

【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 7 月 27 日 (2020.7.27)

【公表番号】特表 2019-517799 (P2019-517799A)

【公表日】令和 1 年 6 月 27 日 (2019.6.27)

【年通号数】公開・登録公報 2019-025

【出願番号】特願 2018-564828 (P2018-564828)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/54

C 1 2 N 15/63 Z N A Z

C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/12

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 N 15/10 Z

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 6 月 11 日 (2020.6.11)

【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】

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 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、前記置換は E 4 5 7 G / N / S / T から選択され、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 7 0 % の同一性を有する、バリエーション。

【請求項 2】

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、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 つの変異をさらに含み、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、請求項 1 に記載の 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。

【請求項 3】

DNA 鎖および / または RNA 鎖を合成することができる、請求項 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 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。

【請求項 4】

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、請求項 1 ~ 3 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 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。

【請求項 5】

前記バリエーションが配列番号 1 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % の同一性を有する、請求項 1 ~ 4 の一項に記載の 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。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つのさらなる変異が、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、請求項 2 ~ 5 の一項に記載の 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。

【請求項 7】

前記バリエーションが、R 3 3 6 および R 4 5 4 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、請求項 1 ~ 6 の一項に記載の 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。

【請求項 8】

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、請求項 1 ~ 7 の一項に記載の 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。

【請求項 9】

配列

( i )  $X_1 X_2 G G F R_1 R_2 G K X_3 X_4$  ( 配列番号 4 )

( 式中、

$X_1$  は、M、I、V、L から選択される残基を表し、

$X_2$  は、T、A、M、Q から選択される残基を表し、

$X_3$  は、M、K、E、Q、L、S、P、R、D から選択される残基を表し、

$X_4$  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 )  $X_1 X_2 L G X_3 X_4 G S R_1 X_5 X_6 E R_2$  ( 配列番号 5 )

( 式中、

$X_1$  は、A、C、G、S から選択される残基を表し、

$X_2$  は、L、T、R から選択される残基を表し、

$X_3$  は、W、Y から選択される残基を表し、

$X_4$  は、T、S、I から選択される残基を表し、

$X_5$  は、Q、L、H、F、Y、N、E、D、または から選択される残基を表し、  
 $X_6$  は、F、Yから選択される残基を表す)、

( i i i )  $L X_1 Y X_2 X_3 P X_4 X_5 R N A$  (配列番号6)

( $X_1$  は、D、E、S、P、A、Kから選択される残基を表し、

$X_2$  は、I、L、M、V、A、Tから選択される残基を表し、

$X_3$  は、E、Q、P、Y、L、K、G、Nから選択される残基を表し、

$X_4$  は、W、S、V、E、R、Q、T、C、K、Hから選択される残基を表し、

$X_5$  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、請求項1～8の一項に記載の  $pol X$ 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。

#### 【請求項10】

- 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  $R_1$ 、 $R_2$ 、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、 $R_1$ 、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  $X_1$  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、請求項9に記載の  $pol X$ 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。

#### 【請求項11】

前記バリエーションが、 $R336$ 、 $K338$ 、 $H342$ 、 $A397$ 、 $S453$ 、 $R454$ 、 $R461$ 、 $N474$ 、 $D501$ 、 $Y502$ 、 $I503$ 、 $R508$ 、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、 $R336$ 、 $A397$ 、 $R454$ 、 $R461$ 、 $N474$ 、 $D501$ 、 $Y502$ 、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、請求項1～10の一項に記載の  $pol X$ 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。

#### 【請求項12】

$R336$ 位、 $K338$ 位、 $H342$ 位、 $A397$ 位、 $S453$ 位、 $R454$ 位、 $R461$ 位、 $N474$ 位、 $D501$ 位、 $Y502$ 位、 $I503$ 位、 $R508$ 位、および $N509$ 位における前記置換が、 $R336 K/H/N/G/D$ 、 $K338 A/C/G/S/T/N$ 、 $H342 A/C/G/S/T$ 、 $N$ 、 $A397 R/H/K/D/E$ 、 $S453 A/C/G/S/T$ 、 $R454 F/Y/W/A$ 、 $N474 S/T/N/Q$ 、 $D501 A/G/X$ 、 $Y502 A/G/X$ 、 $I503 A/G/X$ 、 $R508 A/C/G/S/T$ 、 $N509 A/C/G/S/T$ からなる群より選択される、請求項11に記載の  $pol X$ 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。

#### 【請求項13】

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、請求項1～12の一項に記載の  $pol X$ 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。

#### 【請求項14】

前記バリエーションが、配列番号1の配列の  $TdT$  のバリエーションであり、 $C378$ 位から $L406$ 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  $Pol \mu$  の残基  $H363 \sim C390$  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1～13の一項に記載の  $pol X$ 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。

#### 【請求項15】

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、請求項1～14の一項に記載の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。

【請求項16】

請求項1から15の一項に記載の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をコードする核酸。

【請求項17】

請求項16に記載の核酸を含み、発現する発現カセット。

【請求項18】

請求項16に記載の核酸または請求項17に記載の発現カセットを含むベクター。

【請求項19】

請求項16に記載の核酸、または請求項17に記載の発現カセット、または請求項18に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項20】

請求項1から15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を産生するための、請求項16に記載の核酸、請求項17に記載の発現カセット、請求項18に記載のベクター、または請求項19に記載の細胞の使用。

【請求項21】

請求項1から15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19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22】

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15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の使用。

【請求項23】

DNA鎖またはRNA鎖を合成するための、請求項22に記載の使用。

【請求項24】

請求項1から15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25】

請求項1から15のいずれか一項に記載のp o l XファミリーDNAポリメラーゼまたはそのようなポリメラーゼの機能的断片の少なくとも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。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

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。

(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。

(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 )  $X_1 X_2 G G F R_1 R_2 G K X_3 X_4$  (配列番号 4)

(式中、

$X_1$  は、M、I、V、L から選択される残基を表し、

$X_2$  は、T、A、M、Q から選択される残基を表し、

$X_3$  は、M、K、E、Q、L、S、P、R、D から選択される残基を表し、

$X_4$  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 )  $X_1 X_2 L G X_3 X_4 G S R_1 X_5 X_6 E R_2$  (配列番号5)

(式中、

$X_1$  は、A、C、G、Sから選択される残基を表し、

$X_2$  は、L、T、Rから選択される残基を表し、

$X_3$  は、W、Yから選択される残基を表し、

$X_4$  は、T、S、Iから選択される残基を表し、

$X_5$  は、Q、L、H、F、Y、N、E、D、または から選択される残基を表し、

$X_6$  は、F、Yから選択される残基を表す)、

( i i i )  $L X_1 Y X_2 X_3 P X_4 X_5 R N A$  (配列番号6)

( $X_1$  は、D、E、S、P、A、Kから選択される残基を表し、

$X_2$  は、I、L、M、V、A、Tから選択される残基を表し、

$X_3$  は、E、Q、P、Y、L、K、G、Nから選択される残基を表し、

$X_4$  は、W、S、V、E、R、Q、T、C、K、Hから選択される残基を表し、

$X_5$  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、前記項目の一項に記載の pol 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  $R_1$ 、 $R_2$ 、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、 $R_1$ 、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  $X_1$  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 pol 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、R336、K338、H342、A397、S453、R454、E457、R461、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、R461、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、および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置換、さらにより優先的には、E457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 pol XファミリーDNAポリメラーゼのバリエーション。

(項目11)

R336位、K338位、H342位、A397位、S453位、R454位、E457位、R461位、N474位、D501位、Y502位、I503位、R508位、およびN509位における前記置換が、R336 K/H/N/G/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からなる群より選択される、項目10に記載の pol 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 pol XファミリーDNAポリメラーゼのバリエーション。

(項目 1 3)

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 1 4)

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 1 5)

項目 1 から 1 4 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 1 6)

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。

(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。

(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。