

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6141327号
(P6141327)

(45) 発行日 平成29年6月7日 (2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月12日 (2017.5.12)

(51) Int. Cl.	F I
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34 Z N A
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00

請求項の数 25 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-555836 (P2014-555836)	(73) 特許権者	504058215
(86) (22) 出願日	平成25年2月5日 (2013.2.5)		ディスカヴァーエックス コーポレイショ ン
(65) 公表番号	特表2015-507200 (P2015-507200A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 538 フリーモント アルブレイ スト リート 42501
(43) 公表日	平成27年3月5日 (2015.3.5)	(74) 代理人	100147485
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/024789		弁理士 杉村 憲司
(87) 国際公開番号	W02013/119579	(74) 代理人	100136858
(87) 国際公開日	平成25年8月15日 (2013.8.15)		弁理士 池田 浩
審査請求日	平成27年6月19日 (2015.6.19)	(74) 代理人	100178685
(31) 優先権主張番号	61/595,525		弁理士 田浦 弘達
(32) 優先日	平成24年2月6日 (2012.2.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質存在量の測定による細胞内結合事象の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞における標的ペプチドの結合部位に対する化合物の結合を評価するための方法であって、

(a) 細胞中に、(i) 変異していないペプチドと比較してペプチドを不安定化させる不安定化変異を有する標的ペプチドと (i i) 標識化ペプチドとを含む融合タンパク質を提供するステップ；

(b) (a) の細胞および化合物の混合物を、標的ペプチドの結合部位に対する化合物の結合を可能にし、結合による融合タンパク質の安定化を可能にするのに十分な期間にわたって、インキュベートするステップ、次いで、

(c) ステップ (b) の混合物を、インキュベートするステップの後に残留する標識化ペプチドの量を検出する標識と合わせるステップ
を含み、
検出される標識化ペプチドの量の変化が、標的ペプチドに対する化合物の結合を示す、方法。

【請求項 2】

化合物が、小分子、ペプチドおよび全長タンパク質のうちの 1 つである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

化合物が、標的ペプチドのネイティブリガンドに対する標的ペプチドの結合を阻害する

、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

結合部位が、(a) ATP 結合部位、(b) プロモドメイン配列、(c) 触媒部位または (d) アロステリック部位のうちの 1 つである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

標識化ペプチドが、(a) β -ガラクトシダーゼの酵素ドナー断片、および (b) 二次標識に対する結合エピトープを有するペプチド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 6】

標識化ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3 または配列番号 4 のうちの 1 つに従う配列を有する酵素ドナー（「ED」）である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

酵素アクセプター（「EA」）が、配列番号 5 に従う配列を有する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

化合物の非存在下でステップ (a) から (c) を実施して、検出される標識化ペプチドの量の変化を決定するための対照を提供するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記標的ペプチドが、トランケーションである変異を含み、前記変異が、結合部位の外側に存在する、請求項 1、5 および 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記標的ペプチドが、全長タンパク質の配列の少なくとも 10% の欠失である変異を含む、請求項 1、5 および 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

細胞における標的ペプチド上の結合部位に対する結合に関して化合物を評価するための方法であって、

(a) (i) 変異していないペプチドと比較してペプチドを不安定化させる不安定化変異を有する前記標的ペプチドと (ii) 標識化ペプチドとを含む融合タンパク質を発現する細胞を提供するステップ

(b) ステップ (a) の第 1 の数の細胞を前記化合物と共に、ステップ (a) の第 2 の数の細胞を前記化合物なしで、標的ペプチドの結合部位に対する化合物の結合を可能にし、化合物の結合による融合タンパク質の安定化を可能にするのに十分な期間にわたって、インキュベートするステップ、次いで、

(c) ステップ (b) でインキュベートした試料ウェルに、前記インキュベートするステップの後に細胞中に残留する標識化ペプチドの量を検出する標識を添加するステップを含み、それにより、第 1 の数の細胞と第 2 の数の細胞との間の標識化ペプチドの量の差異が、標的ペプチドに対する化合物の結合を示す、方法。

【請求項 13】

前記化合物が、小分子、ペプチドおよび全長タンパク質のうちの 1 つである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ (b) の化合物と結合について競合する第 2 の化合物を添加するステップをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記結合部位が、(a) ATP 結合部位、(b) プロモドメイン配列、(c) 触媒部位または (d) アロステリック部位のうちの 1 つである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記標識化ペプチドが、(a) EDまたは(b) 標識化ペプチドに対する結合エピトープである、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記標識化ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 のうちの 1 つに従う配列を有する ED である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ (d) を除くステップ (a)、(b)、(c) および (e) を実施して、標識化ペプチドの量の前記変化を決定するための対照を提供するステップをさらに含む、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 0】

前記標的ペプチドが、トランケーションである変異を含み、前記変異が、結合部位の外側に存在する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記標的ペプチドが、欠失である変異を含み、前記変異が、結合部位の外側に存在する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 2】

標的ペプチドと化合物との相互作用をモニタリングするステップを実施するためのキットであって、(a) 変異していないペプチドと比較してペプチドを不安定化させる不安定化変異を有する標的ペプチドとβ-ガラクトシダーゼ断片の ED 断片とを含む融合タンパク質を含む細胞；(b) β-ガラクトシダーゼの EA 断片；および(c) β-ガラクトシダーゼ基質を含む、キット。

20

【請求項 2 3】

細胞中への化合物の導入の影響を研究するためのキットであって、(a) 変異していないペプチドと比較してペプチドを不安定化させる不安定化変異を有する標的ペプチドとβ-ガラクトシダーゼ断片の ED 断片とを含む融合タンパク質を含む細胞；(b) 化合物、(c) β-ガラクトシダーゼの EA 断片；および(d) β-ガラクトシダーゼ基質を含む、キット。

【請求項 2 4】

30

(a) 変異していないペプチドと比較してペプチドを不安定化させる不安定化変異を有する標的ペプチドと(b) β-ガラクトシダーゼの ED 断片とを含む融合タンパク質をコードする発現構築物を含むキット。

【請求項 2 5】

前記第 2 の化合物が、小分子、ペプチドおよび全長タンパク質のうちの 1 つである、請求項 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願に対する相互参照

40

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2012年2月6日出願の米国仮特許出願第61/595,525号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

政府の支援の陳述

なし。

【0 0 0 3】

配列表、コンピュータプログラムまたはコンパクトディスクに対する言及

「Legal Framework for EFS-Web」(11年4月6日)に従って、出願人は、ASCIIテキストファイルとして配列表を本明細書と共に提出する。このテキストファイルは、米国特許規則1.821(c)により要求される紙複写およ

50

び米国特許規則 1. 8 2 1 (e) により要求されるコンピュータ可読形態 (C R F) の両方として機能する。このファイルの作成の日付は、2 0 1 3 年 1 月 3 1 日であり、名称は 3 8 1 7 4 1 1 P. t x t であり、A S C I I テキストファイルのサイズは 4 1, 1 5 0 バイトである。出願人は、配列表の内容を、その全体を参照により組み込む。

【0 0 0 4】

本発明は一般に、細胞における対象の標的の安定性、およびしたがってその存在量、または分子の数を増加させることによって、哺乳動物細胞の内側で対象の標的に対する化合物の結合をモニタリングする方法に関する。さらに、本発明は、細胞において標的-化合物結合の阻害剤として小分子をスクリーニングすることにも関する。

【背景技術】

10

【0 0 0 5】

本発明の特定の態様に関する背景情報は、詳細な説明中で言及されるが必ずしも詳細に記載されていない技術的特徴に関し得るので、かかる背景情報が以下に提示される。即ち、本発明において使用される個々の部分または方法は、以下で考察される材料においてより詳細に記載され得、これらの材料は、特許請求される本発明の特定の態様を作製または使用するために、当業者に対してさらなる指針を提供し得る。以下の考察は、任意の明細書中の特許請求の範囲または記載された材料の先行技術効果に関する情報の妥当性に関する承認として解釈すべきではない。

【0 0 0 6】

タンパク質などの種々の分子間での結合は、正常な細胞機能にとって重要な生物学的プロセスの中核をなす。シグナル伝達、アポトーシス、細胞および成長増殖、遺伝子調節などの細胞経路は、特定のタンパク質間での一連の相互作用および結合を必要とする。転写および翻訳の後、タンパク質は、同期されたタンパク質フォールディングを介して、その機能的形状またはコンフォメーションをとる。正確なタンパク質フォールディングは、タンパク質がその所望の機能および発現を実施するために重要である。フォールディングを受けないまたは必要な様式で折り畳まれないタンパク質は、細胞中での短い半減期を有し、細胞の分解系がそれを不適切なタンパク質として認識するので、細胞によって廃棄される。適切に折り畳まれたタンパク質は、より長い半減期を有し、結合事象または他の必要な細胞機能に関与する。したがって、タンパク質の安定性は、細胞におけるタンパク質の発現および機能に重要であり、これは、正確な構造を介して達成され、複合体形成を導く結合事象に関与している。

20

30

【0 0 0 7】

タンパク質結合は、特別な特徴的配列または相互作用界面として公知の表面を介して生じる。例えば、タンパク質-タンパク質相互作用の場合、これらの界面は、「ホットスポット」として公知であり、界面の中心領域中の至る所に点在する、構造的に保存された残基が富化された相補的ポケットによって一般に特徴付けられる緊密な嵌合領域を構成する (Hubbard および Argos Cavities and packing at protein interfaces. Protein Sci 1994 年; 3 巻: 2194~2206 頁)。これらのポケットは、「相補的」と分類される (Binkowski ら、Inferring functional relationships of proteins from local sequence and spatial surface patterns J. Mol Biol 2003 年; 332 巻: 505~526 頁) が、これは、形状において、ならびに疎水性および親水性ホットスポットの近位において、埋められた荷電残基との大きな相補性が存在するからである (Arkin および Wells Small molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. Nat Rev Drug Discov 2004 年; 3 巻: 301~317 頁)。「ホットスポット」は、結合に関与し、生理学的機能を実施するのに重要なアミノ酸配列である。

40

【0 0 0 8】

50

タンパク質機能の他の態様は、アロステリックモジュレーションであり、タンパク質機能の制御のための一般的かつ幅広い機構として長く認識されてきた。モジュレーターは、タンパク質上の活性部位（ホットスポット）とは別個の調節部位に結合し、タンパク質機能に多大な影響を与え得る、タンパク質挙動の古典的制御機構であるコンフォメーション変化を生じる。上記のように、タンパク質は、アロステリックモジュレーションを受ける場合、ネイティブ状態にある。

【0009】

特に重要なもの（および以下に例示されるもの）は、リン酸化のプロセスに関与するタンパク質キナーゼであり、タンパク質キナーゼは、ATPなどの高エネルギードナー分子から特異的基質へとリン酸基を転移させる。タンパク質リン酸化は、細胞間シグナルがイオン輸送、細胞増殖およびホルモン応答などの重要な細胞内プロセスを調節する、最も重要なシグナル伝達機構の1つである。キナーゼは、最も大きい、最も機能的に多様な遺伝子ファミリーの1つを構成する、細胞機能の重要な調節因子である。これらのキナーゼは、多くのタンパク質およびほとんど全ての細胞プロセスの活性、局在化および全体的機能を指示する。タンパク質キナーゼは、アクチベータータンパク質、阻害剤タンパク質、調節サブユニットに結合するリガンド、補因子、および他のタンパク質によるリン酸化またはそれ自身によるリン酸化（自己リン酸化）によって、調節され得る。キナーゼは、シグナル伝達、および細胞周期などの複雑な機能の協調において突出している。したがって、このことが、キナーゼを、がん、糖尿病、炎症および関節炎などの多くの疾患状態における治療的介入のための潜在的な標的クラスにしており、製薬会社によって研究されている全てのタンパク質標的の30%もの多くを占める。

【0010】

多数の方法が、細胞の結合事象を研究するために開発および使用されてきた。しかし、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、アフィニティブロッキング、免疫沈降および架橋などの物理的方法は、非常に弱い相互作用を検出するか、さもなければ直接接触していない可能性がある最も近い隣接物を検出するかのいずれかである。タンパク質プロービングおよびファージディスプレイなどのライブラリーベースの方法もまた、特定の固有の制限を有する。ツーハイブリッド系は、核に局在化し得るタンパク質のみに限定され、特定の細胞外タンパク質とのその使用を妨げ得る。移行アッセイは、非常に時間がかかり高価であるが、これは、移行アッセイが共焦点蛍光系を必要とし、コンビナトリアルライブラリーからの固有の蛍光およびバックグラウンド蛍光などのアーチファクトによって悩まされるからである。しかし、実行が容易で高スループット様式で実施でき、構成的な生物学的複合体の破壊を研究することおよび相互作用界面を同定することを受け入れやすい方法は、存在しない。

【0011】

さらに、タンパク質の安定化および不安定化アッセイのための系もまた、開発されている。Stankunasらによる研究（Stankunas K.、Bayle H.、Havranek J.J.、Wandless T.J.、Baker D.、Crabtree G.R.、Gestwicki J.E. Rescue of degradation-prone mutants of the FK506-Rapamycin binding (FRB) protein with chemical ligands; ChemBioChem、2007年；8巻（10号）：1162～1169頁）は、化学的リガンドによるFRBタンパク質の易分解性変異体のレスキューを示している。しかし、細胞中でのルシフェラーゼの構造および半減期に起因して、この系は、標的タンパク質の機能を妨害し得、結合アッセイのために融合タンパク質を安定化させるためのリガンドの利用可能性もまた制限している。

【0012】

初期の研究およびアッセイは、細胞結合をモジュレートすることが可能な第1の化合物クラスとして、大きいペプチドおよび天然産物に対して焦点を当ててきた。しかし、ますます多くの証拠は、小分子もまた、生物学的複合体を担う相互作用をモジュレートするこ

10

20

30

40

50

とを示唆している (Toogood, Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. J Med Chem 2002年、45巻:1543~1558頁。Berg T, Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. Angew Chem Int Ed Engl 2003年、42巻:2462~2481頁)。数ある中でも、より高い代謝安定性、バイオアベイラビリティ、より容易な合成および高い溶解性に起因して小分子を阻害剤として使用することには、多数の利点が存在する。

【0013】

10

本発明は、酵素断片補完 (enzyme fragment complementation) の使用によって例示される。原核生物において最初に示された、ベータガラクトシダーゼ (β -gal) を使用する酵素断片補完 (EFC) は、活性酵素を形成する酵素断片の補完に基づいている。例えば、Ullmanら、J. Mol. Biol. 24巻:339~43頁 (1967年) ; Ullmanら、J. Mol. Biol. 32巻:1~13頁 (1968年) ; Ullmanら、J. Mol. Biol. 12巻:918~23頁 (1965年) を参照されたい。これらの系は、試験タンパク質の低レベル発現、相互作用の直接的結果としてのシグナルの生成、および酵素的増幅を含む、重要な利点を有する。結果として、これらの系は、高感度で生理学的に適切なアッセイである。例えば、Blakeleyら、Nat. Biotechnol. 18巻:218~22頁 (2000年) を参照されたい。

20

【0014】

具体的な特許および刊行物

Wandlesら、米国特許出願公開第2010/0034777号、2010年2月11日公開、表題「Method for Regulating Protein Function in Cells In Vivo Using Synthetic Small Molecules」は、タンパク質の安定性を条件付きで制御するための系を開示している。対象のタンパク質 (POI) に対する不安定化ドメイン (DD) の遺伝子融合は、融合タンパク質全体の分解を生じる。例示された不安定化ドメインは、FKBP由来であり、安定化リガンドはShield 1である。

30

【0015】

2005年6月23日公開の本譲受人によって所有される米国特許出願公開第2005/0136488号「Cellular Membrane Protein Assay」は、 β -ガラクトシダーゼ酵素断片補完において使用するための種々の β -ガラクトシダーゼ酵素ドナー即ち「ED」配列を開示している。

【0016】

2005年12月29日公開の米国特許出願公開第2005/0287522号「Detection of Protein Translocation by beta-galactosidase Reporter Fragment Complementation」は、酵素断片補完を使用してタンパク質移行をモニタリングするための種々の方法論を開示している。

40

【0017】

2009年1月20日付の本譲受人によって所有される米国特許第7,479,377号、表題「Genetic Construct Intracellular Monitoring System」は、細胞中への融合タンパク質の導入のための遺伝子構築物を使用する、融合タンパク質を使用して細胞内事象をモニタリングするための系を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

50

- 【特許文献1】米国仮特許出願第61／595, 525号
- 【特許文献2】米国特許出願公開第2010／0034777号
- 【特許文献3】米国特許出願公開第2005／0136488号
- 【特許文献4】米国特許出願公開第2005／0287522号
- 【特許文献5】米国特許7, 479, 377号
- 【特許文献6】米国特許第4, 708, 929号
- 【特許文献7】米国特許出願第11／132, 764号
- 【特許文献8】米国特許第4, 378, 428号
- 【特許文献9】WO00／71702
- 【特許文献10】WO01／94617 10
- 【特許文献11】米国特許第5, 935, 840号
- 【特許文献12】米国特許出願第20070275397号
- 【特許文献13】米国特許出願第20100285451号
- 【特許文献14】米国特許第5, 444, 161号
- 【特許文献15】US2012／02191、「Detection method based on time resolved real time fluorescent energy...」
- 【特許文献16】EP2487183、「Ubiquitin-isopeptide probes」
- 【特許文献17】特許出願WO／2003／087051、「Methods for Identifying allosteric sites」 20
- 【特許文献18】米国特許第7, 589, 167号
- 【特許文献19】US2008／0306127
- 【非特許文献】
- 【0019】
- 【非特許文献1】HubbardおよびArgos Cavities and packing at protein interfaces. Protein Sci 1994年；3巻：2194～2206頁
- 【非特許文献2】Binkowskiら、Inferring functional relationships of proteins from local sequence and spatial surface patterns J. Mol Biol 2003年；332巻：505～526頁 30
- 【非特許文献3】ArkinおよびWells Small molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. Nat Rev Drug Discov 2004年；3巻：301～317頁
- 【非特許文献4】Stankunas K.、Bayle H.、Havranek J J.、Wandless TJ.、Baker D.、Crabtree GR.、Gestwicki JE. Rescue of degradation-prone mutants of the FK506-Rapamycin binding (FRB) protein with chemical ligands; ChemBioChem、2007年；8巻(10号)：1162～1169頁 40
- 【非特許文献5】Toogood、Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. J Med Chem 2002年、45巻：1543～1558頁
- 【非特許文献6】Berg T、Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules. Angew Chem Int Ed Engl 2003年、42巻：2462～2481頁 50

- 【非特許文献7】Ullmanら、J. Mol. Biol. 24巻：339～43頁（1967年）
- 【非特許文献8】Ullmanら、J. Mol. Biol. 32巻：1～13頁（1968年）
- 【非特許文献9】Ullmanら、J. Mol. Biol. 12巻：918～23頁（1965年）
- 【非特許文献10】Blakelyら、Nat. Biotechnol. 18巻：218～22頁（2000年）
- 【非特許文献11】Maniatis、FritschおよびSambrook、「Molecular Cloning: A laboratory Manual」（1982年） 10
- 【非特許文献12】「DNA Cloning: A Practical Approach」、Volumes I and II（D. N. Glover編 1985年）
- 【非特許文献13】「Oligonucleotide synthesis」（M. J. Gait編 1984年）
- 【非特許文献14】「Nucleic Acid Hybridization」（B. D. HamesおよびS. J. Higgins編（1985年））
- 【非特許文献15】「Transcription and Translation」（B. D. HamesおよびS. J. Higgins編（1984年））
- 【非特許文献16】「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney、編（1986年）） 20
- 【非特許文献17】「Immobilized Cells and Enzymes」（IRL Press、（1986年））
- 【非特許文献18】B. Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」（1984年）
- 【非特許文献19】Szegezdiら、「Bcl-2 family on guard at the ER」、Am J Physiol Cell Physiol、2009年；296巻：C941～C953頁
- 【非特許文献20】Kimら、「Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis」、Molecular Cell 36巻、487～499頁、2009年11月13日 30
- 【非特許文献21】J Biol. Chem. 243巻（1969年）、3352～59頁
- 【非特許文献22】Ivanic J、Yu X、Wallqvist A、Reifman J（2009年）「Influence of Protein Abundance on High-Throughput Protein-Protein Interaction Detection」、PLOS ONE 4巻（6号）：e5815頁. doi:10.1371/journal.pone.0005815
- 【非特許文献23】Ghaemmaghamiら、「A quantitative, high-throughput screen for protein stability」、PNAS 2000年7月18日97巻15号8296～8301頁 40
- 【非特許文献24】Ignatovaら、「Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling」、PNAS 2004年1月13日101巻2号523～528頁
- 【非特許文献25】Wehrmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. 2002、99、3469～74頁
- 【非特許文献26】Langleyら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA（1975）72：1254～1257頁 50

- 【非特許文献27】Lin、VillarejoおよびZabin、1970、Biochem. Biophys. Res. Commun. 40:249頁
- 【非特許文献28】CeledaおよびZabin、1979、Biochem. 18:404頁
- 【非特許文献29】Welphy、FowlerおよびZabin、1981、J. Biol. Chem. 256:6804頁
- 【非特許文献30】Nolanら、Proc. Natl Acad. Sci. USA、85:2603~2607頁(1988)
- 【非特許文献31】Lojda、Z.、Enzyme Histochemistry: A Laboratory Manual、Springer、Berlin、(1979) 10
- 【非特許文献32】MohlerおよびBlau、Proc. Natl. Acad. Sci.、93:12423~12427頁(1996)
- 【非特許文献33】Minden(1996) BioTechniques 20(1):122~129頁
- 【非特許文献34】Rotmanら、(1963) Proc. Natl. Acad. Sci.、USA 50:1~6頁
- 【非特許文献35】Bronsteinら、J Biolumin. Chemilumin. 4:99~111頁(1989)
- 【非特許文献36】the series、Methods in Enzymology、Academic Press、New York 20
- 【非特許文献37】Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel、F. M. ら編、2000)
- 【非特許文献38】Sambrook、FritschおよびManiatis、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Second Edition(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.
- 【非特許文献46】Grigorenkoら、「A Genetically Engineered Fusion Protein with Horseradish Peroxidase as a Marker Enzyme for Use in Competitive Immunoassays」、Anal. Chem. 73:1134~1139頁(2001) 30
- 【非特許文献47】Brooks、D. A. Nat. Chem. Biol. 3、84~85頁(2007)
- 【非特許文献48】Romisch、K. Traffic. 5、815~820頁(2004)
- 【非特許文献49】Yewdellら、「Out with the old、in with the new? Comparing methods for measuring protein degradation」、Cell Biol Int 35:457頁(2011) 40
- 【非特許文献50】Prosite documentation PDOC00100 ([http\(colon slash slash\)prosite.expasy.org/PDOC00100](http://colonslashslash.prosite.expasy.org/PDOC00100))
- 【非特許文献51】[http\(colon slash slash\)www\(dot\)ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/](http://colonslashslash.www(dot)ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/)、the EMBL catalytic site atlas
- 【非特許文献52】PNAS March 10、2009 vol. 106 no. 1 0 3935~3940頁
- 【非特許文献53】[http\(colon slash slash\)apps.thesgc.org/chemical_probes/UNC0638#overview](http://colonslashslash.apps.thesgc.org/chemical_probes/UNC0638#overview) 50

、 SGC product literature

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0020】

以下の簡潔な概要は、本発明の全ての特徴および態様を含むことを意図しておらず、本発明がこの概要において考察される全ての特徴および態様を含まなければならないことも暗示しない。

【0021】

本発明は、アッセイされる標的ペプチドが標識化ペプチドと融合され、真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞において融合タンパク質として発現されるアッセイに関する。標的ペプチドが試験化合物に結合する場合、これは複合体を形成し、安定化され、したがって、細胞中の融合タンパク質の量、即ち、細胞中の融合タンパク質（およびその標的ペプチド構成成分）の存在量を変化させる。標識化ペプチド構成成分は、 β ガラクトシダーゼの断片、例えば、ProLabel (PL) ペプチドと命名された独占所有権のあるEDなどの酵素ドナー (ED) であり得る。一部の実施形態では、この標識化ペプチド/タグは、ED以外のものであり得る。

【0022】

ある特定の態様では、本発明は、細胞における標的ペプチド上の結合部位に対する化合物の結合を評価するための方法であって、(a) 細胞中に、(i) 不安定化変異を含む標的ペプチドと (ii) 標識化ペプチドとを含む融合タンパク質を提供するステップ；(b) 細胞および化合物の混合物を、標的ペプチドの結合部位に対する化合物の結合を可能にし、結合による融合タンパク質の安定化を可能にするのに十分な期間にわたって、インキュベートするステップ、次いで (c) ステップ (b) の混合物を、インキュベートするステップの後に融合タンパク質上に残留する標識化ペプチドの量を検出する標識と合わせるステップを含み、検出される標識化ペプチドの量の変化が、標的ペプチドに対する結合を示す、方法を含む。

【0023】

その結合効果について評価される試験化合物であり得る化合物は、小分子、ペプチドまたは全長タンパク質であり得る。化合物は、薬理学的薬剤であり得るか、または標的ペプチドに対するネイティブリガンドであり得る。この状況では、ネイティブリガンドに結合する試験化合物を添加でき、標的ペプチドに対するその結合をモジュレートできる。

【0024】

ある特定の態様では、本発明は、上述のように、標的ペプチド上の結合部位に対する化合物の結合を測定するための方法を含み、結合部位は、(a) ATP 結合部位、(b) プロモドメイン配列、(c) 触媒的 (酵素的) 活性部位または (d) アロステリック部位のうちの1つであり得る。

【0025】

ある特定の態様では、本発明は、標識化ペプチドが、(a) β -ガラクトシダーゼの酵素ドナー断片、(b) 二次標識に対する結合エピトープを有するペプチドからなる群から選択される方法を含む。

【0026】

ある特定の態様では、本発明は、標識化ペプチドが、配列番号1、配列番号2または配列番号3のうちの1つに従う配列を有するEDである方法を含む。

【0027】

ある特定の態様では、本発明は、EAが配列番号4に従う配列を有する方法を含む。

【0028】

ある特定の態様では、本発明は、細胞が哺乳動物細胞である上記方法を含む。

【0029】

ある特定の態様では、本発明は、化合物の非存在下でステップ (a) から (c) を実施して、検出される標識化ペプチドの量の変化を決定するための対照を提供するステップを

10

20

30

40

50

さらに含む上記方法を含む。

【0030】

ある特定の態様では、本発明は、標的ペプチドがトランケーションである変異を含み、前記変異が結合部位の外側に存在する上記方法を含む。以下に記載するように、標的ペプチドは、化合物に対する結合によって安定化されない限り比較的短い半減期を有するように選択されている。変異は、アミノ末端、カルボキシ末端または両方の末端のいずれかからある特定の数のアミノ酸を除去することによって、標的ペプチドをトランケーションさせることを含み得る。除去されるアミノ酸の数は、創出される標的ペプチドに依存する。例えば、これは、結合部位が標的ペプチド中に残る限り、最大5～10アミノ酸、5～20アミノ酸、5～10アミノ酸などまでであり得る。アミノ酸は、適切なフォールディングに必要なドメインなどの、中心ドメインから除去され得る。ある特定の態様では、本発明は、標的ペプチドが、全長タンパク質の配列の少なくとも10%の欠失である変異を含む方法を含む。言い換えると、この実施形態では、ネイティブタンパク質が1000アミノ酸長である場合、少なくとも100アミノ酸が除去される。

10

【0031】

ある特定の態様では、本発明は、細胞における標的ペプチド上の結合部位に対する結合の阻害剤として小分子を評価するための方法であって、(a) 前記細胞中に、(i) 不安定化変異を含む前記標的ペプチドと (ii) 標識化ペプチドとを含む融合タンパク質を提供するステップ；(b) 前記細胞の試料ウェルに前記化合物を添加するステップ；(c) ステップ(b)の前記細胞および前記化合物を、標的ペプチドの結合部位に対する化合物の結合を可能にし、化合物の結合による融合タンパク質の安定化を可能にするのに十分な期間にわたって、インキュベートするステップ、次いで(d) 前記細胞の試験ウェルに前記小分子を添加するステップ；(e) 試料ウェルにおいて、ステップ(c)および(d)の試料ウェルの内容物を、前記インキュベートするステップの後に細胞中に残留する標識化ペプチドの量を検出する標識と合わせるステップを含み、それにより、検出される標識化ペプチドの量の変化が、小分子による、標的ペプチドに対する化合物の結合の阻害を示す、方法を含む。

20

【0032】

ある特定の態様では、本発明は、前記化合物が、小分子、ペプチドおよび全長タンパク質のうちの1つである上記方法を含む。ある特定の態様では、本発明は、前記小分子が、薬物候補、ペプチドおよび全長タンパク質のうちの1つである上記方法を含む。ある特定の態様では、本発明は、前記結合部位が、(a) ATP結合部位、(b) プロモドメイン配列、(c) 触媒部位または(d) アロステリック部位のうちの1つである方法を含む。

30

【0033】

ある特定の態様では、本発明は、標識化ペプチドが、(a) EDまたは(b) 標識化ペプチドに対する結合エピトープである上記方法を含む。EDは、配列番号1、配列番号2または配列番号3のうちの1つに従う配列を有し得る。

【0034】

ある特定の態様では、本発明は、アッセイが、標識化ペプチドの量の前記変化を決定するための対照を提供するために、化合物を添加することなく実施される方法を含む。

40

【0035】

ある特定の態様では、本発明は、上記方法を実施するためのキットを含む。キットは、対象の標的を挿入するための、標識化ペプチドを既に含んでいる発現ベクターを一般に含む。ある特定の態様では、本発明は、細胞中への化合物の導入の影響を研究するためのキットであって、(a) 標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片とを含む融合タンパク質を含む細胞；(b) 化合物、(c) β-ガラクトシダーゼのEA断片；および(d) β-ガラクトシダーゼ基質を含む、キットを含む。ある特定の態様では、本発明は、細胞相互作用を媒介することに対する化合物の影響を研究するためのキットであって、(a) 標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片とを含む融合タンパク質を含む細胞；(b) 化合物、(c) β-ガラクトシダーゼのEA断片；および(d) β-ガラクトシダーゼ基質

50

を含む、キットを含む。ある特定の態様では、本発明は、細胞相互作用に対する小分子阻害剤の影響を研究するためのキットであって、(a) 標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片とを含む融合タンパク質を含む細胞；(b) 小分子、(c) β-ガラクトシダーゼのEA断片；および(d) β-ガラクトシダーゼ基質を含む、キットを含む。ある特定の態様では、本発明は、相互作用界面をモニタリングするためのキットであって、(a) バリエーション配列長の標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片とを含む融合タンパク質を含む細胞；(b) β-ガラクトシダーゼのEA断片；および(c) β-ガラクトシダーゼ基質を含む、キットを含む。ある特定の態様では、本発明は、標的とβ-ガラクトシダーゼのED断片とを含む融合タンパク質をコードする発現構築物を含むキットを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0036】

概要

上で考察したように、タンパク質のトランケーションは、そのフォールディングおよびアンフォールディングに影響を与え、最終的にはその機能性に影響を与える。かかる不安定性および細胞内でのタンパク質安定性に影響を与える他の因子が、かかるタンパク質の安定化の影響を測定するために使用され得ることが、現在見出されている。不安定なタンパク質は、複合体を形成する時まで、細胞によって分解され、さらなる細胞プロセスから安定化され得ると認識されている。天然化合物（例えば、タンパク質）および多くの試験化合物の両方の結合は、特異的結合配列を介して生じるので、活性なまたはアロステリックな結合配列を含むある特定のトランケーションタンパク質断片が、化合物結合を介して安定化され得る。したがって、タンパク質断片の活性部位またはアロステリック部位において結合する化合物は、断片と複合体を形成し、細胞中でのその半減期を変化させる。これは、細胞におけるより大きい数のタンパク質分子、またはより大きい「タンパク質存在量」を導く。

20

【0037】

小分子試験化合物を用いてネイティブまたは天然に変異したヒトタンパク質を標的化することは、薬物開発の重要な一部である。したがって、切断型の不安定化タンパク質の安定性、切断型断片に結合する化合物をモニタリングすること、相互作用界面を推定すること、および細胞性結合複合体の阻害剤として小分子をスクリーニングすることは、多数のヒト障害に対する薬物開発において潜在的な適用を有し、本発明の態様を示す。

30

【0038】

多数の小分子が、その標的ペプチドの活性なコンフォメーションのATP部位に結合することによって作用する（例えば、BCR-Ab1キナーゼに非共有結合するダサチニブ）。標的ペプチドのアミノ領域および／またはカルボキシル領域の一部を除去し、ATP結合部位を残すことによって、かかる結合が引き起こす細胞中での増加した安定性およびしたがって増加した滞留時間を測定することによって、合成または天然のATP競合分子が結合について次いで試験され得る。標的に結合した、PLを保有する融合タンパク質の増加した濃度は、EAを添加することによって測定され、既知の生物物理学的および生物学的アプローチによってさらに特徴付けられ得る結合配列の指標を本発明者らに与える。

40

【0039】

要約すれば、本発明の方法は、結合性実体に結合しておらず細胞機構によって分解される標的ペプチドから、検出のために酵素断片に結合した標的ペプチドを識別するために選択された所定の時間の後に細胞中に残留する、試験化合物に結合ししたがって細胞のターンオーバーに対して安定化されている標的ペプチドの量（例えば、濃度または存在量）を測定するために実施され、かかる分解は、酵素断片標識もまた除去する。

【0040】

ここで図1を参照すると、結合に関与するアミノ酸配列またはタンパク質ドメイン104を含む全長タンパク質102は一般に、細胞中で安定であり、一貫した測定可能な半減期を有する。結合配列104、例えばATP結合部位などのリガンド結合部位またはBA

50

Xの α 1ヘリックスなどのタンパク質-タンパク質相互作用部位は、タンパク質の一次配列内のどこにでも存在し得る。これは、一次構造において連続配列であり得るか、または3次構造において近接したアミノ酸として存在し得る。結合配列は一般に、タンパク質の表面上に存在する。本発明のアッセイでは、タンパク質102は、106で示されるようにトランケーションされ、このトランケーションは、N末端、C末端、またはこの図に示すように両方の末端から生じ得る。しかし、結合配列104は、切断型標的ペプチド中になおも存在する。これらの変更起因して、細胞は、切断型タンパク質（ペプチド）をより迅速に分解する。本発明のアッセイでは、この切断型ペプチド106は、108で示されるように、 β -ガラクトシダーゼの小さい断片（この例ではPL酵素ドナー）と融合される。切断型ペプチド108に対する化合物110の結合は、切断型断片の安定性を増加させ、次いでこの効果は、112で示すように、補完性の β -ガラクトシダーゼ断片、酵素アクセプター即ちEAと共に試料をインキュベートすることによって、推定され得る。EDおよびEAの補完は、測定可能な産物（116に示す）へと基質を変換する活性酵素（114に示す）を生じる。試験化合物110自体が、切断型ペプチドを安定化し得るか、またはある特定の実施形態では、試験化合物110は、同族結合パートナーに対する切断型ペプチドの結合を媒介し、この結合パートナーに対する結合が、切断型ペプチドを安定化する。この化合物は、切断型ペプチドを直接安定化させるのではなく、かかる結合を増加または減少させ得、切断型ペプチドの安定性に影響を与え得る。切断型ペプチド上のED標識は、標識化のためにのみ機能し、安定化のためには機能しない。

【0041】

定義

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または均等な任意の方法および材料が、本発明の実施および試験において使用され得るが、好ましい方法および材料が記載されている。一般に、細胞生物学および分子生物学ならびに化学と関連して利用される術語体系、ならびにそれらの技術は、当該分野で周知であり、一般に使用されるものである。ある特定の実験技術は、特に定義しないが、当該分野で周知の従来の方法に従って、ならびに本明細書を通じて引用および考察される種々の一般的な参考文献およびより具体的な参考文献において記載されているように、一般に実施される。

【0042】

本発明によれば、当業者の技術範囲内の従来分子生物学、微生物学および組換えDNA技術が使用され得る。かかる技術は、文献中で十分に説明されている。例えば、Maniatis、FritschおよびSambrook、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual（1982年）」；「DNA Cloning: A Practical Approach」、Volumes I and II（D. N. Glover編 1985年）；「Oligonucleotide synthesis」（M. J. Gait編 1984年）；「Nucleic Acid Hybridization」（B. D. HamesおよびS. J. Higgins編（1985年））；「Transcription and Translation」（B. D. HamesおよびS. J. Higgins編（1984年））；「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney、編（1986年））；「Immobilized Cells and Enzymes」（IRL Press、（1986年））；B. Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」（1984年）を参照されたい。

【0043】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈が明らかに他を指示しない限り、複数形の指示対象を含むことに留意されたい。特許請求の範囲は、任意の任意選択の要素を排除するように書かれ得ることに、さらに留意されたい。このように、この陳述は、

特許請求した要素の列挙と関連して、「もっぱら (s o l e l y)」、「のみ (o n l y)」などのような排他的術語の使用のため、または「否定的」限定の使用のための先行詞を提供することを意図する。

【0044】

本開示を読んだ当業者に明らかなように、本明細書に記載され例示された個々の実施形態の各々は、本発明の範囲または精神から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離され得るまたはかかる特徴と組み合わせられ得る、個別の構成成分および特徴を有する。任意の列挙された方法は、列挙された事象の順序で、または論理的に可能な任意の他の順序で、実施され得る。

【0045】

明確さの目的のために、以下の用語を以下に定義する。

【0046】

用語「ペプチド」は、本明細書で使用する場合、1つのアミノ酸の α -カルボキシル基と別の基の α -アミノ基との間のアミド形成によって産生される任意のポリマー化合物を指す。

【0047】

用語「BCL2」は、そのメンバーが、Bcl-2 相同性 (BHI-4) ドメインとして公知の4つの保存された α -ヘリックスモチーフのうち少なくとも1つを含む、タンパク質のファミリーを指すために、その科学的に受容された意味において使用される。このファミリーは、Szegediら、「Bcl-2 family on guard at the ER」. Am J Physiol Cell Physiol、2009年；296巻：C941～C953頁に記載されるように、官能基、抗アポトーシス性メンバーおよびアポトーシス促進性メンバーへとさらに分類される。

【0048】

同様に、用語BIM、BAKおよびBAXは、BCL2ファミリーのメンバーを指す。マルチドメインアポトーシス促進性BAXおよびBAKは、重要なエフェクターである。アクチベーターBH3、tBID/BIM/PUMAは、例えばKimら、「Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis」、Molecular Cell 36巻、487～499頁、2009年11月13日に記載されるように、BAXの α 1ヘリックスを攻撃し、曝露させる。

【0049】

用語「BLK」は、チロシン-タンパク質キナーゼBlk [Homo sapiens] としても公知のリンパ球キナーゼ、NCBI参照配列NP_001706を指すために、その科学的に受容された意味において使用される。この配列のバリエーションは、タンパク質チロシンキナーゼ (PTK) ファミリー；LckおよびBlkキナーゼ；触媒 (c) ドメイン中に見出される。PTKcファミリーは、タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ、RIOキナーゼおよびホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K) などの他のキナーゼの触媒ドメインを含むより大きいスーパーファミリーの一部である。

【0050】

用語「MEK」は、ERK遺伝子産物をリン酸化するタンパク質キナーゼを指すために、その科学的に受容された意味において使用される。タンパク質キナーゼのMEKサブファミリーは、他のタンパク質セリン/スレオニンキナーゼ、タンパク質チロシンキナーゼ、RIOキナーゼ、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ、コリンキナーゼおよびホスホイノシチド3-キナーゼの触媒ドメインを含むより大きいスーパーファミリーの一部である。マイトジェン活性化タンパク質 (MAP) キナーゼシグナル伝達経路は、細胞外シグナルに対する細胞応答の重要なメディエーターである。経路は、MAPKキナーゼキナーゼ (MAPKKKまたはMKKK) によってそれ自体リン酸化および活性化されるMAPKキナーゼ (MAPKKまたはMKK) によってリン酸化および活性化されるMAPキナーゼ (MAPK) を含む三重キナーゼコカスケードを含む。MEK1およびME

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

用語「タンパク質」は、本明細書で使用する場合、約50残基よりも大きい特定の配列のポリペプチドを指す。全てのタンパク質はペプチドであるが、用語「ペプチド」は一般に、タンパク質の断片を指す；用語「融合タンパク質」は、融合タンパク質およびペプチドとの融合物の両方、例えば、標識化ペプチド、例えばEDとの融合物を指すために使用される。

10

20

30

40

【 0 0 5 5 】

50

よび哺乳動物細胞では、形質転換DNAは、プラスミドなどのエピソードエレメント上に維持され得る。真核生物細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、形質転換DNAが染色体複製を介して娘細胞によって受け継がれるように染色体中に組み込まれている細胞である。この安定性は、単一細胞または有糸分裂による共通の祖先から誘導された細胞の集団から構成される株細胞またはクローンを樹立する真核生物細胞の能力によって実証される。「株細胞」は、多くの世代にわたって *in vitro* で安定に増殖することが可能な初代細胞のクローンである。

【0056】

本明細書で使用する場合、用語「発現系」とは、細胞において受容体構成成分を発現させるための任意の適切な外因性の系を指す。例えば、本明細書で提供されるような細胞による受容体構成成分の外因性発現は、発現ベクター中の、受容体構成成分をコードする核酸配列または受容体構成成分を含む融合タンパク質をコードする核酸配列の導入から生じ得る。本明細書で使用する場合、用語「融合タンパク質」とは、組換え技術を使用して異種タンパク質またはタンパク質断片に融合されたレポーター構成成分を指す。

10

【0057】

用語「標的」は、本明細書で使用する場合、細胞中に存在する種々の高分子、例えばDNA、RNA、脂質、タンパク質および炭水化物、またはそれらの構成モノマーを指す。用語「標的ペプチド」は、以下に記載されるようなトランケーションなどによって改変されており、β-ガラクトシダーゼ断片（好ましくはPL）によって標識され、試験化合物、例えば小分子もしくは別のタンパク質または小分子とタンパク質パートナーとの組合せを用いて試験される、標的ペプチドを指す。例示的な標的ペプチドには、ATP結合部位を有するキナーゼ、アクチン、シャペロニン、hspタンパク質およびポリメラーゼ、ならびにGTPを結合するGタンパク質およびダイナミンが含まれる。

20

【0058】

用語「小分子」は、当該分野で認識されており、約2000 amu未満、または約1000 amu未満、およびさらには約500 amu未満の分子量を有する組成物を指す。小分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド核酸、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質または他の有機（炭素含有）分子もしくは無機分子であり得る。多くの製薬会社が、本発明のアクセシビリティのいずれかによってスクリーニングされ得る、しばしば真菌、細菌または藻類の抽出物である化学的および／または生物学的混合物の大規模ライブラリーを有している。用語「有機小分子」とは、有機化合物または薬用化合物として同定される場合が多い合成小分子または精製された天然小分子を指し、核酸、ペプチドまたはポリペプチドを含む分子は含まれない。

30

【0059】

用語「結合」は、本明細書で使用する場合、細胞中の既知のタンパク質に対する小分子、タンパク質または化合物の結合を指す。用語「結合パートナー」または「結合対のメンバー」とは、他の分子と特異的に結合して、抗体-抗原、レクチン-炭水化物、核酸-核酸、ビオチン-アビジンなどの結合複合体を形成する分子を指す。特に好ましい実施形態では、結合は、非共有（例えば、イオン性、疎水性など）相互作用によって大部分は媒介され、小分子とその標的との間および／または細胞プロセスの間に互いに特異的に結合する2つのタンパク質間である。

40

【0060】

用語「タンパク質存在量」は、本明細書に記載されるように使用され、例えばIvanic J、Yu X、Wallqvist A、Reifman J（2009年）「Influence of Protein Abundance on High-Throughput Protein-Protein Interaction Detection」、PLoS ONE 4巻（6号）：e5815頁、doi：10.1371/journal.pone.0005815に記載されるように、一般に受容された意味において使用される。タンパク質存在量は、所与の時点における細胞中のタンパク質またはペプチド分子の数に関し得る。

50

【0061】

用語「不安定化変異」は、細胞におけるペプチドまたはタンパク質の安定性における変更、即ち、ある特定の時間期間内でのその分解または凝集の可能性における変更を引き起こす、ペプチドまたはタンパク質配列中の変異を意味する。変異には、アミノ酸の欠失、付加または置換が含まれ得る。変異は一般に、ペプチドまたはタンパク質のミスフォールディングを引き起こす。細胞におけるペプチドまたはタンパク質の安定性は、細胞機構によって除去または分解される前に細胞中にタンパク質が存在する時間の持続期間もまた指し得る。タンパク質またはペプチドの安定性は、例えばGhaemmaghamiら、「A quantitative, high-throughput screen for protein stability」、PNAS 2000年7月18日97巻15号8296～8301頁またはIgnatovaら、「Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling」、PNAS 2004年1月13日101巻2号523～528頁に開示されるように、多数の方法によってin vivoで（即ち、細胞中で）測定され得る。したがって、変異が不安定化変異であるかどうかは、変異したタンパク質を変異していないタンパク質と比較し、変異したタンパク質が、変異していないタンパク質の半減期と比較して、少なくとも10%以上短い細胞中での半減期を有することを観察することによって、決定され得る。一部の場合、この半減期は、変異していないタンパク質の半減期よりも20%以上短くてもよく、あるいは変異していないタンパク質の半減期よりも30%以上短くてもよい。一部の場合、この不安定化変異は、細胞の内側で3時間未満の半減期を有するペプチドを生じる。

10

20

【0062】

ある特定の態様では、用語「不安定化変異」とは、少なくとも5つのアミノ酸が標的ペプチドのN末端領域またはC末端領域のいずれかまたは両方から除去されるランケーションである変異を指す。さらに、これは、細胞の内側での標的細胞の不安定化を導く、N末端領域またはC末端領域のいずれかまたは両方からのランケーションもまた指す。以下に説明するように、本発明の方法では、不安定化変異は、標的ペプチドの結合部位に対するものではない。

【0063】

用語「標識化ペプチド」は、二次構造（即ち、ランダムコイル）を本質的に有さず、それに融合されたタンパク質またはタンパク質断片（例えば標的ペプチド）の検出のための標識として機能し、それが融合される標的ペプチドの安定性に対して本質的に何の影響も有さない、ペプチドを意味する。標識化ペプチドは一般に、100アミノ酸長未満である。標識化ペプチドは、それ自体標識として機能し得るか、または抗体認識のためのエピトープを提供し得る。以下に説明するように、標識化ペプチドは、標識化ペプチドの融合パートナーの安定性または半減期に影響を与えないように選択される。

30

【0064】

用語「標的ペプチド」とは、本発明のアッセイにおいて試験化合物によってモジュレートされる結合の標的である、タンパク質またはタンパク質断片を指す。標的ペプチドは、試験化合物に対する結合部位を提供するまたは試験化合物がモジュレートする別の細胞構成成分に対する結合部位である、ネイティブの部位を有する。例えば、この標的ペプチドは、触媒部位、補因子結合部位、アロステリック調節部位などを有し得る。この結合部位は、ネイティブリガンドに対する結合部位でもあり得る。ネイティブリガンドは、細胞プロセスの一部として標的ペプチドの結合部位に結合する細胞性分子である。例は、酵素触媒部位－基質、酵素調節部位－調節因子、受容体－リガンド、Gタンパク質アクセサリタンパク質などである。

40

【0065】

用語「試験化合物」は、結合部位において特定の標的ペプチドに結合する特性を有する、小分子、高分子または他の材料を指すために、一般的な意味において使用される。試験化合物は一般に、通常は試験される濃度で試験される細胞中に見出されない。試験化合物

50

は、結合の陽性試験結果または結合なしの陰性試験結果を生じ得る；結合は、本発明の方法に従って、定量もされ得る。1種より多い試験化合物が使用され得、ここで、試験化合物は、標的ペプチド上の触媒部位およびATP結合部位などの特異的部位に結合することが既知の参照化合物として使用され得る。試験化合物は、一部の場合には、結合部位に非共有結合する；一部の場合、試験化合物は、結合部位に共有結合する。

【0066】

用語「試料ウェル」は、任意の流体容器を意味し、マイクロタイタープレート中のウェル、種々の試験管（例えばEppendorfチューブ）、マイクロ流体デバイス中のチャンバなどが含まれる。

【0067】

用語「ED」は、当該分野で公知のように、βガラクトシダーゼ酵素断片補完アッセイにおいて使用するための酵素ドナー断片を意味する。EDの例は以下に与える。

【0068】

用語「結合部位」とは、標的が別の分子に結合する場合の標的上の配列または残基クラスターを指す。タンパク質上の結合部位は、周知であり、特徴付けられている。これらは一般に、特定のリガンドまたは結合パートナーに対して特異的である。これらは、EMBL-EBIにおいてPPSearchなどのツールによって配列として同定され得る。例示的な結合部位は、(a)ヌクレオチド（例えばATP）結合部位、(b)プロモドメイン配列、(c)触媒部位または(d)アロステリック部位である。

【0069】

一般的な方法および材料

酵素断片補体

特定の実施形態では、本発明で開示する方法および材料は、酵素断片補体（EFC）系がそれに基づく野生型大腸菌β-ガラクトシダーゼを利用する。野生型大腸菌β-ガラクトシダーゼは大腸菌遺伝子lacZ遺伝子によりコードされている。

【0070】

β-ガラクトシダーゼ酵素およびその断片（米国特許第4,708,929号を参照されたい）は、いくつかの特性を有することが必要とされる。基質の存在下で存在する唯一の断片とのバックグラウンドが、存在する場合でもわずかである点で、断片は個々ではほぼ不活性である。第二に、断片は互いに十分なアフィニティーを有し、例えば断片と融合した物体による他の結合の不在下において、断片は組合わさり活性酵素をもたらす。小断片（「ED」または「PL」）は人為的に設計することができ、融合する遺伝子またはタンパク質の生物学的活性に干渉することはない。生成する融合タンパク質は、ここで決定するように正確にフォールディングし、酵素活性、他のタンパク質との結合活性、転座能力などを含めた活性の部位を保持する。EDは通常少なくとも約37アミノ酸、通常少なくとも約40アミノ酸、および通常約110を超えないアミノ酸、さらに通常約90を超えないアミノ酸である。

【0071】

特定の実施形態では、利用するβ-ガラクトシダーゼ補体系は、2個以上のβ-ガラクトシダーゼ断片またはその変異体で構成される系である。例えば、特定の実施形態では、補体系はβ-ガラクトシダーゼの第1の断片と第2の断片（例えば、α断片とω断片）を含む。さらに他の実施形態では、補体系は、第1の、第2のおよび第3のβ-ガラクトシダーゼ断片などの3個以上のβ-ガラクトシダーゼ断片（例えば、α、βおよびω断片）を含み得る。

【0072】

好ましい態様では、β-galの小断片（さらにシグナル生成ペプチド）を酵素ドナー（ED）と呼ぶ。シグナル生成ペプチドは、2個の断片、酵素ドナー（「ED」）と酵素アクセプター（「EA」）と一緒に複合体形成すると元に戻る酵素断片の対の1つである。EDは、活性酵素を形成するため、別の断片、EAで補うことができる酵素の断片である。融合タンパク質のED断片は、互いに対する断片のアフィニティーの結果としてEA

10

20

30

40

50

断片と複合体形成する。

【0073】

他の実施形態では、補体断片は高アフィニティー断片である。一般に高アフィニティー成分は、それらが互いに自然に結合し、完全機能酵素または酵素サブユニットを再形成することができるほど十分高いアフィニティーを断片が有する、酵素の2断片である。典型的には、溶液中での適切な条件下で混合すると、天然酵素の少なくとも5%の酵素活性、時には天然酵素の約10、20、30、40、50、60、70、80、90、95、99または100%の酵素活性が得られる。この様な活性の決定は、補体酵素と親酵素を比較する濃度で、典型的には例えば 10^{-3} Mと 10^{-6} Mの間と同じ範囲の濃度で、通常の方法を使用して実施することができる。高アフィニティー成分は、補体断片の有無、または増大のモニタリングを可能にする。それらは、相互作用パートナーと複合体を形成するからである。例えば、(対象の標的と融合して)融合タンパク質中に1個の補体断片が存在し、試験化合物と複合体を形成する場合、したがって細胞溶解後の第2の断片とのインキュベーションは検出可能な酵素活性をもたらし、これによって細胞相互作用の分析が可能になる。それゆえ、アッセイ系で高アフィニティー成分の量が増大する場合、したがって検出可能な酵素活性の量は比例して増大する。典型的には、活性の量の多大な増大は1:1レポーター成分比まで検出可能である。初期高アフィニティーβ-ガラクトシダーゼ補体レポーター系で利用するこのような合理的手法の概要に関しては、例えば以下の実験セクション、および2005年5月18日に出願された米国特許出願第11/132,764号を参照されたい。

【0074】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は対象の標的の切断型断片および高アフィニティーED断片を含み、対象の標的はプロテインキナーゼであり切断型断片はATP結合配列からなる。いくつかの実施形態では、切断型タンパク質断片は非ATP結合配列からなる。試験化合物は、ATP競合分子、アロステリックモジュレーターまたはキナーゼ結合分子であってよい。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は対象の標的の切断型断片および低アフィニティーED断片を含む。

【0075】

様々な他の指標酵素もこれらの基準を満たすことが知られており、知られている技術に従い別の酵素を開発することができる。これらの基準に適合する指標酵素には、スプリットルシフェラーゼ、GFP、リボヌクレアーゼAがあり(米国特許第4,378,428号を参照されたい)、小断片はβ-ラクタマーゼ(WO00/71702およびWO01/94617およびWehrmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. 2002、99、3469~74頁)、またはアデノウイルスプロテアーゼなどの小ペプチドコファクターを有する酵素(米国特許第5,935,840号を参照されたい)のアミノもしくはカルボキシ末端またはその内部に由来し得る。

【0076】

具体的実施形態では、利用するαペプチドは、哺乳動物細胞においてωペプチドを確実に補うペプチドである。高アフィニティー最小αペプチドは、検出に必要な最小相互作用のみで、様々な細胞内物体間の細胞相互作用事象の、高感度で正確な分析を可能にする。例示的な高アフィニティーαペプチド(酵素ドナー)には以下のものがある。

配列番号1(野生型ED)

MGVITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQL

配列番号2(Pro1abel、または「PL」ED)

NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRおよび

配列番号3(W34Y、修飾型ED)

MGVITDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASYRNSEEARTDRPSQQL

【0077】

別の利用可能なEDは、以下の高度Pro1abel、配列番号4と呼ぶ：

NSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR

T D R (配列番号 4)

【0078】

任意の適切な方法を使用して、酵素断片を対象のペプチド標的と結合させることが可能である。したがって、酵素断片と1つまたは複数の対象の標的を直接、またはリンカーを介して連結させることが可能である。典型的には、リンカーは共有結合である。例えば、酵素断片と対象の標的がタンパク質であるとき、ペプチド連結に関して当技術分野で知られている方法を利用することができる。好ましい一実施形態では、酵素断片と対象の標的は、アッセイする酵素断片と標的を含む融合タンパク質を含む。

【0079】

いくつかの方法の態様は、本明細書にその全容を述べるのと同様にその方法セクションを具体的に参照により組み込む、前述の参照文献、米国特許出願第20070275397号、公開日2007年11月29日、および米国特許出願第20100285451号、公開日2010年11月11日中に詳細に記載される、低アフィニティー酵素補体レポーター系の使用を含む。

10

【0080】

低アフィニティー酵素補体レポーター系の実施形態は、高いシグナル対ノイズ比をもたらすことにより特徴付けられる。

【0081】

いくつかの方法の態様は、変異体最小N末端β-ガラクトシダーゼペプチドである(酵素ドナーまたは断片としても知られる)第1のβ-ガラクトシダーゼ断片の使用を含む。最小N末端β-ガラクトシダーゼペプチドによって、野生型β-ガラクトシダーゼタンパク質のN末端領域中に見られるアミノ酸配列、例えばN末端の約10残基以内、野生型β-ガラクトシダーゼタンパク質のN末端の約5残基以内などで始まる配列をペプチドが有することを意味する。この実施形態の第1のβ-ガラクトシダーゼ断片は最小なので、特定の実施形態において、それらは、約50アミノ酸長以下、例えば約49アミノ酸長以下、約48アミノ酸長以下などを含めた、約55アミノ酸長以下などの約60アミノ酸長以下などである。

20

【0082】

特定の実施形態において、(例えばLangleyら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1975) 72:1254~1257頁中に記載されたような)第2のβ-ガラクトシダーゼ断片は、野生型大腸菌β-ガラクトシダーゼタンパク質のアミノ酸11~41を欠く欠失変異体であり、その断片はM15アクセプターまたはω断片として知られている。対象の他の具体的なアクセプター(すなわちコフラグメント)には、M112ジマー、β-ガラクトシダーゼ内のアミノ酸23~31の欠失変異体があるが、これだけには限られない(Lin、VillarejoおよびZabin、1970、Biochem. Biophys. Res. Common. 40:249頁; CelledaおよびZabin、1979、Biochem. 18:404頁; Welphly、FowlerおよびZabin、1981、J. Biol. Chem. 256:6804頁; Langleyら、Proc. Natl Acad. Sci. USA (1975) 72:1254頁)。

30

40

【0083】

1つの例示的なωペプチド配列を以下に述べる(配列番号5)

MGVITDSLAVVARTDRPSQQLRSLNGEWRFAWFAPEAVPESWLECDLPEADTVVVPSPNWMHGYDAPIYTNVTYPIT
VNPPFVPTENPTGCYSLTFNVDSEWLQEGQTRIIFDGVNSAFHLWCNWRVWVGQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAVMV
LRWSDGSYLEDDQDMWRMSGIFRDVSLHKKPTTQISDFHVATRFNDDFSRAVLEAEVQMCGELRDYLRVTVSLWQGETQVA
SGTAPFGGEIIDERGGYADRVTLRLNVENPKLWSAEIPNLRYAVVELHTADGTLIEAECDFGVFREVRIENGLLLNGKPL
LIRGVNRHEHHPLHGQVMDEQTMVQDILLMKQNNFNAVRCSHPNHLWYTLCDRYGLYVVDEANIETHGMVPMNRLTDD
PRWLPAMSERVTRMVQRDRNHPSVIEWSLGNESGHGANHDALYRWIKSVDPSRPVQYEGGGADTTATDIIICPMYARVDED
QPFPAVPKWSIKKWLSPGETRPLILCEYAHAMGNSLGGFAKYWQAFRQYPRLQGGFVWDVWDQSLIKYDENNPWSAYGG
DFGDTPNDRQFCMNGLVFADRTPHPALTEAKHQQQFFQFRLSGQTIIEVTSEYLFHSDNELLHWMVALDGKPLASGEVPL

50

DVAPQGKQLIELPELPQPESAGQLWLTVRVVQPNATAWSEAGHISAWQQWRLAENLSVTLPAAASHAIPHLTTSEMDFCIE
 LGNKRWFQNRQSGFLSQMWIGDKKQLLTPLRDQFTRAPLDNDIGVSEATRDPNAWVERWKAAGHYQAEAALLQCTADTL
 ADAVLITTAHAWQHKGKTLFISRKTYRIDGSGQMAITVDVEVASDTPHPARIGLNCQLAQVAERVNWGLGPQENYPDRL
 TAACFDRWDLPLSDMYTPYVFPSENGRLRCGTRELNYGPHQWRGDFQFNI SRYSQQQLMETSHRHLHLHAEEGTWLNIDGFH
 MGIGGDDSWSPSVSAEFQLSAGRYHYQLVWCQK

【0084】

生存細胞フローサイトメトリー、色素原基質 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル
 β -D-ガラクトピラノシド (X-Gal) による組織化学的染色を含めた、一定範囲の
 方法を利用して β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する。例えば、Nolanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2603~2607 頁 (1988) および Lojda, Z., *Enzyme Histochemistry: A Laboratory Manual*, Springer, Berlin, (1979) を参照
 されたい。

10

【0085】

Mohler および Blau, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 12423~12427 頁 (1996) 中に記載されたような、 β -gal 活性のアッセイを
 使用することができる。一実施形態では、細胞の固定およびインディゴ基質 X-gal を
 用いた染色によって、細胞内分析を実施することができる。X-gal または 5-ブロモ
 -6-クロロ-3-インドリル β -D-ガラクトピラノシド (5-6-X-Gal) のい
 ずれかと組合せてアゾ色素を使用し、蛍光組織化学的方法により β -gal 活性をアッセイ
 することによって、固定した細胞をさらに分析することができる。対象の組合せは、ア
 ザ色素レッドバイオレット LB (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.) と、Fluor-X-gal と呼ばれる 5-6-X-Gal である。この組合せ
 用に、2 個以上の他の蛍光シグナルと同時に視覚化する蛍光依存性蛍光で、蛍光顕微鏡写
 真を得ることができる。

20

【0086】

生存細胞中で使用され得る β -gal に必要不可欠な基質も、本発明で開示する方法お
 よび材料によって包含される。例えば蛍光基質、レゾルフィン β -ガラクトシダーゼビス
 -アミノプロピルポリエチレングリコール 1900 (RGPEG) が記載されている。M
 inden (1996) *BioTechniques* 20 (1): 122~129 頁。こ
 の化合物は、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、または様々な多量充
 填技法によって細胞に送達することができる。細胞内に入ると、基質は原形質膜またはギャ
 ップジャンクションを回避することができない。本発明で開示する方法および材料の実
 践において使用することができる別の必要不可欠な基質は、蛍光活性化細胞選別 (FACS)
 およびフローサイトメトリーによる検体の分析に特に十分適合した、フルオレセイン
 ジー β -D-ガラクトピラノシド (FDG) である。Nolanら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2603~2607 頁 (1988) および Rotman
 ら、(1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 1~6 頁。

30

【0087】

化学発光アッセイを使用して β -ガラクトシダーゼを検出することもできる。例えば、
 β -ガラクトシダーゼ融合体を含有する細胞を、Galactolight Plus ア
 ッセイキット (Tropix, Bedford Mass) からの Galacton P
 lus 基質を含有するバッファー混合物において (架橋剤との接触有りまたは無しで) 溶
 かす。Bronsteinら、*J. Biolumin. Chemilumin.* 4: 99
 ~111 頁 (1989)。発光促進溶液を加えた後、ルミノメーターまたはシンチレーシ
 ョンカウンターで発光を測定する。

40

【0088】

分光または蛍光分析に適した代表的な基質には、p-アミノフェニル β -D-ガラク
 トピラノシド、4-メチルウンベル-リフェリル β -D-ガラクトピラノシド、マフチ
 ル-AS-B1- β -D-ガラクトピラノシド、1-ナフチル β -D-ガラクトピラノ

50

シド、2-ナフチル-β-D-ガラクトピラノシドモノハイドレート、O-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、およびフェニル-β-D-ガラクトピラノシド、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド、レゾルフィンβ-D-ガラクトピラノシド、7-ヒドロキシ-4-トリフルオロメチルクマリン、Ω-ノトロスチリル-β-D-ガラクトピラノシドおよびフルオレセイン-β-D-ガラクトピラノシドがあるが、これらだけには限られない。例示的な基質に関しては、例えば米国特許第5,444,161号を参照されたい。

【0089】

本明細書で開示する補体系の成分の会合は、pH、イオン強度、アッセイの成分の濃度、および温度などの溶液におけるいくつかの要因に依存する。アッセイ溶液は、個々の系
10
用設計および開発することができる。本明細書で開示するレポーター系を使用して、例えば緩衝無細胞溶液、細胞内液、細胞の溶液、細胞溶解物の溶液、ならびに核分画、細胞質分画、ミトコンドリア分画および膜分画などの細胞分画の溶液などの溶液においてアッセイを実施することができる。当技術分野で知られている、酵素アッセイ溶液、細胞抽出物および細胞懸濁液などのアッセイ溶液を調製するための方法を使用することができる。例えば、リン酸緩衝生理食塩水などの生理的適合性があるバッファーを使用することができる。例えば、the series、Methods in Enzymology、Academic Press、New Yorkを参照されたい。

【0090】

いくつかの実施形態では、第1のレポーター成分と第2のレポーター成分は、それぞれ
20
蛍光タンパク質と蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)から生じる検出可能シグナルである。発光タンパク質も利用することができる。したがって、第1の補体成分は発光タンパク質であり、第2の補体成分は蛍光タンパク質であり、検出可能シグナルは生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)から生じる。緑色、赤色、藍色および黄色蛍光タンパク質だけには限られないが、これらを含めた任意の適切な蛍光タンパク質を使用することができる。一例では、発光タンパク質はレニラルシフェラーゼまたはホタルルシフェラーゼである。

【0091】

別の態様では、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4または配列番号5を
30
コードする核酸配列、この核酸配列を含むベクター、およびこの核酸配列またはこのベクターを含む細胞を本発明において提供する。さらに、本発明で提供する核酸配列によりコードされるポリペプチドを本発明において提供する。具体的には、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4または配列番号5によりコードされるポリペプチドを含むポリペプチドを本発明において提供する。

【0092】

ベクター

特定の実施形態では、本発明の融合遺伝子構築物を細胞に導入して細胞相互作用をア
40
ッセイする。融合遺伝子構築物は、対象の標的をコードする遺伝子と通常結合した、プロモーターおよび他の転写および／または翻訳制御配列も含有することができる。融合遺伝子構築物は、ウイルスベクター、形質転換、同時沈降、エレクトロポレーション、中性もしくはカチオン性リポソーム媒介移動、マイクロインジェクションまたは遺伝子銃だけには限られないが、これらを含めた当技術分野で知られている任意の核酸導入法によって、細胞に導入することができる。対象のウイルスベクターには、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスがあるが、これらだけには限られない。特定の実施形態では、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込むことができる、レトロウイルスベクターを利用する。例えば、組み込みおよびパッケージングシグナル、薬物耐性マーカーおよび対象の1つまたは複数の融合遺伝子をコードするレトロウイルス構築物は、本発明の特定の実施形態を実施する際に有用である。

【0093】

特有融合タンパク質をコードする異なる融合遺伝子構築物は、別個の核酸分子上、また
50

は同一核酸分子上に存在し得る。本発明の融合遺伝子構築物または融合タンパク質は、培養細胞、動物細胞 *in vivo*、動物細胞 *ex vivo*、または細胞相互作用を試験することが望ましい任意の他型の細胞に導入することができる。

【0094】

任意の適切な発現系を使用して、*in situ*でレポーター成分を発現させることが可能である。ウイルスベクター、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、カチオン性脂質試薬、または当技術分野で知られている任意の他の便利な技法を使用して、形質転換を実施することができる。本発明において有用な形質転換の形式は従来型であり、*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel、F. M. 編、2000) 中に例示される。受容体成分の外因性発現は一過的、安定的、またはこれらのある程度の組合せであってよい。1つまたは複数の別のタンパク質、例えばHIV *rev*との同時発現によって、外因性発現を増加または最大化することができる。外因性発現は、構成的プロモーター、例えばSV40、CMVなど、および当技術分野で知られる誘導性プロモーターを使用して実施することができる。適切なプロモーターは、対象の細胞中で機能し得るプロモーターである。一実施形態では、発現ベクターはレトロウイルスベクターである。

【0095】

様々な研究室用マニュアルにおいて、および多数の宿主中で機能的なベクターの供給者によって記載されたように、従来の方法に従い発現構築物を生成する。例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis、「*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*」、Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y. (本明細書では「Sambrookら、1989」)；「*DNA Cloning: A Practical Approach*」、Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985)；「*Oligonucleotide Synthesis*」(M. J. Gait ed. 1984)；「*Nucleic Acid Hybridization*」[B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1985)]；「*Transcription And Translation*」[B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 (1984)]；「*Animal Cell Culture*」[R. I. Freshney編、(1986)]；「*Immobilized Cells And Enzymes*」[IRL Press、(1986)]；B. Perbal「*A Practical Guide To Molecular Cloning*」(1984)を参照されたい。

【0096】

宿主染色体に組み込む場合、発現構築物の組み込み部位は、転写の効率、したがって融合タンパク質の発現に影響を与える可能性があることは理解されるはずである。高い転写率を有する細胞を選択することにより発現の効率を最適化することができ、発現構築物と増幅および同時増幅することができる遺伝子、例えばメトトレキサートの存在下でDHFRと発現構築物を接合することによって、発現構築物を修飾することができ、または相同的組換えを使用して、組み込み部位が効率よい転写をもたらすことを確実にできる。ゲノム、転写有効部位にCre-Loxなどの挿入エレメントを挿入することによって、発現構築物を同じ部位に誘導することができる。いかなる場合も、所定環境中の細胞由来の酵素活性と評価する環境中の細胞を通常比較する。

【0097】

融合タンパク質をコードする遺伝子は発現構築物の一部であり得る。細胞宿主において機能的な転写および翻訳制御領域下に、遺伝子が位置する。多くの場合、制御領域は、EC (発現構築物) を形成するタンパク質をコードする遺伝子の原型制御領域である可能性があり、融合タンパク質は原型遺伝子を置換し得る。染色体外エレメントまたは染色体における遺伝子部位は、転写レベルに応じて変わる可能性がある。したがって多くの場合、

細胞宿主において作動的な転写開始領域が選択されるが、原型転写制御領域と著しく競合しない、またはE Cの遺伝子由来の異なる遺伝子、融合タンパク質の転写に著しく干渉しない遺伝子と結合し得るウイルスまたは他の供給源に由来してよい。

【0098】

使用することができるベクターには、ウイルス、プラスミド、コスミド、ファージミド、YAC、BACおよびHACがある。ベクターの他の成分は、1つまたは複数の宿主の複製起点、抗生物質耐性を含めた選択用の発現構築物、シグナルなどをもたらすタンパク質、組み込みをもたらす組み込み配列および酵素、マルチクロニングサイト、発現制御配列、対象のタンパク質用の発現構築物を含み得る。市販のベクターはこれらの能力の多数または全てを有しており、有利に使用することができる。

10

【0099】

例えば、CMVプロモーターを有する、プラスミドクロニングベクターpCMV-PLC1のヌクレオチド配列（配列番号6）を以下に示す：

1 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA

```

51 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
101 CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
151 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT
201 AAAGTGGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC
251 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCCAGTA
301 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
351 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
401 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
451 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTGCGTA
501 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
551 GTCTATATAA GCAGAGCTGG TTTAGTGAAC CGTCAGATCC GCTAGCGCTA
601 CCGGACTCAG ATCTCGAGCT CAAGCTTCGA ATTCTGCAGT CGACGGTACC
651 GCGGGCCCGG GATCCACCGG CCGGTCGCCA CCATGAGCTC CAATTCACGT
701 GCCGTCGTTT TACAACGTCG TGAAGGGGAA AACCTGGGCG TTACCCAACT
751 TAATCGCCTT GCAGCACATC CCCCTTTCGC CAGCTGGCGT AATAGCGAAG
801 AGGCCCGCAC CGATCGCCCT TCCCAACAGT TGCGCAGCCT GAATGGCGAA
851 TAGGCGGCCG CCACTCTAGA TCATAATCAG CCATACCACA TTTGTAGAGG
901 TTTTACTTGC TTTAAAAAAC CTCCACACC TCCCCCTGAA CCTGAAACAT
951 AAAATGAATG CAATTGTTGT TGTTAACTTG TTTATTGCAG CTTATAATGG
1001 TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA GCATTTTTTTT
1051 CACTGCATTG TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTAAGGC
1101 GTAAATTGTA AGCGTTAATA TTTTGTTAAA ATTTCGCGTTA AATTTTTTGT
1151 AAATCAGCTC ATTTTAAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT
1201 AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG AGTGTGTGTC CAGTTTGGAA
1251 CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA
1301 CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC CTAATCAAGT
1351 TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAAGGGAG
1401 CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGGAACGTG GCGAGAAAGG
1451 AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG
1501 GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA
1551 GGGCGCGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCTATTT
1601 GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA
1651 CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTC CTGAGGCGGA
1701 AAGAACCAGC TGTGGAATGT GTGTCAGTTA GGGTGTGGAA AGTCCCCAGG
1751 CTCCCCAGCA GGCAGAAAGTA TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA
1801 CCAGGTGTGG AAAGTCCCCA GGCTCCCCAG CAGGCAGAAG TATGCAAAGC

```

20

30

40

50

```

1851 ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCATAGTC CCGCCCCTAA CTCCGCCCAT
1901 CCGCCCCCTA ACTCCGCCCA GTTCCGCCCA TTCTCCGCC CATGGCTGAC
1951 TAATTTTTTT TATTTATGCA GAGGCCGAGG CCGCCTCGGC CTCTGAGCTA
2001 TTCCAGAAGT AGTGAGGAGG CTTTTTTTGA GGCTTAGGCT TTTGCAAAGA
2051 TCGATCAAGA GACAGGATGA GGATCGTTTC GCATGATTGA ACAAGATGGA
2101 TTGCACGCAG GTTCTCCGGC CGCTTGGGTG GAGAGGCTAT TCGGCTATGA
2151 CTGGGCACAA CAGACAATCG GCTGCTCTGA TGCCGCCGTG TTCCGGCTGT
2201 CAGCGCAGGG GCGCCCGGTT CTTTTTGTCA AGACCGACCT GTCCGGTGCC
2251 CTGAATGAAC TGCAAGACGA GGCAGCGCGG CTATCGTGGC TGGCCACGAC
2301 GGGCGTTCCT TGCAGAGCTG TGCTCGACGT TGTCCTGAA GCGGGAAGGG
2351 ACTGGCTGCT ATTGGGCGAA GTGCCGGGGC AGGATCTCCT GTCATCTCAC
2401 CTTGCTCCTG CCGAGAAAAGT ATCCATCATG GCTGATGCAA TCGGGCGGCT
2451 GCATACGCTT GATCCGGCTA CCTGCCCATT CGACCACCAA GCGAAACATC
2501 GCATCGAGCG AGCACGTACT CGGATGGAAG CCGGTCTTGT CGATCAGGAT
2551 GATCTGGACG AAGAGCATCA GGGGCTCGCG CCAGCCGAAC TGTTCGCCAG
2601 GCTCAAGGCG AGCATGCCCG ACGGCGAGGA TCTCGTCGTG ACCCATGGCG
2651 ATGCCTGCTT GCCGAATATC ATGGTGGAAA ATGGCCGCTT TTCTGGATTC
2701 ATCGACTGTG GCCGGCTGGG TGTGGCGGAC CGCTATCAGG ACATAGCGTT
2751 GGCTACCCGT GATATTGCTG AAGAGCTTGG CGGCGAATGG GCTGACCGCT
2801 TCCTCGTGCT TTACGGTATC GCCGCTCCCG ATTTCGAGCG CATCGCCTTC
2851 TATCGCCTTC TTGACGAGTT CTTCTGAGCG GGACTCTGGG GTTCGAAATG
2901 ACCGACCAAG CGACGCCCAA CCTGCCATCA CGAGATTTTCG ATTCCACCGC
2951 CGCCTTCTAT GAAAGGTTGG GCTTCGGAAT CGTTTTCCGG GACGCCGGCT
3001 GGATGATCCT CCAGCGCGGG GATCTCATGC TGGAGTTCTT CGCCCACCCT
3051 AGGGGGAGGC TAACTGAAAC ACGGAAGGAG ACAATACCGG AAGGAACCCG
3101 CGCTATGACG GCAATAAAAA GACAGAATAA AACGCACGGT GTTGGGTCGT
3151 TTGTTTATAA ACGCGGGGTT CGGTCCCAGG GCTGGCACTC TGTCGATACC
3201 CCACCGAGAC CCCATTGGGG CCAATACGCC CGCGTTTCTT CCTTTTCCCC
3251 ACCCCACCCC CCAAGTTCGG GTGAAGGCC AGGGCTCGCA GCCAACGTCG
3301 GGGCGGCAGG CCCTGCCATA GCCTCAGGTT ACTCATATAT ACTTTAGATT
3351 GATTTAAAC TTCATTTTTA ATTTAAAAG ATCTAGGTGA AGATCCTTTT
3401 TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTTCG TTCCACTGAG
3451 CGTCAGACCC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT
3501 CTGCGCGTAA TCTGCTGCTT GCAAACAAAA AAACCACCGC TACCAGCGGT
3551 GGTTTGTTTG CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTCCG AAGGTAAGTG
3601 GCTTCAGCAG AGCGCAGATA CCAAATACTG TCCTTCTAGT GTAGCCGTAG
3651 TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA CCGCCTACAT ACCTCGCTCT
3701 GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG TCGTGTCTTA
3751 CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCGGGC
3801 TGAACGGGGG GTTCGTGCAC ACAGCCCAGC TTGGAGCGAA CGACCTACAC
3851 CGAACTGAGA TACCTACAGC GTGAGCTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG
3901 AAGGGAGAAA GCGGACAGG TATCCGGTAA GCGGCAGGGT CGGAACAGGA
3951 GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGGAAAC GCCTGGTATC TTTATAGTCC
4001 TGTCGGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG TGATGCTCGT
4051 CAGGGGGGCG GAGCCTATGG AAAAACGCCA GCAACGCGGC CTTTTTACGG
4101 TTCCTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC
4151 CCCTGATTCT GTGGATAACC GTATTACCGC CATGCAT

```

【 0 1 0 0 】

DNAまたはRNAベクターは、融合タンパク質の発現が起こり得る細胞に導入することができる。宿主は初代細胞、細胞株、単細胞微生物などであってよく、発現構築物を分

10

20

30

40

50

泌可能型のEAを発現する細胞に組み込むかまたはそこに一過的に存在させ、ロックアウト、転写もしくは翻訳阻害剤などの結果としてその細胞が通常発現するタンパク質を発現させずに、アッセイ条件下でその細胞が通常発現しないタンパク質を発現または過剰発現させることによって、細胞を修飾することができる。

【0101】

ベクターは、プロモーター、通常プロモーター／エンハンサー領域の転写および翻訳制御の下で融合遺伝子、場合によっては複製能力がある複製開始領域、選択マーカを含み、例えば制限部位、PCR開始部位、EAの構成的もしくは誘導的発現をもたらす発現構築物などの別の特徴を含み得る。前に記載したように、宿主中で融合タンパク質を発現させるための多数の異なる手法をもたらす、利用可能な多数のベクターが存在する。

10

【0102】

例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、リポフェクション、融合、形質転換、カルシウム沈殿DNAなどの任意の便利で有効な手段によって、宿主細胞中にベクターを導入することができる。宿主細胞中にベクターを導入する方法は、宿主細胞とベクターの性質を鑑みた有効で便利な方法であり、文献中には、宿主細胞中へのベクターの導入、およびベクターを効率よく得る宿主細胞の選択に関する多数の指示が存在する。例えば抗生物質の選択を可能にする発現構築物を利用することにより、細胞を選択培地中で増殖させることが可能であり、そこではベクターを含む細胞のみが生存する。

【0103】

標識ペプチド

20

さらに、標的のレベルの検出は、例えばAlpha Screen（登録商標）、FRET、TR-FRETなどの、様々な抗体ベースの方法により実施することが可能である。Alpha Screen（登録商標）TechnologyはBioTek Instruments、Incから市販されている。ハイスループットスクリーニングで主に使用されるAlpha Screen（登録商標）は、TR-FRETと類似した相同性アッセイ技術であり、それはある程度、結合などの分子事象の検出を可能にする。コーティングした「ドナー」および「アクセプター」ビーズは、Alpha Screenアッセイ技術のベースである。Alpha Screen、ビーズベースのアッセイは、大幅に増幅したシグナルを生成するよう作用する一連の化学反応をもたらす、互いに接近したビーズの相互作用を介して働く。FRETおよびTR-FRETは、例えばUS 2012/02191、「Detection method based on time resolved real time fluorescent energy...」中に記載される。EDの代わりに使用することが可能である他の標識ペプチドには、例えばヘマグルチニン由来のタグであるアフィニティータグ（HA-タグ；ポリヒスチジンタグ（ヒス5～10（配列番号20）、好ましくはヒス6（配列番号19）、ヒスタグとも呼ばれる）、FLAG-タグ）などのアフィニティータグ、またはMyc-タグがある。これらのタグは、例えばEP 2487183、「Ubiquitin-isopeptide probes」にさらに記載される。

30

【0104】

例えばGrigorenkoら、「A Genetically Engineered Fusion Protein with Horseradish Peroxidase as a Marker Enzyme for Use in Competitive Immunoassays」、Anal. Chem. 73:1134～1139頁（2001）中に記載されたように、別の可能性はホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）である。標識ペプチドは、抗体の結合エピトープを有するペプチド、ペプチド結合ビオチン、FITCの結合用ペプチドなどであってもよい。

40

【0105】

アッセイの適用

利用するアッセイ手順は、生存または非生存状態いずれかの完全細胞を使用することである。細胞を完全状態に保ちながら死滅を誘導する熱、抗生物質、毒素などにより、非生

50

存状態を得ることができる。細胞に適した適切な培養培地中における培養で細胞を増殖させ、融合状態または融合状態未満、例えば80%まで増殖することができる。融合タンパク質発現構築物および他の構築物は、適切に、細胞中に存在することができ、ゲノム中に組み込むことができ、または機能的翻訳のため細胞中にDNAを導入する様々な方法により一過的に加えることができる。以前に記載されたように、これらの方法は文献中で詳細に例示されている。構築物を含む細胞、例えば抗生物質耐性、検出可能シグナルの発色などの選択のため、マーカーとタンパク質試薬を利用することによって、融合タンパク質を含む培養中の細胞と構築物を含まない細胞を分離することができる。融合タンパク質が発現した後、適切に細胞の環境を改変することができる。

【0106】

本発明の実施形態は、様々な細胞／分子結合事象のモニタリングに関する広範囲の試験でを使用することができる。引き続き、本発明の方法の異なる適用の非制限的な例を提供する。本発明で開示する系および方法を使用して、細胞中の様々な相互作用を検出することができる。

【0107】

既知のタンパク質と結合する化合物が、それらの安定化、および細胞内と細胞外でのタンパク質半減期の増大をもたらす可能性があることが示されている。例えば、対象の標的とEDを含む融合タンパク質を細胞中に導入し、既知の化合物を細胞に施す。化合物が標的ペプチドと試験化合物の複合体形成を促進する場合、細胞内の融合タンパク質の濃度が増大する。細胞を溶解しそれをEAとインキュベートすることによって、活性酵素形成をもたらす。化合物を細胞に施していない細胞と比較したとき、酵素は基質に作用し、複合体形成を示す検出可能な産物を生成する。

【0108】

特定の実施形態では、本出願中で開示する方法およびアッセイを利用して、タンパク質が相互作用する相互作用界面を決定することができる。タンパク質が相互作用する接触地点には特異的性質があり、「ホットスポット」として知られている。異なる配列長の標的タンパク質とEDを含む融合タンパク質を細胞中に導入する。相互作用配列を含む特定配列長の標的はその相互作用相当物と複合体を形成し、一方で相互作用配列を含まない配列長の標的は、その相互作用相当物と複合体を形成することができない。結果として、複合体を形成する融合タンパク質は安定化し、一方で複合体を形成しない融合タンパク質は細胞中で分解する。安定化融合タンパク質の濃度の増大は補体アッセイにより検出し、したがって相互作用配列の同定を手助けする。

【0109】

特定の実施形態では、開示する方法を使用して、既知の結合複合体の阻害剤として作用することができる、低分子をスクリーニングすることができる。低分子阻害剤は薬物発見試験の新たな選択肢である。例えば、既知の標的とEDを含む融合タンパク質を細胞中に導入する。標的ペプチドは試験化合物と相互作用し、タンパク質－タンパク質相互作用を介して複合体を形成する。低分子を用いた細胞の処置は融合タンパク質の不安定化をもたらし、したがって分解し、融合タンパク質の濃度の低下につながり、それは次いで補体アッセイを使用して検出する。

【0110】

標的ペプチド

特異的結合部位を有する広く様々な細胞タンパク質を、本発明のアッセイにおける使用に適合させることが可能である。細胞シグナル伝達分子、天然酵素基質、補助タンパク質、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドなどとの結合のため、野生型タンパク質中に結合部位が存在し得る。

【0111】

一例として、転写因子は、発生段階的および環境的刺激に応答して、特異的遺伝子発現パターンを制御することが知られている。それらは特異的マルチタンパク質複合体を形成して遺伝子発現を制御し、したがって細胞応答を制御する。したがって、転写因子の機能

10

20

30

40

50

の直接的阻害または活性化には、特異的妨害または動員またはタンパク質－タンパク質もしくはタンパク質－DNA相互作用が必要である。したがって、本出願中に開示する方法を使用して、様々なヒトのがんとしたがつて関係があるこれらの相互作用を調節する低分子をスクリーニングし、様々ながんにおける転写因子の役割を理解するためプローブを開発することができる。特にNFκB、JNK、STAT1、STAT2、FOXO、Sox2、SP1、RXR、RAR、Myc、Max、MAPK、HNF4、VDRなどの様々な転写因子、およびそれらの相互作用は、開示する方法を用いて試験することができる。

【0112】

シグナル伝達経路は、タンパク質複合体の会合および解離を含む治療標的の豊富な供給源である。シグナル導入療法は、薬物研究の重要な分野となっている。シグナル伝達障害は、様々な既知の病状の主な原因となる。いくつかの近年同定された薬物研究用の確認済み標的ペプチドは、シグナル導入関連マクロ分子である。本明細書で開示する方法を利用して、既知のシグナル伝達複合体の阻害剤を試験することができる。

10

【0113】

熱ショックタンパク質－Hsp90は、非ストレス条件下で全タンパク質の1～2%を構成する、真核生物細胞中で最も多量に存在するタンパク質の1つである。Hsp90は、悪性形質転換の主なメンバーである、特にErbb2、Src、Abl、Metチロシンキナーゼ、サイクリン依存性セリンキナーゼなどの様々なキナーゼと相互作用し、それらを安定状態にする。さらにHsp90は、核内ホルモン受容体および低酸素誘導因子－1のような、いくつかの転写因子の成熟にも必要不可欠である。したがって、複合体パートナーの放出およびその後の分解をもたらすHsp90阻害剤のアッセイは、本明細書で開示する方法を使用して行うことができる。

20

【0114】

アポトーシス、またはプログラムされた細胞死は、多細胞生物の発生および健康状態の通常の構成要素である。細胞は様々な刺激に応答して死滅し、アポトーシス中、制御、統制された形式で細胞は死滅する。これによってアポトーシスは、制御不能な細胞死が細胞の溶解、炎症応答、およびおそらく重大な健康問題をもたらす、壊死と呼ばれる他型の細胞死と異なったものとなる。哺乳動物におけるアポトーシス機構の直接の開始は、TNF誘導経路およびFas誘導経路を介して示唆されている。哺乳動物細胞中でのTNF－R1およびFas活性化後、アポトーシス促進メンバー（BAX、BID、BAK、またはBAD）とBcl－2ファミリーの抗アポトーシスメンバー（Bcl－X1およびBcl－2）の間のバランスが確定する。本明細書で開示する方法を利用して、アポトーシスをもたらす様々な相互作用を試験することができる。

30

【0115】

例えば、チロシンキナーゼ、MAPキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、GTPキナーゼ、ser/thrキナーゼ、Chk1および2などのキナーゼは非常に有意であり、本明細書で開示する方法を用いて試験することができる。

【0116】

さらに、本明細書で開示する方法は、β－アミロイドなどのニューロンタンパク質、TNF、プリオン、APP、トランスポーター、例えばドーパミントランスポーター、NMDA受容体、AMDA受容体、ドーパミン受容体などの受容体、チャネルなどに広げることができる。

40

【0117】

いくつかの場合、トリカルボン酸回路、クレブス回路、糖生成などに関係があるタンパク質などの、ハウスキーピングタンパク質が対象となる。

【0118】

本発明の方法および材料を使用して、突然変異タンパク質の分解／不安定化により引き起こされることが知られている疾患を試験することができる。例えば、リソソーム貯蔵障害（LSD）では、遺伝子突然変異がリソソーム酵素のミスフォールディング状態を引き

50

起こし [Brooks, D. A. Nat. Chem. Biol. 3, 84~85頁 (2007)]、したがって酵素を不安定な状態にし、細胞内の移動および機能を不可能にする可能性がある。[Romisch, K. Traffic. 5, 815~820頁 (2004)]。

【0119】

本発明のアッセイを使用し、(ミスフォールディングタンパク質と標識ペプチドを含む)融合タンパク質を導入し、次いで融合タンパク質の安定化に対する既知/未知の低分子薬剤の影響を分析することにより、LSDの機構を試験することができる。したがってこのアッセイは、(ALSと関係がある)SOD1、(がんと関係がある)p53のような突然変異タンパク質が原因の疾患において用途を見出す。(原発性高シュウ酸尿症1型と関係がある)アラニングリコシレートアミノトランスフェラーゼ、(脊髄性筋萎縮症と関係がある)SMN1は、作用機構を解明するため、および低分子薬物候補をスクリーニングアッセイするための重要なツールであり得る。

10

【0120】

本発明のアッセイは、突然変異標的ペプチドの半減期を決定する際にも用途を見出す。突然変異ペプチドは標識ペプチドと融合することができ、時間依存的活性を結合パートナーの有無の下で検出して、半減期を決定することができる。タンパク質の半減期を測定するための方法は、本発明の方法、または当技術分野で知られている他の異なる方法を使用して誘導することができる。例えば、Yewdellら、「Out with the old, in with the new? Comparing methods for measuring protein degradation」、Cell Biol Int 35: 457頁 (2011)を参照されたい。

20

【0121】

開示する組成物、方法およびアッセイは、配列中にタンデムリピートを有するタンパク質の試験にも用途を見出す。様々な結合性があるタンデムリピートを有するタンパク質はタンパク質-タンパク質相互作用に関与することが知られており、したがってこれらの試験は、既知および未知の相互作用、相互作用に関与する配列、タンデムリピート構造に特異的な化合物の性質を解明する際に大きく関係し得る。

【0122】

結合部位

30

考えられる標的ペプチドの前述の考察から、様々な結合部位を本発明のアッセイ中で使用することができることは明らかである。例は(a)ATP(ヌクレオチド)結合部位、(b)プロモドメイン配列、(c)触媒部位または(d)アロステリック部位である。

【0123】

Walkerモチーフとも呼ばれるATP結合モチーフは、ATPまたはGTPと結合するタンパク質中で頻繁に見られる構造タンパク質モチーフである。それは、ATPまたはGTP結合としてタンパク質を特徴付けるフィンガープリント配列を使用して(GTP結合タンパク質を参照されたい)、タンパク質の一次構造のみから通常同定することができる。Walkerらは(1)は2つの配列保存領域を同定した。領域には、低分子疎水性残基、次にXが任意の残基である[Gly/Ala]-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Thr/Serの延長部分がある。第2の配列保存領域にも低分子疎水性残基の延長部分があり、この場合は保存型アスパラギン酸残基を末端とする。アデニル酸キナーゼなどのATP結合モチーフを有するタンパク質の三次元構造では、A-領域の疎水性残基は埋め込み型b-鎖を形成し、グリシン多量領域は、結合ヌクレオチドのリン酸と相互作用するP-ループと呼ばれるループを形成する。第2の保存領域は別の疎水性b-鎖をコードし、保存型アスパラギン酸は、タンパク質と結合したヌクレオチドに通常付随するマグネシウムイオンとの結合に必要とされる。

40

【0124】

前に論じたように、(ジンクフィンガータンパク質を含めた)転写因子は、これらの分子上の結合部位を介してヌクレオチド配列と結合する。

50

【0125】

アロステリック結合部位は、タンパク質の活性部位以外の部位として一般に定義される。アロステリック調節は、アロステリック部位（タンパク質の活性部位以外の部位）でのエフェクター分子の結合によるタンパク質または酵素の制御である。ここでは、活性結合部位以外（すなわちアロステリック部位）またはそれを加えたアミノ酸配列を有する突然変異ペプチドを用いて融合タンパク質を構築し、細胞内に導入する。結合に関与する様々な分子を用いた細胞の処置は、既知のタンパク質のアロステリックモジュレーターを同定する際に役立つ。それらは非活性部位でタンパク質と結合し、タンパク質を安定状態にするからである。GPCRの場合など、アロステリック部位は薬物標的であり得る。MEKKとのアロステリック結合を以下に例示する。アロステリックJNK阻害剤も知られている。本発明のアッセイ中に含めるためのアロステリック部位を同定するための方法は、特許出願WO/2003/087051、「Methods for Identifying allosteric sites」中にさらに記載される。

10

【0126】

ブロモドメイン配列は以下の実施例中に詳細に記載する。クロマチン結合タンパク質およびヒストンアセチルトランスフェラーゼ中の保存型構造モジュールであるブロモドメイン（BRD）は、タンパク質上のアセチルリシン残基を認識することが知られている唯一のタンパク質ドメインである。これらの配列は文献中で知られており、例えば「ZALoops of bromodomains」という表題の米国特許第7,589,167号中に記載されている。

20

【0127】

「活性部位」とも呼ばれる酵素の触媒部位は、基質が作用する酵素の一部である。Prosite documentation PDOC00100 ([http\(colon slash slash\)prosite.expasy.org/PDOC00100](http://colonslashslash.prosite.expasy.org/PDOC00100))中に記載されたように、例えばプロテインキナーゼは、触媒部位中に約10アミノ酸のコンセンサスパターンを有することが知られている。別の例として、触媒三残基は、特定プロテアーゼ酵素の活性部位内に見られる三個のアミノ酸残基、セリン（S）、アスパラギン酸（D）、およびヒスチジン（H）を指す。酵素に関する触媒のさらなる記載は、[http\(colon slash slash\)www\(dot\)ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/](http://colonslashslash.www(dot)ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/CSA/)、the EMBL catalytic site atlasで見ることができる。

30

【0128】

酵素の触媒部位は別個のサブユニットで見られることが多い。プロテインキナーゼの触媒サブユニットは高度に保存されており、いくつかの構造は解明されている。

【0129】

キット

1つまたは複数の前に記載した適用例を実施するために使用するためのキットも、本発明によって提供する。特定の実施形態では、キットは、前に概説したような標的タンパク質とβ-ガラクトシダーゼ断片を含む融合タンパク質を、構成的または誘導的のいずれかで発現する細胞を少なくとも含む。特定の実施形態では、キットは、このような細胞を作製するための要素、例えばベクター上に存在する融合タンパク質をコードする核酸、および／または前に概説したような標準的分子生物学技法を使用して対象のタンパク質が融合可能であるβ-ガラクトシダーゼ断片をコードする核酸を含む。キットは、酵素基質、細胞増殖培地などだけには限られないがこれらを含めた、本発明の特定の実施形態を実施する際に用途がある、1つまたは複数の別の構成要素をさらに含むことができる。

40

【0130】

特定の実施形態では、本発明のキットは、（a）標的タンパク質とβ-ガラクトシダーゼのED断片を含む第1の融合タンパク質を含む細胞、（b）β-ガラクトシダーゼのEA断片、および（c）β-ガラクトシダーゼ基質を含む。

【0131】

50

特定の実施形態では、キットは、(a) 標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片を含む融合タンパク質を含む細胞、(b) β-ガラクトシダーゼのEA断片、および(c) β-ガラクトシダーゼ基質を含むことができる。

【0132】

(a) 標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片、化合物を含む融合タンパク質を含む細胞、(b) β-ガラクトシダーゼのEA断片、および(c) β-ガラクトシダーゼ基質を含むキットも提供する。

【0133】

(a) 標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片、低分子を含む融合タンパク質を含む細胞、(b) β-ガラクトシダーゼのEA断片、および(c) β-ガラクトシダーゼ基質を含むキットも提供する。

10

【0134】

(a) 様々な配列長の標的とβ-ガラクトシダーゼ断片のED断片を含む融合タンパク質を含む細胞、(b) β-ガラクトシダーゼのEA断片、および(c) β-ガラクトシダーゼ基質を含むキットも提供する。

【0135】

β-ガラクトシダーゼのEA断片と融合した標的ペプチドを含む融合タンパク質をコードする発現構築物を含むキットも、本発明において提供する。

【0136】

特定の実施形態では、ベクターは、制限部位を使用してタンパク質コード配列をベクター中に挿入すると、ベクターが標的とβ-ガラクトシダーゼ断片の融合タンパク質をコードするように、ベクター上に位置する制限部位を含む。特定の実施形態では、キットは哺乳動物細胞をさらに含む。

20

【0137】

前述の構成要素以外に、本発明のキットは、本発明の方法を実施するための説明書をさらに含むことができる。これらの説明書は様々な形で本発明のキット中に存在してよく、その1つまたは複数がキット中に存在してよい。これらの説明書が存在し得る1つの形は、適切な媒体または基盤上に印刷された情報、例えばその上に情報が印刷された一枚または複数枚の紙、キットのパッケージ、添付文書などである。さらに別の手段は、その上に情報が記録されたコンピュータ可読媒体、例えばディスク、CDなどであり得る。存在し得るさらに別の手段は、インターネットを介して使用し遠隔地の情報にアクセスすることができるウェブサイトアドレスである。任意の都合な手段がキットにおいて存在してよい。

30

【実施例】

【0138】

以下の実施例は、本発明を制限することではなく例示することを目的とする。

【実施例1】

【0139】

相互作用界面をモニタリングするための結合アッセイの使用

キナーゼはATPと結合し、標的タンパク質へのリン酸の移動を触媒する。キナーゼ機能を阻害するための一般的な方法は、標的キナーゼへのATP結合を遮断する低分子を適用することである。このように、この化合物はATP競合と呼ばれる。

40

【0140】

この試験を実施するため、BLKとProLabelの間で融合を行った。

【0141】

BLK(241~490)-PLアミノ酸配列を以下に示す(配列番号7)。BLK(GenBank Locus NP_001706で完全長505アミノ酸)のアミノ酸番号241~490を配列内に示す。PL配列には下線を引き、ヌクレオチド結合配列は太字で示す。キナーゼドメインを配列中に含める。

M-(241)LRLVRKLGSGQFGEVWMGYKNNMKVAIKTLKEGTMSPEAF~~LG~~EANVMKALQHERLRLYAVVTKEPIYIVTEY

50

MARGCLLDFLKTDEGSRLSLPRLIDMSAQIAEGMAYIERMNSIHRDLRAANILVSEALCCKIADDFGLARIIDSEYTAQEG
AKFPIKWTAPAEIHFGVFTIKADVWSFGVLLMEVVITYGRVPYPGMSNPEVIRNLERGYRMPRPTCPPELYRGVIAECWR
SRPEERPTFEFLQSVL(490)-SSFELLESSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR(配列番
号7)。

【0142】

他のキナーゼとの相同性により定義したキナーゼ活性部位を中心とする様々な量のタンパク質配列を含む、いくつかの融合体を構築した。例えば、タンパク質BLKアミノ酸番号241～494、246～494、251～494、256～494、261～494および266～494を含有する融合体を作製した。

【0143】

融合タンパク質を含有する発現構築物を使用してHEK細胞に形質導入した。次いで細胞はダサチニブの存在下で3時間インキュベートした。

【0144】

BLK-PL融合体を、次いで溶解バッファー、EAおよび化学発光基質を加えることによって定量化した。241～494アミノ酸残基を有する融合体が、ダサチニブに関して最も高いアフィニティーを示したことが分かった。ダサチニブ、N-(2-クロロ-6-メチルフェニル)-2-[[6-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-2-メチル-4-ピリミジニル]アミノ]-5-チアゾールカルボキサミド水和物は、慢性骨髄性白血病(CML)がある患者における使用が承認された、経口マルチBCR/ABLおよびSrcファミリーチロシンキナーゼ阻害剤である。

【0145】

アミノ酸配列241～494を含有するBLKとダサチニブの結合を示す結果は、図3中に示す。凡例中に示す発現プラスミド(例えば241～494)は、使用したBLK配列の開始および停止アミノ酸位置を示すために命名する。これらのプラスミドを使用して親U2OS細胞に形質導入した。次いで細胞をダサチニブで3時間処置し、BLK-PL融合体は溶解バッファー、EAおよび化学発光基質を加えることによって定量化した。見ることができるように、241～494構築物が最も確かな応答を示した。

【実施例2】

【0146】

キナーゼ相互作用の阻害剤としての低分子をモニタリングするための結合アッセイの使用

PDL173955は、C-Ablキナーゼドメインと複合体形成することが知られている低分子である。フォレチニブ(GSK1363089、XL880)は低分子METおよびVEGFR2/KDRキナーゼ阻害剤である。BLK-PL融合体を発現した細胞を、示したATP競合分子で6時間処置した。次いで細胞をEAと基質の存在下で溶かし、30分後に発光を測定した。

【0147】

結合アッセイを実施して低分子をスクリーニングするため、BLKとProLabelの間で融合体、BLK-PLを作製した(配列番号7)。この発現構築物を使用してHEK細胞に形質導入した。示したBLK-PL融合体を発現したU2OS細胞プールは、有効性および効能の変化によって、異なるアフィニティーの化合物(ダサチニブ、PDL173955、XL-2880)を検出することが示された(図4)。

【実施例3】

【0148】

融合タンパク質と既知の化合物の相互作用、および低分子による阻害をモニタリングするための結合アッセイの使用

B細胞リンパ腫-2(BCL2)およびBCL-X_Lは、BAK(Bcl-2相同アンタゴニスト/キラー)などの抗アポトーシス因子またはアポトーシス促進因子の結合によりその機能が制御される、抗アポトーシスタンパク質である。

【0149】

「Inhibiting the interaction of Bcl Proteins with binding partners」という表題のUS2008/0306127中でさらに詳細に記載されたように、Bcl-2ファミリーのタンパク質には、Bcl-2およびBcl-XLなどの抗アポトーシス分子と、Bax、Bak、BidおよびBadなどのアポトーシス促進分子の両方がある。Bcl-2は、生理的細胞死機構により引き起こされる正常細胞の代謝回転を妨げることにより、がん細胞進行に貢献する。BCL1-2ファミリーのタンパク質のメンバーは、アポトーシス促進機能（例えばBax、Bak、Bid、Bim、Noxa、Puma）、および抗アポトーシス機能を有する（例えばBcl-2、Bcl-xL、Mcl-1）アポトーシスの主要レギュレーターとなる。ファミリーのアポトーシス促進メンバーと抗アポトーシスメンバーの間

10

【0150】

以下に記載するように、BCL2のトランケーションはタンパク質の安定性に影響を与え得る。様々なアミノ酸または欠失を含有するが、通常低分子、例えば薬物候補が結合する結合部位である対象の結合部位を含有する、様々な切断型BCL2断片を合成することができる（図1を参照されたい）。例えばBcl-2は、ホモ二量体およびヘテロ二量体形成を担う別個の結合部位を有する。PNAS March 10, 2009 vol. 106 no. 10 3935~3940頁を参照されたい。

【0151】

20

BCL-2とペプチド試験化合物（Bim、BakおよびBax）の相互作用を試験した。Bim（配列番号8）、Bak（配列番号9）、およびBax（配列番号10）由来の切断型ペプチドをProLabel（PL）に融合させた。

【0152】

BIM断片（配列番号8）のアミノ酸配列を以下に示す（完全長bimβ5, 36アミノ酸はGenBankでAAT34900.1である）：

MRPEIWIAQELRRIGDEFNA（配列番号8）

【0153】

BAK断片（配列番号9）のアミノ酸配列を以下に示す：

GQVGRQLAIIIGDDINR（配列番号9）完全長Bak、GenBankでAAI10338.1、153アミノ酸）

30

【0154】

BAX断片（配列番号10）のアミノ酸配列を以下に示す：

QDASTKKLSECLKRIGDELDS（配列番号10）（完全長Baxε、GenBankでAAD22706.1、164アミノ酸と比較）

【0155】

BIM-PL融合体の配列を以下に示す（配列番号11）：

MRPEIWIAQELRRIGDEFNASSFELLESSNSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTRDR（配列番号11）

【0156】

40

原型BCL-2が、U2OS細胞中で各ProLabel融合体と同時に発現された。BCL-2相互作用を妨害することが報告された低分子を次いで細胞に施し、一晚インキュベートした。

【0157】

化合物の添加は全ての場合で有意なシグナル消失をもたらしたが、偶然最高アフィニティー反応であるBCL-2Bim相互作用に関して最も顕著である（図7A~C）。示した標的PL融合体および非タグ状態タンパク質Bcl-2を用いて、細胞に形質導入した。細胞は示した化合物で一晩処置し、残存標的PL融合体は、EAおよび基質の存在下で細胞を溶かすことにより検出した。発光は30分後に測定した。以下の表は図7A~Cに関するものである：

50

【0158】

【表1】

7A:化合物[M]

	ABT-263	ABT-737
最適値		
最小値	5900	6973
最高値	31800	31292
LogEC50	-8.329	-8.423
HillSlope	-1.216	-1.485
EC50	4.683e-009	3.779e-009

S/B = 14.0

5.5

10

【0159】

【表2】

7B化合物[M]

	ABT-263	ABT-737
最適値		
最小値	6740	7774
最高値	136900	139290
LogEC50	-8.221	-8.363
HillSlope	-1.635	-1.898
EC50	6.011e-009	4.335e-009

S/B = 66.5

26.1

20

【0160】

【表3】

7C化合物[M]

	ABT-263	ABT-737
最適値		
最小値	-14342	5446
最高値	11081	11602
LogEC50	-4.378	-7.191
HillSlope	-0.4082	-0.5348
EC50	4.192e-005	6.437e-008

S/B = 5.1

2.1

30

【0161】

図7Bは、ABT263（アポトーシスを回復するよう設計された低分子二重Bcl-2/Bcl-xL阻害剤）およびABT737（Bcl-2アンタゴニストBH3を模倣した低分子）の添加が、BCL-2に対するBimの安定効果を妨げたことを示す。これらの化合物は、BaxのBCL-2安定化に対して幾分類似した効果があった（図7B）。これらの化合物は、BCL-2結合とBakの安定化に対してはほとんど影響がなかった（図7C）。

40

【0162】

これらの実験は、PL標識結合ペプチドの分解を可能にするほど十分な所定時間で実施する。これは試験するペプチドで変わるが、3～6時間または6～8時間が多くの場合最適であることが分かった。一般に、24時間以下のインキュベーション時間が、本発明の方法によるタンパク質の安定化を観察するのに十分であろう。結合パートナー（例えばB

50

c 1-2) と P L 標的が細胞内で既に 1 つに結合している場合、低分子がペプチドを置換するのに十分な時間が与えられるに違いない。本発明の方法は、異なる濃度の試験化合物での応答の測定、および対照を用いた測定も企図する。

【実施例 4】

【0163】

アロステリックモジュレーターを検出するための結合アッセイの使用

M E K キナーゼ (M E K K) は、細胞性ストレス (例えば U V および γ 線照射、浸透圧ストレス、熱ショック、タンパク質合成阻害剤)、炎症性サイトカイン (例えば、腫瘍壊死因子 α 、T N F α 、およびインターロイキン-1、I L 1) および G タンパク質結合受容体アゴニスト (例えば トロンビン) により誘導される c - J u n N H 2 末端キナーゼ (J N K) および p 3 8 活性化をもたらすマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (M A P K) シグナル伝達経路を制御する、セリンスレオニンプロテインキナーゼのファミリーを含む。これらのストレス活性化キナーゼは、様々な細胞型におけるアポトーシス、発癌性形質転換、および炎症応答に関与している。

【0164】

キナーゼ阻害剤低分子化合物 (U 0 1 2 6 および P D 0 3 2 5 9 0 1) と M E K - P L 融合構築物の相互作用を、本明細書で開示するアッセイを使用して試験した。U 0 1 2 6 は、M E K 1 と M E K 2 の両方に非常に選択的な阻害剤、M A P K / E R K キナーゼの型である。U 0 1 2 6、(2 Z、3 Z) - 2, 3 - ビス (アミノ (2 - アミノフェニルチオ) メチレン) スクシノニトリルは、M E K 1 / 2 における A T P および E R K 1 / 2 結合部位の外側に結合するアロステリック阻害剤であることが知られている。

【0165】

P D 0 3 2 5 9 0 1 ((R) - N - (2, 3 - ジヒドロキシプロポキシ) - 3, 4 - ジフルオロ - 2 - (2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニルアミノ) ベンズアミド) は選択的であり、非 A T P 競合マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (M E K または M A P K K) M E K 阻害剤である。

【0166】

アミノ酸 5 8 ~ 3 7 1 を含有する切断型 M E K ペプチド (N C B I 参照配列 N P _ 0 0 2 7 4 6 . 1) を P L (配列 I D 1 2) と融合させた。M E K (5 8 ~ 3 7 1) - P L 配列を示す (配列番号 1 2)。これは触媒ドメインを含有する。P L 部分に下線を引く。

MQKVGELKDDDFEKISELGAGNGGVVFKVSHKPSGLVMARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGAFFYSDGEISICMEHMDGGSLDQVLKKAGRIPEQILGKVSIAVIKGLTYLREKHKIMHRDVKPSNILVNSRGEIKLCDFGVSGQLIDSMANSFVGTSTRSYMSPERLQGTHYSVQSDIWSMGLSLVEMAVGRYPISPPDAKELELMFGCQVEGDAAETPPRPRTPGRPLSSYGMDSRPPMAIFELLDYIVNEPPPKLP SGVFSLEFQDFVNKCLIKNPAERADLKQLMVHAFIKRSDAEEVDFSSFELLESSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPFASWRNSEEARTDR (配列番号 12)

【0167】

次いで構築物を、H E K (図 8 A)、C H O (図 8 B) および U 2 O S (図 8 C) 細胞を含めた様々な細胞型で発現させた。キナーゼ阻害剤 U 0 1 2 6 および P D 0 3 2 5 9 0 1 を次いで細胞に施した。

【0168】

これらの化合物の結合は活性 β - ガラクトシダーゼ酵素形成の有意な増大をもたらし、(キナーゼ阻害剤として知られる) これらの化合物は、活性部位ではなくアロステリック部位に結合したという指標を本発明者らに与えた (図 8 A ~ C)。

【実施例 5】

【0169】

結合化合物の特異性をモニタリングするための結合アッセイの使用

ダサチニブ (既知の A T P 競合分子) および U 0 1 2 6 と P D 0 3 2 5 9 0 1 (既知のキナーゼ阻害剤) を使用して、それぞれ A T P 結合と非 A T P 結合部位に対する、それらの特異性を決定した。

【0170】

アミノ酸 58～371 を含有する切断型 MEK ペプチドおよびアミノ酸 241～494 を含有する BLK ペプチドを PL と融合させた。MEK 融合体を含有する発現構築物を使用して CHO 細胞に形質導入し、ダサチニブ、U0126 および PD035901 とインキュベートした。一定時間にわたりダサチニブとインキュベートした細胞と比較して、U0126 および PD035901 でシグナルの増大を観察した (図 9A)。

【0171】

第二部の実験では、BLK 融合体を含有する発現構築物を使用して U2OS 細胞に形質導入し、ダサチニブ、U0126 および PD035901 とインキュベートした。一定時間にわたり U0126 および PD035901 とインキュベートした細胞と比較して、ダサチニブでシグナルの増大を観察した (図 9B)。

10

【0172】

観察したように、ダサチニブは ATP 結合部位を含有する BLK 融合体との結合に特異的であり、U0126 および PD035901 (キナーゼ阻害剤) はタンパク質機能を制御するアロステリック部位との結合に特異的である。

【実施例 6】

【0173】

ブロモドメインを試験するための結合アッセイの使用

ブロモドメインタンパク質は後成的リーダータンパク質として知られており、特異的部位にクロマチン修飾酵素を標的化する際に重要な役割を果たす。例えば BRD4 は、クロマチン標的化に関与し得る 2 個のブロモドメイン、1 個の保存型配列モチーフを含有する。

20

【0174】

化合物結合の影響を試験するため、BRD4 (1) (受託番号 NM__058243)、BRD2 (1) (受託番号 NM__005104) および BRDT (1) (受託番号 NM__001242806) (それぞれ配列番号 13、14 および 15) および prolab1 (PL) の断片を使用して融合タンパク質を調製した。これらの融合タンパク質を含有する発現構築物を使用して HEK 細胞に形質導入した。細胞は 384 ウェルプレートに平板培養し、37℃/5% CO₂ で一晚インキュベートし、細胞を接着および増殖させた。これらの配列は以下のように列挙する：

【0175】

BRD4 (1) (配列番号 13)、明解にするため ED 部分に下線を引く

MKVSEQLKCCSGILKEMFAKKHAAYAWPFYKPV DVEALGLHDYCDIIKHPMDMSTIKSKLEAREYRDAQEFGADVRLMFSNCYKYNPPDHEVVAMARKLQDV FEMRFAKMPSSFELLESSNSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR

30

【0176】

BRD2 (1) (配列番号 14)、明解にするため ED 部分に下線を引く

MRVTNQLQYLHKVVMKALWKHQFAWPFQRQPVDAVKLGLPDYHKIIKQPMDMGTIKRRLNNYYWAASECMQDFNTMFTNCYIYNKPTDDIVLMAQTLEKIFLQKVASMPQEEQELVSSFELLESSNSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR

【0177】

BRDT (1) (配列番号 15)、明解にするため ED 部分に下線を引く

MLTNQLQYLQKVVLKDLWKHSFSWPFQRQPVDAVKLQLPDYYTIKKNPMDLNTIKRLENKYAKASECIEDFNTMFSNCYLYNKPGGDIVLMAQALEKLFMQLSSFELLESSNSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR

40

【0178】

次いで細胞を対照化合物 (JQ1) に曝し、37℃で 6 時間インキュベートした。次いで融合タンパク質を、溶解バッファー、EA および検出基質を加えることにより定量化し、融合タンパク質の安定性の増大を化合物の結合後に観察した。

【0179】

さらにアッセイは、配列中で互いに強く結合したタンデムドメイン (BRD-BRD、PHD-BRD または BRD-PHD) としてのブロモドメインからなるタンパク質に適

50

用することもできる。結合アッセイを実施するため、BRDT（タンデム）およびBRD（3）（タンデム、配列番号16）とPLの間で融合体を調製した。

【0180】

BRD3（1～403）－PL（配列番号16）

MSTATTVAPAGIPATPGPVNPPPEVSNPSKPGKRTNQLQYMQNVVVKTLWKHQFAWPFYQPVDAIKLNLDPYHKIIK
NPMDMGTIKKRLNNYYWSASECMQDFNTMFTNCYIYNKPTDDIVLMAQALEKIFLQKVAQMPQEEVELLPAPKGKGRK
PAAGASAGTQQVAAVSSVSPATPFQSVPTVSQTPVIAATPVPTITANVTSPVPPAAAPPPATPIVPVVPPTPPVVK
KKGVKRKADTTTPTTSAITASRESPPPLSDPKQAKVVARRESGGRPIKPPKKDLEDGEVPQHAGKKGKLESEHLRYCDSI
LREMLSKKHAAYAWPFYKPVDAEAELELHDYHDI IKHPMDLSTVKRKMDGREYPDAQGFAADVRLMFSNCKYKNPPDHEVV
AMARKSNCCISFELLESSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDR

10

【0181】

前述の実験条件および対照化合物（JQ1）後、安定性に関して融合タンパク質を定量化し、化合物の結合後、半減期の増大（安定性）をタンデムリピートドメインで観察した。

【実施例7】

【0182】

細胞中でのトランスフェラーゼ酵素の半減期に対する化合物結合の影響を試験するための結合アッセイの使用

メチルトランスフェラーゼは、DNAメチル化に関与するグループのトランスフェラーゼ酵素である。G9aメチルトランスフェラーゼはヒストンH3のリシン9をメチル化し、ヒト中に存在する。本発明のアッセイ用に、G9Aメチルトランスフェラーゼの触媒ドメイン（アミノ酸918～1193、受託番号NM__006709）を、そのC末端においてPLタグ（検出ペプチド、以下下線）と融合させた（配列番号17）。

20

【0183】

G9A（918～1198）－PL（配列番号17）、明解にするためPLに下線を引く

MTEKIIICRDVARGYENVPIPCVNGVDGEPCEPDYKYISENCETSTMNIDRNITHLQHCTCVDDCSSSNCLCGQLSIRC
WYDKDGRLLQEFNKIEPPLIFECNQACSCWRNCKNRVQSGIKVRLQLYRTAKMGWGVRLQTIPQGTFIGEYVGELISD
AEADVREDDSYLFDLDNKDGEVYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIIPVRVFMHLQDLRFPIAFFSSRDIRTGEELGFDY
GDRFWDIKSKYFTQCQSEKCKHSAEIALEQSRLARLDLSFELLESSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASW
RNSEEARTDR

30

【0184】

G9Aの触媒ドメインと融合した酵素ドナーPLをA549細胞において発現させ、それらは384ウェルプレートに平板培養し、37℃/5%CO₂で一晩インキュベートし、細胞を接着および増殖させた。融合タンパク質を発現した細胞は2バッチに分け、一方は対照として利用し、他方は結合化合物（UNC0638）を用いて37℃で6時間処置した。次いで両バッチをシクロヘキシミドで処置し、さらなるタンパク質生成を妨げ、両バッチにおける融合タンパク質の半減期を図10中に示すように計算した。見ることにできるように、100分後、UNC0638処置細胞の発光の変化率は最小であり、一方シクロヘキシミドのみで処置した細胞は約50%低下した。UNC0638は市販されており、G9a/GLPメチルトランスフェラーゼの阻害剤である。例えば、<http://colon-slash-slash.apps.thesgc.org/chemical-probes/UNC0638#overview>、SGC product literatureを参照されたい。

40

【0185】

図10中のグラフからさらに見ることにできるように、結合パートナー（UNC0638）を伴う融合タンパク質の半減期は、結合パートナーに曝していない融合タンパク質と比較して長く、アミノ酸918～1198を有する切断型断片が脱安定状態であったことを示す。

【実施例8】

50

【0186】

チトクローム P₄₅₀ を試験するための結合アッセイの使用

チトクローム P₄₅₀ (CYP) は薬物代謝に関与する主要クラスの酵素であり、したがって薬物設計／開発試験におけるマーカーとしても作用する。

【0187】

それぞれの CYP (CYP19A、受託番号 NM__000103；配列番号 18、および CYP17A、受託番号 NM__000102；配列番号 19) の触媒ドメインを、その C 末端において PL タグと融合させた。HEK 細胞には、融合タンパク質発現構築物で形質導入した。次いで細胞を、異なる化合物を用いて 37℃ で 3～6 時間処置した。次いで融合タンパク質を定量化して、融合タンパク質の安定化に対する異なる化合物の影響を分析した。

10

【0188】

以下の最適値を得て、CYP17A に関するデータは図 11 中に示し、それは以下の最適値データでの、ケトコナゾールおよびアビラテロンによるそのドメインの安定化を示す。

【0189】

【表 4】

	ケトコナゾール	アビラテロン
最適値		
最小値	1.230e+006	1.231e+006
最高値	2.348e+006	2.516e+006
LogEC50	-7.988	-9.598
HillSlope	1.083	1.152
EC50	1.028e-008	2.522e-010

S/B = 1.9

2.0

20

【0190】

CYP17 は小胞体に局在する。それは 17 α ヒドロキシラーゼ活性と 17, 20-リアーゼ活性の両方を有し、プロゲステロン、鉱質コルチコイド、糖質コルチコイド、アンドロゲン、およびエストロゲンを生成する特有立体経路中の主要酵素である。ケトコナゾールは、真菌感染を治療するために使用するイミダゾール系薬剤である。それは真菌 p₄₅₀ 酵素と結合し、ここでは CYP17a と結合することが示される。アビラテロン、CAS 154229-19-3 は強力な CYP17 阻害剤であることが知られている。

30

【0191】

CYP19A アミノ酸 1～503 を使用して、アナストラゾールおよび YM511 が融合ペプチドを安定状態にしたことも分かった（データ示さず）。Arimidex（登録商標）アナストラゾールは AstraZeneca から入手可能であり、アロマターゼと結合することが知られている。YM511（化合物名：4-[[(4-ブロモフェニル) メチル] -4H-1, 2, 4-トリアゾール-4-イルアミノ] ベンゾニトリル）はアロマターゼ阻害剤でもある。CYP19 はアロマターゼとしても知られている。

40

【0192】

CYP17A（配列番号 18）、明解にするため ED に下線を引く：

MWELVALLLLTLAYLFWPKRRCPGAKYPKSLLSPLVGSPLPFLPRHGHMHNFFKLQKKYGPIYSVRMGTKTTVIVGH
HQLAKEVLIKKGKDFSGRPQMATLDIASNNRKGIAFADSGAHWQLHRRLAMATFALFKDGDQKLEKIICQEISTLCDMLA
THNGQSIDISFPVFVAVTNVLISLICFNTSYKNGDPELNVIQNYNEGIIDNLSKDSLVDLPWLKIFPNKTLEKLKSHVKI
RNDLLNKILENYKEKFRSDSITNMLDTLMQAKMNSDNGNAGPDQDSELLSDNHILTTIGDIFGAGVETTTSVVKWTLAFL
LHNPQVKKKLYEEIDQNVGFSRTPTISDRNRLLLLEATIREVLRLRPVAPMLIPHKANVDSSIGFAVDKGTVEVINLWA
LHNEKEWHQPDQFMPEFLNPAGTQLISPSVSYLPFGAGPRSCIGEILARQELFLIMAWLLQRFDLEVPDDGQLPSLEG
IPKVVFLLDSFKVKIKVRQAWREAQAEGSTSSFELLESSNSLAVVLQRRDWENPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTD

50

R

【0193】

結論

前述の具体的記載は本発明の例示および例証を意味するものであり、添付の特許請求の範囲の文面および同等範囲によって定義される、本発明の範囲を制限するものとしてみなすべきではない。本明細書に引用する全ての刊行物および特許は、それぞれ個々の刊行物または特許を具体的かつ個別に示し参照により組み込み、それらの刊行物が引用する方法および／または材料に関して開示および記載するため参照により本明細書に組み込むように、参照により本明細書に組み込む。任意の刊行物の引用は出願日前のその開示のためであり、従来の特許によるこの様な刊行物に本発明が先行し得ないことを、認めるものとして解釈すべきではない。さらに、示した公開日は実際の公開日と異なる可能性があり、それらは個別に確認する必要がある。

10

【図面の簡単な説明】

【0194】

【図1】安定なタンパク質の断片が如何にして不安定になり、結合部位に対する化合物の結合によって安定化され、増加した存在量で検出されるかを示す、本発明のアッセイの一実施形態の模式的表示を示す図である。

【図2】アミノ酸241～490のBLK構築物を発現させるためのRPS-BLK(241-490)のプラスミドマップを示す図である。

【図3】小分子ダサチニブとの相互作用に關与する異なる配列長のチロシン-タンパク質キナーゼBLK(「BLK」との融合構築物(BLK-キナーゼ-Prolabel))を示すグラフを示す図である。

20

【図4】BLK-PL融合物の存在量に対する種々の小分子(ダサチニブ、PD173955およびXL-2880)の影響を示すグラフを示す図である。

【図5】RPS-BCL2 DNA構築物のプラスミドマップを示す図である。

【図6】RPN-pBIM-PL DNA構築物のプラスミドマップを示す図である。

【図7】BCL-2の融合タンパク質との相互作用を示す一連の3つのグラフを示す図である。図7AはPL-Baxからのデータを示し、図7BはPL-Bimからのデータを示し、図7CはPL-Bakからのデータを示す。

【図8】図8Aは、HEK細胞におけるMEK-PL融合物相互作用の存在量に対するキナーゼ阻害剤(U0126およびPD0325901)の影響を示すグラフを示す図である。図8Bは、CHO細胞を用いた、図8Aと同様のグラフを示す図である。図8Cは、U2OS細胞を用いた、図8Aと同様のグラフを示す図である。

30

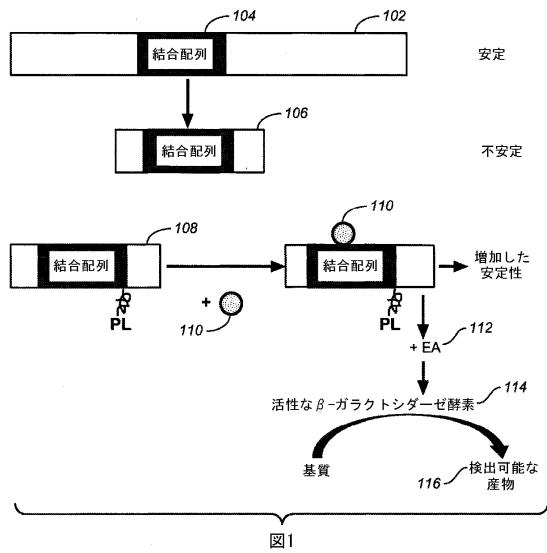
【図9】図9Aは、MEK-PLに対するダサチニブ、U0126およびPD035901の特異性を示すグラフを示す図である。図9Bは、BLK-PL融合物を用いた、図9Aと同様のグラフを示す図である。

【図10】G9a/GLPメチルトランスフェラーゼに対する選択的な化学的プローブであるUN06038で処理した場合の、ヒストンメチラーゼG9a断片における発光の変化を示すグラフを示す図である。

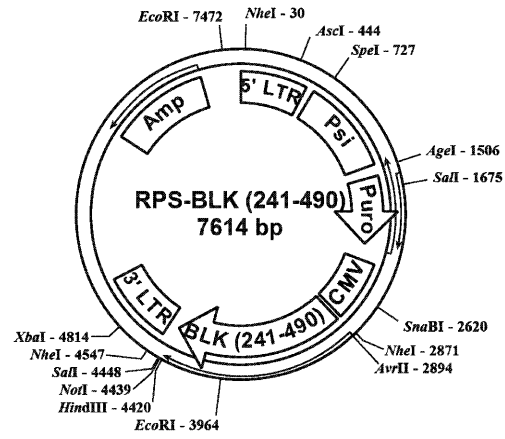
【図11】ケトコナゾールおよびアビラテロンによるそのドメインの安定化を示す、CY P17 A-ED融合物からの蛍光を示すグラフを示す図である。

40

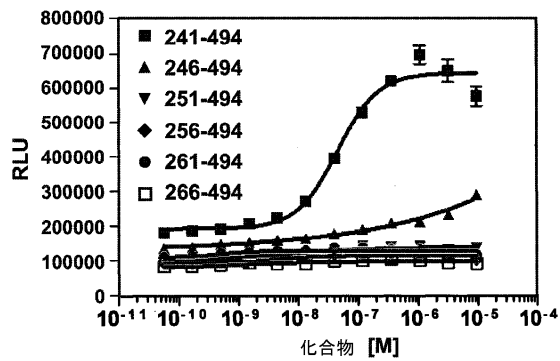
【図 1】



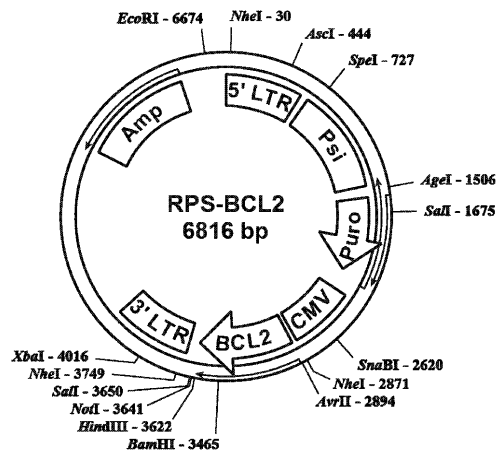
【図 2】



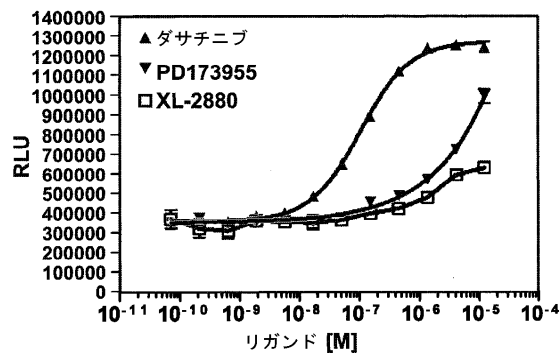
【図 3】



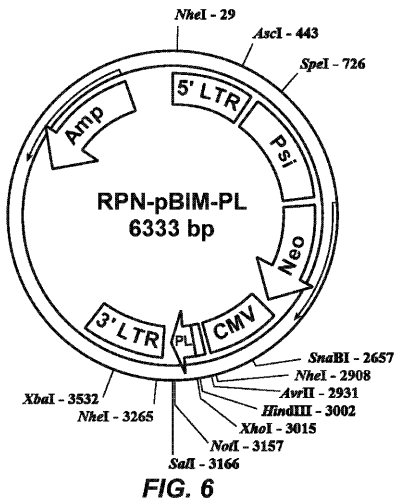
【図 5】



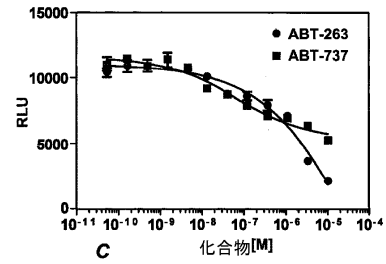
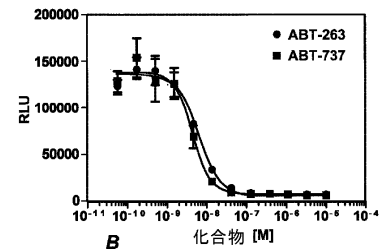
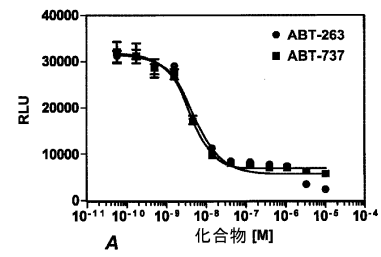
【図 4】



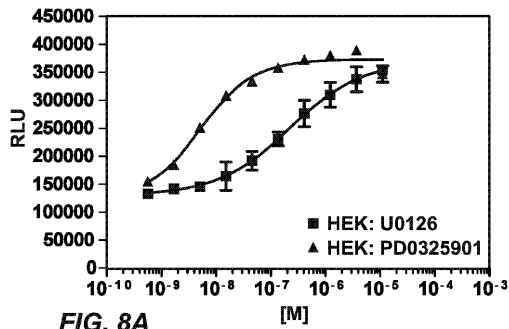
【図 6】



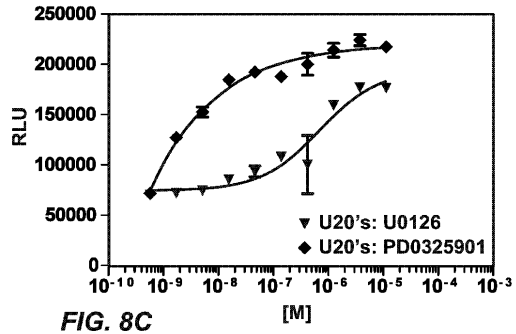
【図 7】



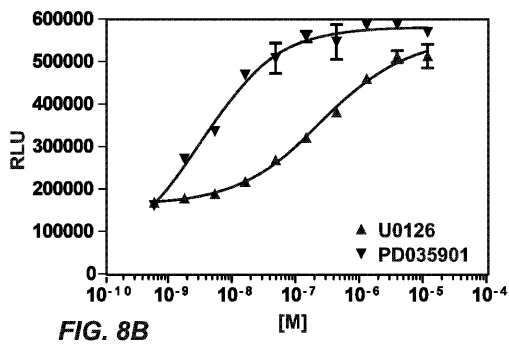
【図 8 A】



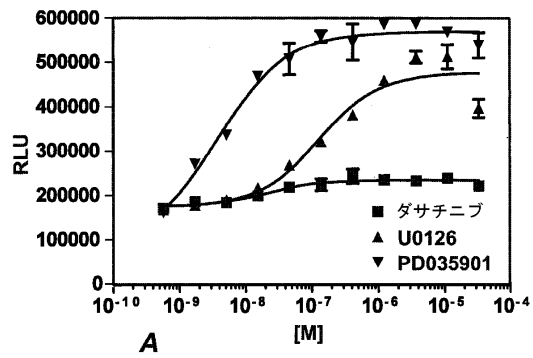
【図 8 C】



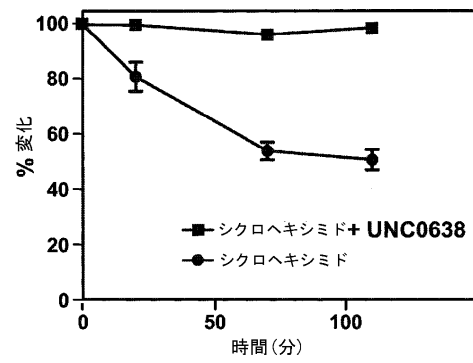
【図 8 B】



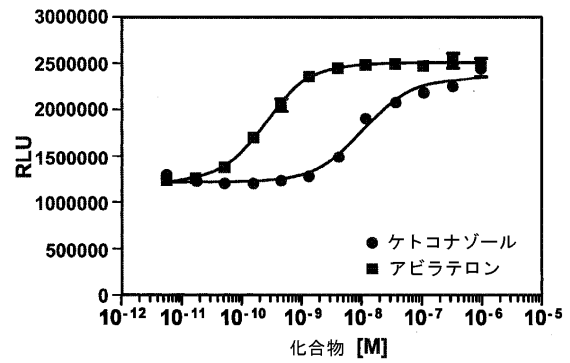
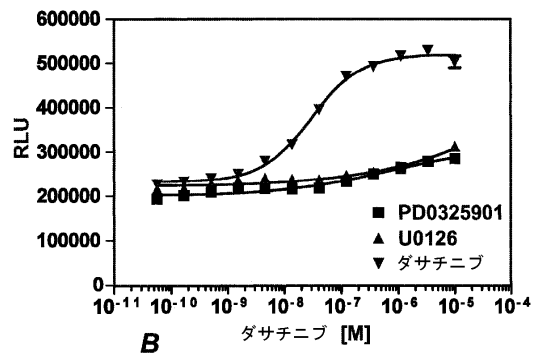
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0006141327000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/12 (2006.01) C 1 2 N 9/12
C 1 2 N 9/38 (2006.01) C 1 2 N 9/38

(72)発明者 ウィリアム ラーブ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 3 6 フレモント ホリー ストリート 3 7 1 5 5
(72)発明者 トーマス エス ウェアマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 2 5 メンローパーク リングウッド アベニュー
1 0 5 1

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0034777 (US, A1)
特表2005-501548 (JP, A)
特開平03-175360 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)