

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4675371号
(P4675371)

(45) 発行日 平成23年4月20日 (2011. 4. 20)

(24) 登録日 平成23年2月4日 (2011. 2. 4)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/542 (2006. 01)

GO 1 N 33/542

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53

M

GO 1 N 21/78 (2006. 01)

GO 1 N 21/78

C

請求項の数 14 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2007-326193 (P2007-326193)
 (22) 出願日 平成19年12月18日 (2007. 12. 18)
 (65) 公開番号 特開2008-157939 (P2008-157939A)
 (43) 公開日 平成20年7月10日 (2008. 7. 10)
 審査請求日 平成19年12月19日 (2007. 12. 19)
 (31) 優先権主張番号 06126927.0
 (32) 優先日 平成18年12月21日 (2006. 12. 21)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ１２４
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 エンデルレ ティロ
 ドイツ連邦共和国 レインフェルデン ア
 ム ロテン ウェグ 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c AMPおよびc GMPの検出のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、c AMPまたはc GMPを検出するためのインビトロ方法：

a) c AMPまたはc GMPを含み得る混合物をトレーサーおよびデクエンチャー (dequencher) の複合体と接触させる段階であって、トレーサーがc AMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、ならびに

b) 蛍光における変化を測定する段階

ここで、該c AMPは、環状アデノシンーリン酸であり、c GMPは、環状グアノシンーリン酸であり、かつ

該デクエンチャーは、該c AMPクエンチャー、及びc AMPまたはc GMPと特異的に結合することができる分子である。

【請求項 2】

混合物が細胞溶解産物である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

以下の段階を含む、受容体の活性を測定するためのインビトロ方法であって、受容体のシグナル伝達がc AMPまたはc GMPを含む、方法：

a) 該受容体を発現する細胞をトレーサーおよびデクエンチャーの複合体と接触させる段階であって、トレーサーがc AMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、

b) 細胞を溶解する段階、ならびに

10

20

c) 蛍光における変化を測定する段階

ここで、該 cAMP は、環状アデノシンーリン酸であり、cGMP は、環状グアノシンーリン酸であり、かつ

該デクエンチャーは、該 cAMP クエンチャー、及び cAMP または cGMP と特異的に結合することができる分子である。

【請求項 4】

以下の段階を含む、受容体についてのリガンドのスクリーニングのためのインビトロ方法であって、受容体のシグナル伝達が cAMP または cGMP を含む、方法：

a) 候補化合物を、該受容体を発現する細胞と接触させる段階、

b) トレーサーおよびデクエンチャーの複合体を細胞に加える段階であって、トレーサーが cAMP クエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、

c) 細胞を溶解する段階、ならびに

d) 蛍光における変化を測定する段階

ここで、該 cAMP は、環状アデノシンーリン酸であり、cGMP は、環状グアノシンーリン酸であり、かつ

該デクエンチャーは、該 cAMP クエンチャー、及び cAMP または cGMP と特異的に結合することができる分子である。

【請求項 5】

受容体が GPCR である、請求項 3 または 4 記載の方法。

【請求項 6】

cAMP クエンチャーが、2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、8-OH-cAMP、または 8-MBT-cAMP である、請求項 1～5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

cAMP クエンチャーが 2-AHA-cAMP である、請求項 1～5 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

フルオロフォアが、MR121、Evoblue30、JA314、または Atto700 である、請求項 1～7 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

デクエンチャーが、cAMP 特異的抗体である、請求項 1～8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

測定された蛍光の変化が対照と比較される、請求項 1～9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

混合物において cAMP または cGMP 濃度を測定するための請求項 1、2、6～10 のいずれか一項記載の方法の使用。

【請求項 12】

デクエンチャーおよび cAMP クエンチャーに共有結合したフルオロフォアを含むキット

ここで、該 cAMP は、環状アデノシンーリン酸であり、cGMP は、環状グアノシンーリン酸であり、かつ

該デクエンチャーは、該 cAMP クエンチャー、及び cAMP または cGMP と特異的に結合することができる分子である。

【請求項 13】

cAMP 誘導体が、2AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、8-OH-cAMP、または 8-MBT-cAMP である、請求項 12 記載のキット。

【請求項 14】

デクエンチャーが、cAMP 特異的抗体である、請求項 12 または 13 記載のキット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、a)混合物をトレーサーおよびデクエンチャー(dequencher)の複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、ならびにb)蛍光における変化を測定する段階を含む、cAMPまたはcGMPを検出するためのインビトロ方法に関する。なおさらに、本発明は、混合物においてcAMPまたはcGMP濃度を測定するための、受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む、受容体の活性を測定するための、およびそのような受容体についてのリガンドのスクリーニングのための該方法の使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ヌクレオチドは、細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たす。例えば、ヌクレオチドcAMPは、Gタンパク質共役受容体(GPCR)のシグナル伝達に關与する。

【0003】

GPCRは、最大クラスの医用薬物標的を形成する。創薬において可能性のある新しい薬剤のGPCRへの活性を試験するために、受容体の機能をそれらの細胞環境においてモニターするアッセイが必要とされる。創薬過程の非常に初期でのハイスループットスクリーニングのために、これらの機能アッセイは、少数の段階を有し単純であること、初期化合物の微小な効果を検出するために感度が高いことが必要であり、かつ、自動方式で適用されるロバストな読み出しを含むことが必要である。

20

【0004】

GPCRについての機能アッセイは、受容体の活性化状態を反映する二次メッセンジャー分子の検出により設定されうる。そのような二次メッセンジャー分子は、アデニル酸シクラーゼ活性の調節で形成される環状アデノシンリン酸(cAMP)である。蛍光または化学ルミネセンス読み出しに基づいた細胞cAMPのレベルを測定する市販されている機能アッセイキットに関する概説は、非特許文献1により提供されている。

【0005】

【非特許文献1】W. Thomsen et al. (Current Opinion in Biotechnology 2005, 16, 65 5-665)

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

これらのキットは、時間がかかり、かつ複雑である。それゆえに、本発明は、cAMPを検出するための単純なアッセイ、ならびに受容体活性を間接的に検出するための、およびリガンドのスクリーニングのためのその使用を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、核酸塩基の修飾により設計されたcAMP誘導体との複合体はフルオロフォアの蛍光放射を消光しうるが、cAMPはフルオロフォアを消光しないという驚くべき事実に基づいている。

40

【0008】

それゆえに、本発明は、a)cAMPを含む混合物をトレーサーおよびデクエンチャー(dequencher)の複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、ならびにb)蛍光における変化を測定する段階を含む、混合物においてcAMPを検出するためのインビトロ方法を提供する。

【0009】

驚くべきことに、アッセイはまた、混合物においてcGMPを検出するためにも用いられうる。cAMPと違って、cGMPは消光能力を有するが、約1mMおよびそれより上の濃度においてのみである。しかしながら、細胞cGMP濃度は通常、1mMより数桁下の範囲にある。

50

【 0 0 1 0 】

それゆえに、本発明は、a) cAMPまたはcGMPを含む混合物を、トレーサーおよびデクエンチャーの複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、ならびにb) 蛍光における変化を測定する段階を含む、混合物においてcAMPまたはcGMPを検出するためのインビトロ方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

好ましくは、蛍光の測定された変化は対照と比較される。対照は、所定量のヌクレオチドでの標準曲線でありうる。

【 0 0 1 2 】

本発明(1)は、以下の段階を含む、cAMPまたはcGMPを検出するためのインビトロ方法である：

a) cAMPを含む混合物をトレーサーおよびデクエンチャー(dequencher)の複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、ならびに

b) 蛍光における変化を測定する段階。

本発明(2)は、混合物が細胞溶解産物である、本発明(1)の方法である。

本発明(3)は、以下の段階を含む、受容体の活性を測定するためのインビトロ方法であって、受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む、方法である：

a) 該受容体を発現する細胞をトレーサーおよびデクエンチャーの複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、

b) 細胞を溶解する段階、ならびに

c) 蛍光における変化を測定する段階。

本発明(4)は、以下の段階を含む、受容体についてのリガンドのスクリーニングのためのインビトロ方法であって、受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む、方法である：

a) 候補化合物を、該受容体を発現する細胞と接触させる段階、

b) トレーサーおよびデクエンチャーの複合体を細胞に加える段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、

c) 細胞を溶解する段階、ならびに

d) 蛍光における変化を測定する段階。

本発明(5)は、受容体がGPCRである、本発明(3)または(4)の方法である。

本発明(6)は、cAMPクエンチャーが、2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、8-OH-cAMP、または8-MBT-cAMPである、本発明(1)～(5)のいずれか一つの方法である。

本発明(7)は、cAMPクエンチャーが2-AHA-cAMPである、本発明(1)～(5)のいずれか一つの方法である。

本発明(8)は、フルオロフォアが、MR121、Evoblue30、JA314、またはAtto700である、本発明(1)～(7)のいずれか一つの方法である。

本発明(9)は、測定された蛍光の変化が対照と比較される、本発明(1)～(8)のいずれか一つの方法である。

本発明(10)は、混合物においてcAMPまたはcGMP濃度を測定するための本発明(1)、(2)、(6)～(9)のいずれか一つの方法の使用である。

本発明(11)は、デクエンチャーおよびcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアを含むキットである。

本発明(12)は、cAMP誘導体が、2AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、8-OH-cAMP、または8-MBT-cAMPである、本発明(11)のキットである。

本発明(13)は、実質的には、本明細書で、特に実施例に関して、記載されているような、方法および使用である。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

本発明により、cAMPおよびcGMPの検出のための方法が提供された。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

「混合物」という用語は、それぞれが変化しないままであるような方法でいっしょに混合された2つまたはそれ以上の物質を指す。混合物は、限定されるわけではないが、細胞溶解産物、細胞培養上清、血清、血漿、尿、気管支洗浄液、痰、脳脊髄液のような生検のような生体液を含む。

【0015】

「ヌクレオチド」という用語は、核酸塩基、糖、および1つ(MP)、2つ(DP)、または3つ(TP)のリン酸基を含む分子を指す。5つの核酸塩基：アデニン(A)、ウラシル(U)、チミン(T)、グアニン(G)、およびシトシン(C)がある。糖は、リボースかまたはデオキシリボース(d)かのいずれかである。

10

【0016】

「環状ヌクレオチド」という用語は、リン酸基が糖のヒドロキシル基の2つに結合して、環状またはリング構造を形成するヌクレオチドを指す。これらは、環状AMP(cAMP)、環状CMP(cCMP)、環状TMP(cTMP)、環状UMP(cUMP)、および環状GMP(cGMP)を含む。

【0017】

本明細書に用いられる場合、「cAMPクエンチャー」という用語は、アッセイに用いられるフルオロフォアを消光する能力があるcAMPの誘導体を指す。クエンチャーは、該フルオロフォアに共有結合している。cAMPクエンチャーは、核酸塩基が電子供与体で置換されているcAMPの誘導体である。置換についての核酸塩基の位置は、図11Bに示されているように、2位または8位である。cAMPの好ましい誘導体は、2-(6-アミノヘキシル)アミノ-cAMP(2-AHA-cAMP)、8-(6-アミノヘキシル)アミノ-cAMP(8-AHA-cAMP)、8-(8-アミノ-3,6-ジオキサオクチルアミノ)-cAMP(8-ADDA-cAMP)、8-ヒドロキシ-cAMP(8-OH-cAMP)、8-(4-メルカプトブチルチオ)-cAMP(8-MBT-cAMP)である。最も好ましい誘導体は2-AHA-cAMPである。

20

【0018】

「フルオロフォア」という用語は、特定の波長で励起された場合、蛍光を放射し、静的に消光可能な分子を指す。好ましいフルオロフォアは、例えば、MR121、Evoblue30、またはJA314のようなEP 747 447に記載されているようなオキサジン誘導体である。さらに、用いられうる好ましいフルオロフォアは、ATTO 590、ATTO 655、ATTO 680、Atto 700(Atto-Tec GmbH, Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, Germany)である。より好ましくは、フルオロフォアはMR121またはAtto 700である。

30

【0019】

本明細書に用いられる場合、「デクエンチャー」という用語は、cAMPクエンチャーに結合することによりcAMPクエンチャーの消光効果を逆転させる分子を指す。デクエンチャーが、cAMPクエンチャー、ならびに検出される環状ヌクレオチド、すなわちcAMPまたはcGMPを結合する能力があることは、必須である。

【0020】

デクエンチャーは結合タンパク質でありうる。好ましくは、デクエンチャーはcAMP特異的抗体である。抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体でありうる。デクエンチャーがタンパク質である場合には、pH値は、そのタンパク質が結合する能力がある範囲に適合されなければならない。通常には、この範囲はpH6.8~7.8である。

40

【0021】

ヌクレオチドに特異的である抗体を産生するための方法は当業者に周知である。例えば、KohlerおよびMilstein(Nature 1975, 256:495-497)は、モノクローナル抗体を産生するための方法を記載する。

【0022】

検出複合体は、トレーサーおよびデクエンチャーを含む。トレーサーは、cAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアからなる。検出複合体は、励起された場合には蛍光を示す。検出複合体がヌクレオチドと接触している場合、デクエンチャーは特定の割合の遊離ヌクレオチドに結合し、検出複合体を去る。トレーサーはもはや脱消光されず、励起さ

50

れた場合、低度か無の蛍光のみを示す。この蛍光の減少は、系に存在するヌクレオチドの量について示す。

【 0 0 2 3 】

蛍光の変化は、標準曲線のような対照と比較されうる。標準曲線は、検出されるヌクレオチドの所定量について蛍光における変化を測定することにより確立されうる。

【 0 0 2 4 】

本発明は、混合物においてcAMP濃度を測定するための上記のような方法の使用をさらに提供する。なおさらに、上記のような方法は、受容体の活性を測定するために用いられることができ、これらの受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む。好ましくは、受容体はGタンパク質共役受容体(GPCR)である。

10

【 0 0 2 5 】

それゆえに、本発明はまた、以下の段階を含む、受容体の活性を測定するための方法であって、この受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む、方法を提供する：

- a) 該受容体を発現する細胞をトレーサーおよびデクエンチャーの複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、
- b) 細胞を溶解する段階、ならびに
- c) 蛍光における変化を測定する段階。

【 0 0 2 6 】

または、段階b)は段階a)の前であってもよい。

【 0 0 2 7 】

20

好ましい態様は、以下の段階を含む、GPCRの活性を測定するための方法である：

- a) GPCRを発現する細胞をトレーサーおよびデクエンチャーの複合体と接触させる段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、
- b) 細胞を溶解する段階、ならびに
- c) 蛍光における変化を測定する段階。

【 0 0 2 8 】

または、段階b)は段階a)の前であってもよい。

【 0 0 2 9 】

好ましくは、測定された蛍光の変化は、対照と比較される。対照は、所定量のcAMPまたはcGMPでの標準曲線でありうる。

30

【 0 0 3 0 】

なおさらに、本発明は、受容体のリガンドをスクリーニングするための上記のような方法の使用であって、この受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む、方法の使用を提供する。好ましくは、該受容体はGPCRである。

【 0 0 3 1 】

それゆえに、本発明はまた、以下の段階を含む、受容体についてのリガンドをスクリーニングするための方法であって、この受容体のシグナル伝達がcAMPまたはcGMPを含む、方法を提供する：

- a) 候補化合物を、該受容体を発現する細胞と接触させる段階、
- b) トレーサーおよびデクエンチャーの複合体を加える段階であって、トレーサーがcAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、
- c) 細胞を溶解する段階、ならびに
- d) 蛍光における変化を測定する段階。

40

【 0 0 3 2 】

または、段階c)は段階b)の前であってもよい。

【 0 0 3 3 】

好ましい態様は、以下の段階を含む、GPCRについてのリガンドをスクリーニングするための方法である：

- a) 候補化合物を、該GPCRを発現する細胞と接触させる段階、
- b) トレーサーおよびデクエンチャーの複合体を細胞に加える段階であって、トレーサーが

50

cAMPクエンチャーに共有結合したフルオロフォアである、段階、

c)細胞を溶解する段階、

d)蛍光における変化を測定する段階。

【0034】

または、段階c)は段階b)の前であってもよい。

【0035】

好ましくは、測定された蛍光の変化は、対照と比較される。対照は、所定量のヌクレオチドでの標準曲線でありうる。

【0036】

例えば、GPCRのような受容体を発現する細胞は、該受容体を内因的に発現する細胞、または該受容体についてトランスジェニックな細胞でありうる。

10

【0037】

そのようなトランスジェニック細胞は、当技術分野において公知の方法により作製される。好ましい方法は、以下の段階を含む：対象となる受容体をコードするDNAをクローニングする段階、該DNAをベクターへ挿入する段階、および該ベクターを細胞へ導入する段階。好ましくは、該ベクターは、相同組換えに適した細胞のゲノムにおけるひと続きに相同的であるひと続きを含み、それにより、細胞のゲノムへの受容体をコードするDNAの標的挿入を可能にする。

【0038】

本明細書に用いられる場合、「リガンド」という用語は、受容体に結合する分子を指す。リガンドは、アゴニスト、アンタゴニスト、モジュレーター、部分的アゴニスト、または部分的アンタゴニストでありうる。

20

【0039】

「アゴニスト」という用語は、細胞において受容体に結合し、応答を引き起こす分子を指す。「部分的アゴニスト」という用語は、受容体を部分的に活性化する分子を指す。「アンタゴニスト」という用語は、受容体に結合するが、受容体を活性化することができず、実際には、アゴニストによる受容体の活性化を阻止する分子を指す。

【0040】

本発明はまた、上記のようなデクエンチャー、およびcAMPクエンチャーと共有結合したフルオロフォアを含むキットに関する。キットは、デクエンチャーおよび修飾フルオロフォアを別々に、または複合体として含む。

30

【0041】

キットはまた、適した緩衝液、フィルターなどのような、それぞれのフルオロフォアのレベルを測定することに関連して適切と考えられる任意の他の構成要素を含む。

【0042】

任意で、キットは、追加として、GPCR活性を測定することに関する任意の測定の結果を解釈するためのユーザーマニュアルを含む。特に、そのようなマニュアルは、測定された蛍光における変化の解釈についての情報、好ましくは標準曲線を含む。

【0043】

ここに、本発明を一般的に記載したが、それは、特定の実施例を参照することによりより良く理解されるようになると思われ、それらの実施例は、例証を目的としてのみ本明細書に含まれ、以下の図面と関連して、他に特定がない限り限定することを意図しない。

40

【実施例】

【0044】

実施例

実施例において言及された市販されている試薬は、他に規定がない限り製造会社の使用説明書に従って用いられた。

【0045】

試薬および器具

cAMP、cGMP、2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、2'-AEC-cAMP、8-MBT-cAMP、N-6-

50

アミノヘキシル-cAMP、および8-OH-cAMPはBiolog Life Science Institute (28071 Bremen, Germany)から、MR121 NHSエステルおよびN-6-アミノヘキシル-cAMPはRoche diagnostics (Penzberg, Germany)から、ならびにAtto 700 NHSエステルはAtto-Tec GmbH (Atto-Tec GmbH, Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, Germany)から購入された。モノクローナルマウス抗cAMP抗体は、KohlerおよびMilstein(Nature 1975, 256:495-497)により記載されているように社内で産生された。

【 0 0 4 6 】

すべての実験は、0.1%BSA(アルブミン、ウシ血清、96%、本質的に脂肪酸を含まない、A6003、Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, Switzerland)を含むPBS(pH7.4)で行われた。細胞を溶解するために、0.1%BSA(ウシ血清由来アルブミン、画分V、96%、05480、Sigma-Aldrich Chemie GmbH)、0.45%Triton(登録商標)X-100(9342、Sigma-Aldrich Chemie GmbH)、0.075%NP40(Nonidet P40 Substitute、19628、USB Corporation, Cleveland, OH USA)、および0.3%NaN₃(purum p.a.、99%、71290、Sigma-Aldrich Chemie GmbH)を含む3×PBS溶解緩衝液(pH7.4)が用いられた。細胞についての増殖培地は、10%FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Gibco 15140-122)を含むF-12K(Gibco 21127-002)であった。

【 0 0 4 7 】

すべての蛍光強度測定は、MR121での測定について630nm(帯域幅50nm)の励起フィルターおよび695nm(帯域幅55nm)の放射フィルター、ならびにAtto 700での測定について655nm(帯域幅50nm)の励起フィルターおよび710nm(帯域幅40nm)の放射フィルターを用いる高圧Xeアークランプを備えたプレート::ビジョン蛍光リーダー(Evotec Technologies GmbH, Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg, Germany)を用いて行われた。蛍光強度は、減衰フィルターおよび様々な露光時間を用いることにより使用されたiCCDカメラの最大シグナルの約60%に調整された。寿命測定は、励起のために630nmへ調整される光源としてのOPOシステム(GWU Lasertechnik Vertriebsgesellschaft m.b.H., 50374 Erftstadt, Germany)、および695nmの放射フィルターを有するプレート::ビジョンTRFリーダー(Evotec Technologies GmbH, Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg, Germany)を用いて行われた。

【 0 0 4 8 】

すべての実験は、384ウェルマイクロタイタープレート(Costar 384、透明の平底をもつ黒色、処理された組織培養物、製造番号3712)において行われ、総アッセイ容量は30 µlから40 µlまで様々であった。

【 0 0 4 9 】

実施例1：MR121の消光

1.1 環状ヌクレオチドの消光能力

PBS(アッセイにおけるDMSO最終濃度：1.25%)における20 µl MR121(PBS中、最終濃度20nM)および20 µlクエンチャーをマイクロタイタープレートへピペティングした。室温で30分間のインキュベーション時間の後、蛍光および寿命を測定した。試験された環状ヌクレオチドの濃度は、0mM、0.1mM、0.2mM、0.4mM、0.8mM、1.6mM、3.2mM、6.4mM、および12.8mMであった。

【 0 0 5 0 】

cGMPはMR121をより高い濃度で消光する(図13a)。しかしながら、この消光は、cGMPアッセイにおいてそのような濃度には達しないため、アッセイウィンドウに影響を及ぼさない。10 µMまでの低濃度(細胞内濃度の範囲に対応する)において、cAMPもcGMPのいずれもフルオロフォアを消光しない(図13b)。MR121-2-AHA-cAMPトレーサーでの置換アッセイにおいて、cAMPまたはcGMPとの置換についてのアッセイウィンドウは、1(MR121-2-AHA-cAMPは抗体への結合により脱消光される)から1.7 I₀/I(MR121は2-AHA-cAMPにより消光される)までを動く。

【 0 0 5 1 】

1.2 cAMP誘導体での消光

消光機構を分析するために、異なる分子(Trp、cAMP、2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、2'-AEC-cAMP、N-6-アミノヘキシル-cAMP、8-MBT-cAMP、および8-OH-cAMP、図4、5参照)の機能として遊離MR121の蛍光強度および蛍光寿命の測定を行った。

【0052】

PBS(アッセイにおけるDMSO最終濃度：1.25%)における20 μ l MR121(PBS中、最終濃度20nM)および20 μ l クエンチャーをマイクロタイタープレートヘビペッティングした。室温で30分間のインキュベーション時間の後、蛍光および寿命を測定した。蛍光寿命における変化なしでの蛍光強度における減少がTrpで観察された。驚くべきことに、蛍光強度の減少は、2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、8-MBT-cAMP、および8-OH-cAMPについてよりいっそう顕著であるが(一定の蛍光寿命をもって)、cAMP、2'-AEC-cAMP、およびN-6-アミノヘキシル-cAMPは全く消光を示さない。参考文献2~5と同様に、本発明者らは、MR121が、2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、8-MBT-cAMP、および8-OH-cAMPとの非蛍光基底状態複合体を形成するが、cAMP、2'-AEC-cAMP、およびN-6-アミノヘキシル-cAMPとは形成しないと結論づける。

10

【0053】

2-AHA-cAMP、8-AHA-cAMP、および8-ADOA-cAMPにおいて、リンカーは、アミン結合を介して、8-MBT-cAMPにおいてはイオウを介して、および8-OH-cAMPにおいては酸素結合を介して、アデノシンのプリン環系へ直接的に結合している。しかしながら、N-6-アミノヘキシル-cAMPおよび2'-AEC-cAMPにおいて、リンカーは、アデノシンのアミン基かまたはリボース部分のいずれかに結合している。明らかに、アデノシンの修飾は、その後オキサジン色素との複合体形成に有利に働く、環系の電子状態における変化へと導く。

20

【0054】

図5において、蛍光強度(I_0/I)における変化が、調べられたすべてのcAMP誘導体についてプロットされている。会合定数、 K_s は8-AHA-cAMP、8-ADOA-cAMP、2-AHA-cAMP、8-MBT-cAMP、および8-OH-cAMPについて、それぞれ、 514M^{-1} 、 475M^{-1} 、 512M^{-1} 、 758M^{-1} 、および 236M^{-1} を与えるプロットの線形領域(3.2mMまで)から計算された。この消光は、非常に効率的であり、cAMP誘導体の大部分についての K_s は、文献で報告されたトリプトファン($\sim 220\text{M}^{-1}$)と比較して2倍より多い。

【0055】

MR121-2-AHA-cAMPが特異的なcAMP抗体に結合される場合、この非蛍光複合体は形成されることができず、MR121蛍光強度における増加が観察される(図6)。20nM遊離MR121、20nM MR121-2-AHA-cAMP(最大消光)、ならびに20nM MR121-2-AHA-cAMPおよび1000nM抗体の混合物(最大脱消光)の蛍光強度は、0.1%BSAを含むPBSにおいて測定された。

30

【0056】

遊離MR121(100%)と比較して、トレーサーは、25%の蛍光強度を示す。抗体Aは61%まで、抗体Bは87%まで、蛍光を脱消光する。明らかに、脱消光の程度もまた、抗cAMP抗体の結合親和性に、および抗体の結合ドメインを形成するアミノ酸配列に依存する。抗体の結合ドメインに近接するトリプトファンは、ある程度までMR121蛍光を消光しうる。これは、異なる抗体が脱消光の異なる程度を示すことを説明できる。

【0057】

アッセイについて、抗体が、標識cAMPおよび修飾cAMP、ならびに細胞で産生された「純粋な」cAMPであるトレーサーを認識することは非常に重要である。アッセイのさらなる開発のために、本発明者らは、脱消光が抗体Bと比較して少ないが、抗体Aを用いた。しかしながら、トレーサーのcAMPとの置換は、抗体Aに関してより良く、ウィンドウ完全消光~完全脱消光は、ロバストなアッセイを開発するのにそれでも十分良い。

40

【0058】

実施例2：抗cAMP抗体の K_d 測定

抗cAMP抗体(抗体A)のMR121-2-AHA-cAMPへの結合親和性(K_d)は、 $1\times$ 溶解緩衝液におけるいくつかのトレーサー濃度(2nM、6nM、10nM、15nM、および20nM)に対して抗体を滴定することにより測定された。20 μ l 抗cAMP希釈液を4連で384ウェルマイクロタイタープレート

50

へピペッティングした。その後、20 μ l MR121-2-AHA-cAMPを各ウェルへ加え、384ウェル振盪器上で室温での30分間のインキュベーション後、蛍光強度を読んだ。データは、抗体無しでの値を0%に設定することにより標準化された。図7は、対応する滴定曲線を示す。4つのパラメーターモデルへのフィッティングにより、異なるトレーサー濃度について25nMから29nMまでの K_d 値がもたらされる。

【0059】

実施例3：用量応答曲線

cAMP

$K_d=28$ nMに基づいて、40nM抗cAMP抗体および20nM MR121-2-AHA-cAMPが、約100nMの IC_{50} でのcAMPの高感度の検出のために選択された。図8は、2つのcAMP標準曲線を示し、1つは細胞無し、および1つは細胞有りである。細胞無しでの標準曲線について、0.1%BSAを含むPBSにおける20 μ l cAMP希釈液を、384ウェルマイクロタイタープレートへ滴定し、その後、10 μ lの検出混合物(3 $\times$ 溶解緩衝液における120nM抗cAMPおよび60nM MR121-2-AHA-cAMP)を加えた。細胞有りでの標準曲線について、10,000細胞/ウェル(CHO-K1)を25 μ l培地に蒔き、20時間、37 $^{\circ}$ Cで保った。その後、培地を除去し、PBS + 0.1%BSAにおける20 μ l cAMP希釈液、続いて10 μ l検出混合物を加えた。その後、プレートを、蛍光シグナルを読む前に、384ウェル振盪器上、室温でインキュベートした。測定された IC_{50} は、両方の標準曲線について類似している(細胞無しおよび細胞有りで、それぞれ、109nMおよび119nM、図8参照)。

【0060】

時間ならびにDMSOおよびBSAに対する許容性に関するcAMP標準曲線の安定性は、溶解緩衝液における検出混合物を用いて細胞無しで試験された。5%DMSOおよび0.8%BSAまでに関して、 IC_{50} における変化およびシグナルの有意な急降下は観察されなかった。シグナルおよび IC_{50} は少なくとも6時間、安定である。

【0061】

図15は、5nM Atto700-2-AHA-cAMPトレーサーおよび48nMの IC_{50} を与える5nM抗体で行われたcAMP用量応答曲線を示す。cAMPを0.1%BSAを含むPBSに希釈した。cAMP希釈液の20 μ lを384ウェルマイクロタイタープレートへ滴定し、10 μ l検出混合物を加えた。プレートを、蛍光シグナルを読む前に、384ウェル振盪器上、室温でインキュベートした。

【0062】

cGMP

図14は、20nM MR121-2-AHA-cAMPトレーサー、ならびにcAMPについて134nMおよびcGMPについて387nMの IC_{50} を与える40nM抗体で行われたcAMPおよびcGMPについての標準曲線の比較を示す。これらの IC_{50} 値、ならびにcAMPおよびcGMPについての感度は、抗体の選択に依存する。異なる抗体は、cGMPについて感度がより高く、cAMPについて感度がより低い可能性がある。

【0063】

cAMPおよびcGMPを、0.1%BSAを含むPBSに希釈した。細胞無しでの標準曲線について、20 μ lのcAMP希釈液および20 μ lのcGMP希釈液を384ウェルマイクロタイタープレートへ滴定し、その後、10 μ lの検出混合物(3 $\times$ 溶解緩衝液における40nM抗cAMPおよび20nM MR121-2-AHA-cAMP)を加えた。その後、プレートを、蛍光シグナルを読む前に、384ウェル振盪器上、室温でインキュベートした。

【0064】

実施例4：cAMP細胞アッセイ

フォルスコリン用量応答曲線は、CHO-K1細胞で行われた。2,500細胞/ウェルから20,000細胞/ウェルまでの細胞数を、25 μ l培地に蒔き、37 $^{\circ}$ Cで20時間、インキュベートした。培地を除去し、0.1%BSAを含むPBSの10 μ lおよび1mM IBMXを加えた後、細胞を37 $^{\circ}$ Cで60分間、インキュベートした。0.01 μ Mから300 μ Mまでの(20 μ lアッセイ容量における最終濃度)、PBS + 0.1%BSA + 1mM IBMXにおけるフォルスコリン希釈液の10 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cでもう30分間、インキュベートした。その後、3 $\times$ 溶解緩衝液における10 μ l検出混合物(20nM MR12

1-2-AHA-cAMP + 40nM抗cAMP、30 μ lにおける最終濃度)を加えることにより細胞を溶解し、384ウェル振盪器上、室温での30分間のインキュベーション後、蛍光シグナルを読んだ。10,000細胞/ウェルに関して、フォルスコリン(3.7 μ M)について最大cAMPレベルおよび最小IC₅₀に達した。図9は、10,000細胞/ウェルに関するフォルスコリン用量応答曲線およびcAMP標準曲線を示す。

【0065】

実施例5：ATTO590およびATTO655の消光

20 μ lのATTO590およびATTO655のそれぞれ(PBS中、最終濃度20nM)、ならびにPBS(アッセイにおけるDMSO最終濃度：1.25%)における20 μ lのクエンチャー(8-AHA-cAMP)をマイクロタイタープレートヘビペッティングした。室温での30分間のインキュベーション時間の後、蛍光および寿命を測定した。結果は、シュテルン-フォルマープロットに組み込まれた。会合定数、K_sは、プロットの線形領域(3.2mMまでの)から計算された。

【0066】

Atto590およびAtto655は、それぞれ、K_s=282M⁻¹およびK_s=347M⁻¹で、8-AHA-cAMPにより消光される(図10)。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】実施例においてcAMP誘導体の標識のために用いられたようなNHSエステルとしてのフルオロフォアMR121の分子構造を示す図である。

【図2】MR121-2-AHA-cAMPの分子構造を示す図である。

【図3】細胞においてcAMP濃度を測定する例を用いたアッセイ原理の概略図を示す図である。細胞を溶解し、検出混合物を細胞溶解産物に加える。検出混合物は、cAMPクエンチャー(cAMP誘導体、例えば、2-AHA-cAMP)に結合したフルオロフォア(例えば、MR121)およびcAMP抗体(例えば、マウスモノクローナル抗cAMP抗体)の複合体を含む。クエンチャーのフルオロフォアへの消光効果は抗体(=デクエンチャー)により取り消される。cAMPと接触した場合、抗体は、cAMP誘導体の代わりにそれを結合する。抗体の脱消光効果無しで、cAMPクエンチャーは、フルオロフォアを消光し、蛍光シグナルの減少を引き起こす。cAMP濃度が高ければ高いほど、蛍光は低い。

【図4】MR121とトリプトファン(a)、2-AHA-cAMP(b)、およびcAMP(c)のシュテルン-フォルマープロットのグラフ表示を示す図である。I₀/I：蛍光強度における変化(I₀クエンチャーの非存在下での蛍光強度およびIクエンチャーの存在下での蛍光強度)、t₀/t：蛍光の寿命の変化(t₀クエンチャーの非存在下での蛍光寿命およびtクエンチャーの存在下での蛍光寿命)。

【図5】異なるcAMP誘導体(8-AHA-cAMP、2-AHA-cAMP、N-6-アミノヘキシル-cAMP、8-OH-cAMP、8-ADDA-cAMP、2'-AEC-cAMP、8-MBT-cAMP)についての蛍光強度の減少(I₀/I)のグラフ表示を示す図である。~5mMより上の8-AHA-cAMPについての直線性からの大きな逸脱は、溶解性の問題のせいである。I₀/I：蛍光強度における変化。

【図6】2つの異なる特異的cAMP抗体AおよびBを用いるトレーサーMR121-2-AHA-cAMPの蛍光の消光および脱消光のグラフ表示を示す図である。Ab：抗体。

【図7】固定したトレーサー濃度(10nM MR121-2-AHA-cAMP)における抗cAMP抗体の滴定のグラフ表示を示す図である。実験データのフィットは、結果として、28nMのK_d値を生じた。

【図8】2つのcAMP標準曲線、1つは細胞無し(黒色菱形)および1つは細胞の存在下(白色菱形)、のグラフ表示を示す図であり、曲線のフィッティングは、細胞無しおよび細胞有り、それぞれ、IC₅₀=109nMおよび119nMを与える。

【図9】10,000細胞/ウェルでのフォルスコリン用量応答曲線およびcAMP標準曲線のグラフ表示を示す図であり、曲線のフィッティングは、cAMPについてIC₅₀=102nMおよびフォルスコリンについて3.7 μ Mを与える。

【図10】以下の分子のシュテルン-フォルマープロットのグラフ表示を示す図である：MR121-8-AHA-cAMP、ATTO590-8-AHA-cAMP、およびATTO655-8-AHA-cAMP。

【図 1 1】環状アデノシンリン酸(cAMP)(A)およびcAMPのプリン環(B)の化学構造を示す図である。

【図 1 2 A】cAMP誘導体、2-(6-アミノヘキシル)アミノ-cAMP(2-AHA-cAMP)の化学構造を示す図である。

【図 1 2 B】cAMP誘導体、8-ヒドロキシ-cAMP(8-OH-cAMP)の化学構造を示す図である。

【図 1 2 C】cAMP誘導体、8-(4-メルカプトブチルチオ)-cAMP(8-MBT-cAMP)の化学構造を示す図である。

【図 1 2 D】cAMP誘導体、8-(8-アミノ-3,6-ジオキサオクチルアミノ)(8-ADOA-cAMP)の化学構造を示す図である。

【図 1 2 E】cAMP誘導体、8-(6-アミノヘキシル)アミノ-cAMP(8-AHA-cAMP)の化学構造を示す図である。

【図 1 2 F】cAMP誘導体、N-6-アミノヘキシル-cAMPの化学構造を示す図である。

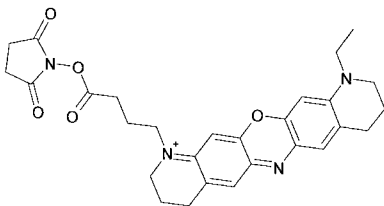
【図 1 2 G】cAMP誘導体、2'-AEC-cAMP(AEC = 3-アミノ-9-エチルカルバゾール)の化学構造を示す図である。

【図 1 3】(a)は13mMまでのcAMP、cGMP、cUMP、およびcTMPによるMR121の消光のグラフ表示を示す図である。(b)はシュテルン-フォルマープロットにおいて10 μ Mまでの濃度におけるcAMPおよびcGMPによるMR121の消光のグラフ表示を示す図である。低濃度において、cAMPもcGMPもMR121を消光しない。

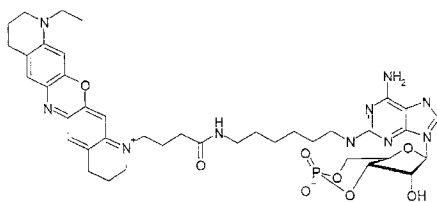
【図 1 4】cAMPおよびcGMPの濃度に関する蛍光の減少のグラフ表示を示す図である(標準曲線)。

【図 1 5】トレーサーとしてAtto700-2-AHA-cAMPおよびデクエンチャーとして抗cAMP抗体を用いてのcAMPの濃度に関する蛍光の減少のグラフ表示を示す図である(cAMP標準曲線)。曲線のフィッティングはIC50=48nMを与える。

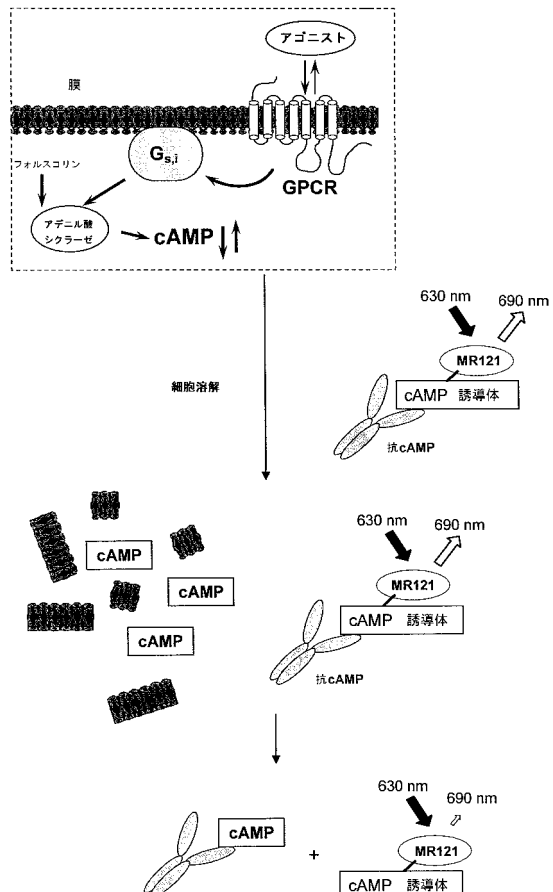
【図 1】



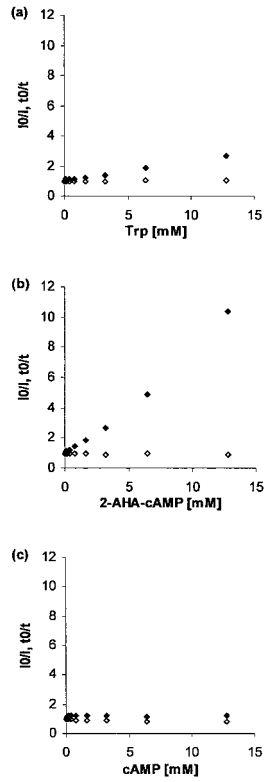
【図 2】



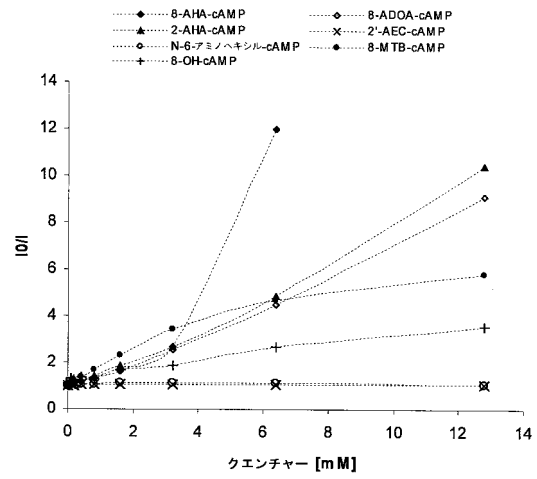
【図 3】



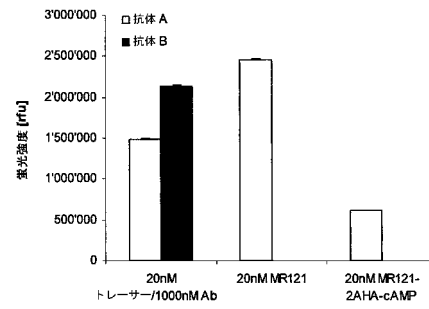
【図 4】



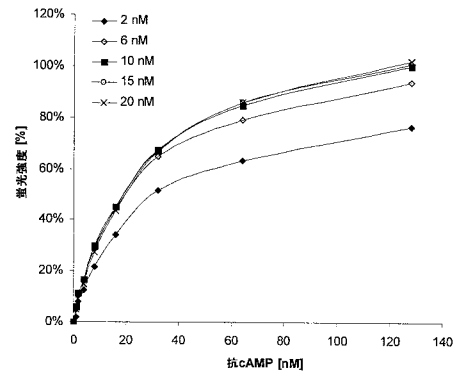
【図 5】



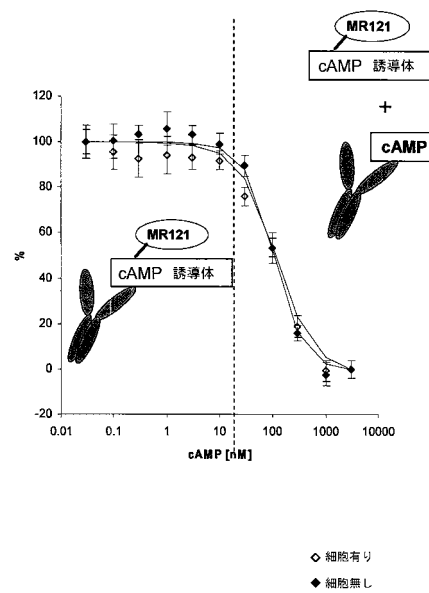
【図 6】



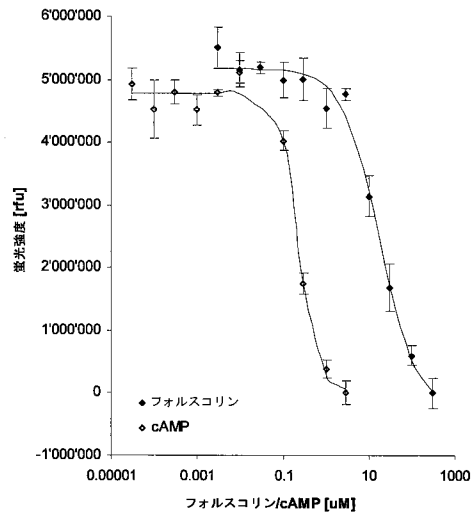
【図 7】



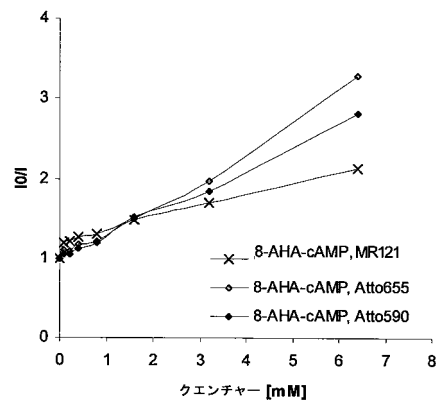
【図 8】



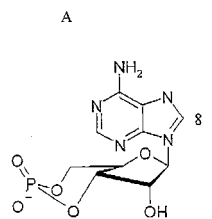
【図 9】



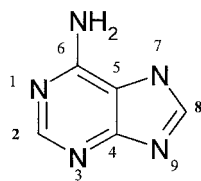
【図 10】



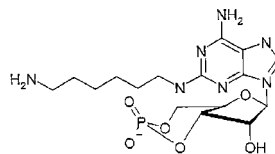
【図 11】



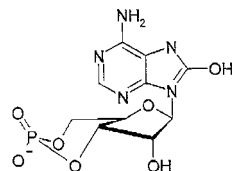
B



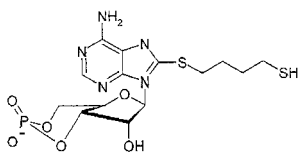
【図 12 A】



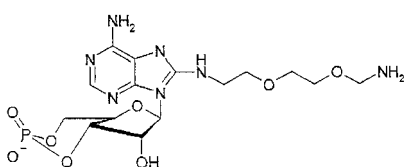
【図 12 B】



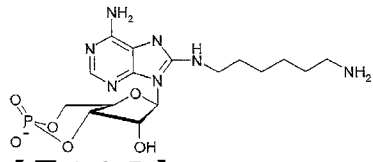
【図 12 C】



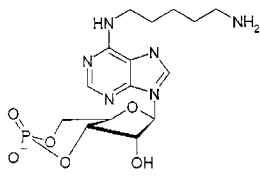
【図 12 D】



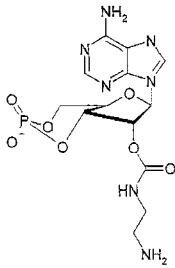
【図 1 2 E】



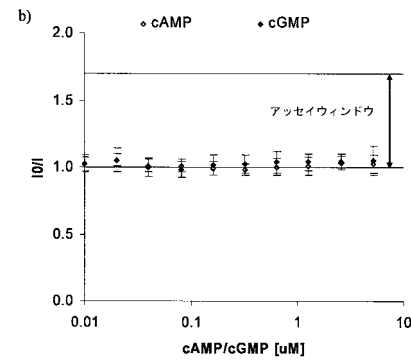
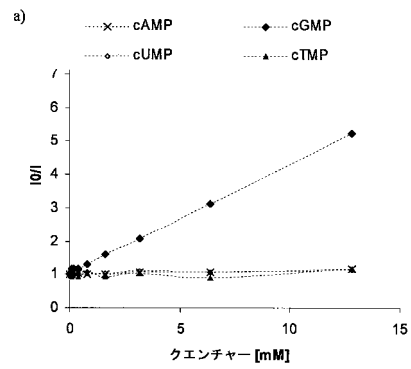
【図 1 2 F】



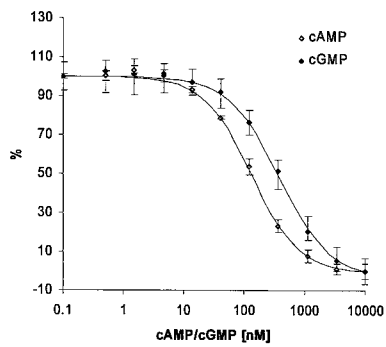
【図 1 2 G】



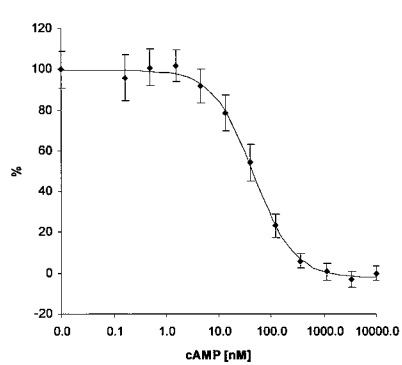
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 マティル ヒューゲ
スイス連邦 バーセル ファルクネストラッセ 1
(72)発明者 ロス ドリス
スイス連邦 バーセル スパレンウォルスタッツ 4 5

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特表2002-544493(JP, A)
特表2005-523439(JP, A)
特表2005-519618(JP, A)
国際公開第2006/093529(WO, A1)
特開2005-052143(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/542
G01N 21/78
G01N 33/53