



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21), (22) Заявка: 2009112104/10, 17.10.2007

(30) Конвенционный приоритет:
18.10.2006 US 60/853,008
12.04.2007 US 60/923,458

(43) Дата публикации заявки: 27.11.2010 Бюл. № 33

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 18.05.2009(86) Заявка РСТ:
US 2007/022232 (17.10.2007)(87) Публикация РСТ:
WO 2008/073184 (19.06.2008)Адрес для переписки:
190068, Санкт-Петербург, ул. Садовая, 51,
офис 303, ООО "ПАТЕНТИКА", пат.пов.
М.И.Ниловой(71) Заявитель(и):
ЗЕ СКРИПС РЕСЕЧ ИНСТИТЮТ (US)(72) Автор(ы):
ЛЬЮ Венши (US),
ШУЛЬЦ Питер Г. (US)(54) ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ВСТРАИВАНИЕ НЕ ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В ПРИРОДЕ
АМИНОКИСЛОТ В БЕЛКИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

(57) Формула изобретения

1. Система трансляции, включающая:

- (а) первую неприродную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из:
 - i) р-метоксифенилаланина (рМра);
 - ii) р-ацетилфенилаланина (рАра);
 - iii) р-бензоилфенилаланина (рВра);
 - iv) р-индофенилаланина (рИра);
 - v) р-азидофенилаланина (рAzра);
 - vi) р-пропагилоксифенилаланина (рPра);
 - vii) α -аминокаприловой кислоты;
 - viii) о-нитробензилцистеина (о-NBC);
 - ix) 1,5-дензилаланина; и
 - x) о-ниетробензилсерина (о-NBS);
- (б) первую ортогональную тРНК (О-тРНК);
- (с) первую ортогональную аминоацил-тРНК-синтетазу (О-РС), полученную из аминоацил-тРНК-синтетазы эубактерии, причем указанная О-РС предпочтительно аминоацилирует указанную О-тРНК указанной неприродной аминокислотой; и

RU 2009112104 A

A 04 12 11 09 00 20 RU

(d) клетку-хозяина, содержащую (a), (b) и (c), причем указанная клетка выбрана из клетки грызуна и клетки примата.

2. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная первая О-РС предпочтительно аминоацилирует указанную первую О-тРНК указанной первой неприродной аминокислотой с эффективностью, составляющей по меньшей мере 50% эффективности, наблюдаемой для системы трансляции, содержащей указанную О-тРНК, указанную неприродную аминокислоту и аминоацил-тРНК-синтетазу, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NOS: 57-101.

3. Система трансляции по п.1, которая содержит последовательность полинуклеотида, определенную в SEQ ID NO: 3, или кодируется указанной последовательностью.

4. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная первая О-РС получена из аминоацил-тРНК-синтетазы *E.coli*.

5. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная О-РС включает последовательность аминокислот, выбранную из группы последовательностей аминокислот, определенных в SEQ ID NOS: 57-101, и консервативных вариантов указанных последовательностей.

6. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую целевой белок, причем указанная нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один селекторный кодон, распознаваемый указанной первой О-тРНК.

7. Система трансляции по п.6, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин дополнительно содержит вторую неприродную аминокислоту, которая отлична от первой неприродной аминокислоты, вторую О-РС и вторую О-тРНК, причем вторая О-РС предпочтительно аминоацилирует вторую тРНК второй неприродной аминокислотой и при этом вторая О-тРНК распознает селекторный кодон, отличный от селекторного кодона, распознаваемого первой О-тРНК.

8. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин содержит полинуклеотид, кодирующий указанную первую О-РС.

9. Система трансляции по п.8, отличающаяся тем, что указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, выбранную из последовательностей нуклеотидов, определенных в SEQ ID NOS: 8-56.

10. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин содержит полинуклеотид, кодирующий указанную первую О-тРНК.

11. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка грызуна выбрана из клетки-хозяина крысы и клетки-хозяина мыши.

12. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что указанная клетка-хозяин примата выбрана из группы, состоящей из клетки-хозяина человека, клетки-хозяина шимпанзе, клетки-хозяина бонобо, клетки-хозяина гориллы, клетки-хозяина орангутана, клетки-хозяина гиббона, клетки-хозяина макаки, клетки-хозяина тамарина и клетки-хозяина мартышки.

13. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина СНО.

14. Система трансляции по п.1, отличающаяся тем, что клетка-хозяин примата представляет собой клетку-хозяина 293Т.

15. Способ получения белка, содержащего неприродную аминокислоту в выбранном положении, включающий:

(а) обеспечение:

(i) первой неприродной аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из:

А) р-метоксифениаланина (рМра);

- В) р-ацетилфенилаланина (рApa);
- С) р-бензоилфенилаланина (рBpa);
- Д) р-иодофенилаланина (рIpa);
- Е) р-азидофенилаланина (рAzpa);
- Ф) р-пропагилоксифенилаланина (рPpa);
- Г) α -аминокаприловой кислоты;
- Н) о-нитробензилцистеина (о-NBC);
- И) 1,5-данзилаланина; и
- Ј) о-нитробензилсерина (о-NBS);
- (ii) первой ортогональной тРНК(О-тРНК);
- (iii) первой ортогональной аминоацил-тРНК синтетазы (О-РС), где указанная первая О-РС предпочтительно аминоацелирует указанную первую О-тРНК указанной неприродной аминокислотой;
- (iv) нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный белок, причем указанная нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один селекторный кодон, распознаваемый указанной первой О-тРНК, и положение указанного селекторного кодона в указанной нуклеиновой кислоте соответствует выбранному положению в указанном белке; и
- (v) клетки-хозяина, содержащей (i), (ii), (iii) и (iv), причем указанная клетка-хозяин выбрана из клетки грызуна и клетки примата; и
- (b) встраивание указанной неприродной аминокислоты в указанный белок в указанном выбранном положении во время трансляции указанного белка в ответ на указанный селекторный кодон, с получением указанного белка, содержащего указанную неприродную аминокислоту в выбранном положении.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная первая О-РС предпочтительно аминоацелирует указанную первую О-тРНК указанной первой неприродной аминокислотой с эффективностью, составляющей по меньшей мере 50% эффективности, наблюдавшейся для системы трансляции, содержащей указанную О-тРНК, указанную неприродную аминокислоту и аминоацил-тРНК-синтетазу, содержащую последовательность аминокислот, выбранную из SEQ ID NOS: 57-101.

17. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная первая О-тРНК содержит последовательность полинуклеотида, определенную в SEQ ID NO:3, или кодируется указанной последовательностью.

18. Способ по п.15, отличающийся тем, что обеспечение первой О-РС включает обеспечение полинуклеотида, кодирующего указанную первую О-РС.

19. Способ по п.15, отличающийся тем, что первая О-РС получена из аминоацил-тРНК синтетазы *E.coli*.

20. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанная первая О-РС содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы последовательностей аминокислот, определенных в EQ ID NOS: 57-101, и консервативных вариантов указанных последовательностей.

21. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное обеспечение первой О-РС включает обеспечение полинуклеотида, кодирующего указанную О-РС.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, выбранную из последовательностей нуклеотидов, определенных в SEQ ID NOS: 8-56.

23. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное обеспечение первой О-РС включает осуществление мутации кармана связывания аминокислоты аминоацил-тРНК синтетазы дикого типа путем сайт-направленного мутагенеза, и отбор полученной О-РС, которая избирательно аминоацелирует указанную О-тРНК

указанной неприродной аминокислотой.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что указанный этап отбора включает положительный отбор и отрицательный отбор указанной О-РС из пула, содержащего множество молекул аминоацил-тРНК-синтетаз, полученных в результате сайт-направленного мутагенеза.

25. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное обеспечение указанной первой О-тРНК включает обеспечение полинуклеотида, кодирующего указанную первую О-тРНК.

26. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанный белок содержит вторую неприродную аминокислоту, которая отлична от указанной первой неприродной аминокислоты, причем способ дополнительно обеспечивает вторую неприродную аминокислоту, вторую О-РС и вторую О-тРНК, причем вторая О-РС предпочтительно аминоацетирирует вторую О-тРНК второй неприродной аминокислотой и вторая О-тРНК распознает селекторный кодон, отличный от селекторного кодона, распознаваемого первой О-тРНК.

27. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанный этап встраивания включает культивирование клетки-хозяина.

28. Способ по п.15, отличающийся тем, что первая неприродная аминокислота включает фотоактивируемую аминокислоту и способ включает:

воздействие на клетки-хозяина УФ светом.

29. Способ по п.29, отличающийся тем, что обработка клетки-хозяина УФ светом обеспечивает пространственный контроль активности белка в клетке-хозяине.