

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502130

(P2004-502130A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 Z C C D	2 GO 4 5
C 1 2 Q 1/68	GO 1 N 33/53 M	2 GO 5 4
GO 1 N 21/78	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15	GO 1 N 21/78 C	
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/15 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-547549 (P2001-547549)	(71) 出願人	397006612
(86) (22) 出願日	平成12年12月7日 (2000.12.7)		ファルマシア・アンド・アップジョン・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月10日 (2002.6.10)		PHARMACIA & UPJOHN
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/042677		COMPANY
(87) 国際公開番号	W02001/046693		アメリカ合衆国49001ミシガン州カラ
(87) 国際公開日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		マズー、ヘンリエッタ・ストリート301
(31) 優先権主張番号	09/458, 171		番
(32) 優先日	平成11年12月9日 (1999.12.9)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100092624
			弁理士 鶴田 準一
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 等温変性下で標的種に結合する化合物の同定方法

## (57) 【要約】

標的種に結合する化合物を固定するための高処理量スクリーニング方法に関する。前記方法は、少なくとも1つの試験化合物及び少なくとも1つの標的種を含んで成る、多数の試験混合物を、測定できる程度への前記標的種の少なくとも一部の変性を引き起こすのに効果的である等温変性条件下でインキュベートすることを包含する。前記方法はさらに、前記少なくとも1つの試験化合物の存在下で個々の標的種の変性シグナルを検出し；そして少なくとも1つの試験化合物の存在下での個々の標的種の前記変性シグナルと、前記少なくとも1つの試験化合物の不在下での同じ標的種の変性シグナルとを、前記同じ等温変性条件下で比較することを含んで成ることを包含する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的種に結合する試験化合物を同定するための高処理量スクリーニング方法であって、少なくとも 1 つの試験化合物及び少なくとも 1 つの標的種を含んで成る、多数の試験混合物を、測定できる程度への前記標的種の少なくとも一部の変性を引き起こすのに効果的である等温変性条件下でインキュベートし；

前記少なくとも 1 つの試験化合物の存在下で個々の標的種の変性シグナルを検出し；そして

少なくとも 1 つの試験化合物の存在下での個々の標的種の前記変性シグナルと、前記少なくとも 1 つの試験化合物の不在下での同じ標的種の変性シグナルとを、前記同じ等温変性条件下で比較する；

ことを含んで成る方法。

## 【請求項 2】

前記標的種が、ポリペプチド又はポリヌクレオチドである請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記標的種がタンパク質である請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記化合物が、前記標的種に対して特異的に結合する請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

前記化合物が、共有結合、疎水性結合、イオン結合又は水素結合相互作用を通して、前記標的種に結合する請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 6】

前記変性シグナルの検出が、蛍光シグナル、UV 吸光度の変化、モル楕円率、赤外線スペクトルのスペクトルシフト、NMR スペクトルのスペクトルシフト、又は支持体材料上での移動度の変化、を検出することを含んで成る請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記変性シグナルの検出が、蛍光シグナルを検出することを含んで成る請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

前記等温変性条件が、DSC により測定される場合、標的種の  $T_m$  値に等しいか、又は  $T_m$  値よりも約 10 高いか又は低い温度を含んで成る請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 9】

前記等温変性条件が、DSC により測定される場合、標的種の  $T_m$  値に等しいか、又は  $T_m$  値よりも約 10 まで低い温度を含んで成る請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

少なくとも 1 つの試験化合物、少なくとも 1 つの標的種、及び少なくとも 1 つのレポーター分子を、等温変性条件下でインキュベートすることをさらに含んで成る請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 11】

前記試験化合物及びレポーター分子の濃度が、比較できる高さのものである請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 12】

前記試験化合物の濃度が、標的種の濃度よりも少なくとも 10 倍高い請求項 11 記載の方法。

## 【請求項 13】

前記レポーター分子が、蛍光レポーター分子である請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 14】

個々の試験混合物が、1 つの標的種を包含する請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 15】

個々の試験混合物が、少なくとも 2 種の試験化合物を包含する請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 16】

個々の試験混合物が、2～10種の試験化合物を包含する請求項15記載の方法。

## 【請求項 17】

タンパク質に結合する試験化合物を同定するための高処理量スクリーニング方法であって、

少なくとも1つの試験化合物、少なくとも1つのレポーター分子、及び少なくとも1つのタンパク質を含んで成る、多数の試験混合物を、測定できる程度への前記標的種の少なくとも一部の変性を引き起こすのに効果的である等温変性条件下でインキュベートし；  
前記少なくとも1つの試験化合物の存在下で個々のタンパク質の変性シグナルを検出し；  
そして

少なくとも1つの試験化合物の存在下での個々のタンパク質の前記変性シグナルと、前記少なくとも1つの試験化合物の不在下での同じタンパク質の変性シグナルとを、前記同じ等温変性条件下で比較する；

ことを含んで成る方法。

## 【請求項 18】

前記レポーター分子が、蛍光レポーター分子である請求項17記載の方法。

## 【請求項 19】

個々の試験混合物が、1つの標的種を包含する請求項1記載の方法。

## 【請求項 20】

個々の試験混合物が、少なくとも2種の試験化合物を包含する請求項1記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の背景：

薬剤発見過程で直面する主用挑戦の1つは、標的種、特にタンパク質標的物に結合するであろう小さな有機リガンドの同定である。多数の新規タンパク質標的物がゲノム及び生物情報科学(Bioinformatics)の努力により発見されている。それらのタンパク質の多くは、既知の機能又は既知の特定のリガンドを有さない。従って、それらの標的物のためのリガンドの同定は、高処理量スクリーニング(HTS)、例えば特にアッセイ開発の観点から超高処理量スクリーニング(UHTS)方法による大きな化学ライブラリーのスクリーニングにおける挑戦を提供する。従って、タンパク質、特に未知の官能性を有するそれらのタンパク質を結合するリガンドを同定するために使用され得る、直接的な、一般的に適用できる方法、特にHTSアッセイ方法についての必要性がある。

## 【0002】

基質又は特定のリガンドの結合が一般的に、固有の安定性及び従って、タンパク質の変性プロフィールを変更することは知られている。従って、タンパク質変性を測定する方法は、リガンド-タンパク質相互作用を検出し、そして定量化するために使用され得る。

## 【0003】

タンパク質の変性は、それらの三次/四次構造及び究極的には、生物学的活性の前進性損失(progressive loss)により達成される。変性は、温度、pH及び/又はイオン強度の変化、カオトロピック剤の使用、等を包含する多くの物理的及び化学的方法により達成され得る。それは、タンパク質におけるコンホメーション変化をモニターするために十分に感受性の方法により追跡され得る。それは単純且つ広く適用できる実験方法であるので、熱変性が、不純物の選択的変性によるタンパク質の精製を包含する種々の目的のために、及びタンパク質構造、折りたたみ及び安定性を研究するために使用されて来た。

## 【0004】

示差走査熱量計(DSC)により得られる熱変性曲線(TDC)、変性されたタンパク質の画分が徐々に上昇する温度の関数として測定される)は、タンパク質安定性を決定し、そしてその三次構造について推定するために特に有用であることが示されている。TDCの有用性は、所定のタンパク質のための基質又は特定のリガンドである化合物の結合が

10

20

30

40

50

そのタンパク質の固有安定性を変え、そして従って、T D C 及び T m ( 中点温度 ) 値の移行を引き起こすので、さらに増強される。

【 0 0 0 5 】

熱走査方法の結果の解釈は、変性方法が、温度走査速度の時間尺度に基づいて非常に急速である、1段階、可逆性且つ連続性方法である仮定に依存する。しかしながら、通常の実験条件下でのほとんどのタンパク質の変性は不可逆性である。典型的には、変性が容易に可逆性であることは、単なる小さなタンパク質及び非常に穏やかな変性剤による。従って、D S C は、再生でき且つ容易に解釈できる結合測定値を提供することはできない。

【 0 0 0 6 】

一般的に、D S C 曲線は、いくつかはリガンドの結合に対して敏感であり、そしていくつかはまったく敏感ではない多くの異なった構造ドメインの安定性に影響を及ぼす。さらに、変性は、タンパク質構造内の多くの位置で開始され得る。それらの工程の個々は、狭い温度範囲内でのみそれを有力な工程にするそれ自体の活性化エネルギーを有する。結果として、走査速度に依存して、所定のドメインの安定性は、D S C 曲線において明白であっても又はなくとも良い。さらに、示差走査熱量計は、複数のタンパク質変性段階を見ることができ、ここで1つの段階は単一の転移のみを予測するであろう。

10

【 0 0 0 7 】

走査熱変性方法のより高い非解決性に寄与するさらにもう1つの主要な要因は、興味あるリガンド、及びタンパク質の構造統合性について報告する蛍光色素のリガンドの両者の結合平衡が強く温度依存性である要因である。従って、方法の感受性、及び研究下のリガンドの安定化効果の両者が、実験の間、強く移動する。

20

従って、標的種に結合する化合物を同定する方法のための必要性が存在する。好ましくは、そのような方法は、U H T S 又は H T S に対して順序であり、再生でき、そして加熱速度に無関係である。

【 0 0 0 8 】

発明の要約：

本発明は、標的種（例えば、ポリペプチド、例えばタンパク質、及びポリヌクレオチド、例えば D N A 及び R N A ）に結合する化合物を同定するための方法を提供する。それらの方法は、好ましくは、蛍光検出方法と組合して、等温変性の使用を包含する。有意には、本発明の方法は、H T S 及び U H T S のために適切な自動方法を包含する。理想的には、本発明の方法は、24時間で、10,000～60,000又はそれ以上の化合物を評価計量できることが予測される。

30

【 0 0 0 9 】

タンパク質の等温変性は、結合リガンドの同定のための魅力ある方法を提供する。有意には、好ましい方法においては、本発明は、結合されたりガンドによる標的物（例えば、タンパク質）安定性の変更を決定するために等温方法による変性と蛍光技法とを結合する。特に好ましい態様においては、等温変性に対する、リガンドによる標的種（例えば、タンパク質標的物）の変性及び安定化又は不安定化が、蛍光強度の変化により定量化される。

【 0 0 1 0 】

1つの好ましい態様においては、本発明は、標的種に結合する試験化合物を同定するための高処理量スクリーニング方法を提供する。前記方法は、等温条件下での多くの試験混合物のインキュベーションを包含し、個々の試験混合物は少なくとも1つの試験化合物（好ましくは、少なくとも2種の試験化合物、及びより好ましくは、2～10種の試験化合物）、及び少なくとも1つの標的種（好ましくは、わずか1種の標的種がいずれか1種の試験混合物に存在する）を包含し、ここで前記等温変性条件は、測定できる程度への標的種の少なくとも一部の変性（例えば、折りたたまれていない）を引き起こすために効果的である。

40

【 0 0 1 1 】

前記方法はさらに、前記少なくとも1つの試験化合物の存在下で個々の標的種の変性シグナルを検出し；そして少なくとも1つの試験化合物の存在下での個々の標的種の前記変性

50

シグナルと、前記少なくとも1つの試験化合物の不在下での同じ標的種の変性シグナルとを、前記同じ等温変性条件下で比較することを包含する。典型的には及び好ましくは、本発明の方法は、1日当たり少なくとも約100種の試験混合物を評価することができる。好ましくは、そのような評価は、実質的に同時に生じる。

#### 【0012】

本明細書に記載される方法においては、標的種は、ポリペプチド（例えば、タンパク質）又はポリヌクレオチド（例えば、DNA又はRNA）であり得る。好ましくは、標的種はタンパク質である。前記化合物は、特異的に（例えば、特異的部位で又は特異的態様において）又は非特異的に標的種に結合することができる。結合は、種々の機構、例えば共有結合、イオン結合、水素結合、疎水性結合（例えば、ファン・デル・ワールス力）、又はそれらの組み合わせを包含することができる。

10

#### 【0013】

##### 定義：

本発明においては、次の定義が適用される：

等温変性条件は、固定された温度で標的分子を変性するのに効果的な条件を意味する。それはまた、一般的には、所定の標的物のための種々の化合物の評価のために一定に指示される、pH、イオン強度、カチオン濃度、等に関する定義された条件も包含する。

#### 【0014】

変性シグナルは、変性に基づいて標的種により生成されるシグナルを意味する。

T<sub>m</sub>は、示差走査熱量計により決定される場合、標的物の溶融転移の中間値を意味する。レポーター分子は、別々に添加される分子、例えば標的物に結合される蛍光色素又は共有結合されたレポーター基を意味する。

20

#### 【0015】

##### 好ましい態様の特定の記載：

本発明は、等温変性の使用に向けられる。前記方法は、広範囲の種類の分子、例えばタンパク質、例えば未知の機能を有するそれらのタンパク質に対するリガンドについてスクリーニングするために使用され得る。有意には、本発明の方法は、傾斜温度を上下する必要性を排除し、そしてHTS又はUHTS自動環境下でより早いアッセイの開発及び高い処理量を可能にすべきである。この技法は、RNA、DNA、-酸性糖タンパク質及び血清アルブミンに結合する化合物の調査に容易に拡張できるべきである。

30

#### 【0016】

等温変性は、変性（例えば、標的種の非折りたたみ）をモニターするための及び結合リガンドの同定のための魅力的な他の方法を提供する。それはHTS及びUHTSに対して従順である。さらに、変性工程は、容易に調節でき、再生でき、そして加熱速度に無関係である。

#### 【0017】

等温変性に使用される温度の選択は、一連の温度（例えば、約45～約75の範囲内）での標的種の変性の速度を測定することによって決定され得る。それらの測定は、例えば標的分子の非折りたたみに関連するコンホメーション変化に結合し、そしてそれを報告する蛍光レポーター分子を用いて行われ得る。他方では、変性シグナルは、標的種に関してのUV吸光度、CD楕円率を用いて、又は微少熱量研究によりモニターされ得る。好ましくは、予備DSC走査は、当業者に知られているように、長期間にわたって標的物の安定性を増強する適切な緩衝液における標的種のT<sub>m</sub>（中間値温度）を決定するために実施される。

40

#### 【0018】

結合実験の間、すべての成分は、標的タンパク質の容易にモニターされる変性を生成するために選択される1つの所定の温度（好ましくは、±約0.2）で維持される。等温変性の温度が低く過ぎる場合、その運動学は遅過ぎる。一般的に、検出できる量の変性（例えば、非折りたたみ）が約60分以内又はそれ以下で生じることが所望される。

#### 【0019】

50

温度が高過ぎる場合、その運動学は早過ぎ、その結果、試験化合物は、例えば高過ぎる程度の非折りたたみをもたらす、変性された標的種を安定化することはできない。高過ぎる非折りたたみは、標的物の沈殿をもたらす凝集を引き起こすことができる。さらに、高過ぎる温度で、試験化合物はまったく結合することができない。好ましくは、等温変性のための所望する温度は、DSCにより測定される場合、標的種のT<sub>m</sub>値±約10に等しい。より好ましくは、この温度は、標的種のT<sub>m</sub>値に等しいか、又はそれよりも約10まで低い。

#### 【0020】

標的種は、好ましくは、その変性をモニターすることができる適切なレポーター分子と共に、標的種の存在及び不在でインキュベートされる。好ましい態様においては、化合物及びレポーター分子の濃度は、比較できる高さのものであるが（好ましくは、約1 μMより高くない）、しかしレポーター分子は、標的分子よりも高くある必要があり、そして試験化合物の濃度は少なくとも10倍以上高い。“適合”のための%阻害カットオフは、アッセイ実施の前に設定され得るか、あるいはすべてのスクリーニングの前、又はその後、統計学的に決定され得る。

10

#### 【0021】

蛍光技法は、HTS及びUHTSについての選択の検出方法に急速に成るに従って、本発明の一定の好ましい態様においては、蛍光分子が選択のマーカーとして使用される。等温方法によつての変性によるカップリング蛍光技法は、等温変性において、外来的に添加されたレポーター分子の量的収量がタンパク質折りたたみの変化にのみ依存し、そして温度効果に依存しないので、魅力あるものである。さらに、量的な蛍光収量のいずれかの変化が、異なった変性された形の標的種へのレポーター分子の結合を測定する。従って、結合されたりガンドによる標的物の安定性の変更は容易に検出できるべきである。

20

#### 【0022】

本発明は、既知の競争インヒビター/リガンドが標的種に結合するかどうかを決定するために、等温変性が使用され得ることを示す。この結果は、他の方法により得られる結果に比較できる。3種の異なった検出方法からの変性運動学の一致は、同じ非折りたたみ工程が本発明の方法を用いて測定されることを確認する。

#### 【0023】

レポーター分子の蛍光は好ましくは、標的物の変性に基づいて数倍（好ましくは、少なくとも約2倍）、高めるべきである。タンパク質に関しては、これは典型的には、タンパク質の疎水性領域の暴露により達成される。レポーター分子はまた、好ましくは、天然の標的物に対して低い親和性を有すべきであり；すなわち、天然の標的物/レポーター分子複合体の蛍光は広い濃度範囲にわたって直線的であるか、又は好ましくは、天然の標的物に対してまったく結合せず、その結果、それはリガンド自体にならない。最終的に、化合物ライブラリーは一般的に、約300 nm～約400 nmの間で吸収し、そして/又は蛍光を発する多数の化合物を含むので、レポーター分子は好ましくは、可視領域において励起及び発光を有し、前記領域においては、数種の化合物は、例えば約488 nmでの励起及び約515 nmでの発光を妨害する。

30

#### 【0024】

レポーター分子（例えば、蛍光色素）は、Molecular Probe（Eugene, OR）から市販されており、そして標的分子の疎水性領域に結合される場合、明るく蛍光を発する。それらは、SYPRO Orange, SYPRO Red, Nano Orange, Nile Red, 1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸（1, 8-ANA）及びダボキシルブチルスルホンアミド（DBS）、並びに他のダボキシル類似体を包含する。Nano Orange蛍光は、非常に低いバックグラウンド蛍光と共に、約10 ng/ml～約10 μg/mlの線状蛍光範囲を伴って、溶液におけるタンパク質の定量化のために超感受性色素を提供する。SYPRO Orange及びSYPRO Redは、銀染色と同じほど良好な感受性を伴って、ゲル染色のために使用される。

40

50

## 【0025】

タンパク質変性を伴う色素の蛍光の上昇のための基礎は、新しく暴露された疎水性部位へのそれらの結合である。1, 8-ANSは、タンパク質の非折りたたみをモニターするために長年、広範囲に使用されてきたが、しかしながら、その量的収量は、変性されたタンパク質に結合される場合、上記で論じられた色素の収量よりも低く、そして従って、アッセイにおいて多量のタンパク質及びレポーター分子の使用を必要とする。DBSは、蛍光発光が環境の変化に基づいて100nmほどシフトすることができる、比較的新しい溶媒和クロム(solvatochromic)色素である。しかしながら、その低い励起及び発光波長のために、それは、HTSに対して、Nano Orange, OYPRO Orange又はSYPRO Redよりも所望されない。

10

## 【0026】

発光強度が、所望する標的種に結合される場合、上昇するか又は低下するいずれかの蛍光レポーター分子が、等温変性のために使用され得る。標的種に対する蛍光レポーター分子の親和性は、上昇する濃度の変性された標的種及び天然の標的種の存在下で、所定の濃度のレポーター分子の蛍光を測定することによって決定され得る。次に、親和性を知るとは、標的種に対する蛍光レポーター分子の濃度の最適化を可能にする。

## 【0027】

試験化合物及び標的種の混合物に添加される非共有蛍光レポーター分子の他に又はその代わりに、1対の蛍光団(その1つは、他の蛍光を消光する)により共有ラベルされた標的種を使用することができる。標的種の非折りたたみは、2種の蛍光団間の分子間距離を変えるので、変性は蛍光の変化により達成される。特異的部位で同じ標的種をラベリングすることにより、異なった構造領域での変性がモニターされ得る。

20

## 【0028】

蛍光技法、特に蛍光増強をもたらす色素結合が選択される検出方法であるが、他の技法も本発明の方法に使用され得る。これは、例えば1)溶媒に対する芳香族アミノ酸の暴露に起因する280nmでのUV吸光度の変化;2)円二色性(CD)によるモル橢円率の変化;3)赤外線又はNMRスペクトルシフト;4)支持材料(例えば、固体支持体)上での移動度の変化の、サイズ排除クロマトグラフィー、細管電気泳動、等によるモニターリングを包含することができる。それらのアプローチのどれも、外来性又は固有の蛍光レポーター分子の使用を必ずしも必要としない。

30

## 【0029】

比較的高い変性温度を有する標的種に関しては、実験は、カオトロピック剤、例えば、尿素、塩酸グアニジン、有機溶媒、又はレポーター分子と標的種との結合を不当に妨害しないで、タンパク質変性を促進するいずれか他の試薬の存在下で行われ得る。

個々の標的分子の変性のための正確な実験条件は変化するであろう。当業者は、適切な決定を行い、そして/又は適切な緩衝システム(pH、イオン強度、イオン性補因子、等)を実験的に決定することができる。例えば、タンパク質分子の等電点(pI)は、pHがそれらの研究において有用であることの決定を助ける。

## 【0030】

実際、本発明の方法は、複数-レザバーサンプルホルダー、例えばマイクロタイタープレートにおいて行われ得る。典型的には、標的種を除くすべての成分が添加され、そして複数-レザバーサンプルホルダーが一定の期間、適切な温度で維持される。熱平衡に達した後、サンプルホルダーは好ましくは、標的種がすべてのレザバーに、好ましくは同時に添加されるステーションに移される。複数-レザバーサンプルホルダーは典型的には、いずれかの成分の添加の前、密封される。

40

## 【0031】

例えば、マイクロタイタープレートは、プレートを密封するが、しかしマイクロタイター先端がプレートに容易に侵入するが、しかし先端の除去の後、それは再密封するような態様で評点される、プラスチックシートから製造される被覆を包含することができる。標的種の導入の後、サンプルホルダーは、変性シグナルを読み取るための適切な検出器に、又

50

は検出が所望されるまで、維持するためにインキュベーターに、すぐに移行される。すべての段階は、主動的に又は所望される場合、ロボットにより行われ得る。

【0032】

高処理量スクリーニングのためには、Rapid Plateモジュール、ジャケット付き回転スライドトレイ、蛍光プレートリーダーと直面する10-プレートインキュベーターシステムを備えた、市販のZymark/Zymate PCSシステム(Zymark Corp., Zymark Center, Hopkinton, MA)が使用され得る。このシステムは、96-及び384-ウェルマイクロタイタープレート进行处理することができ、そして本発明の等温変性方法への使用のために適合され得る。例えば、10-プレートインキュベーターが、加熱要素、例えばサンプルインキュベーションのため

10

【0033】

Zymark/Zymateシステムは、温度調節を助け、そしてマイクロタイタープレートにおけるサンプル体積の損失を低めるために、温度調節された増湿装置及び内部ファン及び外部加熱ランプを包含するよう改良され得るジャケット付き回転スライドトレイを包含する。Zymark/Zymateシステムはまた、加熱ブロック及び加熱ランプを包含するよう改良され得るピペットステーション(Rapid Plate Module)を包含する。蛍光測定のためには、BMG POLARstarマイクロタイター(BMG Lab technologies, Inc., Durham, NC)がまた、循環する水浴により温度を調節するために(例えば、約-20 ~ 約90)、改良され得る。このシステムは、サンプルによる等温条件の経験を可能にするために改良され得る、ロボット及びコンピューターソフトウェアを用いて自動化される。

20

【0034】

本発明の方法を用いて、チミジル酸キナーゼ(TK)及びストロメリシンの等温変性の運動学は、それらの特異的リガンドの存在下で、及び不在下で、量的収量が、折りたたまれていないタンパク質の暴露された疎水性領域に結合される場合、高まる長い波長の蛍光によりモニターされた。時間依存性は、2種の連続した一次反応の反応スキームとすべて一致した。すなわち、両タンパク質についての変性の運動学は、二相モデルにより最良に記載された。従って、たぶん多くの段階のうちわずか2つの段階が速度制限である。

30

【0035】

非折りたたみ工程の運動学の有意な量の情報が蛍光測定により供給されることは明らかである。リガンド濃度に対する速度定数の依存性は、タンパク質/リガンド複合体の安定化効果に影響を及ぼす結合等温により分析できる。この方法は、その結果と、定常状態蛍光分光計、円二色計及びUV分光計により得られるそれらの結果とを比較することによって確認された。いくつかの分析検出方法の結果から計算されたその反応する速度定数は、比較できた。両段階の速度定数は、活性部位リガンドの結合に依存した。解離定数は、溶融転移温度でのリガンドの親和性を表す。

【0036】

生理学的温度での親和性定数(すなわち、“解離定数”)は、2種の異なった温度での測定からの推定により決定され得る。複数ウェル(例えば、96-ウェル)型で得られるそれらの結果と一緒にされるそれらの結果は、等温変性がいずれかの所定のタンパク質に対して高い特異性を有するリガンドについて、HTS、例えばUHTSのための選択の方法であることを示す。

40

本発明を一般的に記載して来たが、本発明は、例示的であって、本発明を限定するものではない次の例により、一層容易に理解されるであろう。

【0037】

実施例

I. 材料及び方法:

A. 試薬:

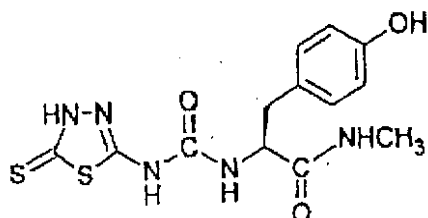
50



S Y P R O O r a n g e , S Y P R O R e d , N a n o O r a n g e , 1 - アニリノナフタレン - 8 - スルホン酸 ( 1 , 8 - A N S ) 及びダボキシルブチルスルホンアミド ( D B S ) を、M o l e c u l a r P r o b e s I n c . , E u g e n e , O r e g o n から購入した。チミジン酸 ( T M P ) 及びすべてのほかの試薬は、S i g m a - A l d r i c h C h e m i c a l C o m p a n y からであった。使用されるすべての市販の化学薬品は、試薬品種又はそれ以上のものであった。P N U - 1 4 3 9 8 8 として言及される化合物は、次の構造を有した：

【 0 0 3 8 】

【 化 1 】



10

【 0 0 3 9 】

20

B . タンパク質：

S . アウレウス ( S . a u r e u s ) チミジル酸キナーゼを、H u m a n G e n o m e S c i e n c e s によりクローン化し、そしてQ i a g e n ( Q I A G E N I n c . , V a l e n c i a , C A ) から購入された $Ni^{2+}$  - N T A カラムを用いて、親和性クロマトグラフィーにより精製した。T K に関しては、等温変性は0 . 5 m M の - メルカプトエタノールを含む、5 m M のトリス緩衝液 ( p H 7 . 8 0 ) において生じ、そして2 5 3 の温度で測定され、但し、ロボットアッセイの確認実験は、5 2 で行われた。S . アウレウスのウリジル酸キナーゼ ( U K ) を、H u m a n G e n o m e S c i e n c e s によりクローン化し、そして $Ni^{2+}$  - N T A カラム ( Q I A G E N I n c . , V a l e n c i a , C A ) を用いて、親和性クロマトグラフィーにより精製した。

30

【 0 0 4 0 】

U K は、5 0 m M のトリス、5 0 0 m M の N a C l 、1 0 % のグリセロール及び5 m M の - メルカプトエタノールの緩衝液 ( p H 7 . 8 ) を用いて、D S C により決定される場合、転移中点値、すなわち4 5 . 5 の $T_m$ を有する。等温変性のための確認実験を、5 0 m M のトリス、2 0 0 m M の K C l 、1 0 % のグリセロール、及び5 m M の - メルカプトエタノールから成る緩衝液 ( p H 7 . 5 ) において、4 1 の $T_m$ で行った。ストロメリシンをクローン化し、そしてF i n z e l など、P r o t . S c i . , 7 , 2 1 1 - 2 1 2 6 ( 1 9 9 8 ) により記載のようにして精製した。それは、D S C により測定される場合、7 5 の $T_m$ を有する。この温度を、次の等温変性実験のために選択した。ストロメリシンのための緩衝液システムは、1 0 m M のイミダゾール、2 . 5 m M の C a C l <sub>2</sub> 、5  $\mu$  M の Z n C l <sub>2</sub> ( p H 6 . 5 ) から成った。

40

【 0 0 4 1 】

C . リガンド：

すべてのリガンドのための原液を、特にことわらない限り、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) において調製した。水溶解性が十分に高い場合、第2原液を特定のタンパク質のための緩衝液システムにおいて製造し；他方では、希釈された原液をD M S O において調製した。少アリコート、典型的には、1 0  $\mu$  l 又はそれ以下のリガンド溶液を、緩衝液に添加し、そしてタンパク質の添加の前、セルにおける適切な温度で平衡化した。

【 0 0 4 2 】

対照実験は、タンパク質変性に対する添加されたD M S O の効果を評価した。いくつかの

50

場合、0.1%のCHAPS(重量/体積%; (3-[ (3-クロロアミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート)を反応混合物に添加し、DMSOの効果を妨げた。システムを確認するために、チミジル酸キナーゼ又はウリジル酸キナーゼのいずれかについての活性アッセイにおいて活性的であることがこれまでに示されているサブセットの化合物を、タンパク質標的物のためのリガンドであることの高められた確立を有する典型的な数の化合物として試験した。

#### 【0043】

D. 蛍光測定:

蛍光測定のために、比率モードでの光子計数ISS K2分光蛍光計を用いた(ISS Inc., Urbana, Illinois)。温度を、Polysciencesプログラム温度調節器(Polysciences, Nijes, IL)により、実験を通して0.2以内に維持した。発光を、次の発光フィルターを用いて、フィルターチャンネル上で観察した: Nano Orangeに関しては530nmのバンドパスフィルター、SYPRO Orangeに関しては590nmのカットオフ、SYPRO Red及びNile Redに関しては630nmのカットオフ、及び1,8-ANS及びダボキシルブチル-スルホンアミドに関しては470nmのカットオフ。

#### 【0044】

他方では、蛍光測定を、BMG POLARstarマイクロプレートリーダー(BMG Lab technologies, Inc., Durham, North Carolina)により獲得した。温度を循環する水浴により調節した。この装置は、485nmの中心波長、15nmのバンドパス励起フィルター及び580nmの中心波長、12nmのバンドパス発光フィルターを用いて、Nano Orangeを最良に検出した。

#### 【0045】

等温変性の間、外来性色素の蛍光の時間-依存性を次の通りにしてモニターした。試験色素を、所望する温度で熱的に予備平衡化された緩衝液2mlを含む攪拌されたキュベットに添加した。色素基線を、45秒の間、記録し、そして変性反応を、少アリコートのタンパク質原液の添加により開始した。この手段においては、タンパク質は、実質的に瞬間的に変性の温度に達した。別の実験においては、タンパク質を、色素の不在下で変性温度で維持し、そしてレポーター分子を、反応の最後で添加した。後者の実験においては、色素の添加に関連する蛍光の上昇は常に瞬間的であった。実験の条件下で、色素自体が生来のタンパク質の有意な画分を複合体化しないことを確かめるために、固定された量の色素を、上昇する量のタンパク質により滴定し、そして蛍光上昇が飽和に達しなかったことを示した。

#### 【0046】

ストロメリシンの3個のトリプトファン残基が、活性部位領域において隠され、そしてそれは、タンパク質の非折りたたみの敏感なレポーターである。従って、このタンパク質の等温変性をまた、固有のトリプトファン蛍光の変化により測定した。それらの実験に関しては、タンパク質を、等温変性の温度でキュベットにおいて平衡化された緩衝液に添加した。励起波長は293nmであり、そして発光を、320±10nmバンドパスフィルターを用いてモニターした。

#### 【0047】

E. 熱量測定:

ストロメリシン及びTKについてのDSCを、Microcal, Inc. (Northampton, MA)からのMC-2示差走査熱量計を用いて行った。ストロメリシンに関しては、熱量計の1.2mlのサンプル細胞を、10mMのイミダゾール、2.5mMのCaCl<sub>2</sub>及び5mMのZnCl<sub>2</sub>を含む緩衝液(pH6.50)中、150μMの酵素により満たした。TKに関しては、熱量計細胞を、0.50MのNaCl、10%のグリセロール及び5mMの2-メルカプトエタノールを含む50mMのトリス-HCl緩衝液(pH7.70)中、15μMの酵素により満たした。

#### 【0048】

対照細胞を、同じ緩衝液により満たした。その溶液を、1 / 分の速度で25 ~ 80  
まで走査する前、5分間ガス抜きした。サンプル細胞における透析物緩衝液により集めら  
れた基線走査を、タンパク質走査から控除し、そしてその得られるデータを、単位タンパ  
ク質濃度に転換した。装置のY - 軸を、標準の電気ヒートパルスを用いて検量し、そして  
温度走査を、それぞれ28.2 及び75.9 で溶融するn - オクタデカン及びn - ヘ  
キサトリアコンタンを用いて検量した。

【0049】

F. 円二色性：

円二色性(CD)スペクトルを、Jasco J - 715分光偏光計(Jasco Corp., Easton, MD)、及びHaake D8循環水浴(Haake GmbH, 10  
Karlsruhe, Germany)により0.1 以内に温度調節された、0.1  
cmの通過の長を有する円柱状石英セルを用いて測定した。タンパク質の濃度は、そのモ  
ル楕円率に基づいて選択され、そして通常、約1  $\mu$ M ~ 約20  $\mu$ Mの範囲であった。タン  
パク質の、又は10 ~ 100倍過剰のリガンドを有するタンパク質の溶液を、セル中に注  
入する前に調製した。個々の溶液をまず、0.25秒の応答、100 nm / 分走査速度、  
1.0 nmの分解能及びバンド幅及び5つの蓄積を伴って、178 nm ~ 260 nmで  
22 で走査した。

【0050】

次に、セルを、等温変性の温度まで急速に添加し、そして222 nmでの楕円率の時間依  
存性をモニターした。0.5 m秒間隔で1.0 nmのバンド幅を有する二色性をサンプリ  
ングし、そして16秒間、蓄積した。データを、16秒束の運転平均として1秒ごとに貯  
蔵した。時間走査の後、波長走査を同じ温度で行った。セル及び緩衝溶液(リガンドを有  
し、そして有さない)を、吸光度及び二色性に通常通りに調べた。セルを、上記のよう  
にして十分に清浄し、そして実験間で、蒸留水及びエタノールによりすすいだ。

20

【0051】

G. 吸光度の測定：

UV吸光度を、Perkin - Elmer Lambda 40 UV - Vis二重線分光計  
(Perkin - Elmer Corp. Norwalk, CT)を用いて測定した。  
緩衝液により満たされた、キャップされた1.0 cmの通過の長さの石英キュベットを、  
対照ビームに配置する。サンプルビームにおいては、1.5 mlのガス抜きされた緩衝液 30  
、又は緩衝液及びリガンド(添加されるタンパク質溶液の体積はそれよりも少ない)を含  
む、キャップされた1.0 cmの通過の長さの石英キュベットを、温度調節されたセルホ  
ルダーに配置し、そして等温変性の温度で平衡化した。

【0052】

温度は、Neslab Exacal EX200緩衝水浴(Neslab Instruments, Inc. Portsmouth, NH)を用いて、0.1 以内に維持  
された。1 ~ 5  $\mu$ lアリコートのタンパク質原液を、緩衝液、又は緩衝液及びリガンドを  
含むキュベットに添加し、1.5 mlの最終体積及びほぼ0.5  $\mu$ Mのタンパク質濃度を  
得た。キュベットを再びキャップし、そして280 nmでの吸光度を、2 nmのバンド幅  
及び0.5秒の応答を伴って、30分までの間、1秒ごとに測定した。個々のタンパク 40  
質に関しては、いくつかのリガンド濃度の効果を、約0.5  $\mu$ M ~ 約400  $\mu$ Mの範囲で  
試験した。キュベットを、硝酸及び10%メタノールにより、上記のようにして十分に清  
浄し、そして実験の間、蒸留水及びエタノールによりすすいだ。

【0053】

H. データ分析：

少数の場合においてのみ、タンパク質変性の時間依存性は、明らかな一次工程であった。  
それらのデータを、下記等式：

【0054】

【数1】

$$Y = Y_0 + \Delta Y \cdot (1 - e^{-k_{\text{exp}} \cdot t}) \quad \text{等式1}$$

【 0 0 5 5 】

[ 式中、Y は実験的に測定されたシグナルであり、Y<sub>0</sub> はバックグラウンドシグナルであり、Y は変性工程に関連するシグナルの全体的な変化であり、t は時間であり、そして k<sub>exp</sub> は実験的に測定された見掛け一次速度定数である ] を用いて、非線状最小二乗法プログラムにより分析した。一般的に、変性の運動学は、しばしば明白な誘発期間を伴なって、二相運動学を示した。それらの時間経過を、次の2種の連続的一次反応の反応スキーム：

【 0 0 5 6 】

【 数 2 】



20

【 0 0 5 7 】

[ 式中、k<sub>1</sub> 及び k<sub>2</sub> は一次速度定数であり、そして理論的には、それらのすべての種は観察されるシグナルに寄与する ] に従って分析した。それらの反応の間に観察されるシグナルに対応する等式は、下記式：

【 0 0 5 8 】

【 数 3 】

$$Y = Y_A \cdot e^{-k_1 t} + Y_B \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + Y_C \left[ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right] \quad \text{等式3}$$

30

【 0 0 5 9 】

[ 式中、Y<sub>A</sub> , Y<sub>B</sub> 及び Y<sub>C</sub> はそれぞれ、種 A , B 及び C のためのシグナルである ] である。しばしば、実験誤差内で、Y<sub>A</sub> = Y<sub>B</sub> が生じ、それにより、下記のように分析を単純化する：

【 0 0 6 0 】

【 数 4 】

40

$$Y = Y_A + (Y_C - Y_A) \left[ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right] \quad \text{等式4}$$

【 0 0 6 1 】

Y<sub>B</sub> = Y<sub>C</sub> の場合、実験曲線は、Y<sub>A</sub> > Y<sub>B</sub> 又は Y<sub>B</sub> > Y<sub>A</sub> ののいずれかに依存して、単純な一次上昇又は崩壊に変化する。

予測されるよりもしばしば、等式 3 又は 4 によるデータの予備分析は、k<sub>1</sub> 及び k<sub>2</sub> がお

50

互い非常に類似することを示した。等式 3 は、 $k_1 = k_2$  の場合、確かではないので、本発明者は、下記速度等式のシステムを統合し：

【数 5】

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A \quad \text{等式5}$$

10

【数 6】

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot A - k \cdot B \quad \text{等式6}$$

【数 7】

20

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot B \quad \text{等式7}$$

【0062】

下記等式を生成した：

【数 8】

30

$$A = A_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{等式8}$$

【数 9】

$$B = k \cdot A_0 \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{等式9}$$

【数 10】

40

$$C = A_0 \cdot [1 - (k \cdot t + 1) \cdot e^{-k \cdot t}] \quad \text{等式10}$$

【0063】

次に、シグナルの時間依存性を、次の等式により与える：

【数 11】

$$Y = Y_A \cdot e^{-k_1 t} + Y_B \cdot k_1 t \cdot e^{-k_1 t} + Y_C \cdot [1 - (k_1 t + 1)e^{-k_1 t}] \quad \text{等式11}$$

この等式は、 $k_1$ 、 $k_2$ の実験の結果を分析するために、非線状最小二乗法と共に使用された。

#### 【0064】

ロボットアッセイ：

化合物のライブラリーを、上記温度でウェル当たり単一の化合物を有する96-ウェルマイクロタイタープレート型において高処理量スクリーニング態様で試験した。TK及びUKに関して、最適色素、及びタンパク質に対する色素の最適比を評価した。個々のマイクロタイタープレートは、88の個々の化合物、及び緩衝液及び色素（化合物を有さない）のみを最初を含む8個の対照ウェルを含んだ。それらのアッセイプレートを、プラスチック製96-ウェルマイクロプレートシール（Tomtec, Inc., Hamden, Connecticut）により手動的に密閉した。それらのシールを、ピペット先端の容易な侵入のために印を付け、続いてピペット先端が取り出された後、再密閉した。

#### 【0065】

残る段階は、次の通りにロボットにより実施された。アッセイプレートを、初期インキュベーション時間、典型的には60～90分間、温度/湿度-調節されたインキュベーター中に挿入し、所望するアッセイ温度にアッセイプレートを平衡化した。次に、蛍光測定 $T_i$ を、BMGPOLARstarにより取り、アッセイの下限を確立した。化合物及び緩衝液及び色素を含むそれらのウェルについてのこの蛍光読み取りを、化合物自体の効果を確かめるために使用した。ウェル含有物がアッセイ温度に平衡化されていることを確かめられた1組のインキュベーターにおける追加のインキュベーション期間に続いて、アッセイプレートを、急速プレート液体分散ユニットに移動した。

#### 【0066】

タンパク質を、改良された加熱されたプレート位置に位置するアッセイプレートに、プラスチックレザバーから添加した。最終インキュベーションのために、アッセイプレートを、温度/湿度調節されたインキュベーターに、アッセイ温度で、定義された時間、典型的には30分間、戻した。第2の蛍光測定 $T_f$ を、BMGPOLARstarにより行った。対照ウェル（アッセイ緩衝液及び色素、並びにタンパク質）は、アッセイの上限を定義した。対照ウェルに比較して、化合物（及びアッセイ緩衝液、及び色素並びにタンパク質）を含むウェルについての蛍光測定値の比較は、化合物が興味あるタンパク質に結合し、そしてそのタンパク質を安定化する、定義された $T_i$ 及び $T_f$ で読み取る。

#### 【0067】

II. 結果：

所定のタンパク質が容易に測定できる速度で変性を受ける温度を、リガンド結合研究の前、決定した。前記速度は、示差走査熱量計により測定される場合、熱転移温度（ $T_m$ ）よりもわずかに低い温度又はその熱転移温度での測定方法のために最も適切であった。蛍光色素が所定のタンパク質のための最大シグナルを生成するかどうかを決定するために、 $T_m$ での予備等温変性実験を、 $1 \mu M$ の濃度での個々の色素及び $0.5 \mu M$ でのタンパク質により行った。試験されるすべての色素のスペクトル性質が表1に与えられる。それらの長い励起及び発光波長のために、SYPRO Orange及びSYPRO RedがHTS型への使用のために魅力的である。

#### 【0068】

#### 【表1】

10

20

30

40

表 1. 等温変性の測定に使用されるスペクトルパラメーター :

色素	$\lambda_{exc}$ , nm	$\lambda_{em}$ , nm
1, 8-ANS	390	470
ダボキシルブチルスルホンアミド	372	470
Nile Red	590	630
Nano Orange	490	525
SYPRO Orange	500	590
SYPRO Red	550	630

10

## 【 0 0 6 9 】

A. チミジル酸キナーゼ :

図 1 に示されるチミジル酸キナーゼ (TK) についての熱走査は、53 で位置する T<sub>m</sub> を示し、次にこの温度がすべての続く等温実験のために選択された。タンパク質の冷却及び再加熱に基づいて、観察できるピークは見出されず (結果は示されていない)、このことは、このタンパク質が不可逆的に変性したことを示した。

20

## 【 0 0 7 0 】

蛍光 : 図 2 は、個々の色素についての時間依存性蛍光変化が 53 で等温変性するチミジル酸キナーゼの存在下で測定される予備実験の結果を示す。すべての色素の蛍光は、変性の経過において二相態様で上昇し、そして DBS がバックグラウンド上で最大の正味上昇をもたらした。Nano Orange、SYPRO Orange 及び SYPRO Red (タンパク質定量化及びゲル染色色素として一般的に使用される) の蛍光がまた、有意に上昇し、ところが、タンパク質よりも 4 倍モル過剰での 1, 8-ANS の蛍光上昇性は比較的小さかった。

## 【 0 0 7 1 】

最終的に、生来のタンパク質の添加に基づいて実験に使用される Nano Orange 又は SYPRO Orange の量の蛍光における上昇は、広範囲のタンパク質濃度にわたって直線的であることがまた確かめられた (図 3)。それらの結果は、色素が実験の条件下でタンパク質を飽和しないことを示す。換言すれば、色素自体はリガンドと競争せず、そしてそれらはタンパク質をいずれの測定できる程度に安定化しない。

30

## 【 0 0 7 2 】

そのスペクトル性質のために (表 1 を参照のこと)、SYPRO Orange を、追加の変性実験への使用のために選択した。図 4 は、酵素のための特異的リガンドである上昇する量の TMP の存在下で、TK の等温変性の間に生じる SYPRO Orange 蛍光の代表的な時間経過を示す。タンパク質が最初に変性され、そして色素が工程の最後で添加される場合、蛍光上昇は瞬間的であった (データは示されていない)。従って、蛍光変化の時間依存性は、タンパク質非折りたたみを表し、そして変性されたタンパク質への色素のゆっくりした結合を表さない。

40

## 【 0 0 7 3 】

その時間依存性は二相性であり、少なくとも 2 種の速度決定非折りたたみ工程の存在を示す。その結果を、種々の運動学モデルと共に、非線状最小二乗法を用いて分析した。試験されるすべてのモデルのうち、同一の速度定数、等式 11 を有する 2 種の連続的一次反応のモデルが、データと最も一致した。最良に適合するパラメーター及び等式 11 により計算された理論的曲線と実験点との一致が図 4 に示される。

## 【 0 0 7 4 】

50

時間経過の初期の直線部分の傾斜はまた、第1の速度定数に比例し、そして従って、変性速度に対するTMP濃度の影響を分析するために使用され得る。図5は、リガンド濃度に対するそれらの2種のパラメーターの依存性を示す。その曲線を、非線形最小二乗法、及びリガンド結合部位の占有性に対する種々のモデル関連変性速度に対応する等式を用いて分析した。最良の一致は、タンパク質当たり2種のTMP分子の十分に協力的な結合が酵素の6倍の安定化をもたらすモデルにより見出された(図5)。

【0075】

この結果は、チミジル酸キナーゼが、サイズ排除クロマトグラフィーにより明らかなように、二量体タンパク質であるので、十分に驚くべきことではない(E. コリタンパク質は、A. Lavieなど, *In Nature Structural Biology*, 4: 601-604 (1997) により、“チミジル酸キナーゼの構造がAZT活性化における制限段階後の原因を示す” ことにおいて二量体として存在することが知られている)。傾斜から、 $K_d$  は  $9.1 \pm 1.6$  mMであることが計算され、そして速度定数から、 $K_d$  は  $7.6 \pm 0.8$  mMであることが計算された。

【0076】

53 で測定されたそれらの協同的 $K_d$ 値は、飽和ATP濃度を用いて活性アッセイにより25 で決定された非協同的運動パラメーター $K_m = 27 \mu M$ に直接的に比較できない。たぶん、その協同性は、TKの運動機構が規則的添加から成り、それにより、TMPが占有されたATP部位を有する酵素に単に結合することができ、そしてTMPがATP部位に弱く結合できる事実から生じるように思える。

【0077】

吸光度及び円二色性：色素の蛍光変化が実際、2種の形の変性されたタンパク質に比例し、そして実際、変性工程を測定することを確認するために、2種の他の技法、すなわちCD及びUV吸光度を、同じタンパク質の非折りたたみ運動学を研究するために使用した。

【0078】

生来のタンパク質及びその変性された形の円二色性走査は、CDスペクトルの有意な変化が非折りたたみを付随することを示す(図6)。例えば、222 nmで -ヘリックスシグナルの強度に45%の損失が存在した。従って、モル楕円率の変化の時間依存性を、222 nmで連続的にモニターした。図7に示されるように、222 nmでの楕円率は急速に上昇し、そして約10分後、最大に達した。25 mMのTMP、すなわち天然のリガンドの添加は、楕円率の上昇の速度及び大きさの両者を非常に低めた。データは、単純な一次反応と十分に一致し、それにより、楕円率の主要変化が2種の連続的非折りたたみ段階の最初の段階により生成されることを示す。

【0079】

最終的に、芳香族アミノ酸の溶媒暴露の上昇に起因する、280 nmでの濃色性の時間依存性変化を測定した。図8におけるデータは、TKの非折りたたみに関連する濃色性変化が急速且つ二相性であったことを示す。吸光度データは、2種の連続的一次反応のモデルにより最良に適合された。その結果は、等式3により記載されるように、2種の連続的一次反応のモデルと最も一致したが、しかし等しくない速度定数とはそうではなかった。

【0080】

3種の技法により得られる速度定数が、表2において比較されている。スペクトル干渉のために、濃色性の変化に対するTMPの存在の効果は試験されなかった。すべてのそれらの方法により測定される物性は、最初の速度制限段階の間、有意な変化を受けるように思える。速度定数と第1段階 $k_1$ との間に良好な一致が存在し、このことは、すべての3の方法が同じ工程を測定することを示す。他方では、SYPRO Orangeにより観察される第2段階は、濃色性のいずれかの変化も生成せず、そして濃色性により観察される第2の非常に遅い段階は、それに関連するSYPRO Orange蛍光のいずれの変化も有さない。

【0081】

【表2】

10

20

30

40

50



表2：種々の方法により測定される、53°Cでのチミジル酸キナーゼ変性についての速度定数：

方法	$K_1 \times 10^3, \text{sec}^{-1}$	$K_2 \times 10^3, \text{sec}^{-1}$
円二色性 <sup>@</sup>	12.0±0.04	NA
280nmでの吸光度 <sup>★</sup>	17.0±0.20	2.90±0.09
SYPRO Orange蛍光 <sup>#</sup>	17.0±0.09	17.0±0.09

@：一次反応；★：等式4を用いて計算された；#等式11を用いて計算された。

10

#### 【0082】

B．ストロメルシン：

ストロメルシンのCDスペクトル（Sarverなど．，BBA，1434，304-316（1999））及びトリプトファン蛍光（Eppsなど．，J．Proto．Chem．，17，699-712（1998））の両者は、活性部位へのリガンドの結合により影響される。DSCは、このタンパク質が、図9に示されるように、75 20  
で非常に高いT<sub>m</sub>を有することを示した。また、DSC実験は、リガンド-結合についてのT<sub>m</sub>において、15もの上昇を示した（Sarverなど．，BBA，1434，304-316（1997））。従って、ストロメルシンの構造は、リガンド結合が非折りたたみ工程を劇的に影響を及ぼすことにおいて、等温変性研究に有用であると思われる。トリプトファン蛍光でさえ、変性工程をモニターするための有用な段階であるべきである。

#### 【0083】

蛍光：ストメルシンの変性の時間依存性は、SYPRO Orangeを用いてモニターされる場合、及び図10Aに示されるように、75 で二相性であった。変性は急速であり、そしてPNU-143988、すなわち既知のチアジアゾール型競争インヒビターにより、用量依存性態様で阻害された。 30

リガンドの不在下での変性反応は、2種の不均等な速度定数（等式3）、続く線状下方ドリフトを有する2種の連続的・一次反応のモデルと最も一致した。前記線状ドリフトは、たぶん変性されたタンパク質の凝集及び／又は沈殿に由来する。それは、インヒビターの存在下で生じる変性においては不在であった。データの分析は、最良の運動モデルが、同一の速度定数（等式11）を有する2種の連続的・一次速度モデルを有する運動モデルであることを示した。それらの分析から計算された速度定数は、表3に与えられる。

#### 【0084】

【表3】

表3：種々の方法により測定された、75℃でのストロメルシン変性についての速度定数：

方法	$K_1 \times 10^3, \text{ sec}^{-1}$	$K_2 \times 10^3, \text{ sec}^{-1}$
SYPRO Orange 蛍光	$60.2 \pm 1.8$	$7.49 \pm 0.04$
トリプトファン蛍光	$67.7 \pm 1.2$	$6.77 \pm 0.12$
吸光	$50.2 \pm 1.8$	NA

10

#### 【0085】

ストロメルシンの固有のトリプトファン蛍光は特に、リガンド誘発されたコンホーメーション変化に対して、及びたぶん、活性部位領域の変性に対して敏感である。図10Bに示されるように、75℃での等温変性の時間経過にわたってトリプトファン蛍光強度の急速な二相性損失が存在した。トリプトファン蛍光の減衰の時間依存性は、同一の速度定数（等式11）を有する2種の連続的・一次反応のモデルと最も一致した。このモデルは、同じ条件下でSYPRO Orangeの蛍光上昇により測定されるそれらと卓越して一致した速度定数を生成した（表3）。

20

#### 【0086】

蛍光運動曲線に由来する2種のパラメーターは、変性の速度、すなわち変曲点での傾斜及び一次速度定数を測定する。両パラメーターの値は、蛍光測定の場合に関して図11に示されるように、インヒビターの存在下で、飽和性用量依存性態様で低下した。濃度依存性は、インヒビターの結合が変性の速度の強烈な低下をもたらすモデルと一致した。データは、単純なLangmuir結合等温モデルにより分析され、初期速度から $K_d = 0.28 \pm 0.02 \mu\text{M}$ を、及び速度定数から $K_d = 0.35 \pm 0.13 \mu\text{M}$ を生成した。75℃で測定されるそれらの値は、25℃で速度アッセイにより測定される $K_d = 0.40 \mu\text{M}$ の値に相当に比較できる。

#### 【0087】

吸光度：PNU-143988の存在及び不在下でのストロメルシンの等温変性は、濃色性変化の速度及び大きさの両者の用量依存性阻害を示した（データは示されていない）。濃色性は、3分で最大に達し、そして長期の処理でわずかに低下し、そしてPNU-143988は、十分な反応のために必要とされる時間を、用量依存性態様で拡張した。阻害されていない反応の実験データと一致する最も単純なモデルは、単純な一次反応であり、そして最良に適合する速度定数は、他の技法により測定される2段階変性工程の第1段階の速度と比較できた（表3）。

30

#### 【0088】

ロボットHTSアッセイの確認：確認実験の前、最適色素、及びタンパク質に対する色素の最適比を、上記アッセイ条件下でTK及びUK等温変性のための96-ウェルプレート型において決定した。TKの等温変性を、 $0.4 \mu\text{M}$ のタンパク質及び $1.1 \mu\text{M}$ の色素の最終アッセイ濃度でNano Orangeにより最良に検出した。同じ態様において、Nano Orangeを用いて、 $0.4 \mu\text{M}$ のタンパク質及び $0.8 \mu\text{M}$ の色素の最終アッセイ濃度によるUKの等温変性の検出を可能にするための十分な手段を得た。

40

#### 【0089】

HTSロボットアッセイとしての等温変性の有効性を示すために、TK及びUKの変性を、記載のようにしてロボット操作するアッセイにより、マイクロプレート型において、既知のリガンドの存在下で行った。使用されるリガンドは、TKの場合、TMPであり、そしてUKの場合、ウリジン酸（UMP）であった。タンパク質を、上昇する濃度のリガンドの不在下（対照）又は存在下でアッセイ変性条件にゆだねた。 $T_i$ 及び $T_f$  蛍光

50

測定を用いて、%阻害率を計算した。

【0090】

チミジル酸キナーゼに関しては、上昇する濃度のTMPは、キュベット実験に見られる結果にもとづいて予測されるように、タンパク質の変性を低めた。TMP濃度対対照の計算された%阻害率の曲線は、Langmuir結合等温モデルと適合し、誤差を考慮する場合、前に見られた値に類似する見掛け $K_d$ 値を生成した。ウリジル酸キナーゼに関してと同様に、変性に対するUMPの効果は、濃度依存性であり、UMPの濃度が上昇するにつれて、変性は低下した。データは、Langmuirモデルにより分析された。得られる計算は、25で行われる活性アッセイから得られる、1mMの見掛け $K_d$ 値に比較できる、 $7.56 \pm 0.95$  mMの見掛け $K_d$ 値を与えた。

10

【0091】

HTSシステムの確認を、それらの化合物は活性アッセイにおいて阻害活性を有するので、高められた可能性の含有タンパク質リガンドにより、サブセットの化合物の存在下でTK及びUKの等温変性により進めた。この確認試験は、 $10 \mu\text{M}$ の最終化合物濃度により、記載のようにして行われた。 $T_i$ 及び $T_f$ 測定値を用いて、%阻害率を計算した。真の活性を、活性カットオフ値としてアッセイプレート対照の平均からの3種の標準偏差を用いることによって決定した。結果は表4に示される。対照実験をまた行った。蛍光及び消光を包含する固有のスペクトル性質を有する化合物を、それらの実験において観察した。

【0092】

【表4】

20

表4：HTS確認試験の結果：

タンパク質標的物	試験される化合物の数	活性の数
TK	703	83
UK	703	97

30

【0093】

C.スタフィロコーカス・アウレウス FemA：

S.アウレウス FemA (Ehler et al., J. Bacteriol., 179: 7573-7576 (1997) 及び Tschierske et al., FEMS Microbiol. Lett., 153: 261-264 (1997)) は、細胞壁合成にたぶん包含されるタンパク質であり、そして従って、可能性ある殺菌剤としての魅力的な標的物を提供する。タンパク質は6-his標識と共に発現され、その結果、それは、上記チミジル酸キナーゼに関するQiagen Ni<sup>2+</sup>-NTAカラムにより精製され得る。等電点(pI値)から十分に除去されたpHを、タンパク質が溶解される緩衝液のために選択し；さらに、適切なイオン強度及びカチオンが、最大の構造が例えばCD 40 楕円率研究においてモニターされる場合に得られるよう使用される。

【0094】

このタンパク質は既知の生化学的機能を有さないもので、等温変性は、このタンパク質に結合する化合物を発現するための理想的手段を提供する。このタンパク質は、チミジル酸キナーゼ及びストロメルシンにより観察されるそれらの運動学に類似する多相運動学を示すと思われる。 $T_m$ 値は、示差走査熱研究により決定される。変性の詳細な運動経路はまず、上記のような蛍光、吸光度及び/又は他の物理的方法により決定されるべきである。最適な色素、及びタンパク質に対する色素の最適比は、96-ウェルマイクロタイタープレート型において急速に評価される。使用される蛍光団は、SYPRO Redである。

【0095】

50

化合物のライブラリー（100，000以上）を、 $T_m$ よりも5 低い又は最大でも5 低い温度で、ウェル当たり単一の化合物を有する96 - ウェルマイクロタイタープレート型において高処理量スクリーニングモデルにより試験する。個々のマイクロタイタープレートは、88の個々の化合物を含む。さらに、8個の対照ウェルが、最初、緩衝液及び色素のみを含む（化合物を含まない）プレートにおいて存在する。タンパク質の添加の前、化合物を含むマイクロタイタープレート及び対照ウェルが読み取られ（ $T_i$  読み取り）、これはアッセイの下限を確立する。化合物及び緩衝液及び色素を含むそれらのウェルについてのこの蛍光読み取りは、化合物自体の効果を確かめるために使用される。

#### 【0096】

アッセイ温度での一定時間、例えば30又は60分後、もう1つの蛍光測定を行う（ $T_f$  読み取り）。対照ウェル（アッセイ緩衝液及び色素及びタンパク質）は、アッセイの上限を定義する。 $T_i$  及び $T_f$  での対照ウェルの蛍光値に対する、化合物（及びアッセイ緩衝液及び色素及びタンパク質）を有するそれらのウェルについての蛍光値の比較は、この例においては、S . アウレウス F e m Aである興味あるタンパク質に結合し、そしてそのタンパク質を安定化する化合物を定義する。続く反復実験において安定化を示すそれらの化合物のみが、可能性あるリガンド結合剤として購入される。

10

#### 【0097】

F e m Aに真に結合する化合物の他に、1つの化合物が次のような理由のために、増強された蛍光を提供することができる：1）それが、色素を結合する疎水性化合物である；2）それが、使用される波長で固有の蛍光を有する；3）それがミセルを形成する；又は4）それが、変性剤、不安定化剤、等であり得る。同様に、化合物は結合活性を有するが、しかし前記化合物は試験される波長で光を吸収する（消光する）ので、予測される結果よりも低い活性を示す。

20

#### 【0098】

色素に直接的に影響を及ぼす化合物を排除するために、アッセイ温度での化合物及び色素及び緩衝液を、タンパク質の添加の前、読み取る。従って、固有の蛍光、消光、蛍光増強又は蛍光団金属イオン封鎖を有するいずれかの化合物が同定され得る。タンパク質変性を増強するそれらの化合物を評価するために、追加の研究を、スクリーンが行われた後に行う。標的分子に結合する色素に対する化合物の効果を、周囲温度で行う。変性剤であるいずれかの化合物は、タンパク質の熱変性が生じない場合でさえ、タンパク質への蛍光色素の増強された結合性を示す。このタイプの化合物は、それらが特定のタンパク質（標的物）に対してこの性質を示し、そしてこの態様で複数のタンパク質（標的物）に影響を及ぼさない場合、興味あるものである。

30

#### 【0099】

すべてのそれらの基準が満たされた後、推定上の真の結合剤であるそれらの化合物はさらに特徴づけられ得る。その第1の研究は、化合物が理想的な用量 - 応答を示すかどうかを確かめることである。さらに、タンパク質変性の運動学に対するそれらの化合物の効果が研究され、そして続いて、 $K_d$  値が決定され得る。所定の温度での $K_d$  値を決定するために、十分な時間経過運動学についてのリガンド用量応答曲線を製造する。この工程は、3種又はそれ以上の温度で行われるべきである。次に、A r r h e n i u s 挙動性を仮定して、化合物の $K_d$  を、いずれかの温度について得ることができる。

40

#### 【0100】

個々の化合物の完全なライブラリーのスクリーニングの他に、化合物混合物を試験することができる。マイクロタイタープレートウェル当たり8種の化合物の混合物を含むサブセットの完全なライブラリーを使用する。このアッセイは上記のようにして行われる。次に、適切な結果を示すそれらの混合物のための化合物が同定され、そして個々に試験される。この場合、陽性の結果が混合物において存在したが、しかし個々の化合物に関しては、それらの結果が付加的であるか又はたぶん相乗的であるので、存在しない。従って、個々の化合物に関するアッセイが活性的でない場合、混合物の入れ替えが、組み合わせが元のスクリーニング結果を付与するかどうかを決定するために試験され得る。

50

## 【0101】

D. S. アウレウスの未知の遺伝子生成物：

全化合物収集物のスクリーニングの他に、基本的な基準に基づいてのサブセットの“サブライブラリー”を試験することができる。サブライブラリーを使用する利点は、高処理量スクリーニングからの有用な化合物の発見を促進することである。この例においては、もう1つのタンパク質標的物、すなわちS. アウレウスの未知の遺伝子生成物が用いられる。このタンパク質は、この生物のための必須遺伝子生成物である。排除されるこの機能を有するS. アウレウスの遺伝子的に構築された株は、細菌増殖を妨げる。

## 【0102】

しかしながら、その生物学的/生化学的機能は未知であり、そしてデータベースの調査は他の微生物における類似する遺伝子を同定するが、それらはまた、既知の生物学的又は生化学的機能を有さない。この遺伝子のためのDNA配列は知られているので、構造体は、タンパク質のアミノ又はカルボキシル末端に6-his標識を配置することで構築され、そして記載される他の6-his標的化されたタンパク質について記載されるようにして精製され得る。例えば、CDによりモニターされるような所定の実験条件下での最大の構造体が、上記FemAタンパク質に類似して得られる。

## 【0103】

試験される1つの特定のサブライブラリー、すなわち不同性ライブラリーが、化合物がそれらの構造/化学的性質に基づいて分類される不同性調査により生成される。最も不同性の化合物が選択されると共に、同時に、それらは完全なライブラリーの発現を示す。等温変性研究においてこのタンパク質標的物を安定化する、同定される化合物を、独自にさらに試験する。さらに、それらのリガンド-結合剤に対する類似性を有するライブラリーにおける化合物を、コンピューター調査プログラムを用いることによって、完全なライブラリーから選択することができる。それらはまた試験される。この場合、化合物は、限定されたサブセットの完全な化合物収集物のみをスクリーニングすることによって、実質的に同定され得る。

## 【0104】

E. 核酸等温変性：

興味ある配列を含むオリゴデオキシリボヌクレオチドは、合成され得るか又は市販されており、そして適切な順序で複合DNAにアセンブリーされ得る。次に、アセンブリーされたDNAが、発現システム（例えば、AmbionからのMEGAScript）中に挿入され、興味あるRNAが生成され得る。他方では、興味あるRNAが十分に小さい場合、前記オリゴは、インビトロ転写がいずれのクローニング及び発現段階も伴わないで行われ得るよう、適切なプロモーターを含むよう構成され得る。RNAの単離は、当業者に知られているプロトコールにより得られる。

## 【0105】

タンパク質性標的物に関しては、T<sub>m</sub>はDSCにより実験的に決定され得る。規則RNA構成から不規則RNA構造への転移をモニターするために使用され得る固有の蛍光色素の例は、SYBR Green, SYBR Green II, Pico-Green, 及びTOPRC, YOYO, 等を包含する。このアプローチを示すために使用され得るRNA分子の例は次のものを包含する：1) HIV-1 tar 47-86 (Meiなど, Biochemistry, 37, 14204-14212 (1998)); 2) RNA aptamer J16f1 (Choなど, Biochemistry, 37, 4985-4992 (1998)); 及び3) 16s rRNAのA-部位 (Wongなど, Chemistry and Biology, 5, 397-406 (1998))。

## 【0106】

それらのそれぞれのRNA分子に結合することが知られているリガンドは、次のものを包含する：1) ネオマイシン、他のアミノグリコシド抗生物質及び他の化合物 (Meiなど, Biochemistry, 37, 14204-14212 (1998)); 2

10

20

30

40

50

トブラマイシン (Cho など, Biochemistry, 37, 4985-4992 (1998)); 及び 3) カナマイシン 及び 他 の アミノグリコシド (Wong など, Chemistry and Biology, 5, 397-406 (1998))。

#### 【0107】

タンパク質性標的物のための既知のリガンドは等温条件下でそれらの構造を安定化するので、それらの既知のリガンドは、類似する条件下でそれらの同起源の RNA 分子を安定化する。同様に、タンパク質標的物に関しては、化合物の大きな収集物は、等温変性条件下でそれらの核酸構造体に結合し、そしてそれを安定化するかどうかを決定するために、高処理量スクリーニングで試験され得る。それらの化合物は、単独で、又はいくつかの化合物の組み合わせとして試験され得る。それらの蛍光色素による等温変性のモニターリングの他に、当業者はまた、UV 濃色性又は細胞電気泳動を用いて、それらの変化をモニターすることができる。

10

#### 【0108】

本発明は、特に前述の記載及び例に記載されるようにして実施され得ることは明白であろう。本発明の多くの修飾及び変更は、上記技法により可能であり、そして従って、本発明の範囲内である。本明細書に引用されるすべての出版物、特許及び特許出願の完全な開示は、引用により本明細書に組み込まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、チミジル酸キナーゼ (TK) の DSC 走査を示す。チミジル酸キナーゼの熱溶解プロフィールは、前記方法に記載のようにして決定された。

20

【図2】図2は、種々の蛍光色素によりモニターされる場合の TK の等温変性を示す。等温変性実験は、0.5  $\mu$ M のタンパク質濃度を用いて、53 の温度で、前記方法に記載のようにして行われた。DSS の濃度は 1  $\mu$ M であり、1, 8-ANS は 2  $\mu$ M であり、そしてタンパク質色素は次の通りであった：Nano Orange は 1:650 倍希釈で存在し、そして SYPRO Orange 及び SYPRO Red の両者は 1:10,000 倍希釈で存在した。

【図3】図3は、TK による SYPRO Orange 及び Nano Orange の滴定を示す。固定された量の色素、すなわち 250 nM の DBS 及び 1:2600 希釈度の Nano Orange が、上昇する量のチミジル酸キナーゼにより T = 23 で滴定され、そして蛍光の上昇が記録された。使用される発光/励起波長は、表1に与えられる。

30

【図4】図4は、SYPRO Orange によりモニターされるチミジン酸 (TMP) の存在下で TK の等温変性の時間依存性を示す。SYPRO Orange 蛍光による TK の等温変性をモニターリングするための実験的変性条件は、前記方法に記載される。緩衝液 2 ml 中、前記反応混合物は、0.5  $\mu$ M のタンパク質、20,000 倍希釈度での SYPRO Orange 及び示される濃度での TMP を含んだ。TMP は、タンパク質の添加の時点で反応混合物に存在した。データは、等式 11 を用いて分析され、そして実線は実験データへの理論的適合性を表す。

【図5】図5は、TMP による等温変性に対する TK の安定化の用量依存性を示す。TMP / TK 相互作用の用量依存性が、運動曲線の直線傾斜及び結果に記載されるような一次速度定数の両者を用いて計算された。二次 Langmuir モデルを用いて、傾斜及び速度定数値から解離定数を計算した。実践は、実験データ点への理論的適合性を表す。一次速度定数により測定される場合のチミジル酸キナーゼの TMP 用量依存性安定化が、図 5A に及び図 5B における初期速度により示される。

40

【図6】図6は、TK の CD (円二色性) 構造の等温変性の効果を示す。次に、生来の及び等温的に変性された TK の CD スペクトルが前記方法に記載のようにして取られ；空白の丸 = 生来のタンパク質；黒丸 = 53 で等温変性された TK。

【図7】図7は、CD によりモニターされる TK の等温変性の時間の依存性を示す。25 mM の TMP の添加を伴って又はそれを伴わないで 53 での TK 等温変性の時間依存性が、前記方法に記載のようにして CD により追跡された。そのデータは一次速度モデル

50

を用いて分析され、そして実践は実践データ点に対する理論的適合性を表す。

【図 8】図 8 は、UV 濃色性によりモニターされる TK の等温変性の時間依存性を示す。TK 等温変性の時間依存性が、前記方法に記載のようにして、280 nm での吸光度上昇によりモニターされた。データは、等式 4 (上記) を用いて分析され、そして実線は、実験データ点に対する理論的適合性を表す。

【図 9】図 9 は、ストロメルシンの DSC 走査を示す。ストロメルシンの熱溶解プロフィールが前記方法に記載のようにして決定された。

【図 10 A】図 10 A は、SYPRO Orange 蛍光によりモニターされるストロメルシンの等温変性の時間依存性を示す。競争インヒビター PNU - 143988 の添加を伴って又はそれを伴わないで 75 でのストロメルシン等温変性の時間依存性が、前記方法に記載のようにして、SYPRO Orange 蛍光の上昇により追跡された。対照反応についてのデータは等式 4 により分析され、そして阻害された反応についてのデータは等式 11 を用いて分析された。1.5 及び 5  $\mu$ M の PNU - 143988 の存在下での代表的なデータがまた示されている。実線は、実験データ点に対する理論的適合性を表す。

10

【図 10 B】図 10 B は、トリプトファン蛍光によりモニターされるストロメルシンの等温変性の時間依存性を示す。ストロメルシンの等温変性の時間依存性は、検出のために固有のトリプトファン蛍光の上昇を用いての検出により T = 75 でモニターされた。データは等式 11 を用いて分析された。実線は、実験データ点に対する理論的適合性を表す。

【図 11】図 11 は、SYPRO Orange によりモニターされるストロメルシンの等温変性の初期速度及び速度定数に対する PNU - 143988 の効果を示す。競争インヒビター PNU - 143988 の添加を伴って、又はそれを伴わないで 75 でのストロメルシン等温変性の時間依存性が、前記方法に記載のようにして、SYPRO Orange 蛍光の上昇により追跡された。図 11 A = 初期速度；図 11 B = 速度定数。

20

【図 1】

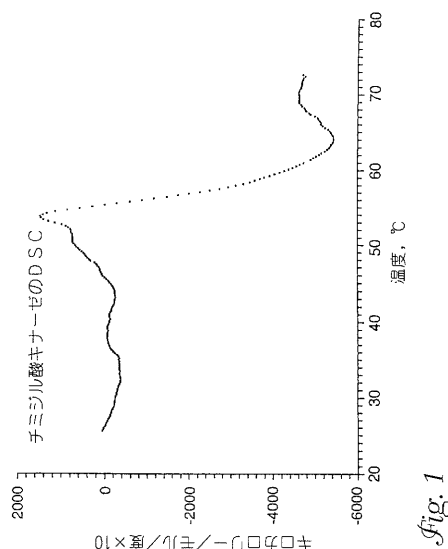


Fig. 1

【図 2】

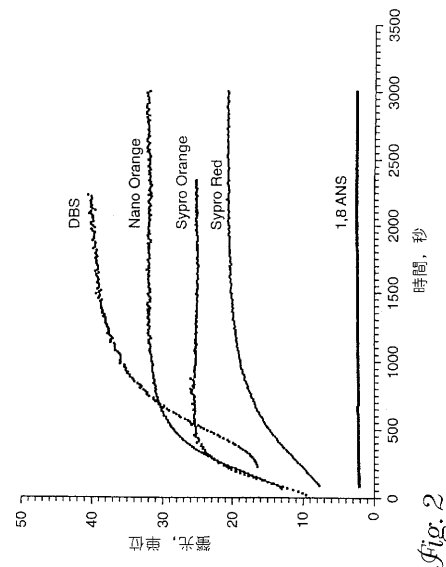
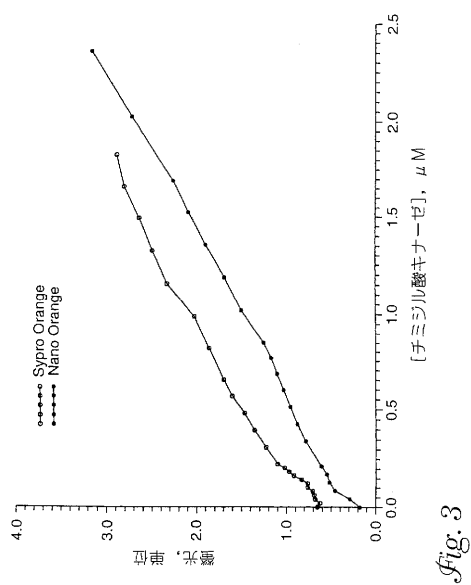
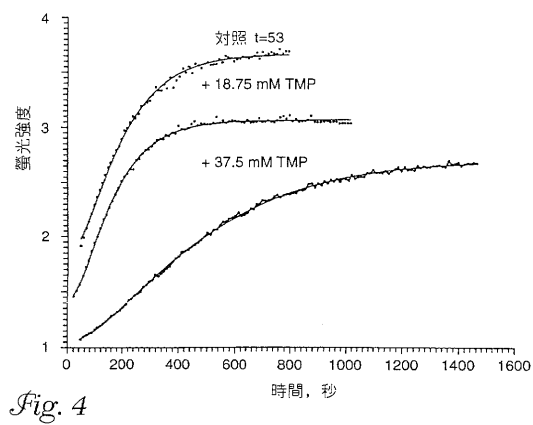


Fig. 2

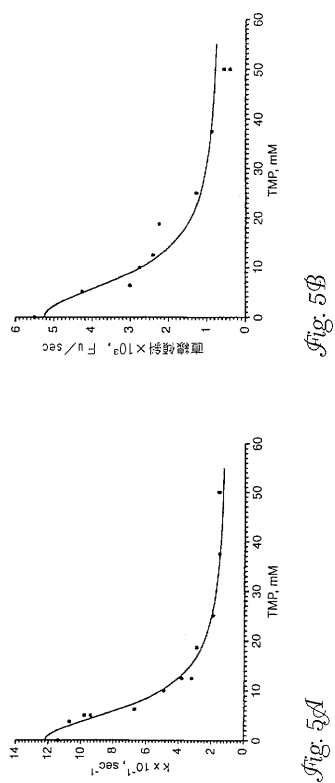
【図 3】



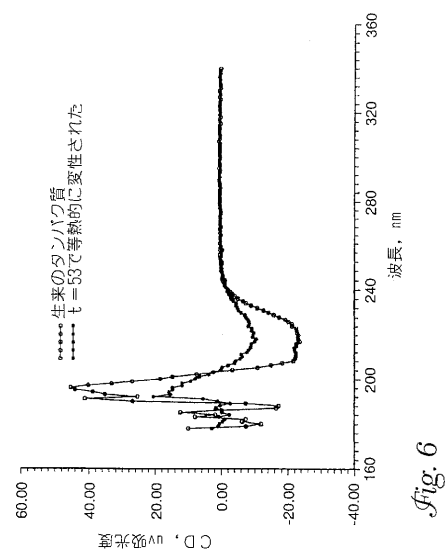
【図 4】



【図 5】



【図 6】





【図 7】

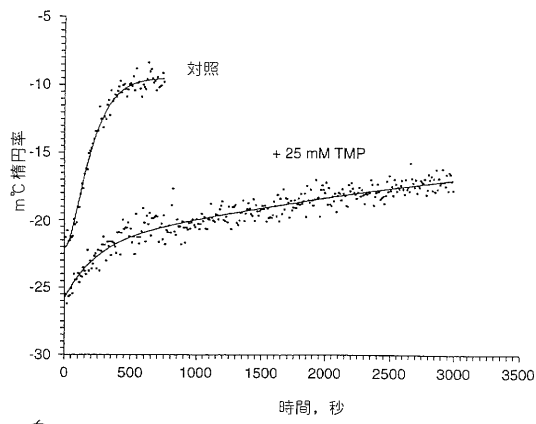


Fig. 7

【図 8】

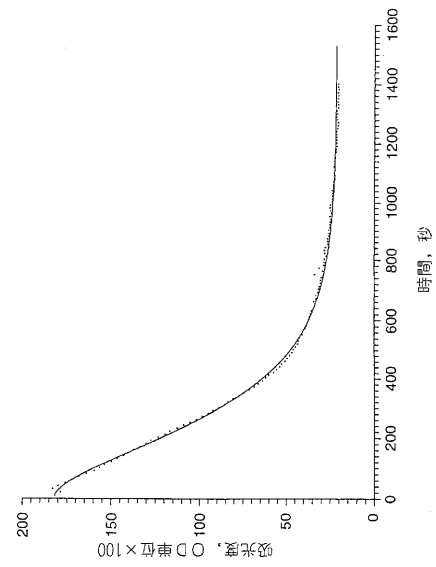


Fig. 8

【図 9】

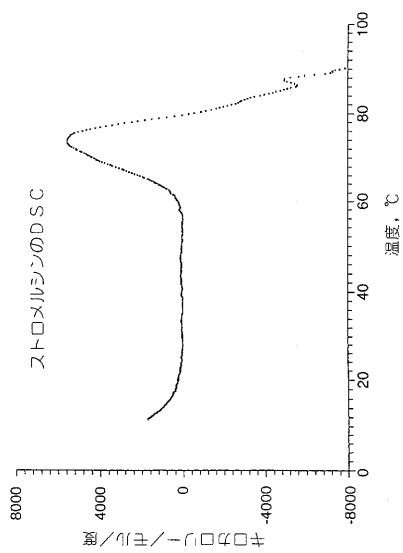


Fig. 9

【図 10】

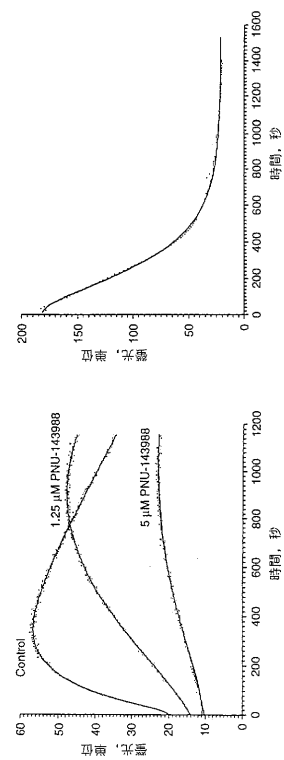
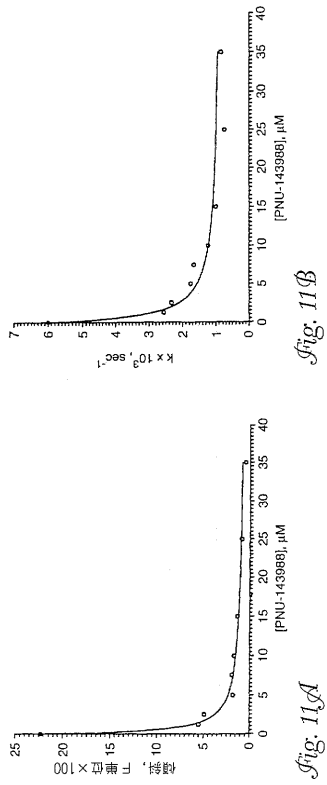


Fig. 10a

Fig. 10b

【図 11】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 June 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/46693 A2**

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/53** (74) Agent: MUETING, Ann, M.; Mueeting, Raasch & Gebhardt, P.A., P.O. Box 581415, Minneapolis, MN 55458-1415 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/42677
- (22) International Filing Date: 7 December 2000 (07.12.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/458,171 9 December 1999 (09.12.1999) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA & UPJOHN COMPANY [US/US]; 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): TOMICH, Paul, K. [US/US]; 3703 Blackberry Lane, Kalamazoo, MI 49008 (US); EPPS, Dennis, E. [US/US]; 240 Point 'O' Woods Drive, Portage, MI 49002 (US); KEZDY, Ferenc, J. [US/US]; 3805 Robin Lane, Kalamazoo, MI 49008 (US); MARSCHKE, Charles, K. [US/US]; Apartment B, 2835 South Burdick Street, Kalamazoo, MI 49001 (US); SARVER, Ronald, W. [US/US]; 32853 Braden Avenue, Paw Paw, MI 49079 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— Without international search report and to be republished upon receipt of that report.
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/46693 A2

(54) Title: METHODS OF IDENTIFYING COMPOUNDS THAT BIND TO TARGET SPECIES UNDER ISOTHERMAL DENATURING CONDITIONS

(57) Abstract: A high throughput screening method for identifying a compound that binds to a target species. The method includes: incubating a plurality of test mixtures under isothermal denaturing conditions, each test mixture including at least one test compound and at least one target species, wherein the isothermal denaturing conditions are effective to cause at least a portion of the target species to denature to a measurable extent. The method further involves detecting a denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound; and comparing the denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound with a denaturation signal of the same target species in the absence of the at least one test compound under the same isothermal denaturing conditions.

**METHODS OF IDENTIFYING COMPOUNDS THAT BIND TO  
TARGET SPECIES UNDER ISOTHERMAL DENATURING  
CONDITIONS**

5

**Background of the Invention**

One of the major challenges facing the drug discovery process is the identification of small organic ligands that will bind to target species, particularly protein targets. A multitude of new protein targets are being discovered by genomics and bioinformatics efforts. Many of these proteins have no known function or known specific ligands. Thus, the identification of ligands for these targets presents challenges in the screening of large chemical libraries by high throughput screening (HTS), including ultra-high throughput screening (UHTS), methods, particularly from the standpoint of assay development. Hence, there is a need for a straightforward, generally applicable methodology, particularly an HTS assay methodology, that can be used to identify ligands that bind proteins, especially those with unknown functionality.

It is known that the binding of substrates or specific ligands does, in general, alter the intrinsic stability and hence the denaturation profile of a protein. Thus, methods that measure protein denaturation can be used to detect and quantitate ligand-protein interactions.

The denaturation of proteins is accompanied by the progressive loss of their tertiary/quaternary structure and ultimately biological activity. Denaturation can be accomplished by a number of physical and chemical methods that involve changes in temperature, pH, and/or, ionic strength, use of chaotropic agents, etc. It can be followed by methods sufficiently sensitive to monitor conformational changes in a protein. Because it is a simple and widely applicable experimental method, thermal denaturation has been used for a variety of purposes, including purifying proteins by selective denaturation of impurities and to study protein structure, folding, and stability. Thermal denaturation curves ((TDC), where the fraction of denatured protein is measured

WO 01/46693

PCT/US00/42677

as a function of gradually increasing temperatures) obtained by differential scanning calorimetry (DSC) have been shown to be particularly useful for determining protein stability and making inferences about the tertiary structure. The usefulness of TDC is further enhanced because binding of compounds that  
5 are substrates or specific ligands for a given protein changes the intrinsic stability of that protein and, hence, causes a shift in the TDC and the  $T_m$  (midpoint temperature) values.

Interpretation of the results of thermal scanning methods depends on the assumption that the denaturation process is a one-step, reversible, and  
10 continuous process that is very rapid on the time scale of the temperature scanning rate. However, the denaturation of most proteins under the usual experimental conditions is irreversible. Typically, it is only with small proteins and very mild denaturing agents that denaturation is readily reversible. Thus, DSC may be unable to provide reproducible and readily interpretable binding  
15 measurements.

In general, the DSC curves reflect the stability of many different structural domains, some sensitive to the binding of ligands and some not sensitive at all. Furthermore, denaturation may be initiated at many locations within the protein structure. Each of these processes has its own activation  
20 energy, which makes it the dominant process only within a narrow temperature range. As a consequence, depending on the scanning rate, the stability of a given domain may or may not be evident in the DSC curve. Furthermore, differential scanning calorimetry may see two or more protein denaturation steps where one would expect only a single transition. Yet another major factor  
25 contributing to the greater inextricability of the scanning thermal denaturation methods is that the binding equilibria of both the ligands of interest and of the fluorescent dyes reporting on the structural integrity of the protein are strongly temperature dependent. Thus, both the sensitivity of the method and the stabilizing effect of the ligand under study drift drastically during the  
30 experiment.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

Therefore, a need exists for a method identifying compounds that bind to target species. Preferably, such a method is amenable to UHTS or HTS, reproducible, and independent of the heating rate.

5                                    **Summary of the Invention**

The present invention provides methods for identifying compounds that bind to target species (e.g., polypeptides including proteins, and polynucleotides including DNA and RNA). These methods involve the use of isothermal denaturation, preferably in combination with fluorescence detection methods.

- 10    Significantly, the methods of the present invention involve automated methods suitable for HTS and UHTS. Ideally, the methods of the present invention are envisioned to be scalable to evaluate 10,000-60,000 compounds or more in a 24 hour period.

- Isothermal denaturation of proteins offers an attractive method for the  
15    identification of binding ligands. Significantly, in preferred methods, the present invention couples fluorescence techniques with denaturation by isothermal methods to determine alteration of target (e.g., protein) stability by a bound ligand. In particularly preferred embodiments, the denaturation and stabilization or destabilization of target species (e.g., protein targets) by ligands  
20    against isothermal denaturation is quantified by changes in fluorescence intensity.

- In one preferred embodiment, the present invention provides a high throughput screening method for identifying a test compound that binds to a target species. The method includes: incubating a plurality of test mixtures  
25    under isothermal denaturing conditions, each test mixture including at least one test compound (preferably, at least two test compounds, and more preferably, 2 to 10 test compounds) and at least one target species (preferably, only one target species is in any one test mixture), wherein the isothermal denaturing conditions are effective to cause at least a portion of the target species to denature (e.g.,  
30    unfold) to a measurable extent. The method further involves detecting a denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test

WO 01/46693

PCT/US00/42677

compound; and comparing the denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound with a denaturation signal of the same target species in the absence of the at least one test compound under the same isothermal denaturing conditions. Typically and preferably, the methods  
5 of the present invention can evaluate at least about 100 test mixtures per day. Preferably, such an evaluation occurs substantially simultaneously.

In the methods described herein, the target species can be a polypeptide (e.g., protein) or a polynucleotide (e.g., DNA or RNA). Preferably, the target species is a protein. The compound can bind to the target species either  
10 specifically (e.g., at a specific site or in a specific manner) or unspecifically. The binding can involve a variety of mechanisms, including covalent bonding, ionic bonding, hydrogen bonding, hydrophobic bonding (involving van der Waals forces), for example, or combinations thereof.

#### 15 **Definitions**

In the present invention the following definitions apply:

Isothermal denaturing conditions refers to conditions effective to denature a target molecule at a fixed temperature. It can also involve defined conditions with respect to pH, ionic strength, cation concentration, etc., which  
20 are generally held constant for evaluation of various compounds for a given target.

Denaturation signal refers to the signal produced by the target species upon being denatured.

$T_m$  refers to the midpoint of the melting transition of the target as  
25 determined by differential scanning calorimetry.

Reporter molecule refers to a separately added molecule such as a fluorescent dye or a covalently bonded reporter group attached to the target.

#### **Brief Description of the Figures**

30 Figure 1. DSC scan of Thymidylate Kinase (TK). The thermal melting profile of thymidylate kinase was determined as described in the Methods.

Figure 2. Isothermal denaturation of TK as monitored by various fluorescent dyes. The isothermal denaturation experiments were performed as described in the Methods at a temperature of 53°C using a protein concentration of 0.5  $\mu$ M. The concentration of DBS was 1  $\mu$ M, 1,8-ANS was 2  $\mu$ M, and the protein dyes were as follows: Nano Orange was at a 1:650-fold dilution, and both SYPRO Orange and SYPRO Red were at 1:10,000-fold dilutions.

Figure 3. Titration of SYPRO Orange and Nano Orange with TK. A fixed amount of dye, 250 nM for DBS and a 1:2600 dilution of Nano Orange was titrated at T = 23°C with increasing amounts of thymidylate kinase and the fluorescence increases recorded. The emission/excitation wavelengths used are given in Table 1.

Figure 4. Time-dependency of the isothermal denaturation of TK in the presence of thymidine monophosphate (TMP) monitored by SYPRO Orange. The experimental denaturation conditions for monitoring the isothermal denaturation of TK by SYPRO Orange fluorescence are described in the Methods. The reaction mixture in 2 mL of buffer contained protein, 0.5  $\mu$ M, SYPRO Orange, at a 20,000-fold dilution, and TMP at the indicated concentrations. TMP was present in the reaction mixture at the time of the addition of protein. The data were analyzed using Equation 11 and the solid lines represent the theoretical fits to the experimental data.

Figure 5. Dose-dependency of the stabilization of TK against isothermal denaturation by TMP. The dose-dependency of the TMP/TK interaction was calculated using both the linear slopes of the kinetic curves and the first-order rate constants as described in the Results. A second-order Langmuir model was used to calculate the dissociation constants from the slope and rate constant values. The solid line represents the theoretical fit to the experimental data points. The TMP dose-dependent stabilization of thymidylate kinase as measured by the first-order rate constants is shown in Figure 5A and by initial rates in Figure 5B.

Figure 6. Effect of isothermal denaturation of the CD (Circular Dichroism) structure of TK. The CD spectra of native and isothermally



WO 01/46693

PCT/US00/42677

denatured TK were taken as described in the Methods; open circles = native protein; solid circles = TK isothermally denatured at  $T = 53^{\circ}\text{C}$ .

Figure 7. Time-dependency of the isothermal denaturation of TK monitored by CD. The time-dependency of TK isothermal denaturation at  $53^{\circ}\text{C}$  with or without the addition of 25 mM TMP was followed by CD as described in the Methods. The data were analyzed using a first-order rate model and the solid lines represent the theoretical fits to the experimental data points.

Figure 8. Time-dependency of the isothermal denaturation of TK monitored by UV Hyperchromicity. The time-dependency of TK isothermal denaturation was monitored by the absorbance increase at 280 nm as described in the Methods. The data were analyzed using Equation 4 (below) and the solid line represents the theoretical fit to the experimental data points.

Figure 9. DSC Scan of Stromelysin. The thermal melting profile of stromelysin was determined as described in the Methods.

Figure 10A. Time-Dependency of the isothermal denaturation of Stromelysin monitored by SYPRO Orange Fluorescence. The time-dependency of stromelysin isothermal denaturation at  $75^{\circ}\text{C}$  with or without the addition of the competitive inhibitor PNU-143988 was followed by the increase in SYPRO Orange fluorescence as described in Methods. The data for the control reaction were analyzed using Equation 4, and those for the inhibited reactions with Equation 11. Representative data in the presence of 1.5 and 5  $\mu\text{M}$  PNU-143988 are also shown. The solid lines represent the theoretical fits to the experimental data points.

Figure 10B. Time-Dependency of the isothermal denaturation of Stromelysin monitored by Tryptophan Fluorescence. The time-dependency of the isothermal denaturation of stromelysin was monitored at  $T = 75^{\circ}\text{C}$  with detection using the decrease in the intrinsic tryptophan fluorescence for detection. The data were analyzed using Equation 11. The solid lines represent the theoretical fits to the experimental data points.

Figure 11. Effect of PNU-143988 on the Initial Rates and the Rate Constants of the Isothermal Denaturation of Stromelysin Monitored by SYPRO

WO 01/46693

PCT/US00/42677

Orange. The time-dependency of stromelysin isothermal denaturation at 75°C with or without the addition of the competitive inhibitor PNU-143988 was followed by the increase in SYPRO Orange fluorescence as described in the Methods. Figure 11A = initial rates; Figure 11B = rate constants.

5

#### **Detailed Description of Preferred Embodiments**

The present invention is directed to the use of isothermal denaturation.

The methodology can be used to screen for ligands to a wide variety of molecules, particularly proteins, including those with unknown function.

10 Significantly, the methods of the present invention eliminate the necessity of ramping temperatures up and down and should allow for much faster assay development and higher throughput in an HTS or UHTS automated environment. The technology should be easily expandable to looking for compounds that bind to RNA, DNA,  $\alpha$ -acidic glycoprotein, and serum albumin,  
15 for example.

Isothermal denaturation offers an attractive alternative method for monitoring denaturation (e.g., unfolding of a target species) and for the identification of binding ligands. It is amenable to HTS and UHTS.

Furthermore, the denaturation process is easily controllable, reproducible, and  
20 independent of the heating rate.

The choice of temperature used in isothermal denaturation can be determined by measuring the rate of denaturation of the target species at a series of temperatures (e.g., within a range of about 45°C to about 75°C). These measurements may be made, for example, using a fluorescent reporter molecule  
25 that binds to and reports conformational changes associated with the unfolding of the target molecule. Alternatively, denaturation signals can be monitored using UV absorbance, CD ellipticity, or by microcalorimetry studies with the target species, for example. Preferably, a preliminary DSC scan is run to determine  $T_m$  (midpoint temperature) of the target species in appropriate buffers  
30 that enhance the stability of the target over a long period of time as would be known to one skilled in the art.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

During the binding experiments, all components are maintained at one given temperature (preferably  $\pm$  about 0.2°C) which is chosen to produce a slow, easily monitored denaturation of the target protein. If the temperature of isothermal denaturation is too low, the kinetics are too slow. Generally, it is desirable to have a detectable amount of denaturing (e.g., unfolding) occur within about 60 minutes or less. If the temperature is too high, the kinetics are so fast that the test compound would not be able to stabilize the denatured target species resulting, for example, in too great an extent of unfolding. Too much unfolding can cause aggregation that could result in precipitation of the target. Furthermore, at too high a temperature, the test compound may not bind at all. Preferably, the desired temperature for isothermal denaturing is equal to the  $T_m$  value  $\pm$  about 10°C of the target species as determined by DSC. More preferably, this temperature is equal to or up to about 10°C less than the  $T_m$  value of the target species.

The target species, preferably together with a suitable reporter molecule able to monitor its denaturation, is incubated in the presence and absence of the target species. In a preferred embodiment, the concentration of the compound and that of the reporter molecule are of comparable magnitude (preferably, no greater than about 1  $\mu$ M), but may require the reporter molecule to be in excess relative to the target molecule, whereas the concentration of the test compound is in at least a 10-fold excess. The percent inhibition cutoff for a "hit" can be set prior to assay implementation, or determined statistically during or after all screening has been performed.

Fluorescence techniques are rapidly becoming the detection methods of choice for HTS and UHTS. Thus, in certain preferred embodiments of the present invention, fluorescence molecules are used as the markers of choice. Coupling fluorescence techniques with denaturation by isothermal methods is attractive because in isothermal denaturation the quantum yield of an extrinsically added reporter molecule is dependent only on changes in protein folding and not on temperature effects. Further, any change in the fluorescence quantum yield measures binding of the reporter molecule to different denatured

WO 01/46693

PCT/US00/42677

forms of the target species. Thus, alteration of target stability by a bound ligand should be easily detectable.

The present invention demonstrates that isothermal denaturation can be used to determine if known competitive inhibitors/ligands could bind to target species. The results are comparable to those obtained by other methods. The agreement of the denaturation kinetics from three different detection methods confirms that the same unfolding processes are being measured using the methods of the present invention.

The fluorescence of the reporter molecule should preferably increase several-fold (preferably, at least about 2-fold) upon denaturation of the target. For proteins, this is typically accompanied by the exposure of the protein's hydrophobic regions. The reporter molecules should also preferably have low affinity for the native target; that is, the fluorescence of the native target/reporter molecule complex is linear over a wide concentration range or, preferably, does not bind to the native target at all so that it does not become a ligand itself. Finally, since compound libraries generally contain numerous compounds that absorb and/or fluoresce between about 300 nanometers (nm) and about 400 nm, the reporter molecule should preferably have excitation and emission in the visible region where few compounds interfere, e.g., excitation at about 488 nm and emission at about 515 nm.

Reporter molecules (e.g., fluorescent dyes) are commercially available from sources such as Molecular Probes (Eugene, OR) and fluoresce brightly when bound to hydrophobic regions of the target molecule. These include SYPRO Orange, SYPRO Red, Nano Orange, Nile Red, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS), and dapoxylbutylsulfonamide (DBS) as well as other dapoxyl analogs. Nano Orange fluorescence provides an ultra-sensitive dye for quantification of proteins in solution with a linear fluorescence range of about 10 nanograms/milliliter (ng/mL) to about 10 micrograms/milliliter ( $\mu$ g/mL) with a very low background fluorescence. SYPRO Orange and SYPRO Red are used for gel staining with sensitivity as good as silver staining. The basis for the increase in fluorescence of the dyes with protein denaturation is their binding to

WO 01/46693

PCT/US00/42677

newly exposed hydrophobic sites. 1,8-ANS has been used extensively for many years to monitor the unfolding of proteins; however, its quantum yield when bound to the denatured protein is much lower than those of the dyes discussed above and, thus, would require the use of large quantities of protein and reporter molecule in the assays. DBS is a relatively new, solvatochromic dye whose fluorescence emission may shift as much as 100 nm upon changing the environment. Due to its lower excitation and emission wavelengths, however, it is less desirable than Nano Orange, SYPRO Orange, or SYPRO Red for HTS.

Any fluorescent reporter molecule whose emission intensity increases or decreases when bound to a desired target species can be used for isothermal denaturation. The affinity of a fluorescent reporter molecule toward a target species can be determined by measuring the fluorescence of a given concentration of the reporter molecule in the presence of increasing concentrations of the denatured target species and the native target species. Knowing the affinity then allows one to optimize the concentration of the fluorescent reporter molecule relative to the target species.

In addition to, or instead of, using noncovalent fluorescent reporter molecules that are added to a mixture of the test compound and target species, one may use target species labeled covalently with a pair of fluorophores, one of which quenches the fluorescence of the other. Because unfolding of the target species changes the intermolecular distances between the two fluorophores, the denaturation is accompanied by changes in fluorescence. By labeling the same target species at specific sites, the denaturation at different structural regions can be monitored.

Although fluorescence techniques, particularly dye binding resulting in fluorescence enhancement are the detection methods of choice, other techniques can be used in the methods of the present invention. This can include, for example, monitoring: 1) the change in UV absorbance, for example, at 280 nm resulting from exposure of aromatic amino acid(s) to solvent; 2) the change in molar ellipticity by circular dichroism (CD); 3) infra-red or NMR spectral shifts; 4) changes in mobility on a support material (e.g., solid support) such as size-

WO 01/46693

PCT/US00/42677

exclusion chromatography, capillary electrophoresis, etc. None of these approaches necessarily requires the use of an extrinsic or intrinsic fluorescent reporter molecule.

For target species that have a relatively high denaturation temperature, the experiments can be performed in the presence of a chaotrope, such as urea, guanidine hydrochloride, organic solvents, or any other reagents that promote protein denaturation without unduly interfering with binding of the reporter molecule with the target species.

The exact experimental conditions for denaturation of each target molecule will vary. One skilled in the art can make appropriate decisions and/or experimentally determine appropriate buffer systems (pH, ionic strength, ionic co-factors, etc.). For example, the isoelectric point (pI) of a protein molecule would help determine what pH would be useful in these studies.

In practice, the methods of the present invention can be carried out in a multi-reservoir sample holder, such as a microtiter plate. Typically, all components but the target species are added and the multi-reservoir sample holder is held at the appropriate temperature for a period of time. After thermal equilibrium is reached, the sample holder is preferably transferred to a station where the target species is added to all reservoirs, preferably simultaneously. The multi-reservoir sample holder is typically sealed prior to addition of any components. For example, a microtiter plate can include a covering that is made of a plastic sheeting which seals the plate but is scored in such a way that a microtiter tip easily penetrates it but that it re-closes after tip removal. After introduction of the target species, the sample holder is either transferred immediately to an appropriate detector for reading the denaturation signal or to an incubator for holding until detection is desired. All steps can be performed either manually or by robot as desired.

For high throughput screening, a commercially available Zymark/Zymate PCS system (Zymark Corp., Zymark Center, Hopkinton, MA) equipped with a Rapid Plate module, jacketed carousel, 10-plate incubator system interfaced with a fluorescent plate reader can be used. This system can

WO 01/46693

PCT/US00/42677

process 96- and 384-well microtiter plates and can be adapted for use in the isothermal denaturation method of the present invention. For example, the 10-plate incubator can be modified with heating elements such as Watlow flexible flat mat heaters for sample incubation. The temperature of the incubator can be further controlled by the use of a circulating waterbath. The Zymark/Zymate system includes a jacketed carousel that can be modified to include a temperature controlled humidifier and fan internally, and heat lamps externally, to assist in temperature control and to reduce loss of sample volume in the microtiter plates. The Zymark/Zymate system also includes a pipetting station (Rapid Plate Module) that can be modified to include a heating block and heat lamps, for example. For fluorescence measurements, a BMG POLARstar microplate reader (BMG Labtechnologies, Inc., Durham, NC) can also be modified for control of temperature by a circulating waterbath (e.g., from about -20°C to about 90°C). This system is automated using robotics and computer software, which can be modified to allow for the samples to experience isothermal conditions.

Using the methods of the present invention, the kinetics of isothermal denaturation of thymidylate kinase (TK) and of stromelysin, with and without the presence of their specific ligands, were monitored by long-wavelength fluorescent dyes whose quantum yields increase when bound to exposed hydrophobic regions of unfolded proteins. The time dependencies were all consistent with a reaction scheme of two consecutive first-order reactions. That is, the kinetics of denaturation for both proteins were best described by a biphasic model. Thus, only two of the probably many steps are rate limiting. It is apparent that a significant amount of information of the kinetics of the unfolding processes are provided by the fluorescence measurements. The dependence of the rate constants on ligand concentration was analyzable in terms of a binding isotherm, reflecting the stabilizing effect of the protein/ligand complex. The method was validated by comparing its results with those obtained by steady-state fluorescence spectroscopy, circular dichroism, and UV spectrophotometry. The corresponding rate constants calculated from the

WO 01/46693

PCT/US00/42677

results of the several analytical detection methods were comparable. The rate constants of both steps were dependent upon the binding of active-site ligands. The dissociation constants represent affinities of the ligands at the melting transition temperature. The affinity constants (i.e., "dissociation constants") at physiological temperatures can be determined by extrapolation from measurements at two different temperatures. These results, coupled with those obtained in multi-well (e.g., 96-well) format, show that isothermal denaturation is a method of choice for HTS, including UHTS, for ligands with high specificity toward any given protein.

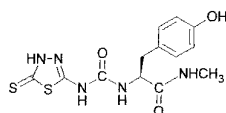
Having generally described the invention, the same will be more readily understood by reference to the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended as limiting.

## Examples

### I. Materials and Methods

#### A. Reagents

SYPRO Orange, SYPRO Red, Nano Orange, 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS), and dapoxylbutylsulfonamide (DBS) were purchased from Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon. Thymidine monophosphate (TMP) and all other reagents were from Sigma-Aldrich Chemical Company. All commercial chemicals used were reagent grade or better. The compound referred to as PNU-143988 has the following structure:





WO 01/46693

PCT/US00/42677

**B. Proteins**

*S. aureus* thymidylate kinase was cloned by Human Genome Sciences and purified by affinity chromatography using  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA columns purchased from Qiagen (QIAGEN Inc., Valencia, CA). For TK the isothermal  
5 denaturation took place in a 5 millimolar (mM) Tris buffer, pH 7.80, containing 0.5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and was measured at a temperature of 53°C, with the exception of the validation experiments of the robotic assay which were carried out at 52°C. *S. aureus* uridylylate kinase (UK) was cloned by Human Genome Sciences and purified by affinity chromatography using  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA  
10 columns (QIAGEN Inc., Valencia, CA). UK has a transition midpoint,  $T_m$ , of 45.5°C as determined by DSC using a buffer of 50 mM TRIS, 500 mM NaCl, 10% glycerol, and 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 7.8. Validation experiments for isothermal denaturation were performed at the  $T_m$ , 41°C, in pH 7.5 buffer composed of 50 mM Tris, 200 mM KCl, 10% glycerol, and 5 mM  $\beta$ -  
15 mercaptoethanol. Stromelysin was cloned and purified as described by Finzel et al., *Prot. Sci.*, 7, 2118-2126 (1998). It has a  $T_m$  of 75°C as determined by DSC. This temperature was chosen for the following isothermal denaturation experiments. The buffer system for stromelysin consisted of 10 mM imidazole, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 micromolar ( $\mu\text{M}$ )  $\text{ZnCl}_2$ , pH 6.50.

20

**C. Ligands**

Stock solutions for all ligands were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) unless noted otherwise. Whenever the water solubility was high enough, secondary stock solutions were made in the buffer system for the  
25 particular protein; otherwise, diluted stocks were prepared in DMSO. A small aliquot of ligand solution, typically 10  $\mu\text{l}$  or less, was added to buffer and equilibrated at the appropriate temperature in the cell before addition of the protein. Control experiments assessed the effect of added DMSO on protein denaturation. In some cases 0.1% CHAPS (weight/volume percent, (3-[(3-choloamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) was added to the  
30

WO 01/46693

PCT/US00/42677

reaction mixture to counteract the effects of DMSO. In order to validate the system, a subset of compounds which had been previously shown to be active in an activity assay for either thymidylate kinase or uridylate kinase was tested as a representative number of compounds having increased probability of being  
5 ligands for the protein targets.

#### D. Fluorescence Measurements

For fluorescence measurements, a photon counting ISS K2 spectrofluorometer in the ratio mode was used (ISS Inc., Urbana, Illinois). The  
10 temperature was maintained within 0.2°C throughout the experiments by means of a Polysciences programmable temperature controller (Polysciences, Niles, IL). Emission was observed on the filter channel using the following emission filters: 530 nanometer (nm) bandpass filter for Nano Orange, 590 nm cut-off for SYPRO Orange, 630 nm cut-off for SYPRO Red and Nile Red, and 470 nm  
15 cut-off for 1,8-ANS and dapoxylbutyl-sulfonamide. Alternatively, fluorescence measurements were acquired by a BMG POLARstar microplate reader (BMG Labtechnologies, Inc., Durham, North Carolina). Temperature was controlled with a circulating waterbath. This instrument best detected Nano Orange using  
20 a 485 nm center wavelength, 15 nm bandpass excitation filter and a 580 nm center wavelength, 12 nm bandpass emission filter.

The time-dependencies of the fluorescence of extrinsic dyes during isothermal denaturation were monitored as follows. The test dye was added to a stirred cuvette containing 2 milliliters (mL) of buffer that had been thermally  
25 preequilibrated at the desired temperature. A dye baseline was recorded for 45 seconds and the denaturation reaction initiated by the addition of a small aliquot of the protein stock solution. In this way, the protein reached the temperature of denaturation virtually instantaneously. In separate experiments, the protein was kept at the denaturation temperature in the absence of dye and the reporter molecule added at the end of the reaction. In the latter experiments, the  
30 fluorescence increase associated with the addition of dye was always instantaneous. In order to be certain that under the conditions of the experiment

WO 01/46693

PCT/US00/42677

the dye itself would not complex a significant fraction of the native protein, a fixed amount of dye was titrated with increasing amounts of protein and showed that the fluorescence increase did not reach saturation.

The three tryptophan residues of stromelysin are buried in the active site region and as such are sensitive reporters of the unfolding of the protein. Thus, the isothermal denaturation of this protein was also measured by changes in the intrinsic tryptophan fluorescence. For these experiments, the protein was added to buffer equilibrated in a cuvette at the temperature of isothermal denaturation. The excitation wavelength was 293 nm and the emission was monitored using a 320 ± 10 nm bandpass filter.

#### E. Calorimetric Measurements

DSC for stromelysin and TK was performed using an MC-2 differential scanning calorimeter from Microcal, Inc. (Northampton, MA). For stromelysin, the 1.2 mL sample cell of the calorimeter was filled with 150 µM enzyme in a pH 6.50 buffer containing 10 mM imidazole, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 5 mM ZnCl<sub>2</sub>. For TK, the calorimeter cell was filled with 15 µM enzyme in a 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.70, containing 0.50 M NaCl, 10% glycerol, and 5 mM 2-mercaptoethanol. The reference cell was filled with the same buffer. The solutions were degassed for 5 minutes prior to scanning from 25°C to 80°C at a rate of 1°C/minute. Baseline scans, collected with dialysate buffer in the sample cell, were subtracted from the protein scans and the resulting data converted to unit protein concentration. The Y-axis of the instrument was calibrated using standard electrical heat pulses and the temperature scale was calibrated using *n*-octadecane and *n*-hexatriacontane which melt at 28.2°C and 75.9°C, respectively.

#### F. Circular Dichroism

Circular Dichroism (CD) spectra were measured using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco Corp., Easton, MD) and a cylindrical quartz cell with a pathlength of 0.1 centimeter (cm) thermostated to within 0.1°C by a Haake D8

WO 01/46693

PCT/US00/42677

circulating water bath (Haake GmbH, Karlsruhe, Germany). The concentration of the protein was chosen on the basis of its molar ellipticity and fell usually in the range of about 1  $\mu$ M to about 20  $\mu$ M. Solutions of protein or protein with 10- to 100-fold excess of ligand were prepared prior to injection into the cell.

5 Each solution was first scanned at 22°C from 178 nm to 260 nm with a response of 0.25 second, scan speed of 100 nm/minute, resolution and bandwidth of 1.0 nm and 5 accumulations. The cell was then rapidly heated to the temperature of isothermal denaturation and the time dependency of the ellipticity at 222 nm was monitored. Dichroism was sampled with a bandwidth of 1.0 nm at 0.5

10 millisecond (msec) intervals and accumulated for 16 seconds. Data were stored every one second as the running average of the 16 second bundles. After the time scan, a wavelength scan was performed at the same temperature. Cells and buffer solutions with and without ligand were routinely checked for absorbance and dichroism. Cells were thoroughly cleaned as described above and rinsed

15 with distilled water and ethanol between experiments.

#### G. Absorbance Measurements

UV absorbance was measured using a Perkin-Elmer Lambda 40 UV-Vis dual-beam spectrophotometer (Perkin-Elmer Corp. Norwalk, CT). A capped

20 1.0 cm pathlength quartz cuvette filled with buffer was placed in the reference beam. In the sample beam, a capped 1.0 cm path length quartz cuvette containing 1.5 mL of degassed buffer or buffer plus ligand—less the volume of protein solution to be added—was placed in a thermostated cell holder and equilibrated at the temperature of isothermal denaturation. The temperature was

25 maintained within 0.1°C using a Neslab Exacal EX200 circulating water bath (Neslab Instruments, Inc. Portsmouth, NH). A 1-5  $\mu$ L aliquot of the protein stock solution was added to the cuvette containing buffer or buffer plus ligand to yield a final volume of 1.5 mL and protein concentration near 0.5  $\mu$ M. The cuvette was recapped and absorbance at 280 nm was measured every 1 second

30 for up to 30 minutes with a bandwidth of 2 nm and response of 0.5 second. For each protein, the effects of several ligand concentrations were examined ranging

WO 01/46693

PCT/US00/42677

from about 0.5  $\mu\text{M}$  to about 400  $\mu\text{M}$ . Cuvettes were thoroughly cleaned as described above with nitric acid and with 10% methanol and rinsed with distilled water and ethanol between experiments.

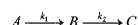
#### 5 H. Data Analysis

Only in a few cases was the time dependency of protein denaturation an apparent first-order process. Those data were analyzed by a nonlinear least squares program using the equation:

$$Y = Y_0 + \Delta Y \cdot (1 - e^{-k_{\text{exp}} \cdot t})$$

Equation 1

10 where Y is the experimentally measured signal,  $Y_0$  is the background signal,  $\Delta Y$  is the total change in signal associated with the denaturation process, t is time and  $k_{\text{exp}}$  is the experimentally measured apparent first-order rate constant. In general, the kinetics of denaturation displayed biphasic kinetics, often with a  
15 distinct induction period. Those time courses were analyzed according to the reaction scheme of two consecutive first-order reactions:



Equation 2

where  $k_1$  and  $k_2$  are first-order rate constants and where, *a priori*, all three  
20 species contribute to the observed signal. The equation corresponding to the signal observed during these reactions is:

$$Y = Y_A \cdot e^{-k_1 t} + Y_B \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + Y_C \left[ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right]$$

Equation 3

25 where  $Y_A$ ,  $Y_B$ , and  $Y_C$  are the signals for the species A, B, and C, respectively. Often, it happened that within experimental error  $Y_A = Y_B$ , thereby simplifying the analysis since:

WO 01/46693

PCT/US00/42677

$$Y = Y_A + (Y_C - Y_A) \left[ 1 + \frac{1}{k_1 - k_2} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right] \quad \text{Equation 4}$$

When  $Y_B = Y_C$ , the experimental curve degenerates into a simple first-order rise or decay, depending on whether  $Y_A > Y_B$  or  $Y_B > Y_A$ .

More often than expected, the preliminary analysis of the data by Equation 3 or Equation 4 indicated that  $k_1$  and  $k_2$  were very similar to each other. Since Equation 3 is not valid for the case where  $k_1 = k_2$ , we integrated the system of rate equations:

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A \quad \text{Equation 5}$$

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot A - k \cdot B \quad \text{Equation 6}$$

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot B \quad \text{Equation 7}$$

to yield:

$$A = A_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Equation 8}$$

$$B = k \cdot A_0 \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Equation 9}$$

$$C = A_0 \cdot [1 - (k \cdot t + 1) \cdot e^{-k \cdot t}] \quad \text{Equation 10}$$

The time dependence of the signal is then given by:

$$Y = Y_A \cdot e^{-k \cdot t} + Y_B \cdot k \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} + Y_C \cdot [1 - (k \cdot t + 1) \cdot e^{-k \cdot t}] \quad \text{Equation 11}$$

WO 01/46693

PCT/US00/42677

This equation was used in conjunction with a nonlinear least squares to analyze the results of experiments with  $k_1 \approx k_2$ .

#### Robotic Assay

5 A library of compounds was tested in a high throughput screening mode in 96-well microtiter plate format with single compounds per well at the temperatures described above. The optimal dye and optimal ratio of dye to protein for TK and UK was assessed. Each microtiter plate contained 88 individual compounds and eight control wells that initially contained only buffer plus dye (no compound). These assay plates were manually sealed with a  
10 plastic 96-well microplate seal (Tomtec, Inc., Hamden, Connecticut). These seals were scored for easy entrance of pipet tips, followed by reclosure after pipet tip exit. The remaining steps were carried out robotically as follows. Assay plates were deposited into the temperature/humidity-controlled incubator  
15 for an initial incubation period, typically 60-90 minutes, which equilibrated the assay plate to the desired assay temperature. A fluorescence measurement,  $T_1$ , was then taken by the BMG POLARstar to establish the lower bound of the assay. This fluorescent reading for those wells containing compounds plus buffer plus dye was used to ascertain the effect of the  
20 compounds themselves. Following an additional incubation period in a set of incubators which ensured that well contents were equilibrated to the assay temperature, assay plates were moved to the RapidPlate liquid dispensing unit. Protein was added from a plate reservoir to assay plates located on a modified heated plate position. For the final incubation, assay plates were transported  
25 back to the temperature/humidity-controlled incubator for a defined time at the assay temperature, typically 30 minutes. A second fluorescence measurement,  $T_2$ , was taken by the BMG POLARstar. The control wells (assay buffer plus dye plus protein) defined the upper bound of the assay. A comparison of the fluorescent measurement for the wells containing compound (plus assay buffer  
30 plus dye plus protein) compared to the control well reads at  $T_1$  and  $T_2$  defined which compounds bound to and stabilized the protein of interest.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

## II. RESULTS

The temperature at which a given protein undergoes denaturation at an easily measurable rate was determined prior to the ligand binding studies. The rates were most appropriate for measuring methods at temperatures slightly below or at the thermal transition temperature ( $T_m$ ) as measured by differential scanning calorimetry. To determine which fluorescent dye produces the largest signal for a given protein, a preliminary isothermal denaturation experiment at  $T_m$  was performed with each dye at a concentration of 1  $\mu$ M and the protein at 0.5  $\mu$ M. The spectral properties of all dyes tested are given in Table 1. Due to their long excitation and emission wavelengths, Nano Orange, SYPRO Orange, and SYPRO Red are attractive for use in HTS format.

**Table 1.** Spectral Parameters Used in Measuring Isothermal Denaturation

Dye	$\lambda_{exc}$ , nm	$\lambda_{em}$ , nm
1,8-ANS	390	470
Dapoxylbutylsulfonamide	372	470
Nile Red	590	630
Nano Orange	490	525
SYPRO Orange	500	590
SYPRO Red	550	630

### A. Thymidylate Kinase

The thermal scan for thymidylate kinase (TK), shown in Figure 1, reveals a  $T_m$  located at 53°C, the temperature which was then chosen for all subsequent isothermal experiments. Upon cooling and reheating of the protein, no observable peak was found (results not shown), which indicated that this protein had denatured irreversibly.



**Fluorescence.** Figure 2 shows the results of preliminary experiments where the time-dependent fluorescence changes for each dye were measured in the presence of thymidylate kinase denaturing isothermally at 53°C. The fluorescence of all the dyes increased in a biphasic manner in the course of the denaturation, with DBS producing the largest net increase over background. The fluorescence of Nano Orange, SYPRO Orange, and SYPRO Red (used in general as protein quantitation and gel stain dyes) also increased significantly, while the fluorescence increase of 1,8-ANS, at a four-fold molar excess to protein, was relatively small. Finally, it was also ascertained that the increase in fluorescence of the amount of Nano Orange or SYPRO Orange used in the experiments upon addition of the native protein was linear over a wide range of protein concentrations (Figure 3). These results demonstrate that the dyes do not saturate the protein under the conditions of the experiment. In other words, the dyes themselves do not compete with the ligands and they do not stabilize the protein to any measurable extent.

Because of its spectral properties (see Table 1), SYPRO Orange was chosen for use in further denaturation experiments. Figure 4 shows representative time courses of SYPRO Orange fluorescence occurring during the isothermal denaturation of TK in the presence of increasing amounts of TMP, which is a specific ligand for the enzyme. When the protein was first denatured and the dye added at the end of the process, the fluorescence increase was instantaneous (data not shown). Thus, the time-dependency of the fluorescence changes represents protein unfolding and not a slow binding of the dye to the denatured protein. The time-dependencies were biphasic, indicating the presence of at least two rate-determining unfolding processes. The results were analyzed using a nonlinear least squares method with a variety of kinetic models. Of all the models tested, the model of two consecutive first-order reactions with identical rate constants, Equation 11, was the most consistent with the data. The agreement of the experimental points with the theoretical curves calculated with the best-fit parameters and Equation 11 is shown in Figure 4.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

The slope of the early, linear portion of the time course is also proportional to the first rate constant and, thus, either can be used to analyze the influence of TMP concentration on the denaturation rates. Figure 5 shows the dependency of these two parameters on ligand concentration. The curves were  
5 analyzed using a nonlinear least squares method and equations corresponding to a variety of models relating denaturation rates to occupancy of the ligand binding site. The best consistency was found with the model where a fully cooperative binding of two TMP molecules per protein results in a six-fold stabilization of the enzyme (Figure 5). This result is not fully surprising since  
10 thymidylate kinase is a dimeric protein as evidenced by size exclusion chromatography (*E. coli* protein is known to exist as a dimer in "Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation" by A. Lavie et. al. in *Nature Structural Biology*, 4,601-604 (1997)). From the slopes,  $K_d$  was calculated to be  $9.1 \pm 1.6$  mM and from the rate constants  $K_d$   
15 was calculated to be  $7.6 \pm 0.8$  mM. These cooperative  $K_d$  values, measured at 53 °C, are not directly comparable to the noncooperative kinetic parameter  $K_m = 27$   $\mu$ M determined at 25°C by an activity assay using saturating ATP concentrations. It seems likely that the cooperativity arises from the fact that the  
20 kinetic mechanism of TK consists of an ordered addition, whereby TMP can only bind to the enzyme which has an occupied ATP site and that TMP can bind weakly to the ATP site.

Absorbance and Circular Dichroism. In order to ascertain that the fluorescence changes of the dyes actually are proportional to the two forms of  
25 denatured protein and do, in fact, measure the denaturation process, two other techniques, CD and UV absorbance, were employed to study the unfolding kinetics of the same protein.

Circular dichroism scans of the native protein and of its denatured form show that a significant change in the CD spectrum accompanies the unfolding  
30 (Figure 6). For example, there was a 45% loss in intensity of the  $\alpha$ -helical signal at 222 nm. Consequently, the time-dependency of the changes in molar

ellipticity was monitored continuously at 222 nm. As illustrated in Figure 7, the ellipticity at 222 nm increased rapidly and reached a maximum after about 10 minutes. Addition of 25 mM TMP, a natural ligand, greatly decreased both the rate and magnitude of the increase in ellipticity. The data were fully consistent with a simple first-order reaction, thereby indicating that the major changes in ellipticity are produced by the first of the two consecutive unfolding steps.

Finally, the time-dependent changes in hyperchromicity at 280 nm which result from the increase in solvent exposure of aromatic amino acids were measured. The data in Figure 8 show that the hyperchromic changes associated with the unfolding of TK were rapid and biphasic. The absorbance data were best fit by a model of two consecutive first-order reactions. The results were most consistent with a model of two consecutive first-order reactions, but with unequal rate constants, as described by Equation 3.

The rate constants obtained by the three techniques are compared in Table 2. Due to spectral interference, the effects of the presence of TMP on the changes in hyperchromicity were not tested. It appears that the physical properties measured by all these methods do undergo a significant change during the first rate-limiting step. There was good agreement between the rate constants of the first step,  $k_1$ , indicating that all three methods are measuring the same process. On the other hand, the second step observed by SYPRO Orange does not produce any changes in hyperchromicity and the second, very slow step observed by hyperchromicity does not have any changes in SYPRO Orange fluorescence associated with it.

**Table 2.** Rate Constants for Thymidylate Kinase Denaturation at 53°C

Measured by Various Methods

Method	$k_1 \times 10^3, \text{sec}^{-1}$	$k_2 \times 10^3, \text{sec}^{-1}$
Circular dichroism <sup>®</sup>	$12.0 \pm 0.04$	NA
Absorbance at 280 nm <sup>*</sup>	$17.0 \pm 0.20$	$2.90 \pm 0.09$
SYPRO Orange fluorescence <sup>#</sup>	$17.0 \pm 0.09$	$17.0 \pm 0.09$

<sup>®</sup> First-order reaction; <sup>\*</sup> Calculated using Equation 4; <sup>#</sup> Calculated using Equation 11.

### B. Stromelysin

Both the CD spectrum (Sarver et. al., *BBA*, 1434, 304-316 (1999)) and the tryptophan fluorescence (Epps et al., *J. Prot. Chem.*, 17, 699-712 (1998)) of stromelysin are affected by the binding of ligands to the active site. DSC revealed that this protein has an extremely high  $T_m$  at 75°C as shown in Figure 9. Also, DSC experiments showed an increase of as much as 15°C in the  $T_m$  for ligand-bound (Sarver et. al., *BBA*, 1434, 304-316 (1999)). Thus, the structure of stromelysin appears to lend itself to isothermal denaturation studies in that ligand binding dramatically affects the unfolding process. Even the tryptophan fluorescence should be a useful tool for monitoring the denaturation processes.

Fluorescence. The time-dependency of the denaturation of stromelysin was biphasic at 75°C as monitored using SYPRO Orange and (shown in Figure 10A). The denaturation was rapid and was inhibited in a dose-dependent manner by PNU-143988, a known thiazole-type competitive inhibitor.

The denaturation reaction in the absence of ligands was most consistent with a model of two consecutive first-order reactions with two unequal rate constants (Equation 3) followed by a linear downward drift. The linear drift most likely derives from aggregation and/or precipitation of the denatured protein. It was absent in the denaturation which occurred in the presence of inhibitors. Analysis of the data showed that the best kinetic model is the one with two consecutive first-order rate model with identical rate constants (Equation 11). The rate constants calculated from these analyses are given in Table 3.

**Table 3.** Rate Constants for Stromelysin Denaturation at 75 °C  
Measured by Various Methods.

Method	$k_1 \times 10^3, \text{sec}^{-1}$	$k_2 \times 10^3, \text{sec}^{-1}$
SYPRO Orange Fluorescence	$60.2 \pm 1.8$	$7.49 \pm 0.04$
Tryptophan Fluorescence	$67.7 \pm 1.2$	$6.77 \pm 0.12$
Absorbance	$50.2 \pm 1.8$	NA

- 5 The intrinsic tryptophan fluorescence of stromelysin is particularly sensitive to ligand-induced conformational changes, and, presumably, to denaturation of the active-site region. As shown in Figure 10B, there was a rapid, biphasic loss of the tryptophan fluorescence intensity over the time course of the isothermal denaturation at 75°C. The time-dependency of the decay of
- 10 the tryptophan fluorescence was most consistent with a model of two consecutive first-order reactions with identical rate constants (Equation 11). This model yielded rate constants that were in excellent agreement with those measured by the fluorescence increase of SYPRO Orange under the same conditions (Table 3).
- 15 Two parameters derived from the fluorescence kinetic curves measure the rate of denaturation, namely, the slope at the inflection point, and the first-order rate constant. The values of both parameters decreased in the presence of inhibitors in a saturable, dose-dependent manner, as shown in Figure 11 for the case of fluorescence measurements. The concentration dependencies were
- 20 consistent with a model where binding of the inhibitor results in a drastic decrease in the rate of denaturation. The data were analyzed in terms of a simple Langmuir binding isotherm model, yielding  $K_d = 0.28 \pm 0.02 \mu\text{M}$  from the initial rates and  $K_d = 0.35 \pm 0.13 \mu\text{M}$  from the rate constants. These values, measured at 75 °C, are quite comparable to the value of  $K_d = 0.40 \mu\text{M}$  measured
- 25 by a rate assay at 25°C.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

Absorbance. Isothermal denaturation of stromelysin in the presence and absence of PNU-143988 revealed a dose-dependent inhibition of both the rate and magnitude of the hyperchromicity changes (data not shown). The hyperchromicity reached a maximum in three minutes and declined slightly at longer periods of treatment while PNU-143988 extended in a dose-dependent manner the time needed for full reaction. The simplest model consistent with the experimental data of the uninhibited reaction was a simple first-order reaction and the best-fit rate constant was comparable to that of the first step of the two-step denaturation process measured by the other techniques (Table 3).

10

Validation of Robotic HTS Assay. Prior to validation experiments, the optimal dye and optimal ratio of dye to protein was determined in 96-well microtiter plate format for both TK and UK isothermal denaturation under the assay conditions described above. Isothermal denaturation of TK was best detected with Nano Orange at final assay concentrations of 0.4  $\mu$ M protein and 1.1  $\mu$ M dye. In the same manner, Nano Orange was utilized to obtain a sufficient window to allow detection of the isothermal denaturation of UK with final assay concentrations of 0.4  $\mu$ M protein and 0.8  $\mu$ M dye.

In order to demonstrate the validity of isothermal denaturation as a HTS robotic assay, denaturation of TK and UK was performed in the presence of a known ligand in microplate format with the assay operating robotically as described. The ligands used were TMP, in the case of TK, and uridine monophosphate (UMP), in the case of UK. The proteins were subjected to the assay's denaturing conditions either in the absence of (control) or presence of increasing ligand concentration. Using  $T_i$  and  $T_f$  fluorescence measurements, percent inhibition was calculated, as one skilled in the art would do. For thymidylate kinase, increasing concentrations of TMP decreased the denaturation of the protein, as expected based on results seen in cuvette experiments. A curve of TMP concentration versus calculated percent inhibition of control was fit with a Langmuir binding isotherm model, yielding an apparent  $K_d$  value similar to what has been seen previously when taking error

WO 01/46693

PCT/US00/42677

into account. Similarly for uridylylate kinase, the effect of UMP on the denaturation was concentration-dependent, as concentration of UMP increased, denaturation decreased. Data was analyzed in terms of a Langmuir model. Resulting calculations gave an apparent  $K_d$  value of  $5.76 \pm 0.95$  mM which was comparable to the apparent  $K_d$  value of 1 mM obtained from an activity assay carried out at 25°C.

Validation of the HTS system was furthered by the isothermal denaturation of TK and UK in the presence of a subset of compounds with an increased potential of containing protein ligands since these compounds had inhibitory activity in activity assays. This validation test was performed as described with 10  $\mu$ M final compound concentration. Using the  $T_i$  and  $T_f$  measurements, percent inhibition was calculated. True actives were determined by using three standard deviations from the mean of the assay plate controls as the active cutoff value. Results are shown in Table 4. Control experiments were also conducted. Compounds with intrinsic spectral properties including fluorescence and quench were observed in these experiments.

Table 4. Results of the HTS Validation Test.

Protein Target	Number of Compounds Tested	Number of Actives
TK	703	83
UK	703	97

20

#### C. *Staphylococcus aureus* FemA

*S. aureus* FemA (Ehlert et al., *J. Bacteriol.*, 179, 7573-7576 (1997) and Tschierske et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 153, 261-264 (1997)) is a protein presumably involved in cell wall biosynthesis and thus provides an attractive target as a potential antibacterial. The protein is expressed with a 6-his tag so that it can be purified with Qiagen  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA columns as for thymidylate kinase described above. A pH sufficiently removed from the isoelectric point (pI value)

25

WO 01/46693

PCT/US00/42677

is chosen for the buffer in which the protein is solubilized; in addition appropriate ionic strength and cations are used so that maximal structure can be obtained as monitored, e.g., in CD ellipticity studies.

Since this protein has no known biochemical function, isothermal  
5 denaturation provides an ideal way to discover compounds that bind to this protein. It is believed that this protein exhibits multi-phasic kinetics similar to those observed with thymidylate kinase and stromelysin. The  $T_m$  value is determined by differential scanning calorimetry studies. The detailed kinetic pathway of denaturation must first be determined by fluorescence, absorbance,  
10 and/or another physical method as described above. The optimal dye and optimal ratio of dye to protein is rapidly assessed in a 96-well microtiter plate format. The fluorophore used is SYPRO Red.

A library of compounds (> 100,000) are tested in a high throughput screening mode in 96-well microtiter plate format with single compounds per  
15 well at or, at most, 5°C below the  $T_m$  value. Each microtiter plate contains 88 individual compounds. Furthermore, eight control wells exist in the plate that initially contain only buffer plus dye (no compound). Prior to addition of protein, the microtiter plate containing compounds plus control wells are read ( $T_i$  read) which establishes the lower bound of the assay. This fluorescent reading for  
20 those wells containing compounds plus buffer plus dye is used to ascertain the effect of compounds themselves.

After a time at the assay temperature, e.g., 30 or 60 minutes, another fluorescent measurement is performed ( $T_f$  read). The control wells (assay buffer plus dye plus protein) define the upper bound of the assay. A comparison of the  
25 fluorescent values for those wells with compound (plus assay buffer plus dye plus protein) compared to the fluorescent values of the control wells at  $T_i$  and  $T_f$  defines which compounds bind to and stabilize the protein of interest, which in this example is *S. aureus* FemA. Only those compounds that demonstrate stabilization in a subsequent repeat experiment are pursued as potential ligand  
30 binders.



WO 01/46693

PCT/US90/42677

In addition to compounds that truly bind to femA, a compound could give enhanced fluorescence because it: 1) is a hydrophobic compound that could bind dye; 2) may have intrinsic fluorescence at the wavelengths used; 3) could form micelles; or 4) could be a denaturant, destabilizer, etc. Similarly, a  
5 compound could have binding activity but exhibit lower than expected results because the compound adsorbs light (quenches) at the wavelengths tested.

To eliminate compounds that affect dye directly, compound plus dye plus buffer at the assay temperature are read before the addition of protein. Any compounds that have intrinsic fluorescence, quench, fluorescence enhancement  
10 or fluorophore sequestration can thus be identified. To assess those compounds which enhance protein denaturation, an additional study is performed after the screen has been performed. The effect of compound on dye binding to the target molecule is performed at ambient temperature. Any compound which is a denaturant demonstrates enhanced binding of the fluorescent dye to the protein  
15 even when no thermal denaturation of the protein occurs. Compounds of this type would only be of interest if they exhibited this property for a specific protein (target) and did not affect two or more proteins (targets) in this manner.

After all these criteria are met, those compounds that are putatively true binders can then be further characterized. The first study would be to ascertain  
20 whether the compounds exhibit a reasonable dose-response. Additionally the effect of these compounds on the kinetics of protein denaturation can be studied and consequently  $K_d$  values can be determined. To determine  $K_d$  values at a given temperature, ligand dose-response curves for the full time-course kinetics are run. This process must be performed at three or more temperatures. Then,  
25 assuming Arrhenius behavior, the  $K_d$  of the compound can be obtained for any temperature.

In addition to screening of an entire library of individual compounds, compound mixtures can be tested. A subset of the entire library that contains mixtures of eight compounds per microtiter plate well are used. The assay is  
30 carried out as described above. The compounds for those mixtures that demonstrate the appropriate results are then identified and tested individually.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

In this case positive results could occur in mixtures but not for individual compounds because the results could be additive, or more likely, synergistic. Consequently, if assays with individual compounds are not active, permutations of mixtures can be tested to determine which combination gives the original  
5 screening result.

#### ***D. S. aureus Unknown Gene Product***

In addition to screening an entire compound collection, subset of a library or "sublibraries," based upon rationale criteria can be tested. The  
10 advantage of using a sublibrary(ies) is to accelerate the discovery of a useful compound from high throughput screening. In this example another protein target is utilized, *S. aureus* Unknown Gene Product. This protein is an essential gene product for this organism. A genetically engineered strain of *S. aureus* that has this function eliminated prevents bacterial growth. However, its  
15 biological/biochemical function is unknown; and although searching of genomic database identifies similar genes in other micro-organisms, they also have no known biological or biochemical function. Because the DNA sequence for this gene is known, constructs can be engineered placing a 6-his tag at either the amino- or carboxyl-terminal end of the protein and purified as described for the  
20 other 6-his tagged proteins described. Maximal structure under given experimental conditions as monitored, for example, by CD can be obtained, similar to the femA protein described above.

One specific sublibrary tested, the dissimilarity sublibrary, is generated by a dissimilarity search in which compounds are sorted on their  
25 structural/chemical properties. The most dissimilar compounds are selected but, simultaneously, they represent the diversity of the entire library. Compounds identified that stabilize this protein target in isothermal denaturation studies are tested further in their own right. In addition, compounds in the library with similarity to these ligand-binders can be selected from the entire library by using  
30 computer search programs. These are also tested. In this way the active

WO 01/46693

PCT/US00/42677

compounds could potentially be identified by screening only a limited subset of the entire compound collection.

#### E. Nucleic Acid Isothermal Denaturation

5 Oligodeoxyribonucleotides that contain the sequence of interest can be synthesized or purchased commercially and assembled into duplex DNA in the proper order. The assembled DNA can then be inserted into an expression system (e. g. MEGAScript from Ambion) to generate an RNA of interest. Alternatively, if the RNA of interest is sufficiently small, the oligos can be  
10 constructed to contain an appropriate promoter such that *in vitro* transcription can be done without any cloning and expression steps. Isolation of RNA can be obtained by protocols known to anyone skilled in molecular biologic arts.

As for proteinaceous targets, a  $T_m$  can be determined experimentally with DSC. Examples of extrinsic fluorescent dyes that can be used to monitor  
15 the transition from an ordered to a disordered RNA structure include SYBR Green, SYBR GreenII, Pico-Green, and TOPRO, YOYO, etc. Examples of RNA molecules that can be used to demonstrate this approach include: 1) HIV-1 tar 47-86 (Mei et al., Biochemistry, 37, 14204-14212 (1998)); 2) RNA aptamer J6f1 (Cho et al., Biochemistry, 37, 4985-4992 (1998)); and 3) A-site of 16s  
20 rRNA (Wong et al., Chemistry and Biology, 5, 397-406 (1998)). Ligands known to bind to these respective RNA molecules are: 1) Neomycin, other aminoglycoside antibiotics, and other compounds (Mei et al., Biochemistry, 37, 14204-14212 (1998)); 2) tobramycin ((Cho et al., Biochemistry, 37, 4985-4992 (1998)); and 3) Kanamycin and other aminoglycosides (Wong et al., Chemistry  
25 and Biology, 5, 397-406 (1998)).

Just as known ligands for proteinaceous targets stabilize their structures under isothermal conditions, these known ligands stabilize their cognate RNA molecules under similar conditions. Similarly, as for protein targets, a large collection of compounds can be tested in high throughput screening to  
30 determine whether any might bind to, and stabilize, these nucleic acid structures

WO 01/46693

PCT/US00/42677

under isothermal denaturation conditions. These compounds can be tested  
singly or as combinations of several compounds. In addition to monitoring  
isothermal denaturation with these fluorescent dyes, one skilled in the art could  
also monitor these changes using UV hyperchromicity or capillary  
5 electrophoresis.

It will be clear that the invention may be practiced otherwise than as  
particularly described in the foregoing description and examples. Numerous  
modifications and variations of the present invention are possible in light of the  
10 above teachings and, therefore, are within the scope of the invention. The entire  
disclosure of all publications, patents, and patent applications cited herein are  
hereby incorporated by reference.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

**What Is Claimed Is:**

1. A high throughput screening method for identifying a test compound that binds to a target species, the method comprising:  
incubating a plurality of test mixtures under isothermal denaturing  
5 conditions, each test mixture comprising at least one test compound, and at least one target species, wherein the isothermal denaturing conditions are effective to cause at least a portion of the target species to denature to a measurable extent;  
detecting a denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound; and  
10 comparing the denaturation signal of each target species in the presence of at least one test compound with a denaturation signal of the same target species in the absence of the at least one test compound under the same isothermal denaturing conditions.
- 15 2. The method of claim 1 wherein the target species is a polypeptide or polynucleotide.
3. The method of claim 2 wherein the target species is a protein.
- 20 4. The method of claim 1 wherein the compound binds specifically to the target species.
5. The method of claim 1 wherein the compound binds to the target species through covalent, hydrophobic, ionic, or hydrogen bonding interactions.
- 25 6. The method of claim 1 wherein detecting the denaturation signal comprises detecting a fluorescence signal, a change in UV absorbance, a change in molar ellipticity, a spectral shift in an infra-red spectrum, a spectral shift in an NMR spectrum, or a change in mobility on a support material.
- 30

WO 01/46693

PCT/US00/42677

7. The method of claim 6 wherein detecting the denaturation signal comprises detecting a fluorescence signal.
8. The method of claim 1 wherein the isothermal denaturation conditions  
5 comprise a temperature equal to or about 10°C more or less than the  $T_m$  value of the target species as determined by DSC.
9. The method of claim 8 wherein the isothermal denaturation conditions  
comprise a temperature equal to or up to about 10°C less than the  $T_m$  value  
10 of the target species as determined by DSC.
10. The method of claim 1 further comprising incubating at least one test  
compound, at least one target species, and at least one reporter molecule  
under isothermal denaturing conditions.
- 15 11. The method of claim 1 wherein the concentrations of the test compound and  
the reporter molecule are of comparable magnitude.
12. The method of claim 11 wherein the concentration of the test compound is  
20 in at least a 10-fold excess relative to the concentration of the target species.
13. The method of claim 10 wherein the reporter molecule is a fluorescent  
reporter molecule.
- 25 14. The method of claim 1 wherein each test mixture includes one target  
species.
15. The method of claim 1 wherein each test mixture includes at least two test  
compounds.
- 30

WO 01/46693

PCT/US00/42677

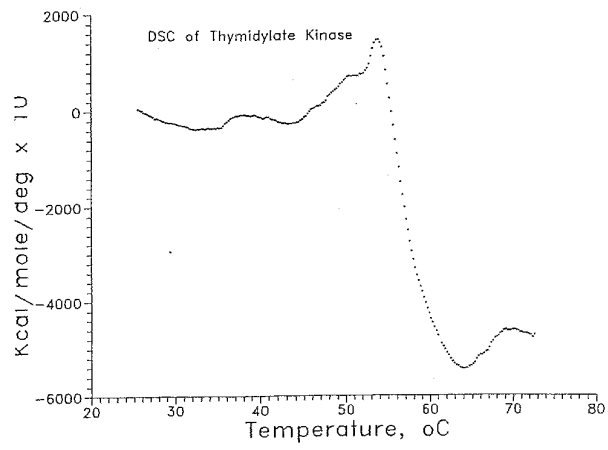
16. The method of claim 15 wherein each test mixture includes two to ten test compounds.
17. A high throughput screening method for identifying a test compound that  
5 binds to a protein, the method comprising:  
incubating a plurality of test mixtures under isothermal denaturing conditions, each test mixture comprising at least one test compound, at least one reporter molecule, and at least one protein, wherein the isothermal denaturing conditions are effective to cause at least a portion of the target species to  
10 denature to a measurable extent;  
detecting a denaturation signal of each protein in the presence of the at least one test compound; and  
comparing the denaturation signal of each protein in the presence of at least one test compound with a denaturation signal of the same protein in the  
15 absence of the at least one test compound under the same isothermal denaturing conditions.
18. The method of claim 17 wherein the reporter molecule is a fluorescent reporter molecule.
- 20
19. The method of claim 1 wherein each test mixture includes one target species.
20. The method of claim 1 wherein each test mixture includes at least two test  
25 compounds.

WO 01/46693

PCT/US00/42677

1 / 11

Figure 1



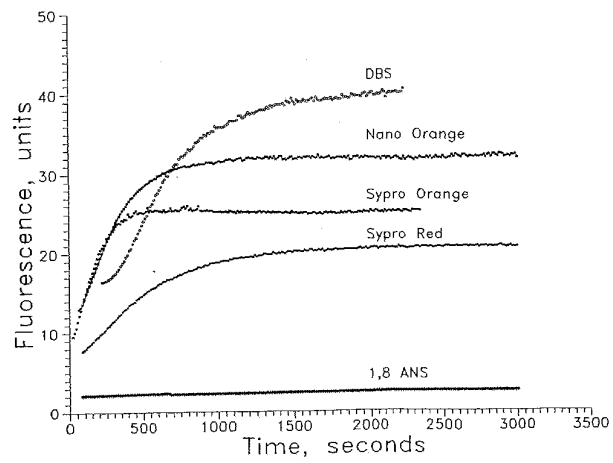


WO 01/46693

PCT/US00/42677

2 / 11

Figure 2

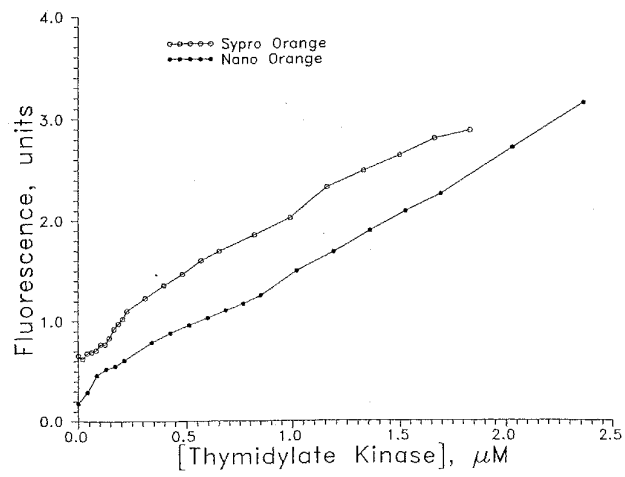


WO 01/46693

PCT/US00/42677

3 / 11

Figure 3

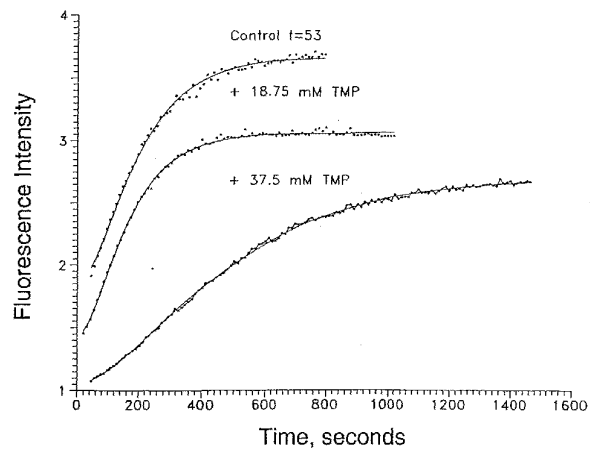


WO 01/46693

PCT/US00/42677

4 / 11

Figure 4

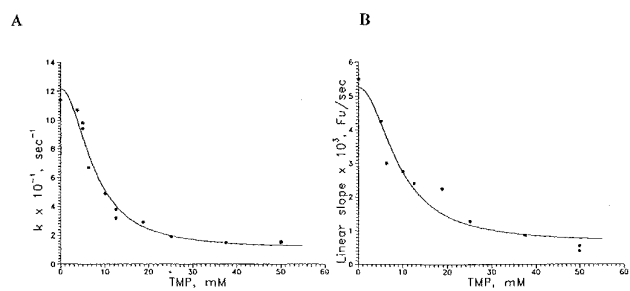


WO 01/46693

PCT/US00/42677

5 / 11

Figure 5

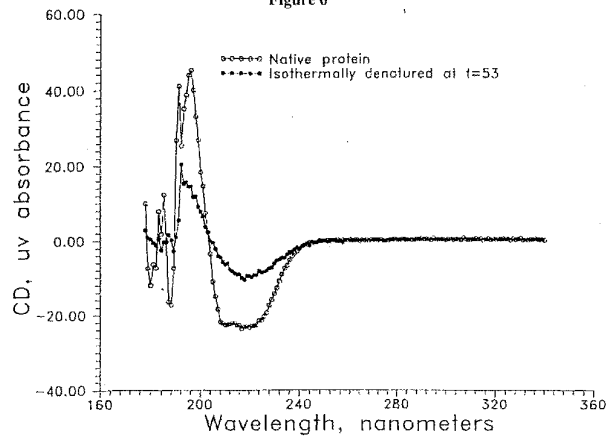


WO 01/46693

PCT/US00/42677

6 / 11

Figure 6

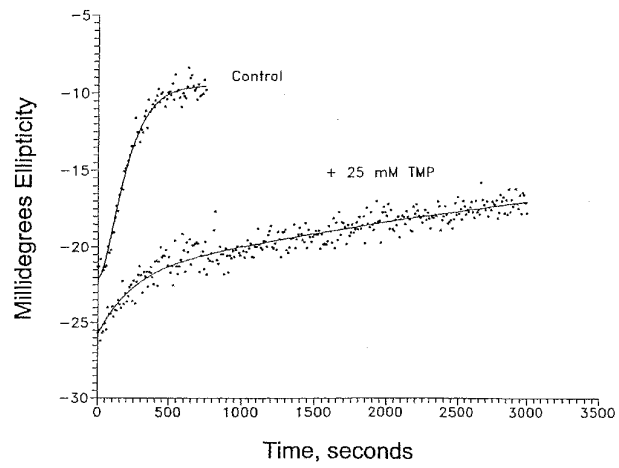


WO 01/46693

PCT/US00/42677

7 / 11

Figure 7

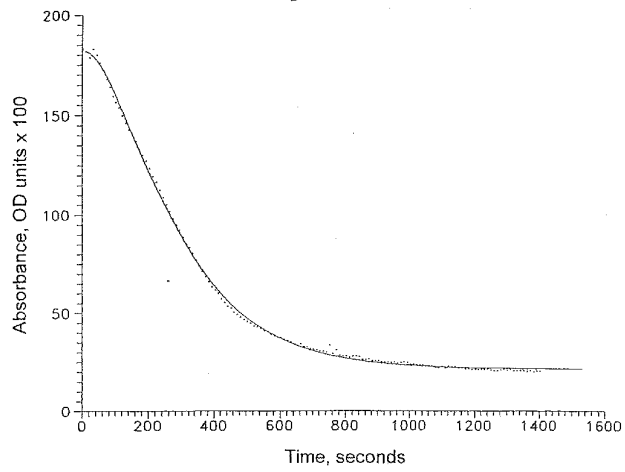


WO 01/46693

PCT/US00/42677

8 / 11

Figure 8

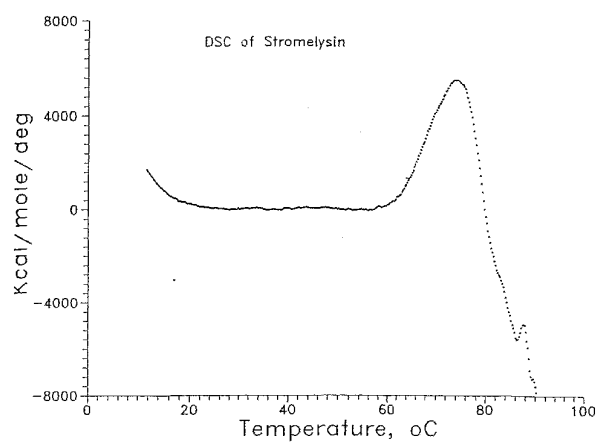


WO 01/46693

PCT/US00/42677

9 / 11

Figure 9



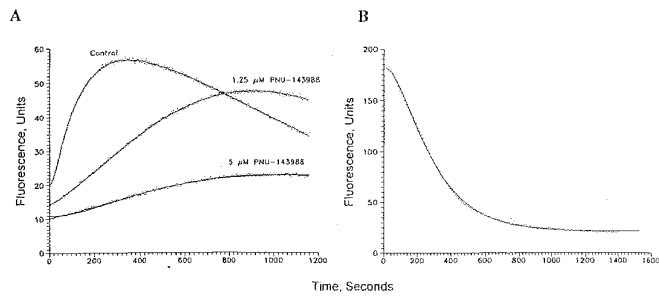


WO 01/46693

PCT/US00/42677

10 / 11

Figure 10

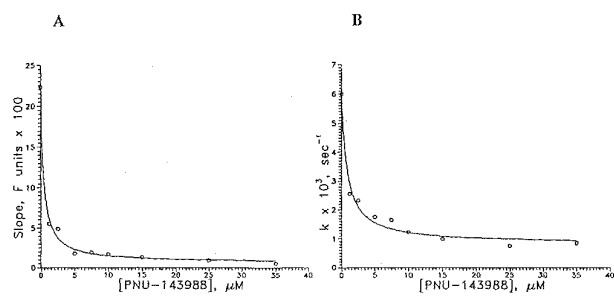


WO 01/46693

PCT/US00/42677

11 / 11

Figure 11



## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
28 June 2001 (28.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/046693 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/68,  
C12Q 1/68(74) Agent: MUETING, Anna, M.; Mueeting, Rausch & Geb-  
hardt, P.A., P.O. Box 581415, Minneapolis, MN 55458-  
1415 (US).

(21) International Application Number: PCT/US00/42677

(22) International Filing Date: 7 December 2000 (07.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/458,171 9 December 1999 (09.12.1999) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PHAR-  
MACIA & UJOHN COMPANY [US/US]; 301 Henri-  
etta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, FB, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian  
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published:

— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments(88) Date of publication of the international search report:  
12 September 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/046693 A3

(54) Title: SCREENING UNDER ISOTHERMAL DENATURING CONDITIONS

(57) Abstract: A high throughput screening method for identifying a compound that binds to a target species. The method includes: incubating a plurality of test mixtures under isothermal denaturing conditions, each test mixture including at least one test compound and at least one target species, wherein the isothermal denaturing conditions are effective to cause at least a portion of the target species to denature to a measurable extent. The method further involves detecting a denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound; and comparing the denaturation signal of each target species in the presence of the at least one test compound with a denaturation signal of the same target species in the absence of the at least one test compound under the same isothermal denaturing conditions.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/42677
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 770 876 A (SCRIPTGEN PHARMACEUTICALS, INC.) 2 May 1997 (1997-05-02) the whole document	1-20
Y	B. IBARRA-MOLERO ET AL.: "Thermal versus guanidine-induced unfolding of ubiquitin. An analysis in terms of the contributions from charge-charge interactions to protein stability" BIOCHEMISTRY, vol. 38, no. 25, 1999, pages 8138-8149, XP002181799 EASTON, PA US the whole document	1-20
Y	US 5 679 582 A (J. U. BOWIE ET AL.) 21 October 1997 (1997-10-21) the whole document	1-20
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (to be specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 July 2003		Date of mailing of the international search report 24/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 KJ Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griffith, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/42677

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 20952 A (SCRIPTGEN PHARMACEUTICALS, INC.) 12 June 1997 (1997-06-12) the whole document -----	1-20
A	WO 99 29894 A (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY) 17 June 1999 (1999-06-17) the whole document -----	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/42677

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0770876	A	02-05-1997	AT 200579 T
			15-04-2001
			AU 698862 B2
			12-11-1998
			AU 6429896 A
			01-05-1997
			BR 9604352 A
			16-06-1998
			CA 2184195 A1
			26-04-1997
			DE 69612457 D1
			17-05-2001
			DE 69612457 T2
			08-11-2001
			DE 770876 T1
			22-07-1999
			DK 770876 T3
			06-08-2001
			EP 0770876 A1
			02-05-1997
US 5679582	A	21-10-1997	ES 2158269 T3
			01-09-2001
			GR 3036138 T3
			28-09-2001
			IL 119149 A
			10-03-2002
			JP 2952848 B2
			27-09-1999
			JP 9178746 A
			11-07-1997
WO 9720952	A	12-06-1997	KR 161256 B1
			30-03-1999
			PT 770876 T
			28-09-2001
			US 2002055123 A1
WO 9929894	A	17-06-1999	09-05-2002
			US 5585277 A
			17-12-1996
			CA 2236339 A1
			12-06-1997
WO 9720952	A	12-06-1997	DE 865502 T1
			19-08-1999
			EP 0865502 A1
			23-09-1998
			JP 2000502440 T
			29-02-2000
			WO 9720952 A1
			12-06-1997
			AT 233325 T
			15-03-2003
			AU 738194 B2
			13-09-2001
			AU 1703499 A
			28-06-1999
			CA 2306686 A1
			17-06-1999
WO 9929894	A	17-06-1999	DE 69811724 D1
			03-04-2003
			DK 1036192 T3
			10-06-2003
			EP 1036192 A1
			20-09-2000
			JP 2001526380 T
			18-12-2001
			WO 9929894 A1
			17-06-1999
US 6203994	B1	20-03-2001	US 6203994 B1
			20-03-2001
			US 2001044117 A1
			22-11-2001

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/483	C
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 R 33/465	G 0 1 N 37/00	1 0 3
	G 0 1 N 24/08	5 1 0 Q

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 トミク, ポール ケー.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 0 0 8, カラマズー, ブラックベリー レーン 3 7 0 3

(72)発明者 エップス, デニス イー.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 0 0 2, ポーテージ, ポイント'オー'ウッズ ドライブ 2 4 0

(72)発明者 ケズディー, フェレンク ジェイ.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 0 0 8, カラマズー, ロビン レーン 3 8 0 5

(72)発明者 マーシュク, チャールズ ケー.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 0 0 1, カラマズー サウス バーディック ストリート 2 8 3 5, アpartment ビー

(72)発明者 サーバー, ロナルド ダブリュ.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 0 7 9, ポー ポー, ブラディーン アベニュー 3 2 8 5 3

F ターム(参考) 2G045 BB50 DA13 DA36 FB02 GC10 GC15

2G054 CA23 EA03 EA04 EA10

4B063 QA18 QQ98 QR32 QR35 QR56 QR66 QS22 QS24 QS28 QS36

QX02