

【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 6 年 9 月 5 日(2024.9.5)

【公開番号】特開 2024-12522(P2024-12522A)

【公開日】令和 6 年 1 月 30 日(2024.1.30)

【年通号数】公開公報(特許)2024-018

【出願番号】特願 2023-189367(P2023-189367)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

10

【F I】

C 1 2 Q 1/686 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 6 年 8 月 23 日(2024.8.23)

【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】

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料において 1 つまたは複数の少量核酸種の存在または非存在を同定する方法であって、

(a) 標的核酸を含む試料から核酸を得るステップであって、前記標的核酸が、1 つの大量核酸種と 1 つまたは複数の少量核酸種とを有し、それぞれの少量核酸種が、前記大量核酸種の低頻度変種またはコピー数変種であり、かつ、前記大量核酸種の頻度またはコピー数の約 10 % 未満の頻度またはコピー数で存在し、「約」は示した値の  $\pm 10 %$  を意味する、ステップと、

(b) 前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止剤と、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な 1 つまたは複数の鎖停止剤とを含む伸長条件下で (a) の前記核酸を、1 つまたは複数の伸長プライマーと接触させるステップであって、それによって、前記 1 つまたは複数の伸長プライマーが前記鎖停止剤によって伸長され、それによって、前記少量核酸種に対応する鎖停止伸長産物および前記大量核酸種に対応する鎖停止伸長産物が生成され、d N T P が前記伸長条件に存在する場合、前記 d N T P に存在する「N」と同一の塩基を含む鎖停止剤は前記伸長条件には存在せず、(i) 前記 1 つまたは複数の伸長プライマーが、前記標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含み、かつ、(ii) 前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止剤の濃度が、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な 1 つまたは複数の鎖停止剤のそれぞれの濃度より少ない、ステップと、

30

(c) (b) の前記伸長産物を分析し、それによって、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対応する伸長産物の前記検出に基づいて、前記 1 つまたは複数の少量核酸種の存在または非存在が同定されるステップと

40

を含む、方法。

【請求項 2】

(a) の前記核酸が、d N T P を含む増幅条件下で増幅プライマー対を用いて、試料中の前記標的核酸を増幅することによって得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載の方法であって、

前記伸長条件が、同じ大量核酸種の複数の少量核酸種のそれぞれに特異的な鎖停止剤を含み、

50

(a) の前記核酸に存在する前記複数の少量核酸種のそれぞれ 1 つに対応する鎖停止伸長産物が 1 回の反応で生成され；前記同じ大量核酸種のすべての変種である前記複数の少量核酸種のそれぞれの存在または非存在が同定される、方法。

【請求項 4】

(b) が少なくとも 2 つの反応容器または区画の組において実施され、

第 1 の容器または区画が、前記大量核酸種に対して特異的である前記鎖停止剤を含むが、前記 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的である鎖停止剤を含まない伸長条件を含み、

残りの容器または区画のそれぞれが、(a) 1 つまたは複数の少量核酸種に対して特異的かつ共通である単一の鎖停止剤を含むが、(b) 前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止剤も、前記共通である単一の鎖停止剤を共有しない少量核酸種に対して特異的な鎖停止剤も含まない伸長条件を含む、

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記少量核酸種および前記大量核酸種の配列が、単一塩基だけ異なり、前記プライマーが、異なっている前記単一塩基まで伸長する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記少量核酸種および前記大量核酸種の配列が、単一塩基だけ異なり、前記プライマーが、異なっている前記単一塩基を通して伸長する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 1 つまたは複数の少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種の頻度またはコピー数の 0 . 25 % ~ 10 % 未満、または、0 . 5 % ~ 10 % 未満、または、1 % ~ 10 % 未満の間の頻度またはコピー数で存在する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つまたは複数の少量核酸種が、総核酸の 30 % 未満、20 % 未満、15 % 未満、10 % 未満、8 % 未満、5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、2 % 未満、1 % 未満、0 . 8 % 未満、0 . 75 % 未満、0 . 5 % 未満、0 . 1 % 未満、0 . 05 % 未満または 0 . 01 % 未満に相当する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止剤の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的なそれぞれの鎖停止剤の濃度の 0 . 01 % ~ 10 % の間である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記大量核酸種に対して特異的な鎖停止剤の濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な鎖停止剤のそれぞれの濃度の 1 % ~ 20 %、または 0 . 1 % ~ 10 %、または、0 . 01 % ~ 5 % の間である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記鎖停止剤が鎖停止ヌクレオチドである、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記鎖停止ヌクレオチドが、独立して ddATP、ddGTP、ddCTP、ddTTP、および ddUTPの中から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

1 つまたは複数の前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドが、1 つの鎖停止ヌクレオチド、2 つの鎖停止ヌクレオチド、または 3 つの鎖停止ヌクレオチドからなる、請求項 11 または請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記鎖停止剤が１つまたは複数の非環式停止剤をさらに含む、請求項１１から１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

１つまたは複数の前記鎖停止剤が質量標識を含み、前記１つまたは複数の少量核酸種が前記質量標識の検出によって同定される、請求項１から１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

前記標識の検出が質量分析による、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

１つまたは複数の鎖停止剤が蛍光標識または色素を含み、前記１つまたは複数の少量核酸種が前記蛍光標識または色素の検出によって同定される、請求項１から１４のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項１８】

前記標識の検出が電気泳動またはリアルタイムＰＣＲによる、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

請求項１から１８のいずれか一項に記載の方法であって、

（１）前記１つまたは複数の少量核酸種の前記伸長産物のそれぞれに対応する検出シグナルと、前記大量核酸種の前記伸長産物に対応する検出シグナルを検出することにより、前記大量核酸種の前記伸長産物に対応する前記検出シグナルに対する、前記１つまたは複数の少量核酸種の前記伸長産物のそれぞれに対応する前記検出シグナルの割合に基づき、前記大量核酸種に対応する伸長産物の量に対する、前記１つまたは複数の少量核酸種のそれぞれに対応する伸長産物の量の比を決定するステップと、

20

（２）（１）で決定した前記比に基づき、かつ、前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度に対する、前記１つまたは複数の少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度に基づき、標準化係数を用いて、前記大量核酸種の量に対する前記少量核酸種の量を定量するステップと

によって前記１つまたは複数の少量核酸種を定量するステップをさらに含む、方法。

【請求項２０】

前記標準化係数が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度と比較した、前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度の比に反比例する、請求項１９に記載の方法。

30

【請求項２１】

前記検出シグナルの検出が質量分析により、前記大量核酸種に対応する伸長産物の量に対する、前記１つまたは複数の少量核酸種のそれぞれに対応する伸長産物の量の前記比が、質量分析によって生成された前記大量核酸種についての前記シグナルに対する、質量分析によって生成された前記少量核酸種についての前記シグナルの比として決定される、請求項１９または請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記少量核酸種の配列が、前記大量核酸種の配列と比較して挿入または欠失を含む、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２３】

40

前記１つまたは複数の少量核酸種が、前記大量核酸種の単一ヌクレオチド多型（ＳＮＰ）変種である、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２４】

前記少量および前記大量核酸種がそれぞれ、同じ遺伝子のバリエーションおよび野生型対立遺伝子であるか、または、前記１つまたは複数の少量核酸種が、野生型の大量核酸種の体細胞変異である、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５】

前記大量核酸種が宿主被験体由来であり、前記少量核酸種が前記宿主以外の被験体由来であるか、または、前記少量核酸種が宿主被験体由来であり、前記大量核酸種が前記宿主以外の被験体由来である、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 26】

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度と、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度の比が、それぞれの少量核酸種が検出可能となるように調整される、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度と、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度の比が、1 : 15 であり、前記少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種の頻度の 10 % 未満の頻度で存在する、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度と、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度の比が、0.2 であり、前記少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種の頻度の約 5 % の頻度で存在し、ここで、「約」は示した値の  $\pm 10\%$  を意味する、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度と、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止剤の濃度の比が、0.05 であり、前記少量核酸種がそれぞれ、前記大量核酸種の頻度の約 5 %、約 2.5 %、または約 1.25 % の頻度で存在し、ここで、「約」は示した値の  $\pm 10\%$  を意味する、請求項から 26 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 30】

標的核酸を分析するためのキットであって、

1 つまたは複数の伸長プライマーと、

前記標的核酸の大量核酸種に対して特異的な鎖停止ヌクレオチドと、

前記標的核酸の少量核酸種に対して特異的な少なくとも 1 つの鎖停止ヌクレオチドと、

請求項 11 から 29 のいずれか一項に記載の方法を実施するための説明書であって、前記鎖停止剤が鎖停止ヌクレオチドである、説明書と、

前記鎖停止ヌクレオチドを溶解させるための説明書であって、前記説明書に従った前記鎖停止ヌクレオチドの溶解時に、前記大量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドの濃度が、前記少量核酸種に対して特異的な前記鎖停止ヌクレオチドの濃度の 0.5 % ~ 20 % 未満の間となる量で前記鎖停止ヌクレオチドが存在する、説明書とを含む、キット。

10

20

30

40

50