

【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30年5月31日(2018.5.31)

【公表番号】特表2017-511155(P2017-511155A)

【公表日】平成29年4月20日(2017.4.20)

【年通号数】公開・登録公報2017-016

【出願番号】特願2017-505732(P2017-505732)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 1/21 (2006.01)

C 12 Q 1/04 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 N 1/21

C 12 Q 1/04

【手続補正書】

【提出日】平成30年4月12日(2018.4.12)

【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】

細菌ゲノム内に欠失を生成するためのプロセスであって、前記細菌が C R I S P R / C a s 系を含み、前記プロセスが：

(a) 1つまたはそれ以上の欠失ベクターによって細菌集団を形質転換するステップであって、前記欠失ベクターが前記集団内の細菌の前記ゲノム内で第1および第2の P A M / プロトスペーサーを標的とする第1および第2の c r R N A の產生を誘導することが可能であるステップ；

(b) 前記第1および第2の c r R N A が產生される条件下で前記細菌集団を培養するステップであって、それらが前記第1および第2の P A M / プロトスペーサーを標的とし、且つ前記第1および第2の c r R N A が前記集団内の1つまたはそれ以上の細菌内の前記ゲノムの二重開裂を促進し、且つ前記細菌ゲノム D N A の2つの開裂末端が再結合するステップ；および

(c) そのゲノムが前記第1および第2の P A M / プロトスペーサーの間の前記細菌ゲノム D N A 内の欠失を含む1つまたはそれ以上の細菌を分離するステップを含む前記プロセス。

【請求項2】

請求項1に記載のプロセスであって、1つの欠失ベクターが前記集団内の細菌の前記ゲノム内で前記第1および第2の P A M / プロトスペーサーを標的とする前記第1および第2の c r R N A の双方の產生を誘導することが可能である前記プロセス。

【請求項3】

請求項2に記載のプロセスであって、前記欠失ベクターが、前記第1および第2の c r R N A をコードする、 C a s 直列配列エレメントと隣接する第1および第2の C a s スペーサーエレメントを含む前記プロセス。

【請求項4】

請求項3に記載のプロセスであって、前記第1および第2の C R I S P R スペーサー工

レメントが前記欠失ベクター内の单一の Cas アレイ内にあるかまたは前記欠失ベクター内の異なる複数の Cas アレイ内にある前記プロセス。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のプロセスであって、前記欠失ベクターが：

- (i) Cas リーダーエレメント
- (ii) 第 1 の Cas 直列反復エレメント
- (iii) 前記第 1 の cr RNA の產生を誘導することの可能な第 1 の Cas スペーサーエレメント、
- (iv) 第 2 の Cas 直列反復エレメント、
- (v) 前記第 2 の cr RNA の產生を誘導することの可能な第 2 の Cas スペーサーエレメント、および
- (vi) 第 3 の Cas 直列反復エレメントを含む前記プロセス。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のプロセスであって、前記欠失ベクターが 2 つのアレイを含み、前記第 1 のアレイが：

- (i) 第 1 の Cas リーダーエレメント
  - (ii) 第 1 の Cas 直列反復エレメント
  - (iii) 前記第 1 の cr RNA の產生を誘導することの可能な第 1 の Cas スペーサーエレメント、
  - (iv) 第 2 の Cas 直列反復エレメントを含み、
- 且つ前記第 2 のアレイが：
- (v) 第 2 の Cas リーダーエレメント、
  - (vi) 第 3 の Cas 直列反復エレメント、
  - (vii) 前記第 2 の cr RNA の產生を誘導することの可能な第 2 の Cas スペーサーエレメント、および
  - (viii) 第 4 の Cas 直列反復エレメントを含む前記プロセス。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のプロセスであって、第 1 の欠失ベクターが前記集団内の細菌の前記ゲノム内で前記第 1 の PAM / プロトスペーサーを標的とする前記第 1 の cr RNA の產生を誘導することが可能であり；かつ第 2 の欠失ベクターが前記集団内の細菌の前記ゲノム内で前記第 2 の PAM / プロトスペーサーを標的とする前記第 2 の cr RNA の產生を誘導することが可能である前記プロセス。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のプロセスであって、前記第 1 の欠失ベクターが：

- (i) 第 1 の Cas リーダーエレメント
  - (ii) 第 1 の Cas 直列反復エレメント
  - (iii) 前記第 1 の cr RNA の產生を誘導することの可能な第 1 の Cas スペーサーエレメント、
  - (iv) 第 2 の Cas 直列反復エレメントを含み、
- 且つ / または前記第 2 の欠失ベクターが：
- (v) 第 2 の Cas リーダーエレメント、
  - (vi) 第 3 の Cas 直列反復エレメント、
  - (vii) 前記第 2 の cr RNA の產生を誘導することの可能な第 2 の Cas スペーサーエレメント、
  - (viii) 第 4 の Cas 直列反復エレメントを含む前記プロセス。

【請求項 9】

前述の請求項のうちいずれか 1 つに記載のプロセスであって、ステップ (b) において、前記 PAM / プロトスペーサーの双方が前記細菌ゲノムから除去されるかまたは前記 PAM / プロトスペーサーの双方が前記 PAM / プロトスペーサーを認識する cr RNA によって認識されることが不可能になる前記プロセス。

**【請求項 10】**

細菌から標的内因性プラスミドを除去するプロセスであって、前記細菌が C R I S P R / C a s 系を含み、前記プロセスが：

(a) 1つまたはそれ以上の欠失ベクターによって細菌集団を形質転換するステップであって、前記欠失ベクターが前記集団内の細菌の前記標的プラスミド内に 1つまたはそれ以上の P A M / プロトスペーサーを標的とする 2つまたはそれ以上の c r R N A の產生を誘導することが可能であるステップ；

(b) 前記 2つまたはそれ以上の c r R N A が產生され且つ前記 2つまたはそれ以上の c r R N A が前記 2つまたはそれ以上の P A M / プロトスペーサーを標的とし、且つ前記集団内の 1つまたはそれ以上の細菌において前記 2つまたはそれ以上の c r R N A が 2つまたはそれ以上の位置における標的プラスミドの開裂を促進して直鎖化 D N A フラグメントを生成し、かつ前記直鎖化フラグメントが好ましくは内因性細胞メカニズムによって分解を受ける条件下で前記細菌集団を培養するステップ；および

(c) 前記標的プラスミドを欠く 1つまたはそれ以上の細菌を分離するステップを含む前記プロセス。

**【請求項 11】**

請求項 10 に記載のプロセスであって、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの c r R N A が 1つ、2つ、3つ、4つまたは5つの P A M / プロトスペーサーを標的とする前記プロセス。

**【請求項 12】**

請求項 10 または 11 に記載のプロセスであって、前記標的プラスミドがメガプラスミドまたは内因性プラスミドである前記プロセス。

**【請求項 13】**

前述の請求項のうちいずれか 1つに記載のプロセスであって、前記細菌が内因性 C R I S P R / C a s 系を有する前記プロセス。

**【請求項 14】**

前述の請求項のうちいずれか 1つに記載のプロセスであって、前記細菌が I 型 C R I S P R / C a s 系を有する前記プロセス。

**【請求項 15】**

前述の請求項のうちいずれか 1つに記載のプロセスであって、前記細菌がグラム陽性菌である前記プロセス。

**【請求項 16】**

前述の請求項のうちいずれか 1つに記載のプロセスであって、前記細菌が非高度組換え誘導細菌である前記プロセス。

**【請求項 17】**

前述の請求項のうちいずれか 1つに記載のプロセスであって、前記細菌が C l o s t r i d i a 細であり好ましくは C l o s t r i d i a c e a e 目であり、より好ましくは C l o s t r i d i u m 属であるかまたは前記細菌が A c t i n o m y c e t a l e s 目であるかまたは B a c i l l u s 属である前記プロセス。

**【請求項 18】**

請求項 17 に記載のプロセスであって、前記細菌が C . a c e t o b u t y l i c u m 、 C . a r b u s t i 、 C . a u r a n t i b u t y r i c u m 、 C . b e i j e r i n c k i i 、 C . c e l l u l o v o r a n s 、 C . c e l l u l o l y t i c u m 、 C . t h e r m o c e l l u m 、 C . t h e r m o b u t y r i c u m 、 C . p a s t e u r i a n u m 、 C . k l u y v e r i 、 C . n o v y i 、 C . s a c c h a r o b u t y l i c u m 、 C . t h e r m o s u c c i n o g e n e s 、 C . t h e r m o p a l m a r i u m 、 C . s a c c h a r o l y t i c u m 、 C . s a c c h a r o p e r b u t y l a c e t o n i c u m 、 C . t y r o b u t y r i c u m 、 C . t e t a n o m o r p h u m 、 C . m a g n u m 、 C . l j u n g d a h l i i 、 C . a u t o e t h a n o g e n u m 、 C . b u t y r i c u m 、 C . p u n i c e u m 、 C . d i o l i s 、 C . h o

*m o p r o p i o n i c u m* および *C . r o s e u m* からなる群から選択される前記プロセス。

**【請求項 19】**

変異菌を作製するためのプロセスであって、請求項 1 から 9 または 13 から 18 のうちいずれか 1 つに記載のプロセスによって細菌ゲノムに欠失を生成することを含む前記プロセス。

**【請求項 20】**

変異菌を作製するためのプロセスであって、請求項 10 から 18 のうちいずれか 1 つに記載のプロセスによって細菌内の標的内因性プラスミドを除去することを含む前記プロセス。