



**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 ИНСТИТЬЮТ (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:

(a) первую неприродную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из:

i) р-метоксифенилаланина (pMpa);

ii) р-ацетилфенилаланина (pApa);

iii) р-бензоилфенилаланина (pBra);

iv) р-индофенилаланина (pIpa);

v) р-азидофенилаланина (pAzpa);

vi) р-пропагиллоксифенилаланина (pPpa);

vii) α-аминокаприловой кислоты;

viii) о-нитробензилцистеина (o-NBC);

ix) 1,5-дензилаланина; и

x) о-ниетробензилсерина (o-NBS);

(b) первую ортогональную тРНК (О-тРНК);

(c) первую ортогональную аминоксил-тРНК-синтетазу (О-РС), полученную из аминоксил-тРНК-синтетазы эубактерии, причем указанная О-РС предпочтительно аминоксилует указанную О-тРНК указанной неприродной аминокислотой; и

(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:

(a) обеспечение:

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

А) р-метоксифенилаланина (pMpa);

RU 2 0 0 9 1 1 2 1 0 4 A

RU 2 0 0 9 1 1 2 1 0 4 A

- В) р-ацетилфенилаланина (pAra);
- С) р-бензоилфенилаланина (pBra);
- Д) р-иодофенилаланина (pIra);
- Е) р-азидофенилаланина (pAzra);
- Ф) р-пропагиллоксифенилаланина (pPra);
- Г) α-аминокаприловой кислоты;
- Н) о-нитробензилцистеина (o-NBC);
- І) 1,5-данзилаланина; и
- Ј) о-нитробензилсерина (o-NBS);

(ii) первой ортогональной тРНК(О-тРНК);

(iii) первой ортогональной аминоксил-тРНК синтетазы (О-РС), где указанная первая О-РС предпочтительно аминоксилурует 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 аминоксилурует 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 аминоксил-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 аминоксил-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 аминоксил-тРНК синтетазы дикого типа путем сайт-направленного мутагенеза, и отбор полученной О-РС, которая избирательно аминоксилурует 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 аминоктил-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 аминоктилирует 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.