

【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 3 部門第 2 区分

【発行日】令和 3 年 11 月 25 日 (2021.11.25)

【公表番号】特表 2020-537646 (P2020-537646A)

【公表日】令和 2 年 12 月 24 日 (2020.12.24)

【年通号数】公開・登録公報 2020-052

【出願番号】特願 2020-520468 (P2020-520468)

【国際特許分類】

C 0 7 K 14/195 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 0 7 K 14/37 (2006.01)

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 1 2 N 15/86 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

【F I】

C 0 7 K 14/195

C 1 2 N 15/62 Z N A Z

C 0 7 K 14/37

C 0 7 K 14/435

C 1 2 N 15/86 Z

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 15/113 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 10 月 11 日 (2021.10.11)

【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】

(a) (i) インテインの N 末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質の N 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第 1 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 1 のベクターと、

(b) (i) 前記選択可能マーカータンパク質の C 末端断片の上流にある、前記インテインの C 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第 2 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 2 のベクターと

含む、組み合わせ物であって、

前記インテインの前記 N 末端断片および前記 C 末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の前記 N 末端断片および前記 C 末端断片の結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生し、

前記組み合わせ物を真核生物細胞の送達することを含む方法において使用するための、組み合わせ物。

【請求項 2】

前記方法が、前記真核生物細胞を、前記第 1 および第 2 のベクターの前記真核生物細胞への導入を許容する条件下で維持して、トランスジェニック真核生物細胞を産生することをさらに含む、請求項 1 に記載の組み合わせ物。

【請求項 3】

前記方法が、前記全長選択可能マーカータンパク質を含む前記トランスジェニック真核生物細胞を選択することをさらに含む、請求項 2 に記載の組み合わせ物。

【請求項 4】

前記真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ物。

【請求項 5】

前記選択可能マーカータンパク質が、抗生物質耐性タンパク質である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ物。

【請求項 6】

前記抗生物質耐性タンパク質が、ハイグロマイシン、G 4 1 8、ピューロマイシン、フレオマイシン D 1、またはブラストサイジンに対する耐性を付与する、請求項 5 に記載の組み合わせ物。

【請求項 7】

前記抗生物質耐性タンパク質が、h y g B 遺伝子、b s r 遺伝子、p a c 遺伝子、または n e o 遺伝子によってコードされる、請求項 5 または 6 に記載の組み合わせ物。

【請求項 8】

前記選択可能マーカータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ物。

【請求項 9】

前記蛍光タンパク質が、T a g C F P、m T a g C F P 2、C z u r i t e、E C F P 2、m K a l a m a l、S i r i u s、S a p p h i r e、T - S a p p h i r e、E C F P、C e r u l e a n、S C F P 3 C、m T u r q u o i s e、m T u r q u o i s e 2、モノマー M i d o r i i s h i - C y a n、T a g C F P、m T F P 1、E G F P、E m e r a l d、S u p e r f o l d e r G F P、モノマー C z a m i G r e e n、T a g G F P 2、m U K G、m W a s a b i、C l o v e r、m N e o n G r e e n、E Y F P、C i t r i n e、V e n u s、S Y F P 2、T a g Y F P、モノマー K u s a b i r a - O r a n g e、m K O κ、m K O 2、m O r a n g e、m O r a n g e 2、m R a s p b e r r y、m C h e r r y、m S t r a w b e r r y、m S c a r l e t、m T a n g e r i n e、t d T o m a t o、T a g R F P、T a g R F P - T、m C p p l e、m R u b y、m R u b y 2、m P l u m、H c R e d - T a n d e m、m K a t e 2、m N e p t u n e、N i r F P、T a g R F P 6 5 7、I F P 1. 4、および i R F P から選択される、請求項 8 に記載の組み合わせ物。

【請求項 10】

前記インテインが、スプリットインテインである、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ物。

【請求項 11】

前記スプリットインテインが、天然のスプリットであり、必要に応じて、天然のスプリットインテインが、D n a E インテインから選択され、必要に応じて、前記 D n a E インテインが、S y n e c h o c y s t i s s p. D n a E (S s p D n a E) インテインおよび N o s t o c p u n c t i f o r m e (N p u D n a E) インテインから選択される、請求項 10 に記載の組み合わせ物。

【請求項 12】

前記スプリットインテインが、操作されたスプリットインテインであり、必要に応じて、前記操作されたスプリットインテインが、D n a B インテインまたは G y r B インテインから操作され、必要に応じて、前記操作されたスプリットインテインが、S s p D n a

B S 1 インテインまたは S s p G y r B S 1 1 インテインである、請求項 1 0 に記載の組み合わせ物。

【請求項 1 3】

前記第 1 および／または第 2 の分子が、タンパク質または非コーディングリボ核酸（RNA）であり、必要に応じて、前記非コーディング RNA が、マイクロ RNA（miRNA）、アンチセンス RNA、短い干渉 RNA（siRNA）、または短いヘアピン RNA（shRNA）である、請求項 1 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ物。

【請求項 1 4】

前記第 1 および／または第 2 のベクターが、プラスミドベクターまたはウイルスベクターである、請求項 1 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の組み合わせ物。

【請求項 1 5】

（a）（i）インテインの N 末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質の N 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および（ii）第 1 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 1 のベクターと、

（b）（i）前記選択可能マーカータンパク質の C 末端断片の上流にある、前記インテインの C 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および（ii）第 2 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 2 のベクターと

を含む真核生物細胞であって、

前記インテインの前記 N 末端断片および前記 C 末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の前記 N 末端断片および前記 C 末端断片の結合を触媒して、全長抗生物質耐性タンパク質を産生する、真核生物細胞。

【請求項 1 6】

キットであって、

（a）インテインの N 末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質の N 末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第 1 のベクターと、

（b）前記選択可能マーカータンパク質の C 末端断片の上流にある、前記インテインの C 末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第 2 のベクターとを含み、

前記インテインの前記 N 末端断片および前記 C 末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の前記 N 末端断片および前記 C 末端断片の結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生する、キット。

【請求項 1 7】

（a）（i）第 1 のインテインの N 末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質の N 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および（ii）第 1 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 1 のベクターと、

（b）（i）第 2 のインテインの N 末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第 1 のインテインの C 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および（ii）第 2 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 2 のベクターと、

（c）（i）前記選択可能マーカータンパク質の C 末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第 2 のインテインの C 末端断片をコードするヌクレオチド配列、および（ii）第 3 の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第 3 のベクターとを含む組み合わせ物であって、

前記第 1 のインテインの前記 N 末端断片および前記 C 末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の N 末端断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第 2 のインテインの前記 N 末端断片および前記 C 末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記 C 末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生し、

前記組み合わせ物を真核生物細胞に送達することをと含む方法において使用するための、組み合わせ物。

【請求項 18】

前記方法が、前記真核生物細胞を、前記第1、第2、および第3のベクターの前記真核生物細胞への導入を許容する条件下で維持して、トランスジェニック真核生物細胞を産生することをさらに含む、請求項19に記載の組み合わせ物。

【請求項 19】

前記方法が、前記全長選択可能マーカートンパク質を含む前記トランスジェニック真核生物細胞を選択することをさらに含む、請求項18に記載の組み合わせ物。

【請求項 20】

(a) (i) 第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、
(b) (i) 第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと、
(c) (i) 前記選択可能マーカートンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第3の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターとを含む真核生物細胞であって、
前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、真核生物細胞。

【請求項 21】

キットであって、
(a) 第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、
(b) 第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと、
(c) 前記選択可能マーカートンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターとを含み、
前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、キット。

【請求項 22】

(a) (i) インテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクター
を含む組成物であって、前記組成物を真核生物細胞の送達することを含む方法において使用するための組成物であり、前記組成物が、
(b) (i) 前記選択可能マーカートンパク質のC末端断片の上流にある、前記インテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第2の目的の分子をコー

ドするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと
組み合わせて送達されることを特徴とし、
前記インテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の前記N末端断片および前記C末端断片の結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、
組成物。

【請求項23】

(b) (i) 選択可能マーカートンパク質のC末端断片の上流にある、インテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクター
を含む組成物であって、前記組成物を真核生物細胞の送達することを含む方法において使用するための組成物であり、前記組成物が、

(a) (i) 前記インテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと
組み合わせて送達されることを特徴とし、

前記インテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の前記N末端断片および前記C末端断片の結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、
組成物。

【請求項24】

(a) (i) 第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクター
を含む組成物であって、前記組成物を真核生物細胞の送達することを含む方法において使用するための組成物であり、前記組成物が、

(b) (i) 第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと、

(c) (i) 前記選択可能マーカートンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第3の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターと
組み合わせて送達されることを特徴とし、

前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、
組成物。

【請求項25】

(b) (i) 第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカートンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクター
を含む組成物であって、前記組成物を真核生物細胞の送達することを含む方法において使用するための組成物であり、前記組成物が、

(a) (i) 前記第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および (i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと

、
(c) (i) 前記選択可能マーカートンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第3の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターと組み合わせて送達されることを特徴とし、

前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、
組成物。

【請求項26】

(c) (i) 選択可能マーカートンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第3の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターを含む組成物であって、前記組成物を真核生物細胞の送達することを含む方法において使用するための組成物であり、前記組成物が、

(a) (i) 第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

(b) (i) 前記第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと組み合わせて送達されることを特徴とし、

前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカートンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、
組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間のそれぞれの値が、本明細書において具体的に企図され、記載される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

真核生物細胞に、

(a) (i) インテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカートンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

(b) (i) 前記選択可能マーカートンパク質のC末端断片の上流にある、前記インテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと
を送達することを含む方法であって、

前記インテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカートンパク質の前記N末端断片および前記C末端断片の結合を触媒して、全長選択可能マーカートンパク質を産生する、方法。

(項目2)

前記真核生物細胞を、前記第1および第2のベクターの前記真核生物細胞への導入を許容する条件下で維持して、トランスジェニック真核生物細胞を産生することをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記全長選択可能マーカートンパク質を含む前記トランスジェニック真核生物細胞を選択することをさらに含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記真核生物細胞が、哺乳動物細胞である、項目1から3のいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

前記選択可能マーカートンパク質が、抗生物質耐性タンパク質である、項目1から4のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

前記抗生物質耐性タンパク質が、ハイグロマイシン、G418、ピューロマイシン、フレオマイシンD1、またはブラストサイジンに対する耐性を付与する、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記抗生物質耐性タンパク質が、hygB遺伝子、bsr遺伝子、pac遺伝子、またはneo遺伝子によってコードされる、項目5または6に記載の方法。

(項目8)

前記選択可能マーカートンパク質が、蛍光タンパク質である、項目1から4のいずれか1項に記載の方法。

(項目9)

前記蛍光タンパク質が、TagCFP、mTagCFP2、Citrine、ECFP2、mKalamal、Sirius、Sapphire、T-Sapphire、ECFP、Cerulean、SCFP3C、mTurquoise、mTurquoise2、モノマーMidoriishi-Cyan、TagCFP、mTFP1、EGFP、Emerald、Superfolder GFP、モノマーCzami Green、TagGFP2、mUKG、mWasabi、Clover、mNeonGreen、EYFP、Citrine、Venus、SYFP2、TagYFP、モノマーKusabira-Orange、mKOκ、mKO2、mOrange、mOrange2、mRaspberry、mCherry、mStrawberry、mScarlet、mTangerine、tdTomato、TagRFP、TagRFP-T、mCapple、mRuby、mRuby2、mPlum、HcRed-Tandem、mKate2、mNeptune、NirFP、TagRFP657、IFP1.4、およびiRFPから選択される、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記インテインが、スプリットインテインである、項目1から9のいずれか1項に記載の方法。

(項目11)

前記スプリットインテインが、天然のスプリットであり、必要に応じて、天然のスプリットインテインが、DnaEインテインから選択され、必要に応じて、前記DnaEインテインが、Synechocystis sp. DnaE (SspDnaE) インテインおよびNostoc punctiforme (NpuDnaE) インテインから選択される、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記スプリットインティンが、操作されたスプリットインティンであり、必要に応じて、前記操作されたスプリットインティンが、DnaBインティンまたはGyrBインティンから操作され、必要に応じて、前記操作されたスプリットインティンが、SspDnaB S1インティンまたはSspGyrB S11インティンである、項目10に記載の方法。

(項目13)

前記第1および／または第2の分子が、タンパク質または非コーディングリボ核酸(RNA)であり、必要に応じて、前記非コーディングRNAが、マイクロRNA(miRNA)、アンチセンスRNA、短い干渉RNA(siRNA)、または短いヘアピンRNA(shRNA)である、項目1から12のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

前記第1および／または第2のベクターが、プラスミドベクターまたはウイルスベクターである、項目1から13のいずれか1項に記載の方法。

(項目15)

(a)(i) インティンのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(ii) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

(b)(i) 前記選択可能マーカータンパク質のC末端断片の上流にある、前記インティンのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(ii) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと

を含む真核生物細胞であって、

前記インティンの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の前記N末端断片および前記C末端断片の結合を触媒して、全長抗生物質耐性タンパク質を産生する、真核生物細胞。

(項目16)

キットであって、

(a) インティンのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

、

(b) 前記選択可能マーカータンパク質のC末端断片の上流にある、前記インティンのC末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターとを含み、

前記インティンの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の前記N末端断片および前記C末端断片の結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生する、キット。

(項目17)

真核生物細胞に、

(a)(i) 第1のインティンのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(ii) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

(b)(i) 第2のインティンのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインティンのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(ii) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと、

(c)(i) 前記選択可能マーカータンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインティンのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(ii) 第3の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターとを送達することを含む方法であって、

前記第1のインティンの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインティンの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能

マーカータンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生する、方法。

(項目18)

前記真核生物細胞を、前記第1、第2、および第3のベクターの前記真核生物細胞への導入を許容する条件下で維持して、トランスジェニック真核生物細胞を産生することをさらに含む、項目19に記載の方法。

(項目19)

前記全長選択可能マーカータンパク質を含む前記トランスジェニック真核生物細胞を選択することをさらに含む、項目18に記載の方法。

(項目20)

(a) (i) 第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第1の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

(b) (i) 第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第2の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと、

(c) (i) 前記選択可能マーカータンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列、および(i i) 第3の目的の分子をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターとを含む真核生物細胞であって、

前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生する、真核生物細胞。

(項目21)

キットであって、

(a) 第1のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、選択可能マーカータンパク質のN末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第1のベクターと、

(b) 第2のインテインのN末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第1のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第2のベクターと、

(c) 前記選択可能マーカータンパク質のC末端断片をコードするヌクレオチド配列の上流にある、前記第2のインテインのC末端断片をコードするヌクレオチド配列を含む、第3のベクターとを含み、

前記第1のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質のN末端断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記中央断片への結合を触媒し、前記第2のインテインの前記N末端断片および前記C末端断片が、前記選択可能マーカータンパク質の中央断片の、前記選択可能マーカータンパク質の前記C末端断片への結合を触媒して、全長選択可能マーカータンパク質を産生する、キット。