

【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2年10月22日(2020.10.22)

【公表番号】特表2019-532628(P2019-532628A)

【公表日】令和1年11月14日(2019.11.14)

【年通号数】公開・登録公報2019-046

【出願番号】特願2019-514294(P2019-514294)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/686	(2018.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/536	(2006.01)
C 1 2 Q	1/6851	(2018.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/686	Z N A Z
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/536	D
C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 N	15/09	Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年9月8日(2020.9.8)

【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】

試料中の標的核酸の増幅および検出方法であって、次の工程：

(a) 単一反応容器中に前記標的核酸を含む前記試料を

(i) 各々のオリゴヌクレオチドプライマーが前記標的核酸の部分配列の反対の鎖にハイブリダイズすることができる、1対のオリゴヌクレオチドプライマー；

(ii) アニーリング部分とタグ部分を含むオリゴヌクレオチドプローブであって、前記タグ部分が標的核酸配列に相補的でないヌクレオチド配列または非ヌクレオチド分子を含み、前記アニーリング部分が標的核酸配列に少なくとも部分的に相補的でありかつ前記オリゴヌクレオチドプライマー対によって結合される、前記標的核酸の前記部分配列の領域にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含み、ここで前記オリゴヌクレオチドプローブが前記タグ部分上または前記アニーリング部分上に置かれたレポーター成分と、前記アニーリング部位上に置かれた第一のクエンチャーチャー成分とを含んで成る相互作用性二重標識を更に含み、そして前記レポーター成分がヌクレアーゼ感受性開裂部位により前記第一のクエンチャーチャー成分から隔てられ；ここで前記タグ部分が温度依存性形式でクエンチング分子に可逆的に結合され、前記クエンチング分子は、該クエンチング分子が前記タグ部分に結合すると前記レポーター成分をまたは前記アニーリング部分上のレポーター成分をクエンチングすることができる1以上のクエンチャーチャー成分を含むかまたはそれと連携される、前記オリゴヌクレオチドプローブ

と接触させ；

(b) 5' - 3' ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを使ったポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、各PCRサイクルの伸長段階の間にポリメラーゼの前記5' - 3' ヌクレア-

ゼ活性が前記オリゴヌクレオチドプローブのアニーリング部分上にある第一のクエンチャー成分から前記タグ成分を開裂・分離させるようにしてPCRにより前記標的核酸を増幅させ；

- (c) 前記レポーター成分からの1以上のシグナルを、前記クエンチング分子が前記タグ部分に結合する第一の温度で測定し；
- (d) 前記レポーター成分からの1以上のシグナルを、前記第一の温度より高温でありかつ前記クエンチング分子がタグ部分に結合しない第二の温度で測定し；
- (e) 前記第一の温度で検出された1以上のシグナルの中央値または平均値を、前記第二の温度で検出された1以上のシグナルの中央値または平均値から減算することにより、計算シグナル値を得；それにより閾値シグナル値より高い計算シグナル値が前記標的核酸の存在を決定できるようになる、

を含む方法。

#### 【請求項2】

前記工程(b)のPCR増幅が、増幅の対数期の後にエンドポイントに到達する、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

前記レポーター成分が前記オリゴヌクレオチドプローブのタグ部分上に存在する、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項4】

前記タグ部分が、標的核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含み、そして前記クエンチング分子が、オリゴヌクレオチドプローブのタグ部分に少なくとも部分的に相補的でありハイブリダイゼーションによりタグ部分に結合するヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項5】

前記タグ部分が、核酸ポリメラーゼにより伸長させることができないような修飾を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項6】

前記オリゴヌクレオチドプローブのタグ部分もしくはクエンチング分子、または該タグ部分とクエンチング分子の双方が、1以上のヌクレオチド修飾を含み、そして前記1以上のヌクレオチド修飾がロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、架橋核酸(BNA)、2'-O-アルキル置換、L-鏡像異性ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項7】

試料中の2以上の標的核酸配列を検出する方法であって、次の工程：

- (a) 単一反応容器中の前記2以上の標的核酸配列を含むと思われる前記試料を、
  - (i) 第一の標的核酸配列の各鎖に相補的であるヌクレオチド配列を有する第一対のオリゴヌクレオチドプライマー、および第二の標的核酸配列の各鎖に相補的であるヌクレオチド配列を有する第二対のオリゴヌクレオチドプライマー；

(ii) 第一の標的核酸配列に少なくとも部分的に相補的でありかつ前記第一対のオリゴヌクレオチドプライマーにより結合された第一の標的核酸配列の領域内でアニーリングするヌクレオチド配列を含む第一のオリゴヌクレオチドプローブであって、前記第一のオリゴヌクレオチドプローブは、検出可能なシグナルを生成することができる蛍光成分と、前記蛍光成分により生成した検出可能シグナルをクエンチングすることができる第一のクエンチャー成分とを含み、ここで前記蛍光成分はヌクレアーゼ感受性開裂部位により第一のクエンチャー成分から隔てられている、前記第一のオリゴヌクレオチドプローブ；

- (iii) 2つの異なる部分を含む第二のオリゴヌクレオチドプローブであって、
  - 前記第二の標的核酸配列に少なくとも部分的に相補的でありかつ前記第二対のオリゴヌクレオチドプライマーにより結合された第二の標的核酸配列の領域内でアニーリングするヌクレオチド配列を含み、第二のクエンチャー成分を含むアニーリング部分と；
  - 前記アニーリング部分の5'末端もしくは3'末端に取り付けられるかまたは前記アニ

ーリング部分の領域にリンカーを介して取り付けられ、前記2以上の標的核酸配列に非相補的であるヌクレオチド配列を含むタグ部分であって、前記第一のオリゴヌクレオチドプローブ上の蛍光成分と同一である蛍光成分を含み、その検出シグナルがアニーリング部分上の第二のクエンチャーフィルター成分によってクエンチングされることができ、ここで前記蛍光成分がヌクレオチド感受性開裂部位により第二のクエンチング成分から隔てられる前記タグ部分との、2つの異なる部分を含む前記第二のオリゴヌクレオチドプローブ；

(iv) 前記第二のオリゴヌクレオチドプローブのタグ部分に少なくとも部分的に相補的でありかつ前記タグ部分にハイブリダイズして二本鎖を形成するヌクレオチド配列を含むクエンチングオリゴヌクレオチドであって、該クエンチングオリゴヌクレオチドがタグ部分にハイブリダイズすると、タグ部分上の蛍光成分により発せられる検出可能シグナルをクエンチングする第三のクエンチャーフィルター成分を含む、クエンチングオリゴヌクレオチドと接触させ；

(b) 5' - 3' ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを使ったポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、各PCRサイクルの伸長段階の間に核酸ポリメラーゼの5' - 3' ヌクレアーゼ活性が

(i) 前記第一のオリゴヌクレオチドプローブ上の第一のクエンチング成分から蛍光成分を開裂・分離させ、そして

(ii) 第二のオリゴヌクレオチドプローブのアニーリング部分上の第二のクエンチング成分からタグ部分上の蛍光成分を開裂・分離させ

るような方法でPCRにより前記第一および第二の標的核酸配列を増幅させ、ここで伸長段階の時には前記クエンチングオリゴヌクレオチドがタグ部分にハイブリダイズしたままであり；

(c) 前記クエンチングオリゴヌクレオチドが第二のオリゴヌクレオチドプローブからのタグ部分にハイブリダイズする第一の温度で、1以上の蛍光シグナルを測定し；

(d) 前記第一の温度より高温であり前記クエンチングオリゴヌクレオチドが第二のオリゴヌクレオチドプローブからのタグ部分にハイブリダイズしない第二の温度で、1以上の蛍光シグナルを測定し；

(e) 前記第一の温度で検出された1以上の蛍光シグナルの中央値または平均値を、前記第二の温度で検出された1以上の蛍光シグナルの中央値または平均値から減算することにより計算シグナル値を得、それにより閾値よりも高い第一の温度で検出された1以上の蛍光シグナルの中央値または平均値が前記第一の標的核酸配列の存在を決定でき、そして閾値シグナル値よりも高い計算シグナル値が第二の標的核酸の存在を決定できるを含む方法。

#### 【請求項8】

前記工程(b)のPCR増幅が増幅の対数期の後でエンドポイントに到達するようにする、請求項7に記載の方法。

#### 【請求項9】

前記タグ部分が前記アニーリング部分の5'末端に取り付けられる、請求項8に記載の方法。

#### 【請求項10】

前記タグ部分が、核酸ポリメラーゼにより伸長させることができないような修飾を含む、請求項7～9のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項11】

前記クエンチングオリゴヌクレオチドがステム-ループ構造を介して前記第二のオリゴヌクレオチドプローブのタグ部分に連結される、請求項7～10のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項12】

前記第二のオリゴヌクレオチドプローブのタグ部分もしくはクエンチングオリゴヌクレオチド、または該タグ部分と該クエンチングオリゴヌクレオチドの双方が1以上のヌクレオチド修飾を含み、そして前記1以上のヌクレオチド修飾が、ロックド核酸(LNA)、ペ

プチド核酸 (PNA) 、架橋核酸 (BNA) 、2'-O-アルキル置換、L-鏡像変異ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせからなる群より選ばれる、請求項7~11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

試料中の2以上の標的核酸配列を検出する方法であって、次の工程：

(a) 単一反応容器中の2以上の標的核酸配列を含むと思われる前記試料を、

(i) 第一の標的核酸配列の各鎖に相補的であるヌクレオチド配列を有する第一対のオリゴヌクレオチドプライマー、および第二の標的核酸配列の各鎖に相補的であるヌクレオチド配列を有する第二対のオリゴヌクレオチドプライマー；

(ii) 2つの異なる部分を含む第一のオリゴヌクレオチドプローブであって、

- 第一の標的核酸配列に少なくとも部分的に相補的でありかつ前記第一対のオリゴヌクレオチドプライマーにより結合された第一の標的核酸配列の領域内でアニーリングするヌクレオチド配列を含む第一のアニーリング部分であって、第一のクエンチャーフィルタ成分を含む前記第一のアニーリング部分と；

- 前記第一のアニーリング部分の5'末端もしくは3'末端に取り付けられまたは前記アニーリング部分の領域にリンカーを介して取り付けられた第一のタグ部分であって、前記タグ部分は第一のアニーリング部分上の第一のクエンチャーフィルタ成分によりクエンチングすることができる蛍光成分を含み、ここで前記蛍光成分はヌクレアーゼ感受性開裂部位により第一のクエンチング成分から隔てられる、前記第一のタグ部分；との、2つの異なる部分を含む前記第一のオリゴヌクレオチドプローブ；

(iii) 前記第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一のタグ部分に少なくとも部分的に相補的でありかつ第一のタグ部分にハイブリダイズして二本鎖を形成するヌクレオチド配列を含む第一のクエンチングオリゴヌクレオチドであって、前記第一のクエンチングオリゴヌクレオチドは、該第一のクエンチングオリゴヌクレオチドが第一のタグ部分にハイブリダイズすると、第一のタグ部分上の蛍光成分により生成された検出可能シグナルをクエンチングする第二のクエンチング成分を含む、第一のクエンチングオリゴヌクレオチド；

(iv) 2つの異なる部分を含む第二のオリゴヌクレオチドプローブであって、

- 第二の標的核酸配列に少なくとも部分的に相補的でありかつ前記第二対のオリゴヌクレオチドプライマーにより結合された第二の標的核酸配列の領域内でアニーリングするヌクレオチド配列を含む第二のアニーリング部分であって第三のクエンチャーフィルタ成分を含みかつ核酸ポリメラーゼによる伸長を阻止するために3'末端がブロックされている第二のアニーリング部分と；

前記第二のアニーリング部分の5'末端もしくは3'末端に取り付けられるか、又は前記アニーリング部分の領域にリンカーを介して取り付けられ、そして2以上の標的核酸配列に相補的であるヌクレオチド配列を含み、第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一のタグ部分のヌクレオチド配列に比較して異なる核酸配列または異なるヌクレオチド修飾を有する第二のタグ部分であって、第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一タグ部分上の蛍光成分と同一でありかつその検出可能シグナルが第二のアニーリング部分上の第三のクエンチャーフィルタ成分によりクエンチングすることができる蛍光成分を含み、前記蛍光成分がヌクレオチド感受性開裂部位により第二のクエンチング成分から隔てられる、前記第二のタグ部分；との、2つの異なる部分を含む第二のオリゴヌクレオチドプローブ；

(v) 前記第二のオリゴヌクレオチドプローブの第二のタグ部分に少なくとも部分的に相補的でありかつ第二のタグ部分にハイブリダイズして二本鎖を形成するヌクレオチド配列を含む第二のクエンチングオリゴヌクレオチドであって、前記第二のクエンチングオリゴヌクレオチドが第二のタグ部分にハイブリダイズすると第二のタグ部分上の蛍光成分により生成された検出可能シグナルをクエンチングする第四のクエンチング成分を含む、前記第二のクエンチングオリゴヌクレオチド；

と接触させ、ここで前記第二のクエンチングオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドプローブの第二のタグ部分との間で形成された二本鎖は、前記第一のクエンチングオリゴヌクレオチドと第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一のタグ部分との間で形成さ

れた二本鎖よりも高い融解温度 (T<sub>m</sub>) を有し；

(b) 5' - 3' ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを使ったポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、各PCRサイクルの伸長段階の間に、前記核酸ポリメラーゼの5' - 3' ヌクレアーゼ活性が

(i) 前記第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一のアニーリング部分上にある第一のクエンチング成分から第一のタグ部分上の蛍光成分を開裂・分離させ、ここで伸長段階では第一のクエンチングオリゴヌクレオチドが第一のタグ部分にハイブリダイズしたままであること；および

(ii) 前記第二のオリゴヌクレオチドプローブの第二のアニーリング部分上の第三のクエンチング成分から第二のタグ部分上にある蛍光成分を開裂・分離させ、ここで伸長段階では第二のクエンチングオリゴヌクレオチドが第二のタグ部分にハイブリダイズしたままであること

を可能にし；

(c) 前記第一のクエンチングオリゴヌクレオチドが第一のオリゴヌクレオチドプローブからの第一のタグ部分にハイブリダイズせずかつ第二のクエンチングオリゴヌクレオチドが第二のオリゴヌクレオチドプローブからの第二のタグ部分にハイブリダイズしたままである第一の温度で、1 以上の蛍光シグナルを測定し；

(d) 前記第一の温度より高く、第二のクエンチングオリゴヌクレオチドが第二のオリゴヌクレオチドプローブからの第二のタグ部分にハイブリダイズしない第二の温度で、1 以上の蛍光シグナルを測定し；

(e) 第一の温度で検出された1 以上の蛍光シグナルの中央値または平均値を第二の温度で検出された1 以上の蛍光シグナルの中央値または平均値から減算することにより計算シグナル値を得；

ここで閾値より高い前記第一の温度で検出された1 以上の蛍光シグナルの中央値または平均値が、前記第一の標的核酸配列の存在を決定し、そして閾値シグナル値より高い計算シグナル値が前記第二の標的核酸の存在を決定する

を含む方法。

#### 【請求項 1 4】

前記工程(b)のPCR増幅が増幅の対数期を超えてエンドポイントに到達できるようにする、請求項1\_3 に記載の方法。

#### 【請求項 1 5】

前記第一のクエンチングオリゴヌクレオチドが、ステム - ループ構造を介して前記第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一のタグ部分に連結され、及び / 又は前記第二のクエンチングオリゴヌクレオチドが、ステム - ループ構造を介して前記第二のオリゴヌクレオチドプローブの第二のタグ部分に連結される、請求項1\_3 ~ 1\_4 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 1 6】

遊離された第一のタグ部分と遊離された第二のタグ部分の両方とも、該遊離された両タグ部分が核酸ポリメラーゼによって伸長できないような修飾を含む、請求項1\_3 ~ 1\_5 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 1 7】

前記2 以上の標的核酸配列の検出がデジタルPCRにより実行される、請求項1\_3 ~ 1\_6 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 1 8】

前記第一のオリゴヌクレオチドプローブの第一のタグ部分もしくは前記第一のクエンチングオリゴヌクレオチドまたは前記第二のオリゴヌクレオチドプローブの第二のタグ部分もしくは前記第二のクエンチングオリゴヌクレオチドのいずれか1つまたはそれらの任意組み合わせが、1つ以上のヌクレオチド修飾を含み、そして

前記1 以上のヌクレオチド修飾がロックド核酸 (LNA) 、ペプチド核酸 (PNA) 、架橋核酸 (BNA) 、2' - O - アルキル置換、L - 鏡像変異ヌクレオチド、またはそれらの組み

合わせからなる群より選ばれる、請求項 1\_3 ~ 1\_7 のいずれか一項に記載の方法。