

【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6年9月10日(2024.9.10)

【国際公開番号】WO2022/051485

【公表番号】特表2023-539360(P2023-539360A)

【公表日】令和5年9月13日(2023.9.13)

【年通号数】公開公報(特許)2023-173

【出願番号】特願2023-514385(P2023-514385)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 M 1/00(2006.01)

C 1 2 M 1/34(2006.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6844 Z Z N A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 M 1/34 Z

C 1 2 N 15/11 Z

10

20

【手続補正書】

【提出日】令和6年9月2日(2024.9.2)

【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】

サンプル中の標的核酸配列を含む標的オリゴヌクレオチドを検出する方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、オリゴヌクレオチドタグ、標的補体、及び検出オリゴヌクレオチドを含む、検出プローブと接触させることであって、前記標的補体が前記標的オリゴヌクレオチドの前記標的核酸配列にハイブリダイズして、反応生成物を形成する条件下で、接触させることと、

(b) 捕捉オリゴヌクレオチドが固定化される支持体表面を、前記反応生成物を含む混合物と接触させることであって、前記反応生成物の前記オリゴヌクレオチドタグが前記捕捉オリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、固定化された検出複合体を形成する条件下で、接触させることと、

(c) 前記固定化された検出複合体を、増幅テンプレートを含む検出混合物と接触させることと、

(d) 前記増幅テンプレートを増幅して、検出標識部位を含む1つ以上の核酸配列を含むアンプリコンを形成することと、

(e) 前記アンプリコンを、標識及び前記検出標識部位に相補的である核酸配列を含む、検出試薬と接触させることであって、前記検出試薬の前記核酸配列が前記アンプリコンの前記検出標識部位にハイブリダイズする条件下で、接触させることと、

(f) 前記検出標識部位に結合した前記標識を検出することと、を含む、方法。

【請求項2】

サンプル中の標的核酸配列を含む標的オリゴヌクレオチドを検出する方法であって、前記方法が、

30

40

50

(a) 前記サンプルを、

(i) 一本鎖 D N A 配列を含むオリゴヌクレオチドタグ、一本鎖 R N A 配列を含む標的補体、及び一本鎖 D N A 配列を含む検出オリゴヌクレオチドを含む、検出プローブ、並びに

(i i) 一本鎖 D N A 配列を含むオリゴヌクレオチドタグ及び一本鎖 D N A 配列を含むアンカー配列を含む、アンカー試薬と接触させることであって、

前記検出プローブの前記標的相補体が前記標的オリゴヌクレオチドの前記標的核酸配列にハイブリダイズして、前記オリゴヌクレオチドタグ、前記標的オリゴヌクレオチド及び前記標的補体の前記標的核酸配列を含む二本鎖 R N A 二本鎖を含む反応生成物を形成する、接触させることと、

(b) 複数の捕捉オリゴヌクレオチドが個別の結合ドメインに固定化されている 1 つ以上の電極を含む支持体表面を、前記反応生成物を含む混合物と接触させることであって、前記反応生成物の前記オリゴヌクレオチドタグが前記捕捉オリゴヌクレオチドにハイブリダイズして前記支持体表面に検出複合体を形成する条件下で、接触させることと、

(c) 前記支持体表面を R N a s e と接触させて、結合していない検出プローブの一本鎖 R N A を分解することと、

(d) 前記固定化された検出複合体を、ローリングサークル増幅 (R C A) テンプレート及びポリメラーゼを含む検出混合物と接触させることと、

(e) R C A によって前記テンプレートを増幅して、前記検出複合体に付着した伸長配列を形成することであって、前記伸長配列が、検出標識部位を含む複数の核酸配列を含む、形成することと、

(f) 前記伸長配列を、電気化学発光 (E C L) 標識及び前記伸長配列の前記検出標識部位に相補的である核酸配列を含む、検出試薬と接触させることであって、前記検出試薬の前記核酸配列が前記検出標識部位にハイブリダイズする条件下で、接触させることと、

(g) 前記 E C L 標識を、E C L 共反応物を含む E C L 読み取り緩衝液と接触させ、前記電極に電位を印加することによって、前記伸長配列に結合した前記 E C L 標識を検出することと、を含む、方法。

【請求項 3】

サンプル中の標的ヌクレオチド配列を検出する方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを、

(i) 一本鎖オリゴヌクレオチドタグ及び前記サンプル中の前記標的ヌクレオチド配列の第 1 の領域に相補的である第 1 の核酸配列を含む標的化プローブ、並びに

(i i) 検出オリゴヌクレオチド及び前記標的ヌクレオチド配列の第 2 の領域に相補的である第 2 の核酸配列を含む、検出プローブ、を含む混合物と接触させることであって、

前記標的化プローブの前記第 1 の核酸配列及び前記検出プローブの第 2 の核酸配列が、前記標的オリゴヌクレオチドの隣接する核酸配列に相補的である、接触させることと、

(b) 核酸リガーゼの存在下で、前記標的オリゴヌクレオチド、標的化プローブ及び検出プローブを含む前記混合物をインキュベートすることであって、前記標的化プローブ及び前記検出プローブが前記標的オリゴヌクレオチドのそれらの対応するヌクレオチド配列に結合し、前記核酸リガーゼが前記標的化及び検出プローブを連結して、前記オリゴヌクレオチドタグ及び検出オリゴヌクレオチドを含む反応生成物を形成する条件下で、インキュベートすることと、

(c) 捕捉オリゴヌクレオチドが固定化されている支持体表面を、前記反応生成物を含む前記混合物と接触させることであって、前記反応生成物の前記オリゴヌクレオチドタグが前記捕捉オリゴヌクレオチドにハイブリダイズして、固定化された検出複合体を形成する条件下で、接触させることと、

(d) 前記固定化された検出複合体を、増幅テンプレートを含む検出混合物と接触させることと、

10

20

30

40

50

(e) 前記増幅テンプレートを増幅して、検出標識部位を含む1つ以上の核酸配列を含むアンプリコンを形成することと、

(f) 前記アンプリコンを、標識及び前記検出標識部位に相補的である核酸配列を含む、検出試薬と接触させることであって、前記検出試薬の前記核酸配列が前記検出標識部位にハイブリダイズする条件下で、接触させることと、

(g) 前記支持体表面に結合した前記標識を検出することと、を含む、方法。

【請求項4】

サンプル中の標的ヌクレオチド配列を検出するためのキットであって、前記キットが、

(a) 1つ以上の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドを含む支持体表面と、

(b) オリゴヌクレオチドタグ、標的補体、及び検出オリゴヌクレオチドを含む、検出プローブと、

(c) 増幅テンプレートと、

(d) 核酸リガーゼと、

(e) 核酸ポリメラーゼと、

(f) 標識及び核酸配列を含む、検出試薬と、を含む、キット。

【請求項5】

オリゴヌクレオチドタグ及びアンカーオリゴヌクレオチドを含む、アンカー試薬を更に含む、請求項4に記載のキット。

【請求項6】

前記アンカーオリゴヌクレオチドが、約10～約30核酸の長さである、請求項5に記載のキット。

【請求項7】

前記増幅テンプレートが、5'末端ヌクレオチド配列及び3'末端ヌクレオチド配列を含む直鎖増幅テンプレートを含み、前記5'及び3'末端ヌクレオチド配列が、前記検出オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、内部ヌクレオチド配列が、前記アンカー試薬の前記アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができ、前記増幅テンプレートの前記5'及び3'末端ヌクレオチド配列が、前記内部配列と重複しない、請求項5又は6に記載のキット。

【請求項8】

前記増幅テンプレートが、5'末端ホスフェート基を含む、請求項7に記載のキット。

【請求項9】

前記増幅テンプレートが、5'-GTTCTGTC-3' (配列番号1666)の5'末端配列及び5'-GTGCTA-3' (配列番号1667)の3'末端配列を含む、請求項4～8のいずれか一項に記載のキット。

【請求項10】

前記増幅テンプレートが、

(a) 5'-CAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAG-3' (配列番号1668)

);

(b) 5'-AAGAGAGTAGTACAGCA-3' (配列番号1669);

(c) 5'-GTTCTGTCATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGTGTCTA-3' (配列番号1670)

);又は

(d) 5'-GCTGTGCAATATTTTCAGTGAATGCGAGTCCGTCTAAGAGAGTAGTACAGCAAGAGCGTCTGA-3' (配列番号1671)

のヌクレオチド配列を含む、請求項4～8のいずれか一項に記載のキット。

【請求項11】

前記増幅テンプレートが、環状増幅テンプレートを含む、請求項4に記載のキット。

【請求項12】

前記検出プローブの前記検出オリゴヌクレオチドが、前記増幅テンプレートの前記5'末端配列に相補的な第1の配列と、前記増幅テンプレートの前記3'末端配列に相補的な

隣接する第 2 の配列とを含む、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 13】

前記検出試薬の前記核酸配列が、

(a) 5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 1672) の 14 又は 15 個の連続したヌクレオチドに対して少なくとも 90% 配列同一性を有する配列

;

(b) 配列 5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T - 3' (配列番号 1672)

); 又は

(c) 配列 5' - C A G T G A A T G C G A G T C C G T C T A A G - 3' (配列番号 1668)

を含む、請求項 4 ~ 12 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 14】

前記検出試薬の前記標識が、電気化学発光 (ECL) 標識を含む、請求項 4 ~ 13 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 15】

前記支持体表面が、カーボンベースの支持体表面を含む、請求項 4 ~ 14 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 16】

複数の捕捉オリゴヌクレオチドが、個別の結合ドメイン内の支持体表面上に固定化され、アレイを形成する、請求項 4 ~ 15 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 17】

前記支持体表面上に固定化された前記捕捉オリゴヌクレオチドが、

(a) 配列番号 1 ~ 64 から選択される配列の少なくとも 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は 36 個の連続したヌクレオチドを有する捕捉オリゴヌクレオチドと、

(b) 配列番号 1 ~ 64 から選択される配列に対する少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の同一性を有する配列を含む捕捉オリゴヌクレオチドと、

(c) 配列番号 1 ~ 64 から選択される配列に対する少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の同一性を有する配列の少なくとも 20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、又は 36 個の連続したヌクレオチドを有する捕捉オリゴヌクレオチドと、

(d) 配列番号 1 ~ 64 から選択される配列を含む捕捉オリゴヌクレオチドと、

(e) (a) ~ (d) のうちのいずれかから選択される捕捉オリゴヌクレオチドと、から選択される、請求項 16 に記載のキット。

30

【請求項 18】

サンプル中の標的ヌクレオチド配列を検出するためのキットであって、前記キットが、

(a) 1 つ以上の固定化された捕捉オリゴヌクレオチドを含む支持体表面と、

(b) オリゴヌクレオチドタグ及びアンカーオリゴヌクレオチドを含む、アンカー試薬と、

40

(c) オリゴヌクレオチドタグ、標的補体、及び一本鎖 DNA 検出オリゴヌクレオチドを含む、検出プローブと、

(d) 電気化学発光 (ECL) 標識及び核酸配列を含む、検出試薬と、

(e) 5' 末端ヌクレオチド配列及び 3' 末端ヌクレオチド配列を含む直鎖増幅テンプレートであって、前記 5' 及び 3' 末端ヌクレオチド配列が、前記検出オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第 1 の内部ヌクレオチド配列が、前記アンカー試薬の前記アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができ、第 2 の内部ヌクレオチド配列が、前記検出試薬の前記核酸配列の相補体にハイブリダイズすることができ、前記増幅テンプレートの前記 5' 及び 3' 末端ヌクレオチド配列が、前記第 1 及び第 2 の内部配列と重複しない、直鎖増幅テンプレートと、

50

- (f) 核酸リガーゼと、
- (g) 核酸ポリメラーゼと、を含む、キット。

【請求項 19】

- サンプル中の標的ヌクレオチド配列を検出するためのキットであって、前記キットが、
- (a) 固定化された捕捉オリゴヌクレオチドを含む支持体表面と、
 - (b) オリゴヌクレオチドタグ及びアンカーオリゴヌクレオチドを含む、アンカー試薬と、
 - (c) 一本鎖オリゴヌクレオチドタグ及び前記サンプル中の前記標的ヌクレオチド配列の第 1 の領域に相補的である第 1 の核酸配列を含む標的化プローブと、
 - (d) 検出オリゴヌクレオチド及び前記標的ヌクレオチド配列の第 2 の領域に相補的である第 2 の核酸配列を含む、検出プローブであって、前記標的化プローブの前記第 1 の核酸配列及び前記検出プローブの第 2 の核酸配列が、前記標的ヌクレオチドの隣接する配列に相補的である、検出プローブと、
 - (e) 5' 末端ヌクレオチド配列及び 3' 末端ヌクレオチド配列を含む直鎖増幅テンプレートであって、前記 5' 及び 3' 末端ヌクレオチド配列が、前記検出オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、第 1 の内部ヌクレオチド配列が、前記アンカー試薬の前記アンカーオリゴヌクレオチドの相補体にハイブリダイズすることができ、第 2 の内部ヌクレオチド配列が、前記検出プローブの前記核酸配列の相補体にハイブリダイズすることができ、前記増幅テンプレートの前記 5' 及び 3' 末端ヌクレオチド配列が、前記第 1 及び第 2 の内部配列と重複しない、直鎖増幅テンプレートと、
 - (f) 核酸リガーゼと、
 - (g) 核酸ポリメラーゼと、
 - (h) 電気化学発光 (E C L) 標識及び核酸配列を含む、検出試薬と、を含む、キット

【請求項 20】

- (a) 直鎖増幅テンプレート並びに、ライゲーション緩衝液、アデノシン三リン酸 (A T P)、ウシ血清アルブミン (B S A)、T w e e n 2 0、T 4 D N A リガーゼ、及びそれらの組み合わせから選択される、1 つ以上の追加の成分；又は
- (b) B S A、緩衝液、デオキシヌクレオシド三リン酸 (d N T P)、T w e e n 2 0、P h i 2 9 D N A ポリメラーゼ、又はそれらの組み合わせから選択されるローリングサークル増幅のための 1 つ以上の成分
- を含む検出混合物を更に含む、請求項 4 ~ 19 のいずれか一項に記載のキット。