

【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16年10月14日(2004.10.14)

【公表番号】特表2001-525662(P2001-525662A)

【公表日】平成13年12月11日(2001.12.11)

【出願番号】特願平10-512602

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/02

C 1 2 Q 1/68

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成15年9月24日(2003.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

手 続 補 正 書

平成 15.9.24 年 月 日



特許庁長官 今 井 康 夫 殿

1. 事件の表示 平成10年特許願第512602号

2. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 プロテイン ポリマー テクノロジーズ  
インコーポレイテッド

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
電話 (代) 3211-8741

氏 名 (5995) 弁理士 中 村 稔



4. 補正命令の日付 自 発

5. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「13」  
となりました。)



6. 補正対象書類名 明細書

7. 補正対象項目名 請求の範囲

8. 補正の内容 別紙記載の通り

## 請求の範囲

1. 約3~30個のコドンを含む繰り返し単位を有し、かつ少なくとも約30kDのタンパクをコードする合成DNA配列の製造方法であって、前記方法が

(1) 一本鎖オリゴマーの、少なくとも2つの異なる対を合成する工程であって、一对の前記オリゴマーの各々が、任意の突出した末端を除きオーバーラップしている、前記工程と、

(2) 一本鎖オリゴマーの各対をハイブリダイズさせ、二本鎖セグメントを生成する工程と、

(3) 予め合成したモノマーから、少なくとも一つの二本鎖セグメントを単離する工程と、

(4) クローニングベクター内で、前記セグメントの増幅された複製体を結合してモノマーを生成させる工程であって、前記結合されたセグメントが読み取り枠内にある、前記工程と、

(5) 制限酵素による消化によって、前記モノマーを、前記クローニングベクターから切取る工程と、

(6) 前記モノマーをオリゴマー化して、少なくとも2つのモノマーを含むマルチマーを生成する工程と、

を含み、合成されたセグメントを配列決定して、複製の忠実度を保証することを特徴とする上記方法。

2. オリゴマー化前に、前記モノマーを分析する付随的工程を含む、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 少なくとも一つの前記繰り返し単位が、

$G\alpha\beta$ , GAGAGS, GVGVP, VPGVG, SGAGAG, および AGAGSG

(ここで、 $\alpha$ および $\beta$ は任意のアミノ酸であり、 $\alpha$ および $\beta$ は前記コードされるタンパクが数基準で約10~45%のプロリンを含むように選択される)からなるアミノ酸配列をコードする、請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 約3~30個のコドンを含む繰り返し単位を有し、かつ少なくとも約30kDのタンパクをコードする合成DNA配列の製造方法であって、前記方法が

(1) プライマー結合部位を側方に有する約3~30個のコドンの繰り返し単位を

含有する、約 100 ～300 個の塩基を含むモノマーをコードする、1 本鎖を合成する工程と、

(2) 相補鎖を調製し、得られる dsDNA モノマーを、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅する工程であって、前記反応が、前記 1 本鎖の配列の前記繰り返し部分とハイブリダイズしない配列を含み、更に制限サイトの共通配列を含まず、またはその一部を含む配列を有する、15～50nt のプライマーを使用し、前記 1 本鎖が、前記プライマーがその一部を含んでいる前記制限サイトの前記共通配列を完成し、前記プライマーは、前記 dsDNA の各端部について異なっており、前記相補性プライマーとハイブリダイズした際に少なくとも 85°C の  $T_m$ 、少なくとも 40% の GC を有することにより特徴付けられ、かつ前記  $T_m$  は、2 つの前記プライマー間で 2°C 以下だけ異なるものである、前記工程と、

(3) 前記 dsDNA モノマーをクローニングし、かつ正確な前記配列をもつモノマーにつき選別する工程と、

(4) 前記モノマーをオリゴマー化して、少なくとも 2 つのモノマーを含む少なくとも一つのマルチマーを生成する工程と、  
を含むことを特徴とする、上記方法。

5. 少なくとも一つの繰り返し単位が、

$G\alpha\beta$ , GAGAGS, GVGVP, VPGVG, SGAGAG, および AGAGSG

(ここで、 $\alpha$  および  $\beta$  は任意のアミノ酸であり、 $\alpha$  および  $\beta$  は前記コードされるタンパクが数を基準として約 10～45% のプロリンを含むように選択される) からなるアミノ酸配列をコードする、請求の範囲第 4 項に記載の方法。

6. 更に、突出末端を与える制限酵素により前記プライマーを除去し、前記 dsDNA モノマーをクローニングした後、突出末端を与える制限酵素で切り取る工程をも含む、請求の範囲第 4 項に記載の方法。

7. 約 3～30 個のコドンを含む繰り返し単位を有し、かつ少なくとも約 30kD のタンパクをコードする合成 DNA 配列の製造方法であって、前記方法が

(1) プライマー結合サイトと隣接する約 3～30 個のコドンの繰り返し単位を含有する、約 100 ～300 個の塩基を含むモノマーをコードする、1 本鎖を合成する工程と、

(2) 相補性鎖を調製し、得られる dsDNA モノマーを、前記 1 本鎖の配列の繰り返し部分とはハイブリダイズせず、末端に近接して制限部位を含まない、あるいは一部を含む配列を有する 20~45nt のプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖鎖反応により増幅する工程であって、前記プライマーは前記 dsDNA の各末端について異なっており、少なくとも 40% の GC、少なくとも 85°C の T<sub>m</sub> を有することにより特徴付けられ、かつ T<sub>m</sub> は前記 2 つのプライマー間で 2°C 以下だけ異なっている、前記工程と、

(3) 前記 dsDNA モノマーをクローニングし、かつ前記正確な配列をもつモノマーについて選別する工程と、

(4) 前記モノマーをオリゴマー化して、少なくとも 2 つのモノマーを含むマルチマーを生成する工程と、

(5) 発現宿主内での発現に関して機能性の、発現ベクター内に前記マルチマーを挿入する工程と、

(6) 前記発現ベクターを前記発現宿主に組み込み、かつ前記発現宿主を成育させ、前記タンパク質ポリマーを発現させる工程と、を含むことを特徴とする、上記方法。

8. 発現されたタンパクポリマーを精製する付随的工程をも含む、請求の範囲第 7 項に記載の方法。

9. 少なくとも一つの繰り返し単位が、

$G\alpha\beta$ , GAGAGS, GVGVP, VPGVG, SGAGAG, および AGAGSG

(ここで、 $\alpha$  および  $\beta$  は任意のアミノ酸であり、 $\alpha$  および  $\beta$  は前記コードされるタンパクが数基準で約 10~45% のプロリンを含むように選択される) からなるアミノ酸配列をコードする、請求の範囲第 7 項に記載の方法。

10. 発現宿主が、大腸菌である、請求の範囲第 7 項に記載の方法。

11. 約 3~30 個のコドンを含む繰り返し単位を有し、かつ少なくとも約 30kD のタンパクをコードする合成 DNA 配列の製造方法であって、前記方法が

(1) モノマーの第一のセグメントをコードする 1 本鎖を合成する工程であって、前記モノマーが、約 3~30 個のコドンの繰り返し単位を含有する、約 100~300 個の塩基を含むものである、前記工程と

(2) 相補鎖を調製し、得られる第一の dsDNA セグメントを、前記 1 本鎖の配列の繰り返し部分とはハイブリダイズせず、末端に近接して制限部位を含まない、あるいは一部を含む配列を有する 20~45nt のプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応により増幅する工程であって、プライマーが制限部位の一部を含む場合は前記 1 本鎖が前記共通配列を完成し、前記プライマーは、少なくとも 40% の GC を有し、相補性プライマーとハイブリッド化した場合に、少なくとも 85°C の  $T_m$  をもつことにより特徴付けられ、かつ前記 2 つのプライマー間で  $T_m$  は 2°C 以下だけ異なっている、前記工程と、

(3) 第一のクローニングベクター内で、前記第一の dsDNA セグメントをクローニングし、正確な配列をもつ第二の二本鎖 DNA セグメントについて選別する工程、

(4) 制限酵素での消化により、前記第一のクローニングベクターから、前記第二の二本鎖セグメントを切取る工程、

(5) 予め合成したモノマーから、第三の二本鎖セグメントを単離する工程、

(6) 第二のクローニングベクター内で、前記第二および第三の二本鎖セグメントの増幅した複製体を結合してモノマーを生成する工程であって、前記結合したセグメントが、読み取り枠内にあり、かつ前記モノマーが、約 3~30 個のコドンの繰り返し単位を含有する、約 100~300 個の塩基を含むものである、前記工程と、

(7) 制限酵素での消化により、前記第二のクローニングベクターから、前記モノマーを切取る工程、および

(8) 前記モノマーをオリゴマー化して、少なくとも 2 つのモノマーを含むマルチマーを生成する工程、  
を含むことを特徴とする、上記方法。

12. 前記予め合成したモノマーが、以下の工程を含む方法により合成される、請求の範囲第 11 項に記載の方法：

(1) 一本鎖オリゴマーの、少なくとも 2 つの異なる対を合成する工程であって、一对の前記オリゴマー各々が任意の突出する末端を除いてオーバーラップしているものである、前記工程、

(2) 一本鎖オリゴマーの各対をハイブリダイズさせ、二本鎖セグメントを生成する工程、

(3) クローニングベクター内で、前記セグメントの増幅した複製体を結合して、モノマーを形成する工程であって、前記結合したセグメントが読み取り枠内にある、前記工程、

(4) 制限酵素での消化により、前記モノマーを、前記クローニングベクターから切取る工程、および

(5) 前記モノマーをオリゴマー化して、少なくとも2つのモノマーを含むマルチマーを生成する工程。

13. 予め合成したモノマーが、以下の工程を含む方法により合成される、請求の範囲第11項に記載の方法：

(1) プライマー結合サイトに隣接する、約3～30個のコドンの繰り返し単位を含有する、約100～300個の塩基を含むモノマーをコードする、1本鎖を合成する工程、

(2) 相補鎖を調製し、かつ前記得られる dsDNA モノマーを、前記1本鎖の配列の繰り返し部分とはハイブリダイズせず、末端に近接して制限部位を含まない、あるいは一部を含む配列を有する15～50ntのプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応により増幅する工程であって、プライマーが制限部位の一部を含む場合は前記1本鎖が共通配列を完成させるものであり、前記プライマーは、前記 dsDNA の各末端について異なっており、少なくとも40%のGCを有し、前記相補性プライマーとハイブリッド化した場合に少なくとも85°CのT<sub>m</sub>をもつことにより特徴付けられ、T<sub>m</sub>は前記2つのプライマー間で2°C以下だけ異なるものである、前記工程、

(3) 前記 dsDNA モノマーをクローニングし、かつ前記正確な配列をもつモノマーについて選別する工程、および

(4) 前記モノマーをオリゴマー化して、少なくとも2つのモノマーを含む、少なくとも一つのマルチマーを生成する工程。