

【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10月26日(2017.10.26)

【公表番号】特表2016-539639(P2016-539639A)

【公表日】平成28年12月22日(2016.12.22)

【年通号数】公開・登録公報2016-069

【出願番号】特願2016-531034(P2016-531034)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/115 (2010.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 N 15/00 H

【手続補正書】

【提出日】平成29年9月12日(2017.9.12)

【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】

少なくとも1つの核酸分子NA1と少なくとも1つの核酸分子NA2を含むキットオブパーツであって：

a) 第一の核酸分子NA1が、NS1 - NSK1 - NS2のヌクレオチド酸配列を含み、ここで

- NS1及びNS2が、少なくとも1ヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドからなり、そしてNS1及びNS2が相補的配列を有し；

- NSK1が、少なくとも2個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し、

b) 第二の核酸分子NA2が、NS3 - NSK2 - NS4のヌクレオチド配列を含み、ここで：

- NS3及びNS4が、少なくとも1ヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドからなり、そしてNS3及びNS4が相補的配列を有し；

- NSK2が、少なくとも2個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し

c) 核酸分子NA1及びNA2が共に、適切な条件で、配列NSK1及びNSK2をそれぞれ含む少なくとも1つのヘアピンループを形成することができ；そして

d) 核酸分子NA1及びNA2が、配列NSK1及びNSK2をそれぞれ含むヘアピンループ間のキッキング複合体の形成によって二本鎖を形成することができ；そして

e) 少なくとも1つの核酸分子NA1又はNA2がターゲット分子に対して特異性及び親和性を示すアダプターである、キットオブパーツ。

【請求項2】

- ヘアピン構造中に折り畳まれた第一の核酸分子NA1を含み、ここで、NSK1が、ヘアピン構造中に折り畳まれた第二の核酸分子NA2のループ中に存在する第二の核酸配列NSK2と相互作用することができる配列ループによって表される、又は、

- NKS1が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有する、又は、

- NKS2が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有する、又は、

- 第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、YRYR、RYRY、YYRY、RYRR、YYR、YRY、RYR、YRRY、YRRR、RYYY、RRYR、RRYY、RRRR、RRRY、YYYY、Y Y R Rからなる群より選択される配列を有する)、及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、NKS1とキッキング複合体を形成することができる)を含む、又は、

- 第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、K_nによって表される)及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、K_n'によって表される)を含み、ここで、K_n及びK_n'が表Bに記述されるように選択され、そしてK_n及びK_n'が同一であるか又は異なる、又は、

- 第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、K_nによって表される)及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、K_n'によって表される)を含み、ここで、K_n及びK_n'が表C1に記述されるように選択され、そしてK_n及びK_n'が同一であるか又は異なる、又は、

- 第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、CCNYからなる核酸配列を含む)及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、RNGGからなる核酸配列を含む)を含む、又は、

- 第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、NCCNYNからなる核酸配列を含む)及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、NRNGGNからなる核酸配列を含む)を含む、又は、

- 第一の核酸分子NA1(ここで、NSK1は、NCCNYNからなる核酸配列を含む)及び第二の核酸分子NA2(ここで、NKS2は、NRNGGNからなる核酸配列を含む)を含み、ここで配列NCCNYN及び配列NRNGGNが、それぞれ、表C2に記述されるように選択される、

請求項1に記載のキットオブパーツ。

【請求項3】

- NS1、NS2、NS3又はNS4が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のヌクレオチドを含む、又は、

- NS1がUGCUCGによって表され、そしてNS2がCGAGCAによって表される、又は、

- NS3がACGAGCによって表され、そしてNS4がGUCGUによって表される、

請求項1又は2に記載のキットオブパーツ。

【請求項4】

- ACGAGCUGGGGCGCUCGU(KG51)によって示される核酸配列を含む第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA(KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列を含む第二の核酸分子を含む、又は、

- TGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAによって示される核酸配列を含む第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA(KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列を含む第二の核酸分子を含む、又は、

- TTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAAによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA(KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む、又は、

- GTTGGGGGACUGGGGCGGGAGGAAACによって示される核酸配列からなる第一の核酸分子及びUGCUCGGCCCCGCGAGCA(KC24-Aptakiss)によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む、又は、

- UCCGAAGUGGUUGGGCUGGGGCGUGUGAACAACGGAによ

て示される核酸配列からなる第一の核酸分子及び U G C U C G G C C C C G C G A G C A
(KC24-Aptakiss) によって示される核酸配列からなる第二の核酸分子を含む、
請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 5】

- アプタマーが、有機小分子、特に少なくとも 1 つの芳香族環基を含有する有機小分子に特異的であり、該アプタマーは、特に、前記ターゲット分子に対して産生された以前から公知のアプタマーに由来し、及び / 又は、

- ターゲット分子に特異的なアプタマーである核酸分子が、それがターゲット分子に結合する場合にのみ、キットオブパーツの他の核酸分子との複合体を形成することができ、該アプタマーは、特に、前記ターゲット分子に対して産生された以前から公知のアプタマーに由来する、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のキットオブパーツ。

【請求項 6】

- 少なくとも 1 つの核酸分子 N A 1 又は N A 2 が標識され、ここで、標識が、視覚的、光学的、フォトニック、電子的、音響的、光音響的、質量により、電気化学的、電気光学的、分光法、酵素的、又はそうでなければ化学的、生化学的若しくは物理的に検出可能である標識からなる群より選択される、又は

- マイクロアレイを形成するために固体支持体中に固定化された少なくとも 1 つの核酸分子 N A 1 又は N A 2 を含む、

請求項 1 に記載のキットオブパーツ。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの可変領域によってフランキングされたキッシング複合体を形成することができる配列 N A 1 又は N A 2 を含む内部領域を有する核酸分子からなるコンビナトリアルランダムライブラリーであって、

該コンビナトリアルランダムライブラリーは、特に、

(i) 一般式：

- 5 ' - P 1 - V - N S K n - P 2 - 3 ' 又は 5 ' - P 1 - N S K n - V - P 2 - 3 ' (式中、P 1 及び P 2 は、プライマー領域を表し、V は、少なくとも 2 つのヌクレオチドの可変領域を表し、N S K n は、核酸配列 N S K 1 又は N S K 2 を表す)、又は、

- 5 ' - P 1 - V 1 - N S K n - V 2 - P 2 - 3 ' (式中、P 1 及び P 2 は、プライマー領域を表し、V 1 及び V 2 は、少なくとも 2 つのヌクレオチドの可変領域を表し、N S K n は、核酸配列 N S K 1 又は N S K 2 を表す)、又は、

- 5 ' - P 1 - X n - V 1 - N S K n - V 2 - Y n - P 2 (式中、P 1 及び P 2 は、プライマー領域を表し、V 1 及び V 2 は、少なくとも 2 つのヌクレオチドの可変領域を表し、X n 及び Y n は、1、2、3 個またはそれ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表し、かつ X n 及び Y n はハイブリダイズすることができ、そして N S K n は、核酸配列 N S K 1 又は N S K 2 を表す) ;

を有する複数の核酸分子を含み、

N S K n が、少なくとも 2 個のヌクレオチドのヌクレオチド酸配列を有し、

核酸分子が、適切な条件下で、N S K n 配列を含む少なくとも 1 つのヘアピンループを形成することができ、かつキッシング複合体を形成することができ ; そして

N S K n 配列が別のヘアピンループとキッシング複合体を形成することができる、及び / 又は、

(i i) 可変領域が、2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 1 0 ; 1 1 ; 1 2 ; 1 3 ; 1 4 ; 1 5 ; 1 6 ; 1 7 ; 1 8 ; 1 9 ; 2 0 ; 2 1 ; 2 2 ; 2 3 ; 2 4 ; 2 5 ; 2 6 ; 2 7 ; 2 8 ; 2 9 ; 3 0 個またはそれ以上のヌクレオチドを含む、及び / 又は

(i i i) 可変領域が同じ長さを有するか又は有さない、及び / 又は

- N S K n が、Y R Y R、R Y R Y、Y Y R Y、R Y R R、Y Y Y R、Y R Y Y、R Y Y R、Y R R Y、Y R R R、R Y Y Y、R R Y R、R R Y Y、R R R R、R R R Y、Y Y Y Y、Y Y R R からなる群より選択される配列を有する、及び / 又は、

(i v) N S K 1 又は N S K 2 が、表 B 又は表 C 1 に記述されるように選択される K n 又は K n ' によって表される、及び / 又は、

(v) N S K 1 が C C N Y からなる核酸配列を含むか、又は N K S 2 が R N G G からなる核酸配列を含む、及び / 又は、

(v i) N S K 1 が N C C N Y N からなる核酸配列を含むか、又は N K S 2 が N R N G G N からなる核酸配列を含む、及び / 又は、

(v i i) N S K 1 が N C C N Y N からなる核酸配列を含むか、又は N K S 2 が N R N G G N からなる核酸配列を含み、ここで、配列 N C C N Y N 及び配列 N R N G G N が、それぞれ、表 C 2 に記述されるように選択される、及び / 又は、

(v i i i) 可変領域 V 1 及び V 2 が、5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 1 0 ; 1 1 ; 1 2 ; 1 3 ; 1 4 ; 1 5 ; 1 6 ; 1 7 ; 1 8 ; 1 9 ; 2 0 ; 2 1 ; 2 2 ; 2 3 ; 2 4 ; 2 5 ; 2 6 ; 2 7 ; 2 8 ; 2 9 ; 又は 3 0 個のヌクレオチドを含む、及び / 又は、

(i x) X n が、1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 1 0 ; 1 1 ; 1 2 ; 1 3 ; 1 4 ; 1 5 ; 1 6 ; 1 7 ; 1 8 ; 1 9 ; 2 0 ; 2 1 ; 2 2 ; 2 3 ; 2 4 ; 2 5 ; 2 6 ; 2 7 ; 2 8 ; 2 9 ; 又は 3 0 個のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す、及び / 又は、

(x) Y n が、1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 1 0 ; 1 1 ; 1 2 ; 1 3 ; 1 4 ; 1 5 ; 1 6 ; 1 7 ; 1 8 ; 1 9 ; 2 0 ; 2 1 ; 2 2 ; 2 3 ; 2 4 ; 2 5 ; 2 6 ; 2 7 ; 2 8 ; 2 9 ; 又は 3 0 個のヌクレオチドのヌクレオチド配列を表す、

コンビナトリアルランダムライブラリー。

【請求項 8】

以下の工程：

i) ターゲット分子を請求項 7 に記載のコンビナトリアルランダムライブラリーと接触させる工程；

i i) 工程 i) の混合物を、対応する配列 N S K 1 又は N S K 2 配列を含む核酸と接触させる工程；

i i i) ターゲット分子に親和性を有する核酸をライブラリーの残りから分割する工程であって、配列 N S K 1 及び N S K 2 をそれぞれ含む 2 つの核酸間で形成された二本鎖の形成の検出がターゲット分子に親和性を有する核酸の存在を示す工程

を含む、ターゲット分子に指向するアプタマーを同定するための方法。

【請求項 9】

- ターゲット分子が固体支持体上に固定化されず、流体サンプル中に可溶化される、及び / 又は、

ターゲット分子に親和性を有する核酸の候補濃縮混合物を生成するための親和性を有する核酸を増幅する工程、場合により、ターゲット分子に最も強い親和性を有するアプタマーを選択するための工程 i) ~ i i i) を何回も繰り返す工程並びに最も強い親和性を有するアプタマーを配列決定及び生成する工程をさらに含む、又は、

- 対応する核酸分子が固体支持体上に固定化される、

請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

- ターゲット分子ではなく固定化されたヘアピンとキッキング複合体を形成し得る非特異的候補を取り除くための、ターゲット分子の非存在下での、固定化されたヘアピン及び支持体に対するライブラリーの対抗選択からなる工程をさらに含む、及び / 又は、

- 陽性候補を溶離する工程をさらに含む、及び / 又は、

- ライブラリー及びターゲット分子を、一緒に、ターゲット分子とライブラリーのメンバーとの相互作用を可能にするのに十分な時間、とりわけライブラリーのメンバーのターゲット分子との立体構造再配列を可能にするであろう十分な時間インキュベートする、及び / 又は、

- ターゲット分子が有機小分子、特に、少なくとも 1 つの芳香族環基を含有する有機小分子である、

請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

サンプル中の少なくとも1つのターゲット分子を検出するための方法であって、i) ターゲット分子に特異的であるアプタマーである核酸分子NA1又はNA2を含む請求項1~6のいずれか一項に記載のキットパーツを提供する工程(ここで、前記アプタマーは、それがターゲット分子に結合する場合にのみ、キットパーツの他の核酸分子との複合体を形成することができる); ii) サンプルをキットパーツの核酸分子と接触させる工程、及びiii) 2つの核酸NA1とNA2との間に形成される二本鎖の形成を検出する工程からなる工程を含む方法。

【請求項 1 2】

- 工程i)が、ターゲット分子に特異的なアプタマーを各々含む複数のキットパーツを提供し、それによってサンプル中の複数のターゲット分子の存在又は非存在を検出する工程を含む、及び/又は、

- ターゲット分子が有機小分子である、及び/又は、

- サンプルが、個体から単離された生物学的物質、例えば、生物学的組織及び流体(血液、皮膚、血漿、血清、リンパ液、尿、脳脊髄液、涙液、スミア、水のサンプル、特に飲料水、地下水、表流水又は廃水サンプル、環境由来物質から調製されたサンプル、臨床検体又は食品サンプルを含む)からなる群より選択される、及び/又は、

- サンプルがかなりの量のマグネシウムを含む、及び/又は、

- 検出が、液相中、多数の標準的な技術(限定されないが、クロマトグラフィー、電気泳動又は濾過を含む)のいずれかによって実行される、及び/又は、

- ターゲット分子に特異的なアプタマーではない核酸分子が上述した固体支持体上に固定化され、そして、アプタマーではない核酸分子がターゲット分子に特異的なアプタマーである核酸分子に結合することができるバイオセンサー素子として使用される、

請求項11に記載の方法。

【請求項 1 3】

以下の工程:

i) ターゲット分子を、請求項7に記載のコンビナトリアルランダムライブラリーと接触させる工程;

ii) 工程i)の混合物を、対応する配列NSK1又はNSK2配列を含む核酸と接触させる工程

iii) ターゲット分子に親和性を有する核酸をライブラリーの残りから分割する工程であって、配列NSK1及びNKS2をそれぞれ含む2つの核酸間で形成された二本鎖の形成の検出がターゲット分子に親和性を有する核酸の存在を示す工程

を含む、ターゲット分子に指向するアプタマーを同定するための方法であって;

該方法は、場合により、ターゲット分子に親和性を有する核酸の候補濃縮混合物を生成するための親和性を有する核酸を増幅する工程、場合により、ターゲット分子に最も強い親和性を有するアプタマーを選択するための工程i)~iii)を何回も繰り返す工程並びに最も強い親和性を有するアプタマーを配列決定及び生成する工程をさらに含む、
方法。

【請求項 1 4】

- 対応する核酸分子が上述した固体支持体上に固定化される、及び/又は、

- 非特異的候補及びターゲット分子ではなく固定化されたヘアピンとキッキング複合体を形成し得る候補を取り除くための、ターゲット分子の非存在下での、固定化されたヘアピン及び支持体に対するライブラリーの対抗選択からなる工程をさらに含む、及び/又は

- 陽性候補を溶離する工程をさらに含む、

請求項13に記載の方法。

【請求項 1 5】

ACGAGCUGGGGCGCUCGU、UGCUCGGCCCGCGAGCA、TGGGGGACUGGGGCGGGAGGA、TTGGGGGACUGGGGCGGG

A G G A A A、G T T G G G G G A C U G G G G C G G G A G G A A A C、U C C G A A
G U G G U U G G G C U G G G G C G U G U G A A A A C G G A、U G C U C G G C C G
C G C G A G C A 及び T G G G G G A C U G C G G C G G G A G G A A からなる群より選
択される配列を含むか又は前記配列からなる、核酸分子。