

【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】令和 2 年 1 月 30 日 (2020.1.30)

【公表番号】特表 2019-501363 (P2019-501363A)

【公表日】平成 31 年 1 月 17 日 (2019.1.17)

【年通号数】公開・登録公報 2019-002

【出願番号】特願 2018-516113 (P2018-516113)

【国際特許分類】

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

C 1 2 N 9/04 (2006.01)

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/32 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

【 F I 】

G 0 1 N 33/68 Z N A

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

C 1 2 N 9/04 Z

C 1 2 N 9/50

C 1 2 N 9/10

C 1 2 Q 1/32

C 1 2 Q 1/37

C 1 2 Q 1/48 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 12 月 3 日 (2019.12.3)

【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】

システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する方法であって、  
前記方法は、

(a) 小分子断片とシステイン反応性プローブで処理された第 1 の細胞溶液を含むサンプルからシステイン反応性プローブ-タンパク質複合体のセットを得る工程であって、システイン反応性プローブが、システイン含有タンパク質上に位置するシステイン残基と共有結合を形成することができる反応性部分を含む、工程と、

(b) プロテオミクス解析手段によってシステイン反応性プローブ-タンパク質複合体のセットを解析する工程と、

(c) 工程 (b) に基づいて、システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定する工程を含む、方法。

【請求項 2】

システイン含有タンパク質を、小分子断片の結合標的であると同定するために、システ

イン反応性プローブ - タンパク質複合体のセットからのシステイン含有タンパク質の各々の値を決定する工程をさらに含み、ここで、前記値は工程 (b) のプロテオミクス解析手段に基づいて決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記サンプルは第 2 の細胞溶液をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

システイン反応性プローブ - タンパク質複合体の第 1 の群を生成するために、第 1 のシステイン反応性プローブで第 1 の細胞溶液をインキュベートする前に、長時間にわたって小分子断片に第 1 の細胞溶液を接触させる工程と、システイン反応性プローブ - タンパク質複合体の第 2 の群を生成するために、第 2 のシステイン反応性プローブに第 2 の細胞溶液を接触させる工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

システイン反応性プローブ - タンパク質複合体の第 1 の群と第 2 の群は、システイン反応性プローブ - タンパク質複合体のセットを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

システイン含有タンパク質は、酵素、輸送体、受容体、チャネルタンパク質、アダプタータンパク質、シャペロン、シグナル伝達タンパク質、血漿タンパク質、転写関連タンパク質、翻訳関連タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、あるいは、細胞骨格関連タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

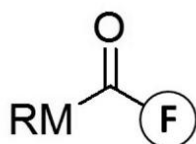
【請求項 7】

システイン含有タンパク質は、表 1、表 2、表 3、表 8、表 9、表 10 A、表 10 B、表 10 C、表 10 D、あるいは表 10 E において例示されるタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

小分子断片は式 (I) の小分子断片であり、

【化 1】



式 (I)

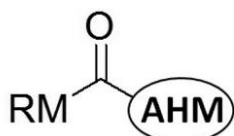
式中、

RM は、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、  
F は小分子断片部分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

システイン反応性プローブは式 (II) のシステイン反応性プローブであり、

【化 2】



式 (II)

式中、

R Mは、マイケル受容体部分、脱離基部分、あるいはシステイン残基のチオール基と共有結合を形成することができる部分から選択される反応性部分であり、および、A H Mは親和性ハンドル部分である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 0】**

マイケル受容体部分はアルケンあるいはアルキン部分を含む、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 1 1】**

親和性ハンドル部分は親和性ハンドルと、システイン含有タンパク質のシステイン残基へのシステイン反応性プローブの共有結合的な相互作用を促す結合部分とを含む、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 1 2】**

親和性ハンドルは、カルボジイミド、N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) エステル、イミドエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、ヒドロキシメチルホスフィン、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルフォナート、ビニルスルホン、ヒドラジド、アルコキシアミン、アルキン、アジド、あるいはイソシアネート基を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

親和性ハンドルはさらに親和性リガンドに結合する、請求項 1 1 に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

親和性リガンドは発色団、標識基、あるいはその組み合わせを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

**【請求項 1 5】**

システイン反応性プローブは図 3 で例示されるシステイン反応性プローブである、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 1 6】**

プロテオミクス解析手段は質量分析方法を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 7】**

工程 c ) における同定する工程は、

( i ) システイン反応性プローブ - タンパク質複合体の第 1 の群からのシステイン含有タンパク質に割り当てられた第 1 の値と、システイン反応性プローブ - タンパク質複合体の第 2 の群からの同じシステイン含有タンパク質の第 2 の値を位置付けることと、

( i i ) 同じシステイン含有タンパク質に割り当てられた 2 つの値の間の比率を計算すること、を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

2 を超える比率は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す、請求項 1 7 に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

工程 c ) における同定する工程は、システイン含有タンパク質へのシステイン反応性プローブの阻害の割合を計算することをさらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 % を超える、あるいは 1 0 0 % の阻害の割合は、システイン含有タンパク質が小分子断片と相互に作用することに関する候補であることを示す、請求項 1 9 に記載の方法。

**【請求項 2 1】**

前記方法はインサイツ法である、請求項 1 - 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

**【請求項 2 2】**

システイン反応性プローブは、4 - ヒドロキシノネナールでも、1 5 - デオキシ - 1 2 , 1 4 - プロスタグランジン J 2 でもない、請求項 1 に記載の方法。