

【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 1 年 6 月 27 日 (2019.6.27)

【公開番号】特開 2018-141017 (P2018-141017A)

【公開日】平成 30 年 9 月 13 日 (2018.9.13)

【年通号数】公開・登録公報 2018-035

【出願番号】特願 2018-107188 (P2018-107188)

【国際特許分類】

C 07K 1/22 (2006.01)

C 12N 15/62 (2006.01)

C 07K 19/00 (2006.01)

【F I】

C 07K 1/22

C 12N 15/62

C 12N 15/62 Z N A

C 07K 19/00

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 5 月 21 日 (2019.5.21)

【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】

C - インテインポリペプチドを含む第 2 の融合タンパク質との結合により、活性インテ  
イン複合体を形成することができる N - インテインポリペプチドを含む可溶性融合タン  
パク質であって、N - インテインポリペプチドは、固体支持体に共有結合され得る、可溶性  
融合タンパク質。

【請求項 2】

前記固体支持体が、ビーズ、中空繊維、中実繊維、パッド、ゲル、膜、カセット、カラ  
ム、チップ、スライド、プレート又はモノリスである、請求項 1 に記載の可溶性融合タン  
パク質。

【請求項 3】

前記固体支持体が、クロマトグラフィー樹脂である、請求項 1 又は 2 に記載の可溶性融  
合タンパク質。

【請求項 4】

固体支持体に任意に共有結合により結合される N - インテインポリペプチドを含むマト  
リックス。

【請求項 5】

前記固体支持体が、クロマトグラフィー樹脂である、請求項 4 に記載のマトリックス。

【請求項 6】

前記クロマトグラフィー樹脂が、親水性ポリビニルエーテルベースを含む、請求項 5 に  
記載のマトリックス。

【請求項 7】

前記固体支持体が、ビーズ、中空繊維、中実繊維、パッド、ゲル、膜、カセット、カラ  
ム、チップ、スライド、プレート又はモノリスである、請求項 4 ～ 6 いずれかに記載のマ  
トリックス。

**【請求項 8】**

前記固体支持体が、磁気ビーズである、請求項 7 に記載のマトリックス。

**【請求項 9】**

前記固体支持体が、多孔性ガラス、シリカ、酸化ジルコニウム、酸化チタン、アガロース、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリスチレン又はこれらの誘導体を含む、請求項 4 ～ 8 いずれかに記載のマトリックス。

**【請求項 10】**

a) ペプチド結合により標的分子に結合した C - インティンポリペプチドを含む第 1 の融合タンパク質；及び

b) 固体支持体に任意に共有結合により結合される N - インティンポリペプチドを含むアフィニティクロマトグラフィーマトリックスを含む、分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 11】**

前記 N - インティンポリペプチドは、ペプチド結合により結合した N - インティンと N - インティン可溶化パートナーを含む第 2 の融合タンパク質として存在する、請求項 10 に記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 12】**

前記固体支持体が、クロマトグラフィー樹脂である、請求項 10 又は 11 に記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 13】**

前記クロマトグラフィー樹脂が、親水性ポリビニルエーテルベースを含む、請求項 12 に記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 14】**

前記固体支持体が、ビーズ、中空繊維、中実繊維、パッド、ゲル、膜、カセット、カラム、チップ、スライド、プレート又はモノリスである、請求項 10 ～ 13 いずれかに記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 15】**

前記固体支持体が、磁気ビーズである、請求項 14 に記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 16】**

前記固体支持体が、多孔性ガラス、シリカ、酸化ジルコニウム、酸化チタン、アガロース、ポリメタクリレート、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリスチレン又はこれらの誘導体を含む、請求項 10 ～ 15 いずれかに記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 17】**

前記アフィニティクロマトグラフィーマトリックスが、前記融合タンパク質と固体支持体の間にスペーサ分子をさらに含む、請求項 11 ～ 16 いずれかに記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 18】**

前記融合タンパク質が、前記 N - インティン可溶化パートナーの単一部位で前記固体支持体に結合される、請求項 11 ～ 17 いずれかに記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 19】**

前記融合タンパク質が、前記 N - インティン可溶化パートナーの 2 つ以上の部位で前記固体支持体に結合される、請求項 11 ～ 17 いずれかに記載の分断インティン系アフィニティクロマトグラフィーシステム。

**【請求項 20】**

サンプル中の標的分子をアフィニティ精製する方法であって、

a) ペプチド結合により標的分子に結合した C - インティンポリペプチドを含む第 1 の

融合タンパク質を含有するサンプルを提供するステップ；

b) 前記第1の融合タンパク質中の前記C - インティンポリペプチドが、N - インティンポリペプチドと選択的に結合して、不活性であるインティン複合体を形成する条件下で、請求項1に規定されるN - インティンを含むアフィニティークロマトグラフィーマトリックスと前記サンプルを接触させるステップ；

c) 不活性インティン複合体を含むアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄して、非結合混入物を除去するステップ；

d) 前記インティン複合体が活性となり、前記C - インティンポリペプチドから前記標的分子を切断する条件に、前記インティン複合体を曝露するステップ；及び

e) 切断された標的分子を回収するステップ

を含む、方法。

**【請求項21】**

請求項10に記載の分断インティン系アフィニティークロマトグラフィーシステムを使用して標的分子を精製する方法であって、

a) ペプチド結合により標的分子に結合したC - インティンポリペプチドを含む第1の融合タンパク質を含有するサンプルを提供するステップ；

b) 前記第1の融合タンパク質中の前記C - インティンポリペプチドが、N - インティンポリペプチドと選択的に結合して、不活性であるインティン複合体を形成する条件下で、N - インティンを含むアフィニティークロマトグラフィーマトリックスと前記サンプルを接触させるステップ；

c) 不活性インティン複合体を含むアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄して、非結合混入物を除去するステップ；

d) 前記インティン複合体が活性となり、前記C - インティンポリペプチドから前記標的分子を切断する条件に、前記インティン複合体を曝露するステップ；及び

e) 切断された標的分子を回収するステップ

を含む、方法。

**【請求項22】**

前記第1の融合タンパク質中の前記C - インティンポリペプチドが、前記第2の融合タンパク質中の前記N - インティンポリペプチドと選択的に結合して、触媒として不活性のインティン複合体を形成する条件が、

a) 約4 ~ 25 の範囲の温度、及び100 mM トリス - HCl、25 mM NaCl、0.1 mM 塩化亜鉛、pH = 9を含むバッファー；

b) 約4 ~ 25 の範囲の温度、及び50 mM NaAc、0.5 M NaCl、pH = 5を含むバッファー；又は

c) 約4 ~ 25 の範囲の温度、及び0.5 M NaCl、10 mM トリス - HCl、pH = 8を含むバッファー

を含む、請求項20又は21に記載の方法。

**【請求項23】**

前記インティン複合体の触媒活性を促進する条件が、

a) 50 mM トリス - HCl、pH = 7.0、300 mM NaCl、1 mM EDTAを含むバッファー；

b) 0.3 M L - アルギニン、5 mM EDTA、50 mM リン酸バッファー、pH = 6.5を含むバッファー；又は

c) 0.5 M NaCl、10 mM トリス - HCl、50 mM DTT、pH = 8.0を含むバッファー

を含む、請求項20 ~ 22いずれかに記載の方法。

**【請求項24】**

前記N - インティン可溶化パートナーが、15 kDa未満の分子量、60未満の脂肪族指数 (Aliphatic Index) 値、及び - 1未満の疎水度大規模平均値を有する、請求項20 ~ 23いずれかに記載の方法。

**【請求項 25】**

前記 N - インティン可溶化パートナーが、N - インティン可溶化パートナー 138 (配列番号 15) 又はその変異体である、請求項 20 ~ 24 いずれかに記載の方法。

**【請求項 26】**

前記 N - インティンポリペプチドが、GP 41 - 1 N - インティン (配列番号 1) 又はその変異体であり、前記 C - インティンポリペプチドが、GP 41 - 1 C - インティン (配列番号 9) である、請求項 20 ~ 25 いずれかに記載の方法。

**【請求項 27】**

前記標的分子が、治療標的に対するモノクローナル抗体であるか、又は前記標的分子が、治療標的である、請求項 20 ~ 26 いずれかに記載の方法。

**【請求項 28】**

後の使用のために、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスをクリーニング、再生又は保存するステップをさらに含む、請求項 20 ~ 27 いずれかに記載の方法。

**【請求項 29】**

アフィニティ精製での使用に好適なインティン複合体のスクリーニング方法であって、  
a) 第 1 の融合タンパク質中の C - インティンポリペプチドが N - インティンポリペプチドと選択的に結合して、インティン複合体を形成する条件下で、ペプチド結合により標的分子に結合した C - インティンポリペプチドを含む第 1 の融合タンパク質と、請求項 1 に規定される N - インティンを接触させるステップ；及び

b) インティン活性を支持する条件下で、前記標的分子が、前記 C - インティンポリペプチドから切断されているか否かを決定するステップ、ここで、切断された標的分子の存在が、触媒活性インティン複合体を示す、  
を含む、方法。

**【請求項 30】**

ペプチド結合により標的分子に結合した C - インティンポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクター。

**【請求項 31】**

前記標的分子が、治療標的に対するモノクローナル抗体であるか、又は前記標的分子が、治療標的である、請求項 30 に記載の発現ベクター。

**【請求項 32】**

請求項 30 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞により産生される、C - インティンポリペプチド及び標的分子を含む融合タンパク質であって、前記融合タンパク質は、相補的な N - インティンポリペプチドと結合し得る、融合タンパク質。