

【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)

【公表番号】特表 2019-519231 (P2019-519231A)

【公表日】令和 1 年 7 月 11 日 (2019.7.11)

【年通号数】公開・登録公報 2019-027

【出願番号】特願 2018-565020 (P2018-565020)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6844 Z N A Z

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/09 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 11 月 29 日 (2019.11.29)

【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】

非等温核酸増幅反応を実施する方法であって、前記方法が、以下のステップ：

(a) プライマーが標的にハイブリダイズするハイブリダイゼーション事象を可能にする条件下で、標的配列を 1 つ以上の相補的一本鎖プライマーと混合するステップであって、ハイブリダイゼーション事象が、直接的または間接的に、二重鎖の反対側の末端またはその近くに配置された 2 つのニッキング部位を含む二重鎖構造の形成を導くステップ；

および以下のステップ：

(b) 二重鎖の鎖中の前記ニッキング部位の各々にニックを発生させるステップ；

(c) 新たな合成核酸を形成するように、ポリメラーゼを使用して前記ニックの入った鎖を伸長し、前記ポリメラーゼとの伸長がニッキング部位を再形成するステップ；

(d) 新たな合成核酸の複数のコピーを産生するように、所望によりステップ (b) および (c) を反復するステップ；

による増幅プロセスを実施するステップを含み、

前記方法が実施される温度が非等温であり、ステップ (b) ~ (d) の前記増幅プロセスの間に少なくとも 2 の低下を受けることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、ステップ (a) において、前記標的が核酸の 2 つの相補鎖を含み、前記プライマーが、フォワードおよびリバースプライマーを含み、それらは、対応する前記標的の鎖にそれぞれ相補的であり、その結果、前記フォワードおよびリバースプライマーの 3' 末端が互いに向かって配向される、方法。

【請求項 3】

前記温度が、前記増幅反応中に、少なくとも 5 、好ましくは少なくとも 10 、より好ましくは少なくとも 15 の制御された低下を受ける、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記増幅反応中の温度低下の平均速度が、 $-0.10 \sim -6.0$  /分<sup>-1</sup>、好ましくは $-0.20 \sim -3.5$  /分<sup>-1</sup>、より好ましくは $-0.30 \sim -3.5$  /分<sup>-1</sup>、最も好ましくは $-0.40 \sim -3.5$  /分<sup>-1</sup>の範囲にある、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(b)～(d)が実質的にステップ(a)の直後に実施され、ステップ(a)～(d)は好ましくは同一の反応容器中または同一の固体支持体上で実施される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(a)が、 $55 \sim 62$ 、好ましくは $57 \sim 61$ 、より好ましくは $58 \sim 60$ の範囲の温度で実施される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

新たな合成核酸を直接的または間接的に検出するステップをさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記検出ステップが、分子ビーコンまたは蛍光色素、側方流動標識プローブ、または電気化学反応を触媒する酵素の使用を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

ステップ(b)が、ニッキング酵素の使用を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

最適温度を有する第1のポリメラーゼおよび/または第1のニッキング酵素、および最適温度を有する第2のポリメラーゼおよび/または第2のニッキング酵素、の使用を含み、前記第2のポリメラーゼおよび/または第2のニッキング酵素の前記最適温度が、それぞれの第1のポリメラーゼおよび/または第1のニッキング酵素の前記最適温度よりも低い、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記第2のポリメラーゼが、DNAポリメラーゼのBsuポリメラーゼまたはクレノウ断片である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記増幅反応の前記初期温度が前記第1のニッキング酵素の前記最適温度以上であり、前記増幅反応の過程で、前記温度が前記第1のニッキング酵素の前記最適温度より低い温度に低下する、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記増幅反応の前記温度が、前記第2のポリメラーゼおよび/または第2のニッキング酵素の前記最適温度以下に低下する、請求項10、11または12に記載の方法。

【請求項14】

前記方法の実施により得られた前記混合物を、核酸を分解する易熱性酵素と接触させるステップをさらに含み、前記混合物を、前記易熱性酵素が実質的に活性である温度で、前記易熱性酵素と接触させる、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記酵素が、codウラシル-DNAグリコシラーゼ(UDG)または南極易熱性UDGである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

ステップ(a)の前に逆転写ステップを実施し、目的のRNA分析物のDNA転写物を形成するように、前記目的のRNA分析物を逆転写酵素と接触させることを含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記DNA転写物から二本鎖DNAを作製するステップをさらに含む、請求項16に記載の方法。

**【請求項 18】**

前増幅または濃縮ステップをさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記プライマーの 1 つ以上が修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記修飾ヌクレオチドが、前記プライマーの標的相補的部分に存在する、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 21】**

前記 1 つ以上のプライマーが 2' - 修飾ヌクレオチドを含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

**【請求項 22】**

前記 1 つ以上のプライマーが 2' O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 23】**

前記 1 つ以上のプライマーが複数の 2' O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 24】**

前記 1 つ以上のプライマーが 7 個までの 2' O - メチル修飾ヌクレオチドを含む、請求項 23 に記載の方法。

**【請求項 25】**

ステップ (b) ~ (d) の間の前記反応の前記温度が、ステップ (a) が実施される前記温度に戻ることはない、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 26】**

前記反応の前記温度が所定の温度に戻ることはない、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 27】**

前記プライマーのうちの 1 つ以上が自己相補的部分を含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 28】**

前記自己相補的部分がヘアピン構造を形成する、請求項 27 に記載の方法。

**【請求項 29】**

前記ヘアピンが 5 ~ 10 塩基対を含む、請求項 28 に記載の方法。

**【請求項 30】**

ステップ (b) ~ (d) の間の前記温度低下の大きさが 8 ~ 20 の範囲内である、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 31】**

請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法を実施するための装置であって、前記装置が温度調節手段と、前記方法を実施するために用いられる反応混合物の増幅プロセスの間、少なくとも 2、好ましくは少なくとも 5 の温度低下を実施するように温度調節手段を操作するようプログラムされる、プログラム可能な制御手段とを備える、装置。