

【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23年6月16日 (2011.6.16)

【公表番号】特表2010-524506(P2010-524506A)

【公表日】平成22年7月22日 (2010.7.22)

【年通号数】公開・登録公報2010-029

【出願番号】特願2010-506503(P2010-506503)

【国際特許分類】

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 R 1/39 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 M 1/34 Z N A A

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 37/00 1 0 2

G 0 1 N 37/00 1 0 3

G 0 1 N 33/50 Z

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:39

【手続補正書】

【提出日】平成23年4月20日 (2011.4.20)

【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】

Pseudomonas fluorescens (*P. fluorescens*) 宿主細胞の少なくとも第 1 および第 2 の集団を含むアレイであって、各集団が、

a) プロテアーゼをコードする少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現が低減するように遺伝子改変されている少なくとも 1 つの *P. fluorescens* 宿主細胞集団、

b) タンパク質プロセッシング、フォールディングまたは移行を調節するタンパク質をコードする少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現が増大するように遺伝子改変されている少なくとも 1 つの *P. fluorescens* 宿主細胞集団、ならびに

c) (a) および (b) に従って遺伝子改変されている少なくとも 1 つの *P. fluorescens* 宿主細胞集団

からなる群から選択され、アレイ内の各集団が同一でなく、各集団が物理的に相互に離れているアレイ。

【請求項 2】

前記ステップ (b) のプロテアーゼが表 2 に記載のプロテアーゼから選択される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 3】

前記ステップ (c) のタンパク質プロセッシング、フォールディング、または移行を調節するタンパク質が、表 1 に記載のタンパク質フォールディング調節因子から選択される、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 4】

プロテアーゼをコードする少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現が減少するようにまたはタンパク質プロセッシング、フォールディングもしくは移行を調節するタンパク質をコードする少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現が増大するように遺伝子改変されていない少なくとも 1 つの *P. fluorescens* 宿主細胞集団をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 5】

プロテアーゼをコードする 2 つ以上の標的遺伝子の発現が減少するようにまたはタンパク質プロセッシング、フォールディングもしくは移行を調節するタンパク質をコードする 2 つ以上の標的遺伝子の発現が増大するように遺伝子改変されている少なくとも 2 つの *P. fluorescens* 宿主細胞集団を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 6】

前記アレイが、前記アレイのハイスループットスクリーニングに役立つフォーマットである、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 7】

前記アレイが 96 ウェルフォーマットである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 8】

対象とする少なくとも 1 つの異種タンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子を含む発現コンストラクトで形質転換された場合、前記対象とする少なくとも 1 つの異種タンパク質を発現できる少なくとも 1 つの *P. fluorescens* 宿主細胞集団を含むアレイである、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のアレイ。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のアレイを含むキット。

【請求項 10】

対象とする少なくとも 1 つの異種タンパク質を発現するのに最適な *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*) 宿主細胞集団を同定する方法であって、

a) 請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のアレイを得るステップと、

b) 対象とする少なくとも 1 つの異種タンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子を含む発現カセットを、*P. fluorescens* 宿主細胞の各集団に導入するステップと、

c) 前記対象とするタンパク質の発現に十分な条件下で前記少なくとも 1 つの細胞集団を維持するステップであって、前記細胞集団はステップ (b) で前記発現カセットを導入されたものであり、

d) 前記対象とする少なくとも 1 つの異種タンパク質を産生するための最適な *P. fluorescens* 宿主細胞を選択するステップと

を含み、最適な *P. fluorescens* 宿主細胞集団で発現された前記対象とする異種タンパク質が、前記最適な細胞集団で、アレイにおける他の *P. fluorescens* 宿主細胞集団で発現されたものと比較して改善された発現、改善された活性、改善された溶解性、改善された移行、または低減したタンパク分解のうち 1 つまたは複数を示す方法。

【請求項 11】

前記発現カセットが、前記対象とする異種タンパク質に作動可能に連結したシグナリングペプチドをさらに含み、任意選択で、前記シグナリングペプチドが分泌シグナルペプチドである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記発現カセットが、Pseudomonas fluorescens 宿主細胞に由来し、その中に前記発現カセットが導入される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

対象とする異種タンパク質の発現に最適な Pseudomonas fluorescens (P. fluorescens) 宿主細胞を同定する方法であって、

a) P. fluorescens 細胞の少なくとも第 1 および第 2 の集団を含む、請求項 1 に記載のいずれかのアレイを得るステップであって、各集団が、プロテアーゼをコードする少なくとも 1 つの標的遺伝子の発現が低減するように遺伝子改変されており、

b) ステップ (a) で改変された P. fluorescens 宿主細胞を溶解するステップと、

c) ステップ (b) で溶解した、改変された P. fluorescens 宿主細胞各集団の細胞の溶解物を、対象とする異種タンパク質と接触させるステップと、

d) 最適な P. fluorescens 宿主細胞集団を選択するステップと
を含み、前記最適な P. fluorescens 宿主細胞集団が、ステップ (c) での接触において、アレイにおける他の P. fluorescens 宿主細胞集団と比較して、対象とする異種タンパク質の分解レベルが低下した集団である方法。