

【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】令和 3 年 10 月 7 日 (2021.10.7)

【公表番号】特表 2020-533974 (P2020-533974A)

【公表日】令和 2 年 11 月 26 日 (2020.11.26)

【年通号数】公開・登録公報 2020-048

【出願番号】特願 2020-512607 (P2020-512607)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6888 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/45 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6888 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 N 9/22

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 15/45

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 8 月 26 日 (2021.8.26)

【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】

生体試料中の R S V の有無の検出のための方法であって、

i) R S V 非構造 N S 2 遺伝子のアンチセンス鎖の 3' 末端に相補的である認識領域を含むヌクレオチド配列を 3' 末端に含む第 1 のフォワードテンプレート；前記認識領域の上流のニッキング酵素結合部位及びニッキング部位；及び前記ニッキング部位の上流の安定化領域；

i i) R S V 非構造 N S 2 遺伝子のセンス鎖の 3' 末端に相補的である認識領域を含む核酸配列を 3' 末端に含む第 1 のリバーステンプレート；前記認識領域の上流のニッキング酵素結合部位及びニッキング部位；及び前記ニッキング部位の上流の安定化領域；

i i i) 少なくとも 1 つのニッキング酵素；及び

i v) D N A ポリメラーゼ

を含む組成物と前記生体試料を接触させること；

核酸増幅反応で前記標的ヌクレオチド配列を増幅して増幅産物を提供すること；並びに前記増幅産物の有無を検出すること

を含む、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つのニッキング酵素が、

前記第 1 のフォワードテンプレートの前記ニッキング部位でニッキング可能であり、かつ R S V 非構造 N S 2 遺伝子のアンチセンス鎖内ではニッキングしない第 1 のニッキング酵素、並びに / 又は

前記第 1 のリバーステンプレートの前記ニッキング部位でニッキング可能でありかつ R S

V 非構造 NS 2 遺伝子のセンス鎖内ではニッキングしない第 2 のニッキング酵素を含み、前記第 1 のニッキング酵素及び前記第 2 のニッキング酵素が、同一であっても又は異なってもよい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記組成物が、前記 RSV 非構造 NS 2 遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むプローブオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

生体試料中の RSV の有無の検出のための方法であって、

i) RSV ヌクレオキャプシド遺伝子 N のアンチセンス鎖の 3' 末端に相補的である認識領域を含むヌクレオチド配列を 3' 末端に含む第 2 のフォワードテンプレート；前記認識領域の上流のニッキング酵素結合部位及びニッキング部位；及び前記ニッキング部位の上流の安定化領域；

ii) RSV ヌクレオキャプシド遺伝子 N のセンス鎖の 3' 末端に相補的である認識領域を含むヌクレオチド配列を 3' 末端に含む第 2 のリバーステンプレート；前記認識領域の上流のニッキング酵素結合部位及びニッキング部位；及び前記ニッキング部位の上流の安定化領域；

iii) 少なくとも 1 つのニッキング酵素；及び

iv) DNA ポリメラーゼ

を含む組成物と前記生体試料を接触させること；

核酸増幅反応で前記標的ヌクレオチド配列を増幅して増幅産物を提供すること；並びに前記増幅産物の有無を検出すること

を含む、方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つのニッキング酵素が、

前記第 2 のフォワードテンプレートの前記ニッキング部位でニッキング可能であり、かつ RSV ヌクレオキャプシド遺伝子 N のアンチセンス鎖内ではニッキングしない第 1 のニッキング酵素、並びに / 又は

前記第 2 のリバーステンプレートの前記ニッキング部位でニッキング可能でありかつ前記ヌクレオキャプシド遺伝子 N のセンス鎖内ではニッキングしない第 2 のニッキング酵素を含み、前記第 1 のニッキング酵素及び前記第 2 のニッキング酵素が、同一であっても又は異なってもよい、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記組成物が、RSV ヌクレオキャプシド遺伝子 N のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むプローブオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

【請求項 7】

増幅が、基本的に等温条件下で行われる、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 のフォワードテンプレートの前記核酸配列が、配列番号 1 に少なくとも 80 %、少なくとも 85 % 又は少なくとも 95 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み；かつ

前記第 1 のリバーステンプレートの前記核酸配列が、配列番号 2 に少なくとも 80 %、少なくとも 85 % 又は少なくとも 95 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 3 及び 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記プローブオリゴヌクレオチドが、配列番号 3 に少なくとも 80 %、少なくとも 85 % 又は少なくとも 95 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 3 及び 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記第2のフォワードテンプレートの前記核酸配列が、配列番号6に少なくとも80%、少なくとも85%又は少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み；かつ

前記第2のリバーステンプレートの前記核酸配列が、配列番号7に少なくとも80%、少なくとも85%又は少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項4～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記プローブオリゴヌクレオチドが、配列番号8に少なくとも80%、少なくとも85%又は少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項4～6及び10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記組成物が、dNTP又はdNTPとddNTPの混合物をさらに含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記DNAポリメラーゼが、ゲオパチルス・ボアジチのDNAポリメラーゼ、Bst（巨大断片）、エクソDNAポリメラーゼ、Manta 1.0 DNAポリメラーゼ（Enzymatics（登録商標））からなる群から選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記第1のフォワードテンプレート及び第1のリバーステンプレート前記第2のフォワードテンプレート及び第2のリバーステンプレートが、前記同じ少なくとも1つのニッキング酵素によって認識されるニッキング酵素結合部位を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記少なくとも1つのニッキング酵素が、Nt.BspQI、Nb.BbvCI、Nb.BsmI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、Nt.AlwI、Nt.BbvCI、Nt.BstNBI、Nt.CviPII、Nb.BpuI、Nt.BpuI及びN.SBspD61からなる群から選択される、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記プローブが、検出可能な標識にコンジュゲートされる、請求項3、6、9又は11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記検出可能な標識が、フルオロフォア、酵素、クエンチャー、酵素阻害剤、放射性標識、結合対のメンバー、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記少なくとも1つのニッキング酵素が、前記ニッキング酵素結合部位の下流でニッキングする、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

増幅前に前記生体試料から核酸を抽出／単離することを含んでもよい、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記生体試料が、糞便、口腔／咽喉の拭き取り検体、唾液、膿、痰、血液、及び尿から選択される、又は前記生体試料が、感染組織若しくは非感染組織からである、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記第1のフォワードテンプレート、前記第1のリバーステンプレート、前記第2のフォワードテンプレート又は前記第2のリバーステンプレートの1以上が、1以上の修飾ヌクレオチド、スペーサー、又はブロッキング基を含む、請求項1～20のいずれか一項に

記載の方法。

【請求項 2 2】

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドが、2' 修飾を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドが、2' - O - メチルを含む、請求項 2 2 に記載の方法。