

【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 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 A

C 12 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】

不活性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；

(ii) 少なくとも15核酸塩基長である標的ハイブリダイズ領域；および

(iii) 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分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单一の分子として連接されている、不活性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に記載の不活性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15～30核酸塩基長である、請求項1または請求項2に記載の不活性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3～20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項に記載の不活性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項に記載の不活性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6～14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項に記載の不活性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連接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連接されている、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連接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連接されている、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、非ヌクレオチドリンク用いて連接されている、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ンク用いて連接されており、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 (dA) ヌクレオチド配列であるかもしくは dT3 dA30 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連接されているか；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連接されている、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、プレアニーリング反応混合物。

【請求項 14】

少なくとも 1 種類の增幅オリゴマーをさらに含む、請求項 13 に記載のプ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；

(ii) 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エンサーにより、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；

(iii) 該 1 組の条件に変更をもたらす工程であって、前記ストリンジエンサーが低下し、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

(iv) 捕捉工程を行なう工程であって、工程 (iii) 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連接されている、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エンサーにより、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、前記ストリンジエンサーが低下し、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連接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連接されている、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ンクাを用いて連接されている、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連接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連接されている、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、非ヌクレオチドリンクাを用いて連接されている、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ンクাを用いて連接されており、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續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ンクাを用いて連接されており、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續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'末端に連接されており、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'末端に連接されているような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21に記載の方法。

(項目23)

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21に記載の方法。

(項目24)

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連接されており、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25)

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24に記載の反応混合物。

(項目26)

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24に記載の反応混合物。

(項目27)

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24に記載の反応混合物。

(項目28)

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24に記載の反応混合物。

(項目29)

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24に記載の反応混合物。

(項目30)

前記タグ閉鎖領域が、前記結合ペアメンバーが連接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連接されている、項目24に記載の反応混合物。

(項目31)

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クাを用いて連接されている、項目30に記載の反応混合物。

(項目32)

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連接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連接されている、項目24に記載の反応混合物。

(項目33)

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クাを用いて連接されている、項目32に記載の反応混合物。

(項目34)

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クাを用いて連接されており、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32に記載の反応混合物。

(項目35)

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クাを用いて連接されており、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な連続ヌクレオチド配列が形成されている、項目34に記載の反応混合物。

(項目36)

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'末端に連接されており、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'末端に連接されているような3'—5'の向きを有する、項目35に記載の反応混合物。

(項目37)

少なくとも1種類の増幅オリゴマーをさらに含む、項目24に記載の反応混合物。

(項目38)

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37に記載の反応混合物。

(項目39)

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24に記載の反応混合物。

(項目40)

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24に記載の反応混合物。

(項目41)

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42)

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41に記載の方法。

(項目43)

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41に記載の方法。

(項目44)

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43に記載の方法。

(項目45)

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43に記載の方法。

(項目46)

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43に記載の方法。

(項目47)

工程 c の増幅反応が非標的核酸と夾雜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、夾雜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連接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連接されている、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ンクাを用いて連接されている、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連接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連接されている、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、非ヌクレオチドリンクাを用いて連接されている、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ンクাを用いて連接されており、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續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ンクাを用いて連接されており、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續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' 末端に連接されており、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' 末端に連接されているような 3' ~ 5' の向きを有する、項目 6 0 に記載

の方法。