

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5808882号
(P5808882)

(45) 発行日 平成27年11月10日 (2015.11.10)

(24) 登録日 平成27年9月18日 (2015.9.18)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 24 (全 101 頁)

(21) 出願番号	特願2008-557434 (P2008-557434)	(73) 特許権者	598128421
(86) (22) 出願日	平成19年3月5日 (2007.3.5)		カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー
(65) 公表番号	特表2009-528824 (P2009-528824A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 91125, パサデナ, イースト カリフォルニア ブールバード 1200, エム/シー 6-32
(43) 公表日	平成21年8月13日 (2009.8.13)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/005581	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開番号	W02007/103307		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成19年9月13日 (2007.9.13)	(74) 代理人	100118773
審査請求日	平成22年3月2日 (2010.3.2)		弁理士 藤田 節
審査番号	不服2013-7939 (P2013-7939/J1)	(74) 代理人	100122389
審査請求日	平成25年4月30日 (2013.4.30)		弁理士 新井 栄一
(31) 優先権主張番号	60/779,375	(74) 代理人	100111741
(32) 優先日	平成18年3月3日 (2006.3.3)		弁理士 田中 夏夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/779,376		
(32) 優先日	平成18年3月3日 (2006.3.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子へのアミノ酸の部位特異的な組み込み

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変酵母フェニルアラニル tRNA シンテターゼ (PheRS) をコードするポリヌクレオチドを含有する第一ベクターを含む組成物であって、該改変 PheRS は、配列番号 3 のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの、(i) アミノ酸配列位置 412、415 および 437 ; または、(ii) アミノ酸配列位置 412、415、418 および 437 にて突然変異されたものであり、そして該改変 PheRS は、tRNA 分子に非天然アミノ酸をチャージすることができる、組成物。

【請求項 2】

改変 tRNA 分子をコードするポリヌクレオチドを含有する第二ベクターをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

前記第一ベクターおよび前記第二ベクターが、同じベクターである、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記第一ベクターおよび前記第二ベクターが、異なるベクターである、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 tRNA が、天然 tRNA の親和性より大きい親和性で、対応するウォブル縮重コドンと塩基対形成する突然変異アンチコドンを含有するように改変される、請求項 2 ~ 4

20

のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

改変酵母フェニルアラニル tRNA シンテターゼ (P h e R S) を含むポリペプチドであって、ここで、該改変 P h e R S は、配列番号 3 の ポリヌクレオチド によってコードされるポリペプチドの、(i) アミノ酸配列位置 4 1 2、4 1 5 および 4 3 7 ; または、(i i) アミノ酸配列位置 4 1 2、4 1 5、4 1 8 および 4 3 7 にて突然変異されたものであり、そして該改変 P h e R S は、tRNA 分子に 非天然 アミノ酸をチャージすることができる、ポリペプチド。

【請求項 7】

改変酵母フェニルアラニル tRNA シンテターゼ (P h e R S) をコードするポリヌクレオチドを含む翻訳系であって、ここで、該改変 P h e R S は、配列番号 3 の ポリヌクレオチド によってコードされるポリペプチドの、(i) アミノ酸配列位置 4 1 2、4 1 5 および 4 3 7 ; または、(i i) アミノ酸配列位置 4 1 2、4 1 5、4 1 8 および 4 3 7 にて突然変異されたものであり、そして該改変 P h e R S は、tRNA 分子に 非天然 アミノ酸をチャージすることができる、翻訳系。

10

【請求項 8】

前記翻訳系が、宿主細胞を含む、請求項 7 に記載の翻訳系。

【請求項 9】

改変 tRNA 分子をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 7 または 8 に記載の翻訳系。

20

【請求項 10】

前記 tRNA が、天然 tRNA の親和性より大きい親和性で、対応するウォブル縮重コドンと塩基対形成する突然変異アンチコドンを含むように改変される、請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の翻訳系。

【請求項 11】

前記改変 tRNA が A A A アンチコドンを装備した tRNA ^{P h e} である、請求項 10 に記載の翻訳系。

【請求項 12】

前記改変 P h e R S および／または前記改変 tRNA 分子が、前記宿主細胞とは異なる生物に由来する、請求項 8 に記載の翻訳系。

30

【請求項 13】

前記改変 tRNA 分子が、真核細胞に由来し、前記宿主細胞が、原核細胞である、請求項 12 に記載の翻訳系。

【請求項 14】

前記宿主細胞が、栄養素要求株である、請求項 8 に記載の翻訳系。

【請求項 15】

1 種以上の 非天然 アミノ酸を含む培養培地をさらに含む、請求項 7 ～ 14 のいずれか一項に記載の翻訳系。

【請求項 16】

標的ポリペプチドの 1 つ以上の指定位置に少なくとも 1 つの 非天然 アミノ酸を組み込む方法であって、該方法が、

40

少なくとも 1 つの 非天然 アミノ酸を含む翻訳系を提供する工程；

該翻訳系に、1 つ以上の改変酵母フェニルアラニル tRNA シンテターゼ (P h e R S) を提供する工程であって、ここで、該改変 P h e R S は、配列番号 3 の ポリヌクレオチド によってコードされるポリペプチドの、(i) アミノ酸配列位置 4 1 2、4 1 5 および 4 3 7 ; または、(i i) アミノ酸配列位置 4 1 2、4 1 5、4 1 8 および 4 3 7 にて突然変異されたものであり、そして該改変 P h e R S は、tRNA 分子に 非天然 アミノ酸をチャージすることができる、工程；

目的とする標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを該翻訳系に提供する工程；および

50

該目的とする標的ポリペプチドを翻訳させて、これによって、該標的ポリペプチドに少なくとも1つの非天然アミノ酸を組み込む工程；
を含む、方法。

【請求項17】

前記tRNA分子が、天然tRNAの親和性より大きい親和性で、対応するウォブル縮重コドンと塩基対形成する突然変異アンチコドンを含むように改変される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記翻訳系が宿主細胞を含み、前記tRNA分子が改変されており、ここで、前記改変PheRSおよび／または前記改変tRNA分子が該宿主細胞とは異なる生物に由来する、請求項16または17に記載の方法。

10

【請求項19】

前記改変PheRSが、アミノ酸配列位置412、位置415、および、位置437にて突然変異されたものである、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物、請求項6に記載のポリペプチド、または、請求項7～15のいずれか一項に記載の翻訳系。

【請求項20】

前記改変PheRSが、アミノ酸配列位置412、位置415、位置418、および、位置437にて突然変異されたものである、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物、請求項6に記載のポリペプチド、または、請求項7～15のいずれか一項に記載の翻訳系。

20

【請求項21】

前記ポリペプチドの特定の位置に非天然アミノ酸を組み込むために前記改変PheRSがアンバー終止コドンを利用する、請求項1に記載の組成物、請求項6に記載のポリペプチド、または、請求項7に記載の翻訳系。

【請求項22】

前記改変PheRSが、アミノ酸配列位置412、位置415、および、位置437にて突然変異されたものである、請求項16～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記改変PheRSが、アミノ酸配列位置412、位置415、位置418、および、位置437にて突然変異されたものである、請求項16～18のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項24】

前記ポリペプチドの特定の位置に非天然アミノ酸を組み込むために前記改変PheRSがアンバー終止コドンを利用する、請求項16に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の参照)

本願は、米国仮特許出願第60／779, 375号(2006年3月3日出願)、および米国仮特許出願第60／779, 376号(2006年3月3日出願)(これらの内容全体は、本明細書に参考として援用される)の出願日の利益を主張する。

40

【0002】

(政府の権利に関する記載)

本発明は、NIHから授与された交付番号GM62523での連邦政府支援を受けて行った。合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

タンパク質工学は、天然タンパク質の構造的触媒および結合特性を改変するための、ならびに人工タンパク質の新規設計のための強力なツールである。タンパク質工学は、所望

50

のタンパク質配列に突然変異体アミノ酸を組み込む有効な認識メカニズムに依存する。このプロセスは、組成および構築の正確な制御を伴う新規高分子の設計に非常に有用とされてきたが、突然変異誘発が20の天然アミノ酸に限定されるという大きな限界がある。しかし、非天然アミノ酸の組み込みによってタンパク質工手法の範囲および影響力を拡大できることが次第に明らかになってきている。

【0004】

多種多様な新規官能基を有する非天然アミノ酸が、世界的に、残基特異的置換または組換えタンパク質への組み込みに代わってきた。タンパク質への非カノニカルアミノ酸の生合成同化は、主として、自然発生アミノ酸の類似体を利用する野生型合成器官の能力を活用することによって達成されている（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4；非特許文献5）。しかし、非天然アミノ酸による単一部位置換または組み込みが求められる状況がある。こうした方法論は、目的とする特定の構造または機能特性を実現するタンパク質（アミノ酸のサイズ、酸性度、求核性、水素結合または疎水性など）のテーラリングを可能にするであろう。タンパク質にそうしたアミノ酸を部位特異的に組み込む能力は、タンパク質機能の探査と新たな特性を有するタンパク質の生成の両方のためにタンパク質の構造を合理的に且つ系統的に操作する能力を大きく拡大するであろう。例えば、重原子を含有する大量のタンパク質を合成する能力は、タンパク質構造決定を助長するであろうし、生細胞におけるタンパク質に蛍光体または光開裂性の基を部位特異的に置換する能力は、タンパク質機能をインビボで研究するための強力なツールとなるであろう。

【0005】

近年、幾つかの研究所が、アンバーまたは4塩基コドンに応じて、それぞれ、ナンセンスサプレッサーまたはフレームシフトサプレッサー tRNA のいずれかを使用してタンパク質に非カノニカルアミノ酸を組み込むことにより、多数の遺伝子コード化アミノ酸に関する増幅を遂行した（非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10；非特許文献11）。こうした方法は、野生型ペプチド合成を正常に終了させるであろうコドン位置に非カノニカルアミノ酸を挿入する（例えば、停止コドンまたはフレームシフト突然変異）。これらの方法は、新規アミノ酸の単一部位挿入には十分に役立っている。しかし、（残基特異的に対して）多部位位置特異的置換または組み込みの際のそれらの有用性は、あまりよくない（20～60%）抑制効率により制限される（非特許文献12；非特許文献13；非特許文献14）。これは、実際一部は、高すぎる停止コドン抑制効率が、生物の一部の非標的タンパク質の正常な翻訳停止に干渉するであろうからである。一方、低い抑制効率は、標的タンパク質における1つより多くのナンセンスまたはフレームシフト突然変異部位を抑制するためには不十分である可能性が高いので、完全長タンパク質の合成、組み込む非カノニカルアミノ酸が多いほど困難にまたは非現実的になるであろう。

【0006】

効率的な多部位組み込みは、例えば、基質特異性が緩和されたまたは編集活性が改変されたアミノアシル-tRNA シンテターゼを使用することによる栄養要求性 *E. coli* (*Escherichia coli*) 株における天然アミノ酸の置換によって遂行された（非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17；非特許文献5；非特許文献18；非特許文献19；非特許文献20）。この方法は、多部位での類似体の効率的な組み込みをもたらすが、新規アミノ酸が天然アミノ酸の1つとコドンを「共有」しなければならないという制限を受ける。従って、天然アミノ酸と新規アミノ酸の両方を挿入することができるいずれの所与のコドン位置についても、組み込みの確率以外、どのアミノ酸が最終的に組み込まれることとなるのかは比較的少ししか制御できない。これは、望ましくないことであり得る。設計作製される酵素またはタンパク質について、意図していない部位での非カノニカルアミノ酸の組み込みは、そのタンパク質の機能を予想外に損なわせることがあり、そしてまた、計画された部位での非カノニカルアミノ酸の組み込みに失敗すると、計画された目標に到達することができないであろうからである。

【0007】

一般に、多部位置換法は、実施が比較的簡単であるが、そのタンパク質全体にわたって特定の天然アミノ酸に対応するすべての部位が置換される。天然および非天然アミノ酸の組み込み度も様々であり得る。さらに、類似体の多部位組み込みは、細胞を利用する場合、毒性を生じることが多く、このことが生細胞における突然変異体タンパク質の研究を難しくしている。本発明は、タンパク質におけるアミノ酸の部位特異的突然変異を可能にすることにより、これらの困難を克服する。

【0008】

本明細書に開示する一定の実施形態は、遺伝子コードの縮重の破壊に基づくタンパク質への代替アミノ酸（自然発生アミノ酸、または非標準的もしくは非カノニカルアミノ酸を含む）の新規組み込み技術を提供する。具体的には、本明細書における一定の実施形態は、タンパク質への非天然アミノ酸の高忠実度位置特異的置換または組み込みを可能にする。

【非特許文献1】Budisa, Eur. J. Biochem, 1995年, 第230巻, p. 788-796

【非特許文献2】Deming, J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem., 1997年, A34, p. 2143-2150

【非特許文献3】Dewel, Biochemistry, 1997年, 第36巻, p. 3404-3416

【非特許文献4】van HestおよびTirrell, FEBS Lett, 1998年, 第428巻(1-2), p. 68-70

【非特許文献5】Sharmaら, FEBS Lett, 2000年, 第467巻(1), p. 37-40

【非特許文献6】Bainら, J. Am. Chem. Soc., 1989年, 第111巻, p. 8013

【非特許文献7】Norenら, Science, 1989年, 第244巻, p. 182

【非特許文献8】Furter, Protein Sci., 1998年, 第7巻, p. 419

【非特許文献9】Wangら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003年, 第100巻, p. 56

【非特許文献10】Hohsakaら, FEBS Lett., 1994年, 第344巻, p. 171

【非特許文献11】KowalおよびOliver, Nucleic Acids Res., 1997年, 第25巻, p. 4685

【非特許文献12】Andersonら, J. Am. Chem. Soc., 2002年, 第124巻, p. 9674

【非特許文献13】Bainら, Nature, 1992年, 第356巻, p. 537

【非特許文献14】Hohsakaら, Nucleic Acids Res., 2001年, 第29巻, p. 3646

【非特許文献15】WilsonおよびHatfield, Biochim. Biophys. Acta, 1984年, 第781巻, p. 205

【非特許文献16】KastおよびHennecke, J. Mol. Biol., 1991年, 第222巻, p. 99

【非特許文献17】Ibbara, Biochemistry, 1994年, 第33巻, p. 7107

【非特許文献18】TangおよびTirrell, Biochemistry, 2002年, 第41巻, p. 10635

【非特許文献19】Dattaら, J. Am. Chem. Soc., 2002年, 第124巻, p. 5652

【非特許文献20】Doringら, Science, 2001年, 第292巻, p. 5

01

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の簡単な概要)

本明細書に開示する一定の実施形態は、外的突然変異体アミノアシル tRNA 分子、外的突然変異体アミノアシルー tRNA シンテターゼ (AARS) 分子、またはこれらのペア、ならびに該ペアの個々の成分を含む、タンパク質生合成機構において使用される成分の組成物に備えるものである。中でも本明細書において開示するように、外的突然変異体分子は、

10

非天然アミノ酸をはじめとするアミノ酸をポリペプチドまたはタンパク質に組み込むことができる、外的突然変異体 tRNA、外的突然変異体アミノアシルー tRNA シンテターゼ、およびそれらのペアを生成および選択するための方法も提供する。特定の実施形態の一定の組成物は、新規外的突然変異体 tRNA または外的突然変異体アミノアシルー tRNA シンテターゼ対を含む。新規外的突然変異体 tRNA 分子、AARS 分子、または AARS-tRNA ペアを使用して、ポリペプチドに非天然アミノ酸をインビトロおよびインビボで組み込むことができる。本発明の他の実施形態は、外的突然変異体ペアの選択を含む。

【0010】

本発明の一部の組成物は、外的突然変異体アミノアシルー tRNA シンテターゼを含み、この場合、該外的突然変異体 tRNA シンテターゼは、非天然アミノ酸で外的突然変異体 tRNA を、場合によってはインビボで、優先的にアミノアシル化する。1つの実施形態において、外的突然変異体シンテターゼをコードする核酸もしくはポリヌクレオチド、またはそれらの相補核酸配列を提供する。

20

【0011】

従って、一定の実施形態は、改変アミノアシル tRNA シンテターゼ (AARS) をコードするポリヌクレオチドを含有する第一ベクターを含む組成物を含み、この場合、該ポリヌクレオチド改変シンテターゼは、tRNA 分子と対形成すべきアミノ酸との相互作用に必要なアミノ酸結合領域をコードする1つ以上のコドンにて突然変異され、そして該改変シンテターゼは、tRNA 分子に非天然アミノ酸をチャージすることができる。一部の実施形態において、前記結合領域は、30個以下、20個以下、15個以下、10個以下または5個以下の連続したアミノ酸残基を含む。少なくとも1つの実施形態において、前記改変 AARS は、改変 PheRS、改変 TrpRS、改変 TyrRS および改変 MetRS からなる群より選択される。前記 AARS が改変 PheRS である一部の実施形態において、該 PheRS は、アミノ酸配列位置番号 412、415、418 および 437 からなる群より選択されるアミノ酸配列位置にて突然変異される。前記改変 AARS が改変 TrpRS である少なくとも1つの実施形態において、該 TrpRS は、アミノ酸配列位置番号 4、5、7、132、133、141 および 143 からなる群より選択されるアミノ酸位置にて突然変異される。前記改変 AARS が改変 MetRS である一部の実施形態において、該 MetRS は、アミノ酸配列位置番号 13 にて突然変異される。

30

40

【0012】

少なくとも1つの実施形態は、tRNA 分子をコードするポリヌクレオチドを含有する第二ベクターをさらに含む。少なくとも1つの実施形態において、前記第一ベクターおよび前記第二ベクターは、同じベクターである。他の実施形態において、前記第一ベクターおよび前記第二ベクターは、異なるベクターである。

【0013】

少なくとも1つの実施形態において、前記 tRNA は、内在性であり、および少なくとも1つの実施形態において、前記 tRNA は、改変される。少なくとも1つの実施形態において、前記 tRNA は、天然 tRNA の親和性より大きい親和性で対応するウォブル縮重コドンと塩基対形成する突然変異アンチコドンを含むように改変される。一部の実

50

施形態において、前記AARSおよびtRNAは、同じかまたは異なる生物からのものである。少なくとも1つの実施形態において、前記非天然アミノ酸は、アジドノルロイシン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、p-エチニルフェニルアラニン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、m-エチニルフェニルアラニン、6-エチニルトリプトファン、5-エチニルトリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロール-3-イル)プロパン酸、p-プロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、p-アジドフェニルアラニン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-ブロモインドリル)アラニン、3-(5-ブロモインドリル)アラニン、アジドホモアラニン、およびp-クロロフェニルアラニンからなる群より選択される。

10

【0014】

本明細書に開示する他の実施形態は、改変アミノアシルtRNAシンテターゼ(AARS)を含むポリペプチドを含み、この場合、該改変シンテターゼは、tRNA分子と対形成すべきアミノ酸との相互作用に必要なアミノ酸結合領域内の1つ以上のコドンにて突然変異され、そして該改変シンテターゼは、tRNA分子に非天然アミノ酸をチャージすることができる。少なくとも1つの実施形態において、前記結合領域は、30個以下、20個以下、15個以下、10個以下または5個以下の連続したアミノ酸残基を含む。

【0015】

少なくとも1つの実施形態において、前記改変AARSは、改変PheRS、改変TrpRS、改変TyrRSおよび改変MetRSからなる群より選択される。前記改変AARSが改変PheRSである一部の実施形態において、該PheRSは、アミノ酸配列位置番号412、415、418および437からなる群より選択されるアミノ酸配列位置にて突然変異される。前記改変AARSが改変TrpRSである少なくとも1つの実施形態において、該TrpRSは、アミノ酸配列位置番号4、5、7、132、133、141および143からなる群より選択されるアミノ酸位置にて突然変異される。前記改変AARSが改変MetRSである一部の実施形態において、該MetRSは、アミノ酸配列位置番号13にて突然変異される。

20

【0016】

一定の実施形態は、改変アミノアシルtRNAシンテターゼ(AARS)をコードするポリヌクレオチドを含む翻訳系を含み、この場合、該ポリヌクレオチド改変シンテターゼは、tRNA分子と対形成すべきアミノ酸との相互作用に必要なアミノ酸結合領域をコードする1つ以上のコドンにて突然変異され、そして該改変シンテターゼは、tRNA分子に非天然アミノ酸をチャージすることができる。少なくとも1つの実施形態において、前記系は、宿主細胞を含む。少なくとも1つの実施形態において、前記改変アミノアシルtRNAシンテターゼは、宿主細胞とは異なる生物に由来する。もう1つの実施形態において、前記翻訳系は、改変tRNA分子をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。

30

【0017】

一定の実施形態において、前記改変tRNA分子は、宿主細胞とは異なる生物に由来する。一定の実施形態において、前記改変tRNA分子は、真核細胞に由来し、前記宿主細胞は、原核細胞である。さらに他の実施形態において、前記細胞は、栄養素要求株である。

40

【0018】

一部の実施形態において、前記翻訳系は、1種以上の非天然アミノ酸を含有する培養基をさらに含む。さらに他の実施形態において、前記1種以上の非天然アミノ酸は、アジドノルロイシン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、p-エチニルフェニルアラニン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、m-エチニルフェニルアラニン、6-エチニルトリプトファン、5-エチニルトリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロール-3-イル)プロパン酸、p-プロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、p-アジドフェニルアラニン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-ブロモインドリル)アラニ

50

ン、3-(5-ブロモインドリル)アラニン、アジドホモアラニン、およびp-クロロフェニルアラニンからなる群より選択される。さらに他の実施形態において、前記改変AARSは、改変PheRS、改変TrpRS、改変TyrRSおよび改変MetRSからなる群より選択される。

【0019】

他の実施形態は、標的ポリペプチドの1つ以上の指定位置に非天然アミノ酸を組み込むための方法に関し、この方法は、

(1) ポリペプチドの1の指定位置での非天然アミノ酸の組み込みのための該ポリペプチドの構造変化を決定する工程；

(2) 翻訳系を提供する工程；

(3) 請求項1に記載の第一ポリヌクレオチド、またはそれによってコードされている改変AARS、を前記翻訳系に提供する工程；

(4) 非天然アミノ酸を前記翻訳系に提供する工程；

(5) 目的とするポリペプチドをコードするテンプレートポリヌクレオチドを前記翻訳系に提供する工程；および

(6) 前記テンプレートポリヌクレオチドの翻訳を可能にし、それによって目的とするポリペプチドの指定位置に非天然アミノ酸を組み込む工程を含む、

この場合、工程(1)～(4)は、任意の順序で実施される。

【0020】

一定の実施形態において、前記翻訳系は、細胞を含む。一定の実施形態において、工程(4)は、非天然アミノ酸を含有する溶液と前記翻訳系を接触させることによって実施される。少なくとも1つの実施形態において、前記改変AARSによる前記非天然アミノ酸の活性化についての特異性定数(K_{cat}/K_M)は、前記天然アミノ酸についてのものより少なくとも5倍大きい。一定の実施形態において、前記改変AARSは、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、6%以下、7%以下または8%以下の率でtRNAにミスチャージする。さらに他の実施形態において、前記tRNAは、改変tRNAである。一定の実施形態において、前記第一ポリヌクレオチドまたは前記第二ポリヌクレオチドは、tRNAまたはAARSの発現を制御する恒常的活性型プロモーター配列または誘導性プロモーター配列のいずれかをさらに含む。少なくとも1つの実施形態において、前記方法は、改変AARSを含有する細胞についてスクリーニングする工程をさらに含む。もう1つの実施形態において、前記方法は、非天然アミノ酸の組み込みを検証する工程をさらに含む。もう1つの実施形態において、前記改変AARSは、PheRS、TyrRS、TrpRSおよびMetRSからなる群より選択される。さらに他の実施形態は、この開示する方法によって作製されるポリペプチドを含む。

【0021】

本明細書に開示する一定の実施形態は、少なくとも1つの非天然アミノ酸を標的ポリペプチドの1つ以上の指定場所に組み込むための方法を含み、この方法は、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含有する翻訳系を提供する工程；改変PheRS、TyrRS、TrpRSおよびMetRSからなる群より選択される1つ以上の改変AARSを該翻訳系に提供する工程；目的とする標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを該翻訳系に提供する工程；および目的とする翻訳を可能にし、それによって少なくとも1つの非天然アミノ酸を該標的ポリペプチドに組み込む工程を含む。一定の実施形態は、この方法によって作製されるポリペプチドを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

(発明の詳細な説明)

タンパク質は、光合成および視力からシグナル伝達および免疫応答まで、実質的にすべての生物学的プロセスの岐路にある。非天然アミノ酸を含むタンパク質またはポリペプチドの改変が、人間の治療、農業、バイオ燃料および他の分野において使用される可能性

10

20

30

40

50

は大きい。

【0023】

アミノアシル-tRNAシンテターゼは、対応するトランスファーRNA分子によるタンパク質へのアミノ酸の組み込みのためのアミノアシル化反応を触媒する。シンテターゼ活性の正確な操作により、非カノニカルアミノ酸を所期のtRNAに安定して取り付けられるようにアミノアシル化特異性を改変することができる。その後、メッセンジャーRNA(mRNA)とtRNAの間のコドン-アンチコドン相互作用により、アミノ酸類似体を成長ポリペプチド鎖に送達することができる。従って、タンパク質への非天然アミノ酸の組み込みは、アミノアシル-tRNAシンテターゼ(AARS)のアミノ酸特異性の操作に依存する。

10

【0024】

アミノアシル-tRNAシンテターゼは、二段階アミノアシル化反応により遺伝子コード配列を生体機能性タンパク質に変換するように機能する。最初の段階として、同種アミノ酸をATPの存在下でAARSによって活性化して、アミノ酸アデニレートを形成し；その後、AARSが、そのエステル化反応を触媒して、そのアミノ酸を、その同種tRNAの末端リボヌクレオチドの2'-または3'-OHに連結させる。アミノアシル化反応が発生すると、そのアミノ酸は、チャージされたtRNAによって成長ポリペプチド鎖に向けられる。

【0025】

本明細書に開示する一定の実施形態は、突然変異体または改変アミノアシル-tRNAシンテターゼ(AARSまたはRS)分子(これらは、該シンテターゼと対応する天然アミノ酸の間の分裂に起因してその酵素がtRNA分子に代替アミノ酸、好ましくは非天然アミノ酸をチャージすることができるように、突然変異または改変されている)に関する。

20

【0026】

例えば、前記分裂は、ワトソン・クリック塩基対への干渉、ウォブル塩基対への干渉、または新規ウォブルもしくは他の塩基対の生成に起因し得る。

【0027】

一部の実施形態は、天然アミノ酸についてのtRNAの突然変異体または改変tRNAをコードするポリヌクレオチドに関し、この場合、該天然アミノ酸は、1つ以上のウォブル縮重コドンによってコードされ、該改変tRNAは、該ウォブル縮重コドンのうちの1つとワトソン・クリック塩基対を形成する改変アンチコドン配列を含む。好ましくは、前記改変tRNAは、天然アミノ酸についての内在性アミノアシル-tRNAシンテターゼ(AARS)によってチャージされない、または不十分にしかチャージされない。1つの実施形態において、多数の改変AARS分子を1つ以上のtRNA分子と併用することがある。1つの実施形態では、1つ以上の改変または突然変異AARS分子を1つ以上の天然tRNAと併用することがあり、その一方で、もう1つの実施形態では、1つの改変または突然変異AARSを1つの改変または突然変異tRNA分子と併用することがある。一定の実施形態では、改変AARS/tRNA分子の1つ以上のペアを利用することがある。一定の実施形態では、異種のペアを使用することがある。一定の実施形態において、1つ以上の改変または突然変異AARSおよび/またはtRNAが、同じ生物に由来することもあり、または異なる生物に由来することもある。

30

40

【0028】

一部の例示的实施形態において、特定のAARSは、代替アミノ酸(非天然アミノ酸を含む)をポリペプチドまたはタンパク質に組み込むために幾つかの方法を利用することがある。例えば、単一AARSは、ポリペプチドの特定の位置に代替アミノ酸(例えば、非天然アミノ酸)を組み込むために、ナンセンスコドン(例えば、アンバー停止コドン)を利用することがある。加えて、またはこの代わりに、ウォブルコドン(例えば、UUU)を、そのウォブルコドン部位にその代替アミノ酸を組み込むため使用することができよう(この例では、改変PheRSを使用する)。

50

【0029】

他の例示的实施形態では、多数の代替アミノ酸（例えば、2つの異なる非天然アミノ酸）を、様々な方法の使用により、ポリペプチドまたはタンパク質に組み込むことができる。例えば、1つの非天然アミノ酸をウォブル部位に組み込むことができ、その一方で、異なる非天然アミノ酸をアンバー停止コドンに組み込むことができる。一部の例示的实施形態において、多数の代替アミノ酸（非天然アミノ酸を含む）の組み込みは、任意のアミノ酸の多数の異なるアミノ酸類似体のために、または特定の自然発生アミノ酸の多数の異なるアミノ酸類似体すべてのために、1つのAARSを利用することを含む。従って、例えば、改変PheRSを使用して、同じポリペプチドまたはタンパク質に多数の異なるフェニルアラニン類似体、例えばプロモフェニルアラニンおよび／またはp-ヨードフェニルアラニン、を組み込むことができる。

10

【0030】

類似のアプローチは、異種シンターゼ、およびtRNA分子と同じ生物または関連生物の突然変異体開始tRNAの使用を含む（例えば、Kowalら、PNAS, 98, 2268 (2001) 参照）。

【0031】

一定の実施形態において、改変または突然変異RSは、野生型RS酵素または野生型の対応するアミノ酸と比較したとき、そのアミノ酸代替物への酵素の改変された結合特異性および／または改変された触媒事象で、（天然アミノ酸であろうと、非天然アミノ酸であろうと）所望のアミノ酸代替物と相互作用する。

20

【0032】

酵素反応速度、 k_{cat} は、全触媒経路において最も遅い段階に相当する一次速度定数である。この k_{cat} は、（酵素が、基質で「飽和」されている場合に発生する）単位時間当たりの酵素分子当たりの積に変換できる、基質の最大分子数を表し、従って、多くの場合、ターンオーバー数と呼ばれる。 K_m は、見掛けの解離定数であり、基質に対するその酵素の親和性に関する。これは、その経路における第一の非可逆的段階の前のすべての解離および平衡定数の積である。多くの場合、これは、酵素-基質解離定数の近似尺度である。 k_{cat}/K_m は、遊離酵素を指す（酵素-基質複合体でない）、および酵素触媒の全効率の尺度でもある、および特異性定数とも呼ばれる、二次速度定数である。

【0033】

30

一定の実施形態において、外的突然変異体シンターゼは、自然発生アミノ酸、例えば20の公知アミノ酸の1つ、と比較して非天然アミノ酸に対して改善または強化された酵素特性を有する（例えば、 K_m が、より高いまたはより低い、 k_{cat} が、より高いまたはより低い、 k_{cat}/K_m の値が、より高いまたはより高い、など）。非天然アミノ酸についての突然変異体または改変AARSの K_m は、好ましくは、対応する野生型天然アミノ酸についてのものと等しいか、それより低い。

【0034】

一定の実施形態において、RS変異体の k_{cat}/K_m 値は、自然発生アミノ酸についてのものより、3倍から、5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、385倍、400倍高い範囲にわたる。

40

【0035】

一定の実施形態において、改変tRNAとウォブル縮重コドンとは、好適にはその非改変バージョンとそのウォブル縮重コドンの間の相互作用より少なくとも 1.0 kcal/mol 、 1.5 kcal/mol 、 2.0 kcal/mol 、 2.5 kcal/mol 、 3.0 kcal/mol 、 3.5 kcal/mol 、 4.0 kcal/mol 、 4.5 kcal/mol 、 5.0 kcal/mol 、またはそれ以上の 37°C での親和性で、相互作用する。

【0036】

例えば、フェニルアラニン（Phe）は、2つのコドン、UUCおよびUUU、によってコードされる。両方のコドンは、アンチコドン配列GAAを備えている単一tRNAに

50

よって読み取られる。従って、UUCコドンは、コドンとアンチコドンの間の標準的ワトソン・クリック塩基対によって認識され；UUUは、そのアンチコドンの第一位置でのG-Uウォブル塩基対によって読み取られる（Crick, J. Mol. Biol. 19: 548, 1996; Soll and RajBhandary, J. Mol. Biol. 29: 113, 1967）。RNA二本鎖の末端変性は、37℃で、それぞれ4.1、6.5、6.3および2.6 kcal/molというG-U、G-C、A-UおよびA-Cの融解のギブス自由エネルギーの推定値を生じた。従って、ウォブル塩基対、G-Uは、ワトソン・クリック塩基対、A-Uより安定性が低い。AAAアンチコドンに装備した改変tRNA^{Phe} (tRNA^{Phe}_{AAA})がUUUコドンを読み取るように設計作製され、そうしたコドンを野生型tRNA^{Phe}_{GAA}より早く読み取ると予測された。

10

【0037】

一部の実施形態において、RSの結合ポケットは、改変されたRSが対応する自然発生アミノ酸より非天然アミノ酸に対して優先性を示すように改変される。好ましい実施形態において、RSは、RSとtRNAにチャージされるアミノ酸との構造的接触に必要な1つ以上のコドンにおいて改変される。一定の実施形態において、突然変異または改変のために選択される1つ以上のコドンは、コンピュータモデリングによって選択される。本開示に従って任意のRSを改変できるが、一定の実施形態は、フェニルアラニル-tRNAシンテターゼ (PheRS)、またはトリプトファン-tRNAシンテターゼ (TrpRS)に関する。一部の実施形態において、改変RSは、*Saccharomyces cerevisiae*、または別の真核細胞からのものである。他の実施形態において、改変RSは、*E. coli*または別の原核細胞からのものである。RSがPheRSである一定の実施形態において、酵素は、その酵素のアルファサブユニット内での点突然変異 (N412G)、(T415G)、(T415A)、(S418C)もしくは(S437F)、または別の種もしくは生物の相同タンパク質における同等の場所もしくは位置での突然変異を有する。前記点突然変異 (例えば、位置415でのTからGもしくはAへの突然変異、または位置418でのSからCへの突然変異、または位置412でのNからGへの突然変異、または位置437でのSからFへの突然変異)は、アミノアシル-tRNAシンテターゼ (RS)の結合ポケット領域内に位置する。

20

【0038】

一部の例示の実施形態において、種々の類似体とAARSについての代表的なKm値は、約15マイクロM、20マイクロM、30マイクロM、50マイクロM、75マイクロM、100マイクロM、150マイクロM、200マイクロM、300マイクロM、400マイクロM、440マイクロM、500マイクロM、1000マイクロM、1500マイクロM、2000マイクロM、3000マイクロM、4000マイクロM、5000マイクロM、6000マイクロMから、もしくはそれ以上の範囲、またはこの間の任意の値であり得る。

30

【0039】

同様に、そのアミノ酸類似体についての突然変異体AARSの k_{cat} 値は、好ましくは、天然アミノ酸についてのものと等しいか、それより高い。例えば、種々の類似体と対応するAARSについての k_{cat} 値は、約0.002秒⁻¹、0.0018秒⁻¹、0.015秒⁻¹、0.014秒⁻¹、0.1秒⁻¹、0.3秒⁻¹、1秒⁻¹、3秒⁻¹、5秒⁻¹、8秒⁻¹、10秒⁻¹、13.3秒⁻¹、15秒⁻¹から、またはそれより高い範囲であり得る。

40

【0040】

従って、アミノ酸類似体についての突然変異体AARSの k_{cat}/K_m は、最適には、天然野生型アミノ酸についてのものと等しいか、それより高い。代表的な k_{cat}/K_m 値は、約0.0001M⁻¹秒⁻¹、0.0003M⁻¹秒⁻¹、0.005M⁻¹秒⁻¹、0.05M⁻¹秒⁻¹、0.5M⁻¹秒⁻¹、5.47M⁻¹秒⁻¹、1M⁻¹秒⁻¹、5M⁻¹秒⁻¹、10M⁻¹秒⁻¹、20M⁻¹秒⁻¹、30M⁻¹秒⁻¹、32M⁻¹秒⁻¹、500M⁻¹秒⁻¹、600M⁻¹秒⁻¹、1000M⁻¹秒⁻¹、5000M⁻¹

50

秒⁻¹、11000M⁻¹秒⁻¹からの範囲であり得る。

【0041】

突然変異AARSの点突然変異は、一般に、結合ポケットに関連付けられるが、突然変異のために選択されるAARSのアミノ酸は、対応するtRNAをアミノアシル化することができる（従って、標的ポリペプチドまたはタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むことができる）任意のアミノ酸に改変することができる。

【0042】

一定の実施形態では、AARS点突然変異を、試験タンパク質／ポリペプチドへの組み込みに望ましい非天然アミノ酸の特性に依存して、任意のアミノ酸に改変することができる。一定の実施形態では、AARSの結合ポケット内のアミノ酸を、小さな側鎖を有するアミノ酸、脂肪族側鎖を有するアミノ酸、環状アミノ酸、ヒドロキシルまたは硫黄含有側鎖を有するアミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸（またはアミド）のためのコドンに突然変異させることができる。特定のポイントでAARSを突然変異させるためのアミノ酸の選択は常例的であり、所望される結果、および標的または試験ポリペプチド／タンパク質への組み込みに所望される非天然アミノ酸に依存する。例えば、AARS分子の結合ポケットを大きくすることが目標である場合には、AARSを突然変異させるために、脂肪族側鎖または小さな側鎖を有するアミノ酸を選択することができる。他の場合、荷電ポケットを収容する結合ポケットが所望される場合には、AARSの点突然変異のために塩基性または酸性アミノ酸を選択することができる。

【0043】

本明細書に開示する一定の実施形態は、少なくとも1つの点突然変異によって結合ポケット領域を突然変異させた任意の改変RS分子を含む。一定の実施形態において、前記点突然変異は、RSが（そのRSが、tRNA分子をアミノアシル化する、またはtRNA分子にチャージする）アミノ酸と接触する1つ以上の位置にある。一定の実施形態において、多数の点突然変異は、RSがアミノ酸と接触する多数の位置を含む。すなわち、一定実施形態では、RSの全結合ポケット領域の多数のもしくはすべてのコドンに突然変異もしくは改変することができ、またはRSの結合ポケット領域の1つ、2つ、3つ、4つもしくはそれ以上のコドンに突然変異もしくは改変することができる。一定の他の実施形態では、特定のRSとアミノ酸の間の構造的結合点に相当するそれぞれのコドンに突然変異または改変することができる。本明細書に開示するように、多数の異なるRS分子をその結合点において様々な種から改変または突然変異させられた。当業者が同じように他のRS相同分子を予想どおりに突然変異させるまたは改変することができる方法のガイダンスを提供する。本明細書に提供する一定の実施形態は、同様の方法で相同RS分子の結合点の改変および／または突然変異を可能にするだろう。従って、他のRS分子のそうした突然変異または改変は、本明細書に提供するガイダンスにかんがみて常例的実験であろう。

【0044】

一定の実施形態では、栄養要求宿主細胞または原栄養宿主細胞を含む翻訳系において、停止コドン（例えば、アンバー、オーカーもしくはオパールナンセンスコドン、特定の生物には存在しない停止コドン、任意のナンセンスコドン、4もしくは5塩基対コドン、またはタンパク質中に有意なレベルで存在しない別のアミノ酸、例えばメチオニン）の割当てを可能にするためにサプレッサーtRNAとともに改変RSを使用して、別のアミノ酸（アミノ酸類似体を含む）を組み込むことができる。従って、RS酵素は、不規則な基質特異性について、部位特異的様式でのポリペプチドへの非天然アミノ酸の組み込みを助長するように「再プログラム」することができる。一定の実施形態では、任意の芳香族非天然アミノ酸を、改変PheRSまたはTrpRSと併用することができる。この再プログラミングにより、栄養要求宿主細胞を使用してまたはせずに、アミノ酸（非天然アミノ酸を含む）をポリペプチドまたはタンパク質に高い忠実度で組み込むことができる。

【0045】

AARS酵素の再プログラミングは、コンピュータモデリングまたは配列アラインメントをはじめとする構造または生化学分析を必要とすることがある。多くのAARS分子に

についての配列情報を、例えばGenBankで、入手できるので、目的とする特定の配列領域が決定されたら、配列アラインメントの比較は常例の手順である。

【0046】

栄養要求宿主細胞の使用は、非天然アミノ酸の組み込みレベルを増加させることができ、または所望の非天然アミノ酸以外の別のアミノ酸の組み込みレベルを減少させることができる。例えば、前記宿主における野生型AARSの発現により細胞アミノアシル化反応性を向上させた後、本発明者らは、驚くべきことに、栄養要求宿主細胞が不在の状態でさえ、不活発なアミノ酸類似体の一部もタンパク質に導入され得ることを発見した。

【0047】

一定の実施形態において、1つ以上の改変または突然変異体AARS分子、1つ以上の改変または突然変異体tRNA分子、または両方の発現は、構成もしくは誘導性プロモーターまたは他の誘導性発現系によって調節することができる。

10

【0048】

本明細書に開示する一定の実施形態は、任意のタンパク質の任意の所望の位置での1つ以上の非天然アミノ酸の部位選択的挿入を可能にすることに関し、(ii)は、原核細胞と真核細胞の両方に適用可能であり、ならびに大量の精製突然変異体タンパク質の産生に加えてインビボでの突然変異体タンパク質の研究を可能にする。加えて、一定の実施形態は、多種多様な非天然アミノ酸のいずれかをインビボでタンパク質に組み込むことへの適応に関する。従って、特定のポリペプチド配列では、非天然アミノ酸の多数の異なる部位選択的挿入が可能である。こうした挿入は、場合によってはすべて同じタイプであり（例えば、1つのポリペプチドの多数のポイントに挿入される、1つ非天然アミノ酸タイプの多数の例）、または場合によっては異なるタイプである（例えば、異なる非天然アミノ酸タイプが、1つのポリペプチドの多数のポイントに挿入される）。

20

【0049】

本明細書に開示する1つの驚くべき結果は、AARS酵素の合成部位の再設計によって、ポリペプチドまたはタンパク質に代替アミノ酸（非天然アミノ酸を含む）を導入する能力を拡大することができることを示している。一定の実施形態において、AARSを改変または突然変異させる組成物および方法は、その改変または突然変異体AARSの編集機能の改変の場合によっては含むことがある。一定の実施形態において、前記改変または突然変異体AARSの編集または校正能力は、野生型（未改変）AARSのものとはほぼ等しい。他の実施形態において、前記改変または突然変異体AARSの編集または校正能力は、低減される。さらに他の実施形態において、前記改変または突然変異体AARSの編集または校正能力は、消去される。一定の実施形態において、AARSの編集または校正機能の改変は、代替アミノ酸を収容するためのAARSの改変（例えば、AARSの結合ポケットへの改変）に固有である。他の実施形態では、代替アミノ酸を収容するためのAARSの改変に加えて、編集または校正機能に対する改変を行うことができる。さらに他の実施形態において、AARSの編集または校正機能は、改変されない。従って、AARSの結合ポケットの改変または改変に加えて、改変AARSの校正または編集ドメインも改変して、（内在性tRNAであろうと、外的突然変異体tRNAであろうと）tRNAへの代替アミノ酸（非天然アミノ酸を含む）のアミノアシル化の特異性を増大させ、その上、形成し得る野生型アミノ酸-アデニレートの場合によっては加水分解し、結果として代替アミノ酸（非天然アミノ酸を含む）のポリペプチドまたはタンパク質への組み込みのより大きな忠実性または特異性を生じさせることができる。

30

40

【0050】

一定の実施形態において、非天然アミノ酸の組み込み率は、改変RSを利用すると、約65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上であった。

【0051】

特に、本明細書に開示するように、改変される正確なRSの結晶構造、または相同RS

50

の結晶構造を酵素－アミノ酸相互作用の分子モデリングのために用いて、RSと対応する自然発生アミノ酸との接点、および／またはRSとポリペプチドに組み込むことが望まれる選択された非天然アミノ酸との接点を決定することができる。例えば、本明細書における一定の実施形態では、フェニルアラニンと複合した*Thermophilus thermophilus* PheRSの結晶構造を*Saccharomyces cerevisiae* PheRSの分子モデリング設計のために用いた。これらのシンテターゼの活性部位領域における約40%の配列同一性のためである。位置415のトレオニンからグリジンまたはアラニンの突然変異（それぞれ、T415GまたはT415A）は、その活性化部位を拡大し、より大きなフェニルアラニン類似体の収容を可能にした。特定のRSに指定される自然発生アミノ酸とのワトソン・クリック塩基対を破断するこのような突然変異は、非天然アミノ酸の組み込みの特異性を増大させ、別のアミノ酸の誤った組み込みを減少させることができる。実施例および図に示すように、（T415）酵母フェニルアラニンアミノアシルtRNAシンテターゼ（PheRS）は、自然発生フェニルアラニンに対してよりプロモフェニルアラニンに対して、5倍の優先性を示した。従って、アミノアシルtRNAシンテターゼ分子（RS）を、所望のアミノ酸が、その特定のRSおよび所望のアミノ酸（非天然アミノ酸を含む）の特性に依存して2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上、優先的に組み込まれるように、改変することができる。

10

【0052】

もう1つの特定の実施形態において、TrpRS（トリプトファンアミノアシルtRNAシンテターゼ）活性部位は、一般に、嵩高い非天然アミノ酸を収容することができ、他の特定の点突然変異は、アミノ酸組み込みに関するさらなる特異性を可能にすることができる。例えば、TrpRSの位置132におけるDの点突然変異によって疎水性アミノ酸に改変することができ、これが、嵩高い非天然アミノ酸（例えば、フェニルアラニン誘導アミノ酸）の組み込みを可能にする。さらに、認識が非天然アミノ酸の特定に官能基に対して発生する場所の結合部位における他の特定の位置での突然変異は、所望のアミノ酸（非天然アミノ酸を含む）の組み込みの特異性増大および／またはより高い忠実度を可能にし得る。

20

【0053】

1つの特定の実施形態において、結合したPheのアリール環のパラ位周辺の空間は、Trpなどの他の芳香族アミノ酸を中に入れないが、pBrFなどの非天然アミノ酸を尚、収容するように、わずかに減少させることができることが判明した。従って、1つの実施形態は、エチレンまたはアセチレン反応パートナーとのパラジウム触媒交叉カップリングにより化学選択的ライゲーションをもたらすことによる、ポリペプチドへのプログラムされた位置での臭化アリール官能基の組み込みを開示する。こうした再プログラムまたは改変されたRSは、任意の数の宿主（栄養要求宿主細胞を含む）において用いることができるが、一定の実施形態の改変RSの所望のアミノ酸の高い組み込み効率レベル、ならびに高いタンパク質生産収率は、栄養要求宿主の使用を不要にする。

30

【0054】

ほぼすべてのアミノ酸シンテターゼについての活性部位領域は判っているか、容易に導出されるので、自然発生アミノ酸から非天然アミノ酸までアミノ酸の特異性を再プログラムしようとする際、成功を期待して、および過度の実験を伴わずに、そうした例示的技法を他のAARSに適用することができる。

40

【0055】

実例となる例として、酵母PheRSにおける位置415のトレオニンは、*E. coli* PheRSにおけるトレオニン251に相当する。従って、酵母PheRS（T415G）の突然変異は、様々なPhe類似体の活性化を可能にする（本明細書における実施例参照）。さらに、点突然変異および／または栄養要求宿主細胞の使用により、T415G酵母PheRS変異体における誤った組み込みを減少させることができた。

【0056】

50

本明細書に開示するもう1つの特定の実施形態において、アミノ酸位置30とアミノ酸位置40の間のワトソン・クリック塩基対を破断する突然変異体酵母トランスファーRNA (y tRNA^{Phe}_{CUA}) に、共発現酵母フェニルアラニンによって、p-ブロモフェニルアラニン (pBrF) をチャージした。一定の実施形態において、AARSのアミノ酸結合ポケットは、約200、約100、約75、約50、約25、約10、約5またはそれ以上もしくは以下のアミノ酸を構成する。一部の実施形態において、活性または結合部位において突然変異されるアミノ酸は、連続したアミノ酸ストレッチである。他の実施形態において、突然変異されるアミノ酸は、互いにきわめて接近して位置するが、連続していない。

【0057】

10

一定の実施形態において、天然アミノ酸は、2つ以上の遺伝子コードによってコードされる（従って、縮重遺伝子コードによってコードされる）。すべての場合ではないかもしれないが、ほとんどの場合、これは、20個の天然アミノ酸のうち、MetおよびTrpを除く、18個を含む。これらの状況下、天然アミノ酸についてのすべての縮重遺伝子コードを認識するために、野生型tRNAのアンチコドンループは、ウォブル塩基対と純粋なワトソン・クリック塩基対の両方に頼る。本改変tRNAは、改変されたアンチコドンループが、前はウォブル塩基対だけでそのtRNAが結合していた縮重遺伝子コードの1つへのワトソン・クリック塩基対を今や形成するような少なくとも1つの改変を、そのアンチコドンループに有する。

【0058】

20

ワトソン・クリック塩基対は、ウォブル塩基対より常に強く、安定であるので、本改変tRNAは、前のウォブル塩基対遺伝子コード（今やワトソン・クリック塩基対による）に、前のワトソン・クリック塩基対（今やウォブル塩基対による）より優先的に結合するであろう。従って、類似体は、本コドンに、天然アミノ酸（これは、この問題のコドンによってコードされる天然アミノ酸と同じであってもよいし、なくてもよい）の類似体が改変tRNAにチャージされている場合、組み込むことができる。

【0059】

従って、一定の実施形態において、一定のアミノ酸類似体をMetまたはTrpについてのコドンに組み込むことが望ましい場合、天然アミノ酸についてのtRNA（例えば、Met tRNA、Trp tRNA、またはさらにPhe tRNAなど）を、MetまたはTrpコドンを認識するように改変することができる。このタイプのユニークな状況下、改変tRNAと天然tRNAの両方が、ワトソン・クリック塩基対によって同じ（単一の）遺伝子コードに結合しようと競合する。すべてではないが一部のコドンは、それらの天然アミノ酸を受け入れるであろうが、他のものは、改変tRNAによって担持されたアミノ酸類似体を受け入れることがある。他の要因、例えば、天然アミノ酸の存在度対類似体の存在度が、最終結果に影響を及ぼすこともある（本明細書に開示する実施例参照）。

30

【0060】

一定の好ましい実施形態において、改変tRNAは、任意の天然アミノ酸についての内在性アミノアシル-tRNAシンテターゼ（AARS）によってチャージされない、または不十分にしかチャージされないの、その改変tRNAは、天然アミノ酸ではなく、（排他的ではないにせよ）主としてアミノ酸類似体を担持する。本改変tRNAは、内在性AARSによって天然アミノ酸をチャージすることできる場合でも有用であり得る。

40

【0061】

一定の実施形態において、アミノ酸類似体がチャージされた改変tRNAは、その類似体-tRNAがリボソーム的に許容される複合体である、すなわち、そのtRNA-類似体複合体がインビボまたはインビトロ翻訳系における原核生物または真核生物リボソームによって許容され得る、ような総合的形狀およびサイズを有する。

【0062】

好ましくは、改変AARSは、改変tRNAに類似体をいずれの天然アミノ酸より特異

50

的にまたは優先的にチャージする。好ましい実施形態において、改変AARSによる類似体の活性化についての特異性定数 (K_{cat}/K_M と定義する) は、天然アミノ酸ものと同じであるか、それより少なくとも約2倍大きい、好ましくは、天然アミノ酸のものより約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上大きい。

【0063】

一定の実施形態において、改変tRNAは、翻訳効率増大のために第四の拡張アンチコドン部位での突然変異をさらに含む。

【0064】

拡張コドンの使用は、翻訳のフレームシフト抑制に基づく。4塩基コドンは、同じタンパク質に多数の非天然アミノ酸を挿入する可能性を有する。例えば、4重項UAGAは、13から16%の効率で、UCUAアンチコドンを有するtRNA^{Leu}により、解読され得る(例えば、Mooreら, J. Mol. Biol., 298:195 (2000) 参照)。単独の拡張コドンの使用は、拡張コドン内の3重項が全フレームシフト抑制と競合するので、最初の3塩基のフレーム内での読み過ぎなどの潜在的な問題を有する。場合により、レアコドンまたはナンセンスコドンに基づく拡張コドンは、他の望ましくない部位でのミスセンス読み過ぎおよびフレームシフト抑制を減少させることができる。しかし、これらの問題は、本明細書に開示する一部の実施形態に示すような拡張コドン/アンチコドンならびに改変AARSおよび/またはtRNAの使用で、克服することができる。

【0065】

従って、要約すると、代替アミノ酸(自然発生アミノ酸または非天然アミノ酸を含む)の組み込みのための突然変異体もしくは改変AARSおよび/または改変もしくは突然変異体tRNAによる本明細書に開示する方法での使用のために特定のコドンが確保される。こうした方法としては、停止(TAG)コドンを読み取るアンバー(amber)(オーカー、オパール(umber)、または他のサプレッサーtRNA)解読; コドンバイアスの原因である未使用tRNAを活用するバイアス解読; ウォブルコドン、および4塩基もしくは5塩基(またはそれ以上の)アンチコドンを使用する突然変異体「サプレッサー」tRNAを使用する拡張(4~5塩基またはそれ以上の)コドンを読み取る新たなtRNAを作るウォブル解読の使用が挙げられる。

【0066】

少なくとも1つの他の実施形態は、標的タンパク質の1つ以上の指定位置にアミノ酸類似体を組み込むための方法を提供し、この方法は、(1)ある環境に改変tRNA、すなわち本改変tRNA、のための第一の本ポリヌクレオチドを供給すること; (2)その環境に改変AARSをコードする第二の本ポリヌクレオチドを供給すること(この場合、該改変AARSは、該改変tRNAに類似体をチャージすることができる); (3)その環境にその類似体を供給すること; (4)標的タンパク質をコードするテンプレートポリヌクレオチドを供給すること(この場合、指定位置のための該テンプレートポリヌクレオチド上のコドンは、該改変tRNAとしかワトソン・クリック塩基対を形成しない); および(5)該テンプレートポリヌクレオチドの翻訳を進行させ、それによって該標的タンパク質の指定位置に該類似体を組み込むことを含み、前記工程(1)~(4)は、任意の順序で実施される。

【0067】

一定の実施形態において、前記方法は、例えば、質量分析法; タンパク質配列決定; 蛍光、放射活性などによるアミノ酸標識付け; ELISA、または他の抗体スクリーニング、機能的アッセイもしくはスクリーニング; あるいは他の方法によって、前記類似体の組み込みを検証することをさらに含む。

【0068】

一定の実施形態において、前記方法は、前記類似体を前記位置に少なくとも約50%、または60%、70%、80%、90%、95%、99%もしくはほぼ100%の効率で組み込む。

【0069】

(定義)

一定の実施形態を詳細に説明する前に、本発明が特定の組成物または生体系に限定されず、それらは、勿論、様々であることを理解しなければならない。本明細書で用いる専門用語が、特定の例証的实施形態の説明のみを目的とするものであり、限定するためのものではないことも理解しなければならない。本明細書および添付のクレームにおいて用いる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、その文脈が明瞭に別様に指示していない限り、多数の指示対象を含む。従って、例えば、「分子 (a molecule)」への言及は、2つ以上のそうした分子の組み合わせなどを場合によっては含む。

【0070】

下で特に定義されていなければ、本明細書において、本発明の全体的文脈の中で、およびそれぞれの用語が用いられている特定の文脈の中で用いる用語は、当該技術分野におけるそれらの通常の意味を一般に有する。本発明の組成物および方法、ならびにそれらをどのようにして作り、使用するかを説明する上で当業者に追加のガイダンスを提供するために、一定の用語を下または本明細書の別の箇所において論じる。ある用語のいずれの使用についての範囲および意味も、その用語が用いられている特定の文脈から明らかになる。

【0071】

「約」および「ほぼ」は、測定の性質または精度を想定して、測定された量についての許容される程度の誤差を一般に意味するであろう。一般に、誤差の例示的な程度は、所与の値または値範囲の20パーセント(%)以内、好ましくは10%以内、およびさらに好ましくは5%以内である。あるいは、および特に生体系では、用語「約」および「ほぼ」は、所与の値の一桁以内、好ましくは5倍以内、およびさらに好ましくは2倍以内である。本明細書に与える数値量は、別様の述べられていない限り近似値であり、これは、はっきりと述べられていない場合には用語「約」または「ほぼ」が推量され得ることを意味する。

【0072】

「アミノ酸類似体」、「非カノニカルアミノ酸」または「非標準的アミノ酸」、「非天然アミノ酸」、「非天然アミノ酸」などは、すべて、交換可能に用いることができ、これは、自然発生タンパク質中で一般に見出される20のL-アミノ酸(WIPO Standard ST. 25 (1998), Appendix 2, Table 3において定義され、列挙されているとおりの、AlaまたはA、CysまたはC、AspまたはD、GluまたはE、PheまたはF、GlyまたはG、HisまたはH、IleまたはI、LysまたはK、LeuまたはL、MetまたはM、AsnまたはN、ProまたはP、GlnまたはQ、ArgまたはR、SerまたはS、ThrまたはT、ValまたはV、TrpまたはW、TyrまたはY)のうちの1つ以上に構造および／または総合的形状の点で類似しているすべてのアミノ酸様化合物を包含する意味をもつ。アミノ酸類似体は、改変された側鎖または骨格を有する天然アミノ酸である場合もある。アミノ酸は、L形ではなくD形の天然アミノ酸である場合もある。好ましくは、AARSの通常は高い特異性のため、これらの類似体は、通常、アミノアシルtRNAシンテターゼ(AARS)にとっての「基質」ではない。場合によってはあるが、天然アミノ酸のものに十分に近い構造または形状を有する一定の類似体は、AARS、特に、基質特異性が緩和された改変AARSにより、タンパク質に誤って組み込まれることがある。好ましい実施形態において、類似体は、1つ以上の天然アミノ酸の骨格構造を、および／または大部分の側鎖構造をも共有し、唯一の違いは、分子内に1つ以上の改変された基を含有することである。こうした改変としては、原子(例えば、N)での関連原子(例えば、S)の置換、基(例えば、メチルもしくはヒドロキシ基など)または原子(例えば、ClもしくはBrなど)の付加、基(上記)の欠失、共有結合の置換(単結合での二重結合の置換など)、あるいはこれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。アミノ酸類似体としては、 α -ヒドロキシ酸、および β -アミノ酸を挙げることができ、ならびにアミノ酸類似体

10

20

30

40

50

を「改変アミノ酸」または「非天然AARS基質」と呼ぶこともある。

【0073】

アミノ酸類似体は、天然のものである場合もあり、非天然のもの（例えば、合成されたもの）である場合もある。当業者には理解されるであろうが、1セットのロータマーが知られている、またはそれを生じさせることができる、いずれの構造も、アミノ酸類似体として使用することができる。側鎖は、(R)配置もしくは(S)配置（または、DもしくはL配置）のいずれであってもよい。好ましい実施形態において、アミノ酸は、(S)またはL配置である。

【0074】

好ましくは、アミノ酸類似体の総合的形狀およびサイズは、（天然のまたは改変もしくはは再設計された）AARSによって（天然のまたは改変もしくはは再設計された）tRNAにチャージされたとき、その類似体—tRNAが、リボソーム的に許容される複合体である、すなわち、tRNA—類似体複合体が、インビトロまたはインビボ翻訳系において原核生物または真核生物のリボソームによって許容され得る、ような形状およびサイズである。

10

【0075】

「アンカー残基」は、AARSと天然アミノ酸骨格の間の重要な相互作用を維持するAARS内の残基位置である。

【0076】

「骨格」または「テンプレート」は、タンパク質（例えば、AARS）の骨格原子および任意の固定側鎖（たとえば、アンカー残基側鎖）を含む。計算のために、類似体の骨格をAARS骨格の一部として処理する。

20

【0077】

本明細書における「タンパク質骨格構造」または文法的相当語句は、特定のタンパク質の三次元構造を規定する三次元座標を意味する。（自然発生タンパク質の）タンパク質骨格構造を構成する構造は、窒素、カルボニル炭素、 α -炭素およびカルボニル酸素とともに、 α -炭素から β -炭素へのベクターの方向である。

【0078】

コンピュータによる分子構造または相互作用予測のためにコンピュータにインプットされるタンパク質骨格構造は、骨格とアミノ酸側鎖の両方についての座標である場合もあり、または骨格だけについての（すなわち、アミノ酸側鎖についての座標を除去した）座標である場合もある。前者を行えば、そのタンパク質構造のそれぞれのアミノ酸の側鎖原子を、当該技術分野において知られているようにタンパク質の構造から「ストリップ」または「除去」し、それによって「骨格」原子（窒素、カルボニル炭素および酸素、および α -炭素、ならびに窒素および α -炭素についている水素原子）についての座標のみを残すことができる。

30

【0079】

場合により、下で概説する分析の前にタンパク質骨格構造を変更してもよい。この実施形態では、出発タンパク質骨格構造の表示がその二次構造要素の立体配置の説明記述に縮小される。二次構造要素の相対位置は、超二次構造パラメーターと呼ばれる1セットのパラメーターによって規定される。これらのパラメーターは、明確な骨格の可撓性を誘導するように二次構造要素の配置を変更するために系統的にまたはランダムに変えることができる割当て値である。次に、それらの変更された超二次構造パラメーターを反映するようにその骨格の原子座標を変化させ、これらの新たな座標を、その後のタンパク質設計自動化で用いるために、システムにインプットする。詳細については、米国特許第6,269,312号参照（この全内容が、本明細書に参照により取り入れられている）。

40

【0080】

「配座エネルギー」は、高分子の特定の「配座」、すなわち三次元構造、に関連したエネルギー、例えば、特定のタンパク質の配座に関連したエネルギーを一般には指す。タンパク質を安定させる傾向がある相互作用は、負のエネルギー値として表されるエネルギー

50

を有し、これに対して、タンパク質を不安定にする相互作用は、正のエネルギー値を有する。従って、いずれの安定なタンパク質についての配座エネルギーも、負の配座エネルギー値によって定量的に表される。一般に、特定のタンパク質についての配座エネルギーは、タンパク質の安定性に関係付けられるであろう。特に、より低い（すなわち、より負の）配座エネルギーを有する分子は、一般に、例えば、より高温で、より安定である（すなわち、それらは、より大きな「熱安定性」を有する）。従って、タンパク質の配座エネルギーを「安定化エネルギー」と呼ぶこともできる。

【0081】

一般に、配座エネルギーは、分子の配座に依存する様々な相互作用からのエネルギー寄与率を計算するエネルギー「力場」を用いて計算される。力場は、アルファ炭素骨格、側鎖-骨格相互作用、および側鎖-側鎖相互作用の配座エネルギーを含む項から成る。一般に、骨格または側鎖との相互作用は、結合回転、結合ねじれ、および結合長についての項を含む。骨格-側鎖および側鎖-側鎖相互作用は、ファンデルワールス相互作用、水素結合、静電および溶媒和の項を含む。静電相互作用は、クーロン相互作用、双極子相互作用および4極子相互作用を包含し得る。他の類似の項も含むことがある。ポリマーについての配座エネルギーを決定するために用いることができる力場は、当該技術分野において周知であり、幾つか挙げてみると、CHARMM (Brooksら, J. Comp. Chem. 1983, 4:187-217; MacKerellら, in The Encyclopedia of Computational Chemistry, Vol. 1:271-277, John Wiley & Sons, Chichester, 1998参照)、AMBER (Cornellら, J. Amer. Chem. Soc. 1995, 117:5179; Woodsら, J. Phys. Chem. 1995, 99:3832-3846; Weinerら, J. Comp. Chem. 1986, 7:230; およびWeinerら, J. Amer. Chem. Soc. 1984, 106:765参照) およびDREIDING (Mayoら, J. Phys. Chem. 1990, 94:8897参照) 力場などが挙げられる。

【0082】

好ましいインプレメンテーションでの水素結合および静電の項は、Dahiyat & Mayo, (Science 1997, 278:82) に記載されているとおである。力場は、他の参考文献におけるように、原子配座の項（結合角、結合長、ねじれ）を含めて記述することもできる。例えば、Nielsenら, Prot. Eng., 12:657662 (1999); Stikoffら, Biophys. J., 67:2251-2260 (1994); Hendschら, Prot. Sci., 3:211-226 (1994); Schneiderら, J. Am. Chem. Soc., 119:5742-5743 (1997); Sidelarら, Prot. Sci., 7:1898-1914 (1998) 参照。溶媒和の項も含まれることがある。例えば、Jacksonら, Biochemistry, 32:11259-11269 (1993); Eisenbergら, Nature, 319:199-203 (1986); Street A G and Mayo S L, Folding & Design, 3:253-258 (1998); Eisenberg and Wesson, Prot. Sci., 1:227-235 (1992); Gordon & Mayo, 上記、参照。

【0083】

「カップルド残基」は、任意のメカニズムにより相互作用する、分子中の残基である。従って、2残基間の相互作用は、「カップリング相互作用」と呼ばれる。カップルド残基は、一般に、カップリング相互作用によってポリマーの適合性に一般に寄与する。一般に、カップリング相互作用は、物理的または化学的相互作用、例えば、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合相互作用、またはこれらの組み合わせである。カップリング相互作用の結果としてのいずれかの残基のアイデンティティーの変更は、特に、その変更がそれら2残基間のカップリング相互作用を崩壊させる場合、その分子の「適合性」に影響を及ぼすであろう。カップリング相互作用は、分子内の残基間の距離パラメータ

ーによって記述されることもある。残基が一定のカットオフ距離内にある場合、それらは、相互作用しているとみなされる。

【0084】

「適合性」は、分子、例えばタンパク質、の特定の特性または特性の組み合わせが最適化されるレベルまたは程度を示すために用いている。本発明の一定の実施形態において、タンパク質の適合性は、好ましくは、使用者が改善を望む特性によって決定される。従って、例えば、タンパク質の適合性は、そのタンパク質の熱安定性、触媒活性、結合親和性、溶解度（例えば、水性または有機溶媒への溶解度）などを指すことがある。適合特性の他の例としては、エナンチオ選択性、非天然基質に対する活性、および代替触媒メカニズムが挙げられる。カップリング相互作用は、適合性（安定性）を評価または予測する方法としてモデリングすることができる。適合性は、実験的にまたは理論的に、例えばコンピュータを使用して、決定または評価することができる。

10

【0085】

好ましくは、適合性は、それぞれの分子、例えばそれぞれのアミノ酸が、個々の「適合性値」を有するように、定量される。例えば、タンパク質の適合性は、そのタンパク質が特定の化学反応を触媒する速度、またはリガンドに対するそのタンパク質の結合親和性であり得る。特に好ましい実施形態において、タンパク質の適合性は、ポリマーの配座エネルギーを指し、例えば、当該技術分野において公知の任意の方法を用いて計算することができる。例えば、Brooksら、J. Comp. Chem., 4:187-217 (1983); Mayoら、J. Phys. Chem., 94:8897-8909 (1990); Paboら、Biochemistry, 25:5987-5991 (1986); Lazarら、Prot. Sci., 6:1167-1178 (1997); Leeら、Nature, 352:448-451 (1991); Colomboら、J. Am. Chem. Soc., 121:6895-6903 (1999); Weinerら、J. Am. Chem. Soc., 106:765-784 (1984) 参照。一般に、タンパク質の適合性は、その特性または特性の組み合わせが最適化されるにつれてその適合性値が増加するように、定量される。例えば、タンパク質の熱安定性を最適化することとなる（好ましくは、配座エネルギーを減少させる）実施形態において、適合性値は、負の配座エネルギーである、すなわち、 $F = -E$ 。

20

【0086】

タンパク質残基の「適合性寄与率」は、アイデンティティー a を有する残基 i_a が、そのタンパク質の全適合性に寄与するレベルまたは程度 $f(i_a)$ を指す。従って、例えば、特定のアミノ酸残基の変更または突然変異が、一般に、そのタンパク質の適合性を低下させる場合、その残基は、そのポリマーに対する高い適合性寄与率を有すると言われる。対照的に、タンパク質中の一部の残基 i_a は、一般に、そのタンパク質の適合性に影響を及ぼさない様々な可能なアイデンティティーを有することがある。従って、こうした残基は、そのタンパク質適合性に対して低い寄与率を有する。

30

【0087】

「デッドエンド排除 (Dead-end elimination)」（DEE）は、不良ロータマーおよびロータマーの組み合わせを、単一解が残るまで、系統的に削除しようと努める決定的検索アルゴリズムである。例えば、アミノ酸残基を、固定骨格と相互作用するロータマーとしてモデリングすることができる。DEEの理論的基礎は、DEE検索が収束した場合、その解は、不確実性を伴わない大域的な最小エネルギー配座 (global minimum energy conformation) (GMEC) であると規定している (Desmetら、1992)。

40

【0088】

デッドエンド排除は、次の概念に基づく。残基 i での2つのロータマー、 i_r および i_t 、ならびに（ロータマー j_s がメンバーである） i を除くすべての残基でのすべての他のロータマー配座 $\{S\}$ を考える。 i_r と j_s の間に寄与するペアでのエネルギーが、すべての $\{S\}$ について、 i_t と j_s の間に寄与するペアでのエネルギーより高い場合には

50

、ロータマー i_r は、その大域的最小エネルギー配座で存在することができず、排除することができる。この概念は、次の不等式によって数学的に表される。

【0089】

【数1】

$$E(i_r) + \sum_{j \neq i}^N E(i_r, j_s) > E(i_t) + \sum_{j \neq i}^N E(i_t, j_s) \{S\} \quad (\text{方程式 A})$$

この式が真である場合、単一のロータマー i_r を排除することができる (Desmetら, 1992)。

【0090】

この形での方程式Aは、コンピュータで扱いにくい。排除を行うために、全配列（ロータマー）空間を数え上げる必要があるからである。この問題を簡単にするために、方程式Aに含まれる範囲を利用することができる：

【0091】

【数2】

$$E(i_r) + \sum_{j \neq i}^N \min(s) E(i_r, j_s) > E(i_t) + \sum_{j \neq i}^N \max(s) E(i_t, j_s) \{S\} \quad (\text{方程式 B})$$

類似の独立変数を用いて、方程式Bを、GMECと一致しないロータマーペアの排除に広げることができる。これは、残基 j でのロータマー i_r と残基 j でのロータマー j_s とのペアが、すべての可能なロータマーの組み合わせ $\{L\}$ でのロータマー i_u および j_v より高いエネルギーを常に与えることを決定することによって行われる。方程式Bと同様に、この言明の厳格な範囲は、

【0092】

【数3】

$$\varepsilon(i_r, j_s) + \sum_{k \neq i, j}^N \min(t) \varepsilon(i_r, j_s, k_t) > \varepsilon(i_u, j_v) + \sum_{k \neq i, j}^N \max(t) \varepsilon(i_u, j_v, k_t) \quad (\text{方程式 C})$$

(この式中、 ε は、ロータマーペアについての併せたエネルギーである)

【0093】

【数4】

$$\varepsilon(i_r, j_s) = E(i_r) + E(j_s) + E(i_r, j_s) \quad (\text{方程式 D})$$

および

【0094】

【数5】

$$\varepsilon(i_r, j_s, k_t) = E(i_r, k_t) + E(j_s, k_t) \quad (\text{方程式 E})$$

によって与えられる。

【0095】

これは、ロータマー i_r および j_s のペアの二重排除につながるが、個々のロータマーを完全に排除することはできない。いずれも、独立して、GMECで存在することがあるからである。二重排除段階は、方程式6の右側で評価する必要がある可能なペアの数を減少させ（Sを減少させ）、それによってより多くのロータマーを個々に排除することができる。

【0096】

Desmetらによって提示された単一および二重の基準では、よりデッドエンドしているロータマーの決定につながる特別な条件を発見することができない。例えば、ロータマー i_t のエネルギー寄与が i_r より常に低く、 i_r の最低値より低い i_t の最高値はないという可能性がある。この問題に取り組むために、Goldstein 1994は、

10

20

30

40

50

2つのロータマーのエネルギープロファイルが交差するかどうかを決定する基準の修正を提示した。それらがしない場合、エネルギーが高いほうのロータマーをデッドエンドしていると決定することができる。この二重計算は、単一計算より有意に長いコンピュータ計算時間を使用する。この処理を加速するために、最も成果が上がるであろう二重計算を予測する他のコンピュータ計算法が開発された (Gordon & Mayo, 1998)。総称して *fast double* と呼ばれるこれらの種類の改良は、D E E の速度および有効性を向上させた。

【0097】

幾つかの他の改良も D E E を向上させる。多数の残基からのロータマーを併せていわゆるスーパー・ロータマーにして、さらなる排除を促すことができる (Desmetら, 1994; Goldstein, 1994)。これは、たった一段階で多数のロータマーを排除する長所を有する。加えて、ロータマー間の配座空間の「分割」が D E E の効率を向上させることが証明された (Pierceら, 2000)。分割は、以下の特別なケースに対処する。ロータマー i_r を考える。ロータマー i_{t_1} が、その配座空間の一部分について i_r より低いエネルギーの一因となり、ロータマー i_{t_2} が、その残りのフラクションについて i_r より低いエネルギーを有する場合には、 i_r を排除することができる。このケースは、あまり感度が高くない Desmet または Goldstein 基準では検出することができない。本明細書に記載するような好ましいインプレメンテーションでは、記載するすべての D E E 向上法を用いた。

【0098】

これらの方法のさらなる考察のために、Goldstein, *Biophysical Journal* 66, 1335-1340 (1994); Desmetら, *Nature* 356, 539-542 (1992); Desmetら, *The Protein Folding Problem and Tertiary Structure Prediction* (Jr., K. M. & Grand, S. L., eds.), pp. 307-337 (Birkhauser, Boston, 1994); De Maeyerら, *Folding & Design* 2, 53-66 (1997), Gordon, and Mayo, *J. Comp. Chem.* 19, 1505-1514 (1998); Pierceら, *J. Comp. Chem.* 21, 999-1009 (2000) を参照のこと。

【0099】

SCREAM (側鎖ロータマーエネルギー分析法 (Side-Chain Rotamer Energy Analysis Method)) と呼ばれるもう1つの計算を用いてもよい。SCREAMは、特定のAARSへの20の天然アミノ酸の相対結合エネルギーを計算することにより、同種でないアミノ酸を識別するメカニズムを調査することができる。(例えば、McClendonら, *Prot Eng. Design & Select.* 19:195-203 (2006) 参照)。

【0100】

第一段階として、他の可動側鎖を有さない空の骨格内の単一のアミノ酸について、ロータマーエネルギースペクトルを計算する。次に、その空の骨格からの最低ロータマーで出発して、側鎖を埋め、不一致を排除する。例えば、空の骨格のスペクトルから低励起状態のエネルギーを予測しながら1部位ごとに側鎖を配置し、不一致を有する配座を排除しながらペアでの相互作用を計算する。例えば、 $E_{tot}(A, B) = E_{self}(A) + E_{self}(B) + E_{int.}(A, B) = E_{self}(A, B)$ および $E_{tot}(A, B, C) = E_{self}(A) + E_{self}(B) + E_{self}(C) + E_{int.}(A, B) + E_{int.}(A, C) + E_{int.}(B, C) = E_{self}(A, B) + E_{self}(C) + E_{int.}(A, C) + E_{int.}(B, C) = E_{self}(A, B) + E_{self}(C) + E_{int.}(AB, C)$ により、再帰的關係が確立される。次に、空の骨格内のロータマーのエネルギー分布の増加が終わるまで、すべての側鎖低励起状態を分析しなければならない。簡単に言うと、すべての残基の基底状態エネルギーを評価し、その後、最低線形和

10

20

30

40

50

エネルギーを有する1セットのロータマー、最後に、最低から2番目に低い線形和エネルギー、等々と評価する。さらに、チャージがその環境を分極させてそれらのチャージを遮蔽し、所望のアミノ酸相互作用を減少させる場合には、静電相互作用に取り組まなければならない。分子動力学モデリング法は、通常、分極を考慮しないので、バイアスは、塩架橋を優先する。この問題を克服するために、残基を中和し、D R E I D I N Gパラメーター表示法に従って再びパラメーターを評価する。

【0101】

D R E I D I N Gパラメーター表示法の場合、チャージを失ったものとチャージを有するものの相互作用およびチャージを有するものと双極子との相互作用を水素結合の項の導入によって補正する。これは、本明細書において説明するようなC H A R M Mをはじめとする他のプログラムを併用して行うことができる。従って、特定のA A R S、または別の生物からの相同A A R S、からの結晶構造を用い、S C R E A MおよびH i e r D o c kまたは他のものなどのプログラムを使用して、どのアミノ酸が特定のA A R Sへの結合について競合するかによって計算を命令することにより、最高結合モードおよび活性化モードで、結合部位における20の天然アミノ酸のそれぞれについての結合配座および結合エネルギーを予測することができる。

10

【0102】

詳細には、アミノ酸およびA T P分子を供給して、A A R Sの活性部位に結合させる、選択的結合を先ず実行する。これは、配座変化をもたらすことがある。次に、そのアミノ酸とA T Pとの共有結合の形成を触媒するA A R Sを選択的に活性化することにより、そのA A R Sと複合したアミノアシルアデニレートを形成し、無機ピロリン酸塩を除去する。第三に、同種でないアミノ酸の誤った活性化が発生した場合、A A R Sは、(転移前校正として)そのアミノアデニル複合体を加水分解により開裂させる。最後に、同種でないアミノアシルアデニレートが生き残った場合、A A R Sは、アミノアシル-t R N A複合体を加水分解により開裂させることができる(転移後校正)。

20

【0103】

従って、こうしたコンピュータ計算プログラムは、野生型または突然変異体A A R S酵素による結合およびアミノアシル化に競合する天然アミノ酸の尤度の信頼できる予測を可能にする。多数のプログラム(例えば、一緒にS C R E A MおよびH i e r D o c k)を用いることにより、誤った組み込みの率が減少し、ならびにそのアミノ酸に特異的に結合するアミノ酸の場所をより高い予測精度で選択することができる。

30

【0104】

さらに他のコンピュータモデリングプログラムとしては、S C A P (側鎖アミノ酸予測プログラムSide Chain Amino Acid Prediction Program)(Xiang and Honig, J. Mol. Biol. 311, 421-430 (2001))、および骨格依存型ロータマーライブラリーに基づくタンパク質骨格への側鎖の付加に有用なS C W R L (ロータマーライブラリーでの側鎖置換(Side Chain Replacement With a Rotamer Library))が挙げられる。S C W R Lライブラリーは、カイ1-カイ2-カイ3-カイ4値のリスト、および所与のカイ-プサイ値の残基についてのそれらの相対確立を提供し、ならびにこれらの配座を探索して、側鎖-骨格不一致および側鎖-側鎖不一致を最小にする(例えば、Bowerら, J. Mol. Biol., 267, 1268-1282 (1997)参照)。

40

【0105】

コンピュータによる予測は、大部分、A A R S酵素の公知核酸および/またはアミノ酸配列の利用による。例えば、その触媒ドメインは、A A R S酵素の特定のクラスのすべてのメンバーにわたって保存される。(O'Donoghue and Luthey-Schulten, Microbiol. And Mol. Biol. Rev. : 550-573 (2003); Diaz-Lazcozら, Mol. Biol. Evol. 15 (11) : 1548-1561 (1998); Wangら, Chem. Commun. 1-

50

11 (2002))。

【0106】

「発現系」は、適する条件、例えば、そのベクターによって担持された異種DNAによりコードされ、その宿主細胞に導入されたタンパク質の発現に適する条件下の、宿主細胞、または細胞成分および適合性ベクターを意味する。一般的な発現系としては、E. coli 宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞、例えば Sf9、Hi5 または S2 細胞、およびバキュロウイルスベクター、ショウジョウバエ (Drosophila) 細胞 (シュナイダー (Schneider) 細胞) および発現系、ならびに哺乳動物細胞およびベクターが挙げられる。

【0107】

「宿主細胞」は、その細胞による物質の生産のために選択される、改変される、形質転換される、増殖されるまたは何らかの方法で操作される、任意の生物の任意の細胞を意味する。宿主細胞は、その維持または増殖に必要な少なくとも 1 つの特定の有機化合物を合成することができず、別の源、例えばその環境または培養基、からその化合物を得なければならない、栄養素要求株であってもよい。加えて、栄養要求性宿主細胞は、その増殖または維持に必要な 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたはそれ以上の有機化合物を合成することができないような、それぞれ、1、2 倍、3 倍、4 倍またはそれ以上の栄養要求レベルを有する場合がある。例えば、宿主細胞は、特定の遺伝子、DNA もしくは RNA 配列、タンパク質または酵素を発現するように操作されているものであってもよい。宿主細胞は、インビトロで、または非ヒト動物 (例えば、トランスジェニック動物または一過的にトランスフェクトされた動物) の 1 つ以上の細胞において培養することができる。

【0108】

本明細書に開示する一定の実施形態は、無細胞発現または翻訳系のみを特に利用し、宿主細胞を利用しない。一定の他の実施形態は、栄養要求性宿主細胞のみを特に利用する。さらに一定の他の実施形態は、非栄養要求性宿主細胞、すなわち原栄養性宿主細胞のみを特に利用する。

【0109】

配列類似性は、野生型配列と 1 つ以上の突然変異体との比較を含めて、配列を互いに比較する工程を含むことがあるような一定の実施形態に関連したものである。こうした比較は、例えば、当該技術分野において周知の配列アラインメントプログラムおよび／またはアルゴリズム (例えば、幾つか挙げるとすれば、BLAST、FASTA および MEGALIGN) を用いる、ポリマー配列のアラインメントを一般に含む。こうしたアラインメントにおいて、突然変異が残基挿入または欠失を含む場合、その配列アラインメントが、残基挿入または欠失を有さないポリマー配列に「ギャップ」 (一般に、ダッシュ、「-」または「Δ」によって表される) を導入することとなることは、当業者には容易に理解できる。

【0110】

そのすべての文法形およびスペル変化で、「相同 (の)」は、同じ生物種のスーパーファミリーからのタンパク質、ならびに異なる生物種からの相同タンパク質をはじめとする、「共通の進化起源」を有する 2 つの分子 (例えば、タンパク質、tRNA、核酸) の間の関係を指す。こうしたタンパク質 (およびそれらをコードする核酸) は、同一率によってにせよ、または特定の残基もしくはモチーフの存在または保存位置によってにせよ、それらの配列類似性によって表されるような、配列および／または構造相同性を有する。相同分子は、類似の機能をまたは同一の機能さえも共有することが多い。

【0111】

一部の態様において、相同は、少なくとも 50 % 相同であるが、三次元で相同構造を呈する (すなわち、実質的に同様の表面電荷または疎水性基提示を含む) 配列を含む場合がある。水素結合、ファンデルワールス力および疎水性相互作用は、AARS の結合ポケットにアミノ酸を結合させるように作用し得るので、AARS の構造の操作によってこれらの力のうちの 1 つ以上を変化させることができる。

【0112】

従って、本明細書で用いる場合、タンパク質および／またはタンパク質配列は、それらが共通祖先のタンパク質またはタンパク質配列から自然にまたは人工的に得られるとき、「相同」である。同様に、核酸および／または核酸配列は、それらが共通祖先の核酸または核酸配列から自然にまたは人工的に得られるとき、相同である。例えば、任意の自然発生核酸を、任意の利用可能な突然変異誘発法により、1つ以上の選択コドンを含むように改変することができる。発現されたとき、この突然変異誘発された核酸は、1つ以上の非天然アミノ酸を含むポリペプチドをコードする。勿論、突然変異プロセスは、1つ以上の標準コドンを中心に改変することがあり、それにより、結果として生ずるタンパク質中の1つ以上の標準アミノ酸も変化させることがある。相同性は、一般に、2つ以上の核酸もしくはタンパク質（またはそれらの配列）の間の配列類似性から推論される。相同性の確立に有用な配列間の正確な類似性百分率は、問題になっている核酸およびタンパク質によって様々であるが、わずか25%ほどの配列類似性が、相同性の確立に日常的に用いられている。より高い配列類似性レベル、例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%もしくは99%またはそれ以上が相同性の確立に用いられる場合もある。配列同一性百分率を決定するための方法（例えば、デフォルトパラメーターを用いるBLASTPおよびBLASTN）は、本明細書中で説明しており、一般に利用できる。

10

【0113】

そのすべての文法形で、用語「配列類似性」は、共通の進化起源を共有しているまたはしていなことがある核酸またはアミノ酸配列の間の同一度または対応度を指す（Reeckら、上記を参照）。しかし、一般的な慣例および本出願において、用語「相同性」は、「高度に」などの副詞で改変されている場合、配列類似性を指すことがあり、ならびに共通の進化起源を指すことまたは指さないことがある。

20

【0114】

核酸分子は、その核酸分子の単一標準形を、適切な温度および溶液イオン強度条件下で、他の核酸分子にアニールすることができる場合、別の核酸分子、例えばcDNA、ゲノムDNA、またはRNAに「ハイブリダイズすることができる」（Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 参照）。前記温度およびイオン強度条件は、そのハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決める。相同核酸の予備スクリーニングには、55℃の T_m （融解温度）に対応する低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件（例えば、5×SSC、0.1% SDS、0.25% ミルク、および無ホルムアミド；または30% ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDS）を用いることができる。中等度ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、例えば、40% ホルムアミドと5×または6×SSCは、より高い T_m に対応する。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、例えば、50%ホルムアミド、5×または6×SSCは、最も高い T_m に対応する。SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸Naである。ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が遺伝子またはアミノ酸配列の相補ストレッチを含むことを必要とするが、そのハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに依存して塩基間にミスマッチが起こり得る。

30

40

【0115】

核酸をハイブリダイズするために適切なストリンジェンシーは、核酸の長さおよび相補度、当該技術分野において周知の変数、に依存する。2つのヌクレオチド配列間の類似度または相同度が大きいほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドの T_m 値は高い。核酸ハイブリダイゼーションの（より高い T_m に対応する）相対安定性は、次の順序で低下する：RNA：RNA、DNA：RNA、DNA：DNA。長さが100ヌクレオチドより大きいハイブリッドについての T_m を計算するための方程式が導出された（Samb

50

rockら、上記、9.50-9.51参照)。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチド、とのハイブリダイゼーションについては、ミスマッチの位置が、より重要となり、オリゴヌクレオチドの長さが、その特異性を決める (Sambrockら、上記、11.7-11.8参照)。ハイブリダイズ可能な核酸の最低長は、少なくとも約10ヌクレオチド、好ましくは、少なくとも約15ヌクレオチドであり、およびさらに好ましくは、その長さは、少なくとも約20ヌクレオチドである。

【0116】

特に指定されていない限り、用語「標準ハイブリダイゼーション条件」は、約55℃の T_m を指し、上で述べたような条件を用いる。好ましい実施形態において、 T_m は、60℃であり、さらに好ましい実施形態において、 T_m は、65℃である。特定の実施形態において、「高ストリンジェンシー」は、0.2×SSC中、68℃での、50%ホルムアミド、4×SSC中、42℃での、またはこれら2つうちのいずれかの条件下で観察されるものと等価のハイブリダイゼーションレベルをもたらす条件下での、ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄条件を指す。

【0117】

オリゴヌクレオチドに（例えば、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーに）適するハイブリダイゼーション条件は、オリゴヌクレオチドのほうが融解温度が低いため、完全長核酸（例えば、完全長cDNA）のものとは一般に多少異なる。オリゴヌクレオチドの融解温度は、関与するオリゴヌクレオチド配列の長さに依存することとなるため、適するハイブリダイゼーション温度は、使用されるオリゴヌクレオチド分子に依存して変わるであろう。例示的温度は、37℃（14塩基オリゴヌクレオチドの場合）、48℃（17塩基オリゴヌクレオチドの場合）、55℃（20塩基オリゴヌクレオチドの場合）および60℃（23塩基オリゴヌクレオチドの場合）であり得る。例示的なオリゴヌクレオチドに適するハイブリダイゼーション条件としては、6×SSC/0.05%ピロリン酸ナトリウム中での洗浄、または同等のハイブリダイゼーションレベルをもたらす他の条件が挙げられる。

【0118】

「ポリペプチド」、「ペプチド」または「タンパク質」は、「ペプチド結合」と呼ばれる化学結合によって互いに連結されているアミノ酸の鎖を記述するために交換可能に用いている。タンパク質またはポリペプチド（酵素を含む）は、「天然」または「野生型」（これは、それが自然に発生することを意味する）である場合もあり、あるいは「突然変異体」、「変異体」、または「改変型」（これは、それが、天然タンパク質または別の突然変異体から作られた、改変された、得られた、または何らかの点でそれらとは異なるもしくはそれらから変化していることを意味する）である場合もある。

【0119】

「ロータマー」は、それぞれのアミノ酸または類似体側鎖についての1セットの可能な配座と定義する。Ponderら、Acad. Press Inc. (London) Ltd. pp. 775-791 (1987); Dunbrackら、Struc. Biol. 1(5): 334-340 (1994); Desmetら、Nature 356: 539-542 (1992) 参照。「ロータマーライブラリー」は、アミノ酸または類似体の所与のセットについての1セットの可能な／許容されるロータマー配座のコレクションである。2つの一般的なタイプのロータマーライブラリーがある：「骨格依存型」および「骨格非依存型」。骨格依存型ロータマーライブラリーは、骨格内の残基の位置に依存して異なるロータマーを割り当てる。従って、例えば、一定のロイシンロータマーは、その位置が α ヘリックス内である場合に割り当てられ、その位置が α ヘリックス内でない場合には異なるロイシンロータマーが割り当てられる。骨格非依存型ロータマーライブラリーは、アミノ酸のすべてのロータマーをあらゆる位置で利用する。一般に、コアの可撓性は重要であるので、コア残基を考慮すると非骨格依存型ライブラリーが好ましい。しかし、骨格非依存型ライブラリーは、コンピュータ計算による費用がよりかかり、従って、表面および境界位置については骨格依存型ライブラリーが好ましい。しかし、いずれのタイプの

ライブラリーも、任意の位置で使うことができる。

【0120】

本明細書において、「可変残基位置」は、設計法の中で特定の残基またはロータマー、一般には野生型残基またはロータマー、に固定されていない、設計されるタンパク質のアミノ酸位置を意味する。ある位置が可変位置として選択される場合であっても、本明細書に開示する一定の方法は、その可変位置で野生型残基を選択するような方法で配列を最適化することが可能であることに留意しなければならない。これは、一般に、コア残基についてのほうが多く行われ、表面残基については然程定期的には行われない。加えて、残基を非野生型アミノ酸に固定することも可能である。

【0121】

「固定残基位置」は、1セットの配座であると三次元構造で同定された残基を意味する。一部の実施形態において、固定位置は、その元々の配座のままである（これは、使用されるロータマーライブラリーの特定のパラメーターに相関する場合もあり、しない場合もある）。あるいは、設計の必要に依存して、残基を非野生型残基に固定することができる。例えば、公知の部位特異的突然変異誘発法により、ある特定の残基が（例えば、タンパク質部分解部位を排除するために、またはAARSの基質特異性を改変するために）望ましいことが証明された場合、その残基を、特定のアミノ酸に固定することができる。固定することができる残基としては、構造または生体機能性残基、例えば、アンカー残基が挙げられるが、これらに限定されない。

【0122】

一定の実施形態において、固定位置は、「浮動的」である場合があり、アミノ酸または類似体はその位置に固定され、そのアミノ酸または類似体の異なるロータマーを試験する。この実施形態において、可変残基は、少なくとも1つ、または概して残基の総数の0.1%から99.9%であり得る。従って、例えば、ほんの少数（または1つ）の残基を変えることができる場合があり、または大部分の残基を変えることができる場合があり、間のすべての可能性がある。

【0123】

本明細書で用いる場合、用語「外的突然変異体」は、対応する野生型アミノ酸でのアミノアシル化について（野生型または内在性のものと比較して）減少した効率を示す改変分子（例えば、外的突然変異体tRNAおよび／または外的突然変異体アミノアシルtRNAシンテターゼ）を指す。「外的突然変異体」は、目的とする翻訳系において対応する天然アミノ酸で機能するtRNAおよび／またはRSの不能または減少した効率、例えば、20%未満の効率、10%未満の効率、5%未満の効率もしくは例えば1%未満の効率を指す。例えば、目的とする翻訳系における外的突然変異体RSは、野生型アミノ酸で目的とする翻訳系の任意の内在性tRNAを、その内在性RSによる内在性tRNAのアミノアシル化と比較して低減されたまたはさらにはゼロ効率でアミノアシル化する。

【0124】

しかし、外的突然変異体RSは、（自然発生のものであろうと、非天然のものであろうと）代替アミノ酸で内在性tRNAを、内在性RSが代替アミノ酸で内在性tRNAをアミノアシル化する能力と比較して増大された効率で、アミノアシル化することに留意しなければならない。同様に、外的突然変異体tRNAは、（非天然アミノ酸であらうと、他の自然発生アミノ酸であらうと）代替アミノ酸に対して、対応する野生型アミノ酸に対するより高い効率で機能する。

【0125】

「ウォブル縮重コドン」は、天然アミノ酸をコードしているコドン（このコドンは、mRNA中に存在するとき、少なくとも1つの非ワトソン・クリックまたはウォブル塩基対（例えば、A-CまたはG-U塩基対）によって天然tRNAアンチコドンを認識する）を指す。ワトソン・クリック塩基対は、G-CもしくはA-U（RNAもしくはDNA/RNAハイブリッド）またはA-T（DNA）塩基対のいずれかを指す。mRNAコドン-tRNAアンチコドン塩基対に関連して用いられている場合、ワトソン・クリック塩基

対は、すべてのコドン－アンチコドン塩基対が G－C 対または A－U 対のいずれかによって媒介されることを意味する。

【0126】

用語「優先的にアミノアシル化する」は、例えば、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 75 %、約 85 %、約 90 %、約 95 %、約 99 % またはそれ以上効率的な効率を指す。この効率は、特定の tRNA、AARS または両方に割り当てられる対応する天然アミノ酸と比較したとき、どの改変または外的突然変異体アミノアシル tRNA シンテターゼが、（非天然アミノ酸であろうと、別の自然発生アミノ酸であろうと）代替アミノ酸で tRNA をアミノアシル化するかによって測定することができる。用語「優先的にアミノアシル化する」は、特定の tRNA、AARS または両方に割り当てられる対応する天然アミノ酸以外の任意のアミノ酸で tRNA をアミノアシル化する、または該アミノ酸を tRNA にチャージする、改変または外的突然変異体アミノアシル tRNA シンテターゼの効率をさらに指す場合がある。用語「優先的にアミノアシル化する」は、非改変または自然発生アミノ酸 AARS と比較して非天然アミノ酸で tRNA をアミノアシル化する改変または外的突然変異体アミノアシル tRNA シンテターゼの効率をさらに指す場合がある。

10

【0127】

AARS による tRNA のアミノアシル化の効率を、標的ポリペプチドまたはタンパク質への非天然アミノ酸の組み込みの特異性または忠実性の有効度と関連させることができることに留意しなければならない。これは、（野生型アミノ酸であろうと、非天然アミノ酸であろうと）アミノ酸で tRNA がアミノアシル化されると、そのチャージされた tRNA が AARS 酵素から放出され、そのアミノ酸が標的ポリペプチドに組み込まれるというタンパク質合成機構の機能による。AARS の較正能力が改変されると、この酵素は、代替アミノ酸を tRNA にチャージすることができ、標的タンパク質に組み込むために放出することができるであろう。従って、AARS によるアミノアシル化の効率は、標的ポリペプチドへの非天然アミノ酸の組み込みの忠実性および特異性と直接関連する。

20

【0128】

その後、代替の（非天然のものでであろうと、自然発生のおのでもであろうと）アミノ酸は、高忠実度で、例えば、特定のコドンについて約 20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、75 %、80 %、90 %、95 % より高い、または約 99 % より高い効率で、成長ポリペプチド鎖に組み込まれる。

30

【0129】

用語「相補的」は、外的突然変異体ペアの成分、一緒に機能することができる外的突然変異体 tRNA と外的突然変異体シンテターゼ、を指し、例えば、外的突然変異体シンテターゼは、外的突然変異体 tRNA をアミノアシル化する。

【0130】

用語「に由来する」は、生物から単離される、または単離され、改変される、または生物からのその成分の情報をを用いて生成される、例えば化学合成される成分を指す。

【0131】

用語「翻訳系」は、自然発生または非天然アミノ酸を成長ポリペプチド鎖（タンパク質）に組み込むために必要な成分を指す。例えば、成分としては、リボソーム、tRNA、シンテターゼ、mRNA などを挙げることができる。本明細書に開示する成分は、インビボでまたはインビトロで翻訳系に追加することができる。インビボ翻訳系は、細胞（真核細胞または原核細胞）であってもよい。インビトロ翻訳系は、無細胞系、例えば、（精製されたまたは組み替え生産された）異なる生物からの成分で再構成されたものであってもよい。一定の実施形態において、翻訳系は、細胞を含まない。一定の実施形態において、翻訳系は、栄養要求性細胞を含まない。翻訳系が栄養要求性細胞を含まない場合、それは、別の細胞または細胞成分を含むことがある。

40

【0132】

用語「不活性 RS」は、自然発生のものでであろうと、非天然のものでであろうと、任意

50

のアミノ酸でその同種 tRNA をアミノアシル化することがもはやできないように突然変異されたシンテターゼを指す。用語「改変 RS」は、対応する自然発生アミノ酸でその同種 tRNA をアミノアシル化することはもはやできないが、別のアミノ酸、好ましくは非天然アミノ酸でその同種 tRNA をアミノアシル化できる場合があるシンテターゼを指す。

【0133】

用語「選択作用因子」は、存在するとき、集団から一定の成分を選択することができる作用因子、例えば、抗生物質、光の波長、抗体または栄養素などを指す。例えば濃度、強度などの選択作用因子は、変えることができる。

【0134】

10

用語「陽性選択マーカー」は、存在する（例えば、発現された、活性化されたなどの）とき、その陽性選択マーカーを有する生物とその陽性選択マーカーのないもとを識別する結果となるマーカーを指す。

【0135】

用語「陰性選択マーカー」は、存在する（例えば、発現された、活性化されたなどの）とき、所望の特性を有さない生物を（例えば、所望の特性を有する生物と比較して）識別することができるマーカーを指す。

【0136】

用語「レポーター」は、本開示に記載する成分を選択するために使用することができる成分を指す。例えば、レポーターとしては、緑色蛍光タンパク質、ホタルルシフェラーゼタンパク質、または遺伝子、例えば、 β -gal/lacZ（ β -ガラクトシダーゼ）、または Adh（アルコールデヒドロゲナーゼ）などを挙げることができる。

20

【0137】

用語「効率的に認識されない」は、ある生物からの RS が外的突然変異体 tRNA をアミノアシル化する、例えば、約 10% 未満、約 5% 未満、または約 1% 未満の効率を指す。一定の実施形態において、前記 RS は、前記外的突然変異体 tRNA と同じ生物からのものであってもよいし、または異なる生物からのものであってもよい。一部の実施形態において、前記 RS は、特定のアミノ酸、好ましくは非天然アミノ酸で tRNA をアミノアシル化するように改変されている。

【0138】

30

用語「真核生物」は、生物発生的ドメイン Eucarya に属する生物、例えば、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、爬虫類、鳥類）、絨毛虫、植物、真菌（例えば、酵母など）、鞭毛虫、微孢子虫類、原生生物などを指す。加えて、用語「原核生物」は、真正細菌（Eubacteria）（例えば、E. coli、Thermus thermophilus など）および古細菌（Archaea）（例えば、Methanococcus jannaschii、Methanobacterium thermoautotrophicum、ハロバクテリウム（Halobacterium）、例えば、Haloferrax volcanii およびハロバクテリウム種 NRC-1、A. fulgidus、P. firiiosus、P. horikoshii、A. pernix など）生物発生的ドメインに属する非真核生物を指す。

40

【0139】

（遺伝子コード、宿主細胞、および縮重コドン）

使用した大部分細胞の標準遺伝子コードを下に列挙する。

【0140】

【化 1 - 1】

遺伝子コード中央

最初	U	C	A	G	最後
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	停止		
(オーカー)	停止				
オパール (Umber)	A				

10

【0 1 4 1】

【化 1 - 2】

最初	U	C	A	G	最後
	Leu	Ser	停止		
アンバー (Amber)	Trp	G			
	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

20

30

遺伝子コードは、縮重しており、この場合、タンパク質合成機構が、61のmRNAセンスコドンを用いて、20の天然アミノ酸モノマーのテンプレート重合を命じる（Crickら，Nature 192：1227，1961）。2つアミノ酸（すなわち、メチオニンおよびトリプトファン）だけが、一意的mRNAトリプレットによってコードされる。

【0 1 4 2】

40

標準遺伝子コードは、すべてではないが殆どのケースにあてはまる。多くの生物のミトコンドリアDNA、および少数の下等生物の核DNAにおいて、例外が見つかった。幾つかの例を次の表に与える。

【0 1 4 3】

(非標準遺伝子コードの例)

【0 1 4 4】

【化 2】

ミトコンドリア	脊椎動物	UGA→ Trp; AGA, AGG → 停止
	無脊椎動物	UGA→ Trp; AGA, AGG → Ser
	酵母	UGA→ Trp; CUN → Thr
	原生生物	UGA→ Trp;
核	細菌	GUG, UUG, AUU, CUG → 開始
	酵母	CUG → Ser
	繊毛虫	UAA, UAG → Gln

10

* 植物細胞は、ミトコンドリアにおいても、核においても、標準遺伝子コードを用いる。

【0145】

NCBI (米国国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information)) は、標準遺伝子コード、ならびに脊椎動物ミトコンドリアコード；酵母ミトコンドリアコード；糸状菌、原生動物および腔腸動物ミトコンドリアコードおよびマイコプラズマ／スピロプラズマコード；無脊椎動物ミトコンドリアコード；繊毛虫、カサノリおよびヒゲハラムシ核コード；棘皮動物および扁形動物ミトコンドリアコード；正倍数性核コード；細菌および植物プラスチドコード；代替酵母核コード；ホヤ類ミトコンドリアコード；代替扁形動物ミトコンドリアコード；ブレファリズマ (*Blepharisma*) 核コード；緑藻類ミトコンドリアコード；吸虫ミトコンドリアコード；セネデスムス・オブリカス (*scenedesmus obliquus*) ミトコンドリアコード；トラウストキトリウム (*Thraustochytrium*) ミトコンドリアコードをはじめとする様々な生物において用いられる遺伝子コードの詳細なリスト (すべて、本明細書に参照により取り入れられている) を保持している。これらは、主として、Osawaら, *Microbiol. Rev.* 56: 229-264, 1992, and Jukes and Osawa, *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 489-494, 1993による総覧に基づく。

20

【0146】

(宿主細胞)

30

本明細書に開示する一部の方法は、実際にはタンパク質の生産レベルを生じさせることができる細胞内で実施することができる。好ましい実施形態において、使用される細胞は、培養可能な細胞 (すなわち、実験室条件下で増殖させることができる細胞) である。適する細胞としては、哺乳動物細胞 (ヒトまたは非ヒト哺乳動物)、細菌細胞および昆虫細胞などが挙げられる。

【0147】

一例としては、PFENEX (商標) 技術が挙げられ、これは、*E. coli* と比較して一定の糖の代謝に関して異なる経路を用いることに起因して一定の溶解度および活性特性を維持しながら細胞発現を増加させるシュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 系細胞系統を使用する細胞系統である。

40

【0148】

加えて、他の栄養要求性宿主細胞系統としては、K10系 Phe 栄養要求株 (AF)、Phe/Trp 二重栄養要求株 (AFW)、Phe/Trp/Lys 三重栄養要求株 (AFWK)、Met 栄養素要求株 (M15 バックグラウンドでの M15MA)、ならびに DH10B 系 AF 株が挙げられる。

【0149】

本明細書に開示する一定の実施形態を実施するために使用することができる細胞としては、(原核性であろうと、真核性であろうと) 栄養要求性宿主細胞が挙げられる。栄養要求性細胞は、1 倍、2 倍、3 倍、4 倍またはそれ以上のレベルの栄養要求性を示すことがある (それぞれの栄養要求性レベルは、その生物が合成できず、細胞に供給しなければな

50

らない特定の有機化合物を示す)。本明細書に開示する一定の実施形態は、栄養要求性宿主細胞を特に利用しない。栄養要求性宿主細胞を使用しないかぎり、本明細書に開示する一定の実施形態を実施するために別の細胞または細胞成分を、尚、使用することができる。他の実施形態は、同じかまたは異なる株または生物からのものであり得る1つ、2つ、3つ、またはそれ以上の異なる栄養要求性宿主細胞を使用することができる。

【0150】

宿主細胞は、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る本開示のベクターを用いて、遺伝子工学処理（例えば、形質転換、形質導入またはトランスフェクト）される。前記ベクターは、例えば、プラスミド、細菌、ウイルス、裸のポリヌクレオチド、または複合ポリヌクレオチドの形態であり得る。前記ベクターは、エレクトロポレーション（Fromら, PNAS, USA 82, 5824 (1985)）、ウイルスベクターによる感染、小型ビーズもしくは粒子のマトリックスの中にまたはその表面に核酸を有する小型粒子による高速衝撃貫入（Kleinら, Nature 327, 70-73 (1987)）をはじめとする標準的な方法によって、細胞および／または微生物に導入される。Berger、SambrookおよびAusubelは、様々な適する形質転換法を提供している。

10

【0151】

その工学処理された宿主細胞を、例えばスクリーニング工程、プロモーターの活性化または形質転換体の選択などの活動のために、適宜、改変した従来の栄養培地で培養した。場合によっては、これらの細胞を培養してトランスジェニック生物にすることができる。

20

【0152】

本明細書に開示する一定の実施形態は、改変AARSおよび／または改変tRNAをスクリーニングする方法をさらに含む。例えば、1つの実施形態において、酵母PheRSライブラリーをダブル・シーブ・スクリーニングに付して、非天然アミノ酸の高レベルの組み込み、またはGFPの高度のミスフォールディングもしくはアンフォールディングをもたらすであろうPhe以外の天然アミノ酸の誤った組み込みを検出する。酵母PheRSライブラリー細胞を、例えば、フローサイトメトリー分析（FACS）に基づくハイ・スループット・スクリーニングに付す。まず、酵母PheRSライブラリー細胞を2NaIの存在下で発現させ、2NaIまたは他の天然アミノ酸のより高い組み込みを示す低蛍光細胞をFACSによって回収する。次に、酵母PheRSライブラリー細胞を2NaIなしで発現させる。明細胞を回収して、他の天然アミノ酸を誤って組み込みこむことがある酵母PheRS変異体を排除する。1つの例示的实施形態において、2サイクルのスクリーニングにより、2NaIの存在下で低い蛍光を有し、2NaI不在下では高い蛍光を有した、N412G、S418C、T415GおよびS437Fに突然変異を有する突然変異体酵母PheRSが得られた。この技術により、UUUコドンに2NaIを組み込み、約90%まで増加させることができる。

30

【0153】

例えば細胞単離および培養についての（例えば、後続の核酸単離についての）、他の有用な参考文献としては、Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New Yorkおよびその中で引用されている参考文献; Payneら, (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, N. Y.; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) ならびにAtlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Flaが挙げられる。

40

50

【0154】

細菌細胞に標的核酸を導入する幾つかの周知の方法を利用することができ、これらは、いずれも、本明細書に開示する一定の実施形態において使用することができる。これらとしては、レシピエント細胞とDNAを含有する細菌プロトプラストとの融合、エレクトロポレーション、発射衝撃法、およびウイルスベクターでの感染などが挙げられる。細菌細胞を使用して、本明細書に開示する一定の実施形態のDNA構築物を含有するプラスミドの数を増幅することができる。その細菌を対数期まで増殖させ、当該技術分野において公知の様々な方法によってその細菌中のプラスミドを単離することができる（例えば、Sambrook参照）。加えて、過剰なキットが、細菌からプラスミドを精製するために市販されている（例えば、EASYPREP（商標）、FLEXIPREP（商標）（両方とも、Pharmacia Biotechから）；STRATACLEAN（商標）（Stratageneから）；およびQIAPREP（商標）（Qiagenから）参照）。その後、それらの単離および精製されたプラスミドは、さらに、他のプラスミドを生産するために操作される、または細胞をトランスフェクトするために使用される、または生物を感染させるために関連ベクターに組み込まれる。

10

【0155】

代表的なベクターは、転写および翻訳ターミネーター、転写および翻訳開始配列、ならびに特定の標的核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。これらのベクターは、少なくとも1つの独立したターミネーター配列、真核生物もしくは原核生物または両方におけるカセットを複製することができる配列（例えば、シャトルベクター）、および原核生物系と原核性物系の両方のための選択マーカーを場合によっては含む。ベクターは、原核生物、真核生物、または好ましくは両方における複製および組み込みに適する。Gilman & Smith, Gene 8:81 (1979); Robertsら, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B.ら, Protein Expr. Purif. 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger（すべて上記）参照。クローニングに有用な細菌およびバクテリオファージのカタログは、例えば、ATCCによって提供されている、例えばATCCによって出版されたThe ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Ghernaら, (eds.)。配列決定、クローニングおよび分子生物学の他の態様についてのさらなる基礎手順ならびに基礎をなす理論的考察も、Watsonら, (1992) Recombinant DNA 2nd Edition Scientific American Books, NYにおいて見つけられる。

20

30

【0156】

（縮重コドン選択）

上で説明したように、メチオニンおよびトリプトファンを除くすべてのアミノ酸は、1つより多くのコドンによってコードされる。本明細書に開示する一部の方法によると、天然アミノ酸をコードするために通常用いられるゲノム内のコドンは、代わりにアミノ酸類似体をコードするように、転写または翻訳機構によって、一部、再プログラムされる。アミノ酸類似体は、自然発生またはカノニカルアミノ酸類似体であってもよい。好ましい実施形態において、アミノ酸類似体は、カノニカルにコードされたアミノ酸ではない。

40

【0157】

コドン-アンチコドンペアの熱力学的安定性は、実験に基づいて予測または決定することができる。一部の実施形態によると、外的突然変異体tRNAは、同じ配列を認識するであろう細胞における天然tRNAより少なくとも約1.0 kcal/mol強い、さらにいっそう好ましくは1.5 kcal/mol強い、およびさらにいっそう好ましくは2.0 kcal/molを超えて強い親和性（37℃）で縮重コドンと相互作用することが好ましい。これらの値は、当業者には公知であり、ならびに熱変性実験によって決定することができる（例えば、Meroueh and Chow, Nucleic Acids Res. 27:1118, 1999参照）。

50

【0158】

次の表は、E. coli についての公知アンチコドン配列の一部のリストである。一般に、いずれの生物についても、当該技術分野において認知されている技法を用いて、tRNAアンチコドン配列を常例的に決定することができる。例えば、いずれのtRNA遺伝子も、例えばPCRによって、増幅することができる。配列決定を行って、アンチコドンループの正確な配列を決定することができる。あるいは、生化学的結合アッセイを用いて、2～6の可能なコドンのうちの1つに対する精製されたtRNAの結合親和性を決定することができる。最も高い特異性／親和性でtRNAに結合するコドンは、おそらく、3つすべてのコドン位置に純粋なワトソン・クリックマッチを有し、それ故、アンチコドンループの配列を決定することができる。

10

【0159】

一般に、アンチコドンループ内のウォブル塩基は、（AまたはCではなく）GまたはUである傾向がある。

【0160】

（E. coli についての縮重コドン）

【0161】

【化3-1】

E. coliについての縮重コドン

アミノ酸	アンチコドン	3番目の塩基 での塩基対形成	コドン	アミノ酸	アンチコドン	塩基対形成	コドン
Ala	GGC	W/C ¹	GCC	His	GUG	W/C	CAC
		ウォブル ²	GCU			ウォブル	CAU
	UGC	W/C	GCA	Ile	GAU	W/C	AUC
		ウォブル	GCG			ウォブル	AUU, AUA
Asp	GUC	W/C	GAC	Leu	GAG	W/C	CUC, CUA, CUG, UUC, UUG
		ウォブル	GAU			ウォブル	CUU
Asn	GUU	W/C	AAC	Lys	UUU	W/C	AAA
		ウォブル	AAU			ウォブル	AAG
Cys	GCA	W/C	UGC	Phe	GAA	W/C	UUC
		ウォブル	UGU			ウォブル	UUU
Glu	UUC	W/C	GAA	Ser	GGA	W/C	UUC, AGU
		ウォブル	GAG			ウォブル	UCU, AGC, UCA, UCG

20

30

40

【0162】

【化 3 - 2】

アミノ酸	アンチコドン	3番目の塩基 での塩基対形成	コドン	アミノ酸	アンチコドン	塩基対形成	コドン
Gly	GCC	W/C	GGC, GGA, GGG	Tyr	GUA	W/C	UAC
		ウオブル	GGU			ウオブル	UAU
Met		W/C	AUG	Thr		W/C	ACC, ACA, ACG
Gln		W/C	CAA, CAG			ウオブル	ACU
Arg		W/C	AGA, AGG, CGU, CGG	Pro		W/C	CCC, CCA, CCG
		ウオブル	CGC, CGA	Trp		ウオブル	CCU
						W/C	UGG
停止		W/C	UGA, UAA	Val		W/C	GUC, GUA
		ウオブル	UAG			ウオブル	GUU, GUG

¹ ワトソン・クリック塩基対

² ウオブル塩基対

単一の tRNA が、その tRNA のアンチコドンと 1 つのコドンの間の完全相補的相互作用によりコドンを確認するとき、それはワトソン・クリック塩基対と呼ばれる。単一の tRNA が、第二の縮重コドンを確認するとき、それは、ウオブルまたは他の非標準的塩基対と呼ばれる。本明細書に開示する一定の実施形態において、縮重コドンまたは非天然アミノ酸のためのコドンに好ましくは相補的であるアンチコドン配列を有する、従って、ワトソン・クリック塩基対を利用する、新規 tRNA を構築することができる。同様に、代替アミノ酸（野生型以外 — 別の自然発生アミノ酸であってもよいし、または非天然アミノ酸であってもよい）を利用して対応する tRNA をアミノアシル化する、新規 AARS を構築することができる。これは、代替アミノ酸の組み込みのための tRNA 分子の改変に加えてであってもよいし、またはその代わりにであってもよい。

【0163】

改変 AARS は、非天然アミノ酸または別の選択された自然発生アミノ酸への結合効率が、対応する天然アミノ酸へのその改変 AARS の結合効率より大きくなるように、改変することができる。このようにして、改変 AARS は、非改変状態の AARS に対応する自然発生アミノ酸の存在下でさえ、非天然アミノ酸に優先的に結合して tRNA にチャージすることができる。アミノアシル tRNA シンターゼのこの「再プログラミング」は、所望の部位への他のアミノ酸の誤った組み込みは低レベルで、非天然アミノ酸をポリペプチドに組み込むことができる。

【0164】

この「再プログラミング」により、標準宿主細胞への高い組み込みレベルを有する、および栄養要求性宿主細胞を必要としない、および対応する天然アミノ酸の培地を枯渇させるまたはさせない、改変または外的突然変異体シンターゼの使用を可能にすることができる。従って、本明細書に開示する一定の実施形態は、栄養要求性宿主細胞を使用することにより実施することができ、一定の他の実施形態は、栄養要求性宿主細胞を使用せずに

10

20

30

40

50

実施することができる。一定の実施形態を実施するために栄養要求性宿主細胞を使用しない事象では、別の宿主細胞を使用してもよいし、細胞成分を使用してもよいし、またはまったく細胞の無い系を使用してもよい。

【0165】

細胞が、特定のアミノ酸についての多数の tRNA 分子を有するとき、および 1 つの tRNA が、選択された縮重コドンに完全に相補的なアンチコドンを有するとき、tRNA をコードする遺伝子は、例えば、部位特異的突然変異誘発、または遺伝子もしくは遺伝子のプロモーター配列の欠失をはじめとする、当業者が利用できる任意の手段によって、不能にすることができる。遺伝子の発現も、任意のアンチセンスまたは RNA 干渉技術によって、不能にすることができる。

10

【0166】

(非天然または非天然アミノ酸)

タンパク質工学プロセスにおける第一工程は、通常、所望の化学特性を有する 1 セットの非天然アミノ酸または非天然アミノ酸の選択である。非天然アミノ酸の選択は、有することを望む所定の化学特性、および標的タンパク質において行うことを望む改変に依存する。非天然アミノ酸を選択したら、それを供給業者から購入してもよいし、または化学合成してもよい。

【0167】

多種多様な非天然アミノ酸または非天然アミノ酸を、本明細書に開示する方法において使用することができる。非天然アミノ酸は、その非天然アミノ酸の所望される特性、例えば、その非天然アミノ酸の機能（例えば、タンパク質の生物学的特性、例えば毒性、生体内分布、免疫原性もしくは半減期；構造特性；分光学的特性；化学および／または光化学的特性；触媒特性；他の分子と（共有結合的に、または非共有結合的に）反応する能力などの改変）に基づいて選択することができる。

20

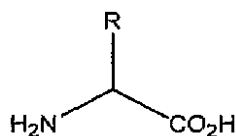
【0168】

本明細書で用いる場合、「非天然アミノ酸」は、セレノシステインおよび次の 20 の遺伝子コード化アルファアミノ酸：アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、以外の任意のアミノ酸、改変アミノ酸またはアミノ酸類似体を指す。アルファアミノ酸の一般構造は、式 I によって図示される：

30

【0169】

【化 4】



式 I

非天然アミノ酸は、一般に、式中の R 基が前記 20 の天然アミノ酸に用いられているものの以外の任意の置換基である式 I を有する任意の構造である。例えば、前記 20 の天然アミノ酸の構造については任意の生化学テキスト、例えば、Biochemistry by L. Stryer, 3rd ed. 1988, Freeman and Company, New York を参照のこと。本明細書に開示する非天然アミノ酸が、上の 20 のアルファアミノ酸以外の自然発生化合物である場合もあることに留意すること。本明細書に開示する非天然アミノ酸は、一般に、側鎖に関してしか天然アミノ酸とは異ならないので、非天然アミノ酸は、他のアミノ酸（例えば、天然または非天然アミノ酸）とのアミド結合を、それらが自然発生タンパク質の中で形成されているのと同じように形成する。しかし、非天然アミノ酸は、それらを天然アミノ酸と区別する側鎖を有する。例えば、式 I 中の R は、アルキル、アリール、アリールハライド、ビニルハライド、アルキル

40

50

ハライド、アセチル、ケトン、アジリジン、ニトリル、ニトロ、ハライド、アシルー、ケトー、アジドー、ヒドロキシー、ヒドラジン、シアノー、ハロー、ヒドラジン、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオエーテル、エポキシド、スルホン、ボロン酸、ボロン酸エステル、ボラン、フェニルボロン酸、チオール、セレノー、スルホニル、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環一、ピリジル、ナフチル、ベンゾフェノン、拘束された環、例えばシクロオクチン、チオエステル、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、アミノ、カルボン酸、アルファケトカルボン酸、アルファもしくはベータ不飽和酸およびアミド、グリオキシルアミドまたはオルガノシラン基など、あるいはこれらの任意の組み合わせを場合によっては含む。

【0170】

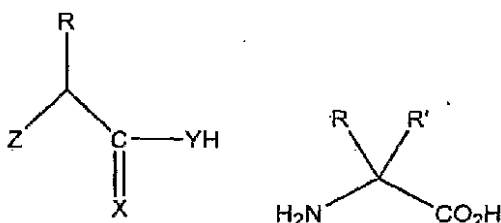
アリール置換は、様々な位置、例えばオルト、メタ、パラ、において、そのアリール環上に位置する1つ以上の官能基で行うことができる。目的とする他の非天然アミノ酸としては、光活性化可能な架橋剤、スピン標識アミノ酸、色素標識アミノ酸、蛍光アミノ酸、金属結合アミノ酸、金属含有アミノ酸、放射性アミノ酸、新規官能基を有するアミノ酸、改変された親水性、疎水性、極性または水素結合能力を有するアミノ酸、他の分子と共有結合的にまたは非共有結合的に相互作用するアミノ酸、フォトケージングされたおよび／または光異性体化可能なアミノ酸、ビオチンまたはビオチン類似体を含むアミノ酸、グリコシル化アミノ酸、例えば糖置換セリン、他の炭水化物改変アミノ酸、ケト含有アミノ酸、ポリエチレングリコールもしくはポリエーテル、ポリアルコールまたは多糖類を含むアミノ酸、複分解され得るアミノ酸、付加環化され得るアミノ酸、重原子置換アミノ酸、化学的解裂可能なおよび／または光解裂可能なアミノ酸、天然アミノ酸と比較して伸長された（例えば、炭素が約5個多いまたは約10個多い）側鎖（例えば、ポリエーテルまたは長鎖炭水化物）を有するアミノ酸、炭素連結糖含有アミノ酸、レドックス活性アミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、薬物部分を含有するアミノ酸、ならびに1つ以上の毒性部分を含むアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0171】

新規側鎖を含有する非天然アミノ酸に加えて、非天然アミノ酸は、例えば式 I I および I I I の構造によって図示されるような、改変骨格構造も場合によっては含む：

【0172】

【化5】



式 II

式 III

（式中、Zは、一般に、OH、NH₂、SH、NH₂O-、NH-R'、R'NH-、R'S-、またはS-R'-を含み；XおよびYは、同じかまたは異なることがあり、一般に、S、NまたはOを含み；ならびにRおよびR'は、場合により同じであるか異なり、一般に、式 I を有する非天然アミノ酸について上で説明したR基についてのものと同じ成分リストおよび水素または(CH₂)_xもしくは天然アミノ酸側鎖から選択される）。例えば、本明細書に開示する非天然アミノ酸は、式 I I および I I I によって図示したようなアミノ酸またはカルボキシル基に関する置換を場合によっては含む。このタイプの非天然アミノ酸としては、例えば上記20の天然アミノ酸にまたは非天然アミノ酸側鎖に対応する側鎖を有する、α-ヒドロキシ酸、α-チオ酸α-アミノチオカルボキシレート、またはα-α-二置換アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。それらには、β-アミノ酸またはγ-アミノ酸、例えば、置換β-アラニンおよびγ-アミノ酪酸もが挙げ

られるが、これらに限定されない。加えて、 α -炭素における置換または改変は、LまたはD異性体、例えば、D-グルタメート、D-アラニン、D-メチル-L-チロシン、およびアミノ酪酸などを場合によっては含む。他の構造的選択肢としては、環状アミノ酸、例えば、プロリン類似体ならびに3、4、6、7、8および9員環プロリン類似体が挙げられる。一部の非天然アミノ酸、例えば、アリールハライド（p-ブロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン）は、アリールハライドと多種多様なカップリングパートナーとの間で炭素-炭素、炭素-窒素および炭素-酸素結合を形成することができる、エチンまたはアセチレン反応との多様なパラジウム触媒クロスカップリング反応を生じさせる。

【0173】

例えば、多くの非天然アミノ酸アミノ酸は、天然アミノ酸、例えばチロシン、グルタミン、フェニルアラニンなどに基づく。チロシン類似体としては、パラ置換チロシン、オルト置換チロシンおよびメタ置換チロシンが挙げられ、前記置換チロシンは、アセチル基、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C6〜C20直鎖または分枝炭化水素、飽和または不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基などを含む。加えて、多置換アリール環も考えられる。グルタミン類似体としては、 α -ヒドロキシ誘導体、 β -置換誘導体、環状誘導体、およびアミド置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。例示的フェニルアラニン類似体としては、メタ置換フェニルアラニン（この場合の置換基は、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、またはアセチル基などを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0174】

非天然アミノ酸の具体的な例としては、ホモアリルグリシン、シス-またはトランス-クロチルグリシン、6,6,6-トリフルオロ-2-アミノヘキサン酸、2-アミノヘプタン酸、ノルバリン、ノルロイシン、O-メチル-L-チロシン、o-, m-またはp-メチルフェニルアラニン、O-3-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジドフェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨードフェニルアラニン、o-, m-またはp-ブロモフェニルアラニン、2-, 3-または4-ピリジルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、ジアミノ酪酸、アミノ酪酸、ベンゾフラニルアラニン、3-ブロモチロシン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-ブロモインドリル)アラニン、3-(5-ブロモインドリル)アラニン、p-クロロフェニルアラニン、p-エチニルフェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシフェニルアラニン、m-エチニルフェニルアラニン、6-エチニルトリプトファン、5-エチニルトリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロール-3-イル)プロパン酸、アジドノルロイシン、アジドホモアラニン、p-アセチルフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、ホモプロパルギルグリシン、p-エチルフェニルアラニン、p-エチニルフェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシフェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-ヨードチロシン、O-プロパルギルチロシン、ホモグルタミン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、3-ニトロ-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、m-アセチル-L-フェニルアラニン、セレノメチオニン、テルロメチオニン、セレノシステイン、アルキンフェニルアラニン、O-アリル-L-チロシン、O-(2-プロピニル)-L-チロシン、p-エチルチオカルボニル-L-フェニルアラニン、p-(3-オキソブタノイル)-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホス

10

20

30

40

50

ホノセリン、ホスホノチロシン、ホモプロパルギルグリシン、アジドホモアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、p-ブromo-L-フェニルアラニン、ジヒドロキシフェニルアラニン、ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン、p-ニトロ-L-フェニルアラニン、m-メトキシ-L-フェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、p-ブromoフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、およびイソプロピル-L-フェニルアラニン、トリフルオロロイシン、ノルロイシン、4-、5-または6-フルオロトリプトファン、4-アミノトリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、ビオシチン、アミノオキシ酢酸、m-ヒドロキシフェニルアラニン、m-アリルフェニルアラニン、m-メトキシフェニルアラニン基、 β -GlcNAc-セリン、 α -GalNAc-トレオニン、p-アセトアセチルフェニルアラニン、パラ-ハローフェニルアラニン、セレノフェニルアラニン、エチオニン、S-ニトロソーホモシステイン、チア-プロリン、3-チエニルアラニン、ホモ-アリルグリシン、トリフルオロイソロイシン、トランスおよびシス-2-アミノ-4-ヘキセン酸、2-ブチニルグリシン、アリルグリシン、パラ-アジドフェニルアラニン、パラ-シアノフェニルアラニン、パラ-エチニルフェニルアラニン、ヘキサフルオロロイシン、1, 2, 4-トリアゾール-3-アラニン、2-フルオロヒスチジン、L-メチルヒスチジン、3-メチル-L-ヒスチジン、 β -2-チエニル-L-アラニン、 β -(2-チアゾリル)-DL-アラニン、ホモプロパルギルグリシン (HPG) ならびにアジドホモアラニン (AHA) などをはじめとする、o、mおよび/またはp形のアミノ酸またはアミノ酸類似体（非天然アミノ酸）が挙げられるが、これらに限定されない。様々な非限定的な非天然アミノ酸の構造は、図、例えば、US 2003/0108885 A1（この全内容が本明細書に参照により取り入れられている）の図29、30および31、で提供されている。

【0175】

チロシン類似体としては、パラ置換チロシン、オルト置換チロシンおよびメタ置換チロシン（この場合の置換基は、アセチル基、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシアミン、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C6~C20直鎖または分枝炭化水素、飽和または不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基などを含む）が挙げられる。加えて、多置換アリール環も考えられる。本発明のグルタミン類似体としては、 α -ヒドロキシ誘導体、 β -置換誘導体、環状誘導体、およびアミド置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。フェニルアラニン類似体の例としては、メタ置換フェニルアラニン（この場合の置換基は、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、またはアセチル基などを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0176】

加えて、他の例としては、チロシンアミノ酸の非天然類似体；グルタミンアミノ酸の非天然類似体；フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体；セリンアミノ酸の非天然類似体；トレオニンアミノ酸の非天然類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケトもしくはアミノ置換アミノ酸、またはこれらの任意の組み合わせ；光活性化可能な架橋剤有するアミノ酸；スピン標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；新規官能基を有するアミノ酸；別の分子と共有結合的にまたは非共結合的に相互作用するアミノ酸；金属結合アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射活性アミノ酸；フォトケージングされたアミノ酸；光異性体化可能なアミノ酸；ビオチンまたはビオチン類似体含有アミノ酸；グリコシル化されたまたは炭水化物で改変されたアミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレングリコールを含むアミノ酸；ポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学的解裂可能なまたは光解裂可能なアミノ酸；伸長された側鎖を有するアミノ酸；毒性基を含有するアミノ酸；糖置換アミノ酸、例えば糖置換セリンなど；炭素連結糖含有アミノ酸；レドックス活性アミノ酸； α -ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸含有アミノ酸； α , α 二置換アミノ酸； β -アミノ

10

20

30

40

50

酸；ならびに環状アミノ酸が場合によっては挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

一般に、本明細書において一定の実施形態に利用する非天然アミノ酸は、上記20の天然アミノ酸では入手できない追加の特性をもたらすように選択または設計することができる。例えば、非天然アミノ酸は、例えばそれらが組み込まれるタンパク質の生物学的特性を改変するように、場合によっては設計または選択される。例えば、タンパク質に非天然アミノ酸を含めることにより、次の特性が場合によっては改変される：毒性、生体内分布、溶解度、安定性（例えば、熱安定性、加水分解安定性、酸化安定性、耐酵素分解性など）、精製および加工の容易さ、構造特性、分光学的特性、化学および／または光化学的特性、触媒活性、レドックス電位、半減期、他の分子と（例えば、共有結合的にまたは非共有結合的に）反応する能力など。

10

【0178】

アミノ酸類似体の他の例としては、チロシニアミノ酸の非天然類似体；グルタミンアミノ酸の非天然類似体；フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体；セリンアミノ酸の非天然類似体；トレオニンアミノ酸の非天然類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケトもしくはアミノ置換アミノ酸、またはこれらの任意の組み合わせ；光活性化可能な架橋剤有するアミノ酸；スピン標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；新規官能基を有するアミノ酸；別の分子と共有結合的にまたは非共有結合的に相互作用するアミノ酸；金属結合アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射活性アミノ酸；フォトケーシングされたアミノ酸；光異性体化可能なアミノ酸；ピオチンまたはピオチン類似体含有アミノ酸；グリコシル化されたまたは炭水化物で改変されたアミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレングリコールを含むアミノ酸；ポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学的解裂可能なまたは光解裂可能なアミノ酸；伸長された側鎖を有するアミノ酸；毒性基を含有するアミノ酸；糖置換アミノ酸、例えば糖置換セリンなど；炭素連結糖含有アミノ酸；レドックス活性アミノ酸； α -ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸含有アミノ酸； α 、 α 二置換アミノ酸； β -アミノ酸；ならびにプロリン以外の環状アミノ酸が場合によっては挙げられる（しかし、これらに限定されない）。

20

30

【0179】

（アミノアシルー tRNA シンテターゼ）

本明細書に開示する一定の方法において使用されるアミノアシルー tRNA シンテターゼ（本明細書では、AARS、RSまたは「シンテターゼ」と交換可能に用いている）は、同じもの（同種）であろうと、異なるもの（異種）であろうと生物に由来する天然シンテターゼ、突然変異もしくは改変されたシンテターゼ、または設計されたシンテターゼであり得る。

【0180】

使用されるシンテターゼは、利用可能な関連アミノ酸に関して所望の（非天然）アミノ酸類似体を選択的に認識することができる。例えば、使用されることとなるアミノ酸類似体が、自然発生アミノ酸に構造的に関連している場合、シンテターゼは、その自然発生アミノ酸のものと少なくとも実質的に等価の効率、およびさらに好ましくはその天然アミノ酸のものより少なくとも約2倍、3倍、4倍、5倍またはそれ以上の効率で、所望のアミノ酸類似体を外的突然変異体 tRNA 分子にチャージしなければならない。しかし、明確なタンパク質産物が不要でないケースでは、シンテターゼは、緩和されたアミノ酸チャージ特異性を有することがある。こうした実施形態では、様々なアミノ酸または類似体と外的突然変異体 tRNA の混合物が生産されるだろう。

40

【0181】

一定の実施形態において、シンテターゼは、アミノ酸類似体と tRNA 分子の対応するコドンによってコードされるアミノ酸の両方に対する活性を有する。

50

【0182】

シンテターゼは、例えば、コンピュータ計算法、選択法、および他の生物からのシンテターゼの組み込みなどの技法の組み合わせをはじめとする、当業者には公知の様々な技法によって得ることができる（下記参照）。

【0183】

一定の実施形態では、宿主細胞のシンテターゼによってチャージされない tRNA 分子を効率的にチャージするシンテターゼを使用または発生させることができる。例えば、一般に、宿主細胞とは異なる生物からのシンテターゼの改変によって適するペアを生成することができる。一定の実施形態において、前記シンテターゼは、選択手順によって発生させることができる。一定の実施形態において、前記シンテターゼは、Datta, J. Am. Chem. Soc. 124: 5652-5653, 2002、および米国特許第 7, 139, 665 号（これらは、本明細書に参照により取り入れられている）に記載されているものなどのコンピュータ計算技術を用いて設計することができる。

10

【0184】

（AARS のコンピュータによる設計）

具体的に言うと、1つの実施形態において、本方法は、非カノニカルアミノ酸類似体を基質として取り込み、そうした非カノニカルアミノ酸を改変 tRNA にチャージする（そのアンチコドンにチャージする）ことができるような、緩和された基質特異性を有する改変形への、天然 AARS の設計および工学処理に、一部、依存する。後続の段落は、そうした改変 AARS の生成方法を簡単に説明するものであり、この方法は、米国特許第 7, 139, 665 号（この全内容が本明細書に参照により取り入れられている）に、より詳細に記載されている）。

20

【0185】

簡単に言うと、その中に記載されている一部の実施形態の方法は、その酵素が、タンパク質翻訳系において、インビトロで、全細胞において、または他の翻訳系において、アミノ酸類似体をより効率的に利用できるようにするように、突然変異によりアミノアシル tRNA シンテターゼ（AARS）の基質特異性を改変するためのコンピュータ計算ツールに関する。一部の実施形態の特徴としては、AARS 酵素の基質結合部位を系統的に再設計して、その酵素が触媒するペプチドまたはタンパク質翻訳反応での非天然アミノ酸基質の使用を助長することが挙げられる。

30

【0186】

1つの方法によると、人工アミノ酸のロータマライブラリーは、そのねじれ角を変えて、その天然基質のための結合ポケットに適合するロータマーを作ることによって、構築される。そのアミノ酸類似体の骨格の幾何学的配向は、その結晶構造におけるその天然基質の骨格の結晶配向によって規定される。構造類似性に依存して、生物特異的アミノ酸シンテターゼの結晶構造を用いてもよいし、または別の生物からの相同構造を用いてもよい。その後のタンパク質設計計算において、その類似体上の側鎖と相互作用するそのシンテターゼの結合ポケット内のアミノ酸を同一性およびロータマーの配座に関して変化させることができる。

40

【0187】

1つのそうしたプロトコルもコンピュータ計算法を利用して、基質位置とタンパク質位置の間の相互作用を強化する。これは、エネルギー計算においてそのタンパク質上の設計位置で許される基質とアミノ酸とのペアでのエネルギーを拡大することによって行う。タンパク質間相互作用と比較して、タンパク質-基質相互作用を拡大する最適化計算では、配列選択を、基質との好適な相互作用を有するものであるようなアミノ酸の選択にかたよらせる。

【0188】

記載されている方法は、関連 *Thermus thermophilus* PheRS (tPheRS) の公知構造に基づいて、新規組換え形の *E. coli* フェニルアラニルトRNAシンテターゼを構築するために役立った。この新規改変形の *E. coli* フェニ

50

ルアラニル-tRNAシンテターゼ (ePheRS) は、組換えタンパク質への反応性アリアルケトン官能基の効率的なインビボ組み込みを可能にする。加えて、改変トリプトファン-tRNAシンテターゼを同様に改変し、自然発生トリプトファンの代わりにポリペプチドに非天然アミノ酸類似体を組み込むことができることを実証した。そこに記載されている結果は、非天然アミノ酸の活性化およびチャージのためのアミノアシル-tRNAシンテターゼの開発におけるコンピュータでのタンパク質設計の総体的能力も明示している。

【0189】

(A. tRNAシンテターゼについての入手可能な配列および構造情報)

mRNAテンプレートからのタンパク質翻訳は、リボソームによって行われる。翻訳プロセスの間、それぞれのtRNAを、それがリボソームに達するかなり前に、そのアミノ酸類似体とマッチングする。このマッチングは、アミノアシル-tRNAシンテターゼ (AARS) として知られている酵素のコレクションによって行われる。これらの酵素は、それぞれのtRNAに正しいアミノ酸をチャージし、その結果、それぞれのtRNAは、DNA (およびそのDNAから転写されたmRNA) の遺伝子コードからタンパク質のアミノ酸コードへの正しい翻訳を行うことができることとなる。

【0190】

大部分の細胞は、20の異なるアミノアシル-tRNAシンテターゼを、アミノ酸のそれぞれのタイプについて1つ作る。これらの20の酵素を、その固有の特定のアミノ酸、およびそのアミノ酸に適するtRNA分子のセットで、機能について、それぞれ最適化する。アミノアシル-tRNAシンテターゼは、高精度でそれらのタスクを行わなければならない。これらの酵素の多くは、それらのtRNA分子をアンチコドンを用いて認識する。これらの酵素は、10,000中1つの間違いを起こす。大部分のアミノ酸にとって、この精度レベルを達成することは然程難しくない。大部分のアミノ酸は、互いに全く異なるからである。

【0191】

本方法において、tRNAについてのAARS結合ポケットの正確な説明記述は、コンピュータ設計アプローチにとって (それが、タンパク質骨格の説明記述のために結晶構造に依存するので) 重要であるが、結晶学的結合ポケット構造の説明記述の代わりに相同タンパク質 (例えば、関連種からの相同体) の結晶構造を用いること、または保存ドメインを用いることさえ、完全に許容されることが多い。結晶構造は、シンテターゼの結合ポケット内の天然基質アミノ酸の配向、ならびにシンテターゼ残基、特に、その結合ポケットの中および周囲の残基、に対するそのアミノ酸基質の相対位置も規定する。類似体のための結合ポケットを設計するには、これらの類似体とその天然基質アミノ酸と同じ配向でそのシンテターゼに結合することが好ましい。この配向は、アデニル化工程にとって重要であり得るからである。

【0192】

AARSは、原核生物および真核生物をはじめとする任意の生物からのものであってよく、細菌、真菌、苛酷な環境で生きられる生物 (extremophiles)、例えば古細菌、蠕虫、昆虫、魚、両生類、鳥類、動物 (特に、哺乳動物および特にヒト) ならびに植物からの酵素がすべて可能である。

【0193】

上に記載したように、大部分の細胞は、20の異なるアミノアシル-tRNAシンテターゼを、アミノ酸のそれぞれのタイプについて1つ作る。幾つかの適するシンテターゼが知られており、酵母フェニルアラニル-tRNAシンテターゼ (Kwonら, J. Am. Chem. Soc. 125:7512-7513, 2003); メタノコッカス・ヤナイシ・チロシン-tRNAシンテターゼ (Wangら, Science 292, 498-500, 2001)、および酵母チロシル-tRNAシンテターゼ (Ohnoら, J. Biochem. 130, 417-423, 2001) を含む。実際、20の異なるAARS酵素ほぼすべてについての結晶構造は、現在、Brookhaven Protein

Data Bank (PDB、Bernsteinら, J. Mol. Biol. 112: 535-542, 1977参照)から入手できる。2001年4月現在、結晶構造が解明されているすべてのAARSのリストをPDBウェブサイトから入手することができる。例えば、フェニルアラニンと複合したサーマス・アクアティクス (Thermus Aquaticus) フェニルアラニンtRNAシンテターゼの結晶構造は、2.7 Åの分解能を有し、そのPDB IDは、1B70である。

【0194】

前記構造データベースまたは分子モデリングデータベース (MMDB) は、結晶学的およびNMR構造決定からの実験データを含む。MMDBについてのデータは、タンパク質データバンク (Protein Data Bank (PDB)) から得られる。NCBI (米国国立生物工学情報センター) は、構造データを、文献情報に、配列データベースに、およびNCBI分類にクロスリンクした。Entrezからの分子構造の簡単な対話式視覚化には、Cn3D (NCBI 3D構造ビューア) を用いることができる。

【0195】

Entrez 3D Domainsデータベースは、NCBI Conserved Domain Database (CDD) からのタンパク質ドメインを含む。計算生物学者は、反復配列パターンまたはモチーフに基づいて保存ドメインを規定する。CDDは、現在、2つの評判の良いコレクション (SmartおよびPfam) とNCBIでの同僚からの寄贈品 (例えば、COG) に由来するドメインを含む。これらのソースデータベースも説明記述を提供し、引用箇所にリンクしている。保存ドメインは、コンパクトな構造単位に対応するので、CDは、可能な限りCn3Dによる3D構造へのリンクを含む。

【0196】

タンパク質配列内の保存ドメインを同定するために、CD-Searchサービスは、逆方向位置特異的BLASTアルゴリズムを利用する。基礎となる保存ドメインのアラインメントから作製された位置特異的スコアマトリックスと問い合わせ配列を比較する。問い合わせ配列と代表ドメイン配列のペアでのアラインメントとして、または多重アラインメントとして、ヒットを表示することができる。さて、CD-Searchをタンパク質PLAST検索と並行してデフォルトによって実行する。使用者が、要求をさらに処理するためにBLASTのキューを待っている間に、その問い合わせのドメイン構造を早くも検討することができる。加えて、CDART (保存ドメイン構造検索ツール (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool)) により、使用者は、類似したドメイン構造を有するタンパク質を検索することができる。CDARTは、事前のコンピュータでのCD検索結果を使用して、問い合わせのものに類似した1セットのドメインを有するタンパク質を迅速に同定する。さらなる詳細については、Marchler-Bauerら, Nucleic Acids Research 31:383-387, 2003、およびMarchler-Bauerら, Nucleic Acids Research 30:281-283, 2002参照。

【0197】

加えて、公知アミノアシルtRNAシンテターゼのデータベースは、Maciej Szymanski、Marzanna A. DeniziakおよびJan BarciszewskiによってNucleic Acid Res. 29:288-290, 2001 (「Aminoacyl-tRNA synthetase database」と題する) に発表されている。対応するウェブサイト (rose.man.poznan.pl/aars/seq_main.html) は、様々な種からのほぼすべての公知AARSの詳細を提供している。例えば、このデータベースによると、放射線耐性菌デインコッカス・ラジオデュランス (Deinococcus radiodurans) (アクセッション番号AAF10907) のイソロイシルtRNAシンテターゼは、1078のアミノ酸を有し、Whiteらにより、Science 286:1571-1577 (1999) に発表されており；マウス (Mus musculus (ハツカネズミ)) のバリルーtRNAシンテターゼは、1263のアミノ酸を有し (アクセッション番

号A A D 2 6 5 3 1)、Snoek M. およびvan Vugt H. により、Immunogenetics 49:468-470 (1999) に発表されており；ならびにヒト、ショウジョウバエ、S. pombe および S. cerevisiae、Candida albicans、E. coli および非常の多数の他の細菌（サーマス・アクアティクス種サーモフィルスを含む）のフェニルアラニル tRNA シンテターゼ配列も入手できる。このデータベースは、最後に2006年11月にアップデートされた。他の新たに同定されたAARSについての類似の情報は、例えば、利用可能な公共データベース（例えば、NCBIにおける非齧歯動物データベース、すなわち、「nr」）または所有者のある私有データベースに対してAARSデータベース内の任意の公知配列を問い合わせとして使用してBLAST検索を行うことにより、得ることができる。

10

【0198】

あるいは、一定の実施形態において、特定のAARSの正確な結晶構造は判らないが、そのタンパク質配列が、公知の結晶構造を有する公知のAARS配列に類似しているまたは相同である場合。そうした場合、問題のAARSの配座は、その相同AARSの公知の結晶構造に類似していると予想される。従って、その既知構造を、目的とするAARSについての構造として用いることができ、または、さらに好ましくは、目的とするAARSの構造を予測する（すなわち、「相同性モデリング」または「分子モデリング」）ために用いることができる。特定の例として、上に記載した分子モデリングデータベース（MMDB）（Wangら、Nucl. Acids Res. 2000, 28:243-245；Marchler-Bauerら、Nucl. Acids Res. 1999, 27:240-243参照）は、三次元構造が判っている隣接配列を含む、タンパク質配列（MMDBでは「隣接」配列と呼ばれている）に類似しているまたは相同であるタンパク質および／または核酸を同定するために用いることができる検索エンジンを提供している。このデータベースは、公知の構造と共にアラインメントおよび視覚化ツール、例えばCn3D（NCBIによって開発されたもの）、RasMolなどへのリンクをされに提供しており、それによって、相同および親配列を比較することができ、そうした配列アラインメントおよび公知の構造に基づいてその親配列についての構造を得ることができる。

20

【0199】

3D構造が判っている相同AARS配列は、アミノ酸基質結合のための活性部位領域またはポケット領域において、目的とするAARSと、好ましくは少なくとも約60%、または少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約95%、または少なくとも約98%同一である。こうした活性部位またはポケットは、遠いアミノ酸がその3D構造内で集まることができるので、AARSの一次アミノ酸配列の中で連続していなくてもよい。この場合、配列相同性または同一性は、例えば、互いにアラインされる（比較される2つの配列のいずれにも挿入および欠失がない）および基質アミノ酸結合に関与することが判っている残基を含む領域において、デフォルト条件を用いるNCBI標準BLASTpプログラムを用いて、計算することができる。例えば、サーマス・アクアティクスフェニルアラニル tRNA シンテターゼ触媒（アルファ）サブユニットは、他の種からのその相同体と比較したとき、残基156から165の「挿入」領域を有するようである。この領域は、配列同一性の計算では無視することができる。あるいは、相同AARSは、好ましくは、全体的に見て、目的とするAARSと約35%、または40%、または45%、または50%または55%同一である。E. coli フェニルアラニル tRNA シンテターゼアルファサブユニットは、サーマス・アクアティクスフェニルアラニル tRNA シンテターゼと、全体的にみて約45%同一であり、および活性部位領域において約80%同一である。ヒトフェニルアラニル tRNA シンテターゼアルファサブユニットは、そのショウジョウバエ、蠕虫（C. elegans）、植物（Arabidopsis thaliana）、酵母（S. cerevisiae）対照物と、それぞれ、全体的に見て約62%、60%、54%、50%同一である。

30

40

【0200】

特定のAARS配列が判らないまたは入手できないことがある少数のケースでは、常例

50

的実験技術（例えば、X線結晶学および核磁気共鳴（NMR）分光学）を用い、過度な実験を伴わずに、その構造を決定することができる。例えば、NMR of Macromolecules: A Practical Approach, G. C. K. Roberts, Ed., Oxford University Press Inc., New York (1993); Ishima and Torchia, Nat. Struct. Biol. 7:740-743, 2000; Gardner and Kay, Annu. Rev. Bioph. Biom. 27:357-406, 1998; Kay, Biochem. Cell. Biol. 75:1-15, 1997; Dayieら, Annu. Rev. Phys. Chem. 47:243-282, 1996; Wuthrich, Acta Crystallogr. D 51:249-270, 1995; Kahnら, J. Synchrotron Radiat. 7:131-138, 2000; Oakley and Wilce, Clin. Exp. Pharmacol. P. 27:145-151, 2000; Fourmeら, J. Synchrotron Radiat. 6:834-844, 1999 参照。

10

【0201】

あるいは、AARSの三次元構造は、それ自体の配列から計算することができ、および当該技術分野において既に知られている分子モデリング技術を最初から用いて計算することができる。例えば、Smithら, J. Comput. Biol. 4:217-225, 1997; Eisenhaberら, Proteins 24:169-179, 1996; Bohm, Biophys. Chem. 59:1-32, 1996; Fetrow and Bryant, BioTechnol. 11:479-484, 1993; Windells and Thornton, Curr. Opin. Biotech. 2:512-519, 1991; Levittら, Annu. Rev. Biochem. 66:549-579, 1997; Eisenhaberら, Crit. Rev. Biochem. Mol. 30:1-94, 1995; Xiaら, J. Mol. Biol. 300:171-185, 2000; Jones, Curr. Opin. Struct. Biol. 10:371-379, 2000 参照。最初からのモデリングにより得られる三次元構造は、経験的技術（例えば、NMR分光学もしくはX線結晶学）または半経験的技術（例えば、相同モデリング）を用いて得られる構造より、一般に信頼性が低い。しかし、こうした構造は、一般に、本明細書に開示する一部の方法での使用には、あまり好ましくはないが、十分な質のものであろう。

20

30

【0202】

（B. 配列相同性に基づく3D構造の予測法）

結晶化されておらず、他の構造決定のまともになっていないAARSタンパク質についても、やはり、当該技術分野において利用できる多数の技術を用いて、AARSおよびその結合部位のコンピュータ作成分子モデルを作成することができる。例えば、相同モデリング技術を用いて、標的AARS配列のC_α-カーボン位置を、類似した配列を有するAARS酵素（「公知AARS」）の特定の配位パターンにマッピングして構造を導出し、その標的タンパク質の構造およびそれぞれの原子の速度を、アミノ酸類似体とのドッキングシミュレーションを決定することとなるシミュレーション温度（T₀）で計算することができる。一般に、こうしたプロトコルは、公知AARSタンパク質によって提供されるものなどの三次構造から得られる主鎖トレースを想定して、モデリングした標的タンパク質における側鎖配座を予測することを、主として含む。エネルギー最小化ルーチンを実行するためのコンピュータプログラムを一般に用いて、分子モデルを生成する。例えば、CHARMMアルゴリズム（Brooksら, (1983) J. Comput. Chem. 4:187-217）とAMBERアルゴリズム（Weinerら, (1981) J. Comput. Chem. 106:765）は両方とも、分子システムセットアップ、力場計算および分析のすべてを処理する（例えば、Eisenfieldら, (1991) Am J Physiol. 261:C376-386; Lybrand (1991) J Pharm Belg 46:49-54; Froimowitz (1990) Biote

40

50

chniques 8:640-644; Burbamら, (1990) Proteins 7:99-111; Pedersen (1985) Environ Health Perspect 61:185-190; および Kiniら, (1991) J Biomol Struct Dyn 9:475-488も参照)。これらのプログラムの中心は、そのモデルのすべての原子の位置を想定して、その系の全ポテンシャルエネルギーおよびそれぞれの原子に対する力を計算する、1セットのサブルーチンである。これらのプログラムは、原子配座とポテンシャルエネルギー関数の様々な項と分子トポロジー（共有結合構造）の説明記述のスターティングセットを利用し得る。こうした分子モデリングの共通の特徴としては、水素結合および他の拘束力の処理への対策；周期的境界条件の使用；ならびに温度、圧力、容積、拘束力または他の外部制御条件を維持または変化させるための位置、速度または他のパラメーターの臨機調整への対策が挙げられる。

10

【0203】

大部分の従来的なエネルギー最小化法は、入力配座データと、ポテンシャルエネルギー関数がデカルト座標の明確な微分可能関数であるという事実とを用いて、原子位置の任意のセットについてのポテンシャルエネルギーおよびその傾き（これは、それぞれの原子に対する力を与える）を計算する。この情報を用いて、全ポテンシャルエネルギーを減少させようとする中で座標の新たなセットを生成し、ならびにこのプロセスを何度も何度も繰り返すことにより、所与の外部条件セットのもとでの分子構造を最適化することができる。これらのエネルギー最小化法は、本AARSタンパク質に類似した分子に常例的に適用される。

20

【0204】

一般に、エネルギー最小化法は、所与の温度（ T_i ）について行われ、前記 T_i は、ドッキングシミュレーション温度（ T_o ）とは異なる場合がある。 T_i でその分子のエネルギーを最小化したら、その系におけるすべての原子の座標および速度をコンピュータ計算する。加えて、その系の正常モードを計算する。それぞれの正常モードが、その系のすべての部分が互いに同期して動く集団、周期運動であること、およびその分子の運動が、すべての正常モードの重ね合わせであることは、当業者には理解されるであろう。所与の温度についての特定モードでの運動の平均二乗振幅は、そのモードについての有効力定数に逆比例する。これに関しては、低周波数振動が、多くの場合、分子の運動を支配する。

【0205】

分子モデルを T_i でエネルギー最小化した後、所望の温度（ T_o ）に達するまで原子の速度を段階的に増減する平衡ランの実施により、その系をシミュレーション温度（ T_o ）に「加熱」または「冷却」する。その系の一定の特性、例えば平均運動エネルギーが一定した状態になるまで、所定の時間、その系をさらに平衡させる。その後、その平衡した系からそれぞれの原子の座標および速度を得る。

30

【0206】

さらなるエネルギー最小化ルーチンを行ってもよい。例えば、第二のクラスの方法は、タンパク質についての制約のあるEOMに対する近似的解の計算を含む。これらの方法は、反復アプローチを用いてラグランジュ乗数について解き、一般に、必要とされる補正が少ない場合には少しの反復しか必要としない。このタイプの最も評判の良い方法、SHAKE (Ryckaertら, (1997) J. Comput. Phys. 23:327; および Van Gunsterenら, (1977) Mol. Phys. 34:1311) は、実行が容易であり、制約の数が増すにつれて $O(N)$ として増減する。従って、この方法は、AARSタンパク質などの高分子に適用することができる。代替法、RATTLE (Anderson (1983) J. Comput. Phys. 52:24) は、ベルレットアルゴリズムの速度バージョンに基づく。SHAKEと同様に、RATTLEは、反復アルゴリズムであり、本AARSタンパク質のモデルのエネルギー最小化に用いることができる。

40

【0207】

(C. 代替法)

50

他の実施形態において、アミノ酸類似体のアイデンティティーを一定に保つことおよび（幾つかの異なる突然変異体構造をモデリングすることにより）AARS構造を変化させることなく、本方法は、（例えば、も1つの非アンカーアミノ酸残基が変更されている）単一の改変AARSについての分子モデルを使用し、様々な異なるアミノ酸類似体またはそれらの可能性のあるフラグメントをサンプリングして、その改変AARS酵素と相互作用し、その基質となる可能性が高い類似体を同定することによって行われる。このアプローチは、アミノ酸類似体（ロータマー変異体を含む）の座標ライブラリーを利用する場合もあり、または連結してアミノ酸類似体の側鎖を形成することができる官能基およびスパーサーのライブラリーを利用する場合もある。

【0208】

10

上で説明したものなどのアプローチ、例えば、相同モデリングを用いて、改変AARSの結合部位の座標セットを得ることができる。

【0209】

改変AARSの基質結合部位と相互作用するために適切な立体的および電子特性を有するであろうアミノ酸類似体の構造の同定に容易に適応させることができる様々なコンピュータ計算法がある。例えば、Cohenら、(1990) J. Med. Cam. 33: 883-894; Kuntzら、(1982) J. Mol. Biol. 161: 269-288; Des Jarlais (1988) J. Med. Cam. 31: 722-729; Bartlettら、(1989) (Spec. Publ., Roy. Soc. Chem.) 78: 182-196; Goodfordら、(1985) J. Med. Cam. 28: 849-857; Des Jarlaisら、J. Med. Cam. 29: 2149-2153) 参照。指示される方法は、一般に2つのカテゴリーに分類される：(1)（例えば、結晶学系データベースからの）既知の分子の3D構造をAARS結合部位構造とドッキングさせ、適合度について採点する、類推による設計；および(2) アミノ酸類似体モデルを、AARS結合部位において区分的に構築する、新規設計。特に、後者のアプローチは、本改変AARS結合部位に結合するように一意的に設計される新規分子の開発を助長することができる。

20

【0210】

例証となる実施形態において、特定の改変AARSとともに機能し得る可能性のあるアミノ酸類似体の設計は、酵素の基質結合部位に相補的な形状の全般的な見通しから始まり、その基質結合部位に幾何学的に合う候補について公知三次元構造の小分子のデータベースをスキャンすることができる検索アルゴリズムを利用する。そうしたライブラリーは、一般的な小分子ライブラリーであってもよいし、またはアミノ酸類似体もしくはアミノ酸類似体を作るために使用することができる小分子に関するライブラリーであってもよい。この形状検索において見つけれられる分子は、それら自体、必ずしも糸口にならないと思われる。化学的相互作用の評価は、必ずしも初期検索中になされないからである。むしろ、こうした候補は、適切な原子置換を行うことができる分子骨格を生じさせる、さらなる設計のための枠組みとしての役割を果たすと予想される。勿論、これらの分子の化学的相補性を評価してもよいが、原子タイプは、基質結合部位との静電的、水素結合性および疎水性相互作用を極大化させるために変更されることとなると予想される。このタイプの殆どのアルゴリズムは、AARS基質結合部位の形状に相補的であり得る化学的構造の幅広い組み合わせを見つける方法となる。

30

40

【0211】

例えば、特定のデータベース、例えばCambridge Crystallographic Data Bank (CCDB) (Allenら、(1973) J. Chem. Doc. 13: 119)、からのそれぞれの小分子セットを、ドッキングアルゴリズムを用いて多数の幾何学的に許容される配向で改変AARSの結合部位に個々にドッキングさせる。好ましい実施形態では、DOCKと呼ばれる1セットのコンピュータアルゴリズムを、結合部位を構成する陥入および溝の形状の特性付けに用いることができる。例えば、Kuntzら、(1982) J. Mol. Biol. 161: 269-288参照。こ

50

のプログラムは、その形状が改変AARSの特定の結合部位に相補的であるテンプレートについて小分子のデータベースを検索することもできる。この目的に適応させることができる例示的アルゴリズムは、例えば、Desjarlaisら、(1988) J. Med. Chem. 31: 722-729に記載されている。

【0212】

配向を適合度について評価し、最良のものは、分子力学プログラム、例えばAMBERまたはCHARMM、を用いるさらなる試験のために保持する。こうしたアルゴリズムは、受容体または酵素の所与の結合部位に形状が相補的である様々な分子でうまくいくことが以前に証明されており、幾つかの魅力的な特徴を有することが明らかになった。第一に、こうしたアルゴリズムは、非常に様々な分子構造を検索することができる。第二に、最良の構造は、他のタンパク質への以前の適用において、広い表面積全体にわたって堂々たる形状相補性を明示した。第三に、全アプローチが、候補原子の位置決めの小さな不確実性に関して相当強いようである。

【0213】

一定の実施形態において、本方法は、Goodford (1985, J. Med. Chem. 28: 849-857) およびBoobbyerら (1989, J. Med. Chem. 32: 1083-1094) によって記載されたアルゴリズムを利用することができる。これらの論文には、結合部位の分子表面の異なる化学基（プローブと呼ばれる）に対して親和性の高い領域を決定しようと努めるコンピュータプログラム（GRID）が記載されている。従って、GRIDは、結合を強化し得る公知リガンドの改変を提案するためのツールとなる。GRIDによって高親和性領域と識別される一部の部位は、一連の公知リガンドから推論により決定される「ファーマコフォアパタン」に対応すると予想できる。本明細書で用いる場合、ファーマコフォアパタンは、結合に重要と考えられる、予想されるアミノ酸類似体の特徴の幾何学的配置である。GoodsellおよびOlson (1990, Proteins: Struct. Funct. Genet. 8: 195-202) は、Metropolis (模擬アニーリング) アルゴリズムを用いて、単一の既知リガンドを標的タンパク質にドッキングした。彼等のアプローチは、AARS結合部位とのドッキングに適するアミノ酸類似体の同定に適応させることができる。このアルゴリズムは、アミノ酸側鎖にねじり可撓性を許容することができ、ならびに近似的相互作用エネルギーをコンピュータ計算するために高速参照テーブルとしてGRID相互作用エネルギーマップを使用することができる。

【0214】

さらに、さらなる実施形態は、立体的に許容もされ、候補分子と周囲アミノ酸残基との好適な化学的相互作用を達成する高い尤度も有するようにAARSの基質結合部位において配向させることができる小分子についてCCDBなどのデータベースを検索するCLIXなどのコンピュータアルゴリズムを利用する。この方法は、異なる化学基についての一団の好適結合位置による基質結合位置の特性付け、個々の候補化学基とその一団のメンバーとの最大の空間的一致を生じさせる候補分子の配向についてのその後の検索に基づく。現在、コンピュータ能力を利用するには、新規リガンドについてのコンピュータベースの検索が幅優先戦略に従うことが条件となる。幅優先戦略は、1つの候補の最大詳細分析を次に進む前に行う深さ優先戦略とは対照的に、次第にストリンジェンシーが増す基準の適用によって可能性のある候補検索空間のサイズを漸進的に減少させることを目的とする。CLIXは、結合についてのその分析が基本である（好適な結合相互作用が実際に発生する十分な条件を課さずとも、空間的適合の必要条件および結合のために「正しい」場所に個々の基を有するという必要条件を満たそうと努める）点で、この戦略に準拠する。好適な配向に関する分子の格付け「選抜候補リスト」を作り、その後、コンピュータグラフィックおよびさらに洗練された分子モデリング技術を用いてそれを分子単位で調査することができる。CLIXは、結合を強化し得る候補分子の置換化学基への変更を提案することもできる。重ねて、出発ライブラリーは、アミノ酸類似体のものである場合もあり、またはアミノ酸類似体の側鎖を生じさせるために用いることができる分子のものである場合も

ある。

【0215】

C L I X のアルゴリズムの詳細は、Lawrenceら(1992) Proteins 12:31-41に記載されており、このC L I Xアルゴリズムは、次のように要約することができる。G R I Dプログラムを用いて、多種多様な代表的化学基についてのA A R Sタンパク質の結合部位における別個の好適な相互作用位置(標的部位と呼ばれる)を決定する。C C D Bにおけるそれぞれの候補リガンドについて、そのタンパク質の結合位置における空間的な意味で、候補の置換化学基のペアとG R I Dによって提案される対応する好適な相互作用部位のペアとを一致させる網羅的試みを行う。リガンド基のペアとG R I D部位のペアのすべての可能な組み合わせがこの手順の間に考慮される。こうした一致を位置決めすると、このプログラムは、基の2つのペアについて候補リガンドを交代させ、立体障害および他の候補原子団と適する標的部位との一致について確認する。その結合部位において良好な幾何学的適合度であり、原子団とG R I D部位の十分な一致を示す特定の候補/配向の組み合わせを保持する。

10

【0216】

幅優先戦略と一致して、このアプローチは、仮定の単純化を含む。固定されたタンパク質および小分子の幾何形状が全体をとおして維持される。第一の近似として、固定された幾何形状は、たとえ局部的なものであってもその分子について最小のエネルギーを示す、改変A A R Sの結合部位のエネルギー最小化座標として、許容される。

20

【0217】

C L I Xに潜在的に含まれるさらなる仮定は、可能性のあるリガンドが、改変A A R Sの基質結合部位に導入されたとき、そのタンパク質の立体化学の変化および偏ったチャージ分布を誘導せず、そのため、G R I D相互作用エネルギーマップをコンピュータ計算した基礎を変えないという仮定である。G R I Dによって予測される相互作用部位が、位置およびタイプの意味でしか用いられないこと、すなわち、候補原子団がG R I Dによって好適と予測された部位に位置するとき、結合幾何形状、プロトン化の状態および偏ったチャージ分布が、タンパク質と原子団との強い相互作用にとって有利であることを保障するための確認が一切行われなことも強調しなければならない。こうした詳細分析は、C L I X選抜候補リストにおいて同定された候補についてのより進んだモデリングの一部を成すであろう。

30

【0218】

所定の改変A A R Sにより利用され得るアミノ酸類似体を同定するためのコンピュータ支援分子設計法のさらにもう1つの実施形態は、その酵素の基質結合部位との望ましい構造および静電的相補性を示すであろう小分子フラグメントのアルゴリズムの連結による可能性のある阻害剤の新規合成を含む。この方法論は、A A R S基質結合部位のモデルにおいて小分子の大きなテンプレートセットを繰り返しつなぎ合わせてながら用いる。ファンデルワールスおよびクーロン相互作用、伸長リガンドの内部ひずみエネルギー、およびリガンドと酵素の両方の脱溶媒を考慮する分子力学に基づくエネルギー関数に従って、それぞれのリガンド成長段階を評価する。検索空間は、結合基準による剪定によって制御し続けるデータツリーの使用によって管理することができる。

40

【0219】

さらにもう1つの実施形態では、改変A A R S酵素の基質結合部位における官能基のエネルギー的に好適な位置を決定するためにエネルギー最小化クエンチ分子動力学的アルゴリズムに基づく方法を用いて、可能性のあるアミノ酸類似体を決定することができる。この方法は、既知アミノ酸およびアミノ酸類似体の改変によって、または新規合成によって、そうした官能基を組み込む分子の設計を助長することができる。

【0220】

例えば、Mirankerら(1991) Proteins 11:29-34によって記載された多コピー同時検索法(MC S S)は、本方法での使用に適応させることができる。タンパク質の力場における官能基の局所最小値を決定および特性付けするために、

50

選択された官能基の多数のコピーを、先ず、AARSタンパク質上の目的とする結合部位に分布させる。分子力学またはクエンチ動力学によるこれらのコピーのエネルギー最小化は、明確な局所的最小値を生じさせる。その後、これらの最小値の付近をグリッドサーチまたは拘束のある最小化によって探査することができる。1つの実施形態において、MCSS法は、古典的時間依存型ハートリー（TDH）近似を用いて、そのタンパク質の力場内の多数の同一の基を同時に最小化またはクエンチする。

【0221】

MCSSアルゴリズムの実行には、官能基の選択およびそれらそれぞれについての分子力学モデルが必要である。基は、容易に特性付けおよび操作できるほど単純（3～6個の原子、二平面の自由度は殆どまたは全くない）でなければならないが、その官能基がAARSタンパク質の部位に結合する基質に関して有するであろう立体および静電相互作用を概算できるほど複雑でなければならない。好ましいセットは、例えば、大部分の有機分子をそうした基のコレクションとして説明することができるものである（Patai's Guide to the Chemistry of Functional Group, ed. S. Patai (New York: John Wiley, and Sons, (1989))。これは、アセトニトリル、メタノール、アセテート、メチルアンモニウム、ジメチルエーテル、メタンおよびアセトアルデヒドなどのフラグメントを含む。

【0222】

結合部位における局所エネルギー最小値の決定は、多数の開始位置のサンプリングを必要とする。これは、例えば1,000～5,000個の基を結合部位を中心にした球の内部にランダムに分布させることによって達成することができ、タンパク質によって占有されない空間だけを考慮する必要がある。一定の位置の特定の基とタンパク質の相互作用エネルギーが、所与のカットオフ（例えば、5.0 kcal/mol）よりプラスである場合、その基は、その部位から切り捨てられる。開始位置のセットを考え合わせると、TDH近似の使用によりすべてのフラグメントが同時に最少化される（Elberら（1990）J. Am. Chem. Soc. 112: 9161-9175）。この方法では、それぞれのフラグメントに対する力は、その内力およびタンパク質に起因する力から成る。この方法の本質的原理は、フラグメント間の相互作用を削除し、タンパク質に対する力を単一フラグメントに起因する力に正規化することである。このようにして、単一タンパク質の場における任意の数の官能基の同時最少化または動力学的処理を実施することができる。

【0223】

例えば100個のランダムに配置された基のサブセットに関する最少化を逐次的に実施する。1,000間隔など、一定の段階数の間隔において、結果を検査して、同じ最小値に収束する基を削除することができる。このプロセスを、最少化が完了する（例えば、0.01 kcal/mol/ÅのRMSの傾き）まで繰り返す。こうして得られるエネルギー最小化分子セットは、アミノ酸類似体についての可能な側鎖に相当する三次元での不連続フラグメントのセットに事実上等しいものを含む。

【0224】

その後、次の工程は、小さな化学単位（原子、鎖または環部分）から組み立てられたスペーサーとそれらの断片を接続して、アミノ酸類似体を形成する工程であり、例えば、例えばNEWLEAD（Tschenkeら（1993）J. Med. Chem. 36: 3863-3870）などのコンピュータプログラムを用いて、前記不連続フラグメントのそれぞれを空間で連結させて、単一分子を生じさせることができる。NEWLEADが採る手順は、次の一連のコマンドを実行する：（1）2つの孤立した部分を接続する、（2）さらなる処理のための途中解を保持する、（3）不連続単位が見つからなくなるまで途中解のそれぞれについて上記工程を繰り返す、および（4）それぞれが単一の分子である最終解を出力する。こうしたプログラムは、例えば、3つのタイプのスペーサー（ライブラリースペーサー、単一原子スペーサーおよび融合環スペーサー）を用いることがある。

ライブラリースペーサーは、小分子、例えば、エチレン、ベンゼンおよびメチルアミドの最適化構造である。NEWLEADなどのプログラムによって生成される出力は、今はスペーサーによって接続されている元々のフラグメントを含有する1セットの分子から成る。入力フラグメントに属する原子は、それらの元々の空間配向を維持する。これらの分子は、スペーサーおよび官能基の単純な組成のため化学的に妥当と思われ、ならびにファンデルワールス半径に違反する解の拒絶のためエネルギー論的に許容される。

【0225】

加えて、この方法の工程を行う順序は、本質的に単なる事例に過ぎない。実際、これらの工程は、本開示により別の指示がない限り、いずれの順序で行ってもよく、または並行して行ってもよい。

10

【0226】

さらに、本明細書に開示する方法は、ハードウェア、ソフトウェア、またはこれらの任意の組み合わせで行うことができる（これらの用語は、当該技術分野において現在知られているとおり）。詳細には、本方法は、任意のタイプのコンピュータでのソフトウェア、ファームウェア、またはマイクロコード操作によって行うことができる。加えて、ソフトウェアは、任意のコンピュータ可読媒体（例えば、ROM、RAM、磁気媒体、穿孔テープまたはカード、任意の形態のコンパクトディスク（CD）、DVDなど）に記憶された任意の形態（例えば、原始コード、目的コード、解釈コードなど）のコンピュータ命令を含む。さらに、こうしたソフトウェアは、インターネットに接続された装置間で転送される周知ウェブページの中で見つけられるような、搬送波に組み入れられたコンピュータデータシグナルの形態である場合もある。従って、一定の実施形態は、本開示において特に別様に述べられていない限り、いずれの特定のプラットフォームにも限定されない。

20

【0227】

一定の実施形態の実施に適する例示的コンピュータハードウェア手段は、10R10000プロセッサが並行して動作するSilicon Graphics Power Challengeサーバーであり得る。適するソフトウェア展開環境としては、Biosym/Molecular Simulations（カリフォルニア州、サンディエゴ）によるCETIUS2、または他の等価物が挙げられる。

【0228】

上で説明したコンピュータ計算法を、非天然アミノ酸の組み込みを可能にするためのタンパク質合成機構の酵素（例えば、AARS）の改変に有効に用いた。コンピュータ計算ツールのこの同じスイートにてこ入れして、非天然アミノ酸が組み込まれる最終製品（例えば、モノクローナル抗体または他の治療薬）を、それらの構造的または機能特性を強化または改変するように、設計することもできる。

30

【0229】

本明細書に開示する特定の実施形態を証明し、説明したが、より広い態様から逸脱することなく変更および改変を行うことができることおよび、従って、添付のクレームが、本発明の真の精神に入るそうした変更および改変すべてをそれらの範囲に包含するものであることは、当業者には理解されるであろう。

【0230】

40

（異なる生物からのAARSの採用）

外的突然変異体tRNA、改変もしくは外的突然変異体RS、または改変tRNA/RSペアを生じさせる第二の戦略は、別の生物から目的とする翻訳系、例えばE. coliへのtRNAおよび/またはシンテターゼの移入を含む。この特定の例において異種シンテターゼ候補の特性としては、例えば、E. coli tRNAにあまり十分にチャージされない（好ましくは、まったくチャージされない）ことが挙げられ、異種tRNA候補の特性としては、例えば、E. coliシンテターゼによって妥当にアシル化されない（好ましくは、まったくされない）ことが挙げられる。

【0231】

Schimmelらは、E. coli GlnRS (EcGlnRS) が、Saccha

50

Saccharomyces cerevisiae tRNA^{Gln}をアシル化しないと報告した (*EcGlnRS*は、*Saccharomyces cerevisiaeGlnRS* (*ScGlnRS*) によりプロセッシングされるN末端RNA結合ドメインを欠く)。E. F. Whelihan and P. Schimmel, EMBO J., 16:2968 (1997) 参照。例えば、*Saccharomyces cerevisiae*・アンバーサプレッサー tRNA^{Gln} (*Sc tRNA^{GlnCUA}*) を分析して、それも *EcGlnRS* の基質でないかどうかを決定した。インビトロアミノアシル化アッセイにより、これがそのケースであることが証明され、インビトロ抑制研究は、*Sc tRNA^{GlnCUA}* が翻訳能力を有することを示している。例えば、Liu and Schultz, PNAS, U S A, 96:4780 (1999) 参照。*ScGlnRS* は、いずれの *E. coli* tRNA もアシル化せず、インビトロで *Sc tRNA^{GlnCUA}* のみをアシル化することが、さらに証明された。*ScGlnRS* が *E. coli* における *Sc tRNA^{GlnCUA}* をアシル化できる程度も、インビボ相補性アッセイを用いて評価された。アンバーナセンス突然変異が、 β -ラクタマーゼ遺伝子における許容される部位に導入された。アンバーサプレッサー tRNA による突然変異の抑制は、完全長 β -ラクタマーゼを生じさせ、細胞にアンピシリン耐性を付与するであろう。*Sc tRNA^{GlnCUA}* のみが発現される場合、細胞は、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンの IC_{50} を示し、これは、内在性 *E. coli* シンテターゼによるアシル化が実質的にないことを示し；*Sc tRNA^{GlnCUA}* が *ScGlnRS* と共発現される場合、細胞は、約 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ アンピリジンの IC_{50} を獲得し、これは、*E. coli* において *ScGlnRS* が *Sc tRNA^{GlnCUA}* を効率的にアシル化することを明示している。Liu and Schultz, PNAS, U S A, 96:4780 (1999) 参照。

【0232】

もう1つの例として、*Saccharomyces cerevisiae* tRNA^{Asp} は、*E. coli* シンテターゼに対する外的突然変異体であることが知られている。例えば、Doctor and Mudd, J. Biol. Chem., 238:3677 (1963)；および Kwok and Wong, Can. J. Biochem., 58:213 (1980) 参照。それに由来するアンバーサプレッサー tRNA (*Sc tRNA^{Asp}_{CUA}*) も *E. coli* における外的突然変異体であることが、上で説明したインビボ β -ラクタマーゼアッセイを用いて実証された。しかし、tRNA^{Asp} のアンチコドンは、AspRS の重要な認識要素であり (Giegeら, Biochimie, 78:695 (1996) 参照)、CUA へのアンチコドンの突然変異は、結果として、AspRS に対するそのサプレッサーの親和性を喪失させる。*E. coli* AspRS E93K 突然変異体は、*E. coli* アンバーサプレッサー tRNA^{Asp}_{CUA} を *wt AspRS* よりほぼ一桁良好に認識することが証明された。例えば、Martin, 'Thesis', Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France, 1995 参照。*Saccharomyces cerevisiae* AspRS (E188K) への関連突然変異の導入は、*Sc tRNA^{Asp}_{CUA}* に対するその親和性を回復させ得ると推測された。インビトロアミノアシル化実験により、*Saccharomyces cerevisiae* AspRS (E188K) 突然変異体は、*E. coli* tRNA をアシル化しないが、中等度の効率で *Sc tRNA^{Asp}_{CUA}* にチャージされると決定された。例えば、Pasternakら, Helv. Chim. Acta, 83:2277 (2000) 参照。

【0233】

類似のアプローチは、異種シンテターゼを外的突然変異体シンテターゼとして、および同じ生物または関連生物の突然変異体開始 tRNA を改変 tRNA として使用することを含む。Raj Bhandary および共同研究者は、ヒトイニシエーター tRNA^{fMet} のアンバー突然変異体が、酵母細胞において、*EcGlnRS* が共発現された場合のみ、*E. coli* *GlnRS* によってアシル化され、アンバーサプレッサーとして作用することを発見した。Kowalら, PNAS U S A, 98:2268 (2001)

参照。従って、このペアは、酵母において使用するための外的突然変異体ペアの代表である。また、E. coli イニシエーター tRNA^{fMet} アンバー突然変異体は、いずれの E. coli シンテターゼに対しても不活性であることが判明した。この突然変異体 tRNA にチャージされ、結果として、E. coli に外的突然変異体ペアをもたらす突然変異体酵母 Ty rRS が、選択された。

【0234】

本明細書に開示する方法を用いて、上の望ましいペアおよびペアの成分を発展させて、例えば非天然アミノ酸で O-tRNA を優先的にアミノアシル化することができる、望ましい特性を有する外的突然変異体 tRNA および／または RS を生じさせる。

【0235】

一定の実施形態において、改変 tRNA および改変 RS は、様々な生物からの自然発生 tRNA および RS の突然変異によって得ることができる。1つの実施形態において、改変 tRNA および／または改変 RS は、少なくとも1つの生物に由来す、この場合の生物は、原核生物、例えば、メタノコッカス・ヤナシイ、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム、ハロバクテリウム、E. coli、A. フルギダス、P. フィリオサス、P. ホリコシ、A. ペルニクス、または T. サーマフィルスなどである。場合によっては、前記生物は、真核生物、例えば、植物（例えば、単子葉植物または双子葉植物などの高等植物）、藻類、真菌（例えば、酵母など）、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、節足動物など）、昆虫、または原生生物などである。場合によっては、改変 tRNA は、第一の生物からの自然発生 tRNA の突然変異によって得られ、改変 RS は、第二の生物の自然発生 RS の突然変異によって得られる。1つの実施形態において、改変 tRNA および改変 RS は、突然変異 tRNA および突然変異 RS から得ることができる。一定の実施形態において、第一の生物からの改変 RS および／または改変 tRNA は、その改変 tRNA または改変 RS によって認識されるコドンに対して非機能性の内在性 RS および／または tRNA を場合によっては有する第二の生物の翻訳系に提供される。

【0236】

外的突然変異体 tRNA および／または外的突然変異体 tRNA シンテターゼも、場合によっては、様々な生物から単離される。1つの実施形態において、外的突然変異体 tRNA および／または外的突然変異体シンテターゼは、少なくとも1つの生物に由来す、この場合の生物は、原核生物、例えば、メタノコッカス・ヤナシイ、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム、ハロバクテリウム、E. coli、A. フルギダス、P. フィリオサス、P. ホリコシ、A. ペルニクス、または T. サーマフィルスなどである。場合によっては、前記生物は、真核生物、例えば、植物（例えば、単子葉植物または双子葉植物などの高等植物）、藻類、真菌（例えば、酵母など）、動物（例えば、哺乳動物、昆虫、節足動物など）、昆虫、または原生生物などである。場合によっては、外的突然変異体 tRNA は、第一の生物からの自然発生 tRNA から単離され、外的突然変異体シンテターゼは、第二の生物の自然発生 RS から単離される。1つの実施形態において、外的突然変異体 tRNA および／または外的突然変異体 tRNA シンテターゼは、1つ以上のライブラリー（これは、（原核生物および／または真核生物を含むものをはじめとする）1つ以上の生物からの1つ以上の tRNA および／または RS を場合によっては含む）から単離することができる。

【0237】

任意の翻訳系において使用するための外的突然変異体 tRNA および／または tRNA シンテターゼ対の選択方法も本明細書に開示する。この方法は、第一生物から単離されたまたは得られたマーカー遺伝子、tRNA および／またはアミノアシルー tRNA シンテターゼ（RS）を、第二の生物からの細胞の第一のセットに導入すること；そのマーカー遺伝子および tRNA または RS を、第二の生物からのもう1つの全く同じ細胞セットに導入すること；およびそのもう1つの全く同じ細胞セットにおいて生存できない、第一のセットにおける生存細胞について選択することを含み、この場合、第一のセットおよびもう1つの全く同じ細胞セットは、選択剤の存在下で増殖させたものであり、ならびに生存

10

20

30

40

50

細胞は、翻訳系において使用するための外的突然変異体 tRNA および／または RS を含む。1つの実施形態において、比較および選択は、インビボ相補性アッセイを含む。もう1つの実施形態において、選択剤の濃度を变化させる。同アッセイを第二の生物に基づくインビトロまたはインビボ系において行うこともできる。

【0238】

(突然変異誘発および選択／スクリーニングによる AARS の生成)

標的ポリペプチドまたはタンパク質への非天然アミノ酸の組み込みのために用いることができる AARS の突然変異または改変は、所望の接触アミノ酸残基が同定され次第、定方向突然変異誘発を用いることにより、行うことができる。前記接触アミノ酸の同定は、結晶学的分析、コンピュータモデリング、核磁気共鳴 (NMR) 分光法、ライブラリースクリーニング、またはこれらのもしくは他の方法のいずれかの組み合わせをはじめとする、AARS の構造を分析することができる任意の方法を用いて行うことができる。

10

【0239】

多数の AARS 分子が配列決定されており、それらは、どのアミノ酸が、対応する tRNA にチャージするアミノ酸を結合するために重要であるかについてのガイダンスとなる。例えば、配列番号 48～103 参照。

【0240】

一定の実施形態において、特定の外的突然変異体 tRNA に特定のアミノ酸をチャージすることができる AARS は、候補のライブラリーを生成するためのその AARS の突然変異誘発、その後、所望される機能が可能な候補 AARS のスクリーニングおよび／または選択によって、得ることができる。こうした外的突然変異体 AARS および外的突然変異体 tRNA は、改変された非天然アミノ酸を有する所望のタンパク質のインビトロ／インビボ生産に使用することができる。

20

【0241】

非天然アミノ酸を組み込むために使用することができるタンパク質合成機構の構成要素、例えば、外的突然変異体 RS、外的突然変異体 tRNA、および／または外的突然変異体 tRNA / RS ペアを生じさせるための方法を、本明細書に開示する一定の実施形態において提供する。

【0242】

1つの実施形態において、少なくとも1つの組換え外的突然変異体アミノアシル-tRNA シンテターゼの生産方法は、(a) 第一の生物、例えば、真核生物 (例えば、酵素) また原核生物、例えば、メタノコッカス・ヤナシイ、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム、ハロバクテリウム、E. coli、A. フルギダス、P. フィリオサス、P. ホリコシ、A. ペルニクス、または T. サモフィルスなど、からの少なくとも1つのアミノアシル-tRNA シンテターゼ (RS) から得た (場合によっては突然変異体) RS のライブラリーを生成すること; (b) 非天然アミノ酸および天然アミノ酸の存在下で外的突然変異体 tRNA をアミノアシル化するメンバーについてその RS (場合によっては突然変異体 RS) のライブラリーを選択 (および／またはスクリーニング) し、それによって活性 (場合によっては突然変異体) RS のプールを生じさせること; および／または (c) 非天然アミノ酸不在の状態で O-tRNA を優先的にアミノアシル化する活性 RS (例えば、突然変異体 RS) についてそのプールを (場合によっては陰性選択によって) 選択し、それによって少なくとも1つの組換え外的突然変異体シンテターゼを生じさせること (この場合の少なくとも1つの組換え外的突然変異体シンテターゼは、非天然アミノ酸でその外的突然変異体 tRNA を優先的にアミノアシル化する) を含む。前記方法によって生産された組換え外的突然変異体シンテターゼも、本明細書に開示する一定の実施形態に含まれる。

30

40

【0243】

1つの実施形態において、前記 RS は、不活性 RS であり、これは、活性 RS を突然変異させることから生成されたものであり得る。例えば、この不活性 RS は、少なくとも約 1、少なくとも約 2、少なくとも約 3、少なくとも約 4、少なくとも約 5、少なくとも約

50

6、もしくは少なくとも約10、またはそれ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸、例えばアラニンに突然変異させることによって生成することができる。

【0244】

突然変異体RSのライブラリーは、当該技術分野において公知の様々な突然変異誘発技術を用いて生成することができる。例えば、突然変異体RSは、部位特異的突然変異、ランダム突然変異、多様性を生じさせる組換え突然変異、キメラ構築物によって、および本明細書に記載するまたは当該技術分野において公知である他の方法によって、生成することができる。

【0245】

1つの実施形態において、活性である、例えば、非天然アミノ酸および天然アミノ酸の存在下で外的突然変異体tRNAをアミノアシル化する、メンバーについてのRS（場合によっては突然変異体RS）のライブラリーの選択（および／またはスクリーニング）は、陽性選択またはスクリーニングマーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子など、および（場合によっては突然変異体）RSのライブラリーを、多数の細胞に導入すること（この場合の陽性選択および／またはスクリーニングマーカーは、少なくとも1つのコドンを含み、その翻訳は、（天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸を）外的突然変異体tRNAにチャージする候補RSの能力に依存する）；選択剤の存在下でその多数の細胞を増殖させること；陽性選択またはスクリーニングマーカーにおけるコドンをやさしく翻訳することによりその選択剤および／またはスクリーニング剤の存在下で生存する（または特定の応答を示す）細胞を同定し、それによって、活性（場合によっては突然変異体）RSのプールを含有する陽性選択細胞のサブセットを生じさせることを含む。場合によっては、前記選択および／またはスクリーニング剤濃度を変えることがある。一定の実施形態において、前記細胞は、そのコドンの翻訳を助長することができる機能性内在性tRNA、RSまたはtRNA-RSペアを含有しない。内在性tRNA/RSPペアは、遺伝子欠失および／またはRS阻害剤によって不能にすることができる。

【0246】

細胞の多くの必須遺伝子も、機能性内在性RS/tRNAペア不在の状態で改変tRNAにチャージする外的突然変異体シンテターゼの能力に依存するようなコドンを含む可能性が高いので、1つの実施形態では、陽性選択プロセスに余分な陽性選択マーカーを必要としない。陽性選択プロセスの読み出しとして細胞の生存を用いることができる。

【0247】

1つの態様において、前記陽性選択マーカーは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子である。場合によっては、前記陽性選択マーカーは、β-ラクタマーゼ遺伝子である。もう1つの態様において、前記陽性選択マーカーは、蛍光もしくは発光スクリーニングマーカー、または親和性に基づくスクリーニングマーカー（例えば、細胞表面マーカー）を含む。

【0248】

類似の実施形態では、無細胞インビトロ系を用いて、陽性スクリーニングにおいて改変tRNAにチャージする外的突然変異体シンテターゼの能力を試験することができる。例えば、陽性スクリーニング遺伝子、例えば蛍光マーカー遺伝子、を翻訳するそのインビトロ系の能力は、そのマーカー遺伝子のコドンによって読み取るために改変tRNAにチャージする外的突然変異体シンテターゼの能力に依存し得る。

【0249】

1つの実施形態において、非天然アミノ酸不在の状態で突然変異体tRNAを優先的にアミノアシル化する活性RS（場合によっては突然変異体）についてのそのプールを陰性選択またはスクリーニングは、陰性選択またはスクリーニングマーカーと、陽性選択またはスクリーニングからの活性（場合によっては突然変異体）RSのプールとを多数の翻訳系に導入すること（この場合の陰性選択またはスクリーニングマーカーは、少なくとも1つのコドン（例えば、毒性マーカー遺伝子、例えばリボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子）

を含み、その翻訳は、（天然アミノ酸を）外的突然変異体 tRNA にチャージする候補 RS の能力に依存する）；ならびに非天然アミノ酸とスクリーニングまたは選択剤を補足した第一の培地において特定のスクリーニング応答を示すが、天然アミノとそのスクリーニングまたは選択剤を補足した第二の培地ではその特定の応答を示すことができない翻訳系を同定し、それによって、少なくとも 1 つの組換え RS を有する生存細胞またはスクリーニングされた細胞をもたらすことを含む。

【0250】

1 つの態様では、選択（および／またはスクリーニング）剤の濃度を変化させる。一部の実施形態において、前記第一の生物と第二の生物は異なる。例えば、前記第一および／または第二の生物は、原核生物、真核生物、哺乳動物、E. coli、真菌、酵母、古細菌、真正菌類、植物、昆虫、原生生物などを場合によっては含む。他の実施形態において、前記スクリーニングマーカーは、蛍光または発光スクリーニングマーカー（例えば、緑色蛍光タンパク質）または親和性に基づくスクリーニングマーカーを含む。

10

【0251】

また、一部の態様は、陰性選択マーカーが、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子（これは、少なくとも 1 つの前記コドンを含む）を含む態様を含む。他の態様は、スクリーニングマーカーが、蛍光または発光スクリーニングマーカーまたは親和性に基づくスクリーニングマーカーを場合によっては含む態様を含む。本明細書における実施形態において、前記スクリーニングおよび／または選択は、そのスクリーニングおよび／または選択のストリンジエンシーの変化を場合によっては含む。

20

【0252】

1 つの態様において、少なくとも 1 つの組換え RS に由来する突然変異 RS の第二のセットは、突然変異誘発、例えば、ランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、組換え、またはこれらの組み合わせによって生じさせることができる。

【0253】

本明細書に具体的に表す方法は、非天然アミノ酸が、例えば、O-メチル-L-チロシン、L-3-（2-ナフチル）アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-L-チロシン 4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc-セリン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-ブロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、およびイソプロピル-L-フェニルアラニンから選択される方法の場合によっては含む。本明細書における方法によって生産される組換え RS も、本明細書に開示する実施形態に包含される。

30

【0254】

関連態様において、組換え外的突然変異体 tRNA の生産方法は、（a）第一の生物からの少なくとも 1 つの tRNA から得た突然変異体 tRNA のライブラリーを生成すること；（b）第一の生物からの RS が不在の状態第二の生物からのアミノアシル-tRNA シンテターゼ（RS）によってアミノアシル化される（場合によっては突然変異体）tRNA についてそのライブラリーを選択（例えば、陰性選択）またはスクリーニングし、それによって tRNA（場合によっては突然変異体）のプールを生じさせること；および（c）導入された外的突然変異体 RS によってアミノアシル化されるメンバーについて tRNA（場合によっては突然変異体）のプールを選択またはスクリーニングし、それによって少なくとも 1 つの組換え tRNA を生じさせること（この場合、前記少なくとも 1 つの組換え tRNA は、非天然アミノ酸コドンを認識し、および第二の生物からの RS によって十分に認識されず、および外的突然変異体 RS によって優先的にアシルアミノ化される）を含む。

40

【0255】

本明細書に開示する様々な方法は、選択またはスクリーニングが、1 つ以上の陽性また

50

は陰性選択またはスクリーニング、例えば、アミノ酸透過性の変更、翻訳効率の変更、および翻訳忠実度の変更を含む方法の場合によっては含む。加えて、前記1つ以上の変更は、外的突然変異体 tRNA-tRNA シンテターゼ対を使用してそうしたタンパク質を生産する生物における1つ以上の遺伝子の突然変異に場合によっては基づく。ここでの選択および／またはスクリーニングは、1つ以上の選択遺伝子中のまたは1つ以上のスクリーニング遺伝子中の少なくとも2つのコドンを使用する選択および／またはスクリーニングの場合によっては含む。場合により、そうした多数のコドンは、同じ遺伝子中にあり、または異なるスクリーニング／選択遺伝子中にある。加えて、場合により、任意の多数のコドンが、異なるコドンであり、または同じタイプのコドンを含む。

【0256】

キットは、本明細書に開示する一定の実施形態の追加の特徴である。例えば、本キットは、上で述べたような1つ以上の翻訳系（例えば、細胞）、1つ以上のtRNA（改変または突然変異tRNAを含む）、1つ以上のAARS（改変または突然変異AARSを含む）、1つ以上の非天然アミノ酸を、例えば、適切な包装材料、そのキットの構成要素を保持するための容器、および／または本明細書における方法を実施するためのインストラクション材料などと共に含むことができる。1つ以上のAARSおよび／または1つ以上のtRNAが1つのキットで提供される場合、それらは、核酸またはタンパク質として提供されることがあり、ならびに単一のベクターの一部であることがあり、または別のベクターに含まれていることがある。同様に、翻訳系（例えば、非天然アミノ酸を含むEPO類似体などのタンパク質）の製品は、キットの形態で、例えば、そのキットの構成要素を保持するための容器、および／または本明細書における方法を実施するためのインストラクション材料などとともに提供することができる。

【0257】

（例示的使用）

伝えられるところでは、100を十分に超えるコーディングされていないアミノ酸（すべてリボソーム的に許容されるもの）が、他の方法を用いてタンパク質に導入されており（例えば、Schultzら, J. Am. Chem. Soc., 103:1563-1567, 1981; Hinsbergら, J. Am. Chem. Soc., 104:766-773, 1982; Pollackら, Science, 242:1038-1040, 1988; Nowakら, Science, 268:439-442, 1995参照）、これらすべての類似体は、これらの類似体のタンパク質産物への効率的な組み込みのために、本方法で用いることができる。

【0258】

もう1つの好ましい実施形態では、2つ以上の類似体を、同じインビトロまたはインビボ翻訳系（それぞれ、その外的突然変異体tRNAまたは外的突然変異体シンテターゼ対を有する）において用いることができる。これは、天然アミノ酸が4つ以上（例えば、LeuおよびArgについては6つ）のコドンによってコードされるとき、より容易に遂行される。しかし、2つのコドンによってしかコードされないアミノ酸の場合、一方は、天然アミノ酸のために保存され得るが、他方は、1つ以上のアミノ酸類似体によって「共有される」ことがある。これらの類似体は、1つだけの天然アミノ酸（例えば、別のPhe類似体）に似ていることがあり、または異なるアミノ酸（例えば、PheおよびTyrの類似体）に似ていることがある。

【0259】

一定の実施形態において、第一の核酸は、細胞／インビトロ翻訳系（IVT）において内在アミノアシル-tRNAシンテターゼによって十分にチャージされない外的突然変異体／改変tRNA分子、または該外的突然変異体／改変tRNAそれ自体をコードする。一部の実施形態によると、外的突然変異体／改変アミノアシルtRNAシンテターゼ（AARS）をコードする第二の核酸も細胞／IVTに導入される。外的突然変異体／改変AARSは、選択されたアミノ酸類似体を外的突然変異体／改変tRNAにチャージすることができる。その後、そのアミノ酸類似体を細胞に供給して、それをその細胞またはIV

T 中の 1 つ以上のタンパク質に組み込むことができる。

【0260】

他の実施形態において、その環境は細胞である。例えば、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞または非ヒト哺乳動物細胞）をはじめとする様々な細胞（または I V T に適するそれらの溶解産物）を一定の方法で使用することができる。1 つの実施形態において、細胞は、E. coli 細胞であり、もう 1 つの実施形態において、細胞は、シュードモナス属細胞である。

【0261】

一定の実施形態において、アミノ酸類似体は、細胞または I V T とその類似体を直接接触させることによって、例えば、培養中の細胞にその類似体の溶液を適用することによって、または I V T にその類似体を直接添加することによって、供給することができる。前記類似体は、1 つ以上の追加の核酸構築物を細胞／I V T に導入することによって供給することもでき、この場合、該追加の核酸構築物は、所望の類似体の合成に必要な 1 つ以上のアミノ酸類似体合成タンパク質をコードする。

【0262】

一定の実施形態は、テンプレート核酸構築物を細胞／I V T に導入することを含み、該テンプレートは、タンパク質をコードしており、該核酸構築物は、少なくとも 1 つの縮重コドン配列を含有する。細胞／I V T に導入される核酸は、1 つの構築物としてまたは多数の構築物として導入することができる。一定の実施形態では、様々な核酸が、同じ構築物に含まれている。例えば、細胞／I V T においてコードされた tRNA および／またはタンパク質を発現することができる任意の適するベクターに核酸を導入することができる。1 つの実施形態において、前記第一および第二核酸配列は、1 つ以上のプラスミドに供給される。もう 1 つの実施形態において、使用されるベクターは、例えばアデノウイルスおよびレンチウイルスベクターをはじめとする、ウイルスベクターである。前記配列は、細胞／I V T に適するプロモーター配列、または前記配列の発現の制御を誘導することができる多数の配列と共に導入することができる。

【0263】

インビトロ使用の場合、1 つ以上の突然変異体シンテターゼを組換え生産し、任意の入手可能なインビトロ翻訳系（たとえば、対でのインビトロ転写／翻訳のための市販 Wheat Germ Lysate-based PROTEINscript-PRO（商標）、Ambion（登録商標）の E. coli 系；または Ambion（登録商標）からのウサギ網状赤血球溶解産物に基づく RetiC Lysate I V T（商標）Kit）に供給することができる。場合により、インビトロ翻訳系から 1 つ以上の天然 AARS（例えば、天然 AARS に対する固定化抗体を使用するイムノデブリーション（immunodepletion）により）および／または天然アミノ酸を選択的に枯渇させて、類似体の組み込み増進を達成することができる。あるいは、再設計された外的突然変異体シンテターゼをコードする核酸を組み換え生産された AARS の代わりに供給してもよい。インビトロ翻訳系には、成熟タンパク質産物に組み込まれる類似体も供給される。

【0264】

インビトロタンパク質合成は、通常、インビボ合成と同じ規模で行うことはできないが、インビトロ法は、アミノ酸類似体を含有する何百マイクログラムもの精製タンパク質を生じさせることができる。そうしたタンパク質は、円偏光二色性（CD）、核磁気共鳴（NMR）分光法および X 線結晶学を用いるそれらの特性付けに十分な量で生産された。この方法論は、タンパク質の安定性およびフォールディングを決定する際に疎水性、充填、側鎖エントロピーおよび水素結合の役割を調査するために用いることもできる。タンパク質における触媒メカニズム、シグナル伝達および電子移動を探索するために用いることもできる。加えて、この方法論を用いてタンパク質の特性を改変することができる。例えば、光分解によって活性化し得る、フォトケージされたタンパク質を生成することができ、ならびに光学および他の分光プローブの部位特異的組み込みのための新規化学的ハンドルがタンパク質に導入された。

【0265】

増殖培地から直接、インビボタンパク質にアミノ酸類似体を組み込むための一般アプローチの開発は、一般に、非天然アミノ酸突然変異誘発力を大きく向上させるであろう。例えば、重原子を含有する大量のタンパク質を合成する能力は、タンパク質構造決定を助長するであろうし、生細胞におけるタンパク質に蛍光体または光解裂性の基を部位特異的に置換する能力は、インビボでタンパク質機能を研究するための強力なツールとなるであろう。あるいは、ケト含有アミノ酸などの新たな官能基を有する結合ブロックを供給することによってタンパク質の特性を向上させることができる場合もある。

【0266】

インビボで使用する場合、1つ以上のAARSを、宿主細胞（原核細胞または真核細胞）に、遺伝物質として、例えば、場合により宿主ゲノムに組み込み、再設計されたAARSを構成的にまたは誘導可能に発現することができるプラスミドまたはウイルスベクター上のコーディング配列として、供給することができる。目的とする異種または同種タンパク質を、そうした宿主細胞において、供給されたアミノ酸類似体の存在下で、発現させることができる。その後、任意の当該技術分野において認知されているタンパク質精製技術、または目的とするタンパク質のために特別に設計された技術を用いて、それらのタンパク質産物を精製することができる。

【0267】

これらは、ポリペプチドをコードする転写産物を生じさせるための数少ない可能な手段である。一般に、転写産物を生じさせるための当該技術分野において公知の任意の手段を利用して、アミノ酸類似体を有するタンパク質を合成することができる。例えば、任意のインビトロ転写系または対になった転写／翻訳系を、目的とする転写産物の産生に用いることができ、その後、それらは、タンパク質合成のテンプレートとして役立つ。あるいは、遺伝物質からタンパク質を発現させることができる任意の細胞、工学処理された細胞／細胞系統、または機能性成分（溶解産物、膜画分など）を使用して、転写産物を生じさせることができる。転写産物を生じさせるためのこれらの手段は、RNAポリメラーゼ（T7、SP6など）および補因子など、ヌクレオチド（ATP、CTP、GTP、UTP）、必要転写因子、および適切な緩衝条件、ならびに少なくとも1つの適するDNAテンプレートなどの成分を一般に含むが、最適化反応条件のために他の成分を加えてもよい。当業者は、本明細書に記載するものに類似した他の実施形態を容易に想像することができるであろう。

【0268】

（化学的部分）

一定の実施形態において、非天然アミノ酸および／または治療用分子は、化学反応性部分を含む。前記部分は、強求電子性または求核性であり得、その結果、治療用分子または抗体もしくはそのフラグメントとの直接反応に利用することができる。あるいは、前記部分は、弱求電子性または求核性であり得、そのため、治療用分子または抗体もしくはそのフラグメントとのコンジュゲーションの前に活性化する必要がある。この代案は、作用因子をその分子に添加するまで化学反応性部分の活性化を遅らせて、その作用因子とその部分の反応を防止することが必要な場合、望ましいであろう。どちらのシナリオにおいても、前記部分は、化学反応性であり、これらのシナリオは、（抗体と反応させるシナリオの場合）、作用因子の添加後なのか、その部分を抗体もしくはそのフラグメントと直接反応させるのか、または1つ以上の化学物質と先ず反応させて、その部分を抗体もしくはそのフラグメントと反応できるようにするのが異なる。一定の実施形態において、化学反応性部分としては、アミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、カルボニル含有基、またはアルキル脱離基が挙げられる。

【0269】

一定の実施形態は、クリックケミストリーを利用することがあり、それらとしては、Huisgen 1, 3-双極子付加環化、特に、Cu(I)触媒段階的変異、ディールス・アルダー反応、求核置換、特に、エポキシおよびアジリジン化合物のような小さな張力

10

20

30

40

50

環への求核置換、ウレアおよびアミドのカルボニル化学様形成、エポキシ化およびジヒドロキシル化のような炭素－炭素二重結合への付加反応が挙げられるが、これらに限定されない。

【0270】

従って、本明細書に開示する実施形態のポリペプチドのグリコシル化に加えて、またはその代わりに、他の化学的部分（ポリ（エチレン）グリコール）を改変ポリペプチドに付加、連結、接続、または別様にコンジュゲートもしくは組み込むことができる。PEG化は、オリゴ糖類および合成ポリマー、例えばポリエチレングリコール（PEG）を治療用タンパク質分子に部位特異的に共有結合で付ける1つのプロセスである。PEG化は、ポリペプチドをタンパク質分解酵素から保護し、そのタンパク質の見掛けのサイズを増大させることによってタンパク質の半減期を有意に増すことができ、従って、クリアランス率を減少させる。さらに、PEGコンジュゲートは、タンパク質の溶解度を増すことができ、生体内分布に対して有益な効果を生じることができる。PEG化タンパク質の物理的および薬理学的特性は、そのポリペプチドに付いているPEG鎖の数およびサイズ、PEG部位の場所、ならびにPEG化に用いられる化学による影響を受ける。

10

【0271】

タンパク質へのPEGコンジュゲーションの例としては、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル誘導体化PEGとリジンの反応、マレイミドおよびビニルスルホン誘導体化PEGとシステインの1, 4-付加反応、ならびにヒドラジン含有PEGと糖タンパクの酸化によって生成されたアルデヒドとの縮合が挙げられる。1つより多くの反応部位（多数のアミノもしくはチオール基）がタンパク質に存在する、または反応性求電子体を用いると、1つまたは多数のPEG分子の非選択的付着が発生し、分離が難しい不均質混合物の生成につながる。PEG鎖を付着させる際の選択性および位置制御の喪失は、生物活性の有意な喪失につながることもあり、ことによると、そのコンジュゲートしたタンパク質の免疫原性を強化することがある。実際、歴史的に、生物活性の喪失および生成物不均質性は、標準的PEG化技術を用いる長時間作用性タンパク質製剤の開発の際に遭遇する2つの最も一般的な問題である。アミン反応性PEGでのタンパク質の改変は、生物活性に重要なタンパク質の領域に位置するリジン残基の改変に起因して、生物活性を激しく喪失させることとなる。一定の状況では、成長ホルモンの生物活性は、400倍以上減少される。例えば、GCSFの生物活性は、従来のアミン-PEG化技術を用いてタンパク質を改変したとき、1,000倍減少される（Clarkら, J. Biol. Chem. 271:21969, 1996; Bowenら, Exp. Hematol. 27, 425, 1999）。従って、タンパク質のPEG鎖を完全に部位特異的および可逆的に付けることができる方法が必要である。

20

30

【0272】

先進タンパク質工学技術を用いて、例えば、工学処理された薬物タンパク質が、より長い半減期および／または持続されたもしくは強化さえされた生物活性を達成することができるように、非天然アミノ酸を薬物タンパク質に組み込むことによって、長時間作用性の「患者に優しい」ヒトタンパク質製剤を作るとは、有利なことであろう。この目的に向けて、本明細書に開示する一定の実施形態を用いて、標準的なアミン-PEG化技術に固有の不均質性および活性喪失などの問題を克服することができる。非天然アミノ酸の組み込みは、PEG分子を部位特異的にコンジュゲートさせることができる、標的タンパク質上の結合または触媒部位から離れた独特な所定の部位を生じさせるであろう。加えて、PEG分子を、アミン-PEG化以外の技術によって非天然アミノ酸に付けることができ、従って、リジンの第一アミン基が望ましくないPEG化を受けずにすむ。これらの技術を用いて、癌、内分泌学、感染症および炎症などの特定分野を含むすべての領域におけるバイオ製剤の半減期、効能および／または安全性を増すことができる。

40

【0273】

例証となる例として、クリックケミストリーまたは付加環化を用いて、トリアゾール結合を形成することができる。付加環化の1つの特定の例は、タンパク質において見出され

50

るすべての官能基にとって外的突然変異体であり、安定なトリアゾール結合を形成するアジドおよびアルキンの銅媒介Huisgen [3+2] 付加環化 (Tornøeら, J. Org. Chem. 67:3057, 2002; Rostovtsevら, Angew. Chem., Int. Ed. 41:596, 2002; およびWangら, J. Am. Chem. Soc. 125:3192, 2003) であり、この反応は、タンパク質の選択的PEG化に用いることができる。例えば、Deitersら (Bioorg. Med. Chem. Lett. 14(23):5743-5745, 2004) は、酵母におけるタンパク質へのパラアジドフェニルアラニンの部位特異的組み込みに基づく一般に適用可能なPEG化方法論を報告している。アジド基を、アルキン誘導体化PEG試薬との穏やかな [3+2] 付加環化反応において用いて、選択的PEG化タンパク質を生じさせた。この戦略は、治療用途の選択的PEG化タンパク質の生成に有用であるだろう。

10

【0274】

一定の実施形態において、本ポリペプチドは、アルファ-1-アンチトリプシン、アンジオスタチン、抗溶血因子、抗体 (Fab、Fab'、F(ab)2、Fd、Fv、ScFv、ダイボディー、トリボディー、テトラボディー、二量体、三量体またはミニボディーから選択される抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体を含む)、血管新生分子、血管新生抑制分子、アポリポタンパク質、アポタンパク質、心房性ナトリウム利尿因子、心房性ナトリウム利尿ポリペプチド、アスパラギナーゼ、アデノシンデアミナーゼ、ヒルジン、毛様体神経栄養因子、骨形態形成因子 (いずれかおよびすべてのBMP)、心房性タンパク質、C-X-Cケモカイン (例えば、T39765、NAP-2、ENA-78、Gro-a、Gro-b、Gro-c、IP-10、GCP-2、NAP-4、SDF-1、PF4、MIG)、カルシトニン、CCケモカイン (例えば、単球化学誘導タンパク質-1、単球化学誘導タンパク質-2、単球化学誘導タンパク質-3、単球炎症性タンパク質-1アルファ、単球炎症性タンパク質-1ベータ、RANTES、I309、R83915、R91733、HCC1、T58847、D31065、T64262)、CD40リガンド、カルシトニン、C-kitリガンド、コラーゲン、コロニー刺激因子 (CSF)、C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、補体因子5a、補体阻害剤、補体受容体1、サイトカイン、(例えば、上皮好中球活性化ペプチド-78、GRO α /MGSA、GRO β 、GRO γ 、MIP-1 α 、MIP-1 δ 、MCP-1)、デオキシリボ核酸、上皮増殖因子 (EGF)、エリスロポエチン、表皮剥脱毒素AおよびB、第IX因子、第VII因子、第VII因子、第X因子、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、フィブリノゲン、フィブ्रोネクチン、顆粒球-コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、フォリトロピン、グルコセレブロシダーゼ、性腺刺激ホルモン、グルカゴン、GLP-1、増殖因子、ヘッジホッグタンパク質 (例えば、ソニック、インディアン、デザート)、ヒト成長ホルモン、ヘモグロビン、肝細胞増殖因子 (HGF)、肝炎ウイルス、ヒルジン、ヒト血清アルブミン、インスリン、インスリン様成長因子 (IGF)、インターフェロン (例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- ϵ 、IFN- ζ 、IFN- η 、IFN- κ 、IFN- λ 、IFN- τ 、IFN- ξ 、IFN- ω)、インターロイキン (例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15など)、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ラクトフェリン、白血病抑制因子、ルシフェラーゼ、黄体形成ホルモン、Neurturin、好中球阻害因子 (NIF)、オンコスタチンM、骨形成タンパク質、副甲状腺ホルモン、PD-ECGF、PDGF、ペプチドホルモン (例えば、ヒト成長ホルモン)、プレイオトロピン、プロテインA、プロテインG、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、パラトルモン (PTH)、プロラクチン、発熱性外毒素A、BおよびC、リラキシン、レニン、リボ核酸、SCF、可溶性補体受容体I、可溶性ICAM-1、可溶性インターロイキン受容体 (IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15)、可溶性TNF受容体、ソマトメジン、ソマトスタチン、ソ

20

30

40

50

マトロピン、ストレプトキナーゼ、超抗原、すなわちブドウ球菌エンテロトキシン（S E A、S E B、S E C 1、S E C 2、S E C 3、S E D、S E E）、スーパーオキシドジムスターゼ（S O D）、毒素ショック症候群毒素（T S S T-1）、チモシンアルファ1、組織プラスミノゲンアクチベーター、腫瘍壊死因子ベータ（T N Fベータ）、腫瘍壊死因子受容体（T N F R）、腫瘍壊死因子-アルファ（T N Fアルファ）、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（T R A I L）、血管内皮細胞増殖因子（V E G E F）、ウロキナーゼ；細胞の増殖、分化もしくは調節を変調する転写モジュレーター（この場合の転写モジュレーターは、真菌、植物、酵母、昆虫および動物（哺乳動物を含む）をはじめとする、原核生物、ウイルスもしくは真核生物からのものである）；サイトカイン、炎症性分子、増殖因子、それらの受容体、癌遺伝子、インターロイキン（例えば、I L-1、I L-2、I L-8など）、インターフェロン、F G F、I G F-I、I G F-II、F G F、P D G F、T N F、T G F- α 、T G F- β 、E G F、K G F、S C F/c-K i t、C D 4 0 L/C D 4 0、V L A-4/V C A M-1、I C A M-1/L F A-1、およびヒアルリン/C D 4 4から選択される発現アクチベーター；シグナル伝達分子および対応する癌遺伝子産物、例えば、M o s、R a s、R a fおよびM e t；転写アクチベーターおよびサプレッサー、例えば、p 5 3、T a t、F o s、M y c、J u n、M y b、R e l；エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、アルドステロン、L D Lもしくはコルチコステロンの受容体から選択されるステロイドホルモン受容体；またはアミダーゼ、アミノ酸ラセマーゼ、アシラーゼ、デハロゲナーゼ、ジオキシゲナーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エピメラーゼ、エポキシドヒドロラーゼ、エステラーゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ハロペルオキシダーゼ、モノオキシゲナーゼ（例えば、p 4 5 0 s）、リパーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、サブチリジン、トランスアミナーゼもしくはヌクレアーゼから選択される酵素、から選択される治療用、診断用または他のタンパク質である。

【0275】

改変する目的とするタンパク質または分子が、抗体または抗体フラグメントである場合、望まれる目標に依存して、抗体構造におけるいずれの場所または位置でも非-天然アミノ酸残基を置換することができる。例えば、F a b可変領域、F c領域、またはその抗体のF c領域と相互作用する別の場所で非-天然アミノ酸残基を置換することができる。他の実施形態では、非-天然アミノ酸残基を、抗体の結合界面、またはV_H領域で置換することができる。一定の実施形態において、改変抗体は、1つ以上の標的を死滅させるその能力の増大または減少を示す。特に、1つ以上の標的を死滅させる能力が増加したまたは副作用が減少した抗体が、望ましいであろう。

【0276】

他の実施形態において、非-天然アミノ酸は、強化された結合親和性をF c受容体に、および／または補体系のC 1 qに付与する。詳細には、改変抗体は、抗原またはタンパク質結合パートナー（例えば、補体のC 1 q、および／またはマクロファージ上のF c受容体など）に対する改変された（例えば、強化された）親和性および／または特異性を有することができる。例えば、分子の改変は、その抗体依存性細胞媒介細胞障害（A D C C）機能、または補体固定活性を増加させる場合もあり、減少させる場合もある。他の例において、特定の分子の改変が、天然対構造のもう一方の分子（例えば、抗体）に結合するその能力を増加させる場合もあり、減少させる場合もある。

【0277】

（非天然アミノ酸によるグリコシル化）

グリコシル化によるタンパク質の後翻訳修飾は、タンパク質のフォールディングおよび安定性に影響を及ぼすことができ、タンパク質の固有活性を改変することができる。例えば、V a r k i, G l y c o b i o l o g y 3:97-130, 1993参照。天然糖タンパク質は、多数の異なるグリコフォームの集団として存在することが多く、これが、グリカン構造の分析

ならびにタンパク質構造および機能に対するグリコシル化の影響の研究を難しくする。従って、グリカンの機能を系統的に理解するために、および改善された糖タンパク質治療薬を開発するために、天然および非天然均一グリコシル化タンパク質の合成方法が必要である。

【0278】

所望のグリコシル化パターンを有するタンパク質を製造するための1つの以前から知られているアプローチは、グリコシダーゼを使用して、不均一天然糖タンパク質を単純な均一コアに転化させ、その後、それに糖類をグリコシルトランスフェラーゼで逐次的にグラフトさせることができる。例えば、Witt¹ら、J. Am. Chem. Soc. 119: 2114-2118, 1997参照。このアプローチの限界は、主要なグリコシル化部位が、タンパク質を発現する細胞系統によって予め決められていることである。あるいは、所望のグリカン構造を含有するグリコペプチドを固相ペプチド合成によって合成することができる。自然化学的ライゲーショ²ン（例えば、Shin²ら、J. Am. Chem. Soc. 121: 11684-11689, 1999参照）、発現タンパク質ライゲーショ³ン（例えば、Tolbert and Wong, J. Am. Chem. Soc. 122: 5421-5428, 2000参照）により、または工学処理したプロテアーゼを用いて（例えば、Witt⁴ら、J. Am. Chem. Soc. 120: 1979-1989, 1998参照）、このグリコペプチドを他のペプチドまたは組換えタンパク質フラグメントとカップリングさせて、大きな糖タンパク質を生じさせることができる。自然化学的ライゲーショ²ンと発現タンパク質ライゲーショ³ンは両方とも、小タンパク質で最も有効であり、ならびに糖タンパク質のN末端のシステイン残基を必要とする。

【0279】

プロテアーゼを用いてペプチドを互いにライゲートする場合、そのライゲーショ²ン部位は、良好なカップリング収率のために、そのグリコシル化部位とは遠く離れた位置になければならない。例えば、Witt⁴ら、J. Am. Chem. Soc. 120: 1979-1989, 1998参照。第三のアプローチは、化学的方法を用いて糖類でタンパク質を直接改変するアプローチである。良好な選択性は、システインのチオール基とカップリングしているハロアセトアミド糖類誘導体で達成することができる（例えば、Davis and Flitsch, Tetrahedron Lett. 32: 6793-6796, 1991; および Macmillan⁵ら、Org. Lett. 4: 1467-1470, 2002参照）。しかし、この方法は、1つより多くのシステイン残基を有するタンパク質を用いると、問題が多くなる場合がある。

【0280】

本明細書に提供する一定の実施形態は、糖タンパク質の合成方法を開示するものである。一部の実施形態において、これらの方法は、第一反応性基を含む非天然アミノ酸をタンパク質に導入すること; およびそのタンパク質を、第二の反応性基を含む糖類部分と接触させることを含み、この場合、第一の反応性基は、第二の反応性基と反応し、それによって、そのタンパク質の非天然アミノ酸に糖類部分を付ける共有結合を形成する。これらの方法によって生成される糖タンパク質も一定の実施形態に包含される。

【0281】

一部の実施形態において、第一の反応性基は、求電子基（例えば、ケト部分および/またはアルデヒド部分など）であり、第二の反応性基は、求核部分である。一部の実施形態において、第一の反応性基は、求核部分であり、第二の反応性基は、求電子部分（例えば、ケト部分および/またはアルデヒド部分など）である。例えば、求電子部分を糖類部分に付け、求核部分を非天然アミノ酸に付ける。糖類部分が、単一の炭水化物部分を含むこともあり、または糖類部分が、2つ以上の炭水化物部分を含むこともある。

【0282】

一部の実施形態において、前記方法は、糖類部分とグリコシルトランスフェラーゼ、糖供与部分、およびグリコシルトランスフェラーゼ活性に必要な他の反応体を、その糖を糖供与部分から糖類部分に移すために十分な時間、適する条件下で接触させることを含む

。所望される場合には、この反応の生成物を、適切な糖供与部分とともに少なくとも第二のグリコシルトランスフェラーゼに接触させることができる。

【0283】

一定の実施形態において、前記方法は、糖類部分を、 β 1-4N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、 α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼ、 α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ、 α 1, 4-フコシルトランスフェラーゼ、 β 1-4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、および/またはシアリルトランスフェラーゼなどのうちの1つ以上と接触させて、二分岐型または三分岐型オリゴ糖類構造を形成することをさらに含む。1つの実施形態において、糖類部分は、末端GlcNAcを含み、糖供与部分は、UDP-Galであり、グリコシルトランスフェラーゼは、 β 1-4-ガラクトシルトランスフェ

10

【0284】

1つの実施形態において、糖類部分は、末端GlcNAcを含み、糖供与部分は、UDP-GlcNAcであり、グリコシルトランスフェラーゼは、 β 1-4N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼである。

【0285】

場合により、一部の方法は、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ反応の生成物を β 1-4マンノシルトランスフェラーゼおよびGDP-マンノースと接触させて、Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-を含む糖類部分を形成することをさらに含む。場合により、前記方法は、そのMan β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-部分を α 1-3マンノシルトランスフェラーゼおよびGDP-マンノースと接触させて、Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-を含む糖類部分を形成することをさらに含む。場合により、前記方法は、そのMan α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-部分を α 1-6マンノシルトランスフェラーゼおよびGDP-マンノースと接触させて、Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-を含む糖類部分を形成することをさらに含む。場合により、前記方法は、そのMan α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-部分を β 1-2N-アセチルグリコサミニルトランスフェラーゼおよびUDP-GlcNAcと接触させて、Man1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-を含む糖類部分を形成することをさらに含む。場合により、前記方法は、そのMan1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-部分を β 1-2N-アセチルグリコサミニルトランスフェラーゼおよびUDP-GlcNAcと接触させて、GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-を含む糖類部分を形成することをさらに含む。

20

30

【0286】

一部の実施形態において、第一の反応性基を含む非天然アミノ酸をタンパク質に組み込む工程は、外的突然変異体tRNA、外的突然変異体RS、または外的突然変異体tRNA/RSペアの使用を含む。そうした場合、外的突然変異体tRNAは、野生型tRNAについての縮重コドンを優先的に認識し、その縮重コドンに応じてその非天然アミノ酸をそのタンパク質に組み込み、そこで、外的突然変異体シンテターゼは、その非天然アミノ酸で外的突然変異体tRNAを優先的にアミノアシル化する。一部の実施形態では、非天然アミノ酸をインビボでポリペプチドに組み込む。

40

【0287】

多種多様な適する反応性基が当業者には公知である。そうした適する反応性基としては、例えば、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシル、カルボキシレート、カルボニル、アルケニル、アルキニル、アルデヒド、エステル、エーテル（例えば、チオーエーテル）、アミド、アミン、ニトリル、ビニル、スルフィド、スルホニル、ホスホリル、または同様に化学的に反応性の基を挙げることができる。追加の適する反応性基としては、マレイミド

50

、N-ヒドロキシスクシンイミド、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド、ニトロトリ酢酸、活性化ヒドロキシル、ハロアセチル（例えば、ブromoアセチル、ヨードアセチル）、活性化カルボキシル、ヒドラジン、エポキシ、アジリジン、スルホニルクロライド、トリフルオロメチルジアジリジン、ピリジルジスルフィド、N-アシル-イミダゾール、イミダゾールカルバメート、ビニルスルホン、スクシンイミジルカーボネート、アリアルアジド、無水物、ジアゾアセテート、ベンゾフェノン、イソチオシアネート、イソシアネート、イミドエステル、フルオロベンゼン、ビオチンおよびアビジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0288】

一部の実施形態において、反応性基の1つは、求電子部分であり、第二の反応性基は、求核部分である。前記求核部分または求電子部分のいずれかを非天然アミノ酸の側鎖に付けることができ、その後、その対応する基を糖類部分に付ける。

10

【0289】

求核部分と反応して共有結合を形成する、適する求電子部分は、当業者には公知である。一定の実施形態において、そうした求電子部分としては、例えば、カルボニル基、スルホニル基、アルデヒド基、ケトン基、ヒンダードエステル基、チオエステル基、安定なイミン基、エポキシド基、アジリジン基などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0290】

求電子部分と反応することができる、適する求核部分は、当業者には公知である。一定の実施形態において、そうした求核部分としては、例えば、脂肪族または芳香族アミン、例えば、エチレンジアミンが挙げられる。一定の実施形態において、求核部分としては、例えば、 $-NR_1-NH_2$ （ヒドラジン）、 $-NR_1(C=O)NR_2NH_2$ （セミカルバジド）、 $-NR_1(C=S)NR_2NH_2$ （チオセミカルバジド）、 $-(C=O)NR_1NH_2$ （カルボニルヒドラジン）、 $-(C=S)NR_1NH_2$ （チオカルボニルヒドラジン）、 $-(SO_2)NR_1NH_2$ （スルホニルヒドラジン）、 $-NR_1NR_2(C=O)NR_3NH_2$ （カルバジド）、 $NR_1NR_2(C=S)NR_3NH_2$ （チオカルバジド）、および $-O-NH_2$ （ヒドロキシルアミン）などが挙げられるが、これらに限定されず、この場合、それぞれの R_1 、 R_2 および R_3 は、独立して、Hであるか、1~6個の炭素を有するアルキルであり、好ましくはHである。一定の実施形態において、反応性基は、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、セミカルバジド、カルボヒドラジド、またはスルホニルヒドラジンなどである。

20

30

【0291】

求核部分と求電子部分との反応の生成物は、一般に、求核部分に元々存在する原子を取り入れる。アルデヒドまたはケトンと求核部分の反応によって得られる代表的な連結は、用いられる求核部分、およびその求核部分と反応させる求電子部分（例えば、アルデヒドおよび/またはケトンなど）に依存して、オキシム、アミド、ヒドラゾン、還元ヒドラゾン、カルボヒドラゾン、チオカルボヒドラゾン、スルホニルヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾンまたは類似の官能基などの反応生成物を含む。カルボン酸との連結は、一般に、カルボヒドラジンまたはヒドロキサム酸と呼ばれる。スルホン酸との連結は、一般に、スルホヒドラジドまたはN-スルホニルヒドロキシルアミンと呼ばれる。結果として生じた連結は、その後、化学的還元によって安定させることができる。

40

【0292】

これらの方法は、糖類部分と、グリコシルトランスフェラーゼ、糖供与部分、およびグリコシルトランスフェラーゼ活性に必要な他の反応体とを、その糖を糖供与部分から糖類部分に移すために十分な時間、適する条件下で接触させることをさらに含む場合がある。一定の実施形態において、前記方法は、グリコシルトランスフェラーゼ反応の生成物と、少なくとも1つの第二のグリコシルトランスフェラーゼおよび第二の糖供与部分とを接触させることをさらに含む。言い換えれば、本明細書に開示する一定の実施形態は、アミノ酸連結糖類部分、または糖類部分を含む非天然アミノ酸を、さらにグリコシル化する方法を提供する。これらのグリコシル化工程は、好ましくは（必然的にではないが）、例えば

50

、グリコシルトランスフェラーゼ、グリコシダーゼ、または当業者には公知の他の酵素を使用して、酵素的に行う。一部の実施形態において、2つ以上の異なるグリコシルトランスフェラーゼを含有する単一の反応混合物で多数の酵素的工程を行う。例えば、その反応混合物にシアリルトランスフェラーゼとガラクトシルトランスフェラーゼの両方を含めることによって、ガラクトシル化工程とシアリル化工程を同時に行うことができる。

【0293】

グリコシルトランスフェラーゼ反応を含む酵素的糖類合成の場合、組換え細胞が、グリコシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも1つの異種遺伝子の場合によっては含有する。多くのグリコシルトランスフェラーゼが公知であり、それらのポリヌクレオチド配列も公知である。例えば、「The WWW Guide To Cloned Glycosyl transferases」(World Wide Webで入手可能)参照。グリコシルトランスフェラーゼアミノ酸配列、およびアミノ酸配列を導出することができるグリコシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列も、GenBank、Swiss-Prot、EMBLおよび他のものを含む様々な公的に利用できるデータベースにおいて見つけることができる。

10

【0294】

一定の実施形態において、グリコシルトランスフェラーゼとしては、例えば、ガラクトシルトランスフェラーゼ、フルコシルトランスフェラーゼ、グルコシルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、グルクロニルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、グルクロン酸トランスフェラーゼ、ガラクトツロン酸トランスフェラーゼ、およびオリゴサッカリルトランスフェラーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。適するグリコシルトランスフェラーゼとしては、真核生物または原核生物に由来するものが挙げられる。

20

【0295】

グリコシルトランスフェラーゼの受容体は、本明細書に開示する方法によって改変された糖タンパク質上に存在するであろう。適する受容体としては、例えば、ガラクトシル受容体、例えばGal β 1, 4GalNAc-; Gal β 1, 3GalNAc-; ラクトーN-テトラオース-; Gal β 1, 3GlcNAc-; Gal β 1, 4GlcNAc-; Gal β 1, 3Ara-; Gal β 1, 6GlcNAc-; およびGal β 1, 4Glc- (ラクトース)が挙げられる。他の受容体は、当業者には公知である(例えば、Paulsonら, J. Biol. Chem. 253:5617-5624, 1978参照)。一般に、これらの受容体は、糖タンパク質に付いている糖類部分の鎖の一部を構成する。

30

【0296】

1つの実施形態において、糖類部分は、末端GlcNAcを含み、糖供与部分は、UDP-GlcNAcであり、グリコシルトランスフェラーゼは、 β 1-4N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼである。もう1つの実施形態において、糖類部分は、末端GlcNAcを含み、糖供与部分は、UDP-Galであり、グリコシルトランスフェラーゼは、 β 1-4N-ガラクトシルトランスフェラーゼである。追加の糖を付加させることもできる。

40

【0297】

グリコシル化反応は、適切なグリコシルトランスフェラーゼおよび受容体に加えて、グリコシルトランスフェラーゼのための糖供与体として作用する活性化ヌクレオチド糖を含む。前記反応は、グリコシルトランスフェラーゼ活性を助長する他の成分も含むことがある。これらの成分としては、二価カチオン(例えば、Mg²⁺またはMn²⁺)、ATP再生に必要な物質、リン酸イオンおよび有機溶媒を挙げることができる。このプロセスにおいて使用される様々な反応体の濃度または量は、反応条件、例えば温度およびpH値、ならびにグリコシル化される受容体糖類の選択および量をはじめとする非常に多数の因子に依存する。反応媒質は、必要な場合には、可溶化界面活性剤(例えば、TritonまたはSDS)および有機溶媒、例えばメタノールまたはエタノールも含むことがある。

50

【0298】

宿主細胞を含むことがあり、含まないことがある翻訳系、外的突然変異体 tRNA、外的突然変異体 RS、またはこれらのいずれかもしくはすべてを含む組成物も、糖タンパク質を改変するために、一定の実施形態によって提供される。

【0299】

本明細書で用いる場合、用語「糖類部分」は、天然および非天然糖部分（すなわち、非自然発生糖部分、例えば、例えば1つ以上のヒドロキシルまたはアミノ位置が改変されている、例えば脱ヒドロキシル化されている、脱アミノ化されている、エステル化されているなどの糖部分；例えば、2-デオキシGalは、非天然糖部分の一例である）を指す。

【0300】

用語「炭水化物」は、一般式 $(CH_2O)_n$ を有するものであり、例えば、単糖類、二糖類、オリゴ糖類および多糖類を含むが、これらに限定されない。オリゴ糖類は、代替的に糖として知られている糖類単位から成る鎖である。糖類単位は、いずれの順序で配列されていてもよく、2つの糖類単位間の連結は、約10の異なる方法のうちのいずれで行われていてもよい。以下の略語を本明細書では用いる：Ara = アラビノシル；Fru = フルコシル；Fuc = フルコシル；Gal = ガラクトシル；GalNAc = N-アセチルガラクトサミニル；Glc = グルコシル；GlcNAc = N-アセチルグルコサミニル；Man = マンノシル；および NeuAc = シアリル（一般には、N-アセチルノイラミニル）。

【0301】

オリゴ糖類は、その糖類の還元末端に実際に還元糖があるにせよ、ないにせよ、還元末端および非還元末端を有すると考えられる。公認命名法に従って、オリゴ糖類は、本明細書では、左側に非還元末端および右側に還元末端で描く。本明細書に記載するすべてのオリゴ糖類は、非還元単位についての名称または略語（例えば、Gal）、続いて、グリコシド結合の配座（ α または β ）、環結合、その結合に関与する還元糖類の環位、そしてその後、還元糖類の名称または略語（例えば、GlcNAc）で記載する。2つの糖の間の連結は、例えば、2, 3；2 $\rightarrow$ 3；2-3；または（2, 3）と表示することがある。2つの糖の間の天然および非天然連結（例えば、1-2；1-3；1-4；1-6；2-3；2-4；2-6 など）が、一定の実施形態に含まれる。それぞれの糖類は、ピラノースである。

【0302】

用語「シアリ酸」（「Sia」と略される）は、9炭素カルボキシル化糖ファミリーの任意のメンバーを指す。シアリ酸ファミリーの最も一般的なメンバーは、N-アセチルノイラミン酸（2-ケト-5-アセトアミノ-3, 5-ジデオキシ-D-グリセロ-D-ガラクトノスロピラノース-1-オン酸）（多くの場合、Neu5Ac、NeuAc または NANA と略される）である。このファミリーの第二のメンバーは、NeuAc の N-アセチルがヒドロキシル化されている N-グリコシルノイラミン酸（Neu5Gc または NeuGc）である。第三のシアリ酸ファミリーメンバーは、2-ケト-3-デオキシノスロソン酸（KDN）である（Nadano ら, J. Biol. Chem. 261: 11550-11557, 1986; Kanamori ら, J. Biol. Chem. 265: 21811-21819, 1990）。9-置換シアリ酸、例えば、9-O-C1-C6 アシル-Nu5Ac（例えば、9-O-ラクチル-Nu5Ac または 9-O-アセチル-Nu5Ac）、9-デオキシ-9-フルオロ-Nu5Ac、およびアジド-9-デオキシNu5Ac も含まれる。シアリ酸ファミリーの総覧については、例えば、Varki, Glycobiology 2: 25-40, 1992; Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, R. Schauer, Ed. (Springer-Verlag, New York (1992)) を参照のこと。シアリ化手順におけるシアリ酸化合物の合成および使用は、例えば、国際出願 WO 92/16640（全内容が本明細書に参照により取り入れられている）に記載されている。

【0303】

グリコシルトランスフェラーゼの供与体基質は、活性化ヌクレオチド糖である。こうした活性化糖は、一般に、ウリジンおよびグアノシン二リン酸、ならびにシチジーン二リン酸、糖の誘導体（ヌクレオシド二リン酸または一リン酸が、脱離基としての役割を果たす）から一般に成る。細菌、植物および真菌系は、時には、他の活性化ヌクレオチド糖を用いることがある。

【0304】

非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸によって、タンパク質および／または機能の変化、例えば、サイズ、酸性度、求核性、水素結合、疎水性、プロテアーゼ標的部位への接近容易性、タンパク質部分への標的接近などの変化、の調整を行うことができる。非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸、を含むタンパク質は、強化された、または完全に新しいことさえある、触媒または物理的特性を有することがある。

10

【0305】

例えば、タンパク質に非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸、を含めることによって、次の特性が場合によっては改変される：毒性、生体内分布、構造特性、分光学的特性、化学および／または光化学的特性、触媒能、半減期（例えば、血清半減期）、ならびに他の分子と、例えば共有結合的にまたは非共有結合的に、反応する能力、など。少なくとも1つの非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸、を含むタンパク質を含む組成物は、例えば、新規治療薬、診断薬、触媒酵素、工業用酵素、結合タンパク質（例えば、抗体）、ならびに例えば、タンパク質の構造および機能の研究のために有用である。例えば、Dougherty, Curr. Opin. in Chem. Biol., 4:645-562 (2000) 参照。

20

【0306】

1つの態様において、組成物は、少なくとも1つ、例えば、少なくとも約2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または少なくとも約10以上の非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸、を有する少なくとも1つのタンパク質を含む、および／または別の非天然アミノ酸を含む。前記非天然アミノ酸は、同じである場合もあり、または異なる場合もあり、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれ以上の異なる非天然アミノ酸を含むタンパク質の中に、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれ以上の異なる部位があり得る。もう1つの態様において、組成物は、非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸、で置換されたタンパク質中の存在する少なくとも1つ、しかしすべてよりは少数、の特定のアミノ酸を有するタンパク質を含む。1つより多くの非天然アミノ酸を有する所与のタンパク質の場合、それらの非天然アミノ酸は、同一であることもあり、または異なることもある（例えば、そのタンパク質は、2以上の異なるタイプの非天然アミノ酸を含むことがあり、または2つの同じ非天然アミノ酸を含むこともある）。2つより多くの非天然アミノ酸を有する所与のタンパク質の場合、それらの非天然アミノ酸は、同一であることもあり、異なることもあり、または同じ種類の多数の非天然アミノ酸と少なくとも1つの異なる非天然アミノ酸の組み合わせであることもある。

30

40

【0307】

非天然アミノ酸、例えば、糖類部分を付けることができる部分を含む非天然アミノ酸、例えばアルデヒドもしくはケト誘導体化アミノ酸、または糖類部分を含む非天然アミノ酸（および任意の対応するコーディング核酸、例えば、1つ以上のセクターコドンを含むもの）を含む本質的にいずれのタンパク質（またはそれらの部分）も、本明細書にお

50

ける組成物および方法を用いて生産することができる。何十万もの公知タンパク質の同定を試みず、それらをいずれも、例えば、適切な翻訳系に1つ以上の適する縮重コドンを含めるように任意の利用可能な突然変異法を調整することにより、1つ以上の非天然アミノ酸を含むように改変することができる。公知タンパク質の一般的な配列保管場所としては、GenBank、EMBL、DDBJおよびNCBIが挙げられる。他の保管場所は、インターネットを検索することにより、容易に特定することができる。

【0308】

一般に、タンパク質は、例えば、任意の利用可能なタンパク質（例えば、治療用タンパク質、診断用タンパク質、工業用酵素、またはそれらの一部分など）と少なくとも約60%、70%、75%、80%、90%、95%、または少なくとも99%以上同一であり、それらは、1つ以上の非天然アミノ酸を含む。

10

【0309】

タンパク質の1つ以上のアミノ酸残基の改変に加えて、タンパク質の炭水化物組成を改変する、すなわちグリコシル化により改変することができる。グリコシル化によるタンパク質の後翻訳修飾により、タンパク質のフォールディングおよび安定性に影響を及ぼすこと、タンパク質の固有活性を改変すること、ならびに他の生体分子とのそれらの相互作用を変調することができる。例えば、Variki, Glycobiology 3:97-130, 1993参照（その全体が本明細書に参照により取り入れられている）。天然糖タンパク質は、多くの異なるグリコフォームの集団として存在することが多く、これが、グリカン構造の分析ならびにタンパク質構造および機能に対するグリコシル化の影響の研究を難しくする。従って、グリカンの機能を系統的に理解するために、および改善された糖タンパク質治療薬を開発するために、天然および非天然均一グリコシル化タンパク質の合成方法が必要とされている。

20

【0310】

本明細書に開示する一定の組成物および方法を用いて製造することができるタンパク質の1つのクラスは、転写モジュレーター、酵素、またはそれらの一部分を含む。転写モジュレーターの例としては、細胞の増殖、分化または調節などを変調する、遺伝子および転写モジュレーターが挙げられる。転写モジュレーターは、広範な治療標的をもたらす、真菌、植物、酵母、昆虫および動物（哺乳動物を含む）をはじめとする原核生物、ウイルスおよび真核生物において見出される。発現および転写アクチベーターが、多くのメカニズムによって、例えば、受容体への結合、シグナル伝達カスケードの刺激、転写因子の発現の調節、プロモーターおよびエンハンサーへの結合、プロモーターおよびエンハンサーに結合するタンパク質への結合、DNAの巻き戻し、プレーmRNAのスプライシング、RNAのポリアダニル化、ならびにRNAの分解によって、転写を調節することは、理解されるであろう。酵素の一部の例としては、例えば、アミダーゼ、アミノ酸ラセマーゼ、アシラーゼ、デハロゲナーゼ、ジオキシゲナーゼ、ジアリールプロパンペルオキシダーゼ、エピメラーゼ、エポキシドヒドrolラーゼ、エステラーゼ、イソメラーゼ、キナーゼ、グルコースイソメラーゼ、グリコシダーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、ハロペルオキシダーゼ、モノオキシゲナーゼ（例えば、p450s）、リパーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ニトリルヒドrolターゼ、ニトリラーゼ、プロテアーゼ、ホスファターゼ、サブチリジン、トランスアミナーゼ、およびヌクレアーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0311】

本明細書に開示する一定の実施形態に従って改変することができるポリペプチドの一部は、市販されており（例えば、the Sigma BioSciences catalogue and price list参照）、対応するタンパク質配列および遺伝子、ならびに、一般に、それらの多数の変異体は、周知である（例えば、Genbank参照）。

【0312】

本明細書に開示する実施形態のいずれかによって操作または改変（グリコシル化、およ

50

び／またはPEG化、および／または非天然アミノ酸の組み込みを含む）することができる治療関連特性の例としては、血清半減期、貯蔵半減期、安定性、免疫原性、治療活性、非天然アミノ酸に関する検出能（例えば、レポーター基（例えば、標識または標識結合部位）を含めることによる）、特異性、LD50または他の副作用の低減、または胃管を通して体内に入る能力（例えば、経口アベイラビリティ）などが挙げられる。関連診断特性の例としては、貯蔵半減期、安定性、診断活性、検出能、または特異性などが挙げられる。関連酵素特性の例としては、貯蔵半減期、安定性、特異性、酵素活性、または生産能力が挙げられる。

【0313】

様々な他のタンパク質も、本明細書に開示する一定の実施形態に従って、1つ以上の非天然アミノ酸を含めるように改変することができる。例えば、感染性真菌、例えば、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、カンジダ属 (*Candida*) 種；病原菌についてのモデルの役割を果たす細菌、特に *E. coli*、ならびに医学的に重要な細菌、例えば、ブドウ球菌 (*Staphylococci*)（例えば、黄色ブドウ球菌 (*aureus*)）、または連鎖球菌 (*Streptococci*)（例えば、肺炎連鎖球菌 (*pneumoniae*)）；原生動物、例えば、孢子虫類（例えば、マラリア病原虫 (*Plasmodia*)）、根足虫類（例えば、体内寄生性アメーバ (*Entamoeba*)）および鞭毛虫（トリパノソーマ属 (*Trypanosoma*)、リシューシマニア属 '*Leishmania*）、トリコモナス属 (*Trichomonas*)、ジアルジア属 (*Giardia*) など）；ウイルス、例えば、(+) RNAウイルス [例としては、ポックスウイルス (*Poxvirus*)、例えば、ワクシニアウイルス；ピコルナウイルス (*Picornavirus*)、例えば、ポリオウイルス；トガウイルス群 (*Togavirus*)、例えば、風疹ウイルス；フラビウイルス (*Flavivirus*)、例えば、HCV；およびコロナウイルス (*Coronavirus*) が挙げられる]、(-) RNAウイルス [例えば、ラブドウイルス (*Rhabdovirus*)、例えば、VSV；パラミクソウイルス (*Paramyxovirus*)、例えば、RSV；オルトミクロウイルス (*Orthomyxoviruses*)、例えば、インフルエンザウイルス；ブンヤウイルス (*Bunyaviruses*)；およびアレイウイルス (*Arenaviruses*)]；dsDNAウイルス（例えば、レオウイルス (*Reovirus*)）、RNA to DNAウイルス、すなわち、レトロウイルス (*Retrovirus*)、例えば、HIVおよびHTLV、ならびに一定のDNA to RNAウイルス、例えば、B型肝炎ウイルス (*Hepatitis B*)、からのタンパク質。

【0314】

農業関連タンパク質、例えば、昆虫耐性タンパク質（例えば、Cryタンパク質）、デンプンおよび脂質生産酵素、植物および昆虫毒素、毒素耐性タンパク質、マイコトキシン解毒タンパク質、植物成長酵素（例えば、リブローース1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ、「RUBISCO」）、リポオキシゲナーゼ (LOX)、およびホスホエノールピルベート (PEP) カルボキシラーゼも、本明細書に開示する一定の実施形態による改変に適する標的である。

【0315】

一定の実施形態において、本明細書に開示する方法および／または組成物における目的とするタンパク質またはポリペプチド（またはそれらの一部分）は、核酸によってコードされる。一般に、前記核酸は、少なくとも1つの縮重コドン、少なくとも約2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または少なくとも約10以上の縮重コドンを含む。

【0316】

従って、上で説明した人工（例えば、人造、および非自然発生）ポリペプチドおよびポリヌクレオチドも、本明細書に開示する一定の実施形態の特徴である。人工ポリヌクレオチドとしては、例えば、(a) 人工ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；(b) (a) のポリヌクレオチド配列に相補的である、または (a) ポ

リヌクレオチド配列をコードする、ポリヌクレオチド；（c）その核酸の実質的に全長にわたって、ストリンジェントな条件下で（a）または（b）のポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸；（d）（a）、（b）または（c）のポリヌクレオチドと少なくとも約95%、好ましくは少なくとも約98%同一であるポリヌクレオチド；ならびに（e）（a）、（b）、（c）または（d）の保存的変形を含むポリヌクレオチドを挙げることができる。

【0317】

非天然アミノ酸は、上に一般に説明されている。式 I 中の R が、糖類部分に付いている反応性基と反応して、非天然アミノ酸を含むタンパク質にその糖類部分を連結させることができる部分を含む、非天然アミノ酸は、本明細書に開示する糖タンパク質の製造に特に興味深い。適する R 基としては、例えば、ケトー、アジドー、ヒドロキシルー、ヒドラジーン、シアノー、ハロー、アミノオキシ、アルケニル、アルキニル、カルボニル、エーテル、チオール、セレンー、スルホニル、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、チオエステル、ヒンダードエステル、ヒドロキシルアミン、およびアミンなど、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。一部の実施形態において、前記非天然アミノ酸は、光活性化可能な架橋剤を有する。

10

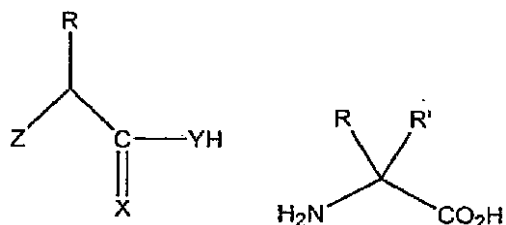
【0318】

新規側鎖を含有する非天然アミノ酸に加えて、非天然アミノ酸は、例えば、式 I I および I I I の構造によって図示されるような、改変骨格構造も場合によっては含む：

20

【0319】

【化6】



式 II

式 III

30

（これらの式中、Z は、一般に、OH、NH₂、SH、NH-R' または S-R' を含む；X および Y は、同じであることもあり、または異なることもあり、一般に、S または O を含む；ならびに R および R' は、場合により同じであるか異なり、一般に、式 I を有する非天然アミノ酸について上で説明した R 基についての同じ成分リストならびに水素から選択される）。例えば、本明細書に開示する非天然アミノ酸は、式 I I および I I I によって図示されているようなアミノまたはカルボキシ基における置換を場合によっては含む。このタイプの非天然アミノ酸としては、例えば一般的な 20 の天然アミノ酸に対応する側鎖または非天然側鎖を有する、α-ヒドロキシ酸、α-チオ酸、α-アミノチオカルボキシレートが挙げられるが、これらに限定されない。加えて、α-炭素での置換は、場合により、L、D または α-α-二置換アミノ酸、例えば、D-グルタメート、D-アラニン、D-メチル-L-チロシン、およびアミノ酪酸などを含む。他の構造的選択肢としては、環状アミノ酸、例えば、プロリン類似体、ならびに 3、4、6、7、8 および 9 員環プロリン類似体、β および γ アミノ酸、例えば、置換 β-アラニンおよび γ-アミノ酪酸が挙げられる。

40

【0320】

例えば、多数の非天然アミノ酸は、天然アミノ酸、例えば、チロシン、グルタミンおよびフェニルアラニンなどに基づく。チロシン類似体としては、パラ置換チロシン、オルト置換チロシン、およびメタ置換チロシンが挙げられ、この場合の置換チロシンは、アセチル基、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン、チオール基、カルボキ

50

シ基、イソプロピル基、メチル基、C 6～C 20 直鎖または分枝炭化水素、飽和または不飽和炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、またはニトロ基などを含む。加えて、多置換アリール環も考えられる。グルタミン類似体としては、 α -ヒドロキシ誘導体、 γ -置換誘導体、環状誘導体、およびアミド置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。フェニルアラニン類似体の例としては、メタ置換、オルト置換、および／またはパラ置換フェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されず、この場合の置換基は、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アルデヒド基またはケトン基などを含む。

【0321】

非天然アミノ酸の具体的な例としては、p-アセチル-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、 β -O-GlcNAc-L-セリン、トリ-O-アセチル-GalNAc- α -トレオニン、 α -GalNAc-L-トレオニン、L-Dopa、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、p-ブロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、および本発明において下にまたは他の箇所に列挙するものなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0322】

本明細書に開示する一部の方法における使用に適する非天然アミノ酸としては、アミノ酸側鎖に付いている糖類部分を有するものも挙げられる。1つの実施形態において、糖類部分を有する非天然アミノ酸としては、Man、GalNAc、Glc、FucまたはGal部分を有する、セリンまたはトレオニンアミノ酸が挙げられる。糖類部分を含む非天然アミノ酸の例としては、例えば、トリ-O-アセチル-GlcNAc β -セリン、 β -O-GlcNAc-L-セリン、トリ-O-アセチル-GalNAc- α -トレオニン、 α -GalNAc-L-トレオニン、O-Man-L-セリン、テトラアセチル-O-Man-L-セリン、O-GalNAc-L-セリン、トリアセチル-O-GalNAc-L-セリン、Glc-L-セリン、テトラアセチル-Glc-L-セリン、fuc-L-セリン、トリアセチル-fuc-L-セリン、O-Gal-L-セリン、テトラアセチル-O-Gal-L-セリン、ベータ-O-GlcNAc-L-トレオニン、トリアセチル-ベータ-GlcNAc-L-トレオニン、O-Man-L-トレオニン、テトラアセチル-O-Man-L-トレオニン、O-GalNAc-L-トレオニン、トリアセチル-O-GalNAc-L-トレオニン、Glc-L-トレオニン、テトラアセチル-Glc-L-トレオニン、fuc-L-トレオニン、トリアセチル-fuc-L-トレオニン、O-Gal-L-トレオニン、およびテトラアセチル-O-Gal-L-セリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。一定の実施形態は、上記のものの非保護およびアセチル化形も含む。

【0323】

一部の実施形態において、非天然アミノ酸の設計は、シンテターゼ、例えば、外的突然変異体tRNAをアミノアシル化するために使用される外的突然変異体tRNAシンテターゼ、の活性部位についての公知情報により偏る。例えば、アミドの窒素原子で置換されている誘導体(1)、 γ 位にメチル基(2)、およびN-C γ -環状誘導体(3)を含む、グルタミン類似体の3つのクラスを提供する。重要な結合部位残基が酵母GlnRSに相同であるE. coli GlnRSのX線結晶構造に基づいて、グルタミンの側鎖の10 Å 殻の中の残基のおびただしい数の側鎖突然変異を補足するように、類似体を設計した。例えば、小さな疎水性アミノ酸への活性部位Phe 233の突然変異を、GlnのC γ 位での立体的な嵩の増加によって補足することができた。

【0324】

例えば、N-フタロイル-L-グルタミン酸 1, 5-無水物 (WO 02/085923 の図 23 中の化合物番号 4) を場合によっては用いて、アミドの窒素に置換基を有するグルタミン類似体を合成する。例えば、King and Kidd, J. Chem. Soc., 3315-3319, 1949; Friedman and Chatterji, J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752, 1959; Craig ら, J. Org. Chem. 53, 1167-1170, 1988; および Azoulay ら, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5, 1991 参照。一般に、前記無水物は、先ず、アミンをフタルイミドとして保護し、続いて酢酸中で還流することによって、グルタミン酸から調製される。その後、そのアルデヒドを多数のアミンで開環させ、結果として、そのアミドに一定範囲の置換基をもたらす。WO 2002/085923 の図 23 に示されているように、ヒドラジンでのフタロイル基の脱保護によって遊離アミノ酸が得られる。

10

【0325】

γ 位での置換は、一般に、グルタミン酸のアルキル化によって遂行される。例えば、Koskinen and Rapoport, J. Org. Chem. 54, 1859-1866, 1989 参照。例えば、WO 02/085923 の図 24 中の化合物番号 5 によって示されるような、保護アミノ酸は、場合によっては、先ず、9-ブロモ-9-フェニルフルオレン (PhFlBr) でアミノ部分をアルキル化し (例えば、Christie and Rapoport, J. Org. Chem. 1989, 1859-1866, 1985 参照)、その後、O-tert-ブチル-N, N'-ジイソプロピルイソウレアを使用してその酸部分をエステル化することにより、調製される。KN(Si(CH₃)₃)₂ の付加により、そのメチルエステルの α 位で位置選択的に脱保護してエノラートを形成し、その後、それを、一定範囲のヨウ化アルキルで場合によってはアルキル化する。tert-ブチルエステルおよび PhFl 基の加水分解により、所望の γ -メチルグルタミン類似体 (WO 02/085923 の図 24 中の化合物番号 2) が得られる。

20

【0326】

一定の他の実施形態は、標的 (例えば、標的細胞) に特異的な抗体 (またはその機能性フラグメント) を含む免疫コンジュゲートを含み、前記抗体 (またはそのフラグメントもしくは機能性等価物) は、特定の所定の位置で 2 つ以上の治療用分子とコンジュゲートしており、この場合、前記位置のそれぞれが、非天然アミノ酸を含む。一定の実施形態において、抗体フラグメントは、F(ab')₂、Fab'、Fab、または Fv フラグメントである。

30

【0327】

一定の実施形態において、前記 2 つ以上の治療用分子は、同じである。一定の実施形態において、前記 2 つ以上の治療用分子は、異なる。一定の実施形態において、前記治療用分子は、同じ非天然アミノ酸にコンジュゲートしている。一定の実施形態において、前記治療用分子は、異なる非天然アミノ酸にコンジュゲートしている。

【0328】

一定の実施形態において、前記非天然アミノ酸/治療用分子連結の性質または化学は、一定の条件、例えば、中または弱酸性条件 (例えば、約 pH 4~6、好ましくは約 pH 5)、還元環境 (例えば、還元剤の存在) または二価カチオン、のもとでその連結の切断を可能にし、場合によっては、熱によって加速される。

40

【0329】

一定の実施形態において、前記治療用分子は、リンカー/スペーサー (例えば、メチレン(-CH₂-)、メチレンオキシ(-CH₂-O-)、メチレンカルボニル(-CH₂-CO-)、アミノ酸、またはこれらの組み合わせの 1 以上のリピート) により、抗体にコンジュゲートしている。

【0330】

(多タンパク質複合体)

非天然アミノ酸を使用して、固有の官能基を有する 2 つ以上のタンパク質またはタンパ

50

ク質サブユニットを連結させることもできる。例えば、2つの抗体（またはそれらの機能的部分またはそれらの誘導体、例えば、F a b、F a b'、F d、F v、s c F vフラグメントなど）をそれらに組み込まれた非天然アミノ酸によって連結させることにより、二重特異性抗体を生成することができる。

【0331】

従って、本明細書における一定の実施形態は、多タンパク質コンジュゲートの合成方法を提供する。一部の実施形態において、これらの方法は、第一の反応性基を含む第一の非天然アミノ酸を第一のタンパク質（例えば、第一の抗体）に組み込むこと；および第二の反応性基を含む第二の非天然アミノ酸を含む第二のタンパク質（例えば、第二の抗体）と前記第一のタンパク質とを接触させ（この場合、前記第一の反応性基が、前記第二の反応性基と反応する）、それによって、第二のタンパク質を第一のタンパク質に付ける共有結合を形成することを含む。

10

【0332】

一部の実施形態において、前記第一の反応性基は、求電子部分（例えば、ケト部分、および／またはアルデヒド部分など）であり、前記第二の反応性基は、求核部分である。一部の実施形態において、前記第一の反応性基は、求核部分であり、前記第二の反応性基は、求電子部分（例えば、ケト部分、および／またはアルデヒド部分など）である。例えば、求電子部分は、第一A bの非天然アミノ酸に付いており、求核部分は、第二A bの非天然アミノ酸は付いている。

【0333】

異なるタンパク質の異なる機能性ドメインを同様の方法で互いに連結させて、新規官能基を有する新規タンパク質（例えば、DNA結合ドメインと転写活性化ドメインの固有の組み合わせを有する新規転写因子；新規調節ドメインを有する新規酵素など）を作ることができる。

20

【0334】

（pH感受性結合）

多くのタンパク質相互作用は、あるタンパク質のその通常の結合パートナーへの結合親和性が、環境pH変化につれて変化し得るという意味で、pH感受性である。例えば、多くのリガンド（例えば、インスリン、インターフェロン、成長ホルモンなど）は、それらそれぞれの細胞表面受容体に結合して、シグナル伝達を惹起する。その後、リガンド-受容体複合体は、受容体媒介エンドサイトーシスによって内在化され、一連のますます酸性の強いエンドソームを通過することとなる。結局、リガンド-受容体相互作用は、一定の酸性pH（例えば、約pH5.0）で弱められ、リガンドが受容体から解離する。一部の受容体（およびことによると一部のリガンド）は、もとの細胞表面に再循環されることがある。そこで、それらは、それらのそれぞれの正常な結合パートナーに結合することができる。

30

【0335】

リガンド-受容体複合体を比較的高いpHで解離することができるように、pH感受性結合を変調できる場合には、一定のリガンドをそれらの受容体より早く解離させることができ、それらは、分解されるのではなく優先的に細胞表面に再循環されるようになる。これは、そうしたリガンドのインビボ半減期を増加させる結果となり、これは、糖尿病患者において同じ（またはより良好な）効能のために必要とし得るインシュリンがより少ないので好ましい。他の状況では、より低いpHでの好適な結合によりpH感受性結合を変調することが望ましいこともある。

40

【0336】

例えば、モノクローナル抗体は、一般に、それらの標的に非常に特異的である。しかし、癌療法などの多くの用途において、それらは、例えば、非腫瘍組織への結合により、一定の副作用を惹起する傾向がある。1つの理由は、モノクローナル抗体を産生させる腫瘍標的が、腫瘍細胞上で特異的に発現されず、一部の健常細胞上でも（より少ない数であり得るが）発現されるからであり得る。こうした副作用は、一般に望ましくなく、改善され

50

た特異性を有する抗体が必要とされている。

【0337】

人血のpHは、高度に調節され、約7.6～7.8の範囲で維持される。一方、腫瘍細胞は、劣った腫瘍血管新生のために十分に除去されない代謝酸の蓄積に起因して、6.3～6.5の細胞外pHを有する。腫瘍抗原とその治療用抗体との相互作用を、低pHでの結合に有利であるように変調できれば、腫瘍-抗体は、同じ抗原が、時には正常な組織上で見出されたとしても、それらの腫瘍抗原に対する一層の特異性／親和性／選択性を有することができる。

【0338】

実際、そうした改変抗体は、癌療法に望ましいばかりでなく、正常より低いレベルのpHで発生し得るいずれの抗原-抗体結合にも望ましいであろう。

【0339】

(一般技術)

本明細書に開示する実施形態の実施は、別の指示がなければ、当業者の範囲内である分子生物学、細胞生物学、細胞培養、微生物学および組換えDNAの従来技術を利用することとなる。そうした技術は、文献で十分に説明されている。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. By Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullisら; 米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wuら, eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987) 参照。

【0340】

さらに、一般的なクローニング、突然変異および細胞培養などを開示している一般的なテキストとしては、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology vol. 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrookら, Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3rd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 2000 (「Sambrook」) および Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 2002) (「Ausubel」) が挙げられる。これらのテキストには、突然変異誘発、ベクターの使用、プロモーター、なたびに例えば、外的突然変異体tRNA、外的突然変異体シンテターゼおよびそれらのペアに関連した多数のトピックが記載されている。

【0341】

一定の実施形態において、例えば、新規シンテターゼまたはtRNAを生産するために、様々なタイプの突然変異誘発を用いている。それらとしては、部位特異的突然変異誘発（例えば、アンバー（Amber）、オーカー、オパール（Umber）、または他の停止コドンによる）、ウォブルコドンによる突然変異誘発、ランダム点突然変異誘発、相同組換え（DNAシャッフリング）、ウラシル含有テンプレートを用いる突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、ホスホロチオエート改変DNA突然変異誘発、またはギャップド・デュプレックスDNA法を用いる突然変異誘発などが挙げられるが、これらに限定されない。追加の適する方法としては、ポイントミスマッチ修復、修復欠損宿主株を用いる突然変異誘発、制限選択および制限精製、欠失突然変異誘発、全遺伝子合成および二本鎖破壊修復などによる突然変異誘発が挙げられる。例えばキメラ構築物を伴う突然変異誘発も一定の実施形態に含まれる。1つの実施形態において、突然変異誘発は、自然発生分子または改変もしくは突然変異させた自然発生分子の公知の情報、例えば、配列、配列比較、物理的特性、または結晶構造などによって導くことができる。

【0342】

これらの手順は、上記テキストおよびここで見出される例、ならびに以下の出版物およびその中に引用されている参考文献に記載されている：Sieber, ら., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); Lingら, *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, *Anal. Biochem.* 254 (2):157-178 (1997); Daleら, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); I. A. L 20
 orimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); Arnold, *Curr. Opin. in Biotech.* 4:450-455 (1993); Bassら, *Science* 242:240-245 (1988); Fritzら, *Nucl. Acids Res.* 16:6987-6999 (1988); Kramerら, *Nucl. Acids Res.* 16:7207 (1988); Sakamar and Khorana, *Nucl. Acids Res.* 14:6361-6372 (1988); Sayersら, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayersら, *Nucl. Acids Res.* 16:803-814 (1988); Carter, *Methods in Enzymol.* 154:382-403 (1987); Kramer & Fritz *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kunkel, *Nucleic Acids & Mol. Biol.* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkelら, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Zoller & Smith, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Carter, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Eghtedarzadeh & Henikoff, *Nucl. Acids Res.* 14:5115 (1986); Mandecki, *PNAS, USA*, 83:7177-7181 (1986); Nakamaye & Eckstein, *Nucl. Acids Res.* 14:9679-9698 (1986); Wellsら, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317:415-423 (1986); Botstein & Shortle, *Science* 229:1193-1201 (1985) Carterら, *Nucl. Acids Res.* 13:4431-4443 (1985); Grundstromら, *Nucl. Acids Res.* 13:3305-3316 (1985); Kunkel, *PNAS, US A* 82:488-492 (1985); Smith, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Taylorら, *Nucl. Acids Res.* 13:8749-8764 (1985); Taylorら, *Nucl. Acids Res.* 13:8765-8787 (1985); Wellsら, *Gene* 34:315-3 50

23 (1985); Kramerら, Nucl. Acids Res. 12:9441-9456 (1984); Kramerら, Cell 38:879-887 (1984); Nambiarら, Science 223:1299-1301 (1984); Zoller & Smith, Methods in Enzymol. 100:468-500 (1983); および Zoller & Smith, Nucl Acids Res. 10:6487-6500 (1982)。上記方法の多くに関するさらなる詳細は、Methods in Enzymology Volume 154において見出すことができ、これにも、様々な突然変異誘発法に伴う問題のトラブルシューティングに有用な操作が記載されている。

【0343】

10

例えば、シンテターゼのライブラリーを突然変異させる、またはtRNAを改変する、例えば、一定の実施形態における突然変異誘発において使用するための、オリゴヌクレオチドは、一般に、例えば、Needham-VanDevanterら, Nucl Acids Res., 12:6159-6168 (1984)に記載されているような自動合成装置を使用して、Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, (1981)によって記載されている固相ホスホロアミダイトトリエステル法に従って、化学的に合成される。

【0344】

加えて、本質的にいずれの核酸も、様々な供給業者、例えば、The Midland Certified Reagent Company、The Great American Gene Company、ExpressGen Inc.、Operon Technologies Inc. (カリフォルニア州、アラミダ) および多数の他の供給御者、のいずれかから、個別または標準注文によって手に入れることができる。

20

【0345】

本明細書に記載するすべての実施形態は、本開示の異なるセクションで説明されているものであっても、1つ以上の他の実施形態と組み合わせることができると解釈する。

【0346】

本明細書において言及する、および／または出願データシートに列挙する、上記米国特許、米国特許公開出願、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許出版物のすべては、それら全体が本明細書に参照により取り入れられている。

30

【実施例】

【0347】

これらの実施例は、タンパク質における一般にフェニルアラニン (Phe) を特異的にコードするまたはトリプトファン (Trp) を特異的にコードするコドンによってコードされた位置へのアミノ酸類似体の組み込みを例証するものである。図1に略図を示す。同様のアプローチを任意の他の類似体を用いることができる。

【0348】

Pheは、2つのコドン、UUCおよびUUU、によってコードされる。両方のコドンは、アンチコドン配列GAAを備えている単一のtRNAによって読み取られる。従って、UUCコドンは、コドンとアンチコドン間の標準的なワトソン・クリック塩基対によって認識され、UUUは、G-Uウォブル塩基対によってそのアンチコドンの第一の位置で読み取られる (Crick, J. Mol. Biol. 19:548, 1966; Soll and RajBhandary, J. Mol. Biol. 29:113, 1967)。RNA二本鎖の熱変性により、37℃で、それぞれ4.1、6.5、6.3および2.6 kcal/molというG-U、G-C、A-UおよびA-C塩基対のギブス自由エネルギーの推定量が得られた。従って、ウォブル塩基対、G-U、は、ワトソン・クリック塩基対、A-U、より安定性が低い。AAAアンチコドンを装備している改変tRNA^{Phe} (tRNA^{Phe}_{AAA}) を、UUUコドンを読み取るように工学処理し、これは、野生型tRNA^{Phe}_{GAA}より早くそうしたコドンを読み取ると予測された。

40

50

【0349】

9つのPhe残基を含有するマウスジヒドロフォレートレダクターゼ(mDHFR)を試験タンパク質として選択した。発現プラスミドpQE16は、バクテリオファージT5プロモーターの制御下でmDHFRをコードする。このタンパク質にC末端ヘキサヒスチジン(HIS₆)タグを装備させて、固定化金属親和性クロマトグラフィーによる精製を助長する。

【0350】

シンテターゼの α -サブユニットでのThr415GlyまたはThr415Ala突然変異の導入により、改変酵母PheRS(mu-yPheRS)を作製した(Dattara, J. Am. Chem. Soc. 124:5652, 2002)。mu-yPheRSによるNaIおよびPheの活性化の動態をアデノシン三リン酸-ピロリン酸交換アッセイによってインビトロで分析した。mu-yPheRSによるNaIの活性化についての特異性定数(K_{cat}/K_M)は、 1.55×10^{-3} (秒⁻¹M⁻¹)であり、Pheについてのものより8倍大きいことが判明した。従って、培養基中のNaIのPheに対する比率が高いとき、ytRNA^{Phe}_{AAA}には、主としてNaIがチャージされるであろう。加えて、T415G突然変異体を4プライマー突然変異誘発によって産生させた。

10

【0351】

E.coliシンテターゼと酵母シンテターゼの両方が、 $\alpha_2\beta_2$ ヘテロ四量体であり、それぞれのサブユニットについての分子量は、相当異なる； α (ePheRS) = 37 kDa； α (yPheRS) = 57 kDa； β (ePheRS) = 87 kDa；および β (yPheRS) = 67.5 (すべて近似的に)。

20

【0352】

従って、以下の実施例は、例証の手段として提供するものであり、限定するために提供するものではない。

【0353】

(実施例1)

酵母アミノアシルtRNAシンテターゼの能力を改変するために、PheRS遺伝子のアルファおよびベータサブユニットをコードするテンプレートプラスミドpUC-ASab2からyPheRS遺伝子を増幅させた。この増幅は、ベータサブユニット遺伝子のATG開始コードの上流に翻訳再開始部位を含有する14塩基対遺伝子間配列を用いて行った。

30

【0354】

次のオリゴプライマーをPCRのための使用した：5'-CGA TTT TCA CAC AGG ATC CAG ACC ATG ATT CTA G-3' (ヘテロアール：7) (制限部位BamHIを有するプライマー1) および5'-GAC GGC CAG TGA ATT CGA GCT CGG TAC-3' (配列番号：8) (制限部位KpnIを有するプライマー2)。得られたDNA産物を、pQE32のBamHIおよびKpnI部位に導入して、pQE32-yFRSを得た。標準的技術によるプライマー突然変異誘発を用いることにより、突然変異体yPheRSポリヌクレオチドを産生させた。

40

【0355】

簡単に言うと、2つの相補的オリゴヌクレオチド：5'-CTA CCT ACA ATC CTT ACG GCG AGC CAT CAA TGG AAA TC-3' (配列番号：9) (プライマー3) および5'-GAT TTC CAT TGA TGG CTC GCC GTA AGG ATT GTA GGT AG-3' (配列番号：10) (プライマー4)を合成して、そのyPheRSポリヌクレオチドのアルファサブユニットの位置415に特異的突然変異をもたらした。

【0356】

(実施例2)

50

プラスミド pQE32-yFRS、および pQE32-T415G、pQE32-T415A を、それぞれ、E. coli 宿主細胞株 BLR (NOVAGEN (登録商標) からのも) に形質転換させて、発現株 BLR (pQE32-yFRS) および BLR (pQE32-T415G) を形成した。細胞を LB 培地において OD600 で 0.6 の濃度まで増殖させた。その後、1 mM IPTG で 4 時間、発現を誘発した。細胞を回収し、ニッケル-ニトリロ三酢酸親和性カラムにより、その製造業者 (QIAGEN (登録商標)) のプロトコルに従って本来の条件下で、ポリペプチドを精製した。溶出緩衝液中のイミダゾールを脱塩カラムによって除去し、50 mM Tris-HCl (pH=7.5)、1 mM DTT を含有する緩衝液にポリペプチドを溶出させた。ポリペプチドのアリコートを 50% グリセロールと共に -80℃ で保存した。

10

【0357】

(実施例 3)

アミノ酸依存性 ATP-PP_i 交換反応を用いて、yPheRS による非天然アミノ酸の活性化を評価した。アッセイは、50 mM HEPES (pH=7.6)、20 mM MgCl₂、1 mM DTT、2 mM ATP、および 0.2~0.5 TBq/mol の比活性を有する 2 mM [³²P]-PP_i を含有する 200 マイクロリットルの反応緩衝液中で行った。様々な非天然アミノ酸とシンテターゼの活性に依存して、アミノ酸濃度は、10 マイクロM から 5 mM まで様々であり、酵素濃度は、10 nM から 100 nM まで様々であった。200 マイクロリットルのアリコートを様々な時点で反応溶液から取り出し、200 mM NaPP_i、7% w/v HClO₄ および 3% w/v 活性炭を含有する 500 マイクロリットルの緩衝溶液に入れてクエンチした。その炭を回転沈降させ、500 マイクロリットルの 10 mM NaPP_i および 0.5% HClO₄ 溶液で 2 回洗浄した。その炭に吸着した放射標識 ATP を液体シンチレーション法によって定量した。Michaelis-Menten モデルへのデータの非線形回帰あてはめによって、特異性定数を計算した。yPheRS (T415G)、野生型 yPheRS および yPheRS-naph 変異体によるアミノ酸の ATP-PP_i 交換についての動力的パラメーターを下の表に示す。

20

【0358】

【化 7】

アミノ酸	酵素	K _m (μM)	K _{cat} (秒 ⁻¹)	K _{cat} /K _m (M ⁻¹ 秒 ⁻¹)	K _{cat} /K _m (相対)
Phe	T415G	55+/-14	0.202+/-0.11	3512+/-1134	1 ^a
Trp	T415G	2.83+/-1.6	0.153+/-0.003	63190+/-34590	18 ^a
2Nal	T415G	7.03+/-0.14	0.208+/-0.04	29535+/-5848	8.4 ^a
Phe	野生型	3.85+/-0.99	0.181+/-0.011	50994+/-22655	15 ^a
Phe	naph	11010+/-2688	0.0095+/-0.0021	0.855+/-0.007	1 ^b
Trp	naph	1424+/-597	0.0035+/-0.0009	2.52+/-0.44	2.9 ^b
2Nal	naph	2030+/-691	0.030+/-0.018	14.54+/-4.22	17 ^b

30

40

(実施例 4)

発現プラスミド、pQE16 (QIAGEN (登録商標)) を、C 末端ヘキサヒスチジンタグ遺伝子を有するマーカーポリペプチドマウスジヒドロフォレートレダクターゼ (mDHFR) とともに、バクテリオファージ T5 プロモーターおよび t₀ ターミネーターの制御下で用いた。

【0359】

QUICK-CHANGE (登録商標) 突然変異誘発キットを使用して、アンバーコードン (TAG) を mDHFR の第 38 位に配置した。2 つの相補的オリゴプライマー (5'-CCG CTC AGG AAC GAG TAG AAG TAC TTC CAA

50

AGA ATG-3' (配列番号: 11) および 5'-CAT TCT TTG GA
A GTA CTT CTA CTC GTT CCT GAG CGG-3' (配列番
号: 12)) を使用して、pQE16amを生産した。突然変異体yPheRS遺伝子T
415GをpQE32-T415Gから増幅させ、lacリプレッサーが完全に破壊され
た結合部位を有する構成的tacプロモーターをその遺伝子の開始コドンの上流に付加さ
せた。

【0360】

T415Gの全発現カセットをpQE16のPvuII部位に挿入して、pQE16a
m-T415Gを生じさせた。突然変異体酵母サプレッサーtRNA (mutRNA^{Phe}
(CUA)) をIppプロモーターの制御下で構成的に発現させた。公知の方法を用い
て、mutRNA^{Phe} (CUA) の発現カセットをレプレッサープラスミドpREP4
に挿入して、pREP4-tRNAを形成した。

10

【0361】

フェニルアラニン (Phe) 栄養要求菌株、AF (K10、Hfr (Cavalli)
pheS13rel-1 tonA22 thi T2^R pheA18) を宿主株とし
て使用した。Phe/Trp二重栄養要求二重株、AFW (K10、Hfr (Caval
li) pheS13rel-1 tonA22 thi T2^R pheA18、trp
B114) およびPhe/Trp/Lys三重栄養要求株AFWK (K10、Hfr (C
avalli) pheS13rel-1 tonA22 thi T2^R pheA18
、trpB114、lysA) を、trpB::Tn10およびlysA::Tn10ト
ランスポゾンでのP1ファージ媒介形質導入によって作製した。

20

【0362】

(実施例5)

栄養要求宿主細胞株AF、AFWおよびAFWKを、それぞれ、pQE16am-T
415GおよびpREP4-tRNAで形質転換させて、発現株AF [pQE16am-T
415G/pREP4-tRNA] およびASF [pQE16am-T415G/pRE
P4-tRNA] をそれぞれ生じさせた。グルコース、チアミン、MgSO₄、CaCl
₂、20のアミノ酸 (20mg/L)、抗生物質 (カナマイシンおよびアンピシリン) を
補足したM9最小培地においてそれらの細胞を増殖させた。細胞が、1.0のOD₆₀₀
読取値に達したら、それらを遠心法によって沈降させ、冷0.9%NaClで2回洗浄し
、そして17のアミノ酸 (20mg/L)、3mMの目的とする非天然アミノ酸、なら
びに指示濃度のPhe、TrpおよびLysを含有する補足されたM9培地に移した。I
PTG (1mM) の添加により、タンパク質発現を誘発した。4時間後、細胞をペレット
化し、C末端ヘキサヒスチジンタグ、および製造業者 (QIAGEN (登録商標)) の
説示に従ってニッケル-NTAスピンカラムにより、そのタンパク質を精製した。

30

【0363】

(実施例6)

突然変異体mDHF Rを変性条件下で精製し、標準的緩衝液 (8M ウレア、100m
M NaH₂PO₄、10mM Tris、pH4.5) で溶出させた。90マイクロリ
ットルの75mM (NH₄)₂CO₃で希釈した10マイクロリットルのその溶液を用い
てそれらのポリペプチドをトリプシン消化し、そのpHを8に調整した。2マイクロリ
ットルの改変トリプシン (0.2マイクログラム/マイクロリットル) を添加し、そのサン
プルを室温で一晩、インキュベートした。それらのポリペプチドを、Lys-C (90マ
イクロリットルの25mM Tris-HCl、pH8および1mM EDTAで希釈し
た10マイクロリットルの溶液) でエンドプロテイナーゼ消化した。次に、2マイクロ
リットルのLys-C (0.2マイクログラム/マイクロリットル; CALBIOCHEM
(登録商標)) を添加し、その反応を10時間、37℃でインキュベートした。2マイク
ロリットルのトリフルオロ酢酸 (TFA) の添加により、その消化反応を停止させた。そ
の溶液をZIPTIP_{C18} (登録商標) (MILLIPORE (登録商標)) によって
精製し、消化されたペプチドを、3マイクロリットルの50%CH₃CN、0.1%TF

40

50

Aで溶出させた。1マイクロリットルを、アルファーシアノー4-ヒドロキシ桂皮酸および2, 5-ジヒドロキシ安息香酸をマトリックスとして用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-MS)の分析のために使用した。この分析は、線形および陽イオンモードでPERSEPTIVE BIOSYSTEMS(登録商標)Voyager DE PRO MALDI-TOF質量分析装置を使用して行った。

【0364】

HPLCポンプおよびESIプローブを用いるFINNIGAN(登録商標)LCQイオントラップ質量分析で、プロテアーゼ消化ペプチドのLC-MS/MS分析を行った。突然変異体mDHF Rの位置38の残基を含むプロテアーゼ消化フラグメントに対応するm/zを有する前駆体イオンの分画により、タンデム質量シーケンシングを行った。

10

【0365】

(実施例7)

野生型yPh eRSおよび本明細書において実施例1で説明したとおりのyPh eRS(T415G)についてのプラスミドを構築した。加えて、次のプライマーを用いて、テンプレートプラスミドpXLLysKS1からPCRによってE. coli lysS遺伝子を増幅した: 5'-GCA CTG ACC ATG GCT GAA CAA CAC GCA CAG-3'(配列番号:13)(NcoI制限部位を有する)および5'-GGA CTT CGG ATC CTT TCT GTG GGC GCA TCG C-3'(配列番号:14)(BamHI制限部位を有する)。得られたDNAをpQE60のNcoIおよびBamHI部位に導入して、pQE60-eLysSを生じさせた。クローニングされた酵素は、タンパク質精製を助長するためにN末端またはC末端ヘキサヒスチジンタグを含有する。

20

【0366】

最初の2つの反応において、(プライマー1およびプライマー4)ならびに(プライマー2およびプライマー3)を個々の試験管に添加し、これらの2つのPCR反応から2つのDNAフラグメントを生成した。2つの反応生成物と追加の外部プライマーの混合物を用いて、3400bp DNAフラグメントを得た。そのフラグメントを標準的な方法によって精製し、BamHIおよびKpnIで消化し、pQE32に挿入して、pQE32-T415Gを生成した。クローニングされたPh eRS酵素は、精製のためのN末端既知ヘキサヒスチジン配列タグを含有した。検証のために、全yPh eRS遺伝子のDNA塩基配列を決定した。

30

【0367】

(実施例8)

プラスミドpQE32-T415A、およびpQE60-eLysSを、個々に、リプレッサープラスミドpREP4とともにE. coli株BLRに共形質転換させて、発現株BLR(pQE32-yFRS)、BLR(pQE32-T415G)、BLR(pQE32-T415A)、BLR(pQE60-eLysS)を形成した。100マイクログラム/mLのアンプシリンおよび35マイクログラム/mLのカナマイシンを伴う2×YT培地で過発現を行った。OD₆₀₀=0.6で、yPh eRS変異体、およびlysS遺伝子によってコードされたE. coliリシルー tRNAシンテターゼ(eLysS)の発現を、1mM IPTGで誘発した。4時間の発現後、細胞を回収し、ニッケル-ニトリロ三酢酸親和性カラムをその製造業者(QIAGEN(登録商標))のプロトコルに従って本来の条件下で用いてタンパク質を精製した。溶出緩衝液中のイミダゾールを脱塩カラムによって除去し、50mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM DTTを含有する緩衝液にポリペプチドを溶出させた。ポリペプチドのアリコートに50%グリセロールとともに-80℃で保存した。yPh eRS変異体およびeLysSの濃度を、280nmでのUV吸収によって決定した。

40

【0368】

(実施例9)

ポリペプチド38(残基26~39;NGDLPWPPLRNEアンバーコドンK)(

50

配列番号：15)は、位置番号38にアンバーコドンを含む。ペプチド(K38S、K38L)、ペプチドW38およびペプチドpBrF(Z)38をMSによって分離し、検出した。ポリペプチドは、(a) tRNA^{Phe}_{CUA}およびyPheRS(T415G)；(b) tRNA^{Phe}_{CUA} _ UGおよびyPheRS(T415G)；(c) tRNA^{Phe}_{CUA} およびyPheRS(T415A)；(d) tRNA^{Phe}_{CUA} _ UG およびyPheRS(T415A)を有する三重栄養要求宿主細胞において、または(e) tRNA^{Phe}_{CUA} _ UG およびyPheRS(T415A)を有する単一栄養要求株において合成した。発現最小培地には、6.0mM pBrf、0.01mM Trp、1.0mM Lys、0.03mM Phe(aおよびb)または0.01mM Phe(c、dおよびe)および25mg/Lの17のアミノ酸を補足した。結果を図9に示す。

10

【0369】

(実施例10)

アミノ酸依存性ATP-PP_i交換反応を用いて、上の実施例で説明したようなyPheRSによるアミノ酸類似体の活性化を評価した。簡単に言うと、反応緩衝液の200マイクロリットルアリコートは、50mM HEPES(pH7.6)、20nM MgCl₂、1mM DTT、2mM ATP、および10~50Ci/molの比活性を有する2mM³²P-ピロリン酸塩(PP_i)を含む。そのシンテターゼによる類似体の活性化に依存して、アミノ酸濃度は、10マイクロMから2.5mMまで様々であり、酵素濃度は、10nMから100nMまで様々であった。20マイクロリットルのアリコートを反応溶液から様々な時点で取り出し、200mM NaPP_i、7% w/v HClO₄および3% w/v活性炭を含む500マイクロリットルの緩衝溶液に入れてクエンチした。その炭を回転沈降させ、500マイクロリットルの10mM NaPP_iおよび0.5% HClO₄溶液で2回洗浄した。その炭に吸着した放射標識ATPを液体シンチレーション法によって定量した。Michaelis-Mentenモデルへのデータの非線形回帰あてはめによって、特異性定数を計算した。

20

【0370】

動力学的パラメーターの結果を表Iに示す。インドール環での(特に、第6位での)置換は、一部の類似体(8~10)にとって非常に有利であった。

【0371】

(表I：外的突然変異体酵母PheRSによる例示的アミノ酸(1~11)のATP-PP_i交換についての動力学的パラメーター)

30

【0372】

【化 8】

アミノ酸	酵素	Km (μM)	Kcat (秒^{-1})	kcat/Km ($\text{M}^{-1}\text{秒}^{-1}$)	kcat/Km (相対) [*]
1	T415G	264 $\pm$ 42	0.05 $\pm$ 0.002	184 $\pm$ 30	1
2	T415G	22 $\pm$ 3	0.03 $\pm$ 0.001	1,538 $\pm$ 228	8
3	T415G	12 $\pm$ 2	0.05 $\pm$ 0.001	4,365 $\pm$ 797	24
4	T415G	11 $\pm$ 3	0.05 $\pm$ 0.002	4,558 $\pm$ 1,186	25
5	T415G	757 $\pm$ 149	0.4 $\pm$ 0.003	48 $\pm$ 10	1/4
6	T415G	20 $\pm$ 5	0.30 $\pm$ 0.006	15,000 $\pm$ 4,063	82
7	T415G	27 $\pm$ 2	0.04 $\pm$ 0.001	1,550 $\pm$ 125	8
8	T415G	20 $\pm$ 8	0.20 $\pm$ 0.018	10,256 $\pm$ 4,562	56
9	T415G	8 $\pm$ 4	0.55 $\pm$ 0.097	70,876 $\pm$ 34,843	385
10	T415G	31 $\pm$ 18	0.06 $\pm$ 0.005	1,939 $\pm$ 1,149	10
11	T415G	94 $\pm$ 50	0.05 $\pm$ 0.006	533 $\pm$ 293	3
1	T415G	68 $\pm$ 20	0.52 $\pm$ 0.093	7,627 $\pm$ 2,664	41

ここでのアミノ酸は、図 2 として示す。

【0373】

(実施例 11)

突然変異体酵母アンバーサプレッサー tRNA ($y t R N A^{P h e}_{C U A}$) を l p p プロモーターの制御下で構成的に発現させた。本明細書における実施例の中で前に説明したように、 $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ の発現カセットをリプレッサープラスミド p R E P 4 に挿入して、p R E P 4 - $y t R N A$ を形成した。突然変異体酵母サプレッサー $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ - 30U40G ($y t R N A^{P h e}_{C U A}$ - U G) を、Q U I C K - C H A N G E (登録商標) 突然変異誘発キットの使用により、 $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ から構築した。フォワードプライマーのためにプライマー U G - f (5' - G A A C A C A G G A C C T C C A C A T T T A G A G T A T G G C G C T C T C C C - 3') (配列番号: 16) およびリバースプライマーのためにプライマー U G - r (5' - G G G A G A G C G C C A T A C T C T A A A T G T G G A G G T C C T G T G T T C - 3') (配列番号: 17) と呼ばれる 2 つの相補的オリゴヌクレオチドを合成して、突然変異体酵母サプレッサー tRNA の位置 30 または位置 40 のいずれかに特異的突然変異をもたらした。 $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ - U G をコードする遺伝子を有する、結果として生じたプラスミドを、p R E P - 4 $y t R N A$ - U G と呼ぶ。 $y t R N A^{P h e}$ のインビトロ転写のためのプラスミドを構築するために、 $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ および $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ - U G 遺伝子を、テンプレートプラスミド p R E P 4 - $y t R N A$ および p R E P 4 - t R N A - U G からそれぞれ増幅させた。tRNA 配列の末端に、B s t N I 部位を挿入して、 $y t R N A^{P h e}$ の正確な転写産物を生産した。T7 RNAポリメラーゼによる $y t R N A^{P h e}$ のインビトロ転写のために、T7 プロモーター配列を付加させた。次のプライマーを PCR のために使用した: 5' - C T G G G T A A G C T T C G C T A A G G A T C T T G C C C T G G T G C G A A C T C T G - 3' (配列番号: 18) (制限部位 H i n d I I I および B s t N I を有する) および 5' - G A T T A C G G A T T C C T A A T A C G A C T C A C T A T A G C G G A C T T A G C T C - 3' (配列番号: 19) (E c o R I 制限部位および T7 プロモーター配列を有する)。結果として生じた DNA を p U C 18 の H i n d I I I および E c o R I 部位に導入して、p U C 18 - $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ および p U C 18 - $y t R N A^{P h e}_{C U A}$ - U G を生じさせた。

【0374】

DNA操作を助長するために、pUC18-ytRNA^{Phe}_{CUA}のT7プロモーター配列に近いBstNI解裂部位を除去して、ytRNA^{Phe}_{CUA}遺伝子を含むDNAフラグメントのサイズを180bpからBstNI消化後には500bpに減少させた。2つの相補的オリゴヌクレオチド、フォワードプライマーのための5'-CGG AAG CAG AAA GTG TAA AGA GCG GGG TGC CTA ATG AGT G-3' (配列番号: 20) およびリバースプライマーのための5'-CAC TCA TTA GGC ACC CCG CTC TTT ACA CTT TAT GCT TCC G-3' (配列番号: 21) を合成して、特異的突然変異をもたらした。

10

【0375】

(実施例12)

以前に記載されているとおり、pUC18-ytRNA^{Phe}_{CUA}およびpUC18-ytRNA^{Phe}_{CUA-UG}のBstNI消化により線形化DNAを作製した(Sampson, Uhlenbeck, PNAS USA 85:1033-1037 (1988) 参照)。線形化DNAテンプレートのインビトロ転写および転写産物の精製は、以前に記載されているとおり行った(Nowakら, Ion Channels pt. B 293:504-529 (1998) 参照)。76量体tRNA転写産物を生産するための線形化DNAのインビトロ転写は、AMBION (登録商標) T7-MEGASHORTSCRIPT (登録商標) キットで行った。転写産物を25:24:1 フェノール:CHCl₃:イソアミルアルコール(PCI)抽出で単離した。有機層を水で再抽出し、水性層に対して24:1 CHCl₃:イソアミルアルコール(CI)を行った。その後、水層を同じ容量のイソプロパノールと混合し、一晚、-20で沈殿させ、ペレット化し、乾燥させ、水に再び溶解した。そのtRNA溶液中の未反応ヌクレオチドを、CHROMA SPIN-30 (登録商標) DEPC-H₂O (BD Bioscience (登録商標)) を使用して除去した。それらの転写産物の濃度を、260nmでのUV吸収によって決定した。

20

【0376】

yPheRS変異体によるPheおよびTrpでの野生型ytRNA^{Phe}_{GAA}のアミノアシル化を、以前に記載されているとおり行った(Sampson, Uhlenbeck, PNAS USA 85:1033-1037 (1988) 参照)。アミノアシル化反応は、30mM HEPES (pH7.45)、15mM MgCl₂、4mM DTT、25mM KClおよび2mM ATPを含む緩衝液中、30℃で、100マイクロリットルの反応容量で行った。精製された酵母の全tRNAは、アッセイにおいて4mg/mLの最終濃度(ytRNA^{Phe}_{GAA}濃度 約2.24マイクロM)で使用した。Pheのアミノアシル化には、13.3マイクロM [³H]-Phe (5.3Ci/mmol) および80nM yPheRS変異体を使用し、Trpのアミノアシル化には、3.3マイクロM [³H]-Trp (30.0Ci/mmol) および160nM yPheRS変異体を使用した。ytRNA^{Phe}転写産物のアミノアシル化は、eLysSについては、37℃で、100mM カリウム-HEPES (pH7.4)、10mM MgCl₂、1mM DTT、0.2mM EDTA、2mM ATPおよび4単位/mL酵母無機ピロホスファターゼを含む緩衝液中の100マイクロリットルの反応容量で行った。Lysのアミノアシル化には、4マイクロMのytRNA^{Phe}転写産物、1.1マイクロM [³H]-Lys (91Ci/mmol) および80nM eLysSを使用した。tRNAは、使用前、アニーリング緩衝液(60mM Tris, pH7.8、2mM MgCl₂)中で4分間、85℃に加熱し、その後、ゆっくりと室温に冷却することによってアニールした。酵素の添加によって反応を開始させ、5%TCAに浸漬したWhatmanフィルターディスクへのスポットティングによって、10マイクロリットルアリコート进行をクエンチした。フィルターを氷冷5%TCA中で10分間、3回洗浄し、氷冷95%エタノール中で洗浄し、液体シンチレーション法によってカウントした。

30

40

50

【0377】

(実施例13)

非天然アミノ酸のインビボ組み込みのためのプラスミド構築を、Phe/Trp二重栄養要求株、AFW、およびPhe/Trp/Lys三重栄養要求株、AFWK、で行った。これらの栄養要求株は、P1ファージ媒介トランスポゾン形質導入により、Phe栄養要求株、AF(K10、Hfr(Cavalli)pheS13rel-1 tonA22 thi T2^R pheA18、trpB114)(Furter, Prot. Sci, 7:419-426(1998)参照)から構築した。バクテリオファージT5プロモーターおよびt₀ターミネーターの制御下でC末端ヘキサヒスチジンタグ遺伝子を有するマーカータンパク質マウスジヒドロフォレートレダクターゼ(mDHFR)をコードするpQE16ベクター(QIAGEN(登録商標))を、発現プラスミドとして選択した。Quick-change突然変異誘発キットを使用して、2つの相補的オリゴヌクレオチド(5'-CCG CTC AGG AAC GAG TAG AAG TAC TTC CAA AGA ATG-3'(配列番号:11);5'-CAT TCT TTG GAA GTA CTT CTA CTC GTT CCT GAG CGG-3'(配列番号:12))でmDHFRの第38位にアンバーコドン(TAG)を配置して、pQE16amを生じさせた。突然変異体hPheRS遺伝子T415GおよびT415Aを、pQE32-T415GおよびpQE32-T415Aから増幅させ、lacリプレッサーが完全に破壊された結合部位を有する構成的tacプロモーターをその遺伝子の開始コドンの上流に付加させた。T415GおよびT415Aの全発現カセットをpQE16am-T415GおよびpQE16am-T415AのPvuII部位に挿入した。

10

20

【0378】

(実施例14)

栄養要求菌株AF、AFWおよびAFWKを、yPheRS変異体を含有するプラスミドpQE16amおよびytrNA変異体を含有するpREP4-ytrNAベクターで形質転換して、pBrF組み込みを調査した。グルコース、チアミン、MgSO₄、CaCl₂、20のアミノ酸(25mg/Lで)、抗生物質(35ミリグラム/mLのカナマイシンおよび100マイクログラム/mLのアmpiシリン)を補足したM9最小培地において、E.coli発現株を増殖させた。細胞が、0.8~1.0のOD₆₀₀に達したら、それらを遠心法によって沈降させ、冷0.9%NaClで2回洗浄し、17のアミノ酸(20mg/Lで)、6mMのpBrF(p-プロモフェニルアラニン)またはpIodoF(p-ヨードフェニルアラニン)ならびに指示濃度のフェニルアラニン、トリプトファンおよびリジンで補足した発現培地に移した。1mM IPTGの添加によって、タンパク質発現を誘発した。4時間の発現の後、細胞を遠心法によってペレット化し、そのタンパク質をC末端ヘキサヒスチジンタグにより、製造業者(QIAGEN(登録商標))の説示に従ってニッケル-NTAスピンカラムによって精製した。精製後、mDHFRの発現レベルを280nmでのUV吸収によって決定した。

30

【0379】

(実施例15)

HPLCポンプおよびESIプローブを有するFinnigan LCQイオントラップ質量分析装置で、mDHFRのトリプシン消化物のLC-MS/MS分析を行った。変性条件下で精製した突然変異体mDHFRは、溶出緩衝液(8M ウレア、100mM NaH₂PO₄、10mM Tirs、pH4.5)中のものであった。トリプシン消化のために、10マイクロLの溶液を90マイクロLの75mM(NH₄)₂CO₃で希釈した。1マイクロリットルの改変トリプシン(0.2マイクログラム/マイクロリットル)を添加した。そのサンプルを37℃で2から6時間、インキュベートした。12マイクロLの5%TFA溶液の添加により、消化反応を停止させた。消化ペプチド溶液をC18 Vydac Microspinカラム(the Nest group)での脱塩に付し、50マイクロLの80%アセトニトリルおよび20%の0.1% w/vギ酸で溶

40

50

出させた。Microspinカラムから溶出した消化ペプチドを乾燥させ、10%アセトニトリルおよび90%の0.1%TFAの溶液に再び溶解し、HPLCポンプに注入した。Magic C18カラム(Michrom、300 Å、0.3×150mm)によってペプチドを分離し、30分間、10~95%の溶媒A(90%のアセトニトリルおよび10%の0.1M酢酸の溶液)および溶媒B(2%のアセトニトリルおよび98%の0.1M酢酸の溶液)の勾配を用いて、30マイクロL/分の流量で溶出させた。カラム溶出液は、エレクトロスプレー源へと流れ、トリプシン消化物のそれぞれのシグナルが検出された。突然変異体mDHF Rの位置38の残基を含むプロテアーゼ消化フラグメントに対応するm/zを有する前駆体イオンの分画により、タンデム質量シーケンシングを同時に行った。従って、DHF Rポリペプチドは、(a)、(b)酵母tRNA^{Phe}_{CUA}および酵母yPheRS(T415G)；(c)酵母tRNA^{Phe}_{CUA-UG}および酵母yPheRS(T415G)；(d)酵母tRNA^{Phe}_{CUA}および酵母yPheRS(T415A)；(e)酵母tRNA^{Phe}_{CUA-UG}および酵母yPheRS(T415A)を有する三重栄養要求宿主細胞において、または(f)酵母tRNA^{Phe}_{CUA-UG}および酵母yPheRS(T415A)を有する単一栄養要求株において合成した。これらの結果を表12に示す。

【0380】

(実施例16)

バチスル・ステロサーモフィルス(*Bacillus sterothermophilus*)からのTrpRSの結合ポケットを突然変異させて、非天然アミノ酸をポリペプチドに組み込んだ。突然変異分析のための候補部位としては、疎水性アミノ酸結合ポケットとして認識される領域にあるアミノ酸配列位置番号4(F)、5(F)、7(N)、132(D)、133(I)、141(V)および143(V)が挙げられる。

【0381】

【化9】

F5Y置換についてのTrpRS動力学的データ

TrpRS	静電気 (kcal/mol)	VDW (kcal/mol)	合計
野生型	-53.94+/- 5.32	-25.78+/-0.35	-79.75+/-5.08
F5Y	-63.04+/-2.47	-25.26+/-0.43	-88.32+/-2.59
差	-9.1	+0.5	-8.6

トリプトファンの融合環は、その認識部位を第二の芳香族環に合わせる。それは、配座での「パラ」より「メタ」ほうが大きいので、位置132の突然変異(DからG)を試験した。簡単に言うと、分子モデリングにより、6-エチニルインドールがPh5骨格とぶつかり、これが運動を抑制することを明らかにした。骨格の運動がなければ、アミノ酸(類似体)は、結合ポケットに、はまらないであろう。位置132(D)のアミノ酸は高度に保存されるので、本発明者らは、その改変がTrpRS内の水素結合網を崩壊させると予測した。従って、位置132のアミノ酸とぶつからないので、結合部位における5-エチニルトリプトファンを、コンピュータでモデリングした。この類似体を収容できるように、アミノ酸配列位置143を(AおよびGにそれぞれ)突然変異させた。結合の差異化は、5-エチニルトリプトファンの結合については5.8kcal/mol(V143A)および4.4kcal/mol(V143G)であることが判明し、これによって、トリプトファンと類似体が識別される。

【0382】

加えて、アミノ酸配列位置132から他のアミノ酸への突然変異を試験した。動力学的データを下の表に示す。

【0383】

【化10-1】

結合部位における突然変異についてのTrpRS動力学的データ:

トリプトファン	K _m (μM)	K _{cat} (秒 ⁻¹)
野生型	1.6 +/- 0.1	1.1 +/- 0.03
D132N	12.1 +/- 1.6	0.0067 +/- 0.0003
D132S	17.8 +/- 2.3	0.055 +/- 0.004
D132T	8.6 +/- 1.4	0.011 +/- 0.0008

10

(実施例17)

酵母PheRSライブラリーを（緑色蛍光タンパク質すなわちGFPを使用して）スクリーニングして、Nalの組み込みを可能にするPheRS突然変異を同定した。突然変異された特異的アミノ酸配列位置としては、残基番号412、415、418および437（これらは、結合部位に位置し、そのアミノ酸と接触する）が挙げられる。図13に示すように、改変酵母PheRSを用いて、p-エチルフェニルアラニンを試験タンパク質に組み込んだ。

【0384】

簡単に言うと、標準的な手順に従って、突然変異体T415Gまたは野生型酵母PheRS遺伝子を含有するベクターにGFPをライゲートした。突然変異体酵母アンバーサプレッサーtRNA (y tRNA^{Phe}_{AAA})をlppプロモーターの制御下で構成的に発現させ、Phe/Trp二重E. coli栄養要求株AFWに形質転換させた。グルコース、チアミン、MgSO₄、CaCl₂、20のアミノ酸（25mg/L）、抗生物質（30μg/mLのカナマイシンおよび100μg/mLのアンピシリン）を補足したM9最小培地においてそれらの細胞を増殖させた。細胞が、0.8~1.0のOD₆₀₀に達したら、細胞をペレット化し、氷冷0.9%NaClで2回洗浄し、そして18のアミノ酸（20mg/L）ならびに様々な濃度のフェニルアラニン、トリプトファンおよび2Nalを補足した発現培地に移した。タンパク質発現をIPTGにより誘発した。

20

【0385】

(実施例18)

選択した4つのアミノ酸残基（N412、T145、S418およびS437）の突然変異誘発を、二段階PCR突然変異によって行った。簡単に言うと、4つの相補的プライマーペア

30

【0386】

【化10-2】

(F64LS65T_f: 5'-CTT GTC ACT ACT CTG ACC TAT GGT GTT CAA TGC TTC TCC CGT-3' (配列番号 22); F64LS65T_r: 5'-ACG GGA GAA GCA TTG AAC ACC ATA GGT CAG AGT AGT GAC AAG-3' (配列番号 23); S99F_f: 5'-GTA CAG GAA CGC ACT ATA TTC TTC AAA GAT GAC GGG AAC-3' (配列番号 24); S99F_r: 5'-GTT CCC GTC ATC TTT GAA GAA TAT AGT GCG TTC CTG TAC-3' (配列番号 25); T153M_f: 5'-CAC AAT GTA TAC ATC ATG GCA GAC AAA CAA AAG AAT GGA-3' (配列番号 26); T153M_r: 5'-TCC ATT CTT TTG TTT GTC TGC CAT GAT GTA TAC ATT GTG -3' (配列番号 27)).

40

を使用して、pQE9_GFP_{UV}プラスミド（STRATAGENE（登録商標））におけるGFP_{UV}遺伝子で一連のPCR突然変異誘発を行った。

【0387】

50

GFP突然変異体は、本明細書において説明するとおり產生させた。簡単に言うと、GFP3は、12のPhe残基を有し、そのうち5つは、Pheウォブルコドン(UUU)によってコードされる。GFP5およびGFP6変異体は、2段階PCR反応、それに続くライゲーションを用いてUUCコドンをUUUで置換することによって作製した。GFP5は、12のプライマー

【0388】

【化10-3】

(1: 5'-GTG

CCA CCT GAC GTC TAA GAA ACC ATT ATT ATC ATG ACA TTA ACC-3'

10

(配列番号 28) 2: 5'-GAG TAA AGG AGA AGA ACT TTT TAC TGG AGT TGT

CCC AAT TC-3' (配列番号 29) 3: 5'-GAA TTG GGA CAA CTC CAG TAA

AAA GTT CTT CTC CTT TAC TC-3' (配列番号 30) 4: 5'-GGC CAA CAC

TTG TCA CTA CTT TTA CCT ATG GTG TTC AAT GCT T-3' (配列番号 31)

5: 5'-AAG CAT TGA ACA CCA TAG GTA AAA GTA GTG ACA AGT GTT GGC

C-3' (配列番号 32) 6: 5'-CAT ATG AAA CGG CAT GAC TTT TTT AAG AGT

GCC ATG CCC GAA G-3' (配列番号 33) 7: 5'-CTT CGG GCA TGG CAC

TCT TAA AAA AGT CAT GCC GTT TCA TAT G (配列番号 34) 8: 5'-GTT

20

ATG TAC AGG AAC GCA CTA TAT TTT TCA AAG ATG ACG GGA ACT ACA

A-3' (配列番号 35) 9: 5'-TTG TAG TTC CCG TCA TCT TTG AAA AAT ATA

GTG CGT TCC TGT ACA TAA C-3' (配列番号 36) 10: 5'-ACA AAA GAA

TGG AAT CAA AGC TAA CTT TAA AAT TCG CCA CAA CAT TGA AGA TG-3'

(配列番号 37) 11: 5'-CAT CTT CAA TGT TGT GGC GAA TTT TAA AGT

TAG CTT TGA TTC CAT TCT TTT GT-3' (配列番号 38); 12: 5'-CGC CAA

GCT AGC TTG GAT TCT CAC CAA TAA AAA ACG CCC-3' (配列番号 39))

を使用して、F8、L64、F84、F99およびF165残基における4つのUUCコドンおよび1つのLeuコドンをUUUコドンで置換することによって作製した。5つのプライマーセット(1および3; 2および5; 4および7; 6および9; 8および10)での5つのPCR反応により、GFP発現カセットの5つの部分的オーバーラッピングフラグメントを得た。

30

【0389】

これらのPCR産物を、アガロースゲル電気泳動法、それに続くゲル抽出によって精製した。6つのプライマーを使用して、GFP5の2つのPheコドン(F71および99)をUUUコドンで置換することにより、すべてのPhe残基がUUUによってコードされるGFP6を作製した。

【0390】

【化10-4】

40

(1および12は、上と同じであり; 13: 5'-TAC

CTA TGG TGT TCA ATG CTT TTC CCG TTA TCC GGA TCA TAT G-3' (配列

番号 40); 14: 5'-CAT ATG ATC CGG ATA ACG GGA AAA GCA TTG AAC

ACC ATA GGT A-3' (配列番号 41); 15: 5'-GTT ATG TAC AGG AAC GCA

CTA TAT TTT TTA AAG ATG ACG GGA ACT ACA AG-3' (配列番号 42); 16:

5'-CTT GTA GTT CCC GTC ATC TTT AAA AAA TAT AGT GCG TTC CTG

TAC ATA AC-3' (配列番号 43))。

50

(実施例 19)

ライブラリー構築を２段階でも行った。簡単に言うと、４つの残基（N 4 1 2、T 4 1 5、S 4 1 8 および S 4 3 7）における飽和突然変異誘発を二段階 P C R 突然変異誘発で遂行した。まず、２つの相補的プライマー

【0391】

【化10-5】

(437_f: 5'-GTC GAA ATC GGT AAC NNK GGT ATG TTC AGA CCA GAA ATG

CTC G-3' (配列番号 44); 437_r: 5'-C GAG CAT TTC TGG TCT GAA CAT

ACC MNN GTT AC C GAT TTC GAC-3' (配列番号 45))

10

での P C R 突然変異誘発により、縮重コドン S 4 3 7 に導入した。P C R 産物を D p n I で 1 時間消化した後、P C R 産物を X L - 1 b l u e クローニング宿主に形質転換させた。第 4 3 7 位のプラスミドを飽和させ、単離し、第二の P C R 突然変異誘発のテンプレートとして使用して、残基 N 4 1 2、T 4 1 5 および S 4 1 8 に突然変異を導入した。第二の P C R 突然変異誘発は、別の相補的プライマーペア

【0392】

【化10-6】

(412_418_f: 5'-C AAG CCT ACC TAC NNK CCT

TAC NNK GAG CCA NNK ATG GAA ATC TTT T-3' (配列番号 46);

20

412_418_r: 5'-A AAA GAT TTC CAT MNN TGG CTC MNN GTA AGG MN N

GTA GG T AGG CTT G-3' (配列番号 47))

で行った。P C R 後、その産物を D p n I で 1 時間消化し、スピンカラムによってそれを浄化し、濃縮した。溶出液を、E l e c t r o T e n - B l u e エレクトロコンピテントセル (S t a r a t a g e n e) に、製造業者のプロトコルに従って、エレクトロポレートした。8, 0 0 0, 0 0 0 の形質転換体を得た。ライブラリープラスミドを培養で増幅させ、N s i I および B g l I I で消化した。これらの挿入物を精製した後、それらを、N s i I および B g l I I での消化によって得られた p Q E 9 _ G F P 6 _ y P h e R S (T 4 1 5 G) および p Q E 9 _ G F P 9 _ y P h e R S (T 4 1 5 G) の大きなフラグメントとライゲートした。

30

【0393】

そのライブラリーをケミカル・コンピテント A F W および D H F E . c o l i 細胞に形質転換させた。その後、カナマイシンを有する 2 × Y T 培地にこれらの細胞を摂取し、一晚、増殖させた。細胞が、0. 8 の O D ₆₀₀ に達したら、細胞をペレット化し、蒸留水に再び懸濁させた。当該技術分野において標準的であるように、そのライブラリーのグリセロールストックを発現させた。

【0394】

3 時間の G F P の発現後、1 m L の細胞 (1. 0 の O D ₆₀₀ に基づく) を P B S で洗浄し、蒸留水で希釈し、その後、4 8 8 n m の励起波長、5 2 5 m m の放射、および 4 9 5 n m のカットオフフィルターを使用するフローサイトメトリー分析 (M o F l o c e l l s o r t e r (登録商標)、コロラド州、フォートコリンズの D a k o C y t o m a t i o n) に付した。少なくとも 2 0, 0 0 0 の事象をそれぞれの測定において収集した。S u m m i t ソフトウェア (D a k o C y t o m a t i o n) でデータを分析した。ライブラリースクリーニングは、陽性および陰性、両方で行った。すなわち、U U U コドンの P h e を除く 2 N a l または任意の他の天然アミノ酸の高度な組み込みを可能にする y P h R S 変異体は、G F P をアンフォールディングするであろうし、あまり明るくなく、そのため、低蛍光細胞を回収する。U U U コドンの P h e を除く任意の他の天然アミノ酸を組み込むことができない y P h e R S 変異体は、G F P のフォールディングに影響をおよぼさないであろうし、明るい。従って、明細胞を回収する。図 1 4 は、G F P y P

40

50

h e R Sライブラリースクリーニングのヒストグラムを図示するものである。

【0395】

(実施例20)

E. coliからの改変MetRSを、本明細書において他の実施例について説明している方法に従ってプラスミドpQE-80における試験タンパク質(DHFR)にアジドノルロイシンを組み込むためにアミノ酸配列位置13(L→G)で、および配列番号:1で、突然変異させた。この特定の実施形態において、DHFRおよびMetRS遺伝子は、同じプラスミドベクター内に位置する。

【0396】

(実施例21)

インターフェロンベータ分子を試験分子として使用して、4つのメチオニン残基のうちの3つを他の代替アミノ酸(非天然アミノ酸を含む)に突然変異させた。アミノ酸位置36、62および117のメチオニン残基を、側鎖ロータマー励起分析によって他のアミノ酸に突然変異させた。分子動力学ソフトウェアおよび突然変異構造のエネルギー計算(サルベージを含む)を用いて、構造を最適化した。次に、野生型インターフェロンベータ分子と改変インターフェロンベータ分子エネルギー計算値の比較を行って、改変分子の総合的安定性を決定した。様々な点突然変異に伴うエネルギー計算の結果を下の表に示す:

【0397】

【化 1 1】

ヒトインターフェロンベータの位置36での突然変異：

突然変異	エネルギー
M→H	-0.2 kcal/mol
M→C	-0.2 kcal/mol
M→I	+1.0 kcal/mol
M→T	+1.4 kcal/mol
M→V	+1.6 kcal/mol
M→A	+4 kcal/mol

10

ヒトインターフェロンベータの位置62での突然変異：

突然変異体	エネルギー (kcal/mol)
H	+1.1
G	0
Y	-2.2
S	-4.7
Q	-4.8
A	-5.0
N	-5.7
F	-7.4
T	-8.8
野生型	-11.6

20

ヒトインターフェロンベータの位置117での突然変異：

突然変異	エネルギー
M→I	-1.2 kcal/mol
M→L	-1.0 kcal/mol
M→V	-0.1 kcal/mol
M→T	+3 kcal/mol
M→Y	+3 kcal/mol
M→S	+4 kcal/mol
M→G	+5.9 kcal/mol

30

40

本明細書において言及する、および／または出願データシートに列挙する、上記米国特許、米国特許公開出願、米国特許出願、外国特許、外国特許出願および非特許出版物のすべては、それら全体が本明細書に参照により取り入れられている。

【0 3 9 8】

上記のことから、例証を目的として本明細書において本発明の特定の実施形態を説明したが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく様々な変更を行うことができることは、理解されるであろう。従って、本発明は、添付のクレームによる場合を除き、限定されない。

50

【0399】

(等価物)

当業者には、代替、変異体、付加、欠失、改変および置換をはじめとする本明細書に記載する特定の方法及び試薬に対する非常に多数の等価物が分かるであろうし、または常例の実験以上のものを用いずともそれらを突き止めることができるであろう。そうした等価物は、本発明の範囲内であるとみなされ、後続のクレームに包含される。

【図面の簡単な説明】

【0400】

【図1】図1は、*Thermus thermophilus*、*E. coli*、および *Saccharomyces cerevisiae* の保存配列からの PheRS 変異体の配列アラインメントを示す。

10

【図2】図2は、本明細書に開示する一部の実施形態のために用いる幾つかの例示的アミノ酸（天然または非天然）を示す。

【図3】図3は、本明細書に開示する一部の実施形態のために用いる例示的ポリペプチド、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、についてのアミノ酸配列を示す。下線を引いた4つのタンパク質分解ペプチドフラグメント（ペプチドA、ペプチドB、ペプチドCおよびペプチドDと表示）をMALDIおよび液体クロマトグラフィー質量スペクトル／質量スペクトル（LC-MS/MS）分析に用いた。

【図4A】図4は、（a）アミノ酸1（3mM）；（b）アミノ酸7（3mM）および1（0.03mM）；（c）アミノ酸2（3mM）および1（0.03）；（d）アミノ酸2（3mM）および1（0.03mM）を補足した培地において発現されたmDHFRから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSを示す。（c）において培地に1mMのトリプトファンを補足する以外、誘発中にトリプトファンを補足しない。1つのPheコドンを含むペプチドBは、対照である。ペプチドAは、アンバーコドン（Z）を含むし、これについてのアミノ酸は、異なる発現条件でペプチドAについての質量単位を基に割り当てられる。ペプチドAでのリジン組み込みに起因して（c）、C末端リジンが切断されて、より短いペプチドA（NGDLPWPPLRNEK）（配列番号：4）が生成された。

20

【図4B】図4は、（a）アミノ酸1（3mM）；（b）アミノ酸7（3mM）および1（0.03mM）；（c）アミノ酸2（3mM）および1（0.03）；（d）アミノ酸2（3mM）および1（0.03mM）を補足した培地において発現されたmDHFRから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSを示す。（c）において培地に1mMのトリプトファンを補足する以外、誘発中にトリプトファンを補足しない。1つのPheコドンを含むペプチドBは、対照である。ペプチドAは、アンバーコドン（Z）を含むし、これについてのアミノ酸は、異なる発現条件でペプチドAについての質量単位を基に割り当てられる。ペプチドAでのリジン組み込みに起因して（c）、C末端リジンが切断されて、より短いペプチドA（NGDLPWPPLRNEK）（配列番号：4）が生成された。

30

【図5】図5は、アミノ酸7（3mM）およびアミノ酸1（0.03mM）を補足した培地において発現されたDHFRから得たペプチドA（NGDLPWPPLRNEZK）（配列番号：5）のタンデム質量スペクトルである。PWPPLRNEの部分配列（配列番号：6）およびペプチドAの残基Z（アミノ酸7に対応する）は、それぞれ、注釈yおよびbイオン系列から割り当てることができる。

40

【図6A】図6は、（a）アミノ酸2（3mM）およびアミノ酸6（3mM）およびアミノ酸1（0.03mM）およびアミノ酸13（0.2mM）；（b）アミノ酸2（3mM）およびアミノ酸6（0.01mM）およびアミノ酸1（0.03mM）およびアミノ酸13（0.2mM）；（c）アミノ酸3（3mM）およびアミノ酸6（0.01mM）およびアミノ酸1（0.03mM）およびアミノ酸13（0.01mM）を補足した培地において発現されたmDHFRから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSを示す。1つのPheコドンを有するペプチドCは、対照である。

50

【図6B】図6は、(a) アミノ酸2 (3 mM) およびアミノ酸6 (3 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.2 mM) ; (b) アミノ酸2 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.2 mM) ; (c) アミノ酸3 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.01 mM) を補足した培地において発現されたmDHF Rから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSを示す。1つのPheコドンを含むペプチドCは、対照である。

【図6C】図6は、(a) アミノ酸2 (3 mM) およびアミノ酸6 (3 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.2 mM) ; (b) アミノ酸2 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.2 mM) ; (c) アミノ酸3 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.01 mM) を補足した培地において発現されたmDHF Rから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSを示す。1つのPheコドンを含むペプチドCは、対照である。

10

【図6D】図6は、(a) アミノ酸2 (3 mM) およびアミノ酸6 (3 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.2 mM) ; (b) アミノ酸2 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.2 mM) ; (c) アミノ酸3 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) およびアミノ酸13 (0.01 mM) を補足した培地において発現されたmDHF Rから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSを示す。1つのPheコドンを含むペプチドCは、対照である。

20

【図7A】図7は、(a) アミノ酸9 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.03 mM) およびアミノ酸1 (0.01 mM) ; (b) アミノ酸10 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.03 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) ; (c) アミノ酸11 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) を補足した培地において発現されたmDHF Rから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSの結果を示す。ペプチドDは、対照である。

【図7B】図7は、(a) アミノ酸9 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.03 mM) およびアミノ酸1 (0.01 mM) ; (b) アミノ酸10 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.03 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) ; (c) アミノ酸11 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) を補足した培地において発現されたmDHF Rから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSの結果を示す。ペプチドDは、対照である。

30

【図7C】図7は、(a) アミノ酸9 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.03 mM) およびアミノ酸1 (0.01 mM) ; (b) アミノ酸10 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.03 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) ; (c) アミノ酸11 (3 mM) およびアミノ酸6 (0.01 mM) およびアミノ酸1 (0.03 mM) を補足した培地において発現されたmDHF Rから得たタンパク質分解ペプチドフラグメントのMALDI-MSの結果を示す。ペプチドDは、対照である。

【図8】図8は、eLys Sによるリジンでの酵母tRNA^{Phe}_{CUA} (四角) およびtRNA^{Phe}_{CUA-UG} (丸) のアミノアシル化を示す。

40

【図9】図9は、mDHF Rポリペプチドのトリプシン消化のLC-MSクロマトグラムを示す。

【図10】図10は、野生型酵母PheRSおよび外的突然変異体酵母PheRS_{T415G}または外的突然変異体酵母PheRS_{T415A}によるフェニルアラニン、トリプトファンおよびp-プロモフェニルアラニンについてのATP-PPi交換率を示す。

【図11A】図11は、野生型アミノアシルtRNAシンテターゼまたは外的突然変異体tRNAシンテターゼ(T415GまたはT415A)によるフェニルアラニンおよびトリプトファンのアミノアシル化を示す。

【図11B】図11は、野生型アミノアシルtRNAシンテターゼまたは外的突然変異体

50

tRNAシンテターゼ (T 4 1 5 GまたはT 4 1 5 A) によるフェニルアラニンおよびトリプトファンのアミノアシル化を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、リジン (白四角)、トリプトファン (斜交平行線模様) または p-ブロモフェニルアラニン (格子縞模様) の組み込みを示す。

【図 1 3】図 1 3 は、宿主細胞において改変 tRNA シンテターゼ (T 4 1 5 G) とアンバーサプレッサーを有する tRNA^{Phe} を使用してポリペプチドに組み込んだ p-エチニルフェニルアラニンの質量スペクトルを示す。

【図 1 4 A】図 1 4 は、試験タンパク質におけるアンバー抑制コドンを使用するアミノ酸の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 組み込みの FACS を示す。

【図 1 4 B】図 1 4 は、試験タンパク質におけるアンバー抑制コドンを使用するアミノ酸の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 組み込みの FACS を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、突然変異体アミノアシル tRNA シンテターゼ (T 4 1 5 G) の例示的プラスミドマッピングを図示する。

【図 1 6】図 1 6 は、酵母フェニルアラニン tRNA シンテターゼにおいて行った例示的突然変異を図示する。

10

【図 1 A】

	261	314
T. thermophilus:	RFQPVFYFPFVEP...	GFAFGLGVERLAMLRY
E. coli:	RFRPSTFPFTEP...	GFAFGMGMERLTLRY
S. cerevisiae:	RFKPTYNPYTEP...	VLGMGLSLERPTMIKY
	415	460

FIG. 1A

【図 1 B】

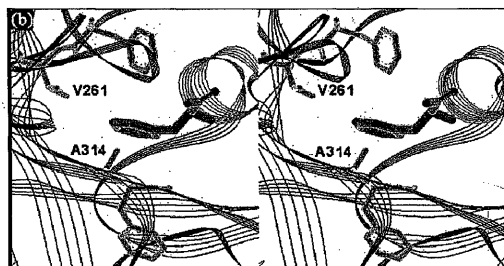


FIG. 1B

【図 2】

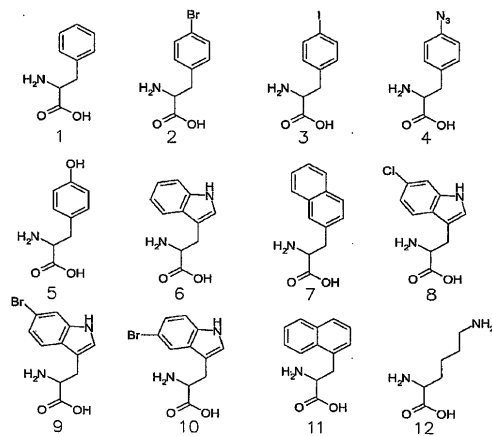


FIG. 2

【図 6 A】

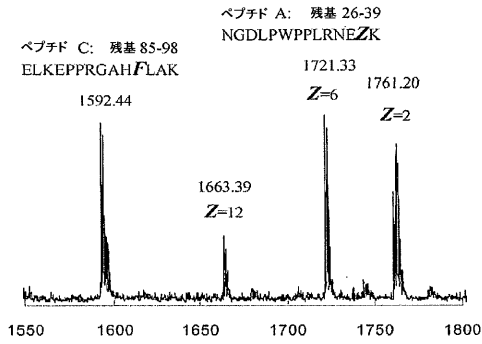


FIG. 6A

【図 6 B】

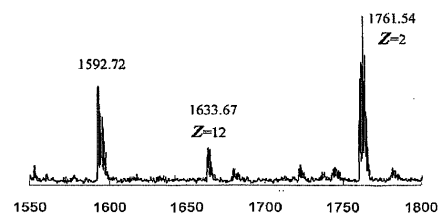


FIG. 6B

【図 6 C】

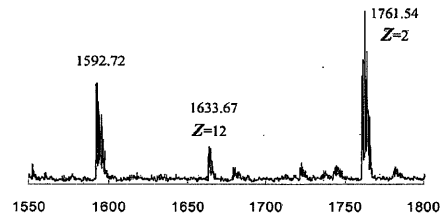


FIG. 6C

【図 6 D】

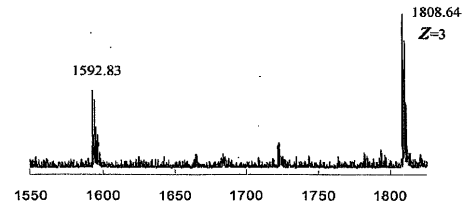


FIG. 6D

【図 7 A】

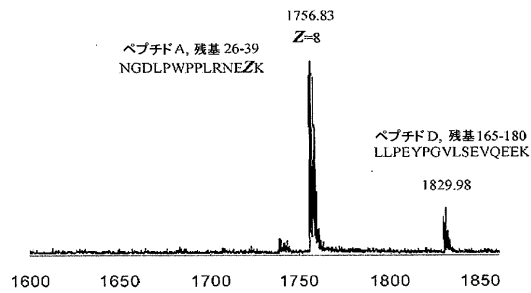


FIG. 7A

【図 7 C】

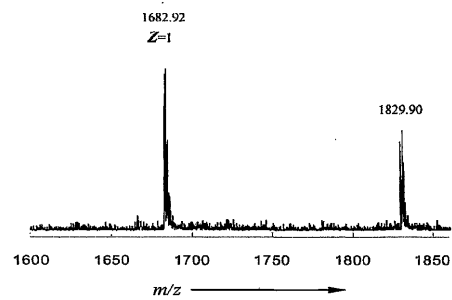


FIG. 7C

【図 7 B】

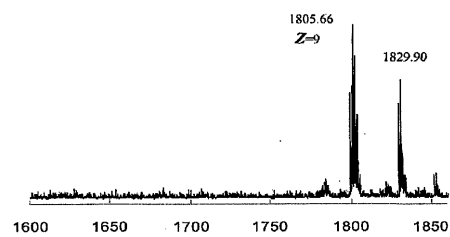


FIG. 7B

【図 8】

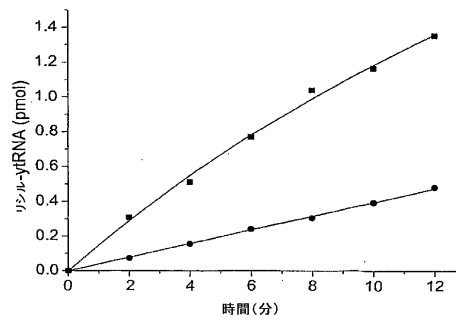
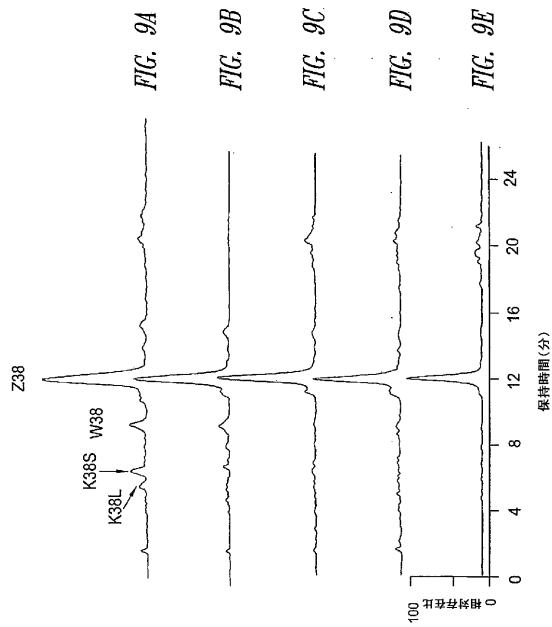


FIG. 8

【図 9】



【図 10】

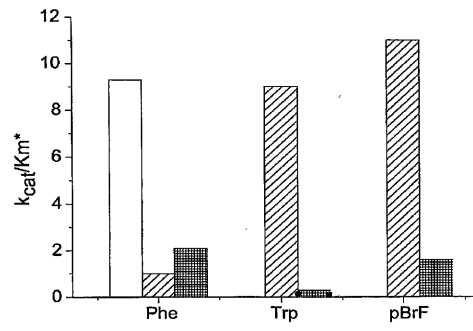


FIG. 10

【図 11 A】

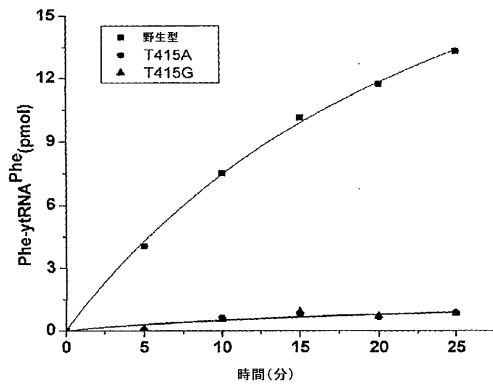


FIG. 11A

【図 11 B】

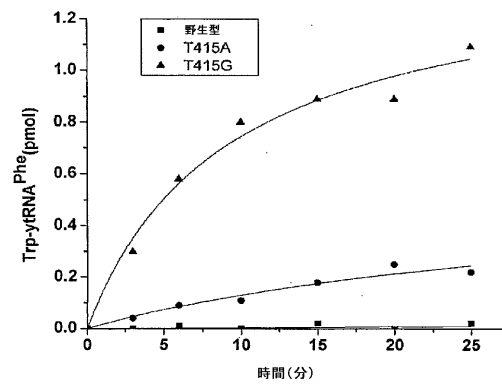
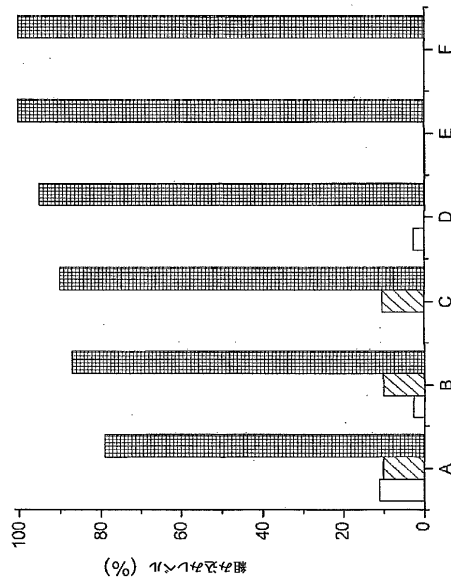


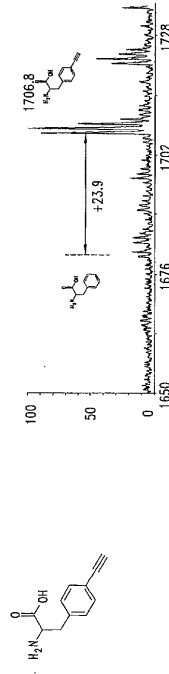
FIG. 11B

【図 12】



【図 13】

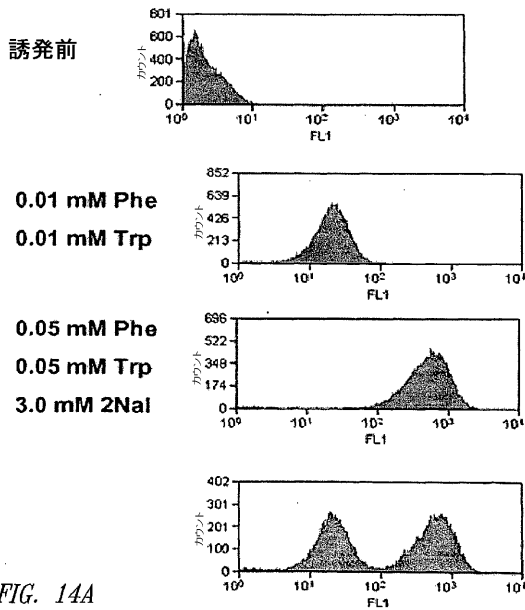
yPheRS (T415G) 変異体および yRNA^{Phe} アンバー-サブプレッサーを使用し、
E. coli 系においてアンバー-コドンに結合して pEif を mDHFR に導入することができる。



【図 14 A】

GFP アンバー抑制_081406

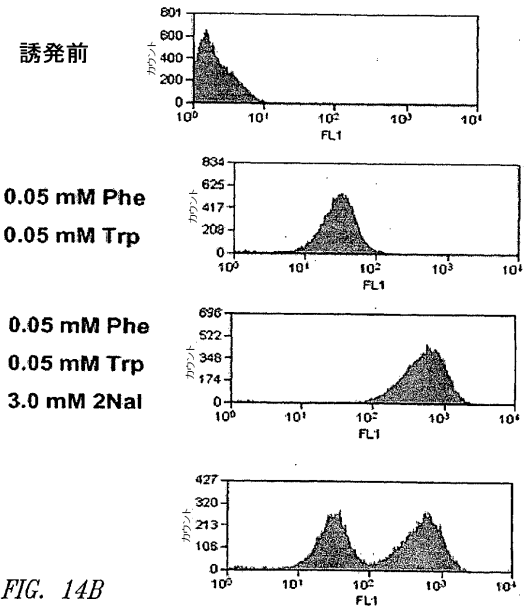
GFP_158 (L64, Am158)



【図 14 B】

GFP アンバー抑制_081406

GFP_158 (L64, Am158)



【図 15】

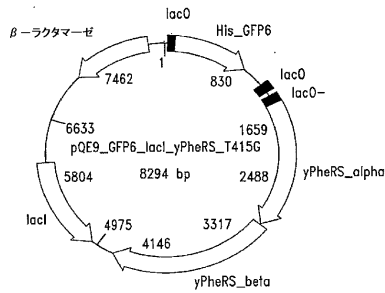


FIG. 15

【図 16】

> 酵母 PheRS_alpha突然変異部位は、NNNで示される

```
atgtctgact tcaattaga aattctaaag aaactagatg aattggatga gatcaagtc
acactggcaa ctttcctca gcacgctct caagatgtc ttccgcttt gaactcttg
aaagccocaa acaagttaga gttttccaag gtacacacg ttactataga ctgacacaa
gaagtgtct aattttgaa tgaaggttcg taccgaatta aactagtcaa gctatccaa
gaattgtgct aacttcaat caaagatgtg atgtccaaac taggcctca agttggttaag
gtcgttcagg cttagacttt caagaacggt tggatcgcca aaacgctct aaacgactt
gaactctccg caaattgca aatctcgat ttaattgagc ttactagata aacgaactt
attctacgct aatcaagaa caactcgct ctgatatga ttgacgcca gaatttgac
gaattgaaga aaagaaggtt aattgtcaa ggttaaatca caatttcag ttgacacaa
ggacacaggt tctcgaacga cctcaccaaa ttggaacg atcttacct cgaatgttc
tcacacaggt catcaagga ctgacgttc aacgttaca atttacctt tcaatgttg
caaatatctt caggtgtctt tcaacctta aacaagtc gaaggaatt tagacaatt
ttctttcca tggatctac ggaatggcc tgaacacat acgtcagac agtttctgg
aacttcaggt cccittcgt cccacacacg catctgtct gtacatgca agacatttc
tactcaaggt accactaac cgtcagtg cccatgac agacatcat ggaacatc
aaagccgtc acgaacagg ggaatcgg tccatggtt atcgttaca ctgaagcca
gaagatgtt aaaaattgt ctggaact cactccacg cactctgc cgaatgtct
cagatgttg ccaagatct aaagccacc agatgtt tttatcagct tttttcgt
aacgaagca ttgaacac ccatgtggt gaattccac agtgagaag tttttcgt
gactacaaca ttactctgg tgaatgtc aagttcgtt aagatgtt cgaagatg
ggtgtcagg gtttgaatt caagctac tacNNNcctt acNNNcctt aNNNcctt
atctttctt ggcacgaag ttgcacaaa tgggtcga tggtaacNNNcctt
agaccagaa tgcctgac catgtgtc ccaagatc taagatctt tgttgggg
ttatctctg aaagacctc caigatcaa tataaggtt aaacatcag agactgtta
ggtcataaag tctcttga cttatgaa accaactcty ctgtagatt ggaacgaag
ttgtacgaat aa
```

	名称	412	415	418	437
	T415G	AAT	GGC	TCA	TCT
1	2Na1	GGG	GGG	TGT	TTT
2	412 415	GGG	GGC		
3	415 418		GGC	TGT	
4	415 437		GGC		TTT
5	412 415 437	GGG	GGC		TTT
6	415 418 437		GGC	TGT	TTT
7	412 415 418	GGG	GGC	TGT	

FIG. 16

【配列表】

0005808882000001.app

0005808882000002.xml

フロントページの続き

- (74)代理人 100169971
弁理士 菊田 尚子
- (74)代理人 100194618
弁理士 鶴田 聡子
- (72)発明者 ワン, ピン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106, パサデナ, サン パスカル ストリート 9
75, アpartment ナンバー226
- (72)発明者 クウォン, インチャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94706, アルパニー, グッディング ウェイ 600
ナンバー628
- (72)発明者 ソン, スーチン
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07302, ジャージー シティ, ワシントン スト
リート 155 ナンバー702
- (72)発明者 タン, イー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91175, サン ガブリエル, アルカディア アベニュー
9141
- (72)発明者 ティレル, デイビッド エー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106, パサデナ, アーデン ロード 714

合議体

審判長 今村 玲英子

審判官 高堀 栄二

審判官 植原 克典

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0053390 (US, A1)
WANG, Pin et al., Chapter 8, Site-specific Incorporation of Amino Acid Analogs into Proteins In Vivo by an Engineered Yeast Phenylalanyl-tRNA Synthetase, Ph. D. thesis, California Institute of Technology, 2003年, p. 8-1-8-34
J. Am. Chem. Soc. (2002) Vol. 124, No. 20, p. 5652-5653
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (2004) Vol. 43, No. 47, p. 6426-6463
Curr. Opin. Biotechnol. (2003) Vol. 14, No. 6, p. 603-609
Chembiochem. (2002) Vol. 3, No. 2-3, p. 235-237
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1997) Vol. 94, No. 19, p. 10092-10097
Curr. Opin. Chem. Biol. (2005) Vol. 9, No. 6, p. 548-554
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2006. Jul.) Vol. 103, No. 27, p. 10180-10185

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

CA/BIOSIS/WPIDS (STN)

PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq