

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-520815

(P2021-520815A)

(43) 公表日 令和3年8月26日 (2021. 8. 26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00 Z N A	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2020-555861 (P2020-555861)	(71) 出願人	511152991
(86) (22) 出願日	平成31年4月9日 (2019. 4. 9)		グリーンライト バイオサイエンス インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年12月10日 (2020. 12. 10)		GREENLIGHT BIOSCIEN CES, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/026561		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 5 5、メドフォード、ボストン アヴ ェニュー 2 0 0、スイート 1 0 0 0
(87) 国際公開番号	W02019/199807		2 0 0 Boston Avenue, Suite 1 0 0 0, Medford , MA 0 2 1 5 5, U. S. A.
(87) 国際公開日	令和1年10月17日 (2019. 10. 17)		
(31) 優先権主張番号	62/655, 747	(74) 代理人	100102842
(32) 優先日	平成30年4月10日 (2018. 4. 10)		弁理士 葛和 清司
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T 7 RNAポリメラーゼバリエント

(57) 【要約】

増大したRNAポリメラーゼ活性および／または熱安定性を有するT 7 RNAポリメラーゼバリエント (T 7 RNA Pバリエント)、およびその使用方法が、本明細書に提供される。

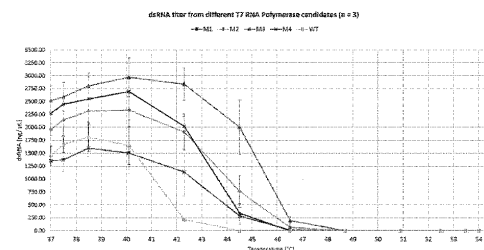


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 に対して少なくとも 70 % の同一性を有するアミノ酸配列中の少なくとも 3 つのアミノ酸置換を含む T 7 R N A ポリメラーゼバリエーションであって、3 つのアミノ酸置換は、I 3 2 0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、および G 7 8 8 から選択される位置にある、前記 T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 2】

配列番号 1 によって同定されるアミノ酸配列中に I 3 2 0 L 置換を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 3】

配列番号 1 によって同定されるアミノ酸配列中に I 3 9 6 L 置換を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 4】

配列番号 1 によって同定されるアミノ酸配列中に F 5 4 6 W 置換を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 5】

配列番号 1 によって同定されるアミノ酸配列中に S 6 8 4 A 置換を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 6】

配列番号 1 によって同定されるアミノ酸配列中に G 7 8 8 A 置換を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 7】

置換 I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、F 5 4 6 W、S 6 8 4 A、および G 7 8 8 A を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 8】

配列番号 2 によって同定されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 9】

置換 I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、および G 7 8 8 A を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 10】

配列番号 3 によって同定されるアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 11】

置換 I 3 9 6 L、S 6 8 4 A、および G 7 8 8 A を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 12】

配列番号 4 によって同定されるアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 13】

置換 I 3 2 0 L、S 6 8 4 A、および G 7 8 8 A を含む、請求項 1 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 14】

配列番号 5 によって同定されるアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーション。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の T 7 R N A ポリメラーゼバリエーションを、ヌクレオシド三リン酸および関心対象の R N A をコードするデオキシリボ核酸（D N A）テンプレートと組み合わせること；および、関心対象の R N A を生成することを含む、リボ核酸（R N A）を生成するための方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

生成するステップが、37℃以上の温度で遂行される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

生成するステップが、T7RNAポリメラーゼバリエントを発現する細胞からの細胞ライセート、またはT7RNAポリメラーゼバリエントを発現する細胞からの酵素調製物を使用することを含む、請求項15または16に記載の方法。

【請求項 18】

DNAテンプレートが、環状のDNAテンプレートである、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

DNAテンプレートが、直鎖のDNAテンプレートである、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

生成される関心対象のRNAの量が、37℃以上の温度で野生型T7RNAポリメラーゼを使用して生成される関心対象のRNAの量より多い、請求項15～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

関心対象のRNAが、dsRNA、ssRNA、siRNA、miRNA、piRNA、mRNA、またはshRNAである、請求項17～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

(i) 請求項1～14のいずれか一項に記載のT7RNAポリメラーゼバリエント；および

(ii) 反応緩衝液

を含む、キット。

【請求項 23】

1以上のリボヌクレオシド三リン酸をさらに含む、請求項22に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、特許法§119(e)の下で、2018年4月10日に本願の出願の米国仮出願番号第62/655,747号の利益を主張し、それは全体として本願明細書に参照として組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

背景

遺伝子発現の間のリボ核酸(RNA)へのデオキシリボ核酸(DNA)の転写は、RNAポリメラーゼが、DNAテンプレートに付着してRNAの重合を開始するときに出現する、基本の細胞のプロセスである。転写などの必須の細胞のプロセスは、37℃で一般に起こり、そして、RNAポリメラーゼを含む多くの酵素は、37℃より上の温度で、典型的には不活性である。従って、高温での増大した熱安定性を有するRNAポリメラーゼバリエントは、高温でのRNA生成のために必要とされる。

【発明の概要】

【0003】

概要

本開示は、増強された熱安定性を有するT7RNAポリメラーゼ(RNAP)バリエントを提供する。RNA合成反応のためのこれらのバリエントの使用は、(37℃より上の温度でさえ、野生型T7RNAPと比べて)RNA収率および生成物プロファイルの改善に、結果としてなる。これらのバリエントは、タンパク質安定性を改善して、親和性に対する影響を最小化すると予測される個々の突然変異の同定を通して合理的に設計された。

それらの突然変異の具体的な組み合わせを含むために改変されたバリエーションは、改善された特性、例えば、高温での改善されたRNA生成を伴うT7RNAPバリエーションを同定するために、次いでテストされた。

【0004】

よって、本開示のいくつかの態様は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むT7RNAPバリエーションを提供し、ここで、少なくとも1つのアミノ酸置換は、I320、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0005】

いくつかの態様において、本開示は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも2つのアミノ酸置換を含むT7RNAPバリエーションを提供し、ここで、少なくとも2つのアミノ酸置換は、I320、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0006】

いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置：I320、I396、F546、S684、およびG788（M1）のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置：I320、I396、およびG788（M2）のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置：I396、S684、およびG788（M3）のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置：I320、S684、およびG788（M4）のアミノ酸置換を含む。配列番号1のアミノ酸配列は、T7RNAPの野生型配列である。

【0007】

本開示は、いくつかの態様において、本明細書に記載のT7RNAPバリエーションを含む組成物、キット、システム、および方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、リボ核酸（RNA）を生成するため方法を、提供する。これらの方法は、いくつかの態様において、本明細書に提供されるT7RNAポリメラーゼバリエーションをヌクレオシド三リン酸と関心対象のRNAをコードするデオキシリボ核酸（DNA）テンプレートとを組み合わせて、関心対象のRNAを生成することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0008】

図面の簡単な記載

【図1】図1は、25Lの反応における反応温度での2時間インキュベーション後のT7RNAポリメラーゼバリエーションによって生成された二本鎖RNA（dsRNA）生成物力価（ng/μL）を示すグラフである（n=3）。

【図2】図2は、温度に基づいてT7RNAポリメラーゼバリエーションによって生成される、%RNAの比較を示す、グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0009】

詳細な記載

バクテリオファージT7RNAポリメラーゼ（T7RNAP）は、DNAポリメラーゼIファミリーに帰属する、DNA依存性RNAポリメラーゼである。野生型T7RNAPは、883のアミノ酸を含み、配列番号1に対応する。野生型T7RNAPは、37℃、pH7.5でポリメラーゼ活性を有し、より高い温度で不活性である。よって、この開示のいくつかの側面は、野生型T7RNAポリメラーゼと比較して、高温で増大した熱安定性および改善されたRNA生成を有するT7RNAポリメラーゼバリエーションを、提供する。本明細書に開示のT7RNAポリメラーゼバリエーションは、37℃以上の温度で遂行される様々な方法において、使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0010】

T7RNAポリメラーゼバリエーション

この開示のいくつかの側面は、配列番号1によって同定される、天然に存在するT7RNA Pのアミノ酸配列と異なるバクテリオファージT7RNAポリメラーゼ(T7RNA P)バリエーションを、提供する。

いくつかの態様において、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むT7RNA Pバリエーションが、本明細書中に提供され、ここで、少なくとも1つのアミノ酸置換は、I320、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0011】

いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320にある。いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396にある。いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置F546にある。いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置S684にある。いくつかの態様において、少なくとも1つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置G788にある。

【0012】

いくつかの態様において、配列番号1のアミノ酸配列中の少なくとも2つ、少なくとも3つ、または、少なくとも4つのアミノ酸置換を含むT7RNA Pバリエーションが、本明細書中に提供され、ここで、少なくとも3つ、少なくとも4つのアミノ酸、またはすべての5つの置換は、I320、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0013】

いくつかの態様において、T7RNA Pバリエーションは、配列番号1のアミノ酸配列中に少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも2つのアミノ酸置換は、I320、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0014】

いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320およびI396にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320およびF546にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396およびF546にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置F546およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置F546およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも2つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置S684およびG788にある。

【0015】

いくつかの態様において、T7RNA Pバリエーションは、配列番号1のアミノ酸配列中に少なくとも3つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも3つのアミノ酸置換は、I3

10

20

30

40

50

20、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0016】

いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、およびF546にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、F546、およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、F546、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、S684、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396、F546、およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396、F546、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも3つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置F546、S684、およびG788にある。

10

20

【0017】

いくつかの態様において、T7RNAPバリエントは、配列番号1のアミノ酸配列中に少なくとも4つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも2つのアミノ酸置換が、I320、I396、F546、S684、およびG788からなる群から選択される位置にある。

【0018】

いくつかの態様において、少なくとも4つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、F546、およびS684にある。いくつかの態様において、少なくとも4つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、F546、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも4つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、F546、S684、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも4つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、S684、およびG788にある。いくつかの態様において、少なくとも4つのアミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I396、F546、S684、およびG788にある。

30

【0019】

いくつかの態様において、T7RNAPバリエントは、配列番号1のアミノ酸配列中に5つのアミノ酸置換を含み、ここで、5つのアミノ酸置換は、位置I320、I396、F546、S684、およびG788にある。

40

【0020】

一定のアミノ酸は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の位置I320、I396、F546、S684、およびG788で、別のアミノ酸によって置換されてもよい。例えば、アミノ酸置換は、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列のI320L、I320V、I396L、I396V、F546W、F546Y、S684A、S684V、G788A、およびG788Vを含むが、これに限定されない。

【0021】

従って、いくつかの態様において、T7RNAPバリエントは、配列番号1中のI32

50

0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、およびG 7 8 8からなる群から選択される位置で、少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、ここで、位置I 3 2 0のアミノ酸置換は、I 3 2 0 LまたはI 3 2 0 Vである、ここで、位置I 3 9 6のアミノ酸置換は、I 3 9 6 LまたはI 3 9 6 Vである、ここで、位置F 5 4 6のアミノ酸置換は、F 5 4 6 WまたはF 5 4 6 Yである、ここで、位置S 6 8 4のアミノ酸置換は、S 6 8 4 AまたはS 6 8 4 Vである、および／または、ここで、位置G 7 8 8のアミノ酸置換は、G 7 8 8 AまたはG 7 8 8 Vである。

【0022】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1中のI 3 2 0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、およびG 7 8 8からなる群から選択される位置で、少なくとも2つのアミノ酸置換を有し、ここで、位置I 3 2 0のアミノ酸置換は、I 3 2 0 LまたはI 3 2 0 Vである、ここで、位置I 3 9 6のアミノ酸置換は、I 3 9 6 LまたはI 3 9 6 Vである、ここで、位置F 5 4 6のアミノ酸置換は、F 5 4 6 WまたはF 5 4 6 Yである、ここで、位置S 6 8 4のアミノ酸置換は、S 6 8 4 AまたはS 6 8 4 Vである、および／または、ここで、位置G 7 8 8のアミノ酸置換は、G 7 8 8 AまたはG 7 8 8 Vである。

10

【0023】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1中のI 3 2 0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、およびG 7 8 8からなる群から選択される位置で、少なくとも3つのアミノ酸置換を有し、ここで、位置I 3 2 0のアミノ酸置換は、I 3 2 0 LまたはI 3 2 0 Vである、ここで、位置I 3 9 6のアミノ酸置換は、I 3 9 6 LまたはI 3 9 6 Vである、ここで、位置F 5 4 6のアミノ酸置換は、F 5 4 6 WまたはF 5 4 6 Yである、ここで、位置S 6 8 4のアミノ酸置換は、S 6 8 4 AまたはS 6 8 4 Vである、および／または、ここで、位置G 7 8 8のアミノ酸置換は、G 7 8 8 AまたはG 7 8 8 Vである。

20

【0024】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1中のI 3 2 0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、およびG 7 8 8からなる群から選択される位置で、少なくとも4つのアミノ酸置換を有し、ここで、位置I 3 2 0のアミノ酸置換は、I 3 2 0 LまたはI 3 2 0 Vである、ここで、位置I 3 9 6のアミノ酸置換は、I 3 9 6 LまたはI 3 9 6 Vである、ここで、位置F 5 4 6のアミノ酸置換は、F 5 4 6 WまたはF 5 4 6 Yである、ここで、位置S 6 8 4のアミノ酸置換は、S 6 8 4 AまたはS 6 8 4 Vである、および／または、ここで、位置G 7 8 8のアミノ酸置換は、G 7 8 8 AまたはG 7 8 8 Vである。

30

【0025】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1中のI 3 2 0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、およびG 7 8 8からなる群から選択される位置で、少なくとも5つのアミノ酸置換を有し、ここで、位置I 3 2 0のアミノ酸置換は、I 3 2 0 LまたはI 3 2 0 Vである、ここで、位置I 3 9 6のアミノ酸置換は、I 3 9 6 LまたはI 3 9 6 Vである、ここで、位置F 5 4 6のアミノ酸置換は、F 5 4 6 WまたはF 5 4 6 Yである、ここで、位置S 6 8 4のアミノ酸置換は、S 6 8 4 AまたはS 6 8 4 Vである、および／または、ここで、位置G 7 8 8のアミノ酸置換は、G 7 8 8 AまたはG 7 8 8 Vである。

40

【0026】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも2つのアミノ酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 2 0 V、I 3 9 6 L、I 3 9 6 V、F 5 4 6 W、F 5 4 6 Y、S 6 8 4 A、S 6 8 4 V、G 7 8 8 A、およびG 7 8 8 Vからなる群から、選択される。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも3つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも3つのアミノ

50

酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 2 0 V、I 3 9 6 L、I 3 9 6 V、F 5 4 6 W、F 5 4 6 Y、S 6 8 4 A、S 6 8 4 V、G 7 8 8 A、およびG 7 8 8 Vからなる群から、選択される。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも4つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも4つのアミノ酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 2 0 V、I 3 9 6 L、I 3 9 6 V、F 5 4 6 W、F 5 4 6 Y、S 6 8 4 A、S 6 8 4 V、G 7 8 8 A、およびG 7 8 8 Vからなる群から、選択される。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列の少なくとも5つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも5つのアミノ酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 2 0 V、I 3 9 6 L、I 3 9 6 V、F 5 4 6 W、F 5 4 6 Y、S 6 8 4 A、S 6 8 4 V、G 7 8 8 A、およびG 7 8 8 Vからなる群から、選択される。

10

【0027】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列中に少なくとも2つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも2つのアミノ酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、F 5 4 6 W、S 6 8 4 A、およびG 7 8 8 Aからなる群から、選択される。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列中に少なくとも3つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも3つのアミノ酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、F 5 4 6 W、S 6 8 4 A、およびG 7 8 8 Aから選択される位置にある。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号1によって同定されるアミノ酸配列中に少なくとも4つのアミノ酸置換を含み、ここで、少なくとも4つのアミノ酸置換は、I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、F 5 4 6 W、S 6 8 4 A、およびG 7 8 8 Aからなる群から、選択される。

20

【0028】

いくつかの態様において、I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、およびG 7 8 8 Aアミノ酸置換を含むT 7 R N A Pバリエントは、配列番号3によって同定されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、I 3 9 6 L、S 6 8 4 A、およびG 7 8 8 Aアミノ酸置換を含むT 7 R N A Pバリエントは、配列番号4によって同定されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、I 3 2 0 L、S 6 8 4 A、およびG 7 8 8 Aアミノ酸置換を含むT 7 R N A Pバリエントは、配列番号5によって同定されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、I 3 2 0 L、I 3 9 6 L、F 5 4 6 W、S 6 8 4 A、およびG 7 8 8 Aアミノ酸置換を含むT 7 R N A Pバリエントは、配列番号2によって同定されるアミノ酸配列を含む。

30

【0029】

いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号3によって同定されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号4によって同定されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号5によって同定されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、配列番号2によって同定されるアミノ酸配列を含む。

【0030】

本開示は、配列番号1の位置I 3 2 0、I 3 9 6、F 5 4 6、S 6 8 4、またはG 7 8 8にないアミノ酸の少なくとも1の置換をさらに含むT 7 R N A Pバリエントを、包含する。いくつかの態様において、追加のアミノ酸置換は、保存アミノ酸または保存モチーフの範囲内にあるアミノ酸でなされるものではなく、そこでのかかる残基は、タンパク質活性のために必須である。いくつかの態様において、追加のアミノ酸置換は、しかしながら、T 7 R N A Pバリエントがその活性を保持するように、T 7 R N A Pバリエントの非保存領域に、組み込まれてもよい。いくつかの態様において、本開示のT 7 R N A Pバリエントは、本明細書に記載のない少なくとも1つのアミノ酸置換を、さらに含むが、ただし、追加のアミノ酸置換は、ポリメラーゼ活性を阻害しない。よっていくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、位置I 3 2 0でのアミノ酸置換と、少なくとも1つの追加のアミノ酸置換とを含む。いくつかの態様において、T 7 R N A Pバリエントは、位置I 3 9

40

50

6でのアミノ酸置換と、少なくとも1つの追加のアミノ酸置換とを含む。いくつかの態様において、T7RNAバリエーションは、位置F546でのアミノ酸置換と、少なくとも1つの追加のアミノ酸置換とを含む。いくつかの態様において、T7RNAバリエーションは、位置S684でのアミノ酸置換と、少なくとも1つの追加のアミノ酸置換とを含む。いくつかの態様において、T7RNAバリエーションは、位置G788でのアミノ酸置換と、少なくとも1つの追加のアミノ酸置換とを含む。

【0031】

位置I320、I396、F546、S684、および／またはG788のアミノ酸置換は、いくつかの態様において、配列番号1に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列に、組み込まれる。従って、T7RNAPバリエーションは、配列番号1に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列中のI320、I396、F546、S684およびG788から選択される位置の、2つ、3つ、4つ、または5つのアミノ酸置換を含む。

【0032】

用語「同一性」は、配列を比較する（アラインメントする）ことによって決定される、2以上のポリペプチドの配列の関係を指す。同一性は、特定の数学モデルまたはコンピュータープログラム（例として、「アルゴリズム」）によって対処されるギャップアラインメント（もしあれば）を有する2以上の配列のより小さいものの間の同一の一致のパーセントを、測定する。関連した分子の同一性は、公知の方法によって、容易に算出されることができる。アミノ酸配列に適用されるとき「パーセント（%）同一性」は、最大のパーセント同一性を達成するための、配列を（必要ならばギャップを導入して）アラインメントした後の、第2の配列のアミノ酸配列中の残基と同一である候補アミノ酸配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。同一性は、パーセント同一性の算出に依存するが、算出において導入されるギャップおよびペナルティに起因する値において異なってもよい。

【0033】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学アルゴリズムを使用して達成されることができる。同一性を決定するための技法は、公に入手できるコンピュータープログラムに体系化されている。2つの配列間の相同性を決定する例示のコンピューターソフトウェアは、GCGプログラムパッケージを含むが、これに限定されない (Devereux, J. et al., *Nucleic Acids Research*, 12(1): 387, 1984), the BLAST suite (Altschul, S. F. et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389, 1997), and FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* 215: 403, 1990)。他の技法は、以下を含む: Smith-Waterman アルゴリズム (Smith, T.F. et al., *J. Mol. Biol.* 147: 195, 1981; Needleman-Wunsch アルゴリズム (Needleman, S.B. et al., *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; および、Fast Optimal Global Sequence Alignment アルゴリズム (FOGSAA) (Chakraborty, A. et al., *Sci Rep.* 3: 1746, 2013)。

【0034】

位置I320、I396、F546、S684、およびG788のアミノ酸置換が、活性およびRNAポリメラーゼの熱安定性に対する類似の影響を有する他のRNAポリメラーゼへ移されてもよいということが、理解されるべきである。RNAポリメラーゼの例は、バクテリオファージT3 (NCBI参照配列: NP_523301.1、配列番号11) からのRNAポリメラーゼ、バクテリオファージSP6 (UniProt: P06221、配列番号: 12) からのRNAポリメラーゼ、エルウィニアファージFE44 (NCBI参照配列: YP_008766719.1、配列番号13) からのRNAポリメラーゼ、クライベラバクテリオファージKvp1 (GenBank: ACJ14548.1、配列番号14) からのRNAポリメラーゼ、およびエルシニアバクテリオファージphi

Y e O 3 - 1 2 (U n i P r o t : Q 9 T 1 4 5、配列番号 1 5) からの R N A ポリメラーゼを含むが、これに限定されない。

【 0 0 3 5 】

本開示のいくつかの側面において、T 7 R N A P バリエーションをコードする核酸は、本明細書に提供される。いくつかの態様において、核酸は、配列番号 2 の T 7 R N A P バリエーションをコードする。いくつかの態様において、核酸は、配列番号 3 の T 7 R N A P バリエーションをコードする。いくつかの態様において、核酸は、配列番号 4 の T 7 R N A P バリエーションをコードする。いくつかの態様において、核酸は、配列番号 5 の T 7 R N A P バリエーションをコードする。

R N A ポリメラーゼ活性および熱安定性

10

本開示のいくつかの側面は、天然に存在する T 7 R N A ポリメラーゼと比較して、増大した R N A ポリメラーゼ活性を有する T 7 R N A P バリエーションを、提供する。

【 0 0 3 6 】

R N A ポリメラーゼ活性は、R N A ポリマーを合成するための、T 7 R N A P バリエーションの特性を指す。T 7 R N A P バリエーションの活性は、例えば、適合度および重合速度論（例として、重合速度）に基づいて、評価される。例えば、T 7 R N A P バリエーションの 1 ユニットは、3 7 °C の温度で 3 0 分、N T P の 1 0 n m o l を、酸不溶性物質（例として、R N A 生成物）の中に組み込んでもよい。

【 0 0 3 7 】

いくつかの態様において、T 7 R N A P バリエーションは、活性（3 7 °C 以上の温度で重合反応を触媒することが可能である）を維持したままでもよい。いくつかの態様において、T 7 R N A P バリエーションは、4 2 °C 以上の温度で活性を維持してもよい。いくつかの態様において、T 7 R N A P バリエーションは、4 2 °C、4 3 °C、4 4 °C、4 5 °C、4 6 °C、4 7 °C、4 8 °C、4 9 °C、5 0 °C、5 1 °C、5 2 °C、5 3 °C、5 4 °C、5 5 °C、5 5 °C、5 6 °C、5 7 °C、5 8 °C、5 9 °C、6 0 °C、6 1 °C、6 2 °C、6 3 °C、6 4 °C、6 5 °C、6 6 °C、6 7 °C、6 8 °C、6 9 °C、7 0 °C、7 1 °C、7 2 °C、7 3 °C、7 4 °C、7 5 °C、7 6 °C、7 7 °C、7 8 °C、7 9 °C、または 8 0 °C の温度で、活性を維持してもよい。

20

【 0 0 3 8 】

いくつかの態様において、T 7 R N A P バリエーションは、1 5 分間から 4 8 時間以上まで、3 7 °C より高い温度で、活性を維持してもよい。例えば、T 7 R N A P バリエーションは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 4、3 6、4 2、または 4 8 時間、3 7 °C より高い温度で、活性を維持してもよい。

30

【 0 0 3 9 】

本明細書に記載の T 7 R N A P バリエーションは、対照の R N A ポリメラーゼを変性させる高温で、活性を維持してもよい。よって、T 7 R N A P バリエーションは、いくつかの態様において、そうでない場合に対照の R N A ポリメラーゼを不活性化（すなわち、その本来の活性の 2 0 % より低く、1 0 % より低く、5 % より低く、2 % より低く、1 % より低く、または 0 % に）するような高温（例として、3 7 °C より高い）で、その活性を 1 0 % より高く保持する。

40

【 0 0 4 0 】

いくつかの態様において、T 7 R N A P バリエーションは、そうでない場合に対照の R N A ポリメラーゼを不活性化するような高温（例として、3 7 °C より高い）で、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の活性を、保持してもよい。

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様において、T 7 R N A P バリエーションは、そうでない場合に対照の R N A ポリメラーゼを不活性化するような高温（例として、3 7 °C より高い）で、1 0 ~ 1 0 0 %、2 5 ~ 1 0 0 %、または 5 0 ~ 1 0 0 % の活性を、保持してもよい。いくつかの態様

50

において、T7RNAポリマーゼは、そうでない場合に対照RNAポリマーゼを不活性化する高温（例として、37℃より上の）で、10～90%、10～85%、10～80%、10～75%、10～70%、10～65%、10～60%、10～55%、25～90%、25～85%、25～80%、25～75%、25～70%、25～65%、25～60%、25～55%、50～90%、50～85%、50～80%、50～75%、50～70%、50～65%、50～60%、または50～55%の活性を、保持してもよい。

よって、T7RNAポリマーゼは、いくつかの態様において、37℃以上の温度で、対照のRNAポリマーゼより少なくとも10%多くのRNA生成物を、生成してもよい。

10

【0042】

いくつかの態様において、T7RNAポリマーゼは、37℃より高い温度で、対照のRNAポリマーゼより少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%多くのRNA生成物を生成する。

【0043】

この開示のいくつかの側面は、天然に存在するT7RNAポリマーゼである対照のT7RNAポリマーゼと比較して、熱安定性を改善していたT7RNAポリマーゼを提供する。熱安定性は、高温で変性に抵抗するT7RNAポリマーゼの特性を指す。例えば、対照のT7RNAポリマーゼは、42℃の温度で、部分的に、または、完全に変性（不活化）してもよく、そして、T7RNAポリマーゼは、「熱安定性である」と考えられ、42℃で変性しない。

20

【0044】

いくつかの態様において、T7RNAポリマーゼは、対照のRNAポリマーゼと比較して、37℃より高い、38℃より高い、39℃より高い、40℃より高い、41℃より高い、42℃より高い、43℃より高い、44℃より高い、45℃より高い、46℃より高い、47℃より高い、48℃より高い、49℃より高い、50℃より高い、51℃より高い、52℃より高い、53℃より高い、54℃より高い、55℃より高い、56℃より高い、57℃より高い、58℃より高い、59℃より高い、60℃より高い、61℃より高い、62℃より高い、63℃より高い、64℃より高い、65℃より高い、66℃より高い、67℃より高い、68℃より高い、69℃より高い、70℃より高い、71℃より高い、72℃より高い、73℃より高い、74℃より高い、75℃より高い、76℃より高い、77℃より高い、78℃より高い、79℃より高い、80℃より高い温度で、熱安定性（例として、変性に対する増大された抵抗）を増大させた。

30

使用方法

【0045】

本開示は、RNAを生成する方法（例として、*in vitro*転写、*in vivo*転写）、標識されたRNAプローブ（例として、放射性標識されたRNAプローブ）を生成する方法、RNAワクチンを調製するための方法、ヌクレオチドを重合させる方法、RNAを増幅するための方法、およびタンパク質を生成するための方法を含むがこれに限定されず、様々な方法のT7RNAポリマーゼの使用を、包含する。

40

【0046】

本明細書に記載のT7RNAポリマーゼは、対照のRNAポリマーゼと比較して、増大した熱安定性を有し、したがって、本明細書に記載のT7RNAポリマーゼの使用方法は、37℃より高い温度で遂行されてもよい。

【0047】

いくつかの態様において、T7RNAポリマーゼの使用の方法は、37℃より高い、

50

38℃より高い、39℃より高い、40℃より高い、41℃より高い、42℃より高い、43℃より高い、44℃より高い、45℃より高い、46℃より高い、47℃より高い、48℃より高い、49℃より高い、50℃より高い、51℃より高い、52℃より高い、53℃より高い、54℃より高い、55℃より高い、56℃より高い、57℃より高い、58℃より高い、59℃より高い、60℃より高い、61℃より高い、62℃より高い、63℃より高い、64℃より高い、65℃より高い、66℃より高い、67℃より高い、68℃より高い、69℃より高い、70℃より高い、71℃より高い、72℃より高い、73℃より高い、74℃より高い、75℃より高い、76℃より高い、77℃より高い、78℃より高い、79℃より高い、80℃より高い温度で、遂行される。

【0048】

10

本明細書に開示のT7RNAポリマーゼは、例えば、37℃以上の温度で、関心対象のRNAを生成するために、T7RNAポリマーゼに勝る一定の利点を、提供する。いくつかの態様において、T7RNAポリマーゼは、37℃以上の温度で対照のRNAポリマーゼより多くの、関心対象のRNAを生成する。

【0049】

いくつかの態様において、T7RNAポリマーゼによって生成される関心対象のRNAの量は、37℃以上の温度で、対照のRNAポリマーゼを使用して生成された関心対象のRNAの量より、少なくとも1.2倍多い。いくつかの態様において、T7RNAポリマーゼによって生成される関心対象のRNAの量は、37℃以上の温度で、対照RNAポリマーゼを使用して生成した、関心対象のRNAの量より、少なくとも1.3倍多く、少なくとも1.4倍多く、少なくとも1.5倍多く、少なくとも1.6倍多く、少なくとも1.7倍多く、少なくとも1.8倍多く、少なくとも1.9倍多く、少なくとも2倍多く、少なくとも2.5倍多く、少なくとも3倍多く、少なくとも4倍多く、少なくとも5倍多く、少なくとも6倍多く、少なくとも7倍多く、少なくとも8倍多く、少なくとも9倍多く、少なくとも10倍多く、少なくとも11倍多く、少なくとも12倍多く、少なくとも13倍多く、少なくとも14倍多く、少なくとも15倍多く、少なくとも20倍多く、少なくとも25倍多い。

20

【0050】

RNA（例として、RNA生成物、標識されたRNA、RNAワクチン、または増幅されたRNA）の生成のために好適な条件は、当該技術分野において公知であるか、または、例えば、pH（例として、pH8）、温度（例として、15℃～70℃）、時間の長さ（例として、5分～72時間）、塩濃度（例として、5mM～1Mの濃度の塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、および／または酢酸カリウム）、および反応混合物のホスファートおよび二価のイオン（例として、 Mg^{2+} ）ならびにいずれかの外来性補因子の存在を含む、T7RNAポリマーゼ活性のための最適条件を考慮に入れて、当業者によって決定されてもよい。

30

【0051】

いくつかの態様において、緩衝液は、反応混合物に加えられ、例えば、特定のpH値および／または塩濃度を、達成する。緩衝液の例は、リン酸塩緩衝液、トリス緩衝液、MOPS緩衝液、HEPES緩衝液、クエン酸塩緩衝液、酢酸塩緩衝液、リンゴ酸塩緩衝液、MES緩衝液、ヒスチジン緩衝液、PIPES緩衝液、ビス-トリス緩衝液、およびエタノールアミン緩衝液が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0052】

いくつかの態様において、安定性改善剤は、反応混合物に加えられ、例えば、様々なタンパク質の活性および／または安定性を、改善する。安定性改善剤の非限定的な例は、ポリアミン（例として、スぺルミジン、プトレシン、カダベリン等々）、担体タンパク質（例として、BSA等々）、ピロホスファターゼ、グリセロール、ジオール（例として、1,2-プロパンジオール等々）、DMSO、塩（例として、NaCl、 $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ ）、還元剤（例として、ジチオスレイトール（DTT）、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCPEP）、ベーターメルカプトエタノール）を含む。

50

【0053】

いくつかの態様において、RNA重合反応の間の反応混合物は、37℃の、37℃より高い、38℃より高い、39℃より高い、40℃より高い、41℃より高い、42℃より高い、43℃より高い、44℃より高い、45℃より高い、46℃より高い、47℃より高い、48℃より高い、49℃より高い、50℃より高い、51℃より高い、52℃より高い、53℃より高い、54℃より高い、55℃より高い、56℃より高い、57℃より高い、58℃より高い、59℃より高い、60℃より高い、61℃より高い、62℃より高い、63℃より高い、64℃より高い、65℃より高い、66℃より高い、67℃より高い、68℃より高い、69℃より高い、70℃より高い、71℃より高い、72℃より高い、73℃より高い、74℃より高い、75℃より高い、76℃より高い、77℃より高い、78℃より高い、79℃より高い、80℃より高い温度で、遂行される。

10

【0054】

本明細書に提供される方法によって生成されるRNAは、一本鎖RNA (ssRNA) および二本鎖RNA (dsRNA) を含む、いずれかのRNAであってもよい。一本鎖RNAの非限定的な例は、メッセンジャーRNA (mRNA)、マイクロRNA (miRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、piwi結合RNA (piRNA)、およびアンチセンスRNAを含む。二本鎖RNAは、一本鎖領域 (例として、ループまたは突出) を含有しない完全に二本鎖の分子、ならびに二本鎖領域および一本鎖領域 (例として、ループまたは突出) を含有する部分的に二本鎖の分子を、本明細書に含む。よって、短いヘアピンRNA (shRNA) は、本開示の方法によって生成されてもよい。いくつかの態様において、RNA生成物は、標的核酸に結合して、例えば、治療、予防、または診断の剤として使用されてもよい。いくつかの態様において、関心対象のRNAは、dsRNA、ssRNA、siRNA、miRNA、piRNA、mRNA、shRNA、またはガイドRNA (gRNA) である。

20

【0055】

本明細書に記載のとおり、本明細書に提供される方法によって生成されるRNAは、修飾されてもよい。いくつかの態様において、RNAは、本明細書に記載の、そして、続いて修飾される方法に従って、生成される。いくつかの態様において、RNAは、修飾された出発材料を使用して、本明細書に記載の方法に従って、生成される。いくつかの態様において、修飾された出発材料は、修飾された核酸塩基である。いくつかの態様において、修飾された出発材料は、修飾されたヌクレオシドである。いくつかの態様において、修飾された出発材料は、修飾されたヌクレオチドである。

30

【0056】

いくつかの態様において、修飾されたRNAは、主鎖修飾を含む。いくつかの例において、主鎖修飾は、還元されたヌクレアーゼ媒介分解により、RNAに関するより長い半減期に、結果としてなる。これは、より長い半減期のターン結果である。好適な主鎖修飾の例は、ホスホチオナート修飾、ホスホロジチオナート修飾、p-エトキシ修飾、メチルホスホナート修飾、メチルホスホチオナート修飾、アルキルおよびアリールホスファート (荷電ホスホナート酸素が、アルキルまたはアリール基と置き換えられた)、アルキルリン酸トリエステル (荷電酸素部分が、アルキル化された)、ペプチド核酸 (PNA) 主鎖修飾、ロックド核酸 (LNA) 主鎖修飾などを含むが、これに限定されない。これらの修飾は、互いにおよび/またはホスホジエステル骨格結合と組み合わせて、使用されてもよい。

40

【0057】

あるいは、または、加えて、RNAは、塩基または糖部分での修飾を包含する、他の修飾を含んでもよい。例は、3位のヒドロキシル基以外および5位のホスファート基以外の低分子量有機基に共有結合する糖 (例として、2'-Oアルキル化リボース) を有するRNA、リボースの代わりにアラビノースなどの糖を有するRNAを、包含する。RNAは、置換プリンおよびC-5プロピン修飾塩基などのピリミジンも包括する (Wagner et al., Nature Biotechnology 14:840-844, 1996)。他のプリンおよびピリミジンは、5-メ

50

チルシトシン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、およびヒポキサンチンを含むが、これに限定されない。修飾されたRNA生成の他の形は、5'-メチルーCTP、シュードウリジン、2'-O-メチルーUTP、2-フルオロ修飾ピリミジンなどの、修飾されたヌクレオチドの使用を、反応混合物中に含んでもよい。他のかかる修飾は、当業者に周知である。

【0058】

関心対象のRNAをコードするいかなる好適なDNAテンプレートも、本明細書に記載の方法において使用されてもよい。DNAテンプレートは、所望のRNA生成物、および、任意には、転写ターミネーターをコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された、プロモーター、任意には誘導性プロモーターを含む。他のテンプレートフォーマットが、使用されてもよいが、DNAテンプレートは、プラスミドなどのベクター上に、典型的には提供される（例として、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、化学物合成、または当該技術分野において公知の他の手段によって生じる直鎖DNAテンプレート）。いくつかの態様において、1以上のDNAテンプレートが、反応混合物において使用される。いくつかの態様において、2、3、4、5以上の異なるDNAテンプレートが、反応混合物において使用される。

10

プロモーターまたはターミネーターは、天然に存在する配列または改変された配列でもよい。いくつかの態様において、改変された配列は、転写活性を増強するために修飾される。

【0059】

20

いくつかの態様において、プロモーターは、天然に存在する配列である。他の態様において、プロモーターは、改変された配列である。いくつかの態様において、ターミネーターは、天然に存在する配列である。他の態様において、ターミネーターは、改変された配列である。

【0060】

いかなる好適な形でのT7RNAPバリエーションも、本明細書に記載の方法において、使用されてもよい。いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、T7RNAPバリエーションを発現する細胞からの細胞ライセートとして提供される。いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、T7RNAPバリエーションを発現する細胞からの酵素調製物として、提供される。酵素調製物は、精製されても、部分的に精製されても、または、精製されなくてもよい。いくつかの態様において、酵素調製物は、T7RNAPバリエーション、および、T7RNAPバリエーションを発現するために使用される細胞または細胞の構成要素を含む。いくつかの態様において、酵素調製物は、細胞または細胞の構成要素から精製される（例として、本質的に細胞または細胞の構成要素を含まない）T7RNAPバリエーションを含む。いくつかの態様において、T7RNAPバリエーションは、T7RNAPバリエーションをコードする核酸によって、提供される。

30

キット

【0061】

本明細書に記載のT7RNAPバリエーションのいずれかは、キットで提供されてもよい。いくつかの態様において、キットは、本明細書に提供されるT7RNAPバリエーションを含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載のとおり、T7RNAPバリエーションを発現するための核酸ベクターを含む。

40

【0062】

いくつかの態様において、キットは、RNAを生成する方法、標識されたRNAプローブの方法、RNAワクチンを調製する方法、ヌクレオチドを重合させる方法、およびRNAを増幅させるための方法を、これらに限定されず含む、本明細書に記載される方法を遂行するための少なくとも1つの試薬を、さらに含む。いくつかの態様において、少なくとも1つの試薬は、リボヌクレオシド三リン酸、反応緩衝液、およびDNAテンプレートを

50

【0063】

本明細書に記載のキットは、本明細書に記載の方法を遂行するための1以上の構成要素、および任意に使用説明書を収容する容器を、含んでもよい。本明細書に記載のキットのいずれかは、アッセイ方法を遂行するために必要な構成要素を、さらに含んでもよい。キットの各構成要素は、該当する場合、液体状態において（例として、溶液において）、または、固体の状態（例として、乾燥粉末）において、提供されてもよい。あるケースにおいて、構成要素のいくつかは、例えば、好適な溶媒または他の種類（例として、水または緩衝液）の添加によって、（例として、活性化状態へ）再構成可能であるかまたは別様に処理可能でもよく、それは、キットで提供されてもよいかまたは提供されなくてもよい。

【0064】

いくつかの態様において、キットは、提供される構成要素の使用のための取扱説明書および／または宣伝を、任意に含んでもよい。本明細書に使用されるとき、「取扱説明書」は、取扱説明書および／または宣伝の構成要素を定義することができて、典型的には書面での取扱説明書を開示のパッケージング上にまたはそれとともに、含むことができる。取扱説明書は、使用者が、取扱説明書がキット、例えば視聴覚手段（例として、ビデオテープ、DVD等々）、インターネット、および／またはウェブに基づく通信等々に関連すると明確に認識するだろういずれかの方法で提供される、いかなる口頭または電子取扱説明書も、含むことができる。書面での取扱説明書は、医薬または生物学的生成物の製造、使用、または販売を規制している政府機関によって定められた形であってもよく、それは、動物投与のための製造、使用、または販売の機関によって、承認を反映することもできる。本明細書に使用されるとき、「推進された」は、本開示と関連する、教育方法、病院および他のクリニックの取扱説明書、科学的な質問、薬物の発見または開発、アカデミックな調査、医薬品販売を含む医薬品工業活動、および、書面での、口頭での、および電子での通信のいずれかの形を含むいずれかの広告または他の推進活動を含む事業を行うすべての方法を、含む。加えて、キットは、本明細書に記載のとおり、具体的な適用に応じて、他の構成要素を含んでもよい。

【0065】

キットは、1以上の容器において本明細書に記載の構成要素のいずれか1以上を、含有してもよい。構成要素は、無菌的に調製されてもよく、シリンジ中に包装されてもよく、冷却されて出荷されてもよい。あるいは、それは、保存のためのバイアルまたは他の容器中に、収容されてもよい。第2容器は、無菌的に調製される他の構成要素を、有してもよい。

あるいは、キットは、バイアル、管、または他の容器中に、前もって混合され出荷された活性剤を、含んでもよい。

【0066】

キットは、パウチ、1以上の管、容器、箱、またはバッグの中で、ゆるく詰められた付属品とともに、ブリスターパウチ、収縮包装パウチ、密封可能な熱成型トレイ、または、類似のパウチまたはトレイなどの、様々な形を有してもよい。キットは、付属品が加えられたあと、滅菌されてもよく、それによって、容器中の個々の付属品が、別途開けられるのを許す。キットは、当該技術分野において公知の放射線滅菌、加熱殺菌、または他の滅菌方法などの、いずれかの適切な滅菌技法を使用して、滅菌されることができる。キットは、具体的な適用、例えば、容器、細胞培地、塩、緩衝液、試薬、シリンジ、針、ガーゼなどの生地に応じて、殺菌剤、使い捨て可能な手袋、投与前の剤のための支持体等々を適用するかまたは取り除くために、他の構成要素を含んでもよい。

【0067】

例

本明細書に記載の発明が、より完全に理解されてもよいために、以下の例が、規定される。この出願で記載の例は、本明細書に提供される方法および組成物を図示するために提示され、どんな形であれ、それらの範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0068】

例1—T7RNAポリメラーゼバリエント

本開示は、T7 RNAポリメラーゼバリエーション、例えば、1以上の生物からのRNAポリメラーゼタンパク質を提供し、それは、本明細書に記載のとおり、少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、RNAポリメラーゼタンパク質の、少なくとも、アミノ酸残基のうち以下に点で同定されているものは、変異していてもよい。いくつかの態様において、配列番号1において提供されるI320、I396、F546、S684およびG788残基か、または配列番号11～15において提供されるアミノ酸配列のいずれかにおける対応する突然変異は、変異している。

【0069】

配列番号1のI320、I396、F546、S684、およびG788の対応する相同アミノ酸残基が、相同アミノ酸残基の対応する突然変異を伴うRNAポリメラーゼバリエーションを生じさせ、他のRNAポリメラーゼタンパク質において同定されることができることを実証するために、様々な種からの多数のRNAポリメラーゼ配列をアラインメントした。アラインメントは、以下のパラメーターによって、NCBI Constraintに基づくMultiple Alignment Tool (COBALT (st-vn.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt)にアクセス可能)を使用して実行した。Alignment parameters: Gap penalties-11,-1; End-Gap penalties -5,-1. CDDParameters: Use RPS BLASTをオン; Blast E-value 0.003; Find Conserved columns and Recomputeをオン. Query Clustering Parameters: Use query clusters をオン; Word Size 4; Max cluster distance 0.8; Alphabet はRegular.

【0070】

4つのRNAポリメラーゼ配列の典型的なアラインメントを、以下で提供する。アラインメントのRNAポリメラーゼ配列は、以下の通りである：(T7)：バクテリオファージT7からの野生型T7 RNAポリメラーゼ、GenBank：FJ881694.1、配列番号1；

【0071】

(T3)：バクテリオファージT3からのRNAポリメラーゼ：NCBI参照配列：NP_523301.1、配列番号11；(SP6)バクテリオファージSP6からのRNAポリメラーゼ：UniProt：P06221、配列番号12；および(FE44)エルウィニアファージFE44からのRNAポリメラーゼ：NCBI参照配列：YP_008766719.1、配列番号13。野生型T7 RNAポリメラーゼにおけるアミノ酸残基I320、I396、F546、S684、およびG788、およびアラインメントした配列における相同アミノ酸を、アミノ酸残基上の点によって同定する。

【化1】

T7	1	M-NTI-NIAKNDFS	DIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAKPLITLTL	78
T3	1	M-NIIENIEKND	FSEIELAAIPFNTLADHYGSALAKEQLALEHESYELGERRFLKMLERQAKAGEIADNAAKPLLATLL	79
SP6	1	MQDLH-----	AIQLQLEEMFNGGIRRFQADQQRQIAAGSESDTAWNRRLLSELI	50
FE44	1	MTNVI-NAPKND	FSDIANAIPYINILADHYGAHLAATQLELEHEAHEGEKRFKAMERQIKAGEFGDNAVAKPLLSSLA	79

T7	79	PKMIARINDWFEEVKA KRGRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTIACLT SADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLE	158
T3	80	PKLTTRIVEWLEEYASKKGRKPSAYAPLQLLKPEASAFITLKVILASLTSTNMTTIQAAAGMLGKAIEDEARFGRIRDLE	159
SP6	51	APMAEGIQAYKEEYEGKKGRAPRALAFLQCVENEVAAYITMKVMDMLNTD--ATLQAIAMSVAERIEDQVRF SKLEGHA	128
FE44	80	PKFIEAWNWFTEVESKRGKRPVAYNLVQKVAPEAAAFITLKVTLACLTKEEYTNLQSVATKIGRSIEDELRFGRIRDEE	159
T7	159	AKHFKNVEEQNLNKRVGHVYKAF-MQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIEST---GMVSLHRQNA	234
T3	160	AKHFKKHVEEQNLNKRHGQVYKAF-MQVVEADMIGRLLGGEAWSSWDKETT MHVGIRLIEMLIEST---GLVELQRHNA	235
SP6	129	AKYFEK-VKKS LKASRTKSYRHAHNVAVVAEKSVAEKDADFDRWEAWPKETQLQIGTTLLEILEGVSFYNGEFVFMRAMR	207
FE44	160	AKHFKNHVQEALNKRVGIVYKAF-MQAVEGKMLDAGQLQTK-WTTWTPEESIHVGVRMLELLIGST---GLVELHRPFA	234
T7	235	GVVGQDSEITIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPKWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMP	314
T3	236	GNAGSDHEALQLAQEYDVVLAKRAGALAGISPMFQPCVVPKPKWVAITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMP	315
SP6	208	TYGGKTIYYLQTSSEVGGWISAFKEHVAQLSPAYAPCVIPRPWRTPFNGGFHTEKVASRIRLVKGNREHVRKLTQKQMP	287
FE44	235	GNVEKDGEYIQLTEQYVDLLSKRAGALAAIAPMYQPCVVPKPKWTSFVGGGYWAAGRKPLSLVRTGSKKGLERYNDVYMP	314
T7	315	EVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWK--HCPVEDIPAIEEREELPMKPEDIDMNEALTA-----W	377
T3	316	EVYKAVNLQNTAWKINKKVLAVVNEIVNWK--NCPVADIPSLEKQELPPKPDIDTNEAALKE-----W	378
SP6	288	KVYKAINALQNTQWQINKDVLAVIEVIRLDLGYGVPSFKPLIDKENKPANVPVVEFQHLRGRELKEMLSPEQWQQFINW	367
FE44	315	EVYKAVNIAQNTQWQINKKVLAVVNEIVNWK--HCPVDDVPALERGE LVPKPEDIDTNEVALKA-----W	377
T7	378	KRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMWRGRVYAVSM-FNPQGNMTKGLLTLAKGKPI-GKE	455
T3	379	KKAAAGIYRLDKARVSRRISLEFMLEQANKFASKKAIWFPYNMWRGRVYAVPM-FNPQGNMTKGLLTLAKGKPI-GEE	456
SP6	368	KGECARLYTAETKRGSKSAAVVRMVGQARKYSAFESIYFVYAMD SRSRVYQSSTLSPQSNLDGKALLRFTGRPVNGVE	447
FE44	378	KKAASAIYRKEKARVSRRMSMEFMLEQANKFAQFKAIWFPNMNWRGRVYAVPM-FNPQGNMTKGLLTLAKGKPI-GVD	455
T7	456	GYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIK--FIEENHENIMACAKSPLENTWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHG-----LSY	528
T3	457	GFYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIA--FIEKHVDDILACAKDPINNTWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVTHHG-----LSY	529
SP6	448	ALKWFCINGANLWGWDKKTDFVRVSNVLDEEFQDMCRDIAADPLTFTQWAKADAPYEF LAWCFEYAYLDLVDGEGRDEF	527
FE44	456	GYWLKIHGANTAGVDKVFDAERIK--FIEDNHENIMSVAADPIANTWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHG-----MNY	528
T7	529	NCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEK	608
T3	530	NCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEVGGRVNLPLSETVQDIYGIVAQKVNEILKQDAINGTPNEMITVTDKDTGEISEK	609
SP6	528	RTHLPVHQDGCSCGIQHYSAMLRDEVGAKAVNLKPSDAPQDIYGAVAQVVIKKNALYMDADD-----ATFTSGSVTLS	601
FE44	529	NCSLPLAFDGCSCGIQHFSAMLRDEIGGRVNLPLSKEVQDIYRIVAERVNEILKQDVINGTDNEVETVTNKDTGEITEK	608
T7	609	VKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKFGRFQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVT	688
T3	610	LKLGSTLTAQQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKFGRFQVLLDDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWDAVSVT	689
SP6	602	-GTELRAMASAWDSIGITRSLTKKPVMTLPYGSTRLTCRESVIDIYVDLEEKAQKAVAE----GRTANKVHPFEDDRQD	676
FE44	609	LKLGTKELAGQWLAYGVTRKSVTKRSVMTLAYGSKFGRFQVLEDTIQPAIDDGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWNAVTVT	688
T7	689	VVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKD-----KKTGEILR---KRCVHVWTPDGFPPVWQEYKKPIQTRNLNMLFGQFRLQ	758
T3	690	VVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKD-----KKTKEILR---HRCVHVWTPDGFPPVWQEYRKPLQKRLDMIFLGQFRLQ	759
SP6	677	YLTPGAAYNYMTALIWPSISEVVKAPIVAMKMRQLARFAAKRNEGLMYTLPTGFIFILEQKIMATEMLRVRTCLMGDIKMS	756
FE44	689	VVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKD-----KKTKEVLR---KRCVHVWTPDGFPPVWQEYRKPVQTRNLNMLFGQIRLQ	758
T7	759	PTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYES	838
T3	760	PTINTLKDSGIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRMTVVYAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAGLKFKAVRETMVITYEN	839
SP6	757	LQVET---DIVDEAAMMGAAAPNFVHGHDASHLILTVCELVDK-GVTSIAVIHDSFGTHADNTLTLRVALKGQMVAMYID	832
FE44	759	PTVNTNKDSGIDARKQESGIAPNFVHSMGDSHLRMTVVRSEVYGVESFALIHDSFGTIPADAGNLFKAVRETMVNTYEE	838
T7	839	CDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNRDILESDFafa	883 (配列番号 1)
T3	840	NDVLADFYSQFADQLHETQLDKMPPLPKKGNLNLQDILKSDFafa	884 (配列番号 11)
SP6	833	GNALQKLLLEEHEVRWMDVTG---IEVPEQGEFDLNEIMDSEYVFA	874 (配列番号 12)
FE44	839	NDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPPEMPAKGSLDLQELKSDFafa	883 (配列番号 13)

【0072】

アラインメントは、T7RNAポリメラーゼアミノ酸配列に相同のアミノ酸配列およびアミノ酸残基を、当該技術分野において公知のアラインメントプログラムおよびアルゴリズムを使用して、T7RNAポリメラーゼアミノ酸配列またはT7RNAポリメラーゼ残基と揃うアミノ酸配列または残基を同定することによって、種々異なる種からのRNAポ

10

20

30

40

50

リメラーゼ配列を含むがこれらに限定されないRNAポリメラーゼ配列全体にわたって同定することができるということを実証する。

【0073】

本開示は、配列番号11～13（例として、それぞれT3、SP6、およびFE44）における点によって同定されるアミノ酸残基の1以上が、本明細書に記載のとおり変異しているRNAポリメラーゼバリエーションを提供する。点によって配列番号11～13において同定される残基に対応する配列番号1のT7RNAポリメラーゼにおける残基I320、I396、F546、S684およびG788を、本明細書において、「相同の」または「対応する」残基と称する。かかる相同残基は、例として上記の通り、配列アラインメントによって、および、T7RNAポリメラーゼ配列または残基と揃う配列または残基を同定することによって、同定することができる。同様に、本明細書中の配列番号1において同定される突然変異、例として配列番号1における残基I320、I396、F546、S684、およびのG788の突然変異に対応するT7RNAポリメラーゼ配列における突然変異は、本明細書中に、「相同の」または「対応する」突然変異として、言及される。

10

【0074】

例えば、上記のアラインメントされた配列に関する配列番号1における位置I320でのアミノ酸置換に対応するアミノ酸置換は、T3に関するV321、SP6に関するI293、およびFE44に関するV320である。

【0075】

種々異なる種からのRNAポリメラーゼ配列は、当該技術分野において公知である。配列番号1のT7RNAポリメラーゼにおける残基I320、I396、F546、S684、およびG788に対応するアミノ酸残基は、当該技術分野において公知のRNAポリメラーゼ配列に関して、本明細書に記載のとおり同定してもよい。同定されたRNAポリメラーゼ配列のいずれかは、本開示に従って使用してもよい。

20

【0076】

例2—野生型T7RNAポリメラーゼまたは熱安定性のT7RNAポリメラーゼバリエーションを使用するRNAの無細胞合成

材料および方法

バリエーションポリメラーゼのクローニング

突然変異を、プライマーを使用して部位定方向突然変異誘発を介して、作成した。本明細書に記載のT7RNAポリメラーゼバリエーションの突然変異を、表1において示す。ポリメラーゼのバリエーションバージョンは、テンプレートとして具体的なプライマーおよび天然のT7RNAポリメラーゼ（Uniprot P00573）を使用するオーバーラップPCR反応を介して生じさせた。さらにその上、6のヒスチジン残基を、カスタムプライマーを介するPCRステップの間、タンパク質精製によって促進するために、N末端で、これらのバリエーションポリメラーゼに導入した。得られたPCR生成物を、NheIおよびHindIII制限酵素を使用してベクターpBAD24中に、クローニングした。かかるプロセスを、各個々の突然変異のために実行した。複数の突然変異を生じさせるために、このプロセスを、PCRテンプレートとして既存のバリエーションを使用して繰り返した。精製後に、タンパク質レベルと同様にDNAレベルで正確さを確保するために、各バリエーションポリメラーゼについて配列決定した。野生型T7RNAポリメラーゼを同様に、天然の活性のための対照として役立てるために、Hisタグ付けし、そして、pBAD24においてクローニングした。

30

40

【0077】

【表 1】

表1: 突然変異体T7RNAポリメラーゼバリエント。

突然変異体 #	突然変異
M1	Ile320Leu, Ile396Leu, Phe546Trp, Ser684Ala, Gly788Ala
M2	Ile320Leu, Ile396Leu, Gly788Ala
M3	Ile396Leu, Ser684Ala, Gly788Ala
M4	Ile320Leu, Ser684Ala, Gly788Ala

10

【0078】

タンパク質発現および細胞成長

種々異なる h i s タグ付けされたバリエントポリメラーゼ配列を担持するプラスミドを、染色体 T 7 R N A P を欠く大腸菌 B L 2 1 株に形質転換し、タンパク質発現のための宿主株を生じさせた。形質転換された大腸菌株を、250rpmの定常攪拌により、37℃で、（カルベニシリン抗生物質とともに）Luria Broth中の1%の接種菌を使用して、増殖させた。培養物を、OD600が0.6に達したときに、4時間0.2%のアラビノースによって誘導した。4時間の誘導の終わりに、培養物を、遠心分離を介して収穫し、そして、収集したバイオマスを、今後のテストのため、-80℃で凍結保存した。試料を、誘導の前に、および（タンパク質発現を確認するための）SDS-PAGE分析のためのおよびOD600決定のための検討終了後に、収集した。

20

【0079】

培地、化学物質、および緩衝液

Luria Broth (Sigma Aldrich) を、細胞成長のために使用した (10g/L Tryptone、5g/L 酵母抽出物、および5g/L NaCl)。タンパク質精製のために、1X洗浄緩衝液 (pH 7.4で、20mM ナトリウムホスファート、500mM NaCl、40mM イミダゾール) を、バイオマスを再懸濁するために、カラム平衡化のために、および、カラムを洗浄するために使用した。使用した溶離緩衝剤の組成物は、以下の通りである：pH 7.4での、20mM ナトリウムホスファート、500mM NaCl、750mM イミダゾール。使用した2X透析緩衝液の組成物は、以下の通りである：2X PBS、5mM DTT、0.01% トリトンX100。

30

【0080】

熱安定性／活性テストのために、以下の商業的に入手可能な化学物質／試薬を、使用した：リボヌクレオチド溶液 (ATP/GTP/CTP/UTP)；スペルミジン；MgSO₄、熱安定性の無機ピロホスファターゼ (TIPP)。10X反応緩衝液 (10X RB) の組成物は、以下の通りである：300mM MgSO₄、20mM スペルミジン。クエンチ緩衝液組成物は、以下の通りである：20mM Tris-HCl pH 8.0、10mM EDTA pH 8。反応をクエンチした後に、デオキシリボヌクレアーゼ I を、バックグラウンドのDNAテンプレートを取り除くために、使用した。アガロースゲルを流すと共に、RNAローディング色素 (2X) を、使用した。使用したDNAテンプレートは、コード配列を担持する線形プラスミドであった (524bp)。

40

【0081】

粗ライセートの発生およびタンパク質精製

関心対象のタンパク質を精製するために、最初に、バイオマスを、溶解し、そして、生じた粗ライセートを、透明化して、関心対象の標的タンパク質を精製するために、使用し

50

た。粗ライセートを生じさせるために、バイオマスを、最初に1 X 洗浄緩衝液中で再懸濁し、および次いで高圧ホモジナイゼーションを使用して、溶解した。溶解につづいて、粗ライセートを、4℃、15,000 gで60分間、遠心分離した。遠心分離の後、上清（透明化されたライセート）を、精製のために別の容器に移して、使用した。

【0082】

透明化されたライセートを、イオン交換／グラジエント溶離プロトコルを使用したFPLC（AKTAプライムプラス）を使用して、Niイオン親和性クロマトグラフィーに基づく精製のために、使用した。1 mLのhis-カラムを、GE Healthcareから入手した。使用したすべての緩衝液を、上でリストする。精製につづいて、該タンパク質を、50%グリセロール（最終的な濃度）を使用して、-20℃において保存した最後に、該タンパク質を、16時間、終夜透析した。

10

【0083】

活性および熱安定性テスト

突然変異体ポリメラーゼの活性テストを、（本明細書に記載の）IVT反応混合物を使用して、in vitro転写（IVT）反応を介して、遂行した。候補の突然変異体ポリメラーゼの活性テストを、37℃～54℃の間で、遂行した。該反応は、PCRプレートにおいて25 μLスケールでセットアップし、そして、サーマルサイクラーを使用して、テスト温度で、2時間インキュベートした。この後、該反応を、クエンチして、下流の分析のために処理した。IVT反応混合物を、表2中に記載する。

【0084】

20

【表2】

表2: IVT反応混合物組成物(25 μL)。

IVT反応混合物	最終濃度
ヌクレアーゼ不含有水	N/A
NTP混合物 (mM)	4
反応緩衝液 (MgSO ₄ / Spermidine) (mM)	(30 / 2)
DNAテンプレート (ng/ μL)	100
T7RNAP候補 (mg/ mL)	0.012
ピロホスファート (TIPP) (2000 U/ mL stock)	40

30

【0085】

2時間後反応をクエンチするために、2.5 μLのデオキシリボヌクレアーゼIを該反応に加え、37℃で30分間インキュベートして、バックグラウンドのテンプレートを取り除いた。次に、22.5 μLの水を、混合物に加えた。この混合物を、クエンチした反応混合物として役立たせ、そして、アガロースゲル電気泳動またはHPLCを介する、RNA生成物の検証／定量化のための下流分析のために、使用した。

40

【0086】

アガロースゲル電気泳動のために、5 μLを、クエンチした反応混合物から取り除き、10 μLのクエンチ緩衝液およびPCRプレートの混合ウェルに加えた。次に、15 μL 2X RNA色素を加え、そして、この混合物を、サーマルサイクラー中で、70℃で10分間加熱した。おおよそ、この混合物の10 μLを、次いで、画像化の前に、140 Vで60分間安全なSYBRで染色した2%のアガロースゲル上で、流した。

【0087】

50

該反応において合成したRNAは、記載の逆相イオン対クロマトグラフィーを使用して、適応したRNA Swift抽出プロトコルを介して精製した（Nwokeji, A. O., Kilby, P. M., Portwood, D. E., & Dickman, M. J. (2016). RNASwift: A rapid, versatile RNA extraction method free from phenol and chloroform. Analytical Biochemistry, 512, 36-46）。

【0088】

精製した生成物のHPLC分析

dsRNAを定量化するために、個体相抽出プロトコルを、不必要なタンパク質を取り除くために遂行した。一次分離機構は、逆相イオン対クロマトグラフィーであった。シグナルは、ダイオードアレイ検出器を使用して、260 nmで測定した。内部標準応答に領域を標準化することによって、結果を、抽出過程に出現し得る何らかのロスのために修正し、そして、濃度を、外部校正曲線から生じさせた傾きに基づき算出した。

10

結果

【0089】

突然変異体T7RNAポリメラーゼの活性をテストするために、IVT反応を、本明細書に記載のとおり2時間セットアップし、そして、生成したRNA量を、HPLCを介して定量化した。野生型T7RNAポリメラーゼは、天然のT7RNAポリメラーゼ活性のための参照対照として、役だてた。陰性対照も含めた。ここで、T7RNAポリメラーゼは、水によって置き換えた。dsRNA生成物を、陰性対照反応から検出した（図1）。

【0090】

20

図1に示すとおり、M3が、37℃～42.3℃で、ほとんどのdsRNAを形成し；40.1℃までのM4が続く；38.5℃までのM2が続く。M2、M3、およびM4T7RNAポリメラーゼが、37℃～46.5℃の範囲にある温度で、野生型に比較してより多くのdsRNAを形成する。一方、M1T7RNAポリメラーゼは、42.3℃～46.5℃の範囲にある温度で、野生型に比較してより多くのdsRNAを形成する。

表3は、野生型ポリメラーゼと比較したdsRNA力価における増加倍数を示す。

表4は、突然変異体および野生型T7RNAポリメラーゼの、平均dsRNA力価（ng/μL）を示す。

【0091】

【表3】

30

表3: M1、M2、M3、およびM4T7RNAポリメラーゼによるWTと比較した、dsRNA力価の増加倍数。

温度 (°C)	M1	M2	M3	M4
37	0.9	1.4	1.7	1.6
37.5	0.8	1.3	1.6	1.5
38.5	0.9	1.3	1.5	1.4
40.1	0.9	1.4	1.8	1.6
42.3	5.3	9.0	13.3	9.5
44.5	WT 不活性	WT 不活性	WT 不活性	WT 不活性
46.5	WT 不活性	WT 不活性	WT 不活性	M4 不活性

40

【0092】

【表 4】

表4: 25 μ Lシステムにおける反応温度での
インキュベーションの2時間後の、突然変異体および野生型T7RNAポリメラーゼからの、
平均dsRNA力価($\text{ng}/\mu\text{L}$) ($n=3$)。

温度	dsRNA力価 ($\text{ng}/\mu\text{L}$)				
$^{\circ}\text{C}$	M1	M2	M3	M4	WT
37	1353	1958	2517	2269	1449
37.5	1373	2145	2590	2447	1668
38.5	1597	2313	2802	2549	1809
40.1	1505	2334	2969	2693	1644
42.3	1133	1911	2835	2022	212
44.5	285	760	2002	339	0.00
46.5	16	70	196	0.00	0.00
48.7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
50.9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
52.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
53.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

10

【0093】

20

WTが、40.1 $^{\circ}\text{C}$ までその活性の90%を保持して、42.3 $^{\circ}\text{C}$ でその最大と比較してわずか12%の活性を有することが、決定された。WTポリメラーゼは、44.5 $^{\circ}\text{C}$ 以上で、活性を失う。対照の野生型と比較したdsRNA力価の増加倍数を、表3に表す。

【0094】

M1が、42.3 $^{\circ}\text{C}$ で野生型と比較した力価の5.3倍の増加を有するということが、わかる。M2、M3、およびM4は、野生型ポリメラーゼに比較して、テストしたすべての温度で、大量のRNAを形成する。42.3 $^{\circ}\text{C}$ で、M2、M3、M4は、野生型タンパク質より8.9、13.3、および9.5倍大量のRNAを、形成する。

図2に示すとおり、M1~M4は、WTに比較して、熱安定性を改善した。候補T7RNAポリメラーゼの熱安定性は、次の通りに推定される：M3 > M2 > M1 > M4 > WT。

30

【0095】

野生型ポリメラーゼが、42.3 $^{\circ}\text{C}$ で、その最大値に比較して約12%のRNA (212.42 $\text{ng}/\mu\text{L}$)を形成し、そして、44.5 $^{\circ}\text{C}$ 以上で、38.5 $^{\circ}\text{C}$ でのその最大値 (1808.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$)に比較して、いかなるRNAも形成しないことがわかる。

【0096】

配列

バクテリオファージT7からの野生型T7RNAポリメラーゼ

(GenBank: FJ881694.1 / Uniprot P00573)

【化 2】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGR
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
ESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHD SFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 1)

10

【0097】

変更された T 7 R N A ポリメラーゼ (I 3 2 0 L I 3 9 6 L F 5 4 6 W S 6 8 4 A
G 7 8 8 A) (バリエーション 1)

20

【化 3】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKALNIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHWSAMLRDEVGGR
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
EAVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDASHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHD SFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 2)

30

【0098】

変更された T 7 R N A ポリメラーゼ (I 3 2 0 L I 3 9 6 L G 7 8 8 A) (バリエ
ーション 2)

【化 4】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTLPLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKALNIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHF SAML RDEVGGR A
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
ESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDASHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配 列 番 号 3)

10

【0099】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (I 3 9 6 L S 6 8 4 A G 7 8 8 A) (バリアン
ト 3)

【化 5】

20

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTLPLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHF SAML RDEVGGR A
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
EAVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDASHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配 列 番 号 4)

30

【0100】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (I 3 2 0 L S 6 8 4 A G 7 8 8 A) (バリアン
ト 4)

【化 6】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRI RDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKALNIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHC PVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLT LAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGR
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
EAVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKCAVHWVTPDGFVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDASHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 5)

10

【0101】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (I 3 2 0 L)

【化 7】

20

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRI RDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKKAQFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKALNIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHC PVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLT LAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGR
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
ESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKCAVHWVTPDGFVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFDYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 6)

30

【0102】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (I 3 9 6 L)

【化 8】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKKAFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRICIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRA
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
ESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHD SFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 7)

10

【0103】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (F 5 4 6 W)

【化 9】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEQLNKRVGHVYKKAFMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRICIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHWSAMLRDEVGGRA
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
ESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVPWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHD SFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 8)

20

30

【0104】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (S 6 8 4 A)

【化 1 0】

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHF KKNVEEQ LNKRVGHVYKKA FMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYW LKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQH HGLSYNCSLPLAFD GSCSGIQHF SAML RDEVGGR A
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
EAVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKD KKTGEILRKRC AVHWVTPDGF PVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS HLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVD TYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 9)

10

【0 1 0 5】

改変された T 7 R N A ポリメラーゼ (G 7 8 8 A)

【化 1 1】

20

MNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAG
EVADNAAAKPLITTTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLA
CLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHF KKNVEEQ LNKRVGHVYKKA FMQVV
EADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAP
EYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYED
VYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPE
ALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRLSLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYW LKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQH HGLSYNCSLPLAFD GSCSGIQHF SAML RDEVGGR A
VNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQW
LAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
ESVSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKD KKTGEILRKRC AVHWVTPDGF PVWQEYKKPIQ
TRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDASHLRKTVVWAHEKYGIES
FALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVD TYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG
NLNLRDILESDFAF A (配列番号 10)

30

【0 1 0 6】

バクテリオファージ T 3 からの R N A ポリメラーゼ

(N C B I 参照配列 : N P _ 5 2 3 3 0 1 . 1)

【化 1 2】

MNIIENIEKNDFSEIELAAIPFNTLADHYGSALAKEQLALEHESYELGERRFLKMLERQAKA
GEIADNAAAKPLLATLLPKLTTRIVEWLEEYASKKGRKPSAYAPLQLLKPEASAFITLKVIL
ASLTSTNMTTIQAAAGMLGKAIEDEARFGRI RDLEAKHFKKHVEEQLNKRHGQVYKKAFMQV
VEADMIGRGLLGGEAWSSWDKETTMHV GIRLIEMLIESTGLVELQRHNAGNAGSDHEALQLA
QEYVDVLAKRAGALAGISPMFQPCVVPPKPWVAITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKGLMRYE
DVYMPEVYKAVNLAQNTAWKINKKVLAVVNEIVNWKNCPVADIPSLERQELPPKPDDIDTNE
AALKEWKKAAGIYRLDKARVSRISLEFMLEQANKFASKKAIWFPYNMDWRGRVYAVPMFN
PQGNDMTKGLLT LAKGKPIGEEGFYWLKIHGANCAGVDKVPFPERIAFIEKHVDDILACAKD
PINNTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVTHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGR
AVNLLPSETVQDIYGIVAQKVNEILKQDAINGTPNEMITVTDKDTGEISEKLKLGSTSLAQQ
WLAGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLDDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLI
WDAVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTK EILRHRC AVHWTT PDGFPVWQEYRKPL
QKRLDMIFLGQFRLQPTINTLKDSGIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS HLRMTVVYAHEKYGIE
SFALIHDSFGTIPADAGKLFKAVRETMVITYENNDVLADFYSQFADQLHETQLDKMPPLPKK
GNLNLQDILKSDFafa (配列番号 11)

10

【0107】

バクテリオファージからのSP6RNAポリメラーゼ
(UniProt: P06221)

【化 1 3】

20

MQDLHAIQLQLEEMFN GGIRRF EADQQRQIAAGSESDTAWNRRLLSELIAPMAEGIQAY
FSKLEGHAAKYFEKVKKSLKASRTKSYRHAHNVA VVAEKSVAEKDADFDRWEAWPKETQL
QIGTTLLEILEGSVFYNGEPVFM RAMRTYGGKTIYYLQTS ES VGQWISAFKEHVAQLSPA
YAPCVIPPRPWRTPFNGGFHTEKVASRI RL VKGNREHVRKLTQKQMPKVYKAINALQNTQ
WQINKDVLAVIEEVIRLDLGYGVPSFKPLIDKENKPANPVPVEFQH LRGRELKEMLSPEQ
WQQFINWKGE CARLYTAETKRGSKSAAVVRMV GQARKYSAFESIYFVYAMDSRSRVYVQS
STLSPQSN DLGKALLRFTEGRPVNGVEALKWFCINGANLWGWDKKTDFDVRVSNVLDEEFQ
DMCRDIAADPLTFTQWAKADAPYEF LAWC FEYAQYLDLVDEGRADEFRTHLPVHQDGSCS
GIQHYSAMLRDEVGAKAVNLKPSDAPQDIYGAVAQVVIKKNALYMDADDATTFTSGSVTL
SGTEL RAMASAWDSIGITRSLTKKPVMTLPYGSTR LTCRESVIDYIVDLEEKEAQKAVAE
GRTANKVHPFEDDRQDYLTPGAAYNYMTALIWPSISEVVKAPIVAMKMIRQLARFAAKRN
EGLMYTLPTGFILEQKIMATEMLRVRTC LMGD IKMSLQVETDIVDEAAMMGAAAPNFVHG
HDASHLILTVCELVDKGVTSIAVIHDSFGTHADNTLT LRVALKGQMVAMYIDGNALQKLL
EEHEVRWMDVTGIEVPEQGEFDLNEIMDSEYVFA (配列番号 12)

30

【0108】

ErwiniaファージFE44からの野生型RNAポリメラーゼ
(NCBI 参照配列: YP_008766719.1)

【化 1 4】

MTNVINAPKNDFSDIANAIQPYNILADHYGAHLAATQLELEHEAHTEGEKRFLLKAMERQIKA
GEFGDNAVAKPLLSSLAPKFIEAWNTWFTEVESKRGKRPVAYNLVQKVAPEAAAFITLKVTL
ACLTKEEYTNLQSVATKIGRSIEDELRFGRIRDEEAKHFKNHVQEALNKRVGIVYKKAQAFMQA
VEGKMLDAGQLQTKWTTWTPEESIHVGVRLLELLIGSTGLVELHRPFAGNVEKDGGEYIQLTE
QYVDLLSKRAGALAAIAPMYQPCVVPPKPWTSPVGGGYWAAGRKPLSLVRTGSKKGLERYND
VYMPEVYKAVNIAQNTPWKINKKVLAVVNEIVNWKHCPVDDVPALERGELPVKPEDIDTNEV
ALKAWKKAASAIYRKEKARVSRMSMEFMLGQANKFAQFKAIWFPMNMDWRGRVYAVPMFNP
QGNDMTKGLLTAKGKPIGVDGYYWLKIHGANTAGVDKVDFAERIKFIEDNHENIMSVAADP
IANTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGMNYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEIGGRA
VNLLPSKEVQDIYRIVAERVNEILKQDVTINGTDNEVETVTNKDTGEITEKLKLGTKELAGQW
LAYGVTRKVTKRSMVTLAYGSKEYGFRDQVLEDTIQPAIDDGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIW
NAVTVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTKEVLRKRCVHWVTPDGFVPVWQEYRKPVQ
TRLNLMFLGQIRLQPTVNTNKDSGIDARKQESGIAPNFVHSMDSHLRMTVVRSEVYGVES
FALIHDSFGTIPADAGNLFKAVRETMVNTYEENDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPEMPAGK
SLDLQEILKSDFAFA (配列番号 13)

10

【0 1 0 9】

K l u y v e r a バクテリオファージ K v p 1 からの RNA ポリメラーゼ
(G e n B a n k : A C J 1 4 5 4 8 . 1)

【化 1 5】

20

MNVINAPKNDFSDIANAIQPYNILADHYGAQLAATQLELEHEAHTEGEKRFLLKAMERQIKAG
EFGDNAVAKPLLSSLAPKFIEAWNTWFTVEEAKRGKRPVAYNLVQKVAPEAAAFITLKVTLA
CLTKEEFTNLQSVATKIGRSIEDELRFGRIRDEEAKHFKNHVQEALNKRVGIVYKKAQAFMQAV
EGKMLDAGQLQTKWTTWTPEESIHVGVRLLELLIGSTGLVELHRPFAGNVEKDGGEYIQLTEQ
YVDLLSKRAGALAAIAPMYQPCVVPPKPWTSPVGGGYWAAGRKPLSLVRTGSKKGLERYNDV
YMPEVYKAVNIAQNTPWKINKKVLAVVNEIVNWKHCPVEDVPALERGELPVKPEDIDTNEAA
LKAWKKAASAIYRKEKARVSRMSMEFMLGQANKFAQFKAIWFPMNMDWRGRVYAVPMFNPQ
GNDMTKGLLTAKGKPIGVDGYYWLKIHGANTAGVDKVDFAERIKFIDDNHENIMSVAADP I
ANTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGMNYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAV
NLLPSKEVQDIYRIVAERVNEMLREAVINGTDNEVETVTNKDTGEITEKLKLGTKELAGQWL
AYGVTRKVTKRSMVTLAYGSKEYGFRDQVLEDTIQPAIDDGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWE
SVTVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTKEVLRKRCVHWVTPDGFVPVWQEYKPKPVQT
RLNLMFLGQIRLQPTVNTNKDSGIDARKQESGIAPNFVHSMDSHLRMTVVRSEVYGVESF
ALIHDSFGTIPADAGNLFKAVRETMVNTYEENDVLADFYEQFADQLHESQLDKMPEMPAGKS
LDLQEILKSDFAFA (配列番号 14)

30

【0 1 1 0】

Y e r s i n i a バクテリオファージ p h i Y e O 3 - 1 2 からの RNA ポリメラーゼ
(U n i P r o t : Q 9 T 1 4 5)

【化 1 6】

MNIIENIEKNDFSEIELAAIPFNTLADHYGSALAREQLALEHESYELGERRFLKMLERQA
KAGEIADNAAKPLLATLLPKLTTRIVEWLEEYATKKGRKPVAYAPLQSLKPEASAFITL
KVILASLTSTNMTTIQAAAGMLGKAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKHVEEQNLNRHGQVYK
KAFMQVVEADMIGRGLLGGEAWSSWDKETTMHVGIRLIEMLIESTGLVELQRHNAGNAGS
DHEALQLAQEYVDVLAKRAGALAGISPMFQPCVVPKPWVAITGGGYWANGRRPLALVRT
HSKKGLMRYEDVYMPEVYKAVNIAQNTAWKINKKVLAVVNEIVNWKNCPVADIPSLEEQE
LPPKPDIDITNEAALKEWKAAAGIYRLDKARVSRRISLEFMLEQANKFASKKAIWFYPYN
MDWRGRVYAVPMFNPQGNDMTKGLLTAKGKPIGEEGFYWLKIHGANCAGVDKVPFPERI
AFIEKHVDDILACAKDPINNTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVAHHGLSYNCSLPLAFDGS
CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAQRVNEILKQDAINGTPNEMITVTD
KDTGEISEKLKLTSTLAQQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLDLDTIQPAI
DSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWDAVSVTVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTKTEIL
RHRCVHWTTPDGFVWQEYRKPLQKRLDMIFLGQFRLQPTINTLKDSGIDAHKQESGIA
PNFVHSQDGSHLRMTVVYAHENYGIESFALIHDSFGTIPADAGKLFKAVRETMVITYENN
DVLADFYDQFADQLHETQLDKMPPLPKKGNNLNLQDILKSDFAF (配列番号 15)

10

【0 1 1 1】

等価物および範囲

当業者は、単にルーチン実験操作を用いて、本明細書に記載の発明の具体的態様の多くの等価物を、確認し、または確かめることができるだろう。本発明の範囲は、上記記載に限定されることを意図せず、しかし、添付の特許請求の範囲で規定された通りである。

20

【0 1 1 2】

請求項において、「a」、「an」、「the」、「」などの冠詞は、逆が示されない限り、または別様に文脈から明白でない限り、1または1以上を意味してもよい。逆が示されない限り、または別様に文脈から明白でない限り、群のメンバーの1以上の間の「または」を含む請求項または記載は、群のメンバーの1、1以上、または全てが、与えられた生成物またはプロセス中で存在するか、用いられるか、または別様に関連する場合に、満足され则认为られる。本発明は、群のちょうど1つのメンバーが、与えられた生成物またはプロセス中で存在するか、用いられるか、または別様に関連する、実施形態を含む。本発明は、群の1以上またはすべてのメンバーが、与えられた生成物またはプロセス中で存在するか、用いられるか、または別様に関連する、実施形態をも含む。

30

【0 1 1 3】

さらにその上、本発明が、1以上の請求項からの、または記載の関連のある部分からの、1以上の限定、要素、個条、記述用語などが、別の請求項に導入される、すべてのバリエーション、組み合わせ、順列を包含することが、理解されるべきである。例えば、別の請求項に従属するいかなる請求項も、同じ基礎請求項に従属する他のいずれかの請求項に見つかる1以上の限定を含むように修飾されることができる。さらにその上、別様に示されない限り、または当業者に、矛盾または不一致が生じることが明らかでない限り、該請求項が、組成物を詳述する場合、本明細書に開示の目的のいずれかのための組成物を使用する方法が含まれ、および、本明細書に開示の作成方法または当該技術分野において公知の他の方法のいずれかに従う組成物を作る方法が含まれるということが理解されるべきである。

40

【0 1 1 4】

例として、マーカッシュ群形式で、要素がリストとして提示される場合、要素の各サブグループも開示され、そして、いかなる要素も、群から取り除かれることができるということが、理解されるべきである。用語「含む」が、追加の要素またはステップを含むことに自由でありそれを許すことが意図されることにも注意すべきである。一般に、本発明、または本発明の側面が、特定の要素、特色、ステップ等々を含むと言及される場合、本発明のある実施形態または本発明の側面が、かかる要素、特色、ステップ等々からなるか、

50

または本質的になることが、理解されるべきである。分かりやすさの目的のために、それらの態様は、本明細書中のこれらの言葉で、具体的に規定されなかった。よって、1以上の要素、特色、ステップ等々を含む本発明の態様ごとに、本発明は、それらの要素、特色、ステップ等々からなるか、または本質的になる実施形態も、提供する。

【0115】

範囲が与えられる場合には、エンドポイントが含まれる。さらにその上、別様に示されない限り、または文脈および／または当業者の理解から別様に明らかでない限り、範囲として表現される値は、文脈から明確に逆を指示しない限り、本発明の種々異なる実施形態において述べられている範囲の中で、該範囲の下限の単位の10分の1まで、いかなる具体的な値も、想定することができるということが理解されるべきである。別様に示されない限り、または文脈および／または当業者の理解から別様に明らかでない限り、範囲として表現される値は、与えられた範囲の中で、部分範囲のエンドポイントが該範囲の下限の単位の10分の1と同じ正確度まで表現されるいかなる部分範囲も、想定することができるということが理解されるべきである。

【0116】

加えて、本発明のいかなる特定の態様も、1以上のいずれかの請求項から明確に除外されてもよいということが理解されるべきである。範囲が与えられている場合、該範囲の中のいかなる値も、いずれか1以上の請求項から、明確に除外されてもよい。本発明の組成物および／または方法のいかなる態様、要素、特色、適用、または側面も、1以上のいずれかの請求項から除外されることができる。簡潔さの目的のために、1以上の要素、特色、目的、または側面が除外される実施形態の全てが、本明細書に明確に規定されるというわけではない。

【図1】

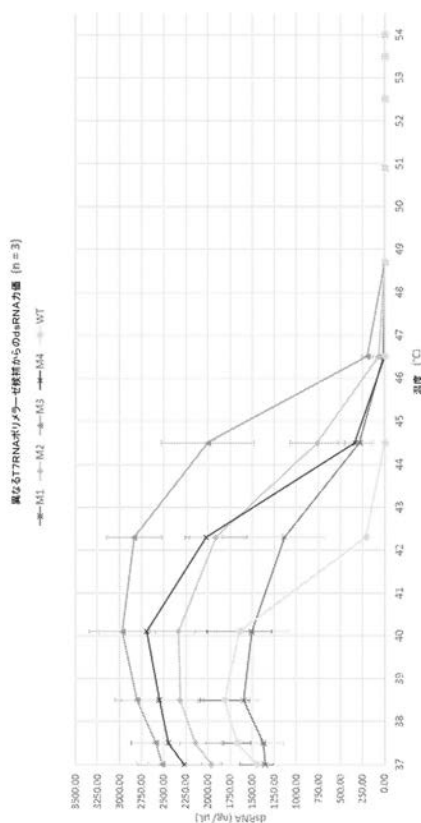


図1

【図2】

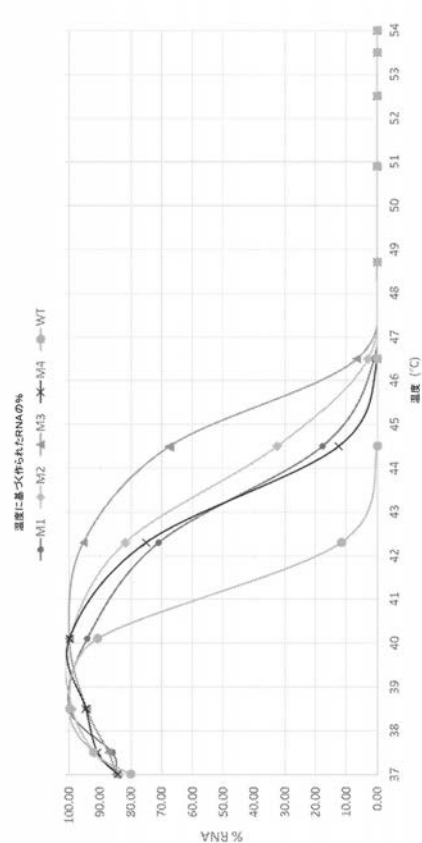


図2

【配列表】

2021520815000001.app

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/123748 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS INC [US]; ONG JENNIFER [US] ET AL.) 20 July 2017 (2017-07-20) page 12 - page 13 sequences 52-70 figures 3-5	1,3,5
A	----- WO 01/66705 A1 (AKZO NOBEL NV [NL]; SUGIYAMA AKIO [JP] ET AL.) 13 September 2001 (2001-09-13) example 4 table 2 example 5; table 1 ----- -/--	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

X See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 May 2019

Date of mailing of the international search report

03/06/2019

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer _____

Voigt-Ritzer, Heike

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/026561

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2 377 928 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 19 October 2011 (2011-10-19) paragraph [0024]; example 5; table 4 example 1; table 1 -----	1-23
A	ADAM J. MEYER ET AL: "Transcription yield of fully 2'-modified RNA can be increased by the addition of thermostabilizing mutations to T7 RNA polymerase mutants", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 43, no. 15, 3 September 2015 (2015-09-03), pages 7480-7488, XP55422628, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkv734 abstract page 7483, column 1, paragraph 3 figures 2-3 page 7486, column 1 -----	1-23
A	DATABASE EMBL [Online] ----- 11 November 2008 (2008-11-11), Lingohr R.J. et al: "RNA polymerase [Kluyvera phage Kvp1]", XP002791371, Database accession no. ACJ14548 sequence -----	1-23
A	DATABASE EMBL [Online] ----- 15 April 2005 (2005-04-15), Pajunen M.I. et al.: "RNA polymerase [Yersinia phage phiYe03-12]", XP002791372, Database accession no. CAB63592 sequence -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/026561

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 2017123748	A1	20-07-2017	CN	108779446 A	09-11-2018
			EP	3402881 A1	21-11-2018
			US	2017247670 A1	31-08-2017
			WO	2017123748 A1	20-07-2017

WO 0166705	A1	13-09-2001	AT	294855 T	15-05-2005
			AU	3742501 A	17-09-2001
			CA	2400049 A1	13-09-2001
			DE	60110564 T2	19-01-2006
			EP	1261696 A1	04-12-2002
			ES	2242733 T3	16-11-2005
			JP	4832694 B2	07-12-2011
			JP	2003525627 A	02-09-2003
			US	2003175738 A1	18-09-2003
			WO	0166705 A1	13-09-2001

EP 2377928	A2	19-10-2011	CA	2737014 A1	16-10-2011
			CN	102220294 A	19-10-2011
			EP	2377928 A2	19-10-2011
			HK	1163165 A1	02-10-2015
			JP	5851709 B2	03-02-2016
			JP	2011224002 A	10-11-2011
			US	2011256589 A1	20-10-2011
			US	2016032260 A1	04-02-2016
			US	2016032261 A1	04-02-2016

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ジェイン, ラシト

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02155、メドフォード、リバーズ エッジ ドライブ
100、ユニット 221

Fターム(参考) 4B050 CC04 DD02 FF01 KK07 KK11 LL05