

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成30年12月20日(2018.12.20)

【公表番号】特表2017-533710(P2017-533710A)

【公表日】平成29年11月16日(2017.11.16)

【年通号数】公開・登録公報2017-044

【出願番号】特願2017-524429(P2017-524429)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 M 1/34 B

【手続補正書】

【提出日】平成30年11月9日(2018.11.9)

【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】

以下の：

a) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含む基材；

b) 少なくとも部分的に内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対を含む第一層；および

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層

が含まれ、前記第二層が備わった後、前記第一層中の前記第一キャップチャーブライマーが存在し、かつアクセス可能である、マイクロアレイ。

【請求項2】

第一層はウェルの周りの表面を覆っていない、または前記第一層は少なくとも部分的に内側ウェル表面を覆う、請求項1のマイクロアレイ。

【請求項3】

少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、必要により、前記複数のウェルは約700nmのピッチで間隔を置かれ、必要により、前記各ウェルの直径は約100nmおよび400nmの間である、請求項1ないし2のマイクロアレイ。

【請求項4】

第一層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、ポリ(N-(5-アジドニアセトアミジルペニチル)アクリルアミド-co-アクリルアミド(PAZAM)が含まれる、請求項1~3のいずれか1項に記載のマイクロアレイ。

【請求項5】

第二層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、PAZAMまたはシランフリーアクリルアミド(SFA)が含まれる、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項6】

少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対は複数の第一キャップチャーブライマー対である、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項7】

少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対のブライマーには、ユニバーサルキャップチャーフィールドが含まれる、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 8】

第二層には、少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対が含まれ、必要により、前記少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対は複数の第二キャップチャーブライマー対である、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 9】

少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対のブライマーは3'端にてブロックされ、必要により、前記少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対のブライマーは3'リノ酸の終端をなし、必要により、前記少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対の3'リノ酸終端化ブライマーには、ユニバーサルキャップチャーフィールドが含まれる、請求項8のマイクロアレイ。

【請求項 10】

少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対のブライマーは、3'端にてブロックされなく、必要により、前記少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対のブライマーには、ユニバーサルキャップチャーフィールドが含まれる、請求項8のマイクロアレイ。

【請求項 11】

複数の第一キャップチャーブライマー対の複数のキャップチャーブライマー対は各々標的ポリヌクレオチドに付着され、必要により、前記複数の標的ポリヌクレオチドは、少なくとも一のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成し、必要により、前記少なくとも一のウェルには、複数のウェルが含まれ、およびそこでは、複数のウェルの二以上のウェルには、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団が含まれる、請求項6のマイクロアレイ。

【請求項 12】

少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対は複数の第一キャップチャーブライマー対であり、および少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対は複数の第二キャップチャーブライマー対であり、およびそこでは、複数の第一キャップチャーブライマー対および複数の第二キャップチャーブライマー対の複数のブライマーは、複数の標的ポリヌクレオチドに付着される、請求項8のマイクロアレイ。

【請求項 13】

以下の：

a ) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含む基材；および

b ) 内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対および少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対を含む層が含まれる、マイクロアレイ。

【請求項 14】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a ) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および少なくとも部分的に内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を覆い；

b ) 少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対を第一層において堆積すること；

c ) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材上に生成し、前記第二層が備わった後、前記第一層中の前記第一キャップチャーブライマーが存在し、かつアクセス可能であること、；

d ) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、標的ポリヌクレオチドについて少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対のキャップチャーブライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させること；および

e ) ウェルの内側で標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、第一の運動排除アッセイ（K E A）を実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチが増幅されることが含まれる、方法。

**【請求項 15】**

複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させる、請求項14の方法。

**【請求項 16】**

第一ＫＥＡはキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションした単一標的ポリヌクレオチドから少なくとも一のウェルにおいてアンプリコンのモノクローナル集団を生成する、請求項14または15の方法。

**【請求項 17】**

少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、およびそこでは、アンプリコンのモノクローナル集団が単一標的ポリヌクレオチドから複数のウェルの二以上のウェルにおいて生成される、請求項16の方法。

**【請求項 18】**

第一層はウェルの周りの表面を覆わない、請求項14の方法。

**【請求項 19】**

第一層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、ポリ(Ｎ-（5-アジドアセトアミジルペンチル）アクリルアミド-co-アクリルアミド（ＰＡＺＡＭ）)が含まれる、請求項14の方法。

**【請求項 20】**

第二層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、ＰＡＺＡＭまたはＳＦＡが含まれ、必要により、前記重合体被覆には、ＰＡＺＡＭまたはＳＦＡが含まれる、請求項14の方法。

**【請求項 21】**

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である、請求項14の方法。

**【請求項 22】**

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を第二層において堆積することがさらに含まれ、必要により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である、請求項14の方法。

**【請求項 23】**

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項14の方法。

**【請求項 24】**

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3'端にてブロックされ、必要により、前記3'ブロック化プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項22の方法。

**【請求項 25】**

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーを第一ＫＥＡの実行後デブロック化することがさらに含まれる、請求項24の方法。

**【請求項 26】**

標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二ＫＥＡを実行することがさらに含まれ、必要により、前記第一キャプチャープライマー対のプライマーには、ＳＢＳがさらに含まれる、請求項14の方法。

**【請求項 27】**

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3'端にてアンブロック化され、必要により、前記少なくとも一の第二プライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項22の方法。

**【請求項 28】**

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は第一ＫＥＡの実行後に堆積され、必要

により、前記少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対および前記少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャップチャーフィールドが含まれる、請求項22の方法。

#### 【請求項29】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対を第一層において堆積することであり、そこでは、第一キャップチャーブライマー対には、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第一キャップチャーブライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第二キャップチャーブライマーが含まれ；

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；

d) 少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対を第二層において堆積することであり、そこでは、第二キャップチャーブライマー対は、3'リン酸の終端をなし、およびIllumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第一キャップチャーブライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第二キャップチャーブライマーが含まれ；

e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、標的ポリヌクレオチドは、相補的なIllumina(R)P5'プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的なIllumina(R)P7'プライマーヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なユニバーサルプライマー領域によって隣接され；

f) 少なくとも一のウェルの内側で単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、第一KEAを実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅され；

g) 第二プライマー対のプライマーをデブロック化するために、基材をT4キナーゼと接触させること；および

h) ウェルを超えて単一標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクローナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二KEAが実行されることが含まれる、方法。

#### 【請求項30】

核酸を増幅するにあたり、以下の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対を第一層において堆積することであり、そこでは、第一キャップチャーブライマー対には、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の少なくとも一の第一キャップチャーブライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の少なくとも一の第二キャップチャーブライマーが含まれ；

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；

d) 少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対を第二層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対には、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第一キャップチャーブライマーおよびIllumina(R)P7ヌクレオチドシーケンスが含まれる

3'部分を含む複数の第二キャップチャーブライマーが含まれ；

e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、複数の標的ポリヌクレオチドは、相補的な I l l u m i n a ( R ) S B S 3' ブライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的な I l l u m i n a ( R ) S B S 8' ヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的な S B S によって隣接され；および

f) 少なくとも一のウェルの内側および外側で単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、K E A を延長された時間の間実行することであり、それによって単一標的ポリヌクレオチがウェルの内側で増幅され、および標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団が少なくとも一のウェルを超えて増大することが含まれる、方法。

#### 【請求項 3 1】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面、および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対を第一層において堆積することであり、そこでは、第一プライマー対には、I l l u m i n a ( R ) P 5 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャップチャーブライマーおよび I l l u m i n a ( R ) P 7 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャップチャーブライマーが含まれ；

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；

d) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、複数のポリヌクレオチドは、相補的な I l l u m i n a ( R ) P 5' プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的な I l l u m i n a ( R ) P 7' プライマーヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なユニバーサルプライマー領域によって隣接され；

e) 少なくとも一のウェルの内側で単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、第一 K E A を実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅され；

f) 少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対を第二層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対には、I l l u m i n a ( R ) P 5 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャップチャーブライマーおよび I l l u m i n a ( R ) P 7 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャップチャーブライマーが含まれ；および

g) 単一標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクローナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二 K E A を実行することが含まれる、方法。

#### 【請求項 3 2】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、ウェルは約 1 μm 以上の直

径をもち、およびそこでは、層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対および少なくとも一の第二キャップチャーブライマー対を層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第一キャップチャーブライマー対のプライマー密度は少なくとも第二プライマー対のプライマー密度よりも高く；

c ) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり第二プライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させること；

d ) ウェルの内側で第二プライマーにハイブリダイゼーションした単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、K E A を実行することであり、それによって単一標的ポリヌクレオチドが増幅されることが含まれる、方法。

【請求項 3 3】

固定化キャップチャーブライマーを修飾するにあたり、次の：

a ) 複数の固定化キャップチャーブライマーが含まれる基材を、一以上の固定化錆型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションについて十分な条件下に複数の錆型核酸と接触させることであり、

そこでは、複数の固定化キャップチャーブライマーには、5'末端ユニバーサルキャップチャーフィールド Y が含まれる第一の複数のプライマーおよび 3'末端ユニバーサルキャップチャーフィールド Z が含まれる第二の複数のプライマーが含まれ、および

そこでは、各錆型核酸は、5'末端および 3'末端ユニバーサルキャップチャーフィールド Y または Z によって隣接され、および一以上の制限部位および 5'末端ユニバーサルキャップチャーフィールド および一以上の制限部位の間、または 3'末端ユニバーサルキャップチャーフィールド および一以上の制限部位の間で標的特異的キャップチャーフィールドを含み、および

b ) 一以上の錆型核酸に相補的な一以上の固定化伸長生成物を生成するために、一以上の固定化キャップチャーブライマーを伸長することが含まれる、方法。

【請求項 3 4】

固定化キャップチャーブライマーを修飾するにあたり、次の：

a ) 複数の固定化キャップチャーブライマーが含まれる基材を、複数の異なる固定化シード核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションについて十分な条件下に、複数の異なるシード核酸と接触させること；

b ) 二以上の固定化キャップチャーブライマーを、複数の異なる固定化シード核酸の二以上に相補的な複数の異なる固定化伸長生成物を生成するために、伸長させること；

c ) 複数の異なる固定化伸長生成物の一の固定化伸長生成物を、活性化キャップチャーブライマーを形成するために、活性化すること、および

d ) 隨意に、活性化キャップチャーブライマーを、固定化修飾キャップチャーブライマーのモノクローナルクラスターを生成するために、増幅することが含まれる、方法。