

【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 3 年 2 月 25 日 (2021.2.25)

【公表番号】特表 2020-503856 (P2020-503856A)

【公表日】令和 2 年 2 月 6 日 (2020.2.6)

【年通号数】公開・登録公報 2020-005

【出願番号】特願 2019-531088 (P2019-531088)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/536 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 0 7 K 16/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6844 Z N A Z

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/536 E

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 N 15/113 Z

C 1 2 N 9/12

C 0 7 K 16/00

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 1 月 8 日 (2021.1.8)

【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】

(a) 複数のタンパク質又はペプチド標的を含有するサンプルと、複数の一次結合パートナーであって、前記複数の一次結合パートナーのそれぞれが、タンパク質又はペプチド標的に特異的に結合し、且つプロープ鎖に連結される、複数の一次結合パートナーとを組み合わせ、且つ一次結合パートナーに結合されたタンパク質又はペプチドを含む第 1 の反応混合物を生成すること、

(b) ステップ (a) で生成された前記第 1 の反応混合物と、d N T P、鎖置換ポリメラーゼ、及び複数の触媒分子であって、各触媒分子が、5' - 3' 方向に第 1 のドメイン、第 2 のドメイン、及び第 3 のドメインを含み、前記第 1 のドメインが、前記第 2 のドメインに結合され、及び前記第 3 のドメインが、前記一次結合パートナーの 1 つの前記プロープ鎖に対して相補的な不對 3' トーホールドドメインである、複数の触媒分子とを組み合わせ、且つ一次結合パートナーに結合された核酸コンカテマーを含む第 2 の反応混合物を生成すること、

(c) ステップ (b) で生成された前記第 2 の反応混合物と、複数のシグナル鎖であっ

て、各シグナル鎖が、異なる検出可能な分子に連結され、且つ前記一次結合パートナーの1つの架橋鎖に対して相補的なドメインを含む、複数のシグナル鎖とを組み合わせ、且つ複数のシグナル鎖によって標識されたコンカテマーを生成すること
を含み、及び

(d) 任意選択的に、前記標識コンカテマーを画像化することをさらに含む、多重化標的検出方法。

【請求項2】

(a) 複数のタンパク質又はペプチド標的を含有するサンプルと、複数の一次結合パートナーであって、前記複数の一次結合パートナーのそれぞれが、タンパク質又はペプチド標的に特異的に結合し、且つ架橋鎖に連結される、複数の一次結合パートナーとを組み合わせ、且つ一次結合パートナーに結合されたタンパク質又はペプチドを含む第1の反応混合物を生成すること、

(b) 前記第1の反応混合物と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、複数のプローブ鎖、及び複数の触媒分子であって、各プローブ鎖が、(i) 前記一次結合パートナーの1つの前記架橋鎖に対して相補的な不対5'標的ドメイン、及び(ii) 不対3'プライマードメインを含み、各触媒分子が、5'-3'方向に第1のドメイン、第2のドメイン、及び第3のドメインを含み、前記第1のドメインが、前記第2のドメインに結合され、及び前記第3のドメインが、前記プローブ鎖の1つに対して相補的な不対3'トーホールドドメインである、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、複数のプローブ鎖、及び複数の触媒分子を第2の反応混合物中で組み合わせることによって生成されたプローブ鎖に結合されたコンカテマーとを組み合わせ、且つ一次結合パートナーに結合された核酸コンカテマーを含む第3の反応混合物を生成すること、

(c) ステップ(b)で生成された前記第3の反応混合物と、複数のシグナル鎖であって、各シグナル鎖が、異なる検出可能な分子に連結され、且つ前記一次結合パートナーの1つの前記架橋鎖に対して相補的なドメインを含む、複数のシグナル鎖とを組み合わせ、且つ複数のシグナル鎖によって標識されたコンカテマーを生成すること
を含み、及び

(d) 任意選択的に、前記標識コンカテマーを画像化することをさらに含む、多重化標的検出方法。

【請求項3】

(a) 複数のタンパク質又はペプチド標的を含有するサンプルと、複数の一次結合パートナーであって、前記複数の一次結合パートナーのそれぞれが、タンパク質又はペプチド標的に特異的に結合し、且つ架橋鎖に連結される、複数の一次結合パートナーとを組み合わせ、且つ一次結合パートナーに結合されたタンパク質又はペプチドを含む第1の反応混合物を生成すること、

(b) 前記第1の反応混合物と、複数のプローブ鎖であって、各プローブ鎖が、(i) 前記一次結合パートナーの1つの前記架橋鎖に対して相補的な不対5'標的ドメイン、及び(ii) 不対3'プライマードメインを含む、複数のプローブ鎖とを組み合わせ、且つプローブ鎖に結合された一次結合パートナーを含む第2の反応混合物を生成すること、

(c) 前記第2の反応混合物と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、及び複数の触媒分子であって、各触媒分子が、5'-3'方向に第1のドメイン、第2のドメイン、及び第3のドメインを含み、前記第1のドメインが、前記第2のドメインに結合され、及び前記第3のドメインが、前記プローブ鎖の1つに対して相補的な不対3'トーホールドドメインである、複数の触媒分子とを組み合わせ、且つ一次結合パートナーに結合された核酸コンカテマーを含む第3の反応混合物を生成すること、

(d) ステップ(b)で生成された前記第3の反応混合物と、複数のシグナル鎖であって、各シグナル鎖が、異なる検出可能な分子に連結され、且つ前記一次結合パートナーの1つの前記架橋鎖に対して相補的なドメインを含む、複数のシグナル鎖とを組み合わせ、且つ複数のシグナル鎖によって標識されたコンカテマーを生成すること
を含み、及び

(e) 任意選択的に、前記標識コンカテマーを画像化することをさらに含む、多重化標的検出方法。

【請求項 4】

前記一次結合パートナーが、抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記触媒分子及び / 又は架橋鎖が、DNA 及び / 又は RNA から構成される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

各触媒分子の前記第 1 のドメインが、同じ触媒分子の前記第 2 のドメインに結合され、各触媒分子の前記第 2 のドメインが、同じ触媒分子の前記第 3 のドメインと同一の配列を含み、及び / 又は各触媒分子の前記第 1 のドメインが、同じ触媒分子の前記第 2 のドメインに対して完全に相補的な配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

各触媒分子が、同じ触媒分子の前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとの間に位置する、重合を終結させるストッパー分子又は修飾をさらに含む、

任意選択的に、重合を終結させる前記ストッパー分子又は修飾が、トリエチレングリコール (TEG)、18 原子ヘキサエチレングリコール、アデニル化、アジド、ジゴキシゲニン、コレステリル-TEG、3-シアノビニルカルバゾール (CNVK)、iso-dG、及び iso-dC から選択され、前記ストッパー分子が、グアニンであり、且つ前記触媒分子が、アデニン、チミン、及びシトシンから構成されるか、あるいは前記ストッパー分子が、シトシンであり、且つ前記触媒分子が、アデニン、チミン、及びグアニンから構成される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

各触媒分子が、前記第 1 のドメインと前記第 2 のドメインとの間に位置するループドメインをさらに含む触媒ヘアピン分子である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

(a) 複数の核酸標的を含有するサンプルと、複数のプローブ鎖であって、各プローブ鎖が、(i) 前記核酸標的の 1 つに対して相補的な不対 5' 標的ドメイン、及び (ii) 不対 3' プライマードメインを含む、複数のプローブ鎖とを組み合わせ、且つプローブ鎖に結合された分子標的を含む第 1 の反応混合物を生成すること、

(b) ステップ (a) で生成された前記第 1 の反応混合物と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、及び複数の触媒分子であって、各触媒分子が、5' - 3' 方向に第 1 のドメイン、第 2 のドメイン、及び第 3 のドメインを含み、前記第 1 のドメインが、前記第 2 のドメインに結合され、及び前記第 3 のドメインが、前記プローブ鎖の 1 つの前記不対 3' プライマードメインに対して相補的な不対 3' トーホールドドメインである、複数の触媒分子とを組み合わせ、且つ分子標的に結合された核酸コンカテマーを含む第 2 の反応混合物を生成すること、

(c) ステップ (b) で生成された前記第 2 の反応混合物と、複数のシグナル鎖であって、各シグナル鎖が、異なる検出可能な分子に連結され、且つ前記プローブ鎖の 1 つの前記不対 3' プライマードメインに対して相補的なドメインを含む、複数のシグナル鎖とを組み合わせ、且つ複数のシグナル鎖によって標識されたコンカテマーを生成することを含み、及び

(d) 任意選択的に、前記標識コンカテマーを画像化することをさらに含む、多重化標的検出方法。

【請求項 10】

(a) 複数のプローブ鎖と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、及び複数の触媒分子とであって、各プローブ鎖が、(i) 複数の核酸標的の核酸標的に対して相補的な不対 5' 標的ドメイン、及び (ii) 不対 3' プライマードメインを含み、各触媒分子が、5' - 3' 方向に第 1 のドメイン、第 2 のドメイン、及び第 3 のドメインを含み、前記第 1 のドメインが、前記第 2 のドメインに結合され、及び前記第 3 のドメインが、前記プローブ鎖の

1つの前記不対3'プライマードメインに対して相補的な不対3'トーホールドドメインである、複数のプローブ鎖と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、及び複数の触媒分子とを組み合わせ、且つプローブ鎖に結合された核酸コンカテマーを含む第1の反応混合物を生成すること、

(b)ステップ(a)で生成された前記第1の反応混合物と、複数の核酸標的を含有するサンプルとを組み合わせ、且つ分子標的に結合された核酸コンカテマーを含む第2の反応混合物を生成すること、

(c)ステップ(b)で生成された前記第2の反応混合物と、複数のシグナル鎖であって、各シグナル鎖が、異なる検出可能な分子に連結され、且つ前記プローブ鎖の1つの前記不対3'プライマードメインに対して相補的なドメインを含む、複数のシグナル鎖とを組み合わせ、且つ複数のシグナル鎖によって標識されたコンカテマーを生成することを含み、及び

(d)任意選択的に、前記標識コンカテマーを画像化することをさらに含む、多重化標的検出方法。

【請求項11】

前記プローブ鎖及び/又は触媒分子が、DNA及び/又はRNAから構成される、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項12】

各触媒分子の前記第1のドメインが、同じ触媒分子の前記第2のドメインに結合され、各触媒分子の前記第2のドメインが、同じ触媒分子の前記第3のドメインと同一の配列を含み、及び/又は各触媒分子の前記第1のドメインが、同じ触媒分子の前記第2のドメインに対して完全に相補的な配列を含む、請求項9～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

各触媒分子が、同じ触媒分子の前記第1のドメインと前記第2のドメインとの間に位置する、重合を終結させるストッパー分子又は修飾をさらに含む、

任意選択的に、重合を終結させる前記ストッパー分子又は修飾が、トリエチレングリコール(TEG)、18原子ヘキサエチレングリコール、アデニル化、アジド、ジゴキシゲニン、コレステリル-TEG、3-シアノビニルカルバゾール(CNVK)、iso-dG、及びiso-dCから選択され、任意選択的に、前記ストッパー分子が、グアニンであり、且つ前記触媒分子が、アデニン、チミン、及びシトシンから構成されるか、あるいは前記ストッパー分子が、シトシンであり、且つ前記触媒分子が、アデニン、チミン、及びグアニンから構成される、請求項9～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

各触媒分子が、前記第1のドメインと前記第2のドメインとの間に位置するループドメインをさらに含む触媒ヘアピン分子であり、任意選択的に、各触媒ヘアピン分子が、25～300ヌクレオチド長を有するDNAの一本鎖から構成される、請求項9～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

各プローブ鎖が、10～50ヌクレオチド長を有し、及び/又は各プローブ鎖の前記標的ドメインが、5～25ヌクレオチド長を有し、及び/又は各プローブ鎖の前記プライマードメインが、5～25ヌクレオチド長を有し、及び/又は前記シグナル鎖のそれぞれが、10～30ヌクレオチド長を有する、請求項9～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記シグナル鎖の前記検出可能な分子が、フルオロフォアである、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記鎖置換ポリメラーゼが、phi29 DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、及びBsu DNAポリメラーゼのラージフラグメントから選択される、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記複数のプローブ鎖が、2～10，000の前記プローブ鎖を含み、
 前記複数の触媒分子が、2～10，000の前記触媒分子を含み、及び
 前記複数のシグナル鎖が、2～10，000の前記シグナル鎖を含む、請求項1～17
 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記サンプルが、細胞サンプル又は組織サンプルである、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

タンデム反復配列のコンカテマーが結合される核酸標的を含むサンプルであって、検出可能な標識に連結されたシグナル鎖が、前記コンカテマーの各配列に結合される、サンプル。

【請求項21】

一次結合パートナーが結合されるタンパク質標的を含むサンプルであって、前記一次結合パートナーが、タンデム反復配列のコンカテマーに連結され、及び検出可能な標識に連結されたシグナル鎖が、前記コンカテマーの各配列に結合される、サンプル。

【請求項22】

(a) 複数の核酸標的を含有するサンプルと、第1の複数のプローブ鎖であって、前記第1の複数のものの各プローブ鎖が、(i) 前記核酸標的の1つに対して相補的な不對5'標的ドメインa、及び(ii) 不對3'プライマードメインbを含む、第1の複数のプローブ鎖とを組み合わせ、且つプローブ鎖に結合された分子標的を含む反応混合物を生成することと、

(b) ステップ(a)で生成された前記反応混合物と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、及び第1の複数の触媒分子であって、前記第1の複数のものの各触媒分子が、5'-3'方向にドメインa₁、ドメインx、ドメインa₂、ドメインb₁、ドメインb₁^{*}、ドメインa₂^{*}、ドメインx^{*}、ドメインa₁^{*}、ドメインb₂^{*}、及びドメインa₃^{*}を含み、ドメインa₁、ドメインx、ドメインa₂、及びドメインb₁が、それぞれドメインb₁^{*}、ドメインa₂^{*}、ドメインx^{*}、及びドメインa₁^{*}に結合し、且つドメインb₂^{*}及びドメインa₃^{*}が、前記第1の複数のものの前記プローブ鎖に対して相補的な不對3'トーホールドドメインを形成する、第1の複数の触媒分子とを組み合わせ、且つ分子標的に結合された第1の複数の核酸コンカテマーを含む反応混合物を生成することと、

(c) ステップ(b)で生成された前記反応混合物と、第2の複数のプローブ鎖であって、前記第2の複数のものの各プローブ鎖が、(i) 前記触媒分子のドメインxに対して相補的な不對5'ドメインx^{*}、及び(ii) 前記触媒分子のドメインb₁及びb₂^{*}に対して相補的な不對3'プライマードメインbを含む、第2の複数のプローブ鎖とを組み合わせ、且つプローブ鎖に結合されたコンカテマーを含む反応混合物を生成することと、

(d) ステップ(c)で生成された前記反応混合物と、dNTP、鎖置換ポリメラーゼ、及び第2の複数の触媒分子であって、前記第2の複数のものの各触媒分子が、5'-3'方向にドメインa₁、ドメインx、ドメインa₂、ドメインb₁、ドメインb₁^{*}、ドメインa₂^{*}、ドメインx^{*}、ドメインa₁^{*}、ドメインb₂^{*}、及びドメインa₃^{*}を含み、ドメインa₁、ドメインx、ドメインa₂、及びドメインb₁が、それぞれドメインb₁^{*}、ドメインa₂^{*}、ドメインx^{*}、及びドメインa₁^{*}に結合し、且つドメインb₂^{*}及びドメインa₃^{*}が、前記第1の複数のものの前記プローブ鎖に対して相補的な不對3'トーホールドドメインを形成する、第2の複数の触媒分子とを組み合わせ、且つ分岐コンカテマーを生成することと

を含む、多重化標的検出方法。

【請求項23】

(e) ステップ(d)で生成された前記反応混合物と、複数のシグナル鎖であって、各シグナル鎖が、異なる検出可能な分子に連結され、且つ前記第1及び/又は第2の複数のプローブ鎖の前記プローブ鎖の前記不對3'プライマードメインbに対して相補的なドメインを含む、複数のシグナル鎖とを組み合わせ、且つ複数のシグナル鎖によって標識され

たコンカテマーを生成することをさらに含み、及び任意選択的に、前記標識コンカテマーを画像化することをさらに含む、請求項 2 2 に記載の方法。