

【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25年8月15日(2013.8.15)

【公表番号】特表2012-511927(P2012-511927A)

【公表日】平成24年5月31日(2012.5.31)

【年通号数】公開・登録公報2012-021

【出願番号】特願2011-542142(P2011-542142)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

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25年6月27日(2013.6.27)

【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、標的配列の少なくとも第二の対立遺伝子変種を含むことが疑われる核酸試料中の該標的配列の第一の対立遺伝子変種を検出するための方法：

(a) i. 核酸試料；

ii. 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該標的配列の該第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；

iii. 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダー(minor groove binder)を含む、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ；

iv. 該標的配列の領域に対して相補的である、第一の座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第一の座特異的プライマー；および

v. 第一の検出プローブ

を混合することによって、第一の反応混合物を形成する段階；

(b) 該第一の座特異的プライマーと該第一の対立遺伝子特異的プライマーとを用いて該第一の反応混合物に対して増幅反応を行い、第一のアンプリコンを形成する段階；ならびに

(c) 該第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって該第一のアンプリコンを検出し、それによって該核酸試料中の標的遺伝子の該第一の対立遺伝子変種を検出する段階。

【請求項 2】

前記第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を用いて、前記第一の対立遺伝子変種を定量する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

(d) (i) 核酸試料；

(ii) 第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、前記標的配列の前記第二の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第二の対立遺伝子特異的プライマー；

(iii) 前記第一の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ；

(iv) 該標的配列の領域に対して相補的である、第二の座特異的プライマーであって、該領域が、該第二の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第二の座特異的プライマー；および

(v) 第二の検出プローブ

を混合することによって、第二の反応混合物を形成する段階；

(e) 該第二の対立遺伝子特異的プライマーと該座特異的プライマーとを用いて該第二の反応混合物に対して増幅反応を行い、第二のアンプリコンを形成する段階；ならびに

(f) 該検出プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって該第二のアンプリコンを検出し、それによって該核酸試料中の標的遺伝子の該第二の対立遺伝子変種を検出する段階。

【請求項 4】

前記第一の反応混合物における前記第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を、前記第二の反応混合物における前記第二の検出プローブの検出可能な特性の変化と比較する段階をさらに含む、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項 6】

前記テールがGCに富む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

前記テールが、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項5記載の方法。

【請求項 9】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの融解温度(T_m)が50～55である、請求項1または3記載の方法。

【請求項 10】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、請求項1または3記載の方法。

【請求項 11】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項1または3記載の方法。

【請求項 12】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項1または3記載の方法。

【請求項 13】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記第一の対立遺伝子特異的プラ

イマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーならびに／または前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項15】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、請求項14記載の方法。

【請求項16】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項14記載の方法。

【請求項17】

前記改変塩基が、マッチ (matched) 標的配列および／またはマッチヌクレオチドとミスマッチ (mismatched) 標的配列および／またはミスマッチヌクレオチドとの間のT_mを増加させる任意の改変塩基である、請求項14記載の方法。

【請求項18】

前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内および／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の3'端、5'端、および／または内部位置にMGB部分を含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項19】

前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記MGB部分が、前記増幅反応中に前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブから切断されない、請求項18記載の方法。

【請求項21】

前記第一の検出プローブおよび／または前記第二の検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項1または3記載の方法。

【請求項22】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記核酸試料がゲノムDNA (gDNA) である、請求項1記載の方法。

【請求項24】

前記第一の反応混合物および／または前記第二の反応混合物が、ポリメラーゼ、dNTP、および／またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅に適した他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、請求項1または3記載の方法。

【請求項25】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項24記載の方法。

【請求項26】

前記増幅反応がリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (rtPCR) である、請求項1または3記載の方法。

【請求項27】

前記核酸試料が腫瘍試料から得られる、請求項1記載の方法。

【請求項28】

前記核酸試料が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、請求項1記載の方法。

【請求項 29】

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、請求項27記載の方法。

【請求項 30】

前記腫瘍が、Ras、EGFR、Kit、pTEN、および / またはp53における変異を含む、請求項27記載の方法。

【請求項 31】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および / またはコドン13中にある、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

(a) 核酸分子；

(b) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該対立遺伝子特異的プライマー；

(c) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ；

(d) 該標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマー；および

(e) 検出プローブ

を含む、反応混合物。

【請求項 34】

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 35】

前記テールがGCに富む、請求項34記載の反応混合物。

【請求項 36】

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、請求項34記載の反応混合物。

【請求項 37】

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項34記載の反応混合物。

【請求項 38】

前記対立遺伝子特異的プライマーの融解温度(T_m)が50 ～ 55 である、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 39】

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 40】

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 41】

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 42】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的

ヌクレオチド部分として用いられる、請求項41記載の反応混合物。

【請求項 4 3】

前記対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 4】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、請求項43記載の反応混合物。

【請求項 4 5】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項43記載の反応混合物。

【請求項 4 6】

前記改変塩基が、マッチ標的配列および／またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および／またはミスマッチヌクレオチドとの間のT_mを増加させる任意の改変塩基である、請求項43記載の反応混合物。

【請求項 4 7】

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、該対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の3'端、5'端、および／または内部位置にMGB部分を含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 4 8】

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項47記載の反応混合物。

【請求項 4 9】

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 0】

前記座特異的検出プローブが標識を含む、請求項49記載の反応混合物。

【請求項 5 1】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項49記載の反応混合物。

【請求項 5 2】

前記核酸分子がゲノムDNA (gDNA) である、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 3】

ポリメラーゼ、dNTP、および／または他の試薬もしくは緩衝液を含む、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 4】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項53記載の反応混合物。

【請求項 5 5】

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いられる、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 6】

前記核酸分子が腫瘍試料から得られる、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 7】

前記核酸分子が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、請求項33記載の反応混合物。

【請求項 5 8】

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、請求項56記載の反応混合物。

【請求項 5 9】

前記腫瘍が、Ras、EGFR、Kit、pTEN、および／またはp53における変異を含む、請求項56記載の反応混合物。

【請求項 6 0】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項59記載の反応混合物。

【請求項 6 1】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および/またはコドン13中にある、請求項60記載の反応混合物。

【請求項 6 2】

(a) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー：

(b) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブを含む、組成物。

【請求項 6 3】

前記標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、前記第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 4】

検出プローブをさらに含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記テールがGCに富む、請求項65記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、請求項65記載の組成物。

【請求項 6 8】

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項65記載の組成物。

【請求項 6 9】

前記対立遺伝子特異的プライマーの融解温度(T_m)が50 ～ 55 である、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 0】

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 1】

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 2】

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 3】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項72記載の組成物。

【請求項 7 4】

前記対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 7 5】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)またはチミン(T)である、請求項74記載の組成物。

【請求項 7 6】

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、請求項74記載の組成物。

【請求項 77】

前記改変塩基が、マッチ標的配列および/またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および/またはミスマッチヌクレオチドとの間のTmを増加させる任意の改変塩基である、請求項74記載の組成物。

【請求項 78】

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、該対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の3'端、5'端、および/または内部位置にMGB部分を含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 79】

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項78記載の組成物。

【請求項 80】

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項64記載の組成物。

【請求項 81】

前記座特異的検出プローブが標識を含む、請求項80記載の組成物。

【請求項 82】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項80記載の組成物。

【請求項 83】

核酸分子、ポリメラーゼ、dNTP、および/または他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、請求項62記載の組成物。

【請求項 84】

前記核酸分子がゲノムDNA (gDNA) である、請求項83記載の組成物。

【請求項 85】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項83記載の組成物。

【請求項 86】

前記核酸分子が腫瘍試料から得られる、請求項83記載の組成物。

【請求項 87】

前記核酸分子が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、請求項83記載の組成物。

。

【請求項 88】

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、請求項86記載の組成物。

【請求項 89】

前記腫瘍がRas、EGFR、Kit、pTEN、および/またはp53における変異を含む、請求項86記載の組成物。

【請求項 90】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項89記載の組成物。

【請求項 91】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および/またはコドン13中にある、請求項90記載の組成物。

【請求項 92】

2つまたはそれより多い容器の1つに独立して分配される以下の構成要素を含む該2つまたはそれより多い容器を含む、キット：

- a) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；および
- b) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ。

【請求項 9 3】

前記標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、前記第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含む、請求項92記載のキット。

【請求項 9 4】

検出プローブをさらに含む、請求項92記載のキット。

【請求項 9 5】

前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが標識を含まない、請求項92記載のキット。

【請求項 9 6】

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、請求項92記載のキット。

【請求項 9 7】

前記テールがGCに富む、請求項96記載のキット。

【請求項 9 8】

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、請求項96記載のキット。

【請求項 9 9】

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、請求項96記載のキット。

【請求項 1 0 0】

前記対立遺伝子特異的プライマーの融解温度(T_m)が50～55である、請求項92記載のキット。

【請求項 1 0 1】

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、請求項92記載のキット。

【請求項 1 0 2】

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、請求項92記載のキット。

【請求項 1 0 3】

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、請求項92記載のキット。

【請求項 1 0 4】

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、請求項103記載のキット。

【請求項 1 0 5】

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、請求項92記載のキット。

【請求項 1 0 6】

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)またはチミン(T)である、請求項105記載のキット。

【請求項 1 0 7】

前記改変塩基がロックド核酸(LNA)塩基である、請求項105記載のキット。

【請求項 1 0 8】

前記改変塩基が、マッチ標的配列および/またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および/またはミスマッチヌクレオチドとの間の T_m を増加させる任意の改変塩基である、請求項105記載のキット。

【請求項 1 0 9】

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、該対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の3'端、5'端、および/または内部位置にMGB部分を含む、請求項92記載のキット。

【請求項 1 1 0】

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、請求項10記載のキット。

【請求項 1 1 1】

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、請求項94記載のキット。

【請求項 1 1 2】

前記座特異的検出プローブが標識を含む、請求項111記載のキット。

【請求項 1 1 3】

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、請求項111記載のキット。

【請求項 1 1 4】

ポリメラーゼ、dNTP、および/または他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、請求項92記載のキット。

【請求項 1 1 5】

前記ポリメラーゼが熱安定性である、請求項114記載のキット。

【請求項 1 1 6】

Ras、EGFR、Kit、pTEN、および/またはp53における変異を検出するために使用される、請求項92～94のいずれか1項記載のキット。

【請求項 1 1 7】

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、請求項116記載のキット。

【請求項 1 1 8】

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および/またはコドン13中にある、請求項117記載のキット。

【請求項 1 1 9】

少なくとも1:1000、1:10,000、1:100,000、または1:1,000,000の検出選択性を有する、請求項1または3記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

[本発明1001]

以下の段階を含む、標的配列の少なくとも第二の対立遺伝子変種を含むことが疑われる核酸試料中の該標的配列の第一の対立遺伝子変種を検出するための方法：

(a) i. 核酸試料；

ii. 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該標的配列の該第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；

iii. 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダー (minor groove binder) を含む、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ；

iv. 該標的配列の領域に対して相補的である、第一の座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第一の座特異的プライマー；および

v. 第一の検出プローブ

を混合することによって、第一の反応混合物を形成する段階；

(b) 該第一の座特異的プライマーと該第一の対立遺伝子特異的プライマーとを用いて該第一の反応混合物に対して増幅反応を行い、第一のアンプリコンを形成する段階；ならびに

(c) 該第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって該第一のアンプリコンを検出し、それによって該核酸試料中の標的遺伝子の該第一の対立遺伝子変種を検出する段階。

[本発明1002]

前記第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を用いて、前記第一の対立遺伝子変種を定量する段階をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

以下の段階をさらに含む、本発明1001の方法：

(d) (i) 核酸試料；

(ii) 第二の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、前記標的配列の前記第二の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第二の対立遺伝子特異的プライマー；

(iii) 前記第一の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、第二の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ；

(iv) 該標的配列の領域に対して相補的である、第二の座特異的プライマーであって、該領域が、該第二の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、第二の座特異的プライマー；および

(v) 第二の検出プローブ

を混合することによって、第二の反応混合物を形成する段階；

(e) 該第二の対立遺伝子特異的プライマーと該座特異的プライマーとを用いて該第二の反応混合物に対して増幅反応を行い、第二のアンプリコンを形成する段階；ならびに

(f) 該検出プローブの検出可能な特性の変化を検出することによって該第二のアンプリコンを検出し、それによって該核酸試料中の標的遺伝子の該第二の対立遺伝子変種を検出する段階。

[本発明1004]

前記第一の反応混合物における前記第一の検出プローブの検出可能な特性の変化を、前記第二の反応混合物における前記第二の検出プローブの検出可能な特性の変化と比較する段階をさらに含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、本発明1001または1003の方法。

[本発明1006]

前記テールがGCに富む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

前記テールが長さ2~30ヌクレオチドである、本発明1005の方法。

[本発明1008]

前記テールが、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、本発明1005の方法。

[本発明1009]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーのTmが50 ~ 55 である、本発明1001または1003の方法。

[本発明1010]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20~900 nMである、本発明1001または1003の方法。

[本発明1011]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、本発明1001または1003

の方法。

[本発明1012]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、本発明1001または1003の方法。

[本発明1013]

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または該第二の対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的プライマーならびに／または前記第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロックプローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、本発明1001または1003の方法。

[本発明1015]

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、本発明1014の方法。

[本発明1017]

前記改変塩基が、マッチ (matched) 標的配列および／またはマッチヌクレオチドとミスマッチ (mismatched) 標的配列および／またはミスマッチヌクレオチドとの間のT_mを増加させる任意の改変塩基である、本発明1014の方法。

[本発明1018]

前記第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロックプローブが、前記第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブ内および／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロックプローブ内の3'端、5'端、および／または内部位置にMGB部分を含む、本発明1001または1003の方法。

[本発明1019]

前記第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロックプローブが3'端において伸長不可能である、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記MGB部分が、前記増幅反応中に前記第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブおよび／または前記第二の対立遺伝子特異的ブロックプローブから切断されない、本発明1018の方法。

[本発明1021]

前記第一の検出プローブおよび／または前記第二の検出プローブが座特異的検出プローブである、本発明1001または1003の方法。

[本発明1022]

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記核酸試料がゲノムDNA (gDNA) である、本発明1001の方法。

[本発明1024]

前記第一の反応混合物および／または前記第二の反応混合物が、ポリメラーゼ、dNTP、および／またはPCR増幅に適した他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、本発明1001または1003の方法。

[本 発 明1025]

前記ポリメラーゼが熱安定性である、本発明1024の方法。

[本 発 明1026]

前記増幅反応がリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である、本発明1001または1003の方法。

[本 発 明1027]

前記核酸試料が腫瘍試料から得られる、本発明1001の方法。

[本 発 明1028]

前記核酸試料が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、本発明1001の方法。

[本 発 明1029]

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、本発明1027の方法。

[本 発 明1030]

前記腫瘍が、Ras、EGFR、Kit、pTEN、および / またはp53における変異を含む、本発明1027の方法。

[本 発 明1031]

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、本発明1030の方法。

[本 発 明1032]

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および / またはコドン13中にある、本発明1031の方法。

[本 発 明1033]

(a) 核酸分子；

(b) 対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該対立遺伝子特異的プライマー；

(c) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、対立遺伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、対立遺伝子特異的ブロッカープローブ；

(d) 該標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、該第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマー；および

(e) 検出プローブ

を含む、反応混合物。

[本 発 明1034]

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、本発明1033の反応混合物。

[本 発 明1035]

前記テールがGCに富む、本発明1034の反応混合物。

[本 発 明1036]

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、本発明1034の反応混合物。

[本 発 明1037]

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、本発明1034の反応混合物。

[本 発 明1038]

前記対立遺伝子特異的プライマーのTmが50 ～ 55 である、本発明1033の反応混合物。

[本 発 明1039]

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、本発明1033の反応混合物。

[本 発 明1040]

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、本発明1033の反応混合物。

[本発明1041]

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、本発明1033の反応混合物。

[本発明1042]

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、本発明1041の反応混合物。

[本発明1043]

前記対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第一のおよび/または前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、本発明1033の反応混合物。

[本発明1044]

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、本発明1043の反応混合物。

[本発明1045]

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、本発明1043の反応混合物。

[本発明1046]

前記改変塩基が、マッチ標的配列および/またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および/またはミスマッチヌクレオチドとの間のT_mを増加させる任意の改変塩基である、本発明1043の反応混合物。

[本発明1047]

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、該対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の3'端、5'端、および/または内部位置にMGB部分を含む、本発明1033の反応混合物。

[本発明1048]

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、本発明1047の反応混合物。

[本発明1049]

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、本発明1033の反応混合物。

[本発明1050]

前記座特異的検出プローブが標識を含む、本発明1049の反応混合物。

[本発明1051]

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、本発明1049の反応混合物。

[本発明1052]

前記核酸分子がゲノムDNA (gDNA) である、本発明1033の反応混合物。

[本発明1053]

ポリメラーゼ、dNTP、および/または他の試薬もしくは緩衝液を含む、本発明1033の反応混合物。

[本発明1054]

前記ポリメラーゼが熱安定性である、本発明1053の反応混合物。

[本発明1055]

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いられる、本発明1033の反応混合物。

[本発明1056]

前記核酸分子が腫瘍試料から得られる、本発明1033の反応混合物。

[本発明1057]

前記核酸分子が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、本発明1033の反応混合物。

[本発明1058]

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、本発明1056の反応混合物。

[本発明1059]

前記腫瘍が、Ras、EGFR、Kit、pTEN、および / またはp53における変異を含む、本発明1056の反応混合物。

[本発明1060]

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、本発明1059の反応混合物。

[本発明1061]

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および / またはコドン13中にある、本発明1060の反応混合物。

[本発明1062]

(a) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー：

(b) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的ブロックプローブを含む、組成物。

[本発明1063]

前記標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、前記第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含む、本発明1062の組成物。

[本発明1064]

検出プローブをさらに含む、本発明1062の組成物。

[本発明1065]

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、本発明1062の組成物。

[本発明1066]

前記テールがGCに富む、本発明1065の組成物。

[本発明1067]

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、本発明1065の組成物。

[本発明1068]

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、本発明1065の組成物。

[本発明1069]

前記対立遺伝子特異的プライマーのTmが50 ～ 55 である、本発明1062の組成物。

[本発明1070]

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、本発明1062の組成物。

[本発明1071]

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、本発明1062の組成物。

[本発明1072]

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、本発明1062の組成物。

[本発明1073]

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、本発明1072の組成物。

[本発明1074]

前記対立遺伝子特異的プライマーおよび / または前記第一のおよび / または前記対立遺伝子特異的ブロックプローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、本発明1062の組成

物。

[本発明1075]

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、本発明1074の組成物。

[本発明1076]

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、本発明1074の組成物。

[本発明1077]

前記改変塩基が、マッチ標的配列および / またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および / またはミスマッチヌクレオチドとの間のT_mを増加させる任意の改変塩基である、本発明1074の組成物。

[本発明1078]

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、該対立遺伝子特異的ブロッカープローブ内の3'端、5'端、および / または内部位置にMGB部分を含む、本発明1062の組成物。

[本発明1079]

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、本発明1078の組成物。

[本発明1080]

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、本発明1064の組成物。

[本発明1081]

前記座特異的検出プローブが標識を含む、本発明1080の組成物。

[本発明1082]

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、本発明1064の組成物。

[本発明1083]

核酸分子、ポリメラーゼ、dNTP、および / または他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、本発明1062の組成物。

[本発明1084]

前記核酸分子がゲノムDNA (gDNA) である、本発明1083の組成物。

[本発明1085]

前記ポリメラーゼが熱安定性である、本発明1084の組成物。

[本発明1086]

前記核酸分子が腫瘍試料から得られる、本発明1083の組成物。

[本発明1087]

前記核酸分子が、循環性腫瘍細胞を含む血液試料から得られる、本発明1083の組成物。

[本発明1088]

前記腫瘍試料が乳癌または肺癌の腫瘍試料である、本発明1086の組成物。

[本発明1089]

前記腫瘍がRas、EGFR、Kit、pTEN、および / またはp53における変異を含む、本発明1086の組成物。

[本発明1090]

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、本発明1089の組成物。

[本発明1091]

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および / またはコドン13中にある、本発明1090の組成物。

[本発明1092]

2つまたはそれより多い容器の1つに独立して分配される以下の構成要素を含む該2つまたはそれより多い容器を含む、キット：

a) 第一の対立遺伝子特異的プライマーの対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、標的配列の第一の対立遺伝子変種に対して相補的である、該第一の対立遺伝子特異的プライマー；および

b) 第二の対立遺伝子変種を含む該標的配列の領域に対して相補的である、第一の対立遺

伝子特異的ブロッカープローブであって、該領域が、該第一の対立遺伝子特異的プライマーの該対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分の結合位置に対応する位置を包含し、かつ該第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが副溝バインダーを含む、第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブ。

[本発明1093]

前記標的配列の領域に対して相補的である、座特異的プライマーであって、該領域が、前記第一の対立遺伝子変種から3'であり、かつ反対鎖上にある、座特異的プライマーをさらに含む、本発明1092のキット。

[本発明1094]

検出プローブをさらに含む、本発明1092のキット。

[本発明1095]

前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが標識を含まない、本発明1092のキット。

[本発明1096]

前記対立遺伝子特異的プライマーがテールを含む、本発明1092のキット。

[本発明1097]

前記テールがGCに富む、本発明1096のキット。

[本発明1098]

前記テールが長さ2～30ヌクレオチドである、本発明1096のキット。

[本発明1099]

前記テールが、前記対立遺伝子特異的プライマーの5'端にある、本発明1096のキット。

[本発明1100]

前記対立遺伝子特異的プライマーのT_mが50～55である、本発明1092のキット。

[本発明1101]

前記対立遺伝子特異的プライマーの濃度が20～900 nMである、本発明1092のキット。

[本発明1102]

前記対立遺伝子特異的プライマーが、3'末端に識別性の高い塩基を含むように設計される、本発明1092のキット。

[本発明1103]

前記対立遺伝子特異的プライマーの前記対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分が、該対立遺伝子特異的プライマーの3'末端に位置する、本発明1092のキット。

[本発明1104]

A/Tが対立遺伝子変種である場合に、AもしくはGが、前記対立遺伝子特異的プライマーの3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられるか、またはC/Gが対立遺伝子変種である場合に、CもしくはTが、該対立遺伝子特異的プライマーの該3'対立遺伝子特異的ヌクレオチド部分として用いられる、本発明1103のキット。

[本発明1105]

前記第一の対立遺伝子特異的プライマーおよび/または前記第一の対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、少なくとも1つの改変塩基を含む、本発明1092のキット。

[本発明1106]

前記改変塩基が、8-アザ-7-デアザ-dN (ppN) 塩基類似体であり、Nがアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) である、本発明1105のキット。

[本発明1107]

前記改変塩基がロックド核酸 (LNA) 塩基である、本発明1105のキット。

[本発明1108]

前記改変塩基が、マッチ標的配列および/またはマッチヌクレオチドとミスマッチ標的配列および/またはミスマッチヌクレオチドとの間のT_mを増加させる任意の改変塩基である、本発明1105のキット。

[本発明1109]

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが、該対立遺伝子特異的ブロッカープローブ

内の3'端、5'端、および／または内部位置にMGB部分を含む、本発明1092のキット。

[本発明1110]

前記対立遺伝子特異的ブロッカープローブが3'端において伸長不可能である、本発明1109のキット。

[本発明1111]

前記検出プローブが座特異的検出プローブである、本発明1094のキット。

[本発明1112]

前記座特異的検出プローブが標識を含む、本発明1111のキット。

[本発明1113]

前記座特異的検出プローブが5'ヌクレアーゼプローブである、本発明1111のキット。

[本発明1114]

ポリメラーゼ、dNTP、および／または他の試薬もしくは緩衝液をさらに含む、本発明1092のキット。

[本発明1115]

前記ポリメラーゼが熱安定性である、本発明1114のキット。

[本発明1116]

Ras、EGFR、Kit、pTEN、および／またはp53における変異を検出するために使用される、本発明1092～1094のいずれかのキット。

[本発明1117]

前記Ras変異がKRAS変異またはおよびNRAS変異である、本発明1117のキット。

[本発明1118]

前記KRAS変異が、図6に図示される通り、コドン12中および／またはコドン13中にある、本発明1118のキット。

[本発明1119]

少なくとも1：1000、1：10,000、1：100,000、または1：1,000,000の検出選択性を有する、本発明1001または1003の方法。

本明細書に組み入れられ、本明細書の一部を構成する添付の図面は、本開示のいくつかの例示的な態様を明示し、記述と共に一定の教示を説明するために役立つ。