

【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24年6月7日(2012.6.7)

【公表番号】特表2011-517929(P2011-517929A)

【公表日】平成23年6月23日(2011.6.23)

【年通号数】公開・登録公報2011-025

【出願番号】特願2010-541633(P2010-541633)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

A 6 1 K 35/76 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

A 6 1 K 35/76

A 6 1 P 35/00

【手続補正書】

【提出日】平成24年4月16日(2012.4.16)

【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】

嫌気性細菌を形質転換するための、該嫌気性細菌において複製されるが大腸菌において複製されないプラスミドベクターであって、該嫌気性細菌において機能するが大腸菌において機能しない少なくとも 1 つのプラスミド複製ユニット、および目的とする活性を有する蛋白質をコードする DNA ならびに嫌気性細菌で機能するプロモーターおよびターミネーターを含む DNA 断片を含む蛋白質発現ユニットを含む、前記プラスミドベクター。

【請求項 2】

プラスミド複製ユニットが、ビフィドバクテリウム属細菌、ラクトバチルス属細菌、エンテロコッカス属細菌、ストレプトコッカス属細菌およびクロストリジウム属細菌からなる群より選ばれる嫌気性細菌のプラスミド複製ユニットである、請求項 1 に記載のプラスミドベクター。

【請求項 3】

プラスミド複製ユニットが、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプラスミド複製ユニットである、請求項 2 に記載のプラスミドベクター。

【請求項 4】

ビフィドバクテリウム属細菌で機能するプラスミド複製ユニットが、O r i V 領域および R e p B 遺伝子を含む p T B 6 r e p ユニットである、請求項 3 に記載のプラスミドベクター。

【請求項 5】

O r i V 領域および R e p B 遺伝子を含む p T B 6 r e p ユニットをコードする遺伝子が、配列番号 4 の 1 7 9 6 番目から 3 3 9 1 番目の塩基配列で示される DNA またはその一塩基変異多形である、請求項 4 に記載のプラスミドベクター。

【請求項 6】

目的とする活性を有する蛋白質が、(a) 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質、または(b) 抗腫瘍活性を有する蛋白質である、請求項1に記載のプラスミドベクター。

【請求項7】

目的とする活性を有する蛋白質が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質である、請求項6に記載のプラスミドベクター。

【請求項8】

抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよび - グルクロニダーゼからなる群より選ばれる一種である、請求項7に記載のプラスミドベクター。

【請求項9】

抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシン・デアミナーゼである、請求項8に記載のプラスミドベクター。

【請求項10】

配列番号4の塩基配列で示されるDNA配列を含む、請求項9に記載のプラスミドベクター(pBifCD)。

【請求項11】

嫌気性細菌を形質転換するための、該嫌気性細菌において複製されるが大腸菌において複製されない、該嫌気性細菌において機能するが大腸菌において機能しない少なくとも1つのプラスミド複製ユニットを含むプラスミドベクターの作製方法であって、(1)嫌気性細菌で機能するプラスミド複製ユニットおよび大腸菌で機能するプラスミド複製ユニットと、(2)目的とする活性を有する蛋白質をコードするDNAならびに前記嫌気性細菌で機能するプロモーターおよびターミネーターを含むDNA断片を含む蛋白質発現ユニットとを含む、前記嫌気性細菌と大腸菌とで相互複製されるシャトルプラスミドを作製すること、および該シャトルプラスミドから、大腸菌で機能するプラスミド複製ユニットを除去することを含む、前記プラスミドベクターの作製方法。

【請求項12】

請求項1～10のいずれかに記載のプラスミドベクターで形質転換された嫌気性細菌を含む、遺伝子輸送担体。

【請求項13】

嫌気性細菌が、ビフィドバクテリウム属細菌、ラクトバチルス属細菌、エンテロコッカス属細菌、ストレプトコッカス属細菌およびクロストリジウム属細菌からなる群より選ばれる、請求項12に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項14】

嫌気性細菌が、ビフィドバクテリウム属細菌である、請求項13に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項15】

ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・アニマリス、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、およびビフィドバクテリウム・ブレベからなる群より選ばれる、請求項14に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項16】

ビフィドバクテリウム属細菌が、ビフィドバクテリウム・ロンガムである、請求項15に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項17】

嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、(a) 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質、または(b) 抗腫瘍活性を有する蛋白質を発現することができる、請求項12に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項18】

嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質を発現することができる、請求項 17 に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項 19】

遺伝子輸送担体が、*ビフィドバクテリウム・ロンガム* 105 - A / *pBif i C D* (独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター受託番号: N I T E B P - 491) である、請求項 18 に記載の遺伝子輸送担体。

【請求項 20】

請求項 12 ~ 19 のいずれかに記載の遺伝子輸送担体を含有する、医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

すなわち本発明は、

[1] 嫌気性微生物で機能するプラスミドベクターであって、大腸菌で機能するプラスミド複製ユニットを含まない発現ベクター、

[2] 嫌気性微生物が、大腸菌以外の腸内細菌である [1] 記載の発現ベクター、

[3] 大腸菌以外の腸内細菌が、*ビフィドバクテリウム* 属細菌、*ラクトバチルス* 属細菌、*エンテロコッカス* 属細菌、*ストレプトコッカス* 属細菌および *クロストリジウム* 属細菌からなる群より選ばれる [2] 記載の発現ベクター、

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

[16] 嫌気的環境下にある疾患の治療活性を有する蛋白質が、抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質である、[15] 記載の発現ベクター、

[17] 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよび - グルクロニダーゼからなる群より選ばれる、

[16] 記載の発現ベクター、

[18] 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシン・デアミナーゼである、[17] 記載の発現ベクター、

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

[36] 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシン・デアミナーゼ、ニトロリダクターゼおよび - グルクロニダーゼからなる群から選ばれる、

[35] に記載の遺伝子輸送担体、

[37] 抗腫瘍物質前駆体を抗腫瘍物質に変換する活性を有する蛋白質が、シトシン・デアミナーゼである、[36] に記載の遺伝子輸送担体、

および、

[38] 遺伝子輸送担体が、*ビフィドバクテリウム・ロンガム* 105 - A / *pBif i C D* (独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター (N P M D) 受託番号: N I T E B P - 491) である、[37] に記載の遺伝子輸送担体に関する。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

本発明の発現ベクターは、嫌気性菌、特に、大腸菌以外の腸内細菌、例えば、ビフィドバクテリウム属細菌、ラクトバチルス属細菌、エンテロコッカス属細菌、ストレプトコッカス属細菌、クロストリジウム属細菌等で機能するプラスミドベクターであって、当該形質転換菌以外の菌、特に大腸菌で機能するプラスミド複製ユニットを具有しない発現ベクターである。

より具体的には、例えば、(1)大腸菌以外の嫌気性微生物で機能するプラスミド複製ユニットと、(2)目的とする活性を有する蛋白質をコードするDNAならびに嫌気性微生物で機能するプロモーターおよびターミネーターを含むDNA断片を含む蛋白質発現ユニットとを含み、且つ、当該形質転換菌以外の菌、特に大腸菌で機能するプラスミド複製ユニットを含まない発現ベクターである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

本発明のベクターは、例えば、大腸菌以外の嫌気性微生物で機能するプラスミド複製ユニットと、目的とする活性を有する蛋白質をコードするDNAおよび嫌気性微生物で機能するプロモーター並びにターミネーターを含むDNA断片を含む蛋白質発現ユニットと、選択マーカー活性遺伝子ユニットを含み、嫌気性微生物に形質転換した場合にその嫌気性微生物内において機能するもので、形質転換菌以外の菌、特に大腸菌で機能するプラスミド複製ユニットを含まないプラスミドであればいかなるものも含まれる。