

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5415264号  
(P5415264)

(45) 発行日 平成26年2月12日(2014.2.12)

(24) 登録日 平成25年11月22日(2013.11.22)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C O 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 19/00
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D
<b>G O 1 N</b>	<b>33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/543 5 O 1 A

請求項の数 29 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2009-518281 (P2009-518281)  
 (86) (22) 出願日 平成19年6月29日(2007.6.29)  
 (65) 公表番号 特表2009-542211 (P2009-542211A)  
 (43) 公表日 平成21年12月3日(2009.12.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/015089  
 (87) 国際公開番号 W02008/005310  
 (87) 国際公開日 平成20年1月10日(2008.1.10)  
 審査請求日 平成22年6月28日(2010.6.28)  
 (31) 優先権主張番号 60/806,422  
 (32) 優先日 平成18年6月30日(2006.6.30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 511132133  
 ドイスコベルク コーポレーション  
 アメリカ合衆国 94538 カリフォル  
 ニア州 フレモント 42501 アルブ  
 ラエ ストリート  
 (74) 代理人 100097456  
 弁理士 石川 徹  
 (72) 発明者 ピエトロ シセリ  
 アメリカ合衆国 92122 カリフォル  
 ニア州 サン ディエゴ レボン ドル.  
 3535 #4404  
 (72) 発明者 ジュエレムイ フント  
 アメリカ合衆国 92107 カリフォル  
 ニア州 サン ディエゴ ペスカデロ ア  
 ベ. 4752

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検出可能な核酸タグ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

融合タンパク質に結合した核酸オリゴマーを含む組成物であって、  
 該融合タンパク質が、

- (a) 対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び、
- (b) 該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み；  
 該核酸オリゴマーが、
- (c) PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び、
- (d) 該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み；  
 該第一の核酸配列が該第二の核酸配列に対して異種性である、前記組成物。

10

【請求項2】

前記核酸が一本鎖又は二本鎖DNAである、請求項1記載の組成物。

【請求項3】

前記核酸相互作用モチーフがDNA結合ドメインである、請求項1又は2記載の組成物。

【請求項4】

前記DNA結合ドメインがNF- BのDNA結合ドメイン、croリプレッサーのDNA結合ドメイン、lacリプレッサーのDNA結合ドメイン、GAL4のDNA結合ドメイン、GCN4のDNA結合ドメイン、Lex-AのDNA結合ドメイン、Opaque-2のDNA結合ドメイン又は、TGA1aのDNA結合ドメインである、請求項3記載の組成物。

【請求項5】

20

前記第二の核酸配列が配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号11、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20又は配列番号21に示す配列を含む、請求項3記載の組成物。

【請求項6】

前記第二の核酸配列が配列番号10、配列番号12又は配列番号13に示す配列を含む、請求項3記載の組成物。

【請求項7】

前記オリゴマーが、約50～約500ヌクレオチドの長さである、請求項1～6のいずれか一項記載の組成物。

【請求項8】

前記対象とするタンパク質が膜貫通タンパク質、膜貫通イオンチャネルタンパク質、リガンド作動性イオンチャネルタンパク質、核ホルモン受容体タンパク質、細胞外シグナル伝達分子若しくは因子、サイトカイン、成長因子、ホルモン、酵素、抗体又は短鎖可変断片(scFv)である、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

【請求項9】

前記対象とするタンパク質が活性状態又は不活性状態のキナーゼである、請求項1～7のいずれか一項記載の組成物。

【請求項10】

前記キナーゼがヒトキナーゼである、請求項9記載の組成物。

【請求項11】

前記キナーゼが非受容体チロシンキナーゼである、請求項9記載の組成物。

【請求項12】

前記非受容体チロシンキナーゼが、ABL、ACK、CSK、MATK、FAK、PYK2、FES、FRK、JAK、SRC-A、SRC-B、TEC又はSYKチロシンキナーゼファミリーのメンバーである、請求項11記載の組成物。

【請求項13】

前記キナーゼが受容体チロシンキナーゼである、請求項9記載の組成物。

【請求項14】

前記受容体チロシンキナーゼが、ALK、AXL、DDR、EGFR、EPH、FGFR、INSR、MET、MUSK、PDGFR、PTK7、RET、ROR、ROS、RYK、TIE、TRK、VEGFR、AATYK又はSuRTK106チロシンキナーゼファミリーのメンバーである、請求項13記載の組成物。

【請求項15】

対象とするタンパク質を検出する方法であって、融合タンパク質を検出可能な核酸オリゴマーと接触させることを含み、該融合タンパク質が、対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なり、該核酸オリゴマーが、(a)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(b)該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み、該第一の核酸配列が該第二の核酸配列に対して異種性である、前記方法。

【請求項16】

リガンドに結合する対象とするタンパク質を同定する方法であって、固体支持体上に固定化されたりガンドを、(a)該対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なる融合タンパク質と接触させること；

(c)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(d)該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み、該第一の核酸配列が該第二の核酸配列に対して異種性である核酸オリゴマーを加えること；

未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去すること；及び、該核酸オリゴマーが該融合タンパク質に結合するかどうかを検出すること；を含み、

10

20

30

40

50

それにより、結合した核酸オリゴマーの検出は、該対象とするタンパク質が該リガンドに結合することを示す、前記方法。

【請求項 17】

対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定する方法であって、

試験化合物の存在下及び不在下で、該対象とするタンパク質に結合する固定化参照リガンドを、(a)該対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なる融合タンパク質と接触させること；

(c)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(d)該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み、該第一の核酸配列が該第二の核酸配列に対して異種性である核酸オリゴマーを加えること；

未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去すること；及び、

該核酸オリゴマーが該融合タンパク質に結合するかどうかを検出すること；を含み、試験化合物の不在と比較した、試験化合物の存在下での該固定化参照リガンドに結合した融合タンパク質の量の減少は、該試験化合物が該対象とするタンパク質に結合することを示す、前記方法。

【請求項 18】

対象とするタンパク質に対する試験化合物の $K_d$ 値を決定する方法であって、

様々な濃度の試験化合物の存在下及び不在下で、該対象とするタンパク質に結合する固定化参照リガンドを、(a)該対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なる融合タンパク質と接触させること；

(c)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(d)該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み、該第一の核酸配列が該第二の核酸配列に対して異種性である核酸オリゴマーを加えること；

未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去すること；及び、

該試験化合物の様々な濃度のそれぞれ及びその不在下において、該固体支持体上に保持された該融合タンパク質に結合する該核酸オリゴマーを検出し、又は定量することによって、競合結合曲線を得ること；を含み、

それにより、該対象とするタンパク質に対する該試験化合物の $K_d$ 値は、試験化合物の存在下で該固定化参照リガンドに保持された該対象とするタンパク質が、試験化合物の不在下で保持された該対象とするタンパク質の50%である濃度である、前記方法。

【請求項 19】

2つ以上の対象とするタンパク質に結合する試験化合物をウェル内で同定する方法であって、

試験化合物の存在下及び不在下で、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合する固定化参照リガンドを、各融合タンパク質が独立して(a)該2つ以上の対象とするタンパク質の1つだけを含む第一のドメイン、及び(b)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なる、2つ以上の融合タンパク質と接触させること；

2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれが、該2つ以上の融合タンパク質の1つだけの核酸相互作用モチーフに独立して結合する第一の核酸配列、及びPCR増幅配列である第二の異種性核酸配列を含む、該2つ以上の核酸オリゴマーを加えること；

未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去すること；及び、

該2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれを検出し、又は定量すること；を含み、試験化合物の不在と比較した、試験化合物の存在下での固定化参照リガンドに結合した該2つ以上の融合タンパク質のそれぞれの量の減少は、該試験化合物が該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合することを示す、前記方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

2つ以上の対象とするタンパク質に対する試験化合物の $K_d$ 値をウェル内で決定する方法であって、

様々な濃度の試験化合物の存在下及び不在下で、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合する固定化参照リガンドを、各融合タンパク質が独立して(a)該2つ以上の対象とするタンパク質の1つだけを含む第一のドメイン、及び(b)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なる、2つ以上の融合タンパク質と、ウェル内で接触させること；

2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれが、該2つ以上の融合タンパク質の1つだけの核酸相互作用モチーフに独立して結合する第一の核酸配列、及びPCR増幅配列である第二の異種性核酸配列を含む、該2つ以上の核酸オリゴマーを加えること；

未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去すること；及び、

該試験化合物の様々な濃度のそれぞれ及びその不在下において、該固体支持体上に保持された該2つ以上の融合タンパク質に結合する該2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれを検出し、又は定量することによって、競合結合曲線を得ること；を含み、

該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに対する該試験化合物の $K_d$ 値は、試験化合物の存在下で該固定化参照リガンドに保持された該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれが、試験化合物の不在下で保持された該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれの50%である濃度である、前記方法。

【請求項 2 1】

前記核酸オリゴマーが放射標識、蛍光標識又はビオチン化されている、請求項19又は20記載の方法。

【請求項 2 2】

前記参照リガンドがSB202190、スタウロスポリン、プルバラノールB、SU5402、イマチニブメシレート、SU6668、イレッサ又はPD-173955である、請求項17~21のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 3】

対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定するためのキットであって、

(a)核酸オリゴマーに結合する融合タンパク質であって、(i)該対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(ii)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なり、該核酸オリゴマーが該融合タンパク質の核酸相互作用モチーフに結合する第一の核酸配列、及びPCR増幅配列である第二の異種性核酸配列を含む、前記融合タンパク質；及び、

(b)該対象とするタンパク質に結合する参照リガンド；  
を含む、前記キット。

【請求項 2 4】

対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定するためのキットを製造する方法であって、

(a)該対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)該第一のドメインとは異なる核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質と該核酸相互作用モチーフとが互いに異なる融合タンパク質をクローニングし発現させること；及び、

該融合タンパク質の該核酸相互作用モチーフに結合する第一の核酸配列、及びPCR増幅配列である第二の異種性核酸配列を含む核酸オリゴマーを合成すること；

を含む、前記製造方法。

【請求項 2 5】

前記対象とするタンパク質に結合する参照リガンドを固体支持体に固定化することをさらに含む、請求項24記載の製造方法。

【請求項 2 6】

試験化合物が、2つ以上の対象とするタンパク質に結合するか否かをウェル内で決定する方法であって、

(i) 核酸オリゴマーを該2つ以上の対象とするタンパク質に接触させるステップであって、該対象とするタンパク質のそれぞれが核酸相互作用モチーフに融合されており、かつ該核酸オリゴマーが(a)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(b)該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み、該第一の核酸配列が該第二の核酸配列に対して異種性であり、該PCR増幅配列が該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに特異である、前記ステップ；

(ii) 試験化合物の存在下及び不在下で、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合する固定化参照リガンドを、該2つ以上の対象とするタンパク質とウェル内で接触させるステップであって、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれが該核酸オリゴマーに結合する、前記ステップ；

(iii) 未結合の融合タンパク質を除去するステップ；及び、

(iv) 該2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれを検出し、又は定量するステップ；を含み、試験化合物の不在と比較した、試験化合物の存在下での固定化参照リガンドに結合した2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれの量の減少は、該試験化合物が2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合することを示す、前記方法。

【請求項 27】

2つ以上の対象とするタンパク質に対する試験化合物の $K_d$ 値をウェル内で決定する方法であって、

(i) 核酸オリゴマーを該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに接触させるステップであって、該対象とするタンパク質のそれぞれが核酸相互作用モチーフにさらに融合されており、かつ該核酸オリゴマーが(a)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(b)該第一のドメインとは異なる該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列を含み、該PCR増幅配列が該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに特異である、前記ステップ；

(ii) 様々な濃度の試験化合物の存在下及び不在下で、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合する固定化参照リガンドを、該2つ以上の対象とするタンパク質とウェル内で接触させるステップであって、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれが該核酸オリゴマーに結合する、前記ステップ；

(iii) 未結合の融合タンパク質を除去するステップ；及び、

(iv) 該試験化合物の様々な濃度のそれぞれ及びその不在下において、該固体支持体上に保持された該2つ以上の融合タンパク質に結合する該2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれを検出し、又は定量することによって、競合結合曲線を得るステップ；を含み、

それにより、該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに対する該試験化合物の $K_d$ 値は、試験化合物の存在下で該固定化参照リガンドに保持された該2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれが、試験化合物の不在下で保持された該それぞれの2つ以上の対象とするタンパク質の50%である濃度である、前記方法。

【請求項 28】

前記ステップ(ii)におけるウェルが、前記核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含み、かつPCR増幅配列を欠失しているPCRサイレント核酸オリゴマーをさらに含む、請求項26又は27記載の方法。

【請求項 29】

前記核酸相互作用モチーフがNFkBである、請求項26～28のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(分野)

本件出願で提供する主題は、対象とするタンパク質と連結するか、又は連結することができる核酸タグに関する。詳細には、本件出願で提供する主題は、レポーター機能及びタンパク質タグ付け機能を含むオリゴヌクレオチドに関する。また、本件出願は、それを使

10

20

30

40

50

用した核酸タグ組成物、キット及び方法も提供する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

タンパク質の存在を定量及び検出するための従来技術には、ゲル電気泳動、ウェスタンブロット法、ELISAベースの免疫吸収アッセイ及びタンパク質マイクロアレイが含まれる。これらの方法のそれぞれは扱いにくく、ハイスループット使用に適合しない。これらの従来方法には、検出感度及び特異性の限界もある。本件出願は、核酸タグ、及びその核酸タグを用いる、非常に高感度で選択的な新しいタンパク質検出方法を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

(概要)

本件出願は、タンパク質と連結するか又は連結することができ、そのタンパク質の高感度検出を可能にする核酸タグを提供する。一実施態様では、核酸タグは、レポーター機能及びタンパク質タグ付け機能を有するオリゴヌクレオチドである。一実施態様では、オリゴヌクレオチド(オリゴマー)は、PCRプローブで判別可能なPCR増幅配列(アンプリコン)である第一の核酸配列、及び対象とするタンパク質と共有結合で連結するか、非共有結合で連結するか、複合体を形成するか、又はその他で結合する(例えば結合するか又は結合することができる)第二の核酸配列を含むオリゴヌクレオチドである。ある実施態様では、アンプリコンは、ランダムに生成される、天然に存在しないPCR増幅配列である。一実施態様では、第一の核酸配列及び/又は第二の核酸配列は、生物に内在しない。他の実施態様では、第一の核酸配列及び/又は第二の核酸配列は、生物に内在する。ある実施態様では、第一の核酸配列及び第二の核酸配列は、異種性である。本明細書で用いるように、2つの核酸配列が「異種性である」場合、第一及び第二の核酸配列は通常一緒に見いだされないことを意味する。例えば、ある実施態様では、第一及び第二の核酸は同じタンパク質をコードせず、及び/又は同じ生物体由来でない。一部の実施態様では、第一の配列は天然に存在する配列であり、第二の配列は天然に存在する配列であり、該第一及び第二の配列は異なる。具体的な実施形態では、第一の核酸配列は、合成の及び/又はランダムに生成される核酸配列、例えば天然に存在しない配列(例えば、任意の天然に存在する配列から分岐したもの)などの核酸配列である。ある実施態様では、第一の核酸配列は、例えば対象とするタンパク質、融合タンパク質、核酸と相互作用するモチーフ、及び/又は本件出願で提供されるスクリーニングアッセイで用いられるベクターで見いだされない、合成の及び/又はランダムに生成される核酸配列などの核酸配列である。一部の実施態様では、第一の核酸配列は、本件出願で提供されるキナーゼアッセイで核酸タグを用いる予定の場合などの、ヒトキノムに存在しない合成の及び/又はランダムに生成される核酸配列(又は所与のアッセイで用いられる他の任意のヌクレオチド配列)などの核酸配列である。これらの実施態様は、例えば、部分配列PCR増幅のために用いるプライマーが、第二のDNA配列及び/又は他の任意の(例えば、天然に存在する)DNA配列、例えば所与のアッセイで用いられるものと、交差反応及びミスプライムしないことを保証する。ある実施態様では、例えば本件出願で提供される多重アッセイで用いる場合などに、プライマーが鋳型の間で交差反応する機会がないように、各PCR鋳型は他とは異なる。

【0004】

他の実施態様では、オリゴヌクレオチドは、PCR増幅配列を含む第一の核酸配列、及び核酸相互作用モチーフの標的配列でありそれに結合する核酸配列を含む第二の核酸配列を含む。一例では、標的配列は、天然又は合成のDNA結合性タンパク質の認識配列である。具体的な実施態様では、PCR増幅配列を含む第一の核酸配列は、核酸相互作用モチーフを含む第二の核酸と分離し、異なっている。そのような実施態様では、核酸タグは、その核酸タグを特異的に認識するDNA結合成分を有する対象とするタンパク質に結合し、又はその他の方法で連結することができる。次に、核酸タグは、例えば定量PCR(qPCR)を用いて

10

20

30

40

50

、検出及び/又は定量することができる。qPCRによる核酸タグの検出は、信頼できる定量検出方法であるだけでなく、非常に高感度で非常に選択的な検出方法である利点を有する。qPCR検出方法の非常に高感度な性質のため、この方法は、非常に少ない量の標的タンパク質の検出を可能にし、組換えタンパク質などの希少で高価なアッセイ成分の必要性を減少させる。qPCR検出方法の非常に特異的な性質のため、qPCRは、複雑で不均一な混合物での特定のDNA配列の検出も可能にし、タンパク質検出を改善又は強化するためにタンパク質試料になされるあらゆる種類の精製工程も不要にする。

#### 【 0 0 0 5 】

本件出願で提供される核酸タグは、放射性標識、蛍光標識又はビオチン化などで、標識することもできる。ある実施態様では、核酸相互作用モチーフに結合し、(a)第一の放射性標識、蛍光標識又はビオチン化核酸配列、及び(b)核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列、を含む核酸オリゴマーが本件出願で提供される。他の実施態様では、本件出願は、核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含む核酸オリゴマーを提供し、該オリゴマーは放射性標識、蛍光標識又はビオチン化されている。放射性標識タグ又は蛍光標識タグなどの標識タグは、例えば、細胞画像化又は可視化アッセイで対象とするタンパク質の存在又は場所を検出するために用いることができる。蛍光標識タグなどの標識タグは、例えば、対象とする1つ以上のタンパク質を個々の試料に分離するために、選別アッセイで用いることもできる。ビオチン化標識などの標識タグは、例えば、免疫学的方法による対象とするタンパク質の検出、又はアフィニティークロマトグラフィーによる対象とする標識タンパク質の精製も可能にする。核酸タグが標識されるある実施態様では、核酸タグは、PR増幅配列を含んでもよく、又は含まなくてもよい。

#### 【 0 0 0 6 】

本件出願は、核酸タグと連結若しくはその他の形で複合体を形成し、又は核酸タグと連結若しくはその他の形で複合体を形成することができ、したがって、例えばその機能、活性又は存在を研究又はモニターする場合に検出可能である、対象とするタンパク質も提供する。一例では、対象とするタンパク質は、核酸相互作用モチーフに融合したキメラタンパク質である。一例では、核酸相互作用モチーフは、DNA結合ドメインである。そのような対象とするタンパク質は、DNA結合ドメインによって認識することができる標的配列を有する核酸によって、タグ付けすることができる。キメラタンパク質は、ランダム突然変異によって生成される発現ヌクレオチド配列、系統的に合成された配列を含む発現ヌクレオチド配列、発現cDNA又はこれらの可能形態の2つ以上の組合せでよい。対象とするタンパク質をクローニングし、その後、細菌、昆虫、哺乳動物又は植物の宿主細胞など、適当な宿主細胞で発現させることができる。ある実施態様では、宿主細胞は、その三次元構造及び機能にとって重要となり得る任意の翻訳後修飾(例えば、ヒト宿主細胞における対象とするタンパク質のグリコシル化又はプレニル化)の利点をタンパク質に与える。

#### 【 0 0 0 7 】

本件出願は、タンパク質を標識して検出する核酸タグを用いて、対象とするタンパク質と第二の分子との間の結合を検出する方法も提供する。ある実施態様では、この方法は、試験化合物のライブラリを、対象とするタンパク質に結合するそれらの能力についてスクリーニングすることを含み、その結合は、核酸タグの検出によって同定される。他の実施態様では、この方法は、対象とするタンパク質に結合することが知られている固定化参照リガンド(又は「ベイト」)の存在下で、対象とするタンパク質に競合的に結合する1つ以上の試験化合物の同一性をスクリーニング及び判定する、競合結合アッセイを含む。そのような競合結合アッセイは、既知の参照リガンドに加えて(又は、それに優先して)、対象とするタンパク質に結合する代替の化合物の同定を可能にする。

#### 【 0 0 0 8 】

本件出願は、対象とするタンパク質のパネルに対して、試験化合物を、該パネル中の1つ以上のタンパク質に結合するその試験化合物の能力、及び/又はその化合物の結合特異性プロフィールを生成する能力についてスクリーニングすることを含む方法も提供する。スクリーニングをタンパク質のパネルに対して実施する場合、一部の実施態様では、スク

10

20

30

40

50

リーニングは多重化フォーマットで、例えば対象とする複数のタンパク質を含有するプールされた試料に対して試験化合物の活性を同時に試験することによって、及び/又は、検出段階において、対象とする特定のタンパク質にそれぞれ特異である複数の核酸タグを用いることによって実施される。

【0009】

本件出願は、以下の要素の1つ以上を含むキットも提供する：検出可能な核酸タグ、核酸タグによって「タグ付けする」ことができるタンパク質、対象とするタンパク質に結合する固定化参照リガンド、及び核酸タグの増幅を開始することができるPCRプライマー対である。そのようなキットは、固定化参照リガンドに結合する分子、及び/又は対象とするタンパク質との結合について固定化リガンドと競合する分子を同定するために用いることができる。或いは、キットは、所与の検体中の、固定化参照リガンドに結合する分子の存在を検出するための診断ツールとして用いることができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】PCR増幅可能なDNA配列を含有する核酸タグを用いる競合結合アッセイを表す概要図である。

【0011】

【図2】既知のキナーゼ阻害剤BIRB-796、SB202190及びVX-745とのp38の相互作用の $K_d$ 計算値による結合曲線を示す図である。SB202190は固定化参照リガンドとして用い、用いた核酸タグは、GAL4標的DNA配列及びPCR増幅可能なDNA配列を含む融合体であった。

20

【0012】

【図3】既知のキナーゼ阻害剤BIRB-796、SB202190及びVX-745とのp38の相互作用の $K_d$ 計算値による結合曲線を示す図である。SB202190は固定化ベイトとして用い、用いた核酸タグは、NF- $\kappa$ B標的DNA配列及びPCR増幅可能なDNA配列を含む融合体であった。

【0013】

【図4】4つの内部商標登録化合物とのBRAFの相互作用の $K_d$ 計算値による結合曲線を示す図である。化合物のうちの3つ、A、B及びCはキナーゼ阻害剤であり、キナーゼ阻害剤ではない化合物の1つは、陰性対照の役目を果たした。相互作用は、GAL4標的DNA配列及びPCR増幅可能なDNA配列を含む核酸タグを用いて検出した。

【0014】

【図5】4つの内部商標登録化合物とのBRAFの相互作用の $K_d$ 計算値による結合曲線を示す図である。化合物のうちの3つ、A、B及びCはキナーゼ阻害剤であり、キナーゼ阻害剤ではない化合物の1つは、陰性対照の役目を果たした。相互作用は、NF- $\kappa$ B標的DNA配列及びPCR増幅可能なDNA配列を含む核酸タグを用いて検出した。

30

【0015】

【図6A】VX-680と2つの形態(活性及び不活性)のAbIとの間の相互作用の $K_d$ 計算値による結合曲線を示す図である。相互作用は、NF- $\kappa$ B標的DNA配列及びPCR増幅可能なDNA配列を含む核酸タグを用いて検出した。

【図6B】イマチニブと2つの形態(活性及び不活性)のAbIとの間の相互作用の $K_d$ 計算値による結合曲線を示す図である。相互作用は、NF- $\kappa$ B標的DNA配列及びPCR増幅可能なDNA配列を含む核酸タグを用いて検出した。

40

【発明を実施するための形態】

【0016】

(詳細な説明)

本件出願で提供される以下の実施態様は、例示であって制限ではない。本件出願で開示される方法はある範囲の適用を有し、その全ては、検出可能な核酸によってタグ付けされる対象とするタンパク質を検出、定量化又は単離する能力に基づく。本件出願で提供される組成物及び方法は、インビトロ及び/又はインビボでタンパク質を標識するために用いることができる。

【0017】

50



一部の実施態様では、核酸相互作用モチーフに結合し、(a)PCR増幅配列である第一の核酸配列、及び(b)該核酸相互作用モチーフに結合する第二の核酸配列、を含む核酸オリゴマー(タグ)が本件出願で提供され、該第一の核酸配列は、該第二の核酸配列に対して異種性である。

【0018】

一実施態様では、核酸オリゴマーの長さは、約50～約100、約50～約200、約50～約300、約50～約400、約50～約500、約100～約200、約100～約300、約100～約400、約100～約500、約200～約300、約200～約400、約200～約500、約300～約400、約300～約500又は約400～約500ヌクレオチド長である。

【0019】

本明細書で用いるように、用語「約(about)」又は「約(approximately)」は、所与の値又は範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内(又は1%以下)を意味する。

【0020】

一部の実施態様では、核酸タグは、レポーター機能及びタンパク質タグ付け機能を有する。本明細書で用いるように、核酸タグに関して「レポーター」機能は、視覚化、又はその他の方法で検出若しくは定量される能力である。ある実施態様では、核酸タグのレポーター機能は、核酸タグの放射能標識、蛍光標識又はビオチン化に由来する。本明細書で用いるように、「核酸タグ」は、異種性のポリヌクレオチド結合ドメイン(本明細書ではポリヌクレオチド相互作用モチーフとも呼ばれる)、例えばDNA結合ドメイン(例えば、NF B)を含むタンパク質(例えば、キナーゼ)融合体などの、対象とするタンパク質に結合するか又は結合する能力があるポリヌクレオチド、例えばオリゴマーである。核酸タグは、一本鎖若しくは二本鎖のDNA、一本鎖若しくは二本鎖のRNA、DNA-RNAハイブリッド、RNA-RNAハイブリッド又はそれらの天然若しくは合成の誘導体、類似体及びその断片であることができる。一部の実施態様では、核酸タグはDNAであり、レポーター機能標識は、例えば、任意の標準の酵素反応、例えばニックトランスレーションによって、又は、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I若しくはビオチンによって標識されたデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)による末端標識化によってそのDNAに導入することができ、或いは、標識を挿入剤として導入することができる。市販され、核酸タグを標識するために用いることができる、多くの蛍光基がある。核酸タグを標識するために用いることができる蛍光標識の一部の例は、フルオレセインイソチオシアンテ(isothiocyanate)、ローダミン及びクマリン、並びにそれらの市販の誘導体、例えばTexas Red(登録商標)及びAlexa Fluor(登録商標)である。

【0021】

ある実施態様では、核酸タグは、検出可能なタンパク質又はポリペプチドと、例えば共有結合によって、複合体を形成するか、共有結合するか又は非共有結合的に連結する。核酸とタンパク質との融合体は、任意の方法、例えば、ピューロマイシンなどのペプチド受容体を共有結合連結剤として用いるRoberts及びSzostakの方法(米国特許第6,258,558号及び6,261,804号;国際公開98/31700;Roberts及びSzostak(1997)の論文Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997)94:12297-12302)によって生成することができる。簡潔には、そのような例示的な方法は、それ自身のmRNAの3'末端と共有結合するタンパク質、すなわちRNA-タンパク質融合体を生成する、インビトロ又はin situの転写/翻訳プロトコルを含む。これは、その3'末端に結合するペプチド受容体を有するmRNA分子の合成及びインビトロ又はin situ翻訳によって達成される。具体的な実施態様では、ペプチド受容体は、成長するペプチド鎖のC末端に付加され、翻訳を終結するヌクレオシド類似体であるピューロマイシンである。一実施態様では、メッセージの末端とペプチド受容体との間に、リボソームに読取り枠の終わりに停止させるように設計されているDNA配列が含まれ、ペプチド受容体(例えば、ピューロマイシン)がペプチジル-tRNA結合の加水分解の前に発生期のペプチド鎖を受容するための追加の時間が提供される。

【0022】

本明細書で用いるように、「ペプチド受容体」は、リボソームのペプチジルトランスフ

10

20

30

40

50

エラーゼ機能の触媒活性によって、成長するタンパク質鎖のC末端に追加することができる任意の分子である。ある実施態様では、そのような分子は、(i)ヌクレオチド又はヌクレオチド様部分(例えば、アデノシン又はアデノシン類似体(N-6アミノ位置のジメチル化が許容される))、(ii)アミノ酸又はアミノ酸様部分(例えば、20個のD-若しくはL-アミノ酸又はその任意のアミノ酸類似体(例えば、O-メチルチロシン又はEllmanらの論文、(1991) Meth. Enzymol. 202:301に記載の類似体のいずれか)、及び(iii)これら2つの間の結合(例えば、3'又は2'位置のエステル、アミド又はケトン結合);を含み、好ましくは、この結合は、天然のリボヌクレオチド高次構造の環のパッカリングを著しく乱すことはない。ペプチド受容体は求核基を有することもでき、それは、アミノ基、ヒドロキシル基又はスルフヒドリル基でよいが、これらに限定されない。さらに、ペプチド受容体は、ヌクレオチド模倣体、アミノ酸模倣体、又は複合ヌクレオチド-アミノ酸構造の模倣体で構成することができる。タンパク質コード配列の「3'末端」に位置するペプチド受容体は、そのペプチド受容体分子がそのタンパク質コード配列の最終コドンの後に位置することを意味する。この用語には、それらに限定されないが、タンパク質コード配列の3'末端に正確に位置するペプチド受容体分子、並びに、介在するコード配列又は非コード配列(例えば、停止部位に対応する配列)によって最終コドンから分離されるものが含まれる。この用語には、コード配列又は非コード配列がペプチド受容体分子の後に続く(すなわち、3'末端側にある)構築物も含まれる。さらに、この用語には、それらに限定されないが、タンパク質コード配列と共有結合する(介在核酸配列を通して直接又は間接的に)ペプチド受容体分子、並びに、何らかの非共有結合手段によって、例えば、タンパク質コード配列の3'末端で又はその近くで結合し、それ自体がペプチド受容体分子に結合する第二の核酸配列を用いるハイブリダイゼーションを介して、タンパク質コード配列に結合するペプチド受容体分子が含まれる。

#### 【0023】

共有結合したRNA-タンパク質融合体に加えて、任意の他の特異なPCR増幅可能な核酸(例えば、RNA、DNA、PNA、又は2つ以上の共有結合した天然の若しくは修飾されたりボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドを含む任意の他の核酸)を、検出可能なタンパク質又はポリペプチドに共有結合又は非共有結合的に結合することができる。融合体のタンパク質部分は、一般的に天然のアミノ酸残基で構成されるが、ペプチド又はペプトイド結合で結合したアミノ酸類似体又は誘導体を含むこともできる。

#### 【0024】

他の実施態様では、核酸タグのレポーター機能は、PCRによって増幅可能である核酸配列である(本明細書では「アンプリコン」とも称される)。増幅可能な配列は、PCRプライマーに配列特異的の様式でハイブリダイズするか又はハイブリダイズすることができる。ある実施態様では、核酸タグは、複数のアンプリコン、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれ以上のアンプリコンを含む。一部の実施態様では、複数のアンプリコンは、単一のアンプリコンのタンデムリピートである。ある実施態様では、アンプリコンは、そのような核酸タグによってタグ付けされたタンパク質の定量化を可能にする、定量PCRによって増幅可能である。具体的な増幅方法では、PCR配列の増幅は、PCR増幅鑄型を含有する核酸、PCRプライマー及びqPCRプローブを、標準のPCR反応混合液(一般に、10mMトリス-HCl(25 でpH8.3)、1~4mMのMgCl<sub>2</sub>、0.1~1mMのdNTPの最終濃度を有する混合液)中で混合すること、並びに非特異的アニーリング又はミスプライミングを最小にするために試料を先ずホットスタート条件(例えば、95 で5分間加熱)で処理すること、それに続く変性ステップ(例えば、95 で45秒間)、それに続くアニーリングステップ(55 で1分間)、及びそれに続く伸長ステップ(72 で1分間)を含み、qPCRシグナルの増幅を完了するために、変性、アニーリング及び伸長の連続ステップを最高40ラウンドまで繰り返す。

#### 【0025】

本明細書で用いるように、核酸タグに関して「タンパク質タグ付け」機能とは、例えば(a)対象とするタンパク質(例えば、キナーゼ)、及び(b)核酸認識配列を含む異種性のポリヌクレオチド相互作用モチーフ、例えばDNA結合性タンパク質(例えば、NF B)を含む融合

10

20

30

40

50

タンパク質などの核酸相互作用モチーフを標的にして、(例えば、共有結合又は非共有結合によって)それに結合するか、複合体を形成するか又はその他の形で連結する能力である。融合タンパク質の核酸相互作用モチーフは、本明細書の他の箇所で記載の核酸オリゴマーに結合する。

【0026】

一実施態様では、標的DNA配列は、転写因子のDNA結合ドメインによって認識可能な転写因子結合部位である。例えば、核酸タグは、NF- $\kappa$ B、croリプレッサー、lacリプレッサー、GAL4、GCN4、Lex-A、Opaque-2及びTGA1aなどの転写因子のDNA結合ドメインによって認識される、標的DNA配列を含有することができる。一実施態様では、転写因子結合部位は、天然又は野生型の配列である。他の実施態様では、転写因子結合部位は、突然変異配列である。他の実施態様では、転写因子結合部位は、野生型配列、及び任意選択で突然変異配列を包含するコンセンサス配列を特徴とし得る。他の実施態様では、転写因子結合部位は、天然であるか、修飾されたか又は合成されたDNA結合タンパク質と複合体を形成することができる、合成又は遺伝子操作された配列である。他の実施態様では、標的DNA配列は、タンパク質二量体によって通常認識される回文配列を有することを特徴とする。Gal4又はLexAの標的配列は、そのような2例である。他の実施態様では、転写因子結合部位は、転写因子Sp1の標的部位などのGCに富む領域を有することを特徴とする。他の実施態様では、転写因子結合部位は、その関連するDNA結合タンパク質と1、2、3、4、5又は6時間を超えるDNA-タンパク質複合体半減期を有することを特徴とする。

【0027】

したがって、本件出願で提供される、DNA結合タンパク質などの対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフを含む融合タンパク質は、例えばDNAタンパク質複合体形成を介して、本件出願で提供される核酸オリゴマーによって「タグ付け」することができる。ある実施態様では、核酸相互作用モチーフ及び対象とするタンパク質を含む融合タンパク質は、ヒトなどの同じ生物体に由来する。特定の一実施態様では、核酸タグは、DNA結合タンパク質(例えば、NF- $\kappa$ B、croリプレッサー、GAL4、GCN4、LexA、Opaque-2及びTGA1a)によって特異的に認識され得る標的DNA配列と連結されたアンプリコンを含む。他の実施態様では、核酸タグは、転写因子のDNA結合ドメインのコグネイトDNA配列と連結されたアンプリコンを含む。そのようなDNA結合ドメインのコグネイトDNA配列は当技術分野で公知であり、例示的な配列を表1に示す。

【0028】

他の実施態様では、核酸タグのタンパク質タグ付け機能は、DNA代謝酵素、例えばメチルトランスフェラーゼ、アルキルトランスフェラーゼ及び/又はグリコシダーゼによって認識される標的DNA配列である。これらの酵素は、化学修飾されたDNA塩基と相互作用することができる、タンパク質のアミノ酸と核酸タグのDNA配列との間で共有結合を形成することができる。例えば、タンパク質融合が $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ(AGT)の機能的断片を含有するならば、該アルキルトランスフェラーゼ機能を用いて $O^6$ -アルキルグアニン又は $O^6$ -ベンジルグアニンに結合させた核酸タグをAGT融合タンパク質に移動させ、核酸タグと融合タンパク質との間で共有結合を形成して核酸-タンパク質複合体を形成することができる(例えば、国際出願第W002/083937号を参照)。OGTは、AGTが基質からAGT融合体へ標識を移動させるようにタンパク質とAGTとの融合体を標識基質と接触させ、それによって、移動した標識のために標識されたAGT-タンパク質融合体の操作及び又は検出を可能にする系において、対象とするタンパク質を標識し、その後任意選択で操作及び/又は検出するために用いることができる。基質の標識部分は、融合タンパク質の意図する用途に従って、当業技術者が選択することができる。標識の非包括的な例には、(1)蛍光団、発色団、磁気プローブ又はコントラスト試薬などの分光学的プローブ;(2)放射能標識分子;(3)パートナーに特異的に結合することができる特異結合対の一方である分子;が含まれる。そのような特異結合対は当技術分野で公知であり、例えば、アビジン若しくはストレプトアビジンに結合することができるビオチン;(4)他の生体分子と相互作用すると思われる分子;(5)他の生体分子と相互作用すると思われる分子のライブラリ

; (6) 当業技術者に公知である、他の生体分子と架橋させることができる分子(例えば、Nadeauら(2002)の論文「タンパク質間相互作用:分子クローニングマニュアル(Protein-Protein interactions: a molecular cloning manual)」(E Golemis編, Cold Spring Harbor Laboratory Press; pp. 75-92)を参照); (7) 連結された金属キレートなどの、 $H_2O_2$ 及びアスコルビン酸塩への曝露後にヒドロキシル基を生成することができる分子(例えば、Horiら(2002)の論文「タンパク質間相互作用:分子クローニングマニュアル(Protein-Protein interactions: a molecular cloning manual)」(Ed. E Golemis, Cold Spring Harbor Laboratory Press; pp. 288-311)を参照); (8) マラカイトグリーンなどの、光照射後に反応性基を生成することができる分子(例えば、Jayらの論文(1999) Biochim. Biophys. Acta M39-48を参照); (9) ガラススライド、マイクロタイタープレート又は当技術分野の熟練者に公知である任意の重合体一般でよい固体支持体に共有結合した分子; (10) その相補鎖と塩基対合が可能な核酸若しくはその誘導體; (11) 膜挿入特性を有する脂質若しくは他の疎水性分子; (12) 好ましい酵素特性、化学特性若しくは物理特性を有する生体分子; (13) 上記の特性のいずれかの組合せを有する分子; などが挙げられる。

10

## 【0029】

本明細書で用いるように、「対象とするタンパク質」は、研究する又はその他で特徴付けるなどのために対象となり得る、任意の考え得るポリペプチド又はタンパク質であり得る。一部の実施態様では、対象とするタンパク質は、トランスフェラーゼ、オキシドレダクターゼ、ヒドロラーゼ、リガーゼ、イソメラーゼ又はリアーゼである。一実施態様では、対象とするタンパク質は、ヒトのポリペプチド又はタンパク質である。ある実施態様では、対象とするタンパク質は、トランスフェラーゼ活性を有するトランスフェラーゼ、例えばアシルトランスフェラーゼ、グリコシルトランスフェラーゼ、アミドトランスフェラーゼ又は硫黄トランスフェラーゼである。他の実施態様では、対象とするタンパク質は、ヒドロラーゼ、ペプチダーゼ、プロテアーゼ又はホスファターゼである。

20

## 【0030】

ある実施態様では、キナーゼは、P13Kファミリーの脂質キナーゼなどの脂質キナーゼである(例えば、mTOR)。具体的な実施態様では、対象とするタンパク質は、タンパク質キナーゼである(例えば、Manning (2002)の論文Science 298:1912を参照)。具体的な実施態様では、対象とするタンパク質は、チロシンキナーゼ又はセリン/スレオニンキナーゼである。一部の実施態様では、対象とするタンパク質は、ヒトの非受容体チロシンキナーゼ、例えば、ABL、ACK、CSK、MATK、FAK、PYK2、FES、FRK、JAK、SRC-A、SRC-B、TEC及び/又はSYKファミリーのメンバーである非受容体チロシンキナーゼである。他の実施態様では、対象とするタンパク質は、ヒトの受容体チロシンキナーゼ、例えば、ALK、AXL、DDR、EGFR、EPH、FGFR、INSR、MET、MUSK、PDGFR、PTK7、RET、ROR、ROS、RYK、TIE、TRK、VEGFR、AATYK及び/又はSuRTK106ファミリーのメンバーである受容体チロシンキナーゼである。

30

## 【0031】

一部の実施態様では、対象とするタンパク質は、G-タンパク質共役受容体(GPCR)などの、7回膜貫通ヘリックスタンパク質などの膜貫通タンパク質である。対象とするタンパク質は膜貫通イオンチャンネルタンパク質でもよく、ある実施態様では、リガンド作動性イオンチャンネルタンパク質でよい。他の実施態様では、対象とするタンパク質は、核ホルモン受容体タンパク質、例えば古典的ステロイドホルモン受容体及び/又はオーファンクラス核ホルモン受容体に含まれる受容体である。

40

## 【0032】

さらに他の実施態様では、対象とするタンパク質は、細胞外のシグナル伝達分子若しくは因子、例えばサイトカイン(例えば、インターフェロン及び/若しくはインターロイキン)、成長因子、並びに/又はホルモン(例えば、インスリン、グルカゴン若しくはプロスタグランジン)である。ある実施態様では、対象とするタンパク質は、細胞内シグナルカスケードに関係するタンパク質、例えば、ホスファチジニル-イノシトールシグナル伝達、cAMP又はcGMPの生成に関係する酵素又はコファクターである。

50

## 【0033】

一部の実施態様では、対象とするタンパク質は、抗体、短鎖可変断片(small chain variable fragment)(scFv)、抗原又はエピトープである。

## 【0034】

対象とするタンパク質は、一部の実施態様では、ランダム突然変異によって生成されるヌクレオチド配列の発現、系統的に合成された配列を含有するヌクレオチド配列の発現であることができ、又は、それは発現したcDNAであることができる。ある実施例では、研究され又は特徴付けられる対象とするタンパク質は、ヒトcDNAライブラリ(すなわち、ヒトタンパク質)に由来する。

## 【0035】

ある実施態様では、対象とするタンパク質は、対象とするタンパク質と異種性のDNA結合タンパク質との間のキメラ融合体である。そのようなキメラ融合体では、キメラの各半分に相当する少なくとも2つの遺伝子配列をインフレームで融合し、適当なベクターにクローニングし、選択した宿主細胞で発現させることができる。ある実施態様では、対象とするタンパク質は、ヌクレオチド結合ドメイン(例えば、DNA結合タンパク質)の5'側である。他の実施態様では、対象とするタンパク質は、ヌクレオチド結合ドメイン(例えば、DNA結合タンパク質)の3'側である。具体的な実施態様では、対象とするタンパク質及び/又はヌクレオチド結合ドメイン(例えば、DNA結合タンパク質)は、野生型タンパク質のそれぞれの活性を保持する。キメラ融合体を含む対象とするタンパク質は、細菌、昆虫、哺乳動物又は植物の宿主細胞を含む、様々な宿主細胞のいずれかにおいて発現させることができる。対象とするタンパク質が適当な真核生物の宿主細胞で発現する場合は、それは、天然のタンパク質に存在する翻訳後の真核生物の修飾を示すことができ、したがって、天然のタンパク質の構造及び機能を有することが予想される。或いは、対象とするタンパク質は、別の方法でヌクレオチド結合ドメインに合成的に連結することができる(例えば、ポリペプチドリンカーを用いる)。

## 【0036】

本件出願は、本件出願で提供される複数の融合タンパク質を含み、該融合タンパク質の少なくとも2つ以上は互いに異なる、融合タンパク質のライブラリも提供する。ある実施態様では、本件出願は、本件出願で提供される複数のオリゴマーを含み、該オリゴマーの少なくとも2つ以上は互いに異なる、オリゴマーのライブラリを提供する。本件出願は、本件出願で提供される融合タンパク質をコードする核酸、並びに本件出願で提供される融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターも提供する。さらに、本件出願は、本件出願で提供される融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターを含む宿主細胞を提供する。ある実施態様では、宿主細胞は、細菌、昆虫、哺乳動物又は植物の宿主細胞である。

## 【0037】

ある実施態様では、本件出願は、対象とするタンパク質の活性を研究する機能アッセイも提供する。一部の実施態様では、対象とするタンパク質の活性は、核酸タグを用いて、例えば核酸タグの存在を検出することによって評価される。そのような機能アッセイは、タンパク質活性の阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト、又はより一般的にはモジュレーターとしての試験化合物の作用を研究するために用いることができる。

## 【0038】

対象とするタンパク質は、(a)核酸相互作用モチーフ、及び(b)研究され又は特徴付けられるタンパク質、から構成されるキメラの一部であることができる(真の「対象とするタンパク質」であるタンパク質の一部)。本発明の一実施態様では、核酸認識モチーフは、DNA結合タンパク質であることができる。例示的なモチーフを表1に示す。DNA結合タンパク質は、転写活性化剤及びリプレッサーを含む、転写因子のDNA結合ドメインを含むことができる。適するDNA結合ドメインの例には、NF- $\kappa$ B(真核生物)、croリプレッサー(バクテリオファージ)、Iacリプレッサー(酵母)、GAL4(酵母)、GCN4(酵母)、Lex-A(大腸菌)、Opague-2(トウモロコシ)及びTGA1a(タバコ)が含まれる。DNA結合ドメインの適合性は、その標的配列への特定のDNA結合ドメインの結合時間に依存してもよい。例えば、NF- $\kappa$ Bは

10

20

30

40

50

、その標的DNA配列と強い結合を形成し、解離半減期は4時間を超えると思われる。(Speightら(2001)の論文、Chem. Biol. 8:951-965を参照)。適するDNA結合ドメインには、天然及び/又は人工のDNA結合モチーフ、例えば合成ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、ウィングドヘリックス、ヘリックス-ループ-ヘリックス、ホメオドメイン及びPOUドメインの異なる断片を組み合わせることによって構築される、合成DNA結合ドメインも含まれる。キメラタンパク質は、DNA結合ドメインの認識を介して、核酸タグのある結合認識配列に「タグ付け」することができる。本発明の他の実施態様では、核酸認識モチーフは、上で既に指摘した、DNAリガーゼ、DNA修復酵素、制限酵素又はDNAメチルトランスフェラーゼなどのDNA代謝酵素の完全長、部分長又は機能的断片であることができる。

【表1】

10

表1: 例示的な核酸タグ、結合ドメイン及び結合ドメイン認識モチーフ配列

NF- $\kappa$ B結合のための核酸タグ	<p>TTGTGAATTGCTGACCGTAGATGTCAACTTTGACCATCAGACAACGTT TCTCCATTCCAATTATGCGAGAATCCTAGGGAATTCCTTAGATCGCATG (配列番号:1); アンプリコン配列は下線を引いた領域の前の配列であり、NF<math>\kappa</math>B認識配列は下線を引いた領域である。</p> <p>CGGCGTAAAAACGAATACCATGTCTCTCATCGCTCGACTCATTCTTTC CAAAATTCGCGGAACCAAGGGGAATTCCTTAGATCGCATG (配列番号:2); アンプリコン配列は下線を引いた領域の前の配列であり、NF<math>\kappa</math>B認識配列は下線を引いた領域である。</p> <p>AAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACA AAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGGGAATTCCTTAGATCGCATG (配列番号:3); アンプリコン配列は下線を引いた領域の前の配列であり、NF<math>\kappa</math>B認識配列は下線を引いた領域である。</p>	20
GAL4結合のための核酸タグ	<p>CATGCGACAGCGGAGTTACGTCCAGAAGGACAACATCTTTGACATCG CCTCTTGAATTGCTGCACCAAGGGCTACTGCCGGAGTACTGTCTCC GCTAGATCGCATG (配列番号:4); アンプリコン配列は下線を引いた領域の前の配列であり、GAL4認識配列は下線を引いた領域である。</p>	30
NF- $\kappa$ B DNA結合ドメイン	<p>MAGPYLQILEQPKQRCFRFRYVCEGSPSHGGLPGASSEKNKKSYPQVKI CNYVGPAAKIVQLVTNGKNIHLHAHSLVGHKCEDGICTVTAGPKDMVVG FANLILHVTKKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEAGGGD RQLGDRKELIRQAALQQTKEMDLSVRLMFTAFLPDSTGFSFTRRLEPV VSDAIYDSKAPNASNLKIVRMDRTAGCVTGGEEIYLLCDKVQKDDIIRFY EEEENGWVWEGFGDFSPDVRHQFAIVFKTPKYKDINITKPAVSFVQLRR KSDLETSEPKPFLYPYPEIKDKEVD (配列番号:5)</p>	40
GAL4 DNA結合ドメイン	<p>MKLLSSIEQACDICRLKCLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLT RAHLTEVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDN VNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKGRQLTVS (配列番号:6)</p>	
NF $\kappa$ B認識配列	GGGAATTCCTC (配列番号:7)	
NF $\kappa$ B認識配列	GGGAAATTCCTC (配列番号:8)	

NF- $\kappa$ B認識配列	GGGACTTTCC (配列番号:9)	
NF- $\kappa$ Bコンセンサス配列	GGGRNNYYCC (配列番号:10) (R=プリン; Y=ピリミジン) (N=任意のアミノ酸)	
Gal4認識配列	CGGAGTACTGTCCTCCG (配列番号:11)	
Gal4コンセンサス配列	CGGNNNNNNNNNNCCG (配列番号:12) (N=任意のアミノ酸)	
RelA/c-Relコンセンサス配列	HGGARNYYCC (配列番号:13) (H=A,C 又は T; R=プリン; Y=ピリミジン)	10
Croリプレッサー認識配列	TCTATCACCGGGGTGATAAA (配列番号:14)	
Lacリプレッサー認識配列	GAATTGTGAGCGCTCACAATT (配列番号:15)	
GCN4認識配列	AGTGACTCAT (配列番号:16)	
Opaque-2認識配列	TGTCATTCCACGTAGATGAAAA (配列番号:17)	
Opaque-2認識配列	TCCACGTAGA (配列番号:18)	
Lex-A認識配列	CTGTATATATACAG (配列番号:19)	
TGA1a認識配列	GACGTC (配列番号:20)	20
EGR-1又はZif 268認識配列	GCGTGGGCGT (配列番号:21)	

## 【 0 0 3 9 】

本件出願で提供されるインビトロ方法は、核酸タグを使用して、標識タンパク質の細胞下局在の研究、標識オルガネラの研究、タンパク質の転位、内在化若しくは分泌を含む標識タンパク質の移動のモニタリング、及び/又は標識タンパク質の時空間発現プロファイルのモニタリングのために、1つ以上のタンパク質を視覚化することを含む。

## 【 0 0 4 0 】

本件出願で提供される他の方法は、フローサイトメトリーを用いて標識タンパク質を検出、定量及び/又は選別するための、核酸タグの使用を含む。そのような用途では、ある実施態様において、核酸タグを蛍光標示細胞分取(fluorescent-activated cell sorting) (FACS)のために蛍光標識することができる。

## 【 0 0 4 1 】

本件出願で提供されるさらに他の方法では、核酸タグをビオチン化し、それにより、免疫学的方法による対象とするタンパク質の検出が可能となる。或いは、対象とする標識タンパク質の精製を、アフィニティークロマトグラフィーによって達成することができる。

## 【 0 0 4 2 】

本件出願で提供される他の方法では、核酸タグはアレイ内に固定化される。そのようなアレイは、ある実施態様において、例えばタンパク質発現プロファイリング分析のために、アドレス可能タンパク質アレイを作製するために用いることができる。

## 【 0 0 4 3 】

一実施態様において、本件出願は、リガンドに結合する対象とするタンパク質を同定する方法であって、(i)リガンドを、(a)対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)核酸相互作用モチーフを含む第二のドメイン、を含む融合タンパク質と接触させることであって、該対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフは互いに異なる(例えば、同じ生物体由来の異なるタンパク質若しくは異なる生物体由来の異なるタンパク質)ことと;(ii)融合タンパク質の核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含む核酸オリゴマーを加えることと;(iii)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を

10

20

30

40

50

除去することと;(iv)核酸オリゴマーが融合タンパク質に結合するかどうかを検出することと;を含み、これにより、結合した核酸オリゴマーの検出は、対象とするタンパク質がリガンドに結合することを示す、前記方法を提供する。

【0044】

本件出願で提供される方法及びアッセイは、任意の順序で実施することができる。例えばある実施態様では、核酸タグは、融合タンパク質と参照リガンドとの接触の前、その間(例えば、同時に)、又は後に、融合タンパク質と接触させられる。本件出願で提供される方法のある実施態様では、核酸オリゴマーは、核酸相互作用モチーフがオリゴマーに結合する条件下で、核酸相互作用モチーフと接触させられる。

【0045】

他の実施態様において、本件出願は、対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定する方法であって、(i)試験化合物の存在下及び不在下で、対象とするタンパク質に結合する固定化参照リガンドを、(a)対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含む融合タンパク質と接触させることであって、該対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフは互いに異なることと;(ii)融合タンパク質の核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含む核酸オリゴマーを加えることと;(iii)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(iv)核酸オリゴマーが融合タンパク質に結合するかどうかを検出することと;を含み、試験化合物の不在と比較した、試験化合物の存在下での固定化参照リガンドに結合した融合タンパク質の量の減少は、試験化合物が対象とするタンパク質に結合することを示す、前記方法を提供する。

【0046】

一部の実施態様において、本件出願は、対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定する方法であって、(i)融合タンパク質が検出可能なオリゴマーに結合する条件下で前記融合タンパク質を前記オリゴマーと接触させることであって、前記融合タンパク質が、核酸相互作用モチーフに融合した前記対象とするタンパク質を含み、前記検出可能なオリゴマーが、前記核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含むことと、(ii)前記試験化合物の存在下及び不在下で、ステップ(i)の混合物を、前記対象とするタンパク質に結合することができる固定化参照リガンドと接触させることと;(iii)未結合のオリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(iv)前記核酸オリゴマーを検出することによって、固定化参照リガンドに結合した融合タンパク質を定量化することと;を含み、化合物の不在と比較した、化合物の存在下での固定化ベイトに結合した融合タンパク質の量の減少は、前記試験化合物が前記対象とするタンパク質に結合することを示す、前記方法を提供する。

【0047】

他の実施態様において、本件出願は、対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定する方法であって、(i)融合タンパク質がオリゴマーに結合する条件下で前記融合タンパク質を前記オリゴマーと接触させることであって、前記融合タンパク質が、核酸相互作用モチーフに融合した前記対象とするタンパク質を含み、前記オリゴマーが、PCR増幅配列、及び前記核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含むことと、(ii)前記試験化合物の存在下及び不在下で、ステップ(i)の混合物を、前記対象とするタンパク質に結合することができる固定化参照リガンドと接触させることと;(iii)未結合のオリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(iv)固定化参照リガンドに結合した融合タンパク質をqPCRによって検出又は定量化することと;を含み、化合物の不在と比較した、化合物の存在下での固定化ベイトに結合した融合タンパク質の量の減少は、前記試験化合物が前記対象とするタンパク質に結合することを示す、前記方法を提供する。

【0048】

具体的な実施態様では、スクリーニングアッセイで核酸タグを使用して、対象とするタンパク質に結合することが知られている競合参照リガンドの存在下で、多数の候補リガンド(又は、「試験化合物」)から、対象とするタンパク質に競合的に結合するリガンドを同

10

20

30

40

50



定する。候補試験化合物には、1つ以上の有機化合物、無機化合物、合成核酸、天然核酸、合成ポリペプチド、天然ポリペプチド、ペプチド断片及び/又はタンパク質を含めることができる。同様に、競合参照リガンドは、有機化合物、無機化合物、合成核酸、天然核酸、合成ポリペプチド、天然ポリペプチド、ペプチド断片及び/又はタンパク質であってよい。

#### 【0049】

例えば、医薬化合物のスクリーニングでは、溶液中で遊離し得る1つ以上の試験化合物が、対象とするタンパク質との結合について、固定化参照リガンド又は「ベイト」と競合する能力について評価される。ある実施態様では、固定化参照リガンドは医薬化合物である。具体的な実施態様では、ベイトは、それらと対象とする複数のタンパク質との選択的相互作用よりもむしろ乱交に基づいて選択することができる。一部の実施態様では、例えばベイトが、対象とする複数のタンパク質を含むパネル又はライブラリに対して用いられる場合など、ベイトが2、3、4、5、10、15、20、30、40、50個又はそれ以上の対象とするタンパク質に結合するように、ベイトは選択される。

10

#### 【0050】

一実施態様では、スクリーニングはキナーゼ阻害剤(又は他のモジュレーター)についてである。固定化参照は、キナーゼの任意の既知の阻害剤又は他の結合剤であってよい。キナーゼのパネルに対して競合結合アッセイを形成する実施態様では、ベイトは、複数のキナーゼとの選択的相互作用よりもむしろそれらの乱交に基づいて選択することができる。乱交プロフィールを有する例示的なベイトは、既知であり、例えば、SB202190、スタウロスポリン、ブルパラノールB、SU5402、イマチニブメシレート、SU6668、イレッサ(Iressa)及びPD-173955である。そのような参照化合物を固定化する技術は公知であり、例えば、米国特許出願公開第20050153371号(例えば、実施例11)を参照のこと。本明細書で用いるように、「固体支持体」は、それらに限定されないが、任意のカラム(又はカラム物質)、ビーズ、試験管、マイクロタイター皿、固体粒子(例えば、磁性、アガロース若しくはセファロースビーズ)、マイクロチップ(例えば、ガラス、ファイバークラス、ラテックス、シリコン、シリコンガラス若しくは金のチップ)、又は膜(例えば、リポソーム若しくは小胞の膜)、プラスチック物質(例えば、ポリスチレン若しくはポリビニルクロライド、又は、参照リガンドなどのリガンドを直接若しくは間接に(例えば、他の抗体若しくはプロテインAなどの他の結合パートナー中間体を介して)結合することができるセンサーチップ(例えば、BIAcoreシステムで用いるもの)、又は参照リガンドなどのリガンドを(例えば、受容体若しくはチャネルを介して)包埋することができるセンサーチップである。

20

30

#### 【0051】

参照リガンド(ベイト)は、任意の標準手順を用いて、例えば、参照リガンドのビオチン化と続く固定化ストレプトアビジン(例えば、磁性ビーズ若しくはカラムの上で固定化されたストレプトアビジン)の使用によるビオチン化参照リガンドの捕捉によって捕捉することができる。参照リガンドに結合する対象とするタンパク質(及び対象とするタンパク質に結合する核酸タグ)は固体支持体に結合したままであるが、未結合の結合試薬(対象とするタンパク質及び/又は核酸タグ)は洗い流される。結合した対象とするタンパク質の捕捉後、試料中の標的に結合した核酸タグ(例えば、又は対象とするタンパク質のパネルの対象とするタンパク質)は、核酸タグのアンプリコン部分にハイブリダイズするプライマーを用いるPCR反応を実施することによって、簡単に検出される。ある実施態様では、PCR反応は、標準の定量方法を用いて(例えば、Perkin-ElmerによるTaq Manを用いて)実施される。一部の実施態様では、対象とするタンパク質と核酸タグとの複数の複合体が固体支持体によって保持され、その場合、単離されたプールの個々のメンバーは、例えば、パネルの中の対象とする特定のタンパク質に特異的な各特有の核酸タグの増幅を介して同定することができる。

40

#### 【0052】

一実施態様では、固定化参照リガンドはキナーゼのATP結合部位に結合し、スクリーニングによりキナーゼのATP結合部位に競合的に結合する化合物の同定が可能になる。

50

## 【 0 0 5 3 】

他の実施態様では、固定化参照は、ATP結合部位を含む部位、及びATP結合部位に近接又は隣接した部位に結合する。そのような参照「ベイト」を使用して、例えばATPの存在下又は不在下で競合結合アッセイを実施して、キナーゼに対する試験化合物の見かけの $K_d$ に及ぼすATPの影響を判定することによって、試験化合物がATP競合的に又は非ATP競合的に結合するかを判定することができる。試験化合物がATP結合キナーゼに協同的に結合する状況において、ATP競合的である試験化合物はATPの存在下で見かけの $K_d$ の上方シフトを示すが、非ATP競合的である試験化合物は、ATPの存在下で見かけの $K_d$ の変化を示さず、及び、試験化合物及びATPが協同的に結合する状況において見かけの $K_d$ の下方シフトを示さない。

10

## 【 0 0 5 4 】

他の実施態様において、本件出願は、ATP結合部位を有する対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同定する方法であって、前記試験化合物が、対象とするタンパク質に対する非ATP競合的結合剤であり、(a)(i)試験化合物の存在下及び不在下で、並びに(ii)外来性ATPの存在下及び不在下で、対象とするタンパク質に結合する固定化参照リガンドと、対象とするタンパク質を含む第一のドメイン及び核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含む融合タンパク質とを接触させることであって、該対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフは互いに異なることと;(b)融合タンパク質の核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含む核酸オリゴマーを加えることと;(c)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(c)核酸オリゴマーが融合タンパク質に結合するかどうかを検出することと;を含み、(i)試験化合物の不在及びATPの不在と比較した、試験化合物の存在下及びATPの不在下での固定化参照リガンドに結合した融合タンパク質の量の減少は、試験化合物が対象とするタンパク質に結合することを示し、(ii)試験化合物の存在及びATPの不在と比較した、試験化合物の存在下及びATPの存在下での融合タンパク質に結合した核酸オリゴマーの量の増加は、試験化合物が対象とするタンパク質に対する非ATP競合的結合剤であることを示す、前記方法を提供する。

20

## 【 0 0 5 5 】

一実施態様において、本件出願は、対象とするタンパク質と非ATP競合的に結合する試験化合物を同定する方法であって、(i)融合タンパク質が検出可能なオリゴマーに結合する条件下で、前記融合タンパク質を前記オリゴマーと接触させることであって、前記融合タンパク質が(a)前記対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、前記オリゴマーが、前記核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含むことと;(ii)前記試験化合物の様々な濃度の存在下及び前記試験化合物の不在下で、ステップ(i)の混合物を固定化参照リガンドと接触させることであって、前記固定化参照リガンドが前記融合タンパク質とATP結合部位で、及び、ATP結合部位に近接又は隣接する領域(例えば、ATP結合部位の外部)に結合することと、(iii)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(iv)試験化合物の各濃度(例えば、結合曲線を得るために)でオリゴマーを検出することによって、固定化参照リガンドに結合した融合タンパク質の量を定量化することと;(v)固定化リガンドに結合した対象とするタンパク質の量が化合物の不在下で固定化リガンドに結合した対象とするタンパク質の量の50%での前記試験化合物の濃度を決定することであって、前記濃度が前記試験化合物の $K_d$ であることと;(vi)ステップ(i)~(v)を繰り返すことであって、ステップ(ii)の混合液をATPとさらに接触させることと;を含み、ATPの存在下及びATPの不在下で計算された $K_d$ が変化しない場合、又は、ATPの存在下で計算された $K_d$ がATPの不在下で計算された $K_d$ よりも小さい場合、前記試験化合物は前記融合タンパク質と非ATP競合的に結合する、前記方法を提供する。ある実施態様では、核酸オリゴマーはアンプリコンを含み、検出はqPCRをさらに含む。

30

40

## 【 0 0 5 6 】

さらに他の実施態様では、固定化参照は、ATP結合部位に近接又は隣接し、任意選択でATP結合部位と重複する部位に結合する。そのような結合部位は、基質結合部位を含むこと

50

ができ、又は、基質結合部位の外部にあることもできる。参照分子が、基質結合部位を含む部位においてキナーゼに結合する場合、そのような参照「ベイト」を使用して、基質の存在下又は不在下で競合結合アッセイを実施して、キナーゼに対する試験化合物の見かけの $K_d$ に及ぼす基質の影響を判定することによって、試験化合物がキナーゼと基質競合的に又は非基質競合的に結合するかを判定することができる。基質競合的である試験化合物は基質の存在下で見かけの $K_d$ の上方シフトを示すが、非基質競合的である試験化合物は、基質の存在下で見かけの $K_d$ の変化を示さず、及び、試験化合物及び基質が協同的に結合する場合には、見かけの $K_d$ の下方シフトも示さない。試験化合物は、本明細書で記載のアッセイから該試験化合物が非ATP競合的分子であると既に判定されている場合、二次スクリーニングのそのような競合結合アッセイにかけることができる。

10

**【0057】**

ある実施態様では、固定化参照リガンド又は「ベイト」から対象とするタンパク質を置換するために必要とされる試験化合物の濃度は、対象とするタンパク質に対するその親和性の目安である。対象とするタンパク質がDNA結合ドメインを含有する場合、固体支持体の上で保持される対象とするタンパク質の量は、DNA結合ドメインと(対象とするタンパク質との融合体として)複合体を形成することができる配列を含有する核酸タグで検出することができる。先に述べたように、核酸タグは、放射能標識、蛍光標識又はPCR増幅配列の増幅によって検出可能である。

**【0058】**

このように、本件出願は、対象とするタンパク質に結合する化合物(例えば、キメラ融合体)を同定する方法であって、溶液中の少なくとも1つの候補試験分子の存在下及び不在下で、対象とするタンパク質を固体支持体上に固定されている参照リガンド「ベイト」に接触させることと、該支持体に保持される対象とするタンパク質の量を、濃度ゼロから始めて次第に高くなる濃度の試験分子で滴定することと、該混合液に検出可能な核酸タグを加えて該対象とするタンパク質を標識することと、試験化合物の各濃度につき固定化された対象とするタンパク質の量を決定することを含む、前記方法を提供する。試験分子の不在と比較した試験分子の存在下での結合した対象とするタンパク質の量の減少は、対象とするタンパク質に結合する試験分子を同定する。「フォワードスクリーニング」では、多数の試験化合物を速やかにスクリーニングして、対象とするタンパク質に結合する化合物を同定することができる。試験化合物の濃度を調節することによって、代替の競合分子がタンパク質に結合する際の親和性をあらかじめ選択することもできる。より高い親和性が所望される場合、より低い濃度の候補が提供され、これらのより低い濃度では、固定化参照リガンドからの対象とするタンパク質の除去が成功することが必要とされる。参照リガンドは、対象とする特定のタンパク質に結合することが同定されているか又は知られている標的分子であることができる。本明細書で記載されるように、この参照リガンドは、任意の従来の方法を用いて固体支持体に固定化することができる。次に、固定化参照リガンドを、参照リガンドが結合することが既知である1つ又は複数の対象とするタンパク質と接触させることができる。ある実施態様では、この相互作用は、少なくとも1つの試験化合物を含有する試料、及び試験化合物を含有しない試料で試験される。本件出願で提供される検出可能な核酸タグを次に用いて、試験化合物の存在下及び不在下で固定化参照リガンドに結合したタンパク質の量を決定することができる。首尾よく結合した試験化合物は、試験化合物の不在と比較して参照リガンドに結合する対象とするタンパク質の量を減少させる。

20

30

40

**【0059】**

この手法では、プール中の試験化合物を供給する最初の競合反応を実施することによって、多数の試験化合物を速やかにスクリーニングすることができる。各プール内の候補数は任意であるが、2、5、10、50又はそれ以上であってもよい。結合した対象とするタンパク質の量を減少させることにプールが不成功となる場合、プールのメンバーをさらに試験する必要はない。プールが成功する場合、プールに存在する個々の試験化合物を試験することができる、又は、当初用いたものの中間サイズのプールを使用することができる。例

50

えば、最初のプールが50個の試験化合物を含有する場合、50個の試験化合物のうちの10個をそれぞれ含有する5つのプールで試験を続けることができる。次に、成功したプールだけが、以降の試験ラウンドのためにさらに細分化される。競合結合スクリーニングは、例えば、それぞれ参照により本明細書に組み込まれているFabianら(2005)の論文Nature Biotechnology 23(3), 329-336、及び米国特許出願公開第2003/0186221号);2004/0009470号及び2005-0009099号でさらに詳細に開示される。

#### 【0060】

本件出願で提供される他の方法では、試験分子の解離定数は、あるアッセイ条件が満たされる場合に決定することができる:第一に、対象とするタンパク質の濃度が、タンパク質の濃度が、対象とするタンパク質に対する試験分子の $K_d$ よりも小さいように十分に低く維持されること、第二に、固定化参照リガンドの濃度が、対象とするタンパク質に対する参照リガンドの $K_d(K_{ref})$ よりも小さいことである。

#### 【0061】

第一の条件を満たすために、アッセイでの対象とするタンパク質の濃度は非常に低く、一般的に0.1nM未満に維持される。試験化合物が対象とするタンパク質の非常に強い結合剤であることが予想される場合、対象とするタンパク質はより低い濃度に希釈される。結合実験では過剰なタンパク質はなく、タンパク質濃度は、対象とするタンパク質に対する試験分子の $K_d$ よりも低い濃度に維持される。

#### 【0062】

試験化合物に対する見かけの $K_d$ が対象とするタンパク質に対する参照リガンドの $K_d(K_{ref})$ によって影響を受けるのは、固定化参照リガンドの濃度が $K_{ref}$ よりも高い場合だけなので、第二の条件は満たされなければならない。この第二の条件を満たすために、 $K_{ref}$ (すなわち、対象とするタンパク質に対する参照分子の $K_d$ )の一般的範囲である0.3nM~300nMの範囲の濃度の固定化参照リガンドを用いて、競合結合アッセイを実施する。これらの条件が満たされる場合、競合的結合は、以下の方程式:

$$f/f_0 = K_{comp}/(K_{comp} + [comp])$$

によって記載することができ、上式で、 $f$ は、溶液中の競合試験分子の存在下で固定化参照リガンドに結合した対象とするタンパク質の分画であり; $f_0$ は、溶解した試験分子の不在下で結合した分画であり; $K_{comp}$ は、溶液中の対象とするタンパク質と競合試験分子との間の相互作用の平衡解離定数( $K_d$ )であり;[comp]は、溶液中の競合試験分子の濃度である。試験分子濃度の関数としての参照リガンドに結合した対象とするタンパク質の数は、グラフ上にプロットすることができ、 $K_d$ は、その曲線を結合方程式 $f/f_0 = (L + (H-L)) \times (K_{comp}/(K_{comp} + [comp]))$ にあてはめることによって計算することができ、上式で、 $L$ は下のベースラインであり、 $H$ は上のベースラインであり、 $K_{comp}$ は試験分子と対象とするタンパク質との間の相互作用の結合定数であり、[comp]は試験分子の濃度である。50%競合では、試験分子の存在下での結合したタンパク質の分画は、試験分子の不在下でのその半分であり、すなわち、 $f/f_0 = 1/2$ であり、 $K_{comp}$ は[comp]と同等である。

#### 【0063】

対象とするタンパク質に対する試験化合物の $K_d$ 値を決定する方法であって、(i)様々な濃度の試験化合物の存在下及び不在下で、対象とするタンパク質に結合する固定化参照リガンドを、(a)対象とするタンパク質を含む第一のドメイン、及び(b)核酸相互作用モチーフを含む第二のドメイン、を含む融合タンパク質と接触させることであって、該対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフは互いに異なることと;(ii)融合タンパク質の核酸相互作用モチーフに結合する核酸配列を含む核酸オリゴマーを加えることと;(iii)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(iv)試験化合物の様々な濃度のそれぞれ及びその不在下において固体支持体上に保持される融合タンパク質に結合する核酸オリゴマーを検出し、又はその他の方法で定量することによって、競合結合曲線を得ることとを含む、前記方法であって;対象とするタンパク質に対する試験化合物の $K_d$ 値は、試験化合物の存在下で参照リガンドに固定化される対象とするタンパク質が、試験化合物の不在下で保持される対象とするタンパク質の50%である濃度である。

## 【0064】

本件出願で提供されるスクリーニングアッセイを用いて、試験化合物を対象とするタンパク質のパネルに対して試験し、その特定のパネルに対する試験化合物の $K_d$ プロフィールを生成することができる。 $K_d$ プロフィールは、標的が、例えば類似した基質結合部位を共有するタンパク質のファミリーに属し、化合物交差反応の可能性が大きい場合に有用であり得る特徴である標的特異性を、ある化合物が有するかどうか判定するために有用である。

## 【0065】

本明細書で記載されるスクリーニングアッセイのいずれかを、一重又は多重フォーマットで実行することができる。一例示的多重フォーマットでは、試験化合物は、対象とするタンパク質のパネルからの複数のタンパク質に対するその結合特性について同時にスクリーニング及び試験される。対象とする複数のタンパク質を同時又は逐次的に分析する場合、対象とする各タンパク質に特異な核酸タグ(例えば、異なるアンプリコン)を用いて、異なるタンパク質を識別することができる。例えば、核酸タグがPCR増幅マーカを含有する場合、PCR増幅マーカは検出される対象とする特定のタンパク質に特異的となる。したがって各タンパク質は、対象とするタンパク質に各々特異的であるDNA標的配列及びPCR増幅マーカを含む核酸タグによって、タグ付けすることができる。この特定のフォーマットでは各核酸タグが特定のタンパク質と特異的に結合するので、対象とするタンパク質は、競合結合工程でプールの、及び/又は各タンパク質について競合結合工程を個々に実施した後に溶出工程でプールのことができる。次に、プールからの分画は、試験化合物との個々のタンパク質の相互作用について分析することができる。

## 【0066】

或いは、多重フォーマットで一緒に分析されている対象とするタンパク質が同じ核酸相互作用タンパク質(例えば、NF-B)で構成される場合、核酸タグは、異なる対象とするタンパク質を識別するために用いることができる特異なPCR増幅マーカなどの、同じDNA標的配列であるが特異なレポーターを含有することができる。この代替の実施態様では、そのコグネイトDNAに対する高い親和性及び/又は長いタンパク質-DNA複合体半減期を有する核酸相互作用タンパク質を選択することもできる。一実施態様では、NF-Bは、そのコグネイトDNAに対する高親和性(表1を参照)、及び4~40時間のその長い複合体半減期のために選択される。そのような実施態様では、対象とするキメラ融合タンパク質は、対象とするタンパク質、及びNF-BのDNA結合ドメインを含む。多重フォーマットのこの代替の実施態様では、競合結合ステップは、最初に各融合タンパク質に特異なアンプリコンを含有する核酸タグを各融合タンパク質に「プリロード」し、その後、例えば2つの「プリロード」されたキナーゼ、又は最高6つの(若しくはそれより多い)「プリロード」された融合タンパク質を共通の容器内へ組み合わせることにより、多重フォーマットで競合結合を実行することで、実施することができる。

## 【0067】

ある実施態様において、本件出願は、2つ以上の対象とするタンパク質に結合する試験化合物を同時に同定する方法であって、(i)試験化合物の存在下及び不在下で、2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合する固定化参照リガンドを2つ以上の融合タンパク質と接触させることであって、各融合タンパク質が独立して(a)2つ以上の対象とするタンパク質の1つだけを含む第一のドメイン、及び(b)核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフは互いに異なることと;(ii)2つ以上の核酸オリゴマーを加えることであって、2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれが、2つ以上の融合タンパク質の1つだけの核酸相互作用モチーフに独立して結合する核酸配列を含むことと;(iii)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと;(iv)2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれを検出し、又はその他の方法で定量することと;を含み、試験化合物の不在と比較した、試験化合物の存在下での固定化参照リガンドに結合した2つ以上の融合タンパク質の量の減少は、試験化合物が2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合することを示す、前記方法を提供する。

## 【0068】

2つ以上の対象とするタンパク質に対する試験化合物の $K_d$ 値を同時に決定する方法であって、(i)様々な濃度の試験化合物の存在下及び不在下で、2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに結合する固定化参照リガンドを2つ以上の融合タンパク質と接触させることであって、各融合タンパク質が独立して(a)2つ以上の対象とするタンパク質の1つだけを含む第一のドメイン、及び(b)核酸相互作用モチーフを含む第二のドメインを含み、該対象とするタンパク質及び核酸相互作用モチーフは互いに異なることと；(ii)2つ以上の核酸オリゴマーを加えることであって、2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれが、2つ以上の融合タンパク質の1つだけの核酸相互作用モチーフに独立して結合する核酸配列を含むことと；(iii)未結合の核酸オリゴマー及び/又は未結合の融合タンパク質を除去することと；(iv)試験化合物の様々な濃度のそれぞれ及びその不在下において固体支持体上に保持された2つ以上の融合タンパク質に結合する2つ以上の核酸オリゴマーのそれぞれを検出し、又はその他の方法で定量することによって、競合結合曲線を得ることを含む前記方法が提供され、2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれに対する試験化合物の $K_d$ 値は、試験化合物の存在下で固定化参照リガンドに保持された2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれが、試験化合物の不在下で保持された2つ以上の対象とするタンパク質のそれぞれの50%である濃度である。

10

## 【0069】

他の実施態様では、結合ステップの実施前に、サイレントデコイ核酸タグを共通の容器に加えることができる。サイレントデコイは、共通の核酸相互作用タンパク質(例えば、NF-B)によって認識されるが、いかなる種類のレポーター機能も含まないDNA標的配列(例えば、コグネイトNF-BのDNA配列)を含む核酸タグであることができる。この代替の実施態様で用いられるレポーター機能がqPCR増幅である場合、サイレントデコイはいかなる種類のPCR増幅配列も含まない「qPCR-サイレント」デコイであることができ、したがって、qPCR工程でいかなるシグナルも発生しない。核酸相互作用タンパク質が転写因子のDNA結合ドメインである場合のように、核酸相互作用タンパク質がそのコグネイトDNAと可逆的に結合する場合には、そのようなデコイを加える。そのようなデコイの目的は、タグ間の任意の交換が2つのタグ間での交換よりもむしろ「サイレント」デコイタグを含み、したがって、任意の交換が特定のタンパク質への結合シグナルを乱雑化させるよりも減少させる可能性を高くすることによって、異なる融合タンパク質の間での核酸タグの交換から生じるシグナルの乱雑化を最小にすることである。

20

30

## 【0070】

多重アッセイのある実施態様では、結合アッセイから個々の容器に溶出液を等分して移し、各一定量をqPCRによって分析することによって、対象とする各タンパク質(例えば、キナーゼ)について結合シグナルを個々に読み取る。或いは、各試料が、例えば多重化qPCRによって、同じ試料中の2つ又は3つ以上の異なるシグナルについて分析されるように、結合アッセイからの試料を等分することによって、結合シグナルを多重フォーマットで判定することができる。多重フォーマットの他の実施態様では、多重化は、結合シグナルが測定される読出工程でのみ起こることができる。そのような実施態様では、競合結合工程は各対象とするタンパク質について個々に実施され、次に、溶出ステップでプールされ、そこで、試験化合物との個々のタンパク質の相互作用についてプールの各分画を分析することができる。

40

## 【0071】

多重フォーマットで試験されるタンパク質のパネルは、同じタンパク質ファミリーに属してもよく、属さなくてもよい。一実施態様では、タンパク質のパネルは、受容体チロシンキナーゼファミリーのキナーゼなどのキナーゼを含む。

## 【0072】

多重フォーマットの他の実施態様では、試験化合物が対象とするタンパク質との結合について参照リガンドと競合する程度を判定するために、複数の試験化合物が、対象とするタンパク質と同時に試験される。多重化は、このように大きな試験化合物ライブラリの迅

50

速なスクリーニングを可能にする。対象とするタンパク質に対して所望の結合親和性を有する特定の化合物を同定するために、所望の競合結合範囲を示すある試験化合物プールだけをさらに試験する必要がある。

【0073】

試験化合物及び/又は対象とするタンパク質の $K_D$ プロフィールは、使いやすさ及び以降の分析のために、データベース又は他の表の様式に入力することができる。一データフォーマットでは、スクリーニングした試験化合物のアイデンティティは表の行で表示され、対象とするタンパク質のアイデンティティは列で表示され、表の各セルは、各試験化合物についての各タンパク質の解離定数値を含む。したがって、表の各行はタンパク質のパネルに対する試験化合物の特異性プロフィールを表し、複数のタンパク質に対して乱雑な結合を示す試験化合物よりも、選択的結合を示す試験化合物の同定及び選択を容易に可能にする。あらゆる試験分子及びあらゆる対象とするタンパク質の結合プロフィールを互いに関係付けることができるような方法でデータを表すために、コンピュータによるクラスタリング方法を用いることもできる。クラスタ化されたデータ表示の一例では、同じ試験分子に結合する傾向があるタンパク質は互いに近接して位置するが、異なる試験分子に結合する傾向があるタンパク質は離れて位置する。クラスタマップに試験化合物が結合する場所を示すことにより、化合物ファミリーの構造活性相関を予測するために価値があり得るさらなる洞察がもたらされ得る。

10

【0074】

本件出願で提供されるスクリーニングアッセイは、他のスクリーニングフォーマットに比べて多数の利点を可能にする。例えば、スクリーニングされる試験化合物は固定化及び化学修飾することが不要であり、したがって、スケールアップ、多重化及びハイスループットスクリーニングに直ちに利用でき、試験分子の速やかで広範な試験を可能にする。さらに、競合結合アッセイは非常に高感度な検出方法(例えば、qPCR)を用いるので、本方法組換えタンパク質などの希少で高コストの物質のより少ない量を必要とする。定量的PCRなどのシグナル増幅技術は、極微量の標的タンパク質さえも用いるスクリーニングアッセイの実施を可能にする。したがって、定量PCRによって低ピコモルの量のタンパク質を正確に検出することができ、 $K_D$ 測定をピコモルの範囲で実施することができる。qPCRなどの高感度であるだけでなく非常に選択的でもある検出方法の使用も、非特異的タンパク質干渉の潜在的問題を除去し、タンパク質精製ステップ及び、通常、より従来的な技術を用いて分析されるタンパク質試料に対して実施される他の種類の操作を不要にする。したがって、本発明は、少量の細胞物質及びタンパク質だけを必要とする、速くて効率的な大容量スクリーニング方法を可能にし、それらの理由のために、本発明は、細胞ベースのアッセイの代替となる経済的スクリーニング方法である。

20

30

【0075】

本件出願は、対象とするタンパク質に結合することが知られている競合参照リガンドの存在下で、対象とするタンパク質に競合的に結合する候補分子又は試験化合物をスクリーニングするためのキットも提供する。そのようなキットは、多重ウェルプレート内のウェルなどの固体支持体又は容器に場合によっては固定化されている参照リガンド(又は「ベイト」);検出可能な核酸タグ;及び、核酸タグによって「タグ付け」することができる対象とするタンパク質;で構成することができる。核酸タグがqPCRによって検出可能である場合、キットはさらに、核酸タグ内にPCR開始配列を認識することができるPCRプライマーを含んでよい。そのようなキットを使用して、先に記載したような競合結合スクリーニングアッセイを実施することができる。

40

【0076】

他の実施態様では、キットは、参照又は「ベイト」リガンドに直接結合する分子(対象とするタンパク質など)の存在を検出するために用いることができる。より具体的な実施態様では、そのようなキットは、化合物、ペプチド又はタンパク質であれ、ある分子の存在について生体試料を試験するための診断キットであってよい。一例では、キットは固体表面に固定されるベイト分子;核酸タグによってタグ付けすることができる対象とするタ

50

ンパク質;及び検出可能な核酸タグ;を含む。qPCR増幅を可能にするために、キットはさらに、核酸タグ内にPCR開始配列を認識することができるPCRプライマーを含んでよい。そのようなキットでは、ベイト分子に結合するペプチド、タンパク質又は化合物などの分子の存在を、ベイト分子に結合することもできる対象とするタンパク質の結合の減少によるシグナルの減少によって検出することができるように、ベイト分子は最適化された濃度で存在する。特定の一実施態様では、検出可能なタンパク質は、核酸タグによってタグ付けすることができる抗体である。より具体的な実施態様では、検出可能なタンパク質は、核酸タグと複合体を形成することができるDNA結合ドメインと融合している抗体である。そのような診断キットは、例えば、患者の病態を判定するためにある生物学的マーカーの存在を判定又は確認するために、血液、唾液、尿、精液又は他の検体などの生体試料を、抗原マーカーの存在について試験するために用いることができる。この診断検査は、生体試料中の天然又は合成のホルモン又は化合物の存在を検出するために用いることもできる。他の実施態様では、診断キットは、ある場合には病原体に由来する、参照又は「ベイト」リガンドに結合する化学分子又は生体分子の存在について、環境試料を試験するために用いることができる。

10

**【0077】**

以下の実施例は、本発明を例示する役目を果たすことを意図するものであり、本発明を限定するものと解釈してはならない。

**【実施例】****【0078】**

本件出願で提供されるシステム及び方法の実施では、特に明記しない限り、分子生物学、微生物学、遺伝分析、組換えDNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチドの合成及び修飾、核酸ハイブリダイゼーション並びに当該分野の技術の範囲内である関連分野における従来の技術が使用される。これらの技術は本明細書で引用される参照内に記載され、その文献で詳細に説明されている。例えば、Maniatisら(1982)の論文「分子クローニング:研究マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」(Cold Spring Harbor Laboratory Press);Sambrookら(2001)の論文「分子クローニング:研究マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第三版(Cold Spring Harbor Laboratory Press);Ausubelらの論文「分子生物学の現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」(John Wiley & Sons)(1987年版及び現在までのアニュアルアップデート);Gait(編)(1984)「オリゴヌクレオチド合成:実際的な手法(Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)」(IRL Press);Eckstein(編)(1991)「オリゴヌクレオチド及び類似体:実際的な手法(Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach)」(IRL Press);Birrenら(編)「ゲノム分析:研究マニュアル(Genome Analysis: A Laboratory Manual)」(1999)(Cold Spring Harbor Laboratory Press)を参照。

20

30

**【0079】**

(一時的な哺乳動物インビトロ発現ベクターの構築)

標準の分子生物学技術を用いて、下記の遺伝要素を、遺伝子合成とそれに続く制限消化及びその後のライゲーションによって、一般的な細菌性プラスミドpGEMの主鎖にクローニングした。5'末端から3'末端にかけて記載すると、それらは以下の通りである:

40

**【0080】**

- 多くの細胞型で強い構成的発現を可能にするCMV(サイトメガロウイルス)エンハンサー/プロモーター領域、

**【0081】**

- ヒト  $\alpha$ -グロビン遺伝子の第一のイントロン、及び免疫グロブリン遺伝子重鎖可変部のリーダーと本体との間のイントロンで構成されるキメライントロン(トランスフェクションの研究は、cDNA挿入断片に連なるイントロンの存在が遺伝子発現レベルをしばしば増加させることを証明している)、

**【0082】**

- TEV(タバコエッチ病ウイルス)プロテアーゼ認識配列と、その後のいくつかの特異な

50



制限部位を有する複数のクローニング領域とインフレーム融合させた酵母GAL4又はヒトNF- $\kappa$ B転写活性化剤のDNA結合ドメイン(表1を参照)、

【0083】

- 増強されたmRNA安定性及び翻訳のためのSV40(シミアンウイルス40)後期ポリアダニル化シグナル、

【0084】

- 大腸菌での増殖のためのpMB1複製起点、及び

【0085】

- 大腸菌での選択/増殖のためのアンピシリン耐性(Amp<sup>R</sup>)遺伝子。

【0086】

(キナーゼのクローニング)

ヒトp38 (GenBank番号NP\_620581.1)及びBRAF(GenBank番号NP\_004324.1)キナーゼ配列を、DNA結合ドメイン(GAL4又はNF- $\kappa$ B;表1を参照)とインフレーム融合させ、標準の分子クローニングプロトコルを用いて制限消化及びその後のライゲーションによってクローニングした。クローンの配列は、ABI配列決定によって検証した。

【0087】

(一時的なインビトロ発現及びタンパク質抽出物調製)

ヒト胚腎臓(human embryonic kidney)(HEK)293細胞での一時的なインビトロ発現を、Lipofectamine(登録商標)(Invitrogen社製)を用いて実施し、配列検証したプラスミドDNAを、標準のQiagenプラスミド精製キットを用いて得た。トランスフェクションは、10cmの丸型ペトリプレート内の80%コンフルエント細胞を用いて、37°Cで24時間実施した。

【0088】

タンパク質抽出は、150mMのNaCl、10mMのDTT及びComplete(商標)(Roche社製)抗タンパク分解酵素混合物を含有する抽出緩衝液M-PER(Pierce社製)を用いて4°Cで実施した。細胞は、低温PBS洗浄の後プレート上で直接溶解し、細胞の細片は遠心分離によって除去した。タンパク質濃度は、Bradfordタンパク質用量アッセイ(Bio-Rad社製)で測定した。抽出物を等分し、液体窒素で凍結し、使用時まで-80°Cで保存した。

【0089】

あらゆるDNA構築物の発現のレベル及び質は、GAL4及びNF- $\kappa$ Bに対する抗体(Santa Cruz Biotechnology社製)を用いて、SDS-PAGE/ウェスタンブロット法によって分析した。

【0090】

(核酸タグの構築)

ランダムな配列を生成し、ソフトウェアPrimer Express(登録商標)(ABI社製)を用いてアンプリコン配列を設計するために用いた。アンプリコン配列を、ヒトキヌム、T7ファージゲノム、及び他のアンプリコン配列に対してBLASTで検索し、BLAST検索における配列との最小の類似性に基づいて選択した。選択されたアンプリコン配列をABIに送り、適切なプライマー及びqPCR蛍光プローブをABIによって調製した。GAL4又はNF- $\kappa$ B認識部位を加えることによってアンプリコン配列をさらに修飾し、完全な核酸タグを作製した。オリゴヌクレオチドを細菌性プラスミドにクローニングし、PCRを用いてタグを複製した。

【0091】

(競合結合アッセイ)

競合結合アッセイのための親和性樹脂は、以下の通りに調製した。Dynabeads(商標)M280(ストレプトアビジン(Dynal社製#602.10))を振盪及び攪拌によって再懸濁し、ビーズは10mg/mLで懸濁し、アッセイウェルにつき0.4mgを用いた。ビーズを3回洗浄し、1×PBS/0.05%ツイーン20(PBST)で10mg/mLに再懸濁し、2mL試験管に分配した。ビオチン化参照リガンドを調製する技術は公知であり、例えば、米国特許出願公開第20050153371号を参照のこと。ビオチン化参照部分を、0.025~0.25:1のモル比(参照リガンド:ビオチン結合能力)で試験管に加え、混合し、室温において30分間ロータータ上でインキュベートした。次にビーズを過剰のビオチン(ビオチン対ビオチン結合能力のモル比2:1)でブロックし、ブロック緩衝液(SeaBlock(Pierce社製)、1% BSA、0.05%ツイーン20、1mM DTT)で洗浄して未結合

10

20

30

40

50

のリガンドを除去し、非特異的タンパク質結合を低減させた。

【0092】

ポリスチレンプレートを、ウェルにつき200  $\mu$ LのSBTB(Pierce社製#37527 Seablock/1% BSA、0.05%ツイーン20)でブロックした。前の工程からのビーズ溶液を、SBTBを除去せずに、ウェルにつき12.5  $\mu$ Lのビーズの割合でポリスチレンプレートに加えた。プレートを700rpmで簡単に振盪し(洗浄1)、次に、ペレット化、デカント及びSBTBとの振盪による追加の洗浄(洗浄2)を実施し、その後3回目の洗浄を行い、ここではビーズをSBTBで少なくとも15分間振盪した。

【0093】

試験化合物はDMSOで1000 $\times$ ストックとして調製し、水性環境(最終1%DMSO)に速やかに希釈した。DMSO(終濃度1%)を、試験化合物が含まれない対照アッセイに加えた。

【0094】

タンパク質抽出物を氷中で徐々に解凍し、1 $\times$ 結合緩衝液(20% SeaBlock、0.17 $\times$  PBS、0.05%ツイーン20、6mM DTT)で希釈した。結合反応は、10nMの核酸タグ(GAL4又はNF- $\kappa$ Bに結合した標的配列、及び定量PCR検出のための1単位の増幅(アンプリコン)を含むキメラDN Aオリゴヌクレオチド)を含有する1 $\times$ 結合緩衝液中で、希釈したタンパク質抽出物及び2nM $\sim$ 30  $\mu$ Mの最終濃度を有するDMSO中の試験分子の1  $\mu$ Lを混合することにより、ビーズ含有ポリスチレンプレート内で組み立てた。アッセイプレートを1時間振盪しながら室温でインキュベートし、親和性ビーズを洗浄緩衝液(1 $\times$  PBS、0.05%ツイーン20、1mM DTT)で4回洗浄して、未結合のタンパク質を除去した。最終洗浄の後、ビーズを溶離緩衝液(1 $\times$  PBS、0.05%ツイーン20及び2  $\mu$ M非ビオチン化親和性リガンド)で再懸濁し、30分間振盪しながら室温でインキュベートした。溶出液中のキナーゼの量は、定量PCRで測定した。或いは、結合反応は核酸タグの不在下で実施することができ、核酸タグは、未結合のタンパク質を除去する洗浄工程の後に加えてもよい。

【0095】

(p38 MAPキナーゼによる競合結合アッセイ)

競合結合アッセイは、HEK293細胞で発現するp38タンパク質、及びp38のATP結合部位に結合する固定化リガンドを特徴とする。p38タンパク質を生成するために、先に述べたように標準のクローニングプロトコルを用いて、p38 のコード領域をGAL4又はNF- $\kappa$ BのDNA結合ドメインとインフレームで融合し、発現ベクターにクローニングした。高い親和性でp38のATP結合部位に結合することが知られている化合物であるSB202190を、固定化参照リガンドとして用いた。ビオチン化した柔軟なリンカーを、p38結合部位を妨害しない位置で、SB202190に結合させた。次に、そのビオチン化リンカーを介して、SB202190をストレプトアビジンでコーティングした磁性ビーズ上に固定化した。

【0096】

3つの化合物を、p38と固定化SB202190:SB201290(修飾されず、溶液中では遊離する)、BIRB-796及びVX-745との間の相互作用と競合するそれらの能力について試験した。相互作用の親和性を決定するために、固体支持体に結合したp38の量を、試験化合物の濃度の関数として定量化した。3つの化合物の $K_d$ を、図2及び3に示す。

【0097】

(BRAFキナーゼによる競合結合アッセイ)

BRAFキナーゼタンパク質を生成するために、BRAFのコード領域をGAL4又はNF- $\kappa$ BのDNA結合ドメイン(表1を参照)とインフレームで融合し、前記発現ベクターにクローニングし、次にHEK293細胞で発現させた。高い親和性でBRAFのATP結合部位に結合することが知られている化合物であるPD-173955を、固定化参照リガンドとして用いた。この連結した化合物は、SB202190ベイトを作製するために用いたものと同じ戦略を用いて生成した。

【0098】

4つの商標登録試験化合物を、BRAFと固定化参照リガンドとの間の相互作用と競合するそれらの能力について試験した。4つの化合物の1つは、他の3つと化学的に関連するが参照リガンドに結合しないので、陰性対照として用いた。相互作用の親和性を決定するため

10

20

30

40

50

に、固体支持体に結合したBRAFの量を、試験化合物の濃度の関数として定量化した。4つの化合物の $K_d$ を、図4及び5に示す。

【 0 0 9 9 】

(キナーゼのパネルによる競合結合アッセイ)

下の表2は、キナーゼのパネルに対して実施した競合結合アッセイのシグナル対バックグラウンド比を示し、各キナーゼは、NF BのDNA結合ドメインとの融合タンパク質として調製した。上記のプロトコルを用い、いくつかの既知のATP競合キナーゼ阻害剤を含む溶液中で、潜在的競合試験化合物の混合物の存在下又は不在下で、各キナーゼを、そのコグネイトペイト(参照リガンド)を用いて試験した。30:1のシグナル対バックグラウンド比が許容可能とみなされ、100:1の比が好ましい。

【表 2】

表 2	
キナーゼ	シグナル対バックグラウンド比 (x:1)
ARAF1	90
BMPR1B	535
BMPR2	93470
CDC2L1	<10
CDK7	117
DDR2	69
IRAK3	10933
MAP2K2	5827
MAP3K10	7162
MAP3K9	187077
MYLK	36637
SHARK	53
FLT3	1307
ZAP70	2192
AURAK	4469
CSHK2A1	291
p38- $\gamma$	3361
VEGFR2	139975
ANKK1 (SgK288)	50
RPS6KA4	960

10

20

30

40

SNARK	370
MAPKAPK5	1100
MAP2K3	90
MAP2K1	14,000
MAP2K4	780
GSK3B	1300
LATS2	290
PIK3CA	240
PIK3CA (E545K)	260
PRKCE	50
MYLK	270
IKK-ε	80

10

20

## 【0100】

(多重化競合結合アッセイ)

競合結合アッセイは、以下の方法で多重化した：そのコグネイトDNAに対するNF- BのDNA結合ドメインの高親和性、及び4～40時間のその長いタンパク質DNA複合体半減期に基づいて、NF- BのDNA結合領域をキナーゼの融合パートナーとして選択した。競合結合アッセイには、ビオチン化参照リガンドペイトを0.0025～0.25:1のモル比でビーズに加え、上記方法で処理することによって、リガンドされたビーズを調製することが含まれた。タンパク質抽出物の調製には、二段階希釈が含まれた。第一の希釈ステップでは、各タンパク質抽出物ストックを、10 μMの特異なキメラ核酸タグ及び200 μg/mLのサケ精子DNAの存在下で、室温において1×PBS/0.05%ツイーン20/0.1% BSA/10mM DTTで100倍に希釈した。第二の希釈ステップは、1 μMの「qPCRサイレント」デコイDNAの存在下で異なる希釈抽出物を混合し、1×PBS/0.05%ツイーン20/0.1%BSA/10mM DTTでさらに100倍希釈し、これにより最終希釈物は、各キナーゼ融合タンパク質のキメラ核酸タグの各々の0.1～1nMを含有する10,000倍希釈のストックを生じる、多重化ステップであった。強いアッセイシグナルを発生する特定のキナーゼをより弱いアッセイシグナルを発生する他のキナーゼで多重化した状況では、異なるキナーゼ抽出物を混合するステップで、弱いシグナルを発生するキナーゼと関連するタグが強いシグナルを発生するキナーゼへ交換される可能性を減少させるために、強いシグナルを発生するキナーゼの第一の希釈ステップは、10nMよりも100nMの核酸タグを含有した。その後の競合結合アッセイステップは、前記の方法で実施した。結合量をqPCRによって決定する読取ステップでは、結合アッセイからの溶出液を異なる試料に等分し、各試料は二重フォーマットで読み取った。或いは、試料は、三色読取りを用いる三重フォーマットでもよい。

30

40

## 【0101】

一例では、ビーズは、米国特許出願公開第2005015337号で記載される方法で、PEGリンカーを介してビオチン化したスタウロスポリンでペイト化した。各々NF- BのDNA結合ドメインにインフレームで融合させた3つのキナーゼ、PRKCE、ROCK2及びZAP70を、クローニングして、HEK293細胞で発現させた。各キナーゼ融合体のタンパク質抽出物は、10nMの核酸タグを含有する緩衝液でまず希釈したが、前の実験からZAP70融合タンパク質がPRKCE及

50

びROCK2融合タンパク質と比較してより強いシグナルを発生することが分かったので、ZAP 70融合タンパク質を含有する試料は100nMの核酸タグを含有する緩衝液で希釈した。希釈した抽出物は、「qPCRサイレント」デコイDNAの存在下でさらに希釈し、次に、競合結合アッセイのために試験化合物及びリガンド化ビーズと混合した。結合実験から得られたタンパク質溶出液を2つの試料に等分し、各試料を、二色qPCR読取りを用いて分析した。

#### 【0102】

(活性及び不活性なキナーゼ高次構造を用いた競合結合アッセイ)

不活性形態のAbl1キナーゼは、Abl1融合タンパク質を発現するHEK293細胞を、150mM NaCl、25×無EDTA COMPLETE(Roche社製#11873 580 001)及び10mM DTTを有する1×M-PER緩衝液(Pierce社製#78501)中で溶解することによって調製した。タンパク質抽出物をPCR試験管へ移して、30℃で45分間サーモサイクラー内でインキュベートし、細胞抽出物中の内因性ホスファターゼにAbl1タンパク質を脱リン酸化させ、それによって不活性(非リン酸化)状態のタンパク質分画を増加させた。

10

#### 【0103】

活性形態のAbl1キナーゼは、最初に、細胞溶解/タンパク質抽出工程の直前に、Abl1でトランスフェクトしたHEK293細胞を以下のホスファターゼ阻害剤中で2時間インキュベートすることで調製した:2mMオルトバナジン酸ナトリウム(Calbiochem社製#567540)又は1×ホスファターゼ阻害剤カクテルセットII(Calbiochem社製#524625)。細胞を、150mM NaCl、25×無EDTA COMPLETE(Roche社製#11873 580 001)、10mM DTT及び1×ホスファターゼ阻害剤カクテルセットII(Calbiochem社製#524625)を含有する1×M-PER緩衝液(Pierce社製#78501)中で溶解した。

20

#### 【0104】

固定化ベイトとしてプルパラノールB結合ビーズを用いて、活性及び不活性の形態のAbl1を上記の方法で実施した競合結合アッセイで用いた。キナーゼの活性及び不活性の形態に対して試験した化合物の1つはVX-680であり、これは、Ablの活性形態に結合することができることが文献で公知である化合物である(Youngら(2006)の論文Cancer Res 66(2): 1007-1014)。活性/不活性キナーゼ構造に対して試験するために選択された第二の化合物はイマチニブ(STI571)であり、これは、Abl1の不活性構造に優先的に結合する阻害剤である化合物である(Schindler, T.らの論文Science (2000) 289:1938-1942、Liuらの論文Nature Chemical Biology (2006) 2(7):358-364)。活性リン酸化形態及び不活性非リン酸化形態のAblに対するVX-680及びイマチニブのKd値を、図6Aに示す。図6Aは、Ablに対するVX-680のKdが、リン酸化Ablキナーゼ及び非リン酸化Ablキナーゼの間で不変のままであることを示す。このデータは、該化合物が不活性構造のAblに結合することができることの確認を、初めて提供する。対照的に、図6Bは、イマチニブのKdがリン酸化形態と比較して非リン酸化形態のAblでより低いことを示し、このことは、該化合物が不活性形態に優先的に結合することを示す。

30

#### 【0105】

(非ATP競合的キナーゼ阻害剤を同定する競合結合アッセイ)

本明細書に記載される競合結合アッセイでベイトとして用いる参照リガンドは、一般にATP分子自体よりも大きい。したがって、これらの参照リガンドはATP結合部位よりも多く結合し、それらは、基質結合部位及びドメイン間隙などの正規のATP結合部位及び隣接部位を含む活性部位に結合するとより正確に記載される。したがって、これらの参照リガンドは、ATP結合部位の結合剤だけでなく、基質結合部位に結合するものを含む、ATP部位に隣接して結合する結合剤も置換する能力を有する。

40

#### 【0106】

BMS-345541のIKK $\gamma$ への結合の非ATP競合的性質を確認するように設計された一実験では、前にIKK $\gamma$ の活性部位に結合すると同定された化合物をピオチン化して、参照ベイトとして用いた。BMS-345541は、ADP/ATPと非相互排他的に部位に結合することが前に多重阻害分析によって示され、したがって、非ATP競合的結合剤であると判断された(Burkeらの論文J of Biol Chem (2003) 278(3):1450-1456)。IKK $\gamma$ キナーゼによる結合実験を既記載

50

の方法で実施したが、さらに、ATPの存在下で結合活性を測定するアッセイで、20mMのMgCl<sub>2</sub>、及びIKK $\beta$ に対するATPのK<sub>d</sub>の10倍と計算された濃度のATPを反応混合液に加えた。IKKキナーゼによる平行実験を、ATP競合対照として既知のATP競合分子、スタウロスポリンを用いて実施した。競合結合実験の結果を、表3に示す。結果は、ATP競合結合剤スタウロスポリンはATPの存在下でK<sub>d</sub>の上方シフトを示すが、BMS-345541はATPの影響を受けないK<sub>d</sub>値を示すことを示し、このことは、その分子が古典的な非ATP競合結合剤であることを確認する。

【0107】

PD184352のMEK1及びMEK2への結合の非ATP競合的性質を確認するように設計された第二の実験では、MEK1及びMEK2キナーゼの活性部位に結合すると同定された化合物を、参照ベイトとして用いた。PD184352は、ATP結合部位と別であるが隣接した新規の結合ポケットに結合することがX線結晶学によって前に示され、非ATP競合結合剤であると判断された(例えば、Ohrenらの論文Nature Structural & Molecular Biology (2004) 11(12):1192-1197を参照)。MEK1キナーゼ結合実験を前記方法で実施したが、結合反応工程では、ATPの存在下で結合活性を測定するアッセイのために、20mMのMgCl<sub>2</sub>、及びMEK1に対するATPのK<sub>d</sub>の10倍と計算された濃度のATPを反応混合液に加えた。同様に、MEK2キナーゼ結合アッセイのための結合反応には、標準の結合アッセイ混合液に加えて、20mMのMgCl<sub>2</sub>、及びMEK2に対するATPのK<sub>d</sub>の10倍と計算された濃度のATPが含まれた。ATP競合対照を提供するために、既知のATP競合的結合剤であるスタウロスポリンも、両方のMEKアッセイで試験した。ATPの存在下及び不在下での競合結合アッセイの結果を、表4及び5に示す。結果は、ATP競合的である化合物で予想されるように、MEK1/2に対するスタウロスポリンの見かけのK<sub>d</sub>の顕著な増加と対照的に、ATPの存在下でのMEK1/2に対するPD184352の見かけのK<sub>d</sub>の顕著な減少を示す。BMS-345541の場合がそうであったように、ATPが見かけのK<sub>d</sub>に影響を及ぼさないというよりも、見かけのK<sub>d</sub>を減少させる影響を有する事実は、PD184352が、未結合のMEKと比較してATP結合MEKに優先的に結合し、したがって、ATP協同的非ATP競合結合剤であることを示唆する。

【表3】

化合物	Kd (nM) ATPは存在しない	Kd (nM) ATPは存在する
スタウロスポリン	40	382
BMS-345541	138	123

【表4】

化合物	Kd (nM) ATPは存在しない	Kd (nM) ATPは存在する
スタウロスポリン	33	151
PD184352	804	4

【表5】

表5: ATPの存在下及び不在下でのMEK2競合結合アッセイ		
化合物	Kd (nM) ATPは存在しない	Kd (nM)ATPは存在する
スタウロスポリン	24	99
PD184352	849	8

10

## 【0108】

(hAGT融合タンパク質のクローニング)

ヒト<sup>0</sup><sub>6</sub>-アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼ(hAGT)をコードする哺乳動物の発現ベクターを、標準の分子クローニング手順を用いて構築した。クローニングベクター中の遺伝的エレメントには、5'末端から3'末端にかけて、CMVエンハンサー/プロモーター、TEVプロテアーゼ認識配列、続いて完全長p38 キナーゼ、続いてHA11エピトプタグをコードする配列とインフレームで融合した、ヒト<sup>0</sup><sub>6</sub>-アルキルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼをコードする配列が含まれた。

## 【0109】

hAGT融合タンパク質は、HEK293細胞内においてインビトロで発現させた。

20

## 【0110】

核酸タグは、<sup>0</sup><sub>6</sub>-ベンジルグアニン-ポリエチレングリコールマレイミド(Covalys社製)を、PCR増幅マーカを含むDNA配列に連結することによって構築することができる。核酸タグを付けた基質は、融合タンパク質に共有結合する核酸標識を移動させる、hAGT融合タンパク質によって認識することができる。

## 【0111】

本明細書で言及されている全ての刊行物及び特許出願は、個々の刊行物又は特許出願が参照により組み込まれることが具体的に及び個々に示されているかのように、本明細書で参照により組み込まれている。

30





【 図 5 】

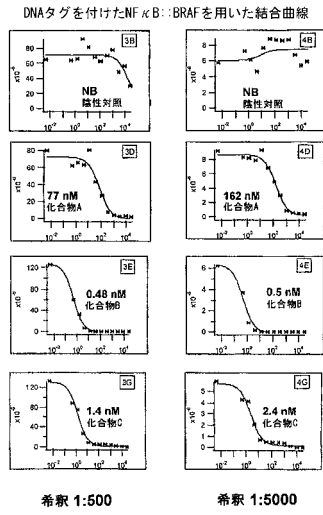


図 5

【 図 6 】

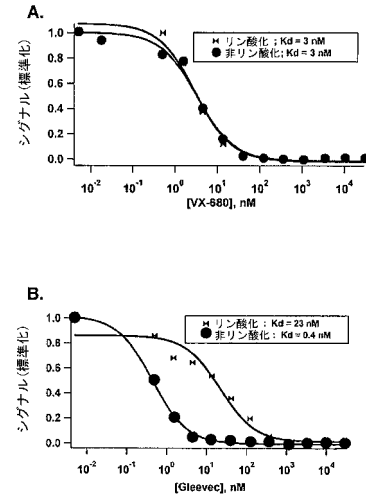


図 6

【 配 列 表 】

[0005415264000001.app](#)

[0005415264000002.xml](#)

## フロントページの続き

- (72)発明者 ジェエアン - ミチャエル エー . レリアス  
アメリカ合衆国 9 2 6 2 9 カリフォルニア州 ダナ ポイント ブリガントイン ドル . 2 5  
2 4 8
- (72)発明者 ミケ モルリソン  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア州 サン ディエゴ メサ スプリングス ワイ  
9 7 1 5 # 2 0 3
- (72)発明者 ダニエル トレイベル  
アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州 サン ディエゴ ビア セブルベダ 4 4 2 5  
# 3
- (72)発明者 リサ エム . ウォドイクカ  
アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サン ディエゴ モナ リサ スト . 1 2 3 8  
4

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 2 7 0 9 2 ( WO , A 1 )  
Analytical Biochemistry , 2 0 0 2 年 , Vol.309 , p.241-247  
Nucleic Acids Research , 1 9 9 1 年 , Vol.19 , p.5205-5211

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
C 1 2 N 1 5 / 0 0  
BIOSIS / MEDLINE / WPIDS / WPIX ( STN )