

【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3部門第2区分

【発行日】平成28年5月12日(2016.5.12)

【公表番号】特表2015-512935(P2015-512935A)

【公表日】平成27年4月30日(2015.4.30)

【年通号数】公開・登録公報2015-029

【出願番号】特願2015-505696(P2015-505696)

【国際特許分類】

C 07 K 14/00 (2006.01)

C 12 Q 1/02 (2006.01)

C 07 K 14/34 (2006.01)

C 07 K 14/245 (2006.01)

【F I】

C 07 K 14/00

C 12 Q 1/02 Z N A

C 07 K 14/34

C 07 K 14/245

【誤訳訂正書】

【提出日】平成28年3月15日(2016.3.15)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

フェルスター共鳴エネルギー転移(FRET)においてドナーおよびアクセプター部分として働くことが組み合わせにおいて可能な、任意の好適なドナー蛍光タンパク質とアクセプター蛍光タンパク質部分との間に、細菌のL1dR転写制御因子を含んでいる、FRETベースの乳酸塩ナノセンサーであって、単一細胞もしくは細胞集団において、接着細胞においてもしくは懸濁液において、細胞培養、組織培養、混合細胞培養、組織外植片において、またはインビボの動物組織において、発現され得る、FRETベースの乳酸塩ナノセンサー。

【請求項2】

前記蛍光タンパク質部分は、mTFP(単量体のティール(teal)色蛍光タンパク質)、CFP(シアン色蛍光タンパク質)、BFP(青色蛍光タンパク質)、GFP(緑色蛍光タンパク質)、YFP(黄色蛍光タンパク質)、それらの強化されたバリエント、例えば強化YFP(EYFP)、YFP-シリコン、Venus、または細菌のフィトクロム由来の赤外線蛍光タンパク質からなる群の中から選択される、請求項1に記載のFRETベースの乳酸塩ナノセンサー。

【請求項3】

前記蛍光タンパク質部分はmTFPおよびVenusである、請求項1に記載のFRETベースの乳酸塩ナノセンサー。

【請求項4】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、または配列番号16と、少なくとも、95%または99%のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1または3に記載のFRETベースの乳酸

塩ナノセンサー。

【請求項 5】

配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、または配列番号 32 と少なくとも、95%または99%の配列同一性を有する核酸配列によってコードされている、請求項 1 または 3 に記載の FRET ベースの乳酸塩ナノセンサー。

【請求項 6】

a . 単一細胞もしくは細胞集団、接着細胞または懸濁液中、細胞培養、組織培養、混合細胞培養または組織外植片中などの、所望の宿主内で、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の FRET ベースの乳酸塩ナノセンサーを発現させる工程と、

b . 時間に内に乳酸塩濃度を記録しながら、細胞内乳酸塩濃度の規定値、細胞外乳酸塩濃度の規定値、細胞レベル下乳酸塩濃度の規定値で、前記宿主を較正する工程と、

c . 前記細胞における乳酸塩の定常状態を妨害する工程と、

d . 異なった時点において前記乳酸塩濃度を計算している、前記ナノセンサーからの出力を記録し、輸送速度を決定する工程と、を包含する、乳酸塩輸送の測定方法。

【請求項 7】

工程 b)において、細胞における前記 FRET ベースの乳酸塩ナノセンサーは、インピトロで得られた前記センサーの反応速度定数、およびピルビン酸塩の存在下で決定されたゼロ乳酸塩レベルを用いることによって較正される、請求項 6 に記載の乳酸塩の測定方法。

【請求項 8】

工程 c)において、前記乳酸塩の定常状態の妨害は、様々な濃度の細胞外乳酸塩に細胞を曝露することによるものである、請求項 7 に記載の乳酸塩の測定方法。

【請求項 9】

a . 単一細胞もしくは細胞集団、接着細胞または懸濁液中、細胞培養、組織培養、混合細胞培養または組織外植片中などの、所望の宿主内で、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の FRET ベースの乳酸塩ナノセンサーを発現させる工程と、

b . 時間に内に乳酸塩濃度を記録しながら、細胞内乳酸塩濃度の規定値、細胞外乳酸塩濃度の規定値、細胞レベル下乳酸塩濃度の規定値で、宿主を較正する工程と、

c . 前記細胞における乳酸塩の定常状態を妨害する工程と、

d . 異なった時点において前記乳酸塩濃度を計算している、前記ナノセンサーからの出力を記録し、乳酸塩生産速度または乳酸塩消費速度を決定する工程と、を包含する、乳酸塩生産速度または乳酸塩消費速度の測定方法。

【請求項 10】

工程 b)において、細胞における前記 FRET ベースの乳酸塩ナノセンサーは、インピトロで得られた前記センサーの反応速度定数およびピルビン酸塩の存在下で決定されたゼロ乳酸塩レベルを用いることによって、較正される、請求項 9 に記載の乳酸塩生産速度または乳酸塩消費速度の測定方法。

【請求項 11】

工程 c)において、乳酸塩の前記定常状態の妨害は、前記乳酸塩生産速度と同等の乳酸塩蓄積速度、または前記乳酸塩消費速度と同等の乳酸塩枯渇速度を測定する、MCT 阻害剤を添加することによるものである、請求項 9 に記載の乳酸塩生産速度または乳酸塩消費速度の測定方法。

【請求項 12】

a . 単一細胞もしくは細胞集団、接着細胞または懸濁液中、細胞培養、組織培養、混合細胞培養または組織外植片中などの、所望の宿主内で、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の FRET ベースの乳酸塩ナノセンサーを発現させる工程と、

b . 時間に内に乳酸塩濃度を記録しながら、細胞内乳酸塩濃度の規定値、細胞外乳酸塩濃度の規定値、細胞レベル下乳酸塩濃度の規定値で、前記宿主を較正する工程と、

c . 前記細胞における前記乳酸塩の定常状態を妨害する工程と、
d . 異なった時点において前記乳酸塩濃度を計算している、前記ナノセンサーからの出力を記録し、ミトコンドリアのピルビン酸塩消費速度を決定する工程と、を包含する、ミトコンドリアのピルビン酸塩消費速度の測定方法。

【請求項 1 3】

工程 b)において、細胞における前記 F R E T ベースの乳酸塩ナノセンサーがインピトロで得られた前記センサーの反応速度定数およびピルビン酸塩の存在下で決定されたゼロ乳酸塩レベルを用いることによって較正される、請求項 1 2 に記載のミトコンドリアのピルビン酸塩消費速度の測定方法。

【請求項 1 4】

工程 c)において、乳酸塩の前記定常状態の妨害は、ミトコンドリアのピルビン酸塩輸送体の遮断剤を添加することによるものであり、ミトコンドリアによるピルビン酸塩消費速度と同等の乳酸塩蓄積の初速度を測定する、請求項 1 2 に記載のミトコンドリアのピルビン酸塩消費速度の測定方法。

【請求項 1 5】

a . 単一細胞もしくは細胞集団、接着細胞または懸濁液中、細胞培養、組織培養、混合細胞培養または組織外植片中などの、所望の宿主内で、請求項 1 ~ 5 の何れか一項に記載の F R E T ベースの乳酸塩ナノセンサーを発現させる工程と、

b . 時間に乳酸塩濃度を記録しながら、細胞内乳酸塩濃度の規定値、細胞外乳酸塩濃度の規定値、細胞レベル下乳酸塩濃度乳酸塩濃度の規定値で、前記宿主を較正する工程と、

c . 前記細胞における乳酸塩の定常状態を妨害する工程と、

d . 異なった時点における前記乳酸塩濃度を計算している、前記ナノセンサーからの出力を記録し、輸送速度を決定する工程と、

e . M C T 阻害剤の存在下の前記乳酸塩蓄積速度と、ミトコンドリアのピルビン酸塩輸送体の阻害剤の存在下の前記乳酸塩蓄積速度との間の比率を計算することによって、ワールブルグ現象を定量する工程と、を包含する、ワールブルグ現象の定量方法。

【請求項 1 6】

工程 b)において、細胞における前記 F R E T ベースの乳酸塩ナノセンサーは、インピトロで得られた前記センサーの前記反応速度定数およびピルビン酸塩の存在下で決定されたゼロ乳酸塩レベルを用いることによって較正されている、請求項 1 5 に記載のワールブルグ現象の消費の定量方法。

【請求項 1 7】

工程 c)において、乳酸塩の前記定常状態の妨害は、前記乳酸塩生産速度または前記乳酸塩消費速度を測定する、M C T 阻害剤を添加すること、およびミトコンドリアのピルビン酸塩輸送体の遮断薬を添加することによるものであって、当該方法は、ミトコンドリアによるピルビン酸塩消費速度と同等である乳酸塩蓄積の初速度を測定する工程をさらに包含する、請求項 1 5 に記載のワールブルグ現象の定量方法。