

【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19年9月13日(2007.9.13)

【公表番号】特表2003-503072(P2003-503072A)

【公表日】平成15年1月28日(2003.1.28)

【出願番号】特願2001-507069(P2001-507069)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 9/99 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 1 2 N 9/50

C 1 2 N 9/99

C 1 2 Q 1/37

【手続補正書】

【提出日】平成19年6月25日(2007.6.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：3のアミノ酸残基1～456からなるメマブシン2タンパク質。

【請求項2】

細菌細胞で発現される、請求項1記載のメマブシン2タンパク質。

【請求項3】

細菌細胞での発現後にリフォールディングされる、請求項1または2記載のメマブシン2タンパク質。

【請求項4】

メマブシン2タンパク質が、少なくとも約pH 8.0のpHで、約8Mの尿素濃度および少なくとも一つの還元剤を有する尿素溶液への溶解によりリフォールディングされる、請求項1～3いずれか記載のメマブシン2タンパク質。

【請求項5】

メマブシン2タンパク質が、少なくとも約pH 9のpHを有する水性緩衝液への希釈によりリフォールディングされ、pHが続いて約pH 8に調整され、次いで約24～約48時間の範囲の時間、約4の温度で維持される、請求項4記載のメマブシン2タンパク質。

【請求項6】

メマブシン2タンパク質が、少なくとも約pH 9のpHを有し、酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンを含む水性緩衝液への希釈によりリフォールディングされ、メマブシ

ン 2 タンパク質の希釈溶液の尿素濃度が約 0.4M まで減少され、pH が約 pH 8 に調整される、請求項 4 記載のメマブシン 2 タンパク質。

【請求項 7】

メマブシン 2 タンパク質が、約 8M の尿素濃度および約 pH 10 の pH を有する尿素溶液への溶解によりリフォールディングされ、得られた溶液が続いて、約 pH 9.0 の pH を有する水性緩衝液に希釈され、約 24 ～ 約 48 時間の範囲の時間、約 4 の温度で維持される、請求項 4 記載のメマブシン 2 タンパク質。

【請求項 8】

配列番号：3 のアミノ酸残基 43 ～ 456 または配列番号：3 のアミノ酸残基 45 ～ 456 からなる、メマブシン 2 タンパク質。

【請求項 9】

請求項 8 記載のメマブシン 2 タンパク質、または配列番号：3 のアミノ酸残基 43 ～ 456 からなるメマブシン 2 タンパク質および配列番号：3 のアミノ酸残基 45 ～ 456 からなるメマブシン 2 タンパク質の混合物を含む、組成物。

【請求項 10】

混合物が、配列番号：3 のアミノ酸残基 1 ～ 456 からなるメマブシン 2 タンパク質の自己触媒切断により生成される、請求項 9 記載の組成物。

【請求項 11】

結晶化されたメマブシン 2 タンパク質および基質が約 3.5 以下まで回折し、メマブシン 2 タンパク質が、配列番号：3 のアミノ酸残基 43 ～ 456 からなるメマブシン 2 タンパク質および配列番号：3 のアミノ酸残基 45 ～ 456 からなるメマブシン 2 タンパク質の混合物である、基質と共に結晶化されたメマブシン 2 タンパク質を含む組成物。

【請求項 12】

結晶化されたメマブシン 2 タンパク質および基質が表 2 に規定されるパラメータを有する、請求項 11 記載の組成物。

【請求項 13】

該メマブシン 2 タンパク質が基質に結合する、請求項 11 または 12 記載の組成物。

【請求項 14】

基質がペプチドを含む、請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

基質が遷移状態等配電子体を含む、請求項 13 記載の組成物。

【請求項 16】

遷移状態等配電子体がヒドロキシエチレンを含む、請求項 15 記載の組成物。

【請求項 17】

基質が、OM99-1 および OM99-2 からなる群より選択される、請求項 11 ～ 13 いずれか記載の組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 6】

図 6 は、OM99-2 が結合したメマブシン 2 プロテアーゼドメインの結晶構造の立体図である。メマブシン 2 のポリペプチド骨格をリボン図で示す。N ロープおよび C ロープは、それぞれ「青色」および「黄色」で示される。ただし例外として、C ロープ中の挿入ループ（A ～ G で示す、図 6 参照）は「マゼンタ色」で示され、C 末端伸長は「緑色」で示される。これらのロープの間のインヒビター結合は「赤色」で示される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 7】

図 7 は、メマプシン 2 およびペプシンの三次元構造の比較を示す立体図である。前者の分子表面は、表面ループならびにヘリックスの挿入および C 末端伸長により、かなり大きいものとなっている。ヒトメマプシン 2 の鎖のトレースは「濃い青色」で示され、ヒトペプシンの場合は「グレー色」で示される。「淡い青色」で示されたボールは、トポロジー同等である同じ残基を示す。ジスルフィド結合は、メマプシン 2 の場合は「赤色」で示され、およびペプシンの場合は「オレンジ色」で示される。C 末端伸長は「緑色」で示される。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 9】

図 9 は、インヒビター OM99-2（「オレンジ色」で示される）とメマプシン 2（「淡い青色」で示される）との相互作用を示す立体図である。窒素原子および酸素原子はそれぞれ「青色」および「赤色」で示される。水素結合は破線で示される。結合サブサイトを含むメマプシン 2 残基が含まれる。OM99-2 の残基 P₄、P₃、P₂、P₁ および P₁'（図 8 中で規定）は、より広い範囲の立体配座の中にある。インヒビター鎖は残基 P₂' で折り返しており、この位置で目立ったキंक（kink）を形成する。P₃' および P₄' の骨格により、該インヒビターは活性部位からはみ出ている。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

実施例 3．大腸菌（*E. coli*）におけるプロメマプシン 2 cDNA の発現、プロメマプシン 2 のリフォールディングと精製

プロメマプシン 2 を PCR 増幅して、pET11a ベクターの BamHI 部位にクローニングした。得られたベクターは、Ala-8p から Ala326 までの配列をもつプロメマプシン 2 を発現する。図 1 に 2 種類の発現ベクター pET11-メマプシン 2-T1（以下 T1）と pET11-メマプシン 2-T2（以下 T2）の構造を示す。いずれのベクターにおいても、発現された組換えタンパク質の N-末端側の 15 残基は、発現ベクターに由来するものである。プロメマプシン 2 の残基は、残基 Ala-16 から開始する。2 種類の組換えプロメマプシン 2 は、C-末端側の長さが異なっている。クローン T1 は Thr-456 で終わっており、クローン T2 は Ala-421 で終わっている。T1 構築物は T2 構築物よりも長い C-末端を持っているが、予想される膜貫通ドメインを全く発現しない。