

【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28年3月31日(2016.3.31)

【公表番号】特表2015-507931(P2015-507931A)  
 【公表日】平成27年3月16日(2015.3.16)  
 【年通号数】公開・登録公報2015-017  
 【出願番号】特願2014-557780(P2014-557780)  
 【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 Q 1/44 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/44

【手続補正書】

【提出日】平成28年2月9日(2016.2.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

別の態様では、(a)その5'末端に単一のリボヌクレオチドを含み、その3'末端にブロック修飾を含み、それによりDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないフラップを有するブロック型プライマー；(b)耐熱性RNase H酵素；および(c)耐熱性ヘリカーゼ依存的増幅試薬を含有する組成物が開示される。

本発明の実施形態として、例えば以下を挙げることができる。

(1) 以下のステップ：

(a) 標的配列をブロック型プライマーと混合するステップであって、該ブロック型プライマーは、その5'末端に単一のリボヌクレオチドおよびその3'末端にブロック修飾を含むフラップを含み、それによりDNAポリメラーゼによる伸長が起こらない、上記ステップ；

(b) ステップ(a)の混合物を耐熱性RNase H酵素および耐熱性ヘリカーゼ依存的増幅試薬と接触させるステップ；

(c) ステップ(b)の混合物を加熱するステップであって、ここで、RNase H酵素がブロック型プライマーからフラップを除去することにより非ブロック型プライマーを生じ、ヘリカーゼ依存的増幅試薬が非ブロック型プライマーを伸長して二本鎖アンプリコンを生成し、これが、ブロック型プライマーにハイブリダイズすることができる一本鎖核酸アンプリコンへと変性されるステップを含む、等温核酸配列増幅法。

(2) RNase H酵素がRNase H1である、(1)に記載の方法。

(3) RNase H酵素がRNase H2である、(1)に記載の方法。

(4) RNase H酵素が1mU/μL以上の濃度で存在する、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) RNase H酵素が3mU/μL以上の濃度で存在する、(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(6) ブロック型プライマーが、以下の式：5'-dNa-Nb-dNc-X-3'

[式中、

aは11以上の整数であり；

bは1の整数であり；

cは1以上の整数であり；

dNはデオキシリボヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログであり；

Nは非修飾リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドであり；

Xは、それによりDNAポリメラーゼによる伸長が起こらない、デオキシヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、または非ヌクレオチド修飾である]

のものである、(1)～(5)のいずれかに記載の方法。

(7) プライマーフラップがプライマーの融解温度を2 超高める、(6)に記載の方法。

(8) プライマーフラップが、少なくとも3塩基対からなり、少なくとも1個のシトシンまたはグアノシン塩基を含有する、(6)または(7)に記載の方法。

(9) プライマーフラップが、シトシンまたはグアノシン塩基を有さず、少なくとも4塩基対からなる、(6)または(7)に記載の方法。

(10) プライマーフラップが、シトシンまたはグアノシンを有さず、修飾塩基および副溝結合剤から選択される少なくとも2個の塩基からなる、(6)または(7)に記載の方法。

(11) プライマーフラップが、70 でインキュベートされる約10mU/μLのRNase H2、約200nMの標的配列、および約400nMのブロック型プライマーを含有する切断アッセイを用いて、約15分以内に除去される、(1)～(10)のいずれかに記載の方法。

(12) アンプリコンが約60分間未満で検出可能である、(1)～(11)のいずれかに記載の方法。

(13) アンプリコンが約30分間未満で検出可能である、(1)～(12)のいずれかに記載の方法。

(14) HDA増幅試薬が、バッファー、DNAポリメラーゼ、ヘリカーゼ、一本鎖結合性タンパク質およびデオキシヌクレオチド三リン酸からなる群のうちの1以上から選択される、(1)～(13)のいずれかに記載の方法。

(15) HDA増幅試薬が、バッファー、DNAポリメラーゼ、一本鎖結合性タンパク質およびデオキシヌクレオチド三リン酸からなる群のうちの1以上から選択される、(1)～(14)のいずれかに記載の方法。

#### **【手続補正2】**

**【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】**

以下のステップ：

(a) 標的配列を5'末端に単一のリボヌクレオチドおよび3'末端にブロック修飾を含むフラップを含むブロック型プライマーと混合するステップ；

(b) ステップ(a)の混合物を耐熱性RNase H酵素ならびにバッファー、DNAポリメラーゼ、ヘリカーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸を含む耐熱性ヘリカーゼ依存的増幅試薬と接触させるステップ；

(c) ステップ(b)の混合物を加熱するステップを含む、等温核酸配列増幅法。

**【請求項2】**

以下のもの：

5'末端に単一のリボヌクレオチドおよび3'末端にブロック修飾を含むフラップを含むブロック型プライマー；

耐熱性RNase H酵素；ならびに

バッファー、DNAポリメラーゼ、ヘリカーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸を含む耐熱性ヘリカーゼ依存的増幅試薬を含む、診断検査用システム。

## 【請求項 3】

RNase H酵素がRNase H1である、請求項1に記載の方法または請求項2に記載のシステム。

## 【請求項 4】

RNase H酵素がRNase H2である、請求項1に記載の方法または請求項2に記載のシステム。

## 【請求項 5】

RNase H酵素が1mU/  $\mu$ L以上の濃度で存在する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 6】

RNase H酵素が3mU/  $\mu$ L以上の濃度で存在する、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 7】

ブロック型プライマーが、以下の式： $5'-dNa-Nb-dNc-X-3'$

[式中、

aは11以上の整数であり；

bは1の整数であり；

cは1以上の整数であり；

dNはデオキシリボヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログであり；

Nは非修飾リボヌクレオチドまたは修飾リボヌクレオチドであり；

Xは、それによりDNAポリメラーゼによる伸長が起こらない、デオキシヌクレオチド、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、または非ヌクレオチド修飾である]

のものである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 8】

プライマーフラップがプライマーの融解温度を2 超高める、請求項7に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 9】

プライマーフラップが、少なくとも3塩基対からなり、少なくとも1個のシトシンまたはグアノシン塩基を含有する、請求項7または8に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 10】

プライマーフラップが、シトシンまたはグアノシン塩基を有さず、少なくとも4塩基対からなる、請求項7または8に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 11】

プライマーフラップが、シトシンまたはグアノシンを有さず、修飾塩基および副溝結合剤から選択される少なくとも2個の塩基からなる、請求項7または8に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 12】

プライマーフラップが、約70 でインキュベートされる約10mU/  $\mu$ LのRNase H2、約200nMの標的配列、および約400nMのブロック型プライマーを含有する切断アッセイを用いて、約15分以内に除去される、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法またはシステム。

## 【請求項 13】

ブロック型プライマーが、耐熱性ヘリカーゼ依存的増幅試薬に添加される場合、50nM超の濃度で存在する、請求項1および3～12のいずれか1項に記載の方法または請求項2～12のいずれか1項に記載のシステム。

## 【請求項 14】

標的特異的プローブに結合したアンプリコン由来のポリヌクレオチド標的の存在または不存在を検出するステップをさらに含む、請求項1および3～13のいずれか1項に記載の方法または請求項2～13のいずれか1項に記載のシステム。

## 【請求項 15】

アンプリコンが標的特異的プローブにハイブリダイズすることにより検出可能である、

請求項1および3～14のいずれか1項に記載の方法または請求項2～14のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項 1 6】

標的特異的プローブに結合したアンブリコン由来のポリヌクレオチド標的の存在または不存在が約30分間未満で検出可能である、請求項1および3～15のいずれか1項に記載の方法または請求項2～15のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項 1 7】

標的特異的プローブに結合したアンブリコン由来のポリヌクレオチド標的の存在または不存在が約60分間未満で検出可能である、請求項1および3～15のいずれか1項に記載の方法または請求項2～15のいずれか1項に記載のシステム。