

【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27年4月2日(2015.4.2)

【公表番号】特表2014-506575(P2014-506575A)

【公表日】平成26年3月17日(2014.3.17)

【年通号数】公開・登録公報2014-014

【出願番号】特願2013-553029(P2013-553029)

【国際特許分類】

C 0 7 K	14/35	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 M	1/34	(2006.01)
C 1 2 N	9/12	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	14/35	Z N A
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q	1/68	Z
C 1 2 M	1/34	E
C 1 2 N	9/12	

【手続補正書】

【提出日】平成27年2月9日(2015.2.9)

【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に示される配列のバリアントを含む変異体M s pモノマーであって、前記バリアントが以下の変異：G 7 5 S、G 7 7 S、L 8 8 NおよびQ 1 2 6 Rの少なくとも1つを含む、前記モノマー。

【請求項2】

前記バリアントが以下の変異：G 7 5 S、G 7 7 SおよびQ 1 2 6 Rを含む、請求項1に記載の変異体M s pモノマー。

【請求項3】

前記バリアントがさらにL 8 8 Nを含む、請求項2に記載の変異体M s pモノマー。

【請求項4】

前記バリアントが、さらに以下の変異：

- (a) 90位にセリン(S)、グルタミン(Q)またはチロシン(Y)；
- (b) 105位にロイシン(L)またはセリン(S)；
- (c) 59位にアルギニン(R)；
- (d) 78位にロイシン(L)；
- (e) 81位にアスパラギン(N)；
- (f) 83位にアスパラギン(N)；
- (g) 86位にセリン(S)またはトレオニン(T)；
- (h) 87位にフェニルアラニン(F)、バリン(V)またはロイシン(L)；
- (i) 89位にフェニルアラニン(F)、バリン(V)またはロイシン(L)；
- (j) 90位にロイシン(L)、フェニルアラニン(F)、トリプトファン(W)、ヒ

スチジン( H )、トレオニン( T )、グリシン( G )、アラニン( A )、バリン( V )、アルギニン( R )、リシン( K )、アスパラギン( N )またはシステイン( C ) ;  
 ( k ) 9 1 位にセリン( S )、グルタミン( Q )、ロイシン( L )、メチオニン( M )、イソロイシン( I )、アラニン( A )、バリン( V )、グリシン( G )、フェニルアラニン( F )、トリプトファン( W )、チロシン( Y )、ヒスチジン( H )、トレオニン( T )、アルギニン( R )、リシン( K )、アスパラギン( N )またはシステイン( C ) ;  
 ( l ) 9 2 位にアラニン( A )またはセリン( S ) ;  
 ( m ) 9 3 位にセリン( S )、アラニン( A )、トレオニン( T )、グリシン( G ) ;  
 ( n ) 9 4 位にロイシン( L ) ;  
 ( o ) 9 5 位にバリン( V ) ;  
 ( p ) 9 6 位にアルギニン( R )、アスパラギン酸( D )、バリン( V )、アスパラギン( N )、セリン( S )またはトレオニン( T ) ;  
 ( q ) 9 7 位にセリン( S ) ;  
 ( r ) 9 8 位にセリン( S ) ;  
 ( s ) 9 9 位にセリン( S ) ;  
 ( t ) 1 0 0 位にセリン( S ) ;  
 ( u ) 1 0 1 位にフェニルアラニン( F ) ;  
 ( v ) 1 0 2 位にリシン( K )、セリン( S )またはトレオニン( T ) ;  
 ( w ) 1 0 3 位にアラニン( A )、グルタミン( Q )、アスパラギン( N )、グリシン( G )またはトレオニン( T ) ;  
 ( x ) 1 0 4 位にイソロイシン ;  
 ( y ) 1 0 5 位にチロシン( Y )、アラニン( A )、グルタミン( Q )、アスパラギン( N )、トレオニン( T )、フェニルアラニン( F )、トリプトファン( W )、ヒスチジン( H )、グリシン( G )、バリン( V )、アルギニン( R )、リシン( K )、プロリン( P )またはシステイン( C ) ;  
 ( z ) 1 0 6 位にフェニルアラニン( F )、イソロイシン( I )、バリン( V )またはセリン( S ) ;  
 ( a a ) 1 0 8 位にプロリン( P )またはセリン( S ) ;  
 ( b b ) 1 1 8 位にアスパラギン( N ) ;  
 ( c c ) 1 0 3 位にセリン( S )またはシステイン( C ) ;  
 ( d d ) 1 0 ~ 1 5 、 5 1 ~ 6 0 、 1 3 6 ~ 1 3 9 および 1 6 8 ~ 1 7 2 位のうちの 1 つまたは複数にシステイン

の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の変異体 M s p モノマー。

#### 【請求項 5】

前記バリエントが、次の置換 :

- ( a ) 7 5 位にセリン( S )、7 7 位にセリン( S )、8 8 位にアスパラギン( N )、9 0 位にグルタミン( Q )および 1 2 6 位にアルギニン( R ) ;
- ( b ) ( i ) 9 0 位にグルタミン( Q )および ( i i ) 1 0 5 位にアラニン( A )の 1 つまたは複数 ;
- ( c ) ( i ) 9 0 位にセリン( S )および ( i i ) 9 2 位にセリン( S )の 1 つまたは複数 ;
- ( d ) ( i ) 8 7 位にグルタミン( Q )および ( i i ) 9 0 位にセリン( S )の 1 つまたは複数 ;
- ( e ) ( i ) 8 9 位にチロシン( Y )および ( i i ) 9 0 位にセリン( S )の 1 つまたは複数 ;
- ( f ) ( i ) 9 0 位にセリン( S )および ( i i ) 9 2 位にアラニン( A )の 1 つまたは複数 ;
- ( g ) ( i ) 9 0 位にセリン( S )および ( i i ) 9 4 位にアスパラギン( N )の 1 つまたは複数 ;
- ( h ) ( i ) 9 0 位にセリン( S )および ( i i ) 1 0 4 位にイソロイシン( I )の 1

つまたは複数；

( i ) ( i ) 9 0 位にグルタミン ( Q )、( i i ) 9 3 位にセリン ( S ) および ( i i i ) 1 0 5 位にアラニン ( A ) の 1 つまたは複数；

( j ) ( i ) 9 0 位にフェニルアラニン ( F )、トリプトファン ( W )、チロシン ( Y ) またはヒスチジン ( H )、( i i ) 9 1 位にフェニルアラニン ( F )、トリプトファン ( W )、チロシン ( Y ) またはヒスチジン ( H ) および ( i i i ) 1 0 5 位にフェニルアラニン ( F )、トリプトファン ( W )、チロシン ( Y ) またはヒスチジン ( H ) の 1 つまたは複数；

( k ) ( i ) 9 0 位にセリン ( S )、トレオニン ( T )、グリシン ( G )、アラニン ( A ) またはバリン ( V )、( i i ) 9 1 位にセリン ( S )、トレオニン ( T )、グリシン ( G )、アラニン ( A ) またはバリン ( V ) および ( i i i ) 1 0 5 位にセリン ( S )、トレオニン ( T )、グリシン ( G )、アラニン ( A ) またはバリン ( V ) の 1 つまたは複数；

( l ) 9 0 位にセリン ( S )、アルギニン ( R )、リシン ( K ) またはヒスチジン ( H ) および / または 9 1 位にセリン ( S )、アルギニン ( R )、リシン ( K ) またはヒスチジン ( H ) ；

( m ) 9 0 位にセリン ( S )、トレオニン ( T )、アスパラギン ( N )、グルタミン ( Q )、チロシン ( Y ) もしくはヒスチジン ( H ) および / または 9 1 位にセリン ( S )、トレオニン ( T )、アスパラギン ( N )、グルタミン ( Q )、チロシン ( Y ) もしくはヒスチジン ( H ) ；ならびに

( n ) 9 0 、 9 1 および 1 0 3 位の 1 つまたは複数にシステインの 1 つまたは複数を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の変異体。

#### 【請求項 6】

前記バリエントが、次の置換：

(i)	N90S;	(xix)	N90L;	(xxxviii)	A96N;
(ii)	N90Q;	(xx)	N91S;	(xxxix)	A96S;
(iii)	N90Y;	(xxi)	N91Q;	(xl)	A96T;
(iv)	I105L;	(xxii)	N91L;	(xli)	P97S;
(v)	I105S;	(xxiii)	N91M;	(xlii)	P98S;
(vi)	G75S, G77S, L88N, N90Q および Q126R;	(xxiv)	N91I;	(xliii)	F99S;
(vii)	E59R;	(xxv)	N91A;	(xliv)	G100S;
(viii)	I78L;	(xxvi)	N91V;	(xlv)	L101F;
(ix)	S81N;	(xxvii)	N91G;	(xlvi)	N102K;
(x)	T83N;	(xxviii)	G92A;	(xlvi)	N102S;
(xi)	N86S;	(xxix)	G92S;	(xlvi)	N102T;
(xii)	N86T;	(xxx)	N93S;	(xli)	S103A;
(xiii)	I87F;	(xxxi)	N93A;	(li)	S103Q;
(xiv)	I87V;	(xxxii)	N93T;	(li)	S103N;
(xv)	I87L;	(xxxiii)	I94L;	(lii)	S103G;
(xvi)	I89F;	(xxxiv)	T95V;	(liii)	S103T;
(xvii)	I89V;	(xxxv)	A96R;	(liv)	V104I;
(xviii)	I89L;	(xxxvi)	A96D;	(lv)	I105Y;
		(xxxvii)	A96V;	(lvi)	I105L;

(lvii) I105A;	(lxxvii) N90Y および N91G;	(xcvii) N90R;
(lviii) I105Q;	(lxxviii) N90G および N91Y;	(xcviii) N91R;
(lix) I105N;	(lxxix) N90G および N91G;	(xcix) N90S および N91S;
(lx) I105S;	(lxxx) I105G;	(c) N90Y および I105A;
(xi) I105T;	(lxxxi) N90R;	(ci) N90G および I105A;
(xii) T106F;	(lxxxii) N91R;	(cii) N90Q および I105A;
(xiii) T106I;	(lxxxiii) N90R および N91R;	(ciii) N90S および I105A;
(xiv) T106V;	(lxxxiv) N90K;	(civ) N90G および N93G;
(xv) T106S;	(lxxxv) N91K;	(cv) N90G;
(xvi) N108P;	(lxxxvi) N90K および N91K;	(cvii) N93G;
(xvii) N108S;	(lxxxvii) N90Q および N91G;	(cvii) N90G および N91A;
(xviii) N90Q および I105A;	(lxxxviii) N90G および N91Q;	(cviii) I105K;
(xix) N90S および G92S;	(lxxxix) N90Q および N91Q;	(cix) I105R;
(xx) I87Q および N90S;	(xc) R118N;	(cx) I105V;
(xxi) I89Y および N90S;	(xci) N91C;	(cxi) I105P;
(xxii) N90S および G92A;	(xcii) N90C;	(cxii) I105W;
(xxiii) N90S および I94N;	(xciii) N90W;	(cxiii) N90R および I105A;
(xxiv) N90S および V104I;	(xciv) N91W;	(cxiv) N90S および I105A;
(xxv) N90Q, D93S および I105A;	(xcv) N90K;	(cxv) S103C; および I105C.
(xxvi) N91Y;	(xcvi) N91K;	(cxvi) I105C.

の少なくとも 1 つを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の変異体。

#### 【請求項 7】

化学修飾されている、前記請求項のいずれか一項に記載の変異体。

#### 【請求項 8】

請求項 7 に記載の変異体であって、

( i ) 1 つもしくは複数のシステインへの分子の付着、1 つもしくは複数のリシンへの分子の付着、1 つもしくは複数の非天然アミノ酸への分子の付着、エピトープの酵素修飾または末端の修飾によって化学的に修飾されており；( ii ) 1 つもしくは複数のシステインへの分子の付着によって化学的に修飾されており、および前記 1 つもしくは複数のシステインが、置換により前記変異体に導入されており；( iii ) 1 つもしくは複数のシステインへの分子の付着、1 つもしくは複数のリシンへの分子の付着、もしくは 1 つもしくは複数の非天然アミノ酸への分子の付着によって化学的に修飾されており、前記分子が、( a ) 前記モノマーを含む細孔と標的ヌクレオチドもしくは標的核酸配列との相互作用を促進する分子アダプターもしくは( b ) 核酸結合タンパク質であり、( iv ) 1 つもしくは複数のシステインへの分子の付着、1 つもしくは複数のリシンへの分子の付着、もしくは 1 つもしくは複数の非天然アミノ酸への分子の付着によって化学的に修飾されており、前記付着がリンカーを介しており、または( v ) 1 つもしくは複数のシステインへの分子の付着、1 つもしくは複数のリシンへの分子の付着、もしくは 1 つもしくは複数の非天然

アミノ酸への分子の付着によって化学的に修飾されており、前記分子が、配列番号 2 の 9  
0、91 および 103 位の 1 つもしくは複数に付着している、

請求項 7 に記載の変異体。

**【請求項 9】**

Msp から得られる共有結合したモノマーを 2 個以上含む構築物であって、前記モノマーの少なくとも 1 つが、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマーである、構築物。

**【請求項 10】**

請求項 9 に記載の構築物であって、(a) 前記 2 個以上のモノマーが、同じまたは異なっており、(b) 少なくとも 1 つのモノマーが、配列番号 2 に示される配列を含み、(c) 前記構築物は 2 個のモノマーを含み、前記モノマーの少なくとも 1 つが、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体であり、(d) 前記モノマーが遺伝学的に融合されており、または(e) 前記モノマーがリンクマーを介して付着している、前記構築物。

**【請求項 11】**

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体または請求項 9 に記載の構築物をコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 12】**

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の同一の変異体モノマーを含む Msp から得られる、ホモオリゴマー細孔。

**【請求項 13】**

前記細孔が、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の同一の変異体モノマー 8 個を含む、請求項 12 に記載のホモオリゴマー細孔。

**【請求項 14】**

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマーを少なくとも 1 つ含み、全 8 個のモノマーのうち少なくとも 1 つが他と異なっている、Msp から得られるヘテロオリゴマー細孔。

**【請求項 15】**

請求項 14 に記載のヘテロオリゴマー細孔であって、(i) 前記細孔が、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマー 8 個を含み、そのうちの少なくとも 1 つが他と異なっており、(ii) 前記細孔が、配列番号 2 に示される配列を含む少なくとも 1 つのモノマーを含み、(iii) 前記細孔が、(a) 1 個の変異体モノマーおよび(b) 7 個の同一のモノマーを含み、(a) の前記変異体モノマーが(b) の前記同一のモノマーとは異なっており、または(iv) 前記細孔が、(a) 配列番号 2 に示される配列を含むモノマー 7 個および置換 N90R、N90K、N90Y、N90Q、N90W もしくは N90C をさらに含む変異体モノマー 1 個を含む請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマー 1 個；(b) 配列番号 2 に示される配列を含むモノマー 7 個、および置換 N91R、N91K、N91Y、N91Q、N91W もしくは N91C を含む請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマー 1 個；または、(c) 配列番号 2 に示される配列を含むモノマー 7 個、および置換 L88C、S103C もしくは I105C を含む請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマー 1 個を含む、前記ヘテロオリゴマー細孔。

**【請求項 16】**

請求項 9 または 10 に記載の構築物を少なくとも 1 つ含む細孔。

**【請求項 17】**

請求項 16 に記載の細孔であって、

- 2 個のモノマーをそれぞれ含む構築物 4 個を含み、モノマーの少なくとも 1 個が請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマーであり、または

- 請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の変異体モノマーを含む構築物 1 個と、(i) 配列番号 2 に示される配列または(ii) 請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の配列番号 2 のバリエントを各々含むモノマー 6 個とを含む、前記細孔。

**【請求項 1 8】**

標的核酸配列を特徴付ける方法であって、

( a ) 核酸結合タンパク質が、請求項1 2から1 7のいずれか一項に記載の細孔を通る前記標的配列の移動を制御し、前記標的配列中のヌクレオチドの一部が前記細孔と相互作用できるように、前記標的配列を前記細孔および前記タンパク質と接触させるステップと；

( b ) 各相互作用の間に前記細孔を通る電流を測定し、それによって前記標的配列を特徴付けるステップと  
を含む方法。

**【請求項 1 9】**

前記標的核酸配列を特徴付けるステップが、前記標的核酸配列の配列を推定するステップまたは配列決定するステップを含む、請求項1 8に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

( a ) 請求項1 2から1 7のいずれか一項に記載の細孔および( b )核酸ハンドリング酵素を含む、標的核酸配列を特徴付けるためのキット。

**【請求項 2 1】**

サンプル中の標的核酸配列を特徴付けるための装置であって、( a )請求項1 2から1 7のいずれか一項に記載の複数の細孔および( b )複数の核酸ハンドリング酵素を含む装置。

**【請求項 2 2】**

前記複数の細孔を支持することができ、前記細孔および酵素を使用して核酸の特徴付けを行うように操作できるセンサーデバイスと；

前記特徴付けを行うための材料保持用の少なくとも1つの貯蔵部と；

前記少なくとも1つの貯蔵部から前記センサーデバイスへと制御可能に材料を供給するよう構成された流体系と；

それぞれのサンプルを受けるための複数の容器とを含み、前記流体系が、前記容器から前記センサーデバイスへと選択的に前記サンプルを供給するよう構成されている、請求項2 1に記載の装置。