

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-519879  
(P2015-519879A)

(43) 公表日 平成27年7月16日(2015.7.16)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z NAA	4 B 01 8
C 07 K 14/00 (2006.01)	C 07 K 14/00		4 B 02 4
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21		4 B 06 4
C 12 P 21/02 (2006.01)	C 12 P 21/02	C	4 B 06 5
A 23 L 1/305 (2006.01)	A 23 L 1/305		4 C 08 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 110 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2015-503331 (P2015-503331)	(71) 出願人	514244103 プロニュートリア・インコーポレイテッド P r o n u t r i a , I n c .
(86) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		アメリカ合衆国O 2 1 3 9 マサチューセッ ツ州ケンブリッジ、メモリアル・ドライブ 8 4 0 番、サード・フロア
(85) 翻訳文提出日	平成26年11月21日 (2014.11.21)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/032212	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(87) 國際公開番号	W02013/148329	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 慎史
(87) 國際公開日	平成25年10月3日 (2013.10.3)	(74) 代理人	100157956 弁理士 稲井 史生
(31) 優先権主張番号	61/615,816		
(32) 優先日	平成24年3月26日 (2012.3.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】荷電栄養タンパク質および方法

## (57) 【要約】

荷電栄養タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH 7で少なくとも 12.5 g / L の水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH 7で少なくとも 50 g / L の水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH 7で少なくとも 100 g / L の水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、a) 基準タンパク質中に存在する全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合以上の栄養タンパク質中に存在する全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、b) 基準タンパク質中に存在する全アミノ酸残基に対するロイシン残基の割合以上の栄養タンパク質中に存在する全アミノ酸残基に対するロイシン残基の割合、および c) 基準タンパク質中に存在する全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合以上の栄養タンパク質中に存在する全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合のレベルのうちの少なくとも 1 つを含む。また、とりわけ、タンパク質をコードする核酸、タンパク質を産生する組換え微生物、組換え微生物を用いてタンパク質を作製する方法、タンパク質を含む組成物、およびタンパク質を用いる方法も提供される。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

第1のポリペプチド配列を含む第1のポリペプチドを含む単離された栄養タンパク質であって、前記第1のポリペプチド配列はpH7で少なくとも12.5g/Lの水溶解性を有し、前記第1のポリペプチド配列はpH7で-25以下の計算上の溶媒和スコアを有する、単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2】**

前記第1のポリペプチド配列は、pH7で少なくとも50g/Lの水溶解性を有する、請求項1に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 3】**

前記第1のポリペプチド配列は、pH7で少なくとも100g/Lの水溶解性を有する、請求項1に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 4】**

前記第1のポリペプチド配列は、  
a. 少なくとも8%の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、  
b. 少なくとも4%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、および  
c. 少なくとも19%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合、を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 5】**

前記第1のポリペプチド配列は、各必須アミノ酸のうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項4に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 6】**

前記第1のポリペプチド配列は、  
a. 少なくとも24%の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、  
b. 少なくとも11%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、および  
c. 少なくとも49%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合、のうちの少なくとも1つを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 7】**

前記第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも70%の相同性を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 8】**

前記第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも95%の相同性を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 9】**

前記第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも70%の相同性を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 10】**

前記第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも95%の相同性を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 11】**

前記第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質からなる、請求項1～10のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 12】**

前記第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質ではない、請求項1～10のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 13】**

前記第1のポリペプチド配列は、アレルゲンではない、請求項1～12のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

10

20

30

40

50

**【請求項 1 4】**

前記第1のポリペプチド配列が、既知のアレルゲンに対して5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85、または90%未満の全体的相同性を有する、請求項1～13のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 1 5】**

前記第1のポリペプチド配列は、毒素ではない、請求項1～14のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 1 6】**

前記第1のポリペプチド配列は、既知の毒素に対して50%未満の全体的相同性を有する、請求項15に記載の単離された栄養タンパク質。 10

**【請求項 1 7】**

前記第1のポリペプチド配列は、乳清よりも短い模擬胃内消化半減期を有する、請求項1～16のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 1 8】**

前記第1のポリペプチド配列は、60分未満または30分未満の模擬胃内消化半減期を有する、請求項17に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 1 9】**

前記第1のポリペプチド配列は、10分未満の模擬胃内消化半減期を有する、請求項18に記載の単離された栄養タンパク質。 20

**【請求項 2 0】**

前記第1のポリペプチド配列は、模擬胃液中で完全に消化される、請求項1～19のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 1】**

前記第1のポリペプチド配列は、ペプシン認識部位、トリプシン認識部位、およびキモトリプシン認識部位から選択される少なくとも1つのプロテアーゼ認識部位を含む、請求項1～20のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 2】**

前記第1のポリペプチド配列は、0個または1個のシステイン残基を含む、請求項1～21のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。 30

**【請求項 2 3】**

前記第1のポリペプチド配列は、ジスルフィド結合を含まない、請求項1～22のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 4】**

前記第1のポリペプチド配列は、N結合型グリコシル化を含まない、請求項1～23のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 5】**

前記第1のポリペプチド配列は、O結合型グリコシル化を含まない、請求項1～24のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 6】**

前記第1のポリペプチド配列は、凝集に耐性を示す、請求項1～25のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 7】**

前記第1のポリペプチド配列は、pH7でアニオン性である、請求項1～26のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 8】**

前記第1のポリペプチド配列は、-40以下の計算上の溶媒和スコアを有する、請求項1～27のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項 2 9】**

前記第1のポリペプチド配列は、-30以下の計算上の溶媒和スコアを有する、請求項 50

28に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項30】**

前記第1のポリペプチド配列は、0.75以下の計算上の凝集スコアを有する、請求項1～29のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項31】**

前記第1のポリペプチド配列は、0.5以下の計算上の凝集スコアを有する、請求項30に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項32】**

前記第1のポリペプチド配列は、0.3以下の計算上の凝集スコアを有する、請求項31に記載の単離された栄養タンパク質。

10

**【請求項33】**

前記第1のポリペプチド配列は、

i. 配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列、

ii. 配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、および

iii. 配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～32のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項34】**

前記第1のポリペプチド配列は、

20

i. 配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列、

ii. 配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、および

iii. 配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1～33のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項35】**

前記第1のポリペプチド配列は、配列番号1～配列番号490から選択される少なくとも1つの基準アミノ酸配列と、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%相同である、請求項1～34のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

30

**【請求項36】**

第1のポリペプチド配列を含む第1のポリペプチドを含む単離された栄養タンパク質であって、前記単離された栄養タンパク質はpH7で少なくとも12.5g/Lの水溶解性を有し、前記第1のポリペプチド配列はpH7で-25以下の計算上の溶媒和スコアを有する、単離された栄養タンパク質。

**【請求項37】**

前記単離された栄養タンパク質は、pH7で少なくとも50g/Lの水溶解性を有する、請求項36に記載の単離された栄養タンパク質。

40

**【請求項38】**

前記単離された栄養タンパク質は、pH7で少なくとも100g/Lの水溶解性を有する、請求項37に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項39】**

前記単離された栄養タンパク質は、

a. 少なくとも8%の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、

b. 少なくとも4%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、および

c. 少なくとも19%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合、を含む、請求項36～38のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【請求項40】**

50

前記単離された栄養タンパク質は、各必須アミノ酸のうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項3～9に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項41】

前記単離された栄養タンパク質は、

a. 少なくとも24%の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、

b. 少なくとも11%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、および

c. 少なくとも49%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合、のうちの少なくとも1つを含む、請求項36～40のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項42】

前記単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも70%の相同性を含む、請求項36～41のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項43】

前記単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも95%の相同性を含む、請求項36～41のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項44】

前記単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも70%の相同性を含む、請求項36～41のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項45】

前記単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも95%の相同性を含む、請求項36～41のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項46】

前記単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質からなる、請求項36～41のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項47】

前記単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質ではない、請求項36～41のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項48】

前記単離された栄養タンパク質は、アレルゲンではない、請求項36～47のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項49】

前記単離された栄養タンパク質は、既知のアレルゲンに対して5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85、または90%未満の全体的相同性を有する、請求項36～48のいずれかに記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項50】

前記単離された栄養タンパク質は、毒素ではない、請求項36～49のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項51】

前記単離された栄養タンパク質は、既知の毒素に対して50%未満の全体的相同性を有する、請求項50に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項52】

前記栄養タンパク質は、乳清よりも短い模擬胃内消化半減期を有する、請求項36～51のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項53】

前記栄養タンパク質は、60分未満または30分未満の模擬胃内消化半減期を有する、

10

20

30

40

50

請求項 5 2 に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 5 4】

前記単離された栄養タンパク質は、10分未満の模擬胃内消化半減期を有する、請求項 5 3 に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 5 5】

前記単離された栄養タンパク質は、模擬胃液中で完全に消化される、請求項 3 6 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 5 6】

前記単離された栄養タンパク質は、ペプシン認識部位、トリプシン認識部位、およびキモトリプシン認識部位から選択される少なくとも 1 つのプロテアーゼ認識部位を含む、請求項 3 6 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。10

【請求項 5 7】

前記単離された栄養タンパク質は、0 個または 1 個のシステイン残基を含む、請求項 3 6 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 5 8】

前記単離された栄養タンパク質は、ジスルフィド結合を含まない、請求項 3 6 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 5 9】

前記単離された栄養タンパク質は、N 結合型グリコシル化を含まない、請求項 3 6 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。20

【請求項 6 0】

前記単離された栄養タンパク質は、O 結合型グリコシル化を含まない、請求項 3 6 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 1】

前記単離された栄養タンパク質は、凝集に耐性を示す、請求項 3 6 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 2】

前記単離された栄養タンパク質は、pH 7 でアニオン性である、請求項 3 6 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 3】

前記単離された栄養タンパク質は、-40 以下の計算上の溶媒和スコアを有する、請求項 3 6 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。30

【請求項 6 4】

前記単離された栄養タンパク質は、-30 以下の計算上の溶媒和スコアを有する、請求項 6 3 に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 5】

前記単離された栄養タンパク質は、0.75 以下の計算上の凝集スコアを有する、請求項 3 6 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 6】

前記単離された栄養タンパク質は、0.5 以下の計算上の凝集スコアを有する、請求項 6 5 に記載の単離された栄養タンパク質。40

【請求項 6 7】

前記単離された栄養タンパク質は、0.3 以下の計算上の凝集スコアを有する、請求項 6 6 に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 8】

前記単離された栄養タンパク質は、

i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列、

i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、および

i i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択50

されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 6 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 6 9】

前記単離された栄養タンパク質は、

i . 配列番号 1 ~ 配列番号 4 9 0 から選択されるアミノ酸配列、

i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 4 9 0 から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、および

i i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 4 9 0 から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 3 6 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

10

【請求項 7 0】

前記単離された栄養タンパク質は、配列番号 1 ~ 配列番号 4 9 0 から選択される少なくとも 1 つの基準アミノ酸配列と、少なくとも 4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 9 9 . 5 % 相同である、請求項 3 6 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 7 1】

前記単離された栄養タンパク質は、親和性精製のためのポリペプチドタグをさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 、1 2 ~ 3 3 、3 5 ~ 4 5 、4 7 ~ 6 8 、および 7 0 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質。

20

【請求項 7 2】

親和性精製のための前記タグは、ポリヒスチジンタグである、請求項 7 1 に記載の単離された栄養タンパク質。

【請求項 7 3】

請求項 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の栄養タンパク質をコードする核酸配列を含む、単離された核酸。

【請求項 7 4】

前記単離された核酸は、ゲノム D N A 、c D N A 、センス R N A 、およびアンチセンス R N A から選択される、請求項 7 3 に記載の単離された核酸。

30

【請求項 7 5】

前記単離された核酸は、ゲノム D N A である、請求項 7 4 に記載の単離された核酸。

【請求項 7 6】

前記単離された核酸は、c D N A である、請求項 7 4 に記載の単離された核酸。

【請求項 7 7】

前記栄養タンパク質をコードする前記核酸配列と作動可能に連結された発現制御配列をさらに含む、請求項 7 3 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸。

【請求項 7 8】

請求項 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の栄養タンパク質をコードする核酸配列を含む、ベクター。

40

【請求項 7 9】

前記栄養タンパク質をコードする前記核酸配列と作動可能に連結された発現制御配列をさらに含む、請求項 7 8 に記載のベクター。

【請求項 8 0】

請求項 7 3 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の核酸、ならびに請求項 7 8 および 7 9 のいずれか 1 項に記載のベクターのうちの少なくとも 1 つを含む、組換え微生物。

【請求項 8 1】

前記組換え微生物は、原核生物である、請求項 8 0 に記載の組換え微生物。

【請求項 8 2】

前記原核生物は、従属栄養性である、請求項 8 1 に記載の組換え原核生物。

50

**【請求項 8 3】**

前記原核生物は、独立栄養性である、請求項 8 1 に記載の組換え原核生物。

**【請求項 8 4】**

前記原核生物は、細菌である、請求項 8 1 に記載の組換え原核生物。

**【請求項 8 5】**

前記組換え微生物による前記栄養タンパク質の生成に十分な条件下で、請求項 8 0 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物を培養することを含む、請求項 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の栄養タンパク質を作製する方法。

**【請求項 8 6】**

前記培養物から前記栄養タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 8 5 に記載の方法。 10

**【請求項 8 7】**

請求項 1 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の単離された栄養タンパク質と、少なくとも 1 つの第 2 の構成成分とを含む、栄養組成物。

**【請求項 8 8】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、遊離アミノ酸、炭水化物、脂質、ミネラルまたはミネラル源、ビタミン、栄養補助食品、生物、医薬品、および賦形剤から選択される、請求項 8 7 に記載の栄養組成物。

**【請求項 8 9】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、タンパク質である、請求項 8 8 に記載の栄養組成物。 20

**【請求項 9 0】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、栄養タンパク質である、請求項 8 9 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 1】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、必須アミノ酸、非必須アミノ酸、分枝鎖アミノ酸、非標準アミノ酸、および修飾アミノ酸から選択される遊離アミノ酸である、請求項 8 8 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 2】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、必須アミノ酸から選択される遊離アミノ酸である、請求項 9 1 に記載の栄養組成物。 30

**【請求項 9 3】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、分枝鎖アミノ酸から選択される遊離アミノ酸である、請求項 9 1 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 4】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、L e u である、請求項 9 1 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 5】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、脂質である、請求項 8 8 に記載の栄養組成物。 40

**【請求項 9 6】**

前記脂質は、脂肪、油、トリグリセリド、コレステロール、リン脂質、および脂肪酸から選択される、請求項 9 5 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 7】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、ミネラルおよびビタミンから選択される、請求項 8 8 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 8】**

前記少なくとも 1 つの第 2 の構成成分は、栄養補助食品である、請求項 8 8 に記載の栄養組成物。

**【請求項 9 9】**

50

前記少なくとも1つの第2の構成成分は、生物である、請求項8～8に記載の栄養組成物。

【請求項100】

前記少なくとも1つの第2の構成成分は、医薬品である、請求項8～8に記載の栄養組成物。

【請求項101】

前記少なくとも1つの第2の構成成分は、賦形剤である、請求項8～8に記載の栄養組成物。

【請求項102】

前記少なくとも1つの賦形剤は、緩衝剤、保存剤、安定剤、結合剤、圧縮剤、滑沢剤、分散促進剤、崩壊剤、香味剤、甘味剤、着色剤から選択される、請求項101に記載の栄養組成物。

【請求項103】

前記栄養組成物は、液体溶液、スラリー、懸濁液、ゲル、ペースト、粉末、または固体として製剤化される、請求項8～102のいずれか1項に記載の栄養組成物。

【請求項104】

請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質を提供することと、前記栄養タンパク質を前記少なくとも1つの第2の構成成分と組み合わせることとを含む、請求項8～103のいずれか1項に記載の栄養組成物を作製する方法。

【請求項105】

対象において筋肉量、筋力、および機能的能力のうちの少なくとも1つを維持するかまたは増加させる方法であって、前記対象に、十分な量の請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項8～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む、方法。

【請求項106】

対象において望ましいボディマス指数を維持するかまたは達成する方法であって、前記対象に、十分な量の請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項8～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む、方法。

【請求項107】

前記対象は、高齢者、医学的に重症である者、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している者、のうちの少なくとも1つである、請求項105または106に記載の方法。

【請求項108】

タンパク質エネルギー栄養障害を有する対象にタンパク質を提供する方法であって、前記対象に、十分な量の請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項8～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む、方法。

【請求項109】

対象において熱発生を増加させる方法であって、前記対象に、十分な量の請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項8～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む、方法。

【請求項110】

対象において心的飽和反応および満腹反応のうちの少なくとも1つを誘導する方法であって、前記対象に、十分な量の請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項8～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む、方法。

【請求項111】

前記対象は、肥満である、請求項109または110に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 112】**

前記請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項87～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される、請求項105～111のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 113】**

対象において悪液質、サルコペニア、および虚弱のうちの少なくとも1つを治療する方法であって、前記対象に、十分な量の請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項87～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104に記載の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む、方法。10

**【請求項 114】**

請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質、請求項87～103のいずれか1項に記載の栄養組成物、または請求項104の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で前記対象によって摂取される、請求項105～113のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 115】**

前記タンパク質を化学的に合成することを含む、請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質を作製する方法。

**【請求項 116】**

前記タンパク質を単離することを含む、請求項1～72のいずれか1項に記載の栄養タンパク質を作製する方法。20

**【請求項 117】**

前記第1のポリペプチド配列は、少なくとも25アミノ酸長である、請求項1～72のいずれか1項に記載の単離された栄養タンパク質。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願の参考**

本出願は、2012年3月26日に出願された米国仮特許出願第61/615,816号に対する優先権を主張するものであり、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。30

**【0002】****配列表**

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列表を含み、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。2013年3月12日に作成された上記ASCIIコピーは、1005.004-PCT\_SL.txtという名称であり、1,194,666バイトのサイズである。

**【背景技術】****【0003】****序文**

食事性タンパク質は、ヒトの健康および成長のための必須栄養素である。世界保健機関は、エネルギーバランスがとれている場合および体重が安定している場合、食事性タンパク質は、エネルギー摂取量の約10～15%に寄与するべきであると推奨している。様々な国々におけるタンパク質の1日平均摂取量は、これらの推奨が世界中で消費されているタンパク質の量と一致することを示唆している。エネルギーバランスがとれた状態で摂取される場合、タンパク質からのエネルギーの平均20～30%を含む食事が、高タンパク食の代表的なものである。

**【0004】**

体は、健康および成長に必要な特定のアミノ酸を合成することができないため、代わりに食物からそれらを得なければならない。「必須アミノ酸」と称されるこれらのアミノ酸40

は、ヒスチジン（H）、イソロイシン（I）、ロイシン（L）、リジン（K）、メチオニン（M）、フェニルアラニン（F）、スレオニン（T）、トリプトファン（W）、およびバリン（V）である。すべての必須アミノ酸を提供する食事性タンパク質は、「高品質タンパク質」と称される。肉、魚、鶏肉、卵、および乳製品等の動物性食品は、一般的に、良好な必須アミノ酸のバランスを提供する高品質タンパク質源であると考えられている。カゼイン（哺乳類の乳に一般的に見出されるタンパク質であり、牛乳中のタンパク質の80%を占める）および乳清（乳を凝固させて濾した後に残る液体のタンパク質）は、高品質の食事性タンパク質の主な源である。良好な必須アミノ酸のバランスを提供しない食物は、「低品質タンパク質」と称される。ほとんどの果物および野菜は、タンパク質の源として十分ではない。マメ、エンドウ、レンズマメ、ナッツ類、および穀物（コムギ等）を含むいくつかの植物性食品は、より良好なタンパク質源である。大豆から製造される植物性タンパク質であるソイを高品質タンパク質であるとする見解もある。

10

#### 【0005】

ヒトにおける大量のタンパク質摂取の急性効果に関する研究により、食事にタンパク質を取り入れること、また場合によってはタンパク質含有量を増加させることが、有益な効果を及ぼし得ることが示されている。例えば、研究により、タンパク質の経口摂取が、ヒト対象において、食後の満腹感（空腹感を抑制することによることを含む）を誘導し、熱発生を誘導し、血糖反応を低減し得ることが示されている。

20

#### 【0006】

体重減少のための高タンパク質食に関する研究により、タンパク質が、エネルギー消費量および除脂肪体重に好影響を及ぼすことが示されている。さらなる研究により、タンパク質からのエネルギーの少なくとも5%を含有する食事において、過食による体重増加は著しく少なく、高タンパク質食がエネルギー摂取量を減少させることが示されている。

20

#### 【0007】

臨床試験は、タンパク質が加齢または床上安静による筋力低下を防止するという証拠を提供している。具体的には、研究により、タンパク質の補給が、長期床上安静中の筋タンパク質合成速度（FSR）を増加させ、長期床上安静中に脚質量および強度を維持し、除脂肪体重を増加させ、歩行およびバランスの機能測定値を改善すること、ならびに不動および長期床上安静のためにサルコペニアのリスクがある個体に対する実行可能な治療介入としての役割を果たし得ることが示されている。

30

#### 【0008】

運動選手における筋肉タンパク同化作用の増加に関する研究は、運動後に供給されるタンパク質が、運動単独で達成されるより大きな程度まで筋肥大を促進することを示している。また、運動後に供給されるタンパク質が、タンパク質分解を一切増加させることなくタンパク質合成を支持し、正味の正のタンパク質バランスおよび筋肉量増加をもたらすことも示されている。筋肉のタンパク質合成は、必須アミノ酸の補給に対して用量反応様式で反応するが、すべてのタンパク質が筋肉増強において等しいわけではない。例えば、乳タンパク質は、レジスタンストレーニングによる筋肉量増加を支持する上でソイよりも優れていると考えられるが、どちらも炭水化物単独よりも優れている。アミノ酸ロイシンは、筋肉のタンパク質合成を刺激する上で重要な因子である。

40

#### 【0009】

食物中に一般に見出される全タンパク質は、ヒト等の哺乳動物のアミノ酸要求量を満たすアミノ酸組成物を必ずしも効果的に提供するとは限らない。その結果として、各必須アミノ酸の最低要求量を得るために、食事性タンパク質の質がより高い場合に必要とされるであろうよりも多くの総タンパク質量が食事中に摂取されなければならない。食事中のタンパク質の質を向上させることによって、より質の低いタンパク質を含む食事と比較して摂取されなければならない総タンパク質量を減少させることが可能である。

#### 【0010】

一般に、より高いタンパク質の質を有するタンパク質は、それを有しない他のタンパク質よりも哺乳動物の食事においてより有益であると考えられる。そのようなタンパク質は

50

、例えば、哺乳動物の食事の構成要素として有用である。特定の状況下において、そのようなタンパク質は、とりわけ、筋肉量、健全なボディマス指数、および血糖バランスの維持を促進する。したがって、高いタンパク質の質を有するタンパク質源の必要性が存在する。

#### 【0011】

従来、必須アミノ酸を含む混合物等の望ましいアミノ酸の混合物は、乳清タンパク質等の比較的高いレベルの必須アミノ酸を用いてタンパク質を加水分解することにより、および／または乳清等の加水分解されたタンパク質も任意選択的に含む混合物中に遊離アミノ酸を合わせることにより提供されてきた。この種類の混合物は、苦みを有する場合があり、特定の使用には不適切または望ましくないと見なされるかもしれない。その結果として、そのような混合物は、遊離アミノ酸および／または加水分解されたタンパク質の味を隠すための香味剤を含むことがある。場合によっては、ポリペプチドまたはタンパク質によってある割合のアミノ酸含有量が提供される組成物が、遊離アミノ酸および／または特定の加水分解されたタンパク質として提供される高い割合の全アミノ酸を有する組成物よりも美味であることがある。しかしながら、従来、栄養製剤は、牛乳から単離された乳清、または大豆から単離された大豆タンパク質等の自然食品から単離されたタンパク質から作製されてきたため、そのような組成物の利用可能性は限定されていた。これらのタンパク質のアミノ酸プロファイルは、必ずしも哺乳動物のアミノ酸要求量を満たすとは限らない。加えて、汎用タンパク質は、典型的には、タンパク質組成の異なり得るタンパク質および／またはタンパク質加水分解物の混合物から構成されるため、それらの栄養価に関する予測不可能性の原因となる。さらに、そのような高品質タンパク質源の数が限られているということは、タンパク質の形態での大規模な経口摂取には特定のアミノ酸の組み合わせのみが利用可能であることを意味していた。

10

20

30

#### 【0012】

カゼインおよび乳清、卵、ならびに肉等の高品質動物タンパク質源だけでなく、ソイ等の植物性タンパク質を供給するために必要とされる農法も、著しいエネルギー入力を必要とし、潜在的に有害な環境影響を有する。したがって、特定の状況において、哺乳類による摂取のためにタンパク質を供給する代替の源および方法を有することが有用であるかもしれない。

#### 【0013】

理論上は、実験室環境において、所望のアミノ酸混合物を含む合成ポリペプチド配列を設計し、生成することが可能である。しかしながら、このアプローチは、種々の懸念を引き起こす可能性があり、それゆえに、必ずしも適用可能とは限らない。第1に、当業者は、そのような合成配列の高レベルの生成は、非常に困難であり得るということを認識している。第2に、たとえそのような合成タンパク質が合成されたとしても、栄養製品に使用するためのその適合性は不確実であろう。例えば、そのような天然に存在しないポリペプチドは、アレルゲンまたは毒素であり得る。したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、天然のタンパク質もしくはポリペプチド配列、またはそれらの改変体を提供する。

#### 【0014】

栄養タンパク質の有用性を高めることができる1つの特徴は、その溶解性である。溶解性の高い栄養タンパク質は、安定性の増加、抗凝集性、および望ましい味覚プロファイル等の望ましい特徴を呈することができる。例えば、高い溶解性を示す栄養タンパク質は、比較的小ない体積の溶液中に高濃度の栄養タンパク質を含む飲料または液体製剤に製剤化することができるため、単位体積当たり大量のタンパク栄養を送達する。可溶性栄養タンパク質は、ユーザ（例えば、運動選手）が身体的活動の前、最中、または後に栄養タンパク質を経口摂取したいと所望する場合、スポーツ飲料または回復飲料において有用であり得る。高い溶解性を示す栄養タンパク質はまた、対象（例えば、患者または高齢者）がタンパク栄養を必要としているが、固形食または大量の液体を摂取することができない臨床設定において特に有用であり得る。

40

50

**【0015】**

本開示は、生成について従来の農業だけに依存しない、アミノ酸の有用な組み合わせからなるタンパク質を提供する。例えば、本発明者は、全アミノ酸に対する分枝鎖アミノ酸の割合、全アミノ酸に対するアミノ酸ロイシンの割合、および全アミノ酸に対する必須アミノ酸の割合のうちの少なくとも1つの有用なレベルを含有するアミノ酸の組み合わせからなる天然に存在するポリペプチド配列を発見し、本開示において提供する。本開示はまた、ポリペプチド配列を含む栄養タンパク質も提供する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、少なくとも24%の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、少なくとも11%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、および少なくとも49%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合のうちの少なくとも1つを含む。

10

**【0016】**

本開示はまた、とりわけ、タンパク質をコードする核酸、タンパク質を產生する組換え微生物、組換え微生物を使用してタンパク質を作製する方法、タンパク質を含む組成物、およびタンパク質を使用する方法を提供する。

**【発明の概要】****【0017】**

第1の態様において、本開示は、第1のポリペプチド配列を含む単離された栄養タンパク質を提供し、第1のポリペプチド配列は、pH7で少なくとも12.5g/Lの水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、pH7で少なくとも50g/Lの水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、pH7で少なくとも100g/Lの水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、a. 少なくとも8%の全アミノ酸残基に対する分岐鎖アミノ酸残基の割合、b. 少なくとも4%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、およびc. 少なくとも19%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合を含む。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、各必須アミノ酸のうちの少なくとも1つをさらに含む。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、a. 少なくとも24%の全アミノ酸残基に対する分岐鎖アミノ酸残基の割合、b. 少なくとも11%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、およびc. 少なくとも49%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも70%の相同性を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも95%の相同性を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも70%の相同性を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも95%の相同性を有する。

20

**【0018】**

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質からなる。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、天然に存在する栄養タンパク質ではない。

30

**【0019】**

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、アレルゲンではない。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、既知のアレルゲンに対して50%未満の全体的相同性(global homology)を有する。

40

**【0020】**

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、毒素ではない。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、既知の毒素に対して50%未満の全体的相同性を有する。

**【0021】**

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、60分未満の模擬胃内消化

50

半減期(simulated gastric digestion half-life)を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、30分未満の模擬胃内消化半減期を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、10分未満の模擬胃内消化半減期を有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、模擬胃液中で完全に消化される。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、ペプシン認識部位、トリプシン認識部位、およびキモトリプシン認識部位から選択される少なくとも1つのプロテアーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、システイン残基を含まない。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、ジスルフィド結合を含まない。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、N結合型グリコシル化を含まない。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、O結合型グリコシル化を含まない。

10

## 【0022】

いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、凝集に耐性を示す。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、pH7でアニオン性である。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、-20以下の計算上の溶媒和スコアを有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、-30以下の計算上の溶媒和スコアを有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、0.75以下の計算上の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、0.5以下の計算上の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、0.3以下の計算上の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、i.配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列、ii.配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、およびiii.配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列i.配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列、ii.配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、およびiii.配列番号1～配列番号490から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、第1のポリペプチド配列は、配列番号1～配列番号490から選択される少なくとも1つの基準アミノ酸配列と、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%相同である。

20

## 【0023】

別の態様において、本開示は、第1のポリペプチド配列を含む単離された栄養タンパク質を提供し、単離された栄養タンパク質は、pH7で少なくとも12.5g/Lの水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、pH7で少なくとも50g/Lの水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、pH7で少なくとも100g/Lの水溶解性を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、a.少なくとも8%の全アミノ酸残基に対する分岐鎖アミノ酸残基の割合、b.少なくとも4%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、およびc.少なくとも19%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合を含む。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、各必須アミノ酸のうちの少なくとも1つをさらに含む。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、a.少なくとも24%の全アミノ酸残基に対する分岐鎖アミノ酸残基の割合、b.少なくとも11%の全アミノ酸残基に対するLeu残基の割合、およびc.少なくとも49%の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも70%の相同性を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質の少なくとも50個のアミノ酸に対して少なくとも95%

30

40

50

の相同性を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも 70 % の相同性を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質に対して少なくとも 95 % の相同性を有する。

【0024】

いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質からなる。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、天然に存在する栄養タンパク質ではない。

【0025】

いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、アレルゲンではない。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、既知のアレルゲンに対して 50 % 未満の全体的相同性を有する。

【0026】

いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、毒素ではない。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、既知の毒素に対して 50 % 未満の全体的相同性を有する。

【0027】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、60 分未満の模擬胃内消化半減期を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、30 分未満の模擬胃内消化半減期を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、10 分未満の模擬胃内消化半減期を有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、模擬胃液中で完全に消化される。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、ペプシン認識部位、トリプシン認識部位、およびキモトリプシン認識部位から選択される少なくとも 1 つのプロテアーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、システイン残基を含まない。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、ジスルフィド結合を含まない。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、N 結合型グリコシル化を含まない。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、O 結合型グリコシル化を含まない。

【0028】

いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、凝集に耐性を示す。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、pH 7 でアニオン性である。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、-20 以下の計算上の溶媒和スコアを有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、-30 以下の計算上の溶媒和スコアを有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、0.75 以下の計算上の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、0.5 以下の計算上の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、0.3 以下の計算上の凝集スコアを有する。

【0029】

いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列、i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、および i i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列、i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列の修飾された誘導体、および i i i . 配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択されるアミノ酸配列のムテインから選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、単離された栄養タンパク質は、配列番号 1 ~ 配列番号 490 から選択される少なくとも 1 つの基準アミノ酸配列と、少なくとも 40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、9

10

20

30

40

50

2%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%相同である。

#### 【0030】

いくつかの実施形態において、本開示の単離された栄養タンパク質は、親和性精製のためのポリペプチドタグをさらに含む。いくつかの実施形態において、親和性精製のためのタグは、ポリヒスチジンタグである。

#### 【0031】

別の態様において、本開示は、本開示の栄養タンパク質をコードする核酸配列を含む単離された核酸を提供する。いくつかの実施形態において、単離された核酸は、ゲノムDNA、cDNA、センスRNA、およびアンチセンスRNAから選択される。いくつかの実施形態において、単離された核酸は、ゲノムDNAである。いくつかの実施形態において、単離された核酸は、cDNAである。いくつかの実施形態において、単離された核酸は、栄養タンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結された発現制御配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、ベクターが提供される。

10

#### 【0032】

別の態様において、本開示は、開示の栄養タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターを提供する。いくつかの実施形態において、ベクターは、栄養タンパク質をコードする核酸配列と作動可能に連結された発現制御配列をさらに含む。

#### 【0033】

別の態様において、本開示は、本開示の核酸および本開示のベクターのうちの少なくとも1つを含む組換え微生物を提供する。いくつかの実施形態において、組換え微生物は、原核生物である。いくつかの実施形態において、原核生物は、従属栄養性である。いくつかの実施形態において、原核生物は、独立栄養性である。いくつかの実施形態において、原核生物は、細菌である。

20

#### 【0034】

別の態様において、本開示は、本開示の栄養タンパク質を作製する方法を提供し、該方法は、組換え微生物による栄養タンパク質の生成に十分な条件下で本開示の組換え微生物を培養することを含む。いくつかの実施形態において、方法は、培養物から栄養タンパク質を単離することをさらに含む。

30

#### 【0035】

別の態様において、本開示は、本開示の単離された栄養タンパク質と、少なくとも1つの第2の構成成分とを含む栄養組成物を提供する。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、遊離アミノ酸、炭水化物、脂質、ミネラルまたはミネラル源、ビタミン、栄養補助食品、生物、医薬品、および賦形剤から選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、タンパク質である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、栄養タンパク質である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、必須アミノ酸、非必須アミノ酸、分枝鎖アミノ酸、非標準アミノ酸、および修飾アミノ酸から選択される遊離アミノ酸である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、必須アミノ酸から選択される遊離アミノ酸である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、分枝鎖アミノ酸から選択される遊離アミノ酸である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、L-euである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、脂質である。いくつかの実施形態において、脂質は、脂肪、油、トリグリセリド、コレステロール、リン脂質、および脂肪酸から選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、ミネラルおよびビタミンから選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、栄養補助食品である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、生物である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、医薬品である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの第2の構成成分は、賦形剤である。いくつかの実施形態にお

40

50

いて、少なくとも 1 つの賦形剤は、緩衝剤、保存剤、安定剤、結合剤、圧縮剤、滑沢剤、分散促進剤、崩壊剤、香味剤、甘味剤、着色剤から選択される。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、液体溶液、スラリー、懸濁液、ゲル、ペースト、粉末、または固体として製剤化される。

#### 【 0 0 3 6 】

別の態様において、本開示は、本開示の栄養タンパク質を提供することと、栄養タンパク質と少なくとも 1 つの第 2 の構成成分とを組み合わせることとを含む、本開示の栄養組成物を作製する方法を提供する。

#### 【 0 0 3 7 】

別の態様において、本開示は、対象において筋肉量、筋力、および機能的能力のうちの少なくとも 1 つを維持するかまたは増加させる方法を提供し、該方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は、高齢者、医学的に重症である、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している、のうちの少なくとも 1 つである。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行(performance)に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

10

20

30

40

#### 【 0 0 3 8 】

別の態様において、本開示は、対象において望ましいボディマス指数を維持するかまたは達成する方法を提供し、該方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は、高齢者、医学的に重症である、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している、のうちの少なくとも 1 つである。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【 0 0 3 9 】

別の態様において、本開示は、タンパク質エネルギー栄養障害を有する対象にタンパク質を提供する方法を提供し、該方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【 0 0 4 0 】

別の態様において、本開示は、対象において熱発生を増加させる方法を提供し、該方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

50

**【0041】**

別の態様において、本開示は、対象において心的飽和反応および満腹反応のうちの少なくとも1つを誘導する方法を提供し、該方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

10

**【0042】**

別の態様において、本開示は、対象において悪液質、サルコペニア、および虚弱のうちの少なくとも1つを治療する方法を提供し、該方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

20

**【図面の簡単な説明】****【0043】**

【図1】溶媒和スコア( Y 軸)と凝集スコア( X 軸)の関数として大腸菌発現スクリーンにおいて発現されたタンパク質の相対的確率(対数スケールで)を示す2次元ヒストグラムを示す。

【図2】溶媒和スコア( Y 軸)と凝集スコア( X 軸)の関数として大腸菌発現スクリーンにおいて可溶性に発現されたタンパク質の相対的確率(対数スケールで)を示す2次元ヒストグラムを示す。

**【発明を実施するための形態】****【0044】**

本明細書において別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別途要求されない限り、単数形の用語は、複数形の用語を含むものとし、複数形の用語は単数形の用語を含むものとする。一般的に、本明細書に記載される生化学、酵素学、分子生物学および細胞生物学、微生物学、遺伝子学、ならびにタンパク質および核酸化学、そしてハイブリダイゼーションについて使用される命名法、およびそれらの技術は、当該技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである。本明細書に引用される特定の参考文献および他の文書は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。さらに、本明細書に引用されるすべての UniProt / SwissProt の記録は、参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。材料、方法、および例は、例示に過ぎず、限定的であることは意図されない。

30

**【0045】**

本開示の方法および技術は、別途指示されない限り、当該技術分野において周知の従来の方法に従って、また本明細書の全体を通して引用され、論じられる種々の一般的なおよびより具体的な参考文献に記載されるように、一般的に行われる。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, and Supplements to 2002)、Taylor and Drickamer, Introduction to Glycobiol

40

50

ogy, Oxford Univ. Press (2003)、Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.、Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol I, CRC Press (1976)、Handbook of Biochemistry: Section A Proteins, Vol II, CRC Press (1976)、Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)を参照のこと。シアノバクテリアに適用可能な多くの分子生物学および遺伝学的技術は、Heidorn et al., "Synthetic Biology in Cyanobacteria: Engineering and Analyzing Novel Functions," Methods in Enzymology, Vol. 497, Ch. 24 (2011)に記載され、参考により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0046】

本開示は、インターネット上で公開されている特定のタンパク質および遺伝子配列に関する配列データベースエントリ（例えば、UniProt/SwissProtの記録）、ならびにインターネット上の他の情報を参照する。当業者は、配列データベースエントリを含むインターネット上の情報は時々更新されるため、例えば、特定の配列を指すために使用される参照番号が変更になる場合があることを理解する。配列情報の公開データベースまたは他のインターネット上の情報に対して言及がなされる場合、そのような変更が起こる可能性があり、インターネット上の情報の特定の実施形態は変化しやすいことを理解されたい。当業者は、インターネット上で検索を行うことにより同等の情報を見つけることができるため、インターネットのウェブページアドレスまたは配列データベースエントリに対する言及は、該当する情報の利用可能性および公的普及を裏付ける。

20

#### 【0047】

本発明のタンパク質、組成物、方法、および他の実施形態を開示および説明する前に、本明細書において使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためのものにすぎず、限定的であることを意図するものではないことを理解されたい。本明細書および付属の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈上、別途明確に指示されない限り、複数形の指示対象を含むことに留意されなければならない。

30

#### 【0048】

本明細書において使用される用語「含む（comprising）」は、「含む（including）」または「含む（containing）」と同義であり、包括的または非制限的であり、付加的な記載されていないメンバー、要素、または方法ステップを除外しない。

#### 【0049】

本開示は、アミノ酸について言及する。アミノ酸の完全名称は、標準的3文字コードおよび1文字略語と交換可能に使用される。不確かさを回避するために、それらは、アラニン（Ala、A）、アルギニン（Arg、R）、アスパラギン（Asn、N）、アスパラギン酸（Asp、D）、システイン（Cys、C）、グルタミン酸（Glu、E）、グルタミン（Gln、Q）、グリシン（Gly、G）、ヒスチジン（His、H）、イソロイシン（Ile、I）、ロイシン（Leu、L）、リジン（Lys、K）、メチオニン（Met、M）、フェニルアラニン（Phe、F）、プロリン（Pro、P）、セリン（Ser、S）、スレオニン（Thr、T）、トリプトファン（Trp、W）、チロシン（Tyr、Y）、バリン（Val、V）である。

40

#### 【0050】

本明細書において使用される場合、用語「インピトロ」は、生物（例えば、動物、植物、または微生物）の中ではなく、人工環境において、例えば、試験管もしくは反応容器中、細胞培養中、ペトリ皿中等で起こる事象を指す。

50

## 【0051】

本明細書において使用される場合、用語「*in vivo*」は、生物（例えば、動物、植物、または微生物）の中で起こる事象を指す。

## 【0052】

本明細書において使用される場合、用語「単離された」は、（1）最初に生成された時にそれが会合していた構成成分の少なくともいくつかから分離された（天然において、もしくは実験環境においてのいずれか）、および／または（2）人間の手によって生成、調製、および／もしくは製造された物質または実体を指す。単離された物質および／または実体は、それらが最初に会合していた他の構成成分の少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、またはそれ以上から分離されてもよい。いくつかの実施形態において、単離された薬剤は、約80%超、約85%超、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、約99%超、または約99%超純粋である。本明細書において使用される場合、物質が実質的に他の構成成分を含まない場合、それは「純粋」である。10

## 【0053】

本明細書において使用される場合、「分枝鎖アミノ酸」は、ロイシン、イソロイシン、およびバリンから選択されるアミノ酸である。

## 【0054】

本明細書において使用される場合、「必須アミノ酸」は、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、およびバリンから選択されるアミノ酸である。20

## 【0055】

本明細書において使用される用語「ペプチド」は、例えば、典型的には約50個未満のアミノ酸、より典型的には、約30個未満のアミノ酸を含有する、短いポリペプチドを指す。該用語は、本明細書において使用される場合、構造機能、ひいては生物学的機能を模倣する類似体および模倣体を包含する。

## 【0056】

用語「ポリペプチド」は、天然に存在するタンパク質および天然に存在しないタンパク質の両方、ならびにその断片、変異体、誘導体および類似体を包含する。ポリペプチドは、単量体または重合体であり得る。さらに、ポリペプチドは、多数の異なるドメインを含んでもよく、それらの各々は、1つ以上のはっきりと異なる活性を有する。不確かさを回避するために、「ポリペプチド」は、2アミノ酸長よりも長い任意の長さであってよい。30

## 【0057】

用語「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」は、その起源または誘導源に基づいて、（1）その天然の状態でそれに付随する自然に結合した成分に結合していない、（2）天然では見られない純度（純度は他の細胞物質の存在に関して判断され得る）で存在する（例えば、同種の他のタンパク質を含まない）、（3）異なる種の細胞によって発現される、または（4）天然に存在しない（例えば、それは天然に見出されるポリペプチドの断片であるか、あるいは天然に見出されないアミノ酸類似体もしくは誘導体、または標準的なペプチド結合以外の結合を含む）タンパク質またはポリペプチドである。よって、化学合成された、または天然でそれが由来する細胞とは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、その天然で結合する構成成分から「単離」されている。また、ポリペプチドまたはタンパク質は、当該技術分野で周知のタンパク質精製技術を用いて、単離により、天然で結合する成分を実質的に含まないようにすることも可能である。そのように定義される場合、「単離された」は、そのように記載されているタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはオリゴペプチドが、合成された細胞から物理的に取り出されていることを必ずしも必要としない。40

## 【0058】

本明細書において使用される用語「ポリペプチド断片」は、天然に存在するタンパク質等の完全長ポリペプチドと比較した場合に、欠失、例えば、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失を有するポリペプチドを指す。一実施形態において、ポリペプチド断片は、該断片のアミノ酸配列が、天然に存在する配列における対応する位置と同一である、連続した配列である。断片は、典型的には、少なくとも5、6、7、8、9、もしくは10アミノ酸長、少なくとも12、14、16、もしくは18アミノ酸長、または少なくとも20アミノ酸長、または少なくとも25、30、35、40、もしくは45アミノ酸長、または少なくとも50もしくは60アミノ酸長、または少なくとも70アミノ酸長、または少なくとも100アミノ酸長である。

## 【0059】

10

用語「融合タンパク質」は、異種アミノ酸配列に連結したポリペプチドまたは断片を含むポリペプチドを指す。融合タンパク質は、2つ以上の異なるタンパク質に由来し得る2つ以上の所望の機能要素を含有するように構築することができるため、有用である。融合タンパク質は、該当するポリペプチドからの少なくとも10個の連続するアミノ酸、または少なくとも20もしくは30個のアミノ酸、または少なくとも40、50、もしくは60個のアミノ酸、または少なくとも75、100、もしくは125個のアミノ酸を含む。融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチドは、通常、少なくとも6アミノ酸長、または少なくとも8アミノ酸長、または少なくとも15、20、もしくは25アミノ酸長である。IgG Fc領域等のより大きなポリペプチドを含む融合体、およびさらには緑色蛍光タンパク質（「GFP」）発色団含有タンパク質等の全タンパク質を含む融合体は、特定の有用性を有する。融合タンパク質は、異なるタンパク質またはペプチドをコードする核酸配列とインフレームでポリペプチドまたはその断片をコードする核酸配列を構築し、次いで融合タンパク質を発現させることにより、組換えによって生成することができる。代替として、融合タンパク質は、ポリペプチドまたはその断片を別のタンパク質と架橋させることによって化学的に生成することもできる。

20

## 【0060】

本明細書において使用される場合、あるタンパク質をコードする核酸配列が、第2のタンパク質をコードする核酸配列に類似した配列を有する場合、該タンパク質は、第2のタンパク質に対して「相同性」を有するか、または「相同」である。代替として、2つのタンパク質が類似したアミノ酸配列を有する場合、該タンパク質は第2のタンパク質に対して相同性を有する。（よって、用語「相同的なタンパク質」は、2つのタンパク質が類似したアミノ酸配列を有することを意味すると定義される）。本明細書において使用される場合、アミノ酸配列の2つの領域間の相同性（特に、予測される構造上の類似性に関する）は、機能における類似性を暗示するものであると解釈される。

30

## 【0061】

「相同」が、タンパク質またはペプチドに関して使用される場合、同一ではない残基の位置は、しばしば、保存的なアミノ酸置換によって異なることを認識されたい。「保存的なアミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基が、類似した化学特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されるものである。一般に、保存的なアミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、配列同一性パーセントまたは相同性の程度は、置換の保存的な性質によって補正するように上方調整されてもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson, 1994, Methods Mol. Biol. 24: 307-31 and 25: 365-89を参照のこと。

40

## 【0062】

以下の6つの群は、それぞれ、互いに保存的な置換であるアミノ酸を含有する：1)セリン、スレオニン；2)アスパラギン酸、グルタミン酸；3)アスパラギン、グルタミン；4)アルギニン、リジン；5)イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アラニン、バリン；および6)フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン。

50

## 【0063】

配列同一性パーセントとも称されるポリペプチドの配列相同性は、典型的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定される。例えば、University of Wisconsin Biotechnology Center (910 University Avenue, Madison, Wis. 53705) の配列分析ソフトウェアパッケージ Genetics Computer Group (GCG) のを参照のこと。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的なアミノ酸置換を含む種々の置換、欠失、およびこの他の修飾に割り当てられた相同性の尺度を使用して、類似する配列をマッチングさせる。例えば、GCGは、「Gap」および「Best fit」等のプログラムを含有し、これらは、異なる生物種に由来する相同ポリペプチド等の密接に関連するポリペプチド間、または野生型タンパク質とそのムテインとの間の、配列相同性または配列同一性を決定するためのデフォルトパラメータを用いて使用することができる。例えば、GCG Version 6.1 を参照のこと。

## 【0064】

特定のポリペプチド配列を、異なる生物に由来する多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の例示的なアルゴリズムは、コンピュータプログラム BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990) )、Gish and States, Nature Genet. 3: 266 - 272 (1993)、Madden et al., Meth. Enzymol. 266: 131 - 141 (1996)、Altschul et al., Nucleic Acid Res. 25: 3389 - 3402 (1997)、Zhang and Madden, Genome Res. 7: 649 - 656 (1997) )、特に、blastpまたはtblastn (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997) )を使用して比較することができる。

## 【0065】

BLASTpのための例示的なパラメータは次の通りである：期待値：10 (デフォルト)、フィルタ：seg (デフォルト)、ギャップ開始コスト：11 (デフォルト)、ギャップ伸長コスト：1 (デフォルト)、最大アラインメント：100 (デフォルト)、ワードサイズ：11 (デフォルト)、表示数：100 (デフォルト)、ペナルティマトリックス：BLOWSUM62。相同性のために比較されるポリペプチド配列の長さは、一般的に、少なくとも約16アミノ酸残基、または少なくとも約20残基、または少なくとも約24残基、または少なくとも約28残基、または約35残基超である。多数の異なる生物からの配列を含有するデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが有用であるかもしれない。アミノ酸配列を使用したデータベース検索は、当該技術分野において既知であるblastp以外のアルゴリズムによって測定することができる。例えば、ポリペプチド配列は、GCG Version 6.1の中のプログラムであるFASTAを使用して比較することができる。FASTAは、クエリー配列と検索配列と間の最適なオーバーラップ領域のアラインメントおよび配列同一性パーセントを提供する。Pearson, Methods Enzymol. 183: 63 - 98 (1990)。例えば、アミノ酸配列間の配列同一性パーセントは、参照により本明細書に組み込まれるGCG Version 6.1の中に提供されるように、FASTAをそのデフォルトパラメータ (ワードサイズ2、およびPAMスコアリングマトリックス250) で使用して決定することができる。

## 【0066】

いくつかの実施形態において、高分子（例えば、ポリペプチド配列または核酸配列）は、それらの配列が、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一である場合に、互いに「相同」とあると見なされる。いくつかの実施形態において、高分子は、

10

20

30

40

50

それらの配列が、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 99%類似する場合に、互いに「相同」であると見なされる。用語「相同の」は、少なくとも 2つの配列（又クレオチド配列またはアミノ酸配列）間の比較を必然的に指す。いくつかの実施形態において、2つの又クレオチド配列は、それらがコードするポリペプチドが、少なくとも約 20 個のアミノ酸の少なくとも 1つのストレッチと、少なくとも約 50% 同一、少なくとも約 60% 同一、少なくとも約 70% 同一、少なくとも約 80% 同一、または少なくとも約 90% 同一である場合に、相同であると見なされる。いくつかの実施形態において、相同な又クレオチド配列は、少なくとも 4~5 個の一意に特定されたアミノ酸のストレッチをコードする能力によって特徴づけられる。これらのアミノ酸の互いに対する同一性および近似間隔の両方が、相同であると見なされる又クレオチド配列について考慮されなければならない。60 又クレオチド長未満の又クレオチド配列のいくつかの実施形態において、相同性は、少なくとも 4~5 個の一意に特定されたアミノ酸のストレッチをコードする能力によって決定される。いくつかの実施形態において、2つのタンパク質配列は、それらのタンパク質が、少なくとも約 20 個のアミノ酸の少なくとも 1つのストレッチと、少なくとも約 50% 同一、少なくとも約 60% 同一、少なくとも約 70% 同一、少なくとも約 80% 同一、または少なくとも約 90% 同一である場合に、相同であると見なされる。

## 【0067】

本明細書において使用される場合、「修飾された誘導体」は、一次構造配列において基準ポリペプチドと実質的に相同であるが、例えば、インピボもしくはインピトロの化学的および生化学的な修飾を含むか、または基準ポリペプチドには見出されないアミノ酸が組み込まれたポリペプチドもしくはその断片を指す。そのような修飾は、例えば、当業者によって容易に認識されるような、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、例えば放射性核種による標識、および種々の酵素修飾を含む。ポリペプチドを標識するための様々な方法、およびそのような目的のために有用な置換基または標識は、当該技術分野において周知であり、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、および<sup>3</sup>H 等の放射性同位体、標識されたアンチリガンド（例えば、抗体）に結合するリガンド、フルオロフォア、化学発光剤、酵素、ならびに、標識されたリガンドに対する特異的結合対メンバーとしての役割を果たすことができるアンチリガンドを含む。標識の選択は、必要とされる感度、プライマーを用いたコンジュゲーションの容易さ、安定性要件、および利用可能な機器に依存する。ポリペプチドを標識するための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, and Supplements to 2002) を参照のこと。

## 【0068】

本明細書において使用される場合、「ポリペプチド変異体」または「ムテイン」は、その配列が、天然または野生型タンパク質等の参照タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸の挿入、複製、欠失、再編成、または置換を含有するポリペプチドを指す。ムテインは、ある位置の単一のアミノ酸が別のアミノ酸に変更された1つ以上のアミノ酸点置換、1つ以上のアミノ酸が、参照タンパク質の配列において、それぞれ挿入もしくは欠失される1つ以上の挿入および／もしくは欠失、ならびに／またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかもしくは両方におけるアミノ酸配列の切断を有してもよい。ムテインは、参照タンパク質と比較して、同じかまたは異なる生物学的活性を有してもよい。

## 【0069】

いくつかの実施形態において、ムテインは、例えば、そのカウンターパートである参照タンパク質に対して少なくとも 85% の全体配列相同性を有する。いくつかの実施形態に

10

20

30

40

50

おいて、ムテインは、野生型タンパク質に対して少なくとも90%の全体配列相同性を有する。他の実施形態において、ムテインは、少なくとも95%の配列同一性、または98%、もしくは99%、もしくは99.5%、もしくは99.9%の全体配列同一性を示す。

#### 【0070】

本明細書において使用される場合、「親和性精製のためのポリペプチドタグ」は、第1の「タグ」ポリペプチドに融合した該当する第2のタンパク質またはポリペプチド配列を単離または精製するために使用することができる結合パートナーを有する任意のポリペプチドである。いくつかの例は、当該技術分野において周知であり、His-6タグ、FLAGエピトープ、c-mycエピトープ、Strep-TAGII、ビオチンタグ、グルタチオン5-トランスフェラーゼ(GST)、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質(MBP)、または金属親和性タグを含む。10

#### 【0071】

本明細書において使用される場合、「組換え体」は、(1)その天然の環境から取り出された、(2)遺伝子が天然に見出されるポリヌクレオチドの全部もしくは一部と結合していない、(3)天然では連結していないポリヌクレオチドと作動可能に連結された、または(4)天然に存在しない、生体分子、例えば、遺伝子もしくはタンパク質を指す。用語「組換え体」は、クローン化DNA単離体、化学的に合成されるポリヌクレオチド類似体、または異種系によって生物学的に合成されるポリヌクレオチド類似体、ならびにそのような核酸によってコードされるタンパク質および/またはmRNAに関連して使用することができる。よって、例えば、タンパク質が、細胞中に存在する組換え遺伝子から合成されたmRNAから合成される場合、例えば、微生物によって合成されるタンパク質は組換え体である。20

#### 【0072】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」、「核酸」、または「核酸配列」は、少なくとも10塩基長のヌクレオチドからなる重合形態を指す。この用語は、DNA分子(例えば、cDNAもしくはゲノムDNAもしくは合成DNA)およびRNA分子(例えば、mRNAもしくは合成RNA)、ならびに非天然ヌクレオチド類似体、変性ヌクレオシド間結合、またはその両方を含有するDNAまたはRNAの類似体を含む。核酸は、任意の位相幾何学的構造であり得る。例えば、核酸は、一本鎖、二本鎖、三本鎖、四本鎖、部分二本鎖、分枝型、ヘアピン型、環状、または南京錠型の立体構造であってもよい。核酸(ポリヌクレオチドとも称される)は、RNA、cDNA、ゲノムDNAのセンス鎖およびアンチセンス鎖の両方、ならびに上記の合成形態および混合ポリマーを含み得る。当業者によつて容易に認識されるように、これらは、化学的もしくは生化学的に修飾されてもよいか、または非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含有してもよい。そのような修飾は、例えば、標識、メチル化、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上の類似体による置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメート等)、荷電結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)、懸垂部分(例えば、ポリペプチド)、インターラーカー(例えば、アクリジン、ソラレン等)、キレート剤、アルキル化剤、および修飾された結合(例えば、アノマー核酸等)を含む。また、水素結合および他の化学相互作用を介して指定された配列に対するそれらの結合能においてポリヌクレオチドを模倣する合成分子も含まれる。そのような分子は、当該技術分野において既知であり、例えば、ペプチド結合が、分子の骨格内のリン酸結合の代わりとなるものを含む。他の修飾は、例えば、リボース環が「ロックされた」核酸に見出される修飾のような架橋部分または他の構造を含有する類似体を含むことができる。30

#### 【0073】

「合成」RNA、DNA、または混合ポリマーは、細胞外で作製されるものであり、例えば、化学的に合成されるものである。

#### 【0074】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される用語「核酸断片」は、完全長の基準ヌクレオチド配列と比較して、欠失、例えば、5'末端または3'末端の欠失を有する核酸配列を指す。一実施形態において、核酸断片は、該断片のヌクレオチド配列が、天然に存在する配列における対応する位置と同一である、連続した配列である。いくつかの実施形態において、断片は、少なくとも10、15、20、もしくは25ヌクレオチド長、または少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、もしくは150ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態において、核酸配列の断片は、オープンリーディングフレーム配列の断片である。いくつかの実施形態において、そのような断片は、オープンリーディングフレームのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のポリペプチド断片（本明細書において定義されるような）をコードする。

10

## 【0075】

本明細書において使用される場合、生物のゲノム中の内在性核酸配列（またはその配列のコードされたタンパク質産物）は、この内在性核酸配列の発現が改変されるように、異種配列が内在性核酸配列に隣接して配置される場合に、本明細書において「組換え体」であると見なされる。これに関連して、異種配列は、異種配列自体が内在性（同じ宿主細胞もしくはその子孫に由来する）または外因性（異なる宿主細胞もしくはその子孫に由来する）であろうとなからうと、天然では内在性核酸配列に隣接していない配列である。例として、プロモーター配列は、この遺伝子が改変された発現パターンを有するように、（例えば、相同組換えによって）宿主細胞のゲノム内の遺伝子の天然プロモーターに取って代わることができる。この遺伝子は、天然でそれにフランкиングする配列の少なくともいくつから分離されるため、今度は「組換え体」になる。

20

## 【0076】

また、核酸は、天然ではゲノム内の対応する核酸に生じない任意の修飾を含有する場合に、「組換え体」であると見なされる。例えば、内在性コード化配列は、例えば、ヒトの介入によって、人工的に導入された挿入、欠失、または点突然変異を含有する場合に、「組換え体」であると見なされる。「組換え核酸」はまた、異種部位で宿主細胞の染色体に組み込まれた核酸、およびエピソームとして存在する核酸構築物も含む。

30

## 【0077】

本明細書において使用される場合、基準核酸配列の「縮重改変体」という句は、基準核酸配列から翻訳されるものと同一のアミノ酸配列を提供するように、標準的な遺伝暗号に従って翻訳することができる核酸配列を包含する。用語「縮重オリゴヌクレオチド」または「縮重プライマー」は、配列は必ずしも同一ではないが、1つ以上の特定のセグメント内で互いに相同である標的核酸配列とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを表すために使用される。

## 【0078】

核酸配列に関する用語「配列同一性パーセント」または「同一」とは、最大に一致するようにアラインされた場合に同じである2つの配列内の残基を指す。配列同一性比較の長さは、少なくとも約9ヌクレオチド、一般的に少なくとも約20ヌクレオチド、より一般的に少なくとも約24ヌクレオチド、典型的には少なくとも約28ヌクレオチド、より典型的には少なくとも約32、さらにより典型的には少なくとも約36以上のヌクレオチドのストレッチにわたってもよい。ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができる、当該技術分野において既知の異なるアルゴリズムが存在する。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG)、Madison, Wis.) のプログラムであるFASTA、Gap、またはBestfitを使用して比較することができる。FASTAは、クエリー配列と検索配列と間の最適なオーバーラップ領域のアラインメントおよび配列同一性パーセントを提供する。Pearson, Methods Enzymol. 183: 63-98 (1990)。例えば、核酸配列間の配列同一性パーセントは、参照により本明細書に組み込まれるGCG Version 6.1の中に提供されるように、FASTAをそのデフォルトパラメータで使用して（ワードサ

40

50

イズ6、およびスコアリングマトリックス用のN O P A M因子)、またはGapをそのデフォルトパラメータで使用して決定することができる。代替として、配列は、コンピュータプログラムBLAST(Altenschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990)、Gish and States, Nature Genet. 3: 266 - 272 (1993)、Madden et al., Meth. Enzymol. 266: 131 - 141 (1996)、Altenschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997)、Zhang and Madden, Genome Res. 7: 649 - 656 (1997))、特に、blastpまたはtblastn(Altenschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402 (1997))を使用して比較することができる。  
10

#### 【0079】

用語「実質的な相同意」または「実質的な類似性」は、核酸またはその断片を言及する場合、適切なヌクレオチドの挿入または欠失によってもう1つの核酸(またはその相補鎖)と最適にアラインされた時に、前述のようなFASTA、BLAST、またはGap等の任意の周知の配列同一性のアルゴリズムによって測定すると、ヌクレオチド塩基の少なくとも約76%、80%、85%、もしくは少なくとも約90%、または少なくとも約95%、96%、97%、98%、もしくは99%のヌクレオチド配列同一性が存在することを意味する。

#### 【0080】

代替として、核酸またはその断片が、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で別の核酸、別の核酸の鎖、またはその相補鎖にハイブリダイズする場合、実質的な相同意または類似性が存在する。核酸ハイブリダイゼーション実験に関連する「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」および「ストリンジエントな洗浄条件」は、多数の異なる物理的パラメータに依存する。核酸ハイブリダイゼーションは、当業者によって容易に認識されるように、塩濃度、温度、溶媒、ハイブリダイズする種の塩基組成、相補的な領域の長さ、およびハイブリダイズする核酸間のヌクレオチド塩基ミスマッチの数等の条件によって影響を受ける。当業者は、特定のハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを実現するためにこれらのパラメータを変化させる方法を理解している。  
20

#### 【0081】

一般に、「ストリンジエントなハイブリダイゼーション」は、特定の一連の条件下で、特定のDNAハイブリッドの熱的融点( $T_m$ )よりも約25低い温度で行われる。「ストリンジエントな洗浄」は、特定の一連の条件下で、特定のDNAハイブリッドの $T_m$ より約5低い温度で行われる。 $T_m$ は、標的配列の50%が、完全にマッチするプローブにハイブリダイズする温度である。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), page 9.51を参照のこと。本明細書における目的のために、液相ハイブリダイゼーションの「ストリンジエントな条件」は、6×SSC(20×SSCが、3.0M NaClおよび0.3Mクエン酸ナトリウムを含有する)、1%SDS中、65で8~12時間の水性ハイブリダイゼーション(すなわち、ホルムアミドを含まない)、その後の0.2×SSC、0.1%SDS、65で20分の洗浄2回と定義する。当業者は、65でのハイブリダイゼーションが、ハイブリダイズしている配列の長さおよび同一性パーセントを含む多数の要因に応じて異なる速度で起こることを認識するであろう。  
40

#### 【0082】

本明細書において使用される場合、「発現制御配列」は、それらが作動可能に連結されたコード配列の発現に影響を及ぼすのに必要なポリヌクレオチド配列を指す。発現制御配列は、核酸配列の転写、転写後事象、および翻訳を調節する配列である。発現制御配列は、適切な転写開始配列、終結配列、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシン

10

20

30

40

50

グシグナルおよびポリアデニル化シグナル等の効率的なRNAプロセシングシグナル；細胞質mRNAを安定させる配列；翻訳効率を高める配列（例えば、リボソーム結合部位）；タンパク質の安定性を高める配列；所望により、タンパク質の分泌を高める配列を含む。そのような制御配列の性質は、宿主生物によって異なり、原核生物では、そのような制御配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含む。用語「制御配列」は、最低でも、その存在が発現に不可欠な任意の成分を包含し、その存在が有利である付加的な成分、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列も包含できることを意図する。

#### 【0083】

本明細書において使用される場合、「作動可能に連結された」または「動作可能に連結された」発現制御配列は、該当する遺伝子を制御するために発現制御配列が該当する遺伝子と隣接している結合、および該当する遺伝子を制御するためにトランスでまたは離れて作用する発現制御配列を指す。

10

#### 【0084】

本明細書において使用される場合、「ベクター」は、それが連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すことを意図する。1つの種類のベクターは「プラスミド」であり、これは、一般に、付加的なDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指すが、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅から生じるか、または環状プラスミドの制限酵素による処理等から生じる線形二重鎖分子も含む。他のベクターは、コスミド、細菌人工染色体（BAC）、および酵母人工染色体（YAC）を含む。別の種類のベクターは、付加的なDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るウイルスペクターである（より詳細に後述する）。あるベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自己複製することができる（例えば、宿主細胞において機能する複製起点を有するベクター）。他のベクターは、宿主細胞内に導入すると、宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、あるベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を司ることができる。そのようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と称される。

20

#### 【0085】

用語「組換え宿主細胞」（または単に「組換え細胞」もしくは「宿主細胞」）は、本明細書において使用される場合、組換えベクター等の組換え核酸が導入された細胞を指すことを意図する。ある場合には、「細胞」という単語は、ある種類の細胞を特定する名称に置き換える。例えば、「組換え微生物」は、微生物宿主細胞である組換え宿主細胞である。このような用語は、特定の対象細胞だけではなく、そのような細胞の子孫も指すことを意図することを理解されたい。突然変異または環境の影響のいずれかに起因して、後続世代において特定の修飾が起こり得るため、そのような子孫は、実際は親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書において使用されるような用語「組換え宿主細胞」、「組換え細胞」、および「宿主細胞」の範囲内になおも含まれる。組換え宿主細胞は、単離された細胞もしくは培養物中で増殖させた細胞株であり得るか、または生組織もしくは生物に存在する細胞であり得る。

30

#### 【0086】

本明細書において使用される場合、用語「従属栄養性」は、炭素を固定することができず、成長のために有機炭素を用いる生物を指す。

40

#### 【0087】

本明細書において使用される場合、用語「独立栄養性」は、光からのエネルギー（光合成による）または無機化学反応（化学合成）を利用して、単純な無機分子から複雑な有機化合物（炭水化物、脂肪、およびタンパク質等）を生成する生物を指す。

#### 【0088】

本明細書において使用される場合、「筋肉量」は、対象の体内の筋肉の重量を指す。筋肉量は、骨格筋、平滑筋（心筋および消化器系の筋肉等）、およびこれらの筋肉に含まれ

50

る水分を含む。特定の筋肉の筋肉量は、二重エネルギーX線吸収測定法（DEXA）（Padden-Jones et al., 2004）を用いて決定することができる。総除脂肪体重（脂肪を含まない）、総体重、および骨塩量も、DEXAによって測定することができる。いくつかの実施形態において、対象の特定の筋肉の筋肉量における変化は、例えば、DEXAによって決定され、該変化は、対象の筋肉量における全体的な変化の代理として用いられる。よって、例えば、対象が、本明細書に開示されるような栄養タンパク質を摂取し、特定の筋肉または筋肉群の筋肉量において一定期間にわたる増加を経験する場合、対象は筋肉量の増加を経験したと結論付けることができる。

#### 【0089】

本明細書において使用される場合、「筋力」は、単一の最大努力により筋肉が生成することができる力の量を指す。筋力には、静的強度と動的強度の2種類がある。静的強度とは、筋肉の等尺性収縮を指し、筋肉が力を発生させるが、その間筋長は一定のままであり、かつ／またはその時に関節運動は起こらない。例として、物体を把持するもしくは運ぶこと、または壁を押すことが挙げられる。動的強度とは、筋肉が運動を生じる力を発生することを指す。動的強度は等張性収縮であり得、一定負荷時または等速性収縮すると筋肉が短縮し、その場合、筋肉は一定の速度で収縮および短縮する。動的強度は、等慣性強度も含む。

#### 【0090】

特定されない限り、「筋力」は、最大動的筋力を指す。最大強度は、「1回最大拳上重量」（1RM）と称される。これは、失敗または損傷することなく、完全に1回動かすことができる（持ち上げる、押す、または引く）最も大きな負荷（キログラム）の尺度である。この値は、直接測定することができるが、それを行うには、対象がその活動を完遂することができなくなるまで重量を増加する必要がある。代替として、1RMは、対象が動かすことができる最大量よりも少ない負荷を用いて対象が動かすことができる最大運動反復数を数えることによって推定される。脚伸展および脚屈曲が、臨床試験においてしばしば測定される（Borsheim et al., "Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly," Clin Nutr 2008; 27: 189 - 195、Paddon-Jones, et al., "Essential amino acid and carbohydrate supplementation ameliorates muscle protein loss in humans during 28 days bed rest," J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 4351 - 4358）。

#### 【0091】

本明細書において使用される場合、「機能的能力」は、日常活動をシミュレートする機能試験を指す。「機能的能力」は、時間計測式の踏み台昇降テスト（4インチの台から5回できるだけ速く昇り降りする）、時間計測式の床上体位変換テスト（できるだけ早く、床の上で立位置から仰臥位になり、その後、再び立位に戻る（1回反復））、および身体能力バッテリーテスト（静的バランステスト、椅子立ち上がりテスト、および歩行テスト）を含む、任意の好適な許容される試験によって測定される（Borsheim et al., "Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly," Clin Nutr 2008; 27: 189 - 195）。

#### 【0092】

本明細書において使用される場合、「ボディマス指数」または「BMI」または「ケトレーア指数」は、対象の体重（キログラム）を体重の身長（メートル）の二乗で除したものである（kg / m<sup>2</sup>）。

#### 【0093】

10

20

30

40

50

成人の場合、自分と同じ身長の人物にとって正常であるかまたは望ましい体重から、その個体の体重がどれくらい逸脱しているかを評価するために頻繁に BMI が使用される。体重過多または体重不足は、一部、体脂肪によって説明され得るが、筋肉質等の他の要因も BMI に大きく影響する。世界保健機関は、BMI 18.5 未満である場合を低体重とし、栄養失調、摂食障害、または他の健康問題を示唆する可能性があり、25 を超える BMI は過体重であると見なされ、30 を超えると肥満であると見なされる (World Health Organization. BMI classification. Accessed March 19, 2012 [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html))。本明細書において使用される場合、「望ましいボディマス指数」は、約 18.5 ~ 約 25 のボディマス指数である。よって、対象が約 18.5 未満の BMI を有する場合、対象の BMI の増加が、対象の BMI の望ましさの増加である。代わりに、対象が約 25 を超える BMI を有する場合、対象の BMI の減少が、対象の BMI の望ましさの増加である。

#### 【0094】

本明細書において使用される場合、「高齢の」哺乳動物は、ボディマス指数および筋肉量のうちの少なくとも 1 つにおける加齢に伴う変化（例えば、加齢性筋肉減弱症）を経験する哺乳動物である。いくつかの実施形態において、「高齢」のヒトは、少なくとも 50 歳、少なくとも 60 歳、少なくとも 65 歳、少なくとも 70 歳、少なくとも 75 歳、少なくとも 80 歳、少なくとも 85 歳、少なくとも 90 歳、少なくとも 95 歳、または少なくとも 100 歳である。いくつかの実施形態において、高齢の動物、哺乳動物、またはヒトは、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、または少なくとも 60 % のピーク生涯筋肉量からの筋肉量の損失を経験したヒトである。ボディマス指数および筋肉量のうちの少なくとも 1 つに対する加齢に伴う変化は、年齢の増加に相関していることが分かっているため、いくつかの実施形態において、高齢の動物は、単純に年齢に基づいて同定または定義される。よって、いくつかの実施形態において、「高齢」のヒトは、ボディマス指数および筋肉量のうちの少なくとも 1 つの測定に頼らずに、単純に年齢が少なくとも 60 歳、少なくとも 65 歳、少なくとも 70 歳、少なくとも 75 歳、少なくとも 80 歳、少なくとも 85 歳、少なくとも 90 歳、少なくとも 95 歳、または少なくとも 100 歳であるという事実によって同定または定義される。

#### 【0095】

本明細書において使用される場合、患者が、医学的疾患のために、ボディマス指数および筋肉量のうちの少なくとも 1 つにおける変化（例えば、筋肉減弱症）を経験する場合、その患者は「医学的に重症」である。いくつかの実施形態において、患者は、覚醒時間の少なくとも 25 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または 100 % 寝たきりである。いくつかの実施形態において、患者は意識不明である。いくつかの実施形態において、患者は、少なくとも 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、10 日、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、10 週間、またはそれ以上、本段落に記載されるように寝たきりである。

#### 【0096】

本明細書において使用される場合、「タンパク質エネルギー栄養障害」は、タンパク質の摂取量が不十分である栄養失調の一形態である。その種類として、クワシオルコル（タンパク質栄養不良優位）、マラスマス（熱量およびタンパク質栄養の両方が不足）、および消耗性クワシオルコル（著しいタンパク質欠乏および著しい熱量不足の兆候を呈し、栄養失調の最も重篤な形態と称されることもある）が挙げられる。

#### 【0097】

本明細書において使用される場合、「悪液質」は、消耗および体重減少を引き起こす多面的な臨床症候群を指す。これは、タンパク質異化作用がタンパク質同化作用を超過し、筋肉消耗がこの状態の主な特徴となる複雑な状態である。タンパク質代謝における代謝異

10

20

30

40

50

常に加えて、これは、食欲不振および炎症によっても特徴づけられる。これらの異常およびタンパク質代謝障害は、栄養療法に様々な程度で反応する。

【0098】

本明細書において使用される場合、「熱発生」は、哺乳動物における熱生成プロセスである。熱発生は、エネルギー消費量の増加を伴う。熱発生は、具体的には、食物成分(タンパク質等)の代謝後に燃やされるエネルギーである。これは、食物の熱効果と称されてもよい。個体による総エネルギー消費量は、安静時エネルギー消費量(基本代謝を支持するために空腹状態で安静時に消費されるエネルギー)、食物の熱効果、および身体活動によるエネルギー摂取量の和と等しい。安静時エネルギー消費量は、ヒトにおける総エネルギー消費量の約65~75%を占める。筋肉量の量および活性は、安静時エネルギー消費量に影響を与えるものの1つである。筋肉を支持するための十分なタンパク質の摂取も、安静時エネルギー消費量に影響を与える。タンパク質の経口摂取は、食後のエネルギー消費量を増加させる傾向がある:これが、食物の熱効果である。食物の熱効果は、ヒトにおける総エネルギー消費量の約10%を占める。これは、総エネルギー消費量のうちの少ない割合だが、この値のわずかな増加が体重に影響を及ぼし得る。タンパク質は、脂肪または炭水化物よりも高い熱効果を有する:この効果は、タンパク質の他の代謝影響と相まって、タンパク質を体重管理、糖尿病の管理、および他の状態に有用な物質にする。

10

【0099】

本明細書において使用される場合、「心的飽和」は、食べている間に満腹になる行為、または食べたいという欲求の減少である。これにより摂食が停止または減少される。

20

【0100】

本明細書において使用される場合、「満腹感」は、食後に満腹な状態に留まる行為であり、食事後の摂食しない期間として現れる。

【0101】

本明細書において使用される場合、「運動」は、最も広義に、体力ならびに全体的な健康および健康状態を増強または維持する任意の身体的活動である。運動は、筋肉および心血管系の強化、運動技能の修練、体重の減少または維持、ならびに楽しむ目的を含む種々の理由から行われる。

30

【0102】

本明細書において使用される場合、「十分な量」とは、所望の効果をもたらすのに十分な、本明細書に開示されるタンパク質またはポリペプチドの量である。例えば、筋肉量の増加が所望される場合、十分な量は、一定期間にわたって対象の筋肉量の増加をもたらす量である。タンパク質またはポリペプチド断片の十分な量は、直接的に、すなわち、タンパク質もしくはポリペプチド断片を対象に投与することにより提供されてもよいか、またはタンパク質もしくはポリペプチド断片を含む組成物の一部として提供されてもよい。投与の様式については本明細書の他の箇所で論じる。

【0103】

本明細書において使用される場合、用語「哺乳動物」は、胎盤性哺乳動物および有袋類哺乳動物を含む、分類上の綱である哺乳綱の任意のメンバーを指す。よって、「哺乳動物」は、ヒト、靈長類、家畜、および実験用哺乳動物を含む。例示的な哺乳動物として、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、ラマ、ウシ、靈長類、ブタ、および任意の他の哺乳動物が挙げられる。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、トランスジェニック哺乳動物、遺伝子操作された哺乳動物、およびクローン哺乳動物のうちの少なくとも1つである。

40

【0104】

A. 栄養タンパク質

本開示の目的のために、「栄養タンパク質」は、望ましい量の必須アミノ酸を含有するタンパク質である。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、少なくとも30重量%の必須アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、少なくとも40重量%の必須アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、

50

少なくとも 50 重量 % の必須アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、食用種において自然に生じるタンパク質またはタンパク質の断片を含むかまたはそれからなる。その最も広義において、「食用種」は、少なくとも 1 種類の哺乳動物によって有害な影響なく食されることが分かっている任意の種を包含する。有害な影響は、毒性効果および毒作用を含む。いくつかの実施形態において、食用種は、有害な影響なくヒトによって食されることが分かっている種である。限定された地理的地域において、ある種類の哺乳動物の小さなグループのみの食事の、希少ではあるが既知である構成要素である食用種もあれば、世界中ほとんどの地域で主食となっている食用種もある。他の実施形態において、食用種は、いずれかの哺乳動物によって以前に食されたことは分かっていないが、試験時に食用であることが明らかになる種である。食用種は、限定されないが、以下を含むワタ (*turneri*)、シロノタモギタケモドキ、グリシンマックス、アジアイネ、メバチ、ブリストルコーンモミ、トゲネズミ、タクヨウレンリソウ、インドヤギュウ、ケープグリスピック、タテゴトアザラシ、カラチョウザメ、ジャワジヤコウネコ、ヒマラヤヒラタケ、ダッタンソバ、ストローブマツ、アサガオ、キャラボク、フウリンアサガオ、オオノガイ、キウイフルーツ、グラントガゼル、ヨーロッパヤマナラシ、セイヨウスモモ、セグロカモメ、ビロードクサフジ、ホシエビス、ヒロハノマンテマ、サラワクイルカ、アメリカウバガイ、クシマンセ、アズキ、ツルナシレリンソウ、カラフトマス、ミシシッピワニ、アレッポマツ、カモメ、セイヨウアブラナ、シラタマソウ、クラカケアザラシ、インディアンガゼル、テーダマツ、カナダイチイ、ヒロハザミア、ウンナンマツ、ヒマラヤゴヨウマツ、アスパラガス、アヒ・アマリージョ、イガゴヨウマツ、ヨーロッパイチイ、シベリアマツ、オレンジ、ハワイアンスコーレルフィッシュ、アメリカバイソン、トムソンガゼル、ヤハズエンドウ、カナダガン、セロリ、コブカエデ、コリアンダー、ヒメシラタマソウ、レタス、カプシカム・シネンゼ、シラビソ、カプラ・ヒルクス、スペックガゼル、サケ、ヒメノアサガオ、シロウリ、ワモンアザラシ、アカギツネ、ルコウソウ、ソラナム (*habrochaites*)、ポプラ種、リギダマツ、オーバーカップオーク、ベニバナインゲン、ユリカモメ、トガリエビス、タイセイヨウクロマグロ、ホッキョクギツネ、インディアンバイソン、イタリアン・メープル、イロハモミジ、セイヨウヒイラギガシ、モンタナマツ、オオヅル、カギミヤママツ、ウメ、マスノスケ、コウジョウセンガゼル、フェネック、シシマツ、ワタ (*barbadense*)、シカモアカエデ、ベニザケ、ヒゲイノシシ、ソバ亜種アンセストラル、カルドン、ヤエナリ、セイコウハコヤナギ、ワタ (*schnwendimanni*)、ソラナム (*chacoense*)、アカガシワ、キュウリ、サバンナシマウマ、ギンザケ、ラジアータパイン、ゼニガタアザラシ、オグロヅル、アメリカオオモミ、サクラマス、ホウレンソウ、ソラナム (*chilense*)、アダックス、サツマイモ、グレビーシマウマ、トドマツ、イタリアカサマツ、オオカグラコウモリ、オータム・クロッカス、ブンタン、シロチョウザメ、ワタ (*gossypioideus*)、インドジャコウネコ、ターキー・オーク、インドガン、フォックステールパイン、スペニッシュムシトリナデシコ、オンコリンクス属種、ビルマジャコウネコ、ヤク、スラッシュマツ、インドノロバ、アイベックス、ニンニク、ラディッシュ、エキナタマツ、ブラックチェリー、ニジエビス、シロバナマンテマ、ヤセイカンラン、ノラニンジン、ニジマス、カイラン、ワタ (*hirsutum*)、ヨーロッパモミ、シトラス・レティキュラータ、チコリー、コープレイ、ラマ、トウモロコシ、セキショウ、キットギツネ、アルタイアルガリ、シャープグリスピック、コントルタマツ、コブウシ、シベリアアイベックス、ポンデローサマツ、アーモンド、ソラナム (*sogardianum*)、ヨウサイ、ハナジロカマイルカ、ビッグホーン、セイヨウミザクラ、ダマガゼル、ビンナガ、マンテマ、スイスマツ、サフラン、スイカ、アカガゼル、ハリゲナタネ、マーコール、ミンドロスイギュウ、ダイオウマツ、セイヨウバクチノキ、マナヅル、マルバアサガオ、チワワマツ、ハラジロカマイルカ、スタインボック、ブラッシカ・ラバ亜種ペキンシス、アメリカセンニチコウ、ホシアサガオ、パツラマツ、マスクメロン、バージニアマツ、ソラナム (*lycopersicum*)、アカマツ、アパッチパイン、ヨーロッパナラ、イボメア・セトーサ、トキイロヒラタケ、ハチマキカグラコウモリ、ヒツジ、ヒ

10

20

30

40

50

メエビス、ブロッコリー、カフカスツール、キタカミハクヨウ、プレーリーオニオン、ソラマメ、ツツウソバ、ステップバイソン、コルクガシ、ラゴフィラ・ラモシッシマ、マダガスカルボア、シベリアチョウザメ、カプシクム・アンヌウム、パンコムギ、アフリカツメガエル、バイカルアザラシ、アドリアチョウザメ、オニマタタビ、ドールシープ、ソラナム (*tuber ossum*)、カラバオ、ザボン、ヨーロッパバイソン、ヌビアノロバ、アノア、エリンギ、ソラナム (*demissum*)、ウリアル、トウモロコシ亜種バルビルミス、ハットクマメ、ウェルウィッチャ、オーストラリアヅル、マルバルコウ、タマネギ、ゼメリングガゼル、ブラッシカ・ラバ、ビクニヤ、ソラナム (*peruvianum*)、アフリカツメガエル、カフカスアイベックス、キハダマグロ、ヤマシマウマ、セキショクヤケイ、ソラナム (*bulbocastanum*)、テラソカグラコウモリ、タイセイヨウカマイルカ、カバ、チョウセンゴヨウ、フランスモミジ、アメリカクロボプラ、ブラック・コットンウッド、ロシアチョウザメ、クロマツ、キャベツ、カジカ (*koerotnefffi*)、エドミガゼル、ウラジロモミ、マンシュウモミ、マウンテンガゼル、ゴヨウマツ、ハボタン、ペボカボチャ、カザンマツ、オオシラビソ、タイセイヨウクロマグロ、ウンシュウミカン、ソラナム (*cheesmani*)、カマイルカ、ノルウェー<sup>10</sup>  
カエデ、レモン、デュメリルボア、ソラナム (*commersonii*)、ワタ (*arboreum*)、モモ、ヒラタケ、モミ、リムガゼル、タイセイヨウサケ、アメリカウミザリガニ、カリフォルニアアカモミ、バンテン、ゴマファザラシ、フィリピンヒゲイノシシ、ナス、ゼニガタアザラシ、ヨーロッパアカマツ、ザミア、コサックギツネ、リーキ、カスピカイアザラシ、ケープギツネ、チュウゴクイチイ、カリフラワー、キバシハイイロガ<sup>20</sup>  
ン、ライマメ、ブラッシカ・カンペストリス、サトウカエデ、ハイマツ、ソラナム (*pennellii*)、ピニヨンマツ、イモネノホシアサガオ、ウラジロハコヤナギ、ノドキリマス、フユナラ、スンダイボイノシシ、ブルツワルスキーモウコノウマ、コトカケヤナギ、アフリカツメガエル、タイヘイヨウイチイ、グアナコ、バンクスマツ、イヌホオズキ、セレベスイノブタ、カラシナ、ダンダラカマイルカ、アメリカヤマナラシ、コロラドトウヒ、ヤマアノア、カシ (*gamelliciflora*)、アジアムフロン、アジアスイギュウ、リュウキュウマツ、フィリピンヒゲイノシシ、インゲンマメ、ブラウントラウト、ペルシャチョウザメ、ソラナム (*brevidens*)、レジノーサマツ、セーブルアン<sup>30</sup>  
テロープ、ヌビアアイベックス、シーアスパラガス、イポメア・プラテンシス、ブタ、<sup>40</sup>  
サン、ガラスマメ、アオスジエビス、タイセイヨウオヒヨウ、アメリカショウブ、ウマ、コブウシ、ツケバナ、アルパカ、フランスカイガンショウ、マダコ、ソラナム (*cripspum*)、ローンアンテロープ、チャップマンシマウマ、アレキサンダークシマンセ、ヨルガオ、ヒツブコムギ、アラビアバルサムノキ、ミナミカマイルカ、ドルカスガゼル、ケルメスオーク、ハクガン、トウ、ヒマラヤマツ、マンシュウクロマツ、フィッシュエリ、ホオカザリヅル、カイロトゲマウス、ネットメロン、セイロンヤケイ、ピスム・サティヴム、ノブコーンパイン、サンドパイン、サウジガゼル、キャプラアイベックス、イポメア・トリフィーダ、テオント、ベトナムマツ、ウイルソントゲマウス、パセリ、ピンオーク、コムギ (*timopheevi*)、シチメンチョウ、ヤセイカンラン、ヤセイカンラン、ビーツ、ソラナム (*lycopersicum*)、インゲンマメ、メカジキ、ストライブドバス、オオクチバス、マゼランツキヒガイ、ヨーロピアン・スプラト、タイセイヨウニシン、モトカタクチイワシ、セイヨウカボチャ、アガリクス・ビスピルス、キングバナナ、マルス・ドメスティカ、ヒヨコマメ、マガモ、ヒメツルコケモモ、ラズベリー、ローブッシュ・ブルーベリー、イチゴ、セイヨウヤブイチゴ、マスクメロン、パイナップル、ペポカボチャ、二ホンカボチャ、ブタ、バジル、ローズマリー、ウイキョウ、ダイオウ、パパイヤ、マンゴー、キウифルーツ、アンズ、セイヨウミザクラ、ココヤシ、オリーブ、セイヨウナシ、イチジク、クダモノトケイソウ、アジアイネ亜種ジャポニカ、アジアイネ亜種インディカ、ヨーロッパウズラ、サッカロマイセス・セレビシエ。

#### 【0105】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、食用種において自然に生じるタンパク質またはタンパク質の断片の誘導体またはムテインを含むかまたはそれらからなる。そ<sup>50</sup>

のような栄養タンパク質は、「遺伝子操作された栄養タンパク質」と称されてもよい。そのような実施形態において、天然のタンパク質またはその断片は、「参照」タンパク質またはポリペプチドであり、遺伝子操作された栄養タンパク質またはその第1のポリペプチド配列は、参照タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列にと比較して少なくとも1つの配列修飾を含む。例えば、いくつかの実施形態において、遺伝子操作された栄養タンパク質またはその第1のポリペプチド配列は、少なくとも1つの基準栄養タンパク質アミノ酸配列と、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%相同である。典型的には、遺伝子操作された栄養タンパク質またはその第1のポリペプチド配列に存在する全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基、全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基、および全アミノ酸残基に対するロイシン残基のうちの少なくとも1つの割合は、基準栄養タンパク質またはポリペプチド配列に存在する全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基、全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基、および全アミノ酸残基に対するロイシン残基のうちの少なくとも1つの対応する割合よりも高い。

## 【0106】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、食物またはその誘導体もしくはムテイン中の豊富なタンパク質であるか、あるいは、食物またはその誘導体もしくはムテイン中の豊富なタンパク質の断片である。豊富なタンパク質は、食物中に存在する他のタンパク質と比べて、より高い濃度で食物中に存在するタンパク質である。限定された地理的地域において、ある種類の哺乳動物の小さなグループのみの食事の既知の構成要素であり得る食物もあれば、世界のほとんどの地域で主食となり得るものもある。いくつかの実施形態において、食物中の豊富なタンパク質は、鶏卵タンパク質、例えば、卵白アルブミン、オボトランスフェリン、およびオボムコイド；食肉タンパク質、例えば、ミオシン、アクチン、トロポミオシン、コラーゲン、およびトロポニン；穀物タンパク質、例えば、カゼイン、1カゼイン、2カゼイン、カゼイン、カゼイン、ラクトグロブリン、ラクトグロブリン、グリシン、コングリシニン、グルテリン、プロラミン、グリアジン、グルテニン、アルブミン、グロブリン；ニワトリ筋タンパク質、例えば、アルブミン、エノラーゼ、クレアチンキナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アポリポタンパク質、オボトランスフェリン、ホスホグルコムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素、ヘモグロビン、コフィリン、グリコーゲンホスホリラーゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、アクチン、ミオシン、トロポミオシン鎖、カゼインキナーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、アルドラーゼ、チューブリン、ビメンチン、エンドプラスミン、乳酸脱水素酵素、デストリン、トランスサイレチン、フルクトースニリン酸アルドラーゼ、炭酸脱水酵素、アルデヒド脱水素酵素、アネキシン、アデノシルホモステイナーゼ；ブタ筋タンパク質、例えば、アクチン、ミオシン、エノラーゼ、タイチン、コフィリン、ホスホグリセリン酸キナーゼ、エノラーゼ、ピルビン酸脱水素酵素、グリコーゲンホスホリラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ミオキナーゼ；ならびに魚類タンパク質、例えば、パルブアルブミン、ピルビン酸脱水素酵素、デスミン、およびトリオースリン酸イソメラーゼから選択される。

## 【0107】

一般的に、高品質アミノ酸の良好な源であると考えられる3つの天然タンパク質源は、乳清タンパク質、卵タンパク質、および大豆タンパク質である。各源は、複数のタンパク質を含む。表1は、パーセンテージとして表したタンパク質源中の各アミノ酸を重量比で表示したものを見せる(g AA /タンパク質g数)。

## 【0108】

10

20

30

40

## 【表1】

アミノ酸	乳清	卵	大豆	
イソロイシン	6.5%	5.5%	5.0%	
ロイシン	11.0%	8.6%	8.0%	
リジン	9.1%	7.2%	6.3%	
メチオニン	2.1%	3.1%	1.3%	
フェニルアラニン	3.4%	5.3%	1.2%	10
スレオニン	7.0%	4.8%	3.7%	
トリプトファン	1.7%	1.2%	1.3%	
バリン	6.2%	6.1%	4.9%	
ヒスチジン	2.0%	2.4%	2.7%	
その他	51.7%	49.5%	60.4%	

## 【0109】

表1に示したパーセンテージに基づいて、各タンパク質源、すなわち、必須アミノ酸、分枝鎖アミノ酸（L、I、およびV）、ならびにロイシン（L）の重量比を表2に示す。

## 【0110】

## 【表2】

20

タンパク質源	必須アミノ酸	分枝鎖アミノ酸	ロイシン
乳清	49.0%	23.7%	11.0%
卵	50.5%	20.1%	8.6%
大豆	39.6%	17.9%	8.0%

## 【0111】

乳清のアミノ酸含有量を決定するための信頼できる情報源は次の通りである：B e l i t z H D . , G r o s c h W . , a n d S c h i e b e r l e P . F o o d C h e m i s t r y ( 4 t h E d ) . S p r i n g e r - V e r l a g , B e r l i n H e i d e l b e r g 2 0 0 9 、 h t t p : / / w w w . g n c . c o m / p r o d u c t / i n d e x . j s p ? p r o d u c t I d = 2 9 8 6 0 2 7 、 h t t p : / / w w w . n u t r a b i o . c o m / P r o d u c t s / w h e y \_ p r o t e i n \_ c o n c e n t r a t e . h t m 、 お よ び h t t p : / / n u t r a b i o . c o m / P r o d u c t s / w h e y \_ p r o t e i n \_ i s o l a t e . h t m . 。 こ れ ら の 情 報 源 か ら の ア ミ ノ 酸 含 有 量 の 値 を 平 均 化 し て 表 1 お よ び 2 に 示 す 数 値 を 得 た 。 大 豆 タ ナ パ ク 質 の 情 報 源 は 、 E g g , N a t i o n a l N u t r i e n t D a t a b a s e f o r S t a n d a r d R e f e r e n c e , R e l e a s e 2 4 ( h t t p : / / n d b . n a l . u s d a . g o v / n d b / f o o d s / l i s t ) で あ る 。 大 豆 タ ナ パ ク 質 の 情 報 源 は S e l f N u t r i t i o n D a t a ( h t t p : / / n u t r i t i o n d a t a . s e l f . c o m / f a c t s / l e g u m e s - a n d - l e g u m e - p r o d u c t s / 4 3 8 9 / 2 ) で あ る 。 40

## 【0112】

本明細書において使用される場合、「乳清タンパク質」または「乳清」は、表1および2に記載のアミノ酸組成を含むタンパク質混合物を意味する。本明細書において使用される場合、乳清タンパク質は、49重量%の必須アミノ酸、24重量%の分枝鎖アミノ酸、および11重量%のロイシンを含む。

## 【0113】

本明細書において使用される場合、「卵タンパク質」または「卵」は、表1および2に記載のアミノ酸組成を含むタンパク質混合物を意味する。本明細書において使用される場

50

合、卵タンパク質は、51重量%の必須アミノ酸、20重量%の分枝鎖アミノ酸、および9重量%のロイシンを含む。

【0114】

本明細書において使用される場合、「大豆タンパク質」または「大豆」は、表1および2に記載のアミノ酸組成を含むタンパク質混合物を意味する。本明細書において使用される場合、大豆タンパク質は、40重量%の必須アミノ酸、18重量%の分枝鎖アミノ酸、および8重量%のロイシンを含む。

【0115】

可溶性栄養タンパク質は、ある場合に特に有用である。乳清タンパク質、卵タンパク質、および大豆タンパク質を含む多くのタンパク質の限界は、タンパク質が、特定の目的のために十分に可溶性ではないことである。いくつかの実施形態において、本開示は、乳清タンパク質、卵タンパク質、および大豆タンパク質のうちの少なくとも1つよりも可溶性の高い栄養タンパク質を提供する。

10

【0116】

特定の目的に有用な溶解性の程度を有する、十分に特徴づけられたタンパク質の1つは、ゼラチンである。市販の骨ゼラチンは、18%の必須アミノ酸、7.76%パーセントの分枝鎖アミノ酸、および3.45%のロイシンを含む(Eastow, J. E., "The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin," Biochem. J., Vol. 61, pp. 589-600 (1955))。本明細書において使用される場合、「ゼラチンタンパク質」または「ゼラチン」は、18重量%の必須アミノ酸、8重量%の分枝鎖アミノ酸、および4重量%のロイシンを含むタンパク質混合物を意味する。これらのアミノ酸含有量の数値を乳清タンパク質、卵タンパク質、および大豆タンパク質と比較すると、少なくともゼラチンの場合、溶解性と栄養アミノ酸含有量のトレードオフが存在することが分かる。多くの実施形態において、本開示は、有用な溶解性プロファイルを有し、18重量%の必須アミノ酸、8重量%の分枝鎖アミノ酸、および4重量%のロイシンのうちの少なくとも1つを含むタンパク質を提供する。

20

【0117】

本明細書におけるある場合には、ポリペプチド、タンパク質、または組成物中の特定の種類のアミノ酸(複数可)の一部が、該当するポリペプチド、タンパク質、または組成物中に存在するアミノ酸の総重量に対する該種類のアミノ酸(複数可)の重量比に基づいて定量化される。この値は、ポリペプチド、タンパク質、または組成物中の特定のアミノ酸(複数可)の重量を、ポリペプチド、タンパク質、または組成物中に存在するすべてのアミノ酸の重量で除すことによって算出される。

30

【0118】

他の場合において、該当するポリペプチドまたはタンパク質中に存在するアミノ酸の合計数に対する、ポリペプチドまたはタンパク質中に存在する特定の種類のアミノ酸(複数可)残基の割合が用いられる。この値は、ポリペプチドまたはタンパク質の各分子中に存在する該当するアミノ酸(複数可)の数を、ポリペプチドまたはタンパク質の各分子中に存在するアミノ酸残基の合計数で除すことによって算出される。当業者は、これら2つの方法が類似しており、ポリペプチドまたはタンパク質中に存在するある種類のアミノ酸(複数可)の重量比を特定の種類のアミノ酸残基(複数可)の割合に変換することができること、またその逆も同じであることを認識する。

40

【0119】

本明細書における特定の実施形態において、乳清、卵、大豆、またはゼラチン中の分枝鎖アミノ酸、ロイシン、および/または必須アミノ酸の重量比は、ポリペプチド、タンパク質、またはポリペプチドおよびタンパク質のうちの少なくとも1つを含む組成物のアミノ酸組成を測定するための基準として使用される。それらの実施形態において、2つの測定は完全に同等ではないことを理解されたいが、測定は、この目的に使用するのに十分に類似した測定値をもたらすこともまた理解されたい。例えば、該当するタンパク質が、2

50

4 % 以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合（乳清中に存在する分枝鎖アミノ酸残基の重量比）を有すると特徴づけられる場合、それは、タンパク質の分枝鎖アミノ酸含有量の正確な説明である。同時に、そのタンパク質中に存在する分枝鎖アミノ酸残基の重量比は、必ずしも正確に 24 % と等しくなくてもよい。たとえそうであっても、当業者は、これが有用な比較であることを理解する。該当するタンパク質中に存在するアミノ酸残基の合計数とともに提供される場合、当業者は、該当するタンパク質中の分枝鎖アミノ酸残基の重量比も決定することができる。

## 【0120】

いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、乳清タンパク質、卵タンパク質、大豆タンパク質、およびゼラチンタンパク質のうちの少なくとも 1 つに存在する全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合を含む。よって、そのような実施形態において、栄養タンパク質は、24 %、20 %、18 %、および 8 % から選択される割合以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合を含む。

10

## 【0121】

いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、乳清タンパク質、卵タンパク質、および大豆タンパク質のうちの少なくとも 1 つに存在する全アミノ酸残基に対する L 残基の割合以上の全アミノ酸残基に対する L 残基の割合を含む。よって、そのような実施形態において、栄養タンパク質は、11 %、9 %、8 %、および 4 % から選択される割合以上の全アミノ酸残基に対する L 残基の割合を含む。

20

## 【0122】

いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、乳清タンパク質、卵タンパク質、大豆タンパク質、およびゼラチンタンパク質のうちの少なくとも 1 つに存在する全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合以上の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合を含む。よって、そのような実施形態において、栄養タンパク質は、49 %、51 %、40 %、および 18 % から選択される割合以上の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合を含む。

30

## 【0123】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、乳清タンパク質、卵タンパク質、大豆タンパク質、およびゼラチンタンパク質のうちの少なくとも 1 つに存在する全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合を含み、また、乳清タンパク質、卵タンパク質、大豆タンパク質、およびゼラチンタンパク質のうちの少なくとも 1 つに存在する全アミノ酸残基に対する L 残基の割合以上の全アミノ酸残基に対する L 残基の割合を含む。いくつかのそのような実施形態において、栄養タンパク質は、乳清タンパク質、卵タンパク質、大豆タンパク質、およびゼラチンタンパク質のうちの少なくとも 1 つに存在する全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合をさらに含む。

30

## 【0124】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、24 % 以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、および 11 % 以上の全アミノ酸残基に対する L 残基の割合を含む。いくつかのそのような実施形態において、栄養タンパク質は、49 % 以上の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合をさらに含む。

40

## 【0125】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、20 % 以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、および 9 % 以上の全アミノ酸残基に対する L 残基の割合を含む。いくつかのそのような実施形態において、栄養タンパク質は、51 % 以上の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合をさらに含む。

## 【0126】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、18 % 以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、および 8 % 以上の全アミノ酸残基に対する L 残基の割合を

50

含む。いくつかのそのような実施形態において、栄養タンパク質は、40%以上の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合をさらに含む。

#### 【0127】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、8%以上の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基の割合、および4%以上の全アミノ酸残基に対するL残基の割合を含む。いくつかのそのような実施形態において、栄養タンパク質は、18%以上の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合をさらに含む。

#### 【0128】

栄養タンパク質の溶解性は、当該技術分野において既知のいずれの方法によって測定されてもよい。いくつかの実施形態において、溶解性は、遠心濃縮の後にタンパク質濃度アッセイにより調べることができる。Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay (Thermo Scientific) およびBicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Sigma-Aldrich) の2つの方法を用いて、プロトコルに従って、20 mM HEPES (pH 7.5) 中の栄養タンパク質の試料をタンパク質濃度について検査する。これらの測定値に基づいて、10 mgのタンパク質をAmicon Ultra 3 kDa 遠心濾過器 (Millipore) に添加する。10,000 X gで30分間の遠心分離により試料を濃縮する。最終的な、今や濃縮された試料を、沈殿したタンパク質について調べ、次いで Bradford および BCA の2つの方法を用いて上記のようにタンパク質の濃度について検査する。

10

20

30

40

#### 【0129】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、生理的pHで少なくとも5 g/L、10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L、または100 g/Lの最終溶解限度を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超、96%超、97%超、98%超、99%超、または99.5%超可溶性であり、生理的pHで5 g/L、または10 g/L、または20 g/L、または30 g/L、または40 g/L、または50 g/L、または100 g/Lを超える濃度では、タンパク質の沈殿が観察されない。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の溶解性は、乳清 (12.5 g/L; Pelegrine et al., Lebensm.-Wiss.U.-Technol. 38 (2005) 77-80) および大豆 (10 g/L; Lee et al., JAOC S 80 (1) (2003) 85-90) の溶解限度を調べる試験で典型的に報告されているものよりも高い。

#### 【0130】

栄養タンパク質の有用性を高めることができる1つの特徴は、その電荷（またはアミノ酸当たりの電荷）である。より高い電荷を有する栄養タンパク質は、いくつかの実施形態において、溶解性の増加、安定性の増加、抗凝集性、および望ましい味覚プロファイル等の望ましい特徴を呈することができる。例えば、高い溶解性を示す荷電栄養タンパク質は、比較的小ない体積の溶液中に高濃度の栄養タンパク質を含む飲料または液体製剤に製剤化することができるため、単位体積当たり大量のタンパク栄養を送達する。高い溶解性を示す荷電栄養タンパク質は、例えば、ユーザ（例えば、運動選手）が身体的活動の前、最中、または後に栄養タンパク質を経口摂取したいと所望する場合、スポーツ飲料または回復飲料において有用であり得る。高い溶解性を示す荷電栄養タンパク質はまた、対象（例えば、患者または高齢者）がタンパク栄養を必要としているが、固体食または大量の液体を経口摂取することができない臨床設定において特に有用であり得る。

#### 【0131】

例えば、pH 7でのポリペプチドの正味電荷（電荷<sub>p</sub>）は、以下の式を用いて算出することができる：

$$\text{電荷}_p = -0.002 - (C)(0.045) - (D)(0.999) - (E)(0.998) + (H)(0.091) + (K)(1.0) + (R)(1.0) - (Y)(-0.50)$$

50

001)

式中、Cは、ポリペプチド中のシステイン残基の数であり、Dは、アスパラギン酸残基の数であり、Eは、グルタミン酸残基の数であり、Hは、ヒスチジン残基の数であり、Kは、リジン残基の数であり、Rは、アルギニン残基の数であり、Yは、チロシン残基の数である。ポリペプチドのアミノ酸当たりの電荷(電荷<sub>A</sub>)は、正味電荷(電荷<sub>P</sub>)をアミノ酸残基の数(N)で除すことによって算出することができ、すなわち、電荷<sub>A</sub>=電荷<sub>P</sub>/Nである。(Basssi S (2007), "A Primer on Python for Life Science Researchers." PLoS Computational Biology. 3(11): e199. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030199を参照のこと)。

10

【0132】

所与のタンパク質の親水性および潜在的溶解性を評価するための1つの測定基準は、溶媒和スコアである。溶媒和スコアは、各残基を独立して溶媒和させた場合のすべてのアミノ酸側鎖の溶媒和の全自由エネルギー(すなわち、気相から希薄溶液への移行に関連した自由エネルギーの変化)を、配列中の残基の合計数によって正規化したものとして定義される。側鎖溶媒和の自由エネルギーは、真空の誘電率1と水の誘電率80との間の静電エネルギーの差を算出することにより(ポアソン・ボルツマン方程式を解くことによって)、また線形溶媒露出表面積モデルを用いて非極性のファンデルワールスエネルギーを算出することにより計算的に得られる(D. Sitkoff, K. A. Sharp, B. Honig. "Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models". J. Phys. Chem. 98, 1994)。イオン化できる側鎖を有するアミノ酸の場合(Arg、Asp、Cys、Glu、His、Lys、およびTyr)、平均溶媒和自由エネルギーは、指定されたpHでの各イオン化状態の相対的確率に基づいて用いられる。溶媒和スコアは、0から始まって負の値へと続き、溶媒和スコアがよりマイナスであるほど、タンパク質は、より親水性であり、潜在的に可溶性であると予測される。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-10以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-15以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-20以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-25以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-30以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-35以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、pH7で-40以下の溶媒和スコアを有する。

20

【0133】

溶媒和スコアは、以下のヘンダーソン・ハッセルバルヒ式によって定義されるように、共役塩基([A<sup>-</sup>])に対する非解離弱酸([HA])のモル比のpH依存性に基づくpHの関数である:

30

【数1】

$$pH = pKa + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

40

【0134】

すべての弱酸は、それらの共役塩基と比較して異なる溶媒和自由エネルギーを有し、所与のpHで溶媒和スコアを算出する際に所与の残基について用いられる溶媒和自由エネルギーは、これら2つの値の重み付け平均である。

【0135】

したがって、栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性

50

pHで-10以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性pHで-15以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性pHで-20以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性pHで-25以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性pHで-30以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性pHで-35以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、酸性pHで-40以下の溶媒和スコアを有する。

## 【0136】

10

したがって、栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-10以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-15以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-20以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-25以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-30以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-35以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、塩基性pHで-40以下の溶媒和スコアを有する。

20

## 【0137】

したがって、栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-10以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-15以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-20以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-25以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-30以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-35以下の溶媒和スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2~3、3~4、4~5、5~6、6~7、7~8、8~9、9~10、10~11、および11~12から選択されるpH範囲で-40以下の溶媒和スコアを有する。

30

## 【0138】

40

凝集スコアは、所与のタンパク質の疎水性および凝集の可能性を評価するための、配列に基づく主要な測定基準である。疎水性残基に正の値、親水性残基に負の値を与えるカイトおよびドウーリトルの疎水性指標(Kyte J, Doolittle RF (May 1982) "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". J. Mol. Biol. 157 (1): 105-32)を使用して、タンパク質配列の平均疎水性は、5つの残基の移動平均を用いて算出される。ゼロを上回る値の曲線下面積を決定し、タンパク質の全長によって正規化することによって得られたプロットから凝集スコアを導き出す。根底にある仮説は、2つ以上の疎水性パッチが集まって水を排除し、表面露

50

出を軽減することの結果が凝集であるというものであり、タンパク質が凝集する可能性は、その疎水性（すなわち、凝集を起こしやすい）残基がいかに高密度に密集しているかの関数である。凝集スコアは、0から始まって正の値へと続き、凝集スコアが小さいほど、タンパク質は、より疎水性が低く、潜在的に凝集を起こしにくいと予測される。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、1.5以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、1以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.9以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.8以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.7以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.6以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.5以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.4以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.3以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.2以下の凝集スコアを有する。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.1以下の凝集スコアを有する。

10

## 【0139】

場合によっては、栄養タンパク質の量および／または収率を増加させ、栄養タンパク質の単離および精製のうちの1つ以上を促進することができるため、可溶性発現が望ましい。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質は、宿主生物において可溶性に発現される。溶媒和スコアおよび凝集スコアは、宿主生物における組換え栄養タンパク質の可溶性発現を予測するために使用することができる。実施例8に示すように、本開示は、-20の溶媒和スコアおよび0.75の凝集スコアを有する栄養タンパク質が、特定の大腸菌発現系において組換いで発現される確率が高いことを示唆する証拠を提供する。さらに、データは、-20の溶媒和スコアおよび0.5の凝集スコアを有する栄養タンパク質が、この系において可溶性に発現される確率が高いことも示唆する。したがって、いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質は、-20以下の溶媒和スコアを有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.75以下の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、0.5以下の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、-20以下の溶媒和スコアおよび0.75以下の凝集スコアを有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、-20以下の溶媒和スコアおよび0.5以下の凝集スコアを有する。

20

## 【0140】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、配列番号1～490から選択される。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、配列番号1～490の修飾された誘導体から選択される。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、配列番号1～490のムテインから選択される。

30

## 【0141】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、卵タンパク質、例えば、卵白アルブミン、オボトランスフェリン、およびオボムコイド；食肉タンパク質、例えば、ミオシン、アクチン、トロポミオシン、コラーゲン、およびトロポニン；乳タンパク質、例えば、乳清およびカゼイン；穀物タンパク質、例えば、カゼイン、1カゼイン、2カゼイン、カゼイン、カゼイン、ラクトグロブリン、ラクトグロブリン、グリシン、コングリシニン、グルテリン、プロラミン、グリアジン、グルテニン、アルブミン、グロブリン；ニワトリ筋タンパク質、例えば、アルブミン、エノラーゼ、クレアチンキナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アポリポタンパク質、オボトランスフェリン、ホスホグルコムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素、ヘモグロビン、コ

40

50

フィリン、グリコーゲンホスホリラーゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、アクチン、ミオシン、トロボミオシン鎖、カゼインキナーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、アルドラーゼ、チューブリン、ビメンチン、エンドプラスミン、乳酸脱水素酵素、デストリン、トランスサイレチン、フルクトースニリン酸アルドラーゼ、炭酸脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アネキシン、アデノシルホモシスティナーゼ；ブタ筋タンパク質、例えは、アクチン、ミオシン、エノラーゼ、タイチン、コフィリン、ホスホグリセリン酸キナーゼ、エノラーゼ、ピルビン酸脱水素酵素、グリコーゲンホスホリラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ミオキナーゼ；ならびに魚類タンパク質、例えは、パルブアルブミン、ピルビン酸脱水素酵素、デスミン、およびトリオースリン酸イソメラーゼから選択される少なくとも1つの栄養タンパク質以外の栄養タンパク質である。

10

## 【0142】

フェニルケトン尿症(PKU)は、肝酵素フェニルアラニン水酸化酵素(PAH)の遺伝子における突然変異によって特徴づけられる常染色体劣性の遺伝性代謝疾患であり、その遺伝子を非機能性にする。この酵素は、フェニルアラニンを代謝してチロシンにするために必要である。PAHの活性が低下すると、フェニルアラニンが蓄積してフェニルピルビン酸(フェニルケトンとしても知られる)に変換され、尿中に検出される。未治療の小児は、出生時は正常であるが、初期発達の節目に到達することができず、小頭症を発症し、進行性能機能障害を示す。多動、EEG異常および発作、ならびに学習障害が、後に起こる主な臨床上の問題である。皮膚、毛髪、汗、および尿の特徴的な臭い(フェニル酢酸の蓄積による)、ならびに色素沈着低下の傾向および湿疹も観察される。すべてのPKU患者は、フェニルアラニンの少ない特別な食事制限を忠実に守る必要がある。したがって、少数のPh e残基を含むかまたは全く含まない栄養タンパク質が、PKU患者には望ましい。そのようなタンパク質は、Ph e残基をわずかに有するかまたはまったく有しない本明細書において提供される栄養タンパク質を選択することによって得ることができる。したがって、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、5%、4%、3%、2%、または1%以下の全アミノ酸残基に対するPh e残基の割合を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、10個以下のPh e残基、9個以下のPh e残基、8個以下のPh e残基、7個以下のPh e残基、6個以下のPh e残基、5個以下のPh e残基、4個以下のPh e残基、3個以下のPh e残基、2個以下のPh e残基、1個のPh e残基、または0個のPh e残基を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、Ph e残基を含まない。

20

## 【0143】

アルギニンは、条件付きで非必須アミノ酸である、すなわち、ほとんど常に人体によって製造され得るため、食事を通して直接的に得る必要はない。栄養不良の個体、高齢者、または特定の身体的条件(例えは、敗血症)を有する人々は、十分な量のアルギニンを生成しない場合があり、したがって、アルギニンを含有する食物の摂取量を増加させる必要がある。アルギニンは、創傷治癒時間の短縮(特に骨)、および血圧低下、特にハイリスク妊娠中の高血圧(子癇前症)の低下を含む、有益な健康特性を有すると考えられている。さらに、研究により、L-アルギニンの食事補給は、自然発生型の子宮内発育遅延を伴うブタの繁殖成績の向上、授乳中の仔ブタのタンパク質の沈着および出生後の発育の向上、ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける血漿グルコース値の正常化、ズッカー糖尿病肥満(ZDF)ラットにおける体脂肪量の減少、および糖尿病ラットにおける血管機能の向上に有益であることが示されている。これらの利点を本明細書に開示される栄養タンパク質の少なくとも1つの有用性と組み合わせるために、本明細書に開示される栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、3%以上、4%以上、5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、10%以上、11%以上、または12%以上の栄養タンパク質中の全アミノ酸残基に対するアルギニン残基の割合を含む。

30

## 【0144】

消化率は、栄養タンパク質の栄養上の利点および有用性に関するパラメータである。消

40

50

化の相対的完全性に関する情報は、ペプチドの生物学的利用能の予測因子として機能することができる (Daniel, H., 2003. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. Annual Review of Physiology, Volume 66, pp. 361 - 384)。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される栄養タンパク質は、それらの消化率を評価するためにスクリーニングされる。栄養タンパク質の消化率は、当該技術分野において既知のいずれの好適な方法によって評価されてもよい。いくつかの実施形態において、消化率は、模擬胃内消化および模擬腸内消化といったタンパク質消化の一方または両方の段階を含む、生理的に適切なインピトロ

消化反応によって評価される(例えば、Moreno, et al., 2005. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Bere 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. FEBS Journal, pp. 341 - 352、Martos, G., Contreras, P., Molina, E. & Lopez-Fandino, R., 2010. Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. Journal of Agricultural and food chemistry, pp. 5640 - 5648、Moreno, F. J., Mackie, A. R. & Clare Mills, E. N., 2005. Phospholipid interactions protect the milk allergen α-Lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. Journal of agricultural and food chemistry, pp. 9810 - 9816を参照のこと)。端的に述べると、試験タンパク質を、連続的に模擬胃液(SGF)に120分間曝露し(流動食の90%が胃から小腸に通過するのに必要な時間の長さ、Kong, F. & Singh, R. P., 2008. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. Journal of Food Science, pp. 67 - 80を参照のこと)、次いで、模擬十二指腸液(SDF)に移してさらに120分消化させる。異なる消化段階(例えば、2、5、15、30、60、および120分)にある試料を電気泳動(例えば、チップ電気泳動またはSDS-PAGE)により分析し、インタクトなタンパク質だけでなく任意の大きな消化断片(例えば、4kDa超)のサイズおよび量をモニタリングする。経時的なタンパク質の消失は、アッセイ中にタンパク質が消化される速度を示す。観察されるインタクトなタンパク質の量を経時的にモニタリングすることにより、SGFについて消化の半減期( $t_{1/2}$ )を算出し、SGFによる処置の後にインタクトなタンパク質が検出された場合、SIFについて消化の $t_{1/2}$ を算出する。このアッセイは、相対的な消化率(すなわち、乳清等の基準タンパク質に対する)を評価するため、または絶対的な消化率を評価するために使用することができる。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の消化率は、乳清タンパク質よりも高い(すなわち、SGF $t_{1/2}$ および/またはSIF $t_{1/2}$ がそれより短い)。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、30分以下、20分以下、15分以下、10分以下、5分以下、4分以下、3分以下、2分以下、または1分以下のSGF $t_{1/2}$ を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、30分以下、20分以下、15分以下、10分以下、5分以下、4分以下、3分以下、2分以下、または1分以下のSIF $t_{1/2}$ を有する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、2分、5分、15分、30分、60分、または120分まで、SGFおよびSIFアッセイの一方または両方において検出不可能である。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、SGFおよびSIFの一方または両方において一定速度および/または制御された速度で消化される。そのような実施形態において、栄養タンパク質の消化の速度は、最大限の消化速度のために最適化されていないかもしれない。そのような実施形態では、SGFおよびSIFの一方または両方

10

20

30

40

50

においてより迅速な初期速度で消化される同様のアミノ酸組成物の栄養タンパク質の場合と比べて、哺乳動物による経口摂取後のタンパク質の吸収速度はより緩徐である場合があり、経口摂取後に吸収が起こる合計時間はより長い場合がある。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、完全にまたは実質的に完全にSGF中で消化される。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、SGFによって実質的に消化されないかまたは消化されない：ほとんどのそのような実施形態において、タンパク質はSIF中で消化される。消化プロテアーゼに耐性を示すタンパク質またはタンパク質の大きな断片は、アレルギー反応を引き起こすより高いリスクを有し得るため、タンパク質の消化率を評価することにより、タンパク質の潜在的なアレルゲン性についても理解することができる(Goodman, R. E. et al., 2008. Allergenicity assessment of genetically modified crops - what makes sense? *Nature Biotechnology*, pp. 73 - 81)。チップ電気泳動分析には小さ過ぎるペプチドを検出および同定するために、液体クロマトグラフィーおよび質量分析法を使用することができる。SGF試料中で、LC/MSによりペプチドを直接的に検出および同定することができる。SIFによるタンパク質消化は、LC/MSによる検出および同定の前に胆汁酸を除去するための精製を必要とする場合がある。

10

## 【0145】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の消化率は、タンパク質アミノ酸配列の消化性プロテアーゼ認識部位の同定および定量化によって評価される。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、ペプシン認識部位、トリプシン認識部位、およびキモトリプシン認識部位から選択される少なくとも1つのプロテアーゼ認識部位を含む。

20

## 【0146】

本明細書において使用される場合、「ペプシン認識部位」は、ペプシンによって切断されることが実験的に分かっているポリペプチド配列中の任意の部位である。いくつかの実施形態において、それは、Phe、Trp、Tyr、Leu、Ala、Glu、およびGlnから選択されるアミノ酸残基の後の（すなわち、その下流の）ペプチド結合であるが、但し、それに続く残基は、Ala、Gly、およびValから選択されるアミノ酸残基ではない。

30

## 【0147】

本明細書において使用される場合、「トリプシン認識部位」は、トリプシンによって切断されることが実験的に分かっているポリペプチド配列中の任意の部位である。いくつかの実施形態において、それは、LysまたはArgから選択されるアミノ酸残基の後のペプチド結合であるが、但し、それに続く残基はプロリンではない。

## 【0148】

本明細書において使用される場合、「キモトリプシン認識部位」は、キモトリプシンによって切断されることが実験的に分かっているポリペプチド配列中の任意の部位である。いくつかの実施形態において、それは、Phe、Trp、Tyr、およびLeuから選択されるアミノ酸残基の後のペプチド結合である。

40

## 【0149】

タンパク質中のジスルフィド結合したシステイン残基は、ジスルフィド結合が存在しない場合と比較してタンパク質の消化速度を低下させる傾向がある。例えば、タンパク質b-Lactoglobulinの消化速度は、そのジスルフィド架橋が切断されると増加することが示されている(I. M. Reddy, N. K. D. Kella, and J. E. Kinsella. "Structural and Conformational Basis of the Resistance of B-Lactoglobulin to Peptic and Chymotryptic Digestion". *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36, 737 - 741)。したがって、より少ないジスルフィド結合を有する栄養タンパク質の消化率は、より多い数のジスルフィド結合を有する同等の栄養タンパク質よりも高い傾向がある。いくつかの実施形態におい

50

て、本明細書に開示される栄養タンパク質は、それぞれに存在するシステイン残基の数を同定するために、具体的には、比較的少ない数のシステイン残基を含む栄養タンパク質の選択を可能にするためにスクリーニングされる。例えば、天然に存在する栄養タンパク質または断片は、Cys残基を含まないか、または比較的少ない数のCys残基、例えば、10個以下のCys残基、9個以下のCys残基、8個以下のCys残基、7個以下のCys残基、6個以下のCys残基、5個以下のCys残基、4個以下のCys残基、3個以下のCys残基、2個以下のCys残基、1個のCys残基、もしくは0個のCys残基を含むと同定されてもよい。いくつかの実施形態において、天然に存在する栄養タンパク質またはその断片の1つ以上のCys残基が、欠失により、および/または別のアミノ酸との置換により除去される。いくつかの実施形態において、1個のCys残基が欠失もしくは置換されるか、1個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、2個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、3個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、4個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、5個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、6個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、7個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、8個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、9個以上のCys残基が欠失もしくは置換されるか、または10個以上のCys残基が欠失もしくは置換される。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質は、5%、4%、3%、2%、または1%以下の全アミノ酸残基に対するCys残基の割合を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、10個以下のCys残基、9個以下のCys残基、8個以下のCys残基、7個以下のCys残基、6個以下のCys残基、5個以下のCys残基、4個以下のCys残基、3個以下のCys残基、2個以下のCys残基、1個のCys残基、または0個のCys残基を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、1個以下のCys残基を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、Cys残基を含まない。

#### 【0150】

代替的にまたは付加的に、栄養タンパク質中に存在するかまたは存在し得るジスルフィド結合が除去されてもよい。ジスルフィドは、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)、またはトリス(2-カルボキシエチル)ホスфин(TCEP)等の還元剤を用いてジスルフィドを2つのチオール基に還元することにより、化学的方法を用いて除去することができる。次いで、ヨードアセトアミド、N-エチルマレイミド、または亜硫酸ナトリウム等の試薬を用いて、チオールを共有結合的に修飾するかまたは「キャッピング」することができる(例えば、Crankshaw, M. W. and Grant, G. A. 2001. Modification of Cysteine. Current Protocols in Protein Science. 15. 1. 1-15. 1. 18を参照のこと)。

#### 【0151】

真核生物のタンパク質は、しばしばグリコシル化され、タンパク質に付着した炭水化物鎖が種々の機能を果たす。N結合型およびO結合型グリコシル化は、タンパク質に起こる最も一般的な2つのグリコシル化の形態である。N結合型グリコシル化は、タンパク質のアミノ酸残基における糖分子の窒素原子への付着である。N結合型グリコシル化は、アスパラギンおよびアルギニン残基で起こる。O結合型グリコシル化は、タンパク質のアミノ酸残基における糖分子の酸素原子への付着である。O結合型グリコシル化は、スレオニンおよびセリン残基で起こる。

#### 【0152】

グリコシル化タンパク質は、非グリコシル化形態よりも可溶性が高いことが多い。タンパク薬物に関して、適切なグリコシル化は、通常、血液における高い活性、適切な抗原結合、さらなる安定性等を付与する。しかしながら、グリコシル化は、糖部分を「それと一緒に担持する」タンパク質を必然的に意味する。そのような糖部分は、組換え栄養タンパク質を含む本開示の栄養タンパク質の有用性を低下させ得る。例えば、実施例に示されるように、同じタンパク質のグリコシル化形態と非グリコシル化形態の消化の比較は、非グ

10

20

30

40

50

リコシル化形態がグリコシル化形態よりも迅速に消化されることを示している。これらの理由から、いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、低グリコシル化を含むかまたは全くグリコシル化を含まない。例えば、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% の全アミノ酸残基に対する非グリコシル化の割合を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、いずれのグリコシル化も含まない。

#### 【0153】

いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、生成された後または単離された後で脱グリコシル化される。低グリコシル化されたまたは全くグリコシル化されていない栄養タンパク質は、当該技術分野で既知のいずれの方法によって作製されてもよい。例えば、酵素的および／または化学的方法が用いられてもよい (Bioc hem. J. (2003) 376, p 339 - 350)。酵素は、N 結合型およびO 結合型オリゴ糖の除去のために研究規模で商業的に生成されている。化学的方法は、N 結合型およびO 結合型ペプチド - 糖結合を選択的に破壊するためのトリフルオロメタンスルホン酸の使用を含む。この方法は、酵素的方法の使用よりもさらに完全な脱グリコシル化をもたらすことが多い。

10

#### 【0154】

他の実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、宿主生物による低グリコシル化によりまたは全くグリコシル化しないことにより生成される。ほとんどの細菌および他の原核生物は、タンパク質、特に異種タンパク質をグリコシル化する能力が非常に限られている。したがって、本開示のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、組換えタンパク質のグリコシル化のレベルが低くなるかまたは全くグリコシル化されないように、微生物において組換えによって作製される。いくつかの実施形態において、組換え栄養タンパク質のグリコシル化のレベルは、それが誘導される生物において起こるようなタンパク質のグリコシル化のレベルよりも低い。

20

#### 【0155】

いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質またはポリペプチドは、全アミノ酸に対する Asn、Arg、Ser、およびThr から選択されるアミノ酸の 20% 以下、19% 以下、18% 以下、17% 以下、16% 以下、15% 以下、14% 以下、13% 以下、12% 以下、11% 以下、10% 以下、9% 以下、8% 以下、7% 以下、6% 以下、5% 以下、4% 以下、3% 以下、2% 以下、1% 以下の割合を含む。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質またはポリペプチドは、Asn、Arg、Ser、およびThr から選択されるアミノ酸を含まない。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質またはポリペプチドは、20 個未満、19 個未満、18 個未満、17 個未満、16 個未満、15 個未満、14 個未満、13 個未満、12 個未満、11 個未満、10 個未満、9 個未満、8 個未満、7 個未満、6 個未満、5 個未満、4 個未満、3 個未満、2 個未満、1 個未満、または 0 個の Asn、Arg、Ser、および Thr から選択されるアミノ酸を含む。

30

#### 【0156】

本明細書において使用される場合、「安定な」タンパク質は、該当するタンパク質の生物物理学的形質（例えば、溶解性）、生物学的形質（例えば、消化率）、または組成上の形質（例えば、ロイシンアミノ酸の割合）を改変する変化（例えば、アンフォールディング、酸化、凝集、加水分解等）に抵抗を示すタンパク質である。

40

#### 【0157】

タンパク質の安定性は、当該技術分野で既知の種々のアッセイを用いて測定することができ、本明細書に開示される栄養タンパク質および閾値を上回る安定性を有する栄養タンパク質を選択することができる。いくつかの実施形態において、乳清タンパク質の熱安定性に匹敵するかまたはそれよりも良好な熱安定性を示すタンパク質が選択される。熱安定性は、栄養タンパク質の寿命を予測するのに役立ち得る特性である。栄養タンパク質試料

50

のアッセイ安定性のいくつかの実施形態において、極端な温度に曝露した後にサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して凝集形成をモニタリングすることにより試料が決定される。検査されるタンパク質の水性試料を90°の加熱ブロックに配置し、0、1°、5°、10°、30°、および60分後にSEC分析のために試料を採取する。タンパク質は、214nmで吸光度をモニタリングすることにより検出され、凝集体は、該当するタンパク質よりも迅速に溶出するピークとして特徴づけられる。ピーク面積に全体的な変化が見られないことは、加熱処理中にタンパク質の沈殿がないことを示唆する。乳清タンパク質は、そのようなアッセイにおいて90°に曝露されると約80%の凝集体を急速に形成することが示されている。

## 【0158】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の熱安定性は、温度の上昇に伴ってタンパク質が変性するにつれて形成される凝集タンパク質に結合する疎水性色素（例えば、Proteostat（登録商標）Thermal shift stability assay kit, Enzo Life Sciences）の存在下で、25°から95°まで徐々に試料を加熱することによって決定される（Niesen, F. H., Berglund, H. & Vadadi, M., 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, Volume 2, pp. 2212-2221）。結合すると色素の蛍光が著しく増加するので、それをRT PCR機器により記録し、タンパク質の溶融曲線によって表す（Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J. & Magilery, T. J., 2009. High-Throughput Thermal Scanning: A General, Rapid Dye-Binding Thermal Shift Screen for Protein Engineering. *Journal of the American Chemical Society*, pp. 3794-3795）。熱シフトが終了した後、試料を不溶性沈殿物について調べ、分析用のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によってさらに分析する。

## 【0159】

いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質は、抗凝集性を示し、例えば、高温（例えば、50°、60°、70°、80°、85°、90°、または95°）で80%未満の凝集、10%の凝集、または検出不能な凝集を示す。

## 【0160】

本明細書に開示されるような安定な栄養タンパク質の1つの利点は、ある場合には、冷蔵または冷却の必要なしに、使用前に長期間保存できる場合があることである。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、（例えば、凍結乾燥により）乾燥形態に加工される。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、凍結乾燥すると安定である。いくつかの実施形態において、そのような凍結乾燥した栄養タンパク質は、再構成すると（例えば、液体製剤）それらの安定性を維持する。

## 【0161】

ほとんどの実施形態の場合、栄養タンパク質が不適切に高いアレルゲン性を示さないことが好ましい。したがって、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の潜在的なアレルゲン性が評価される。これは、当該技術分野において既知のいずれの好適な方法によって行われてもよい。いくつかの実施形態において、アレルゲン性スコアが算出される。アレルゲン性スコアは、あるタンパク質が任意の既知のアレルゲンにどれほど類似するかを評価するための、WHOの推奨（<http://www.fao.org/ag/agn/food/pdf/allergygm.pdf>）を基準とした配列に基づく主要な測定基準であり、主要仮説は、標的と既知のアレルゲンとの間の高い同一性パーセントは交差反応を示唆する可能性が高いというものである。所与のタンパク質の場合、アレルギー反応を誘発する可能性は、配列相同性に基づく試験の相補的な対の一方または両方によ

10

20

30

40

50

り評価することができる。最初の試験は、BLOSUM50置換マトリックス、ギャップオープンペナルティ10、およびギャップ伸長ペナルティ2を用いてFASTAアルゴリズムを使用して、既知のアレルゲンのデータベースに対するグローバル・グローバル配列アラインメントにより配列全体にわたるタンパク質の同一性パーセントを決定する。50%未満の全体的相同性を有するタンパク質は、アレルゲン性である可能性が低いことが示唆されている(Goodman R. E. et al. Allergenicity assessment of genetically modified crops - what makes sense? Nat. Biotech. 26, 73-81 (2008)、Aalberse R. C. Structural biology of allergens. J. Allergy Clin. Immunol. 106, 228-238 (2000)).

10

### 【0162】

栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、分析に使用されるデータベース中の任意の既知のアレルゲンに対して50%未満の全体的相同性を有する。いくつかの実施形態において、40%未満の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、30%未満の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、20%未満の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、10%未満の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、40%～50%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、30%～50%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、20%～50%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、10%～50%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、5%～50%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、0%～50%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、分析に使用されるデータベース中の任意の既知のアレルゲンに対して50%を超える全体的相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、50%～60%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、50%～70%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、50%～80%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、50%～90%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、55%～60%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、65%～70%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、70%～75%のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、75%～80%のカットオフが用いられる。

20

### 【0163】

第2の試験は、BLOSUM50置換マトリックス、ギャップオープンペナルティ10、およびギャップ伸長ペナルティ2を用いてFASTAアルゴリズムを使用して、各断片の既知のアレルゲンのデータベースに対するグローバル・ローカル配列アラインメントにより、すべての可能性のある連続する80個のアミノ酸断片の局所的アレルゲン性を決定することによってタンパク質配列に沿った局所的アレルゲン性を評価する。任意のアレルゲンを有する任意の80個のアミノ酸ウィンドウの最も高い同一性パーセントを、該当するタンパク質の最終スコアとして採用する。WHOのガイドラインは、この断片試験には35%の同一性カットオフを用いることを提案している。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質のすべての可能性のある断片は、この試験を用いる分析に使用されるデータベース中の任意の既知のアレルゲンに対して35%未満の局所的相同性を有する。いくつかの実施形態において、30%未満の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、30%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、25%～30%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、20%～25%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、15%～20%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、10%～15%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、5%～10%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態にお

30

40

50

いて、0%～5%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%を超える相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～40%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、40%～45%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、45%～50%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、50%～55%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、55%～60%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、65%～70%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、70%～75%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、75%～80%の相同性のカットオフが用いられる。

10

#### 【0164】

当業者は、この目的に好適な既知のアレルゲンのデータベースを特定および使用することができる。いくつかの実施形態において、1つより多くのデータベースソースからタンパク質を選択することにより、データベースがカスタムメイドされる。いくつかの実施形態において、カスタムデータベースは、Food Allergy Research and Resource Programによって収集された統合アレルゲンリスト(<http://www.allergenonline.org/>)、UNIPROT注釈(<http://www.uniprot.org/docs/allergen>)、およびStructural Database of Allergenic Proteins(SDAP,[http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap\\_link.html](http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_link.html))を含む。このデータベースは、International Union of Immunological Societies(IUIS、<http://www.allergen.org/>)によって現在認識されているすべてのアレルゲン、および正式には名付けられていない多数のさらなるアレルゲンを含む。いくつかの実施形態において、データベースは、既知のデータベースで入手可能な既知のアレルゲンタンパク質のサブセットを含む：すなわち、このデータベースは、既知のアレルゲンタンパク質のカスタム選択されたサブセットである。いくつかの実施形態において、既知のアレルゲンのデータベースは、少なくとも10個のタンパク質、少なくとも20個のタンパク質、少なくとも30個のタンパク質、少なくとも40個のタンパク質、少なくとも50個のタンパク質、少なくとも100個のタンパク質、少なくとも200個のタンパク質、少なくとも300個のタンパク質、少なくとも400個のタンパク質、少なくとも500個のタンパク質、少なくとも600個のタンパク質、少なくとも700個のタンパク質、少なくとも800個のタンパク質、少なくとも900個のタンパク質、少なくとも1,000個のタンパク質、少なくとも1,100個のタンパク質、少なくとも1,200個のタンパク質、少なくとも1,300個のタンパク質、少なくとも1,400個のタンパク質、少なくとも1,500個のタンパク質、少なくとも1,600個のタンパク質、少なくとも1,700個のタンパク質、少なくとも1,800個のタンパク質、少なくとも1,900個のタンパク質、または少なくとも2,000個のタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、既知のアレルゲンのデータベースは、100～500個のタンパク質、200～1,000個のタンパク質、500～1,000個のタンパク質、500～1,000個のタンパク質、または1,000～2,000個のタンパク質を含む。

20

30

40

50

#### 【0165】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の異なる長さの連続するアミノ酸ウンドウ(例えば、70、60、50、40、30、20、10、8、または6アミノ酸ウンドウ)のすべて(または選択されたサブセット)をアレルゲンデータベースに対して検査し、100%の同一性、95%以上の同一性、90%以上の同一性、85%以上の同一性、80%以上の同一性、75%以上の同一性、70%以上の同一性、65%以上の同一性、60%以上の同一性、55%以上の同一性、または50%以上の同一性マッチを有するペプチド配列を、潜在的なアレルゲン性のさらなる調査のために同定する。

## 【0166】

タンパク質のアレルゲン性を予測する別 の方法は、ヒト起源のタンパク質に対するタンパク質の相同性を評価することである。ヒト免疫系は、可能性のある数多くのアレルゲン性タンパク質に定期的に曝露され、宿主の体のタンパク質と外来性タンパク質とを区別する固有の能力を有する。この能力の正確な性質は常に明確であるわけではなく、体が自身を非自身から区別することに失敗した結果として生じる多くの疾患が存在する（例えは、関節炎）。それにもかかわらず、基本的仮説は、ヒトタンパク質とある程度の配列相同性を共有するタンパク質は、免疫反応を引き起こす可能性が低いというものである。特に、これは、既知のアレルゲンメンバー（トロポミオシン、パルプアルブミン、カゼイン）を有するいくつかのタンパク質ファミリーについて示されており、既知のアレルゲンタンパク質と比べてそれらのヒトのカウンターパートに対するより多くの配列相同性を有するこれらのタンパク質は、アレルゲン性ではないと考えられる（Jenkins J. A. et al. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J. Allergy Clin Immunol.* 120 (2007) : 1399 - 1405）。所与のタンパク質の場合、BLOSUM50置換マトリックス、ギャップオープンペナルティ10、およびギャップ伸長ペナルティ2を用いてFASTAアルゴリズムを使用して、グローバル・ローカルアラインメントからのヒトタンパク質のデータベース（例えは、UNIPROTデータベース）に対するタンパク質の最大同一性パーセントを決定することによりヒト相同性スコアが測定されるJenkinsら（Jenkins J. A. et al. Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J. Allergy Clin Immunol.* 120 (2007) : 1399 - 1405）によれば、約62%を超えるヒトタンパク質に対する配列同一性を有するタンパク質は、アレルゲン性である可能性が低い。当業者は、例えは、UNIPROTデータベース（<http://www.uniprot.org>）を検索することにより、この目的に好適な既知のヒトタンパク質のデータベースを特定および使用することができる。いくつかの実施形態において、1つより多くのデータベースソースからタンパク質を選択することにより、データベースがカスタムメイドされる。当然、データベースは、包括的であってもよいが、そうである必要はない。いくつかの実施形態において、データベースは、ヒトタンパク質のサブセットを含む：すなわち、このデータベースは、ヒトタンパク質のカスタム選択されたサブセットである。いくつかの実施形態において、ヒトタンパク質のデータベースは、少なくとも10個のタンパク質、少なくとも20個のタンパク質、少なくとも30個のタンパク質、少なくとも40個のタンパク質、少なくとも50個のタンパク質、少なくとも100個のタンパク質、少なくとも200個のタンパク質、少なくとも300個のタンパク質、少なくとも400個のタンパク質、少なくとも500個のタンパク質、少なくとも600個のタンパク質、少なくとも700個のタンパク質、少なくとも800個のタンパク質、少なくとも900個のタンパク質、少なくとも1,000個のタンパク質、少なくとも2,000個のタンパク質、少なくとも3,000個のタンパク質、少なくとも4,000個のタンパク質、少なくとも5,000個のタンパク質、少なくとも6,000個のタンパク質、少なくとも7,000個のタンパク質、少なくとも8,000個のタンパク質、少なくとも9,000個のタンパク質、または少なくとも10,000個のタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、データベースは、100～500個のタンパク質、200～1,000個のタンパク質、500～1,000個のタンパク質、500～1,000個のタンパク質、または5,000～10,000個のタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、データベースは、すべての既知のヒトタンパク質の少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%を含む。

## 【0167】

10

20

30

40

50

栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、ヒトタンパク質と少なくとも20%相同である。いくつかの実施形態において、少なくとも30%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも40%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも50%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも60%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも70%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも80%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも62%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも20%の相同性～少なくとも30%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも30%の相同性～少なくとも40%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも50%の相同性～少なくとも60%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも60%の相同性～少なくとも70%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、少なくとも70%の相同性～少なくとも80%の相同性のカットオフが用いられる。

#### 【0168】

ほとんどの実施形態の場合、栄養タンパク質が不適切に高い毒性を示さないことが好ましい。したがって、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の潜在的な毒性が評価される。これは、当該技術分野において既知のいずれの好適な方法によって行われてもよい。いくつかの実施形態において、既知の毒性タンパク質（例えば、UNIPROTデータベースから特定された毒性タンパク質）のデータベースに対するタンパク質の同一性パーセントを決定することにより毒性スコアが算出される。BLOSUM50置換マトリックス、ギャップオープンペナルティ10、およびギャップ伸長ペナルティ2を用いてFASTAアルゴリズムを使用して、既知の毒素のデータベースに対する該当するタンパク質のグローバル-グローバルアラインメントが行われる。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、既知の毒素と35%未満相同である。いくつかの実施形態において、35%未満の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、30%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、25%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、20%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、15%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、10%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、5%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、0%～35%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%を超える相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～40%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～45%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～50%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～55%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～60%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～70%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～75%の相同性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35%～80%の相同性のカットオフが用いられる。当業者は、例えば、UNIPROTデータベース(<http://www.uniprot.org>)を検索することにより、この目的に好適な既知の毒素のデータベースを特定および使用することができる。いくつかの実施形態において、1つより多くのデータベースソースから毒素として同定されたタンパク質を選択することにより、データベースがカスタムメイドされる。いくつかの実施形態において、データベースは、既知の毒性タンパク質のサブセットを含む：すなわち、このデータベースは、既知の毒性タンパク質のカスタム選択されたサブセットである。いくつかの実施形態において、毒性タンパク質のデータベースは、少なくとも10個のタンパク質、少なくとも20個のタンパク質、少なくとも30個のタ

10

20

30

40

50

ンパク質、少なくとも 40 個のタンパク質、少なくとも 50 個のタンパク質、少なくとも 100 個のタンパク質、少なくとも 200 個のタンパク質、少なくとも 300 個のタンパク質、少なくとも 400 個のタンパク質、少なくとも 500 個のタンパク質、少なくとも 600 個のタンパク質、少なくとも 700 個のタンパク質、少なくとも 800 個のタンパク質、少なくとも 900 個のタンパク質、少なくとも 1,000 個のタンパク質、少なくとも 2,000 個のタンパク質、少なくとも 3,000 個のタンパク質、少なくとも 4,000 個のタンパク質、少なくとも 5,000 個のタンパク質、少なくとも 6,000 個のタンパク質、少なくとも 7,000 個のタンパク質、少なくとも 8,000 個のタンパク質、少なくとも 9,000 個のタンパク質、または少なくとも 10,000 個のタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、データベースは、100～500 個のタンパク質、200～1,000 個のタンパク質、500～1,000 個のタンパク質、500～1,000 個のタンパク質、1,000～2,000 個のタンパク質、1,000～5,000 個のタンパク質、または 5,000～10,000 個のタンパク質を含む。  
10

### 【0169】

いくつかの実施形態の場合、栄養タンパク質が抗栄養活性（「抗栄養性」（anti-nutricity））（すなわち、食物からの栄養素の吸収を妨げる可能性を有するタンパク質）を示さないことが好ましい。抗栄養因子の例として、トリプシン、ペプシン、および他の腸内プロテアーゼの活性を阻害し、タンパク質の消化およびその後の吸収を妨げるプロテアーゼ阻害剤が挙げられる。したがって、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質の潜在的な抗栄養性が評価される。これは、当該技術分野において既知のいずれの好適な方法によって行われてもよい。いくつかの実施形態において、既知のプロテアーゼ阻害剤（例えば、UNI PROT データベースから特定されたプロテアーゼ阻害剤）のデータベースに対するタンパク質の同一性パーセントを決定することにより抗栄養性スコアが算出される。栄養タンパク質が既知の抗栄養タンパク質に相同であるかどうかを同定するために、BLOSUM50 置換マトリックス、ギャップオープンペナルティ 10、およびギャップ伸長ペナルティ 2 を用いて FASTA アルゴリズムを使用して、既知のプロテアーゼ阻害剤のデータベースに対する該当するタンパク質のグローバル・グローバルアラインメントが行われる。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、分析に使用されるデータベース中の任意の既知の抗栄養タンパク質（例えば、任意の既知のプロテアーゼ阻害剤）に対して 35 % 未満の全体的相同性を有する。いくつかの実施形態において、35 % 未満の同一性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、30 %～35 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、20 %～35 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、15 %～35 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、10 %～35 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、5 %～35 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、0 %～35 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 % を超える同一性のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～40 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～45 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～50 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～55 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～60 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～70 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～75 % のカットオフが用いられる。いくつかの実施形態において、35 %～80 % のカットオフが用いられる。当業者は、例えば、UNI PROT データベース（<http://www.uniprot.org>）を検索することにより、この目的に好適な既知のプロテアーゼ阻害剤のデータベースを特定および使用することができる。いくつかの実施形態において、1つより多くのデータベースソースからプロテアーゼ阻害剤として同定されたタンパク質を選択することにより、データベースがカスタムメイドされる。いくつかの実施形態において、データベースは、データベースで入手可能な既知のプロ  
20  
30  
40  
50

テアーゼ阻害剤のサブセットを含む：すなわち、このデータベースは、既知のプロテアーゼ阻害剤のカスタム選択されたサブセットである。いくつかの実施形態において、既知のプロテアーゼ阻害剤のデータベースは、少なくとも10個のタンパク質、少なくとも20個のタンパク質、少なくとも30個のタンパク質、少なくとも40個のタンパク質、少なくとも50個のタンパク質、少なくとも100個のタンパク質、少なくとも200個のタンパク質、少なくとも300個のタンパク質、少なくとも400個のタンパク質、少なくとも500個のタンパク質、少なくとも600個のタンパク質、少なくとも700個のタンパク質、少なくとも800個のタンパク質、少なくとも900個のタンパク質、少なくとも1,000個のタンパク質、少なくとも1,100個のタンパク質、少なくとも1,200個のタンパク質、少なくとも1,300個のタンパク質、少なくとも1,400個のタンパク質、少なくとも1,500個のタンパク質、少なくとも1,600個のタンパク質、少なくとも1,700個のタンパク質、少なくとも1,800個のタンパク質、少なくとも1,900個のタンパク質、または少なくとも2,000個のタンパク質を含む。<sup>10</sup> いくつかの実施形態において、既知のプロテアーゼ阻害剤のデータベースは、100~500個のタンパク質、200~1,000個のタンパク質、500~1,000個のタンパク質、または1,000~2,000個のタンパク質、または2,000~3,000個のタンパク質を含む。

#### 【0170】

他の実施形態において、ある程度のプロテアーゼ阻害剤活性を示す栄養タンパク質が用いられる。例えば、いくつかの実施形態において、そのようなタンパク質は、栄養タンパク質が摂取されると、栄養タンパク質が消化される前に消化管内により長い距離を横切り、したがって吸収を遅らせるようにプロテアーゼ消化を遅らせるため、そのようなタンパク質が有用である場合がある。例えば、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、胃内消化を阻害するが、腸内消化は阻害しない。<sup>20</sup>

#### 【0171】

Delaney B. et al. (Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. Food. Chem. Toxicol. 46 (2008: S71 - S97))は、可能性のある食物タンパク質の安全性を評価する場合、既知の毒性タンパク質および抗栄養タンパク質の両方を避けるべきであると提案している。栄養タンパク質のいくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、本明細書において定義されるように、既知の毒性タンパク質のデータベースに対して好ましく低いレベルの全体的相同意を有し、かつ／または既知の抗栄養タンパク質（例えば、プロテアーゼ阻害剤）のデータベースに対して好ましく低いレベルの全体的相同意を有する。<sup>30</sup>

#### 【0172】

特定の遊離アミノ酸および遊離アミノ酸の混合物は、苦味またはさもなければ不快な味を有することが分かっている。さらに、一般的なタンパク質（例えば、乳清および大豆）の加水分解物は、苦味または不快な味を有することが多い。いくつかの実施形態において、本明細書に開示および記載される栄養タンパク質は、苦味またはさもなければ不快な味を有しない。いくつかの実施形態において、本明細書に開示および記載される栄養タンパク質は、遊離アミノ酸、遊離アミノ酸の混合物、および／またはタンパク質加水分解物のうちの少なくとも1つと比較して、より許容できる味を有する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示および記載される栄養タンパク質は、乳清タンパク質のうちの少なくとも1つに等しいかまたはそれを超える味を有する。<sup>40</sup>

#### 【0173】

タンパク質は、甘味、酸味、辛味、塩味、および旨味の確立された5つの味覚モダリティを有することが分かっている。特定のタンパク質の味（またはその欠如）は、タンパク質の一次構造、荷電側鎖の存在、ならびに電子および立体構造特性を含むいくつかの要因に起因し得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示および記載される栄養タンパク質は、望ましい味（例えば、甘味、塩味、旨味）を有するように、かつ／または望ま

10

20

30

40

50

しくない味（例えば、苦味、酸味）を有しないように設計される。この文脈において、「設計」は、例えば、望ましい味覚性を実現する特性を具現化する天然に存在するタンパク質を選択すること、および望ましい味覚性を有する天然に存在するタンパク質のムテインを作製することを含む。例えば、栄養タンパク質は、甘味受容体（T1R2-T1R3ヘテロ二量体）または旨味受容体（T1R1-T1R3ヘテロ二量体、mGluR4、および／もしくはmGluR1）等の特定の味覚受容体と相互作用するように設計することができる。さらに、栄養タンパク質は、苦味受容体（T2R受容体）等の他の味覚受容体と相互作用しないように、または微弱な相互作用を有するように設計されてもよい。

#### 【0174】

本明細書に開示および記載される栄養タンパク質はまた、経口摂取されると、口内に「食感」と称されることもある異なる身体的感覚を引き出すこともできる。栄養タンパク質の食感は、タンパク質の一次構造、荷電側鎖の存在、ならびに電子および立体構造特性を含む1つ以上の要因に起因し得る。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、経口摂取されると、バターのようなまたは脂肪のような食感を引き出す。

#### 【0175】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、20～5,000個のアミノ酸、20～2,000個のアミノ酸、20～1,000個のアミノ酸、20～500個のアミノ酸、20～250個のアミノ酸、20～200個のアミノ酸、20～150個のアミノ酸、20～100個のアミノ酸、20～40個のアミノ酸、30～50個のアミノ酸、40～60個のアミノ酸、50～70個のアミノ酸、60～80個のアミノ酸、70～90個のアミノ酸、80～100個のアミノ酸、少なくとも25個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも35個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも245個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも55個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも65個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも75個のアミノ酸、少なくとも80個のアミノ酸、少なくとも85個のアミノ酸、少なくとも90個のアミノ酸、少なくとも95個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも105個のアミノ酸、少なくとも110個のアミノ酸、少なくとも115個のアミノ酸、少なくとも120個のアミノ酸、少なくとも125個のアミノ酸、少なくとも130個のアミノ酸、少なくとも135個のアミノ酸、少なくとも140個のアミノ酸、少なくとも145個のアミノ酸、少なくとも150個のアミノ酸、少なくとも155個のアミノ酸、少なくとも160個のアミノ酸、少なくとも165個のアミノ酸、少なくとも170個のアミノ酸、少なくとも175個のアミノ酸、少なくとも180個のアミノ酸、少なくとも185個のアミノ酸、少なくとも190個のアミノ酸、少なくとも195個のアミノ酸、少なくとも200個のアミノ酸、少なくとも205個のアミノ酸、少なくとも210個のアミノ酸、少なくとも215個のアミノ酸、少なくとも220個のアミノ酸、少なくとも225個のアミノ酸、少なくとも230個のアミノ酸、少なくとも235個のアミノ酸、少なくとも240個のアミノ酸、少なくとも245個のアミノ酸、または少なくとも250個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、20～5,000個のアミノ酸、20～2,000個のアミノ酸、20～1,000個のアミノ酸、20～500個のアミノ酸、20～250個のアミノ酸、20～200個のアミノ酸、20～150個のアミノ酸、20～100個のアミノ酸、20～40個のアミノ酸、30～50個のアミノ酸、40～60個のアミノ酸、50～70個のアミノ酸、60～80個のアミノ酸、70～90個のアミノ酸、80～100個のアミノ酸、少なくとも25個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも35個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも245個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも55個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも65個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも75個のアミノ酸、少なくとも80個のアミノ酸、少なくとも85個のアミノ酸、少なくとも90個のアミノ酸、少なくとも95個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも105個のアミノ酸、

10

20

30

40

50

個のアミノ酸、少なくとも 125 個のアミノ酸、少なくとも 130 個のアミノ酸、少なくとも 135 個のアミノ酸、少なくとも 140 個のアミノ酸、少なくとも 145 個のアミノ酸、少なくとも 150 個のアミノ酸、少なくとも 155 個のアミノ酸、少なくとも 160 個のアミノ酸、少なくとも 165 個のアミノ酸、少なくとも 170 個のアミノ酸、少なくとも 175 個のアミノ酸、少なくとも 180 個のアミノ酸、少なくとも 185 個のアミノ酸、少なくとも 190 個のアミノ酸、少なくとも 195 個のアミノ酸、少なくとも 200 個のアミノ酸、少なくとも 205 個のアミノ酸、少なくとも 210 個のアミノ酸、少なくとも 215 個のアミノ酸、少なくとも 220 個のアミノ酸、少なくとも 225 個のアミノ酸、少なくとも 230 個のアミノ酸、少なくとも 235 個のアミノ酸、少なくとも 240 個のアミノ酸、少なくとも 245 個のアミノ酸、または少なくとも 250 個のアミノ酸からなる。

10

## 【0176】

## B . 核酸

栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸も、本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、核酸は、単離される。いくつかの実施形態において、核酸は、精製される。

## 【0177】

核酸のいくつかの実施形態において、核酸は、上記セクション A に開示される第 1 のポリペプチド配列をコードする核酸配列を含む。核酸のいくつかの実施形態において、核酸は、上記セクション A に開示される第 1 のポリペプチド配列をコードする核酸配列からなる。核酸のいくつかの実施形態において、核酸は、上記セクション A に開示される栄養タンパク質をコードする核酸配列を含む。核酸のいくつかの実施形態において、核酸は、上記セクション A に開示される栄養タンパク質をコードする核酸配列からなる。核酸のいくつかの実施形態において、第 1 のポリペプチド配列をコードする核酸配列は、少なくとも 1 つの発現制御配列と作動可能に連結される。例えば、核酸のいくつかの実施形態において、第 1 のポリペプチド配列をコードする核酸配列は、下のセクション D に記載されるプロモーターのようなプロモーターと作動可能に連結される。

20

## 【0178】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示の核酸分子は、それ自体が栄養ポリペプチドまたはタンパク質であるポリペプチドまたはタンパク質をコードする。そのような核酸分子は、「栄養核酸」と称されてもよい。いくつかの実施形態において、栄養核酸は、それ自体が、a) 少なくとも 24% の全アミノ酸残基に対する分岐鎖アミノ酸残基の割合、b) 少なくとも 11% の全アミノ酸残基に対する L e u 残基の割合、および c) 少なくとも 49% の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基の割合のうちの少なくとも 1 つを含むポリペプチドまたはタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、栄養核酸は、少なくとも 10 個のヌクレオチド、少なくとも 20 個のヌクレオチド、少なくとも 30 個のヌクレオチド、少なくとも 40 個のヌクレオチド、少なくとも 50 個のヌクレオチド、少なくとも 60 個のヌクレオチド、少なくとも 70 個のヌクレオチド、少なくとも 80 個のヌクレオチド、少なくとも 90 個のヌクレオチド、少なくとも 100 個のヌクレオチド、少なくとも 200 個のヌクレオチド、少なくとも 300 個のヌクレオチド、少なくとも 400 個のヌクレオチド、少なくとも 500 個のヌクレオチド、少なくとも 600 個のヌクレオチド、少なくとも 700 個のヌクレオチド、少なくとも 800 個のヌクレオチド、少なくとも 900 個のヌクレオチド、少なくとも 1,000 個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、栄養核酸は、10 ~ 100 個のヌクレオチド、20 ~ 100 個のヌクレオチド、10 ~ 50 個のヌクレオチド、または 20 ~ 40 個のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、栄養核酸は、天然に存在する栄養ポリペプチドまたはタンパク質をコードするオープンリーディングフレームの全部または一部を含む。いくつかの実施形態において、栄養核酸は、天然に存在する栄養タンパク質の断片をコードするオープンリーディングフレームからなり、オープンリーディングフレームは、完全な天然に存在する栄養タンパク質をコードしない。

30

40

50

## 【0179】

いくつかの実施形態において、栄養核酸は、cDNAである。

## 【0180】

いくつかの実施形態において、天然に存在する栄養核酸に少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.9%同一な配列を含む核酸分子が提供される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの基準栄養核酸を用いるストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸が提供される。

## 【0181】

本開示において提供される栄養核酸およびその断片は、様々なシステムおよび方法において有用性を示す。例えば、断片は、種々のハイブリダイゼーション法においてプローブとして使用されてもよい。方法に応じて、標的核酸配列は、DNAまたはRNAのいずれかであってもよい。標的核酸配列は、ハイブリダイゼーションの前に（例えば、ゲル電気泳動により）分画されてもよいか、またはハイブリダイゼーションは、インサイツで試料に対して行われてもよい。当業者は、既知の配列の核酸プローブが、染色体構造の決定（例えば、サザンプロット法による）および遺伝子発現の測定（例えば、ノーザンプロット法による）に有用性を見出すことを認識するであろう。そのような実験において、配列断片は、好ましくは検出可能に標識され、そのため、標的配列に対するそれらの特異的ハイブリダイゼーションが検出可能となり得、任意選択的に定量化され得る。当業者は、本開示の核酸断片が、本明細書に具体的に記載されていない様々なプロット法に使用され得ることを認識するであろう。

10

20

30

40

50

## 【0182】

また、本明細書に開示される核酸配列断片は、マイクロアレイに固定されると、プローブとしての有用性も見出すことも理解されたい。支持基質上の核酸の蒸着および固定化によるマイクロアレイの作製法は、当該技術分野で周知である。Reviewed in DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768)、Nature Genet. 21(1) (suppl): 1-60 (1999)、Microarray Biochip: Tools and Technology, Schena (ed.), Eaton Publishing Company / Biotechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376)：これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、本明細書に開示される核酸配列断片等の核酸配列断片を含むマイクロアレイを用いた遺伝子発現の分析は、細胞生物学および分子生物学の分野で配列断片に関する有用性が十分に確立されている。マイクロアレイに固定化した配列断片の他の使用法は、Gerhold et al., Trends Biochem. Sci. 24: 168-173 (1999) and Zweiger, Trends Biotechnol. 17: 429-436 (1999)、DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Schena (ed.), Oxford University Press (1999) (ISBN: 0199637768)、Nature Genet. 21(1) (suppl): 1-60 (1999)、Microarray Biochip: Tools and Technology, Schena (ed.), Eaton Publishing Company / Biotechniques Books Division (2000) (ISBN: 1881299376)に開示されている。

## 【0183】

## C. ベクター

本明細書においてさらに記載されるように、本明細書に開示される核酸分子のうちの少なくとも1つを含む発現ベクターを含むベクターもまた提供される。いくつかの実施形態

において、ベクターは、本明細書に開示されるような栄養タンパク質をコードする少なくとも1つの単離された核酸分子を含む。代替の実施形態において、ベクターは、1つ以上の発現制御配列に動作可能に連結されたそのような核酸分子を含む。ベクターは、したがって、組換え微生物宿主細胞において少なくとも1つの組換えタンパク質を発現させるために使用することができる。

#### 【0184】

微生物における核酸の発現に好適なベクターは、当業者に周知である。シアノバクテリアにおいて使用するための好適なベクターは、例えば、Heidorn et al., "Synthetic Biology in Cyanobacteria: Engineering and Analyzing Novel Functions," Methods in Enzymology, Vol. 497, Ch. 24 (2011) 10に記載されている。本明細書に開示されるようなシアノバクテリアを遺伝子操作するために使用することができる例示的な複製ベクターは、pPMQAK1、pSL1211、pFC1、pSB2A、pSCR119/202、pSUN119/202、pRL2697、pRL25C、pRL1050、pSG111M、およびpPBH201を含む。

#### 【0185】

本明細書に開示される核酸配列を受容することができるpJB161等の他のベクターもまた使用されてもよい。pJB161等のベクターは、特定の光合成微生物に内在するプラスミド(例えば、特定のシネココッカス種のプラスミドpAQ1、pAQ3、およびpAQ4)に存在する配列と相同な配列を含む。そのようなベクターの例およびその使用方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Xu et al., "Expression of Genes in Cyanobacteria: Adaptation of Endogenous Plasmids as Platforms for High-Level Gene Expression in Synechococcus sp. PCC 7002," Chapter 21 in Robert Carpentier (ed.), "Photosynthesis Research Protocols," Methods in Molecular Biology, Vol. 684, 2011(参照により、本明細書に組み込まれる)に提供される。pJB161と内在性プラスミドとの間のインビボでの組換えにより、それらの内在性プラスミドから該当する遺伝子を発現する遺伝子操作された微生物がもたらされる。代替として、宿主細胞染色体と組み合わさるようにベクターを遺伝子操作することができるか、または宿主細胞染色体もしくは宿主細胞の内在性プラスミドのいずれとも関係なく、該当する遺伝子を複製および発現するようにベクターを遺伝子操作することができる。

#### 【0186】

組換えタンパク質の生成に好適なベクターのさらなる例は、pETシステム(Novaagen(登録商標))である。このシステムは、大腸菌および微生物における使用のために広範囲に特徴づけられている。このシステムでは、標的遺伝子が、強力なバクテリオファージT7転写および(任意選択的に)翻訳シグナルの制御下でpETプラスミド中にクローニングされる:発現は、宿主細胞中にT7 RNAポリメラーゼの源を提供することによって誘導される。T7 RNAポリメラーゼは、非常に選択的かつ能動的であるため、完全に誘導されると、ほぼすべての微生物の源が標的遺伝子発現に変換される:所望の生成物は、誘導の数時間後に全細胞タンパク質の50%超を含むことができる。また、単純にインデューサーの濃度を低下させることによって発現レベルを減衰させることも可能である。発現レベルの減少は、いくつかの標的タンパク質の可溶性収率を向上させる場合がある。いくつかの実施形態において、このシステムはまた、標的遺伝子を転写的にサイレントな非誘導状態に維持することもできる。

#### 【0187】

このシステムを使用するいくつかの実施形態において、標的遺伝子は、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含有しない宿主を用いてクローニングされ、よって、潜在的に宿主細胞に毒性を示すタンパク質の生成に起因するプラスミドの不安定性に関連する潜在的な問

10

20

30

40

50

題を軽減する。一旦、非発現宿主中に確立されると、p L および p I プロモーターの制御下で T 7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を担持するファージである C E 6 を用いて宿主を感染させることにより、または lac UV 5 の制御下で T 7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーを含有する発現宿主にプラスミドを導入することにより、標的タンパク質の発現を開始させることができる。第 2 の場合には、細菌培養に IPTG またはラクトースを添加することによって、または自己誘導培地を用いることによって発現を誘導する。 lac オペレーターによって制御されるが、 T 7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を必要とせず、かつ大腸菌の天然 RNA ポリメラーゼに依存する他のプラスミド系は、 p Trc プラスミドのスイート (Invitrogen) または pQE プラスミドのスイート (QIAGEN) を含む。

10

## 【0188】

他の実施形態において、発現宿主に直接クローニングすることが可能である。2種類の T 7 プロモーター、および基礎発現レベルを抑制するストリンジエンシーが異なるいくつかの宿主が利用可能であり、高い柔軟性および多様な標的遺伝子の発現を最適化するための機能を提供する。

20

## 【0189】

哺乳類細胞における核酸の発現に好適なベクターは、典型的には、ウイルスの調節エレメントにおいて提供される制御機能を含む。例えば、一般的に用いられるプロモーターは、ポリオーマウイルス、アデノウイルス 2、サイトメガウイルス、またはサルウイルス 40 に由来する。

20

## 【0190】

## D. プロモーター

本明細書に記載される組換え遺伝子を発現させるために有用なプロモーターは、構成的プロモーターおよび誘導性 / 抑制可能プロモーターの両方を含む。誘導性 / 抑制可能プロモーターの例として、ニッケル誘導性プロモーター（例えば、 PnrsA 、 PnrsB : 例えば、 Lopez-Maury et al. , Cell (2002) v. 43 : 247 - 256 を参照）および PnirA 等の尿素抑制性プロモーター（例えば、 Qi et al. , Applied and Environmental Microbiology (2005) v. 71 : 5678 - 5684 に記載される）が挙げられる。誘導性 / 抑制可能プロモーターのさらなる例として、 PnirA (硝酸によって誘導され、尿素によって抑制される、 nirA 遺伝子の発現を駆動するプロモーター、) および Psuf (鉄ストレスによって誘導される、 sufB 遺伝子の発現を駆動するプロモーター) が挙げられる。構成的プロモーターの例として、 PcpC (cpC オペロンの発現を駆動するプロモーター) 、 Prbc (ルビスコの発現を駆動するプロモーター) 、 PpsbAII (PpsbAII の発現を駆動するプロモーター) 、 Pcro (cro の発現を駆動するファージプロモーター) が挙げられる。他の実施形態において、 PapHI1 および / または lacIq - Ptrc プロモーターは、発現を制御するために使用することができる。遺伝子操作された微生物において複数の組換え遺伝子が発現される場合、異なる遺伝子が、異なるプロモーターによってもしくは別個のオペロンの同一のプロモーターによって制御されてもよいか、または 2 つ以上の遺伝子の発現が、オペロンの一部としての単一のプロモーターによって制御されてもよい。

30

## 【0191】

誘導性プロモーターのさらなる非限定的な例として、限定されないが、外来性タンパク質（例えば、 T 7 RNA ポリメラーゼ、 SP6 RNA ポリメラーゼ）の発現によって、小分子の存在（例えば、 IPTG 、ガラクトース、テトラシクリン、ステロイドホルモン、アブシジン酸）によって、小分子（例えば、 CO<sub>2</sub> 、鉄、窒素）の欠如によって、金属または金属イオン（例えば、銅、亜鉛、カドミウム、ニッケル）によって、および環境因子（例えば、熱、低温、応力、光、暗さ）によって、ならびに増殖期によって誘導されるものを挙げることができる。いくつかの実施形態において、非誘導時にプロモーターによる転写が実質的に開始されないように、誘導性プロモーターは厳密に調節される。いく

40

50

つかの実施形態において、プロモーターの誘導は、他のプロモーターによる転写を実質的に変化させない。また、一般的に言って、誘導性プロモーターを誘導する化合物または条件は、発現が求められる生物または環境に天然では存在しない。

#### 【0192】

いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、シアノバクテリア培養物へのCO<sub>2</sub>の供給を制限することによって誘導される。非限定的な例として、誘導性プロモーターは、CO<sub>2</sub>制限条件下で上方制御されるシネコシスティスPCC 6803のプロモーター配列、例えば、cmp遺伝子、ntp遺伝子、ndh遺伝子、sbt遺伝子、chp遺伝子、およびrbc遺伝子、またはその改変体もしくは断片であってもよい。

#### 【0193】

いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、鉄飢餓により、または定常期に突入することにより誘導される。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、鉄飢餓条件下で上方制御されるシアノバクテリア遺伝子のプロモーター配列の改変体配列、例えば、is i Aであってもよいか、または培養物が定常期に突入する場合、例えば、is i A、phrA、sigC、sigB、およびsigH遺伝子、またはその改変体もしくは断片であってもよい。

#### 【0194】

いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、金属または金属イオンによって誘導される。非限定的な例として、誘導性プロモーターは、銅、亜鉛、カドミウム、水銀、ニッケル、金、銀、コバルト、およびビスマスまたはそのイオンによって誘導され得る。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、ニッケルまたはニッケルイオンによって誘導される。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、Ni<sup>2+</sup>等のニッケルイオンによって誘導される。別の例示的な実施形態において、誘導性プロモーターは、シネコシスティス PCC 6803由来のニッケル誘導性プロモーターである。別の実施形態において、誘導性プロモーターは、銅または銅イオンによって誘導され得る。さらに別の実施形態において、誘導性プロモーターは、亜鉛または亜鉛イオンによって誘導され得る。さらに別の実施形態において、誘導性プロモーターは、カドミウムまたはカドミウムイオンによって誘導され得る。さらに別の実施形態において、誘導性プロモーターは、水銀または水銀イオンによって誘導され得る。代替の実施形態において、誘導性プロモーターは、金または金イオンによって誘導され得る。別の代替の実施形態において、誘導性プロモーターは、銀または銀イオンによって誘導され得る。さらに別の代替の実施形態において、誘導性プロモーターは、コバルトまたはコバルトイオンによって誘導され得る。さらに別の代替の実施形態において、誘導性プロモーターは、ビスマスまたはビスマスイオンによって誘導され得る。

#### 【0195】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、誘導性プロモーターを含む細胞を金属または金属イオンに曝露することによって誘導される。細胞は、微生物増殖培地に金属を添加することにより金属または金属イオンに曝露されてもよい。特定の実施形態において、微生物増殖培地に添加される金属または金属イオンは、培地から効率的に回収され得る。他の実施形態において、回収後に培地中に残る金属または金属イオンは、培地のまたは細菌遺伝子産物の下流プロセシングを実質的に妨げない。

#### 【0196】

構成的プロモーターのさらなる非限定的な例として、グラム陰性細菌またはグラム陰性細菌を増殖するバクテリオファージに由来する構成的プロモーターが挙げられる。例えば、Lpp、OmpA、rRNA、およびリボソームタンパク質のプロモーター等の、高度に発現されるグラム陰性遺伝子産物をコードする遺伝子のプロモーターが用いられてもよい。代替として、調節可能なプロモーターは、そのプロモーターの調節タンパク質を欠損した株に用いられ得る。例えば、P<sub>lac</sub>、P<sub>tac</sub>、およびP<sub>trc</sub>は、lacIを欠損した株において構成的プロモーターとして用いられ得る。同様に、P<sub>22</sub> P<sub>R</sub>およびP<sub>L</sub>は、C2リプレッサータンパク質を欠損した株に用いられ得、P<sub>R</sub>およびP<sub>L</sub>は

10

20

30

40

50

、 C 1 リプレッサータンパク質を欠損した株に用いられ得る。一実施形態において、構成的プロモーターは、バクテリオファージに由来する。別の実施形態において、構成的プロモーターは、サルモネラバクテリオファージに由来する。さらに別の実施形態において、構成的プロモーターは、シアノファージに由来する。いくつかの実施形態において、構成的プロモーターは、シネコシスティスプロモーターである。例えば、構成的プロモーターは、P<sub>p</sub>s b A 1 1 プロモーターまたはその改変体配列、P<sub>r</sub>b c プロモーターまたはその改変体配列、P<sub>c</sub>p<sub>c</sub> プロモーターまたはその改変体配列、およびP<sub>r</sub>n p B プロモーターまたはその改変体配列であり得る。

## 【0197】

## E.宿主細胞

10

また、本明細書に開示される核酸分子またはベクターで形質転換される宿主細胞、およびその子孫も提供される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、微生物細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、自由に複製するベクターであってもよいが、そうである必要はないベクター上に、核酸配列を担持する。他の実施形態において、核酸は、宿主細胞のゲノムおよび／または宿主細胞の内在性プラスミドに組み込まれている。形質転換された宿主細胞は、例えば、本明細書に開示される組換え栄養タンパク質の生成に用途を見出す。

## 【0198】

「微生物」は、古細菌、細菌、および真核生物ドメイン由来の原核生物および真核生物の微生物種を含み、後者は、酵母および糸状菌、原虫類、藻類、またはより高等な原生生物を含む。用語「微生物細胞」および「微生物(microbe)」は、「微生物(microorganism)」と同義に用いられる。

20

## 【0199】

様々な宿主微生物が、本明細書に開示される核酸配列で形質転換され得、いくつかの実施形態において、本明細書に開示される組換え栄養タンパク質を生成するために用いられ得る。好適な宿主微生物は、独立栄養微生物および従属栄養微生物の両方である。いくつかの用途において、独立栄養微生物は、化石燃料における還元、および／または宿主微生物に導入された組換え核酸配列によってコードされる栄養タンパク質を作製するために必要な電気入力を可能にする。同様に、いくつかの用途において、これは、栄養タンパク質を生成するコストおよび／もしくは環境影響を削減し、かつ／または、乳清、卵、および大豆等の代替の栄養タンパク質を製造するコストおよび／もしくは環境影響と比較してコストおよび／もしくは環境影響を削減する。例えば、本明細書に開示されるような宿主微生物を使用して本明細書に開示される栄養タンパク質を作製するコストおよび／または環境影響は、いくつかの実施形態において、牛乳を処理することによって食用に好適な形態の乳清タンパク質を作製するコストおよび／または環境影響よりも低い。

30

## 【0200】

従属栄養素の非限定的な例として、大腸菌、サルモネラネズミチフス菌、枯草菌、巨大菌、コリネバクテリウム・グルタミクム、ストレプトマイセス・セリカラー、ストレプトマイセス・リビダンス、ストレプトマイセス・ベネズエラエ、ロゼストレプトマイセス・ロゼオスポラス、ストレプトマイセス・フラディニアエ、ストレプトマイセス・グリセウス、ストレプトマイセス・クラブリゲルス、ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス、ストレプトマイセス・プラテンシス、サッカロポリスピラ・エリスラエア、コリネバクテリウム・グルタミクム、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデュランス、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・テレウス、アスペルギルス・ソーヤ、ペニシリウム・クリソゲナム、トリコデルマ・リーゼイ、クロストリジウム・アセトブチリカム、クロストリジウム・ベイジェリンキ、クロストリジウム・サーモセラム、フュージバクター・パウシボランス、サッカロマイセス・セレビシエ、サッカロマイセス・ボウラディ、ピキア・パストリス、およびピキア・スティピティスが挙げられる。

40

## 【0201】

光独立栄養微生物は、真核性藻類、ならびに原核生物シアノバクテリア、緑色硫黄細菌

50

、緑色非硫黄細菌、紅色硫黄細菌、および紅色非硫黄細菌を含む。

【0202】

好極限性細菌も、好適な生物として企図される。そのような生物は、温度、放射線、圧力、重力、真空、乾燥、塩分、pH、酸素分圧、および化学物質等の種々の環境パラメータに耐える。これらは、80以上で増殖するピュロロブス・フマリイ等の超好熱菌、60～80で増殖するシネコッカス・リビダス等の好熱菌、15～60で増殖する中温菌、および15未満で増殖するPsychrobacter等の好冷菌、ならびにいくつかの昆虫を含む。放射線耐性生物は、デイノコッカス・ラディオデュランスを含む。圧力耐性生物は、130MPaの圧力に耐える好圧生物を含む。重量耐性生物は、好圧菌を含む。過重力（例えば、>1g）低重力（例えば、<1g）耐性生物も企図される。真空耐性生物は、緩歩動物、昆虫、微生物、および種子を含む。乾燥耐性および耐無水生存生物は、アルテミア・サリーナ等の乾生植物、線形動物、微生物、真菌、および地衣類を含む。耐塩性生物は、好塩性生物（例えば、2～5M NaCl）の好塩菌およびドナリエラ・サリーナを含む。pH耐性生物は、好アルカリ菌、例えば、ナトロノバクテリウム、バチルス・ファーマスOF4、スピルリナ種（例えば、pH>9）、および好酸球、例えば、シアニジウム・カルダリウム、フェロプラズマ種（例えば、低pH）を含む。 $O_2$ に耐えることができない嫌気性菌、例えばメタノコッカス・ヤンナスキイ等；いくらかの $O_2$ に耐性を示す微好気性菌、例えばクロストリジウム、および $O_2$ を必要とする好気性菌もまた企図される。純粋なCO<sub>2</sub>に耐性を示す気体耐性生物は、シアニジウム・カルダリウムを含み、金属耐性生物は、耐金属菌、例えば、フェロプラズマ・アシダルマヌス（例えば、Cu、As、Cd、Zn）、ラルストニア種CH34を（例えば、Zn、Co、Cd、Hg、Pb）含む。Gross, Michael. Life on the Edge: Amazing Creatures Thriving in Extreme Environments. New York: Plenum (1998) and Seckbach, J. "Search for Life in the Universe with Terrestrial Microbes Which Thrive Under Extreme Conditions." In Cristiano Batalli Cosmovici, Stuart Bowyer, and Daniel Wertheimer, eds., Astronomical and Biochemical Origins and the Search for Life in the Universe, p. 511. Milan: Editrice Compositori (1997)。

10

20

30

40

50

【0203】

混合栄養生物も、好適な生物である。混合栄養生物は、異なるエネルギー源および炭素源の混合、例えば、光合成栄養および化学合成栄養、無機栄養および有機栄養、独立栄養および従属栄養、ならびにそれらの組み合わせ、またはその組み合わせを利用することができる。混合栄養は、真核性または原核性であり得る。また、混合栄養は、絶対独立または任意独立であり得る。好適な混合栄養生物は、混合栄養藻類および混合栄養細菌を含む。

【0204】

藻類およびシアノバクテリアは、限定されないが、以下の属を含む：アカントセラス、アカントコッカス、アカリオクロリス、アクナンテス、アクナンチジウム、アクチナストラム、アクチノクロリス、アクティノサイクラス、アクチノタエニウム、アンフィクリシス、アンフィジニウム、アンフィクリコス、アンフィプレウラ、アンフィプロラ、アンフィスリクス、アンフォラ、アナベナ、アナベノプシス、アネウマスター（Aneumastus）、アンキストロデスマス、アンキラ、アノモエオネイス、アパトコッカス、アフアニゾメノン、アファノカブサ、アファノカエテ、アファノテーケ、アピオキスティス、アピストネマ、アルスロデスマス、アルテロスピラ、アスコクロリス、アステリオネラ、アステロコッカス、アウドワイネラ、アウラコセイラ、バシラリア、バルビアニア、バンブシナ、バンギア、バシクラミス、バトラコスペルマム、ビヌクレアリア、ビトリキア、

プリディンジア、ボトルジオプシス、ボトリジウム、ボトリオコッカス、ボトリオスファエリア、プラキオモナス、プラキシラ、プラキトリキア、ブレビスソニア、ブルボカエテ、ブミレリア、ブミレリオブシス、カロネイス、カロトリクス、カンピロディスクス、キヤップソシフォン、カルテリア、カテナ、カビヌラ、セントリトラクタス、セントロネラ、ケラチウム、キートセロス、カエトクロリス、カエトモルファ、カエトネラ、カエトネマ、カエトペルティス、カエトフォラ、カエトスファエリジウム、カマエシフォン、カラ、カラシオクロリス、カラシオブシス、カラシウム、カラレス、キロモナス、クライノモナス、クラミドブレファリス、クラミドカブサ、クラミドモナス、クラミドモノブシス、クラミドミクサ、クラミドネフリス、クロラギエラ、クロランギオブシス、クロレラ、クロロボトリス、クロロプラキス、クロロキトリウム、クロロコックム、クロログロエア、クロログロエオブシス、クロロゴニウム、クロロロビオン、クロロモナス、クロロフィセマ (*Chlorophysema*)、クロロフィタ、クロロサッカス、クロロサルキナ、コリシスティス、クロモフィトン、クロムリナ、クロオコッキディオブシス、クロオコッカス、クロオダクチロン、クロオモナス、クロオテセ、クリソアメーバ、クリサブシス、クリシジアストラム、クリソカブサ、クリソカブセラ、クリソカエテ、クロソクロムリナ、クリソコッカス、クリソクリナス、クリソレピドモナス、クリソリコス、クリソネブラ、クリソフィタ、クリソピキス、クリソサッカス、クロソファエレラ、クリソステファノスファエラ、クラドフォラ、クラスチジウム、クロステリオブシス、クロステリウム、コッコミクサ、コッコネイス、コエラステラ、コエラストラム、コエロスファエリウム、コエノクロリス、コエノコッカス、コエノシスティス、コラシウム、コレオカエテ、コロディクティオン、コムブソゴノブシス、コムブソポゴン、コンジュガトフィタ、コノカエテ、コロナストラム、コスマリウム、コスミオネイス、コスモクラジウム、クラテリポルツラ、クラチクラ、クリナリウム、クルシゲニア、クルシゲニエラ、クリプトアウラクス (*Cryptoaulax*)、クリプトモナス、クリプトフィタ、ステノフォラ、シアノジクチオン (*Cyanodictyon*)、シアノネフロン、シアノフォラ、シアノフィタ、シアノテセ、シアノトモナス (*Cyanothomonas*)、シクロネキシス、シクロステファノス、シクロテラ、クリンドロカブサ、クリンドロシスティス、シリンドロスペルマム、クリンドロテカ、キマトプレウラ、キンベラ、シムベロニズシア、シストジニウム、ダクチロコッコブシス、デバルヤ (*Debarya*)、デンチクラ、デルマトクリシス、デルモカルパ、デルモカルペラ、デスマトラクタム、デスミジウム、デスモコッカス、デスモネマ、デスモシホン、ジアカントス、ジアクロネマ、ジアデスマス、ジアトマ、ジアトメラ、ジセルラ、ジコスリックス、ジコトモコッカス、ジクラノカエテ、ジクトヨクロリス、ジクトヨコッカス、ジクチオスファエリウム、ジジモシスティス、ジジモゲネス、ジジモスフェニア、ジラビフィラム、ジモルホコッカス、ディノブリオン、ディノコッカス、ジプロクロリス、ジプロネイス、ジプロスタウロン、ジストリオネラ、ドシジウム、ドラバルナルディア、ドゥナリエラ、ジスモルホコッカス、エクバロシスティス、エラカトスリクス、エレルベキア、エンシオネマ、エンテロモルファ、エントクラジア、エントモネイス、エントフィサリス、エピクリシス、エピピキシス、エピテミア、エレモスファエラ、ユーアストロブシス、ユーアストラム、ユーカブシス、ユーココネイス、ユードリナ、ユーグレナ、ユーグレノフィタ、ユーノティア、ユースティグマトフィタ、ユートレプティア、ファラシア、フィシェレラ、フラギラリア、フラギラリフォルマ、フランセイア、フルストリア、クルシラ、ゲミネラ、ゲニクラリア、グラウコシスティス、グラウコフィタ、グレノジニオブシス、グレノジニウム、グロエオカブサ、グロエオカエテ、グロエオクリシス、グロエオコッカス、グロエオシスティス、グロエオデンドロン、グレオモナス、グロエオプラクス、グロエオテセ、グロエオティラ、グロエオトリキア、グロイオジクチオン、ゴレンキニア、ゴレンキニオブシス、ゴモンチア、ゴンフォキンベラ、ゴンフォネマ、ゴンフォスファエリア、ゴナトザイゴン、ゴングロシア、ゴングロシラ、ゴニオクロリス、ゴニウム、ゴニオストラム、グラヌロクロリス、グラヌロシストブシス、グロエンプラジア、ギムノジニウム、ギムノザイガ、ジャイロシグマ、ヘマトコッカス、ハフニオモナス、ハラシア、ハンマトイデア、ハンナエア、ハンズティア、ハパロ

10

20

30

40

50

シホン、ハプロタエニウム、ハプトフィタ、ハスレア、ヘミジニウム、ヘミトマ、ヘリバ  
ウジエラ、ヘテロマスティクス、ヘテロスリクス、ヒベルジア、ヒルデンプランディア、  
ヒレア、ホロペジウム、ホモエオスリクス、ホルマントネマ、ホルモチラ、ヒアロブラキ  
オン、ヒアロカルジウム、ヒアロディスカス、ヒアロゴニウム、ヒアロテカ、ハイドリア  
ナム、ヒドロコッカス、ヒドロコレウム、オオタマウミヒドラ、ヒドロディクティオン、  
ヒドロセラ、ヒドルルス、ヒエラ、ヒメノモナス、イストモクロロン、ヨハネスバブティ  
スチア、ジュラニイエラ、カライベニア、カサブレファリス、カトジニウム、ケフィリオ  
ン、ケラトコッカス、キルクネリエラ、クレブソルミジウム、コルベシア、コリエラ、コ  
マレキア、コルシコビエラ、クラスケラ、ラゲルヘイミア、ラギニオン、シラタマモ、レ  
マネア、レボシンクリス、レプトシラ、ラボコッカス、ロボシスティス、ロボモナス、ル  
チコラ、リングビア、マレオクロリス、マロモナス、マントニエラ、マルソニエラ、マル  
チアナ、マスチゴコレウス、ガストグロイア、メロシラ、メリスモペディア、メソステイ  
グマ、メソタエニウム、ミクラクチニウム、ミクラステリアス、ミクロカエテ、ミクロコ  
レウス、ミクロシスティス、ミクログレナ、ミクロモナス、ミクロスピラ、ミクロタムニ  
オン、ミスココッカス、モノクリシス、モノダス、モノマスティクス、モノラフィジウム  
、ヒトエグサ、ヒザオリ、モウゲオチオプシス、ミオクロリス、マイロメシア、ミクソサ  
ルシナ、ナエゲリエラ、ナンノクロリス、ナウトコッカス、ナビクラ、ネグレクテラ、ネ  
イジウム、ネフロクラミス、ネフロシチウム、ネフロジエラ、ネフロセルミス、ネトリウ  
ム、ニテラ、ホシツリモ、ニッチア、ノドウラリア、ノストック、オクロモナス、サヤミ  
ドロ、オリゴカエトホラ、オニコネマ、オオカルジウム、オオシスティス、オペホラ、オ  
フィオシチウム、オルトセイラ、オシラトリア、オキシネイス、パチクラデラ、パルメラ  
、パルモジクチオン、パンドリナ、パンヌス、パラリア、パシェリナ、パウルシュルジア  
、ペディアストラム、ペディネラ、ペディノモナス、ペディノペラ、ペラゴジクチオン、  
ペニウム、ペラネマ、ペリジニオプシス、ペリジニウム、ペロニア、ペトロネイス、ファ  
コタス、ファクス、ファエアスター、フェオデルマチウム、フェオフィタ、フェオスファ  
エラ、フェオタムニオン、フォルミジウム、フィコペルティス、フィラリオクロリス、フ  
ィロカルジウム、フィロミタス、ピンヌラリア、ピトホラ、プラコネイス、プランクトネ  
マ、プランクトスファエリア、プラノチジウム、プレクトネマ、プレオドリナ、プレウラ  
ストラム、プレウロカプサ、プレウロクラジア、プレウロジスカス、プレウロシグマ、プレ  
ウロシラ、プレウロタエニウム、ポシロモナス、ポドヘドラ、ポリブレファリデス、ポ  
リカエトホラ、ポリエドリエラ、ポリエドリオプシス、ポリゴニオクロリス、ポリエピド  
モナス、ポリタエニア、ポリトマ、ポリトメラ、ポルフィリディウム、ポステリオクロモ  
ナス、プラシノクロリス、プラシノクラダス、プラシノフィタ、プラシオラ、プロクロル  
フィタ、プロクロロトリックス、プロトデルマ、プロトシフォン、プロバソリエラ、ブリ  
ムネシウム、ブサモジクチオン、ブサモチジウム、シュードアナベナ、シュードエノクロ  
ニウム、シュードカルテリア、シュードカテ、シュードカラシウム、シュードコッコミク  
サ、シュードジクチオスファエリウム、シュードケフィリオン、シュードンコビルサ、シ  
ュードクアドリグラ、シュードスファエロシスティス、シュードスタウラストラム、シ  
ュードスタウロシラ、シュードテトラストラム、ブテロモナス、パンクタストルアタ、ピラ  
ミクラミス、ピラミモナス、ピロフィタ、クアドリクロリス、クアドリコッカス、クアド  
リグラ、ラジオコッカス、ラジオフィラム、ラフィジオプシス、ラフィドセリス、ラфи  
ドネマ、ラフィドフィタ、ペイメリア、ラブドデルマ、ラブドモナス、リゾクロニウム、  
ロドモナス、ロドフィタ、ロイコスフェニア、ロパロジア、リプラリア、ロゼンビンギエ  
ラ、ロシチジウム、ロヤ、セネデスマス、シェルフェリア、シゾクラミデラ、シゾクラミ  
ス、シゾメリス、シゾトリックス、スクロエデリア、スコリオネイス、スコチエラ、スコ  
チエロブシス、スコウルフィエルジア、スキトネマ、セレナストラム、セレノクロリス、  
セラホラ、セミオルビス、シデロセリス、ジデロシストブシス、ジモンセニア、シホノネ  
マ、シロクラジウム、シロゴニウム、スケレトネマ、ソラストラム、スペルマトゾブシス  
、スファエレロシスティス、スファエレロブシス、スファエロジニウム、ヨコワミドロ、  
スファエロゾスマ、スピニフェロモナス、スパイロジヤイラ、スピロタエニア、スピルリ

10

20

30

40

50

ナ、スponジロモラム、スponジロシウム、スロテトラス、スメラ、スタウラストラム、スタエロデスマス、スタウロネイス、スタウロシラ、スタウロシレラ、ステノブテロビア、ステファノコスティス、ステファノディスカス、ステファノポロス、ステファノスファエラ、スチココッカス、スチコグロエア、スチゲオクロニム、スチゴネマ、スチピトコッカス、ストケシエラ、ストロムボモナス、スチロクリサリス、スチロジニウム、スチロイキシス、スチロスファエリジウム、スリレラ、シキジョン、シンプロカ、シネココッカス、シネコシスティス、シネドラ、シノクロモナス、シヌラ、タベラリア、タブラリア、テイリンギア、テムノガメタム、テトメモラス、テトラクロレラ、テトラシクラス、テトラデスマス、テトラエドリエラ、テトラエドロン、テトラセルミス、テトラスピラ、テトラストラム、タラシオシラ、タムニオカエテ、トラコクロリス、トレア、トリペラ、トリボスリクス、トラケロモナス、トラキディスカス、トレボウキシア、トレントホリア、トレウバリア、トリボネマ、トリコデスマウム、トリコディスカス、トロキスシア、トリブリオネラ、ウロトリックス、ウログレナ、ウロネマ、ウロソレニア、ウロスピラ、ウバ、バキュオラリア、バウケリア、ボルボックス、ボルブリナ、ウェステラ、ウォロスジンスキア、キサンチジウム、キサントフィタ、キセノコッカス、ジグネマ、ジグネモブシス、およびジゴニウム。

10

## 【0205】

さらなるシアノバクテリアは、カマエシフォン、クロオコッカクス、シアノバクテリア、シアノビウム、シアノテセ、ダクチロコッコプシス、グレオバクター、グロエオカブサ、グロエオテセ、ミクロシスティス、プロクロロコッカス、プロクロロン、シネココッカス、シネコシスティス、シアノシスティス、デルモカルペラ、スタニエリア、キセノコッカス、クロオコッキディオブシス、ミクソサルシナ、アルスロスピラ、ボルジア、クリナリウム、ゲイトレリネマ、レプトリングビヤ、リムノスリックス、リングビア、ミクロコレウス、オシラトリア、プランクトスリックス、プロキオロスリックス、ドアナベナ、スピルリナ、スタリア、シンプロカ、トリコデスマウム、チコネマ、アナベナ、アナベノブシス、アファニゾメノン、シアノスピラ、シリンドロスペルモブシス、シリンドロスペルマム、ノドウラリア、ノストック、スキロネマ、カロトリクス、リプラリア、トリボスリクス、クロログロエオブシス、フィシェレラ、ゲイティエリア、リエンガリエラ、ノストクホブシス、スティゴネマ、およびサーモシネココッカス属のメンバーを含む。

20

## 【0206】

緑色非硫黄細菌は、限定されないが以下の属を含む：クロロフレクスス、クロロネマ、オシロクロリス、ヘリオトリックス、ヘルペトシフォン、およびロゼイフレクサス、およびサーモミクロビウム。

30

## 【0207】

緑色硫黄細菌は、限定されないが以下の属を含む：クロロビウム、クラスロクロリス、およびプロステコクロリス。

## 【0208】

紅色硫黄細菌は、限定されないが以下の属を含む：アロクロマチウム、クロマチウム、ハロクロマチウム、イソクロマチウム、マリクロマチウム、ロドブラム、サーモクロマチウム、チオカブサ、チオロドコッカス、およびチオシスティス。

40

## 【0209】

紅色非硫黄細菌は、限定されないが以下の属を含む：ファエオスピリルム、ロドバカ、ロドバクター、ロドミクロビウム、ロドピラ、ロドシュードモナス、ロドサラシウム、ロドスピリラム、ロドビブリオ、およびロゼオスピラ。

## 【0210】

好気性化学合成無機栄養細菌は、限定されないが、硝化細菌、例えば、ニトロバクテラセ工種、ニトロバクター種、ニトロスピナ種、ニトロコッカス種、ニトロスピラ種、ニトロソモナス種、ニトロソコッカス種、ニトロソスピラ種、ニトロソロブス種、ニトロソブリオ種；無色硫黄細菌、例えばチオラム種、チオバチルス種、チオミクロスピラ種、チオスフェラ種、サーモトリックス種；絶対独立化学合成無機栄養水素細菌、例えばヒド

50

ロゲノバクター種、鉄およびマンガン酸化ならびに／または沈殿細菌、例えばシデロコッカス種、および磁性細菌、例えばアクアスピリラム種を含む。

【0211】

古細菌は、限定されないが、メタン生成古細菌、例えばメタノバクテリウム種、メタノブレビバクター種、メタノテルムス種、メタノコッカス種、メタノミクロビウム種、メタノスピリルム種、メタノゲニウム種、メタノサルキナ種、メタノロブス種、メタノスリックス種、メタノココイデス種、メタノプラヌス種；超好熱性S代謝群、例えば、サーモプロテウス種、ピロディクティウム種、スルホロブス種、アジアヌス種、および他の微生物、例えば、枯草菌、サッカロマイセス・セレビシエ、ストレプトマイセス種、ラルストニア種、ロドコッカス種、コリネバクテリア種、ブレビ宅テリア種、マイコバクテリア種、ならびに油性酵母を含む。

10

【0212】

さらに他の好適な生物は、Venterら米国特許公開第2007/0264688号によって記載されるような合成細胞または合成ゲノムによって生成される細胞、およびGlossら米国特許公開第2007/0269862号に記載されるような細胞様システムまたは合成細胞を含む。

【0213】

さらに他の好適な生物は、大腸菌、アセトバクター・アセチ、枯草菌、酵母、および真菌、例えば、クロストリジウム・リュングダリイ、クロストリジウム・サーモセラム、ペニシリウム・クリソゲナム、ピキア・パストリス、サッカロマイセス・セレビシエ、スキゾサッカロマイセス・ポンベ、シュードモナス・フルオレッセンス、またはザイモモナス・モビリスを含む。いくつかの実施形態において、これらの生物は、二酸化炭素を固定するために遺伝子操作され、他の実施形態において、これらは遺伝子操作されない。

20

【0214】

いくつかの実施形態において、真核細胞、例えば、昆虫細胞または哺乳類細胞、例えば、ヒト細胞が、宿主細胞として用いられる。そのような細胞のためのプロモーターおよびエンハンサーを含むベクターおよび発現制御配列は周知である。この目的に有用な哺乳類宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓株(293、または懸濁培養における増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977))；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR (CHO、Ur laub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))；サル腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎細胞(MDCK、ATCC CC-L 34)；バッファローラット肝細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(Hep G2、HB 8065)；マウス乳房腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL 51)；TR I細胞(Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；およびヒト肝癌株(Hep G2)である。

30

【0215】

### F. 栄養タンパク質の生成

当業者は、本明細書に開示されるような組換え栄養タンパク質を生成する（および任意選択的に分泌する）ように組換え細胞を培養するための、ならびに発現させた組換えタンパク質の精製および／または単離のための多くの好適な方法を認識している。タンパク質精製のために選択される方法は、該当するタンパク質の特性、細胞内におけるその位置および形態、ベクター、宿主株のバックグラウンド、ならびに発現させたタンパク質の意図

40

50

する用途を含む多くの変数に依存する。培養条件も、所与の標的タンパク質の溶解性および局在性に影響を及ぼし得る。本明細書に開示されるような組換え微生物細胞に発現される標的タンパク質を精製するために、限定されないが、イオン交換およびゲル濾過を含む多くのアプローチを用いることができる。

#### 【0216】

いくつかの実施形態において、ペプチド融合タグを組換えタンパク質に付加することにより、ペプチド融合タグを利用する様々な親和性精製法が可能になる。いくつかの実施形態において、親和性方法の使用により、一段階でほぼ均一に標的タンパク質を精製することができる。精製は、例えば、エンテロキナーゼ、第Xa因子、トロンビン、またはHRV 3Cプロテアーゼによる融合タグの一部または全部の切断を含み得る。いくつかの実施形態において、発現させた標的タンパク質の精製または活性測定の前に、標的タンパク質の発現レベル、細胞局在性、および溶解性の予備分析が行われる。標的タンパク質は、以下の分画のいずれかまたはすべてに見出され得る：可溶性または不溶性の細胞質分画、周辺質、または培地。意図する用途に応じて、封入体、培地、または周辺質空間への選択的局在化は、いくつかの実施形態において、比較的単純な手順による迅速な精製に有利であり得る。

#### 【0217】

大腸菌は、異種タンパク質の発現のための強力な宿主として広く認められているが、この宿主における多くのタンパク質の過剰発現は、不溶性封入体の形態で凝集を起こしやすいことも広く知られている。封入体の形成をレスキューするため、またはタンパク質自体の力価を向上させるために最も一般的に用いられる方法の1つは、アミノ末端のマルトース結合タンパク質(MBP) [Austin BP, Nallamsetty S, Waugh DS. Hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner for the production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli. Methods Mol Biol. 2009; 498: 157-72]、または低分子ユビキチン様修飾因子(SUMO) [Saitoh H, Uwada J, Azusa K. Strategies for the expression of SUMO-modified target proteins in Escherichia coli. Methods Mol Biol. 2009; 497: 211-21; Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. J Struct Funct Genomics. 2004; 5(1-2): 75-86; Panavas T, Sanders C, Butt TR. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. Methods Mol Biol. 2009; 497: 303-17]の融合物を該当するタンパク質に含めることである。これらの2つのタンパク質は、著しく良好に発現され、大腸菌中で可溶性形態であるため、該当するタンパク質も可溶性形態で効率的に生成される。該当するタンパク質は、該当するタンパク質と融合タンパク質との間に部位特異的プロテアーゼ認識配列(タバコエッチ病ウイルス(TEV)プロテアーゼ等)を設計することにより切断することができる[1]。

#### 【0218】

いくつかの実施形態において、組換えタンパク質は、最初は、正しくフォールディングされていないか、または不溶性である。不溶性タンパク質のリフォールディングのための様々な方法が周知である。ほとんどのプロトコルは、遠心分離により不溶性封入体を単離した後、変性条件下で可溶化することを含む。次いで、タンパク質を非変性バッファーで

10

20

30

40

50

透析または希釈し、リフォールディングを行う。それぞれのタンパク質は特有のフォールディング特性を有するため、当業者は、任意の所与のタンパク質ごとに最適なリフォールディングプロトコルを実験的に決定することができる。最適なリフォールディング条件は、例えば、タンパク質濃度、還元剤、酸化還元処理、二価カチオン等の変数を、マトリックス法による小規模実験で検討することにより迅速に決定することができる。最適濃度が分かったら、標的タンパク質の大規模な可溶化およびリフォールディングにそれらを適用することができる。

#### 【0219】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、三次構造を含まない。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質中のアミノ酸の半分未満が三次構造に関与する。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質は、二次構造を含まない。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質中のアミノ酸の半分未満が二次構造に関与する。組換え栄養タンパク質は、これらの構造特性のうちの1つ以上を含む状態においてそれらを発現する細胞の培養物から単離されてもよい。いくつかの実施形態において、組換え栄養タンパク質の三次構造は、タンパク質がそれを生成する培養物から単離された後に減少または消失される。いくつかの実施形態において、組換え栄養タンパク質の二次構造は、タンパク質がそれを生成する培養物から単離された後に減少または消失される。

10

#### 【0220】

いくつかの実施形態において、アルカリ pH の CAPS バッファーを N - ラウリルサルコシンと組み合わせて使用して封入体の可溶化を達成した後、DTT の存在下で希釈することによりリフォールディングを促進する。標的タンパク質、発現条件、および意図する用途に応じて、洗浄した封入体から可溶化したタンパク質は 90 % 超均一であり得、さらなる精製を必要としない場合がある。Histag (登録商標) 融合タンパク質および Histbind (登録商標) 固定化金属親和性クロマトグラフィー (Novogen (登録商標)) を使用すると、完全な変性条件下 (リフォールディング前) での精製が可能である。さらに、6 M 尿素を用いて封入体から可溶化した STag (商標) 、 T7Tag (登録商標) 、および Strep Tag (登録商標) II 融合タンパク質は、適切な樹脂上でクロマトグラフィーを行う前に 2 M 尿素 (STag および T7Tag) または 1 M 尿素 (Strep Tag II) に希釈することにより、部分変性条件下で精製することができる。リフォールディングされた融合タンパク質は、Histag 、 STag 、 Strep Tag II 、および他の適切な親和性タグ (例えば、GSTTag (商標) 、および T7Tag ) (Novogen (登録商標)) を用いて、天然条件下で親和性精製することができる。

20

30

#### 【0221】

いくつかの実施形態において、組換え栄養タンパク質は、それを発現させるために用いられる宿主細胞の内在性タンパク質である。すなわち、宿主細胞の細胞ゲノムは、組換え栄養タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。いくつかの実施形態において、調節配列が組換え核酸からの組換え栄養タンパク質の過剰発現を駆動するように、栄養タンパク質の発現を増加させるのに十分な調節配列が、宿主細胞ゲノムに挿入され、内在性オープンリーディングフレームと作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、異種核酸配列は、栄養タンパク質の内在性オープンリーディングフレームに融合され、組換え栄養タンパク質の細胞輸送を変更する (それをオルガネラまたは分泌経路に誘導する等) 異種アミノ酸配列を含むように栄養タンパク質の合成を引き起こす。いくつかの実施形態において、内在性宿主細胞タンパク質をコードするオープンリーディングフレームが、該オープンリーディングフレームと作動可能に連結された調節配列をさらに含むプラスミド上で宿主細胞に導入される。いくつかの実施形態において、組換え宿主細胞は、同様の条件下で増殖させた同様の宿主細胞によって生成される栄養タンパク質の量よりも、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍、または少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 50 倍、または少なくとも 100 倍多くの組換え栄養タンパク質を発現する。

40

50

## 【0222】

いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質は、組換え生成系を使用することなく、化学的に合成される。タンパク質合成は、当該技術分野で既知の技術を用いて、液相系または固相系において実行することができる（例えば、Atherton, E., Sheppard, R.C. (1989)。Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press; Stewart, J.M., Young, J.D. (1984)。Solid phase peptide synthesis (2nd ed.) Rockford: Pierce Chemical Companyを参照のこと）。

10

## 【0223】

## G. 植物における組換え栄養タンパク質の生成

本開示の栄養タンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子は、核酸配列を含むトランシジェニック植物の生成を可能にする。したがって、本開示はまた、本開示の栄養タンパク質をコードする核酸配列を含む組換え核酸分子を含む植物も提供する。植物は、形質転換および再生を受けるいずれの植物であってもよく、限定されないが、アカシア、アルファルファ、アネット、リンゴ、アンズ、アーティチョーク、ルッコラ、アスパラガス、アボカド、バナナ、オオムギ、マメ、ビート、ブラックベリー、ブルーベリー、ブロッコリー、芽キャベツ、キャベツ、キャノーラ、カントロープメロン、ニンジン、キャッサバ、カリフラワー、セロリ、白菜、サクランボ、コリアンダー、柑橘類、クレメンタイン、コーヒー、トウモロコシ、ワタ、キュウリ、ダグラスファー、ナス、エンダイブ、キクデシャ、ユーカリ、ウイキョウ、イチジク、森林樹、ウリ、ブドウ、グレープフルーツ、ハニーデューメロン、ヒカマ、キウифルーツ、レタス、リーク、レモン、ライム、テーダマツ、マンゴ、メロン、キノコ、木の実、オーツ麦、オクラ、タマネギ、オレンジ、観賞植物、パパイヤ、パセリ、エンドウ、モモ、ピーナッツ、ナシ、コショウ、カキ、パイナップル、オオバコ、プラム、ザクロ、ポプラ、ジャガイモ、カボチャ、マルメロ、ラジエタパイン、赤チコリ、ラディッシュ、ナタネ、ラズベリー、米、ライ麦、モロコシ、ザザンパイン、大豆、ホウレンソウ、スカッシュ、イチゴ、テンサイ、サトウキビ、ヒマワリ、スイートコーン、サツマイモ、モミジバフウ、タンジェリン、紅茶、タバコ、トマト、芝生、つる植物、スイカ、コムギ、ヤムイモ、およびズッキーニを含む。好ましい実施形態において、植物は、マメ、ブロッコリー、キャベツ、キャノーラ、ニンジン、カリフラワー、セロリ、白菜、トウモロコシ、ワタ、キュウリ、ナス、リーク、レタス、メロン、エンドウ、コショウ、カボチャ、ラディッシュ、ホウレンソウ、大豆、スカッシュ、サトウキビ、スイートコーン、トマト、スイカ、およびコムギ植物である。いくつかの実施形態において、植物は、トウモロコシ植物である。いくつかの実施形態において、植物は、大豆植物である。いくつかの実施形態において、植物は、ワタ植物である。いくつかの実施形態において、植物は、キャノーラ植物である。いくつかの実施形態において、植物は、アラビドプシス、ベータ、グリシンヤトロファ、ミスカンサス、パニクム、ファラリス、ポブルス、サッカルム、サリクス、シモンドシア、およびゼアから選択される属のメンバーである。

20

## 【0224】

植物細胞において活性な多数のプロモーターが、文献に記載されている。これらは、植物ゲノムに存在するプロモーター、および他の源に由来するプロモーター（アグロバクテリウム・ツメファシエンスの腫瘍誘発プラスミド上に担持されるノパリンシンターゼ（NOS）プロモーターおよびオクトピンシンターゼ（OCS）プロモーターを含む）、カリモウイルスプロモーター、例えば、カリフラワーモザイクウイルスを含む。例えば、米国特許第5,858,742号および第5,322,938号（カリフラワーモザイクウイルス（CaMV35S）に由来する構成的プロモーターの種類を開示する）、米国特許第5,641,876号（コメアクチンプロモーターを開示する）、米国特許出願公開第2002/0192813A1号（効果的な植物発現ベクターの設計に有用な5'、3'、

30

40

50

およびイントロンエレメントを開示する)、米国特許出願第09/757,089号(トウモロコシ葉緑体アルドラーゼプロモーターを開示する)、米国特許出願第08/706,946号(コメグルテリンプロモーターを開示する)、米国特許出願第09/757,089号(トウモロコシアルドラーゼ(FDA)プロモーターを開示する)および米国特許出願第60/310,370号(トウモロコシニコチアミンシンターゼプロモーターを開示する)を参照のこと。植物細胞において機能するこれらのおよび多数の他のプロモーターは、当業者に既知であり、トランスジェニック植物における栄養タンパク質の発現を提供するための組換え核酸における使用に利用可能である。

#### 【0225】

いくつかの用途において、植物の緑色組織における選択的発現が望ましい。そのような使用のための該当するプロモーターは、シロイヌナズナのリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ(Rubisco)の小サブユニット(Fischhoff et al.(1992)Plant Mol. Biol. 20:81-93)、アルドラーゼ、およびピルビン酸リン酸ジキナーゼ(PPDK)(Taniguchi et al.(2000)Plant Cell Physiol. 41(1):42-48)等の遺伝子に由来するものを含む。

10

#### 【0226】

さらに、プロモーターは、遺伝子発現の上昇に役立つように、少なくとも1つのエンハンサー配列を含有するように改変されてもよい。そのようなエンハンサーは、当該技術分野で既知である。そのような構築物を含むエンハンサー配列を含めることにより、栄養タンパク質の発現が増強され得る。これらのエンハンサーは、真核細胞において機能するプロモーターの転写開始点の5'に見出されることが多いが、しばしばコード配列の上流(5')または下流(3')に挿入され得る。ある場合には、これらの5'増強エレメントはイントロンである。エンハンサーとして特に有用なのは、コメアクチン1(米国特許第5,641,876号を参照)およびコメアクチン2遺伝子の5'イントロン、トウモロコシアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン、トウモロコシ熱ショックタンパク質70遺伝子のイントロン(米国特許第5,593,874号)、およびトウモロコシshrunken 1遺伝子である。

20

#### 【0227】

いくつかの用途には、種子組成の変更を実現するために植物の種子組織における発現が望ましい。種子組成の変更に使用するための例示的なプロモーターは、ナピン(米国特許第5,420,034号)、トウモロコシL3オレオシン(米国特許第6,433,252号)、ゼインZ27(Russell et al.(1997)Transgenic Res. 6(2):157-166)、グロブリン1(Belanger et al.(1991)Genetics 129:863-872)、グルテリン1(Russell(1997)上記参照)、およびペルオキシレドキシン抗酸化物質(Per1)(Stacy et al.(1996)Plant Mol. Biol. 31(6):1205-1216)等の種子遺伝子のプロモーターを含む。

30

#### 【0228】

本開示に従って調製される組換え核酸構築物は、典型的にはポリアデニル化シグナルおよびポリアデニル化部位を含む3'エレメントも含む。周知の3'エレメントは、例えば、米国特許第6,090,627号に開示されるnos 3'、tml 3'、t mr 3'、t ms 3'、ocs 3'、tr 7 3'等のアグロバクテリウム・ツメファシエンス遺伝子に由来するもの;パンコムギ熱ショックタンパク質17(Hsp17 3')、コムギユビキチン遺伝子、コムギフルクトース-1,6-ビホスファターーゼ遺伝子、米グルテリン遺伝子、米乳酸脱水素酵素遺伝子、および米-チューブリン遺伝子等の植物遺伝子由来の3'エレメント(これらはすべて米国公開特許出願第2002/0192813 A1号に開示される);ならびにエンドウ(ピスマ・サティヴィム)リブロースビスホスフェートカルボキシラーゼ遺伝子(rbs 3')、および宿主植物内の遺伝子に由来する3'エレメントを含む。

40

50

## 【0229】

構築物およびベクターは、遺伝子標的を、植物オルガネラに、特に、葉緑体、白色体、または他の植物細胞小器官に標的化するための輸送ペプチドも含んでもよい。葉緑体輸送ペプチドの使用についての記載は、米国特許第5,188,642号および第5,728,925号を参照のこと。アラビドブシスE P S P S 遺伝子の輸送ペプチド領域についての記載は、K l e e , H . J . e t a l ( M G G ( 1 9 8 7 ) 2 1 0 : 4 3 7 - 4 4 2 ) を参照のこと。

## 【0230】

組換えDNAで植物細胞を形質転換する数多くの方法が、当該技術分野で既知であり、本開示において使用され得る。植物の形質転換によく用いられる2つの方法は、アグロバクテリウム媒介形質転換および微粒子銃である。微粒子銃法は、米国特許第5,015,580号(大豆)；第5,550,318号(トウモロコシ)；第5,538,880号(トウモロコシ)；第5,914,451号(大豆)；第6,160,208号(トウモロコシ)；第6,399,861号(トウモロコシ)、および第6,153,812号(コムギ)に例示されており、アグロバクテリウム媒介形質転換は、米国特許第5,159,135号(ワタ)；第5,824,877号(大豆)；第5,591,616号(トウモロコシ)；および第6,384,301号(大豆)に記載されている。アグロバクテリウム・ツメファシエンスに基づく植物形質転換系の場合、形質転換構築物上に存在する付加的なエレメントは、植物ゲノムへの組換えポリヌクレオチドの組込みを促進するためのT-DNA左右境界配列を含む。

10

20

## 【0231】

一般に、標的植物系統のゲノム中にランダムに、すなわち非特異的な位置に、組換えDNAを導入することが有用である。特別な場合、例えば、ゲノム中の既存の遺伝子を置換するように、または植物ゲノム中の既存のプロモーターを用いるように、または遺伝子発現に活性があることが分かっている所定の部位に組換えポリヌクレオチドを挿入するよう部特異的組み込みを達成するために、組換えDNAの挿入を標的とすることが有用であり得る。米国特許第4,959,317号に開示されるようなc r e - l o x および米国特許第5,527,695号に開示されるようなF L P - F R Tを含む、植物において機能することが分かっているいくつかの部位特異的な組換え系が存在する。

30

## 【0232】

形質転換方法は、一般的に、培地上の組織培養において、制御された環境で行われる。「培地」は、インビトロで、すなわち、インタクトな生物の外で細胞を増殖させるために使用される多数の栄養混合物を指す。レシピエント細胞標的は、限定されないが、分裂組織細胞、カルス、未熟胚、および配偶子細胞、例えば、小胞子、花粉、精細胞、および卵細胞を含む。稔性植物が再生され得るいずれの細胞も、レシピエント細胞として有用であると考えられる。カルスは、限定されないが、未熟胚、苗の頂端分裂組織、ミクロスフェア等を含む組織源から開始されてもよい。カルスとして増殖することができる細胞はまた、遺伝子形質転換のためのレシピエント細胞もある。本開示のトランスジェニック植物を作製するための実際の形質転換方法および材料、例えば、種々の培地およびレシピエント標的細胞、未熟胚細胞の形質転換、ならびにそれに続く稔性ランスジェニック植物の再生は、米国特許第6,194,636号および第6,232,526号に開示されている。

40

## 【0233】

トランスジェニック植物の種子は、稔性トランスジェニック植物から採取することができ、本開示の組換え栄養タンパク質を産生する形質転換された植物の子孫世代を育成するために使用することができる。組換えDNAを用いた植物の直接的な形質転換に加えて、トランスジェニック植物は、組換えDNAを有する第1の植物をDNAを欠損した第2の植物と交雑することにより調製することができる。例えば、形質転換に適した第1の植物系統に組換えDNAを導入してトランスジェニック植物を生成し、それを第2の植物系統と交雑して組換えDNAを第2の植物系統に遺伝子移入することができる。本開示の栄養

50

タンパク質をコードする組換えDNAを有するトランスジェニック植物を、別の形質、例えば、除草剤抵抗性もしくは害虫抵抗性、または油等の第2の栄養生成物の生成を付与する他の組換えDNAを有するトランスジェニック植物系統と交雑し、両方の形質を付与する組換えDNAを有する子孫植物を生成することができる。典型的には、そのような繁殖において、形質を組み合わせるために、さらなる形質を寄与するトランスジェニック植物は雄性系統であり、基本の形質を保持するトランスジェニック植物は雌性系統である。この交雑の子孫は、ある植物は両方の親の形質のDNAを保持し、ある植物は一方の親の形質のDNAを保持するように分離する：そのような植物は、親の組換えDNAに関連するマークによつて、例えば、組換えDNAに関する分析によるマーク同定によつて同定することができるか、または、選択マークが組換え体に連結している場合には、除草剤耐性マークとともに使用するための除草剤等の選択剤の適用により、もしくは強化された形質の選択により同定することができる。両方の親の形質のDNAを保持する子孫植物は、複数回、例えば、通常6～8世代、雌性親系統に戻し交雫して、他のトランジェニック親系統の組換えDNA以外は元の1つのトランスジェニック親系統と実質的に同じ遺伝子型を有する子孫植物を生成することができる。

#### 【0234】

形質転換の実施において、典型的には、DNAが、いずれか1つの形質転換実験において、わずかな割合を占める標的植物細胞に導入される。マーク遺伝子は、トランスジェニックDNA構築物をそれらのゲノムに受容することおよび組み込むことにより、安定に形質転換された細胞を同定するための有効な系を提供するために用いられる。好みのマーク遺伝子は、抗生物質または除草剤等の選択剤に対する抵抗性を付与する選択マークを提供する。形質転換された植物が抵抗性であり得るいずれの除草剤も、選択マークとして有用な薬剤である。潜在的に形質転換された細胞が、選択剤に曝露される。生存細胞の集団では、一般的に、抵抗性を付与する遺伝子が、細胞生存を許容する十分なレベルで組み込まれ、発現される細胞である。外来性DNAの安定な組み込みを確認するために、細胞をさらに検査してもよい。一般的に使用される選択マーク遺伝子は、カナマイシンおよびパロモマイシン(*npt* I I)、ハイグロマイシンB(*aph* I V)およびゲンタマイシン(*aac* 3および*aac* C 4)等の抗生物質に抵抗性を付与するか、またはグルフォシネット(*bar*または*pat*)およびグリフィオセート(*aroA*または*EPS* *PS*)等の除草剤に抵抗性を付与するものを含む。そのような選択マークの例は、米国特許第5,550,318号、第5,633,435号、第5,780,708号、および第6,118,047号に例示されている。形質転換体を視覚的に同定する能力を提供する選択マークも用いることができ、例えば、ルシフェラーゼもしくは緑色蛍光タンパク質(*GFP*)等の有色タンパク質または蛍光タンパク質を発現する遺伝子、あるいは種々の発色基質が分かっているグルクロニダーゼまたは*uidA*遺伝子(*GUS*)を発現する遺伝子を用いることができる。

#### 【0235】

選択剤への曝露を生き延びる植物細胞、またはスクリーニングアッセイで陽性と記録された植物細胞は、再生培地で培養し、植物へと成熟させることができる。形質転換植物細胞から再生された発育中の小植物は、植物育成用混合物に移し、例えば、環境的に制御されたチャンバー内で順化させることができる。植物は、初期の組織に応じて、形質転換体が同定されてから約6週～10ヶ月で再生する。植物は、当業者に既知の従来の植物育種法を用いて授粉されてもよく、例えば自家授粉で生成された種子が、一般的にはトランスジェニックトウモロコシとともに用いられる。再生された形質転換植物またはその子孫種子もしくは子孫植物を、組換えDNAの発現について試験し、異種栄養タンパク質の存在について選択することができる。

#### 【0236】

本開示の植物細胞に由来するトランスジェニック植物は、本開示の栄養タンパク質をコードする異種核酸を含むトランスジェニック植物を作製し、異種核酸配列を含むトランスジェニック種子および半数体花粉を生成するように育成される。強化された特性を有する

10

20

30

40

50

そのような植物は、強化された特性について形質転換植物または子孫種子を選択することにより同定される。本明細書において提供されるトランスジェニック種子から育成させたトランスジェニック植物は、収量の増加に寄与するか、または、例えば、必須アミノ酸、分枝鎖アミノ酸、もしくは L e u のうちの少なくとも 1 つの含有量の増加等のタンパク質の品質向上を含む高い植物価値を提供する他の形質に寄与する改善された農業的形質を示す。

#### 【 0 2 3 7 】

トランスジェニック植物は、栄養タンパク質の源として有用である。例えば、いくつかの実施形態において、本開示の組換え栄養タンパク質を含むトランスジェニック植物は、対照非トランスジェニック植物と比較して重量分率の大きな総タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本開示の組換え栄養タンパク質を含むトランスジェニック植物は、対照非トランスジェニック植物と比較して重量分率の大きな必須アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、本開示の組換え栄養タンパク質を含むトランスジェニック植物は、対照非トランスジェニック植物と比較して重量分率の大きな分枝鎖アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、本開示の組換え栄養タンパク質を含むトランスジェニック植物は、対照非トランスジェニック植物と比較して重量分率の大きな L e u を含む。いくつかの実施形態において、本開示の組換え栄養タンパク質を含むトランスジェニック植物は、a ) 対照非トランスジェニック植物と比較して高い割合の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基、b ) 対照非トランスジェニック植物と比較して高い割合の全アミノ酸残基に対する L e u 残基、および c ) 対照非トランスジェニック植物と比較して高い割合の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基のうちの少なくとも 1 つを含む。いくつかの実施形態において、本開示の組換え栄養タンパク質を含むトランスジェニック植物は、a ) 対照非トランスジェニック植物と比較して高い割合の全アミノ酸残基に対する分枝鎖アミノ酸残基、b ) 対照非トランスジェニック植物と比較して高い割合の全アミノ酸残基に対する L e u 残基、および c ) 対照非トランスジェニック植物と比較して高い割合の全アミノ酸残基に対する必須アミノ酸残基を含む。

10

20

30

#### 【 0 2 3 8 】

したがって、トランスジェニック植物は、高品質タンパク質の源として有用である。植物は、採取し、さらに処理してまたは処理せずに、哺乳類の食事に用いることができる。例えば、トランスジェニックコムギから作製されたる小麦粉、トランスジェニックトウモロコシから作製されたコーンミール、またはトランスジェニックコメに由来する米または米粉は、組換え栄養タンパク質を含まない植物から作製された同様の生成物と比較して、タンパク質、必須アミノ酸、分枝鎖アミノ酸、および L e u のうちの少なくとも 1 つが濃縮されている。いくつかの実施形態において、組換え栄養タンパク質は、植物性タンパク質であるか、あるいは植物性タンパク質またはその誘導体もしくはムテインのポリペプチド配列、例えば、必ずではないが、同じ種類の植物のタンパク質またはポリペプチド配列等を含む。他の実施形態において、組換え栄養タンパク質は、植物性タンパク質またはその誘導体もしくはムテインではない。

#### 【 0 2 3 9 】

いくつかの実施形態において、組換え栄養タンパク質は、哺乳動物によって摂取される前にトランスジェニック植物から回収または一部回収される。

40

#### 【 0 2 4 0 】

##### H . 組成物

本明細書に開示される少なくとも 1 つの栄養タンパク質は、栄養組成物を形成するための少なくとも 1 つの第 2 の構成成分と組み合わせられてもよい。いくつかの実施形態において、組成物中のアミノ酸の唯一の源は、本明細書に開示される少なくとも 1 つの栄養タンパク質である。そのような実施形態において、上記組成のアミノ酸組成物は、本明細書に開示される少なくとも 1 つの栄養タンパク質のアミノ酸組成物と同じである。いくつかの実施形態において、組成物は、本明細書に開示される少なくとも 1 つの栄養タンパク質と、少なくとも 1 つの第 2 のタンパク質とを含む。いくつかの実施形態において、少なく

50

とも1つの第2のタンパク質は、本明細書に開示される第2の栄養タンパク質であり、他の実施形態において、少なくとも1つの第2のタンパク質は、本明細書に開示される栄養タンパク質ではない。いくつかの実施形態において、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の本明細書に開示される栄養タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、組成物は0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の本明細書に開示される栄養タンパク質ではないタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の本明細書に開示される栄養タンパク質を含み、組成物は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個、またはそれ以上の本明細書に開示される栄養タンパク質ではないタンパク質を含む。  
10

#### 【0241】

いくつかの実施形態において、先行する段落に記載されるような栄養組成物は、少なくとも1つのポリペプチド、少なくとも1つのペプチド、および少なくとも1つの遊離アミノ酸のうちの少なくとも1つをさらに含む。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、少なくとも1つのポリペプチドと、少なくとも1つのペプチドとを含む。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、少なくとも1つのポリペプチドと、少なくとも1つの遊離アミノ酸とを含む。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、少なくとも1つのペプチドと、少なくとも1つの遊離アミノ酸とを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのポリペプチド、少なくとも1つのペプチド、および/または少なくとも1つの遊離アミノ酸は、1) 分枝鎖アミノ酸、2) ロイシン、および3) 必須アミノ酸から選択されるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのポリペプチド、少なくとも1つのペプチド、および/または少なくとも1つの遊離アミノ酸は、1) 分枝鎖アミノ酸、2) ロイシン、および3) 必須アミノ酸から選択されるアミノ酸からなる。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、少なくとも1つの修飾アミノ酸または非標準アミノ酸を含む。修飾アミノ酸は、カルボキシ末端、アミノ末端、および/または側鎖のうちの1つ以上に対する修飾を有するアミノ酸を含む。非標準アミノ酸は、タンパク質の翻訳後修飾によって形成されるもの、例えば、カルボキシリ化グルタミン酸、ヒドロキシプロリン、またはハイブシンから選択されてもよい。他の非標準アミノ酸は、タンパク質中に認められない。例として、ランチオニン、2-アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、アミノ酪酸、オルニチン、およびシトルリンが挙げられる。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、1つ以上のD-アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、1つ以上のL-アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、栄養組成物は、1つ以上のD-アミノ酸と、1つ以上のL-アミノ酸との混合物を含む。  
20  
30

#### 【0242】

ポリペプチド、ペプチド、および遊離アミノ酸のうちの少なくとも1つを栄養組成物に添加することにより、組成物中に存在する全アミノ酸に対する分枝鎖アミノ酸、ロイシン、および必須アミノ酸のうちの少なくとも1つの割合を増加させることができる。  
40

#### 【0243】

いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの炭水化物を含む。「炭水化物」は、糖または糖のポリマーを指す。用語「糖類」、「多糖類」、「炭水化物」、および「オリゴ糖類」は、同義に用いられ得る。ほとんどの炭水化物は、多くのヒドロキシリ基(通常、分子の各炭素原子上に1個)を有するアルデヒドまたはケトンである。炭水化物は、一般に、分子式 $C_nH_{2n}O_n$ を有する。炭水化物は、单糖類、二糖類、三糖類、オリゴ糖類、または多糖類であり得る。最も基本的な炭化水素は、单糖類、例えば、グルコース、スクロース、ガラクトース、マンノース、リボース、アラビノース、キシロース、およびフルクトースである。二糖類は、2つの結合した单糖類である。例示的な二糖類として、スクロース、マルトース、セロビノース、およびラクトースが挙げられる。典型  
50

的には、オリゴ糖類は、3個～6個の単糖類単位（例えば、ラフィノース、スタキオース）を含み、多糖類は、6個以上の単糖類単位を含む。例示的な多糖類として、デンプン、グリコーゲン、およびセルロースが挙げられる。炭水化物は、修飾された糖類単位、例えば、ヒドロキシル基が除去された2'-デオキシリボース、ヒドロキシル基がフッ素で置換された2'-フルオロリボース、またはN-アセチルグルコサミン、グルコースの窒素含有形態（例えば、2'-フルオロリボース、デオキシリボース、およびヘキソース）を含有してもよい。炭水化物は、多くの異なる形態、例えば、配座異性体、環式形態、非環式形態、立体異性体、互変異性体、アノマー、および異性体として存在し得る。

#### 【0244】

いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの脂質を含む。本明細書で使用される場合、「脂質」は、遊離脂肪酸を含む任意の形態の脂肪、油、トリグリセリド、コレステロール、リン脂質、脂肪酸を含む。脂肪、油、および脂肪酸は、飽和、不飽和（シスもしくはトランス）、または部分不飽和（シスもしくはトランス）であり得る。いくつかの実施形態において、脂質は、ラウリン酸（12:0）、ミリスチン酸（14:0）、パルミチン酸（16:0）、パルミトレン酸（16:1）、マルガリン酸（17:0）、ヘプタデセン酸（17:1）、ステアリン酸（18:0）、オレイン酸（18:1）、リノール酸（18:2）、リノレン酸（18:3）、オクタデカテトラエン酸（18:4）、アラキジン酸（20:0）、エイコセン酸（20:1）、エイコサジエン酸（20:2）、エイコサテトラエン酸（20:4）、エイコサペンタエン酸（20:5）（EPA）、ドコサン酸（22:0）、ドコセン酸（22:1）、ドコサペンタエン酸（22:5）、ドコサヘキサエン酸（22:6）（DHA）、およびテトラコサン酸（24:0）から選択される少なくとも1つの脂肪酸を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの修飾された脂質、例えば、調理によって修飾された脂質を含む。

#### 【0245】

いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの補助的なミネラルまたはミネラル源を含む。ミネラルの例として、限定されないが、塩化物、ナトリウム、カルシウム、鉄、クロム、銅、ヨウ素、亜鉛、マグネシウム、マンガン、モリブデン、リン、カリウム、およびセレンが挙げられる。上記ミネラルのいずれかの好適な形態は、可溶性無機塩、難溶性無機塩、不溶性無機塩、キレート化ミネラル、ミネラル錯体、非反応性ミネラル（カルボニルミネラル等）、および還元ミネラル、ならびにそれらの組み合わせを含む。

#### 【0246】

いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの補助ビタミンを含む。少なくとも1つのビタミンは、脂溶性または水溶性のビタミンであってもよい。好適なビタミンは、限定されないが、ビタミンC、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンB<sub>12</sub>、ビタミンK、リボフラビン、ナイアシン、ビタミンD、ビタミンB<sub>6</sub>、葉酸、ピリドキシン、チアミン、パントテン酸、およびビオチンを含む。上記のいずれかの好適な形態は、ビタミンの塩、ビタミンの誘導体、ビタミンと同じかまたは同様の活性を有する化合物、およびビタミンの代謝物である。

#### 【0247】

いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの生物を含む。好適な例は当該技術分野で周知であり、プロバイオティクス（例えば、乳酸桿菌またはビフィズス菌の種）、スピルリナ、クロレラ、およびポルフィラを含む。

#### 【0248】

いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1つの栄養補助食品を含む。好適な例は当該技術分野で周知であり、薬草、植物、および特定のホルモンを含む。非限定的な例として、イチョウ、朝鮮人参、およびメラトニンを含む。

#### 【0249】

いくつかの実施形態において、組成物は、賦形剤を含む。好適な賦形剤の非限定的な例として、緩衝剤、保存剤、安定剤、結合剤、圧縮剤、滑沢剤、分散促進剤、崩壊剤、香味

10

20

30

40

50

剤、甘味剤、着色剤が挙げられる。

【0250】

いくつかの実施形態において、賦形剤は、緩衝剤である。好適な緩衝剤の非限定的な例として、クエン酸ナトリウム、炭酸マグネシウム、炭酸水素マグネシウム、炭酸カルシウム、および炭酸水素カルシウムが挙げられる。

【0251】

いくつかの実施形態において、賦形剤は、保存剤を含む。好適な保存剤の非限定的な例として、抗酸化剤、例えば、トコフェロールおよびアスコルビン酸塩、および抗菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、およびフェノールが挙げられる。

【0252】

いくつかの実施形態において、組成物は、結合剤を賦形剤として含む。好適な結合剤の非限定的な例として、デンプン、アルファ化デンプン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、ポリアクリルアミド、ポリビニルオキソアゾリドン、ポリビニルアルコール、C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>脂肪酸アルコール、ポリエチレングリコール、ポリオール、糖類、オリゴ糖類、およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0253】

いくつかの実施形態において、組成物は、滑沢剤を賦形剤として含む。好適な滑沢剤の非限定的な例として、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、硬化植物油、ステロテックス、モノステアリン酸ポリオキシエチレン、タルク、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、および軽鉱物油が挙げられる。

【0254】

いくつかの実施形態において、組成物は、分散促進剤を賦形剤として含む。分散剤の非限定的な例として、デンプン、アルギン酸、ポリビニルピロリドン、グーガム、カオリソ、ベントナイト、精製木質セルロース、デンブングリコール酸ナトリウム、イソアモルファスシリケート、および高HLB乳化剤界面活性剤としての微結晶性セルロースが挙げられる。

【0255】

いくつかの実施形態において、組成物は、崩壊剤を賦形剤として含む。いくつかの実施形態において、崩壊剤は、非発泡性崩壊剤である。好適な非発泡性崩壊剤の非限定的な例として、デンプン、例えば、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、それらのアルファ化デンプンおよび修飾デンプン、甘味剤、クレー、例えば、ベントナイト、微晶質セルロース、アルギネット、デンブングリコール酸ナトリウム、寒天、ガム、例えば、グーアー、ローカストビーン、カラヤ、ペクチン、およびトラガカント等が挙げられる。いくつかの実施形態において、崩壊剤は、発泡性崩壊剤である。好適な発泡性崩壊剤の非限定的な例として、クエン酸と組み合わせた重炭酸ナトリウム、および酒石酸と組み合わせた重炭酸ナトリウムが挙げられる。

【0256】

いくつかの実施形態において、賦形剤は、香味剤を含む。外層内に組み込まれる香味剤は、合成香味油および香味芳香剤；天然油；植物、葉、花、および果実からの抽出物；ならびにそれらの組み合わせから選択することができる。いくつかの実施形態において、香味剤は、桂皮油、冬緑油、ペパーミント油、クローバー油、乾草油、アニス油、ユーカリ油、バニラ油、柑橘油、例えば、レモン油、オレンジ油、ブドウ油、およびグレープフルーツ油等、ならびに果実エッセンス、例えば、リンゴ、モモ、ナシ、イチゴ、ラズベリー、サクランボ、プラム、パイナップル、およびアンズから選択される。

【0257】

いくつかの実施形態において、賦形剤は、甘味剤を含む。好適な甘味剤の非限定的な例として、グルコース（コーンシロップ）、デキストロース、転化糖、フルクトース、およびそれらの混合物（担体として使用しない場合）；サッカリンおよびその種々の塩、例え

10

20

30

40

50

ばナトリウム塩等；ジペプチド甘味剤、例えば、アスパルチーム等；ジヒドロカルコン化合物、グリシルリジン；ステビア（ステビオシド）；スクロースのクロロ誘導体、例えば、スクラロース等；糖アルコール、例えば、ソルビトール、マンニトール、シリトール等が挙げられる。また、水素添加デンプン加水分解物、および合成甘味剤3，6-ジヒドロ-6-メチル-1，2，3-オキサチアジン-4-オン-2，2-ジオキシド、特に、カリウム塩（アセサルフェーム-K）、ならびにそれらのナトリウム塩およびカルシウム塩も企図される。

#### 【0258】

いくつかの実施形態において、組成物は、着色剤を含む。好適な着色剤の非限定的な例として、食品、医薬品、化粧品（F D & C）用の着色剤、医薬品および化粧品用の着色剤（D & C）、ならびに外用薬品および化粧品用の着色剤（E x t . D & C）を含む。着色剤は、色素またはそれらの対応するレーキとして使用することができる。10

#### 【0259】

製剤中の賦形剤または賦形剤の組み合わせの重量分率は、通常、組成物中のアミノ酸の総重量の約50%以下、約45%以下、約40%以下、約35%以下、約30%以下、約25%以下、約20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約2%以下、または約1%以下である。

#### 【0260】

本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物は、様々な形態に製剤化することができ、多数の異なる手段によって投与することができる。組成物は、所望により従来許容されている担体、アジュvant、およびビヒクリを含有する製剤で経口的、経腸的、または非経口的に投与することができる。本明細書において使用される用語「非経口的」は、皮下、静脈内、筋肉内、または胸骨内の注射および注入技術を含む。例示的な実施形態において、栄養タンパク質または組成物は、経口投与される。20

#### 【0261】

経口投与のための固体投薬形態は、カプセル剤、錠剤、カプレット剤、丸剤、トローチ剤、ロゼンジ剤、散剤、および顆粒剤を含む。カプセル剤は、典型的には、栄養タンパク質または組成物を含むコア材料と、コア材料を封入するシェル壁とを含む。いくつかの実施形態において、コア材料は、固体、液体、およびエマルションのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、シェル壁材量は、軟質ゼラチン、硬質ゼラチン、およびポリマーのうちの少なくとも1つを含む。好適なポリマーは、限定されないが、セルロースポリマー、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース（H P M C）、メチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、酢酸トリメリット酸セルロース、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースナトリウム；アクリル酸ポリマーおよびコポリマー、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸メチル、アンモニオメチルアクリレート、エチルアクリレート、メチルメタクリレート、および/またはエチルメタクリレートから形成されるもの（例えば、「E u d r a g i t」の商標名で販売されているコポリマー）等；ビニルポリマーおよびコポリマー、例えば、ポリビニルポロリドン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアセテートフタレート、ビニルアセテートクロトン酸コポリマー、およびエチレン-ビニルアセテートコポリマー；ならびにシェラック（精製ラック）を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのポリマーは、味覚マスキング剤として機能する。30

#### 【0262】

錠剤、丸剤等は、圧縮、複数圧縮、多層化、および/またはコーティングされてもよい。コーティングは、単数または複数であり得る。一実施形態において、コーティング材料は、植物、真菌、および微生物のうちの少なくとも1つから抽出された糖類、多糖類、および糖タンパク質のうちの少なくとも1つを含む。非限定的な例として、トウモロコシンデンプン、コムギデンプン、ジャガイモデンプン、タピオカデンプン、セルロース、ヘミセ40

10

20

30

40

50

ルロース、デキストラン、マルトデキストリン、シクロデキストリン、イヌリン、ペクチン、マンナン、アラビアガム、ローカストビーンガム、メスキートガム、グアーガム、カラヤガム、ガティガム、トラガントガム、フノリ、カラゲナン、寒天、アルギン酸塩、キトサン、またはジェランガムが挙げられる。いくつかの実施形態において、コーティング材料は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、コーティング材料は、脂肪および油のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、脂肪および油のうちの少なくとも1つは、高温で融解する。いくつかの実施形態において、脂肪および油のうちの少なくとも1つは、植物に由来する。いくつかの実施形態において、脂肪および油のうちの少なくとも1つは、グリセリド、遊離脂肪酸、および脂肪酸エステルのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態において、コーティング材料は、少なくとも1つの食用ワックスを含む。食用ワックスは、動物、昆虫、または植物に由来し得る。非限定的な例として、蜜蝋、ラノリン、ヤマモモワックス、カルナバワックス、および米ぬかワックスが挙げられる。錠剤および丸剤は、腸溶コーティングを用いてさらに調製することができる。

10

#### 【0263】

代替として、本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物を具現化する散剤または顆粒剤は、食品に組み込むことができる。いくつかの実施形態において、食品は、経口投与のための飲料である。好適な飲料の非限定的な例として、果実飲料、人工香味料入り飲料、人工甘味料入り飲料、炭酸飲料、スポーツ飲料、液体乳製品、シェイク、アルコール飲料、カフェイン入り飲料、調整粉乳等が挙げられる。経口投与に他の好適な手段は、水溶液および非水溶液、クリーム、ペースト、エマルジョン、懸濁液およびスラリーを含み、これらの各々はまた、好適な溶媒、保存剤、乳化剤、懸濁剤、稀釀剤、甘味剤、着色剤、および香味剤のうちの少なくとも1つを任意選択的に含有してもよい。

20

#### 【0264】

いくつかの実施形態において、食品は、固体食料である。固体食料の好適な例として、限定されないが、フードバー、スナックバー、クッキー、プラウニー、マフィン、クラッカー、ビスケット、クリームまたはペースト、アイスクリームバー、フローズンヨーグルトバー等が挙げられる。

30

#### 【0265】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物は、治療食に組み込まれる。いくつかの実施形態において、治療食は、必須主要栄養素および微量栄養素のいくつかまたは全部を任意選択的に含有する、すぐに使える食品である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物は、既存の食事に混ぜるように設計された栄養補助食品に組み込まれる。いくつかの実施形態において、栄養補助食品は、必須主要栄養素および微量栄養素のいくつかまたは全部を任意選択的に含有する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物は、既存の食品に混合されるか添加されて、その食品のタンパク栄養を強化する。例として、主食（穀物、塩、砂糖、料理油、マーガリン）、飲料（コーヒー、紅茶、ソーダ、ビール、酒、スポーツドリンク）、軽食、甘い菓子、およびその他の食品が挙げられる。

40

#### 【0266】

本明細書に開示される組成物は、例えば、筋肉量、強度および身体機能、熱発生、代謝消費量、満腹感、ミトコンドリア生合成、体重または脂肪の損失、ならびに身体組成のうちの少なくとも1つを増加させるための方法に利用することができる。

#### 【0267】

##### I . 使用方法

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物は、患者またはユーザ（時には、集合的に「対象」と称される）に投与される。本明細書において使用される場合、「投与する」および「投与」は、ある人物が別の人物に、特定

50

の様式で、かつ／または特定の目的のために栄養タンパク質または栄養組成物を摂取するように指示する実施形態、同様に、ユーザが、第2の人物から受けたいずれの指示にも関係なくまたは矛盾して、特定の様式で、かつ／または特定の目的のために栄養タンパク質または栄養組成物を使用する状況を包含する。ある人物が別の人物に、特定の様式で、かつ／または特定の目的のために、栄養タンパク質または栄養組成物を摂取するように指示する実施形態の非限定的な例として、医師が一連の処置法および／または治療を患者に処方する場合、訓練者がユーザ（運動選手等）に、特定の一連の処置法および／または治療に従うように助言する場合、ならびに、製造業者、流通業者、マーケティング業者が、例えば、製品の販売またはマーケティングに関連して提供される、パッケージまたは他の材料上の広告または標示を通して、エンドユーザに使用の条件を推奨する場合が挙げられる。

10

#### 【0268】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質または栄養組成物は、剤形で投与される。いくつかの実施形態において、剤形は、本明細書に開示される少なくとも1つの栄養タンパク質の投与のために設計され、投与される栄養タンパク質の総量は、0.1g～1g、1g～5g、2g～10g、5g～15g、10g～20g、15g～25g、20g～40g、25～50g、および30～60gから選択される。いくつかの実施形態において、剤形は、本明細書に開示される少なくとも1つの栄養タンパク質の投与のために設計され、投与される栄養タンパク質の総量は、約0.1g、0.1g～1g、1g、2g、3g、4g、5g、6g、7g、8g、9g、10g、15g、20g、25g、30g、35g、40g、45g、50g、55g、60g、65g、70g、75g、80g、85g、90g、95g、および100gから選択される。

20

#### 【0269】

いくつかの実施形態において、剤形は、本明細書に開示される少なくとも1つの栄養タンパク質の投与のために設計され、投与される須アミノ酸の総量は0.1g～1g、1g～5g、2g～10g、5g～15g、10g～20g、および1～30gから選択される。いくつかの実施形態において、剤形は、本明細書に開示される少なくとも1つの栄養タンパク質の投与のために設計され、投与される栄養タンパク質の総量は、約0.1g、0.1～1g、1g、2g、3g、4g、5g、6g、7g、8g、9g、10g、15g、20g、25g、30g、35g、40g、45g、50g、55g、60g、65g、70g、75g、80g、85g、90g、95g、および100gから選択される。

30

#### 【0270】

いくつかの実施形態において、栄養タンパク質または栄養組成物は、1日0.1g～1g、1日1g～5g、1日2g～10g、1日5g～15g、1日10g～20g、1日15g～30g、1日20g～40g、1日25g～50g、1日40g～80g、1日50g～100g、またはそれ以上の割合で摂取される。

#### 【0271】

対象による総タンパク質摂取量のいくつかの実施形態において、ある食事期間にわたる対象による総タンパク質摂取量の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または約100%が、本開示による少なくとも1つの栄養タンパク質で構成される。対象による総タンパク質摂取量のいくつかの実施形態において、ある食事期間にわたる、対象による総タンパク質摂取量の5%～100%、対象による総タンパク質摂取量の5%～90%、対象による総タンパク質摂取量の5%～80%、対象による総タンパク質摂取量の5%～70%、対象による総タンパク質摂取量の5%～60%、対象による総タンパク質摂取量の5%～50%、対象による総タンパク質摂取量の5%～40%、対象による総タンパク質摂取量の5%～30%、

40

50

対象による総タンパク質摂取量の 5 % ~ 20 %、対象による総タンパク質摂取量の 5 % ~ 10 %、対象による総タンパク質摂取量の 10 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 10 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 20 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 30 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 40 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 50 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 60 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 70 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 80 % ~ 100 %、対象による総タンパク質摂取量の 90 % ~ 100 % は、本開示による少なくとも 1 つの栄養タンパク質で構成される。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの本開示の栄養タンパク質は、ある食事期間にわたる対象のカロリー摂取量の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、少なくとも 45 %、または少なくとも 50 % を占める。

10

#### 【0272】

いくつかの実施形態において、本開示による少なくとも 1 つの栄養タンパク質は、本開示の少なくとも 2 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 3 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 4 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 5 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 6 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 7 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 8 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 9 つの栄養タンパク質、本開示の少なくとも 10 個の栄養タンパク質、またはそれ以上を含む。

20

#### 【0273】

いくつかの実施形態において、食事期間は、1 回の食事、2 回の食事、3 回の食事、少なくとも 1 日、少なくとも 2 日、少なくとも 3 日、少なくとも 4 日、少なくとも 5 日、少なくとも 6 日、少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、少なくとも 3 週間、少なくとも 4 週間、少なくとも 1 ヶ月、少なくとも 2 ヶ月、少なくとも 3 ヶ月、少なくとも 4 ヶ月、少なくとも 5 ヶ月、少なくとも 6 ヶ月、または少なくとも 1 年である。いくつかの実施形態において、食事期間は、1 日 ~ 1 週間、1 週間 ~ 4 週間、1 ヶ月 ~ 3 ヶ月、3 ヶ月 ~ 6 ヶ月、または 6 ヶ月 ~ 1 年である。

#### 【0274】

臨床試験は、タンパク質が加齢または床上安静による筋力低下を防止するという証拠を提供している。具体的には、研究により、タンパク質の補給が、長期床上安静中の時間当たりの筋タンパク質合成速度 ( F S R ) を増加させ、長期床上安静中に脚質量および強度を維持し、除脂肪体重を増加させ、歩行およびバランスの機能測定値を改善し、不動および長期床上安静のためにサルコペニアのリスクがある個体に対する実行可能な治療介入としての役割を果たし得ることが示されている。( 例えば、P addon - Jones D , et al . J Clin Endocrinol Metab 2004 , 89 : 4351 - 4358 、 Ferrando , A et al . Clinical Nutrition 2009 1 - 6 、 Katsanos C et al . Am J Physiol Endocrinol Metab . 2006 , 291 : 381 - 387 を参照のこと ) 。

30

#### 【0275】

運動選手における筋肉タンパク同化作用の増加に関する研究は、運動後に供給されるタンパク質が、運動単独で達成されるより大きな程度まで筋肥大を促進することを示している。また、運動後に供給されるタンパク質が、タンパク質分解を一切増加させることなくタンパク質合成を支持し、正味の正のタンパク質バランスおよび筋肉量増加をもたらすことも示されている。筋肉のタンパク質合成は、必須アミノ酸の補給に対して用量反応様式で反応するが、すべてのタンパク質が筋肉増強において等しいわけではない。例えば、アミノ酸ロイシンは、筋肉のタンパク質合成を刺激する上で重要な要因である。( 例えば、B orscheim E et al . Am J Physiol Endocrinol Metab 2002 , 283 : E 648 - E 657 、 B orscheim E et al . Clin Nutr . 2008 , 27 : 189 - 95 、 E smarck B e 50

t al J Physiol 2001, 535: 301-311, Moore D et al. Am J Clin Nutr 2009, 89: 161-8を参照のこと)。

#### 【0276】

別の態様において、本開示は、対象において筋肉量、筋力、および機能的能力のうちの少なくとも1つを維持するかまたは増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は、高齢者、医学的に重症である、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している、のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態において、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【0277】

別の態様において、本開示は、対象において望ましいボディマス指数を維持するかまたは達成する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は、高齢者、医学的に重症である、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している、のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態において、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【0278】

別の態様において、本開示は、タンパク質エネルギー栄養障害を有する対象にタンパク質を提供する方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【0279】

癌患者および悪液質に罹患する他の患者において、必須アミノ酸補給の必要性が提案されてきた。マウスにおける食生活に関する研究は、必須アミノ酸を用いた食事介入による悪液性癌を有するマウスに対する生存上および機能上の利点を示している。癌以外にも、必須アミノ酸の補給は、慢性閉塞性肺疾患、慢性心不全、HIV、および他の病態等の他の疾患に罹患していて運動困難であるため筋肉の劣化に悩む患者において、筋機能改善および筋肉增量等の利点を示している。

#### 【0280】

研究により、特定のアミノ酸が悪液質の管理に有利であることが示されている。食事中のBCAAおよびLeu含有量が比較的多いと、翻訳增加をシグナル伝達すること、インスリン放出を促進すること、およびタンパク質分解を阻害することにより、総タンパク質合成を促進して悪液質に好影響を与えると考えられる。よって、一般的にはBCAAおよび/または具体的にはLeuを食事によって多く摂取することは、悪液質の影響の軽減または逆転に確実に寄与する。悪液質の根底にある原因に対処する上で窒素バランスが重要であることから、食事によって多くのグルタミンおよび/またはアルギニンを摂取することは、悪液質の影響の軽減または逆転に確実に寄与すると考えられる。(例えば、Opden Kamp C, Langen R, Haegens A, Schools A. "Muscle atrophy in cachexia: can dietary p

10

20

30

40

50

rotein tip the balance?" Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2009, 12: 611-616、Poon RT-P, Yu W-C, Fan S-T, et al. "Long-term oral branched chain amino acids in patients undergoing chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized trial." Aliment Pharmacol Ther 2004; 19: 779-788、Tayek JA, Bistrian BR, Hehir DJ, Martin R, Moldawer LL, Blackburn GL. "Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia." Cancer. 1986; 58: 147-57; Xi P, Jiang Z, Zheng C, Lin Y, Wu G "Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health." Front Biosci. 2011 Jan 1; 16: 578-97を参照のこと)。

#### 【0281】

したがって、対象において悪液質を治療する方法も、本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、悪液質を有する対象のための本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物の十分な量は、ヒトによって経口摂取される本開示のタンパク質の量が代謝要求（しばしば上昇する）を満たすかまたは超過する量である。1日当たり1.5g / 体重1kgまたは総カロリー摂取量の15~20%のタンパク質摂取量が、悪液質を有する人々にとって適切な標的であると考えられる。いくつかの実施形態において、対象によって摂取されるタンパク質のすべてが、本開示による栄養タンパク質である。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、対象の総タンパク質摂取量を提供するために、タンパク質および/または遊離アミノ酸の他の源と組み合わされる。いくつかの実施形態において、対象は、高齢者、医学的に重症である、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している、のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態において、対象は、慢性閉塞性肺疾患、慢性心不全、HIV、癌、および他の病態等の、運動を困難にし、ひいては筋肉の劣化を引き起こす疾患に罹患している。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【0282】

サルコペニアは、加齢に関連した骨格筋の量（典型的には、25歳以降は1年当たり0.5~1%の損失）、質、および強度の退行性の損失である。サルコペニアは、脆弱症候群の構成要素である。European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWG-SOP)は、加齢に伴うサルコペニアに関する実用的臨床定義およびコンセンサス診断基準を開発した。上記ワーキンググループは、サルコペニアの診断のために、筋肉量の低下および筋機能の低下（強度または性能）の両方の存在を用いることを提案している。サルコペニアは、脂肪による筋線維の置換、線維症の増加、筋肉代謝の変化、酸化ストレス、および神経筋接合部の変性等の要因によって引き起こされる、筋組織の「質」の低下を伴う筋萎縮（筋肉のサイズの減少）によって最初に特徴付けられる。これらの変化が合わさると、筋機能の進行性損失、および最終的には脆弱性を引き起こす。脆弱性は、高齢の成人における健康および機能の破局的衰退のリスク増加を具体化する、一般的な老年症候群である。脆弱性の原因は、サルコペニア、骨粗鬆症、および筋力低下を含み得る。筋疲労（または、「強度の欠如」）と

10

20

30

40

50

しても知られる筋力低下は、骨格筋により力を発揮することができないことを意味する。疾病的結果としての長期にわたる床上安静後等の衰弱は、しばしば筋萎縮および活性の減少を伴う。また、サルコペニアの結果として、筋疲労が徐々に発生する。

#### 【0283】

本開示の栄養タンパク質は、サルコペニアもしくは脆弱性が対象に発症した場合、それを治療するのに有用であるか、またはリスク群のメンバーである対象におけるサルコペニアもしくは脆弱性の発症の予防に有用である。いくつかの実施形態において、対象によって摂取されるタンパク質のすべてが、本開示による栄養タンパク質である。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質は、対象の総タンパク質摂取量を提供するために、タンパク質および／または遊離アミノ酸の他の源と組み合わされる。いくつかの実施形態において、対象は、高齢者、医学的に重症である、およびタンパク質エネルギー栄養障害に罹患している、のうちの少なくとも1つである。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

10

#### 【0284】

肥満は、高血圧、2型糖尿病、脂質異常症、冠動脈心疾患、脳卒中、癌（例えば、子宮内膜、乳房、および結腸）、変形性関節症、睡眠時無呼吸、ならびに呼吸障害を含む共存症の宿主に関連する多因子疾患である。 $> 30 \text{ kg} / \text{m}^2$  のボディマス指数として定義される肥満の発生率は、米国において15%（1976～1980）から33%（2003～2004）へと劇的に増加し、なおも増加し続けている。肥満に寄与する機構は複雑であり、行動的成分と、ホルモン、遺伝、および代謝プロセスとの相互作用に関与するが、肥満は、主に、過剰なエネルギー摂取量および不十分な身体活動の2つの主因による生活習慣に依存する状態であると見なされる。エネルギー摂取量に関して、総エネルギー摂取量を制御しながら食事中のタンパク質の割合を適度に増加させることができ、身体組成を改善し、脂肪消失を促進し、体重減少後の体重維持を向上し得るという証拠が存在する。食事性タンパク質の増加に関連する好ましい成果は、満腹感の増加に伴うエネルギー摂取量の減少、エネルギー効率の低下および／または熱発生の増加、身体組成に及ぼす好ましい影響（具体的には除脂肪筋肉量）、ならびに血糖管理の強化に主に起因すると考えられる。

20

#### 【0285】

食事性タンパク質は、等カロリーの炭水化物または脂肪の摂取量よりも食後のエネルギー消費量を増加させる上で効果的である（例えば、Dauncey M, Bingham S. "Dependence of 24 h energy expenditure in man on composition of the nutrient intake." Br J Nutr 1983, 50:1-13、Karst H et al. "Diet-induced thermogenesis in man: thermic effects of single proteins, carbohydrates and fats depending on their energy amount." Ann Nutr Metab. 1984, 28:245-52、Tappy L et al "Thermic effect of infused amino acids in healthy humans and in subjects with insulin resistance." Am J Clin Nutr 1993, 57(6):912-6を参照のこと）。この特性は、他の特性（満腹感誘導、除脂肪体重の維持）と並んで、タンパク質を体重管理を標的とする食事の魅力的な構成成分にする。そのような食事によって引き起こされるエネルギー消費量の増加は、タンパク質を消化および代謝するエネルギーコストが、他のカロリー源よりも高いという事実に一部起因し得る。タンパク質合成を含むタンパク質の代謝回転は、エネルギー消費プロセスである。さらに、高タンパク食は、肝組織および褐色脂肪において

30

40

50

、エネルギー消費量の増加と確実に相關する脱共役タンパク質を上方制御し得る。異なるタンパク質は、エネルギー消費量に特有の影響を及ぼし得るという理論が立てられてきた。

#### 【0286】

研究は、タンパク質、具体的には、EAAおよび/またはBCAA含有量の高いタンパク質の経口摂取が、熱発生およびエネルギー消費量にはっきりと異なる影響を及ぼすことを示唆している（例えば、Mikkelsen P. et al. “Effect of fat-reduced diets on 24 h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein and carbohydrate.” Am J Clin Nutr 2000, 72:1135-41、Acheson K. et al. “Protein choices targeting thermogenesis and metabolism.” Am J Clin Nutr 2011, 93:525-34、Alfenas R. et al. “Effects of protein quality on appetite and energy metabolism in normal weight subjects” Arg Bras Endocrinol Metabol 2010, 54(1):45-51、Lorenzen J. et al. “The effect of milk proteins on appetite regulation and diet-induced thermogenesis.” J Clin Nutr 2012 66(5):622-7を参照のこと）。また、L-チロシンは、熱発生に関するアミノ酸として同定されている（例えば、Belza A. et al. “The beta-adrenergic antagonist propranolol partly abolishes thermogenic response to bioactive food ingredients.” Metabolism 2009, 58(8):1137-44を参照のこと）。さらなる研究により、ロイシンおよびアルギニンの補給が、脂肪組織ではなく除脂肪体重への基質を誘導することによりエネルギー代謝を変化させること示唆されている（Dulloo A. “The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients.” Obes Rev 2011 12:866-83）。

#### 【0287】

総合すると、文献は、異なるタンパク質の種類は、熱発生にはっきりと異なる影響をもたらすことを示唆している。EAA、BCAA、ならびに/またはTyr、Arg、およびLeuのうちの少なくとも1つに富んだタンパク質またはペプチドは、熱発生に刺激作用を及ぼすと考えられるため、また、熱発生の刺激は、体重管理に好影響をもたらすと考えられるため、本開示は、一般に、熱発生を刺激するためおよび/または体重管理に好影響をもたらすために有用な生成物および方法も提供する。

#### 【0288】

より具体的には、本開示は、対象において熱発生を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

#### 【0289】

10

20

30

40

50

基本的レベルで、過体重状態の発生の理由は、エネルギー摂取量とエネルギー消費量との間の不均衡によるものである。いずれか特定の機会に（心的飽和）および食事の機会全体にわたって（満腹感）食物を減らそうとする試みが、最近の研究の大きな焦点となっている。食事中の満足感および食後の満腹感の結果としてのカロリー摂取量の減少は、内部および外部シグナルの複雑な相互作用によるものである。種々の栄養学的研究により、エネルギー密度、含有量、舌触り、および味覚等の食物の特性における多様性が、心的飽和反応および満腹感の両方に影響することが証明されている。

#### 【0290】

エネルギーを運搬する3つの主要栄養素として、脂肪、炭水化物、およびタンパク質が存在する。1グラムのタンパク質または炭水化物は、4カロリーを提供し、1グラムの脂肪は、9カロリーを提供する。タンパク質は、一般的に、炭水化物または脂肪よりも大きく満腹感を増加させ、したがって、カロリー摂取量の減少を促進し得る。しかしながら、満腹感を誘導する際にタンパク質の種類が重要であることを示す考慮すべき証拠が存在する（例えば、W. L. Hall, et al. "Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite." Br J Nutr. 2003 Feb, 89(2): 239-48、R. Abou-Samra, et al. "Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter." Nutr J. 2011 Dec 23, 10:139、T. Akhavan, et al. "Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults." Am J Clin Nutr. 2010 Apr, 91(4): 966-75, Epub 2010 Feb 17、MA Veldhorst "Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy" Physiol Behav. 2009 Mar 23, 96(4-5): 675-82を参照のこと）。証拠は、ロイシンに富んだタンパク質が、満腹感を誘導するのに特に効果的であることを示している（例えば、Fromentin G et al "Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins." Nutr Rev 2012 25: 29-39を参照のこと）。

#### 【0291】

いくつかの実施形態において、本開示の栄養タンパク質は、少なくとも1つの薬学的または生物学的な製剤と同時に対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、栄養タンパク質および少なくとも1つの薬学的または生物学的な製剤の有益な効果は、相加効果を有し、一方、いくつかの実施形態において、栄養タンパク質および少なくとも1つの薬学的または生物学的な製剤の有益な効果は、相乗効果を有する。本開示の栄養タンパク質とともに投与することができる薬学的または生物学的な製剤の例は、当該技術分野で周知である。例えば、本開示の栄養タンパク質が、対象において筋肉量、筋力、および機能的能力のうちの少なくとも1つを維持するまたは増加させるために使用される場合、栄養タンパク質は、対象において筋肉量、筋力、および機能的能力のうちの少なくとも1つを維持するかまたは増加させることができることが示されている少なくとも1つの薬学的または生物学的な製剤、例えば、タンパク質同化ステロイド等の治療投与計画と同時に対象によって摂取されてもよい。本開示の栄養タンパク質が、対象において望ましいボディマス指数を維持するまたは達成するために使用される場合、栄養タンパク質は、対象において望ましいボディマス指数を維持するまたは達成することが示されている少なくとも1つの薬学的ま

10

20

30

40

50

たは生物学的な製剤、例えば、オルリストット、ロルカセリン、シブトラミン、リモナバン、メトホルミン、エキセナチド、またはプラムリンチド等の治療投与計画と同時に対象によって摂取されてもよい。本開示の栄養タンパク質が、対象において心的飽和反応および満腹反応のうちの少なくとも1つを誘導するために使用される場合、栄養タンパク質は、対象において心的飽和反応および満腹反応のうちの少なくとも1つを誘導することが示されている少なくとも1つの薬学的または生物学的な製剤、例えば、リモナバン、エキセナチド、またはプラムリンチド等の治療投与計画と同時に対象によって摂取されてもよい。本開示の栄養タンパク質が、対象において悪液質、サルコペニア、および虚弱のうちの少なくとも1つを治療するために使用される場合、栄養タンパク質は、悪液質、サルコペニア、および虚弱のうちの少なくとも1つを治療することが示されている少なくとも1つの薬学的または生物学的な製剤、例えばオメガ3脂肪酸またはタンパク質同化ステロイド等の治療投与計画と同時に対象によって摂取されてもよい。心的飽和および満腹感の誘導における食事性タンパク質の役割のために、本明細書に開示される栄養タンパク質および栄養組成物は、対象において心的飽和反応および満腹反応のうちの少なくとも1つを誘導するために使用することができる。いくつかの実施形態において、方法は、対象に、十分な量の本開示の栄養タンパク質、本開示の栄養組成物、または本開示の方法によって作製される栄養組成物を提供することを含む。いくつかの実施形態において、対象は肥満である。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、運動の遂行に合わせて対象によって摂取される。いくつかの実施形態において、本開示による栄養タンパク質、本開示による栄養組成物、または本開示による方法によって作製される栄養組成物は、経口、経腸、または非経口経路で対象によって摂取される。

10

20

30

40

50

#### 【0292】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの本開示の栄養タンパク質または栄養組成物を対象の食事に組み入れることは、食後の満腹感の誘導（空腹感を抑制することによる）ことを含む）、熱発生の誘導、血糖反応の低減、エネルギー消費量に対する好影響、除脂肪体重に対する好影響、過食によって引き起こされる体重増加の減少、およびエネルギー摂取量の減少から選択される少なくとも1つの影響を有する。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの本開示の栄養タンパク質または栄養組成物を対象の食事に組み入れることは、対象における体脂肪消失の増大、除脂肪組織消失の減少、脂質プロファイルの改善、ならびに耐糖能およびインスリン感受性の向上から選択される少なくとも1つの影響を有する。

#### 【実施例】

#### 【0293】

以下の実施例は、本発明を使用する様式をより完全に説明する役割を果たす。これらの実施例は、例示の目的で提示されるのであって、本発明の真の範囲を限定する役割を果たすべきではない。

#### 【0294】

実施例1：ゼラチンよりも高い割合の必須アミノ酸、分枝鎖アミノ酸、およびロイシンを含有するタンパク質の同定

UniProtKB/Swiss-Prot (European Bioinformatics InstituteとSwiss Institute of Bioinformaticsとのコラボレーション)は、手作業で処理および検討されたタンパク質のデータベースであり、タンパク質同定の出発点として使用した。50個以上のアミノ酸を有する食用種であるソラナム・リコペルシク、トウモロコシ、オリザ・サティバ亜種ジャポニカ、グリシンマックス、オービス・アリエス、ピスム・サティヴム、ホウレンソウ、オリザ・サティバ亜種インディカ、トリティクム・アエスティウム、スース・スクロファ、モモ、カブシクム・アンヌウム、マルス・ドメスティカ、キハダマグロ、カブラ・ヒルクス、シセル・アリエチヌム、タイセイヨウサケ、メレアグリス・ガロバボ、ソラナム・ツベロスマ、およびアガリクス・ビスピルスからのタンパク質試料をこの試験の標的

として採取した。こうして、8,415個の一連のタンパク質が評価のために提供された。各タンパク質について、アミノ酸含有量、必須アミノ酸（「EAA」）のパーセンテージ、分枝鎖アミノ酸（「BCAA」）のパーセンテージ、ロイシン（「L」）のパーセンテージ、およびタンパク質がすべての必須アミノ酸を含有するかどうかを算出した。また、SolvScoreも各タンパク質ごとに算出した。さらに、既知のアレルゲンに対して50%を超える全体的相同意を有するものがあるかどうかを決定するために、既知のアレルゲンのデータベースに対してタンパク質をスクリーニングした。全部で463個のタンパク質が、20以下のSolvScoreを有し、19%以上のEAA、8%以上のBCAA、および4%以上のLeuを含有し、既知のアレルゲンに対する50%未満の全体的相同意（配列番号1~463）を有すると同定された。（同定されたタンパク質がゼラチンよりも高い含有量のEAA、BCAA、およびLeuを有することを確実にするために、これらの値は、この実施例において該当する栄養タンパク質を同定するために用いられた）。一連のタンパク質について、pH7での溶媒和スコア（「SolvScore」）、凝集スコアpH7での（「AggScore」）、アレルゲン性（すなわち、本明細書に記載されるような既知のアレルゲンに対する局所的相同意パーセント）、毒性（すなわち、本明細書に記載されるような既知の毒素に対する相同意パーセント）、抗栄養性（すなわち、本明細書に記載されるような既知のプロテアーゼ阻害剤に対する相同意パーセント）、およびヒト相同意（すなわち、本明細書に記載されるような既知のヒトタンパク質に対する相同意パーセント）を算出し、Cys残基（「C」）の合計数を決定した。このようにして同定した200個の代表的なタンパク質の特性を表3Aおよび3Bに提示する。

【0295】

表3A

10

20

【表3-1】

配列番号	UniProt	EAA	BCAA	L	C
1	P13915	0.38	0.18	0.09	2
2	Q39817	0.44	0.16	0.06	4
3	O82709	0.45	0.17	0.05	4
4	P30236	0.49	0.23	0.12	1
5	Q29092	0.46	0.19	0.08	5
6	P19244	0.54	0.25	0.12	0
7	Q9TV61	0.45	0.19	0.10	16
8	Q9TV63	0.45	0.19	0.10	16
9	P15590	0.34	0.15	0.06	8
10	Q9TV62	0.45	0.18	0.10	16
11	Q9SP22	0.44	0.14	0.05	2
12	Q9SLY8	0.44	0.13	0.05	3
13	P86412	0.57	0.22	0.08	2
14	Q6YNX6	0.44	0.16	0.06	0
15	P79293	0.44	0.19	0.11	14
16	Q08275	0.44	0.20	0.07	1
17	P02547	0.33	0.16	0.09	1
18	Q6Z6L5	0.39	0.22	0.10	0
19	Q0JNS6	0.46	0.17	0.07	1
20	Q0DJV6	0.34	0.13	0.07	4
21	Q0IUU4	0.43	0.16	0.09	3
22	P62163	0.46	0.17	0.07	1
23	P04353	0.45	0.17	0.07	1
24	A2WN93	0.46	0.17	0.07	1
25	A2WNH1	0.46	0.17	0.07	1
26	P93087	0.46	0.17	0.07	1
27	Q7DMN9	0.45	0.17	0.07	1
28	P84339	0.45	0.16	0.07	0
29	P24632	0.43	0.20	0.08	1
30	Q5ZCK5	0.35	0.13	0.04	4
31	Q6ES52	0.44	0.19	0.07	4
32	P29269	0.47	0.12	0.06	1
33	P41040	0.45	0.18	0.08	1
34	P24631	0.45	0.21	0.08	1
35	Q6F332	0.46	0.17	0.07	1
36	Q0JNL7	0.46	0.17	0.07	1
37	Q0IQB6	0.43	0.16	0.09	3
38	A2Y609	0.46	0.17	0.07	1
39	Q40642	0.41	0.16	0.06	2
40	P04464	0.45	0.17	0.07	1
41	P48976	0.45	0.17	0.07	1
42	P27161	0.45	0.17	0.08	1
43	Q8S1Y9	0.41	0.16	0.06	2
44	P13868	0.45	0.16	0.08	1
45	P10246	0.45	0.16	0.06	1
46	P46254	0.43	0.21	0.11	0
47	Q84MN0	0.45	0.19	0.09	1
48	Q2R1Z5	0.45	0.16	0.06	1

10

20

30

40

【表3-2】

配列番号	UniProt	EAA	BCAA	L	C
49	P02540	0.37	0.19	0.10	1
139	P21753	0.52	0.09	0.05	0
140	Q75ZZ6	0.37	0.13	0.07	0
141	Q6DUB7	0.42	0.15	0.09	0
142	Q95274	0.46	0.09	0.04	0
143	P58272	0.44	0.19	0.07	0
144	Q8S1Z1	0.44	0.15	0.08	0
145	B5X4E0	0.42	0.14	0.06	2
146	Q08655	0.59	0.13	0.06	0
147	Q10B98	0.32	0.10	0.04	3
148	Q6H7U2	0.37	0.13	0.06	4
149	P46618	0.46	0.19	0.06	0
150	P0C380	0.46	0.19	0.06	0
151	P0C379	0.46	0.19	0.06	0
152	P47815	0.41	0.19	0.07	3
153	Q29361	0.52	0.21	0.12	0
154	B5X186	0.41	0.14	0.05	2
155	P17703	0.51	0.19	0.12	0
156	B5DGI7	0.36	0.13	0.06	0
157	P37219	0.60	0.12	0.04	0
158	P0C470	0.51	0.19	0.11	0
159	P0C469	0.51	0.19	0.11	0
160	P69661	0.50	0.19	0.12	0
161	P42755	0.31	0.10	0.06	0
162	P12675	0.41	0.13	0.07	5
163	Q6ZK48	0.40	0.13	0.06	6
164	A2YQU8	0.40	0.13	0.06	6
165	Q0JHZ2	0.42	0.14	0.05	6
166	Q9M4U5	0.42	0.12	0.06	3
167	Q8LH03	0.34	0.15	0.08	3
168	P61268	0.46	0.21	0.07	4
169	B5XCZ6	0.44	0.19	0.12	0
170	P56276	0.37	0.14	0.04	5
171	P14287	0.37	0.14	0.06	1
172	Q9MYT8	0.37	0.21	0.11	0
173	Q08000	0.28	0.09	0.05	0
174	Q29307	0.40	0.13	0.05	0
175	B5XGH3	0.54	0.24	0.12	2
176	Q9AS36	0.38	0.15	0.06	8
177	O97965	0.36	0.09	0.04	2
178	Q2PMN9	0.48	0.22	0.09	0
179	Q6Q311	0.51	0.19	0.10	1
180	O04438	0.43	0.15	0.06	2
181	P22701	0.30	0.09	0.05	0
182	P83884	0.51	0.13	0.05	5
183	P13618	0.42	0.12	0.06	0
184	Q65WT0	0.42	0.16	0.07	11
185	Q6K5K2	0.43	0.15	0.06	24
186	P12026	0.51	0.16	0.07	0
187	Q5KQI4	0.37	0.14	0.08	3
188	P04568	0.27	0.09	0.05	0

10

20

30

40

【表3-3】

配列番号	UniProt	EAA	BCAA	L	C
189	Q9XGX7	0.43	0.16	0.09	4
190	P46291	0.56	0.22	0.11	2
191	Q2MI43	0.52	0.24	0.12	0
192	Q69V36	0.37	0.16	0.09	1
193	P46517	0.32	0.10	0.05	0
194	Q9M3I4	0.53	0.24	0.14	1
195	P67985	0.49	0.20	0.08	1
196	P48504	0.47	0.15	0.06	6
197	Q94DE2	0.40	0.16	0.07	11
198	P12151	0.44	0.22	0.10	2
199	P0C474	0.44	0.22	0.10	2
200	A2XAM1	0.46	0.16	0.06	7
201	P46520	0.26	0.09	0.04	0
202	P41101	0.52	0.19	0.07	1
203	Q64L94	0.47	0.22	0.10	3
204	Q10RE5	0.41	0.17	0.07	3
205	A2XCT8	0.41	0.17	0.07	3
206	Q7XNS7	0.44	0.19	0.10	1
207	P49120	0.54	0.16	0.04	0
208	Q41396	0.46	0.24	0.10	2
209	Q2PMR3	0.51	0.19	0.04	5
210	Q8L805	0.50	0.21	0.11	0
211	P28520	0.41	0.17	0.06	2
212	Q5JLY8	0.37	0.18	0.09	4
213	O18734	0.34	0.19	0.13	1
214	P49680	0.46	0.19	0.10	7
215	Q8LJS2	0.42	0.14	0.06	3
216	A7WLH8	0.47	0.17	0.07	1
217	Q2MJV9	0.39	0.17	0.07	3
218	A2XAM0	0.47	0.16	0.06	8
219	A1L4T4	0.44	0.17	0.08	4
220	A2Z7C4	0.44	0.17	0.08	4
221	P55844	0.55	0.25	0.10	0
222	A5YVD9	0.44	0.18	0.09	3
223	P0CE66	0.47	0.17	0.06	8
224	B7F6L8	0.47	0.17	0.06	8
225	Q2VEC4	0.55	0.24	0.12	0
226	Q943L2	0.53	0.17	0.04	0
227	A2WWU2	0.53	0.17	0.04	0
228	O65821	0.55	0.18	0.05	0
229	Q2QWE9	0.43	0.13	0.07	6
230	Q9ZQW8	0.30	0.12	0.04	7
231	Q43694	0.41	0.15	0.06	4
232	A2ZIW7	0.43	0.13	0.07	6
233	P60099	0.43	0.19	0.08	3
234	P60098	0.43	0.19	0.08	3
235	B5XG43	0.47	0.16	0.06	4
236	Q6ZBP3	0.51	0.15	0.05	0
237	A2YWI3	0.51	0.15	0.05	0
238	O49118	0.52	0.17	0.05	0
239	P27723	0.44	0.22	0.09	2

10

20

30

40

【表3-4】

配列番号	UniProt	EAA	BCAA	L	C
240	P25461	0.47	0.16	0.04	4
241	O04433	0.51	0.14	0.07	3
242	Q7XEJ5	0.45	0.20	0.09	3
243	P62272	0.50	0.23	0.09	0
244	A5JST6	0.50	0.23	0.09	0
245	P08698	0.41	0.23	0.07	0
246	A5A777	0.46	0.15	0.08	3
247	P62901	0.49	0.19	0.05	0
248	B5XG19	0.40	0.14	0.07	0
249	A1Y2B7	0.43	0.14	0.07	4
250	Q2QLT8	0.43	0.17	0.05	4
251	P46605	0.37	0.15	0.06	15
252	Q8LNU5	0.47	0.19	0.09	14
253	O24473	0.45	0.18	0.08	5
254	P68211	0.41	0.12	0.08	0
255	Q05462	0.62	0.21	0.09	1
256	B5XBI1	0.37	0.20	0.10	0
257	Q43216	0.55	0.17	0.05	0
258	O65818	0.55	0.17	0.05	0
259	B5SNZ6	0.39	0.14	0.05	4
260	P62262	0.41	0.20	0.10	3
261	Q8LJU5	0.47	0.22	0.08	1
262	Q5FZP5	0.36	0.18	0.11	0
263	Q0JGY1	0.42	0.16	0.08	1
264	Q29561	0.44	0.20	0.07	4
265	Q8H2P8	0.42	0.14	0.06	4
266	P55871	0.42	0.18	0.08	6
267	P02632	0.45	0.20	0.13	0
268	Q40703	0.47	0.19	0.09	2
269	B5X7E4	0.37	0.17	0.08	1
270	Q94IB1	0.36	0.13	0.07	6
271	Q6B7M7	0.51	0.22	0.09	5
272	P10668	0.51	0.22	0.09	5
273	P30755	0.53	0.16	0.05	0
274	A2WXX3	0.41	0.16	0.08	1
275	A1XQU5	0.53	0.18	0.05	0
276	Q08069	0.44	0.16	0.07	2
277	Q712U6	0.41	0.11	0.07	0
278	P28807	0.45	0.22	0.09	1
279	P80220	0.38	0.21	0.13	0
280	P0C267	0.40	0.20	0.13	4
281	Q2MI77	0.44	0.23	0.08	1
282	Q2VEF5	0.44	0.23	0.08	1
283	Q2PMR2	0.47	0.19	0.10	0
284	P28803	0.44	0.21	0.07	2
285	Q5G6V9	0.53	0.23	0.08	2
286	A5YVF1	0.42	0.13	0.06	2
287	P27807	0.52	0.15	0.05	0
288	Q41418	0.41	0.20	0.10	2
289	Q95H63	0.44	0.22	0.10	2

【0 2 9 6】

表3 B

【表4-1】

配列番号	SolvScore	AggScore	アレルゲン性	毒性	抗栄養性	ヒト相容性
1	-28.68	0.37	0.83	0.21	0.21	0.22
2	-28.04	0.37	0.71	0.00	0.21	0.42
3	-27.88	0.40	0.68	0.00	0.21	0.41
4	-25.31	0.41	0.65	0.00	0.19	0.00
5	-28.80	0.28	0.63	0.00	0.21	0.98
6	-26.64	0.44	0.60	0.00	0.23	0.00
7	-28.16	0.23	0.58	0.18	0.18	0.97
8	-28.15	0.23	0.58	0.18	0.17	0.97
9	-27.54	0.37	0.55	0.19	0.21	0.22
10	-28.30	0.23	0.55	0.18	0.17	0.95
11	-31.29	0.25	0.55	0.00	0.22	0.51
12	-30.53	0.27	0.55	0.21	0.21	0.53
13	-25.09	0.33	0.54	0.26	0.19	0.94
14	-28.55	0.19	0.53	0.21	0.24	1.00
15	-28.42	0.22	0.53	0.18	0.19	0.98
16	-26.63	0.40	0.52	0.23	0.25	0.27
17	-28.92	0.16	0.52	0.00	0.20	0.95
18	-25.93	0.39	0.51	0.24	0.25	0.25
19	-28.97	0.24	0.51	0.23	0.21	0.91
20	-26.30	0.21	0.51	0.25	0.23	0.39
21	-26.00	0.25	0.51	0.22	0.24	0.55
22	-28.97	0.24	0.51	0.23	0.21	0.91
23	-28.36	0.24	0.51	0.21	0.21	0.90
24	-28.97	0.24	0.51	0.23	0.21	0.91
25	-28.98	0.24	0.51	0.23	0.21	0.90
26	-29.02	0.23	0.51	0.23	0.21	0.89
27	-29.01	0.23	0.51	0.23	0.21	0.90
28	-28.50	0.19	0.51	0.24	0.19	0.91
29	-25.19	0.42	0.50	0.24	0.25	0.25
30	-26.03	0.27	0.50	0.23	0.22	0.36
31	-26.52	0.36	0.50	0.00	0.21	0.37
32	-27.66	0.23	0.50	0.00	0.24	1.00
33	-28.96	0.24	0.49	0.22	0.21	0.91
34	-25.05	0.40	0.49	0.24	0.24	0.00
35	-28.96	0.24	0.49	0.22	0.21	0.91
36	-28.97	0.24	0.49	0.22	0.21	0.89
37	-26.04	0.25	0.49	0.22	0.24	0.54
38	-28.96	0.24	0.49	0.22	0.21	0.91
39	-29.48	0.26	0.49	0.00	0.22	0.65
40	-29.44	0.24	0.49	0.22	0.22	0.91
41	-29.00	0.21	0.49	0.24	0.21	0.89
42	-28.98	0.24	0.48	0.24	0.19	0.91
43	-29.54	0.25	0.48	0.00	0.23	0.64
44	-28.98	0.23	0.48	0.00	0.19	0.91
45	-30.31	0.28	0.47	0.25	0.24	0.90
46	-25.90	0.32	0.47	0.00	0.23	0.00
47	-27.55	0.34	0.46	0.22	0.24	0.64
48	-28.99	0.30	0.45	0.00	0.00	0.47

10

20

30

40

【表4-2】

配列番号	SolvScore	AggScore	アレルゲン性	毒性	抗栄養性	ヒト相同意
49	-25.35	0.18	0.45	0.20	0.22	0.98
139	-33.88	0.00	0.15	0.37	0.30	0.90
140	-37.24	0.12	0.34	0.22	0.25	0.97
141	-36.00	0.11	0.34	0.25	0.26	1.00
142	-35.85	0.01	0.18	0.30	0.28	1.00
143	-33.70	0.25	0.29	0.00	0.00	0.00
144	-32.94	0.12	0.33	0.21	0.25	0.35
145	-32.77	0.23	0.34	0.00	0.00	0.78
146	-32.65	0.32	0.31	0.23	0.27	0.25
147	-32.38	0.21	0.33	0.00	0.22	0.38
148	-32.24	0.12	0.33	0.19	0.21	0.22
149	-32.09	0.27	0.28	0.00	0.00	0.00
150	-31.90	0.29	0.29	0.00	0.00	0.00
151	-31.90	0.29	0.29	0.00	0.00	0.00
152	-31.80	0.29	0.30	0.20	0.00	0.71
153	-31.78	0.19	0.33	0.24	0.25	0.98
154	-31.47	0.24	0.35	0.00	0.00	0.77
155	-31.44	0.25	0.30	0.00	0.17	0.31
156	-30.95	0.17	0.32	0.22	0.26	0.93
157	-30.92	0.34	0.30	0.22	0.25	0.27
158	-30.74	0.25	0.30	0.00	0.00	0.30
159	-30.74	0.25	0.30	0.00	0.00	0.30
160	-30.60	0.25	0.29	0.00	0.00	0.31
161	-30.53	0.08	0.31	0.00	0.30	0.29
162	-30.34	0.15	0.35	0.00	1.00	0.78
163	-30.30	0.11	0.35	0.00	0.22	0.46
164	-30.30	0.11	0.35	0.00	0.22	0.46
165	-30.25	0.18	0.34	0.00	0.24	0.42
166	-29.86	0.19	0.34	0.00	0.23	0.21
167	-29.72	0.30	0.35	0.18	0.20	0.37
168	-29.39	0.35	0.31	0.20	0.00	1.00
169	-29.33	0.23	0.28	0.00	0.27	0.65
170	-29.26	0.21	0.30	0.25	0.28	0.78
171	-29.25	0.22	0.31	0.00	0.22	0.69
172	-29.22	0.40	0.27	0.26	0.00	0.93
173	-29.20	0.07	0.30	0.00	0.30	0.31
174	-29.17	0.23	0.29	0.21	0.27	0.71
175	-29.09	0.24	0.30	0.00	0.22	0.85
176	-29.05	0.29	0.33	0.00	0.19	0.37
177	-28.89	0.08	0.28	0.21	0.24	0.29
178	-28.81	0.21	0.28	0.25	0.23	0.28
179	-28.73	0.25	0.34	0.24	0.00	1.00
180	-28.69	0.26	0.30	0.00	0.22	0.38
181	-28.66	0.08	0.32	0.26	0.29	0.00
182	-28.49	0.18	0.27	0.00	0.23	1.00
183	-28.45	0.08	0.23	0.26	0.00	0.82
184	-28.41	0.25	0.29	0.24	0.17	0.71
185	-28.35	0.25	0.34	0.18	0.00	0.19
186	-28.33	0.16	0.33	0.00	0.00	0.90
187	-28.32	0.20	0.34	0.00	0.24	0.00
188	-28.31	0.07	0.31	0.00	0.30	0.31

10

20

30

40

【表4-3】

配列番号	SolvScore	AggScore	アレルゲン性	毒性	抗栄養性	ヒト相同意性
189	-28.30	0.16	0.27	0.25	0.00	0.31
190	-28.17	0.27	0.26	0.00	0.23	0.78
191	-28.05	0.26	0.29	0.25	0.00	0.26
192	-28.03	0.22	0.33	0.21	0.00	0.00
193	-28.01	0.09	0.30	0.27	0.32	0.32
194	-28.00	0.34	0.31	0.00	0.21	0.29
195	-27.93	0.24	0.31	0.21	0.00	0.99
196	-27.86	0.17	0.26	0.33	0.29	0.38
197	-27.78	0.25	0.30	0.27	0.18	0.70
198	-27.76	0.38	0.23	0.00	0.27	0.31
199	-27.76	0.38	0.23	0.00	0.27	0.31
200	-27.75	0.45	0.30	0.27	0.25	0.00
201	-27.72	0.07	0.31	0.24	0.30	0.27
202	-27.70	0.33	0.34	0.26	0.26	0.56
203	-27.64	0.33	0.32	0.00	0.27	0.99
204	-27.63	0.23	0.30	0.21	0.23	0.55
205	-27.63	0.23	0.30	0.21	0.23	0.55
206	-27.63	0.29	0.33	0.00	0.23	0.47
207	-27.55	0.25	0.31	0.25	0.25	0.62
208	-27.55	0.35	0.32	0.21	0.00	0.41
209	-27.52	0.30	0.25	0.24	0.26	0.26
210	-27.51	0.17	0.30	0.27	0.22	0.53
211	-27.44	0.21	0.30	0.24	0.24	0.42
212	-27.42	0.23	0.35	0.00	0.21	0.24
213	-27.42	0.12	0.33	0.27	0.26	0.91
214	-27.35	0.28	0.33	0.00	0.22	0.19
215	-27.34	0.22	0.33	0.24	0.25	0.27
216	-27.32	0.14	0.30	0.00	0.24	1.00
217	-27.26	0.16	0.33	0.00	0.21	0.87
218	-27.26	0.44	0.29	0.26	0.25	0.00
219	-27.25	0.26	0.31	0.22	0.25	0.51
220	-27.25	0.26	0.31	0.22	0.25	0.51
221	-27.25	0.41	0.32	0.25	0.21	0.43
222	-27.24	0.32	0.34	0.20	0.19	0.85
223	-27.23	0.46	0.29	0.27	0.25	0.00
224	-27.23	0.46	0.29	0.27	0.25	0.00
225	-27.20	0.29	0.29	0.25	0.28	0.26
226	-27.19	0.24	0.33	0.21	0.24	0.62
227	-27.19	0.24	0.33	0.21	0.24	0.62
228	-27.18	0.23	0.32	0.24	0.26	0.64
229	-27.14	0.18	0.33	0.00	0.20	0.00
230	-27.13	0.17	0.35	0.00	0.22	0.46
231	-27.11	0.25	0.30	0.23	0.22	0.36
232	-27.10	0.18	0.34	0.00	0.21	0.00
233	-27.09	0.26	0.30	0.25	0.25	0.45
234	-27.09	0.26	0.30	0.25	0.25	0.45
235	-27.09	0.30	0.32	0.24	0.23	0.57
236	-27.08	0.23	0.31	0.24	0.28	0.61
237	-27.08	0.23	0.31	0.24	0.28	0.61
238	-27.08	0.23	0.33	0.21	0.00	0.61
239	-27.07	0.38	0.26	0.00	0.26	0.32

10

20

30

40

【表4-4】

配列番号	SolvScore	AggScore	アレルゲン性	毒性	抗栄養性	ヒト相同性
240	-27.06	0.25	0.22	0.28	0.26	0.25
241	-27.05	0.26	0.30	0.23	0.25	0.37
242	-27.02	0.33	0.31	0.00	0.24	0.55
243	-27.01	0.34	0.32	0.27	0.24	1.00
244	-27.01	0.34	0.32	0.27	0.24	1.00
245	-26.92	0.26	0.26	0.25	0.24	0.27
246	-26.91	0.14	0.32	0.00	0.00	0.84
247	-26.88	0.18	0.28	0.25	0.28	1.00
248	-26.88	0.13	0.32	0.00	0.24	0.56
249	-26.85	0.18	0.33	0.00	0.20	0.00
250	-26.83	0.34	0.33	0.00	0.25	0.33
251	-26.81	0.14	0.32	0.19	0.20	0.21
252	-26.80	0.38	0.33	0.00	0.20	0.26
253	-26.80	0.34	0.32	0.00	0.23	0.50
254	-26.78	0.08	0.28	0.23	0.00	0.99
255	-26.74	0.38	0.30	0.23	0.29	0.56
256	-26.70	0.21	0.30	0.20	0.27	0.59
257	-26.68	0.25	0.30	0.21	0.23	0.65
258	-26.62	0.24	0.31	0.25	0.25	0.66
259	-26.62	0.21	0.32	0.00	0.23	0.83
260	-26.62	0.33	0.32	0.00	0.00	1.00
261	-26.60	0.32	0.32	0.00	0.21	0.51
262	-26.58	0.20	0.34	0.21	0.21	0.88
263	-26.56	0.27	0.34	0.00	0.00	0.54
264	-26.56	0.35	0.32	0.00	0.24	0.97
265	-26.56	0.30	0.32	0.25	0.00	0.34
266	-26.55	0.32	0.32	0.21	0.23	0.48
267	-26.54	0.20	0.33	0.27	0.28	0.90
268	-26.53	0.27	0.33	0.22	0.20	0.29
269	-26.52	0.17	0.30	0.19	0.23	0.57
270	-26.52	0.23	0.34	0.23	0.22	0.23
271	-26.52	0.46	0.31	0.23	0.26	0.99
272	-26.52	0.46	0.31	0.23	0.26	0.99
273	-26.51	0.22	0.31	0.27	0.20	0.57
274	-26.51	0.27	0.34	0.00	0.00	0.54
275	-26.49	0.33	0.31	0.24	0.23	1.00
276	-26.48	0.19	0.31	0.00	0.21	0.58
277	-26.46	0.11	0.30	0.26	0.26	1.00
278	-26.45	0.33	0.28	0.00	0.25	0.29
279	-26.42	0.21	0.34	0.00	0.29	0.95
280	-26.40	0.33	0.34	0.00	0.24	0.85
281	-26.38	0.32	0.27	0.22	0.22	0.31
282	-26.38	0.32	0.27	0.22	0.22	0.31
283	-26.37	0.25	0.31	0.00	0.24	0.29
284	-26.34	0.33	0.30	0.20	0.23	0.31
285	-26.34	0.43	0.29	0.00	0.28	1.00
286	-26.32	0.16	0.33	0.00	0.20	0.20
287	-26.31	0.22	0.33	0.25	0.23	0.57
288	-26.31	0.32	0.32	0.20	0.00	0.75
289	-26.31	0.38	0.25	0.00	0.27	0.29

## 【0297】

実施例2：タンパク質の発現

本開示の栄養タンパク質をコードする遺伝子を、大腸菌における発現のためにコドン最適化し、Life Technologies / GeneArt またはDNA 2.0 のいずれかの遺伝子組み立て装置を使用して、組み立てた遺伝子を大腸菌に導入する。

10

20

30

40

50

れかにより合成した。遺伝子は、天然タンパク質を発現するように、または精製を促進するためには2つのアミノ末端タグのうちの1つを含有するように設計した：

【0298】

M G S H H H H H H H H (配列番号495)

【0299】

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H (配列番号494)

【0300】

N c o I - B a m H I 制限酵素部位（第1のタグの場合）を用いて、またはN d e I - B a m H I 制限酵素部位（第2のタグの場合）を用いて、これらの遺伝子構築物を p E T 15 b プラスミドベクター（Novagen）に挿入した。すべての制限酵素は、New England Biolabs から購入した。プラスミドを大腸菌T7 Express (New England Biolabs) に形質転換し、100 mg / 1 カルベニシリンを含有する溶原培地 (LB) プレート上で選択した。単一のコロニーを取り出し、100 mg / 1 カルベニシリンを用いて LB 中 OD<sub>600 nm</sub> = 0.6 まで増殖させ、マスター細胞ストックとしての役割を果たすようにグリセロールストック (10% グリセロールを含む LB 中 (v/v)) として -80°で保存した。

10

【0301】

100 mg / 1 カルベニシリンを含む 2 ml LB (14 mm × 100 mm 培養試験管中) にグリセロールストックからのスタブを接種し、37°および 250 rpm で一晩増殖させた。翌日、100 mg / 1 カルベニシリンを含む 2 ml LB (14 mm × 100 mm 培養試験管中) に一晩培養物を OD<sub>600 nm</sub> = 0.05 まで接種し、30°または 37° ならびに 250 rpm で増殖させた。OD<sub>600 nm</sub> = 0.8 で、1 mM イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (IPTG) を用いて異種遺伝子の発現を開始し、採取するまでさらに 2 時間 (37° で増殖させる場合) または 4 時間 (30° で増殖させる場合) 増殖させた。採取してから、OD<sub>600 nm</sub> を測定し、1 ml アリコートを遠心分離し、上清をデカントした。SDS-PAGE 分析のために細胞を OD<sub>600 nm</sub> = 1.50 に再懸濁し、発現レベルを評価した。10 μl の再懸濁した培養物を、1) Novex (登録商標) NuPAGE (登録商標) 12% Bis-Tris ゲル (Life Technologies)、または 2) Novex (登録商標) 16% Tricine ゲル (Life Technologies) のいずれかにローディングし、標準的な製造者のプロトコルを用いて実行した。標準的な製造者のプロトコルを用いて SimpleBlue (商標) SafeStain (Life Technologies) を使用してゲルを染色し、Molecular Imager Gel Doc (商標) XR+ System (Bio-Rad) を使用して画像化した。過剰発現された異種タンパク質を、分子量マーカーおよび対照培養物と比較することにより同定した。

20

【0302】

この方法を用いて、表 4A および 4B に列挙したタンパク質の組換え発現が観察された。

30

【0303】

表 4A

40

【表 5 A】

配列番号	UniProt	EAA	BCAA	L	C
464	P02754	0.50	0.26	0.15	7
465	P02662	0.44	0.21	0.10	1
466	P29290	0.45	0.21	0.10	0
467	Q5ZMN0	0.34	0.20	0.14	2
468	P35622	0.49	0.20	0.10	4
469	P02586	0.42	0.16	0.06	1
470	P63317	0.46	0.18	0.08	2
471	P63315	0.46	0.18	0.08	2
472	P29290	0.47	0.21	0.09	0
473	P60660	0.47	0.20	0.09	3
474	P02607	0.46	0.18	0.09	4
475	P02605	0.48	0.19	0.08	1
476	Q41784	0.43	0.17	0.08	11
477	P02587	0.42	0.16	0.05	1
478	P10246	0.45	0.16	0.06	1
479	Q030J7	0.50	0.25	0.08	0
480	Q8DHS3	0.45	0.28	0.10	0
481	Q5FJI8	0.46	0.22	0.06	0
482	Q9WZD0	0.51	0.29	0.10	0
483	Q74IP1	0.45	0.20	0.06	0
484	Q84MN0	0.45	0.19	0.09	1
485	P41040	0.45	0.18	0.08	1
486	P06787	0.44	0.23	0.13	0
487	P93087	0.46	0.17	0.07	1
488	P52193	0.42	0.14	0.06	3
489	Q9SP22	0.44	0.14	0.05	2
490	P67975	0.50	0.25	0.13	5

10

20

【0 3 0 4】

表 4 B

【表5B】

配列番号	SolvScore	AggScore	アレルゲン性	毒性	抗栄養性	ヒト相容性
464	-20.98	0.56	1.00	0.00	0.24	0.44
465	-21.19	0.32	1.00	0.23	0.23	0.35
466	-30.62	0.31	0.98	0.23	0.00	0.41
467	-38.14	0.22	0.41	0.23	0.25	0.64
468	-32.67	0.32	0.54	0.26	0.25	0.37
469	-30.64	0.26	0.45	0.25	0.22	0.99
470	-31.40	0.32	0.43	0.21	0.22	0.99
471	-31.40	0.32	0.43	0.21	0.22	0.99
472	-29.63	0.32	1.00	0.25	0.00	0.37
473	-23.50	0.38	0.46	0.00	0.18	1.00
474	-23.76	0.32	0.45	0.22	0.23	0.91
475	-23.80	0.35	0.49	0.23	0.27	0.84
476	-19.97	0.34	0.54	0.00	0.21	0.88
477	-30.84	0.27	0.45	0.25	0.23	0.98
478	-30.31	0.28	0.47	0.25	0.24	0.90
479	-33.16	0.40	0.24	0.34	0.00	0.29
480	-27.07	0.41	0.30	0.41	0.24	0.43
481	-29.97	0.29	0.35	0.42	0.30	0.36
482	-29.38	0.37	0.29	0.38	0.23	0.36
483	-30.86	0.24	0.30	0.38	0.00	0.40
484	-27.55	0.34	0.46	0.22	0.24	0.64
485	-28.96	0.24	0.49	0.22	0.21	0.91
486	-23.64	0.35	0.46	0.25	0.26	0.59
487	-29.02	0.23	0.51	0.23	0.21	0.89
488	-30.63	0.26	0.49	0.00	0.22	0.93
489	-31.29	0.25	0.55	0.00	0.22	0.51
490	-21.19	0.47	0.99	0.22	0.24	0.43

## 【0305】

## 実施例3：組換え栄養タンパク質の大量生成

本開示に記載されるような栄養タンパク質を大量に生成するための代表的なプロトコルは次の通りである。

## 【0306】

100mg / 1カルベニシリンを含む5mL LB (50mL バッフル付きPyrex (登録商標) 振盪フラスコ中) に、栄養タンパク質をコードする組換え遺伝子を含む組換え大腸菌株のグリセロールストックからのスタブを接種し、後期対数増殖期まで37および250rpmで増殖させる(OD600nm = 2)。2.5L Ultra Yie 1d Flask (Thomson Instrument Company) に、500mL の滅菌水および十分なEnBase EnPresso (商標) 錠剤(BioSilta)を接種し、500mL の増殖培地を作製する。この培地に、100mg / 1カルベニシリン、0.001% Industrol 204消泡剤、および0.6U / 1

EnzI'm (BioSilta) を補充する。振盪フラスコにOD600nm = 0.05まで接種し、30および250rpmで16時間増殖させる。増殖培地にEnPresso (商標) Booster錠剤(BioSilta)、1.2U / 1 EnzI'm、および1mM IPTGを補充して異種タンパク質の生成を誘導する。30および250rpmでさらに8~24時間振盪させた後、遠心分離によりフラスコから採取し、上清をデカントし、細胞湿重量を測定した。この段階では、約20g WCW (細胞湿重量のグラム) / 培地1リットルが典型的に回収される。

## 【0307】

各振盪フラスコによる発酵から採取された細胞を、25mLのIMAC Equil i

10

20

30

40

50

b r a t i o n S o l u t i o n ( 3 0 m M I m i d a z o l e 、 5 0 m M P h o s p h a t e 、 0 . 5 M N a C l 、 p H 7 . 5 ) に懸濁する。懸濁した細胞を、次いで、氷上で超音波処理を行って溶解させる。溶解した細胞を 6 0 分間遠心分離し、デカントする。細胞片を破棄し、上清を 0 . 2  $\mu$ m 濾過する。次いで、フィルタにさらに 1 0 mL の I M A C E q u i l i b r a t i o n S o l u t i o n を流す。これらの濾過したタンパク質溶液を、次いで、固定化金属親和性クロマトグラフィー( I M A C )により精製する。

### 【 0 3 0 8 】

I M A C 樹脂( G E H e a l t h c a r e 、 I M A C S e p h a r o s e 6 F a s t F l o w ) にニッケルを加えて平衡化する。3 0 mL の各タンパク質溶液を 5 mL I M A C カラムに充填し、さらなる平衡化溶液で洗浄し、未結合の不純物を除去する。次いで、該当するタンパク質を 1 5 mL の 0 . 5 M N a C l 、 0 . 2 M イミダゾール( p H 7 . 5 ) で溶出する。この段階で、精製タンパク質は、典型的には S D S - P A G E により少なくとも 9 0 % 純粋であることが示される。約 2 0 ~ 6 0 mg の各タンパク質を I M A C 溶出画分から回収する。各 I M A C 溶出画分を配合液( 2 0 m M H E P E S 、 p H 7 . 5 ) に透析することによりバッファー交換を行う。バッファー交換後、すべての下流プロセシングのためにタンパク質溶液を回収する。

### 【 0 3 0 9 】

#### 実施例 4 : 栄養タンパク質の可溶性発現の予測

一連の 2 9 2 個の栄養タンパク質をコードするオープンソリーディングフレームをクローニングし、大腸菌に導入し、実施例 2 の方法を用いて組換えタンパク質の発現を評価した。用いたシステムにおいて、1 6 3 個のタンパク質が発現されたと同定され、1 2 9 個は発現されなかった。発現された 1 6 3 個のタンパク質のうち、1 2 5 個を可溶性発現について調べた。7 5 個は可溶性に発現されたが、5 0 個は発現されなかつたことが分かった。

### 【 0 3 1 0 】

図 1 は、大腸菌発現スクリーンにおけるタンパク質発現の 2 次元ヒストグラムを示す。図 1 は、発現されるタンパク質の相対的尤度( 対数スケールで ) を溶媒和スコア( Y 軸 ) と凝集スコア( X 軸 ) の関数として表している。ヒストグラム上の色の濃い印は、より多い数のタンパク質が発現されたことを示し、薄い色の印は、より少ない数のタンパク質が発現されたことを示す。図 1 は、良好に発現したタンパク質が、プロットの左上領域においてクラスター化する傾向があり、溶媒和スコアはよりマイナスであり( - 2 0 ) 、凝集スコアはより低い( 0 . 7 5 ) ことを示している。よりマイナスでない溶媒和スコア( - 1 5 ) および大きな凝集スコア( 1 ) を有する良好に発現されたタンパク質の例は、ほとんど存在しなかつた。この結果は、- 2 0 以下の溶媒和スコアおよび 0 . 7 5 以下の凝集スコアを有する栄養タンパク質が、このシステムにおいて発現される確率がより高いことを示している。

### 【 0 3 1 1 】

図 2 は、大腸菌発現スクリーンにおける可溶性タンパク質の発現数の 2 次元ヒストグラムを示す。図 2 は、溶媒和スコア( Y 軸 ) と凝集スコア( X 軸 ) の関数として可溶性に発現されるタンパク質の相対的確率( 対数スケール上 ) を示す。この場合も同様に、ヒストグラム上の色の濃い印は、より多い数のタンパク質が発現されたことを示し、薄い色の印は、より少ない数のタンパク質が発現されたことを示す。図 2 は、可溶性に発現したタンパク質が、プロットの左上領域においてクラスター化する傾向があり、溶媒和スコアはよりマイナスであり( - 2 0 ) 、凝集スコアはより低い( 0 . 5 ) ことを示している。よりマイナスでない溶媒和スコア( - 1 5 ) および大きな凝集スコア( 0 . 7 5 ) を有する可溶性に発現されたタンパク質の例は、ほとんど存在しなかつた。この結果は、- 2 0 以下の溶媒和スコアおよび 0 . 5 以下の凝集スコアを有する栄養タンパク質が、このシステムにおいて可溶性に発現される確率がより高いことを示している。

### 【 0 3 1 2 】

10

20

30

40

50

### 実施例 5 : 溶解性スクリーニング

実施例 2 および 3 に記載されるように生成した 9 個の栄養タンパク質の溶解性を、遠心濃縮後にタンパク質濃縮アッセイにより調べた。Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay (Thermo Scientific) のプロトコルに従って、280 nm の吸光度（適用される場合）で、20 mM HEPES (pH 7.5) 中の試料をタンパク質濃度について検査した。これらの測定値に基づいて、10 mg のタンパク質を Amicon Ultra 3 kDa 遠心濾過器 (Millipore) に添加した。10,000 Xg で 30 分間の遠心分離により試料を濃縮した。最終的な濃縮された試料を、沈殿したタンパク質および色について調べ、次いで、上記のようにタンパク質の濃度について検査した。その結果を表 5 に示す。

10

#### 【0313】

表 5

#### 【表 6】

配列番号	外見	濃度(g/L)
466	透明な薄黄色	265
467	無色透明	53
475	透明な黄色	176
480	無色透明	91
481	無色透明	107
483	無色透明	120
484	透明な薄黄色	133
485	透明な薄黄色	192
486	透明な薄黄色	335

20

#### 【0314】

これらの栄養タンパク質の溶解性は、乳清 (12.5 g / L) および大豆 (10 g / L) に関する典型的に見られる濃度よりも著しく高いことが分かった (Pelegrine, D. H. G. & Gasparotto, C. A., 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. LWT - Food Science and Technology, p. 77 - 80, Lee, K. H., Ryu, H. S. & and Rhee, K. C., 2003. Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. Journal of the American Oil Chemists' Society, pp. 85 - 90)。これは、本明細書に開示される栄養タンパク質の有用性を証明するものである。例えば、栄養タンパク質の溶解性は、しばしばこの様式で送達されるタンパク質を特徴づける「粉っぽさ」を回避しながら、できる限り少量の体積で高品質タンパク質のコンプライアントな送達を向上し得る。これは、例えば、高齢者または他の対象にタンパク質を送達するのに有用であり得る。

30

40

#### 【0315】

### 実施例 6 : 安定性スクリーニング

栄養タンパク質の熱安定性は、タンパク質が有用な有効期間を有する可能性があるかどうかの洞察を提供する。実施例 6 および 7 に記載されるように生成したタンパク質の試料を、迅速な熱安定性スクリーニング法を用いて並行してスクリーニングした。この方法では、温度の上昇に伴ってタンパク質が変性するにつれて形成する凝集タンパク質に結合する疎水性色素 (Enzo Life Sciences, ProteoStat (登録商

50

標) Thermal shift stability assay kit) の存在下で、タンパク質を 2 つの代表的な配合物中で 25 から 95 に徐々に加熱した (Niesen, F. H., Berglund, H. & Vadadi, M., 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nature Protocols, Volume 2, pp. 2212 - 2221)。結合すると色素の蛍光が著しく増加するので、次いでそれを rtPCR 機器により記録し、タンパク質の溶融曲線によって表す (Lavinder, J. J., Hari, S. B., Sullivan, B. J. & Magilery, T. J., 2009. High-Throughput Thermal Scanning: A General, Rapid Dye-Binding Thermal Shift Screen for Protein Engineering. Journal of the American Chemical Society, pp. 3794 - 3795.)。熱シフトが終了した後、試料を不溶性沈殿物について調べ、分析用サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によってさらに分析した。

10

20

30

40

## 【0316】

タンパク質溶液 (12.5 mg/ml) を PBS および 20 mM HEPES pH 7.7 バッファー) の両方において調製した (各々が、1 X Proteostat TS Detection Reagent を含有する)。色素の蛍光をモニタリングしながら、リアルタイム PCR (rtPCR) サーモサイクラーを用いて、各溶液の試料を 0.5 / 30 秒で 25 から 95 に徐々に加熱した。この熱スキャンから、蛍光の増加が観察された場合、最も強い勾配を有する温度から凝集体の温度を決定した ( $T_{agg}$ )。アッセイを補完するために、熱シフトの前および後に試料を採取し、大きな可溶性凝集体を検出することができる SEC (GE Healthcare-Superdex 75 / 150) により分析した。本開示の 3 つの栄養タンパク質および乳清標準物質の結果を表 6 に提示する。SEC によって検出された可溶性凝集体の存在は、観察された場合は「有」、観察されなかった場合は「無」と記載され、乳清標準物質の「該当なし」の記入は、不溶性沈殿物が生成されたために SEC 分析が行われなかつたことを示す。栄養タンパク質について、「-」はアッセイが行われなかつたことを示す。

## 【0317】

表 6

## 【表 7】

配列番号	HEPES - $T_{agg}$	PBS - $T_{agg}$	HEPES - SEC 凝集体	PBS - SEC 凝集体
466	95	-	-	-
467	55.5	54.5	有	有
471	95	-	-	-
475	95	-	-	-
479	95	-	無	-
480	64.5	59.5	有	有
481	95	95	無	無
483	95	95	無	無
484	95	-	有	-
485	95	-	有	-
486	95	95	無	無
乳清	79	81.5	該当なし	該当なし

## 【0318】

表 6 に示すように、タンパク質の多くは乳清よりも高い HEPES  $T_{agg}$  を有し、

50

95 (本アッセイの上限である)でいずれの凝集体も形成しないものもあるため、乳清よりも安定であると予想される。

### 【0319】

#### 実施例7：消化率スクリーニング - 消化半減期の決定

タンパク質の消化率をスクリーニングする目的は、潜在的に安全ではないアレルゲン性タンパク質を除外すること、およびペプチドの生物学的利用能の予測因子として消化の相対的完全性を決定することである。このスクリーニング方法は、模擬胃内消化および模擬腸内消化といったタンパク質消化の両方の段階を含む、生理的に適切なインビトロ消化反応を利用する (Moreno, J. F. et al., 2005. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. FEBS Journal, pp. 341 - 352)。<sup>10</sup>

試料は、反応を通して採取することができ、チップ電気泳動およびLC-QTOF-MSを用いてインタクトなタンパク質およびペプチド断片について分析することができる。アレルゲン性を有するタンパク質は、消化プロテアーゼに耐性を示すためにアレルギー反応を引き起こすより高いリスクを有するタンパク質またはタンパク質の大きな断片を同定することにより評価することができる (Goodman, R. E. et al., 2008. Allergenicity assessment of genetically modified crops - what makes sense?. Nature Biotechnology, pp. 73 - 81)。<sup>20</sup> 消化率は、いかに効率的にタンパク質がペプチドに分解されるかを判定することによって測定される (Daniel, H., 2003. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. Annual Review of Physiology, Volume 66, pp. 361 - 384)。

### 【0320】

本方法では、アッセイ条件およびプロテアーゼ濃度が生理的に適切である、タンパク質のインビトロ消化のための自動化アッセイを用いた (Moreno, F. J., Mackie, A. R. & Clare Mills, E. N., 2005. Phospholipid interactions protect the milk allergen α-Lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion. Journal of agricultural and food chemistry, pp. 9810 - 9816, Martos, G., Contreras, P., Molina, E. & Lopez-Fandino, R., 2010. Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. Journal of Agricultural and food chemistry, pp. 5640 - 5648, Moreno, J. F. et al., 2005. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. FEBS Journal, pp. 341 - 352)。<sup>30</sup> 消化の第1段階は、模擬胃液 (SGF) 中であり、pH 1.5 および (1 : 10 w/w) のペプシン : 基質の比率で配合される。消化の第2段階は、模擬腸液 (SIF) 中であり、pH 6.5 の胆汁酸塩とともに、(1 : 4 : 400 w/w) トリプシン : キモトリプシン : 基質の比率で配合される。流動食の 90 % が胃から小腸に通過するのに必要な時間の長さである 120 分間、模擬胃液中でタンパク質を処理し (Kong, F. & Singh, R. P., 2008. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. Journal of Food Science, pp. 67 - 80)、次いで、模擬腸液で 120 分処理する。両方の反応全体にわたって試料の時点を採用し、分<sup>40</sup>

10

20

30

40

50

50

析のために反応停止させる。ペプシンによって消化されやすいウシ血清アルブミンは、S G F 溶液の陽性対照であり、天然の状態でペプシンに耐性を示すが S I F 中で消化される

ラクトグロブリンは、S I F 溶液の陽性対照である。電気泳動を用いてインタクトなタンパク質および大きな断片を検出した。チップ電気泳動には、H T L o w M W P r o t e i n A s s a y K i t を搭載した C a l i p e r L a b c h i p G X I I を使用して、インタクトなタンパク質および 4 k D a よりも大きなあらゆる消化断片のサイズおよび量をモニタリングした。観察されるインタクトなタンパク質の量を経時的にモニタリングすることにより、S G F について消化の半減期 ( $\tau_{1/2}$ ) を算出し、S G F による消化の後にインタクトなタンパク質が検出された場合、S I F における消化の半減期を算出した。

10

### 【0321】

この方法は、実施例 2 および 3 に記載されるように生成した本開示の 11 個の栄養タンパク質と、天然および組換え卵白アルブミン（それぞれ、O V A および r O V A、配列番号 491）ならびに ラクトグロブリン（それぞれ、B L G および r B L G、配列番号 464）タンパク質、そして乳清標準物質の消化半減期を分析するために用いられた。これらの実験の結果を表 7 に要約する。模擬腸液の「該当なし」の記入は、S G F による消化の後にインタクトなタンパク質が検出されなかったことを示す。

### 【0322】

表 7

### 【表 8】

20

配列番号	消化 $\tau_{1/2}$ (分)	
	模擬胃液	模擬腸液
466	0.9	該当なし
467	3	該当なし
471	0.3	該当なし
475	0.3	該当なし
479	0.4	該当なし
480	1	該当なし
481	2	該当なし
483	0.6	該当なし
484	0.3	該当なし
485	0.3	該当なし
486	0.7	該当なし
B L G(464)	77	4
r B L G(464)	50	0.7
O V A(491)	18	1
r O V A(491)	5	該当なし
乳清	99	4

30

40

### 【0323】

表 7 に示される結果は、本開示の 11 個の栄養タンパク質はすべて S G F によって完全に消化され、2 分以下の S G F 半減期を有することを示す。比較すると、乳清は、S G F によって完全には消化されず、99 分の S G F 半減期および 4 分の S I F 半減期を有する。この試験は、本開示の栄養タンパク質が、容易に消化される可能性が高く、経口摂取さ

50

れた時にアレルギー反応を誘発する可能性が低いことを示唆している。

【0324】

また、表7の結果は、本開示に従って生成された組換え ラクトグロブリンおよび卵白アルブミンは、両方とも、それらの天然に存在するカウンターパートよりも消化されやすいことも示している。タンパク質が分解される速度は、消化管プロテアーゼの到達性を改善または制限する特性を選択することにより制御することができる。この能力は、2つの典型的なタンパク質特性であるグリコシル化およびジスルフィド架橋結合について実証することができる。多くの天然に存在するタンパク質と同様に、天然に存在するOVAおよびBLGは、それらの宿主生物によってグリコシル化される。対称的に、宿主生物（この場合は大腸菌）がグリコシル化しないため、本開示に従って生成される組換えタンパク質はグリコシル化されない。本開示による組換え栄養タンパク質におけるグリコシル化の欠如は、より消化されやすいタンパク質をもたらし得る。さらに、BLGは、消化を遅らせるかまたは妨げることが分かっている4つのジスルフィド結合を有する。これらのジスルフィド結合が破壊されると、消化の速度が増加する（Reddy, I. M., Kellila, N. K. D. & Kinsella, J. E., 1988. Structural and conformational Basis of the Resistance of b-Lactoglobulin to Peptic and Chymotryptic Digestion. J. Agric. Food Chem., Volume 36, pp. 737-741）。本開示による組換え栄養タンパク質におけるジスルフィド結合形成の欠如または破壊は、より消化されやすいタンパク質をもたらし得る。

10

20

【0325】

実施例8：消化率スクリーニング - 消化生成物の分析

実施例2および3に記載されるように生成した2つの栄養タンパク質（配列番号762および763）を、実施例7に記載されるようにSGFおよびSIFによる消化に供した。両方のタンパク質はSGF中で完全に消化され、SGF半減期を表8に示す。

【0326】

表8

【表9】

消化 $\tau_{1/2}$ (分)

30

配列番号	模擬胃液	模擬腸液
486	0.7	該当なし
493	6	該当なし

【0327】

SGFおよびSIFによる消化の後に存在するペプチドを検出および同定するために、SGFおよびSIF消化物の試料をLC/Q-TOF MS/MSにより分析した。SGF消化物の試料は、LC/Q-TOF MS/MSにより直接分析したが、SIFタンパク質の消化には、LC/Q-TOF MS/MSによる検出および同定の前に、胆汁酸を除去するためのSCXによる精製が必要であった。クロマトグラムからペプチドを抽出し、Bioconform Software (Agilent)を使用して同定した。ペプチドの配列割当は、正確な質量マッチング( $\pm 10 \text{ ppm}$ )に基づいており、MS/MS断片化によってさらに確認された。その結果を表9および10に示す。

40

【0328】

表9

【表 10】

(配列番号 486)			
SGF ペプチド 120 分	配列番号	SIF ペプチド 120 分	配列番号
LL		SE	
LAL		PSE	
HVL		HVL	
LEL		FKV	
LALA	496	HQI	
LLLD	497	PSEA	498
IAEF	499	REV	
IQQF	500	FDK	
YDKL	501	AEFK	502
SNLTE	503	LKHV	504
ELLEA	505	SSSEL	506
EELAL	507	FKVF	508
DDLLL	509	AELKH	510
LAYDK	511	LKHVL	512
TKTRL	513	FKEAF	514
DLDHQ	515	NGSISS	516
GTLENL	517	SLGLSPS	518
EKLTDA	519	GEKLTD	520
AEVDDM	521	ELATVM	522
LDDLLL	523	GSGEINI	524
LDLDHQ	525	RSLGLSP	526
DLKKKL	527	ELKHVL	528
TKTKTRL	529	KLTDAEV	530
SQRLEE	531	FKVFDK	532
AEVDDML	533	AEVDDML	534
QQUELDDL	535	DAEVDDM	536
LEKTKTR	537	AELKHVL	538
LEKTKTR	539	HVLTSIGE	540
GTLENLEE	541	SIGEKLT	542
QQUELDDLL	543	RSLGLSPSE	544
KLEKTKTRLQ	545	VLTSIGEKL	546
SRQLKSNDSEQ	547	TSIGEKLT	548
EKTKTRLQQEL	549	HVLTSIGEK	550
YDKLEKTKTRL	551	AELKHVLTS	552
LAYDKLEKTKTRL	553	RSLGLSPSEA	554
EELKKKKLKDDEL	555	SSNLTEEQIA	556
EELKKKKLKDLELL	557	RSLGLSPSEAE	558
AELKHVLTSIGEKLT	559	KVFDKNGDGLISA	560
MGSHHHHHHHSSNL	561	FDKDNNGSISSSEL	562
LREVSDGSGEINIQQF	563	REVSDGSGEINIQQ	564
AAELKHVLTSIGEKLT	565	DVDGNHQIEFSEF	566
AELKHVLTSIGEKLTDAE	567	LREVSDGSGEINIQQ	568
AYDKLEKTKTRLQQEL	569	REVSDGSGEINIQQF	570
AAELKHVLTSIGEKLTDAE	571	LREVSDGSGEINIQQFAALLS	572
LENLEELKKKKLKDDEL	573		
KLEKTKTRLQQELDDLL	574		
DKLEKTKTRLQQELDDLL	575		
LAYDKLEKTKTRLQQELDDL	576		
LALAYDKLEKTKTRLQQELDDL	577		

【0329】

表 10

## 【表 11】

(配列番号 491)			
SGF ペプチド 120 分	配列番号	SIF ペプチド 120 分	配列番号
GVL		TKH	
ALL		INDI	578
LVL		HLVL	579
IGVL	580	TIKF	581
TIKF	582	IGVLD	583
TIKF	584	RNLD	585
EVYDL	586	IGVLDV	587
LND SVQ	588	QTIKF	589
IWVIND	590	VQTIKF	591
DLND SVQ	592	SVQTIKF	593
SVQTIKF	594	KCAKCISMIGVL	595
HHLVLG ALLD	596	EKCAKCISMIGV	597
HHHHHHHLVL	598	HEFKRTTYSE	599
HHHHHHHHHLVL	600	SHKFRNLDKDL	601
DVT KHEFKRTTY	602	ISMIGVLDVTKHE	603
SHHHHHHHHLVL	604		
TKHEFKRTTYSEN	605		
GSHHHHHHHHLVLG	606		
MGSHHHHHHHHHLVL	607		
KRTTYSENEVYDLN	608		

## 【0330】

表 9 および 10 に見られるように、各タンパク質は、2 ~ 22 個のアミノ酸（配列番号 486）または 2 ~ 13 個のアミノ酸（配列番号 491）のサイズに及ぶ、複数のより小さなペプチド断片に消化された。これらのペプチド断片のうちのいずれも、任意の既知のアレルゲンと相同であるとは認められなかった。

## 【0331】

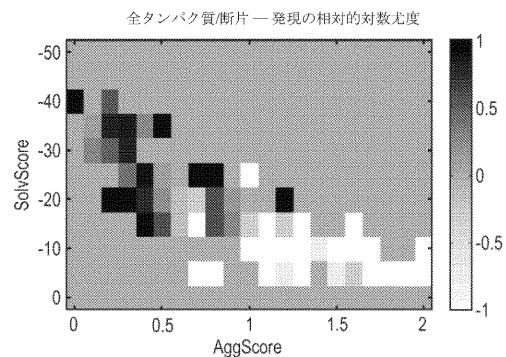
本発明を、その特定の実施形態を参照して説明してきたが、当業者は、本発明の真の主旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更が行われてもよく、均等物が置き換えられてもよいことを理解されたい。また、特定の状態、材料、物質の組成、プロセス、単数または複数のプロセスステップを、本発明の目的、主旨、および範囲に適応させるために、多くの修正が行われてもよい。すべてのそのような修正は、特許請求の範囲内であることが意図される。

10

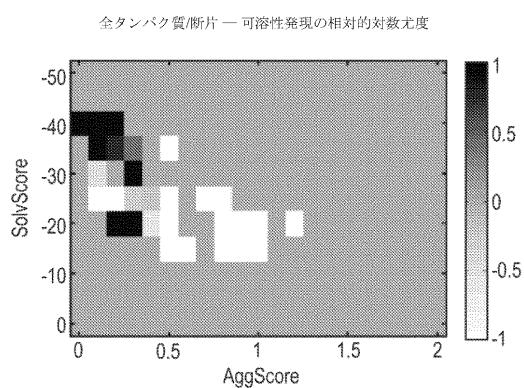
20

30

【図1】



【図2】



【配列表】

[2015519879000001.app](#)

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/032212
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C07K 14/435(2006.01)i, A23J 3/04(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/74(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C07K 14/435; C07K 1/34; A23J 3/00; A23L 1/29; A23L 2/66; A23L 1/212; A23L 2/39; A61J 15/00; C07K 14/415; A23J 3/04; C12N 15/12; C12N 15/63; C12N 15/74</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>eKOMPASS(KIPO internal) &amp; Keywords: isolated nutritive protein, first polypeptide sequence, solubility, brance chain amino acid residue</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2010-0330250 A1 (SEGALL, KEVIN I. et al.) 30 December 2010 See paragraph [0161]; claim 1; table 5.	1-3, 36-37 4-5, 38-40
X A	US 2012-0046449 A1 (GREEN, BRENT E. et al.) 23 February 2012 See claims 1 and 10-12.	36-37 1-5, 38-40
A	WO 2006-047308 A2 (IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC) 04 May 2006 See claim 1.	1-5, 36-40
A	US 3870801 A (TOMBS, MICHAEL PETER) 11 March 1975 See claims 6 and 14.	1-5, 36-40
A	WO 2012-006074 A1 (NESTEC S.A.) 12 January 2012 See abstract.	1-5, 36-40
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "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		"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 "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 "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 "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 June 2013 (28.06.2013)	Date of mailing of the international search report <b>28 June 2013 (28.06.2013)</b>	
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. 82-42-481-8150	
		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. <b>PCT/US2013/032212</b>
---

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 105-114  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 105 to 114 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.: See below  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims Nos.: 14,16,18,19,29,31,32,49,51,53,54,64,66,67,72,74-76,79,81-84,86,88-102.  
- Claims 14, 16, 18, 19, 29, 31, 32, 49, 51, 53, 54, 64, 66, 67, 72, 74-76, 79, 81-84, 86 and 88-102 are unclear since they refer to claims, which are not searchable due to not being drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a).
3.  Claims Nos.: See Extra Sheet  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2013/032212**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0330250 A1	30.12.2010	AU 2010-268659 A1 CA 2766822 A1 CN 102639000 A EP 2448424 A1 JP 2012-531214 A KR 10-2012-0047236 A KR 20120047236 A MX 2012000193 A US 2012-171348 A1 WO 2011-000097 A1	09.02.2012 06.01.2011 15.08.2012 09.05.2012 10.12.2012 11.05.2012 11.05.2012 25.06.2012 05.07.2012 06.01.2011
US 2012-0046449 A1	23.02.2012	AU 2011-291396 A1 CA 2808325 A1 WO 2012-021980 A1	04.04.2013 23.02.2012 23.02.2012
WO 2006-047308 A2	04.05.2006	US 2008-0095914 A1 US 2012-095190 A1 US 8142832 B2 WO 2006-047308 A3	24.04.2008 19.04.2012 27.03.2012 16.04.2009
US 03870801 A	11.03.1975	US 03870801 A	11.03.1975
WO 2012-006074 A1	12.01.2012	AU 2011-276545 A1 CN 102958386 A EP 2584920 A1 SG 186086 A1	13.12.2012 06.03.2013 01.05.2013 30.01.2013

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. <b>PCT/US2013/032212</b>
---

(Continuation of Box No. II.)

Claims Nos.: 6-13,15,17,20-28,30,33-35,41-48,50,52,55-63,65,68-71,73,77-78,80,85,87,103-114.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100183243

弁理士 野呂 祐司

(72) 発明者 ディビッド・アーサー・ベリー

アメリカ合衆国 0 2 4 4 5 マサチューセッツ州ブルックライン、キャメロン・ストリート 2 0 番、ナンバー 4 0 2

(72) 発明者 ブレット・アダム・ボイジャン

アメリカ合衆国 0 2 1 2 7 マサチューセッツ州サウス・ボストン、ウェスト・ブロードウェイ 3 4 4 番、アパートメント・ナンバー 2

(72) 発明者 ナサンエル・ダブリュー・シルバー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ケンブリッジ・ストリート 1 2 1 8 番、ナンバー 2

(72) 発明者 ジェフリー・フォン・マルツァーン

アメリカ合衆国 0 2 1 1 3 マサチューセッツ州ボストン、セイレム・ストリート 6 1 番、アパートメント 5

(72) 発明者 ラジーブ・チラクル

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、メモリアル・ドライブ 8 4 0 番、サード・フロア、プロニュートリア・インコーポレイテッド内

(72) 発明者 マイケル・ジェイ・ハミル

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、メモリアル・ドライブ 8 4 0 番、サード・フロア、プロニュートリア・インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B018 ME01 ME02

4B024 AA01	AA05	BA80	CA01	CA04	CA11	DA05	EA04	GA11
4B064 AG01	CA02	CA19	CC24	DA01	DA10			
4B065 AA01X	AA26X	AB01	BA02	CA41	CA44			
4C084 AA02	AA19	BA44	CA53	CA59	MA02	MA16	MA23	MA28
					MA34			
MA43	MA52	MA55	NA05	NA14	ZC211			
4H045 AA10	AA20	AA30	BA09	EA01	EA20	FA74		