

【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 2 年 11 月 26 日 (2020.11.26)

【公表番号】特表 2019-537434 (P2019-537434A)

【公表日】令和 1 年 12 月 26 日 (2019.12.26)

【年通号数】公開・登録公報 2019-052

【出願番号】特願 2019-519212 (P2019-519212)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/66 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/02 Z N A

C 1 2 Q 1/66

C 1 2 M 1/34 E

C 1 2 N 15/53

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 10 月 12 日 (2020.10.12)

【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】

阻害剤耐性ルシフェラーゼであって、配列番号 3 のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリン及びその誘導体による阻害に対して向上した耐性を備えており、

配列番号 3 との少なくとも 70 % の配列同一性を備え、且つ、配列番号 3 の 396、244、300、344、240、及び / または 254 から選択される位置で配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含む、阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項 2】

デヒドロルシフェリンに曝された際の活性において、配列番号 3 のルシフェラーゼより小さな相対低下を示すか、または、

阻害剤耐性ルシフェラーゼも配列番号 3 のルシフェラーゼもデヒドロルシフェリンに曝されていない場合、配列番号 3 のルシフェラーゼの少なくとも 10 % の生物発光活性を備える、請求項 1 に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項 3】

配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記少なくとも 1 つの置換が I 396 K、H 244 R、C 300 G、T 344 A、I 240 L、Y 254 S、及び / またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、請求項 1 または 2 に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項 4】

I) 配列番号 3 の 396 位にて配列番号 3 に対して置換を含み、任意で、配列番号 3 に対して I 396 K の置換、またはその保存的なもしくは半保存的な変異を含むか、

II) 配列番号 5 との少なくとも 70 % の配列同一性を備え、且つ、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記置換が、配列番号 3 の 244、300、及び / または 396 から選択される位置にあり、任意で、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含

み、前記少なくとも1つの置換が、H 2 4 4 R、C 3 0 0 G、I 3 9 6 K、及び/またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択されるか、または、

III) 配列番号7との少なくとも70%の配列同一性を備え、且つ、配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記置換が、配列番号3の2 4 0、2 5 4、3 4 4、及び/または3 9 6から選択される位置にあり、任意で、配列番号3に対して少なくとも1つの置換を含み、前記少なくとも1つの置換が、I 2 4 0 L、Y 2 5 4 S、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び/またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される

、
請求項3に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、ルシフェリン基質とを含む、試薬組成物。

【請求項6】

ルシフェリンの分解産物を含む混入物をさらに含み、任意で、前記混入物が、デヒドロルシフェリンであり、及び/または、

マグネシウムをさらに含み、及び/または、

緩衝剤、消泡剤、A T Pアーゼ阻害剤、L - ルシフェリン、アミノチオチミジン、酵素安定剤、界面活性剤、A T P生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、A T P抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される1種以上の追加の成分をさらに含み、及び/または、

単一の液体試薬である、

請求項5に記載の試薬組成物。

【請求項7】

請求項1～4のいずれか1項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、カチオン性界面活性剤とを含む試薬組成物であって、任意で、前記カチオン性界面活性剤が、D T A B (臭化ドデシルトリメチルアンモニウム)、C T A B (セチルトリメチルアンモニウム)、塩化ベンザルコニウム、またはB D D A B r (臭化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム)である、試薬組成物。

【請求項8】

請求項5～7のいずれか1項に記載の試薬組成物を含むキットであって、任意で、緩衝剤、消泡剤、A T Pアーゼ阻害剤、酵素安定剤、界面活性剤、A T P生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、A T P抽出剤、補酵素A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される1種以上の追加の成分をさらに含み、及び/または、A T Pの検出アッセイまたはA T Pの定量アッセイを行うための使用説明書をさらに含む、キット。

【請求項9】

試料にてA T Pを検出または定量するためのアッセイシステムであって、

(a) 請求項5～7のいずれか1項に記載の試薬組成物と

(b) A T Pを含むまたはA T Pを含むことが疑われる試料と

を含む、アッセイシステムであって、任意で、前記アッセイシステムが発光の検出及び/または測定のための装置をさらに含むか、または、前記試料が細胞溶解物である、アッセイシステム。

【請求項10】

試料にてA T Pを検出する方法であって、

(a) 請求項5～7のいずれか1項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

(b) 発光を検出する工程とを含み、

任意で、前記試料が、細胞を含み、前記方法が、細胞を溶解して細胞溶解物を生成する工程をさらに含む、方法。

【請求項11】

試料にてA T Pの量または濃度を定量する方法であって、

- (a) 請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、
 (b) 前記試料からの発光を定量する工程と、
 (c) 前記発光を対照値と比較して前記試料における前記 A T P の量または濃度を決定する工程とを含む、方法。

【請求項 1 2】

- I) 前記対照値が、既知の濃度の A T P を含む対照試料によって生成される発光の別の定量から決定されるか、
 II) 前記方法が、前記試料に既知の濃度の A T P を添加する工程をさらに含むか、
 III) 発光が複数の時点で定量されるか、または
 IV) 発光がリアルタイムで定量される、
 請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

試料における A T P の検出及び / または定量のための、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物の使用。

【請求項 1 4】

アッセイにて請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼの見かけのシグナル安定性を向上させる方法であって、存在する前記ルシフェラーゼの 1 種以上の阻害剤と共に前記アッセイを行う工程を含み、

任意で、前記阻害剤が、デヒドロルシフェリン、オキシルシフェリン、及び L - ルシフェリンの 1 種以上から選択されるか、または、前記阻害剤耐性ルシフェラーゼが、天然野生型バージョンのルシフェラーゼと比べて見かけのシグナル安定性の向上における増大を示す、方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 3】

反応物を室温で 3 分間インキュベートし、G l o M a x (登録商標) - M u l t i + ルミノメーター (P r o m e g a) を用いて発光を測定した。ミカエリス・メンテンの競合阻害酵素動態モデルにデータを当て嵌めることによって非線形回帰を用いて G r a p h P a d P r i s m 7 にてデータを解析した。

表 1

	K i (nM)	
	B r i g h t G l o	検出試薬
U l t r a G l o	3 9 . 9	4 1 9 . 7
トリプル+300	7 1 . 8	5 6 2 . 5

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕阻害剤耐性ルシフェラーゼであって、配列番号 3 のルシフェラーゼと比べてデヒドロルシフェリン及びその誘導体による阻害に対して向上した耐性を備えている、阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔2〕デヒドロルシフェリンに曝された際の活性において、配列番号 3 のルシフェラーゼより小さな相対低下を示す、前記〔1〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔3〕配列番号 3 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を含み、且つ、配列番号 3 の 2 4 0、2 4 4、2 5 4、3 0 0、3 4 4、及び / または 3 9 6 から選択される位置で配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含む、前記〔1〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔3〕配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記少なくとも 1 つの置換が I

2 4 0 L、H 2 4 4 R、Y 2 5 4 S、C 3 0 0 G、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、前記〔 3 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 4 〕配列番号 3 の 3 9 6 位にて配列番号 3 に対して置換を含む、前記〔 3 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 5 〕配列番号 3 に対して I 3 9 6 K の置換、またはその保存的なもしくは半保存的な変異を含む、前記〔 4 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 6 〕配列番号 5 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を含み、且つ、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記置換が、配列番号 3 の 2 4 4、3 0 0、及び / または 3 9 6 から選択される位置にある、前記〔 3 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 7 〕配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記少なくとも 1 つの置換が、H 2 4 4 R、C 3 0 0 G、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、前記〔 6 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 8 〕配列番号 7 との少なくとも 7 0 % の配列同一性を含み、且つ、配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記置換が、配列番号 3 の 2 4 0、2 5 4、3 4 4、及び / または 3 9 6 から選択される位置にある、前記〔 3 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 9 〕配列番号 3 に対して少なくとも 1 つの置換を含み、前記少なくとも 1 つの置換が、I 2 4 0 L、Y 2 5 4 S、T 3 4 4 A、I 3 9 6 K、及び / またはそのような置換の保存的なまたは半保存的な変異から選択される、前記〔 8 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 1 0 〕阻害剤耐性ルシフェラーゼも配列番号 3 のルシフェラーゼもデヒドロルシフェリンに曝されていない場合、配列番号 3 のルシフェラーゼの少なくとも 1 0 % の生物発光活性を備える、前記〔 1 〕に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼ。

〔 1 1 〕前記〔 1 〕～〔 1 0 〕のいずれか 1 項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、ルシフェリン基質とを含む、試薬組成物。

〔 1 2 〕ルシフェリンの分解産物を含む混入物をさらに含む、前記〔 1 1 〕に記載の試薬組成物。

〔 1 3 〕前記混入物が、デヒドロルシフェリンである、前記〔 1 2 〕に記載の試薬組成物。

〔 1 4 〕マグネシウムをさらに含む、前記〔 1 1 〕～〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

〔 1 5 〕緩衝剤、消泡剤、A T P アーゼ阻害剤、L - ルシフェリン、アミノチオチミジン、酵素安定剤、界面活性剤、A T P 生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、A T P 抽出剤、補酵素 A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される 1 種以上の追加の成分をさらに含む、前記〔 1 1 〕～〔 1 4 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

〔 1 6 〕単一の液体試薬である、前記〔 1 1 〕～〔 1 5 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

〔 1 7 〕前記〔 1 〕～〔 1 0 〕のいずれか 1 項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼと、カチオン性界面活性剤とを含む、試薬組成物。

〔 1 8 〕前記カチオン性界面活性剤が、D T A B（臭化ドデシルトリメチルアンモニウム）、C T A B（セチルトリメチルアンモニウム）、塩化ベンザルコニウム、または B D D A B r（臭化ベンジルジメチルドデシルアンモニウム）である、試薬組成物。

〔 1 9 〕前記〔 1 1 〕～〔 1 6 〕または〔 1 7 〕～〔 1 8 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を含むキット。

〔 2 0 〕緩衝剤、消泡剤、A T P アーゼ阻害剤、酵素安定剤、界面活性剤、A T P 生成酵素の阻害剤、細胞溶解剤、A T P 抽出剤、補酵素 A、チオール試薬、金属イオンキレート剤、プロテアーゼ阻害剤、及び塩から成る群から選択される 1 種以上の追加の成分をさらに含む、前記〔 1 9 〕に記載のキット。

〔 2 1 〕 A T P の検出アッセイまたは A T P の定量アッセイを行うための使用説明書をさらに含む、前記〔 1 9 〕または〔 2 0 〕に記載のキット。

〔 2 2 〕 試料にて A T P を検出または定量するためのアッセイシステムであって、

（ a ）前記〔 1 1 〕～〔 1 6 〕または〔 1 7 〕～〔 1 8 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物と

（ b ） A T P を含むまたは A T P を含むことが疑われる試料とを含む、アッセイシステム。

〔 2 3 〕 発光の検出及び / または測定のための装置をさらに含む、前記〔 2 2 〕に記載のアッセイシステム。

〔 2 4 〕 前記試料が、細胞溶解物である、前記〔 2 2 〕に記載のアッセイシステム。

〔 2 5 〕 試料にて A T P を検出する方法であって、

（ a ）前記〔 1 1 〕～〔 1 6 〕または〔 1 7 〕～〔 1 8 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

（ b ）発光を検出する工程とを含む、方法。

〔 2 6 〕 前記試料が、細胞を含み、前記方法が、細胞を溶解して細胞溶解物を生成する工程をさらに含む、前記〔 2 5 〕に記載の方法。

〔 2 7 〕 試料にて A T P の量または濃度を定量する方法であって、

（ a ）前記〔 1 1 〕～〔 1 6 〕または〔 1 7 〕～〔 1 8 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を前記試料に添加する工程と、

（ b ）前記試料からの発光を定量する工程と、

（ c ）前記発光を対照値と比較して前記試料における前記 A T P の量または濃度を決定する工程とを含む、方法。

〔 2 8 〕 前記対照値が、既知の濃度の A T P を含む対照試料によって生成される発光の別の定量から決定される、前記〔 2 7 〕に記載の方法。

〔 2 9 〕 前記試料に既知の濃度の A T P を添加する工程をさらに含む、前記〔 2 7 〕に記載の方法。

〔 3 0 〕 発光が複数の時点で定量される、前記〔 2 7 〕に記載の方法。

〔 3 1 〕 発光がリアルタイムで定量される、前記〔 2 7 〕に記載の方法。

〔 3 2 〕 試料における A T P の検出及び / または定量のための、前記〔 1 1 〕～〔 1 6 〕または〔 1 7 〕～〔 1 8 〕のいずれか 1 項に記載の試薬組成物の使用。

〔 3 3 〕 アッセイにて前記〔 1 〕～〔 1 0 〕のいずれか 1 項に記載の阻害剤耐性ルシフェラーゼの見かけのシグナル安定性を向上させる方法であって、存在する前記ルシフェラーゼの 1 種以上の阻害剤と共に前記アッセイを行う工程を含む、方法。

〔 3 4 〕 前記阻害剤が、デヒドロルシフェリン、オキシルシフェリン、及び L - ルシフェリンの 1 種以上から選択される、前記〔 3 3 〕に記載の方法。

〔 3 5 〕 前記阻害剤耐性ルシフェラーゼが、天然野生型バージョンのルシフェラーゼと比べて見かけのシグナル安定性の向上における増大を示す、前記〔 3 3 〕に記載の方法。