

【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28年9月15日(2016.9.15)

【公表番号】特表2015-528294(P2015-528294A)

【公表日】平成27年9月28日(2015.9.28)

【年通号数】公開・登録公報2015-060

【出願番号】特願2015-530085(P2015-530085)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

G 0 1 N 21/78 C

【手続補正書】

【提出日】平成28年7月27日(2016.7.27)

【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】

試料中の標的核酸配列を定量化する方法であって、前記方法は：

(a) 前記標的核酸配列の第 1 の部分への第 1 の増幅オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、前記試料を、前記標的核酸配列の前記第 1 の部分に特異的な前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドと接触させ、これにより、前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドおよび前記標的核酸配列を含む増幅前ハイブリッドを生成するステップと、

(b) 固体支持体上に標的捕捉し、続いて洗浄して、ステップ (a) において前記標的核酸配列の前記第 1 の部分にハイブリダイズしなかったあらゆる前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドを除去することにより、前記増幅前ハイブリッドを単離するステップと、

(c) 第 1 相増幅反応混合物において、その線形増幅を支持するが、その指数関数的増幅を支持しない条件下で、第 1 相の実質的に等温性の転写関連増幅反応で、ステップ (b) において単離された前記増幅前ハイブリッドの前記標的核酸配列の少なくとも一部分を増幅し、これにより、第 1 の増幅産物を含む反応混合物をもたらすステップであって、ここで

前記第 1 相増幅反応混合物が、第 2 の増幅オリゴヌクレオチドを含み、前記第 2 の増幅オリゴヌクレオチドが、前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドの伸長産物の部分に相補的であり、かつ

前記第 1 の増幅産物が、前記第 1 相の実質的に等温性の転写関連増幅反応中の核酸合成の鑄型ではない、ステップと、

(d) 前記第 1 の増幅産物を含む前記反応混合物を、前記第 1 の増幅産物の指数関数的増幅に関与するが、前記第 1 の増幅産物を含む前記反応混合物から欠如している少なくとも 1 種の構成成分と組み合わせて、第 2 相増幅反応混合物を産生するステップであって、

ここで

前記第 2 相増幅反応混合物が、配列特異的ハイブリダイゼーションプローブをさらに含む、ステップと、

(e) 前記第 2 相増幅反応混合物において、第 2 相の実質的に等温性の転写関連増幅反応で、前記第 1 の増幅産物の指数関数的増幅を行い、これにより、第 2 の増幅産物を合成するステップと、

(f) 前記配列特異的ハイブリダイゼーションプローブを用いて、規則的な時間間隔で、前記第 2 相増幅反応混合物における前記第 2 の増幅産物の合成を検出するステップと、

(g) ステップ (f) の結果を使用して、前記試料中の前記標的核酸配列を定量化するステップと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドが、3' 標的特異的配列と、RNA ポリメラーゼの 5' プロモーター配列とを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 RNA ポリメラーゼが、T7 RNA ポリメラーゼである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 2 の増幅オリゴヌクレオチドが、前記第 1 相の等温性の転写関連増幅反応で酵素的に伸長される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記固体支持体が、固定化された捕捉プローブを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (a) が、前記試料を、前記標的核酸配列にハイブリダイズする標的捕捉オリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含み、そして

前記増幅前ハイブリッドが、前記標的捕捉オリゴヌクレオチドおよび前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドのそれぞれにハイブリダイズした前記標的核酸配列を含む、

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記固体支持体が、磁氣的に誘引できる粒子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 相の等温性の転写関連増幅反応および前記第 2 相の等温性の転写関連増幅反応のそれぞれが、RNA ポリメラーゼおよび逆転写酵素を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 種の構成成分が、前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (c) の前記第 1 の増幅産物が、前記試料中の前記標的核酸配列と同じ極性を有する cDNA 分子であり、そして

ステップ (e) の前記第 2 の増幅産物が、RNA 分子である、

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (d) における前記配列特異的ハイブリダイゼーションプローブが、前記第 2 の増幅産物にハイブリダイズすると検出可能なシグナルを産生するコンフォメーション感受性プローブである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ (d) における前記配列特異的ハイブリダイゼーションプローブが、蛍光標識

された配列特異的ハイブリダイゼーションプローブである、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ (g) が、線形校正曲線およびステップ (f) の結果を使用して、前記試料中の前記標的核酸配列を定量化するステップを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ (c) が、前記第 1 相増幅反応混合物において 10 倍 ~ 10,000 倍増幅するステップを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

第 5 の態様では、本発明は、試料中の標的核酸配列を定量化する方法を提供する。本方法によれば、まず、(a) 標的核酸配列の第 1 の部分への第 1 の増幅オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、試料を、標的核酸配列の第 1 の部分に特異的な第 1 の増幅オリゴヌクレオチドと接触させ、これにより、第 1 の増幅オリゴヌクレオチドおよび標的核酸配列を含む増幅前ハイブリッドを生成するステップが存在する。次に、(b) 固体支持体上に標的捕捉し、続いて洗浄して、ステップ (a) において標的核酸配列の第 1 の部分にハイブリダイズしなかった第 1 の増幅オリゴヌクレオチドを全て除去することにより、増幅前ハイブリッドを単離するステップが存在する。これに続き、(c) 第 1 相増幅反応混合物において、その線形増幅を支持するが、その指数関数的増幅を支持しない条件下で、第 1 相の実質的に等温性の転写関連増幅反応で、ステップ (b) において単離された増幅前ハイブリッドの標的核酸配列の少なくとも一部分を増幅し、これにより、第 1 の増幅産物を含む反応混合物をもたらすステップが行われる。一般的に言えば、第 1 相増幅反応混合物は、第 2 の増幅オリゴヌクレオチドを含み、第 2 の増幅オリゴヌクレオチドは、第 1 の増幅オリゴヌクレオチドの伸長産物の部分に相補的である。同様に、第 1 の増幅産物は、第 1 相の実質的に等温性の転写関連増幅反応中の核酸合成の鋳型ではない。次に、(d) 第 1 の増幅産物を含む反応混合物を、第 1 の増幅産物の指数関数的増幅に関与するが、第 1 の増幅産物を含む反応混合物から欠如している少なくとも 1 種の構成成分と組み合わせて、第 2 相増幅反応混合物を産生するステップが存在する。一般に、第 2 相増幅反応混合物は、配列特異的ハイブリダイゼーションプローブをさらに含む。次に、(e) 第 2 相増幅反応混合物において、第 2 相の実質的に等温性の転写関連増幅反応で、第 1 の増幅産物の指数関数的増幅を行い、これにより、第 2 の増幅産物を合成するステップが存在する。これに続き、(f) 配列特異的ハイブリダイゼーションプローブを用いて、規則的な時間間隔で、第 2 相増幅反応混合物における第 2 の増幅産物の合成を検出するステップ、次に、(g) 検出ステップ (f) の結果を使用して、試料中の標的核酸配列を定量化するステップを行う。一般に好ましい一方法において、第 1 の増幅オリゴヌクレオチドは、3' 標的的特異的配列および RNA ポリメラーゼのための 5' プロモーター配列を含む。好ましい事例において、RNA ポリメラーゼは、T7 RNA ポリメラーゼである。別の一般に好ましい一方法において、第 2 の増幅オリゴヌクレオチドは、第 1 相の等温性の転写関連増幅反応で酵素的に伸長される。別の一般に好ましい一方法において、固体支持体は、固定化された捕捉プローブを含む。別の一般に好ましい一方法において、ステップ (a) は、試料を、標的核酸配列にハイブリダイズする標的捕捉オリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含み、増幅前ハイブリッドは、標的捕捉オリゴヌクレオチドおよび第 1 の増幅オリゴヌクレオチドのそれぞれにハイブリダイズした標的

核酸配列を含む。別の一般に好ましい一方法において、固体支持体は、磁氣的に誘引できる粒子を含む。別の一般に好ましい一方法において、第1および第2相の等温性の転写関連増幅反応のそれぞれは、RNAポリメラーゼおよび逆転写酵素を含み、逆転写酵素は、内在性RNaseH活性を含む。別の一般に好ましい一方法において、少なくとも1種の構成成分は、第1の増幅オリゴヌクレオチドを含む。別の一般に好ましい一方法において、ステップ(c)の第1の増幅産物は、試料中の標的核酸配列と同じ極性を有するcDNA分子であり、ステップ(e)の第2の増幅産物は、RNA分子である。別の一般に好ましい一方法において、ステップ(d)における配列特異的ハイブリダイゼーションプローブは、第2の増幅産物にハイブリダイズすると検出可能なシグナルを産生するコンフォメーション感受性プローブである。別の一般に好ましい一方法において、ステップ(d)における配列特異的ハイブリダイゼーションプローブは、蛍光標識された配列特異的ハイブリダイゼーションプローブである。別の一般に好ましい一方法において、ステップ(g)は、線形校正曲線およびステップ(f)の結果を使用して、試料中の標的核酸配列を定量化するステップを含む。別の一般に好ましい一方法において、ステップ(c)は、第1相増幅反応混合物において10倍~10,000倍増幅するステップを含む。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

試料中の標的核酸配列を定量化する方法であって、前記方法は：

(a) 前記標的核酸配列の第1の部分への第1の増幅オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、前記試料を、前記標的核酸配列の前記第1の部分に特異的な前記第1の増幅オリゴヌクレオチドと接触させ、これにより、前記第1の増幅オリゴヌクレオチドおよび前記標的核酸配列を含む増幅前ハイブリッドを生成するステップと、

(b) 固体支持体上に標的捕捉し、続いて洗浄して、ステップ(a)において前記標的核酸配列の前記第1の部分にハイブリダイズしなかったあらゆる前記第1の増幅オリゴヌクレオチドを除去することにより、前記増幅前ハイブリッドを単離するステップと、

(c) 第1相増幅反応混合物において、その線形増幅を支持するが、その指数関数的増幅を支持しない条件下で、第1相の実質的に等温性の転写関連増幅反応で、ステップ(b)において単離された前記増幅前ハイブリッドの前記標的核酸配列の少なくとも一部分を増幅し、これにより、第1の増幅産物を含む反応混合物をもたらすステップであって、ここで

前記第1相増幅反応混合物が、第2の増幅オリゴヌクレオチドを含み、前記第2の増幅オリゴヌクレオチドが、前記第1の増幅オリゴヌクレオチドの伸長産物の部分に相補的であり、かつ

前記第1の増幅産物が、前記第1相の実質的に等温性の転写関連増幅反応中の核酸合成の鑄型ではない、ステップと、

(d) 前記第1の増幅産物を含む前記反応混合物を、前記第1の増幅産物の指数関数的増幅に関与するが、前記第1の増幅産物を含む前記反応混合物から欠如している少なくとも1種の構成成分と組み合わせて、第2相増幅反応混合物を産生するステップであって、ここで

前記第2相増幅反応混合物が、配列特異的ハイブリダイゼーションプローブをさらに含む、ステップと、

(e) 前記第2相増幅反応混合物において、第2相の実質的に等温性の転写関連増幅反応で、前記第1の増幅産物の指数関数的増幅を行い、これにより、第2の増幅産物を合成するステップと、

(f) 前記配列特異的ハイブリダイゼーションプローブを用いて、規則的な時間間隔で、前記第2相増幅反応混合物における前記第2の増幅産物の合成を検出するステップと、

(g) ステップ(f)の結果を使用して、前記試料中の前記標的核酸配列を定量化するステップとを含む、方法。

(項目 2)

前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドが、3' 標的特異的配列と、RNA ポリメラーゼの 5' プロモーター配列とを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記 RNA ポリメラーゼが、T7 RNA ポリメラーゼである、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記第 2 の増幅オリゴヌクレオチドが、前記第 1 相の等温性の転写関連増幅反応で酵素的に伸長される、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5)

前記固体支持体が、固定化された捕捉プローブを含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6)

ステップ (a) が、前記試料を、前記標的核酸配列にハイブリダイズする標的捕捉オリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含み、そして

前記増幅前ハイブリッドが、前記標的捕捉オリゴヌクレオチドおよび前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドのそれぞれにハイブリダイズした前記標的核酸配列を含む、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記固体支持体が、磁氣的に誘引できる粒子を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記第 1 相の等温性の転写関連増幅反応および前記第 2 相の等温性の転写関連増幅反応のそれぞれが、RNA ポリメラーゼおよび逆転写酵素を含み、そして

前記逆転写酵素が、内在性 RNase H 活性を含む、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記少なくとも 1 種の構成成分が、前記第 1 の増幅オリゴヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

ステップ (c) の前記第 1 の増幅産物が、前記試料中の前記標的核酸配列と同じ極性を有する cDNA 分子であり、そして

ステップ (e) の前記第 2 の増幅産物が、RNA 分子である、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

ステップ (d) における前記配列特異的ハイブリダイゼーションプローブが、前記第 2 の増幅産物にハイブリダイズすると検出可能なシグナルを産生するコンフォメーション感受性プローブである、項目 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

ステップ (d) における前記配列特異的ハイブリダイゼーションプローブが、蛍光標識された配列特異的ハイブリダイゼーションプローブである、項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 13)

ステップ (g) が、線形校正曲線およびステップ (f) の結果を使用して、前記試料中の前記標的核酸配列を定量化するステップを含む、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

ステップ (c) が、前記第 1 相増幅反応混合物において 10 倍 ~ 10,000 倍増幅するステップを含む、項目 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。