

【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28年7月7日(2016.7.7)

【公表番号】特表2015-516165(P2015-516165A)

【公表日】平成27年6月11日(2015.6.11)

【年通号数】公開・登録公報2015-038

【出願番号】特願2015-511949(P2015-511949)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 9/10 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 N 9/10

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月13日(2016.5.13)

【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】

第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加するための方法であって、酵素活性提示部分を含むタンパク質の存在下で1以上のL-ヌクレオチドを第一のL-核酸と反応させる段階を含み、前記酵素活性が前記第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加することができる、方法。

【請求項2】

前記酵素活性提示部分が、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記酵素活性提示部分がポリメラーゼ活性提示部分である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記ポリメラーゼ活性が温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項3に記載の方法。

。

【請求項5】

前記ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列が少なくとも300個のアミノ酸を含む、請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi29DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼおよびそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択され、

好ましくは前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からな

る、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、*Pfuturb*oポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、*Taq*ポリメラーゼ、*Tth*ポリメラーゼ、*Pyrobest*ポリメラーゼ、*Pwo*ポリメラーゼ、*Sac*ポリメラーゼ、*Bst*ポリメラーゼ、*Poc*ポリメラーゼ、*Pab*ポリメラーゼ、*Mth*ポリメラーゼ、*Pho*ポリメラーゼ、*ES4*ポリメラーゼ、EX-Taqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、*Exband*ポリメラーゼ、*Platinium* Taqポリメラーゼ、*Hi-Fi*ポリメラーゼ、*Tbr*ポリメラーゼ、*Tfl*ポリメラーゼ、*Tru*ポリメラーゼ、*Tac*ポリメラーゼ、*Tne*ポリメラーゼ、*Tma*ポリメラーゼ、*Tih*ポリメラーゼ、*Tfi*ポリメラーゼ、*AmpliTaq*、*Stoffel*断片、9°Nm DNAポリメラーゼ、*Therminator*、*Terminator II*、*Phusion High Fidelity*ポリメラーゼ、*Paq5000*、*Pfx-50*、*Proofstart*、*FidelityTaq*、エロンガーゼおよびそれらの変異体の群から選択され、

好ましくは、前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、DPO4ポリメラーゼまたはその変異体である、請求項3から5の何れか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記反応が、第二のL-核酸をさらに含み、前記第一のL-核酸の1つの分子が、好ましくはワトソン-クリック塩基対形成を通じて前記第二のL-核酸の1つの分子とハイブリッド形成する、請求項1から7の何れか1項に記載の方法。

【請求項9】

L-ヌクレオチドおよび酵素活性提示部分を含むタンパク質の存在下で標的L-核酸を増幅するための方法であって、前記酵素活性が前記標的L-核酸を増幅させることができる、方法。

【請求項10】

前記酵素活性提示部分が、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記酵素活性提示部分がポリメラーゼ活性提示部分である、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】

前記ポリメラーゼ活性が温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列が少なくとも300個のアミノ酸を含む、請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアド

メイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi29DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼおよびそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択され、

好ましくは前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である、請求項1_1に記載の方法。

【請求項15】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus sp.*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、*P futurbio*ポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Pyrobestポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、EX-Taqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、ExpaNDポリメラーゼ、PlatiniumTaqポリメラーゼ、Hi-Fiポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tflポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、AmpliTaq、Stoffel断片、9°Nm DNAポリメラーゼ、Therminator、Therminator II、Phusion High Fidelityポリメラーゼ、Paq5000、Pfx-50、Proofstart、FidelityTaq、エロンガーゼおよびそれらの変異体の群から選択され、

好ましくは前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、Dpo4ポリメラーゼまたはその変異体である、請求項1_1から1_3の何れか1項に記載の方法。

【請求項16】

少なくとも1つのプライマー、好ましくは2つのプライマーを利用し、前記少なくとも1つのプライマーが、L-ヌクレオチドおよび場合によっては修飾からなる、請求項9から1_5の何れか1項に記載の方法。

【請求項17】

酵素活性提示部分を含むタンパク質であって、前記酵素活性提示部分が、アミノ酸がD-アミノ酸であるアミノ酸配列からなり、前記酵素活性が第一のL-核酸の3'末端に1以上のL-ヌクレオチドを付加することができる、タンパク質。

【請求項18】

前記酵素活性提示部分がポリメラーゼ活性提示部分である、請求項1_7に記載のタンパク質。

【請求項19】

前記ポリメラーゼ活性が温度安定性のポリメラーゼ活性である、請求項1_8に記載のタンパク質。

【請求項20】

前記ポリメラーゼ活性提示部分のアミノ酸配列が少なくとも300個のアミノ酸を含む

、請求項18または19に記載のタンパク質。

【請求項21】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼX、サーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)ポリメラーゼXコアドメイン、ラットポリメラーゼ、真核生物ポリメラーゼ、クレノウ断片、クレノウエキソポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、Phi29DNAポリメラーゼ、シーケナーゼ、T7DNAポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、ポリメラーゼおよびそれらのそれぞれおよび何れかの変異体の群から選択され、

好ましくは、前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号1に記載のアミノ酸配列、配列番号2に記載のアミノ酸配列、配列番号3に記載のアミノ酸配列および配列番号4に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、アフリカブタ熱ウイルスポリメラーゼXまたはその変異体である、請求項18に記載のタンパク質。

【請求項22】

前記ポリメラーゼ活性提示部分が、ポリメラーゼDPO4、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus littoralis*)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス属(*Pyrococcus* sp.)DNAポリメラーゼ、パイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)DNAポリメラーゼ、*Pfuturb* oポリメラーゼ、スルホロブス・ソルファタリカス(*Sulfolobus solfataricus*)DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(*Thermococcus gorgonarius*)DNAポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、*Pyrobest*ポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、Phoポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、EX-Taqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、ExpanDポリメラーゼ、Platinum-Taqポリメラーゼ、Hi-Fiポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tf1ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、Amp1iTaq、Stoffel断片、9°Nm DNAポリメラーゼ、Therminator、Therminator II、Phusion High Fidelityポリメラーゼ、Paq5000、Pfx-50、Proofstart、FideliTaq、エロンガーゼおよびそれらの変異体の群から選択され、

好ましくは前記ポリメラーゼ活性提示部分が、配列番号15に記載のアミノ酸配列、配列番号16に記載のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列、配列番号18に記載のアミノ酸配列、配列番号19に記載のアミノ酸配列、配列番号20に記載のアミノ酸配列、配列番号21に記載のアミノ酸配列および配列番号22に記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列の選択されるアミノ酸配列からなる、Dpo4ポリメラーゼまたはその変異体である、

請求項18から20の何れか1項に記載のタンパク質。

【請求項23】

配列番号15に記載のアミノ酸配列を含むポリメラーゼであって、前記アミノ酸配列のアミノ酸がD-アミノ酸である、ポリメラーゼ。

【請求項24】

配列番号1に記載のアミノ酸配列を含むポリメラーゼであって、前記アミノ酸配列のアミノ酸がD-アミノ酸である、ポリメラーゼ。

【請求項25】

野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体であって、前記野生型ポリメラーゼが配列番号15に記載のアミノ酸配列からなり、前記ポリメラーゼ変異体が、ポリメラーゼ活性、好ましくは温度安定性のポリメラーゼ活性を有する、野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体。

【請求項 2 6】

前記ポリメラーゼ変異体が、少なくとも 1 つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項 2 5 に記載のポリメラーゼ変異体。

【請求項 2 7】

前記ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸が D - アミノ酸である、請求項 2 5 または 2 6 に記載のポリメラーゼ変異体。

【請求項 2 8】

野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体であって、前記野生型ポリメラーゼが、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなり、前記ポリメラーゼ変異体がポリメラーゼ活性を有する、野生型ポリメラーゼのポリメラーゼ変異体。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 つのアミノ酸位置で野生型ポリメラーゼのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む、請求項 2 8 に記載のポリメラーゼ変異体。

【請求項 3 0】

前記ポリメラーゼ変異体のアミノ酸配列のアミノ酸が D - アミノ酸である、請求項 2 8 または 2 9 に記載のポリメラーゼ変異体。

【請求項 3 1】

L - 核酸の 3' 末端に対して 1 以上の L - ヌクレオチドを付加するための方法における、酵素活性提示部分を含むタンパク質の使用。

【請求項 3 2】

L - ヌクレオチドの存在下で標的 L - 核酸を增幅するための方法における、酵素活性提示部分を含むタンパク質の使用。

【請求項 3 3】

標的 L - 核酸を増幅するための方法がポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 3 2 に記載の使用。

【請求項 3 4】

前記タンパク質が、請求項 1 7 から 3 0 の何れか 1 項に記載のタンパク質であり、前記タンパク質が、アミノ酸が D - アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、請求項 3 1 から 3 3 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 3 5】

標的分子結合 L - 核酸分子の同定のための方法であって、次の段階：

- (a) L - 核酸分子の不均一集団を作製すること；
- (b) 段階 (a) の前記 L - 核酸分子の不均一集団を前記標的分子と接触させること；
- (c) 前記標的分子が結合しない L - 核酸分子を分離すること；
- (d) 前記標的分子が結合する L - 核酸分子を増幅させること

を含み、前記増幅段階が請求項 1 7 から 3 0 の何れか 1 項に記載のタンパク質を使用し

、前記タンパク質が、アミノ酸が D - アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 7 から 3 0 の何れかに記載のタンパク質を作製するための方法であって、

a) 請求項 1 7 から 3 0 の何れかに記載のタンパク質の 2 以上の断片が化学的に合成され、それによって、前記断片が全体として前記タンパク質のアミノ酸配列を形成し、好ましくは前記断片が固相ペプチド合成により合成され、

b) 段階 a) の断片が、セグメント縮合、ネイティブ化学ライゲーション、酵素性ライゲーションまたはそれらの組み合わせにより互いに対して連結され、

前記タンパク質が、アミノ酸が D - アミノ酸であるアミノ酸配列からなる、方法。

【請求項 3 7】

酵素性ライゲーションによって第一の D - ペプチドまたは第一の D - タンパク質および第二の D - ペプチドまたは第二の D - タンパク質を互いに対し連結させるための方法であって、

前記第一のD-ペプチドまたは前記第一のD-タンパク質が保護基によってそのN-末端で保護され、そのC-末端で4-グアニジノフェニルエステル基により保護され、

前記第二のD-ペプチドまたは前記第二のD-タンパク質が、自由N-末端および、そのC-末端でチオアルキルエステルまたはチオアリールエステル基を含む、方法。