

【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24年11月22日 (2012.11.22)

【公表番号】特表2011-501663(P2011-501663A)

【公表日】平成23年1月13日 (2011.1.13)

【年通号数】公開・登録公報2011-002

【出願番号】特願2010-528992(P2010-528992)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A Z

C 1 2 N 15/00 G

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年10月6日 (2011.10.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 3】

本発明のこれらおよび他の特徴および利点は、以下の詳細な記載、添付の図面および請求項を参照すれば明らかとなる。本明細書に開示される全ての参考文献は、各々が組み込まれたのと同様に、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目 1)

長さ約 1 0 0 ヌクレオチド未満の小さな R N A 標的配列の逆転写のための方法であり、

( a ) 上記小さな R N A 標的配列を含む試料を、

( i ) 上記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に上記小さな R N A 標的配列に対して相補的である、プライマー、および

( i i ) 逆転写酵素活性を有する R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ

と接触させるステップと；

( b ) 上記 R N A 依存性 D N A ポリメラーゼの基質である少なくとも一つの塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む d N T P の混合物の存在下で、上記小さな R N A 標的配列に相補的な c D N A を合成するステップと

を含む、方法。

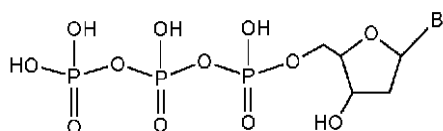
(項目 2)

上記 d N T P の混合物が、上記 5 - 位で置換されたピリミジンである、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

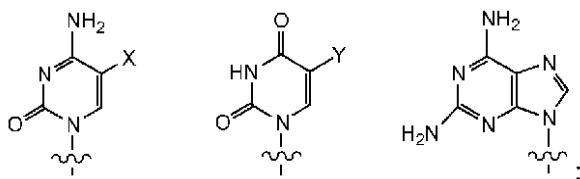
上記 d N T P の混合物が、式：

【化 1 1】



を有する塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含み、  
 式中、B は、

【化 1 2】



より選択され；

X は、- F、- C l、- B r、- I、- C H<sub>3</sub> または

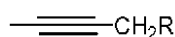
【化 1 3】



より選択され；

Y は、- F、- C l、- B r、- I または

【化 1 4】



より選択され；

R は、- H、- O H、- O C H<sub>3</sub> または - N H<sub>2</sub> である、

項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

上記 d N T P の混合物が、d ( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および / または d ( 5 - P r C ) T P より選択される、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

上記 d N T P の混合物が、( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および d ( 5 - P r C ) T P および / または d G T P の少なくとも二つを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

上記小さな R N A 標的配列が、約 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さである、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

上記小さな R N A 標的配列が、m i R N A 配列である、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

上記プライマーに、一つ以上の塩基修飾二重鎖安定化 d N T P が組み込まれている、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

( a ) 一本鎖 c D N A を提供するために、上記ステップ ( b ) で形成される c D N A を処理するステップと；

( b ) 二重鎖 c D N A 分子を産出するために、上記一本鎖 c D N A を、上記 c D N A に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、D N A ポリメラーゼの存在下で伸長産物の合成を開始する、第二プライマーと接触させる、ステップと  
 をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 0)

上記小さな R N A 標的配列およびその相補鎖に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、D N A ポリメラーゼの存在下で増幅産物を産出する、増幅プライマーを用いて、核酸増幅反応を行うステップをさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 1)

上記核酸増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

上記増幅プライマーの一つ以上に、塩基修飾二重鎖安定化 d N T P が組み込まれている、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 3)

上記増幅反応が、少なくとも一つの塩基修飾二重鎖安定化 d N T P を含むデオキシヌクレオシド 5' - 三リン酸の混合物の存在下で行われる、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 4)

長さ約 1 0 0 ヌクレオチド未満の小さな R N A 標的配列を増幅するための方法であり、

( a ) 上記小さな R N A 標的配列を含む試料を、

( i ) 上記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に上記小さな R N A 標的配列に対して相補的である、プライマー、および

( i i ) 逆転写酵素活性を有する R N A 依存性 D N A ポリメラーゼと接触させるステップと；

( b ) 上記 R N A 依存性 D N A ポリメラーゼのための基質である少なくとも一つの塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む d N T P の混合物の存在下で、上記小さな R N A 標的配列に相補的な c D N A を合成するステップと、

( c ) 上記小さな R N A 標的配列およびその相補鎖に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、D N A ポリメラーゼの存在下で増幅産物を産出する、増幅プライマーを用いて、核酸増幅反応を行うステップ

を含む、方法。

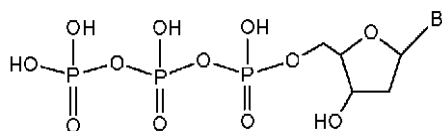
(項目 1 5)

上記 d N T P の混合物が、上記 5 - 位で置換されたピリミジンである、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

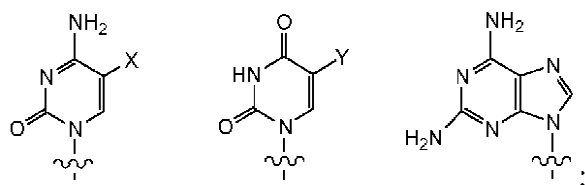
上記 d N T P の混合物が、式：

【化 1 5】



を有する塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含み、式中、B は、

【化 1 6】



より選択され；

X は、- F、- C l、- B r、- I、- C H<sub>3</sub> または

【化 1 7】

—CH<sub>2</sub>R

より選択され；

Y は、- F、- C l、- B r、- I または

【化 1 8】

—CH<sub>2</sub>R

より選択され；

R は、- H、- O H、- O C H<sub>3</sub> または - N H<sub>2</sub> である、

項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 7)

上記 d N T P の混合物が、d ( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および / また

は  $d(5 - PrC)TP$  より選択される、塩基修飾、二重鎖安定化  $dNTP$  を含む、項目 14 に記載の方法。

(項目 18)

上記  $dNTP$  の混合物が、 $(2 - amA)TP$ 、 $d(5 - PrU)TP$  および  $d(5 - PrC)TP$  および / または  $dGTP$  の少なくとも二つを含む、項目 14 に記載の方法。

(項目 19)

上記小さな RNA 標的配列が、約 10 ~ 30 ヌクレオチドの長さである、項目 14 に記載の方法。

(項目 20)

上記小さな RNA 標的配列が、miRNA 配列である、項目 14 に記載の方法。

(項目 21)

上記プライマーに、一つ以上の塩基修飾二重鎖安定化  $dNTP$  が組み込まれている、項目 14 に記載の方法。

(項目 22)

(a) 一本鎖  $cDNA$  を提供するために、上記ステップ (b) で形成される  $cDNA$  を処理するステップと；

(b) 二重鎖  $cDNA$  分子を産出するために、上記一本鎖  $cDNA$  を、上記  $cDNA$  に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、DNA ポリメラーゼの存在下で伸長産物の合成を開始する、第二プライマーと接触させる、ステップとをさらに含む、項目 14 に記載の方法。

(項目 23)

上記核酸増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、項目 14 に記載の方法。

(項目 24)

上記増幅プライマーの一つ以上に、塩基修飾二重鎖安定化  $dNTP$  が組み込まれている、項目 14 に記載の方法。

(項目 25)

上記増幅反応が、少なくとも一つの塩基修飾二重鎖安定化  $dNTP$  を含むデオキシヌクレオシド 5' - 三リン酸の混合物の存在下で行われる、項目 14 に記載の方法。

(項目 26)

(a) 小さな RNA 標的配列を含む試料と；

(b) 上記小さな RNA 標的配列とハイブリダイズするのに十分に上記小さな RNA 標的配列に対して相補的である、プライマーと；

(c) 逆転写酵素活性を有する RNA 依存性 DNA ポリメラーゼと；

(d) 上記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼの基質である少なくとも一つの塩基修飾二重鎖安定化  $dNTP$  を含むデオキシヌクレオシド 5' - 三リン酸の混合物とを含む、反応混合物。

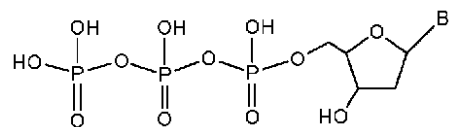
(項目 27)

上記  $dNTP$  の混合物が、上記 5 - 位で置換されたピリミジンである塩基修飾、二重鎖安定化  $dNTP$  を含む、項目 26 に記載の反応混合物。

(項目 28)

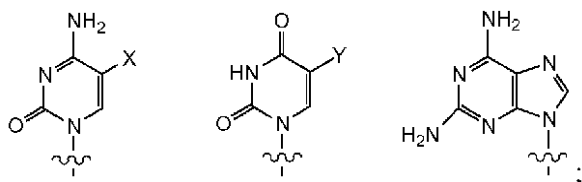
上記  $dNTP$  の混合物が、式

【化 19】



を有する塩基修飾、二重鎖安定化  $dNTP$  を含み、式中、B は、

## 【化 2 0】



より選択され；

X は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CH_3$  または

## 【化 2 1】



より選択され；

Y は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$  または

## 【化 2 2】



より選択され；

R は、 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$  または  $-NH_2$  である、

項目 26 に記載の反応混合物。

(項目 29)

上記 d N T P の混合物が、d ( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および / または d ( 5 - P r C ) T P より選択される、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、項目 26 に記載の反応混合物。

(項目 30)

( a ) 逆転写酵素活性を有する R N A 依存性 D N A ポリメラーゼと；

( b ) 上記 R N A 依存性 D N A ポリメラーゼの基質である少なくとも一つの塩基修飾、二重鎖安定化デオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む、キット。

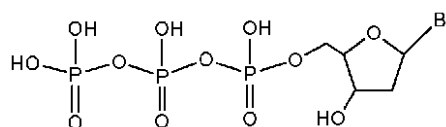
(項目 31)

上記 d N T P の混合物が、上記 5 - 位で置換されたピリミジンである塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、項目 30 に記載のキット。

(項目 32)

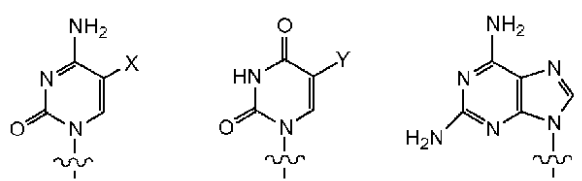
上記 d N T P の混合物が、式

## 【化 2 3】



を有する塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含み、式中、B は、

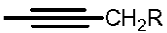
## 【化 2 4】



より選択され；

X は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CH_3$  または

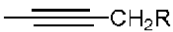
## 【化 2 5】



より選択され；

Y は、- F、- C l、- B r、- I または

## 【化 2 6】



より選択され；

R は、- H、- O H、- O C H<sub>3</sub> または - N H<sub>2</sub> である、

項目 3 0 に記載のキット。

( 項目 3 3 )

上記 d N T P の混合物が、d ( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および / または d ( 5 - P r C ) T P より選択される、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、項目 3 0 に記載のキット。

( 項目 3 4 )

第二プライマーであって、上記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に上記小さな R N A 標的配列に対して相補的である第二プライマーをさらに含む、項目 3 0 に記載のキット。

( 項目 3 5 )

小さな R N A 標的配列を増幅するために有効な増幅プライマー対をさらに含む、項目 3 0 に記載のキット。

## 【手続補正 2】

【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】

長さ約 1 0 0 ヌクレオチド未満の小さな R N A 標的配列の逆転写のための方法であり、

( a ) 前記小さな R N A 標的配列を含む試料を、

( i ) 前記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に前記小さな R N A 標的配列に対して相補的である、プライマー、および

( i i ) 逆転写酵素活性を有する R N A 依存性 D N A ポリメラーゼと接触させるステップと；

( b ) 前記 R N A 依存性 D N A ポリメラーゼの基質である少なくとも一つの塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む d N T P の混合物の存在下で、前記小さな R N A 標的配列に相補的な c D N A を合成するステップとを含む、方法。

【請求項 2】

前記小さな R N A 標的配列およびその相補鎖に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、D N A ポリメラーゼの存在下で増幅産物を産出する、増幅プライマーを用いて、核酸増幅反応を行うステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

長さ約 1 0 0 ヌクレオチド未満の小さな R N A 標的配列を増幅するための方法であり、

( a ) 前記小さな R N A 標的配列を含む試料を、

( i ) 前記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に前記小さな R N A 標的配列に対して相補的である、プライマー、および

( i i ) 逆転写酵素活性を有する RNA 依存性 DNA ポリメラーゼと接触させるステップと；

( b ) 前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼのための基質である少なくとも一つの塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む d N T P の混合物の存在下で、前記小さな RNA 標的配列に相補的な c D N A を合成するステップと、

( c ) 前記小さな RNA 標的配列およびその相補鎖に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、DNA ポリメラーゼの存在下で増幅産物を産出する、増幅プライマーを用いて、核酸増幅反応を行うステップとを含む、方法。

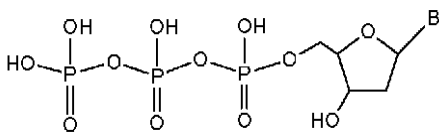
【請求項 4】

前記 d N T P の混合物が、

( a ) 5 - 位で置換されたピリミジンである、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P ；

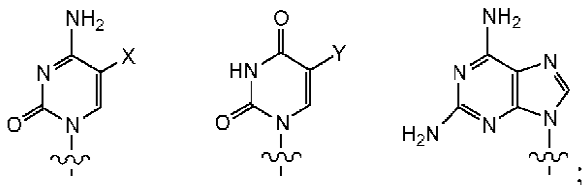
( b ) 式：

【化 1 5】



を有する塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P であって、式中、B は、

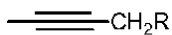
【化 1 6】



より選択され；

X は、- F、- C l、- B r、- I、- C H <sub>3</sub> または

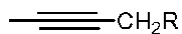
【化 1 7】



より選択され；

Y は、- F、- C l、- B r、- I または

【化 1 8】



より選択され；

R は、- H、- O H、- O C H <sub>3</sub> または - N H <sub>2</sub> である、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P ；ならびに / あるいは

( c ) d ( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および / または d ( 5 - P r C ) T P より選択される、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P を含む、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 d N T P の混合物が、d ( 2 - a m A ) T P、d ( 5 - P r U ) T P および d ( 5 - P r C ) T P および / または d G T P の少なくとも二つを含む、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記小さな RNA 標的配列が、約 1 0 ~ 3 0 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記小さな RNA 標的配列が、m i R N A 配列である、請求項 1 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記プライマーに、一つ以上の塩基修飾二重鎖安定化 d N T P が組み込まれている、請求項 1 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 9】

( a ) 一本鎖 c D N A を提供するために、前記ステップ ( b ) で形成される c D N A を処理するステップと；

( b ) 二重鎖 c D N A 分子を産出するために、前記一本鎖 c D N A を、前記 c D N A に十分に相補的であるためにこれにハイブリダイズし、D N A ポリメラーゼの存在下で伸長産物の合成を開始する、第二プライマーと接触させる、ステップと  
をさらに含む、請求項 1 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記核酸増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 2 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記増幅プライマーの一つ以上に、塩基修飾二重鎖安定化 d N T P が組み込まれている、請求項 2 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記増幅反応が、少なくとも一つの塩基修飾二重鎖安定化 d N T P を含むデオキシヌクレオシド 5' - 三リン酸の混合物の存在下で行われる、請求項 2 または 3 に記載の方法。

## 【請求項 13】

( a ) 小さな R N A 標的配列を含む試料と；

( b ) 前記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に前記小さな R N A 標的配列に対して相補的である、プライマーと；

( c ) 逆転写酵素活性を有する R N A 依存性 D N A ポリメラーゼと；

( d ) 前記 R N A 依存性 D N A ポリメラーゼの基質である少なくとも一つの塩基修飾二重鎖安定化 d N T P を含むデオキシヌクレオシド 5' - 三リン酸の混合物と  
を含む、反応混合物。

## 【請求項 14】

( a ) 逆転写酵素活性を有する R N A 依存性 D N A ポリメラーゼと；

( b ) 前記 R N A 依存性 D N A ポリメラーゼの基質である少なくとも一つの塩基修飾、二重鎖安定化デオキシリボヌクレオチド三リン酸と  
を含む、キット。

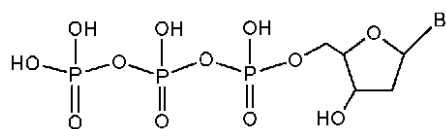
## 【請求項 15】

前記 d N T P の混合物が、

( a ) 5 - 位で置換されたピリミジンである塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P ；

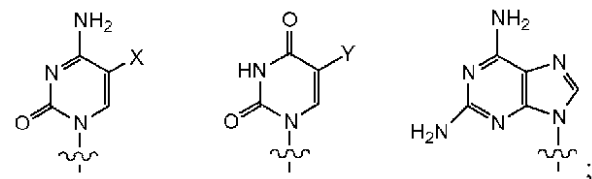
( b ) 式：

## 【化 23】



を有する塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P であって、式中、B は、

## 【化 24】

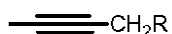


より選択され；

X は、- F、- C l、- B r、- I、- C H <sub>3</sub> または



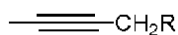
## 【化 2 5】



より選択され；

Y は、- F、 - C l、 - B r、 - I または

## 【化 2 6】



より選択され；

R は、- H、 - O H、 - O C H<sub>3</sub> または - N H<sub>2</sub> である、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P：ならびに / あるいは

( c ) d ( 2 - a m A ) T P、 d ( 5 - P r U ) T P および / または d ( 5 - P r C ) T P より選択される、塩基修飾、二重鎖安定化 d N T P

を含む、請求項 1 3 に記載の反応混合物または請求項 1 4 に記載のキット。

## 【請求項 1 6】

( a ) 第二プライマーであって、前記小さな R N A 標的配列とハイブリダイズするのに十分に前記小さな R N A 標的配列に対して相補的である第二プライマー；および / または

( b ) 小さな R N A 標的配列を増幅するために有効な増幅プライマー対、をさらに含む、請求項 1 4 に記載のキット。