

【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29年1月12日 (2017.1.12)

【公表番号】特表2016-508713(P2016-508713A)

【公表日】平成28年3月24日 (2016.3.24)

【年通号数】公開・登録公報2016-018

【出願番号】特願2015-548545(P2015-548545)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 D 495/04 (2006.01)

C 0 7 D 213/53 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

C 0 7 D 495/04 1 0 3

C 0 7 D 213/53

【手続補正書】

【提出日】平成28年11月24日 (2016.11.24)

【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】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異体を富化する方法であって、前記標的核酸は 2 つの変異体配列の形態で存在し、前記変異体は単一のヌクレオチド位置で異なり、前記方法は：

前記標的核酸配列を含むサンプルを供給する工程であって、ここで富化されるべき変異体は大過剰の他方の変異体の中で少量においてサンプル中に存在する、工程；

前記標的核酸配列の 1 つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給する工程であって、ここで前記オリゴヌクレオチドは富化されるべき変異体と単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして他方の変異体と単一のヌクレオチド位置で完全に一致する、工程；

前記オリゴヌクレオチド、及び前記標的核酸配列の何れかの変異体の 1 つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのために適切な条件を提供する工程；

前記核酸の混合物が変性されるように前記サンプルを加熱する工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、15 μ M 以上の濃度で存在する $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記富化されるべき変異体の変異対立遺伝子であり、そして前記他方の変異体が野生型対立遺伝子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記変異対立遺伝子の変異 E G F R 対立遺伝子であり、そして前記野生型対立遺伝子が野生型 E G F R 対立遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異対立遺伝子を検出するための方法であって、前記変異対立遺伝子は、単一のヌクレオチド位置で野生型対立遺伝子とは異なり、かつ大過剰の野生型対立遺伝子の中で少量においてサンプルに存在し、前記方法は：

前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化する工程であって、ここで前記富化は、

前記標的核酸配列の 1 つの鎖に対して相補的であるオリゴヌクレオチドを供給する工程であって、ここで前記オリゴヌクレオチドは変異対立遺伝子と単一のヌクレオチド位置でミスマッチを有し、そして野生型対立遺伝子と単一のヌクレオチド位置で完全に一致する工程；

前記核酸の混合物が変性されるよう前記サンプルを加熱する工程；

前記オリゴヌクレオチド、及び前記変異対立遺伝子又は野生型対立遺伝子の何れかの 1 つの鎖から成る二本鎖オリゴヌクレオチドを生成するために、標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのために適切な条件を提供する工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記富化された変異対立遺伝子を含む溶出された緩衝液を回収する工程により行われる、工程、

前記富化された変異対立遺伝子を増幅する工程；及び

前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された変異対立遺伝子から生成されるシグナルを検出する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、15 μ M 以上の濃度で存在する $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項 5】

前記変異対立遺伝子の変異 E G F R 対立遺伝子であり、そして前記野生型対立遺伝子が野生型 E G F R 対立遺伝子である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記増幅工程が、対立遺伝子特異的プライマーにより行われる、請求項 4 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異体を富化する方法であって、前記標的核酸は 2 つの変異体配列の形態で存在し、前記変異体は単一のヌクレオチド位置で異なり、前記方法は：

前記標的核酸配列を含むサンプルを供給する工程であって、ここで富化されるべき変異

体は大過剰の他方の変異体の中で少量においてサンプルに存在する、工程；

前記核酸の混合物が変性されるように、前記サンプルを加熱する工程；

前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供する工程であって、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、1つの変異体配列の1つの鎖と、他方の変異体配列の1つの鎖との間で形成され、変異体が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成される、工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、15 μ M以上の濃度で存在する $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項8】

前記富化されるべき変異体の変異対立遺伝子であり、そして前記他方の変異体が野生型対立遺伝子である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記変異対立遺伝子の変異EGFR対立遺伝子であり、そして前記野生型対立遺伝子が野生型EGFR対立遺伝子である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

サンプルからの核酸の混合物中の標的核酸配列の変異対立遺伝子を検出するための方法であって、ここで前記変異対立遺伝子は、単一のヌクレオチド位置で野生型対立遺伝子とは異なり、そして大過剰の野生型対立遺伝子の中で少量においてサンプルに存在し、前記方法は：

前記サンプル中の前記変異対立遺伝子を富化する工程であって、ここで前記富化は；

前記核酸の混合物が変性されるように、前記サンプルを加熱する工程；

前記標的核酸の再アニーリングのために適切な条件を提供する工程であって、ここで二本鎖オリゴヌクレオチドが、前記変異対立遺伝子の1つの鎖と、野生型対立遺伝子の1つの鎖との間で形成され、対立遺伝子が異なる単一のヌクレオチド位置でミスマッチが生成される、工程；

反応混合物を生成するために、前記二本鎖オリゴヌクレオチドと、親和性標識により結合されるミスマッチインターカレーション化合物とを接触させる工程であって、ここで前記ミスマッチインターカレーション化合物は、ミスマッチを含む二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができ、かつミスマッチを含まない二本鎖ポリヌクレオチドに結合することができない、工程；

前記反応混合物を、前記ミスマッチインターカレーション化合物上の親和性標識を認識し、そして結合する親和性マトリックスに供給する工程；

前記反応混合物を洗浄し、そして親和性マトリックスに結合されていないすべての材料から親和性マトリックスを分離する工程；及び

前記親和性マトリックスから核酸を溶出する緩衝液を供給し、そして前記標的核酸配列の富化された変異体を含む溶出された緩衝液を回収する工程により行われる、工程；

前記富化された変異対立遺伝子を増幅する工程；及び

前記富化増幅された変異対立遺伝子の生成物、又は前記富化増幅された変異対立遺伝子から生成されるシグナルを検出する工程を含み、

ここで前記親和性標識を伴うミスマッチインターカレーション化合物は、15 μ M以上の濃度で存在する $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ であることを特徴とする、方法。

【請求項11】

前記変異対立遺伝子の変異EGFR対立遺伝子であり、そして前記野生型対立遺伝子が野生型EGFR対立遺伝子である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記増幅工程が、対立遺伝子特異的プライマーにより行われる、請求項10～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

15 μ M以上の濃度で存在する $\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})(\text{PEG3-ビオチン})^{3+}$ である、混合物中の希対立遺伝子DNAを富化するための化合物。