

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-516637

(P2008-516637A)

(43) 公表日 平成20年5月22日(2008.5.22)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 5 0
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-538145 (P2007-538145)	(71) 出願人	593052785 ザ スクリップス リサーチ インスティ テュート アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 037 ラ ジョラ ノース トーリー ¹ パインス ロード 10550
(86) (22) 出願日	平成17年10月20日 (2005.10.20)	(74) 代理人	100064355 弁理士 川原田 一穂
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月15日 (2007.6.15)	(72) 発明者	ピーター・ジー・・シュルツ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 037 ラ ジョラ ラ ジョラス ラン チ ロード 1650
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/038250		
(87) 國際公開番号	W02006/045116		
(87) 國際公開日	平成18年4月27日 (2006.4.27)		
(31) 優先権主張番号	60/620,898		
(32) 優先日	平成16年10月20日 (2004.10.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】真正細菌へのN-アセチルガラクトサミンアミノ酸のインビボ部位特異的組込み

(57) 【要約】

糖蛋白質を *in vitro* 及び *in vivo* の両者で作製するための方法及び組成物を提供する。1方法はN-アセチルガラクトサミン部分をもつ非天然アミノ酸を蛋白質に組込む段階を含み、場合により、N-アセチルガラクトサミン含有非天然アミノ酸を更に付加糖で修飾することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O-RS) を含む組成物であって、前記 O-RS が N-アセチルガラクトサミン部分を含む非天然アミノ酸で直交 tRNA (O-tRNA) を優先的にアミノアシル化し、前記 O-RS が前記非天然アミノ酸と、前記 O-tRNA と、配列番号 1、2、3、4 及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含む O-RS を含む翻訳系で観察される効率の少なくとも 50% の効率で前記 O-tRNA を前記非天然アミノ酸でアミノアシル化する前記組成物。

【請求項 2】

前記 O-RS が野生型 *Methanococcus jannaschii* チロシル tRNA シンテターゼから誘導される請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 3】

前記 O-RS が配列番号 1、2、3、4 に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

非天然アミノ酸が N-アセチルガラクトサミン - - - スレオニンを含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

非天然アミノ酸が N-アセチルガラクトサミン - - - セリンを含む請求項 1 に記載の組成物。 20

【請求項 6】

請求項 1 に記載の組成物をコードする核酸。

【請求項 7】

核酸が配列番号 6、7、8 又は 9 に記載のヌクレオチド配列を含む請求項 6 に記載の核酸。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の核酸を含むベクターを含む細胞。 30

【請求項 11】

デフォルトパラメーターに設定した BLAST を使用して決定した場合に配列番号 5 に對して少なくとも 70% の配列一致度をもつ直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O-RS) のアミノ酸配列を含む組成物であって、アミノ酸配列が Tyr32Phe、Tyr32Gln、Tyr32Ala、Tyr32Leu、Ala67Pro、Ala67Ser、Ala67Thr、His70Pro、His70Lys、Leu98Ile、Val149Ile、Gln155Ser、Asp158Val、Gly163Cys 及び Ala167Val から構成される群から選択される 1 種以上のアミノ酸置換を含む前記組成物。 40

【請求項 12】

選択位置に非天然アミノ酸をもつ蛋白質を翻訳系で生産する方法であって、

a) i) N-アセチルガラクトサミン部分を含む非天然アミノ酸と；

i i) 少なくとも 1 個のセレクターコドンを含み、前記蛋白質をコードする核酸と；

i i i) 前記セレクターコドンを認識する直交 tRNA (O-tRNA) と；

i v) 前記グリコシリ化アミノ酸と、前記 O-tRNA と、配列番号 1、2、3、4 及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含む O-RS を含む翻訳系で観察される効率の少なくとも 50% の効率で O-tRNA を非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O-RS) を含む翻訳系を提供する段階と；

20

30

40

50

b) 蛋白質の翻訳中に前記核酸のセレクターコドンの位置に対応する蛋白質の選択位置にグリコシル化アミノ酸を組込むことにより、蛋白質を生産する段階を含む前記方法。

【請求項 13】

非天然アミノ酸を提供する前記段階がN-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン、3, 4, 6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン、N-アセチルガラクトサミン- - -セリン及び3, 4, 6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン- - -セリンから構成される群から選択されるアミノ酸を提供する段階を含む請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

翻訳系を提供する前記段階が前記O-RSをコードするポリヌクレオチドを提供する段階を含む請求項12に記載の方法。 10

【請求項 15】

翻訳系を提供する前記段階が野生型*Methanococcus jannaschii*チロシルtRNAシンテターゼから誘導されるO-RSを提供する段階を含む請求項12に記載の方法。

【請求項 16】

翻訳系を提供する前記段階が配列番号1、2、3、4に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含むO-RSを提供する段階を含む請求項12に記載の方法。

【請求項 17】

翻訳系を提供する前記段階が前記O-tRNAをコードするポリヌクレオチドを提供する段階を含む請求項12に記載の方法。 20

【請求項 18】

翻訳系を提供する前記段階が宿主細胞を提供する段階を含み、前記宿主細胞が前記非天然アミノ酸と、前記O-RSと、前記O-tRNAと、前記核酸を含み、前記組込み段階が前記宿主細胞を培養する段階を含む請求項12に記載の方法。

【請求項 19】

宿主細胞を提供する前記段階が大腸菌宿主細胞を提供する段階を含む請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

非天然アミノ酸を提供する前記段階が非天然アミノ酸を蛋白質に組込む前に3, 4, 6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン- - -スレオニンをN-アセチルガラクトサミン- - -スレオニンに変換する段階を含む請求項12に記載の方法。 30

【請求項 21】

非天然アミノ酸を提供する前記段階がO-tRNAをアミノアシル化する前に3, 4, 6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン- - -スレオニンをN-アセチルガラクトサミン- - -スレオニンに変換する段階を含む請求項12に記載の方法。

【請求項 22】

O-RSを提供する前記段階が配列番号1、2、3、4に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含むO-RSを提供する段階を含む請求項12に記載の方法。 40

【請求項 23】

(a) N-アセチルガラクトサミン部分を含む非天然アミノ酸と；
(b) 直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)と；
(c) 直交tRNA(O-tRNA)を含む翻訳系であって；

前記O-RSが前記非天然アミノ酸と、前記O-tRNAと、配列番号1、2、3、4及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含むO-RSを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも50%の効率で前記O-tRNAを前記非天然アミノ酸でアミノアシル化する前記翻訳系。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

前記非天然アミノ酸がN - アセチルガラクトサミン - - - スレオニン、トリアセチル - N - アセチルガラクトサミン - - - スレオニン、N - アセチルガラクトサミン - - - セリン、及びトリアセチル - N - アセチルガラクトサミン - - - セリンから構成される群から選択される請求項23に記載の翻訳系。

【請求項25】

前記O - RSが野生型 *Methanococcus jannaschii* チロシルtRNAシンテターゼから誘導される請求項23に記載の翻訳系。

【請求項26】

前記O - RSが配列番号1、2、3、4に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含む請求項23に記載の翻訳系。

10

【請求項27】

前記O - tRNAがアンバーサプレッサー tRNAである請求項23に記載の翻訳系。

【請求項28】

該当蛋白質をコードする核酸を更に含み、前記核酸が少なくとも1個のセレクターコドンを含み、前記セレクターコドンが前記O - tRNAにより認識される請求項23に記載の翻訳系。

【請求項29】

前記翻訳系が宿主細胞を含み、前記宿主細胞が前記非天然アミノ酸と、前記O - RSと、前記O - tRNAを含む請求項23に記載の翻訳系。

【請求項30】

前記宿主細胞が大腸菌細胞である請求項29に記載の翻訳系。

20

【請求項31】

前記宿主細胞が前記O - RSをコードするポリヌクレオチドを含む請求項29に記載の翻訳系。

【請求項32】

前記ポリヌクレオチドが配列番号6、7、8又は9に記載のヌクレオチド配列を含む請求項31に記載の翻訳系。

【請求項33】

前記宿主細胞が前記O - tRNAをコードするポリヌクレオチドを含む請求項29に記載の翻訳系。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願とのクロスリファレンス)

本願は米国仮特許出願第60/620,898号(出願日2004年10月20日)の優先権と特典を主張し、その明細書の開示内容全体を全目的で本明細書に組込む。

【0002】

(連邦政府支援研究開発から創出された発明の権利に関する陳述)

本発明は国立衛生研究所助成番号GM44154として米国政府助成下に創出された。米国政府は本発明に所定の権利をもつことができる。

40

【0003】

(発明の技術分野)

本発明は蛋白質生化学の分野に関する。本発明は非天然アミノ酸を蛋白質に組込む直交tRNA、直交アミノアシルtRNAシンテターゼ、及びその対を作製及び使用するための組成物及び方法に関し、非天然アミノ酸はN - アセチルガラクトサミン部分を含み、得られる蛋白質は糖蛋白質である。本発明は前記対を使用して細胞で蛋白質を生産する方法と関連組成物にも関する。本発明は糖ペプチド、糖蛋白質、及び関連ミメティクスと、糖ペプチド、糖蛋白質、及び関連ミメティクスの合成方法の分野に関する。

【背景技術】

【0004】

50

グリコシル化は蛋白質の最も一般的な翻訳後修飾(PTM)の1つであり、多くの生体プロセスで重要な役割を果たす。例えば、グリコシル化による蛋白質の翻訳後修飾は蛋白質フォールディング及び安定性に影響を与え、蛋白質の固有活性を変化させ、他の生体分子とのその相互作用を変化させることができる。例えばVarki, A. (1993) Glycobiology 3: 97-130; Dwek (1996) Chem. Rev. 96: 683-720; 及びSears and Wong (1998) Cell Mol. Life Sci. 54: 223-252参照。天然糖蛋白質は多数の異なる糖形態の集団として存在することが多いので、グリカン構造の分析や、蛋白質構造及び機能に及ぼすグリコシル化効果の研究は困難である。従って、均質にグリコシル化された天然及び非天然蛋白質の合成方法は例えばグリカン機能の系統的解明と改良糖蛋白質治療薬の開発に有用なツールになると考えられる。

10

【0005】

化学的及び酵素合成アプローチ、*in vitro*翻訳、及び経路操作を含む糖蛋白質作製方法に多大な労力が注がれている。所望グリコシル化パターンをもつ蛋白質を作製するための従来公知のアプローチの1つはグリコシダーゼを使用して不均質天然糖蛋白質を単純な均質コアに変換し、糖をグリコシルトランスフェラーゼで順次グラフトできるよう 20 している。例えばWitt, K.ら, (1997) J. Am. Chem. Soc. 119: 2114-2118参照。このアプローチは、主要グリコシル化部位が蛋白質を発現させる細胞株により予め決定されるという欠点がある。あるいは、固相ペプチド合成により所望グリカン構造を含む糖ペプチドを合成することもできる。この糖ペプチドを天然化学的ライゲーション(例えばShin, Y.ら, (1999) J. Am. Chem. Soc. 121: 11684-11689参照)、発現蛋白質ライゲーション(例えばTolbert, T. J. and Wong, C. - H. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122: 5421-5428参照)、又は遺伝子組換えプロテアーゼにより他のペプチド又は組換え蛋白質フラグメントと結合し、より大きな糖蛋白質にすることができる。例えばWitt, K.ら, (1998) J. Am. Chem. Soc. 120: 1979-1989参照。天然化学的ライゲーションと発現蛋白質ライゲーションはどちらも小蛋白質で最も有効であり、糖ペプチドのN末端にシステイン残基を必要とする。ペプチドを相互にライゲーションするためにプロテアーゼを使用する場合には、良好な結合収率のためにはライゲーション部位をグリコシル化部位から離して配置することが好ましい。例えばWitt, K.ら, (1998) J. Am. Chem. Soc. 120: 1979-1989参照。第3のアプローチは化学的方法を使用して蛋白質を糖で直接修飾する方法である。ハロアセトアミド糖誘導体をシステインのチオール基と結合すると、良好な選択性を達成できる(例えばDavis, N. J. and Flitsch, S. L. (1991) Tetrahedron Lett. 32: 6793-6796; 及びMacmillan, D.ら, (2002) Org. Lett. 4: 1467-1470参照)が、この方法は2個以上のシステイン残基をもつ蛋白質では問題となる可能性がある。

20

30

30

【非特許文献1】Varki, A. (1993) Glycobiology 3: 97-130

30

【非特許文献2】Dwek (1996) Chem. Rev. 96: 683-720

40

【非特許文献3】Sears and Wong (1998) Cell Mol. Life Sci. 54: 223-252

40

【非特許文献4】Witt, K.ら, (1997) J. Am. Chem. Soc. 119: 2114-2118

40

【非特許文献5】Shin, Y.ら, (1999) J. Am. Chem. Soc. 121: 11684-11689

40

【非特許文献6】Tolbert, T. J. and Wong, C. - H. (2000) J. Am. Chem. Soc. 122: 5421-5428

40

【非特許文献7】Witt, K.ら, (1998) J. Am. Chem. Soc. 120: 1979-1989

50

【非特許文献8】Davis, N. J. and, Flitsch, S. L. (1991) Tetrahedron Lett. 32: 6793 - 6796

【非特許文献9】Macmillan, D. (2002) Org Lett 4: 1467 - 1470

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、所望グリコシル化パターンをもつ糖蛋白質を作製するための改良方法が必要とされている。本発明は以下の開示から明らかなように、前記及び他の必要を満たすものである。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は糖蛋白質を作製するための方法と関連組成物を提供する。1側面では、本発明はN-アセチルガラクトサミン- -スレオニンやN-アセチルガラクトサミン- -セリン等のN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)部分をもつ非天然アミノ酸で直交tRNA(O-tRNA)を優先的にアミノアシル化する直交アミノアシルtRNAシンテターゼを提供する。所定態様では、直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)はMethanococcus jannaschiiに由来するシンテターゼ配列、例えば野生型Methanococcus jannaschiiチロシルtRNAシンテターゼから誘導されるアミノ酸配列から作製される。GalNAc含有非天然アミノ酸を利用することができる突然変異体M. jannaschii Tyr-tRNAシンテターゼ(MjTyrRS)の例としては限定されないが、配列番号1~4に記載のポリペプチド配列とその保存変異体が挙げられる。

20

【0008】

所定態様では、O-RSは非天然アミノ酸と、O-tRNAと、配列番号1、2、3、4又はその保存変異体のアミノ酸配列をもつO-RSを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも50%の効率でO-tRNAを非天然アミノ酸でアミノアシル化する。

【0009】

O-RSポリペプチドをコードする核酸、例えば本発明の代表的直交tRNAシンテターゼをコードする配列番号6~9の核酸も提供する。更に、これらのDNA配列を含むベクター(例えば発現ベクター)と、前記ベクターを含む細胞も提供する。

30

【0010】

関連側面では、本発明はデフォルトパラメーターに設定したBLASTを使用して決定した場合にM. jannaschii Tyr-tRNAシンテターゼ(配列番号5)に對して少なくとも70%の配列一致度をもつ直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)のアミノ酸配列を提供し、アミノ酸配列は限定されないが、(配列番号5に比較して)Tyr32Phe、Tyr32Gln、Tyr32Ala、Tyr32Leu、Ala67Pro、Ala67Ser、Ala67Thr、His70Pro、His70Lys、Leu98Ile、Glu107Pro、Val149Ile、Gln155Ser、Asp158Val、Asp158Cys、Ile159Tyr、Leu162Arg、Gly163Cys及びAla167Valから構成される群から選択される1種以上のアミノ酸置換を含む。

40

【0011】

本発明の他の側面は糖部分を含む非天然アミノ酸(例えばグリコシル含有アミノ酸)を蛋白質の選択位置に組込むことによる糖蛋白質の合成方法を含む。前記方法により生産された糖蛋白質も本発明の特徴である。前記方法は限定されないが、(a) i) GalNAc部分をもつ非天然アミノ酸と；ii)少なくとも1個のセレクターコドンを含み、前記糖蛋白質をコードする核酸と；iii)前記セレクターコドンを認識する直交tRNA(O-tRNA)と；iv) O-tRNAを非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する直交アミノアシルtRNAシンテターゼを含む翻訳系を提供する段階と；(b)蛋白質の

50

翻訳中に前記核酸のセレクターコドンの位置に対応する蛋白質の選択位置に前記グリコシリ化アミノ酸を組込むことにより、蛋白質を生産する段階を含む。

【0012】

所定態様では、前記方法で使用されるO-RSはグリコシリ化アミノ酸と、O-tRNAと、配列番号1、2、3、4及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含むO-RSを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも50%の効率でO-tRNAを非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する。

【0013】

本発明のシンテターゼにより認識される非天然アミノ酸としては限定されないが、-GalNAc-L-スレオニン、-O-GalNAc-L-セリン、-O-GlcNAc-L-セリン、C-グリコシド及びグリコシリ含有アミノ酸のチオグリコシリ類似体（例えば、アノマー酸素を炭素又は硫黄原子で置換する組成物）、及び/又は同等物が挙げられる。前記方法で使用することができる非天然アミノ酸としては、更にN-アセチルガラクトサミン-L-スレオニン、3,4,6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン-L-スレオニン、N-アセチルガラクトサミン-L-セリン及び3,4,6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン-L-セリンが挙げられる。場合により、組み込み段階は *in vivo* で実施される。

【0014】

所定態様では、翻訳系は野生型 *Methanococcus jannaschii* チロシルtRNAシンテターゼから誘導されるO-RSを使用する。

【0015】

直交tRNAと直交アミノアシルtRNAシンテターゼは直交対（O-tRNA/O-RS対）として機能し、O-tRNAはセレクターコドンを認識し、セレクターコドンに応答して非天然アミノ酸（この場合には、グリコシリ含有アミノ酸）を蛋白質に組込む。場合により、本方法で使用されるO-tRNAはmutRNA_{CUA}^{Tyr}を含む。

【0016】

ガラクトサミン含有アミノ酸をペプチド配列に組込むのに使用する直交アミノアシルtRNAシンテターゼの例としては限定されないが、配列番号1~4に記載のポリペプチドとその保存変異体、又は配列番号6~9のいずれか1種（又はその保存変異体）のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが挙げられる。（例えば、1種以上のグルコサミン含有アミノ酸を認識する）本発明の付加的O-RS配列としては配列番号11~13のいずれか1種を含むアミノ酸配列、又は配列番号14~16のいずれか1種のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列が挙げられる。

【0017】

本発明の糖蛋白質合成方法は更に糖供与体部分から糖部分に糖を転移させるために十分な時間と適切な条件下でグリコシリトランスフェラーゼ、糖供与体部分、及びグリコシリトランスフェラーゼ活性に必要な他の反応体と非天然アミノ酸（又は非天然アミノ酸を組込んだ成長中のポリペプチド）の糖部分を接触させる段階を含む。この反応の生成物を所望により1種以上の付加グリコシリトランスフェラーゼ及び適当な糖供与体部分と接触させると、糖成分を更に延長することができる。

【0018】

前記方法の所定態様では、翻訳系を提供する段階はO-tRNA及びO-RSが発現されるか及び/又は機能する細胞（例えば、大腸菌細胞等の原核細胞）を提供する段階を含む。翻訳系を提供する段階は例えば、増殖培地で細胞を増殖させることにより達成することができ、場合によりO-RSをコードする核酸配列及び/又はO-tRNAをコードする核酸を細胞で同時発現させる段階を含むことができる。

【0019】

場合により、グリコシリ化アミノ酸を提供する段階は非天然アミノ酸の保護形態（例えば、3,4,6-トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン-L-スレオニン等のアセ

10

20

30

40

50

チル化形態)を非保護形態(例えば、N-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン)に変換する段階を含む。例えば細胞のサイトゾル(又は他の細胞翻訳系)における非特異的エステラーゼによる非天然アミノ酸の脱保護はO-tRNAをアミノアシル化する前及び/又は非天然アミノ酸を蛋白質に組込む前に実施することが好ましい。

【0020】

所定態様では、前記方法は更にグリコシルトランスフェラーゼ反応の生成物を少なくとも第2のグリコシルトランスフェラーゼ及び第2の糖供与体部分と接触させる段階を含む。1態様では、糖部分は末端G1cNAcを含み、糖供与体部分はUDP-G1cNAcであり、グリコシルトランスフェラーゼは-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。別の態様では、糖部分は末端G1cNAcを含み、糖供与体部分はUDP-Galであり、グリコシルトランスフェラーゼは-1-4-ガラクトシルトランスフェラーゼである。別の態様では、糖部分は末端G1cNAcを含み、糖供与体部分はUDP-G1cNAc及び/又はUDP-Galであり、グリコシルトランスフェラーゼは夫々(-1-6)N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ及び/又は-1-3-ガラクトシルトランスフェラーゼを含む。限定されないが、例えば、ガラクトシルトランスフェラーゼ、フ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、ガラクツロン酸トランスフェラーゼ、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ等の適当なグリコシルトランスフェラーゼを使用することにより、場合により各種糖を非天然アミノ酸の糖部分に付加することができる。

10

20

30

40

50

【0021】

別の側面では、本発明は糖蛋白質を作製するための翻訳系も提供する。本発明の翻訳系は限定されないが、少なくとも1個のセレクターコドンを認識する直交tRNA(O-tRNA)と、糖部分(例えば、N-アセチルガラクトサミン部分)を含む非天然アミノ酸でO-tRNAを優先的にアミノアシル化する直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)を含む。保護又は脱保護組成物(例えば、-O-G1cNAc-L-セリン、トリアセチル--O-G1cNAc-セリン、-O-GalNAc-L-スレオニン、トリアセチル--O-GalNAc-スレオニン、-O-GalNAc-セリン、トリアセチル--GalNAc-セリン、対応する保護又は脱保護チオグリコシル類似体、及び/又は同等物)として、1種以上の糖含有非天然アミノ酸も提供する。所定態様では、翻訳系で使用されるO-RSは野生型**Methanococcus jannaschii**チロシルtRNAシンテターゼから誘導される。所定態様では、翻訳系はアンバーサブレッサーtRNAであるO-tRNAを使用する。

【0022】

所定態様では、翻訳系におけるO-RSは非天然アミノ酸と、O-tRNAと、配列番号1、2、3、4又はその保存変異体のアミノ酸配列をもつO-RSを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも50%の効率でO-tRNAを非天然アミノ酸でアミノアシル化する。

【0023】

ガラクトサミン含有非天然アミノ酸の使用に関する態様では、翻訳系で使用されるO-RSは配列番号1~4とその保存変異体から構成される群から選択される1種以上のアミノ酸配列を含むことができる(又は配列番号6~9のいずれか1種のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる)。グルコサミン含有アミノ酸基質に関する他の態様では、O-RSは配列番号11~13のいずれか1種を含むアミノ酸配列を含むか、又は配列番号14~16のいずれか1種のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる。翻訳系は更に該当蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記ポリヌクレオチドはO-tRNAにより認識されるセレクターコドンを含む。所定態様では、翻訳系は大腸菌細胞等の細胞である。宿主細胞はO-RSをコードするポリ

ヌクレオチド（例えば、配列番号6、7、8又は9）やO-tRNAをコードするポリヌクレオチド等の系成分を含むことができる。

【0024】

本発明は更に例えば、本発明の方法及び翻訳系で新規直交tRNAシンテターゼと併用するための、グリコシル含有非天然アミノ酸と糖部分をもつ非天然アミノ酸に結合したO-tRNA分子を提供する。本発明のグリコシル含有非天然アミノ酸としては限定されないが、-GalNAc-L-スレオニン、-O-GalNAc-L-セリン、-O-GlcNAc-L-セリン、グリコシル含有アミノ酸の保護形態、及びチオグリコシル類似体が挙げられる。

【0025】

人工（例えば人為的に作製した非天然）ポリペプチド及びポリヌクレオチドも本発明の特徴である。例えば、本発明の人工ポリペプチドは例えば（a）配列番号1～4及び11～13のいずれか1種に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；（b）配列番号6～9及び14～16のいずれか1種に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（c）（a）、又は（b）のポリペプチドに特異的な抗体に対して特異的に免疫反応性のポリペプチド；並びに（d）（a）、（b）、又は（c）の保存変異体を含むアミノ酸配列を含む。本発明の人工ポリペプチドに対して特異的に免疫反応性の抗体及び抗血清も提供する。本発明の人工ポリヌクレオチドは例えば（a）配列番号6～9及び14～16のいずれか1種に記載の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か又はこれをコードするポリヌクレオチド；（c）配列番号1～4及び11～13のいずれか1種に記載のアミノ酸配列又はその保存変異体を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；（d）人工ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；（e）核酸の実質的に全長にわたって高ストリングエンント条件下で（a）、（b）、（c）、又は（d）のポリヌクレオチドとハイブリダイズする核酸；（f）（a）、（b）、（c）、（d）、又は（e）のポリヌクレオチドと少なくとも98%一致するポリヌクレオチド；並びに（h）（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、又は（f）の保存変異体を含むポリヌクレオチドを含む。

（定義）

【0026】

本発明を詳細に記載する前に、本発明は特定装置又は生物系に限定されず、当然のことながら種々のものに適用できると理解すべきである。同様に、本明細書で使用する用語は特定態様のみの記載を目的とし、限定的でないことも理解すべきである。本明細書と特許請求の範囲で使用する単数形はそうでないことが内容から明白である場合を除き、複数形も含む。従って、例えば「細胞」と言う場合には2個以上の細胞の組合せを含み、「細菌」と言う場合には細菌培養物を含み、「ポリペプチド」と言う場合には実際問題としてそのポリペプチドの多数のコピーを含み、他の用語についても同様である。

【0027】

直交：本明細書で使用する「直交」なる用語は細胞又は翻訳系に内在する対応分子に比較して低効率で細胞の内在成分と共に働くか、あるいは細胞の内在成分と共に働く分子（例えば直交tRNA（O-tRNA）及び/又は直交アミノアシルtRNAシンテターゼ（O-RS））を意味する。tRNA及びアミノアシルtRNAシンテターゼに関して直交とは、内在tRNAが内在tRNAシンテターゼと共に働く能力に比較して直交tRNAが内在tRNAシンテターゼと共に働くできないか又は低効率（例えば20%未満、10%未満、5%未満、又は1%未満の効率）でしか共働くことができず、あるいは、内在tRNAシンテターゼが内在tRNAと共に働く能力に比較して直交アミノアシルtRNAシンテターゼが内在tRNAと共に働くできないか又は低効率でしか共働くことができないことを意味する。直交分子は細胞内に機能的に正常な相補的内在分子をもたない。例えば、細胞中の直交tRNAがこの細胞の任意内在RSによりアミノアシル化される効率は内在tRNAが内在RSによりアミノアシル化される効率に比較して低いか又はゼロである。別の例では、直交RSが該当細胞の任意内在tRNAをアミノアシル化する効率は内在tRNAが内在R

10

20

30

40

50

Sによりアミノアシル化される効率に比較して低いか又はゼロである。第1の直交分子と共に働く第2の直交分子を細胞に導入することができる。例えば、直交tRNA/R S対は対照（例えば対応するtRNA/R S内在対、又は活性直交対（例えばチロシル直交tRNA/R S対））の効率に比較して所定の効率（例えば45%の効率、50%の効率、60%の効率、70%の効率、75%の効率、80%の効率、90%の効率、95%の効率、又は99%以上の効率）で細胞中で共働く導入相補成分を含む。

【0028】

直交チロシルtRNA：本明細書で使用する直交チロシルtRNA（チロシル-O-tRNA）とは該当翻訳系に対して直交性のtRNAであり、tRNAは（1）天然に存在するチロシルtRNAと同一であるか又は実質的に類似しているか、（2）自然又は人工突然変異誘発により天然に存在するチロシルtRNAから誘導されるか、（3）（1）又は（2）の野生型又は突然変異体チロシルtRNA配列の配列を考慮する任意プロセスにより誘導されるか、（4）野生型又は突然変異体チロシルtRNAと相同であるか；（5）表3にチロシルtRNAシンテターゼの基質として指定する任意特定tRNAと相同であるか、あるいは（6）表3にチロシルtRNAシンテターゼの基質として指定する任意特定tRNAの保存変異体である。チロシルtRNAはアミノ酸を負荷した状態でも負荷しない状態でも存在することができる。更に当然のことながら、「チロシル-O-tRNA」は場合によりコグネイトシンテターゼによりチロシン以外のアミノ酸（例えばN-アセチルガラクトサミンを含む非天然アミノ酸）を負荷（アミノアシル化）される。実際に、当然のことながら、本発明のチロシル-O-tRNAは翻訳中にセレクターコドンに応答して成長中のポリペプチドに天然又は人工のいずれかに拘わらずほぼ任意アミノ酸を挿入するために有利に使用される。

10

20

30

【0029】

直交チロシルアミノ酸シンテターゼ：本明細書で使用する直交チロシルアミノ酸シンテターゼ（チロシル-O-R S）とは該当翻訳系においてチロシル-O-tRNAをアミノ酸で優先的にアミノアシル化する酵素である。チロシル-O-R Sがチロシル-O-tRNAに負荷するアミノ酸は天然、非天然又は人工のいずれかを問わずに任意アミノ酸とすことができる、本明細書では限定しない。シンテターゼは場合により天然に存在するチロシルアミノ酸シンテターゼと同一又は相同であるか、あるいは表3にO-R Sとして指定するシンテターゼと同一又は相同である。例えば、O-R Sは表3のチロシル-O-R Sの保存変異体とすことができる、及び／又は表3のO-R Sと少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又はそれ以上配列が一致することができる。

【0030】

コグネイト：「コグネイト」なる用語は共働く成分、例えば直交tRNAと直交アミノアシルtRNAシンテターゼを意味する。これらの成分は「相補的」であると言ふこともできる。

【0031】

優先的にアミノアシル化する：本明細書で直交翻訳系に関して使用する場合に、O-R SはO-R Sが発現系で任意内在tRNAに負荷するよりも効率的にO-tRNAにアミノ酸を負荷するときにコグネイトO-tRNAを「優先的にアミノアシル化する」。即ち、O-tRNAと所与の任意内在tRNAがほぼ等モル比で翻訳系に存在するとき、O-R Sは内在tRNAに負荷するよりも高頻度でO-tRNAに負荷する。O-R Sにより負荷されるO-tRNAとO-R Sにより負荷される内在tRNAの相対比は高いことが好ましく、従って、O-tRNAと内在tRNAが等モル濃度で翻訳系に存在する場合にはO-R SはO-tRNAに排他的、又はほぼ排的に負荷することが好ましい。O-tRNAとO-R Sが等モル濃度で存在する場合にO-R Sにより負荷されるO-tRNAと内在tRNAの相対比は1:1を上回り、好ましくは少なくとも約2:1、より好ましくは5:1、更に好ましくは10:1、更に好ましくは20:1、更に好ましくは50:1、更に好ましくは75:1、更に好ましくは95:1、98:1、99:1、100:50

1、500:1、1,000:1、5,000:1又はそれ以上である。

【0032】

(a) O-RSが内在tRNAに比較してO-tRNAを優先的にアミノアシル化するとき、及び(b) O-RSがO-tRNAを任意天然アミノ酸でアミノアシル化する場合に比較してそのアミノアシル化が非天然アミノ酸に特異的であるときには「O-tRNAを非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する」。即ち、非天然アミノ酸と天然アミノ酸がO-RSとO-tRNAを含む翻訳系に等モル量で存在するとき、O-RSは天然アミノ酸よりも高頻度で非天然アミノ酸をO-tRNAに負荷する。非天然アミノ酸を負荷されたO-tRNAと天然アミノ酸を負荷されたO-tRNAの相対比は高いことが好ましい。O-RSはO-tRNAに排他的、又はほぼ排的に非天然アミノ酸を負荷することがより好ましい。天然アミノ酸と非天然アミノ酸の両者が等モル濃度で翻訳系に存在するとき、O-tRNAの非天然アミノ酸負荷とO-tRNAの天然アミノ酸負荷の相対比は1:1を上回り、好ましくは少なくとも約2:1、より好ましくは5:1、更に好ましくは10:1、更に好ましくは20:1、更に好ましくは50:1、更に好ましくは75:1、更に好ましくは95:1、98:1、99:1、100:1、500:1、1,000:1、5,000:1又はそれ以上である。

10

【0033】

セレクターコドン：「セレクターコドン」なる用語は翻訳プロセスでO-tRNAにより認識され、内在tRNAにより認識されないコドンを意味する。O-tRNAアンチコドンループはmRNA上のセレクターコドンを認識し、そのアミノ酸（例えばGalanicアミノ酸等の非天然アミノ酸）をポリペプチドのこの部位に組込む。セレクターコドンとしては例えば終止コドン（例えばアンバー、オーカー及びオパールコドン）等のナンセンスコドン、4塩基以上のコドン、レアコドン、天然又は非天然塩基対から誘導されるコドン及び/又は同等物を挙げることができる。

20

【0034】

サブレッサーtRNA：サブレッサーtRNAは例えばセレクターコドンに応答してポリペプチド鎖にアミノ酸を組込むためのメカニズムを提供することにより、所与翻訳系でメッセンジャーRNA(mRNA)の読み取りを変更するtRNAである。例えば、サブレッサーtRNAは例えば終止コドン（例えばアンバー、オーカー又はオパールコドン）、4塩基コドン、レアコドン等を読み飛ばすことができる。

30

【0035】

抑圧活性：本明細書で使用する「抑圧活性」なる用語は一般に、読み飛ばさないと翻訳終結又は誤訳（例えばフレームシフト）をもたらすコドン（例えばアンバーコドンや4塩基以上のコドンであるセレクターコドン）の翻訳読み飛ばしを行うtRNA（例えばサブレッサーtRNA）の能力を意味する。サブレッサーtRNAの抑圧活性は第2のサブレッサーtRNA又は対照系（例えばO-RSをもたない対照系）に比較して観測される翻訳読み飛ばし活性の百分率として表すことができる。

【0036】

本発明は抑圧活性を定量することが可能な種々の手段を提供する。該当セレクターコドン（例えばアンバーコドン）に対する特定O-tRNA及びO-RSの抑圧百分率とは、O-tRNA、O-RS及びセレクターコドンをもたない陽性対照構築物に比較して、O-RSとO-tRNAを含む該当翻訳系で発現され、そのコーディング核酸中にセレクターコドンを含む所与試験マーカー（例えばLacZ）の活性百分率を意味する。従って、例えば、セレクターコドンをもたない活性陽性対照マーカー構築物が所与翻訳系において該当マーカーアッセイに関連する単位で表した観測活性Xをもつ場合には、セレクターコドンを含む試験構築物の抑圧百分率は、O-tRNAとO-RSを更に含む翻訳系で発現される以外は陽性対照マーカーが発現される環境条件とほぼ同一の環境条件下で試験マーカー構築物が示すXの百分率である。一般に、試験マーカーを発現する翻訳系は更にO-RSとO-tRNAにより認識されるアミノ酸を含む。場合により、抑圧百分率測定値は、O-tRNA、O-RS及び/又はO-tRNA及び/又はO-RSにより認識される

40

50

該当アミノ酸を含まない系で試験マーカーと同一のセレクターコドンを含む「バックグラウンド」又は「陰性」対照マーカー構築物に試験マーカーを比較することにより精密化することができる。この陰性対照は該当翻訳系におけるマーカーからのバックグラウンドシグナル効果を考慮するように抑圧百分率測定値を正規化するのに有用である。

【0037】

抑圧効率は当分野で公知の多数のアッセイの任意のものにより測定することができる。例えば、-ガラクトシダーゼレポーターアッセイを使用することができ、例えば本発明のO-tRNAを含むプラスミドと共に修飾lacZプラスミド（構築物はlacZ核酸配列中にセレクターコドンをもつ）を適当な生物（例えば直交成分を使用することができる生物）に由来する細胞に導入する。コグネイトシンテターゼも（ポリペプチド又は発現されるとコグネイトシンテターゼをコードするポリヌクレオチドとして）導入することができる。細胞を培地で所望密度（例えばOD₆₀₀ = 約0.5）まで増殖させ、例えばBetaFluor（登録商標）-ガラクトシダーゼアッセイキット（Novagen）を使用して-ガラクトシダーゼアッセイを実施する。比較可能な対照（例えば所望位置にセレクターコドンではなく対応するセンスコドンをもつ修飾lacZ構築物から観測される値）に対するサンプルの活性百分率として抑圧百分率を計算することができる。

10

【0038】

翻訳系：「翻訳系」なる用語は成長中のポリペプチド鎖（蛋白質）にアミノ酸を組込む成分を意味する。翻訳系の成分としては例えばリボソーム、tRNA、シンテターゼ、mRNA等を挙げることができる。本発明のO-tRNA及び/又はO-RSは例えば非真核細胞（例えば細菌（例えば大腸菌））、又は真核細胞（例えば酵母細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、藻類細胞、真菌細胞、昆虫細胞、及び/又は同等物）でin vitro又はin vivo翻訳系に付加するか又はその一部とすることができます。所定態様では、翻訳系はin vitroとすることができます、宿主細胞の代わりに細胞抽出液を使用する。

20

【0039】

非天然アミノ酸：本明細書で使用する「非天然アミノ酸」なる用語は20種の標準天然アミノ酸の1種又はセレノシステインもしくはピロリジン以外の任意アミノ酸、修飾アミノ酸、及び/又はアミノ酸類似体（例えばGalNAcアミノ酸）を意味する。

30

【0040】

から誘導：本明細書で使用する「から誘導」なる用語は特定分子もしくは生物から単離されているか、あるいは特定分子もしくは生物を使用するか又は特定分子もしくは生物からの情報を使用して作製された成分を意味する。例えば、第2のポリペプチドから誘導されるポリペプチドは第2のポリペプチドのアミノ酸配列と同一又は実質的に同様のアミノ酸配列を含む。ポリペプチドの場合には、誘導種は例えば自然突然変異誘発、人工的特異的突然変異誘発又は人工的ランダム突然変異誘発により得ることができる。ポリペプチドを誘導するために使用される突然変異誘発は意図的に特異的でも意図的にランダムでもよい。第1のポリペプチドから誘導される別のポリペプチドを作製するためのポリペプチドの突然変異誘発は（例えばポリメラーゼの非忠実性に起因する）ランダムなイベントとすることができる、誘導されたポリペプチドの同定は偶然とすることができます。ポリペプチドの突然変異誘発は一般にポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの操作を伴う。

40

【0041】

ポジティブ選択又はスクリーニングマーカー：本明細書で使用する「ポジティブ選択又はスクリーニングマーカー」なる用語は、このマーカーが存在する（例えば発現、活性化等される）場合に、該当形質をもたない細胞からこの形質を含む細胞（例えばポジティブ選択マーカーをもつ細胞）を識別するマーカーを意味する。

【0042】

ネガティブ選択又はスクリーニングマーカー：本明細書で使用する「ネガティブ選択又はスクリーニングマーカー」なる用語は、このマーカーが存在する（例えば発現、活性化等される）場合に、（例えば選択性質又は形質をもつ細胞に対して）選択性質又は形質を

50

もたない細胞を識別することができるマーカーを意味する。

【0043】

レポーター：本明細書で使用する「レポーター」なる用語は該当系のターゲット成分を同定及び／又は選択するために使用することができる成分を意味する。例えば、レポーターとしては蛋白質、例えば抗生物質耐性又は感受性を付与する酵素（例えば - ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）等）、蛍光スクリーニングマーカー（例えば緑色蛍光蛋白質（例えばG F P）、Y F P、E G F P、R F P等）、発光マーカー（例えばホタルルシフェラーゼ蛋白質）、アフィニティースクリーニングマーカー、又はポジティブもしくはネガティブ選択マーカー遺伝子（例えばl a c Z、- g a l / l a c Z（- ガラクトシダーゼ）、A D H（アルコールデヒドロゲナーゼ）、h i s 3、u r a 3、l e u 2、l y s 2等）を挙げることができる。

10

【0044】

真核生物：本明細書で使用する「真核生物」なる用語は真核生物界に属する生物を意味する。真核生物はその構成が一般に多細胞であり（但し、例えば酵母のように多細胞ではないものもある）、膜結合核と他の膜結合オルガネラが存在し、遺伝物質が線状であり（即ち染色体が線状）、オペロンが存在せず、イントロン、メッセージキャッピング及びポリA m R N A が存在し、更に他の生化学的特徴（例えば特徴的リボソーム構造）により一般に原核生物から区別できる。真核生物としては例えば動物（例えば哺乳動物、昆虫、爬虫類、鳥類等）、纖毛虫、植物（例えば单子葉植物、双子葉植物、藻類等）、真菌類、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物等が挙げられる。

20

【0045】

原核生物：本明細書で使用する「原核生物」なる用語はモネラ界（原核生物界とも言う）に属する生物を意味する。原核生物はその構成が单細胞であり、出芽又は分裂による無性生殖であり、膜結合核又は他の膜結合オルガネラをもたず、染色体が環状であり、オペロンが存在し、イントロン、メッセージキャッピング及びポリA m R N A が存在せず、更に他の生化学的特徴（例えば特徴的リボソーム構造）により一般に真核生物から区別できる。原核生物は真正細菌及び古細菌亜界を含む。シアノバクテリア（藍藻類）とマイコプラズマをモネラ界の別々の分類にする場合もある。

30

【0046】

細菌：本明細書で使用する「細菌」及び「真正細菌」なる用語は「古細菌」から区別できる原核生物を意味する。同様に、古細菌は真核生物から区別できる原核生物を意味する。真正細菌と古細菌は多数の形態学的及び生化学的基準により区別することができる。例えば、リボソームR N A配列、R N Aポリメラーゼ構造、イントロンの有無、抗生物質感受性、細胞壁ペプチドグリカン及び他の細胞壁成分の有無、膜脂質構造の分岐の有無、並びにヒストン及びヒストン様蛋白質の有無を使用して生物を真正細菌又は古細菌に分類する。

【0047】

真正細菌の例としては、E s c h e r i c h i a c o l i、T h e r m u s t h e r m o p h i l u s 及びB a c i l l u s s t e a r o t h e r m o p h i l u s が挙げられる。古細菌の例としては、M e t h a n o c o c c u s j a n n a s c h i i (M j)、M e t h a n o s a r c i n a m a z e i (M m)、M e t h a n o b a c t e r i u m t h e r m o a u t o t r o p h i c u m (M t)、M e t h a n o c o c c u s m a r i p a l u d i s、M e t h a n o p y r u s k a n d l e r i、H a l o b a c t e r i u m (例えばH a l o f e r a x v o l c a n i i 及びH a l o b a c t e r i u m種N R C - 1)、A r c h a e o g l o b u s f u l g i d u s (A f)、P y r o c o c c u s f u r i o s u s (P f)、P y r o c o c c u s h o r i k o s h i i (P h)、P y r o b a c u l u m a e r o p h i l u m、P y r o c o c c u s a b y s s i、S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s (S s)、S u l f o l o b u s t o k o d a i i、A e u r o p y r u m p e r n i x (A p)、T h e r m o p l a s m a a c i d o p h i l u m 及びT h e r m o p l a s

40

50

ma volcaniumが挙げられる。

【0048】

保存変異体：翻訳成分に関して本明細書で使用する「保存変異体」なる用語は類似する基本成分（例えばO-tRNA又はO-RS）と同様に機能するが、参照O-tRNA又はO-RSに比較して配列に変異をもつ翻訳成分（例えば保存変異体O-tRNA又は保存変異体O-RS）を意味する。例えば、O-RS、又はこのO-RSの保存変異体はコグネイトO-tRNAを非天然アミノ酸（例えばN-アセチルガラクトサミン部分を含むアミノ酸）でアミノアシル化する。この例では、O-RSと保存変異体O-RSは同一アミノ酸配列をもたない。保存変異体はこの保存変異体が対応するO-tRNA又はO-RSに相補的である限り、例えば配列の1カ所、2カ所、3カ所、4カ所、又は5カ所以上に変異をもつことができる。

10

【0049】

所定態様では、保存変異体O-RSは親O-RSに比較して1カ所以上の保存アミノ酸置換を含む。所定態様では、保存変異体O-RSは親O-RSに比較して1カ所以上の保存アミノ酸置換を含むと共に、O-RS生物活性を維持し、例えば親O-RS分子の生物活性の少なくとも10%を維持し、あるいは、少なくとも20%、少なくとも30%、又は少なくとも40%を維持する保存変異体O-RSが挙げられる。所定の好ましい態様では、保存変異体O-RSは親O-RS分子の生物活性の少なくとも50%を維持する。保存変異体O-RSの保存アミノ酸置換はアミノ酸結合ポケットを含むO-RSの任意ドメインに生じることができる。

20

【0050】

選択又はスクリーニング物質：本明細書で使用する「選択又はスクリーニング物質」なる用語はこのような物質が存在すると、集団から所定成分を選択／スクリーニングすることができる物質を意味する。例えば、選択又はスクリーニング物質としては限定されないが、例えば栄養素、抗生物質、光波長、抗体、発現されたポリヌクレオチド等が挙げられる。選択物質は例えば濃度、強度等を変動させることができる。

【0051】

～に応答して：本明細書で使用する「～に応答して」なる用語は本発明のtRNAがセレクターコドンを認識し、tRNAと結合したGalNAcアミノ酸を成長中のポリペプチド鎖に組込むのを媒介するプロセスを意味する。

30

【0052】

コードする：本明細書で使用する「コードする」なる用語は第1の分子又は配列鎖とは異なる第2の分子又は配列鎖の生産を誘導するためにポリマー巨大分子又は配列鎖中の情報を使用する任意プロセスを意味する。本明細書ではこの用語を広義に使用し、種々に適用することができる。1側面では、「コードする」なる用語は新規に合成された相補的姉妹鎖をDNA依存性DNAポリメラーゼによりコードするための鋳型として2本鎖DNA分子の一方の鎖を使用する半保存的DNA複製プロセスを意味する。

【0053】

別の側面では、「コードする」なる用語は第1の分子とは異なる化学的性質をもつ第2の分子の生産を誘導するためにある分子中の情報を使用する任意プロセスを意味する。例えば、DNA分子は（例えばDNA依存性RNAポリメラーゼ酵素を含む転写プロセスにより）RNA分子をコードすることができる。また、RNA分子は翻訳プロセスと同様にポリペプチドをコードすることができる。翻訳プロセスについて使用する場合には、「コードする」なる用語はアミノ酸をコードするトリプレットコドンにも適用する。所定側面では、RNA分子は例えばRNA依存性DNAポリメラーゼを含む逆転写プロセスによりDNA分子をコードすることができる。別の側面では、DNA分子はポリペプチドをコードすることができ、この場合に使用する「コードする」とは当然のことながら転写プロセスと翻訳プロセスの両者を含む。

40

【0054】

糖部分：本明細書で使用する「糖部分」なる用語は天然及び非天然糖部分を意味する（

50

即ち、非天然糖部分、例えば1個以上のヒドロキシル又はアミノ位を修飾（例えば脱ヒドロキシル化、脱アミノ化、アセチル化、エステル化等）された糖部分、例えば2-デオキシG a 1は非天然糖部分の1例である）。「糖質」なる用語は一般式($\text{C H}_2\text{O}$)_nをもち、限定されないが、例えば単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類が挙げられる。オリゴ糖は糖単位（糖とも言う）から構成される鎖である。糖単位は任意順序で配置することができ、2個の糖単位間の結合は約10種の異なる方法の任意のものとすることができます。

【0055】

本明細書ではグルコシルに関連する以下の略称を使用する：

A r a = アラビノシル；

F r u = フルクトシル；

F u c = フコシル；

G a l = ガラクトシル；

G a l N A c = N-アセチルガラクトサミニル；

G l c = グルコシル；

G l c N A c = N-アセチルグルコサミニル；

M a n = マンノシル；及び

N e u A c = シアリル（一般にN-アセチルノイラミニル）。

【0056】

本欄及び以下に特に定義しない限り、本明細書で使用する全科学技術用語は本発明が属する分野の当業者に通常理解されている通りの意味をもつ。

【発明を実施するための最良の形態】

【0057】

蛋白質の翻訳後修飾は代謝、シグナル伝達、及び遺伝子発現をはじめとする多数の生体プロセスを調節する。しかし、選択的に修飾された蛋白質の均質集団の作製に関連する合成の問題により、蛋白質構造及び機能に及ぼすこれらの修飾の効果に関する詳細な研究は妨げられている。例えば、グリコシル化は真核生物で最も一般的な蛋白質の翻訳後修飾の1種であり、フォールディングや分泌から生体分子認識及び血清半減期に至る広範な蛋白質機能に影響を与える。例えばR. A. Dwek, (1996) Chem. Rev. 96: 683参照。

【0058】

グリコシル化の効果の解明はかなり進んだが、オリゴ糖鎖の具体的な役割とその構造と機能の関係についてはまだ解明され始めたばかりである。例えば、C. R. Bertozzi, & L. L. Kiessling, (2001) Science 291: 2357参照。主な問題は糖蛋白質が一般に糖形態の混合物として産生されるため、天然源から固有糖形態を単離しにくい点である。規定構造の糖形態を合成するために種々の方法が開発されているが、産生される糖蛋白質のサイズ、量、及び/又は品質に大きな制約がある。例えばP. Sears, & C. H. Wong, (2001) Science 291: 2344; M. Wackerら, (2002) Science 298: 1790; B. G. Davis, (2002) Chem. Rev. 102: 579; 及びH. C. Haung, & C. R. Bertozzi, (2001) Acc. Chem. Res. 34: 727参照。

【0059】

本発明はこの問題と他の問題を解決し、糖蛋白質及び糖蛋白質ミメティクス、並びに所望グリコシル化パターンをもつ糖蛋白質の高効率新規合成方法を提供する。本発明の糖蛋白質及び糖蛋白質ミメティクスは均質な糖形態の治療用糖蛋白質の生産及び/又はグリコシル化蛋白質の構造と機能に関する研究の助長に有用である。

【0060】

本発明により提供される解決方法は直交翻訳成分を使用してN-アセチルガラクトサミニン部分を含む非天然アミノ酸を蛋白質にプログラム下で部位特異的に生合成的に組込む方法を使用する。このストラテジーの結果、遺伝コードを拡張し、N-アセチルガラクトサ

10

20

30

40

50

ミンアミノ酸を生物翻訳レパートリーに付加する。このアプローチは宿主細胞（例えば真正細菌大腸菌細胞）の *in vivo* 蛋白質合成機構を使用して成長中の蛋白質鎖に非天然アミノ酸を直接組込むために「直交」tRNAと対応する新規「直交」アミノアシルtRNAシンテーゼを使用することにより実現可能になる。

【0061】

本発明ではアンバーナンセンスコドンTAGに応答して真正細菌宿主細胞（例えば大腸菌）で産生される蛋白質にN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）アミノ酸を高い効率で遺伝的に組込むための新規直交翻訳系の進化について報告する。本明細書に記載する新規組成物及び方法は直交tRNA(O-tRNA) / アミノアシルtRNAシンテーゼ(O-RS)系を利用し、直交系はMethanococcus janaschii 10 に由来する成分を使用し、これらの成分は該当蛋白質を生産するために真正細菌宿主系で使用される。N-アセチルガラクトサミンアミノ酸の蛋白質組込みはN-アセチルガラクトサミンアミノ酸の組込みを指示するセレクターコドンを含むように該当蛋白質をコードするポリヌクレオチドを組換えることにより任意所望位置で行われるようにプログラムすることができる。

直交tRNA / アミノアシルtRNAシンテーゼ技術

【0062】

本発明の新規組成物及び方法の理解は直交tRNAと直交アミノアシルtRNAシンテーゼの対に関連する活性を理解することにより容易になる。直交tRNA及びアミノアシルtRNAシンテーゼ技術については例えば、Wangら, (2001), Science 292: 498 - 500; Chinら, (2002) Journal of the American Chemical Society 124: 9026 - 90 27; Chin and Schultz, (2002), ChemBioChem 1 20 1: 1135 - 1137; Chinら, (2002), PNAS United States of America 99: 11020 - 11024; 及びWang and Schultz, (2002), Chem. Comm., 1 - 10に記載されている。国際公開WO2002/086075、発明の名称「直交tRNA - アミノアシルtRNAシンテーゼ対を作製するための方法及び組成物 (METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA AMINOACYL - tRNA SYNTHETASE PAIRS)」; WO2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み (IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS)」; WO2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張 (EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE)」; WO2005/019415 (出願日2004年7月7日); WO2005/007870 (出願日2004年7月7日); 及びWO2005/007624 (出願日2004年7月7日)も参照。これらの文献及び公開特許出願は各々その開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む。

【0063】

付加反応性非天然アミノ酸（例えばGalNAcアミノ酸）を遺伝コードに付加するためには、宿主翻訳機構で効率的に機能することができるが、対が翻訳系に内在性のシンテーゼ及びtRNAから独立して機能するという意味で該当翻訳系に対して「直交性」のアミノアシルtRNAシンテーゼと適切なtRNAを含む新規直交対が必要である。直交対の所望特徴としては、内在tRNAによりデコードされない特定新規コドン（例えばセレクターコドン）のみをデコード又は認識するtRNAと、そのコグネイトtRNAをただ1種の特定非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化（又は負荷）するアミノアシルtRNAシンテーゼが挙げられる。O-tRNAは一般に内在シンテーゼによりアミノアシル化されない。例えば大腸菌では、直交対は例えば大腸菌に存在する40種の内在tRNAのいずれとも交差反応しないアミノアシルtRNAシンテーゼと、例えば大腸菌に存在する21種の内在シンテーゼのいずれによってもアミノアシル化されない直交

10

20

30

40

50

tRNAを含む。

【0064】

本発明は真正細菌（例えば大腸菌）の蛋白質にGalNAcアミノ酸を遺伝的にコードさせて組込むための直交対を提供し、直交成分は宿主細胞の翻訳機構の内在大腸菌成分と交差反応しないが、所望非天然アミノ酸を認識し、アンバーナンセンスコドンTAGに応答して蛋白質に組込む。本発明により提供される直交成分としては、Methanococcus jannaschiiチロシルtRNAシンテターゼから誘導される直交アミノアシルtRNAシンテターゼと、突然変異体チロシルtRNA_{cua}アンバーサプレッサーが挙げられる。この系では、突然変異体アミノアシルtRNAシンテターゼはサプレッサーtRNAを例えばGalNAc- -スレオニンでアミノアシル化するが、20種の標準アミノ酸にいずれでもアミノアシル化しない。

10

【0065】

本発明はGalNAcアミノ酸を蛋白質に組込むために使用することができる付加直交tRNA-アミノアシルtRNAシンテターゼ対（例えばO-tRNA/O-RS対）の組成物と、前記対の同定及び作製方法を提供する。本発明のO-tRNAはO-tRNAにより認識されるセレクターコドンを含むポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質へのGalNAcアミノ酸の例えばin vivoでの組込みを媒介することができる。O-tRNAのアンチコドンループはmRNA上のセレクターコドンを認識し、そのアミノ酸（例えばGalNAcアミノ酸）をポリペプチドのこの部位に組込む。本発明の直交アミノアシルtRNAシンテターゼはそのO-tRNAをただ1種の特定GalNAcアミノ酸で優先的にアミノアシル化（又は負荷）する。

20

【0066】

例えば、本明細書に実証するように、アミノ酸GalNAc- -スレオニンはセレクターコドン（例えばTAGコドン）に応答して真正細菌細胞（大腸菌；E.coli）の蛋白質に選択的且つ効率的に組込まれた。GalNAcアミノ酸を蛋白質に部位特異的に組込むことができると、蛋白質の研究を助長できると共に、新規特性をもつ蛋白質の開発が可能になる。

直交tRNA/直交アミノアシルtRNAシンテターゼ及び翻訳系

【0067】

1種以上の非天然アミノ酸を含む蛋白質の作製に適した翻訳系は例えば国際公開WO2002/086075、発明の名称「直交tRNA-アミノアシルtRNAシンテターゼ対を作製するための方法及び組成物（METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS）」；WO2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み（IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS）」；WO2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張（EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE）」；WO2005/019415（出願日2004年7月7日）；WO2005/007870（出願日2004年7月7日）；及びWO2005/007624（出願日2004年7月7日）に記載されている。これらの各出願はその開示内容全体を参考資料として本明細書に組込む。このような翻訳系は一般に直交tRNA（O-tRNA）と、直交アミノアシルtRNAシンテターゼ（O-RS）と、非天然アミノ酸（本発明ではGalNAcアミノ酸）を含む細胞（例えば大腸菌等の非真核細胞又は酵母等の真核細胞とすることができます）を含み、O-RSはO-tRNAをGalNAcアミノ酸でアミノアシル化する。本発明の直交対はO-tRNA（例えばサプレッサーtRNA、フレームシフトtRNA等）とO-RSを含む。本発明は個々の成分も提供する。

30

【0068】

本発明は例えば本発明の方法、翻訳系及び/又はキットを使用して糖蛋白質を作製するに使用する新規直交tRNAシンテターゼ（O-RS）を提供する。O-RSに加え、

40

50

前記方法、翻訳系及びキットは一般に更に直交 t RNA (例えは、サプレッサー t RNA 、フレームシフト t RNA 等) と、 O - RS が O - t RNA をアミノアシル化するのに使用するグリコシル含有非天然アミノ酸を含む。複数の直交 t RNA / シンテターゼ対 (O - t RNA と O - RS) が開発されるならば、各種コドンを使用して複数の非天然アミノ酸を同時に組込むことが可能になる。表 3 は本発明の代表 O - RS 及び O - t RNA 配列を示す。

【 0069 】

一般に、直交対がセレクターコドンを認識し、セレクターコドンに応答してアミノ酸を負荷するとき、直交対はセレクターコドンを「抑圧」すると言う。即ち、翻訳系の (例えは細胞の) 内在機構により認識されないセレクターコドンは通常翻訳されないので、非抑圧下で核酸から翻訳されるポリペプチドの生産を阻止することができる。本発明の O - t RNA はセレクターコドンを認識し、本明細書の配列表に記載するようなポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされる O - t RNA の抑圧効率に比較してコグネイトシンテターゼの存在下でセレクターコドンに応答して少なくとも例えは約 45% 、 50% 、 60% 、 75% 、 80% 、又は 90% 以上の抑圧効率を含む。 O - RS は O - t RNA を該当非天然アミノ酸 (例えは GalNAc アミノ酸) でアミノアシル化する。細胞は例えは該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を介して成長中のポリペプチド鎖に非天然アミノ酸を組込むために O - t RNA / O - RS 対を使用し、ポリヌクレオチドは O - t RNA により認識されるセレクターコドンを含む。所定の望ましい側面では、細胞は付加 O - t RNA / O - RS 対を含むことができ、付加 O - t RNA は付加 O - RS により別の非天然アミノ酸を負荷される。例えは、 O - t RNA の一方は 4 塩基コドンを認識することができ、他方は終止コドンを認識することができる。あるいは、複数の異なる終止コドン又は複数の異なる 4 塩基コドンが異なるセレクターコドンを特異的に認識することができる。

10

20

30

40

【 0070 】

本発明の所定態様では、直交 t RNA (O - t RNA) と、直交アミノアシル t RNA シンテターゼ (O - RS) と、 GalNAc アミノ酸と、該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む細胞 (例えは大腸菌細胞) が提供され、ポリヌクレオチドは O - t RNA により認識されるセレクターコドンを含む。翻訳系は無細胞系でもよく、例えは各種市販「 in vitro 」転写 / 翻訳系の任意のものを本明細書に記載するような O - t RNA / O RS 対及び非天然アミノ酸と併用することができる。

【 0071 】

1 態様では、 O - RS と O - t RNA の併用による抑圧効率は O - RS の不在下の O - t RNA の抑圧効率の例えは約 5 倍、 10 倍、 15 倍、 20 倍、又は 25 倍以上である。 1 側面では、 O - RS と O - t RNA の併用による抑圧効率は本明細書の配列表に記載するような直交シンテターゼ対の抑圧効率の少なくとも例えは約 35% 、 40% 、 45% 、 50% 、 60% 、 75% 、 80% 、又は 90% 以上である。

【 0072 】

上記のように、本発明は場合により細胞又は他の翻訳系に複数の O - t RNA / O - RS 対を含み、 2 種以上の非天然アミノ酸 (例えは GalNAc アミノ酸と別の非天然アミノ酸) を組込むことができる。例えは、細胞は更に別の付加 O - t RNA / O - RS 対と第 2 の非天然アミノ酸を含むことができ、この付加 O - t RNA は第 2 のセレクターコドンを認識し、この付加 O - RS は O - t RNA を第 2 の非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する。例えは、 O - t RNA / O - RS 対 (O - t RNA は例えはアンバーセレクターコドンを認識する) を含む細胞は更に第 2 の直交対 (例えはロイシル、リシル、グルタミル等) を含むことができる (第 2 の O - t RNA は別のセレクターコドン、例えはオバールコドン、 4 塩基コドン等を認識する) 。各直交対は異なるセレクターコドンの認識を助長できるように異なる起源に由来することが望ましい。

【 0073 】

O - t RNA 及び / 又は O - RS は天然に存在するものでもよいし、例えは種々の生物

50

の任意のものに由来する tRNA のライブラリー及び / 又は RS のライブラリーを作製するか及び / 又は種々の利用可能な突然変異ストラテジーの任意のものを使用することにより、天然に存在する tRNA 及び / 又は RS の突然変異により誘導してもよい。例えば、直交 tRNA / アミノアシル tRNA シンテターゼ対を作製するための 1 つのストラテジーは例えば宿主細胞以外の起源又は多重起源に由来する（宿主に対して）異種の tRNA / シンテターゼ対を宿主細胞に導入する方法である。異種シンテターゼ候補の特性としては、例えば宿主細胞 tRNA に負荷しないことが挙げられ、異種 tRNA 候補の特性としては、例えば宿主細胞シンテターゼによりアミノアシル化されないことが挙げられる。更に、異種 tRNA は全宿主細胞シンテターゼに対して直交性である。

【0074】

10

直交対を作製するための第 2 のストラテジーは O - tRNA 又は O - RS をスクリーニング及び / 又は選択するための突然変異体ライブラリーを作製する方法である。これらのストラテジーを組み合わせてもよい。

直交 tRNA (O - tRNA)

【0075】

20

本発明の直交 tRNA (O - tRNA) は O - tRNA により認識されるセレクターコドンを含むポリヌクレオチドによりコードされる蛋白質への非天然アミノ酸（例えば糖部分を含む非天然アミノ酸、例えば G a l N A c アミノ酸）の例えば in vivo 又は in vitro での組込みを媒介することが望ましい。所望セレクターコドンに対応するアンチコドン配列を含む O - tRNA は対応する O - RS でしかアミノアシル化することができず、内在シンテターゼではアミノアシル化することができない。所定態様では、本発明の O - tRNA は本明細書の配列表の O - tRNA 配列に記載するようなポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされる O - tRNA に比較してコグネイトシンテターゼの存在下でセレクターコドンに応答して少なくとも例えば約 45%、50%、60%、75%、80%、又は 90% 以上の抑圧効率を含む。

【0076】

30

本発明の方法、翻訳系、及びキットで使用することができる O - tRNA の 1 例は配列番号 17 である。tRNA 分子では、チミン (T) はウラシル (U) に置換されるが、塩基に付加修飾を加えてよい。本発明は O - tRNA の保存変異体も含む。例えば、O - tRNA の保存変異体としては、配列番号 17 の O - tRNA と同様に機能し、tRNA L 形構造を維持するが、同一配列をもたない（と共に野生型 tRNA 分子でもない）分子が挙げられる。本明細書の「核酸及びポリペプチド配列と変異体」のセクションも参照。組換え直交 tRNA (O - tRNA) の作製方法は国際特許出願 WO 2002 / 086075，前出に記載されている。

【0077】

40

組換え直交 tRNA の他の作製方法も例えば国際特許出願 WO 2002 / 086075、Forsterら, (2003) "Programming peptidomimetic synthetases by translating genetic codes designed de novo" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (11) : 6353 - 6357; 及び Fengら, (2003) "Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (10) : 5676 - 5681 に記載されている。

【0078】

50

特定直交翻訳系（又は前記系の任意成分、例えば O - tRNA 又は O - RS）の抑圧効率は当分野で公知の多数のアッセイの任意のものにより測定することができる。例えば、 - ガラクトシダーゼレポーターアッセイを使用することができ、例えば本発明の O - tRNA を含むプラスミドと共に修飾 lacZ プラスミド（構築物は lacZ 核酸配列中にセレクターコドンをもつ）を適当な生物（例えば直交成分を使用することができる生物）

に由来する細胞に導入する。コグネイトシンテーゼも（ポリペプチド又は発現されるとコグネイトシンテーゼをコードするポリヌクレオチドとして）導入することができる。細胞を培地で所望密度（例えばOD₆₀₀ = 約0.5）まで増殖させ、例えばBetafluor（登録商標）-ガラクトシダーゼアッセイキット（Novagen）を使用して-ガラクトシダーゼアッセイを実施する。比較可能な対照（例えば所望位置にセレクターコドンではなく対応するセンスコドンをもつ修飾lacz構築物から観測される値）に対するサンプルの活性百分率として抑圧百分率を計算することができる。

【0079】

本発明のO-tRNAの例を本明細書の配列表に記載する。代表的O-tRNA及びO-RS分子の配列については本明細書の表、実施例及び図面も参照。更に、本明細書の「核酸及びポリペプチド配列と変異体」のセクションも参照。O-RS mRNA又はO-tRNA分子等のRNA分子では、所与配列又はその相補配列に対してチミン（T）がウラシル（U）で置換されている（コーディングDNAでは逆）。塩基に付加修飾を加えてもよい。

10

【0080】

本発明は本明細書に記載する特定O-tRNAに対応するO-tRNAの保存変異体も含む。例えば、O-tRNAの保存変異体としては、例えば本明細書の配列表に記載するような特定親O-tRNAと同様に機能し、適当な自己相補性によりtRNA L形構造を維持するが、例えば本明細書の配列表、図面又は実施例に記載する配列と同一配列をもたない分子が挙げられる（更に野生型tRNA分子以外のものであることが望ましい）。

20

【0081】

O-tRNAを含む組成物は更に直交アミノアシルtRNAシンテーゼ（O-RS）を含むことができ、O-RSはO-tRNAを非天然アミノ酸（例えばGalanacアミノ酸）で優先的にアミノアシル化する。所定態様では、O-tRNAを含む組成物は更に（例えばin vitro又はin vivo）翻訳系を含むことができる。該当ポリペプチドをコードし、O-tRNAにより認識されるセレクターコドンを含むポリヌクレオチドを含む核酸、又はこれらの1種以上の組み合わせも細胞に加えることができる。

【0082】

直交tRNA（O-tRNA）の作製方法も本発明の特徴である。本方法により作製されたO-tRNAも本発明の特徴である。本発明の所定態様では、O-tRNAは突然変異体ライブラリーを作製することにより作製することができる。突然変異体tRNAのライブラリーは当分野で公知の種々の突然変異誘発技術を使用して作製することができる。例えば、突然変異体tRNAは部位特異的突然変異、ランダム点突然変異、相同組換え、DNAシャフリング又は他の帰納的突然変異誘発法、キメラ構築又はその任意組み合わせにより作製することができる。

30

【0083】

tRNAの所望ループ又は領域（例えばアンチコドンループ、受容体ステム、Dアーム又はループ、可変ループ、TPCアーム又はループ、tRNA分子の他の領域又はその組合せ）の特定位置（例えば非保存位置又は保存位置）、ランダム位置又は両者の組合せに付加突然変異を導入することができる。一般に、tRNAの突然変異としてはセレクターコドンの認識を可能にするよう突然変異体tRNAライブラリーの各メンバーのアンチコドンループを突然変異させる方法が挙げられる。この方法は更にO-tRNAの末端に付加配列（CCA）を付加する段階を含むことができる。一般に、O-tRNAは所望RSに対するその親和性等を維持しながら、出発材料（例えば複数のtRNA配列）に比較して所望生物に対する直交性が改善されている。

40

【0084】

前記方法は場合によりtRNA及び/又はアミノアシルtRNAシンテーゼの配列の類似性（及び/又は推定相同性）を分析し、特定生物に対して直交性であると思われるO-tRNA、O-RS及び/又はその対の潜在候補を決定する段階を含む。分析には、当分野で公知であり、本明細書に記載するコンピュータープログラム（例えばBLAST及

50

び p i l e u p プログラム)を使用することができる。1例では、大腸菌で使用するための潜在的直交翻訳成分を選択するためには、真正細菌生物に密接な配列類似性を示さないシンテターゼ及び/又は t R N A を選択する。

【0085】

一般に、O-t R N A は複数の潜在的O-t R N A のメンバーを含む第1の種の細胞の集団に例えればネガティブ選択を実施することにより得られる。ネガティブ選択は細胞に内在性のアミノアシル t R N A シンテターゼ (R S) によりアミノアシル化される潜在的O-t R N A ライブラリーのメンバーを含む細胞を排除する。こうして、第1の種の細胞に直交性の t R N A プールが得られる。

【0086】

所定態様において、ネガティブ選択では、ネガティブ選択マーカー (例えれば抗生物質耐性を付与する酵素 (例えば - ラクタマーゼ) 、検出可能な産物を付与する酵素 (例えば - ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)) 、例えれば毒性物質 (例えばバルナーゼ)) をコードするポリヌクレオチドの (例えれば機能的バルナーゼを依然として產生する) 非必須位置等にセレクターコドンを導入する。場合により選択物質 (例えればアンピシリン等の抗生物質) の存在下で細胞集団を増殖させることによりスクリーニング / 選択を実施する。1態様では、選択物質の濃度を変動させる。

【0087】

例えれば、サプレッサー t R N A の活性を測定するためには、セレクターコドンの i n v i v o 抑圧 (例えればネガティブ選択マーカー (例えば - ラクタマーゼ遺伝子 (b 1 a)) をコードするポリヌクレオチドに導入されたナンセンス又はフレームシフト突然変異) に基づく選択システムを使用する。例えれば、所定位置 (例えば A 1 8 4) にセレクターコドンをもつポリヌクレオチド変異体 (例えば b 1 a 变異体) を構築する。細胞 (例えれば細菌) をこれらのポリヌクレオチドで形質転換する。内在大腸菌シンテターゼにより効率的に負荷することができない直交 t R N A の場合には、抗生物質耐性 (例えればアンピシリン耐性) はプラスミドで形質転換されていない細菌と同等以下のはずである。 t R N A が非直交性の場合、又は t R N A に負荷することが可能な異種シンテターゼをシステムで同時発現させる場合には、より高レベルの抗生物質 (例えればアンピシリン) 耐性が観測される。プラスミドで形質転換されていない細胞と同等の抗生物質濃度の L B 寒天プレートで増殖することができない細胞 (例えれば細菌) を選択する。

【0088】

毒性物質 (例えればリボヌクレアーゼ又はバルナーゼ) の場合には、複数の潜在的 t R N A のメンバーが内在宿主 (例えば大腸菌) シンテターゼによりアミノアシル化されるとき (即ち、宿主 (例えば大腸菌) シンテターゼに非直交性であるとき) には、セレクターコドンは抑圧され、生産される毒性ポリヌクレオチド産物は細胞死を生じる。直交 t R N A 又は非機能的 t R N A を含む細胞は生存する。

【0089】

1態様では、所望生物に直交性の t R N A プールに次にポジティブ選択を実施し、セレクターコドンを例えれば - ラクタマーゼ遺伝子等の薬剤耐性遺伝子によりコードされるポジティブ選択マーカーに配置する。ポジティブ選択は細胞に直交性の t R N A プールのメンバーをコードするか又は前記メンバーを含むポリヌクレオチドと、ポジティブ選択マーカーをコードするポリヌクレオチドと、コグネイト R S をコードするポリヌクレオチドを含む細胞で実施される。所定態様では、第2の細胞集団はネガティブ選択により排除されなかった細胞を含む。ポリヌクレオチドを細胞で発現させ、選択物質 (例えればアンピシリン) の存在下で細胞を増殖させる。次に、同時発現させたコグネイトシンテターゼによりアミノアシル化され、このセレクターコドンに応答してアミノ酸を挿入することができる t R N A を選択する。一般に、これらの細胞は非機能的 t R N A 、又は該当シンテターゼにより効率的に認識することができない t R N A を含む細胞に比較して高い抑圧効率を示す。非機能的 t R N A 又は該当シンテターゼにより効率的に認識されない t R N A を含む細胞は抗生物質に感受性である。従って、(i) 内在宿主 (例えば大腸菌) シンテターゼ

10

20

30

40

50

の基質ではなく；(i i)該当シンテターゼによりアミノアシル化することができ；(i i)翻訳で機能的なtRNAが両者選択後に生存している。

【0090】

従って、スクリーニングされる状況に応じて同一マーカーがポジティブマーカーにもネガティブマーカーにもなる。即ち、マーカーがポジティブスクリーニングされる場合にはポジティブマーカーであり、ネガティブスクリーニングされる場合にはネガティブマーカーである。

【0091】

上記方法における選択（例えばポジティブ選択、ネガティブ選択又はポジティブ選択とネガティブ選択の両者）のストリンジエンシーは場合により選択ストリンジエンシーの変動を含む。例えば、バルナーゼは極毒性蛋白質であるので、異なる数のセレクターコドンをバルナーゼ遺伝子に導入するか及び／又は誘導プロモーターを使用することによりネガティブ選択のストリンジエンシーを制御することができる。別の例では、選択又はスクリーニング物質の濃度（例えばアンピシリン濃度）を変動させる。本発明の1側面では、初期ラウンド中の所望活性は低いと思われる所以ストリンジエンシーを変動させる。即ち、初期ラウンドでは低ストリンジエンシー選択基準を適用し、後期ラウンドの選択では高ストリンジエンシー基準を適用する。所定態様では、ネガティブ選択、ポジティブ選択又はネガティブ選択とポジティブ選択の両方を複数回反復することができる。複数の異なるネガティブ選択マーカー、ポジティブ選択マーカー又はネガティブ選択マーカーとポジティブ選択マーカーの両方を使用することができる。所定態様では、ポジティブ選択マーカーとネガティブ選択マーカーを同一にすることができる。

10

20

30

【0092】

本発明ではセレクターコドンに応答して非天然アミノ酸（例えばGalNAcアミノ酸）を負荷する直交翻訳成分（例えばO-tRNA、O-RS、及びO-tRNA/O-RS対）を作製するために他の型の選択／スクリーニングを使用することもできる。例えば、ネガティブ選択マーカー、ポジティブ選択マーカー又はポジティブ選択マーカーとネガティブ選択マーカーの両方として、適切な反応体の存在下で蛍光発光するか又は発光反応を触媒するマーカーを使用することができる。別の態様では、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）又は発光によりマーカーの産物を検出する。場合により、マーカーはアフイニティースクリーニングマーカーを含む。Francisco, J. A.ら, (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface. Proc Natl Acad Sci U S A. 90:10444-8も参照。

40

【0093】

組換え直交tRNAの他の作製方法も例えば国際出願公開WO2002/086075、発明の名称「直交tRNA-アミノアシルtRNAシンテターゼ対を作製するための方法及び組成物（METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS）」；WO2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張（EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE）」；及びWO2005/019415（出願日2004年7月7日）に記載されている。Forsterら, (2003) Programming peptidomimetic synthetases by translating genetic codes designed de novo PNAS 100(11):6353-6357；及びFengら, (2003), Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change, PNAS 100(10):5676-5681も参照。

50

直交アミノアシル t R N A シンテターゼ (O - R S)

【0094】

本発明のO - R S はO - t R N A を非天然アミノ酸（例えばGalNAc - - スレオニン等のGalNAcアミノ酸）で優先的にin vitro又はin vivoアミノアシル化する。本発明のO - R S はO - R S を含むポリペプチド及び/又はO - R S 又はその一部をコードするポリヌクレオチドにより翻訳系（例えば細胞）に提供することができる。例えば、O - R S の1例は本明細書の配列表と実施例に記載するようなアミノ酸配列、又はその保存変異体を含む。別の例では、O - R S 、又はその一部は本明細書の配列表又は実施例に記載する配列を含むアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列、又はその相補的ポリヌクレオチド配列によりコードされる。例えば、代表的O - R S 分子の配列については本明細書の表及び実施例参照。本明細書の「核酸及びポリペプチド配列と変異体」のセクションも参照。

10

【0095】

本発明のO - R S は糖部分を含む非天然アミノ酸でO - t R N A を優先的にin vitro又はin vivoアミノアシル化する。本発明のO - R S はO - R S を含むポリペプチド及び/又はO - R S (又はその触媒部分)をコードするポリヌクレオチドにより翻訳系（例えば細胞又はin vivo翻訳系）に提供することができる。本発明の糖蛋白質合成法で使用する代表的直交t R N A シンテターゼのアミノ酸配列を配列番号1~4及び11~13に示す。あるいは、O - R S 、又はその一部は配列番号6~9及び14~16のいずれか1種のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、又は配列番号1~4もしくは11~13を含むアミノ酸をコードする他のポリヌクレオチド配列、又はその相補的ポリヌクレオチド配列によりコードされる。

20

【0096】

O - R S の作製方法は一般に野生型シンテターゼの構成から突然変異体シンテターゼのプールを作製する段階と、次に1種以上の選択非天然アミノ酸（例えば、グリコシル含有アミノ酸）に対するその特異性に基づいて突然変異R S を選択する段階に基づく。O - R S (及びこれが認識するO - t R N A)は天然に存在するものでもよいし、資源と宿主のセクションに記載する種々の生物に由来する天然に存在するt R N A 及び/又はR S の突然変異により誘導してもよい。O - t R N A とO - R S は同一生物に由来するものでもよいが、所定態様では、O - t R N A は第1の生物に由来する天然に存在するか又は天然に存在するものを突然変異させたt R N A から誘導し、O - R S は第2の生物に由来する天然に存在するか又は天然に存在するものを突然変異させたR S から誘導する。

30

【0097】

具体的には、これらの方法は(a)第1の生物に由来する少なくとも1種のt R N A から誘導されるt R N A のライブラリーを作製する段階と、(b)第1の生物に由来するR S の不在下で第2の生物に由来するアミノアシルt R N A シンテターゼ(R S)によりアミノアシル化されるt R N A についてライブラリーをネガティブ選択することによりt R N A のプールを提供する段階と、(c)導入した直交R S (O - R S)によりアミノアシル化されるメンバーについてt R N A のプールを選択することにより少なくとも1種の組換えO - t R N A を提供する段階を含む。組換えO - t R N A はセレクターコドンを認識し、第2の生物に由来するR S により効率的に認識されず、O - R S により優先的にアミノアシル化される。方法は更に、(d)第3の生物に由来する少なくとも1種のアミノアシルt R N A シンテターゼ(R S)から誘導される突然変異体R S のライブラリーを作製する段階と、(e)非天然アミノ酸と天然アミノ酸の存在下で組換えO - t R N A を優先的にアミノアシル化するメンバーについてR S のライブラリーを選択することにより活性R S のプールを提供する段階と、(f)非天然アミノ酸の不在下で少なくとも1種の組換えO - t R N A を優先的にアミノアシル化する活性R S についてプールをネガティブ選択することにより特異的O - t R N A /O - R S 対を提供する段階を含み、特異的O - t R N A /O - R S 対は非天然アミノ酸（例えば糖部分を含む非天然アミノ酸）に特異的な少なくとも1種の組換えO - R S と組換えO - t R N A を含む。

40

50

【0098】

直交対を作製するための1つのストラテジーは突然変異体ライブラリーを作製してこのライブラリーからO-tRNA又はO-RSをスクリーニング及び/又は選択する方法である。直交tRNA/シンテターゼ対を作製するための第2のストラテジーは異種tRNA/シンテターゼ対(例えば別の生物起源の対)を宿主細胞に導入する方法である。異種シンテターゼ候補の性質としては、例えば宿主細胞tRNAに負荷しないことが挙げられ、異種tRNA候補の性質としては、例えば宿主細胞シンテターゼによりアシル化されない(例えば、前記シンテターゼに対して直交性である)ことが挙げられる。

【0099】

直交アミノアシルtRNAシンテターゼの作製方法はシンテターゼを(例えばシンテターゼの活性部位、シンテターゼの編集メカニズム部位、シンテターゼの各種ドメインを組み合わせることにより各種部位等で)突然変異させる段階と、選択プロセスを適用する段階を含む。一般に、ポジティブ及びネガティブ選択基準の併用に基づくストラテジーを使用する。ポジティブ選択ラウンド中に、(ポジティブマーカーの非必須位置に導入した)セレクターコドンが抑圧されると、細胞はポジティブ選択圧下で生存することができる。選択段階は複数回、例えば少なくとも2回実施することが好ましく、場合により、選択物質の濃度を変動させる。従って、天然アミノ酸と非天然アミノ酸の両者の存在下で生存細胞は直交サブレッサーtRNAに天然又は非天然アミノ酸を負荷する活性シンテターゼをコードする。非天然アミノ酸の不在下(ネガティブ選択)では、ネガティブマーカーの非必須位置に導入したセレクターコドンが抑圧されると、天然アミノ酸特異性をもつシンテターゼは除去される。ネガティブ選択とポジティブ選択の生存細胞は直交サブレッサーtRNAを非天然アミノ酸のみでアミノアシル化(負荷)するシンテターゼをコードする。

【0100】

これらのシンテターゼを場合により更に突然変異誘発(例えばDNAシャーフリング、他の帰納的突然変異誘発法、及び/又は当分野で公知の他の突然変異誘発技術)に付すことができる。例えば、部位特異的突然変異、ランダム点突然変異、相同組換え、キメラ構築等により突然変異体RSを作製することができる。RSのキメラライブラリーも本発明に含まれる。

【0101】

O-RSの作製、シンテターゼの基質特異性の改変、及びO-RSの他の例に関するその他の詳細については例えばWO2002/086075に記載されている。

【0102】

O-tRNAと併用する直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)(例えばO-RS)の同定方法も本発明の特徴である。例えば、1方法は第1の種の細胞集団について選択(例えばポジティブ選択)を実施する段階を含み、前記細胞は1)複数のアミノアシルtRNAシンテターゼ(RS)のメンバー(例えば複数のRSは突然変異体RS、第1の種以外の種に由来するRS又は突然変異体RSと第1の種以外の種に由来するRSの両方を含むことができる)と;2)(例えば1種以上の種に由来する)直交tRNA(O-tRNA)と;3)(例えばポジティブ)選択マーカーをコードし、少なくとも1個のセレクターコドンを含むポリヌクレオチドを各々含む。複数のRSのメンバーを含まないか又はその量の少ない細胞に比較して抑圧効率の高い細胞について細胞を選択又はスクリーニングする。抑圧効率は当分野で公知の技術及び本明細書に記載するように測定することができる。抑圧効率の高い細胞はO-tRNAをアミノアシル化する活性RSを含む。第1の種に由来する第1組のtRNAの活性RSによる(in vitro又はin vivo)アミノアシル化レベルを第2の種に由来する第2組のtRNAの活性RSによる(in vitro又はin vivo)アミノアシル化レベルと比較する。アミノアシル化レベルは検出可能な物質(例えば標識アミノ酸又は非天然アミノ酸、例えば標識Galanac- -スレオニン)により測定することができる。第1組のtRNAに比較して第2組のtRNAをより効率的にアミノアシル化する活性RSを一般に選択することにより、O-tRNAと併用する効率的(最適化)直交アミノアシルtRNAシンテターゼ

10

20

30

40

50

が得られる。この方法により同定されたO-RSも本発明の特徴である。

【0103】

アミノアシル化を測定するためには多数のアッセイの任意のものを使用することができる。これらのアッセイはin vitro又はin vivoで実施することができる。例えば、in vitroアミノアシル化アッセイは例えばHoben and Sol 1 (1985) Methods Enzymol. 113: 55-59に記載されている。アミノアシル化は直交翻訳成分と共にレポーターを使用し、蛋白質をコードする少なくとも1個のセレクターコドンを含むポリヌクレオチドを発現する細胞でレポーターを検出することにより測定することもできる。WO 2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインピボ組込み(IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS)」；及びWO 2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張(EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE)」も参照。

10

【0104】

同定されたO-RSを更に操作し、所望非天然アミノ酸(例えばGalNAcアミノ酸)のみをO-tRNAに負荷し、20種の標準アミノ酸のいずれをも負荷しないようにシンテターゼの基質特異性を改変することができる。非天然アミノ酸に対して基質特異性をもつ直交アミノアシルtRNAシンテターゼの作製方法は例えばシンテターゼの活性部位、シンテターゼの編集メカニズム部位、シンテターゼの各種ドメインを組み合わせることによる各種部位等でシンテターゼを突然変異させる段階と、選択プロセスを適用する段階を含む。ポジティブ選択後にネガティブ選択を行う併用に基づくストラテジーを使用する。ポジティブ選択では、ポジティブマーカーの非必須位置に導入したセレクターコドンが抑圧されると、細胞はポジティブ選択圧下で生存する。従って、天然アミノ酸と非天然アミノ酸の両者の存在下で生存細胞は直交サプレッサーtRNAに天然又は非天然アミノ酸を負荷する活性シンテターゼをコードする。ネガティブ選択では、ネガティブマーカーの非必須位置に導入したセレクターコドンが抑圧されると、天然アミノ酸特異性をもつシンテターゼは除去される。ネガティブ選択とポジティブ選択の生存細胞は直交サプレッサーtRNAを非天然アミノ酸のみでアミノアシル化(負荷)するシンテターゼをコードする。その後、これらのシンテターゼを更に突然変異誘発(例えばDNAシャフリング又は他の帰納的突然変異誘発法)に付すことができる。

20

【0105】

突然変異体O-RSのライブラリーは当分野で公知の種々の突然変異誘発技術を使用して作製することができる。例えば、突然変異体RSは部位特異的突然変異、ランダム点突然変異、相同組換え、DNAシャフリング又は他の帰納的突然変異誘発法、キメラ構築又はその任意組み合わせにより作製することができる。例えば、突然変異体RSのライブラリーは2種以上の他の例えばサイズとダイバーシティーの小さい「サプライブラリー」から作製することができる。RSのキメラライブラリーも本発明に含まれる。なお、場合により各種生物(例えば真正細菌又は古細菌等の微生物)に由来するtRNAシンテターゼのライブラリー(例えば天然ダイバーシティーを含むライブラリー)(例えば米国特許第6,238,884号(Shortら)；米国特許第5,756,316号(Schaleenbergerら)；米国特許第5,783,431号(Petersenら)；米国特許第5,824,485号(Thompsonら)；米国特許第5,958,672号(Shortら)参照)を構築し、直交対についてスクリーニングする。

30

【0106】

シンテターゼにポジティブ及びネガティブ選択/スクリーニングストラテジーを実施した後、これらのシンテターゼを更に突然変異誘発することができる。例えば、O-RSをコードする核酸を単離することができ；(例えばランダム突然変異誘発、部位特異的突然変異誘発、組換え又はその任意組み合わせにより)突然変異O-RSをコードする1組のポリヌクレオチドを核酸から作製することができ；O-tRNAを非天然アミノ酸(例えばGalNAcアミノ酸)で優先的にアミノアシル化する突然変異O-RSが得られるま

40

50

でこれらの個々の段階又はこれらの段階の組み合わせを繰り返すことができる。本発明の1側面では、前記段階を複数回、例えば少なくとも2回実施する。

【0107】

O-tRNA、O-RS、又はその対を作製するための本発明の方法では、付加レベルの選択／スクリーニングストリンジエンシーを使用することもできる。選択又はスクリーニングストリンジエンシーはO-RSを作製するための方法の一方又は両方の段階で変動させることができる。これは例えば選択／スクリーニング物質の使用量等の変動とすることができます。付加ラウンドのポジティブ及び／又はネガティブ選択を実施することもできる。選択又はスクリーニングは更にアミノ酸浸透率の変化、翻訳効率の変化、翻訳忠実度の変化等の1種以上を含むこともできる。一般に、1種以上の変化は蛋白質を生産するために直交tRNA-tRNAシンテーゼ対を使用する生物における1個以上の遺伝子の突然変異に基づく。

10

【0108】

O-RSの作製と、シンテーゼの基質特異性の改変に関するその他の一般的な詳細については国際公開WO 2002/086075、発明の名称「直交tRNA-アミノアシルtRNAシンテーゼ対を作製するための方法及び組成物(METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA AMINOACYL-tRNA SYNTHETASE PAIRS)」；及びWO 2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張(EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE)」に記載されている。

20

資源及び宿主生物

【0109】

本発明の直交翻訳成分(O-tRNAとO-RS)はO-tRNA/O-RS成分と宿主系が直交に作用するという条件で他の任意種に由来する宿主翻訳系で使用するために任意生物(又は生物組み合わせ)に由来することができる。O-tRNAとO-RSは同一生物に由来する必要はない。1側面では、直交成分は真正細菌宿主系で使用するために古細菌遺伝子(即ち古細菌)に由来する。

【0110】

例えば、直交O-tRNAは古細菌生物、例えばMethanococcus jannaschii、Methanobacterium thermoautotrophicum、Halobacterium(例えばHaloferax volcanii及びHalobacterium種NRC-1)、Archaeoglobus fulgidus、Pyrococcus furiosus、Pyrococcus horikoshii、Aeuryopyrum pernix、Methanococcus maripaludis、Methanopyrus kandleri、Methanosaarcina mazei(Mm)、Pyrobaculum aerophilum、Pyrococcus abyssi、Sulfolobus solfataricus(Ss)、Sulfolobus tokodaii、Thermoplasma acidophilum、Thermoplasma volcanium等の古細菌や、Escherichia coli、Thermus thermophilus、Bacillus stearothermophilus等の真正細菌に由来することができ、直交O-RSは生物又は生物組み合わせ、例えばMethanococcus jannaschii、Methanobacterium thermoautotrophicum、Halobacterium(例えばHaloferax volcanii及びHalobacterium種NRC-1)、Archaeoglobus fulgidus、Pyrococcus furiosus、Pyrococcus horikoshii、Aeuryopyrum pernix、Methanococcus maripaludis、Methanopyrus kandleri、Methanosaarcina mazei、Pyrobaculum aerophilum、

30

40

50

Pyrococcus abyssi、*Sulfolobus solfataricus*、*Sulfolobus tokodaii*、*Thermoplasma acidophilum*、*Thermoplasma volcanium*等の古細菌や、*Escherichia coli*、*Thermus thermophilus*、*Bacillus stearothermophilus*等の真正細菌に由来することができる。1態様では、例えば植物、藻類、原生動物、真菌類、酵母、動物（例えば哺乳動物、昆虫、節足動物等）等の真核資源もO-tRNA及びO-RSの資源として使用することができる。

【0111】

O-tRNA/O-RS対の個々の成分は同一生物に由来するものでも異なる生物に由来するものでもよい。1態様では、O-tRNA/O-RS対は同一生物に由来する。あるいは、O-tRNA/O-RS対のO-tRNAとO-RSは異なる生物に由来する。

【0112】

O-tRNA、O-RS又はO-tRNA/O-RS対はin vivo又はin vitroで選択又はスクリーニングすることができ、及び/又はGalNAcアミノ酸を組込んだポリペプチドを生産するために細胞（例えば真正細菌細胞）で使用することができる。使用される真正細菌細胞は限定されないが、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）、*Thermus thermophilus*、*Bacillus stearothermophilus*等である。本発明の翻訳成分を含む真正細菌細胞の組成物も本発明の特徴である。

【0113】

別の種で使用するためにある種のO-tRNA及び/又はO-RSをスクリーニングする方法については、国際出願公開WO2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張（EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE）」（出願日2004年4月16日）も参照。

セレクターコドン

【0114】

本発明のセレクターコドンは非天然アミノ酸（例えば糖部分を含む非天然アミノ酸）を組込むための蛋白質合成機構の遺伝コドン枠を拡張する。例えば、セレクターコドンとしては例えばユニーク3塩基コドン、ナンセンスコドン（例えばアンバーコドン（UAG）又はオパールコドン（UGA）等の終止コドン）、非天然コドン、少なくとも4塩基のコドン、レアコドン等が挙げられる。例えば1個以上、2個以上、3個以上等の多数のセレクターコドンを所望遺伝子に導入することができる。複数の異なるセレクターコドンを使用することにより、これらの異なるセレクターコドンを使用して（例えば少なくとも1種のGalNAcアミノ酸を含む）複数の非天然アミノ酸の同時部位特異的組込みを可能にする複数の直交tRNA/シンテターゼ対を使用することができる。

【0115】

64種の遺伝コドンは20種のアミノ酸と3種の終止コドンをコードする。翻訳終結には1個の終止コドンしか必要ないので、他の2個は主に非蛋白産生アミノ酸をコードするために使用することができる。アンバー終止コドンUAGはin vitro生合成系とアフリカツメガエル卵母細胞で使用して非天然アミノ酸の組込みを誘導することに成功している。3種の終止コドンのうちでUAGは大腸菌での使用頻度が最も低い終止コドンである。大腸菌株にはUAGを認識して天然アミノ酸を挿入する天然サプレッサーtRNAを含むものもある。更に、これらのアンバーサプレッサーtRNAは慣用蛋白質突然変異誘発でも使用されている。本発明の所定態様では、他の終止コドンを本発明で使用する。

【0116】

1態様では、本発明の方法及び系はグリコシル含有非天然アミノ酸（例えばGalNAcアミノ酸）のin vivo細胞組込みに終止コドンであるセレクターコドンを使用する。例えば、終止コドン（例えばUAG）を認識し、O-RSによりGalNAcアミノ酸でアミノアシル化されるO-tRNAを作製する。このO-tRNAは天然に存在する

10

20

30

40

50

宿主のアミノアシル t RNA シンテターゼにより認識されない。慣用部位特異的突然変異誘発法を使用して該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの該当部位に終止コドンを導入することができる。例えば Sayers, J. R. ら, (1988), 5', 3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res. 791-802 参照。O-tRNA、O-tRNA 及び該当ポリペプチドをコードする核酸を例えれば in vivo で併用すると、GalNAc アミノ酸は終止コドンに応答して組込まれ、特定位置に GalNAc アミノ酸を含むポリペプチドが得られる。本発明の 1 様では、セレクターコドンとして使用される終止コドンはアンバーコドン UAG 及び / 又はオパールコドン UGA である。1 例では、セレクターコドンとして UAG と UGA の両者を使用する遺伝コードは存在度が最も高い終結シグナルであるオーカーナンセンスコドン UAA を保存しながら 22 種のアミノ酸をコードすることができる。

10

20

30

40

50

【0117】

GalNAc アミノ酸の in vivo 組込みは宿主細胞をさほど搅乱せずに実施することができる。例えば、大腸菌等の非真核細胞では、UAG コドンの抑圧効率は O-tRNA (例えはアンバーサプレッサー tRNA) と (UAG コドンと結合してリボソームから成長中のペプチドの放出を開始する) 放出因子 1 (RF1) の競合に依存するので、例えは O-tRNA (例えはサプレッサー tRNA) の発現レベルを増加するか又は RF1 欠損株を使用することにより抑圧効率を調節することができる。真核細胞では、UAG コドンの抑圧効率は O-tRNA (例えはアンバーサプレッサー tRNA) と (終止コドンと結合してリボソームから成長中のペプチドの放出を開始する) 真核放出因子 1 (例えは eRF) の競合に依存するので、例えは O-tRNA (例えはサプレッサー tRNA) の発現レベルを増加することにより抑圧効率を調節することができる。更に、付加化合物、例えはジチオスレイトール (DTT) 等の還元剤も加えてよい。

【0118】

GalNAc アミノ酸はレアコドンでコードすることもできる。例えは、in vitro 蛋白質合成反応でアルギニン濃度を下げる、レアアルギニンコドン AGG はアラニンでアシル化された合成 tRNA による Ala の挿入に有効であることが分かっている。例えは Ma ら, Biochemistry, 32: 7939 (1993) 参照。この場合には、合成 tRNA は大腸菌に少量種として存在する天然 tRNA Arg と競合する。更に、生物によっては全トリプレットコドンを使用しないものもある。Micrococcus luteus で割り当てられないコドン AGA が in vitro 転写 / 翻訳抽出物へのアミノ酸挿入に使用されている。例えは Kowal and Oliver, Nucleic Acid Res., 25: 4685 (1997) 参照。本発明の成分はこれらのレアコドンを in vivo 使用するために作製することができる。

【0119】

セレクターコドンは更に拡張コドン (例えは 4、5、6 塩基以上のコドン等の 4 塩基以上のコドン) も含むことができる。4 塩基コドンの例としては例えは AGGA、CUAG、UAGA、CCCC 等が挙げられる。5 塩基コドンの例としては例えは AGGAC、CCCUU、CCCCUC、CUAGA、CUACU、UAGGC 等が挙げられる。本発明の方法はフレームシフト抑圧に基づく拡張コドンの使用を含む。4 塩基以上のコドンは例えは 1 又は複数の非天然アミノ酸 (例えは GalNAc アミノ酸) を同一蛋白質に挿入することができる。他の様では、アンチコドンループは例えは少なくとも 4 塩基コドン、少なくとも 5 塩基コドン、又は少なくとも 6 塩基コドン又はそれ以上をコードすることができる。4 塩基コドンは 256 種が考えられるので、4 塩基以上のコドンを使用すると同一細胞で複数の非天然アミノ酸をコードすることができる。Anderson ら, (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9: 237-244; 及び Magliery, (2001) Expanding the Genet

ic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 307: 755 - 769 参照。

【0120】

本発明の方法はフレームシフト抑圧に基づく拡張コドンの使用を含む。4塩基以上のコドンは例えれば1個又は複数の非天然アミノ酸を同一蛋白質に挿入することができる。例えれば、*in vitro*生合成法を使用して非天然アミノ酸を蛋白質に組込むために4塩基コドンが使用されている。例えばMara, (1993) *Biochemistry*, 32, 7939; 及びHohsakaら, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 34 参照。2個の化学的にアシル化されたフレームシフトサプレッサー tRNAを用いて2-ナフチルアラニンとリジンのNBD誘導体をストレプトアビジンに同時に*in vitro*で組込むためにCGGGとAGGUが使用された。例えばHohsakaら, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 12194 参照。*in vivo* 試験では、MooreらはNCUAアンチコドンをもつtRNA^{Leu}誘導体がUAGNコドン(NはU、A、G又はCであり得る)を抑圧する能力を試験し、カドラプレットUAGAはUCUAアンチコドンをもつtRNA^{Leu}により13~26%の効率でデコードすることができるが、0又は-1フレームでは殆どデコードできないことを見出した。Mooreら, (2000) *J. Mol. Biol.*, 298: 195 参照。1態様では、レアコドン又はナンセンスコドンに基づく拡張コドンを本発明で使用し、他の望ましくない部位でのミスセンス読み飛ばしとフレームシフト抑圧を減らすことができる。

【0121】

所与系では、セレクターコドンは更に天然3塩基コドンの1種を含むことができ、内在系はこの天然塩基コドンを使用しない(又は殆ど使用しない)。例えれば、天然3塩基コドンを認識するtRNAをもたない系、及び/又は3塩基コドンがレアコドンである系がこれに該当する。

【0122】

セレクターコドンは場合により非天然塩基対を含む。これらの非天然塩基対は既存遺伝子アルファベットを更に拡張する。塩基対が1個増えると、トリプレットコドン数は64から125に増す。第3の塩基対の性質としては安定的で選択的な塩基対合、高い忠実度でポリメラーゼによるDNAへの効率的な酵素組込み、及び成長中の非天然塩基対の合成後の効率的な持続的プライマー伸長が挙げられる。方法と組成物に適応可能な非天然塩基対については、例えはHiraoら, (2002) *An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein*, *Nature Biotechnology*, 20: 177 - 182に記載されている。Wu, Y.ら, (2002) *J. Am. Chem. Soc.* 124: 14626 - 14630 参照。他の関連刊行物は以下に挙げる。

【0123】

in vivo 使用では、非天然ヌクレオシドは膜透過性であり、リン酸化され、対応する三リン酸塩を形成する。更に、増加した遺伝情報は安定しており、細胞内酵素により破壊されない。Bennerらによる従来の報告はカノニカルワトソンクリック対とは異なる水素結合パターンを利用してあり、そのうちで最も注目される例はイソC:イソG対である。例えはSwitzerら, (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8322; 及びPiccirilliら, (1990) *Nature*, 343: 33; Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 602 参照。これらの塩基は一般に天然塩基とある程度まで誤対合し、酵素複製することができない。Koolらは水素結合を塩基間の疎水性パッキング相互作用に置き換えることにより塩基対の形成を誘導できることを立証した。Kool, (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 602; 及びGuckian and Kool, (1998

10

20

30

30

40

50

) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 2825 参照。上記全要件を満足する非天然塩基対を開発する目的で Schulz, Romerberg らは一連の非天然疎水性塩基を体系的に合成し、試験した。PICS: PICS 自己対は天然塩基対よりも安定していると認められており、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の Klenow フラグメント (KF) により DNA に効率的に組込むことができる。例えば McMinn ら, (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 11586; 及び Ogawa ら, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 3274 参照。生体機能に十分な効率と選択性で KF により 3MN: 3MN 自己対を合成することができる。例えば Ogawa ら, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 8803 参照。しかし、どちらの塩基も後期複製用チェーンターミネーターとして作用するものである。PICS 自己対を複製するために使用できる突然変異体 DNA ポリメラーゼが最近開発された。更に、T4 DNA ポリメラーゼも複製することができる。例えば Tae ら, (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 7439 参照。Cu (II) と結合すると安定な対を形成する新規メタ口塩基対 Dipic: Py も開発された。Meggers ら, (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, 122: 10714 参照。拡張コドンと非天然コドンは天然コドンに本質的に直交性があるので、本発明の方法は天然コドンに直交性の tRNA を作製するためにこの性質を利用することができる。

10

【0124】

翻訳バイパス系を使用して糖部分を含む非天然アミノ酸 (例えば GalNAc アミノ酸) を所望ポリペプチドに組込むこともできる。1 翻訳バイパス系では、大きい配列が遺伝子に挿入されるが、蛋白質に翻訳されない。この配列はリボソームに配列を飛び越させて挿入の下流の翻訳を再開するための合図として機能する構造を含む。

20

【0125】

別法として又は糖部分を含む非天然アミノ酸をポリペプチドに組みための他の上記方法と組み合わせてトランス翻訳系を使用することもできる。この系は大腸菌に存在する tmRNA と呼ばれる分子を含む。この RNA 分子はアラニル tRNA と構造的に関連しており、アラニルシンテターゼによりアミノアシル化される。tmRNA と tRNA の相違はアンチコドンループが特殊な大きい配列で置換されていることである。この配列は tmRNA 内でコードされるオープンリーディングフレームを鋳型として使用し、停止している配列でリボソームに翻訳を再開させることができる。本発明では、直交シンテターゼで優先的にアミノアシル化され、非天然アミノ酸を負荷される直交 tmRNA を作製することができる。この系を使用して遺伝子を転写することにより、リボソームは特定部位で停止し、非天然アミノ酸をこの部位に導入した後、直交 tmRNA 内でコードされる配列を使用して翻訳が再開する。

30

非天然アミノ酸

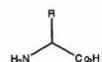
【0126】

本明細書で使用する非天然アミノ酸とはセレノシステイン及び / 又はピロリジンと 20 種の遺伝的にコードされる以下の - アミノ酸、即ちアラニン、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、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン以外の任意アミノ酸、修飾アミノ酸又はアミノ酸類似体を意味する。 - アミノ酸の一般構造は式 I :

40

【化1】

I



により表される。

【0127】

非天然アミノ酸は一般に式 I をもつ任意構造であり、式中、R 基は 20 種の天然アミノ

50

酸で使用されている以外の任意置換基である。20種の天然アミノ酸の構造については、例えばL. Stryer著Biochemistry, 第3版, 1988, Freeman and Company, New York参照。なお、本発明の非天然アミノ酸は上記20種の - アミノ酸以外の天然化合物でもよい。

【0128】

本発明の非天然アミノ酸は一般に側鎖が天然アミノ酸と異なるので、天然蛋白質と同様に他のアミノ酸（例えば天然又は非天然アミノ酸）とアミド結合を形成する。一方、非天然アミノ酸は天然アミノ酸と異なる側鎖基をもつ。

【0129】

本発明ではN-アセチルガラクトサミン部分を含む非天然アミノ酸が特に重要である。10 例えば、GalNAcアミノ酸では、式IにおけるRは任意N-アセチルガラクトサミン含有構造を含む。例えば、本発明ではN-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン、トリアセチル-N-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン、N-アセチルガラクトサミン- - -セリン、及びトリアセチル-N-アセチルガラクトサミン- - -セリンが利用される。本発明はN-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン種を含む系に限定するものではない。例えば、他の各種GalNAcアミノ酸が考えられる（例えば表1参照）。

【0130】

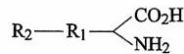
他の非天然アミノ酸では、例えば、式IにおけるRは場合によりアルキル、アリール、アシル、ヒドラジン、シアノ、ハロ、ヒドラジド、アルケニル、エーテル、硼酸、ボロン酸、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、エノン、イミン、エステル、ヒドロキシルアミン、アミン基等又はその任意組合せを含む。他の該当非天然アミノ酸としては限定されないが、光架橋基をもつアミノ酸、スピノ標識アミノ酸、蛍光アミノ酸、金属結合性アミノ酸、金属含有アミノ酸、放射性アミノ酸、新規官能基をもつアミノ酸、他の分子と共有又は非共有的に相互作用するアミノ酸、フォトケージド及び/又は光異性化可能なアミノ酸、ビオチン又はビオチン類似体を含有するアミノ酸、ケト含有アミノ酸、グリコシル化アミノ酸、アミノ酸側鎖と結合した糖部分、ポリエチレングリコール又はポリエーテルを含むアミノ酸、重原子置換アミノ酸、化学分解性又は光分解性アミノ酸、天然アミノ酸に比較して延長側鎖（例えばポリエーテル又は例えば約5もしくは約10炭素長を上回る長鎖炭化水素等）をもつアミノ酸、炭素結合糖含有アミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、及び1個以上の毒性部分を含むアミノ酸が挙げられる。20 30

【0131】

別の側面では、本発明は下式IV：

【化2】

IV



により表される一般構造をもつGalNAcアミノ酸を提供する。

【0132】

この構造をもつGalNAcアミノ酸は一般にR₁が20種の天然アミノ酸の1種で使用される置換基であり、R₂がGalNAc置換基である任意構造である。従って、この種のアミノ酸は天然アミノ酸誘導体とみなすことができる。40

【0133】

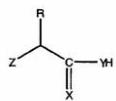
上記のように、本発明は非天然アミノ酸N-アセチルガラクトサミン- - -スレオニンの使用に限定するものではない。実際に、真正細菌において本発明の直交翻訳系で使用することができる任意GalNAcアミノ酸が本発明の範囲に含まれる。

【0134】

GalNAc基等の新規側鎖を含む非天然アミノ酸に加え、非天然GalNAcアミノ酸は場合により例えば式II及びIII：

【化3】

II



III



の構造により表されるような修飾主鎖構造も含み、上記式中、Zは一般にOH、NH₂、SH、NH-R'又はS-R'を含み、XとYは同一でも異なっていてもよく、一般にS又はOであり、RとR'は場合により同一又は異なり、一般に式Iをもつ非天然アミノ酸について上記に記載したR基と同一の基及び水素から選択される。例えば、本発明の非天然アミノ酸は場合により式II及びIIIにより表されるようにアミノ又はカルボキシル基に置換を含む。この種の非天然アミノ酸としては限定されないが、例えば20種の標準天然アミノ酸に対応する側鎖又は非天然GalNAc側鎖をもつ-ヒドロキシ酸、-チオ酸、-アミノチオカルボキシレートが挙げられる。更に、炭素の置換は場合によりL、D又は-,ジ置換アミノ酸（例えばD-グルタミン酸、D-アラニン、D-メチル-O-チロシン、アミノ酪酸等）を含む。他の代替構造としては環状アミノ酸（例えばプロリン類似体や、3、4、6、7、8及び9員環プロリン類似体）、及びアミノ酸（例えば置換-L-アラニン及び-D-アミノ酪酸）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0135】

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、及びメタ置換チロシンが挙げられ、置換チロシンはGalNAc基、アルキニル基、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、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C₆-C₂₀直鎖又は分岐鎖炭化水素、飽和又は不飽和炭化水素、O-Me基、ポリエーテル基、ニトロ基等を含む。更に、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限定されないが、-ヒドロキシ誘導体、置換誘導体、環状誘導体及びアミド置換グルタミン誘導体が挙げられる。フェニルアラニン類似体の例としては限定されないが、パラ置換フェニルアラニン、オルト置換フェニルアラニン、及びメタ置換フェニルアラニンが挙げられ、置換基はアルキニル基、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アルデヒド、ニトロ、チオール基又はケト基等を含む。非天然アミノ酸の特定例としては限定されないが、GalNAc- -スレオニン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(DHP)、3,4,6-トリヒドロキシ-L-フェニルアラニン、3,4,5-トリヒドロキシ-L-フェニルアラニン、4-ニトロ-フェニルアラニン、p-アセチル-L-フェニルアラニン、O-Me-L-チロシン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-Me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、3-ニトロ-チロシン、3-チオール-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、ホスホチロシン、p-ヨードフェニルアラニン、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、及びイソプロピル-L-フェニルアラニン等が挙げられる。各種非天然GalNAcアミノ酸の構造は本明細書に記載する。

【0136】

本発明の糖蛋白質の作製には、式IのRが側鎖の一部として糖（グリコシル）部分を含む非天然アミノ酸が特に重要である。グリコシル含有非天然アミノ酸の例としては限定されないが、GalNAc- -O-スレオニン、GalNAc- -O-セリン、及びGlcNAc- -O-セリンと、（例えば1個以上のアセチル化ヒドロキシル残基を含む

) 対応する保護形態及びチオール類似体(アノマーOをSで置換)が挙げられる。

【0137】

本発明の組成物と方法で使用するのに適したグリコシル含有非天然アミノ酸としては、一般にアミノ酸側鎖に糖部分を結合したものが挙げられ、限定されないが、保護(例えばアセチル化)組成物と「脱保護」組成物の両者が挙げられる。1態様では、糖部分をもつ非天然アミノ酸としてはMan、GalNAc、Glc、GlcNAc、Fuc、又はGal部分をもつセリン又はスレオニンが挙げられる。

【0138】

糖部分を含む非天然アミノ酸の例としては限定されないが、例えばトリ-O-アセチル-GlcNAc-L-セリン、-O-GlcNAc-L-セリン、トリ-O-アセチル-GalNAc-L-スレオニン、-GalNAc-L-スレオニン、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、-O-GlcNAc-L-スレオニン、トリアセチル-GlcNAc-L-スレオニン、O-Man-L-スレオニン、テトラアセチル-O-Man-L-スレオニン、O-GalNAc-L-スレオニン、トリアセチル-O-GalNAc-L-スレオニン、Glc-L-スレオニン、テトラアセチル-Glc-L-スレオニン、fuc-L-スレオニン、トリアセチル-fuc-L-スレオニン、O-Gal-L-スレオニン、テトラアセチル-O-Gal-L-セリン等が挙げられる。本発明のグリコシル含有組成物は上記の非保護形態と保護(アセチル化)形態の両者を含む。当業者に公知の付加及び/又は代替保護基(例えばt-ブチル部分、Fmoc保護基、フェニル基等)がグリコシル含有非天然アミノ酸の1個以上のヒドロキシル又はアミン部分に場合により存在してもよい。代表的なグリコシルアミノ酸を表1に示す。WO2003/031464A2、発明の名称「ペプチドのリモデリングと糖結合(Remodeling and Glycoconjugation of Peptides)」;及び米国特許第6,331,418号、発明の名称「糖組成物、その合成方法及び装置(Saccharide Compositions, Methods and Apparatus for their synthesis)」も参照。

10

20

30

【表1-1】

表1: グリコル非天然アミノ酸

	非天然アミノ酸	構造
1	GalNAc- α -O-スルオニン	
2	過アセチル化 GalNAc- α -O-スルオニン	
3	GalNAc- α -O-セリン	
4	過アセチル化 GalNAc- α -O-セリン	
5	GalNAc- β -O-セリン	
6	過アセチル化 GalNAc- β -O-セリン	

10

20

【表1-2】

	非天然アミノ酸	構造
7	GalNAc- α -S-スルオニン	
8	過アセチル化 GalNAc- α -S-スルオニン	
9	GalNAc- α -S-セリン	
10	過アセチル化 GalNAc- α -S-セリン	
11	GlcNAc- β -S-セリン	
12	過アセチル化 GlcNAc- β -S-セリン	

30

40

本明細書に記載するグリコシル含有非天然アミノ酸には例えばSigma-Aldrich (Milwaukee, WI, 米国)、Sussex Research Laboratories Inc. (Ottawa, CA)、V-Labs, Inc. (Covington, LA)、又は例えば固相ペプチド合成スキームで使用されるアミノ酸の他の供給業者から市販されているものがある。市販されていないものは必要に応じて下記実施例に記載する方法や当業者に公知の標準方法を使用して合成される。有機合成技術については例えばFessendenとFessenden著Organic Chemistry (1982, 第2版, Willard Grant Press, Boston Mass.) ; March著Advanced Organic Chemistry (第3版, 1985, Wiley and Sons, New York) ; 及びCareyとSundberg著Advanced Organic Chemistry (第3版, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York) 参照。非天然アミノ酸のその他の合成についてはWO2002/085923も参照。

10

【0140】

例えば、過アセチル化N-アセチルガラクトサミン- - O-スレオニン2は実質的にKoellikerら(2000)Bioorganic & Medicinal Chemistry 8:1017-1025に概説され、図2に示すような手順で合成することができる。ガラクトサミンHCl 13を使用して過アセチル化アジド中間体14を生成し、アノマー位置を選択的に脱アセチル化し、トリクロロアセトイミド酸誘導体15に変換した。得られた15のアノマー混合物をジクロロメタン:ジエチルエーテル(1:1)中、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル(TMSOTf)で-30にて活性化すると、中間体17が主に-アノマーとして得られた。アミノ部分とカルボニル部分を脱保護すると、過アセチル化N-アセチルガラクトサミン- - O-スレオニン2が得られた。

20

【0141】

非天然アミノ酸の合成について記載しているその他の刊行物としては例えばMatsoukashら,(1995)J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F. E. & Kidd, D. A. A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O. M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J. C. ら(1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4[[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinaline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials. Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A. M. P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B. D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation a

30

40

50

nd Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 1989: 1859 - 1866; Bartonら, (1987) Synthesis of Novel - Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- - Amino-Adipic Acids, L- - aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron Lett. 43: 4297 - 4308; 及び Subasingheら, (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35: 4602 - 7 が挙げられる。国際公開WO 2004 / 058946、発明の名称「蛋白質アレー (PROTEIN ARRAYS)」(出願日2003年12月22日)も参照。
10

非天然アミノ酸の細胞取込み

【0142】

細胞による非天然アミノ酸取り込みは例えば蛋白質に組込むように非天然アミノ酸を設計及び選択する場合に一般に考慮される問題の1つである。例えば、-アミノ酸は電荷密度が高いため、これらの化合物は細胞に浸透しにくいと思われる。天然アミノ酸は異なる程度のアミノ酸特異性を示すことが多い一連の蛋白質輸送システムにより細胞に取り込まれる。非天然アミノ酸が細胞に取り込まれる場合にはどの非天然アミノ酸が取り込まれるかを判断する迅速なスクリーニングを実施することができる。例えば国際公開WO 2004 / 058946、発明の名称「蛋白質アレー (PROTEIN ARRAYS)」(出願日2003年12月22日); 及び Liu and Schultz (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS 96: 4780 - 4785における毒性アッセイ参照。取込みは種々のアッセイで容易に分析されるが、細胞取込み経路に利用可能な非天然アミノ酸を設計する代替方法は、アミノ酸を *in vivo* 生産する生合成経路を提供する方法である。
20

非天然アミノ酸の生合成

【0143】

細胞にはアミノ酸と他の化合物を生産するために多数の生合成経路が元々存在している。特定非天然アミノ酸の生合成法は自然界(例えば細胞中)には存在しないと思われるが、本発明はこのような方法を提供する。例えば、非天然アミノ酸の生合成経路は場合により新規酵素を付加するか又は既存宿主細胞経路を変更することにより宿主細胞で作製される。付加新規酵素は場合により天然酵素又は人工的に進化させた酵素である。例えば、(WO 2002 / 085923、前出の実施例に記載されているような) p-アミノフェニルアラニンの生合成は他の生物に由来する公知酵素の組合せの付加に依存している。これらの酵素の遺伝子はこれらの遺伝子を含むプラスミドで細胞を形質転換することにより細胞に導入することができる。これらの遺伝子は細胞で発現されると、所望化合物を合成するための酵素経路を提供する。場合により付加される酵素種の例は下記実施例に記載する。その他の酵素配列は例えば Genbank に登録されている。人工的に進化させた酵素も場合により同様に細胞に付加する。このように、非天然アミノ酸を生産するように細胞機構と細胞資源を操作する。
40

【0144】

実際に、生合成経路で使用する新規酵素を生産するため又は非天然アミノを生産するように既存経路を *in vitro* もしくは *in vivo* で進化させるためには種々の方法の任意のものを使用することができる。非天然アミノ酸を生産するため(又は、実際に新規基質特異性もしくは他の該当活性をもつようにシンテターゼを進化させるため)には、酵素及び他の生合成経路成分を進化させる方法として入手可能な多数の方法を本発明に
50

適用することができる。例えば、非天然アミノ酸を生産（又は新規シンテーゼを生産）するように新規酵素及び／又は前記酵素の経路を *in vitro* 又は *in vivo* で開発するためには、場合により DNA シャフリングを使用する。例えば Stemmer (1994) *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, *Nature* 370 (4) : 389 - 391 ; 及び Stemmer, (1994) *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 : 10747 - 10751 参照。関連アプローチは所望特性をもつ酵素を迅速に進化させるために関連（例えば相同）遺伝子のファミリーをシャフリングする。このような「ファミリー遺伝子シャフリング」法の1例は Crameri ら (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution", *Nature*, 391 (6664) : 288 - 291 に記載されている。（生合成経路成分であるか又はシンテーゼであるかを問わずに）新規酵素は例えば Ostermeier ら (1999) "A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology", *Nature Biotech* 17 : 1205 に記載されているような「ハイブリッド酵素作製用インクリメンタルランケーション (incremental truncation for the creation of hybrid enzymes: ITCHY)」として知られる DNA 組換え法を使用して作製することもできる。このアプローチは 1 種以上の *in vitro* 又は *in vivo* 組換え法の基質として使用することができる酵素又は他の経路変異体のライブラリーを作製するために使用することもできる。Ostermeier ら (1999) "Combinatorial Protein Engineering by Incremental Truncation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 3562 - 67, 及び Ostermeier ら (1999) "Incremental Truncation as a Strategy in the Engineering of Novel Biocatalysts", *Biological and Medicinal Chemistry*, 7 : 2139 - 44 に記載されている。別のアプローチは例えば非天然アミノ酸（又は新規シンテーゼ）の生産に関連する生合成反応を触媒する能力について選択する酵素又は他の経路変異体のライブラリーを作製するために指数的集合突然変異誘発を使用する。このアプローチでは、該当配列中の小群の残基を並行してランダム変異させ、機能的蛋白質をもたらすアミノ酸を各変異位置で同定する。非天然アミノ酸（又は新規シンテーゼ）の生産用新規酵素を作製するように本発明に応用することができるこのような方法の例は Delegrave & Youvan (1993) *Biotechnology Research* 11 : 1548 - 1552 に記載されている。更に別のアプローチでは、例えば Arkin and Youvan (1992) "Optimizing nucleotide mixtures to encode specific subsets of amino acids for semi-random mutagenesis" *Biotechnology* 10 : 297 - 300 ; 又は Reidhaar-Olson ら (1991) "Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes" *Methods Enzymol.* 208 : 564 - 86 の一般突然変異誘発法を使用することにより、酵素及び／又は経路成分操作にドープ又は縮重オリゴヌクレオチドを使用するランダム又は半ランダム突然変異誘発を使用することができる。ポリヌクレオチドリアセンブリと部位飽和突然変異誘発を使用する更に別のアプローチ（「非確率論的」突然変異誘発と呼ぶことが多い）を使用すると、酵素及び／又は経路成分を作製した後に、（例えば非天然アミノ酸の *in vivo* 生産のための）1 種以上のシンテーゼ又は生合

成経路機能を実施する能力についてスクリーニングすることができる。例えばShort「遺伝子ワクチン及び酵素の非確率論的作製(NON-STOCHASTIC GENE RATION OF GENETIC VACCINES AND ENZYMES)」WO00/46344参照。

【0145】

このような突然変異法の代替方法は生物の全ゲノムを組換え、得られた子孫を特定経路機能について選択する方法である(「全ゲノムシャフリング」と呼ぶことが多い)。このアプローチは、例えばゲノム組換えと非天然アミノ酸(又はその中間体)の生産能に関する生物(例えば大腸菌又は他の細胞)の選択により本発明に適用することができる。例えば、非天然アミノ酸を *in vivo* 生産するように細胞で既存及び/又は新規経路を進化させるための経路設計には、以下の刊行物に教示されている方法を適用することができる: Patnaikら(2002) "Genome shuffling of *lactobacillus* for improved acid tolerance" *Nature Biotechnology*, 20(7):707-712; 及び Zhangら(2002) "Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria" *Nature*, February 7, 415(6872):644-646。

10

【0146】

例えば所望化合物を生産するための他の生物及び代謝経路組換え技術も利用可能であり、同様に非天然アミノ酸の生産に適用することができる。有用な経路組換えアプローチを教示している刊行物の例としては、Nakamura and White(2003) "Metabolic engineering for the microbial production of 1,3 propanediol" *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(5):454-9; Berryら(2002) "Application of Metabolic Engineering to improve both the production and use of Biotech Indigo" *J. Industrial Microbiology and Biotechnology* 28:127-133; Bantaら(2002) "Optimizing an artificial metabolic pathway: Engineering the cofactor specificity of *Corynebacterium* 2,5-diketo-D-gluconic acid reductase for use in vitamin C biosynthesis" *Biochemistry*, 41(20), 6226-36; Selivonovaら(2001) "Rapid Evolution of Novel Traits in Microorganisms" *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3645、及び他の多数の文献が挙げられる。

20

30

【0147】

使用する方法に關係なく、一般に本発明の組換え生合成経路を使用して生産される非天然アミノ酸は効率的な蛋白質合成に十分な濃度(例えば天然細胞量)で生産されるが、他の細胞内アミノ酸濃度を有意に変化させたり細胞資源を枯渇させる程ではない。このように *in vivo* 生産される典型的な濃度は約 10 mM ~ 約 0.05 mM である。特定経路に所望される酵素を生産するように細胞を組換え、非天然アミノ酸を作製した後、場合により *in vivo* 選択を使用してリボソーム蛋白質合成と細胞増殖の両方に適合するように非天然アミノ酸の生産を更に最適化させる。

40

GalNAc - - スレオニンを組込むための直交成分

【0148】

本発明はセレクターコドン(例えばアンバー終止コドン、ナンセンスコドン、4 塩基以上のコドン等)に応答して成長中のポリペプチド鎖に GalNAc アミノ酸(例えば GalNAc - - スレオニン)を例えれば *in vivo* で組込むための直交成分を作製する

50

組成物及び方法を提供する。例えば、本発明は直交 t RNA (O - t RNA)、直交アミノアシル t RNA シンテターゼ (O - RS) 及びその対を提供する。これらの対は成長中のポリペプチド鎖に GalNAc - - スレオニンを組込むために使用することができる。

【0149】

本発明の組成物は直交アミノアシル t RNA シンテターゼ (O - RS) を含み、O - RS は O - t RNA を GalNAc - - スレオニンで優先的にアミノアシル化する。所定態様では、O - RS は配列番号 1、2、3 もしくは 4 を含むアミノ酸配列又はその保存変異体を含む。本発明の所定態様では、O - RS は内在 t RNA よりも O - t RNA を優先的に GalNAc アミノ酸でアミノアシル化し、O - RS は O - t RNA を優先し、GalNAc アミノ酸を負荷される O - t RNA と GalNAc アミノ酸を負荷される内在 t RNA の比は 1 : 1 を上回り、O - RS は O - t RNA に排他的又はほぼ排他的に負荷することがより好ましい。

10

【0150】

O - RS を含む組成物は場合により更に直交 t RNA (O - t RNA) を含むことができ、O - t RNA はセレクターコドンを認識する。一般に、本発明の O - t RNA は本明細書の配列表 (例えば配列番号 17) 及び実施例に記載するようなポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされる O - t RNA の抑圧効率に比較してコグネイトシンテターゼの存在下でセレクターコドンに応答して少なくとも例えば約 45%、50%、60%、75%、80%、又は 90% 以上の抑圧効率を含む。1 態様では、O - RS と O - t RNA の併用による抑圧効率は O - RS の不在下の O - t RNA の抑圧効率の例えば 5 倍、10 倍、15 倍、20 倍、25 倍又はそれ以上である。1 側面では、O - RS と O - t RNA の併用による抑圧効率は *Methanococcus jannaschii* に由来する直交チロシル t RNA シンテターゼ対の抑圧効率の少なくとも 45% である。

20

【0151】

O - t RNA を含む組成物は場合により細胞 (例えば大腸菌細胞等の真正細菌細胞)、及び / 又は翻訳系を含むことができる。

【0152】

本発明は翻訳系を含む細胞 (例えば真正細菌細胞) も提供し、前記翻訳系は直交 t RNA (O - t RNA) と; 直交アミノアシル t RNA シンテターゼ (O - RS) と; GalNAc アミノ酸を含む。一般に、O - RS は内在 t RNA よりも O - t RNA を優先的に GalNAc アミノ酸でアミノアシル化し、O - RS は O - t RNA を優先し、GalNAc アミノ酸を負荷される O - t RNA と GalNAc アミノ酸を負荷される内在 t RNA の比は 1 : 1 を上回り、O - RS は O - t RNA に排他的又はほぼ排他的に負荷することがより好ましい。O - t RNA は第 1 のセレクターコドンを認識し、O - RS は O - t RNA を GalNAc アミノ酸で優先的にアミノアシル化する。1 態様では、O - t RNA は配列番号 17 に記載のポリヌクレオチド配列又はその相補的ポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされる。1 態様では、O - RS は配列番号 1、2、3、4 の任意 1 種に記載のアミノ酸配列又はその保存変異体を含む。

30

【0153】

本発明の細胞は場合により異なる付加 O - t RNA / O - RS 対と第 2 の非天然アミノ酸を更に含むことができ、例えばこの O - t RNA は第 2 のセレクターコドンを認識し、この O - RS は対応する O - t RNA を第 2 の非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化し、第 2 のアミノ酸は GalNAc アミノ酸と異なる。場合により、本発明の細胞は該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含み、前記ポリヌクレオチドは O - t RNA により認識されるセレクターコドンを含む。

40

【0154】

所定態様では、本発明の細胞は直交 - t RNA (O - t RNA) と、直交アミノアシル t RNA シンテターゼ (O - RS) と、GalNAc アミノ酸 (例えば GalNAc -

50

-スレオニン)と、該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸を含む真正細菌細胞(例えば大腸菌細胞)であり、前記ポリヌクレオチドはO-tRNAにより認識されるセレクターコドンを含む。本発明の所定態様では、O-RSはO-RSが任意内在tRNAをアミノアシル化する効率よりも高い効率でO-tRNAを優先的にアミノアシル化する。

【0155】

本発明の所定態様では、本発明のO-tRNAは本明細書の配列表(例えば配列番号17)及び実施例に記載するようなポリヌクレオチド配列、又はその相補的ポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされる。本発明の所定態様では、O-RSは本明細書の配列表に記載するようなアミノ酸配列、又はその保存変異体を含む。1態様では、O-RS又はその一部は本明細書の配列又は実施例に記載するようなアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列、又はその相補的ポリヌクレオチド配列によりコードされる。

10

【0156】

本発明のO-tRNA及び/又はO-RSは種々の生物(例えば真核及び/又は非真核生物)の任意のものに由来することができる。

【0157】

ポリヌクレオチドも本発明の特徴である。本発明のポリヌクレオチドは本明細書の配列表に記載するようなポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む人工(例えば人為的に作製され、天然には存在しない)ポリヌクレオチドを含むか、及び/又は前記ポリヌクレオチド配列に相補的であるか又は前記配列をコードする。本発明のポリヌクレオチドは更に核酸の実質的に全長にわたって高ストリンジエント条件下で上記ポリヌクレオチドとハイブリダイズする核酸も含むことができる。本発明のポリヌクレオチドは更に天然に存在するtRNA又は対応するコーディング核酸のポリヌクレオチドと例えば少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又はそれ以上一致するポリヌクレオチドを含み(但し、本発明のポリヌクレオチドは天然に存在するtRNA又は対応するコーディング核酸以外のものである)、前記tRNAはセレクターコドン(例えば4塩基コドン)を認識する。上記任意ポリヌクレオチド及び/又は上記任意ポリヌクレオチドの保存変異体を含むポリヌクレオチドと例えば少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又はそれ以上一致する人工ポリヌクレオチドも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

20

【0158】

本発明のポリヌクレオチドを含むベクターも本発明の特徴である。例えば、本発明のベクターはプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス、発現ベクター及び/又は同等物を含むことができる。本発明のベクターを含む細胞も本発明の特徴である。

【0159】

O-tRNA/O-RS対の成分の作製方法も本発明の特徴である。これらの方法により作製された成分も本発明の特徴である。例えば、細胞に対して直交性である少なくとも1種のtRNA(O-tRNA)の作製方法は突然変異体tRNAのライブラリーを作製する段階と;セレクターコドンを認識できるように突然変異体tRNAのライブラリーの各メンバーのアンチコドンループを突然変異させることにより、潜在的O-tRNAのライブラリーを提供する段階と、潜在的O-tRNAのライブラリーのメンバーを含む第1の種の第1の細胞集団についてネガティブ選択を実施する段階を含む。ネガティブ選択は細胞に内在性のアミノアシルtRNAシンテターゼ(RS)によりアミノアシル化される潜在的O-tRNAライブラリーのメンバーを含む細胞を排除する。こうして、第1の種の細胞に対して直交性のtRNAプールが得られ、それにより少なくとも1種のO-tRNAが得られる。本発明の方法により作製されたO-tRNAも提供する。

40

【0160】

所定態様では、前記方法は更に第1の種の第2の細胞集団についてポジティブ選択を実施する段階を含み、前記細胞は第1の種の細胞に対して直交性のtRNAプールのメンバーと、コグネイトアミノアシルtRNAシンテターゼと、ポジティブ選択マーカーを含む

50

。ポジティブ選択を使用し、コグネイトアミノアシルtRNAシンテターゼによりアミノアシル化され、ポジティブ選択マーカーの存在下で所望応答を示すtRNAプールのメンバーを含む細胞について細胞を選択又はスクリーニングすることにより、O-tRNAを得る。所定態様では、第2の細胞集団はネガティブ選択により排除されなかった細胞を含む。

【0161】

GalNAcアミノ酸をO-tRNAに負荷する直交アミノアシルtRNAシンテターゼの同定方法も提供する。例えば、方法は第1の種の細胞集団に選択を実施する段階を含み、前記細胞は、1)複数のアミノアシルtRNAシンテターゼ(RS)(例えば複数のRSは突然変異体RS、第1の種以外の種に由来するRS、又は突然変異体RSと第1の種以外の種に由来するRSの両方を含むことができる)のメンバーと;2)(例えば1種以上の種に由来する)直交-tRNA(O-tRNA)と;3)ポジティブ選択マーカーをコードし、少なくとも1個のセレクターコドンを含むポリヌクレオチドを各々含む。

10

【0162】

複数のRSのメンバーを含まないか又はその量の少ない細胞に比較して抑圧効率の高い細胞について細胞(例えば宿主細胞)を選択又はスクリーニングする。これらの選択/スクリーニングした細胞はO-tRNAをアミノアシル化する活性RSを含む。この方法により同定された直交アミノアシルtRNAシンテターゼも本発明の特徴である。

【0163】

GalNAc- -スレオニンを特定位置にもつ蛋白質を細胞(例えば大腸菌細胞等の真正細菌細胞)で生産する方法も本発明の特徴である。例えば、1方法は、少なくとも1個のセレクターコドンを含み、蛋白質をコードする核酸を含む細胞を適当な培地で増殖させる段階と、GalNAc- -スレオニンを提供する段階と、少なくとも1個のセレクターコドンによる核酸の翻訳中に蛋白質の特定位置にGalNAc- -スレオニンを組込むことにより、蛋白質を生産する段階を含む。細胞は更に、細胞で機能し、セレクターコドンを認識する直交tRNA(O-tRNA)と;O-tRNAをGalNAc- -スレオニンで優先的にアミノアシル化する直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)を含む。この方法により生産された蛋白質も本発明の特徴である。

20

【0164】

本発明は例えばGalNAc- -スレオニンを組込んだ蛋白質を含有する組成物も提供する。所定態様では、蛋白質は公知蛋白質(例えば治療用蛋白質、診断用蛋白質、産業用酵素、又はその部分)のアミノ酸配列と少なくとも75%一致するアミノ酸配列を含む。場合により、組成物は医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する。

30

糖蛋白質のin vivo合成

【0165】

本発明の方法及び翻訳系では直交tRNA/RS対による非天然アミノ酸のin vivo組込みに適した宿主細胞及び生物を使用することができる。糖蛋白質をin vivo合成するためには、セレクターコドンを認識する直交tRNAと、グリコシル含有非天然アミノ酸と直交tRNAの結合を触媒する直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)と共に、(糖部分の結合が所望される位置に1個以上のセレクターコドンを組込んだ)該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する。グリコシル含有アミノ酸は一般に宿主細胞の増殖培地に外部から添加されるが、場合により宿主細胞に生合成経路を挿入することによりin vivo合成することもできる。糖蛋白質を生産するために、O-RSは非天然アミノ酸を直交tRNAと結合した後に、翻訳機構により適当なセレクターコドンが提示されると、非天然アミノ酸を成長中の該当グリコポリペプチドに導入する。

40

【0166】

場合により、直交tRNA、直交tRNAシンテターゼ、及び合成しようとする糖蛋白質をコードするポリヌクレオチドの1種以上を発現する1種以上のベクターで宿主細胞を遺伝子組換え(例えば形質転換、形質導入又はトランスフェクション)する。これらの成

50

分は単一ベクターに配置してもよいし、ベクターの組合せに配置してもよい。場合により、ベクターはプラスミド、細菌、ウイルス、裸のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドコンジュゲートの形態とすることができます。

【0167】

ターゲット核酸を細菌細胞に導入する方法としては数種の周知方法が利用可能であり、本発明ではその任意のものを使用することができる。これらの方法としては、DNAを含む細菌プロトプラストとレシピエント細胞の融合、エレクトロポレーション、遺伝子銃及びウイルスベクターによる感染等が挙げられる。遺伝子組換えした宿主細胞は例えばスクリーニング段階、プロモーター活性化又は形質転換細胞選択等の操作に合うように適宜改変した慣用栄養培地で培養することができる。これらの細胞は場合によりトランスジェニック生物で培養することができる。

10

【0168】

直交tRNA、直交tRNAシンテターゼ、及び修飾すべき蛋白質のコーディング領域を所望宿主細胞で機能的な遺伝子発現制御エレメントに機能的に連結する。典型的なベクターは転写及び翻訳ターミネーターと、転写及び翻訳開始配列と、特定ターゲット核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含む。ベクターは場合により少なくとも1個の独立ターミネーター配列と、真核生物又は原核生物又は両者（例えばシャトルベクター）でカセットの複製を可能にする配列と、原核系と真核系の両者の選択マーカーを含む包括的発現カセットを含む。ベクターは原核生物、真核生物、又は好ましくは両者での複製及び/又は組込みに適している。Gilliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Robertsら, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B.ら, Protein Expr. Purif. 6435:10 (1995); Berger and Kimmell, 前出; Sambrook, 前出, 及び Ausubel, 前出参照。クローニングに有用な細菌とバクテリオファージのカタログは例えばATCCから入手でき、例えばATCCから刊行されたThe ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherardi (編)が挙げられる。シーケンシング、クローニング及び分子生物学の他の側面のその他の基本手順と基礎理論事項もWatsonら (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY. Proteins and Polypeptides of Interestに記載されている。

20

30

【0169】

例えば、糖蛋白質の生産方法は、少なくとも1個のセレクターコドンを含み、蛋白質をコードする核酸を含む細胞を適当な培地で増殖させる段階と、糖部分を含む非天然アミノ酸を提供する段階と、少なくとも1個のセレクターコドンによる核酸の翻訳中に蛋白質の特定位置に非天然アミノ酸を組みこことにより、蛋白質を生産する段階を含む。場合により、核酸は少なくとも2個のセレクターコドン、少なくとも3個のセレクターコドン、少なくとも4個のセレクターコドン、少なくとも5個のセレクターコドン、少なくとも6個のセレクターコドン、少なくとも7個のセレクターコドン、少なくとも8個のセレクターコドン、少なくとも9個のセレクターコドン、又は10個（以上）のセレクターコドンを含む。細胞は更に、セレクターコドンを認識するO-tRNAと、グリコシル含有非天然アミノ酸でO-tRNAを優先的にアミノアシル化するO-RSを含む。一般方法は参考資料として本明細書に組込むPCT国際公開WO2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み（IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS）」と国際公開WO2004-0357

40

6、発明の名称「ケトアミノ酸の部位特異的蛋白質組込み（Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins）」に記載されている。

【0170】

例えば細胞単離及び培養（例えば後期核酸単離）に有用な他の文献としては、Fres

50

hney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 第3版, Wiley - Liss, New York 10 とその引用文献; Payneら (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (編) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer - Verlag (Berlin Heidelberg New York) 及び Atlas and Parks (編) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL が挙げられる。

【0171】

分子生物学技術について記載している一般教科書としては Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrookら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (第3版), Vol. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2001 (「Sambrook」) 及び Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら編, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2003年補遺) (「Ausubel」) が挙げられる。これらの教科書は突然変異誘発法、ベクターの使用、プロモーター、更に例えば非天然アミノ酸、直交 tRNA、直交シンテターゼ及びその対を含む蛋白質を生産するためのセレクターコドンを含む遺伝子の作製に関する他の多くの関連事項について記載している。

グリコシルトランスフェラーゼ

【0172】

本発明は更に糖部分をもつ非天然アミノ酸を更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段階は例えばグリコシルトランスフェラーゼ、グリコシダーゼ、又は当業者に公知の他の酵素を使用して酵素により実施することが好ましい。所定態様では、2種以上の異なるグリコシルトランスフェラーゼを含む单一反応混合物で複数の酵素段階を実施する。例えば、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者を反応混合物に加えることによりガラクトシル化段階とシアリル化段階を同時に実施することができる。

【0173】

グリコシルトランスフェラーゼ反応を含む酵素糖合成では、本発明の組換え細胞は場合により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個の異種遺伝子を含む。多数のグリコシルトランスフェラーゼとそのポリヌクレオチド配列が公知である。例えば “The WWW Guide To Cloned Glycosyltransferases” 参照 (ワールドワイドウェブで閲覧可能)。グリコシルトランスフェラーゼアミノ酸配列とアミノ酸配列を推定することが可能な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 等の各種公開データベースから入手できる。

【0174】

本発明の細胞で使用することができるグリコシルトランスフェラーゼとして限定されないが、ガラクトシルトランスフェラーゼ、フ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

10

20

30

40

50

エラーゼ、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、ガラクトロン酸トランスフェラーゼ、オリゴサッカリルトランスフェラーゼ等が挙げられる。適切なグリコシルトランスフェラーゼとしては真核生物と原核生物から得られるものが挙げられる。

【0175】

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と受容体に加え、グリコシルトランスフェラーゼの糖供与体として機能する活性化ヌクレオチド糖を含む。反応は更に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できる。これらの成分としては2価カチオン（例えばMg²⁺又はMn²⁺）、ATP再生に必要な材料、リン酸イオン、及び有機溶媒が挙げられる。プロセスで使用される種々の反応体の濃度又は量は温度及びpH値等の反応条件や、グリコシル化すべき受容体糖の選択と量などの多数の因子により異なる。反応媒体は更に必要に応じて溶解補助界面活性剤（例えば Triton又はSDS）と、メタノール又はエタノール等の有機溶媒を加えてよい。

核酸及びポリペプチド配列と変異体

【0176】

本明細書に記載するように、本発明は例えばO-tRNA及びO-RSをコードするポリヌクレオチド配列と、ポリペプチドアミノ酸配列（例えばO-RS）と、前記配列を含む組成物、方法、翻訳系及びキットを提供する。前記配列（例えばO-tRNA及びO-RSアミノ酸及びヌクレオチド配列）の例を本明細書に開示する（表3、例えば配列番号1～17参照）。しかし、当業者に自明の通り、本発明は本明細書、例えば実施例や配列表に開示する配列に限定されない。当業者に自明の通り、本発明は例えば本明細書に記載する機能をもつ（例えば本明細書に記載する機能をもつO-tRNA又はO-RSをコードする、例えばグリコシル含有非天然アミノ酸をO-tRNAに負荷するO-RSをコードする）多数の他の関連配列も提供する。O-tRNAをGalNac-スレオニンでアミノアシル化することが可能なO-RS種の構築と分析を実施例に記載する。これらの実施例は単離された4種のO-RS種について記載する。本明細書は更に本発明の範囲内に含まれる付加O-RS種（例えば単離されたO-RS種の保存変異体）を設計するために十分な手引きについても記載する。

【0177】

本発明はポリペプチド（O-RS）とポリヌクレオチド（例えばO-tRNA、O-RS又はその部分をコードするポリヌクレオチド、アミノアシルtRNAシンテターゼクローンを単離するために使用されるオリゴヌクレオチド等）を提供する。本発明のポリペプチドは更に人工ポリペプチドを含み、例えば（a）配列番号1～4及び11～13のいずれか1種に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；（b）配列番号6～9及び14～16のいずれか1種に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（c）（a）、又は（b）のポリペプチドに特異的な抗体に対して特異的に免疫反応性のポリペプチド；並びに（d）（a）、（b）、又は（c）の保存変異体を含むアミノ酸配列が挙げられる。本発明の人工ポリペプチドに対して特異的に免疫反応性の抗体及び抗血清も提供する。1態様では、組成物は本発明のポリペプチドと賦形剤（例えば緩衝液、水、医薬的に許容可能な賦形剤等）を含有する。

【0178】

本発明のポリヌクレオチドとしては1個以上のセレクターコドンを含み、本発明の該当蛋白質又はポリペプチドをコードするものが挙げられる。本発明のポリヌクレオチドは配列番号6～9、14～16のいずれか1種のポリヌクレオチド、又はその保存変異体と、配列番号1～4又は11～13を含むアミノ酸配列（又はこれらのアミノ酸配列の保存変異体）をコードする他のポリヌクレオチドも含む。同様に、核酸の実質的に全長にわたって高ストリンジメント条件下で上記ポリヌクレオチドとハイブリダイズする人工核酸（天然ポリヌクレオチド以外のもの）も本発明のポリヌクレオチドである。人工ポリヌクレオチドは天然に存在しない人造ポリヌクレオチドである。

【0179】

10

20

30

40

50

本発明はポリペプチド（O-RS）とポリヌクレオチド（例えばO-tRNA、O-RS又はその部分をコードするポリヌクレオチド、アミノアシルtRNAシンテターゼクローンを単離するために使用されるオリゴヌクレオチド等）を提供する。本発明のポリヌクレオチドとしては、1個以上のセレクターコドンをもつ本発明の該当蛋白質又はポリペプチドをコードするものが挙げられる。更に、本発明のポリヌクレオチドとしては、例えば配列番号6、7、8又は9に記載のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；そのポリヌクレオチド配列に相補的であるか又は前記配列をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。本発明のポリヌクレオチドは更に配列番号1、2、3又は4を含むアミノ酸配列をコードする任意ポリヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチドは更に本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。同様に、核酸の実質的に全長にわたって高ストリンジエント条件下で上記ポリヌクレオチドとハイブリダイズする人工核酸（天然ポリヌクレオチド以外のもの）も本発明のポリヌクレオチドである。1態様では、組成物は本発明のポリペプチドと賦形剤（例えば緩衝液、水、医薬的に許容可能な賦形剤等）を含有する。本発明は本発明のポリペプチドに対して特異的に免疫反応性の抗体又は抗血清も提供する。人工ポリヌクレオチドは人為的に作製され、天然には存在しないポリヌクレオチドである。

10

【0180】

本発明のポリヌクレオチドは天然に存在するtRNAのポリヌクレオチドと例えば少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又はそれ以上一致する人工ポリヌクレオチド（但し、天然に存在するtRNA以外のもの）も含む。ポリヌクレオチドは天然に存在するtRNAのポリヌクレオチドと例えば少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又はそれ以上一致する（但し100%は一致しない）人工ポリヌクレオチドも含む。

20

【0181】

所定態様では、ベクター（例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルス等）に本発明のポリヌクレオチドを組込む。1態様では、ベクターは発現ベクターである。別の態様では、発現ベクターは本発明のポリヌクレオチドの1種以上と機能的に連結されたプロモーターを含む。別の態様では、本発明のポリヌクレオチドを組んだベクターを細胞に導入する。

30

【0182】

同様に当業者に自明の通り、開示配列の多数の変異体も本発明に含まれる。例えば、機能的に同一配列となる開示配列の保存変異体も本発明に含まれる。少なくとも1種の開示配列とハイブリダイズする核酸ポリヌクレオチド配列の変異体も本発明に含むものとする。例えば標準配列比較法により判定した場合に本明細書に開示する配列のユニークサブ配列であると判断される配列も本発明に含まれる。

保存変異

【0183】

遺伝コードの縮重により、「サイレント置換」（即ちコードされるポリペプチドに変化を生じない核酸配列の置換）はアミノ酸をコードする全核酸配列の暗黙の特徴である。同様に、「保存アミノ酸置換」はアミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸を類似の化学的特性をもつ別のアミノ酸で置換するものであり、このような置換も開示構築物と高度に類似することが容易に認められる。各開示配列のこのような保存変異体は本発明の特徴である。

40

【0184】

特定核酸配列の「保存変異体」とは同一又は本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を意味し、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には本質的に同一の配列を意味する。当業者に自明の通り、コードされる配列中の單一アミノ酸又は低百分率（一般に5%未満、より一般には4%、2%又は1%未満）のアミノ酸を置換、付加又は欠失させる個々の置換、欠失又は付加の結果としてアミノ酸を欠失するか、アミノ酸が付加されるか、又はアミノ酸が化学的に類似するアミノ酸で置換される場合には、これらの変異は「保存

50

修飾変異」である。従って、本発明の指定ポリペプチド配列の「保存変異体」としては、ポリペプチド配列のアミノ酸の低百分率、一般に5%未満、より一般には2%又は1%未満が同一保存置換基のアミノ酸で置換される場合が挙げられる。最後に、非機能的配列の付加のように核酸分子のコードされる活性を変えない配列の付加も基本核酸の保存変異である。

【0185】

機能的に類似するアミノ酸を示す保存置換表は当分野で周知であり、このようなアミノ酸では、あるアミノ酸残基が類似の化学的性質（例えば芳香族側鎖又は正荷電側鎖）をもつ別のアミノ酸残基に置換しているため、ポリペプチド分子の機能的性質は実質的に変化しない。化学的性質が類似する天然アミノ酸を含む代表的グループを以下に示すが、これらのグループ内の置換は「保存置換」である。

10

【表2】

非極性及び/又は 脂肪族側鎖	極性非荷電側鎖	芳香族側鎖	正荷電側鎖	負荷電側鎖
アラニン	セリン			
アラニン	スルオニン			
バーリン	ジスチジン	フェニルアラニン	リシン	
ロイシン	メオニン	チロシン	アルギニン	
イソロイシン	アスパラギン	トリプトファン	ヒスチジン	
グロブリン	グロブリン			アスパラギン酸 グリセミン酸

核酸ハイブリダイゼーション

20

【0186】

本発明の核酸の保存変異体を含めて本発明の核酸（例えば配列番号6～9及び14～16）を同定するためには比較ハイブリダイゼーションを使用することができ、この比較ハイブリダイゼーション法は本発明の核酸を識別する1好適方法である。更に、高、超高及び超々高ストリンジエンシー条件下で例えば配列番号6～9及び14～16により表される核酸とハイブリダイズするターゲット核酸も本発明の特徴である。このような核酸の例としては所与核酸配列と比較して1又は少数のサイレント又は保存核酸置換をもつものが挙げられる。

【0187】

試験核酸が完全にマッチする相補的ターゲットに比較して少なくとも50%の割合でプローブとハイブリダイズする場合、即ちマッチしないターゲット核酸の任意のものとのハイブリダイゼーションに観測されるシグナル対ノイズ比の少なくとも約5倍～10倍で完全にマッチするプローブが完全にマッチする相補的ターゲットと結合する条件下におけるプローブとターゲットのハイブリダイゼーションに比較してシグナル対ノイズ比が少なくとも1/2である場合に試験核酸はプローブ核酸と特異的にハイブリダイズすると言う。

30

【0188】

核酸は一般に溶液中で会合するときに「ハイブリダイズ」する。核酸は水素結合、溶媒排除、塩基スタッキング等の種々の十分に特性決定された物理化学的力によりハイブリダイズする。核酸ハイブリダイゼーションの詳しい手引きはTijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and

40

Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," (Elsevier, New York)、及びCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2004年補遺) (「Ausubel」)に記載されており、Hames and Higgins (1995) Gene Probes

50

1 I R L P r e s s a t O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , O x f o r d , E n g l a n d , (H a m e s a n d H i g g i n s 1) と、 H a m e s a n d H i g g i n s (1 9 9 5) G e n e P r o b e s 2 I R L P r e s s a t O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , O x f o r d , E n g l a n d (H a m e s a n d H i g g i n s 2) はオリゴヌクレオチドを含む D N A と R N A の合成、標識、検出及び定量について詳細に記載している。

【 0 1 8 9 】

サザン又はノーザンプロットで 1 0 0 個を上回る相補的残基をもつ相補的核酸のハイブリダイゼーションをフィルター上で行うためのストリンジェントハイブリダイゼーション条件の 1 例は、 5 0 % ホルマリンにヘパリン 1 m g を加え、 4 2 で一晩ハイブリダイゼーションを実施する。ストリンジェント洗浄条件の 1 例は 6 5 、 0 . 2 × S S C で 1 5 分間洗浄する (S S C 緩衝液の説明については S a m b r o o k , 前出参照) 。多くの場合には高ストリンジェンシー洗浄の前に低ストリンジェンシー洗浄を実施してバックグラウンドプローブシグナルを除去する。低ストリンジェンシー洗浄の 1 例は 4 0 、 2 × S S C で 1 5 分間である。一般に、シグナル対ノイズ比が特定ハイブリダイゼーションアッセイで無関係プローブに観測される比の 5 倍 (以上) である場合に特異的ハイブリダイゼーションが検出されたとみなす。

【 0 1 9 0 】

サザン及びノーザンハイブリダイゼーション等の核酸ハイブリダイゼーション実験において「ストリンジェントハイブリダイゼーション洗浄条件」は配列依存性であり、各種環境パラメーターにより異なる。核酸ハイブリダイゼーションの詳しい手引きは T i j s s e n (1 9 9 3) , 前出や H a m e s a n d H i g g i n s 1 及び 2 に記載されている。ストリンジェントハイブリダイゼーション及び洗浄条件は任意試験核酸について経験により容易に決定することができる。例えば、高ストリンジェントハイブリダイゼーション及び洗浄条件を決定するには、一連の選択基準に合致するまで (例えばハイブリダイゼーション又は洗浄における温度上昇、塩濃度低下、界面活性剤濃度増加及び / 又はホルマリン等の有機溶媒濃度増加により) ハイブリダイゼーション及び洗浄条件を徐々に増加する。例えば、高ストリンジェントハイブリダイゼーション及び洗浄条件では、マッチしないターゲットとプローブのハイブリダイゼーションに観測されるシグナル対ノイズ比の少なくとも約 5 倍でプローブが完全にマッチする相補的ターゲットと結合するまでハイブリダイゼーション及び洗浄条件を徐々に増加する。

【 0 1 9 1 】

「超ストリンジェント」条件は特定プローブの熱融点 (T_m) に等しくなるように選択される。 T_m は (規定イオン強度及び p H 下で) 試験配列の 5 0 % が完全にマッチするプローブとハイブリダイズする温度である。本発明の目的には、一般に規定イオン強度及び p H で特定配列の T_m よりも約 5 低くなるように「高ストリンジェント」ハイブリダイゼーション及び洗浄条件を選択する。

【 0 1 9 2 】

「超高ストリンジェンシー」ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は完全にマッチする相補的ターゲット核酸とプローブの結合に観測されるシグナル対ノイズ比がマッチしないターゲット核酸の任意のものとのハイブリダイゼーションに観測されるシグナル対ノイズ比の少なくとも 1 0 倍になるまでハイブリダイゼーション及び洗浄条件のストリンジェンシーを増加する条件である。完全にマッチする相補的ターゲット核酸のシグナル対ノイズ比の少なくとも 1 / 2 で前記条件下にプローブとハイブリダイズする場合にターゲット核酸は超高ストリンジェンシー条件下でプローブと結合すると言ふ。

【 0 1 9 3 】

同様に、該当ハイブリダイゼーションアッセイのハイブリダイゼーション及び / 又は洗浄条件を徐々に増加することにより更に高レベルのストリンジェンシーを決定することもできる。例えば、完全にマッチする相補的ターゲット核酸とプローブの結合に観測されるシグナル対ノイズ比がマッチしないターゲット核酸の任意のものとのハイブリダイゼーション

10

20

30

40

50

ヨンに観測されるシグナル対ノイズ比の少なくとも10倍、20倍、50倍、100倍又は500倍以上になるまでハイブリダイゼーション及び洗浄条件のストリングエンシーを増加する条件である。完全にマッチする相補的ターゲット核酸のシグナル対ノイズ比の少なくとも1/2で前記条件下にプローブとハイブリダイズする場合にターゲット核酸は超々高ストリングエンシー条件下でプローブと結合すると言う。

【0194】

ストリングエント条件下で相互にハイブリダイズしない核酸でも、これらの核酸によりコードされるポリペプチドが実質的に同一である場合には実質的に同一である。これは、例えば遺伝コードに許容される最大コドン縮重を使用して核酸のコピーを作製する場合に該当する。

10

ユニークサブ配列

【0195】

1側面では、本発明は本明細書に開示するO-tRNA及びO-RSの配列から選択される核酸中にユニークサブ配列を含む核酸を提供する。ユニークサブ配列は任意公知O-tRNA及びO-RS核酸配列に対応する核酸に比較してユニークである。例えばデフォルトパラメーターに設定したBLASTを使用してアラインメントを実施することができる。任意ユニークサブ配列は例えば本発明の核酸を同定するためのプローブとして有用である。

【0196】

同様に、本発明は本明細書に開示するO-RSの配列から選択されるポリペプチド中にユニークサブ配列を含むポリペプチドを含む。この場合には、ユニークサブ配列は任意公知ポリペプチド配列に対応するポリペプチドに比較してユニークである。

20

【0197】

本発明はO-RSの配列から選択されるポリペプチド中のユニークサブ配列をコードするユニークコーディングオリゴヌクレオチドとストリングエント条件下でハイブリダイズするターゲット核酸も提供し、この場合には、ユニークサブ配列は対照ポリペプチド（例えば本発明のシンテターゼを例えれば突然変異により誘導した元の親配列）の任意のものに対応するポリペプチドに比較してユニークである。ユニーク配列は上記のように決定する。

30

配列比較、一致度及び相同度

【0198】

2種以上の核酸又はポリペプチド配列に関して「一致」又は「一致度百分率」なる用語は2種以上の配列又はサブ配列を最大限に対応するように対比及び整列させ、以下に記載する配列比較アルゴリズム（又は当業者に入手可能な他のアルゴリズム）の1種を使用するか又は目視により測定した場合に相互に同一であるか又は同一のアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの百分率が特定値であることを意味する。

【0199】

2種以上の核酸又はポリペプチド（例えばO-tRNAもしくはO-RSをコードするDNA又はO-RSのアミノ酸配列）に関して「実質的に一致」なる用語は2種以上の配列又はサブ配列を最大限に対応するように対比及び整列させ、配列比較アルゴリズムを使用するか又は目視により測定した場合にヌクレオチド又はアミノ酸残基一致度が少なくとも約60%、約80%、約90~95%、約98%、約99%又はそれ以上であることを意味する。このような「実質的に一致」する配列は一般に実際の起源が記載されていなくても「相同」であるとみなす。少なくとも約50残基長の配列の領域、より好ましくは少なくとも約100残基長の領域にわたって「実質的一致」が存在していることが好ましく、少なくとも約150残基又は比較する2配列の全長にわたって配列が実質的に一致していることが最も好ましい。

40

【0200】

蛋白質及び/又は蛋白質配列は共通の祖先蛋白質又は蛋白質配列から天然又は人工的に誘導される場合に「相同」である。同様に、核酸及び/又は核酸配列は共通の祖先核酸又

50

は核酸配列から天然又は人工的に誘導される場合に相同である。例えば、1個以上のセレクターコドンを含むように任意天然核酸を利用可能な任意突然変異誘発法により改変することができる。この突然変異誘発した核酸は発現されると、1種以上の非天然アミノ酸（例えばG a l N A cアミノ酸）を含むポリペプチドをコードする。突然変異法は当然のことながら更に1個以上の標準コドンを変異させ、得られる突然変異体蛋白質の1個以上の標準アミノ酸も変異させることができる。相同性は一般に2種以上の核酸又は蛋白質（又はその配列）間の配列類似度から推定される。相同性の判定に有用な配列間類似度の厳密な百分率は該当核酸及び蛋白質により異なるが、通常は25%程度の低い配列類似度を使用して相同性を判定する。例えば30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又は99%以上のより高レベルの配列類似度を使用して相同性を判定することができる。配列類似度百分率の決定方法（例えばデフォルトパラメーターを使用するBLASTP及びBLASTN）は本明細書に記載し、一般に入手可能である。

10

【0201】

配列比較及び相同性判定には、一般にある配列を参照配列としてこれに試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合には、試験配列と参照配列をコンピューターに入力し、必要に応じてサブ配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。こうすると、配列比較アルゴリズムは指定プログラムパラメーターに基づいて参照配列に対して試験配列の配列一致度百分率を計算する。

【0202】

比較のための最適な配列アラインメントは例えばSmith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988) の類似性探索法、これらのアルゴリズムのコンピューターソフトウェア (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BEST FIT、FASTA及びTFASTA)、又は目視（一般にCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編、Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2004年補遺) 参照）により実施することができる。

20

【0203】

配列一致度及び配列類似度百分率を決定するのに適したアルゴリズムの1例はAltschulら, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990) に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実施するためのソフトウェアはNational Center for Biotechnology Informationウェブサイトから公共入手可能である。このアルゴリズムはデータベース配列中の同一長さの単語と整列した場合に所定の正の閾値スコアTと一致するか又はこれを満足するクエリー配列中の長さWの短い単語を識別することによります高スコア配列対 (HSP) を識別する。Tを隣接単語スコア閾値と言う (Altschulら, 前出)。これらの初期隣接単語ヒットをシードとして検索を開始し、これらの単語を含むもっと長いHSPを探査する。次に、累積アラインメントスコアを増加できる限り、単語ヒットを各配列に沿って両方向に延長する。スクレオチド配列の場合にはパラメーターM (1対のマッチ残基のリウォードスコア、常に>0) 及びN (ミスマッチ残基のペナルティースコア、常に<0) を使用して累積スコアを計算する。アミノ酸配列の場合には、スコアリングマトリクスを使用して累積スコアを計算する。累積アラインメントスコアがその最大到達値から量Xだけ低下するか、累積スコアが1カ所以上の負スコア残基アラインメントの累積によりゼロ以下になるか、又はどちらかの配列の末端に達したら各方向の単語ヒットの延長

30

40

50

を停止する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T及びXはアラインメントの感度と速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は語長(W)11、期待値(E)10、カットオフ100、M=5、N=4、及び両鎖の比較をデフォルトとして使用する。アミノ酸配列用として、BLASTPプログラムは語長(W)3、期待値(E)10、及びBLOSUM62スコアリングマトリクスをデフォルトとして使用する(Henikoff & Henikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照)。

【0204】

配列一致度百分率の計算に加え、BLASTアルゴリズムは2配列間の類似性の統計分析も実施する(例えばKarlin & Altshul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787(1993)参照)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の1尺度は2種のヌクレオチド又はアミノ酸配列間に偶然にマッチが起こる確率を示す最小合計確率(P(N))である。例えば、試験核酸を参照核酸に比較した場合の最小合計確率が約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合に核酸は参照核酸に類似しているとみなす。

突然変異誘発及び他の分子生物学技術

【0205】

本発明のポリヌクレオチドとポリペプチド及び本発明で使用されるポリヌクレオチドとポリペプチドは分子生物学技術を使用して操作することができる。分子生物学技術について記載している一般教科書としてはBerger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA(Berger); Sambrookら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual(第3版), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2001(「Sambrook」)及びCurrent Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら編, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2004年補遺)(「Ausubel」)が挙げられる。これらの教科書は突然変異誘発法、ベクターの使用、プロモーター、更に例えばGalNAcアミノ酸(例えばGalNAc- -スレオニン)、直交tRNA、直交シンテターゼ及びその対を含む蛋白質を生産するためのセレクターコドンを含む遺伝子の作製に関連する他の多くの関連事項について記載している。

【0206】

例えばtRNA分子を突然変異させるため、tRNAのライブラリーを作製するため、シンテターゼのライブラリーを作製するため、GalNAcアミノ酸をコードするセレクターコドンを該当蛋白質又はポリペプチドに挿入するために、本発明では各種突然変異誘発法を使用する。これらの方法としては限定されないが、部位特異的、ランダム点突然変異誘発、相同組換え、DNAシャフリング又は他の帰納的突然変異誘発法、キメラ構築、ウラシル含有錆型を使用する突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、ホスホチオエート修飾DNA突然変異誘発、ギャップデュプレクスDNAを使用する突然変異誘発等、又はその任意組み合わせが挙げられる。他の適切な方法としては点ミスマッチ修復、修復欠損宿主株を使用する突然変異誘発、制限-選択及び制限-精製、欠失突然変異誘発、完全遺伝子合成による突然変異誘発、2本鎖切断修復等が挙げられる。例えばキメラ構築物を使用する突然変異誘発も本発明に含まれる。1態様では、天然分子又は改変もしくは突然変異させた天然分子の既知情報(例えば配列、配列比較、物性、結晶構造等)に基づいて突然変異誘発を誘導することができる。

10

20

30

40

50

【0207】

本発明のポリヌクレオチド又は本発明のポリヌクレオチドを組込んだ構築物（例えばクローニングベクター又は発現ベクター等の本発明のベクター）で宿主細胞を遺伝子組換え（例えば形質転換、形質導入又はトランスフェクション）する。例えば、直交tRNA、直交tRNAシンテターゼ、及び修飾すべき蛋白質のコーディング領域を所望宿主細胞で機能的な遺伝子発現制御エレメントに機能的に連結する。典型的なベクターは転写及び翻訳ターミネーターと、転写及び翻訳開始配列と、特定ターゲット核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含む。ベクターは場合により少なくとも1個の独立ターミネーター配列と、真核生物又は原核生物又は両者（例えばシャトルベクター）でカセットの複製を可能にする配列と、原核系と真核系の両者の選択マーカーを含む包括的発現カセットを含む。ベクターは原核生物、真核生物、又は好ましくは両者での複製及び／又は組込みに適している。Gilliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Robertsら, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B.ら, Protein Expr. Purif. 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (いずれも前出) 参照。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又はポリヌクレオチドコンジュゲートの形態とすることができる。ベクターはエレクトロポレーション (Fromら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985))、ウイルスベクターによる感染、核酸を小ビーズもしくは粒子のマトリックスに埋込むか又は表面に付着させて小粒子形態で高速射入する方法 (Kleinら, Nature 327, 70-73 (1987))、及び／又は同等方法等の標準方法により細胞及び／又は微生物に導入する。

10

20

30

30

【0208】

クローニングに有用な細菌とバクテリオファージのカタログは例えばATCCから入手でき、例えばATCCから刊行されたThe ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1996) Ghernaら(編)が挙げられる。シーケンシング、クローニング及び分子生物学の他の側面のその他の基本手順と基礎理論事項もSambrook(前出)、Ausubel(前出)、及びWatsonら(1992) Recombinant DNA Second Edition, Scientific American Books, NYに記載されている。更に、Midland Certified Reagent Company (Midland, TX mcrc.com)、The Great American Gene Company (Ramona, CA, ワールドワイドウェブ genco.comで販売)、ExpressGen Inc. (Chicago, IL, ワールドワイドウェブ expressgen.comで販売)、Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) 及び他の多数の企業等の各種販売会社からほぼ任意核酸（及び標準又は標準外を問わずほぼ任意標識核酸）をオーダーメード又は標準注文することができる。

【0209】

遺伝子組換えした宿主細胞は例えばスクリーニング段階、プロモーター活性化又は形質転換細胞選択等の操作に合うように適宜改変した慣用栄養培地で培養することができる。これらの細胞は場合によりトランスジェニック生物で培養することができる。例えば細胞単離及び培養（例えば後期核酸単離）に有用な他の文献としては、Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 第3版, Wiley-Liss, New York とその引用文献；Payneら(1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillip (編) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg

40

50

New York) 及びAtlas and Parks(編) The Handbook of Microbiological Media(1993) CRC Press, Boca Raton, FLが挙げられる。

該当蛋白質及びポリペプチド

【0210】

(例えばGalNAc- -スレオニン等の少なくとも1種のGalNAcアミノ酸を組込んだ)該当蛋白質又はポリペプチドは本発明の特徴である。本発明は本発明の組成物と方法を使用して生産された少なくとも1種のGalNAcアミノ酸を含むポリペプチド又は蛋白質も含む。賦形剤(例えば医薬的に許容可能な賦形剤)も蛋白質に添加することができる。場合により、本発明の蛋白質は單一アミノ酸位置又は複数の位置に翻訳後修飾(例えば付加糖部分の結合等のGalNAcアミノ酸部分の後期修飾)を含むことができるか、あるいは蛋白質は複数の異なる型の修飾をもつことができる。

【0211】

GalNAcアミノ酸を特定位置にもつ蛋白質を細胞で生産する方法も本発明の特徴である。例えば、1方法は、少なくとも1個のセレクターコドンを含み、蛋白質をコードする核酸を含む細胞を適当な培地で増殖させる段階と、GalNAcアミノ酸を提供する段階を含み、細胞は更に、細胞で機能し、セレクターコドンを認識する直交tRNA(O-tRNA)と; O-tRNAをGalNAcアミノ酸で優先的にアミノアシル化する直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)を含む。この方法により生産された蛋白質も本発明の特徴である。

【0212】

所定態様では、O-RSは発現系において内在tRNAよりもコグネイトO-tRNAのアミノアシル化を優先する。O-tRNAとO-RSが等モル濃度で存在する場合にO-RSにより負荷されるO-tRNAと内在tRNAの相対比は1:1を上回り、好ましくは少なくとも約2:1、より好ましくは5:1、更に好ましくは10:1、更に好ましくは20:1、更に好ましくは50:1、更に好ましくは75:1、更に好ましくは95:1、98:1、99:1、100:1、500:1、1,000:1、5,000:1又はそれ以上である。

【0213】

本発明はGalNAcアミノ酸を組込んだ蛋白質を含有する組成物も提供する。所定態様では、蛋白質は治療用蛋白質、診断用蛋白質、産業用酵素、又はその部分のアミノ酸配列と少なくとも75%一致するアミノ酸配列を含む。

【0214】

本発明の組成物と本発明の方法により作製された組成物は場合により細胞に導入する。その後、本発明のO-tRNA/O-RS対又は個々の成分を宿主系の翻訳機構で使用することができ、その結果として、GalNAcアミノ酸が蛋白質に組込まれる。国際公開WO2004/094593、出願日2004年4月16日、発明の名称「真核遺伝コードの拡張(EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE)」、及びWO2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み(IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS)」はこのプロセスを記載しており、参考資料として本明細書に組込む。例えば、O-tRNA/O-RS対を宿主(例えば大腸菌細胞)に導入すると、前記対はセレクターコドンに応答してGalNAc- -スレオニン等のGalNAcアミノ酸のin vivo蛋白質組込みを誘導する。系に付加されるGalNAc- -スレオニンは合成アミノ酸(例えばスレオニン誘導体)であり、外部から増殖培地に添加することができる。場合により、本発明の組成物はin vitro翻訳系に導入してもよいし、in vivo系に導入してもよい。

【0215】

本発明の翻訳系(例えば宿主細胞を含む翻訳系)は非天然アミノ酸を組込んだ蛋白質を大量の有用な量で合成することができる。1側面では、組成物は場合により、GalNA

10

20

30

40

50

c アミノ酸を組込んだ蛋白質を例えれば少なくとも 10 µg、少なくとも 50 µg、少なくとも 75 µg、少なくとも 100 µg、少なくとも 200 µg、少なくとも 250 µg、少なくとも 500 µg、少なくとも 1 mg、少なくとも 10 mg、又はそれ以上、あるいは *in vivo* 蛋白質生産方法で達成可能な量で含有する（組換え蛋白質生産及び精製に関する詳細は本明細書に記載する）。別の側面では、蛋白質は場合により例えば細胞溶解液、緩衝液、医薬緩衝液、又は他の懸濁液中（例えば約 1 nL ~ 約 100 L の任意の容量中）に例えば少なくとも 10 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 50 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 75 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 100 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 200 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 250 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 500 µg 蛋白質 / 1、少なくとも 1 mg 蛋白質 / 1、又は少なくとも 10 mg 蛋白質 / 1 以上の濃度で組成物中に存在する。少なくとも 1 種の GalNAc アミノ酸を組込んだ蛋白質を細胞で大量（例えば他の方法、例えば *in vitro* 翻訳で一般に可能な量よりも多量）に生産することも本発明の特徴である。

10

20

30

40

50

【0216】

GalNAc アミノ酸の組込みは例えば寸法、酸性度、求核性、水素結合、疎水性、プロテアーゼ標的部位接近性、（例えば蛋白質アレーのための）部分へのターゲット等を変化させるように例えば蛋白質構造及び / 又は機能の変化を調整するために実施することができる。GalNAc アミノ酸を組込んだ蛋白質は触媒性又は物性を強化するか又は全く新規にすることができる。例えば、GalNAc アミノ酸を蛋白質に組込むことにより、場合により毒性、生体分布、構造的性質、分光学的性質、化学及び / 又は光化学的性質、触媒能、半減期（例えば血清半減期）、他の分子との（例えば共有又は非共有）反応性等の性質を改変する。少なくとも 1 種の GalNAc アミノ酸を組込んだ蛋白質を含有する組成物は例えば新規治療薬、診断薬、触媒酵素、産業用酵素、結合蛋白質（例えば抗体）及び例えば蛋白質構造と機能の研究に有用である。例えば Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 645 - 652 参照。

【0217】

本発明の 1 側面では、組成物は少なくとも 1 個、例えば少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、又は少なくとも 10 個以上の非天然アミノ酸（例えば GalNAc アミノ酸及び / 又は他の非天然アミノ酸）を組込んだ少なくとも 1 種の蛋白質を含有する。非天然アミノ酸は同一でも異なっていてもよく、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 種以上の異なる非天然アミノ酸を含む 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個以上の異なる部位が蛋白質に存在することができる。別の側面では、組成物は蛋白質に存在する特定アミノ酸の全部よりは少ないが少なくとも 1 個が GalNAc アミノ酸で置換された蛋白質を含有する。2 個以上の非天然アミノ酸を組込んだ所与蛋白質では、非天然アミノ酸は同一でも異なっていてもよい（例えば蛋白質は 2 個以上の異なる型の非天然アミノ酸を組込んでもよいし、2 個の同一非天然アミノ酸を組込んでもよい）。3 個以上の非天然アミノ酸を組込んだ所与蛋白質では、非天然アミノ酸は同一でも異なっていてもよいし、同一種の複数の非天然アミノ酸と少なくとも 1 個の別の非天然アミノ酸の組み合わせでもよい。

【0218】

本明細書に記載する組成物と方法を使用してガラクトサミン又はグルコサミン含有非天然アミノ酸を含むほぼ任意蛋白質（又はその部分）（及び例えば 1 個以上のセレクターコドンを含む対応する任意コーディング核酸）を生産することができる。数十万種の公知蛋白質を列挙するには及ばないが、例えば該当翻訳系に 1 個以上の適当なセレクターコドンを含むように入手可能な任意突然変異法を調整することにより、1 種以上の非天然アミノ酸を組込むように公知蛋白質の任意のものを改変することができる。公知蛋白質の一般的な配列寄託機関としては GenBank、EMBL、DDBJ 及び NCBI が挙げられる

。他の寄託機関もインターネットを検索することにより容易に確認できる。

【0219】

一般に、蛋白質は入手可能な任意蛋白質（例えば治療用蛋白質、診断用蛋白質、産業用酵素、又はその部分等）と例えば少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%以上一致しており、1種以上の非天然アミノ酸を含む。1種以上のGalNAcアミノ酸を組込むように改変することができる治療用、診断用、及び他の蛋白質の例としては限定されないが、国際公開WO2004/094593、出願日2004年4月16日、発明の名称「真核遺伝コードの拡張（Expanding the Eukaryotic Genetic Code）」；及びWO2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み（IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS）」に記載されているものが挙げられる。1種以上のGalNAcアミノ酸を組込むように改変することができる治療用、診断用、及び他の蛋白質の例としては限定されないが、例えば1アンチトリプシン、アンジオスタチン、抗血友病因子、抗体（抗体の詳細については後述する）、アポリポ蛋白質、アポ蛋白質、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、心房性ペプチド、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、PF-4、MIG）、カルシトニン、C-Cケモカイン（例えば単球化学誘引蛋白質-1、単球化学誘引蛋白質-2、単球化学誘引蛋白質-3、単球炎症性蛋白質-1、単球炎症性蛋白質-1、RANTES、I309、R83915、R91733、HCC1、T58847、D31065、T64262）、CD40リガンド、Cキットリガンド、コラーゲン、コロニー刺激因子（CSF）、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/MGSA、GRO、GRO、MIP-1、MIP-1、MCP-1）、表皮増殖因子（EGF）、エリスロポエチン（「EPO」）、表皮剥離毒素A及びB、IX因子、VII因子、VIII因子、X因子、纖維芽細胞増殖因子（FGF）、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、G-CSF、GM-CSF、グルコセレブロシダーゼ、ゴナドトロピン、増殖因子、ヘッジホッグ蛋白質（例えばソニック、インディアン、デザート）、ヘモグロビン、肝細胞増殖因子（HGF）、ヒルジン、ヒト血清アルブミン、インスリン、インスリン様増殖因子（IGF）、インターフェロン（例えばIFN-、IFN-、IFN-）、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等）、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、ラクトフェリン、白血病阻害因子、ルシフェラーゼ、ニュールチュリン、好中球阻害因子（NIF）、オンコスタチンM、骨形成蛋白質、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、発熱外毒素A、B及びC、リラキシン、レニン、SCF、可溶性補体受容体I、可溶性I-CAM1、可溶性インターロイキン受容体（IL-1、2、3、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15）、可溶性TNF受容体、ソマトメジン、ソマトスタチン、ソマトトロピン、ストレプトキナーゼ、スーパー抗原即ちブドウ球菌エンテロトキシン（SEA、SEB、SEC1、SEC2、SEC3、SED、SEE）、スーパーオキシドジスムター（SOD）、毒素性ショック症候群毒素（TSST-1）、チモシン1、組織プラスミノーゲンアクチベーター、腫瘍壞死因子（TNF）、腫瘍壞死因子受容体（TNFR）、腫瘍壞死因子（TNF）、血管内皮増殖因子（VEGEG）、ウロキナーゼ並びに他の多数の蛋白質が挙げられる。

【0220】

本明細書に記載するGalNAcアミノ酸のin vivo組込み用組成物及び方法を使用して生産することができる蛋白質の1類としては転写モジュレーター又はその部分が挙げられる。転写モジュレーターの例としては細胞増殖、分化、制御等を調節する遺伝子

10

20

30

40

50

及び転写モジュレーター蛋白質が挙げられる。転写モジュレーターは原核生物、ウイルス及び真核生物（例えば真菌、植物、酵母、昆虫、及び哺乳動物を含む動物）に存在し、広範な治療ターゲットを提供する。当然のことながら、発現及び転写アクチベーターは例えば受容体との結合、シグナル伝達カスケードの刺激、転写因子の発現調節、プロモーターやエンハンサーとの結合、プロモーターやエンハンサーと結合する蛋白質との結合、DNA巻き戻し、プレmRNAスプライシング、RNAポリアデニル化及びRNA分解等の多数のメカニズムにより転写を調節する。

【0221】

本発明の蛋白質（例えば1種以上のGalNAcアミノ酸を組込んだ蛋白質）の1類としてはサイトカイン、炎症性分子、増殖因子、その受容体、及び腫瘍遺伝子産物等の生体活性蛋白質が挙げられ、例えばインターロイキン（例えばIL-1、IL-2、IL-8等）、インターフェロン、FGF、IGF-I、IGF-II、FGF、PDGF、TNF、TGF-、TGF-、EGF、KGF、SCF/c-キット、CD40L/CD40、VLA-4/VCAM-1、ICAM-1/LFA-1及びヒアルリン/CD44；シグナル伝達分子及び対応する腫瘍遺伝子産物（例えばMos、Ras、Raf及びMet）；並びに転写アクチベーター及びサプレッサー（例えばp53、Tat、Fos、Myc、Jun、Myb、Rel、及びステロイドホルモン受容体（例えばエストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、アルドステロン、LDL受容体リガンド及びコルチコステロン））が挙げられる。

【0222】

少なくとも1種のGalNAcアミノ酸を組込んだ酵素（例えば産業用酵素）又はその部分も本発明により提供される。酵素の例としては限定されないが、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p450類）、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、スブチリシン、トランスアミナーゼ及びヌクレアーゼが挙げられる。

【0223】

これらの蛋白質の多くは市販されており（例えばSigma Biosciences 2002カタログ及び価格表参照）、対応する蛋白質配列と遺伝子及び、一般に多くのその変異体も周知である（例えばGenbank参照）。例えば1種以上の該当治療、診断又は酵素特性に関して蛋白質を改変するように本発明に従って1種以上のGalNAcアミノ酸を挿入することにより前記蛋白質の任意のものを改変することができる。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、（例えば非天然アミノ酸（例えばGalNAcアミノ酸）へのレポーター基（例えばラベル又はラベル結合部位）の付加による）検出性、LD₅₀又は他の副作用の低減、胃管を経由して体内に導入できること（例えば経口利用性）等が挙げられる。診断特性の例としては貯蔵半減期、安定性、診断活性、検出性等が挙げられる。該当酵素特性の例としては貯蔵半減期、安定性、酵素活性、産生能等が挙げられる。

【0224】

他の各種蛋白質も本発明の組成物と方法を使用して1種以上のGalNAcアミノ酸を組込むように改変することができる。例えば、本発明は例えば感染性真菌（例えばAspergillus、Candida種）；細菌、特に病原細菌モデルとして利用できる大腸菌や医学的に重要な細菌（例えばStaphylococci（例えばaureus）又はStreptococci（例えばpneumoniae））；原生動物（例えば胞子虫類（例えばPlasmodia）、根足虫類（例えばEntamoeba）及び鞭毛虫類（Trypanosoma、Leishmania、Trichomonas、Giardia等））；ウイルス（例えば（+）RNAウイルス（例えばポックスウイルス（例えばワクシニア）、ピコルナウイルス（例えばポリオ）、トガウイルス（例えば風疹）

10

20

30

40

50

、 フラビウイルス（例えば H C V ）、及びコロナウイルス）、（ - ） R N A ウイルス（例えばラブドウイルス（例えば V S V ）、パラミクソウイルス（例えば R S V ）、オルトミクソウイルス（例えばインフルエンザ）、ブンヤウイルス及びアレナウイルス）、 d s D N A ウイルス（例えばレオウイルス）、 R N A D N A ウイルス（即ちレトロウイルス、例えば H I V 及び H T L V ）、及び所定の D N A R N A ウイルス（例えば B 型肝炎））に由来する蛋白質において、 1 種以上のワクチン蛋白質中の 1 種以上の天然アミノ酸を G a l N A c アミノ酸で置換することができる。

【 0 2 2 5 】

昆虫耐性蛋白質（例えば C r y 蛋白質）、澱粉及び脂質產生酵素、植物及び昆虫毒素、毒素耐性蛋白質、マイコトキシン解毒蛋白質、植物成長酵素（例えばリブロース 1,5- ビスリン酸カルボキシラーゼ / オキシゲナーゼ、「 R U B I S C O 」）、リボキシゲナーゼ（ L O X ）及びホスホエノールピルビン酸（ P E P ）カルボキシラーゼ等の農業関連蛋白質も G a l N A c アミノ酸修飾の適切なターゲットである。

10

【 0 2 2 6 】

所定態様では、本発明の方法及び / 又は組成物における該当蛋白質又はポリペプチド（又はその部分）は核酸によりコードされる。一般に、核酸は少なくとも 1 個のセレクターコドン、少なくとも 2 個のセレクターコドン、少なくとも 3 個のセレクターコドン、少なくとも 4 個のセレクターコドン、少なくとも 5 個のセレクターコドン、少なくとも 6 個のセレクターコドン、少なくとも 7 個のセレクターコドン、少なくとも 8 個のセレクターコドン、少なくとも 9 個のセレクターコドン、 10 個以上のセレクターコドンを含む。

20

【 0 2 2 7 】

該当蛋白質又はポリペプチドをコードする遺伝子は例えば G a l N A c アミノ酸を組込むための 1 個以上のセレクターコドンを付加するように本明細書の「突然変異誘発及び他の分子生物学技術」のセクションに記載する当業者に周知の方法を使用して突然変異誘発することができる。例えば、 1 個以上のセレクターコドンを付加するように該当蛋白質の核酸を突然変異誘発し、 1 種以上の G a l N A c アミノ酸を挿入できるようにする。本発明は例えば少なくとも 1 種の G a l N A c アミノ酸を組込んだ任意蛋白質のこのような任意変異体（例えば突然変異体、変形）を含む。同様に、本発明は対応する核酸、即ち 1 種以上の G a l N A c アミノ酸をコードする 1 個以上のセレクターコドンを含む任意核酸も含む。

30

【 0 2 2 8 】

G a l N A c アミノ酸を組込んだ蛋白質を生産するためには、直交 t R N A / R S 対による G a l N A c アミノ酸の i n v i v o 組込みに適した宿主細胞及び生物を使用することができる。直交 t R N A 、直交 t R N A シンテターゼ、及び修飾すべき蛋白質をコードするベクターを発現する 1 種以上のベクターで宿主細胞を遺伝子組換え（例えば形質転換、形質導入又はトランスフェクション）する。これらの成分の各々を同一ベクターに配置してもよいし、各々別々のベクターに配置してもよいし、 2 成分を第 1 のベクターに配置し、第 3 の成分を第 2 のベクターに配置してもよい。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又はポリヌクレオチドコンジュゲートの形態とすることができる。

40

免疫反応性によるポリペプチドの定義

【 0 2 2 9 】

本発明のポリペプチドは種々の新規ポリペプチド配列（例えば本発明の翻訳系で合成される蛋白質の場合には G a l N A c アミノ酸を含み、例えば新規シンテターゼの場合には標準アミノ酸の新規配列を含むポリペプチド）を提供するので、ポリペプチドは例えばイムノアッセイで認識することができる新規構造特徴も提供する。本発明のポリペプチドは特異的に結合する抗血清の作製及び前記抗血清と結合するポリペプチドも本発明の特徴である。本明細書で使用する「抗体」なる用語は限定されないが、検体（抗原）と特異的に結合してこれを認識する 1 又は複数の免疫グロブリン遺伝子又はそのフラグメントにより実質的にコードされるポリペプチドを意味する。例としてはポリクローナル、モノクローナル

50

ナル、キメラ、及び1本鎖抗体等が挙げられる。F a b フラグメントやファージディスプレイを含む発現ライブラリーにより生産されるフラグメント等の免疫グロブリンフラグメントも本明細書で使用する「抗体」なる用語に含まれる。抗体構造及び用語については、例えば Paul , Fundamental Immunology , 4 th Ed. , 1999 , Raven Press , New York 参照。

【0230】

本発明は本明細書に記載する各種配列の1種以上から選択されるシンテターゼアミノ酸配列を含む免疫原に対して作製した抗体又は抗血清に特異的に結合するか又は特異的に免疫反応性である新規シンテターゼ蛋白質を含む。他の相同体との交差反応性を排除するために、野生型 *Methanococcus jannaschii* (M. jannaschii) チロシルシンテターゼ (TyrRS) 等の入手可能なシンテターゼ又は WO 2002/085923 に記載されているもの等の公知人工シンテターゼを用いて抗体又は抗血清をサブトラクションする。野生型 M. jannaschii チロシルシンテターゼ (TyrRS) 又は従来配列が核酸に対応する場合には、場合により核酸によりコードされるポリペプチドを作製し、抗体 / 抗血清サブトラクション目的に使用する。

10

【0231】

典型的な1フォーマットでは、イムノアッセイは本明細書に記載するシンテターゼ配列の1種以上又はその実質的サブ配列（即ち記載する全長配列の少なくとも約30%）を含む1種以上のポリペプチドに対して作製したポリクローナル抗血清を使用する。これらの配列に由来する潜在的ポリペプチド免疫原群を以下の文中では「免疫原性ポリペプチド」と総称する。得られた抗血清を場合により対照シンテターゼ相同体（野生型 TyrRS、及び / 又は WO 2002/085923 に記載のシンテターゼ）に対する交差反応性が低下するように選択し、ポリクローナル抗血清をイムノアッセイで使用する前に例えば免疫吸着により対照シンテターゼ相同体の1種以上に対するこのような交差反応性を排除する。

20

【0232】

イムノアッセイ用抗血清を作製するためには、免疫原性ポリペプチドの1種以上を本明細書に記載するように作製し、精製する。例えば、組換え蛋白質を組換え細胞で生産することができる。（マウスの仮想遺伝子一致により結果の再現性が高いのでこのアッセイで使用する）近交系マウスに標準マウス免疫プロトコールに従って標準アジュバント（例えばフロイントアジュバント）と共に免疫原性蛋白質を免疫する（抗体作製、イムノアッセイフォーマット及び特異的免疫反応性を測定するために使用可能な条件の標準解説については例えば Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York 参照。抗体に関するその他の事項については本明細書にも記載し、本欄の免疫反応性によるポリペプチドの定義にも適用することができる）。例えば、国際公開 WO 2004/094593、発明の名称「真核遺伝コードの拡張 (EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE)」； WO 2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み (IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS)」； WO 2004/035605、発明の名称「糖蛋白質合成 (GLYCOPROTEIN SYNTHESIS)」；及び WO 2004/058946、発明の名称「蛋白質アレー (PROTEIN ARRAYS)」参照。

30

40

【0233】

あるいは、本明細書に開示する配列から誘導される1種以上の合成又は組換えポリペプチドをキャリヤー蛋白質にコンジュゲートし、免疫原として使用する。蛋白質、抗体、抗血清等に関するその他の詳細は WO 2002/085923 に記載されている。

【0234】

ポリクローナル血清を採取し、イムノアッセイ（例えば固体支持体に固定化した免疫原性蛋白質の1種以上を使用する固相イムノアッセイ）で免疫原性ポリペプチドに対する力

50

価を測定する。10⁶以上の力価をもつポリクローナル抗血清を選択し、プールし、対照シンテターゼポリペプチドでサブトラクションし、高力価ポリクローナル抗血清サブトラクションプールを作製する。

【0235】

高力価ポリクローナル抗血清サブトラクションプールを比較イムノアッセイで対照相10同体に対する交差反応性について試験する。この比較アッセイでは、サブトラクション高力価ポリクローナル坑血清に差別的な結合条件を設定し、高力価ポリクローナル坑血清と免疫原性シンテターゼの結合のシグナル対ノイズ比を対照シンテターゼ相10同体との結合に比較して少なくとも約5～10倍にする。即ち、アルブミン又は脱脂粉乳等の非特異的競合剤を加えるか及び／又は塩条件、温度、及び／又は同等条件を調節することにより結合反応のストリングエンシーを調整する。これらの結合条件は、試験ポリペプチド（免疫原性ポリペプチド及び／又は対照ポリペプチドに比較するポリペプチド）がサブトラクションポリクローナル坑血清プールに特異的に結合するか否かを調べる後期アッセイで使用される。特に、差別的結合条件下で対照シンテターゼ相10同体の少なくとも2～5倍のシグナル対ノイズ比と、免疫原性ポリペプチドの少なくとも約1/2のシグナル対ノイズ比を示す試験ポリペプチドは公知シンテターゼに比較して免疫原性ポリペプチドと実質的な構造類似性をもつので、本発明のポリペプチドである。

【0236】

別の例では、競合的結合フォーマットのイムノアッセイを試験ポリペプチドの検出に使用する。例えば、上述のように、対照ポリペプチドの免疫吸着により坑血清混合物プールから交差反応性抗体を除去する。次に、免疫原性ポリペプチドを固体支持体に固定化し、支持体をサブトラクション坑血清プールに暴露する。試験蛋白質をアッセイに加え、サブトラクション坑血清プールとの結合を競合させる。試験蛋白質が固定化蛋白質に対してサブトラクション坑血清プールとの結合を競合する能力と、アッセイに加えた免疫原性ポリペプチドが結合を競合する能力を比較する（免疫原性ポリペプチドは坑血清プールとの結合を固定化免疫原性ポリペプチドと有効に競合する）。標準計算を使用して試験蛋白質の交差反応性百分率を計算する。

【0237】

平行アッセイでは、場合により対照蛋白質がサブトラクション坑血清プールとの結合を競合する能力を免疫原性ポリペプチドが坑血清との結合を競合する能力と比較測定する。この場合も、標準計算を使用して対照ポリペプチドの交差反応性百分率を計算する。試験ポリペプチドの交差反応性百分率が対照ポリペプチドの少なくとも5～10倍である場合又は試験ポリペプチドの結合が免疫原性ポリペプチドの結合とほぼ同一範囲である場合に、試験ポリペプチドはサブトラクション坑血清プールに特異的に結合すると言う。

【0238】

一般に、本明細書に記載する競合的結合イムノアッセイでは任意試験ポリペプチドを免疫原性及び／又は対照ポリペプチドに比較するために免疫吸着坑血清プールを使用することができる。この比較を行うためには、免疫原性、試験及び対照ポリペプチドを各々広い濃度範囲でアッセイし、サブトラクション坑血清と例えば固定化した対照、試験又は免疫原性蛋白質との結合の50%を阻害するために必要な各ポリペプチドの量を標準技術により決定する。競合アッセイで結合に必要な試験ポリペプチドの量が免疫原性ポリペプチドの必要量の2倍未満であり、対照ポリペプチドの少なくとも約5～10倍である場合に、試験ポリペプチドは免疫原性蛋白質に対して作製した抗体に特異的に結合すると言う。

【0239】

特異性の付加試験として、得られる免疫原性ポリペプチドサブトラクション坑血清プールと免疫吸着に使用する免疫原性ポリペプチドの結合が殆ど又は全く検出できなくなるまで場合により坑血清プールに（対照ポリペプチドではなく）免疫原性ポリペプチドを完全に免疫吸着させる。この完全に免疫吸着させた坑血清を次に試験ポリペプチドとの反応性について試験する。反応性が殆ど又は全く観察されない場合（即ち完全に免疫吸着させた坑血清と免疫原性ポリペプチドの結合に観察されるシグナル対ノイズ比の2倍以下）には

10

20

30

40

50

、試験ポリペプチドは免疫原性蛋白質により誘導される抗血清に特異的に結合する。

O - t R N A 及び O - R S 及び O - t R N A / O - R S 対の使用

【0240】

本発明の組成物と本発明の方法により作製された組成物は場合により細胞に導入する。その後、本発明の O - t R N A / O - R S 対又は個々の成分を宿主系の翻訳機構で使用することができ、その結果として、GalNAcアミノ酸が蛋白質に組込まれる。国際公開 WO 2002 / 085923、発明者 Schultzら、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み (IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS)」はこのプロセスを記載しており、参考資料として本明細書に組込む。例えば、O - t R N A / O - R S 対を宿主(例えば大腸菌細胞)に導入すると、前記対はセレクターコドン(例えばアンバーナンセンスコドン)に応答して外部から増殖培地に添加することができるGalNAcアミノ酸の in vivo 蛋白質(例えばミオグロビン試験蛋白質又は治療用蛋白質)組込みを誘導する。場合により、本発明の組成物は in vitro 翻訳系に導入してもよいし、細胞内 in vivo 系に導入してもよい。GalNAcアミノ酸を組込んだ蛋白質は多様な用途の任意のものに使用することができる。最も特筆すべき点として、蛋白質に組込まれたGalNAc部分は例えば、他の蛋白質、小分子(例えばラベルや色素)及び/又は生体分子との架橋をはじめとする多様な修飾の任意のもののターゲットとして利用することができる。これらの修飾により、GalNAcアミノ酸の組込みの結果、治療用蛋白質を改善することができ、更に酵素の触媒機能を改変又は改善するために使用することもできる。所定側面では、GalNAcアミノ酸の蛋白質組込みとその後の修飾は蛋白質構造、他の蛋白質との相互作用等の研究を助長することができる。

10

20

30

キット

【0241】

キットも本発明の特徴である。例えば、少なくとも1個の糖部分(例えばGalNAcアミノ酸)を組込んだ糖蛋白質を細胞で生産するためのキットが提供され、前記キットは O - t R N A をコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は O - t R N A 、及び/又は O - R S をコードするポリヌクレオチド配列、及び/又は O - R S を収容する容器を含む。1態様では、キットは更にGalNAc - -スレオニン等のGalNAcアミノ酸を含む。別の態様では、キットは更に(例えば対照用の)セレクターコドンを含む1種以上のポリヌクレオチド配列、緩衝液、各種容器、糖蛋白質を生産するための説明書等を含む。

糖蛋白質の in vivo 合成

【0242】

本発明の方法及び翻訳系では直交 t R N A / R S 対による非天然アミノ酸の in vivo 組込みに適した宿主細胞及び生物を使用することができる。糖蛋白質を in vivo 合成するためには、セレクターコドンを認識する直交 t R N A と、グリコシル含有非天然アミノ酸と直交 t R N A の結合を触媒する直交アミノアシル t R N A シンテターゼ (O - R S)と共に、(糖部分の結合が所望される位置に1個以上のセレクターコドンを組込んだ)該当ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する。グリコシル含有アミノ酸は一般に宿主細胞の増殖培地に外部から添加されるが、場合により宿主細胞に生合成経路を挿入することにより in vivo 合成することもできる。糖蛋白質を生産するために、O - R S は非天然アミノ酸を直交 t R N A と結合した後に、翻訳機構により適当なセレクターコドンが提示されると、非天然アミノ酸を成長中の該当グリコポリペプチドに導入する。

40

【0243】

場合により、直交 t R N A 、直交 t R N A シンテターゼ、及び合成しようとする糖蛋白質をコードするポリヌクレオチドの1種以上を発現する1種以上のベクターで宿主細胞を遺伝子組換え(例えば形質転換、形質導入又はトランスフェクション)する。これらの成分は単一ベクターに配置してもよいし、ベクターの組合せに配置してもよい。場合によ

50

り、ベクターはプラスミド、細菌、ウイルス、裸のポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドコンジュゲートの形態とすることができます。

【0244】

ターゲット核酸を細菌細胞に導入する方法としては数種の周知方法が利用可能であり、本発明ではその任意のものを使用することができる。これらの方法としては、DNAを含む細菌プロトプラストとレシピエント細胞の融合、エレクトロポレーション、遺伝子銃及びウイルスベクターによる感染等が挙げられる。遺伝子組換えした宿主細胞は例えばスクリーニング段階、プロモーター活性化又は形質転換細胞選択等の操作に合うように適宜改変した慣用栄養培地で培養することができる。これらの細胞は場合によりトランスジェニック生物で培養することができる。

10

【0245】

直交tRNA、直交tRNAシンテターゼ、及び修飾すべき蛋白質のコーディング領域を所望宿主細胞で機能的な遺伝子発現制御エレメントに機能的に連結する。典型的なベクターは転写及び翻訳ターミネーターと、転写及び翻訳開始配列と、特定ターゲット核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含む。ベクターは場合により少なくとも1個の独立ターミネーター配列と、真核生物又は原核生物又は両者（例えばシャトルベクター）でカセットの複製を可能にする配列と、原核系と真核系の両者の選択マーカーを含む包括的発現カセットを含む。ベクターは原核生物、真核生物、又は好ましくは両者での複製及び/又は組込みに適している。Gilliman & Smith, Gene 8:81 (1979); Robertsら, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B.ら, Protein Expr. Purif. 6435:10 (1995); Berger and Kimmel, 前出; Sambrook, 前出, 及び Ausubel, 前出参照。クローニングに有用な細菌とバクテリオファージのカタログは例えばATCCから入手でき、例えばATCCから刊行されたThe ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Ghernaら（編）が挙げられる。シーケンシング、クローニング及び分子生物学の他の側面のその他の基本手順と基礎理論事項もWatsonら (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY. Proteins and Polypeptides of Interestに記載されている。

20

【0246】

例えば、糖蛋白質の生産方法は、少なくとも1個のセレクターコドンを含み、蛋白質をコードする核酸を含む細胞を適当な培地で増殖させる段階と、糖部分を含む非天然アミノ酸を提供する段階と、少なくとも1個のセレクターコドンによる核酸の翻訳中に蛋白質の特定位置に非天然アミノ酸を組込むことにより、蛋白質を生産する段階を含む。場合により、核酸は少なくとも2個のセレクターコドン、少なくとも3個のセレクターコドン、少なくとも4個のセレクターコドン、少なくとも5個のセレクターコドン、少なくとも6個のセレクターコドン、少なくとも7個のセレクターコドン、少なくとも8個のセレクターコドン、少なくとも9個のセレクターコドン、又は10個（以上）のセレクターコドンを含む。細胞は更に、セレクターコドンを認識するO-tRNAと、グリコシル含有非天然アミノ酸でO-tRNAを優先的にアミノアシル化するO-RSを含む。一般方法は参考資料として本明細書に組込むPCT公開WO2002/085923、発明の名称「非天然アミノ酸のインビオ組込み（IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS）」と国際公開WO2004-03576、発明の名称「ケトアミノ酸の部位特異的蛋白質組込み（Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins）」に記載されている。

30

40

【0247】

例えば細胞単離及び培養（例えば後期核酸単離）に有用な他の文献としては、Freschney (1994) Culture of Animal Cells, a Manu

50

al of Basic Technique, 第3版, Wiley-Liss, New York とその引用文献; Payneら(1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips(編)(1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York) 及びAtlas and Parks(編) The Handbook of Microbiological Media(1993) CRC Press, Boca Raton, FLが挙げられる。

10

【0248】

分子生物学技術について記載している一般教科書としては Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA(Berger); Sambrookら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual(第3版), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 2001(「Sambrook」) 及び Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubelら編, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2003年補遺)(「Ausubel」)が挙げられる。これらの教科書は突然変異誘発法、ベクターの使用、プロモーター、更に例えば非天然アミノ酸、直交tRNA、直交シンテターゼ及びその対を含む蛋白質を生産するためのセレクターコドンを含む遺伝子の作製に関連する他の多くの関連事項について記載している。

20

糖蛋白質生産

【0249】

本発明の翻訳系(例えば細胞)は糖蛋白質を有用な量で合成又は生産することができる。1側面では、本発明の方法、翻訳系及び/又はキットにより生産される糖蛋白質組成物は場合により、1種以上の糖蛋白質を例えば少なくとも10 μg、少なくとも50 μg、少なくとも75 μg、少なくとも100 μg、少なくとも200 μg、少なくとも250 μg、少なくとも500 μg、少なくとも1mg、少なくとも10mg以上、又はそれ以上、あるいはin vivo蛋白質生産方法で達成可能な量で含有する。別の側面では、蛋白質は場合により例えば細胞溶解液、緩衝液、医薬緩衝液、又は他の懸濁液中(例えば約1nL~約100Lの任意の容量中)に例えば少なくとも10 μg蛋白質/1、少なくとも50 μg蛋白質/1、少なくとも75 μg蛋白質/1、少なくとも100 μg蛋白質/1、少なくとも200 μg蛋白質/1、少なくとも250 μg蛋白質/1、少なくとも500 μg蛋白質/1、少なくとも1mg蛋白質/1、又は少なくとも10mg蛋白質/1以上の濃度で組成物中に存在する。少なくとも1種のグリコシル含有非天然アミノ酸を組込んだ蛋白質を細胞で大量(例えば他の方法、例えばin vitro翻訳で一般に可能な量よりも多量)に生産することも本発明の特徴である。

30

【0250】

糖部分を含む非天然アミノ酸の組込みは例えば寸法、酸性度、求核性、水素結合、疎水性、プロテアーゼ標的部位接近性、蛋白質部分へのターゲットアクセス、レクチン特異性、抗原性等を変化させるように例えば蛋白質構造及び/又は機能の変化を調整するために使用することができる。グリコシル含有非天然アミノ酸を組込んだ蛋白質は場合により抗原性、触媒性又は物性を強化するか又は全く新規にすることができる。

40

【0251】

本発明の1側面では、組成物は少なくとも1個、例えば少なくとも2個、少なくとも3

50

個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、又は少なくとも 10 個以上の非天然アミノ酸を組込んだ少なくとも 1 種の蛋白質を含有しており、限定されないが、糖部分を含む非天然アミノ酸、及び / 又は別の非天然アミノ酸（糖を結合することができる部分をもつ非天然アミノ酸を含む；例えば国際公開 WO 2004-035743 参照）が挙げられる。非天然アミノ酸は同一でも異なるあってもよく、例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 種以上の異なる非天然アミノ酸を含む 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個以上の異なる部位が蛋白質に存在することができる。別の側面では、組成物は蛋白質に存在する特定アミノ酸の全部よりは少ないが少なくとも 1 個がグリコシル含有アミノ酸で置換された蛋白質を含有する。2 個以上の非天然アミノ酸を組込んだ所与蛋白質では、非天然アミノ酸は同一でも異なるあってもよい（例えば蛋白質は 2 個以上の異なる型の非天然アミノ酸を組込んでもよいし、2 個の同一非天然アミノ酸を組込んでもよい）。3 個以上の非天然アミノ酸を組込んだ所与蛋白質では、非天然アミノ酸は同一でも異なるあってもよいし、同一種の複数の非天然アミノ酸と少なくとも 1 個の別の非天然アミノ酸の組み合わせでもよい。

10

【0252】

本明細書に記載する組成物と方法を使用してガラクトサミン又はグルコサミン含有非天然アミノ酸を含むほぼ任意蛋白質（又はその部分）（及び例えば 1 個以上のセレクターコドンを含む対応する任意コーディング核酸）を生産することができる。数十万種の公知蛋白質を列挙するには及ばないが、例えば該当翻訳系に 1 個以上の適当なセレクターコドンを含むよう入手可能な任意突然変異法を調整することにより、1 種以上の非天然アミノ酸を組むように公知蛋白質の任意のものを改変することができる。公知蛋白質の一般的な配列寄託機関としては GenBank、EMBL、DDBJ 及び NCBI が挙げられる。他の寄託機関もインターネットを検索することにより容易に確認できる。

20

免疫反応性によるポリペプチドの定義

【0253】

例えば、本発明は本明細書に記載する各種配列の 1 種以上から選択されるシンテターゼアミノ酸配列を含む免疫原に対して作製した抗体又は抗血清に特異的に結合するか又は特異的に免疫反応性である新規シンテターゼ蛋白質を含む。他の相同体との交差反応性を排除するために、野生型 *Methanococcus jannaschii* (M. jannaschii) チロシルシンテターゼ (TyrRS) 等の入手可能なシンテターゼ又は WO 2002/085923 に記載されているもの等の公知人工シンテターゼを用いて抗体又は抗血清をサブトラクションする。野生型 M. jannaschii チロシルシンテターゼ (TyrRS) 又は従来配列が核酸に対応する場合には、場合により核酸によりコードされるポリペプチドを作製し、抗体 / 抗血清サブトラクション目的に使用する。

30

【0254】

典型的な 1 フォーマットでは、イムノアッセイは本明細書に記載するシンテターゼ配列の 1 種以上又はその実質的サブ配列（即ち記載する全長配列の少なくとも約 30 %）を含む 1 種以上のポリペプチドに対して作製したポリクローナル抗血清を使用する。これらの配列に由来する潜在的ポリペプチド免疫原群を以下の文中では「免疫原性ポリペプチド」と総称する。得られた抗血清を場合により対照シンテターゼ相同体（野生型 TyrRS、及び / 又は WO 2002/085923 に記載のシンテターゼ）に対する交差反応性が低下するように選択し、ポリクローナル抗血清をイムノアッセイで使用する前に例えば免疫吸着により対照シンテターゼ相同体の 1 種以上に対するこのような交差反応性を排除する。

40

【0255】

イムノアッセイ用抗血清を作製するためには、免疫原性ポリペプチドの 1 種以上を本明細書に記載するように作製し、精製する。例えば、組換え蛋白質を組換え細胞で生産することができる。（マウスの仮想遺伝子一致により結果の再現性が高いのでこのアッセイで使用する）近交系マウスに標準マウス免疫プロトコールに従って標準アジュバント（例え

50

ばフロイントアジュvant)と共に免疫原性蛋白質を免疫する(抗体作製、イムノアッセイフォーマット及び特異的免疫反応性を測定するために使用可能な条件の標準解説については例えばHarlow and Lane(1988)Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York参照。抗体に関するその他の事項については本明細書にも記載し、本欄の免疫反応性によるポリペプチドの定義にも適用することができる)。あるいは、本明細書に開示する配列から誘導される1種以上の合成又は組換えポリペプチドをキャリヤー蛋白質にコンジュゲートし、免疫原として使用する。蛋白質、抗体、抗血清等に関するその他の詳細はWO2002/085923に記載されている。

【0256】

10

ポリクローナル血清を採取し、イムノアッセイ(例えば固体支持体に固定化した免疫原性蛋白質の1種以上を使用する固相イムノアッセイ)で免疫原性ポリペプチドに対する力価を測定する。 10^6 以上の力価をもつポリクローナル抗血清を選択し、プールし、対照シンテターゼポリペプチドでサブトラクションし、高力価ポリクローナル抗血清サブトラクションプールを作製する。

【0257】

20

高力価ポリクローナル抗血清サブトラクションプールを比較イムノアッセイで対照相同じ体に対する交差反応性について試験する。この比較アッセイでは、サブトラクション高力価ポリクローナル坑血清に差別的な結合条件を設定し、高力価ポリクローナル坑血清と免疫原性シンテターゼの結合のシグナル対ノイズ比を対照シンテターゼ相同じ体との結合に比較して少なくとも約5~10倍にする。即ち、アルブミン又は脱脂粉乳等の非特異的競合剤を加えるか及び/又は塩条件、温度、及び/又は同等条件を調節することにより結合反応のストリングエンシーを調整する。これらの結合条件は、試験ポリペプチド(免疫原性ポリペプチド及び/又は対照ポリペプチドに比較するポリペプチド)がサブトラクションポリクローナル坑血清プールに特異的に結合するか否かを調べる後期アッセイで使用される。特に、差別的結合条件下で対照シンテターゼ相同じ体の少なくとも2~5倍のシグナル対ノイズ比と、免疫原性ポリペプチドの少なくとも約1/2のシグナル対ノイズ比を示す試験ポリペプチドは公知シンテターゼに比較して免疫原性ポリペプチドと実質的な構造類似性をもつので、本発明のポリペプチドである。

【0258】

30

別の例では、競合的結合フォーマットのイムノアッセイを試験ポリペプチドの検出に使用する。例えば、上述のように、対照ポリペプチドの免疫吸着により坑血清混合物プールから交差反応性抗体を除去する。次に、免疫原性ポリペプチドを固体支持体に固定化し、支持体をサブトラクション坑血清プールに暴露する。試験蛋白質をアッセイに加え、サブトラクション坑血清プールとの結合を競合させる。試験蛋白質が固定化蛋白質に対してサブトラクション坑血清プールとの結合を競合する能力と、アッセイに加えた免疫原性ポリペプチドが結合を競合する能力を比較する(免疫原性ポリペプチドは坑血清プールとの結合を固定化免疫原性ポリペプチドと有効に競合する)。標準計算を使用して試験蛋白質の交差反応性百分率を計算する。

【0259】

40

平行アッセイでは、場合により対照蛋白質がサブトラクション坑血清プールとの結合を競合する能力を免疫原性ポリペプチドが坑血清との結合を競合する能力と比較測定する。この場合も、標準計算を使用して対照ポリペプチドの交差反応性百分率を計算する。試験ポリペプチドの交差反応性百分率が対照ポリペプチドの少なくとも5~10倍である場合又は試験ポリペプチドの結合が免疫原性ポリペプチドの結合とほぼ同一範囲である場合に、試験ポリペプチドはサブトラクション坑血清プールに特異的に結合すると言う。

【0260】

50

一般に、本明細書に記載する競合的結合イムノアッセイでは任意試験ポリペプチドを免疫原性及び/又は対照ポリペプチドに比較するために免疫吸着坑血清プールを使用することができる。この比較を行うためには、免疫原性、試験及び対照ポリペプチドを各々広い

濃度範囲でアッセイし、サブトラクション坑血清と例えば固定化した対照、試験又は免疫原性蛋白質との結合の50%を阻害するために必要な各ポリペプチドの量を標準技術により決定する。競合アッセイで結合に必要な試験ポリペプチドの量が免疫原性ポリペプチドの必要量の2倍未満であり、対照ポリペプチドの少なくとも約5~10倍である場合に、試験ポリペプチドは免疫原性蛋白質に対して作製した抗体に特異的に結合すると言う。

【0261】

特異性の付加試験として、得られる免疫原性ポリペプチドサブトラクション坑血清プールと免疫吸着に使用する免疫原性ポリペプチドの結合が殆ど又は全く検出できなくなるまで場合により坑血清プールに（対照ポリペプチドではなく）免疫原性ポリペプチドを完全に免疫吸着させる。この完全に免疫吸着させた坑血清を次に試験ポリペプチドとの反応性について試験する。反応性が殆ど又は全く観察されない場合（即ち完全に免疫吸着させた坑血清と免疫原性ポリペプチドの結合に観察されるシグナル対ノイズ比の2倍以下）には、試験ポリペプチドは免疫原性蛋白質により誘導される坑血清に特異的に結合する。

10

【0262】

以下、実施例により本発明を例証するが、これらの実施例により本発明を限定するものではない。当然のことながら、本明細書に記載する実施例及び態様は例証の目的に過ぎず、これらの記載に鑑みて種々の変形又は変更が当業者に示唆され、このような変形又は変更も本願の精神及び範囲と特許請求の範囲に含むものとする。

20

【0263】

本発明は付加糖残基を必要に応じて結合することができるグリコシリ化アミノ酸を付加するように生物（例えば大腸菌）の遺伝コードを拡張することにより、特定グリコシリ化部位をもつ糖蛋白質を作製することができるメカニズムを提供する。

20

【実施例1】

【0264】

グリコシリ化アミノ酸を蛋白質に組込むためのシステム

真核生物では、ムチンが炎症と細胞認識に関する多分散糖蛋白質及びプロテオグリカン群を構成する最も一般的な型のO-グリカンを含む（Hansch (2001) Biol. Chem. 382: 143-149）。スレオニン又はセリンのヒドロキシリ基に

結合したN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）糖がムチン型糖蛋白質のコア単位（「Tn抗原」）に相当する。C-3及び/又はC-6ヒドロキシリ基のGalNAc残基の順次グリコシリ化により、各種ムチン型コア構造が生じる。

30

【0265】

本実施例はN-アセチルガラクトサミン- - -スレオニン（GalNAc-Thr）を作製し、この非天然アミノ酸を翻訳時に蛋白質にin vivo組込むための方法と組成物について記載する。この官能基を大腸菌でGalNAc-スレオニンとして遺伝的にコードさせるために、アンバーナンセンスコドンに応答して（且つ応答してのみ）このグリコシリ含有アミノ酸を大腸菌の蛋白質に部位特異的に挿入することが可能な多数のtRNA-シンテーゼ対を作製した。tRNA-シンテーゼ対は20種の標準アミノ酸のその対応部分に対して直交性であり、即ち、直交シンテーゼ（且つこのシンテーゼのみ）が直交tRNA（且つこのtRNAのみ）を非天然アミノ酸のみでアミノアシル化し、得られるアシル化tRNAはアンバーコドンに応答してのみ非天然アミノ酸を挿入する。

40

材料と方法

【0266】

特に明記しない限り、全化学物質はSigma-Aldrichから購入した。DNAシーケンシングはScripps Research InstituteのProtein and Nucleic Acids Core Facilityで実施した。質量スペクトル分析はScripps Center for Mass Spectrometry, Joseph A. Loo教授（University of California, Los Angeles）、及びYu-Ju Chen教授（Academia Sinica, Taiwan）が実施した。

50

GalNAc-スレオニンの作製

【0267】

Koellikerら("Chemoenzymatic synthesis of P SGL-1 glycopeptides: Sulfation on tyrosine affects glycosyltransferase-catalyzed synthesis of the O-glycan" (2000) Bioorganic and Medicinal Chemistry 8: 1017-1025)により記載されている化学合成アプローチを図2に示すように改変することにより、ガラクトサミンからN-アセチルガラクトサミン- -スレオニンの過アセチル化形2を作製した。

10

【0268】

Bruker DRX-600を使用して2のNMRスペクトロスコピーデータを取得した: ^1H NMR (600 MHz, D_2O): 1.45 (d, $J = 7.0\text{ Hz}$, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 3.78 (brs, 1H), 4.18-4.25 (m, 2H), 4.42 (dd, $J = 10.9, 3.5\text{ Hz}$, 1H), 4.49-4.50 (m, 2H), 5.10 (d, 3.5 Hz, 1H), 5.19 (dd, $J = 11.4, 2.6\text{ Hz}$, 1H), 5.45 (brs, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O): 20.90, 20.91, 20.97, 48.49, 59.86, 63.44, 67.99, 68.92, 69.56, 76.37, 100.22, 172.53, 173.89, 174.21, 174.38, 175.27; Ion Spec FTMS質量分析計で2のMALDI-FTMSを取得した: m/z 471.1586 ($\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}$, [M+Na] $^+$ 計算値 471.1585)。

20

突然変異体シンテターゼの誘導進化

【0269】

グリコシルアミノ酸(例えばGalNAc- -O-スレオニンとGalNAc- -O-セリン)を受容するtRNAシンテターゼの作製のための出発点として直交Methanococcus jannaschiiチロシルtRNAシンテターゼ(TyrRS)と突然変異体チロシンアンバーサブレッサー-tRNA(mut tRNA_{CUA}^{Tyr})を使用した。tRNAにグリコシルアミノ酸を負荷するようにTyrRSのアミノ酸特異性を変化させるために、M. jannaschii TyrRS突然変異体を以下のように作製及びスクリーニングした。

30

【0270】

第1ラウンドポジティブスクリーニングでは、プラスミドpREP/YC-JYC_{UA}(Santoroら(2002)Nat. Biotechnol. 20:1044-1048)を導入したコンピメント大腸菌DH10細胞をpBK-1ib-m(残基Tyr32, Ala67, His70, Glu155, Asp158, 及びAla167をランダムに変異)及びpBK-1ib(残基Tyr32, Glu107, Asp158, Ile159, 及びLeu162をランダムに変異)の2種のM. jannaschii TyrRSライブラリーの組合せで形質転換した。ライブラリー合計で独立クローン約2.6×10⁹とした。

40

【0271】

50 μg / mLカナマイシン、24 μg / mLテトラサイクリン、68 μg / mLクロラムフェニコール、及び1 mM 2を添加したロイシン含有グリセロール最少培地(GMML, 1×M9最少培地, 1%グリセロール, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 0.5% NaCl, 及び0.3 mMロイシン)500 mL中で形質転換細胞を37で増殖させた。60時間後にプラスミドを生存細胞から抽出し、Wang and Schulitz(Chem. Biol. 8:883-890, 2002)により記載されているようにプラスミドpLWJ17B3を含むDH10に形質転換した。50 μg / mLカナマイシン、68 μg / mLクロラムフェニコール、及び0.02% L-アラビノ

50

ースを添加した Luria - Bertani プレートに形質転換細胞を撒き、37℃で10時間インキュベートした。生存細胞を採取し、プラスミドを次ラウンドのポジティブスクリーニングのために精製した。

【0272】

ポジティブスクリーニング4ラウンドとネガティブスクリーニング3ラウンドを交互に実施した処、2の存在下でクロラムフェニコール耐性の増加を示す *MjTyrRS* 突然変異体の4個のクローニングが得られた。単離した突然変異体は細胞コロニーからの蛍光発光によると、グリコシルアミノ酸2の不在下よりも存在下で増殖させた場合のほうが GFPuv の発現レベルも高かった。進化型シンテターゼ突然変異体の突然変異を表2に示す。

【表3】

表2: 野生型 *M. jannaschii* (*Mj*) *TyrRS* と *GalNAc*-アルオニンに対して
特異性をもつ進化型突然変異体シンテターゼにおけるアミノ酸基

アミノ酸残基	シンテターゼ 単離体				
	I-90	AH1	C8F	C10F	D10B
Tyr32		Phe	Gln	Ala	Leu
Ala67		Pro	Pro	Ser	Thr
His70				Pro	Lys
Leu98				Ile	
Val149					Ile
Glu107	Pro				
Gln155				Ser	
Asp158	Cys				Val
Ile159	Tyr				
Leu162	Arg				
Gly163		Cys			
Ala167			Val		Val

10

20

蛋白質発現、精製及び特性決定

【0273】

(Gly4をアンバーコドンTAGに突然変異させた)突然変異ミオグロビン配列と、選択 *MjTyrRS* 突然変異体(各々AH1及びC10F)と、突然変異体 *Tyr-tRNA_{can}* 遺伝子を大腸菌DH10⁺細胞で同時発現させた。50 μg/mLカナマイシン、24 μg/mLテトラサイクリン、及び1 mM IPTGを添加したGMML500mL中でOD₆₀₀が0.6になるまで増殖させた。次にL-アラビノースを最終濃度0.02%まで添加することにより蛋白質発現を誘導した後、8時間通気下に30℃で増殖させた。細胞を回収し、溶解させ、変性条件下にNi²⁺-NTAアフィニティクロマトグラフィー(Qiagen Inc., Valencia, CA)を使用して蛋白質を精製した。蛋白質を10% NuPAGE Bis-Tris Gelにより分析し、SimpliBlue SafeStain(Invitrogen, Carlsbad, CA)で染色した。得られた蛋白質産物の分子量を逆相液体クロマトマグラフィーとエレクトロスプレーイオン化飛行時間(LC ESI-TOF)質量分析の併用により分析した。

酵素によるレクチン結合アッセイ(ELLA)

【0274】

GalNAc-Thr特異的レクチンであるヘアリーベッチ(*Vicia villosa*)レクチン(VVL)とホースグラム(*Dolichos biflorus*)レクチン(DBL)をビオチン化コンジュゲートとしてVector Laboratories(Burlingame, CA)から購入した。精製ミオグロビンサンプルを高結合性マイクロタイタープレート(Maxisorp, Nunclon)に分注した(600ng)。3% BSAを添加したPBSでプレートをブロックした後、レクチン(PBS中10 μg/mL)で処理した。PBSで3回洗浄後、ストレプトアビシン-アルカリホスファターゼ(AP)コンジュゲート(AP-St, Roche)を各ウェルに加えた(PBS中1U/mL)。レクチン処理後、プレートを3回洗浄した後、AP基質p-Nitrophenylphosphate(pNPP)を加えた(0.5 mM MgCl₂を添加した10 mMジエタノールアミン緩衝液, pH 9.5中pNPP 1 mg/mL)。AP活性を405nmでモニターした。図3に示すように、*GalNAc*-Thrの存在下で増殖させた

30

40

50

サンプルではミオグロビンシグナルの増加が検出された。

結果と考察

【0275】

セレクターコドンに対応する突然変異体 tRNA と進化型 *M. jannaschii* Tyr-tRNAシンテターゼ (*Mj Tyr RS*) を併用し、N-アセチルガラクトサミン-O-スレオニン (GalNAc-O-Thr, 1) を大腸菌で遺伝的にコードさせた (配列番号 17)。非保護グリコシルアミノ酸 1 の細胞膜透過性を増すために、本明細書に記載するように過アセチル化 GalNAc-O-Thr (2) を化学的に合成し、細胞のサイトゾルに一旦導入してから (例えば、非特異的エステラーゼにより) アセチル基を除去した。

10

【0276】

1) 抗生物質耐性を付与するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子における非必須突然変異 Asp112TAG と、2) 緑色蛍光蛋白質の発現を誘導する T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 GFPuv (Wangら (2001) Science 292: 498-500; Santoro (2002, 前出) における非必須突然変異 Met1TAG 及び Gln107TAG の抑圧に基づくポジティブ選択を使用して従来記載されている 2 種の *Mj Tyr RS* 突然変異体ライブラリー (Zhang (2004, 前出) から 1 に特異的な突然変異体 *Mj Tyr RS* シンテターゼに進化させた。内在天然アミノ酸を受容する *Mj Tyr RS* 突然変異体を除去するために毒性バルナーゼ遺伝子の 3 個の許容位置 (Gln2, Asp44, 及び Gly65) のアンバーコドンの抑圧に基づくネガティブ選択も使用した。ポジティブ選択 4 ラウンドとネガティブ選択 3 ラウンド後に、2 を補充した場合に高濃度のクロラムフェニコール下で細胞増殖が可能であった数個の *Mj Tyr RS* 突然変異体が単離された (図 1 及び表 1)。

20

【0277】

GalNAc-O-Thr を受容する单離 *Mj Tyr RS* クローンを配列決定した処、以下の突然変異が認められた。AH1: Tyr32Phe 及び Ala67Pro; C8F: Tyr32Gln, Ala67Pro, Gly163Cys, 及び Ala167Val; C10F: Tyr32Ala, Ala67Ser, His70Pro, 及び Leu98Ile; D10B: Tyr32Leu, Ala67Thr, His70Lys, Val149Ile, Gln155Ser, Asp158Val, 及び Ala167Val。注目すべき点として、天然チロシン基質との 2 個の主要水素結合の一方を形成する Tyr32 は全 GalNAc-O-Thr 突然変異体で突然変異している (Kobayashi (2003) Nat. Struct. Biol. 10: 425-432)。他方の主要水素結合供与体である Asp158 は Gln155Ser シンテターゼ I-90 で突然変異している (表 2)。グリコシル化アミノ酸を受容するシンテターゼの他の突然変異の大半はモデリングによると、活性部位の外側に生じるようである。

30

【0278】

上記 *Mj Tyr RS* 突然変異体により示される表現型が TAG に応答する 2 の組込みに起因することを確認するために、ミオグロビン突然変異体を進化型 *Mj Tyr RS* クローンと同時発現させた (図 3A)。ミオグロビン遺伝子の 4 番目のアミノ酸のコドンをアンバーコドン TAG に突然変異させ、Ni²⁺-NTAアフィニティークロマトグラフィーによる全長蛋白質の精製を助長するために遺伝子の C 末端に 6xHis タグを付加した。2 の存在下では、クローン AH1 及び C10F は夫々精製蛋白質 2 mg/L 及び 4 mg/L を產生したが、同一条件下で野生型ミオグロビンの收量は 5.5 mg/L であった。tRNA_{CUA} 又は突然変異体シンテターゼのどちらの不在下でも全長蛋白質は產生されなかつたが、クーマシー染色 SDS-PAGE 分析によると、2 の不在下で増殖させた場合に弱いミオグロビンバンド (陽性サンプルの約 10%) が検出され、多少の残留バックグラウンド抑圧が残っていることが判明した。

40

【0279】

ヘアリーベッチ (*Vicia villosa*) (VVL) とホースグラム (Doli

50

chos Biflorus) (DBL) に由来するレクチンを使用する酵素によるレクチン結合アッセイを使用して GalNAc - - Thr 組込みを更に確認した。 VVL は Tn 抗原に対して特異性をもつことがよく知られており、 DBL は結合 GalNAc 残基を検出するために頻用されている (例えば、 Wu (2004) FEBS Lett. 562: 51 - 58 参照)。比色定量用 p - ニトロフェニルリン酸基質に対するストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ活性によりビオチン化レクチンとミオグロビン及びグリコミオグロビンサンプルの結合を測定した。 VVL と DBL で処理した場合には、グリコミオグロビンでは等価濃度のチロシン - ミオグロビンに対して夫々 10 倍と 5 倍のシグナル増加が観察された (図 4)。このデータは GalNAc - - Thr が in vivo 生合成中にミオグロビンに組込まれたことを裏付けるものである。グリコシルアミノ酸を翻訳時に蛋白質に in vivo 組込むための一般アプローチが開発された。

10

【実施例 2】

【0280】

糖蛋白質合成ストラテジー

本発明の別の態様では、グリコシル化アミノ酸 N - アセチルグルコサミン - - セリン (GlcNAc - Ser) の翻訳時組込みにより生物 (例えば大腸菌) で均質糖蛋白質を合成する。例えば、規定位置に - GlcNAc - セリンを含むミオグロビンを大腸菌で良好な収率と高い忠実度で発現させることができる。 - GlcNAc 部分は糖質結合蛋白質により認識することができ、又はガラクトシルトランスフェラーゼで後期修飾することもできる。このアプローチは他の翻訳後修飾 (例えば蛋白質リン酸化、アセチル化、メチル化等) にも適用可能であると思われる。

20

【0281】

新規化学的及び物理的性質をもつアミノ酸を大腸菌 (例えば L. Wangら, (2001) Science 292: 498; L. Wangら, (2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 1836; Z. Zhangら, (2002) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 41: 2840; J. W. Chinら, (2002) J. Am. Chem. Soc. 124: 9026; J. W. Chinら, (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99: 11020; S. W. Santor ら, (2002) Nat. Biotechnol. 20: 1044; L. Wangら, (2003), Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100: 56; 及び Z. Zhangら, (2003) Biochemistry 42: 6735 参照) と酵母 (例えば J. W. Chinら, Science, (2003 年印刷中) 参照) の遺伝コードに体系的に付加することを初めて可能にした数種の方法が従来開発されている。このアプローチでは、所望非天然アミノ酸のみを負荷するように、内在 tRNA 及びシンテターゼと交差反応しないアンバーサブレッサー M. jannaschii TyrRS - mu tRNA_{CUA} Tyr 対に進化させている。この方法はグリコシル化、リン酸化、又はメチル化アミノ酸を蛋白質に直接組込み (例えば T. Arslanら, (1997) J. Am. Chem. Soc. 119: 10877 参照)、蛋白質の選択的酵素又は化学的翻訳後修飾を不要にすることもできる。

30

【0282】

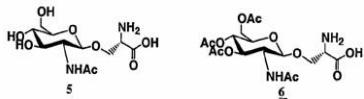
- O - GlcNAc - L - セリン 5 (表 2 参照) を大腸菌の蛋白質に部位特異的に組込んだ。O - GlcNAc 修飾はほぼ全真核生物に遍在しており、細胞シグナリング、蛋白質トラフィкиング及び細胞増殖の調節に関与しており、より複雑な糖質を生産するための基質でもある。例えば L. Wells ら, (2001) Science 291: 2376; 及び N. Lamarre - Vincent, & L. Hsieh - Wilson, (2003) J. Am. Chem. Soc. 125: 6612 参照。残念ながら、遊離ヒドロキシル基をもつ糖誘導体は真核細胞の膜を通過しにくいので、基質 5 は細胞浸透性でないと思われる。例えば A. K. Sarkar ら, (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92: 3323 参照。しかし、糖のヒドロキシル基をアセチル化すると、細胞膜を通過し易くなり、ヒドロキシルアセチル基を一旦細胞内に導入

40

50

してから非特異的サイトゾルエステラーゼにより脱アセチル化できることが示されている。例えばN. Lamarre-Vincent, & L. Hsieh-Wilson, (2003) J. Am. Chem. Soc. 125: 6612参照。従って、これらの実験ではアセチル化誘導体トリアセチル-GlcNAc-セリン6(その前駆体であるN-Fmoc-トリアセチル-GlcNAc-セリンは市販されている)を使用した。上記化合物は下式で示される。

【化4】



10

【0283】

一連のポジティブ及びネガティブ選択を使用して活性部位突然変異体のライプラリーから大腸菌で直交mu tRNA_{C U A}^{Tyr}に-GlcNAc-セリンを特異的に負荷するTyrRSを単離した。相同 *Bacillus stearothermophilus* TyrRSのX線構造に基づき、活性部位残基をランダムに変異させた2種のライプラリー、即ちプラスミドpBK-1ib-mによりコードされ、残基Tyr³²、Ala⁶⁷、His⁷⁰、Gln¹⁵⁵、Asp¹⁵⁸、及びAla¹⁶⁷をランダムに変異させた第1のライプラリーと、プラスミドpBK-1ibによりコードされ、残基Tyr³²、Glu¹⁰⁷、Asp¹⁵⁸、Ile¹⁵⁹、及びLeu¹⁶²をランダムに変異させた第2のライプラリーを構築した。これらの残基はいずれもフェニル環から6.9以内にあり、基質結合ポケットを形成する主残基である。ライプラリー合計で独立クローン約2.6×10⁹とした。このライプラリーを次に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子のAsp¹¹²に導入したアンバーコドンの抑圧に基づくポジティブ選択にかけ、グリコシリ化アミノ酸を組込むことが可能なTyrRS突然変異体を選択した。高濃度のクロラムフェニコールの存在下で生存する細胞はAsp¹¹²TAGアンバーコドンに応答して-GlcNAc-セリン又は内在アミノ酸を挿入する能力をもつ突然変異体TyrRSを発現すると考えられる。次に、毒性バルナーゼ遺伝子の3個のアンバーコドンの抑圧に基づくネガティブ選択を使用し、選択したクローンから内在アミノ酸を組込む突然変異体TyrRSを排除した。ポジティブ選択5ラウンドとネガティブ選択4ラウンド後に、高濃度のクロラムフェニコールの存在下で生存する3個のクローンが出現した。これらのクローンとその突然変異は以下の通りである。S1-90(Glu¹⁰⁷Pro¹⁰⁷, Asp¹⁵⁸Cys¹⁵⁸, Ile¹⁵⁹Tyr¹⁵⁹, Leu¹⁶²Arg¹⁶²)、S4-5(Tyr³²Gly³², Glu¹⁰⁷-Gly¹⁰⁷, Asp¹⁵⁸Cys¹⁵⁸, Leu¹⁶²His¹⁶²)、S1-5(Glu¹⁰⁷Cys¹⁰⁷, Asp¹⁵⁸His¹⁵⁸, Ile¹⁵⁹Asp¹⁵⁹, Leu¹⁶²Met¹⁶²)。6の代わりに1mMセリン、-トリアセチル-GalNAc-スレオニン2、/-トリアセチル-GalNAc-セリン4又は-テトラアセチル-Glu-アスパラギンを使用すると、>30μg/mlクロラムフェニコールで細胞増殖できないので、これらの全クローンは-GlcNAc-セリンに高度に選択的であると思われる。これらのin vivo遺伝結果は、新規に選択された突然変異体TyrRSが-GlcNAc-L-セリン5に対して優れた特異性をもつことを示唆している。

【0284】

5の組込み効率及び忠実度を試験するために、4位にアンバーコドンとC末端His6タグを含む突然変異体ミオグロビン遺伝子(Gly4TAG)を作製した。例えばS.W. Santoroら、(2002) Nat. Biotechnol. 20: 1044参照。突然変異体シンテーゼS1-90を最少培地で6の存在下にmu tRNA_{C U A}^{Tyr}及びGly4TAGミオグロビン遺伝子と同時発現させると、全長突然変異体ミオグロビン1mg/Lが産生された(図5参照)。比較のために、同様の条件下で野生型ミオグロビン5.5mg/Lが産生され、S1-90の抑圧レベルが良好であることを示した

20

30

40

50

。S 1 - 9 0 、 mu t R N A_{C U A}^{T y r} 、又は 6 の不在下では銀染色 S D S - P A G E により全長ミオグロビンの発現は観察されなかった(図 5 参照)。

【0285】

図 5 A は G 1 y 4 - 突然変異体ミオグロビン(~ 1 8 . 5 k D)の発現を示す。蛋白質を N i²⁺ - アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、 S D S - P A G E により分解した。ゲルを銀染色した。レーン 1 は直交 t R N A 、シンテターゼ S 1 - 9 0 、及び化合物 6 の存在下でミオグロビンが発現されたことを示す。 ~ 1 8 k D a バンドは全長ミオグロビンに対応する。レーン 2 は直交 t R N A とシンテターゼ S 1 - 9 0 の存在下で且つ基質 6 の不在下で発現後に溶出した蛋白質を示す。レーン 3 は直交 t R N A と基質 6 の存在下で且つシンテターゼ S 1 - 9 0 の不在下で発現後に溶出した蛋白質を示す。レーン 4 はシンテターゼ S 1 - 9 0 と基質 6 の存在下で且つ直交 t R N A の不在下で発現後に溶出した蛋白質を示す。レーン 5 は比較のために精製野生型ミオグロビンを含む。

10

【0286】

高分解能 M A L D I - T O F 分析(図 5 B)によると、 H i s 6 タグ精製突然変異体ミオグロビンのモノアイソトピック質量は 1 8 4 3 0 . 1 D a であり、 G 1 c (O H)₃ N a c - セリンを含み、メチオニンを欠失するミオグロビンの理論質量(M_{theoretic} = 1 8 4 2 9 . 5 D a)と 3 2 p p m 以内で一致する。 N 末端 M e t の欠失は大腸菌で一般的であることに留意されたい。更に、 O - アセチル化グリコミオグロビン又は野生型ミオグロビンに対応するシグナルは観察されなかった。質量スペクトルデータにより、 G 1 c N A c - セリンのミオグロビン組込みの高度特異性が確認された(9 6 %)。

20

【0287】

突然変異体ミオグロビンを更に特性決定するために数種の付加実験を実施した。まず、 E L I S A 様アッセイを使用し、 G 1 c N A c 特異的レクチン B a n d e i r a e a s i m p l i c i f o l i a I I (B S I I) (例え S . E b i s u r a , (1 9 7 8) , C a r b o h y d r . R e s . 6 1 : 1 2 9 参照) と野生型ミオグロビン及びグリコミオグロビンの結合を分析した。図 6 A は G 1 c N A c 特異的レクチンバンデリアマメ(B a n d e i r a e a s i m p l i c i f o l i a) I I (B S I I) と野生型ミオグロビン及びグリコミオグロビンの結合を示す。野生型ミオグロビン、グリコミオグロビン、及び陰性対照(レクチン非添加)の A₄₀₅ 値を示す。グリコシル含有突然変異体ミオグロビン(2 0 0 n g)と野生型ミオグロビン(2 0 0 n g)をマイクロタイターブレートウェルに固定化した後、ビオチン化 B S I I とストレプトアビシン - アルカリホスファターゼコンジュゲートの存在下でインキュベートした。ウェルを p - ニトロフェニルリン酸の存在下でインキュベートし、 4 0 5 n m の吸光度を測定することによりモニターした。2種の形態のミオグロビンをマイクロタイターブレートウェルに固定化した後、夫々ビオチン化 B S I I 、ストレプトアビシン - アルカリホスファターゼコンジュゲート、及び p - ニトロフェニルリン酸の存在下でインキュベートした。野生型ミオグロビンを含むウェルは陰性対照ウェルと等価のシグナルを発生した。他方、グリコミオグロビンを含むウェルは野生型ミオグロビンの少なくとも 2 0 0 倍のシグナルを発生し、 G 1 c N A c 特異的レクチンによる選択性が立証された。更に、このレクチンは G 1 c N A c に高度に選択性であるので、この結果から糖質は G a l N A c や M a n N A c 等の他の異性形に変異していないことも判明した(例え S . E b i s u r a , (1 9 7 8) , C a r b o h y d r . R e s . 6 1 : 1 2 9 参照)。

30

【0288】

ミオグロビンの O - G 1 c N A c - セリン残基をガラクトシルトランスフェラーゼで選択的に修飾できるか否かについても検討した。 - 1 , 4 - ガラクトシルトランスフェラーゼは糖ヌクレオチド U D P - G a l からガラクトース(G a l)を N - アセチルグルコサミン(G 1 c N A c)の 4 位に転移させ、 G a l - 1 , 4 G 1 c N A c を形成することが知られている。 O - グリコシル化ミオグロビンを U D P - G a l で修飾できるか否かを調べるために、野生型ミオグロビンと O - グリコシル化ミオグロビンの両者を S D S - P

40

50

AGEにより分解し、PVD膜に転写させた。次に膜を牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼと放射性UDP-[H³] - ガラクトースの存在下に室温で24時間インキュベートした。例えばK. Kamemuraら、(2002), J. Biol. Chem. 277: 19229参照。膜をX線フィルムに露光することにより[H³] - Galの取込みをモニターした。グリコミオグロビンのみが標識され、野生型ミオグロビンでは検出可能なシグナルは観察されなかった。図6BはUDP-[H³]ガラクトースによるグリコミオグロビンのオンプロットガラクトシルトランスフェラーゼ標識を示す。野生型ミオグロビン(1μg)とグリコシル含有突然変異体ミオグロビン(1μg)を12%SDS-PAGEにより分解し、PVD膜に転写させた。次に膜を牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼ(1U)、UDP-[H³] - ガラクトース(0.5μCi)及びウシ腸アルカリホスファターゼ(1U)で24時間室温にて処理した。十分に洗浄後、エンハンストオートラジオグラフィーを使用して膜をX線フィルムに露光した。

10

【0289】

定量分析のために、更に溶液中で糖転移反応を実施した。例えばK. Witt et al., (1997) J. Am. Chem. Soc. 119: 2114参照。48時間室温でインキュベーション後に、存在する放射性ラベルに基づいて72%の二糖収率が得られた。図6Cは溶液中で実施したガラクトシルトランスフェラーゼ反応の定量分析を示し、1.0が100%転移に対応するように放射性標識ガラクトースを正規化した。HPLC精製野生型ミオグロビン(100μg)とグリコシル含有突然変異体ミオグロビン(100μg)を含有する溶液にピルビン酸キナーゼ(5U)、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ(1U)、無機ピロホスホリラーゼ(10U)、ガラクトース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼ(1U)、牛乳ガラクトシルトランスフェラーゼ(2U)、グルコース-1-リン酸(3μmol)、ウリジルニリン酸(3μmol)、ホスホエノールビルビン酸(0.01mmol)、及びDTT(2μmol)を加えた。反応溶液をpH7.2に調整した後、[H³] - ガラクトース-1-リン酸(0.01mmol)を加えた。反応は室温で48時間実施した。蛋白質産物をPD-10 Sephadex 25カラムで分離した。放射性ラベル取込みを液体シンチレーションアナライザーで測定した。

20

【0290】

これらの試験の結果、-GalNAc-L-セリンは優れた特異性と良好な収率で大腸菌の蛋白質に翻訳時組込みが可能であることが立証された。組込まれた- GalNAc - セリンは糖をグリコシルトランスフェラーゼで順次付加することができる主グリコシル化部位として機能することができる。例えばK. Kamemuraら、(2002), J. Biol. Chem. 277: 19229。

30

材料と方法

【0291】

突然変異体TyrRS酵素の誘導進化。ポジティブ及びネガティブ選択の一般手順は従来報告されている。例えばZ. Zhangら、(2003) Biochemistry, 42: 6735参照。要約すると、プラスミドpRep(2)/YC(例えば、S. W. Santoroら、(2002) Nat. Biotechnol. 20: 1044参照)を導入したコンピテント大腸菌DH10BにプラスミドpBK-1ib-m(例えば、Z. Zhangら、(2003) Biochemistry 42: 6735参照)とpBK-1ib(例えば、L. Wangら、(2001) Science 292: 498参照)の組み合わせを導入した。40μg/mlテトラサイクリン、50μg/mlカナマイシン、68μg/mlクロラムフェニコール、及び1mM化合物Bを添加したGMML培地(1%グリセロール, 0.3mMロイシン, 1mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂及び0.5% NaClを含有する1×M9最少培地)500ml中で形質転換細胞を60時間37℃で増殖させた。プラスミド(pBK)を生存細胞から精製し、pLWJ17B3(例えば、L. Wangら、(2001) Science 292: 498参照)を導入した大腸菌DH10Bに導入し、ネガティブ選択を開始した。次に、40μg/mlクロラムフェニコール、50μg/mlカナマイシン、及び0.02%L-アラビ

40

50

ノースを添加したLB (Luria-Bertani) プレートに細胞を撒き、37で8時間インキュベートした。プラスミドpBKを生存細胞から精製し、後続ポジティブ及びネガティブ選択に使用した。ポジティブ選択5ラウンドとネガティブ選択4ラウンド後に、基質依存的クロラムフェニコール耐性を付与する3個の候補直交tRNA-シンテターゼ対を単離し、配列決定した。

【0292】

突然変異体ミオグロビンの発現と特性決定。カナマイシン、テトラサイクリン、0.02%L-アラビノース、5μM FeCl₃、及び0又は1mM化合物6を加えたGMM L培地500ml中でpBAD/JYAMB-4TAG (例えばS.W.Santoroら, (2002) Nat. Biotechnol. 20:1044参照)とpS1-90を導入したDH10B細胞を増殖させた。細胞をペレット化し、溶解させ、天然条件下でNi²⁺-NTAビーズを使用するアフィニティークロマトグラフィーにより蛋白質を精製した。蛋白質を12%SDS-PAGEにより分析し、銀染色した。精製蛋白質のアリコートを高分解能質量分析に付した。飛行時間(TOF)質量分析計(Voyager DE-STR, Applied Biosystems, Foster City, CA)によるマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)を使用して蛋白質の分子量を測定した。337nm窒素レーザーから照射することにより蛋白質サンプルを脱離イオン化した。シナピン酸をMALDIマトリックスとして使用した。確立プロトコール(例えば、K.Kamemuraら, (2002), J. Biol. Chem. 277:19229; 及びK.Wittelら, (1997) J. Am. Chem. Soc. 119:2114参照)に従ってレクチン結合及びグリコシルトランスフェラーゼ反応を実施した。

【実施例3】

【0293】

代表的O-RSの配列

本発明で使用することができる代表的O-RSとしては、配列番号1~4及び11~13(表3参照)が挙げられ、本発明で使用することができる代表的O-tRNAとしては配列番号17が挙げられる。O-RSをコードする代表的ポリヌクレオチドとしては配列番号6~9及び14~16が挙げられる。

【0294】

当然のことながら、本明細書に記載する実施例及び態様は例証の目的に過ぎず、これらの記載に鑑みて種々の変形又は変更が当業者に示唆され、このような変形又は変更も本願の精神及び範囲と特許請求の範囲に含むものとする。

【0295】

以上、明確に理解できるように本発明を多少詳細に記載したが、本発明の真の範囲を逸脱することなく形態や細部に種々の変更が可能であることは以上の開示から当業者に自明である。例えば、上記全技術及び装置は種々に組合せて使用することができる。本明細書に引用した全刊行物、特許、特許出願、及び/又は他の文献はその開示内容全体を全目的で参考資料として組込み、各刊行物、特許、特許出願、及び/又は他の文献を全目的で参考資料として組込むと個々に記載しているものとして扱う。

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表 3: 配列例

箇 要	配 列
配列番号1 アミノ酸置換:Tyr32Phe Ala67Pro をもつ $\text{GalNAc-}\alpha\text{-ルチノ-}\beta\text{-アラ}$ tRNA シテカゼ 単離体 C107:アミノ酸列(野生型 Methanococcus jannaschii ナシ tRNA シテカゼ から誘導)	MDEFEMIKRNTSEIIISSEELREVLIKDKDEKSQAIGFEPSS GKHLGHLYLQIKKMDLQNAGFDIILLLSDPLAYLNQK GELDEIRKIGYDKYNNFKFEMALCKAIVGVYSGEFLQDLDY TLNVNVRALAKTTLKRARRSMLAREIDENPKVAEYIVP IMQVNDIHYLGVD/AVVGGMGMRKIHMLARELLPKKVV IHNPFVL/GLDGEGMSSSKGNFIAVNDSPRETRAKIKK AYCPAGVVEGPNIMEIAKYFLYEP/LT/TKRPERKGDDLT VNSYEEELSLFKNKEHLHMPDLKNAVAEELIKILEPIRK RL
配列番号2 アミノ酸置換:Tyr32Gln Ala67Pro Gly163Xys Ala167Val をもつ $\text{GalNAc-}\alpha\text{-ルチノ-}\beta\text{-アラ}$ tRNA シテカゼ 単離体 C107:アミノ酸列(野生型 Methanococcus jannaschii ナシ tRNA シテカゼ から誘導)	MDEFEMIKRNTSEIIISSEELREVLIKDKDEKSQAIGFEPSS GKHLGHLYLQIKKMDLQNAGFDIILLLSDPLAYLNQK GELDEIRKIGYDKYNNFKFEMALCKAIVGVYSGEFLQDLDY TLNVNVRALAKTTLKRARRSMLAREIDENPKVAEYIVP IMQVNDIHYLGVD/AVVGGMGMRKIHMLARELLPKKVV IHNPFVL/GLDGEGMSSSKGNFIAVNDSPRETRAKIKK AYCPAGVVEGPNIMEIAKYFLYEP/LT/TKRPERKGDDLT VNSYEEELSLFKNKEHLHMPDLKNAVAEELIKILEPIRK RL
配列番号3 アミノ酸置換:Tyr32Ala Ala67Ser His70Phe Leu98Ile をもつ $\text{GalNAc-}\alpha\text{-ルチノ-}\beta\text{-アラ}$ tRNA シテカゼ 単離体 C107:アミノ酸列(野生型 Methanococcus jannaschii ナシ tRNA シテカゼ から誘導)	MDEFEMIKRNTSEIIISSEELREVLIKDKDEKSQAIGFEPSS GKHLGHLYLQIKKMDLQNAGFDIILLLSDPLAYLNQK GELDEIRKIGYDKYNNFKFEMALCKAIVGVYSGEFLQDLDY TLNVNVRALAKTTLKRARRSMLAREIDENPKVAEYIVP IMQVNDIHYLGVD/AVVGGMGMRKIHMLARELLPKKVV IHNPFVL/GLDGEGMSSSKGNFIAVNDSPRETRAKIKK AYCPAGVVEGPNIMEIAKYFLYEP/LT/TKRPERKGDDLT VNSYEEELSLFKNKEHLHMPDLKNAVAEELIKILEPIRK RL
配列番号4 アミノ酸置換:Tyr32Leu Ala67Thr His70Lys Val149Ile Gln155Ser Asp158Val Ala167Val をもつ $\text{GalNAc-}\alpha\text{-ルチノ-}\beta\text{-アラ}$ tRNA シテカゼ 単離体 D107:アミノ酸列(野生型 Methanococcus jannaschii ナシ tRNA シテカゼ から誘導)	MDEFEMIKRNTSEIIISSEELREVLIKDKDEKSQAIGFEPSS GKHLGHLYLQIKKMDLQNAGFDIILLLSDPLAYLNQK GELDEIRKIGYDKYNNFKFEMALCKAIVGVYSGEFLQDLDY TLNVNVRALAKTTLKRARRSMLAREIDENPKVAEYIVP IMSVNVIHYLGVD/AVVGGMGMRKIHMLARELLPKKVV IHNPFVL/GLDGEGMSSSKGNFIAVNDSPRETRAKIKK AYCPAGVVEGPNIMEIAKYFLYEP/LT/TKRPERKGDDLT VNSYEEELSLFKNKEHLHMPDLKNAVAEELIKILEPIRK RL

【表 4 - 2】

【表 4 - 3】

10

【表 4 - 4】

20

30

40

【表 4 - 5】

10

【表 4 - 6】

20

【図面の簡単な説明】

【 0 2 9 6 】

【図1】(例えば、非特異的サイトゾルエステラーゼによる)過アセチル化前駆体2のアセチル基の除去後のTyr-tRNA_{cua}への非天然アミノ酸GalNAc- -スレオニン1の「負荷」を模式的に示す。その後、ナンセンスアンバーコドンUAGの読み飛ばしにより、(例えば大腸菌で)生合成中に組換え糖蛋白質にGalNAc- -スレオニンをin vivo部位特異的に組込むことができる。

【図2】過アセチル化GalNAc-*S*の作製の合成アプローチを模式的に示す。

【図3】図3A～3Cは進化型AH1(図3A)及びC10F(図3B)MjTyrsを組込んだミオグロビン4TAG突然変異体遺伝子の発現を示し、N-アセチルガラクトサミン- -O-スレオニン基質の存在下(+)と不在下(-)における蛋白質産生レベルを実証する。M=蛋白質マーカー(kDa)。図3CはC10Fと共に発現されたミオグロビンの高分解能ESI-TOF質量スペクトルを示し、グリコシルアミノ酸2はGa1NAc- -Thr組込み(予想平均値MH+18448.8)及びチロシン組込み(予想平均値MH+18431.2)に対応するピークを示す。サンプル混合物を逆相クロマトグラフィーにより分離した。

40

50

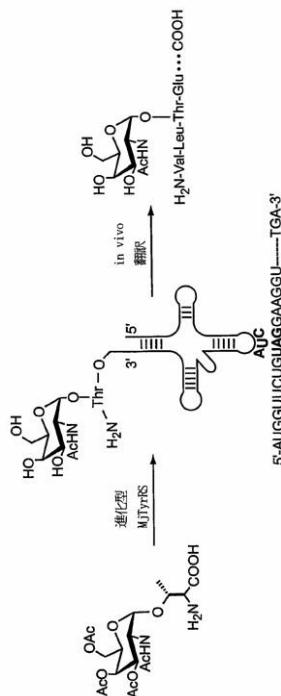
【図4】図4A及び図4BはGalNAc特異的レクチンであるヘアリーベッチ (Vicia villosa) レクチン (VVL) 及びホースグラム (Dolichos biflorus) レクチン (DBL) とグリコミオグロビンサンプルの結合を示す。GalNAc--Thrの存在下 (+) で発現させたミオグロビンサンプルではこのグリコシルアミノ酸の不在下 (-) で増殖させたサンプルに比較してVVL及びDBLで夫々10倍及び5倍のELLAシグナル増加が観察された。AP-Stを加えずにpNPP基質のみから構成される対照サンプル（「ランク」）はバックグラウンド加水分解を示す。

【図5】図5AはG1y4 A突然変異体ミオグロビン(～18.5kD)の発現を示す。蛋白質をNi²⁺アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGEにより分解した。ゲルを銀染色した。図5BはG1y4 A突然変異体ミオグロビンの分子量のMALDI-TOF分析を示す。

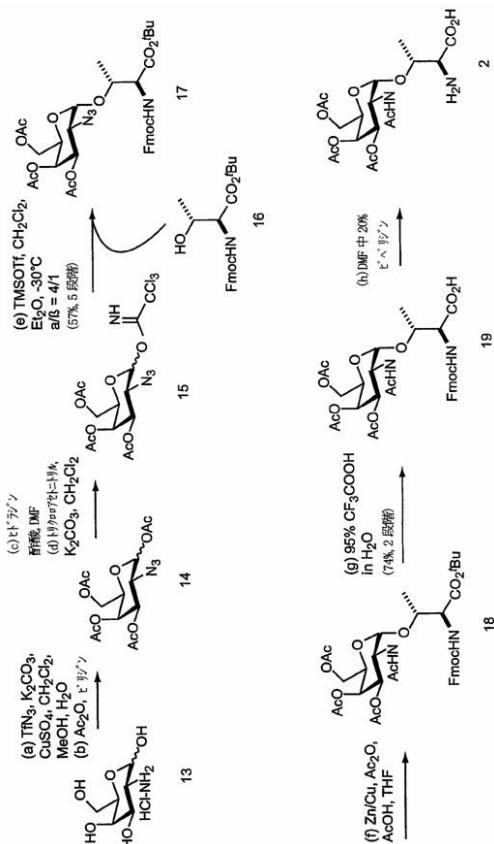
10

【図6】図6A～6Cはグリコシル化アミノ酸を含む精製突然変異体ミオグロビンの特性決定を示す。図6AはG1cNAc特異的レクチンバンデリアマメ(Banderiraea simplicifolia)II(BSII)と野生型ミオグロビン及びグリコミオグロビンの結合を示す。図6BはUDP-[H³]ガラクトースによるグリコミオグロビンのオンプロットガラクトシルトランスフェラーゼ標識を示す。図6Cは溶液中で実施したガラクトシルトランスフェラーゼ反応の定量分析を示し、1.0が100%転移に対応するように放射性標識ガラクトースを正規化した。

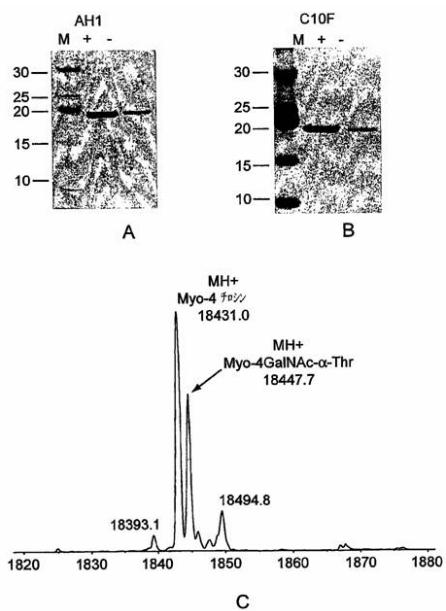
【 図 1 】



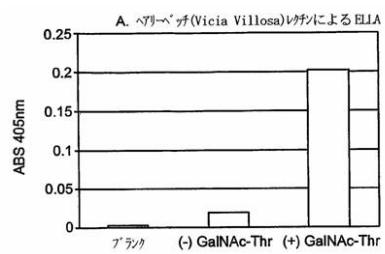
【図2】



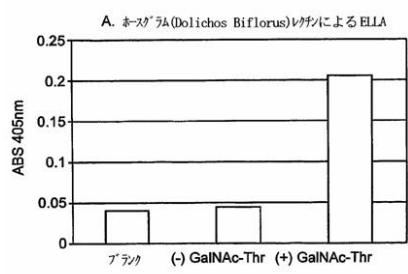
【図3】



【図4】

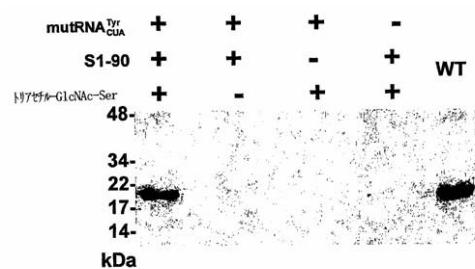


A

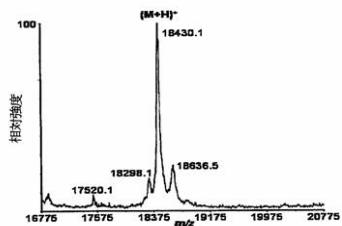


B

【図5】

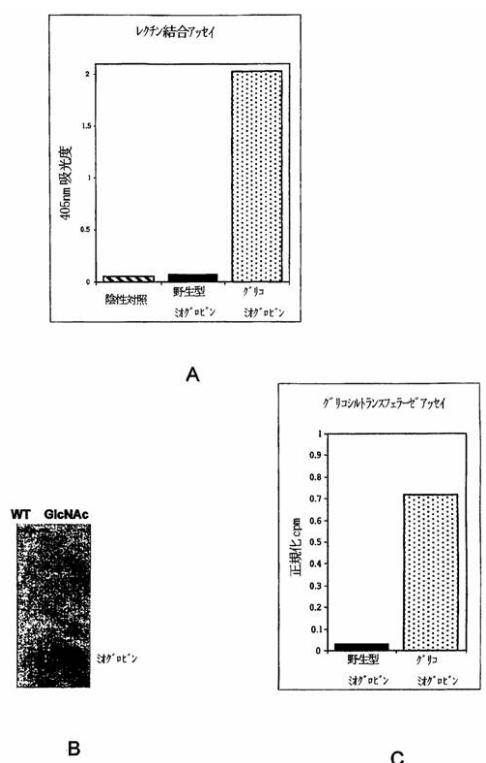


A

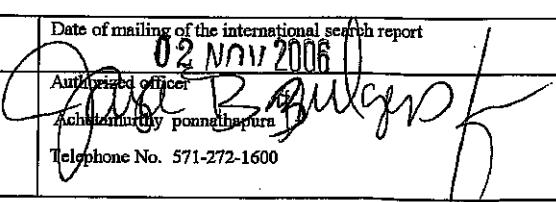
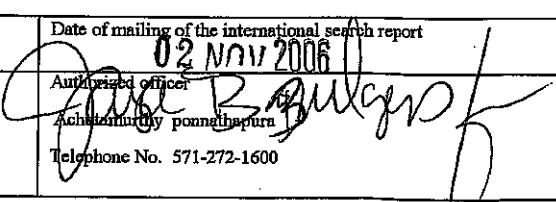


B

【図6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/38250									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07H 21/04(2006.01);C12N 1/21(2006.01),15/74(2006.01),9/22(2006.01);C12P 19/34(2006.01),21/06(2006.01)											
USPC: 435/262,471,484,199,91.5,91.53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/262,471,484,199,91.5,91.53											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 02/086075 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 31 October 2002 (31.10.2002), entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1-33</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 6,927,042 B2 (SCULTZ et al.) 09 August 2005 (9.09.2005), entire document.</td> <td style="padding: 2px;">1-33</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 02/086075 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 31 October 2002 (31.10.2002), entire document.	1-33	A	US 6,927,042 B2 (SCULTZ et al.) 09 August 2005 (9.09.2005), entire document.	1-33
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 02/086075 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 31 October 2002 (31.10.2002), entire document.	1-33									
A	US 6,927,042 B2 (SCULTZ et al.) 09 August 2005 (9.09.2005), entire document.	1-33									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
Date of the actual completion of the international search 22 September 2006 (22.09.2006)		Date of mailing of the international search report  02 Nov 2006									
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer  Achuthanthy Ponnathapura Telephone No. 571-272-1600									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/38250

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/38250

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I. Claim(s) 1-5, 11, 23-28 are drawn to a composition or a translation system comprising an orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase (ORS) wherein the ORS preferentially aminocylates an O-tRNA with the unnatural amino acid comprising an N-acetylgalactosamine moiety with an efficiency that is at least 50% of the efficiency observed for a ORS selected from the group SEQ ID NO: 1-4, and conservative variants thereof.

Group II. Claims 6-10 drawn to a nucleic acid selected from the group consisting of SEQ ID NO: 6, 7, 8, or 9 vectors comprising the same and cells comprising said vectors.

Group III. Claims 12-17, 20 and 21 in part, 22 are drawn to a method of producing in a translation system a protein having an unnatural amino acid wherein the unnatural amino acid comprises an N-acetylgalactosamine moiety selected from N-acetylgalactosamine- α -threonine, 3, 4, 6-triacetyl-N-acetylgalactosamine- α -threonine, N-acetylgalactosamine- α -serine and 3, 4, 6-triacetyl-N-acetylgalactosamine- α -serine.

Group IV. Claims 18, 19, 20 and 21 in part, 29-33 are drawn to a method of producing in a protein having an unnatural amino acid comprising an N-acetylgalactosamine moiety in a translation system comprising providing a host cell a polynucleotide encoding an ORS selected from SEQ ID NO: 6-9.

In addition Group I comprises ORS species of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO: 4.

Groups II and IV comprises ORS species of SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 or SEQ ID NO: 9 or the use of the same to produce proteins with unnatural amino acids.

The inventions listed in Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons. The invention in group I and Group II are not related in that the invention in Group I does not require the presence of the polynucleotides of Group II.

The technical feature relating the invention in group I, III is that the composition of group I comprising ORS are used in the method of group III i.e. production of polypeptides with unnatural glycosylated amino acids. Likewise the polynucleotides in Group II can be used in the method of group IV. However the use of an ORS compositions to produce polypeptides with glycosylated amino acids was disclosed by Schutz et al (WO/02/085923). Therefor the technical feature linking the invention of Group I-IV is not a special technical feature as defined in PCT Rule 13.1.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/00 (2006.01) C 1 2 N 9/00

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,L,S,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 サラ・アール・・ハンソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ カミノ グロリタ 7829

(72) 発明者 ラン・スー
アメリカ合衆国 テキサス州 77005 ヒューストン パッファロ スピードウェイ 6330

(72) 発明者 ツィーウェン・ツァン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92130 サン ディエゴ ヴィア ターセト 12751

(72) 発明者 カイ・ヒューアイ・ウォン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92067 ランチョー サンタ フェ(番地なし)ピー・
・オー・ボックス 8154

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA06 DA11
EA04 GA11 HA01
4B050 CC01 CC07 DD02 LL01 LL05
4B065 AA01X AA01Y AA26X AA57X AA87X AB01 AC14 BA01 CA24 CA27
CA44