

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年5月14日(2020.5.14)

【公表番号】特表2019-510504(P2019-510504A)

【公表日】平成31年4月18日(2019.4.18)

【年通号数】公開・登録公報2019-015

【出願番号】特願2018-553092(P2018-553092)

【国際特許分類】

C 12 P	19/34	(2006.01)
C 12 N	15/10	(2006.01)
C 12 N	1/19	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	1/21	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)
C 12 N	15/11	(2006.01)
C 12 N	9/12	(2006.01)
C 12 N	9/22	(2006.01)
C 12 N	15/113	(2010.01)

【F I】

C 12 P	19/34	Z N A A
C 12 N	15/10	Z
C 12 N	1/19	
C 12 N	1/15	
C 12 N	1/21	
C 12 N	5/10	
C 12 N	15/11	Z
C 12 N	9/12	
C 12 N	9/22	
C 12 N	15/113	Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年4月6日(2020.4.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

リボ核酸(RNA)を生合成する無細胞的方法であって、該方法が：

(a) RNAと、リボヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および耐熱性RNAポリメラーゼからなる群から選択される少なくとも1つの酵素とを含む細胞ライセート混合物をインキュベートして、解重合したヌクレオシドーリン酸を含む細胞ライセート混合物を生産すること；

(b) ステップ(a)において生産された細胞ライセート混合物を、耐熱性キナーゼおよび耐熱性RNAポリメラーゼを不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼおよびホスファターゼを不活性化または部分的に不活性化する温度に加熱して、熱不活性化されたヌクレアーゼおよびホスファターゼを含む細胞ライセート混合物を生産すること；および

(c) (b)において生産された細胞ライセート混合物を、エネルギー供給源と関心の

R N A をコードするデオキシリボ核酸 ( D N A ) 鑄型との存在下においてインキュベートして、関心の R N A を含む細胞ライセート混合物を生産すること、  
を含む、  
前記方法。

【請求項 2】

細胞ライセート混合物が、单一の細胞ライセートまたは少なくとも 2 つの細胞ライセートを含み、少なくとも 2 つの細胞ライセートのうちの少なくとも 1 つの細胞ライセートが、R N A を含む細胞から得られ、少なくとも 2 つの細胞ライセートのうちの少なくとも 1 つの細胞ライセートが、リボヌクレアーゼ、キナーゼ、および / または R N A ポリメラーゼを発現する細胞から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

リボヌクレアーゼが、S 1 ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ P 1 、 R N a s e I I 、 R N a s e I I I 、 R N a s e R 、 R N a s e J I 、 N u c A 、 P N P a s e 、 R N a s e T 、 R N a s e E 、 R N a s e G および *Escherichia coli* R N a s e R からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

耐熱性キナーゼが、耐熱性ヌクレオシドーリン酸キナーゼ、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および耐熱性ポリリン酸キナーゼからなる群から選択され、任意に、耐熱性ヌクレオシドーリン酸キナーゼが、耐熱性ウリジル酸キナーゼ、耐熱性シチジル酸キナーゼ、耐熱性グアニル酸キナーゼ、および耐熱性アデニル酸キナーゼからなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

耐熱性ヌクレオシドーリン酸キナーゼが、耐熱性 *Pyrococcus furiosus* ウリジル酸キナーゼ ( P f P y r H ) 、耐熱性 *Thermus thermophilus* アデニル酸キナーゼ ( T t h A d k ) 、耐熱性 *Thermus thermophilus* シチジル酸キナーゼ ( T t h C m k ) 、および耐熱性 *Thermotoga maritima* グアニル酸キナーゼ ( T m G m k ) からなる群から選択され、および / または、耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼが、耐熱性 *Aquifex aeolicus* ヌクレオシドニリン酸キナーゼからなる群から選択され、および / または、耐熱性ポリリン酸キナーゼが、耐熱性 P P K 1 酵素および耐熱性ポリリン酸キナーゼ 2 ( P P K 2 ) 酵素からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

耐熱性 P P K 1 酵素が、耐熱性 *Thermosynechococcus elongatus* P P K 1 酵素からなる群から選択され、および / または、耐熱性 P P K 2 酵素が、耐熱性 クラス I I I P P K 2 酵素からなる群から選択され、任意に、耐熱性 クラス I I I P P K 2 酵素が、 *Meiothermus ruber* 、 *Meiothermus silvanus* 、 *Deinococcus geothermalis* 、 *Thermosynechococcus elongatus* 、 *Anaerolinea thermophile* 、 *Caldilinea aerophila* 、 *Chlorobaculum tepidum* 、 *Oceanithermus profundus* 、 *Roseiflexus castenholzii* 、 *Roseiflexus* sp. 、および *Truepera radiovctrix* P P K 2 酵素からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

耐熱性 クラス I I I P P K 2 酵素が、配列番号 8 ~ 1 8 のいずれか 1 つによって同定されるアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、または 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む耐熱性 クラス I I I P P K 2 酵素からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞ライセート混合物が、少なくとも 1 つのリボヌクレアーゼ、少なくとも 1 つの耐熱性ヌクレオシドーリン酸キナーゼ、少なくとも 1 つの耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および少なくとも 1 つのポリリン酸キナーゼを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの耐熱性 RNA ポリメラーゼが、耐熱性 DNA 依存性 RNA ポリメラーゼからなる群から選択され、任意に、耐熱性 DNA 依存性 RNA ポリメラーゼが、耐熱性 T 7 RNA ポリメラーゼ、耐熱性 S P 6 RNA ポリメラーゼ、および耐熱性 T 3 RNA ポリメラーゼからなる群から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 10】

エネルギー供給源が、アデノシン三リン酸 (ATP) または ATP 再生系であり、任意に、ATP 再生系が、ポリリン酸、任意にヘキサメタリン酸、ヌクレオシドーリン酸、およびポリリン酸キナーゼを含み、さらに任意に、エネルギー供給源、またはエネルギー供給源の少なくとも 1 つのコンポーネントがステップ (c) の細胞ライセート混合物に追加される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 11】

少なくとも 1 つの精製された酵素または融合酵素がステップ (a) および / またはステップ (c) の細胞ライセート混合物に追加され、該少なくとも 1 つの精製された酵素または融合酵素は、リボヌクレアーゼ、耐熱性キナーゼ、および / または耐熱性 RNA ポリメラーゼである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 12】

(i) ステップ (a) の細胞ライセート混合物が、関心の RNA をコードする DNA 鑄型を含む、および / または、

(ii) ステップ (a) の細胞ライセート混合物が、さらに  $Mg^{2+}$  キレート剤を含み、任意に、 $Mg^{2+}$  キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) であるか、または、さらに塩化マンガン ( $MnCl_2$ ) および / または硫酸マグネシウム ( $MgSO_4$ ) を含む、および / または、

(iii) ステップ (b) の温度が、50 ~ 80 である、および / または、

(iv) 関心の RNA をコードする DNA 鑄型がステップ (c) の細胞ライセート混合物に追加される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 13】

関心の RNA が、一本鎖 RNA または二本鎖 RNA であり、任意に、一本鎖 RNA が、メッセンジャー RNA (mRNA) 、アンチセンス RNA 、または、ヒンジドメインによって互いに連結された相補的なドメインを含有する一本鎖 RNA であり、任意に、二本鎖 RNA が、低分子干渉 RNA (siRNA) またはショートヘアピン RNA (shRNA) であり、さらに任意に、関心の RNA が、少なくとも 1 g / L 、少なくとも 5 g / L 、少なくとも 10 g / L の濃度で生産される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 14】

任意に、熱不活性化された細胞ライセート混合物と蛋白質沈殿剤とを組み合わせること、および沈殿した蛋白質、脂質、および DNA を除去することによって、関心の RNA を精製することをさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 15】

細胞が、細菌細胞または酵母であり、任意に、細菌細胞が、Escherichia coli 細胞である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項 16】

細胞培養培地で、(a) RNA を含む細胞と、(b) 少なくとも 1 つのリボヌクレアーゼ、少なくとも 1 つの耐熱性キナーゼ、および少なくとも 1 つの耐熱性 RNA ポリメラーゼを含む細胞とを培養することを含む、方法であって、任意に、以下：

(i) (a) および (b) の細胞を溶解して細胞ライセートを生産することおよび該細胞ライセートを組み合わせて複数の酵素を含有する混合物を生産すること；あるいは

(ii) (a) および (b) の細胞を組み合わせること、および組み合わせられた細胞を溶解して複数の酵素を含有する混合物を生産することをさらに含み、任意に、

細胞ライセートを、耐熱性キナーゼを完全に不活性化することなしに内在性ヌクレアーゼ

ゼおよびホスファターゼを不活性化または部分的に不活性化する温度に加熱して、熱不活性化された細胞ライセートを生産することをさらに含み、および、任意に、

熱不活性化された細胞ライセートを、エネルギー供給源および関心のRNAをコードするデオキシリボ核酸(DNA)鑄型の存在下、ヌクレオシド三リン酸の生産およびヌクレオシド三リン酸の重合をもたらす条件下でインキュベートして、関心のRNAを含む細胞ライセート混合物を生産することをさらに含む、前記方法。

【請求項17】

少なくとも1つの耐熱性ヌクレオシドーリン酸キナーゼ、少なくとも1つの耐熱性ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、および少なくとも1つのポリリン酸キナーゼを含み、任意に、少なくとも1つのリボヌクレアーゼおよび/または少なくとも1つの熱安定性RNAポリメラーゼをさらに含む、改変細胞。

【請求項18】

ヌクレオシド三リン酸、関心のリボ核酸(RNA)をコードするデオキシリボ核酸(DNA)、少なくとも1つのリボヌクレアーゼ、少なくとも1つの耐熱性キナーゼ、および少なくとも1つの耐熱性RNAポリメラーゼを含み、任意に、エネルギー供給源、ヌクレオシドーリン酸、および5'-ヌクレオシドーリン酸から5'-ヌクレオシド三リン酸への変換を直接的または間接的に触媒するキナーゼをさらに含み、および/または、任意に、

該細胞ライセートおよび/または該細胞ライセートの少なくとも1つのコンポーネントは改変細胞および/または細菌細胞から得られ、任意に細菌細胞が、Escherichia coli細胞である、前記細胞ライセート。

【請求項19】

(i) 少なくとも1つのリボヌクレアーゼが、S1ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼP1、RNase II、RNase III、RNase R、RNase JI、NucA、PNPase、RNase T、RNase E、およびRNase Gからなる群から選択され、および/または、

(ii) 少なくとも1つのキナーゼが、ヌクレオシドーリン酸キナーゼ、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、およびポリリン酸キナーゼからなる群から選択され、および/または、

(iii) 少なくとも1つのRNAポリメラーゼが、T7 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、およびT3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される、請求項18に記載の細胞ライセート。