

(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2004-511237

(P2004-511237A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 128 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-534565 (P2002-534565)	(71) 出願人	398051143
(86) (22) 出願日	平成13年10月9日 (2001.10.9)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月11日 (2003.4.11)		ティ オブ カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/031745		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(87) 国際公開番号	W02002/031201		07-5200, オークランド, 12ティ
(87) 国際公開日	平成14年4月18日 (2002.4.18)		ーエイチ フロア, フランクリン ストリ
(31) 優先権主張番号	09/687,593		ート 1111
(32) 優先日	平成12年10月13日 (2000.10.13)	(74) 代理人	100064355
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川原田 一穂
		(72) 発明者	鉄 治
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
			115 サン フランシスコ ギアリー
			ブルバード ナンバー405 2550
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 代謝生成物の蓄積のモジュレーターについてスクリーニングするための哺乳動物2-ハイブリッドシステム

(57) 【要約】

本発明は、代謝生成物を分解及び/又は蓄積するための細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーニングするための、或いは細胞を選択的に殺すための、又は代謝生成物を蓄積及び/又は分解する能力の欠陥を有する細胞内で遺伝子若しくはcDNAを選択的に発現するために2-ハイブリッドシステムを利用する。1つの具体例では、ペプチド結合ドメイン及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；代謝生成物又は代謝生成物に結合するリガンドに対して結合するペプチド結合領域に結合する核酸結合領域を含む第一キメラタンパク質；並びに、第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質を含む哺乳動物細胞を提供する。細胞は1種又はそれ以上の試験試薬と接触し、そしてエフェクター遺伝子の発現の変化が（存在する場合）検出される、ここで、試験試薬に応答したエフェクター遺伝子の発現の変化は、試験試薬が前記細胞の能力をモジュレートし代謝生成物を蓄積又は分解することを示す。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーニングする方法であって：

i) ペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；

前記代謝生成物又は前記代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記ペプチド結合サイトを結合させる核酸結合ドメインを含む第一キメラタンパク質；

第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質；

10

を含む哺乳動物細胞を提供し、

i i) 試験試薬と前記細胞を接触させ；そして

i i i) 前記エフェクター遺伝子の発現の変化を検出する、ここで前記試験細胞中の前記エフェクターの発現における差異は、低濃度の試験試薬と接触し若しくは試験試薬と接触しないコントロール細胞との比較で、前記試験細胞が前記代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力をモジュレートすることを示す、

ことを含む該方法。

【請求項 2】

前記発現コントロールタンパク質がトランスアクティベーターである請求項 1 の方法。

20

【請求項 3】

前記トランスアクティベーターが V P 1 6 である請求項 2 の方法。

【請求項 4】

前記発現コントロールタンパク質がリプレッサーである請求項 1 の方法。

【請求項 5】

前記核酸結合タンパク質が G A L - 4 及び G A L - 4 - Y からなる群より選択される請求項 1 の方法。

【請求項 6】

前記エフェクターがレポーター遺伝子、細胞毒及びアポトーシス遺伝子からなる群より選択される請求項 1 の方法。

30

【請求項 7】

前記レポーター遺伝子が、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)、ルシフェラーゼ、b - ガラクトシダーゼ (b - g a l)、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (H R P)、成長ホルモン (G H)、緑蛍光タンパク質 (G F P) からなる群より選択される請求項 1 の方法。

【請求項 8】

前記エフェクターが、チミジンキナーゼ、シュードモナスエキソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリンからなる群より選択される細胞毒を符号化する請求項 1 の方法。

【請求項 9】

前記アポトーシス遺伝子が、P 5 3、P 7 3、B a x、B a d、F A D D、カスパーゼ (c a s p a s e) からなる群より選択される請求項 1 の方法。

40

【請求項 10】

前記リガンド及び代謝生成物が、ベータカテニン及び T c f、N F - B 及び I - B、P 5 3 及び M D M 2、レセプター及びそのヘテロメリックレセプターパートナーからそれぞれ選択される請求項 1 の方法。

【請求項 11】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内の核酸から発現される請求項 1 の方法。

【請求項 12】

前記第二キメラタンパク質が前記細胞内の核酸から発現される請求項 1 の方法。

【請求項 13】

50

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内に輸送されるタンパク質である請求項1の方法。

【請求項14】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内に輸送されるタンパク質である請求項1の方法。

【請求項15】

前記第一キメラタンパク質又は前記第二キメラタンパク質がHIV TATドメインを含む請求項1の方法。

【請求項16】

前記細胞がSW480、SW48、DLD-1、HCT-116、HT29、293、U-20S、T-47D、MCF-7、Hela、A549、Hep G2及びJarkat細胞から選択される細胞である請求項1の方法。

10

【請求項17】

前記核酸がGAL-4結合サイトを符号化し、そして前記エフェクター遺伝子がレポーター遺伝子であり；

前記第一キメラタンパク質がGAL-4核酸結合タンパク質及びベータカテニン又はTcfを含み；

前記第二キメラタンパク質がVP-16及びベータカテニン又はTcfを含む、請求項1の方法。

【請求項18】

前記TcfがTcf4である請求項17の方法。

【請求項19】

20

前記細胞が、組織特異的又は誘導可能なプロモーターのコントロール下で第一又は第二キメラタンパク質を符号化する核酸を含む請求項1の方法。

【請求項20】

前記プロモーターがエクジソンプロモーターである請求項19の方法。

【請求項21】

前記細胞が、さらに誘導可能なプロモーターと操作可能に連結する前記リガンド又は代謝生成物を符号化する第二核酸を含む請求項1の方法。

【請求項22】

代謝生成物を蓄積又は分解する細胞中でエフェクター遺伝子を選択的に発現させる方法であって；

30

ペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；

核酸結合タンパク質が前記代謝生成物又は前記代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記ペプチド結合サイトを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質；
第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質；

を含む細胞を提供し、それにより前記細胞が前記代謝生成物又は前記代謝生成物を結合させるリガンドを分解する能力の不存在下で、前記エフェクター遺伝子の発現を活性化又は抑制する該方法。

40

【請求項23】

前記発現コントロールタンパク質がトランスアクティベーターである請求項22の方法。

【請求項24】

前記トランスアクティベーターがVP16である請求項23の方法。

【請求項25】

前記発現コントロールタンパク質がリプレッサーである請求項22の方法。

【請求項26】

前記核酸結合タンパク質がGAL-4及びGAL-4-Yからなる群より選択される請求項22の方法。

【請求項27】

50

前記エフェクターがレポーター遺伝子、細胞毒及びアポトーシス誘導遺伝子からなる群より選択される請求項 22 の方法。

【請求項 28】

前記レポーター遺伝子が、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、b - ガラクトシダーゼ (b - gal)、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、成長ホルモン (GH)、緑蛍光タンパク質 (GFP) からなる群より選択される請求項 27 の方法。

【請求項 29】

前記エフェクターが、チミジンキナーゼ、シュードモナスエキソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリンからなる群より選択される細胞毒を符号化する請求項 27 の方法。 10

【請求項 30】

前記アポトーシス遺伝子が、P53、P73、Bax、Bad、FADD、カスパーゼからなる群より選択される請求項 27 の方法。

【請求項 31】

前記リガンド及び代謝生成物が、ベータカテニン及びTcf、NF - B及びI - B、P53及びMDM2、レセプター及びそのヘテロメリックレセプターパートナーからそれぞれ選択される請求項 22 の方法。

【請求項 32】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内の核酸から発現される請求項 22 の方法。

【請求項 33】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内の核酸から発現される請求項 22 の方法。 20

【請求項 34】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内に輸送されるタンパク質である請求項 22 の方法。

【請求項 35】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内に輸送されるタンパク質である請求項 22 の方法。

【請求項 36】

前記第一キメラタンパク質又は前記第二キメラタンパク質が、HIV TATドメインを含む請求項 22 の方法。 30

【請求項 37】

前記核酸がGAL - 4結合サイトを符号化し、そして前記エフェクター遺伝子がレポーター遺伝子であり；

前記第一キメラタンパク質がGAL - 4核酸結合タンパク質及びベータカテニン又はTcfを含み；

前記第二キメラタンパク質がVP - 16及びベータカテニン又はTcfを含む、請求項 22 の方法。

【請求項 38】

前記TcfがTcf4である請求項 37 の方法。

【請求項 39】

前記試験試薬が小有機分子である請求項 1 の方法。 40

【請求項 40】

代謝生成物を蓄積する細胞を選択的に殺す方法であって：

ペプチド結合サイトを符号化する核酸及び細胞毒若しくはアポトーシス誘導遺伝子であるエフェクターを用いて前記細胞をトランスフェクトし；

核酸結合タンパク質が前記代謝生成物又は前記代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記ペプチド結合サイトを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質を細胞内に導入し；そして

第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を 50

含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合するトランスアクティベーターを含む第二キメラタンパク質を前記細胞中へ導入する、ことを含む該方法。

【請求項 4 1】

前記トランスアクティベーターが V P 1 6 である請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 2】

前記核酸結合タンパク質が G A L - 4 及び G A L - 4 - Y からなる群より選択される請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 3】

前記エフェクターが細胞毒である請求項 4 0 の方法。

10

【請求項 4 4】

前記エフェクターが、チミジンキナーゼ、シュードモナスエキソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリンからなる群より選択される細胞毒である請求項 4 3 の方法。

【請求項 4 5】

前記エフェクターがアポトーシス誘導遺伝子である請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 6】

前記アポトーシス誘導遺伝子が、P 5 3、P 7 3、B a x、B a d、F A D D、カスパーゼからなる群より選択される請求項 4 5 の方法。

【請求項 4 7】

前記リガンド及び代謝生成物が、ベータカテニン及び T c f、N F - B 及び I - B、P 5 3 及び M D M 2、レセプター及びそのヘテロメリックレセプターパートナーからそれぞれ選択される請求項 4 0 の方法。

20

【請求項 4 8】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内の核酸から発現される請求項 4 0 の方法。

【請求項 4 9】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内の核酸から発現される請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 0】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内に輸送されるタンパク質である請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 1】

前記第一キメラタンパク質が前記細胞内に輸送されるタンパク質である請求項 4 0 の方法。

30

【請求項 5 2】

前記第一キメラタンパク質又は前記第二キメラタンパク質が H I V T A T ドメインを含む請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 3】

前記細胞が S W 4 8 0、S W 4 8、D L D - 1、H C T - 1 1 6、H T 2 9、2 9 3、U - 2 0 S、T - 4 7 D、M C F - 7、H e L a、A 5 4 9、H e p G 2 及び J a r k a t 細胞から選択される細胞である請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 4】

前記細胞が癌細胞である請求項 4 0 の方法。

40

【請求項 5 5】

前記核酸が G A L - 4 結合サイトを符号化し；

前記第一キメラタンパク質が G A L - 4 核酸結合タンパク質及びベータカテニン又は T c f を含む；

前記第二キメラタンパク質が V P - 1 6 及びベータカテニン又は T c f を含む、請求項 4 0 の方法。

【請求項 5 6】

前記 T c f が T c f 4 である請求項 5 5 の方法。

【請求項 5 7】

50

前記癌細胞が、結腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、咽喉癌、皮膚癌及び卵巣癌からなる群より選択される癌からの細胞である請求項 54 の方法。

【請求項 58】

請求項 40 ~ 55 のいずれか 1 項の方法を含む癌の治療方法。

【請求項 59】

前記癌が、結腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、咽喉癌、皮膚癌及び卵巣癌からなる群より選択される請求項 62 の方法。

【請求項 60】

ペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；

核酸結合タンパク質が前記代謝生成物又は前記代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記ペプチド結合サイトを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質；及び

第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質；を含む細胞。

10

【請求項 61】

前記発現コントロールタンパク質がトランスアクティベーターである請求項 60 の細胞。

【請求項 62】

前記トランスアクティベーターが VP16 である請求項 60 の細胞。

20

【請求項 63】

前記発現コントロールタンパク質がリプレッサーである請求項 60 の細胞。

【請求項 64】

前記核酸結合タンパク質が GAL-4 及び GAL-4-Y からなる群より選択される請求項 60 の細胞。

【請求項 65】

前記エフェクターがレポーター遺伝子、細胞毒及びアポトーシス誘導遺伝子からなる群より選択される請求項 60 の細胞。

【請求項 66】

前記レポーター遺伝子が、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、ルシフェラーゼ、b-ガラクトシダーゼ (b-gal)、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、成長ホルモン (GH)、緑蛍光タンパク質 (GFP) からなる群より選択される請求項 60 の細胞。

30

【請求項 67】

前記エフェクターが、チミジンキナーゼ、シュードモナスエキソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリンからなる群より選択される細胞毒を符号化する請求項 60 の細胞。

【請求項 68】

前記アポトーシス誘導遺伝子が、P53、P73、Bax、Bad、FADD、カスパーゼからなる群より選択される請求項 60 の細胞。

40

【請求項 69】

前記リガンド及び代謝生成物が、ベータカテニン及び Tcf、NF- κ B 及び I- κ B、P53 及び MDM2、レセプター及びそのヘテロメリックレセプターパートナーからそれぞれ選択される請求項 60 の細胞。

【請求項 70】

前記細胞が前記第一キメラタンパク質を符号化する核酸を含む請求項 60 の細胞。

【請求項 71】

前記細胞が前記第二キメラタンパク質を符号化する核酸を含む請求項 60 の細胞。

【請求項 72】

前記細胞が SW480、SW48、DLD-1、HCT-116、HT29、293、U

50

- 20S、T-47D、MCF-7、Hela、A549、Hep G2 及び Jarkat 細胞から選択される細胞である請求項 60 の細胞。

【請求項 73】

前記核酸が GAL-4 結合サイトを符号化し、そして前記エフェクター遺伝子がレポーター遺伝子であり；

前記第一キメラタンパク質が GAL-4 核酸結合タンパク質及びベータカテニン又は Tcf を含み；

前記第二キメラタンパク質が VP-16 及びベータカテニン又は Tcf を含む、請求項 60 の細胞。

【請求項 74】

前記 Tcf が Tcf4 である請求項 73 の細胞。

【請求項 75】

前記細胞が、さらに誘導可能なプロモーターと操作可能に連結する前記リガンド又は代謝生成物を符号化する第二核酸を含む請求項 60 の細胞。

【請求項 76】

Tcf4 又はベータカテニンに結合する核酸結合ドメインを含むキメラタンパク質を符号化する核酸、及びベータカテニン又は Tcf4 に対して結合するトランスアクティベーターを符号化する核酸、からなる群より選択される核酸を含む核酸。

【請求項 77】

前記核酸が、Tcf4 に対して結合する核酸結合ドメインを符号化する核酸を含む請求項 76 の核酸。 20

【請求項 78】

前記核酸が、ベータカテニンに対して結合する核酸結合ドメインを符号化する核酸を含む請求項 76 の核酸。

【請求項 79】

前記核酸がトランスアクティベーターに結合する Tcf4 を符号化する核酸を含む請求項 76 の核酸。

【請求項 80】

前記核酸がトランスアクティベーターに結合するベータカテニンを符号化する核酸を含む請求項 76 の核酸。 30

【請求項 81】

前記核酸が DNA である請求項 76 の核酸。

【請求項 82】

前記核酸がベクターである請求項 76 の核酸。

【請求項 83】

ペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；

核酸結合タンパク質が、前記代謝生成物又は前記代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記ペプチド結合サイトを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質を符号化する核酸；及び

第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質を符号化する核酸；
を含むベクター。 40

【請求項 84】

前記第一キメラタンパク質を符号化する核酸が、さらに前記第一キメラタンパク質に結合する HIV-TAT ドメインを符号化する請求項 83 のベクター。

【請求項 85】

前記第二キメラタンパク質を符号化する核酸が、さらに前記第二キメラタンパク質に結合する HIV-TAT ドメインを符号化する請求項 83 のベクター。 50

【請求項 86】

前記代謝生成物又は代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質を符号化する核酸。

【請求項 87】

前記核酸が、さらに前記第一キメラタンパク質に結合する HIV TAT ドメインを符号化する請求項 86 の核酸。

【請求項 88】

前記代謝生成物又は代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質を符号化する核酸。

【請求項 89】

前記核酸が、さらに前記第一キメラタンパク質に結合する HIV TAT ドメインを符号化する請求項 88 の核酸。

【請求項 90】

代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーニングするためのキットであって：

タンパク質結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；

前記代謝生成物及び代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記タンパク質結合サイトを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質；

前記第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に前記第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質；

を含む哺乳動物細胞

を含むコンテナを含む該キット。

【請求項 91】

代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーニングするためのキットであって、請求項 76 の核酸を含むコンテナを含む該キット。

【請求項 92】

細胞を選択的に殺すためのキットであって、

請求項 76 の核酸、及び請求項 76 の核酸により符号化されるタンパク質からなる群より選択される 2 - ハイブリッドシステム成分を含むコンテナを含む該キット。

【請求項 93】

代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力をモジュレートする化合物であって、請求項 1 の方法により同定される該化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、全ての目的について本明細書中に完全に参照として援用される、2000年10月13日出願のUS N 09/687, 593 に対し優先権及び利益を主張する。

【0002】

連邦政府主催研究の下でなされた本発明に対する権利の声明（適用なし）

【0003】

発明の分野

本発明は分子生物学及び腫瘍学の分野に関する。特に本発明は、代謝生成物を分解する細胞（例えば所定の癌細胞）の能力をモジュレートする試薬についてスクリーンし又は代謝生成物を分解するその能力の欠陥を有する細胞を選択的に殺すための新規な 2 - ハイブリッドシステム（two-hybrid system）を提供する。

【0004】

発明の背景

種々の疾患が、1種又はそれ以上の代謝生成物の異常な蓄積により特徴付けられる。しば

10

20

30

40

50

しば“貯蔵疾患 (storage disease)”と呼ばれるこのような疾患は、代謝生成物を分解する酵素の不活性化又は該生成物を生成する酵素の過度の活性化のために代謝生成物の増加する蓄積により典型的に引き起こされる。貯蔵疾患は、限定するものではないがグリコゲン貯蔵疾患 I、GM1 ガングリオシドーズ (gangliosidoses)、MPS IV B (Morquio B)、GM2 ガングリオシドーズ (O, B, AB, B1 変異体)、ニーマンピック病 (A、B 及び C)、異染性脳白質変性症 (アリアルサルファターゼ A 及び SAP-1 欠乏)、クラッペ病、ファブリ病、ゴーシェ病、ファーバー病、ウォルマン病 (コレステロールエステル蓄積症)、MPS I (Hurler 及び Scheie 症候群)、MPS II (ハンター症候群)、MPS III A、C 及び D (Sanfilippo A, C 及び D)、PS III B (Sanfilippo B)、MPS IV A (Morquio A)、MPS VI (Maroteaux-Lamy 症候群)、MPS VII (ベータ-グルコロニダーゼ欠乏)、多発性スルファターゼ欠乏 (multiple sulfatase deficiency)、ミュークリピドーシス (Mucopolipidosis) I (Sialidosis)、ミュークリピドーシス (Mucopolipidosis) II & III、アルファ-マンノーシドーシス、ベータ-マンノーシドーシス、フコーシドーシス、シアル酸貯蔵疾患、ガラクトシアリドーシス、及びアスパルチルグルコサミン尿症シスチノーシスを含む。

10

【0005】

歴史的には、貯蔵疾患は“不足している”酵素活性を補うことにより治療されてきた。それゆえ、例えばゴーシェ病は脾臓細胞にターゲットされたグルコセレブロシダーゼの使用により治療できる。同様に、ジスムターゼ超過酸化物は、抗酸化剤として肝臓などに対してターゲットされることができる。

20

【0006】

このような試みは典型的には限られた成功を表す。しばしば、この“治療試薬”は特定の臓器又は組織に対して特定のターゲットされなければならない。さらにターゲットされた治療試薬の生理学的関連濃度における一貫したデリバリーは困難であることが証明されている。さらに、生存能力のある治療試薬の特定は困難であることが証明されている。

【0007】

発明の要約

本発明は、1種又はそれ以上の所望でない代謝物の蓄積により特徴付けられる病理学的な状態の治療 (例えば1種又はそれ以上の症状の改善) に対する新規なアプローチを提供する。さらに本発明は、代謝生成物を蓄積及び/又は分解するための細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーンする効果的なシステムを提供する。

30

【0008】

好ましい具体例において、本発明は、代謝生成物を分解及び/又は蓄積するための細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーンするための、或いは細胞を選択的に殺すための、又は代謝生成物を蓄積及び/又は分解する能力の欠陥を有する細胞内で遺伝子若しくは cDNA を選択的に発現するための 2 - ハイブリッドシステムを利用する。あるそのような具体例において、本発明は、代謝生成物を蓄積又は分解するための細胞の能力をモジュレートする試薬についてのスクリーニングの方法を提供する。本方法は、ペプチド結合ドメイン及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；代謝生成物又は代謝生成物に結合するリガンドに対して結合するペプチド結合領域に結合する核酸結合領域を含む第一キメラタンパク質；並びに、第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質、を含む哺乳動物細胞を提供することを含む。細胞は1種又はそれ以上の試験試薬と接触させ、そしてエフェクター遺伝子の発現の変化が検出される、ここで低濃度の試験試薬と接触し又は試験試薬とは接触しないコントロール細胞と比較して、試験細胞中のエフェクター遺伝子の発現の差異は、試験試薬が前記細胞の能力をモジュレートし代謝生成物を蓄積又は分解

40

50

することを示す。

【0009】

特に好適な具体例において、発現コントロールタンパク質は、トランスアクティベーター（例えばVP16）又はリプレッサーである。特に好ましい核酸結合タンパク質は、限定するものではないがGAL-4及びGAL-4-Yを含む。所定の具体例において、好ましいエフェクターは、限定するものではないがレポーター遺伝子（例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ルシフェラーゼ、b-ガラクトシダーゼ（b-gal）、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、成長ホルモン（GH）、緑蛍光タンパク質（GFP）等）、細胞毒（例えばチミジンキナーゼ、シュドモナスエキソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリン等）及び/又はアポトーシス誘導（例えばP53、P73、Bax、Bad、FADD、カスパーゼ（caspase）遺伝子等）を含む。種々の具体例において、リガンド及び代謝生成物はそれぞれ、限定するものではないが、ベータカテニン及びTcf、NF-B及びI-B、P53及びMDM2、レセプター及びそのヘテロメリックレセプターパートナーを含む。

10

【0010】

第一及び/又は第二キメラタンパク質は、（例えば誘導可能な（例えばエクジソンプロモーター）、細胞特異的な又は構成性プロモーターのコントロール下で）細胞中の核酸から発現され、或いは第一及び/又は第二キメラタンパク質は、例えばHIV-TATドメインを含むタンパク質を使用することにより、細胞内に輸送されるタンパク質である。

20

【0011】

本発明の方法を行うために好適な細胞は、限定するものではないが、SW480、SW48、DLDD-1、HCT-116、HT29、293、U-20S、T-47D、MCF-7、Hela、A549、HepG2、及び/又はJarkat細胞を含む。

【0012】

特に好適な1つの具体例において、核酸はGAL-4結合サイトを符号化し、エフェクター遺伝子はレポーター遺伝子であり、第一キメラタンパク質はGAL-4核酸結合タンパク質及びベータカテニン又はTcfを含む；そして第二キメラタンパク質は、VP-16及びベータカテニン又はTcfを含む。好適なTcfの1つはTcf4である。

【0013】

所定の具体例において、細胞はさらに誘導性プロモーター（例えばecdysonプロモーター）に操作可能にリンクするリガンド又は代謝生成物を符号化する第二の核酸を含む。

30

【0014】

他の具体例において、本発明は代謝生成物を蓄積又は分解する細胞においてエフェクター遺伝子を選択的に発現する方法を提供する。本方法は、ペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸、核酸結合タンパク質が代謝生成物に対して又は前記代謝生成物結合するリガンドに対して結合するペプチド結合ドメインを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質、代謝生成物に対して又は代謝生成物に結合するリガンドに対して、前記第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に第二キメラタンパク質がリガンドを含み、第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質であって、代謝生成物を含む該第二キメラタンパク質、を含む細胞を提供することを含む、それにより、代謝生成物又は代謝生成物を結合させるリガンドを分解する能力の不存在下で、細胞は前記エフェクター遺伝子の発現を活性化又は抑制する。好ましい発現コントロールタンパク質は、トランスアクティベーター（例えばVP16）又はリプレッサーである。好ましい核酸結合タンパク質、エフェクター遺伝子、リガンド及び代謝生成物は、限定するものではないが上述のものである。

40

【0015】

第一及び/又は第二キメラタンパク質は、細胞中の核酸から（例えば誘導性（例えばエク

50

ジソンプロモーター)、組織特異的、又は構成性プロモーターのコントロール下で)発現され、或いは第一及び/又は第二キメラタンパク質は、例えばHIV TATドメインを含むタンパク質を使用することにより細胞中に輸送される。

【0016】

本発明の方法を行うための好ましい細胞は、限定するものではないが、SW480、SW48、DLDD-1、HCT-116、HT29、293、U-20S、T-47D、MCF-7、HeLa、A549、Hep G2、及び/又はJarkat細胞を含む。

【0017】

好適な具体例の1つにおいて、核酸はGAL-4結合サイトを符号化し、エフェクター遺伝子はレポーター遺伝子であり、第一キメラタンパク質はGAL-4核酸結合タンパク質及びベータカテニン又はTcfを含む;そして第二キメラタンパク質はVP-16及びベータカテニン又はTcfを含む。好適なTcfの1つはTcf4である。

10

【0018】

本発明は、代謝生成物を蓄積する細胞(例えば所定の癌細胞)を選択的に殺す方法も提供する。本方法は、ペプチド結合サイト及び細胞毒若しくはアポトーシス誘導遺伝子であるエフェクターを符号化する核酸を用いて細胞をトランスフェクトし;核酸結合タンパク質が前記代謝生成物及び前記代謝生成物に結合するリガンドに結合するペプチド結合ドメインを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質を細胞内に誘導し;そして前記代謝生成物又は前記代謝生成物に結合するトランスアクティベーター(例えばVP16)を含む第二キメラタンパク質を、第一キメラタンパク質が前記代謝生成物を含む場合には前記第二キメラタンパク質が前記リガンドを含み、第一キメラタンパク質が前記リガンドを含む場合には前記第二キメラタンパク質が前記代謝生成物を含むように細胞内に導入することを含む。好ましい核酸結合タンパク質は、限定するものではないがGAL-4及びGAL-4-Yである。好適な具体例の1つにおいて、エフェクターは細胞毒(例えばチミジンキナーゼ、シュドモナスエキソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリン等)である。所定の好適な具体例において、エフェクターはアポトーシス誘導遺伝子(例えばP53、P73;Bax、Bad、FADD、カスパーゼ(caspase)(例えばCasp3、Casp9、Apaf1等)等)である。種々の具体例において、リガンド及び代謝生成物は、限定するものではないが、それぞれベータカテニン及びTcf、NF-B及びI-B、P53及びMDM2、レセプター及びそのヘテロメリックレセプターパートナーを含む。

20

30

【0019】

第一及び第二キメラタンパク質は、(誘導性(例えばエクジソンプロモーター)、組織特異的、又は構成性プロモーターのコントロール下で)発現され、或いは第一及び/又は第二キメラタンパク質は、例えばHIV TATドメインを含むタンパク質を使用することにより細胞中に輸送される。好ましい細胞は、限定するものではないが、SW480、SW48、DLDD-1、HCT-116、HT29、293、U-20S、T-47D、MCF-7、HeLa、A549、Hep G2、Jarkat細胞等を含む。具体例の1つにおいて、核酸はGAL-4結合サイトを符号化し、第一キメラタンパク質はGAL-4核酸結合タンパク質及びベータカテニン又はTcfを含み、そして第二キメラタンパク質VP-16及びベータカテニン又はTcf(例えばTcf4)を含む。

40

【0020】

さらに他の具体例において、本発明は本発明の1種又はそれ以上の構成を含む脊椎細胞、好ましくは哺乳動物細胞を提供する。1つの具体例において、該細胞は、ペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸、核酸結合タンパク質が代謝生成物又は代謝生成物に結合するリガンドに結合されるペプチド結合ドメインに結合する核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質;第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に前記第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタン

50

パク質を含む細胞である。発現コントロールタンパク質、第一及び第二核酸、エフェクター遺伝子、核酸結合ドメインは上述のものを含むが、限定するものではない。

【0021】

さらに別の具体例において、本発明は；Tcf又はベータカテニンに結合する核酸結合ドメインを含むキメラタンパク質を符号化する核酸、及びベータカテニン又はTcfに対して結合されるトランスアクティベーターを符号化する核酸、からなる群から選択される核酸を提供する。特に好ましい核酸は、Tcf4に結合する核酸結合タンパク質を符号化する核酸、ベータカテニンに結合する核酸結合タンパク質を符号化する核酸、及びトランスアクティベーター（例えばVP16）に結合するベータカテニンを符号化する核酸を含む。好ましい核酸はDNA又はRNAであり、所定の具体例においてベクターを含む。

10

【0022】

さらに別の具体例において、本発明は代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーニングするためのキットを提供する。好ましいキットは、タンパク質結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸；前記代謝生成物及び代謝生成物に結合するリガンドに結合する前記ペプチド結合ドメインを結合させる核酸結合タンパク質を含む第一キメラタンパク質；第一キメラタンパク質が代謝生成物を含む場合に前記第二キメラタンパク質がリガンドを含みかつ第一キメラタンパク質がリガンドを含む場合に第二キメラタンパク質が代謝生成物を含むように、代謝生成物に若しくは代謝生成物に結合するリガンドに対して結合する発現コントロールタンパク質を含む第二キメラタンパク質、を含む哺乳動物細胞を含むコンテナを含む。

20

【0023】

他の具体例において、該キットは本明細書中に記載されるように核酸を含むコンテナである。

【0024】

細胞を選択的に殺すキットも提供する。このようなキットは、本明細書中に示されるような1種又はそれ以上の核酸及び/又は本明細書中に示されるような1種又は2種のキメラタンパク質からなる群より選択される2-ハイブリッドシステム成分を含むコンテナを含む。

【0025】

定義

30

“キメラ分子”とは、1種又はそれ以上の共有結合を通じて典型的に結合するネイティブ状態において別々に見出される2種又はそれ以上の分子を含む分子である。この分子は直接的に又はリンカーを通して結合できる。分子が両方ともポリペプチドである場合は、ペプチド結合又は融合タンパク質を形成するペプチドリinkerを通じて結合できる。

【0026】

“融合タンパク質”とは、あるポリペプチドのアミノ末端と他のポリペプチドのカルボキシル末端との間で形成されるペプチド結合を通じて2種又はそれ以上のポリペプチドを結合させることにより形成されるポリペプチドを意味する。融合タンパク質は、構成ポリペプチドの化学的なカップリングにより形成されることができ、或いはそれは単一接触（contiguous）融合タンパク質を符号化する核酸シーケンスからの単一のポリペプチドとして発現され得る。一本鎖融合タンパク質は、単一接触ポリペプチドバックボーンを有する融合タンパク質である。

40

本明細書中において融合タンパク質に対して使用される“スペーサー”又は“リンカー”は、融合タンパク質を含むタンパク質を結合させるペプチドを意味する。一般的には、スペーサーは、タンパク質を結合させ或いは数種の最小距離又はそれらの間の空間的な関係を維持するため以外には特異的な生物学的活性を有さない。しかし、スペーサーの構成アミノ酸は、分子のホールディング、ネットチャージ又は疎水性のような分子の数種の特性に影響を与えるように選択される。

【0027】

本明細書中で化学的にコンジュゲートしたキメラ分子に関して使用される“スペーサー”

50

又は“リンカー”は、化学的にコンジュゲートしたキメラ分子の構成分子をリンク／結合させる任意の分子を意味する。

【0028】

“代謝生成物”とは、代謝経路の中間又は最終生成物として形成される分子を意味する。この用語は、細胞内の異なる経路のメンバーにより続けて修飾される生成物をも含むことができる。本発明におけるキメラ分子のドメインとして使用される場合、代謝生成物は完全長／完全サイズの代謝生成物又は他の分子により十分に特異的に結合されるそれらのフラグメントであることができる。

【0029】

“細胞を殺し又は抑制する”というフレーズは、細胞の死又は細胞の成長及び／又は増幅における減少を意味する。

10

【0030】

核酸結合タンパク質及び核酸結合サイト又は2タンパク質若しくは他の結合対の相互作用に関して、“特異的に結合”という用語は、分子（例えばタンパク質又は他の生物製剤）の不均一な個体群の存在下で1種又はそれ以外の構成要素の結合対の存在に限定される結合反応を意味する。それゆえ、例えばレセプター／リガンド結合対の場合、リガンドは特異的に及び／又は優先的に分子の複合混合物からそのレセプターを選択する、又はその逆である。酵素はその基体等と特異的に結合する。結合は限定するものではないが、イオン相互作用、共有相互作用、疎水相互作用、ファンデルワールス相互作用等を含む種々の機構のうち1種又はそれ以上を含むことができる。

20

【0031】

用語“結合パートナー”又は“結合対”のメンバー或いは“同属リガンド”とは、他の分子と特異的に結合し、抗体／抗原、レクチン／炭水化物、核酸／核酸、レセプター／レセプターリガンド（例えばIL-4レセプター及びIL-4）、アビジン／ビオチン等である。

【0032】

用語リガンドは、他の分子に特異的に結合する分子を意味することに使用される。一般的に、リガンドはレセプターに対して結合する溶性分子（例えばホルモン又はサイトカイン）である。どの結合対のメンバーがリガンドであり及びどれが“レセプター”であるかの規定はより広い意味でのレセプターが使用される場合（例えば信号の変換の意味がない場合）には、しばしば多少任意である。これらの場合において、典型的には、結合対の2種のメンバーの小さい方がリガンドと呼ばれる。それゆえ、レクチン-糖相互作用において、糖はリガンドである（非常に大きな分子に結合したとしても、認識はサッカライドのものである）。

30

【0033】

用語“2-ハイブリッドシステム”は2種のキメラ分子を含むシステムを意味し、そのうちの一方は核酸結合領域を産し、他方は発現コントロールエレメント（例えばトランスアクティベーション又はリプレッサドメイン）を産する。さらに該分子は、一方のキメラ分子が他方のキメラ分子に特異的に結合できるような同属の結合対であり得る。2-ハイブリッドシステムは、キメラ分子上のタンパク質結合ドメインにより特異的に結合し、それによりキメラ分子を核酸に対して固定することにより、タンパク質結合サイトを符号化する核酸を含む。キメラ分子のドメインは、第二キメラ分子上の同属結合パートナーに対して認識及び結合し、それにより核酸に対して分子を補い、それにより発現コントロールエレメントは潜在する核酸を含む遺伝子又はcDNAの発現を変化させる（例えば、活性化させる）。

40

【0034】

“本発明の2-ハイブリッドシステムの1種又はそれ以上の成分”というフレーズは、2-ハイブリッドシステムを含むキメラ分子及び／又はそれらを符号化する核酸及び／又はタンパク質認識サイト及びエフェクターを含む核酸のいずれか又はいずれをも意味する。

50

【0035】

“トランスフェクション”とは、ターゲット細胞が核酸を発現できるようにするよう、発現可能な核酸をターゲット細胞へデリバリーすることを意味するために使用される。用語“核酸”は分子量に関係無くDNA及びRNAの両方を意味し、用語“発現”とは細胞内の核酸の機能的な存在の任意の表現を含み、制限無く一時的な発現及び安定した発現の両方を含むものと理解される。

【0036】

“デリバリー”とは、所望の化合物が、最終的にはターゲット細胞内或いはターゲット細胞膜内若しくは膜上に位置するように、ターゲット細胞へ輸送されるプロセスを表すために使用される。本発明の化合物の多くの使用において、所望の化合物はターゲット細胞により直ちには吸収されず、脂質集合体を経由するデリバリーは細胞内に所望の化合物を得る方法である。所定の使用において、特にインビボ条件下において、特定のターゲット細胞型へのデリバリーが好ましく、そして本発明の化合物により容易化され得る。

10

【0037】

本明細書中において、用語“ポリペプチド”、“ペプチド”及び“タンパク質”は、本明細書中において、アミノ酸残渣のポリマーを意味するために交換可能に使用される。この用語は1種又はそれ以上のアミノ酸残渣が天然発生アミノ酸ポリマー同様に天然発生のアミノ酸に相当する人工的な化学的類似体であるアミノ酸ポリマーに適用する。この用語は、ポリペプチドを形成するアミノ酸を連結させた従来のポリペプチド結合における変異体を含む。

20

【0038】

用語“核酸”又は“オリゴヌクレオチド”は、互いに共有結合した少なくとも2種のヌクレオチドを意味する。本発明の核酸は、好ましくは一本鎖又は二本鎖であり、そして通常はホスホジエステル結合を含むが、ある場合においては、概略として核酸類似体は別のバックボーンを有するものことができるもの、例えばホスホラミド(phosphoramidate) (Beaucage等(1993) Tetrahedron 49(10): 1925) 及びその中の参考文献; Letsinger(1970) J. Org. Chem. 35: 3800; Sprinzl等(1977) Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsinger等(1986) Nucleic Acids Res. 14: 3487; Sawai等(1984) Chem. Lett. 805, Letsinger等(1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; 及び Pauwels等(1986) Chemica Scripta 26: 1419)、ホスホロチオエート(Mag等(1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437; 及び米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート(Briu等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 2321)、O-メチルホスホロアミダイト結合(Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press 参照)並びにペプチド核酸バックボーン及び結合(Egholm(1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 1985; Meier等(1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008; Nielsen(1993) Nature, 365: 566; Carlsson等(1996) Nature 380: 207 参照)を含む。他の類似核酸ポジティブなバックボーンを有するもの(Denpcy等(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097)、非イオン性バックボーンを有するもの(米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号及び第4,469,863号; Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English 30: 423; Letsinger等(1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; Letsinger等(1994) Nucleoside & Nucleotide 13: 1597; Chapter 2 及び 3, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Rese

30

40

50

arch” , Ed . Y . S . Sanghui and P . Dan Cook ; Mesmaecker 等 (1994) , Bioorganic & Medicinal Chem. Lett . 4 : 395 ; Jeffs 等 (1994) J . Biomolecular NMR 34 : 17 ; Tetrahedron Lett . 37 : 743 (1996)) 並びに米国特許第 5 , 235 , 033 号及び第 5 , 034 , 506 号、及び Chapter 6 及び 7 , ASC Symposium Series 580 , Carbohydrate Modifications in Antisense Research , Ed . Y . S . Sanghui and P . Dan Cook に記載されるものを含む非リボゼバックボーンを有するものを含む。1 種又はそれ以上の炭環式糖を含む核酸も、核酸の定義に含まれる (Jenkins 等 (1995) , Chem . Soc . Rev . pp 169 - 176 参照) 。種々の核酸同属体は、Rawls , C & E News June 2 , 1997 35 頁に記載される。リボース - ホスフェートバックボーンのこれらの修飾は、ラベルのような追加的な部位を追加することを容易化し又は生理学的な環境におけるこのような分子の安定性及び半減期を増加させる。

10

20

30

40

50

【 0039 】

“ 組換え発現カセット ” 又は単純に “ 発現カセット ” は、組換え的又は合成的に発生された核酸構造であり、そのようなシーケンスと融和するホスト内における遺伝子又は cDNA の発現をもたらし得る核酸エレメントを有する。発現カセットは少なくともプロモーターを含み、及び随意に転写末端信号を含む。典型的には、組換え発現カセットは転写されるための核酸 (例えば所望のポリペプチドを符号化する核酸) 及びプロモーターを含む。発現を行うことにおいて必要かつ有用なさらなるファクターも本明細書中で使用できる。

【 0040 】

用語 “ 遺伝子 ” 及び “ cDNA ” は、典型的には本明細書中で交換可能に使用される。それゆえ、例えばレポーター遺伝子はゲノム核酸 (例えばイントロン及びエクソンを含む) 又は cDNA を含むことができる。所定の例において、用語ゲノム DNA 及び cDNA は交換可能には使用できない。これは用法の状況より定義される。

【 0041 】

“ アポトーシス誘導遺伝子 ” とはアポトーシスにおいて影響を与える遺伝子又は cDNA を意味する。好適なアポトーシス誘導遺伝子は、それらが活性化された場合にアポトーシスを誘導又は増加させる。限定するものではないが P53、P73、Bax、Bad、FADD、カスパーゼ等を含む。

【 0042 】

“ 選択的に殺す ” 方法とは、特定の細胞型の死をより頻繁に及び / 又は “ ターゲット化 ” 細胞とは別の細胞型 (例えば特定の分類態様を欠く細胞) の死よりも早く死を誘導する方法を意味する。

【 0043 】

用語 “ トランスアクティベーター ” とは、遺伝子又は cDNA の転写を誘導し及び / 又は転写をアップレギュレートする分子を意味する。トランスアクティベーターは完全に “ ネイティブな ” 分子であることができ、又は遺伝子又は cDNA の転写を誘発し及び / 又はアップレギュレートできる分子のドメインであることができる。

【 0044 】

“ 発現コントロールドメイン ” 又は “ 発現コントロールタンパク質 ” は、典型的には遺伝子又は cDNA 発現を変化させるポリペプチドである。典型的な発現コントロールタンパク質は、(遺伝子又は cDNA の発現をアップレギュレートする) トランスアクティベーター - 又は (遺伝子又は cDNA の発現をダウンレギュレートする) リプレッサーである。

【 0045 】

“ 細胞毒 ” とは細胞を殺す試薬 (例えばタンパク質) を意味する。

【 0046 】

“アポトーシス遺伝子”とは、それらの発現がアポトーシス過程に含まれる遺伝子を意味する。このようなアポトーシス遺伝子は、限定するものではないが、P 53、P 73、Bax、Bad、FADD、カスパーゼ遺伝子等を含む。

【0047】

用語“試験試薬”は、所望の活性についてスクリーンされる任意の遺伝子を意味する。“試験組成物”とは、場合によっては好適なキャリア内の任意の分子又は分子の混合物であることができる。

【0048】

用語“小有機分子”とは、典型的には医薬において通常使用される有機分子に匹敵するサイズの分子を意味する。この用語は、生物学的マクロ分子（例えばタンパク質、核酸等）を除外する。好ましい小有機分子は約5000Daまでの、より好ましくは約2000Da、まで及び最も好ましくは約1000Daまでの範囲のサイズである。

【0049】

“エフェクター分子”は、それらの発現が本発明の2-ハイブリッドシステムによりコントロールされる任意の分子である。好適なエフェクター分子は、限定するものではないが細胞毒、レポーター遺伝子、酵素、アポトーシス遺伝子等を含む。

【0050】

“レポーター遺伝子”は容易にアッセイ可能な（検出可能及び／又は定量可能な）生成物を発現する遺伝子又はcDNAである。アッセイ可能な生成物の検出は、レポーター遺伝子の発現及び／又は発現のレベルを表す。レポーター遺伝子は当業者に公知である。それらは、限定するものではないが、バクテリアクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ベータ-ガラクトシダーゼ（-gal）、緑蛍光タンパク質（GFP）及び他の蛍光タンパク質、種々のバクテリアルシフェラーゼ遺伝子、例えばVibrioharveyi、Vibriofischeri、及びXenorhabdusluminescens、蛍ルシフェラーゼ遺伝子FFlux等により符号化されるルシフェラーゼ遺伝子を含む。

【0051】

用語“モジュレート”は、代謝生成物を蓄積又は分解する細胞の能力に言及して使用される。

【0052】

用語“ペプチド結合サイト”又は“タンパク質結合サイト”とは、核酸結合タンパク質（例えばDNA結合タンパク質）により認識及び／又は結合される核酸シーケンスを意味する。

【0053】

“核酸結合ドメイン”とは、核酸を認識し及び／又は核酸に結合するタンパク質又はタンパク質の領域を意味する。核酸結合タンパク質（例えばDNA結合タンパク質）は完全長の核酸結合タンパク質であることができ、又は核酸に結合するそれらのフラグメントであることができる。

【0054】

用語“キット”とは、材料の集合、より好ましくは特定の機能を行うための（例えばスクリーニングアッセイを行う、タンパク質を発現する、細胞を培養する等）材料（好ましくは関連材料）のパッケージされた集合を意味する。該キットは、随意にキット内に存在する材料の使用を記載する指示材料を含む。

【0055】

図面の簡単な説明

図1は、-カテニン/Tcf4哺乳動物2-ハイブリッドシステムを用いた遺伝子治療の概念を表す。細胞がGAL-4/WT-カテニン、VP-16/FL-Tcf4及びGAL-4応答エレメント-ドライブ化（element-driven）自殺遺伝子を符号化するプラスミドを用いてトランスフェクトされる場合には、自殺遺伝子発現はAPC変異細胞内でのみ発生する。

【 0 0 5 6 】

図 2 A、図 2 B 及び図 2 C は、本発明の 2 - ハイブリッドシステムを表す。図 2 A は 2 - ハイブリッド成分の構造を示す。p B I N D / W T - - カテニンプラスミドは、酵母 G A L 4 D N A 結合ドメイン及び野生型 - - カテニンで構成されるキメラタンパク質を生成するためにデザインされる。p B I N D / M T - - カテニンプラスミドは、G A L 4 D N A 結合ドメイン及び G S K - 3 リン酸化サイト (a a 2 9 - a a 4 8) - 削除カテニンからなるキメラタンパク質を生成するためにデザインされる。p A C T / F L - T c f 4 プラスミドは、単純性ヘルペスウイルス V P 1 6 転写活性化ドメイン及び完全長 T c f 4 からなるキメラタンパク質を生成するためにデザインされる。p A C T / D N - T c f 4 プラスミドは、V P 1 6 転写活性化ドメイン及びカテニン結合サイト (a a 2 - a a 5 3) - 削除 T c f 4 からなるキメラタンパク質を生成するためにデザインされる。図 2 B は G A L 4 / - カテニン及び S W 4 8 0 細胞内の V P 1 6 / T c f 4 の発現を表す。細胞は p B I N D / - カテニン又は p A C T / T c f 4 プラスミドを用いてトランスフェクトされ、そして 2 4 時間培養された。それから融合タンパク質の発現レベルがウエスタンブロットにより検出された。図 2 C は 2 - ハイブリッドシステムの特異性を表す。S W 4 8 0 細胞は G A L 4 融合タンパク質、V P 1 6 融合タンパク質及び p G 5 / l u c プラスミドの種々の組合せを用いてトランスフェクトされ、そして 2 4 時間培養された。各試料のルシフェラーゼ活性をルミノメーターにより測定した。

10

【 0 0 5 7 】

図 3 A 及び図 3 B は A P C 依存性の選択的な発現及び S W 4 8 細胞における 2 - ハイブリッド成分タンパク質の検出を表す。図 3 A は S W 4 8 0 細胞における 2 - ハイブリッド産出遺伝子の A P C 依存性の選択的な発現を表す。S W 4 8 0 細胞は、p B I N D / W T 若しくは M T - - カテニンプラスミド、p A C T / F L - T c f 4 プラスミド及び p G 5 / l u c プラスミドの存在下で、種々の濃度の p c D N A / A P C プラスミドを使用してトランスフェクトされた。2 4 時間の培養の後、細胞は溶解され、そしてルシフェラーゼ活性が測定された。図 3 B は S W 4 8 細胞における 2 - ハイブリッド成分タンパク質の検出を表す。S W 4 8 0 細胞は、p B I N D / W T 若しくは M T - - カテニンプラスミド、p A C T / F L - T c f 4 プラスミド及び p G 5 / l u c プラスミドの存在下で、種々の濃度の p c D N A / A P C プラスミドを使用してトランスフェクトされた。2 4 時間の培養の後、細胞は溶解され、そしてルシフェラーゼ活性がウエスタンブロットティングにより検出された。

20

30

【 0 0 5 8 】

図 4 A、図 4 B 及び図 4 C は、細胞質 - カテニンの発現、G a l 4 融合タンパク質分解生成物の検出、及びターゲット細胞の A P C プロファイルに依存する選択的な遺伝子発現を表す。図 4 A は、細胞質 - カテニン及びヒト細胞株内の A P C の発現レベルを表す。S W 4 8 0 細胞、S W 4 8 細胞、U - 2 O S 細胞及び 2 9 3 細胞 (1.0×10^6 細胞) はプロテアーゼリプレッサーを含む T E バッファーを用いて溶解された (c o m p l e t e m i n i , B o e h r i n g e r M a n n h e i m 製)、そして溶解可能なフラクションは遠心分離により集められた。各試料は 4 - 2 0 % 勾配アクリルアミドゲルへ充填され、そしてニトロセルロース膜へ移された。分離したタンパク質は抗 - - カテニン抗体又は抗 - A P C 抗体を用いて検出された。図 4 B は、G a l 4 融合タンパク質分解生成物の検出を表す。S W 4 8 0 細胞及び S W 4 8 細胞は、p B I N D / W T 若しくは M T - - カテニンプラスミドを使用してトランスフェクトされ、そして 2 4 時間培養された。細胞は S D S ページ試料バッファーを用いて溶解され、そして 4 - 2 0 % 勾配ポリアクリルアミドゲルへ充填された。分離されたタンパク質はニトロセルロース膜へ移され、G A L 4 タンパク質は抗 - G A L 4 抗体を用いて検出された。図 4 C は細胞株の A P C プロファイルに依存する 2 - ハイブリッドシステムの選択的な産出遺伝子発現を表す。ヒト細胞株は、p A C T / F L - T c f 4 プラスミド及び p G 5 / l u c プラスミドの存在下で、種々の濃度の p B I N D / W T - - カテニンプラスミドを使用してトランスフェクトされた。各点におけるルシフェラーゼ活性は 2 4 時間の培養後に測定された。

40

50

【0059】

図5A、図5B及び図5Cはp53応答ルシフェラーゼ発現の活性化及びp53-EGF Pの検出を表す。図5Aは、p53-EGF Pによるp53応答ルシフェラーゼ発現の活性化を表す。pcDNA/p53-EGF Pは、pRL/TK(Promega)の存在下で、p53-Luc、pAP-1-Luc又はpCRE-Luc(Stratagene)を用いて、SW480細胞へトランスフェクトされ、そして24時間培養される。細胞は採取されそしてルシフェラーゼ活性が測定された。図5Bは、SW480細胞におけるp53-EGF Pの検出を表す。SW480細胞は、pBIND/WT- -カテニン、pACT/FL-Tcf4及びpG5/p53-EGF Pを用いてコ-トランスフェクトされ、そして24時間培養された。生成したp53-EGF Pは抗-p53抗体を使用してウエスタンブロットにより検出された。図5Cは2-ハイブリッドシステムを使用する細胞殺傷実験の結果を表す。SW480細胞は、pBIND/WT- -カテニン、pACT/FL-Tcf4及びpG5/p53-EGF Pを用いてトランスフェクトされ、そして48-72時間培養された。細胞はトリプシナイズされそしてPBSで洗浄された。それから細胞は、10µMのヨウ化プロピジウムを含むPBS中に懸濁された、EGFPポジティブ細胞の細胞死プロファイルは、フローシトメーターを使用して、ヨウ化プロピジウムのアップテークを測定することにより分析された。

10

【0060】

詳細な説明

本発明は、1種又はそれ以上の代謝生成物の望ましくない蓄積により特徴付けられる病理学的な状態の治療(例えば1種又はそれ以上の症状の改善)に対する新規なアプローチを提供する。さらに、本発明は、細胞の能力をモジュレートする試薬をスクリーンし、代謝生成物(例えば -カテニン)を分解又は蓄積する効果的なシステムを提供する。

20

【0061】

一般的には、本発明の方法は2-ハイブリッドシステムを、より好ましくは哺乳動物2-ハイブリッドシステム(例えばPromega Check Mate(登録商標))を利用する。細胞は、2-ハイブリッドシステムを形成する構造を含むものが提供される。第一構造は、蓄積する代謝生成物、代謝経路において代謝生成物を生成若しくは分解する酵素、又は酵素に対するものの代謝生成物に結合するリガンドのいずれかに結合する核酸結合ドメインを有するものを含む第一キメラタンパク質を含む。第二構造は、代謝生成物の同属結合パートナー、リガンド又は第一構造の酵素成分に結合するトランスアクティベータードメインを含むキメラタンパク質を提供される。それゆえ、例えば第一構造が核酸結合ドメインに結合する代謝生成物を含む場合、第二構造はトランスアクティベータードメインに結合する代謝生成物に結合するリガンドを含む。細胞内の第三構造は、第一構造及びエフェクターを符号化する遺伝子/cDNAの核酸結合ドメインにより結合されることができる核酸シーケンスを含むことができる核酸である。エフェクターは、この2-ハイブリッドシステムにより転写及び/又は翻訳が制限される任意の核酸又はタンパク質である。それゆえ、例えば所定の好ましい具体例の場合、エフェクターはレポーター又は細胞毒である。

30

【0062】

代謝生成物を分解する能力を減少して有する又は有さない細胞において、代謝生成物を産する構造は、その生成物の同属の結合パートナーを産する構造に特異的に結合する。2-タンパク質複合物は、核酸結合ドメインを産する成分により核酸に対して固定され、結合するトランスアクティベータードメインはエフェクター遺伝子の発現をアップレギュレートする(ある具体例においてはダウンレギュレートする)。細胞が代謝生成物を分解できる場合は、その生成物を産する構造は全て又は部分的に分解される。2種の構造物間で形成される複合物は無く、エフェクター遺伝子の転写及び/又は翻訳は影響をされない(例えば信号が存在しない)。

40

【0063】

このシステムの1つの特徴的な具体例が図1に表されており、これは家族性腺腫ポリポシ

50

ス患者にて本来発見される（及び結腸癌を含む種々の散発性癌においても発見される）家族性腺腫ポリポシス菌（A P C）遺伝子生成物の機能的損失に適する。腫瘍抑制A P C遺伝子生成物は、W n t信号経路のメンバーである。この経路は、胚形成中の細胞の運命を示すことにおいて、重要かつ進化的に保護される役割を果たすものと信じられる。

【0064】

W n t信号は細胞内のタンパク質 - カテニンの存在又は不存在により制限される。A P C又はA x i nファミリーのタンパク質を含む大きなマルチタンパク質機構は、ホスフェート基を - カテニンヘグリコーゲン合成酵素キナーゼ - 3（G S K 3）により加えることを容易化する。リン酸化 - カテニンは T r C Pと呼ばれるタンパク質と結合し、そしてそれからユビキチンと呼ばれる小さなタンパク質の共有結合添加により修飾される。ユビキチンを付けたタンパク質は、通常、プロテオソームにより分解される。

【0065】

変異したA P Cは、A P C / A x i n複合物を形成できない。この場合、 - カテニンはリン酸化されず及び最終的に分解されない。それゆえ、 - カテニンは細胞内へ蓄積する。過剰な - カテニンが蓄積し、そしてパートナー、例えばT C F / L E FファミリーのD N A結合タンパク質を見つけた場合は核に入る。さらにそれらは、新しい遺伝子発現プログラム、例えばサイクリンD 1のような発癌ターゲット遺伝子を発現させる。この条件は多数の癌細胞中（例えば全ての結腸癌の80～85%において）で観察される。

【0066】

ある具体例において、本発明の方法は、欠陥A P Cを有する細胞を選択的に殺しかつ - カテニン分解へ誘導するW n t経路のモジュレータ - についてスクリーンすることに使用される。特定の例を図1に示す、これは核酸結合ドメインを含む第一キメラ分子を表し、この場合G a l 4は - カテニンへ結合する。第二キメラ分子はトランスアクティベーター（V P 1 6）に結合するT - 細胞因子（例えばT c f - 4）を含む。第三構造はG a l 4結合ドメイン及びエフェクター（例えばチミジンキナーゼ）遺伝子を符号化する核酸である。

【0067】

欠陥A P Cを有する細胞は - カテニン、この場合はG a l 4 - - カテニン構造を蓄積する。G a l 4 - - カテニン構造は、核酸上のG a l 4結合サイトへ結合する。T c f 4 - V P 1 6キメラ分子は - カテニン / T c f 4相互作用を介して - カテニンに結合し、それにより核酸に対してV P 1 6トランスアクティベーターを並列させ、それからエフェクター遺伝子の転写を誘導する。エフェクター遺伝子が細胞毒である場合は、欠陥A P Cを有する細胞は殺される。エフェクターがレポーターの場合は、生じた信号が欠陥A P Cを含む細胞を同定する。細胞が試験試薬と接触し及びエフェクターがレポーターである場合は、信号における変化は、試験試薬が特に - カテニンの蓄積に関してW n t経路の活性をモジュレートすることを示す。

【0068】

通常のA P Cを有する細胞は - カテニン（この場合はG A l 4 - - カテニン）キメラ分子を分解する。T c f 4 - V P 1 6キメラ分子は、それから核酸に対しては向けられず、そしてエフェクター遺伝子の発現（又は非発現（n o n - e x p r e s s i o n））における代替は無い。それゆえ、エフェクター遺伝子が細胞毒である場合、通常のA P Cを有し及びそれゆえ - カテニンを分解できる細胞は、細胞毒を発現せずそして殺されない。細胞毒エフェクターを用いたこのシステムの使用は、それゆえ欠陥A P Cを有する細胞を特異的に除去する。

【0069】

I. 本発明の方法の使用

上記システム又はそれらの変形は、代謝生成物を蓄積又は分解するための細胞の能力をモジュレートする（増加又は減少させる）試薬（例えば医薬又はリード化合物）についてスクリーンする広範囲の状況にて使用できる。他の具体例において、本明細書中に記載される方法は、代謝生成物を異常に蓄積又は分解する細胞を選択的に殺し又は抑制し、そして

それにより代謝生成物の異常な蓄積又は分解により特徴付けられる病理学的な状態の症状を静める。

【0070】

A) 代謝生成物を蓄積又は分解するための細胞の能力のモジュレーターについてのスクリーニング

上述のように、本発明の方法は、代謝生成物を蓄積又は分解するための細胞の能力をモジュレートする試薬についてスクリーニングすることに、良好に適合する。好適な具体例において、このようなアッセイは、上述のように2種のキメラタンパク質（結合ドメイン/代謝物、リガンド-トランスアクティベーター）及びエフェクターを含む核酸を含有する細胞を提供することを含む。ある具体例において、エフェクターは、レポーター遺伝子又は検出可能であるが致死生成物を符号化する他の遺伝子を符号化することが好ましい。この例において、遺伝子発現が検出される。他の具体例において、遺伝子は致死遺伝子生成物（例えばP53又は細胞毒）を符号化し、アッセイは生存遺伝子の数を測定することを含む。

10

【0071】

それから細胞は関心ある試薬と接触され、そしてレポーター遺伝子の活性が検出される。レポーター遺伝子が、同じ構造を有する同じ型の細胞中に示されるレベルと異なる発現レベル及び/又は活性レベルを示すが、異なる濃度の試験試薬と接触する場合（又は試験試薬が無い場合）、試験試薬は代謝生成物の蓄積又は分解を導く変更された代謝経路を有するものと推定される。

20

【0072】

試験試薬の効果は、例えば代謝生成物又は酵素或いは通常代謝生成物に結合する他のリガンドの結合又は分解により直接的であることができる、或いはその効果は、例えば関心ある代謝生成物を蓄積又は分解するための細胞の能力を最終的に変える経路の異なる成分を結合させ、分解し又は変化させることによって間接的であることができる。それゆえ、例えば上記APCシステムの場合において、試験試薬は、APC、アキシン又はTcfと結合させ又は接触させることにより、直接的に - カテニンの細胞蓄積を変化させ得る。そのかわりに、試験試薬は、例えば結合又はGSK3 の活性を変化させることにより - カテニンのリン酸化を変化させることにより、直接的に作用する。これは、もちろん可能な試験試薬又は存在もする他の多数の可能性による間接的な作用についての例証的な機構の1つである。この例において、試験試薬の作用の機構にかかわらず、 - カテニンのそれが蓄積又は分解を変化させる限りは、その活性はこの発明のアッセイにおいて検出される。

30

【0073】

1) アッセイのスコアリング

本発明のアッセイは、当業者に公知の標準的な方法に従って評価される。典型的には、レポーター遺伝子の発現レベルは標準的な方法に従ってアッセイされる。レポーター遺伝子は、容易にアッセイ可能な（検出可能及び/又は定量可能な）生成物を発現する遺伝子又はcDNAである。アッセイ可能な生成物の検出は、レポーター遺伝子の発現及び/又は発現レベルを示す。レポーター遺伝子は当業者に公知である。それらは、限定するものではないが、バクテリアクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、ベータ-ガラクトシダーゼ（ - gal）、緑蛍光タンパク質（GFP）及び他の蛍光タンパク質、種々のバクテリアルシフェラーゼ遺伝子、例えばVibrio harveyi, Vibrio fischeri, 及びXenorhabdus luminescens、蛍ルシフェラーゼ遺伝子FFlux等を含む。レポーター遺伝子は、第二キメラ分子を含む転写因子（例えばVP-16）により活性化又は抑制されるプロモーターのコントロール下で単独の遺伝子であることができ、或いは対象プロモーター（例えばP53-eGFP）のコントロール下でも1種又はそれ以上の他の遺伝子が存在し得る。

40

【0074】

本発明のアッセイは、レポーター遺伝子の使用に限定されるものではない。一般的に、任

50

意の遺伝子又は c D N A の転写、翻訳又は活性は、日常的に検出される。それゆえ、例えば転写された m R N A は、限定するものではないが、ノーザンブロット、増幅技術（例えば P C R ）等を含む。同様に、翻訳されたタンパク質生成物はタンパク質の特徴的な活性を検出することにより又はタンパク質生成物自体を（例えば、ウエスタンブロット、キャピラリー - 電気泳動等を介して）検出することにより検出され得る。

【 0 0 7 5 】

上述のように、好ましい具体例においては“ レポーター ” 遺伝子又は c D N A の発現は、1 種又はそれ以上のコントロールに関して評価される。典型的な具体例は、試験試薬を低濃度で含む又は試験試薬が存在しないネガティブコントロールを利用する。試験試薬が低い濃度で存在するか又は存在しない場合のレポーター遺伝子の発現と比較したターゲット試薬の存在下での“ レポーター ” 遺伝子の発現は、試験試薬がアッセイされる代謝経路における活性を有することを示す。

10

【 0 0 7 6 】

他の具体例は、特定の濃度の試験試薬又はより好ましくは参照試薬を投与された細胞を含むポジティブコントロールを利用できる。試験試薬の効果は、それから試験試薬又は参照試薬の特定濃度と比較して測定される。

【 0 0 7 7 】

さらに他のコントロールを利用し、試験試薬の活性の特性についてアッセイできる。それゆえ、例えば試験試薬は 関心ある代謝経路における特定の活性を通じてよりも、細胞の完全な一般化された活性を作用させることができる。好ましい具体例において、試験試薬の一般化された活性と関心ある代謝経路における特定の活性とを区別することが望ましい。所定の具体例において、これは誘導可能なプロモーターのコントロール下でキメラタンパク質の一方又は両方を発現することにより達成される。それゆえ、例えば G a l 4 - カテニンキメラは誘導可能なプロモーター（例えばエクジソン誘導可能システム又はテトラサイクリン（ t e t r a c y c l i n e ）誘導可能システム）のコントロール下であることができる。試験試薬が誘導された G a l 4 - カテニンの不存在下においても効果を有する場合、或いは G a l 4 - カテニンの誘導のレベルを変化させることが試験試薬の効果を变えない場合、試験試薬は非特異的機構を通じて作用するものと推測される。逆に、G a l 4 - カテニンの発現レベルを変化させることが試験試薬の明確な活性を変化させる場合は、試験試薬は関心ある経路において特異的に作用するものと仮定される（この例においては、W n t 信号経路）。

20

30

【 0 0 7 8 】

本発明のアッセイは、存在する試験試薬及び（通常はネガティブ）コントロールを用いて示される活性間に差異がある場合、好ましくはその差異が統計的に大きい場合（例えば 8 0 % 以上、好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 8 % 以上、最も好ましくは 9 9 % 以上の信頼レベル）、典型的にはポジティブとしてスコアされる。最も好ましい“ ポジティブ ” アッセイは、ネガティブコントロールから少なくとも 1 . 2 倍、好ましくは少なくとも 1 . 5 倍、より好ましくは少なくとも 2 倍、及び最も好ましくは少なくとも 4 倍又は又はまさに 1 0 倍の差異を表す。

【 0 0 7 9 】

40

2) スクリーニング用試薬：組合せライブラリー（例えば小有機分子）

実際に、任意の試薬が本発明の方法に従ってスクリーンされ得る。このような試薬は、限定するものではないが、核酸、タンパク質、糖、多糖類、糖タンパク、脂質及び小有機分子を含む。用語“ 小有機分子 ” は、典型的には医薬において通常使用される有機分子に匹敵するサイズの分子を意味する。この用語は、生物学的マクロ分子（例えばタンパク質、核酸等）を除外する。好ましい小有機分子は約 5 0 0 0 D a まで、より好ましくは約 2 0 0 0 D a 、及び最も好ましくは約 1 0 0 0 D a までのサイズの範囲である。

【 0 0 8 0 】

慣用的には、有用な特性を有する新規な化学物質は、数種の所望の特性又は活性を有する化学化合物（リード化合物と呼ばれる）を同定し、リード化合物の変異体を生成させ、そ

50

してそれらの変異体化合物の特性及び活性を評価することにより発生される。しかし、最近の傾向は、医薬発見の全ての面についての時間スケールを短くすることである。早くかつ効率的にたくさんの数を試験する能力のために、高処理量スクリーニング (H T S) 方法が慣用のリード化合物同定方法に取って代わっている。

【0081】

ある好適な具体例において、高処理量スクリーニング方法は多数の潜在的な治療上の化合物 (候補化合物) ライブラリーを提供することを含む。このような “組合せ化学物質ライブラリー” は、それから1種又はそれ以上のアッセイにおいてスクリーンされ、本明細書中に記載されるように、所望の特徴的な活性を示すこれらのライブラリーメンバーを同定する (特に化学種又はサブクラス)。そのようにして同定される該化合物は、慣用の “リード化合物” として働き、又は潜在的な若しくは現実の治療として、それ自体が使用される。

10

【0082】

組合せの化学物質ライブラリーは、試薬のような化学的な “ビルディングブロック” を多数組み合わせることによる化学合成又は生物学的合成のいずれかにより発生する多様な化学化合物の集合である。例えば、ポリペプチド (例えばムテイン) ライブラリーのような線状組合せ化学物質ライブラリーは、アミノ酸と呼ばれる化学的なビルディングブロックのセットを、与えられた化合物の長さ (すなわちポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数) について全ての可能な方法において組み合わせることにより形成される。100万種の化学化合物が、化学的なビルディングブロックのこのような組合せの混合を通じて合成され得る。例えば、あるコメンテーターは、合成の100種の交換可能なビルディングブロックの組合せ混合は、1億種の四量体化合物又は100億種の五量体化合物の理論合成物が生じる (G a l l o p 等 (1994) 37 (9) : 1233 - 1250) と述べた。

20

【0083】

組合せ化学ライブラリーの調製は、当業者に公知である。このような組合せ化学ライブラリーは、限定するものではないがペプチドライブラリーを含む (例えば米国特許第5, 010, 175号、F u r k a (1991) I n t . J . P e p t . P r o t . R e s . , 37 : 487 - 493、H o u g h t o n 等 (1991) N a t u r e , 354 : 84 - 88 参照)。ペプチド合成は本発明とともに使用することについてのみ想定及び意図するものではない。多様な化学ライブラリーを発生させる他の化学物質も使用できる。このような化学物質は、限定するものではないが：ペプチド (P C T 公報 W O 9 1 / 1 9 7 3 5、1991年12月26日)、符号化ペプチド (P C T 公報 W O 9 3 / 2 0 2 4 2、1993年10月14日)、ランダムバイオオリゴマー (P C T 公報 W O 9 2 / 0 0 0 9 1、1992年1月9日)、ベンゾジアゼピン (米国特許第5, 288, 514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン及びジペプチドのような変異体 (H o b b s 等 (1993) P r o c . N a t . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 6 9 0 9 - 6 9 1 3)、ビニル性 (v i n y l o g o u s) ポリペプチド (H a g i h a r a 等 (1992) J . A m e r . C h e m . S o c . 114 : 6568)、ベータ-D-グルコース骨格を有する非ペプチド擬似ペプチド (H i r s c h m a n n 等 (1992) J . A m e r . C h e m . S o c . 114 : 9217 - 9218)、類似の小化合物ライブラリーの有機合成物 (C h e n 等 (1994) J . A m e r . C h e m . S o c . 116 : 2661)、オリゴカルバメート (C h o 等 (1993) S c i e n c e 261 : 1303)、及び/又はペプチジルホスホネート (C a m p b e l l 等 (1994) J . O r g . C h e m . 59 : 658)、を含む。(一般的には、G o r d o n 等 (1994) J . M e d . C h e m . 37 : 1385、核酸ライブラリー (例えば S t r a t e g e n e , C o r p . 参照)、ペプチド核酸ライブラリー (例えば米国特許第5, 539, 083号参照)、抗体ライブラリー (例えば V a u g h n 等 (1996) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y , 14 (3) : 309 - 314 参照)、及び P C T / U S 9 6 / 1 0 2 8 7)、炭水化物ライブラリー (例えば L i a n g 等 (1996) S c i e n c e , 274 : 1520 - 1522 及び

30

40

50

米国特許第 5,593,853 参照) 及び小有機分子ライブラリー (例えばベンゾジアゼピン, Baum (1993) C & EN, 1月18日33頁、イソプレノイド, 米国特許 5,569,588 号、チアゾリジノン及びメタチアザノン, 米国特許 5,549,974 号、ピロリジン, 米国特許 5,525,735 号及び 5,519,134 号、モルホリノ化合物, 米国特許第 5,506,337 号、ベンゾジアゼピン 5,288,514 等参照)。

【0084】

組合せライブラリーの製造装置は市販入手できる (例えば 357 MPS、390 MPS、Advanced Chem Tech, Louisville KY, Sympho ny, Rainin, Woburn、MA, 433A Applied Biosyst 10
ems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore、Bedford, MA 参照)。

【0085】

多数の公知のロボットシステムも解決段階化学について発達してきた。これらのシステムは、限定するものではないが、Takeda Chemical Industries, LTD. (大阪, 日本) により発達した自動化合成装置のような自動化ワークステーション及び化学者により行われる手動合成操作を真似たロボットアームを利用する多くのロボットシステム (Zymate II、Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.) 及び Venture (登録商標) プラットフォーム、開始から終了まで 576 ~ 9600 の同時反応を行うことができる超高処理量シンセサイザー (Advanced Chem Tech, Inc., Louisville, KY 参 20
照) を含む。上記装置のうち任意のものが本発明に使用するに好適である。(もしあれば) 本明細書中に議論されるように操作できるように、これらの装置に対する性質及び改変の実施は、当業者に明らかである。さらに、多くの組合せライブラリー自体が市販入手できる (例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, RU, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Ext 30
on, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD 等参照)。

【0086】

3) 高処理量スクリーニング

本明細書中に記載された代謝生成物の蓄積又は分解をモジュレートする化合物について任意のアッセイが、高処理量スクリーニングに従う。好ましいアッセイは、試験化合物の存在に应答して、レポーター遺伝子の転写及び/又は翻訳における増加又は減少を検出する。

【0087】

本発明の方法に利用される細胞は、1度に単一の試験試薬と接触する必要はない。逆に、高処理量スクリーニングを容易化するために、1つの細胞は少なくとも2種、好ましくはおよそ5種まで、より好ましくはおよそ10種まで、最も好ましくはおよそ20種までの 40
試験化合物と接触できる。細胞がポジティブである場合は、活性を有する試薬が同定されるまで試験試薬のサブセットを用いて続けて試験される。

【0088】

種々のレポーター遺伝子生成物用の高処理量アッセイは、当業者に公知である。例えばマルチウエル蛍光光度計は (Perkin-Elmer より) 市販入手できる。

【0089】

さらに、高処理量スクリーニングシステムは市販入手できる (例えば Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, M 50

A等参照)。これらのシステムは、全試料及び試薬のピペッティング、液体分配、定期的なインキュベーション、及びアッセイに適する検出器の最終読み取りを含む全ての手順を、典型的に自動化する。これらの適用可能なシステムは、高度の柔軟性及びカスタマイゼーションはもちろん、高処理量及び迅速なスタートアップを提供する。このようなシステムの製造は、詳細なプロトコルの種々の高処理量を提供する。それゆえ、例えばZymark Corp. は、遺伝子転写、リガンド結合等のモジュレーションを検出するスクリーニングシステムを記載する技術報告を提供する。

【0090】

B) 代謝経路において異常性を示す細胞の選択的な殺傷又は抑制

本発明の方法は代謝経路において異常性を示す細胞を殺傷又は抑制することにも使用できる。これはエフェクターとして細胞毒遺伝子又はcDNAを使用することにより簡単に達成される。問題の代謝生成物を分解できる細胞は(例えば - カテニン)、キメラ分子を生成する代謝生成物も分解し、そしてエフェクター遺伝子はトランスアクティベートされない。逆に、代謝生成物を分解できない細胞は、細胞毒エフェクターをトランスアクティベートし、それにより細胞を殺傷又は抑制する2 - ハイブリッドシステムを機能させる。それゆえ本方法は、関心ある代謝経路における異常性を示す細胞について高度に選択的である。

10

【0091】

このアプローチは従来の“蓄積の疾患”の治療において有用であるばかりでなく、代謝生成物の蓄積により特徴付けられる種々の癌の治療においても有用である。

20

【0092】

本明細書中で使用されるように、細胞毒遺伝子又はcDNAとは、発現された場合に細胞死を生じ、又は細胞を他の試薬による殺傷に対して感受性にする遺伝子又はcDNAを意味する。それゆえ、例えばヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子の発現は、細胞を、tkを生成する任意の細胞の選択的な殺傷を引き起こす医薬ガンシクロビルに対し感受性にする。

【0093】

好適な細胞毒遺伝子は、限定するものではないが、シュードモナスエクソトキシン、ジフテリア毒、リシン及びアブリン、チミジンキナーゼ、アポトーシス遺伝子、及びアポトーシス関連経路にて含まれる遺伝子(例えばP53、P73、Bax、Bad、FADD、カスパーゼ等)を含む。所定の具体例において、遺伝子はBcl2又はMDM2等のような抗アポトーシス遺伝子である。

30

【0094】

本明細書中の例1において、本方法は、欠陥APCを有する細胞の選択的な殺傷について例証される。Gal4 - カテニン及びTcf - VP16キメラ分子を含む2 - ハイブリッドシステムは、P53又はtk遺伝子を含むエフェクターをトランスアクティベートするために使用される。例中に表されるように、本方法は、APC - 欠陥細胞の高度に特異的な殺傷を提供する。

【0095】

本方法はインビトロでの使用に限定されない。逆に、欠陥細胞の高度に効果的な殺傷を提供する場合、キメラ分子又はキメラ分子を含む核酸はインビボで(例えば本明細書中に記載されるような遺伝子治療デリバリー方法を用いて)細胞へ運ばれる。それゆえ本方法は、多数の癌及び蓄積の他の疾患を治療する方法を提供する。

40

【0096】

C) 代謝欠陥についての選択的な補充

対象細胞を殺す代わりに、本発明の方法は1種又はそれ以上の代謝欠陥について選択的に補うことにも使用できる。この場合において、エフェクターは、細胞が欠乏するタンパク質(例えば酵素)を符号化する遺伝子又はcDNAである。所望の活性について欠乏する細胞内に2 - ハイブリッドシステムが導入される場合、2 - ハイブリッドシステムはエフェクターを変換し、それにより所望の代謝活性を開始させる(例えば特定の代謝生成物を

50

分解する)。

【0097】

D) 本発明の方法を使用する介在に適する例証的な病状

本発明の方法は、代謝生成物の蓄積により特徴付けられる必須の任意の条件における活性を有する試薬についてのアッセイに使用できる。同様に、本方法は分解欠陥を示す細胞を選択的に殺すことに使用できる。それゆえ、本発明の方法は蓄積疾患の治療又は蓄積疾患の治療においても有用な試薬のスクリーニングにおいて有用である。

【0098】

蓄積疾患(貯蔵疾患)は当業者に公知であり、そして限定するものではないが、グリコーゲン貯蔵疾患I、GM1ガングリオシドーズ、MPS IV B (Morquio B) 10、GM2ガングリオシドーズ(O、B、AB、B1変異体)、ニーマンピック病(A、B及びC)、異染性脳白質変性症(アリアルサルファターゼ A及びSAP-1欠乏)、クラッペ(Krabbe)病、ファブリー(Fabry)病、ゴーシェ(Gaucher)病、ファーバー(Farber)病、ウォルマン(Wolman)病(コレステロールエステル蓄積症)、MPS I (Hurler及びScheie症候群)、MPS II (Hurler症候群)、MPS III A、C及びD (Sanfilippo A、C及びD)、PS III B (Sanfilippo B)、MPS IV A (Morquio A)、MPS VI (Maroteaux-Lamy症候群)、MPS VII (ベータ-グルクロニダーゼ欠乏)、多発性スルファターゼ欠乏(multiple 20 sulfatase deficiency)、ミュークリピドーシス(Mucopolysaccharidosis) I (Sialidosis)、ミュークリピドーシス(Mucopolysaccharidosis) II & III、アルファ-マンノーシドーシス、ベータ-マンノーシドーシス、フコーシドーシス、シアル酸貯蔵疾患、ガラクトシアリドーシス、及びアスパルチルグルコサミン尿症シスチノーシスを含む。

【0099】

このような蓄積疾患の原因は、比較的よく理解されている。それゆえ、疾患に関連する2-ハイブリッドシステムにおいて使用される代謝生成物及びリガンドの同定は、比較的簡単である。例えばグルコセレブロシダーゼについてのゴーシェ病欠陥遺伝子は、マクロファージ内にグルコシルセラミドの蓄積を生じる。グルコシルセラミド又は細胞毒であるエフェクターを用いた同経路の他の成分を用いる本発明の2-ハイブリッドシステムの使用 30は、ゴーシェ表現型を示す細胞を選択的に殺すが、グルコセレブロシダーゼであるエフェクターの使用は、このような活性の必要性においてこれらの細胞中の失われた活性に取って代わる。同様に、クラッペ病はガラクトシルセラミダーゼ(GALC)酵素活性の欠乏により生じる致死demelinating条件である。これはセレブロシド(cerebroside)及びプシコシン(psychosine)の蓄積を導く。本発明の2-ハイブリッドシステム中の代謝生成物又はガラクトシルセラミダーゼのいずれかのエフェクターとしての使用は、そのような活性の必要性について細胞内の所望の代謝生成物を選択的に置きかえるシステムを提供する。

【0100】

本発明の方法は、多くの癌の治療において又は多くの癌の治療において有用である治療試薬についてスクリーニングするためにも有用である。例えば、欠陥あるAPCは多数の癌(全ての結腸癌の80-85%)において観察される。さらに、Wnt-1のウイルス活性化は、乳腺腫瘍を引き起こし、多種の癌において見出される破壊に対して - カテニンを耐性にする(例えばPolakis (1999) Curr. Opin. Gene. Dev., 9: 15 参照)。

【0101】

II 本発明の方法の成分

A) 第一及び第二キメラ分子

本発明の方法は、核酸結合ドメインを有する第一キメラ分子及び調整ドメイン(例えばトランスアクティベーター又はリプレッサー)を有する第二キメラ分子を含む哺乳動物2- 50

ハイブリッドシステムを利用する。第一キメラ分子は、好ましくは関心ある代謝生成物（例えば γ -カテニン）であるドメインを含むが、第二キメラ分子は、第一キメラ分子を含む代謝生成物ドメインを結合させるリガンド、酵素等であるドメインを含む。リガンド及び代謝生成物は交換可能である。すなわち、第一キメラ分子がリガンドを有しかつ第二キメラ分子が代謝生成物を有してもよい。

【0102】

例1に表されるAPCシステムにおいて、第一キメラ分子はGal4ドメイン及び γ -カテニンドメインを含み、第二キメラ分子はTcf4ドメイン及びVP16ドメインを含む。該成分は逆でもよく第一キメラ分子はGal4ドメイン及びTcf4を含み、第二キメラ分子が γ -カテニン及びVP16を含んでもよい。さらに、リガンドはTcf4である必要はない。必然的に、 γ -カテニンに結合するWnt経路における任意の分子が好適である。それゆえ、例えばTcfはTcf1、Tcf3、Lef1又はTcfファミリーの他のメンバーに置き換えられることができる。Wnt信号経路において含まれる他の分子は、限定するものではないがアキシン、乱雑な、GSK3、 β -TrCP、カゼインキナーゼ1及びII、タンパク質ホスファターゼ2A、並びにFRAT（発展したT細胞lymphomas中で頻繁に再配列される）。

10

【0103】

それゆえ、本発明の2-ハイブリッドシステムは：1）代謝生成物（又はそれらのフラグメント）、2）代謝生成物又はそれらのフラグメントに結合するリガンド、3）調整（発現コントロール）ドメイン、4）核酸結合ドメイン、を含む。核酸結合ドメイン及び調整ドメインは異なるキメラ細胞上にある。

20

【0104】

1) 代謝生成物

本発明の方法の2-ハイブリッドシステムにおける使用のための代謝生成物（又はそれらのフラグメント）の選択は、関心ある特定の代謝経路又は病状の機能である。例1において表されるように、Wnt信号経路について有用な代謝生成物は、 γ -カテニンである。

【0105】

マクロファージ内にグルコシルセラミダーゼの蓄積を生じるグルコセレブロシダーゼの不活性化により特徴付けられるゴーシェ病の場合、グルコシルセラミダーゼ又はグルコセレブロシダーゼは、本発明の方法の使用のための効果的なターゲット（代謝生成物又は酵素）を提供する。同様に、クラッペ病、致死ミエリン除去コンディションは、セレブロシド及びpsychosineの蓄積を導くガラクトシルセラミダーゼ（GALC）酵素活性の欠乏により発生する。さらに、蓄積された代謝生成物及び/又は欠乏酵素及び/又は同代謝経路の他の分子は、本発明の方法の使用のために良好なターゲットを提供する。

30

【0106】

本明細書で使用される教示を使用すると、当業者は本発明の方法によるアッセイ及び治療のための2-ハイブリッドシステムにおける使用のために他の代謝生成物を直ちに決定することができる。

【0107】

2) 代謝生成物に結合するリガンド

代謝生成物に結合するリガンドは、代謝生成物を生成又は分解する代謝生成物経路中で見出される天然発生分子であることができる。その代わり、関心ある代謝生成物を結合させることに使用されるリガンドは、代謝生成物を正常に生成又は分解する経路において見出されるリガンドである必要はない。代謝生成物を結合させる任意のリガンド、より好ましくは代謝生成物を特異的に結合させるリガンドが適している。それゆえ、例えば例1に表されるシステムは、TCF/Lefファミリーのメンバーを利用する。TCFファミリーメンバーは γ -カテニンに結合することが公知であるが、 γ -カテニンを生成又は分解する経路において、関連するものと信じられている。

40

【0108】

リガンドは、自然発生分子である必要はない。それゆえ、例えばリガンドが特定の分子（

50

例えばゴーシェ病におけるグルコシルセラミド)用に必要とされる場合、多数の公知の技術(例えばファージディスプレイ又は示された進化の他の方法)のうちの任意のものを用いて直ちに発生させることができる。高度の親和性を有する特定の分子を特異的に結合させる一本鎖ポリペプチドを同定するためのファージディスプレイライブラリーの使用は当業者に公知である(例えば、McCafferty等(1990)Nature, 348: 552-554; Hoogenboom等(1991, Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137; Marks等(1991)J. Mol. Biol. 222: 581-597; Marks等(1993). Bio/Technology, 10: 779-783; Griffiths等(1993)EMBO J. 12: 725-734; Clackson等(1991)Nature. 352: 624-628)。 10

【0109】

3) 発現コントロールタンパク質/ドメイン

本発明の2-ハイブリッドシステムにて使用されるキメラ分子の一つは、発現コントロール(調整)ドメインを含む。発現コントロールドメインは、典型的には遺伝子又はcDNAの発現を変えるポリペプチドである。典型的な発現コントロールタンパク質は、(遺伝子又はcDNAの発現をアップレギュレートする)トランスアクティベーター又は(遺伝子又はcDNAの発現をダウンレギュレートする)リプレッサーである。

【0110】

ある特定の好適な具体例において、発現コントロールタンパク質はVP16であるが、好適な具体例において、公知のトランスアクティベータタンパク質のTATAボックス結合ドメインは、VP16に取って代わることができる。他の好適なトランスアクティベーターは、当業者に公知である。種々のトランスアクティベーターは、限定するものではないが、E2F-4(米国特許第6,045,999号)、ヒト転写因子(米国特許第46,001,971号参照)、転写因子Isllet-Brain 1(IBM1)(米国特許第5,880,261号)、日和見感染からのTFIIB転写因子(米国特許第5,863,762号)、DP1(米国特許第5,863,757号)、DP-3(米国特許第5,859,199号)、肝臓富化転写因子(米国特許第5,849,485号)、RNAポリメラーゼ転写因子(米国特許第5,792,634号)、転写因子APRF(急性段階応答因子)(米国特許第5,719,042号)、細胞型特異性転写因子(米国特許5,710,025号)、p300転写因子(米国特許第5,658,784号)、ヒト転写因子IIA(米国特許第5,652,117号参照)、S-II転写因子(米国特許5,196,303)等を含む。 20 30

【0111】

好適な具体例においては、本発明はトランスアクティベーターである発現コントロールドメインを利用するが、所定の具体例においては、コントロールエレメントは遺伝子又はcDNA転写のリプレッサーであるものが使用される。種々の転写リプレッサーは当業者に公知である。これらは、限定するものではないが、Kruppel様因子(米国特許第6,077,933号)、テトラサイクリンリプレッサー(米国特許第5,972,650号及び5,917,122号)、ETS2リプレッサー(米国特許第5,856,125号)、パピローマウイルスE2トランスアクティベーションリプレッサー(米国特許第5,595,884号)、CI434リプレッサー、プラスミド(米国特許第5,147,789号)等を含む。 40

【0112】

4) 核酸結合ドメイン

実際には、任意の核酸結合タンパク質又はそれらの中の結合ドメインが、本発明の2-ハイブリッドシステム中で使用できる。好ましくは、結合タンパク質は、結合されたトランスアクティベーターが適切に配置された遺伝子又はcDNAの発現をアップレギュレートすることができる十分な親和力を有する特定の核酸シーケンスへ結合する。他の多くの核酸結合分子は当業者に公知であるがGal4ドメインは良好に特徴化され及び特別に好ましい具体例を提供する。例えば、米国特許第6,010,849号及び5,578,44 50

4号は、(典型的には非タンパク質)核酸結合分子の迅速な同定のためのアッセイを提供し、そして多数の例証となる分子も提供する。

【0113】

他の核酸結合タンパク質は、種々のトランスアクティベーターを含み、そしてジンクフィンガー(zinc-finger)モチーフの存在によりしばしば特徴付けられる。好適な核酸結合タンパク質及びそれらの及び他の核酸結合タンパク質を同定するためのアッセイは、当業者に公知である。それゆえ、例えば米国特許第6,066,452号は多重DNA結合タンパク質用の結合サイトシーケンス同時に選択する方法を教示する。米国特許第6,07,988号は、特定のターゲットシーケンスに結合するためのジンクフィンガーポリペプチドをデザインする方法を開示し、そして多数の好適なジンクフィンガーポリペプチドを列挙する。米国特許5,773,583号は、特定のDNAシーケンスに結合する多数の“Egr”タンパク質を開示する。

10

【0114】

本明細書中で提供される教示を使用すると、他の好適な核酸結合タンパク質/結合ドメインは、過度の経験を有さない当業者により直ちに決定されることができる。

【0115】

5) キメラ分子の調製

本発明の2-ハイブリッドシステムを含むキメラ分子は、化学的にコンジュゲートされたドメインであることができる、或いは該ドメインがアミノ酸又はペプチドリinkerによりリンクされる場合は、組換え発現される融合タンパク質であることができる。キメラ分子が化学的にコンジュゲートされる場合、キメラ分子は細胞へ運ばれる。キメラ分子が融合タンパク質である場合、融合タンパク質自体が細胞へ運ばれるか、又は融合タンパク質を符号化する核酸が、所望の融合タンパク質を生成する細胞内へトランスフェクトされるかのいずれかである。

20

【0116】

化学的に分子をコンジュゲートすることの分子の意味は、当業者に公知である。ポリペプチドは典型的には種々の官能基;例えば、カルボン酸(COOH)又は自由アミン(-NH₂)基を含み、それはエフェクター分子における好適な官能基を用いた反応に利用でき、それらへエフェクターを結合させるのに利用できる。その代わりに、キメラ分子を含む成分(例えばGal4及び-カテニン)はデリバタイズされることができ、さらなる反応性の官能基を曝し及び結合できる。この発現は、Pierce Chemical Company, Rockford Illinoisから市販入手できるもののような多数のリンカー分子のうち任意のものの結合を含む。

30

【0117】

本明細書中で使用される“リンカー”とは、キメラ分子の2種のドメインを繋ぐことに使用される分子である。好適な具体例において、リンカーは両方のドメインに対して共有結合を形成することができる。好適なリンカーは当業界で公知であり、限定するものではないが、直鎖又は分岐鎖炭素リンカー、ヘテロ環状炭素リンカー又はペプチドリinkerを含む。所定の具体例において、リンカーはそれらの側基を通して(例えばシステインに対するジサルファイド結合を通して)アミノ酸に連結できる。しかし、好適な具体例において、リンカーはアルファ炭素アミノ及び末端アミノ酸のカルボキシル基と連結する。リンカーは二官能性であることができ、第1ドメイン(例えばGal4)上での置換基と反応性の官能基と第2ドメイン(例えば-カテニン)の置換基と反応性の別の官能基を有する。その代わりに、2種のドメインがデリバタイズされ、“一官能性”リンカーと反応してもよい(例えば、ペプチドにおける反応性の基を発生させる手順について米国特許第4,671,958号及び4,659,839号を参照されたい)。

40

【0118】

特に好適な具体例において、本発明のキメラ分子は融合タンパク質である。融合タンパク質は標準的な化学ペプチド合成技術を用いて合成され、より好ましくは組換え発現される。両方の分子が比較的短い場合、キメラ分子は単一の接触ポリペプチドとして化学的に合

50

成される。シーケンスのC-末端アミノ酸が不溶性支持体に結合し、シーケンス内の残渣アミノ酸が連続的に付加する固相合成は、本発明のポリペプチドの化学合成の好ましい方法である。固相合成についての技術は、Barany及びMerrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; 3-284頁 in The Peptide: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield等 J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963)、及びStewart等., Solid Phase Peptide Synthesis, 2版 Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)により記載される。

10

【0119】

最も好適な具体例において、本発明のキメラ分子は組換えDNA方法論を用いて合成される。一般的には、これは融合タンパク質を符号化するDNAシーケンスを生成し、特定のプロモーターのコントロール下で発現カセット中にDNAを配置させ、そしてキメラ(融合)タンパク質を宿主細胞内に発現させる。

【0120】

本発明中で使用される融合タンパク質を符号化するDNAは、任意の好適な方法、例えばクローニング及び適当なシーケンスの制限、又はNarang等(1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99のホストリエステル方法; Brown等(1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151のホスホジエステル方法; Beauccage等(1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862のジエチルホスホラミダイト方法; 及び米国特許第4,458,066号の固体支持方法を含む任意の好適な方法により調製できる。

20

【0121】

化学合成は一本鎖オリゴヌクレオチドを生成する。これは、相補的シーケンスを用いたハイブリダイゼーションにより、又は鋳型として一本鎖を使用するDNAポリメラーゼを用いた重合により、二本鎖DNAに変換される。当業者は、DNAの化学合成は約100~500塩基のシーケンスに限定されるが、短いシーケンスのライゲーションにより長いシーケンスが得られることが理解できるであろう。

【0122】

その代わりに、シーケンスはクローン化されることができ、そして好適なシーケンスは好適な制限酵素を使用して開裂される。フラグメントはライゲートされ、所望のDNAシーケンスを生成する。

30

【0123】

好適な具体例において、本発明のDNA符号化融合タンパク質はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のようなDNA増幅反応を使用する。それゆえ、例えば例1に表されるように、ヒト-カテニンcDNAはBamHIリンカーを用いてPCR増幅され、pBINDのBamHIサイトへクローン化される。BamHIリンカーを用いてヒトTcf4cDNAはPCR増幅され、そしてpACTのBamHIサイトへクローン化される。

【0124】

リンカーは、核酸結合ドメインと代謝生成物間で或いはリガンド及びトランスアクティベーター間で、キメラ分子内に導入されることができ、リンカーは2つのドメインを、好適な具体例において、各ドメインが適切にその第二及び第三構造へ収まることを保証するに十分な距離により、分離することに使用される。好適なペプチドリンカーシーケンスは、フレキシブルに延びる形態を採用し、機能的なGM-CSF及びG250ドメインと相互作用できる整列第二構造を発展させるための傾向を示さない。フレキシブルなタンパク質領域における典型的なアミノ酸は、Gly、Asn及びSerを含む。実際には、上記基準を満足させるために、Gly、Asn及びSerを含むアミノ酸シーケンスの任意の入れ替えが予測される。Thr及びAlaのような他の良く似た神経アミノ酸も、リンカーシーケンスにおいて使用できる。リンカーとして使用できるさらに他のアミノ酸は、M

40

50

aratea等(1985), Gene 40:39-46; Murphy等(1986) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83:8258-62; 米国特許第4,935,233号; 及び米国特許第4,751,180号に記載される。

【0125】

ペプチドリinkerシーケンスの長さは、融合タンパク質の生物学的活性に大きく影響することなく変えることができる。長いリンカーシーケンスも使用できるが、本発明の好適な具体例において、約2のアミノ酸のペプチドリinkerシーケンス長は官能性タンパク質ドメインの好適な分離を提供するために使用できる。リンカーシーケンスは長さにおいて1~50アミノ酸であることができる。本発明の最も好適な態様において、リンカーシーケンスは長さにおいて1~20アミノ酸である。本明細書中に開示される特定の具体例において、リンカーシーケンスは約2~15アミノ酸で、そして有利には約2~10アミノ酸である。ペプチドリinkerシーケンスは本発明の融合タンパク質において必ずしも必要ではない。

10

【0126】

一般的には、リンカーは、タンパク質を連結し又はある最小距離若しくはそれらの間の他の空間的関係を保つ以外には特別な生物学的活性を有しない。しかし、スペーサーの構成アミノ酸は、保護、ネットチャージ又は疎水性のような分子のある特性に作用するように選択できる。

【0127】

本発明の2-ハイブリッドシステムを含む2つのキメラ分子のいずれかが組み合わせて発現されることが所望である場合、G250、GM-CSF、又はG250-GM-CSF融合タンパク質、所望のタンパク質を符号化する核酸シーケンスは、典型的には好適な転写若しくは翻訳調整エレメントと操作可能にリンクする。調整エレメントは、典型的には転写プロモーター、転写をコントロールするための随意のオペレーターシーケンス、好適なmRNAリボゾーム結合サイトを符号化するシーケンス、転写及び翻訳の終結をコントロールするシーケンスを含む。複製の起源により通常与えられるホスト中で複製する能力及び形質転換の認識を容易化するための選択遺伝子がさらに導入できる。

20

【0128】

融合タンパク質を符号化する核酸シーケンスは、E. coli 及び他のバクテリアホスト、最も好ましくは限定するものではないが酵母、昆虫細胞及び哺乳動物細胞を含む真核生物ホスト細胞を含む種々のホスト細胞内で発現される。組換えタンパク質遺伝子は、各ホストについての適切な発現コントロールシーケンスに操作可能にリンクする。

30

【0129】

本発明のプラスミドは、E. coli についての塩化カルシウム形質転換及び哺乳動物細胞についてのリン酸カルシウム処理又はエレクトロポレーションのような公知の方法により、選ばれたホスト細胞中に輸送されることができる。インビボトランスフェクションは、例えば本明細書中に記載される標準的な遺伝子治療方法を使用して達成される。

【0130】

これらの技術の例及び多くのクローニング実施を通じて当業者に指示するために十分な教示は、Berger及びKimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook等(1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2版) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook等); Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等版, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. 及びJohn Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel); Cashio

40

50

n等., 米国特許第5,017,478;及びCarr, 欧州特許第0,246,864号中に見出せる。

【0131】

インビボの増幅方法を通して当業者を指示するに十分な技術の例は、Mullis等., (1987) 米国特許第4,683,202号; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis等版) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim&Levinson (1990年10月1日) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; (Kwoh等 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Gautelli等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell等 (1989) J. Clin. Chem., 35: 1826; Landegren等 (1988) Science, 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology, 8: 291-294; Wu及びWallaca, (1989) Gene, 4: 560; 及びBarringer等 (1990) Gene, 89: 117 同様に、Berger, Sambrook及びAusbel中に見出せる。

【0132】

C 核酸

本発明の2-ハイブリッドシステムの核酸成分は標準的な方法に従って製造される。典型的には、核酸は核酸結合分子(例えばGAL4)により認識される結合ドメイン及び1種又はそれ以上の遺伝子若しくはcDNAを含む発現カセットを含む。2-ハイブリッド複合物が結合サイトに結合するようにタンパク質結合サイトに関して位置付けられた発現カセットは、発現カセットを含む遺伝子又はcDNAの転写を果たすことができる。

【0133】

そのような核酸を生成する方法は、当業者に公知でありかつ本明細書中の例1に表される。

【0134】

D 細胞

実際には、任意の細胞が本発明の2-ハイブリッドシステムを収容できる。しかし、好適な細胞は真核細胞であり、及びより好ましくは哺乳動物細胞であり、最も好ましくはヒト細胞である。細胞は、長期培養(long term culture)細胞を含む(例えばHeLa細胞、CHO細胞、SW480細胞、SW48細胞、DLD-1、HCT-116、HT29、293細胞、U2OS、T-47D、MCF-7、A549、Hep G、Jarkat細胞等)。細胞は急性の(非通過)細胞及びインビボ細胞も含むことができる。

【0135】

細胞は、本発明の2-ハイブリッド成分を含むキメラ分子を符号化する核酸を用いてトランスフェクトされ、又はキメラ分子は細胞内に(例えばマイクロインジェクション、脂質エンカプスレーション、HIV TATタンパク質媒介輸送等を介して)直接的に導入され得る。特に、非常に大きなタンパク質に対して融合する場合、ヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質(HIV TAT)は血液脳関門でさえ通過する生物学的活性のタンパク質のデリバリーを生じる(例えばSchwarze等(1999) Science, 285: 1569-1572及びそこで引用された参考文献を参照されたい)。

【0136】

細胞も本発明の方法のタンパク質結合サイトを符号化する核酸及びエフェクター分子を含むことが好ましい。

【0137】

具体例に依存して、細胞は本発明の2-ハイブリッドシステムの1種又はそれ以上の成分を含む。それゆえ、細胞は、キメラ分子のいずれか又は両方及び/又はキメラ分子のいず

れか又は両方を符号化する核酸及び／又は結合サイト及びエフェクター遺伝子を含む核酸を含むことができる。

【0138】

III 細胞中への構造物の配置

キメラ細胞は細胞内に直接導入でき、キメラ分子が融合タンパク質の場合は、タンパク質を符号化する核酸は、当業者に公知の標準的な方法に従って細胞内に導入できる。

【0139】

細胞が急性又は培養中のものである場合、半ピボトランスフェクションの標準的な方法が利用できる。これらは、限定するものではないが、マイクロインジェクション、バイオリスティック輸送、脂質媒介輸送、デンドリマー媒介輸送、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム輸送等を含む。

10

【0140】

キメラ分子自体が細胞中に導入される場合は、医薬を細胞内に輸送する標準的な方法が使用できる。このような方法は、限定するものではないが、リボソームエンカプスレーション、マイクロインジェクション、輸送を容易化する HIV TAT ドメインの使用等を含む。

【0141】

A) 2 - ハイブリッドシステムの成分の発現のための構成

キメラ分子（例えば Gal4 - カテニン、Tcf4 - VP16、Gal4 - Tcf4、カテニン - VP16 等）を発現させるために、キメラ分子を発現する遺伝子 / cDNA は典型的には発現カセット内に配置される。発現カセットは、典型的には遺伝子及び／又は cDNA の直接的な発現に十分な調整機構（例えば真核生物プロモーター、出発サイト、停止サイト等）を含む。本明細書中で提供されるシーケンス情報を使用して、発現カセットは発現するために適している。

20

【0142】

遺伝子 / cDNA は、典型的には対象の核酸の転写を示すプロモーターのコントロール下（すなわち操作可能にリンクする）に配置される。プロモーターは構造的で誘導可能である。組織特異的な発現が所望である場合、プロモーターは組織特異的なプロモーターであることができる。

【0143】

本発明の状況において、広範囲の組織特異的なプロモーターが利用できる。このようなプロモーターの典型的な例としては、限定するものではないが、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ（“PEPCK”）（Hatzoglou 等（1988）J. Biol. Chem. 263: 17798 - 808; Benveniste 等（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1118 - 1122; Vaulont 等（1989）Mol. Cell. Biol. 9: 4409 - 4415）; IgG プロモーターのような B 細胞特異的プロモーター; 癌胚性抗原プロモーター（CEA）のような乳癌又は肝細胞性癌特異性プロモーター（Schrewe 等（1990）Mol. and Cell. Biol. 10: 2738）; エラスターゼプロモーターのような膵臓腺房特異的プロモーター（Swift 等（1989）Genes Develop. 3: 687 - 96）; カゼインプロモーターのような乳上皮特異的プロモーター（Doppler 等（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 104 - 108）; ボルホビリノゲンデアミナーゼプロモーターのような赤芽球細胞内にて活性な赤芽球特異的転写プロモーター（Mignotte 等（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6458 - 6452）; - 又は - グロビン特異性プロモーター（van Assendelft 等（1989）Cell 56: 969 - 977; Forrester 等（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5439 - 5443）; myo-D 結合サイトのような骨格筋を調整するプロモーター（Burden（1989）Nature 341: 716; Weintroub 等（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5434 - 5438）;

30

40

50

インスリンプロモーターのような膵臓のベータ細胞に特異的なプロモーター (Ohlsson等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4228 - 4231; Karlsson等 (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 823 - 827); 成長ホルモン因子プロモーターのような下垂体について特異的なプロモーター (Ingraham等 (1988) Cell 55: 519 - 529; Bodner等 (1988) Cell 55: 505 - 518); チロシン水酸化酵素プロモーターのような黒色腫について特異的なプロモーター; アルブミンプロモーター及びアルファフェトタンパク質プロモーターのような肝臓特異性プロモーター (Feuerman等 (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 4204 - 4212; Camper 及び Tilghman (1989) Genes Develop. 3: 537 - 546); HER2/neu 10
プロモーターのような乳癌特異性プロモーター (Tal等 (1987) Mol. and Cell. Biol. 7: 2597); アルコール脱水素酵素プロモーターのような肝臓特異性プロモーター (Felder (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5903 - 5907); T-細胞レセプタープロモーターのようなT-細胞特異性プロモーター (Anderson等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3551 - 3554; Winto及び Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729 - 733); オステオカルシンプロモーターのような骨特異性プロモーター (Markose等 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1701 - 1705; McDonnell等 (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 3517 - 3523; Kerner等 (1989) Proc. N 20
atl. Acad. Sci. USA 86: 4455 - 4559)、IL-2プロモーター、IL-2レセプタープロモーター、乳漿 (ワップ) プロモーター及びMHCクラスIIプロモーター等、を含む

【0144】

該構造は、随意にホストゲノムDNAの領域に対して相補的なフランキング (flanking) シーケンスを含み、(例えば下記のような類似の組換えを通じて) ホストゲノム内へのカセットの統合を容易化する。さらに又は代わりに、フランキングシーケンスは1種又はそれ以上の組み換え酵素認識サイト (例えばLoxP又はFLP) を含むことができ、組み換え酵素 (例えばCre) の使用を通じて発現カセットの統合を容易化する。

【0145】

B) インビボトランスフェクション

所定の好適な具体例において、本発明の2-ハイブリッドシステムはインビボで細胞内に導入され、代謝欠陥を表す細胞 (例えば、所定の癌細胞) を選択的に殺し、又はそのような活性が消滅又は不足する細胞内の特定の酵素活性を誘導する。ある具体例において、HIV-TAT融合タンパク質を用いて、キメラ分子は細胞内に“直接的に”すなわち組替発現されないで) 導入されるが (例えばSchwarze等 (1999) Science, 285: 1569 - 1572及びそれらの中に引用される参考文献参照)、好適な具体例においては、キメラ分子は組換え発現された融合タンパク質である。両方のタンパク質が単一の核酸又は別々の核酸から発現されることができる。同様に、タンパク質結合サイト及びエフェクターcDNAを符号化する核酸は、キメラ分子を符号化する核酸の成分 40
であることができる、又は別々の核酸であることができる。典型的には、キメラ分子を符号化する核酸及び/又は結合サイトを含む核酸並びにエフェクターは、“遺伝子治療”の標準的な方法を使用して細胞内に導入される。

【0146】

核酸をインビボ、半ビボ及びインビトロで細胞内に核酸を導入する数種のアプローチが使用されてきた。これらは脂質又はリポソームベースの遺伝子デリバリーを含む (WO96/18372; WO93/24640; Mannino及びGould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682 - 691; Rose 米国特許第5,279,833号; WO91/06309; 及びFelgner等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 - 7414) 及びレトロ 50

ウイルスゲノムの一部として治療のポリヌクレオチドシーケンス有する複製欠陥レトロウイルスベクター（例えばMiller等（1991）Mol. Cell. Biol. 10: 4239（1990）；Kolberg（1992）J. NIH Res. 4: 43及びCornetta等（1991）Hum. Gene Ther. 2: 215）を含む。

【0147】

遺伝子治療手順のレビューについては、例えばAnderson, Science（1992）256: 808 - 813；Nabel及びFelgner（1993）TIBTECH 11: 211 - 217；Mitani及びCaskey（1993）TIBTECH 11: 162 - 166，Mulligan（1993）Science, 926 - 932；Dillon（1993）TIBTECH 11: 167 - 175，Miller（1992）Nature 357: 455 - 460；Van Brunt（1988）Biotechnology 6（10）: 1149 - 1154；Vigne（1995）Restorative Neurology and Neuroscience 8: 35 - 36；Kremer及びPerricaudet（1995）British Medical Bulletin 51（1）31 - 44；Haddada等（1995）in Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler及びBoehm（eds）Springer-Verlag, Heidelberg Germany；及びYu等（1994）Gene Therapy, 1: 13 - 26を参照されたい。

10

【0148】

広く使用されるレトロウイルスベクターは、マウス白血病ウイルス（MuLV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、アルファウイルス及びそれらの組合せに基づくものを含む（例えば、Buchsher等（1992）J. Virol. 66（5）2731 - 2739；Johann等（1992）J. Virol. 66（5）1635 - 1640（1992）；Sommerfelt等（1990）Virol. 176 58 - 59；Wilson等（1989）J. Virol. 63: 2374 - 2378；Miller等J. Virol. 65: 2220 - 2224（1991）；Wong-Staal等PCT/US94/05700、及びRosenburg及びFauci（1993）in Fundamental Immunology, 3版, Paul（ed）Raven Press, Ltd., New York及びそれらの中の参考文献、並びにYu等（1994）Gene Therapy, supra；米国特許6,008,535等参照）。

20

30

【0149】

ベクターは偽性分類（pseudotyped）され、ベクターに対応するレトロウイルスにより感染していない細胞に対するベクターのホスト範囲を広げる。例えば、水疱性口内炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質（VSV-G）は、造血幹細胞を感染させるVSV-G-偽性分類HIVベクターを構成することに使用される（Naldini等（1996）Science 272: 263，及びAkkin等（1996）J. Virol. 70: 2581）。

【0150】

例えば、核酸及びペプチドのインビトロ生成及びインビボ及び半ビボ遺伝子治療手順において、アデノアソシエイテウイルス（AAV）をベースとするベクターも使用でき、ターゲット核酸を用いて細胞を形質導入する。AAVベクターのあらましについては、West等（1987）Virology 160: 38 - 47；Carter等（1989）米国特許第4,797,368号；Carter等WO93/24641（1993）；Kotin（1994）Human Gene Therapy 5: 793 - 801；Muzyczka（1994）J. Clin. Invest. 94: 1351を参照されたい。組換えAAVベクターの構成は、Lebkowski米国特許第5,173,414号；Tratschin等（1985）Mol. Cell. Biol. 5（11）: 3251 - 3260；Tratschin等（1984）Mol. Cell. Biol. 4

40

50

: 2072 - 2081; Hermonat 及び Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466 - 6470; McLaughlin 等 (1988) 及び Samulski 等 (1989) J. Virol., 63: 03822 - 3828、を含む多数の刊行物に記載される。rAVVにより変換され得る細胞株は、Lebkowski 等 (1988) Mol. Cell. Biol., 8: 3988 - 3996 に記載されるものである。他の好適なウイルスベクターはヘルペスウイルス、レンチウイルス及びワクシニアウイルスを含む。

【0151】

1) レトロウイルストランスフェクションシステム

ある特定の好適な具体例において、レトロウイルス（例えばレンチウイルス）は、ターゲット細胞を種々の成分を符号化する核酸を用いて本発明の 2 - ハイブリッドシステムに対してトランスフェクトすることに使用される。レトロウイルス、特にレンチウイルス（例えば HIV、SIV 等）は、この適用について特に好適である、なぜならそれらは非分離（non-dividing）細胞を感染させることができるからである。核酸トランスフェクションのためにレトロウイルスを使用する方法は、当業界で公知である（例えば米国特許第 6,013,576 号参照）。

【0152】

レトロウイルスは RNA ウイルスであり、ウイルスゲノムは RNA である。ホスト細胞がレトロウイルスに感染した場合、ゲノム RNA は、感染細胞の染色体 DNA 中に非常に効率的に統合された DNA 媒体へ逆転写される。統合された DNA 媒体は、プロウイルスと呼ばれる。プロウイルスの転写と感染ウイルスへの集合は、好適なヘルパーウイルスの存在下又は混入ヘルパーウイルスの同時生成なしにエンカプシデーション（encapsulation）を可能にする好適なシーケンスを含む細胞株にて起こる。好適な具体例において、エンカプシレーションのためのシーケンスは好適なベクターを用いたコ-トランスフェクションにより生成されることができ、ヘルパーウイルスは組換えレトロウイルス生成のために利用される必要はない。

【0153】

レトロウイルスゲノム及びプロウイルス DNA は 3 種の遺伝子を有する： gag、pol 及び env、これらは 2 種の末端反復配列（LTR）シーケンスによりフラंकされる。gag 遺伝子は内部構造（マトリックス、キャプシド及びヌクレオキャプシド）タンパク質を符号化する；pol 遺伝子は RNA 指定 DNA ポリメラーゼ（逆転写酵素）を符号化し、そして env 遺伝子はウイルスエンベロープ糖タンパク質を符号化する。5' 及び 3' LTR はピリオン RNA の転写及びポリアデニル化を促進させる。LTR はウイルス複製に必要な全ての他のシス作用シーケンスを含む。レンチウイルスは（HIV-1、HIV-2 及び / 又は SIV 中の）vit、vpr、tat、rev、vpu、nef 及び vpx を含む他の遺伝子を有する。

【0154】

ゲノム（tRNA 結合サイト）の逆転写及びウイルス RNA の粒子（Psi サイト）内への効率的なエンカプシデーションのために必要なシーケンスは、5' LTR に隣接する。エンカプシデーション（又はレトロウイルス RNA の感染ピリオンへのパッケージング）に必要なシーケンスがウイルスゲノムから無くなる場合、ゲノム RNA のエンカプシデーションを阻止するシス欠陥が生じる。しかし、生じた変異体は、さらに全てのピリオンタンパク質の合成を示すことができる。

【0155】

ある好ましい具体例において、本発明は、非分離細胞に感染可能な組換えレトロウイルスを提供する。上述のように、組換えレトロウイルスは、ウイルス性 GAG、ウイルス性 POL、ウイルス性 ENV、調節核酸シーケンスと操作可能にリンクする異質構造の核酸シーケンス、及びパッケージング、逆転写及び統合に必要なシス作用核酸シーケンスを含む。本発明の組換えレトロウイルスは、非分離細胞はもちろん分離細胞に感染することができることを理解されたい。

10

20

30

40

50

【0156】

好ましい具体例において、組換えレトロウイルスは、それゆえ、ネイティブウイルス（例えばenv、gag、pol）の構造的、感染遺伝子の数種が取り除かれそして核酸シーケンスに置き換えられターゲット非分離細胞へ運ばれるような方法により、遺伝子改変される（例えば、本発明の2 - ハイブリッドシステムの種々の成分を符号化するシーケンス）。ウイルスによる細胞の感染後、ウイルスは核酸を細胞内へ注入し、そしてレトロウイルス遺伝物質は、時折、ホスト細胞ゲノム内へ統合される。統合され又はエピソームのいずれかであっても、移されたレトロウイルス遺伝物質は、ホスト細胞内で本発明の2 - ハイブリッドシステムの種々の成分内に転写及び翻訳される。レンチウイルスベクターを作成及び使用する方法は、米国特許第6,013,516号、第5,932,467号等で詳しく議論される。 10

【0157】

2) アデノウイルスベクターシステム

他の好適な具体例において、本発明の2 - ハイブリッドシステムの1種又はそれ以上の成分は、遺伝子治療用に好適なアデノウイルスベクターにて発現される。アデノウイルスベクターの使用はWO96/25507において詳細に記載される。特に好適なアデノウイルスベクターは、Wills等(1994) Hum. Gene Therap. 5:1079-1088により記載される。典型的には、アデノウイルスベクターは、アデノウイルス初期(early)領域3及び/又は初期領域4において欠失を含み、そしてこの欠失はタンパク質IX遺伝子の数種又は全部の欠失を含むことができる。ある具体例において、アデノウイルスベクターはE1a及び/又はE1bの欠失を含むことができる。 20

【0158】

多数の異なるアデノウイルスベクターは、遺伝子輸送のために最適化される。このようなアデノウイルスベクターの1つは、米国特許第6,020,191号に記載される。このようなベクターは、導入遺伝子が操作可能にリンクするCMVプロモーターを含み、そしてE1欠失及びE3領域からの1.6kbの部分欠失を含む。これは、導入遺伝子（例えばサブユニット遺伝子）及びその発現コントロールシーケンスが挿入され得るE1領域、好ましくはこのベクター内に含まれるCMVプロモーターを含む複製欠陥ベクターである。それはさらに野生型アデノウイルスE2及びE4領域を含む。ベクターはアデノウイルスヌクレオチド29292~30840の1549ヌクレオチドを包含するE3領域内の欠失を含む(Robert等(1986) Adenovirus DNA, in Development in Molecular Virology, W. Doerfler, ed., 8:1-51)。ベクター内のE3領域へのこれらの改変は以下のことを生じる：(a) 全ての下流の接続アクセプターサイトが欠失し、そしてmRNAのみがE3プロモーターから合成される(Tollifson等(1996) J. Virol. 70:2296-2306, 1996; Tollifson等(1996) Virology 220:152-162,); (b) E3AポリAサイトが欠失する、しかしE3BポリAサイトは残る；(c) E3gp19K(MHC I 結合タンパク質) 遺伝子が残る；そして(d) E3 11.6K(Ad死タンパク質) 遺伝子が欠失する。 30

【0159】

このようなアデノウイルスベクターは、限定するものではないがアデノウイルス抗原型2, 5及び好ましくは他の全ての非発癌性抗原型を含む任意のアデノウイルス抗原型からのアデノウイルス遺伝子シーケンスを利用できる。 40

【0160】

1種の好適な具体例において、サイトメガロウイルス(CMV)即時型初期プロモーターは(Boschardt等(1985) Cell 41:521-530)、本発明の2 - ハイブリッドシステムを含むキメラ分子の発現をコントロールすることに使用される。CMVプロモーターは、転写ユニット内の導入遺伝子に対して5'へ位置付けられる。完全長プロモーターの一部は、導入遺伝子の持続性の発現をさせる能力についてテストできる。

【0161】

導入遺伝子の 3' 末端に位置することができるポリアデニル化信号は、限定するものではないが、ウシ成長ホルモン (BGH) 及び SV40 から誘導されるものを含む。

【0162】

ある好適な具体例において、本明細書中に記載の 2 - ハイブリッドシステムの成分を符号化する転写ユニット (発現カセット) を含む本発明の組換えアデノウイルスベクターを生成するために、アデノウイルスゲノムフラグメントへ挿入される転写ユニットを含むプラスミドは、関心あるアデノウイルスベクターから受容細胞へ誘導される線状化ウイルスを用いて、それにより相同組換えがゲノムフラグメントとウイルスとの間で起こる条件下において、コ-トランスフェクトされる。好ましくは、転写ユニットは E1 欠失のサイト内に処理される。結果として、所望の導入遺伝子を符号化する転写ユニットは、プラスミドヘクロン化されるサイトにおいてアデノウイルスゲノム内へ挿入され、組換えアデノウイルスベクターを生成する。相同組換えに続いて、ベクターゲノムはウイルス血小板の形成により証明されるように、ピリオン内にエンカプシデートされる。複製 - 欠失ベクターストックの製造は、相同性ウイルス遺伝子がベクターから欠失される細胞株、例えば欠失されたアデノウイルス E1 ゲノムシーケンスを含む 293 若しくは A549 細胞を使用して達成できる。好適な相同細胞株における血小板の増幅後、ウイルスは凍結 - 解凍により回復され及びその後の塩化セシウム遠心分離を使用して精製される。その代わりに、ウイルス精製は、(例えば、国際出願 PCT/US96/13872 に示されているように) クロマトグラフィー技術を使用して行われることができる。

10

【0163】

複製 - 欠陥アデノウイルスベクターストックの滴定濃度は、相同する細胞株、例えば 293 細胞中の血小板形成により測定される。例えば、抗体を使用するヘクソン (hexon) タンパク質に対する終点希釈は、定量的なウイルス生成に使用できる (Armetano 等 (195) Hum. Gene Ther. 6:1343-1353)。

20

【0164】

3) 非ウイルストランスフェクション

単独で又はウイルスベクターとの組合せで、多数の非ウイルスベクターは、本明細書中に記載される核酸構造を使用して細胞をトランスフェクトするためにも有用であり得る。好適な非ウイルスベクターは、限定するものではないが、プラスミド、コスミド、ファージミド、リボソーム、水 - 油乳化物、ポリエチレンイミン、バイオリスティックペレット / ビーズ、及びデンドリマーを含む。

30

【0165】

リボソームは 1965 年に初めて細胞膜のモデルとして記載され、そして細胞に物質を運ぶことに迅速に適用された。リボソームは一種又はそれ以上の機構により DNA を捕らえ、それはカチオン性リボソーム又は pH 感受性リボソームとしてそれらの分類を生じる。カチオン性リボソームは正に帯電したリボソームであり、負に帯電したリボソームと相互作用し、安定な複合体を形成する。カチオン性リボソームは、典型的には正に帯電した脂質及び共脂質 (co-lipid) からなる。一般的に使用される共脂質は、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) 又はジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC) を含む。ヘルパー脂質とも呼ばれる共脂質は、ほとんどの場合、リボソーム複合物の安定化のために必要とされる。種々の正に帯電した脂質配合物は市販入手でき、そして多くの他のものが改良中である。2 種の最も頻繁に引用されるカチオン性脂質は、リポフェクタミン及びリポフェクチンである。リポフェクチンは、1987 年に Phil Felgner により初めて報告された市販入手できるカチオン性脂質であり、培地中の細胞へ遺伝子を運ぶ。リポフェクチンは N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニオクロライド (DOTMA) と DOPE との混合物である。

40

【0166】

DNA とリポフェクチン又はリポフェクタミンは、自発的に相互作用し、100% 充填効率を有する複合体を形成する。言いかえると、十分な脂質が入手できる場合、必然的に全

50

てのDNAが脂質と複合される。DNA分子の負の帯電はDOTMAの正に帯電した群と相互作用するものと仮定される。脂質：DNA比及びこれらの複合物を形成することにおいて使用される全体の脂質濃度は、効率的な遺伝子輸送に非常に重要であり、そして適用とともに変化する。リポフェクチンは線状DNA、プラスミドDNA及びRNAを培地中の種々の細胞中に運ぶことに使用される。その導入の少し後に、リポフェクチンは遺伝子をインビボで運ぶことに使用できることが分かる。リポフェクチン-DNA複合物の静脈投与に続いて、肺及び肝臓は、これらの複合物の摂取及び導入遺伝子発現について、顕著な親和力を示した。これらの複合物の他の組織への注入は、変化する結果を有し、そしてほとんどの部分において、肺又は肝臓のいずれかへのリポフェクチン媒介遺伝子輸送よりも効率が非常に低い。

10

【0167】

PH感受性又は負に帯電したリポソームは、DNAを、むしろそれを有する複合物よりも捕らえる。DNA及び脂質は同様の帯電をするので、複合物形成よりも反発が起こる。しかし数種のDNAは、これらのリポソームの水性の内部に捕らえられるように処理される。数種の場合、これらのリポソームは低いpHにより不安定化され、そしてpH感受性と呼ばれる。現在まで、カチオン性リポソームは、pH感受性リポソームよりも、インビボ及びインビトロ両方の遺伝子輸送において非常に効率的であった。pH感受性リポソームは、インビボのDNA輸送において、それらのカチオン性の対象物よりも非常に効率的であるポテンシャルを有する、そして減少した毒性及び血清タンパク質からの阻害を伴って、それを行うことができなければならない。

20

【0168】

他のアプローチにおいて、DNAに複合するデンドリマーが、細胞をトランスフェクトすることに使用される。このようなデンドリマーは、限定するものではないが、“スターバースト”デンドリマー及び種々のデンドリマーポリカチオンを含む。

【0169】

デンドリマーポリカチオンは3次元で、典型的にはコア分子又は明確な開始剤上において、オリゴマー又はポリマーを加える反復反応シーケンスにより形成される高度に整列したオリゴマー又はポリマー化合物であり、そしてそれは正に帯電した外表面を提供する。これらのデンドリマーはPCT/US83/02052、及び米国特許第4,507,466号；第4,558,120号；第4,568,737号；第4,587,329号；第4,631,337号；第4,694,064号；第4,713,975号；第4,737,550号；第4,871,779号；第4,857,599号に記載されるように製造できる。

30

【0170】

デンドリマーポリカチオンは、典型的にはポリマーが加えられるコア分子を含む。ポリマーは正電荷を獲得することができる末端機を有するオリゴマー又はポリマーであることができる。好適なコア分子は、コア分子のオリゴマー及び/又はポリマーへの結合に利用可能な少なくとも2種の反応性残基を含む。反応性残基の例は、特にヒドロキシル、エステル、アミノ、イミノ、イミド、ハライド、カルボキシル、カルボハライド、マレイミド、ジチオピリジル、スルフヒドリルである。好適なコア分子は、特にアンモニア、トリス-(2-アミノエチル)アミン、リシン、オルニチン、ペンタエリトルトール及びエチレンジアミンである。これらの残基の組み合わせも、他の残基と同様に好適である

40

【0171】

本発明のデンドリマーポリカチオンの製造に好適なオリゴマー及びポリマーは、人体に良好に許容される医薬的に許容性オリゴマー及び/又はポリマーである。これらの例は、特に、-エチレン性不飽和カルボン酸又は、-エチレン性不飽和アミドのアルキルエステルとアルキレンポリアミン又はポリアルキレンポリアミンとの反応から誘導されるポリアミドアミンである。好適にはメチルアクリレートとエチレンジアミンである。ポリマーは、好ましくはコア分子と共有結合する。

【0172】

50

オリゴマー及び／又はポリマーに結合する末端基は正電荷を得ることができるものでなければならない。これらの例は、アゾール並びにS若しくはOで置換されることができる第一、第二、第三、第四脂肪族及び芳香族アミン及びアゾール、グアニジニウム、又はそれらの組合せである。末端カチオン基は、好ましくはオリゴマー及び／又はポリマーに共有様式で結合する。好ましい末端カチオン基は、アミン及びグアニジニウムである。しかし、他のものも利用できる。末端カチオン基は、オリゴマー及び／又はポリマーの全末端基の約10～100%、より好ましくは約50～100%の割合で存在できる。

【0173】

デンドリマーポリカチオンも、カチオン基以外の末端反応性残基を0～約90%含むことができる。末端カチオン基以外の好適な反応性残基は、特にヒドロキシル、シアノ、カルボキシル、スルフィドリル、アミド及びチオエーテル並びにそれらの組合せである。しかし、他のものも利用できる。

10

【0174】

デンドリマーポリカチオンは、一般的に及び好適にはポリヌクレオチドと非共有結合する。これは、一旦細胞内に運ばれた場合に、組成物の容易な分解及び解離を許容する。本明細書中で好適に使用される典型的なデンドリマーポリカチオンは、約2,000～1,000,000Da、より好ましくは約5,000～500,000Daの範囲の分子量を有する。しかし他の分子量も使用できる。好適なデンドリマーポリカチオンは約11～60、及びより好ましくは約15～55の流体力学的半径を有する。しかし、他のサイズも好適である。デンドリマーの製造方法及び遺伝子治療における使用方法は当業者に公知であり、例えば米国特許第5,661,025号に詳細に記載される。

20

【0175】

適切な場合は、2種又はそれ以上の型のベクターと一緒に使用できる。例えば、プラスミドベクターはリボソームとともに使用できる。非ウイルスベクターの場合は、核酸は当業界で公知の任意の方法により非ウイルスベクター内へ導入できる。プラスミドについては、これは、典型的には該構造を好適な制限サイト内へライゲートすることを含む。リボソーム、水-油乳化物、ポリエチレンアミン及びデンドリマーのようなベクターについては、ベクター及び構造は当業界で公知な好適な条件下で混合することにより結合されることができる。

【0176】

30

D) 半ピボ遺伝子治療

本発明の方法は、インピボの細胞の治療に制限されるものではない。それゆえ、所定の具体例において、本発明は、特定の酵素活性を欠く場合に、それを補うためにデザインされた2-ハイブリッドシステムを用いた細胞の半ピボトランスフェクションを企図している

【0177】

診断、調査又は遺伝子治療のための(例えば形質転換された細胞の宿主生物体内への再注入を介する)半ピボ細胞形質転換は、当業者に公知である。好適な具体例において、細胞は対象生物体から単離され、本発明の構造を用いてトランスフェクトされ、そして場合によっては対象生物体(例えば患者)へ再注入される。

【0178】

40

VI. キット

さらに他の具体例において、本発明は本明細書中に記載される方法の実施のためのキットを提供する。所定の具体例において、該キットは、本発明の2-ハイブリッドシステムにおいて使用されるキメラ分子の一方又は両方を符号化する核酸を含む。それゆえ、例えば例1に記載のAPC2-ハイブリッドシステムにおいて、該キットはGal4-カテニン、及び／又はTcf-VP16、及び／又はGal4-Tcf、及び／又はカテニン-VP16を符号化する核酸を含むことができる。所定のキットはキメラ分子自体(例えば融合タンパク質)を含むことができる。キットは代わりに又は追加でポリペプチド結合サイト及びエフェクター遺伝子を符号化する核酸を含むことができる。核酸は(例えば適切な制限サイト及び／又はPCRプライマー結合サイトによりフランクされた)ベクタ

50

一の成分として提供されることができる。キメラ分子を符号化する核酸構造は、構造的、誘導性又は組織特異的なプロモーターのコントロール下で“融合遺伝子”を含むことができる。このようなプロモーターは、当業者に公知である。

【0179】

所定の具体例において、キットは本明細書中に記載されるような2-ハイブリッドシステムの1種又はそれ以上の成分を含む細胞（例えば哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞）を含む。

【0180】

該キットは、本明細書中に記載される方法の実施を容易化するために任意の試薬及び/又は装置を随意に含むことができる。このような試薬は、限定するものではないが、緩衝液、器具（例えばバンドパスフィルター）、レポーター遺伝子からの信号を検出するための試薬、トランスフェクション試薬、細胞株、ベクター等を含む。

10

【0181】

さらに、該キットは本発明の方法の実施のための指示（すなわちプロトコル）を含む指示材料を含むことができる。好ましい指示材料は、代謝生成物を蓄積及び/又は分解する細胞能力のモジュレーターをスクリーニングするための、及び/又は異常な代謝経路を有する細胞を選択的に殺す方法のための、及び/又は本明細書中に記載されるように減少した若しくは不存在の前記細胞活性を有する細胞を補うための酵素活性を選択的に発現する方法のためのキット内容を利用するプロトコルを提供する。指示材料は記載又は印刷された材料を含むが、それらに限定されるものではない。それらの指示を保存しかつ末端ユーザーへ伝達できる任意の媒体が本発明により企図される。このような媒体は、限定されるものではないが、電気記録媒体（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えばCD-ROM）等を含む。このような媒体は、このような指示材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含み得る。

20

【0182】

例

例証のために以下の例を表す、しかし特許請求の範囲の発明に限定されるものではない。

【0183】

例1:

A P C - 変異結腸癌治療用の哺乳動物2-ハイブリッドシステムの適用される使用

30

細胞質内の - カテニンの蓄積は、腺腫ポリポシス菌（A P C）遺伝子変異結腸癌細胞中に見出される重要なイベントの一つである。変異A P C遺伝子は、 - カテニンタンパク質に対する親和力を欠く途切れた形態のA P Cタンパク質を提供する。 - カテニンタンパク質の蓄積は、ユビキチン - プロテアソーム経路を経由する分解機構から避ける - カテニンにより引き起こされ、それはグリコーゲン合成酵素キナーゼ3（G S K - 3）による - カテニン / A P Cのリン酸化を必要とする。この例において、我々は、A P C変異細胞を選択的に殺す新規な遺伝子治療システムを記載する。このシステムは、G A L 4 / - カテニン、V P 1 6 / T c f 4及び自殺遺伝子発生産出遺伝子D N A構造からなる哺乳動物2-ハイブリッドシステムから作られる。このシステムは、G A L 4 / - カテニンの蓄積が発生する場合にのみ働くためにデザインされる。A P C変異ヒト結腸癌細胞株S W 4 8 0において、V P 1 6 / T C F 4タンパク質の存在下におけるG A L 4 / - カテニンの蓄積は、高い発現レベルの産出遺伝子を生じた。逆に、S W 4 8 0のようなA P C野生型を有する他のヒト細胞株において、G A L 4 / - カテニンの分解が観察され、そして産出遺伝子の発現レベルは低く維持された。S W 4 8 0細胞内の2-ハイブリッド構造を用いた野生型A P C発現プラスミドの添加は、G A L 4 / 及び完全な - カテニンレベルの減少ばかりでなく、産出遺伝子の発現レベルの減少を生じた。レポーター遺伝子からの産出遺伝子の自殺遺伝子への置き換えは、この2-ハイブリッドシステムをS W 4 8 0細胞を殺すことができるものにした。我々は、p G 5プラスミドのホタルルシフェラーゼc D N Aをp 5 3 - E G F P c D N Aへ交換し、そして他の2-ハイブリッド成分の存在下で、S W 4 8 0細胞へトランスフェクトした。p 5 3 - E G F Pトランスフェク

40

50

トされた細胞中で約 80% の EGF P ポジティブ細胞が死んだが、コントロール p53 - EGF P トランスフェクトされた細胞中では、約 20% のみの EGF P ポジティブ細胞が死んだ。我々は、このシステムがタンパク質分解疾患を含む疾患を標的にする遺伝子治療におけるより広い使用のために適用できるものと信じる。

【0184】

導入

家族性腺腫ポリポシス (FAP) 患者に見出される (Kinzer 等 (1991) Science, 253: 661 - 665; Nishisho 等 (1991) Science, 253: 665 - 669) 腺腫ポリポシス菌 (APC) 腫瘍抑制遺伝子の変異は、散发性大腸癌患者においても頻繁に見出せる (Spark 等 (1998) Cancer Res., 58: 1130 - 1134)。APC の機能的な研究は、野生型 APC タンパク質が - カテニンをリン酸化するために、本来は細胞接着分子の成分として見出されているグリコーゲン合成酵素キナーゼ - 3 (GSK - 3) について最適な環境を提供し、(Rubinfeld 等 (1996) Science, 272: 1023 - 1026)、そしてユビキチン - プロテアソーム経路を経由して細胞質 - カテニンの分解を促進することを明らかにした (Aberle 等 (1997) EMBO J., 16: 3797 - 3804; Winston 等 (1999) Gene Dev., 13: 270 - 283)。それゆえ大腸癌における遺伝子変異による APC の機能的損失は、- カテニンの蓄積を生じる (Munemitsu 等 (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 92: 3046 - 3050)。およそ 80% の大腸癌細胞は機能不全 APC を有し (Spark 等 (1998) Cancer Res., 58: 1130 - 1134) 及び他のものは - カテニンの GSK - 3 リン酸化サイトに数種の変異を有し、それは細胞中の - カテニタンパク質を安定化もさせる (Munemitsu 等 (1996) Cell Biol., 16: 4088 - 4094) という事実は、細胞質内の - カテニンの蓄積が大腸癌形成のために重要なイベントであることを示すものである。その上、遺伝子操作されたマウスモデルにおいて、APC - 変異マウス (Shibata 等 (1997) Science, 278: 120 - 123) 及び - カテニン変異マウス (Harada (1999) EMBO J., 18: 5931 - 5942) の両方が、腸ポリープを形成した。これらの変異はラス (ras) 又は p53 変異の前でさえ、大腸癌進行の初期段階にて観察された (Laurent - Puig 等 (1999) Eur. J. Cancer Prev., 8: Suppl 1 S39 - 47)。最近の研究は、大腸癌中に蓄積された - カテニンが転写因子 T 細胞因子 4 (Tcf4) を用いて複合物を形成し (Korinek 等 (1997) Science, 275: 1784 - 1787; Morin 等 (1997) Science, 275: 1787 - 1790) 及びサイクリン D1 (Tetsu 及び McCormick (1999) Nature, 398: 422 - 426)、c - myc (He 等 (1998) Science, 281: 1509 - 1512) 及びペルオキシソーム増殖薬活性化レセプター (He 等 (1999) Cell, 99: 335 - 345) のような Tcf / lcf - 1 - 依存発癌性遺伝子発現を強めることを報告している。

【0185】

酵母 2 - ハイブリッドシステムは、タンパク質 - タンパク質相互作用を研究するための又は所定のタンパク質用の相互作用パートナーを同定するための最も便利なツールの一つとして使用される (Dang 等 (1991) Mol. Cell Biol., 11: 954 - 962)。このシステムは基本的には 3 種の成分からなる。第一の成分は、転写因子の DNA 結合ドメインを含む融合タンパク質である。第二の成分は、転写因子の転写活性ドメインを含む融合タンパク質である。第三の成分は、第一成分のための一致シーケンスを有し、続けて TATA ボックスのような第二成分のための転写活性サイトである産出遺伝子発現構造である。第一成分として、酵母 GAL4 DNA 結合ドメインが広く使用される、そして第二成分としてヘルペス単純ウイルス VP16 転写活性ドメインが広く使用される。数年後、酵母 2 - ハイブリッドシステムは改良され、融合タンパク質発現プラスミド

のプロモーター領域を置きかえることにより、哺乳動物細胞用に改変された (Fearon 等 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 7958 - 7962)。この改変は、産出遺伝子発現を測定することにより、哺乳動物細胞における 2 種のタンパク質の機能的結合を研究することを可能にした。このペーパーにおいて、我々は哺乳動物 2 - ハイブリッドシステムのユニークな適用を導入した。我々は - カテニン及び Tcf4 を、細胞死誘発遺伝子産出の組合せを用いた 2 - ハイブリッドシステム用の結合分子として導入し、そして APC 変異細胞を使用して選択的な細胞殺傷の研究を行った (図 1)。

【0186】

材料及び方法

細胞

本明細書中で使用される全てのヒト癌細胞株は、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手した。ヒト結腸癌細胞株 SW480 及び SW48 を、0.8% CO₂ インキュベーター中、37 °C で 10% - 熱不活性化 FBS (Life Technologies Inc.) を補充した Leibovitz' s L-15 媒体 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) 中に保持した。ヒト骨肉腫細胞株 U2-OS 及び胚性腎臓細胞株 293 を 5% CO₂ インキュベーター中、37 °C で 10% FBS (Life Technologies Inc.) を補充した RPMI 1640 媒体中に保持した。

【0187】

プラスミド

pBIND、pBIND/Id、pACT 及び pG5Luc プラスミドを Promega (Madison, WI) から購入した。pp53-EGFP を Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。GAL4 融合 - カテニン発現プラスミド、pBIND/ - カテニン 及び VP16 融合 Tcf4 発現プラスミド、pACT/Tcf4 を以下のように製造した。Bam HI リンカーを有するヒト - カテニン cDNA を PCR を使用して製造し、そして pACT の Bam HI サイト内へクローン化した。Bam HI リンカーを有するヒト Tcf4 cDNA を PCR を使用して製造し、そして pACT の Bam HI サイト内へクローン化した。pcDNA3 / p53-EGFP を、pp53-EGFP の KpnI 及び XbaI を pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) の KpnI / XbaI サイト内へ発生させることにより製造した。pG5 / p53-EGFP プラスミドは、pp53-EGFP の p53-EGFP cDNA フラグメントを pG5Luc の BglII 及び HindIII サイトへ導入することにより構成される。pG5 / EGFP プラスミドは pG5 / p53-EGFP プラスミドから p53 cDNA を消去することにより構成される。p53-Luc、pAP-1-Luc、及び pCRE-Luc プラスミドは Stratagene (La Jolla, CA) より購入した。

【0188】

免疫染色

50 - 80% 融合 (confluency) まで成長した細胞を、トリプシナイズしそしてホスフェートバッファー塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、そしてプロテアーゼ抑制剤 (Complete Mini (登録商標), Boehringer Mannheim) を含む TE バッファー (10mM Tris, 1mM EDTA) 内で溶解させた。細胞溶解物試料を 4 - 20% のアクリルアミド線状勾配 SDS-PAGE ゲル (Bio-Rad, Cambridge, MA) を用いて分離し、ニトロセルロース膜上に移し、第一 (primary) 抗体を用いてインキュベートし、第二抗体を用いて西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲートし、そして Enhanced Chemiluminescence (ECL) キット (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて検出した。抗 - カテニン (sc-7199)、GA

10

20

30

40

50

L4 (sc-577)、VP16 (sc-7546)、p53 (sc-126) 抗体を、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) から購入した。抗APC抗体 (OP44) はCalbiochem Novabiochem (San Diego, CA) 製であった。抗Tcf4抗体はUpstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY) から入手した。西洋わさびコンジュゲートした抗マウス又は抗ウサギIgG抗体は、Amersham Pharmacia Biotech 製であった。

【0189】

2 - ハイブリッドアッセイ

pBIND / - カテニン、pACT / Tcf4 及び pG5 / luc プラスミドを、製造者の推奨するプロトコルに従って、TransFast (登録商標) (Promega) を使用して、細胞に対してコ-トランスフェクトした。簡単には、細胞を24-ウエルプレートへ 5×10^4 細胞/ウエルの密度で供給し、そして24時間培養した。全1 μ g / ウエルのプラスミドをトランスフェクトし、そしてさらに24時間培養した。最終的に、ルシフェラーゼ活性を市販入手できるキット (Promega) を用いて測定した。トランスフェクション効率を、pBIND プラスミドから同時に発現された renilla ルシフェラーゼ活性により標準化した。

【0190】

FACS 分析

pG5 / p53 - EGFP 又は pG5 / EGFP プラスミドを、pBIND / WT - - カテニン及び pACT / FL - Tcf4 プラスミドを用いて、SW480 ヘコ-トランスフェクトした。48-72時間のインキュベーションの後、細胞をトリプシナイズしそしてPBSで2回洗浄した。細胞を10 μ M ヨウ化プロピジウムを含むPBS中で懸濁させ、シトメーターを流すことができるFACS (Becton Dickinson, San Jose, CA) において分析した。EGFP - ポジティブ細胞の細胞生存力プロファイルを、ヨウ化プロピジウムの取り込みにより分析した。

【0191】

結果

結腸癌細胞株における2 - ハイブリッドタンパク質の機能的発現

我々は、pBIND / WT - - カテニン、pBIND / MT - - カテニン、pACT / FL - Tcf4、pACT / DN - Tcf4 の4種の融合タンパク質発現プラスミドを構成させ、それはそれぞれ GAL4 / WT - - カテニン、GAL4 / MT - - カテニン、VP16 / FL - Tcf4、VP16 / DN - Tcf4 を発現する (図2A)。GAL4 / WT - - カテニンは、酵母 GAL4 タンパク質のDNA結合ドメイン及び完全長ヒト - カテニンからなる融合タンパク質である。GAL4 / MT - - カテニンは、- カテニンの途切れた形態であり、それはGSK-3 認識サイトを欠く。VP16 / FL - Tcf4 は、ヘルペス単純ウイルスの転写活性ドメイン及び完全長ヒトTcf4 からなる。VP16 / DN - Tcf4 はTcf4 の途切れた形態であり、それは カテニン結合サイトを欠く。我々はpBIND / WT - - カテニン、pBIND / MT - - カテニン、pACT / FL - Tcf4、pACT / DN - Tcf4 をSW480細胞に対してトランスフェクトし、免疫プロットングを使用してそれらの融合タンパク質発現レベルを検出した。発現された GAL4 / - カテニン融合タンパク質は、抗VP16 及び抗Tcf4 抗体の両方により認識されるVP16 / Tcf4 タンパク質と同様に、抗GAL4 及び抗 - カテニン抗体の両方により認識される (図2B)。pBIND / WT - - カテニン、pACT / FL - Tcf4 及び pG5 / luc のコ-トランスフェクションは、産出遺伝子の発現、ホタルルシフェラーゼへと導く (図2C)。pBIND / WT - - カテニンプラスミドのpBIND / Id への置き換え又はpACT / FL - Tcf4 プラスミドのpACT / DN - Tcf4 への置き換えが、ホタルルシフェラーゼ活性を上げることができないとき、これらの産出遺伝子発現レベルは、GAL4 / - カテニン及びVP16 / FL - Tcf4 の組合せの発現により、厳格にコントロールされる。

【0192】

A P Cによる - カテニン / T c f 4 2 - ハイブリッドシステムの調整

それらの融合タンパク質が産出遺伝子発現レベルを適切に操るとき、我々は、次にA P Cプロファイルに依存して、完全な野生型 - カテニンタンパク質と同様に、G A L 4 / W T - - カテニンが分解されるかどうかを試験した。初めに、野生型A P C発現プラスミドのコトランスフェクションを、S W 4 8 0内においてp B I N D / W T又はM T - - カテニン、p A C T / F L - T c f 4及びp G 5 / L u cを使用して行った。p B I N D / W T - - カテニンシステム中でのA P Cの添加は、ホタルルシフェラーゼ活性の激的な減少を生じるが、p B I N D / M T - - カテニンシステムはA P C発現により影響を受けない(図3 A)。次に、G A L 4 / - カテニン及びV P 1 6 / T c f 4のタンパク質レベルは、レポーター遺伝子アッセイと同じ条件で検出される。ポジティブコントロール実験として、p c D N A 3 / m y c - - カテニンを、p c D N A / A P Cプラスミドを用いてコ-トランスフェクトした。A P Cタンパク質の存在下で、G A L 4 / M T - - カテニン及びm y c - タグ化M T - - カテニンタンパク質レベルは変化しなかったにもかかわらず、G A L 4 / W T - - カテニン及びm y c - タグ化W T - - カテニンタンパク質レベルは減少した(図3 B)。V P 1 6 / T c f 4も完全なT c f 4タンパク質レベルも、A P C発現により影響されない。

10

【0193】

種々の細胞型における - カテニン / T c f 4 2 - ハイブリッドシステムの調節

これらの結果を確認するために、我々は、野生型A P Cを発現することが想定されるヒト骨肉腫U - 2 O S及びヒト胚性腎臓2 9 3細胞を使用して2 - ハイブリッドアッセイを行った。我々は細胞質 - カテニン及びA P C第一の発現レベルを試験した(図4 A)。U - 2 O S及び2 9 3の両方が、低いレベルの細胞質 - カテニンを示した。これらの2種の細胞株は、予測された分子サイズにおけるA P Cバンドも示した。これらの結果は、 - カテニンの分解機構がこれらの細胞株中において適切に作用したことを示した。A P C変異細胞株として公知のS W 4 8 0は、予測されたサイズにおいてA P Cバンドを示さなかった。 - カテニン変異細胞株として公知のS W 4 8は、野生型A P Cを有するにもかかわらず高いレベルの - カテニンを示した。図4 Bは、S W 4 8 0及びS W 4 8細胞中のG A L 4 / W T又はM T - - カテニンタンパク質の発現レベルを表す。S W 4 8細胞においてのみ、G A L 4 / M T - - カテニンでなくG A L 4 / W T - - カテニンがA P C野生型細胞株中において分解されたことを意味するG A L 4 / W T - - カテニンを表す特定の下側のバンドが観察された。野生型A P Cを有する試験された全ての細胞株は、S W 4 8 0細胞よりも低い産出遺伝子発現レベルを表した(図4 C)。その上、S W 4 8は、G A L 4 / M T - - カテニンを使用する2 - ハイブリッドシステムを用いてトランスフェクトされる場合は、S W 4 8 0細胞に対して近い量の産出遺伝子発現を示した(データは示さない)。これらの結果は、細胞のA P Cプロファイルが産出遺伝子発現レベルをコントロールするために非常に重要な因子であることを示すものである。

20

30

【0194】

哺乳動物2 - ハイブリッドシステムのインビボ遺伝子治療への適用

この2 - ハイブリッドシステムが機能不全A P C存在環境下で選択的に作用したことを我々が示したように、我々は産出遺伝子をルシフェラーゼからp 5 3 - E G F Pへ置きかえることを決めた。第一に、我々はS W 4 8 0内でp 5 3 - E G F Pをp 5 3応答性エレメント - ドライブ化(e l e m e n t - d r i v e n)ルシフェラーゼプラスミドの存在下で発現させ、p 5 3 - E G F P融合タンパク質が野生型p 5 3と機能的に同じであるか試験した。トランスフェクトされたp 5 3 - E G F Pは、p 5 3応答性エレメント - ドライブ化ルシフェラーゼを選択的に活性化したが、ネガティブコントロールl a c Zはp 5 3応答性エレメント - ドライブ化ルシフェラーゼを活性化しなかった(図5 A)。p 5 3 - E G F P発現は蛍光顕微鏡で緑光として観察され(データは示さない)、抗p 5 3抗体により8 0 k D aタンパク質として認識もされた(図5 B)。それらのp 5 3 - E G F P発現細胞の生存力を、ヨウ化プロピジウム導入法を使用するフローシトメトリー(f l o w

40

50

c y t o m e t o r y) により分析した。48時間又は72時間のインキュベーション後、2 - ハイブリッドプラスミド - トランスフェクトされた細胞を採取した。約20%のpG5 / p53 - EGFPプラスミド - トランスフェクトされた細胞が生存し、約80%のpG5 / EGFPプラスミド - トランスフェクトされた細胞が生存した(図5C)。この実験において、pG5 / EGFPトランスフェクトされた細胞は、pG5 / p53 - EGFPトランスフェクトされた細胞よりもより強いGFP光を示した(データは示さない)。おそらく、p53 - EGFP発現細胞は、p53 - EGFPの発現レベルがEGFPと同じ高さに到達する前に、死に始めた。

【0195】

ディスカッション

癌治療用アプローチとしての遺伝子治療は、比較的新しい。以前には、非効率的又は非特異的なデリバリー方法が、このようなアプローチには問題あることが証明した(Verm a及びSomi a(1997) Nature, 389:239-242)。不十分なデリバリー効率を補うために、癌細胞に対してユニークな特異化された選択性が所望である。例えば、組織特異的なプロモーター - ドライブ化自殺遺伝子発現は、非癌細胞へのダメージを防ぐためのアイデアの一つである(Vandier等(1988) Cancer Res., 58:4577-4580)

【0196】

本明細書において、我々は遺伝子治療の選択性を改良することができる2種の新規なコンセプトを提案する。1つは癌細胞特異的タンパク質分解疾患をターゲットとし、そして他
20
は哺乳動物2 - ハイブリッドシステムを使用して自殺遺伝子発現をコントロールすることである。細胞質内の - カテニンの蓄積は、ほとんどの大腸癌で起こり、それらの約80%が機能不全APCにより生じる(Kinzer及びVogelstein(1996) Cell, 87:159-170)。我々のシステムは、 - カテニンがAPC変異細胞中で迅速に分解しないという利点がある。Gal4融合タンパク質でさえ、GAL4/WT - - カテニンタンパク質は、APC依存分解経路を経由して除去された(図3B)。このイベントにおける重要な事実は、このシステムにおける - カテニンが、それが産出遺伝子発現を活性化し及びAPC依存経路を経由して分解可能である限り、完全長の野生型タンパク質である必要が無いことである。この2 - ハイブリッドシステム用の - カテ
30
ニンタンパク質の最少成分は、GSK-3 用のリン酸化サイト、APC及びTcf4の
ための結合ドメインである。 - カテニンの最終アルマジロドメイン後のC末端部分は、この部分が転写活性機能を有すると認められるときには必要ない。それは、GAL4/WT - - カテニンの親和力がAPCに対して好適であり得、E - カドヘリンに対しては好適でない場合、アルマジロ構造の数種の部分を消去又は変異することによりシステムをより効率的にする。VP16/Tcf4に関しては、N末端 - カテニン結合ドメインは2 - ハイブリッドシステム用のTcf4タンパク質からの唯一の必要なドメインである。このDNA結合ドメインのランケーションは、不必要な遺伝子発現の可能性を、核中のTcf一致シーケンスを認識するVP16/Tcf4により減じることができる。少なくとも、pACT/FL - Tcf4及びTop Flash(Korinek等(1997) Science, 275:1784-1787)プラスミドのコトランスフェクションは
40
、重要なTcfコンセンサスシーケンスをベースとする遺伝子トランスアクティベーションを何も誘発しない(データは示さない)。他の起こり得るイベントは、DNA上のTcf4は - カテニンなしでgrouchoとの複合物を形成するのでVP16/Tcf4の過剰発現が非所望の遺伝子活性化を生じず、そして遺伝子転写アクティベーターよりもターゲット遺伝子サプレッサーとして作用するということである。さらに、GAL4融合タンパク質及びVP16融合タンパク質発現用の機能性Tcf4応答性エレメントを有するプロモーターを使用することにより大腸癌細胞のためのこの治療方法の選択性を改良することは可能であり、そのためこれらのタンパク質の発現レベルは大腸癌細胞中で選択的に高い。サイクリンD1(Tetsu及びMcCormick(1999) Nature, 398:422-426)又はc - myc(He等(1998) Science, 28
50

10

20

30

40

50

1 : 1 5 0 9 - 1 5 1 2) プロモーターは、この目的のために良い候補である。

【 0 1 9 7 】

より安全なプロトコルとして、1 度に全ての成分を導入する代わりに、V P 1 6 / F L - T c f 4 及び p G 5 / p 5 3 - E G F P 構造は、青蛍光タンパク質 (B F P) のような数種のマーカー発現プラスミドを用いて、G e n e G u n を用いた感染性 R N A のような方法 (M a n d l 等 (1 9 9 8) N a t M e d . , 4 : 1 4 3 8 - 1 4 4 0) 又は V P 1 6 / F L - T c f 4 の十分な発現レベルを得るためのアデノウイルスデリバリーシステムを使用して、初めに導入されなければならない。遺伝子の第一セット発現レベルを確認後、G A L 4 / W T - - カテニンは、産出遺伝子の発現レベルをマニピュレートできる方法を使用することにより (すなわち T c f 4 応答性エレメント - ドライブ化プロモーターを用いて) 、導入されなければならない。遺伝子デリバリーよりも早い G A L 4 - - カテニンタンパク質の発現を行うために、T A T - t a g 融合タンパク質を使用することも魅力的な選択である (N a g a h a r a 等 (1 9 9 8) N a t M e d . , 4 : 1 4 4 9 - 1 4 5 2) 。 G A L 4 / W T - - カテニンの量により産出遺伝子の発現レベル処理し、患者における副作用を防ぎ得ることは、遺伝子治療のための 2 - ハイブリッドシステムの非常に重要な利点である。産出遺伝子の発現レベルが嚴重に調整される限りにおいては、産出遺伝子についての選択が広くなり得る、すなわち p 5 3 、 B a x 、ヘルペス、単純ウイルスチミジンキナーゼ (H S V - T K) 、カスパーゼなどである。

10

【 0 1 9 8 】

より広い視点から、このシステムは、タンパク質分解疾患を含みかつ異常に蓄積されたタンパク質が相互作用パートナーを有する疾患に関しては大腸癌以外の他の疾患にも適用できる。その上、2 - ハイブリッド部分が特定の信号変換用のバイオセンサーとして働くことができ及びインビボでのイベント、すなわち血中グルコース濃度の増加を検出する場合、そのイベントをモジュレートする遺伝子は、産出遺伝子、すなわち糖尿病患者についてのインスリン又はインスリンレセプターとして選択されることができる。

20

【 0 1 9 9 】

本明細書中に記載される例及び具体例は単に例証の目的であり、そしてそれらの権利の範囲内の種々の改変及び変化が当業者に提案でき、そしてそれは本出願の精神及び範囲及び添付される特許請求の範囲の領域に含まれる。本明細書中に引用される全ての刊行物、特許、特許出願は、その全体が全ての目的について参考として本明細書中に援用される。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、 - カテニン / T c f 4 哺乳動物 2 - ハイブリッドシステムを用いた遺伝子治療の概念を表す。

【 図 2 】 図 2 A 、図 2 B 及び図 2 C は、本発明の 2 - ハイブリッドシステムを表す。

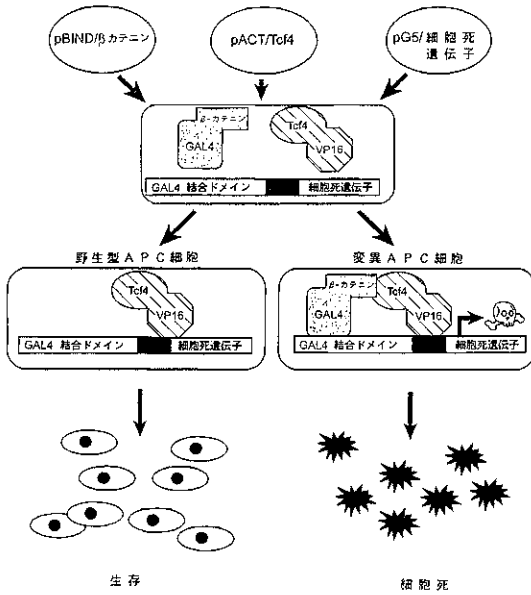
【 図 3 】 図 3 A 及び図 3 B は A P C 依存性の選択的な発現及び S W 4 8 細胞における 2 - ハイブリッド成分タンパク質の検出を表す。

【 図 4 】 図 4 A 、図 4 B 及び図 4 C は、細胞質 - カテニンの発現、G a l 4 融合タンパク質分解生成物の検出、及びターゲット細胞の A P C プロファイルに依存する選択的な遺伝子発現を表す。

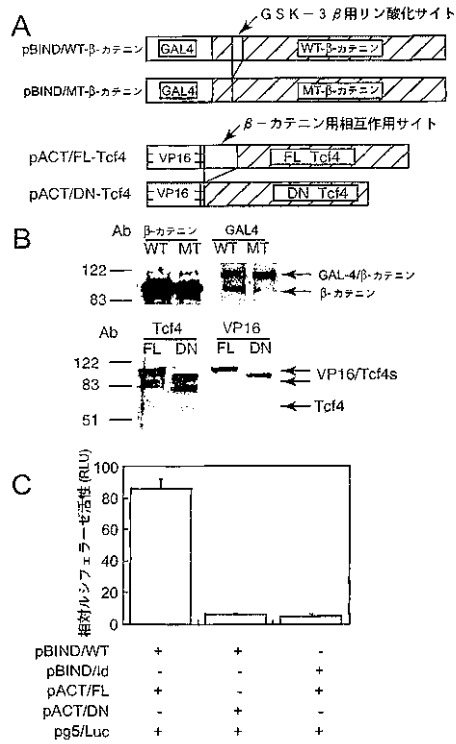
【 図 5 】 図 5 A 、図 5 B 及び図 5 C は p 5 3 応答ルシフェラーゼ発現の活性化及び p 5 3 - E G F P の検出を表す。

40

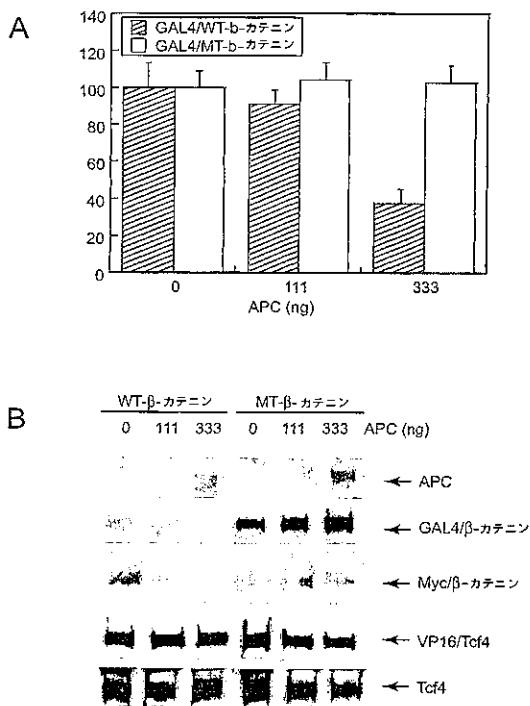
【図 1】



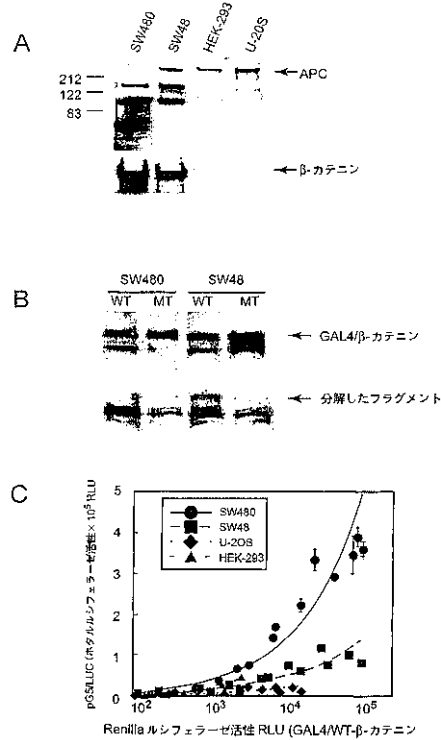
【図 2】



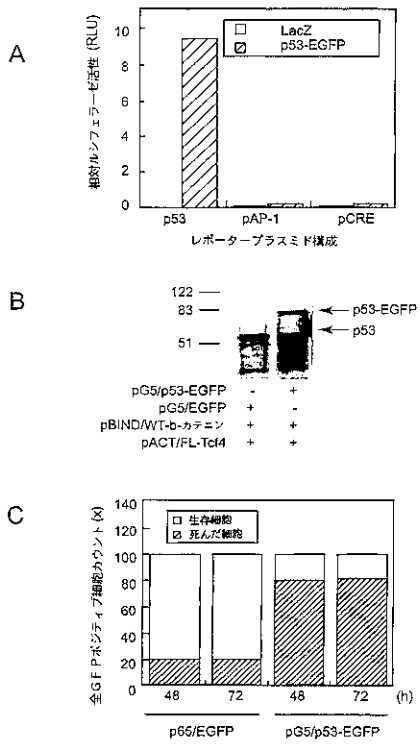
【図 3】



【図 4】



【 図 5 】



【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
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/31201 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US91/31745
- (22) International Filing Date: 9 October 2001 (09.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (36) Priority Data: 09/687,593 13 October 2000 (13.10.2000) US
- (71) Applicant for all designated States except USA: **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA** [US/US]; 12th floor, 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607-5200 (US).
- (72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants for US only: **TETSU, Osamu** [JP/US]; 2550 Geary Boulevard #605, San Francisco, CA 94115 (US); **WAKITA, Kenichi** [JP/US]; 2036 California Street, San Francisco, CA 94115 (US); **MCCORMICK, Frank** [GB/US]; 1870 Jackson Street, San Francisco, CA 94109 (US).
- (74) Agents: **QUINE, Jonathan, Alan et al.**, The Law Offices of Jonathan Alan Quine, P.O. Box 458, Alameda, CA 94501 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AU, AT, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, 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 (GL, 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, GN, GT, GW, ML, MR, NE, NG, 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.

(54) Title: MAMMALIAN TWO-HYBRID SYSTEM FOR SCREENING FOR MODULATORS OF THE ACCUMULATION OF METABOLIC PRODUCTS

(57) Abstract: This invention utilizes a two-hybrid system to screen for agents that modulate the ability of a cell to degrade or to accumulate a metabolic product or to selectively kill a cell or to selectively express a gene or cDNA in a cell that has a defect in its ability to degrade or to accumulate a metabolic product. One embodiment provides a mammalian cell comprising a nucleic acid encoding a peptide binding domain and an effector gene, a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding domain that binds the peptide binding domain attached to the metabolic product or to a ligand that binds to the metabolic product, and a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to the metabolic product or to the ligand that binds to the metabolic product such that when the first chimeric protein comprises the metabolic product, the second chimeric protein comprises the ligand and when the first chimeric protein comprises the ligand, the second chimeric protein comprises the metabolic product. The cell is contacted with a test agent and an alteration of expression of the effector gene is detected (if present) where a change in expression of the effector gene in response to the test agent indicates that the test agent modulates the ability of the cell to accumulate or degrade the metabolic product.

WO 02/31201 A2

WO 02/31201

PCT/US01/31745

**MAMMALIAN TWO-HYBRID SYSTEM FOR SCREENING FOR
MODULATORS OF THE ACCUMULATION OF METABOLIC
PRODUCTS**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to and benefit of USSN 09/687,593, filed on October 13, 2000 which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.

**STATEMENT AS TO RIGHTS TO INVENTIONS MADE UNDER FEDERALLY
SPONSORED RESEARCH AND DEVELOPMENT**

[Not Applicable]

FIELD OF THE INVENTION

This invention pertains to the fields of molecular biology and oncology. In particular, this invention provides a novel two-hybrid system two-hybrid system to screen for agents that modulate the ability of a cell to degrade a metabolic product (*e.g.* certain cancer cells) or to selectively kill a cell that has a defect in its ability to degrade a metabolic product.

BACKGROUND OF THE INVENTION

A wide variety of diseases are characterized by the abnormal accumulation of one or more metabolic products. Such diseases, sometimes referred to as "storage diseases" are typically caused by the increased accumulation of metabolic products (*e.g.*, lipids, proteins, complex carbohydrates, *etc.*) due to either the inactivity of an enzyme that degrades the products or the hyperactivity of an enzyme that creates the products. Storage disease include but are not limited to glycogen storage disease I, GM1 gangliosidosis, MPS IV B (Morquio B), GM2 gangliosidosis (O, B, AB, B1 variants), Niemann-Pick disease (A, B, and C), Metachromatic leukodystrophy (arylsulfatase A and SAP-I deficient), Krabbe disease, Fabry disease, Gaucher disease, Farber disease, Wolman disease (cholesterol ester storage disease), MPS I (Hurler and Scheie syndromes), MPS II (Hunter syndrome), MPS III A, C, and D (Sanfilippo A, C, and D), PS III B (Sanfilippo B), MPS IV A (Morquio A), MPS VI (Maroteaux-Lamy syndrome), MPS VII (beta-glucuronidase deficiency), Multiple

WO 02/31201

PCT/US01/31745

sulfatase deficiency, Mucopolipidosis I (Sialidosis), Mucopolipidosis II & III, alpha-Mannosidosis, beta-Mannosidosis, Fucosidosis, Sialic acid storage disease, Galactosialidosis, and Aspartylglucosaminuria Cystinosis.

Historically, storage diseases have been treated by supplementing the "missing" enzymatic activity. Thus, for example, Gaucher's disease can be treated by use of a glucocerebrosidase targeted to spleen cells. Similarly, superoxide dismutase can be targeted to the liver as an anti-oxidant, and so forth.

Such approaches typically have seen limited success. Often the "therapeutic agent" must be specifically targeted to a particular organ or tissue. In addition consistent delivery of the targeted therapeutic agent at physiologically relevant concentrations has proven difficult. In addition, the identification of viable therapeutic agents has proven difficult.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention provides novel approaches to the treatment (e.g. amelioration of one or more symptoms) of pathological states characterized by the undesired accumulation of one or more metabolic products. In addition, this invention provides effective systems in which to screen for agents that modulate the ability of a cell to accumulate and/or degrade a metabolic product.

In preferred embodiments, this invention utilizes a two-hybrid system to screen for agents that modulate the ability of a cell to degrade or to accumulate a metabolic product or to selectively kill a cell or to selectively express a gene or cDNA in a cell that has a defect in its ability to degrade or to accumulate a metabolic product. In one such embodiment, this invention provides a method of screening for an agent that modulates the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product. The method involves providing a mammalian cell comprising a nucleic acid encoding a peptide binding domain and an effector gene; a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding domain that binds the peptide binding domain attached to the metabolic product or to a ligand that binds to the metabolic product; and a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to the metabolic product or to the ligand that binds to the metabolic product such that when the first chimeric protein comprises the metabolic product, said second chimeric protein comprises the ligand and when the first chimeric protein comprises the ligand, said second chimeric protein comprises the metabolic product. The cell is contacted

WO 02/31201

PCT/US01/31745

with one or more test agent(s) and alteration of expression of the effector gene is detected wherein a difference in the expression of the effector gene in the test cell, as compared to a control cell contacted with a lower concentration of test agent or no test agent indicates that the test agent(s) modulate the ability of said cell to accumulate or degrade the metabolic product.

In particularly preferred embodiments, the expression control protein is a transactivator (e.g. VP16) or a repressor. Particularly preferred nucleic acid binding proteins include, but are not limited to GAL-4, and GAL-4-Y. In certain embodiments, preferred effectors include, but are not limited to, a reporter gene (e.g., chloramphenicol acetyl transferase (CAT), luciferase, b-galactosidase (b-gal), alkaline phosphatase, horse radish peroxidase (HRP), growth hormone (GH), green fluorescent protein (GFP), etc.), a cytotoxin (e.g., thymidine kinase, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, ricin, abrin, etc.), and/or an apoptosis inducing (e.g., P53, P73, Bax, Bad, FADD, a caspase gene, etc.). In various embodiments, the ligand and metabolic product respectively include, but are not limited to a beta-catenin and a Tcf, a NF-kB and I-kB, a P53 and MDM2, a receptor and its heteromeric receptor partner.

The first and/or the second chimeric protein(s) are expressed from a nucleic acid in the cell (e.g. under control of an inducible (e.g. ecdysone promoter), tissue-specific, or constitutive promoter), or the first and/or the second chimeric protein is a protein transported into the cell, e.g. by using a protein comprising an HIV TAT domain.

Preferred cells for the practice of the methods of this invention include, but are not limited to SW480, SW48, DLD-1, HCT-116, HT29, 293, U-20S, T-47D, MCF-7, HeLa, A549, Hep G2, and/or Jarakat cell.

In one particularly preferred embodiment the nucleic acid encodes a GAL-4 binding site, the effector gene is a reporter gene, the first chimeric protein comprises a GAL-4 nucleic acid binding protein and a beta catenin or a Tcf; and the second chimeric protein comprises a VP-16 and beta catenin or a Tcf. One particularly preferred Tcf is Tcf4.

In certain embodiments, the cell further comprises a second nucleic acid encoding the ligand or metabolic product operably linked to an inducible promoter (e.g. an ecdysone promoter).

In another embodiment, this invention provides a method of selectively expressing an effector gene in a cell that accumulates or degrades a metabolic product. The method involves providing a cell comprising a nucleic acid encoding a peptide binding site

WO 02/31201

PCT/US01/31745

and an effector gene, a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds the peptide binding domain where the nucleic acid binding protein is attached to the metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product, and a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to the metabolic product or to a ligand that binds to the metabolic product such that when said first chimeric protein comprises the metabolic product, said second chimeric protein comprises the ligand and when the first chimeric protein comprises the ligand, said second chimeric protein comprises the metabolic product; whereby the cell, in the absence of the ability to degrade the metabolic product or the ligand that binds the metabolic product activates or represses expression of said effector gene. A preferred expression control protein is a transactivator (e.g. VP16) or a repressor. Preferred nucleic acid binding proteins, effector genes, ligands and metabolic products include, but are not limited to those described above.

The first and/or the second chimeric protein(s) are expressed from a nucleic acid in the cell (e.g. under control of an inducible (e.g. tetracycline promoter), tissue-specific, or constitutive promoter), or the first and/or the second chimeric protein is a protein transported into the cell, e.g. by using a protein comprising an HIV TAT domain.

Preferred cells for the practice of the methods of this invention include, but are not limited to SW480, SW48, DLD-1, HCT-116, HT29, 293, U-20S, T-47D, MCF-7, HeLa, A549, Hep G2, and/or Jurkat cell.

In one particularly preferred embodiment the nucleic acid encodes a GAL-4 binding site, the effector gene is a reporter gene, the first chimeric protein comprises a GAL-4 nucleic acid binding protein and a beta catenin or a Tcf; and the second chimeric protein comprises a VP-16 and beta catenin or a Tcf. One particularly preferred Tcf is Tcf4.

This invention also provides methods of selectively killing a cell that accumulates a metabolic product (e.g. certain cancer cells). The methods involve transfecting the cell with a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector that is a cytotoxin or an apoptosis-inducing gene; introducing into the cell a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds the peptide binding domain where said nucleic acid binding protein is attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product; and introducing into the cell a second chimeric protein comprising a transactivator (e.g. VP16) attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product, such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said

WO 02/31201

PCT/US01/31745

first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product. Preferred nucleic acid binding proteins include, but are not limited to, GAL-4 and GAL-4-Y. In one preferred embodiment, the effector is a cytotoxin (*e.g.* thymidine kinase, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, ricin, abrin, *etc.*). In certain preferred embodiments, the effector is an apoptosis-inducing gene (*e.g.* P53, P73; Bax, Bad, FADD, a caspase (*e.g.* Casp3, Casp9, Apaf1, *etc.*), *etc.*). In various embodiments, the ligand and metabolic product respectively include, but are not limited to a beta-catenin and a Tcf, a NF- κ B and I- κ B, a P53 and MDM2, a receptor and its heteromeric receptor partner.

The first and/or the second chimeric protein(s) are expressed from a nucleic acid in the cell (*e.g.* under control of an inducible (*e.g.* ecodyson promoter), tissue-specific, or constitutive promoter), or the first and/or the second chimeric protein is a protein transported into the cell, *e.g.* by using a protein comprising an HIV TAT domain. Suitable cells include, but are not limited to SW480, SW48, DLD-1, HCT-116, HT29, 293, U-203, T-47D, MCF-7, HeLa, A549, Hep G2, Jarkat cells, *etc.* In one embodiment, the nucleic acid encodes a GAL-4 binding site, the first chimeric protein comprises a GAL-4 nucleic acid binding protein and a beta catenin or a Tcf, and the second chimeric protein comprises a VP-16 and beta catenin or a Tcf (*e.g.* Tcf4).

In still another embodiment this invention provides vertebrate, preferably mammalian cells comprising one or more constructs of this invention. In one embodiment the cell is a cell comprising a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector gene, a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds the peptide binding domain where the nucleic acid binding protein is attached to the metabolic product or to a ligand that binds to the metabolic product; and a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to the metabolic product or to the ligand that binds to the metabolic product such that when the first chimeric protein comprises said metabolic product, the second chimeric protein comprises the ligand and when said first chimeric protein comprises the ligand, the second chimeric protein comprises the metabolic product. Expression control proteins, first and second nucleic acids, effector genes, nucleic acid binding domains, include, but are not limited to those described above.

In still another embodiment this invention provides a nucleic acid selected from the group consisting of: a nucleic acid encoding a chimeric protein comprising a nucleic acid binding domain attached to a Tcf or to a beta catenin, and a nucleic acid encoding a transactivator attached to a beta catenin or to a Tcf. Particularly preferred

WO 02/31201

PCT/US01/31745

nucleic acids include a nucleic acid encoding a nucleic acid binding protein attached to a Tef4, a nucleic acid encoding a nucleic acid binding protein attached to a beta catenin, a nucleic acid encoding a Tef4 attached to a transactivator, and a nucleic acid encoding a beta catenin attached to a transactivator (e.g. VP16). Preferred nucleic acids include DNAs or RNAs and in certain embodiments, the nucleic acid comprises a vector.

In still another embodiment this invention provides a kit for screening for an agent that modulates the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product. Preferred kits comprise a container containing a mammalian cell comprising a nucleic acid encoding a protein binding site and an effector gene; a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds said peptide binding domain attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product; a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product.

In another embodiment, the kit a container containing a nucleic acid as described herein.

Also provided are kits for selectively killing a cell. Such kits include a container containing a two-hybrid system component selected from the group consisting of one or more nucleic acids as described herein, and/or one or two chimeric proteins as described herein.

Definitions.

A "chimeric molecule" is a molecule comprising two or more molecules typically found separately in their native state that are joined together typically through one or more covalent bonds. The molecules may be directly joined or joined through a linker. Where the molecules are both polypeptides they may be joined through a peptide bond or a peptide linker forming a fusion protein.

A "fusion protein" refers to a polypeptide formed by the joining of two or more polypeptides through a peptide bond formed between the amino terminus of one polypeptide and the carboxyl terminus of another polypeptide. The fusion protein may be formed by the chemical coupling of the constituent polypeptides or it may be expressed as a

WO 02/31201

PCT/US01/31745

single polypeptide from nucleic acid sequence encoding the single contiguous fusion protein. A single chain fusion protein is a fusion protein having a single contiguous polypeptide backbone.

A "spacer" or "linker" as used in reference to a fusion protein refers to a peptide that joins the proteins comprising a fusion protein. Generally a spacer has no specific biological activity other than to join the proteins or to preserve some minimum distance or other spatial relationship between them. However, the constituent amino acids of a spacer may be selected to influence some property of the molecule such as the folding, net charge, or hydrophobicity of the molecule.

A "spacer" or "linker" as used in reference to a chemically conjugated chimeric molecule refers to any molecule that links/joins the constituent molecules of the chemically conjugated chimeric molecule.

The "metabolic product" refers to a molecule formed as an intermediate or an end product of a metabolic pathway. The term may also include such products as they may be subsequently modified by member of a different pathway in a cell. When used as a domain of a chimeric molecule in this invention the metabolic product may be a full-length/full-size metabolic product or a fragment thereof sufficient to be specifically bound by another molecule.

The phrase "kill or inhibit a cell" refers to the death of a cell or a decrease in cellular growth and/or proliferation.

The term "specifically binds", when referring to the interaction of a nucleic acid binding protein and a nucleic acid binding site or two proteins or other binding pairs refers to a binding reaction which is determinative of the presence of the one or other member of the binding pair in the presence of a heterogeneous population of molecules (e.g., proteins and other biologics). Thus, for example, in the case of a receptor/ligand binding pair the ligand would specifically and/or preferentially select its receptor from a complex mixture of molecules, or vice versa. An enzyme would specifically bind to its substrate, *etc.* The binding may be by one or more of a variety of mechanisms including, but not limited to ionic interactions, covalent interactions, hydrophobic interactions, van der Waals interactions, *etc.*

The terms "binding partner", or a member of a "binding pair", or "cognate ligand" refers to molecules that specifically bind other molecules to form a binding complex

WO 02/31201

PCT/US01/31745

such as antibody/antigen, lectin/carbohydrate, nucleic acid/nucleic acid, receptor/receptor ligand (e.g. IL-4 receptor and IL-4), avidin/biotin, etc.

The term ligand is used to refer to a molecule that specifically binds to another molecule. Commonly a ligand is a soluble molecule, e.g. a hormone or cytokine, that binds to a receptor. The decision as to which member of a binding pair is the ligand and which the "receptor" is often a little arbitrary when the broader sense of receptor is used (e.g., where there is no implication of transduction of signal). In these cases, typically the smaller of the two members of the binding pair is called the ligand. Thus, in a lectin-sugar interaction, the sugar would be the ligand (even if it is attached to a much larger molecule, recognition is of the saccharide).

The term "two-hybrid system" refers to a system comprising two chimeric molecules one of which bears a nucleic acid binding region, the other of which bears an expression control element (e.g. a transactivation or repressor domain). The molecules further a cognate binding pair such that one chimeric molecule is capable of specifically binding to the other chimeric molecule. The two-hybrid system further comprises a nucleic acid encoding a protein binding site that is specifically bound by the protein binding domain on the chimeric molecule thereby anchoring the chimeric molecule to the nucleic acid. The domain of the chimeric molecule recognizes and binds to its cognate binding partner on the second chimeric molecule thereby recruiting that molecule to the nucleic acid whereby the expression control element alters (e.g. activates) expression of a gene or cDNA comprising the underlying nucleic acid.

The phrase "one or more components of the two-hybrid systems of this invention" refers to either or both of the chimeric molecules comprising the two-hybrid system and/or the nucleic acid(s) encoding them and/or the nucleic acid comprising the protein recognition site and effector.

"Transfection" is used herein to mean the delivery of expressible nucleic acid to a target cell, such that the target cell is rendered capable of expressing said nucleic acid. It will be understood that the term "nucleic acid" includes both DNA and RNA without regard to molecular weight, and the term "expression" means any manifestation of the functional presence of the nucleic acid within the cell, including without limitation, both transient expression and stable expression.

"Delivery" is used to denote a process by which a desired compound is transferred to a target cell such that the desired compound is ultimately located inside the

WO 02/31201

PCT/US01/31745

target cell or in, or on the target cell membrane. In many uses of the compounds of the invention, the desired compound is not readily taken up by the target cell and delivery via lipid aggregates is a means for getting the desired compound into the cell. In certain uses, especially under *in vivo* conditions, delivery to a specific target cell type is preferable and can be facilitated by compounds of the invention.

The terms "polypeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical analogue of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers. The term also includes variants on the traditional peptide linkage joining the amino acids making up the polypeptide.

The terms "nucleic acid" or "oligonucleotide" refer to at least two nucleotides covalently linked together. A nucleic acid of the present invention is preferably single-stranded or double stranded and will generally contain phosphodiester bonds, although in some cases, as outlined below, nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones, comprising, for example, phosphoramidate (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) and references therein; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; and Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), phosphorothioate (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; and U.S. Patent No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111 :2321, O-methylphosphoroamidite linkages (see Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), and peptide nucleic acid backbones and linkages (see Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielson (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380: 207). Other analog nucleic acids include those with positive backbones (Denpoy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; non-ionic backbones (U.S. Patent Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Angew. (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.*

WO 02/31201

PCT/US01/31745

37:743 (1996)) and non-ribose backbones, including those described in U.S. Patent Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within the definition of nucleic acids (see Jenkins *et al.* (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp169-176). Several nucleic acid analogs are described in Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35. These modifications of the ribose-phosphate backbone may be done to facilitate the addition of additional moieties such as labels, or to increase the stability and half-life of such molecules in physiological environments.

A "recombinant expression cassette" or simply an "expression cassette" is a nucleic acid construct, generated recombinantly or synthetically, with nucleic acid elements that are capable of effecting expression of a gene or cDNA in hosts compatible with such sequences. Expression cassettes include at least promoters and optionally, transcription termination signals. Typically, the recombinant expression cassette includes a nucleic acid to be transcribed (e.g., a nucleic acid encoding a desired polypeptide), and a promoter. Additional factors necessary or helpful in effecting expression may also be used as described herein.

The terms "gene" and "cDNA" are typically used interchangeably herein. Thus, for example, a reporter gene can comprise a genomic nucleic acid (e.g., comprising introns and exons) or a cDNA. In certain instances, the terms genomic DNA and cDNA will not be used interchangeably. This may be determined from the context of the usage.

An "apoptosis inducing gene" refers to a gene or cDNA implicated in apoptosis. Preferred apoptosis genes induce or increase apoptosis when they are activated. Apoptosis inducing genes include, but are not limited to P53, P73, Bax, Bad, FADD, caspases, *etc.*

A method of "selectively killing" refers to a method that induces death of a particular cell type more frequently and/or sooner than the death of a different cell type (e.g. a cell lacking the particular distinguishing feature(s)) of the "targeted" cell.

The term "transactivator" refers to a molecule that induces transcription and/or upregulates transcription of a gene or cDNA. The transactivator may be a complete "native" molecule or a domain of a molecule that is capable of inducing and/or upregulating transcription of a gene or cDNA.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

An "expression control domain" or "expression control protein" is typically a polypeptide that alters the expression of a gene or cDNA. Typical expression control proteins are transactivators (that upregulate expression of a gene or cDNA) or repressors (that downregulate the expression of a gene or cDNA).

A "cytotoxin" is an agent (*e.g.* a protein) that kills a cell.

An "apoptosis gene" refers to a gene whose expression is involved in an apoptosis pathway. Such apoptosis genes include, but are not limited to P53, P73, Bax, Bad, FADD, a caspase gene, *etc.*

The term "test agent" refers to any agent that is to be screened for a desired activity. The "test composition" can be any molecule or mixture of molecules, optionally in a suitable carrier.

The term "small organic molecule" typically refers to molecules of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (*e.g.*, proteins, nucleic acids, *etc.*). Preferred small organic molecules range in size up to about 5000 Da, more preferably up to 2000 Da, and most preferably up to about 1000 Da.

An "effector molecule" is any molecule whose expression is to be controlled by the two-hybrid system of this invention. Suitable effector molecules include, but are not limited to cytotoxins, reporter genes, enzymes, apoptosis genes, and the like.

"Reporter genes" are genes or cDNAs that express an easily assayable (detectable and/or quantifiable) product. Detection of the assayable product indicates the expression and/or level of expression of the reporter gene. Reporter genes are well known to those of skill in the art. They include, but are not limited to, genes expressing bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT), beta-galactosidase (β -gal), green fluorescent protein (GFP) and other fluorescent proteins, various bacterial luciferase genes, *e.g.*, the luciferase genes encoded by *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, and *Xenorhabdus luminescens*, the firefly luciferase gene EFlux, and the like.

The term "modulate" when used with reference to the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product.

The terms "peptide binding site" or "protein binding site" refer to a nucleic acid sequence that is recognized and/or bound by a nucleic acid binding protein (*e.g.* a DNA binding protein).

WO 02/31201

PCT/US01/31745

A "nucleic acid binding domain" refers to a protein or a region of a protein that recognizes and/or binds to a nucleic acid. A nucleic acid binding protein (*e.g.*, a DNA binding protein) can be a full-length nucleic acid binding protein or a fragment thereof that binds to a nucleic acid.

The term "kit" refers to a collection of materials, more preferably a packaged collection of materials (preferably related materials) to perform a particular function (*e.g.* to run a screening assay, to express a protein, to culture a cell, *etc.*). A kit may optionally comprise instructional materials describing the use of the materials present in the kit.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates the concept of gene therapy using β -catenin/Tcf4 mammalian two-hybrid system. When cells are transfected with the plasmids encoding GAL4/WT- β -catenin, VP-16/FL-Tcf4 and GAL4-responsive element-driven suicide gene, suicide gene expression occurs only in APC mutated cells.

Figure 2A Figure 2B, and Figure 2C illustrate the two-hybrid system of this invention. Figure 2A shows the structure of the two-hybrid components. The pBIND/WT- β -catenin plasmid is designed to produce chimera protein that consists of yeast GAL4 DNA binding domain and wild type- β -catenin. The pBIND/MT- β -catenin plasmid is designed to produce the chimera protein consists of GAL4 DNA binding domain and the GSK-3 β phosphorylation site (aa29-aa48)-deleted β -catenin. The pACT/FL-Tcf4 plasmid is designed to produce the chimera protein consists of herpes simplex virus VP16 transcription activation domain and full length Tcf4. The pACT/DN-Tcf4 plasmid is designed to produce the chimera protein consists of VP16 transcription activation domain and β -catenin binding site (aa2-aa53)-deleted Tcf4. Figure 2B illustrates expression of GAL4/ β -catenin and VP16/Tcf4 in SW480 Cells. Cells were transfected with pBIND/ β -catenin or pACT/Tcf4 plasmid and cultured for 24 h. Then expression levels of fusion proteins were detected by western blot. Figure 2C illustrates the specificity of two-hybrid system. SW480 cells were transfected with various combinations of GAL4 fusion protein, VP16 fusion protein and pGS/luc plasmids and cultured for 24 h. Luciferase activity of each sample was measured by luminometer.

Figure 3A and Figure 3B illustrate APC dependent selective expression and detection of two-hybrid component proteins in SW48 cells. Figure 3A illustrates APC dependent selective expression of the two-hybrid output gene in SW480 cells. SW480 cells

WO 02/31201

PCT/US01/31745

were transfected with various concentration of the pcDNA/APC plasmid in the presence of pBIND/WT or MT- β -catenin plasmid, pACT/TL-Tcf4 plasmid and pG5/luc plasmid. After 24 h culture, cells were lysed and luciferase activity was measured. Figure 3B illustrates detection of two-hybrid component proteins in SW48 cells. SW480 cells were transfected with various concentration of the pcDNA/APC plasmid in the presence of pBIND/WT or MT- β -catenin plasmid, pACT/TL-Tcf4 plasmid and pG5/luc plasmid. After 24 h culture, cells were lysed and two-hybrid component proteins were detected by western blotting.

Figure 4A, Figure 4B, and Figure 4C illustrate expression of cytoplasmic β -catenin, detection of Gal4 fusion protein degradation products, and selective gene expression dependent on the APC profile of the target cell. Figure 4A shows the expression levels of cytoplasmic β -catenin and APC in human cell lines. SW480 cells, SW48 cells, U-2OS cells and 293 cells (1.0×10^6 cells) were lysed with TE buffer containing protease inhibitors (complete mini, Boehringer Mannheim), and soluble fraction was collected by centrifugation. Each sample was loaded to 4-20% gradient acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Separated protein was detected with anti- β -catenin antibody or anti-APC antibody. Figure 4B illustrates detection of GAL4 fusion protein degradation products. SW480 cells and SW48 cells were transfected with pBIND/WT or MT- β -catenin plasmid and cultured for 24 h. Cells were lysed with SDS-page sample buffer and loaded to 4-20% gradient poly acrylamide gel. Separated protein was transferred to nitrocellulose membrane and GAL4 protein was detected with anti-GAL4 antibody. Figure 4C shows selective output gene expression of two-hybrid system dependent on the APC profile of the cell lines. Human cell lines were transfected with various concentrations of pBIND/WT- β -catenin plasmid in the presence of pACT/TL-Tcf4 and pG5/luc plasmids. Luciferase activity of each point was measured after 24 h culture.

Figure 5A, Figure 5B, and Figure 5C illustrate activation of p53 responsive luciferase expression and detection of p53-EGFP. Figure 5A shows activation of p53 responsive-luciferase expression by p53-EGFP. The pcDNA/p53-EGFP was transfected with p53-Luc, pAP-1-Luc or pCREB-Luc (Stratagene) in the presence of pRL/TK (Promega) to SW480 cells and cultured for 24 h. Cells were harvested and luciferase activity was measured. Figure 5B illustrates detection of p53-EGFP in SW480 cells. SW480 cells were co-transfected with pBIND/WT- β -catenin, pACT/TL-Tcf4 and pG5/p53-EGFP and cultured for 24 h. Produced p53-EGFP was detected by western blot using anti-p53 antibody.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

Figure 5C shows the results of a cell killing experiment using two-hybrid system. SW480 cells were transfected with pBIND/WT- β -catenin, pACT/FL-Tcf4 and pG5/p53-EGFP, and cultured for 48-72 h. Cells were trypsinized and washed with PBS. Then, cells were suspended in PBS containing 10 μ M propidium iodide. Cell death profile of EGFP positive cells were analyzed by measuring the uptake of propidium iodide using flow cytometer.

DETAILED DESCRIPTION

This invention provides novel approaches to the treatment (*e.g.* amelioration of one or more symptoms) of pathological states characterized by the undesired accumulation of one or more metabolic products. In addition, this invention provides effective systems in which to screen for agents that modulate the ability of a cell to degrade or accumulate a metabolic product (*e.g.* β -catenin).

In general the methods of this invention utilize a two-hybrid system, more preferably a mammalian two-hybrid system (*e.g.* Promega Check MateTM). A cell is provided containing constructs forming a two-hybrid system. The first construct comprises a first chimeric protein comprising having a nucleic acid binding domain attached to either the metabolic product that accumulates, an enzyme in the metabolic pathway that produces or degrades the metabolic product, or to a ligand that binds to the metabolic product of to the enzyme. A second construct is provided that is a chimeric protein comprising a transactivating domain attached to a cognate binding partner of the metabolic product, ligand, or enzyme component of the first construct. Thus, for example, where the first construct comprises the metabolic product attached to the nucleic acid binding domain, the second construct comprises a ligand that binds the metabolic product attached to a transactivating domain. A third construct in the cell is a nucleic acid comprising a nucleic acid sequence capable of being bound by the nucleic acid binding domain of the first construct and a gene/cDNA encoding an effector. The effector is any nucleic acid or protein whose transcription and/or translation is to be regulated by this two-hybrid system. Thus, for example, in certain preferred embodiments the effector is a reporter or a cytotoxin.

In a cell that has a reduced ability or no ability to degrade the metabolic product, the construct bearing the metabolic product specifically binds to the construct bearing the cognate binding partner of that product. The two-protein complex is anchored to the nucleic acid by the component bearing the nucleic acid binding domain and the attached transactivator domain upregulates (or in some embodiments, down-regulates)

WO 02/31201

PCT/US01/31745

expression of the effector gene. Where the cell is able to degrade the metabolic product, the construct bearing that product is all, or partially, degraded. No complex is formed between the two constructs transcription and/or translation of the effector gene is unaffected (*e.g.* there is no signal).

One specific embodiment of this system is illustrated in Figure 1 which pertains to functional loss of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene product originally discovered in familial Adenomatous Polyposis patients (and also found in varieties of sporadic cancers including colon cancer). The tumor suppressor APC gene product is a member of the Wnt signaling pathway. This pathway is believed to play a critical and evolutionarily conserved role in directing cell fates during embryogenesis. In addition, inappropriate activation of the Wnt signal transduction pathway plays a role in a variety of human cancers.

Wnt signaling is regulated by the presence or absence of the intracellular protein β -catenin. A large multiprotein machine that includes proteins of the APC and Axin families normally facilitates the addition of phosphate groups to β -catenin by glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β). Phosphorylated β -catenin binds to a protein called β TTCP and is then modified by the covalent addition of a small protein called ubiquitin. Proteins tagged with ubiquitin are normally degraded by the proteasome.

Mutated APC is unable to form an APC/Axin complex. In this case, the β -catenin is not phosphorylated and ultimately not degraded. Thus, β -catenin accumulates in the cell. The excess β -catenin accumulates and enters the nucleus, where it finds a partner, *e.g.*, a DNA binding protein of the TCF/LEF family. Together they activate new gene expression programs, *e.g.* oncogenic target genes such as cyclin D1. This condition is observed in a large number of cancers (*e.g.* in 80 to 85% of all colon cancers).

In one embodiment, the methods of this invention are used to selectively kill cells having a defective APC or to screen for modulators of the Wnt pathway leading to β -catenin degradation. A specific embodiment is illustrated in Figure 1, which shows a first chimeric molecule comprising a nucleic acid binding domain, in this case Gal4 attached to a β -catenin. A second chimeric molecule comprises a T-cell factor (*e.g.*, Tcf-4) attached to a transactivator (VP16). The third construct is a nucleic acid encoding a Gal4 binding domain and an effector (*e.g.* a thymidine kinase) gene.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

A cell having a defective APC will accumulate β -catenin, in this case, the Gal4- β -catenin construct. The Gal4- β -catenin construct binds to the Gal4 binding site on the nucleic acid. The Tcf4-VP16 chimeric molecule binds to the β -catenin via the β -catenin/Tcf4 interaction thereby juxtaposing the VP16 transactivator to the nucleic acid which then induces transcription of the effector gene. If the effector gene is a cytotoxin the cell having a defective APC is killed. If the effector is a reporter the resulting signal identifies the cells a cell comprising a defective APC. Where the cell is contacted with a test agent and the effector is a reporter, a change in signal indicates that the test agent modulates activity of the Wnt pathway in particular with respect to the accumulation of β -catenin.

A cell having a normal APC will degrade β -catenin (in this case the Gal4- β -catenin chimeric molecule. The Tcf4-VP16 chimeric molecule then is not directed to the nucleic acid and there is no alteration in expression (or non-expression) of the effector gene. Thus, where the effector gene is a cytotoxin, a cell having normal APC and therefore able to degrade β -catenin will not express the cytotoxin and will not be killed. The use of this system with a cytotoxic effector thus specifically eliminates cells having a defective APC.

I. Uses of the methods of this invention.

The above-described system, or variants thereof, can be used in a wide variety of contexts to screen for agents (e.g. drugs or lead compounds) that modulate (e.g. increase or decrease) the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product. In other embodiments the methods described herein can be used to selectively kill or inhibit cells that abnormally accumulate or degrade metabolic products and thereby mitigate symptoms of pathological states characterized by the abnormal accumulation or degradation of metabolic products.

A) Screening for modulators of the ability of a cell to accumulate or to degrade metabolic products.

As indicated above, the methods of this invention are well suited to screening for an agent or agents that modulate the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product. In preferred embodiments, such assays involve providing a cell, as described above, containing the two chimeric proteins (binding-domain/metabolite, ligand-transactivator) and the nucleic acid comprising an effector. In one embodiment, the effector

WO 02/31201

PCT/US01/31745

preferably encodes a reporter gene or another gene that encodes a detectable, but not lethal product. In this instance, the gene expression is detected. In another embodiment, the gene encodes a lethal gene product (e.g. P53 or a cytotoxin) and the assay involves measuring the number of viable cells.

The cell is then contacted with the agent or agents of interest and activity of the reporter gene is detected. Where the reporter gene shows an expression level and/or activity level different than the level shown in a cell of the same type harboring the same constructs, but contacted with a different concentration of test agent (or no test agent), the test agent is presumed to have altered the metabolic pathway leading to the accumulation or degradation of the metabolic product.

The effect of the test agent can be direct, e.g. by binding or degradation of the metabolic product or an enzyme or other ligand that normally binds to the metabolic product, or the effect can be indirect, e.g. by binding, degrading, or otherwise altering a different component of the pathway that ultimately alters the ability of the cell to accumulate or to degrade the metabolic product of interest. Thus, for example, in the case of the APC system described above, the test agent may alter the cell's accumulation of β -catenin directly by binding to or otherwise interacting with APC, axin, or with Tcf. Alternatively, the test agent may act indirectly, for example, by altering the phosphorylation of β -catenin by binding to or otherwise altering the activity of GSK3 β . This is, of course, only one illustrative mechanism for indirect action by a possible test agent and numerous other possibilities also exist. In this example, regardless of the mechanism of action of the test agent, as long as it alters the accumulation or degradation of β -catenin, its activity will be detected in the assays of this invention.

1) Scoring the assay.

The assays of this invention are scored according to standard methods well known to those of skill in the art. Typically the expression level of the reporter gene is assayed according to standard methods. Reporter genes are genes or cDNAs that express an easily assayable (detectable and/or quantifiable) product. Detection of the assayable product indicates the expression and/or level of expression of the reporter gene. Reporter genes are well known to those of skill in the art. They include, but are not limited to, genes expressing bacterial chloramphenicol acetyl transferase (CAT), beta-galactosidase (β -gal), green fluorescent protein (GFP) and other fluorescent proteins, various bacterial luciferase

WO 02/31201

PCT/US01/31745

genes, *e.g.*, the luciferase genes encoded by *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, and *Xenorhabdus luminescens*, the firefly luciferase gene FFlux, and the like. The reporter gene can be the sole gene under the control of the promoter activated or inhibited by the transcription factor (*e.g.* VP-16) comprising the "second chimeric molecule" or there may be one or more other genes also under control of the subject promoter (*e.g.* P53-eGFP).

The assays of this invention are not limited to the use of reporter genes.

Generally the transcription, translation, or activity of any gene or cDNA can routinely be detected. Thus, for example, the transcribed mRNA can be detected by methods including, but not limited to, Northern blots, amplification techniques (*e.g.* PCR), and the like. Similarly, the translated protein product can be detected by detecting the characteristic activity of the protein or by detecting the protein product itself (*e.g.* via Western blot, capillary electrophoresis, and the like).

As indicated above, in preferred embodiments, the expression of the "reporter" gene or cDNA is evaluated with respect to one or more controls. Typical embodiments utilize a negative control comprising the test agent(s) at a lower concentration or in the absence of the test agent(s). A difference in expression of the "reporter" gene in the presence of the test agent(s) as compared to the expression of the reporter gene where the test agent is present at a lower concentration or absent indicates that the test agent has an activity on the metabolic pathway being assayed.

Other embodiments, may utilize a positive control comprising a cell administered the test agent or, more preferably, a reference agent at a particular concentration. The effect of the test agent is then measured relative to the particular concentration of test agent or reference agent.

Still other controls may be utilized to assay for the specificity of the activity of the test agent. Thus, for example the test agent may act through generalized activity of the cell (*e.g.* by diminishing metabolic rate, cell viability, proliferation rate, growth rate, etc.) rather than through specific activity on the pathway of interest. In preferred embodiments it is desired to distinguish between generalized activity of the test agent(s) and specific activity on the metabolic pathway of interest. In certain embodiments, this is accomplished by expressing one or both of the chimeric proteins under control of an inducible promoter. Thus, for example, the Gal4- β -catenin chimera may be under control of a inducible promoter (*e.g.*, ecodycine inducible system or tetracycline inducible system). If the test agent still has an effect in the absence of induced Gal4- β -catenin or if varying the

WO 02/31201

PCT/US01/31745

level of induction of Gal4- β -catenin does not alter the effect of the test agent(s) then the test agent(s) are presumed to act through a non-specific mechanism. Conversely, where altering the expression level of Gal4- β -catenin alters the apparent activity of the test agent(s) the agent(s) are presumed to act specifically on the pathway of interest (in this example, the Wnt signaling pathway).

The assays of this invention are typically scored as positive where there is a difference between the activity seen with the test agent present and the (usually negative) control, preferably where the difference is statistically significant (e.g. at greater than 80%, preferably greater than about 90%, more preferably greater than about 98%, and most preferably greater than about 99% confidence level). Most preferred "positive" assays show at least a 1.2 fold, preferably at least a 1.5 fold, more preferably at least a 2 fold, and most preferably at least a 4 fold or even a 10-fold difference from the negative control.

2) Agents for screening: Combinatorial libraries (e.g., small organic molecules)

Virtually any agent can be screened according to the methods of this invention. Such agents include, but are not limited to nucleic acids, proteins, sugars, polysaccharides, glycoproteins, lipids, and small organic molecules. The term small organic molecules typically refers to molecules of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (e.g., proteins, nucleic acids, etc.). Preferred small organic molecules range in size up to about 5000 Da, more preferably up to 2000 Da, and most preferably up to about 1000 Da.

Conventionally, new chemical entities with useful properties are generated by identifying a chemical compound (called a "lead compound") with some desirable property or activity, creating variants of the lead compound, and evaluating the property and activity of those variant compounds. However, the current trend is to shorten the time scale for all aspects of drug discovery. Because of the ability to test large numbers quickly and efficiently, high throughput screening (HTS) methods are replacing conventional lead compound identification methods.

In one preferred embodiment, high throughput screening methods involve providing a library containing a large number of potential therapeutic compounds (candidate compounds). Such "combinatorial chemical libraries" are then screened in one or more assays, as described herein to identify those library members (particular chemical species or

WO 02/31201

PCT/US01/31745

subclasses) that display a desired characteristic activity. The compounds thus identified can serve as conventional "lead compounds" or can themselves be used as potential or actual therapeutics.

A combinatorial chemical library is a collection of diverse chemical compounds generated by either chemical synthesis or biological synthesis by combining a number of chemical "building blocks" such as reagents. For example, a linear combinatorial chemical library such as a polypeptide (*e.g.*, motilin) library is formed by combining a set of chemical building blocks called amino acids in every possible way for a given compound length (*i.e.*, the number of amino acids in a polypeptide compound). Millions of chemical compounds can be synthesized through such combinatorial mixing of chemical building blocks. For example, one commentator has observed that the systematic, combinatorial mixing of 100 interchangeable chemical building blocks results in the theoretical synthesis of 100 million tetrameric compounds or 10 billion pentameric compounds (Gallop *et al.* (1994) 37(9): 1233-1250).

Preparation of combinatorial chemical libraries is well known to those of skill in the art. Such combinatorial chemical libraries include, but are not limited to, peptide libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,010,175, Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493, Houghton *et al.* (1991) *Nature*, 354: 84-88). Peptide synthesis is by no means the only approach envisioned and intended for use with the present invention. Other chemistries for generating chemical diversity libraries can also be used. Such chemistries include, but are not limited to: peptoids (PCT Publication No WO 91/19735, 26 Dec. 1991), encoded peptides (PCT Publication WO 93/20242, 14 Oct. 1993), random bio-oligomers (PCT Publication WO 92/00091, 9 Jan. 1992), benzodiazepines (U.S. Pat. No. 5,288,514), diversomers such as hydantoins, benzodiazepines and dipeptides (Hobbs *et al.*, (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913), vinylogous polypeptides (Hagihara *et al.* (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568), nonpeptidic peptidomimetics with a Beta-D-Glucose scaffolding (Hirschmann *et al.*, (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218), analogous organic syntheses of small compound libraries (Chen *et al.* (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661), oligocarbamates (Cho, *et al.*, (1993) *Science* 261:1303), and/or peptidyl phosphonates (Campbell *et al.*, (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658). *See, generally*, Gordon *et al.*, (1994) *J. Med. Chem.* 37:1385, nucleic acid libraries (*see, e.g.*, Strategene, Corp.), peptide nucleic acid libraries (*see, e.g.*, U.S. Patent 5,539,083) antibody libraries (*see, e.g.*, Vaughn *et al.* (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3): 309-314), and PCT/US96/10287),

WO 02/31201

PCT/US01/31745

carbohydrate libraries (*see, e.g.,* Liang *et al.* (1996) *Science*, 274: 1520-1522, and U.S. Patent 5,593,853), and small organic molecule libraries (*see, e.g.,* benzodiazepines, Baum (1993) *C&EN*, Jan 18, page 33, isoprenoids U.S. Patent 5,569,588, thiazolidinones and metathiazanones U.S. Patent 5,549,974, pyrrolidines U.S. Patents 5,525,735 and 5,519,134, morpholino compounds U.S. Patent 5,506,337, benzodiazepines 5,288,514, and the like).

Devices for the preparation of combinatorial libraries are commercially available (*see, e.g.,* 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA).

A number of well known robotic systems have also been developed for solution phase chemistries. These systems include, but are not limited to, automated workstations like the automated synthesis apparatus developed by Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan) and many robotic systems utilizing robotic arms (Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.) which mimic the manual synthetic operations performed by a chemist and the Venture™ platform, an ultra-high-throughput synthesizer that can run between 576 and 9,600 simultaneous reactions from start to finish (*see* Advanced ChemTech, Inc. Louisville, KY). Any of the above devices are suitable for use with the present invention. The nature and implementation of modifications to these devices (if any) so that they can operate as discussed herein will be apparent to persons skilled in the relevant art. In addition, numerous combinatorial libraries are themselves commercially available (*see, e.g.,* ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, RU, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, *etc.*).

3) High Throughput Screening

Any of the assays for compounds modulating the accumulation or degradation of metabolic products described herein are amenable to high throughput screening. Preferred assays detect increases or decreases in the transcription and/or translation of a reporter gene in response to the presence of a test compound.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

The cells utilized in the methods of this invention need not be contacted with a single test agent at a time. To the contrary, to facilitate high-throughput screening, a single cell may be contacted by at least two, preferably by at least 5, more preferably by at least 10, and most preferably by at least 20 test compounds. If the cell scores positive, it can be subsequently tested with a subset of the test agents until the agents having the activity are identified.

High throughput assays for various reporter gene products are well known to those of skill in the art. For example, multi-well fluorimeters are commercially available (e.g., from Perkin-Elmer).

In addition, high throughput screening systems are commercially available (see, e.g., Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA, etc.). These systems typically automate entire procedures including all sample and reagent pipetting, liquid dispensing, timed incubations, and final readings of the microplate in detector(s) appropriate for the assay. These configurable systems provide high throughput and rapid start up as well as a high degree of flexibility and customization. The manufacturers of such systems provide detailed protocols for the various high throughput. Thus, for example, Zymark Corp. provides technical bulletins describing screening systems for detecting the modulation of gene transcription, ligand binding, and the like.

B) Selectively killing or inhibiting cells showing an abnormality in a metabolic pathway.

The methods of this invention can also be used to selectively kill or inhibit a cell showing an abnormality in a metabolic pathway. This is accomplished simply by using a cytotoxic gene or cDNA as the effector. Cells able to degrade the metabolic product in question (e.g. β -catenin) will also degrade the metabolic product producing the chimeric molecule and the effector gene will not be transactivated. Conversely, cells unable to degrade the metabolic product will have a functioning two-hybrid system that transactivates the cytotoxic effector thereby killing or inhibiting the cell. The method is thus highly selective for cells showing an abnormality in the metabolic pathway of interest.

It is noted that this approach is not only useful in the treatment of traditional "diseases of accumulation", but also in the treatment of various cancers characterized by the accumulation of a metabolic product.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

As used herein, a cytotoxic gene or cDNA refers to a gene or cDNA that when expressed results in cell death or renders the cell susceptible to killing by another reagent. Thus, for example, expression of a herpes virus thymidine kinase gene will render a cell susceptible to the drug gancyclovir which will cause the selective killing of any cell producing tk.

Suitable cytotoxic genes include, but are not limited to genes for cytotoxins such as *Pseudomonas* exotoxin, *Diphtheria* toxin, ricin, abrin, thymidine kinase, apoptosis genes, and genes involved in an apoptosis related pathway (e.g. P53, P73, Bax, Bad, FADD, caspases, etc.). In certain embodiments, the gene is an anti-apoptotic gene such as Bcl2 or MDM2, etc.

In Example 1 herein, the method is illustrated for the selective killing of cells having a defective APC. A two-hybrid system comprising Gal4- β -catenin and Tef-VP16 chimeric molecules is used to transactivate an effector comprising a P53 or a tk gene. As illustrated in the Example, the method provides highly specific killing of APC-defective cells.

The method is not limited to the *in vitro* use. To the contrary, the chimeric molecules, or nucleic acids comprising the chimeric molecules, can be delivered to cells *in vivo* (e.g. using gene therapy delivery methods as described herein) where they provide highly effective killing of the defective cell(s). The methods thus offer a means to treat a large number of cancers and other diseases of accumulation.

C) Selectively compensating for metabolic defects.

Instead of killing the subject cells, the methods of this invention can also be used to selectively compensate for one or more metabolic defects. In this instance, the effector is a gene or cDNA that encodes the protein (e.g. an enzyme) for which the cell is deficient. When the two-hybrid system is inserted into a cell that is deficient for the desired activity, the two-hybrid system turns on the effector thereby initiating the desired metabolic activity (e.g. degrading the particular metabolic product).

D) Illustrative pathologies suitable for intervention using the methods of this invention.

The methods of this invention can be used to assay for agents having activity in essentially any condition characterized by the accumulation of a metabolic product.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

Similarly, the methods can be used to selectively kill cells that show a degradation defect. Thus, the methods of this invention are useful in the treatment of diseases of accumulation or in screening for agents that are also useful in the treatment of diseases of accumulation.

Diseases of accumulation (storage diseases) are well known to those of skill in the art and include, but are not limited to Storage disease include but are not limited to glycogen storage disease I, GM1 gangliosidosis, MPS IV B (Morquio B), GM2 gangliosidosis (O, B, AB, B1 variants), Niemann-Pick disease (A, B, and C), metachromatic leukodystrophy (arylsulfatase A and SAP-1 deficient), Krabbe disease, Fabry disease, Gaucher disease, Farber disease, Wolman disease (cholesterol ester storage disease), MPS I (Hurler and Scheie syndromes), MPS II (Hunter syndrome), MPS III A, C, and D (Sanfilippo A, C, and D), PS III B (Sanfilippo B), MPS IV A (Morquio A), MPS VI (Maroteaux-Lamy syndrome), MPS VII (beta-glucuronidase deficiency), Multiple sulfatase deficiency, Mucopolidosis I (Sialidosis), Mucopolidosis II & III, alpha-Mannosidosis, beta-Mannosidosis, Fucosidosis, Sialic acid storage disease, Galactosialidosis, Aspartylglucosaminuria Cystinosis.

The etiology of such storage diseases is relatively well understood. Thus, identification of metabolic product(s) and ligands for use in two-hybrid system relevant to the disease is relatively straightforward. For example, in Gauchers disease defective genes for glucocerebrosidase result in the accumulation of glucosylceramide in macrophages. Use of the two-hybrid system of this invention with glucosylceramide, or another component of the same pathway with an effector that is a cytotoxin will selectively kill cells showing the Gauchers phenotype, while use of an effector that is a glucocerebrosidase selectively replaces the missing activity in those cells in need of such activity. Similarly, Krabbe disease is a lethal demyelinating condition caused by a deficiency of galactosylceramidase (GALC) enzyme activity. This leads to accumulation of cerebroside and psychosine. Use of either metabolic product in a two-hybrid system and galactosylceramidase enzyme as the effector, according to the methods of this invention provides a system that selectively replaces the desired metabolic activity in cells in need of such activity.

The methods of this invention are also useful in the treatment of a number of cancers or for screening for therapeutic agents useful in the treatment of a number of cancers. For example defective APC is observed in a large number of cancers (e.g. in 80 to 85% of all colon cancers). In addition, viral activation of *Wnt-1* causes mammary tumors in

WO 02/31201

PCT/US01/31745

mice and mutations that make β -catenin refractory to destruction are found in a wide variety of cancers (*see, e.g.,* Polakis (1999) *Curr. Opin. Gene. Dev.*, 9: 15).

II. Components of the methods of this invention.

A) The first and second chimeric molecules.

The methods of this invention utilize a mammalian two-hybrid system involving a first chimeric molecule having a nucleic acid binding domain and a second chimeric molecule having a regulatory domain (*e.g.* a transactivator or a repressor). The first chimeric molecule preferably comprises a domain that is the metabolic product of interest (*e.g.* β -catenin) while the second chimeric molecule comprises a domain that is a ligand, enzyme, *etc.* that binds the metabolic product domain comprising the first chimeric molecule. The ligand and the metabolic product are interchangeable. That is, the first chimeric molecule may comprise the ligand and the second chimeric molecule may comprise the metabolic product.

In the APC system illustrated in example 1, the first chimeric molecule comprises a Gal4 domain and a β -catenin domain, while the second chimeric molecule comprises a Tcf4 domain and a VP16 domain. The components can be reversed, so the first chimeric molecule comprises Gal4 and Tcf4, while the second chimeric molecule comprises β -catenin and VP16. In addition, the ligand need not be Tcf4. Essentially any molecule in the Wnt pathway that binds to β -catenin is suitable. Thus, for example, Tcf4 may be substituted with Tcf1, Tcf3, Lef1, or other members of the Tcf family. Other molecules involved in the Wnt signaling pathway include, but are not limited to axin, disheveled, GSK3 β , β -TrCP, casein kinases 1 α and 1 β , protein phosphatase 2A, and FRAT (frequently rearranged in advanced T cell lymphomas).

The two-hybrid systems used in this invention thus comprise: 1) A metabolic product (or fragment thereof), 2) A ligand that binds to the metabolic product or fragment thereof, 3) A regulatory (expression control) domain, and 4) A nucleic acid binding domain. The nucleic acid binding domain and the regulatory domain are on different chimeric molecules.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

1) The metabolic product.

Selection of the metabolic product (or fragment thereof) for use in the two-hybrid system according to the methods of this invention is a function of the particular metabolic pathway or pathology of interest. As illustrated in example 1, one metabolic product useful for the Wnt signaling pathway is β -catenin.

In the case of Gaucher's disease which is characterized by the inactivation of glucocerebrosidase resulting in the accumulation of glucosylceramide in macrophages, glucosylceramide or the glucocerebrosidase provide effective targets (metabolic products or enzymes) for use in the methods of this invention. Similarly, Krabbe's disease, a lethal demyelinating condition is caused by a deficiency of galactosylceramidase (GALC) enzyme activity leading to the accumulation of cerebroside and psychosine. Again, both the accumulated metabolic products and/or the deficient enzyme and/or other molecules in the same metabolic pathway provide good targets for use in the methods of this invention.

Using the teaching provided herein, one of skill may readily determine other metabolic products for use in the two-hybrid systems for assays and therapeutics according to the methods of this invention.

2) The ligand that binds to the metabolic product.

The ligand that binds the metabolic product may be a naturally occurring molecule found in the metabolic pathway that produces or degrades the metabolic product. Alternatively, the ligand used to bind the metabolic product of interest need not be a ligand found in the pathway that normally produces the metabolic product. Any ligand that binds the metabolic product, and more preferably that specifically binds the metabolic product is suitable. Thus, for example the system illustrated in example 1 utilizes a member of the TCF/LEF family. The TCF family members are known to bind to β -catenin, but are not believed to be participants in the pathway that produces or degrades β -catenin.

The ligand need not even be a naturally-occurring molecule. Thus, for example, where a ligand is needed for a particular molecule (*e.g.* glucosylceramide in Gaucher's disease), one can be readily generated using any of a number of known technologies (*e.g.* phage display or other methods of directed evolution). The use of phage display libraries to identify single chain polypeptides that specifically bind a particular molecule with high affinity is well known to those of skill in the art (*see, e.g., McCafferty et al. (1990) Nature, 348: 552-554; Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4133-*

WO 02/31201

PCT/US01/31745

4137; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Marks *et al.* (1993) *BioTechnology*, 10: 779-783; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 725-734; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624-628).

3) The expression control protein/domain.

One of the chimeric molecules used in the two-hybrid systems of this invention comprises an expression control (regulatory) domain. The expression control domain is typically a polypeptide that alters the expression of a gene or cDNA. Typical expression control proteins are transactivators (that upregulate expression of a gene or cDNA) or repressors (that downregulate the expression of a gene or cDNA).

While in one particularly preferred embodiment, the expression control protein is VP16, in preferred embodiments, any TATA box binding domain of a known transactivating protein can replace VP16. Other suitable transactivators will be known to those of skill in the art. Various transactivators include, but are not limited to, E2F-4 (U.S. Patent 6,045,999), human transcription factor (*see* U.S. Patent 4,600,971), transcription factor Islet-Brain 1 (IB1) (U.S. Patent 5,880,261), TFIIB transcription factor from *Candida albicans* (U.S. Patent 5,863,762), DP1 (U.S. Patent 5,863,757), DP-3 (U.S. Patent 5,859,199), Liver enriched transcription factor (U.S. Patent 5,849,485), RNA polymerase transcription factor (U.S. Patent 5,792,634), transcription factor APRF (acute phase response factor) (U.S. Patent 5,719,042), cell-type specific transcription factor (U.S. Patent 5,710,025), p300 transcription factor (U.S. Patent 5,658,784), human transcription factor IIA (U.S. Patent 5,652,117), S-II transcription factor (U.S. Patent 5,196,303), and the like.

While in preferred embodiments, this invention utilizes an expression control domain that is a transactivator, in certain embodiments, a control element is used that is a repressor of gene or cDNA transcription. Various transcription repressors are known to those of skill in the art. These include, but are not limited to Kruppel-like factor (U.S. Patent 6,077,933), tetracycline repressor (U.S. Patents 5,972,650 and 5,917,122), ETS2 repressor (U.S. Patent 5,856,125), papillomavirus E2 transactivation repressor (U.S. Patent 5,595,884), the CI434 repressor, plasmids (U.S. Patent 5,147,789), and the like.

4) The nucleic acid binding domain

Virtually any nucleic acid binding protein or the binding domain therein may be used in the two-hybrid systems of this invention. The binding protein preferably binds to

WO 02/31201

PCT/US01/31745

a particular nucleic acid sequences with sufficient affinity that an attached transactivator is able to upregulate expression of an appropriately positioned gene or cDNA. While the Gal4 domain provides a well characterized and particular preferred embodiment, many other nucleic acid binding molecules are known to those of skill in the art. For example, U.S. Patents 6,010,849 and 5,578,444 provide assays for the ready identification of (typically non-protein) nucleic acid binding molecules and also provide a number of illustrative molecules.

Other nucleic acid binding proteins comprise various transactivators and are often characterized by the presence of a zinc-finger motif. Suitable nucleic acid binding proteins and assays for identifying these and other nucleic acid binding proteins are well known to those of skill in the art. Thus, for example, U.S. Patent 6,066,452 teaches methods for simultaneously selecting binding site sequences for multiple DNA binding proteins. U.S. Patent 6,07,988 discloses method of designing zinc finger binding polypeptides for binding to a particular target sequence and lists a number of suitable zinc finger polypeptides. U.S. Patent 5,773,583 discloses a number of "Fgr" proteins that bind to specific DNA sequences.

Using the teaching provided herein, other suitable nucleic acid binding proteins/binding domains can be readily determined by one of ordinary skill in the art without undue experimentation.

5) Preparation of the chimeric molecules.

The chimeric molecules comprising the two-hybrid systems of this invention may be chemically conjugated domains, or, where the domains are linked by an amino acid or peptide linker the chimeric molecules may be recombinantly expressed fusion proteins. Where the chimeric molecules are chemically conjugated, the chimeric molecule is delivered to the cell. Where the chimeric molecules are fusion proteins either the fusion protein itself is delivered to the cell or a nucleic acid encoding the fusion protein is transfected into the cell where it produces the desired fusion protein(s).

Means of chemically conjugating molecules are well known to those of skill. Polypeptides typically contain variety of functional groups; e.g., carboxylic acid (COOH) or free amine (-NH₂) groups, which are available for reaction with a suitable functional group on an effector molecule to bind the effector thereto. Alternatively, the components comprising the chimeric molecule(s) (e.g. Gal4 and β -catenin) may be derivatized to expose

WO 02/31201

PCT/US01/31745

or attach additional reactive functional groups. The derivatization may involve attachment of any of a number of linker molecules such as those available from Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

A "linker", as used herein, is a molecule that is used to join the two domains of the chimeric molecule(s) to each other. In preferred embodiments, the linker is capable of forming covalent bonds to both the domains. Suitable linkers are well known to those of skill in the art and include, but are not limited to, straight or branched-chain carbon linkers, heterocyclic carbon linkers, or peptide linkers. In certain embodiments, the linkers may be joined to amino acids comprising the domains through their side groups (e.g., through a disulfide linkage to cysteine). However, in a preferred embodiment, the linkers will be joined to the alpha carbon amino and carboxyl groups of the terminal amino acids. The linker may be bifunctional, having one functional group reactive with a substituent on the first domain (e.g. Gal4) and a different functional group reactive with a substituent on the second domain (e.g. β -catenin). Alternatively, the two domains may be derivatized to react with a "mono-functional" linker (see, e.g., U.S. Patent No. 4,671,958 and 4,659,839 for procedures to generate reactive groups on peptides).

In a particularly preferred embodiment, the chimeric molecules of this invention are fusion proteins. The fusion protein can be chemically synthesized using standard chemical peptide synthesis techniques, or, more preferably, recombinantly expressed. . Where both molecules are relatively short the chimeric molecule may be chemically synthesized as a single contiguous polypeptide. Solid phase synthesis in which the C-terminal amino acid of the sequence is attached to an insoluble support followed by sequential addition of the remaining amino acids in the sequence is a preferred method for the chemical synthesis of the polypeptides of this invention. Techniques for solid phase synthesis are described by Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), and Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed.* Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

In a most preferred embodiment, the chimeric molecules of the present invention are synthesized using recombinant DNA methodology. Generally this involves creating a DNA sequence that encodes the fusion protein, placing the DNA in an expression cassette under the control of a particular promoter, and expressing the chimeric (fusion) protein in a host cell.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

DNA encoding the fusion protein(s) used in the methods of this invention may be prepared by any suitable method, including, for example, cloning and restriction of appropriate sequences or direct chemical synthesis by methods such as the phosphotriester method of Narang *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; the phosphodiester method of Brown *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; the diethylphosphoramidite method of Beaucage *et al.* (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; and the solid support method of U.S. Patent No. 4,458,066.

Chemical synthesis produces a single stranded oligonucleotide. This may be converted into double stranded DNA by hybridization with a complementary sequence, or by polymerization with a DNA polymerase using the single strand as a template. One of skill would recognize that while chemical synthesis of DNA is limited to sequences of about 100 to 500 bases, longer sequences may be obtained by the ligation of shorter sequences.

Alternatively, subsequences may be cloned and the appropriate subsequences cleaved using appropriate restriction enzymes. The fragments may then be ligated to produce the desired DNA sequence.

In a preferred embodiment, DNA encoding fusion proteins of the present invention is using DNA amplification methods such as polymerase chain reaction (PCR). Thus, for example, as illustrated in Example 1, a human β -catenin cDNA is PCR amplified with the Bam HI linker and cloned into a Bam HI site of pBIND. The human Tcf4 cDNA with Bam HI linker is PCR amplified and cloned into the Bam HI site of pACT.

A linker may be introduced into the chimeric molecules, e.g., between the nucleic acid binding domain and the metabolic product or between the ligand and the transactivator. The linker is used to separate the two domains comprising the chimeric molecule by a distance sufficient to ensure that, in a preferred embodiment, each domain properly folds into its secondary and tertiary structures. Preferred peptide linker sequences adopt a flexible extended conformation, do not exhibit a propensity for developing an ordered secondary structure that could interact with the functional GM-CSF and G250 domains. Typical amino acids in flexible protein regions include Gly, Asn and Ser. Virtually any permutation of amino acid sequences containing Gly, Asn and Ser would be expected to satisfy the above criteria for a linker sequence. Other near neutral amino acids, such as Thr and Ala, also may be used in the linker sequence. Still other amino acid sequences that may be used as linkers are disclosed in Maratea *et al.* (1985), *Gene* 40: 39-

WO 02/31201

PCT/US01/31745

46; Murphy *et al.* (1986) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 83: 8258-62; U.S. Pat. No. 4,935,233; and U.S. Pat. No. 4,751,180.

The length of the peptide linker sequence may vary without significantly affecting the biological activity of the fusion protein. In one preferred embodiment of the present invention, a peptide linker sequence length of about 2 amino acids is used to provide a suitable separation of functional protein domains, although longer linker sequences also may be used. The linker sequence may be from 1 to 50 amino acids in length. In the most preferred aspects of the present invention, the linker sequence is from about 1-20 amino acids in length. In the specific embodiments disclosed herein, the linker sequence is from about 2 to about 15 amino acids, and is advantageously from about 2 to about 10 amino acids. Peptide linker sequences not necessarily required in the fusion proteins of this invention.

Generally the linker will have no specific biological activity other than to join the proteins or to preserve some minimum distance or other spatial relationship between them. However, the constituent amino acids of the spacer may be selected to influence some property of the molecule such as the folding, net charge, or hydrophobicity.

Where it is desired to recombinantly express either of the two chimeric molecules comprising the two-hybrid systems of this invention, the G250, the GM-CSF, or the G250-GM-CSF fusion protein, the nucleic acid sequences encoding the desired protein are typically operably linked to suitable transcriptional or translational regulatory elements. The regulatory elements typically include a transcriptional promoter, an optional operator sequence to control transcription, a sequence encoding suitable mRNA ribosomal binding sites, and sequences that control the termination of transcription and translation. The ability to replicate in a host, usually conferred by an origin of replication, and a selection gene to facilitate recognition of transformants may additionally be incorporated.

The nucleic acid sequences encoding the fusion proteins may be expressed in a variety of host cells, including *E. coli* and other bacterial hosts, and most preferably eukaryotic host cells including but not limited to yeast, insect cells, and mammalian cells. The recombinant protein gene will be operably linked to appropriate expression control sequences for each host.

The plasmids of the invention can be transferred into the chosen host cell by well-known methods such as calcium chloride transformation for *E. coli* and calcium

WO 02/31201

PCT/US01/31745

phosphate treatment or electroporation for mammalian cells. *In vivo* transfection can be accomplished using standard gene therapy methods, e.g. as described herein.

Examples of these techniques and instructions sufficient to direct persons of skill through many cloning exercises are found in Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook *et al.*); *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel); Cashion *et al.*, U.S. patent number 5,017,478; and Carr, European Patent No. 0,246,864.

Examples of techniques sufficient to direct persons of skill through *in vitro* amplification methods are found in Berger, Sambrook, and Ausubel, as well as Mullis *et al.*, (1987) U.S. Patent No. 4,683,202; *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.* eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990) *C&EN* 36-47; *The Journal Of NIH Research* (1991) 3: 81-94; (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173; Quatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874; Lomell *et al.* (1989) *J. Clin. Chem.*, 35: 1826; Landegren *et al.*, (1988) *Science*, 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology*, 8: 291-294; Wu and Wallace, (1989) *Gene*, 4: 560; and Barringer *et al.* (1990) *Gene*, 89: 117.

C) The nucleic acid.

The nucleic acid component of the two-hybrid systems of this invention is produced according to standard methods. Typically, the nucleic acid comprises a binding domain recognized by a nucleic acid binding molecule (e.g. GAL4) and an expression cassette comprising one or more genes or cDNAs. The expression cassette positioned with respect to the protein binding site such that a two-hybrid complex bound to the binding site can effect transcription of the gene or cDNA comprising the expression cassette.

Methods of producing such a nucleic acid are well known to those of skill in the art and are illustrated in Example 1 herein.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

D) The Cells

Virtually any cell can harbor the two-hybrid systems of this invention.

Preferred cells, however, are eukaryotic cells and even more preferred cells are mammalian cells and most preferred cells are human cells. The cells can include cells in long term culture (e.g. HeLa cells, CHO cells, SW480 cells, SW48 cells, DLD-1, HCT-116, HT29, 293 cells, U-20S, T-47D, MCF-7, A549, Hep G, Jarakat cells, and the like. The cells can also include acute (unpassaged) cells and cells *in vivo*.

The cells may be transfected with nucleic acids encoding the chimeric molecules comprising the two-hybrid components of this invention or the chimeric molecules may be directly introduced into the cells (e.g. via microinjection, lipid encapsulation, HIV TAT protein mediated transfer, *etc.*). In particular, it is noted that the human immunodeficiency virus TAT protein (HIV TAT), when fused to considerably larger proteins results in delivery of the biologically active protein even across the blood brain barrier (see, e.g., Schwarze *et al.* (1999) *Science*, 285: 1569-1572, and references cited therein).

The cells also preferably include the nucleic acid encoding the protein binding site and an effector molecule according to the methods of this invention.

Depending on the embodiment, the cells may comprise one or more components of the two-hybrid systems of this invention. Thus the cell can include either or both chimeric molecules and/or nucleic acids encoding either or both of the chimeric molecules and/or the nucleic acid comprising the binding site and the effector gene.

III. Placing the constructs into a cell.

The chimeric molecules can be introduced directly into the cells, or where the chimeric molecules are fusion proteins, the nucleic acids encoding the proteins can be introduced into the cells according to standard methods known to those of skill in the art.

Where the cells are acute or in culture, standard methods of *ex vivo* transfection may be utilized. These include, but are not limited to, microinjection, biolistic transfer, lipid-mediated transfer, dendrimer-mediated transfer, electroporation, calcium phosphate transfection, and the like.

Where the chimeric molecules themselves are to be introduced into the cell, standard methods for transferring pharmaceuticals into cells may be used. Such methods

WO 02/31201

PCT/US01/31745

include, but are not limited to liposome encapsulation, microinjection, the use of HIV TAT domains to facilitate transfer, and the like.

A) Constructs for expression of components of the two-hybrid system.

In order to express the chimeric molecules (e.g. Gal4- β -catenin, Tef4-VP16, Gal4-Tef4, β -catenin-VP16, etc.), the gene/cDNA encoding the chimeric molecule is typically placed in an expression cassette. The expression cassette typically comprising regulatory machinery (e.g. eukaryotic promoter, initiation site, stop site, etc.) sufficient to direct expression of the gene and/or cDNA. Using the sequence information provided herein expression cassettes suitable for the expression

The gene/cDNA is typically placed under the control of (i.e., operably linked to) a promoter that directs transcription of the subject nucleic acid. The promoter may be constitutive or inducible. Where tissue-specific expression is desired the promoter may be tissue-specific promoter.

A wide variety of tissue-specific promoters may be utilized within the context of the present invention. Representative examples of such promoters include, but are not limited to liver-specific promoters such as phosphoenolpyruvate carboxylase ("PEPCK") (Halzogiou *et al.*, (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 17798-808; Benvenisty *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1118-1122; Vaulont *et al.* (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 4409-4415); B cell specific promoters such as the IgG promoter; breast carcinoma or hepatocellular carcinoma specific promoters such as Carcinoembryonic Antigen promoter (CEA) (Schrewe *et al.*, (1990) *Mol. and Cell. Biol.* 10: 2738); pancreatic acinar cell specific promoters such as the elastase promoter (Swift *et al.*, (1989) *Genes Develop.* 3: 687-96); breast epithelial specific promoters such as the casein promoter (Doppler *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:104-108); erythroid specific-transcription promoters which are active in erythroid cells, such as the porphobilinogen deaminase promoter (Mignotte *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6458-6452); α - or β -globin specific promoters (van Assendelft *et al.*, (1989) *Cell* 56:969-977; Forrester *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :5439-5443); promoters which regulate skeletal muscle such as the myo-D binding site (Burden (1989) *Nature* 341: 716; Weintraub *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5434-5438); promoters which are specific for β .cells of the pancreas, such as the insulin promoter (Ohlsson *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4228-4231; Karlsson *et al.*, (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 823-827); promoters which are specific for the pituitary

WO 02/31201

PCT/US01/31745

gland, such as the growth hormone factor promoter (Ingraham *et al.* (1988) *Cell* 55: 519-529; Bodner *et al.* (1988) *Cell* 55:505-518); promoters which are specific for melanosomes, such as the tyrosine hydroxylase promoter; liver-specific promoters such as the albumin promoter and the alpha-fetoprotein promoter (Feuerman *et al.* (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 4204-4212; Camper and Tilghman (1989) *Genes Develop.* 3: 537-546); breast carcinoma specific promoters such as the HER2/neu promoter (Tal *et al.* (1987) *Mol. and Cell. Biol.* 7: 2597); liver-specific promoters such as the alcohol dehydrogenase promoter (Felder (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5903-5907); T-cell specific promoters such as the T-cell receptor promoter (Anderson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3551-3554; Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733); bone-specific promoters such as the osteocalcin promoter (Markose *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1701-1705; McDonnell *et al.* (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 3517-3523; Kerner *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4455-4559) the IL-2 promoter, IL-2 receptor promoter, the wiley (wap) promoter, and the MHC Class II promoter, and the like.

The constructs may, optionally, include flanking sequences complementary to a region of the host genomic DNA to facilitate integration of the cassette into the host genome (*e.g.* through homologous recombination as described below). In addition or alternatively, the flanking sequences may optionally comprise one or more recombinase recognition sites (*e.g.* LoxP or FLP) to facilitate integration of the expression cassette through the use of a recombinase (*e.g.* Cre).

B) In vivo transfection.

In certain preferred embodiments, the two-hybrid systems of this invention are introduced into cells *in vivo* to selectively kill cells showing metabolic defects (*e.g.* certain cancer cells) or to introduce a particular enzymatic activity in a cell where such activity is diminished or lacking. While in some embodiments, the chimeric molecules are introduced into the cells "directly" (*e.g.* not recombinantly expressed), *e.g.*, using an HIV TAT fusion protein (*see, e.g.*, Schwarze *et al.* (1999) *Science*, 285: 1569-1572, and references cited therein), in preferred embodiments, the chimeric molecules are recombinantly expressed fusion proteins. Both proteins can be expressed from a single nucleic acid or from separate nucleic acids. Similarly the nucleic acid encoding the protein binding site and the effector cDNA can be a component of the nucleic acid(s) encoding the chimeric molecules or it can be a separate nucleic acid. Typically, the nucleic acid(s)

WO 02/31201

PCT/US01/31745

encoding the chimeric molecule(s) and/or the nucleic acid comprising the binding site and the effector are introduced into the cells using standard methods of "gene therapy".

Several approaches for introducing nucleic acids into cells *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* have been used. These include lipid or liposome based gene delivery (WO 96/18372; WO 93/24640; Mannino and Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7): 682-691; Rose U.S. Pat No. 5,279,833; WO 91/06309; and Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7414) and replication-defective retroviral vectors harboring therapeutic polynucleotide sequence(s) as part of the retroviral genome (see, e.g., Miller *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg (1992) *J. NIH Res.* 4: 43, and Cornetta *et al.* (1991) *Hum. Gene Ther.* 2: 215).

For a review of gene therapy procedures, see, e.g., Anderson, *Science* (1992) 256: 808-813; Nabel and Felgner (1993) *TIBTECH* 11: 211-217; Mitani and Caskey (1993) *TIBTECH* 11: 162-166; Mulligan (1993) *Science*, 926-932; Dillon (1993) *TIBTECH* 11: 167-175; Miller (1992) *Nature* 357: 455-460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36; Kremer and Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1) 31-44; Haddada *et al.* (1995) in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Doerfler and Bohm (eds) Springer-Verlag, Heidelberg Germany; and Yu *et al.*, (1994) *Gene Therapy*, 1:13-26.

Widely used retroviral vectors include those based upon murine leukemia virus (MuLV), gibbon ape leukemia virus (GaLV), Simian Immunodeficiency virus (SIV), human immunodeficiency virus (HIV), alphavirus, and combinations thereof (see, e.g., Buchscher *et al.* (1992) *J. Virol.* 66(5) 2731-2739; Johann *et al.* (1992) *J. Virol.* 66(5):1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al.*, (1990) *Virol.* 176:58-59; Wilson *et al.* (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Müller *et al.*, *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal *et al.*, PCT/US94/05700, and Rosenberg and Fauci (1993) in *Fundamental Immunology*, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York and the references therein, and Yu *et al.* (1994) *Gene Therapy*, *supra*; U.S. Patent 6,008,535, and the like).

The vectors are optionally pseudotyped to extend the host range of the vector to cells which are not infected by the retrovirus corresponding to the vector. For example, the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein (VSV-G) has been used to construct VSV-G-pseudotyped HIV vectors which can infect hematopoietic stem cells (Naldini *et al.* (1996) *Science* 272:263, and Akkina *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:2581).

WO 02/31201

PCT/US01/31745

Adeno-associated virus (AAV)-based vectors are also used to transduce cells with target nucleic acids, *e.g.*, in the *in vitro* production of nucleic acids and peptides, and in *in vivo* and *ex vivo* gene therapy procedures. See, West *et al.* (1987) *Virology* 160:38-47; Carter *et al.* (1989) U.S. Patent No. 4,797,368; Carter *et al.* WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351 for an overview of AAV vectors. Construction of recombinant AAV vectors are described in a number of publications, including Lebkowski, U.S. Pat. No. 5,173,414; Tratschin *et al.* (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260; Tratschin, *et al.* (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6466-6470; McLaughlin *et al.* (1988) and Samulski *et al.* (1989) *J. Virol.*, 63:03822-3828. Cell lines that can be transformed by rAAV include those described in Lebkowski *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996. Other suitable viral vectors include herpes virus, lentivirus, and vaccinia virus.

1) Retroviral transfection systems.

In one particularly preferred embodiment, retroviruses (*e.g.* lentiviruses) are used to transfect the target cell(s) with nucleic acids encoding the various components to the two-hybrid systems of this invention. Retroviruses, in particular lentiviruses (*e.g.* HIV, SIV, *etc.*) are particularly well suited for this application because they are capable of infecting a non-dividing cell. Methods of using retroviruses for nucleic acid transfection are known to those of skill in the art (*see, e.g.*, U.S. Patent 6,013, 576).

Retroviruses are RNA viruses wherein the viral genome is RNA. When a host cell is infected with a retrovirus, the genomic RNA is reverse transcribed into a DNA intermediate which is integrated very efficiently into the chromosomal DNA of infected cells. This integrated DNA intermediate is referred to as a provirus. Transcription of the provirus and assembly into infectious virus occurs in the presence of an appropriate helper virus or in a cell line containing appropriate sequences enabling encapsidation without coincident production of a contaminating helper virus. In preferred embodiments, a helper virus need not be utilized for the production of the recombinant retrovirus since the sequences for encapsidation can be provided by co-transfection with appropriate vectors.

The retroviral genome and the proviral DNA have three genes: the *gag*, the *pol*, and the *env*, which are flanked by two long terminal repeat (LTR) sequences. The *gag* gene encodes the internal structural (matrix, capsid, and nucleocapsid) proteins; the *pol*

WO 02/31201

PCT/US01/31745

gene encodes the RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase) and the *env* gene encodes viral envelope glycoproteins. The 5' and 3' LTRs serve to promote transcription and polyadenylation of the virion RNAs. The LTR contains all other cis-acting sequences necessary for viral replication. Lentiviruses have additional genes including *tat*, *rev*, *vpr*, *nef*, and *vpx* (in HIV-1, HIV-2 and/or SIV).

Adjacent to the 5' LTR are sequences necessary for reverse transcription of the genome (the tRNA primer binding site) and for efficient encapsidation of viral RNA into particles (the Psi site). If the sequences necessary for encapsidation (or packaging of retroviral RNA into infectious virions) are missing from the viral genome, the result is a cis defect which prevents encapsidation of genomic RNA. However, the resulting mutant is still capable of directing the synthesis of all virion proteins.

In one preferred embodiment, the invention provides a recombinant retrovirus capable of infecting a non-dividing cell. The recombinant retrovirus comprises a viral GAG, a viral POL, a viral ENV, a heterologous nucleic acid sequence operably linked to a regulatory nucleic acid sequence, and cis-acting nucleic acid sequences necessary for packaging, reverse transcription and integration, as described above. It should be understood that the recombinant retrovirus of the invention is capable of infecting dividing cells as well as non-dividing cells.

In preferred embodiments, the recombinant retrovirus is therefore genetically modified in such a way that some of the structural, infectious genes of the native virus (*e.g.* *env*, *gag*, *pol*) have been removed and replaced instead with a nucleic acid sequence to be delivered to a target non-dividing cell (*e.g.*, a sequence encoding various components of the two-hybrid systems of this invention). After infection of a cell by the virus, the virus injects its nucleic acid into the cell and the retrovirus genetic material may on occasion integrate into the host cell genome. Whether integrated or episomal, the transferred retrovirus genetic material is then transcribed and translated into the various components of the two-hybrid system of this invention within the host cell. Methods of making and using lentiviral vectors are discussed in detail in U.S. Patent 6,013,516, 5,932,467, and the like.

2) Adenoviral vector systems.

In another preferred embodiment, one or more components of the two-hybrid systems of this invention are expressed in an adenoviral vector suitable for gene therapy. The use of adenoviral vectors is described in detail in WO 96/25507. Particularly preferred

WO 02/31201

PCT/US01/31745

adenoviral vectors are described by Wills *et al.* (1994) *Hum. Gene Therap.* 5: 1079-1088. Typically, adenoviral vectors contain a deletion in the adenovirus early region 3 and/or early region 4 and this deletion may include a deletion of some or all of the protein IX gene. In one embodiment, the adenoviral vectors include deletions of the E1a and/or E1b sequences.

A number of different adenoviral vectors have been optimized for gene transfer. One such adenoviral vector is described in U.S. patent 6,020,191. This vector comprises a CMV promoter to which a transgene may be operably linked and further contains an E1 deletion and a partial deletion of 1.6 kb from the E3 region. This is a replication defective vector containing a deletion in the E1 region into which a transgene (e.g. the β subunit gene) and its expression control sequences can be inserted, preferably the CMV promoter contained in this vector. It further contains the wild-type adenovirus E2 and E4 regions. The vector contains a deletion in the E3 region which encompasses 1549 nucleotides from adenovirus nucleotides 29292 to 30840 (Roberts *et al.* (1986) *Adenovirus DNA, in Developments in Molecular Virology*, W. Doerfler, ed., 8: 1-51). These modifications to the E3 region in the vector result in the following: (a) all the downstream splice acceptor sites in the E3 region are deleted and only mRNA would be synthesized from the E3 promoter (Tollefson *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:2 296-2306, 1996; Tollefson *et al.* (1996) *Virology* 220: 152-162.); (b) the E3A poly A site has been deleted, but the E3B poly A site has been retained; (c) the E3 gp19K (MHC I binding protein) gene has been retained; and (d) the E3 11.6K (Ad death protein) gene has been deleted.

Such adenoviral vectors can utilize adenovirus genomic sequences from any adenovirus serotypes, including but not limited to, adenovirus serotypes 2, 5, and all other preferably non-oncogenic serotypes.

In one preferred embodiment, the cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter (Boshart *et al.* (1985) *Cell* 41: 521-530) is used to control expression of the chimeric molecules comprising the two-hybrid systems of this invention. The CMV promoter is positioned 5' to the transgene(s) in a transcription unit. Portions of the full-length promoter can be tested for their ability to allow persistent expression of the transgene.

Polyadenylation signals which may be positioned at the 3' end of the transgene include, but are not limited to, those derived from bovine growth hormone (BGH) and SV40.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

In one embodiment, to create the recombinant adenoviral vectors of the invention which contain a transcription unit (expression cassette) encoding a component of the two-hybrid systems described herein, a plasmid containing the transcription unit inserted into an adenovirus genomic fragment is co-transfected with a linearized viral genome derived from an adenoviral vector of interest into a recipient cell under conditions whereby homologous recombination occurs between the genomic fragment and the virus. Preferably, the transcription unit is engineered into the site of an E1 deletion. As a result, the transcription unit encoding a desired transgene is inserted into the adenoviral genome at the site in which it was cloned into the plasmid, creating a recombinant adenoviral vector. Following the homologous recombination, the vector genome is encapsidated into virions as evidenced by the formation of viral plaques. Preparation of replication-defective vector stocks can be accomplished using cell lines that complement viral genes deleted from the vector, *e.g.*, 293 or A549 cells containing the deleted adenovirus E1 genomic sequences. After amplification of plaques in suitable complementing cell lines, the viruses can be recovered by freeze-thawing and subsequently purified using cesium chloride centrifugation. Alternatively, virus purification can be performed using chromatographic techniques (*e.g.*, as set forth in International Application No. PCT/US96/13872).

Titers of replication-defective adenoviral vector stocks can be determined by plaque formation in a complementing cell line, *e.g.*, 293 cells. For example, end-point dilution using an antibody to the adenoviral hexon protein may be used to quantitate virus production (Armentano *et al.* (1995) *Hum. Gene Ther.* 6:1343-1353).

3) Non-viral transfection.

Alone, or in combination with viral vectors, a number of non-viral vectors are also useful for transfecting cells with the nucleic acid constructs described herein. Suitable non-viral vectors include, but are not limited to, plasmids, cosmids, phagemids, liposomes, water-oil emulsions, polyethylene imines, biolistic pellets/beads, and dendrimers.

Liposomes were first described in 1965 as a model of cellular membranes and quickly were applied to the delivery of substances to cells. Liposomes entrap DNA by one of two mechanisms which has resulted in their classification as either cationic liposomes or pH-sensitive liposomes. Cationic liposomes are positively charged liposomes which interact with the negatively charged DNA molecules to form a stable complex. Cationic liposomes typically consist of a positively charged lipid and a co-lipid. Commonly

WO 02/31201

PCT/US01/31745

used co-lipids include dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) or dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC). Co-lipids, also called helper lipids, are in most cases required for stabilization of liposome complex. A variety of positively charged lipid formulations are commercially available and many other are under development. Two of the most frequently cited cationic lipids are lipofectamine and lipofectin. Lipofectin is a commercially available cationic lipid first reported by Phil Felgner in 1987 to deliver genes to cells in culture. Lipofectin is a mixture of N-[1-(2, 3-dioleoyloxy) propyl]-N-N-N-trimethyl ammonia chloride (DOTMA) and DOPE.

DNA and lipofectin or lipofectamine interact spontaneously to form complexes that have a 100% loading efficiency. In other words, essentially all of the DNA is complexed with the lipid, provided enough lipid is available. It is assumed that the negative charge of the DNA molecule interacts with the positively charged groups of the DOTMA. The lipid:DNA ratio and overall lipid concentrations used in forming these complexes are extremely important for efficient gene transfer and vary with application. Lipofectin has been used to deliver linear DNA, plasmid DNA, and RNA to a variety of cells in culture. Shortly after its introduction, it was shown that lipofectin could be used to deliver genes *in vivo*. Following intravenous administration of lipofectin-DNA complexes, both the lung and liver showed marked affinity for uptake of these complexes and transgene expression. Injection of these complexes into other tissues has had varying results and, for the most part, are much less efficient than lipofectin-mediated gene transfer into either the lung or the liver.

pH-sensitive, or negatively-charged liposomes, entrap DNA rather than complex with it. Since both the DNA and the lipid are similarly charged, repulsion rather than complex formation occurs. Yet, some DNA does manage to get entrapped within the aqueous interior of these liposomes. In some cases, these liposomes are destabilized by low pH and hence the term pH-sensitive. To date, cationic liposomes have been much more efficient at gene delivery both *in vivo* and *in vitro* than pH-sensitive liposomes. pH-sensitive liposomes have the potential to be much more efficient at *in vivo* DNA delivery than their cationic counterparts and should be able to do so with reduced toxicity and interference from serum protein.

In another approach dendrimers complexed to the DNA have been used to transfect cells. Such dendrimers include, but are not limited to, "starburst" dendrimers and various dendrimer polycations.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

Dendrimer polycations are three dimensional, highly ordered oligomeric and/or polymeric compounds typically formed on a core molecule or designated initiator by reiterative reaction sequences adding the oligomers and/or polymers and providing an outer surface that is positively charged. These dendrimers may be prepared as disclosed in PCT/US83/02052, and U.S. Pat. Nos. 4,507,466, 4,558,120, 4,568,737, 4,587,329, 4,631,337, 4,694,064, 4,713,975, 4,737,550, 4,871,779, 4,857,599.

Typically, the dendrimer polycations comprise a core molecule upon which polymers are added. The polymers may be oligomers or polymers which comprise terminal groups capable of acquiring a positive charge. Suitable core molecules comprise at least two reactive residues which can be utilized for the binding of the core molecule to the oligomers and/or polymers. Examples of the reactive residues are hydroxyl, ester, amino, imino, imido, halide, carboxyl, carboxyhalide maleimide, dithiopyridyl, and sulfhydryl, among others. Preferred core molecules are ammonia, tris-(2-aminoethyl)amine, lysine, ornithine, pentaerythritol and ethylenediamine, among others. Combinations of these residues are also suitable as are other reactive residues.

Oligomers and polymers suitable for the preparation of the dendrimer polycations of the invention are pharmaceutically-acceptable oligomers and/or polymers that are well accepted in the body. Examples of these are polyamidoamines derived from the reaction of an alkyl ester of an α,β -ethylenically unsaturated carboxylic acid or an α,β -ethylenically unsaturated amide and an alkylene polyamine or a polysalkylene polyamine, among others. Preferred are methyl acrylate and ethylenediamine. The polymer is preferably covalently bound to the core molecule.

The terminal groups that may be attached to the oligomers and/or polymers should be capable of acquiring a positive charge. Examples of these are azoles and primary, secondary, tertiary and quaternary aliphatic and aromatic amines and azolcs, which may be substituted with S or O, guanidinium, and combinations thereof. The terminal cationic groups are preferably attached in a covalent manner to the oligomers and/or polymers. Preferred terminal cationic groups are amines and guanidinium. However, others may also be utilized. The terminal cationic groups may be present in a proportion of about 10 to 100% of all terminal groups of the oligomer and/or polymer, and more preferably about 50 to 100%.

The dendrimer polycation may also comprise 0 to about 90% terminal reactive residues other than the cationic groups. Suitable terminal reactive residues other

WO 02/31201

PCT/US01/31745

than the terminal cationic groups are hydroxyl, cyano, carboxyl, sulfhydryl, amide and thioether, among others, and combinations thereof. However others may also be utilized.

The dendrimer polycation is generally and preferably non-covalently associated with the polynucleotide. This permits an easy disassociation or disassembling of the composition once it is delivered into the cell. Typical dendrimer polycation suitable for use herein have a molecular weight ranging from about 2,000 to 1,000,000 Da, and more preferably about 5,000 to 500,000 Da. However, other molecule weights are also suitable. Preferred dendrimer polycations have a hydrodynamic radius of about 11 to 60 Å., and more preferably about 15 to 55 Å. Other sizes, however, are also suitable. Methods for the preparation and use of dendrimers in gene therapy are well known to those of skill in the art and describe in detail, for example, in U.S. Patent 5,661,025

Where appropriate, two or more types of vectors can be used together. For example, a plasmid vector may be used in conjunction with liposomes. In the case of non-viral vectors, nucleic acid may be incorporated into the non-viral vectors by any suitable means known in the art. For plasmids, this typically involves ligating the construct into a suitable restriction site. For vectors such as liposomes, water-oil emulsions, polyethylene amines and dendrimers, the vector and construct may be associated by mixing under suitable conditions known in the art.

D) Ex vivo gene therapy.

The methods of this invention are not restricted to the treatment of cells *in vivo*. Thus, in certain embodiments, this invention contemplates *ex vivo* transfection of cells with two-hybrid systems designed to supplement a particular enzymatic activity where such is lacking.

Ex vivo cell transformation for diagnostics, research, or for gene therapy (e.g., via re-infusion of the transformed cells into the host organism) is well known to those of skill in the art. In a preferred embodiment, cells are isolated from the subject organism, transfected with the constructs of this invention and, optionally, re-infused back into the subject organism (e.g., patient).

VI. Kits

In still another embodiment, this invention provides kits for practice of the methods described herein. In certain embodiments the kits comprise a nucleic acid

WO 02/31201

PCT/US01/31745

encoding one or both of the chimeric molecules used in the two-hybrid systems of this invention. Thus, for example, in the case of the APC two-hybrid system described in example 1, the kit may comprise a nucleic acid encoding a Gal4- β -catenin, and/or a Tef-VP16, and/or a Gal4-Tef, and/or a β -catenin-VP16. Certain kits may comprise the chimeric molecules themselves (*e.g.* the fusion proteins). The kits may alternatively or additionally include a nucleic acid encoding a polypeptide binding site and an effector gene. The nucleic acids may be provided as components of vectors (*e.g.* flanked by appropriate restriction sites and/or PCR primer binding sites). The nucleic acid constructs encoding the chimeric molecules may contain the "fusion gene" under the control of a constitutive, an inducible, or a tissue specific promoter. Such promoters are well known to those of skill in the art.

In certain embodiments, the kits comprise a cell (*e.g.* a mammalian cell, more preferably a human cell) comprising one or more of the components of a two-hybrid system as described herein.

The kits may optionally include any reagents and/or apparatus to facilitate practice of the methods described herein. Such reagents include, but are not limited to buffers, instrumentation (*e.g.* bandpass filter), reagents for detecting a signal from a reporter gene, transfection reagents, cell lines, vectors, and the like.

In addition, the kits may include instructional materials containing directions (*i.e.*, protocols) for the practice of the methods of this invention. Preferred instructional materials provide protocols utilizing the kit contents for screening for modulators of a cell's ability to accumulate or to degrade a metabolic product, and/or for methods of selectively killing a cell that has an abnormal metabolic pathway, and/or for methods of selectively expressing an enzymatic activity to supplement a cell having said activity diminished or non-existent as described herein. While the instructional materials typically comprise written or printed materials they are not limited to such. Any medium capable of storing such instructions and communicating them to an end user is contemplated by this invention. Such media include, but are not limited to electronic storage media (*e.g.*, magnetic discs, tapes, cartridges, chips), optical media (*e.g.*, CD ROM), and the like. Such media may include addresses to internet sites that provide such instructional materials.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

EXAMPLES

The following examples are offered to illustrate, but not to limit the claimed invention.

Example 1:**Applied use of mammalian two-hybrid system for APC-mutated colon cancer therapeutics**

Accumulation of β -catenin in cytoplasm is one of the crucial events found in adenomatous polyposis coli (APC) gene-mutated colon cancer cells. The mutated APC gene produces truncated form of APC protein that lacks the affinity to β -catenin protein. The accumulation of β -catenin protein is caused by β -catenin avoiding from degradation mechanisms via the ubiquitin-proteasome pathway, which requires phosphorylation of β -catenin/APC complex by glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β). In this example, we describe a novel gene-therapy system that selectively kills APC mutated-cell. This system is made of mammalian two-hybrid system that consists of GAL4/ β -catenin, VP16/Tcf4 and the suicide gene generated output gene DNA construct. This system is designed to work only when accumulation of GAL4/ β -catenin occurs. In APC-mutated human colon cancer cell line SW480, accumulation of GAL4/ β -catenin in the presence of VP16/TCF4 proteins caused a high expression level of the output gene. In contrast, in other human cell lines that have APC wild type such as SW48, degradation of GAL4/ β -catenin was observed and expression levels of the output gene was kept low. Addition of the wild type APC expression plasmid with the two-hybrid constructs in SW480 cells resulted in the reduction of the output gene expression levels as well as the reduction of GAL4/ and intact β -catenin levels. Replacement of the output gene from the reporter gene to the suicide gene made this two-hybrid system possible to kill SW480 cells. We exchanged the firefly luciferase cDNA of the pG5 plasmid to the p53-EGFP cDNA, and transfected to SW480 cells in the presence of other two-hybrid components. About 80% of EGFP-positive cells were dead in the p53-EGFP transfected cells, while only 20% of EGFP-positive cells were dead in the control EGFP transfected cells. We believe this system is applicable for broader uses in gene therapy targeting diseases that involve protein degradation disorders.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

Introduction

Mutation of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene, which was found in Familial Adenomatous Polyposis (FAP) patients (Kinzler *et al.* (1991) *Science*, 253: 661-665; Nishisho *et al.* (1991) *Science*, 253: 665-669), had also frequently been found in sporadic colorectal cancer patients (Sparks *et al.* (1998) *Cancer Res.*, 58: 1130-1134). Functional studies of APC revealed that wild type APC protein provides an optimal environment for glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) to phosphorylate β -catenin, which was originally found as a component of cell adhesion molecules (Rubinfeld *et al.* (1996) *Science*, 272: 1023-1026, and accelerates the degradation of cytoplasmic β -catenin via the ubiquitin-proteasome pathway (Aberle *et al.* (1997) *EMBO J.*, 16: 3797-3804; Winston *et al.* (1999) *Genes Dev.*, 13: 270-283). The functional loss of APC by genetic mutation in colorectal cancer hence causes the accumulation of β -catenin (Munemitsu *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 3046-3050). The fact that around 80% of colorectal cancer cells have dysfunctional APC (Sparks *et al.* (1998) *Cancer Res.*, 58: 1130-1134) and that others have some mutations in the GSK-3 β phosphorylation site of β -catenin, which also stabilizes β -catenin protein in the cells (Munemitsu *et al.* (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16: 4088-4094), implies accumulation of β -catenin in cytoplasm is one of the crucial events for colorectal cancer formation. Moreover, in the gene manipulated mice model, both APC-mutated mice (Shibata *et al.* (1997) *Science*, 278: 120-123) and β -catenin-mutated mice (Harada (1999) *EMBO J.*, 18: 5931-5942) formed intestinal polyps. These mutations are observed at the early stage of colon cancer development even before ras or p53 mutation (Laurent-Puig *et al.* (1999) *Eur. J. Cancer Prev.*, 8: Suppl 1 S39-47). Recent studies have reported that accumulated β -catenin in colorectal cancer forms complex with transcription factor T cell factor 4 (Tcf4) (Korinek *et al.* (1997) *Science*, 275: 1784-1787; Morin *et al.* (1997) *Science*, 275: 1787-1790) and intensifies the Tcf/lef-1-dependent oncogenic genes expression such as cyclin D1 (Tetsu and McCormick (1999) *Nature*, 398: 422-426, c-myc (He *et al.* (1998) *Science*, 281: 1509-1512) and peroxisome proliferator-activated receptor δ (He *et al.* (1999) *Cell*, 99: 335-345).

The yeast two-hybrid system has been used as one of the most convenient tools to study protein-protein interactions or to identify the interacting partners for certain proteins (Dang *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.*, 11: 954-962). This system consists of basically three components. The first component is the fusion protein that contains the

WO 02/31201

PCT/US01/31745

DNA binding domain of a transcription factor. The second component is the fusion protein that contains the transcription activation domain of a transcription factor. The third component is the output gene expression construct that has the consensus sequence for the first component and is followed by the transcription activation site, such as TATA box, for the second component. As the first component, the yeast GAL4 DNA binding domain is widely used, and as the second component, the herpes simplex virus VP16 transcription activation domain is widely used. A few years after this yeast two-hybrid system was developed, it was modified for mammalian cells by replacing promoter regions of the fusion protein expression plasmids (Pearson *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 7958-7962). This modification made it possible to study the functional binding of two proteins in mammalian cells by measuring the output gene expression. In this paper, we introduce a unique application of the mammalian two-hybrid system. We used β -catenin and Tcf4 as binding modules for two-hybrid system with the combination of the cell death inducing gene output, and performed a selective cell killing study using APC mutant cells (Figure 1).

Materials and Methods

Cells.

All the human cancer cell lines used here were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Human colon cancer cell lines SW480 and SW48 were maintained in Leivovitz's L-15 medium (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Life Technologies Inc.) in a 0.8% CO₂ incubator at 37 °C. The human osteosarcoma cell line U2-OS and embryonic kidney cell line 293 were maintained in RPMI1640 medium (Life Technologies Inc) supplemented with 10% FBS in a 5% CO₂ incubator at 37 °C.

Plasmids.

The pBIND, pBIND/Id, pACT and pG5Luc plasmids were purchased from Promega (Madison, WI). The pp53-EGFP was purchased from Clontech (Palo Alto, CA). The GAL4 fusion β -catenin expression plasmid, pBIND/ β -catenin, and VP16 fusion Tcf4 expression plasmids, pACT/Tcf4, were prepared as followed. The human β -catenin cDNA with Bam HI linker was prepared with PCR and cloned into Bam HI site of pBIND. The human Tcf4 cDNA with Bam HI linker was prepared with PCR and cloned into Bam HI site

WO 02/31201

PCT/US01/31745

of pACT. The pcDNA3/p53-EGFP was prepared by generating Kpn I and Xba I fragment of the pp53-EGFP, into Kpn I / Xba I site of pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The pG5/p53-EGFP plasmid was constructed by inserting the p53-EGFP cDNA fragment of pp53-EGFP to Bgl II and Hind III site of pG5Luc. The pG5/EGFP plasmid was constructed by deleting p53 cDNA from the pG5/p53-EGFP plasmid. The p53-Luc, pAP-1-Luc and pCRE-Luc plasmids were purchased from Stratagene (La Jolla, CA).

Immunostaining.

Cells grown to 50-80% confluency were trypsinized and washed twice with phosphate buffer saline (PBS), and lysed in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) containing protease inhibitors (Complete Mini™, Boehringer Mannheim). Cell lysate samples were separated with 4-20% acrylamide linear gradient SDS-PAGE gel (Bio-Rad, Cambridge, MA), transferred onto nitrocellulose membrane, incubated with primary antibodies, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, and detected with Enhanced Chemiluminescence (ECL) kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Anti β -catenin (sc-7199), GAL4 (sc-577), VP16 (sc-7546), p53 (sc-126) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-APC (OP44) antibody was from Calbiochem Novabiochem (San Diego, CA). Anti-Tcf4 antibody was obtained from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY). Horseradish-conjugated anti-mouse or anti rabbit IgG antibodies were from Amersham Pharmacia Biotech.

Two-hybrid assay.

The pBIND/ β -catenin, pACT/Tcf4 and pG5/luc plasmids were co-transfected to cells using TransFect™ (Promega) according to the manufacturer's recommended protocol. Briefly, cells were seeded in 24-well plates at a density of 5×10^4 cells/well and cultured for 24 h. Total 1 μ g/well of plasmids were transfected and cultured for another 24h. Finally, luciferase activity was measured with a commercially available kit (Promega). The transfection efficiency was normalized by *renilla* luciferase activity, which was simultaneously expressed from the pBIND plasmids.

FACS analysis.

The pG5/p53-EGFP or pG5/EGFP plasmid was co-transfected with pBIND/WT- β -catenin and pACT/FL-Tcf4 plasmids to SW480 cells. After 48-72 h

WO 02/31201

PCT/US01/31745

incubation, cells were trypsinized and washed twice with PBS. Cells were suspended in PBS containing 10 μ M propidium iodide, and analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Cell viability profile of EGFP-positive cells were analyzed by the uptake of propidium iodide.

Results

Functional expression of two-hybrid proteins in colon cancer cell line.

We constructed four fusion protein expression-plasmids, pBIND/WT- β -catenin, pBIND/MT- β -catenin, pACT/FL-Tcf4 and pACT/DN-Tcf4, which express GAL4/WT- β -catenin, GAL4/MT- β -catenin, VP16/FL-Tcf4 and VP16/DN-Tcf4 respectively (Figure 2A). GAL4/WT- β -catenin is a fusion protein that consists of the DNA binding domain of yeast GAL4 protein and full length human β -catenin. GAL4/MT- β -catenin has a truncated form of β -catenin, which lacks GSK-3 β recognition site. VP16/FL-Tcf4 is a fusion protein which consists of the transcription activation domain of herpes simplex virus VP16 and full length human Tcf4. VP16/DN-Tcf4 has a truncated form of Tcf4, which lacks the β -catenin binding site. We transfected pBIND/WT- β -catenin, pBIND/MT- β -catenin, pACT/FL-Tcf4 or pACT/DN-Tcf4 to SW480 cells and detected those fusion protein expression levels using immunoblotting. Expressed GAL4/ β -catenin fusion proteins were recognized by both anti-GAL4 and anti- β -catenin antibodies, as well as VP16/Tcf4 proteins, which were recognized by both anti-VP16 and anti-Tcf4 antibodies (Figure 2B). The co-transfection of pBIND/WT- β -catenin, pACT/FL-Tcf4 and pG5/Luc led to an expression of the output gene, firefly luciferase, (Figure 2C). This output gene expression level was strictly controlled by the expression of the GAL4/ β -catenin and VP16/FL-Tcf4 combination, as the replacement of pBIND/WT- β -catenin plasmid to pBIND/ld or pACT/FL-Tcf4 plasmid to pACT/DN-Tcf4 failed to raise the firefly luciferase activity.

Regulation of β -catenin/Tcf4 two-hybrid system by APC.

As those fusion proteins properly manipulate the output gene expression levels, we next examined whether the GAL4/WT- β -catenin protein was degradable, as well as intact wild type β -catenin protein, dependent on the APC profile. First, co-transfection of the wild type APC expression plasmid with pBIND/WT or MT- β -catenin, pACT/FL-Tcf4

WO 02/31201

PCT/US01/31745

and pG5/Luc in SW480 cells was examined. Addition of APC in the pBIND/WT- β -catenin system resulted in a drastic decrease of firefly luciferase activity, whereas pBIND/MT- β -catenin system was not affected by APC expression (Figure 3A). Next, the protein levels of GAL4/ β -catenin and VP16/Tcf4 were detected in the same condition as reporter gene assay. As a positive control experiment, the pcDNA3/myc- β -catenin was co-transfected with the pcDNA/APC plasmid. In the presence of APC protein, both GAL4/WT- β -catenin and myc-tagged WT- β -catenin protein levels were reduced, whereas neither GAL4/MT- β -catenin nor myc-tagged MT- β -catenin protein levels were changed (Figure 3B). Neither VP16/Tcf4 nor intact Tcf4 protein levels were affected by APC expression.

Regulation of β -catenin/Tcf4 two-hybrid system in various cell types.

In order to confirm these results, we performed the two-hybrid assay using human osteosarcoma U-2OS and human embryonic kidney 293 cells, which were supposed to express wild type APC. We examined the expression levels of cytoplasmic β -catenin and APC first (Figure 4A). Both U-2OS and 293 showed low levels of cytoplasmic β -catenin. These two cell lines also showed an APC band at the expected molecular size. These results indicated that the degradation mechanism of β -catenin worked properly in these cell lines. SW480, which is known as an APC mutated cell line, did not show an APC band at the expected size. SW48, which is known as a β -catenin mutated-cell line, exhibited high levels of β -catenin despite of having wild type APC. Figure 4B shows the expression levels of GAL4/WT or MT- β -catenin proteins in SW480 cells and SW48 cells. There was a specific lower band observed only in SW48 cells that expressed GAL4/WT- β -catenin which implied GAL4/WT- β -catenin but not GAL4/MT- β -catenin was degraded in APC wild type cell line. All of the cell lines examined that have wild type APC showed lower output gene expression levels than SW480 cells (Figure 4C). Moreover, SW48 cells showed similar amount of the output gene expression levels to SW480 cells, when transfected with the two-hybrid system using GAL4/MT- β -catenin (data not shown). These results implied that APC profile of the cells was a very important factor to control the output gene expression levels.

Application of mammalian two-hybrid system to *in vitro* gene therapy.

As we figured out that this two-hybrid system selectively worked under dysfunctional APC existing environment, we decided to replace the output gene from

WO 02/31201

PCT/US01/31745

luciferase to p53-EGFP. First we expressed p53-EGFP in SW480 cells in the presence of p53 responsive element-driven luciferase plasmid to examine whether the p53-EGFP fusion protein was functionally the same as wild type p53. Transfected p53-EGFP selectively activated the p53 responsive element-driven luciferase, while negative control lacZ did not activate p53 responsive element-driven luciferase (Figure 5A). The p53-EGFP expression was observed as green light under the fluorescent microscope (data not shown), and also recognized as 80 kDa protein by anti-p53 antibody (Figure 5B). The viability of those p53-EGFP expressing cells was analyzed by flowcytometry using the propidium iodide incorporation method. The two-hybrid plasmids-transfected cells were harvested after 48 h or 72 h incubation. About 20% of the pG5/p53-EGFP plasmid-transfected cells survived, while about 80% of the pG5/EGFP-transfected cells survived (Figure 5C). In this experiment, pG5/EGFP transfected cells showed a higher intensity of GFP light than pG5/p53-EGFP transfected cells (data not shown). Probably, p53-EGFP expressing cells started dying before the expression levels of p53-EGFP reached those as high as EGFP.

Discussion

Gene therapy as an approach for cancer therapy is relatively new.

Previously, inefficient or non-specific delivery methods have proven problematic for such approaches (Verma and Somia (1997) *Nature*, 389: 239-242). In order to compensate for insufficient delivery efficiency, unique specified selectivity toward cancer cells is desired. For instance, tissue specific promoter-driven suicide gene expression is one of the ideas to prevent damage to non-cancer cells (Vandier *et al.* (1988) *Cancer Res.*, 58: 4577-4580)

In this paper, we suggest two novel concepts that can improve the selectivity of gene therapy. One is to target the cancer cell-specific protein-degradation disorder, and the other is to use the mammalian two-hybrid system to control suicide gene expression. Accumulation of β -catenin in cytoplasm occurs in most of the colon cancer cells, and about 80% of those are caused by dysfunctional APC (Kinzler and Vogelstein (1996) *Cell*, 87: 159-170). Our system takes advantage of the fact that β -catenin is not degraded quickly in APC-mutated cells. Even as a GAL4 fusion protein, GAL4/WT- β -catenin protein was scavenged via the APC-dependent degradation pathway (Figure 3B). The important fact in this event is that the β -catenin in this system should not necessarily be a full-length wild type protein, as far as it can activate output gene expression and can be degradable via the APC-dependent pathway. The minimum component of the β -catenin protein for this two-

WO 02/31201

PCT/US01/31745

hybrid system is the phosphorylation site for GSK-3 β , binding domain for APC and Tcf4. The C terminus part, after the last armadillo domain of β -catenin, might not be necessary as this part is considered to have a transcription activation function. It will also make the system more efficient if the affinity of GAL4/WT- β -catenin can be preferable to APC but not to B-cadherin by deleting or mutating some part of armadillo structure. As far as the VP16/Tcf4, the N terminus β -catenin binding domain is the only necessary domain from Tcf4 protein for the two-hybrid system. This truncation of DNA binding domain may reduce the possibility of unnecessary gene expression by VP16/Tcf4 recognizing Tcf consensus sequence in the nuclei. At least, co-transfection of pACT/FL-Tcf4 and Top Flash (Korinek *et al.* (1997) *Science*, 275: 1784-1787) plasmids did not induce any significant Tcf consensus sequence based gene transactivation (data not shown). Another possible event that may occur is that over-expression of VP16/Tcf4 does not cause unwanted gene activation because the Tcf4 on the DNA without β -catenin forms a complex with groucho (Roose *et al.* (1998) *Nature*, 395: 608-612) and would rather work as a target gene suppressor than gene transcription activator. Additionally, it is possible to improve the selectivity of this therapy method for colon cancer cells by using a promoter that has a functional Tcf4 responsive element for the expression of GAL4 fusion protein and VP16 fusion protein, so that the expression levels of those proteins would be selectively higher in colon cancer cells. The cyclin D1 (Tetsu and McCormick (1999) *Nature*, 398: 422-426) or c-myc (He *et al.* (1998) *Science*, 281: 1509-1512) promoters may be good candidates for this purpose.

As a safer protocol, instead of introducing all components at one time, the VP16/FL-Tcf4 and pG5/p53-EGFP constructs should be introduced first with some marker expression plasmid such as blue fluorescence protein (BFP) using methods such as infectious RNA with GeneGun (Mandl *et al.* (1998) *Nat Med.*, 4: 1438-1440) or adenovirus delivery system to obtain enough expression levels of VP16/FL-Tcf4. After confirming expression levels of the first sets of genes, GAL4/WT- β -catenin should be introduced by using the method that you can manipulate the expression levels of out put gene, i.e. using Tcf4 responsive element-driven promoter. In order to perform quicker expression of GAL4- β -catenin protein than gene delivery, using TAT-tag fusion protein also seems to be a fascinating option (Nagahara *et al.* (1998) *Nat Med.*, 4: 1449-1452). It is a very important advantage of the two-hybrid system for gene therapy that the expression level of the output

WO 02/31201

PCT/US01/31745

gene is manageable by the amount of GAL4/WT- β -catenin to prevent the side effect on patients. And as far as the expression levels of output gene is tightly regulated, the choice for the output genes can be broader, *i.e.* p53, Bax, herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK), caspases, and so on.

From a broader point of view, this system may be applicable to other diseases than colon cancer, as far as the diseases involve a protein degradation disorder and the abnormally accumulated protein has an interacting partner. Moreover, if the two-hybrid part may work as a bio-sensor for a specific signal transduction and detect the event *in vivo*, *i.e.* increase of blood glucose concentration, the gene which modulates the event can be chosen as an output gene, *i.e.* insulin or insulin receptor for diabetes patients.

It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of screening for an agent that modulates the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product, said method comprising:

(i) providing a mammalian cell comprising:

a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector gene;

a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding domain that binds said peptide binding site attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product; and

a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product;

(ii) contacting said cell with a test agent; and

(iii) detecting an alteration of expression of said effector gene

wherein a difference in the expression of said effector gene in said test cell, as compared to a control cell contacted with a lower concentration of test agent or no test agent indicates that said test agent modulates the ability of said cell to accumulate or degrade said metabolic product.

2. The method of claim 1, wherein said expression control protein is a transactivator.

3. The method of claim 2, wherein said transactivator is VP16.

4. The method of claim 1, wherein said expression control protein is a repressor.

5. The method of claim 1, wherein said nucleic acid binding protein is selected from the group consisting of GAL-4, and GAL-4-Y.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

6. The method of claim 1, wherein said effector is selected from the group consisting of a reporter gene, a cytotoxin, and an apoptosis gene.
7. The method of claim 1, wherein said reporter gene is selected from the group consisting of chloramphenicol acetyl transferase (CAT), luciferase, b-galactosidase (b-gal), alkaline phosphatase, horse radish peroxidase (HRP), growth hormone (GH), and green fluorescent protein (GFP).
8. The method of claim 1, wherein said effector encodes a cytotoxin selected from the group consisting of thymidine kinase, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, ricin, and abrin.
9. The method of claim 1, wherein said apoptosis gene is selected from the group consisting of P53, P73, Bax, Bad, FADD, and a caspase.
10. The method of claim 1, wherein said ligand and metabolic product respectively are selected from the group consisting of beta-catenin and a Tcf, a NF- κ B and I- κ B, a P53 and MDM2, a receptor and its heteromelic receptor partner.
11. The method of claim 1, wherein said first chimeric protein is expressed from a nucleic acid in said cell.
12. The method of claim 1, wherein said second chimeric protein is expressed from a nucleic acid in said cell.
13. The method of claim 1, wherein said first chimeric protein is a protein transported into said cell.
14. The method of claim 1, wherein said first chimeric protein is a protein transported into said cell.
15. The method of claim 1, wherein said first chimeric protein or said second chimeric protein comprises an HIV TAT domain.
16. The method of claim 1, wherein said cell is a cell selected from the group consisting of SW480, SW48, DLD-1, HCT-116, HCT29, 293, U-20S, T-47D, MCF-7, HeLa, A549, Hep G2, and a Jarkat cell.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

17. The method of claim 1, wherein
said nucleic acid encodes a GAL-4 binding site, and said
effector gene is a reporter gene;
said first chimeric protein comprises a GAL-4 nucleic acid
binding protein and a beta catenin or a Tcf;
said second chimeric protein comprises a VP-16 and beta
catenin or a Tcf.
18. The method of claim 17, wherein said Tcf is Tcf4.
19. The method of claim 1, wherein said cell comprises a nucleic acid
encoding said first or said second chimeric protein under control of a tissue specific or an
inducible promoter.
20. The method of claim 19, wherein said promoter is an ecdysone
promoter.
21. The method of claim 1, wherein said cell further comprises a second
nucleic acid encoding said ligand or metabolic product operably linked to an inducible
promoter.
22. A method of selectively expressing an effector gene in a cell that
accumulates or degrades a metabolic product, said method comprising:
providing a cell comprising:
a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector
gene;
a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding
protein that binds said peptide binding site where said nucleic acid binding protein is
attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic
product;
a second chimeric protein comprising an expression control
protein attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said
metabolic product such that when said first chimeric protein comprises said
metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when

WO 02/31201

PCT/US01/31745

said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product;
whereby said cell, in the absence of the ability to degrade said metabolic product or said ligand that binds said metabolic product activates or represses expression of said effector gene.

23. The method of claim 22, wherein said expression control protein is a transactivator.

24. The method of claim 23, wherein said transactivator is VP16.

25. The method of claim 22, wherein said expression control protein is a repressor.

26. The method of claim 22, wherein said nucleic acid binding protein is selected from the group consisting of GAL-4, and GAL-4-Y.

27. The method of claim 22, wherein said effector is selected from the group consisting of a reporter gene, a cytotoxin, and an apoptosis-inducing gene.

28. The method of claim 27, wherein said reporter gene is selected from the group consisting of chloramphenicol acetyl transferase (CAT), luciferase, b-galactosidase (b-gal), alkaline phosphatase, horse radish peroxidase (HRP), growth hormone (GH), and green fluorescent protein (GFP).

29. The method of claim 27, wherein said effector encodes a cytotoxin selected from the group consisting of thymidine kinase, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, ricin, and abrin.

30. The method of claim 27, wherein said apoptosis gene is selected from the group consisting of P53, P73, Bax, Bad, FADD, and a caspase.

31. The method of claim 22, wherein said ligand and metabolic product respectively are selected from the group consisting of beta-catenin and a Tcf, a NF- κ B and I- κ B, a P53 and MDM2, a receptor and its heteromeric receptor partner.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

32. The method of claim 22, wherein said first chimeric protein is expressed from a nucleic acid in said cell.
33. The method of claim 22, wherein said first chimeric protein is expressed from a nucleic acid in said cell.
34. The method of claim 22, wherein said first chimeric protein is a protein transported into said cell.
35. The method of claim 22, wherein said first chimeric protein is a protein transported into said cell.
36. The method of claim 22, wherein said first chimeric protein or said second chimeric protein comprises an HIV TAT domain.
37. The method of claim 22, wherein
said nucleic acid encodes a GAL-4 binding site, and said effector gene is a reporter gene;
said first chimeric protein comprises a GAL-4 nucleic acid binding protein and a beta catenin or a Tcf;
said second chimeric protein comprises a VP-16 and beta catenin or a Tcf.
38. The method of claim 37, wherein said Tcf is Tcf4.
39. The method of claim 1, wherein said test agent is a small organic molecule.
40. A method of selectively killing a cell that accumulates a metabolic product, said method comprising:
transfecting said cell with a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector that is a cytotoxin or an apoptosis-inducing gene;
introducing into said cell a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds said peptide binding site where said nucleic acid binding protein is attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product; and

WO 02/31201

PCT/US01/31745

introducing into said cell a second chimeric protein comprising a transactivator attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product, such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product.

41. The method of claim 40, wherein said transactivator is VP16.
42. The method of claim 40, wherein said nucleic acid binding protein is selected from the group consisting of GAL-4, and GAL-4-Y.
43. The method of claim 40, wherein said effector is a cytotoxin.
44. The method of claim 43, wherein said effector is a cytotoxin selected from the group consisting of thymidine kinase, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, ricin, and abrin.
45. The method of claim 40, wherein said effector is an apoptosis-inducing gene.
46. The method of claim 45, wherein effector is an apoptosis-inducing gene selected from the group consisting of P53, P73, Bax, Bad, FADD, and a caspase.
47. The method of claim 40, wherein said ligand and metabolic product respectively are selected from the group consisting of beta-catenin and aTcf, a NF- κ B and I- κ B, a P53 and MDM2, a receptor and its heteromelic receptor partner..
48. The method of claim 40, wherein said first chimeric protein is expressed from a nucleic acid in said cell.
49. The method of claim 40, wherein said first chimeric protein is expressed from a nucleic acid in said cell.
50. The method of claim 40, wherein said first chimeric protein is a protein transported into said cell.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

51. The method of claim 40, wherein said first chimeric protein is a protein transported into said cell.
52. The method of claim 40, wherein said first chimeric protein or said second chimeric protein comprises an HIV TAT domain.
53. The method of claim 40, wherein said cell is a cell selected from the group consisting of SW480, SW48, DLD-1, HCT-116, HT29, 293, U-20S, T-47D, MCF-7, HeLa, A549, Hep G2, and a Jurkat cell.
54. The method of claim 40, wherein said cell is a cancer cell.
55. The method of claim 40, wherein
 said nucleic acid encodes a GAI-4 binding site;
 said first chimeric protein comprises a GAI-4 nucleic acid binding protein and a beta catenin or a Tcf;
 said second chimeric protein comprises a VP-16 and beta catenin or a Tcf.
56. The method of claim 55, wherein said Tcf is Tcf4.
57. The method of claim 54, wherein said cancer cell is a cell from a cancer selected from the group consisting of a colorectal cancer, a lung cancer, a breast cancer, a prostate cancer, a throat cancer, a skin cancer, and an ovarian cancer.
58. A method of treatment of a cancer said method comprising the method of any one of claims 40 through 55.
59. The method of claim 62, wherein said cancer is selected from the group consisting of a colorectal cancer, a lung cancer, a breast cancer, a prostate cancer, a throat cancer, a skin cancer, and an ovarian cancer.
60. A cell comprising:
 a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector gene;
 a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds said peptide binding site where said nucleic acid binding protein is

WO 02/31201

PCT/US01/31745

attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product; and

a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product.

61. The cell of claim 60, wherein said expression control protein is a transactivator.

62. The cell of claim 60, wherein said transactivator is VP16.

63. The cell of claim 60, wherein said expression control protein is a repressor.

64. The cell of claim 60, wherein said nucleic acid binding protein is selected from the group consisting of GAL-4, and GAL-4-Y.

65. The cell of claim 60, wherein said effector is selected from the group consisting of a reporter gene, a cytotoxin, and an apoptosis-inducing gene.

66. The cell of claim 60, wherein said reporter gene is selected from the group consisting of from the group consisting of chloramphenicol acetyl transferase (CAT), luciferase, b-galactosidase (b-gal), alkaline phosphatase, horse radish peroxidase (HRP), growth hormone (GH), and green fluorescent protein (GFP).

67. The cell of claim 60, wherein said effector encodes a cytotoxin selected from the group consisting of thymidine kinase, pseudomonas exotoxin, diphtheria toxin, ricin, and abrin.

68. The cell of claim 60, wherein said apoptosis-inducing gene is selected from the group consisting of P53, F73, Bax, Bad, FADD, and a caspase.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

69. The cell of claim 60, wherein said ligand and said metabolic product respectively are selected from the group consisting of beta-catenin and a Tcf, a NF- κ B and I- κ B, a P53 and MDM2, a receptor and its heteromeric receptor partner.

70. The cell of claim 60, wherein said cell comprises a nucleic acid encoding said first chimeric protein.

71. The cell of claim 60, wherein said cell comprises a nucleic acid encoding said second chimeric protein.

72. The cell of claim 60, wherein said cell is a cell selected from the group consisting of SW480, SW48, DLD-1, HCT-116, HT29, 293, U-20S, T-47D, MCF-7, HeLa, A549, Hep G2, and a Jarakat cell.

73. The cell of claim 60, wherein
 said nucleic acid encodes a GAL-4 binding site, and said
 effector gene is a reporter gene;
 said first chimeric protein comprises a GAL-4 nucleic acid
 binding protein and a beta catenin or a Tcf;
 said second chimeric protein comprises a VP-16 and beta
 catenin or a Tcf.

74. The cell of claim 73, wherein said Tcf is Tcf4.

75. The cell of claim 60, wherein said cell further comprises a second nucleic acid encoding said ligand or metabolic product operably linked to an inducible promoter.

76. A nucleic acid comprising a nucleic acid selected from the group consisting of

 a nucleic acid encoding a chimeric protein comprising a
 nucleic acid binding domain attached to a Tcf4 or to a beta catenin, and
 a nucleic acid encoding a transactivator attached to a beta
 catenin or to a Tcf4.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

77. The nucleic acid of claim 76, wherein said nucleic acid comprises a nucleic acid encoding a nucleic acid binding domain attached to a Tef4.

78. The nucleic acid of claim 76, wherein said nucleic acid comprises a nucleic acid encoding a nucleic acid binding domain attached to a beta catenin.

79. The nucleic acid of claim 76, wherein said nucleic acid comprises a nucleic acid encoding a Tef4 attached to a transactivator.

80. The nucleic acid of claim 76, wherein said nucleic acid comprises a nucleic acid encoding a beta catenin attached to a transactivator.

81. The nucleic acid of claim 76, wherein said nucleic acid is a DNA.

82. The nucleic acid of claim 76, wherein said nucleic acid is a vector.

83. A vector comprising:

a nucleic acid encoding a peptide binding site and an effector gene;

a nucleic acid encoding a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds said peptide binding site where said nucleic acid binding protein is attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product; and

a nucleic acid encoding a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product.

84. The vector of claim 83, wherein said a nucleic acid encoding a first chimeric protein further encodes an HIV TAT domain attached to said first chimeric protein.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

85. The vector of claim 83, wherein said a nucleic acid encoding a second chimeric protein further encodes an HIV TAT domain attached to said second chimeric protein.

86. A nucleic acid encoding a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that attached to a metabolic product or to a ligand that binds to a metabolic product.

87. The nucleic acid of claim 86, wherein said nucleic acid further encodes an HIV TAT domain attached to said first chimeric protein.

88. A nucleic acid encoding a second a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to a metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic.

89. The nucleic acid of claim 88, wherein said nucleic acid further encodes an HIV TAT domain attached to said first chimeric protein.

90. A kit for screening for an agent that modulates the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product, said kit comprising:

a container containing a mammalian cell comprising:

a nucleic acid encoding a protein binding site and an effector

gene;

a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding protein that binds said protein binding site attached to said metabolic product or to a ligand that binds to said metabolic product;

a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to said metabolic product or to said ligand that binds to said metabolic product such that when said first chimeric protein comprises said metabolic product, said second chimeric protein comprises said ligand and when said first chimeric protein comprises said ligand, said second chimeric protein comprises said metabolic product.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

91. A kit for screening for an agent that modulates the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product, said kit comprising: a container containing a nucleic acid of claim 76.

92. A kit for selectively killing a cell, said kit comprising a container containing a two-hybrid system component selected from the group consisting of:
a nucleic acid of claim 76, and
a protein encoded by a nucleic acid of claim 76.

93. A compound that modulates the ability of a cell to accumulate or to degrade a metabolic product, said compound being identified according to the method of claim 1.

WO 02/31201

PCT/US01/31745

1/5

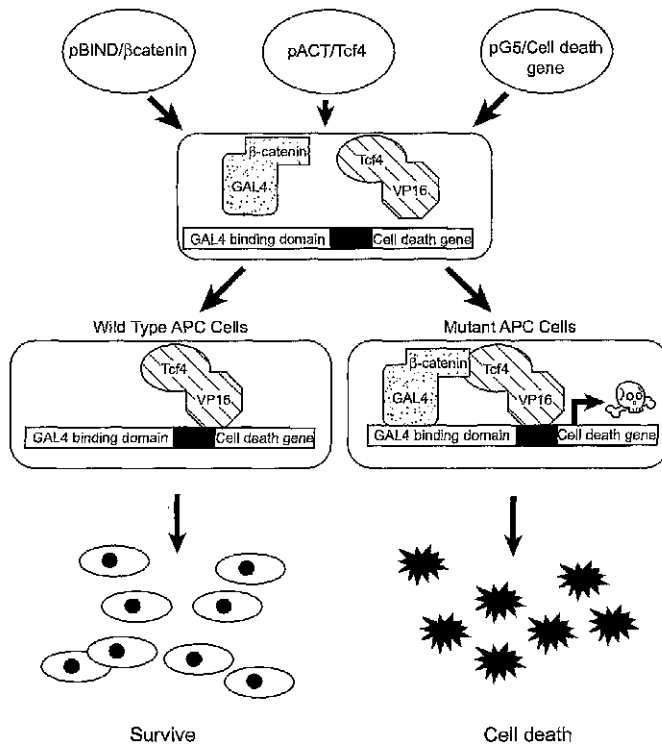


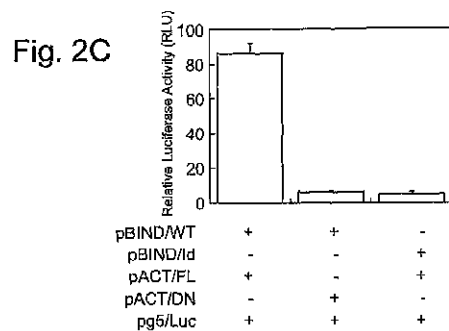
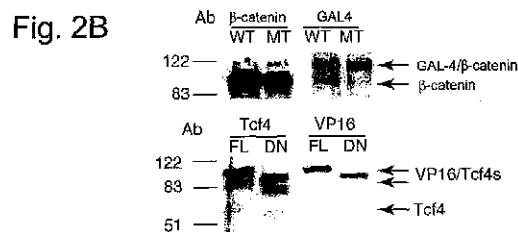
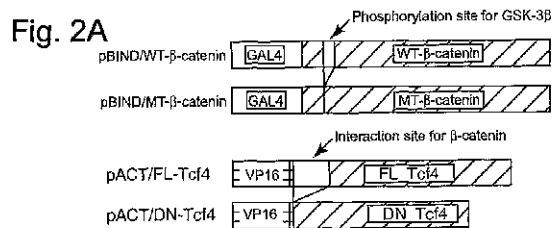
Fig. 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/31201

PCT/US01/31745

2/5



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

3/5

Fig. 3A

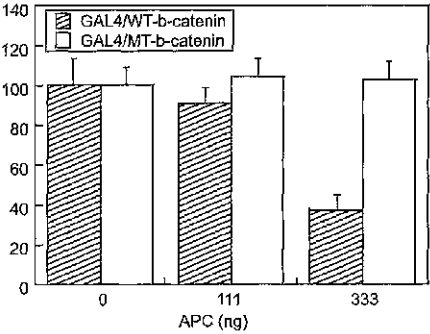
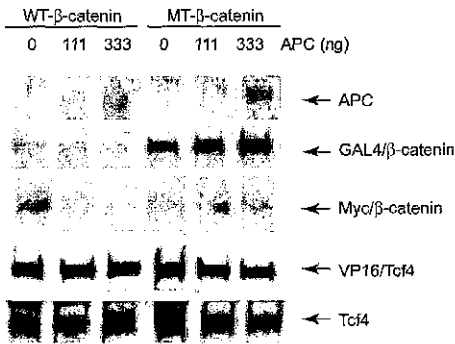


Fig. 3B



WO 02/31201

PCT/US01/31745

4/5

Fig. 4A

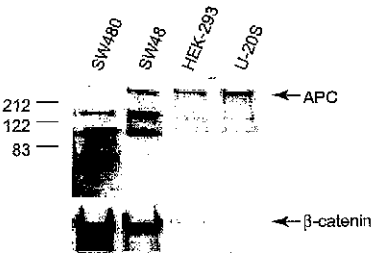


Fig. 4B

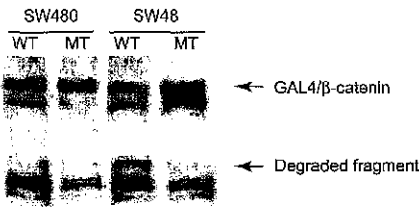
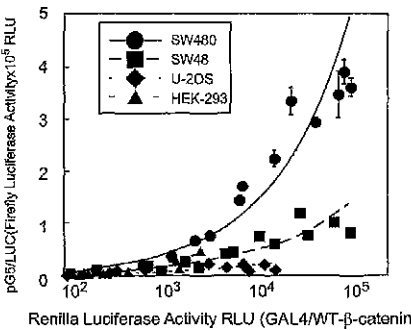


Fig. 4C



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/31201

PCT/US01/31745

5/5

Fig. 5A

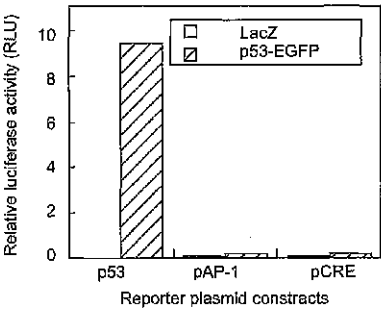


Fig. 5B

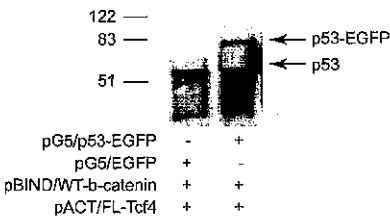
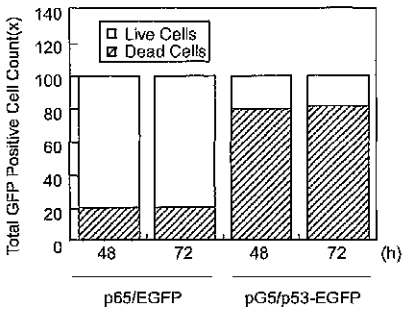


Fig. 5C



【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
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/031201 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/10
15/62, 5/10, 15/63
- (21) International Application Number: PCT/US01/31745
- (22) International Filing Date: 9 October 2001 (09.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/687,593 13 October 2000 (13.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 7201 Boon, 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607-3200 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): TETSU, Osamu [JP/US]; 2550 Geary Boulevard #405, San Francisco, CA 94115 (US); WAKITA, Kenichi [JP/US]; 3016 California Street, San Francisco, CA 94115 (US); MCCORMICK, Frank [GB/US]; 1870 Jackson Street, San Francisco, CA 94109 (US).
- (74) Agents: QUINE, Jonathan, Alan et al.; The Law Offices of Jonathan Alan Quine, P.O. Box 458, Alameda, CA 94501 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LA, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, 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 (GII, 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, LI, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, 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: 21 November 2002
- 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 02/031201 A3

(54) Title: MAMMALIAN TWO HYBRID SYSTEM FOR SCREENING FOR MODULATORS OF THE ACCUMULATION OF METABOLIC PRODUCTS

(57) Abstract: This invention utilizes a two-hybrid system to screen for agents that modulate the ability of a cell to degrade or to accumulate a metabolic product or to selectively kill a cell or to selectively express a gene or cDNA in a cell that has a defect in its ability to degrade or to accumulate a metabolic product. One embodiment provides a mammalian cell comprising a nucleic acid encoding a peptide-binding domain and an effector gene; a first chimeric protein comprising a nucleic acid binding domain that binds the peptide-binding domain attached to the metabolic product or to a ligand that binds to the metabolic product; and a second chimeric protein comprising an expression control protein attached to the metabolic product or to the ligand that binds to the metabolic product such that, when the first chimeric protein comprises the metabolic product, the second chimeric protein comprises the ligand and when the first chimeric protein comprises the ligand, the second chimeric protein comprises the metabolic product. The cell is contacted with a test agent and an alteration of expression of the effector gene is detected (if present) where a change in expression of the effector gene in response to the test agent indicates that the test agent modulates the ability of the cell to accumulate or degrade the metabolic product.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/31745
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/10 C12N15/62 C12N5/10 C12N15/63		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched to establish on symbols followed by classification symbols IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Criterion of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 051 381 A (KORNACKER MICHAEL G) 18 April 2000 (2000-04-18) abstract; claims 1,2,16 column 10, paragraph 1	1-21, 60-75, 83-85,90
X	US 5 468 614 A (SONG OK-KYU ET AL) 21 November 1995 (1995-11-21) abstract column 5, line 3 - line 14 column 6, line 42 - line 55 -/-	22-39, 60,61, 64-66, 70,71, 83-85,90
<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(s) published on or after the international filing date "L" document(s) which may (now double or partly) claim(s) or which is/are to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document(s) relevant 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 applicant's 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		Date of mailing of the international search report
19 July 2002		11.09.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5018, Patentstrasse 1 NL - 2280 (Viljoen) Tel. (+31-70) 540-2940, Tx. 31 651 (p.o.n), Fax (+31-70) 540-3016		Authorized officer Bigot-Maucher, C

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		international application No. PCT/US 01/31745
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 370 813 A (TRANSGENIC SCIENCES INC) 30 May 1990 (1990-05-30) claims 1,7,8	1-21, 60-75, 83-85,90
X	US 5 905 025 A (SENTENAC ANDRE ET AL) 18 May 1999 (1999-05-18) column 1, line 34 - line 46 column 3, last paragraph	22-39, 60-75, 83-85,90
X	LE DOUARIN B ET AL: "A NEW VERSION OF THE TWO-HYBRID ASSAY FOR DETECTION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 5, 11 March 1995 (1995-03-11), pages 876-878, XP002012441 ISSN: 0305-1048 page 876, column 1, paragraph 1 page 876, column 1, paragraph 2	60-75, 83-85,90
X	MONTROSS WERNER T ET AL: "A beta-catenin/engrailed chimera selectively suppresses Wnt signaling." JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 113, no. 10, May 2000 (2000-05), pages 1759-1770, XP002195626 ISSN: 0021-9533 abstract page 1760, column 2, paragraph 3	76-82, 90-92
X	WO 98 05/b4 A (HOPE CITY :UNIV CALIFORNIA (US)) 12 February 1998 (1998-02-12) abstract page 6, paragraph 3	40-59
A	HWANG JUNG-JOO ET AL: "Novel retroviral vector transferring a suicide gene and a selectable marker gene with enhanced gene expression by using a tetracycline-responsive expression system." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 70, no. 11, 1996, pages 8138-8141, XP000652456 ISSN: 0022-538X the whole document	40-59

	---/---	

Note: PCT/US 01/31745 (to procedure of Japan) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

reference	application No.
PCT/US	01/31745

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	KAMETAKA MINAKO ET AL: "Introduction of an inducible suicide system into CTL-2 using Fas-estrogen receptor chimera for cytotoxicity modulation." BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 2, 16 November 2000 (2000-11-16), page 311b XP001063254 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Francisco, California, USA; December 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971 abstract	40-59
P,X	MAKITA KENICHI ET AL: "A mammalian two-hybrid system for adenomatous polyposis coli-mutated colon cancer therapeutics." CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 3, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 854-858, XP001061741 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-21, 60-85,90

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/31745
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 86-89, 93 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
1. <input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/IS 01 /1745

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-21; 60-85 (partially); 90

Method of screening for an agent that modulates the ability of a cell to accumulate or degrade a metabolic product using a cell comprising a two hybrid system; the cell containing the two hybrid system; a nucleic acid; a vector; a kit.

2. Claims: 22-39; 60-85 (partially); 91

Method of selectively expressing an effector gene in a cell that accumulates or degrades a metabolic product using a cell comprising a two hybrid system; the cell containing the two hybrid system; a nucleic acid; a vector; a kit.

3. Claims: 40-59; 60-85 (partially); 92

Method of selectively killing a cell that accumulates a metabolic product; a nucleic acid; a vector; a kit.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/81745

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 86-89,93

Present claims 86-89 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options, variables, possible permutations and provisos that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible due to the vague terms "metabolic product".

Present claim 93 is a reach-through claim and could be any type of drug, i.e. it also relates to an extremely large number of possible compounds. As a consequence, said claim also lacks clarity (Article 6 PCT) to such an extent as to render a meaningful search of said claim impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

International application No.
PCT/US 01/31745

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6051381	A	18-04-2000	AU 721549 B2 06-07-2000 AU 55993398 A 03-07-1998 EP 0963376 A1 15-12-1999 JP 2001506851 T 29-05-2001 WO 9825947 A1 18-06-1998
US 5468614	A	21-11-1995	US 5283173 A 01-02-1994 US 5667973 A 16-09-1997
EP 0370813	A	30-05-1990	CA 2083415 A1 25-05-1990 EP 0370813 A2 30-05-1990 JP 1988255 C 24-02-1995 JP 2145200 A 04-06-1990 JP 6030623 B 27-04-1994 JP 4084900 A 18-03-1992 US 6100089 A 08-08-2000
US 5905025	A	18-05-1999	FR 2734567 A1 29-11-1996 EP 0828838 A1 18-03-1998 WO 9637618 A1 28-11-1996
WO 9805754	A	12-02-1998	US 6133027 A 17-10-2000 EP 0960116 A2 01-12-1999 WO 9805754 A2 12-02-1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	B

(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, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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

(72) 発明者 脇田 賢一

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 5 サン フランシスコ カリフォルニア ストリート 3 0 3 6

(72) 発明者 フランク・マコーミック

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 0 9 サン フランシスコ ジャクソン ストリート 1 8 7 0

F ターム(参考) 2G045 AA29 CB01 DA13 DA36 FA16 FB02 FB03 GC15
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07 DA02 FA02 FA10 GA11 HA11
 4B063 QA18 QQ79 QR69 QR77 QR80 QS24 QS28 QS36
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA13 AA17 MA01 NA14 ZB262
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26