

【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2年1月16日(2020.1.16)

【公開番号】特開2019-92509(P2019-92509A)

【公開日】令和1年6月20日(2019.6.20)

【年通号数】公開・登録公報2019-023

【出願番号】特願2018-230605(P2018-230605)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 27/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6853 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 27/00 Z

C 1 2 Q 1/6853 Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/11 Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年11月26日(2019.11.26)

【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】

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法であって、以下の段階を含む方法：

プライマーのセットと該サンプルを接触させる段階であって、該プライマーの少なくとも1つが、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつペイロード分子に特異的に結合することができるコンジュゲーション部位を含むように修飾されている、段階；

該サンプルに対して増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応により生成されるアンプリコンが、該コンジュゲーション部位を含む、段階；

該ペイロード分子を該コンジュゲーション部位に結合させる段階；

ナノ細孔を含むナノ細孔デバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分け、該デバイスは、該ナノ細孔を通してペイロード結合標的ポリヌクレオチドを通過させるように構成され、かつ該センサは、該2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して、電流事象シグネチャを生成するように構成されている、段階；ならびに

該サンプル中の該標的ポリヌクレオチド配列のより深い事象によって、該サンプル中の非結合バックグラウンド分子と識別可能な該ペイロード結合標的ポリヌクレオチドによっ

て生成された該電流事象シグネチャを検出する段階。

【請求項 2】

前記サンプルが、前記増幅前に前記デバイスに投入される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルが、前記増幅後に前記デバイスに投入される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記ペイロード分子が、前記増幅後に前記アンプリコンのコンジュゲーション部位に結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

前記ペイロード分子が、前記増幅前に前記プライマーのコンジュゲーション部位に結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが、前記増幅とナノ細孔内での前記検出との間に精製ステップを経ない、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

前記サンプルが、少なくとも1:20000、1:10000、1:5000、1:2000、1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50、1:20、1:10、1:5、1:2、1:1.5、1:1.2、1:1.1または1:1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプルが希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記サンプルが、非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記ナノ細孔の直径が少なくとも5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、または組換えポリメラーゼ増幅からなる群より選択される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

前記増幅反応が前記デバイスの内部空間で行われる、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

標的ポリヌクレオチドが、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または二本鎖リボ核酸(dsRNA)を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

標的ポリヌクレオチドが天然に存在するポリヌクレオチドである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

標的ポリヌクレオチドが人工的に合成されたポリヌクレオチドである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

標的ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

前記ペイロード分子が、デンドリマー、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアダプター、フルオロフォア、タンパク質、抗体、ポリペプチド、ナノビーズ、ナノロッド、ナノチューブ、ナノ粒子、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドからなる群より選択される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

前記ペイロード分子が電荷を含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

前記荷電したペイロード分子が、ペプチド、アミノ酸、荷電ナノ粒子、合成分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、金属、またはイオンからなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分けるナノ細孔を流れる電流を測定して、電流事象シグネチャを生成するように構成された電極対を、前記センサが含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

前記コンジュゲーション部位とペイロード分子が共有結合を介して結合される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

前記共有結合がクリックケミストリーによって形成される、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記クリックケミストリーが銅触媒による、請求項22記載の方法。

【請求項24】

前記クリックケミストリーが銅フリーである、請求項22記載の方法。

【請求項25】

前記コンジュゲーション部位とペイロード分子が非共有結合を介して結合される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

前記非共有結合が、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、極性結合、カチオン- 相互作用、平面スタッキング相互作用、または金属結合である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

前記コンジュゲーション部位が前記プライマーの3'末端または5'末端に位置する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

前記コンジュゲーション部位が前記アンプリコンの3'末端または5'末端に位置する、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

前記コンジュゲーション部位が、化学基、反応基、小分子、またはペプチドを含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

前記小分子がビオチンを含む、請求項29記載の方法。

【請求項31】

前記反応基がジベンゾシクロオクチル(DBCO)またはアジドを含む、請求項29記載の方法。

【請求項32】

2つ以上のペイロード分子が前記アンプリコンに結合される、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

前記デバイスが少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記ペイロード分子に結合した前記アンプリコンが、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する

、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

サンプル中に存在すると予想される標的ポリヌクレオチド配列の存在または非存在を検出するための方法であって、以下の段階を含む方法：

プライマーのセットと該サンプルを接触させる段階であって、該プライマーの少なくとも1つが、該標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつペイロード分子に結合される、段階；

該サンプルに対して増幅反応を実施する段階であって、該増幅反応により生成される該標的ポリヌクレオチド配列を含むアンプリコンが、該ペイロード分子に結合する、段階；

ナノ細孔を含むナノ細孔デバイスに該サンプルを投入する段階であって、該ナノ細孔が該デバイスの内部空間を2つの容積に分け、かつ該デバイスが、該ナノ細孔を通してペイロード結合標的ポリヌクレオチドを通過させるように構成され、該デバイスが、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された電極対を有するセンサを備え、かつ該センサが、該2つの容積の間に電圧差を印加し、かつ該2つの容積を分ける該ナノ細孔を流れる電流を測定して、電流事象シグネチャを生成するようにさらに構成されている、段階；ならびに

該サンプル中の該標的ポリヌクレオチド配列の検出のより深い事象によって、該サンプル中の非結合バックグラウンド分子と識別可能な該ペイロード結合標的ポリヌクレオチドによって生成された該電流事象シグネチャを検出する段階。

【請求項35】

前記サンプルが、前記増幅前に前記デバイスに投入される、請求項34記載の方法。

【請求項36】

前記サンプルが、前記増幅後に前記デバイスに投入される、請求項34記載の方法。

【請求項37】

前記サンプルが、前記増幅とナノ細孔内での前記検出との間に精製ステップを経ない、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

前記サンプルが、1：10000、1：1000、1：500、1：200、1：100、1：50、1：20、1：10、1：5、1：2、1：1.5、1：1.2、1：1.1または1：1.05の希釈率で前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

前記サンプルが希釈せずに前記ナノ細孔デバイスに投入される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項40】

前記サンプルが非標的ポリヌクレオチドおよび増幅反応試薬を含む、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

前記ナノ細孔の直径が少なくとも5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、または50nmである、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

前記増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写PCR、ライゲーション媒介PCR、ループ介在増幅(LAMP)、等温増幅、鎖置換増幅(SDA)、多重置換増幅、鎖置換増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、ニッキング酵素増幅反応、または組換えポリメラーゼ増幅からなる群より選択される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

前記増幅反応が前記デバイスの内部空間で行われる、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

標的ポリヌクレオチドが、二本鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)、一本鎖DNA(ssDNA)、ペプチド核酸(PNA)、一本鎖リボ核酸(ssRNA)、DNA/RNAハイブリッド、または二本鎖リボ核酸(

dsRNA)を含む、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項45】

標的ポリヌクレオチドが天然に存在するポリヌクレオチドである、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

標的ポリヌクレオチドが人工的に合成されたポリヌクレオチドである、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項47】

標的ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項48】

ペイロード分子が、 dendrimer、二本鎖DNA、一本鎖DNA、DNAアプタマー、フルオロフォア、タンパク質、抗体、ポリペプチド、ナノビーズ、ナノロッド、ナノチューブ、ナノ粒子、フラーレン、PEG分子、リボソーム、またはコレステロール-DNAハイブリッドからなる群より選択される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項49】

ペイロード分子がイオン電荷を含む、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項50】

荷電したペイロード分子が、ペプチド、アミノ酸、荷電ナノ粒子、合成分子、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、金属、またはイオンからなる群より選択される、請求項49記載の方法。

【請求項51】

標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度が、該標的ポリヌクレオチドを荷電ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する、請求項49記載の方法。

【請求項52】

標的ポリヌクレオチドの存在または非存在の検出の感度または特異度が、該標的ポリヌクレオチドを前記ペイロード分子に結合させた場合に、未結合の標的ポリヌクレオチドと比較して増加する、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項53】

ペイロードに結合した標的ポリヌクレオチドがナノ細孔を通過するときに生成される電流事象シグネチャが、その平均深度、最大深度、持続時間、深度レベル数、深度面積と持続時間、またはノイズレベルによって、バックグラウンド分子の電流事象シグネチャから識別可能である、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項54】

前記プライマーとペイロード分子が共有結合を介して結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項55】

前記プライマーとペイロード分子が非共有結合を介して結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項56】

ペイロード分子が前記プライマーの3'末端または5'末端に結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項57】

2つ以上のペイロード分子が前記プライマーに結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項58】

前記アンプリコンとペイロード分子が共有結合を介して結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項59】

前記アンプリコンとペイロード分子が非共有結合を介して結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項60】

2つ以上のペイロード分子が前記アンプリコンに結合される、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項61】

前記デバイスが少なくとも2つのナノ細孔を直列に含み、かつ、前記ペイロード分子に結合した前記アンプリコンが、移動中に該少なくとも2つのナノ細孔内に同時に存在する、請求項34～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項62】

デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；

プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつプライマーの少なくとも1つが、ペイロード分子に特異的に結合することができるコンジュゲーション部位を含むように修飾されている、プライマーセット；

増幅前、増幅中または増幅後に該コンジュゲーション部位に結合させるためのペイロード分子；

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書を含むキット。

【請求項63】

デバイスの内部空間を2つの容積に分けるナノ細孔を含み、かつ1つ以上の細孔を通して核酸を通過させるように構成されるデバイスであって、該ナノ細孔を通過する物体を識別するように構成された各細孔のためのセンサを備える、デバイス；

プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能であり、かつプライマーの少なくとも1つがペイロード分子に結合される、プライマーセット；

サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または非存在を検出するための使用のための使用説明書を含むキット。