

【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30年12月20日(2018.12.20)

【公表番号】特表2018-500009(P2018-500009A)

【公表日】平成30年1月11日(2018.1.11)

【年通号数】公開・登録公報2018-001

【出願番号】特願2017-524052(P2017-524052)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (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 5/10 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/483 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 5/10

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/483 C

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

C 0 7 K 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成30年11月7日(2018.11.7)

【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】

細胞の表面上に対象のポリペプチドを発現させるための D N A 核酸であって：

D N A 核酸は、

(i) シグナルポリペプチドをコードする第 1 のヌクレオチド配列；

(i i) 合成ストークポリペプチドをコードする第 2 のヌクレオチド配列；および

(i i i) 表面のアンカーポリペプチドをコードする第 3 のヌクレオチド配列：を含み、

(i) (i i) および (i i i) は、5 ' から 3 ' の方向に互いに対して位置決めされ、

同じプロモータに動作可能に連結され、

プロモータは真核細胞において機能的であることを特徴とする D N A 核酸。

【請求項 2】

対象のタンパク質（P O I）をコードするヌクレオチド配列を挿入するための挿入部位を含み、挿入部位は（i）の 3' および（i i）の 5' に位置する請求項 1 記載の D N A 核酸。

【請求項 3】

（i v）対象のタンパク質（P O I）をコードする、第 4 のヌクレオチド配列を含み、第 1 から第 4 のヌクレオチド配列は、：

（a）（i）、（i v）、（i i）、（i i i）の順に 5' から 3' へ位置決めされ：
および

（b）それらがシグナルポリペプチド、P O I、ストークポリペプチドおよび表面のアンカーポリペプチドを含む表面の接近可能な融合タンパク質をまとめてコードするように、互いに、インフレームである請求項 1 記載の D N A 核酸。

【請求項 4】

ストークポリペプチドは 20 以上のアミノ酸の長さを有しているポリペプチド配列を含む請求項 1 乃至 3 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 5】

ストークポリペプチドは、20 乃至 2000 のアミノ酸の範囲の長さを有するポリペプチド配列を含む請求項 1 乃至 4 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 6】

前記第 2 のヌクレオチド配列は低い自己相似性を特徴とし、コードされたストークポリペプチドは、アミノ酸配列の低い複雑性、全体的に酸性の性質、高親水性、二次または三次構造の機能の定義の欠如、及び高密度の O - 結合型糖鎖付加部位を特徴とする請求項 1 ~ 5 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 7】

ストークポリペプチドは配列番号：31 - 35 のいずれかで示されたアミノ酸配列と 60 % 以上のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む請求項 1 乃至 6 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 8】

シグナルポリペプチドは酵母蛋白質からのシグナルポリペプチドである請求項 1 乃至 7 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 9】

シグナルポリペプチドは小胞体（E R）への翻訳後輸送を示すタンパク質由来のものである請求項 1 乃至 8 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 10】

シグナルポリペプチドは配列番号：11 - 17 のいずれかで示されたアミノ酸配列と 60 % 以上のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む請求項 1 乃至 9 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 11】

表面のアンカーポリペプチドはグリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）アンカードメインである請求項 1 乃至 10 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 12】

G P I アンカーポリペプチドは配列番号：51 - 64 及び 71 のいずれかで示されたアミノ酸配列と 60 % 以上のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む請求項 11 に記載の D N A 核酸。

【請求項 13】

表面のアンカーポリペプチドは合成ポリペプチド配列である請求項 1 乃至 12 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 14】

D N A 核酸は組み換えの発現ベクターである請求項 1 乃至 13 のうちのいずれか 1 項 に記載の D N A 核酸。

【請求項 15】

前記プロモータは真菌細胞において機能的である請求項 1 乃至 14 のうちのいずれか 1 項に記載の DNA 核酸。

【請求項 16】

真菌細胞は酵母菌細胞である請求項 15 に記載の DNA 核酸。

【請求項 17】

2 つ以上の DNA 核酸を含むキットであって、

DNA 核酸はそれぞれ次のものを含み：

(i) シグナルポリペプチドをコードする第 1 のヌクレオチド配列；

(ii) 合成ストークポリペプチドをコードする第 2 のヌクレオチド配列；および

(iii) 表面のアンカーポリペプチドをコードする第 3 のヌクレオチド配列；

各 DNA 核酸の (i)、(ii)、および (iii) は 5' から 3' の方向に互いに対し
て位置決めされ、同じプロモータに動作可能に連結され、；

2 つ以上の DNA 核酸の少なくとも 2 つによってコードされたストークポリペプチドは、
異なる長さであるキット。

【請求項 18】

2 つ以上の DNA 核酸の少なくとも 2 つによってコードされた合成ストークポリペプチド
は、20 から 100 のアミノ酸、40 から 100 のアミノ酸、

101 から 200 のアミノ酸、201 から 300 のアミノ酸、301 から 400 のアミノ
酸、401 から 500 のアミノ酸、501 から 600 のアミノ酸、601 から 700 のア
ミノ酸、701 から 800 のアミノ酸、801 から 900 のアミノ酸、901 から 100
0 のアミノ酸、あるいは 1001 から 1500 のアミノ酸の範囲の長さを有している請求
項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

合成 GPI アンカードメインを含む、タンパク質、またはタンパク質をコードする核酸で
あって、

ここで合成 GPI アンカードメインは、配列番号 51 - 64 のいずれかで示されたアミノ
酸配列と 60 % 以上または、80 % 以上のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む
タンパク質、またはタンパク質をコードする核酸。

【請求項 20】

合成 GPI アンカードメインを含む、タンパク質、またはタンパク質をコードする核酸で
あって、

ここで合成 GPI アンカードメインは、配列番号 71 で示されたアミノ酸配列と 60 % 以
上または、80 % 以上のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含むタンパク質、また
はタンパク質をコードする核酸。

【請求項 21】

真核細胞の表面上に対象のタンパク質 (POI) を表示する方法であって、

該方法は：

表面に接近可能な融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を真核細胞へ導入
する工程を含み、

該表面の接近可能な融合蛋白質はシグナルのポリペプチド、POI、合成ストークポリペ
プチドおよび表面のアンカーポリペプチドを含むことを特徴とする方法。

【請求項 22】

真核細胞は真菌細胞である請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

真菌細胞は酵母菌細胞である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

対象のタンパク質 (POI) への薬剤の結合を測定する方法であって、

該方法は：

請求項 21 乃至 23 のうちのいずれか 1 項に記載の方法によって真核細胞の表面上に PO

I を表示する工程、
真核細胞を薬剤に接触させる工程、及び
細胞に結合した薬剤の量の測定する工程を含む方法。

【請求項 25】

薬剤は直接検知できるラベルを用いて標識付けされる請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記測定する工程はフローサイトメトリーを含む請求項 24 あるいは請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記測定する工程は定性的であり、薬剤が細胞に結合しているかどうかを判定することを含む、請求項 24 乃至 26 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記方法は：

2 以上の異なる対象のタンパク質 (P O I) を表示する工程であって、各 P O I は異なる細胞の表面上に表示される工程、：

前記 P O I を表示する細胞と薬剤と接触させる工程；及び

前記細胞に結合した薬剤の量を測定する工程；

を含む請求項 24 乃至 27 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

2 つ以上の異なる P O I の少なくとも 2 つは 1 から 20 のアミノ酸だけアミノ酸配列が異なる請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記方法は、突然変異生成を含む方法を使用し、2 つ以上の異なる P O I の少なくとも 2 つを生成させる 1 工程を含む請求項 28 あるいは請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記方法は：

真核細胞と 2 つ以上の薬剤とを接触させる工程；および

前記細胞に結合した薬剤を特定する工程；

を含む請求項 24 乃至 30 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。