Sub44 配列番号 25	非特異的切断	10
	Sub55 配列番号 29	非特異的切断	
	Sub61 配列番号 73	非特異的切断	
	Sub65 配列番号 74	非特異的切断	
	Sub72 配列番号 75	特異的切断	
	Sub74 配列番号 77	非特異的切断	
RPL13aA/74-P 配列番号 159 および RPL13aB/74-P 配列番号 160	Sub44 配列番号 25	非特異的切断	30
	Sub55 配列番号 29	非特異的切断	
	Sub61 配列番号 73	非特異的切断	
	Sub65 配列番号 74	非特異的切断	
	Sub72 配列番号 75	非特異的切断	
	Sub74 配列番号 77	特異的切断	

## 【 0 2 9 4 】

6.5. 結果： MNA ザイムによる特異的切断および潜在的非特異的切断の測定

ユニバーサル基質に十分に相補的な基質センサーアームを有するパートザイムと共にゲノム DNA およびユニバーサル基質を含有するすべての反応で、蛍光の増加が見られた（すなわち、特異的切断を試験する反応）。無 DNA 標的対照の蛍光は、特異的切断を試験する反応での蛍光よりも少なかったことから、特異的切断を試験する反応での蛍光の増加は、触媒活性 MNA ザイムの標的依存集合の後で十分に相補的なユニバーサルレポーター基質が切断されたことに起因することが実証される。

## 【0295】

交差反応性を試験するいずれの反応でも、蛍光の増加はなかった（図9（i）b～（i）v）b）。このことから、これらの近縁のユニバーサル基質を切断するように設計されたパートザイムは、十分な相補性を有する基質のみを切断したことが実証される。これらのデータから、これらのユニバーサル基質は、多重MNAザイムqPCRアッセイに適合することが示される。

## 【0296】

実施例7：DNAザイムによるユニバーサル基質の非特異的切断に関する試験

10-23DNAザイムは、基質配列に直接結合してそれを修飾可能な単分子構造である。MNAザイムと異なり、10-23DNAザイムは、活性コアを形成するための標的配列を必要としないので、10-23DNAザイムによる基質の結合および後続の切断は、標的配列により影響されず、分離した触媒コアを有していない。

10

## 【0297】

DNAザイムのセンサーアームと基質との相補度は、結合の特異性に影響を及ぼす。リボヌクレオチドに最も近い塩基の十分な相補性は、特異的切断により重要である。効率的に切断されるユニバーサル基質の形成の設計ガイドラインは、ユニバーサル基質の配列組成に関する制約を含む。すなわち、リボヌクレオチド（N4～N13）を取り囲む10個の塩基中7個以上はシトシンヌクレオチドであり、リボヌクレオチドに直接隣接した塩基（N8およびN9）はシトシンであり、基質の全含有率は>64%ピリミジンを含む。これらの制約は、リボヌクレオチドの近くの基質の配列の類似性をもたらす可能性があり、とくに、一連のユニバーサル基質が単一の反応ミックス中にそれらの関連DNAザイムと共に存在する多重方式では、部分的にマッチしたDNAザイムによるユニバーサル基質の非特異的切断を引き起こす可能性がある。基質が、第2の基質を特異的に切断するように設計された部分的にマッチしたDNAザイムにより非特異的に切断される場合、その特定の組合せの基質は、多重方式で使用するのに好適ではない可能性がある。

20

## 【0298】

この実施例では、非特異的切断活性に関して、ユニバーサル基質Sub55、Sub61、Sub72、Sub74、Sub75、Sub79、Sub80、およびSub8、ならびにそれらの関連10-23DNAザイムを試験した。これは、すべての他の基質に十分な相補性で結合するように設計されたDNAザイムを用いてすべてのユニバーサル基質を個別に試験して、シグナルが等温検出方式で検出されるかを調べることを含んでいた。基質の異なる領域に類似の配列を有することから、これらの基質を試験するように選択した。

30

## 【0299】

7.1. 10-23DNAザイムオリゴヌクレオチド

非相補的DNAザイムによる非特異的切断を試験すべく行った実験で使用した10-23DNAザイムは、以下では5' 3'方向に列挙されており、下線付き塩基は、基質にハイブリダイズし、イタリック体の塩基は、触媒コアを形成する。以下のいくつかのDNAザイム配列は、まさしく5'および3'末端に追加のGを含有する。これらの追加された塩基は、基質配列にハイブリダイズせず、DNAザイムが基質を切断する効率に影響を及ぼさない。

40

配列番号139 DNAザイム Dz55

GGAGCTGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGTTGCGGTG

配列番号141 DNAザイム Dz61

GTGGCGTGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGTTCGAGG

配列番号142 DNAザイム Dz72

GCTGGGAGGAGAGGGCTAGCTACAAACGAGAGGCCTGATG

配列番号144 DNAザイム Dz74

GCTGGGAGGGGAGGGCTAGCTACAAACGAGGGGAGTGATG

配列番号145 DNAザイム Dz75

50

G T A G T G G G G A G A G G C T A G C T A C A A C G A G A G G A G G G T C A G

配列番号 147 DNAザイム Dz 79

G G G T T G A A G G G G A G G C T A G C T A C A A C G A G G G G A G A G G A G

配列番号 148 DNAザイム Dz 80

G G G T T C A C G G G A G G C T A G C T A C A A C G A G A G G G C G G T T G G

配列番号 150 DNAザイム Dz 85

G C T G G G A G G G G A G G C T A G C T A C A A C G A G A G G T G C G G T G

【0300】

### 7.2. レポーター基質

本実施例では、基質は、5'末端を6-FAM部分(以下の基質名では「F」により表される)で、3'末端をIowa Black(登録商標)FQクエンチャー部分(以下の基質名で「IB」により表される)で、末端標識した。基質の切断は、450~490nmの励起(CFX96(BioRad)に基づくFAM励起波長領域)を用いて510~530nm(CFX96(BioRad)に基づくFAM発光波長範囲)でモニターした。この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。

10

配列番号 29 Sub 55 - FIB:

A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C

配列番号 73 Sub 61 - FIB:

C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A

20

配列番号 75 Sub 72 - FIB:

A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G

配列番号 77 Sub 74 - FIB:

A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G

配列番号 78 Sub 75 - FIB:

T G A C C C T C C T C g u C T C C C C A C T A

配列番号 80 Sub 79 - FIB:

T C C T C T C C C C g u C C C C T T C A A C C

配列番号 81 Sub 80 - FIB:

A A C C G C C C T C g u C C C G T G A A C C

30

配列番号 85 Sub 85 - FIB:

A C C G C A C C T C g u C C C C T C C C A G

【0301】

7.3. 反応成分: 52 および58 でのDNAザイムによるユニバーサル基質の特異的切断および潜在的な非特異的切断の測定

DNAザイムによる基質の結合および後続の修飾により引き起こされる蛍光シグナルをモニターすることにより、ユニバーサル基質の切断を測定した。DNAザイムによるユニバーサル基質の切断は、フルオロフォアとクエンチャーとの分離を引き起こして蛍光の増加をもたらすであろう。表17にまとめられている反応はすべて、25μLの全体積中に1×PCR緩衝液II(Applied Biosystems)、10mMのMgCl<sub>2</sub>、200nMの基質、およびNF-H<sub>2</sub>Oを含有するものであった。各反応は、「試験」(10nM DNAザイム添加)反応または「対照」(NF-H<sub>2</sub>O添加)反応のいずれかとして二重試験方式で行った。反応は、52および58 で、CFX96(商標)Real-Time PCR Detection System(BioRad)を用いて行った。各反応の蛍光は、最初の50サイクルでは1秒後に読み取るようにプログラムし、その後、その次の50サイクルでは25秒後に読み取るようにプログラムした。

40

【0302】

【表 2 2】

表 17: 特異的および非特異的な切断に関して試験した DNA ザイム-基質の組合せ

	Dz55	Dz61	Dz72	Dz74	Dz75	Dz79	Dz780	Dz85
Sub55	test	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub61	-ve	test	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub72	-ve	-ve	test	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub74	-ve	-ve	-ve	test	-ve	-ve	-ve	-ve
Sub75	-ve	-ve	-ve	-ve	test	-ve	-ve	-ve
Sub79	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	test	-ve	-ve
Sub80	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	test	-ve
Sub85	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	test

test; 十分に相補的な基質および DNA ザイムアーム(特異的切断に関する試験)

-ve; 対照反応、十分に相補的でない基質および DNA ザイムアーム(非特異的切断に関する試験)

## 【 0 3 0 3】

7.5. 結果: DNA ザイムによる特異的切断および潜在的非特異的切断の測定 DNA ザイム

DNA ザイムとその十分に相補的な基質とを含有する各「試験」反応では、蛍光の増加が見られた。DNA ザイムを含有していなかったいずれの反応(DNA ザイム無添加)でも、蛍光の増加はなかった。このことから、DNA ザイム含有「試験」反応で生じた蛍光の増加は、DNA ザイムによる結合および後続のレポーター基質の触媒切断によるものであることが実証される。

## 【 0 3 0 4】

各基質データセット(試験反応および対照反応)で、生の蛍光データ点を Excel (Microsoft) にエクスポートし、二重試験値を平均し、次いで、規格化した。規格化は、各平均データ点を同一の基質を含有する反応の最初の読取り後の無 DNA ザイム反応の平均値で割り算することにより行った(たとえば、Sub 61 の試験反応の平均データを Sub 61 の無 DNA ザイム反応の 1 サイクル目の平均蛍光(最初の 8 秒間後)で割り算し、Sub 61 の無 DNA ザイム対照反応の平均蛍光を無 DNA ザイム対照反応の 1 サイクル目の平均蛍光で割り算した)。次いで、これらの規格化データを用いて、10 分間の時点での試験規格化蛍光を 10 分間の時点での無 DNA ザイム規格化蛍光で割り算することにより、10 分間の時点でのシグナル対ノイズ比を計算した。このシグナル対ノイズの計算は、各温度で行った。次いで、シグナル対ノイズ比を棒グラフ上にプロットして、試験した種々の温度で各 DNA ザイムによる各ユニバーサル基質の切断効率を比較した(図 10 (i) および (ii))。

## 【 0 3 0 5】

基質と非相補的 DNA ザイムとの種々の組合せを有するいくつかの反応は、対をなす無 DNA ザイム対照反応と比較して蛍光レベルのわずかな上昇を示した。このシグナルは、経時的に増加しなかったため、非相補的 DNA ザイムによるユニバーサル基質の切断の指標とならない。この水平バックグラウンド蛍光を示す検出プロットはすべて、1.2 未満のシグナル対ノイズを有していた。したがって、1.2 超のシグナル対ノイズを示すいずれの反応も、(i) ユニバーサル基質の切断の指標となるか(特異的もしくは非特異的のいずれか)、または(ii) 基質と非相補的 DNA ザイムとの特定の組合せが、多重方式の場合、特異的切断から識別可能でないバックグラウンドノイズレベルを生じることの指標となるか、のいずれかであるとみなされた。

## 【 0 3 0 6】

ユニバーサル基質とその十分にマッチした DNA ザイムとの組合せはすべて、試験した両方の温度で高いシグナル対ノイズ比(1.2 の閾値を超える)を示した(図 10 (i))

10

20

30

40

50

および ( i i ) ) 。

【 0 3 0 7 】

いずれの温度でも、いかなる非相補的 DNA ザイムによるユニバーサル基質 S u b 6 1、S u b 7 4、S u b 7 5、S u b 7 9、および S u b 8 0 の非特異的切断も、なかった ( 図 1 0 ( i ) および ( i i ) ) 。

【 0 3 0 8 】

5 2 では、いくつかのユニバーサル基質は、基質に十分にマッチしなかった DNA ザイムにより切断された ( この場合、切断は、以上に記載の 1 . 2 の閾値を超えるシグナル対ノイズ比として定義される ) 。非特異的切断を示す組合せは、D z 5 5 により非特異的に切断された S u b 8 5、D z 7 4 および D z 8 5 により非特異的に切断された S u b 7 2、および D z 8 5 により非特異的に切断された S u b 5 5 であった ( 図 1 0 ( i ) ) 。

10

【 0 3 0 9 】

S u b 5 5 と D z 8 5 とは 4 塩基のみ異なるので、D z 8 5 による S u b 5 5 の非特異的切断が予想されうる。S u b 5 5 と D z 8 5 とのアライメントから、4 塩基のミスマッチは、リボヌクレオチドに近接するクリティカル領域から離れて 3 ' 基質アームの遠位端にあることが示される ( 表 1 8 ) 。さらに、4 塩基の 1 つは、A / T および G / C マッチよりも弱いとはいえ、いくらかの親和性で結合することが当技術分野で公知の G / T ミスマッチである。S u b 8 5 と D z 5 5 とは 5 塩基のみ異なり、この 5 塩基ミスマッチは、リボヌクレオチドに近接するクリティカル領域から離れて 3 ' 基質アームの遠位端に見いだされるので、D z 5 5 による S u b 8 5 の非特異的切断もまた、予想されうる ( 表 1 8 ) 。しかしながら、以上の逆のシナリオとは異なり、G / T ミスマッチは存在しないので、S u b 8 5 は、S u b 5 5 と D z 8 5 との逆の組合せと同程度に効率的に切断されることはないと思われる。S u b 7 2 と S u b 7 4 とは 3 塩基のみ異なるので、D z 7 4 による S u b 7 2 の非特異的切断が予想されうる。S u b 7 2 と D z 7 4 とのアライメントから、リボヌクレオチドに最も近い 2 つのミスマッチは、G / T ミスマッチであることが示される ( 表 1 8 ) 。このことはまた、なぜ S u b 7 4 が D z 7 2 により切断されないかを説明する。つまり、2 つのミスマッチは C / A であり、これはリボヌクレオチドの非常に近くに存在し、DNA ザイムによる基質の切断を無効にするのに十分である ( 表 1 8 ) 。表 1 8 の配列のアライメントにより、D z 8 5 による S u b 7 2 の非特異的切断を説明することが可能である。これは、ミスマッチ塩基が主に G / T であることを示すので、D z 8 5 を S u b 7 2 に結合させてそれを切断するであろう。この場合も、D z 7 2 が S u b 8 5 を非特異的に切断するという逆の状況は予想されないであろう。なぜなら、関連ミスマッチが、より不安定性の C / A ミスマッチになるので、おそらく、DNA ザイムと基質との十分に強い結合を引き起こして切断することはないであろう。

20

30

【 0 3 1 0 】

## 【表 2 3】

表 18. 非特異的切断が観測された基質と DNA ザイムとのアライメント。

	オリゴヌクレオチド名	配列 <sup>^</sup>
基質	Sub55 (配列番号 29)	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC
DNA ザイム	Dz85 (配列番号 150)	GTGGCGTGGAG AGGGGAGGGT <u>TCG</u> GA GG AC CT ACATCGA
基質	Sub85 (配列番号 85)	ACCGCACCTCguCCCCTCCAG
DNA ザイム	Dz55 (配列番号 139)	GTGGCGTGGAG AGGGGTCGAGG GA GG AC CT ACATCGA
基質	Sub72 (配列番号 75)	ATCACGCCTCguCTCCTCCA
DNA ザイム	Dz74 (配列番号 144)	GTAGTGAGGGG AGGGGAGGGT <u>TCG</u> GA GG AC CT ACATCGA
基質	Sub72 (配列番号 75)	ATCACGCCTCguCTCCTCCAG
DNA ザイム	Dz85 (配列番号 150)	GTGGCGTGGAG AGGGGAGGGT <u>TCG</u> GA GG AC CT ACATCGA
基質	Sub74 (配列番号 77)	ATCAC <u>TCCC</u> CguCCCCTCCAG
DNA ザイム	Dz72 (配列番号 142)	GTAGTGCGGAG AGAGGAGGGT <u>TCG</u> GA GG AC CT ACATCGA

<sup>^</sup>5'→3'方向に書かれた基質配列および3'→5'方向に書かれた DNA ザイム配列。

ミスマッチ塩基はボールド体かつ下線付きであり、G/T であるミスマッチ塩基はボールド体のみである。

DNA ザイムコア配列はイタリック体である。

## 【0311】

反応温度を 58 に上昇させたところ、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのよりストリンジентな条件が形成され、52 で見られた非特異的切断はほとんどすべての消失した(図 10 (ii))。58 で非特異的切断を示したユニバーサル基質と DNA ザイムとの唯一の組合せは、Dz85 による Sub55 の非特異的切断であった。Sub55 および Dz85 は 4 塩基のみ異なり、この 4 塩基ミスマッチは、リボヌクレオ

10

20

30

40

50

チドに近接するクリティカル領域から離れて基質アームの遠位端に見いだされ、ミスマッチの1つはG/Tであることから、この非特異性は、予想されうる(表18)。Sub 7 2とSub 7 4とは3塩基のみ異なるだけであるが、この3塩基ミスマッチは、リボヌクレオチドの近くのクリティカル領域に生じるので、特異性にはきわめて重大であり、オリゴヌクレオチドの結合に対してよりストリンジেন্টな条件を形成するより高い温度では、さらに不安定化するであろう。

#### 【0312】

これらの結果から、設計ガイドラインは、10-23 DNA ザイムを必要とする用途の温度範囲で効果的に多重化可能なユニバーサル基質を生成することが実証される。基質のいくつかの組合せに十分な結合ストリンジエンシーを提供するように、ただし、全体的に、ガイドラインが、多重化可能な基質のセットを生成するように、反応温度のいくらかの最適化の必要性が存在する。基質およびDNA ザイム結合アームの長さを調整することにより、より低いおよびより高い温度でよりストリンジেন্টな結合を形成することが可能であることは、当業者であれば理解しうる。

10

#### 【0313】

実施例8: 52 または58 のアニーリング温度を用いて多重反応で5つの異なる核酸標的の定量を行う多重MNA ザイム qPCR と組み合わせたユニバーサル基質の使用。

qPCR などの *in vitro* 標的増幅方法を用いて、リアルタイムで複数の標的を同時に増幅および検出することが可能である。さらに、複数のユニークMNA ザイムを含む1つの多重化反応により、リアルタイムで標的の増幅を同時にモニターすることが可能である。1つの標的に特異的なセンサーアームと、一連のユニバーサル基質のユニークメンバーに特異的な基質アームと、を用いて、各MNA ザイムを設計することが可能である。一連のユニバーサル基質のそれぞれが異なるフルオロフォアで標識されるのであれば、各標的を個別に検出することが可能である。複数の標的の増幅および検出は、PCR 増幅およびMNA ザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで実施される。リアルタイムモニタリングでは、曲線の形状(スティーブネスおよびプラトーに達する速度)により反応効率を表しうる増幅曲線を作成する。

20

#### 【0314】

当技術分野で使用されるMNA ザイム qPCR のアニーリング/検出温度は、50~54 である。この温度は、当技術分野で公知のユニバーサル基質が、効率的に切断される温度に課される限定条件を有し、シリーズ1のユニバーサル基質の効率的な切断では54 が上限であるという事実により決定された。多重反応での組合せおよびより高い温度での効率的切断が可能な一群のユニバーサル基質の必要性が存在する。これにより、より高い温度でアニールするプライマーおよびパートザイムを設計したりG/Cリッチ鑄型を標的としたりうえでの柔軟性を高めることが可能になるだけでなく、標準的アニーリング/検出温度が60~65 の範囲内であるTaqMan(登録商標)など当技術分野で周知の他のリアルタイム化学を併用してMNA ザイム qPCR 検出を多重化することも可能になる。より広範な温度で良好に一緒に機能する基質が存在すれば、ユニバーサル基質の有用性は、大幅に増大させるであろう。

30

#### 【0315】

この実施例では、2つの多重反応を行った。それらは、両方とも、5つの異なる標的、すなわち、ヒトTFRC、HPR T、TP53、RPL13a、およびCYP2C9 遺伝子を検出するように設計されたMNA ザイムを含むものであった。多重方式1では、シリーズ1のユニバーサル基質Sub 2、Sub 3、Sub 4、Sub 6、およびSub 7の1つを切断するように各標的MNA ザイムを設計し、多重方式2では、改善されたシリーズ2または3のユニバーサル基質Sub 55、Sub 61、Sub 74、Sub 79、およびSub 80の1つを切断するように各標的MNA ザイムを設計した。本方法に従って任意の個数の標的を使用可能であり、当業者により任意の標的を検出するように適切なパートザイムを設計可能であることは、わかるであろう。

40

#### 【0316】

50

2つの多重反応を比較して曲線の形状(スティーブネスおよびプラトーに達する速度)を調べることにより、ユニバーサル基質の各セットの切断効率を決定した。この実施例では、すべての基質に有利な52の温度およびシリーズ1の基質で効率的な範囲を外れた58の温度で、増幅および検出を比較する。

【0317】

#### 8.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

各標的に対するパートザイムAおよびBの配列を5' 3'方向に以下に列挙する。各標的に対して、最初のシリーズ1のユニバーサル基質の1つおよびシリーズ3からの新規な改善された基質の1つと共に使用するよう、パートザイムを設計した。次の配列では、下線付き塩基は、基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号157 パートザイムA RPL13aA/6-P

AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGGCGTGAT

配列番号163 パートザイムB RPL13aB/6-P

CTGGGAGGAAGGCTAGCTCTCAAGACCACGGACTCCT

配列番号120 パートザイムA RPL13aA/80-P

AATTGACAAATACACAGAGGTCACAACGAGAGGGGCGGTT

配列番号121 パートザイムB RPL13aB/80-P

GGTTCACGGGAGGCTAGCTCTCAAGACCACGGACTCCT

配列番号96 パートザイムA CYP2C9A/3-P

GGGAAGAGGAGCATTTGAGGAACAACGAGGGTTGTGCTG

配列番号97 パートザイムB CYP2C9B/3-P

CGGTTGGTGAAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC

配列番号98 パートザイムA CYP2C9A/61-P

GGGAAGAGGAGCATTTGAGGAACAACGAGGGGGTCTGAG

配列番号99 パートザイムB CYP2C9B/61-P

TGGCGTGGAGAGGCTAGCTCCGTGTTCAAGAGGAAGC

配列番号164 パートザイムA TP53A/4-P

GACGGAAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGGTGCGCCATG

配列番号165 パートザイムB TP53B/4-P

TACTTCTCCCAAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCTCTG

G

配列番号106 パートザイムA TP53A/79-P:

GACGGAAACAGCTTTGAGGTGACAACGAGGGGGAGAGGA

配列番号107 パートザイムB TP53B/79-P:

GGTTGAAGGGGAGGCTAGCTCGTGTTTGTGCCTGTCTCTG

G

配列番号34 パートザイムA TFRCA/2-P:

GGAAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGAGGGAACAACCTT

配列番号35 パートザイムB TFRCB/2-P:

TGCCCAAGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGACT

配列番号58 パートザイムA TFRCA/74-P:

GGAAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGAGGGGGAGTGAT

配列番号59 パートザイムB TFRCB/74-P:

CTGGGAGGGGAGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

T

配列番号166 パートザイムA HPRTA/7つのP

CTGAAATAGAAAATAGTGTATAGATCAACAACGAGGTGCCATGT

TAA

配列番号167 パートザイムB HPRTB/7つのP

10

20

30

40

50

T A T C A C A G C C A A G G C T A G C T C A T T C C T A T G A C T G T A G A T  
T T T A

配列番号 168 パートザイム A H P R T A / 55 の P

C T G A A T A G A A A T A G T G A T A G A T C A C A A C G A G A G G T G C G G  
T

配列番号 169 パートザイム B H P R T B / 55 の P

G A G C T G G G G A G G C T A G C T C A T T C C T A T G A C T G T A G A T T T  
T A

【0318】

#### 8.2. レポーター基質

10

この実施例では、各多重方式で、5つの異なるユニバーサル基質を1つの反応チャンパー内で一緒に使用した。各多重方式で、各ユニバーサル基質を5つの異なるフルオロフォアの1つで標識した。本実施例では、基質は、5'末端をフルオロフォアで標識し、3'末端をクエンチャー部分で標識した(表19)。種々の発光波長および励起波長で基質の切断をモニターした(表19)。

【0319】

【表24】

表 19. 基質およびその蛍光標識

基質	名称	フルオロフォア	クエンチャー <sup>^</sup>	励起*	発光*
<b>多重方式 1</b>					
Sub2	Sub2-Q705B2	Quasar 705	BHQ2	672-684	705-730
Sub6	Sub6-Q670B2	Quasar 670	BHQ2	620-650	675-690
Sub4	Sub4-TRB2	Texas Red	BHQ2	560-590	610-650
Sub7	Sub7-JB	JOE	BHQ1	515-535	560-580
Sub3	Sub3-FIB	6-FAM	IB	450-490	510-530
<b>多重方式 2</b>					
Sub74	Sub74-Q705B2	Quasar 705	BHQ2	672-684	705-730
Sub80	Sub80-Q670B2	Quasar 670	BHQ2	620-650	675-690
Sub79	Sub79-TRIBR	Texas Red	IBR	560-590	610-650
Sub55	Sub55-HIB	HEX	IB	515-535	560-580
Sub61	Sub61-FIB	6-FAM	IB	450-490	510-530

20

30

<sup>^</sup> BHQ1; black hole quencher 1, BHQ2; black hole quencher 2, IB; Iowa black® FQ, IBR; Iowa black® RQ

\* CFX96 Real-Time PCR Detection System (Biorad)は、各チャンネルに対して波長範囲にわたり各フルオロフォアを励起してその発光を測定する。

【0320】

この実施例で試験したレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。

40

配列番号 21 Sub2-Q705B2:

A A G G T T T C C T C g u C C C T G G G C A

配列番号 22 Sub3-FIB:

C A G C A C A A C C g u C A C C A A C C G

配列番号 23 Sub6-Q670B2:

A T C A C G C C T C g u T C C T C C C A G

配列番号 24 Sub7-JB:

T T A A C A T G G C A C g u T G G C T G T G A T A

配列番号 171 Sub4-TRB2:

50

C A T G G C G C A C g u T G G G A G A A G T A

配列番号73 Sub61-FIB:

C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A

配列番号77 Sub-74Q705B2:

A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G

配列番号80 Sub-79TRIBR:

T C C T C T C C C C g u C C C C T T C A A C C

配列番号81 Sub-80Q670B2:

A A C C G C C C T C g u C C C G T G A A C C

配列番号29 Sub-55HIB:

10

### 【0321】

8.3 標的配列ならびにCYP2C9、TP53、HPRT、TFRC、およびRPL13a遺伝子の増幅用のPCRプライマー

IM9細胞系から抽出されたヒトDNA(Promega)の*in vitro*増幅により、5つの遺伝子すべてに対して標的PCRアンプリコンを作製した。以下に5'3'方向に列挙したオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用いて、アンプリコンを作製した。ボールド体の配列は、遺伝子標的に対するプライマーの特異性に影響を及ぼすことなくプライマーのTmを増大させるユニバーサルタグ(U1、U2、またはU3)に対応する。このタグは、PCR反応の増幅効率を改善する。

配列番号91 フォワードプライマー 5TFRC\_\_U1

20

G C T A A A A C A A T A A C T C A G A A C T T A C G

配列番号92 リバースプライマー 3TFRC\_\_U2

C A G C T T T C T G A G G T T A C C A T C C T A

配列番号125 フォワードプライマー 5TP53\_\_U3

C T A A C T T A C T G C C T C T T G C T T C T C

配列番号126 リバースプライマー 3TP53\_\_U2

C A G C T C T G T G C G C C G G T C T C T C

配列番号127 フォワードプライマー 5RPL13a\_\_U3

C T A A A C C G G A A G A A G A A A C A G C T C A

配列番号128 リバースプライマー 3RPL13a\_\_U2

30

C A G G A G G A A T T A A C A G T C T T T A T T G G

配列番号129 フォワードプライマー 5CYP2C9\_\_U3

C T A A C C T C A T G A C G C T G C G G A A

配列番号130 リバースプライマー 3CYP2C9\_\_U2

C A G A T A T G G A G T A G G G T C A C C C A

配列番号176 フォワードプライマー 5HPRT\_\_U3

C T A A C T T T G C T G A C C T G C T G G A T T A

配列番号177 リバースプライマー 3HPRT\_\_U2

C A G C A A T A G C T C T T C A G T C T G A T A A

40

### 【0322】

8.4 反応成分: 多重MNAザイムqPCR方式での標的配列の増幅および検出  
標的配列のリアルタイムPCR増幅および検出は、25μLの全反応空間内で行った。反応はすべて、CFX96 Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad)で行った。サイクルパラメーターは、1)95で2分間、95で15秒間と52で60秒間とを40サイクル、または2)95で2分間の、95で15秒間と58で60秒間とを40サイクルのいずれかであった。52または58の工程のいずれかで、蛍光データを収集した。各多重反応は、二重試験方式で行われ、10mMのMgCl<sub>2</sub>、200μMの各dNTP、10単位のRibosafe RNアーゼ阻害剤(Bioline)、1×Immobuffer(Bioline)、2単位のMyTaqHS(Bioline)を含んでいた。パートザイム、プライマー、お

50

よび基質が何であるか、ならびにそれらのそれぞれの濃度は、表 20 に列挙されている。反応は、DNA 鋳型 (100 ng もしくは 391 pg) または無標的対照 (NF - H<sub>2</sub>O) のいずれかを含有していた。

【0323】

表 20 のように、プライマー、基質、およびそれらの関連パートザイムを用いて、多重反応を構成した (多重方式 1 または多重方式 2)。同一の PCR プライマーを両方の多重反応に使用した。また、パートザイムはすべて、同一の標的感知部分を有していた。したがって、同一の標的を検出する反応の効率に差があれば、基質の切断効率の差に帰属するであろう。

【0324】

【表 25】

表 20. 各多重反応に使用したオリゴヌクレオチドの組合せ

標的	5'プライマー (20 nM 例外 * = 80 nM)	3'プライマー (400 nM 例外 * = 200 nM)	PzA & PzB (各 200 nM)		基質 (各 200 nM)
多重方式 1					
TFRC	5TFRC_U3	3TFRC_U2	TFRCA/2-P 配列番号 34	TFRCB5/2-P 配列番号 35	Sub2-Q705B2 配列番号 21
HPRT	5HPRT_U3*	3HPRT_U2	HPRTA/7-P 配列番号 166	HPRTB5/7-P 配列番号 167	Sub7-JB 配列番号 24
TP53	5TP53_U1	3TP53_U2*	TP53A/4-P 配列番号 164	TP53B5/4-P 配列番号 165	Sub4-TRB2 配列番号 171
RPL13a	5RPL13a_U1	3RPL13a_U2	RPL13aA/6-P 配列番号 157	RPL13aB/6-P 配列番号 163	Sub6Q670B2 配列番号 23
CYP2C9	5CYP2C9_U1	3CYP2C9_U2	CYP2C9A/3-P 配列番号 96	CYP2C9B/3-P 配列番号 97	Sub3-FIB 配列番号 22
多重方式 2					
TFRC	5TFRC_U3	3TFRC_U2	TFRCA/74-P 配列番号 58	TFRCB/74-P 配列番号 59	Sub74- Q705B2 配列番号 77
HPRT	5HPRT_U3*	3HPRT_U2	HPRTA/55-P 配列番号 168	HPRTB/55-P 配列番号 169	Sub55-HIB 配列番号 29
TP53	5TP53_U1	3TP53_U2*	TP53A/79-P 配列番号 106	TP53B/79-P 配列番号 107	Sub79-TRIBR 配列番号 80
RPL13a	5RPL13a_U1	3RPL13a_U2	RPL13aA/80-P 配列番号 120	RPL13aB/80-P 配列番号 121	Sub80- Q670B2 配列番号 81
CYP2C9	5CYP2C9_U1	3CYP2C9_U2	CYP2C9A/61-P 配列番号 98	CYP2C9B/61-P 配列番号 99	Sub61-FIB 配列番号 73

【0325】

8.5. 結果： 多重 MNA ザイム qPCR 方式での標的の増幅およびレポーター基質の切断

ヒトゲノム DNA を含有する各多重反応は、遺伝子 CYP2C9、TP53、HPRT、RPL13a、および TFRC のリアルタイム検出で経時的に蛍光の増加を示した。すべての反応で、無 DNA 標的対照の蛍光は、DNA 標的含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性 MNA ザイムの標的依存集合の後でユニバーサル基質の 1 つが切断されたことに起因することが実証される。

【0326】

52 での CYP2C9、TP53、HPRT、RPL13a、および TFRC 遺伝子の増幅プロットでは、新しい改善されたシリーズ 2 および 3 のユニバーサル基質を使用した多重方式 2 (図 11 (i)) は、急勾配の曲線を有し、シリーズ 1 のユニバーサル基質を使用した多重方式 1 (図 11 (i)) で観測されたよりも速くプラトーに達することが実証された。52 では Sub74 と対比して Sub2 を用いた TFRC の検出の増幅プロットにごくわずかな差が存在した。シリーズ 2 および 3 の基質と対比してシリーズ 1 を

10

20

30

40

50

用いた多重方式1の増幅プロットはすべて、これらの標的の検出分野で容易に許容可能な十分に良好な品質であることは、当業者であればわかるであろう。

【0327】

58 でのCYP2C9、TP53、HPRT、RPL13a、およびTFRC遺伝子の増幅プロットでは、新しい改善されたシリーズ2および3のユニバーサル基質を使用した多重方式2(図11(ii))は、かなり急勾配の曲線を有し、シリーズ1のユニバーサル基質を使用した多重方式1(図11(i))で観測されたよりも実質的に速くプラトーに達することが実証された。多重方式1でSub2、Sub3、Sub6、およびSub7を用いて作成された増幅曲線は、標的のロバストな検出に十分な品質でない可能性があり、従って、一般的には、当技術分野で許容できない可能性がある。

10

【0328】

全体的に、新しいシリーズ2および3の基質は、MNAザイムqPCR反応で現在使用されている温度で多重データの改善された品質ひいてはロバスト性を示し、これまで可能であったよりもかなり高い温度で多重検出を可能にする。新しい設計ガイドラインは、MNAザイムqPCRに現在使用されている温度で多重化能を拡張する、かつより高い反応温度でロバストなデータを生成する、ユニバーサル基質の設計可能性を増大させる。

【0329】

実施例9：リアルタイムPCRでMNAザイムを用いて種々の温度で機能するように設計されたユニバーサル基質の使用。

設計ガイドラインの新規なセットを用いて、10-23DNAザイムまたは10-23DNAザイムベースのMNAザイムと併用すべく、高活性基質の新しいシリーズを発明した。

20

【0330】

MNAザイムを調節して、種々の温度で基質の切断またはライゲーションにより検出可能作用を生成することが可能である。反応温度を変化させることにより、MNAザイムまたはDNAザイムの触媒活性の効率およびストリンジェンシーを操作することが可能である。触媒活性の効率およびストリンジェンシーを最適化する他の方法は、基質、マッチパートザイム、またはマッチDNAザイムのT<sub>m</sub>および/または長さを修飾することである。基質配列の5'および/または3'末端にヌクレオチドを付加することにより、基質のT<sub>m</sub>を増大させることが可能である。これらの変更を設計ガイドライン内に行なうことが可能である。この拡張のために選択されるヌクレオチドもまた、T<sub>m</sub>に影響を及ぼしうる。3'または5'末端への追加のGまたはC塩基の付加は、追加のAまたはT塩基の付加よりもT<sub>m</sub>に大きい影響を及ぼすであろう。同様に、3'または5'末端からヌクレオチドを除去することにより、基質のT<sub>m</sub>を低減することが可能である。MNAザイムパートザイムおよびDNAザイムをランケートまたは伸長して基質配列にマッチさせることが可能である。

30

【0331】

この実施例では、シリーズ2の基質Sub55の長さおよび塩基組成を修飾して、さまざまなT<sub>m</sub>を有する一連の誘導体基質を作製した(表21)。修飾は、5'および3'末端のそれぞれから1~3個のヌクレオチドを除去することにより基質をランケートすること、5'および3'末端の両方にヌクレオチドを付加することにより基質を伸長すること、を含んでいた。5'および3'末端に追加のAまたはCヌクレオチドのいずれかを有する基質を設計することにより、この拡張を行うべく異なるヌクレオチドを付加する作用も、試験した。次いで、得られた基質をMNAザイムqPCR反応で試験して、基質の誘導体の設計柔軟性および一連の温度でのそれらの有用性を評価した。PCR増幅およびMNAザイム媒介検出は、PCR増幅およびMNAザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで行った。いくつかのアニーリング温度で得られたC<sub>t</sub>値により、基質の切断効率を測定することが可能である。より低いC<sub>t</sub>値を生じる反応は、そのような反応がより速く閾値サイクルに達するので、特異的基質のより効率的な切断の指標となる。

40

50

【 0 3 3 2 】

【 表 2 6 】

表 21: Sub55 および誘導体

名称	配列 <sup>^</sup>	長さ (bp)	Tm*
Sub55(16)	GCACCTCguCCCCAGC 配列番号 172	16	52
Sub55(18)	CGCACCTCguCCCCAGCT 配列番号 173	18	58
Sub55	ACCGCACCTCguCCCCAGCTC 配列番号 29	21	68
Sub55(23A)	AACCGCACCTCguCCCCAGCTCA 配列番号 174	23	72
Sub55(23C)	CACCGCACCTCguCCCCAGCTCC 配列番号 175	23	76

<sup>^</sup>すべて 5'→3' 方向に書かれた配列; 大文字は DNA を表し、小文字は RNA を表す。

\* ここに示された Tm は、ウォーレス則を用いて計算された 2 つのパートザイムに結合された塩基の融解温度に等しい。基質が 10-23 DNA ザイムベースの MNA ザイムまたは 10-23 DNA ザイムそのものに結合した時、「g」リボヌクレオチドは、未結合の状態を維持するので、全結合 Tm に寄与しない。

【 0 3 3 3 】

## 9. 1. パートザイムオリゴヌクレオチド

表 2 1 に記載の S u b 5 5 およびその誘導体の触媒活性の速度を測定するために行った実験では、ヒト T F R C 遺伝子に相補的標的センサーアームを用いてパートザイムオリゴヌクレオチド A および B を設計した。A および B のパートザイムの配列は、以下では 5' 3' 方向に列挙されている。下線付き塩基は、基質にハイブリダイズする。「- P」は、オリゴヌクレオチドの 3' リン酸化を表す。

配列番号 179 パートザイム A T F R C A / 5 5 ( 1 8 ) - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T G C G

配列番号 180 パートザイム B T F R C B / 5 5 ( 1 8 ) - P :

A G C T G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A C A G A C T

配列番号 181 パートザイム A T F R C A / 5 5 ( 1 6 ) - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T G C

配列番号 182 パートザイム B T F R C B / 5 5 ( 1 6 ) - P :

G C T G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A C A G A C T

配列番号 183 パートザイム A T F R C A / 5 5 ( 2 3 A ) - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T G C G G T T

配列番号 184 パートザイム B T F R C B / 5 5 ( 2 3 A ) - P :

T G A G C T G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A C A G A C

T

配列番号 185 パートザイム B T F R C A / 5 5 ( 2 3 C ) - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T G C G G T G

配列番号 186 パートザイム B T F R C B / 5 5 ( 2 3 C ) - P :

G G A G C T G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A C A G A C

T

配列番号 46 パートザイム A T F R C A / 5 5 - P :

G G A A T A T G G A A G G A G A C T G T C A C A A C G A G A G G T G C G G T

配列番号 45 パートザイム B T F R C B / 5 5 - P :

G A G C T G G G G A G G C T A G C T C C T C T G A C T G G A A A C A G A C T

10

20

30

40

50

## 【0334】

## 9.2. レポーター基質

本実施例では、5'末端をQuasar 670部分で、3'末端をBHQ 2部分で、末端標識した。635 nm (Quasar 670励起波長)の励起を用いて665 nm (Quasar 670発光波長)で基質の切断をモニターした。この実施例で試験したレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。

配列番号29 Sub55 - Q670B2 :

ACCGCACCTTCgucCCCAAGCTC

配列番号172 Sub55(16) - Q670B2 :

GCACTTCgucCCCAAGC

配列番号173 Sub55(18) - Q670B2 :

CGCACCTTCgucCCCAAGCT

配列番号174 Sub55(23A) - Q670B2 :

AACCGCACCTTCgucCCCAAGCTCA

配列番号175 Sub55(23C) - Q670B2 :

CACCGCACCTTCgucCCCAAGCTCC

10

## 【0335】

## 9.3. 標的配列およびTFRC増幅用のPCRプライマー

この実施例の標的配列は、以下に列挙したオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用いて、IM9細胞系から抽出されたヒトゲノムDNA (Promega)のin vitro増幅により産生されたPCRアンプリコンであった。プライマー配列は、5' 3'方向に列挙されている。

20

配列番号187 フォワードプライマー 5TFRC :

AACAATAACTCAGAACTTACG

配列番号188 リバースプライマー 3TFRC :

CTTCTGAGGTTACCATCCTA

## 【0336】

## 9.4. 反応成分： 標的配列の増幅および検出

標的配列のリアルタイム増幅および検出は、25 μLの全反応空間内で行った。すべての反応をMx3005P QPCRシステム (Stratagene / Agilent)で行った。サイクルパラメーターは、アニーリング温度により変化させ(次のように下線を付す)、以下のいずれかであった。

30

1) 95 で10分間、95 で15秒間と55 で30秒間とを5サイクル、95 で15秒間と50 で60秒間とを50サイクル、または

2) 95 で10分間、95 で15秒間と55 で30秒間とを5サイクル、95 で15秒間と52 で60秒間とを50サイクル、または

3) 95 で10分間、95 で15秒間と55 で30秒間とを5サイクル、95 で15秒間と55 で60秒間とを50サイクル、または

4) 95 で10分間、95 で15秒間と55 で30秒間とを5サイクル、95 で15秒間と60 で60秒間とを50サイクル。

40

すべての蛍光データをアニーリング温度で収集した。表22のように、基質およびその関連パートザイムを用いて反応を構成した。反応条件の各セットは、二重試験方式で行われ、40 nMの5TFRC、200 nMの3TFRC、各200 nMのパートザイムAおよびパートザイムB、200 nMの基質、8 mMのMgCl<sub>2</sub>、200 μMの各dNTP、10単位のRnasin (Promega)、1x Immobilizer (Bioline)、1単位のImmolase (Bioline)、およびゲノムDNA鋳型(100 ng)または無標的(NF-H<sub>2</sub>O)のいずれかを含む。個別の反応を構成して、そのマッチパートザイムにより各基質を試験した。同一のPCRプライマーをすべての反応に使用した。また、パートザイムはすべて、同一の標的感知部分を有していた。した

50

がって、種々の温度で、反応効率に差があれば、基質の切断効率の差に帰属しうるであろう。

【0337】

【表27】

**表 22: 各ユニバーサル基質に対して使用したパートザイムの組合せ**

基質	パートザイム A	パートザイム B
Sub55 配列番号 29	TFRCA/55-P 配列番号 46	TFRCB/55-P 配列番号 45
Sub55(16) 配列番号 172	TFRCA/55(16)-P 配列番号 181	TFRCB/55(16)-P 配列番号 182
Sub55(18) 配列番号 173	TFRCA/55(18)-P 配列番号 179	TFRCB/55(18)-P 配列番号 180
Sub55(23A) 配列番号 174	TFRCA/55(23A)-P 配列番号 183	TFRCB/55(23A)-P 配列番号 184
Sub55(23C) 配列番号 175	TFRCA/55(23C)-P 配列番号 185	TFRCB/55(23C)-P 配列番号 186

10

20

【0338】

9.5. 結果： 標的の増幅およびレポーター基質の切断

ヒトゲノムDNAを含有する各反応は、Sub55および種々の誘導体を用いたTFRC遺伝子のリアルタイム検出で経時的に蛍光の増加を示した。無DNA標的対照の蛍光は、DNA標的含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性MNAザイムの標的依存集合の後でユニバーサル基質の1つが切断されたことに起因することが実証される。

30

【0339】

Ctにより測定された反応効率は、反応温度（アニーリング/切断温度）の適合性および反応に使用される基質のTmに依存した。種々のSub55誘導体は、異なる長さおよびヌクレオチド組成を有するので、異なる融解温度（Tm）を有し、したがって、試験した種々のアニーリング温度（50、52、55および60）で異なる性能を呈すると予想される。表23の結果は、異なる反応温度での各基質のCtを示している。ポールド体のCt値は、指定の温度で最も効率的な性能を呈した基質を表す。

【0340】

より低温では、より短い基質（Sub55（18））がより良好な性能を呈した（低いCt値を有していた）。アニーリング温度を上昇させると、増大された長さしたがって増大されたTmを有する基質が最適な性能を呈した。当業者であれば、5'および/もしくは3'末端の基質アームの延長または短縮により、ならびに/または基質の5'および3'末端のヌクレオチド組成の変化により、選択された反応温度で効率的に切断可能な基質の誘導体を作製することが可能である。

40

【0341】

## 【表 28】

表 23: 種々のアニーリング温度で Sub55 および誘導体を用いて行った MNA ザイム qPCR の Ct 値

名称	50°C	52°C	55°C	60°C
Sub55(16)	26.1	26.7	31.2	n/a
Sub55(18)	<b>23.9</b>	23	24.8	n/a
Sub55	24.4	<b>22.8</b>	<b>23.0</b>	26.8
Sub55(23A)	25.3	23.9	<b>23.0</b>	<b>25.8</b>
Sub55(23C)	25.8	24.1	23.9	26.2

10

## 【0342】

実施例 10: 58 のアニーリング温度における MNA ザイム qPCR と組み合わせたユニバーサル基質の使用。

PCR などの *in vitro* 標的増幅方法を用いてリアルタイムで標的核酸の増幅をモニターするために、MNA ザイムを使用することが可能である。さらに、フルオロフォアとクエンチャーとの対で標識された MNA ザイム基質を用いた qPCR 中のリアルタイムモニタリングでは、反応の対数期にわたり任意のレベルの蛍光の閾値ラインを配置して、Ct (サイクル閾値) として知られる値を生成可能な曲線が作成される。より低い Ct 値を生じる反応は、そのような反応がより速く閾値サイクルに達するので、特異的基質のより効率的な切断の指標となる。この実施例では、増幅および検出は、PCR 増幅および MNA ザイム媒介検出が単一のチューブ内で同時に行われる一工程プロセスで実施される。他の反応条件がすべての同一である場合、Ct 値は、ユニバーサル基質の配列による影響を受けることもある。当技術分野で使用される MNA ザイム qPCR のアニーリング/検出温度は、50 ~ 54 である。この温度は、当技術分野で公知のユニバーサル基質が、効率的に切断される温度に課される限定条件を有し、シリーズ 1 のユニバーサル基質では 54 が上限であるという事実により決定された。より高い温度でアニールするプライマーおよびパートザイムを設計するうえでより大きい柔軟が可能になるように、より高い温度で切断されるユニバーサル基質の必要性が存在する。プライマーおよびパートザイムに対するこの設計柔軟性は、特異的検出のためにより高い反応温度ひいてはより高い Tm を有するパートザイムおよびプライマーを必要とする、配列中に高パーセントの G 塩基および C 塩基を有する対象の遺伝子標的など、多くの用途にきわめて有益でありうる。

20

30

## 【0343】

シリーズ 1 および 2 の基質の性能に基づく基質の切断効率についての研究は、第 3 ラウンドの基質設計を支援するガイドラインの開発につながり、結果的に、シリーズ 3 の基質をもたらす。これらのガイドラインは、限定されるものではないが、(i) リボヌクレオチドを取り囲む 10 個の塩基 (N<sub>4</sub> ~ N<sub>13</sub>) 中に 7 個以上のシトシンヌクレオチド、(ii) リボヌクレオチドに直接隣接した塩基 (N<sub>8</sub> および N<sub>9</sub>) がシトシンである、(iii) 基質の全含有率が > 64% ピリミジンを含む、および (iv) オリゴヌクレオチドの全 Tm が 66 以上である (後者のガイドラインは、基質切断の反応温度が 50 超である場合のみ適用可能である)、を含んでいた。

40

## 【0344】

この実施例では、シリーズ 2 のユニバーサル基質 Sub 59 をシリーズ 3 の基質 Sub 77 と比較して、58 でのリアルタイム PCR の切断効率を比較することにより、設計ガイドラインが、高温での MNA ザイム qPCR への高い適用可能性を有するユニバーサル基質を生成することを確証する。切断効率レベルは、さまざまなユニバーサル基質を含有する反応に対して Ct 値を測定することにより決定した。

## 【0345】

10.1. パートザイムオリゴヌクレオチド

シリーズ 2 およびシリーズ 3 のユニバーサル基質の切断効率をリアルタイムで測定すべく行った実験では、パートザイムオリゴヌクレオチド A および B はすべて、ヒト TFR C

50

遺伝子の同一の配列に相補的なセンサーアームを用いて設計した。AおよびBのパートザイムの配列は、以下では5' 3'方向に列挙されている。下線付き塩基は、それらのマッチユニバーサル基質にハイブリダイズする。「-P」は、オリゴヌクレオチドの3'リン酸化を表す。

配列番号47 パートザイムA TFRCA / 59 - P :

GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGA AGGGAGGGAGG

配列番号62 パートザイムA TFRCA / 77 - P :

GGAATATGGAAGGAGACTGTCAACAACGA GAGGGAGGGAGG

配列番号63 パートザイムB TFRCB / 77 - P :

AGGAGGGAGGGAGGGCTAGCTCCTCTGACTGGAAAACAGAC

10

T

【0346】

10.2. レポーター基質

この実施例のレポーター基質は、以下では5' 3'方向の配列で示されている。小文字の塩基はRNAを表し、大文字の塩基はDNAを表す。本実施例では、基質は、5'末端を6-FAM部分(以下の基質名では「F」により表される)で、3'末端をIowa Black(登録商標)FQクエンチャー部分(以下の基質名で「IB」により表される)で、末端標識した。基質の切断は、485nmの励起(Mx3005P(Stratagene))に基づくFAM励起波長領域)を用いて530nm(Mx3005P(Stratagene))に基づくFAM発光波長範囲)でモニターした。

20

配列番号33 Sub59-FIB :

CCTCCTCCCTguCCCTCCTCCT

配列番号79 Sub77-FIB :

CTCCTCCTCCTguCCCTCCTCCT

【0347】

10.3. 標的配列およびTFRC増幅用のPCRプライマー

この実施例の標的配列は、以下に列挙したオリゴヌクレオチドPCRプライマーを用いて、IM9細胞系(Promega)から抽出されたヒトゲノムDNAのin vitro増幅により産生された、TFRC遺伝子のPCRアンプリコンであった。プライマー配列は、5' 3'方向に列挙されている。

30

配列番号187 フォワードプライマー 5TFRC :

AACAATAACTCAGA ACTTACG

配列番号188 リバースプライマー 3TFRC :

CTTTCTGAGGTTACCATCCTA

【0348】

10.4. 反応成分: 標的配列の増幅および定量

標的配列のリアルタイムPCR増幅および検出は、25μLの全反応空間内で行った。すべての反応をMx3005P QPCRシステム(Stratagene)で行った。表24のように、基質およびその関連パートザイムを用いて反応を構成した。サイクルパラメーターは、95 で2分間、95 で15秒間と58 で60秒間とを40サイクル(58 の工程でデータを収集した)。反応条件の各セットは、二重試験方式で行われ、40nMの5TFRC、200nMの3TFRC、各200nMのパートザイムAおよびパートザイムB、200nMの基質、8mMのMgCl<sub>2</sub>、200μMの各dNTP、10単位のRNasin(Promega)、1×Immobuffer(Bioline)、2単位のMyTaqHS(商標)DNAポリメラーゼ(Bioline)、およびゲノムDNA鋳型(50ng)または無標的(NF-H<sub>2</sub>O)のいずれかを含有していた。

40

【0349】

【表 29】

表 24: 各ユニバーサル基質に対して使用したパートザイムの組合せ

基質	パートザイム A	パートザイム B
Sub59 配列番号 33	TFRCA/59-P 配列番号 47	TFRCB/77-P 配列番号 63
Sub77 配列番号 79	TFRCA/77-P 配列番号 62	TFRCB/77-P 配列番号 63

10

【0350】

10.5. 結果： 標的の増幅およびレポーター基質の切断

ヒトゲノムDNAを含有する各MNAザイムqPCR反応では、ヒトゲノムDNAからのTFRCのリアルタイム検出で経時的に蛍光の増加を示した。すべての反応で、無DNA標的対照の蛍光は、DNA標的含有反応よりも少なかった。このことから、標的含有反応で生じた蛍光の増加は、触媒活性MNAザイムの標的依存集合の後でユニバーサルレポーター基質の1つが切断されたことに起因することが実証される。

【0351】

シリーズ2の基質Sub59を用いた反応は、28.5の平均Ct値を示し、一方、シリーズ3の基質Sub77を用いた反応は、26.5の平均Ct値を示した。

20

【0352】

Sub59およびSub77は、同一のTmおよび%C/Tを有するが、中心領域N4~N13中のシトシンの数およびN8の組成が異なることは、注目に値する。リボヌクレオチドを取り囲む中心領域では、Sub77は、位置N8にシトシンを有しており、これは、より低いCt値(26.5)により示唆されるように、Sub59よりも改善された切断効率をもたらすように思われる。Sub59は、位置N8にチミンを含有し、5'アームの遠位端に付加されたシトシンを有しており、これは、切断反応の減少ひいてはより高いCt値(28.5)をもたらす。

【0353】

注目に値するのは、効率的に切断される基質のヌクレオチド配列の性質および基質のリボヌクレオチドに対する特異的ヌクレオチドの近接性が重要なことである。これらの特徴は、高温で効率的に切断される可能性がより高いユニバーサル基質をもたらす一群のガイドラインの根底をなす。これらの設計ガイドラインは、限定されるものではないが、(i)リボヌクレオチドを取り囲む10個の塩基(N4~N13)中に7個以上のシトシンヌクレオチド、(ii)リボヌクレオチドに直接隣接した塩基(N8およびN9)がシトシンである、(iii)基質の全含有率が>64%ピリミジンを有する、(iv)オリゴヌクレオチドの全Tmが66以上である(後者のガイドラインは、基質切断の反応温度が50超である場合のみ適用可能である)を含む(すべてが必要であるとは限らないこともありうる)(表25)。シリーズ3の基質Sub77のCt値がより早期にあるので、この基質は、これらの設計ガイドラインのすべてを満たすと予想され、一方、Sub59は、これらの設計ガイドラインの2つのみを満たす(表25)。

30

40

【0354】

## 【表 3 0】

表 25: ユニバーサル基質の切断効率(Ctに基づいて切断効率の順に列挙した)

名称	配列 <sup>^</sup>	Cの数 N <sub>4</sub> -N <sub>13</sub>	CguC	%C/T <sup>+</sup>	Tm*	Ct	(i - iv)の数 <sup>~</sup>
Sub77	CTCCTCCCTCguCCCTCC TCCT配列番号 79	8	はい	100	70	26.5	4
Sub59	CCTCCTCCCTguCCCTCC TCCT配列番号 33	6	いいえ	100	70	28.5	2

<sup>^</sup> 大文字の塩基はDNAを表し、小文字の塩基はRNAを表し、基質中の塩基の位置は (N<sub>x</sub>)-N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-N<sub>5</sub>-N<sub>6</sub>-N<sub>7</sub>-N<sub>8</sub>-rR-rY-N<sub>9</sub>-N<sub>10</sub>-N<sub>11</sub>-N<sub>12</sub>-N<sub>13</sub>-N<sub>14</sub>-N<sub>15</sub>-(N<sub>x</sub>)により表される。

<sup>+</sup> 各基質に対して以上に示された配列長さの% C/T (ピリミジン)は、リボヌクレオチドを含まない。

\* ここに与えられた Tm は、ウォーレス則を用いて計算された結合塩基の融解温度に等しい  
- 相補配列にハイブリダイズする塩基についてのみ計算。基質が 10-23 DNA ザイムベースの MNA ザイムに結合した時、「g」リボヌクレオチドは、未結合の状態を維持するので、全結合 Tm に寄与しない。  
~ 基質配列が満たした設計ガイドライン(i), (ii), (iii), および/または(iv)の数。

10

## 【 0 3 5 5】

## 参考文献

- PCT International Publication No. WO/2007/041774 20
- PCT International Publication No. WO/2008/040095
- PCT International Publication No. WO/2008/122084
- U.S. Patent No. 4,683,202
- U.S. Patent No. 4,683,195
- U.S. Patent No. 4,800,159
- U.S. Patent No. 4,965,188
- U.S. Patent No. 5,176,995 30
- US publication number 2007-0231810
- US publication number 2010-0136536
- US publication number 2011-0143338
- Cairns, M.J., Hopkins, T.M., Witherington, G., Wang, L. and Sun, L. (1999) Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. Nat. Biotech. 17: 480-486.
- Cruz, R.P., Withers, J.B. and Li, Y. (2004) Dinucleotide junction cleavage versatility of 8-17 deoxyribozyme. Chem Biol 40
- Jan;11(1): 57-67.
- Perreault, J., Labuda, D., Usman, N., Yang, J. and Cedergren, R. (1991) Relationship between 2'-hydroxyls and magnesium binding in the hammerhead RNA domain: a model for ribozyme catalysis. Biochemistry 30(16): 4020-5.
- Perreault, J., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. and Cedergren, R. (1990) Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides w 50

ith catalytic activity. Nature 344(6266): 565-7.

Silverman, S. (2004) Breaking up is easy to do (if you're a DNA enzyme that cleaves RNA). Chem Biol. Jan;11(1): 7-8. Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. and Itakura K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to x174 DNA: the effect of single base pair mismatch. Nucl. Acids Res. 6(11): 3543-3558.

10

Zaborowska, Z., Furste, J., Erdmann, V. and Kurreck, J. (2002) Sequence requirements in the catalytic core of the "10-23" DNA enzyme. J Biol Chem. 277(43): 240617-22.

【 図 4 】

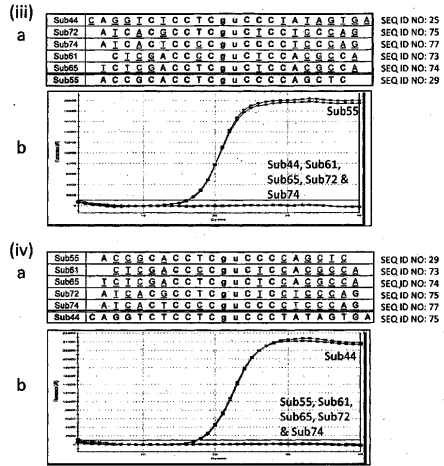
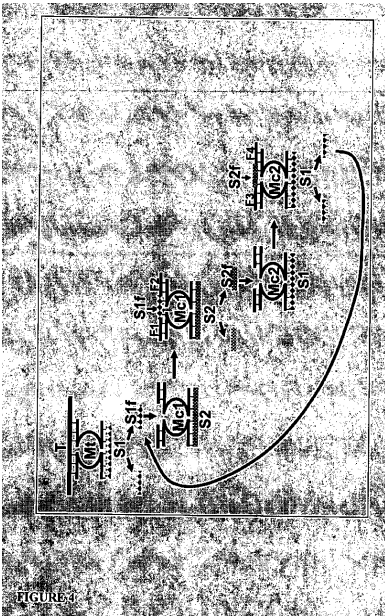


FIGURE 9 (Cont)

【図1】

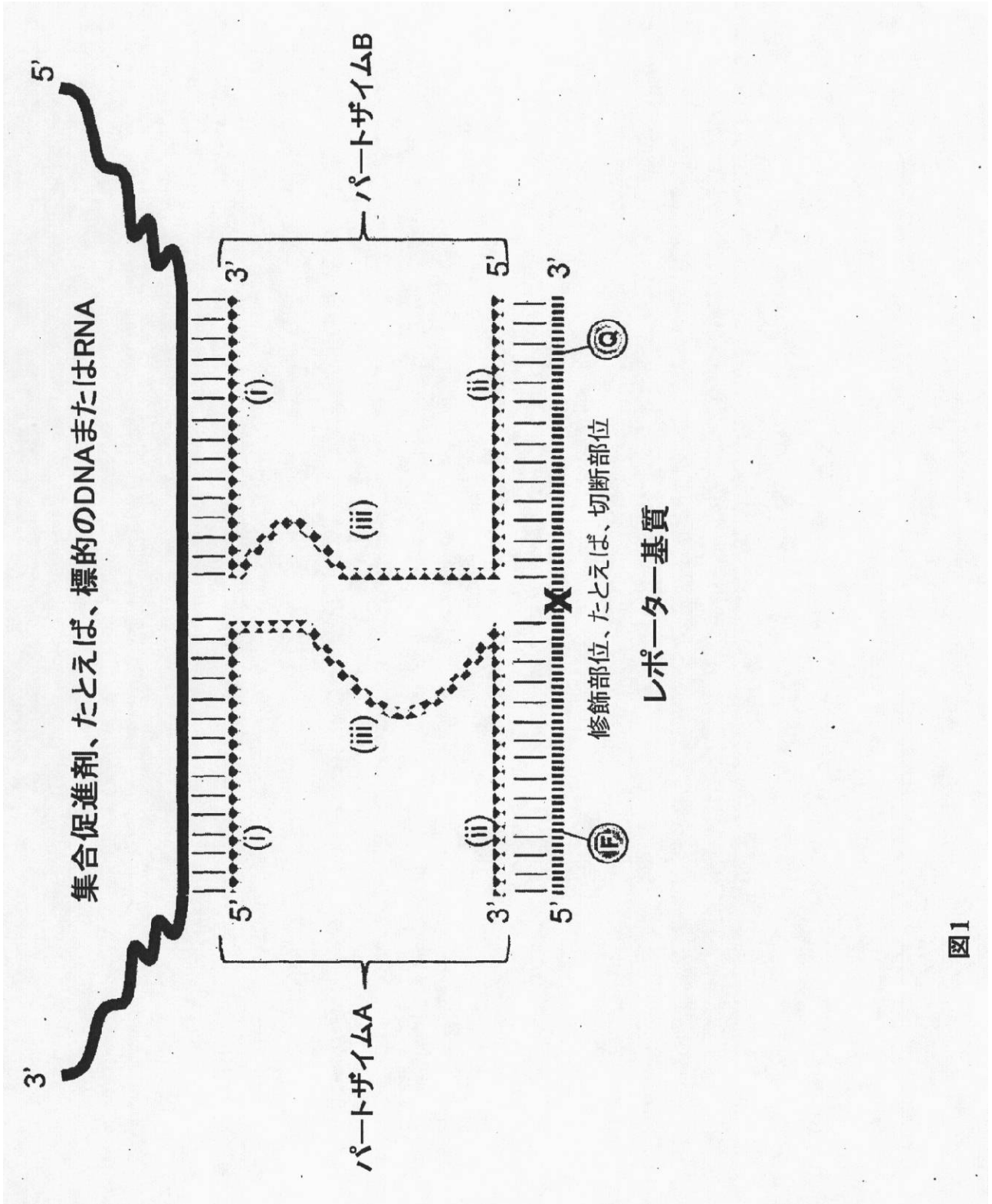


図1

【 図 2 】

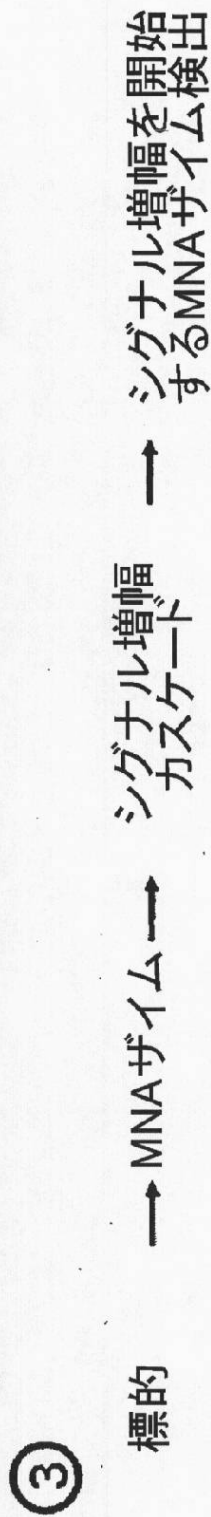
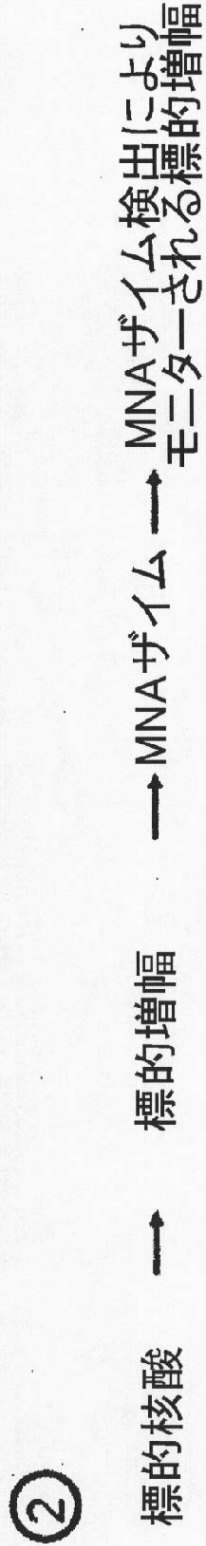
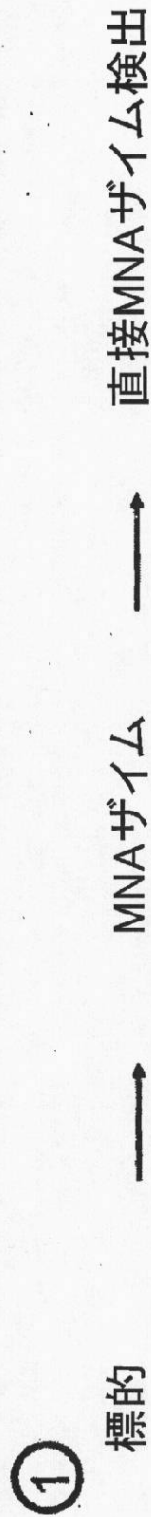


図 2



【 図 5 】

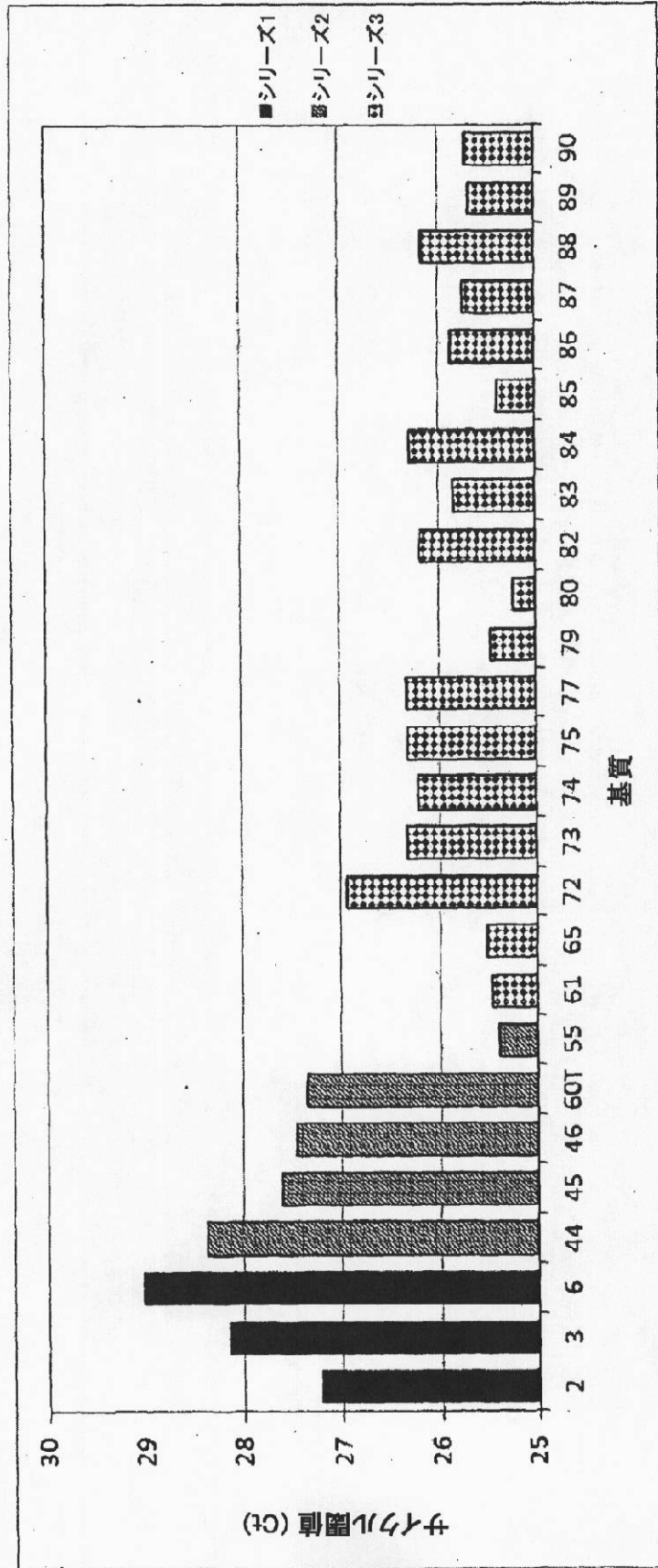
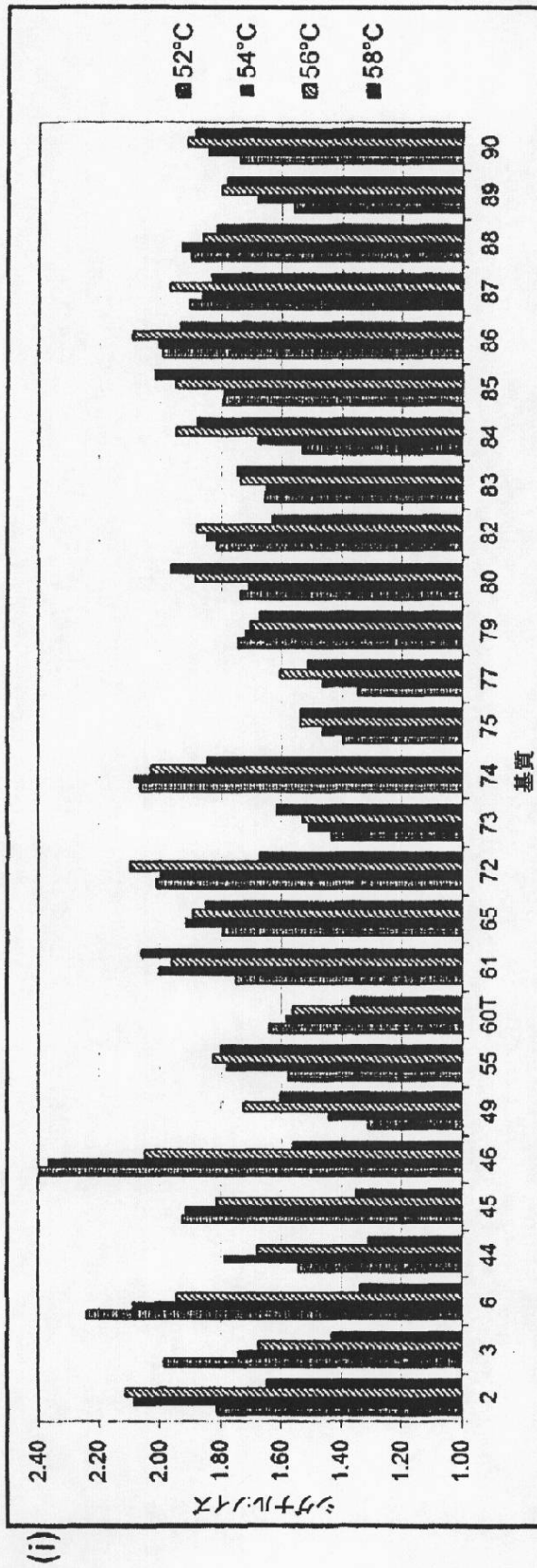
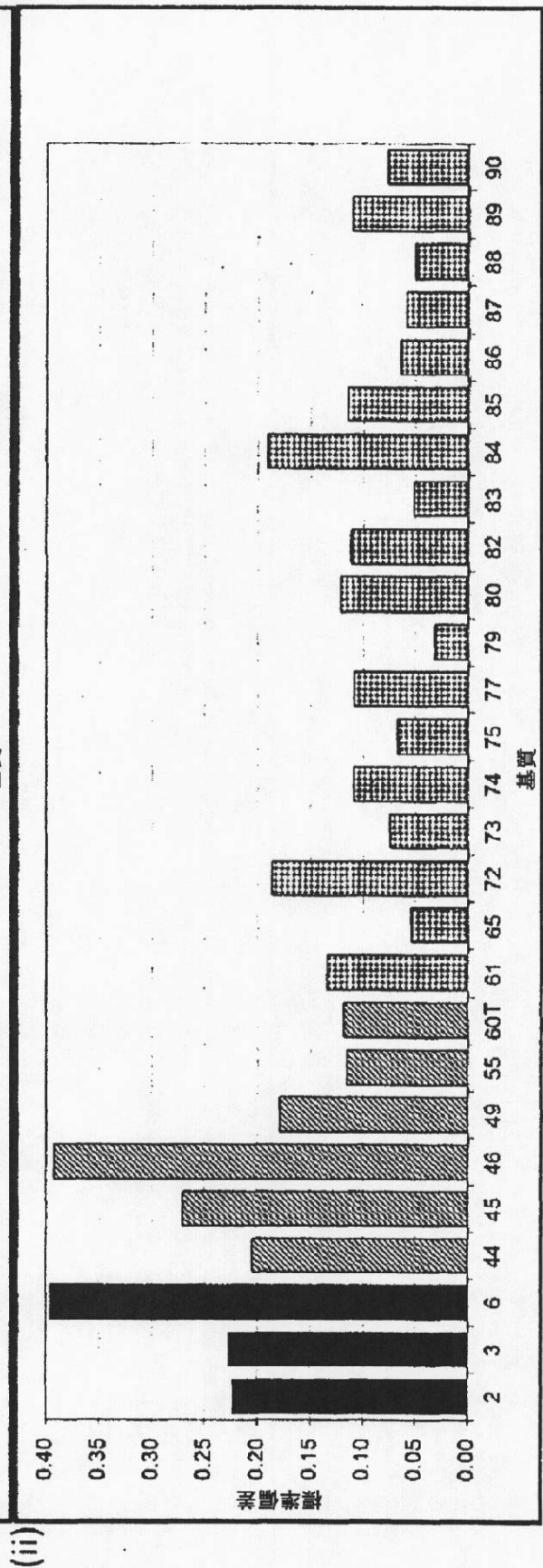


図 5

【 図 6 】



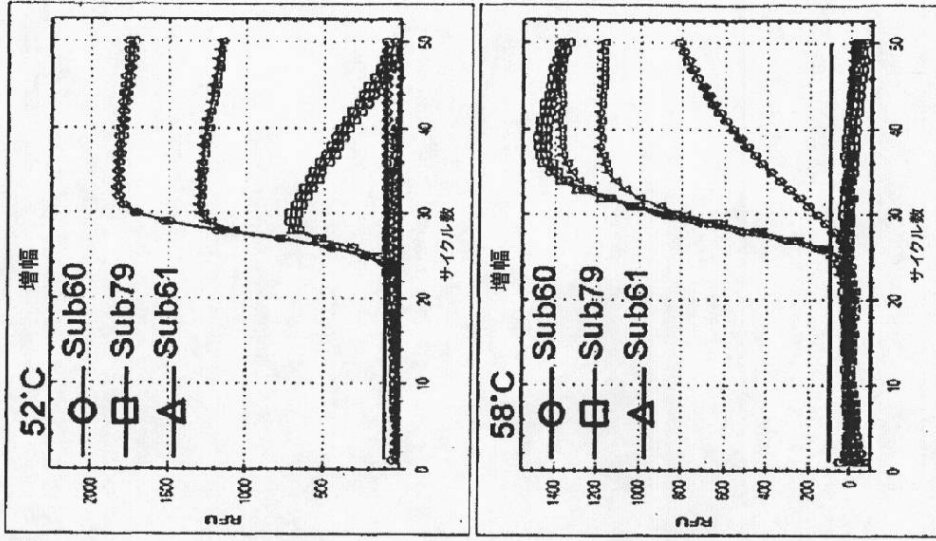
9 図



【図7A】

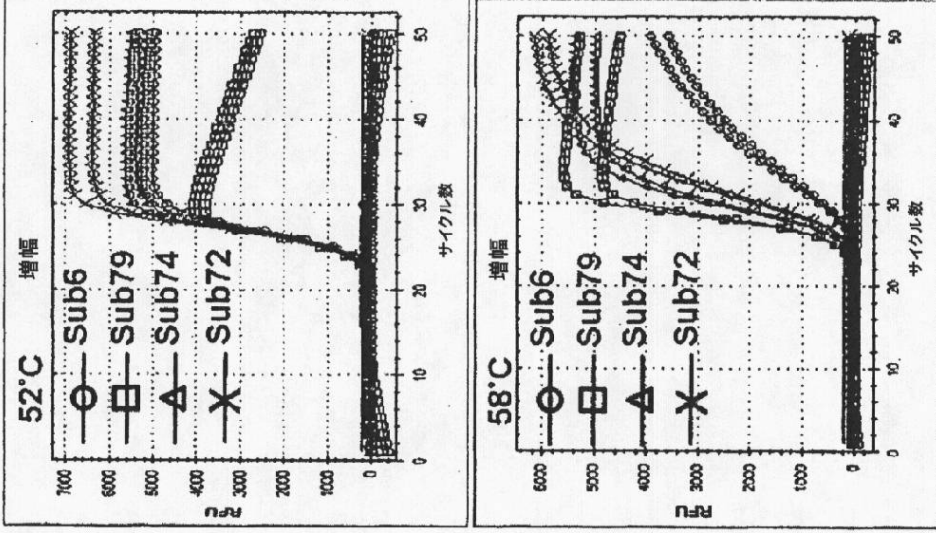
B2M

(iii)



TP53

(ii)



CYP2C9

(i)

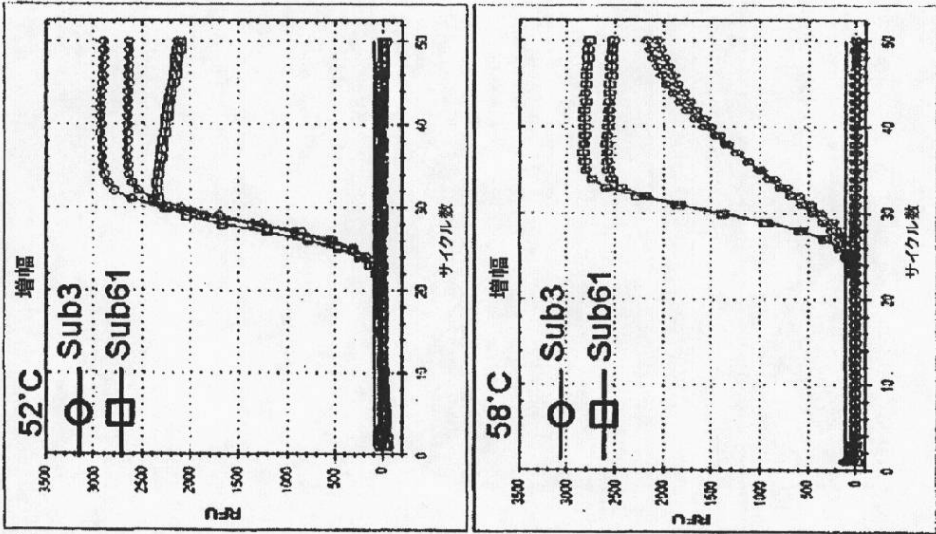


図7A

【 図 7 B 】

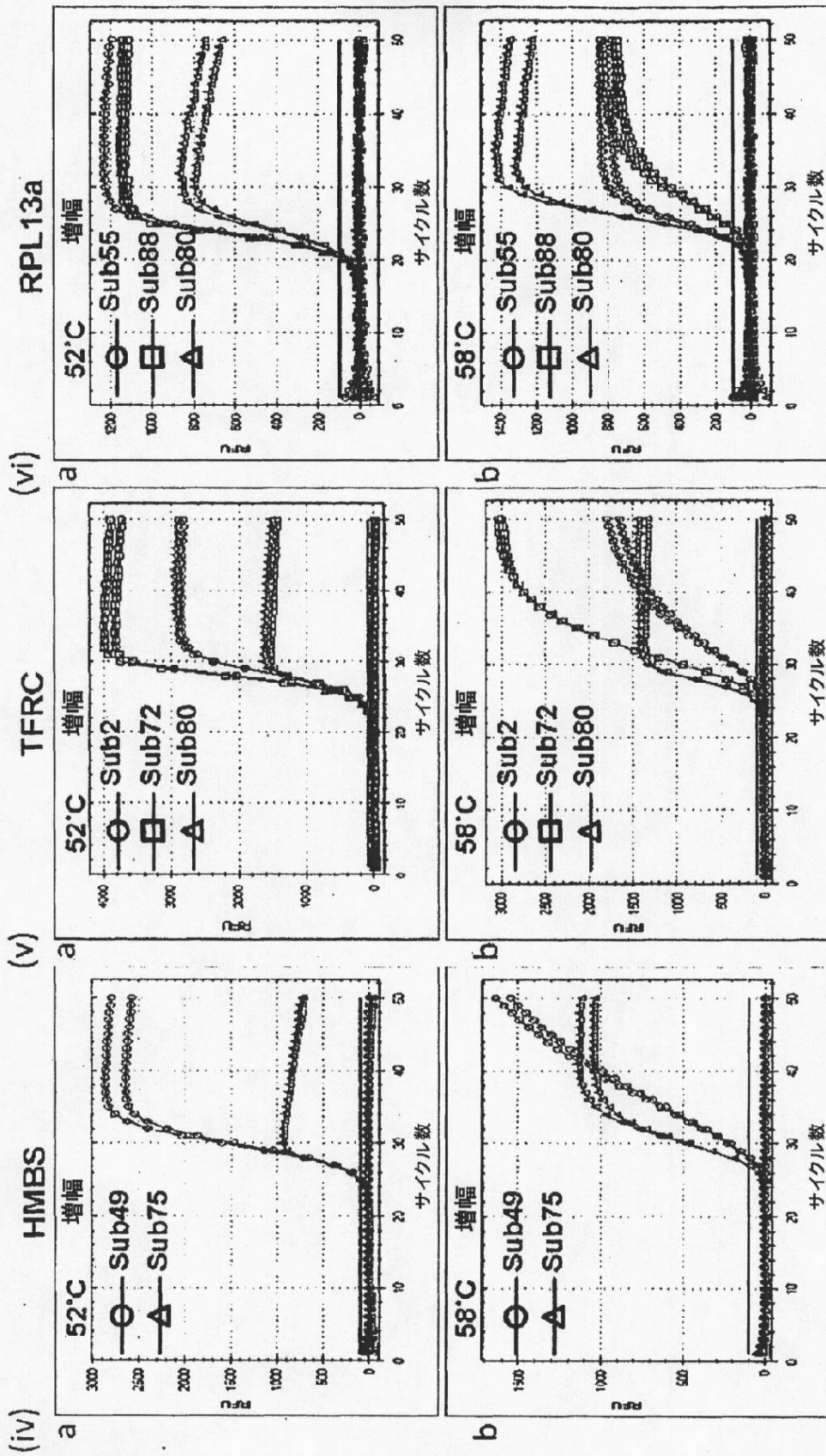
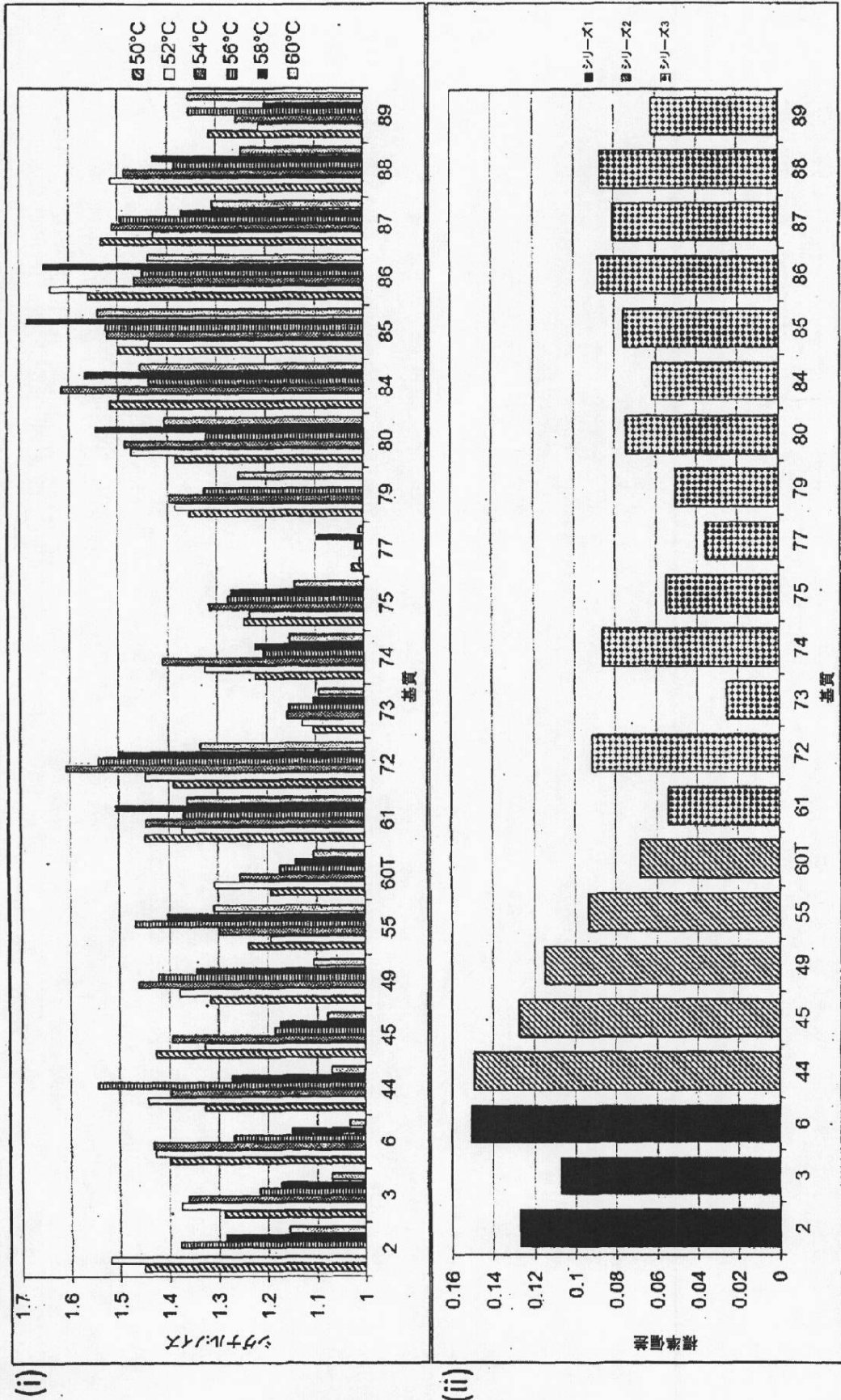


図 7 B

【 図 8 】



8 図

【 図 9 A 】

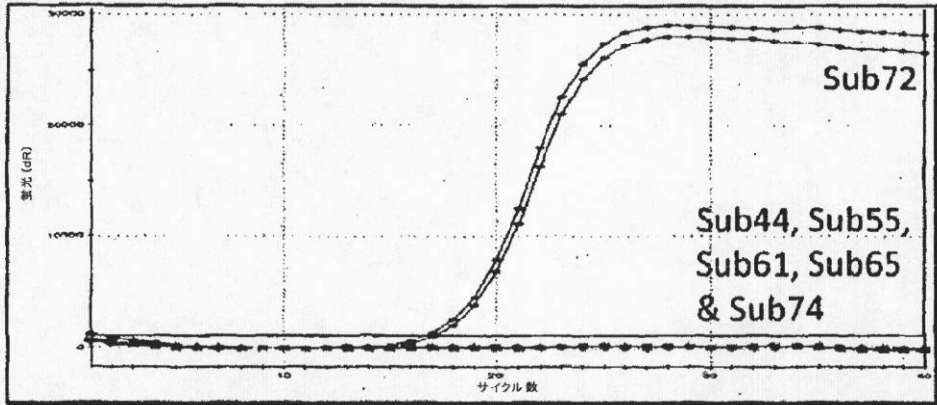
(i)

a

Sub44	C A G G I C T C C T C g u C C C T A I A G I G A
Sub55	A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C
Sub61	C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A
Sub65	T C T C G A C C T C g u C T C C A C G C C A
Sub74	A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G
Sub72	A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G

配列番号 25  
 配列番号 29  
 配列番号 73  
 配列番号 74  
 配列番号 77  
 配列番号 75

b



(ii)

a

Sub44	C A G G I C T C C T C g u C C C T A I A G I G A
Sub55	A C C G C A C C T C g u C C C C A G C T C
Sub61	C T C G A C C C C g u C T C C A C G C C A
Sub65	I C I C G A C C T C g u C I C C A C G C C A
Sub72	A T C A C G C C T C g u C T C C T C C C A G
Sub74	A T C A C T C C C C g u C C C C T C C C A G

配列番号 25  
 配列番号 29  
 配列番号 73  
 配列番号 74  
 配列番号 77  
 配列番号 75

b

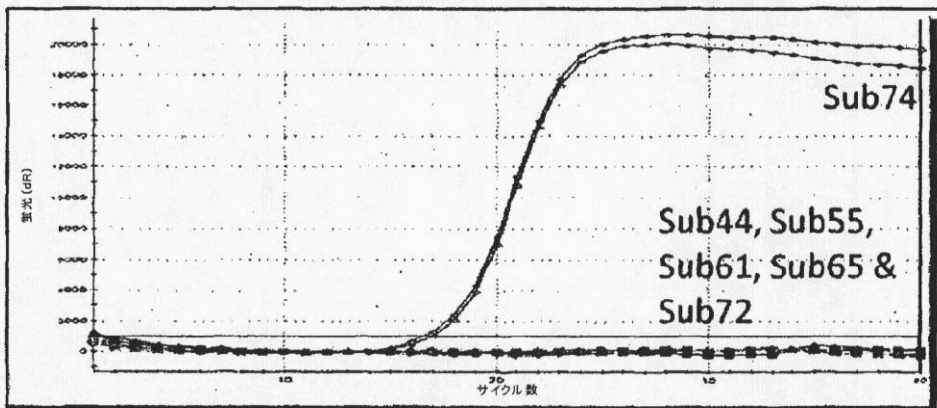


図 9 A

【図9B】

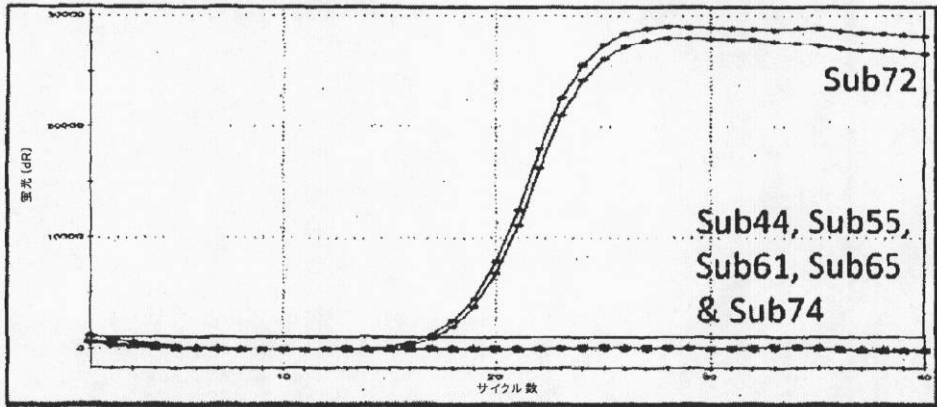
(i)

a

Sub44	<u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u>
Sub55	<u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u>
Sub61	<u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u>
Sub65	<u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u>
Sub74	<u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u>
Sub72	<u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u>

配列番号 25  
 配列番号 29  
 配列番号 73  
 配列番号 74  
 配列番号 77  
 配列番号 75

b



(ii)

a

Sub44	<u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u>
Sub55	<u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u>
Sub61	<u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u>
Sub65	<u>I</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u>
Sub72	<u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u>
Sub74	<u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u>

配列番号 25  
 配列番号 29  
 配列番号 73  
 配列番号 74  
 配列番号 77  
 配列番号 75

b

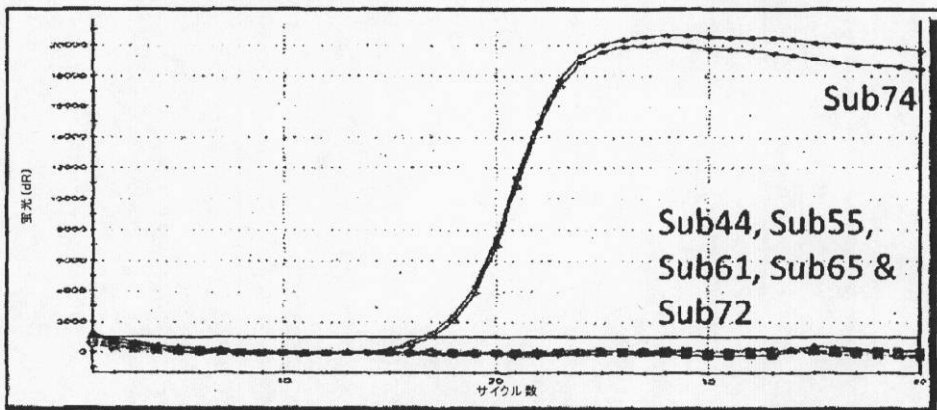
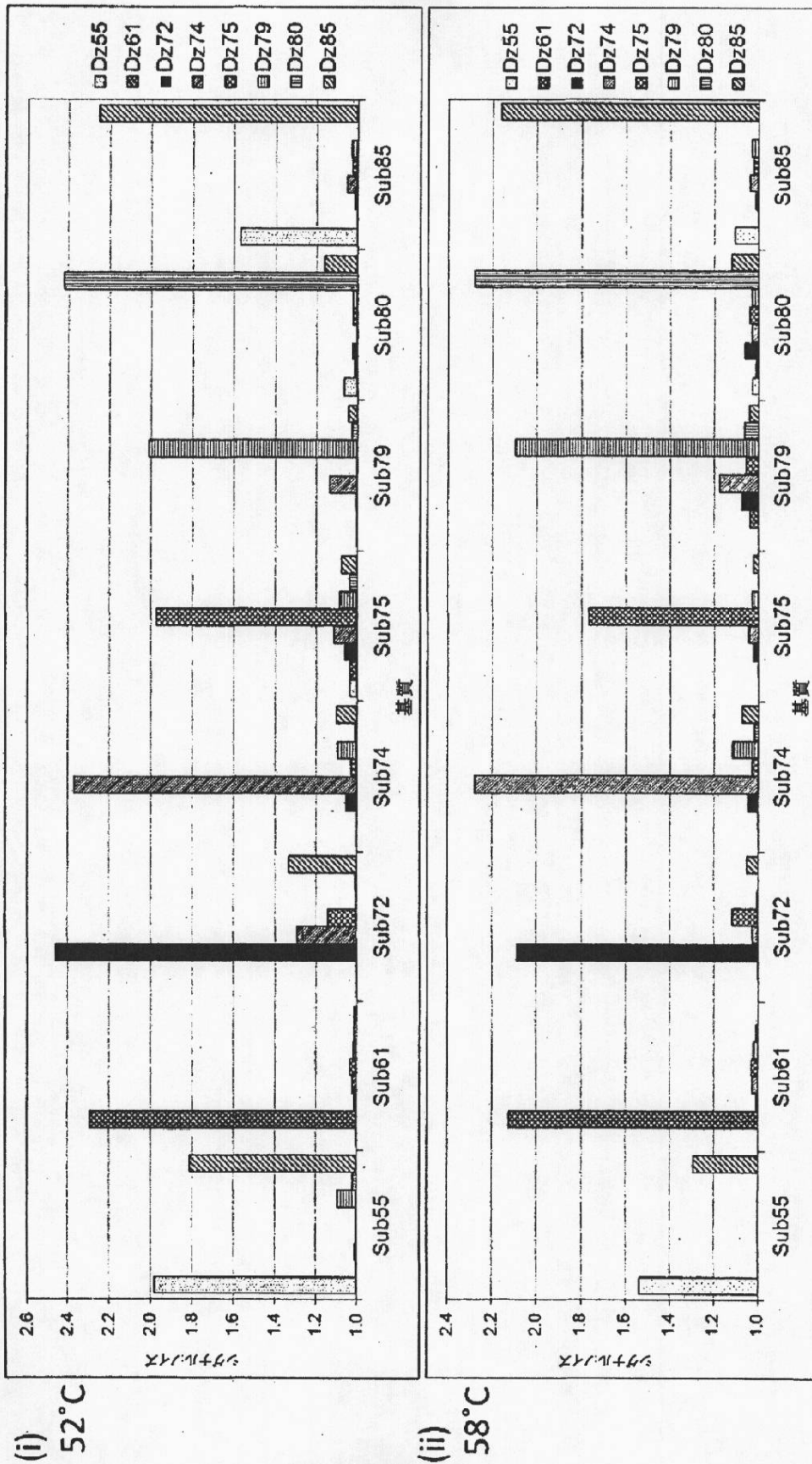


図9B

【 図 10 】



10

【 図 1 1 】

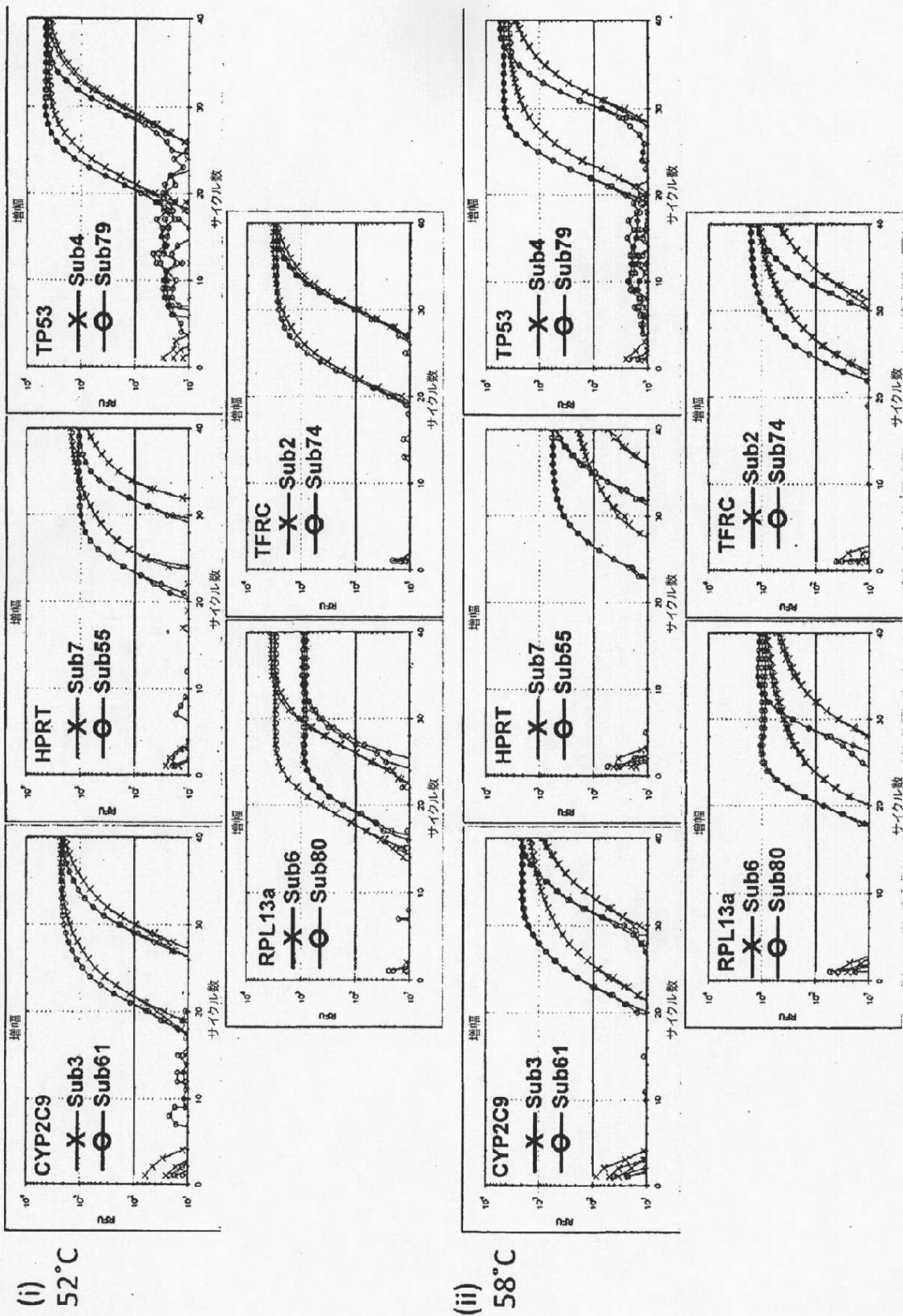


図 11

【 配 列 表 】

2014531203000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年7月3日(2013.7.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリヌクレオチド基質が、配列  $N_1 - N_2 - N_3 - N_4 - N_5 - N_6 - N_7 - N_8 - rR - rY - N_9 - N_{10} - N_{11} - N_{12} - N_{13} - N_{14} - N_{15}$

(式中、

$rR$  は、プリンリボヌクレオチドであり、

$rY$  は、ピリミジンリボヌクレオチドであり、

$N_1 \sim N_{15}$  のそれぞれは、ヌクレオチドであり、

$N_5 \sim N_{13}$  のうち6個以上は、シトシンヌクレオチドであり、かつ

$N_9 \sim N_{15}$  のうち3個未満は、グアニンヌクレオチドがある)

を含む、触媒核酸酵素に対する単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項2】

前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25～27、29～30、33、72～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項3】

$N_5 \sim N_{13}$  のうち7個以上または8個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1または請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項4】

$N_5 \sim N_{13}$  のうち7個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号29、73、76～80、82～83、85～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項3に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項5】

$N_5 \sim N_{13}$  のうち8個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号76、77、80、83、または87のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項3に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項6】

$N_4 \sim N_{13}$  のうち7個以上または8個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1または請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項7】

$N_4 \sim N_{13}$  のうち7個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号27、29、73、76～83、85～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項6に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項8】

$N_4 \sim N_{13}$  のうち8個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号76、77、79～80、82～83、87、88、または90のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項6に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項9】

$N_4 \sim N_{12}$ のうち6個以上、7個以上、または8個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1または請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項10】

$N_4 \sim N_{12}$ のうち7個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号27、29、73、76、77、79～83、85～88、90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項9に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項11】

$N_4 \sim N_{12}$ のうち8個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号76、77、80、83、87、または88のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項9に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項12】

$N_5 \sim N_{12}$ のうち6個以上、7個以上、または8個以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1または請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項13】

$N_5 \sim N_{12}$ のうち7個以上が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号29、73、76、77、80、83、85～88、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項12に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項14】

$N_5 \sim N_{12}$ のうち8個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号76、77、80、83、または87のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項12に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項15】

$N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_8$ 、および/または $N_9$ のいずれか1つ以上がシトシンヌクレオチドである、請求項1～14のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項16】

$N_8$ および $N_9$ が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25～26、29～30、72～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項15に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項17】

$N_9 \sim N_{15}$ のうち2個、1個、または0個が、グアニンヌクレオチドである、請求項1～16のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項18】

$N_9 \sim N_{15}$ のうち1または0個が、グアニンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25～27、29～30、33、72～80、82～90、または172～175のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項17に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項19】

$N_9 \sim N_{15}$ のうち0個が、グアニンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、配列番号25、26、30、72、75、77～80、84～85、または89のいずれか1つにより定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項17に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

【請求項20】

$N_1 \sim N_{15}$ のうち10個超、11個超、12個超、または13個超がピリミジンヌクレオチドである、請求項1～19のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 1】

$N_1 \sim N_{15}$ のうち11個、12個、または12個超が、ピリミジンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか1つの配列番号25～27、29、33、73～90、または173～175により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項20に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 2】

$N_1 \sim N_{15}$ のうち13個または14個が、ピリミジンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか1つの配列番号75、77～80、82～85、または88～89により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項20または請求項21に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 3】

$N_1 \sim N_{14}$ のうち8個超、9個超、10個超または11個がシトシンヌクレオチドである、請求項1～22のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 4】

$N_1 \sim N_{14}$ のうち10個または11個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか1つの配列番号33、76～80、82～83、85、87、88、または89により定義された配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項23に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 5】

$N_1 \sim N_{14}$ のうち11個が、シトシンヌクレオチドであり、かつ前記ポリヌクレオチド基質が、いずれか1つの配列番号77～79により定義される配列を含むかまたはその配列で構成される、請求項23または請求項24に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 6】

前記ポリヌクレオチド基質を検出するための検出可能標識をさらに含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 7】

検出可能部分とクエンチャー部分とをさらに含み、前記検出可能部分により提供される検出可能作用が、前記触媒核酸酵素による前記ポリヌクレオチド基質の修飾により増大または低減される、請求項1～25のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 8】

前記プリンリボヌクレオチドがグアニンを含む、請求項1～27のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 2 9】

前記ピリミジンリボヌクレオチドがウラシルを含む、請求項1～28のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 3 0】

前記触媒核酸酵素に結合する前記基質の部分が、50～90、50～65、50～60、52～58、66～76、68～76、64～70、70～76、70～75、72～76、52、58、64、66、68、70、72、または76の融解温度( $T_m$ )を有する、請求項1～29のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 3 1】

前記触媒核酸酵素が、

(a) 多成分核酸酵素(MNAザイム)、ここで、前記部分は、前記MNAザイムの少なくとも1つの基質アームに結合する、または

(b) DNAザイム

である、請求項1～30のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質。

## 【請求項 3 2】

(a) 2つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムを提供することと、ただし、少なくとも第1のオリゴヌクレオチドパートザイムおよび第2のオリゴヌクレオチドパートザイムは、前記標的の存在下で自己集合して少なくとも第1の触媒活性多成分核酸酵素(MNAザイム)を形成する、

(b) 請求項1~31のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質を提供することと、前記ポリヌクレオチド基質は、前記第1のMNAザイムによる修飾が可能であり、前記MNAザイムによる前記ポリヌクレオチド基質の修飾は、検出可能作用を提供する、

(c) (1) 前記少なくとも第1のMNAザイムの自己集合と、

(2) 前記少なくとも第1のMNAザイムの触媒活性と、

を可能にする条件下で、前記2つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムと前記標的を推定上含有するサンプルとを接触させることと、

(d) 前記検出可能作用を検出することと、

を含む、少なくとも1つの標的の存在を検出する方法。

【請求項33】

前記標的が核酸である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記核酸が、DNA、メチル化DNA、アルキル化DNA、RNA、メチル化RNA、マイクロRNA、siRNA、shRNA、tRNA、mRNA、snRNA、stRNA、smRNA、プレもしくはプリマイクロRNA、他の非コードRNA、リボソームRNA、それらの誘導體、アンプリコン、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記核酸が増幅される、請求項33または請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、ループ媒介等温増幅(LAMP)、ローリングサークル増幅(RCA)、転写媒介増幅(TMA)、自己保持配列複製(3SR)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)の1つ以上を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記第1および第2のオリゴヌクレオチドパートザイムが、

配列番号9および配列番号10、配列番号11および配列番号12、配列番号13および配列番号14、配列番号16および配列番号14、配列番号17および配列番号18、配列番号40および配列番号41、配列番号42および配列番号43、配列番号44および配列番号45、配列番号46および配列番号45、配列番号47および配列番号63、配列番号48および配列番号49、配列番号50および配列番号51、配列番号52および配列番号51、配列番号38および配列番号55、配列番号56および配列番号57、配列番号58および配列番号59、配列番号60および配列番号61、配列番号62および配列番号63、配列番号64および配列番号65、配列番号66および配列番号67、配列番号62および配列番号68、配列番号69および配列番号70、配列番号46および配列番号55、配列番号46および配列番号59、配列番号38および配列番号45、配列番号58および配列番号45、配列番号62および配列番号45、配列番号46および配列番号63、配列番号71および配列番号68、配列番号98および配列番号99、配列番号100および配列番号103、配列番号104および配列番号105、配列番号106および配列番号107、配列番号108および配列番号109、配列番号110および配列番号111、配列番号112および配列番号113、配列番号116および配列番号117、配列番号118および配列番号119、配列番号120および配列番号121、配列番号122および配列番号119、配列番号155および配列番号156、配列番号157および配列番号158、配列番号159および配列番号160、配列番号168および配列番号169、配列番号179および配列番号180、配列番号181および

配列番号 1 8 2、配列番号 1 8 3 および配列番号 1 8 4、または配列番号 1 8 5 および配列番号 1 8 6

により定義されるそれぞれの配列を含む、請求項 3 2 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記ポリヌクレオチド基質が、5 0 ~ 9 0、5 0 ~ 6 5、5 0 ~ 6 0、5 2 ~ 5 8、6 6 ~ 7 6、6 8 ~ 7 6、6 4 ~ 7 0、7 0 ~ 7 6、7 0 ~ 7 5、7 2 ~ 7 6、5 2、5 8、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、または 7 6 の温度で前記 M N A ザイムの基質アームにハイブリダイズする、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記方法が、

異なる標的の存在下で自己集合して第 2 の触媒活性 M N A ザイムを形成可能な 2 つ以上の追加のオリゴヌクレオチドパートザイムと、

少なくとも 1 つの追加のポリヌクレオチド基質と、

を提供することをさらに含み、

前記追加のポリヌクレオチド基質が、前記異なる標的の存在下で前記第 2 の M N A ザイムによる修飾が可能である、

請求項 3 2 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記追加のポリヌクレオチド基質が前記第 1 の M N A ザイムによる修飾が可能でない、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

パート ( d ) での前記検出が、蛍光分光法、表面プラズモン共鳴法、質量分析法、N M R 法、電子スピン共鳴法、偏光蛍光分光法、円二色性法、免疫アッセイ法、クロマトグラフィ法、放射測定法、電気化学的方法、測光法、シンチグラフィ法、電子的方法、U V、可視光、もしくは赤外の分光法、酵素法、またはそれらの任意の組合せの使用を含む、請求項 3 2 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

パート ( d ) での前記検出が蛍光分光法の使用を含む、請求項 3 2 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

パート ( d ) での前記検出が F R E T 検出可能作用の検出を含む、請求項 3 2 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

触媒核酸酵素に対する基質としての、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質の使用。

【請求項 4 5】

前記触媒核酸酵素が、多成分核酸酵素 ( M N A ザイム ) であり、前記 M N A ザイムが、少なくとも 2 つ以上のオリゴヌクレオチドパートザイムを含み、少なくとも第 1 のオリゴヌクレオチドパートザイムおよび第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムが、M N A ザイム集合促進剤の存在下で自己集合して触媒活性多成分核酸酵素 ( M N A ザイム ) を形成し、前記少なくとも第 1 および前記第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムのそれぞれは、基質アーム部分と、触媒コア部分と、センサーアーム部分と、を含み、

自己集合すると、前記第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムのセンサーアーム部分が、M N A ザイムのセンサーアームとして作用し、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムの基質アーム部分が、M N A ザイムの基質アームとして作用し、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザイムの触媒コア部分が、M N A ザイムの触媒コアとして作用し、

前記 M N A ザイムのセンサーアームが、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドパートザ

イムを近接して維持してそれらのそれぞれの触媒コア部分の会合によりMNAザイムの触媒コアを形成するように、前記MNAザイム集合促進剤と相互作用し、前記触媒コアが、前記ポリヌクレオチド基質の修飾が可能であり、前記MNAザイムの前記基質アームが、前記MNAザイムの前記触媒コアが前記ポリヌクレオチド基質を修飾できるように、前記ポリヌクレオチド基質に結合する、請求項44に記載の使用。

【請求項46】

それぞれの前記オリゴヌクレオチドパートザイムの触媒コア部分がDNAまたはそのアナログを含む、請求項45に記載の使用。

【請求項47】

前記集合促進剤が、同定、検出、または定量される標的である、請求項45または請求項46に記載の使用。

【請求項48】

前記ポリヌクレオチド基質が、50 ~ 90、50 ~ 65、50 ~ 60、52 ~ 58、66 ~ 76、68 ~ 76、64 ~ 70、70 ~ 76、70 ~ 75、72 ~ 76、52、58、64、66、68、70、72、または76の温度で前記触媒核酸酵素にハイブリダイズする、請求項44 ~ 47のいずれか一項に記載の使用。

【請求項49】

請求項1 ~ 31のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質を含むキット。

【請求項50】

前記ポリヌクレオチド基質の触媒修飾が可能な触媒核酸酵素をさらに含む、請求項49に記載のキット。

【請求項51】

請求項1 ~ 31のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド基質と、少なくとも1つの標的の検出が可能な多成分核酸酵素(MNAザイム)を集合するように設計された複数のオリゴヌクレオチドパートザイムと、を含み、前記MNAザイムが前記ポリヌクレオチド基質の触媒修飾が可能である、キット。

【請求項52】

請求項1 ~ 31のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド基質に結合された固体担体を含む集合体。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/AU2012/001081</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C12Q 1/68 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenomeQuest, SEQ ID NOS: 9-14, 16-18, 25-27, 29-30, 33, 38, 41-52, 55-90, 98-100, 103-113, 116-122, 155-160, 168-170, 172-176, 179-186 at 100% identity. Keywords MNAzyme and like terms. WPI, EDPODOC, MEDLINE, CAPLUS BIOSIS, Keywords MNAzyme, substrate and like terms		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 7 November 2012	Date of mailing of the international search report 07 November 2012	
<b>Name and mailing address of the ISA/AU</b> AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pot@ipaaustralia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	<b>Authorised officer</b> Julie Christie AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832463	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		<b>PCT/AU2012/001081</b>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2385141 A1 (JOHNSON AND JOHNSON RESEARCH PTY LTD) 09 September 2011 The whole document, but particularly paragraphs [0209], [0214], [0275], [0276]; the examples; the claims, particularly claims 41, 44, 45, 48, 49, 60, 61	32-48, 50, 51
A	MOKANY, E. et al., 'MNAzymes, a versatile new class of nucleic acid enzymes that can function as biosensors and molecular switches', Journal of the American Chemical Society, 2010, vol. 132, pages 1051-1059 The whole document.	1-52

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2012/001081</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
EP 2385141 A1	09 Sep 2011	AU 2006302729 A1	19 Apr 2007
		AU 2006302729 B2	03 Feb 2011
		AU 2008235256 A1	16 Oct 2008
		AU 2011202017 A1	26 May 2011
		AU 2011202017 B2	02 Feb 2012
		BR PI0616466 A2	21 Jun 2011
		CA 2625263 A1	19 Apr 2007
		CA 2682612 A1	16 Oct 2008
		CN 101341260 A	07 Jan 2009
		CN 101802216 A	11 Aug 2010
		EP 1948822 A1	30 Jul 2008
		EP 1948822 B1	13 Jul 2011
		EP 2142673 A1	13 Jan 2010
		EP 2385141 A1	09 Nov 2011
		HK 1116836 A1	18 Nov 2011
		JP 2009509551 A	12 Mar 2009
		JP 2010523088 A	15 Jul 2010
		KR 20080071130 A	01 Aug 2008
		KR 20100019429 A	18 Feb 2010
		MX 2009010710 A	08 Dec 2009
		NZ 567403 A	31 Mar 2011
		NZ 580129 A	25 May 2012
		TW 200902726 A	16 Jan 2009
		US 2007231810 A1	04 Oct 2007
		US 2011143338 A1	16 Jun 2011
		US 2012101267 A1	26 Apr 2012
		WO 2007041774 A1	19 Apr 2007
		WO 2008122084 A1	16 Oct 2008
		ZA 200802937 A	30 Sep 2009
<b>End of Annex</b>			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/543 5 9 5

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 アリソン・ヴェリアン・トッド

オーストラリア・ニューサウスウェールズ・2 0 3 7・グリーブ・コネイル・ブレイス・1 0

(72)発明者 エリサ・モカニー

オーストラリア・ニューサウスウェールズ・2 2 2 9・キャリングバー・バビン・ブレイス・2 2

(72)発明者 エヴェリン・メイリア・リナディ

オーストラリア・ニューサウスウェールズ・2 7 6 7・ウッドクラフト・ワイアンガラ・サーキット・6 5

(72)発明者 ディナ・ロネガン

オーストラリア・ニューサウスウェールズ・2 0 3 4・クッジー・レインボー・ストリート・3 0 / 2 3 6

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA07 CA01 CA11 HA08 HA12

4B063 QA01 QA11 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR01 QR08 QR32 QR42

QR55 QR62 QS25 QS26 QS34 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014531203A5</a>	公开(公告)日	2015-11-05
申请号	JP2014528802	申请日	2012-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	斯比戴克斯私人有限公司		
申请(专利权)人(译)	Supidekusu私人有限公司		
[标]发明人	アリソンヴェリアントッド エリサモカニー エヴェリンメイリアリナデイ ディナロネガン		
发明人	アリソン・ヴェリアン・トッド エリサ・モカニー エヴェリン・メイリア・リナデイ ディナ・ロネガン		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C12Q1/6818 C12Q1/6823 C12Q2521/345 C12Q2522/101 C12Q2565/1015 C12N15/111 C12N2310/12 C12N2310/53 C12N2320/11 C12Q1/686 C12Q1/6865		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/543.501.P G01N33/543.595		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063 /QA11 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR01 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS26 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2011903686 2011-09-09 AU		
其他公开文献	JP2014531203A		

#### 摘要(译)

本发明涉及催化核酸酶的核酸底物和利用该底物的方法。