

【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23年3月31日(2011.3.31)

【公表番号】特表2010-517535(P2010-517535A)

【公表日】平成22年5月27日(2010.5.27)

【年通号数】公開・登録公報2010-021

【出願番号】特願2009-548455(P2009-548455)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/25 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/25 Z N A

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 5/00 1 0 2

G 0 1 N 33/50 X

G 0 1 N 33/15 Z

【手続補正書】

【提出日】平成23年1月24日(2011.1.24)

【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】

パーキン活性のインビトロでの測定方法であって：

(a) パーキンタンパク質およびS5aタンパク質を、S5aタンパク質がパーキンによりユビキチン化される条件下で一緒にインキュベーションし、そして

(b) S5aタンパク質のユビキチン化の速度または程度を測定する、  
ことを含んでなる上記方法。

【請求項2】

パーキン活性のモジュレーターに関するアッセイ方法であって、

(a) パーキンタンパク質およびS5aタンパク質を、S5aタンパク質がユビキチン化され得る条件下で一緒にインキュベーションし；

(b) パーキンタンパク質およびS5aタンパク質を試験作用物質の存在下で(a)の条件下にて一緒にインキュベーションし；

(c) 試験作用物質の存在および不存在下でS5aのユビキチン化の速度もしくは程度を比較することを含んでなり、ここで試験作用物質の存在下でのS5aのユビキチン化の相対的増加は、試験作用物質がパーキン活性の正のモジュレーターであることを示し、そして試験作用物質の存在下でのS5aのユビキチン化の相対的減少は、試験作用物質がパーキン活性を阻害することを示す、上記アッセイ方法。

【請求項3】

細胞をベースとし、(a)工程がパーキンタンパク質およびS5aタンパク質を発現す

る哺乳動物細胞を提供する工程を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

( a ) 工程中で哺乳動物細胞がパーキンタンパク質および S 5 a タンパク質を発現し、  
( b ) 工程が ( a ) 工程の細胞を試験作用物質に曝す工程を含む、琴を特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

パーキンおよび S 5 a がヒト由来である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

パーキンおよび S 5 a の少なくとも 1 つが細胞に対して異種である、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 7】

測定されるパーキン活性がパーキン E 3 リガーゼ活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

パーキン活性の正のモジュレーターの特異性のインビトロでの評価方法であって：

( a ) パーキン以外の E 3 リガーゼタンパク質およびパーキン基質タンパク質を、基質がユビキチン化される条件下で一緒にインキュベーションし；  
( b ) E 3 リガーゼタンパク質およびパーキン基質タンパク質を、パーキン活性の正のモジュレーターの存在下で ( a ) の条件下にて一緒にインキュベーションし；  
( c ) 正のモジュレーターの存在および不存在下で E 3 リガーゼのリガーゼ活性を比較することを含んでなり、ここで正のモジュレーターが存在する場合に E 3 リガーゼ活性の増加は、正のモジュレーターがパーキンに対して完全には特異的でないことを示し、そして増加の不存在は正のモジュレーターがパーキンに対して完全に特異的であることを示す、上記方法。

【請求項 9】

正のモジュレーターの存在下での S 5 a タンパク質のユビキチン化の増加は、正のモジュレーターがパーキンに対して完全には特異的ではないことを示すが、正のモジュレーターが部分的に特異的であると決定される請求項 8 に記載のインビトロアッセイ方法であって、部分的特異性は非 - パーキン E 3 に対して EC<sub>10</sub> が 100 マイクロモル以下であり、そしてパーキンに対する EC<sub>10</sub> よりも少なくとも 4 倍高いもの定義される上記方法。

【請求項 10】

E 3 リガーゼタンパク質が R I N G E 3 リガーゼである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

E 3 リガーゼタンパク質が M d m 2、N e d d 4、M u r f 1 および E 6 A P からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 8 に記載の方法であって、パーキン活性の正のモジュレーターが：

( a ) パーキンタンパク質および S 5 a タンパク質を、S 5 a タンパク質がユビキチン化され得る条件下で一緒にインキュベーションし；  
( b ) パーキンタンパク質および S 5 a タンパク質を試験作用物質の存在下で ( a ) の条件下にて一緒にインキュベーションし；  
( c ) 試験作用物質の存在および不存在下で S 5 a のユビキチン化の速度もしくは程度を比較することを含んでなり、ここで試験作用物質の存在下での S 5 a のユビキチン化の相対的増加は、試験作用物質がパーキン活性の正のモジュレーターであることを示すアッセイ方法で同定される、上記方法。

【請求項 13】

( a ) 工程および ( b ) 工程の前に、パーキンタンパク質が、パーキン活性を試験作用物質の不存在下での 40 ~ 70 % まで下げる熱的条件下にて試験作用物質の存在下でインキュベーションされる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の方法であって、パーキン活性の正のモジュレーターが：

- ( a ) パーキンを発現し、そしてS 5 aを発現する哺乳動物細胞を準備し；
- ( b ) 細胞を試験作用物質に対して暴露し；
- ( c ) 試験作用物質の存在下でS 5 aのユビキチン化の速度もしくは程度を、試験作用物質に暴露しない対照細胞でのS 5 aのユビキチン化の速度もしくは程度と比較することを含んでなり、ここで試験作用物質の存在下でS 5 aのユビキチン化の相対的増加は、試験作用物質がパーキン活性の正のモジュレーターであることを示すアッセイ方法で同定される、上記方法。