

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年10月25日(2018.10.25)

【公表番号】特表2017-532043(P2017-532043A)

【公表日】平成29年11月2日(2017.11.2)

【年通号数】公開・登録公報2017-042

【出願番号】特願2017-519813(P2017-519813)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/00 C

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月10日(2018.9.10)

【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】

以下のステップを含む、真核細胞において非天然アミノ酸を所望のタンパク質に組み込むための方法。

i) 直交性 tRNA シンテターゼ - tRNA のペア、前記所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列、及びミュータント eRF 1 を発現する真核細胞を用意するステップであって、前記ミュータント eRF 1 が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、1 個又は 2 個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、前記ミュータント eRF 1 が、配列番号 4 のヒト野生型 eRF 1 配列と少なくとも 60 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ミュータント eRF 1 が、

(i) E 5 5

(ii) N 1 2 9、K 1 3 0

(iii) T 1 2 2、S 1 2 3

(iv) Y 1 2 5

(v) T 5 8、S 6 0、S 6 4、Y 1 2 5、N 1 2 9

(vi) S 1 2 3、L 1 2 4、Y 1 2 5

(vii) M 5 1、K 1 3 0

(viii) S 7 0、G 7 3

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含み、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記 tRNA によって認識されるコドンを含む、ステップ；

ii) 前記真核細胞を、前記所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれ

る非天然アミノ酸の存在下でインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が、前記直交性 tRNA シンテターゼの基質である、ステップ；並びに

iii) 前記真核細胞を、前記直交性 tRNA シンテターゼ - tRNA のペアにより前記非天然アミノ酸を前記所望のタンパク質に組み込まれるように、インキュベートするステップ；

【請求項 2】

真核細胞において、非天然アミノ酸を所望のタンパク質に組み込むためのミュータント eRF1 の使用であって、前記ミュータント eRF1 が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、1 個又は 2 個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、前記ミュータント eRF1 が、配列番号 4 のヒト野生型 eRF1 配列と少なくとも 60 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ミュータント eRF1 が、

(i) E 5 5

(ii) N 1 2 9、K 1 3 0

(iii) T 1 2 2、S 1 2 3

(iv) Y 1 2 5

(v) T 5 8、S 6 0、S 6 4、Y 1 2 5、N 1 2 9

(vi) S 1 2 3、L 1 2 4、Y 1 2 5

(vii) M 5 1、K 1 3 0

(viii) S 7 0、G 7 3

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含む、前記使用。

【請求項 3】

所望のポリペプチドをコードする核酸の翻訳による、前記所望のポリペプチドへの非天然アミノ酸の組み込みの補助における使用のためのミュータント eRF1 ポリペプチド、又はそれをコードする核酸であって、前記ミュータント eRF1 が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、1 個又は 2 個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、前記ミュータント eRF1 が、配列番号 4 のヒト野生型 eRF1 配列と少なくとも 60 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ミュータント eRF1 が、

(i) E 5 5

(ii) N 1 2 9、K 1 3 0

(iii) T 1 2 2、S 1 2 3

(iv) Y 1 2 5

(v) T 5 8、S 6 0、S 6 4、Y 1 2 5、N 1 2 9

(vi) S 1 2 3、L 1 2 4、Y 1 2 5

(vii) M 5 1、K 1 3 0

(viii) S 7 0、G 7 3

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含み、前記核酸が、前記所望のポリペプチドへの前記非天然アミノ酸の組み込みを指示する直交性コドンを含む、前記ミュータント eRF1 ポリペプチド、又はそれをコードする核酸。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のミュータント eRF1 ポリペプチド又は核酸を含む真核生物宿主細胞。

【請求項 5】

(i) 直交性 tRNA シンテターゼ - tRNA のペアと、
(ii) ミュータント eRF1 とを含む、真核生物宿主細胞であって、
前記ミュータント eRF1 が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、1 個又は 2 個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、配列番号 4 のヒト野生型 eRF1 配列と少なくとも 60 % の配列同一性を有するアミノ酸

配列を有し、

- (i) E 5 5
- (ii) N 1 2 9、K 1 3 0
- (iii) T 1 2 2、S 1 2 3
- (iv) Y 1 2 5
- (v) T 5 8、S 6 0、S 6 4、Y 1 2 5、N 1 2 9
- (vi) S 1 2 3、L 1 2 4、Y 1 2 5
- (vii) M 5 1、K 1 3 0
- (viii) S 7 0、G 7 3

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含み、かつ
前記真核生物宿主細胞が、任意で、

(iii) 非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記 t R N A によって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列を含む、前記真核生物宿主細胞。

【請求項 6】

(i) 直交性 t R N A シンテターゼ - t R N A のペアをコードする核酸と、
(ii) ミュータント e R F 1 をコードする核酸とを含む組合せ又はキットであって、
前記ミュータント e R F 1 が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、1 個又は 2 個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、
配列番号 4 のヒト野生型 e R F 1 配列と少なくとも 6 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、

- (i) E 5 5
- (ii) N 1 2 9、K 1 3 0
- (iii) T 1 2 2、S 1 2 3
- (iv) Y 1 2 5
- (v) T 5 8、S 6 0、S 6 4、Y 1 2 5、N 1 2 9
- (vi) S 1 2 3、L 1 2 4、Y 1 2 5
- (vii) M 5 1、K 1 3 0
- (viii) S 7 0、G 7 3

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含み、かつ
前記組合せ又はキットが、任意で、

(iii) 非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記 t R N A によって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列を含む核酸を含む、前記組合せ又はキット。

【請求項 7】

B o c K 又は C y p K 又は B C N K などの非天然アミノ酸をさらに含む、請求項 5 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6 に記載の組合せ若しくはキット。

【請求項 8】

ミュータント e R F 1 が、野生型 e R F 1 対照と比較して、非天然アミノ酸の組み込みの効率の増加をもたらす、請求項 1 に記載の方法、請求項 2 に記載の使用、請求項 3 に記載のミュータント e R F 1 ポリペプチド、請求項 4、5、若しくは 7 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6 に記載の組合せ若しくはキット。

【請求項 9】

ミュータント e R F 1 が、

- (i) E 5 5 D
- (ii) N 1 2 9 P、K 1 3 0 Q
- (iii) T 1 2 2 Q、S 1 2 3 F
- (iv) E 5 5 A
- (v) Y 1 2 5 F
- (vi) T 5 8 K、S 6 0 T、S 6 4 D、Y 1 2 5 F、N 1 2 9 S

- (vii) S 1 2 3 A、L 1 2 4 I、Y 1 2 5 L
- (viii) S 1 2 3 R、L 1 2 4 W、Y 1 2 5 R
- (ix) S 1 2 3 H、L 1 2 4 A、Y 1 2 5 G
- (x) M 5 1 A、K 1 3 0 M
- (xi) S 1 2 3 A、L 1 2 4 L、Y 1 2 5 V
- (xii) S 1 2 3 L、L 1 2 4 C、Y 1 2 5 S
- (xiii) S 1 2 3 L、L 1 2 4 S、Y 1 2 5 S
- (xiv) S 1 2 3 V、L 1 2 4 T、Y 1 2 5 P

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含む、請求項 1 に記載の方法、請求項 2 に記載の使用、請求項 3 に記載のミュータント e R F 1 ポリペプチド、請求項 4、5、若しくは 7 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6 に記載の組合せ若しくはキット。

【請求項 10】

終止コドンが T A G (アンバー)であり、かつミュータント e R F 1 が、

- (i) E 5 5 D
- (ii) N 1 2 9 P、K 1 3 0 Q
- (iii) E 5 5 A
- (iv) Y 1 2 5 F
- (v) T 5 8 K、S 6 0 T、S 6 4 D、Y 1 2 5 F、N 1 2 9 S
- (vi) S 1 2 3 A、L 1 2 4 I、Y 1 2 5 L
- (vii) S 1 2 3 R、L 1 2 4 W、Y 1 2 5 R
- (viii) S 1 2 3 H、L 1 2 4 A、Y 1 2 5 G
- (ix) M 5 1 A、K 1 3 0 M
- (x) S 1 2 3 A、L 1 2 4 L、Y 1 2 5 V
- (xi) S 1 2 3 L、L 1 2 4 C、Y 1 2 5 S
- (xii) S 1 2 3 L、L 1 2 4 S、Y 1 2 5 S
- (xiii) S 1 2 3 V、L 1 2 4 T、Y 1 2 5 P

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含む、請求項 1 に記載の方法、請求項 2 に記載の使用、請求項 3 に記載のミュータント e R F 1 ポリペプチド、請求項 4、5、若しくは 7 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6 に記載の組合せ若しくはキット。

【請求項 11】

終止コドンが T G A (オパール)であり、かつミュータント e R F 1 が、

- (i) T 1 2 2 Q、S 1 2 3 F
- (ii) S 7 0 A、G 7 3 S

からなる群から選択される、配列番号 4 に対する変異又は変異の組合せを含む、請求項 1 に記載の方法、請求項 2 に記載の使用、請求項 3 に記載のミュータント e R F 1 ポリペプチド、請求項 4、5、若しくは 7 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6 に記載の組合せ若しくはキット。

【請求項 12】

真核細胞が哺乳類細胞又は昆虫細胞である、請求項 1、8、9、10、若しくは 11 に記載の方法、請求項 2、8、9、10、若しくは 11 に記載の使用、請求項 3、8、9、10、若しくは 11 に記載のミュータント e R F 1 ポリペプチド、請求項 4、5、7、8、9、10、若しくは 11 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6、8、9、10、若しくは 11 に記載の組合せ若しくはキット。

【請求項 13】

コドンが終止コドンであり、任意で前記終止コドンが U A G である、請求項 1、8、9、10、若しくは 11 に記載の方法、請求項 2、8、9、10、若しくは 11 に記載の使用、請求項 3、8、9、10、若しくは 11 に記載のミュータント e R F 1 ポリペプチド、請求項 4、5、7、8、9、10、若しくは 11 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求

項 6、8、9、10、若しくは 11 に記載の 組合せ 若しくはキット。

【請求項 14】

直交性 tRNA シンテターゼ - tRNA のペアが、ピロリシル tRNA シンテターゼ (Py1RS) / Py1T tRNA_{CUA} のペアを含む、請求項 1、8、9、10、若しくは 11 に記載の方法、請求項 2、8、9、10、若しくは 11 に記載の使用、請求項 3、8、9、10、若しくは 11 に記載のミュータント eRF1 ポリペプチド、請求項 4、5、7、8、9、10、若しくは 11 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6、8、9、10、若しくは 11 に記載の 組合せ 若しくはキット。

【請求項 15】

tRNA が、

(i) Py1T の U25C バリエント、又は

(ii) Py1T の Opt バリエント、又は

(iii) Py1T の U25C - Opt バリエント

である、請求項 1、8、9、10、若しくは 11 に記載の方法、請求項 2、8、9、10、若しくは 11 に記載の使用、請求項 3、8、9、10、若しくは 11 に記載のミュータント eRF1 ポリペプチド、請求項 4、5、7、8、9、10、若しくは 11 に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項 6、8、9、10、若しくは 11 に記載の 組合せ 若しくはキット。