

【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19年1月18日(2007.1.18)

【公表番号】特表2006-507003(P2006-507003A)

【公表日】平成18年3月2日(2006.3.2)

【年通号数】公開・登録公報2006-009

【出願番号】特願2004-555631(P2004-555631)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成18年11月21日(2006.11.21)

【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】

以下の段階を含む、方法試料中の標的核酸の標的核酸配列に対応する転写産物の産生方法：

(1) 鋳型として標的核酸を用いてDNAポリメラーゼでセンスプロモータープライマーをプライマー伸長させ、該センスプロモータープライマーが、センス転写プロモーターを含む5'末端部分と標的核酸配列に相補的な3'末端部分とを含む段階；

(2) センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを得るため、得られたセンスプロモーターを含む第一鎖cDNAをそれ自身にライゲーションする段階；

(3) 転写基質を得るため、第一鎖cDNAを含むセンスプロモーターにアンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドをアニーリングさせる段階；および

(4) 転写基質を転写させ、標的核酸配列に対応する転写産物を産生する段階。

【請求項2】

以下の段階を含む、請求項1記載の方法：

(1) 標的核酸を得る段階；

(2) センス転写プロモーターを含む5'末端部分と標的に相補的な3'末端部分とを含む、センスプロモータープライマーを得る段階；

(3) 標的核酸とセンスプロモータープライマーとの複合体を形成させるため、センスプロモータープライマーを標的核酸とアニーリングさせる段階；

(4) 標的配列に相補的な第一鎖cDNAを得るため、ポリメライゼーション反応条件下で、標的核酸とセンスプロモータープライマーとの複合体をDNAポリメラーゼと接触させる段階；

(5) センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを得るため、ライゲーション条件下で、第一鎖cDNAをそれ自身にライゲーションする段階；

(6) アンチセンスプロモーターオリゴを得る段階；

(7) 環状の転写基質を得るため、センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAにアンチセンスプロモーターオリゴをアニーリングさせる段階；および

(8) 転写条件下で、環状の転写基質をRNAポリメラーゼと接触させて、その際に転写産

物を得る段階。

【請求項 3】

アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドのアニールリングおよび転写基質の転写の前に、転写プロモーターの3'である部位および標的相補配列の5'である部位において請求項1記載の段階(2)または請求項2記載の段階(5)で得られるセンスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを直線化し、センスプロモーターを含む直線状第一鎖cDNAが得られる段階を含み；アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドのアニールリングが、直線状転写基質を得るために、該アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドを、該センスプロモーターを含む直線状第一鎖cDNAにアニールさせることを含む、請求項1または2記載の方法

【請求項 4】

転写基質の転写前に、直線状転写基質を得るために、転写プロモーターの3'である部位および標的相補配列の5'である部位において請求項1記載の段階(3)または請求項2記載の段階(7)で得られる転写基質を直線化する段階を含む、請求項1または2記載の方法

【請求項 5】

転写産物を得る段階、付加的なセンスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNA、付加的な環状転写基質、付加的なセンスプロモーターを含む直線状第一鎖cDNA、および/または付加的な直線状転写基質を得るために、および/またはさらなる転写産物を転写し、それにより請求項1～4に記載の方法のいずれか一つを適用することによって、転写産物量を増幅するために、標的核酸として転写産物を用いる段階を含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドが表面に付着もしくは固定化される、または分析物結合物質(ABS)に付着する、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

転写産物が、RNA、DNAもしくは修飾DNA、または修飾RNAを含み、639位および784位の両方において改変アミノ酸を有するT7 RNAP Y639F変異酵素またはT7 RNAP変異酵素を含むRNAポリメラーゼを用いて、および/または5-アリルアミノ-UTPなどの塩基置換リボヌクレオチド、またはdNTPまたは2'-フルオロ-、2'-アミノ-、2'-メトキシ-、もしくは2'-アジド-置換2'-デオキシリボヌクレオチドのような2'-置換2'-デオキシリボヌクレオチドのような標準的ではないヌクレオチド基質を用いて、転写産物を産生することができる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

標的核酸配列が、mRNA、特定試料中のmRNAの単一種または全てのmRNAのどちらかを含み、および/または転写産物が(a)インビトロまたはインビボ翻訳に；(b)一つまたは複数の遺伝子をインビボで沈黙化させるためのRNAiとしての使用に；(c)発現アレイまたはマイクロアレイを作製するための表面へのスポットに；(d)遺伝子プロファイリングのためのアレイまたはマイクロアレイ用のハイブリダイゼーションプローブの作製に；または(e)RACE(random amplification of cDNA ends)における使用のためのまたはハイブリダイゼーションプローブの作製用のようなmRNAからの第一鎖cDNAの産生に用いられる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

標的核酸が、DNAまたはtRNA、rRNA、ミトコンドリアRNA、葉緑体RNA、マイクロRNA、もしくは1つまたは複数の全長mRNA分子を含むmRNAを含むRNAである、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

センスプロモーターが、一本鎖擬似プロモーター、合成プロモーター、またはファージN4 vRNAPに対する一本鎖プロモーターを含み、かつ転写用転写基質が、アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドがアニールすることなくセンスプロモーターを含む環状または直線状の第一鎖cDNAを含み、かつアンチセンスプロモーターオリゴがこの方法では提供されない、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 1】**

センスプロモータープライマーが、オリゴ-(dT)配列、アンカーオリゴ-(dT)<sub>n</sub>X配列、標的特異的配列、およびランダム配列から選択されるその3'末端において標的に相補的な部分を含み、かつ5'末端が任意でリン酸またはトポイソメラーゼ部分を含む、請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 1 2】**

以下の段階を含む、鋳型に相補的な転写産物の量を増幅させるための請求項5記載の方法：

- (1) 転写産物を得る段階；
- (2) 転写産物の3'末端に相補的な3'末端部分および任意で、5'末端にリン酸基またはトポイソメラーゼ部分を含むセンスプロモータープライマーを得る段階；
- (3) センスプロモータープライマーを転写産物にアニーリングさせる段階；
- (4) 第一鎖cDNAを得るため、転写産物にアニーリングしたプロモータープライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼにより、DNA合成条件下でプライマー伸長させる段階；
- (5) 任意で、第一鎖cDNAにアニーリングしているRNAを除去する段階；
- (6) センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを得るため、第一鎖cDNAの3'末端にその5'末端を共有結合させる、第一鎖cDNAをライゲーションする段階；
- (7) 環状の転写基質を得るため、センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAにアンチセンスプロモーターオリゴをアニーリングさせる段階；および
- (8) さらに転写産物を得るため、転写条件下で、環状の転写基質をRNAポリメラーゼと接触させる段階。

**【請求項 1 3】**

センスプロモータープライマーが、(a)転写に使用されるRNAポリメラーゼがN4 vRNAP、ミニvRNAP、および変異型のミニvRNAPから選択される場合にはN4プロモーター；または(b)RNAポリメラーゼによって使用される擬似プロモーターまたは合成プロモーターから選択される一本鎖センスプロモーターを含み、かつアンチセンスプロモーターオリゴが、さらなる転写産物を得るために使用されない、請求項12記載の方法。

**【請求項 1 4】**

以下の段階を含む、組織切片の細胞または組織において、標的核酸を含んだ標的配列に相補的であるセンスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを含む転写基質の作製方法：

- (1) 転写基質中のこのプロモーターを用いてRNAを合成できるRNAポリメラーゼに対するセンス転写プロモーターを含む5'リン酸化部分と、(ii) 標的核酸を含んだ標的配列に相補的である3'末端とを含むセンスプロモータープライマーと、ハイブリダイズ条件下で組織切片の細胞または組織を接触させる段階；
- (2) 標的配列に相補的である第一鎖cDNAを得るため、組織切片のセンスプロモータープライマー含有細胞または組織を逆転写酵素と逆転写条件下で接触させる段階；
- (3) センスプロモーターを含む直線状の第一鎖cDNAを得る段階；
- (4) センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを得るため、センスプロモーターを含む直線状の第一鎖cDNAをライゲーションする段階；および
- (5) 環状の転写基質を得るため、センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAにアンチセンスプロモーターオリゴをアニーリングさせる段階。

**【請求項 1 5】**

以下の段階を含む、アンチセンス転写産物の転写のための転写基質を得るための方法：

- (1) プロモーター配列がないプライマーを用いて標的配列を含む標的核酸に相補的な第一鎖cDNAを合成する段階、
- (2) 任意で、第一鎖cDNAを尾部付けし、標的配列に相補的でない付加配列を第一鎖cDNAの3'末端に付加する段階、
- (3) センスプロモータープライマーを含む第二鎖cDNAを得るために、第一鎖cDNAの特異的な3'配列に相補的な3'末端における配列を有するセンスプロモータープライマーをプライマー伸長させる段階、

(4) センスプロモータープライマーを含む環状の第二鎖cDNAを得るため、センスプロモータープライマーを含む第二鎖cDNAをライゲーションする段階、

(5) 任意で、センスプロモータープライマーを含む環状の第二鎖cDNAを、転写プロモーターの3'である部位およびセンスプロモータープライマーを含む環状の第二鎖cDNAのセンスプロモータープライマー部分の標的相補配列の5'である部位で直線化する段階、

(6) 環状または直線状の転写基質を得るため、センスプロモータープライマーを含む環状または直線状の第二鎖cDNAにアンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドをアニーリングさせる段階、および

(7) 任意で、段階(6)で得られる環状または直線状の転写基質を転写させる段階。

【請求項16】

二つのプロモーター配列を含むプロモータープライマーであって、(a)両プロモーター配列が、本発明の二つの異なるRNAポリメラーゼに対するような第一鎖cDNAのセンスプロモーターをコードする、または(b)第一のプロモーター配列がセンスプロモーターを含み、かつ第二のプロモーター配列がアンチセンスプロモーターを含む、プロモータープライマー。

【請求項17】

標的配列の3'末端に相補的な3'末端部分とセンス転写プロモーター配列を含む5'末端部分とを含み、鋳型として標的配列を用いて、センスプロモータープライマーについての逆転写酵素触媒性またはDNAポリメラーゼ触媒性のプライマー伸長によって得られる直線状第一鎖cDNAのセンスプロモーター配列がプライマー伸長産物の3'末端に操作可能に連結されるまで、センス転写プロモーター配列が標的配列の転写のためにセンス転写プロモーターとして操作可能でない、センスプロモータープライマー。

【請求項18】

センス転写プロモーターが(a)T7、T3、またはSP6 RNAポリメラーゼを含むT7型RNAポリメラーゼに対する二本鎖プロモーターのためのセンスプロモーター配列；(b)一本鎖擬似プロモーター；または(c)野生型または変異型ミニvRNAPを含むファージN4 vRNAポリメラーゼに対する一本鎖プロモーターであり；および/またはセンスプロモータープライマーの3'末端部分が(a)オリゴ(dT)配列、(b)アンカーオリゴ(dT)配列、(c)4つの標準的なヌクレオチドのランダム配列、または(d)標的核酸における特異的な既知配列に相補的な配列であり；および/またはセンスプロモータープライマーが(a)1つまたは複数のdUMPヌクレオチド、および/または(b)標的配列に相補的な3'領域と転写プロモーター5'部分との間に1つまたは複数の転写終結配列を含む、請求項17記載のセンスプロモータープライマー。

【請求項19】

(i)それぞれが異なる標的配列に相補的である複数の特異的センスプロモータープライマー；および/または(ii)異なるRNAポリメラーゼによって認識される異なるセンスプロモーター配列をコードする複数の異なるセンスプロモータープライマーを含む、複数のセンスプロモータープライマーを含む組成物。

【請求項20】

標的配列に対応する転写産物を産生するために適当な試薬を含み、少なくとも1つのセンスプロモータープライマーおよびアンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドを含むキット。

【請求項21】

(i)サーマス・スコトダクタス(Thermus scotoductus)に感染するファージTS2126に由来する、ThermoPhage(商標) RNAリガーゼIIのようなライゲーション用スプリントの非存在下でssDNAの非相同性分子内ライゲーションを触媒するリガーゼを含む、プロモーターを含む直線状第一鎖cDNAを環状化するためのリガーゼの最適化組成物、ならびに(ii)使用説明書をさらに含む、またはプロモーターを含む第一鎖cDNAを環状化するためのリガーゼの最適化組成物、(ii)dUMP残基を有するセンスプロモータープライマーを用いて導入されたdUMP残基を有するセンスプロモーターを含む環状第一鎖cDNAを直線化するためのウラシル-N-グリコシラーゼのような酵素の最適化組成物、ならびに(iii)使用説明書をさらに含む、

請求項20記載のキット。

【請求項 2 2】

(i)プロモータを含む直線状第一鎖cDNAを環状化するためのリガーゼの最適化組成物、(ii)任意で、センスプロモーターを含む環状第一鎖cDNAを直線化するための最適化組成物、および(iii)転写産物を産生するために得られた転写基質中の二本鎖プロモーターを用いるRNAポリメラーゼの最適化組成物、および(iv)使用説明書をさらに含む、請求項20または21記載のキット。

【請求項 2 3】

アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドが(i)溶液中に存在する；(ii)固体支持体に固定化される；または(iii)分析物結合基質(ABS)に付着する、請求項20～22のいずれか一項記載のキット。

【請求項 2 4】

(i)DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素、および/または(ii)ベタイン(トリメチルグリシン)をさらに含む、請求項20～22のいずれか一項記載のキット。

【請求項 2 5】

アンチセンスプロモーターのための配列を含むオリゴヌクレオチドに連結する分析物結合基質(ABS)を含み、アンチセンスプロモーター配列が同族のRNAポリメラーゼに対する機能的な二本鎖プロモーターを得るためシグナルプローブ中のセンスプロモーター配列と複合体化可能であり、複合体化シグナルプローブが検出可能な転写物を得るためRNAポリメラーゼによって転写可能である組成物。

【請求項 2 6】

オリゴヌクレオチドがABSにその5'末端または5'部分により連結される；および/またはアンチセンスプロモーター配列を含むオリゴヌクレオチドがアンチセンスプロモーター配列の3'または5'である付加的なヌクレオチドを含み、付加的なヌクレオチドがアンチセンスプロモーター配列のシグナルプローブ中のセンスプロモーター配列との複合体化とは無関係な形でシグナルプローブに結合しない、請求項25記載の組成物。

【請求項 2 7】

ABSが、他の抗体を含む、分析物が抗原である場合にはモノクローナル抗体を含む抗体；分析物が核酸またはポリヌクレオチドではない場合には、SELEX法を用いて選択される核酸(DNA、RNA、または修飾DNAまたはRNAモノヌクレオシドを含むDNAとRNAの双方のモノヌクレオシドから構成される核酸を含む)；分析物が、フットプリンティングのような方法を用いて同定できる特異的配列が結合する、各々のタンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、または小分子分析物である場合には、オペレーター、プロモーター、複製起点、またはステロイドホルモン受容体複合体もしくは特異的なタンパク質に強固に結合する制限酵素エンドヌクレアーゼによって認識される配列のような特異的な核酸配列；タンパク質；分析物が無作為化ペプチドライブラリーから選択されることが出来るペプチドである場合には、ペプチド；分析物が一種類の抗体だけを含んだ試料における抗体である場合には、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のプロテインAを含む抗体結合タンパク質；分析物が糖タンパク質または多糖である場合には、レクチン；分析物がホルモンである場合には、ホルモン受容体；分析物がホルモン受容体である場合には、ホルモン；分析物が酵素である場合には、酵素阻害剤；または分析物が酵素阻害剤である場合には、酵素である、請求項25記載の組成物。

【請求項 2 8】

アンチセンスプロモーターオリゴヌクレオチドに連結されるABSが、生化学的分子、生体高分子もしくは生体高分子の断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、酵素、ホルモン、受容体、抗原、抗体、核酸(DNAまたはRNA)、多糖、または脂質である分析物と結合する、請求項25記載の組成物。

【請求項 2 9】

試料中の少なくとも1つの分析物を検出または定量化するためのキットであって、1つまたは複数のシグナルプローブ、アンチセンスプロモーターのための配列を含むオリゴヌク

レオチドに連結したABS(ABS-オリゴ)、および本発明の方法におけるそれらの使用説明書を含み、特に、シグナルプローブが環状シグナルプローブ(RCTシグナルプローブ)または直線状シグナルプローブ(LINTシグナルプローブ)であり、かつ1つまたは複数のシグナルプローブがセンスプロモーター配列の5'を連結する一本鎖鋳型を含み、シグナルプローブのセンスプロモーター配列とABS-オリゴのアンチセンスプロモーター配列との間の二本鎖プロモーター複合体が同族RNAポリメラーゼに対する機能的プライマーを含むキット。

【請求項30】

転写産物を産生するため、シグナルプローブをABS-オリゴと複合体化させることによって転写基質において二本鎖プロモーターを用いるRNAポリメラーゼの最適化組成物をさらに含む、請求項29記載のキット。

【請求項31】

分析物の検出および/または定量化のためのシグナル伝達系であって、

(i) RCTシグナルプローブおよびLINTシグナルプローブからなる群より選択され、シグナルの鋳型の3'末端に連結されたセンスプロモーターを含む、シグナルプローブ；および(i) アンチセンスプロモーター配列(ABS-オリゴ)を含むオリゴヌクレオチドに連結された分析物基質(ABS)を含み；シグナルプローブ-ABS-オリゴ複合体の転写から、試料中の分析物の存在および/または量が示される、シグナル伝達系

【請求項32】

RCTシグナルプローブおよびLINTシグナルプローブからなる群より選択されるシグナルプローブが、転写条件下で転写用の二本鎖プロモーターを認識するRNAポリメラーゼに対するセンスプロモーターを含み、かつセンスプロモーターの5'を連結する(すなわち、センスプロモーターが一本鎖シグナル鋳型の3'末端に連結される)一本鎖シグナル鋳型がQ-レプリカーゼの基質および任意で、1つまたは複数の転写終結配列をコードする、請求項31記載のシグナル伝達系。

【請求項33】

以下の段階を含む、試料中のまたは試料由来の分析物を検出するための方法：

(1) プロモーターを認識するRNAポリメラーゼに対する二重鎖プロモーターのアンチセンスプロモーター部分に対する配列を含むオリゴヌクレオチドに連結されたABSを含んだ、分析物結合物質-オリゴヌクレオチド(ABS-オリゴ)を得る段階；

(2) シグナルプローブを得る段階、その際に、シグナルプローブが鋳型の3'末端に連結されたセンスプロモーターを含み、その際に、センスプロモーターがABS-オリゴのアンチセンスプロモーターに十分に相補的であって、複合体に結合するRNAポリメラーゼを用いた鋳型の転写に使用できる、複合体を形成する段階；

(3) 試料中に分析物が存在する場合に分析物を結合させた表面とABS-オリゴを、該表面に分析物が存在する場合に分析物へABS-オリゴが結合可能とする分析物結合条件下で接触させる段階；

(4) 結合していないABS-オリゴの除去を可能とする条件下で表面を洗浄する段階；

(5) 表面に存在する場合にABS-オリゴとのシグナルプローブの複合体化を可能とする複合体化条件下で、表面をシグナルプローブと接触させる段階；

(6) 任意で、結合していないシグナルプローブの除去を可能とする条件下で表面を洗浄する段階；

(7) ABS-オリゴとシグナルプローブとの間の複合体を用いて、鋳型がコードする産物の転写を可能とする条件下で、表面をRNAポリメラーゼと接触させる段階；

(8) 存在する場合、鋳型がコードする転写産物を検出する段階。

【請求項34】

以下の段階を含む、鋳型に相補的な転写産物の量を増幅させるための方法：

(1) ABS-オリゴと複合体化されるシグナルプローブの鋳型の転写によって転写産物を得る段階；

(2) 転写産物の3'末端に相補的な3'末端部分および任意で、5'末端にリン酸基またはトポイソメラーゼ部分を含むセンスプロモータープライマーを得る段階；

(3) プロモータープライマーを転写産物にアニーリングさせる段階；

(4) 第一鎖cDNAを得るため、転写産物にアニーリングしたプロモータープライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼにより、DNA合成条件下でプライマー伸長させる段階；

(5) 任意で、第一鎖cDNAにアニーリングしているRNAを除去する段階；

(6) センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAを得るため、第一鎖cDNAの3'末端にその5'末端を共有結合させる、第一鎖cDNAをライゲーションする段階；

(7) 環状の転写基質を得るため、センスプロモーターを含む環状の第一鎖cDNAにアンチセンスプロモーターオリゴをアニーリングさせる段階；

(8) さらに転写産物を得るため、転写条件下で、環状の転写基質をRNAポリメラーゼと接触させる段階。

【請求項35】

(i) 直線状のセンスプロモーターを含む第一鎖cDNAを得るために、環状のセンスプロモーターの第一鎖cDNAを直線化し、

(ii) 転写のための直線状基質を得るために、アンチセンスプロモータープライマーをセンスプロモーターを含む直線状第一鎖cDNAのセンスプロモーター配列にアニーリングさせ；および/または

(iii) さらに転写産物を得るために、転写のための直線状基質を転写条件下でRNAポリメラーゼと接触させる、

請求項34記載の方法。

【請求項36】

センスプロモータープライマーが、(a) 転写に使用されるRNAポリメラーゼがN4 vRNAP、ミニvRNAP、および変異型のミニvRNAPから選択される場合、N4プロモーター；または(b) RNAポリメラーゼによって使用される擬似プロモーターまたは合成プロモーターから選択される一本鎖センスプライマーを含み、アンチセンスプロモーターオリゴが、さらに転写産物を得るために使用されない、請求項34または35記載の方法。