

【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3年12月16日(2021.12.16)

【公表番号】特表2021-508235(P2021-508235A)

【公表日】令和3年3月4日(2021.3.4)

【年通号数】公開・登録公報2021-012

【出願番号】特願2020-526562(P2020-526562)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/52 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/75 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

A 0 1 H 3/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/62 Z N A Z

C 1 2 N 15/52 Z

C 1 2 N 15/11 Z

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/75 Z

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 N 1/21

A 0 1 H 3/00

C 1 2 Q 1/6897 Z

【手続補正書】

【提出日】令和3年11月8日(2021.11.8)

【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】

融合タンパク質をコードする核酸分子であって、(a) N末端シグナルペプチドをコードする第一のポリヌクレオチド配列、およびこれが作動可能に連結する(b) 前記N末端シグナルペプチドにとって異種であるポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチド配列を含み、ここで、前記第一のポリヌクレオチド配列が、

(i) 配列番号1、3、5、7、9、19、23、25、27もしくは29と少なくとも50%、60%、70%、80%もしくは90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列；または

(ii) 配列番号1、3、5、7、9、19、23、25、27もしくは29の少なくとも45、90、135、180、225、270、315もしくは345個の連続したヌクレオチドからなる断片を含むポリヌクレオチド配列；

を含み、

前記N末端シグナルペプチドが、前記融合タンパク質をバエニバチルス(Paenibacillus)

c i l l u s) 内生胞子の胞子表面にターゲティングすることが可能である、前記核酸分子。

【請求項 2】

前記断片が、配列番号 1、3、5、7、9、19、23、25、27 または 29 の最初のヌクレオチドから始まる、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記第一のポリヌクレオチド配列が、配列番号 1、7、19 または 27 と少なくとも 50%、60%、70%、80% または 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記断片が、配列番号 2 または配列番号 8 のアミノ酸 1 ~ 15、または 1 ~ 30、1 ~ 45、1 ~ 60、1 ~ 75、1 ~ 90、1 ~ 105、または 1 ~ 115 をコードする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記 N 末端シグナルペプチドにとって異種である前記ポリペプチドが、

- (a) 植物成長刺激性タンパク質；
- (b) 酵素；
- (c) タンパク質；
- (d) パエニバチルスにとって異種であるポリペプチド；
- (e) 治療タンパク質；または
- (f) 植物免疫刺激性タンパク質

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

(a) 1 もしくは複数のプロテアーゼ切断部位を含むポリペプチド（ここで、前記ポリペプチドは、前記 N 末端シグナルペプチドと前記 N 末端シグナルペプチドにとって異種である前記ポリペプチドとの間に位置する）；

(b) 選択可能マーカを含むポリペプチド；

(c) 可視化マーカを含むポリペプチド；

(d) タンパク質認識 / 精製ドメインを含むポリペプチド；または

(e) フレキシブルリンカーエレメントを含むポリペプチド（これは、前記 N 末端シグナルペプチドと前記 N 末端シグナルペプチドにとって異種である前記ポリペプチドとを接続する）

をコードする第三のポリヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記パエニバチルス内生胞子が、

パエニバチルス種 *N R R L B - 5 0 9 7 2*、パエニバチルス・テラエ (*P a e n i b a c i l l u s t e r r a e*)、パエニバチルス・ポリミキサ (*P a e n i b a c i l l u s p o l y m y x a*) もしくはパエニバチルス・ペオリアエ (*P a e n i b a c i l l u s p e o r i a e*) を含むパエニバチルス種により形成される内生胞子であるか；または

パエニバチルス種の 16S rRNA 遺伝子と少なくとも 97%、98% もしくは 99% の同一性を共有する 16S rRNA 遺伝子を持つ細菌により形成される内生胞子である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記第二のポリヌクレオチド配列およびパエニバチルスのうちの少なくとも 1 つにとって異種であるプロモーターエレメントに作動的に連結されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

N 末端シグナルペプチドにとって異種であるポリペプチドに作動可能に連結された前記

N末端シグナルペプチドを含む融合タンパク質であって、前記N末端シグナルペプチドが、

(i) 配列番号 2、4、6、8、10、18、20、21、22、24、26、28、30、31もしくは32のアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%もしくは90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド；または

(i i) 配列番号 2、4、6、8、10、18、20、21、22、24、26、28、30、31もしくは32の少なくとも15、30、45、60、75、90、105もしくは115個の連続したアミノ酸からなる断片を含むポリペプチド；

を含み、

前記N末端シグナルペプチドが、前記融合タンパク質をバエニバチルス内生胞子の胞子表面にターゲティングすることが可能である、前記融合タンパク質。

【請求項10】

前記断片が、配列番号 2、4、6、8、10、18、20、21、22、24、26、28、30、31または32の最初のアミノ酸から始まる、請求項9に記載の融合タンパク質。

【請求項11】

前記ポリペプチド配列が、配列番号 2、8、20、21、22、28、31または32と少なくとも50%、60%、70%、80%または90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項9または10に記載の融合タンパク質。

【請求項12】

前記断片が、配列番号 2、8、31または32のアミノ酸 1～15、または1～30、1～45、1～60、1～75、1～90、1～105、または1～115を含む、請求項9～11のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項13】

前記バエニバチルス内生胞子が、

バエニバチルス種 NRRL B - 50972、バエニバチルス・テラエ、バエニバチルス・ポリミキサもしくはバエニバチルス・ペオリアエを含むバエニバチルス種により形成される内生胞子であるか；または、

バエニバチルス種の 16S rRNA 遺伝子と少なくとも97、98もしくは99%の同一性を共有する 16S rRNA 遺伝子を持つ細菌により形成される内生胞子である、請求項9～12のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項14】

請求項 1～8のいずれか一項に記載の核酸分子を含む細菌染色体を含む、組換えバエニバチルス細胞。

【請求項15】

請求項 1～8のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターであって、前記ベクターが、プラスミド、人工染色体またはウイルスベクターを含む、前記ベクター。

【請求項16】

請求項 1～8のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターで形質転換された組換えバエニバチルス細胞。

【請求項17】

前記バエニバチルス細胞が、

バエニバチルス種 NRRL B - 50972、バエニバチルス・テラエ、バエニバチルス・ポリミキサもしくはバエニバチルス・ペオリアエを含むバエニバチルス種であるか；または、

バエニバチルス種の 16S rRNA 遺伝子と少なくとも97、98もしくは99%の同一性を共有する 16S rRNA 遺伝子を持つ細菌である、請求項16に記載の組換えバエニバチルス細胞。

【請求項18】

組成物であって、相乗的に有効な量で

a) 請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する 1 または複数の組換え内生孢子産生性パエニバチルス細胞（ここで、前記 N 末端シグナルペプチドにとって異種である前記ポリペプチドが、植物成長または免疫刺激性タンパク質を含む）を含み；および

b) 少なくとも 1 つの生物学的防除剤を含んでもよい前記組成物。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 16 もしくは 17 に記載の組換え細菌細胞、または請求項 18 に記載の組成物で処理された種子。

【請求項 20】

植物、種子、ヒトまたは動物を処理する方法であって、組換えパエニバチルス細胞により産生される内生孢子を含む組成物を植物、種子、ヒトまたは動物に投与することを含み；ここで、前記組換えパエニバチルス細胞が、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を発現する、前記方法。

【請求項 21】

単離および/または精製された、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を含む、組成物。