

【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20年10月30日(2008.10.30)

【公表番号】特表2008-512998(P2008-512998A)

【公表日】平成20年5月1日(2008.5.1)

【年通号数】公開・登録公報2008-017

【出願番号】特願2007-531743(P2007-531743)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 R 1/19 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 21/02 G

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19

【手続補正書】

【提出日】平成20年9月8日(2008.9.8)

【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】

天然に存在しないバクテリア細胞であって：

i) 発現が調節されるべきタンパク質をコードし、且つ動作可能にこれに結合された D N A 配列と、

i i) R N A I I 配列またはその一部を模倣し、且つ C o l E 1 複製開始点を備えたプラスミドから転写可能な R N A I 配列に対して相補的な R N A 配列をコードする D N A 配列と

を含んだバクテリア細胞。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のバクテリア細胞であって、そのゲノムに組み込まれた前記 D N A 配列 i) および i i) を含むバクテリア細胞。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のバクテリア細胞であって、前記 D N A 配列 i) は、前記細胞に対して外来の D N A 配列であるバクテリア細胞。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のバクテリア細胞であって、前記外来 D N A 配列 i) が、前記細胞に対して致死的または毒性であるタンパク質をコードするバクテリア細胞。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のバクテリア細胞であって、前記外来 D N A 配列 i) が、誘導性プロモータの制御下にあるバクテリア細胞。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のバクテリア細胞であって、前記外来 D N A 配列 i) は、それ自身が、

または毒性物質を発生させることによって、前記細胞に対して致命的または毒性であるタンパク質をコードするバクテリア細胞。

【請求項 7】

請求項 4 に記載のバクテリア細胞であって、前記外来 DNA 配列 i) は、前記細胞の増殖に不可欠な必須遺伝子の転写を抑制することによって、前記バクテリア細胞に対して致命的または毒性であるリプレッサタンパク質をコードするバクテリア細胞。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のバクテリア細胞であって、前記必須遺伝子がプロモータに対して動作可能に連結されるように操作され、該プロモータは、前記リプレッサタンパク質によって認識され且つ特異的に結合される DNA 配列を含んだバクテリア細胞。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のバクテリア細胞であって、前記必須遺伝子に連結された前記プロモータが誘導性であるバクテリア細胞。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のバクテリア細胞であって、前記誘導性プロモータは、請求項 5 の誘導性プロモータとは独立に誘導可能であるバクテリア細胞。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のバクテリア細胞であって、前記 DNA 配列 i i) が、前記 DNA 配列 i) のリボゾーム結合部位と開始コドンの間に挿入されるバクテリア細胞。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のバクテリア細胞であって、前記 DNA 配列 i) および前記 DNA 配列 i i) は、それらが融合タンパク質をコードするように連結されるバクテリア細胞。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のバクテリア細胞であって、前記 DNA 配列 i) および前記 DNA 配列 i i) が翻訳によって結合されるバクテリア細胞。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 の何れか 1 項に記載のバクテリア細胞であって、ColE1 複製開始点を備えたプラスミドを複製する能力を有するバクテリア細胞。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のバクテリア細胞であって、それが大腸菌細胞であるバクテリア細胞。

【請求項 16】

宿主ベクター系であって、

a) ColE1 複製開始点を備えたプラスミドと；

b) その中で前記プラスミド a) を複製することができるバクテリア宿主細胞とを含んでなり、

該宿主細胞は、

i) その発現が調節されるべきタンパク質をコードし、且つ動作可能にこれに結合された DNA 配列；および

ii) RNAI 配列またはその一部を模倣し、且つ前記プラスミド a) から転写可能な RNAI 配列に対して相補的な RNA 配列をコードする DNA 配列を含み、

前記 ii) に定義された RNA 配列は、前記プラスミド a) の不存在下で前記タンパク質の発現を可能にし、

また前記プラスミド a) が前記宿主細胞 b) の中に存在するときに、前記プラスミドから転写された前記 RNAI 分子は、ii) で定義された RNA 配列とハイブリダイズし、それによって前記タンパク質の発現が抑制される宿主ベクター系。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の宿主ベクター系であって、前記バクテリア宿主細胞 b) は、請求項 2 ~ 13 および請求項 15 の何れか 1 項に定義したバクテリア細胞である宿主ベクター

系。

【請求項 18】

請求項 16 または 17 に記載の宿主ベクター系であって、前記外来 DNA 配列 i) は、前記バクテリア細胞に対して致死性的または毒性であるタンパク質をコードし、また i i) に定義された前記 RNA 配列は、前記プラスミド a) の不存在下において、前記宿主細胞の増殖が完全にまたは部分的に阻害されるように前記致死性的または毒性のタンパク質の発現を可能にし、また前記プラスミド a) が前記宿主細胞の内部に存在するときは、前記プラスミドから転写された RNA I 分子が、i i) で定義した前記 RNA 配列とハイブリダイズし、それにより前記致死性的または毒性のタンパク質の発現が抑制されて、前記プラスミドを有する細胞において前記完全なまたは部分的な増殖阻害が抑制される宿主ベクター系。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の宿主ベクター系であって、前記プラスミド a) が、更に興味ある遺伝子を含んでいる宿主ベクター系。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の宿主ベクター系であって、前記興味ある遺伝子が治療用遺伝子である宿主ベクター系。

【請求項 21】

請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の宿主ベクター系であって、前記プラスミドが p U C プラスミドである宿主ベクター系。

【請求項 22】

プラスミド DNA を製造する方法であって：

i) 請求項 4 のバクテリア宿主細胞の集団を、C o l E 1 複製開始点を有し、且つ前記バクテリア宿主細胞内で前記プラスミドから発現されない興味ある遺伝子を含んだプラスミドを用いて形質転換する工程と、

i i) 前記バクテリア宿主細胞ポピュレーションを、前記致死性的または毒性のタンパク質が前記細胞内で発現される条件下において増殖させ、それによって前記タンパク質の発現は、前記プラスミドを含む細胞が前記プラスミドフリーの細胞よりも速く増殖するように、前記プラスミドフリーの細胞の増殖を完全にまたは部分的に阻害する工程と、

i i i) プラスミドを含む細胞を回収する工程と、

i v) 前記プラスミド DNA を単離および精製する工程と
を含んでなる方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法であって、前記興味ある遺伝子が、哺乳類における発現を可能にする真核細胞プロモーターに動作可能に結合された治療用遺伝子である方法。

【請求項 24】

興味あるタンパク質を製造する方法であって：

i) 請求項 4 のバクテリア宿主細胞の集団を、C o l E 1 複製開始点を有し、且つ前記バクテリア宿主細胞内で前記タンパク質の発現を可能にする原核性プロモーターの制御下にある興味あるタンパク質をコードする DNA 配列を含んだプラスミドを用いて形質転換する工程と、

i i) 前記バクテリア宿主細胞ポピュレーションを、前記致死性的または毒性のタンパク質が前記細胞内で発現される条件下において増殖させ、それによって前記タンパク質の発現は、前記プラスミドを含む細胞が前記プラスミドフリーの細胞よりも速く増殖するように、前記プラスミドフリーの細胞の増殖を完全にまたは部分的に阻害する工程と、

i i i) 前記興味あるタンパク質を回収する工程と、

i v) それを単離および精製する工程と
を含んでなる方法。

【請求項 25】

請求項 22 または 24 に記載の方法であって、前記プラスミドが p U C プラスミドであ

る方法。

【請求項 26】

バクテリア宿主細胞内で興味あるタンパク質を発現するプラスミドであって、前記プラスミドはマーカー遺伝子を持たず、且つ

a) C o l E 1 複製開始点；および

b) 原核性プロモーターの制御下にある興味あるタンパク質をコードするDNA配列を含んでなるプラスミド。

【請求項 27】

マーカー遺伝子を持たず、且つ

a) C o l E 1 複製開始点；および

b) プロモーターの制御下にある興味あるタンパク質をコードするDNA配列（前記プロモーターはバクテリア宿主細胞内で前記タンパク質を発現させない）を含んでなるプラスミド。

【請求項 28】

請求項 27 に記載のプラスミドであって、前記興味あるタンパク質が治療用タンパク質であり、且つ前記プロモーターは哺乳類における発現を可能にする真核細胞プロモーターであるプラスミド。