

【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9月29日(2016.9.29)

【公表番号】特表2015-512645(P2015-512645A)

【公表日】平成27年4月30日(2015.4.30)

【年通号数】公開・登録公報2015-029

【出願番号】特願2015-504688(P2015-504688)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 1 2 P 7/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

C 1 2 P 7/04

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

C 1 2 N 9/16

C 1 2 N 9/00

【手続補正書】

【提出日】平成28年8月5日(2016.8.5)

【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】

SEQ ID NO: 7に対して少なくとも約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む変異型カルボン酸レダクターゼ(CAR)ポリペプチドであって、アミノ酸位置3、18、20、22、80、87、191、288、473、535、750、827、870、873、926、927、930および1128からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの突然変異を有するように遺伝子操作された、変異型CARポリペプチド。

【請求項2】

組換え宿主細胞における前記変異型CARポリペプチドの発現が、対応する野生型ポリペプチドを発現する宿主細胞と比較してより高い力価の脂肪アルコール組成物をもたらす、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項3】

CARポリペプチドがCarBポリペプチドである、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項4】

S3R、D18R、D18L、D18T、D18P、E20V、E20S、E20R、S22R、S22N、S22G、L80R、R87G、R87E、V191S、F288R、F288S、F288G、Q473L、Q473W、Q473Y、Q473I、Q473H、A535S、D750A、R827C、R827A、I870L、R873S、V926A、V926E、S927K、S927G、M930K、M930RおよびL1128Wからなる群より選択される突然変異を含む、請求項1記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項5】

突然変異A535Sを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項6】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473IおよびA535Sを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項7】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927Gを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項8】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827AおよびS927Gを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項9】

変異型ポリペプチドが突然変異S3R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項10】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R873S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項11】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項12】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、S927KおよびM930Rを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項13】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、F288G、Q473I、A535S、R827C、V926E、M930KおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項14】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、V926A、S927KおよびM930Rを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項15】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535SおよびR827Cを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項16】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827CおよびM930Rを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項17】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870L、S927GおよびM930Rを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項18】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、I870LおよびS927Gを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項19】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、V926AおよびS927Gを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 0】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870LおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 1】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 2】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 3】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 4】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、I870L、S927GおよびM930Kを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 5】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、F288G、Q473I、A535S、I870L、M930Kを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 6】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、S927G、M930KおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 7】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927GおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 8】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870LおよびS927Gを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 2 9】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、R827C、I870L、S927GおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3 0】

変異型ポリペプチドが突然変異D18R、E20R、S22R、F288G、Q473I、A535S、S927G、M930RおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3 1】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、V926E、S927GおよびM930Rを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3 2】

変異型ポリペプチドが突然変異E20R、S22R、F288G、Q473H、A535S、R827C、I870L、V926AおよびL1128Wを含む、請求項4記載の変異型CARポリペプチド。

【請求項 3 3】

SEQ ID NO : 7に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ、アミノ酸位置3、18、20、22、80、87、191、288、473、535、750、827、870、873、926、927、930および1128からなる群より選択されるアミノ酸位置に少なくとも1つの突然変異を有する変異型カルボン酸レダクターゼ (CAR) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞であって、該組換え宿主細胞が、炭素源を含有する培地中で、該変異型CARポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞よりも高い力価または収量で脂肪アルコール組成物を産生する、組換え宿主細胞。

【請求項 3 4】

SEQ ID NO : 7が前記対応する野生型CARポリペプチドである、請求項33記載の組換え宿

主細胞。

【請求項 3 5】

チオエステラーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項33記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 6】

FabBポリペプチドおよびFadRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項35記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 7】

前記組換え宿主細胞が、該組換え宿主細胞と同じ条件下で培養した場合の前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する宿主細胞の力価よりも少なくとも3倍高い力価を有する、請求項33記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 8】

約30g/L～約250g/Lの力価を有する、請求項37記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3 9】

約90g/L～約120g/Lの力価を有する、請求項38記載の組換え宿主細胞。

【請求項 4 0】

前記組換え宿主細胞が約10%～約40%までの収量を有する、請求項33記載の組換え宿主細胞。

【請求項 4 1】

請求項33記載の組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

【請求項 4 2】

前記対応する野生型CARポリペプチドを発現する細胞培養物の産生能よりも少なくとも3倍高い産生能を有する、請求項41記載の細胞培養物。

【請求項 4 3】

産生能が約0.7mg/L/hr～約3g/L/hrの範囲である、請求項42記載の細胞培養物。

【請求項 4 4】

培養培地が脂肪アルコール組成物を含む、請求項43記載の細胞培養物。

【請求項 4 5】

前記脂肪アルコール組成物が細胞外環境に分泌される、請求項44記載の細胞培養物。

【請求項 4 6】

前記脂肪アルコール組成物がC6、C8、C10、C12、C13、C14、C15、C16、C17、またはC18脂肪アルコールのうち1つまたは複数を含む、請求項45記載の細胞培養物。

【請求項 4 7】

前記脂肪アルコール組成物がC10:1、C12:1、C14:1、C16:1、またはC18:1不飽和脂肪アルコールを含む、請求項45記載の細胞培養物。

【請求項 4 8】

前記脂肪アルコール組成物がC₁₂およびC₁₄脂肪アルコールを含む、請求項45記載の細胞培養物。

【請求項 4 9】

前記脂肪アルコール組成物がC₁₂およびC₁₄脂肪アルコールを約3:1の比で含む、請求項48記載の細胞培養物。

【請求項 5 0】

前記脂肪アルコール組成物が不飽和脂肪アルコールを含む、請求項45記載の細胞培養物。

【請求項 5 1】

前記脂肪アルコール組成物が、脂肪アルコールの還元末端からC₇～C₈の間の炭素鎖における7番目の位置に二重結合を有する該脂肪アルコールを含む、請求項50記載の細胞培養物。

【請求項 5 2】

前記脂肪アルコール組成物が飽和脂肪アルコールを含む、請求項45記載の細胞培養物。

【請求項 5 3】

前記脂肪アルコール組成物が分枝鎖脂肪アルコールを含む、請求項45記載の細胞培養物

°

【請求項 5 4】

脂肪アルデヒドレダクターゼ (AlrA) をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項35記載の組換え宿主細胞。

【請求項 5 5】

請求項54記載の組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

【請求項 5 6】

脂肪アルコール組成物を高い力価、収量または産生能で製造する方法であって、

(a) 請求項1記載の組換え宿主細胞を遺伝子工学的に作製する段階；

(b) 炭素源を含む培地中で該組換え宿主細胞を培養する段階；および

(c) 任意で、該培地から該脂肪アルコール組成物を単離する段階を含む、方法。