

【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】令和 3 年 4 月 22 日 (2021.4.22)

【公表番号】特表 2020-511135 (P2020-511135A)

【公表日】令和 2 年 4 月 16 日 (2020.4.16)

【年通号数】公開・登録公報 2020-015

【出願番号】特願 2019-549581 (P2019-549581)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 4 0 B 40/08 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/52 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/13

C 4 0 B 40/08 Z N A

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/52 Z

C 1 2 N 15/63 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 3 月 10 日 (2021.3.10)

【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】

変異体核酸ライブラリーを合成する方法であって、

前記方法は、

a. 少なくとも 500 のポリヌクレオチドをコードするあらかじめ定められた配列を提供する工程であって、前記少なくとも 500 のポリヌクレオチドはあらかじめ選択された不均一なコドン分布を有する、工程と；

b. 前記少なくとも 500 のポリヌクレオチドを合成する工程であって、前記少なくとも 500 のポリヌクレオチドは、各位置で不均一な分布を有する複数のアミノ酸を含むタンパク質ライブラリーをコードする、工程と；

c. 前記少なくとも 500 のポリヌクレオチドによってコードされた核酸、または前記少なくとも 500 のポリヌクレオチドに基づいて翻訳されたタンパク質について細胞活性を分析する工程と；

d. 工程 (c) のアッセイからの結果を収集する工程であって、収集する工程は、否定的な結果または無効の結果に関連するあらかじめ定められた配列の結果を収集することを含む、工程と、

を含む、方法。

【請求項 2】

工程 (d) は、前記あらかじめ定められた配列の少なくとも 80 % に関する結果を収集することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

予測された多様性の少なくとも約 70 % が表される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 500 のポリヌクレオチド配列の少なくとも約 80 % は、前記変異体核酸ライブラリーの前記ポリヌクレオチド配列の各々について平均頻度の 2 倍以内の量で前記変異体核酸ライブラリー中に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞活性は、繁殖、成長、接着、死亡、遊走、エネルギー産生、酸素利用、代謝活性、細胞シグナル伝達、遊離ラジカル損傷に対する反応、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記変異体核酸ライブラリーは、変異体遺伝子あるいはその断片のための配列をコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記変異体核酸ライブラリーは、抗体、酵素、あるいはペプチドの少なくとも一部をコードする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

核酸のコンビナトリアルライブラリーを生成するための方法であって、
前記方法が：

a .

(i) 第 1 の複数のポリヌクレオチドであって、第 1 の複数のポリヌクレオチドのそれぞれのポリヌクレオチドが、参照配列と比較して、変異体配列をコードする、第 1 の複数のポリヌクレオチドと、

(i i) 第 2 の複数のポリヌクレオチドであって、第 2 の複数のポリヌクレオチドのそれぞれのポリヌクレオチドが、前記参照配列と比較して、変異体配列をコードする、第 2 の複数のポリヌクレオチドと、

をコードするあらかじめ定められた配列を設計する工程と；

b . 前記第 1 の複数のポリヌクレオチドと前記第 2 の複数のポリヌクレオチドを合成する工程と；

c . 前記核酸のコンビナトリアルライブラリーを形成するために前記第 1 の複数のポリヌクレオチドと前記第 2 の複数のポリヌクレオチドを混合する工程であって、予測された多様性の少なくとも約 70 % が表され、および、前記コンビナトリアルライブラリーは、各位置でアミノ酸の不均一な分布を有する複数のアミノ酸を含むタンパク質ライブラリーをコードする、工程と、
を含む、方法。

【請求項 9】

前記コンビナトリアルライブラリーは、非飽和コンビナトリアルライブラリーであり、および、前記非飽和コンビナトリアルライブラリーの生成のためのポリヌクレオチドの合計数は、飽和コンビナトリアルライブラリーの生成のためのポリヌクレオチドの合計数の少なくとも 25 % 未満である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

PCR 突然変異誘発反応のためのプライマーとして前記コンビナトリアルライブラリーを使用して、核酸の PCR 突然変異誘発を実施する工程をさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記コンビナトリアルライブラリーは、変異体遺伝子あるいはその断片のための配列をコードする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

前記コンビナトリアルライブラリーは、抗体、酵素、あるいはペプチドの少なくとも一部をコードする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記コンビナトリアルライブラリーは、前記抗体の可変領域あるいは定常領域の少なく

とも一部をコードする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記コンビナトリアルライブラリーは、前記抗体の少なくとも 1 つの C D R 領域をコードする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記コンビナトリアルライブラリーは、前記抗体の重鎖上の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 と、軽鎖上の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 をコードする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

変異体核酸ライブラリーを合成する方法であって、

前記方法は、

a . 複数のポリヌクレオチドをコードするあらかじめ定められた配列を提供する工程であって、ここで、前記ポリヌクレオチドは、参照配列と比較して、変異体配列を有する複数のコドンにコードする、工程と；

b . 前記参照配列中のあらかじめ選択された位置のコドンに対する不均一な分布値を選択する工程と；

c . 選択された分布値に合う分布値を有する核酸配列のセットを生成する工程であって、ここで、前記核酸配列のセットは、飽和コドン変異体ライブラリーを生成するために必要とされる核酸配列の量未満である、工程と；

d . 前記あらかじめ選択された位置のコドンの変異体の確率を計算する工程と；

e . 前記確率が前記選択された分布値に合う場合に、あらかじめ選択された分布の前記変異体核酸ライブラリーを合成する工程であって、ここで、予測された多様性の少なくとも約 7 0 % が表され、および、前記変異体核酸ライブラリーは、各位置で不均一な分布を有する複数のアミノ酸を含むタンパク質ライブラリーをコードする、工程と、を含む、方法。

【請求項 1 7】

P C R 突然変異誘発反応のためのプライマーとして前記変異体核酸ライブラリーを使用して、核酸の P C R 突然変異誘発を行う工程をさらに含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

コドンの割り当ては、変異体配列を有する前記複数のコドンの各コドンを決断するために使用される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記コドンの割り当ては生物中のコドン配列の頻度に基づく、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記生物は、動物、植物、真菌、原生生物、古細菌、および細菌の少なくとも 1 つである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記コドンの割り当ては前記コドン配列の多様性に基づく、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記変異体核酸ライブラリーは、抗体、酵素、またはペプチドの少なくとも一部をコードする、請求項 1 6 に記載の方法。