

【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23年11月17日(2011.11.17)

【公表番号】特表2010-539956(P2010-539956A)

【公表日】平成22年12月24日(2010.12.24)

【年通号数】公開・登録公報2010-051

【出願番号】特願2010-527295(P2010-527295)

【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 Z N A A

C 12 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年9月30日(2011.9.30)

【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】

核酸分子内に位置する標的ヌクレオチド配列の選択的増幅のための方法であって、核酸分子(「鑄型」分子)を、

(i)少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドであって、促進因子オリゴヌクレオチドからの3'伸長がブロックされるように、その3'末端にまたはその近くに少なくとも1つの修飾を含む促進因子オリゴヌクレオチド、および

(ii)2つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーであって、これらのうちの少なくとも1つが、修飾の存在により相補鎖合成が早期に終結するように修飾された開始因子プライマーであるオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップであって、

促進因子オリゴヌクレオチドおよび開始因子プライマーが、鑄型核酸分子の実質的に同じまたは隣接する領域に結合し、促進因子オリゴヌクレオチドが、開始因子プライマーの結合位置に対して3'側に、標的配列に相補的な配列をさらに含むステップと、

特異的な標的配列が選択的に増幅されるように、熱サイクルの酵素的増幅を実行するステップと

を含む方法。

【請求項2】

(a)鑄型核酸分子を変性させるステップと、

(b)変性した鑄型核酸分子を少なくとも1つの開始因子プライマーと接触させ、それから第2の鎖合成を開始し、それによって、新しく合成された鎖に開始因子プライマーからの修飾を導入するステップと、

(c)そのように生成された二本鎖分子を変性させて、開始因子プライマーが結合する標的ヌクレオチド配列の反対の端に位置するプライマーからの逆方向の鎖合成を開始し、それによって、逆方向の鎖合成が、ステップ(b)において導入された修飾により、早期に終結するステップと、

(d)新しく合成された二本鎖分子を変性させて、ステップ(c)において生成された不完全な逆方向の鎖に促進因子オリゴヌクレオチドを結合し、それから鎖伸長を開始して、それによって逆方向の鎖を完成させるステップと、

(e)1回または複数回のさらなるサイクルでステップ(a)～(d)を任意選択で反復するステップと

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

開始因子プライマー結合部位が、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖伸長に続いて再生成され、それによって、開始因子プライマーが鎖合成のさらなるラウンドを開始することを可能にするように、促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が開始因子プライマーと十分な配列同一性を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

開始因子プライマー結合部位が、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖合成に続いて再生成されないように、促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が開始因子プライマーと不十分な配列同一性を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

修飾の存在により相補鎖合成が早期に終結するように修飾された促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーをさらに使用し、前記プライマーが、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖合成から促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマー結合部位が生成され、それによって、促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーが鎖合成のさらなるラウンドを開始することを可能にするように、促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域と十分な配列同一性を有する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

所望の標的配列の増幅の特異性を改善し、同時に、所望されない非標的配列の増幅を実質的に低下させ、または排除するために使用される、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

鑄型核酸分子が、組織、細胞、および/またはその抽出物から選択される生物学的試料中に存在する、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

促進因子オリゴヌクレオチドの3'伸長をブロックする少なくとも1つの修飾が、3'末端のまたはその近くの1つまたは複数の非伸長性部分またはヌクレオチド類似体の組み込みを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

少なくとも1つの修飾が、単一の3'末端非伸長性塩基もしくは塩基類似体、3'末端非伸長性塩基およびオリゴヌクレオチドの3'末端の近くの1つもしくは複数のヌクレオチドミスマッチの組合せおよび/またはオリゴヌクレオチドの3'末端の近くの脱塩基部位の組み込みを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

非伸長性塩基が、2',3'ジデオキシヌクレオチド、3'C3、C18もしくは他の長さのスペーサー、3'リン酸化ヌクレオチド、「ペプチド核酸」塩基、「ロックド核酸」(LNA)塩基、ヌクレオチドアミン誘導体、ウラシルDNAグリコシラーゼを用いて処理されたウラシル、RNAもしくは2'-O-メチルヌクレオチド、またはこれらの組合せから選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

開始因子プライマーおよび/または促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーが、1つまたは複数のスペーサー、脱塩基部位、または2'-O-メチルヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチドの包含によって修飾される、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

開始因子プライマーおよび/または促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーにおける修飾が、プライマーが3'伸長を開始する能力を保持する一方で、そのプライマー配列内に修飾を含有する伸長産物が複製される場合に、相補鎖が早期に切断され、後の増幅サイクルにおけるプライマー結合を阻止するように、プライマーの3'末端の十分近くに位置

する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

促進因子オリゴヌクレオチドの5'末端が、開始因子プライマーの5'末端と一致する、または開始因子プライマーに含まれる、あるいは、促進因子オリゴヌクレオチドが、開始因子プライマーの5'端に存在する配列に付加的な配列を含む、伸長された5'尾部を含む、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

促進因子オリゴヌクレオチドの5'末端が、促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーの5'末端と一致する、または促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーに含まれる、あるいは、促進因子オリゴヌクレオチドが、促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーの5'端に存在する配列に付加的な配列を含む、伸長された5'尾部を含む、請求項5から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

促進因子オリゴヌクレオチドが、伸長された5'尾部を含み、かつ、促進因子オリゴヌクレオチドの5'尾部が、検出可能なタグまたは標識の付加を促進する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

標的配列に隣接する両方のオリゴヌクレオチドプライマーが開始因子プライマーであり、2つの促進因子オリゴヌクレオチドを使用し、これらのうちの一方が、順方向開始因子プライマーと実質的に同じまたはそれに隣接する、鑄型核酸分子の領域に結合し、他方が、逆方向開始因子プライマーと実質的に同じまたはそれに隣接する、鑄型核酸分子の領域に結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

開始因子プライマー結合部位が、少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖伸長に続いて再生成され、それによって、対応する開始因子プライマーが、鎖合成のさらなるラウンドを開始することを可能にするように、少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が、対応する開始因子プライマーと十分な配列同一性を有する、あるいは、開始因子プライマー結合部位が、少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖合成に続いて再生成されないように、少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が、対応する開始因子プライマーと不十分な配列同一性を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が、対応する開始因子プライマーと不十分な配列同一性を有し、かつ、修飾の存在により相補鎖合成が早期に終結するように修飾された少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーをさらに使用し、前記プライマーが、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖合成から促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマー結合部位が生成され、それによって、促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーが鎖合成のさらなるラウンドを開始することを可能にするように、対応する促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域と十分な配列同一性を有する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

2つの促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーを使用し、これらのうちの一方が、一方の促進因子オリゴヌクレオチドと実質的に同じまたはそれに隣接する、鑄型核酸分子の領域に結合し、他方が、他方の促進因子オリゴヌクレオチドと実質的に同じまたはそれに隣接する、鑄型核酸分子の領域に結合する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

熱サイクルの酵素的增幅反応の特異性を改善するための方法であって、反応が、核酸分子内に位置する、対象とする標的ヌクレオチド配列に隣接する少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーを利用し、前記プライマーの少なくとも1つが、修飾の存在により相補鎖合成が早期に終結するように修飾されており、反応が、少なくとも1つの非プライ

ミング促進因子オリゴヌクレオチドをさらに利用し、促進因子オリゴヌクレオチドが、促進因子オリゴヌクレオチドからの3'伸長がブロックされるように、その3'末端にまたはその近くに少なくとも1つの修飾を含み、促進因子オリゴヌクレオチドおよび修飾プライマーが、鑄型核酸分子の実質的に同じまたは隣接する領域に結合し、促進因子オリゴヌクレオチドが、修飾プライマーの結合位置に対して3'側に、標的配列に相補的な配列をさらに含む方法。

【請求項 2 1】

熱サイクルの酵素的増幅反応の特異性が、対象とする標的ヌクレオチド配列を含まない増幅産物の消失またはその量の低下によって決定される、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 2】

核酸分子内に位置し、変異配列を含む標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅するステップを含む、変異ヌクレオチド配列を検出するための方法であって、

核酸分子(「鑄型」分子)を、

(i)少なくとも1つの促進因子オリゴヌクレオチドであって、促進因子オリゴヌクレオチドからの3'伸長がブロックされるように、その3'末端にまたはその近くに少なくとも1つの修飾を含む促進因子オリゴヌクレオチド、および

(ii)2つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーであって、これらのうちの少なくとも1つが、修飾の存在により相補鎖合成が早期に終結するように修飾された開始因子プライマーであるオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップであって、

促進因子オリゴヌクレオチドおよび開始因子プライマーが、鑄型核酸分子の実質的に同じまたは隣接する領域に結合し、促進因子オリゴヌクレオチドが、開始因子プライマーの結合位置に対して3'側に、標的配列に相補的な3'配列をさらに含み、前記3'配列は、対応する非変異配列へではなく、変異配列を含む標的ヌクレオチド配列への促進因子オリゴヌクレオチドの優先的な結合を可能にするステップと、

特異的な標的配列が選択的に増幅されるように、熱サイクルの酵素的増幅を実行するステップと、

増幅された産物のヌクレオチド配列を非変異標的配列に対応する配列と比較して、変異ヌクレオチド配列を検出するステップと

を含む方法。

【請求項 2 3】

開始因子プライマー結合部位が、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖伸長に続いて再生成され、それによって、開始因子プライマーが、鎖合成のさらなるラウンドを開始することを可能にするように、促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が開始因子プライマーと十分な配列同一性を有する、あるいは、開始因子プライマー結合部位が、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖合成に続いて再生成されないように、促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が開始因子プライマーの対応する領域と不十分な配列同一性を有する、請求項22に記載の方法。

【請求項 2 4】

促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域が、対応する開始因子プライマーと不十分な配列同一性を有し、かつ、促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーをさらに使用し、前記プライマーが、促進因子オリゴヌクレオチドから開始される鎖合成から促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマー結合部位が生成され、それによって、促進因子オリゴヌクレオチド依存的プライマーが鎖合成のさらなるラウンドを開始することを可能にするように、促進因子オリゴヌクレオチドの5'領域と十分な配列同一性を有する、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 5】

変異配列が、1つもしくは複数のヌクレオチドの付加、欠失、もしくは置換または標的配列内の1つもしくは複数のヌクレオチドに対するメチル化状態の変化などの修飾を含む、請求項22から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

DNAメチル化分析において、かつ/または被験者における疾患もしくは状態の診断もしくはそれに対する感受性の予測において利用され、疾患または状態が、遺伝子配列における変化によって特徴づけられ、またはそれと関連する、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。