

【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1月30日(2020.1.30)

【公表番号】特表2017-500024(P2017-500024A)

【公表日】平成29年1月5日(2017.1.5)

【年通号数】公開・登録公報2017-001

【出願番号】特願2016-536954(P2016-536954)

【国際特許分類】

| | | |
|--------|--------|-----------|
| C 12 N | 15/09 | (2006.01) |
| C 12 P | 17/12 | (2006.01) |
| C 12 N | 9/02 | (2006.01) |
| C 12 Q | 1/68 | (2018.01) |
| C 12 N | 5/10 | (2006.01) |
| A 01 H | 5/00 | (2018.01) |
| C 07 D | 217/24 | (2006.01) |

【F I】

| | | |
|--------|--------|-------|
| C 12 N | 15/00 | A |
| C 12 P | 17/12 | Z N A |
| C 12 N | 9/02 | |
| C 12 Q | 1/68 | A |
| C 12 N | 5/10 | |
| A 01 H | 5/00 | A |
| C 07 D | 217/24 | |

【誤訳訂正書】

【提出日】令和1年12月10日(2019.12.10)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0130

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0130】

実施例2-(S)-レチクリンの1,2-デヒドロレチクリンへの変換

この実施例では、パパベール・ロエアス(Papaver rhoeas)のCYP450(配列番号325)を使用する、酵母における(S)-レチクリンの1,2-デヒドロレチクリンへのin vitro変換が示される。下記のように、pESC-leu2d::PSCP/R/PrDRSを保持するサッカロミセス・セレビシア(Saccharomyces cerevisiae)株YPH499を増殖させ、ミクロソームを精製した。手短に言えば、2%グルコースを添加した、ロイシン不含合成完全(SC)培地中で、この酵母株を30で16時間、250rpmで増殖させた。この培養物の1ミリリットルを、1.8%ガラクトース、0.2%グルコース、および1%ラフィノースを添加した、ロイシン不含SC培地50mLに加え、30で72時間、250rpmで増殖させた。次いで、培養物を4,000gで5分間遠心分離し、TEK緩衝液(50mM Tris-HCl pH8、1mM EDTA、100mM KCl)5mLで洗浄した。次いで、ペレットを、TESB緩衝液(50mM Tris-HCl pH8、1mM EDTA、0.6Mソルビトール)1mLに再懸濁し、0.5mmのガラスピーブを等量加えた。チューブを10で4分間、手で振盪した。ビーズをTESBで洗浄し、洗浄液を集め、14,000gで10分間遠心分離した。次いで、上清を125,000gで1時間超遠心分離し、上清を廃棄した。次いで、ミクロソームを50mM HEPES p

H 7 . 5 に再懸濁した。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 1 3 3

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 1 3 3】

実施例 3 - 1 , 2 - デヒドロレチクリンの (R) - レチクリンへの変換

この実施例では、パパヴェル・ロエアス (P a p a v e r r h o e a s) の A K R (配列番号 3 2 7) を使用する、酵母における 1 , 2 - デヒドロレチクリンの (R) - レチクリンへの in vitro 変換が示される。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(R) - レチクリンまたは (R) - レチクリン前駆体を調製するための方法であって、
(a) 宿主細胞に、

(i) 作動可能に連結される成分として、配列番号 3 2 5 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むシトクロム P 4 5 0 (C Y P 4 5 0) ポリペプチドをコードする第 1 の核酸配列と、細胞における第 1 の核酸配列の発現を制御する第 2 の核酸配列とを含む第 1 のキメラ核酸配列と、

(i i) 作動可能に連結される成分として、配列番号 3 2 7 または配列番号 3 2 9 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むアルド・ケト還元酵素 (A K R) ポリペプチドをコードする第 3 の核酸配列と、細胞における前記第 3 の核酸配列の発現を制御する第 4 の核酸配列とを含む第 2 のキメラ核酸配列と、
を導入するステップと、

(b) 前記宿主細胞を増殖させて (R) - レチクリンまたは (R) - レチクリン前駆体を產生させるステップと、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記 C Y P 4 5 0 ポリペプチドが、配列番号 3 2 5 のアミノ酸配列を含み、前記 A K R ポリペプチドが、配列番号 3 2 7 または配列番号 3 2 9 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項 3】

(R) - レチクリンまたは (R) - レチクリン前駆体を調製するための方法であって、
(a) 作動可能に連結される成分として、

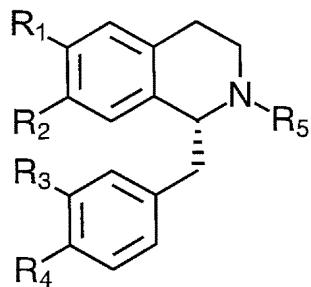
(i) シトクロム P 4 5 0 (C Y P 4 5 0) ポリペプチドをコードする第 1 の核酸配列と、

(i i) アルド・ケト還元酵素 (A K R) ポリペプチドをコードする第 2 の核酸配列と、

(i i i) 宿主細胞における発現を制御することができる 1 つまたは複数の核酸配列と

を含むキメラ核酸配列を導入するステップと、

(b) 前記宿主細胞を増殖させて、(R) - レチクリンまたは (R) - レチクリン前駆体を產生させるステップと
を含み、前記 (R) - レチクリン前駆体が、化学式：



[式中、R₁、R₂、R₃、およびR₄はそれぞれ、水素原子、ヒドロキシル基、またはメトキシ基であり；

R₅ は、水素原子またはメチル基である]

を有するが、(R)-レチクリンが前記式から除外されており、

前記第1の核酸配列が、配列番号325と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、かつ、前記第2の核酸配列が、配列番号327または配列番号329と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、または、

前記キメラ核酸配列が、配列番号2または配列番号323と少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドをコードすることを特徴とする方法。

【 請求項 4 】

請求項 3 に記載の方法において、前記第 1 の核酸配列が、配列番号 325 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、かつ、前記第 2 の核酸配列が、配列番号 327 または配列番号 329 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、または、前記キメラ核酸配列が、配列番号 2 または配列番号 323 のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドをコードすることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項3または4に記載の方法において、前記第1および第2の核酸配列が、C Y P 4 5 0 ポリペプチドおよびA K R ポリペプチドを含む融合ポリペプチドを産生させるために作動可能に連結されており、前記融合ポリペプチドが配列番号323のアミノ酸配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 の何れか 1 項に記載の方法において、前記方法が、(R) - レチクリンを產生することを特徴とする方法。

【 請求項 7 】

シトクロム P 450 (CYP450) ポリペプチドおよびアルド・ケト還元酵素 (AKR) ポリペプチドを含む単離された組成物であって、

前記 C Y P 4 5 0 ポリペプチドが、配列番号 3 2 5 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、

前記 A K R ポリペプチドが、配列番号 327 または配列番号 329 と少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

または

前記 C Y P 4 5 0 ポリペプチドおよび前記 A K R ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 3 2 3 と少なくとも 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドを形成することを特徴とする組成物

【請求項8】

請求項 7 に記載の組成物において、前記 C Y P 4 5 0 ポリペプチドが、配列番号 3 2 5 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記 A K R ポリペプチドが、配列番号 3 2 7 または配列番号 3 2 9 のアミノ酸配列を含む、または、前記融合ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 3 2 3 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする組成物

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の組成物において、前記融合ポリペプチドが、配列番号 323 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 10】

作動可能に連結される成分として、

(a) 宿主細胞における発現を制御することができる核酸配列と、
 (b) (i) 配列番号 325 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含むシトクロム P450 (CYP450) ポリペプチド、および、配列番号 327 または配列番号 329 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含むアルド・ケト還元酵素 (AKR) ポリペプチド、または、

(ii) 配列番号 2 または配列番号 323 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドと、

をコードする核酸配列とを含む組換え発現ベクターであって、前記発現ベクターが、宿主細胞における発現に適していることを特徴とする組換え発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターにおいて、前記 CYP450 ポリペプチドが、配列番号 325 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記 AKR ポリペプチドが、配列番号 327 または配列番号 329 のアミノ酸配列を含む、または、前記融合ポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 323 のアミノ酸配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項 12】

植物の外で (R)-レチクリンを製造する方法であって、
 最適な条件下で、(S)-レチクリンを (R)-レチクリンに変換することができる 1 つまたは複数の酵素と (S)-レチクリンを接触させるステップと
 を含み、

前記 1 つまたは複数の酵素が、

(a) 配列番号 325 のアミノ酸配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含むシトクロム P450 (CYP450) ポリペプチド、および、配列番号 327 または配列番号 329 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含むアルド・ケト還元酵素 (AKR) である、または、

(b) CYP450 および AKR ポリペプチドを含み、かつ配列番号 323 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を有する融合ポリペプチドであることを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、前記 CYP450 ポリペプチドが配列番号 325 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記 AKR ポリペプチドが、配列番号 327 または配列番号 329 のアミノ酸配列を含む、または前記融合ポリペプチドが、配列番号 323 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする方法。

【請求項 14】

a) (S)-レチクリンを 1, 2-デヒドロレチクリンへと酸化することができる第 1 のポリペプチド；および / または

b) 1, 2-デヒドロレチクリンを (R)-レチクリンへと還元することができる第 2 のポリペプチド

を発現するキメラ核酸を含む微生物であって、

前記第 1 のポリペプチドが配列番号 325 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、前記第 2 のポリペプチドが配列番号 327 または配列番号 329 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、または、

前記第 1 および第 2 のポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 323 と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドを形成することを特徴とする微生物。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の微生物において、前記第 1 のポリペプチドが配列番号 325 のアミ

ノ酸配列を含み、かつ、前記第2のポリペプチドが配列番号327または配列番号329のアミノ酸配列を含む、または、前記融合ポリペプチドが配列番号2または配列番号323のアミノ酸配列を含むことを特徴とする微生物。

【請求項16】

請求項14または15に記載の微生物において、前記微生物が酵母であることを特徴とする微生物。