

【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28年12月28日 (2016.12.28)

【公表番号】特表2016-506239(P2016-506239A)

【公表日】平成28年3月3日 (2016.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2016-013

【出願番号】特願2015-545470(P2015-545470)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 4 0 B 40/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (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)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

C 4 0 B 30/04 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 4 0 B 40/02

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

G 0 1 N 33/53 Y

C 4 0 B 30/04

C 1 2 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成28年11月8日 (2016.11.8)

【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】

目的の遺伝子と、レポーターをコードする核酸と、第 1 の DNA レコンビナーゼ認識配列と、第 2 の DNA レコンビナーゼ認識配列とを含む DNA 構築物であって、

ここにおいて、第 1 の DNA レコンビナーゼ認識配列は前記レポーターの上流に位置し、第 2 の DNA レコンビナーゼ認識配列は前記レポーターの下流に位置し、

前記レポーターは、目的の遺伝子の下流、目的の遺伝子上流、または、目的の遺伝子のイントロン中に位置し、

それにより、前記レポーターの発現は、目的の遺伝子の発現の代理となる、DNA 構築物。

【請求項 2】

目的の遺伝子を含む DNA 構築物であって、

ここにおいて目的の遺伝子は少なくとも1つのエクソンと、スプライス受容体配列と、膜結合ドメインをコードする核酸と、第1のDNAレコンビナーゼ認識配列と、第2のDNAレコンビナーゼ認識配列とを含み、

前記スプライス受容体配列に続いて膜結合ドメインをコードする核酸が位置し、これによって選択的スプライシングが、目的のたんぱく質の少なくとも一部の膜結合型形態または分泌型の目的のたんぱく質をコードする転写産物を生成し、

前記第1のDNAレコンビナーゼ認識配列は、スプライス受容体配列および膜結合ドメインをコードする核酸の上流に位置し、前記第2のDNAレコンビナーゼ認識配列は、膜結合ドメインをコードする核酸の下流に位置し、それにより、DNAレコンビナーゼは、スプライス受容体部位および膜結合ドメインをコードする核酸を除去することができる、DNA構築物。

【請求項3】

前記DNAレコンビナーゼ認識部位は、FLPレコンビナーゼのためのDNAレコンビナーゼ認識部位、CreレコンビナーゼのためのDNAレコンビナーゼ認識部位、またはC31インテグラーゼのためのDNAレコンビナーゼ認識部位である、請求項1または2に記載のDNA構築物。

【請求項4】

目的の遺伝子が抗体をコードする、請求項1～3のいずれか1項に記載のDNA構築物。

【請求項5】

コードされた膜結合ドメインが、抗体CH3ドメインの融合ペプチドであり、当該融合ペプチドをコードする核酸は、イントロン中、または、抗体の重鎖ポリペプチドをコードする核酸の終止コドンの下流に位置する、請求項4に記載のDNA構築物。

【請求項6】

請求項1、2、3、4または5に記載のDNA構築物を含む細胞。

【請求項7】

前記細胞が、部位特異的レコンビナーゼをさらに含み、ここにおいて前記部位特異的レコンビナーゼはDNAレコンビナーゼ認識配列に結合する、請求項6に記載の細胞。

【請求項8】

レポーターまたは膜結合ドメインをコードする核酸が、DNA構築物から除去されたものである、請求項6または7に記載の細胞。

【請求項9】

DNA構築物は、細胞の染色体に組み込まれているか、または、細胞中において染色体外に位置する、請求項6～8のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項10】

目的の遺伝子からポリペプチドを製造する方法であって、
請求項7に記載の細胞を培養するステップと、
細胞中において目的の遺伝子を発現するステップと、
ポリペプチドを単離するステップとを含む、方法。

【請求項11】

目的のたんぱく質のために細胞ライブラリーをスクリーニングする方法であって、
(a) 培養培地中に複数の宿主細胞を提供するステップと、
(b) 目的のレポーターを発現する細胞ライブラリー、または、膜アンカー型たんぱく質を生成するために、複数の請求項1～4のいずれか1項に記載のDNA構築物で複数の宿主細胞をトランスフェクトするステップと、
(c) 所望の性質を有する、目的のレポーターまたは膜アンカー型たんぱく質を発現する宿主細胞を確認するステップと、
(d) DNAレコンビナーゼに確認された宿主細胞を曝露するステップと、
(e) 所望の性質を有する目的のたんぱく質の生産用の確認された宿主細胞をスクリーニングするステップとを含む、方法。

【請求項 1 2】

前記 DNAレコンビナーゼが、F L Pレコンビナーゼ、C r eレコンビナーゼ、または C 3 1インテグラーゼである、請求項 1 1に記載の方法。

【請求項 1 3】

目的の遺伝子が抗体をコードする、請求項 1 1または 1 2に記載の方法。

【請求項 1 4】

目的のレポーターまたは膜結合型たんぱく質の量が、蛍光活性化細胞選別もしくは磁気活性化細胞選別により細胞表面で検出される、請求項 1 1～1 3のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

所望の性質が抗原の結合または他の生物活性である、請求項 1 1～1 4のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

所望の性質が発現レベルである、請求項 1 1～1 4のいずれか 1 項に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 5】

リツキサン重鎖の下流での膜アンカー型 G F P の発現

I R E S 配列（配列番号 1 8）をコザック共通配列を持つ膜アンカー型 G F P（配列番号 1）に融合させた。次いで、L o x P 部位を N 末端および C 末端の両方に付加した。全配列を、リツキサンガンマ終止コドン<u>の</u>下流でベクター L B 0 - H におけるポリ A シグナルの前に挿入し、図 1 B に記載するように、ベクター L B 1 4 を作成した。2 9 3 F 細胞に、Freestyle Max トランスフェクション試薬を用いて L B 1 4 および L B 0 - K を同時トランスフェクトした。2 日後、媒体中の抗体レベルを実施例 1 に記載したように E L I S A によりアッセイし、これを図 1 0 A に示す。L B 1 1 トランスフェクト細胞における G F P の発現は、フローサイトメトリー分析により確認した。