

【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 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 K 14/435 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 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 E 8 4 及び E 9 2 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 E 8 5、E 9 7 及び D 1 2 6 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 pi 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、E 8 4 又は E 9 2 に正に荷電したアミノ酸を導入することによりまたは E 8 4 及び E 9 2 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、E 8 4 及び E 9 2 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；

$x x i i i$. 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；

$x x i v$. 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；

$x x v$. 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；

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

$x x v i i$. 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 つしくは複数；

$x x v i i i$. 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 つしくは複数；

$x x i x$. 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 つしくは複数；

$x x x$. 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 つしくは複数；

$x x x i$. 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 つしくは複数；

$x x x i i$. 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 つしくは複数；

$x x x i i i$. 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 つしくは複数；

$x x x i v$. 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 つしくは複数；

$x x x v$. 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 つしくは複数；

$x x x v i$. 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 つしくは複数；

$x x x v i i$. 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 つしくは複数；

$x x x v i i i$. 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 つしくは複数；

$x x x i x$. 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 つしくは複数；または

$x 1$. 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

(i i) 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

(i i i) 前記構築物が 2 つのモノマーを含み、および / または

(i v) 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し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。