

【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】平成30年10月18日(2018.10.18)

【公表番号】特表2017-536104(P2017-536104A)

【公表日】平成29年12月7日(2017.12.7)

【年通号数】公開・登録公報2017-047

【出願番号】特願2017-520506(P2017-520506)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
G 01 N	33/50	(2006.01)
G 01 N	33/15	(2006.01)
C 12 Q	1/66	(2006.01)
C 12 Q	1/02	(2006.01)
C 07 K	14/705	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
G 01 N	33/50	Z
G 01 N	33/15	Z
C 12 Q	1/66	
C 12 Q	1/02	
C 07 K	14/705	
C 12 N	5/10	

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月4日(2018.9.4)

【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】

(A)、または(B)で定義される要素を含む、Gタンパク質活性を検出するためのバイオセンサーシステムであって、

(A)

(a) 共鳴エネルギー転移(RET)ドナー；(b) RETアクセプター、または(c)レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；及び

融合Gタンパク質または融合Gタンパク質を含む第2の成分、前記Gタンパク質または前記Gタンパク質は、(a)RETドナー；(b)RETアクセプター、または(c)前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

を含む、(i)第1のバイオセンサー、

(i)で定義される前記第1及び第2の成分；及び

組換えGタンパク質を含む第3の成分；

(a)前記IIPが前記RETドナーに融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記RETアクセプターに融合しており；(b)前記IIPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記GまたはGタンパク質は、前記RETドナーに融合しており；及び(c)前記IIPが前記レポータータンパク質の第1の断片に融

合している場合、前記 G または G タンパク質は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；

を含む、( i i ) 第 2 のバイオセンサー、または  
( B )

( a ) RET ドナー；( b ) RET アクセプター、または( c ) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G 相互作用タンパク質( I P )を含む第 1 の成分；

融合 G タンパク質共役型レセプター( GPCR )を含む第 2 の成分、前記 GPCR は、その C 末端で( a ) RET ドナー；( b ) RET アクセプター、または( c ) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；

組換え G タンパク質を含む第 3 の成分；

( a ) 前記 I P が前記 RET ドナーに融合している場合、前記 GPCR は、前記 RET アクセプターに融合しており；( b ) 前記 I P が前記 RET アクセプターに融合している場合、前記 GPCR は、前記 RET ドナーに融合しており；及び( c ) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 GPCR は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している

を含む、( i ) バイオセンサー

を含む、前記バイオセンサーシステム。

#### 【請求項 2】

前記 G タンパク質が、前記 RET ドナー、RET アクセプター、または第 2 の断片に融合している、請求項 1 に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 3】

前記 RET ドナー、RET アクセプター、または第 2 の断片が、前記 G または G タンパク質の N 末端で融合している、請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 4】

前記 RET ドナー、RET アクセプター、または第 1 の断片が、前記 I P の C 末端で融合している、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 5】

前記 I P が、前記 RET アクセプター及び前記 G タンパク質に融合しており、G タンパク質または GPCR が、前記 RET ドナーに融合している、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 6】

前記 RET ドナーが、生物発光タンパク質であり、そして、前記 RET アクセプターが、蛍光タンパク質である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 7】

前記生物発光タンパク質が、ルシフェラーゼである、請求項 6 に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 8】

前記蛍光タンパク質が、GFP である、請求項 6 または 7 に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 9】

前記第 1 の成分が、前記 I P または前記 RET ドナー、RET アクセプター、または第 1 の断片に融合した原形質膜( PM )標的化部分をさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 10】

前記 PM 標的化部分が、ブレニル化モチーフを含む、請求項 9 に記載のバイオセンサーシステム。

#### 【請求項 11】

前記 PM 標的化部分が、アミノ酸配列 K K K K K K S K T K C V I M ( 配列番号 37 ) を含む、請求項 10 に記載のバイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 2】

( i ) 前記 R E T ドナー、 R E T アクセプター、または第 1 の断片と ( i i ) 前記 P M 標的化部分の間にフレキシブルリンクバーをさらに含む、請求項 7 に記載のバイオセンサー システムであって、前記フレキシブルリンクバーが、約 50 ~ 約 500 アミノ酸に対応する長さを有する、バイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 3】

前記組換え G タンパク質が、ヒト G<sub>q</sub>、 G<sub>s</sub>、 G<sub>i1</sub>、 G<sub>i2</sub>、 G<sub>i3</sub>、 G<sub>t-co</sub><sub>ne</sub>、 G<sub>t-rod</sub>、 G<sub>t-gust</sub>、 G<sub>z</sub>、 G<sub>oA</sub>、 G<sub>oB</sub>、 G<sub>olf</sub>、 G<sub>11</sub>、 G<sub>12</sub>、 G<sub>13</sub>、 G<sub>14</sub>、及び G<sub>15</sub> / G<sub>16</sub> タンパク質、またはそれらの無差別または非選択的 G 变異体である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 4】

前記 I P が、 G R K 2 または G R K 3 である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 5】

( i ) 前記第 2 の成分が融合 G タンパク質を含む場合、前記第 1 及び第 2 のバイオセンサーは、組換え G タンパク質をさらに含み、または ( i i ) 前記第 2 の成分が融合 G タンパク質を含む場合、前記第 1 及び第 2 のバイオセンサーは、組換え G タンパク質をさらに含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 6】

( A ) で定義される前記バイオセンサーシステムが、 G タンパク質共役型レセプター ( G P C R ) をさらに含むか、あるいは、 ( B ) で定義される前記バイオセンサーシステムが、組換え G タンパク質及び / または組換え G タンパク質をさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 7】

( A ) で定義される前記バイオセンサーシステムが、複数の第 2 のバイオセンサーを含み、前記第 2 のバイオセンサーの各々が、異なる組換え G タンパク質を含み、そして、前記異なる組換え G タンパク質が、以下の G タンパク質 : G<sub>q</sub>、 G<sub>s</sub>、 G<sub>i1</sub>、 G<sub>i2</sub>、 G<sub>i3</sub>、 G<sub>t-cone</sub>、 G<sub>t-rod</sub>、 G<sub>t-gust</sub>、 G<sub>z</sub>、 G<sub>oA</sub>、 G<sub>oB</sub>、 G<sub>olf</sub>、 G<sub>11</sub>、 G<sub>12</sub>、 G<sub>13</sub>、 G<sub>14</sub>、及び G<sub>15</sub> / G<sub>16</sub> の少なくとも 2 つである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーシステム。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のバイオセンサーを含む宿主細胞。

## 【請求項 1 9】

G タンパク質活性を検出するためのバイオセンサーであって、

( i ) ( a ) R E T ドナー； ( b ) R E T アクセプター、または ( c ) レポータータンパク質の第 1 の断片に融合した G 相互作用タンパク質 ( I P ) を含む第 1 の成分；及び

( i i ) 融合原形質膜 ( P M ) 標的化部分を含む第 2 の成分、前記 P M 標的化部分は、 ( a ) R E T ドナー； ( b ) R E T アクセプター、または ( c ) 前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している；

を含み、

( a ) 前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T アクセプターに融合しており； ( b ) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び ( c ) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第 1 の断片に融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記レポータータンパク質の第 2 の断片に融合している、前記バイオセンサー。

## 【請求項 2 0】

試験薬剤が G P C R の活性を調節するかどうかの決定方法であって、

( 1 ) ( A ) 、 ( B ) 、または ( C ) で定義される要素を含むバイオセンサーを提供す

ること：

( A )

( i ) ( a ) R E T ドナー；( b ) R E T アクセプター、または( c ) レポータータンパク質の第1の断片に融合した G 　相互作用タンパク質( I P )を含む第1の成分；

( i i ) 融合 G 　タンパク質または融合 G 　タンパク質を含む第2の成分、前記 G 　タンパク質または前記 G 　タンパク質は、( a ) R E T ドナー；( b ) R E T アクセプター、または( c ) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している、

( a ) 前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G 　または G 　タンパク質は、前記 R E T アクセプターに融合しており；( b ) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G 　または G 　タンパク質は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び( c ) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 G 　または G 　タンパク質は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

( i i i ) 組換え G 　タンパク質を含む第3の成分；及び

( i v ) 前記 G P C R を含む第4の成分；

( B )

( i ) ( a ) R E T ドナー；( b ) R E T アクセプター、または( c ) レポータータンパク質の第1の断片に融合した G 　相互作用タンパク質( I P )を含む第1の成分；

( i i ) その C 末端で( a ) R E T ドナー；( b ) R E T アクセプター、または( c ) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合した前記 G P C R を含む第2の成分；

( i i i ) 組換え G 　タンパク質を含む第3の成分；

( a ) 前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T アクセプターに融合しており；( b ) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 G P C R は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び( c ) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 G P C R は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；または

( C )

( i ) ( a ) R E T ドナー；( b ) R E T アクセプター、または( c ) レポータータンパク質の第1の断片に融合した G 　相互作用タンパク質( I P )を含む第1の成分；

( i i ) 融合原形質膜( P M )標的化部分を含む第2の成分、前記 P M 標的化部分は、( a ) R E T ドナー；( b ) R E T アクセプター、または( c ) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

( a ) 前記 I P が前記 R E T ドナーに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T アクセプターに融合しており；( b ) 前記 I P が前記 R E T アクセプターに融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記 R E T ドナーに融合しており；及び( c ) 前記 I P が前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記 P M 標的化部分は、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

( i i i ) 組換え G 　タンパク質を含む第3の成分；及び

( i v ) 前記 G P C R を含む第4の成分；及び

( 2 ) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記 R E T アクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること；

前記薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記 G P C R の活性を増加させることを示し、前記薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記薬剤が前記 G P C R の活性を阻害することを示す

を含む、前記方法。

【請求項 2 1】

G 　タンパク質が G P C R アゴニストによって活性化されるかどうかの決定方法であつ

て、

(a) 請求項1～17のいずれか1項に記載のバイオセンサーシステムの前記第1及び第2のバイオセンサー中で前記GPCRアゴニストの存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること、及び

(b) 前記RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルに基づいて、前記Gタンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されるかどうかを同定すること；

前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記Gタンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されることを示し、前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記Gタンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されないことを示す；または

(a1) 以下の(i)、及び(ii)を含む第1のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下及び不在下において、RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること：

(i) (a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) レポータータンパク質の第1の断片に融合したG相互作用タンパク質(IIP)を含む第1の成分；及び

(ii) 融合Gタンパク質共役型レセプター(GPCR)を含む第2の成分、前記GPCRは、そのC末端で(a) RETドナー；(b) RETアクセプター、または(c) 前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

(b1) 以下の(i)、及び(ii)を含む第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下及び不在下において、RETアクセプターまたはレポータータンパク質が発したシグナルを測定すること：

(i) (a1)で定義される前記第1及び第2の成分；及び

(ii) 前記Gタンパク質の組換え形態を含む第3の成分；

(A) 前記IIPが前記RETドナーに融合している場合、前記GPCRは、前記RETアクセプターに融合しており；(B) 前記IIPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記GPCRは、前記RETドナーに融合しており；及び(C) 前記

IIPが前記レポータータンパク質の第1の断片に融合している場合、前記GPCRは、前記レポータータンパク質の第2の断片に融合している；

前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下において測定されたシグナルのより高い増加は、前記Gタンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されることを示し、前記第1のバイオセンサーに対して前記第2のバイオセンサー中の前記GPCRアゴニストの存在下において測定されたシグナルの同様のまたはより低い増加、または減少は、前記Gタンパク質が前記GPCRアゴニストによって活性化されないことを示す

を含む、前記方法。

## 【請求項22】

試験薬剤が目的Gタンパク質のインヒビターまたは活性化因子であるかどうかの決定方法であって、

(1)

(a) 請求項1～17のいずれか1項に記載の要素(A)で定義される第2のバイオセンサー、または

(b) 請求項1～17のいずれか1項に記載の要素(B)で定義されるバイオセンサー

をGPCRアゴニストまたはアンタゴニストと接触させること、前記組換えGタンパク質は、前記目的Gタンパク質に対応する；

(2) 前記試験薬剤の存在下及び不在下において、前記RETアクセプターまたはレポ

－タータンパク質が発したシグナルを測定すること；及び

(c) 前記試験薬剤が前記Gタンパク質のインヒビターまたは活性化因子であるかどうかを決定すること

(i) 前記G P C Rアゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定されたより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的Gタンパク質のインヒビターであることを示し、前記G P C Rアゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的Gタンパク質のインヒビターではないことを示す；または(i i) 前記G P C Rアンタゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定されたより高いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的Gタンパク質活性化因子であることを示し、前記G P C Rアンタゴニストとの接触後に前記試験薬剤の存在下において測定された同様のまたはより低いシグナルは、前記試験薬剤が前記目的Gタンパク質活性化因子ではないことを示す

を含む、前記方法。