

【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4月24日(2014.4.24)

【公表番号】特表2013-522174(P2013-522174A)

【公表日】平成25年6月13日(2013.6.13)

【年通号数】公開・登録公報2013-030

【出願番号】特願2012-556416(P2012-556416)

【国際特許分類】

C 0 7 K	1/12	(2006.01)
G 0 1 N	27/62	(2006.01)
G 0 1 N	33/68	(2006.01)
G 0 1 N	33/50	(2006.01)
G 0 1 N	21/78	(2006.01)
C 4 0 B	40/10	(2006.01)
C 1 2 Q	1/37	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	1/12	Z N A
G 0 1 N	27/62	V
G 0 1 N	33/68	
G 0 1 N	33/50	F
G 0 1 N	21/78	C
C 4 0 B	40/10	
C 1 2 Q	1/37	

【手続補正書】

【提出日】平成26年3月6日(2014.3.6)

【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】

ある1つのアミノ酸配列を含む第1のペプチドをカッティングした第1のタグを含む内部ペプチド標準であって、該第1のペプチドのアミノ酸配列のC末端が、ペプチドのアミド結合、エステル結合またはチオエステル結合の配列特異的加水分解によって作製されたC末端に対応し、該第1のタグが標識を含み、化学的切断、酵素的切断および物理的切断を含む群から選択される手段によって除去可能である、内部ペプチド標準。

【請求項2】

標識が、質量標識、蛍光標識およびUV標識を含む群から選択される、請求項1に記載の内部ペプチド標準。

【請求項3】

標識が修飾アミノ酸を含む、請求項1または2に記載の内部ペプチド標準。

【請求項4】

修飾アミノ酸がメタ-ニトロ-チロシンである、請求項3に記載の内部ペプチド標準。

【請求項5】

第1のタグの除去が配列特異的である、請求項1から4のいずれか一項に記載の内部ペプチド標準。

【請求項6】

第1のペプチドが質量標識を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の内部ペプチド標準。

【請求項7】

質量標識がC同位体およびN同位体を含む群から選択される、請求項6に記載の内部ペプチド標準。

【請求項8】

第2のタグを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の内部ペプチド標準。

【請求項9】

第2のタグが、アンカー部分を含む、請求項8に記載の内部ペプチド標準。

【請求項10】

アンカー部分が、ビオチン、デスチオビオチン、アビジンおよびストレプトアビジンを含む群から選択されるか、または表面での、適当な反応性官能基との化学選択的反応を可能にする化学基である、請求項9に記載の内部ペプチド標準。

【請求項11】

アンカー部分と第1のペプチドの間をリンカーが連結する、請求項9または10に記載の内部ペプチド標準。

【請求項12】

第1のタグが、第1のペプチドのC末端とカップリングされる、請求項1から11のいずれかに記載の内部ペプチド標準。

【請求項13】

第2のタグが、第1のペプチドのN末端とカップリングされる、請求項1から12のいずれか一項に記載の内部ペプチド標準。

【請求項14】

請求項1から13のいずれか一項に記載の内部ペプチド標準の複数の異なる種を含む組成物であって、該複数の異なる種の内部ペプチド標準が、第1のタグならびに/または第1のペプチドのアミノ酸配列において互いに異なる、組成物。

【請求項15】

種々のポリペプチドの少なくとも1種の混合物中の標的ポリペプチドの存在および/または量、および/または精製ポリペプチドの量を決定する方法における、請求項1から13のいずれか一項に記載の内部ペプチド標準の使用。

【請求項16】

種々のポリペプチドの少なくとも1種の混合物中の、第1のペプチドがプロテオタイプのペプチドである標的ポリペプチドの存在および/または量を決定する方法であって、

a) 好ましくは標的ポリペプチドを含有する種々のポリペプチドの混合物を提供することと；

b) (i) ある1つのアミノ酸配列を含む第1のペプチドをカップリングした第1のタグを含む内部ペプチド標準であって、該第1のペプチドのアミノ酸配列のC末端が、ペプチドのアミド結合、エステル結合またはチオエステル結合の配列特異的加水分解によって作製されたC末端に対応する、内部ペプチド標準、または(ii) 該内部ペプチド標準の複数の異なる種であって、第1のタグおよび/または第1のペプチドのアミノ酸配列において互いに異なる該内部ペプチド標準の異なる種の一定量を加え、それによってスパイクされた混合物を作製することと；

c) スパイクされた混合物を配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、種々のポリペプチドの混合物から複数のペプチドを作製し、内部ペプチド標準(単数または複数)から第1のタグを切断除去し、このようにして第1のペプチドを放出し、それによって、複数のペプチドが種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドと内部標準から放出された第1のペプチドとを含むことと；

d) スパイクされた混合物中に含有される第1のタグの量を決定することならびにそれから工程b)において添加された内部標準(単数または複数)の量を決定することと；

e ) 各々工程 c )において作製された、第 1 のペプチド対種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドの比を決定することと；

f ) 工程 d )において決定された内部標準（単数または複数）の比および量から種々のポリペプチドの混合物中の標的ポリペプチドの量を算出することと  
を含み、種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドまたは内部ペプチド標準（単数または複数）の第 1 のペプチドいずれかが質量標識を含む、方法。

#### 【請求項 1 7】

種々のポリペプチドの少なくとも 1 種の混合物中の、第 1 のペプチドがプロテオタイプのペプチドである標的ポリペプチドの存在および / または量を決定する方法であって、

a ) 好ましくは標的ポリペプチドを含有する種々のポリペプチドの混合物を提供することと；

b ) ( i ) ある 1 つのアミノ酸配列を含む第 1 のペプチドをカップリングした第 1 のタグを含む内部ペプチド標準であって、該第 1 のペプチドのアミノ酸配列の C 末端が、ペプチドのアミド結合、エステル結合またはチオエステル結合の配列特異的加水分解によって作製された C 末端に対応する、内部ペプチド標準、または ( ii ) 該内部ペプチド標準の複数の異なる種であって、第 1 のタグおよび / または第 1 のペプチドのアミノ酸配列において互いに異なる該内部ペプチド標準の異なる種を提供し、内部ペプチド標準または該内部ペプチド標準の複数の異なる種を、配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、内部ペプチド標準または該内部ペプチド標準の複数の異なる種から第 1 のタグを切断除去し、このようにして、第 1 のペプチドを放出することと；

c a 1 ) 工程 a ) の種々のポリペプチドの混合物に、工程 b ) において得られた反応混合物を添加することと；

c a 2 ) 工程 c a 1 ) において得られた混合物を、配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、種々のポリペプチドの混合物から複数のペプチドを作製し、それによって、複数のペプチドがプロテオタイプのペプチドを含むこと、  
または

c b 1 ) 工程 a ) の種々のポリペプチドの混合物を、配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、種々のポリペプチドの混合物から複数のペプチドを作製し、それによって、複数のペプチドがプロテオタイプのペプチドを含むことと；

c b 2 ) 工程 c b 1 ) において得られた混合物に、工程 b ) において得られた反応混合物を添加すること  
のいずれかによって、工程 c a 2 ) および c b 2 ) 後に、それぞれ、スパイクされた混合物が得られることと；

d ) スパイクされた混合物中に含有される第 1 のタグの量を決定することならびにそれから工程 c a 1 ) または c b 2 ) において添加された内部標準（単数または複数）の量を決定することと；

e ) スパイクされた混合物中の、第 1 のペプチド対種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドの比を決定することと；

f ) 工程 d ) において決定された内部標準（単数または複数）の比および量から、種々のポリペプチドの混合物中の標的ポリペプチドの量を算出することと  
を含み、

種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドまたは内部ペプチド標準（単数または複数）の第 1 のペプチドのいずれかが質量標識を含む、方法。

#### 【請求項 1 8】

種々のポリペプチドの少なくとも 1 種の混合物中の、第 1 のペプチドがプロテオタイプのペプチドである標的ポリペプチドの存在および / または量を決定する方法であって、

a ) ( i ) ある 1 つのアミノ酸配列を含む第 1 のペプチドをカップリングした第 1 のタグを含む内部ペプチド標準であって、該第 1 のペプチドのアミノ酸配列の C 末端が、ペプチドのアミド結合、エステル結合またはチオエステル結合の配列特異的加水分解によって作製された C 末端に対応する、内部ペプチド標準、または ( ii ) 該内部ペプチド標準の

複数の異なる種であって、第1のタグおよび／または第1のペプチドのアミノ酸配列において互いに異なる該内部ペプチド標準の異なる種を提供し、内部ペプチド標準または該内部ペプチド標準の複数の異なる種を、配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、内部ペプチド標準または該内部ペプチド標準の複数の異なる種から第1のタグを切断除去し、このようにして第1のペプチドを放出することと；

b) 場合によっては、配列特異的加水分解のための手段を除去することと；

c) 工程a)またはb)から得られた混合物中に含有されている第1のタグの量を決定することならびにそれから前記混合物中に含有された内部標準の量を決定することと；

d) 好ましくは標的ポリペプチドを含有する種々のポリペプチドの混合物を提供することと；

d a 1) 工程d)の種々のポリペプチドの混合物に、工程a)またはb)において得られた反応混合物の一部を添加することと；

d a 2) 工程d a 1)において得られた混合物を、配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、種々のポリペプチドの混合物から複数のペプチドを作製し、それによって、複数のペプチドがプロテオタイプのペプチドを含むこと；

または

d b 1) 工程d)の種々のポリペプチドの混合物を、配列特異的加水分解のための手段を用いて処理して、種々のポリペプチドの混合物から複数のペプチドを作製し、それによって、複数のペプチドがプロテオタイプのペプチドを含むことと；

d b 2) 工程d b 1)において得られた混合物に、工程a)またはb)において得られた混合物の一部を添加すること

のいずれかによって、工程d a 2)およびd b 2)後にそれぞれ、スパイクされた混合物が得られることと；

e) スパイクされた混合物中の、第1のペプチド対種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドの比を決定することと；

f) 内部標準(単数または複数)の比および量から、種々のポリペプチドの混合物中の標的ポリペプチドの量を算出することと

を含み、種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドまたは内部ペプチド標準(単数または複数)の第1のペプチドのいずれかが質量標識を含む、方法。

#### 【請求項19】

質量標識が、C同位体およびN同位体を含む群から選択される、請求項16から18のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項20】

内部ペプチド標準から放出された第1のペプチド対種々のポリペプチドに由来するプロテオタイプのペプチドの比が、質量分析、好ましくは多段質量分析によって決定される、請求項16から19のいずれか一項に記載の方法。

#### 【請求項21】

配列特異的加水分解のための手段が、タンパク質分解性酵素、配列特異的化学反応または配列特異的物理的処理から選択される、請求項16から20のいずれか一項に記載の方法。