

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6146934号
(P6146934)

(45) 発行日 平成29年6月21日 (2017. 6. 21)

(24) 登録日 平成29年5月26日 (2017. 5. 26)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	9/88	(2006. 01)	C 1 2 N	9/88	
C 0 7 K	1/18	(2006. 01)	C 0 7 K	1/18	
C 0 7 K	1/20	(2006. 01)	C 0 7 K	1/20	
C 0 7 K	1/22	(2006. 01)	C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	1/36	(2006. 01)	C 0 7 K	1/36	

請求項の数 25 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-503433 (P2015-503433)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月25日 (2013. 3. 25)
 (65) 公表番号 特表2015-512639 (P2015-512639A)
 (43) 公表日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/033716
 (87) 国際公開番号 W02013/148580
 (87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)
 審査請求日 平成28年3月4日 (2016. 3. 4)
 (31) 優先権主張番号 13/830, 494
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/615, 629
 (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)

(73) 特許権者 508010880
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ コロラド, ア ボディー コ
 ーポレイト
 アメリカ合衆国、80203 コロラド州
 、デンバー、グラント ストリート 18
 00、エイズ フロアー (番地なし)
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 カリージョ, リチャード ジー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 09, オークランド, 45ティーエイ
 チ ストリート 725

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シスタチオンβ-シクターゼの精製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

シスタチオンβ-シクターゼ(CBS)タンパク質を精製するための方法であって、
 該CBSタンパク質が、天然に存在するトランケート型CBSタンパク質、化学的にトラン
 ケートされたトランケート型CBSタンパク質または遺伝子操作されたトランケート型
 CBSタンパク質でありかつ配列番号2の382~532、382~550、および54
 3~550からなる群における範囲のうちの1つから選択されるアミノ酸位置でトランケ
 ーションが開始するC末端欠失バリエーションであり、該CBSタンパク質が、精製タグを含
 有せず、該方法が、

- (a) 1つまたは複数の不純物を含むCBS含有溶液を用意するステップと、
 - (b) イオン交換クロマトグラフィーカラムを使用して該CBS含有溶液のクロマトグ
 ラフィーによる最初の分離を実施するステップと、
 - (c) 亜鉛により荷電した金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を
 使用してクロマトグラフィーによる2番目の分離を実施し、それにより、該不純物を除去
 するステップと
- を含む方法。

【請求項2】

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)カラムを使用してクロマトグラフィーに
 よる分離を実施するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

10

20

セラミックヒドロキシアパタイト樹脂を使用してクロマトグラフィーによる分離を実施するステップをさらに含む、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記イオン交換クロマトグラフィーカラムが弱陰イオン交換体である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記弱陰イオン交換体が D E A E - セファローズ F F カラムである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

イミダゾールを含む溶出緩衝液を用いて前記金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂から C B S を溶出させるステップをさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記トランケート型 C B S タンパク質が、配列番号 3 によって識別されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 C B S 含有溶液が清澄化された C B S 溶液である、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 C B S が組換え細胞において産生される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記組換え細胞が細菌細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 C B S 含有溶液が、C B S をコードする核酸配列を含む組換え構築物を発現する組換え細菌細胞をホモジナイズすることによって得られる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 C B S 核酸がトランケート型 C B S タンパク質をコードする、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 C B S 核酸配列が配列番号 4 を含む、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記組換え細胞が E . c o l i 細胞である、請求項 9 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記トランケート型 C B S タンパク質をコードする核酸配列が、E . c o l i 細胞において発現させるために最適化されている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

濃縮された C B S 溶液を作製するための方法であって、該 C B S タンパク質がその天然に存在するトランケート体、化学的に切断されたトランケート体または遺伝子操作されたトランケート体でありかつ配列番号 2 の 382 ~ 532、382 ~ 550、および 543 ~ 550 からなる群における範囲のうちの 1 つから選択されるアミノ酸位置でトランケーションが開始する C 末端欠失バリエーションであり、該 C B S タンパク質が、精製タグを含有せず、該方法が、

40

(a) 1 つまたは複数の不純物を含む C B S 含有溶液を用意するステップと、

(b) 亜鉛により荷電した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂を使用して該 C B S 含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施し、それにより、該不純物を除去するステップとを含む方法。

【請求項 17】

50

トランケート型CBSタンパク質が、配列番号3によって識別されるアミノ酸配列を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記CBS溶液が清澄化されたCBS溶液である、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

前記CBSが組換え細胞において産生される、請求項16から18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記組換え細胞が細菌細胞である、請求項19に記載の方法。

10

【請求項21】

前記CBS溶液が、CBSをコードする核酸配列を含む組換え構築物を発現する組換え細菌細胞をホモジナイズすることによって得られる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記CBSがトランケート型CBSタンパク質をコードする、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記CBS核酸配列が配列番号4を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記細菌細胞がE. coli細胞である、請求項16から23のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項25】

前記トランケート型CBSタンパク質をコードする核酸配列が、E. coli細胞において発現させるために最適化されている、請求項16から24のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年3月26日に提出された米国特許仮出願第61/615,629号および2013年3月14日に提出された米国特許出願第13/830,494号の利益を請求し、これらの開示は各々参照によって組み込まれる。

30

【0002】

本発明は、一般には、シスタチオニン - シンターゼ (CBS)、特に、そのトランケート型バリエーションを精製するための方法に関する。本発明は、前記精製方法によって作製される実質的に純粋なCBSの組成物にも関する。

【背景技術】

【0003】

シスタチオニン - シンターゼ (CBS) は、真核生物におけるホモシステイン (Hcy) 代謝において重要な役割を果たす (Muddら、2001年、The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease、第8版、2007~2056頁、McGraw-Hill、New York)。CBS酵素により、セリンとホモシステインのピリドキサル5'-リン酸 (PLP; ビタミンB₆) 依存性縮合が触媒されてシスタチオニンが形成され、次いでこれが、別のPLP依存性酵素であるシスタチオニン - リアーゼによるシステインの産生に使用される。トランススルフィレーション経路を有する哺乳動物の細胞では、CBSは、Hcyのメチオニンへの再メチル化またはシステインの生合成におけるその代替的使用の間の調節上重要な位置にある。これらの2つの競合経路間の相対的なフラックスは、おおむね同等であり、細胞内S-アデノシルメチオニン (AdoMet) 濃度により制御される (FinkelesteinおよびMartin、1984年、J. Biol. Chem. 40

50

259巻：9508～13頁)。AdoMetにより、哺乳動物のCBS酵素が5倍も活性化され、見かけの解離定数は15 μ Mになる(Finkelsteinら、1975年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 66巻：81～87頁；Roperら、1992年、Arch. Biochem. Biophys. 298巻：514～521頁；Kozichら、1992年、Hum. Mutation 1巻：113～123頁)。

【0004】

ヒトCBSのC末端調節ドメインは、約140アミノ酸残基からなる(Keryら、1998年、Arch. Biochem. Biophys. 355巻：222～232頁)。この領域は、ヒト酵素の四量体化およびAdoMet活性化のために必要である(Keryら、1998年、同上)。C末端調節領域は、以前に定義された「CBSドメイン」も包含する(Bateman、1997年、Trends Biochem. Sci. 22巻：12～13頁)。これらの疎水性配列(CBS1およびCBS2)は、それぞれ配列番号1のアミノ酸残基416～468および486～543にわたり、他の点では無関係のタンパク質内で広範囲に保存されている。これらの機能は依然として不明であるが、熱により誘導されるCBS活性化の移り変わりが鋭いこと、およびこのドメインにおける変異により酵素が構成的に活性化され得るという知見により、これらがC末端領域の自己阻害的(autoinhibitory)機能において役割を果たすことが示される(Janosikら、2001年、Biochemistry 40巻：10625～33頁；Shanら、2001年、Hum. Mol. Genet. 10巻：635～643頁；MilesおよびKraus、2004年、J. Biol. Chem. 279巻：29871～4頁)。酵母CBSのC末端領域にも2つの良く保存されたCBSドメインが存在し、これらはヒト酵素とほぼ同じ長さである。

【0005】

健康な正常な個体では、HcyからシスタチオンへのCBS媒介性変換は、システイン(Cys)へのメチオン(Met)代謝の律速的な中間ステップである。ビタミンB₆がこのプロセスに必須の補酵素である。CBS酵素における特定の遺伝子変異を有する患者では、Hcyのシスタチオンへの変換は遅くなる、または存在せず、その結果、酵素の基質(Hcy)の血清中濃度が上昇し、それに対応して酵素産物(シスタチオン)の血清中濃度が低下する。Hcyの血清中レベルが上昇し、同時にそれが尿中に排出される臨床的状態は、集合的にホモシスチン尿症として公知である。

【0006】

CBSの欠乏は、血漿、組織および尿におけるホモシステインレベルの重度な上昇をもたらす、重篤な生命にかかわる疾患である遺伝性ホモシスチン尿症の最も一般的な原因である。ホモシスチン尿症の分布率に関する推定値は広範囲に変動する。新生児スクリーニングによる確認および臨床的確認により、1：200,000から1：335,000までにわたる分布率が示されている(Muddら、1995年、The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases、McGraw-Hill：New York、1279頁)。CBS欠損ホモシスチン尿症(CBSDH)に伴う一次的な健康問題としては、治療を受けていない患者および部分的な治療を受けた患者における高い死亡率がもたらされる、血栓症に対する素因を伴う心血管疾患；進行性の近視および水晶体転位を伴う、眼の系に影響を及ぼす結合組織の問題；マルファン症候群様の体質、骨粗鬆症、および側弯症を特徴とする、骨格に影響を及ぼす結合組織の問題；ならびに精神遅滞および発作を含めた中枢神経系の問題が挙げられる。症状としては、水晶体脱臼、骨格障害、精神遅滞、ならびに早発性の動脈硬化症および血栓症が挙げられる(Muddら、2001年、同上)。ホモ接合性CBS欠乏は、精神遅滞、骨粗鬆症、後側弯症、脳卒中、心筋梗塞、水晶体偏位、および肺塞栓症を含めた多数の臨床症状に関連する。この疾患の心血管系の合併症、具体的には動脈血栓症および静脈血栓症は早期の死亡率の主要な一因となっている。

【0007】

10

20

30

40

50

CBS欠乏の病態生理は、確実に複雑であるが、シスタチオニンが形成されるHcyとL-セリンのCBSに触媒される縮合がないことに起因して組織および血液中に蓄積されるCBSの基質である血清中Hcyが極度に上昇することが終末器官傷害の基本的な扇動因子であるということは一致する。Hcyの血液および組織中の濃度がきわめて大きく上昇することの毒性は、Hcyそれ自体の分子反応性および生物学的効果、またはいくつもの生物学的プロセスに影響を及ぼすその代謝産物（例えばHcy-チオラクトン）により生じる可能性がある（Jakubowskiら、2008年、FASEB J 22巻：4071～6頁）。慢性血小板凝集における異常、血管パラメータの変化、および内皮の機能障害は全て、ホモシスチン尿症の患者において記載されている。

現在、CBS DHを治療するための治療の選択肢は3つ存在する：

- 1) ビタミンB₆ 応答性患者において、薬理的用量のビタミンB₆ を使用してCBS活性の残留する活性を増大させること
- 2) Metの摂取を厳密に制限した食事によって血清中Hcyを低減させること、および
- 3) HcyからMetへのベタイン媒介性変換、したがって、血清中Hcy濃度を低減させることによって解毒すること。

【0008】

これらの3つの療法はそれぞれ、血清中Hcy濃度を低減させることを目的としている。ビタミンB₆ 非反応性CBS DHを患っている個体に対する標準の治療は、代謝的調合およびシステインの形態のCys（この状態においては条件的必須アミノ酸になる）を補充したMet制限食からなる。天然のタンパク質が多い肉、乳製品、および他の食品の摂取は禁止される。二次的な栄養不良を予防するために、アミノ酸および微量栄養素を含有する美味しくない合成の代謝的調合を毎日消費することが必要である。ベタイン（商品名：Cystadane（商標）、シノニム：トリメチルグリシン）を補充することも標準の療法であり、ベタインは、肝臓におけるベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼによって触媒されるHcyからMetへの再メチル化のためのメチル供与体としての機能を果たす（Wilckenら、1983年、N. Engl. J. Med. 309巻：448～53頁）。食事の遵守は、一般に、最適な介護およびリソースが提供される医療センターにおいてさえ不十分であり、この不履行が、ホモシスチン尿症の生命にかかわる合併症の発生に主に関連している。

【0009】

ホモシスチン尿症の患者が、制限がはるかに少ない食事（例えば、毎日の摂取を1kg当たりタンパク質2gに限定すること、これは容易に実現できる）を楽しむこと、およびHcyの血漿中レベルを有意に低下させ、それにより長期にわたって臨床的な改善をもたらすことを可能にするために、同時係属の米国仮特許出願第61/758,138号に記載の通り、酵素活性を増大させるための戦略により、治療の潜在性がもたらされる。最も有効な治療的戦略は、ビタミンB₆ 応答性ホモシスチン尿症患者にピリドキシン（pyridoxone）を与えた場合に明らかであるように、酵素活性を増大させることである。しかし、この戦略は、ビタミンB₆ 非反応性患者に対しては、変異の性質に起因して不可能である。これらの患者において酵素活性を増大させるためのやり方としての酵素置換療法（ERT）には、当技術分野では存在しない外因性酵素が必要であり、したがって、当技術分野において、CBSを、治療的投与をするための十分に精製された酵素としてより大きな収率で作製するための、改善された試薬および方法の必要性が生じる。

【0010】

Krausおよび共同研究者らにより、活性な組換えヒトCBSおよびそのバリエーションを生成するための発現系および発酵条件が開発された（米国特許第5,635,375号、同第5,523,225号および同第7,485,307号、その全体があらゆる目的について参照により本明細書に組み込まれる）。これらのタンパク質は、医薬品を調製するために有用であると考えられていないタンパク質を先導するタンパク質の使用を含めた、学術的な目的に関連するプロセスによって精製された。

10

20

30

40

50

【0011】

CBS酵素活性を増大させる方法を使用するために、CBS酵素を精製する効率的な方法が必要である。組換えCBSタンパク質に対する既存の精製方法は、精製を容易にするためにアフィニティータグに依拠し、所望の純度および効率がもたらされない。したがって、治療的使用に必要なレベルのCBSをより効率的に得るために、微生物細胞において産生されるCBSタンパク質の下流の精製の改善が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許第5,635,375号明細書

10

【特許文献2】米国特許第5,523,225号明細書

【特許文献3】米国特許第7,485,307号明細書

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Muddら、2001年、The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease、第8版、2007~2056頁、McGraw-Hill、New York

【非特許文献2】FinkelsteinおよびMartin、1984年、J. Biol. Chem. 259巻：9508~13頁

【非特許文献3】Finkelsteinら、1975年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 66巻：81~87頁

20

【非特許文献4】Roperら、1992年、Arch. Biochem. Biophys. 298巻：514~521頁

【非特許文献5】Kozichら、1992年、Hum. Mutation 1巻：113~123頁

【非特許文献6】Keryら、1998年、Arch. Biochem. Biophys. 355巻：222~232頁

【非特許文献7】Bateman、1997年、Trends Biochem. Sci. 22巻：12~13頁

【非特許文献8】Janosikら、2001年、Biochemistry 40巻：10625~33頁

30

【非特許文献9】Shanら、2001年、Hum. Mol. Genet. 10巻：635~643頁

【非特許文献10】MilesおよびKraus、2004年、J. Biol. Chem. 279巻：29871~4頁

【非特許文献11】Muddら、1995年、The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases、McGraw-Hill：New York、1279頁

【非特許文献12】Jakubowskiら、2008年、FASEB J 22巻：4071~6頁

40

【非特許文献13】Wilckenら、1983年、N. Engl. J. Med. 309巻：448~53頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、シスタチオニン - シンターゼ(CBS)を精製するための方法であって、前記CBSタンパク質がその天然に存在するランケート型パリアント、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたランケート体、特に、組換え細胞において産生されたランケート型CBSである方法を提供する。特別な実施形態では、当該方法は、(a)少なくとも1つの不純物の存在下でCBS含有溶液を用意するステップと、(b)金

50

属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂を使用して前記 C B S 含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む。追加的な特別な実施形態では、当該方法は、(a) 少なくとも1つの不純物の存在下で C B S 含有溶液を用意するステップと、(b) イオン交換クロマトグラフィーカラムおよび金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂を使用して前記 C B S 含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む。

【 0 0 1 5 】

ある特定の実施形態では、当該方法は、追加的なクロマトグラフィーステップ (当技術分野で「最終精製」ステップとして公知である) を実施することをさらに含む。特別な実施形態では、本発明の方法は、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C) カラムを使用してクロマトグラフィーによる分離を実施するステップを含む。他の実施形態では、当該方法は、セラミックヒドロキシアパタイト (h y d r o x y a p a p t i t e) 樹脂を使用してクロマトグラフィーによる分離を実施するステップをさらに含む。

10

【 0 0 1 6 】

ある特定の実施形態では、イオン交換カラムは、陰イオン交換体、好ましくは弱陰イオン交換体である。特別な実施形態では、陰イオン交換体は D E A E - セファロース F F カラムである。さらなる実施形態では、I M A C 樹脂が二価イオンにより荷電している。さらに別の実施形態では、二価金属イオンは、ニッケル、銅、コバルトまたは亜鉛である。さらなる特定の実施形態では、二価金属イオンは亜鉛である。

ある特定の他の実施形態では、当該方法は、イミダゾールを含む溶出緩衝液を用いて I M A C 樹脂から C B S を溶出させるステップをさらに含む。ある特定の実施形態では、C B S 含有溶液は、これだけに限定されないが、遠心分離後の上清または濾過後の濾液を含めた、C B S を含む懸濁液から細胞壊死組織片および他の粒子状物質が除去されている、清澄化された C B S 溶液である。さらに他の実施形態では、C B S 含有溶液は、C B S をコードする核酸配列を含む組換え構築物を発現している細胞をホモジナイズすることによって得られる。ある特定の実施形態では、C B S 核酸配列は配列番号 1 を含み、配列番号 2 と識別されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。他の実施形態では、核酸配列はトランケートされたものである。さらに他の実施形態では、トランケート型 C B S 核酸配列は、配列番号 2 の 3 8 2 ~ 5 3 2、3 8 2 ~ 5 5 0 または 5 4 3 ~ 5 5 0 からのアミノ酸残基のうちの 1 つの終了位置までトランケートされている。

20

30

【 0 0 1 7 】

他のある特定の実施形態では、組換え細胞は、微生物細胞、特に、細菌細胞である。特別な実施形態では、細菌細胞は、E . c o l i 細胞、特に、哺乳動物、好ましくはヒトの C B S タンパク質を産生する組換え E . c o l i 細胞である。いくつかの特別な実施形態では、前記ヒト C B S タンパク質は、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列または配列番号 2 の 3 8 2 ~ 5 3 2 または 5 4 3 ~ 5 5 0 からのアミノ酸残基のうちの 1 つの終了位置までトランケートされているトランケート型 C B S 核酸配列を有する。他の特別な実施形態では、トランケート型 C B S 核酸配列は、E . c o l i において発現させるために最適化されており、配列番号 4 によって識別される。

【 0 0 1 8 】

別の態様では、(a) 少なくとも1つの不純物の存在下で C B S 含有溶液を用意するステップであって、前記 C B S タンパク質が、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体、特に、トランケートされたものであるステップと、(b) 金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂を使用して前記 C B S 含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む方法を使用して実質的に精製された C B S 溶液が提供される。追加的な特別な実施形態では、(a) 少なくとも1つの不純物の存在下で C B S 含有溶液を用意するステップと、(b) イオン交換クロマトグラフィーカラムおよび金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂を使用して前記 C B S 含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む方法を使用して実質的に精製された C B S 溶液が提

40

50

供される。

【0019】

本発明のある特定の形態では、実質的に精製されたCBS溶液は、薬学的に許容される担体中に製剤化される。

【0020】

別の態様では、本発明は、濃縮されたCBS溶液を作製するための方法であって、(a)少なくとも1つの不純物の存在下でCBS含有溶液を用意するステップであって、前記CBSタンパク質が、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体、特に、トランケートされたものであるステップと、(b)二価金属イオンにより荷電した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を使用して前記CBS含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む方法を提供する。

【0021】

別の態様では、a)少なくとも1つの不純物の存在下でCBS含有溶液を用意するステップであって、前記CBSタンパク質が、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体、特に、トランケートされたものであるステップと、(b)二価金属イオンにより荷電した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を使用して前記CBS含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む方法を使用して濃縮されたCBS溶液が提供される。

【0022】

本発明の特定の利点は、組換え型、全長の、またはトランケートされたCBS、特にヒトCBSの精製を、タンパク質を、例えば、当技術分野で公知の「タグ」分子(ポリ-HIS、FLAGなど)を組み入れることによって、さらに修飾することなく実現することができることである。本明細書に開示されているクロマトグラフィー法を使用することにより、有利にこれらのタグが不必要になり、したがって、追加的な組換え操作およびそのようなタグを含有する組換えCBSの任意の調製物に導入される恐れがあるいかなる不都合(免疫原性、in vivo半減期または生化学的活性における)も回避される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

シスタチオニン - シンターゼ(CBS)タンパク質を精製するための方法であって、該CBSタンパク質が、天然に存在するトランケート型CBSタンパク質、化学的にトランケートされたトランケート型CBSタンパク質または遺伝子操作されたトランケート型CBSタンパク質であり、

(a) 1つまたは複数の不純物を含むCBS含有溶液を用意するステップと、
(b) イオン交換クロマトグラフィーカラムおよび金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を使用して該CBS含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施し、それにより、該不純物を除去するステップと
を含む方法。

(項目2)

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)カラムを使用してクロマトグラフィーによる分離を実施するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

セラミックヒドロキシアパタイト樹脂を使用してクロマトグラフィーによる分離を実施するステップをさらに含む、項目1から2に記載の方法。

(項目4)

前記イオン交換クロマトグラフィーカラムが弱陰イオン交換体である、項目1から3に記載の方法。

(項目5)

前記弱陰イオン交換体がDEAE-セファロースFFカラムである、項目4に記載の方

10

20

30

40

50

法。

(項目6)

前記金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂が二価金属陽イオンにより荷電している、項目1から5に記載の方法。

(項目7)

前記二価金属陽イオンがニッケル、銅、コバルトまたは亜鉛である、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記二価金属イオンが亜鉛である、項目7に記載の方法。

(項目9)

イミダゾールを含む溶出緩衝液を用いて前記金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) 樹脂から C B S を溶出させるステップをさらに含む、項目1から8に記載の方法。

(項目10)

前記トランケート型 C B S タンパク質が、配列番号3によって識別されるアミノ酸配列を有する、項目1から9に記載の方法。

(項目11)

前記 C B S 含有溶液が清澄化された C B S 溶液である、項目1から10に記載の方法。

(項目12)

前記 C B S が組換え細胞において産生される、項目1から11に記載の方法。

(項目13)

前記組換え細胞が細菌細胞である、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記 C B S 含有溶液が、 C B S をコードする核酸配列を含む組換え構築物を発現する組換え細菌細胞をホモジナイズすることによって得られる、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記 C B S 核酸がトランケート型 C B S タンパク質をコードする、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記トランケート型 C B S タンパク質が、配列番号2の382~532、382~550または543~550からのアミノ酸残基のうちの1つの終了位置までトランケートされている、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記 C B S 核酸配列が配列番号4を含む、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記組換え細胞が E . c o l i 細胞である、項目12から17に記載の方法。

(項目19)

前記トランケート型 C B S タンパク質をコードする核酸配列が、 E . c o l i 細胞において発現させるために最適化されている、項目16に記載の方法。

(項目20)

項目1から9に記載の方法によって作製される、実質的に精製された C B S 溶液。

(項目21)

薬学的に許容される担体中に製剤化される、項目20に記載の実質的に精製された C B S 溶液。

(項目22)

濃縮された C B S 溶液を作製するための方法であって、該 C B S タンパク質がその天然に存在するトランケート体、化学的に切断されたトランケート体または遺伝子操作されたトランケート体であり、

(a) 1 つまたは複数の不純物を含む C B S 含有溶液を用意するステップと、

(b) 二価金属イオンにより荷電した固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (

10

20

30

40

50

I M A C) 樹脂を使用して該 C B S 含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施し、それにより、該不純物を除去するステップとを含む方法。

(項目 2 3)

前記二価金属イオンがニッケル、銅、コバルトまたは亜鉛である、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記二価金属イオンが亜鉛である、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

トランケート型 C B S タンパク質が、配列番号 3 によって識別されるアミノ酸配列を有する、項目 2 2 から 2 4 に記載の方法。

10

(項目 2 6)

前記 C B S 溶液が清澄化された C B S 溶液である、項目 2 2 から 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記 C B S が組換え細胞において産生される、項目 2 2 から 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記組換え細胞が細菌細胞である、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記 C B S 溶液が、C B S をコードする核酸配列を含む組換え構築物を発現する組換え細菌細胞をホモジナイズすることによって得られる、項目 2 8 に記載の方法。

20

(項目 3 0)

前記 C B S がトランケート型 C B S タンパク質をコードする、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記トランケート型 C B S タンパク質が、配列番号 2 の 3 8 2 ~ 5 3 2 または 5 4 3 ~ 5 5 0 からのアミノ酸残基のうちの 1 つの終了位置までトランケートされている、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記 C B S 核酸配列が配列番号 4 を含む、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記細菌細胞が E . c o l i 細胞である、項目 2 2 から 3 2 に記載の方法。

30

(項目 3 4)

前記トランケート型 C B S タンパク質をコードする核酸配列が、E . c o l i 細胞において発現させるために最適化されている、項目 2 2 から 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

項目 2 2 から 3 4 に記載の方法によって作製される、濃縮された C B S 溶液。

【 0 0 2 3 】

本発明の特定の好ましい実施形態は、以下のある特定の好ましい実施形態についてのより詳細な記載および特許請求の範囲から明らかになる。

【 0 0 2 4 】

以下の本発明の実施形態の詳細な説明は、以下の図と併せて読めば最も良く理解することができる。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 A 】 図 1 は、D E A E - セファロース - F F、Z n - I M A C および H I C クロマトグラフィーを含む多段階クロマトグラフィー法を使用したスケールアップ生成実行からの精製手順の概要を示す図である。

【 図 1 B 】 図 1 は、D E A E - セファロース - F F、Z n - I M A C および H I C クロマトグラフィーを含む多段階クロマトグラフィー法を使用したスケールアップ生成実行からの精製手順の概要を示す図である。

【 図 1 C 】 図 1 は、D E A E - セファロース - F F、Z n - I M A C および H I C クロマ

50

トグラフィーを含む多段階クロマトグラフィー法を使用したスケールアップ生成実行からの精製手順の概要を示す図である。

【0026】

【図2】図2は、DEAE-セファロース-FFカラムおよび「最適化されていない」細菌発現構築物を使用して精製したCBSを使用した精製実験からの精製の概要を示す図である。移動相は、実施例に記載の他の構成成分に加えて10%エチレングリコールを含んだ。

【0027】

【図3-1】図3は、DEAE-セファロース-FF、Zn-IMAC、セラミックヒドロキシアパタイト樹脂およびHICクロマトグラフィーを含む多段階クロマトグラフィー法を使用したスケールアップ生成実行からの精製手順の概要を示す図である。

10

【図3-2】図3は、DEAE-セファロース-FF、Zn-IMAC、セラミックヒドロキシアパタイト樹脂およびHICクロマトグラフィーを含む多段階クロマトグラフィー法を使用したスケールアップ生成実行からの精製手順の概要を示す図である。

【図3-3】図3は、DEAE-セファロース-FF、Zn-IMAC、セラミックヒドロキシアパタイト樹脂およびHICクロマトグラフィーを含む多段階クロマトグラフィー法を使用したスケールアップ生成実行からの精製手順の概要を示す図である。

【0028】

【図4】図4は、DEAEカラムを使用した精製ステップの各段階についてのCBSタンパク質と不純物の相対量を示すSDS pageゲルの写真画像である。

20

【0029】

【図5】図5は、DEAEカラム、Zn-IMACカラムおよびHICカラムを含む3カラム精製方法についてのCBSタンパク質と不純物の相対量を示すSDS pageゲルの写真画像である。

【0030】

【図6】図6は、DEAEカラム、Zn-IMACカラム、セラミックヒドロキシアパタイト樹脂およびHICカラムを含む4カラム精製方法についてのCBSタンパク質と不純物の相対量を示すSDS pageゲルの写真画像である。

【0031】

【図7A】図7は、Zn-IMACを使用した精製後に分離された混合物の構成成分を実証しているクロマトグラムである。

30

【図7B】図7は、Zn-IMACを使用した精製後に分離された混合物の構成成分を実証しているクロマトグラムである。

【0032】

【図8】図8は、Ni-IMACカラムを使用した展開実行からの精製の概要を示す図である。

【0033】

【図9】図9は、Ni-IMACカラムを使用した精製方法後の総タンパク質量を実証している要約表である。

【0034】

40

【図10A】図10は、Ni-IMACカラムを使用した精製ステップの各段階についてのCBSタンパク質と不純物の相対量を示すSDS pageゲルの写真画像である。

【図10B】図10は、Ni-IMACカラムを使用した精製ステップの各段階についてのCBSタンパク質と不純物の相対量を示すSDS pageゲルの写真画像である。

【0035】

【図11】図11は、Cu-IMACカラムを使用したスケールアップ生成実行からの精製の概要を示す図である。

【0036】

【図12】図12は、Zn-IMACカラムを使用した精製方法後の総タンパク質量を実証している要約表である。

50

【0037】

【図13】図13は、Zn-IMACカラムを使用した精製ステップの各段階についてのCBSタンパク質と不純物の相対量を示すSDS pageゲルの写真画像である。

【0038】

【図14】図14は、多段階クロマトグラフィー精製ステップを使用した精製方法のスキームである。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本発明は、CBSタンパク質を精製するための方法であって、前記CBSタンパク質が、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体、特に、組換え細胞において産生されたトランケート型タンパク質CBSである方法を提供する。具体的には、本発明は、CBSタンパク質を精製するための方法であって、(a)少なくとも1つの不純物の存在下でCBS含有溶液を用意するステップと、(b)金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を使用して前記CBS含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む方法を提供する。追加的な特別な実施形態では、当該方法は、(a)少なくとも1つの不純物の存在下でCBS含有溶液を用意するステップと、(b)イオン交換クロマトグラフィーカラムおよび金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を使用して前記CBS含有溶液のクロマトグラフィーによる分離を実施するステップとを含む。

10

【0040】

本発明によって提供される方法のある特定の実施形態における特定のクロマトグラフィーによる分離ステップは、イオン交換クロマトグラフィーカラムを含む。一実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーカラムは、陰イオン交換体、好ましくは弱陰イオン交換体である。DEAE-セファデックス、QAE-セファデックス、DEAE-セファセル、DEAE-セルロースおよびDEAE-セファロース-FFを含めたさまざまな種類の陰イオン交換樹脂を使用することができる。一実施形態によると、陰イオン交換樹脂はDEAE-セファロース-FFである。

20

【0041】

本発明によって提供されるある特定の方法における別の特定のクロマトグラフィーによる分離ステップは、タンパク質をカラムに結合させると同時に選択的中間洗浄を使用して結合性の弱いタンパク質および他の分子種を除去することを可能にするために適したpHおよび伝導率を有する金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)樹脂を含む。ある特定の実施形態では、さまざまな濃度のイミダゾールを使用して、クロマトグラフィーの間の分配を調節した。適切な金属アフィニティー樹脂としては、ニッケル、銅、コバルトまたは亜鉛を含めた二価金属イオンにより荷電した固定化金属アフィニティークラムが挙げられる。本発明の方法のある特定の実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーの後に金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)カラムを使用する。そのような実施形態では、IMACカラムは、二価陽イオンとして亜鉛を用いて荷電させることが好ましい。本発明の方法の他の実施形態では、IMACカラムを最初のクロマトグラフィーステップとして使用する。そのような実施形態では、ニッケルまたは銅二価陽イオンを使用してIMACカラムを荷電させることが好ましい。

30

40

【0042】

CBS含有溶液からCBSを精製するための、本発明の方法のある特定の実施形態において提供される追加的なクロマトグラフィーステップとしては、これだけに限定することなく、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)が挙げられる。HICは、捕捉ステップの間に標的タンパク質と一緒に溶出される、比較的密接に関連するクロマトグラフィー上の性質を有する不純物を除去するために有用である。

【0043】

CBS含有溶液からCBSを精製するための、本発明の方法のある特定の実施形態において提供されるさらなる追加的なクロマトグラフィーステップとしては、これだけに限定

50

することなく、セラミックヒドロキシアパタイト樹脂が挙げられる。「セラミックヒドロキシアパタイト」または「CHAP」とは、高温で球状のマクロ多孔性のセラミック形態に焼結された、式 $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ の不溶性ヒドロキシル化リン酸カルシウムを指す。本発明の方法は、遊離の、またはカラムに充填されたヒドロキシアパタイト樹脂と一緒に使用することもできる。当業者は、カラム寸法の選択を決定することができる。

【0044】

本発明の方法において有用なクロマトグラフィーマトリックスは、生化学的化合物、好ましくはタンパク質、核酸、および/または内毒素を結合させることができる材料であり、前記生化学的化合物の前記クロマトグラフィーマトリックスに対する親和性は、周囲の溶液（緩衝液）のイオン組成に影響される。前記溶液のイオン組成を制御することにより、本発明のクロマトグラフィー材料を減法様式（CBSが前記クロマトグラフィーマトリックスを通過し、少なくともある特定の混入物が前記クロマトグラフィーマトリックスに結合する）、または、好ましくは、吸着様式（CBSがクロマトグラフィーマトリックスに結合する）のいずれかで使用することが可能になる。

【0045】

特別な実施形態では、精製するための方法は、宿主細胞、特に、組換え細胞、およびある特定の実施形態では、哺乳動物、好ましくはヒトのCBSタンパク質を産生する組換え細胞をホモジナイズするステップを含み、前記組換え構築物は、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または遺伝子操作されたトランケート体であるCBSタンパク質をコードし、特に、前記構築物は組換え細胞での発現のために最適化されている。特別な実施形態では、前記組換え細胞は、微生物細胞、特に、細菌細胞である。いくつかの特別な実施形態では、細菌細胞はE. coli細胞であり、CBS配列は、組換え発現構築物において、前記細胞において発現させるために最適化されるように工学的に操作されており、E. coliにおけるCBS発現のために最適化されたそのような核酸配列の特定の実施形態が配列番号4に記載されている。前記方法では、細胞を、例えば遠心分離によって収集し、場合によって-80で保管する。宿主細胞のホモジナイズを、物理的手段、化学的手段もしくは酵素的手段を使用して、またはその組合せによって細胞宿主を攪乱することによって実施する。細菌性供給源から精製するために、前記細菌宿主の細胞壁を超音波処理によって攪乱することによってホモジナイズを実施することが有利である。その代わりにまたはそれに加えて、宿主の細菌細胞壁をリゾチームなどの細胞壁分解酵素に曝露させることによって不安定化することにより、ホモジナイズを実施する。

【0046】

本発明の方法は、濾過または遠心分離のいずれかによって細胞壊死組織片がホモジネートから除去されている、清澄化されたCBSホモジネートをさらに含んでよい。ある特定の実施形態では、有効な回転速度でホモジネートを遠心分離することによって清澄化を実施する。必要な遠心分離時間は、とりわけホモジネートの体積に左右され、これは経験的に決定して、十分に固いペレットを得ることができる。本質的に細胞壊死組織片を含まない清澄化されたホモジネートを得るために、遠心分離と濾過の組合せをホモジネートに対して実施することができる。

【0047】

「組換え細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、CBSタンパク質、好ましくはヒトCBSタンパク質、および最も具体的には、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体であるヒトCBSタンパク質をコードする核酸を発現することができる組換え発現構築物が導入された、任意の種由来の適切な細胞（そのような細胞の後代を含む）を指す。特定の実施形態では、前記組換え発現構築物によりコードされるトランケート型CBSタンパク質は、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する。

【0048】

「細菌細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、前記組換え細胞の後代を含め

10

20

30

40

50

た、哺乳動物、好ましくはヒトのCBSタンパク質を、とりわけ組換え遺伝子による方法を使用して産生する細菌を指し、前記CBSタンパク質は、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または遺伝子操作されたトランケート体である。

【0049】

「組換え発現構築物」という用語は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、好ましくはヒトのCBSタンパク質のヌクレオチド配列、および組換え発現構築物が導入された細胞の培養物およびその後代においてCBSタンパク質の合成を導くために十分な配列を有する核酸を指す。

【0050】

本明細書で使用される場合、CBSタンパク質またはポリペプチドへの言及は、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体、または融合タンパク質、またはその任意の相同体（バリエーション、変異体）、特に哺乳動物のCBS、好ましくはヒトCBSを包含することが好ましい。そのようなCBSタンパク質は、これだけに限定されないが、精製されたCBSタンパク質、組換えによって作製されたCBSタンパク質、可溶性CBSタンパク質、不溶性CBSタンパク質、および他のタンパク質を伴う単離されたCBSタンパク質を包含し得る。さらに、「ヒトCBSタンパク質」とは、ヒト(Homo sapiens)由来のCBSタンパク質を指し、その天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体を包含することが好ましい。そのように、ヒトCBSタンパク質は、精製されたタンパク質、部分的に精製されたタンパク質、組換えタンパク質、変異した/修飾されたタンパク質および合成タンパク質を包含し得る。本明細書および関連する米国特許第8,007,787号および同第7,485,307号に開示されている通り、CBSタンパク質のトランケート体は、不溶性封入体を創製せずに細菌において産生される可溶性CBSタンパク質であることが有利である。

【0051】

本明細書で使用される場合、「相同体」という用語（またはバリエーションもしくは変異体）は、天然に存在するタンパク質またはペプチド（すなわち、「プロトタイプ」または「野生型」タンパク質）とは、天然に存在するタンパク質またはペプチドに対する修飾によって異なるが、天然に存在する形態の基本的なタンパク質および側鎖構造を維持するタンパク質またはペプチドを指すために使用される。そのような変化としては、これだけに限定されないが、1つ、少数、またはさらにいくつかのアミノ酸の側鎖の変化；欠失（例えば、タンパク質またはペプチドのトランケート版）、挿入および/または置換を含めた、1つ、少数またはいくつかのアミノ酸の変化；1つまたは少数の原子の立体化学の変化；および/または、これだけに限定されないが、メチル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリストイル化、プレニル化、パルミチン酸化(palmitation)、アミド化および/またはグリコシルホスファチジルイノシトールの付加を含めた副次的な誘導体化が挙げられる。相同体は、天然に存在するタンパク質またはペプチドと比較して増強された、低下した、変化したまたは実質的に類似した性質を有してよい。相同体は、タンパク質のアゴニストまたはタンパク質のアンタゴニストを包含し得る。

【0052】

相同体は、天然の対立遺伝子の変動または自然変異の結果であってよい。タンパク質をコードする核酸の天然に存在する対立遺伝子バリエーションは、ゲノム内の、そのようなタンパク質をコードする遺伝子と基本的に同じ遺伝子座（複数可）に存在するが、例えば、変異または組換えによって引き起こされる自然変動に起因して、同様であるが同一ではない配列を有する遺伝子である。対立遺伝子バリエーションは、一般には、比較されている遺伝子によりコードされるタンパク質の活性と同様の活性を有するタンパク質をコードする。対立遺伝子バリエーションの1つのクラスは、同じタンパク質をコードし得るが、遺伝暗号の縮重に起因して異なる核酸配列を有する。対立遺伝子バリエーションは、遺伝子の5'または3'非翻訳領域（例えば、調節性制御領域）の変更も含み得る。対立遺伝子バリエーションは、当業者に周知である。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

相同体は、これだけに限定されないが、単離された、天然に存在するタンパク質に対する直接修飾、直接タンパク質合成、または、例えば、ランダム変異誘発または標的化変異誘発を行うための典型的なまたは組換えDNA技法を使用したタンパク質をコードする核酸配列の修飾を含めた、タンパク質を作製するための当技術分野で公知の技法を使用して作製することができる。CBSバリエーションは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,007,787号に記載されており、特別な好ましい実施形態では、本明細書に記載の本発明の試薬および方法は、ヒトCBSタンパク質の天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体を含むことが好ましい。本発明による配列番号3の特定のトランケート型としては、N末端欠失バリエーション、C末端欠失バリエーション、およびN末端欠失とC末端欠失の両方を有するバリエーションが挙げられる。

10

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋な」とは、*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*におけるタンパク質の有効な使用が可能になる純度を指す。タンパク質が*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*において有用になるためには、その使用に干渉する可能性があるもしくは干渉すると思われる、または少なくともCBSタンパク質（その相同体を含む）に含まれることが望ましくないと思われる混入物、他のタンパク質および/または化学物質を実質的に含まないことが好ましい。

20

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用される場合、濃縮されたCBS溶液とは、1つまたは複数の精製ステップに供された溶液である。

【 0 0 5 6 】

タンパク質の純度は、精製倍率を算出すること、すなわち、精製された溶液が精製度の低い溶液または粗抽出物と比較してどれほど多いかの尺度をもたらす式によって決定することができる。精製倍率は、次式：

【 0 0 5 7 】

最終画分の特異的活性 / 粗製画分の特異的活性
を使用して算出する。

純度を評価するための別の測定は、酵素の純度を測定する「特異的活性」である。特異的活性は、次式：

30

【 数 1 】

$$\frac{\text{ユニット}}{\text{mL}} \times \frac{\text{mL}}{\text{mg}} = \frac{\text{ユニット}}{\text{mg}}$$

を使用して測定することができる。

【 0 0 5 8 】

本発明によって提供されるCBSタンパク質組成物は、生物学的プロセス、特に、シスタチオニンが形成されるセリンおよびホモシステインのピリドキサル5'-リン酸（PLP）依存性縮合の触媒作用に関連するプロセスを調節するために有用である。具体的には、本発明の組成物は、シスタチオニンおよびシステインを*in vitro*で作製するため、またはCBS活性を増大させることが有効である患者（例えば、ホモシステニン尿症の患者）を治療するために有用である。ある特定の実施形態では、本発明は、前記CBSタンパク質、好ましくはヒトCBSタンパク質の組成物であって、前記CBSタンパク質が、ヒトCBSタンパク質の天然に存在するトランケート型バリエーション、または化学的に切断されたもしくは遺伝子操作されたトランケート体である組成物を、前記CBSタンパク質および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物として提供する。

40

【 0 0 5 9 】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」とは、*in vitro*、*ex vivo*または*in vivo*における適切な組成物の投与において使用するために

50

適した薬学的に許容される賦形剤および/または薬学的に許容される送達ビヒクルを包含する。適切な *in vitro*、*in vivo* または *ex vivo* における投与は、CBS 活性を調節することが望ましい任意の部位を含むことが好ましい。適切な薬学的に許容される担体は、本発明によって提供される CBS タンパク質を、タンパク質が培養物中または患者における標的細胞または組織に到達するとタンパク質がその予測されたまたは所望の生物活性を有するような形態に維持することができる。薬学的に許容される担体の例としては、これだけに限定されないが、水、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、ブドウ糖溶液、血清含有溶液、ハンクス液、他の水を含む生理的に平衡させた溶液、油、エステルおよびグリコールが挙げられる。水を含む担体は、例えば、化学的安定性および等張性を増強させることによってレシピエントの生理的条件に近づけるために必要な適切な補助物質を含有してよい。本発明の組成物は、従来の方法によって滅菌し、かつ/または凍結乾燥させることができる。

10

【0060】

本明細書において記載され、かつ/または引用されている参考文献はそれぞれ、その全体が参照によって組み込まれる。

【0061】

以下の実施例は、例示のために提供され、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0062】

(実施例1)

20

細菌におけるトランケート型 CBS タンパク質の産生

保存されていない領域の特定の部分を欠くトランケート型ヒト CBS バリエーション (r-hCBS C; 配列番号3) を構築し、以前に記載されている *E. coli* に基づく発現系 (Kozich および Kraus, 1992年, 上記) を使用して過剰発現させた。本明細書に開示されているこの系の改変 (すなわち、全長の CBS タンパク質ではなくトランケート体を発現させること) では、配列番号3によりコードされる CBS トランケート体を、いかなる融合パートナーも伴わず、*tac* プロモーターの制御下で発現させた。トランケート型ヒト CBS タンパク質バリエーション r-hCBS C (配列番号4) をコードする構築物を、CBS の全長コード配列 (配列番号1) が pKK388.1 にクローニングされた、以前に記載されている pHCS3 CBS 発現構築物 (Kozich および Kraus, 1992年, Hum. Mutat. 1巻, 113~123頁) を改変することによって生成した。この構築物では、CBS 発現は IPTG 誘導性 *lac* プロモーターにより支配された。C 末端欠失構築物を生成するために、*Sph*I 部位および *Kpn*I 部位を PCR 産物の 5' 末端および 3' 末端それぞれに組み入れるプライマーを使用して、所望のヌクレオチド残基にわたる CBS cDNA 断片を増幅した。次いで、全ての PCR 産物を *Sph*I および *Kpn*I を用いてカットし、*Sph*I および *Kpn*I を用いて消化した pHCS3 ベクターにライゲーションすることによってクローニングした。*Sph*I 部位は、CBS cDNA においてアンチセンスプライマーハイブリダイゼーション部位 (CBS cDNA 番号付け、参考文献25に従って、塩基対 (pare) 1012位) のちょうど上流に天然に存在する。したがって生成した PCR 産物を次に *Nco*I および *Sph*I を用いて消化し、同じ酵素を用いてカットした pHCS3 プラスミドにライゲーションした。

30

40

【化1】

pKK CBS Δ414-551

センス: CGTAGAATTCACCTTTGCCCGCATGCTGAT (*Sph*I) (配列番号5)

アンチセンス: TACGGGTACCTCAACGGAGGTGCCACCACCAGGGC (*Kpn*I) (配列番号6)

【0063】

50

最後に、構築物を *E. coli* BL21 (Stratagene) に導入してそれを形質転換した。構築物の确实性を、Thermo Sequenase Cy5.5 配列決定キット (Amersham Pharmacia Biotech) および Visible Genetics Long-Read Tower System-V3.1 DNA シークエンサーを製造者の説明書に従って使用して DNA 配列決定によって検証した。

【0064】

CBS 欠失変異体の細菌による発現の解析 - CBS トランケート型変異体構築物を有する *E. coli* BL21 細胞の成長、発現の誘導および粗細胞溶解物の生成を以前に記載されている通り実施した (Maclean ら、2002 年、Hum. Mutat. 19 巻 (6 号)、641~55 頁)。簡単に述べると、細菌を、0.3 mM の α -アミノレブリン酸 (α -ALA) の存在下または不在下で、75 μ g/mL のアンピシリン (ampicillin) および 0.001% チアミンを含有する NZCYMT 培地 (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) 1 L 中、37 °C で好氣的に、600 nm における濁度が 0.5 に達するまで成長させた。次いで、IPTG を 0.5 mM まで添加し、細菌をさらに成長させた。不溶性画分を以下の通り調製した：超音波処理したホモジネートを遠心分離した後、ペレット化した細胞壊死組織片を、冷却したイソトリス緩衝生理食塩水、pH 8.0 を用いて徹底的に洗浄した。次いで、ペレットを溶解緩衝液 (Maclean ら、同書) 1 ml に再懸濁させた後、不溶性画分をホモジナイズするために短時間超音波処理した。

【0065】

CBS 活性アッセイ - CBS 活性を、以前に記載されている放射性同位元素アッセイにより、 $[^{14}\text{C}]$ セリンを標識された基質として使用して決定した (Kraus, 1987 年、Methods Enzymol. 143 巻、388~394 頁)。タンパク質の濃度を Lowry 手順 (Lowry ら、1951 年、J. Biol. Chem. 193 巻、265~275 頁) により、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準物質として使用して決定した。活性の 1 ユニットは、37 °C、1 時間で 1 μ mol のシスタチオニンの形成を触媒する CBS の量と定義される。

【0066】

変性およびネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット法 - 粗細胞溶解物のウエスタンブロット分析を、以前に記載されている通り (Janosik, 2001 年、上記)、いくつかの改変を伴って、変性条件下およびネイティブ条件下の両方で実施した。発現した変異タンパク質を含有する *E. coli* 溶解物の可溶性画分を試料緩衝液と混合し、6% ネイティブ PAGE に、ゲルを積み重ねずに流した。試料緩衝液の最終的な組成は、50 mM のトリス-HCl、pH 8.9、1 mM の DTT、10% グリセロール、0.001% プロモフェノールブルーであった。ヘムの検出を、ヘムペルオキシダーゼ活性に依拠する以前に記載されている方法を使用して実施した (Vargas ら、1993 年、Anal. Biochem. 209 巻 (2 号)、323~6 頁)。

【0067】

濃度測定走査分析 - 定量的濃度測定分析を、Imagemaster ID (バージョン 2.0) ソフトウェア (Pharmacia) を使用して実施した。較正曲線を構築するために、精製された野生型 CBS タンパク質 50 ng、75 ng、100 ng、250 ng、500 ng および 1000 ng を、個々の変異体の粗細胞溶解物と一緒に SDS-PAGE に流した。電気泳動した後、ウエスタンブロット免疫分析を、ウサギ抗 CBS 血清を使用して行った。実験により観察された CBS 変異体サブユニットに対応するシグナルは全て、精製されたヒト CBS を用いて構築された較正曲線の線形範囲内であった。

【0068】

(実施例 2)

粗抽出の調製

下流のクロマトグラフィーステップにおいて使用するための粗CBSタンパク質含有抽出物を調製した。配列番号4によりコードされるトランケート型ヒトCBSを発現する、ヒトトランケート型CBSバリエーション(r-hCBS-C; 配列番号3)を産生する組換え細菌の発酵により得た凍結ペレット(細胞)を溶解させた。最初の単離のための溶解緩衝液は1mMのDTT、1%トリトンX100、およびプロテアーゼ阻害剤を含有した。これらの構成成分は、最終的に緩衝液から除去した。スケールアップ実行のための材料を生じた、最終的な単離のために使用した緩衝液は、20mMのリン酸ナトリウム、50mMのNaCl、0.1mMのPLP(pH7.2)からなり、ホモジナイズした後にリゾチームを2mg/mLの濃度まで添加した。4で1時間にわたってリゾチームと混合した後、ホモジネートを、粘度が低下するまで超音波処理し、次いで、20,000rpm(48,000xg)で30分の遠心分離に供した。上清を採取し、一定分量にし、使用するまで-70で保管した。一般に、クロマトグラフィーによる精製の前に粗抽出物を37で解凍した。

【0069】

(実施例3)

DEAE-セファロースFFクロマトグラフィー

CBSの精製方法の本実施例では、DEAE-セファロースFFが良好な能力および流動性を有し、数年にわたって一貫して製造されているので、これを使用した。このステップでは、樹脂およそ6mLを含有する滴下/重力カラムを使用した。カラムを、50mMのNaCl、pH7.0を伴うリン酸ナトリウム緩衝液中で平衡化した。粗抽出物の負荷を、樹脂1mL当たり総タンパク質量およそ20mgに標準化した。カラムに負荷した後、負荷液の赤色がカラムの上部近くに集中した。平衡化緩衝液を用いて洗浄した後、カラムを150mMのNaClを含有する緩衝液で洗浄し、それにより、色の大部分がカラムから溶出した(全てのステップをpH7.0で実施した)。300mMのNaClで洗浄することにより基本的に全ての色がカラムから除去された。これらの結果に基づいて、流動様式で作動させることができるカラムを充填した。NaCl濃度50mMの平衡化/負荷の条件を使用し、250mMのNaClで溶出させた。最終的な条件は、平衡化/洗浄緩衝液(50mMのNaCl)のイオン強度に近づけるためにカラム負荷液をH₂Oで希釈すること、および137mMのNaClを用いて溶出することが必要であった(図1、図2および図3)。試料をSDS-PAGEによって分析して、CBSタンパク質と不純物の相対量を決定した(図4)。以下の表には、カラム操作パラメータおよびそれらを使用したスケールアップ実行からのデータが示されている。

【表1】

表1. DEAE捕捉ステップについての操作パラメータ

プロセスのステップ	カラム負荷液の標的(1mL当たりの総タンパク質量のmg数)	NaCl濃度(20mMのNa ₃ PO ₄ 、pH7.0を伴う)	カラム容量(mL)	接触時間、カラム容量/流速(分)
平衡化	N/A	50 mM	3-5	10
負荷	20-25 mg/mL	およそ 50 mM	変動する	15
洗浄	N/A	50 mM	3	10
溶出	N/A	137 mM	変動する*	15
2MのNaClストリップ	N/A	2 M	3	10

*注: 溶出液の採取をおよそ0.4AUで開始し、およそ0.55AUで終了する。空隙容量は、一般には、およそ1カラム容量である。

【表 2】

表2. スケールアップ実行からのデータ (n=6)

インプット		アウトプット		
カラム負荷(樹脂1ml当たり)				
総タンパク質量 (mg)	ユニット	回収率 (%)	精製倍率 (S. A. による)	
14.5 - 19.8	3275 - 5443	79.3 - 93.0	2.5 - 3.3	範囲
18.2	4451	86	2.8	平均

【 0 0 7 0 】

(実施例 4)

I M A C クロマトグラフィー

固定化金属アフィニティーカラム (I M A C) により、組換え細菌細胞ホモジネートなどの生物学的供給源から、C B S タンパク質と不純物および他の混入物を分離することができることが実証された。低 pH 条件 (< 5、事例的) を回避することが望ましいので、クロマトグラフィーの間にさまざまな濃度のイミダゾールを使用して、分配を調節した。

【 0 0 7 1 】

銅 (Cu^{++}) を、その比較的強力な結合特性に基づいて、I M A C カラムの候補種として試験した。I M A C カラムに適用する前に、C B S 溶液を 0 . 4 M の N a C l に対して調整した。結果により、捕捉がほぼ完全であり、活性回収 (7 0 ~ 8 0 %) が許容できるものであったことが示された。1 0 0 m M のイミダゾールを使用して C B S の回収を得、これにより、- 7 0 °C での保管から解凍した際に有意な沈殿が生じた (図 1 1) 。さらに、純度は負荷液と比較してほんの少ししか上昇しなかった。したがって、選択金属として N i $^{++}$ I M A C を使用する実験を行った。これらの実験では、C B S 試料を G - 2 5 カラムに流してジチオスレイトール (D T T) を除去した後に、溶液を I M A C カラムに負荷した。高イミダゾールストリップ画分における A_{280} ピークが比較的小さいことによって証明される通り、純度の増強は低いままであり、選択性は Cu^{++} と同様であった (図 8、図 9 および図 1 0) 。

【 0 0 7 2 】

結合性が比較的弱い Z n $^{++}$ も試験した。捕捉、洗浄および溶出の条件に必要であったイミダゾール濃度は有意に低かったが、純度の増強に関する潜在性により、負荷後の洗浄液および高イミダゾールストリップ画分における A_{280} ピークが有意なサイズであることに起因して、陽性の結果がもたらされた。非特異的な結合を最小限にするために、0 . 4 M の N a C l および 0 . 0 1 % トリトン X - 1 0 0 を平衡化緩衝液および洗浄緩衝液に添加した (図 1 および図 3) 。試料を S D S - P A G E によって分析して、C B S タンパク質と不純物の相対量を決定した (図 1 3) 。I M A C 実験の結果が図 7 に示されている。以下の表に、カラム操作パラメータおよびそれらを使用したスケールアップ実行からのデータが示されている。

10

20

30

【表 3】

表3. Zn-IMACステップについての操作パラメータ

プロセスのステップ	カラム負荷液の標的 (1mL当たりの総タンパク質量のmg数)	イミダゾール濃度 (20mMのNa ₃ PO ₄ 、 pH7.0を伴う)	カラム容量 (mL)	接触時間、 カラム容量/ 流速(分)
平衡化	N/A	1 mM	3	10
負荷	10	0	変動する	10
洗浄	N/A	1 mM	3	10
溶出	N/A	11 mM	変動する*	10
ストリップ	N/A	100 mM	3	10

*注: 溶出液の採取をおよそ0.25AUで開始し、およそ0.16AUで終了する。空隙容量は、一般には、およそ1.5カラム容量である。

10

【表 4】

表4. スケールアップ実行からのデータ (n=5)

インプット		アウトプット		
カラム負荷(樹脂1ml当たり)				
総タンパク質量 (mg)	ユニット	回収率(%)	精製倍率(S. A. による)	
6.5-9.3	4414-7038	71.8 - 84.6	1.3 -1.6	範囲
8.1	5687	80	1.4	平均

20

【 0 0 7 3 】

(実施例 5)

H I C クロマトグラフィー

H I C クロマトグラフィーについてのパラメータを同定するために多数の実験を行った。結合性が比較的強力なりガンド(フェニル)を伴う樹脂を使用した最初の滴下カラム実験を、出発材料/負荷液としてI M A C 溶出液を用いて行った。この実験により、1.3 Mの(NH₄)₂SO₄における経験的に完全な結合がもたらされた。しかし、低イオン強度の緩衝液を用いて洗浄した後でさえC B S がカラムに有意に保持されたという証拠があった。これらの結果に基づいて、結合性が弱いリガンド(ブチル)を伴う樹脂を試験した。この樹脂を用いた最初の実験では、0.5 Mの(NH₄)₂SO₄における明らかな捕捉は示されなかった。このカラム実験の非結合性フロースルーを採取し、1.25 Mの(NH₄)₂SO₄に対して調整し、同じ(NH₄)₂SO₄の濃度に平衡化したカラムに再負荷した。この場合、カラムに有意に結合するという証拠があった。画分を採取しながら、1.25 Mの(NH₄)₂SO₄から0.25 Mの(NH₄)₂SO₄までの20カラム容量(NH₄)₂SO₄グラジエント溶出を実施した。画分のS D S - P A G E 分析により、グラジエントの下端において不純物クリアランスの有意な潜在性があることが示された。さまざまな濃度の(NH₄)₂SO₄におけるステップグラジエント洗浄を利用した実験により、最終的な操作パラメータを決定した(図1および図3)。これらのパラメータおよびスケールアップ実行データが下の表に要約されている。

30

40

【表 5】

表5. HICステップについての操作パラメータ (n=6)

プロセスのステップ	カラム負荷液の標的 (1mL当たりの総タンパク質量のmg数)	(NH ₄) ₂ SO ₄ 濃度 (20mMのNa ₂ PO ₄ 、 pH7.0を伴う)	カラム容量 (mL)	接触時間、 カラム容量/ 流速(分)
平衡化	N/A	1.4M	3	10
負荷	5-10	1.4M	変動する	10
洗浄	N/A	1.4M	3	10
溶出	N/A	1.1M	変動する*	10
ストリップ	N/A	0.05M NaCl	3	10

*注: 溶出液の採取をおよそ0.25AUで開始し、およそ0.15AUで終了する。空隙容量は、一般には、およそ1.4カラム容量である。

10

【表 6】

表6. スケールアップ実行からのデータ (n=5)

インプット		アウトプット		
カラム負荷(樹脂1ml当たり)				
総タンパク質量 (mg)	ユニット	回収率 (%)	精製倍率(S. A. による)	
5.1 - 7.2	5375 - 9248	77.8 - 92.7	1.0 - 1.3	範囲
6.3	7638	85	1.2	平均

20

【 0 0 7 4 】

(実施例 6)

C H A P クロマトグラフィー

セラミックヒドロキシアパタイトは、C B S 精製方法において利用された独特の、潜在的に混在する結合様式化学を有する樹脂である。C B S は酸性の特性を示し、したがって、最初の調査は、リン酸により調節される分配を使用することに焦点を合わせた。最初の実験では、緩衝液を 0 . 0 5 M の N a C l 、 0 . 0 0 5 M の リン酸カリウム (p H 6 . 8) 緩衝液に交換した H I C 溶出液を利用した。5 m L のセラミックヒドロキシアパタイト (1 型) カートリッジを同じ緩衝液中で平衡化し、適当な状態にした H I C 溶出液をカラムに負荷した。負荷およびその後の平衡化 / 洗浄緩衝液を用いた洗浄の間にタンパク質の目に見えるブレイクスルーはなかった (A ₂₈₀ によって測定された)。次いで、0 . 0 0 5 M ~ 0 . 5 M のリン酸カリウムの直線グラジエント (5 %) を流し、画分を採取した。クロマトグラムに基づいて、試料を S D S - P A G E によって分析して C B S タンパク質と不純物の相対量を決定した。その後の実験 (以前の実験の結果の分析に基づいて) において、リン酸のレベルを変動させたステップ洗浄を使用して、負荷ステップ、洗浄ステップ、および溶出ステップについての最適な条件を決定した。さらに、緩衝塩の組成をカリウムからリン酸ナトリウムに移行した (図 3)。以下の表に、カラム操作パラメータおよびそれらを使用したスケールアップ実行からのデータが示されている。

30

40

【表 7】

表7. CHAPステップについての操作パラメータ

プロセスのステップ	カラム負荷液の標的 (1mL当たりの総タンパク質量のmg数)	Na ₃ PO ₄ 濃度 (50mMのNaCl、 pH7.0を伴う)	カラム容量 (mL)	接触時間、 カラム容量/ 流速(分)
平衡化	N/A	10 mM	3	6
負荷	10-15	10 mM	変動する	6
洗浄	N/A	30 mM	3	6
溶出	N/A	90 mM	変動する*	6
ストリップ	N/A	150 mM	3	6

*注: 溶出液の採取をおよそ0.20AUで開始し、およそ0.16AUで終了する。空隙容量は、一般には、およそ1.0カラム容量である。

10

【表 8】

表8. スケールアップ実行からのデータ (n=5)

インプット		アウトプット		
カラム負荷(樹脂1ml当たり)				
総タンパク質量 (mg)	ユニット	回収率 (%)	精製倍率(S. A. による)	
9.9-12.2	11205 - 12297	84.6 - 92.4	1.1 - 1.2	範囲
11.1	11751	89	1.2	平均

20

【 0 0 7 5 】

(実施例 7)

統合プロセスの結果

これらの実施例に記載されている特定の多段階方法を60 mLの捕捉カラムのスケールで評価した。精製手順の全てに、E. coliにおいて発現させるために最適化されたコドンを含む核酸によりコードされるヒトCBSのトランケート型バリエーションを含む構築物を含む組換え細胞を播種した発酵から得た出発材料(粗抽出物)を利用した。この構築物により、特異的活性がおよそ2倍高い出発材料がもたらされ、統合精製方法により実現された最終的な純度に有意に強い影響があった。多段階方法を使用した全体的な精製結果をSDS-PAGEおよび特異的活性によって測定した(図5および図6)。結果により、純度および特異的活性が精製されたタグ付けされたトランケート型CBSの純度および特異的活性に応じるまたはそれを超えることが実証された。現在可能な最も大きなスケールで得られる最終的なカラム溶出液の特異的活性は全て、総タンパク質量1 mg当たり1200 Uを超えた。以下の表に、スケールアップ実行からの全体的な精製の結果が要約されている。

30

【表 9】

表9. スケールアップ実行からの全体的な結果

	総回収率 (%)		精製倍率	
	範囲	平均	範囲	平均
3カラム手順 (n=3)	57 - 60	58	5.7 - 6.2	5.9
4カラム手順 (n=2)	47 - 52	50	4.6 - 5.4	5.0

最終的なカラム溶出液の特異的活性=1206~1509。

【0076】

本発明が詳細に、その特定の実施形態を参照することによって説明されているので、添付の特許請求の範囲において定義されている本発明の範囲から逸脱することなく改変および変形が可能であることが明らかになる。より詳細には、本明細書では本発明の一部の態様が特に有利であると識別されているが、本発明は必ずしもこれらの本発明の特定の態様に限定されないことが意図されている。

【表 10 - 1】

表10: CβS配列

分子	配列番号	配列
ネイティブなヒト CpS核酸配列	1	atgccttctgagacccccaggcagaagtgggcccacag gctgccccaccgctcagggccacactcggcgaaggggag cctggagaaggggtccccagaggataaggaagccaaggag cccctgtggatccggcccgatgctccgagcaggtgcacct ggcagctgggcccggcctgcctccgagtccccacatcacca cactgccccggcaaaaatctccaaaaatcttgccagatatt ctgaagaaaatcggggacaccctatggtcagaatcaaca agattgggaagaagtccggcctgaagtgtgagctcttggc caagtgtgagttctcaacgcggggcgggagcgtgaaggac cgcatcagcctgcggatgattgaggatgctgagcgcgacg ggaogctgaagcccggggacacgattatcgagccgacatc cgggaacaccgggatcgggctggccctggctgcggcagtg aggggctatcgctgcatcatcgtgatgccagagaagatga gctccgagaaggtggacgtgctgcgggcactgggggctga gattgtgaggaccccccaatgccagggttcgactccccg gagtcacacgtgggggtggcctggcggctgaagaacgaaa tccccaatctcacatcctagaccagtaccgcaacgcag caacccccctggctcactacgacaccaccgctgatgagatc ctgcagcagtgatgggaagctggacatgctgggtggctt cagtgggcacggcgccaccatcacgggcatgccaggaa gctgaaggagaagtgtcctggatgcaggatcattgggggtg gatcccgaaggggtccatcctcgcagagccggaggagctga accagacggagcagacaacctacgaggtggaagggatcgg ctaogacttcataccccacgggtgctggacaggacgggtgtg gacaagtgggttcaagagcaacgatgaggaggcgttcacct

【表 10 - 2】

分子	配列番号	配列
		ttgccccgatgctgatcgcgcaagaggggctgctgtgctg tggcagtgctggcagcacgggtggcggtggccgtgaaggct gcgcaggagctgcaggagggccagcgtgctgctgctcattc tgccccgactcagtgccgaactacatgaccaagttcctgag cgacaggtggatgctgcagaagggctttctgaaggaggag gacctcacggagaagaagccctgggtgggtggcacctccgtg ttcaggagctgggcctgtcagccccctgacctgctccc gaccatcacctgtgggcacaccatcgagatcctccgggag aagggtctcgaccaggcggccctgggtggatgaggcggggg taatcctgggaatggtgacgcttgggaacatgctctcgtc cctgcttgccgggaaggtgcagccgtcagaccaagtggc aaagtcactctacaagcagttcaaacagatccgcctcacgg acacgctgggcaggctctcgacacatcctggagatggacca cttcgccctggtggtgcacgagcagatccagtagcacagc accgggaagtccagtcagcggcagatggtgttcgggggtg tcaccgccattgacttgcgtaacttcgtggccgcccagga gctgggaccagaagtga
ネイティブなヒト C β Sポリペプチド配列	2	MPSETPQAEVGP TGCPHRS GPHSAKGSLEKGS PEDKEAKE PLWIRPDAPS RCTWQLGR PASESPHHHTAPAKSPKILPDI LKKIGDTPMVRINKIGKKFGLKCELLAKCEFFNAGGSVKD RISLRMIEDAERDGLKPGDTIIIEPTSGNTGIGLALAAAV RGYRCIIVMPEKMSSEKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSF ESHVGVAVRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDTTAD E I LQQCDGKLDMLVASVGTGGTITGIARKLKEKCPGCRIGV DPEGSILAEPEELNQTEQTTYEVEGIGYDFIPTVLDRTVV DKWFKSNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGSAGSTVAVAVKA AQELQEGQRCVVILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGF LKEE DLTEKKPWWHLRVQELGLSAPLTVLFTITCGHTIEILRE KGFDDQAPVVDEAGVILGMVTLGNM LSSLLAGKVQPSDQVG KVIYKQFKQIRLTDTLGRLSHILEMDHFALVVHEQIQYHS TGKSSQRQMVFGVVT AIDLLNFVAAQERDQK
トランケートされた、 ヒトc β sポリペプチド 配列	3	MPSETPQAEVGP TGCPHRS GPHSAKGSLEKGS PED KEAKEPLWIRPDAPS RCTWQLGR PASESPHHHTAP AKSPKILPDILKKIGDTPMVRINKIGKKFGLKCEL LAKCEFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGLKPGD TIIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCIIVMPEKMS EKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPE SHVGVAVRL KNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDTTAD E I LQQCD GKLDMLVASVGTGGTITGIARKLKEKCPGCRIGV DPEGSILAEPEELNQTEQTTYEVEGIGYDFIPTVL DRTVVDKWFKSNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGS A GSTVAVAVKAAQELQEGQRCVVILPDSVRNYMTK F LSDRWMLQKGF LKEEDLTEKKPWWHLR
トランケートされた、 最適化されたヒトc β s 核酸配列	4	ATGCCGTCAGAAACCCCGCAGGCAGAAGTGGGTCCGACGG GTTGCCCCACCGTAGCGGTCCGCATTCTGCAAAAGGCAG TCTGGAAAAAGGTTCCCCGGAAGATAAAGAAGCCAAAGAA CCGCTGTGGATTCTGTCGGGACGCACCGTCACGCTGTACCT GGCAGCTGGGTCTGTCGGCAAGCGAATCTCCGCATCACCA TACGGCTCCGGCGAAAAGTCCGAAAATTCTGCCGATATC

10

20

30

40

【表 10 - 3】

分子	配列番号	配列
		CTGAAGAAAATTGGTGACACCCCGATGGTTCGTATCAACA AAATCGGCAAAAAATTCGGTCTGAAATGCCAACTGCTGGC TAAATGTGAATTTTCAATGCGGGCGGTTCCGTGAAAGAT CGTATCTCACTGCCATGATTGAAGATGCTGAACGCGACG GCACCTGAAACCGGGTGATACGATTATCGAACCGACCTC TGGCAACACGGGTATCGGTCTGGCACTGGCGGGCGCAGTC CGTGGTTATCGCTGCATTATCGTGATGCCGGA AAAAATGA GCTCTGAAAAAGTTGATGTCTCGGTGCTCTGGGCGCGGA AATTGTTCTGACCCCGACGAATGCCCGCTTCGACAGTCCG GAATCCCATGTGGGTGTTGCATGCGCGCTGAAAAACGAAA TCCCGAATTTCGCACATTCTGGATCAGTATCGTAACGCTAG CAATCCGCTGGCGCATTACGATACCACGGCCGACGAAATC CTGCAGCAATGTGATGGCAAACGGACATGCTGGTTCGCTT CTGTGGGTACCGGGGTACCATTACGGGCATCGCGCGTAA ACTGAAAGAAAAATGCCCGGGCTGTCGCATTATCGGTGTG GATCCGGAAGGCAGTATTCTGGCGGAACCGGAAGAAGTGA ACCAGACCGAACAAACCAGTATGAAGTTGAAGGCATCGG TTACGATTTTATTCGACCGCTCTGGATCGCACGGTGGTT GACAATGGTTCAAAGCAATGACGAAGAAGCCTTTACCT TCGCACGTATGCTGATCGCTCAGGAAGGTCTGCTGTGCGG TGGTTCAGCAGGTTGACGGTTCGACAGTGGCAGTTAAAGCT GCGCAGGAAGTGCAGAAGGTCACAGTTGTGTCGTGATTC TGCCGGATTCTGTTCGCAACTACATGACCAAAATTTCTGAG TGACCGTTGGATGCTGCAAAAAGGCTTCTTGAAGAAGAA GATCTGACCGAGAAAAACCGTGGTGGTGGCACCTGCGCT AA

10

20

【図 1 A】

CBS 精製手順 DEAE-FF → ZnIMAC (Sepharose 6B) → HiC (PharL-S Seph)

DEAE-FF カラム容量: 10 ml

重量	CONV. U/ml	検U数	mg/ml	総mL数	S.A.	記録された活性
スピン前	88.6	1.0	2655	1099	214	100.0%
スピン後	85.2	1.0	2459	963	218	89.1%

活性収率 (スピン前/スピン後) 89.1%

精製倍率 (x) 1.0

重量	CONV. U/ml	検U数	mg/ml	総mL数	S.A.	記録された活性
供前液	102.6	1.0	1947	882	226	100.0%
FT	105.2	1.0	427	200	2	0.2%
洗浄液	159.7	1.0	197	128	2	0.1%
空欄	57.6	1.0	12	62	2	0.4%
溶出液	47	1.0	3671	306	565	86.4%
溶出液-1	33.7	1.0	472	57	278	8.0%
2M NaCl	140.8	1.0	9417	282	33	4.7%

精製倍率 (x) 2.5

総タンパク質重量: 14.5, 327.5

総タンパク質濃度: 111%

記録された活性: 100%

【図 1 B】

CBS 精製手順 DEAE-FF → ZnIMAC (Sepharose 6B) → HiC (PharL-S Seph)

ZnIMAC カラム容量: 40 ml

重量	CONV. U/ml	検U数	mg/ml	総mL数	S.A.	記録された活性
供前液	47.3	1.0	3733	176570	679	100.0%
FT	156	1.0	13	200	30	1.1%
洗浄液/空欄	54.8	1.0	22	67	309	0.7%
溶出液 PK 1	39.4	1.0	941	4	1034	21.0%
溶出液 PK 2	50.5	1.0	2158	36	1027	61.7%
溶出液、P.K.の組合せ	88	1.0	1681	147928	1121	83.8%
100 mM ストリンク	86	1.0	64	50	111	3.1%

精製倍率 (x) 1.5

総タンパク質重量: 6.5, 4414

総タンパク質濃度: 97%

記録された活性: 89%

【 3 - 3 】

HIC		DEAE-FF → Zn-IMAC (Chel. Seph. FF) → HAP (セラムミック) → HIC (フタル-S. Seph.)	
重量	21 mL	総タンパク重量	7.2
濃度	1.0 mg/mL	総タンパク重量	8447
重量	43.8	mg/mL	3.82
FT/洗浄液	105.7	総mg数	152
洗出液	28.7	S.A.	1166
溶出液	44.9		50
ストリップ	40.2	配製された活性	100.0%
			0.1%
			0.1%
			90.5%
			8.1%
			99%

最初のカラム洗浄液から回収された総ユニット重量	1.0
回収率	11.3%

最初のカラム洗浄液から回収された総ユニット重量	52%
回収率	4.6

【 4 】

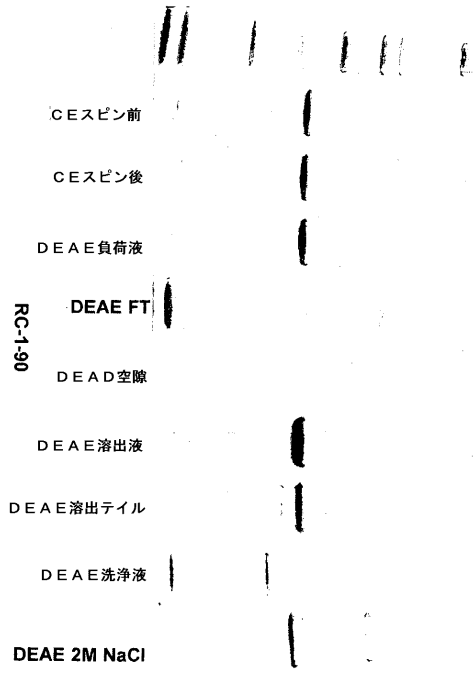


Figure 4

【 5 】

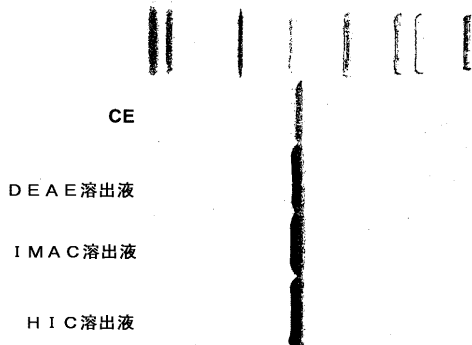


Figure 5

【 6 】

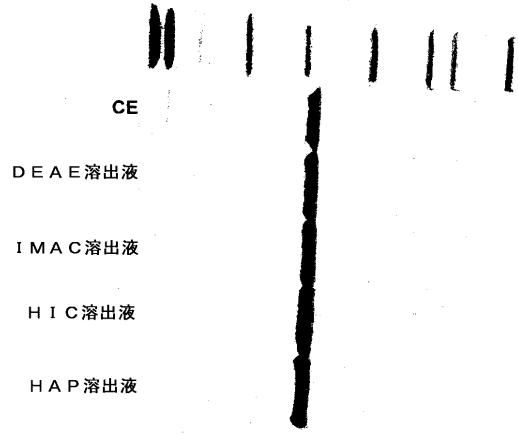
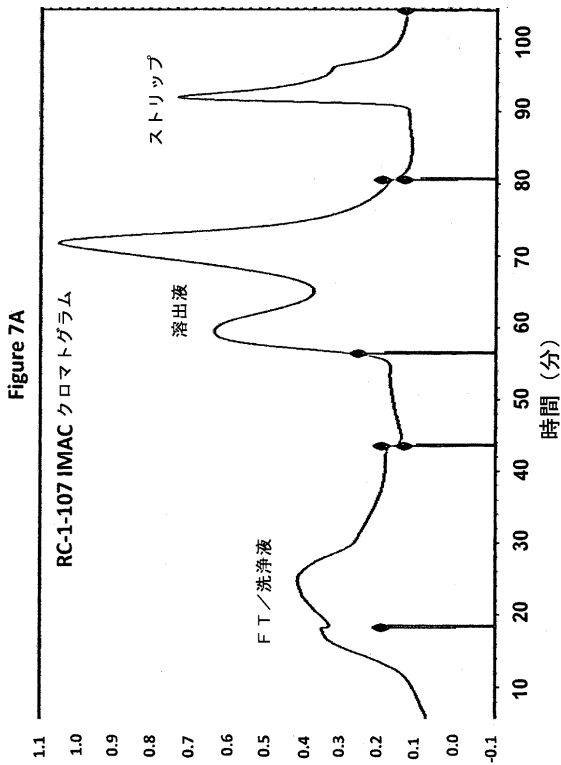
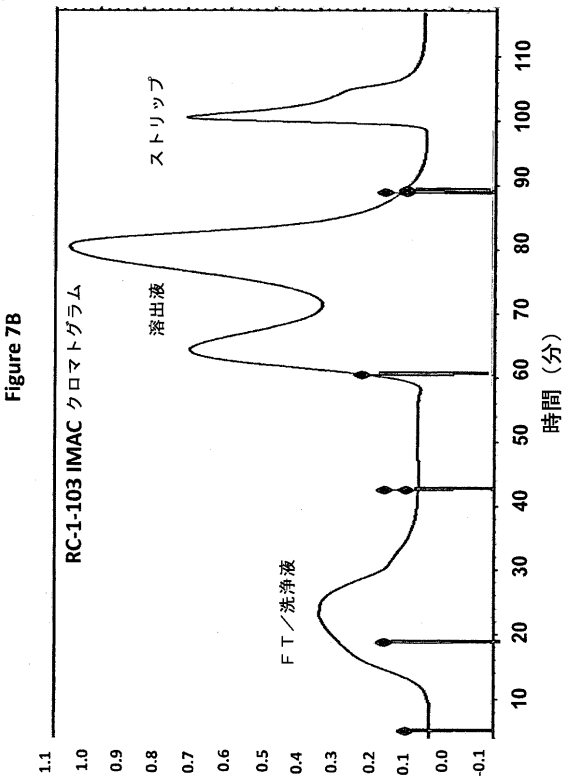


Figure 6

【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 8 】

Figure 8

カラム用試薬
カラムID RC-3
実験番号 RC-1-57 IMAC

検量 1 mL 当たり の 総タンパク質濃度 20 mg/mL

画分 ID	検量 (mg/mL)	タンパク質濃度 (mg/mL)	タンパク質濃度 (mg/mL)	アッセイからのシステチニン (nmol/mL)	アッセイからの希釈係数	画分中の総タンパク質	SA 画分	% 記録シート	% 記録シート
CE	16	15.3	244.1	76039	20	24332	100	100.0%	100.0%
IMAC 洗浄液	34.7	1.0	7.6	40808	20	26321	107	106.4%	106.5%
IMAC FT	34.3	1.0	7.3	40808	20	34	0	0.1%	31.9%
IMAC 5mM イミダゾール	32.6	1.0	2.8	4111	1	134	1	0.5%	37.5%
IMAC 5mM イミダゾール	34.3	1.0	0.6	9271	1	316	16	1.1%	7.9%
IMAC 5mM イミダゾール	5.9	1.0	0.4	30	1	264	69	0.9%	1.2%
IMAC 5mM イミダゾール	14	1.0	0.7	77625	1	1087	110	3.8%	4.0%
IMAC 5mM イミダゾール	16.6	1.0	4.6	75841	20	25212	327	89.0%	31.6%
IMAC 5mM イミダゾール	6.7	1.0	1.4	40388	5	1353	145	4.8%	3.8%
IMAC 100mM イミダゾール	38	1.0	0.4	29197	1	1109	66	3.9%	6.8%

総タンパク質濃度 (検量液から) 115.1%

検量液: 50 mM Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.002 M イミダゾール, 0.01% トリス, pH 7.0
 平衡化: 0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.005 M イミダゾール, 0.01% トリス, pH 7.0
 洗浄: 0.02 M Na3PO4, 0.4 M NaCl, 0.005 M イミダゾール, 0.01% トリス, pH 7.0
 ストリップ: 100 mM イミダゾール
 再平衡化: 1 M NaOH
 検量: 0.001 M NaOH

【 図 9 】

Figure 9

Bradford アッセイ (総タンパク質濃度)
 日付: 4/7/2011
 検量液: BSA ストック 2000 ug/mL
 試料: 10

検量液 (ug/mL) BSA (uL) 水 (uL)

1	0	0	40
2	50	1	39
3	125	2.5	37.5
4	250	5	35
5	500	10	30
6	1000	20	20

検量液当量 10 uL、3 重に実行

試料番号	検量液 (uL)	水 (uL)	Bradford (ug/uL)
1	1000	2	198
2	1925.9	4	196
3	2852	8	192
4	3778	16	182
5	4704	20	180
6	5630	20	180
7	6556	20	180
8	7482	20	180
9	8408	20	180
10	9334	20	180
11	10260	20	180
12	11186	20	180
13	12112	20	180
14	13038	20	180
15	13964	20	180
16	14890	20	180
17	15816	20	180
18	16742	20	180
19	17668	20	180
20	18594	20	180
21	19520	20	180
22	20446	20	180
23	21372	20	180
24	22298	20	180

検量液 (3 重を含む) 10
 必要であった Bradford 試験の重 19

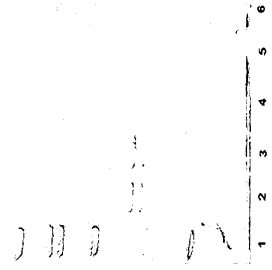
1 適切な量の試薬を取り出し、室温にする。
 2 1.0 mL の検量液または試料を各ウェルに添加する。
 3 5 分間、室温で静置する。多量セルプレートを使用し、
 4 室温で 10 分インキュベートする。
 5 VersaMax を読み取る。

【 10 A 】

Figure 10A

レーン	試料	T P 濃度 (ug/ul)	ゲルに對する濃度 (ug)	希釈度 (X)	試料緩衝液 (ul)	タンパク質 (10μg/2.6μLに對し)	ddH2O (ul)
1	BIORAD 標準物質	--	--	1		1.00	11.50
2	CE	15.256	10	1		0.66	11.84
3	IMAC 負荷液	7.6292	10	1		1.31	11.19
4	IMAC FT	2.2707	10	1	12.5	4.40	8.10
5	IMAC 平衡洗滌液	2.8103	10	1		3.56	8.94
6	IMAC 5min イミダゾール洗滌液	0.5593	10	1		12.50	0.00

7μgのみを
負荷

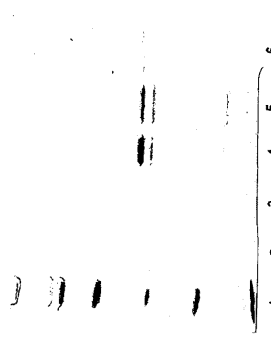


【 10 B 】

Figure 10B

レーン	試料	T P 濃度 (ug/ul)	ゲルに對する濃度 (ug)	希釈度 (X)	試料緩衝液 (ul)	タンパク質 (10μg/2.6μLに對し)	ddH2O (ul)
1	BIORAD 標準物質	--	--	1		1.00	11.5
2	IMAC 負載	0.4323	10	1		12.50	0.00
3	IMAC 洗出液フロント	0.7027	10	1	12.5	12.50	0.00
4	IMAC 洗出液	4.6492	10	1		2.15	10.35
5	IMAC 洗出液テイル	1.389	10	1		7.20	5.3
6	IMAC 100mm イミダゾール	0.4393	10	1		12.50	0.00

5. 4μgのみを負荷
8. 7.8μgのみを負荷



【 1 1 】

Figure 11

キレートセフェトロースFFにおけるCBS抽出

実験番号 | RC-139

日付 | 02/18/11

RC-32 キレート

カラミD | Seph. FF

カラミ容量 = 6.2 mL (柱: カラムA, 6.2 mL, 6.5 cmまで使用)

樹脂 | 1 mL 当たりの数タンパク質負荷

部分ID	成分	タンパク質 (mg/mL)	部分中の総タンパク質 (mg)	アッセイからの希釈率	部分中の総ユニット	% 記録ユニット	% 記録タンパク質
CE	11	1.0	88.0	74067	10	8147	100.0%
負荷液	11.4	1.0	92.3	82223	10	9373	101.5
洗出液	16	1.0	0.3	4.8	7	0	0.0%
FT/洗出液	62	1.0	1.2	74.4	368	4.9	4.5%
洗出液	25	1.0	2.1	56851	5	7106	135.4
50mm イミダゾール洗出液	36	1.0	0.2	1152	1	41	5.8

平衡液: 0.02 M リン酸, 0.002 M イミダゾール, 0.4 M NaCl, pH 7.0

洗滌液: 0.02 M リン酸, 0.002 M イミダゾール, 0.4 M NaCl, pH 7.0

洗出液: 0.02 M リン酸, 0.1 M イミダゾール, 0.4 M NaCl, pH 7.0

ストリップ: 0.5 M イミダゾール

再生液: 1.0 M NaOH

保管: 0.001 M NaOH

抽出液中の回収率 (負荷液から): 75.8%

物質収支: ユニットの回収率 (洗出液から): 92.3%

物質収支: ユニットの回収率 (洗出液から): 80.2%

【 1 2 】

Figure 12

試料番号	試料	タンパク質 (ug/mL)	希釈度	タンパク質 (ul)	Bradford (ug/mL)
1	スピン-結合自己溶液	100	2	188	32187.209
2	平衡液	20	10	190	11830.182
3	FT	10	20	180	3310.385
4	50mM 洗出液	10	20	180	262.588
5	80mM 洗出液	10	20	180	670.278
6	120mM 洗出液	10	20	180	324.895

1. 希釈液の試液を振り出し、室温にする

2. 1.0 mL の標準物質または試液を各ウェルに添加する

3. 30分間の室温で、多量にブレンドを使用し、室温にする

4. 515 nm で吸光度を測定する

【 図 1 3 】

Figure 13

レーン	試料	TP 濃度 (ug/ul)	ケルに對 する濃度 (ug)	希釈度 (X)	試料繼 衝液 (ul)	タンパク質 (10μg/ 25μLに對し C)	ddH ₂ O (ul)
1	BIORAD 標準物質	--	--	1	1.00	1.00	11.50
2	Equil 洗浄液	11.83	10	1	0.85	12.50	11.65
3	5mM 洗浄液	0.2526	10	1	12.5	12.50	0.00
4	8mM 洗浄液	0.6703	10	1	12.50	12.50	0.00
5	20mM 洗浄液	0.5249	10	1	12.50	12.50	0.00

3. 1.6μgのタンパク質を載荷
 8. 3.8μgのタンパク質を載荷
 6. 5.6μgのタンパク質を載荷

1 2 3 4 5

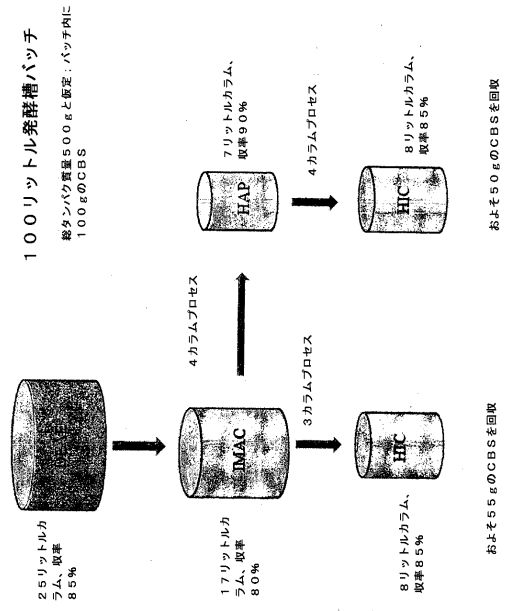
【 配列表 】

0006146934000001.app

【 図 1 4 】

Figure 14

プロセスフローチャート



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72)発明者 クラウス, ジャン ピー.
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 1 2 3, リトルトン, レイクショア ドライブ 5 0 0 0

(72)発明者 マイタン, トーマス
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 0 1 1, オーロラ, アイディリア コート 1 0 0, アパ
 ートメント ナンバー 3 0 2

(72)発明者 ナバー, デイビッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 1 1, ピードモント, モンティ アベニュー 1 1
 9

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第 0 3 / 1 0 6 9 7 1 (W O , A 1)
 欧州特許出願公開第 0 1 8 7 8 7 3 9 (E P , A 1)
 国際公開第 9 5 / 0 0 7 7 1 4 (W O , A 1)
 FRANK N. et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, 470(2008), p.64-72
 BELEW M.S. et al., Protein Expression and Purification, 64(2009), p.139-145
 WANG W. et al., Progress in Modern Biomedicine (Xiandai Shengwuyixue Jinzhan), 11(5)(2
 011), p.830-833
 KRAUS J. et al., J. Biol. Chem., Vol.253, No.18(1978), p.6523-6528
 ONO B. et al., YEAST, Vol.10(1994), p.333-339
 VOZDEK R. et al, Biochem. J., 443(2012 Apr), p.535-547

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 9 / 8 8

C 1 2 P 2 1 / 0 2

C 1 2 N 1 5 / 0 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)