

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4007459号

(P4007459)

(45) 発行日 平成19年11月14日(2007.11.14)

(24) 登録日 平成19年9月7日(2007.9.7)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z

請求項の数 33 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願平11-502995	(73) 特許権者	ファーマコピーア ドラッグ ディスカバリー, インコーポレーティッド
(86) (22) 出願日	平成10年6月1日(1998.6.1)		アメリカ合衆国、ニュージャージー州 O 8 5 1 2、クランベリー、イーストパーク
(65) 公表番号	特表2002-511140 (P2002-511140A)		ブルバード 3 0 0 0 番地
(43) 公表日	平成14年4月9日(2002.4.9)	(74) 代理人	弁理士 森田 憲一
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/011749		
(87) 国際公開番号	W01998/055866	(74) 代理人	弁理士 山口 健次郎
(87) 国際公開日	平成10年12月10日(1998.12.10)		
審査請求日	平成17年5月18日(2005.5.18)	(72) 発明者	ジョナサン ジェイ. バーバウム
(31) 優先権主張番号	868, 280		アメリカ合衆国、ニュージャージー O 8 5 1 2、クランベリー、アダムズ ドライブ 1 1 番地
(32) 優先日	平成9年6月3日(1997.6.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高処理量検定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験化合物によるリガンド／受容体相互作用または酵素触媒反応の阻害の程度を決定すること、又は標的分子への該化合物の結合の程度を決定することを目的とする複数の該化合物の迅速スクリーニングのための高効率検定法であって、

(a) 試験対象である該化合物を

(1) リガンド及び受容体、

(2) 酵素及び該酵素の基質、又は

(3) 標的分子、

と接触させる工程であって、そこでは一つ以上の該試験化合物による阻害又は結合が、該リガンド及び受容体（それらの一方が標識されている）の相互作用により、

該酵素と該酵素の基質（それらの一方が標識されている）の相互作用により、又は標識された試験化合物と該標的分子の相互作用により、

懸濁可能な細胞又は固体支持体に結合した光学的に検出可能な標識の量の変化を惹起するものであり、

(b) 個々の細胞又は固体支持体に結合した該光学的に検出可能なシグナルの量を共焦点顕微鏡の使用により測定し、該量を該細胞又は固体支持体に結合していない該検定法におけるバックグラウンドシグナルの量と比較し、そして該結合シグナルと該バックグラウンドシグナルの間の差から阻害又は結合の該程度を決定することにより、阻害又は結合の該程度を決定する工程、を含んで成る方法。

【請求項 2】

酵素阻害剤に対する検定を含むものである請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 3】

受容体結合の阻害剤に対する検定を含むものである請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 4】

該受容体が該リガンドに結合する受容体ドメインからなるものである請求項 3 に記載の検定法。

【請求項 5】

該光学的に検出可能な標識が、化学発光標識、蛍光性標識、及び可視光の変化を生じさせる酵素からなる群より選択されるものである、請求項 1 に記載の検定法。

10

【請求項 6】

該リガンドが蛍光標識されているものである請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 7】

該化合物が蛍光標識されているものである請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 8】

溶液中の酵素及び化合物が、懸濁可能な固体支持体に付着している蛍光的に標識されている基質とインキュベートされる検定を含むものである請求項 2 に記載の検定法。

【請求項 9】

酵素及び蛍光的に標識された基質が、該酵素／基質反応の反応生産物に特異的に結合する部分で被覆されている懸濁可能な固体支持体とインキュベートされ、そして該反応生産物が蛍光的に標識されるものである請求項 2 に記載の検定法。

20

【請求項 10】

該受容体が標識を付されそして該リガンドが該懸濁可能な固体支持体に結合するものである請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 11】

該共焦点顕微鏡検査が共焦点レーザー走査顕微鏡検査である請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 12】

該共焦点顕微鏡検査がニプコウディスク (Nipkow disc) を用いるものである請求項 1 に記載の検定法。

【請求項 13】

該化合物が酵素及び基質と接触し、そして該酵素への結合、該基質への結合、酵素と基質の複合体への結合、及び酵素と生産物の複合体への結合より成る群から選択される 1 機構により阻害するものである請求項 1 に記載の検定法。

30

【請求項 14】

懸濁可能な細胞又は固体支持体上に含まれる標的分子への蛍光標識されたりガンドの結合の阻害を目的として複数の化合物を迅速スクリーニングするための高効率検定法であって、

(a) 該化合物の存在下に該蛍光標識されたりガンドを該懸濁可能な細胞又は懸濁可能な固体支持体上に含まれる該標的分子と接触させる工程、

(b) 個々の細胞又は固体支持体に結合する蛍光標識されたりガンドの量を共焦点顕微鏡検査により測定することにより該結合の阻害の程度を決定する工程、

40

(c) 該量を、該細胞又は固体支持体と結合していない該検定中の蛍光と比較する工程、及び

(d) 該相違を該阻害の程度と相関させる工程、を含んで成る方法。

【請求項 15】

該標的分子が受容体又は受容体ドメインである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

該受容体又は受容体ドメインが懸濁された細胞の表面に含まれるものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

50

該標的分子が懸濁可能な固体支持体に付着しているものである請求項 1 4に記載の方法。

【請求項 1 8】

該懸濁可能な固体支持体が5 0 μm より小さな直径をもつものである請求項 1 7に記載の方法。

【請求項 1 9】

該懸濁可能な固体支持体が1 0 μm より小さくそして1 μm より大きな直径をもつものである請求項 1 7に記載の方法。

【請求項 2 0】

リガンドと細胞表面受容体又は受容体ドメインの間の結合の阻害を目的として化合物ライブラリーをスクリーニングするための均一検定法であって、

(a) 該細胞表面受容体又はドメインを発現する細胞の液体懸濁液を複数の容器に加える工程、

(b) 該阻害のためにスクリーニングされる化合物のライブラリーを該複数の容器に添加する工程、

(c) 該受容体に対する蛍光標識リガンドを該容器に添加する工程、

(d) 該細胞、該化合物、及び該蛍光標識リガンドをインキュベートする工程、

(e) 共焦点顕微鏡検査により該容器中の該細胞と結合している蛍光の量を個々に測定する工程、及び

(f) 一つ以上の化合物による該受容体への該リガンドの結合の阻害の程度を決定する工程、を含んで成る方法。

【請求項 2 1】

該インキュベーションの後でそして該測定の前に、7 5 %より多くの該細胞が該容器の容積の2 5 %より少ない場所に沈着するように、該細胞を該容器中に沈着させるものである請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 2】

該インキュベーションの後でそして該測定の前に、9 0 %より多くの該細胞が該容器の容積の1 0 %より少ない場所に沈着するように、該細胞を該容器中に沈着させるものである請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 3】

該化合物が6 0 0 nmより長波長で蛍光を発する官能基部分で蛍光標識されているものである請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 4】

該容器が一つ以上のマイクロタイタープレート中のウェルを含むものである請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 5】

該容器が1 μl 以下の検定溶液を含むものである請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 6】

リガンドと懸濁可能な固体支持体に付着した標的分子の間の結合の阻害を目的とする化合物ライブラリーのスクリーニングのための均一検定法であって、

(a) 該懸濁可能な固体支持体に付着した該標的分子の液体懸濁液を複数の容器に添加する工程、

(b) 該阻害についてスクリーニングすべき複数の化合物を該複数の容器に添加する工程、

(c) 蛍光的に標識されたりガンドを該容器に添加する工程、

(d) 固体支持体に付着した該標的分子、該化合物、及び該蛍光的に標識されたりガンドをインキュベートする工程、

(e) 共焦点顕微鏡検査により該固体支持体と結合している蛍光の量を個々に測定する工程、及び

(f) 該リガンドの該標的分子への結合の、該化合物の一つ以上による阻害の程度を決定する工程、を含んで成る方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

該インキュベーションの後でそして該測定の前に、該細胞の75%より多くが該容器の容積の25%より少ない場所に沈着するように該固体支持体を該容器に沈着させるものである請求項 2 6に記載の方法。

【請求項 28】

該インキュベーションの後でそして該測定の前に、該細胞の90%より多くが該容器の容積の10%より少ない場所に沈着するように該固体支持体を該容器に沈着させるものである請求項 2 6に記載の方法。

【請求項 29】

該化合物が 600 nmより長波長で蛍光を発する官能基部分で蛍光的に標識されているものである請求項 2 6に記載の方法。 10

【請求項 30】

該容器が一つ以上のマイクロタイタープレート中のウェルを含むものである請求項 2 6に記載の方法。

【請求項 31】

該容器が 1 μl 以下の検定溶液を含むものである請求項 2 6に記載の方法。

【請求項 32】

リガンドと懸濁し得ない固体支持体に付着した標的部分との間の結合の障害を目的として化合物のライブラリーをスクリーニングするための均一検定法であって、

(a) 該障害についてスクリーニングすべき複数の化合物を該懸濁し得ない固体支持体を含む容器に添加する工程、 20

(b) 蛍光的に標識したリガンドを該容器に添加する工程、

(c) 該懸濁し得ない固体支持体に付着した該標的部分、該化合物、及び該蛍光標識したリガンドをインキュベートする工程、

(d) 共焦点顕微鏡検査により該固体支持体と結合している蛍光の量を測定する工程、及び

(e) 該標的部分への該リガンドの結合の、該化合物の一つ以上による障害の程度を決定する工程、

を含んで成る方法。

【請求項 33】

該容器がマイクロタイタープレート中のウェルを含み、そして該懸濁し得ない固体支持体が該プレート中のウェルの底を含むものである請求項 3 2に記載の検定法。 30

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、標的分子との相互作用を目的とする化学化合物の高処理量スクリーニングに関する。

発明の背景

薬の発見プログラム用の先導化合物を見出すために、多数の化合物が、酵素阻害剤又は受容体アゴニスト／アンタゴニストとしてのそれらの活性についてスクリーニングされることがしばしばある。化合物の大きなライブラリーがこのようなスクリーニングには必要とされる。この分野での発展の結果として、現在、スクリーニング用に何百又は何千もの小分子を含む組合せライブラリー (combinatorial libraries) を同時に生産することが可能である。しかしながら、このようなライブラリーが利用可能になったので、大きなスケールの迅速スクリーニング法に対する必要性が生じてきた。 40

例えば、該ライブラリーは、各化合物がピコモル量で存在するマイクロビーズ上に含有されていてもよい。化合物の量が非常に少ないので、非常に小さい容量で、例えば、1 μl のオーダーで、高処理量スクリーニング法を行なうのが有利である。このような検定法は、1997年2月18日に出願された米国特許出願第60/037,636号に記載された1536穴プレートで行なうことができる。しかしながら、このような小容量での微量検定は、従来の方法を用いて正確にかつ反復して行なうことが困難である。 50

高処理量スクリーニングに使用される受容体結合検定は、通常三つの工程を含んでいる。第1に、標識したリガンドを、リガンド／受容体結合の阻害について試験される化合物の存在下で標的受容体とインキュベートする。第2に、受容体及びリガンド（及び化合物）を、固定された受容体の濾過及び／又は洗浄を用いて分離する。最後に、受容体に結合した標識リガンドの量を定量する。この従来のスクリーニング法は、「分離一様式」検定法、すなわち、濾過膜を用いるか、又は結合成分もしくは遊離の成分の、ある表面（例えば、マイクロタイタープレートの表面）への選択的接着を用いるかのいずれかで、結合したリガンドを遊離のリガンドから物理的に分離する検定法である。

しかしながら、分離は時間がかかるので、高処理量スクリーニングを遅らせる。用いる流体の操作工程が十分に正確でないときは、分離は、その検定法で発生するシグナルに変化を引き起こすことも可能であり、平衡結合条件を攪乱することもできる。さらに、分離は、自動化することが困難であり、放射性物質を含む場合は潜在的に有害である。これらの問題は、少量の試験化合物を用いて微量の容量で行なわれる検定法においては特に深刻である。

したがって、均一検定法、すなわち、分離の必要性を排除する検定法において結合したリガンドと遊離のリガンドを区別することは、高処理量スクリーニングに有利である。大スケールの組合せライブラリーのスクリーニングに特に役立つためには、かかる検定法は、用いられる試験化合物の小容量及び少量を容易に可能にするものであるべきである。

発光物質（scintillant）を含浸させたビーズ（これらはシンチレーション・プロキシミティー・アッセイ・ビーズ（SPATM、アマシャム社、アーリントンハイツ、イリノイ州）として市販されている）を用いる均一検定法が米国特許第4,568,649号に記載されている。このビーズは、試料中の放射性標識された標的と結合することができるリガンドでも被覆されている。このリガンドが放射性標識された標的に結合すると、ビーズ上の発光物質は、放射性標識により活性化される。発光物質により発生した光エネルギーのレベルは、試料中の結合した標識化標的の量を示す。しかしながら、この方法は、放射性試薬の操作を必要とし、多少感度に制限がある。

標識されたりガンドと標識された標的が相互作用する場合にシグナルが発生するもう一つの均一検定法が知られている。一方の標識は、より長寿命の蛍光励起状態を持つエネルギー供与性Eu-クリプテートであり、他方は、短い蛍光励起状態を有するエネルギー受容性タンパク質であるアロフィコシアニンである。エネルギーの転移は、7 nmより少なくしか離れていない場合にこれらの標識間で起こる。検定の間、Eu-クリプテートはパルスレーザーで励起され、その蛍光放射はアロフィコシアニンを連続的に再励起する、そしてその蛍光は時間設定型蛍光測定器で測定される。しかしながら、この方法は、リガンドと標的の両方の標識を必要とし、いくつかの他の市販の検定法ほど感度が良くない。また、アロフィコシアニンは非常に大きな多量体タンパク質であり、予想できない仕方でこの検定法に影響を及ぼしうる。

蛍光イメージングプレートリーダーを用いて、膜電位及び細胞内カルシウムを測定する、細胞に基づく動力学的検定法における光学的スクリーニングが行なわれている。この検定法は、検定用のウェルの底に向けたCCDカメラにより測定する視野の深さを限定する光学的方法を用いる。ここでは、生存している接着細胞層内の蛍光が測定される。細胞層の視野の深さを限定することにより、細胞外色素由来のバックグラウンド蛍光が低減される。データは、経時的測定、例えば、細胞の脱分極にわたって得られる（シュレーダー（Schroeder）ら、（1996）Journal of Biomolecular Screening 1: 75-80）。しかしながら、この方法は、迅速な細胞事象を引き起こすために複雑に調整された液体の操作を必要とする検定の間中維持を必要とする生きた細胞を使用する。このような操作は、少量のライブラリー化合物の高処理量スクリーニングで使用される微小容量で行なうためには、不可能でないとしても、非常に困難である。また、大きな試料、すなわち、細胞層全体が測定されるので、この検定法は、個々の懸濁細胞に結合した蛍光とバックグラウンドの蛍光とを区別しない。

したがって、本発明の目的は、分離工程を必要としない、すなわち、均一な高処理量スク

10

20

30

40

50

リーニングのための検定法を提供することにある。

本発明の別の目的は、放射性廃棄物の発生を回避し、リガンドと標的分子の両方の標識化を避けることにある。

本発明の別の目的は、微小容量での小型化に容易に適応可能なそして高感度な検定法を提供することにある。

本発明の別の目的は、ピコモル量の化合物を表面に有するビーズの組合せライブラリーで見られるような少量の化合物の活性を検出するための高処理量スクリーニング法を提供することにある。

発明の概要

本発明は、多数の化合物の迅速スクリーニングのための高処理量検定法に関する。この検定法は、リガンド／受容体相互作用又は酵素触媒反応の、化合物による阻害の程度、又はライブラリー化合物の標的分子への結合の程度を決定する。ライブラリー化合物による阻害（又は結合）は、懸濁可能な細胞又は懸濁可能な固体支持体のいずれかに結合する光学的に検出可能な標識の量の変化を惹起する。阻害（又は結合）の程度は、個々の細胞又は固体支持体に結合している標識の量を顕微鏡検査により、測定することにより、決定される。これらの量を、個々の細胞又は固体支持体に結合しない標識の量（すなわち、バックグラウンドシグナル）と比較する。阻害又は結合の程度は、このデータを用いて決定される。測定は共焦点顕微鏡を用いて行なうことが好ましい。結合した標識の量は、個々の細胞又は固体支持体の走査により区別されるので、この検定法は均一である、すなわち、未結合標識を除去するための分離工程を必要としない。この方法は、小容量かつ少量の試験化合物を用いる検定法では例外的な感度及び高処理量を得ることを可能にする。

【図面の簡単な説明】

図1 A～1 Dは、蛍光標識したリガンドに結合する表面受容体を有する細胞懸濁物を用いる本発明の態様の図式的描写である。活性なライブラリー化合物は、細胞に結合している蛍光を阻害し、個々の細胞で測定されるシグナルの減少を惹き起こす。

図2は、活性なライブラリー化合物が存在しない場合に、検定培地中で蛍光標識リガンドに結合する標的分子により表面が被覆されているビーズを用いる本発明の態様の図式的描写である。

図3は、Cy 5-NKAのNK 2 R／CHO細胞への結合について計算された平均蛍光強度（MFI）を示すグラフである。

図4は、Cy 5-NKAのSR 48. 968による置換について対照のパーセントとして計算された、細胞と結合した蛍光を示すグラフである。

図5は、蛍光標識IL-8の未標識IL-8による置換に対して得られたF値のグラフである。

発明の詳細な説明

本明細書に列挙されたすべての特許出願、公報その他の参考文献は、参照により本明細書に取り込まれる。

本発明は、活性な薬物候補を決定するために、組合せライブラリーに見出されるもの等の化合物の高処理量スクリーニングを可能にする。この方法は、このようなライブラリーのスクリーニングに要する時間を、非不均一法が要する時間よりも実質的に減少させる。また、それは、洗浄した反応物の廃棄の必要性をも排除し、微量検定容器での実行に高度に適応可能である。さらに、この方法は、より高いシグナル対ノイズ比の点でそして一つの標識のみの使用を必要とする点で、従来の均一検定法を改良する。それは、マイクロビーズライブラリーに由来する非常に少量の化合物のスクリーニングを成功させる高感度検定法を提供することにより、それらのマイクロビーズを用いるさらなる検定法及びより速くより効果的なスクリーニングを可能にする。

本発明の方法は、顕微鏡使用による検定法において結合したシグナルと遊離のシグナルの量の測定を含んでいる。これは、例えば、狭い焦点深度を用いる従来の顕微鏡を使用して、試料中の異なる深さを順次観察することにより行なうことができる。しかしながら、本発明の好ましい方法によれば、個々の細胞のサイズの粒子に対して結合しているシグナル

の量を個々に決定するために、共焦点顕微鏡検査が用いられる。

共焦点顕微鏡検査は、照射した対象物又は試料の検出を薄い対物平面に制限する。対象物又は試料の「スライス」の観察が得られる。これは、例えば、対物レンズと検出器との間に位置する像の平面中にピンホール等の空間フィルターを置くことにより達成される。対物平面に近い狭い領域から発せられた光のみが、空間フィルターを通過して収束する。他の水平面からの光は、フィルターによりブロックされる。例えば、「スライス」を得るためには視野の点を順に走査することにより、対物平面の像が得られる。

本発明に使用するには、レーザー走査を用いる共焦点顕微鏡が特に好ましい。適当なレーザー走査顕微鏡は、バイオメトリックイメージング社（マウンテンビュー、カルフォルニア州）により「IMAGN/2000」として市販されている。また、レーザー走査顕微鏡は、米国特許第5,556,764号及び第5,547,849号にも記載されている。これらの顕微鏡は、蛍光抗体により標識された細胞数を決定するために、毛細管内で血液を分析するのに慣用されている。

非レーザー走査顕微鏡はよく知られており、本発明を実施するためにも使用することができる。例えば、所望ならばNipkowディスクの回転を用いる共焦点顕微鏡又は類似の配置を使用することができる。このような顕微鏡は、例えば、ディクソン（Dixon）（1996）Nature, 383:760、ジャスカイティス（Juskaitis）ら（1996）Nature, 383:804、ペトラン（Petran）ら（1968）J. Opt. Soc. Am. 58, 661、及びシャウ（Xiao）ら（1988）Appl Phys. Lett. 53:716に記載されている。

また、有用な共焦点顕微鏡は、例えば、米国特許第5,032,720号、第5,120,953号、第5,260,578号、第5,304,810号、第5,283,684号、第5,351,152号及び第5,162,946号にも記載されている。

本発明の方法によれば、共焦点顕微鏡検査により得られたデータを分析して、個々の懸濁細胞又は固体支持体に結合するシグナルとバックグラウンドシグナルとの差を決定し、阻害又は結合の尺度を得る。例えば、CD4+細胞の計数用に慣用されている共焦点顕微鏡検査は、この決定又は化合物の高処理量スクリーニングに関係しない。

蛍光標識及び化学発光標識を含むいかなる所望の光学検出標識をも本発明で 사용할ことができる。標識が化学発光の場合、短寿命のシグナルを発生することが好ましい。適当な基質の存在下で可視色の変化を生じさせる酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼも用いることができる。蛍光標識が好ましく、本発明の好ましい態様という観点から以下に記載する。しかしながら、望ましいときは、他の光学的に検出可能な標識をこれらの態様において置き換えてもよい。

一つの態様において、本検定法は、懸濁可能な細胞又は固体支持体のいずれかの表面に含まれる標的分子への蛍光標識リガンドの結合を阻害する化合物をスクリーニングする。結合阻害の程度は、共焦点顕微鏡検査により、該化合物の存在下で個々の細胞又は支持体に結合した標識リガンドの量を測定することにより決定される。

この態様では、懸濁した細胞の膜に結合した受容体は、受容体結合の阻害に関してスクリーニングするライブラリー化合物の存在下で、蛍光標識リガンドと接触させることができる。（本明細書に用いられる「受容体」という用語は、受容体全体ばかりでなく受容体ドメインをも包含するものとする。）一例として、IL-8のその細胞表面受容体への結合阻害に関してスクリーニングするライブラリー化合物を、蛍光標識したIL-8の存在下で受容体を産生する細胞の懸濁物と接触させる。共焦点顕微鏡検査により調べた場合、標識したIL-8に結合した細胞は、相対的に一定の「遊離」標識のバックグラウンド上で増加した蛍光の領域として出現する。細胞に結合した蛍光の量は、活性化合物がリガンドの受容体への結合を阻害する検定ではより少ない。

この態様を図1に図式的に描く。図1A及び1Cは、受容体が蛍光標識したリガンド（「F」で付箋した黒塗り四角）に結合するので、付着した受容体（「Y」）を有する細胞を示す。図1Cにおいて、蛍光標識したリガンドは、ライブラリー化合物（白抜きの三角）により置換される。図1B及び1Dは、それぞれ、活性ライブラリー化合物を有する及び有しない試料の切片から集めた蛍光を図式的に示す。バックグラウンド蛍光と比較した「

10

20

30

40

50

スポット」の存在は、結合したリガンドを示す。一方、バックグラウンド蛍光それ自体は、遊離のリガンドから生じる。共焦点顕微鏡検査により、個々の細胞の大きさの結合した蛍光の「スポット」の測定が可能になる。遊離の蛍光性リガンドの量も同時に決定することができる。図1Bにおいて、細胞は、バックグラウンドよりも有意に多くの蛍光を発しているので、より強いスポットとして現れる。図1Dでは、活性なライブラリー化合物による置換の効果を例示する。同じ細胞が、リガンド置換の結果として減光になるか又はバックグラウンドと区別できなくなった。したがって、「結合した」シグナルの消失は、高処理量スクリーニング検定法における活性分子を示す。受容体結合検定法は、通常、過剰のリガンドを用いて行なわれるので、バックグラウンド蛍光の量は、正常では変化しない。

10

本発明の検定法では、この検定法での個々の細胞（又は固体支持体）と結合する蛍光の量を合計する。この合計量は、リガンドと標的との間の結合量の尺度を提供する。この量を遊離の蛍光の量と比較して、ライブラリー化合物の活性の指標値に達する（この量は、この検定法の設定され方に依存して、活性薬物候補に関して増加又は減少することがありうる）。結合（又は結合の阻害）を示す特定の値に達するための特定の方法論を、以下に記載する。バックグラウンド蛍光が各検定法において個々に測定されうるかぎり、バックグラウンド蛍光が比較的一定であることは必要でないかもしれない。

本発明の方法は、バックグラウンドノイズに対するシグナルのレベルを増加させる点で特に有利である。測定される粒子又は細胞を含む「スライス」の外側の溶液に含まれる標識からのシグナルを除くことにより、バックグラウンドノイズは有意に低下する。シグナル対バックグラウンドノイズの比は、¹²⁵Iで標識したリガンドを用いる市販の従来の不均一（すなわち、分離に基づく）検定法の場合、本発明の方法よりも約15倍も低いことがわかった。

20

本発明の方法は、沈着させておいた試料についての蛍光を測定する点で特に有効である。共焦点顕微鏡検査は、容器内の液体の「スライス」又は「切片」の正確な測定を可能にする。したがって、測定は、例えば、細胞又は固体粒子に結合した蛍光が濃縮されている試料の底部10%で行なうことができる。これは、慣用の光学検出を用いる従来技術の検定法では不可能である。なぜなら、このような検定法では沈着した細胞又は固体粒子の上方の容積からのシグナルを除去しないからである。このシグナルの除去は本発明の方法により達成される非常に高いシグナル対ノイズ比の説明の一部となる。

30

懸濁細胞（又は懸濁した固体支持体）を、約75%を越える該細胞又は支持体が測定容器の容積の約25%より少なく、すなわち、細胞又は支持体の層が底の上で形成されるように約10分間又はそれ以上沈着させておくことが好ましい。90%を越える細胞又は支持体を、該容器の容積の約10%より少なく沈着させることが最も好ましい。一つの好ましい態様では、細胞又は支持体の層の厚さは、共焦点対物平面の厚さとほぼ同じである。沈着に要する時間は、カラムの高さの関数であり、例えば、1536穴プレート内の試料よりも96穴プレート内の試料の方がより高い。

本発明の検定法においては、いかなる所望のリガンドと受容体との組合せを用いても、活性な阻害剤について試験することができる。リガンドとそれらの細胞に基づく受容体の例としては、ニューロキニンとNK2R細胞、及びIL-8とIL-8B/CHO細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの受容体及びリガンドは、以下の実施例でさらに議論する。

40

リガンドと受容体の他の例には、インスリン/インスリン受容体、ブラジキニン/ブラジキニン受容体、エリスロポエチン/EPO受容体及びレプチン/OB受容体が含まれるがこれらに限定されるものではない。これらの検定法を行なうための細胞株が利用可能である。例えば、IM-9(ATCC CCL-159)は、ヒトインスリン受容体を構成的に発現する。IMR-90(ATCC CRL 7931)は、ブラジキニンB2受容体を構成的に発現し、インターロイキン-1 β で刺激されてブラジキニンB1受容体を産生することができる。EPO受容体を発現する細胞は、キタムラ(Kitamura)ら、J. Cellular Physiology 140: 323-334 (1989)に記載されている。レプチン受容体（すなわち、

50

O B受容体)を発現する細胞は、タータグリア (Tartaglia) ら、Cell 83: 1263-1271 (1995) に記載されている。

本発明の別の態様では、標的分子を、例えばビオチン／アビジン会合を介して、懸濁可能な固体支持体に結合させ、溶液中のライブラリー化合物及び蛍光標識リガンドを該支持体と接触させる。活性化合物は、該標的から蛍光性リガンドを置換することにより支持体と結合した蛍光の減少を惹起させ、そして試験化合物の存在及び／又は能力が定量化される。支持体の蛍光の明るさは、試験化合物の能力に比例して減少する。この方法を図2に図式的に描く。

「懸濁可能な固体支持体」とは、液体に懸濁され得るいかなる固体支持体をも含むことを意図する。この支持体は、検定用ウエルの底に沈着した際に残りの溶液に光学的に接近することを妨げないように、十分小さくなくてはならない。他方、該支持体は、検定成分が混合された後のさらに長い期間懸濁したままでないように、十分小さくなくてはならない。好ましい支持体は、直径約50 μm未満であり、最も好ましくは直径10 μm未満である。支持体の直径は、共焦点対物平面の厚さよりも有意に小さくなくてもよいが、それ未満であることが好ましい。支持体は、懸濁物が検定容器の底に支持体を濃縮させるための遠心分離を必要としないように、直径1 μmより大きいことが好ましい。

好ましい懸濁可能な支持体は、ポリスチレン製の6.2 μmビーズであり、スフェロテック社 (リバティービレ、イリノイ州) から市販されている。このビーズは、アビジンで被覆されており、通常ビーズ当たり10⁶個の結合部位を含んでいる。しかしながら、セルロースビーズ、孔調整ガラスビーズ、シリカゲル及び他の型のポリスチレンビーズ (ジビニルベンゼンで架橋されていてもよく、ポリエチレングリコールでグラフト重合されていてもよく、又はアミノ、ヒドロキシ、カルボキシル又はハロ基で機能性高分子にされてもよい) を含むいかなる適当な懸濁可能固体支持体をも用いることができる。さらなる支持体としては、グラフトコポリビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、ジメチルアクリルアミドビーズ (N, N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンで架橋されていてもよい)、疎水性ポリマーで被覆したガラス粒子等 (すなわち、剛体表面又は半剛体表面を有する) を含む。TentaGel S-NH₂^{▲R▼}ビーズ (ラップポリマー、チュービングン、ドイツ) のような、ジビニルベンゼンで架橋したポリエチレングリコールでグラフト重合したポリスチレン型ビーズを用いることができる。

固体支持体は、ヒドロラーゼ (プロテアーゼ、エステラーゼ、ヌクレアーゼを含む)、リガーゼ (DNA又はRNA系の) 及びトランスペプチダーゼならびに抗体等の結合タンパク質及びDNA結合タンパク質及びこれらのタンパク質のドメインを含むいかなる所望の標的で被覆することもできるが、これらに限定されるものではない。

固体支持体上に被覆する標的 (又はリガンド) は、いかなる所望の手段によってそこに結合させてもよい。例えば、それは、ビオチン化され次いでストレプトアビジン被覆支持体に非共有結合させてもよい。また、支持体を被覆させた抗体 (標的に特異的なもの) に標的 (又はリガンド) を結合させることも可能である。また、共有結合も当該技術分野において知られている。

支持体は、組換え技術により生産された受容体又は受容体結合ドメインで被覆してもよい。これは、細胞表面に正常では発現しない受容体又はドメインにとって特に有利である。例えば、ステロイド受容体等の核受容体を組換え技術により有利に発現させて、本発明のマイクロビーズ検定法に用いる。かかる受容体の一例は、ヒト組換えエストロジェン受容体 (アレクシス バイオケミカルズ、サンジエゴ、カルフォルニア州) である。しかしながら、細胞表面受容体の場合は、受容体が結合しているビーズとは対照的に、受容体を発現する懸濁細胞を用いることが好ましい。

例えば、懸濁可能な固体支持体をリガンドで被覆し、リガンド／受容体結合の障害のスクリーニング対象である化合物の存在下に、溶液中で標識受容体を用いて本発明の検定法を行なうことも可能である。

本発明によれば、溶液中の蛍光標識したライブラリー化合物を懸濁した細胞又は固体支持体と共にインキュベートし、リガンドの非存在下で該化合物と細胞又は支持体との間の

10

20

30

40

50

結合を測定することも可能である。換言すれば、この検定法は、化合物により置換されるリガンドを追加する必要がなく、細胞又は支持体上の標的分子と化合物との間の結合の直接的な尺度を提供する。

別の態様では、酵素触媒反応の阻害に関して化合物のライブラリーを検定し、個々の懸濁可能な固体支持体に結合した蛍光の量を測定して阻害の程度を決定する。例えば、かかる検定法の一例では、阻害性化合物の存在下でマイクロビーズに結合した蛍光の量は、非阻害性化合物が存在する場合よりも大きい。個々のビーズに結合した蛍光の量は、共焦点顕微鏡検査により決定される。この型の検定法を用いて、固体支持体に結合した蛍光標識基質を切断するカテプシンD等のプロテアーゼの阻害を決定することができる。カテプシンDの場合は、基質は、一端がマイクロビーズに他端が蛍光標識C y - 5に連結したl y s - p r o - i l e - g l u - p h e - p h e - a r g - l e u等のペプチドであることができ、いずれかの連結がガンマアミノ酪酸等のスペーサーを用いて完成され得る。

また、この型の検定法を用いて、蛍光標識オリゴヌクレオチドのエンドヌクレアーゼ切断の阻害を決定することも可能である。エンドヌクレアーゼを、ライブラリー化合物及び蛍光標識オリゴヌクレオチド基質で被覆した懸濁可能な固体支持体と共に溶液中加入する。基質の切断の際に、蛍光標識した生成物が支持体から放出される。ビーズに結合したまま存在する蛍光の量は、活性な阻害剤が存在するところで増加する。

酵素阻害に関する別の検定法においては、酵素と蛍光標識基質の両方を、試験化合物及びリガンドで被覆したマイクロビーズと共に溶液中でインキュベートする。リガンド（抗体等）は、酵素触媒反応の反応生成物に特異的に結合する。該反応生成物は蛍光標識を保持したままである。例えば、チロシンキナーゼの阻害剤は、キナーゼと蛍光標識ペプチド基質が溶液中に存在する検定法で決定することができる。このペプチド基質は、その配列の中央にチロシンアミノ酸を含み、反応生成物はホスホチロシンを含む。この検定溶液はホスホチロシン含有反応生成物に対する抗体で被覆した懸濁可能なマイクロビーズを含む。ライブラリー化合物による阻害が成功すれば、対照と比較したときのビーズに結合した蛍光は減少する結果となる。

酵素触媒反応の阻害が決定される本発明の検定法において、阻害性化合物は、いかなる機構によっても阻害することができる。例えば、それらは、酵素への結合、基質への結合、酵素と基質の複合体への結合又は酵素と生成物の複合体への結合により阻害することができる。

好ましくは、本発明の検定法は、1997年2月18日に出願された米国特許出願第60/037, 636号に記載された1536穴プレート等の微量容器を有するマイクロタイタープレートを用いて行なわれる。共焦点走査顕微鏡は、マイクロタイタープレートの各ウェルの底を順次走査する。

また、この方法は、従来の96穴マイクロタイタープレート中もしくは他のいかなる容器中又は液体試料を保持することができ、かつ、共焦点顕微鏡により走査されうるいかなる表面上でも行なうことができる。例としては、12穴、24穴、384穴、864穴プレート及び顕微鏡用スライドが挙げられる。

受容体産生細胞が用いられる本発明の態様においては、所望の細胞密度は、好ましくは、1536穴プレートでは1 μ l当たり約100~1000細胞の間であり、慣用の96穴プレートでは1 μ l当たり約30~300細胞の間であろう。通常、統計学的に適切な結果を得るためには、試料当たり少なくとも100~1000細胞からのシグナルを測定することが必要であると信じられている。最適の密度は、指針としてこれらの濃度並びに用いる特定の細胞のサイズを用いて、そしてリガンド/受容体相互作用の既知の阻害剤を用いる検定法で提供されるシグナルを測定することにより決定することができる。走査する領域を限定し、走査時間を減らすことにより、測定される細胞の数が十分である限り処理量を増加させることができる。

懸濁可能な支持体を約6 μ mの好ましいサイズで用いるならば、支持体の好ましい密度は、一般的に、細胞の場合と同様に好ましい範囲内にあるであろう。該密度は、支持体のサイズ及び各支持体に固定される標的の量に依存して変動する。

10

20

30

40

50

本発明によって検出されるシグナルは、蛍光標識により発生させることが好ましい。この標識は、受容体又は他の標的分子に結合するリガンドに付着させることができる。また、本発明のある種の態様においては標識受容体（又は他の標的分子）を用いることも可能である。また、望ましいときは、標識化抗体が、例えば、未標識リガンド、受容体又は標的分子を探す「第2の標識化」アプローチを用いることができる。

また、ライブラリー化合物それ自体が蛍光標識された本発明の検定法を行なうことも可能である。例えば、第一アミンである化合物のライブラリーは、アミン特異的蛍光標識（例えば、一官能性Cy5-NHSEステル）で標識することができる。次いで、該化合物を細胞又は懸濁された支持体上の標的分子への直接結合について試験することができる。結合した蛍光の量は、結合の程度と相関する。

本発明での使用に適する蛍光標識はよく知られており、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャム社）等のシアニン色素、フルオレッセイン、ローダミン及びテキサスレッドが挙げられる。細胞を用いる本発明の態様では、細胞起源の蛍光とガラス及びプラスチック容器起源の蛍光との干渉を避けるために、蛍光標識が比較的高波長、すなわち、約450nmよりも高い波長で蛍光を発することが好ましい。この標識は、600nmより上でそして約800nmより低い蛍光を発することが最も好ましい。約400nmで励起する標識は、近UV光により惹起される光脱色（photobleaching）を避けることができる。

また、非蛍光標識も、前記した本発明の態様において使用することができる。化学発光発生標識ルシフェラーゼを用いる一つの態様では、懸濁可能な固体支持体を受容体で被覆する。この被覆された支持体を、ルシフェラーゼ結合リガンド、ルシフェラーゼの基質及び試験対象の化合物と共にインキュベートする。受容体／リガンド結合の阻害の非存在下では、ルシフェラーゼは懸濁可能な固体支持体と会合し、ルシフェラーゼの酵素作用から生じる化学発光シグナルが支持体周辺に集中する。阻害性化合物の存在下では、支持体と結合するシグナルが減少する。

本発明の別の態様では、懸濁不可能な固体支持体の処理表面への結合の程度を決定する目的でこの検定法が行われる。支持体は、マイクロタイタープレートの底等の容器又は器それ自体でありうる。あるいは、この懸濁不可能な支持体は、例えば、ディスクであってもよい。この支持体がマイクロタイタープレートのウェルの底である態様では、該プレートを標的分子で被覆し、次いで、標識したリガンドに曝す。プレートの底の層を含む共焦点切片を、光学的に検出可能なシグナルについて測定する。マイクロタイタープレートの底を含まない他の共焦点切片で、遊離のシグナルを測定する。次いで、支持体に結合したシグナルを計算することができる。この方法は、走査を迅速に行なうことができる点で有利である。個々の細胞／ビーズを同定する必要はなく、高処理量が得られる結果となる。薄い共焦点対物平面を使用することは、被覆プレートの上部から発生するシグナルを排除するため及び高いシグナル対ノイズ比を維持するために好ましい。この方法の一つの態様では、共焦点対物平面は10µm未満である。

本発明の高処理法で測定される化合物は、ポリマービーズ上の組合せライブラリーに由来するものであることが好ましい。いくつかの検定法用に各ビーズ上に十分な化合物を合成することにより、化合物の取扱いが低減又は除去される。かかるビーズは、例えば、ビーズ当たり100ピコモルオーダーの化合物を含むことが可能であり、そして試験は約1µMの濃度で行なわれることが多い。約100回までの試験に1つのビーズを用いることができるので、かかるビーズを用いるときは、1µlの試験容量が有利である。

ライブラリー化合物をビーズから溶出し、この検定法の準備にマイクロタイタープレート中で蒸発乾燥させることが好ましい。ビーズ上の化合物は、光切断又は別の型の切断により放出され得る。光切断可能なリンカーの切断が好ましい。このようなリンカー及びそれらの切断方法は、バラニー（Barany）ら、（1985）J. Am. Chem. Soc. 107: 4936に記載されている。他のリンカー及び関連する切断試薬の例は、WO94/08051号に記載されている。

ビーズ上に調製した組合せライブラリーを使用して、WO94/08051号ならびに米国特許出願第08/436,120号及び第08/239,302号（WO95/306

10

20

30

40

50

42号に相当する)に記載されたコード化システムを用いて、活性化合物の同一性を決定することが好ましい。このシステムでは、化合物の同一性をコード化する化学タグを固体支持体に適用する。所定の支持体上の化合物の同一性は、該支持体から化学タグを脱着させて、ガスクロマトグラフィー等により該タグを同定し、タグの同一性を化合物の同一性と関連付けることにより決定することができる。一旦活性化合物が同定されると、対応するピーズ(該化合物を含んでいたもの)を調べ、そしてこの方法によりタグを放出させて解読することにより化合物の同一性を決定することができる。

試験のためにいくつかの大きなライブラリーが利用可能な場合には、各検定容器中に一つを超える試験化合物を入れることにより各ライブラリーを「探索」することが有利でありうる。活性化合物を有する検定容器は、この容器中に存在する複数の化合物のそれぞれを個別に評価することによりさらに研究することができる。この方式で「高密度」でスクリーニングすることは、各ライブラリー中の活性化合物の数と能力を統計学的に評価することを可能にする。最も活性な化合物を含むライブラリーは、より徹底的に試験することができる。この検定法でスクリーニングした活性化合物の割合が高いときは、活性化合物の第2の検定法をより低い濃度で行なって、最も活性な化合物を選択しさらに評価されるべき化合物を選択してもよい。

本発明を以下の実施例により説明するが、これは、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

実施例1：受容体結合用の化合物のスクリーニング

本発明を、共焦点顕微鏡検査装置及び元々蛍光サイトメトリー用に意図されたソフトウェアを用いて示した。得られたデータをさらに分析して、リガンドと細胞表面受容体の間の結合量の指標となる数値を提供した。

1) リガンドの合成

(a) Cy-5 標識ニューロキニン-A (NKA)。

ニューロキニン-A (HK TDS FVGLM) は、ケンブリッジリサーチバイオケミカルズ (PP-05-0826A) から購入し、一官能性Cy5色素は、アマシャム (FluorolinkTM コンジュゲーションキットとして、カタログ番号A25001) から購入した。NKA (1mg) を0.88mLの重炭酸緩衝液 (100mM NaHCO₃、pH9.3) に溶解し、Cy5色素 (約1mg) を0.13mLの重炭酸緩衝液に溶解した。二つの溶液を混合し、室温で1.5時間インキュベートした後、5℃に移してさらに17時間インキュベートした。このコンジュゲートは、HPLC (H₂O、0.1% TFA中20-40% CH₃CN勾配、Vydac^{▲R▼} 分析用C18カラム上、R_f8.9分@1.5mL/分) により精製して、157nmol (理論収量の18%) を得た。リガンドの同一性は、受容体に対する競合及び質量分析法により確認した。

(b) Cy-5 標識IL-8

ヒトインターロイキン-8のSer→Cys突然変異体 (hIL-8 (S72C)) は、PCR技術を用いてヒトcDNAからクローニングし、配列を決定して突然変異とその配列を確認した。一官能性Cy5-ヨードアセトアミドは、アマシャムから入手した。500nMのCy5-ヨードアセトアミドを、20mMのリン酸ナトリウム、pH6.5、400mMのNaCl中200nmol (200μlの1mMストック) のhIL-8 (S72C) に加えた。試験管を攪拌し、周囲の温度で暗所に置いた。HPLC分析により、48時間後に反応が完了したことが示された。生成物を、未反応のCy5-ヨードアセトアミド及び酸化されたhIL-8 (S72C) からHPLCにより精製した (2x100μl注入)。試料を、400μMの推定濃度で50mMのリン酸ナトリウム、pH7.2中で再構成した。次いで、この試料の一部の蛍光スペクトルから、より正確な濃度を決定した。さらなる特性決定により、hIL-8 (S72C)-Cy5は、16% SDS-PAGE分析で野生型IL-8と同様の移動度を有し、慣用の [¹²⁵I] IL-8リガンド置換検定法で2nMのK_iを示すことが示された。

2) 細胞株

(a) ニューロキニン-2受容体を発現する細胞 (NK2R/CHO) を得た。NK2R

10

20

30

40

50

を発現する細胞はよく知られており、当業者により容易に得られる。例えば、NK 2 Rを発現する細胞は以下の参考文献に記載されている。すなわち、アーキンストール (Arkinstall, S.)、エドガートン (M. Edgerton) ら (1995)、「分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) におけるニューロキニンNK 2受容体及びGタンパク質成分の共発現。」*FEBS Lett* 375(3): 183-7、ブラッドshaw (Bradshaw, C. G.)、セスコウスキー (K. Ceszkowski) ら (1994)「ニューロキニンNK 2受容体に対する選択的蛍光性リガンドの合成と特性決定。」*J Med Chem* 37 (13): 1991-5、グリスハンマー (Grisshammer, R.)、リトル (J. Little) ら (1994)「大腸菌におけるラットNK 2 (ニューロキニン-A) 受容体の発現。」*Receptors Channels* 2 (4): 295-302、ランドストローム (Lundstrom, K.)、ミルズ (A. Mills) ら (1995)「セムリキ森林ウイルス発現系を用いるGタンパク質結合受容体の高レベル発現。」*J Recept Signal Transduc Res* 15 (1-4): 617-30、及びターカッチー (Turcatti, G.)、ネメス (K. Nemeth) ら (1996)「特異的部位での蛍光アミノ酸の生合成による取り込みを介するタキキニン・ニューロキニン-2受容体の構造と機能の探索。」*J Biol Chem* 271 (33): 19991-8である。

b) IL-8 A及びIL-8 B受容体を発現する細胞 (IL-8 A/CHO及びIL-8 B/CHO) は、以下のようにして得た。

ヒトIL-8 A又はIL-8 Bの配列をコードするpCDNAIIIプラスミドでCHO-K1細胞 (ATCC) を、カチオン性リポポリアミン (リポフェクタミン、GIBCO BRL) を介してトランスフェクトすることにより、CHO・IL-8 A及びIL-8 B細胞株を調製した。細胞を、DMEM、10%ウシ胎仔血清、2mMのL-グルタミン及び2%非必須アミノ酸中で、G418選択 (1mg/ml) 下で培養し、最高の受容体レベルを発現するクローン株を、これらの実験に使用するために維持した。ヒトIL-8 A受容体cDNAは、HL-60細胞 (ATCC) mRNAからクローニングした。(IL-8 Aをコードするクローンは、アフジャ (Ahuja) ら、(1992) *Nature Genetics* 2:31に記載されている。) 第1鎖cDNAは、M-MLV逆転写酵素 (プロメガRiboclonetTM cDNA合成系) を用いて合成し、プライマー、5' CCGAATTTCGACATGTCAAATATTACAGATCC3' 及び5' GCTCTAGATCAGAGGTTTGGAAAGAGAC3' を用いて、IL-8 AcDNAをポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。PCR産物をEcoRI+XbaIで消化し、EcoRI/XbaI/ウシ腸ホスファターゼ消化pCDNA3ベクター (インビトロゲン) 中に連結した。1つの候補のDNA配列を、プロメガSilver SequenceTM 法を用いて確認した。ヒトIL-8 B発現クローンを作製するために、EcoRIとXhoIを用いて、約1.8kbのcDNA断片をpBlue-scriptクローンBS-p3 (マーフィー (Murphy) とティファニー (Tiffany)、(1991) *Science*, 253: 1280) からpCDNA3ベクター中に再クローニングした。

3) 検定法

(a) Cy5-NKAのNK 2 R/CHO細胞への結合

ほぼコンフルエントなNK 2 R/CHO細胞の培養物を、12mlのDPBS (Mg⁺²とCa⁺²を含まない) で洗浄し、トリプシン (2mL/T-25フラスコ) を添加することによりトリプシン消化し、37℃で約5分間インキュベートした後、10mLの培地で停止させた。次いで、細胞を計数し、細胞の所望の最終濃度 (5,000細胞/25μL) に希釈した。検定法は、以下の成分を用いて設定した。すなわち、種々の濃度 (0.76~136nM最終) のCy5-NKAを含む緩衝液 (チオルファン及びバシトラシンを含む1×BSS+0.2%BSA) 10μL、細胞40μLである。プレートに蓋をし、アルミニウムホイルで覆って光から保護し、室温で1時間振盪させた。各試料について、25μLを取り、IMAGN2000TM キャピラリー中に入れて、IMAGNTM ソフトウェア (バイオメトリックイメージング社) を用いて読み取った。細胞がウエルの底の上に静止するまで、試料を沈着させた。沈着に要する時間は、通常10分であった。

(b) NK 2 R/CHO細胞に結合したCy5-NKAのSR-48, 968による置換

SR-48, 968は、NK Aニューロキニン2受容体の結合の既知の阻害剤である。設定と検定法は、5 μ MのCy5-NK Aという固定濃度で、そしてSR-48, 968のストック溶液（ストック1 mM、1.6% DMSO、BSS中）をCy5-NK A含有緩衝液中88 nMから8.8 pMまでに希釈し、(a)に記載したように行なった。

(c) 細胞に結合したCy5-IL-8の未標識IL-8による置換。

ほぼコンフルエントなIL-8 B/CHO細胞の培養物を、トリプシン（2 mL/T-25 フラスコ）を添加することによりトリプシン消化し、37℃で約1分間インキュベートした後、4 mLの培地で停止させた。次いで、細胞を計数し、所望の最終濃度（15,000細胞/25 μ L）に希釈した。検定法は、96穴マイクロリター（microliter）プレート（100 μ Lの全容量）中で設定し、以下の成分からなるものであった。すなわち、緩衝液（1 $\times$ BSS）30 μ L、細胞25 μ L、バックグラウンド蛍光（Tris-Cy5、60 μ M）25 μ L、hIL-8（S72C）-Cy5（20 nM）10 μ L、未標識IL-8（種々の濃度、BSSで希釈）10 μ Lであった。プレートに蓋をし、アルミニウムホイルで覆って光から保護し、室温で1時間振盪させた。各試料に対して、85 μ Lを取り、IMAGN2000TMキャピラリー中に入れて、IMAGNソフトウェアを用いて読み取った。

4) データ分析

IMAGN系から得られたデータは、視野で同定された各細胞に関する情報を含むタブで境界を定められたテキストファイルからなるものである。このIMAGN系は、イメージング視野中の各細胞（又は細胞のサイズの対象物）についての、位置、形及び強度データ（Cy5及びCy5.5の2チャンネルに対する）ばかりでなくベースラインの情報をも提供する。（この型の装置を用いる典型的な分析において、細胞は、ベースラインシグナルよりも有意に大きな強度を有する2以上の連続した画素により同定される。）データの統計学的パラメーター（例えば、標準偏差）も表にまとめられる。このデータを分析して、結合の量の尺度を提供する試料についてのスカラー値を得ることができる。このさらなる分析を行なうために可能な三つの方法を以下に記載する。

(a) 平均蛍光強度。この値は、すべての細胞に関する「MaMO」の平均値として、データ表から導かれるものである。チャンネル0（ゼロ）はCy5蛍光チャンネルであり、そしてMaMO値は、最小（ベースライン蛍光）値を差し引いたピークのCy5蛍光（細胞に結合した蛍光に相当する）として計算される。「MaMO」は、視野中の各細胞に対して表にまとめられる。

この分析は、細胞表面受容体の高い蛍光濃度及び比較的高いレベルの占有を含む検定法に対して特に有用である。それはすべての細胞が検出され得ない場合、例えば、細胞表面受容体の低い蛍光濃度又は低いレベルの占有の場合には、有利でないことがありうる。F値の分析（以下に説明する）は、これらの環境下でより正確なデータを提供することができる。具体的には、より弱い蛍光を発する細胞（それらのサイズ及び/又は特異的な結合特性により）は、競合するリガンドにより置換された場合、イメージング視野で最初に「消失」するであろう。（この意味での「消失」は、細胞のイメージを含む画素がベースラインイメージよりも強度が有意に高くないことを意味する。）固定した濃度の蛍光性リガンドを競合体でチャレンジする場合に、二つの変化が実験的に観察される。第1に、細胞全体の強度が減少する（すなわち、平均MaMO値が減少する）。第2に、より弱い細胞がバックグラウンド中に消滅するので、観察可能な細胞の数が減少する。F値は、細胞層における全蛍光を測定するので、すべての細胞が計数できない場合により正確な測定を与える。

(b) F値。F値は、ウェル内に入れた細胞の総数（計数した蛍光性細胞の数とは対照的に）をMFIに乘じそして1000で除することにより決定される。この値は、細胞層の全蛍光を提供し、共焦点顕微鏡による一定の走査では検出不可能な程その蛍光が弱い細胞を含む。F値は、一定の試料におけるより正確な結合の尺度を与えると一般に信じられている。

10

20

30

40

50

(c) 対照のパーセント。対照のパーセント分析は、MFI分析又はF値分析のいずれかから得られた値を用いて行なうことができ、このデータを規格化する結果となる。それは、関連性のある値に対して以下の式に従って計算される。「最大」及び「最小」とは、関連性のある値に対する最大及び最小の蛍光をいう。

$$\% \text{対照} = ((\text{値} - \text{最小}) / (\text{最大} - \text{最小})) \times 100$$

Cy5-NKAのNK2R/CHO細胞への結合に対して計算されたMFIを、図3に示す。これらの結果は、7,720の最大MFI及び3.9nMのKd(解離定数)を示す。

SR48,968によるCy5-NKAの置換に対する対照のパーセントとして計算された結果を、図4に示す。0.575nMのIC₅₀が決定され、0.29nMの推定Kiが決定された。0.963というR²値が決定されたが、これは理論値に対する実験データの「優良適合性」を示すものである。

測定されたヒル係数は、0.996であった。ヒル係数は、結合における協同性の尺度である。1つの受容体が1つのリガンドに結合する単純な系に対して、Hill係数は1である。多価系に対しては、Hill係数は、1から変化しうるが、理想的には多価リガンドに関して小さい整数であるか又は多価受容体に関して小さい整数の逆数である。NKA/NK2R及びIL-8/IL-8BR系は、一価受容体及び一価リガンドを含む。未標識IL-8による標識IL-8の置換に対するF値として計算された結果を、図5に示す。

挿入グラフは、4パラメーター曲線適合に対する式を提供する、

$$y = ((M1 - M4) / (1 + (MO / M3)^{M2})) + M4$$

式中、M1は最大値であり、M4は最小値であり、M3は曲線の中央点(見かけのKd)であり、M2は中央点における傾きである。

前記結果に対する結合定数は、遊離のリガンド濃度の関数としての結合したリガンドの測定を含むスキャッチャード分析により決定することができる。具体的には、結合リガンド対遊離リガンドの比を、結合したリガンド濃度に対してプロットする。傾きがリガンドの解離定数の負の逆数であり、X軸との交点が最大結合値(B_{max})である直線が得られる。

これらの実験の結果は、本発明の方法がリガンド/標的結合の正確な定量分析を可能にし、組合せライブラリースクリーニングに普通に用いられる様々な標的に対して用いることができることを証明するものである。本方法は、高処理量スクリーニングにおいて迅速な検出及び分析をも可能にする。結果における変動は低く、この結果は従来の分析方法により得られたものと強く相関する。本方法は、顕微鏡レベルの容量で容易に行なわれる。したがって、それは、1536穴プレートを用いる場合等のマイクロリットルの試料での高処理量スクリーニングによく適し、被覆したマイクロビーズに由来する少量のライブラリー化合物の有効な使用を可能にする。

5) 従来用いられてきた検定法との比較。

受容体結合検定法において、検定の感度は、バックグラウンドにより制約される。バックグラウンドに対する最大シグナルの比を計算することにより、異なる検定の感度を比較することが可能である。IL-8結合を含む前記検定については、本発明の検定法では、200の非特異的バックグラウンドの上に6300のシグナル(F値)を与え、31.5というシグナル対バックグラウンド比を与えることがわかった。例えば、同様の濃度の標識IL-8を用いる [¹²⁵I] IL-8結合分析は、39,000cpmの非特異的バックグラウンドの上に85,000cpmのシグナルを生じ、2.1というシグナル対バックグラウンド比を与える。これらの値に基づくと、本発明の検定法を用いる感度の改良は約15倍である。

実施例2: SH2ドメイン結合に関する化合物のスクリーニング

高処理量検定法を行なって、ヒトGrb2のSH2ドメインに対するリガンド結合の阻害剤を決定する。Grb2は、そのSH2ドメインがホスホチロシン含有タンパク質に結合して、特異的な細胞タンパク質の会合を生じさせることによりシグナル伝達を促進するア

10

20

30

40

50

ダプタータンパク質である。G r b 2 のクローニングは、ローエンスタイン (Lowenstein) ら、Cell 70: 431-442 (1992) に記載されている。I R S - 1 は、インスリン受容体 (I R) チロシンキナーゼの基質であり、チロシンがリン酸化された後の G r b 2 の S H 2 ドメインに結合する。(I R S - 1 と G r b 2 との相互作用は、スコールニック (Skolnick) ら、EMBO 12: 1929-1936 (1993) に記載されている。)

この検定法のためのリガンドは約 $1 \mu\text{M}$ 未満の解離定数を持つことが好ましい。本発明の検定法は、I R S - 1 の配列 (p Y 8 9 6 アミノ酸の近くに位置する) に由来するホスホチロシン含有ペプチドである S H 2 ドメインに対する合成リガンドを用いる。このペプチドは、K S P G N p Y V N I E - C O₂ N H₂ の配列を有する。

ビーズ当たり 1×10^6 の結合部位を含む、ストレプトアビジンで被覆した $6.2 \mu\text{m}$ のビーズ (スフェロテック) を用いる。このビーズを、発現中にビオチンで特定の部位を標識した S H 2 ドメイン (S r c ホモロジー 2 ドメイン) とインキュベートする (シャッツ (Schatz, P. J.) (1993) Bio/Technology 11, 1138-1143)。

ビーズ、リガンド及びライブラリー化合物を 1 5 3 6 穴プレート中で混合し、インキュベートし、振盪する。次いで、試料を約 1 0 分間沈着させ、共焦点レーザー走査顕微鏡によりプレートを読み取る。活性な化合物は、結合した蛍光の量を減少させる。実施例 1 で前記したように結果を分析して、結合定数及び／又は阻害定数を決定する。

実施例 3 : E G F 受容体キナーゼドメインの結合に関する化合物のスクリーニング 高処理量検定法を行なって、上皮成長因子 (E G F) のキナーゼドメインに対するリガンドの結合を阻害するライブラリー化合物を決定する。このキナーゼは、ペプチド R R K G S T A E N A E Y L R V A (「1 1 7 3」ペプチド) を含む多数のタンパク質及びペプチドをリン酸化する。アミノ酸配列中の下線を付したチロシンがこのキナーゼによりリン酸化される。

E G F 受容体キナーゼドメインは、アレクシスバイオケミカルズ (サンジエゴ、カルフォルニア州) から入手する。1 1 7 3 ペプチドをビオチン化し、次いで、ストレプトアビジンで被覆した $6.2 \mu\text{m}$ のマイクロビーズ (スフェロテック) と共にインキュベートして、このペプチドをビーズに固定させる。ホスホチロシンに特異的なモノクローナル抗体は、シグマ (セントルイス、ミズーリー州) 又はバイオゲネシス (サンダウン、ニューハンプシャー州) から入手し、製造業者の指示 (アマシャム) に従って、C y 5 で標識する。

1 5 3 6 穴プレートで検定を行なう。E G F キナーゼドメインは、中性緩衝液中、1 1 7 3 で被覆したマイクロビーズ、M g · A T P、C y 5 標識抗ホスホチロシン抗体及びライブラリー化合物の存在下でインキュベートする。このキナーゼによる 1 1 7 3 ペプチドのリン酸化の際に、ペプチドは、蛍光標識抗体によって結合させられ、蛍光がビーズと結合するようになる。阻害性ライブラリー化合物は、リン酸化を妨害し、ビーズに結合した蛍光を減少させる結果となる。プレートのウェルを、共焦点レーザー走査顕微鏡により走査し、得られたデータを実施例 1 に記載したように、さらに分析して阻害及び／又は結合の値を決定する。

10

20

30

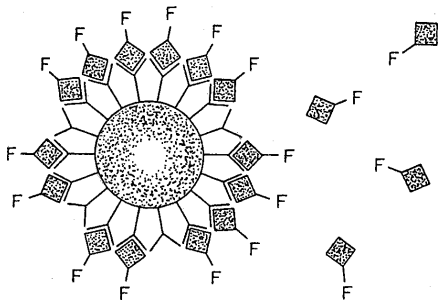
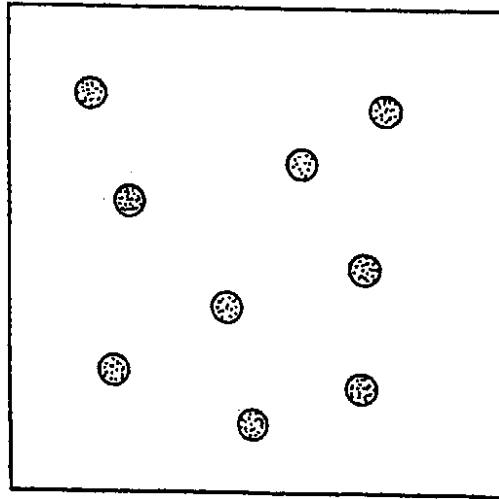
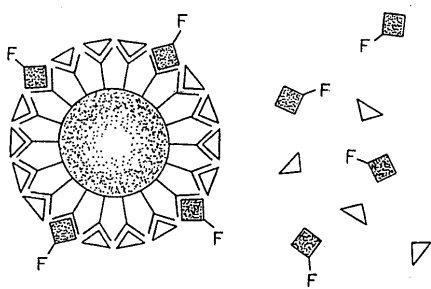
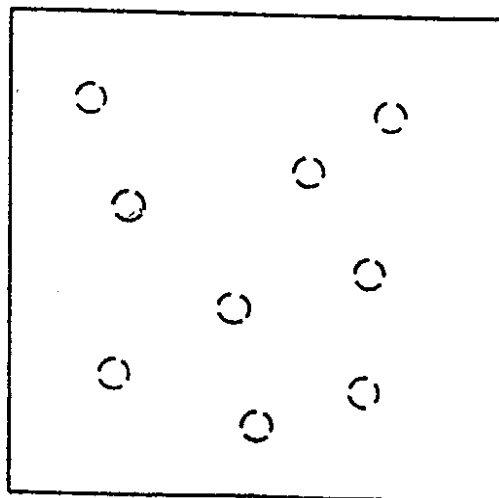
【図 1 A】
FIG. 1A【図 1 B】
FIG. 1B【図 1 C】
FIG. 1C【図 1 D】
FIG. 1D

FIG. 2

【図 2】

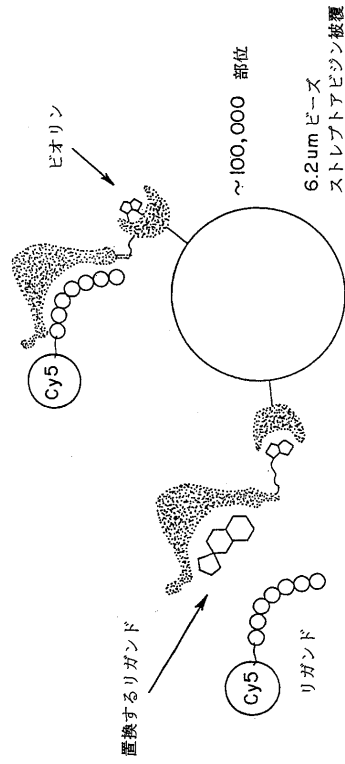


FIG. 3

【図 3】

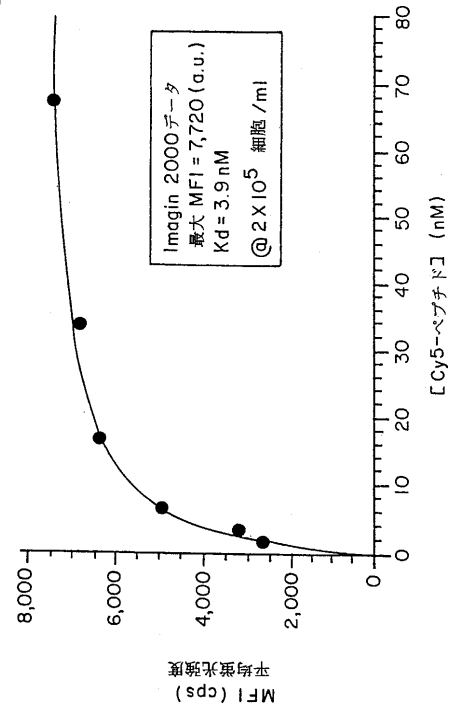


FIG. 4

【図 4】

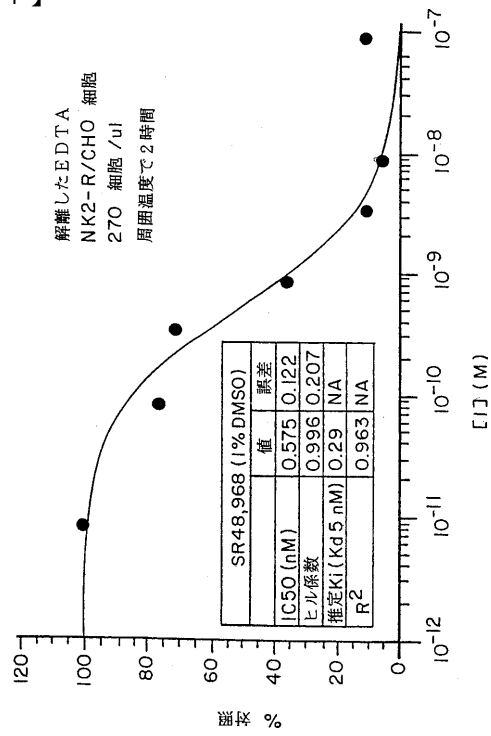
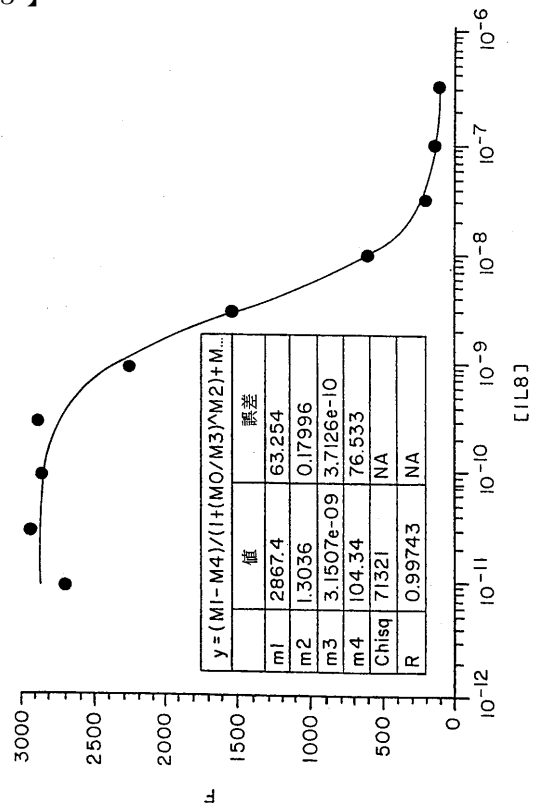


FIG. 5

【図 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 トーマス ディー. ワイ. チュング
アメリカ合衆国、デラウェア 19810-3816、ウイルミントン、フェアウッド レーン
2005番地
- (72)発明者 グレゴリー エル. カーク
アメリカ合衆国、ニュージャージー 08558、スキルマン、ナッソー コート 6番地
- (72)発明者 ジェイムス イングリース
アメリカ合衆国、ニュージャージー 08810、デイトン、ラースクプル ドライブ 45番地
- (72)発明者 ダニエル チェルスキー
アメリカ合衆国、ペンシルベニア 19065、モイラン、グレンウッド アベニュー 300番
地

審査官 宮澤 浩

- (56)参考文献 特開昭63-066465 (JP, A)
特開昭58-206966 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/50
G01N 33/15