

【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 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

【F I】

C 1 2 P 19/34 Z N A A

C 1 2 N 15/10 Z

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/22

C 1 2 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

RNAをコードするデオキシリボ核酸(DNA)鋳型との存在下において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、

を含む、

前記方法。

【請求項2】

細胞ライセート混合物が、単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、RNA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RNA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、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、RNase GおよびEscherichia coli RNase 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(PfPyrH)、耐熱性Thermus thermophilusアデニル酸キナーゼ(TthAdk)、耐熱性Thermus thermophilusシチジル酸キナーゼ(TthCmk)、および耐熱性Thermotoga maritimaグアニル酸キナーゼ(TmGmk)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、耐熱性ポリリン酸キナーゼ1(PPK1)酵素および耐熱性ポリリン酸キナーゼ2(PPK2)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PPK1酵素が、耐熱性Thermosynechococcus elongatus PPK1酵素からなる群から選択され、および/または、耐熱性PPK2酵素が、耐熱性クラスIII PPK2酵素からなる群から選択され、任意に、耐熱性クラスIII PPK2酵素が、Meiothermus ruber、Meiothermus silvanus、Deinococcus geothermalis、Thermosynechococcus elongates、Anaerolinea thermophila、Caldilinea aerophila、Chlorobaculum tepidum、Oceanithermus profundus、Roseiflexus castenholzii、Roseiflexus sp.、およびTruepera radiovctrix PPK2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III PPK2酵素が、配列番号8～18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70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む耐熱性クラスIII PPK2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T7 RNAポリメラーゼ、耐熱性SP6 RNAポリメラーゼ、および耐熱性T3 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鋳型を含む、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鋳型がステップ(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1g/L、少なくとも5g/L、少なくとも10g/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】

細胞培養培地中で、(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ることで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む、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

ぜ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)鋳型の存在下、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三リン酸キナーゼ、少なくとも1つの耐熱性ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、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、ヌクレオシド三リン酸、および5' - ヌクレオシド三リン酸から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、ヌクレオシド三リン酸キナーゼ、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、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。