

【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3部門第2区分

【発行日】平成28年4月28日(2016.4.28)

【公表番号】特表2015-514128(P2015-514128A)

【公表日】平成27年5月18日(2015.5.18)

【年通号数】公開・登録公報2015-033

【出願番号】特願2015-505016(P2015-505016)

【国際特許分類】

C 07 K 14/435 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 M 1/00 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 07 K 14/435 Z N A

C 12 N 15/00 A

C 12 M 1/00 A

C 12 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成28年3月10日(2016.3.10)

【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】

配列番号2に示す配列の変種を含む変異体ライセニン(lysenin)モノマーであって、前記モノマーがポアを形成でき、前記変種が、配列番号2のアミノ酸配列と配列全長にわたって少なくとも85%の相同性を有し、前記変種が、ポリヌクレオチドと相互作用するモノマーの能力を変更する配列番号2のE84及びE92の位置での置換を含む、変異体ライセニンモノマー。

【請求項2】

前記変種が、ポリヌクレオチドと相互作用するモノマーの能力を変更する配列番号2のE85、E97及びD126の位置での置換を含む、請求項1に記載の変異体ライセニンモノマー。

【請求項3】

前記置換が、(a)前記モノマーの立体効果を変更する、(b)前記モノマーの正味電荷を変更する、(c)前記ポリヌクレオチドと水素結合する前記モノマーの能力を変更する、(d)非局在化電子p iシステムを通じて相互作用する化学的基を導入するもしくは除去する、および/または(e)モノマーの構造を変更する、請求項1に記載の変異体ライセニンモノマー。

【請求項4】

(i)前記置換が、正味の正電荷を増加または減少させ、(ii)前記置換が、E84又はE92に正に荷電したアミノ酸を導入することによりまたはE84及びE92で負電荷を中和することによって前記正味の正電荷を増加させ、または(iii)前記置換が、前記負に荷電したアミノ酸を1つもしくは複数の無荷電アミノ酸、非極性アミノ酸および/もしくは芳香族アミノ酸で置換することによって、E84及びE92で負電荷を中和する、請求項3に記載の変異体ライセニンモノマー。

## 【請求項 5】

E 8 4 および E 9 2 の位置で置換されたアミノ酸が、アスパラギン (N)、セリン (S)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、グリシン (G)、チロシン (Y)、ロイシン (L)、リジン (K) またはアラニン (A) から選択される、請求項\_1 に記載の変異体ライセニンモノマー。

## 【請求項 6】

前記変種が次の置換：

i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G および E 1 6 7 A の 1 つもしくは複数；

i i . E 7 6 S、E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G および E 1 6 7 A の 1 つもしくは複数；

i i i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および E 5 0 S の 1 つもしくは複数；

i v . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および E 7 1 S の 1 つもしくは複数；

v . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および E 9 4 S の 1 つもしくは複数；

v i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および E 1 0 2 S の 1 つもしくは複数；

v i i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および E 1 2 8 S の 1 つもしくは複数；

v i i i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および E 1 3 5 S の 1 つもしくは複数；

i x . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および D 6 8 S の 1 つもしくは複数；

x . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および D 1 2 1 S の 1 つもしくは複数；

x i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G、E 1 6 7 A および D 1 3 4 S の 1 つもしくは複数；または

x i i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、D 1 2 6 G および E 1 3 5 S の 1 つもしくは複数；

x i i i . E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S、H 1 0 3 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x i v . E 8 4 Q、E 8 5 K、M 9 0 S、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x v . E 8 4 Q、Q 8 7 S、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x v i . E 8 4 Q、E 8 5 S、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x v i i . E 8 4 S、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x v i i i . H 8 1 S、E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x i x . Y 7 9 S、E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x x . F 7 0 S、E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x x i . H 5 8 S、E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

x x i i . R 5 2 S、E 8 4 Q、E 8 5 K、E 9 2 Q、E 9 7 S および D 1 2 6 G の 1 つもしくは複数；

もしくは複数；

$\times \times i i i . N 4 8 S$ 、 $E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ および $D 1 2 6 G$ の1つもしくは複数；

$\times \times i v . N 4 6 S$ 、 $E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ および $D 1 2 6 G$ の1つもしくは複数；

$\times \times v . M 4 4 S$ 、 $E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ および $D 1 2 6 G$ の1つもしくは複数；

$\times \times v i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ および $E 9 7 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times v i i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ および $D 1 2 6 G$ の1つもしくは複数；

$\times \times v i i i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ および $E 1 6 7 A$ の1つもしくは複数；

$\times \times i x . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $D 1 2 6 G$ および $E 1 6 7 A$ の1つもしくは複数；

$\times \times x . E 8 4 Q$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ および $E 1 6 7 A$ の1つもしくは複数；

$\times \times x i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $D 1 2 1 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x i i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $D 6 8 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x i i i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $E 1 3 5 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x i v . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $E 1 2 8 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x v . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $E 1 0 2 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x v i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $E 9 4 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x v i i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $E 7 1 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x v i i i . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ 、 $E 1 6 7 A$ および $E 5 0 S$ の1つもしくは複数；

$\times \times x i x . E 7 6 S$ 、 $E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ および $E 1 6 7 A$ の1つもしくは複数；または

$\times 1 . E 8 4 Q$ 、 $E 8 5 K$ 、 $E 9 2 Q$ 、 $E 9 7 S$ 、 $D 1 2 6 G$ および $E 1 6 7 A$ の1つもしくは複数

を含む、請求項1に記載の変異体ライセニンモノマー。

#### 【請求項7】

前記変種が*i*からx 1のいずれか1つの全ての置換を含む、請求項6に記載の変異体ライセニンモノマー。

#### 【請求項8】

ライセニン由来の2つ以上の共有結合的に付着されたモノマーを含む構築物であって、モノマーの少なくとも1つが請求項1から7のいずれか一項に記載の変異体ライセニンモノマーである、構築物。

#### 【請求項9】

(i) 前記2つ以上のモノマーが同じであるまたは異なっている、および/または

(ii) 少なくとも1つのモノマーが配列番号2に示す配列を含み、および/または

(iii) 前記構築物が2つのモノマーを含み、および/または

(iv) 前記モノマーが遺伝子的に融合されており、および/または

(v) 前記モノマーがリンカーを介して付着している、

請求項8に記載の構築物。

【請求項10】

請求項1から7のいずれか一項に記載の変異体ライセニンモノマーまたは請求項8に記載の構築物をコードしているポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項1から7のいずれか一項に記載の十分な数の変異体ライセニンモノマーを含むライセニン由来のホモオリゴマーポア。

【請求項12】

請求項1から7のいずれか一項に記載の少なくとも1つの変異体ライセニンモノマーを含むライセニン由来のヘテロオリゴマーポア。

【請求項13】

(a) 標的分析物を請求項11または12に記載のポアに接触させて、前記標的分析物が前記ポアを通って移動するようにするステップ、および

(b) 前記分析物が前記ポアに対して移動するときに1つまたは複数の測定を行うステップであって、前記測定が標的分析物の1つまたは複数の特性を示し、それにより標的分析物を特性決定するステップ

を含む、標的分析物を特性決定する方法。

【請求項14】

標的分析物を特性決定するための請求項11または12に記載のポアの使用。

【請求項15】

(a) 請求項11または12に記載のポアおよび(b)ポリヌクレオチド結合タンパク質を含む、標的ポリヌクレオチドを特性決定するためのキット。