

【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 4 年 1 月 6 日 (2022.1.6)

【公表番号】特表 2021-508496 (P2021-508496A)

【公表日】令和 3 年 3 月 11 日 (2021.3.11)

【年通号数】公開・登録公報 2021-013

【出願番号】特願 2020-555291 (P2020-555291)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/81 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 15/44 (2006.01)

C 1 2 N 15/90 (2006.01)

A 6 1 K 36/06 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/81 1 0 0 Z

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 N 15/44

C 1 2 N 15/90 1 0 2 Z

A 6 1 K 36/06

A 6 1 K 39/00 G

A 6 1 P 37/04

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 11 月 18 日 (2021.11.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 1 7 】

【表 4】

配列番号	名称
1	<i>K. ラクティス avt3::LAC9</i>
2	<i>PLAC4-12-LR2</i>
3	<i>KlpURA3-</i> ベクター
4	<i>KlpMET5-</i> ベクター
5	<i>LAC4-12-</i> プロモーター変種 <i>PLAC4-12</i>
6	<i>LAC4-12-</i> プロモーター変種 <i>PLAC4-12-LR2</i>
7	<i>LAC4-12-</i> プロモーター変種 <i>PLAC4</i>
8	<i>LAC4-12-</i> プロモーター変種 <i>PLAC4-LR2</i>
9	プライマー配列 VK183
10	プライマー配列 VK184
11	プライマー配列 MAB6
12	プライマー配列 VK71
13	プライマー配列 VK211
14	<i>PLAC4-12</i> からのBCR
15	プライマー配列 VK30
16	プライマー配列 VK31
17	プライマー配列 VK32
18	プライマー配列 VK33
19	プライマー配列 VK34
20	プライマー配列 VK35
21	<i>Klp3-</i> タンデム- <i>oVP2T2S</i>
22	プライマー配列 VK67
23	プライマー配列 VK69
24	プライマー配列 VK74
25	プライマー配列 VK75

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態 様 1)

クルイベロマイセス・ラクティス(*K. ラクティス*)株の酵母ゲノム内へ、異種抗原をコードする核酸の標的クローニングをするための該ラクティス株であって、*KILAC4*遺伝子座の代わりに又は追加して、*KIURA3-20*遺伝子座(*KLLA0E22771g*)に、及び / 若しくは*KIMET5-1*遺伝子座(*KLLA0B03938g*)に、該異種抗原のために組み込まれた発現カセットを有すること

を特徴とする、前記K.ラクティス株。

(態 様 2)

前記発現カセットは、K.ラクティスLAC4-12プロモーター($P_{LAC4-12}$)又は該プロモーターの変種であってLAC12及びLAC4の間の遺伝子間領域も含むもの、前記抗原をコードする領域、及びAgTEF1ターミネーターを有することを特徴とする、態様1記載のK.ラクティス株。

(態 様 3)

異種抗原をコードする核酸の複数のコピーが、得られるK.ラクティス株のKILAC4遺伝子座、若しくはKIURA3-20遺伝子座、若しくはKIMET5-1遺伝子座に、タンデム発現カセット又はマルチ発現カセットを介して挿入されていることを特徴とする、態様1又は2記載のK.ラクティス株。

(態 様 4)

前記異種抗原IBDV VP2の遺伝子が、前記K.ラクティス株の遺伝子座KILAC4に、タンデム発現カセットの形で存在することを特徴とする、態様1～3いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態 様 5)

異なる異種抗原をコードする核酸の1以上のコピーが、KILAC4遺伝子座、及び/若しくは、KIURA3-20遺伝子座、及び/若しくは、KIMET5-1遺伝子座に、シングル発現カセット、タンデム発現カセット又はマルチ発現カセットを介して挿入されていることを特徴とする、態様1～3いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態 様 6)

異種抗原インフルエンザA HA(A/プエルトリコ/8/1934(H1N1))及びインフルエンザA M1(A/プエルトリコ/8/1934(H1N1))をコードする遺伝子が、前記K.ラクティス株のKILAC4及びKIURA3-20遺伝子座に挿入されて、発現することを特徴とする、態様1～3及び5いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態 様 7)

前記K.ラクティス株は、前記ゲノム本来のKIGAL4遺伝子に加えて、追加で該KIGAL4遺伝子の第二の異所性コピーを含むことを特徴とする、態様1～6いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態 様 8)

前記KIGAL4遺伝子の異所性コピーは、KIGAL4プロモーター及びKIGAL4ターミネーターに隣接し、前記K.ラクティス株内の遺伝子座KLLA0E13795g(Klavt3::KIGAL4-1、配列番号:1)で組み込まれることを特徴とする、態様7記載のK.ラクティス株。

(態 様 9)

前記異種抗原IBDV VP2の遺伝子は、前記K.ラクティス株の遺伝子座KILAC4に存在することを特徴とする、態様1～8いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態 様 10)

前記K.ラクティス株は、非誘導条件下では異種タンパク質をわずかに又は全く発現しない、LAC4-12プロモーターを改変したプロモーター構造を有する、態様1～9いずれか1項記載のK.ラクティス株であって、-1065及び-1540の間のプロモーター $P_{LAC4-12}$ の基本制御領域(BCR)(LR2欠損; $P_{LAC4-12-LR2}$;配列番号:2)は削除されていることを特徴とする、前記K.ラクティス株。

(態 様 11)

前記異種抗原インフルエンザA HA(A/プエルトリコ/8/1934(H1N1))の遺伝子が、前記K.ラクティス株の遺伝子座KILAC4に存在することを特徴とする、態様10記載のK.ラクティス株。

(態 様 12)

異種タンパク質発現の調節を可能にする、前記LAC4-12プロモーターを改変したプロモーター構造を有する前記K.ラクティス株であって、該プロモーターのアクチベーターKIGa14(「上流活性化配列」1、2及び4、5)のための結合部位数が変動し、1、2、3又は4個のKI

Gal4結合部位が存在することを特徴とする、態様1～11いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態様13)

前記異種抗原IBDV VP2の遺伝子が、前記K.ラクティス株の遺伝子座KILAC4で挿入されることを特徴とする、態様1～12いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態様14)

前記対立遺伝子Kilac4、Klura3-20及びKlmet5-1の遺伝子機能が回復され、前記K.ラクティス株は原栄養性であることを特徴とする、態様1～13いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態様15)

前記異種抗原BVDV E2外部ドメイン(1型、CP7)、BVDV E2外部ドメイン(2型、ニューヨーク93)及びBVDV Npro-NS3(1型、CP7)の遺伝子が、前記K.ラクティス株の遺伝子座KILAC4、KIURA3-20、及びKIMet5-1に挿入されることを特徴とする、態様1～14いずれか1項記載のK.ラクティス株。

(態様16)

下記株から選択される、K.ラクティス株：

VAK952(受託番号:DSM32705)、

VAK1111(受託番号:DSM32696)、

VAK1118(受託番号:DSM32701)、

VAK1131(受託番号:DSM32700)、

VAK1171(受託番号:DSM32699)、

VAK1243(受託番号:DSM32702)、

VAK1283(受託番号:DSM32697)、

VAK1395(受託番号:DSM32706)、及び

VAK1400(受託番号:DSM32698)。

(態様17)

KlpURA3(配列番号:3)又はKlpMET5(配列番号:4)から選択される、組み込み型発現ベクター。

(態様18)

KlpMET5- P_{L4-12} -Et、KlpMET5- $P_{L4-12-LR2}$ -Et、KlpMET5- P_{L4} -Et、KlpMET5- P_{L4-LR2} -Etから、並びにKlpURA3- P_{L4-12} -Et、KlpURA3- $P_{L4-12-LR2}$ -Et、KlpURA3- P_{L4} -Et及びKlpURA3- P_{L4-LR2} -Et(配列番号:5、6、7又は8と組み合わせられた配列番号No.3、4)から選択される、組み込み型発現ベクター。

(態様19)

態様1～16いずれか1項記載のK.ラクティス株を作製する方法であって、下記ステップ：

(i)目的とする抗原の遺伝子配列をKlpURA3ベクター及び/又はKlpMET5ベクター内に挿入するステップ、

(ii)K.ラクティス培養体を、改変され、かつ予め酵素的に消化されたベクター構築物で形質転換するステップ、

(iii)ウラシル及び/又はメチオニンを含まない固形培地を利用して、形質転換したK.ラクティス細胞を選択するステップ、並びに

(iv)任意で原栄養性を回復するステップ、を含む、前記方法。

(態様20)

前記複数の抗原の遺伝子配列が、異所的に同時に挿入され、かつ制御されて発現することを特徴とする、態様19記載の方法。

(態様21)

1の病原体の異なる複数の変種の抗原をコードする異なる遺伝子配列が、異所的に挿入され、かつ制御されて発現することを特徴とする、態様20記載の方法。

(態 様 2 2)

異なる複数の病原体の抗原をコードする異なる遺伝子配列が、異所的に挿入され、かつ制御されて発現することを特徴とする、態様 2 0 記載の方法。

(態 様 2 3)

態様 1 ~ 1 6 いずれか 1 項記載の K.ラクティス株を含む、医薬組成物。

(態 様 2 4)

ワクチン接種に使用するための、態様 1 ~ 1 6 いずれか 1 項記載の K.ラクティス株。

(態 様 2 5)

予防ワクチン接種に使用するための、態様 1 ~ 1 6 いずれか 1 項記載の K.ラクティス株。

(態 様 2 6)

態様 1 ~ 1 6 いずれか 1 項記載の K.ラクティス株を、対象へ、該対象内で 1 以上の異種抗原に対する防御的免疫応答を引き起こすために十分な量で投与することを含む、ワクチン接種方法。

(態 様 2 7)

前記 K.ラクティス株は、皮下、筋肉内、又は、口 / 粘膜を通して投与されることを特徴とする、態様 2 4 若しくは 2 5 記載の K.ラクティス株、又は態様 2 6 記載の方法。

(態 様 2 8)

前記 K.ラクティス株は、病原体に対する防御的免疫応答を、1 回適用 / 免疫化 (「単回接種」) 又は 2 回適用 / 免疫化 (「プライムブースト」) で引き起こすことを特徴とする、態様 2 4 若しくは 2 5 記載の K.ラクティス株、又は態様 2 6 若しくは 2 7 記載の方法。

(態 様 2 9)

前記 K.ラクティス株は、1 の病原体の異なる複数の変種に対する交差防御的免疫応答を、1 回使用 / 免疫化 (「単回接種」) 又は 2 回適用 / 免疫化 (「プライムブースト」) で引き起こすことを特徴とする、態様 2 4 若しくは 2 5 記載の K.ラクティス株、又は態様 2 6 若しくは 2 7 記載の方法。

(態 様 3 0)

前記 K.ラクティス株は、異なる複数の病原体に対する防御的免疫応答を、1 回使用 / 免疫化 (「単回接種」) 又は 2 回適用 / 免疫化 (「プライムブースト」) で引き起こすことを特徴とする、態様 2 4 若しくは 2 5 記載の K.ラクティス株、又は態様 2 6 若しくは 2 7 記載の方法。