

【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DNA核酸であつて：

DNA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；

(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；を含み、

(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、

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DNA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DNA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DNA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DNA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DNA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DNA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DNA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DNA核酸。

【請求項 9】

シグナルポリペプチドは小胞体（ER）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DNA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DNA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DNA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DNA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DNA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DNA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1000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POI

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 2 5】

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2 4に記載の方法。

【請求項 2 6】

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2 4あるいは請求項2 5に記載の方法。

【請求項 2 7】

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2 4乃至2 6のうちのいずれか1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記方法は：

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

前記POI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2 4乃至2 7のうちのいずれか1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

2つ以上の異なるPOI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2 8に記載の方法。

【請求項 3 0】

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POIの少なくとも2つを生成させる1工程を含む請求項2 8あるいは請求項2 9に記載の方法。

【請求項 3 1】

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2 4乃至3 0のうちのいずれか1 項に記載の方法。