

【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】令和 3 年 2 月 4 日 (2021.2.4)

【公表番号】特表 2020-501573 (P2020-501573A)

【公表日】令和 2 年 1 月 23 日 (2020.1.23)

【年通号数】公開・登録公報 2020-003

【出願番号】特願 2019-533058 (P2019-533058)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 11/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/54 Z N A

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 11/00

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 N 15/31

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 12 月 18 日 (2020.12.18)

【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】

表 1 から選択される第 1 の重合酵素に基づく組換え重合酵素であって、前記第 1 の重合酵素の少なくとも 1 つのアミノ酸セグメントが、表 1 から選択される第 2 の重合酵素に由来する対応するアミノ酸セグメントで置き換えられており、前記第 1 および第 2 の重合酵素は互いに異なり、任意選択で、前記組換え重合酵素が、表 1 の前記第 1 および / または第 2 の重合酵素の配列に対して 1 つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失、または置換をさらに含む、組換え重合酵素。

【請求項 2】

前記第 1 の重合酵素が、29 ポリメラーゼ (配列番号 1) であり、前記第 2 の重合酵素が、配列番号 2 から 19 のいずれか 1 つから選択される、請求項 1 に記載の組換え重合酵素。

【請求項 3】

前記第 1 の重合酵素の少なくとも 1 から 3 個の追加のアミノ酸セグメントが、表 1 の 1 つまたは複数の重合酵素に由来する対応するアミノ酸セグメントで置き換えられており、表 1 の前記 1 つまたは複数の重合酵素が前記第 1 の重合酵素と異なり、任意選択で、前記対応するアミノ酸セグメントのうちの 1 つまたは複数が、表 1 内のそれらの配列に対して 1 つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を含む、請求項 1 または 2 に記載の組換え重合酵素。

【請求項 4】

前記セグメントのうちの 1 つまたは複数が、表 1 の重合酵素のドメインを含み；および / または

前記アミノ酸セグメントのうちの1つまたは複数が、表1の重合酵素のドメインの一部を含み；任意選択で、

前記アミノ酸セグメントのうちの1つまたは複数が、表1の重合酵素内の前記ドメインまたはその一部分に隣接する1つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の組換え重合酵素。

【請求項5】

少なくとも1つのアミノ酸の挿入、欠失、または置換が、表1の異なる天然の重合酵素中に見出されるアミノ酸の挿入、欠失、または置換に対応する；および/または、

少なくとも1つのアミノ酸の挿入、欠失、または置換が、表1の天然の重合酵素中に見出されないアミノ酸の挿入、欠失、または置換に対応する、請求項1乃至4のいずれか一項に記載の組換え重合酵素。

【請求項6】

前記1つまたは複数の対応するアミノ酸セグメントが、M2Yポリメラーゼに由来するアミノ酸1から51、E・フェシウムポリメラーゼに由来するアミノ酸271から375、E・フェシウムポリメラーゼに由来するアミノ酸72から89、および/またはE・フェシウムポリメラーゼに由来するアミノ酸445から449からなる群から選択される、請求項1乃至5のいずれか一項に記載の組換え重合酵素。

【請求項7】

少なくとも1つのアミノ酸の挿入、欠失、または置換が、29ポリメラーゼ内の位置：M8、V51、N62、I71、L107、K131、K135、L142、G197、Y224、E239、V250、L253、Y281、I288、T301、R306、R308、D325、D341、K354、T368、E375、A437、A444、E466、D476、A484、E508、D510、K512、E515、K539、D570、およびT571から選択される位置に対応する位置にある；および/または、

配列番号1におけるI71、L107、K135、L142、G197、Y224、E239、V250、L253、E375、A437、A444、E466、D476、A484、E508、D510、K512、E515、K539、D570、およびT571に対応する位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む；および/または、

配列番号1におけるK131、K135、L142、Y148、Y224、E239、V250、L253、R306、R308、E375、A437、E466、D476、A484、E508、D510、K512、E515、K539、D570、およびT571に対応する位置において1つまたは複数のアミノ酸置換を含む、請求項1乃至6のいずれか一項に記載の組換え重合酵素。

【請求項8】

置換したセグメントの少なくとも1つまたは複数が、エキソヌクレアーゼ領域、パーム領域、TPR1領域、フィンガー領域、TPR2領域、サム領域、またはそれらのうちのいずれか1つの一部を含み、任意選択で1つまたは複数の隣接するアミノ酸を含む、請求項1乃至7のいずれか一項に記載の組換え重合酵素。

【請求項9】

表1のアミノ酸配列と少なくとも60%、60から70%、70から80%、または少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有し、表2から5の1つまたは複数のアミノ酸改変を含む組換え重合酵素。

【請求項10】

前記1つまたは複数のアミノ酸改変は、少なくとも1つのアミノ酸突然変異を含む；または、

前記1つまたは複数のアミノ酸改変は、少なくとも1つのドメイン置換を含む；または、

前記1つまたは複数のアミノ酸改変は、少なくとも1つのドメイン置換および少なくとも1つのアミノ酸突然変異を含む、請求項8に記載の組換え重合酵素。

## 【請求項 1 1】

表 2 または表 3 から選択される配列を有する、請求項 9 に記載の組換え重合酵素。

## 【請求項 1 2】

カップリング基をさらに含み、任意選択で、

前記カップリング基が、前記組換え重合酵素の C 末端または N 末端に連結し、さらに任意選択で、

前記カップリング基が、ビオチン化配列である、請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載の組換え重合酵素。

## 【請求項 1 3】

表面上に固定化され、任意選択で、

前記表面がナノアパーチャを含む、請求項 9 に記載の組換え重合酵素。

## 【請求項 1 4】

請求項 9 に記載の組換え重合酵素をコードする単離された核酸分子。

## 【請求項 1 5】

請求項 9 に記載の組換え重合酵素を含む組成物。

## 【請求項 1 6】

表 1 のアミノ酸配列と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有し、

i ) 表 1 または表 2 の異なる重合酵素に由来するエキソヌクレアーゼ領域と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一であるエキソヌクレアーゼ領域；および/または、

i i ) 表 1 または表 2 の異なる重合酵素に由来するパーム領域と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一であるパーム領域；および/または、

i i i ) 表 1 または表 2 の異なる重合酵素に由来する T P R 1 領域と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一である T P R 1 領域；および/または、

i v ) 表 1 または表 2 の異なる重合酵素に由来するフィンガー領域と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一であるフィンガー領域；および/または、

v ) 表 1 または表 2 の異なる重合酵素に由来する T P R 2 領域と少なくとも 80 % 同一である T P R 2 領域；および/または、

v i ) 表 1 または表 2 の異なる重合酵素に由来するサム領域と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一であるサム領域を含む、請求項 1 に記載の組換え重合酵素。

## 【請求項 1 7】

表 1 のアミノ酸配列と少なくとも 60 %、60 から 70 %、70 から 80 %、または少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有し、請求項 1 6 に記載の 2 つ以上の領域を含む組換え重合酵素。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 乃至 1 7 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数のポリメラーゼを使用して、シーケンシング反応を実施する工程を含むシーケンシング方法。