

【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21年8月13日(2009.8.13)

【公表番号】特表2009-502161(P2009-502161A)

【公表日】平成21年1月29日(2009.1.29)

【年通号数】公開・登録公報2009-004

【出願番号】特願2008-523491(P2008-523491)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 21/78 C

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成21年6月16日(2009.6.16)

【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】

DNAの第1鎖および第2鎖を含む標的核酸分子をDNA増幅させるRPAプロセスであって：

(a) リコンビナーゼ因子を第1核酸プライマーおよび第2核酸プライマーならびに1つまたは複数の非相補的もしくは修飾された内部残基を含む第3伸長ブロック化プライマーと接触させて、第1核タンパク質プライマー、第2核タンパク質プライマーおよび第3核タンパク質プライマーを形成させる工程と；

(b) 該第1核タンパク質プライマーおよび該第2核タンパク質プライマーを該二本鎖標的核酸と接触させ、それにより、該第1核タンパク質プライマーと該DNAの第1鎖の第1部分の該第1鎖との間で第1二本鎖構造を形成させ、そして該第2核タンパク質プライマーと該DNAの第2鎖の第2部分の該第2鎖との間で第2二本鎖構造を形成させ、その結果、該第1核タンパク質プライマーの3'末端および該第1核タンパク質プライマーの3'末端が、該3'末端間に標的核酸の第3部分を有して同一標的核酸分子上で相互に向けて方向付けられる工程と；

(c) 1つまたは複数のポリメラーゼおよびdNTPを用いて該第1核タンパク質プライマーおよび該第2核タンパク質プライマーの3'末端を伸長させて、該核酸の第3部分を含む内部領域を備える第1の増幅された標的核酸を生成する工程と；

(d) 該増幅された標的核酸を該第3核タンパク質プライマーと接触させて、ヌクレアーゼの存在下で該増幅させた標的核酸の第3部分で第3二本鎖構造を形成する工程であって：このとき該ヌクレアーゼは、該第3二本鎖構造の形成後にのみ該非相補的もしくは修飾された内部残基を特異的に切断して、第3の5'プライマーおよび第3の3'伸長ブロック化プライマーを形成する工程と；

(e) 1つまたは複数のポリメラーゼおよびdNTPを用いて該第3の5'プライマー

の3'末端を伸長させて、該第1核酸プライマーおよび該第3の5'プライマーを含む第2二本鎖増幅核酸を生成する工程と；

(f) 所望の程度の第2二本鎖増幅核酸が達成されるまで、(b)から(e)を繰り返して反応を継続する工程と、を含むプロセス。

【請求項2】

前記第1二本鎖構造は第1Dループの一部であり、前記第2二本鎖構造は第2Dループの一部である、請求項1に記載のプロセス。

【請求項3】

前記ヌクレアーゼは、DNAグリコシラーゼもしくはAPエンドヌクレアーゼである、請求項1に記載のプロセス。

【請求項4】

前記修飾された内部残基は、ウラシル残基もしくはイノシン残基である、請求項1に記載のプロセス。

【請求項5】

前記ヌクレアーゼは前記ウラシル残基もしくは前記イノシン残基を認識し、前記第3伸長ブロック化プライマーを該ウラシル残基もしくは該イノシン残基において切断する、請求項4に記載のプロセス。

【請求項6】

前記ヌクレアーゼは前記第3伸長ブロック化プライマーの非相補的塩基と前記標的核酸との間の塩基ミスマッチを認識し、該第3伸長ブロック化プライマーを該非相補的塩基において切断する、請求項1に記載のプロセス。

【請求項7】

前記ヌクレアーゼは、fpg、Nth、MutY、MutS、MutM、大腸菌MUG、ヒトMUG、ヒトOgg1、脊椎動物Nei様(Neil)グリコシラーゼ、ウラシルグリコシラーゼ、ヒポキサンチン-DNAグリコシラーゼならびにそれらの機能的アナログからなる群から選択される、請求項1に記載のプロセス。

【請求項8】

前記ヌクレアーゼは大腸菌Nfoもしくは大腸菌エキソヌクレアーゼIIIであり、前記修飾された残基はテトラヒドロフラン残基もしくは炭素リンカーである、請求項1に記載のプロセス。

【請求項9】

前記修飾された内部塩基は、8-オキソグアニン、チミングリコールおよび無塩基性部位模擬体からなる群から選択される、請求項1に記載のプロセス。

【請求項10】

前記無塩基性部位模擬体は、テトラヒドロフラン残基またはD-スパーサーである、請求項9に記載のプロセス。

【請求項11】

前記第3伸長ブロック化プライマーは、DNAポリメラーゼによる伸長に抵抗性であるブロック化3'残基を含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項12】

前記ブロック化3'残基は、ポリメラーゼによる前記プライマーの伸長を防止するブロック部分を含む、請求項11に記載のプロセス。

【請求項13】

前記ブロック部分は、3'残基の糖の3'部位または2'部位に付着させられる、請求項12に記載のプロセス。

【請求項14】

前記ブロック部分は、検出可能標識である、請求項12に記載のプロセス。

【請求項15】

前記検出可能標識は、蛍光体、酵素、クエンチャー、酵素阻害剤、放射性標識、結合対の一方のメンバーおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項14に記載

載のプロセス。

【請求項 16】

前記ブロック化 3' 残基は、ジデオキシヌクレオチドである、請求項 11 に記載のプロセス。

【請求項 17】

前記第 1 核酸プライマーは第 1 検出可能標識を含み、前記第 3 伸長ブロック化プライマーは第 2 検出可能標識を含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 18】

前記第 1 検出可能標識と前記第 2 検出可能標識とは相違しており、前記第 2 二本鎖増幅核酸の産生は、単一の二本鎖 DNA 分子上の該第 1 検出可能標識および該第 2 検出可能標識の存在を検出することによって監視される、請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 19】

前記第 2 二本鎖増幅核酸の産生は、第 1 抗体が前記第 1 検出可能標識に結合し、第 2 抗体が前記第 2 検出可能標識に結合するサンドイッチアッセイによって検出される、請求項 18 に記載のプロセス。

【請求項 20】

前記第 3 伸長ブロック化プライマーは 1 つまたは複数の検出可能標識をさらに含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 21】

前記プロセスは、前記第 3 伸長ブロック化プライマー上の前記検出可能標識を検出することによって RPA 反応の進行を監視する工程をさらに含む、請求項 20 に記載のプロセス。

【請求項 22】

前記検出可能標識は、蛍光体、酵素、クエンチャー、酵素阻害剤、放射性標識、結合対の一方のメンバーおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 20 に記載のプロセス。

【請求項 23】

前記蛍光体は、蛍光体 - dT アミダイト残基によって前記第 3 伸長ブロック化プライマーに付着させられる、請求項 22 に記載のプロセス。

【請求項 24】

前記クエンチャーは、クエンチャー - dT アミダイト残基によって前記第 3 伸長ブロック化プライマーに付着させられる、請求項 22 に記載のプロセス。

【請求項 25】

前記第 3 伸長ブロック化プライマーは蛍光体およびクエンチャーを含む、請求項 22 に記載のプロセス。

【請求項 26】

前記蛍光体と前記クエンチャーとは 0 ~ 2 塩基離れている、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 27】

前記蛍光体と前記クエンチャーとは 0 ~ 5 塩基離れている、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 28】

前記蛍光体と前記クエンチャーとは 0 ~ 8 塩基離れている、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 29】

前記蛍光体と前記クエンチャーとは 0 ~ 10 塩基離れている、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 30】

前記蛍光体と前記クエンチャーとは、前記伸長ブロック化プライマーが前記標的核酸にハイブリダイズする場合よりも、該伸長ブロック化プライマーがハイブリダイズしない場

合の方が長い距離離れている、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 31】

前記蛍光体または前記クエンチャーは、非相補的もしくは修飾された内部残基に付着させられ、該蛍光体および該クエンチャーは、前記ヌクレアーゼによる修飾された内部残基の切断に続いて分離される、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 32】

前記蛍光体は、フルオレセイン、FAM、TAMRA の群から選択される、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 33】

前記クエンチャーはダーククエンチャーである、請求項 25 に記載のプロセス。

【請求項 34】

前記ダーククエンチャーは、Dark Quencher 1、Dark Quencher 2、Black Hole Quencher 1 および Black Hole Quencher 2 からなる群から選択される、請求項 33 に記載のプロセス。

【請求項 35】

前記第 1 プライマー、前記第 2 プライマーもしくは前記第 3 伸長ブロック化プライマーは、長さが 12 ~ 30 残基である、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 36】

前記第 1 プライマー、前記第 2 プライマーもしくは前記第 3 伸長ブロック化プライマーは、長さが 12 ~ 40 残基である、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 37】

前記第 1 プライマー、前記第 2 プライマーもしくは前記第 3 伸長ブロック化プライマーは、長さが 12 ~ 60 残基である、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 38】

前記プロセスは、14 ~ 21 の温度で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 39】

前記プロセスは、21 ~ 25 の温度で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 40】

前記プロセスは、25 ~ 30 の温度で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 41】

前記プロセスは、30 ~ 37 の温度で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 42】

前記プロセスは、40 ~ 43 の温度で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 43】

前記プロセスは、前記標的核酸の少なくとも第 3 部分を少なくとも 10^7 倍増幅させる、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 44】

前記プロセスは、1% ~ 12% の PEG の存在下で実施され、その結果、該 PEG が増幅を刺激する、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 45】

前記プロセスは、6% ~ 8% の PEG の存在下で実施され、その結果、該 PEG が増幅を刺激する、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 46】

前記 dNTP は dUTP を含み、前記 RPA プロセスは 20 分間未満の第 1 期間にわたりウラシルグリコシラーゼの存在下で実施され、該プロセスは該第 1 期間後にウラシルグリコシラーゼ阻害剤の存在下で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 47】

前記プロセスは、前記ウラシルグリコシラーゼの温度に基づく不活性化を伴わずに実施される、請求項 46 に記載のプロセス。

【請求項 48】

前記ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、枯草菌ファージ P B S 1 ウラシルグリコシラーゼ阻害剤または枯草菌ファージ P B S 2 ウラシルグリコシラーゼ阻害剤である、請求項 4 6 に記載のプロセス。

【請求項 4 9】

前記 d N T P は、d A T P、d U T P、d C T P および d G T P からなる、請求項 4 6 に記載のプロセス。

【請求項 5 0】

前記 d N T P は d T T P を含有していない、請求項 4 6 に記載のプロセス。

【請求項 5 1】

1 つの反応において 1 つまたは複数の二本鎖標的核酸上で 1 より多くの R P A プロセスを実施する工程を含む R P A の多重プロセスであって、各プロセスが以下の工程：

(a) リコンビナーゼ因子を第 1 核酸プライマーおよび第 2 核酸プライマーならびに 1 つまたは複数の非相補的もしくは修飾された内部残基を含む第 3 伸長ブロック化プライマーと接触させて、第 1 核タンパク質プライマー、第 2 核タンパク質プライマーおよび第 3 核タンパク質プライマーを形成させる工程と；

(b) 該第 1 核タンパク質プライマーおよび該第 2 核タンパク質プライマーを該二本鎖標的核酸と接触させ、それにより、該第 1 核タンパク質プライマーと該 D N A の第 1 鎖の第 1 部分の該第 1 鎖との間で第 1 二本鎖構造を形成させ、そして該第 2 核タンパク質プライマーと該 D N A の第 2 鎖の第 2 部分の該第 2 鎖との間で第 2 二本鎖構造を形成させ、その結果、該第 1 核タンパク質プライマーの 3 ' 末端および該第 1 核タンパク質プライマーの 3 ' 末端が、該 3 ' 末端間に標的核酸の第 3 部分を有して同一標的核酸分子上で相互に向けて方向付けられる工程と；

(c) 1 つまたは複数のポリメラーゼおよび d N T P を用いて該第 1 核タンパク質プライマーおよび該第 2 核タンパク質プライマーの 3 ' 末端を伸長させて、該核酸の第 3 部分を含む内部領域を備える第 1 増幅された標的核酸を生成する工程と；

(d) 該増幅された標的核酸を該第 3 核タンパク質プライマーと接触させて、ヌクレアーゼの存在下で該増幅させた標的核酸の第 3 部分で第 3 二本鎖構造を形成する工程であって：このとき該ヌクレアーゼは、該第 3 二本鎖構造の形成後にのみ該非相補的もしくは修飾された内部残基を特異的に切断して、第 3 の 5 ' プライマーおよび第 3 の 3 ' 伸長ブロック化プライマーを形成する工程と；

(e) 1 つまたは複数のポリメラーゼおよび d N T P を用いて該第 3 の 5 ' プライマーの 3 ' 末端を伸長させて、該第 1 核酸プライマーおよび該第 3 の 5 ' プライマーを含む第 2 二本鎖増幅核酸を生成する工程と；

(f) 所望の程度の第 2 二本鎖増幅核酸が達成されるまで、(b) から (e) を繰り返して反応を継続する工程と；を含み、

このとき各 R P A プロセスは、該第 1 核酸プライマーおよび該第 2 核酸プライマーの相違する組み合わせを用いて実施され、各プロセスは同一の第 3 伸長ブロック化プライマーを用いて実施されるプロセス。

【請求項 5 2】

前記 1 より多くの R P A プロセスは、少なくとも 2 つの別個の R P A プロセスを含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 3】

前記 1 より多くの R P A プロセスは、少なくとも 4 つの別個の R P A プロセスを含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 4】

前記 1 より多くの R P A プロセスは、少なくとも 5 つの別個の R P A プロセスを含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 5】

前記 1 より多くの R P A プロセスは、少なくとも 7 つの別個の R P A プロセスを含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 6】

前記 1 より多くの R P A プロセスは、少なくとも 1 0 の別個の R P A プロセスを含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 7】

前記修飾された内部残基は、ウラシル残基またはイノシン残基である、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 8】

前記第 2 二本鎖増幅核酸の形成を検出して、前記 1 より多くの R P A プロセスのいずれかの累積増幅を決定する工程をさらに含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 5 9】

各 R P A プロセスの前記第 1 核酸プライマーは同一の第 1 検出可能標識で標識され、前記第 3 伸長ブロック化プライマーは第 2 検出可能標識で標識され、および前記検出する工程は該第 1 検出可能標識および該第 2 検出可能標識の両方を含む二本鎖核酸を検出する工程を含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 0】

前記第 2 二本鎖増幅核酸の産生は、第 1 抗体が前記第 1 検出可能標識に結合し、第 2 抗体が前記第 2 検出可能標識に結合するサンドイッチアッセイによって検出される、請求項 5 9 に記載のプロセス。

【請求項 6 1】

前記ヌクレアーゼは D N A グリコシラーゼもしくは A P エンドヌクレアーゼである、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 2】

前記ヌクレアーゼは前記第 3 伸長ブロック化プライマーの非相補的塩基と前記標的核酸との間の塩基ミスマッチを認識し、該第 3 伸長ブロック化プライマーを該非相補的塩基で切断する、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 3】

前記ヌクレアーゼは、f p g、N t h、M u t Y、M u t S、M u t M、大腸菌 M U G、ヒト M U G、ヒト O g g 1、脊椎動物 N e i 様 (N e i l) グリコシラーゼ、ウラシルグリコシラーゼ、ヒポキサンチン - D N A グリコシラーゼならびにそれらの機能的アナログからなる群から選択される、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 4】

前記ヌクレアーゼは大腸菌 N f o もしくは大腸菌エキソヌクレアーゼ I I I であり、前記修飾された残基はテトラヒドロフラン残基もしくは炭素リンカーである、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 5】

前記修飾された内部塩基は、8 - オキソグアニン、チミングリコール、または無塩基性部位模擬体からなる群から選択される、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 6】

前記無塩基性部位模擬体は、テトラヒドロフラン残基または D - スペーサーである、請求項 6 5 に記載のプロセス。

【請求項 6 7】

前記無塩基性部位模擬体は、テトラヒドロフラン残基または D - スペーサーである、請求項 6 6 に記載のプロセス。

【請求項 6 8】

前記第 3 伸長ブロック化プライマーは、D N A ポリメラーゼによる伸長に抵抗性であるブロック化 3 ' 残基を含む、請求項 5 1 に記載のプロセス。

【請求項 6 9】

前記ブロック化 3 ' 残基は、ポリメラーゼによる前記プライマーの伸長を防止するブロック部分を含む、請求項 6 8 に記載のプロセス。

【請求項 7 0】

前記ブロック部分は、3'残基の糖の3'部位または2'部位に付着させられる、請求項69に記載のプロセス。

【請求項71】

前記ブロック化3'残基は、ジデオキシヌクレオチドである、請求項70に記載のプロセス。

【請求項72】

DNAの第1鎖および第2鎖を含む二本鎖標的核酸分子をDNA増幅させるRPAプロセスであって、以下の工程：

(a) リコンビナーゼ因子を第1核酸プライマーおよび第2核酸プライマーと接触させて、第1核タンパク質プライマーおよび第2核タンパク質プライマーを形成させる工程と；

(b) 該第1核タンパク質プライマーおよび該第2核タンパク質プライマーを該二本鎖標的核酸と接触させ、それにより、該第1核タンパク質プライマーと該DNAの第1鎖の第1部分の該第1鎖との間で第1二本鎖構造を形成させ、そして該第2核タンパク質プライマーと該DNAの第2鎖の第2部分の該第2鎖との間で第2二本鎖構造を形成させ、その結果、該第1核タンパク質プライマーの3'末端および該第2核タンパク質プライマーの3'末端が、同一の二本鎖標的核酸分子上で相互に向けて方向付けられる工程と；

(c) 1つまたは複数のポリメラーゼならびにdNTPおよびdUTPを用いて該第1核タンパク質プライマーおよび第2核タンパク質プライマーの3'末端を伸長させて、増幅された標的核酸分子を生成する工程と；

(d) ウラシルグリコシラーゼの存在下で20分間以内の第1期間にわたり(b)および(c)を繰り返すことで反応を継続する工程と；

(e) 所望の程度の増幅が達成されるまで、ウラシルグリコシラーゼ阻害剤の存在下で、(b)および(c)の繰り返しを通して反応を継続する工程と、を含むプロセス。

【請求項73】

前記第1期間は10分間以内である、請求項72に記載のプロセス。

【請求項74】

前記第1期間は5分間以内である、請求項72に記載のプロセス。

【請求項75】

前記第1期間は2分間以内である、請求項72に記載のプロセス。

【請求項76】

前記ウラシルグリコシラーゼ阻害剤は、枯草菌ファージPBS1ウラシルグリコシラーゼ阻害剤または枯草菌ファージPBS2ウラシルグリコシラーゼ阻害剤である、請求項72に記載のプロセス。

【請求項77】

前記dNTPは、dATP、dUTP、dCTPおよびdGTPからなる、請求項72に記載のプロセス。

【請求項78】

前記dNTPはdTTPを含有していない、請求項72に記載のプロセス。