

【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 1 区分
 【発行日】平成 17 年 8 月 4 日 (2005.8.4)

【公開番号】特開 2003-107066 (P2003-107066A)
 【公開日】平成 15 年 4 月 9 日 (2003.4.9)
 【出願番号】特願 2002-208687 (P2002-208687)
 【国際特許分類第 7 版】

G 0 1 N 30/72
 G 0 1 N 27/62
 G 0 1 N 30/00
 G 0 1 N 30/06
 G 0 1 N 30/60
 G 0 1 N 30/88

【F I】

G 0 1 N	30/72	C
G 0 1 N	27/62	L
G 0 1 N	27/62	V
G 0 1 N	27/62	X
G 0 1 N	30/00	B
G 0 1 N	30/06	E
G 0 1 N	30/60	K
G 0 1 N	30/88	J

【手続補正書】
 【提出日】平成 16 年 12 月 27 日 (2004.12.27)
 【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】

酵素の混合物を含む 1 つまたはそれ以上のサンプル中の 1 つまたはそれ以上の酵素を同定するための方法であって、該方法は以下：

(a) 1 つまたはそれ以上の親和性タグ化したタンパク質反応試薬を提供する工程であって、ここで、該試薬は以下の式を有し：

A - L - P R G

ここで、A は、捕捉試薬に選択的に結合する親和性標識であり、L は、1 つまたはそれ以上の原子が 1 つまたはそれ以上の安定同位体で差次的に標識され得る、リンカー基であり、そして P R G は、酵素に対する基質であるタンパク質反応基である、工程；

(b) 各サンプルを 1 つまたはそれ以上の該タンパク質反応試薬と反応させ、各サンプル中に親和性タグ化酵素生成物を提供する、工程；

(c) 選択的に A と結合する該捕捉試薬を使用して、該サンプル中のいずれの親和性タグ化酵素生成物も捕捉する工程；

(d) 該親和性タグ化酵素生成物と該捕捉試薬との間の相互作用を中断することによって、該捕捉試薬から捕捉された親和性タグ化酵素生成物を放出する工程；ならびに

(e) 該放出された親和性タグ化酵素生成物を質量分析計によって検出および同定し、それにより、該 1 つまたはそれ以上のサンプル中の 1 つまたはそれ以上の酵素を同定する、工程、

を包含する、方法。

【請求項 2】

親和性タグ化した実質的に化学的に同一であるが同位体的に区別可能であるタンパク質反応試薬が、該親和性タグ化したタンパク質反応試薬のリンカー基を 1 つまたはそれ以上の安定同位体で差次的に標識することによって、サンプル中で検出および同定される各酵素に対して提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記放出された親和性タグ化酵素生成物が、質量分析計によって該酵素生成物を検出しそして同定する前に、クロマトグラフィーによって分離される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記タンパク質反応試薬が、1 つまたはそれ以上の酵素に対する酵素基質であり、該酵素の欠乏が、疾患状態に関連する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

親和性タグ化した実質的に化学的に同一であるが同位体的に区別可能であるタンパク質反応試薬が、サンプル中で検出および同定される各酵素に対して提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

サンプル中の 1 つまたはそれ以上のタンパク質が、前記タンパク質反応試薬のタンパク質反応基と反応し得る酵素を露出させるために、酵素学的にまたは化学的に処理される工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 1 つまたはそれ以上のサンプル中の 1 つまたはそれ以上の酵素の量もまた、質量分析計によって決定され、定量される該酵素の各々に対する既知の量の 1 つまたはそれ以上の内部標準を、1 つまたはそれ以上の該サンプルに導入する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記内部標準が、1 つまたはそれ以上の前記サンプル中で同定される酵素に特徴的な、親和性タグ化した差次的に同位体的に標識した酵素生成物である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

酵素との反応について異なる特異性を有する、親和性タグ化した、実質的に化学的に同一であるが同位体的に区別可能である、2 つまたはそれ以上のタンパク質反応試薬を提供し、そして分析する各サンプルと反応させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

サンプル中の 1 つまたはそれ以上の酵素の酵素学的速度が、親和性タグ化酵素生成物の定量によって決定され、定量される該親和性タグ化酵素生成物の各々に対する既知の量の 1 つまたはそれ以上の内部標準を、1 つまたはそれ以上の該サンプルに導入する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

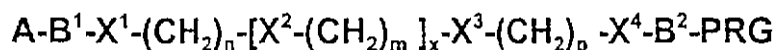
【請求項 11】

サンプル中の 1 つまたはそれ以上の酵素の前記酵素学的速度が、時間の関数として親和性タグ化酵素生成物の定量によって決定される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法であって、前記試薬が、以下の式：

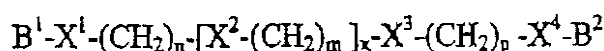
【化 1】



を有し、

A は、前記親和性標識であり；

P R G は、酵素に対する基質である前記タンパク質反応基であり；そして
【化 2】



は、前記リンカー基であり、ここで：

X¹、X²、X³ および X⁴ は、互いに独立して、かつ X² は他の X² と独立して、O、S、NH、NR、NR R'⁺、CO、COO、COS、S-S、SO、SO₂、CO-NR'、CS-NR'、Si-O、アリールまたはジアリール基から選択され得るか、あるいは X¹ ~ X⁴ は、存在しなくてもよく；

B¹ および B² は、互いに独立して、COO、CO、CO-NR'、CS-NR'、(CH₂)_q-CONR'、(CH₂)_q-CS-NR'、または (CH₂)_q から選択される任意の基であり；

n、m、p、q および x は、0 ~ 約 100 の値を取り得る整数であり、ここで、n + x + m + p + q の合計が約 100 未満であり；

R は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、または必要に応じて 1 つまたはそれ以上のアルキル、アルケニル、アルキニルもしくはアルコキシ基で置換されるアリール基であり；そして、

R' は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、または必要に応じて 1 つまたはそれ以上のアルキル、アルケニル、アルキニルもしくはアルコキシ基で置換されるアリール基であり、

ここで、該リンカー中の 1 つまたはそれ以上の CH₂ 基は、アルキル、アルケニル、アルコキシ基、必要に応じて 1 つまたはそれ以上のアルキル、アルケニル、アルキニルもしくはアルコキシ基で置換されるアリール基、酸性基、塩基性基、または永久的な正の電荷もしくは負の電荷を有する基で必要に応じて置換され得；ここで、該リンカー中の非隣接 CH₂ 基を連結する 1 つまたはそれ以上の単結合は、二重または三重結合で置き換えられ得、ここで、該リンカー中の 1 つ以上の原子は、安定同位体で置換され得る、
方法。

【請求項 13】

前記試薬中の B¹ または B² の少なくとも 1 つが、CO-NR' または CS-NR' である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記試薬中の X¹ および X⁴ が、NH、NR、および NR R'⁺ からなる群より選択され、X³ が O であり、そして全ての X² 基が O である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記試薬における親和性標識が、ハプテンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試薬における親和性標識が、ビオチンまたは改変ビオチンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記タンパク質反応試薬における親和性標識が、1, 2 - ジオール、グルタチオン、マルトース、ニトリロ三酢酸基、オリゴヒスチジンおよびハプテンからなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記タンパク質反応試薬における前記リンカー基が、ジスルフィド基を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記タンパク質反応試薬における前記リンカー基が、切断可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記タンパク質反応基における前記リンカー基が、重同位体で置換され得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試薬のタンパク質反応基が、
- ガラクトシダーゼ、アセチル -
- D - グルコサミニダーゼ、ヘパリンスルファミダーゼ、アセチル - C o A - D - グルコサミニド N - アセチルトランスフェラーゼまたは N - アセチルグルコサミン - 6 - スルファターゼに対する基質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

1 つまたはそれ以上の前記酵素が、出生時欠損と関連する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

同定される 1 つまたはそれ以上の前記酵素が、リソソーム蓄積病と関連する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

2 つまたはそれ以上の異なるサンプル中の膜タンパク質の相対量を測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

異なるサンプルが、異なるオルガネラまたは異なる細胞成分画分に由来するタンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

異なるサンプルが、異なる環境状態もしくは栄養状態、異なる化学的刺激もしくは物理的刺激、または異なる時間に応答して発現されるタンパク質を表す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記サンプルが、細胞表面タンパク質を含むサンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記方法が、細胞表面タンパク質を含む 1 つまたはそれ以上の前記サンプルにおける、特定の細胞状態に特徴的な 1 つまたはそれ以上のマーカータンパク質を同定する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記方法が、細胞表面タンパク質を含む 2 つまたはそれ以上のサンプルにおける、特定の細胞状態に特徴的な 1 つまたはそれ以上のマーカータンパク質の相対的な発現レベルを決定する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

1 つのサンプル中の複数の酵素を検出および同定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

複数の酵素を 1 つまたはそれ以上のサンプル中で検出および同定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

1 つのサンプル中の全ての酵素を検出および同定する、請求項 1 に記載の方法。