

【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26年3月27日(2014.3.27)

【公表番号】特表2012-521346(P2012-521346A)

【公表日】平成24年9月13日(2012.9.13)

【年通号数】公開・登録公報2012-037

【出願番号】特願2011-547867(P2011-547867)

【国際特許分類】

C 0 7 K 14/785 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/785 Z N A

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 25/28

【手続補正書】

【提出日】平成26年2月4日(2014.2.4)

【手続補正1】

【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】

[例2 - セルロース膜上でSP-C誘導ペプチドスポットに結合するCTproSP-CBrichos,CTproSP-CおよびCTproSP-CL188Qの分析]

SP-C ^{I 2 3 V} から誘導された10-残基フラグメントを含むスポット膜(Frank R, J Immunol Meth, 267:13-26, 2002)をSigma Genosys (Cambridge, England)から購入した。膜をメタノールに5分間浸漬し、それからT-TBS (50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 8, containing 0.05 % Tween)で3x30分間洗浄し、T-TBS中、22℃で1時間に亘って1 μg/ml CTproSP-CBrichos, CTproSP-CまたはCTproSP-CL188Qでのインキュベーションを続けた。次に、膜は1時間に亘ってTBS中に2 % BSAでブロックされた。T-TBSで4x1時間洗浄した後、膜を2 % BSAを含むT-TBS中に1:5000に希釈されたHRP-複合化S-タンパク質 (Novagen, Madison, WI) でインキュベートした。次に、膜をT-TBSで4x1時間再び洗浄し、かつ結合を製造者の取扱説明書に従ってECLによって視覚化した。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

以下に詳述されるようにセルロース膜に結合される全SP-C ^{I 2 3 V} アミノ酸配列に相当する重複配列を持つ10残基ペプチドはCTproSP-C (配列番号4)に結合するために探査された。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 9 5 】

図 2 A は、SP-C^{I 2 3 V} から誘導される10残基フラグメントを含むスポットへのCTproSP-Cの結合を示す。ペプチドスポット1から25はスポット8, 9, 11, 12, 17および18(下記参照)を除外するとN-からC末端方向(図 2 B 参照)中にSP-C^{I 2 3 V}配列を占める。スポット8および9がそれらのLeu-置換(KRLLLLLLLL)またはAla-置換(KRAAAAAAAAA)型をそれぞれ含むのに対して、スポット7はSP-C^{I 2 3 V}中にKRLLIVVVVVセグメントを含む。同様な方法において、スポット10-12はRLLIVVVVVV(SP-C^{I 2 3 V}中の位置12-21), RLLLLLLLLL, およびRAAAAAAAAAをそれぞれ含み、かつスポット16-18はVVVVVVVVV(SP-C^{I 2 3 V}中の位置17-26), LLLLLLLLLL, and AAAAAAAAAAをそれぞれ含む。スポット21および23は同じペプチド(LVVVIVGAL)を含む。

【 手続補正 4 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 9 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 9 6 】

図 2 B は、SP-C^{I 2 3 V}配列に従うペプチドへのCTproSP-C結合の概要を表示する。破線はCTproSP-Cが結合していないペプチドを記し、一方、実線はCTproSP-Cが結合するペプチドを表す。SP-C^{I 2 3 V}配列の下線部分は、その膜貫通領域に相当する。番号1-35は、成熟SP-C ペプチド(配列番号3)を示し、proSP-C(配列番号1)の相当する残基は24-58である。

【 手続補正 5 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 9 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 9 8 】

CTproSP-C基質特異性の分析に用いられるのと同じペプチドスポット膜は、CTproSP-C(proSP-C59-197)のそれと非常に類似する結合プロフィールを示したCTproSP-CBrichos(proSP-C94-197)で探査された。図2Cに示されるように、Brichosドメインは、CTproSP-C結合特性を反復する。これに対し、CTproSP-CL188QはSP-C^{I 2 3 V}のいかなるフラグメントに結合されない(図2D)。したがって、CTproSP-CおよびCTproSP-CBrichosは同じ基質特異性を有し、一方、CTproSP-CL188Qは無効な基質結合を示す。