

【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

、  
(a1) または (a2) のいずれか：

(a1) 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；

(ii) 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

(a2) 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<sub>0</sub>群から選択される任意のDNAセグメント、リンカー配列L<sub>B<sub>0</sub></sub>を含む、第1のコンポーネントポリヌクレオチド；

(ii) 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L<sub>A<sub>n</sub></sub>、D<sub>n</sub>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L<sub>B<sub>n</sub></sub>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

(iii) 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L<sub>A<sub>m</sub></sub>、D<sub>m</sub>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L<sub>B<sub>(p-1)</sub></sub>は、リンカー配列L<sub>A<sub>p</sub></sub>と相同組換えが可能であり、nは、1～(m-1)の様々な整数であり、pは、1～mの整数を表し、各D<sub>0</sub>群、…D<sub>n</sub>群、…D<sub>m</sub>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；  
を含み、

(a1) 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、インビボでこ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；

(a2)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、インビ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】

(a1)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；

(a2)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LB<sub>0</sub>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<sub>n</sub>、および互いに同一な第2のリンカー配列LB<sub>n</sub>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<sub>m</sub>、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か

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。