

【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】令和6年11月6日(2024.11.6)

【国際公開番号】WO2022/090521
 【公表番号】特表2023-547498(P2023-547498A)
 【公表日】令和5年11月10日(2023.11.10)
 【年通号数】公開公報(特許)2023-212
 【出願番号】特願2023-526474(P2023-526474)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 Q 1/6823(2018.01)
 C 1 2 Q 1/6853(2018.01)
 C 1 2 Q 1/6858(2018.01)
 C 1 2 M 1/00(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6823 Z Z N A
 C 1 2 Q 1/6853 Z
 C 1 2 Q 1/6858 Z
 C 1 2 M 1/00 A

20

【手続補正書】

【提出日】令和6年10月28日(2024.10.28)

【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】

サンプル中のK I F 1 1核酸に対して前記サンプル中の標的核酸の数を定量化するための方法であって： 30

1. K I F 1 1増幅反応においてK I F 1 1特異的プライマー対を使用して前記サンプルに含まれるK I F 1 1核酸を増幅することであって、

i. 前記K I F 1 1特異的プライマー対のメンバーのそれぞれが、エクソン、イントロン内に位置するK I F 1 1領域、またはK I F 1 1遺伝子の非コード配列に対して - 互いに独立して - 相補的であり；

ii. 前記K I F 1 1増幅反応が、K I F 1 1検出可能なプローブの存在下で実施される、

K I F 1 1核酸を増幅すること；

2. 前記K I F 1 1増幅反応において前記K I F 1 1検出可能なプローブにより産生されるシグナルを検出すること； 40

3. 2. の前記シグナルを定量化すること；

4. 標的増幅反応において標的的特異的プライマー対を使用して前記サンプルからの前記標的核酸を増幅することであって；

前記標的増幅反応が、標的検出可能なプローブの存在下で実施される、

標的核酸を増幅すること；および

5. 前記標的増幅反応において前記標的検出可能なプローブにより産生されるシグナルを検出すること；

6. 5. の前記シグナルを定量化すること；

7. 3. の定量化されたシグナルに対して6. の定量化されたシグナルを標準化し、そ 50

れによってサンプル中の K I F 1 1 核酸に対して前記サンプル中の標的核酸の数を定量化すること

を含む、方法。

【請求項 2】

前記 K I F 1 1 領域が、K I F 1 1 遺伝子のエクソン 6、エクソン 8、エクソン 1 8、エクソン 2 1、イントロン 6、エクソン 2 1 - イントロン 2 1 境界または非コード領域のいずれかに位置する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 K I F 1 1 特異的プライマー対が、以下：

i . 配列番号 6 9 および 7 0 ;

i i . 配列番号 7 1 および 7 2 ;

i i i . 配列番号 7 3 および 7 4 ;

i v . 配列番号 7 5 および 7 6 ;

v . 配列番号 7 7 および 7 8 ; および

v i . 配列番号 7 9 および 8 0 から選択されたプライマー対から選択されるか、および / または、

前記 K I F 1 1 を検出可能なプローブは、配列番号 8 1 から 8 8 から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標的核酸および K I F 1 1 核酸が、同一の増幅反応中で増幅されるか、および / または同一のサンプルから得られる、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

サンプル中の g D N A 混入を決定するための方法であって：

1 . K I F 1 1 増幅反応において第 1 および第 2 の K I F 1 1 特異的プライマー対を使用して前記サンプルに含まれる K I F 1 1 核酸を増幅することであって、

a . 前記第 1 の K I F 1 1 特異的プライマー対の少なくとも 1 つのメンバーが、K I F 1 1 イントロンまたは K I F 1 1 遺伝子の非コード配列に対して相補的であり；

b . 前記第 1 の K I F 1 1 特異的プライマー対を使用する前記増幅反応が、第 1 の K I F 1 1 検出可能なプローブの存在下で実施され；

c . 前記第 2 の K I F 1 1 特異的プライマー対のメンバーのそれぞれが、K I F 1 1 エクソン内に位置し；

d . 前記第 2 の K I F 1 1 特異的プライマー対を使用する前記増幅反応が、第 2 の K I F 1 1 検出可能なプローブの存在下で実施される、

増幅すること；

2 . 前記第 1 および第 2 の K I F 1 1 増幅反応において前記第 1 および第 2 の K I F 1 1 検出可能なプローブにより産生されるシグナルを検出すること；

3 . 前記第 1 および第 2 の K I F 1 1 増幅反応の前記シグナルを定量化すること；

4 . 第 2 の増幅シグナルの定量化されたシグナルに対して前記第 1 の増幅反応の定量化されたシグナルを標準化し、それによって前記サンプル中の g D N A 混入を決定すること

であって、好ましくは、前記サンプルが、ミトコンドリア D N A、c D N A、m R N A、r R N A、t R N A、h n R N A、m i c r o R N A、l n c R N A、c f D N A、無細胞腫瘍 D N A または s i R N A サンプルである、決定すること

を含む、方法。

【請求項 6】

サンプル中の核酸の完全性を決定するための方法であって：

1 . K I F 1 1 増幅反応において第 1 および第 2 の K I F 1 1 特異的プライマー対を使用して前記サンプルに含まれる K I F 1 1 核酸を増幅することであって、

a . 前記第 1 の K I F 1 1 特異的プライマー対のメンバーのそれぞれが、エクソン、イントロン内に位置する K I F 1 1 領域、または K I F 1 1 遺伝子の非コード配列に対して - 互いに独立して - 相補的であり；

10

20

30

40

50

b. 前記第1のK I F 1 1特異的プライマー対を使用する前記増幅反応が、第1のK I F 1 1検出可能なプローブの存在下で実施され；

c. 前記第2のK I F 1 1特異的プライマー対のメンバーのそれぞれが、エクソン、イントロン内に位置するK I F 1 1領域、または前記K I F 1 1遺伝子の前記非コード配列に対して - 互いに独立して - 相補的であり；

d. 前記第2のK I F 1 1特異的プライマー対を使用する前記増幅反応が、第2のK I F 1 1検出可能なプローブの存在下で実施されること；

2. 前記核酸増幅反応のそれぞれにおいて閾値を決定することであって、

i. その強度が前記反応において増幅される核酸配列の量に関係する少なくとも1つのシグナルを前記増幅反応中の複数の異なる時間に測定すること；および

ii. 前記閾値を表す、導関数の特徴に関連するサイクル数を決定することによる、決定すること；

3. 前記第1および第2のK I F 1 1増幅反応の前記閾値（閾値サイクル数）を比較すること；

を含み、

4. 前記第1および前記第2のK I F 1 1増幅反応の前記閾値サイクル数の間の差（Cq）が、サンプル中の核酸の完全性の尺度である、

方法。

【請求項7】

g DNA断片化を決定するための方法であって、

i. 第1、第2および第3の増幅反応により、好ましくはPCRにより識別可能な長さの3種の（第1、第2および第3の）K I F 1 1アンプリコンを生成すること；

ii. 前記第1、第2および第3の増幅反応のCq値を決定すること；

iii. 前記第1、第2および第3の増幅反応の前記Cqを比較すること；

を含み、

前記第1、第2および第3の増幅反応の間のCq値の差が、前記g DNA断片化の指標であるか、あるいは、

i. 第1の増幅反応により第1のK I F 1 1アンプリコン（「短い」）を生成すること；

および

ii. 第2の増幅反応により第2のK I F 1 1アンプリコン（「長い」）を生成すること

；

iii. 前記第1および前記第2の増幅反応のCq値を決定すること；

iv. 前記第1および前記第2の増幅反応のCq値を決定すること；

を含み、

前記Cqが、g DNA断片化の指標である、

方法。

【請求項8】

加工、単離および増幅プロセスを品質管理するための方法であって：

i. サンプル加工；

ii. 核酸単離；

iii. 増幅反応により識別可能に異なる長さの3種のK I F 1 1アンプリコンを生成すること；

iv. 前記K I F 1 1アンプリコンのそれぞれのCq値を決定すること；

を含み、

前記K I F 1 1アンプリコンの前記Cq値が、前記加工、単離および増幅の品質管理の尺度である、

方法。

【請求項9】

マルチプル遺伝子標的を検出するための方法であって：

- マルチプルオリゴヌクレオチドサブセットのミックスを提供することであって、前記

10

20

30

40

50

サブセットのそれぞれが、遺伝子標的に対して特異的であり、かつ前記サブセットにユニークなジェネリック配列タグ（ユニークジェネリック配列タグ）を含んでおり、

前記サブセットのそれぞれが、核酸増幅条件下および前記遺伝子標的の存在下で、前記ユニークジェネリック配列タグを含む検出可能な核酸産物を生成するように適合されている、

ミックスを提供すること；

- 前記ミックスとは別に、

(i) 生物学的サンプルおよび/または前記ミックスを受け入れるための入口ポート、

(i i) 前記入口ポートの下流に置かれた核酸単離区画、

(i i i) 核酸増幅のための試薬；

(i v) 前記核酸単離区画の下流に置かれた1つまたは複数の核酸増幅区画、および

(v) 複数種のジェネリックレポーターであって、前記複数種のジェネリックレポーターのうちの1種ずつが、前記検出可能な核酸産物のうちの1種に含まれる前記ユニークジェネリック配列タグ（「UGST」）に対して特異的なジェネリック配列を含み、かつ前記検出可能な核酸産物の存在下でシグナルを生成するように適合されている、複数種のジェネリックレポーター；

を含むカートリッジを提供することであって、

生物学的サンプルおよび前記ミックスが、使用者により前記カートリッジに挿入される

、カートリッジを提供すること

を含み、

- 前記生物学的サンプルおよび前記ミックスの挿入後に前記カートリッジを操作することであって、前記生物学的サンプルからの核酸単離、続いて、前記ミックスを含むマルチプレックス核酸増幅を実施することを含む、操作すること；

- 少なくとも1種の検出可能な核酸産物が前記増幅から生成される場合に、前記カートリッジの内部に含まれる前記複数種のジェネリックレポーターのうちの少なくとも1種から生成されるシグナルを検出すること

をさらに含む、方法。

【請求項10】

前記マルチプルオリゴヌクレオチドサブセットのうちの1種または複数種が、少なくとも1種のプライマーおよび少なくとも1種のメディエータープローブを含み、前記メディエータープローブが、5'から3'までに：

i) UGSTを含み、前記UGSTの配列が、ジェネリックレポーター分子のUGST結合部位に対して相補的である第1のポーション；

i i) 増幅されるべき前記遺伝子標的の第1の鎖に対して相補的である第2のポーション；

を含み、

前記検出可能な核酸産物が、前記ユニークジェネリック配列タグを含む切断された第1のポーションである、

請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記少なくとも1種のプライマーがARMSプライマーであり、

前記ARMSプライマーが、ステム-ループ構造を含み、好ましくは、メディエータープローブ配列が、前記ステム-ループ構造に含まれる配列、またはその相補体と少なくとも部分的に重複する、請求項10記載の方法。

【請求項12】

前記マルチプルオリゴヌクレオチドサブセットのうちの1種が、ヒトKIF11遺伝子中の領域に対して特異的なプライマーを含み、前記プライマーにより生成されるKIF11アンプリコンが、ゲノムリファレンス遺伝子として使用される、請求項9から11までのいずれか1項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

キットであって、

別々の構成要素として提供され：

- マルチプルオリゴヌクレオチドサブセットのミックスであって、前記サブセットのそれぞれが、遺伝子標的に対して特異的であり、かつ前記遺伝子標的が検出される生物の遺伝情報中に存在しない配列として定義される、前記サブセットにユニークなユニークジェネリック配列タグを含んでおり、

前記サブセットのそれぞれが、核酸増幅条件下および前記遺伝子標的の存在下で、前記ユニークジェネリック配列タグを含む検出可能な核酸産物を生成するように適合されている、

10

マルチプルオリゴヌクレオチドサブセットのミックス；および

- 一体型流体カートリッジであって、

(i) 生物学的サンプルおよび/または前記ミックスを受け入れるための入口ポート；

(ii) 前記入口ポートの下流に置かれた核酸単離区画；

(iii) 核酸増幅のための試薬；

(iv) 前記核酸単離区画の下流に置かれた1つまたは複数の核酸増幅区画、および

(v) 複数種のジェネリックレポーターであって、前記複数種のジェネリックレポーターのそれぞれが、前記ユニークジェネリック配列タグのうちの1つに対して特異的なジェネリック配列を含み、かつ前記ユニークジェネリック配列タグを含む前記検出可能な核酸産物の存在下でシグナルを生成するように適合されている、複数種のジェネリックレポーター

20

を含む、一体型流体カートリッジ

を含む、キット。

【請求項 14】

システム、またはシステムの部分であって、前記システムが、別々の構成要素として：自動化されたシステムと係合可能なカートリッジであって：

a) 入口ポート、

b) 核酸単離区画；

c) 核酸増幅区画；

を含み、

30

前記入口ポートが、前記核酸単離区画と流体接続しており、前記核酸単離区画が、前記核酸増幅区画と流体接続しており；

前記核酸増幅区画が、ジェネリックレポーター分子を含み、前記ジェネリックレポーター分子が、一本鎖DNAであり、かつ：

i) フルオロフォア/クエンチャー対の第1のメンバー；

ii) ステム-ループ構造；

iii) フルオロフォア/クエンチャー対の第2のメンバー；

iv) ユニークジェネリック配列タグ(「UGST」)結合部位；

v) ポリメラーゼ伸長ブロッカー

を含むカートリッジと、オリゴヌクレオチド混合物とを含み：

40

前記オリゴヌクレオチド混合物は、

オリゴヌクレオチド混合物であって；

a) 標的核酸の増幅のために構成された標的的特異的増幅プライマー対；および

b) メディエータープロンプであって、5'から3'までに：

i) UGSTを含み、前記UGSTの配列が、前記ジェネリックレポーター分子の前記UGST結合部位に対して相補的である第1のポーション；および

ii) 増幅されるべき標的核酸配列の第1の鎖に対して相補的である第2のポーションを含むメディエータープロンプ

を含む、オリゴヌクレオチド混合物；

オリゴヌクレオチド混合物であって；

50

a) 標的核酸の増幅のために構成された標的特異的増幅プライマー対；および
 b) メディエータープローブであって、5'から3'までに：
 i) U G S Tを含み、前記U G S Tの配列が、前記ジェネリックレポーター分子の前記U G S T結合部位に対して相補的である第1のポジション；
 i i) 増幅されるべき標的核酸配列の第1の鎖に対して相補的である第2のポジション；
 および

i i i) ポリメラーゼ伸長ブロッカー

を含むメディエータープローブを含む、オリゴヌクレオチド混合物；
 オリゴヌクレオチド混合物であって：

a) 標的特異的増幅プライマー対であって、前記標的特異的プライマー対の少なくとも1つのメンバーが、標的に結合されたときシステム・ループ構造を含む、標的特異的増幅プライマー対、および；

b) メディエータープローブであって、5'から3'までに：

i) U G S Tを含み、前記U G S Tの配列が、前記ジェネリックレポーター分子の前記U G S T結合部位に対して相補的である第1のポジション；および

i i) 前記プライマーの前記ステム・ループ構造またはその相補体に対して相補的である第2のポジション

を含むメディエータープローブを含む、オリゴヌクレオチド混合物；および
 オリゴヌクレオチド混合物であって：

a) 標的特異的増幅プライマー対であって、前記標的特異的プライマー対の少なくとも1つのメンバーが、標的に結合されたときシステム・ループ構造を含む、標的特異的増幅プライマー対、および；

b) メディエータープローブであって、5'から3'までに：

i) ユニークジェネリック配列タグ(「U G S T」)を含み、前記U G S Tの配列が、前記ジェネリックレポーター分子の前記U G S T結合部位に対して相補的である第1のポジション；

i i) 前記プライマーの前記ステム・ループ構造またはその相補体に対して相補的である第2のポジション；および

i i i) ポリメラーゼ伸長ブロッカー

を含むメディエータープローブを含む、オリゴヌクレオチド混合物
 から選択される、システムまたはシステムの部分。

【請求項15】

請求項14に記載のシステム、またはシステムの部分であって、前記標的特異的プライマー対の少なくとも一つがアレル特異的である、システム、またはシステムの部分。

【請求項16】

対象からの標的核酸を検出するための方法であって：

標的特異的プライマー対を使用して前記対象からの核酸サンプルを増幅することであって、増幅反応が、メディエータープローブおよびジェネリックレポーター分子の存在下で実施され；

a) 前記メディエータープローブが、5'から3'までに：

i) ユニークジェネリック配列タグ(「U G S T」)を含む第1のポジション；

i i) 前記標的核酸の第1の鎖に対して相補的である第2のポジション；

i i i) 任意選択で、ポリメラーゼ伸長ブロッカー

を含み；

b) 前記ジェネリックレポーター分子が：

i) フルオロフォア/クエンチャー対の第1のメンバー；

i i) ステム・ループ構造；

i i i) 前記フルオロフォア/クエンチャー対の第2のメンバー；

i v) 前記メディエータープローブの前記U G S Tに対して相補的であるU G S T結合部位；

10

20

30

40

50

v) ポリメラーゼ伸長ブロッカー；

を含み、

前記フルオロフォア/クエンチャー対の前記メンバーが、前記フルオロフォアをクエンチするために前記ステム-ループ構造を介して置かれる、増幅すること；および

前記標的核酸の存在下で前記フルオロフォア/クエンチャー対の前記フルオロフォアにより産生されるシグナルを検出し、それによって前記標的核酸の存在を検出することを含む、方法。

【請求項17】

対象からの標的核酸を検出するための方法であって：

10

標的的特異的プライマー対を使用して前記対象からの核酸サンプルを増幅することであって、

前記標的的特異的プライマー対の少なくとも1つのメンバーが、標的に結合されたときステム-ループ構造を含み、任意選択で、前記標的的特異的プライマー対の少なくとも1つのメンバーがアレル特異的であり、

増幅反応が、メディエータープローブおよびジェネリックレポーター分子の存在下で実施され；

a) 前記メディエータープローブが、5'から3'までに：

i) ユニークジェネリック配列タグ(「UGST」)を含む第1のポーション；

ii) 前記プライマーの前記ステム-ループ構造またはその相補体に対して相補的である第2のポーション；

20

iii) 任意選択で、ポリメラーゼ伸長ブロッカーを含み；

b) 前記ジェネリックレポーター分子が：

i) フルオロフォア/クエンチャー対の第1のメンバー；

ii) ステム-ループ構造；

iii) 前記フルオロフォア/クエンチャー対の第2のメンバー；

iv) 前記メディエータープローブの前記UGSTに対して相補的であるUGST結合部位；

v) ポリメラーゼ伸長ブロッカー；

30

を含み、

前記フルオロフォア/クエンチャー対の前記メンバーが、前記フルオロフォアをクエンチするために前記ステム-ループを介して置かれる、増幅すること；および

前記標的核酸の存在下で前記フルオロフォア/クエンチャー対の前記フルオロフォアにより産生されるシグナルを検出し、それによって前記標的核酸の存在を検出することを含む、方法。

【請求項18】

対象からの標的核酸を検出するための方法であって：

標的的特異的プライマー対を使用して前記対象からの核酸サンプルを増幅することであって、

40

前記標的的特異的プライマー対の少なくとも1つのメンバーが、標的に結合されたときステム-ループ構造を含み、かつ任意選択でアレル特異的であり(「FuseTag」)、増幅反応が、ジェネリックレポーター分子の存在下で実施され；

a) 前記FuseTagが、5'から3'までに：

i) ユニークジェネリック配列タグ(「UGST」)を含む第1のポーション；

ii) ステム-ループ構造；

iii) 前記標的に対して相補的であり、かつ好ましくはアレル特異的である第2のポーション；

を含み、

50

b) 前記ジェネリックレポーター分子が：

i) フルオロフォア/クエンチャー対の第1のメンバー；

ii) ステム-ループ構造；

iii) 前記フルオロフォア/クエンチャー対の第2のメンバー；

iv) 前記 Fuse Tag の前記 UGST に対して相補的である UGST 結合部位；

v) ポリメラーゼ伸長ブロッカー；

を含み、

前記フルオロフォア/クエンチャー対の前記メンバーが、前記フルオロフォアをクエンチするために前記ステム-ループ構造を介して置かれる、

増幅すること；

前記標的核酸の存在下で前記フルオロフォア/クエンチャー対の前記フルオロフォアにより産生されるシグナルを検出し、それによって前記標的核酸の存在を検出することを含む、方法。

10

20

30

40

50