

【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 25 年 5 月 2 日 (2013.5.2)

【公表番号】特表 2011-520450 (P2011-520450A)  
 【公表日】平成 23 年 7 月 21 日 (2011.7.21)  
 【年通号数】公開・登録公報 2011-029  
 【出願番号】特願 2011-509650 (P2011-509650)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】  
 【提出日】平成 24 年 3 月 30 日 (2012.3.30)  
 【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】

不活化可能型標的捕捉オリゴマーであって、少なくとも：

( i ) 結合ペアメンバー；

( i i ) 少なくとも 1 5 核酸塩基長である標的ハイブリダイズ領域；および

( i i i ) 少なくとも 3 核酸塩基長であるタグ閉鎖領域

を含み、ここで、該タグ閉鎖領域の核酸配列が、該標的ハイブリダイズ領域の核酸配列の一部に実質的に相補的であり、該結合ペアメンバー、該標的ハイブリダイズ領域および該タグ閉鎖領域が単一の分子として接続されている、不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

【請求項 2】

前記結合ペアメンバーが実質的にホモポリマーの核酸である、請求項 1 に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

【請求項 3】

前記標的ハイブリダイズ領域が、少なくとも 1 5 ~ 3 0 核酸塩基長である、請求項 1 または請求項 2 に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

【請求項 4】

前記タグ閉鎖領域が、少なくとも 3 ~ 2 0 核酸塩基長であるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

【請求項 5】

前記タグ閉鎖領域が、脱塩基ヌクレオチド残基、ゆらぎヌクレオチド残基、前記標的ハイブリダイズ領域内に含まれた前記配列内の前記残基の対応する位置に対するミスマッチヌクレオチド残基、およびその組合せからなる群より選択される 1 つ以上のヌクレオチド残基を含むヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

【請求項 6】

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 1 4 核酸塩基長または少なくとも 6 ~ 9 核酸塩基長または 7 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 7】

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ～ 9 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含み、前記標的ハイブリダイズ領域が 17 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 8】

前記タグ閉鎖領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記標的ハイブリダイズ領域の末端と反対側である前記標的ハイブリダイズ領域の末端に接続されている、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 9】

前記標的ハイブリダイズ領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記タグ閉鎖領域の末端と反対側である前記タグ閉鎖領域の末端に接続されている、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 10】

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端に、非ヌクレオチドリinkerを用いて接続されている、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 11】

前記標的ハイブリダイズ領域が、前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリinkerを用いて接続されており、それにより、前記標的ハイブリダイズ領域および前記タグ閉鎖領域から本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成されている、請求項 10 に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 12】

前記結合ペアメンバーが実質的にポリ ( d A )ヌクレオチド配列であるかもしくは d T 3 d A 30ヌクレオチド配列であるか；および / または  
前記タグ閉鎖領域および前記標的ハイブリダイズ領域が連続した核酸配列として接続されているか；および / または  
前記結合ペアメンバー領域および前記タグ閉鎖領域が連続した核酸配列として接続されている、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマー。

## 【請求項 13】

請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマーから本質的になる、ブレアニーリング反応混合物。

## 【請求項 14】

少なくとも 1 種類の増幅オリゴマーをさらに含む、請求項 13 に記載のブレアニーリング反応混合物。

## 【請求項 15】

試料からの標的核酸の特異的ハイブリダイゼーションおよび捕捉のための方法であって、  
( i ) 試料またはその一部を、請求項 1 ～ 3 および 5 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の不活化可能型標的捕捉オリゴマーと接触させる工程；

( i i ) 1 組の条件を準備する工程であって、該条件のストリンジェンシーにより、該不活化可能型標的捕捉オリゴマーの標的ハイブリダイズ領域が該試料中の標的核酸と安定的にハイブリダイズする方向に偏向され、該不活化可能型標的捕捉オリゴマーの前記タグ閉鎖領域と安定的にハイブリダイズする方向には偏向されない、工程；

( i i i ) 該 1 組の条件に変更をもたらす工程であって、前記ストリンジェンシーが低下し、前記タグ閉鎖領域が前記標的ハイブリダイズ領域とハイブリダイズすることにより、標的核酸と安定的にハイブリダイズされない不活化可能型標的捕捉オリゴマーが、不活性な立体配置を形成することが可能になる、工程；ならびに

( i v ) 捕捉工程を行なう工程であって、工程 ( i i ) で前記標的核酸と安定的にハイブリダイズされた前記不活化可能型捕捉オリゴマーを含む複合体が捕捉される、工程、を含む方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

上記の反応混合物の実施形態の不活化可能型標的捕捉オリゴマーは、以下に記載する種々の不活化可能型標的捕捉オリゴマーの任意の実施形態の特性を示す特徴を有するものであり得る。また、具体的に除外していない限り、反応混合物には、さらに、増幅反応を行なうために必要とされる試薬および構成要素が含まれ得る。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

a. 核酸試料中の標的核酸配列を、不活化可能型標的捕捉オリゴマーで処理する工程であって、前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーは、約15連続核酸塩基長～約30連続核酸塩基長である標的ハイブリダイズ領域、結合ペアメンバーおよびタグ閉鎖領域を含み、前記タグ閉鎖領域は約3連続核酸塩基長～約20連続核酸塩基長であり、前記標的ハイブリダイゼーション領域の一部分に実質的に相補的であり、前記標的核酸に安定的にハイブリダイズせず、前記標的ハイブリダイズ領域、前記結合ペアメンバーおよび前記タグ閉鎖領域が単一の分子として接続されている、工程；

b. 1組の条件を準備する工程であって、前記条件のストリンジェンシーにより、前記標的ハイブリダイズ領域が前記標的核酸と安定的にハイブリダイズする方向に偏向され、前記タグ閉鎖領域と安定的にハイブリダイズする方向には偏向されない、工程；

c. 前記1組の条件に変更をもたらす工程であって、前記ストリンジェンシーが低下し、前記タグ閉鎖領域が前記標的ハイブリダイズ領域とハイブリダイズすることにより、標的核酸と安定的にハイブリダイズされない不活化可能型標的捕捉オリゴマーが、不活性な立体配置を形成することが可能になる、工程；ならびに

d. 捕捉工程を行なう工程であって、工程bで前記標的核酸と安定的にハイブリダイズされた前記不活化可能型捕捉オリゴマーを含む複合体が捕捉される、工程、を含む、標的核酸の特異的ハイブリダイゼーションおよび捕捉のための方法。

(項目2)

工程d.が、相補結合ペアメンバーから本質的になる固相支持体物質を準備すること；および前記不活化可能型捕捉プローブの前記結合ペアメンバーと、前記相補結合メンバーとの結合を可能にする条件を準備することを含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記固相支持体物質が常磁性ビーズであり、前記相補結合ペアメンバーが前記常磁性ビーズに共有結合されている、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記相補結合ペアメンバーが固定化プローブであり、前記不活化可能型捕捉プローブの前記結合ペアメンバーが、前記固定化プローブに実質的に相補的なヌクレオチド配列から本質的になるポリヌクレオチド領域である、項目3に記載の方法。

(項目5)

洗浄工程をさらに含み、工程d.の前記捕捉された標的核酸は保持されるが、非捕捉核酸、非標的核酸、夾雑核酸、不活化された不活化可能型標的捕捉オリゴマー、試薬および試料残屑の1種類以上は、前記捕捉された標的核酸から分離される、項目2に記載の方法。

(項目6)

前記固相支持体物質が、アミン、イミンまたはグアニジンコート常磁性ビーズである、項目2に記載の方法。

(項目7)

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーの前記結合ペアメンバーが、ヌクレオチド配列から本質的になるポリヌクレオチド領域である、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記タグ閉鎖領域が、脱塩基ヌクレオチド残基、ゆらぎヌクレオチド残基、前記標的ハイブリダイズ領域内に含まれた前記配列内の前記残基の対応する位置に対するミスマッチヌクレオチド残基、およびその組合せからなる群より選択される１つ以上のヌクレオチド残基を含むヌクレオチド配列を含む、項目１に記載の方法。

(項目９)

前記タグ閉鎖領域が少なくとも６～１４核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目１に記載の方法。

(項目１０)

前記タグ閉鎖領域が少なくとも６～９核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目１に記載の方法。

(項目１１)

前記タグ閉鎖領域が７核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目１に記載の方法。

(項目１２)

前記タグ閉鎖領域が少なくとも６～９核酸塩基長のヌクレオチド配列を含み、前記標的ハイブリダイズ領域が１７核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目１に記載の方法。

(項目１３)

前記タグ閉鎖領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記標的ハイブリダイズ領域の末端と反対側である前記標的ハイブリダイズ領域の末端に接続されている、項目１に記載の方法。

(項目１４)

前記タグ閉鎖領域が、前記標的ハイブリダイズ領域の前記末端に非ヌクレオチドリinkerを用いて接続されている、項目１３に記載の方法。

(項目１５)

前記標的ハイブリダイズ領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記タグ閉鎖領域の末端と反対側である前記タグ閉鎖領域の末端に接続されている、項目１に記載の方法。

。

(項目１６)

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端に、非ヌクレオチドリinkerを用いて接続されている、項目１５に記載の方法。

(項目１７)

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリinkerを用いて接続されており、それにより、前記標的ハイブリダイズ領域と前記タグ閉鎖領域とから本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成されている、項目１５に記載の方法。

(項目１８)

前記結合ペアメンバーが実質的にホモポリマーであるヌクレオチド配列であり、前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリinkerを用いて接続されており、それにより、前記結合ペアメンバー、前記タグ閉鎖領域および前記標的ハイブリダイズ領域から本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成されている、項目１７に記載の方法。

(項目１９)

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーが、前記結合ペアメンバーの５'末端が前記タグ閉鎖領域の３'末端に接続されており、前記タグ閉鎖領域の５'末端が前記標的ハイブリダイズ領域の３'末端に接続されているような３' ５'の向きを有する、項目１８に記載の方法。

(項目２０)

前記捕捉された標的核酸の分析を行なう工程をさらに含む、項目１に記載の方法。

(項目２１)

前記分析が増幅および検出反応である、項目２０に記載の方法。

(項目２２)

前記増幅反応が、タグ配列を含む第１の増幅産物が生成されるように構成された異種増幅オリゴマーを含み、前記第１の増幅産物内の前記タグ配列またはその相補体にハイブリダ

イズして後続の増幅産物が生成されるように構成された第 2 の増幅オリゴマーを含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記検出がヌクレオチドプローブによる検出である、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 4)

少なくとも、結合ペアメンバー、少なくとも 15 ~ 30 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む標的ハイブリダイズ領域、および少なくとも 3 ~ 20 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含むタグ閉鎖領域を含む不活化可能型標的捕捉オリゴマーから本質的になり、前記結合ペアメンバー、前記標的ハイブリダイズ領域および前記タグ閉鎖領域が単一の分子として接続されており、前記タグ閉鎖領域のヌクレオチド配列が、前記標的ハイブリダイズ領域内に含まれた配列に実質的に相補的である、プレアニーリング反応混合物。

(項目 2 5)

前記タグ閉鎖領域が、脱塩基ヌクレオチド残基、ゆらぎヌクレオチド残基、前記標的ハイブリダイズ領域内に含まれた前記配列内の前記残基の対応する位置に対するミスマッチヌクレオチド残基、およびその組合せからなる群より選択される 1 つ以上のヌクレオチド残基を含むヌクレオチド配列を含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 2 6)

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 14 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 2 7)

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 9 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 2 8)

前記タグ閉鎖領域が 7 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 2 9)

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 9 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含み、前記標的ハイブリダイズ領域が 17 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 3 0)

前記タグ閉鎖領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記標的ハイブリダイズ領域の末端と反対側である前記標的ハイブリダイズ領域の末端に接続されている、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 3 1)

前記タグ閉鎖領域が、前記標的ハイブリダイズ領域の前記末端に非ヌクレオチドリンカーを用いて接続されている、項目 3 0 に記載の反応混合物。

(項目 3 2)

前記標的ハイブリダイズ領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記タグ閉鎖領域の末端と反対側である前記タグ閉鎖領域の末端に接続されている、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 3 3)

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端に、非ヌクレオチドリンカーを用いて接続されている、項目 3 2 に記載の反応混合物。

(項目 3 4)

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリンカーを用いて接続されており、それにより、前記標的ハイブリダイズ領域と前記タグ閉鎖領域から本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成されている、項目 3 2 に記載の反応混合物。

(項目 3 5)

前記結合ペアメンバーが実質的にホモポリマーであるヌクレオチド配列であり、前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリンカーを用いて接続されており、それにより、前記

結合ペアメンバー、前記タグ閉鎖領域および前記標的ハイブリダイズ領域から本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成されている、項目 3 4 に記載の反応混合物。

(項目 3 6)

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーが、前記結合ペアメンバーの 5' 末端が前記タグ閉鎖領域の 3' 末端に接続されており、前記タグ閉鎖領域の 5' 末端が前記標的ハイブリダイズ領域の 3' 末端に接続されているような 3' 5' の向きを有する、項目 3 5 に記載の反応混合物。

(項目 3 7)

少なくとも 1 種類の増幅オリゴマーをさらに含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 3 8)

前記少なくとも 1 種類の増幅オリゴマーが異種増幅オリゴマーである、項目 3 7 に記載の反応混合物。

(項目 3 9)

前記標的ハイブリダイズ領域が標的核酸とハイブリダイズする方向に偏向され、前記タグ閉鎖領域とハイブリダイズする方向には偏向されない 1 組の条件をさらに含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 4 0)

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域とハイブリダイズする方向に偏向され、非標的核酸とハイブリダイズする方向には偏向されない 1 組の条件をさらに含む、項目 2 4 に記載の反応混合物。

(項目 4 1)

標的核酸と、非標的核酸と夾雑核酸の一方または両方とを含む核酸混合物中の標的核酸の選択的増幅のための方法であって、

a. 核酸試料の標的核酸を、項目 1 に記載の方法を用いて選択的にハイブリダイズさせ、捕捉する工程；

b. 増幅反応を行ない、タグ配列を含む第 1 の増幅産物を生成させる工程；

c. 後続の増幅反応を行なう工程であって、前記後続の増幅反応の混合物は、前記第 1 の増幅産物内に含まれた前記タグ配列またはその相補体にハイブリダイズし、それにより後続の増幅産物が生成されるように構成された増幅オリゴマーを含む、工程；ならびに

d. 前記標的核酸の存在または非存在を判定するために前記後続の増幅産物を検出する工程

を含む方法。

(項目 4 2)

前記タグ配列が前記第 1 の増幅産物内に異種増幅オリゴマーによって導入されている、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記タグ配列が前記第 1 の増幅産物内に、前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーをプライマーとして使用することにより導入されている、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーがタグ領域をさらに含み、前記タグ領域のヌクレオチド配列が、前記タグ閉鎖領域のヌクレオチド配列とは別個のヌクレオチド配列である、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーがタグ領域をさらに含み、前記タグ領域のヌクレオチド配列が、一部、前記タグ閉鎖領域のヌクレオチド配列と重複している、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーがタグ領域をさらに含み、前記タグ領域のヌクレオチド配列が前記タグ閉鎖領域のヌクレオチド配列と同じである、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 7)

工程 c の増幅反応が非標的核酸と夾雑核酸の一方または両方の存在下で行なわれ、工程 b の組込みタグ配列が非標的核酸に実質的に含まれず、夾雑核酸に実質的に含まれない、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 8 )

前記標的核酸がプローブによる検出工程において検出される、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9 )

前記標的核酸がプローブによる検出工程において検出される、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 0 )

前記タグ閉鎖領域が、脱塩基ヌクレオチド残基、ゆらぎヌクレオチド残基、前記標的ハイブリダイズ領域内に含まれた前記配列内の前記残基の対応する位置に対するミスマッチヌクレオチド残基、およびその組合せからなる群より選択される 1 つ以上のヌクレオチド残基を含むヌクレオチド配列を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 1 )

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 14 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 2 )

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 9 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 3 )

前記タグ閉鎖領域が 7 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 4 )

前記タグ閉鎖領域が少なくとも 6 ~ 9 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含み、前記標的ハイブリダイズ領域が 17 核酸塩基長のヌクレオチド配列を含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 5 )

前記タグ閉鎖領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記標的ハイブリダイズ領域の末端と反対側である前記標的ハイブリダイズ領域の末端に接続されている、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 6 )

前記タグ閉鎖領域が、前記標的ハイブリダイズ領域の前記末端に非ヌクレオチドリinkerを用いて接続されている、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7 )

前記標的ハイブリダイズ領域が、前記結合ペアメンバーが接続されている前記タグ閉鎖領域の末端と反対側である前記タグ閉鎖領域の末端に接続されている、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 5 8 )

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端に、非ヌクレオチドリinkerを用いて接続されている、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9 )

前記標的ハイブリダイズ領域が前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリinkerを用いて接続されており、それにより、前記標的ハイブリダイズ領域と前記タグ閉鎖領域とから本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0 )

前記結合ペアメンバーが実質的にホモポリマーであるヌクレオチド配列であり、前記タグ閉鎖領域の前記末端にヌクレオチドリinkerを用いて接続されており、それにより、前記結合ペアメンバー、前記タグ閉鎖領域および前記標的ハイブリダイズ領域から本質的になる連続ヌクレオチド配列が形成される、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1 )

前記不活化可能型標的捕捉オリゴマーが、前記結合ペアメンバーの 5' 末端が前記タグ閉鎖領域の 3' 末端に接続されており、前記タグ閉鎖領域の 5' 末端が前記標的ハイブリダイズ領域の 3' 末端に接続されているような 3' 5' の向きを有する、項目 6 0 に記載

の方法。