

【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 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 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】

テンプレートニ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、M u Aトランスポサーベ、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ニ本鎖M u A基質の集団と接触させ、その結果、前記トランスポサーベが前記テンプレートポリヌクレオチドを断片化し、前記基質をニ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ニ本鎖断片を含む複数のニ本鎖構築物を生成するステップ、および

(c) 前記ニ本鎖構築物の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ニ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ニ本鎖構築物の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ニ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(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、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む、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っ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って移動する、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トランスポーザーと(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）ナノボ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] テンプレートニ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、M u A トランスポーザー、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ニ本鎖M u A 基質の集団と接触させ、その結果、前記トランスポーザーが前記テンプレートポリヌクレオチドを断片化し、前記基質をニ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ニ本鎖断片を含む複数のニ本鎖構築物を生成するステップ、および

(c) 前記ニ本鎖構築物の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ニ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ニ本鎖構築物の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ニ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、前記複数の修飾ニ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、前記複数のニ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、前記ニ本鎖構築物の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ニ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む、[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MuA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っ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っ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って移動する、[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、(ii) 前記ポリヌクレオチドの同一性、(iii) 前記ポリヌクレオチドの配列、(iv) 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、前記ポアを通って移動し、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、

(ii) 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、[18] に記載の方法。

[20] 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、[19] に記載の方法。

[21] 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、[19] または [20] に記載の方法。

[22] 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 MuA 基質の集団と (b) MuA トランスポーザーと (c) ポリメラーゼとを含むキット。