

【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6部門第3区分

【発行日】平成20年1月10日(2008.1.10)

【公表番号】特表2007-511837(P2007-511837A)

【公表日】平成19年5月10日(2007.5.10)

【年通号数】公開・登録公報2007-017

【出願番号】特願2006-539990(P2006-539990)

【国際特許分類】

**G 0 6 F 19/00 (2006.01)**

**G 0 1 N 33/53 (2006.01)**

**G 0 1 N 37/00 (2006.01)**

**C 1 2 P 21/08 (2006.01)**

【F I】

G 0 6 F 19/00 6 0 0

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 37/00 1 0 2

C 1 2 P 21/08 Z N A

【手続補正書】

【提出日】平成19年11月13日(2007.11.13)

【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】

試料中の標的タンパク質上の翻訳後修飾の存在と位置を検出する方法であって、下記を含む当該方法：

(1)該標的タンパク質のアミノ酸配列をコンピューター分析して、該翻訳後修飾のための少なくとも1つの候補の部位を同定し；

(2)該標的タンパク質の少なくとも1つの断片のアミノ酸配列をコンピューターにより同定し、該断片は、該試料中の該標的タンパク質の処理から予想通りに生じて、該断片は、該試料中の該断片にユニークな該潜在的翻訳後修飾部位及び該断片から選別された部位であるP E T(プロテオームエピトームタグ)を含み；

(3)該断片の該翻訳後修飾から選別された該P E Tに特異的に結合する捕捉剤を生成させて、該捕捉剤を支持体に固定化し；

(4)該試料を該処理にかけて、該断片を溶液に可溶性にして、該試料を、該処理後、該捕捉剤に接触させて；

(5)該捕捉剤に結合された該断片において、該断片の該P E Tにより分離された翻訳後修飾に特異的な第二捕捉剤を利用することにより、該翻訳後修飾の存否を検出する。

【請求項2】

前記の翻訳後修飾が、アセチル化、アミド化、脱アミド化、ブレニル化、ホルミル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、ミリストイル化、リン酸化、ユビキチン化、リボシル化又は硫酸化である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記の翻訳後修飾が、チロシン、セリン又はスレオニンに対するリン酸化である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記のアミノ酸配列のコンピューター分析のステップが、該 P E T を、 p I 、電荷、立体構造、溶解度、疎水性、極性及び溶媒露出領域の少なくとも 1 つをも含む基準に基づいて同定するニアレスト - ネイバーアミノ酸分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

(3) で生成した捕捉剤の、少なくとも一種の P E T のニアレスト - ネイバーに対する特異性を測定することを更に含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ペプチド競合アッセイを、(3) で生成した捕捉剤の、 P E T のニアレスト - ネイバーに対する特異性の測定に利用する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記のアミノ酸配列をコンピューター分析するステップが、示された溶解条件下で少なくとも閾値の溶解度を有すると予想された該 P E T を同定する溶解度分析を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記の該標的タンパク質の少なくとも 1 つの断片のアミノ酸配列の長さを、 15 ~ 20 アミノ酸、 20 ~ 25 アミノ酸、 25 ~ 30 アミノ酸、又は 30 ~ 40 アミノ酸から選択する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記の捕捉剤が、完全長の抗体、又は F ab 断片、 F (ab')<sub>2</sub> 断片、 F d 断片、 F v 断片、 d A b 断片、単離された相補性決定領域 (C D R ) 、一本鎖抗体 (sc F v ) 、又はこれらの誘導体から選択する機能的な抗体断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記の捕捉剤が、ヌクレオチド；核酸； P N A (ペプチド核酸)；タンパク質；ペプチド；炭水化物；人工ポリマー；又は小型有機分子から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記の捕捉剤が、アプタマー、足場ペプチド、又は小型有機分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記の処理が、前記の試料の、プロテアーゼ、化学薬剤、物理的剪断、又は超音波処理による変性及び / 又は断片化である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記の変性が、熱変性又は化学的変性である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

前記の熱変性で、熱安定性プロテアーゼを利用するタンパク質分解をその後行なうか又は同時に行なう、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

前記の熱変性が、 2 サイクル以上の熱変性とその後のプロテアーゼ消化を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 16】

前記の断片化を、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カルボキシペプチダーゼ、カルパイン、ズブチリシン、 g l u c - C 、エンド l y s - C 、又はプロテイナーゼ K から選択するプロテアーゼによって行なう、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 17】

前記の試料が、唾液、粘液、汗、全血液、血清、尿、羊水、生殖器液、糞便、骨髓、血漿、脊髓液、心腔液、胃液、腹液、腹膜腔液、胸膜液、滑液、囊胞液、脳脊髓液、肺洗浄液、リンパ液、涙、前立腺液、他の身体部分からの抽出液、又は他の腺からの分泌物から選択する体液であり；又は上清、全細胞溶解物、又は細胞画分(細胞性物質の溶解及び分画により得られる)、生物学的実在物又は人工的環境で成長した細胞から直接得られる細胞の抽出物又は画分に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記の試料が、ヒト、マウス、ラット、カエル、魚類、ハエ、線虫、分裂又は出芽酵母、又は植物から得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記の試料が、膜結合タンパク質を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記の処理が、前記の翻訳後修飾を保存する条件下で行なわれる、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記の捕捉剤が、変性条件下で前記のP E Tについての選択性について最適化される、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記の第二捕捉剤が、酵素、蛍光標識、着色染料、化学発光性化合物、コロイド粒子、放射性同位体、近赤外線染料、DNAデンドリマー、水溶性量子ドット、ラテックスビーズ、セレン粒子、又はユーロピウムナノ粒子から選択する検出可能な部分により標識される、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記の翻訳後修飾が、リン酸化であり、前記の第二の捕捉剤が、リン酸化チロシン、リン酸化セリン、又はリン酸化スレオニンに特異的な標識された第二抗体である、請求項2に記載の方法。

【請求項24】

前記の第二抗体は、酵素又は蛍光基により標識される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記の酵素が、HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

該翻訳後修飾がリン酸化である、請求項22に記載の方法。

【請求項27】

前記の蛍光染料が、Pro-Q Diamond染料である、請求項22に記載の方法。

【請求項28】

前記の翻訳後修飾が、グリコシル化であり、前記の標識した第二捕捉剤が、グリコシル化部位に結合した少なくとも一つの糖部分に特異的である標識されたレクチンである、請求項22に記載の方法。

【請求項29】

前記の翻訳後修飾が、ユビキチン化であり、前記の標識した第二捕捉剤が、ユビキチンに特異的な標識した第二抗体である、請求項22に記載の方法。

【請求項30】

前記の試料が、前記の断片に対して10億モル過剰の無関係のタンパク質又はその断片を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項31】

前記の捕捉剤に結合した前記の断片を定量することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項32】

ステップ(3)が、動物を前記のP E T配列を含む抗原で免疫化することにより実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項33】

前記のP E T配列のN又はC末端、又は両方が、遊離のN又はC末端、又は両方を排除するためにブロックされる、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記のP E T配列のN又はC末端が、P E T配列を異質のキャリアーポリペプチドに融合することによってブロックされ、又は小さい化学基によってブロックされる、請求項3

3に記載の方法。【請求項35】

前記の翻訳後修飾が、チロシンに対するリン酸化である、請求項3に記載の方法。

【請求項36】

前記の翻訳後修飾が、リン酸化であり、前記の第二の捕捉剤が、リン酸化チロシンに特異的な標識された第二抗体である、請求項23に記載の方法。

【請求項37】

前記の捕捉剤が完全長抗体である、請求項9に記載の方法。

【請求項38】

前記第二捕捉剤が蛍光基により標識される、請求項22に記載の方法。

【請求項39】

前記第二抗体が蛍光基により標識される、請求項24に記載の方法。

【請求項40】

前記第二抗体が蛍光基により標識される、請求項36に記載の方法。