

【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3部門第2区分

【発行日】平成18年1月5日(2006.1.5)

【公表番号】特表2004-535382(P2004-535382A)

【公表日】平成16年11月25日(2004.11.25)

【年通号数】公開・登録公報2004-046

【出願番号】特願2002-581694(P2002-581694)

【国際特許分類】

C 0 7 H 21/00 (2006.01)

C 0 8 G 65/335 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

G 0 1 N 27/447 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 0 7 H 21/00 Z N A

C 0 8 G 65/335

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 37/00 1 0 2

G 0 1 N 27/26 3 3 1 E

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成17年4月13日(2005.4.13)

【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

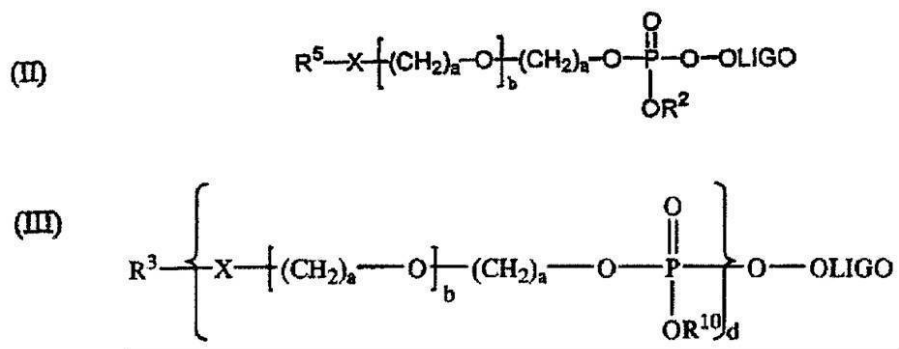
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造式(II)または(III)：

【化1】



に従う、配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーに連結された移動度改変ポリマーを含む、移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーまたはその塩であって、ここで：

R² は、少なくとも2つの炭素原子を含むアルキル、アリール、(R⁸)₃Si-、塩基安定性保護基、およびR⁵-X-[(CH₂)_a-O]_b-(CH₂)_a-からなる群

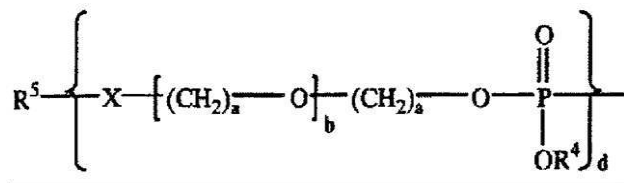
より選択され、ここで、各 R^8 は、直鎖および分枝鎖のアルキルおよびアリールからなる群より独立して選択され；

各 R^{10} は、水素および R^2 からなる群より独立して選択され；

R^5 は、水素、保護基、レポーター分子、およびリガンドからなる群より選択され；

R^3 は、

【化 2】



であり；

各 R^4 は、水素および R^2 からなる群より独立して選択され；

各 X は、 O 、 S 、 NH 、および $NH - C(O)$ からなる群より独立して選択され；

各 a は、独立して、1～6の整数であり；

各 b は、独立して、0～40の整数であり；

各 d は、独立して、1～200の整数であり；そして

OLIGOは、配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーであるが、

ただし、少なくとも1つの R^{10} または少なくとも1つの R^4 は、水素ではない、移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーまたはその塩。

【請求項 2】

各 X が O である、請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 3】

各 a が 2 である、請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 4】

各 b が 4 である、請求項 3 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 5】

OLIGOが、DNA、RNA、DNAアナログ、またはRNAアナログオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 6】

OLIGOが、DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドのアナログである、請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 7】

OLIGOが、少なくとも1つの非負荷電内部ヌクレオチド連結を含む請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 8】

前記内部ヌクレオチド連結が、モノアルキルリン酸トリエステルである、請求項 7 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 9】

R^5 がレポーター分子である、請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 10】

前記レポーター分子が、フルオロフォア、化学発光部分、またはリガンドである、請求項 9 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 11】

OLIGOが検出可能な標識を含む、請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 12】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 9 に記載の移動度改変配列特異的

ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 13】

OLIGO がポリエチレンオキシドポリマーを含む、請求項 1 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 14】

前記移動度改变ポリマーが、前記配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの 5' 末端に結合される、請求項 1 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 15】

前記配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの 3' 末端に結合されたポリエチレンオキシドポリマーをさらに含む、請求項 14 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 16】

前記移動度改变ポリマーが、前記配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの 3' 末端に結合される、請求項 1 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 17】

前記配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの 5' 末端に結合されたポリエチレンオキシドポリマーをさらに含む、請求項 16 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 18】

R^2 が、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、tert-ブチル、およびネオペンチルから選択される、請求項 1 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 19】

R^{10} が、独立して、水素、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、tert-ブチル、およびネオペンチルから選択される、請求項 1 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 20】

R^4 が、独立して、水素、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、tert-ブチル、およびネオペンチルから選択される、請求項 1 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 21】

前記ポリエチレンオキシドポリマーが、モノメチルポリエチレンオキシドポリマーである、請求項 13、15 および 16 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 22】

前記ポリエチレンオキシドポリマーが、少なくとも 2000 ダルトンの分子量を有する、請求項 13、15 および 16 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 23】

前記ポリエチレンオキシドポリマーが、少なくとも 5000 ダルトンの分子量を有する、請求項 13、15 および 16 に記載の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項 24】

複数の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーを含む組成物であって、該ヌクレオ塩基ポリマーの各々が請求項 1 に従う化合物であり、そして該ヌクレオ塩基ポリマーの各々が、異なる電荷対並進摩擦抵抗の比を有する、組成物。

【請求項 25】

前記複数の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの各々が、OLIGO を含み、そして各 OLIGO が、同数のヌクレオ塩基単位を有する、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 26】

1 つ以上の標的核酸中の複数の選択されたヌクレオチド配列を検出する方法であって：少なくとも 1 つ以上の標的核酸と、複数の移動度改变配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーとを、該標的核酸にハイブリダイズするこれらのヌクレオ塩基ポリマーを識別する条件下で接触させる工程であって、該ヌクレオ塩基ポリマーの各々が請求項 1 に従う化合物であり、そして該ヌクレオ塩基ポリマーの各々が、異なる電荷対並進摩擦抵抗の比を有す

る、工程；および

該標的核酸にハイブリダイズしたこれらのヌクレオ塩基ポリマーを検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 27】

前記ヌクレオ塩基ポリマーの O L I G O 部分が、同数のヌクレオ塩基単位で構成される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 1 つ以上の標的核酸が、固体支持体に固定されている、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

ヌクレオ塩基ポリマーの各々が検出可能な標識を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

前記検出可能な標識が、放射性同位元素、化学発光部分、フルオロフォア、またはリガンドである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記検出工程が：

前記標的核酸にハイブリダイズしたこれらのヌクレオ塩基ポリマーを回収する工程；および

該回収したヌクレオ塩基ポリマーを電気泳動により分離する工程、を包含する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

前記電気泳動が、非ふるい媒体におけるキャピラリー電気泳動により実行される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

1 つ以上の標的核酸中の複数の選択されたヌクレオチド配列を検出する方法であって：

該標的核酸と、第 1 の複数の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマープローブおよび第 2 の複数の配列特異的ヌクレオ塩基ポリマープローブとを、該標的核酸にハイブリダイズするこれらのプローブ間を識別する条件下で接触させる工程であって、該移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの各々が請求項 1 に従う化合物であり、そして該ヌクレオ塩基ポリマーの各々が、異なる電荷 対 並進摩擦抵抗の比を有する、工程；

同一の標的核酸分子に隣接してハイブリダイズする第 1 のプローブおよび第 2 のプローブを共有結合して、連結産物を形成する工程であって、該連結産物の各々が、異なる電荷 対 並進摩擦抵抗の比を有する、工程；ならびに

該連結産物を検出する工程、を包含する、方法。

【請求項 34】

連結産物の各々が同数のヌクレオ塩基を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 1 つ以上の標的核酸が、固体支持体に固定されている、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 1 のプローブおよび前記第 2 のプローブのうちの少なくとも 1 つが、検出可能な標識を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

前記検出可能な標識が、放射性同位元素、化学発光部分、生物発光部分、フルオロフォア、またはリガンドである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記検出工程が：

前記連結産物を回収する工程；および

該回収した連結産物を電気泳動により分離する工程、を包含する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記電気泳動が、非ふるい媒体におけるキャピラリー電気泳動により実行される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記共有結合がリガーゼによって達成される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記リガーゼが熱安定性リガーゼである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記接触工程、ハイブリダイズ工程、連結工程、および放出工程が、複数回繰り返される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

複数の標的核酸分子を分離する方法であって：

請求項 1 に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーを、該複数の標的核酸の各々に結合し、それによって、複数の移動度改変標的核酸を形成する工程であって、同数のヌクレオチド残基を有する標的核酸の各々は、異なる電荷 対 並進摩擦抵抗の比を有する、工程；および

該複数の移動度改変標的核酸を分画する工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 4】

前記複数の標的核酸が、連鎖終結配列決定法および化学切断配列決定法からなる群より選択される配列決定法により生成される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

1 つ以上の標的核酸中の複数の選択されたヌクレオチド配列を検出する方法であって：

a) 該標的核酸と、複数のヌクレオ塩基ポリマープライマーとを接触させる工程であって、それによって第 1 のヌクレオ塩基ポリマープライマーおよび第 2 のヌクレオ塩基ポリマープライマーの各々が、複数の選択されたヌクレオチド配列の各々の反対端で相補鎖にハイブリダイズし、該第 1 のヌクレオ塩基ポリマープライマーおよび該第 2 のヌクレオ塩基ポリマープライマーの各々の少なくとも 1 つは、請求項 3 に記載される移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーである、工程；

b) 該第 1 のヌクレオ塩基ポリマープライマーの各々および該第 2 のヌクレオ塩基ポリマープライマーの各々を、デオキシヌクレオシド三リン酸基質の存在下で、DNA 重合活性により伸長する工程；

c) 伸長した各第 1 のヌクレオ塩基ポリマープライマーと該標的核酸との間および伸長した各第 2 のヌクレオ塩基ポリマープライマーと該標的核酸との間の塩基対形成相互作用により形成される複数の塩基対構造を変性する工程；

d) 工程 (a) ~ (c) を複数回繰り返して複数のポリメラーゼ連鎖反応産物を形成する工程であって、該ポリメラーゼ連鎖反応産物の各々は、異なる電荷 対 並進摩擦抵抗の比を有する、工程；ならびに

e) 該ポリメラーゼ連鎖反応産物を検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項 4 6】

前記ポリメラーゼ連鎖反応産物の各々が、同数のヌクレオ塩基を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 1 つ以上の標的核酸が、固体支持体に固定されている、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記第 1 のヌクレオ塩基ポリマープライマー、前記第 2 のヌクレオ塩基ポリマーポリマー、または基質デオキシヌクレオシド三リン酸のうちの少なくとも 1 つが、検出可能な標識を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 9】

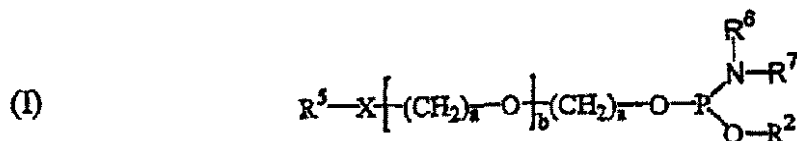
前記検出工程が、非ふるい媒体におけるキャピラリー電気泳動による前記複数のポリメ

ラーゼ連鎖反応産物の分画を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 0】

以下の構造：

【化 3】



を有する移動度改変ホスホルアミダイト試薬であって、ここで：

R^2 は、少なくとも 2 つの炭素原子を含むアルキル、アリール、 $(R^8)_3Si-$ 、塩基安定性保護基、および $R^5-X-[(CH_2)_a-O]_b-(CH_2)_a-$ からなる群より選択され、ここで、各 R^8 は、直鎖および分枝鎖のアルキルおよびアリールからなる群より独立して選択され；

R^5 は、水素、保護基、レポーター分子、およびリガンドからなる群より選択され；

R^6 および R^7 は、各々独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{20}$ アリール、および $C_{20} \sim C_{27}$ アリールアルキルからなる群より選択され；

X は、 O 、 S 、 NH 、および $NH-C(O)$ からなる群より独立して選択され；

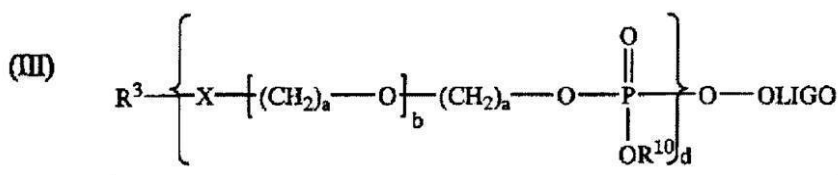
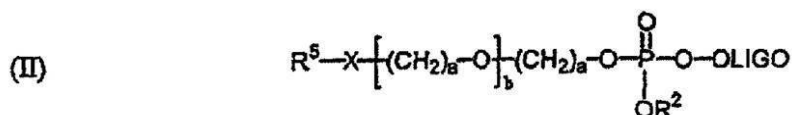
各 a は、独立して、1 ~ 6 の整数であり；そして

b は、0 ~ 40 の整数である、移動度改変ホスホルアミダイト試薬。

【請求項 5 1】

少なくとも 1 つの移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーを備えるキットであって、該移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーが、以下の構造式 (II) または (III)：

【化 4】



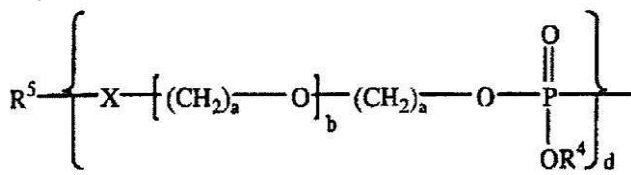
に従う、配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーに連結された移動度改変ポリマーまたはその塩を含み、ここで：

R^2 は、少なくとも 2 つの炭素原子を含むアルキル、アリール、 $(R^8)_3Si-$ 、塩基安定性保護基、および $R^5-X-[(CH_2)_a-O]_b-(CH_2)_a-$ からなる群より選択され、ここで、各 R^8 は、直鎖および分枝鎖のアルキルおよびアリールからなる群より独立して選択され；

R^5 は、水素、保護基、レポーター分子、およびリガンドからなる群より選択され；

R^3 は、

【化 5】



であり；

各 R^{10} は、水素および R^2 からなる群より独立して選択され；

各 R^4 は、水素および R^2 からなる群より独立して選択され；

各 X は、 O 、 S 、 NH 、および $NH-C(O)$ からなる群より独立して選択され；

各 a は、独立して、 $1 \sim 6$ の整数であり；

各 b は、独立して、 $0 \sim 40$ の整数であり；

各 d は、独立して、 $1 \sim 200$ の整数であり；そして

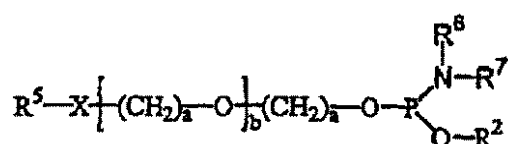
OLIGO は、配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーであるが、ただし、少なくとも1つの R^{10} または少なくとも1つの R^4 は、水素ではない、キット。

【請求項52】

少なくとも1つの移動度改変ホスホルアミダイト試薬を含むキットであって、該試薬が、以下の構造：

【化6】

(I)



を有し、ここで：

R^5 は、水素、保護基、レポーター分子、およびリガンドからなる群より選択され；

R^6 および R^7 は、各々独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{20}$ アリール、および $C_{20} \sim C_{27}$ アリールアルキルからなる群より選択され；

X は、 O 、 S 、 NH 、および $NH-C(O)$ からなる群より選択され；

a は、 $1 \sim 6$ の整数であり；

R^2 は、少なくとも2つの炭素原子を含むアルキル、アリール、 $(R^8)_3Si-$ 、塩基安定性保護基、および $R^5-X-[(CH_2)_a-O]_b-(CH_2)_a-$ からなる群より選択され、ここで、各 R^8 は、直鎖および分枝鎖のアルキルおよびアリールからなる群より独立して選択され；そして

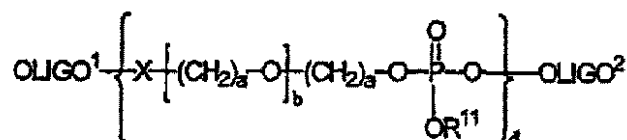
b は、 $0 \sim 40$ の整数である、キット。

【請求項53】

移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーまたはその塩であって、以下の構造式 (IV)：

【化7】

(IV)



に従う、第1の配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの3'末端および第2の配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーの5'末端に連結された移動度改変ポリマーを含み、ここで：

R^{11} は、水素、少なくとも2つの炭素原子を含むアルキル、アリール、 $(R^8)_3Si-$ 、塩基安定性保護基、 $R^5-X-[(CH_2)_a-O]_b-(CH_2)_a-$ 、保護基、レポーター分子、およびリガンドからなる群より選択され、ここで、各 R^8 は、直鎖および分枝鎖のアルキルおよびアリールからなる群より独立して選択されるが、ただし、少なくとも1つの R^{11} は水素ではなく；

各 X は、 O 、 S 、 NH 、および $NH-C(O)$ からなる群より独立して選択され；

各 a は、独立して、 $1 \sim 6$ の整数であり；

各 b は、独立して、 $0 \sim 40$ の整数であり；

d は、1 ~ 200 の整数であり；

OLIGO¹ は、第1の配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーであり；そして

OLIGO² は、第2の配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーである、移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマーまたはその塩。

【請求項54】

OLIGO¹ およびOLIGO² のうちの少なくとも1つが、ポリエチレンオキシドポリマーを含む、請求項53に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項55】

前記ポリエチレンオキシドポリマーが、モノメチルポリエチレンオキシドポリマーである、請求項54に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項56】

前記ポリエチレンオキシドポリマーが、少なくとも2000ダルトンの分子量を有する、請求項54に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【請求項57】

前記ポリエチレンオキシドポリマーが、少なくとも5000ダルトンの分子量を有する、請求項54に記載の移動度改変配列特異的ヌクレオ塩基ポリマー。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

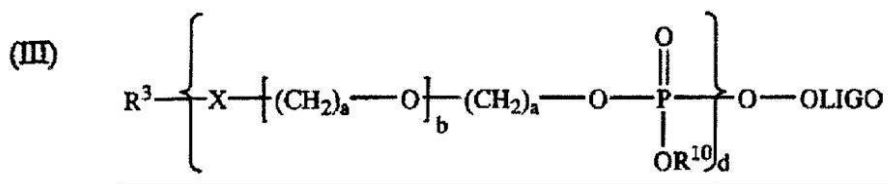
【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

【化11】



に従う化合物またはその塩である。ここで：

R³ は、

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

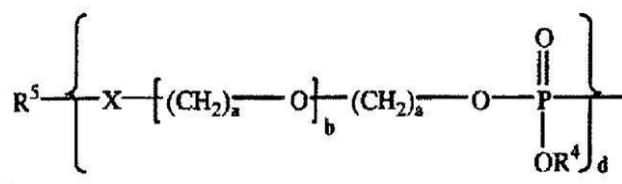
【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

【化12】



であり；

R²、R⁵、a、b、X、およびOLIGOは、式(I)および(II)において先に定義された通りであり；

各dは、独立して、1 ~ 200の整数であり；そして

各R⁴および各R¹⁰は、水素およびR²からなる群より独立して選択されるが、ただし、少なくとも1つのR¹⁰または少なくとも1つのR⁴は、水素ではない。

【化 1 7】



【化 1 8】



OLIGOは、少なくとも1つのR¹⁰または少なくとも1つのR⁴が水素以外である場合、少なくとも5つのヌクレオ塩基を代表的に含む配列特異的なヌクレオ塩基ポリマーである。