

【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 1 年 5 月 16 日 (2019.5.16)

【公表番号】特表 2018-517398 (P2018-517398A)

【公表日】平成 30 年 7 月 5 日 (2018.7.5)

【年通号数】公開・登録公報 2018-025

【出願番号】特願 2017-552146 (P2017-552146)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 0 7 K 7/04 (2006.01)

C 0 7 K 14/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/06 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/74 (2015.01)

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

C 0 7 K 14/195 (2006.01)

A 6 1 K 38/08 (2019.01)

A 6 1 K 38/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/31 Z N A

C 1 2 N 1/21

C 0 7 K 7/04

C 0 7 K 14/00

C 0 7 K 19/00

C 1 2 P 21/06

C 1 2 P 21/00 B

A 6 1 K 35/74 A

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 31/04

C 0 7 K 14/195

A 6 1 K 38/08

A 6 1 K 38/10

【手続補正書】

【提出日】平成 31 年 4 月 5 日 (2019.4.5)

【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】

バイオフィルムを作製する方法であって、

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク

質の融合物をコードする核酸配列を含む細菌細胞を増殖させるステップであって、前記融合物を発現し、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが付着したバイオフィルムを形成する細菌細胞の集団を産生するステップを含み、

前記リンカーが、C s g A タンパク質のC末端またはN末端のいずれかに付着した7つまたはそれ超のアミノ酸を含むポリペプチドである、方法。

【請求項2】

前記核酸配列を前記細菌細胞に導入する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細菌細胞が E s c h e r i c h i a c o l i である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記細菌細胞が、c s g A 遺伝子のゲノム欠失を含み；

前記細菌細胞が、ゲノム c s g A 遺伝子の発現を欠失しており、必要に応じて前記ゲノム c s g A 遺伝子の発現を欠く前記細菌細胞が、N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N)、M G 1 6 5 5、L S R 1 0 または P H L 6 2 8 である；

前記細菌細胞が、ゲノム C s g A タンパク質をコードする核酸（単数または複数）が除去されるように遺伝子改変されている；

前記細菌細胞が、ゲノム C s g A タンパク質が除去されるように遺伝子改変されている；または

前記細菌細胞が、ゲノム c s g A 遺伝子に関してノックアウトである、
請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記リンカーが、

7 アミノ酸 ~ 2 5 0 アミノ酸である；

柔軟なリンカーまたは剛性リンカーである；

親水性または疎水性である；

反復アミノ酸サブユニットを含み、必要に応じて前記リンカーが、3つまたはそれ超の反復アミノ酸サブユニットを含む；

[G G G S]_n（式中、n は、2 から 2 0 までの整数である）（配列番号 1 2）を含み、必要に応じて前記リンカーが、[G G G S]_n（式中、n は、3、6、または 1 2 である整数である）（配列番号 5 ~ 7）を含む；

[P]_n（式中、n は、7 から 3 0 までの整数である）（配列番号 1 3）を含み、必要に応じて前記リンカーが、[P]_n（式中、n は、1 2 または 2 4 である整数である）（配列番号 8 ~ 9）を含む；

[E A A A K]_n（式中、n は、2 から 1 5 までの整数である）（配列番号 1 5）を含み、必要に応じて前記リンカーが、[E A A A K]_n（式中、n は、3 または 9 である整数である）（配列番号 1 0 ~ 1 1）を含む；

グリシン、セリン、アラニンまたはロイシンのうちの1つまたは複数を含む；かつ/または

切断可能であり、必要に応じて前記リンカーが、酵素により切断可能である、
請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、放出可能である、または、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、治療用ポリペプチド、診断用ポリペプチド、組織結合性ポリペプチド、細胞結合性ポリペプチド、抗菌性ポリペプチド、抗がん性ポリペプチド、抗炎症性ポリペプチド、ポリマー結合性ポリペプチド、代謝産物結合性ポリペプチド、標的化ポリペプチドまたは分子の結合対の第1の対であるポリペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記細菌細胞が N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) であり、前記リンカーが [G G G S]_n（式中、n は、3、6、または 1 2 である整数である）（配列番号 5 ~ 7）である

、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の天然に存在しない融合物であって、前記リンカーが、 $[GGGS]_n$ （式中、 n は、2 から 20 までの整数である）（配列番号 12）を含む、融合物。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の融合物をコードする核酸配列。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の核酸配列を含む細菌細胞。

【請求項 12】

請求項 8 に記載の融合物を発現する細菌細胞。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の細菌細胞を含むバイオフィルム。

【請求項 14】

細菌細胞を生物内の組織に送達するための医薬組成物であって、
請求項 11 に記載の細菌細胞を有効成分として含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、組織結合性ポリペプチドである、医薬組成物。

【請求項 15】

前記細菌細胞が増殖し、前記組織に付着する**バイオフィルムを産生することができる**、
請求項 14 に記載の**医薬組成物**。

【請求項 16】

前記生物内の組織が、胃腸管上皮組織、バイエル板、感染部位、上皮の損傷を受けた領域、腫瘍組織、炎症部位、結腸癌細胞、腸粘膜または M 細胞である、請求項 14 に記載の**医薬組成物**。

【請求項 17】

胃腸管の炎症を有する生物を処置する**ための医薬組成物**であって、
請求項 11 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、組織結合性ポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が、胃腸管の組織に前記組織結合性ポリペプチドによって付着することができ、それにより、前記細菌細胞が前記組織に、炎症を軽減する様式で局在化する、医薬組成物。

【請求項 18】

前記炎症が、炎症性腸疾患、クローン病または潰瘍性大腸炎に由来する、請求項 17 に記載の**医薬組成物**。

【請求項 19】

胃腸管の炎症を有する生物を処置する**ための医薬組成物**であって、
請求項 11 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、抗炎症性ポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が前記胃腸管内で増殖し、産生することができ、前記抗炎症性ポリペプチドを含むバイオフィルムを、炎症を軽減する様式で形成することができる、医薬組成物。

【請求項 20】

前記炎症が、炎症性腸疾患またはクローン病に由来する、請求項 19 に記載の**医薬組成物**。

【請求項 21】

胃腸管のがんを有する生物を処置する**ための医薬組成物**であって、
請求項 11 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、抗がんポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が胃腸管内で増殖し、産生することができ、抗がんポリペプチドを含むバ

イオフィルムを、がんの増殖を低減する様式で形成することができる、医薬組成物。

【請求項 2 2】

胃腸管内に微生物病原体を有する生物を処置するための医薬組成物であって、
請求項 1 1 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、抗微生物性ポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が胃腸管内で増殖し、産生することができ、前記抗微生物性ポリペプチドを含むバイオフィルムを、前記微生物病原体の増殖を低減する様式で形成することができる、医薬組成物。

【請求項 2 3】

診断用ポリペプチドを生物の胃腸管に送達するための医薬組成物であって、
請求項 1 1 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、診断用ポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が胃腸管内で増殖し、産生することができ、前記診断用ポリペプチドを含むバイオフィルムを形成することができる、医薬組成物。

【請求項 2 4】

生物の胃腸管内の標的を結合捕捉するための医薬組成物であって、
請求項 1 1 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、捕捉剤ポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が胃腸管内で増殖し、産生することができ、前記捕捉剤ポリペプチドを含むバイオフィルムを形成することができ、
前記捕捉標的が前記捕捉剤ポリペプチドに結合する、医薬組成物。

【請求項 2 5】

機能性薬剤を生物の胃腸管に送達するための医薬組成物であって、
請求項 1 1 に記載の細菌細胞を含み、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、分子の結合対の第 1 のメンバーであるポリペプチドであり、前記細菌細胞が、E . c o l i 細菌細胞であり、
前記細菌細胞が胃腸管内で増殖し、産生することができ、分子の結合対の第 1 のメンバーを含むバイオフィルムを形成することができ、
前記組成物が、機能性薬剤が付着した、前記分子の結合対の第 2 のメンバーをさらに含み、
前記分子の結合対の第 1 のメンバーおよび第 2 のメンバーが互いと結合し、それにより、前記機能性薬剤が前記バイオフィルムに付着することができる、医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 4】

本特許または出願のファイルは、カラーで製作された少なくとも 1 つの図面を含有する。カラーの図面（単数または複数）を伴う本特許または特許出願公開のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、特許庁により提供される。本実施形態の前述および他の特徴および利点は、以下の例示的な実施形態の詳細な説明を付属の図面と併せて利用して、より詳細に理解される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目 1）

バイオフィルムを作製する方法であって、
ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする核酸配列を含む細菌細胞を増殖させるステップであって、前記融合物を発現し、前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが付着したバイオフィルムを形

成する細菌細胞の集団を産生するステップを含み、

前記リンカーが、C s g A タンパク質のC末端またはN末端のいずれかに付着した7つまたはそれ超のアミノ酸を含むポリペプチドである、方法。

(項目2)

前記核酸配列を前記細菌細胞に導入する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記細菌細胞がE . c o l i である、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記細菌細胞が非病原性細菌である、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記細菌細胞が、N i s s l e 1917株(E c N)、M G 1655、L S R 10またはP H L 628である、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記細菌細胞が、C s g A 遺伝子のゲノム欠失を含む、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記細菌細胞が、前記C s g A タンパク質をコードする核酸(単数または複数)が除去されるように遺伝子改変されている、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記細菌細胞が、前記C s g A タンパク質が除去されるように遺伝子改変されている、項目1に記載の方法。

(項目9)

細菌細胞が、天然のC s g A 遺伝子の発現を欠き、N i s s l e 1917株(E c N)、M G 1655、L S R 10またはP H L 628である、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記天然のC s g A 遺伝子の発現を欠く細菌細胞が、N i s s l e 1917株(E c N)、M G 1655、L S R 10またはP H L 628である、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記細菌細胞が、前記C s g A 遺伝子に関してノックアウトである、項目1に記載の方法。

(項目12)

前記リンカーが、7アミノ酸~250アミノ酸である、項目1に記載の方法。

(項目13)

前記リンカーが、柔軟なリンカーまたは剛性リンカーである、項目1に記載の方法。

(項目14)

前記リンカーが、親水性または疎水性である、項目1に記載の方法。

(項目15)

前記リンカーが、反復アミノ酸サブユニットを含む、項目1に記載の方法。

(項目16)

前記リンカーが、2つまたはそれ超の反復アミノ酸サブユニットを含む、項目1に記載の方法。

(項目17)

前記リンカーが、3つまたはそれ超の反復アミノ酸サブユニットを含む、項目1に記載の方法。

(項目18)

前記リンカーが、[G G G S]_n(式中、nは、2から20までの整数である)(配列番号12)を含む、項目1に記載の方法。

(項目19)

前記リンカーが、[G G G S]_n(式中、nは、3、6、または12である整数である)(配列番号5~7)を含む、項目1に記載の方法。

(項目20)

前記リンカーが、 $[P]_n$ （式中、 n は、1から30までの整数である）（配列番号13）を含む、項目1に記載の方法。

(項目 2 1)

前記リンカーが、 $[P]_n$ （式中、 n は、1 2 または 2 4 である整数である）（配列番号 8 ~ 9）を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記リンカーが、 $[EAAAK]_n$ （式中、 n は、1から15までの整数である）（配列番号15）を含む、項目1に記載の方法。

(項目 2 3)

前記リンカーが、 $[EAAAK]_n$ （式中、 n は、3または9である整数である）（配列番号10～11）を含む、項目1に記載の方法。

(項目 2 4)

前記リンカーが、グリシン、セリン、アラニンまたはロイシンのうちの 1 つまたは複数を含む、項目 1 に記載の方法。

(項 目 2 5)

前記リンカーが、 $[GGGS]_n$ （式中、 n は、2から20までの整数である）（配列番号12）、 $[P]_n$ （式中、 n は、1から30までの整数である）（配列番号13）または $[EAAAK]_n$ （式中、 n は、1から15までの整数である）（配列番号15）のうちの1つまたは複数を含む、項目1に記載の方法。

(項目 2 6)

前記リンカーが、切断可能である、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記リンカーが、酵素により切断可能である、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、放出可能である、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記リンカーが、

【化 3】

GGGS GGGS GGGS,

GGSGGSGGSGGSGGSGGSGS,

[illegible]

7)、PPPPPPPPPPPP, PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP (配列番号 8-9)、

EAAAKEAAAKEAAAK, または

EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAK (配列番号 10-

11)

である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記ネイティブでない機能性ポリペプチドが、治療用ポリペプチド、診断用ポリペプチド、組織結合性ポリペプチド、細胞結合性ポリペプチド、抗菌性ポリペプチド、抗がん性ポリペプチド、抗炎症性ポリペプチド、ポリマー結合性ポリペプチド、代謝産物結合性ポリペプチド、標的化ポリペプチドまたは分子の結合対の第 1 の対であるポリペプチドである、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記細菌細胞がN i s s l e 1917株（E c N）であり、前記リンカーが[G G G S]_n（式中、nは、3、6、または12である整数である）（配列番号5～7）である、項目1に記載の方法。

(項 目 3 2)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の天然に存在しない融合物であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、融合物。

(項目 3 3)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする核酸配列であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、核酸配列。

(項目 3 4)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする核酸配列を含むベクターであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、ベクター。

(項目 3 5)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を含む細菌細胞であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、細菌細胞。

(項目 3 6)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする核酸配列を含むベクターを含む細菌細胞であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、細菌細胞。

(項目 3 7)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する細菌細胞であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、細菌細胞。

(項目 3 8)

ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する細菌細胞を含むバイオフィームであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、バイオフィーム。

(項目 3 9)

細菌細胞を生物内の組織に送達する方法であって、

前記生物に、組織結合性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、ステップを含む、

前記細菌細胞が、前記組織に前記組織結合性ポリペプチドによって付着し、それにより、前記細菌細胞が前記組織に局在化する、方法。

(項目 4 0)

前記細菌細胞が増殖し、前記組織に付着する、細菌細胞の集団を含むバイオフィームが形成される、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記細菌細胞が N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記組織結合性ポリペプチドが、C P 1 5、P 8、A 1、T 1 8、T T F 1、T T F 2 または T T F 3 である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記生物内の組織が、胃腸管上皮組織である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記生物内の組織が、パイエル板である、項目 39 に記載の方法。

(項目 45)

前記生物内の組織が、感染部位である、項目 39 に記載の方法。

(項目 46)

前記生物内の組織が、上皮の損傷を受けた領域である、項目 39 に記載の方法。

(項目 47)

前記生物内の組織が、腫瘍組織である、項目 39 に記載の方法。

(項目 48)

前記生物内の組織が、炎症部位である、項目 39 に記載の方法。

(項目 49)

前記生物内の組織が、結腸癌細胞を含む、項目 39 に記載の方法。

(項目 50)

前記生物内の組織が、腸粘膜である、項目 39 に記載の方法。

(項目 51)

前記生物内の組織が、M細胞を含む、項目 39 に記載の方法。

(項目 52)

胃腸管の炎症を有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、組織結合性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 20 までの整数である) (配列番号 12) を含む、ステップを含み、

前記 N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞が、胃腸管の組織に前記組織結合性ポリペプチドによって付着し、それにより、前記 N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞が前記組織に、炎症を軽減する様式で局在化する、方法。

(項目 53)

前記 N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞が増殖し、前記組織に付着した、N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞の集団を含むバイオフィームが形成される、項目 52 に記載の方法。

(項目 54)

前記組織結合性ポリペプチドが、C P 15、P 8、A 1、T 18、T T F 1、T T F 2 または T T F 3 である、項目 52 に記載の方法。

(項目 55)

前記炎症が、炎症性腸疾患に由来する、項目 52 に記載の方法。

(項目 56)

前記炎症が、クローン病または潰瘍性大腸炎に由来する、項目 52 に記載の方法。

(項目 57)

胃腸管の炎症を有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、抗炎症性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 20 までの整数である) (配列番号 12) を含む、ステップを含み、

前記 N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞が前記胃腸管内で増殖し、前記抗炎症性ポリペプチドを含む、N i s s l e 1917 株 (E c N) 細菌細胞の集団を含むバイオフィームが、炎症を軽減する様式で形成される、方法。

(項目 58)

前記抗炎症性ポリペプチドが、T T F 1、T T F 2 または T T F 3 である、項目 57 に記載の方法。

(項目 59)

前記炎症が、炎症性腸疾患またはクローン病に由来する、項目 57 に記載の方法。

(項目 60)

前記抗炎症性ポリペプチドが放出される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、炎症の結果として産生されるプロテアーゼによる前記リンカーの切断によって放出される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、MMP プロテアーゼによる前記リンカーの切断によって放出される、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 5)

胃腸管のがんを有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、抗がんポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、ステップを含み、

前記 N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、抗がんポリペプチドを含む、N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが、がんの増殖を低減する様式で形成される、方法。

(項目 6 6)

前記抗がんポリペプチドが、成長阻害性の生物学的製剤である、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記抗がんポリペプチドが放出される、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗がんポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗がんポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 7 0)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗がんポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 7 1)

胃腸管内に微生物病原体を有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、抗微生物性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、ステップを含み、

前記 N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、前記抗微生物性ポリペプチドを含む、N i s s l e 1 9 1 7 株 (E c N) 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが、前記微生物病原体の増殖を低減する様式で形成される、方法。

(項目 7 2)

前記微生物病原体が C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e である、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記抗微生物性ポリペプチドが、コプリシン、ツリシンCD、ランチビオティクス (lanibiotic)、ナイシン、アクタガルジン (actagardine)、カテリシジンまたはLL-37である、項目71に記載の方法。

(項目74)

前記抗微生物性ポリペプチドが放出される、項目71に記載の方法。

(項目75)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目71に記載の方法。

(項目76)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目71に記載の方法。

(項目77)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目71に記載の方法。

(項目78)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、胃腸管内のプロテアーゼCD2830による前記リンカーの切断によって放出される、項目71に記載の方法。

(項目79)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、微生物病原体に曝露すると放出される、項目71に記載の方法。

(項目80)

診断用ポリペプチドを生物の胃腸管に送達する方法であって、

前記生物に、診断用ポリペプチドにリンカーによって連結されたCsgAタンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現するNissle 1917株 (EcN) 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、 $[GGGS]_n$ (式中、 n は、2から20までの整数である) (配列番号12) を含む、ステップを含み、

前記Nissle 1917株 (EcN) 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、前記診断用ポリペプチドを含む、Nissle 1917株 (EcN) 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが形成される、方法。

(項目81)

前記診断用ポリペプチドを検出する、項目80に記載の方法。

(項目82)

前記診断用ポリペプチドが、造影剤または色素をさらに含む、項目80に記載の方法。

(項目83)

前記診断用ポリペプチドが放出される、項目80に記載の方法。

(項目84)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記診断用ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目80に記載の方法。

(項目85)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記診断用ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目80に記載の方法。

(項目86)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記診断用ポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目80に記載の方法。

(項目87)

生物の胃腸管内の標的を結合捕捉する方法であって、

前記生物に、捕捉剤ポリペプチドにリンカーによって連結されたCsgAタンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現するNissle 1917株 (EcN) 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、 $[GGGS]_n$ (式中、 n は、2から

20までの整数である)(配列番号12)を含む、ステップを含み、

前記Nissle 1917株(EcN)細菌細胞が胃腸管内で増殖し、前記捕捉剤ポリペプチドを含む、Nissle 1917株(EcN)細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが形成され、

前記捕捉標的が前記捕捉剤ポリペプチドに結合する、方法。

(項目88)

結合した捕捉標的を含むバイオフィルムが前記生物から排出される、項目87に記載の方法。

(項目89)

結合した捕捉標的を含むバイオフィルムが組織から除去され、前記生物から排出される、項目87に記載の方法。

(項目90)

結合した捕捉標的を含むバイオフィルムが天然のプロセスによって組織から除去され、前記生物から排出される、項目87に記載の方法。

(項目91)

前記捕捉剤ポリペプチドが放出される、項目87に記載の方法。

(項目92)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記捕捉剤ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目87に記載の方法。

(項目93)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記捕捉剤ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目87に記載の方法。

(項目94)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記捕捉剤ポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目87に記載の方法。

(項目95)

機能性薬剤を生物の胃腸管に送達する方法であって、

前記生物に、分子の結合対の第1のメンバーであるポリペプチドにリンカーによって連結されたCs g Aタンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現するNissle 1917株(EcN)細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[GGGS]_n(式中、nは、2から20までの整数である)(配列番号12)を含む、ステップであって、

前記Nissle 1917株(EcN)細菌細胞が胃腸管内で増殖し、分子の結合対の第1のメンバーを含む、Nissle 1917株(EcN)細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが形成される、ステップと、

機能性薬剤が付着した、前記分子の結合対の第2のメンバーを胃腸管に導入するステップと、を含み、

前記分子の結合対の第1のメンバーおよび第2のメンバーが互いと結合し、それにより、前記機能性薬剤が前記バイオフィルムに付着する、方法。

(項目96)

Cs g Aタンパク質をコードするネイティブな配列を欠くように遺伝子改変された細菌細胞。

(項目97)

E.coliである、項目96に記載の細菌。

(項目98)

Nissle 1917株(EcN)である、項目96に記載の細菌。

(項目99)

Cs g Aタンパク質をコードするネイティブな配列を欠くように遺伝子改変されており、ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結されたCs g Aタンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を含む細菌細胞であって、前記リンカーが、[GG

G S]_n (式中、nは、2から20までの整数である) (配列番号12)を含む、細菌細胞。

(項目100)

C s g Aタンパク質をコードするネイティブな配列を欠くように遺伝子改変されており、ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結されたC s g Aタンパク質の融合物をコードする核酸配列を含むベクターを含む細菌細胞であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、nは、2から20までの整数である) (配列番号12)を含む、細菌細胞。

(項目101)

C s g Aタンパク質をコードするネイティブな配列を欠くように遺伝子改変されており、ネイティブでない機能性ポリペプチドにリンカーによって連結されたC s g Aタンパク質融合物をコードする外来核酸配列を発現する細菌細胞であって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、nは、2から20までの整数である) (配列番号12)を含む、細菌細胞。

(項目102)

胃腸管の炎症を有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、組織結合性ポリペプチドにリンカーによって連結されたC s g Aタンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現するE . c o l i細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、nは、2から20までの整数である) (配列番号12)を含む、ステップを含み、

前記E . c o l i細菌細胞が、胃腸管の組織に前記組織結合性ポリペプチドによって付着し、それにより、前記E . c o l i細菌細胞が前記組織に、炎症を軽減する様式で局在化する、方法。

(項目103)

前記E . c o l i細菌細胞が増殖し、前記組織に付着した、E . c o l i細菌細胞の集団を含むバイオフィームが形成される、項目102に記載の方法。

(項目104)

前記組織結合性ポリペプチドが、C P 1 5、P 8、A 1、T 1 8、T T F 1、T T F 2またはT T F 3である、項目102に記載の方法。

(項目105)

前記炎症が、炎症性腸疾患に由来する、項目102に記載の方法。

(項目106)

前記炎症が、クローン病または潰瘍性大腸炎に由来する、項目102に記載の方法。

(項目107)

胃腸管の炎症を有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、抗炎症性ポリペプチドにリンカーによって連結されたC s g Aタンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現するE . c o l i細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、nは、2から20までの整数である) (配列番号12)を含む、ステップを含み、

前記E . c o l i細菌細胞が前記胃腸管内で増殖し、前記抗炎症性ポリペプチドを含む、E . c o l i細菌細胞の集団を含むバイオフィームが、炎症を軽減する様式で形成される、方法。

(項目108)

前記抗炎症性ポリペプチドが、T T F 1、T T F 2またはT T F 3である、項目107に記載の方法。

(項目109)

前記炎症が、炎症性腸疾患またはクローン病に由来する、項目107に記載の方法。

(項目110)

前記抗炎症性ポリペプチドが放出される、項目107に記載の方法。

(項目111)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 0 7 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 0 7 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、炎症の結果として産生されるプロテアーゼによる前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 0 7 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗炎症性ポリペプチドが、MMP プロテアーゼによる前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 0 7 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

胃腸管のがんを有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、抗がんポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する E . c o l i 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である)

(配列番号 1 2) を含む、ステップを含み、

前記 E . c o l i 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、抗がんポリペプチドを含む、E . c o l i 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが、がんの増殖を低減する様式で形成される、方法。

(項目 1 1 6)

前記抗がんポリペプチドが、成長阻害性の生物学的製剤である、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 7)

前記抗がんポリペプチドが放出される、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 8)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗がんポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 9)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗がんポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 2 0)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗がんポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 2 1)

胃腸管内に微生物病原体を有する生物を処置する方法であって、

前記生物に、抗微生物性ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する E . c o l i 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、ステップを含み、

前記 E . c o l i 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、前記抗微生物性ポリペプチドを含む、E . c o l i 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが前記微生物病原体の増殖を低減する様式で形成される、方法。

(項目 1 2 2)

前記微生物病原体が C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e である、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記抗微生物性ポリペプチドが、コプリシン、ツリシン C D、ランチビオティクス、ナイシン、アクタガルジン、カテリシジンまたは L L - 3 7 である、項目 1 2 1 に記載の方

法。

(項目 1 2 4)

前記抗微生物性ポリペプチドが放出される、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 5)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 6)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 7)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 8)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、胃腸管内のプロテアーゼ C D 2 8 3 0 による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 9)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記抗微生物性ポリペプチドが、微生物病原体に曝露すると放出される、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 3 0)

診断用ポリペプチドを生物の胃腸管に送達する方法であって、

前記生物に、診断用ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する E . c o l i 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である)

(配列番号 1 2) を含む、ステップを含み、

前記 E . c o l i 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、前記診断用ポリペプチドを含む、E . c o l i 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが形成される、方法。

(項目 1 3 1)

前記診断用ポリペプチドを検出する、項目 1 3 0 に記載の方法。

(項目 1 3 2)

前記診断用ポリペプチドが、造影剤または色素をさらに含む、項目 1 3 0 に記載の方法

。

(項目 1 3 3)

前記診断用ポリペプチドが放出される、項目 1 3 0 に記載の方法。

(項目 1 3 4)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記診断用ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 3 0 に記載の方法。

(項目 1 3 5)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記診断用ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 3 0 に記載の方法。

(項目 1 3 6)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記診断用ポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 3 0 に記載の方法。

(項目 1 3 7)

生物の胃腸管内の標的を結合捕捉する方法であって、

前記生物に、捕捉剤ポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する E . c o l i 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である)

(配列番号 1 2) を含む、ステップを含み、

前記 E . c o l i 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、前記捕捉剤ポリペプチドを含む、E .

c o l i 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが形成され、
前記捕捉標的が前記捕捉剤ポリペプチドに結合する、方法。

(項目 1 3 8)

結合した捕捉標的を含むバイオフィルムが前記生物から排出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 3 9)

結合した捕捉標的を含むバイオフィルムが組織から除去され、前記生物から排出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 0)

結合した捕捉標的を含むバイオフィルムが天然のプロセスによって組織から除去され、そして前記生物から排出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 1)

前記捕捉剤ポリペプチドが放出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 2)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記捕捉剤ポリペプチドが、前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 3)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記捕捉剤ポリペプチドが、酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 4)

前記リンカーが、切断可能なリンカーであり、前記捕捉剤ポリペプチドが、胃腸管内の酵素による前記リンカーの切断によって放出される、項目 1 3 7 に記載の方法。

(項目 1 4 5)

機能性薬剤を生物の胃腸管に送達する方法であって、
前記生物に、分子の結合対の第 1 のメンバーであるポリペプチドにリンカーによって連結された C s g A タンパク質の融合物をコードする外来核酸配列を発現する E . c o l i 細菌細胞を導入するステップであって、前記リンカーが、[G G G S]_n (式中、n は、2 から 2 0 までの整数である) (配列番号 1 2) を含む、ステップであって、
前記 E . c o l i 細菌細胞が胃腸管内で増殖し、分子の結合対の第 1 のメンバーを含む、E . c o l i 細菌細胞の集団を含むバイオフィルムが形成される、ステップと、
機能性薬剤が付着した、前記分子の結合対の第 2 のメンバーを胃腸管に導入するステップと、を含み、
前記分子の結合対の第 1 のメンバーと第 2 のメンバーが互いと結合し、それにより、前記機能性薬剤が前記バイオフィルムに付着する、方法。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 6】

以下の表 1 に記載の通り、C s g A と F L A G ドメインとを接続するリンカーとして 6 種の異なるドメインをデザインした。

【表 1】

プラスミド名	リンカーの説明	リンカー	完全な配列
pBbE1a-CsgA-F12-FLAG	柔軟 [GGGS]x3	F12	GGGSGGGSGGGS (配列番号 5)
pBbE1a-CsgA-F24-FLAG	柔軟 [GGGS]x6	F24	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (配列番号 6)
pBbE1a-CsgA-F48-FLAG	柔軟 [GGGS]x12	F48	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS (配列番号 7)
pBbE1a-CsgA-Pro12-FLAG	ポリプロリン [P]x12	P12	PPPPPPPPPPPP (配列番号 8)
pBbE1a-CsgA-Pro24-FLAG	ポリプロリン [P]x24	P24	PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP (配列番号 9)
pBbE1a-CsgA-EK3-FLAG	アルファヘリックス [EAAAK]x3	EK3	EAAAKEAAAKEAAK (配列番号 10)
pBbE1a-CsgA-EK9-FLAG	アルファヘリックス [EAAAK]x9	EK9	EAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAK (配列番号 11)