

【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28年7月21日 (2016.7.21)

【公表番号】特表2015-523066(P2015-523066A)

【公表日】平成27年8月13日 (2015.8.13)

【年通号数】公開・登録公報2015-051

【出願番号】特願2015-515191(P2015-515191)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 14/255 (2006.01)

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 1 2 N 1/11 (2006.01)

C 1 2 N 1/13 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 14/255

C 0 7 K 14/435

C 1 2 N 1/11

C 1 2 N 1/13

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 P 21/02 Z

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月30日 (2016.5.30)

【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】

F l g M 核酸配列と、切断部位と、制御可能な転写調節エレメント (T C E) と、対象核酸配列と、を含むコンストラクトであって、
前記対象核酸配列が対象ペプチドをコードしており、且つ
前記制御可能な T C E が、テトラサイクリン、ドキシサイクリン又はアラビノース誘導性プロモーターである、前記コンストラクト。

【請求項 2】

精製タグをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 1 に記載のコンストラクト。

【請求項 3】

前記精製タグがポリヒスチジン、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、M y c、H A、F L A G 又はマルトース結合タンパク質である、請求項 2 に記載のコンストラクト。

【請求項 4】

前記 F l g M 核酸配列が野生型 F l g M である、請求項 1 ~ 3 の何れかに記載のコンストラクト。

【請求項 5】

前記切断部位がタバコエッチウイルス (T E V) プロテアーゼ切断部位又はエンテロキナーゼ (E T K) 切断部位である、請求項 1 ~ 4 の何れかに記載のコンストラクト。

【請求項 6】

前記対象核酸配列が、システインリッチペプチドをコードする、請求項 1 ~ 5 の何れかに記載のコンストラクト。

【請求項 7】

前記システインリッチペプチドが向神経活性毒素である、請求項 6 に記載のコンストラクト。

【請求項 8】

前記向神経活性毒素がコノペプチドである、請求項 7 に記載のコンストラクト。

【請求項 9】

前記コノペプチドが μ - コノトキシンである、請求項 8 に記載のコンストラクト。

【請求項 10】

前記 μ - コノトキシンが S I I I A である、請求項 9 に記載のコンストラクト。

【請求項 11】

(a) 前記切断部位が、前記 F l g M 核酸配列と前記対象核酸配列との間にあるか、
(b) 前記配列の順序が、前記制御可能な T C E 、前記 F l g M 核酸配列、前記精製タグをコードする核酸配列、前記切断部位および前記対象核酸配列であるか、
(c) 前記配列の順序が、前記制御可能な T C E 、前記精製タグをコードする核酸配列、前記 F l g M 核酸配列、前記切断部位および前記対象核酸配列であるか、或いは
(d) 前記精製タグをコードする核酸配列が、対象核酸配列に対して C 末端にある、
請求項 1 ~ 10 の何れかに記載のコンストラクト。

【請求項 12】

前記前記制御可能な T C E が P_{araBAD} プロモーターである、請求項 1 ~ 11 の何れかに記載のコンストラクト。

【請求項 13】

F l g M と、切断部位と、対象ペプチドと、精製タグとを含むポリペプチド。

【請求項 14】

前記精製タグがポリヒスチジン、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、M y c 、H A 、F L A G 又はマルトース結合タンパク質である、請求項 13 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

前記 F l g M が野生型 F l g M である、請求項 13 又は 14 に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

前記切断部位が T E V プロテアーゼ切断部位又は E T K 切断部位である、請求項 13 ~ 15 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 17】

前記対象ペプチドがシステインリッチペプチドである、請求項 13 ~ 16 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 18】

前記システインリッチペプチドが向神経活性毒素である、請求項 17 に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

前記向神経活性毒素がコノペプチドである、請求項 18 に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

前記コノペプチドが μ - コノトキシンである、請求項 19 に記載のポリペプチド。

【請求項 21】

前記 μ - コノトキシンが S I I I A である、請求項 20 に記載のポリペプチド。

【請求項 22】

(a) 前記切断部位が前記 F l g M と前記対象ペプチドとの間にあるか、

(b) 前記 F l g M が前記精製タグに対して N 末端にあり、前記精製タグが前記切断部位に対して N 末端にあり、前記切断部位が前記対象ペプチドに対して N 末端にあるか、

(c) 前記精製タグが、F l g M に対して N 末端にあり、F l g M が前記切断部位に対して N 末端にあり、前記切断部位が前記対象ペプチドに対して N 末端にあるか、或いは

(d) 前記精製タグが前記対象ペプチドに対して C 末端にある

請求項 13 ~ 21 の何れかに記載のポリペプチド。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 12 の何れかに記載のコンストラクトを含む、組み換え細胞株。

【請求項 24】

前記細胞株が、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 血清型チフムリウム (*Typhimurium*) の野生型株由来である、請求項 23 に記載の組み換え細胞株。

【請求項 25】

前記組み換え細胞株のゲノムが、1 以上のフラジェリンまたはフック付随タンパク質遺伝子に対する改変を含む、請求項 23 または 24 に記載の組み換え細胞株。

【請求項 26】

前記 1 以上のフラジェリン遺伝子が、f l g K、f l g L、f l i C、f l j B および f l i D からなる群から選択される、請求項 25 に記載の組み換え細胞株。

【請求項 27】

前記細胞株が、鞭毛 F l h D 4 C 2 マスター制御タンパク質複合体の 1 以上の阻害剤に対する改変を含む、請求項 23 ~ 26 の何れかに記載の組み換え細胞株。

【請求項 28】

鞭毛 F l h D 4 C 2 マスター制御タンパク質複合体の前記阻害剤が、f i m Z、s r g D、h d f R、r b s R、o m p R、c l p X、c l p P、l r h A、y d i V、d s k A、e c n R、f l i T および r c s B からなる群から選択される、請求項 27 に記載の組み換え細胞株。

【請求項 29】

F l g M T 3 S - シャペロン遺伝子 f l i A の転写または翻訳を向上させるための突然変異を含む、請求項 23 ~ 28 の何れかに記載の組み換え細胞株。

【請求項 30】

対象ペプチドを製造する方法であって、培地中で請求項 23 ~ 29 の何れかに記載の細胞株を培養する工程、及び

前記培地から前記対象ペプチドを精製する工程を含む、前記方法。

【請求項 31】

前記対象ペプチドを精製する工程が、アフィニティーカラムの使用を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記アフィニティーカラムが ²⁸アフィニティーカラムである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞株が、前記対象ペプチドを含むポリペプチドを分泌させるために、サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 血清型チフムリウム (*Typhimurium*) の鞭毛 I I I 型分泌 (T 3 S) 系を含む、請求項 30 ~ 32 の何れかに記載の方法。