

【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 3 年 2 月 18 日 (2021.2.18)

【公開番号】特開 2021-139 (P2021-139A)

【公開日】令和 3 年 1 月 7 日 (2021.1.7)

【年通号数】公開・登録公報 2021-001

【出願番号】特願 2020-168502 (P2020-168502)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)

C 0 7 H 19/10 (2006.01)

C 0 7 H 19/14 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869

C 1 2 Q 1/6813 Z

C 0 7 H 19/10

C 0 7 H 19/14

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 12 月 4 日 (2020.12.4)

【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】

D N A 配列において標識されたヌクレオチドを検出する方法であって、

a) 核酸鋳型と、プライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体を形成するように該鋳型にハイブリダイズできるプライマーと、チオール含有化合物を含む開裂試薬とを用意するステップと；

b) 反応混合物を生じるように、該プライマーおよび鋳型に、D N A ポリメラーゼおよび第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加するステップであって、該第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートは、核酸塩基および糖を含み、該糖は、3' - O 上に開裂可能な保護基を含み、該開裂可能な保護基は、メチレンジスルフィドを含み、該デオキシヌクレオシドトリホスフェートはさらに、開裂可能なオキシメチレンジスルフィド含有リンカーを介して該核酸塩基と結合している第 1 の検出可能な標識を含む、ステップと；

c) 修飾されたプライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体を生じるように、該反応混合物を、D N A ポリメラーゼ触媒プライマー伸長反応を可能にする条件に供するステップであって、該第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが組み込まれる、ステップと；

d) 該修飾されたプライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体において該デオキシヌクレオシドトリホスフェートの該第 1 の検出可能な標識を検出するステップと；

e) 該修飾されたプライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体から該開裂可能な保護基および該検出可能な標識を除去するような条件下で、該開裂試薬を導入するステップと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記方法がさらに、ステップ b) の繰り返し中に第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加するステップを含み、該第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが、第 2 の検出可能な標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記チオール含有化合物がジチオベースの基を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記チオール含有化合物が、システイン、システアミン、ジチオ - コハク酸およびジチオトレイトールからなる群より選択される化合物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記チオール含有化合物が、2, 3 - ジメルカプト - 1 - プロパンスルホン酸ナトリウム塩、ジチオブチルアミン、メソ - 2, 5 - ジメルカプト - N, N, N', N' - テトラメチルアジパミド、2 - メルカプト - エタンスルホネート、および N, N' - ジメチル, N, N' - ビス(メルカプトアセチル) - ヒドラジンからなる群より選択される化合物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基が、前記第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基とは異なる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ b) において、A、G、C および T または U の類似体を表す、少なくとも 4 種の異なって標識された 3' - O メチレンジスルフィドでキャッピングされたデオキシヌクレオシドトリホスフェート化合物の混合物が使用される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出するステップが、前記組み込まれた第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基の決定を可能にする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

DNA 配列において標識されたヌクレオチドを検出する方法であって、

a) 核酸鋳型と、プライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体を形成するように該鋳型にハイブリダイズできるプライマーと、チオール含有化合物を含む開裂試薬と、開裂スカベンジャー試薬とを用意するステップと；

b) 反応混合物を生じるように、該プライマーおよび鋳型に、DNA ポリメラーゼおよび第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加するステップであって、該第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートは、核酸塩基および糖を含み、該糖は、3' - O 上に開裂可能な保護基を含み、該開裂可能な保護基は、メチレンジスルフィドを含み、該デオキシヌクレオシドトリホスフェートはさらに、開裂可能なオキシメチレンジスルフィド含有リンカーを介して該核酸塩基と結合している第 1 の検出可能な標識を含む、ステップと；

c) 修飾されたプライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体を生じるように、該反応混合物を、DNA ポリメラーゼ触媒プライマー伸長反応を可能にする条件に供するステップであって、該第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが組み込まれる、ステップと；

d) 該修飾されたプライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体において該デオキシヌクレオシドトリホスフェートの該第 1 の検出可能な標識を検出するステップと；

e) 該修飾されたプライマー / 鋳型ハイブリダイゼーション複合体から該開裂可能な保護基および該検出可能な標識を除去するような条件下で、該開裂試薬を導入するステップと；

f) 該開裂スカベンジャー試薬を導入するステップとを含む、方法。

【請求項 10】

前記方法がさらに、ステップ b) の繰り返し中に第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加するステップを含み、該第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが、

第 2 の検出可能な標識を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記チオール含有化合物がジチオベースの基を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記チオール含有化合物が、システイン、システアミン、ジチオ - コハク酸およびジチオトレイトールからなる群より選択される化合物を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記チオール含有化合物が、2, 3 - ジメルカプト - 1 - プロパンスルホン酸ナトリウム塩、ジチオブチルアミン、メソ - 2, 5 - ジメルカプト - N, N, N', N' - テトラメチルアジパミド、2 - メルカプト - エタンスルホネート、および N, N' - ジメチル, N, N' - ビス(メルカプトアセチル) - ヒドラジンからなる群より選択される化合物を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基が、前記第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基とは異なる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

ステップ b) において、A、G、C および T または U の類似体を表す、少なくとも 4 種の異なって標識された 3' - Oメチレンジスルフィドでキャッピングされたデオキシヌクレオシドトリホスフェート化合物の混合物が使用される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

前記検出するステップが、前記組み込まれた第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基の決定を可能にする、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記方法がさらに、ステップ b) の繰り返し中に第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートを添加するステップを含み、該第 2 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが、第 2 の開裂可能なオキシメチレンジスルフィドリンカーを介して結合している第 2 の検出可能な標識を含み、該第 2 の検出可能な検出可能な標識が、前記第 1 の検出可能な検出可能な標識とは異なる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 18】

ステップ b) において、A、G、C および T または U の類似体を表す、少なくとも 4 種の異なって標識された 3' - Oメチレンジスルフィドでキャッピングされたデオキシヌクレオシドトリホスフェート化合物の混合物が使用される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 19】

前記検出するステップが、前記組み込まれた第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの核酸塩基の決定を可能にする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

1 つまたは複数の DNA 配列決定試薬と、説明書と、チオール含有化合物を含む開裂試薬とを含む、キット。

【請求項 21】

緩衝液をさらに含む、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

開裂スカベンジャーをさらに含む、請求項 20 に記載のキット。

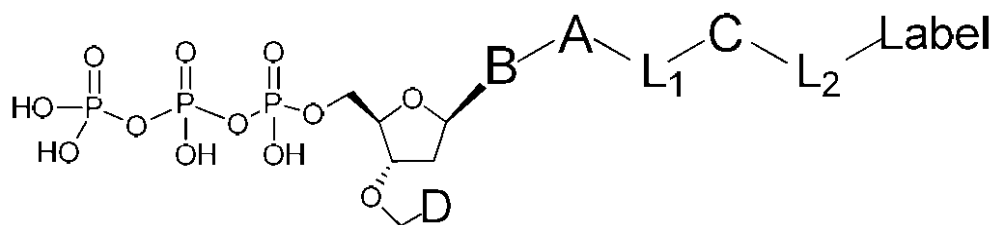
【請求項 23】

前記 1 つまたは複数の DNA 配列決定試薬が、ポリメラーゼ、プライマー、鋳型およびヌクレオチドを含む群より選択される、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 24】

請求項 1 または 9 に記載の方法であって、ここで、前記第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートは、下記：

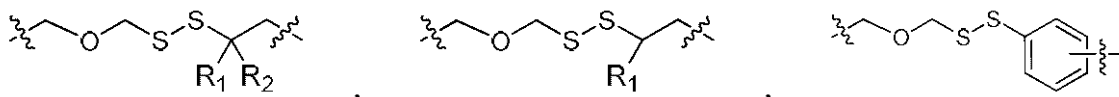
【化 4 1】



の構造を有し、

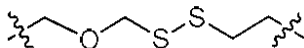
ここで、Dは、ジスルフィドアルキル、ジスルフィド置換アルキル基、ジスルフィドアリル、およびジスルフィド置換アリル基からなる群から選択され；Bは、核酸塩基であり；Aは、環外アミン、プロパルギルアミン、およびプロパルギルヒドロキシルからなる群から選択される結合基であり；Cは、

【化 4 2】



および

【化 4 3】



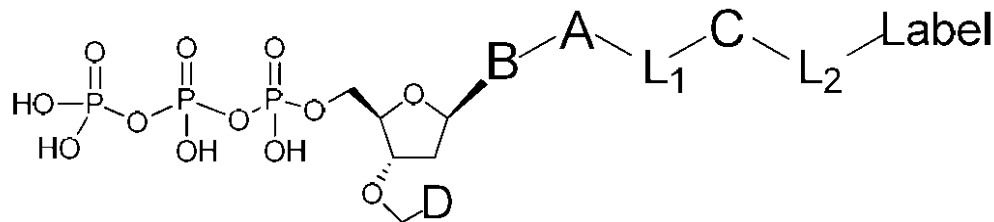
からなる群から選択される開裂可能な部位のコアであり、ここで、R₁ および R₂ は、独立して選択されるアルキル基であり；L₁ および L₂ は、接続基であり；そしてLabelは、フルオロフォア色素、エネルギー移動色素、質量タグ、ビオチンおよびハプテンからなる群から選択される標識である、

方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 または 9 に記載の方法であって、ここで、前記第 1 のデオキシヌクレオシドリホスフェートが、下記：

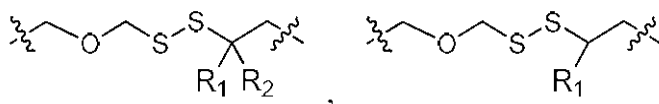
【化 5 1】



の構造を有し、

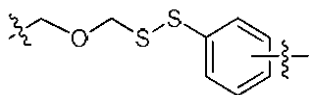
ここで、Dは、ジスルフィドアルキル、ジスルフィド置換アルキル基、ジスルフィドアリル、およびジスルフィド置換アリル基からなる群から選択され；Bは、核酸塩基であり、Aは、結合基であり、ここで、前記結合基Aは、プロパルギル、ヒドロキシメチル、環外アミン、プロパルギルアミンおよびプロパルギルヒドロキシルからなる群から選択される化学基であり；Cは、開裂可能な部位のコアであり、ここで、前記開裂可能な部位のコアは、

【化 5 2】



および

【化 5 3】



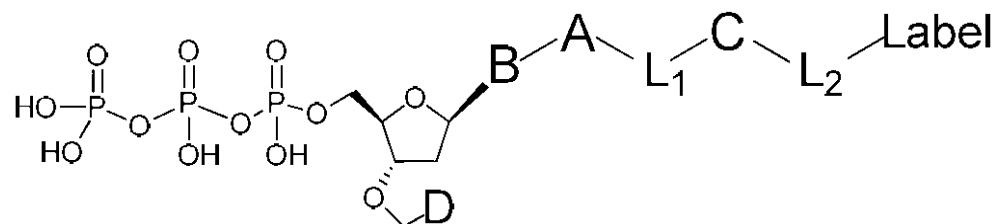
からなる群から選択され、ここで、 R_1 および R_2 は、独立して選択されるアルキル基であり；そして L_1 および L_2 は、接続基であり、ここで、 L_1 は、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_x-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2)_x-$ 、 $-\text{CONH}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$ および $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x-$ からなる群から選択され、ここで、 x は 0 ~ 10 であり、ここで、 L_2 は $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHCONH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}=\text{N}$ 、および $-\text{N}=\text{N}-$ 、アルキル、アリール、分枝鎖アルキル、分枝鎖アリールならびにそれらの組合せからなる群から選択され、そしてここで、Label は、フルオロフォア色素、エネルギー移動色素、質量タグ、ビオチンおよびハプテンからなる群から選択される検出可能な標識である、

方法。

【請求項 26】

請求項 1 または 9 に記載の方法であって、ここで、前記第 1 のデオキシヌクレオシドトリホスフェートが、下記：

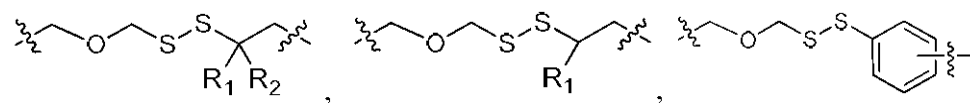
【化 6 1】



の構造を有し、

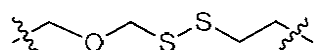
ここで、D は、ジスルフィドアルキル、ジスルフィド置換アルキル基からなる群から選択され；B は、核酸塩基であり；A は、プロパルギル、ヒドロキシメチル、環外アミン、プロパルギルアミンおよびプロパルギルヒドロキシルからなる群から選択される結合基であり；C は、

【化 6 2】



および

【化 6 3】



からなる群から選択される開裂可能な部位のコアであり、ここで、 R_1 および R_2 は、独

立して選択されるアルキル基であり； L_1 および L_2 は、接続基であり、ここで、 L_1 は、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_x-$ 、 $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2)_x-$ 、 $-\text{CONH}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$ 、および $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$ からなる群から選択され、ここで、 x は、 $0 \sim 10$ であり；そして Label は、フルオロフォア色素、エネルギー移動色素、質量タグ、ビオチンおよびハプテンからなる群から選択される、
方法。