

【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30年11月29日 (2018.11.29)

【公表番号】特表2017-532962(P2017-532962A)

【公表日】平成29年11月9日 (2017.11.9)

【年通号数】公開・登録公報2017-043

【出願番号】特願2017-520492(P2017-520492)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/34 (2006.01)

G 0 1 N 33/483 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

C 1 2 Q 1/34

G 0 1 N 33/483 C

G 0 1 N 33/483 E

G 0 1 N 33/50 P

【手続補正書】

【提出日】平成30年10月18日 (2018.10.18)

【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】

標的 RNA ポリヌクレオチドを特徴付けるための方法であって、

a) (i) DNA ヘリカーゼ結合部位を含む DNA リーダー配列を含むように修飾されている RNA ポリヌクレオチド、および (i i) DNA ヘリカーゼ酵素を用意するステップ；

b) a) において用意された前記 RNA ポリヌクレオチドおよび DNA ヘリカーゼ酵素を膜貫通細孔と接触させて、前記 DNA ヘリカーゼが前記膜貫通細孔を通る RNA ポリヌクレオチドの移動を制御するステップ；

c) 前記 RNA ポリヌクレオチドが膜貫通細孔に対して移動する間に 1 つ以上の測定値を得るステップであって、前記測定値は、前記 RNA ポリヌクレオチドの 1 つ以上の特徴を示し、それによって前記標的 RNA ポリヌクレオチドを特徴付けるステップを含む方法。

【請求項 2】

前記リーダー配列が優先的に前記細孔に入り込む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(i) 前記 DNA リーダー配列が、前記 RNA ポリヌクレオチドと前記 DNA リーダー配列のそれぞれの少なくとも 1 つの反応性基の間に形成される共有結合によって前記 RNA ポリヌクレオチドに結合され、(i i) 前記 DNA リーダー配列が、化学的または酵素

的ライゲーシオンによって前記RNAポリヌクレオチドにライゲーシオンされ、または、(i i i) 前記DNAリーダー配列が、前記RNAポリヌクレオチドにハイブリダイズされる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記1つ以上の特徴が、(i) 前記RNAポリヌクレオチドの長さ、(i i) 前記RNAポリヌクレオチドの素性、(i i i) 前記RNAポリヌクレオチドの配列、(i v) 前記RNAポリヌクレオチドの二次構造、および(v) 前記RNAポリヌクレオチドが修飾されているかどうか、場合により、1つ以上のタンパク質もしくは類似塩基を用いたメチル化による、酸化による、損傷による修飾、または1つ以上の標識、タグもしくはスパーサーを用いた修飾がされているかどうかから選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記RNAポリヌクレオチドの1つ以上の特徴が、電気的測定および/または光学的測定によって測定される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

ステップc) が、前記RNAポリヌクレオチドが膜貫通細孔に対して移動する間に膜貫通細孔を通過する電流を測定するステップであって、前記電流は、前記RNAポリヌクレオチドの1つ以上の特徴を示し、それによって前記RNAポリヌクレオチドを特徴付けるステップを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記RNAポリヌクレオチドが、1つ以上のアンカーを用いて前記膜にカップリングされる、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記DNAヘリカーゼが、ポリヌクレオチド結合ドメインの開口部のサイズを減少させるための修飾を含み、前記開口部を通して、少なくとも1つの立体配座状態で、RNAポリヌクレオチドがヘリカーゼから解離することができる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記1つ以上のヘリカーゼが、a) He l 3 0 8ヘリカーゼ、Rec Dヘリカーゼ、XPDヘリカーゼまたはDdaヘリカーゼ；(b) (a) のヘリカーゼのいずれかに由来するヘリカーゼ；ならびに(c) (a) および/または(b) のヘリカーゼのいずれかの組み合わせである、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

ヘリカーゼに由来し、前記ポリヌクレオチドに結合するが、ヘリカーゼとして機能しないように修飾されている1つ以上の分子ブレーキをさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記膜貫通細孔が、タンパク質細孔であって、場合により溶血素、ロイコシジン、マイコバクテリウム・スメグマチス (Mycobacterium smegmatis) ポリンA (M s p A)、M s p B、M s p C、M s p D、C s g G、リセニン、外膜ポリンF (O m p F)、外膜ポリンG (O m p G)、外膜ホスホリパーゼA、ナイセリア (Neisseria) 自己輸送体リボタンパク質 (N a l P) およびW Z A由来である、または前記膜貫通細孔が固体状態細孔である、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

RNAポリヌクレオチドおよびDNA リーダー配列を含むポリヌクレオチドであって、前記DNA リーダー配列がDNAヘリカーゼ結合部位を含むまたはそれだけを含む、ポリヌクレオチド。

【請求項13】

ポリヌクレオチド鎖上にバーコード部分をさらに含み、場合により、前記バーコード部分が、前記リーダー配列と前記DNAヘリカーゼ結合部位との間に位置される、請求項1

2 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 14】

RNA ポリヌクレオチドと DNA ヘリカーゼとの組み合わせであって、前記 RNA ポリヌクレオチドの一部が、DNA ヘリカーゼ結合部位を含む DNA リーダー配列を含むように修飾されている、組み合わせ。

【請求項 15】

DNA ヘリカーゼ結合部位を含む DNA リーダー配列を含む、標的 RNA ポリヌクレオチドを特徴付けるためのキットであって、前記 DNA リーダー配列は、特徴付けのために任意の標的 RNA ポリヌクレオチドに結合するように適合されている、キット。