

【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】令和 2 年 6 月 18 日 (2020.6.18)

【公表番号】特表 2019-516378 (P2019-516378A)

【公表日】令和 1 年 6 月 20 日 (2019.6.20)

【年通号数】公開・登録公報 2019-023

【出願番号】特願 2018-560571 (P2018-560571)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 Q 1/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/63 Z N A Z

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 N 15/09 1 0 0

C 1 2 N 15/09 1 1 0

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 5 月 7 日 (2020.5.7)

【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】

宿主細胞のゲノムに 1 つまたは複数の外因性ドナー核酸を組み込むための方法であって

、

(a 1) または (a 2) のいずれか：

(a 1) 宿主細胞のゲノム中に組み込まれた 1 つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッドを含む宿主細胞であって、各外因性ランディングパッドは、上流ランディングパッド相同配列 (ULP) と下流ランディングパッド相同配列 (DLP) との間に位置するヌクレアーゼ標的配列 (NTS) を含む、宿主細胞を、

(i) 1つまたは複数の第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドであって、各第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドは、5' から 3' 方向に、

(1) 1つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッドのいずれかの任意の (ULP) と相同組換えが可能な上流ライブラリー配列 (UL) ;

(2) 第 1 の目的の核酸、および

(3) 第 1 のリンカー配列

を含む、第 1 のコンポーネントポリヌクレオチド ;

(i i) 1つまたは複数の最後のコンポーネントポリヌクレオチドであって、各最後のコンポーネントポリヌクレオチドは、5' から 3' 方向に、

(1) 最後のリンカー配列 ;

(2) 最後の目的の核酸 ; および

(3) 1つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッドのいずれかの任意の (DLP) で、相同組換えが可能な下流ライブラリー配列 (DL) 、を含む、最後のコンポーネントポリヌクレオチドと接触させる工程であって、

1つまたは複数の第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドの任意の第 1 のリンカー配列は、1つまたは複数の最後のコンポーネントポリヌクレオチドの任意の最後のリンカー配列と相同組換えが可能である、工程 ; または

(a 2) 宿主細胞のゲノム中に組み込まれた 1つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッドを含む宿主細胞であって、各外因性ランディングパッドは、上流ランディングパッド相同配列 (ULP) と下流ランディングパッド相同配列 (DLP) との間に位置するヌクレアーゼ標的配列 (NTS) を含む、宿主細胞を、

(i) 1つまたは複数の第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドであって、各第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドは、5' から 3' 方向に、1つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッドの任意の (ULP) と相同組換えが可能な上流ライブラリー配列 (UL) 、 D_0 群から選択される任意の DNA セグメント、リンカー配列 LB_0 を含む、第 1 のコンポーネントポリヌクレオチド ;

(i i) 1つまたは複数の中間コンポーネントポリヌクレオチドであって、各中間コンポーネントポリヌクレオチドは、5' から 3' 方向に、第 1 のリンカー配列 LA_n 、 D_n 群から選択される任意の DNA セグメント、第 2 のリンカー配列 LB_n を含み、 n は、1 から中間コンポーネントポリヌクレオチドの数までの整数を表す、中間コンポーネントポリヌクレオチド ; および

(i i i) 1つまたは複数の最後のコンポーネントポリヌクレオチドであって、各最後のコンポーネントポリヌクレオチドは、5' から 3' 方向に、リンカー配列 LA_m 、 D_m 群から選択される任意の DNA セグメント、および 1つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッドの任意の (DLP) と相同組換えが可能な下流ライブラリー配列 (DL) を含む、最後のコンポーネントポリヌクレオチドと接触させる工程であって、

各リンカー配列 $LB_{(p-1)}$ は、リンカー配列 LA_p と相同組換えが可能であり、 n は、 $1 \sim (m-1)$ の様々な整数であり、 p は、 $1 \sim m$ の整数を表し、各 D_0 群、 \dots D_n 群、 \dots D_m 群、は、独立して、1つまたは複数の DNA セグメントからなる、工程 ; および

(b) (NTS) に結合し、1つまたは複数の (x) 外因性ランディングパッド内の部位を切断することが可能な、1つまたは複数のヌクレアーゼ (N) ; および

(c) 接触させた宿主細胞から生成した宿主細胞を回収する工程 ;
を含む、

(a 1) について、1つまたは複数の第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドからの第 1 のコンポーネントポリヌクレオチドと、1つまたは複数の最後のコンポーネントポリヌクレオチドからの最後のコンポーネントポリヌクレオチドとの任意の組合せが、インビトロでそれらのリンカー配列を介して相同組換えされ、該組合せが、各ランディングパッド周

辺のゲノム配列から独立して、1つまたは複数の(x)外因性ランディングパッドのいずれかにおいて組み込まれ、xは、少なくとも1の整数であり；

(a 2) について、1つまたは複数の第1のコンポーネントポリヌクレオチドからの第1のコンポーネントポリヌクレオチド、1つまたは複数の中間コンポーネントポリヌクレオチドからの中間コンポーネントポリヌクレオチド、および1つまたは複数の最後のコンポーネントポリヌクレオチドからの最後のコンポーネントポリヌクレオチドの任意の組合せが、インピボでそれらのリンカー配列を介して相同組換えされ、該組合せが、各ランディングパッド周辺のゲノム配列から独立して、1つまたは複数の(x)外因性ランディングパッドのいずれかにおいて組み込まれ、xは、少なくとも1の整数である、方法。

【請求項2】

(a 1) について、2つ以上の第1のコンポーネントポリヌクレオチドが、互いに同一な上流ライブラリー配列(UL)、および互いに同一な第1のリンカー配列を含み；1つまたは複数の最後のコンポーネントポリヌクレオチドが、互いに同一な最後のリンカー配列、および互いに同一な下流ライブラリー配列(DL)を含み；

(a 2) について、2つ以上の第1のコンポーネントポリヌクレオチドが、互いに同一な上流ライブラリー配列(UL)、および互いに同一なリンカー配列LB₀を含み；2つ以上の中間コンポーネントポリヌクレオチドが、互いに同一な第1のリンカー配列LA_n、および互いに同一な第2のリンカー配列LB_nを含み；2つ以上の最後のコンポーネントポリヌクレオチドが、互いに同一なリンカー配列LA_m、および互いに同一な下流ライブラリー配列(DL)を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(ULP)および(DLP)の各々が、約20ヌクレオチド～約5,000ヌクレオチド長、約25ヌクレオチド～約1000ヌクレオチド長、約25ヌクレオチド～約500ヌクレオチド長、または約100ヌクレオチド～約500ヌクレオチド長を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

宿主細胞が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の外因性ランディングパッドを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

1つまたは複数の外因性ランディングパッドが、宿主細胞のゲノム中の選択されたニュートラルな遺伝子座において組み込まれている、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

1つまたは複数の外因性ランディングパッドが、宿主細胞のゲノム中の遺伝子間領域において組み込まれている、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

宿主細胞が、宿主細胞のゲノム中に組み込まれた少なくとも1つの二次ランディングパッド、二次上流ランディングパッド相同配列と二次下流ランディング相同性パッド配列との間に位置する二次ヌクレアーゼ標的配列を含む二次ランディングパッドをさらに含み、

(a) 二次上流ランディングパッド配列は、1つまたは複数の外因性ランディングパッドの(ULP)とは異なっているか；

(b) 二次下流ランディングパッド配列は、1つまたは複数の外因性ランディングパッドの(DLP)とは異なっているか；

(c) 二次ヌクレアーゼ標的配列は、1つまたは複数の外因性ランディングパッドの(NTS)とは異なっているか；または

(d) それらの任意の組合せである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

(ULP)または(DLP)のいずれかまたは両方のヌクレオチド配列が、宿主細胞のゲノムの内因性ゲノム配列に実質的な相同性を有さないランダムに生成したヌクレオチド配列が

ら得られる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

(ULP) または (DLP) のいずれかまたは両方のヌクレオチド配列が、宿主細胞のゲノム中に存在しない、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

外因性ランディングパッドの各々が、上流内因性ゲノム配列と (ULP) の 5' 領域との間に位置するインシュレーター配列、(DLP) の 3' 領域と下流内因性ゲノム配列との間に位置するインシュレーター配列、または両方の配置に位置するインシュレーター配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

各第 1 のコンポーネントポリヌクレオチド、中間コンポーネントポリヌクレオチド、および最後のコンポーネントポリヌクレオチドが、追加の機能的なエレメントを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

追加の機能的なエレメントが、バーコード、(NTS) と異なる二次ヌクレアーゼ標的部位、シス調節エレメントのための DNA 結合部位、またはそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

宿主細胞が、真菌細胞、細菌細胞、植物細胞、および動物細胞からなる群から選択される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

真菌細胞が、サッカロマイセス・セレビシエ細胞である、請求項 13 に記載の方法。