

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7118510号

(P7118510)

(45)発行日 令和4年8月16日(2022.8.16)

(24)登録日 令和4年8月5日(2022.8.5)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

C 1 2 N 15/54

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z Z N A

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10

2 0 0 Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 14 (全35頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-564828(P2018-564828)

(86)(22)出願日 平成29年6月13日(2017.6.13)

(65)公表番号 特表2019-517799(P2019-517799
A)

(43)公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(86)国際出願番号 PCT/FR2017/051519

(87)国際公開番号 WO2017/216472

(87)国際公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

審査請求日 令和2年6月11日(2020.6.11)

(31)優先権主張番号 1655475

(32)優先日 平成28年6月14日(2016.6.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関
フランス(FR)

前置審査

(73)特許権者 516304610

ディーエヌエー スクリプト

フランス国 9 4 2 7 0 ル クルムラン

- ピセトル, アヴニユ ドゥ フォンテ

ヌプロ 6 7 - イメブル オカベ

(73)特許権者 593218462

インスティテュート・パスツール

I N S T I T U T P A S T E U R

フランス国、7 5 7 2 4 パリ・セデュ

・ 1 5、リュウ・デュ・ドクトール・ル

ー、2 5 - 2 8

(73)特許権者 508242056

センター ナショナル デ ラ ルシェルシ

ュ サイエントフィック

フランス国 エフ - 7 5 7 9 4 パリ セ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 p o l XファミリーDNAポリメラーゼのバリエーション

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる末端デオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T) のバリエーションであって、前記バリエーションが、R 3 3 6 N - E 4 5 7 N、R 3 3 6 N - R 4 5 4 A - E 4 5 7 N、R 3 3 6 N - R 4 5 4 A - E 4 5 7 G、R 3 3 6 N - E 4 5 7 G、R 3 3 6 G - R 4 5 4 A - E 4 5 7 N、またはR 3 3 6 G - E 4 5 7 Nから選択される置換の組み合わせを含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定され、前記バリエーションは配列番号 1 と少なくとも 9 0 % の同一性を有する、バリエーション。

【請求項 2】

D N A 鎖および / または R N A 鎖を合成することができる、請求項 1 に記載の T d T のバリエーション。

【請求項 3】

前記バリエーションが配列番号 1 の配列と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % の同一性を有する、請求項 1 または 2 に記載の T d T のバリエーション。

【請求項 4】

前記バリエーションが、配列番号 1 の配列の T d T のバリエーションであり、C 3 7 8 位から L 4 0 6 位の間の残基または機能的に同等な残基の、配列番号 2 の配列のポリメラーゼ P o l μ の残基 H 3 6 3 ~ C 3 9 0 または機能的に同等な残基による置換をさらに含む、請求項 1 ~ 3 の一項に記載の T d T のバリエーション。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 の一項に記載の T d T のバリエーションをコードする核酸。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の核酸を含み、発現する発現カセット。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の核酸または請求項 6 に記載の発現カセットを含むベクター。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の核酸、または請求項 6 に記載の発現カセット、または請求項 7 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の T d T のバリエーションを産生するための、請求項 5 に記載の核酸、請求項 6 に記載の発現カセット、請求項 7 に記載のベクター、または請求項 8 に記載の細胞の使用。

【請求項 10】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の T d T のバリエーションを産生するためのプロセスであって、前記プロセスは前記バリエーションをコードする核酸の発現を可能にする培養条件下で請求項 8 に記載の宿主細胞を培養するステップ、任意選択で、そのように発現した前記バリエーションを培養培地または前記宿主細胞から回収するステップを含む、プロセス。

【請求項 11】

3' -OH 修飾ヌクレオチドから鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するための、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の T d T のバリエーションの使用。

【請求項 12】

DNA 鎖または RNA 鎖を合成するための、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の T d T のバリエーションの存在下で、少なくとも 1 つのヌクレオチド、優先的には 3' -OH 修飾ヌクレオチドにプライマー鎖を接触させるステップを含む、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのプロセス。

【請求項 14】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の T d T のバリエーションの少なくとも 1 つと、ヌクレオチド、優先的には 3' -OH 修飾ヌクレオチドと、任意選択で少なくとも 1 つのヌクレオチドプライマーとを含む、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素増強の分野に属する。本発明は、pol X ファミリー DNA ポリメラーゼの増強されたバリエーション、前記バリエーションをコードする核酸、宿主細胞における前記バリエーションの産生、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するためのその使用、および鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

核酸断片の化学合成は、研究室で広く使用されている技術である (Adams ら、1983 年、J. Amer. Chem. Soc.、105 巻: 661 頁; Froehle ら、1983 年、Tetrahedron Lett.、24 巻: 3171 頁)。これにより、所望のヌクレオチド配列を含む核酸分子の迅速な産生が可能になる。5' から 3' の方向に合成する酵素とは異なり、化学合成は 3' から 5' の方向で起こる。しかしながら、化学合成はある特定の制限を有する。実際、複数の溶媒および試薬の使用が必要とされる。加えて、短い核酸断片しか得ることができず、所望の最終的な核酸鎖を得るためにはこれを次にアセンブルしなければならない。

【0003】

最初の核酸断片 (プライマー) から、鋳型鎖の非存在下で、ヌクレオチド間のカップリ

10

20

30

40

50

ング反応を行うことができる酵素を使用した、代替的な解決策が開発された。いくつかのポリメラーゼ酵素はそのような合成方法に好適であると思われる。

【0004】

鋳型鎖の有無にかかわらず、核酸鎖の合成を触媒することができるDNAポリメラーゼが極めて多数存在する。例えば、pol XファミリーDNAポリメラーゼは、広範な生物学的プロセス、特にDNA修復機構またはDNA配列に現れるエラーの補正機構に関与する。これらの酵素は、配列内のエラーが特定された後に切除を受けた核酸鎖にヌクレオチドを導入することができる。pol XファミリーDNAポリメラーゼには、DNAポリメラーゼ (Pol)、 (Pol)、 μ (Pol μ)、酵母由来のIV (Pol IV)、および末端デオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) が含まれる。特にTdTは、核酸分子の酵素的合成プロセスで広く使用されている。

10

【0005】

しかしながら、これらのDNAポリメラーゼは通常、天然ヌクレオチドの取り込みしか可能にしない。あらゆる場合において、天然DNAポリメラーゼは、天然ヌクレオチドよりも大きな立体容積を有する非天然ヌクレオチド、特に3' OH修飾ヌクレオチドの存在下で、その触媒活性を失う。

【0006】

しかしながら、修飾ヌクレオチドの使用は、ある特定の適用には有用であり得る。したがって、そのようなヌクレオチドを組み込むことにより核酸鎖の合成を触媒することができる酵素を開発する必要があった。したがって、顕著な構造修飾を含むヌクレオチドを用いた研究を目的として、DNAポリメラーゼのバリエーションが開発された。

20

【0007】

しかしながら、現在利用可能なバリエーションは、それらの活性が低く研究室規模の酵素的合成としか適合性がないことをとりわけ理由として、完全に満足のものとはいえない。したがって、鋳型鎖の非存在下で、かつ修飾ヌクレオチドを使用し、可能であれば工業規模で、核酸を合成することができるDNAポリメラーゼが必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Adamsら、J. Amer. Chem. Soc. (1983年) 105巻: 661頁

30

Froehlerら、Tetrahedron Lett. (1983年) 24巻: 3171頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、核酸の酵素的合成のためにDNAポリメラーゼを工業規模で使用することを妨げる、ある特定の技術的障壁を取り除く。

【0010】

したがって本発明は、鋳型鎖の非存在下で核酸を合成することができ、かつ修飾ヌクレオチドを使用することができる、pol XファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションを提案する。開発されたバリエーションは、バリエーションが由来する天然DNAポリメラーゼのものよりもはるかに優れた修飾ヌクレオチド取り込み能力を有する。特に、本発明に係るDNAポリメラーゼのバリエーションは、糖修飾のあるヌクレオチドの取り込みに特に有効である。実際、本発明者らは、バリエーションが由来するDNAポリメラーゼのものと比較して触媒ポケット容積が増加したことで天然ヌクレオチドよりも嵩高な修飾ヌクレオチドの取り込みを促進するバリエーションを開発した。より詳細には、本発明に係るpol XファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションは、酵素の触媒キャビティに直接介在するか、またはヌクレオチドに存在する修飾に起因する立体容積に適応するためにこのキャビティの輪郭を変形させる、アミノ酸の少なくとも1つの変異を含む。例えば、導入された変異

40

50

は、修飾ヌクレオチドの3' - OH末端が嵌る酵素の触媒キャビティを拡大することを可能にする。代替的または付加的に、作られた変異は、3' - OH修飾ヌクレオチドによる触媒ポケットへのアクセスを増大させ、かつ/または、酵素の構造に必要な柔軟性を与えて3' - OH修飾ヌクレオチドの立体的に大幅な修飾に適応できるようにするために、触媒キャビティの膨張または容積増加を行うことを可能にする。そのような変異により、伸長すべき核酸断片にポリメラーゼが結合すると、アクセスが拡大され最適な空間的コンフォメーションを採る触媒ポケットのコアに修飾ヌクレオチドが進入し、核酸鎖の最後のヌクレオチドの3' - OH末端と修飾ヌクレオチドの5' - 三リン酸末端との間にホスホジエステル結合が作出される。

【0011】

したがって本発明は、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーション、またはそのようなポリメラーゼの機能的断片のバリエーションであって、前記バリエーションが、T331、G332、G333、F334、R336、K338、H342、D343、V344、D345、F346、A397、D399、D434、V436、A446、L447、L448、G449、W450、G452、R454、Q455、F456、E457、R458、R461、N474、E491、D501、Y502、I503、P505、R508、N509、およびA510からなる群より選択される少なくとも1つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも1つの変異を含み、示された位置は配列番号1とのアラインメントにより決定される、バリエーションに関する。

【0012】

特定の実施形態では、バリエーションは、DNA鎖またはRNA鎖を合成することができる。

【0013】

本発明は特に、polXファミリーDNAポリメラーゼ、特に酵母Pol IV、Pol μ 、または野生型TdTの、選択された変異を含む、バリエーションに関する。特定の実施形態では、本発明によるバリエーションは、配列番号1の配列または配列番号1の配列と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有する相同配列のTdTのバリエーションであり、選択された変異を保有する。

【0014】

本発明は、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションをコードする核酸、本発明による核酸を含む発現カセット、および本発明による核酸または発現カセットを含むベクターにも関する。本発明のバリエーションをコードする核酸は、本発明によるDNAポリメラーゼの成熟型または前駆体型のものであってもよい。

【0015】

本発明は、宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションを行うための、本発明による核酸、発現カセット、またはベクターの使用にも関する。本発明はさらに、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼをコードする核酸、発現カセット、またはベクターを含む、宿主細胞に関する。本発明は、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションを産生するための、そのような核酸、発現カセット、ベクター、または宿主細胞の使用に関する。

【0016】

本発明は、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションを産生するためのプロセスであって、本発明による核酸、発現カセット、またはベクターで宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションを行うことと、前記バリエーションをコードする核酸の発現を可能にする培養条件下で、形質転換/トランスフェクトされた宿主細胞を培養することと、任意選択で、宿主細胞により産生されたpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションを回収することを含む、プロセスにも関する。

【0017】

宿主細胞は、原核生物のものであっても真核生物のものであってもよい。特に、宿主細胞は、微生物、好ましくは細菌、酵母、または真菌であり得る。一実施形態では、宿主細胞

10

20

30

40

50

胞は、細菌、好ましくは *E. coli* である。別の実施形態では、宿主細胞は、酵母、好ましくは *P. pastoris* または *K. lactis* である。別の実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、好ましくは COS7 または CHO 細胞である。

【0018】

本発明は、3'-OH 修飾ヌクレオチドから鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するための、本発明による polX ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションの使用にも関する。当然ながら、本発明による polX ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションは、本発明の文脈においては、未修飾ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドおよび未修飾ヌクレオチドの混合物から、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するために使用することもできる。

【0019】

本発明は、本発明による polX ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションの存在下で、少なくとも1つのヌクレオチド、好ましくは3'-OH 修飾ヌクレオチドにプライマー鎖を接触させる、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのプロセスも提案する。本プロセスは特に、精製されたバリエーション、前記バリエーションを発現するように形質転換された宿主細胞の培養培地、および/またはそのような宿主細胞の細胞抽出物を使用して実施してもよい。

【0020】

本発明は、本発明による polX ファミリー DNA ポリメラーゼの少なくとも1つのバリエーションと、ヌクレオチド、好ましくは3'-OH 修飾ヌクレオチドと、任意選択で少なくとも1つのプライマー鎖もしくはヌクレオチドプライマー、および/または反応バッファーを含む、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのキットにも関する。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本発明のある実施形態による TdT バリエーションの画分の SDS-PAGE ゲル (M: 分子量マーカー、1: ロード前の遠心分離物、2: ロード後の遠心分離物、3: ロード後の洗浄バッファー、4: 溶出画分 3 mL、5: 溶出画分 30 mL、6: 溶出ピークアセンブリ、7: 濃縮)。

【図2】Multalin オンラインアラインメントソフトウェア (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) を用いて得られた、Homo sapiens 由来の Pol μ (UniProtKB Q9NP87)、Pan troglodytes 由来の Pol μ (UniProtKB H2QUI0)、Mus musculus 由来の Pol μ (UniProtKB Q924W4)、Canis lupus familiaris 由来の TdT (UniProtKB F1P657)、Mus musculus 由来の TdT (UniProtKB Q3UZ80)、Gallus gallus 由来の TdT (UniProtKB P36195)、および Homo sapiens 由来の TdT (UniProtKB P04053) の各 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列のアラインメント。

【図3】SDS-PAGE ゲル上の、事前に5'放射性標識されたプライマーおよび3'-O-アミノ-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸修飾ヌクレオチド (ONH₂ゲル) または3'-biot-EDA-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸修飾ヌクレオチド (Biot-EDAゲル) の存在下における、配列番号3の配列の切断型野生型 TdT および表1に示される様々な置換を含むこの切断型 TdT のいくつかのバリエーションの活性の比較 (なし: 酵素の存在なし、wt: 配列番号3の配列の切断型野生型 TdT、DSi: 表1で定義するバリエーション)。

【図4】SDS-PAGE ゲル上の、事前に5'放射性標識されたプライマーおよび3'-O-アミノ-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸で修飾された様々なヌクレオチドの存在下における、本発明によるバリエーション DS124 (表1参照) の活性の研究。

【図5】SDS-PAGE ゲル上の、事前に5'放射性標識されたプライマーおよび3'-O-アミノ-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸で修飾された様々なヌクレオチドの存在下における、バリエーション DS22、DS24、DS124、DS125、D

10

20

30

40

50

S 1 2 6、D S 1 2 7、および D S 1 2 8 の活性の研究。

【図 6】R 3 3 6 N - R 4 5 4 A - E 4 5 7 G の置換の組合せを有する本発明による T d T のバリエーション (D S 1 2 5) を用いた、配列 5' - A A A A A A A A A A G G G G - 3' (配列番号 1 4) のプライマーの後に配列 5' - G T A C G C T A G T - 3' (配列番号 1 5) が続く DNA 鎖の合成。

【発明を実施するための形態】

【0022】

定義

本文書において、アミノ酸は、次の命名法による 1 文字または 3 文字のコード：A : A l a (アラニン)、R : A r g (アルギニン)、N : A s n (アスパラギン)、D : A s p (アスパラギン酸)、C : C y s (システイン)、Q : G l n (グルタミン)、E : G l u (グルタミン酸)、G : G l y (グリシン)、H : H i s (ヒスチジン)、I : I l e (イソロイシン)、L : L e u (ロイシン)、K : L y s (リシン)、M : M e t (メチオニン)、F : P h e (フェニルアラニン)、P : P r o (プロリン)、S : S e r (セリン)、T : T h r (スレオニン)、W : T r p (トリプトファン)、Y : T y r (チロシン)、V : V a l (バリン) によって表される。

【0023】

本発明の目的では、2 つの核酸またはアミノ酸配列間の「同一性百分率」とは、最良のアラインメントの後に得られた、比較される 2 つの配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の百分率を意味し、この百分率は純粋に統計的なものであり、2 つの配列間の差はランダムに、またそれらの全長にかけて分布している。最良のアラインメントまたは最適なアラインメントとは、比較される 2 つの配列間の同一性百分率が、下記のように計算した場合に最も高いアラインメントである。2 つの核酸またはアミノ酸配列間の配列比較は、従来、これらの配列を最適なアラインメント後に比較することによって行われ、前記比較は、配列類似性の局所領域を特定し比較するためのセグメントまたは比較ウィンドウによって行われる。比較のための最適な配列アラインメントは、手作業に加えて、S m i t h および W a t e r m a n (1981 年) (A d . A p p . M a t h . , 2 巻 : 4 8 2 頁) の局所相同性アルゴリズムを用いて、N e d d l e m a n および W u n s c h (1970 年) (J . M o l . B i o l . , 4 8 巻 : 4 4 3 頁) の局所相同性アルゴリズムを用いて、P e a r s o n および L i p m a n (1988 年) (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 5 巻 : 2 4 4 4 頁) の類似性検索法を用いて、これらのアルゴリズムを使用したコンピュータソフトウェア (W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r . , M a d i s o n , W I) の G A P , B E S T F I T , F A S T A , および T F A S T A) を用いて、M u t a l i n オンラインアラインメントソフトウェア (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, 1988 年、N u c l . A c i d s R e s . , 1 6 巻 (22 号) , 1 0 8 8 1 ~ 1 0 8 9 0 頁) を用いて、達成することができる。2 つの核酸またはアミノ酸配列間の同一性百分率は、これらの最適にアラインメントされた 2 つの配列を、これら 2 つの配列間の最適なアラインメントのための参照配列に対する付加または欠失が、比較される核酸またはアミノ酸配列の領域に含まれ得る比較ウィンドウによって比較することにより、決定される。同一性百分率は、2 つの配列間で同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一位置数を決定し、この同一位置数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除し、得られた結果に 100 を乗じて、これら 2 つの配列間の同一性百分率を得ることにより計算される。

【0024】

本発明に係るバリエーションは、それらの特定の残基上の変異に従って記載され、この残基の位置は、配列番号 1 の酵素配列とのアラインメントにより、またはそれを参照して決定される。本発明の文脈においては、これらの同じ変異を機能的に同等な残基に保有する任意のバリエーションも関係する。「機能的に同等な残基」とは、配列番号 1 と相同であり

10

20

30

40

50

同一の機能的役割を有する配列の pol XファミリーDNAポリメラーゼの配列内の残基を意味する。機能的に同等な残基は、配列アラインメントを使用して、例えば Multalin オンラインアラインメントソフトウェア (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>、1988年、Nucleic Acids Res.、16巻(22号)、10881~10890頁) を使用して特定される。アラインメント後、機能的に同等な残基は、問題の異なる配列上で相同な位置にある。配列アラインメントおよび機能的に同等な残基の特定は、任意の pol XファミリーDNAポリメラーゼと、種間のバリエーションを含むその天然バリエーションとの間で行われ得る。例として、ヒト TdT (UniProtKB P04053) の残基 L40 は、ニワトリ TdT (UniProtKB P36195) の残基 M40 および Pan troglodytes Polp (UniProtKB H2QUI0) の残基 V40 と機能的に同等であり、前記残基は配列アラインメント後のものとみなされる (図2)。

10

【0025】

「機能的断片」とは、DNAポリメラーゼ活性を有する pol XファミリーDNAポリメラーゼの断片を意味する。この断片は、pol XファミリーDNAポリメラーゼの、100、200、300、310、320、330、340、350、360、370、380個、またはそれよりも多くの連続したアミノ酸を含み得る。優先的には、この断片は、pol XファミリーDNAポリメラーゼの、前記酵素の触媒断片からなる380個の連続したアミノ酸を含む。

20

【0026】

「変異体」および「バリエーション」という用語は、pol XファミリーDNAポリメラーゼに由来するか、またはそのようなDNAポリメラーゼ、とりわけ配列番号1の配列によるマウス TdT などの TdT の機能的断片に由来し、かつ1つまたは複数の位置に変化、すなわち置換、挿入、および/または欠失を含み、かつDNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを指すように、互換的に使用される場合がある。バリエーションは、当技術分野で周知である種々の技術によって得ることができる。特に、野生型タンパク質をコードするDNA配列を修飾するための例示的な技術としては、定方向変異誘発、ランダム変異誘発、および合成オリゴヌクレオチドの構築が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0027】

アミノ酸の位置または残基に関して本明細書で使用される「修飾」または「変異」という用語は、問題の位置におけるアミノ酸が、参照の野生型タンパク質のアミノ酸と比べて修飾されていることを意味する。そのような修飾は、1つまたは複数のアミノ酸、とりわけ1~5、1~4、1~3、1~2つのアミノ酸の、1つまたは複数の位置、とりわけ1、2、3、4、5、またはそれよりも多くの位置における、置換、欠失、および/または挿入を含む。

【0028】

アミノ酸の位置または残基に関する「置換」という用語は、特定の位置におけるアミノ酸が、野生型または親DNAポリメラーゼにおけるそれ以外のアミノ酸に置き換えられていることを意味する。好ましくは、「置換」という用語は、1つのアミノ酸残基を、20種の標準的な天然アミノ酸残基、稀な天然に存在するアミノ酸残基 (例えば、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリシン、アロヒドロキシリシン、6-N-メチルリシン (6-N-methyllysine))、N-エチルグリシン、N-メチルグリシン、N-エチルアスパラギン、アロ-イソロイシン、N-メチルイソロイシン、N-メチルバリン、ピログルタミン、アミノ酪酸、オルニチン)、および合成的に産生されることが多い稀な非天然アミノ酸残基 (例えば、ノルロイシン、ノルバリン、およびシクロヘキシル-アラニン) から選択される別のものに置き換えることを意味する。好ましくは、「置換」という用語は、1つのアミノ酸残基を、20種の標準的な天然に存在するアミノ酸残基 (G、P、A、V、L、I、M、C、F、Y、W、H、K、R、Q、N、E、D、S、およびT) から選択される別のものに置き換えることを意味する。置換は、保存的であっても非保存的で

40

50

あってもよい。保存的置換は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リシン、およびヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸およびアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミンおよびアスパラギン）、疎水性アミノ酸（メチオニン、ロイシン、イソロイシン、およびバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン）、および小さなアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、およびスレオニン）の中の同じ群のアミノ酸内で行われる。本文書中では、置換の表記には次の用語法が使用される：R 4 5 4 Fは、配列番号1の4 5 4位におけるアミノ酸残基（アルギニン、R）がフェニルアラニン（F）に置き換えられることを示す。N 4 7 4 S / T / N / Qは、4 7 4位のアミノ酸残基（アスパラギン、N）が、セリン（S）、スレオニン（T）、アスパラギン（N）、またはグルタミン（Q）に置き換えられ得ることを意味する。「+」の記号は置換の組合せを示す。

10

【0029】

本発明は、核酸分子、とりわけDNAまたはRNA鎖を、鋳型鎖を用いずに合成することができる、pol XファミリーDNAポリメラーゼ（EC 2.7.7.7; *Advances in Protein Chemistry*, 71巻、401~440頁）のバリエーションに関する。pol XファミリーDNAポリメラーゼは、とりわけ、DNAポリメラーゼPol（ヒトではUniProt P06746; マウスではQ8K409）、Pol、Pol（ヒトではUniProt Q9UGP5; マウスではQ9QUG2およびQ9QXE2）およびPol μ （ヒトではUniProt Q9NP87; マウスではQ9JIW4）、Pol4（酵母*Vanderwaltozyma polyspora*ではUniProt A7TER5; 酵母*Saccharomyces cerevisiae*ではP25615）、ならびに末端デオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼすなわちTdT（EC 2.7.7.31; ヒトではUniProt P04053; マウスではP09838）を含む。

20

【0030】

より詳細には、本発明は、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができるpol XファミリーDNAポリメラーゼのバリエーション、またはそのようなポリメラーゼの機能的断片のバリエーションであって、前記バリエーションが、T 3 3 1、G 3 3 2、G 3 3 3、F 3 3 4、R 3 3 6、K 3 3 8、H 3 4 2、D 3 4 3、V 3 4 4、D 3 4 5、F 3 4 6、A 3 9 7、D 3 9 9、D 4 3 4、V 4 3 6、A 4 4 6、L 4 4 7、L 4 4 8、G 4 4 9、W 4 5 0、G 4 5 2、R 4 5 4、Q 4 5 5、F 4 5 6、E 4 5 7、R 4 5 8、R 4 6 1、N 4 7 4、E 4 9 1、D 5 0 1、Y 5 0 2、I 5 0 3、P 5 0 5、R 5 0 8、N 5 0 9、およびA 5 1 0からなる群より選択される少なくとも1つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも1つの変異を含み、示された位置は配列番号1の配列とのアラインメントにより、またはそれを参照して決定される、バリエーションに関する。

30

【0031】

一実施形態では、バリエーションは、DNA鎖および/またはRNA鎖が可能である。

【0032】

「少なくとも1つの変異を含む」または「少なくとも1つの変異を含むこと」という表現は、バリエーションが、配列番号1のポリペプチド配列と比べて示される1つまたは複数の変異を有するが、他の修飾、とりわけ置換、欠失、または付加を有してもよいことを意味する。

40

【0033】

一般に、上記の位置における1つまたは複数の残基の変異は、触媒ポケットを拡大し（例えばW 4 5 0位、D 4 3 4位、D 4 3 5位、H 3 4 2位、D 3 4 3位、T 3 3 1位、R 3 3 6位、D 3 9 9位、R 4 6 1位、および/またはR 5 0 8位を標的とすることによる）、触媒ポケットへのアクセス可能性を高め（例えばR 4 5 8位、E 4 5 5位、R 4 5 4位、A 3 9 7位、K 3 3 8位、および/またはN 5 0 9位を標的とすることによる）、かつ/または酵素の構造により大きな柔軟性を与えて、それが相当な立体容積を有する修飾ヌクレオチドを受容することができるようにする（例えばV 4 3 6位、F 3 4 6位、V 3

50

4 4 位、F 3 3 4 位、M 3 3 0 位、L 4 4 8 位、E 4 9 1 位、E 4 5 7 位、および / または N 4 7 4 位を標的とすることによる)。

【0034】

本発明に係るバリエーションは、Pol IV、Pol μ 、Pol δ 、Pol ϵ 、または TdT のバリエーション、優先的には Pol IV、Pol μ 、または TdT のバリエーションであり得る。代替的に、バリエーションは、例えば、少なくとも 2 つの pol X ファミリー DNA ポリメラーゼの異なる配列の部分を組み合わせたキメラ酵素のバリエーションであってもよい。

【0035】

特定の実施形態では、バリエーションは、配列番号 1 の配列と少なくとも 60 % の同一性、優先的には配列番号 1 の配列と少なくとも 70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、および 100 % 未満の同一性を有する。

10

【0036】

本発明によれば、変異は、1 つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、または付加からなる場合がある。欠失の場合は、X の注記が使用され、これは、問題の残基をコードするコドンが終止コドンに置き換えられ、したがって、問題の残基のみならず続くアミノ酸の全てが欠失することを示す。したがって、変異 D 5 0 1 X とは、その酵素が、5 0 1 位のアスパラギン酸 (D) に先行する残基、すなわち 5 0 0 位のロイシン (L) で終わり、それ以降の残基は全て欠失していることを意味する。一方で、X の注記は、考慮されている残基の単純な点欠失を示す。したがって、変異 D 5 0 1 X とは、5 0 1 位のアスパラギン酸 (D) が欠失していることを意味する。

20

【0037】

優先的には、本発明によるバリエーションは、T 3 3 1、G 3 3 2、G 3 3 3、F 3 3 4、R 3 3 6、D 3 4 3、L 4 4 7、L 4 4 8、G 4 4 9、W 4 5 0、G 4 5 2、R 4 5 4、Q 4 5 5、E 4 5 7、および R 5 0 8 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも 1 つの変異、優先的には、R 3 3 6、R 4 5 4、E 4 5 7 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも 1 つの変異を含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される。

【0038】

30

特定の実施形態では、前記バリエーションは、R 3 3 6、R 4 5 4、および E 4 5 7 からなる群より選択される少なくとも 2 つの位置における残基の少なくとも 1 つの変異、優先的には、前記 3 つの位置 R 3 3 6、R 4 5 4、および E 4 5 7 における残基または機能的に同等な残基の変異を含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される。

【0039】

特定の実施形態では、バリエーションは、配列 X₁ X₂ G G F R₁ R₂ G K X₃ X₄ (配列番号 4) (式中、

X₁ は、M、I、V、L から選択される残基を表し、

X₂ は、T、A、M、Q から選択される残基を表し、

40

X₃ は、M、K、E、Q、L、S、P、R、D から選択される残基を表し、

X₄ は、T、I、M、F、K、V、Y、E、Q、H、S、R、D から選択される残基を表す)

の少なくとも半保存領域における残基の少なくとも 1 つの変異をさらに含む。

【0040】

優先的には、前記バリエーションは、配列番号 4 の配列の半保存領域の少なくとも 1 つの位置 R₁、R₂、および / または K における残基の少なくとも 1 つの置換を有する。

【0041】

別の特定の実施形態では、バリエーションは、配列 X₁ X₂ L G X₃ X₄ G S R₁ X₅ X₆ E R₂ (配列番号 5) (式中、

50

X₁ は、A、C、G、S から選択される残基を表し、
 X₂ は、L、T、R から選択される残基を表し、
 X₃ は、W、Y から選択される残基を表し、
 X₄ は、T、S、I から選択される残基を表し、
 X₅ は、Q、L、H、F、Y、N、E、D、または から選択される残基を表し、
 X₆ は、F、Y から選択される残基を表す)

の少なくとも1つの半保存領域における残基の少なくとも1つの変異をさらに含む。

【0042】

優先的には、前記バリエーションは、配列番号5の配列の半保存領域の少なくとも1つの位置S、R₁、および/またはEにおける残基の少なくとも1つの置換を有する。

10

【0043】

別の特定の実施形態では、バリエーションは、配列 L X₁ Y X₂ X₃ P X₄ X₅ R N A (配列番号6) (式中、

X₁ は、D、E、S、P、A、K から選択される残基を表し、
 X₂ は、I、L、M、V、A、T から選択される残基を表し、
 X₃ は、E、Q、P、Y、L、K、G、N から選択される残基を表し、
 X₄ は、W、S、V、E、R、Q、T、C、K、H から選択される残基を表し、
 X₅ は、E、Q、D、H、L から選択される残基を表す)

の少なくとも1つの半保存領域における残基の少なくとも1つの変異をさらに含む。

【0044】

20

優先的には、前記バリエーションは、配列番号6の配列の半保存領域のX₁位における残基の少なくとも1つの欠失ならびに/またはR位および/もしくはN位における少なくとも1つの置換を有する。

【0045】

特定の実施形態では、バリエーションは、R336、K338、H342、A397、S453、R454、E457、N474、D501、Y502、I503、R508、およびN509からなる群より選択される少なくとも1つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換、優先的には、R336、A397、R454、E457、N474、D501、Y502、およびI503からなる群より選択される少なくとも1つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換、より優先的には、R336、R454、E457からなる群より選択される少なくとも1つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも1つの置換を含み、示された位置は配列番号1とのアラインメントにより決定される。

30

【0046】

本発明は、好ましくは、R336 K/H/G/N/D、K338 A/C/G/S/T/N、H342 A/C/G/S/T/N、A397 R/H/K/D/E、S453 A/C/G/S/T、R454 F/Y/W/A、E457 G/N/S/T、N474 S/T/N/Q、D501 A/G/X、Y502 A/G/X、I503 A/G/X、R508 A/C/G/S/T、N509 A/C/G/S/Tからなる群よりの少なくとも1つの置換を含む、polXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションに関する。特定の実施形態では、バリエーションは、R336、R454、E457からなる群より選択される少なくとも2つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換、優先的には、前記3つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換を含み、示された位置は配列番号1とのアラインメントにより決定される。とりわけ、置換は、R336 K/H/G/N/D、R454 F/Y/W/A、およびE457 N/D/G/S/Tからなる群より、優先的には、R336 N/G、R454 A、およびE457 G/N/S/Tからなる群より選択される。

40

【0047】

一実施形態では、バリエーションは、E457 G/N/S/Tによる少なくとも1つの置換を含む。

【0048】

50

有利なことには、バリエーションは、上記に挙げた群から選択される置換の組合せを含む。この組合せは、前記群から選択される 2、3、4、5、6、7、8、9、10、または 11 の置換からなることができる。

【0049】

本発明は、より特定すると、DNA または RNA 鎖などの核酸分子を鋳型鎖を用いずに合成することができる pol X ファミリー DNA ポリメラーゼまたはそのようなポリメラーゼの機能的断片のバリエーションであって、前記バリエーションが、表 1 に記載の変異の少なくとも 1 つの組合せを含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される、バリエーションに関する。

【0050】

一実施形態では、pol X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションは、R336G - E457N、R336N - E457N、R336N - R454A - E457N、R336N - R454A - E457G、R336N - E457G、および R336G - R454A - E457N のうちの置換の組合せを含む。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1: polIXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションの変異の例示的な組合せ

	変異の組合せ
DS1	R454F - E457N - A397D
DS2	R454F - E457N
DS3	R454Y - E457N - A397D
DS4	R454Y - E457N
DS5	R454W - E457N - A397D
DS6	R454W - E457N
DS7	R335A - E457N - A397D
DS8	R335A - E457N
DS9	R335G - E457N - A397D
DS10	R335G - E457N
DS11	R335N - E457N - A397D
DS12	R335N - E457N
DS13	R335D - E457N - A397D
DS14	R335D - E457N
DS15	R336K - E457N - A397D
DS16	R336K - E457N
DS17	R336H - E457N - A397D
DS18	R336H - E457N
DS21	R336G - E457N - A397D
DS22	R336G - E457N
DS23	R336N - E457N - A397D
DS24	R336N - E457N
DS25	R336D - E457N - A397D
DS26	R336D - E457N
DS27	R454A - E457N
DS28	R454A - E457A
DS29	R454A - E457G
DS30	R454A - E457D

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

DS31	E457N
DS32	E457D
DS33	R454A - E457N - A397D
DS34	R454A - E457N - A397K
DS35	R454A - E457N - N474S
DS36	R454A - E457D - A397D
DS37	D501X
DS38	D501X - E457N
DS39	D501X - E457N - A397D
DS40	R454F - E457S - A397D
DS41	R454F - E457S
DS42	R454Y - E457S - A397D
DS43	R454Y - E457S
DS44	R454W - E457S - A397D
DS45	R454W - E457S
DS46	R335A - E457S - A397D
DS47	R335A - E457S
DS48	R335G - E457S - A397D
DS49	R335G - E457S
DS50	R335N - E457S - A397D
DS51	R335N - E457S
DS52	R335D - E457S - A397D
DS53	R335D - E457S
DS54	R336K - E457S - A397D
DS55	R336K - E457S
DS56	R336H - E457S - A397D
DS57	R336H - E457S
DS60	R336G - E457S - A397D
DS61	R336G - E457S
DS62	R336N - E457S - A397D
DS63	R336N - E457S
DS64	R336D - E457S - A397D

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

DS65	R336D - E457S
DS66	R454A - E457S
DS70	E457S
DS72	R454A - E457S - A397D
DS73	R454A - E457S - A397K
DS74	R454A - E457S - N474S
DS75	D501X - E457S
DS76	D501X - E457S - A397D
DS77	R454F - E457T - A397D
DS78	R454F - E457T
DS79	R454Y - E457T - A397D
DS80	R454Y - E457T
DS81	R454W - E457T - A397D
DS82	R454W - E457T
DS83	R335A - E457T - A397D
DS84	R335A - E457T
DS85	R335G - E457T - A397D
DS86	R335G - E457T
DS87	R335N - E457T - A397D
DS88	R335N - E457T
DS89	R335D - E457T - A397D
DS90	R335D - E457T
DS91	R336K - E457T - A397D
DS92	R336K - E457T
DS93	R336H - E457T - A397D
DS94	R336H - E457T
DS97	R336G - E457T - A397D
DS98	R336G - E457T
DS99	R336N - E457T - A397D
DS100	R336N - E457T
DS101	R336D - E457T - A397D
DS102	R336D - E457T

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

DS103	R454A - E457T
DS104	E457T
DS105	R454A - E457T - A397D
DS106	R454A - E457T - A397K
DS107	R454A - E457T - N474S
DS108	D501X - E457T
DS109	D501X - E457T - A397D
DS110	D502X
DS111	D502X - E457N
DS112	D502X - E457TN - A397D
DS113	D502X - E457S
DS114	D502X - E457S - A397D
DS115	D502X - E457T
DS116	D502X - E457T - A397D
DS117	D503X
DS118	D503X - E457N
DS119	D503X - E457TN - A397D
DS120	D503X - E457S
DS121	D503X - E457S - A397D
DS122	D503X - E457T
DS123	D503X - E457T - A397D
DS124	R336N - R454A - E457N
DS125	R336N - R454A - E457G
DS126	R336N - E457G
DS127	R336G - R454A - E457N

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、バリエーションは、p o l XファミリーDNAポリメラーゼのキメラ構築物である。「キメラ構築物」とは、考慮されているDNAポリメラーゼのバリエーションにおける1つまたは複数の相同配列の代わりに、p o l Xファミリーに属する酵素の1つまたは複数の規定の配列の結合、とりわけ融合またはコンジュゲーションからなるキメラ酵素を意味する。

【 0 0 5 2 】

したがって本発明は、上記の位置のうちの1つおよび/またはその他における1つまたは複数の点変異に加えて、C 3 7 8位からL 4 0 6位の間に含まれる残基または機能的に同等な残基の、配列番号2の配列のポリメラーゼP o l μの残基H 3 6 3 ~ C 3 9 0または機能的に同等な残基による置換を含む、配列番号1の配列のT d Tのバリエーションを提案する。

【 0 0 5 3 】

代替的または付加的に、本発明に係るバリエーションは、N末端部分における1つまたは複数の連続したアミノ酸残基の欠失を有し得る。これらの欠失は、とりわけ、他のタンパク質との結合に関与し、かつ/または細胞局在に関与する、1つまたは複数の酵素ドメインを標的とし得る。例えば、TdTポリペプチド配列は、Ku70/80などの他のタンパク質との相互作用のためのN末端BRCドメイン、および核局在化ドメイン(NLS)を含む。

【0054】

本発明の特定の実施形態では、バリエーションは、上記の変異のうちの1つまたは複数に加えて、野生型TdTのN末端に対応する残基1~129の欠失を有する、配列番号1の配列のTdTのバリエーションである。

【0055】

ある特定の特定事例では、変異誘発の方策は、天然バリエーションの配列、同様のタンパク質との配列比較、物理的特性、三次元構造またはいくつかの実体に関わるコンピュータシミュレーションの研究などの公知の情報によってガイドされ得る。

【0056】

本発明は、本発明による鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションをコードする核酸に関する。本発明は、本発明による核酸のための発現カセットにも関する。本発明はさらに、本発明による核酸または発現カセットを含むベクターに関する。ベクターは、プラスミドおよびウイルスベクターから選択することができる。

【0057】

DNAポリメラーゼのバリエーションをコードする核酸は、DNA(cDNAまたはgDNA)、RNA、これら両方の混合物であってもよい。核酸は、一本鎖もしくは二本鎖の形態、またはこれら両方の混合物であってもよい。核酸は、例えば修飾された結合、修飾されたプリンもしくはピリミジン塩基、または修飾された糖を含む、修飾ヌクレオチドを含んでもよい。核酸は、化学合成、組換え、変異誘発などを含む、当業者に公知のあらゆる方法によって調製することができる。

【0058】

発現カセットは、本発明による鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションの発現に必要な全てのエレメント、とりわけ、宿主細胞における転写および翻訳に必要なエレメントを含む。宿主細胞は、原核生物のものであっても真核生物のものであってもよい。特に、発現カセットは、プロモーターおよびターミネーター、任意選択で増幅因子を含む。プロモーターは、原核生物のものであっても真核生物のものであってもよい。好ましい原核生物プロモーターの例は、LacI、LacZ、pLacT、ptac、pARA、pBAD、T3またはT7バクテリオファージRNAポリメラーゼプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、ラムダファージプロモーターPRまたはPLである。好ましい真核生物プロモーターの例は、CMV初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、SV40初期または後期プロモーター、マウスメタロチオネイン-Lプロモーター、およびある特定のレトロウイルスのLTR領域である。一般に、好適なプロモーターの選択に関して、当業者は有利なことに、Sambrookら(1989年)の研究あるいはFullerら(1996年、Immunology in Current Protocols in Molecular Biology)により記載された技術を参照することができる。

【0059】

本発明は、本発明による鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションをコードする核酸または発現カセットを保有するベクターに関する。ベクターは、好ましくは発現ベクターであり、すなわち、ベクターは、宿主細胞におけるバリエーションの発現に必要なエレメントを含む。宿主細胞は、原核生物、例えばE.coli、または真核生物であってもよい。真核生物は、酵母(例えば、P.PastorisまたはK.lactis)もしくは真菌(例えばAspergill

10

20

30

40

50

l u s 属のもの) などの下等真核生物、または昆虫細胞 (例えば S f 9 または S f 2 1) 、哺乳動物細胞、もしくは植物細胞などの高等真核生物であってもよい。細胞は、哺乳動物細胞、例えば C O S (ミドリザル細胞株) (例えば、C O S 1 (A T C C C R L - 1 6 5 0) 、 C O S 7 (A T C C C R L - 1 6 5 1) 、 C H O (U S 4 , 8 8 9 , 8 0 3 ; U S 5 , 0 4 7 , 3 3 5 、 C H O - K 1 (A T C C C C L - 6 1)) 、マウス細胞、およびヒト細胞であってもよい。特定の実施形態では、細胞は、非ヒトかつ非胚性である。ベクターは、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、ウイルス、Y A C 、 B A C 、 A g r o b a c t e r i u m p T i プラスミドなどであり得る。ベクターは、好ましくは、複製起点、多重クローニング部位、および選択可能な遺伝子から選択される 1 つまたは複数のエレメントを含み得る。好ましい実施形態では、ベクターはプラスミドである。原核生物ベクターのいくつかの非包括的な例は、次のとおりである: p Q E 7 0 、 p Q E 6 0 、 p Q E - 9 (Q i a g e n) 、 p b s 、 p D 1 0 、ファージスクリプト、 p s i X 1 7 4 、 p ブルースクリプト (p b l u e s c r i p t) S K 、 p b s k s 、 p N H 8 A 、 p N H 1 6 A 、 p N H 1 8 A 、 p N H 4 6 A (S t r a t a g e n e) ; p t r c 9 9 a 、 p K K 2 2 3 - 3 、 p K K 2 3 3 - 3 、 p D R 5 4 0 、 p B R 3 2 2 、および p R I T 5 (P h a r m a c i a) 、 p E T (N o v a g e n) 。真核生物ベクターのいくつかの非包括的な例は、次のとおりである: p W L N E O 、 p S V 2 C A T 、 p P I C Z 、 p c D N A 3 . 1 (+) H y g (I n v i t r o g e n) 、 p O G 4 4 、 p X T 1 、 p S G (S t r a t a g e n e) ; p S V K 3 、 p B P V 、 p C I - n e o (S t r a t a g e n e) 、 p M S G 、 p S V L (P h a r m a c i a) ; および p Q E - 3 0 (Q L A e x p r e s s) 。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、A A V 、 H S V 、 レンチウイルスなどを挙げることができるが、これらに限定されない。好ましくは、発現ベクターはプラスミドまたはウイルスベクターである。

【 0 0 6 0 】

本発明によるバリエーションをコードする配列は、任意選択でシグナルペプチドを含み得る。これを含まない場合、メチオニンを任意選択で N 末端に付加してもよい。別の代替形態では、異種シグナルペプチドを導入してもよい。この異種シグナルペプチドは、E . c o l i などの原核生物に由来しても、真核生物、とりわけ哺乳動物、昆虫、または酵母細胞に由来してもよい。

【 0 0 6 1 】

本発明は、細胞の形質転換またはトランスフェクションを行うための、本発明によるポリヌクレオチド、発現カセット、またはベクターの使用に関する。本発明は、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションをコードする核酸、発現カセット、またはベクターを含む宿主細胞、および本発明による組換え鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを産生するためのその使用に関する。「宿主細胞」という用語は、前記細胞の培養または増殖から生じる娘細胞を含む。特定の実施形態では、細胞は、非ヒトかつ非胚性である。本発明は、本発明による組換え鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを産生するための方法であって、本発明によるポリヌクレオチド、発現カセット、またはベクターを用いて細胞の形質転換またはトランスフェクションを行うことと、トランスフェクト/形質転換された細胞を培養することと、細胞により産生された、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを収集することとを含む方法にも関する。代替的な実施形態では、本発明による組換え鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを産生するための方法は、本発明によるポリヌクレオチド、発現カセット、またはベクターを含む細胞を提供することと、トランスフェクト/形質転換された細胞を培養することと、細胞により産生された、鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを収集することとを含む。特に、細胞は、バリエーションをコードする核酸で一過的または安定に形質転換/トランスフェクトされてもよい

。この核酸は、エピソームまたは染色体として細胞に含まれていてもよい。組換えタンパク質を産生するための方法は、当業者には周知である。例えば、E. coliにおける産生に関しては、US 5,004,689、EP 446582、Wangら(Sci. Sin. B, 24巻:1076~1084頁、1994年、およびNature, 295巻、503頁)、哺乳動物細胞における産生に関してはJAMESら(Protein Science(1996年)、5巻:331~340頁)に記載されている、特定の方法を挙げることができる。

【0062】

本発明によるDNAポリメラーゼのバリエーションは、鋳型鎖を用いない核酸の合成を特に目的とする。より特定すると、本発明によるバリエーションは、天然ヌクレオチドよりも大きな嵩を有する修飾ヌクレオチドを使用した核酸合成に特に適した、拡大された触媒ポケットを有する。本発明によるバリエーションは、とりわけ、WO 2016/034807の出願に記載されているような核酸鎖修飾ヌクレオチドへの取り込みを可能にすることができる。

10

【0063】

上記の特定の変異または変異の組合せを有する、本発明によるDNAポリメラーゼのバリエーション、特にTdTのバリエーションの取り込みの動態は、野生型DNAポリメラーゼの取り込みの動態と比較して大きく増強されている。これらのバリエーションは、有利なことに、高性能酵素DNA合成法の文脈において使用され得る。

【0064】

したがって本発明は、とりわけWO 2016034807の出願に記載されているような3'-OH修飾ヌクレオチドから鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するための、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションの使用にも関する。

20

【0065】

本発明は、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションの存在下で、少なくとも1つのヌクレオチド、優先的には3'-OH修飾ヌクレオチドにプライマー鎖を接触させる、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのプロセスにも関する。

【0066】

有利なことに、本発明によるバリエーションは、WO 2015/159023の出願に記載されている合成プロセスを実施するために使用することができる。

【0067】

本発明は、本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼの少なくとも1つのバリエーションと、ヌクレオチド、優先的には3'-OH修飾ヌクレオチドと、任意選択で少なくとも1つのヌクレオチドプライマーとを含む、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのキットにも関する。

30

【0068】

本明細書において引用される参考文献は全て、参照により本出願に組み込まれる。本発明の他の特色および利点は、当然ながら例証的かつ非限定的である以下の実施例を読むことによって、より容易に明らかとなるであろう。

【実施例】

【0069】

(実施例1 - 本発明によるpolXファミリーDNAポリメラーゼのバリエーションの生成、産生、および精製)

産生株の生成

その構築が[Bouleら、1998年、Mol. Biotechnol.、10巻、199~208頁]に記述されているプラスミドpET28bから、切断型マウスTdT遺伝子を生成した。次のプライマー：

40

【化 1】

❖ T7-pro: TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号 7)

❖ T7-ter: GCTAGTTATTGCTCAGCGG (配列番号 8)

を使用し、従来のPCR増幅および分子生物学技術を使用して、対応する配列番号3の配列（配列番号1の最初の120個のアミノ酸が切断されたものに対応する）を増幅した。これをプラスミドpET32にクローニングして、ベクターpET32 - 配列番号3を得た。

【0070】

プラスミドpET32 - 配列番号3の配列決定をまず行い、次に市販のE. coli株BL21 (DE3) (Novagen)に形質転換した。カナマイシン/クロラムフェニコールプレートで増殖することができたコロニーを単離し、Ec - 配列番号3とマークした。

【0071】

バリエーションの生成

ベクターpET32 - 配列番号3を出発ベクターとして使用した。点変異を含むプライマー（またはそれらが十分に近ければ、ある特定の場では複数の点変異）を、Agilentのオンラインツール：<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>）から生成した。

【0072】

QuickChange IIキット (Agilent) を使用して、所望の変異を有するバリエーションのプラスミドを生成した。プラスミドpET32 - DS*i* (*i*は、表1に示される問題のバリエーションの番号である)を得るために、製造元により与えられた変異誘発プロトコルに忠実に従った。手順の最後に、プラスミドpET32 - DS*x*の配列決定をまず行い、次に市販のE. coli株BL21 (DE3) (Novagen)に形質転換した。カナマイシン/クロラムフェニコールプレートで増殖することができたコロニーを単離し、Ec - DS*x*とマークした。

【0073】

産生

カナマイシンおよびクロラムフェニコールを適量添加した50 mLのLB培地を含む250 mLのエrlenmeyerフラスコ内で、Ec - 配列番号3およびEc - DS*x*細胞を前培養した。この培養物を振盪しながら37 °Cで一晩インキュベートした。次にこの前培養物を使用して、カナマイシンおよびクロラムフェニコールを適量補充した2 LのLB培地を含む5 Lのエrlenmeyerフラスコに播種した。初期の光学密度(OD)は0.01であった。この培養物を振盪しながら37 °Cでインキュベートした。ODが0.6から0.9の間の値に達するまでこれを定期的に測定した。この値に達したら、1 mLの1 M イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシドを培養培地に添加した。この培養物を翌日まで再度37 °Cでインキュベートした。次に、5000 rpmを超えずに遠心分離によって細胞を収集した。得られた種々のペレットを、溶解バッファー(20 mM トリス - HCl、pH 8.3、0.5 M NaCl)を用いた洗浄中に単一のペレットに組み合わせた。細胞ペレットを-20 °Cで冷凍した。細胞ペレットはこのようにして数か月間保存することができる。

【0074】

抽出

先のステップ中に冷凍した細胞ペレットを25 ~ 37 °Cの水浴中で解凍した。完全に解凍されたら、約100 mLの溶解バッファーにこれを再懸濁した。再懸濁は、非常に均質な溶液をもたらす、特に凝集物が全く存在しないことが必要であるため、特に注意した。このように再懸濁した細胞を、14000 psiの圧力でフレンチプレスを使用して溶解した。収集したライセートを、10000 gで1時間 ~ 1時間30分にわたり高速で遠

10

20

30

40

50

心分離した。遠心分離物を 0.2 μM フィルタで濾過し、十分な容積の管に収集した。

【0075】

精製

TdT をアフィニティカラムで精製した。5 mL の His-Trap Crude カラム (GE Life Sciences) を蠕動ポンプ (MINIPULS (登録商標) Evolution, Gilson) と共に使用した。まず、2~3 CV (カラム容積) の溶解バッファーを使用してカラムを平衡化した。次に、先のステップの遠心分離物を約 0.5~5 mL / 分の速度でカラムにロードした。遠心分離物の全体をロードしたら、3 CV の溶解バッファーおよび 3 CV の洗浄バッファー (20 mM トリス-HCl、pH 8.3、0.5 M NaCl、60 mM イミダゾール) でカラムを洗浄した。このステップの最後に、約 0.5~1 mL / 分で総容積 3 CV にわたり溶出バッファー (20 mM トリス-HCl、pH 8.3、0.5 M NaCl、1 M イミダゾール) をカラムに注入した。溶出段階全体を通して、カラム出力を 1 mL の画分に収集した。これらの画分を SDS-PAGE により分析して、どの画分が溶出ピークを含むかを決定した。決定されたら、これらを単一の画分に組み合わせ、透析バッファー (20 mM トリス-HCl、pH 6.8、200 mM NaCl、50 mM MgOAc、100 mM [NH₄]₂SO₄) に対して透析した。次に TdT を 5~15 mg/mL の最終濃度まで濃縮した (Amicon Ultra-30 Centrifugal Filters、Merk Millipore)。濃縮された TdT に 50% グリセロールを添加した後、長期間保存のため -20 で冷凍した。精製段階全体を通して、SDS-PAGE ゲル分析のために種々の試料のアリコート (約 5 μL) を収集した。分析の結果を図 1 に提示する。

【0076】

(実施例 2 - 本発明によるバリエーションの作出に使用される可能性が高い Pol X ファミリーの種々のポリメラーゼ間の配列アラインメント)

Mutalin オンラインアラインメントソフトウェア (<http://mutalin.toulouse.inra.fr/mutalin/mutalin.html>、アクセス日: 2016 年 4 月 4 日) を使用し、Pol X ファミリーの種々の DNA ポリメラーゼのアラインメントを行った。

【表 2】

表 2: アラインメントした配列

識別子	DNA ポリメラーゼ	種	長さ
Q9NP87	Pol μ (配列番号 2)	<i>Homo sapiens</i>	494
H2QUI0	Pol μ (配列番号 9)	<i>Pan troglodytes</i>	494
Q924W4	Pol μ (配列番号 10)	<i>Mus musculus</i>	496
F1P657	TdT (配列番号 11)	<i>Canis lupus familiaris</i>	509
Q3UZ80	TdT (配列番号 1)	<i>Mus musculus</i>	510
P36195	TdT (配列番号 12)	<i>Gallus gallus</i>	506
P04053	TdT (配列番号 13)	<i>Homo sapiens</i>	509

【0077】

結果として得られたアラインメントを図 2 に示す。

【0078】

(実施例 3 - 非天然基質の存在下におけるバリエーションの活性の研究)

本発明による様々なバリエーションの活性を、以下の試験によって決定した。結果を、各バリエーションが由来する天然酵素で得られたものと比較した。

活性試験

【表 3】

表 3:反応混合物

試薬	濃度	容積
H ₂ O	—	15 µL
プライマー	500 nM	2.5 µL
バッファー	10x	2.5 µL
修飾ヌクレオチド	250 µM	2.5 µL
酵素	20 µM	2.5 µL

10

【0079】

使用した配列 5' - A A A A A A A A A A G G G G - 3' (配列番号 14) のプライマーは、酵素 P N K (N E B) および放射性 A T P (P e r k i n E l m e r) を使用し、標準的な標識プロトコールを用いて事前に 5' 放射性標識した。

20

【0080】

250 mM トリス - H C l (p H 7 . 2)、80 mM M g C l 2、3 . 3 mM Z n S O 4 からなる 10 × バッファーを使用した。

【0081】

使用した修飾ヌクレオチドは、3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシヌクレオチド - 5' - 三リン酸 (O N H 2、F i r e b i r d B i o s c i e n c e s) または 3' - b i o t - E D A - 2' , 3' - ジデオキシヌクレオチド - 5' - 三リン酸 (B i o t - E D A、J e n a B i o s c i e n c e s)、例えば 3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシアデノシン - 5' - 三リン酸または 3' - b i o t - E D A - 2' , 3' - ジデオキシアデノシン - 5' - 三リン酸などである。3' - O - アミノ基は、3' - O H 末端に結合した、より容積の大きい基である。3' - b i o t - E D A 基は、3' - O H 末端に結合した、極めて容積が大きく柔軟性のない基である。

【0082】

天然 T d T (配列番号 3) と比べた、表 1 に列挙されるバリエーションにより行われる修飾ヌクレオチドの取り込み性能を、酵素のみを変更した同時の活性試験を行うことによって評価した。

【0083】

上記の表 3 に示した順序で試薬を添加し、次に 37 °C で 90 分間インキュベートした。次に、ホルムアミドブルー (100%ホルムアミド、1 ~ 5 mg のプロモフェノールブルー; S i m g a) を添加することによって反応を停止させた。

40

【0084】

ゲルおよび X 線撮影

先の活性試験の分析のために、16%変性ポリアクリルアミドゲル (B i o r a d) を使用した。ゲルは事前に注ぎ、放置して重合させた。これを次に、T B E バッファー (S i g m a) で満たした好適なサイズの電気泳動槽に載置した。種々の試料を前処理せずにゲルに直接ロードした。

【0085】

次にこのゲルを、3 ~ 6 時間 500 ~ 2000 V の電位差に供した。泳動が満足のいく

50

ものになったら、ゲルを取り外し、次にインキュベーションカセットに移した。適切な検出モードを予め設定したTyphoon機器 (GE Life Sciences) を使用して行った可視化のため、蛍光スクリーン (Amersham) を10～60分間使用した。

【0086】

結果

使用した2つの酵素の比較結果を図3に提示する。

【0087】

より詳細には、第1のゲル (ONH2の取り込み) では、天然TdT (wtの列) は、陰性対照 (「なし」の列) との比較により示されるように、3'-O-アミノ-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸修飾ヌクレオチドを取り込むことができない。 10

【0088】

様々なバリエーションの中で、3つの異なる群を観察することができる。

第1の群のバリエーション (DS7～DS34の列) は、約50%の取り込みが可能である。

第2の群のバリエーション (DS46～DS73の列) は、95%超、場合によっては98%超の取り込みが可能である。

第3の群のバリエーション (DS83～DS106の列) は、60～80%の取り込みが可能である。

【0089】

第2のゲル (Biot-EDAの取り込み) では、天然TdT (wtの列) は、陰性対照 (「なし」の列) との比較により示されるように、3'-biot-EDA-2', 3'-ジデオキシアデノシン-5'-三リン酸修飾ヌクレオチドを同様に取り込むことができない。 20

【0090】

様々なバリエーションの中で、3つの異なる群を観察することができる。

第1の群のバリエーション (DS7～DS34の列) は、約5～10%の取り込みが可能である。

第2の群のバリエーション (DS46～DS73の列) は、30%超、場合によっては40%超の取り込みが可能である。

第3の群のバリエーション (DS83～DS106の列) は、10～25%の取り込みが可能である。 30

【0091】

これらの結果は、本発明によるTdTのバリエーションが全て、野生型酵素とは異なり、基質として、修飾ヌクレオチド、とりわけ3'-OH修飾ヌクレオチドを使用することができることを確認する。特に有利なことには、ある特定のバリエーションは非常に高い取り込み率を有し、これは、修飾を保有するヌクレオチドの存在下でさえも、前記ヌクレオチドの立体容積を大きく増加させる傾向がある。

【0092】

(実施例4 - 本発明によるバリエーションの動態の研究)

先行する実施例1に従い、R336N-R454A-E457Nの置換の組合せを有する変異体 (DS124) を生成し、産生した。 40

【0093】

活性試験

活性試験では、酵素をONH2修飾ヌクレオチドの存在下におき、種々の長さの時間にわたって37℃でインキュベートする。反応を停止させてDS124の取り込み動態を観察し、これを天然のWT酵素 (配列番号3) の動態と比較する。

【表 4】

表 4:反応混合物

試薬	濃度	容積
H ₂ O	—	15 μ L
バッファー	10x	2.5 μ L
ヌクレオチド	2.5 μ M	2.5 μ L
酵素	80 μ M	2.5 μ L
プライマー	1 μ M	2.5 μ L

10

【0094】

使用するプライマーおよびバッファーは実施例 3 と同一である。

【0095】

使用した修飾ヌクレオチドは、3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシヌクレオチド - 5' - 三リン酸 (ONH2、Firebird Biosciences) : 3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシグアノシン - 5' - 三リン酸、3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシチジン - 5' - 三リン酸、および 3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシチミジン - 5' - 三リン酸である。3' - O - アミノ基は、3' - OH 末端に結合した、より容積の大きい基である。

【0096】

20

プライマー以外の全ての試薬 (表 4 に示した順序で添加した) を含むプレミックスを調製した活性試験を行うことにより、酵素 DS124 によるヌクレオチド混合物の取り込み性能を評価した。これらを様々な反応ウェルに分配する。初期時間 $t = 0$ において、プライマーを全てのウェルに同時に加える。 $t = 2$ 分、 $t = 5$ 分、 $t = 10$ 分、 $t = 15$ 分、 $t = 30$ 分、および $t = 90$ 分の異なる時間において、ホルムアミドブルー (100%ホルムアミド、1 ~ 5 mg のプロモフェノールブルー; Sigma) を添加することによって反応を停止させる。

【0097】

ゲルおよび X 線撮影

実施例 3 に記載したプロトコールに従い、ポリアクリルアミドゲル中の種々の試料の泳動により、活性試験の分析を行う。

30

【0098】

結果

2 つの酵素 (DS124 および WT) の比較結果を図 4 に提示する。

【0099】

より詳細には、このゲルでは、使用するプライマーが伸長されていない場合、すなわちヌクレオチドが取り込まれていない場合、陰性対照 (「なし」の列) は、予想されるサイズのプライマーをもたらす。天然の TdT (WT の列) は、修飾ヌクレオチド (ここでは ONH2 - dGTP) を取り込むことができない: 「なし」の列と同じレベルのバンドが観察される。

40

【0100】

試験した全てのヌクレオチド、そして 90 分間 (ここでは陽性対照として使用した) から 2 分間の範囲の全ての時間、すなわちインキュベーション時間の 45 分の 1 への低減に関して、バリエーション DS124 は、100% の見かけの効率で修飾ヌクレオチドを取り込むことができる。

【0101】

これらの結果は、本発明による TdT のバリエーションが、取り込み効率および取り込み率の両方の観点から、天然 TdT のものよりも大幅に高い取り込み性能を有し得ることを確認する。本発明による TdT のバリエーションの動態は、本発明により記載される特定の変異または変異の組合せによって大きく増強される。

50

【 0 1 0 2 】

(実施例 5 - 本発明によるバリエーションの特異性の研究)

実施例 1 に従い、以下の表 5 による置換の組合せを有する変異体を生成し、産生した。

【表 5】

表 5:使用した酵素バリエーションのリスト

番号	変異の組合せ
DS124	R336N – R454A – E457N
DS24	R336N – E457N
DS125	R336N – R454A – E457G
DS126	R336N – E457G
DS127	R336G – R454A – E457N
DS22	R336G – E457N
DS128	R336A – R454A – E457G
WT	配列番号 3

10

20

【 0 1 0 3 】

活性試験

この活性試験では、天然ヌクレオチドおよび修飾ヌクレオチドの高度に濃縮された混合物と、様々なバリエーションを合わせた。インキュベーション時間を短縮するため、また定量的な添加を達成するため（実施例 4 参照）、酵素濃度も増加させる。

【 0 1 0 4 】

生成した様々なバリエーションの活性を以下の試験によって決定した。

【 0 1 0 5 】

各バリエーションを、(1)ヌクレオチドの非存在下 (H₂O に置き換える) または (2)ヌクレオチド混合物の存在下の、2 つの条件下で試験する。様々なバリエーションの結果を互いと比較する。ヌクレオチドも酵素も含まない (H₂O に置き換えられた) 対照試料を添加した。

30

【表 6】

表 6:反応混合物

試薬	濃度	容積
H ₂ O	—	15 μL
プライマー	1 μM	2.5 μL
バッファー	10x	2.5 μL
ヌクレオチド混合物(10:90)	2.5 μM	2.5 μL
酵素	80 μM	2.5 μL

40

【 0 1 0 6 】

使用するプライマーおよびバッファーは実施例 3 と同一である。

【 0 1 0 7 】

存在する場合、ヌクレオチド混合物は、天然の 2' - デオキシヌクレオチド 5' - リン酸ヌクレオチド (Nuc、Sigma - Aldrich)、例えば 2' - デオキシグアノシン 5' - リン酸 (dGTP)、および 3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシヌクレオチド 50

ド - 5' - 三リン酸修飾ヌクレオチド (ONH₂、Firebird Biosciences)、例えば 3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシグアノシン - 5' - 三リン酸などからなる。3' - O - アミノ基は、3' - OH末端に結合した、より容積の大きい基である。この混合物は、90%のONH₂ - dGTP修飾ヌクレオチドおよび10%の天然dGTPヌクレオチドからなる。

【0108】

互いと比べた、表5に列挙されるバリエーションによるヌクレオチド混合物の取り込み性能を、酵素のみを変更した同時の活性試験を行うことによって評価した。

【0109】

上記の表6に示した順序で試薬を添加し、次に37℃で15分間インキュベートした。次に、ホルムアミドブルー (100%ホルムアミド、1~5mgのプロモフェノールブルー; Sigma) を添加することによって反応を停止させた。

10

【0110】

ゲルおよびX線撮影

実施例3に記載したプロトコールに従い、ポリアクリルアミドゲル中の種々の試料の泳動により、活性試験の分析を行った。

【0111】

結果

使用した酵素の比較結果を図5に提示する。

【0112】

より詳細には、このゲルでは、使用するプライマーが伸長されていない場合、すなわちヌクレオチドが取り込まれていない場合、陰性対照 (「なし」の列) は、予想されるサイズのプライマーをもたらず。以下の試料はペアになっており、各ペアは、同じ酵素バリエーションをヌクレオチドの非存在下および存在下 (それらが存在する場合は混合物の形態) の2つの条件下で試験したものに对应する。

20

【0113】

試験した様々なバリエーションの中で、3つの異なる群を観察することができる。

【0114】

第1の群は、陰性対照を構成するバリエーションDS128である。このバリエーションは、極めて低いヌクレオチド取り込み率を有する：ヌクレオチド混合物が存在する場合、混合物中に存在する天然ヌクレオチドの割合に对应する5%から10%の間の取り込みが観察される。

30

【0115】

第2の群は、バリエーションDS127およびDS22からなる。これらのバリエーションは、高いヌクレオチド取り込み率を有する：ヌクレオチド混合物が存在する場合、50%から60%の間の取り込みが観察される。この場合でも、これら2つのバリエーションに関して、2つのヌクレオチドの連続的な取り込みに对应する過剰添加バンド (une bande de sur-addition) が観察される。このバンドの強度は、ヌクレオチド混合物中に存在する天然ヌクレオチドの割合に对应する。

【0116】

最後の群は、バリエーションDS124、DS24、DS125、およびDS126からなる。これらのバリエーションは、ヌクレオチド混合物が存在する場合、DS124およびDS125については80%から100%の間の極めて高いヌクレオチド取り込み率を有する。この場合、過剰添加バンドは存在しない。バリエーションDS24およびDS126の場合、非取り込みの割合は、混合物中に存在する天然ヌクレオチドの割合と同様である。

40

【0117】

これらの結果は、本発明によるTdTのバリエーションが、修飾ヌクレオチドおよび天然ヌクレオチドの混合物の中でも修飾ヌクレオチドを優先的に使用することができることを確認する。特に有利なことには、これらのバリエーションは、修飾ヌクレオチドの極めて高い取り込み率を有し、天然ヌクレオチドを取り込まないようにそれらを区別することができ、

50

したがって、過剰添加を回避することによりDNA合成の質を大きく向上させる。

【0118】

(実施例6 - 鋳型鎖を用いないDNA鎖の合成の例)

実施例1に従い、R336N - R454A - E457Gの置換の組合せを有するTdTのバリエーション(DS125)を生成し、産生した。

【0119】

バリエーションDS125を使用して、配列5' - AAAAAAAAAAGGGG - 3' (配列番号14)のプライマーの後に5' - GTACGCTAGT - 3' (配列番号15)が続く配列を合成する。このプライマーは、酵素PNK (NEB) および放射性ATP (PerkinElmer) を使用し、標準的な標識プロトコルを用いて事前に5'放射性標識した。

10

【0120】

このプライマーは、配列5' - CCTTTTTTTTTT - 3' (配列番号16)の相補的な捕捉断片との相互作用により、固体支持体に結合する。捕捉断片は、その3'末端に、それが、表面に結合した反応基と共有結合性に反応することができるようにする基を有する。例えば、この基は、NH₂、反応基のN-ヒドロキシスクシンイミド、および磁性ビーズ (Dynabeads、ThermoFisher) の表面であってもよい。捕捉断片とプライマーの相互作用は、標準的なDNA断片ハイブリダイゼーション条件下で行われる。

【0121】

20

使用した修飾ヌクレオチドは、3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシヌクレオチド - 5' - 三リン酸 (ONH₂、Firebird Biosciences)、例えば3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシグアノシン - 5' - 三リン酸、3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシチジン - 5' - 三リン酸、3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシチミジン - 5' - 三リン酸、または3' - O - アミノ - 2' , 3' - ジデオキシアデノシン - 5' - 三リン酸である。3' - O - アミノ基は、3' - OH末端に結合した、より容積の大きい基である。

合成

【表7】

表7:反応混合物

30

試薬	濃度	容積
H ₂ O	—	210 μ L
バッファー	10x	70 μ L
ヌクレオチド	2.5 μ M	35 μ L
酵素	80 μ M	35 μ L
固体支持体上のプライマー	1 μ M	—

【0122】

250 mM トリス - HCl (pH 7.2)、80 mM MgCl₂、3.3 mM ZnSO₄ からなる10xバッファーを使用した。

40

【0123】

使用した洗浄バッファーWは、pH 7.2の25 mM トリス - HCl からなる。

【0124】

使用した脱保護バッファーDは、10 mM MgCl₂の存在下でpH 5.5の50 mM 酢酸ナトリウムからなる。

【0125】

合成の開始前、総当量35 pmolのプライマーに対し、プライマーをハイブリダイズさせる固体支持体を構成するビーズを、バッファーWで数回洗浄した。これらの洗浄の後、ビーズを磁石上に保持し、上清の全体を除去した。

50

【 0 1 2 6 】

表 7 に示した順序で添加した様々な試薬からなる、いくつかのプレミックスを調製した。これらのプレミックスのそれぞれは、以下の表 8 に示されるように、異なるヌクレオチドを含む。

【表 8】

表 8:プレミックスの組成

プレミックスの番号	プレミックスのヌクレオチド
1	G
2	T
3	A
4	C
5	G
6	C
7	T
8	A
9	G
10	T

10

【 0 1 2 7 】

20

事前に洗浄し上清を取り除いたビーズにプレミックス 1 を添加すると、合成が始まる。以下の表 9 に提示される合成ステップは、新たな配列 5' - G T A C G C T A G T - 3' を産生するために、示されている順序で行われる。

30

40

50

【表 9 - 1】

表 9: 鋳型鎖を用いずに DNA 鎖を合成するためのプロセスのステップ

ステップ	行為	容積	持続時間
1 の伸長	プレミックス 1 を添加	350 μ L	15 分
1 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
1 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
1 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
1 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
1 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
2 の伸長	プレミックス 2 を添加	350 μ L	15 分
2 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
2 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
2 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
2 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
2 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
3 の伸長	プレミックス 3 を添加	350 μ L	15 分
3 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
3 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
3 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
3 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
3 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
4 の伸長	プレミックス 4 を添加	350 μ L	15 分
4 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
4 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
4 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
4 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
4 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
5 の伸長	プレミックス 5 を添加	350 μ L	15 分
5 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
5 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
5 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
5 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
5 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
6 の伸長	プレミックス 6 を添加	350 μ L	15 分
6 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
6 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
6 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
6 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
6 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
7 の伸長	プレミックス 7 を添加	350 μ L	15 分
7 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
7 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
7 の脱保護 1 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
7 の脱保護 2 回目	バッファー D を添加	350 μ L	15 分
7 の洗浄 2 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分
8 の伸長	プレミックス 8 を添加	350 μ L	15 分
8 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
8 の洗浄 1 回目	バッファー W を添加	350 μ L	5 分

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

8 の脱保護 1 回目	バッファーD を添加	350 μ L	15 分
8 の脱保護 2 回目	バッファーD を添加	350 μ L	15 分
8 の洗浄 2 回目	バッファーW を添加	350 μ L	5 分
9 の伸長	プレミックス 9 を添加	350 μ L	15 分
9 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分
9 の洗浄 1 回目	バッファーW を添加	350 μ L	5 分
9 の脱保護 1 回目	バッファーD を添加	350 μ L	15 分
9 の脱保護 2 回目	バッファーD を添加	350 μ L	15 分
9 の洗浄 2 回目	バッファーW を添加	350 μ L	5 分
10 の伸長	プレミックス 10 を添加	350 μ L	15 分
10 の試料採取	試料採取	5 μ L	<1 分

10

【 0 1 2 8 】

試料採取ステップを除く各ステップ間で、磁石を用いてビーズを収集し、上清の全体を除去する。

【 0 1 2 9 】

ホルムアミドブルー (1 0 0 %ホルムアミド、 1 ~ 5 m g のプロモフェノールブルー ; S i m g a) の 1 5 μ L 溶液に各試料を添加して、反応を停止させ、分析を作成する。

【 0 1 3 0 】

20

ゲルおよび X 線撮影

実施例 3 に記載したプロトコールに従い、ポリアクリルアミドゲル中の種々の試料の泳動により、活性試験の分析を行う。

【 0 1 3 1 】

結果

この合成の結果を図 6 に提示する。

【 0 1 3 2 】

0 の列 (「なし」、ヌクレオチドなし) は、使用するプライマーが伸長されていない場合、すなわちヌクレオチドが取り込まれていない場合、予想されるサイズのプライマーをもたらす。

30

【 0 1 3 3 】

1 ~ 1 0 の列は、合成中の試料 1 ~ 1 0 に対応する。ヌクレオチドの取り込みはそれぞれ、最大の性能を有する酵素によって行った。さらなる精製ステップは行わない。

【 0 1 3 4 】

天然の T d T を用い、同様の合成実験を行った。後者は修飾ヌクレオチドを取り込むことができず、所望の配列を合成することは不可能であった。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成することができる p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼまたはそのようなポリメラーゼの機能的断片のバリエーションであって、前記バリエーションが、 E 4 5 7、T 3 3 1、G 3 3 2、G 3 3 3、F 3 3 4、R 3 3 6、K 3 3 8、H 3 4 2、D 3 4 3、V 3 4 4、D 3 4 5、F 3 4 6、A 3 9 7、D 3 9 9、D 4 3 4、V 4 3 6、A 4 4 6、L 4 4 7、L 4 4 8、G 4 4 9、W 4 5 0、G 4 5 2、R 4 5 4、Q 4 5 5、F 4 5 6、R 4 5 8、R 4 6 1、N 4 7 4、E 4 9 1、D 5 0 1、Y 5 0 2、I 5 0 3、P 5 0 5、R 5 0 8、N 5 0 9、および A 5 1 0 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも 1 つの変異を含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される、バリエーション。

40

(項目 2)

DNA 鎖および / または RNA 鎖を合成することができる、項目 1 に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

50

(項目 3)

P o l I V、P o l μ、または末端デオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T) のバリエーションである、項目 1 または 2 に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 4)

配列番号 1 の配列と少なくとも 6 0 % の同一性、優先的には配列番号 1 の配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % の同一性を有する、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 5)

少なくとも 1 つの変異が、1 つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、または付加からなる、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 6)

前記バリエーションが、T 3 3 1、G 3 3 2、G 3 3 3、F 3 3 4、R 3 3 6、D 3 4 3、L 4 4 7、L 4 4 8、G 4 4 9、W 4 5 0、G 4 5 2、R 4 5 4、Q 4 5 5、E 4 5 7、R 4 6 1、および R 5 0 8 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも 1 つの変異、優先的には、R 3 3 6、R 4 5 4、および E 4 5 7 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の少なくとも 1 つの変異を含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 7)

R 3 3 6、R 4 5 4、および E 4 5 7 からなる群より選択される少なくとも 2 つの位置における残基の少なくとも 1 つの変異、優先的には、前記 3 つの位置 R 3 3 6、R 4 5 4、および E 4 5 7 における残基の変異を含む、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 8)

配列

(i) X₁ X₂ G G F R₁ R₂ G K X₃ X₄ (配列番号 4)

(式中、

X₁ は、M、I、V、L から選択される残基を表し、

X₂ は、T、A、M、Q から選択される残基を表し、

X₃ は、M、K、E、Q、L、S、P、R、D から選択される残基を表し、

X₄ は、T、I、M、F、K、V、Y、E、Q、H、S、R、D から選択される残基を表す)、

(i i) X₁ X₂ L G X₃ X₄ G S R₁ X₅ X₆ E R₂ (配列番号 5)

(式中、

X₁ は、A、C、G、S から選択される残基を表し、

X₂ は、L、T、R から選択される残基を表し、

X₃ は、W、Y から選択される残基を表し、

X₄ は、T、S、I から選択される残基を表し、

X₅ は、Q、L、H、F、Y、N、E、D、または から選択される残基を表し、

X₆ は、F、Y から選択される残基を表す)、

(i i i) L X₁ Y X₂ X₃ P X₄ X₅ R N A (配列番号 6)

(X₁ は、D、E、S、P、A、K から選択される残基を表し、

X₂ は、I、L、M、V、A、T から選択される残基を表し、

X₃ は、E、Q、P、Y、L、K、G、N から選択される残基を表し、

X₄ は、W、S、V、E、R、Q、T、C、K、H から選択される残基を表し、

X₅ は、E、Q、D、H、L から選択される残基を表す)

の少なくとも 1 つの半保存領域における残基の少なくとも 1 つの変異を有する、前記項目

10

20

30

40

50

の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 9)

- 配列番号 4 の配列の前記半保存領域の少なくとも 1 つの位置 R₁、R₂、および / または K における残基の少なくとも 1 つの置換、ならびに / または
 - 配列番号 5 の配列の前記半保存領域の少なくとも 1 つの位置 S、R₁、および / または E における残基の少なくとも 1 つの置換、ならびに / または
 - 配列番号 6 の配列の前記半保存領域の X₁ 位における残基の欠失ならびに / または R 位および / もしくは N 位における少なくとも 1 つの置換
- を有する、項目 8 に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 10)

前記バリエーションが、R 3 3 6、K 3 3 8、H 3 4 2、A 3 9 7、S 4 5 3、R 4 5 4、E 4 5 7、R 4 6 1、N 4 7 4、D 5 0 1、Y 5 0 2、I 5 0 3、R 5 0 8、および N 5 0 9 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換、優先的には、R 3 3 6、A 3 9 7、R 4 5 4、E 4 5 7、R 4 6 1、N 4 7 4、D 5 0 1、Y 5 0 2、および I 5 0 3 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換、より優先的には、R 3 3 6、R 4 5 4、および E 4 5 7 からなる群より選択される少なくとも 1 つの位置における残基または機能的に同等な残基の置換、さらにより優先的には、E 4 5 7 位における残基または機能的に同等な残基の少なくとも 1 つの置換を含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 11)

R 3 3 6 位、K 3 3 8 位、H 3 4 2 位、A 3 9 7 位、S 4 5 3 位、R 4 5 4 位、E 4 5 7 位、R 4 6 1 位、N 4 7 4 位、D 5 0 1 位、Y 5 0 2 位、I 5 0 3 位、R 5 0 8 位、および N 5 0 9 位における前記置換が、R 3 3 6 K / H / N / G / D、K 3 3 8 A / C / G / S / T / N、H 3 4 2 A / C / G / S / T、N、A 3 9 7 R / H / K / D / E、S 4 5 3 A / C / G / S / T、R 4 5 4 F / Y / W / A、E 4 5 7 G / N / S / T、N 4 7 4 S / T / N / Q、D 5 0 1 A / G / X、Y 5 0 2 A / G / X、I 5 0 3 A / G / X、R 5 0 8 A / C / G / S / T、N 5 0 9 A / C / G / S / T からなる群より選択される、項目 10 に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 12)

前記バリエーションが、表 1 に列挙される置換、欠失、置換および / または欠失の組合せを含むかまたは有し、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 13)

前記バリエーションが、配列番号 1 の配列の T d T のバリエーションであり、C 3 7 8 位から L 4 0 6 位の間の残基または機能的に同等な残基の、配列番号 2 の配列のポリメラーゼ P o l μ の残基 H 3 6 3 ~ C 3 9 0 または機能的に同等な残基による置換をさらに含む、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 14)

前記バリエーションが、R 3 3 6 G - E 4 5 7 N、R 3 3 6 N - E 4 5 7 N、R 3 3 6 N - R 4 5 4 A - E 4 5 7 N、R 3 3 6 N - E 4 5 7 N、R 3 3 6 N - R 4 5 4 A - E 4 5 7 G、R 3 3 6 N - E 4 5 7 G、R 3 3 6 G - R 4 5 4 A - E 4 5 7 N、R 3 3 6 G - E 4 5 7 N から選択される置換の組合せを含み、示された位置は配列番号 1 とのアラインメントにより決定される、前記項目の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーション。

(項目 15)

項目 1 から 14 の一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションをコードする核酸。

(項目 16)

10

20

30

40

50

項目 1 5 に記載の核酸のための発現カセット。

(項目 1 7)

項目 1 5 に記載の核酸または項目 1 6 に記載の発現カセットを含むベクター。

(項目 1 8)

項目 1 5 に記載の核酸、または項目 1 6 に記載の発現カセット、または項目 1 7 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

(項目 1 9)

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを産生するための、項目 1 5 に記載の核酸、項目 1 6 に記載の発現カセット、項目 1 7 に記載のベクター、または項目 1 8 に記載の細胞の使用。

10

(項目 2 0)

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションを産生するためのプロセスであって、前記バリエーションをコードする核酸の発現を可能にする培養条件下で項目 1 8 に記載の宿主細胞を培養し、任意選択で、そのように発現した前記バリエーションを培養培地または前記宿主細胞から回収する、プロセス。

(項目 2 1)

3' - OH 修飾ヌクレオチドから鋳型鎖を用いずに核酸分子を合成するための、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションの使用。

(項目 2 2)

DNA 鎖または RNA 鎖を合成するための、項目 2 1 に記載の使用。

20

(項目 2 3)

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼのバリエーションの存在下で、少なくとも 1 つのヌクレオチド、優先的には 3' - OH 修飾ヌクレオチドにプライマー鎖を接触させる、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのプロセス。

(項目 2 4)

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の p o l X ファミリー DNA ポリメラーゼの少なくとも 1 つのバリエーションと、ヌクレオチド、優先的には 3' - OH 修飾ヌクレオチドと、任意選択で少なくとも 1 つのヌクレオチドプライマーとを含む、鋳型鎖を用いない核酸分子の酵素的合成のためのキット。

30

40

50

【図面】
【図 1】

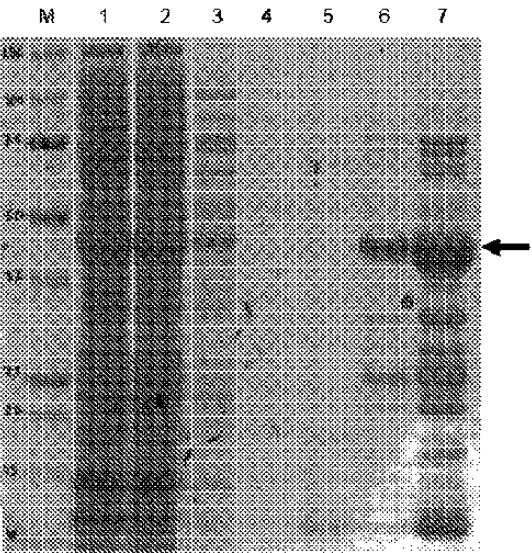


FIGURE 1

【図 2】

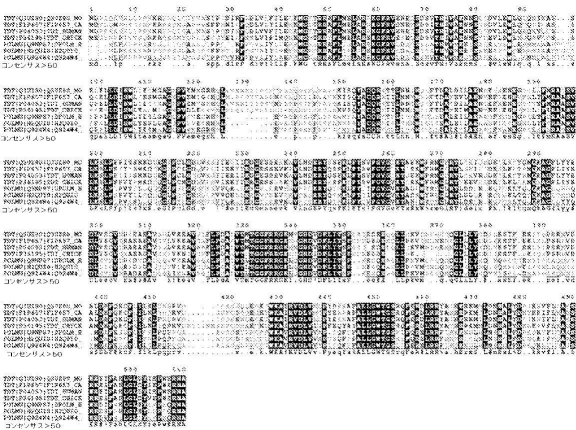


FIGURE 2

【図 3】

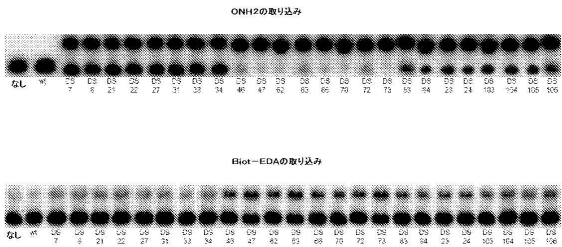


FIGURE 3

【図 4】

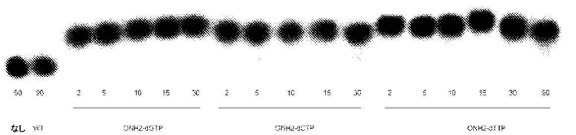


FIGURE 4

10

20

30

40

50

【図 5】

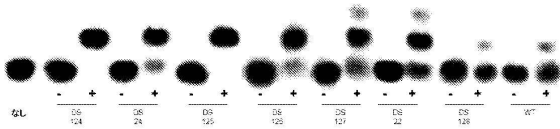


FIGURE 5

【図 6】

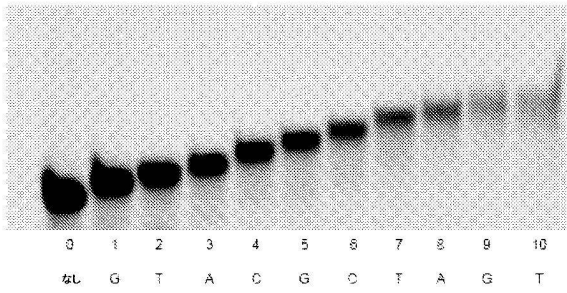


FIGURE 6

10

【配列表】

0007118510000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	9/12 (2006.01)	C 1 2 N	9/12	
C 1 2 P	19/34 (2006.01)	C 1 2 P	19/34	A
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	Z
		C 1 2 P	21/02	C

デックス 16 , リュ ミシェル - アンジュ , 3

(74)代理人 110002077 園田・小林弁理士法人

(72)発明者 イペール , トマス

フランス国 75012 パリ , リュ ドゥ ラ ヴガ 4

(72)発明者 ドュラリュ , マルク

フランス国 78000 ヴェルサイユ , ベデ ドゥ ラ レヌ 98

審査官 山本 匡子

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2016 / 0108382 (US , A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 15 / 00 - 90

C 07 K

C 1 2 Q

MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / CAPLUS / REGISTRY (ST
N)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (J DreamIII)