

【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5月18日 (2017.5.18)

【公表番号】特表2016-521548(P2016-521548A)

【公表日】平成28年7月25日 (2016.7.25)

【年通号数】公開・登録公報2016-044

【出願番号】特願2016-515077(P2016-515077)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 N 9/10

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月31日 (2017.3.31)

【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】

テロメア反復配列及び染色体のサブテロメア配列を増幅する方法であって、前記方法は
:

a) 以下によって核酸伸長産物を作製すること:

i) 二本鎖染色体 DNA の 3' オーバーハングにおけるテロメア反復配列に伸長プライマーをハイブリダイズすることであって:

(1) 二本鎖染色体 DNA は、テロメア反復配列を含むテロメア領域及びサブテロメア配列を含むサブテロメア領域を有し; 及び

(2) 伸長プライマーは:

(A) アニーリング条件下で 3' オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする 3' 部分及び

(B) アニーリング条件下で 3' オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズしないアンカー配列を有する 5' 部分を含む、前記ハイブリダイズすること; 及び

ii) 時間が限られた伸長反応を行って二本鎖染色体 DNA のサブテロメア領域の方へ伸長プライマーを伸張することであって、伸長反応は、予め定められた長さの範囲内でテロメア領域を有する二本鎖染色体 DNA のみからのテロメア反復配列及びサブテロメア配列の両方を含む伸長産物を産生するように調節される、前記伸長すること; 及び

b) 伸長産物の配列を増幅すること、
を含み; これによりテロメア反復配列及びサブテロメア配列を有する核酸を含む長さの限られた増幅産物を産生する、前記方法。

【請求項 2】

配列は:

(1) アニーリング条件下で伸長産物におけるサブテロメア領域に独特の配列にハイブリダイズする第1の増幅プライマー；及び

(2) アニーリング条件下でアンカー配列にハイブリダイズする第2の増幅プライマー、
を使用して増幅される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

第1の増幅プライマーは、配列5' - G A T G G A T C C T G A G G G T G A G G G T G A G G G - 3' [配列番号：2]、5' - C G G G C C G G C T G A G G G T A C C G C G A - 3' [配列番号：10] (染色体1)、5' - G C T A A T G C A C T C C C T C A A T A C - 3' [配列番号：11] (染色体5) または 5' - C A T T C C T A A T G C A C A C A T G A T A C C - 3' [配列番号：12] (染色体9) を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

第1の増幅プライマーは、配列5' - G A T G G A T C C T G A G G G T G A G G G T G A G G G - 3' [配列番号：2] を含む、及び第2のプライマーは、配列5' - T G C T C G G C C G A T C T G G C A T C - 3' [配列番号：8] を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

増幅されたテロメア産物の長さ範囲は、PCR反応において時間が限られた伸長時間を使用して決定することができる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

対照配列を同時増幅することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

対照配列は、複数の非テロメア反復配列を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

短いテロメアの存在量を決定するための方法であって：

a) 被験体から3' オーバーハングを含む二本鎖染色体DNAを含む試料を得ること；
b) 請求項1の方法を使用して二本鎖染色体DNAから長さの限られた増幅産物を産生すること；及び

c) 長さの限られた増幅された産物から短いテロメアの存在量を決定すること、
を含む前記方法。

【請求項9】

d) 試料からの総テロメアの存在量の測定と短いテロメアの存在量を比較することをさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

工程d) は、総テロメアの存在量の関数として短いテロメアの存在量を決定することを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

短いテロメアの存在量を決定することは、qPCRを使用して行われる、請求項8に記載の方法。

【請求項12】

qPCRは、第1及び第2のプライマーを使用して行われ、

i) 前記第1のプライマーは、第1の鎖の少なくとも1つの反復単位にハイブリダイズし、及び前記第2のプライマーは、第2の鎖の少なくとも1つの反復単位にハイブリダイズし、

ii) 前記ハイブリダイズしたプライマーは、これらのそれぞれの鎖にハイブリダイズしたときに、プライマー伸長ができる、及び前記第1のプライマーの少なくとも1つのヌクレオチドは、前記第1のプライマーが前記第1の鎖の少なくとも1つの反復単位にハイブリダイズしたときに、前記第1のプライマーと前記反復単位のヌクレオチドとの間に内部塩基対ミスマッチを生じ、

i i i) 前記第 1 のプライマーは、また第 1 及び第 2 のプライマーが互いにハイブリダイズするときに、前記第 2 のプライマーの 3' 末端ヌクレオチドとミスマッチを生じ、

i v) 前記第 2 のプライマーの少なくとも 1 つのヌクレオチドは、前記第 2 のプライマーが前記第 2 の鎖の少なくとも 1 つの反復単位にハイブリダイズしたときに、前記第 2 のプライマーと前記反復単位のヌクレオチドとの間の内部塩基対ミスマッチを生じる、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

短いテロメアの存在量を決定することは、サザンブロット、ドットブロット法、スロットブロット、免疫化学、核酸シーケンシング、またはデジタル PCR によって試料における平均テロメア長を測定することを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

短いテロメアの存在量は、存在量比の測定である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 5】

総テロメアの存在量は、ゲノム参照配列の存在量に相対的に測定される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 6】

ゲノム参照配列は、単一コピー参照核酸配列または非テロメア反復 DNA 配列を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

単一のコピー参照核酸配列は、ヒト グロビンである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

非テロメア反復 DNA 配列は、A l u 反復配列または動原体性反復配列である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

a) 被験体から試料を得ること；

b) 請求項 8 ~ 9 および 1 0 ~ 1 6 に記載のいずれかの方法を使用して短いテロメアの存在量を決定すること；及び

c) 短いテロメアの存在量を状態または疾患と関連づけること、を含む、方法。

【請求項 2 0】

短いテロメアの存在量の測定は、試料からの総テロメアの存在量と短いテロメアの存在量を比較して決定される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

症状または疾患は、死亡リスクである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

テロメアの存在量は、絶対存在量である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

絶対存在量は、テロメア配列の長さとして測定される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

症状または疾患は、疾患のリスクである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

疾患のリスクは、年齢に関連した疾患である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

年齢に関連した疾患は、心臓血管疾患であり；及び集団における平均より低い測定は、心臓血管疾患のリスクの増加を関連づけられる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

関連に基づいた診断または予後を被験体に提供することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 8】

関連に基づいた被験体を治療することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 29】

a) 被験体から複数の試料を得ることであって；試料は、期間にわたって採取され；及びそれぞれの試料は、異なる時に得られる、前記得ること；

b) 請求項 8 ~ 9 および 10 ~ 16 に記載のいずれかの方法を使用してそれぞれの複数の試料における短いテロメアの存在量を決定すること；

c) 短いテロメアの存在量の測定における増減率を決定すること；及び

d) (1) 健康の測定；(2) 病態のリスク；(3) テロメア疾患または(4) 薬物応答性と増減率を関連づけること、を含む、方法。

【請求項 30】

短いテロメアの存在量は、短いテロメアの存在量を試料からの総テロメアの存在量と比較することによって決定される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

(1) (A) アニーリング条件下で二本鎖染色体 DNA の 3' オーバーハングにおけるテロメア反復配列にハイブリダイズする 3' 部分、及び

(B) 染色体 DNA におけるテロメア領域における配列に、またはサブテロメア領域における配列にアニーリング条件下でハイブリダイズしないアンカー配列を有する 5' 部分、

を含む第 1 の増幅プライマー；及び

(2) アニーリング条件下でサブテロメア配列にハイブリダイズする第 2 の増幅プライマー、を含む、キット。

【請求項 32】

(3) アニーリング条件下でアンカー配列の相補物にハイブリダイズする第 3 の増幅プライマー、をさらに含む、請求項 31 に記載のキット。

【請求項 33】

(3) 短いテロメアの測定のハイブリダイゼーション、伸長、増幅及び定量化工程を実施する試薬、

をさらに含む、請求項 31 に記載のキット。

【請求項 34】

(3) 公知のテロメア長をもつ染色体 DNA を含む対照試料及び参照試料、をさらに含む、請求項 31 に記載のキット。