

【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2年1月16日(2020.1.16)

【公表番号】特表2019-534025(P2019-534025A)

【公表日】令和1年11月28日(2019.11.28)

【年通号数】公開・登録公報2019-048

【出願番号】特願2019-524385(P2019-524385)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/10	(2006.01)
C 1 2 Q	1/6869	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6844	(2018.01)
C 1 2 Q	1/6851	(2018.01)
C 1 2 N	15/11	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/10	Z N A Z
C 1 2 Q	1/6869	
C 1 2 Q	1/6844	Z
C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 N	15/11	Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年10月30日(2019.10.30)

【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】

ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの検出、定量、配列決定、増幅、またはクローニングにおける使用のための、捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用であって、
該捕捉プローブオリゴヌクレオチドが、5'-3'に、

(i)(a) 最も5'にあるヌクレオチドが、末端5'リン酸基を有するDNAヌクレオチドである、あらかじめ決定された配列の少なくとも3個の5'連続ヌクレオチド(1A)、

(b) 任意で、領域1Aの3'に位置づけられた、縮重ヌクレオチドまたはあらかじめ決定されたヌクレオチドの領域(1B)、

(c) ユニバーサルプライマー結合部位を含む、3'領域(1C)を含む、第1のヌクレオチドセグメント；

(ii)(a) 第1のセグメントのあらかじめ決定された配列1Aに相補的である、ヌクレオチドの連続配列(2A)、

(b) 最も3'にあるヌクレオチドが、プロックされた3'末端基を有する末端ヌクレオチドである、少なくとも2個のヌクレオチドの領域を含む、第2のヌクレオチドセグメント

を含み、第1および第2の領域が、ハイブリダイズしないリンカー部分を介して共有結合で連結されており、かつ該ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドがLNA修飾オリゴヌクレオチドである、前記使用。

【請求項2】

前記ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、請求項1に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項3】

前記ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオアートヌクレオシド間結合を含む、請求項1または2に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項4】

前記ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドが、LNAギャップマー(gapmer)オリゴヌクレオチドなどのギャップマーオリゴヌクレオチドである、請求項1~3のいずれか一項に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項5】

前記ハイブリダイズしないリンカーが、アルキルリンカー、ポリエチレングリコールリンカー、非ヌクレオシド炭水化物リンカー、光切断性リンカー(PCスペーサー)、アルキルジスルフィドリンカー、1,2-ジデオキシリボースもしくは脱塩基フランの領域、またはハイブリダイズしない塩基の基を含むヌクレオシドの領域からなる群より選択される、請求項1~4のいずれか一項に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項6】

領域1Aが、少なくとも2個または少なくとも3個の連続DNAヌクレオチドを含み；かつ領域2Aが、領域1Aに相補的であるDNAヌクレオチドを含む、請求項1~5のいずれか一項に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項7】

前記オリゴヌクレオチドが領域1Bを含み、領域1Bが、少なくとも3~30個の例えばDNAヌクレオチドなどの縮重ヌクレオチドの領域を含むか；または

前記オリゴヌクレオチドが領域1Bを含み、領域1Bが、少なくとも3~30個の例えばDNAヌクレオチドなどのあらかじめ決定されたヌクレオチドの領域を含む、
請求項1~6のいずれか一項に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項8】

領域2Bが、ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'ヌクレオチドに相補的である少なくとも2個または3個のヌクレオチドの領域を含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項9】

領域2B上の3'末端が、3'-OH基を含まないヌクレオチド修飾体、例えば、3'デオキシリボース、2',3'-ジデオキシリボース、1',3'-ジデオキシリボース、1',2',3'-トリデオキシリボース、逆位リボース、3'ホスフェート、3'アミノ、3'標識、例えば3'ビオチン、および3'蛍光体からなる群より選択される修飾体；または非ヌクレオシド修飾体、例えば、非リボース糖、脱塩基フラン、リンカー基(例えば、請求項5に記載のものなど)、チオール修飾物質(例えば、C6SH、C3SH)、アミノ修飾物質、グリセロール、もしくはコンジュゲート、および標識からなる群より選択される非ヌクレオシド修飾体のいずれかである、請求項1~8のいずれか一項に記載の捕捉プローブオリゴヌクレオチドの使用。

【請求項10】

以下の段階を含む、試料におけるヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドを検出、定量、配列決定、增幅、またはクローニングするための方法であって、該ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドがLNA修飾オリゴヌクレオチドである、前記方法：

- (a) 任意で、試料のRNアーゼ処理を行う段階、
- (b) 捕捉プローブオリゴヌクレオチドと試料とを、ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドに対する捕捉プローブオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で混合する段階、
- (c) 捕捉プローブオリゴヌクレオチドの5'末端とヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'末端との、T4 DNAリガーゼ媒介性ライゲーションを行う段階、
- (d) 捕捉プローブオリゴヌクレオチドに相補的であるユニバーサルプライマーを添加する段階、
- (e) ユニバーサルプライマーの5'-3'鎖伸長を行う段階、
- (f) 段階(e)において得られた鎖伸長産物を検出、定量、配列決定、增幅、またはクロ-

ニングする段階。

【請求項 1 1】

前記ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、請求項10に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドが、ホスホロチオアートヌクレオシド間結合を含む、請求項10または11に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドが、LNAギャップマーオリゴヌクレオチドなどのギャップマーオリゴヌクレオチドである、請求項10～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

段階(b)において、捕捉プローブオリゴヌクレオチドの領域2Bが、ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'領域にハイブリダイズし、かつユニバーサルプライマーが、捕捉プローブオリゴヌクレオチドの領域1Aに相補的である、請求項10～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'末端を、DNAオリゴヌクレオチドの5'末端にライゲーションするためのT4DNAリガーゼの使用であって、該ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、前記使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 5】

本発明は、以下の段階を含む、例えば、哺乳動物またはヒトにおける、標的細胞または標的組織に濃縮されているヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドを同定するための方法を提供する；

- (a) 異なる核酸塩基配列を有するヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの混合物を、哺乳動物に投与する段階、
- (b) 該オリゴヌクレオチドを、例えば少なくとも24～48時間の期間にわたって、哺乳動物内に分布させる段階、
- (c) 哺乳動物の標的細胞または標的組織から、修飾オリゴヌクレオチドの集団を単離する段階、
- (d) 以下のために修飾オリゴヌクレオチドの集団を配列決定する段階を含む、本発明による方法を行う段階、
- (e) 哺乳動物の標的組織に濃縮されているヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチド配列を同定する段階。

【本発明1001】

糖修飾オリゴヌクレオチドのPCRまたは配列決定における使用のための捕捉プローブオリゴヌクレオチドであって、5'-3'に、

(i)(a) 最も5'にあるヌクレオチドが、末端5'リン酸基を有するDNAヌクレオチドである、あらかじめ決定された配列の少なくとも3個の5'連続ヌクレオチド(1A)、

(b) 任意で、領域1Aの3'に位置づけられた、縮重ヌクレオチドまたはあらかじめ決定されたヌクレオチドの領域(1B)、

(c) ユニバーサルプライマー結合部位を含む、3'領域(1C)

を含む、第1のヌクレオチドセグメント；

(ii)(a) 第1のセグメントのあらかじめ決定された配列1Aに相補的である、ヌクレオチドの連続配列(2A)、

(b) 最も3'にあるヌクレオチドが、ブロックされた3'末端基を有する末端ヌクレオチドである、少なくとも2個のヌクレオチドの領域を含む、第2のヌクレオチドセグメント

を含み、第1および第2の領域が、ハイブリダイズしないリンカー部分を介して共有結合で連結されている、前記捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1002]

前記ハイブリダイズしないリンカーが、アルキルリンカー、ポリエチレングリコールリンカー、非ヌクレオシド炭水化物リンカー、光切断性リンカー（PCスペーサー）、アルキルジスルフィドリンカー、1,2-ジデオキシリボースもしくは脱塩基フランの領域、またはハイブリダイズしない塩基の基を含むヌクレオシドの領域からなる群より選択される、本発明1001の捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1003]

領域1Aが、少なくとも2個または少なくとも3個の連続DNAヌクレオチドを含む、本発明1001または1002の捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1004]

領域1Bを含む捕捉プローブオリゴヌクレオチドであって、領域1Bが、少なくとも3~30個の例えはDNAヌクレオチドなどの縮重ヌクレオチドの領域を含む、本発明1001~1003のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1005]

領域1Bを含む捕捉プローブオリゴヌクレオチドであって、領域1Bが、少なくとも3~30個の例えはDNAヌクレオチドなどのあらかじめ決定されたヌクレオチドの領域を含む、本発明1001~1003のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1006]

領域2Aが、領域1Aに相補的であるDNAヌクレオチドを含む、本発明1001~1006のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1007]

領域2Bが、ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'ヌクレオチドに相補的である少なくとも2個または3個のヌクレオチドの領域を含む、本発明1001~1007のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1008]

第1のヌクレオチドセグメントが、領域1Cの3'に位置づけられたさらなる領域1Dを含む（領域1Dは、短いリンカーが選択された場合に、自己塩基対形成（2A-2B）を達成するのに必要とされる内部柔軟性を有する分子を提供するために用いられ得、かつこれは、ネステッドPCR反応を設定するための外側プライマー部位として機能してもよく、かつこれは、捕捉プローブの3'端が固定化されている場合には、ライゲーション産物を固体支持体から放出するのに用いられ得る制限部位を導入するためにも用いられ得る（これは法律用語で適正に記述されるべきである））、本発明1001~1008のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1009]

領域2B上の3'末端が、3'-OH基を含まないヌクレオチド修飾体、例えは、3'デオキシリボース、2',3'-ジデオキシリボース、1',3'-ジデオキシリボース、1',2',3'-トリデオキシリボース、逆位リボース、3'ホスフェート、3'アミノ、3'標識、例えは3'ビオチン、および3'蛍光体からなる群より選択される修飾体；または非ヌクレオシド修飾体、例えは、非リボース糖、脱塩基フラン、リンカー基（例えは、本発明1002のものなど）、チオール修飾物質（例えは、C6SH、C3SH）、アミノ修飾物質、グリセロール、もしくはコンジュゲート、および標識からなる群より選択される非ヌクレオシド修飾体のいずれかである、本発明1001~1009のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチド。

[本発明1010]

ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの検出、定量、配列決定、増幅、またはクローニングにおける使用のための、本発明1001~1010のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオ

チドの使用。

[本発明1011]

以下の段階を含む、試料におけるヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドを検出、定量、配列決定、増幅、またはクローニングするための方法：

- (a) 任意で、試料のRNアーゼ処理を行う段階、
- (b) 前記本発明のいずれかの捕捉プローブオリゴヌクレオチドと試料とを、ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドに対する捕捉プローブオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で混合する段階、
- (c) 捕捉プローブオリゴヌクレオチドの5'末端とヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'末端との、T4 DNAリガーゼ媒介性ライゲーションを行う段階、
- (d) 捕捉プローブオリゴヌクレオチドに相補的であるユニバーサルプライマーを添加する段階、
- (e) ユニバーサルプライマーの5'-3'鎖伸長を行う段階、
- (f) 段階(e)において得られた鎖伸長産物を検出、定量、配列決定、増幅、またはクローニングする段階。

[本発明1012]

段階(b)において、捕捉プローブオリゴヌクレオチドの領域2Bが、ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'領域にハイブリダイズし、かつユニバーサルプライマーが、捕捉プローブオリゴヌクレオチドの領域1Aに相補的である、本発明1011の方法。

[本発明1013]

段階(f)が、鎖伸長産物のPCR増幅、例えばqPCR増幅、ならびに任意で、伸長産物のクローニングおよび/または配列決定を含む、本発明1011または1023の方法。

[本発明1014]

以下の段階を含む、哺乳動物における標的細胞または標的組織に濃縮されているヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドを同定するための方法：

- (a) 異なる核酸塩基配列を有するヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの混合物を、哺乳動物に投与する段階、
- (b) 該オリゴヌクレオチドを、例えば少なくとも24~48時間の期間にわたって、哺乳動物内に分布させる段階、
- (c) 哺乳動物の標的細胞または標的組織から、修飾オリゴヌクレオチドの集団を単離する段階、
- (d) 以下のため修飾オリゴヌクレオチドの集団を配列決定する段階を含む、前記本発明のいずれかの方法を行う段階、
- (e) 哺乳動物の標的組織に濃縮されているヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチド配列を同定する段階。

[本発明1015]

ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'末端を、DNAオリゴヌクレオチドの5'末端にライゲーションするためのT4DNAリガーゼの使用であって、該ヌクレオシド修飾オリゴヌクレオチドの3'ヌクレオシドがLNAヌクレオシドである、前記使用。