

【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3月29日 (2018.3.29)

【公表番号】特表2017-530714(P2017-530714A)

【公表日】平成29年10月19日 (2017.10.19)

【年通号数】公開・登録公報2017-040

【出願番号】特願2017-519821(P2017-519821)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成30年2月19日 (2018.2.19)

【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】

テンプレート二本鎖ポリヌクレオチドを修飾する方法であって、

(a) 前記テンプレートポリヌクレオチドを、MuAトランスポサゼ、ならびに各々が (i) 少なくとも 1 つのオーバーハング、および (i i) 前記少なくとも 1 つのオーバーハングを含む鎖とは反対の鎖内の少なくとも 1 つのヘアピンループを含む二本鎖 MuA 基質の集団と接触させ、その結果、前記トランスポサゼが前記テンプレートポリヌクレオチドを断片化し、前記基質を二本鎖断片の一方または両方の末端にライゲートし、それによって複数の断片 / 基質構築物を生成するステップ、

(b) 前記断片 / 基質構築物をポリメラーゼと接触させ、その結果、前記ポリメラーゼが前記オーバーハングを含む鎖を外し、前記ヘアピンループを含む鎖を相補する鎖と置き換え、それによって、各々が前記テンプレートポリヌクレオチドの二本鎖断片を含む複数の二本鎖構築物を生成するステップ、および

(c) 前記二本鎖構築物の 2 本の鎖を分離し、それらの鎖をテンプレートとして使用して、少なくとも 1 つのヘアピンループによって連結された 2 本の相補鎖を各々が含む複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成するステップを含む方法。

【請求項 2】

ステップ (c) が、pH、温度およびイオン強度のうちの 1 つまたは複数を上昇させることによって前記二本鎖構築物の 2 本の鎖を分離することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (c) が、前記分離された鎖をポリメラーゼと接触させ、その結果、前記ポリメラーゼが前記鎖をテンプレートとして使用して前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (c) が、(i) 前記複数の分離された鎖を、前記鎖内のヌクレオチドのすべてに相補的であるヌクレオチドのあらゆる可能な組み合わせを含むヌクレオチドオリゴマーの集団と、前記オリゴマーが前記鎖にハイブリダイズすることができる条件下で接触させること、および (i i) 前記鎖にハイブリダイズするそれらのオリゴマーと一緒にライ

ゲートして、前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ (c) が、前記複数の二本鎖構築物をポリメラーゼと接触させ、その結果、前記ポリメラーゼが、同時に、前記二本鎖構築物の 2 本の鎖を分離し、前記鎖をテンプレートとして使用して前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのヘアピンループが、各基質の 2 本の鎖を連結せず、場合により前記少なくとも 1 つのオーバーハングが、4、5 または 6 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

各基質が、選択可能な結合部分を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

各基質が、膜貫通ポアを優先的に通り抜けることができるリーダー配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

(d) Y アダプターを前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドのヘアピンループとは反対の末端に付着させるステップをさらに含み、前記 Y アダプターが、膜貫通ポアを優先的に通り抜けることができるリーダー配列を場合により含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

1 つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質を前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドと結合させるステップをさらに含み、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

テンプレートポリヌクレオチドを修飾するための二本鎖ポリヌクレオチド M u A 基質の集団であって、前記基質が請求項 1、6 および 7 のいずれか一項において定義した通りである、集団。

【請求項 12】

テンプレートポリヌクレオチドを特性評価する方法であって、

a) 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法を使用して前記テンプレートポリヌクレオチドを修飾して、複数の修飾ポリヌクレオチドを生成するステップと、

b) 各修飾ポリヌクレオチドを膜貫通ポアと、各ポリヌクレオチドの少なくとも 1 本の鎖が前記ポアを通して移動するように接触させるステップと、

c) 各ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動するときに、各ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性を示す 1 つまたは複数の測定値を取り、それによって前記テンプレートポリヌクレオチドを特性評価するステップと

を含む方法。

【請求項 13】

前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドの両方の鎖が前記ポアを通して移動する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

接触させるステップ (a) または接触させるステップ (b) が、前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチド結合タンパク質と、前記タンパク質が前記ポアを通る前記ポリヌクレオチド / 各ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させることをさらに含む、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

テンプレート二本鎖ポリヌクレオチドを修飾するためのキットであって、(a) 請求項 1、6 および 7 のいずれか一項において定義した通りの M u A 基質の集団と (b) M u A トランスポサゼと (c) ポリメラーゼとを含むキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0238

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0238】

d A テーリング、酵素が前負荷されたアダプターのライゲーション、およびテザーのハイブリダイゼーション（実施例 1.4 ~ 1.6 で説明した通り）によってこの鎖をさらに修飾して、（実施例 1.7 で説明したように）ナノポア系を使用して特性評価することができる鎖を生成することができた。

また、本発明は以下を提供する。

[1] テンプレート二本鎖ポリヌクレオチドを修飾する方法であって、

（a）前記テンプレートポリヌクレオチドを、MuA トランスポサゼ、ならびに各々が（i）少なくとも 1 つのオーバーハング、および（ii）前記少なくとも 1 つのオーバーハングを含む鎖とは反対の鎖内の少なくとも 1 つのヘアピンループを含む二本鎖 MuA 基質の集団と接触させ、その結果、前記トランスポサゼが前記テンプレートポリヌクレオチドを断片化し、前記基質を二本鎖断片の一方または両方の末端にライゲートし、それによって複数の断片 / 基質構築物を生成するステップ、

（b）前記断片 / 基質構築物をポリメラーゼと接触させ、その結果、前記ポリメラーゼが前記オーバーハングを含む鎖を外し、前記ヘアピンループを含む鎖を相補する鎖と置き換え、それによって、各々が前記テンプレートポリヌクレオチドの二本鎖断片を含む複数の二本鎖構築物を生成するステップ、および

（c）前記二本鎖構築物の 2 本の鎖を分離し、それらの鎖をテンプレートとして使用して、少なくとも 1 つのヘアピンループによって連結された 2 本の相補鎖を各々が含む複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成するステップを含む方法。

[2] ステップ（c）が、pH、温度およびイオン強度のうちの 1 つまたは複数を上昇させることによって前記二本鎖構築物の 2 本の鎖を分離することを含む、[1] に記載の方法。

[3] ステップ（c）が、前記分離された鎖をポリメラーゼと接触させ、その結果、前記ポリメラーゼが前記鎖をテンプレートとして使用して前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成することを含む、[1] または [2] に記載の方法。

[4] ステップ（c）が、（i）前記複数の分離された鎖を、前記鎖内のヌクレオチドのすべてに相補的であるヌクレオチドのあらゆる可能な組み合わせを含むヌクレオチドオリゴマーの集団と、前記オリゴマーが前記鎖にハイブリダイズすることができる条件下で接触させること、および（ii）前記鎖にハイブリダイズするそれらのオリゴマーと一緒にライゲートして、前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成することを含む、[1] または [2] に記載の方法。

[5] ステップ（c）が、前記複数の二本鎖構築物をポリメラーゼと接触させ、その結果、前記ポリメラーゼが、同時に、前記二本鎖構築物の 2 本の鎖を分離し、前記鎖をテンプレートとして使用して前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドを形成することを含む、[1] に記載の方法。

[6] 前記少なくとも 1 つのヘアピンループが、各基質の 2 本の鎖を連結しない、[1] ~ [5] のいずれか一項に記載の方法。

[7] 前記少なくとも 1 つのオーバーハングが、4、5 または 6 ヌクレオチドの長さである、[1] ~ [6] のいずれか一項に記載の方法。

[8] 各基質が、選択可能な結合部分を含む、[1] ~ [7] のいずれか一項に記載の方法。

[9] 各基質が、膜貫通ポアを優先的に通り抜けることができるリーダー配列を含む、[1] ~ [8] のいずれか一項に記載の方法。

[10] (d) Yアダプターを前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドのヘアピンループとは反対の末端に付着させるステップをさらに含み、前記 Yアダプターが、膜貫通ポアを優先的に通り抜けることができるリーダー配列を場合により含む、[1] ~ [8] のいずれか一項に記載の方法。

[11] 1つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質を前記複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチドと結合させるステップをさらに含み、[1] ~ [10] のいずれか一項に記載の方法。

[12] [1] ~ [11] のいずれか一項に記載の方法を使用して生成される複数の修飾二本鎖ポリヌクレオチド。

[13] テンプレートポリヌクレオチドを修飾するための二本鎖ポリヌクレオチド M u A 基質の集団であって、前記基質が [1]、[6]、[7] および [8] のいずれか一項において定義した通りである、集団。

[14] [1] ~ [11] のいずれか一項に記載の方法を使用して修飾された少なくとも1つのポリヌクレオチドを特性評価する方法であって、

a) 修飾ポリヌクレオチドを膜貫通ポアと、前記ポリヌクレオチドの少なくとも1本の鎖が前記ポアを通して移動するように接触させるステップと、

b) 前記少なくとも1本の鎖がポアに対して移動するときに、前記少なくとも1本の鎖の1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによって前記修飾ポリヌクレオチドを特性評価するステップと
を含む方法。

[15] テンプレートポリヌクレオチドを特性評価する方法であって、

a) [1] ~ [11] のいずれか一項に記載の方法を使用して前記テンプレートポリヌクレオチドを修飾して、複数の修飾ポリヌクレオチドを生成するステップと、

b) 各修飾ポリヌクレオチドを膜貫通ポアと、各ポリヌクレオチドの少なくとも1本の鎖が前記ポアを通して移動するように接触させるステップと、

c) 各ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動するときに、各ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示す1つまたは複数の測定値を取り、それによって前記テンプレートポリヌクレオチドを特性評価するステップと
を含む方法。

[16] 前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドの両方の鎖が前記ポアを通して移動する、[14] または [15] に記載の方法。

[17] 前記1つまたは複数の特性が、(i) 前記ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 前記ポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 前記ポリヌクレオチドの配列、(i v) 前記ポリヌクレオチドの二次構造、および(v) 前記ポリヌクレオチドが修飾されているか否かから選択される、[11] ~ [13] のいずれか一項に記載の方法。

[18] 接触させるステップ(a) または接触させるステップ(b) が、前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチド結合タンパク質と、前記タンパク質が前記ポアを通る前記ポリヌクレオチド / 各ポリヌクレオチドの移動を制御するように接触させることをさらに含む、[14] ~ [17] のいずれか一項に記載の方法。

[19] (i) 前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドを、膜貫通ポアおよび1つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質と、前記ポリヌクレオチド / 各ポリヌクレオチドの少なくとも1本の鎖が、前記ポアを通して移動し、前記1つまたは複数のタンパク質が、前記ポアを通る前記ポリヌクレオチド / 各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、

(i i) 前記ポリヌクレオチド / 各ポリヌクレオチドが前記ポアに対して移動するときに前記ポアを通過する電流を測定し、前記電流が前記ポリヌクレオチド / 各ポリヌクレオチドの1つまたは複数の特性を示し、それによって前記ポリヌクレオチドを特性評価するステップ

を含む、[1 8] に記載の方法。

[2 0] 前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドを前記膜貫通ポアと接触させる前に、前記 1 つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質を、前記修飾ポリヌクレオチド / 各修飾ポリヌクレオチドと結合させる、[1 9] に記載の方法。

[2 1] 前記 1 つまたは複数のポリヌクレオチド結合タンパク質が、ヘリカーゼに由来する、[1 9] または [2 0] に記載の方法。

[2 2] テンプレート二本鎖ポリヌクレオチドを修飾するためのキットであって、(a) [1]、[6]、[7] および [8] のいずれか一項において定義した通りの M u A 基質の集団と (b) M u A トランスポサゼと (c) ポリメラーゼとを含むキット。