

【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29年2月16日(2017.2.16)

【公表番号】特表2016-510593(P2016-510593A)

【公表日】平成28年4月11日(2016.4.11)

【年通号数】公開・登録公報2016-022

【出願番号】特願2015-560761(P2015-560761)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	33/58	(2006.01)
G 0 1 N	27/02	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/68	Z N A Z
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 M	1/00	A
G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/58	A
G 0 1 N	27/02	E

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月10日(2017.1.10)

【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】

1つまたは複数の停止されたヘリカーゼをポリヌクレオチド中の1個または複数のスペーサーを過ぎて移動させる方法であって、(a)前記1つまたは複数の停止されたヘリカーゼおよび前記ポリヌクレオチドを膜貫通ポアと接触させるステップ、ならびに(b)前記ポア全体に電位を印加して、それにより前記1つまたは複数のヘリカーゼを前記ポリヌクレオチド上の前記1個または複数のスペーサーを過ぎて移動させるステップを含む、方法。

【請求項2】

膜貫通ポアを通過する標的ポリヌクレオチドの移動を制御する方法であって、(a)前記標的ポリヌクレオチドに1個または複数のスペーサーを設けるステップ、(b)1つまたは複数のヘリカーゼが前記1個または複数のスペーサーで停止するように、前記標的ポリヌクレオチドを前記1つまたは複数のヘリカーゼと接触させるステップ、(c)前記標的ポリヌクレオチドおよび前記1つまたは複数の停止されたヘリカーゼを前記ポアと接触させるステップ、ならびに(d)前記1つまたは複数のヘリカーゼが前記1個または複数のスペーサーを過ぎて移動し、前記ポアを通過する前記標的ポリヌクレオチドの前記移動を制御するように、前記ポア全体に電位を印加するステップを含む、方法。

【請求項3】

標的ポリヌクレオチドを特性決定する方法であって、

(a) 請求項 2 に記載の方法を実行するステップ、および

(b) ポアに関して前記ポリヌクレオチドが移動する際に 1 つまたは複数の測定値を取るステップであって、前記測定値が前記ポリヌクレオチドの 1 つまたは複数の特性の指標であり、それにより前記標的ポリヌクレオチドを特性決定する、ステップを含む、方法。

【請求項 4】

前記標的ポリヌクレオチドに前記 1 個または複数のスペーサーを設けるステップが、1 個または複数のスペーサーを含むように前記標的ポリヌクレオチドを修飾するステップを含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 1 つまたは複数の特性が、

(a) (i) 前記標的ポリヌクレオチドの長さ、(i i) 前記標的ポリヌクレオチドの同一性、(i i i) 前記標的ポリヌクレオチドの配列、(i v) 前記標的ポリヌクレオチドの二次構造、(v) 前記標的ポリヌクレオチドが修飾されているか否か、および(v i) 前記標的ポリヌクレオチドが、メチル化によって、酸化によって、損傷によって、1 つもしくは複数のタンパク質でまたは 1 つもしくは複数の標識、タグもしくはスペーサーで修飾されているか否か、から選択され、

(b) 電気的測定および / または光学的測定によって測定され、あるいは

(c) 電流測定、インピーダンス測定、トンネル測定または電界効果トランジスタ (F E T) 測定により測定される、

請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 1 つまたは複数のヘリカーゼが、前記印加された電位から生じる場に沿って前記ポアを通る前記標的ポリヌクレオチドの前記移動を制御する、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

(a) 前記 1 個または複数のスペーサーが、前記ポリヌクレオチドとは異なる構造を有し、

(b) 前記ポリヌクレオチドが、デオキシリボ核酸 (D N A) またはリボ核酸 (R N A) であり、前記 1 個または複数のスペーサーが、ペプチド核酸 (P N A) 、グリセロール核酸 (G N A) 、トレオース核酸 (T N A) 、ロックド核酸 (L N A) またはヌクレオチド側鎖を有する合成ポリマーを含み、

(c) 前記 1 個または複数のスペーサーが、1 つもしくは複数のニトロインドール、1 つもしくは複数のイノシン、1 つもしくは複数のアクリジン、1 つもしくは複数の 2 - アミノプリン、1 つもしくは複数の 2 - 6 - ジアミノプリン、1 つもしくは複数の 5 - プロモ - デオキシリジン、1 つもしくは複数の逆位チミジン (逆位 d T) 、1 つもしくは複数の逆位ジデオキシ - チミジン (d d T) 、1 つもしくは複数のジデオキシ - シチジン (d d C) 、1 つもしくは複数の 5 - メチルシチジン、1 つもしくは複数の 5 - ヒドロキシメチルシチジン、1 つもしくは複数の 2 ' - O - メチル R N A 塩基、1 つもしくは複数のイソ - デオキシシチジン (イソ - d C) 、1 つもしくは複数のイソ - デオキシグアノシン (イソ - d G) 、1 つもしくは複数の C 3 基、1 つもしくは複数の光開裂 (P C) 基、1 つもしくは複数のヘキサンジオール基、1 つもしくは複数のスペーサー 9 (i S p 9) 基、1 つもしくは複数のスペーサー 18 (i S p 18) 基、ポリマーまたは 1 つもしくは複数のチオール連結を含み、

(d) 前記 1 個または複数のスペーサーが、ポリペプチドまたはポリエチレングリコール (P E G) であり、

(e) 前記 1 個または複数のスペーサーが、塩基を持たない前記 1 個または複数のヌクレオチドを含み、

(f) 前記 1 個または複数のスペーサーが、前記 1 個または複数のヘリカーゼが停止する

原因となる1つまたは複数の化学基を含み、

(g) 前記1個または複数のスペーサーが、前記1つまたは複数のヘリカーゼが停止する原因となる1つまたは複数の化学基を含み、前記1つまたは複数の化学基が、1つまたは複数のフルオロフォア、ストレプトアビシンおよび/もしくはビオチン、コレステロール、メチレンブルー、ジニトロフェノール(DNP)、ジゴキシゲニンおよび/もしくは抗ジゴキシゲニンまたはジベンジルシクロオクチニン基であり、

(h) 前記1個または複数のスペーサーが、遊離ヌクレオチドの存在下および/またはヘリカーゼ補因子の存在下で前記1つまたは複数のヘリカーゼを停止でき、

(i) 前記1個または複数のスペーサーが、約100mM以下の塩濃度において前記1つまたは複数のヘリカーゼを停止でき、あるいは、

(j) 前記1個または複数のスペーサーが、前記ポリヌクレオチドに含まれる、および/または前記ポリヌクレオチドにハイブリダイズされた1つまたは複数のブロッキング分子の一部ではない、

請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

(i) 2つ以上の停止されたヘリカーゼが、各スペーサーを過ぎて移動し、(ii)互いに付着した前記2つ以上のヘリカーゼが、各スペーサーを過ぎて移動し、または(iii)互いに共有結合的に付着している前記2つ以上のヘリカーゼが、各スペーサーを過ぎて移動する、

請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

(a) 前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖であり、

(b) 前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖であり、前記1個または複数のスペーサーが、前記ポリヌクレオチドの1本鎖領域または非ハイブリダイズ領域に含まれ、

(c) 前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖であり、前記1個または複数のスペーサーが、前記ポアに優先的に挿入されるリーダー配列を含む前記1本鎖領域に含まれ、

(d) 前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖であり、前記2本鎖部分の2本の鎖が、架橋成分を使用して連結されており、あるいは、

(e) 前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部が2本鎖であり、前記2本鎖部分の2本の鎖が、架橋成分を使用して連結されており、前記1個または複数のスペーサーが、架橋成分に含まれる、

請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記1つまたは複数のヘリカーゼが、(a)1つもしくは複数のHe1308ヘリカーゼ、1つもしくは複数のRecDヘリカーゼ、1つもしくは複数のXPDヘリカーゼまたは1つもしくは複数のDdaヘリカーゼ、(b)(a)におけるヘリカーゼのいずれかに由来の1つもしくは複数のヘリカーゼ、あるいは(c)(a)および/もしくは(b)におけるいずれかのヘリカーゼの組合せである、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

(a) 前記ポアが、膜貫通タンパク質ポアまたはソリッドステートポアであり、

(b) 前記膜貫通タンパク質ポアが、ヘモリジン、ロイコシジン、スメグマ菌(Mycobacterium smegmatis)ポリンA(MspA)、MspB、MspC、MspD、ライセン(lysenin)、外膜ポリンF(OmpF)、外膜ポリンG(OmpG)、外膜ホスホリバーゼA、ナイセリア(Neisseria)オートトランスポーターリポタンパク質(NalP)およびWZA由来であり、

(c) 配列番号2に示す8つの同一のサブユニットから形成されている、または前記8つのサブユニットの1つもしくは複数が配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号2に対して少なくとも50%の相同性を有し、ポア活性を保持しているその変種であり

、あるいは、

(d) 配列番号4に示す7つの同一サブユニットから形成されている、または前記7つのサブユニットの1つまたは複数が配列全体にわたるアミノ酸同一性に基づいて配列番号4に対して少なくとも50%の相同性を有し、ポア活性を保持しているその変種である、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

1つまたは複数の停止されたヘリカーゼをポリヌクレオチド上の1個または複数のスペーサーを過ぎて移動させるための膜貫通ポアおよび印加された電位の使用。

【請求項13】

ポリヌクレオチドが膜貫通ポアと接触する前に、前記ポリヌクレオチド上の1つまたは複数のヘリカーゼを停止させるための1個または複数のスペーサーの使用。

【請求項14】

標的ポリヌクレオチド上の1つまたは複数のヘリカーゼのローディングを制御する方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドに1個または複数のスペーサーを設けるステップ、および

(b) 前記1つまたは複数のヘリカーゼが前記標的ポリヌクレオチドに結合し、各スペーサーで停止するように、(a)において提供された前記標的ポリヌクレオチドを1つまたは複数のヘリカーゼと接触させるステップを含む、方法。

【請求項15】

ステップ(a)が、前記標的ポリヌクレオチドが1個または複数のスペーサーを含むように標的ポリヌクレオチドを修飾するステップを含み、および/または前記標的ポリヌクレオチドに5'から3'方向で(L-S)nまたは(S-L)nを設ける(式中、Lは1本鎖ポリヌクレオチドまたは非ハイブリダイズポリヌクレオチドであり、Sはスペーサーであり、nは整数である)、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

ステップ(b)が、前記1つまたは複数のヘリカーゼが前記標的ポリヌクレオチドに結合し、1つのヘリカーゼが各スペーサーで停止するように、(a)において提供された前記標的ポリヌクレオチドを前記1つまたは複数のヘリカーゼと接触させるステップを含む、請求項14または15に記載の方法。

【請求項17】

ステップ(a)が、前記標的ポリヌクレオチドに5'から3'方向で(L¹-S)nまたは(S-L¹)nを設けるステップを含む(式中、Lは1本鎖ポリヌクレオチドまたは、1つのヘリカーゼが結合するために十分な長さだけである非ハイブリダイズポリヌクレオチドであり、Sはスペーサーであり、nは整数である)、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

ステップ(b)が、前記1つまたは複数のヘリカーゼが前記標的ポリヌクレオチドに結合し、2つのヘリカーゼが各スペーサーで停止するように、(a)において提供された前記標的ポリヌクレオチドを前記1つまたは複数のヘリカーゼと接触させるステップを含む、請求項14または15に記載の方法。

【請求項19】

ステップ(a)が、前記標的ポリヌクレオチドに5'から3'方向で(L²-S)nまたは(S-L²)nを設けるステップを含む(式中、Lは1本鎖ポリヌクレオチドまたは、2つのヘリカーゼが結合するために十分な長さだけである非ハイブリダイズポリヌクレオチドであり、Sはスペーサーであり、nは整数である)、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

各スペーサーに停止された前記2つのヘリカーゼが互いに異なっており、または各スペーサーに停止された前記2つのヘリカーゼが互いに付着しているまたは互いに共有結合的に付着している、請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】

(a) 前記標的ポリヌクレオチドに $5'$ から $3'$ 方向で ($L^2 - S$) n または ($S - L^2$) n を設けるステップ(式中、 L は 1 本鎖ポリヌクレオチドまたは、2 つのヘリカーゼが結合するために十分な長さだけである非ハイブリダイズポリヌクレオチドであり、 S はスペーサーであり、 n は整数である)、

(b) 各領域 L^2 の残りの部分が 1 つのヘリカーゼが結合するために十分な長さだけであるように、ブロッキングポリヌクレオチドを各領域 L^2 の一部にハイブリダイズさせるステップ、

(c) 1 つのヘリカーゼが各領域 L^2 の残りの部分に結合するように、(b)において生成された前記標的ポリヌクレオチドを 1 つまたは複数のヘリカーゼに接触させるステップ、

(d) それらが各ブロッキングポリヌクレオチドを除去し、各スペーサー S で停止するように、遊離ヌクレオチドおよびヘリカーゼ補因子を (c) における前記 1 つまたは複数の結合したヘリカーゼに提供するステップ、ならびに

(e) 1 つの異なるヘリカーゼが各領域 L^2 に結合し、各スペーサーおよび (d) において停止された各ヘリカーゼによって停止されるように、(d) において生成された前記標的ポリヌクレオチドを (c) において使用されたものとは異なる 1 つまたは複数のヘリカーゼと接触させるステップを含む、請求項 2_0 に記載の方法。

【請求項 2_2】

前記標的ポリヌクレオチドに、2 つ以上スペーサーが設けられ、および / または前記 1 つまたは複数の停止されたヘリカーゼが、請求項 1 から 1_1 のいずれか一項に記載の方法を使用して前記 1 個または複数のスペーサーを過ぎて移動される、請求項 1_4 から 2_1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2_3】

標的ポリヌクレオチドの移動を制御するための複合体であって、(a) $5'$ から $3'$ 方向の ($L - S - D$) n または ($D - S - L$) n (式中、 L は 1 本鎖ポリヌクレオチドまたは非ハイブリダイズポリヌクレオチドであり、 S はスペーサーであり、 D は 2 本鎖ポリヌクレオチドであり、式中 n は整数である) を含むアダプターと、(b) 各アダプターに停止された 1 つまたは複数のヘリカーゼとを含む、複合体。

【請求項 2_4】

(a) L が、1 つのヘリカーゼだけに結合できる (L^1) または 2 つのヘリカーゼだけに結合できるものであり (L^2)、あるいは

(b) 1 つのヘリカーゼだけに結合できる (L^1) または 2 つのヘリカーゼだけに結合できるものであって (L^2)、 n が 1 であり、1 つまたは 2 つのヘリカーゼが前記アダプターで停止されている、

請求項 2_3 に記載の複合体。

【請求項 2_5】

標的ポリヌクレオチドの移動を制御するためのキットであって、(a) 1 個または複数のスペーサー、請求項 7 に定義される 1 もしくは複数のスペーサー、または請求項 2_3 もしくは 2_4 に定義される 1 もしくは複数のアダプター、(b) 1 つまたは複数のヘリカーゼおよび (c) 膜貫通ポアを含む、キット。