

【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 6 部門第 1 区分

【発行日】令和 4 年 7 月 21 日 (2022.7.21)

【公開番号】特開 2022-58402 (P2022-58402A)

【公開日】令和 4 年 4 月 12 日 (2022.4.12)

【年通号数】公開公報 (特許) 2022-065

【出願番号】特願 2021-210002 (P2021-210002)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

10

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6816 (2018.01)

C 1 2 Q 1/682 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6853 (2018.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 33/543 5 0 1 F

G 0 1 N 33/53 D Z N A

G 0 1 N 33/53 M

20

C 1 2 Q 1/6816 Z

C 1 2 Q 1/682 Z

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 Q 1/6853 Z

C 1 2 N 15/11 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 7 月 11 日 (2022.7.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

30

【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】

試料中の目的の分析物を検出する方法であって、

a. 該分析物を (i) 捕捉試薬を含む表面上の該分析物に関する該捕捉試薬、ここで、該捕捉試薬は第 1 の核酸プローブを含む； (ii) 該分析物に関する検出試薬、ここで、該検出試薬は第 2 の核酸プローブを含む；に結合させ；それにより、該捕捉試薬、該分析物ならびに該検出試薬を含む該表面上に複合体を形成させること；

40

b. 該第 1 および第 2 の核酸プローブが近接される場合、該第 1 の核酸プローブまたは第 2 の核酸プローブを伸長して、伸長オリゴヌクレオチドを形成させること；ならびに

c. 該伸長オリゴヌクレオチドの量を測定すること、を含み、

それにより、該試料中の目的の該分析物を検出する、前記方法。

【請求項 2】

捕捉試薬および検出試薬は、独立して、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを各々含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

捕捉試薬および検出試薬の各々は、抗体である、請求項 2 に記載の方法。

50

## 【請求項 4】

表面はアンカー試薬をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

アンカー試薬はアンカーオリゴヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

アンカーオリゴヌクレオチドは 1 本鎖オリゴヌクレオチドを含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

伸長オリゴヌクレオチドは、アンカーオリゴヌクレオチドに対して相補的であるアンカーオリゴヌクレオチド相補体を含む、請求項 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 8】

工程 (a) は、分析物を、(i) 第 1 に、捕捉試薬；および (ii) 第 2 に、検出試薬；に結合させることを含む、または、

工程 (a) は、分析物を、(i) 第 1 に、検出試薬；および (ii) 第 2 に、捕捉試薬；に結合させることを含む、または、

工程 (a) は、分析物を、同時にまたは実質的に同時に、捕捉試薬および検出試薬に結合させることを含む、

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

伸長することは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、鎖置換増幅 (SDA)、自己持続合成反応 (3SR)、等温性の増幅方法、又はこれらの組み合わせである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 10】

第 2 の核酸プローブは、鑄型オリゴヌクレオチドを含み、伸長することは、第 1 の核酸プローブを第 2 の核酸プローブに結合させること、および第 1 の核酸プローブを PCR によって伸長させることを含む、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

伸長することの前に、1 つまたはそれ以上の RNA オリゴヌクレオチドを、第 1 および第 2 の核酸プローブの各々の少なくとも一部にハイブリダイズさせることをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

30

## 【請求項 12】

ハイブリダイズさせることの後に：

1 つまたはそれ以上の RNA オリゴヌクレオチドを除去すること；および

1 つまたはそれ以上の RNA オリゴヌクレオチドの除去後、第 1 の核酸プローブを第 2 の核酸プローブに結合させること

をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

除去することは、第 1 および第 2 の核酸プローブにハイブリダイズした 1 つまたはそれ以上の RNA オリゴヌクレオチドを、RNase と接触させることを含む、請求項 12 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

複合体は、伸長後、表面に結合される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 15】

伸長オリゴヌクレオチドは、1 つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドを含み、測定することは、伸長オリゴヌクレオチドを、1 つまたはそれ以上の検出オリゴヌクレオチドに対して相補的な複数の標識プローブと接触させることを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 16】

各標識プローブは、検出可能な標識を含む、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

50

伸長することは、1つまたはそれ以上の修飾塩基を、伸長オリゴヌクレオチドに組み込むことを含み、測定することは、該伸長オリゴヌクレオチドを、該1つまたはそれ以上の修飾塩基に結合する複数の検出可能な部分と接触させることを含み、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

1つまたはそれ以上の修飾塩基は、アプタマー、アプタマーリガンド、抗体、抗原、受容体リガンド、受容体、ハプテン、エピトープ、またはミモトープを含み、複数の検出可能な部分は、1つまたはそれ以上の修飾塩基および検出可能な標識の結合パートナーを各々含む；あるいは、

1つまたはそれ以上の修飾塩基は、ストレプトアビジンまたはアビジンを含み、複数の検出可能な部分は、ビオチンおよび検出可能な標識を含む；あるいは、

1つまたはそれ以上の修飾塩基は、ビオチンを含み、複数の検出可能な部分は、ストレプトアビジンまたはアビジンおよび検出可能な標識を各々含む、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

伸長することは、1つまたはそれ以上の標識塩基を、伸長オリゴヌクレオチドに組み込むことを含み、測定することは、該1つまたはそれ以上の標識塩基の存在を検出することを含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

1つまたはそれ以上の標識塩基の各々は、検出可能な標識を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

検出可能な標識は、光散乱、光学的な吸光度、蛍光、化学発光、エレクトロケミルミネッセンス（ECL）、バイオルミネッセンス、リン光、放射能、磁場、またはそれらの組み合わせによって測定されることができる、請求項16、18、または20に記載の方法。

【請求項22】

検出可能な標識は、ECL標識であり、測定することは、ECLシグナルを測定することを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

表面は粒子を含む、または表面はマルチウェルプレートのウェルを含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

表面は複数の別個の結合ドメインを含み、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の2つの別個の結合ドメインに位置する；または

表面は複数の別個の結合ドメインを含み、捕捉試薬およびアンカー試薬は表面上の同じ結合ドメインに位置する、

請求項4～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

表面は電極を含み、測定工程は電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含む、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

表面は粒子を含み、方法は、粒子を電極上で採取することおよび電位波形を電極に適用して、エレクトロケミルミネッセンスシグナルを生成することをさらに含む、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

工程（a）の前に、分析物を前濃縮することをさらに含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前濃縮することは；

a. 試料を、分析物に結合する結合試薬に連結された粒子と接触させること、それにより該結合試薬に結合した該分析物を含む複合体を形成させること；

10

20

30

40

50

b. 試料の非結合構成体を複合体から分離すること；および

c. 複合体を放出すること

を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

分析物はエクソソームである、または分析物は、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 10、IL - 12 p70、IL - 17A、IL - 22、GM - CSF、G - CSF、IFN - alpha、TNF - 、50Sリボソームタンパク質L20、30Sリボソームタンパク質S7、30Sリボソームタンパク質S2、50Sリボソームタンパク質L21、50Sリボソームタンパク質L17、30Sリボソームタンパク質S4、50Sリボソームタンパク質L15、30Sリボソームタンパク質S5、50Sリボソームタンパク質L16、30Sリボソームタンパク質S3、50Sリボソームタンパク質L22、50Sリボソームタンパク質L4、リボソームタンパク質L25、50Sリボソームタンパク質L5、30Sリボソームタンパク質S2、リボソームタンパク質L30、リボソームタンパク質L31、リボソームタンパク質L32、伸長因子EF - TU、アシルキャリアタンパク質 (ACP)、Rp1L、リボソームタンパク質GroS (MopB、65、000)、シャペロンシステムGro - EL - Gro - ESの構成要素およびGapA、解糖系の酵素、HDL、LDL、IDL、VLDL、カイロミクロン、IMP - 1、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 30】

分析物はエクソソームであり、捕捉試薬および / または検出試薬は該エクソソームにより発現させた標的タンパク質に結合する、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 31】

捕捉試薬および / または検出試薬は、CD9、CD63、CD81、Hsp70、DPCD6IP、またはTsg101に結合する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

捕捉試薬および / または検出試薬は、エクソソームの表面内または表面上の疾病に特異的なターゲットに結合する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

エクソソームは検出試薬と接触する前に、表面上で固定化および / または透過処理される、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 34】

伸長することは、蛍光プローブを用いて蛍光標識したアンプリコンを形成するローリングサークル増幅を含み、測定することは：複合体中のエクソソームを蛍光試薬で標識して蛍光標識したエクソソームを形成すること、蛍光標識したアンプリコンおよびエクソソームを画像化すること、および画像化した蛍光サイン間の相関を決定することを含む、請求項 30 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、

a) 該分析物に関する捕捉試薬、ここで該捕捉試薬は第 1 の核酸プローブに連結される；

40

および  
b) 該分析物に関する検出試薬、ここで該検出試薬は第 2 の核酸プローブに連結される  
を含む、

該捕捉試薬および該検出試薬は、該分析物に結合すること、および該捕捉試薬、該分析物、および該検出試薬を含む複合体を形成することができる、前記キット。

【請求項 36】

試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、1つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、

a) 該分析物に関する捕捉試薬；

b) 該分析物に関する第 1 の検出試薬、ここで該第 1 の検出試薬は第 1 の核酸プローブに

50

連結される；

c) 該分析物に関する第 2 の検出試薬、ここで該第 2 の検出試薬は第 2 の核酸プローブに連結される；および

d) 1 つまたは両方の (i) アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬、および (i i) 該第 1 および / または該第 2 の核酸プローブに結合することができる鑄型オリゴヌクレオチド

を含み、

該捕捉試薬ならびに該第 1 および第 2 の検出試薬は、該分析物に結合すること、および該捕捉試薬、該分析物、ならびに該第 1 および第 2 の検出試薬を含む複合体を形成することができる、前記キット。

10

【請求項 37】

試料中の目的の分析物を検出するためのキットであって、1 つまたはそれ以上のバイアル、容器、またはコンパートメントにおいて、

a) 該分析物に関する捕捉試薬；

b) 該分析物に関する検出試薬、ここで該検出試薬は核酸プローブに連結される；および

c) 1 つまたは両方の (i) アンカーオリゴヌクレオチドを含むアンカー試薬、および (i i) 該第 1 および / または該第 2 の核酸プローブに結合することができる鑄型オリゴヌクレオチド

を含み、

該捕捉試薬および該検出試薬は、該分析物に結合すること、および該捕捉試薬、該分析物、および該検出試薬を含む複合体を形成することができる、前記キット。

20

【請求項 38】

表面をさらに含む、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 39】

捕捉試薬および検出試薬は、独立して、抗体、抗原、リガンド、受容体、オリゴヌクレオチド、ハプテン、エピトープ、ミモトープ、またはアプタマーを各々含む、請求項 37 または 38 に記載のキット。

【請求項 40】

捕捉試薬および検出試薬の各々は、抗体である、請求項 39 に記載のキット。

【請求項 41】

捕捉試薬は、表面上に提供される、請求項 38 に記載のキット。

30

【請求項 42】

捕捉試薬を表面に固定するための試薬をさらに含む、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 43】

表面はアンカー試薬をさらに含む、請求項 38 または 41 に記載のキット。

【請求項 44】

アンカー試薬および該アンカー試薬を表面に固定するための試薬をさらに含む、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 45】

表面は粒子を含む、または表面はマルチウェルプレートのウェルを含む、請求項 38 ~ 44 のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項 46】

表面は電極を含む、請求項 38 ~ 45 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 47】

バッファー、ポリメラーゼ、リガーゼ、標識または非標識 d N T P、検出可能な標識、検出可能な標識に関する共反応物、遮断薬、安定化剤、界面活性剤、塩、p H 緩衝液、保存剤、標識プローブ、第 2 の核酸プローブによる検出試薬の修飾のための試薬、アッセイ希釈剤、キャリブレーター、環状化オリゴヌクレオチド、またはそれらの組み合わせをさらに含む、請求項 35 ~ 46 のいずれか一項に記載のキット。

50

## 【請求項 48】

分析物はエクソソームである、または分析物は、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 10、IL - 12 p70、IL - 17A、IL - 22、GM - CSF、G - CSF、IFN - alpha、TNF - alpha、50Sリボソームタンパク質L20、30Sリボソームタンパク質S7、30Sリボソームタンパク質S2、50Sリボソームタンパク質L21、50Sリボソームタンパク質L17、30Sリボソームタンパク質S4、50Sリボソームタンパク質L15、30Sリボソームタンパク質S5、50Sリボソームタンパク質L16、30Sリボソームタンパク質S3、50Sリボソームタンパク質L22、50Sリボソームタンパク質L4、リボソームタンパク質L25、50Sリボソームタンパク質L5、30Sリボソームタンパク質S2、リボソームタンパク質L30、リボソームタンパク質L31、リボソームタンパク質L32、伸長因子EF - TU、アシルキャリアタンパク質 (ACP)、Rp1L、リボソームタンパク質GroS (MopB、65,000)、シャペロンシステムGro - EL - Gro - ESの構成要素およびGapA、解糖系の酵素、HDL、LDL、IDL、VLDL、カイロミクロン、またはそれらの組み合わせである、請求項30～40のいずれか一項に記載のキット。

10

## 【請求項 49】

分析物はエクソソームであり、捕捉試薬および/または検出試薬は、該エクソソームにより発現された標的タンパク質に結合する、請求項48に記載のキット。

## 【請求項 50】

捕捉試薬および/または検出試薬は、CD9、CD63、CD81、Hsp70、DPCD6IP、またはTsg101に結合する、請求項49に記載のキット。

20

## 【請求項 51】

捕捉試薬および/または検出試薬はエクソソームの表面内または表面上の疾病に特異的なターゲットに結合する、請求項49に記載のキット。

30

40

50