

【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17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2004-525623(P2004-525623A)

【公表日】平成16年8月26日(2004.8.26)

【年通号数】公開・登録公報2004-033

【出願番号】特願2002-559583(P2002-559583)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15 Z C C

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成17年1月24日(2005.1.24)

【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】

5' 3' 方向に、一般式

$[rs_2\text{-SP-PR-X-TR-SP-rs}_1]_n$

(ここで、

rs_1 と rs_2 は共に機能的制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも2つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、

PRは、細胞内で機能しうるプロモーターを表し、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

TRはターミネーターを表し、そして

SPは個々に少なくとも2つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、そして

$n \geq 2$ であり、そして

少なくとも第一カセットは第二カセットと異なる)

のヌクレオチド配列のカセットを含んで成るヌクレオチドコンカテマー。

【請求項2】

ヌクレオチド配列がcDNA、ゲノムDNAから成る群から選択されるDNA配列を含んで成る、請求項1に記載のコンカテマー。

【請求項3】

少なくとも2つのカセットの rs_1 - rs_2 制限部位が、同一の制限酵素によって認識され、更に好ましくは同一である、請求項1又は2に記載のコンカテマー。

【請求項4】

少なくとも1つのカセットがプロモーターと発現可能なヌクレオチド配列との間にイン

トロンを含んで成り、更に好ましくは実質的に全てのカセットがプロモーターと発現可能なヌクレオチド配列との間にイントロンを含んで成る、請求項1~3のいずれか1項に記載のコンカテマー。

【請求項5】

少なくとも1つのカセットが一次ベクター由来のカセットを含んで成り、更に好ましくは実質的に全てのカセットが一次ベクター由来のカセットを含んで成る、請求項1~4のいずれか1項に記載のコンカテマー。

【請求項6】

人工染色体内に含まれる、請求項1~5のいずれか1項に記載のコンカテマー。

【請求項7】

人工染色体が、酵母人工染色体、メガ酵母染色体、細菌人工染色体、マウス人工染色体、哺乳類人工染色体、昆虫人工染色体、鳥類人工染色体、バクテリオファージ人工染色体、バキュロウイルス人工染色体、又はヒト人工染色体から成る群から選択される、請求項6に記載のコンカテマー。

【請求項8】

異なる発現可能なヌクレオチド配列が異なる発現状態に由来する、請求項1~7のいずれか1項に記載のコンカテマー。

【請求項9】

異なる発現状態が少なくとも2つの種を表す、請求項8に記載のコンカテマー。

【請求項10】

コンカテマー化の方法であって、各カセットが第一の粘着末端、スペーサー配列、プロモーター、発現可能なヌクレオチド配列、ターミネーター、スペーサー配列及び第二の粘着末端を含んで成る、ヌクレオチド配列の少なくとも2つのカセットをコンカテマー化する段階を含んで成り、

一次ベクター [RS1-RS2-SP-PR-X-TR-SP-RS2'-RS1']

(ここで、Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

RS1及びRS1'は制限部位を表し、

RS2及びRS2'はRS1及びRS1'と異なる制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも2つのヌクレオチドのスペーサーを表し、

PRはプロモーターを表し、

TRはターミネーターを表す) から出発して、

i) RS2及びRS2'に特異的な少なくとも1つの制限酵素の力を借りて一次ベクターを切断し、一般式 [rs₂-SP-PR-X-TR-SP-rs₁] (ここで、rs₁及びrs₂は一緒に機能的制限部位RS2又はRS2'を表す) を有するカセットを獲得し、

ii) rs₁とrs₂との間の相互作用を介して、切り出されたカセットを構築すること、を更に含んで成る、方法。

【請求項11】

一方の末端にRS2又はRS2'を、そして他方の末端に非相補的なオーバーハング又は平滑末端をそれぞれが有するベクターアームの添加を更に含んで成る、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

一方の末端にRS2又はRS2'を、そして他方の末端に非相補的なオーバーハング又は平滑末端をそれぞれが有するストッパーフラグメントの添加を更に含んで成る、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

ベクターアームをストッパーフラグメントにライゲーションすることを更に含んで成る、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

更に、

iv) 発現状態から mRNA を単離し、

v) 当該 mRNA 配列に相当する実質的に完全長の cDNA を獲得し、

vi) 一次ベクター内の、5' 3' 方向の一般式：

$[RS1-RS2-SP-PR-CS-TR-SP-RS2'-RS1']$

(ここで、CSはクローニング部位を表す)のカセットのクローニング部位内に実質的に完全長の cDNA クローンを挿入すること、
を含んで成る、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

RS1とRS1'が同一であり、そしてRS2とRS2'が同一である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

コンカテマーが、酵母人工染色体、メガ酵母染色体、細菌人工染色体、マウス人工染色体、ヒト人工染色体から成る群から選択される人工染色体内にライゲーションされる、請求項 10 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも 2 つのカセット内の RS2 及び RS2' が 1 つの制限酵素によって開裂し、好ましくは実質的に全てのカセット内の RS2 及び RS2' が 1 つの制限酵素によって開裂する、請求項 10 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

各コンカテマーが 5' 3' 方向に以下の式：

$[rs_2-SP-PR-X-TR-SP-rs_1]_n$

(ここで、 rs_1 と rs_2 は一緒に制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも 2 つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、

PRは、細胞内で機能しうるプロモーターを表し、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

TRはターミネーターを表し、そして

SPは個々に少なくとも 2 つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、

$n \geq 2$ であり、そして

少なくとも 2 つの発現可能なヌクレオチド配列が異なる発現状態に由来する)のオリゴヌクレオチドを含んで成る、個々のオリゴヌクレオチドカセットの少なくとも 1 つのコンカテマーを含んで成る細胞。

【請求項 19】

各コンカテマーが 5' 3' 方向に以下の式：

$[rs_2-SP-PR-X-TR-SP-rs_1]_n$

(ここで、 rs_1 と rs_2 は一緒に制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも 2 つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、

PRは、細胞内で機能しうるプロモーターを表し、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

TRはターミネーターを表し、そして

SPは個々に少なくとも 2 つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、

$n \geq 2$ であり、そして

少なくとも 2 つのカセットの rs_1-rs_2 が同一の制限酵素によって認識される)のオリゴヌクレオチドを含んで成る、個々のオリゴヌクレオチドカセットの少なくとも 1 つのコンカテマーを含んで成る細胞。

【請求項 20】

実質的に全ての rs_1-rs_2 配列が同一の制限酵素によって認識され、更に好ましくは実質的に全ての rs_1-rs_2 配列が実質的に同一である、請求項 18 又は 19 に記載の細胞。

【請求項 21】

パン酵母、クルイベロマイセス・マリキシャヌス(Kluyveromyces marxianus)、K.ラクチス(K. lactis)、カンジダ・ウチリス(Candida utilis)、ファフィア・ロドザイマ(Phaffia rhodozyma)、サッカロマイセス・ポウラジイ(Saccharomyces boulardii)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)、ハンセヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)、ヤ

ロウミア・リポリチカ (Yarrowia lipolytica), カンジダ・パラフィニカ (Candida paraffinica), シュワニオマイセス・カステリイ (Schwanniomyces castellii), ピキア・スティピチス (Pichia stipitis), カンジダ・シェハタエ (Candida shehatae), ロドトルラ・グルチニス (Rhodotorula glutinis), リポマイセス・リポフェル (Lipomyces lipofer), クリプトコッカス・クルパツス (Cryptococcus curvatus), カンジダ種 (Candida spp) (例えば、C. パルミオレオフィリア (C. palmioleophila)), ヤロウミア・リポリチカ (Yarrowia lipolytica), カンジダ・ギリエルモンジイ (Candida guilliermondii), カンジダ属 (Candida), ロドトルラ種 (Rhodotorula spp), サッカロマイセス種 (Saccharomycopsis spp), アウレオバシジウム・プルランス (Aureobasidium pullulans), カンジダ・ブルンプチイ (Candida brumptii), カンジダ・ハイドロカーボフマリカ (Candida hydrocarbofumarica), トルロブシス属 (Torulopsis), カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis), サッカロマイセス・セレビスシアエ (Saccharomyces cerevisiae), ロドトルラ・ルブラ (Rhodotorula rubra), カンジダ・フラベリ (Candida flaveri), エレモテシウム・アシュビイ (Eremothecium ashbyii), ピキア種 (Pichia spp.), クルイベロマイセス属 (Kluyveromyces), ハンセヌラ属 (Hansenula), クロエケラ属 (Kloeckera), ピキア属 (Pichia), パチソレン種 (Pachysolen spp.), 又はトルロブシス・ボンビコラ (Torulopsis bombicola) を含んで成る群から選択される酵母細胞である、請求項 18 又は 19 に記載の細胞。

【請求項 22】

少なくとも 1 つのコンカテマー、好ましくは、実質的に全てのコンカテマーが、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のコンカテマーである、請求項 18 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 23】

少なくとも 1 つのヌクレオチドコンカテマーを含んで成る人工染色体であって、当該コンカテマーが、

5' 3' 方向に、一般式

$[rs_2\text{-SP-PR-X-TR-SP-rs}_1]_n$

(ここで、

rs₁ と rs₂ は一緒に制限部位を表し、

SP は個々に少なくとも 2 つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、

PR は、細胞内で機能しうるプロモーターを表し、

X は発現可能なヌクレオチド配列を表し、

TR はターミネーターを表し、そして

SP は個々に少なくとも 2 つのヌクレオチド塩基のスペーサーを表し、そして n 2 である) のヌクレオチド配列カセットを含んで成る、人工染色体。

【請求項 24】

前記コンカテマーが、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のコンカテマーである、請求項 23 に記載の人工染色体。

【請求項 25】

請求項 23 又は 24 に記載の少なくとも 1 つの人工染色体を含んで成る細胞。

【請求項 26】

トランスジェニック細胞を産生するための方法であって、宿主細胞に、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のコンカテマーを挿入することを含んで成る方法。

【請求項 27】

5' 3' 方向に、一般式

$[RS1\text{-RS2-SP-PR-CS-TR-SP-RS2}'\text{-RS1}']$

(ここで、

RS1 及び RS1' は制限部位を表し、

RS2 及び RS2' は RS1 及び RS1' と異なる制限部位を表し、

SP は個々に少なくとも 2 つのヌクレオチドのスペーサー配列を表し、

PR はプロモーターを表し、

CSはクローニング部位を表し、そして

TRはターミネーターを表す)のヌクレオチド配列カセットを含んで成る一次ベクター。

【請求項 28】

ヌクレオチド配列がDNA配列である、請求項 27 に記載のベクター。

【請求項 29】

プロモーターとクローニング部位との間及び/又はクローニング部位とターミネーターとの間にイントロン配列を更に含んで成る、請求項 27 又は 28 に記載のベクター。

【請求項 30】

クローニング部位が発現可能なヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 31】

RS2とRS2'が同一である、請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 32】

RS1とRS1'が同一である、請求項 27 ~ 31 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 33】

TRとRS2'との間にスペーサー配列を更に含んで成る、請求項 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 34】

プロモーターが外部から制御可能なプロモーターである、請求項 27 ~ 33 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 35】

カセットを含んで成る一次ベクターが、高コピー数を有し、E.コリにおいて増殖することができ、そしてE.コリにおける維持のための選択マーカーを有するプラスミドベクターである、請求項 27 ~ 34 のいずれか 1 項に記載のベクター。

【請求項 36】

一次ベクターを調製する方法であって、5' 3' 方向に、一般式

[RS1-RS2-SP-PR-CS-TR-SP-RS2'-RS1']

(ここで、

RS1及びRS1'は制限部位を表し、

RS2及びRS2'はRS1及びRS1'と異なる制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも2つのヌクレオチドのスペーサー配列を表し、

PRはプロモーターを表し、

CSはクローニング部位を表し、

TRはターミネーターを表す)のヌクレオチド配列を含んで成るカセットを含んで成る一次ベクターのクローニング部位内に発現可能なヌクレオチド配列を挿入すること、を含んで成る方法。

【請求項 37】

発現状態から全mRNAを単離し、そしてベクター内への挿入のために完全長のcDNAを獲得すること、を更に含んで成る、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

実質的に完全長のcDNAを得るために、cDNAの選択を更に含んで成る、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

5' 3' 方向に、一般式：

[RS1-RS2-SP-PR-X-TR-SP-RS2'-RS1']

(ここで、

RS1及びRS1'は制限部位を表し、

RS2及びRS2'はRS1及びRS1'と異なる制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも2つのヌクレオチドのスペーサー配列を表し、

PRはプロモーターを表し、

Xは発現可能なヌクレオチド配列を表し、

TRはターミネーターを表し、

- ここで、当該発現可能なヌクレオチド配列は、1つの発現状態から単離され、そして
- 少なくとも第一及び第二の一次ベクターが、前記第一及び第二の一次ベクター内の2つの異なるプロモーターの制御下で発現可能な同一のペプチドをコードする発現可能なヌクレオチド配列を含んで成る)のヌクレオチド配列のカセットをそれぞれが含んで成る少なくとも2つの一次ベクターを含んで成るヌクレオチドライブラリー。

【請求項40】

宿主細胞が、細菌、例えばE.コリ又はバチルス・サブチリス、又は真菌、例えば酵母を含んで成る群から選択される、請求項39に記載のライブラリー。

【請求項41】

実質的に全てのベクターが同一のRS2及びRS2'配列を含んで成る、請求項39に記載のライブラリー。

【請求項42】

請求項27～35のいずれか1項に記載の少なくとも1つの一次ベクターを含んで成る、請求項39～41のいずれか1項に記載のライブラリー。

【請求項43】

ヌクレオチドライブラリーを調製する方法であって、発現可能なヌクレオチド配列を獲得し、当該発現可能なヌクレオチド配列を、

一般式

[RS1-RS2-SP-PR-CS-TR-SP-RS2'-RS1']

(ここで、

RS1及びRS1'は制限部位を表し、

RS2及びRS2'はRS1及びRS1'と異なる制限部位を表し、

SPは個々に少なくとも2つのヌクレオチドのスペーサー配列を表し、

PRはプロモーターを表し、

CSはクローニング部位を表し、そして

TRはターミネーターを表す)のヌクレオチド配列を5' 3'方向に含んで成るカセットを含んで成る一次ベクター混合物のクローニング部位内にクローニングし、そして一次ベクターを宿主細胞内に伝達すること、
を含んで成る方法。