

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 523756

(P2003 - 523756A)

(43)公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 Q 1/00	ZCC	C 1 2 Q 1/00	ZCC 4 B 0 2 4
C 1 2 N 9/00		C 1 2 N 9/00	4 B 0 5 0
15/09		C 1 2 Q 1/68	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 27/447			Z

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 32数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 561791(P2001 - 561791)

(86)(22)出願日 平成13年2月26日(2001.2.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月26日(2002.8.26)

(86)国際出願番号 PCT/US01/06147

(87)国際公開番号 W001/062983

(87)国際公開日 平成13年8月30日(2001.8.30)

(31)優先権主張番号 60/184,515

(32)優先日 平成12年2月24日(2000.2.24)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 フィロス インク .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レ
キシントン スプリング ストリート 12
8

(72)発明者 クルツ マークス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
エスト ニュートン ケンジントン スト
リート 62

(72)発明者 ローゼ ピーター
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ
ェストン ゴールデン ボール ロード
50

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 触媒蛋白質の生成のための改良された方法

(57)【要約】

本明細書では、核酸-蛋白質融合法を用いて触媒蛋白質
および自己蛋白分解性蛋白質の生成および同定を行うた
めの新規の方法が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 核酸コード配列および基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；および
b) 未反応の融合分子と比較して、前記融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化を分析することによって、候補触媒蛋白質が基質の反応を触媒するかどうかを決定し、それによって触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階、
を含む、触媒蛋白質をコードする核酸分子の同定方法。

【請求項2】 反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化が、電気泳動の移動度の変化によって検出される、請求項1記載の方法。

【請求項3】 反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化が、カラムクロマトグラフィーによって検出される、請求項1記載の方法。

【請求項4】 反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化が、HPLC、FPLC、イオン交換カラムクロマトグラフィー、またはサイズ排除クロマトグラフィーによって検出される、請求項3記載の方法。

【請求項5】 a) 核酸コード配列および基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；
b) 候補触媒蛋白質に溶液中の基質の反応を触媒させる段階；
c) 段階(b)の産物に、反応した融合分子に対する特異性を有しこれに結合するが、未反応融合分子には結合しない捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および
d) 固体支持体に結合した反応した融合分子を検出する段階、
を含み、それにより触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する方法。

【請求項6】 反応の結果、基質がアフィニティタグに共有結合し、捕獲分子がアフィニティタグに結合するが、未反応の融合分子には結合しない、請求項6記載の方法。

【請求項7】 a) 核酸コード配列、およびおよびアフィニティタグに共有結合した基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；

- b) 候補触媒蛋白質に溶液中の基質の反応を触媒させる段階；
 - c) 段階(b)の産物に、アフィニティタグに特異的な捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および
 - d) 融合分子が固体支持体に結合しているかどうかを決定する段階で、融合分子が固体支持体上に結合していなければ、触媒蛋白質をコードする核酸分子が同定されたことになる段階、
- を含む、触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する方法。

【請求項8】 固体支持体がカラムまたはビーズで、カラムに結合しない融合分子が触媒蛋白質をコードする核酸分子を含む、請求項7記載の方法。

- 【請求項9】 a) 核酸コード配列および基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；
- b) 候補触媒蛋白質にアフィニティタグの存在下で溶液中の基質の反応を触媒させる段階で、反応の結果、アフィニティタグが融合分子に共有結合することになる；
 - c) アフィニティタグに特異的な抗体を用いて段階(b)の産物を免疫沈降させる段階；および
 - d) 免疫沈降複合体を検出し、それにより、融合分子が触媒蛋白質をコードする核酸分子を有することを同定する段階、
- を含む、触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する方法。

【請求項10】 候補触媒蛋白質融合分子が、候補触媒蛋白質融合分子の集団に存在する、請求項1、5、7、または9記載の方法。

【請求項11】 基質が蛋白質である、請求項1、5、7、または9記載の方法。

【請求項12】 基質が核酸である、請求項1、5、7、または9記載の方法。

【請求項13】 核酸がRNAである、請求項12記載の方法。

【請求項14】 触媒蛋白質がリボヌクレアーゼで、基質がRNAである、請求項1または7記載の方法。

【請求項15】 触媒蛋白質がRNAリガーゼ、RNAポリメラーゼ、末端転移酵素、逆転写酵素、またはtRNA合成酵素であり、基質がRNAである請求項1、5、ま

たは9記載の方法。

【請求項16】 核酸がDNAである、請求項12記載の方法。

【請求項17】 触媒蛋白質がDNA分解酵素または制限エンドヌクレアーゼであり、基質がDNAである、請求項1または7記載の方法。

【請求項18】 触媒蛋白質がDNAリガーゼ、末端転移酵素、DNAポリメラーゼ、またはポリヌクレオチドキナーゼであり、基質がDNAである、請求項1、5、または9記載の方法。

【請求項19】 基質が候補触媒蛋白質融合分子に共有結合している、請求項1、5、または9記載の方法。

【請求項20】 基質が基質-核酸結合体であり、結合体の核酸部分が候補触媒蛋白質融合分子の核酸部分に連結している、請求項7または19記載の方法。

【請求項21】 基質が蛋白質であり、候補触媒蛋白質融合分子の蛋白質部分に連結している、請求項7または19記載の方法。

【請求項22】 基質が候補触媒蛋白質融合分子に非共有結合している、請求項1、5、または9記載の方法。

【請求項23】 基質が、候補触媒融合分子の核酸部分にハイブリダイズしている核酸鎖に共有結合している、請求項22記載の方法。

【請求項24】 候補触媒蛋白質融合分子の核酸コード配列が二本鎖である、請求項1、5、7、または9記載の方法。

【請求項25】 段階(b)で、決定する段階が、その断片の核酸コード配列の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化を分析することによって行われる、請求項1記載の方法。

【請求項26】 段階(d)で、検出段階が、固体支持体に結合した核酸コード配列またはその断片を検出することによって行われる、請求項5記載の方法。

【請求項27】 段階(d)で、決定する段階が、核酸コード配列またはその断片が固体支持体に結合しているかどうかを決定することによって行われる、請求項7記載の方法。

【請求項28】 段階(d)で、検出段階が、免疫沈降複合体中の核酸コード配列またはその断片を検出することによって行われる、請求項9記載の方法。

【請求項29】 a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子を提供する段階；および
b) 未反応の融合分子に比較して、融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化を分析することによって、候補自己蛋白分解性蛋白質が自己反応を触媒するかどうかを決定し、それによって自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階を含む、
自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子の同定方法。

【請求項30】 反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化が、電気泳動の移動度の変化によって検出される、請求項29記載の方法。

【請求項31】 反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化が、カラムクロマトグラフィーによって検出される、請求項29記載の方法。

【請求項32】 反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化が、HPLC、FPLC、イオン交換カラムクロマトグラフィー、またはサイズ排除クロマトグラフィーによって検出される、請求項31記載の方法。

【請求項33】 a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子を提供する段階；
b) 候補自己蛋白分解性蛋白質に自己反応を行なわせる段階；
c) 段階(b)の産物に、自己反応した融合分子に対する特異性を有しこれに結合するが、未反応融合分子には結合しない捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および
d) 固体支持体に結合した自己反応した融合分子を検出し、それにより自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階、
を含む、自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子の同定方法。

【請求項34】 a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子を提供し、蛋白質がアフィニティタグに共有結合している段階；
b) 候補自己蛋白分解性蛋白質に溶液中で自己反応を行なわせる段階；
c) 段階(b)の産物に、アフィニティタグに特異的な捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；

d) 融合分子が固体支持体に結合しているかどうかを決定する段階で、融合分子が固体支持体上に結合していなければ、自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子が同定されたことになる段階、

を含む、自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子の同定方法。

【請求項35】 固体支持体がカラムまたはビーズであり、カラムに結合しない融合分子が自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子を含む、請求項34記載の方法。

【請求項36】 a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子を提供する段階；
b) 候補自己蛋白分解性蛋白質に溶液中で自己反応を行なわせる段階；
c) 反応した融合蛋白質に特異的な抗体を用いて段階(b)の産物を免疫沈降させる段階；および
d) 免疫沈降複合体を検出し、それにより、融合分子が自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子を有することを同定する段階、
を含む、自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子の同定方法。

【請求項37】 候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子が、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子の集団に存在する、請求項29、33、34、または36記載の方法。

【請求項38】 自己蛋白分解性蛋白質が自己開裂酵素である、請求項29、33、34、または36記載の方法。

【請求項39】 自己蛋白分解性蛋白質が自己スプライシング酵素である、請求項29、33、34、または36記載の方法。

【請求項40】 候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子の核酸コード配列が二本鎖である、請求項29、33、34、または36記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

一般に、本発明は触媒蛋白質のスクリーニング法に関する。

【0002】

新規または改良された機能を持つ酵素を生成するために、いくつかの根本的に異なる手法が開発され、試験されてきた。改良された生体触媒の合理的な設計には、触媒機構および分子構造を深く理解して、生産的なやり方で酵素を変化させる必要がある。必要な構造情報を得るのが困難な上、合理的な酵素設計は時間のかかる作業であることが分かった。他方で、応用分子進化的手法のような非合理的な手法は、酵素構造の詳細の知識を必要とせず、既存の酵素のランダムな変異体を数多く作製し、最も強力な変異体を選択またはスクリーニングする（例えば、Skandalisら、*Chem. Biol.* 1997、4:889；Bornscheuer、*Angew. Chem. Int. ed.* 1998、37:3105；Arnold、*Acc. Chem. Res.* 1998、31:125；Steipe、*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999、243:55参照）。また別の手法では、免疫系の多様性を利用して、化学反応を触媒する抗体を新たに選択する（Lernerら、*Science* 1991；252:659）。

【0003】

これらの開始ライブラリーに必要な分子多様性を作出するために、部分的にランダム化した遺伝子の化学合成、ランダム変異導入、および分子育種のようないくつかの方法が考案された（Skandalisら、*Chem. Biol.* 1997、4:889）。あるライブラリーメンバーが選択可能になるためには、その酵素活性は表現型の変化に結びついている必要がある。そのような表現型には、宿主細胞の生存、マーカー物質（例えば、蛍光蛋白質）の発現、ライブラリーメンバーの修飾、遷移状態類似体の結合、または反応基質類似体による化学修飾が含まれる。

【0004】

これらの方法では、選択もしくはスクリーニングまたはライブラリーの調製がインピボで行われるために、ライブラリーのサイズと多様性、ならびに所望の化合物を単離する可能性が大きく制限される（Roberts、*Curr. Opin. Chem. Biol.*

1999、3:268に考察)。

【0005】

発明の概要

一般に、本発明は触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する方法を特徴とする。第1の局面では、本発明は(a) 核酸コード配列および基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；および (b) 未反応の融合分子に比較して、融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化を分析することによって、候補触媒蛋白質が基質の反応を触媒するかどうかを決定し、それによって触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階、を含む方法を特徴とする。反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化は、電気泳動の移動度の変化またはカラムクロマトグラフィー（例えば、HPLC、FPLC、イオン交換カラムクロマトグラフィー、またはサイズ排除クロマトグラフィー分析）によって検出できる。

【0006】

関連する局面では、本発明は触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する別の方法を特徴とし、この方法は(a) 核酸コード配列および基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；(b) 候補触媒蛋白質に溶液中の基質の反応を触媒させる段階；(c) 段階(b)の産物に、反応した融合分子に対する特異性を有しこれに結合するが、未反応融合分子には結合しない捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および (d) 固体支持体に結合した反応した融合分子を検出し、それにより触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階を含む。本方法の好ましい態様では、反応の結果、基質はアフィニティタグに共有結合し、捕獲分子はアフィニティタグに結合するが、未反応融合分子には結合しない。

【0007】

第3の局面では、本発明は触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定するためのさらに別の方法を特徴とし、この方法は(a) 核酸コード配列、およびアフィニティタグに共有結合した基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；(b) 候補触媒蛋白質に溶液中の基質の反応を触媒

させる段階；(c) 段階(b)の産物に、アフィニティタグに特異的な捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および(d) 融合分子が固体支持体に結合しているかどうかを決定する段階で、融合分子が固体支持体上に結合していなければ、触媒蛋白質をコードする核酸分子が同定されたことになる段階を含む。この方法では、固体支持体は好ましくはカラムまたはビーズであり、カラムに結合しない融合分子には、触媒蛋白質をコードする核酸分子が含まれる。

【0008】

第4の局面では、本発明は触媒蛋白質をコードする核酸分子を同定するためのさらに別の方法の特徴とし、この方法は (a) 核酸コード配列および基質の両方に連結した候補触媒蛋白質を含む、候補触媒蛋白質融合分子を提供する段階；(b) アフィニティタグの存在下で候補触媒蛋白質に溶液中の基質の反応を触媒させ、反応によりアフィニティタグが融合分子に共有結合することになる段階；(c) アフィニティタグに特異的な抗体を用いて段階(b)の産物を免疫沈降させる段階；および (d) 免疫沈降複合体を検出し、それにより、融合分子が触媒蛋白質をコードする核酸分子であることを同定する段階を含む。

【0009】

本発明の種々の局面の好ましい態様では、候補触媒蛋白質融合分子は、候補触媒蛋白質融合分子の集団に存在し；基質は蛋白質または核酸（例えば、RNAまたはDNA）であり；触媒蛋白質はリボヌクレアーゼ、RNAリガーゼ、RNAポリメラーゼ、末端転移酵素、逆転写酵素、またはtRNA合成酵素であり、基質はRNAであり；触媒蛋白質はDNA分解酵素、制限エンドヌクレアーゼ、DNAリガーゼ、末端転移酵素、DNAポリメラーゼ、またはポリヌクレオチドキナーゼで、基質はDNAであり；基質は候補触媒蛋白質融合分子に共有結合しており；基質は基質-核酸結合体であり、結合体の核酸部分は候補触媒蛋白質融合分子の核酸部分に結合しており；基質は蛋白質であり、候補触媒蛋白質融合分子の蛋白質部分に結合しており；基質は候補触媒蛋白質融合分子に非共有結合しており（例えば、基質は候補触媒融合分子の核酸部分にハイブリダイズした核酸鎖に共有結合している）；候補触媒蛋白質融合分子の核酸コード配列は、二本鎖であり；および本発明の決定また

は検出段階は、その断片の核酸コード配列を分析することによって実施される。

【0010】

上記に加え、本発明の一般的方法は、自己蛋白分解性の蛋白質をコードする核酸分子の同定にも使用できる。特に、第1の局面では、本発明は自己蛋白質分解性蛋白質をコードする核酸分子の同定方法の特徴とし、これは (a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白質分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白質分解性蛋白質融合分子を提供する段階；および (b) 未反応の融合分子に比較して、融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化を分析することによって、候補自己蛋白質分解性蛋白質が自己反応を触媒するかどうかを決定し、それによって自己蛋白質分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階を含む。この方法では、反応した融合分子の分子サイズ、電荷、または立体配座の変化は、電気泳動の移動度の変化またはカラムクロマトグラフィー（例えば、HPLC、FPLC、イオン交換カラムクロマトグラフィー、またはサイズ排除クロマトグラフィー）によって検出できる。

【0011】

さらに、本発明は自己蛋白質分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定する関連する方法の特徴とし、この方法は(a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白質分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白質分解性蛋白質融合分子を提供する段階；(b) 候補自己蛋白質分解性蛋白質に自己反応を行なわせる段階；(c) 段階(b)の産物に、自己反応した融合分子に対する特異性を有しこれに結合するが、未反応融合分子には結合しない捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および (d) 固体支持体に結合した自己反応した融合分子を検出し、それにより自己蛋白質分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定する段階を含む。

【0012】

別の関連する局面では、本発明は自己蛋白質分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定するための第3の方法の特徴とし、この方法は(a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白質分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白質分解性蛋白質融合分子を提供し、蛋白質がアフィニティタグに共有結合する段階；(b) 候補自己蛋白質分解性蛋白質に溶液中で自己反応を行なわせる段階；(c) 段階(b)の産物に、アフィニ

ティタグに特異的な捕獲分子を接触させ、捕獲分子が固体支持体上に固定されている段階；および(d) 融合分子が固体支持体に結合しているかどうかを決定する段階で、融合分子が固体支持体上に結合していなければ、自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子が同定されたことになる段階を含む。この方法では、固体支持体はカラムまたはビーズであり、カラムに結合しない融合分子には、自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子が含まれる。

【0013】

自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子を同定するための第4の手法では、本発明は (a) 核酸コード配列に連結した候補自己蛋白分解性蛋白質を含む、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子を提供する段階；(b) 候補自己蛋白分解性蛋白質に溶液中で自己反応を行なわせる段階；(c) 反応した融合分子に特異的な抗体を用いて段階(b)の産物を免疫沈降させる段階；および (d) 免疫沈降複合体を検出し、それにより、融合分子が自己蛋白分解性蛋白質をコードする核酸分子であることを同定する段階を含む。

【0014】

本発明の種々の局面の好ましい態様では、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子は、候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子の集団に存在し；自己蛋白分解性蛋白質は、自己開裂酵素であり；自己蛋白分解性蛋白質は自己スプライシング酵素であり；および候補自己蛋白分解性蛋白質融合分子の核酸コード配列は二本鎖である。

【0015】

本明細書では、「蛋白質」は2つまたはそれ以上の天然に存在するかまたは修飾されたアミノ酸が1つまたはそれ以上のペプチド結合で結合した任意のものを意味する。「蛋白質」と「ペプチド」は本明細書では互換的に使用される。

【0016】

「核酸」とは、2つまたはそれ以上の共有結合したヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体または誘導体を意味する。本明細書では、この用語には、DNA、RNA、およびPNAが含まれるが、これらに限定されるわけではない。したがって「核酸コード配列」は、DNA（例えば、cDNA）、RNA、PNA、またはその組み合わせであ

り得る。「DNA」とは、天然に存在するかまたは修飾されたデオキシリボヌクレオチドが2つまたはそれ以上共有結合した配列を意味する。「RNA」とは、天然に存在するかまたは修飾されたリボヌクレオチドが2つまたはそれ以上共有結合した配列を意味する。修飾RNAの一例には、ホスホリボチオエートRNAが含まれる。

【0017】

本明細書では「連結した」という用語は、共有または非共有結合で結合していることを意味する。

【0018】

ペプチド受容体に「共有結合した」とは、共有結合で直接、または別の共有結合した配列を介して間接的に、ペプチド受容体が、「蛋白質コード配列」に結合していることを意味する。

【0019】

「非共有結合した」とは、共有結合以外の方法（例えば、ハイブリダイゼーション）で、結合したことを意味する。

【0020】

「集団」とは、複数の分子（例えば、複数のRNA、DNA、またはRNA-蛋白質融合分子）を意味する。本発明の方法は、必要に応じて多数の候補分子から始める選択を容易にするため、本発明に係る「集団」は、好ましくは 10^9 個を超える、より好ましくは 10^{11} 個、 10^{12} 個、 10^{13} 個を超える、および最も好ましくは 10^{13} 個を超える分子を意味する。そのような分子集団に存在する場合に、所望の触媒蛋白質はこの集団の他のメンバーから選択される。本明細書では、「選択」とは、集団で他の分子から実質的に1つの分子を隔離することを意味する。「選択」段階では、選択段階後に、集団の望まない分子と比較して、所望の分子を、少なくとも2倍、好ましくは30倍、より好ましくは100倍、および最も好ましくは1000倍濃縮する。選択段階は、任意の回数繰り返すことができ、1つの所定の手法において異なる種類の選択段階を組み合わせることができる。

【0021】

「ペプチド受容体」とは、リボゾームのペプチジル転移酵素機能の触媒活性によって、伸長中の蛋白質鎖のC末端に付加される能力を持つ、任意の分子を意味

する。通常は、そのような分子には、(i)ヌクレオチドまたはヌクレオチド様部分(例えば、アデノシンまたはアデノシン類似体(N-6アミノ位置のジメチル化は許容される))、(ii)アミノ酸またはアミノ酸様部分(例えば、20個のD-アミノ酸もしくはL-アミノ酸またはその任意のアミノ酸類似体(例えば、O-メチルチロシンまたはEllmanら、Meth. Enzymol. 202:301、1991に記述される任意の類似体)、および(iii)この2つの間の連結(例えば、3'位、またはそれよりは好ましくないが2'位での、エステル、アミド、またはケトン結合);好ましくは、この結合は天然のリボヌクレオチドの立体配座から環のひだをあまり混乱させない。ペプチド受容体は、求核基を持つ可能性もあり、これはアミノ基、ヒドロキシル基、またはスルフヒドリル基である可能性があるが、これらに限定されるわけではない。さらに、ペプチド受容体はヌクレオチド模倣体、アミノ酸模倣体、またはヌクレオチド-アミノ酸組み合わせ構造の模倣体で構成されている可能性がある。

【0022】

本明細書で用いられる「捕獲分子」とは、所望の触媒蛋白質融合分子部分または結合した「アフィニティタグ」部分に対して、特異的な、共有または非共有結合の親和性を有する任意の分子を意味する。捕獲分子と対応するアフィニティタグの例には、抗原/抗体対、蛋白質/阻害剤対、受容体/リガンド対(例えば、ホルモン受容体/ペプチドホルモン対のような細胞表面受容体/リガンド対)、酵素/基質対、レクチン/炭水化物対、オリゴマーまたはヘテロオリゴマー蛋白質集合体、DNA結合蛋白質/DNA結合部位対、RNA/蛋白質対、および核酸の二本鎖、ヘテロ二本鎖、もしくは連結された鎖、ならびに触媒蛋白質融合分子、アフィニティタグ、またはそのような分子に付加された部分(例えば、合成後修飾による)に対して1つまたは複数の共有または非共有結合(例えば、ジスルフィド結合)を形成する能力を持つ任意の分子が含まれるが、これらに限定されるわけではない。好ましい捕獲分子/アフィニティタグ対は、アビジン-ビオチン対(例えば、ストレプトアビジン-ビオチン)である。

【0023】

「固体支持体」とは、アフィニティ複合体が直接もしくは間接的に(例えば、

他の抗体またはプロテインAのような他の結合パートナー中間体を介して)結合できる、またはアフィニティ複合体を埋め込むことのできる(例えば、受容体またはチャネルを介して)、任意のカラム(またはカラム材料)、ビーズ、試験管、マイクロタイターディッシュ、固形粒子(例えば、アガロースまたはセファロース)、マイクロチップ(例えば、シリコン、シリコン-ガラス、または金チップ)、または膜(例えば、リポソームまたは小胞の膜)を意味するが、これらに限定されるわけではない。

【0024】

詳細な説明

本明細書では、そのペプチドまたは蛋白質成分が新規または改良された触媒活性を持つ、RNA-蛋白質融合体(PROfusion(商標)と呼ぶ)およびDNA-蛋白質融合体を単離するための改良されたインビトロ選択方法を記述する。これらの方法を用いて、ランダム化したペプチドおよび蛋白質ライブラリーから、個々の目的に合う活性および基質特異性を有する新規の酵素を単離したり、改良された触媒性特徴を持つ、既存の酵素の方向づけられた進化を行うことができる。触媒性特徴には、より速い触媒速度、所望の反応条件下(例えば、温度または溶媒条件)で最適化された能力、より高いまたは変化した基質特異性、調節された補因子依存性、および改変されたアロステリックな相互作用が含まれるが、これらに限定されるわけではない。本明細書に記述される方法は、最近記述された核酸-蛋白質融合技術を利用しているため、ライブラリーのサイズおよび多様性ならびに融合物の調製の容易さに関して、この技術に固有の利点を全て利用している。産物の単離は、インビトロでの直接的選択で行われるため、遺伝的選択またはインビボのスクリーニング手順に基づく従来の方法よりも、複雑なライブラリーを用いることが可能になる。さらに、反応条件は宿主細胞の環境または他の複雑または脆弱な分子集合体によって制限されないため、広範囲にわたって変化させることができる。最後に、核酸-融合体調製方法は簡単であるため、従来の手法よりも、はるかに迅速に選択が実行できる。

【0025】

核酸-蛋白質融合体ライブラリー

本明細書に記述される選択方法の開始点は、適当な核酸-蛋白質融合体ライブラリーの調製である。これらの融合体ライブラリーは、RNA-蛋白質融合体（米国特許出願第09/007,005号；米国特許出願第09/247,190号；国際公開公報第98/31700号；RobertsおよびSzostak、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997、94:12297；Roberts、Curr. Opin. Chem. Biol. 1999、3:268）またはDNA-蛋白質融合体（Lohseら、米国特許出願第60/110,549号；米国特許出願第09/453,190号；米国特許第99/28472号；国際公開公報第00/32823号）のいずれかを含む可能性がある。ライブラリーの設計は、特定の用途に依存する。特定の既存の触媒活性を改良する選択では（例えば、より速い触媒速度、特定の温度または溶媒条件のような所望の反応条件下で最適化された能力、変化した基質特異性、変化した補因子依存性、および改変されたアロステリックな相互作用）、既存の酵素の遺伝情報に変異を導入する。これは、変異した遺伝子断片の化学合成、化学薬品による変異導入、変異誘導PCR、DNAシャッフリング、または大腸菌（*E. coli*）突然変異誘発株における複製（例えば、Skandalisら、Chem. Biol. 1997、4:889および本明細書の参照に記述されるように）を含む任意の標準的な方法で実行できる。または、複数の独立した酵素ドメインをペプチドリンカーによって連結し、ハイブリッド酵素（例えば、Beguin、Curr. Opin. Biotech. 1999、10:336に記述される）または一本鎖酵素（Tangら、J. Biol. Chem. 1996、271:15682）が生成するような、半合理的手法も使用できる。必要に応じて、例えば、上述の方法等によって、これらのドメインの各々に分子多様性を導入することもできる。酵素活性を新たに作出したい場合には、部分的または完全にランダム化した蛋白質または蛋白質骨格のライブラリーを使用できる。変異導入またはランダム化は、好ましくはDNAレベルで行われる（任意の標準的技術による）；得られた遺伝子コンストラクトは、以前に記述された標準的プロトコールにしたがって、核酸-蛋白質の構築に使用される（例えば、米国特許出願第09/007,005号、米国特許出願第09/247,190号；国際公開公報第98/31700号；RobertsおよびSzostak、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997、94:12297；米国特許出願第09/619,103号；米国特許第00/19653号；Kurzら、Nucleic Acids Res. 28:e83、2000）。使用される所望のインビトロ選択方法（以下参照）によって、融合分子に、反応基または基質模倣体を付加し

て合成後修飾をさらに加えることもできる。予想される触媒活性を融合体の蛋白質部分に限定するために、好ましくは核酸は触媒活性を持たなくしておく。これは、選択段階の前に二本鎖核酸（例えば、逆転写酵素による）を作製することで実行できる。これは、触媒性のリボザイムおよびデオキシリボザイム構造は、一般に、困難もしくは不可能な複雑な核酸の折畳みを必要とする、または二本鎖分子となるためである。

【0026】

選択方法

本明細書に記述される方法は、既存の酵素の方向づけられた分子進化、および新規の酵素活性の選択に適しており、これらは主に使用するライブラリーが異なっている。以下のようにして、ライブラリーから融合体を機能に基づいて選択した後、融合体を増幅および増殖でき、または米国特許出願第09/007,005号；米国特許出願第09/247,190号；国際公開公報第98/31700号；RobertsおよびSzostak、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997、94:12297；Roberts、Curr. Opin. Chem. Biol. 1999、3:268に記述されるようにして遺伝情報を解析できる。

【0027】

以下に、所望の触媒機能を持つ核酸-蛋白質融合体の好ましい選択方法を説明する。

【0028】

反応部位の結合

遷移状態理論によると、酵素活性は反応の遷移状態の安定化に支配される（Jencks、「化学と酵素学における触媒(Catalysis in Chemistry and Enzymology)」、Dover Mineola、NY、1969、ModerとBartlett、Chem. Rev. 1997、97:1281）（図1A）。この仮定に基づくと、特定の化学反応の遷移状態に構造的に類似した適当なハプテン分子に結合する核酸-蛋白質融合体がインビトロで選択できる（図1B）。この選択方法は、RNA-蛋白質融合技術を用いたペプチドおよび蛋白質アフィニティ結合体の選択について以前に記述された方法と基本的には同一である（米国特許出願第09/007,005号；米国特許出願第09/247,190号；国際公開公報第98/31700号；RobertsおよびSzostak、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997、94:1229

7; Roberts, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, 3:268)。ハプテンは以前に触媒抗体について記述された方法で設計できる (Lernerら、*Science* 1991; 252:659; Fujiiら、*Nature Biotech.* 1998, 16:463)。必要に応じて、種々のハプテンを順次用いた段階的手法を利用して、選択の可能性を上げることもできる (Wentworth Jr.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:5971)。

【0029】

上述の手法をさらに変更したものでは、基質への結合または触媒の能力を持つ核酸-蛋白質融合体を共有結合で捕獲する反応性基質 (Jandaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91:2532; Rahilら、*Bioorg. Med. Chem.* 1997, 5:1783; Banzonら、*Biochemistry* 1995, 34:743; Vanwetswinkelら、*J. Mol. Biol.* 2000, 295:527; Wirschingら、*Science* 1995, 270:1775) または産物 (Jandaら、*Science* 1997, 275:945) のいずれかを用いて、酵素活性を持つ核酸-蛋白質分子を選択できる (図10)。

【0030】

酵素-基質キメラの使用

核酸-蛋白質融合体の触媒活性が、それ自身の表現型を永久に変化させる場合には、同様な酵素活性を示さない核酸-蛋白質融合体と容易に区別することができるようになる。都合の良い自己修飾には、例えば、分子サイズ、電気泳動移動度、またはアフィニティ捕獲または固相上での保持に基づいて融合体を物理的に分離できるようにする、機能的ユニット (例えば、ビオチン) の付加または切断が含まれる (図2) (Pedersenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:105223; Jestinら、*Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38:1124; AtwellおよびWells、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96:9497)。この技術を実施するためには、酵素核酸-蛋白質融合体と、適切な基質ドメインの間に、安定な結合が形成されなくてはならない。1つの好ましい手法では、融合酵素ドメインは、適当に修飾された核酸部分に直接に作用する。提案される酵素活性には、ヌクレアーゼ、リガーゼ、末端転移酵素、ポリヌクレオチドキナーゼ、tRNA合成酵素、およびポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されるわけではない (Pedersenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:105223; Jestinら、*Angew. Chem. Int. Ed.* 1999

、38:1124; Sambrook、FritschおよびManiatis、「分子クローニング(Molecular Cloning)」、(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor参照) (図3~6)。固相付着は、核酸基質に結合部分(例えば、ビオチン部分)を組み込むか、固定化した捕獲プローブに対する核酸ハイブリダイゼーションによって、かなり容易に行うことができる。または、自己修飾融合分子は、ゲル電気泳動またはクロマトグラフィー技術によって、未反応分子からヌクレオチド切断または連結後に分離することもできる。

【0031】

別の手法では、基質(ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド)は核酸-蛋白質融合体に結合される。これは、例えば、適当に修飾した逆転写プライマー(図7A)、基質-核酸結合体のソラレン架橋(図7B; PielesおよびEnglisch、Nucleic Acids Res. 1989、17:285; Pielesら、Nucleic Acids Res. 1989、17:8967)、または標準的なペプチド架橋剤(図7C; Pierce Chemical Co.、「二重物質架橋剤選択ガイド(Double-Agents cross-linking reagents selection guide)」、Rockford、IL、1999)を用いた合成後修飾によって、行うことが可能である。また、好ましくは基質は、酵素が作用すると、固体支持体への結合もしくはそれからの開裂、または例えば、分子サイズ、電気泳動の移動度等に基づいて物理的に分離できるような他の変化が起きるように設計されている(図2; AtwellおよびWells、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999、96:9497)。これは適当なやり方で基質につながれたビオチンのような、アフィニティ試薬を利用すると、かなり容易に行うことができる。または、産物の構造を認識する特異的抗体が使用できるならば、融合体は免疫沈降によって単離できる可能性がある。

【0032】

基質については、特定の選択の目的によって、ペプチド、ヌクレオチド、および小さい有機分子の任意の組み合わせが可能である。基質部分を融合体に結合するつなぎ部分は、好ましくは、融合体の酵素コア部分へのアクセスを制限しないように選択されるべきであり、したがって、好ましくは、アルキルまたはポリエチレングリコール鎖のような柔軟なリンカーユニットから作製される。

【0033】

自己切断反応が望まれる場合は、酵素活性は反応媒体または補因子の選択によってコントロールできる。これによって、触媒活性を抑えるような条件下で、コントロールされた融合体合成が可能になる。例えば、固定化および洗浄後に、適切な媒体を供給することによって酵素活性をオンに切り替え、触媒活性を持つ融合分子の放出を行うことができる。

【0034】

好ましくは、基質ドメインは融合体のcDNA部分に共有結合している。これによって、酵素反応後に融合分子を単離または選択する必要がなくなり、cDNAのみを回収できるようになる。これは、サイズまたは電気泳動の移動度の違いに基づいて、未反応の融合体を反応したものから分離するために変性ゲル電気泳動を行う際に特に有用である。

【0035】

自己蛋白分解性反応

触媒活性がありそうな第3のクラスは、蛋白質スプライシングおよび関連する自己蛋白分解性反応に関する(Perlerら、Curr. Opin. Chem. Biol. 1997、1:292)。1つの好ましい手法では、N末端のアフィニティタグと、これに続く適当な(ランダム化した)インテイン配列を含む核酸-蛋白質融合分子が作製される。アフィニティタグを用いて固定化した後、所望の反応媒体または補因子を供給して自己開裂が誘導され、C末端の開裂断片(核酸部分を含む)が回収され、増幅される(図8)。この手法の変形では、アフィニティタグはインテイン領域に含まれている。インテインが切断され、エクステインが連結されると、産物は固相から放出され、回収される(図9)。エクステインの連結が産物の必須の特徴ならば、N末端のエクステイン部分に対するさらなる親和性精製段階を含んでもよい。

【0036】

または、切断またはスプライスされた融合分子は、分子サイズ(例えば、ゲル電気泳動による)によって、未切断または未スプライス融合分子から分離することもできる。

【0037】

その他の態様

本明細書中に言及された全ての出版物および特許出願は、各々の独立した出版物および特許出願が特に個々に参照として本明細書に組み入れられると示されたのと同様に、参照として本明細書に組み入れられる。

【0038】

本発明は、その詳細な態様に関して説明されてきたが、さらに修正を加えることは可能である。本出願には、一般に本発明の原理に従う本発明の任意の変化、使用、または適用を含み、これには本発明の属する当技術分野における既知の実行または慣行の範囲内で生じる本開示からの逸脱も含むものであると考えられる。かつ、本出願は上述の必須の特徴に応用されることができ、添付の特許請求の範囲に従う。

【図面の簡単な説明】

【図1】 反応部位の結合に関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

【図2】 酵素-基質キメラに関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

【図3】 ヌクレアーゼ活性に関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

【図4】 リガーゼ活性に関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

【図5】 ポリメラーゼまたは末端転移酵素活性に関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

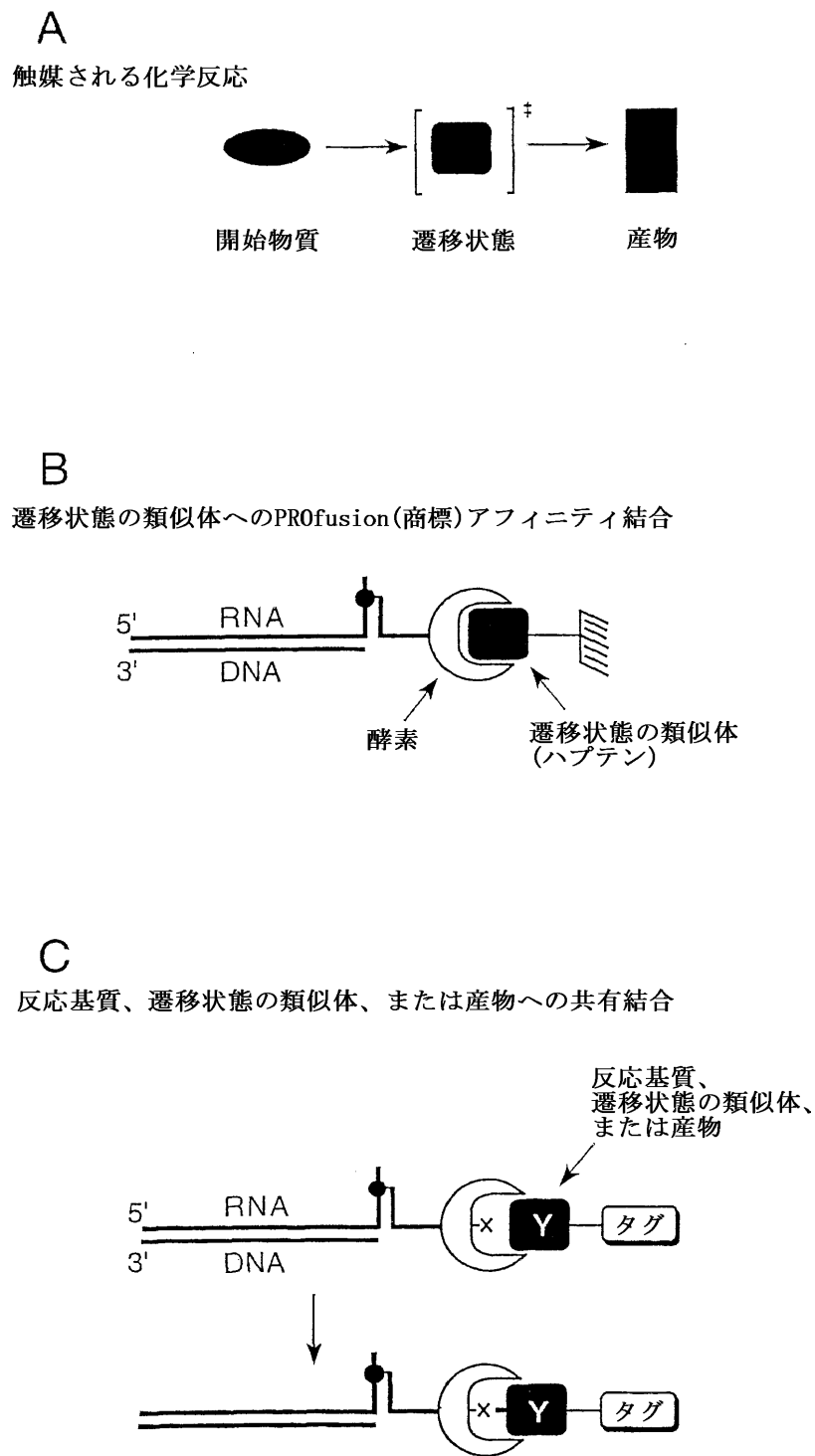
【図6】 キナーゼまたはtRNA合成酵素活性に関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

【図7】 基質の付加のための例示的な方法を示す模式図である。

【図8及び9】 自己蛋白分解性反応に関する例示的な核酸-蛋白質選択を示す模式図である。

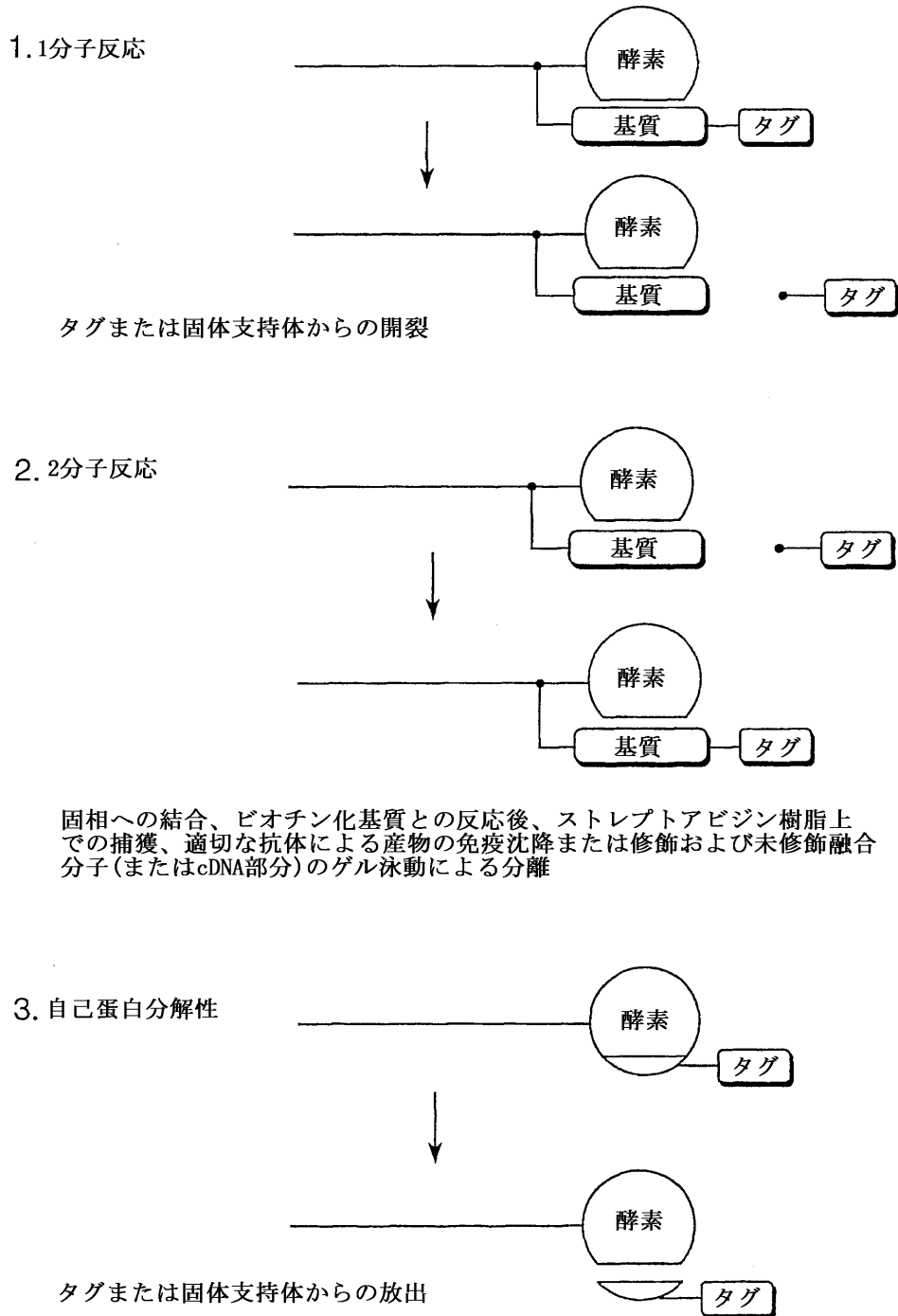
【図1】

反応部位の結合



【図2】

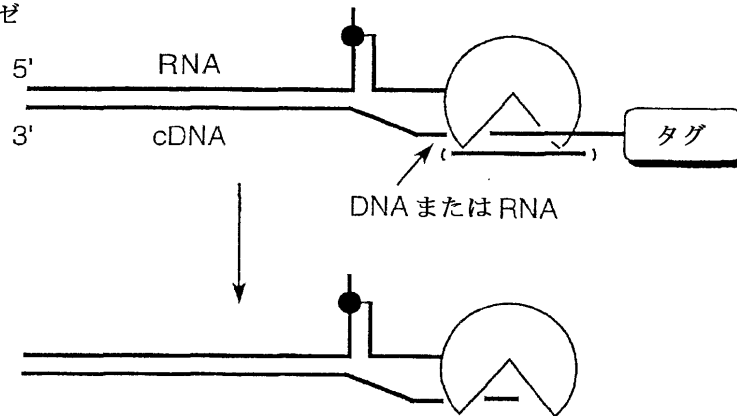
酵素-基質キメラ



【図3】

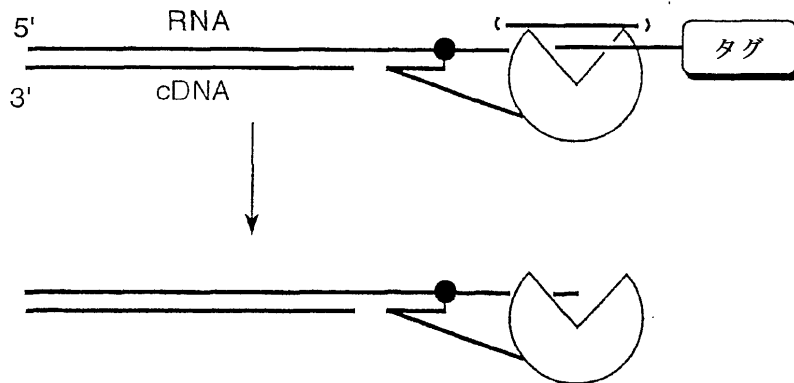
ヌクレアーゼ

- DNA分解酵素
- リボヌクレアーゼ
- 制限エンドヌクレアーゼ



PROfusion(商標)DNA分解酵素またはエンドヌクレアーゼはタグまたは固体支持体からの自己開裂を促進する。第2の鎖の使用は選択的である。標的配列の選択によって、配列特異的開裂を行うことができる。同様に、この方法を用いて、変異導入後に制限酵素の制限部位特異性を変化させるためにも使用できる。

- リボヌクレアーゼ

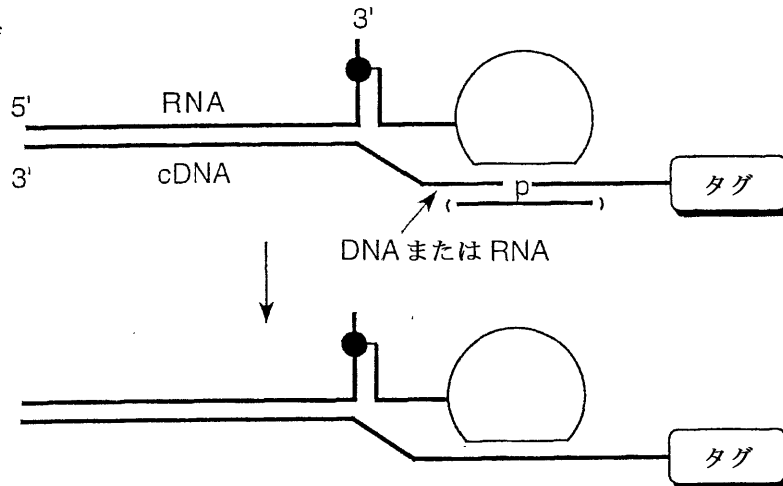


PROfusion(商標)DNA分解酵素タグまたは固体支持体からの自己開裂を促進する。第2の鎖の使用は選択的である。標的配列の選択によって、配列特異的開裂を行うことができる。

【図4】

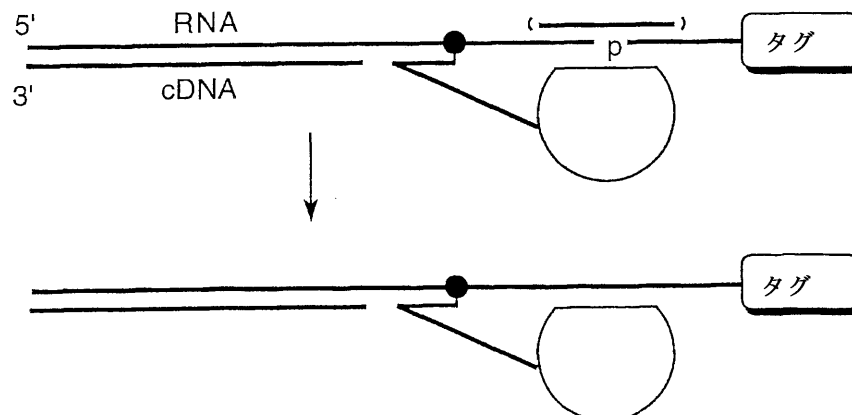
リガーゼ

- DNA リガーゼ
- RNA リガーゼ



PROfusion(商標)DNA分解酵素またはRNAリガーゼはタグまたは固体支持体への結合を触媒する。第2の鎖の使用は選択的である。標的配列の選択によって、配列特異的開裂を行うことができる。第2の基質は、固体支持体に直接結合しているか、またはたとえば固定化ストレプトアビジンで捕獲できるようにビオチン化されている。または、前駆体と産物のサイズの違いを用いて、電気泳動で分離できる可能性もある。

- RNA リガーゼ

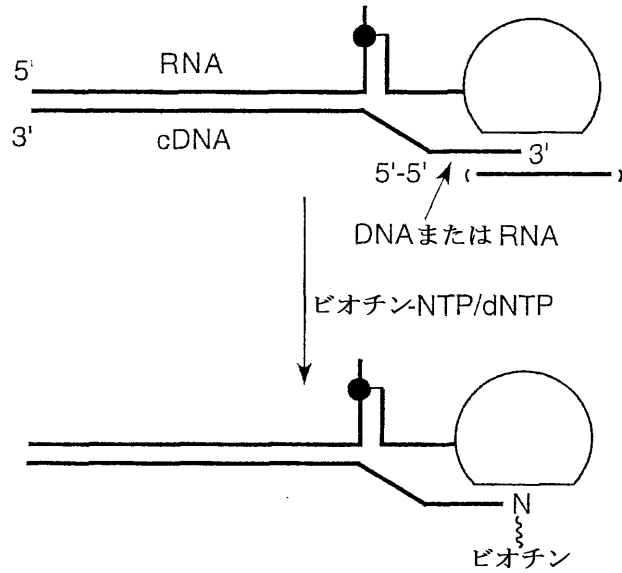


PROfusion(商標)RNAリガーゼはタグへの結合を触媒する。DNAリガーゼの場合と同様。

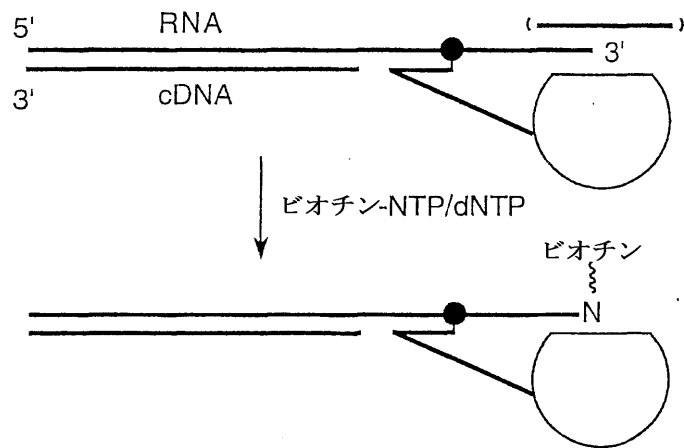
【図5】

ポリメラーゼおよび末端転位酵素

- 末端転位酵素
- DNAポリメラーゼ
- RNAポリメラーゼ
- 逆転写酵素



- 末端転位酵素
- RNAポリメラーゼ
- 逆転写酵素

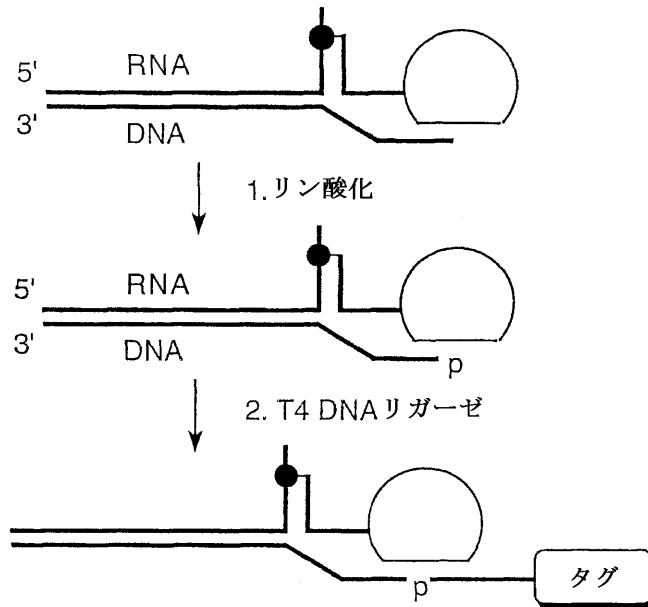


ビオチン化ヌクレオチド三リン酸の結合によるPROfusion(商標)捕獲。
 ポリメラーゼ酵素の選択のために第2の鎖を使用する必要がある。
 反応後、修飾されたPROfusion(商標)はストレプトアビジン樹脂を用いて
 捕獲できる。

【図6】

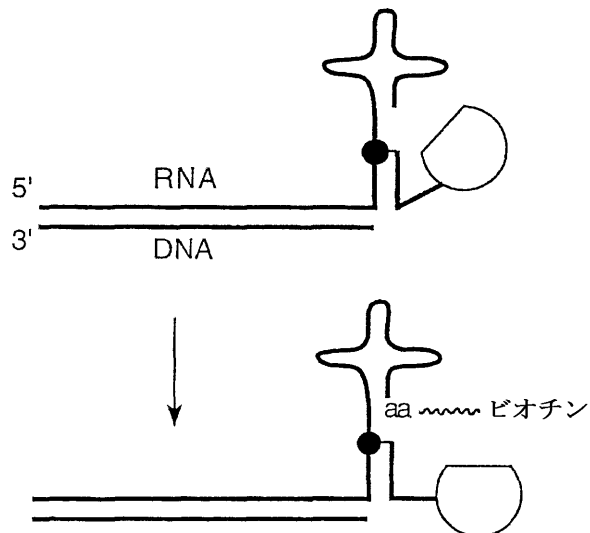
キナーゼおよびtRNA合成酵素

• ポリヌクレオチドキナーゼ



脱リン酸化後、キナーゼPROfusion(商標)は連結の基質となり、未修飾前駆体からの物理的な分離が可能となる。

• tRNA合成酵素

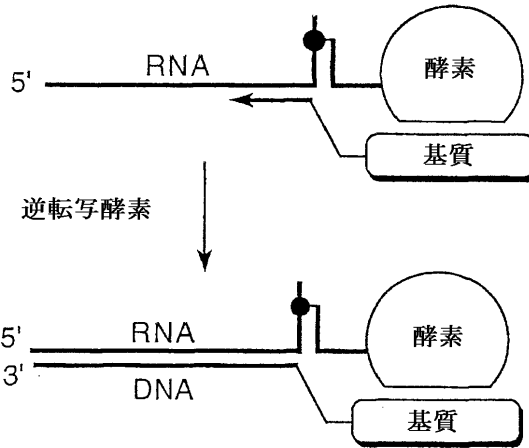


tRNA合成酵素活性を持つPROfusion(商標)によるビオチン化アミノ酸の結合。修飾された分子は、ストレプトアビジン支持体上で捕獲できる。tRNAドメインもcDNA部分に結合可能である。

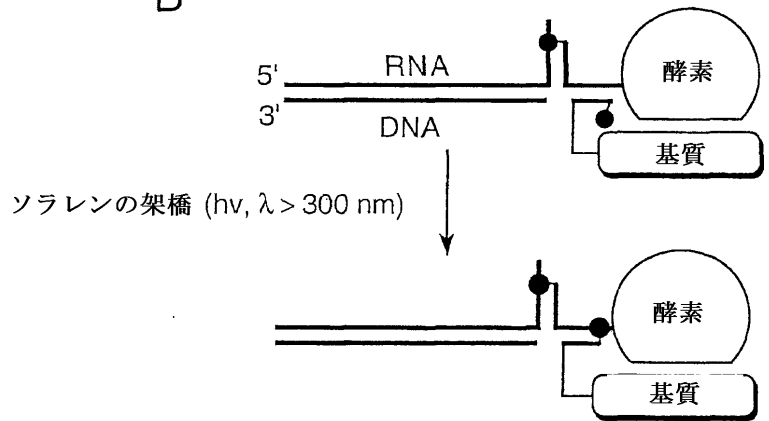
【図7】

基質の結合

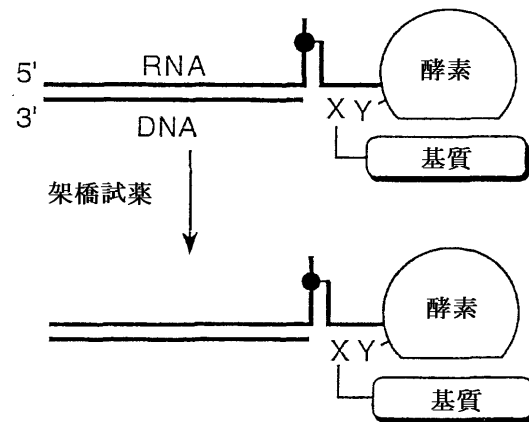
A



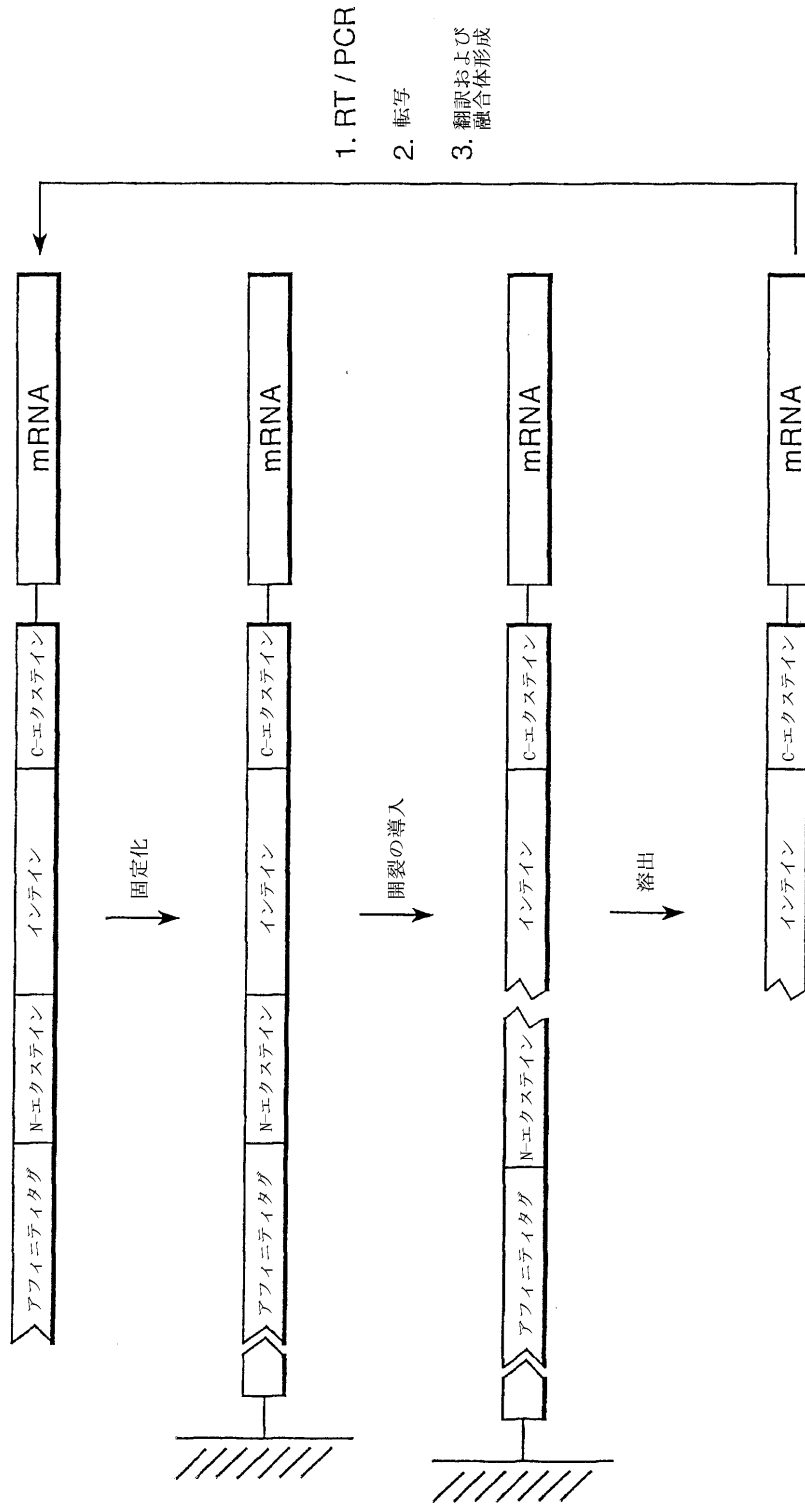
B



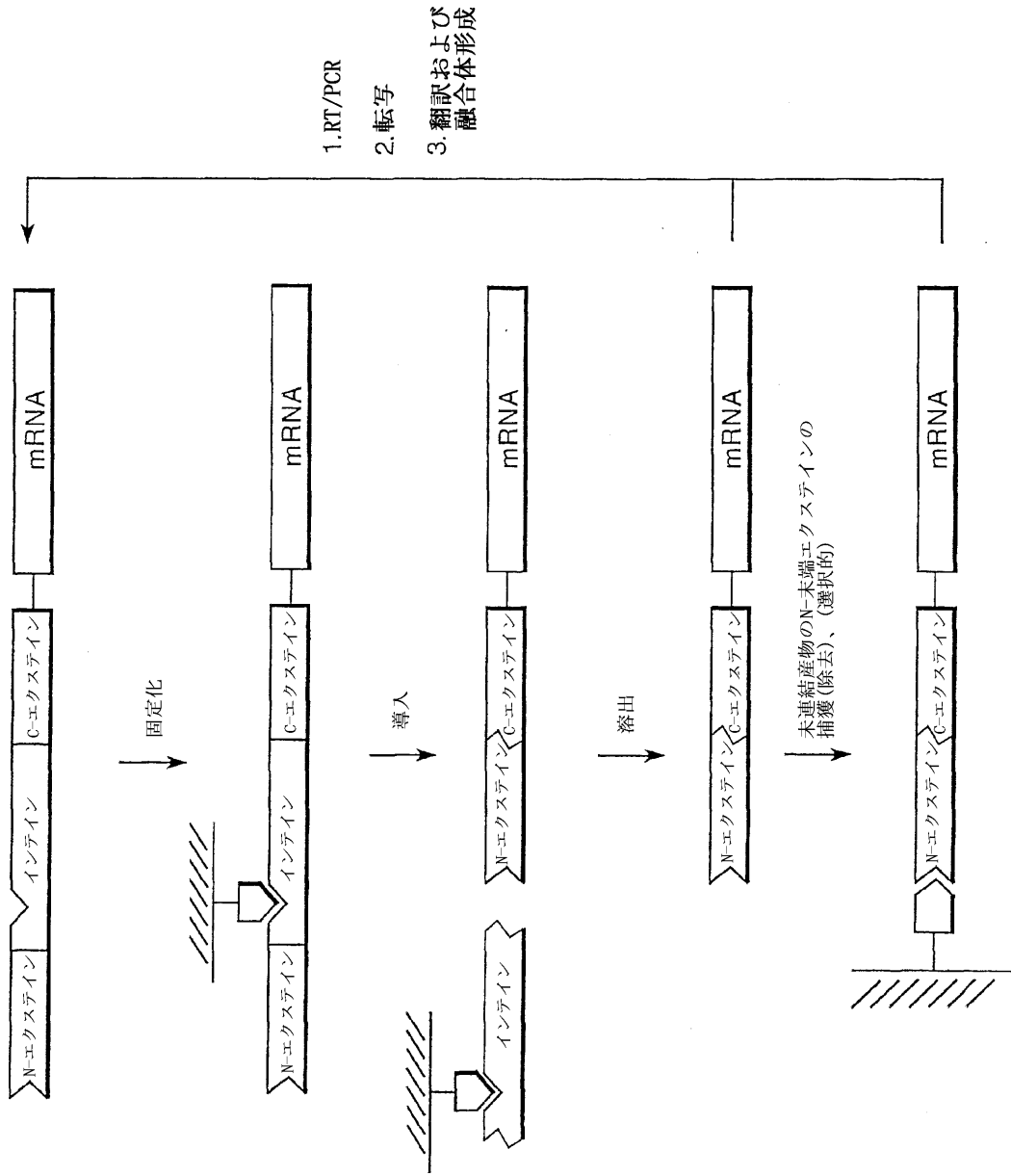
C



【図8】



【図9】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/06147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7)	: C12Q 1/68, 1/48	
US CL	: 435/6, 15, 188, 183, 199	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 15, 188, 183, 199		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/40141 A1 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 30 October 1997 (30.10.1997), pp 3-9, entire document.	1, 3-8, 10, 19, 22, 24
-		
Y		2, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 25-28, 29-40
Y	WO 96/40723 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 19 December 1996 (19.12.1996), pp 5-7, see entire document.	1-4, 29-32
-		
A		5-12, 14-15, 17-19, 22, 24-28, 33-40
A	US 5,807,718 A (JOYCE et al) 15 September 1998 (15.09.1998).	1-12, 14-15, 17-19, 22, 24-40
A	US 5,795,718 A (BISENBEIS) 18 August 1998 (18.08.1998).	1-12, 14-15, 17-19, 22, 24-40
A	US 5,731,146 A (DUCK et al) 24 March 1998 (24.03.1998).	1-12, 14-15, 17-19, 22, 24-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 02 May 2001 (02.05.2001)		Date of mailing of the international search report 08 JUN 2001
Name and mailing address of the ISA/IJS Commissioner of Patents and Trademarks Int PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer Madhreen Chaudhry
Facsimile No. (703) 305-3230		Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/06147

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.: 13, 16, 20, 21 and 23
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)
G 0 1 N 30/88		C 1 2 N 15/00	A
		G 0 1 N 27/26	3 1 5 Z
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
Fターム(参考)	4B024 AA11 AA20 BA07 CA05 CA09 CA11 CA20 HA01 HA11 HA20 4B050 CC01 CC03 CC10 EE10 LL05 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ21 QQ41 QQ79 QR01 QR31 QR38 QR48 QR57 QR82 QS36 QX01 QX04 QX10		

专利名称(译)	改进的催化蛋白质生产方法		
公开(公告)号	JP2003523756A	公开(公告)日	2003-08-12
申请号	JP2001561791	申请日	2001-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	Firosuinku		
申请(专利权)人(译)	Firosu油墨.		
[标]发明人	クルツマークス ローゼピーター		
发明人	クルツ マークス ローゼ ピーター		
IPC分类号	G01N27/447 C12N9/00 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/00 C12Q1/68 C40B30/00 C40B40/02 C40B50/06 G01N30/88 G01N33/531		
CPC分类号	C12N15/1034 C12N15/1062 C12N15/1075 C12Q1/00 C12Q1/6811 G01N33/531 G01N2458/10		
FI分类号	C12Q1/00.ZCC C12N9/00 C12Q1/68.Z G01N30/88.J G01N30/88.Z C12N15/00.A G01N27/26.315.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA07 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA01 4B024/HA11 4B024/HA20 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC10 4B050/EE10 4B050/LL05 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ79 4B063/QR01 4B063/QR31 4B063/QR38 4B063/QR48 4B063/QR57 4B063/QR82 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX04 4B063/QX10		
优先权	60/184515 2000-02-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了使用核酸-蛋白质融合方法产生和鉴定催化蛋白和自蛋白水解蛋白的新方法。

C

反応基質、遷移状態の類似体、または産物への共有結合

