

【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(ii) 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、(ii) 前記DNAリーダー配列が、化学的または酵素

的ライゲーションによって前記 R N A ポリヌクレオチドにライゲーションされ、または、
(i i i) 前記 D N A リーダー配列が、前記 R N A 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 R N A ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 前記 R N A ポリヌクレオチドの素性、(i i i) 前記 R N A ポリヌクレオチドの配列、(i v) 前記 R N A ポリヌクレオチドの二次構造、および(v) 前記 R N A 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、タグもしくはスペ
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 R N A 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 R N A 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 R N A 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 R N A 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 R N A 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 D N A 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、前記開口部を通って、少なくとも 1 つの立体配座状態で、R N A 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) H e l 3 0 8 ヘリカーゼ、R e c D ヘリカーゼ、X
P D ヘリカーゼまたは D d a 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) 自己輸送体リポ
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】

R N A ポリヌクレオチドおよび D N A リーダー配列を含むポリヌクレオチドであって、
前記 D N A リーダー配列が D N A 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 D N A 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】

R N A ポリヌクレオチドと D N A ヘリカーゼとの組み合わせであって、前記 R N A ポリヌクレオチドの一部が、D N A ヘリカーゼ結合部位を含む D N A 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】

D N A ヘリカーゼ結合部位を含む D N A リーダー配列を含む、標的 R N A 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 D N A リーダー配列は、特徴付けのために任意の標的 R N A 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。