

【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】平成23年12月1日(2011.12.1)

【公表番号】特表2011-512153(P2011-512153A)

【公表日】平成23年4月21日(2011.4.21)

【年通号数】公開・登録公報2011-016

【出願番号】特願2010-547269(P2010-547269)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (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 0 7 K 14/005 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 0 7 K 14/005

【手続補正書】

【提出日】平成23年10月12日(2011.10.12)

【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】

以下のステップ：

a) 二本鎖核酸から一本鎖置換核酸を生成するステップであって、二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び／又は鎖分離が一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

b) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

c) 前記一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、一本鎖置換核酸を標的核酸に挿入する方法。

【請求項2】

二本鎖核酸が5'末端において非対称的であるように適合され、非対称性によって一方の鎖が優先的に分解される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップa)～c)の一本鎖置換核酸が、ステップa)に規定される、特に5'及び3'領域間の置換領域を含む第一の一本鎖置換核酸であり、さらなるステップd)～f)：

d) 第二の二本鎖核酸から第二の一本鎖置換核酸を生成するステップであって、第二の

二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び／又は鎖分離が第二の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第二の一本鎖置換核酸は：

i) 第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列と同一の5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列と同一の3'領域、又は第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域のいずれか；並びに

ii) 場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、前記ステップ、

e) 第二の一本鎖置換核酸と選択された標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で、ステップc)の選択された標的核酸を第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

f) 前記第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

ステップa)～c)が：

a)

i) 第一の二本鎖核酸から第一の一本鎖置換核酸を生成し、ここで第一の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び／又は鎖分離が第一の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第一の一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、また、

ii) 第二の二本鎖核酸から第二の一本鎖置換核酸を生成し、ここで第二の二本鎖核酸は一方の鎖の優先的分解及び／又は鎖分離が第二の一本鎖置換核酸を生成するように一方又は両方の5'末端において適合され、第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖核酸の置換配列上の第一の配列に相補的な5'領域、第一の一本鎖核酸の置換配列上の第二の配列に相補的な3'領域、並びに場合により標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の置換領域を含む、

ステップ、

b) 第一及び第二の一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下で、標的核酸を第一及び第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップ、そして

c) 前記第一及び第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

以下のステップ：

a) 一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red 又はその機能的等価物の存在下で、標的核酸を一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、そして

b) 一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、標的核酸に変異を作出する方法。

【請求項6】

5'末端において非対称的であるように適合され、その非対称性によって一方の鎖が優先的に分解される、二本鎖核酸基質から一本鎖核酸基質を生成するステップを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ステップa)及びb)の一本鎖置換核酸が、ステップa)に規定される第一の一本鎖置換核酸

であり、さらなるステップc)及びd)：

c) 第二の一本鎖置換核酸と選択された標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red⁺ 又はその機能的等価物の存在下で、ステップb)の選択された標的核酸を第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

第二の一本鎖置換核酸は：

i) 第一の一本鎖核酸の置換領域上の第一の配列と同一の5'領域及び第一の一本鎖核酸の置換領域上の第二の配列と同一の3'領域、又は第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域及び第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域のいずれか；並びに

ii) 標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む、前記ステップ、

d) 第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

を含む、請求項5または請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

ステップa)及びb)が：

a) 第一及び第二の一本鎖置換核酸と標的核酸との間で組換えが起きるのに適した条件下、Red⁺ 又はその機能的等価物の存在下で、標的核酸を第一及び第二の一本鎖置換核酸に接触させるステップであって、

i) 第一の一本鎖置換核酸は、標的核酸上の配列と同一の5'領域、標的核酸上の配列と同一の3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含み、

ii) 第二の一本鎖置換核酸は、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第一の配列に相補的な5'領域、第一の一本鎖置換核酸の置換領域上の第二の配列に相補的な3'領域、並びに標的核酸上の配列と同一でない5'及び3'領域間の少なくとも61塩基長の置換領域を含む前記ステップ、そして

b) 第一及び第二の一本鎖置換核酸を取り込むことによって配列が変更した標的核酸を選択するステップ

である、請求項5または請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

一本鎖置換核酸が少なくとも61ヌクレオチド長の置換領域を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

一本鎖置換核酸が少なくとも200ヌクレオチド長の置換領域を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

一本鎖置換核酸が遺伝子全体を含む置換領域を含む、請求項9または請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

選択ステップが、最低有効量より5～70%高い濃度で抗生物質を使用し、一本鎖置換核酸を標的核酸に接触させるのに用いた宿主細胞を19～33℃の温度で1～7日間インキュベートする抗生物質選択を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 13】

内在性のsbcBエキソヌクラーゼ又はそのオルソログの活性が、野生型カウンターパートに比べて低減されているか、又は不活性化されている宿主細胞。

【請求項 14】

E176位に変異を有するRed⁺ 又はそのバリエーション。

【請求項 15】

相同組換えを行う方法であって、請求項13に記載の宿主細胞中で組換えを実施するステップを含むか、または相同組換えを行うために請求項14に記載のRed⁺ を使用するステッ

ブを含み、この場合該相同組換えが一本鎖オリゴヌクレオチド修復であるか、又は請求項1～12のいずれか1項に記載の方法である、前記方法。