

【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1部門第1区分

【発行日】平成17年5月26日(2005.5.26)

【公表番号】特表2004-524023(P2004-524023A)

【公表日】平成16年8月12日(2004.8.12)

【年通号数】公開・登録公報2004-031

【出願番号】特願2002-559551(P2002-559551)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09  
 A 6 1 K 38/00  
 A 6 1 K 39/395  
 A 6 1 K 51/00  
 A 6 1 P 35/00  
 C 0 7 K 16/18  
 C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 P 21/08  
 C 1 2 Q 1/02  
 C 1 2 Q 1/68

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/395	C
A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	16/18	
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/08	
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	49/02	A

【手続補正書】

【提出日】平成15年8月20日(2003.8.20)

【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】請求項53

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項53】

細胞系統が、ジャーカット、M O L T - 4、H S - 6 0 2、U 9 3 7、T F - 1、T H P - 1、K G - 1、M L - 2 及び H U T - 7 8 から成るグループの中から選択されている、請求項52に記載のペプチド又はポリペプチド。

【手続補正2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項80

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項 80】

前記小型ペプチドが、AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPTH、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG(商標)、T7、V5、VSV-G及びKAK-Tagから成るグループの中から選択されている、請求項79に記載の組成物。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項81

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項 81】

前記タグが、AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPTH、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG(商標)、T7、V5、VSV-G、及びKAK-Tagから成るグループの中から選択されている、請求項1、31、34及び37のいずれか1項に記載のペプチド又はポリペプチド。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項85

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項 85】

前記抗癌剤が、ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、cis-プラチナ、タキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラピン、クロラムブシル、インターフェロンアルファ、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド、プレオマイシン及びそれらの誘導体から成るグループの中から選択されている、請求項82に記載の組成物。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項125

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項 125】

抗癌剤が、ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラピン、クロラムブシル、インターフェロンアルファ、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド、プレオマイシン及びそれらの誘導体から成るグループの中から選択されている、請求項122に記載の方法。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項171

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項 171】

標的細胞上又はその中の実質的に露呈されかつ/又は過剰発現された結合部位に対し選択的及び/又は特異的に結合するべく増強された結合特性をもつ、Fv分子、その構成体、そのいずれかのフラグメント又はフラグメントの構成体を含んで成るペプチド又はポリ

ペプチドにおいて、標的細胞に対する結合が、その上又は中で結合部位が実質的に利用可能でないかつ/又は発現されていないその他の細胞に有利なように発生し、結合選択性又は特異性が、主として第1の超可変領域によって決定され、第1の超可変領域が、配列番号8又は20から成るCDR3領域であり、FvがscFv又はdsFvであり、Fvが任意には単数又は複数のタグを有するペプチド又はポリペプチド。

【手続補正7】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項173

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項173】

その他の細胞に有利なように標的細胞に対し選択的及び/又は特異的に結合するべく増強された結合特性をもつ、Fv分子、その構成体、そのいずれかのフラグメント又はフラグメントの構成体を含んで成るペプチド又はポリペプチドにおいて、Fv分子が、第1、第2及び第3の超可変領域をもつ第1の鎖及び第1、第2及び第3の超可変領域をもつ第2の鎖を含んで成り、第1鎖の超可変領域のうちの一つが、配列番号8又は20の配列を含み、第2鎖の超可変領域のうちの一つが、配列番号1~6及び125~202から成るグループの中から選択された一つの配列を有し、第1、第2及び第3の超可変領域は、それぞれCDR3、CDR2及びCDR1領域であり、FvはscFv又はdsFvであり、Fvが任意には単数又は複数のタグを有する、ペプチド又はポリペプチド。

【手続補正8】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項191

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項191】

細胞系統が、ジャーカット、MOLT-4、HS-602、U937、TF-1、THP-1、KG-1及びHUT-78から成るグループの中から選択されている、請求項190に記載のペプチド又はポリペプチド。

【手続補正9】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項211

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項211】

前記小型ペプチドが、AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPHH、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG(商標)、T7、V5及びVSV-Gから成るグループの中から選択されている、請求項210に記載の組成物。

【手続補正10】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項212

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項212】

タグが、AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTTPHH、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG(商標)、T7、V5及びVSV-Gから成るグループの中から選択されている、請求項137、170、172及び175のいずれか1項に記載のペプチド又はポリペプチド。

【手続補正11】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 2 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2 1 6】

前記抗癌剤が、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、cis - プラチナ、トキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン（Ara - C）、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロンアルファ、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド、プレオマイシン及びそれらの誘導体から成るグループの中から選択されている、請求項 2 1 2 に記載の組成物。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 6】

[ 6 . ] A M L は、通常の条件下で骨髄性系列の末端分化した細胞（赤血球、顆粒球、単球及び血小板）を発生させる始原細胞を伴う新生物の異種起原のグループである。その他の形態の新形成の場合と同様、A M L は、単数又は複数のタイプの早期骨髄様分化を示す。比較的未分化の芽細胞での正常に分化した骨髄様細胞の置換を結果としてもたらず後天的遺伝的改変と結びつけられる。A M L は一般に、骨髄中で進行し、それより低い程度であるが、二次的造血器官の中で進行する。A M L は、主として成人が罹患し、1 5 ~ 4 0 歳で出現率がピークに達するが、小児と同時により高齢の成人も罹患することもわかっている。A M L 患者のほぼ全てが、未分化芽細胞の異常な循環レベルの証拠が全く無い臨床的緩解に達するために、診断の直後の治療を必要とする。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 8】

[ 8 . ] いくつかのその他のヒト化及びキメラ抗体が開発中であるか又は臨床試験中である。さらに、正常な骨髄様細胞ならびに大部分のタイプの骨髄性白血病細胞の両方の上で発現された C D 3 3 抗原と特異的に反応するヒト化 I g が、抗癌薬カリケマイシン、C M A - 6 7 6 ( Sievers et al., Blood, 9 0 ( 1 0 Suppl. 1 Part 1 ), 5 0 4 A ( 1 9 9 7 ) ) に接合された。薬物 M Y L O T A R G ( 商標 ) として知られているこの接合体は、最近承認された ( Caron et al., Cancer Supplement, 7 3, 1 0 4 9 - 1 0 5 6 ( 1 9 9 4 ) ) 。その細胞溶解活性を考慮して、現在臨床試験中の付加的な抗 - C D 3 3 抗体 ( H u M 1 9 5 ) が、ゲロニン毒素 ( McGraw et al., Cancer Immunol, Immunother, 3 9, 3 6 7 - 3 7 4 ( 1 9 9 4 ) ) 及び放射性同位元素<sup>131</sup>I ( Caron et al., Blood 8 3, 1 7 6 0 - 1 7 6 8 ( 1 9 9 4 ) ) 、<sup>90</sup>Y ( Jurci et al., Blood, 9 2, ( 1 0 Suppl, Part 1 ~ 2 ) 、6 1 3 A ( 1 9 9 8 ) ) 及び<sup>213</sup>B i ( Sgouras et al., J. Nucl, Med., 3 8 ( 5 Suppl. ) 2 3 1 P ( 1 9 9 7 ) ) を含めた複数の細胞毒性作用物質に接合された。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 1

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0041】

[56.] 保存的アミノ酸置換というのは、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質又はそのフラグメントの1つ又は2個のアミノ酸を変更することによるアミノ酸組成物内の変化として定義づけされる。置換は、置換が主要な形でペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の特徴（例えば電荷、等電点、親和性、結合力、立体配座、可溶性）又は活性を実質的に改変しないように一般に類似の特性（例えば酸性、塩基性、芳香族、サイズ、正又は負の帯電、非極性）をもつアミノ酸に関するものである。かかる保存的アミノ酸置換のために実施可能な標準的置換は、以下のようなアミノ酸の基の間でのものでありうる：

(i) グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)及びイソロイシン(I)、

(ii) アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)

(iii) アラニン(A)、セリン(S)及びトレオニン(T)

(iv) ヒスチジン(H)、リジン(K)及びアルギニン(R)、

(v) アスパラギン(N)及びグルタミン(Q)

(vi) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)。

## 【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0072】

[87.] M13又はfdといったような繊維状ファージからの複製起点を含むように設計されたプラスミドベクターである。

## 【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0093】

## [108.]

本発明の1実施形態においては、タグは、Fvペプチド又はポリペプチドに挿入又は付着されており、その調製及び同定及び診断の一助となる。タグはその後分子から除去できる。タグは、以下のタグであり得るがこれらに制限されるわけではない：AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、Glu-Glu、HA、His6、HSV、HTT、PHH、IRS、KT3、プロテインC、S-TAG（商標）、T7、V5、VSV-G（Jarvik and Telmer, Ann. Rev.Gen., 32, 601-618 (1998)）及びKAK（リジン-アラニン-リジン）。タグは好ましくはc-myc又はKAKである。

## 【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0130

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0130】

[143.] 好ましい実施形態においては、細胞系統は、制限的意味なく、ジャーカット、MOLT-4、HS-602、U937、TF-1、THP-1、KG-1、ML-2及びHUT-78細胞系統といったような造血細胞系統である。

## 【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0155

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0155】

[168.] 本発明のFvsのCDR3領域は、AML細胞に特異的に結合するコア配列 Arg/Gly/Lys Phe Pro を含有し得る。かかるCDR3領域の8つの例が表2に提示されている。モチーフは、各ケースにおいてCDR3領域の3つのN末端アミノ酸残基と一致するが、これをCDR3領域内の他の場所に位置設定することも可能である。代替的には、モチーフは、より大きな結合又はターゲティング又は認識分子の一部分のアンカー又は結合領域を構築する又は構成するために用いられるか又は単独で標的ピヒクルとして使用される結合モチーフである。

## 【手続補正19】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0171

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0171】

[184.] Y1二量体と(CONY1とも呼ばれる)scFv単量体の結合を比較するため、KG-1細胞についてin vitroで結合競合実験が行なわれた。さらに、これらの実験は、全YIgGのscFvY1単量体に対する結合を比較した。この研究を実施するために、Y1 IgG Y1 IgGはビオチンで標識づけされた。この研究は、Y1 IgGがIGYコービオチンと競合したことを明らかにした。関連性のないヒトIgGは、標識づけされたY1 IgGと競合しなかった。Y1 scFvs (5 µg及び10 µg) は、Y1 IgG-Biotin (50 ng) と部分的に競合した。研究は同様に、1 ngのIgG Y1-FITCが、1 µgのscFv FITCと同じ程度までKG-1細胞に(血清無しで)結合したが、血清が存在する場合、大部分のY1 IgG結合は「遮断される」ということをも示した。これらの研究は同様に、ラジオレセプターアッセイ、ELISA又はFACSによって分析されるように、Y1二量体の結合が少なくともscFv単量体のものより少なくとも20倍高いことも示した。

[185.] さらにもう1つの実施形態においては、(YI-cys-KAK scFvと呼ばれる)カルボキシ末端におけるシステインに加えて、リジン-アラニン-リジンが加えられた。このscFv構成体のアミノ酸配列は以下に再現されている。

## 【手続補正20】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0173

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0173】

[186.] Y1-cys-KAKは、細菌中の-pLベクター内で産生された。42℃まで温度を上昇させることによって-pLベクター内の発現が誘発された。誘発された培養から封入体を得られ、望まれない可溶性タンパク質を除去するべく水溶液により半精製された。この封入体はグアニジンの中で可溶化され、DTTにより還元され、アルギニン/酸化-グルタチオンに基づく溶液中でin vitroで再度折畳まれた。再折畳み後、タンパク質は透析され、尿素/リン酸緩衝液を含む緩衝液に対して接線方向流でのろ過により濃縮された。タンパク質は、SP-カラム中のイオンクロマトグラフィにより再精製され濃縮された。

## 【手続補正21】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0174

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0174】

[187.] CONY1 scFv 中ならびに Y1-cys-KAK scFv 中でより高レベルの発現を得るために、我々は、scFv 構成体のN末端配列の位置2に、アラニン残基についてコードするアミノ酸を導入した。この新たに修飾された構成体で、4倍の発現レベルが得られた。

## 【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0175

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0175】

[188.] 血小板から誘導された抗原 GPIb (グリコカリシン) について、単量体 (Y1-KAK としても知られている CONY scFv) と二量体 Y1-cys-KAK (システイン二量体) の間の結合の差を確認するべく、ELISA 検定が実施された。GPIb に対する結合を検出するために、ポリクローナル抗1本鎖抗体及び/又は新規のポリクローナル抗-V<sub>L</sub> (ウサギ由来) 及び抗ウサギHRPが使用された。二量体は、単量体より2~100倍高い活性を示した。例えば、0.8 OD単位を達成するために、わずか0.1 mg/mlの二量体に比べて、12.8 mg/mlの単量体が使用された。図12を参照のこと。

## 【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0200

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0200】

[213.] 対象の発明のもう1つの特定の実施形態においては、抗癌剤は、ドキソルピシン (アドリアマイシン)、モルホリノドキソルピシン、メトキシモルホリニルドキソルピシン、cis-プラチナ、トキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラビン (Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロンアルファ、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド、プレオマイシン 及びそれらの誘導体を含むグループの中から選択される。

## 【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0210

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0210】

[223.] さらにもう1つの実施形態においては、ペプチドと薬学的作用物質の間のリンクは、リンカー化合物により作用される。本明細書及びクレーム中で使用されているリンカー化合物は、2つ以上の部分を互いにつなぐ化合物として定義づけされる。リンカーは、直鎖又は有枝鎖リンカーでありうる。有枝鎖リンカーは、2重分岐、3重分岐又は4重以上の有枝化合物から成り得る。リンカー化合物は、ジカルボン酸、マレミドヒドラジド、PDPH、カルボン酸ヒドラジド、及び小型ペプチドであり得るが、これらに制限されるわけではない。その他のリンカー化合物の例としては、コハク酸、グルタル酸、及びアジピン酸といったジカルボン酸；N-〔 -マレイミドカプロン酸〕ヒドラジド、4-〔N-マレイミドメチル〕ジクロヘキサン-1-カルボキシヒドラジド及び〔N-〔6-マレイミドウンデカン酸〕ヒドラジド〕といったようなマレイミドヒドラジド；サルファヒドリル反応性タンパク質に接合された(3-〔2-ピリジルジチオ〕プロピオニルヒドラジド)といったPDPHリンカー；2~5個の炭素から選択されたカルボン酸ヒドラ

ジド；及び例えば抗癌医薬品ドクソルピシンの遊離糖と s c F v の間の小型ペプチドリンカを用いた直接的カップリングが含まれる。小型ペプチドには、A U 1、A U 5、B T a g、c - m y c、F L A G、G l u - G l u、H A、H i s 6、H S V、H T T P H H、I R S、K T 3、プロテインC、S - T A G（商標）、T 7、V 5、V S V - G、及び K A K T a g が含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【手続補正 25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0237

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0237】

[250.] 本発明のさらにもう1つの実施形態においては、抗癌剤は、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、モルホリノドキシソルピシン、メトキシモルホリニルドキシソルピシン、モルホリノ - ドキシソルピシン (MDOX)、アドリアマイシン、c i s - プラチナ、トキソール、カリケアマイシン、ピンクリスチン、シタラビン (A r a - C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、モルホリノダウノルピシン、メトキシモルホリニルダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロンアルファ、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド、プレオマイシン及びそれらの誘導体から成るグループの中から選択されている。

【手続補正 26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0257

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0257】

[270.] 1.5 A M L 細胞からの膜調製。10<sup>8</sup>個の洗浄された細胞を含有するペレットに対し1mlの低温溶解溶液（0.3Mのスクロース、5mMのE D T A、1mMのP M S F）を添加し、その後4 で11000×gで20分間スピンさせた。上清流体を廃棄し、ペレットをT E（10mMのトリス、1mMのE D T A、1mMのP M S F中で再懸濁させ、上述のとおりスピンさせた。最終的ペレットを0.4のA<sub>280</sub>で6mlのP B S中で再懸濁させ、2時間37 で、3本のMaxiSorpimmuno-管（N U N C）をコーティングするために使用した。コーティングの後、管をP B Sで3回洗い流し、次に2時間R TでM P B S（P B S中の2%の脱脂粉乳）で遮断させた。バイオパンニングの前に、管をさらに3回P B Sで洗い流した。

【手続補正 27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0320

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0320】

[329.] コア配列 A r g / G l y P h e P r o に基づいて、A M L 細胞に結合するための高い親和性をもつその他のC D R 3 領域を構築することができる。これらは、A r g / G l y P h e P r o コア配列を維持する一方で、添加、欠失又は突然変異により上述の5 - 1 2 - m e r s のいずれかを変動させることによって構築することができる。

【手続補正 28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0321

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0321】

[ 3 3 0 . ] 本発明の C D R 3 領域は、アミノ酸配列 R 1 - A r g / <sub>G L Y</sub> P h e P r o - R 2 を有し、ここで R 1 は 0 ~ 1 5 個のアミノ酸、好ましくは 0 ~ 9 個、最も好ましくは 0 ~ 1 個のアミノ酸を含み、R 2 は、1 ~ 1 5 個、最も好ましくは 1 ~ 9 個のアミノ酸を含む。R 1 及び R 2 は、A M L 細胞に対する A r g / <sub>G L Y</sub> P h e P r o 配列の特異的結合に不利な影響を及ぼさないアミノ酸配列である。

【手続補正 2 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 5】

[ 3 7 4 . ] 9 . 5 Y 1 - c y s - K A K (システイン二量体) の産生

【手続補正 3 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 6】

[ 3 7 5 . ] p L - y l - c y s - K A K 細菌培養 1 リットルを 2 ~ 3 時間 4 2 で誘発させた。この培養を 3 0 分間 5 0 0 0 R P M で遠心分離した。1 8 0 ml の T E 中でペレットを再懸濁させた ( 5 0 m M の T r i s - H C l 、 p H 7 . 4 、 2 0 m M の E D T A ) 。 8 ml の リゾチーム ( 5 m g / m l のストックからのもの ) を添加し、1 時間 インキュベートした。5 M の N a C l 及び 2 5 ml の 2 5 % トリトンを添加し、さらに 1 時間 インキュベートした。この混合物を 4 で 6 0 分間 1 3 0 0 0 R P M で遠心分離に付した。上清を廃棄した。テッシュマイザ ( 又はホモジナイザ ) を用いて T E 中にペレットを再懸濁させた。このプロセスを、封入体 ( ペレット ) の色が灰色 / 明褐色となるまで、3 ~ 4 回くり返した。封入体を、6 M の G u a n i d i n e - H C l 、 0 . 1 M の T r i s p H 7 . 4 、 2 m M の E D T A 中で可溶化させた ( 1 0 ml の可溶化緩衝液中の 1 . 5 グラムの封入体は ~ 1 0 m g / m l の可溶性タンパク質を提供した ) 。これを少なくとも 4 時間 インキュベートした。タンパク質濃度を測定し、1 0 m g / m l の濃度にした。D T T を 6 5 m M の最終濃度まで添加し、室温で一晩 インキュベートした。0 . 5 M の A r g i n i n e 、 0 . 1 M の T r i s p H 8 、 2 m M の E D T A 、 0 . 9 m M の G S S G を含有する溶液に対し 1 0 ml のタンパク質を希釈させる ( 滴下による ) ことにより再折畳みを開始した。再折畳み用溶液を 4 8 時間 ~ 1 0 で インキュベートした。タンパク質を含有する再折畳み用溶液を、2 5 m M のリン酸緩衝液 p H 6 、 1 0 0 m M の尿素を含む緩衝液中で透析し、5 0 0 m l s に濃縮した。濃縮 / 透析済み溶液を S P - セファロースカラムに結合させ、N a C l 勾配により ( 最高 1 M まで ) 溶出した。

【手続補正 3 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 3

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 3 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 4

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 3 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 5

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0387

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0387】

[386.] 以下の配列、LNDIFEAQKIEWHEを、PCR及びIPTG誘発可能発現系へのクローニングによりY1のC末端で添加した。クローンをY1-biotagと命名した。この配列は、遊離ビオチンの不在下で、酵素がビオチンをリシン(K)残基に共有結合により連結させることのできる、酵素BirAのための基質である(抗原特異的Tリンパ球の表現型分析。Science, 1996. 10月4; 274(5284): 94-6, Altman JD et al)。この構成体は、BL21細菌細胞中で封入体として産生された。前述の通りに再折畳みを行なった。封入体をグアニジン-DTT内で可溶化させた。再折畳みは、アルギニン-トリス-EDTAを含有する緩衝液中での希釈によって行なった。透析及び濃縮を実施し、その後HiTrapQイオン交換精製を行なった。