

【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】令和 1 年 7 月 4 日 (2019.7.4)

【公表番号】特表 2018-514210 (P2018-514210A)

【公表日】平成 30 年 6 月 7 日 (2018.6.7)

【年通号数】公開・登録公報 2018-021

【出願番号】特願 2017-555780 (P2017-555780)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/04 Z N A

C 1 2 M 1/34 B

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 5 月 29 日 (2019.5.29)

【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】

試験作用因子に対する細胞の感受性を予測する方法であって、

a) 血清を有する培養培地中、試験作用因子の存在下および非存在下で、接着性固体表面上にて細胞を培養するステップ；

b) 培養された前記細胞を、B H 3 プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性 B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップ；

c) 前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型ミトコンドリア外膜透過化 (M O M P) の量を測定するステップ；および

d) 前記試験作用因子の存在下で培養された前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量を、前記試験作用因子の非存在下で培養された前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量と比較するステップ

を含み、

前記試験作用因子の非存在下で培養された前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量と比較した、前記試験作用因子の存在下で培養された前記細胞における M O M P の増加が、前記細胞が前記試験作用因子に対して感受性であることを示す、方法。

【請求項 2】

前記細胞を前記 B H 3 プロファイリング緩衝液および前記アポトーシス促進性 B H 3 ドメインペプチドと接触させる前に、前記細胞から前記培養培地を洗浄するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、2 ×、3 × または 4 × の濃度で添加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、2 × の濃度で添加され、B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、顕微鏡法によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、3 × または 4 × の濃度で添加され、B H 3 ドメ

インペプチド誘導型 M O M P の量が、蛍光活性化セルソーティング ( F A C S ) によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記接着性固体表面が、1 種または複数の接着促進化合物でコーティングされている、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記 1 種または複数の接着促進化合物が、細胞外マトリックス ( E C M ) タンパク質である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 E C M タンパク質が、コラーゲン 1、ラミニン、コラーゲン 4 およびフィブロネクチンからなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記 E C M タンパク質が、動物組織に由来する E C M タンパク質混合物である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記 1 種または複数の接着促進化合物が抗体である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 1 種または複数の接着促進化合物が、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンである、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、トレハロース由来実験緩衝液 ( D T E B ) またはマンニトール実験緩衝液 ( M E B ) である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記 B H 3 ドメインペプチドとの接触の後、その前、またはそれと同時に前記細胞が透過化される、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液に透過化剤が補充される、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記透過化剤が、ジギトニンまたはサボニンである、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、i ) 電位差測定用色素と接触した細胞における前記電位差測定用色素の発光、または i i ) ミトコンドリア膜間腔からの分子の放出を決定することによって測定される、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 17】**

B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、F A C S、プレート蛍光定量法、蛍光イメージングまたは自動画像解析によって測定される、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 18】**

M O M P を測定する前に前記細胞を固定するステップをさらに含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 19】**

固定された前記細胞が、電位差測定用色素と接触する、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記電位差測定用色素が、5, 5', 6, 6' - テトラクロロ - 1, 1', 3, 3' - テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニンヨード ( J C - 1 )、ジヒドロローダミン 123、テトラメチルローダミンメチルエステル ( T M R M ) またはテトラメチルローダミンエチルエステル ( T M R E ) である、請求項 19 に記載の方法。

**【請求項 2 1】**

固定された前記細胞が、チトクローム C、S M A C / D i a b l o、O m i、アデニル酸キナーゼ - 2 またはアポトーシス誘導因子に対する抗体と接触する、請求項 1 8 に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

固定された前記細胞が、T o m 2 0 または V D A C に対する抗体と接触する、請求項 1 8 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

前記 B H 3 ドメインペプチドが、B I D、B I M、B A D、N O X A、P U M A、B M F、または H R K ポリペプチドの B H 3 ドメインに由来する、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

前記 B H 3 ドメインペプチドが、配列番号 1 ~ 1 5 からなる群より選択される、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 5】**

前記試験作用因子が治療剤である、請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 6】**

試験治療剤が化学療法剤である、請求項 2 5 に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

前記細胞が初代ヒト腫瘍細胞である、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 8】**

前記細胞が、患者由来異種移植片 ( P D X ) から得られる、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 2 9】**

前記細胞が培養ヒト細胞である、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 0】**

前記細胞が、初代動物腫瘍細胞である、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

前記細胞が、ヒトまたは動物組織に由来する健康な細胞である、請求項 1 から 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 2】**

複数の試験作用因子を用いて繰り返される、請求項 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 3 3】**

各ウェルが接着性作用因子でコーティングされている、試験治療剤および B H 3 ドメインペプチドを含むマルチウェルプレート。

**【請求項 3 4】**

前記 B H 3 ドメインペプチドが、B I D、B I M、B A D、N O X A、P U M A、B M F、または H R K ポリペプチドの B H 3 ドメインに由来する、請求項 3 3 に記載のマルチウェルプレート。

**【請求項 3 5】**

前記 B H 3 ドメインペプチドが、配列番号 1 ~ 1 5 からなる群より選択される、請求項 3 3 に記載のマルチウェルプレート。

**【請求項 3 6】**

前記試験治療剤が化学療法剤である、請求項 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

**【請求項 3 7】**

前記接着性作用因子が細胞外マトリックス ( E C M ) タンパク質である、請求項 3 3 から 3 6 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

**【請求項 38】**

前記 E C M タンパク質が、コラーゲン 1、ラミニン、コラーゲン 4 およびフィブロネクチンからなる群より選択される、請求項 37 に記載のマルチウェルプレート。

**【請求項 39】**

前記接着性作用因子が抗体である、請求項 33 から 36 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

**【請求項 40】**

請求項 33 から 39 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレートを含むキットであって、B H 3 プロファイリング緩衝液を収容するパイアルおよび治療剤に対する細胞の感受性を予測するために前記キットを使用するための指示をさらに含む、キット。