

【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17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2005-506039(P2005-506039A)

【公表日】平成17年3月3日(2005.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2005-009

【出願番号】特願2002-558022(P2002-558022)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

C 0 7 K 1/22

G 0 1 N 27/62

G 0 1 N 30/48

G 0 1 N 30/88

G 0 1 N 33/15

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

// C 0 7 K 14/00

C 0 7 K 19/00

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 1/22

G 0 1 N 27/62 D

G 0 1 N 27/62 V

G 0 1 N 30/48 R

G 0 1 N 30/88 J

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/566

C 0 7 K 14/00

C 0 7 K 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成16年12月17日(2004.12.17)

【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) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1個の複合体の形成が促進されるように、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択によってリガンド分子を選択する工程と、

(b) 該複合体を非結合分子から分離する工程と、

(c) リガンド分子を同定する工程と

からなる疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法。

**【請求項 2】**

前記疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、均一溶液相の条件下で行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記疎水性標的タンパク質を多数の分子に曝すことが、不均一溶液相の条件下で行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記リガンド分子の選択が、多次元クロマトグラフィを使用して行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) 膜タンパク質と、
- (b) 内在性膜タンパク質と
- (c) 膜貫通タンパク質と、
- (d) モノトピック型膜タンパク質と、
- (e) ポリトピック型膜タンパク質と、
- (f) ポンプ・タンパク質と、
- (g) チャネル・タンパク質と、
- (h) 受容体キナーゼタンパク質と、
- (i) Gタンパク質共役受容体タンパク質と、
- (j) 膜結合酵素と、
- (k) 輸送体タンパク質と

からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記多数の分子はマスコードされた分子ライブラリである請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記多数の分子はマスコードされていない分子ライブラリである請求項 1 に記載の方法

。

**【請求項 8】**

前記両親媒性物質が、

- (a) 極性脂質と、
- (b) 両親媒性高分子ポリマーと、
- (c) 表面活性物質または界面活性剤と、
- (d) 両親媒性ポリペプチドと

からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

リガンド分子の同定が、質量スペクトル分析によって行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記リガンド分子のデコンボリューションが質量スペクトル分析によって行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記複合体の前記非結合分子からの分離が、固相クロマトグラフィ媒体により行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列と、
- (b) アフィニティ選択に有用な少なくとも 2 つのタグ配列と、
- (c) 疎水性タンパク質 (HP) 配列と

からなる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記疎水性タンパク質配列が、

- (a) 膜タンパク質と、
- (b) 内在性膜タンパク質と、
- (c) 膜貫通タンパク質と、
- (d) モノトピック型膜タンパク質と、
- (e) ポリトピック型膜タンパク質と、
- (f) ポンプ・タンパク質と、
- (g) チャネル・タンパク質と、
- (h) 受容体キナーゼタンパク質と、
- (i) Gタンパク質共役受容体タンパク質と、
- (j) 膜結合酵素と、
- (k) 輸送体タンパク質と

からなる群から選択される請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記タグ配列が、

- (a) FLAGタグ(NH<sub>2</sub>-DYKDDDDK-COOH)(配列番号29)と、
  - (b) EEタグ(NH<sub>2</sub>-EEEEYMPME-COOH)(配列番号30)と、
  - (c) ヘマグルチニン・タグ(NH<sub>2</sub>-YPYDVPDYA-COOH)(配列番号31)と、
  - (d) mycタグ(NH<sub>2</sub>-KHKLEQLRNSGA-COOH)(配列番号32)と、
  - (e) HSVタグ(NH<sub>2</sub>-QPELAPEDPED-COOH)(配列番号33)と
- からなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む請求項12に記載の方法。

【請求項15】

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) タグ1-タグ2-HPと、
- (b) タグ1-HP-タグ2と、
- (c) HP-タグ1-タグ2と

からなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列を含む請求項12に記載の方法。

【請求項16】

前記疎水性標的タンパク質が、

- (a) Mycタグ-EEタグ-ヒトm2 mAChR(配列番号7)と、
- (b) Flagタグ-ヒト2アドレナリン受容体-EEタグ(配列番号8)と、
- (c) ヒトニューロキニン3受容体-HSVタグ-Mycタグ(配列番号9)と、
- (d) Flagタグ-ヒトm1 mAChR-EEタグ(配列番号10)と、
- (e) ラットm3 mAChR-HSVタグ-8Hisタグ(配列番号11)と

からなる群から選択される請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記疎水性標的タンパク質が、アミノ末端に異種シグナル配列(SS)をさらに含む請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記異種シグナル配列が、

- (a) メリチン・シグナル配列NH<sub>2</sub>-KFLVNVALLVFMVVYISYIYA-COOH(配列番号12)と、
- (b) GPシグナル配列NH<sub>2</sub>-VRTAVLILLVRFSEP-COOH(配列番号13)と、
- (c) ヘマグルチニン・シグナル配列NH<sub>2</sub>-KTIIALS YIFCLVFA-COOH(配列番号14)と、
- (d) ロドプシン・タグ1シグナル配列NH<sub>2</sub>-MNGTEGPNFYVPFSNKTG

V V R S P F E A P Q Y Y L A E P - C O O H ( 配列番号 1 5 ) と、  
( e ) ロドブシン・タグ I D 4 シグナル配列 N H <sub>2</sub> - G K N P L G V R K T E T S Q V A  
P A - C O O H ( 配列番号 1 6 ) と  
からなる群から選択される請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 ( 配列番号 1 7 ) とデカヒスチジン配列 ( 配列番号 1 8 ) とをさらに含む請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記疎水性標的タンパク質が、  
( a ) G P 6 7 S S - M y c タグ - E E タグ - ヒト m 2 m A C h R ( 配列番号 1 9 )  
と、  
( b ) メリチン S S - F l a g タグ - ヒト 2 アドレナリン受容体 - E E タグ ( 配列番号  
2 0 ) と、  
( c ) ヘマグルチニン S S - ヒトニューロキニン 3 受容体 - H S V タグ - M y c タグ ( 配  
列番号 2 1 ) と、  
( d ) メリチン S S - F l a g タグ - ヒト m 1 m A C h R - E E タグ ( 配列番号 2 2 )  
と、  
( e ) ヘマグルチニン S S - ラット m 3 m A C h R - H S V タグ - 8 H i s タグ ( 配列  
番号 2 3 ) と  
からなる群から選択される請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

( a ) 疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、  
( b ) 該疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、  
( c ) 該疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製  
する工程と  
からなる、疎水性タンパク質を単離する方法。

【請求項 2 2】

前記疎水性タンパク質が、  
( a ) 少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン配列と、  
( b ) アフィニティ選択に有用な少なくとも 2 つのタグ配列と、  
( c ) 疎水性タンパク質 ( H P ) 配列と  
からなる請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記疎水性タンパク質配列が、  
( a ) 膜タンパク質と、  
( b ) 内在性膜タンパク質と、  
( c ) 膜貫通タンパク質と、  
( d ) モノトピック型膜タンパク質と、  
( e ) ポリトピック型膜タンパク質と、  
( f ) ポンプ・タンパク質と、  
( g ) チャネル・タンパク質と、  
( h ) 受容体キナーゼタンパク質と、  
( i ) G タンパク質共役受容体タンパク質と、  
( j ) 膜結合酵素と、  
( k ) 輸送体タンパク質と  
からなる群から選択される請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記タグ配列が、  
( a ) F L A G タグ ( N H <sub>2</sub> - D Y K D D D D K - C O O H ) ( 配列番号 2 9 ) と、  
( b ) E E タグ ( N H <sub>2</sub> - E E E E Y M P M E - C O O H ) ( 配列番号 3 0 ) と、

(c) ヘマグルチニン・タグ (NH<sub>2</sub> - Y P Y D V P D Y A - C O O H) (配列番号 3 1) と、

(d) myc タグ (NH<sub>2</sub> - K H K L E Q L R N S G A - C O O H) (配列番号 3 2) と、

(e) HSV タグ (NH<sub>2</sub> - Q P E L A P E D P E D - C O O H) (配列番号 3 3) とからなる群から選択されるエピトープ・タグ配列を含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記疎水性タンパク質が、

(a) タグ 1 - タグ 2 - H P と、

(b) タグ 1 - H P - タグ 2 と、

(c) H P - タグ 1 - タグ 2 と

からなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ配列を含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記疎水性タンパク質が、

(a) Myc タグ - E E タグ - ヒト m 2 m A C h R (配列番号 7) と、

(b) F l a g タグ - ヒト 2 アドレナリン受容体 - E E タグ (配列番号 8) と、

(c) ヒトニューロキニン 3 受容体 - H S V タグ - M y c タグ (配列番号 9) と、

(d) F l a g タグ - ヒト m 1 m A C h R - E E タグ (配列番号 1 0) と、

(e) ラット m 3 m A C h R - H S V タグ - 8 H i s タグ (配列番号 1 1) とからなる群から選択される請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記疎水性タンパク質が、アミノ末端に異種シグナル配列 (S S) をさらに含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記異種シグナル配列が、

(a) メリチン・シグナル配列 NH<sub>2</sub> - K F L V N V A L V F M V V Y I S Y I Y A - C O O H (配列番号 1 2) と、

(b) G P シグナル配列 NH<sub>2</sub> - V R T A V L I L L L V R F S E P - C O O H (配列番号 1 3) と、

(c) ヘマグルチニン・シグナル配列 NH<sub>2</sub> - K T I I A L S Y I F C L V F A - C O O H (配列番号 1 4) と、

(d) ロドプシン・タグ 1 シグナル配列 NH<sub>2</sub> - M N G T E G P N F Y V P F S N K T G V V R S P F E A P Q Y Y L A E P - C O O H (配列番号 1 5) と、

(e) ロドプシン・タグ I D 4 シグナル配列 NH<sub>2</sub> - G K N P L G V R K T E T S Q V A P A - C O O H (配列番号 1 6) と

からなる群から選択される請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記タグ配列が、ヘキサヒスチジン配列 (配列番号 1 7) とデカヒスチジン配列 (配列番号 1 8) とをさらに含む請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記疎水性標的タンパク質が、

(a) G P 6 7 S S - M y c タグ - E E タグ - ヒト m 2 m A C h R (配列番号 1 9) と、

(b) メリチン S S - F l a g タグ - ヒト 2 アドレナリン受容体 - E E タグ (配列番号 2 0) と、

(c) ヘマグルチニン S S - ヒトニューロキニン 3 受容体 - H S V タグ - M y c タグ (配列番号 2 1) と、

(d) メリチン S S - F l a g タグ - ヒト m 1 m A C h R - E E タグ (配列番号 2 2) と、

(e) ヘマグルチニンSS - ラットm3 mAChR - HSVタグ - 8Hisタグ (配列番号23) と

からなる群から選択される請求項29に記載の方法。

【請求項31】

(a) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、

(b) 下記の要素、すなわち

(i) N末端メチオニン残基、

(ii) 異種シグナル配列(SS)、

(iii) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列、

(iv) アフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列、および

(v) 疎水性タンパク質(HP)配列

からなる人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とを含む疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子。

【請求項32】

前記N末端メチオニン配列および前記異種シグナル配列が、

(a) MKFLVNVAVLFMVVYISYIYA (配列番号24) と、

(b) MVRTAVLILLVRFSEPP (配列番号25) と、

(c) MKTIIALSIFYFLVFA (配列番号26) と、

(d) MMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRS PF EAPQYYLAEP - COOH (配列番号27) と、

(e) MGKNPLGVRKTETSQVAPA - COOH (配列番号28) と

からなる群から選択される請求項31に記載の単離核酸分子。

【請求項33】

前記タグ配列が、

(a) FLAGタグ(NH<sub>2</sub> - DYKDDDDK - COOH) (配列番号1) と、

(b) EEタグ(NH<sub>2</sub> - EEEEMYPMEE - COOH) (配列番号2) と、

(c) ヘマグルチニン・タグ(NH<sub>2</sub> - YPYDVPDYA - COOH) (配列番号3) と、

(d) mycタグ(NH<sub>2</sub> - KHKLEQLRNSGA - COOH) (配列番号4) と、

(e) HSVタグ(NH<sub>2</sub> - QPELAPEDPED - COOH) (配列番号5) と

からなる群から選択されたエピトープ・タグ配列からなる請求項31に記載の単離核酸分子。

【請求項34】

前記人工的に改変された疎水性タンパク質の前記要素が、

(a) SS - タグ1 - タグ2 - HPと、

(b) SS - タグ1 - HP - タグ2と、

(c) SS - HP - タグ1 - タグ2と

からなる群から選択された順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列される請求項33に記載の単離核酸分子。

【請求項35】

前記タグ配列がヘキサヒスチジン配列(配列番号17)とデカヒスチジン配列(配列番号18)とをさらに含む請求項34に記載の単離核酸分子。

【請求項36】

前記人工的に改変された疎水性タンパク質が、

(a) GP67 - Myc - EE - ヒトm2 mAChR (配列番号19) と、

(b) メリチン - Flagタグ - ヒトm1 mAChR - EE (配列番号20) と

からなる群から選択される請求項35に記載の単離核酸分子。

【請求項37】

(a) (i) 膜タンパク質、

(ii) 内在性膜タンパク質、

- ( i i i ) 膜貫通タンパク質、
- ( i v ) モノトピック型膜タンパク質、
- ( v ) ポリトピック型膜タンパク質、
- ( v i ) ポンプ・タンパク質、
- ( v i i ) チャネル・タンパク質、
- ( v i i i ) 受容体キナーゼタンパク質、
- ( i x ) Gタンパク質共役受容体タンパク質、
- ( x ) 膜結合酵素、および
- ( x i ) 輸送体タンパク質

からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、

- ( x i i ) 該疎水性タンパク質に両親媒性物質が結合していることと、
- ( b ) ( i ) 極性脂質、
- ( i i ) 両親媒性高分子ポリマー、
- ( i i i ) 表面活性物質または界面活性剤、および
- ( i v ) 両親媒性ポリペプチド

からなる群から該疎水性タンパク質に結合する両親媒性物質を選択する工程と、

( c ) 該疎水性標的タンパク質と該リガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、均一溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している該疎水性標的タンパク質をマスコード・ライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、

- ( d ) 該複合体を非結合分子から分離する工程と、
- ( e ) 質量スペクトル分析によって該リガンド分子を同定する工程と

からなる、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法。

【請求項38】

- ( a ) ( i ) 膜タンパク質、
- ( i i ) 内在性膜タンパク質、
- ( i i i ) 膜貫通タンパク質、
- ( i v ) モノトピック型膜タンパク質、
- ( v ) ポリトピック型膜タンパク質、
- ( v i ) ポンプ・タンパク質、
- ( v i i ) チャネル・タンパク質、
- ( v i i i ) 受容体キナーゼタンパク質、
- ( i x ) Gタンパク質共役受容体タンパク質、
- ( x ) 膜結合酵素、および
- ( x i ) 輸送体タンパク質

からなる群から疎水性標的タンパク質を選択する工程と、

- ( x i i ) 該疎水性タンパク質に両親媒性物質が結合していることと、
- ( b ) ( i ) 極性脂質、
- ( i i ) 両親媒性高分子ポリマー、
- ( i i i ) 表面活性物質または界面活性剤、および
- ( i v ) 両親媒性ポリペプチド

からなる群から該疎水性タンパク質に結合する両親媒性物質を選択する工程と、

( c ) 疎水性標的タンパク質とリガンド分子との少なくとも1つの複合体の形成が促進されるように、不均一溶液相の条件下、両親媒性物質が結合している疎水性標的タンパク質をマスコードされていないライブラリ由来の多数の分子に曝すことによるアフィニティ選択により、多次元クロマトグラフィを使用してリガンド分子を選択する工程と、

- ( d ) 複合体を非結合分子から分離する工程と、
- ( e ) 質量スペクトル分析によって該リガンド分子を同定する工程と

からなる、疎水性タンパク質のリガンドを同定する方法。

【請求項39】

( a ) ( i ) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列、

( i i ) ( 1 ) F L A G タグ ( N H 2 - D Y K D D D D K - C O O H ) ( 配列番号 2 9 )、

( 2 ) E E タグ ( N H 2 - E E E E Y M P M E - C O O H ) ( 配列番号 3 0 )、

( 3 ) ヘマグルチニン・タグ ( N H 2 - Y P Y D V P D Y A - C O O H ) ( 配列番号 3 1 )、

( 4 ) m y c タグ ( N H 2 - K H K L E Q L R N S G A - C O O H ) ( 配列番号 3 2 )、および

( 5 ) H S V タグ ( N H 2 - Q P E L A P E D P E D - C O O H ) ( 配列番号 3 3 )

)

からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列、

( i i i ) ( 1 ) 膜タンパク質、

( 2 ) 内在性膜タンパク質、

( 3 ) 膜貫通タンパク質、

( 4 ) モノトピック型膜タンパク質、

( 5 ) ポリトピック型膜タンパク質、

( 6 ) ポンプ・タンパク質、

( 7 ) チャネル・タンパク質、

( 8 ) 受容体キナーゼタンパク質、

( 9 ) G タンパク質共役受容体タンパク質、

( 1 0 ) 膜結合酵素、および

( 1 1 ) 輸送体タンパク質

からなる群から選択される疎水性タンパク質 ( H P ) 配列

からなる疎水性タンパク質を選択する工程と、

( b ) 該疎水性タンパク質をショ糖勾配超遠心法によって精製する工程と、

( c ) 該疎水性タンパク質を抗体アフィニティ精製によって精製する工程と、

( d ) 該疎水性タンパク質を固定化金属アフィニティ・クロマトグラフィによって精製する工程と

からなる疎水性タンパク質を単離する方法。

【請求項 4 0】

( a ) 真核細胞におけるタンパク質発現用のベクター・ポリヌクレオチド配列と、

( b ) 下記の要素、すなわち

( i ) N 末端メチオニン残基、

( i i ) 該 N 末端メチオニン配列および異種シグナル配列が、

( 1 ) M K F L V N V A L V F M V V Y I S Y I Y A ( 配列番号 2 4 )、

( 2 ) M V R T A V L I L L L V R F S E P ( 配列番号 2 5 )、

( 3 ) M K T I I A L S Y I F C L V F A ( 配列番号 2 6 )、

( 4 ) M M N G T E G P N F Y V P F S N K T G V V R S P F E A P Q Y Y L A E P - C O O H ( 配列番号 2 7 )、および

( 5 ) M G K N P L G V R K T E T S Q V A P A - C O O H ( 配列番号 2 8 )

からなる群から選択される異種シグナル配列 ( S S )、

( i i i ) 少なくとも1つの膜貫通ドメイン配列、

( i v ) ( 1 ) F L A G タグ ( N H 2 - D Y K D D D D K - C O O H ) ( 配列番号 1 )、

( 2 ) E E タグ ( N H 2 - E E E E Y M P M E - C O O H ) ( 配列番号 2 )、

( 3 ) ヘマグルチニン・タグ ( N H 2 - Y P Y D V P D Y A - C O O H ) ( 配列番号 3 )、

( 4 ) m y c タグ ( N H 2 - K H K L E Q L R N S G A - C O O H ) ( 配列番号 4 )、および

( 5 ) H S V タグ ( N H 2 - Q P E L A P E D P E D - C O O H ) ( 配列番号 5 )

からなる群から選択されるアフィニティ選択に有用な少なくとも2つのタグ配列、

- (v) (1) 膜タンパク質、
- (2) 内在性膜タンパク質
- (3) 膜貫通タンパク質、
- (4) モノトピック型膜タンパク質、
- (5) ポリトピック型膜タンパク質、
- (6) ポンプ・タンパク質、
- (7) チャネル・タンパク質、
- (8) 受容体キナーゼタンパク質、
- (9) Gタンパク質共役受容体タンパク質、
- (10) 膜結合酵素、および
- (11) 輸送体タンパク質

からなる群から選択される疎水性タンパク質(HP)配列を含む人工的に改変された疎水性タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列とを含む、疎水性タンパク質の発現に適した単離核酸分子。