

【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15日(2011.9.15)

【公表番号】特表2011-507542(P2011-507542A)

【公表日】平成23年3月10日(2011.3.10)

【年通号数】公開・登録公報2011-010

【出願番号】特願2010-540181(P2010-540181)

【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 A

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成23年8月1日(2011.8.1)

【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】

試料中の標的核酸を操作する、単離する、検出するまたは増幅させる方法であって、  
少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲート  $A_i - B_j$  を含み、

- テンプレートとして前記標的核酸を有する構造 I ~ III のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲート  $A_i - B_j$  を伸長させる工程と、

- 構造 I ~ X のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲート  $A_i - B_j$  により前記標的核酸を検出する工程と

を含み、

前記コンジュゲート  $A_i - B_j$  において、

・  $A_i$  は  $i$  - mer のオリゴヌクレオチドであり、 $i = 3 \sim 50$  であり、 $A_i$  は天然または非天然の核酸塩基および / またはペンタフラノシル基および / または天然のホスホジエステル結合を有するオリゴマーであり、場合によってはマーカース基を含み、

・  $B_j$  部分は、 $A_i$  部分に、またはホスホジエステル結合を介して  $A_i$  へのリンカーに付着され、

$B_j$  は、 $j$  - mer の有機オリゴカチオン部分であり、 $j = 1 \sim 50$  であり、 $B$  は、

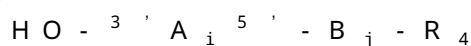
-  $HPO_3R_1 - (NH - R_2)_n - NH - R_3 - O - (R_1, R_2 \text{ および } R_3 \text{ は同一または異なって、C 1 - C 6 アルキレン基であり、} NH - R_2 \text{ 部分は、} n \text{ が } > 1 \text{ である場合に同一または異なる})$  ; または

-  $HPO_3 - R_1 - CH(X) - R_3 - O - (R_1 \text{ および } R_3 \text{ は同一または異なって、C 1 ~ C 6 のアルキレン基であり、} X \text{ はプトレシン、スペルミジンまたはスペルミン残基である})$

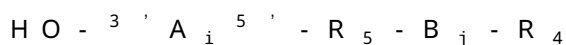
であり、

前記構造 I ~ X は以下の通りであり：

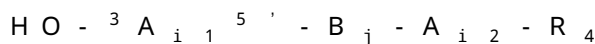
構造 I



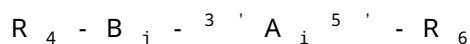
構造 II



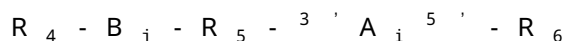
構造III



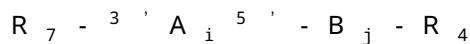
構造IV



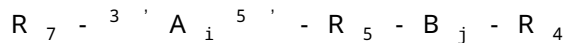
構造V



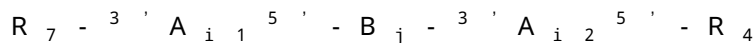
構造VI



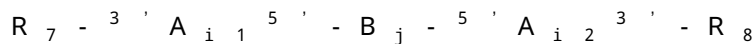
構造VII



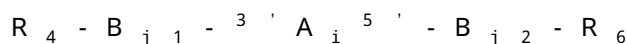
構造VIII



構造IX



構造X



ここで、

- $\text{A}_{i1}$  および  $\text{A}_{i2}$  は、同一または異なって、 $\text{A}_i$  についての上記定義の通りであり；
- $\text{R}_4$  および  $\text{R}_6$  は、同一または異なって、Hまたはリンカー、クエンチャー、マーカー、例えば、発色団またはフルオロフォア基、あるいは化学部分、例えば、ビオチン、疎水性鎖、コレステロール誘導体、抗原、タンパク質、ペプチド、糖またはホスファート基であり；
- $\text{R}_5$  は、H、 $\text{A}_i$  および  $\text{B}_j$  とは異なって、 $\text{A}_i$  と  $\text{B}_j$  との間の化学的に安定なまたは切断可能なリンカーであり、
- $\text{B}_{j1}$  および  $\text{B}_{j2}$  は、同一または異なって、 $\text{B}_j$  についての上記定義の通りであり；
- $\text{R}_7$  および  $\text{R}_8$  は、同一または異なって、Hとは異なり、リンカー、クエンチャー、マーカー、例えば、発色団またはフルオロフォア基、または化学部分、例えば、ビオチン、疎水性鎖、コレステロール誘導体、抗原、タンパク質、ペプチド、ホスファート基または糖からなる群より選択される、方法。

#### 【請求項2】

$\text{A}_i$  は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および非天然核酸塩基（例えば、ロックド（LNA）ヌクレオチド、PNA）、ならびにそれらの化学的修飾体または置換体（例えば、ホスホロチオアート、2'-フルオロまたは2'-O-アルキル基）を含む群から選択される、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

構造I~IIIの前記オリゴヌクレオチド-オリゴカチオンコンジュゲートは、DNAまたはRNAポリメラーゼのプライマーとして使用される、請求項1または2に記載の方法。

#### 【請求項4】

構造I、IIまたはIIIの少なくとも1種のオリゴヌクレオチド-オリゴカチオンコンジュゲートを用いた核酸増幅を可能にする、請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

#### 【請求項5】

前記オリゴヌクレオチド-オリゴカチオンコンジュゲートが逆転写用のプライマーとして使用される、請求項1~4のいずれか1つに記載の方法。

#### 【請求項6】

構造IV~Xのオリゴヌクレオチド-オリゴカチオンコンジュゲート  $\text{A}_i - \text{B}_j$  は、少なくとも1回のプライマー伸長工程を含むアッセイにおいて前記標的核酸を検出するためのプローブとして使用される、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記オリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、核酸増幅アッセイにおいて標的核酸を検出するためのプローブとして使用される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記オリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、PCR アッセイ、リアルタイム PCR アッセイまたは逆転写アッセイにおいてプローブとして使用される、請求項 6 または 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記オリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、核酸合成工程を含むアッセイにおいてプローブとして使用される、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 10】**

構造Ⅳ～Ⅹの少なくとも 1 種は、標的核酸の検出または増幅を阻害するクランプとして使用される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 11】**

標的核酸を増幅させおよび検出する、請求項 1～8 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 12】**

構造Ⅰ～Ⅹの少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、核酸合成工程を含むアッセイにおいて標的を検出するのに使用される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 13】**

構造Ⅰ～Ⅹの少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、核酸合成工程を含むアッセイにおいて野生型標的核酸と突然変異標的核酸とを識別するのに使用される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 14】**

構造Ⅰ～Ⅹの少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、マルチプレックスアッセイに使用される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 15】**

構造Ⅰ～Ⅹの少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチド - オリゴカチオンコンジュゲートは、少なくとも 1 回の核酸合成工程を含むアッセイにおいて使用される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 16】**

構造Ⅰ～Ⅹの少なくとも 1 種の分子を用いて、前記標的核酸を精製、捕捉および修飾するような操作工程を更に含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 17】**

構造Ⅰ～Ⅹの少なくとも 1 種の分子は、野生型標的核酸と突然変異標的核酸とを識別するのに使用される、請求項 1 または 2 に記載の方法。