

【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21年12月3日(2009.12.3)

【公表番号】特表2009-512441(P2009-512441A)

【公表日】平成21年3月26日(2009.3.26)

【年通号数】公開・登録公報2009-012

【出願番号】特願2008-536632(P2008-536632)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

C 4 0 B 40/06

【手続補正書】

【提出日】平成21年10月16日(2009.10.16)

【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】

モジュールオープンリーディングフレームを形成するように連続的に配置された下記の要素の各々を含むベクターであって、

(a) 少なくとも2個のアミノ酸を含む第一の群のアミノ酸をコードする第一の制限酵素部位；

(b) 関心対象のポリペプチドのコード配列が、第一の制限酵素部位の少なくとも2個のアミノ酸のコード配列とインフレームである、関心対象のポリペプチドをコードする第一のオープンリーディングフレーム；

(c) 第二の制限酵素部位の第二の群のアミノ酸のコード配列が、第一のオープンリーディングフレームの関心対象のポリペプチドのコード配列とインフレームであり、第二の制限酵素部位のポリヌクレオチド配列が、第一の制限酵素部位のポリヌクレオチド配列と同一ではない、少なくとも2個のアミノ酸を含む第二の群のアミノ酸をコードする第二の制限酵素部位；

(d) スペーサー配列のコード配列が、第二の制限酵素部位のポリヌクレオチド配列とインフレームである、少なくとも3個のスペーサーアミノ酸をコードするスペーサーポリヌクレオチド配列；および

(e) 第三の制限酵素部位の第三の群のアミノ酸のコード配列が、少なくとも3個のスペー

サーアミノ酸のコード配列とインフレームであり、第三の制限酵素部位のポリヌクレオチド配列が、第一の制限酵素部位のポリヌクレオチド配列と同一ではなく、第三の制限酵素部位が、第二の制限酵素部位のポリヌクレオチド配列と同一ではない、少なくとも2個のアミノ酸を含む第三の群のアミノ酸をコードする第三の制限酵素部位を含み、

要素(a)～(e)が、モジュールオープンリーディングフレームを形成するように互いにインフレームで連結されている、ベクター。

【請求項2】

関心対象のポリペプチドが、全長タンパク質もしくはポリペプチド、タンパク質機能ドメイン、タンパク質構造ドメイン、タンパク質酵素ドメイン、タンパク質阻害ドメイン、タンパク質結合ドメイン、タンパク質局在化ドメイン、またはエピトープである、請求項1記載のベクター。

【請求項3】

第一の制限酵素部位が、少なくとも2個のヌクレオチドを含む第一の一本鎖突出部をもたらし制限酵素に感受性であり、第二の制限酵素部位が、少なくとも2個のヌクレオチドを含む第二の一本鎖突出部をもたらし制限酵素に感受性であり、該第一および第二の突出部が、適切な条件下で互いにアニールすることが可能であるように互いに相補的である、請求項1記載のベクター。

【請求項4】

第一の制限酵素部位が、NgoM IV制限酵素によって認識されるポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～3のいずれか一項記載のベクター。

【請求項5】

第二の制限酵素部位が、Xma I制限酵素によって認識されるポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のベクター。

【請求項6】

第三の制限酵素部位が、Cla I制限酵素によって認識されるポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のベクター。

【請求項7】

スペーサーポリヌクレオチド配列が、3個のグリシンアミノ酸をコードする、請求項1～6のいずれか一項記載のベクター。

【請求項8】

少なくとも一つの追加的なオープンリーディングフレームが、第一のオープンリーディングフレームと第二の制限酵素部位との間に挿入されており、該少なくとも一つの追加的なオープンリーディングフレームの各々が、該第一のオープンリーディングフレームおよび第二の制限酵素群の双方とインフレームであり、該追加的なオープンリーディングフレームの各々が、少なくとも一つの追加的な関心対象のポリペプチドをコードする、請求項1～7のいずれか一項記載のベクター。

【請求項9】

第一または第二の制限酵素部位のいずれかにおいて生じる制限酵素部位が、第一と第二の制限酵素群の間のいかなるオープンリーディングフレーム中にも存在しない、請求項8記載のベクター。

【請求項10】

第一のオープンリーディングフレームと、少なくとも一つの追加的なオープンリーディングフレームとが互いにインフレームでライゲーションされる、以下の段階を含む融合ポリペプチドの作製方法：

a) 第二および第三の制限酵素部位を認識する制限酵素で請求項3～9のいずれか一項記載のベクターを消化して、第一および第二の一本鎖突出部を有する直鎖状ベクターを作製する段階であって、該第一および第二の突出部が互いに適合しない、段階；

b) 第一の挿入断片を提供する段階であって、該第一の挿入断片が、少なくとも一つの追加的なオープンリーディングフレームを含み、該少なくとも一つの追加的なオープンリ

ーディングフレームが、第一および第二の突出部と適合する5'および3'突出部を含み、該少なくとも一つの追加的なオープンリーディングフレームの各々が、少なくとも一つの追加的な関心対象のポリペプチドをコードする、段階；

c) 第一の挿入断片を直鎖状ベクター中にライゲーションして、ライゲーションされた発現ベクターを形成させる段階であって、少なくとも一つのオープンリーディングフレームの5'突出部のライゲーションが、直鎖状ベクターの第一の一本鎖突出部とアニールし、少なくとも一つのオープンリーディングフレームの3'突出部のライゲーションが、直鎖状ベクターの第二の一本鎖突出部とアニールし、該3'突出部のライゲーションが、第三の制限酵素部位を再作製する、段階。

【請求項 1 1】

以下の段階を含む、融合タンパク質DNA構築物の作製方法：

a) 第一および第二のポリヌクレオチド試薬を提供する段階であって、各試薬が、関心対象のオープンリーディングフレームを含み、各関心対象のオープンリーディングフレームには、少なくとも3箇所の所定の制限エンドヌクレアーゼ部位が隣接しており、所定の部位のうちの2箇所が、適合する突出部を有する、段階、

b) 所定の制限エンドヌクレアーゼ部位のうちの2箇所で切断する2種類の異なる制限エンドヌクレアーゼにより第一のポリヌクレオチド試薬を消化して、2個の異なる突出部を有するポリヌクレオチドを生成する段階、

c) 所定の制限エンドヌクレアーゼ部位のうちの2箇所で切断する2種類の異なる制限エンドヌクレアーゼにより第二のポリヌクレオチド試薬を消化する段階であって、関心対象のオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドが遊離し、該遊離したポリヌクレオチドが2個の異なる突出部を有し、該突出部のうちの1個が段階b)において消化されたポリヌクレオチドの突出部と適合する、段階、

d) 段階b)において生成されたポリヌクレオチドと、段階c)の関心対象のオープンリーディングフレームを含む遊離したポリヌクレオチドとを一緒に混合し、アニールし、かつライゲーションする段階であって、オープンリーディングフレームの融合物を含む第三のポリヌクレオチドが生成され、関心対象のオープンリーディングフレーム間の接合部が、前記3箇所の所定の制限酵素部位で切断するいかなるエンドヌクレアーゼによる消化にもはや感受性ではなく、該関心対象のオープンリーディングフレームの融合物に隣接する配列が、前記3箇所の所定の制限酵素部位を含む、段階。

【請求項 1 2】

以下の段階を含む、融合タンパク質DNA構築物の作製方法：

a) 第一および第二のポリヌクレオチド試薬を提供する段階であって、各試薬が、関心対象のオープンリーディングフレームを含み、各関心対象のオープンリーディングフレームには、少なくとも3箇所の所定の制限エンドヌクレアーゼ部位が隣接しており、所定の部位のうちの2箇所が、適合する突出部を有する、段階、

b) 所定の制限エンドヌクレアーゼ部位のうちの2箇所で切断する2種類の異なる制限エンドヌクレアーゼにより第一のポリヌクレオチド試薬を消化して、2個の適合しない突出部を有するポリヌクレオチドを生成する段階、

c) 所定の制限エンドヌクレアーゼ部位のうちの2箇所で切断する2種類の異なる制限エンドヌクレアーゼにより第二のポリヌクレオチド試薬を消化する段階であって、制限エンドヌクレアーゼのうちの1種類が段階b)の制限エンドヌクレアーゼと同一であり、関心対象のオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドが遊離し、該遊離したポリヌクレオチドが、2個の適合しない突出部を有する、段階、

d) 段階b)において生成されたポリヌクレオチドと、段階c)の関心対象のオープンリーディングフレームを含む遊離したポリヌクレオチドとを一緒に混合し、アニールし、かつライゲーションする段階であって、オープンリーディングフレームの融合物を含む第三のポリヌクレオチドが生成され、該関心対象のオープンリーディングフレームの融合物には、前記所定の制限酵素部位が隣接しており、該関心対象のオープンリーディングフレーム間の接合部には、前記3箇所の所定の制限エンドヌクレアーゼ部位が欠如している、段階

。

【請求項 1 3】

所定の制限酵素部位が、NgoM IV、Xma I、およびCla Iによって切断可能な配列である、請求項11または12記載の方法。

【請求項 1 4】

単離されたポリヌクレオチドのライブラリーであって、各ポリヌクレオチドが、少なくとも3箇所の所定の制限エンドヌクレアーゼ部位が隣接する関心対象のオープンリーディングフレームを含み、3箇所の所定の制限酵素部位のうちの2箇所が互いに適合せず、3箇所の所定の制限酵素部位のうちの2箇所が互いに適合し、各関心対象のオープンリーディングフレームには、該所定の制限酵素部位が欠如している、ライブラリー。

【請求項 1 5】

関心対象のオープンリーディングフレームを含む単離されたポリヌクレオチドであって、該関心対象のオープンリーディングフレームの一方の末端には、NgoM IVによって切断可能な配列が隣接しており、該関心対象のオープンリーディングフレームの他方の末端には、Xma IおよびCla Iによって切断可能な配列が隣接している、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

単離されたポリヌクレオチドのライブラリーであって、各ポリヌクレオチドが、関心対象のオープンリーディングフレームを含み、各関心対象のオープンリーディングフレームの一方の末端には、NgoM IVによって切断可能な配列が隣接しており、各関心対象のオープンリーディングフレームの他方の末端には、Xma IおよびCla Iによって切断可能な配列が隣接しており、該関心対象のオープンリーディングフレームには、NgoM IV、Xma I、およびCla Iによって切断可能な配列が欠如している、ライブラリー。

【請求項 1 7】

請求項16記載のライブラリーの単離されたポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 1 8】

請求項16記載のライブラリーを含む、組換え宿主細胞。