

【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23年4月14日(2011.4.14)

【公表番号】特表2009-528824(P2009-528824A)

【公表日】平成21年8月13日(2009.8.13)

【年通号数】公開・登録公報2009-032

【出願番号】特願2008-557434(P2008-557434)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/00

C 0 7 K 14/00

C 1 2 N 1/21

【手続補正書】

【提出日】平成22年3月2日(2010.3.2)

【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】

改变アミノ-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であって、該ポリヌクレオチドは、tRNA分子と対形成するべきアミノ酸との相互作用に必要な該AARSの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、そして該改变シンテターゼは、tRNA分子に非-天然アミノ酸をチャージすることができる、組成物。

【請求項2】

前記結合領域が、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、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記改变AARSが、改变Ph e R S、改变Tr p R S、改变Ty r R Sおよび改变Met R Sからなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記Ph e R Sが、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、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

前記Tr p R Sが、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、請求項3に記載の組成物。

【請求項6】

前記Met R Sが、アミノ酸配列位置番号13にて突然変異される、請求項3に記載の組成物。

【請求項7】

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。

【請求項8】

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7に記載の組成物。

【請求項9】

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7に記載の組成物。

【請求項10】

前記tRNAが、改変される、請求項7に記載の組成物。

【請求項11】

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10に記載の組成物。

【請求項12】

前記AARSおよび前記tRNAが、同じかまたは異なる生物からのものである、請求項1に記載の組成物。

【請求項13】

前記非-天然アミノ酸が、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、p-アセチルフェニルアラニン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-プロモインドリル)アラニン、3-(5-プロモインドリル)アラニン、アジドホモアラニン、p-クロロフェニルアラニン、アミノカブリル酸、O-メチル-L-チロシン、N-アセチルガラクトサミン- -トレオニンおよびN-アセチルガラクトサミン- -セリンからなる群より選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】

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であって、この場合、該改変AARSは、tRNA分子と対形成するべきアミノ酸との相互作用に必要な該AARSのアミノ酸結合領域内の1つ以上のアミノ酸残基にて突然変異され、そして該改変AARS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15】

前記結合領域が、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、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項16】

前記改変AARSが、改変Ph e R S、改変Tr p R S、改変Ty r R Sおよび改変Me t R Sからなる群より選択される、請求項14に記載のポリペプチド。

【請求項17】

前記Ph e R Sが、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、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項18】

前記Tr p R Sが、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、請求項16に記載のポリペプチド。

【請求項19】

前記 M e t R S が、アミノ酸配列位置番号 1 3 にて突然変異される、請求項 1 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む翻訳系。

【請求項 2 1】

前記翻訳系が、宿主細胞を含む、請求項 2 0 に記載の翻訳系。

【請求項 2 2】

前記改変 A A R S が、前記宿主細胞とは異なる生物に由来する、請求項 2 1 に記載の翻訳系。

【請求項 2 3】

改変 t R N A 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 2 0 に記載の翻訳系。

【請求項 2 4】

前記改変 t R N A 分子が、前記宿主細胞とは異なる生物に由来する、請求項 2 3 に記載の翻訳系。

【請求項 2 5】

前記改変 t R N A 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 2 3 に記載の翻訳系。

【請求項 2 6】

前記宿主細胞が、栄養素要求株である、請求項 2 1 に記載の翻訳系。

【請求項 2 7】

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、請求項 2 0 に記載の翻訳系。

【請求項 2 8】

前記 1 種以上の非 - 天然アミノ酸が、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 - 1 H - 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、p - アセチルフェニルアラニン、3 - (6 - クロロインドリル) アラニン、3 - (6 - プロモインドリル) アラニン、3 - (5 - プロモインドリル) アラニン、アミノカプリル酸、アジドホモアラニン、p - クロロフェニルアラニン、O - メチル - L - チロシン、N - アセチルガラクトサミン - - トレオニンおよびN - アセチルガラクトサミン - - セリンからなる群より選択される、請求項 2 0 に記載の翻訳系。

【請求項 2 9】

前記改変 A A R S が、改変 P h e R S 、改変 T r p R S 、改変 T y r R S および改変 M e t R S からなる群より選択される、請求項 2 0 に記載の翻訳系。

【請求項 3 0】

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方法であって、該方法が、

(1) 該ポリペプチドの 1 つ以上の指定位置での非 - 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) 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 A A R S を含む翻訳系を提供する工程；

(3) 該非 - 天然アミノ酸を該翻訳系に提供する工程；

(4) 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該翻訳系に提供する工程；および

(5) 該テンプレートポリヌクレオチドの翻訳を可能にし、それによって該ポリペプチドの指定位置に該非 - 天然アミノ酸を組み込む工程；

を含み、

工程（1）～（4）が、任意の順序で実施される、方法。

【請求項 3 1】

前記翻訳系が、細胞を含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

工程（3）が、前記非 - 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、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記改変 A A R S 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 ）が、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、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記改変 A A R S が、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7% または 8% 以下の率で t R N A にミスチャージする、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 t R N A が、改変 t R N A である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第一ポリヌクレオチドまたは第二ポリヌクレオチドが、前記 t R N A または A A R S 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、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

改変 A A R S 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、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記非 - 天然アミノ酸の組み込みを検証する工程をさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記改変 A A R S が、P h e R S、T y r R S、T r p R S および M e t R S からなる群より選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 0】

請求項 3 0 に記載の方法によって作製される、ポリペプチド。

【請求項 4 1】

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ための方法であって、該方法が、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 P h e R S、改変 T y r R S、改変 T r p R S および改変 M e t R S からなる群より選択される 1 つ以上の改変 A A R S 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 4 2】

請求項 4 1 に記載の方法によって作製される、ポリペプチド。

【請求項 4 3】

前記改変 A A R S が、E . c o l i または M . j a n n a s c h i i に由来する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記 t R N A が、E . c o l i または M . j a n n a s c h i i に由来する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記改変 A A R S が、E . c o l i または M . j a n n a s c h i i に由来する、請求項

14に記載のポリペプチド。

【請求項46】

前記改変AARSが、E.coliまたはM.jannaschiiに由来する、請求項20に記載の翻訳系。

【請求項47】

前記改変tRNAが、E.coliまたはM.jannaschiiに由来する、請求項23に記載の翻訳系。

【請求項48】

前記宿主細胞が、酵母細胞、真正細菌細胞、真核細胞；真菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞およびシードモナス属細胞からなる群より選択される、請求項21に記載の翻訳系。

【請求項49】

前記改変AARSが、E.coliまたはM.jannaschiiに由来する、請求項30に記載の方法。

【請求項50】

前記ポリペプチドがヒト成長ホルモンである、請求項30に記載の方法。

【請求項51】

前記細胞が栄養素要求株である、請求項31に記載の方法。

【請求項52】

前記細胞が、酵母細胞、真正細菌細胞、真核細胞；真菌細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞およびシードモナス属細胞からなる群より選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項53】

前記tRNAが、E.coliまたはM.jannaschiiに由来する、請求項34に記載の方法。

【請求項54】

前記標的ポリペプチドがヒト成長ホルモンである、請求項41に記載の方法。