

【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 個または複数のスパ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 個または複数のスパ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 個または複数のスパ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 個または複数のスパ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 個または複数のスパーサーを過ぎて移動し、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、(ii) 前記標的ポリヌクレオチドの同一性、(iii) 前記標的ポリヌクレオチドの配列、(iv) 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(vi) 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) 電氣的測定および/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(FET)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(DNA)またはリボ核酸(RNA)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(PNA)、グリセロール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、ロックド核酸(LNA)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 - デオキシウリジン、1 つもしくは複数の逆位チミジン(逆位 dT)、1 つもしくは複数の逆位ジデオキシ - チミジン(ddT)、1 つもしくは複数のジデオキシ - シチジン(ddC)、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 RNA 塩基、1 つもしくは複数のイソ - デオキシシチジン(イソ - dC)、1 つもしくは複数のイソ - デオキシグアノシン(イソ - dG)、1 つもしくは複数の C3 基、1 つもしくは複数の光開裂(PC)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 (isp9) 基、1 つもしくは複数のスペーサー 18 (isp18) 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(PEG)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 つ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 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、

(g) 前記 1 個または複数のスパーサーが、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、ストレプトアビジンおよび / 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 (D N P)、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ン基であり、

(h) 前記 1 個または複数のスパーサーが、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 個または複数のスパーサーが、約 1 0 0 m M 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 個または複数のスパーサーが、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、各スパーサーを過ぎて移動し、(i i) 互いに付着した前記 2 つ以上のヘリカーゼが、各スパーサーを過ぎて移動し、または (i i i) 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、各スパ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 個または複数のスパーサーが、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 個または複数のスパーサーが、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 本鎖領域に含まれる、

(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 個または複数のスパーサーが、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 H e l 3 0 8 ヘリカーゼ、1 つもしくは複数の R e c D ヘリカーゼ、1 つもしくは複数の X P D ヘリカーゼまたは 1 つもしくは複数の D d a 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 (M s p A)、M s p B、M s p C、M s p D、ライセニン (lysenin)、外膜ポリン F (O m p F)、外膜ポリン G (O m p G)、外膜ホスホリパーゼ 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 (N a l P) および W Z A 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 つもしくは複数の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 5 0 % 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む、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 20 に記載の方法。

【請求項 22】

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 11 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 14 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

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 24】

(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 23 に記載の複合体。

【請求項 25】

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 23 もしくは 24 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。