

【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4年7月1日(2022.7.1)

【国際公開番号】WO2020/006049

【公表番号】特表2021-528975(P2021-528975A)

【公表日】令和3年10月28日(2021.10.28)

【出願番号】特願2020-572532(P2020-572532)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09(2006.01)

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 Q 1/34(2006.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 Q 1/34

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 N 15/11 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和4年6月23日(2022.6.23)

【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】

30

標的核酸配列の検出法であって、以下：

(a) 前記標的核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを、トランスポゾン複合体と接触させること、ただし、前記トランスポゾン複合体は、トランスポザーゼと、1つまたは複数のT7 RNAポリメラーゼプロモーターを含むトランスポゾン配列とを含む；

(b) 前記トランスポザーゼを用いて、前記1つまたは複数のT7 RNAポリメラーゼプロモーターを、前記オリゴヌクレオチドに挿入すること；

(c) 前記挿入された1つまたは複数のT7 RNAポリメラーゼプロモーターからの転写を介して、前記標的核酸配列を含むRNAオリゴヌクレオチドを生成させることにより、前記標的核酸配列を増幅すること

を含む、前記方法。

40

【請求項2】

さらに、前記増幅された標的核酸を検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記増幅された標的核酸は、CRISPR Cas13に基づく検出システムを用いて検出される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記トランスポザーゼは、Tn5トランスポザーゼ、Muトランスポザーゼ、またはTn7トランスポザーゼである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記トランスポザーゼは、Tn5トランスポザーゼであり、前記トランスポゾン配列は、

50

19塩基対のモザイクエンド(ME)Tn5トランスポザーゼ認識配列を2つ含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記トランスポザーゼは、改変トランスポザーゼである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記改変トランスポザーゼは、30~45で機能するように最適化されている、または前記改変トランスポザーゼは、35~40で機能するように最適化されている、または前記改変トランスポザーゼは、野生型トランスポザーゼと比較してより速い速度で前記オリゴヌクレオチドから放出するように最適化されている、請求項6に記載の方法。

10

【請求項8】

前記1つまたは複数のT7RNAポリメラーゼプロモーターの前記オリゴヌクレオチドへの挿入は、無作為である、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記オリゴヌクレオチドは、二本鎖である、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記1つまたは複数のT7RNAポリメラーゼプロモーターの前記二本鎖オリゴヌクレオチドへの挿入は、前記二本鎖オリゴヌクレオチドのGCリッチ領域で生じる、請求項9に記載の方法。

20

【請求項11】

前記CRISPR Cas13に基づく検出システムは、*Leptotrichia*、*Listeria*、*Corynebacter*、*Sutterella*、*Legionella*、*Treponema*、*Filifactor*、*Eubacterium*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、*Mycoplasma*、*Bacteroides*、*Flavivivola*、*Flavobacterium*、*Sphaerochaeta*、*Azospirillum*、*Gluconacetobacter*、*Neisseria*、*Roseburia*、*Parvibaculum*、*Staphylococcus*、*Nitratifractor*、*Mycoplasma*、*Campylobacter*、及び*Lachnospira*からなる群より選択される属の生物に由来するCas13酵素を含む、請求項3に記載の方法。

30

【請求項12】

前記Cas13酵素は、*Leptotrichia shahii*、*Leptotrichia wadei*(Lw2)、*Listeria seeligeri*、*Lachnospiraceae*属菌MA2020、*Lachnospiraceae*属菌NK4A179、[*Clostridium*] *aminophilum* DSM 10710、*Carnobacterium gallinarum* DSM 4847、*Carnobacterium gallinarum* DSM 4847(第二CRISPR遺伝子座)、*Paludibacter propionici* genes WB4、*Listeria weihenstephanensis* FSL R9-0317、*Listeriaceae*属菌FSLM6-0635、*Leptotrichia wadei* F0279、*Rhodobacter capsulatus* SB 1003、*Rhodobacter capsulatus* R121、*Rhodobacter capsulatus* DE442、*Leptotrichia buccalis* C-1013-b、*Herbinix hemicellulosilytica*、[*Eubacterium*] *rectale*、*Eubacteriaceae*属菌CHKCI004、*Blautia*種Marseille-P2398、*Leptotrichia*種口腔分類群879株F0557、*Lachnospiraceae*属菌NK4A144、*Chloroflexus aggregans*、*Demequina aurantiaca*、*Thalassospira*種TSL5-1、*Pseudobutyrvibri*

40

50

o種OR37、*Butyrivibrio*種YAB3001、*Blautia*種Marseille-P2398、*Leptotrichia*種Marseille-P3007、*Bacteroides ihuae*、*Porphyromonadaceae*属菌KH3CP3RA、*Listeria riparia*、及び*Insolitispirillum peregrinum*からなる群より選択される生物に由来するものである、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記増幅された標的核酸は、CRISPR Cas12に基づく検出システムを用いて検出される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項14】

前記Cas12に基づく検出システムは、Cas12aまたはCas12b酵素を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記Cas12に基づく検出システムは、*Francisella tularensis*、*Prevotella albensis*、*Lachnospiraceae*属菌、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacterium*属菌、*Parcubacteria*属菌、*Smithella*種、*Acidaminococcus*種、*Lachnospiraceae*属菌、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi*、*Leptospira inadai*、*Porphyromonas crevioricanis*、*Prevotella disiens*及び*Porphyromonas macaccae*、*Succinivibrio dextrinosolvens*、*Prevotella disiens*、*Flavobacterium branchiophilum*、*Helcococcus kunzii*、*Eubacterium*種、*Microgenomates (Roizmanbacteria)*属菌、*Flavobacterium*種、*Prevotella brevis*、*Moraxella caprae*、*Bacteroidetes oral*、*Porphyromonas cansulci*、*Synergistes jonesii*、*Prevotella bryantii*、*Anaerovibrio*種、*Butyrivibrio fibrisolvens*、*Candidatus Methanomethylophilus*、*Butyrivibrio*種、*Oribacterium*種、*Pseudobutyrvibrio ruminis*、及び*Proteocatella sphenisci*からなる群より選択される属の生物に由来するCas12酵素を含む、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記方法は、前記オリゴヌクレオチドを加熱することを必要としない、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記標的核酸配列の増幅は、一定温度で行われる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記標的核酸配列は、長さが、約20~30、約30~40、約40~50、または約50~100ヌクレオチドであるか、または前記標的核酸配列は、長さが、約100~200、約100~500、または約100~1000ヌクレオチドであるか、または前記標的核酸配列は、長さが、約1000~2000、約2000~3000、約3000~4000、または約4000~5000ヌクレオチドである、請求項1から17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

さらに、ゲル電気泳動、挿入色素検出、PCR、リアルタイムPCR、蛍光、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、質量分析、リアルタイムRPA、リアルタイムLAMP、リアルタイムNEAR、リアルタイムHDA、リアルタイムTMA、リアルタイムNASB

10

20

30

40

50

A、及びCRISPR-SHERLOCKからなる群より選択される方法により、前記増幅された核酸を検出することを含む、請求項1から18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記標的核酸は、フェムトモル感度で検出されるか、または前記標的核酸は、アトモル感度で検出される、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記標的核酸を含む前記オリゴヌクレオチドは、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、プラスミドDNA、及び合成二本鎖DNAからなる群より選択されるか、または

前記標的核酸を含む前記オリゴヌクレオチドは、RNAオリゴヌクレオチドであり、かつ前記方法は、前記オリゴヌクレオチドを前記トランスポゾン複合体と接触させる前に逆転写工程を含む、請求項1から20のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項22】

前記標的核酸配列は、試料に由来するものであり、かつ前記試料は、生体試料または環境試料である、請求項1から21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記生体試料は、血液、血漿、血清、尿、糞便、痰、粘液、リンパ液、滑液、胆汁、腹水、胸水、漿液腫、唾液、脳脊髄液、眼房水もしくは硝子体液試料、あるいは任意の体分泌、漏出液、滲出液、または関節から得られる液体、あるいは皮膚または粘膜表面のスワブである、請求項22に記載の方法。

20

【請求項24】

前記試料は、ヒト患者から得られた血液、血漿、または血清であるか、または前記試料は、植物試料であるか、または前記試料は、未精製試料であるか、または前記試料は、精製試料である、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

試料中の標的核酸配列を検出するシステムであって、以下：

a. トランスポゾン複合体、ただし前記トランスポゾン複合体は、トランスポザーゼと、1つまたは複数のT7 RNAポリメラーゼプロモーターを含むトランスポゾン配列とを含み、ただし前記トランスポザーゼは、前記1つまたは複数のT7 RNAポリメラーゼプロモーターを、前記標的核酸配列を含むオリゴヌクレオチドに挿入し；

30

b. T7 RNAポリメラーゼ、ただし前記T7 RNAポリメラーゼは、前記挿入された1つまたは複数のT7プロモーターから前記標的核酸を転写し；ならびに

c. 前記転写された標的核酸を検出するCRISPRに基づく検出システム、を含む、前記システム。

【請求項26】

前記CRISPRに基づく検出システムは、CRISPR-Cas13に基づく検出システムである、請求項25に記載のシステム。

【請求項27】

前記トランスポザーゼは、Tn5トランスポザーゼであるか、または前記トランスポザーゼは、Tn5トランスポザーゼのバリエーションである、請求項25に記載のシステム。

40

【請求項28】

前記トランスポゾン配列は、19塩基対のME Tn5トランスポザーゼ認識配列を2つ含む、請求項25から27のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項29】

前記CRISPR-Cas13に基づく検出システムは、Cas13に基づくCRISPR-SHERLOCKシステムである、請求項26に記載のシステム。

【請求項30】

前記CRISPRに基づく検出システムは、CRISPR-Cas12に基づく検出システムである、請求項25に記載のシステム。

【請求項31】

50

さらに、核酸増幅試薬を含む、請求項 2 5 から 3 0 のいずれか 1 項に記載のシステム。

【請求項 3 2】

さらに、逆転写試薬を含む、請求項 2 5 から 3 1 のいずれか 1 項に記載のシステム。

10

20

30

40

50