

【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23年9月1日 (2011.9.1)

【公表番号】特表2010-532986(P2010-532986A)

【公表日】平成22年10月21日 (2010.10.21)

【年通号数】公開・登録公報2010-042

【出願番号】特願2010-515596(P2010-515596)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/48 Z

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月8日 (2011.7.8)

【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】

試料中の N A D 依存性リガーゼを発現する微生物の存在を検出する方法であって、

( a ) 試料を、試料中の N A D 依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させるステップと、

( b ) こうして接触させた試料を、N A D 依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートするステップと、

( c ) 基質核酸分子に対する N A D 依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲーションされた核酸分子の存在を特異的に決定して、N A D 依存性リガーゼを発現する微生物の存在を示すステップと、

を含む方法。

【請求項 2】

細菌細胞又は他の N A D 依存性リガーゼを発現する微生物の、前記細胞、細菌、又は他の微生物に対する作用物質に対する耐性をスクリーニングする方法であって、

試料中において、

( a ) 細菌細胞又は微生物を作用物質にさらすステップと、

( b ) 試料を、試料中の N A D 依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させるステップと、

( c ) こうして接触させた試料を、N A D 依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートするステップと、

( d ) 基質核酸分子に対する N A D 依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲーションされた核酸分子が存在するかを特異的に検出するステップであって、耐性がある場合には、ライゲーションされた核酸分子が検出されるか、又は高レベルで検出されるステップと、

を含む方法。

【請求項 3】

1つ又は複数の細菌細胞又は他のNAD依存性リガーゼを発現する微生物を死滅させるか又はその増殖を抑えることが可能な作用物質をスクリーニングする方法であって、

試料中において、

(a) 細菌細胞又は微生物を作用物質にさらすステップと、

(b) 試料を、試料中のNAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させるステップと、

(c) こうして接触させた試料を、NAD依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートするステップと、

(d) 基質核酸分子に対するNAD依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲーションされた核酸分子が存在するかを特異的に検出するステップであって、作用物質が細菌又は微生物を死滅させるか又はその増殖を抑えることが可能な場合には、新たな核酸分子が検出されないか、又は低レベルで検出されるステップと、

を含む方法。

#### 【請求項4】

対象における細菌細胞若しくは他のNAD依存性リガーゼを発現する微生物の存在に関連する感染、又は疾患を診断する方法であって、

対象から得られた試料中において、

(a) 試料を、試料中のNAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させるステップと、

(b) こうして接触させた試料を、NAD依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートするステップと、

(c) 基質核酸分子に対するNAD依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲーションされた核酸分子の存在を特異的に決定して、感染又は疾患の指標として細菌又は他の微生物の存在を示すステップと、

を含む方法。

#### 【請求項5】

血小板含有試料中における細菌汚染の存在を検出する方法であって、

(a) 血小板試料を、試料中のNAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させるステップと、

(b) こうして接触させた試料を、NAD依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートするステップと、

(c) 基質核酸分子に対するNAD依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲーションされた核酸分子の存在を特異的に決定して、血小板含有試料中における細菌汚染の存在を示すステップと、

を含む方法。

#### 【請求項6】

試料中の、特異的な抗細菌剤に対して耐性である目的の細菌の存在を決定するための方法であって、

(a) 目的の細菌を、特異的な抗細菌剤を含むインキュベーション培地中でインキュベートするステップと、

(b) インキュベートされた目的の細菌を、特異的な捕捉試薬を用いて捕捉するステップと、

(c) インキュベートされた目的の細菌を、細菌の溶解を引き起こすことが可能か、又は細菌に由来するNAD依存性リガーゼの存在が決定され得る程度に細菌の細胞壁の透過性を増大させることが可能な作用物質にさらすステップと、

(d) (i) 試料を、試料中のNAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させること、

(ii) こうして接触させた試料を、NAD依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートすること、及び

(iii) 基質核酸分子に対するNAD依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲ-

ションされた核酸分子の存在を特異的に決定して、(NAD依存性リガーゼを発現する) 目的の細菌の存在を示すこと

により、試料中の目的の(耐性)細菌の存在を決定するステップと、を含む方法。

【請求項 7】

試料中の、特異的な抗細菌剤に対して耐性である目的の細菌の存在を決定するための方法であって、

(a) 特異的な捕捉試薬を用いて目的の細菌を捕捉するステップと、

(b) こうして捕捉された目的の細菌を、特異的な抗細菌剤を含むインキュベーション培地中でインキュベートするステップと、

(c) インキュベートされた目的の細菌を、細菌の溶解を引き起こすことが可能か、又は目的の細菌に由来する細胞内物質の存在が決定され得る程度に細菌の細胞壁の透過性を増大させることが可能な作用物質にさらすステップと、

(d) 目的の細菌に由来する細胞内物質の存在を決定するステップと、を含む方法。

【請求項 8】

目的の細菌に由来する細胞内物質の存在を決定するステップが、

(i) 試料を、試料中のNAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子と接触させること、

(ii) こうして接触させた試料を、NAD依存性リガーゼ活性に適した条件下でインキュベートすること、及び

(iii) 基質核酸分子に対するNAD依存性リガーゼの作用の結果生じる、ライゲーションされた核酸分子の存在を特異的に決定して、(NAD依存性リガーゼを発現する) 目的の細菌の存在を示すこと、

を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

試料中のNAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子が、試料中の、存在する場合は、NAD依存性リガーゼよりも過剰なモル濃度で用いられる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

NAD依存性リガーゼ活性の基質となる核酸分子が、NAD依存性リガーゼを発現する微生物のゲノム核酸とヌクレオチド配列の同一性を欠くことによって、ライゲーションされた核酸分子の検出の特異性が確実なものとなる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

NAD依存性リガーゼ活性に適した条件が、さらなるNADを試料に供給することを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

NAD依存性リガーゼ活性が内因性NAD<sup>+</sup>により支持される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

NAD依存性リガーゼを放出させるための、試料中のNAD依存性リガーゼを発現する微生物の選択的溶解をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

試料からのNAD依存性リガーゼの捕捉をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

試料中のNAD依存性リガーゼを発現する微生物の存在の指標としての、NAD依存性リガーゼ活性の使用。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、

(a) 試料中の N A D 依存性リガーゼ活性の基質となる少なくとも 1 つの核酸分子であって、固体支持体上に固定されているか、又は前記固体支持体上に基質核酸分子を固定するための手段と共に提供されている、少なくとも 1 つの核酸分子と、

(b) (基質核酸分子に対する) 試料中の N A D 依存性リガーゼ活性により産生されるライゲーションされた核酸分子の特異的な検出のためのプライマーと、  
を含むキット。

【請求項 17】

請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、

(a) 特異的な抗細菌剤に対して耐性である目的の細菌を捕捉するための特異的な捕捉剤と、

(b) 目的の細菌が耐性を有する特異的な抗細菌剤を任意選択で含む、目的の細菌のためのインキュベーション培地と、

(c) 目的の細菌の細胞溶解を引き起こすことが可能か、又は目的の細菌に由来する N A D 依存性リガーゼの存在が決定され得る程度に細菌の細胞壁の透過性を増大させることが可能な、適切な作用物質と、

(d) 試料中の N A D 依存性リガーゼ活性の基質となる少なくとも 1 つの核酸分子と、  
を含むキット。

【請求項 18】

実質的にヌクレアーゼ及び / 又はリガーゼ汚染物質のないリゾスタフィン調製物を製造するための方法であって、

ヌクレアーゼ及び / 又はリガーゼ活性は低減されるがリゾスタフィンのエンドペプチダーゼ活性は実質的に影響を受けない条件下で、ヌクレアーゼ及び / 又はリガーゼ汚染物質を含むリゾスタフィン調製物を加熱するステップを含む方法。

【請求項 19】

実質的にヌクレアーゼ及び / 又はリガーゼ汚染物質のないリゾスタフィン調製物。

【請求項 20】

請求項 18 に記載の方法に従って製造されるリゾスタフィン調製物。