

【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24年7月12日 (2012.7.12)

【公開番号】特開2012-95665(P2012-95665A)

【公開日】平成24年5月24日 (2012.5.24)

【年通号数】公開・登録公報2012-020

【出願番号】特願2012-13260(P2012-13260)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 H 19/10 (2006.01)

C 0 7 H 19/20 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 H 19/10 C S P

C 0 7 H 19/20

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年5月18日 (2012.5.18)

【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】

式 S M - B A S E を有するリボヌクレオシドであって、

S M はリボースであり、

B A S E は、アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルからなる群より選択され、

該リボースは、該リボースの 2' 位に、2 - ニトロベンジル基、デシル基および p - ヒドロキシフェナシルケージング基からなる群より選択される部分を含み、そして

該リボヌクレオシドは、検出可能な標識で標識されている、

リボヌクレオシド。

【請求項 2】

リボヌクレオシド 5' リン酸、リボヌクレオシド 5' ニリン酸およびリボヌクレオシド 5' 三リン酸からなる群より選択されるリボヌクレオチドである、請求項 1 に記載のリボヌクレオシド。

【請求項 3】

アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' ニリン酸、アデノシン 5' 三リン酸、グアノシン 5' - リン酸、グアノシン 5' ニリン酸、グアノシン 5' 三リン酸、ウリジン 5' - リン酸、ウリジン 5' ニリン酸、ウリジン 5' 三リン酸、シチジン 5' - リン酸、シチジン 5' ニリン酸、およびシチジン 5' 三リン酸からなる群より選択されるリボヌクレオチドである、請求項 1 に記載のリボヌクレオシド。

【請求項 4】

前記検出可能な標識が、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、
- ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、
- グルコロニダーゼ、ルシフェラーゼ、b - ラクタマーゼ、ジゴキシゲニン、蛍光色素分子、
フルオレセイン、c y 3、c y 5、アルカリホスファターゼおよびホースラディッシュペ

ルオキシダーゼからなる群より選択される部分である、請求項 1 に記載のリボヌクレオシド。

【請求項 5】

以下：

(a) 式 $SM-BASE$ を有するリボヌクレオシドを提供する工程であって、 SM はリボースであり、 $BASE$ は、アデニン、グアニン、シトシンおよびウラシルからなる群より選択される、工程；

(b) 該リボースの 2' 位に部分を結合させる工程；ならびに

(c) 工程 (b) の前または後に、リボヌクレオシドに検出可能な標識を結合させる工程

を包含する、方法であって、ここで、該部分は、2 - ニトロベンジル基、デシル基および p - ヒドロキシフェナシルケージング基からなる群より選択される、方法。

【請求項 6】

前記リボヌクレオシドが、リボヌクレオシド 5' リン酸、リボヌクレオシド 5' ニリン酸およびリボヌクレオシド 5' 三リン酸からなる群より選択されるリボヌクレオチドである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記リボヌクレオシドが、アデノシン 5' - リン酸、アデノシン 5' ニリン酸、アデノシン 5' 三リン酸、グアノシン 5' - リン酸、グアノシン 5' ニリン酸、グアノシン 5' 三リン酸、ウリジン 5' - リン酸、ウリジン 5' ニリン酸、ウリジン 5' 三リン酸、シチジン 5' - リン酸、シチジン 5' ニリン酸、およびシチジン 5' 三リン酸からなる群より選択されるリボヌクレオチドである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

以下：

(a) RNA ポリメラーゼおよび式 $PM-SM-BASE$ を有する第一のリボヌクレオチドを用いて、プライマー：標的核酸複合体を伸長させて、取り込まれた状態のリボヌクレオチドを形成する工程であって、該プライマー：標的核酸複合体は、標的核酸と複合体化したプライマーを含み、該取り込まれた状態のリボヌクレオチドは、検出可能な標識を含み、 PM はリン酸部分であり、 SM はリボースであり、 $BASE$ はピリミジンまたはプリンであり、該リボースは、該リボースの 2' 位に部分を含む、工程；ならびに

(b) 該検出可能な標識を検出することによって、該取り込まれた状態のリボヌクレオチドを検出し、該標的核酸の配列を決定する工程

を包含する、方法であって、ここで、該部分は、2 - ニトロベンジル基、デシル基および p - ヒドロキシフェナシルケージング基からなる群より選択される、方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、さらに、以下：

(c) 可逆的結合を切断することによって、前記取り込まれた状態のリボヌクレオチドの鎖終止部分を除去する工程；ならびに

(d) 前記第一のリボヌクレオチドとは異なる第二のリボヌクレオチドを用いて工程 (a)、(b) および (c) を繰り返す工程であって、該第二のリボヌクレオチドは、式 $PM'-SM'-BASE'$ を有し、ここで PM' はリン酸部分であり、 SM' はリボースであり、 $BASE'$ はピリミジンまたはプリンであり、該第二のリボヌクレオチドの該リボースは、該第二のリボヌクレオチドの該リボースの 2' 位に可逆的結合によって結合される鎖終止部分を含む、方法。

【請求項 10】

ハイブリダイゼーションまたは RNA ポリメラーゼによる合成によって、前記プライマー：標的核酸複合体を形成する工程をさらに包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 RNA ポリメラーゼが、 $T3$ RNA ポリメラーゼ、 $T7$ RNA ポリメラーゼおよび $SP6$ RNA ポリメラーゼからなる群より選択されるファージがコードする RNA

ポリメラーゼである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記リボヌクレオチドが、リボヌクレオシド 5'リン酸、リボヌクレオシド 5'ニリン酸およびリボヌクレオシド 5'三リン酸からなる群より選択されるリボヌクレオチドである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記リボヌクレオチドが、アデノシン 5'ーリン酸、アデノシン 5'ニリン酸、アデノシン 5'三リン酸、グアノシン 5'ーリン酸、グアノシン 5'ニリン酸、グアノシン 5'三リン酸、ウリジン 5'ーリン酸、ウリジン 5'ニリン酸、ウリジン 5'三リン酸、シチジン 5'ーリン酸、シチジン 5'ニリン酸、およびシチジン 5'三リン酸からなる群より選択されるリボヌクレオチドである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

以下：

(a) RNAポリメラーゼおよび第一のリボヌクレオチドを用いて、プライマー：標的核酸複合体を伸長させて、取り込まれた状態のリボヌクレオチドを形成する工程であって、該プライマー：標的核酸複合体は、標的核酸と複合体化したプライマーを含み、該第一のリボヌクレオチドは、ATP、GTP、UTPおよびCTPからなる群より選択され、該第一のリボヌクレオチドは、リボースおよび該リボースの2'位に可逆的結合によって結合した鎖終止部分を含み、該取り込まれた状態のリボヌクレオチドは、検出可能な標識で可逆的に標識される、工程；ならびに

(b) 該検出可能な標識を検出することによって、該取り込まれた状態のリボヌクレオチドを検出し、該標的核酸の配列を決定する工程
を包含する、方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の方法であって、さらに以下：

(c) 前記鎖終止部分および前記検出可能な標識を前記取り込まれた状態のリボヌクレオチドから除去する工程；ならびに

(d) 前記第一のリボヌクレオチドとは異なる第二のリボヌクレオチドを用いて工程 (a)、(b) および (c) を繰り返す工程
を包含する、方法。

【請求項 1 6】

ハイブリダイゼーションまたはRNAポリメラーゼによる合成によって、前記プライマー：標的核酸複合体を形成する工程をさらに包含する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記RNAポリメラーゼが、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼおよびSP6 RNAポリメラーゼからなる群より選択されるファージがコードするRNAポリメラーゼである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記RNAポリメラーゼが、2'改変型リボヌクレオチドを伸長する核酸に取り込み得る立体的なゲートの欠失を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記RNAポリメラーゼが、2'改変型リボヌクレオチドを伸長する核酸に取り込み得るヌクレオチド結合および触媒ポケット中のさらなるアミノ酸置換を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記第一のリボヌクレオチドが、リボヌクレオシド 5'リン酸、リボヌクレオシド 5'ニリン酸およびリボヌクレオシド 5'三リン酸からなる群より選択される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記第一のリボヌクレオチドが、アデノシン 5'ーリン酸、アデノシン 5'ニリン酸、

アデノシン 5'三リン酸、グアノシン 5'ーリン酸、グアノシン 5'二リン酸、グアノシン 5'三リン酸、ウリジン 5'ーリン酸、ウリジン 5'二リン酸、ウリジン 5'三リン酸、シチジン 5'ーリン酸、シチジン 5'二リン酸、およびシチジン 5'三リン酸からなる群より選択される、請求項 14 に記載の方法。