

【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 20 年 1 月 10 日 (2008.1.10)

【公表番号】特表 2007-511238 (P2007-511238A)

【公表日】平成 19 年 5 月 10 日 (2007.5.10)

【年通号数】公開・登録公報 2007-017

【出願番号】特願 2006-541422 (P2006-541422)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 11 月 13 日 (2007.11.13)

【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】

a. 組換えポリペプチドをコードする核酸と；

b. 原栄養能を栄養要求性宿主細胞へ回復させる少なくとも 1 つのポリペプチドをコードする核酸と；

を含む核酸構築物を含む核酸構築物を含む細菌発現系で使用するための、栄養要求性シュードモナス (Pseudomonad) 細胞。

【請求項 2】

組換えポリペプチドを産生するプロセスであって：

a. 少なくとも 1 つの代謝産物に対する栄養要求株であるように遺伝子改変されたシュードモナス (Pseudomonad) 細胞において組換えポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程と；

b. 原栄養能を栄養要求性細胞に回復させるポリペプチドをコードする核酸を発現させる工程と；

c. 栄養要求性代謝産物の欠乏した培地上で細胞を培養する工程と；

を含むプロセス。

【請求項 3】

l a c I 遺伝子の少なくとも 1 つの染色体挿入を含むシュードモナス (Pseudomonad) において組換えポリペプチドをコードする核酸を発現する工程を含む、組換えポリペプチドを産生するためのプロセスであって、l a c I 遺伝子が完全または切断 P l a c - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外である、プロセス。

【請求項 4】

シュードモナス (Pseudomonad) 細胞において組換えポリペプチドをコードする核酸を発現する工程を含む、組換えポリペプチドを産生するためのプロセスであって、核酸が少なくとも 1 つの l a c オペレーター配列をさらに含み、l a c オペレーター配列が l a c O i d 配列である、プロセス。

【請求項 5】

宿主細胞における組換えポリペプチドの発現を調節するプロセスであって：

a．シュードモナス（Pseudomonad）細胞を選択する工程であって、細胞が細胞に *lacI* 遺伝子を染色体的に挿入することによって遺伝子改変され、*lacI* 遺伝子が完全または切断 *P lac - lacI - lacZYA* オペロンの一部として以外である、工程と；

b．細胞に組換えポリペプチドをコードする核酸に作動可能に結合された *LacI* タンパク質プロモーターを含む核酸構築物を導入する工程と；

を含むプロセス。

【請求項 6】

宿主細胞における組換えポリペプチドの発現を調節するプロセスであって：

a．シュードモナス（Pseudomonad）細胞を選択する工程と；

b．核酸構築物であって：

i．組換えポリペプチドをコードする核酸と；

ii．1つを超える *lac* オペレーター配列と；

を含むプロセス。

【請求項 7】

抗生物質の非存在下での組換えポリペプチドの産生のプロセスであって：

a．シュードモナス（Pseudomonad）細胞を選択する工程であって、細胞が少なくとも1つの代謝産物に対する栄養要求株を誘導するように遺伝子改変され、それにより栄養要求性細胞を産生する、工程であって；

b．細胞に：

i．組換えポリペプチドをコードする核酸と；

ii．原栄養能を栄養要求性宿主細胞に回復させるポリペプチドをコードする核酸と

；

を含む核酸構築物を導入する工程と；

c．組換えポリペプチドおよび原栄養能回復ポリペプチドを細胞内で発現させる工程と

；

d．栄養要求性代謝産物の欠乏した培地上で細胞を増殖させる工程と；

を含むプロセス。

【請求項 8】

シュードモナスが蛍光菌である、請求項 1 ~ 7 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 9】

前記細胞がウラシルまたはプロリンに対して栄養要求性である、請求項 1 ~ 8 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 10】

前記細胞が少なくとも1つの代謝産物に対して栄養要求株であるようにさらに改変されている、請求項 1 ~ 9 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 11】

前記原栄養能回復ポリペプチドが細胞生存に必要な代謝産物の生合成で活性な酵素である、請求項 1 ~ 10 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 12】

前記酵素が、オロトジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼまたは¹ - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼである、請求項 1 ~ 10 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 13】

前記酵素がオロトジン - 5' - ホスフェートデカルボキシラーゼである場合、配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸配列によってコードされており、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 14】

前記酵素が¹ - ピロリン - 5 - カルボキシラートレダクターゼである場合、配列番号

6 および配列番号 8 からなる群から選択される核酸配列によってコードされており、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 1 5】

前記栄養要求性細胞が p y r F 遺伝子および / または p r o C 遺伝子 を無効にすることによって產生される、請求項 1 ~ 1 4 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 1 6】

前記無効にされた p y r F 遺伝子が、配列番号 1 および配列番号 3 からなる群から選択される核酸を含む、請求項 1 5 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 1 7】

前記無効にされた p r o C 遺伝子が配列番号 6 および配列番号 8 からなる群から選択される核酸を含む、請求項 1 5 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 1 8】

前記細胞が、完全または切断 P l a c I - l a c I - l a c Z Y A オペロンの一部として以外の染色体 l a c I インサートも含有する、請求項 1 ~ 1 7 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 1 9】

前記 l a c I 遺伝子が l a c I、l a c I^Q、および l a c I^{Q1} からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 8 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 2 0】

前記核酸構築物が 1 つを超える l a c オペレーター配列をさらに含む、請求項 1 ~ 1 9 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つの l a c オペレーター配列または少なくとも 1 つの l a c O i d 配列がプロモーターの 3 ' 側もしくは 5 ' 側、または 3 ' 側および 5 ' 側の両方に位置する、請求項 2 0 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 2 2】

前記組換えポリペプチドをコードする核酸が、少なくとも 1 つの l a c O i d 配列をさらに含む、請求項 1 ~ 2 1 の細胞またはプロセス。

【請求項 2 3】

前記 l a c O i d 配列が配列番号 1 4 および配列番号 5 9 からなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 2 4】

前記 l a c I 遺伝子がレバンスクラーズ位置に挿入される、請求項 1 ~ 2 3 に記載の細胞またはプロセス。

【請求項 2 5】

選択の間に栄養共生阻害が最小限に抑えられる、請求項 2 ~ 2 4 に記載のプロセス。