

【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 3 部門第 2 区分

【発行日】平成24年6月7日(2012.6.7)

【公表番号】特表2011-518112(P2011-518112A)

【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2010-541634(P2010-541634)

【国際特許分類】

A 6 1 K 35/74 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7004 (2006.01)

A 6 1 K 31/513 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 35/74 A

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 31/7004

A 6 1 P 43/00 1 2 3

A 6 1 K 31/513

【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】

嫌気性疾患部位に送達するための嫌気性疾患治療剤であって、  
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 と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 断片とを含む蛋白質発現ユニットを含むプラスミドベクターで形質転換された嫌気性細菌を有効成分として含有する医薬組成物と、  
 上記嫌気性細菌の生着・増殖促進剤を有効成分として含有する医薬組成物  
 とを組み合わせる含む、嫌气的疾患治療剤。

【請求項 2】

目的とする活性を有する蛋白質が、嫌气的環境下にある疾患の治療活性を有する蛋白質である、請求項 1 に記載の疾患治療剤。

【請求項 3】

嫌气的環境下にある疾患の治療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 2 に記載の疾患治療剤。

【請求項 4】

嫌気的環境下にある疾患の治療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である、請求項 3 に記載の疾患治療剤。

【請求項 5】

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択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の疾患治療剤。

【請求項 6】

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 5 に記載の疾患治療剤。

【請求項 7】

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・プレーベからなる群より選択される、請求項 6 に記載の疾患治療剤。

【請求項 8】

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 7 に記載の疾患治療剤。

【請求項 9】

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 105 - A / p B i f i C D (独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター受領番号: N I T E B P - 491) である、請求項 8 に記載の疾患治療剤。

【請求項 10】

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択される、請求項 4 に記載の疾患治療剤。

【請求項 11】

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 10 に記載の疾患治療剤。

【請求項 12】

生着・増殖促進剤が、マルトース、グルコース、アラビノース、キシロース、ガラクトース、ラクトース、メリビオース、メレジトース、ラフィノース、ラクツロースからなる群より選択される少なくとも一種である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の疾患治療剤。

【請求項 13】

生着・増殖促進剤が、マルトースまたはグルコースである、請求項 12 に記載の疾患治療剤。

【請求項 14】

生着・増殖促進剤が、マルトースである、請求項 13 に記載の疾患治療剤。

【請求項 15】

有効成分として、マルトース、グルコース、アラビノース、キシロース、ガラクトース、ラクトース、メリビオース、メレジトース、ラフィノース、ラクツロースからなる群より選択される少なくとも一種を含む、嫌気性疾患部位に送達するための嫌気性細菌の生着・増殖促進剤。

【請求項 16】

有効成分がマルトースまたはグルコースである、請求項 15 に記載の生着・増殖促進剤。

【請求項 17】

有効成分がマルトースである、請求項 16 に記載の生着・増殖促進剤。

## 【請求項 18】

さらに、(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によって抗腫瘍物質に変換される抗腫瘍物質前駆体を有効成分として含有する医薬組成物を含む、請求項4に記載の疾患治療剤。

## 【請求項 19】

抗腫瘍物質前駆体が5-フルオロシトシンである、請求項18に記載の疾患治療剤。

## 【請求項 20】

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で機能する、請求項5に記載の疾患治療剤。

## 【請求項 21】

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、OriV領域およびRepB遺伝子を含むpTB6 repユニットである、請求項6に記載の疾患治療剤。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

[2] 発現ベクターが、

(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、および  
(2) 目的とする活性を有する蛋白質をコードするDNAと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断片とを含む蛋白質発現ユニット、  
を含む発現ベクターである、[1]記載の疾患治療剤、

[3] 目的とする活性を有する蛋白質が、嫌気的環境下にある疾患の治療活性を有する蛋白質である、[2]記載の疾患治療剤、

## 【手続補正3】

【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】

本発明の嫌気的疾患治療用形質転換嫌気性微生物の形質転換に用いる発現ベクターは、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。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

本発明の発現ベクターの具体的な例示として、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して、ビフィドバクテリウム属細菌で機能するOriV領域およびRepB遺伝子を含むpTB6 repユニットを具有し、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断片として、ビフィドバクテリウム属細菌由来のヒ

ストン様DNA結合蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター及びターミネーターを具有し、目的とする活性を有する蛋白質をコードするDNAとして、5-F Cを5-F Uに変換する酵素のCDをコードするDNAを具有し、選択マーカー活性遺伝子ユニットとして、エンテロコッカス・フェカリス由来のスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼをコードするDNA (AAD9カセット) を含むベクターを挙げることができる。

より具体的な例示として、例えば、配列番号1の塩基配列で示される、pBifiCDを挙げることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

本発明の嫌気的疾患治療用形質転換嫌気性微生物の形質転換に用いる発現ベクターは、例えば、米国仮出願61/124,528号に記載するようにして作製することができる。

したがって、本発明の発現ベクターは、

(1) 大腸菌の複製開始点、例えばpUC oriと任意に選択マーカー活性遺伝子ユニット、例えば、AAD9カセットを含むプラスミド(以下、選択マーカープラスミドという)を作製し(工程1)、

(2) この選択マーカープラスミドの直鎖化プラスミドを調製し、これと、プロモーター及びターミネーター、例えば、ピフィドバクテリウム属細菌由来のヒストン様DNA結合蛋白質をコードする遺伝子のプロモーター及びターミネーターと、(a) 抗腫瘍活性を有する蛋白質または(b) 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、例えば、CDを含む断片(以下、蛋白質発現ユニットという)をライゲーションして、選択マーカー活性遺伝子ユニットと蛋白質発現ユニットを有するプラスミド(以下、選択マーカー・活性蛋白質プラスミドという)を作製し(工程2)、

(3) この選択マーカー・活性蛋白質プラスミドの直鎖化プラスミドを調製し、これと、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、例えば、ピフィドバクテリウム属細菌で機能するOriV 領域およびRepB遺伝子からなるpTB6 repユニットのDNA断片(以下、プラスミド複製ユニットという)をライゲーションして、大腸菌の複製開始点及び選択マーカー活性遺伝子ユニット、蛋白質発現ユニット並びにプラスミド複製ユニットを有するプラスミド(以下、シャトルプラスミドという)を作製し(工程3)、

(4) このシャトルプラスミドから大腸菌の複製開始点を除去する(工程4)ことにより作製することができる。

なお、各工程における操作は、文献記載の公知の方法に準じて行うことができる。