

【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8月25日(2011.8.25)

【公表番号】特表2010-539994(P2010-539994A)

【公表日】平成22年12月24日(2010.12.24)

【年通号数】公開・登録公報2010-051

【出願番号】特願2010-528976(P2010-528976)

【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)

【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

【手続補正書】

【提出日】平成23年7月6日(2011.7.6)

【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】

下記のステップを含む所望の核酸分子の合成方法であって、

(a) 各々のカセットが所望の核酸分子の一部のヌクレオチド配列を含む複数のカセットを提供するステップ、

当該ステップ(a)において、

(i) 複数のカセットのメンバー(複数)がヌクレオチド配列の重複部分(複数)を含み、かつ

(ii) 該カセットが、重複部分に従って組み合わせた場合に、所望の核酸分子の完全なヌクレオチド配列のサブセット(複数)を提供し、

(b) インビトロの 1 以上のステップにおいて前記複数のカセット及び任意で追加されるベクター DNA を組み合わせて、結果として形成される複数のサブセットを得るステップ  
当該ステップ(b)において、

(i) 前記複数のサブセットが、ヌクレオチド配列の重複部分を含み、かつ、

(ii) 前記複数のサブセットが、重複部分に従って組み立てた場合に、所望の核酸分子の完全なヌクレオチド配列を提供し、

(c) インビボで宿主細胞において複数のサブセット及び任意に追加されるベクター DNA を組み立てて完全な所望の核酸分子を得るステップ、

当該ステップ(c)において、

前記所望の核酸分子が更に宿主細胞において作動可能な複製起点を含むこと、を含む方法。

【請求項 2】

- (a) 宿主細胞が酵母細胞であること、
  - (b) 少なくとも1つの前記カセット又は追加のベクターDNAがセントロメア及び/又は選択可能なマーカーを含むこと、又は
  - (c) 宿主細胞が酵母細胞であり、かつ少なくとも1つの前記カセット又は追加のベクターDNAがセントロメア及び/又は選択可能なマーカーを含むこと
- を特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

- (a) 少なくとも1つの前記サブセット又は追加のベクターが複製起点を含むこと、
  - (b) 少なくとも1つの前記サブセット又は追加のベクターがセントロメア及び/又は選択可能なマーカーを含むこと、
  - (c) 前記サブセット又は追加のベクターが複製起点と、セントロメア及び/又は選択可能なマーカーとを含むこと、あるいは、
  - (d) ステップ(a)において提供される少なくとも1つの前記カセットが透かし配列を含むこと、
- を特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

インビボにおいて10個以上の核酸断片(複数)を少なくとも1つのターゲット核酸分子に組み立てる方法であって、下記のステップ:

- (a) 宿主細胞の培養物に前記10個以上の断片の各々の複数コピーを含む混合物を形質移入するステップ、但し、前記断片(複数)が少なくとも10塩基対の重複配列(複数)を含んで、所望の順序の組み立て物を提供し、かつ、1以上の前記断片が少なくとも1つの複製起点を含み、
  - (b) 前記宿主細胞を培養するステップ、そして
  - (c) 形質移入された宿主細胞をスクリーニングして、少なくとも1つの前記組み立てたターゲット核酸分子の存在を確認するステップ、
- を含む方法。

【請求項5】

下記のステップ:

- (i) 前記宿主細胞において1以上の組み立てたターゲット核酸分子を複製するステップ: 但し、前記少なくとも1つの複製起点の1つが前記宿主細胞において作動可能な複製起点であること、又は、
  - (ii) 前記宿主細胞から1以上の組み立てたターゲット核酸分子を抽出し、他の細胞に形質移入して、前記1以上の組み立てたターゲット核酸分子を複製するステップ: 但し、前記少なくとも1つの複製起点の1つが前記他の細胞において作動可能であること;
- を更に含むことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記宿主細胞又は前記他の細胞から、組み立てたターゲット核酸分子を単離することをさらに含むことを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記宿主細胞において、少なくとも2つのターゲット核酸分子を前記10個以上の核酸断片から組み立てることを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも1つの断片が前記宿主細胞又は他の細胞において作動可能なセントロメアを含むことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項9】

前記少なくとも1つの断片が選択可能なマーカーを含み、前記培養を前記選択可能なマーカーの選択条件下で実行することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項10】

- (a) 前記断片が二重鎖であり、かつ100塩基対から $5 \times 10^6$ 塩基対の長さであること、

又は、

(b) 前記断片が一重鎖であり、かつ 40ヌクレオチドから1000ヌクレオチドの長さであること

を特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項11】

少なくとも2つの前記断片が、各々、1つの末端にテロメアを含むことを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項12】

前記宿主細胞が酵母細胞であることを特徴とする請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

請求項1～11のいずれか1項に記載の方法によって組み立てた単離された核酸分子。

【請求項14】

前記組み立てた核酸分子が、自然に発生するゲノム、合成ゲノム、最小ゲノム、種々の生物のゲノムもしくはその部分の組み合わせ、天然の代謝経路の複数の酵素をコードする核酸分子、(非天然の)操作した(engineered)代謝経路の複数の酵素をコードする核酸分子、複数の代謝経路をコードする核酸分子、及び、組み合わせ的に組み立てた代謝経路をコードする核酸分子から成る群から選択されることを特徴とする請求項13に記載の単離状態の核酸分子。

【請求項15】

請求項1～11のいずれか1項に記載の方法によって組み立てた少なくとも1つの核酸分子を含む細胞培養物。

【請求項16】

前記少なくとも1つの組み立てた核酸分子が、自然に発生するゲノム、合成ゲノム、最小ゲノム、種々の生物のゲノム又はその部分の組み合わせ、天然の代謝経路の複数の酵素をコードする核酸分子、(非天然の)操作した代謝経路の複数の酵素をコードする核酸分子、複数の代謝経路をコードする核酸分子、及び、組み合わせ的に組み立てた代謝経路をコードする核酸分子から成る群から選択されることを特徴とする請求項15に記載の細胞培養物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

他の視点(複数)では、本発明は、本発明の方法によって合成され、かつ、自然には発生しない合成大型(large)核酸分子に向けられる。一般的には、インビボ組み換えステップ(recombination steps)が、宿主細胞において作動可能な複製起点の包含を少なくとも必要とするので、該方法の結果物は新規である。本発明は、また、本発明の方法によって合成した合成大型核酸分子を含む細胞の培養物及びそのような培養物を使用する方法にも向けられる。

[請求項1001]

下記のステップを含む所望の核酸分子の合成方法であって、

a) 複数のカセットを提供するステップ、但し、ステップa)において、該カセットの各々は、所望の核酸の一部のヌクレオチド配列を含み、該カセットは、所望の核酸分子のヌクレオチド配列の重複部分(複数)を含み、そして、該カセットは、該重複部分(複数)に従って結合(コンバイン: combine)した場合には、所望の核酸の完全なヌクレオチド配列を提供すること、

b) インビトロで前記カセットを結合して、結果として形成される複数のサブセットを得るステップ、但し、ステップb)において、前記サブセットは、所望の配列の重複部分

(複数)を含み、そして、該サブセットは、重複部分(複数)に従って組み立てた場合には、所望の核酸のヌクレオチド配列を提供すること、

c) インビボで宿主培養物において該サブセット(複数)を組み立て(assemble)て、所望の核酸分子を得るステップ、但し、ステップc)において、前記組み立て物は、複製起点を更に含むこと、  
を特徴とする方法。

[請求項1002]

前記重複部分(複数)は、少なくとも20ベースをそれぞれ含むことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1003]

ステップb)及び/又はステップc)を、少なくとも1回繰り返すことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1004]

ステップc)を酵母において実行し、前記複製起点は、酵母において作動可能(operable)であることを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1005]

ステップc)の前記組み立て物は、セントロメア及び/又は選択可能マーカを含むことを特徴とする請求項1004に記載の方法。

[請求項1006]

前記複製起点を、追加のベクターに含むことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1007]

前記セントロメア及び/又は選択可能マーカを、追加のベクターに含むことを特徴とする請求項1005に記載の方法。

[請求項1008]

ステップa)の1以上のカセットが、透かし配列(watermark)を含むことを特徴とする請求項1001に記載の方法。

[請求項1009]

10個以上のDNA断片を単一のDNA分子に組み立てる方法であって、  
下記のステップ：

(a) 宿主細胞の培養物を十分な数の前記10個の断片(fragments)の各々のコピーを含む混合物で形質転換して、前記培養物の平均の細胞によって異なる断片の数の少なくともおよそ2倍に達する量のコピーを取り込ませるステップ、  
但し、ステップa)において、前記断片は少なくとも10塩基対の重複配列を含み、該重複配列は、配列が重複して所望の順番の組み立て物を提供するように整列し、そして、複製起点を、前記断片の中に含むこと、

(b) 前記酵母培養物における前記断片の組み立てのために十分な時間を許容するステップ、さらに、

(c) 以下のいずれかのステップ：

(i) 前記宿主を培養して、回収のための組み立てた核酸分子の十分なコピーを得るステップ、又は

(ii) 前記宿主からDNAを抽出し、他の培養物に形質移入して、前記他の培養物が前記回収のための組み立てた核酸分子の十分なコピーを複製するようにするステップ、  
を含むことを特徴とする方法。

[請求項1010]

組み立てたDNA分子を、宿主培養物又は他の培養物から単離するステップをさらに含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1011]

少なくとも2つのターゲットDNA分子を前記宿主培養物において組み立てることを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1012]

複製起点が宿主において作動可能 (operable) であり、宿主において作動可能なセントロメアを前記複数断片の中に含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1013]

他のシステムにおいて作動可能な複製起点を前記複数断片の中 (among) に含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1014]

選択可能なマーカーを前記複数断片の中に含み、前記培養を選択条件下で実行することを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1015]

断片 (複数) が二重鎖であり、 $100 - 5 \times 10^6$ 塩基対を含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1016]

断片 (複数) が一重鎖であり、40 - 1000ヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1017]

前記断片の2つが、各々、1つの末端にテロメアを含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1018]

組み立てたDNA分子が自然に発生するゲノムを表すことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1019]

組み立てたDNA分子が所望の代謝経路を含むことを特徴とする請求項1009に記載の方法。

[請求項1020]

宿主培養物が酵母であることを特徴とする請求項1009～1019のいずれか1項に記載の方法。

[請求項1021]

請求項1001～1019のいずれか1項に記載の方法によって組み立てた単離状態のDNA分子。

[請求項1022]

請求項1001～1019のいずれか1項に記載の方法に従って組み立てたDNA分子を含む宿主培養物又は他の培養物。

[請求項1023]

酵母であることを特徴とする請求項1022に記載の宿主培養物、及び大腸菌又はバチルス  
の培養物であることを特徴とする請求項1022に記載の他の培養物。

[請求項1024]

遺伝子の決定的性質 (criticality) を評価する方法であって、

細胞培養物に形質移入した請求項1021に記載の合成核酸分子から候補遺伝子を削除する又は破壊すること、及び前記削除すること又は破壊することの培養物の生存に対する影響を評価すること

を含む方法。