

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/046137 A1

(43) Date de la publication internationale
31 mars 2016 (31.03.2016)

W I P O I P C T

- (51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/20 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/72 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP20 15/071619
- (22) Date de dépôt international :
21 septembre 2015 (21.09.2015)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
14 59019 24 septembre 2014 (24.09.2014) FR
- (71) Déposants : UNIVERSITE DE BOURGOGNE [FR/FR]; BP 27877, Esplanade Erasme, 21078 Dijon Cedex (FR). INRA [FR/FR]; 147 rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR). INSERM [FR/FR]; 101 rue Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).
- (72) Inventeurs : NEIERS, Fabrice; 9 rue Roulotte, F-21 110 Pluvault (FR). SEIGNEURIC, Renaud; 6 rue Jean Bon, F-21 110 Magny sur Tille (FR). BRIAND, Loïc; 7 rue Joseph Samson, F-21850 Saint Apollinaire (FR). GARRIDO-FLEURY, Carmen; 13 rue des Pépinières, F-21240 Talant (FR).
- (74) Mandataire : CABINET GUIU - JURISPATENT; 10, rue Paul Thénard, 21000 Dijon (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))



WO 2016/046137 A1

(54) Title : AUTO-INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

(54) Titre : SYSTEME D'EXPRESSION AUTO-INDUCTIBLE

(57) Abstract : The present invention relates in particular to a method for the expression of a protein of interest by a bacterium, notable in that it comprises the culturing of a bacterium temporarily or continuously expressing an Hsp protein, in that said bacterium also comprises a nucleic acid sequence, encoding a protein of interest, under the control of a lac promoter and in that said bacterium is cultured in a medium which does not contain IPTG or a metabolized molecule in such a way as to automatically induce the induction of transcription from the lac promoter.

(57) Abrégé : La présente invention concerne notamment un procédé pour l'expression d'une protéine d'intérêt par une bactérie remarquable en ce qu'il comprend la culture d'une bactérie exprimant de façon temporaire ou continue une protéine Hsp, en ce que ladite bactérie comprend en outre une séquence d'acide nucléique, codant une protéine d'intérêt, sous le contrôle d'un promoteur lac et en ce que ladite bactérie est cultivée dans un milieu ne contenant pas d'IPTG ou une molécule métabolisée de telle sorte à induire automatiquement l'induction de la transcription à partir du promoteur lac.

SYSTEME D'EXPRESSION AUTO- INDUCTIBLE

Domaine technique

La présente invention concerne notamment une bactérie permettant l'expression à haut niveau d'une protéine d'intérêt. La présente invention concerne également un procédé de production d'une protéine d'intérêt mettant en œuvre une bactérie selon l'invention. Par ailleurs, la présente invention concerne également un ensemble de parties permettant d'obtenir une bactérie selon l'invention .

Technique antérieure

La production de protéines recombinantes, comme les enzymes, les hormones et les anticorps, est nécessaire dans de nombreux domaines comme la recherche en biologie, la médecine humaine ou vétérinaire et l'industrie alimentaire. Cette production est souvent faite en cellules procaryotes et plus particulièrement en *Escherichia coli* (*E. coli*) .

Le promoteur lac est le promoteur inductible le plus utilisé pour l'expression de protéine chez *E. coli*. Il peut être notamment utilisé pour induire l'expression de la T7 polymérase. Dans ce système, le gène codant la T7 polymérase est inséré dans le chromosome bactérien sous le contrôle de l'opéron lac. L'ajout d'isopropyle- β -D galactoside (IPTG) dans le milieu de culture permet d'induire efficacement la transcription de la T7 polymérase qui va ensuite pouvoir induire la transcription d'un gène, codant une protéine hétérologue, placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la T7 polymérase.

Toutefois, l'IPTG présente des limitations pour la production industrielle de protéines recombinantes. Ces limitations sont notamment liées au coût et à la toxicité

de l'IPTG. Par ailleurs, l'IPTG doit être introduit à un moment bien précis de la croissance bactérienne ce qui implique la nécessité de suivre précisément la densité cellulaire dans le milieu de culture.

5 Afin de contourner les problèmes liés à l'IPTG, différentes stratégies ont été mises en œuvre. Parmi celle-ci, on peut notamment citer l'utilisation de lactose ou du galactose comme inducteur de transcription. Mais ces derniers ne permettent pas d'atteindre des taux de
10 production équivalents à l'IPTG et nécessitent toujours une surveillance précise de la croissance bactérienne.

Des systèmes auto-inductibles mettant en œuvre des milieux de culture spécifiques, comprenant des molécules métabolisées de telles sortes à induire automatiquement
15 l'induction de la transcription à partir du promoteur lac, ont également été proposés.

Ces derniers systèmes, bien qu'efficaces, peuvent mettre en œuvre des molécules et des milieux qui ne sont pas encore approuvés par les autorités réglementaires. Il
20 existe donc un besoin pour de nouvelles bactéries capables d'exprimer de façon auto-inductible une protéine hétérologue sous le contrôle d'un promoteur lac dans un milieu de culture ne comprenant pas de molécules toxiques.

25 Résumé de l'invention

Ainsi la présente invention concerne notamment un procédé pour l'expression d'une protéine d'intérêt par une bactérie remarquable en ce qu'il comprend la culture d'une
bactérie exprimant de façon temporaire ou continue une
30 protéine Hsp, en ce que ladite bactérie comprend en outre une séquence d'acide nucléique, codant une protéine d'intérêt, sous le contrôle d'un promoteur lac et en ce que

ladite bactérie est cultivée dans un milieu ne contenant pas d'IPTG.

La présente invention concerne également un procédé pour l'expression d'une protéine d'intérêt par une bactérie remarquable en ce qu'il comprend la culture d'une bactérie exprimant de façon temporaire ou continue une protéine Hsp, en ce que ladite bactérie comprend en outre une séquence d'acide nucléique, codant une protéine d'intérêt, sous le contrôle d'un promoteur lac et en ce que ladite bactérie est cultivée dans un milieu ne contenant pas une molécule métabolisée de telle sorte à induire automatiquement l'induction de la transcription à partir du promoteur lac.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « un milieu ne contenant pas une molécule métabolisée de telle sorte à induire automatiquement l'induction de la transcription à partir du promoteur lac » entend signifier que ledit milieu ne contient pas ladite molécule au moment de l'introduction desdites bactéries et que ladite molécule n'est pas introduite, depuis l'extérieur, dans ledit milieu au cours du procédé selon l'invention.

Il a été observé, de façon surprenante, que l'expression d'une protéine Hsp par la bactérie induisait, même en l'absence d'IPTG, la transcription des séquences d'acides nucléiques sous le contrôle d'un promoteur lac. Bien que des milieux ou des conditions de culture particulières sans IPTG puissent conduire à l'induction de la transcription de ces séquences (voir par exemple Studier et al. protein expression and purification, académie press, vol. 41, 1, 2005, 207-234 ou le produit Overnight Express™ Autoinduction Systems de Novagen), la combinaison spécifique d'un promoteur lac et d'une protéine Hsp permet d'obtenir cette induction tout en utilisant les milieux et les conditions de culture classiques.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « promoteur lac » se réfère à un promoteur de l'opéron lac, dont l'activité de transcription est réprimée par une protéine répresseur comme la protéine Lacl codée par le gène lacl mais levée par un inducteur, tel que le lactose ou des analogues de celui-ci (par exemple, l'isopropyle- β -D galactoside (IPTG)). L'inducteur se lie à la protéine répresseur et empêche la répression de la transcription génique.

10 Dans le cadre de la présente invention, le terme « sous le contrôle » entend signifier que la transcription de la séquence d'acide nucléique, codant ladite protéine d'intérêt, est dépendante de l'association d'une polymérase sur ledit promoteur. Avantageusement, ledit promoteur lac est placé en amont de ladite séquence d'acide nucléique, codant ladite protéine d'intérêt.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, ladite protéine d'intérêt n'est pas la β -galactosidase, la lactose perméase et/ou la thiogalactoside transacétylase.

20 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention ladite protéine d'intérêt est une protéine hétérologue.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « protéine hétérologue » entend signifier que ladite protéine n'est pas une protéine naturellement exprimée par ladite bactérie.

Selon un mode de réalisation préféré, ledit acide nucléique codant une protéine d'intérêt est compris dans un premier plasmide. Dans le cadre de ce mode de réalisation, ledit plasmide comprend le promoteur lac.

30 Selon un mode de réalisation préféré, ladite protéine d'intérêt est une protéine recombinante et de façon encore plus préféré une protéine de mammifère et de façon tout à fait préféré une protéine humaine. Selon un mode de

réalisation encore plus préféré ladite protéine recombinante n'est pas une polymérase.

Selon un autre mode de réalisation préféré, ladite protéine d'intérêt est une polymérase. Selon un mode de réalisation encore plus préféré, ladite polymérase est une 5 T7 polymérase.

Dans le cadre de ces deux derniers modes de réalisations, la bactérie selon l'invention comprend en outre une deuxième séquence d'acide nucléique, codant une 10 seconde protéine d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de ladite polymérase. Ainsi, dans ce mode de réalisation c'est l'induction de l'expression de la polymérase qui va permettre l'expression de la protéine d'intérêt. Selon un mode de réalisation préféré ladite 15 deuxième séquence d'acides nucléiques est comprise dans ledit premier plasmide ou dans un second plasmide. Selon un mode de réalisation encore plus préféré, ladite séquence codant pour la polymérase sous le contrôle d'un promoteur Lac est comprise dans le génome de ladite bactérie.

20 Selon un mode de réalisation préféré, ladite protéine Hsp est codée par une séquence d'acides nucléiques sous le contrôle d'un promoteur lac.

Selon un mode de réalisation préféré, ladite bactérie est une E. coli.

25 Selon un mode de réalisation préféré, ladite bactérie appartient à la souche BL21 (DE3) star ou à la souche BL21 (DE3) .

Dans le cadre de la présente invention, le terme « protéine Hsp » fait référence aux « heat shock protein » 30 c.à.d. aux protéines appartenant au groupe de protéines dont l'expression est naturellement induite par un choc thermique. Ces protéines sont bien connues de l'homme du métier. Elles sont notamment impliquées dans le pliage et

le dépliage des autres protéines. Leur expression est augmentée lorsque les cellules sont exposées à des températures élevées ou à d'autres stress. Les Hsp sont trouvées dans presque tous les organismes vivants, de la bactérie à l'homme. Les protéines de choc thermique sont nommées en fonction de leur poids moléculaire. Par exemple, la Hsp60, Hsp70 et Hsp90 se réfèrent à des familles de protéines de choc thermique de l'ordre de 60, 70 et 90 kilodaltons par la taille, respectivement.

10 Dans le cadre de la présente invention, le terme « protéine Hsp » fait référence aux protéines Hsp produites naturellement par les cellules eucaryotes ou procaryotes. Le terme « protéine Hsp » fait également référence aux protéines présentant une séquence ayant une homologie
15 supérieure à 90%, préférentiellement supérieure à 95% et tout à fait préférentiellement supérieure à 99% aux protéines Hsp naturellement produites. Dans le cadre de la présente invention, est considérée comme une séquence protéique, homologue d'une autre séquence protéique, une
20 protéine qui présente, sur un nombre d'acides aminés au moins égal à 80 pourcent du nombre d'acides aminés de la séquence protéique de référence, de préférence sur la longueur totale de la séquence de référence, un pourcentage d'homologie correspondant aux valeurs indiquées
25 précédemment. Le pourcentage d'homologie est calculé en comptant le nombre de positions pour lesquelles les séquences protéiques présentent des acides aminés identiques et en divisant ce nombre de positions identiques par la longueur de la séquence du polypeptide le plus long
30 et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'homologie entre ces deux séquences.

Selon un mode de réalisation préféré, la protéine Hsp est choisie dans le groupe comprenant les Hsp27 (P04792),

Hsp40 (P25685), Hsp60 (P10809), Hsp70 (P08107), Hsp90 (P08238 and P07900) et Hsp110 (Q92598) (Uniprot référence number) .Selon un mode de réalisation préféré, la protéine Hsp est la protéine Hsp70 humaine (Uniprot référence number : P08107) .

Selon un mode de réalisation préféré, ladite bactérie est cultivée dans un milieu liquide.

De façon surprenante, la demanderesse a observé que la concentration en glucose et/ou en lactose du milieu de culture utilisé permet de moduler le moment où la protéine d'intérêt est exprimée par la bactérie selon l'invention.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture comprend du glucose. Selon un mode de réalisation encore plus préféré ledit milieu de culture comprend entre 0.01% et 0.5% de glucose et selon un mode de réalisation tout à fait préféré entre 0.3% et 0.7% de glucose.

Ainsi, selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture comprend du lactose. Selon un mode de réalisation encore plus préféré ledit milieu de culture comprend entre 0.01% et 0.5% de lactose et selon un mode de réalisation tout à fait préféré entre 0.3% et 0.7% de lactose.

25 Description des modes de réalisation

Expression de protéines hétérologues par une bactérie exprimant l'Hsp70 humaine

30 Matériels et méthodes

Dans toutes les expériences suivantes une souche de bactérie E. coli BL21 (DE3)star a été utilisée. Toutefois, l'invention n'est pas limitée à ce type particulier de bactéries .

La séquence codant l'Hsp70 humaine a été clonée dans le plasmide d'expression bactérien pET21d et placée sous le contrôle du promoteur T7lac. Ce plasmide contient par ailleurs un gène de résistance à l'ampicilline .

5 Le plasmide pET21d-Hsp70 a été utilisé pour transformer E. coli BL21(DE3)Star et obtenir une bactérie capable d'exprimer l'Hsp70.

Un second plasmide pET comprenant un gène de résistance à la kanamycine et la même origine de
10 répllication que le plasmide pET21d a été utilisé pour cloner un gène codant pour une protéine hétérologue. Ce second plasmide a été utilisé pour transformer la souche bactérienne codant Hsp70.

La production de cinq protéines hétérologues
15 différentes a été testée, ces protéines sont :

- La méthionine sulfoxyde réductase B (MsrB) de *Xanthomonas compestris*.
- La thioredoxine 1 (Trxl) d'E. coli.
- La purine nucléoside phosphorylase (PNP) d'E.
20 coli.
- Le domaine N-Terminal du récepteur T1R3 d'*Homo sapiens* .
- La miraculine de *Richardella dulcifica* (MCL) .

Ces cinq protéines sont d'origines différentes
25 (bactérie, plante ou homme) et de taille variant de 14kDa à 45kDa. Elles présentent par ailleurs différentes fonctions (enzyme, récepteur ou ligand) et localisation cellulaire (cytoplasme, plasma ou membrane) .

Les bactéries transformées ont été cultivées en
30 milieu LB, dans des volumes différents (5ml, 20 ml, IL) à différentes températures (25°C, 30°C et 37°C).

Les milieux de culture obtenus ont été analysés par électrophorèse PAGE-SDS.

Résultats

Toutes les protéines testées sont exprimées à haut niveau à 37°C en l'absence d'inducteur. Ainsi on peut observer sur les électrophorèses PAGE-SDS que la protéine hétérologue est la protéine la plus fortement exprimée par la bactérie.

Une accumulation des protéines hétérologues est observée pendant au moins 20 heures.

La production des protéines hétérologues n'est pas dépendante du volume de milieu de culture utilisé.

Ces résultats sont retrouvés à toutes les températures compatibles avec la croissance bactérienne.

Le procédé selon l'invention a été mis en œuvre, avec le même succès, avec des protéines hétérologues de mammifères (notamment humaines), de bactéries et de plantes. Parmi celles-ci, on peut notamment citer les GST humaines (GSTA1 et GSTP1), de drosophile (GSTD2 et GSTD7), une lipocaline humaine (LCN1), et l'Hspl10 humaine.

Le procédé selon l'invention fonctionne également quelque soit la localisation de la protéine : membranaire, extracellulaire ou cytoplasmique .

Le procédé selon l'invention n'est pas dépendant de la structure du plasmide utilisé et a pu être mis en œuvre avec succès avec les plasmides pD431-SR, pD451-SR, pD434-SR, pD434-WR, pD454-WR, pJ431:2047, pJ414:2047 (DNA2 .0 Menlo Park, USA) .

Effets du glucose et du lactose sur l'expression des protéines d'intérêts

Matériels et méthodes

Les bactéries transformées pour exprimer les protéines recombinantes citées précédemment ont été

cultivées en milieu LB supplémenté avec 0.05% de glucose ou 0.2% de lactose.

La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la densité optique à 600nm et la quantité de protéine recombinate produite a été mesurée par chromatographie PAGE-SDS du surnageant de culture.

Résultats

En l'absence de glucose ou de lactose, l'expression des protéines d'intérêt apparaît à une densité optique de 1.

L'ajout de 0.05% de glucose dans le milieu retarde l'expression de la protéine d'intérêt à une densité optique à 600nm de 1.5.

L'ajout de 0.02% de lactose permet d'accélérer la production de la protéine d'intérêt à une densité optique de 0.7.

REVENDICATIONS

1 - Procédé pour l'expression d'une protéine d'intérêt par une bactérie **caractérisé** en ce qu'il comprend la culture d'une bactérie exprimant de façon temporaire ou continue une protéine Hsp, en ce que ladite bactérie
5 comprend en outre une séquence d'acide nucléique, codant une protéine d'intérêt, sous le contrôle d'un promoteur lac et en ce que ladite bactérie est cultivée dans un milieu ne contenant pas d'IPTG ou une molécule métabolisée de telle sorte à induire automatiquement l'induction de la
10 transcription à partir du promoteur lac.

2 - Procédé selon la revendication précédente **caractérisé** en ce que ledit acide nucléique codant une protéine d'intérêt est compris dans un premier plasmide.

15

3 - Procédé selon l'une des revendications précédentes **caractérisé** en ce que ladite protéine d'intérêt est une protéine recombinante.

4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 2 **caractérisé** en ce que ladite protéine d'intérêt est une polymérase .

5 - Procédé selon la revendication précédente
25 **caractérisé** en ce que ladite polymérase est une T7 polymérase .

6 - Procédé selon l'une des revendications 4 à 5 **caractérisé** en ce que ladite bactérie comprend en outre une
30 deuxième séquence d'acide nucléique, codant une seconde protéine d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de ladite polymérase.

7 - Procédé selon la revendication précédente
caractérisé en ce que ladite deuxième séquence d'acides
nucléiques est comprise dans ledit premier plasmide ou dans
5 un second plasmide.

8 - Procédé selon l'une des revendications
précédentes **caractérisé** en ce que ladite protéine Hsp est
codée par une séquence d'acides nucléiques sous le contrôle
10 d'un promoteur lac.

9 - Procédé selon l'une des revendications
précédentes **caractérisé** en ce que ladite bactérie est une
E. coli.

15

10 - Procédé selon la revendication 9 **caractérisé** en
ce que ladite bactérie appartient à la souche BL21 (DE3) ou
BL21 (DE3) star.

20 11 - Procédé selon l'une des revendications
précédentes **caractérisé** en ce que la protéine Hsp est
choisie dans le groupe comprenant l'Hsp40, l'Hsp70,
l'Hsp90 et l'Hsp110.

25 12 - Procédé selon l'une des revendications
précédentes **caractérisé** en ce que la protéine Hsp est la
protéine Hsp70 humaine.

30 13 - Procédé selon la revendication précédente
caractérisé en ce que ladite bactérie est cultivée dans un
milieu liquide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/071619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N1/20 C12N15/72 C12P21/02 C07K14/47
 ADD. C12R1/19

According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification System followed by classification symbols)
 C12N C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal , BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OGANESYAN ET AL: "Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 52, no. 2, 27 January 2007 (2007-01-27), pages 280-285, XP005737467, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2006.09.015	1-7, 9, 11, 13
Y	the whole document ----- -/-	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Spécial catégories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 9 December 2015	Date of mailing of the international search report 21/12/2015
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lejeune, Robert
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/071619

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>LINDA L STEPHENS ET AL: "Co-expression of the molecular chaperone, Hsp70, improves the heterologous production of the antimicrobial drug target GTP cyclohydrolase I.GCHI", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 77, no. 2, 22 January 2011 (2011-01-22), pages 159-165, XP028176503, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2011.01.005 [retrieved on 2011-01-22] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>MARCION GUILLAUME ET AL: "C-terminal amino acids are essential for human heat shock protein 70 dimerization", CELL STRESS AND CHAPERONES, ALLEN PRESS ONLINE PUBLISHING, EDINBURGH, GB, vol. 20, no. 1, 17 July 2014 (2014-07-17), pages 61-72, XP035409489, ISSN: 1355-8145, DOI: 10.1007/S12192-014-0526-3 [retrieved on 2014-07-17] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>NISHIHARA ET AL: "Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in Escherichia coli", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 5, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 1694-1699, XP002135426, ISSN: 0099-2240 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>LEE S C ET AL: "EFFECT OF OVERPRODUCTION OF HEAT SHOCK CHAPERONES GROESL AND DNAK ON HUMAN PROCOLLAGENASE PRODUCTION IN ESCHERICHIA COLI", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 267, no. 5, 15 February 1992 (1992-02-15), pages 2849-2852, XP002029694, ISSN: 0021-9258 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/071619

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STUDIER ET AL: "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 41, no. 1, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 207-234, XP027430000, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016 [retrieved on 2005-03-28] the whole document -----</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2015/071619

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/20 C12N15/72 C12P21/02 C07K14/47 ADD. C12PJ/19</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p> <p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C12P C07K</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal , BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	OGANESYAN ET AL: "Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 52, no. 2, 27 janvier 2007 (2007-01-27) , pages 280-285 , XP005737467 , ISSN: 1046-5928, DOI : 10.1016/J.PEP.2006.09.015	1-7 , 9 , 11 , 13
Y	Le document en entier ----- -/- .	1-13
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p>9 décembre 2015</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p>21/12/2015</p>
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>Lejeune, Robert</p>

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>LINDA L STEPHENS ET AL: "Co-expression of the molecular chaperone, Hsp70, improves the heterologous production of the antimicrobial drug target GTP cyclohydrolase I.GCHI", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 77, no. 2, 22 janvier 2011 (2011-01-22), pages 159-165, XP028176503, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2011.01.005 [extrait le 2011-01-22] Le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>MARCION GUILLAUME ET AL: "C-terminal amino acids are essential for human heat shock protein 70 dimerization", CELL STRESS AND CHAPERONES, ALLEN PRESS ONLINE PUBLISHING, EDINBURGH, GB, vol. 20, no. 1, 17 juillet 2014 (2014-07-17), pages 61-72, XP035409489, ISSN: 1355-8145, DOI: 10.1007/S12192-014-0526-3 [extrait le 2014-07-17] Le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>NISHIHARA ET AL: "Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in Escherichia coli", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 5, 1 mai 1998 (1998-05-01), pages 1694-1699, XP002135426, ISSN: 0099-2240 Le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
Y	<p>LEE S C ET AL: "EFFECT OF OVERPRODUCTION OF HEAT SHOCK CHAPERONES GROESL AND DNAK ON HUMAN PROCOLLAGENASE PRODUCTION IN ESCHERICHIA COLI", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 267, no. 5, 15 février 1992 (1992-02-15), pages 2849-2852, XP002029694, ISSN: 0021-9258 Le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-13
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>STUDIER ET AL: "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 41, no. 1, 1 mai 2005 (2005-05-01) , pages 207-234, XP027430000, ISSN: 1046-5928, DOI : 10.1016/J.PEP.2005.01.016 [extrait le 2005-03-28] le document en entier -----</p>	1-13