

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 8 月 20 日 (2020.8.20)

【公表番号】特表 2019-520083 (P2019-520083A)

【公表日】令和 1 年 7 月 18 日 (2019.7.18)

【年通号数】公開・登録公報 2019-028

【出願番号】特願 2019-500781 (P2019-500781)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 K 38/43 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

C 0 7 K 14/245 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/31 Z N A

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 1/21

C 0 7 K 14/47

A 6 1 K 38/16

A 6 1 K 38/43

A 6 1 K 39/395 H

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 K 39/395 A

C 0 7 K 14/245

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 7 月 9 日 (2020.7.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：4 に対して少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含み、配列番号：4 の 7 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、ポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項 2】

(a) 配列番号：1 であり、配列番号：1 の 3 4 4 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(b) 配列番号：2 であり、配列番号：2 の 7 0 2 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(c) 配列番号：3 であり、配列番号：3 の 6 5 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(d) 配列番号：5 であり、配列番号：5 の 7 8 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(e) 配列番号：6であり、配列番号：6の136位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(f) 配列番号：7であり、配列番号：7の183位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(g) 配列番号：8であり、配列番号：8の1位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(h) 配列番号：9であり、配列番号：9の102位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(i) 配列番号：10であり、配列番号：10の105位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(j) 配列番号：11であり、配列番号：11の673位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(k) 配列番号：12であり、配列番号：12の69位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(l) 配列番号：13であり、配列番号：13の107位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(m) 配列番号：17であり、配列番号：17の246位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(n) 配列番号：18であり、配列番号：18の545位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、及び/または、

(o) 配列番号：19であり、配列番号：19の124位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、
に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子。

【請求項3】

請求項1または2に記載の核酸分子から選択される少なくとも1つの核酸分子を含む菌株。

【請求項4】

配列番号：20、配列番号：21または配列番号：22に対して少なくとも90%同一なtRNAをコードする核酸を含み、以下の特徴、

(i) 7位に相当する位置にGまたはC、

(ii) 49位に相当する位置にT、

(iii) 50位に相当する位置にAまたはC、

(iv) 64位に相当する位置にT、

(v) 65位に相当する位置にGまたはA、及び/または、

(vi) 66位に相当する位置にG、TまたはC、

のうちの1つまたは複数を含む、請求項3に記載の菌株。

【請求項5】

寄託受入番号42595でNCIMBに寄託されたE. coli 菌株。

【請求項6】

請求項3または請求項5に記載の細菌の培養物であって、1~100mg/Lの前記培養物の量で発現組換えポリペプチドを含み、前記発現組換えポリペプチドは少なくとも1つのセレノシステイン残基を含む、細菌の培養物。

【請求項7】

少なくとも1つのセレノシステイン残基を含むポリペプチドを発現させるための方法であって、

(a) セレン供給源の存在下、請求項5または6に記載の菌株内で前記ポリペプチドをコードする核酸を発現させることと、

(b) 前記細菌から前記組換えポリペプチドを精製することと、
を含む、前記方法。

【請求項 8】

配列番号：4 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含み、配列番号：4 の 7 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、組換えポリペプチドであって、
好ましくは、前記ポリペプチドは、配列番号：4 の 7 3 位に相当する位置に A l a 置換を含み、

さらにより好ましくは、前記ポリペプチドは、配列番号：4 の 4 5 位に相当する位置に A s n 置換、2 9 0 位に相当する位置に L e u 置換、2 7 1 位に相当する位置に A s p 置換、1 5 3 位に相当する位置に T y r 置換、4 5 位に相当する位置に V a l 置換、2 8 4 位に相当する位置に P r o 置換、7 3 位に相当する位置に I l e 置換、6 8 位に相当する位置に L e u 置換、6 9 位に相当する位置に I l e 置換、3 0 5 位に相当する位置に C y s 置換、1 4 4 位に相当する位置に S e r 置換、及び / または、2 8 1 位に相当する位置に V a l 置換、を更に含む、組換えポリペプチド。

【請求項 9】

(a) 配列番号：1 であり、配列番号：1 の 3 4 4 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(b) 配列番号：2 であり、配列番号：2 の 7 0 2 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(c) 配列番号：3 であり、配列番号：3 の 6 5 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(d) 配列番号：5 であり、配列番号：5 の 7 8 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(e) 配列番号：6 であり、配列番号：6 の 1 3 6 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(f) 配列番号：7 であり、配列番号：7 の 1 8 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(g) 配列番号：8 であり、配列番号：8 の 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(h) 配列番号：9 であり、配列番号：9 の 1 0 2 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(i) 配列番号：1 0 であり、配列番号：1 0 の 1 0 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(j) 配列番号：1 1 であり、配列番号：1 1 の 6 7 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(k) 配列番号：1 2 であり、配列番号：1 2 の 6 9 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(l) 配列番号：1 3 であり、配列番号：1 3 の 1 0 7 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(m) 配列番号：1 7 であり、配列番号：1 7 の 2 4 6 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(n) 配列番号：1 8 であり、配列番号：1 8 の 5 4 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、または、

(o) 配列番号：1 9 であり、配列番号：1 9 の 1 2 4 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む組換えポリペプチドであって、
好ましくは、

前記ポリペプチドは、配列番号：1 の 3 4 4 位に相当する位置に P r o 置換を含む、

前記ポリペプチドは、配列番号：2 の 7 0 2 位に相当する位置に H i s 置換を含む、

前記ポリペプチドは、配列番号：3 の 6 5 5 位に相当する位置に A l a 置換を含む、

前記ポリペプチドは、配列番号：5 の 7 8 1 位に相当する位置に G l y 置換を含む、

前記ポリペプチドは、配列番号：6 の 1 3 6 位に相当する位置に V a l 置換を含む、

前記ポリペプチドは、配列番号：7の183位に相当する位置にA l a置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：8の1位に相当する位置にA r g置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：9の102位に相当する位置にC y s置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：10の105位に相当する位置にC y s置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：11の673位に相当する位置にL e u置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：12の69位に相当する位置にG l y置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：13の107位に相当する位置にS e r置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：17の246位に相当する位置にA l a置換を含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：18の545位に相当する位置にI l e置換を含む、
 または
前記ポリペプチドは、配列番号：19の124位に相当する位置にP r o置換を含み、
さらにより好ましくは、
前記ポリペプチドは、配列番号：1の999位に相当する位置にT h r置換、457位
に相当する位置にT h r置換、591位に相当する位置にP r o置換、183位に相当
する位置にT h r置換、358位に相当する位置にL e u置換、23位に相当する位置にA
r g置換、902位に相当する位置にI l e置換、889位に相当する位置にV a l置換
、620位に相当する位置にC y s置換、及び/または、174位に相当する位置にG l
y置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：3の398位に相当する位置にC y s置換、652位
に相当する位置にA l a置換、264位に相当する位置にC y s置換、及び/または、2
1位に相当する位置にA l a置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：5の916位に相当する位置にG l y置換、938位
に相当する位置にH i s置換、860位に相当する位置にH i s置換、925位に相当
する位置にA s p置換、及び/または、470位に相当する位置にM e t置換、を更に含む
、
前記ポリペプチドは、配列番号：6の115位に相当する位置にA l a置換、386位
に相当する位置にA r g置換、155位に相当する位置にA r g置換、98位に相当する
位置にS e r置換、201位に相当する位置にA l a置換、294位に相当する位置にT
h r置換、159位に相当する位置にT y r置換、及び/または、112位に相当する位
置にI l e置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：18の76位に相当する位置にG l y置換、293位
に相当する位置にV a l置換、637位に相当する位置にT h r置換、3位に相当する位
置にV a l置換、311位に相当する位置にS e r置換、471位に相当する位置にT h
r置換、228位に相当する位置にV a l置換、311位に相当する位置にS e r置換、
及び/または、257位に相当する位置にT h r置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：7の173位に相当する位置にV a l置換、196位
に相当する位置にL e u置換、180位に相当する位置にP h e置換、249位に相当す
る位置にA l a置換、5位に相当する位置にV a l置換、273位に相当する位置にL e
u置換、及び/または、176位に相当する位置にA s n置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：9の15位に相当する位置にC y s置換、及び/また
は、30位に相当する位置に置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：19の193位に相当する位置にI l e置換、233
位に相当する位置にT h r置換、300位に相当する位置にA l a置換、及び/または、
199位に相当する位置にA r g置換、を更に含む、
前記ポリペプチドは、配列番号：17の246位に相当する位置にA l a置換を更に含
む、または
前記ポリペプチドは、配列番号：11の119位に相当する位置にV a l置換、535
位に相当する位置にP r o置換、373位に相当する位置にA r g置換、535位に相当
する位置にS e r置換、119位に相当する位置にT h r置換、601位に相当する位置
にA l a置換、103位に相当する位置にL y s置換、31位に相当する位置にA s p置

換、662位に相当する位置にI l e置換、359位に相当する位置にL y s置換、及び/または、519位に相当する位置にA s p置換、を更に含む、組換えポリペプチド。

【請求項10】

精製組換えポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドの野生型には存在しない選択位置に少なくとも1つのセレノシステイン残基を含み、前記組成物中における前記組換えポリペプチドの少なくとも80%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、前記組成物。

【請求項11】

前記組成物中における前記組換えポリペプチドの80%～99.9%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含み、

好ましくは、前記組成物中における前記組換えポリペプチドの90%～99%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含み、

より好ましくは、前記組成物中における前記組換えポリペプチドの少なくとも95%または99%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

前記組換えポリペプチドは、ヒトポリペプチドに対して少なくとも90%同一であり、好ましくは、前記ヒトポリペプチドは疾患に關与するポリペプチドである、請求項10から請求項11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項13】

前記組換えポリペプチドは抗体または酵素を含む、請求項10から請求項11のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項14】

前記ポリペプチドは選択位置に少なくとも2つのセレノシステイン残基を含む、請求項10から請求項13のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項15】

前記選択位置の前記2つのセレノシステイン残基はジセレニド結合を形成する、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

少なくとも50μgの前記精製組換えポリペプチドを含み、精製組換えポリペプチドは97%～99.9%の純度である、請求項10から請求項15のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項17】

請求項10から請求項16のいずれか1項に記載の組成物を含む医薬組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

本発明のその他の目的、特徴及び利点は、以下の発明を実施するための形態により明らかとなるであろう。しかしながら、発明を実施するための形態及び特定の実施例については、本発明の好ましい実施形態を示してはいるが、単に例示として示されていると理解すべきであり、そのため、本発明の趣旨内及び範囲内における様々な変更及び修正は、本明細書の発明を実施するための形態により当業者に明らかとなるであろう。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

精製組換えポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、前記ポリペプチドの野生型には存在しない選択位置に少なくとも1つのセレノシステイン残基を含み、前記組成物中における前記組換えポリペプチドの少なくとも80%は、前記選択位置に前記

セレノシステイン残基を含む、前記組成物。

(項目2)

前記組成物中における前記組換えポリペプチドの80%～99.9%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目1に記載の組成物。

(項目3)

前記組成物中における前記組換えポリペプチドの90%～99%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目1に記載の組成物。

(項目4)

前記組成物中における前記組換えポリペプチドの少なくとも95%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目1に記載の組成物。

(項目5)

前記組成物中における前記組換えポリペプチドの少なくとも99%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目1に記載の組成物。

(項目6)

前記組換えポリペプチドは、ヒトポリペプチドに対して少なくとも90%同一である、項目1から項目5のいずれか1項に記載の組成物。

(項目7)

前記ヒトポリペプチドは疾患に關与するポリペプチドである、項目6に記載の組成物。

(項目8)

前記組換えポリペプチドは抗体または酵素を含む、項目1から項目5のいずれか1項に記載の組成物。

(項目9)

前記ポリペプチドは選択位置に少なくとも2つのセレノシステイン残基を含む、項目1から項目5のいずれか1項に記載の組成物。

(項目10)

前記選択位置の前記2つのセレノシステイン残基はジセレニド結合を形成する、項目9に記載の組成物。

(項目11)

前記ポリペプチドは酵素または抗体を含む、項目10に記載の組成物。

(項目12)

前記抗体はアグリコシル化抗体である、項目11に記載の組成物。

(項目13)

少なくとも50μgの前記精製組換えポリペプチドを含む、項目1から項目5のいずれか1項に記載の組成物。

(項目14)

精製組換えポリペプチドは97%～99.9%の純度である、項目1から項目5のいずれか1項に記載の組成物。

(項目15)

前記ポリペプチドは、選択位置に2、3、4、5、6、7、8、9または10のセレノシステイン残基を含む、項目1から項目11のいずれか1項に記載の組成物。

(項目16)

項目1から項目11のいずれか1項に記載の組成物を含む医薬組成物。

(項目17)

項目16に記載の有効量の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、対象を治療するための方法。

(項目18)

(a) 配列番号：1であり、配列番号：1の344位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(b) 配列番号：2であり、配列番号：2の702位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(c) 配列番号： 3 であり、配列番号： 3 の 6 5 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(d) 配列番号： 4 であり、配列番号： 4 の 7 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(e) 配列番号： 5 であり、配列番号： 5 の 7 8 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(f) 配列番号： 6 であり、配列番号： 6 の 1 3 6 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(g) 配列番号： 7 であり、配列番号： 7 の 1 8 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(h) 配列番号： 8 であり、配列番号： 8 の 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(i) 配列番号： 9 であり、配列番号： 9 の 1 0 2 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(j) 配列番号： 1 0 であり、配列番号： 1 0 の 1 0 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(k) 配列番号： 1 1 であり、配列番号： 1 1 の 6 7 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(l) 配列番号： 1 2 であり、配列番号： 1 2 の 6 9 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(m) 配列番号： 1 3 であり、配列番号： 1 3 の 1 0 7 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(n) 配列番号： 1 7 であり、配列番号： 1 7 の 2 4 6 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(o) 配列番号： 1 8 であり、配列番号： 1 8 の 5 4 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、及び / または、

(p) 配列番号： 1 9 であり、配列番号： 1 9 の 1 2 4 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

に対して少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子。

(項目 1 9)

(a) 配列番号： 1 であり、配列番号： 1 の 3 4 4 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(b) 配列番号： 2 であり、配列番号： 2 の 7 0 2 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(c) 配列番号： 3 であり、配列番号： 3 の 6 5 5 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(d) 配列番号： 4 であり、配列番号： 4 の 7 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(e) 配列番号： 5 であり、配列番号： 5 の 7 8 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(f) 配列番号： 6 であり、配列番号： 6 の 1 3 6 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(g) 配列番号： 7 であり、配列番号： 7 の 1 8 3 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(h) 配列番号： 8 であり、配列番号： 8 の 1 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(i) 配列番号： 9 であり、配列番号： 9 の 1 0 2 位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(j) 配列番号： 1 0 であり、配列番号： 1 0 の 1 0 5 位に相当する位置にアミノ酸置

換または欠失を有する、

(k) 配列番号：11であり、配列番号：11の673位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(l) 配列番号：12であり、配列番号：12の69位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(m) 配列番号：13であり、配列番号：13の107位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(n) 配列番号：17であり、配列番号：17の246位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

(o) 配列番号：18であり、配列番号：18の545位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、または、

(p) 配列番号：19であり、配列番号：19の124位に相当する位置にアミノ酸置換または欠失を有する、

に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む組換えポリペプチド。

(項目20)

前記ポリペプチドは、配列番号：1の344位に相当する位置にPro置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目21)

前記ポリペプチドは、配列番号：2の702位に相当する位置にHis置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目22)

前記ポリペプチドは、配列番号：3の655位に相当する位置にAla置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目23)

前記ポリペプチドは、配列番号：4の73位に相当する位置にAla置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目24)

前記ポリペプチドは、配列番号：5の781位に相当する位置にGly置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目25)

前記ポリペプチドは、配列番号：6の136位に相当する位置にVal置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目26)

前記ポリペプチドは、配列番号：7の183位に相当する位置にAla置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目27)

前記ポリペプチドは、配列番号：8の1位に相当する位置にArg置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目28)

前記ポリペプチドは、配列番号：9の102位に相当する位置にCys置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目29)

前記ポリペプチドは、配列番号：10の105位に相当する位置にCys置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目30)

前記ポリペプチドは、配列番号：11の673位に相当する位置にLeu置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目31)

前記ポリペプチドは、配列番号：12の69位に相当する位置にGly置換を含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 2)

前記ポリペプチドは、配列番号：13の107位に相当する位置にS e r置換を含む、
項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 3)

前記ポリペプチドは、配列番号：17の246位に相当する位置にA l a置換を含む、
項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 4)

前記ポリペプチドは、配列番号：18の545位に相当する位置にI l e置換を含む、
項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 5)

前記ポリペプチドは、配列番号：19の124位に相当する位置にP r o置換を含む、
項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 6)

前記ポリペプチドは、配列番号：1の999位に相当する位置にT h r置換、457位
に相当する位置にT h r置換、591位に相当する位置にP r o置換、183位に相当す
る位置にT h r置換、358位に相当する位置にL e u置換、23位に相当する位置にA
r g置換、902位に相当する位置にI l e置換、889位に相当する位置にV a l置換
、620位に相当する位置にC y s置換、及び/または、174位に相当する位置にG l
y置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 7)

前記ポリペプチドは、配列番号：3の398位に相当する位置にC y s置換、652位
に相当する位置にA l a置換、264位に相当する位置にC y s置換、及び/または、2
1位に相当する位置にA l a置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 8)

前記ポリペプチドは、配列番号：4の45位に相当する位置にA s n置換、290位に
相当する位置にL e u置換、271位に相当する位置にA s p置換、153位に相当する
位置にT y r置換、45位に相当する位置にV a l置換、284位に相当する位置にP r
o置換、73位に相当する位置にI l e置換、68位に相当する位置にL e u置換、69
位に相当する位置にI l e置換、305位に相当する位置にC y s置換、144位に相当
する位置にS e r置換、及び/または、281位に相当する位置にV a l置換、を更に含
む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 3 9)

前記ポリペプチドは、配列番号：5の916位に相当する位置にG l y置換、938位
に相当する位置にH i s置換、860位に相当する位置にH i s置換、925位に相当す
る位置にA s p置換、及び/または、470位に相当する位置にM e t置換、を更に含む
、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 4 0)

前記ポリペプチドは、配列番号：6の115位に相当する位置にA l a置換、386位
に相当する位置にA r g置換、155位に相当する位置にA r g置換、98位に相当する
位置にS e r置換、201位に相当する位置にA l a置換、294位に相当する位置にT
h r置換、159位に相当する位置にT y r置換、及び/または、112位に相当する位
置にI l e置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目 4 1)

前記ポリペプチドは、配列番号：18の76位に相当する位置にG l y置換、293位
に相当する位置にV a l置換、637位に相当する位置にT h r置換、3位に相当する位
置にV a l置換、311位に相当する位置にS e r置換、471位に相当する位置にT h
r置換、228位に相当する位置にV a l置換、311位に相当する位置にS e r置換、
及び/または、257位に相当する位置にT h r置換、を更に含む、項目19に記載の組
換えポリペプチド。

(項目 4 2)

前記ポリペプチドは、配列番号：7の173位に相当する位置にV a l置換、196位に相当する位置にL e u置換、180位に相当する位置にP h e置換、249位に相当する位置にA l a置換、5位に相当する位置にV a l置換、273位に相当する位置にL e u置換、及び／または、176位に相当する位置にA s n置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目43)

前記ポリペプチドは、配列番号：9の15位に相当する位置にC y s置換、及び／または、30位に相当する位置に置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目44)

前記ポリペプチドは、配列番号：19の193位に相当する位置にI l e置換、233位に相当する位置にT h r置換、300位に相当する位置にA l a置換、及び／または、199位に相当する位置にA r g置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目45)

前記ポリペプチドは、配列番号：17の246位に相当する位置にA l a置換を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目46)

前記ポリペプチドは、配列番号：11の119位に相当する位置にV a l置換、535位に相当する位置にP r o置換、373位に相当する位置にA r g置換、535位に相当する位置にS e r置換、119位に相当する位置にT h r置換、601位に相当する位置にA l a置換、103位に相当する位置にL y s置換、31位に相当する位置にA s p置換、662位に相当する位置にI l e置換、359位に相当する位置にL y s置換、及び／または、519位に相当する位置にA s p置換、を更に含む、項目19に記載の組換えポリペプチド。

(項目47)

(i) 配列番号：14に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列、ならびに、(i i) 212位に相当する位置にI l e置換、162位に相当する位置にA s n置換、299位に相当する位置にA l a置換、及び／または、220位に相当する位置にA r g置換、を含む、ポリペプチドをコードする核酸分子。

(項目48)

(i) 配列番号：14に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列、ならびに、(i i) 212位に相当する位置にI l e置換、162位に相当する位置にA s n置換、299位に相当する位置にA l a置換、及び／または、220位に相当する位置にA r g置換、を含む、組換えポリペプチド。

(項目49)

(i) 配列番号：15に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列、ならびに、(i i) 184位に相当する位置にA l a置換、1730位に相当する位置にA s n置換、1888位に相当する位置にA s p置換、352位に相当する位置にT h r置換、374位に相当する位置にS e r置換、1423位に相当する位置にA r g置換、1502位に相当する位置にG l u置換、285位に相当する位置にG l n置換、470位に相当する位置にL y s置換、939位に相当する位置にT h r置換、1669位に相当する位置にP h e置換、2034位に相当する位置にI l e置換、1713位に相当する位置にA s n置換、704位に相当する位置にT h r置換、及び／または、1084位に相当する位置にI l e置換、を含むポリペプチドをコードする核酸分子。

(項目50)

(i) 配列番号：15に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列、ならびに、(i i) 184位に相当する位置にA l a置換、1730位に相当する位置にA s n置換、1888位に相当する位置にA s p置換、352位に相当する位置にT h r置換、374位に相当する位置にS e r置換、1423位に相当する位置にA r g置換、1502位に相当する位置にG l u置換、285位に相当する位置にG l n置換、470位に相当する位

置に L y s 置換、9 3 9 位に相当する位置に T h r 置換、1 6 6 9 位に相当する位置に P h e 置換、2 0 3 4 位に相当する位置に I l e 置換、1 7 1 3 位に相当する位置に A s n 置換、7 0 4 位に相当する位置に T h r 置換、及び / または、1 0 8 4 位に相当する位置に I l e 置換、を含む、組換えポリペプチド。

(項目 5 1)

(i) 配列番号 : 1 6 に対して少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列、ならびに、(i i) 1 1 2 位に相当する位置に P h e 置換、1 2 6 位に相当する位置に A l a 置換、9 7 8 位に相当する位置に L e u 置換、1 9 9 位に相当する位置に G l y 置換、4 7 6 位に相当する位置に T h r 置換、及び / または、7 3 5 位に相当する位置に V a l 置換、を含むポリペプチドをコードする核酸分子。

(項目 5 2)

(i) 配列番号 : 1 6 に対して少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列、ならびに、(i i) 1 1 2 位に相当する位置に P h e 置換、1 2 6 位に相当する位置に A l a 置換、9 7 8 位に相当する位置に L e u 置換、1 9 9 位に相当する位置に G l y 置換、4 7 6 位に相当する位置に T h r 置換、及び / または、7 3 5 位に相当する位置に V a l 置換、を含む、組換えポリペプチド。

(項目 5 3)

項目 1 8、項目 4 7、項目 4 9 または項目 5 1 に記載の核酸分子から選択される少なくとも 1 つの核酸分子を含む菌株。

(項目 5 4)

前記菌株は、項目 1 8、項目 4 7、項目 4 9 または項目 5 1 に記載の核酸分子から選択される少なくとも 1 つの核酸分子によりコードされる前記ポリペプチドを発現する、項目 5 3 に記載の菌株。

(項目 5 5)

少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 の前記核酸分子を含む、項目 5 3 に記載の菌株。

(項目 5 6)

前記菌株は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 の前記核酸分子によりコードされる前記ポリペプチドを発現する、項目 5 5 に記載の菌株。

(項目 5 7)

前記菌株は E . c o l i 株である、項目 5 5 に記載の菌株。

(項目 5 8)

配列番号 : 2 0、配列番号 : 2 1 または配列番号 : 2 2 に対して少なくとも 9 0 % 同一な t R N A をコードする核酸を含み、以下の特徴、

(i) 7 位に相当する位置に G または C、

(i i) 4 9 位に相当する位置に T、

(i i i) 5 0 位に相当する位置に A または C、

(i v) 6 4 位に相当する位置に T、

(v) 6 5 位に相当する位置に G または A、及び / または、

(v i) 6 6 位に相当する位置に G、T または C、

のうちの 1 つまたは複数を含む、項目 5 3 に記載の菌株。

(項目 5 9)

前記分子は、配列番号 : 2 0 に対して少なくとも約 9 0 % 同一な前記配列を含む t R N A をコードし、以下の特徴、

(i) 7 位に相当する位置に G、

(i i) 4 9 位に相当する位置に T、

(i i i) 5 0 位に相当する位置に C、

(i v) 6 4 位に相当する位置に T、

(v) 6 5 位に相当する位置に G、及び / または、

(v i) 6 6 位に相当する位置に C、

のうちの1つまたは複数を含む、項目58に記載の菌株。

(項目60)

前記分子は、前記特徴(i)~(vi)のうちの2、3、4、5または6つを含む、項目59に記載の菌株。

(項目61)

前記分子は、配列番号：20に対して少なくとも95%同一な配列を含むtRNAをコードする、項目58に記載の菌株。

(項目62)

前記分子は、配列番号：20の前記配列を含むtRNAをコードする、項目61に記載の菌株。

(項目63)

前記分子は、配列番号：21に対して少なくとも約90%同一な前記配列を含むtRNAをコードする、項目58に記載の菌株。

(項目64)

前記分子は、配列番号：21の前記配列を含むtRNAをコードする、項目63に記載の菌株。

(項目65)

前記分子は、配列番号：22に対して少なくとも約90%同一な前記配列を含むtRNAをコードする、項目58に記載の菌株。

(項目66)

前記分子は、配列番号：22の前記配列を含むtRNAをコードする、項目65に記載の菌株。

(項目67)

セレノシステイン組み込み用のTAGコドンを含むコード配列中に少なくとも1つの位置を有する目的のポリペプチドをコードする発現可能な核配列を更に含む、項目53に記載の菌株。

(項目68)

前記発現可能な核配列はヒトポリペプチドをコードする、項目67に記載の菌株。

(項目69)

前記発現可能な核配列は酵素または抗体をコードする、項目67に記載の菌株。

(項目70)

前記発現可能な核配列はT7 RNAポリメラーゼプロモーターを含む、項目67に記載の菌株。

(項目71)

T7 RNAポリメラーゼをコードする核酸配列を更に含む、項目53に記載の菌株。

(項目72)

寄託受入番号42595でNCIMBに寄託されたE. coli 菌株。

(項目73)

項目53から項目72のいずれか1項に記載の菌株を含む細菌の培養物。

(項目74)

1~100mg/Lの前記培養物の量で発現組換えポリペプチドを含む前記培養物を含み、前記発現組換えポリペプチドは少なくとも1つのセレノシステイン残基を含む、細菌の培養物。

(項目75)

10~40mg/Lの前記培養物の量で発現組換えポリペプチドを含み、前記発現組換えポリペプチドは少なくとも1つのセレノシステイン残基を含む、項目74に記載の培養物。

(項目76)

前記発現組換えポリペプチドは項目のいずれか1項に記載のポリペプチドである、項目74または項目75に記載の培養物。

(項目 7 7)

前記発現組換えポリペプチドは、前記ポリペプチドの野生型には存在しない選択位置に少なくとも1つのセレノシステイン残基を含む、項目74または項目75に記載の培養物。

(項目 7 8)

前記培養物中における前記発現組換えポリペプチドの少なくとも80%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目77に記載の培養物。

(項目 7 9)

前記培養物中における前記組換えポリペプチドの80%～99.9%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目77に記載の培養物。

(項目 8 0)

前記培養物中における前記発現組換えポリペプチドの90%～99%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目77に記載の培養物。

(項目 8 1)

前記培養物中における前記発現組換えポリペプチドの少なくとも95%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目77に記載の培養物。

(項目 8 2)

前記培養物中における前記発現組換えポリペプチドの少なくとも99%は、前記選択位置に前記セレノシステイン残基を含む、項目77に記載の培養物。

(項目 8 3)

前記発現組換えポリペプチドはヒトポリペプチドに対して少なくとも90%同一である、項目74または項目75に記載の培養物。

(項目 8 4)

前記ヒトポリペプチドは疾患に關与するポリペプチドである、項目83に記載の培養物。

(項目 8 5)

前記発現組換えポリペプチドは抗体または酵素を含む、項目74または項目75に記載の培養物。

(項目 8 6)

前記ポリペプチドは選択位置に少なくとも2つのセレノシステイン残基を含む、項目74または項目75に記載の培養物。

(項目 8 7)

前記選択位置の前記2つのセレノシステイン残基はジセレニド結合を形成する、項目86に記載の培養物。

(項目 8 8)

前記ポリペプチドは、選択位置に2、3、4、5、6、7、8、9または10のセレノシステイン残基を含む、項目86に記載の培養物。

(項目 8 9)

項目74から項目88のいずれか1項に記載の培養物から精製した少なくとも第1のセレノシステイン残基を含むポリペプチド。

(項目 9 0)

少なくとも1つのセレノシステイン残基を含むポリペプチドを発現させるための方法であって、

(a) セレン供給源の存在下、項目53から項目72のいずれか1項に記載の菌株内で前記ポリペプチドをコードする核酸を発現させることと、

(b) 前記細菌から前記組換えポリペプチドを精製することと、
を含む、前記方法。

(項目 9 1)

(a) セレン供給源の存在下、項目53から項目72のいずれか1項に記載の菌株内で前記ポリペプチドをコードする核酸を発現させることと、

(b) 前記細菌から前記組換えポリペプチドを精製することと、
を含む方法により製造した、選択位置に少なくとも1つのセレノシステイン残基を含む組
換えポリペプチド。