

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4570870号
(P4570870)

(45) 発行日 平成22年10月27日(2010.10.27)

(24) 登録日 平成22年8月20日(2010.8.20)

(51) Int.Cl.

F 1

C07D 401/12	(2006.01)	C 07 D 401/12	C S P
C12Q 1/02	(2006.01)	C 12 Q 1/02	Z N A
C12Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q 1/68	A
G01N 33/15	(2006.01)	G 01 N 33/15	Z
G01N 33/50	(2006.01)	G 01 N 33/50	Z

請求項の数 21 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-512705 (P2003-512705)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月2日 (2002.7.2)
 (65) 公表番号 特表2005-501037 (P2005-501037A)
 (43) 公表日 平成17年1月13日 (2005.1.13)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2002/007364
 (87) 國際公開番号 WO2003/006988
 (87) 國際公開日 平成15年1月23日 (2003.1.23)
 審査請求日 平成17年5月20日 (2005.5.20)
 (31) 優先権主張番号 01202689.4
 (32) 優先日 平成13年7月13日 (2001.7.13)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 390033008
 ジヤンセン・ファーマシューチカ・ナーム
 ローゼ・フェンノートシャツブ
 JANSSEN PHARMACEUTI
 CA NAAMLOZE VENNOOT
 SCHAP
 ベルギー・ビー-2340-ビールセ・ト
 ウルンホウトセベーグ30
 (74) 代理人 110000741
 特許業務法人小田島特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管安全性アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

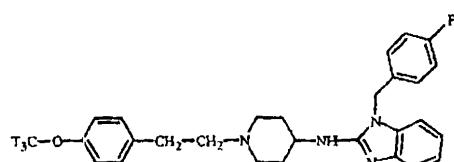
【請求項 1】

個体に心不整脈を誘導し得る化合物をスクリーニングする方法であつて：

a) H E R G またはその断片を含む供給源を；

i) 式 (I I I)

【化 1】



10

III

の放射能標識されたアステミゾール、および

i i) 该方法により心不整脈誘導能が評価される化学的に定められた分子、
 とインキュベーションし；そしてb) H E R G に結合する該アステミゾールの量に及ぼす該分子の効果を測定する、
 ことを含んでなる上記方法。

【請求項 2】

H E R G を含む供給源が：

20

i) 配列番号 2 の配列に少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する H E R G ポリペプチドまたはその断片を形成する单離され、そして精製されたタンパク質；
 ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる H E R G ポリペプチドまたはその断片を形成する单離され、そして精製されたタンパク質；
 iii) 表面に H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞；または
 iv) 表面に H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物
 、
 からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

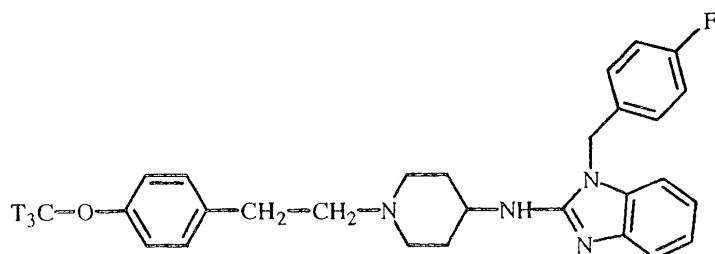
【請求項 3】

H E R G を含む供給源が、表面に配列番号 2 からなる H E R G ポリペプチドチャンネル 10 を発現する細胞の膜調製物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

式 (I I I)

【化 4】



III

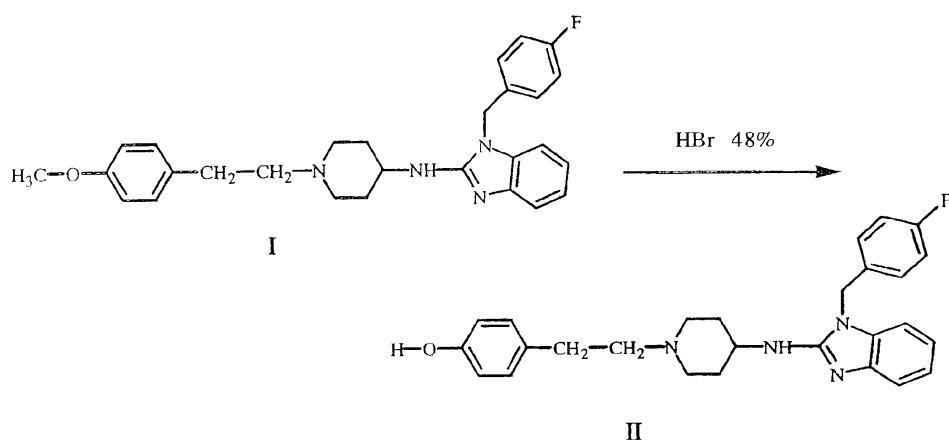
の放射能標識されたアステミゾール。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の放射能標識されたアステミゾールの製造方法であって：

a) 適当な試薬を使用して式 (I) のアステミゾールを脱メチル化し

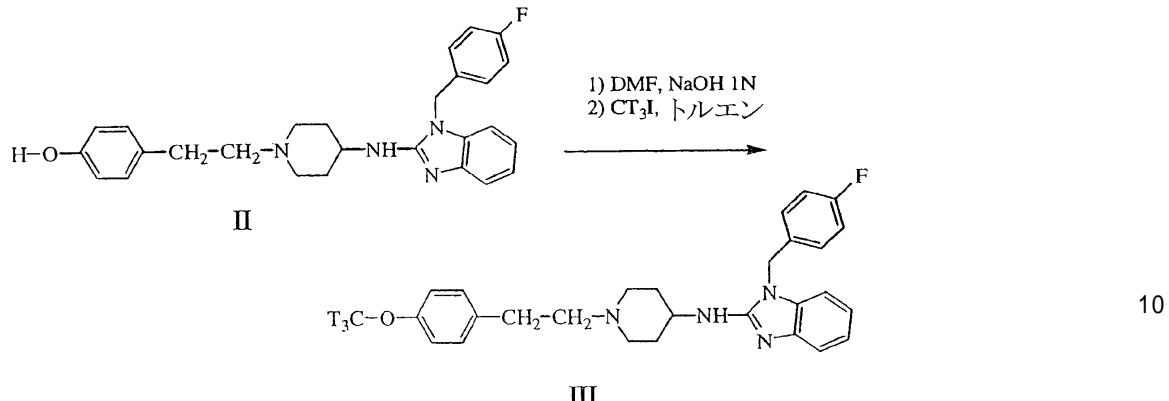
【化 5】



；そして

b) 式 (I I) の中間体を、場合により反応に不活性な溶媒中で、そして塩基の存在下で [3 H³] - メチルヨージド (C T₃ I) と反応させる、

【化6】



ことを特徴とする上記方法。

【請求項6】

個体に心不整脈を誘導し得る化合物をスクリーニングする方法であって；

a) 表面に配列番号2の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するHERGポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物を、請求項4に記載の放射能標識されたアステミゾールと、該アステミゾールのHERGポリペプチドチャンネルへの結合を可能とする十分な時間接触させ；

20

b) 表面に配列番号2の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するHERGポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物を、該方法により心不整脈誘導能が評価される化学的に定められた分子と一緒に工程a)の放射能標識されたアステミゾールと、該アステミゾールおよび該分子のHERGポリペプチドチャンネルへの結合を可能とする十分な時間接触させ；

c) 工程a)でHERGチャンネルへ結合した放射能標識されたアステミゾールの量を測定し；

d) 工程b)でHERGチャンネルへ結合した放射能標識されたアステミゾールの量を測定し；そして

e) 工程a)で測定したHERGチャンネルへ結合した放射能標識されたアステミゾールの量と、工程b)で測定したHERGポリペプチドチャンネルへ結合した放射能標識されたアステミゾールの量とを比較する、

30

ことを含んでなる上記方法。

【請求項7】

個体に心不整脈を誘導し得る化合物をスクリーニングする方法であって；

i) 該方法に参加することができる第1の標識で標識されたHERGおよび請求項4に記載の放射能標識されたアステミゾールと一緒に該方法により心不整脈誘導能が評価される化学的に定められた分子とを接触させ；

ii) 該HERGと該アステミゾールとの間の相互作用を、該HERGと該アステミゾールが相互作用する時の第1の標識と第2の標識の近接性により検出する、

40

ことを含んでなる上記方法。

【請求項8】

a) HERGを含む供給源；

b) 請求項4に記載の放射能標識されたアステミゾール、

を含んでなる個体に心不整脈を誘導し得る化合物をスクリーニングするためのキット。

【請求項9】

HERGを含む供給源が；

i) 配列番号2の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するHERGポリペプチドまたはその断片を形成する単離され、そして精製されたタンパク質；

ii) 配列番号2のアミノ酸配列含んでなるHERGポリペプチドまたはその断片を形成

50

する単離され、そして精製されたタンパク質；
 i i i) 表面に H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞；または
 i v) 表面に H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物
 、
 から選択される請求項 8 に記載のキット。

【請求項 1 0】

H E R G を含む供給源が、固体支持体に結合した単離され、そして精製された H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片である、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 1 1】

固体支持体が蛍光剤を含む固体支持体である請求項 1 0 に記載のキット。

10

【請求項 1 2】

H E R G を含む供給源が、配列番号 2 からなるアミノ酸配列を有する H E R G ポリペプチドチャンネルを表面に発現する細胞の膜調製物からなる、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 1 3】

上記細胞が H E K 2 9 3 細胞である請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

過剰な未結合の放射標識されたアステミゾールをインキュベーション混合物から除去する手段を場合により含んでなる、請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

分離手段が G F / B 濾過からなる請求項 1 3 に記載のキット。

20

【請求項 1 6】

請求項 1 に記載の方法における、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる H E R G またはその断片を形成する単離され、そして精製されたタンパク質の使用。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の方法における、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を表面に発現する細胞の使用。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の方法における、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を表面に発現する細胞の膜調製物の使用。

【請求項 1 9】

30

請求項 1 に記載の方法における、配列番号 2 からなるアミノ酸配列を有する H E R G ポリペプチドチャンネルを表面に発現する細胞の膜調製物の使用。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載の方法における、請求項 4 に記載の放射能標識されたアステミゾールの使用。

【請求項 2 1】

請求項 1 2 記載の方法における、標識されたアステミゾールの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

40

本発明は心血管の安全性アッセイの分野に関し、そして個体に心臓毒性 (cardio toxicity) を誘導する能力について試験化合物をスクリーニングするためのアッセイおよびキットを提供する。該アッセイおよびキットは、アステミゾール (astemizole) と H E R G カリウムチャンネルとの相互作用を、新規治療薬および他の作用物質の開発中に化合物の潜在的な心臓毒性を予測するために活用することができるという知見に基づく。本発明は化学化合物ライブラリーの高処理量スクリーニングに特に有利な用途がある。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

50

数種の薬剤は、心臓の再分極（すなわち、表面心電図の QT 間隔として「測定される」）を、特に過剰投与または薬物動態学的相互作用の場合に生命を脅かす可能性がある心室不整脈 (ventricular arrhythmias)、例えばトルサード・ド・ポワント (T d P) が起こり得る程度まで延長し得るという証拠が得られた。

【 0 0 0 3 】

T d P を起こす、または起こさずに QT 間隔の延長を誘導することが報告された薬剤の数は増え続けている（非特許文献 1）。50 種もの臨床的に利用可能な、または未だ調査用の非 - 心血管剤および心血管非 - 抗不整脈剤が関係してきた。新旧両方の多数の薬剤が市場から引き上げられ、またはその販売が制限された。中でも重要な事は、これらの薬剤を市場に出してから薬剤と QT 間隔の延長および / または T d P との関係が初めて認識されるまでに、通常、年で測定される間隔があることである。したがって新規な化学的物体の潜在的副作用を、それらが新規治療薬および / または他の作用物質として開発される初期段階で、ヒトに最初に使用する前に調査することは有益である。

10

【 0 0 0 4 】

新規治療薬の本開発における重要な要素は、化学化合物ライブラリーの高処理量スクリーニング (High Throughput Screening : HTS) からなる。製薬会社は構造的に異なる化合物の大きなコレクションを確立し、これが薬剤標的リード同定プログラム (drug target lead identification program) に関する出発点としての役を果たす。典型的な会社の化合物コレクションは現在、100,000 から 1,000,000 の間の別個の化学的物体を含んでなる。2 ~ 3 年前までは 1 日およびアッセイあたり数千の化合物の処理で十分であると考えられていたが、今日では製薬会社は 1 週間に数十万の化合物を試験する超高処理量スクリーニング技術を目標としている。典型的な HTS 関連スクリーニング形式では、アッセイは 96、384 または 1536 ウエルプレートのようなマルチ - ウエルマイクロプレート中で行われる。これらプレートの使用により、自動化試薬分配器およびロボットピペット装置の使用のような自動化が促進される。さらに組換えタンパク質のような生化学物質に関するサイクル時間、経費および資源を減らすために、HTS 関連スクリーニングは好ましくはアッセイで試験する各化合物について室温で 1 回の測定を行う。

20

【 0 0 0 5 】

リード評価プロセス (lead evaluation process) における決定的基準は、薬剤の QT 延長および / または T d P との潜在的関係の早期の認識となるだろう。しかし現在展開している HTS 技術において同定される多数の化合物にうまく対処することができる、心臓毒性を評価するために利用可能な信頼性があり迅速で容易なスクリーニング法は存在しない。本発明の目的は、アステミゾールと HERG カリウムチャネルとの相互作用を、新規治療薬および他の作用物質の開発中に化合物の心臓毒性を予測するために活用することができるという知見に基づくアッセイおよびキットを提供することにより、当該技術分野におけるこの問題を解決することである。

30

【 0 0 0 6 】

現在利用できるインピトロモデルは、ヘテロロガスな発現系、非凝集細胞、単離された組織および単離された完全な (Langendorff - 灌流) 心臓を含んでなる。すべてのモデルでカリウム電流遮断の効果は、微小電極または共焦点顕微鏡を使用した (非特許文献 2) 膜電位の 2 極電圧クランプ記録 (非特許文献 3) またはパッチ - クランプ記録 (非特許文献 4) を使用したいずれかのイオン電流の測定により評価される。前述のいずれの方法も実験手順の複雑さ、遅いサイクル時間および供給材料の性質 (すなわち、単離された組織およびそれらの非凝集細胞) ならびに試験結果の信頼性といった観点から HTS スクリーニングに使用することはできない。

40

【 0 0 0 7 】

驚くべきことには本発明者は、HERG チャネルの特異的リガンドとして標識したアステミゾールを使用した結合アッセイを、化合物と QT 延長および / または T d P との潜在的関係を予測するために使用できることを見いだした。この結合アッセイは前述の問題

50

を解決し、そしてHTS関連スクリーニング形式に展開することができる。

【0008】

同様のアッセイがChadwick C. et al (非特許文献5)により記載され、ここで[³H]-ドフェチリド(dofetilide)が心遅延整流性(cardiac delayed rectifier)K⁺チャンネルに特異的な放射能リガンドとして同定された。この文献ではさらに、多数の抗不整脈化合物のドフェチリド置換とカリウムチャンネル遮断活性との間の良好な相関を証明した。この結合アッセイは薬剤-チャンネル相互作用を分子レベルで特性決定するために役立つ。

【0009】

このアッセイで標識したドフェチリドは、分子あたり2個の³H-標識の包含をもたらす³H-交換によりジブロモ前駆体から調製された。分子あたりの³H-標識数と結合アッセイの感度との間には直接的な相関がある。本発明は、1分子のアステミゾールあたり3個の³H-標識の包含をもたらす[3³H]-メチルヨージドでの反応にデスマチルアステミゾール前駆体を使用するので、上記に優る改良された結合アッセイを提供する。このようにして得られた放射能リガンドの比活性は、[³H]-ドフェチリドの比活性よりも1.5~2倍高い。

【0010】

さらにドフェチリドアッセイは、モルモットのオス成体から単離した心室筋細胞が単離から6時間以内に使用しなければならなかつたことからもHTS関連スクリーニング形式に使用することはできなかつた。さらに36%の単離細胞が生存し、そしてこの結合アッセイに使用することができただけであった。HTS関連スクリーニングに使用するためには、出発材料が容易に、しかも十分な量で得られるべきである。本発明はHERGカリウムチャンネルを安定に発現しているHEK293細胞の膜調製物を使用するので、この問題を解決する。該細胞は培養中、十分な量で維持することができ、動物モデルの必要性および供給を回避し、そして細胞膜を結合アッセイに使用するので、これは後に使用するために-80で結合アッセイに即使用可能なアリコートとして保存することができる。Chadwick et al.により記載されたドフェチリド結合アッセイのさらなる欠点は、インキュベーションプロトコールと関係がある点である。生きている筋細胞を使用する時、インキュベーションは34の生理学的温度で行わなければならない。これはアッセイがHTS関連スクリーニング形式で行われる場合に、疑うことなくアッセイの経費、可能なサイクル時間、および複雑さを増す。驚くべきことには、本発明は膜調製物を室温でインキュベーションできることが証明されたので、この問題を解決する。特にHERGについて測定した動力学的特性が温度に顕著に依存し、そして差異が幾つかの報告で観察された差異は生理学的温度、すなわち35で試験を実施すると消失すると結論したZhou Z. et al. (非特許文献4)による実験を考慮する。

【0011】

本発明のこのおよび他の観点を本明細書で以下に記載する。

【非特許文献1】W. Haverkamp et al. (2000) Cardiov
ascular Research 47, 219-233)

【非特許文献2】Dall'Asta V. et al. (1997) Exp. Cel
l. Research 231, 260-268)

【非特許文献3】Dascal N. (1987) Crit. Rev. Biochem
22, 341-356)

【非特許文献4】Zhou Z. et al. (1998) Biophysical
Journal 74, 230-241

【非特許文献5】Chadwick C. et al., (1993) Circulat
ion Research, 72, 707-714)

【0012】

発明の要約：

本発明は、個体に心臓毒性を誘導する能力について試験化合物をスクリーニングするた

10

20

30

40

50

めのアッセイを提供し、該方法は H E R G またはその断片を含む供給源を、参照化合物および試験化合物と、参照化合物および試験化合物が H E R G ポリペプチドチャンネルに結合できる十分な時間インキュベーションし、そして H E R G に結合した参照化合物の量に及ぼす試験化合物の効果を測定することを含んでなる。

【 0 0 1 3 】

本発明の好適な態様では、アッセイは配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を表面に発現する細胞、好ましくは H E K 2 9 3 細胞の膜調製物を；標識した参照化合物とインキュベーションすることからなる。ここで該標識した参照化合物は、個体に心不整脈 (cardiac arrhythmia) を誘導することができる薬剤、好ましくは該標識した参照化合物は [³ H] - アステミゾールである。上記を試験化合物と一緒にインキュベーションし、そして H E R G ポリペプチドチャンネルへ結合した参照化合物の量に及ぼす試験化合物の効果を測定する。さらなる態様では、測定手段はインキュベーション混合物から過剰な未結合の標識した参照化合物を除去するための分離手段、および標識した参照化合物の検出手段からなり、ここで後者は好ましくはシンチレーションカウンティングを使用した放射能標識した測定からなる。

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに個体に心臓毒性を誘導する能力について化合物をスクリーニングするための高処理量アッセイを提供し、このアッセイは；

a) 表面に配列番号 2 の配列に少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物を、標識した参照化合物と、参照化合物の H E R G ポリペプチドチャンネルへの結合を可能とする十分な時間接觸させ；

b) 表面に配列番号 2 の配列に少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する H E R G ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物を、試験化合物と一緒に工程 a) の標識した参照化合物と、参照化合物および試験化合物の H E R G ポリペプチドチャンネルへの結合を可能とする十分な時間接觸させ；

c) 工程 a) で H E R G チャンネルへ結合した標識した参照化合物の量を測定し；

d) 工程 b) で H E R G チャンネルへ結合した標識した参照化合物の量を測定し；そして

e) 工程 a) で測定した H E R G チャンネルへ結合した標識した参照化合物の量と、工程 b) で測定した H E R G ポリペプチドチャンネルへ結合した標識した参照化合物の量とを比較することを含んでなる。

【 0 0 1 5 】

高処理量スクリーニングアッセイの好適な態様では、膜調製物は表面に配列番号 2 からなるアミノ酸配列によりコードされる H E R G ポリペプチドチャンネルを発現する細胞、好ましくは H E K 2 9 3 細胞に由来する。高処理量スクリーニングアッセイのさらなる態様では、標識した参照化合物はアステミゾール、好ましくは [³ H] - アステミゾールである。

【 0 0 1 6 】

また本発明は、化合物が個体に心臓毒性を誘導する能力をスクリーニングするためのキット、ならびに本発明のアッセイにおけるポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび適当な参照化合物を含む試薬の使用を包含する。

詳細な記述

本発明は心血管の安全性アッセイの分野に関し、そして個体に心臓毒性を誘導する能力について試験化合物をスクリーニングするためのアッセイおよびキットを提供する。該アッセイおよびキットは、アステミゾールと H E R G カリウムチャンネルとの相互作用を、新規治療薬および他の作用物質の開発中に化合物の心臓毒性を予測するために活用することができるという知見に基づく。本発明は化学化合物ライブラリーの高処理量スクリーニングに特に有利な用途がある。

【 0 0 1 7 】

10

20

30

40

50

本発明の1つの態様では、試験化合物をスクリーニングするためのアッセイは；a) H E R G またはその断片を含む供給源を、i) 参照化合物、ii) 試験化合物とインキュベーションし；そしてb) H E R G に結合した参照化合物の量に及ぼす試験化合物の効果を測定することを含んでなる。

【0018】

本発明の特別な態様では、アッセイは個体に心不整脈を誘導する試験化合物の能力を評価するために使用する。

【0019】

本明細書で使用する用語「試験化合物」は、心不整脈を誘導する能力が本発明によるアッセイで評価される化学的に定められた分子を称する。試験化合物には限定するわけではないが、薬剤、リガンド（天然または合成）、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド模造物、多糖、サッカリド、糖タンパク質、核酸、ポリヌクレオチドおよび低有機分子を含む。1つの態様では、試験化合物は化合物の既存ライブラリーを含んでなる。別の態様では、試験化合物は化合物の新規ライブラリーを含んでなる。

10

【0020】

本明細書で使用する用語「参照化合物」は、個体に心臓毒性を誘導することができる薬剤を称する。参照化合物には限定するわけではないが、アステミゾール、テルフェナジン（terfenadine）、エリスロマイシン（erythromycin）、スバルフロキサイン（sparfloxacin）、プロブコール（probucol）、テロジリン（terodilane）およびセルチンドール（sertindole）を含む。

20

【0021】

本明細書で使用する用語「H E R G」は、ヒトエーテル-ア-ゴー-ゴー-関連遺伝子（Human Ether-a-go-go-Related Gene）チャンネルを称する。これは多くの細胞型で作用電位の再分極の制御に役割を果たす遅延整流性カリウムチャンネルである。H E R G は元はヒト海馬からクローニングされ、そして心臓で強く発現する。本発明によるH E R G ポリペプチドには、配列番号2の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する単離され、そして精製されたタンパク質またはその断片を含む。さらなる態様では、本発明によるH E R G ポリペプチドチャンネルは配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるアミノ酸配列を有する。好適な態様では、本発明によるH E R G ポリペプチドは配列番号2からなる。

30

【0022】

定めた配列および断片の変異体も本発明の一部を構成する。変異体には保存的アミノ酸の変化により元の配列から変化した配列を含み、ここで「保存的アミノ酸の変化」は、特定のアミノ酸の当該技術分野で認識されている置換性に基づき、元の分子の生物学的活性に影響を及ぼすことなく元の配列の1以上のアミノ酸残基（1つまたは複数）の置換を称する（例えば、M. Dayhoff、タンパク質配列および構造の地図で（Atlas of Protein Sequence and Structure）、第5巻、追補3、第345～352頁、1987を参照にされたい）。さらなる変異体は数個、5～10、1～5、または1～2個のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、削除または付加されている変異体である。

40

【0023】

2以上の配列の同一性および類似性を比較するための方法は、当該技術分野では周知である。すなわち例えば、ワインコンシン配列分析パッケージ（Wisconsin Sequence Analysis Package）、第9.1バージョン（Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12, 387～395, 1984）で利用可能なプログラム、例えばプログラムBESTFITおよびGAPは、2つのポリヌクレオチド間の同一性の%、および2つのポリペプチド配列間の同一性の%および類似性の%を決定するために使用することができる。BESTFITはSmith and Waterman (J. Mol. Biol., 147, 195～197, 1981)の「ローカルホモロジー（local homology）」アルゴリズムを使

50

用し、そして2つの配列間の類似性が最高の1領域を見いだす。BESTFITは長さが異なる2つのポリヌクレオチドおよび2つのポリペプチド配列を比較するためにより適し、プログラムはより短い配列が長い配列の一部分を表すことを想定している。対照的にGAPは2つの配列を並べ、Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol., 48, 443~453, 1970) のアルゴリズムに従い「最大類似性」を見いだす。GAPはほぼ同じ長さの配列を比較するためにより適し、そして整列は全長にわたると期待される。好ましくは各プログラムで使用するパラメーター「ギャップ加重値」および「長さの加重値」は、それぞれポリヌクレオチド配列について50および3、そしてポリペプチド配列について12および4である。好ましくは同一性および類似性の%は、比較される2つの配列が最適に並列配置された時に決定される。配列間の同一性および/または類似性を決定するための他のプログラムも当該技術分野では既知であり、例えばそれはBLASTファミリーのプログラム (Altschul S F et al., Nucleic Acids Res., 25:3389~3402, 1997) である。

【0024】

当業者は本発明のポリペプチド、すなわちHERGポリペプチドチャンネルが例えばハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅、またはデノボDNA合成を含む複数の組換えDNA技術 (例えばT. Maniatis et al. モレキュラークローニング: アラボラトリーマニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2版、第14章 (1989)) により得ることができると認識するだろう。このようにさらなる態様では、本発明によるアッセイまたはキットでHERGポリペプチドまたはその断片をコードする単離され、そして精製されたポリヌクレオチドの使用を提供する。別の態様では本発明は、配列番号1のポリヌクレオチド配列を含んでなるHERGポリペプチドチャンネルまたはその断片をコードする単離され、そして精製されたポリヌクレオチドの使用を提供する。好適な態様では、本発明は配列番号1のポリヌクレオチド配列からなるHERGポリペプチドチャンネルをコードする単離され、そして精製されたポリヌクレオチドの使用を提供する。

【0025】

用語「その断片」は、該断片が元のタンパク質中で連続する5以上のアミノ酸を含んでなるよう、あるいは該断片が元のポリヌクレオチド中で15以上の核酸を含んでなるよう、配列が本明細書に開示されたタンパク質またはポリヌクレオチド分子の一片 (a piece) またはサブ領域を記載する。用語「その断片」は「機能的断片」を含むことを意図し、ここで単離された断片、片またはサブ領域は、受容体タンパク質の活性部位、結合部位またはリン酸化部位のような機能的に明らかな領域を含んでなる。機能的断片はクローニング技法により生産することができ、あるいは選択的スプライシング技法の天然産物としてでもよい。

【0026】

本明細書で使用する「単離された」とは、問題のポリヌクレオチド、タンパク質およびポリペプチドまたはそれらの各断片がそのインビボの環境から取り出されたので、当業者により、限定するわけではないがシークエンシング、制限消化、部位特異的突然変異誘発法および核酸断片用の発現ベクターへのサブクローニングのような操作にかけられ、そして問題のタンパク質またはタンパク質断片を、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、アミノ酸シークエンシングおよびペプチド消化を行うための好機を与えるに十分な量で得られる、という事実を指す。したがって本明細書に記載する核酸は、全細胞または細胞溶解物で、または部分的に、実質的に、または全部が精製された状態で存在することができる。

【0027】

ポリペプチドは環境的混入物から精製された時に「精製された」と考えられる。すなわち細胞から単離されたポリペプチドは、標準法により細胞の成分から精製された時に実質的に精製されたと考えられるが、化学的に合成されたポリペプチド配列は、その化学的前

10

20

30

40

50

駆体から精製された時に実質的に精製されたと考えられる。「実質的に純粋」なタンパク質または核酸は、典型的にはサンプルの少なくとも 85 %を構成し、より大きな割合が好ましい。タンパク質または核酸分子の純度を決定する 1 つの方法は、ポリアクリルアミドまたはアガロースのようなマトリックス中で調製物を電気泳動することによる。純度は染色後に単一バンドの出現により証明される。純度を評価する他の方法にはクロマトグラフィーおよび分析的遠心を含む。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用する用語「結合を可能にする十分な時間」とは、HERG ポリペプチドチャンネルに結合した標識した参照化合物の検出可能な量を生じるために必要な時間を称する。この検出可能な量を生じるために必要な時間は、アッセイ系に依存して変動するだろう。当業者はアッセイ系に基づき HERG ポリペプチドチャンネルに結合する標識した参照化合物の検出可能な量を生じるために十分な時間の量を知っている。

アッセイ

本発明のアッセイは、ポリペプチドチャンネルに結合する化合物をスクリーニングするために当該技術分野で一般的に知られている多くの形式で設計することができる。

【 0 0 2 9 】

本発明のアッセイは、アステミゾールと HERG カリウムチャンネルとの相互作用を、新規治療薬および他の作用物質の開発中に化合物の心臓毒性を予測するために活用することができるという事実を有利に活用する。

【 0 0 3 0 】

したがって本発明は試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供し、このアッセイは a) HERG またはその断片を含む供給源を； i) 参照化合物、 i i) 試験化合物とインキュベーションし；そして b) HERG に結合した参照化合物の量に及ぼす試験化合物の効果を測定することを含んでなる。

【 0 0 3 1 】

本発明の第 1 の態様では、 HERG を含む供給源が配列番号 2 の配列に少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する HERG またはその断片をコードする単離され、そして精製されたタンパク質である。

【 0 0 3 2 】

本発明の第 2 の態様では、 HERG を含む供給源が配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる HERG またはその断片をコードする単離され、そして精製されたタンパク質である。

【 0 0 3 3 】

本発明のさらなる態様では、 HERG を含む供給源が表面に HERG ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞である。

【 0 0 3 4 】

本発明の別の態様では、 HERG を含む供給源は表面に HERG ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物である。

【 0 0 3 5 】

本発明の別の態様では、参照化合物は個体に心臓毒性を誘導することができる化合物であり、好ましくはアステミゾール、テルフェナジン、エリスロマイシン、スバルフロキサイン、プロブコール、テロジリンおよびセルチンドールからなる群から選択される。好適な態様では、参照化合物はアステミゾールである。本発明のさらなる目的は、参照化合物が標識され、好ましくは放射能標識されたアッセイを提供することである。

【 0 0 3 6 】

好適な態様では、個体に心臓毒性を誘導する能力について試験化合物をスクリーニングするためのアッセイは、 a) 表面に配列番号 2 からなるアミノ酸配列によりコードされる HERG ポリペプチドチャンネルを発現する細胞の膜調製物を、 i) [³ H] - アステミゾール、 i i) 試験する化合物とインキュベーションし；そして HERG に結合した参照化合物の量に試験化合物が及ぼす効果を測定することからなる。参照化合物の標識はこ

10

20

30

40

50

の効果を測定するために使用し、ここで該標識はとりわけシンチレーションカウンティングを使用して測定することができる。

【0037】

本発明によるアッセイの特別な態様は、試験化合物をスクリーニングするための高処理アッセイからなり、このアッセイは：a) 表面に配列番号2の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するHERGポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物を、標識した参照化合物と、参照化合物のHERGポリペプチドチャンネルへの結合を可能とする十分な時間接触させ；b) 表面に配列番号2の配列に少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するHERGポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物を、試験化合物と一緒に工程a)の標識した参照化合物と、参照化合物および試験化合物のHERGポリペプチドチャンネルへの結合を可能とする十分な時間接触させ；c) 工程a)でHERGチャンネルへ結合した標識した参照化合物の量を測定し；d) 工程b)でHERGチャンネルへ結合した標識した参照化合物の量を測定し；そしてe) 工程a)で測定したHERGチャンネルへ結合した標識した参照化合物の量と、工程b)で測定したHERGポリペプチドチャンネルへ結合した標識した参照化合物の量とを比較することを含んでなる。

【0038】

さらなる態様では、高処理量スクリーニングアッセイの膜調製物は配列番号2のアミノ酸配列を含んでなるHERGポリペプチドチャンネルまたはその断片を表面に発現する細胞の膜調製物からなる。

【0039】

本発明の好適な態様では、高処理量スクリーニングアッセイの膜調製物は配列番号2のアミノ酸配列からなるHERGポリペプチドチャンネルを表面に発現する細胞、好ましくはHEK293細胞の膜調製物からなる。

【0040】

さらなる好適な態様では、高処理量スクリーニングアッセイにおける標識した参照化合物は [³H] - 標識アステミゾールからなる。該標識はとりわけシンチレーションカウンティングを使用して測定することができる。

【0041】

別の特別な態様では、本発明は試験化合物をスクリーニングするための高処理量近接検出アッセイを提供し、アッセイは；

i) 近接検出アッセイに参加することができる第1標識で標識したHERG；
 ii) 近接検出アッセイに参加することができる第2標識で標識した参照化合物；
 iii) 工程i)のHERGおよび工程ii)の参照化合物を試験化合物と一緒に、参照化合物および試験化合物のHERGへの結合を可能とする十分な時間接触させ；そして
 iv) 工程i)のHERGと工程ii)の参照化合物との間の相互作用を、HERGおよび参照化合物が相互作用した時に第1標識と第2標識の近接により検出することを含んでなる。

【0042】

HERGおよび参照化合物の相互作用によりもたらされる第2標識への第1標識の近接は、検出可能なシグナルの生成を生じる。これは例えばシンチレーション近接アッセイ (scintillation proximity assay: SPA) 系により達成することができ、ここで標識の1つはSPAでの使用に適する放射能標識であり、そしてもう1つの標識は固相中に含まれる蛍光剤である。検出可能なシグナルは、標識したHERGタンパク質が標識した参照化合物と相互作用し、放射能標識が蛍光剤の十分近くに運ばれた時に発生する光エネルギーである。シンチレーション近接アッセイ技法は、米国特許第4,568,649号明細書に記載されている。

【0043】

あるいは検出可能なシグナルは存在しているシグナル出力、例えば蛍光の変化でもよい。蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence resonance energy

10

20

30

40

50

gy transfer : FRET) はこの原理で作用する方法であり、そして Tsien R. et al. (Tsien R. et al. (1993) Trends Cell Biol. 3: 242 - 245) により記載されている。これは 2 種類の蛍光分子、供与体および受容体を採用して、これらが互いに十分に近接した時、供与体分子の蛍光が受容体分子により吸収され、そして別の波長の光が発生する。すなわち HERG と参照化合物のように 2 つの分子間に相互作用がある時、その各々はこれら蛍光分子の 1 つで標識され、検出可能なシグナルが生成する。

【0044】

上に記載したそのような近接アッセイにより、本発明によるスクリーニングアッセイは 1 段階で、すなわち濾過のような分離手段を使用してインキュベーション混合物から過剰な標識した参照化合物を除去する分離工程を必要とせずに行うことができる。

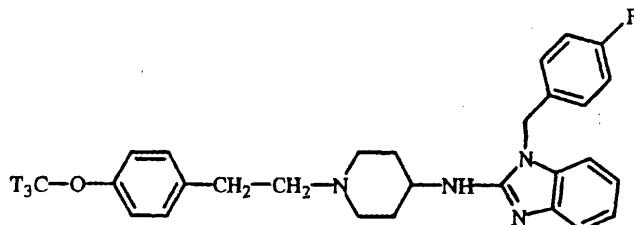
10

【0045】

高処理量近接検出アッセイの好適な態様では HERG を、コートされたシンチレーション近接アッセイビーズのような固体相に含まれる蛍光剤で標識し、そして参照化合物を放射能標識し、好ましくは参照化合物は式 (III) のアステミゾールである。

【0046】

【化1】



20

III

【0047】

当業者はアステミゾールと HERG の結合が :

a) HERG ポリペプチドチャンネルとアステミゾールとの結合部位の構造にプローブを 30 付け ;

b) 結合中にアステミゾールと相互作用する HERG ポリペプチドチャンネルの結合部位の接触する原子を同定し ;

c) (b) で同定した原子と相互作用する試験化合物を設計して HERG - アステミゾール相互作用に影響を及ぼし ; そして

d) 該設計した試験化合物を、 HERG またはその断片を含む供給源と接触させて、該化合物が HERG へ結合した標識したアステミゾールの量に影響を与える能力を測定する、ことにより、前述の結合に影響を及ぼす化合物の構造に基づく、または合理的な設計法に使用することもできると容易に考えるだろう。

【0048】

さらにこれは通常、反復法になると考えられる。

40

キット

本発明は上記アッセイに使用することができるキットも提供する。1 つの態様では、キットは a) HERG を含む供給源 ; b) 参照化合物を含んでなる。

【0049】

第 1 の態様では、キットは ; i) 配列番号 2 の配列に少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を有する HERG またはその断片をコードする単離され、そして精製されたタンパク質 ; ii) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含んでなる HERG またはその断片をコードする単離され、そして精製されたタンパク質 ; iii) 表面に HERG ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞 ; または iv) 表面に HERG ポリペプチドチャンネルまたはその断片を発現する細胞の膜調製物から選択される HERG を含む供給源を含

50

んでなる。

【0050】

さらなる態様では、キットはアステミゾール、テルフェナジン、エリスロマイシン、スバルフロキサイン、プロブコール、テロジリンおよびセルチンドールからなる群から選択される参照化合物を含んでなる。好適な態様では、参照化合物はアステミゾールである。本発明のさらなる目的は、参照化合物が標識され、好ましくは放射能標識されたキットを提供することである。

【0051】

特別な態様では、単離され、そして精製されたH E R G ポリペプチドチャネルが固体支持体、好ましくはコートされたシンチレーション近接ビーズのような固体支持体を含んでなる蛍光剤に結合している。

10

【0052】

このように特別な態様では、キットは a) 固体支持体に結合した単離され、そして精製されたH E R G ポリペプチドチャネルまたはその断片；および b) 標識した参照化合物を含んでなる。好ましくはこの特別な態様は a) 固体支持体を含んでなる蛍光剤に結合した、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる単離され、そして精製されたH E R G ポリペプチドチャネル；および b) 放射能標識した参照化合物、好ましくは [³ H] - 標識したアステミゾールを含んでなるキットからなる。

【0053】

別の特別な態様では、キットは a) 表面に配列番号 2 の配列からなるH E R G ポリペプチドチャネルを発現する細胞、好ましくはH E K 2 9 3 細胞の膜調製物、 b) [³ H] - 標識したアステミゾール；および c) H E R G に結合した標識した参照化合物の量を測定する手段を含んでなる。

20

【0054】

測定手段は、過剰な未結合の標識した参照化合物をインキュベーション混合物から除去するための分離手段および標識した参照化合物の検出手段からなる。当業者は過剰な未結合の標識した参照化合物をインキュベーション混合物から除去するために利用できる分離手段を知っている。該分離手段には限定するわけではないが、磁気ビーズ、遠心技術および濾過技術を含む。標識した参照化合物の検出手段は、使用する標識に依存する。該標識は蛍光または放射能標識である。熟練者は使用する標識に依存して利用できる検出手段を知っている。

30

【0055】

特別な態様では、分離手段はG F / B 濾過（ワットマン（W h a t m a n ）社、クリフトン、ニュージャージー州）からなる。別の特別な態様では、検出手段はT o p c o u n t（パックカード（P a c k a r d ）、メリデン、コネチカット州）でのシンチレーションカウンティングからなる。

【0056】

さらなる態様では、本発明のキットはさらにアッセイを行うための使用説明書および/またはマルチウェルプレートを含んでなる。

40

【0057】

本発明は以下の実施例の詳細を参照にしてより良く理解されると思われるが、当業者はこれらが特許請求の範囲をより完全に記載するような本発明の具体的説明のみであると容易に理解するだろう。さらに本出願を通じて、さまざまな刊行物を引用する。これら刊行物の開示は引用により本出願に編入し、本発明が関係する当該技術分野の状況をより完全に説明する。

【実施例 1】

【0058】

D N A 構築物およびH E K 2 9 3 細胞のトランスフェクション

H E R G c D N A (G e n b a n k 寄託番号 : U 0 4 2 7 0 (配列番号 1)) を p c D N A 3 ベクター (インビトロゲン (I n v i t r o g e n)) の b a m H I / E c o R

50

I部位にサブクローン化した。このベクターはCMVプロモーターおよびSV40プロモーターを含み、これらはそれぞれ挿入されたcDNA(HERG)およびネオマイシン耐性遺伝子の発現を駆動する。HEK293細胞はこの構築物を用いてリン酸カルシウム沈殿法(ギブコ(Gibco))またはリポフェクタミン法(ギブコ)によりトランスフェクトした。800μg/mlジェネティシン(G418;ギブコ)で15~20日間選択した後、単一コロニーをクローニングシリンドーで取り出し、そしてHERG電流について試験した。安定にトランスフェクトされた細胞は10%ウシ胎児血清および400μg/mlジェネティシンを補充した最少必須培地(EMEM)で培養した。

【0059】

電気生理学的実験のために、細胞を培養皿からトリプシン処理により回収し、標準EMEM培地で2回洗浄し、そしてポリ-L-リシンをコートした小さいペトリ皿にまいた。実験は細胞をまいてから1~2日後に行った。

10

【実施例2】

【0060】

HERGカリウムチャンネルで安定にトランスフェクトされたHEK293細胞の膜調製物 HERGチャンネルcDNAで安定にトランスフェクトされたHEK293細胞は、10%ウシ胎児血清および抗生素質を濃縮したDMEEM培養基で成長させた。集めた細胞はTris-HCl 50mM pH7.4中でUltraturraxホモジナイザーを使用して均一化し、そしてホモジネートを10分間、23,500×gでSorval遠心機中で遠心した。細胞膜は、再-均一化および再遠心により1回洗浄した。膜をTris-HCl 50mM pH7.4に懸濁し、アリコートに分け、そして-80で保存した。

20

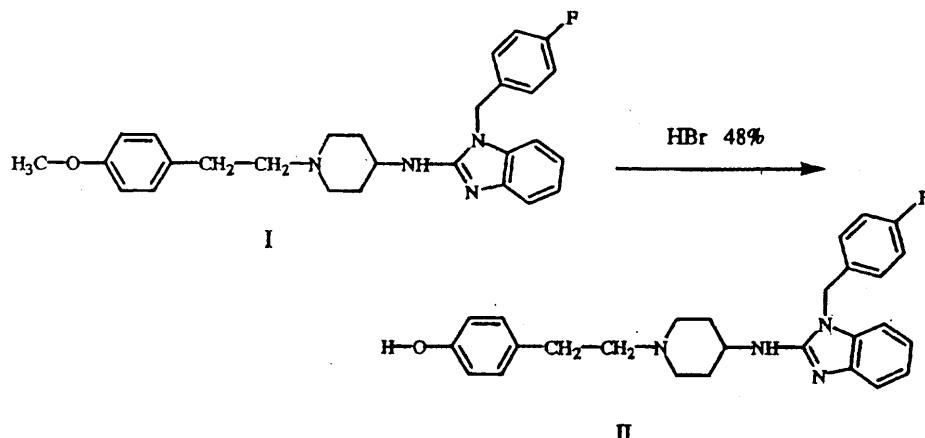
【実施例3】

【0061】

アステミゾールの放射能標識

【0062】

【化2】



30

【0063】

4.6gのアステミゾール(I)(10ミリモル)の溶液(80mlの48%の臭化水素酸水溶液中)を攪拌し、そして2時間還流した。反応混合物を室温に冷却し、そして形成した沈殿を濾過し、そして水で洗浄した。固体をN,N-ジメチルホルムアミド(20ml)および水(20ml)の混合物に溶解し、そして混合物は濃水酸化アンモニウム水溶液をゆっくりと攪拌しながら加えることによりアルカリ性とした。次に水(100ml)を加え、そして混合物を1時間攪拌した。沈殿を濾過し、そして18時間風乾して、デスマチルアステミゾール(II)を得た。

40

【0064】

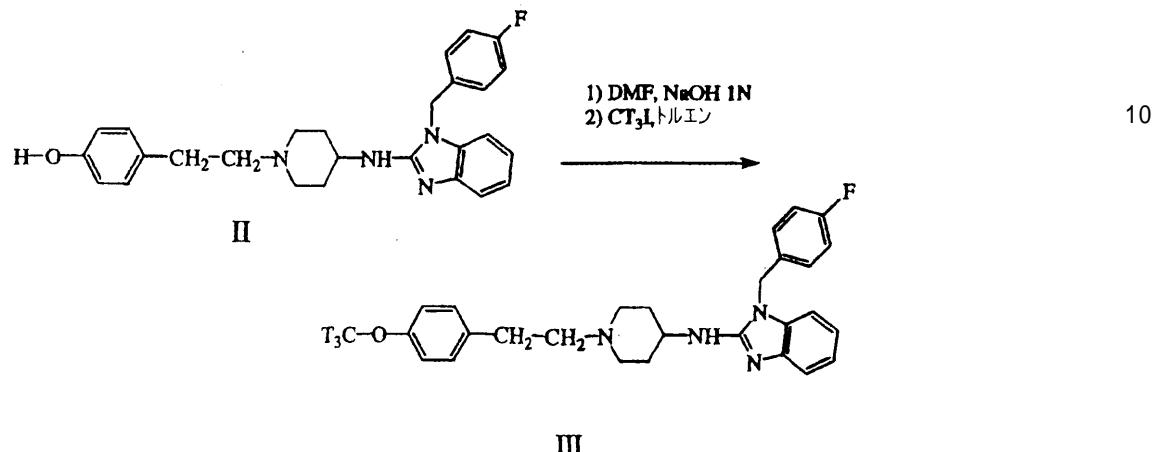
この量から画分を取り、そしてHyperesyl ODS(5μm)結合相のステンレス

50

鋼カラム (7.1 mm ID × 300 mm) での調製用 HPLC を介して数部に分けて徹底的に精製してアステミゾールを含まないデスマチルアステミゾールを得た。検出は 282 nm で行い、そして溶出は 4.0 ml / 分の流速でアセトニトリル - 水 - ジイソプロピルアミン (56:44:0.2、容量 / 容量) を用いてイソクラティックに行った。

【0065】

【化3】



【0066】

HPLC 精製デスマチルアステミゾール (II) (26.7 mg、60マイクロモル) の画分を N, N-ジメチルホルムアミド (1.0 ml) に溶解した。この溶液に 1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (60 μl、60マイクロモル) を加えた。混合物を室温で 25 分間攪拌し、そしてトルエン中で前冷却した (-78) [³H] - メチルヨージド (370 MBq) 溶液に滴下した。反応混合物をボルテックスで混合し、そして次に冷却せずに 3 時間静置した。トルエンを 40 の水浴上で吸引圧にて反応混合物から蒸発させ、そして残渣は上記のように数部に分けて調製用 HPLC を介して精製した。画分を含む生成物を合わせ、そして 70 ml にメタノールでデプレート (deplete) させて、198 MBq の全放射活性および 3.14 TBq / ミリモル (85 Ci / ミリモル) の比活性を有する [³H] - アステミゾール (III) を得た。

【実施例 4】

【0067】

放射能リカンド結合アッセイ

膜は解凍し、そしてインキュベーションバッファー (Hepes 10 nM pH 7.4、40 mM KCl、20 mM KH₂PO₄、5 mM MgCl₂、0.5 mM KHC₂O₃、10 mM グルコース、50 mM グルタメート、20 mM アスパルテート、14 mM ヘプタン酸、1 mM EGTA、0.1% BSA) で再度、均一化し、そして 20 ~ 100 μg タンパク質を [³H] - アステミゾールと 25 で 60 分間、競合剤の存在下または不存在下でインキュベーションし、続いて Filtrate 40 96 回収器 (パッカード、メリデン、コネチカット州) を使用して GF/B フィルター上で迅速に濾過した。フィルターを氷冷したリンスバッファー (Tris-HCl 25 mM pH 7.4、130 mM NaCl、5.5 mM KCl、5 mM グルコース、0.8 mM MgCl₂、50 μM CaCl₂、0.1% BSA) で徹底的にすすいだ。フィルターに結合した放射活性は Topcount (パッカード、メリデン、コネチカット州) でシンチレーションカウンティングにより測定し、そして結果を 1 分あたりのカウント (cpm) として表した。

【0068】

最初に非特異的結合を測定するためのバッファー、放射能リガンドおよび化合物を含む種々のパラメーターを、至適条件を選択するために調査した。飽和結合実験では、[³H

20

30

40

50

] - アステミゾールの濃度を上げながら膜とインキュベーションし、バッファー中に再懸濁した。非特異的結合は、 $10 \mu M$ 66204 の存在下で測定した(図1)。

【0069】

インキュベーションバッファー中に存在する BSA および / またはシクロデキストリン、および実験前に化合物を添加する様々な方法の効果は、22種の参照化合物の結合親和性を電気生理学的データと比較することにより調査した。化合物を DMSO に溶解し、そして Multi probe II ピペットティングステーション(パッカード、メリデン、コネチカット州)を使用して同じ溶媒でさらに希釈した。すべての実験で最終的な DMSO 濃度は 1 % であった。この分析から化合物は DMSO ストック溶液から直接加えることができると思われる。BSA および / またはシクロデキストリンの添加により化合物の溶解性を上げる試みは、相関を有意に向上させなかった。

10

【実施例5】

【0070】

全 - 細胞電圧クランプ技法(パッチクランプ)

溶液：浴溶液は(mM で) 150 NaCl、4 KCl、5 グルコース、10 HEPES、1.8 CaCl₂ および 1 MgCl₂ (NaOH で pH 7.4 にした) を含んだ。ピペット溶液は(mM で) 120 KCl、5 EGTA、10 HEPES、4 MgATP、0.5 CaCl₂ および 2 MgCl₂ (KOH で pH 7.4 にした) を含んだ。化合物は DMSO に溶解して 10^{-2} M または 10^{-1} M のストック溶液を得た。対照(= 浴溶液 + DMSO) および試験溶液(= 浴溶液 + DMSO + 試験する化合物)は、0.3%、0.1% または 0.03% DMSO を含んだ。試験および対照溶液は Y - 管系を使用して実験中の細胞に適用し、実験中の細胞に接近して溶液を迅速に交換した(0.5 秒未満)。

20

電気生理学的測定：HERG を発現する付着した HEK293 細胞を含むペトリ皿を、パッチクランプタワー(Patch Clamp Tower)の台に固定した。倒立顕微鏡を使用して細胞を観察した。ペトリ皿は室温で浴溶液を一定に灌流した。

【0071】

パッチピペットはさらに火で仕上げることなく水平フラミング / ブラウン(Flaming / Brown)マイクロピペットラーを使用してホウ珪酸ガラスキャピラリーから引いた。使用した微小電極はピペット溶液を充填した時、1.5 から 3 M の間の入力抵抗を有した。

30

【0072】

細胞の膜電流は EPC - 9 パッチクランプ増幅器によりパッチクランプ技術を用いて明確な膜電位で測定した。データを得、そして Pulse and Pulse fit (HEKA)、Data Access (Bruylants) および Igor (Wavemetrics) プログラムを使用して分析した。電流シグナルはロー - パスフィルターにかけ、そして繰り返してデジタル化した。液間電位差は密閉を確立する前に電気的に正した。膜を破壊した後、細胞の電気容量および一連の抵抗は EPC - 9 パッチクランプ増幅器の回路を使用して補正した。

【0073】

保持電位は -80 mV であった。HERG 電流(K^+ - 選択的な外側電流) は、+60 mV に対して 2 秒間、脱分極した後、-40 mV で最大の末尾電流(tail current) として測定した。パルスサイクリングレイト(pulse cycling rate) は 15 秒であった。各試験パルスの前に、短いパルス(0.5 秒) を保持電位から -60 mV に与えて漏電を測定した。全 - 細胞の立体配置を確立した後、5 分間の平衡期間によりピペット溶液で細胞の内部灌流を可能とした。その後、試験パルスを 5 分間与えて制御された条件下での HERG 電流を定量した。パルスプロトコールを続行している間、灌流を対照溶液から薬剤含有溶液に切り替えた。薬剤の効果は薬剤の添加から 5 分後に測定した。細胞あたり 1 ~ 3 種の薬剤濃度を試験した(累積的に適用した)。

40

測定のパラメーター分析：HERG 電流は -80 mV の保持電流から始めて +60 mV に対して 2 秒間、脱分極した後、-40 mV で最大の末尾電流として測定した。

50

【0074】

対照溶液の存在下で測定した最初の5分間に、H E R G - 媒介膜K⁺電流の振幅は時間とともに次第に低下した（ラン - ダウン）。化合物による遮断の程度を正確に定量するために、この連続的なK⁺電流のラン - ダウンを考慮しなければならない。したがってK⁺電流のタイムコース（-40mVで測定）を対照溶液中で最初の5分間にに対して指数的に合わせ、そして残りの実験については外挿した。これらの外挿は、薬剤が与えられなかつた場合に予想される電流の振幅を与える。化合物による遮断の程度を決定するために、測定された電流の比率は、各々の測定された電流の振幅を同時点で合つた電流の値で割ることにより算出した。

【実施例6】

10

【0075】

結合アッセイの薬物動態学的評価

結合アッセイの薬物動態学的評価のために、322種の化合物をそれらが[³H] - アステミゾールのH E R G チャンネルへの結合を阻害する能力について8種の濃度で試験し、そしてp I C₅₀ - 値を非 - 線型回帰分析により算出した。p I C₅₀ 値が利用できる場合、結合およびパッチクランプに関して効力の順位（スペルマン（Spearman））を比較した。

【0076】

パッチクランプアッセイで化合物が4つの濃度未満でのみ試験された場合、スコアは以下の基準に従い結合 - およびパッチクランプデータの両方に割り当てた：

20

スコア1 : 10⁻⁶ M以上でp I C₅₀ < 6 または遮断% < 50%

スコア2 : 10⁻⁶ から 10⁻⁸ Mの間で 6 から 8 の間のp I C₅₀ または遮断% < 50%

スコア3 : 10⁻⁸ 以下でp I C₅₀ > 8 または遮断% > 50%

42種の参照化合物がH E R G チャンネルから[³H] - アステミゾール結合を置換する効力の順位は、遅延整流性K⁺電流の急激な活性化の機能的遮断について、電気生理学的データとよく相關する（r_{s p} = 0.87）（図2）。

【0077】

試験した化合物の94%について、結合データはパッチクランプデータと相關する。2%の場合で、結合アッセイスコアがパッチクランプアッセイよりも高く、そして残る4%については反対であり、すなわちパッチクランプアッセイのスコアが結合アッセイよりも高い。

30

【0078】

結合データと電気生理学的データとの間のこの良好な相關から見て、放射能標識リガンド結合アッセイは潜在的な心血管副作用を予測するために最初のスクリーニングツールとして使用できると結論することができる。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1A - B】図1AはH E R G チャンネルc D N Aで安定にトランスフェクトしたH E K 2 9 3 細胞の細胞膜調製物に対する[³H] - アステミゾールの飽和結合を示す。T Bは測定された全結合を表し、N S Bは測定された非特異的結合を表し、そしてS Bは測定された特異的結合を表す。図1Bは飽和結合実験に関するスキヤッチャード（S c a t c h a r d）分析を示す。適合した線から、3.07 ± 2.26 n M (n = 11) のK_Dを、3260 ± 900 f m o l / m g タンパク質のB_{m a x}（最大結合）を用いて決定できた（n = 11）。

40

【図2】電気生理学的パッチクランプデータと比べた42種の参照化合物の結合親和性を示す。0.87のスピアルマン（Spearman）順位相関係数を得ることができた。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Pharmaceutica NV
 <120> Cardiovascular Safety Assay
 <130> Cardiovascular Safety Assay
 <140>
 <141>
 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1 10
 <211> 4070
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (184)..(3663)
 <300>
 <301> Warmke, J. W.
 <302> Human putative potassium channel subunit (h-erg) mRNA,
 complete cds.
 <308> GenBank / U04270
 <309> 1993-12-09
 <313> 1 TO 4070
 <400> 1 20
 acgcggcctg ctcaggcctc cagcggccgg tccggagggga ggcgggagggc gagcggaggac 60
 ccgcgcggcgc agtccagttt gtgcgcgcgc gtgcctcggtt ggcgcgggtgc gggaccagcg 120
 ccggccaccc gaagcctagt gcgtcgccgg gtgggtgggc ccgcggcgcc ccatgggctc 180
 agg atg ccg gtg cgg agg ggc cac gtc gcg ccg cag aac acc ttc ctg 228
 Met Pro Val Arg Arg Gly His Val Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 gac acc atc atc cgc aag ttt gag ggc cag agc cgt aag ttc atc atc 276
 Asp Thr Ile Ile Arg Lys Phe Glu Gly Gln Ser Arg Lys Phe Ile Ile
 20 25 30
 gcc aac gct cgg gtg gag aac tgc gcc gtc atc tac tgc aac gac ggc 324
 Ala Asn Ala Arg Val Glu Asn Cys Ala Val Ile Tyr Cys Asn Asp Gly
 35 40 45
 ttc tgc gag ctg tgc ggc tac tcg cgg gcc gag gtg atg cag cga ccc 372
 Phe Cys Glu Leu Cys Gly Tyr Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Pro
 50 55 60
 tgc acc tgc gac ttc ctg cac ggg cgg cgc acg cag cgc cgc gct gcc 420
 Cys Thr Cys Asp Phe Leu His Gly Pro Arg Thr Gln Arg Arg Ala Ala
 65 70 75
 gcg cag atc gcg cag gca ctg ctg ggc gcc gag gag cgc aaa gtg gaa 468
 Ala Gln Ile Ala Gln Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg Lys Val Glu
 80 85 90 95

atc gcc ttc tac cgg aaa gat ggg agc tgc ttc cta tgt ctg gtg gat Ile Ala Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Cys Phe Leu Cys Leu Val Asp 100 105 110	516	
gtg gtg ccc gtg aag aac gag gat ggg gct gtc atc atg ttc atc ctc Val Val Pro Val Lys Asn Glu Asp Gly Ala Val Ile Met Phe Ile Leu 115 120 125	564	
aat ttc gag gtg gtg atg gag aag gac atg gtg ggg tcc ccc gct cat Asn Phe Glu Val Val Met Glu Lys Asp Met Val Gly Ser Pro Ala His 130 135 140	612	
gac acc aac cac cgg ggc ccc acc agc tgg ctg gcc cca ggc cgc Asp Thr Asn His Arg Gly Pro Pro Thr Ser Trp Leu Ala Pro Gly Arg 145 150 155	660	
gcc aag acc ttc cgc ctg aag ctg ccc gcg ctg ctg gcg acg gcc Ala Lys Thr Phe Arg Leu Lys Leu Pro Ala Leu Leu Ala Leu Thr Ala 160 165 170 175	708	10
cgg gag tcg tcg gtg cgg tcg ggc ggc gcg ggc ggc ggc ggc ccc Arg Glu Ser Ser Val Arg Ser Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Pro 180 185 190	756	
ggg gcc gtg gtg gac gtg gac ctg acg ccc gcg gca ccc agc agc Gly Ala Val Val Asp Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ser 195 200 205	804	
gag tcg ctg gcc ctg gac gaa gtg aca gcc atg gac aac cac gtg gca Glu Ser Leu Ala Leu Asp Glu Val Thr Ala Met Asp Asn His Val Ala 210 215 220	852	
ggg ctc ggg ccc gcg gag gag cgg cgt gcg ctg gtg ggt ccc ggc tct Gly Leu Gly Pro Ala Glu Glu Arg Arg Ala Leu Val Gly Pro Gly Ser 225 230 235	900	20
ccg ccc cgc agc ggg ccc ggc cag ctc cca tcg ccc cgg gcg cac agc Pro Pro Arg Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Ser Pro Arg Ala His Ser 240 245 250 255	948	
ctc aac ccc gac gcc tcg ggc tcc agc tgc agc ctg gcc cgg acg cgc Leu Asn Pro Asp Ala Ser Gly Ser Ser Cys Ser Leu Ala Arg Thr Arg 260 265 270	996	
tcc cga gaa agc tgc gcc agc gtg cgc cgc gcc tcg tcg gcc gac gac Ser Arg Glu Ser Cys Ala Ser Val Arg Arg Ala Ser Ser Ala Asp Asp 275 280 285	1044	
atc gag gcc atg cgc gcc ggg gtg ctg ccc ccc cca ccc ccc cac gcc Ile Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Arg His Ala 290 295 300	1092	30
agc acc ggg gcc atg cac cca ctg cgc agc ggc ttg ctc aac tcc acc Ser Thr Gly Ala Met His Pro Leu Arg Ser Gly Leu Leu Asn Ser Thr 305 310 315	1140	
tcg gac tcc gac ctc gtg cgc tac cgc acc att agc aag att ccc caa Ser Asp Ser Asp Leu Val Arg Tyr Arg Thr Ile Ser Lys Ile Pro Gln 320 325 330 335	1188	
atc acc ctc aac ttt gtg gac ctc aag ggc gac ccc ttc ttg gct tcg Ile Thr Leu Asn Phe Val Asp Leu Lys Gly Asp Pro Phe Leu Ala Ser 340 345 350	1236	

ccc acc agt gac cgt gag atc ata gca cct aag ata aag gag cga acc Pro Thr Ser Asp Arg Glu Ile Ile Ala Pro Lys Ile Lys Glu Arg Thr 355 360 365	1284	
cac aat gtc act gag aag gtc acc cag gtc ctg tcc ctg ggc gcc gac His Asn Val Thr Glu Lys Val Thr Gln Val Leu Ser Leu Gly Ala Asp 370 375 380	1332	
gtg ctg cct gag tac aag ctg cag gca ccg cgc atc cac cgc tgg acc Val Leu Pro Glu Tyr Lys Leu Gln Ala Pro Arg Ile His Arg Trp Thr 385 390 395	1380	
atc ctg cat tac agc ccc ttc aag gcc gtg tgg gac tgg ctc atc ctg Ile Leu His Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Val Trp Asp Trp Leu Ile Leu 400 405 410 415	1428	10
ctg ctg gtc atc tac acg gct gtc ttc aca ccc tac tcg gct gcc ttc Leu Leu Val Ile Tyr Thr Ala Val Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Phe 420 425 430	1476	
ctg ctg aag gag acg gaa gaa gcc ccg cct gct acc gag tgg ggc tac Leu Leu Lys Glu Thr Glu Gly Pro Pro Ala Thr Glu Cys Gly Tyr 435 440 445	1524	
gcc tgc cag ccg ctg gct gtg gtg gac ctc atc gtg gac atc atg ttc Ala Cys Gln Pro Leu Ala Val Val Asp Leu Ile Val Asp Ile Met Phe 450 455 460	1572	
att gtg gac atc ctc atc aac ttc cgc acc acc tac gtc aat gcc aac Ile Val Asp Ile Leu Ile Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Asn Ala Asn 465 470 475	1620	20
gag gag gtg gtc agc cac ccc ggc cgc atc gcc gtc cac tac ttc aag Glu Glu Val Val Ser His Pro Gly Arg Ile Ala Val His Tyr Phe Lys 480 485 490 495	1668	
ggc tgg ttc ctc atc gac atg gtg gcc gcc atc ccc ttc gac ctg ctc Gly Trp Phe Leu Ile Asp Met Val Ala Ala Ile Pro Phe Asp Leu Leu 500 505 510	1716	
atc ttc ggc tct ggc tct gag gag ctg atc ggg ctg ctg aag act gcg Ile Phe Gly Ser Gly Ser Glu Glu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Thr Ala 515 520 525	1764	
cgg ctg ctg cgg ctg gtg cgc gtg gcg cgg aag ctg gat cgc tac tca Arg Leu Leu Arg Leu Val Arg Val Ala Arg Lys Leu Asp Arg Tyr Ser 530 535 540	1812	
gag tac ggc gcg gcc gtg ctg ttc ttg ctc atg tgc acc ttt gcg ctc Glu Tyr Gly Ala Ala Val Leu Phe Leu Leu Met Cys Thr Phe Ala Leu 545 550 555	1860	30
atc gcg cac tgg cta gcc tgc atc tgg tac gdc atc ggc aac atg gag Ile Ala His Trp Leu Ala Cys Ile Trp Tyr Ala Ile Gly Asn Met Glu 560 565 570 575	1908	
cag cca cac atg gac tca cgc atc ggc tgg ctg cac aac ctg ggc gac Gln Pro His Met Asp Ser Arg Ile Gly Trp Leu His Asn Leu Gly Asp 580 585 590	1956	
cag ata ggc aaa ccc tac aac agc agc ggc ctg ggc ggc ccc tcc atc Gln Ile Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ser Gly Leu Gly Pro Ser Ile	2004	

595	600	605	
aag gac aag tat gtg acg gcg ctc tac ttc acc ttc agc agc ctc acc Lys Asp Lys Tyr Val Thr Ala Leu Tyr Phe Thr Phe Ser Ser Leu Thr 610 615 620			2052
agt gtg ggc ttc ggc aac gtc tct ccc aac acc aac tca gag aag atc Ser Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Pro Asn Thr Asn Ser Glu Lys Ile 625 630 635			2100
ttc tcc atc tgc gtc atg ctc att ggc tcc ctc atg tat gct agc atc Phe Ser Ile Cys Val Met Leu Ile Gly Ser Leu Met Tyr Ala Ser Ile 640 645 650 655			2148
ttc ggc aac gtg tcg gcc atc atc cag cgg ctg tac tcg ggc aca gcc Phe Gly Asn Val Ser Ala Ile Ile Gln Arg Leu Tyr Ser Gly Thr Ala 660 665 670			2196
cgc tac cac aca cag atg ctg cgg gtg cgg gag ttc atc cgc ttc cac Arg Tyr His Thr Gln Met Leu Arg Val Arg Glu Phe Ile Arg Phe His 675 680 685			2244
cag atc ccc aat ccc ctg cgc cag cgc ctc gag gag tac ttc cag cac Gln Ile Pro Asn Pro Leu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Tyr Phe Gln His 690 695 700			2292
gcc tgg tcc tac acc aac ggc atc gac atg aac gcg gtg ctg aag ggc Ala Trp Ser Tyr Thr Asn Gly Ile Asp Met Asn Ala Val Leu Lys Gly 705 710 715			2340
ttc cct gag tgc ctg cag gct gac atc tgc ctg cac ctg aac cgc tca Phe Pro Glu Cys Leu Gln Ala Asp Ile Cys Leu His Leu Asn Arg Ser 720 725 730 735			2388
ctg ctg cag cac tgc aaa ccc ttc cga ggg gcc acc aag ggc tgc ctt Leu Leu Gln His Cys Lys Pro Phe Arg Gly Ala Thr Lys Gly Cys Leu 740 745 750			2436
cgg gcc ctg gcc atg aag ttc aag acc aca cat gca ccc cca ggg gac Arg Ala Leu Ala Met Lys Phe Lys Thr Thr His Ala Pro Pro Gly Asp 755 760 765			2484
aca ctg gtg cat gct ggg gac ctg ctc acc gcc ctg tac ttc atc tcc Thr Leu Val His Ala Gly Asp Leu Leu Thr Ala Leu Tyr Phe Ile Ser 770 775 780			2532
cgg ggc tcc atc gag atc ctg cgg ggc gac gtc gtc gtg gcc atc ctg Arg Gly Ser Ile Glu Ile Leu Arg Gly Asp Val Val Ala Ile Leu 785 790 795			2580
ggg aag aat gac atc ttt ggg gag cct ctg aac ctg tat gca agg cct Gly Lys Asn Asp Ile Phe Gly Glu Pro Leu Asn Leu Tyr Ala Arg Pro 800 805 810 815			2628
ggc aag tcg aac ggg gat gtg cgg gcc ctc acc tac tgt gac cta cac Gly Lys Ser Asn Gly Asp Val Arg Ala Leu Thr Tyr Cys Asp Leu His 820 825 830			2676
aag atc cat cgg gac gac ctg gag gtg ctg gac atg tac cct gag Lys Ile His Arg Asp Asp Leu Leu Glu Val Leu Asp Met Tyr Pro Glu 835 840 845			2724
ttc tcc gac cac ttc tgg tcc agc ctg gag atc acc ttc aac ctg cga			2772

Phe Ser Asp His Phe Trp Ser Ser Leu Glu Ile Thr Phe Asn Leu Arg		
850	855	860
gat acc aac atg atc ccg ggc tcc ccc ggc agt acg gag tta gag ggt		2820
Asp Thr Asn Met Ile Pro Gly Ser Pro Gly Ser Thr Glu Leu Glu Gly		
865	870	875
ggc ttc agt cgg caa cgc aag cgc aag ttg tcc ttc cgc agg cgc acg		2868
Gly Phe Ser Arg Gln Arg Lys Arg Lys Leu Ser Phe Arg Arg Arg Thr		
880	885	890
gac aag gac acg gag cag cca ggg gag gtg tcc gcc ttg ggg ccg ggc		2916
Asp Lys Asp Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Ser Ala Leu Gly Pro Gly		
900	905	910
cgg gcg ggg gca ggg ccg agt agc cgg ggc ccg ccg ggg ggg ccg tgg		2964
Arg Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Arg Gly Arg Pro Gly Gly Pro Trp		
915	920	925
ggg gag agc ccg tcc agt ggc ccc tcc agc cct gag agc agt gag gat		3012
Gly Glu Ser Pro Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro Glu Ser Ser Glu Asp		
930	935	940
gag ggc cca ggc cgc agc tcc agc ccc ctc cgc ctg gtg ccc ttc tcc		3060
Glu Gly Pro Gly Arg Ser Ser Pro Leu Arg Leu Val Pro Phe Ser		
945	950	955
agc ccc agg ccc gga gag ccg ccg ggt ggg gag ccc ctg atg gag		3108
Ser Pro Arg Pro Pro Gly Glu Pro Pro Gly Gly Glu Pro Leu Met Glu		
960	965	970
975		
gac tgc gag aag agc agc act tgc aac ccc ctg tca ggc gcc ttc		3156
Asp Cys Glu Lys Ser Ser Asp Thr Cys Asn Pro Leu Ser Gly Ala Phe		
980	985	990
tca gga gtg tcc aac att ttc agc ttc tgg ggg gac agt cgg ggc cgc		3204
Ser Gly Val Ser Asn Ile Phe Ser Phe Trp Gly Asp Ser Arg Gly Arg		
995	1000	1005
cag tac cag gag ctc cct cga tgc ccc gcc ccc acc ccc agc ctc ctc		3252
Gln Tyr Gln Glu Leu Pro Arg Cys Pro Ala Pro Thr Pro Ser Leu Leu		
1010	1015	1020
aac atc ccc ctc tcc agc ccg ggt cgg cgg ccc cgg ggc gac gtg gag		3300
Asn Ile Pro Leu Ser Ser Pro Gly Arg Arg Pro Arg Gly Asp Val Glu		
1025	1030	1035
agc agg ctg gat gcc ctc cag cgc cag ctc aac agg ctg gag acc cgg		3348
Ser Arg Leu Asp Ala Gln Arg Gln Leu Asn Arg Leu Glu Thr Arg		
1040	1045	1050
1055		
ctg agt gca gac atg gcc act gtc ctg cag ctg cta cag agg cag atg		3396
Leu Ser Ala Asp Met Ala Thr Val Leu Gln Leu Leu Gln Arg Gln Met		
1060	1065	1070
acg ctg gtc ccg ccc gcc tac agt gct gtg acc acc ccg ggg cct ggc		3444
Thr Leu Val Pro Pro Ala Tyr Ser Ala Val Thr Pro Gly Pro Gly		
1075	1080	1085
ccc act tcc aca tcc ccg ctg ttg ccc gtc agc ccc ctc ccc acc ctc		3492
Pro Thr Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Ser Pro Leu Pro Thr Leu		
1090	1095	1100

acc ttg gac tcg ctt tct cag gtt tcc cag ttc atg gcg tgt gag gag 3540
 Thr Leu Asp Ser Leu Ser Gln Val Ser Gln Phe Met Ala Cys Glu Glu
 1105 1110 1115

 ctg ccc ccg ggg gcc cca gag ctt ccc caa gaa ggc ccc aca cga cgc 3588
 Leu Pro Pro Gly Ala Pro Glu Leu Pro Gln Glu Gly Pro Thr Arg Arg
 1120 1125 1130 1135

 ctc tcc cta ccg ggc cag ctg ggg gcc acc tcc cag ccc ctg cac 3636
 Leu Ser Leu Pro Gly Gln Leu Gly Ala Leu Thr Ser Gln Pro Leu His
 1140 1145 1150

 aga cac ggc tcg gac ccg ggc agt tag tggggctgcc cagtgtggac 3683
 Arg His Gly Ser Asp Pro Gly Ser
 1155 1160

 acgtggctca cccagggatc aaggcgctgc tggccgctc cccttggagg ccctgctcag 3743
 gaggccctga ccgtggaagg ggagaggaac tcgaaagcac agctcctccc ccagccctg 3803
 ggaccatctt ctccctgcagt cccctggcc ccagtgagag gggcaggggc agggccggca 3863
 gtaggtgggg cctgtggtcc cccactgcc ctgagggcat tagctggct aactgcccgg 3923
 aggcacccgg ccctggccct taggcacccctc aaggactttt ctgctattta ctgctcttat 3983
 tgttaaggat aataattaag gatcatatga ataattaatg aagatgtga tgactatgaa 4043
 taataaataaa ttatcctgag gagaaaa 4070

<210> 2
 <211> 1159
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 20

 <400> 2
 Met Pro Val Arg Arg Gly His Val Ala Pro Gln Asn Thr Phe Leu Asp
 1 5 10 15
 Thr Ile Ile Arg Lys Phe Glu Gly Gln Ser Arg Lys Phe Ile Ile Ala
 20 25 30
 Asn Ala Arg Val Glu Asn Cys Ala Val Ile Tyr Cys Asn Asp Gly Phe
 35 40 45
 Cys Glu Leu Cys Gly Tyr Ser Arg Ala Glu Val Met Gln Arg Pro Cys
 50 55 60
 Thr Cys Asp Phe Leu His Gly Pro Arg Thr Gln Arg Arg Ala Ala Ala
 65 70 75 80
 Gln Ile Ala Gln Ala Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg Lys Val Glu Ile
 85 90 95
 Ala Phe Tyr Arg Lys Asp Gly Ser Cys Phe Leu Cys Leu Val Asp Val 30
 100 105 110
 Val Pro Val Lys Asn Glu Asp Gly Ala Val Ile Met Phe Ile Leu Asn
 115 120 125
 Phe Glu Val Val Met Glu Lys Asp Met Val Gly Ser Pro Ala His Asp
 130 135 140
 Thr Asn His Arg Gly Pro Pro Thr Ser Trp Leu Ala Pro Gly Arg Ala
 145 150 155 160
 Lys Thr Phe Arg Leu Lys Leu Pro Ala Leu Ala Leu Thr Ala Arg
 165 170 175
 Glu Ser Ser Val Arg Ser Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Pro Gly
 180 185 190
 Ala Val Val Val Asp Val Asp Leu Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ser Glu
 195 200 205

Ser Leu Ala Leu Asp Glu Val Thr Ala Met Asp Asn His Val Ala Gly
 210 215 220
 Leu Gly Pro Ala Glu Glu Arg Arg Ala Leu Val Gly Pro Gly Ser Pro
 225 230 235 240
 Pro Arg Ser Ala Pro Gly Gln Leu Pro Ser Pro Arg Ala His Ser Leu
 245 250 255
 Asn Pro Asp Ala Ser Gly Ser Ser Cys Ser Leu Ala Arg Thr Arg Ser
 260 265 270
 Arg Glu Ser Cys Ala Ser Val Arg Arg Ala Ser Ser Ala Asp Asp Ile
 275 280 285
 Glu Ala Met Arg Ala Gly Val Leu Pro Pro Pro Arg His Ala Ser
 290 295 300
 Thr Gly Ala Met His Pro Leu Arg Ser Gly Leu Leu Asn Ser Thr Ser
 305 310 315 320
 Asp Ser Asp Leu Val Arg Tyr Arg Thr Ile Ser Lys Ile Pro Gln Ile
 325 330 335
 Thr Leu Asn Phe Val Asp Leu Lys Gly Asp Pro Phe Leu Ala Ser Pro
 340 345 350
 Thr Ser Asp Arg Glu Ile Ile Ala Pro Lys Ile Lys Glu Arg Thr His
 355 360 365
 Asn Val Thr Glu Lys Val Thr Gln Val Leu Ser Leu Gly Ala Asp Val
 370 375 380
 Leu Pro Glu Tyr Lys Leu Gln Ala Pro Arg Ile His Arg Trp Thr Ile
 385 390 395 400
 Leu His Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Val Trp Asp Trp Leu Ile Leu Leu
 405 410 415
 Leu Val Ile Tyr Thr Ala Val Phe Thr Pro Tyr Ser Ala Ala Phe Leu
 420 425 430
 Leu Lys Glu Thr Glu Glu Gly Pro Pro Ala Thr Glu Cys Gly Tyr Ala
 435 440 445
 Cys Gln Pro Leu Ala Val Val Asp Leu Ile Val Asp Ile Met Phe Ile
 450 455 460
 Val Asp Ile Leu Ile Asn Phe Arg Thr Thr Tyr Val Asn Ala Asn Glu
 465 470 475 480
 Glu Val Val Ser His Pro Gly Arg Ile Ala Val His Tyr Phe Lys Gly
 485 490 495
 Trp Phe Leu Ile Asp Met Val Ala Ala Ile Pro Phe Asp Leu Leu Ile
 500 505 510
 Phe Gly Ser Gly Ser Glu Glu Leu Ile Gly Leu Leu Lys Thr Ala Arg
 515 520 525
 Leu Leu Arg Leu Val Arg Val Ala Arg Lys Leu Asp Arg Tyr Ser Glu
 530 535 540
 Tyr Gly Ala Ala Val Leu Phe Leu Leu Met Cys Thr Phe Ala Leu Ile
 545 550 555 560
 Ala His Trp Leu Ala Cys Ile Trp Tyr Ala Ile Gly Asn Met Glu Gln
 565 570 575
 Pro His Met Asp Ser Arg Ile Gly Trp Leu His Asn Leu Gly Asp Gln
 580 585 590
 Ile Gly Lys Pro Tyr Asn Ser Ser Gly Leu Gly Gly Pro Ser Ile Lys
 595 600 605
 Asp Lys Tyr Val Thr Ala Leu Tyr Phe Thr Phe Ser Ser Leu Thr Ser
 610 615 620
 Val Gly Phe Gly Asn Val Ser Pro Asn Thr Asn Ser Glu Lys Ile Phe
 625 630 635 640
 Ser Ile Cys Val Met Leu Ile Gly Ser Leu Met Tyr Ala Ser Ile Phe
 645 650 655
 Gly Asn Val Ser Ala Ile Ile Gln Arg Leu Tyr Ser Gly Thr Ala Arg
 660 665 670
 Tyr His Thr Gln Met Leu Arg Val Arg Glu Phe Ile Arg Phe His Gln
 675 680 685
 Ile Pro Asn Pro Leu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Tyr Phe Gln His Ala
 690 695 700
 Trp Ser Tyr Thr Asn Gly Ile Asp Met Asn Ala Val Leu Lys Gly Phe

10

20

30

705	710	715	720	
Pro Glu Cys Leu Gln Ala Asp Ile Cys Leu His Leu Asn Arg Ser Leu				
725	730	735		
Leu Gln His Cys Lys Pro Phe Arg Gly Ala Thr Lys Gly Cys Leu Arg				
740	745	750		
Ala Leu Ala Met Lys Phe Lys Thr Thr His Ala Pro Pro Gly Asp Thr				
755	760	765		
Leu Val His Ala Gly Asp Leu Leu Thr Ala Leu Tyr Phe Ile Ser Arg				
770	775	780		
Gly Ser Ile Glu Ile Leu Arg Gly Asp Val Val Val Ala Ile Leu Gly				
785	790	795	800	
Lys Asn Asp Ile Phe Gly Glu Pro Leu Asn Leu Tyr Ala Arg Pro Gly				
805	810	815		
Lys Ser Asn Gly Asp Val Arg Ala Leu Thr Tyr Cys Asp Leu His Lys				
820	825	830		
Ile His Arg Asp Asp Leu Leu Glu Val Leu Asp Met Tyr Pro Glu Phe				10
835	840	845		
Ser Asp His Phe Trp Ser Ser Leu Glu Ile Thr Phe Asn Leu Arg Asp				
850	855	860		
Thr Asn Met Ile Pro Gly Ser Pro Gly Ser Thr Glu Leu Glu Gly Gly				
865	870	875	880	
Phe Ser Arg Gln Arg Lys Arg Lys Leu Ser Phe Arg Arg Arg Thr Asp				
885	890	895		
Lys Asp Thr Glu Gln Pro Gly Glu Val Ser Ala Leu Gly Pro Gly Arg				
900	905	910		
Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Arg Gly Arg Pro Gly Gly Pro Trp Gly				
915	920	925		
Glu Ser Pro Ser Ser Gly Pro Ser Ser Pro Glu Ser Ser Glu Asp Glu				
930	935	940		
Gly Pro Gly Arg Ser Ser Pro Leu Arg Leu Val Pro Phe Ser Ser				
945	950	955	960	
Pro Arg Pro Pro Gly Glu Pro Pro Gly Gly Glu Pro Leu Met Glu Asp				
965	970	975		
Cys Glu Lys Ser Ser Asp Thr Cys Asn Pro Leu Ser Gly Ala Phe Ser				
980	985	990		
Gly Val Ser Asn Ile Phe Ser Phe Trp Gly Asp Ser Arg Gly Arg Gln				
995	1000	1005		
Tyr Gln Glu Leu Pro Arg Cys Pro Ala Pro Thr Pro Ser Leu Leu Asn				
1010	1015	1020		
Ile Pro Leu Ser Ser Pro Gly Arg Arg Pro Arg Gly Asp Val Glu Ser				
1025	1030	1035	1040	
Arg Leu Asp Ala Leu Gln Arg Gln Leu Asn Arg Leu Glu Thr Arg Leu				
1045	1050	1055		
Ser Ala Asp Met Ala Thr Val Leu Gln Leu Leu Gln Arg Gln Met Thr				
1060	1065	1070		
Leu Val Pro Pro Ala Tyr Ser Ala Val Thr Thr Pro Gly Pro Gly Pro				
1075	1080	1085		
Thr Ser Thr Ser Pro Leu Leu Pro Val Ser Pro Leu Pro Thr Leu Thr				30
1090	1095	1100		
Leu Asp Ser Leu Ser Gln Val Ser Gln Phe Met Ala Cys Glu Glu Leu				
1105	1110	1115	1120	
Pro Pro Gly Ala Pro Glu Leu Pro Gln Glu Gly Pro Thr Arg Arg Leu				
1125	1130	1135		
Ser Leu Pro Gly Gln Leu Gly Ala Leu Thr Ser Gln Pro Leu His Arg				
1140	1145	1150		
His Gly Ser Asp Pro Gly Ser				
1155				

【図1 A - B】

Figure 1 A

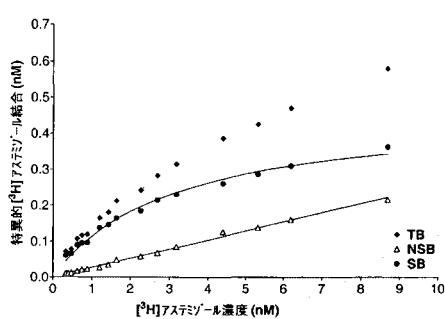
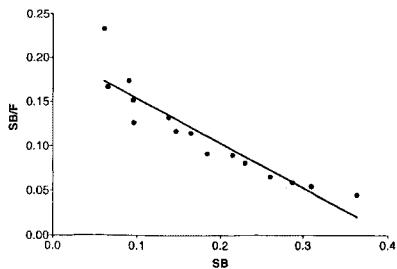
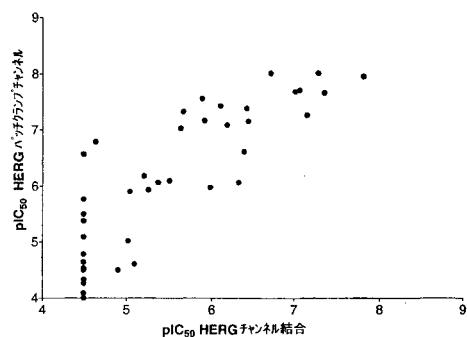


Figure 1 B



【図2】

Figure 2



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47

- (72)発明者 ヘイレン, ゴデリーベ・イルマ・クリステイン・マリア
ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセベーグ 3 0 ・ジヤンセン・ファーマシュー
チカ・ナームローゼ・フエンノートシャツブ
- (72)発明者 ジヤンセン, コルネルス・ゲラルドウス・マリア
ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセベーグ 3 0 ・ジヤンセン・ファーマシュー
チカ・ナームローゼ・フエンノートシャツブ
- (72)発明者 ユルツアク, ミレク・ロマン
ドイツ 6 4 6 6 5 アルスバツハ - ハーンライン・ハーンライナーシュトラーセ 1 6 アー
- (72)発明者 バン・アソウ, ヘンリクス・ペトルス・マルティヌス・マリア
ベルギー・ビー - 2 3 4 0 ビールセ・トウルンホウトセベーグ 3 0 ・ジヤンセン・ファーマシュー
チカ・ナームローゼ・フエンノートシャツブ

審査官 福井 悟

(56)参考文献 Drug Discovery Today, 2 0 0 1 年, 6,2, 78-84
Clinical and Experimental Allergy, 1 9 9 9 年, 29, suppl.3, 182-189

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D 401/00-421/14

CA/REGISTRY(STN)