

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

C 1 2 Q 1/66 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/15 Z

C 1 2 Q 1/66

C 1 2 Q 1/02

C 0 7 K 14/705

C 1 2 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 ( 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

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；

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 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 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 ) 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；

融合 G タンパク質共役型レセプター ( G P C R ) を含む第 2 の成分、前記 G P C R は、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 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

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 R E T ドナー、R E T 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 R E T ドナー、R E T 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 R E T ドナー、R E T 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 R E T 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 G P C R が、前記 R E T 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 R E T ドナーが、生物発光タンパク質であり、そして、前記 R E T 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、G F P 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 R E T ドナー、R E T アクセプター、または第 1 の断片に融合した原形質膜 ( P M ) 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 P M 標的化部分が、プ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 P M 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 12】

(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カーをさらに含む、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カーが、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 13】

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>ne、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 変異体である、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 14】

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 15】

(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、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 16】

(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 17】

(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 18】

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 19】

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 20】

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) 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( IP)を含む第1の成分；

(ii) 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、

(a) 前記 IP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 IP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 IP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；

(iii) 組換えG タンパク質を含む第3の成分；及び

(iv) 前記GPCRを含む第4の成分；

(B)

(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( IP)を含む第1の成分；

(ii) 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の断片に融合した前記GPCRを含む第2の成分；

(iii) 組換えG タンパク質を含む第3の成分；

(a) 前記 IP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 IP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

IP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；または

(C)

(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( IP)を含む第1の成分；

(ii) 融合原形質膜(PM)標的化部分を含む第2の成分、前記PM標的化部分は、(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；

(a) 前記 IPが前記RETドナーに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETアクセプターに融合しており；(b) 前記 IPが前記RETアクセプターに融合している場合、前記PM標的化部分は、前記RETドナーに融合しており；及び

(c) 前記 IP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PM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；

(iii) 組換えG タンパク質を含む第3の成分；及び

(iv) 前記GPCR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；

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GPCR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GPCRの活性を阻害することを示す

を含む、前記方法。

【請求項21】

G タンパク質がGPCR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っ

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 (IP) 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 IP 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 IP 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 IP 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

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

(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 GPCR 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 GPCR 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 (ii) 前記 GPCR 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 GPCR 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。