

【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30年7月5日(2018.7.5)

【公開番号】特開2018-46827(P2018-46827A)

【公開日】平成30年3月29日(2018.3.29)

【年通号数】公開・登録公報2018-012

【出願番号】特願2017-195120(P2017-195120)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/21	(2006.01)
A 2 3 L	33/135	(2016.01)
A 6 1 K	35/74	(2015.01)
A 6 1 K	35/744	(2015.01)
A 6 1 K	35/747	(2015.01)
A 6 1 K	35/745	(2015.01)
A 6 1 P	1/04	(2006.01)
A 6 1 P	3/10	(2006.01)
A 6 1 P	17/06	(2006.01)
A 6 1 P	19/02	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)
A 6 1 P	37/06	(2006.01)
A 6 1 P	37/08	(2006.01)
A 6 1 P	11/06	(2006.01)
A 6 1 P	25/16	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	25/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	19/10	(2006.01)
A 6 1 P	9/00	(2006.01)
A 6 1 P	9/10	(2006.01)
A 6 1 P	7/04	(2006.01)
A 6 1 P	1/16	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)
A 6 1 P	3/04	(2006.01)
A 6 1 P	31/12	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
A 6 1 P	31/00	(2006.01)
A 6 1 P	1/14	(2006.01)
A 6 1 P	21/02	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/21	Z N A
A 2 3 L	33/135	
A 6 1 K	35/74	A
A 6 1 K	35/744	
A 6 1 K	35/747	
A 6 1 K	35/745	
A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	3/10	

A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	21/02	
C 1 2 N	15/00	A

## 【手続補正書】

【提出日】平成30年5月18日(2018.5.18)

## 【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】

機能的な PTS 系 IIC コンポーネント (PtcC) タンパク質を產生することが不可能なようにその内因性 ptcC 遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されており、前記 PtcC タンパク質が、配列番号 8 に少なくとも 75% 同一なアミノ酸配列を有する、乳酸菌 (LAB) およびビフィズス菌から選択される細菌であって、

前記細菌が (a) ~ (c) :

(a) 前記細菌が機能的なトレハロース - 6 - リン酸ホスホリラーゼ (TrePP) タンパク質を產生することが不可能なように内因性 trePP を遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている；

(b) 前記細菌が、トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子を構成的に過剰発現する；および

(c) 前記細菌が、機能的な異種トレハロース 6 - リン酸ホスファターゼ遺伝子を含む、からなる群から選択される少なくとも一つの特徴をさらに有する、前記細菌。

## 【請求項2】

前記内因性 ptcC 遺伝子が、配列番号 7 に少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 同一な核酸配列を有する、請求項 1 に記載の細菌。

**【請求項3】**

前記 P t c C タンパク質が、配列番号 8 に少なくとも 90%、または少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の細菌。

**【請求項4】**

前記内因性 p t c C 遺伝子が、未成熟終始コドンを導入することにより不活性化される、請求項 1 に記載の細菌。

**【請求項5】**

前記内因性 t r e P P 遺伝子が、部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている、請求項 1 に記載の細菌。

**【請求項6】**

前記内因性 t r e P P 遺伝子が、配列番号 1 に少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 同一な核酸配列を有するか、前記 T r e P P タンパク質が、配列番号 2 に少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 同一なアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載の細菌。

**【請求項7】**

前記内因性 t r e P P 遺伝子が、配列番号 1 の核酸配列を含むか、前記 T r e P P タンパク質が、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の細菌。

**【請求項8】**

前記細菌が、トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子を構成的に過剰発現する、請求項 1 に記載の細菌。

**【請求項9】**

前記トレハローストランスポーターが、内因性 t r e P T C トランスポーターである、請求項 8 に記載の細菌。

**【請求項10】**

前記トレハローストランスポーターが、配列番号 10 または 12 に少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を有する、請求項 8 に記載の細菌。

**【請求項11】**

前記トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子が、h 1 1 A プロモーター (P h 1 1 A) の制御下にある、請求項 8 に記載の細菌。

**【請求項12】**

前記 P h 1 1 A プロモーターが配列番号 13 の核酸配列を有する、請求項 11 に記載の細菌。

**【請求項13】**

前記トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子が、前記細菌の染色体に導入される、請求項 8 に記載の細菌。

**【請求項14】**

前記細菌が、1 または複数の異種遺伝子産物をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の細菌。

**【請求項15】**

前記 1 または複数の異種遺伝子産物が、インスリン、成長ホルモン (G H)、プロラクチン、カルシトニン、黄体形成ホルモン、副甲状腺ホルモン、ソマトスタチン、甲状腺刺激ホルモン、血管活性腸管ポリペプチド、I L - 2 ~ I L - 7、I L - 9 ~ I L - 3 2、G M - C S F、M - C S F、S C F、I F N、E P O、G - C S F、L I F、O S M、C N T F、G H、P R L、T N F、C D 4 0、C D 2 7、F A S リガンド、サイトカインの I L - 1 ファミリー、線維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、形質転換成長因子、神経成長因子、上皮成長因子、インスリン関連サイトカイン、グルカゴン様ペプチド - 1 (G L P - 1)、グルカゴン様ペプチド - 2 (G L P - 2)、トレフォイル因子 (T F F)、および P Y Y からなる群から選択される、請求項 14 に記載の細菌。

**【請求項16】**

前記1または複数の異種遺伝子産物が、抗体またはその機能的フラグメントである、請求項14に記載の細菌。

【請求項17】

前記抗体またはその機能的フラグメントが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12(及びそのサブユニットIL-12p35及びIL12p40)、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23(及びそのサブユニットIL-23p19)、IL-27、IL-32(及びそのスプライス変異体)、IFN、IFN、IFN、及びTNFからなる群から選択されるサイトカインの生物学的効果を阻害する中和抗体である、請求項16に記載の細菌。

【請求項18】

前記1または複数の異種遺伝子産物が：

- i) 抗TNF抗体、抗TNF抗体フラグメント、抗TNF单一抗体可変領域、可溶性TNF受容体、又はTNFのドミナントネガティブ変異体；
- ii) 抗IL-12抗体、抗IL-12抗体フラグメント、抗IL-12单一抗体可変領域、可溶性IL-12受容体、IL-12又はIL-12dAbのドミナントネガティブ変異体；
- iii) 抗IL-12p35抗体、抗IL-12p35抗体フラグメント、抗IL-12p35单一抗体可変領域、可溶性IL-12p35受容体、IL-12p35又はIL-12p35dAbのドミナントネガティブ変異体；
- iv) 抗IL-12p40抗体、抗IL-12p40抗体フラグメント、抗IL-12p40单一抗体可変領域、可溶性IL-12p40受容体、IL-12p40又はIL-12p40dAbのドミナントネガティブ変異体；
- v) 抗IL-23抗体、抗IL-23抗体フラグメント、抗IL-23单一抗体可変領域、可溶性IL-23受容体、IL-23又はIL-23dAbのドミナントネガティブ変異体；
- vi) 抗IL-23p19抗体、抗IL-23p19抗体フラグメント、抗IL-23p19单一抗体可変領域、可溶性IL-23p19受容体、IL-23p19又はIL-23p19dAbのドミナントネガティブ変異体；
- vii) 抗IFN抗体、抗IFN抗体フラグメント、抗IFN单一抗体可変領域、可溶性IFN受容体、又はIFNのドミナントネガティブ変異体；
- viii) 抗IL-17抗体、抗IL-17抗体フラグメント、抗IL-17单一抗体可変領域、可溶性IL-17受容体、IL-17又はIL-17dAbのドミナントネガティブ変異体；および
- ix) 抗MCP-1抗体、抗MCP-1抗体フラグメント、抗MCP-1单一抗体可変領域、可溶性IL-17受容体、MCP-1又はMCP-1dAbのドミナントネガティブ変異体

からなる群から選択される、請求項14に記載の細菌。

【請求項19】

前記1または複数の異種遺伝子産物が、thyA遺伝子座に挿入される、請求項14に記載の細菌。

【請求項20】

前記LABが、ラクトコッカス種またはラクトバシラス種である、請求項1~19のいずれか1項に記載の細菌。

【請求項21】

前記LABが、ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)である、請求項20に記載の細菌。

【請求項22】

前記ラクトコッカス・ラクティスが、ラクトコッカス・ラクティス株MG1363である、請求項21に記載の細菌。

**【請求項 2 3】**

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の細菌を含む、薬剤、食品添加物、プロバイオティック組成物又はスターーター培養物。

**【請求項 2 4】**

被験体への予防的及び / 又は治療的な遺伝子産物の送達のための、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の細菌の使用。

**【請求項 2 5】**

前記予防的及び / 又は治療的な遺伝子産物が、炎症性腸疾患、自己免疫疾患、アレルギー性疾、神経障害、がん、骨粗鬆症、心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、血友病、変性肝疾患、肺疾患、肥満および感染からなる群から選択される状態を治療するために送達される、請求項 2 4 に記載の使用。

**【請求項 2 6】**

前記予防的及び / 又は治療的な遺伝子産物が、1型糖尿病、乾癬、喘息、食物アレルギーおよびセリアック病から選択される状態を治療するために送達される、請求項 2 4 に記載の使用。

**【請求項 2 7】**

乳酸菌 (LAB) およびビフィズス菌から選択される細菌のストレス抵抗性または保存特性の少なくとも 1 つを改善する方法であって、

当該細菌が機能的な P t c C タンパク質を産生することができないよう、当該細菌において内因性 p t c C 遺伝子を部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化することを含む、方法。

**【請求項 2 8】**

前記 P t c C タンパク質が、配列番号 8 に少なくとも 75% 同一なアミノ酸配列を有する、請求項 2 7 に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

前記細菌が、(a) ~ (c) :

(a) 前記細菌が機能的な T r e P P タンパク質を産生することができないよう内因性 t r e P P 遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている ;

(b) 前記細菌が、トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子を構成的に過剰発現する ; および

(c) 前記細菌が、機能的な異種トレハロース 6 - リン酸ホスファターゼ遺伝子を含む、からなる群から選択される少なくとも一つの特徴をさらに有する、請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法。

**【請求項 3 0】**

前記ストレス抵抗性または保存特性が、酸性条件に対する抵抗性、胆汁塩に対する抵抗性、乾燥、凍結若しくはフリーズドライに対する抵抗性、及び浸透圧抵抗性からなる群から選択される、請求項 2 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

乳酸菌 (LAB) およびビフィズス菌から選択される細菌を含む組成物を調製する方法であって、

i) 前記細菌を、前記細菌によって発酵させることができ基質材料を含む培地中で培養し、それにより増殖させた細菌を形成する工程 ; および

i i) 前記増殖させた細菌を、前記組成物に配合する工程と、  
を含み、

前細菌が P t c C 活性を欠き、かつ、(a) ~ (c) :

(a) 前記細菌が機能的な t r e P P 遺伝子産物を産生することができないようトレハロース - 6 - リン酸ホスホリラーゼ (T r e P P) をコードする内因性遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている ;

(b) 前記細菌が、トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子を構成的に過剰発現する ; および

(c) 前記細菌が、機能的な異種トレハロース6-リン酸ホスファターゼ遺伝子を含む、  
からなる群から選択される少なくとも一つの特徴をさらに有する、  
前記方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0194

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0194】

結果

図11に示されるように、マルトースはバイオマス產生中又はバイオマス產生後に細胞内トレハロースへと変換されることができる。

本願発明は以下の態様を含み得る。

[1]

セロビオース特異的PTS系IICコンポーネント(Ptcc)活性を欠く、又は機能的なptcc遺伝子産物を產生する事が不可能なように内因性Ptccをコードする遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている、非病原性グラム陽性菌。

[2]

Ptcc遺伝子又はタンパク質が、それぞれ配列番号7又は配列番号8に少なくとも75%同一な核酸配列又はアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の非病原性グラム陽性菌。

[3]

トレハロース6-リン酸ホリラーゼ(TrepP)活性を欠く、又は機能的なTreP遺伝子産物を產生する事が不可能なように内因性TrePをコードする遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている、請求項1又は2に記載の非病原性グラム陽性菌。

[4]

トレハローストランスポーター又は内因性トレハローストランスポーターをコードする1つ又は複数の遺伝子を過剰発現する、請求項1～3のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌。

[5]

機能的な異種トレハロース6-リン酸ホスファターゼを含有する、請求項1～4のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌。

[6]

前記トレハロース6-リン酸ホスファターゼがotsB又は大腸菌に由来するotsBである、請求項5に記載の非病原性グラム陽性菌。

[7]

1つ又は複数の異種遺伝子産物、又は1つ又は複数の予防的及び/又は治療的な遺伝子産物を含有する、請求項1～6のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌。

[8]

乾燥、噴霧乾燥、凍結又はフリーズドライされている、請求項1～7のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌。

[9]

乳酸菌(LAB)、又はラクトコッカス種若しくはラクトバシラス種である、請求項1～8のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌。

[10]

ビフィドバクテリウム種である、請求項1～8のいずれか一項に記載の非病原性グラム

陽性菌。

[ 1 1 ]

薬剤として使用される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌。

[ 1 2 ]

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌を含む薬剤、食品添加物、プロバイオティック組成物又はスターーター培養物。

[ 1 3 ]

食品の調製用のスターーター培養物である、請求項 1 2 に記載のスターーター培養物。

[ 1 4 ]

薬剤を調製する又は食品添加物を調製する又はスターーター培養物を調製する又はプロバイオティック組成物を調製する方法であって、

i ) 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の非病原性グラム陽性菌を、該グラム陽性菌によって発酵させることができ可能な基質材料を含む培地中で増殖させる工程と、

i i ) そのようにして増殖させた非病原性グラム陽性菌を、薬剤又は食品添加物又はスターーター培養物又はプロバイオティック組成物のそれぞれに配合する工程と、  
を含む、方法。

[ 1 5 ]

セロビオース特異的 PTS 系 IIC コンポーネント ( P t c C ) 活性を欠き、又は機能的な p t c C 遺伝子産物を產生することができないように内因性 P t c C をコードする遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されているグラム陽性菌においてトレハロースを内因的に蓄積させる方法であって、前記グラム陽性菌を、該グラム陽性菌によって発酵させることができ可能な基質材料を含む培地中で増殖させることを含む、方法。

[ 1 6 ]

前記細菌が非病原性グラム陽性菌、又は乳酸菌 ( LAB ) 若しくはビフィズス菌である、請求項 1 5 に記載の方法。

[ 1 7 ]

培養培地が炭素源、又は主要な若しくは唯一の炭素源としてマルトース若しくはグルコース又はマルトース及びグルコースの組合せを含む、請求項 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 8 ]

前記培養培地が実質的に外部から添加されたトレハロースを含有しない、請求項 1 4 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

[ 1 9 ]

グラム陽性菌、又は乳酸菌 ( LAB ) 若しくはビフィズス菌のストレス抵抗性若しくは保存特性、又は酸性条件に対する抵抗性、胆汁塩に対する抵抗性、乾燥、凍結若しくはフリーズドライに対する抵抗性、及び浸透圧抵抗性を含む群から選択される 1 つ又は複数のストレス抵抗性若しくは保存特性を改善する方法であって、前記グラム陽性菌を、 P t c C 活性を欠き、又は機能的な p t c C 遺伝子産物を產生することができないように内因性 P t c C をコードする遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されるように改変することを含む、方法。

[ 2 0 ]

前記細菌が非病原性グラム陽性菌である、請求項 1 9 に記載の方法。

[ 2 1 ]

前記グラム陽性菌が Tre PP 活性を欠き、又は機能的な Tre PP 遺伝子産物を產生することができないように内因性 Tre PP をコードする遺伝子が部分的又は完全に欠失、破壊又は不活性化されている、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の方法。

[ 2 2 ]

前記グラム陽性菌がトレハローストランスポーター又は内因性トレハローストランスポーターをコードする 1 つ又は複数の遺伝子を過剰発現する、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか

一項に記載の方法。

[ 2 3 ]

前記グラム陽性菌が機能的な異種トレハロース 6 - リン酸ホスファターゼを含有する、  
請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 4 ]

前記トレハロース 6 - リン酸ホスファターゼが o t s B 又は大腸菌に由来する o t s B  
である、請求項 2 3 に記載の方法。

[ 2 5 ]

前記グラム陽性菌が 1 つ又は複数の異種遺伝子産物、又は 1 つ又は複数の予防的及び /  
又は治療的な遺伝子産物又は抗原を発現する、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の  
方法。

[ 2 6 ]

前記グラム陽性菌、薬剤、食品添加物、又はスターター 培養物を凍結又はフリーズドライ  
することを更に含む、請求項 1 4 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

[ 2 7 ]

請求項 1 2 又は 1 3 に記載の食品添加物又はスターター 培養物と、非病原性グラム陽性  
菌によって発酵させることができ基質材料とを混合することを含み、任意に該基質材料  
を発酵させる工程を更に含む、食品を調製する方法。

[ 2 8 ]

請求項 2 7 に記載の方法によって得ることができる食品。