

【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31年1月31日(2019.1.31)

【公表番号】特表2017-537643(P2017-537643A)
 【公表日】平成29年12月21日(2017.12.21)
 【年通号数】公開・登録公報2017-049
 【出願番号】特願2017-532046(P2017-532046)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 7/01 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 7/01 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/16 Z

【手続補正書】

【提出日】平成30年12月13日(2018.12.13)

【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】

宿主細胞中に導入されると、操作されていないウイルス核酸の宿主細胞への導入によって産生されるウイルス粒子と比較して2つ以上の改善されたウイルス特性を有する非天然ウイルス粒子を産生することができる、操作されたウイルスゲノムを含み、該2つ以上の改善されたウイルス特性が、宿主域、ウイルス溶菌サイクル、吸着、付着、注入、複製及びアセンブリ、溶菌、放出数、免疫回避、免疫刺激、免疫不活性化、バイオフィルムの分散、細菌のファージ耐性、細菌の抗生物質感受性化、ビルレンス因子の調節、ならびに標的化された宿主ゲノム消化または編集からなる群から選択される、操作されたp h i K M V (K M V) バクテリオファージ。

【請求項2】

前記改善されたウイルス特性のうちの少なくとも1つが宿主域である、請求項1に記載のバクテリオファージ。

【請求項3】

前記バクテリオファージウイルスゲノムが、以下の1つまたは複数を含む、請求項1に記載のバクテリオファージ：

i) 目的の遺伝子を含む発現カセットの挿入；

i i) g p 1 3 C 1 7 Y、g p 1 8 D 3 6 Y、g p 3 8 D 8 2 GおよびI 8 3 S、ならびにg p 4 0 N 2 5 3 Dからなる群より選択され、L U Z 1 9と比較して改善された宿主域を示す、1つもしくは複数の変異；

i i i) ウイルスL K D 1 6由来のg p 1 8で置換された野生型L U Z 1 9 g p 1 8；ならびに/または

i v) g p 3 4の位置55のリジンの欠失(g p 3 4 L 5 5 変異)、ここで該ファージは、野生型ファージと比較して増大した溶菌活性を示す。

【請求項4】

前記バクテリオファージウイルスゲノムが、P p 1 5 g p 4 4 (シュードモナス・プチ

ダ (Pseudomonas pudita) 15 に由来する尾部スパイク gp 44)、NTU gp 34 (クレブシエラ・ニューモニエ (Klebsiella pneumoniae) ファージ NTUH - K2044 - K1 - 1 (NTU) に由来する尾部スパイク gp 34)、LKAL gp 49 (緑膿菌 (P. aeruginosa) ファージ LKA1 に由来する尾部スパイク gp 49)、表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis) に由来するフェノール可溶性モルホリン界面活性剤 (PSM)、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) に由来するフェノール可溶性モルホリン界面活性剤 (PSM 3)、Staphylococcus aureus に由来するフェノール可溶性モルホリン界面活性剤 (PSM 2)、抗菌性ペプチド、DNase からなる群より選択される目的の遺伝子を含む発現カセットの挿入を含む、請求項 3 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 5】

前記バクテリオファージウイルスゲノムが、DNase を発現する目的の遺伝子を含む発現カセットの挿入を含む、請求項 4 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 6】

前記バクテリオファージウイルスゲノムが、PSM を発現する目的の遺伝子を含む発現カセットの挿入を含む、請求項 4 ~ 5 のいずれか一項に記載のバクテリオファージ。

【請求項 7】

前記バクテリオファージウイルスゲノムが、PSM 2 を発現する目的の遺伝子を含む発現カセットの挿入を含む、請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載のバクテリオファージ。

【請求項 8】

前記変更の少なくとも 1 つが、配列番号 34 (野生型 LUZ19 Gp 13 タンパク質配列)、配列番号 35 (野生型 LUZ19 Gp 38 タンパク質配列)、配列番号 36 (野生型 LUZ19 Gp 40 タンパク質配列)、配列番号 25 (野生型 LUZ19 gp 49 及び gp 48 - gp 49 遺伝子間領域)、配列番号 48 (LUZ19 Gp 18 タンパク質配列) または配列番号 49 (LUZ19 Gp 49 タンパク質配列) に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列中にある、請求項 1 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 9】

前記操作されたウイルスゲノムが、LUZ19 ゲノムに対して少なくとも 85% の同一性を有するウイルスゲノムの全てまたは一部を含む、請求項 1 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 10】

異種 gp 18 遺伝子の全てまたは一部を更に含む、請求項 9 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 11】

前記異種 gp 18 遺伝子が、配列番号 38 (LKD16 Gp 18 タンパク質配列) に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 10 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 12】

操作された gp 34 遺伝子の全てまたは一部を更に含む、請求項 9 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 13】

前記操作された gp 34 遺伝子が、配列番号 5 のアミノ酸位置 55 に対応する位置に変異を含むアミノ酸をコードする、請求項 12 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 14】

配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36 及び配列番号 48 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする 1 つ以上の核酸配列中における変更を更に含む、請求項 9 に記載のバクテリオファージ。

【請求項 15】

前記操作されたウイルスゲノムが、配列番号34 (Phikmv様ウイルス属(Phikmvlikevirus)LUZ19)に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列、配列番号35 (野生型LUZ19 Gp38タンパク質配列)に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列、配列番号36 (Phikmvlikevirus LUZ19)に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列及び配列番号48 (LUZ19 Gp18タンパク質配列)に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列のそれぞれをコードする核酸配列中における改変を含む、請求項14に記載のバクテリオファージ。

【請求項16】

前記改変が、配列番号34のアミノ酸位置17に対応する位置でのCからYへの置換、配列番号48のアミノ酸位置36に対応する位置でのDからYへの置換、配列番号35のアミノ酸位置82に対応する位置でのDからGへの置換、配列番号35のアミノ酸位置83に対応する位置でのIからSへの置換及び配列番号36のアミノ酸位置253に対応する位置でのNからDへの置換を含む、請求項15に記載のバクテリオファージ。

【請求項17】

配列番号49に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列中における改変を更に含む、請求項9に記載のバクテリオファージ。

【請求項18】

前記改変が、配列番号49に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列への異種核酸分子の挿入、または配列番号49 (LUZ19 Gp49タンパク質配列)に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列中に含まれる核酸配列の異種核酸分子による置換である、請求項17に記載のバクテリオファージ。

【請求項19】

前記異種核酸分子が、配列番号37 (PyoSSタンパク質配列)、配列番号39 (LKAI Gp49タンパク質配列)、配列番号40 (NTUH-K2044-K1-1 Gp34タンパク質配列)、配列番号41 (Pp15 Gp44タンパク質配列)、配列番号43 (SaP5Ma3タンパク質配列)、配列番号44 (SaPAMb2タンパク質配列)、配列番号45 (SeP5Maタンパク質配列)、配列番号46 (MS2 Lタンパク質配列)及び配列番号47 (PRRI Lタンパク質配列)からなる群から選択される配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする異種核酸配列を含む、請求項18に記載のバクテリオファージ。

【請求項20】

前記操作されたウイルス核酸が、配列番号21 (LUZ19 gp32プロモーター(P₃₂))に含まれる核酸配列またはその一部を含むプロモーターに作動可能に連結された異種核酸配列を含む、請求項1に記載のバクテリオファージ。

【請求項21】

前記操作されたウイルス核酸が、配列番号22 (LUZ19 gp32ターミネーター(T₃₂))に含まれる核酸配列またはその一部を含むターミネーターに作動可能に連結された異種核酸配列を含む、請求項1に記載のバクテリオファージ。

【請求項22】

前記 phikmv (KMV) バクテリオファージが LUZ19 を含む、請求項1～21のいずれか一項に記載のバクテリオファージ。

【請求項23】

(a) 第1のウイルスゲノムを準備することと、

(b) 前記第1のウイルスゲノムの少なくとも1つの断片を少なくとも1つの修復核酸分子と結合して、前記第1のウイルスゲノムと比較して少なくとも1つの改変を含む第2のウイルスゲノムを作製することによって、操作されたウイルスゲノムを作製することとを含み、

前記第2のウイルスゲノムは、宿主細胞中に導入されると、2つ以上の改善されたウイ

ルス特性を有するウイルス粒子を産生することができる、
所望のウイルス特性を2つ以上有する、目的のバクテリオファージを作製するための方法

【請求項24】

(c)ステップ(a)~(b)を1回以上の反復で繰り返すこと
を更に含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

改善されたウイルス特性のそれぞれが、宿主域、ウイルス溶菌サイクル、吸着、付着、
注入、複製及びアセンブリ、溶菌、放出数、免疫回避、免疫刺激、免疫不活性化、バイオ
フィルムの分散、細菌のファージ耐性、細菌の抗生物質感受性化、ビルレンス因子の調節
、ならびに標的化された宿主ゲノム消化または編集からなる群から選択される、請求項2
3に記載の方法。

【請求項26】

ステップ(b)の操作されたウイルスゲノムを作製することが、

(1)RNA誘導型エンドヌクラーゼを使用した前記第1のウイルスゲノムの領域の
インビトロ消化と、

(2)前記消化された第1のウイルスゲノムの少なくとも1つの断片を少なくとも1つ
の修復核酸分子とアセンブルすることと

を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記第1のウイルスゲノムがウイルス粒子から単離される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記第1のウイルスゲノムまたは前記少なくとも1つの修復核酸分子が、デノボ合成さ
れる、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記デノボ合成が、化学的に合成された核酸分子、PCR増幅された核酸配列、単離さ
れた核酸分子の消化断片またはこれらの任意の組み合わせを結合することを含む、請求項
28に記載の方法。

【請求項30】

前記第1のウイルスゲノムまたは前記少なくとも1つの修復核酸分子が、インビトロ消
化の前に増幅される、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記アセンブリが、

(a)3'エキソヌクラーゼ活性を欠く単離された5' 3'エキソヌクラーゼと

(b)3'エキソヌクラーゼ活性を有する単離された非鎖置換型DNAポリメラーゼ
、または前記DNAポリメラーゼ及び3'エキソヌクラーゼ活性を欠く第2のDNAポ
リメラーゼの混合物と、

(c)単離されたりガーゼと、

(d)dNTPの混合物と

を含む混合物を使用して、

前記操作されたウイルスゲノムを含む組換え核酸を形成するための、前記消化されたウ
イルス核酸への前記断片の挿入に効果的である条件下で、インビトロで実施される、請求
項26に記載の方法。

【請求項32】

前記RNA誘導型ヌクラーゼが、Cas9またはCas9由来酵素であり、前記少な
くとも1つのガイドRNAが、(1)キメラgRNA、または(2)crRNA及びtr
acrRNAを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項33】

前記エンドヌクラーゼが、アセンブリの前に、熱不活性化されるか、または除去され

る、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記操作されたウイルスゲノムにより宿主細胞を形質転換することを更に含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記操作されたウイルスゲノムをウイルス粒子内にパッケージングするためのインビトロパッケージングキットを使用することを更に含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 2 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法によって作製された、バクテリオファージ。

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の バクテリオファージ である、請求項 3 6 に記載の バクテリオファージ。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 3】

いくつかの態様において、本開示は、核酸を操作する方法を提供し、当該核酸は、宿主細胞から単離されたプラスミドである。いくつかの態様において、プラスミドは、少なくとも 5 kb である。いくつかの態様において、プラスミドは、少なくとも 6 kb である。いくつかの態様において、プラスミドは、少なくとも 10 kb である。いくつかの態様において、プラスミドは、少なくとも 15 kb である。いくつかの態様において、プラスミドは、少なくとも 20 kb である。

[本発明 1 0 0 1]

宿主細胞中に導入されると、操作されていないウイルス核酸の宿主細胞への導入によって産生されるウイルス粒子と比較して 2 つ以上の改善されたウイルス特性を有する非天然ウイルス粒子を産生することができる、操作されたウイルス核酸を含む、操作されたウイルス。

[本発明 1 0 0 2]

産生された前記ウイルス粒子が、少なくとも 3 つの改善されたウイルス特性を有する、本発明 1 0 0 1 の操作されたウイルス。

[本発明 1 0 0 3]

改善されたウイルス特性のそれぞれが、宿主域、ウイルス溶菌サイクル、吸着、付着、注入、複製及びアセンブリ、溶菌、放出数、免疫回避、免疫刺激、免疫不活性化、バイオフィルムの分散、細菌のファージ耐性、細菌の抗生物質感受性化、ビルレンス因子の調節、ならびに標的化された宿主ゲノム消化または編集からなる群から選択される、本発明 1 0 0 1 の操作されたウイルス。

[本発明 1 0 0 4]

前記操作されたウイルス核酸が、操作されたウイルスゲノムである、本発明 1 0 0 1 の操作されたウイルス。

[本発明 1 0 0 5]

前記操作されたウイルスゲノムが、操作されたバクテリオファージゲノムである、本発明 1 0 0 4 の操作されたウイルス。

[本発明 1 0 0 6]

前記改善されたウイルス特性のうちの少なくとも 1 つが宿主域である、本発明 1 0 0 5 の操作されたウイルス。

[本発明 1 0 0 7]

改善されたウイルス特性のそれぞれが、前記操作されたウイルス核酸中における少なく

とも1つの改変の結果である、本発明1001の操作されたウイルス。

[本発明1008]

少なくとも1つの改善されたウイルス特性が、前記操作されたウイルス核酸中における少なくとも2つの改変の結果である、本発明1007の操作されたウイルス。

[本発明1009]

前記操作されたウイルス核酸中における前記少なくとも1つの改変が、1回の工学的ステップの結果である、本発明1007の操作されたウイルス。

[本発明1010]

前記操作されたウイルス核酸中における前記少なくとも1つの改変が、反復的な工学的ステップの結果である、本発明1007の操作されたウイルス。

[本発明1011]

前記改変の少なくとも1つが、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号5、配列番号48または配列番号49に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列中にある、本発明1007の操作されたウイルス。

[本発明1012]

前記操作されたウイルスゲノムが、LUZ19ゲノムに対して少なくとも85%の同一性を有するウイルスゲノムの全てまたは一部を含む、本発明1004の操作されたウイルス。

[本発明1013]

異種gp18遺伝子の全てまたは一部を更に含む、本発明1012の操作されたウイルス。

[本発明1014]

前記異種gp18遺伝子が、配列番号38に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、本発明1013の操作されたウイルス。

[本発明1015]

操作されたgp34遺伝子の全てまたは一部を更に含む、本発明1012の操作されたウイルス。

[本発明1016]

前記操作されたgp34遺伝子が、配列番号5のアミノ酸位置55に対応する位置に変異を含むアミノ酸をコードする、本発明1015の操作されたウイルス。

[本発明1017]

配列番号34、配列番号35、配列番号36及び配列番号48からなる群から選択される配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする1つ以上の核酸配列中における改変を更に含む、本発明1012の操作されたウイルス。

[本発明1018]

前記操作されたウイルスゲノムが、配列番号34に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列、配列番号35に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列、配列番号36に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列及び配列番号48に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列のそれぞれをコードする核酸配列中における改変を含む、本発明1017の操作されたウイルス。

[本発明1019]

前記改変が、配列番号34のアミノ酸位置17に対応する位置でのCからYへの置換、配列番号48のアミノ酸位置36に対応する位置でのDからYへの置換、配列番号35のアミノ酸位置82に対応する位置でのDからGへの置換、配列番号35のアミノ酸位置83に対応する位置でのIからSへの置換及び配列番号36のアミノ酸位置253に対応する位置でのNからDへの置換を含む、本発明1018の操作されたウイルス。

[本発明1020]

配列番号49に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列中における改変を更に含む、本発明1012の操作されたウイルス。

[本発明1021]

前記改変が、配列番号 49 に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列への異種核酸分子の挿入、または配列番号 49 に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列中に含まれる核酸配列の異種核酸分子による置換である、本発明 1020 の操作されたウイルス。

[本発明 1022]

前記異種核酸分子が、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46 及び配列番号 47 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列をコードする異種核酸配列を含む、本発明 1021 の操作されたウイルス。

[本発明 1023]

前記操作されたウイルス核酸が、配列番号 21 に含まれる核酸配列またはその一部を含むプロモーターに作動可能に連結された異種核酸配列を含む、本発明 1001 の操作されたウイルス。

[本発明 1024]

前記操作されたウイルス核酸が、配列番号 22 に含まれる核酸配列またはその一部を含むターミネーターに作動可能に連結された異種核酸配列を含む、本発明 1001 の操作されたウイルス。

[本発明 1025]

(a) 第 1 のウイルスゲノムを準備することと、

(b) 前記第 1 のウイルスゲノムの少なくとも 1 つの断片を少なくとも 1 つの修復核酸分子と結合して、前記第 1 のウイルスゲノムと比較して少なくとも 1 つの改変を含む第 2 のウイルスゲノムを作製することによって、操作されたウイルスゲノムを作製することとを含み、

前記第 2 のウイルスゲノムは、宿主細胞中に導入されると、2 つ以上の改善されたウイルス特性を有するウイルス粒子を産生することができる、

所望のウイルス特性を 2 つ以上有する、目的の操作されたウイルスを作製するための方法。

[本発明 1026]

(c) ステップ (a) ~ (b) を 1 回以上の反復で繰り返すことを更に含む、本発明 1025 の方法。

[本発明 1027]

改善されたウイルス特性のそれぞれが、宿主域、ウイルス溶菌サイクル、吸着、付着、注入、複製及びアセンブリ、溶菌、放出数、免疫回避、免疫刺激、免疫不活性化、バイオフィルムの分散、細菌のファージ耐性、細菌の抗生物質感受性化、ビルレンス因子の調節、ならびに標的化された宿主ゲノム消化または編集からなる群から選択される、本発明 1025 の方法。

[本発明 1028]

ステップ (b) の操作されたウイルスゲノムを作製することが、

(1) エンドヌクレアーゼを使用した前記第 1 のウイルスゲノムの領域のインビトロ消化と、

(2) 前記消化された第 1 のウイルスゲノムの少なくとも 1 つの断片を少なくとも 1 つの修復核酸分子とアセンブルすることと

を含む、本発明 1025 の方法。

[本発明 1029]

前記第 1 のウイルスゲノムがウイルス粒子から単離される、本発明 1028 の方法。

[本発明 1030]

前記第 1 のウイルスゲノムまたは前記少なくとも 1 つの修復核酸分子が、デノボ合成される、本発明 1028 の方法。

[本発明 1031]

前記デノボ合成が、化学的に合成された核酸分子、PCR 増幅された核酸配列、単離さ

れた核酸分子の消化断片またはこれらの任意の組み合わせを結合することを含む、本発明 1030の方法。

[本発明 1032]

前記第1のウイルスゲノムまたは前記少なくとも1つの修復核酸分子が、インビトロ消化の前に増幅される、本発明 1030の方法。

[本発明 1033]

前記第1のウイルスゲノムが、少なくとも3 kb、少なくとも10 kb、少なくとも18 kb、少なくとも25 kbまたは少なくとも30 kbである、本発明 1026の方法。

[本発明 1034]

前記アセンブリがインビトロまたはインビボで実施される、本発明 1028の方法。

[本発明 1035]

前記アセンブリが、

(a) 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く単離された5' 3'エキソヌクレアーゼと

、
(b) 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する単離された非鎖置換型DNAポリメラーゼ、または前記DNAポリメラーゼ及び3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く第2のDNAポリメラーゼの混合物と、

(c) 単離されたりガーゼと、

(d) dNTPの混合物と

を含む混合物を使用して、

前記操作されたウイルスゲノムを含む組換え核酸を形成するための、前記消化されたウイルス核酸への前記断片の挿入に効果的である条件下で、インビトロで実施される、本発明 1034の方法。

[本発明 1036]

前記エンドヌクレアーゼがRNA誘導型ヌクレアーゼである、本発明 1028の方法。

[本発明 1037]

少なくとも1つのガイドRNAを更に含む、本発明 1036の方法。

[本発明 1038]

前記RNA誘導型ヌクレアーゼが、Cas9またはCas9由来酵素であり、前記少なくとも1つのガイドRNAが、(1)キメラgRNA、または(2)crRNA及びtracrRNAを含む、本発明 1037の方法。

[本発明 1039]

前記エンドヌクレアーゼが、アセンブリの前に、熱不活性化されるか、または除去される、本発明 1028の方法。

[本発明 1040]

前記インビトロ消化がスベルミジンを含み、本発明 1028の方法。

[本発明 1041]

前記操作されたウイルスゲノムにより宿主細胞を形質転換することを更に含む、本発明 1028の方法。

[本発明 1042]

前記操作されたウイルスゲノムをウイルス粒子内にパッケージングするためのインビトロパッケージングキットを使用することを更に含む、本発明 1028の方法。

[本発明 1043]

本発明 1026 ~ 1046のいずれかの方法によって作製された、操作されたウイルス。

[本発明 1044]

本発明 1001 ~ 1025のいずれかの操作されたウイルスである、本発明 1047の操作されたウイルス。

[本発明 1045]

(a) 精製された組換えRNA誘導型ヌクレアーゼと、

(b) 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く単離された5' 3'エキソヌクレアーゼと

(c) 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する単離された非鎖置換型DNAポリメラーゼ、または前記DNAポリメラーゼ及び3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く第2のDNAポリメラーゼの混合物と、

(d) 単離されたりガーゼと
を含む、ウイルス核酸分子を操作するためのキット。

[本発明1046]

(1) クラウディング剤、
(2) dNTPの混合物、及び
(3) 好適な緩衝液
のうちの1つ以上を更に含む、本発明1045のキット。

[本発明1047]

個別化されたガイドRNAを更に含む、本発明1045のキット。

[本発明1048]

アセンブリ反応において挿入されるDNA断片として機能するための、個別化された合成核酸分子を更に含む、本発明1045のキット。

[本発明1049]

形質転換のためのコンピテント宿主細胞を更に含む、本発明1045のキット。

[本発明1050]

単離されたウイルスゲノム核酸を更に含む、本発明1045のキット。

[本発明1051]

(a) 核酸を準備することと、
(b) RNA誘導型ヌクレアーゼを使用した前記核酸の領域のインビトロ消化と、
(c) 前記消化された核酸へのDNA断片の挿入による組換え核酸のアセンブリと
を含み、前記アセンブリは、
(i) 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く単離された5' 3'エキソヌクレアーゼと

(ii) 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する単離された非鎖置換型DNAポリメラーゼ、または前記DNAポリメラーゼ及び3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く第2のDNAポリメラーゼの混合物と、

(iii) 単離されたりガーゼと、

(iv) dNTPの混合物と
を含む成分の混合物を含む単一容器中で、組換え核酸を形成するための、前記消化された核酸への前記断片の挿入に効果的である条件下で、インビトロで実施される、核酸配列を操作する方法。

[本発明1052]

前記RNA誘導型ヌクレアーゼが、Cas9またはCas9由来酵素である、本発明1051の方法。

[本発明1053]

前記RNA誘導型ヌクレアーゼが、アセンブリの前に、熱不活性化されるか、または除去される、本発明1051の方法。

[本発明1054]

(d) 前記組換え核酸による宿主細胞の形質転換を更に含む、本発明1051の方法。

[本発明1055]

前記核酸が、宿主細胞から単離されたプラスミドである、本発明1051の方法。

[本発明1056]

前記プラスミドが少なくとも6kbである、本発明1055の方法。

[本発明1057]

前記プラスミドが少なくとも10kbである、本発明1055の方法。

[本発明 1 0 5 8]

前記プラスミドが少なくとも 1 5 k b である、本発明 1 0 5 5 の方法。

[本発明 1 0 5 9]

前記プラスミドが少なくとも 2 0 k b である、本発明 1 0 5 5 の方法。