

【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18年6月22日(2006.6.22)

【公表番号】特表2002-513813(P2002-513813A)

【公表日】平成14年5月14日(2002.5.14)

【出願番号】特願2000-547238(P2000-547238)

【国際特許分類】

C 0 7 K	1/22	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	17/00	(2006.01)
A 6 1 P	31/20	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
C 0 7 K	14/025	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 Q	1/70	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	1/22	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	14/025	
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 Q	1/70	
A 6 1 K	37/02	Z N A
C 1 2 N	15/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成18年4月28日(2006.4.28)

【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】 E1組換えタンパク質を真核生物発現系中で生成し、その核製剤を単離する工程、及び

E1タンパク質を300 mMより低い濃度の塩を含む緩衝液中で前記核製剤から抽出する工程を含むことを特徴とするウイルスヘリカーゼ活性を有するパピローマウイルスE1タンパク質又はその機能性誘導体の単離方法。

【請求項2】 真核生物発現系からの組換えパピローマウイルスE1タンパク質の製剤であって、前記E1がウイルスヘリカーゼ活性を有し、E1タンパク質が300 mM未満の濃度の塩の存在下で核製剤から抽出され、アフィニティークロマトグラフィーにより精製されることを特徴とする組換えパピローマウイルスE1タンパク質の製剤。

【請求項3】 パピローマウイルスE1タンパク質のウイルスヘリカーゼ比活性のアッセイ方法であって、前記方法が

請求の範囲第1項記載の前記E1タンパク質製剤と、前記ウイルスヘリカーゼ酵素活性に適した基質の混合物をインキュベートする工程、及び

前記E1タンパク質のヘリカーゼ比活性の量を測定する工程
を含むことを特徴とするアッセイ方法。

【請求項4】ヘリカーゼ活性をモジュレートすることができる薬剤の同定方法であって、前記方法が

a)前記E1ヘリカーゼの活性を前記薬剤の不在下で請求の範囲第3項記載の方法によりアッセイする工程、

b)前記ヘリカーゼの活性を前記薬剤の存在下で請求の範囲第3項記載の方法によりアッセイする工程（前記薬剤を前記インキュベーション中に前記ヘリカーゼ及び基質混合物に添加する）、及び

c)工程a)の結果を工程b)の結果と比較する工程
を含むことを特徴とする同定方法。

【請求項5】パピローマウイルスDNA複製のアッセイ方法であって、前記方法が候補薬剤を請求の範囲第1項記載のE1タンパク質製剤と、E2タンパク質及び好適なDNA複製開始点の混合物とともにインキュベートする工程、及び

DNA巻き戻しの量を測定する工程
を含むことを特徴とするアッセイ方法。

【請求項6】パピローマウイルスDNA複製をモジュレートすることができる薬剤の同定方法であって、前記方法が

a)前記DNA複製活性を前記薬剤の不在下で請求の範囲第5項記載の方法によりアッセイする工程、

b)前記DNA複製活性を前記薬剤の存在下で請求の範囲第5項記載の方法によりアッセイする工程（前記薬剤を前記インキュベーション中に前記混合物に添加する）、及び

c)工程a)の結果を工程b)の結果と比較する工程
を含むことを特徴とする同定方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

本発明の更なる実施態様によれば、E1タンパク質がウシパピローマウイルス(BPV)、ワタオウサギパピローマウイルス(CRPV)又はヒトパピローマウイルス(HPV)からのE1ヘリカーゼである上記方法が提供される。好ましい実施態様において、E1タンパク質はHPV低リスク型又は高リスク型からのものである。E1タンパク質が低リスク型である場合、それは型6、型11及び型13、特にHPV型11及び型6から選ばれることが好ましい。また、E1タンパク質が高リスク型である場合、それは型16、18、31、33、35、45、52、又は58、好ましくは型16からなる群から選ばれる。あるいは、E1タンパク質が配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号26、及び配列番号27からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有するのが好ましい。

本発明の更なる局面は真核生物発現系が昆虫細胞中のバキュロウイルス；哺乳類細胞（例えば、COS細胞又はVero細胞）中のワクチニアウイルス、シンドビスウイルス、及びセムリキ森林ウイルス、又はアデノウイルス；及び酵母発現系中のプラスミド、好ましくは昆虫細胞発現系中のバキュロウイルスからなる群から選ばれる上記方法を提供する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 3 1 】

更に、本発明の更なる局面は低塩濃度から調製され、好ましくは0-100 mMのNaCl、更に好ましくは0-50 mMのNaClの存在下で、最も好ましくはNaClの不在下で核製剤から抽出され、更にアフィニティーコロマトグラフィーにより精製されたHPV E1製剤を提供する。

上記E1製剤は少なくとも約60%以上の純度に“実質的に精製される”ことが好ましく、少なくとも約80%以上の純度に“実質的に純粋である”ことが更に好ましく、特に少なくとも約90%の純度で“本質的に純粋である”。

上記E1製剤はウシパピローマウイルス(BPV)、ワタオウサギパピローマウイルス(CRPV)又はヒトパピローマウイルス(HPV)、好ましくはHPV低リスク型又は高リスク型からのE1ヘリカーゼであることが好ましい。E1タンパク質が低リスク型である場合、それは型6、型11及び型13、特にHPV型11及び型6から選ばれることが好ましい。また、E1タンパク質が高リスク型である場合、それは型16、18、31、33、35、45、52、又は58、好ましくは型16からなる群から選ばれる。あるいは、E1タンパク質が配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号26、及び配列番号27からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有するのが好ましい。