

【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】平成25年9月26日 (2013.9.26)

【公表番号】特表2013-508388(P2013-508388A)
 【公表日】平成25年3月7日 (2013.3.7)
 【年通号数】公開・登録公報2013-012
 【出願番号】特願2012-535338(P2012-535338)
 【国際特許分類】

C 0 7 K 14/33 (2006.01)
 C 0 7 K 1/18 (2006.01)
 C 0 7 K 1/20 (2006.01)
 C 0 7 K 1/36 (2006.01)
 C 0 7 K 1/30 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/33
 C 0 7 K 1/18
 C 0 7 K 1/20
 C 0 7 K 1/36
 C 0 7 K 1/30
 C 1 2 P 21/02 A

【手続補正書】
 【提出日】平成25年7月23日 (2013.7.23)
 【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】

非複合ボツリヌス毒素を精製するための方法であって、前記方法は、

- (i) 粗非複合ボツリヌス毒素を提供すること；
 - (i i) アニオン交換カラムによる非複合ボツリヌス毒素の捕捉を可能にするように、アニオン交換カラムに前記非複合ボツリヌス毒素をローディングすること；
 - (i i i) 前記アニオン交換カラムから前記非複合ボツリヌス毒素を溶出して、非複合ボツリヌス毒素を含む溶離液を得ること；
 - (i v) カチオン交換カラムによる非複合ボツリヌス毒素の捕捉を可能にするように、前記アニオン交換カラムからの溶離液を前記カチオン交換カラムにローディングすること；
- および
- (v) 前記カチオン交換カラムから、精製非複合ボツリヌス毒素を溶出することを含む、方法。

【請求項 2】

粗非複合ボツリヌス毒素が、
 ボツリヌス毒素複合体を含むサンプルを得ること；
 疎水性相互作用カラムによるボツリヌス毒素複合体の捕捉を可能にするように、疎水性相互作用カラムに前記サンプルをローディングすること；
 前記疎水性相互作用クロマトグラフィーカラムから前記ボツリヌス毒素複合体を溶出させること；および

前記ボツリヌス毒素複合体を解離して、粗非複合ボツリヌス毒素を含む混合物を得ることによって得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

サンプルがボツリヌス毒素複合体を含む上清またはろ液である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプルが、

ボツリヌス毒素を含む発酵培養物を酸沈殿に供して酸沈殿物を得ること；および前記沈殿物に対して接線流ろ過を実施して沈殿物を濃縮することによって得られる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

サンプルが、発酵培養物の不溶性画分を接線流ろ過に供することによって得られる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

サンプルが、疎水性相互作用カラムへのローディング前にヌクレアーゼ消化に供される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

ヌクレアーゼが動物産物を含まないプロセスに由来する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

動物産物を含まない、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

精製非複合ボツリヌス毒素が、A 型、B 型、C₁ 型、D 型、F 型、F 型、および G 型ボツリヌス毒素の少なくとも 1 種を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

精製非複合ボツリヌス毒素が A 型ボツリヌス毒素を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

精製非複合ボツリヌス毒素が少なくとも 95% 純粋である、請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

精製非複合ボツリヌス毒素が少なくとも 200 LD₅₀ 単位/ng の活性を有する、請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

少なくとも 2 mg/L 発酵培養の収率を生じる、請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

アニオン性カラムが、Q Sepharose HP、Q Sepharose Fast Flow、および Q XL Sepharose カラムからなる群より選択され、カチオン性カラムが、SP Sepharose、SP Sepharose HP、SP Sepharose Fast Flow、Mono S、Source-S、Source-30S、および Source-15S カラムからなる群より選択される、請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

アニオン性カラムに非複合ボツリヌス毒素をローディングするための緩衝液が、Tris、ビス-Tris、トリエタノールアミン、および N-メチルジエタノールアミンからなる群より選択される、請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

緩衝液が 7.4 ～ 8.2 の pH で使用される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

カチオン性カラムに非複合ボツリヌス毒素をローディングするための緩衝液が、リン酸ナトリウム、MES、および HEPES からなる群より選択される、請求項 1 ～ 16 のい

れかに記載の方法。

【請求項 18】

緩衝液が 6.0～7.0 の pH で使用される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

アニオン性カラムの pH が 7.4～8.2 である、請求項 1～18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

カチオン性カラムの pH が 6.0～7.0 である、請求項 1～19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

アニオン性カラムからの非複合ボツリヌス毒素を溶出させるための勾配が、塩化ナトリウムの上昇勾配および塩化カリウムの上昇勾配からなる群より選択される、請求項 1～20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

勾配が 7.4～8.4 の pH で使用される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

カチオン性カラムから非複合ボツリヌス毒素を溶出させるための勾配が、塩化ナトリウムの上昇勾配および塩化カリウムの上昇勾配からなる群より選択される、請求項 1～22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

勾配が 6.0～7.0 の pH で使用される、請求項 23 に記載の方法。