

【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28年9月1日(2016.9.1)

【公表番号】特表2015-529451(P2015-529451A)

【公表日】平成27年10月8日(2015.10.8)

【年通号数】公開・登録公報2015-063

【出願番号】特願2015-522172(P2015-522172)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	9/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)
C 1 2 N	9/14	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	33/483	(2006.01)
G 0 1 N	27/02	(2006.01)
G 0 1 N	27/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/68	Z N A Z
C 1 2 N	9/00	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/34	Z
C 1 2 N	9/14	
G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/483	C
G 0 1 N	33/483	E
G 0 1 N	27/02	D
G 0 1 N	27/00	Z

【手続補正書】

【提出日】平成28年7月7日(2016.7.7)

【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】

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、

(a) 標的ポリヌクレオチドを、膜貫通ポアならびにヘリカーゼおよび追加的ポリヌクレオチド結合成分を含む構築物と、構築物がポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させるステップであって、ヘリカーゼがポリヌクレオチド結合成分に付着されており、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有するステップ；ならびに

(b) ポリヌクレオチドがポアに関して移動するときに1つまたは複数の測定値を取るステップであって、測定値が標的ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示し、それにより標的ポリヌクレオチドを特性決定するステップ

を含む方法。

【請求項 2】

(a) ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが、共有結合的に付着されている、化学的に付着されている、もしくは遺伝子的に融合されている、および／または

(b) ヘリカーゼとポリヌクレオチド結合成分とが、1つもしくは複数のリンカーによって付着されている、もしくはアミノ酸配列である1つもしくは複数のリンカーによって付着されている、

請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ポリヌクレオチド結合成分が1つまたは複数のヘリカーゼを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

(a) 構築物中の2つ以上のヘリカーゼが互いに異なっている、および／または

(b) 2つ以上のヘリカーゼが同じであるもしくは類似している、もしくは2つ以上のヘリカーゼが同じであるもしくは類似しており各ヘリカーゼ中の同じアミノ酸残基を使用して付着されている、

請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

(a) ポリヌクレオチド結合成分が、ヘリックス-ヘアピン-ヘリックス(HhH)ドメイン、真核生物1本鎖結合タンパク質(single-stranded binding protein)(SSB)、細菌性SSB、古細菌SSB、ウイルス性SSB、2本鎖結合タンパク質、スライディングクラップ、前進性因子、DNA結合ループ、複製開始タンパク質、テロメア結合タンパク質、リプレッサー、亜鉛フィンガーおよび増殖細胞核抗原(PCNA)から独立に選択される1つまたは複数のドメインを含む、もしくはポリヌクレオチド結合成分が表4に示されるものおよびその変種から選択される、ならびに／または

(b) ポリヌクレオチド結合成分が(i)エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼもしくはトポイソメラーゼ由来、もしくは(ii)Phi29ポリメラーゼ(配列番号62)もしくはその変種由来である、

請求項1または2に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 1つもしくは複数のヘリカーゼがスーパーファミリー1～6から独立に選択される、ならびに／または

(b) 1つもしくは複数のヘリカーゼが単量体である、ならびに／または

(c) 1つもしくは複数のヘリカーゼが、Hel308ヘリカーゼ、RecDヘリカーゼ、Tra1ヘリカーゼ、Tra1サブグループヘリカーゼ、XPDヘリカーゼおよびその変種から独立に選択される、

前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

(a) Hel308ヘリカーゼがアミノ酸モチーフQ-X1-X2-G-R-A-G-R(配列番号8)(式中、X1はC、MもしくはLであり、X2は任意のアミノ酸残基である)を含み；

(b) RecDヘリカーゼが、

- アミノ酸モチーフX1-X2-X3-G-X4-X5-X6-X7(配列番号8)(式中、X1はG、SもしくはAであり、X2は任意のアミノ酸であり、X3はP、A、SもしくはGであり、X4はT、A、V、SもしくはCであり、X5はGもしくはAであり、X6はKもしくはRであり、X7はTもしくはSである)；および／または

- アミノ酸モチーフX1-X2-X3-X4-X5-(X6)<sub>3</sub>-Q-X7(配列番号12)(式中、X1はY、WもしくはFであり、X2はA、T、S、M、CもしくはVであり、X3は任意のアミノ酸であり、X4はTもしくはNであり、X5はA、T、G、S、VもしくはIであり、X6は任意のアミノ酸であり、X7はGもしくはSである)

を含み；

- (c) T r a I ヘリカーゼまたは T r a I サブグループヘリカーゼが、
  - アミノ酸モチーフ H - (X<sub>1</sub>)<sub>2</sub> - X<sub>2</sub> - R - (X<sub>3</sub>)<sub>5~12</sub> - H - X<sub>4</sub> - H (配列番号 31~38) (式中、X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は任意のアミノ酸であり、X<sub>2</sub>およびX<sub>4</sub>はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択される)；または
  - アミノ酸モチーフ G - X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - H - (X<sub>8</sub>)<sub>6~12</sub> - H - X<sub>9</sub> (配列番号 39~45) (式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>、X<sub>7</sub>およびX<sub>9</sub>はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択され、X<sub>4</sub>はDまたはEであり、X<sub>8</sub>は任意のアミノ酸である)

を含み；または

- (d) X P D ヘリカーゼが、
  - アミノ酸モチーフ X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - G - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - E - G (配列番号 8) (式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>5</sub>およびX<sub>6</sub>はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択され、X<sub>3</sub>およびX<sub>4</sub>は任意のアミノ酸残基であってよい)；および／または
  - アミノ酸モチーフ Q - X<sub>a</sub> - X<sub>b</sub> - G - R - X<sub>c</sub> - X<sub>d</sub> - R - (X<sub>e</sub>)<sub>3</sub> - X<sub>f</sub> - (X<sub>g</sub>)<sub>7</sub> - D - X<sub>h</sub> - R (配列番号 9) (式中、X<sub>a</sub>、X<sub>e</sub>およびX<sub>g</sub>は任意のアミノ酸残基であってよく、式中、X<sub>b</sub>、X<sub>c</sub>およびX<sub>d</sub>はD、E、KおよびRを除く任意のアミノ酸から独立に選択される)

を含む、請求項6に記載の方法。

#### 【請求項 8】

(a) H e l 3 0 8 ヘリカーゼ中のX<sub>2</sub>がA、F、M、C、V、L、I、S、TもしくはPである、ならびに／または

(b) H e l 3 0 8 ヘリカーゼが表1に示すヘリカーゼの1つもしくはその変種である、もしくはH e l 3 0 8 ヘリカーゼが、(i)配列番号10、13、16もしくは19のいずれか1つに示す配列、もしくは(iii)その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて関連配列と少なくとも40%相同性を有し、かつヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、または

(c) T r a I ヘリカーゼが、(i)配列番号46、87、98もしくは102に示す配列、もしくは(ii)その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて関連配列と少なくとも40%相同性を有し、かつヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む、または

(d) X P D ヘリカーゼ中のX<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>5</sub>およびX<sub>6</sub>ならびに／もしくはX<sub>b</sub>、X<sub>c</sub>およびX<sub>d</sub>がG、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、Q、N、SおよびTから独立に選択される、もしくはX P D ヘリカーゼが、(i)配列番号52のいずれか1つに示す配列、もしくは(iii)その配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて関連配列と少なくとも40%相同性を有し、かつヘリカーゼ活性を保持しているその変種を含む

、  
請求項7に記載の方法。

#### 【請求項 9】

1つもしくは複数のヘリカーゼが付着を促進するために修飾されている、または  
1つもしくは複数のヘリカーゼが、1つもしくは複数の非天然システイン残基および／もしくは1つもしくは複数の4-アジド-L-フェニルアラニン(Faz)残基の導入によって付着を促進するために修飾されている、

前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 10】

標的ポリヌクレオチドの1つもしくは複数の特性が、

(a) 電気的測定および／もしくは光学的測定、または

(b) 電流測定、インピーダンス測定、トンネル測定もしくは電界効果トランジスタ(FET)測定である電気的測定、

によって測定される、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 11】

2つ以上のヘリカーゼを含む構築物であって、ヘリカーゼが互いに付着しており、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する構築物。

【請求項 1 2】

構築物が請求項4に定義されており、および / または 2つ以上のヘリカーゼが請求項1 6から9のいずれか一項に定義されている、請求項1 1に記載の構築物。

【請求項 1 3】

(a) ヘリカーゼと、配列番号9 4もしくは配列番号9 4の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号9 4と少なくとも 80% 相同性を有するその変種を含むアミノ酸配列とを含む構築物であってヘリカーゼがアミノ酸配列に付着されている構築物、または

(b) 配列番号9 0もしくは配列番号9 0の配列全体にわたってアミノ酸同一性に基づいて配列番号9 0と少なくとも 80% 相同性を有するその変種を含む構築物

であって、構築物がポリヌクレオチドの移動を制御する能力を有する構築物。

【請求項 1 4】

ポリヌクレオチドの移動を制御する方法であって、ポリヌクレオチドを、請求項1 1から1 3のいずれか一項に記載の構築物に接触させ、それによりポリヌクレオチドの移動を制御するステップを含む方法。

【請求項 1 5】

ポアと、請求項1から9のいずれか一項に定義されている構築物または請求項1 1から1 3のいずれか一項に記載の構築物との間の複合体を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのセンサー。

【請求項 1 6】

ポアを通る標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための、請求項1から9のいずれか一項に定義されている構築物または請求項1 1から1 3のいずれか一項に記載の構築物の使用。

【請求項 1 7】

(a) ポアおよび (b) 請求項1から9のいずれか一項に定義されている構築物または請求項1 1から1 3のいずれか一項に記載の構築物を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。

【請求項 1 8】

複数のポア、および請求項1から9のいずれか一項に定義されている複数の構築物または請求項1 1から1 3のいずれか一項に記載の複数の構築物を含む、試料中の標的ポリヌクレオチドを特性決定するための装置。