

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和3年1月28日(2021.1.28)

【公表番号】特表2020-506933(P2020-506933A)

【公表日】令和2年3月5日(2020.3.5)

【年通号数】公開・登録公報2020-009

【出願番号】特願2019-542078(P2019-542078)

【国際特許分類】

C 07 K 14/47 (2006.01)

C 07 K 1/16 (2006.01)

C 07 K 19/00 (2006.01)

C 12 P 21/02 (2006.01)

C 12 N 15/62 (2006.01)

【F I】

C 07 K 14/47 Z N A

C 07 K 1/16

C 07 K 19/00

C 12 P 21/02 C

C 12 N 15/62 Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年12月11日(2020.12.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

P - セレクチン糖タンパク質リガンド - 1 (P S G L - 1 G e n B a n k A c c . N . Q 1 4 2 4 2 . 1) の成熟細胞外ドメインを含む標的可溶性タンパク質を精製する方法であって、

前記タンパク質は、N末端にP S G L - 1 の成熟型の少なくともaa5 - 16を含み、および神経網膜特異的ロイシンジッパートンパク質 (N C B I A c c . N : N P _ 0 0 6 1 6 8 1) の少なくともaa187 ~ 208、または、aa187 ~ 208と90%相同的アミノ酸配列を含み、

前記方法は、前記の標的可溶性タンパク質を含む混合物を、
 a) 強力なアニオニン交換 (A E) 固相クロマトグラフィー、
 b) 疎水性相互作用 (H I) 固相クロマトグラフィーおよび
 c) ヒドロキシアパタイト (H A) 固相クロマトグラフィー、
 に、上記に示された順番で供するステップを含む、

方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

前記の強力なアニオニン交換クロマトグラフィーは、トリス、トリシン、トリエタノールアミン、H E P E S、T E S、M O P S およびリン酸からなる群より選択されるバッファーと合わせて、強力なアニオニン交換固相上に、前記の標的可溶性タンパク質を含む混合物をローディングするステップを含む、
 方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、

前記バッファーは、30 mMよりも低い濃度で、pH 6.5～8 のトリスまたはリン酸である、
方法。

【請求項 4】

請求項 2 から 3 のいずれか一項に記載の方法であって、

生理食塩水の濃度を1Mまで増大することによる、定組成溶離または陽性勾配溶離の下での、NaCl または KCl 生理食塩水を用いた前記の強力なアニオン交換固相からの標的タンパク質の溶離をさらに含む、
方法。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記疎水性相互作用固相は、フェニル-疎水性固相である、
方法。

【請求項 6】

請求項 4 から 5 のいずれか一項に記載の方法であって、

AE から溶離された標的可溶性タンパク質を含む混合物は、高塩濃度を含むローディングバッファーにおいて前記疎水性相互作用固相クロマトグラフィー上にローディングされて、ここで塩類は、NaCl、硫酸アンモニウムおよび硫酸カリウムからなる群より選択される、
方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、

前記バッファーは、100 mMよりも低い濃度のトリスであって、前記塩はNaCl である、
方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、

前記トリスバッファーにおいて、前記NaCl 濃度は3.5Mよりも高い、
方法。

【請求項 9】

請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法であって、

緩衝液を加えることによる、前記疎水性相互作用 (HI) 固相クロマトグラフィーからの前記標的タンパク質の溶離をさらに含み、前記NaCl 塩濃度は2.5Mよりも低い、
方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、

HI から溶離された可溶性標的タンパク質を含む混合物は、pH 6.5～8 で15 mM よりも低いバッファー濃度にされて、H A カラム上にローディングされる、
方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、

前記バッファーは、pH 6.6～7.4 のトリスおよびリン酸から選択される、
方法。

【請求項 12】

請求項 10 から 11 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記バッファーはリン酸であり、0.5 mM よりも低い濃度、好ましくは約0.3 mM でCaCl₂ を含む、
方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記バッファーはトリスであり、MgCl₂を含む、
方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の方法であって、
MgCl₂は、1.5 mMよりも低い濃度、好ましくは1.2 mMである、
方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 0 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法であって、
15 mMよりも低くてpH 6.5 ~ 8の適切なバッファー濃度は、希釀または透析濾過
によって達成される、
方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 または 1 5 に記載の方法であって、
前記標的タンパク質は、ヒドロキシアパタイト固相クロマトグラフィー後の素通り画分
内に見られる、
方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 3 から 1 5 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記標的タンパク質は、リン酸イオン濃度を15 mMよりも上に増大させることによっ
て、前記ヒドロキシアパタイト固相から溶離される、
方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の方法であって、
前記の増大は、リン酸濃度勾配によって行われる、
方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記標的可溶性タンパク質は、N末端に、PSGL-1 (GenBank Acc. N
.Q14242.1) の成熟型の少なくとも aa1 ~ 47、神經網膜特異的ロイシンジッ
パートンパク質 (NCBI Acc. N: NP_0061681) の少なくとも aa18
7 ~ 208、および、少なくとも 1 つの Cys を含む共有結合二量体化ドメインを含む、
方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の方法であって、
前記標的タンパク質は、配列番号 1 または配列番号 2 を有する、
方法。