

【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 10 月 21 日 (2021.10.21)

【公表番号】特表 2020-537499 (P2020-537499A)

【公表日】令和 2 年 12 月 24 日 (2020.12.24)

【年通号数】公開・登録公報 2020-052

【出願番号】特願 2020-514986 (P2020-514986)

【国際特許分類】

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/553 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/6813 Z

C 1 2 M 1/00 A

G 0 1 N 33/543 5 2 1

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/543 5 0 1 D

G 0 1 N 33/553

C 1 2 Q 1/6844 Z N A Z

C 1 2 N 9/16 Z

C 1 2 N 9/12

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 9 月 13 日 (2021.9.13)

【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】

クラウディング剤、
二重ハプテン脱離基を含むオリゴヌクレオチドプローブ、および
ヌクレアーゼ酵素
を含むリコンビナーゼポリメラーゼ増幅組成物であって、
ヌクレアーゼが、ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼであってもよい、組成物。

【請求項 2】

(i) クラウディング剤が、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリビニルアルコール (P V A)、ポリビニルピロリドン (P V P)、フィコール、またはデキストランを含

む、

(i i) クラウディング剤が、少なくとも 1 k D a、少なくとも 2 k D a、少なくとも 3 k D a、少なくとも 4 k D a、少なくとも 5 k D a、少なくとも 6 k D a、少なくとも 8 k D a、または少なくとも 10 k D a の分子量を有する、及び / 又は

(i i i) クラウディング剤が、少なくとも 15 % v / v の濃度、少なくとも 12 % v / v の濃度、少なくとも 10 % v / v の濃度、少なくとも 8 % v / v の濃度、少なくとも 6 % v / v の濃度、少なくとも 5 % v / v の濃度、少なくとも 4 % v / v の濃度、または少なくとも 3 % v / v の濃度で組成物中に存在する、請求項 1 に記載の組成物であって、
クラウディング剤は、3 k D a の分子量を有する P E G であってもよく、かつ該 P E G が 6 . 5 % v / v の濃度であってもよい、組成物。

【請求項 3】

クラウディング剤が、20 で 5 m P a / s 以下、4 m P a / s 以下、3 m P a / s 以下、2 m P a / s 以下、または 1 m P a / s 以下の粘度プロファイルを有する、請求項 1 又は 2 に記載の組成物であって、

クラウディング剤が、20 で 3 m P a / s 以下の粘度を有する P E G であってもよい、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

オリゴヌクレオチドプローブが、オリゴヌクレオチドに脱離基を結合させる塩基を欠く d R - O - [C] n ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

二重ハプテンを有するオリゴヌクレオチドプローブが、相補的ヌクレオチド配列にハイブリダイズする際にホルムアミドピリミジン D N A グリコシラーゼにより切断されると、二重ハプテン脱離基を放出する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

二重ハプテン脱離基が、異なるエピトープを有する 2 つの免疫原性基を含む、請求項 1 に記載の組成物であって、

免疫原性基が、蛍光基、酵素またはそのフラグメント、ペプチドまたはそのフラグメント、ビオチンを含んでもよく、

好ましくは、免疫原性基が、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニンまたはジニトロフェニルを含む群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドプローブが、エキソヌクレアーゼにより切断可能であり、かつ前記オリゴヌクレオチドが、切断されると前記二重ハプテン脱離基を放出する、請求項 1 に記載の組成物であって、

前記エキソヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼ I I I であってもよい、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチドプローブが、構造式 $5' - X(n)_a - L(n)_b - H(n)_c - B3'$ (式中、 n はヌクレオチドであり、 a 、 b および c は整数であり、 X は $5'$ ヘキシルであり、 H は T H F 残基であり、 B は C 3 スペースであり、 L は複数のハプテンを含む分枝修飾因子である) を有する、請求項 7 に記載の組成物であって、

(i) 前記ハプテンが、D N P、F A M、およびビオチンからなる群から選択されてもよく、

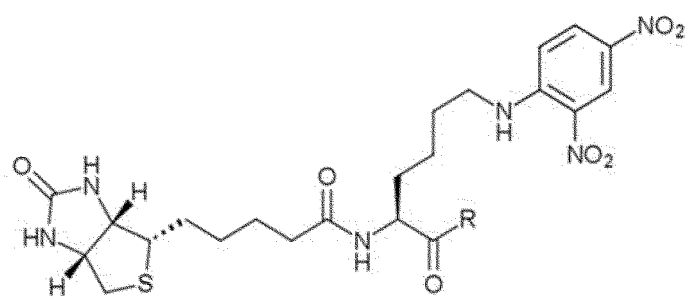
(i i) 前記オリゴヌクレオチドプローブが、ハプテン間のホスホロチオエート結合を含んでもよく、及び / 又は

(i i i) 前記 C 3 スペースが、プロパノールであってもよい、請求項 7 に記載の組成物。

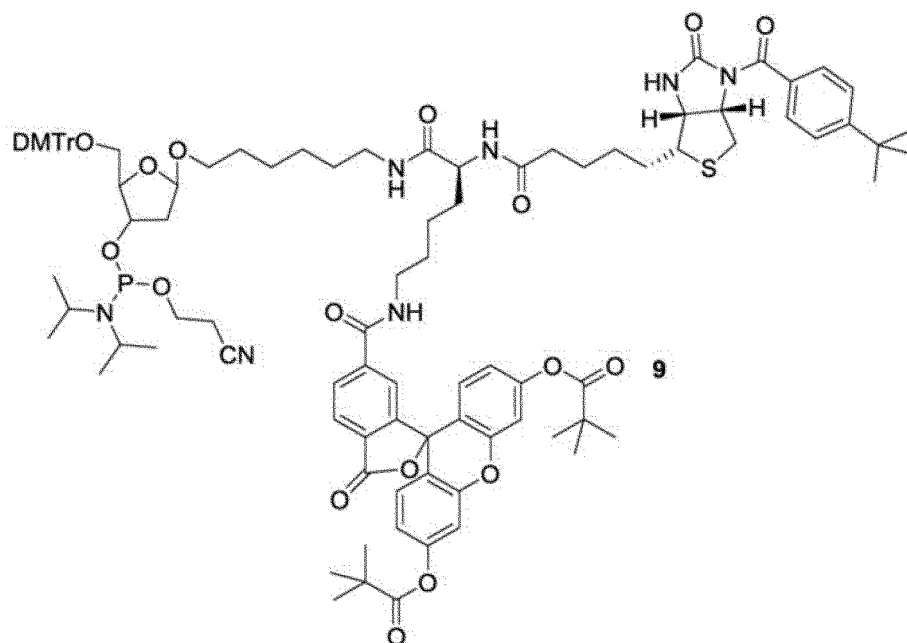
【請求項 9】

(i)

【化 2】



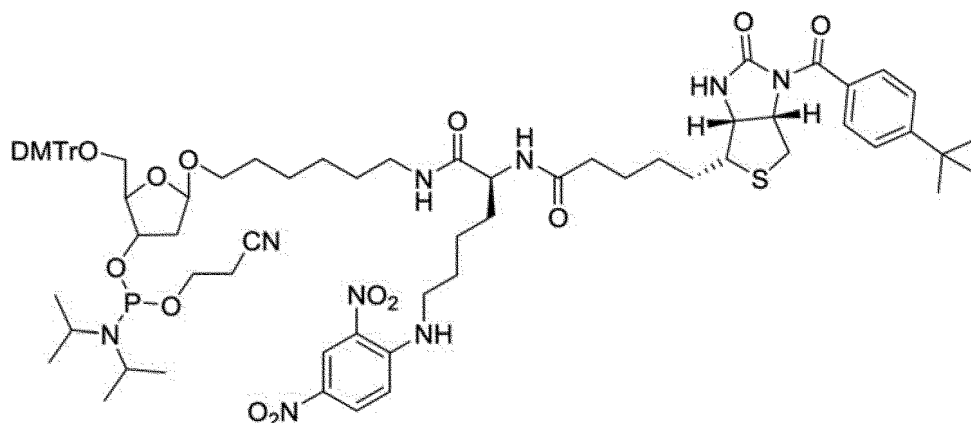
【化 3】



又は

(i i)

【化 4】

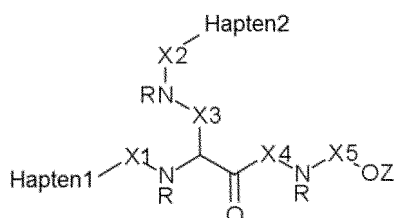


(式中、DMTr はジメトキシトリチルである)

を含む組成物。

【請求項 11】

【化 5】



(式中、ハプテン 1 およびハプテン 2 は請求項 10 に記載の免疫原性基であり、
Z は (i) アノマー炭素原子で β 立体配置を有する、RNA または DNA オリゴヌクレオチド
各々における脱塩基リボースまたはデオキシリボース環の C1' ; (ii) DNA または
RNA オリゴヌクレオチドに結合するように構成されたホスホロアミダイト化合物：
から選択され、

かつ Z が DNA または RNA ホスホロアミダイトである場合、ハプテン 1 およびハプテン
2 の反応基はピバロイル、tert-ブチルベンゾイル、アシル、ベンゾイル、またはイ
ソブチリルで保護されてもよく、

R は水素、または直鎖もしくは分枝 C1 ~ C6 アルキルを表し、

X1、X2 および X4 は結合基であり、それは独立に不在であり得るか、または 1 つ以上
の -O-、-C(=O)- もしくは -NR- 基により中断され得る直鎖若しくは分枝 C1
~ C12 アルキルであってもよく、

X3 は直鎖または分枝 C1 ~ C6 アルキルであり、かつ

X5 は、1 つ以上の -O-、-C(=O)- または -NR- 基により中断されてもよい直
鎖または分枝 C1 ~ C12 アルキルである)

を含む組成物。

【請求項 12】

(i) 試料適用領域、

(ii) 前記試料適用領域下流にありかつそれと流体連通している試薬領域であって、標
的核酸を増幅するための乾燥 RPA 試薬組成物、増幅された標的核酸産物に特異的な結合
剤および検出分子を含む、試薬領域であって、乾燥された RPA 試薬組成物が、クラウデ
ィング剤、リコンビナーゼ、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼ、二重ハプテンプローブおよび
検出分子を含んでもよく、好ましくは、二重ハプテンプローブが、ビオチンとカルボキシ

フルオレセイン（F A M）のまたはビオチンとジニトロフェニル（D N P）のコンジュゲートを含む、試薬領域、

（ i i i ）前記試薬領域の下流にありかつそれと流体連通している少なくとも1つの試験領域であって、前記増幅された標的核酸産物に特異的な固定化捕捉分子を含む、試験領域であって、増幅された標的核酸に特異的な固定化捕捉分子が、抗F A M捕捉分子または抗D N P捕捉分子からなる群から選択されてもよく、好ましくは抗F A Mまたは抗D N Pが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびF A B、S c F v、F vまたはD A Bを含むこれらの機能的結合フラグメントからなる群から独立に選択される、試薬領域ならびに

（ i v ）前記試験領域の下流にあるコントロール領域を含む、ラテラルフローストリップを含む、装置。

【請求項13】

（ i ）検出分子が、金ゾル、銀ゾル、ラテックスゾル、セルロースナノビーズ、またはカーボンナノストリング、および抗ビオチン捕捉分子からなる群から選択される、

（ i i ）コントロール領域が、ラテラルフローストリップの正確な操作を示す結合領域を含む、又は、

（ i i i ）コントロール領域が、抗マウス抗体捕捉ラインを含む、
請求項12に記載の装置。

【請求項14】

（ i ）目的の標的核酸を含有することが疑われる試料を、前記標的核酸を増幅するためのR P A試薬、前記標的核酸に相補的な核酸配列および共有結合された二重ハプテン脱離基を含むオリゴヌクレオチドプローブ、ならびにヌクレアーゼと接触させることであって、R P A試薬は、ラテラルフローストリップの試料適用領域上に位置してもよく、

（ i i ）前記標的核酸を増幅して標的核酸産物を生成することと、

（ i i i ）前記標的核酸にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブから切断された遊離二重ハプテン部分を検出することにより前記標的核酸産物を検出することを含む、増幅産物を検出する方法。

【請求項15】

（ i ）標的核酸を含有することが疑われる試料をラテラルフローストリップに適用することと、

（ i i ）前記試料をラテラルフローストリップの試薬領域上に乾燥された標的核酸を増幅するためのR P A試薬混合物と接触させることと、

（ i i i ）増幅産物を、存在する場合、ラテラルフローストリップの試験領域上で検出することを含む方法。