

【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 P T S 系 I I C コンポーネント ( P t c C ) タンパク質を産生することが不可能なようにその内因性 p t c C 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 P t c C タンパク質が、配列番号 8 に少なくとも 7 5 % 同一なアミノ酸配列を有する、乳酸菌 ( L A B ) 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 ( T r e P P ) タンパク質を産生することが不可能なように内因性 t r e P P 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 p t c C 遺伝子が、配列番号 7 に少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % 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 9 0 %、または少なくとも 9 5 % 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 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % 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 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % 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 9 0 % 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 l l A プロモーター ( P h l l 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 l l 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 - 32、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 40、C D 27、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 1 4 に記載の細菌。

【請求項 1 7】

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 - 12 p 35 及び IL 12 p 40)、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 - 23 p 19)、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 1 6 に記載の細菌。

【請求項 1 8】

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 単一抗体可変領域、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 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 12 受容体、IL - 12 又は IL - 12 d A b のドミナントネガティブ変異体；
  - iii) 抗 IL - 12 p 35 抗体、抗 IL - 12 p 35 抗体フラグメント、抗 IL - 12 p 35 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 12 p 35 受容体、IL - 12 p 35 又は IL - 12 p 35 d A b のドミナントネガティブ変異体；
  - iv) 抗 IL - 12 p 40 抗体、抗 IL - 12 p 40 抗体フラグメント、抗 IL - 12 p 40 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 12 p 40 受容体、IL - 12 p 40 又は IL - 12 p 40 d A b 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 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 23 受容体、IL - 23 又は IL - 23 d A b のドミナントネガティブ変異体；
  - vi) 抗 IL - 23 p 19 抗体、抗 IL - 23 p 19 抗体フラグメント、抗 IL - 23 p 19 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 23 p 19 受容体、IL - 23 p 19 又は IL - 23 p 19 d A b 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 単一抗体可変領域、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 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 17 受容体、IL - 17 又は IL - 17 d A b 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 単一抗体可変領域、可溶性 IL - 17 受容体、MCP - 1 又は MCP - 1 d A b 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 1 4 に記載の細菌。

【請求項 1 9】

前記 1 または複数の異種遺伝子産物が、thy A 遺伝子座に挿入される、請求項 1 4 に記載の細菌。

【請求項 2 0】

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 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の細菌。

【請求項 2 1】

前記 LAB が、ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) である、請求項 2 0 に記載の細菌。

【請求項 2 2】

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 MG 1 3 6 3 である、請求項 2 1 に記載の細菌。

**【請求項 23】**

請求項 1 ~ 22 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ター培養物。

**【請求項 24】**

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 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の細菌の使用。

**【請求項 25】**

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、アレルギー性疾患、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 24 に記載の使用。

**【請求項 26】**

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 24 に記載の使用。

**【請求項 27】**

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不可能なように、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 28】**

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 27 に記載の方法。

**【請求項 29】**

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不可能なように内因性 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 27 または 28 に記載の方法。

**【請求項 30】**

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 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 31】**

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可能な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不可能なようにトレハロース - 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産生中又はバイオマス産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 P T S 系 I I C コンポーネント ( P t c C ) 活性を欠く、又は機能的な p t c C 遺伝子産物を産生することが不可能なように内因性 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、非病原性グラム陽性菌。

[ 2 ]

P t c C 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 7 5 % 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 - リン酸ホスホリラーゼ ( T r e P P ) 活性を欠く、又は機能的な T r e P P 遺伝子産物を産生することが不可能なように内因性 T r e P P 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 o t s B 又は大腸菌に由来する o t s B 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 ( L A B )、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 ~ 1 0 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 ~ 1 0 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ター培養物。

[ 1 3 ]

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

[ 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 ~ 1 0 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 P T S 系 I I C 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 遺伝子産物を産生することが不可能なように内因性 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 ( L A B ) 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 ( L A B ) 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 遺伝子産物を産生することが不可能なように内因性 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 T r e P P 活性を欠き、又は機能的な T r e P P 遺伝子産物を産生することが不可能なように内因性 T r e P P 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可能な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。