



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102906566 A

(43) 申请公布日 2013.01.30

(21) 申请号 201180008060.2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.02.02

G01N 33/53 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/15 (2006.01)

2010-022622 2010.02.03 JP

G01N 33/50 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012.08.01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/052158 2011.02.02

(87) PCT申请的公布数据

W02011/096440 JA 2011.08.11

(71) 申请人 株式会社棱镜生物实验室

地址 日本神奈川县

(72) 发明人 小路弘行

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 5 页

(54) 发明名称

与天然变性蛋白质结合的化合物及其筛选方法

(57) 摘要

对于以转录因子为首的具有多个不规则序列的蛋白质进行了调整蛋白质·蛋白质相互作用的低分子化合物的筛选,但几乎无法获得具有充分活性的低分子化合物。本发明人发现在调整天然变性蛋白质与协同蛋白的相互作用的蛋白质的筛选中,通过着眼于不规则序列进行筛选、进而从具有拟肽骨架且具有肽侧链或与其相类似侧链的拟肽化合物中选择候选化合物,可以高效地选择调整天然变性蛋白质活性的化合物,进而完成了本发明。

1. 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质的活性调节剂的筛选方法,其包括:

- (1) 使所述蛋白质或所述蛋白质的不规则序列区与待测物质相接触;
- (2) 对所述蛋白质的不规则序列区和待测物质的相互作用进行检测。

2. 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选方法,其包括:

- (1) 使所述蛋白质或所述蛋白质的不规则序列区与待测物质相接触;
- (2) 对所述蛋白质的不规则序列区和待测物质的相互作用进行检测。

3. 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选方法,其包括:

- (1) 使所述蛋白质或所述蛋白质的不规则序列区、所述协同蛋白和待测物质相接触;
- (2) 对所述蛋白质的不规则序列区和待测物质的相互作用进行检测。

4. 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选方法,其包括:

- (1) 使所述蛋白质或所述蛋白质的不规则序列区、所述协同蛋白和待测物质相接触;
- (2) 对所述蛋白质的不规则序列区和所述协同蛋白的相互作用进行检测。

5. 如权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的筛选方法,其中,待测物质为拟肽化合物。

6. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的筛选方法,其中,天然变性蛋白质为转录调节因子、信号传递系统的蛋白质、细胞内蛋白质。

7. 如权利要求 1 所述的筛选方法,其中,检测相互作用利用双杂交法 (Y2H)、免疫共沉淀法、蛋白质芯片法、立体结构解析、Farwestern 印迹法、交联 (crosslinking) 法、荧光猝灭法进行。

8. 一种化合物,是利用权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的筛选方法获得的。

9. 一种化合物,其与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合。

10. 一种天然变性蛋白质的活性调节剂,其含有与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物。

11. 一种调节天然变性蛋白质活性的方法,其使用与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物。

12. 一种药物,其含有与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物。

与天然变性蛋白质结合的化合物及其筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种与天然变性蛋白质的不规则序列区（以下有时也表述为不规则区域）相结合的化合物。详细地说，本发明涉及一种化合物，该化合物通过与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合、利用该结合使不规则序列结构域的结构改变、从而导致不能与在天然变性蛋白质的自然状态下应该结合的协同蛋白相结合，由此可以阻碍在自然状态下发生的生物体反应。另外，本发明还涉及与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物的筛选方法等。进而，本发明还涉及含有与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物的药物。

背景技术

[0002] 在此之前，提到在生物体内发挥功能的蛋白质时，则是说形成特定的立体结构、以该结构为基础发挥特异的功能。近年来，与上述普通的想法相反，已知在生物体内存在很多不形成立体结构的蛋白质或蛋白质的一部分不形成立体结构的蛋白质。在蛋白质中，不形成立体结构的氨基酸序列部分高达数百残基也是很常见的。这种序列部分被称作“原本不规则”的区域，蛋白质分子的整体由不规则区域构成或者即便是部分具有不规则区域者均称作天然变性蛋白质。

[0003] 在美国的生化学者 Christian B. Anfinsen 的研究以来，建立了“1 级结构决定高级结构”这一想法。这被称作“安芬森信条 (Anfinsen's dogma)”，描绘了 1 级结构→特有的立体结构→蛋白质的特有功能这一图式。反过来说，也具有缺乏特有立体结构的（= 变性状态）蛋白质→没有功能的（变性）蛋白质这一默契。

[0004] 然而，这 10 年来已知存在具有很长的不规则区域的蛋白质 IDP (天然变性蛋白质) (Intrinsically disordered Protein)。IDP 具有以下特征：

[0005] (1) 大量的 IDP 存在于真核细胞中（特别是多在细胞核内）、原核细胞中很少；

[0006] (2) IDP 富含大量的亲水性残基、疏水性区域少；

[0007] (3) 很多 IDP 与如转录因子、CBP 等共激活因子、细胞内信号传递蛋白质、p53 等细胞周期的控制因子、细胞膜融合因子，RNA 结合蛋白质等其他蛋白质相结合，发挥功能；

[0008] (4) 这些蛋白质的功能与不规则区域密切相关。

[0009] 之前的研究中显示，IDP 普遍存在于几乎所有的生物中，与所有的生物体功能相关。据说，真核细胞中形成的蛋白质的约 20% 为 IDP、不规则区域也达到 50 ~ 500 个残基。IDP 通常具有没有高级结构的不规则序列，但当 IDP 与靶蛋白结合时，则诱发结构、IDP 发挥功能。

[0010] 通常来说，很多转录因子中具有不规则区域。转录因子是控制在基因表达中的转录过程的开始或抑制的蛋白质，根据与受到控制的基因的组合不同，存在多种转录因子。据说人基因组中存在 1000 种以上的转录因子的基因。使用 DISODRED 程序 (IDP 预测程序) 由氨基酸序列进行 IDP 预测时，预测到在人转录因子中平均来说多达全长一半 (49%) 的部分为不规则区域。

[0011] 一直以来,天然变性蛋白质在生物体内大量存在是事实,而且据说在与信号传递系统或基因表达控制等有关的重要的蛋白质中特别多。然而,另一方面,备受关注也是最近才开始的事情,对天然变性蛋白质仍有很多不清楚的方面。

[0012] 本身不形成立体结构或者具有不形成结构的部分的蛋白质事实上在很久以前就是已知的。但是,还从未着眼于对不规则序列进行筛选。

[0013] 非专利文献 1 :生物物理 49 (1),004-010 (2009)

[0014] 非专利文献 2 :Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug24 ;101 (34) :12682-7.

发明内容

[0015] 以转录因子为首、对多个具有不规则序列的蛋白质进行了调整蛋白质·蛋白质相互作用的低分子化合物的筛选,但获得具有充分活性的低分子化合物几乎是不可能的。因而,本发明的目的在于提供用于获得天然变性蛋白质的活性调节剂、或天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选方法。另外,本发明的目的还在于提供利用该筛选方法获得的化合物、含有该化合物的药物等。

[0016] 当重叠在结构域和不规则区域上时,通过生物化学方法搞清楚的功能部位的位置在几乎所有的情况下并非位于结构域、而是位于不规则区域上。这表明蛋白质的不规则区域承担着生物学上重要的功能。因此可以认为控制 IDP 是作为各种疾病治疗药的有吸引力的技术。

[0017] 这些物质作为疾病治疗药极为有用,由于不规则序列具有结构域结构,所以通过选出选择性地与结构域相结合的物质,有可能找到具有选择性、没有副作用的理想药物。另外,如上所述,由于不规则序列主要存在于细胞内,所以变得能够控制通过之前的药物无法控制的细胞内的蛋白质 / 蛋白质相互作用,还能创造出所谓的疑难杂症的治疗药。

[0018] 因此,本发明人进行了深入研究,结果发现在天然变性蛋白质的活性调节剂、或天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选中,通过着眼于天然变性蛋白质的不规则序列中的相互作用进行筛选,特别是通过使用具有拟肽骨架、具有肽侧链或与其相类似侧链的拟肽化合物作为待测物质,能够高效地筛选出调节天然变性蛋白质活性的化合物。

[0019] 在具有拟肽骨架、具有肽侧链或与其相类似侧链的拟肽化合物与天然变性蛋白质的不规则区域发挥相互作用时,认为这些不规则区域高效地变为近似于无规卷曲的变性状态。如果这样,则会产生为什么在生物体内不会相互会合并凝集、或者为什么不会被各种蛋白酶(分解酶)分解的疑问。但是,虽然表面上看这与以往普通的想法是相反的,但这也许是天然变性蛋白质的最大特性。

[0020] 即,本发明提供下述方式的筛选方法、化合物、天然变性蛋白质的活性调节剂、天然变性蛋白质的活性调节方法及药物。

[0021] [1] 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质的活性调节剂的筛选方法,其包括:

[0022] (1) 使该蛋白质或该蛋白质的不规则序列区与待测物质相接触;

[0023] (2) 对该蛋白质的不规则序列区和待测物质的相互作用进行检测。

[0024] [2] 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活

性调节剂的筛选方法,其包括:

[0025] (1) 使该蛋白质或该蛋白质的不规则序列区与待测物质相接触;

[0026] (2) 对该蛋白质的不规则序列区和待测物质的相互作用进行检测。

[0027] [3] 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选方法,其包括:

[0028] (1) 使该蛋白质或该蛋白质的不规则序列区、该协同蛋白和待测物质相接触;

[0029] (2) 对该蛋白质的不规则序列区和待测物质的相互作用进行检测。

[0030] [4] 一种活性调节剂的筛选方法,其为天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选方法,其包括:

[0031] (1) 使该蛋白质或该蛋白质的不规则序列区、该协同蛋白和待测物质相接触;

[0032] (2) 对该蛋白质的不规则序列区和该协同蛋白的相互作用进行检测。

[0033] [5] 如 [1] ~ [4] 中任一项所述的筛选方法,其中,待测物质为拟肽化合物。

[0034] [6] 如 [1] ~ [5] 中任一项所述的筛选方法,其中,天然变性蛋白质为转录调节因子、信号传递系统的蛋白质、细胞内蛋白质。

[0035] [7] 如 [1] ~ [6] 中任一项所述的筛选方法,其中,检测相互作用利用双杂交法 (Y2H)、免疫共沉淀法、蛋白质芯片法、立体结构解析、Farwestern 印迹法、交联 (crosslinking) 法、荧光猝灭法进行。

[0036] [8] 一种化合物,是利用 [1] ~ [7] 中任一项所述的筛选方法获得的。

[0037] [9] 一种化合物,其与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合。

[0038] [10] 一种天然变性蛋白质的活性调节剂,其含有与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物。

[0039] [11] 一种调节天然变性蛋白质活性的方法,其使用与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物。

[0040] [12] 一种药物,其含有与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物。

附图说明

[0041] [图 1] 表示利用免疫沉淀法将 ICG-001 和 CBP 拉下 (pull down) 时的数据。由该实验可知,ICG-001 与 CBP 相结合。

[0042] [图 2] 为 ICG-001 与 CBP 的 N 末端相结合的实验结果。图 2 的实验数据显示在利用免疫沉淀法拉下在大肠杆菌中表达的 CBP (1-111) 和 β - 联蛋白时,由于 ICG-001 的添加,CBP (1-111) 离去,由此可知不会结合在与 CBP 相似性很高的 P300 上。

[0043] [图 3] 为表示 CBP 的结构的图。圈的部分为规则序列,线的部分为不规则序列。(P. E. Wright, Nature Review 2009)

[0044] [图 4] 表示以在大肠杆菌中表达的 CBP (1-111) 为样品进行 NMR 分析,获得 X 轴表示 C-13 数据、Y 轴表示 N-15 数据的 2D 光谱结果。

[0045] [图 5] 表示对使在大肠杆菌中表达的 CBP (1-111) 与 5 μ M 的 ICG-001 共存的样品进行 NMR 分析,获得 X 轴表示 C-13 数据、Y 轴表示 N-15 数据的 2D 光谱结果。

[0046] [图 6] 表示对使在大肠杆菌中表达的 CBP (1-111) 与 15 μ M 的 ICG-001 共存的样品进行 NMR 分析,获得 X 轴表示 C-13 数据、Y 轴表示 N-15 数据的 2D 光谱结果。

具体实施方式

[0047] 以下对本发明详细地进行说明。本说明书中的基因操作技术只要无特别说明,则可根据《Molecular Cloning》(Sambrook, J 等, ColdSpring Harbor Laboratory 出版, 1989 年) 等公知技术进行实施, 蛋白质操作技术只要无特别说明, 则可根据《蛋白质实验规程》(秀润社, 1997 年) 等公知技术进行实施。

[0048] 天然变性蛋白质只要是如上所述具有不规则序列的蛋白质, 则可以是任何蛋白质, 既可以是蛋白质整体为不规则序列的蛋白质, 也可以是其一部分、例如 N 末端区域、C 末端区域、中间区域含有不规则序列的蛋白质。另外, 还可以是它们的组合。作为它们的例子, 可举出具有不规则序列的转录调节因子、信号传递系统的蛋白质或其他细胞内功能蛋白质。具体地说, 可举出 CBP、c-Myc、Fos、SRF、EGR-4、c-Myb、TBX3 等仅由 DNA 结合结构域和不规则序列构成的转录调节因子, 进而还可以举出 p53、IRF-3、E2F-1、Ets-1、HIF-1 α 、AR、NF-AT1、SREBP-1 等具有 DNA 结合结构域、其他结构域、不规则序列的转录调节因子等。

[0049] 协同蛋白包含与上述天然变性蛋白质发生相互作用的全部蛋白质。例如在天然变性蛋白质为 CBP 时, 如 HIF-1、SYT、p53、p73、Mdm2、Stat-2、TAL-1、Ets-1、TBP、NF-kB、HNF-4、CREB、SREBP、c-JUN、c-Myb、ATF、BRCA-1、Sap1、NF-E2、TFIIB、P/CAF、MyoD、c-Fos、Ets-1、C/EBP、E2F、GATA-1、MI、SYT、p53、Smad、SRC-1、p/CIP、YY1 是显示相互作用的协同蛋白。

[0050] 当在筛选中使用天然变性蛋白质时, 其可以是自然存在的状态、也可以将不规则部分切出后使用。不规则部分只要是能够检测到与待测物质的相互作用, 则可以是任何形态, 也可以结合有具有不规则序列部分和结构域结构的部分。

[0051] 作为待测物质, 可举出低分子化合物、肽、蛋白质、拟肽化合物、核酸、核酸类似化合物、胆固醇类或维甲酸、前列腺素等生理活性物质或它们的衍生物或类似物。优选拟肽化合物, 更具体地可举出 α 螺旋模拟化合物、 β 折叠模拟化合物、 β 转角模拟化合物。拟肽化合物是指例如其骨架具有与 α 螺旋、 β 折叠及 / 或 β 转角非常近似的空间结构, 其侧链在与肽非常近似的方向上突出, 其侧链优选是具有氨基酸侧链或类似结构的侧链。

[0052] 拟肽化合物的骨架并不具有如肽键那样易于被分解的结构, 可以具有类似的药效团, 例如可举出在 W092/13878、W094/03494、W095/00534、W095/25120、W096/30035、W096/30396、W098/05333、W097/15577、W098/49168、W001/00210、W097/15589、W002/092010、W02003/030907、W02003/031448、W02004/093828、W02005/116032、W02004/108731、W02006/101858、W02007/056513、W02007/056593、W02007/062243、W02007/139346、W02009/051397、W02009/051398、W02009/051399、W02010/027114、W02010/120112 公报中给出的骨架。除此之外, 具有类似骨架的化合物作为待测物质也优选。

[0053] 本发明中, 天然变性蛋白质的活性调节剂的筛选如下进行: (1) 使天然变性蛋白质或该蛋白质的不规则序列区与待测物质相接触; (2) 对该蛋白质的不规则序列区与待测物质的相互作用 (即分子间结合) 进行检测。

[0054] 另外, 本发明中天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂的筛选如下进行: (1) 使天然变性蛋白质或该蛋白质的不规则序列区与待测物质相接触, 或者使天然变性蛋白质或该蛋白质的不规则序列区与其协同蛋白与待测物质相接触; (2) 对天然变性蛋

白质的不规则序列区与待测物质的相互作用（即分子间结合）或天然变性蛋白质的不规则序列区与协同蛋白的相互作用（即分子间结合）进行检测。

[0055] 对天然变性蛋白质的不规则序列区与待测物质的相互作用进行检测的方法只要是能够检测不规则序列区与待测物质的相互作用的方法，则无特别限定。另外，还可以检测待测物质对天然变性蛋白质和与其发生相互作用的协同蛋白的相互作用造成的影响。无论如何，优选并非仅对相互作用进行检测，而是着眼于天然变性蛋白质的不规则区域对相互作用进行检测。作为它们的检测方法，例如可举出双杂交法 (Y2H)、免疫共沉淀法、蛋白质芯片法、立体结构解析、Farwestern 印迹法、交联 (crosslinking) 法、荧光猝灭法等。

[0056] 这些方法是公知的方法，双杂交法 (Y2H) 为利用 2 个分子发生结合、才显示活性的方法。举出酵母双杂交系的一个例子，说明双杂交系统的原理。酵母双杂交系利用了拥有 2 个可分离功能性结构域的多种多样的真核生物转录因子的特征。2 个结构域中的 1 个是特异性识别顺式作用元件并结合的 DNA 结合结构域（有时简称为“DBD”），另 1 个是活化转录的转录活化结构域（有时简称为“AD”）。在该双杂交系统中，在酵母内作为融合蛋白表达含有 DNA 结合结构域 (GAL4bd 或 lexA) 和感兴趣的蛋白质“A”的所谓诱饵蛋白 (Bait protein)。同时，在相同酵母细胞内还表达含有 DNA 活化结构域 (GAL4ad 或 VP16) 和蛋白质“B”的狩猎蛋白 (Fish protein)。诱饵蛋白与狩猎蛋白发生相互作用时，这些融合蛋白的 DNA 结合结构域和转录活化结构域变得接近，结果所产生的蛋白质复合体诱导报告基因（例如 HIS3 或 lacZ）的表达。该表达通过在不含组氨酸的选择性培养基上的该酵母细胞的培养或者 lacZ 基因的活化，可以容易地进行监测。例如，编码未知狩猎蛋白的 DNA 序列可通过将对应的质粒分离、接着进行碱基序列分析来容易地鉴定。需要说明的是，在双杂交系统中，有时将作为试验对象一方的蛋白质、成为探索的靶标的蛋白质称作靶标蛋白、猎物 (prey) 蛋白质或狩猎 (fish) 蛋白等，将成为靶标蛋白对象的蛋白质称作诱饵 (bait) 蛋白。

[0057] 进而，还开发了双杂交系统的多个改变体系。为了对生物学体系中可见的各种相互作用进行鉴定、检测和分析，认为必须使用不同的双杂交系统，实际上其他的双杂交技术也有所发展，也可在不同的生物体及 / 或不同的细胞区室内研究蛋白质 - 蛋白质相互作用。

[0058] 双杂交系统可通过分子生物学方法在生物体内迅速进行从准备欲确认相互作用的受试蛋白至蛋白质相互作用的筛选阶段，可以省去在保持感兴趣的蛋白质的生物活性的同时要分离 / 纯化、进行受试的麻烦。而且，双杂交系统在能够简单地分离编码相互作用对手的对应的核酸序列方面也优选。即，认为在检测蛋白质相互作用时，利用双杂交系统在迅速性、容易性、成本等方面均有利。

[0059] 本发明中，以天然变性蛋白质或其不规则序列区作为靶标蛋白（狩猎蛋白）、以天然变性蛋白质的协同蛋白组作为诱饵蛋白，可以从待测物质（例如拟肽化合物）中筛选调节天然变性蛋白质的活性的化合物、或者调节天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合活性的化合物。

[0060] 免疫共沉淀法是利用免疫沉淀法将蛋白质复合体回收的方法。进一步扩展该方法，则产生被称作“下拉分析”(pull down assay) 的方法，该方法代替抗原抗体反应使用标签的特异结合性。通过这些方法中组合质量分析，则可以明确与已知蛋白质发挥相互作用的未知蛋白质的本来面目。本发明中，通过将特异地结合于天然变性蛋白质或其不规则序列区的待测物质（例如拟肽化合物）回收，确定该化合物的结构或者鉴定该化合物，可以

筛选本申请的特异性调节天然变性蛋白质活性的化合物。另外,还可用于特异性阻碍天然变性蛋白质与显示相互作用的协同蛋白的结合的化合物筛选中。

[0061] 关于免疫沉淀法的具体方法,可参照《Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版》(Maniatis, T. 等编(1989)Cold Spring Harbor 出版)等。简单地说,可以利用使用能够与经鉴定的多肽的抗原性结构域相结合的抗体、优选 FLAG(注册商标)单克隆抗体、M1、M2 或 M5 的免疫沉淀试验对该蛋白质进行检测。如上所述,利用经鉴定的多肽将细胞转化,使其在培养液中增殖,接着使其溶解,获得细胞所产生的标记蛋白质样物质溶液。将该溶液与单克隆抗体溶液孵育,通过沉降研究形成在细胞中的经鉴定的多肽标记的蛋白质与抗体的所有复合体。然后,从沉降物中将蛋白质/抗体复合体分离。接着,利用常规的分析方法、例如在蛋白质/抗体复合体的解离条件下使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光间接拍摄法确认标记蛋白质的存在。另外,还可使用质量分析或 HPLC 鉴定与该复合体相结合的待测化合物或拟肽化合物。

[0062] 蛋白质芯片法是使用表面等离子体共振技术等对相互作用进行检测的方法的方法。不仅可对平衡状态进行解析,还可进行结合·解离的动力学解析。

[0063] 作为使用的测定方法,除了表面等离子体共振技术之外,例如还可举出消散场分子成像法、荧光成像分析法、固相酶免疫分析法、荧光偏振消偏法及荧光相关光谱法等。

[0064] 表面等离子体共振技术是指通过在金属/液体界面发生相互作用的分子激发表面等离子体,利用反射光的强度变化对其进行测定的方法(Cullen, D. C., 等., Biosensors, 3(4), 211-225(1987-88))。使用该方法进行蛋白质-分子间相互作用的测定或解析时,C 末端标签化蛋白质有必要利用上述方法进行固相化,但靶标分子不需要进行标记化。

[0065] 作为用于将 C 末端标签化蛋白质固相化的底座,使用在玻璃等透明底座上形成有金、银、铂等金属薄膜的底座。作为透明底座只要是通常表面等离子体共振装置中使用的底座即可,通常由相对于激光为透明的材料(例如玻璃)构成,其厚度使用 0.1~5mm 左右。另外,优选金属薄膜的膜厚为 100~2000Å 左右。作为这种表面等离子体共振装置用固相底座也可以使用市售品。C 末端标签化蛋白质在上述底座上的固相化可利用上述方法进行。

[0066] 本方法中作为使靶标分子与 C 末端标签化蛋白质接触的方法,只要是两分子以对于相互作用来说充分的程度进行接触的方法,则可以是任何方法,优选可使用使固相化的 C 末端蛋白质与以适当浓度在生物化学中通常使用的缓冲液中溶解有靶标分子的溶液相接触的方法。

[0067] 这些过程可通过市售的表面等离子体共振装置、例如 BIAcore2000(Pharmacia Biosensor 公司制)进行。使两分子接触后,使用其本身已知的表面等离子体共振装置,通过测定各个反射光的相对强度的时间变化,从而可以解析固相化后的 C 末端标签化蛋白质与靶标分子的相互作用。

[0068] 该方法中,作为同时进行多个解析的方法,例如使用在上述表面等离子体共振装置中使用的底座上使每个蛋白有一个地址地固相化多个 C 末端标签化蛋白质的方法;或者使多种靶标分子与 1 种固相化后的 C 末端标签化蛋白质相接触的方法等。

[0069] 消散场分子成像法是 Funatsu, T., 等., Nature, 374, 555-559(1995) 等中记载的

方法,为使第 2 分子作为溶液接触于固相化在玻璃等透明体上的分子,以向其产生消散场的角度照射激光等光源,利用检测器对瞬逝光进行测定或解析的方法。这些操作可以使用其本身已知的消散场荧光显微镜装置进行。

[0070] 使用该方法进行蛋白质-分子间相互作用的测定或解析时,有必要利用上述方法将 C 末端标签化蛋白质和靶标分子的任一者固相化。靶标分子在固相化时,不需要进行标记,但以未固相化的状态进行使用时,有必要利用上述标记物质进行标记化。

[0071] 作为用于将 C 末端标签化蛋白质或靶标分子固相化的底座,使用玻璃等材质的底座,优选使用石英玻璃。另外,为了防止激光的散射等,优选对表面进行超声波洗涤。

[0072] 本方法中,作为用于使未被固相化的 C 末端标签化蛋白质或标记化靶标分子与固相化分子相接触的方法,只要是两分子以对于相互作用来说充分的程度进行接触的方法,则可以是任何方法,优选制作以适当的浓度在生物化学中通常使用的缓冲液中溶解有未经固相化的 C 末端标签化蛋白质或标记化靶标分子的溶液,将其滴加在固相表面上的方法。

[0073] 使两分子接触后,使用 CCD 相机等检测器对通过消散场照明所激发的荧光进行测定,从而可以鉴定与经固相化的分子发生相互作用的分子。

[0074] 该方法中,作为同时进行多个解析的方法,例如使用在上述底座上使每个蛋白有一个地址地固相化多个 C 末端标签化蛋白质或标记化靶标分子的方法。

[0075] 荧光成像分析法是使标记化分子与经固相化的分子相接触、通过两分子的相互作用由停留在经固相化的分子上的标记化分子发出荧光,使用市售的荧光成像分析仪对所发出的荧光进行测定或解析的方法。

[0076] 使用该方法进行蛋白质-分子间相互作用的测定或解析时,C 末端标签化蛋白质或靶标分子的任一者有必要利用上述方法进行固相化。靶标分子在经固相化后使用时,可利用经标记者、也可利用未经标记者。另外,以未固相化的方式进行使用时,有必要利用上述标记物质进行标记化。

[0077] C 末端标签化蛋白质可以利用介由标签部经固相化者,也可利用通过标签部以外的部分经固相化者。

[0078] 作为用于将 C 末端标签化蛋白质或靶标分子固相化的底座,还可使用通常在固定化蛋白质或核酸等中使用的硝基纤维素膜或尼龙膜或者塑料制微孔板等。

[0079] 本方法中,作为使标记化靶标分子或 C 末端标签化蛋白质与固相化分子相接触的方法,只要是两分子以对于相互作用来说充分的程度进行接触的方法,则可以是任何方法,优选制作以适当的浓度在生物化学中通常使用的缓冲液中溶解有标记化靶标分子或 C 末端标签化蛋白质的溶液,将其与固相表面相接触的方法。

[0080] 使两分子接触后,优选进行利用相同缓冲液等对过量存在的标记化靶标分子或 C 末端标签化蛋白质进行洗涤的工序,通过使用市售的成像分析仪对由停留在固相上的靶标分子或 C 末端标签化蛋白质的标记物质所发出的荧光信号或由经固相化的标记化分子所发出的荧光与停留在固相上的标记化分子所发出的荧光混合而成的信号进行测定或解析,可以鉴定与经固相化的分子发生相互作用的分子。

[0081] 本发明中,作为同时进行多个解析的方法,例如使用在上述固相表面上使每个蛋白有一个地址地固相化多个 C 末端标签化蛋白质或者标记化或非标记化的靶标分子的方法;或者使未固相化的多种 C 末端标签化蛋白质或标记化靶标分子与 1 种 C 末端标签化蛋

白质或者标记化或非标记化靶标分子相接触的方法等。使多种 C 末端标签化蛋白质或标记化靶标分子接触时,利用缓冲液的浓度差等使停留在固相上的该分子解离并获得,利用已知的方法对其进行分析,从而可以鉴定。

[0082] 固相酶免疫分析法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) :Crowther, J. R., Methods in Molecular Biology, 42 (1995)) 是使含有抗体的溶液与固定化在固相上的抗原相接触,通过两分子的相互作用 (抗原抗体反应),使用市售的检测器 (ELISA 读取器) 对由与停留在经固相化的抗原上的抗体特异性结合的标记化分子 (IgG 等) 所发出的荧光、或者由以标记化分子为底物的色素所发出的信号进行测定或解析的方法。

[0083] 使用该方法进行蛋白质 - 分子间相互作用的测定或解析时,有必要利用上述方法将成为抗原的 C 末端标签化蛋白质固相化。另外,成为抗体的靶标分子有必要利用上述标记物质进行标记化。

[0084] 作为用于将成为抗原的 C 末端标签化蛋白质固相化的底座,还可使用通常 ELISA 所用的塑料制微孔板等。

[0085] 本方法中,作为使成为抗体的标记化靶标分子与固相分子相接触的方法,只要是两分子以对于相互作用来说充分的程度进行接触的方法,则可以是任何方法,优选制作以适当的浓度在生物化学中通常使用的缓冲液中溶解有标记化靶标分子的溶液,将其注入到微孔板中的方法。

[0086] 使两分子接触后,优选进行利用相同缓冲液等对过量存在的未结合于固相化分子的标记化分子进行洗涤的工序,通过使用市售的 ELISA 读取器对由停留在固相上的标记化分子所发出的荧光进行测定或解析,可以鉴定与经固相化的抗原分子发生相互作用的分子。

[0087] 本方法中,作为同时进行多个解析的方法,例如使用在上述微孔板的各个孔内分别固相化不同的多个标记化靶标分子的方法。

[0088] 荧光偏振光法 (Perran, J., 等., J. Phys. Rad., 1, 390-401 (1926)) 是利用通过荧光偏振光激发的荧光分子在处于激发状态之间、保持稳定状态时,在同一偏振光平面上放射荧光;但一旦经激发的分子在激发状态下进行转动布朗运动等时,则所放射的荧光与激发光处于不同平面的方法。分子运动受到其大小的影响,当荧光分子为高分子时,几乎没有激发状态之间的分子运动、放射光处于保持偏振光的状态,而为低分子的荧光分子时,由于运动速度快,因而消除了放射光的偏振光。因此,通过在最初的平面和与其垂直的平面上测定由通过平面偏振光激发的荧光分子放射的荧光的强度,由两平面的荧光强度的比例可以获得该分子的运动性及与其存在状态有关的信息。通过该方法,即便是杂质对其也没有影响,可以追踪与经荧光标签化的分子发生相互作用的靶标分子的行为。这是由于仅在经荧光标签化的分子与靶标分子发生相互作用时,该行为作为偏振光度的变化能够测定。

[0089] 作为用于进行该方法的装置,例如市场有售 BECON (Panyera 公司制) 等,本方法也可使用这些装置进行。

[0090] 使用该方法进行蛋白质 - 分子间相互作用的测定或解析时, C 末端标签化蛋白质和靶标分子的任一者均需要以溶液的形式提供。靶标分子无需进行标记。另外,与想要研究相互作用的 C 末端标签化蛋白质相比、分子量明显小的分子由于对 C 末端标签化蛋白质的布朗运动没有影响,因而在本发明中并不适合。

[0091] 本方法中,作为使靶标分子与 C 末端标签化蛋白质相接触的方法,只要是两分子

以对于相互作用来说充分的程度进行接触的方法,则可以是任何方法,优选通过向市售的荧光偏振消偏装置的测定用孔中投入以适当的浓度在生物化学中通常使用的缓冲液中溶解有 C 末端标签化蛋白质的溶液,进而投入以适当的浓度在相同缓冲液中溶解有靶标分子的溶液的方法来进行。

[0092] 由于认为本方法中测定的与 C 末端标签化蛋白质及靶标分子之间的相互作用并非必须如抗原抗体方法那样特异性很高,因而为了检测最佳的组合,将相互作用的程度数值化是有效的。作为表示相互作用程度的指标,例如可以使用相对于一定浓度的 C 末端标签化蛋白质赋予最大荧光偏振光度的最小靶标物浓度的值。

[0093] 该方法中,作为同时进行多个解析的方法,例如使用向上述荧光偏振消偏法测定装置的各测定用孔中分别投入不同的多个 C 末端标签化蛋白质、向其中投入特定的靶标分子溶液或者特定的 C 末端标签化蛋白质,向各孔中投入相互间不同的多种靶标分子溶液的方法。

[0094] 荧光相关光谱法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS); Eigen, M., 等., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5740-5747 (1994)) 是在共聚焦激光显微镜等下测定粒子的流动速度或扩散率、容积收缩等的方法,本发明中,通过利用 C 末端标签化蛋白质与靶标分子之间的相互作用,测定原来的标签化分子 1 分子的平移布朗运动的变化,从而可测定发生相互作用的分子。

[0095] 具体地说,试样粒子被激发光激发,在试样液容积的一部分中放射荧光,测定该放射光,获得光子比例。该值随着在特定时间内观测的存在于空间容积中的粒子数一起变化。上述各种参数可以使用自相关函数由该信号的变动求得。用于进行该 FCS 的装置也由 Carl Zeiss (Zeiss) 公司等出售,本方法中也可使用这些装置进行解析。

[0096] 使用该方法进行蛋白质 - 分子间相互作用的测定或解析时, C 末端标签化蛋白质和靶标分子的任一者均需要以溶液的形式提供。靶标分子无需进行标记。另外,与想要研究相互作用的 C 末端标签化蛋白质相比,分子量明显小的分子由于对 C 末端标签化蛋白质的布朗运动没有影响,因而在本发明中并不适合。

[0097] 本方法中,作为使靶标分子与 C 末端标签化蛋白质相接触的方法,只要是两分子以对于相互作用来说充分的程度进行接触的方法,则可以是任何方法,优选通过向市售的 FCS 装置的测定用孔中投入以适当的浓度在生物化学中通常使用的缓冲液中溶解有 C 末端标签化蛋白质的溶液,进而投入以适当的浓度在相同缓冲液中溶解有靶标分子的溶液的方法进行。

[0098] 该方法中,作为同时进行多个解析的方法,例如使用向上述 FCS 装置的各测定用孔中分别投入不同的多个 C 末端标签化蛋白质、向其中投入特定的靶标分子溶液或者特定的 C 末端标签化蛋白质,向各孔中投入相互间不同的多种靶标分子溶液的方法。

[0099] 本申请发明中,为了进行天然变性蛋白质或其不规则序列区与待测物质的分子间相互作用的测定,可以使用上述方法。

[0100] 立体结构解析在利用 X 射线衍射或 NMR 等明确复合体的具体结构时,通过在天然变性蛋白质或其不规则序列区和待测物质的存在下制作结晶、进行 X 射线解析,可以对其结合进行解析。另外,通过对天然变性蛋白质或其不规则序列区和待测物质存在的溶液测定 NMR,可以对该不规则序列区与待测物质的结合进行解析。

[0101] 交联 (crosslinking) 法通过利用低分子化合物将复合体的蛋白质分子间交联、固定,在天然变性蛋白质或其不规则序列区和待测物质的存在下进行交联,由此可以对不规则序列区与待测物质的相互作用进行检测。

[0102] 检测天然变性蛋白质的不规则序列区与待测物质的相互作用时,或者检测到天然变性蛋白质的不规则序列区与协同蛋白的相互作用降低时,用于该测定的待测物质被鉴定为调节天然变性蛋白质的活性的化合物、或调节天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合活性的化合物。

[0103] 这样,通过本发明的筛选方法可获得天然变性蛋白质的活性调节剂、或者天然变性蛋白质与其协同蛋白的结合的活性调节剂。

[0104] 另外,本发明还提供含有通过该筛选方法获得的化合物的药物。

[0105] 结合于天然变性蛋白质的不规则序列区的化合物(例如利用本发明的筛选方法获得的化合物)作为天然变性蛋白质的活性调节剂有效,该化合物根据其类型,可以使用在制剂化中通常使用的药理学上允许的载体、赋形剂及/或其他添加剂以药物组合物的形式进行制备。作为给药方式,例如可举出片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、细粒剂、散剂或口服液剂等口服给药,或者静脉注射(包含点滴)、肌肉注射或皮下注射等的注射剂,栓剂、经皮给药剂或经粘膜给药剂等非口服给药。特别是为在胃中被消化的肽时,优选静脉注射等非口服给药。

[0106] 在用于口服给药的固体药物组合物中,可以混合1种或多种的活性物质和至少1种惰性的稀释剂,例如乳糖、甘露醇、葡萄糖、微晶纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或偏硅铝酸镁等。上述组合物可以根据常规方法含有惰性稀释剂以外的添加剂、例如润滑剂、崩解剂、稳定剂或溶解剂或助溶剂等。片剂或丸剂还可根据需要被糖衣或胃溶性或肠溶性物质等膜包覆。

[0107] 用于口服的液体药物组合物例如可包括乳浊剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂或酏剂,可含有通常使用的惰性稀释剂,例如纯化水或乙醇。上述组合物还可含有惰性稀释剂以外的添加剂、例如湿润剂、混悬剂、甜味剂、芳香剂或防腐剂。

[0108] 作为用于非口服的注射剂,可以包括无菌的水性或非水性的溶液剂、混悬剂或乳浊剂。水溶性的溶液剂、混悬剂中作为稀释剂例如可以含有注射用蒸馏水或生理用盐水等。作为非水溶性的溶液剂或混悬剂的稀释剂,例如可含有丙二醇、聚乙二醇、植物油(例如橄榄油)、醇类(例如乙醇)或聚山梨醇酯80等。上述组合物还可进一步含有湿润剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、溶解剂或助溶剂或者防腐剂等。上述组合物例如可以利用通过除菌滤器的过滤、杀菌剂的配合或照射进行无菌化。另外,制造无菌的固体组合物进行使用时,还可溶解在无菌水或其他无菌用注射用介质中进行使用。

[0109] 给药量可考虑有效成分、即通过本发明的筛选方法获得的物质的活性强弱、症状、给药对象的年龄或性别等适当确定。

[0110] 实施例

[0111] 以下举出实施例说明本发明,但本发明并非限于这些实施例进行解释。

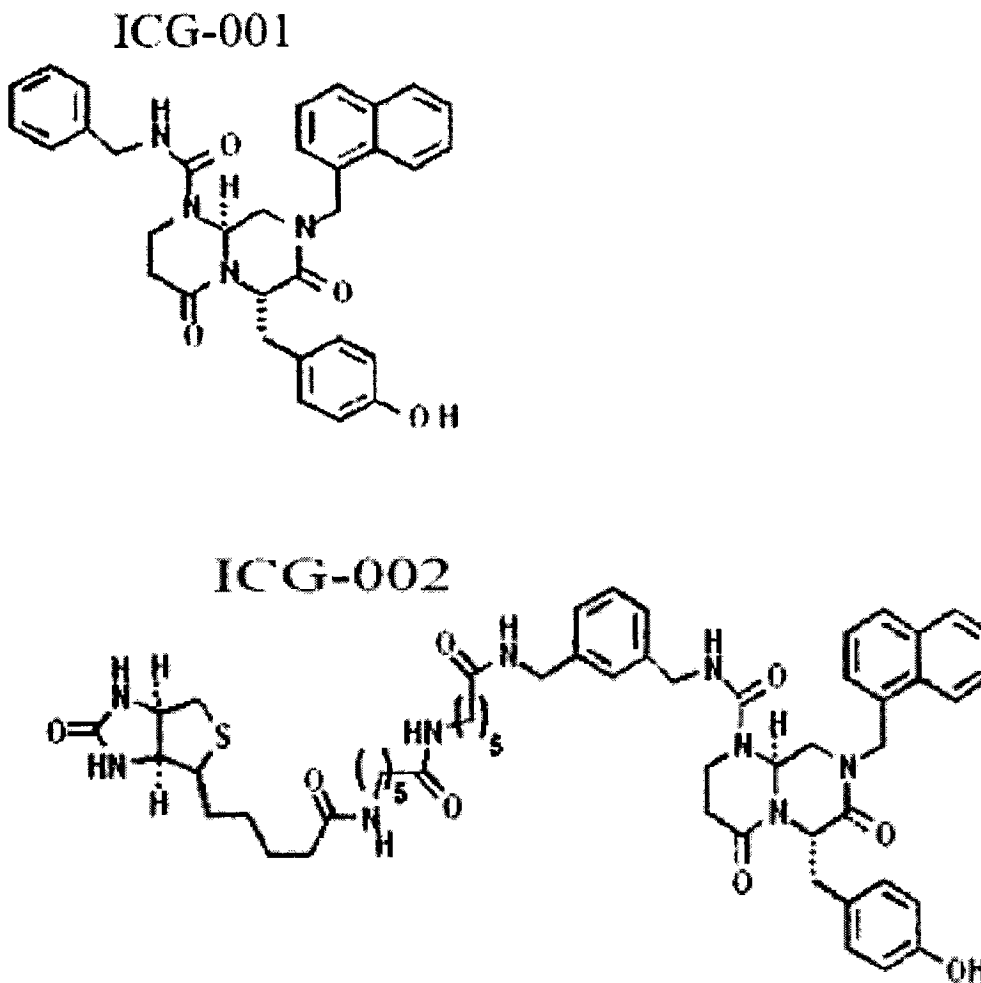
[0112] 实施例 1

[0113] 作为本发明的确实的证据,以下示出已经发表的论文(Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 24 ;101(34) :12682-7)的实验概要。该论文中虽未公开本发明的发明思想,但

该论文所记载的内容构成了本说明书。该论文中仅给出了作为拟肽化合物的 ICG-001 仅与 CBP 相结合、进而与 CBP 的 N 末端序列相结合,但不与 p300 结合。但是,清楚的是其证明了本发明的技术思想。

[0114] 将 ICG-001 示于化学式 1,将对 ICG-001 进行生物素化的产物示于化学式 2(ICG-002)。将使用这些物质、利用免疫沉淀法进行分析的结果示于图 1。将 SW480 细胞(来自人结肠癌的细胞株)的核抽提物与在链霉亲和素琼脂糖微球上结合有 ICG-002 的产物进行孵育的结果作为条带 1。用 ICG-001 拉下的结果为条带 2。

[0115]



[0116] 利用免疫沉淀法拉下在大肠杆菌中表达的 CBP(1-111)(不定型序列区域)与 β - 联蛋白和 p300(1-111)(不规则序列区)时,由于 ICG-001 添加、CBP(1-111) 离去, ICG-001 与 P300 不结合(参照图 3),所述 P300 与 CBP 的相似性很高。

[0117] 实施例 2

[0118] 在大肠杆菌中表达用 ^{15}N 进行了标签化的 CBP(1-111)(不定型序列区域),使其溶解在缓冲液($\text{NaP } 25\text{mM} \cdot \text{pH}6.8$ 、 $\text{NaCl } 50\text{mM}$ 、 $0.02\% \text{NaN}_3$)中,将 $300 \mu\text{l}$ 放在 NMR 样品管中。进而,添加 ICG-001 的 D_2O 溶液使得 ICG-001 达到 $5 \mu\text{M}$ 和 $15 \mu\text{M}$ 的浓度。将如此制备的溶液作为 NMR 样品,用于 NMR 分析。在 NMR 分析中进行测定、解析,获得 X 轴表示 C-13 数据、Y 轴表示 N-15 数据的 2D 光谱。

[0119] 将 CBP1-111 的结果示于图 4,将共存有 $5 \mu\text{M}$ 的 ICG-001 的 CBP1-111 的结果示于图 5,将共存有 $15 \mu\text{M}$ 的 ICG-001 的 CBP1-111 的结果示于图 6。结果, CBP1-111 显示典型

的天然变性蛋白质的峰（参照图 4），通过 ICG-001 的添加可见峰的变化（参照图 5-6）。由该结果，在 CBP1-111 与 ICG-001 之间观察到明显的相互作用。

[0120] 产业上的可利用性

[0121] 本发明提供与天然变性蛋白质的不规则序列区相结合的化合物、含有该化合物的天然变性蛋白质的活性调节剂、含有该化合物的药物和对该化合物进行筛选的方法。本发明由于提供了一种化合物，该化合物通过与天然变性蛋白质相结合改变了不规则序列结构域的结构、使得该蛋白质变得无法与在自然状态下应该结合的协同蛋白相结合、从而可特异地调节自然状态下发生的生物体反应，因而有用。进而，本发明可提供基于新型机理的划时代的药物。

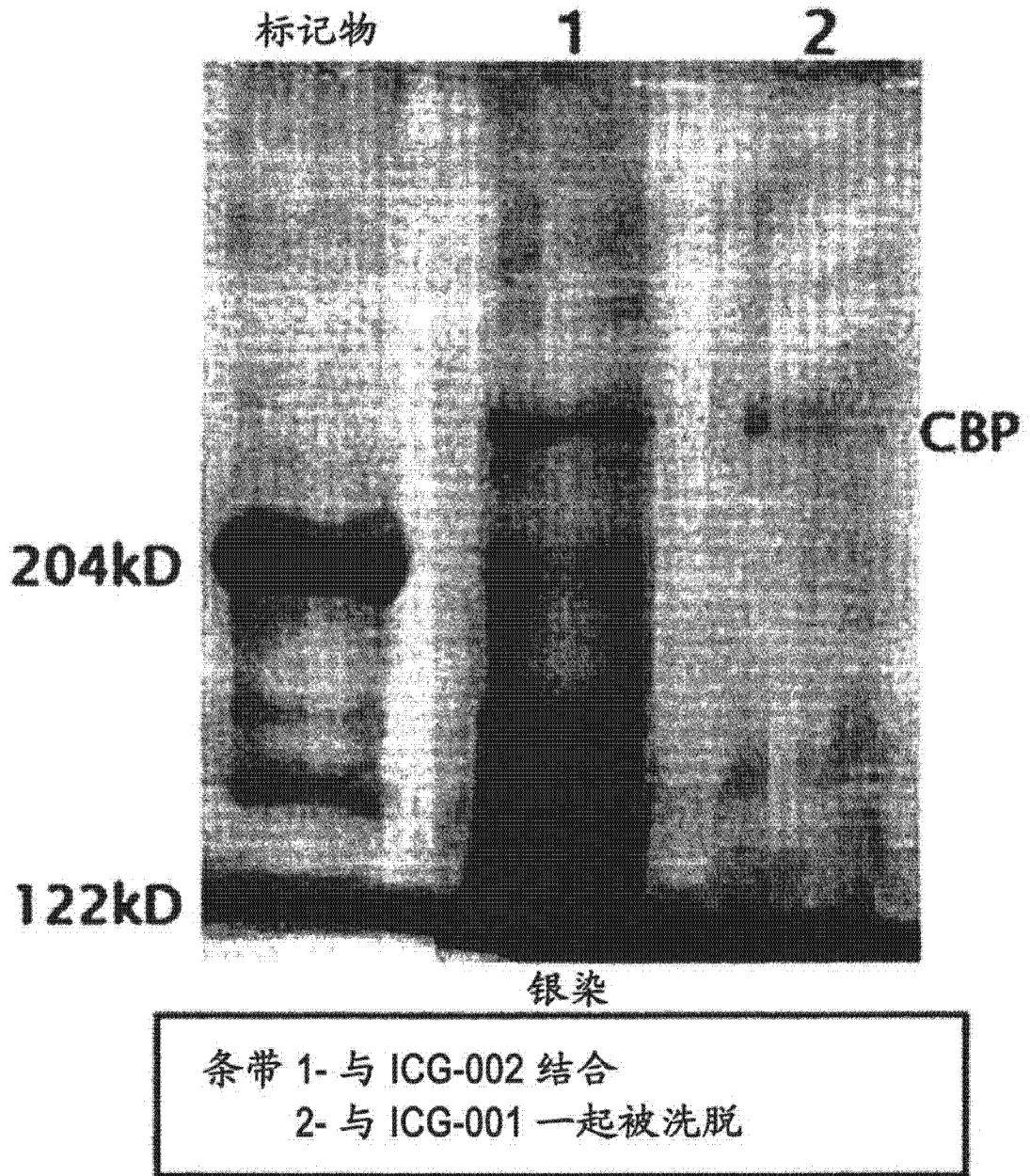


图 1

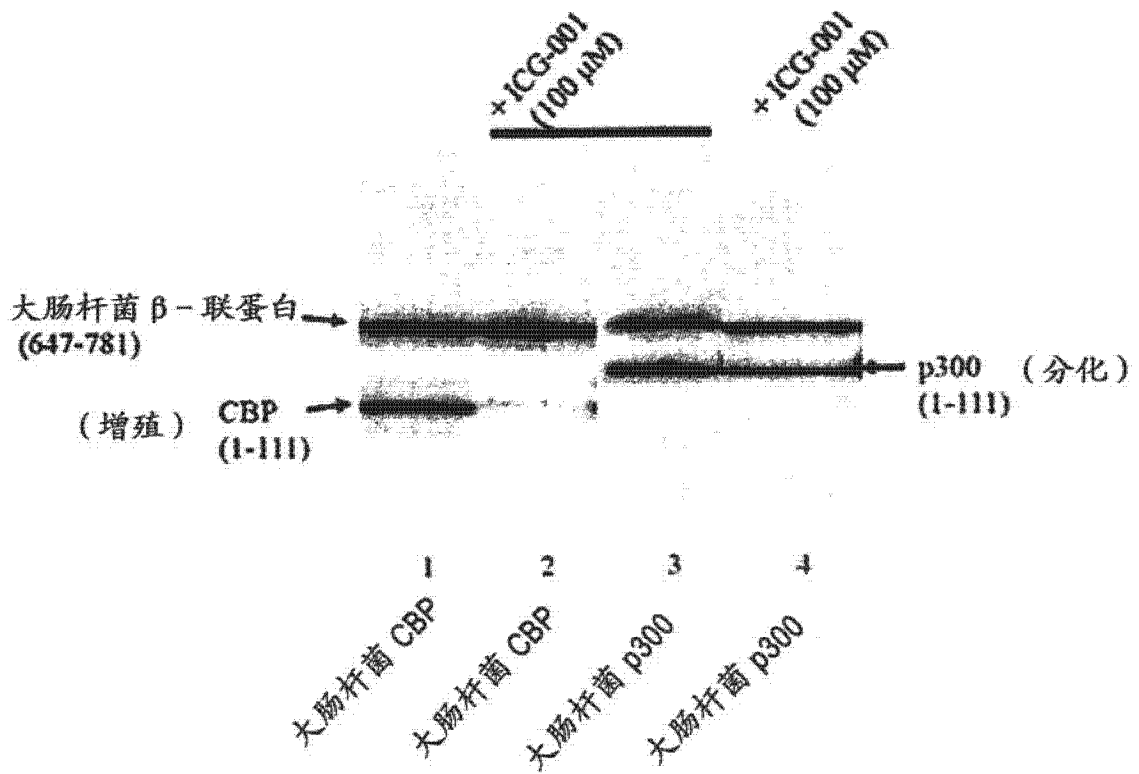


图 2

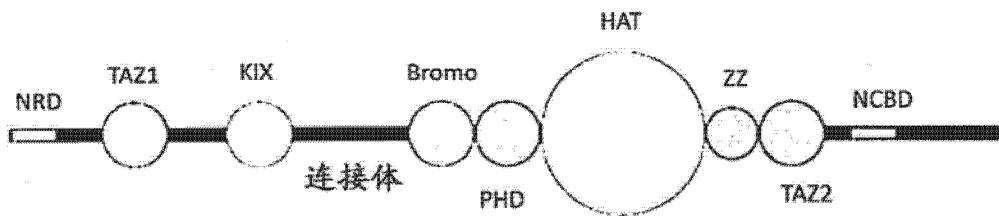


图 3

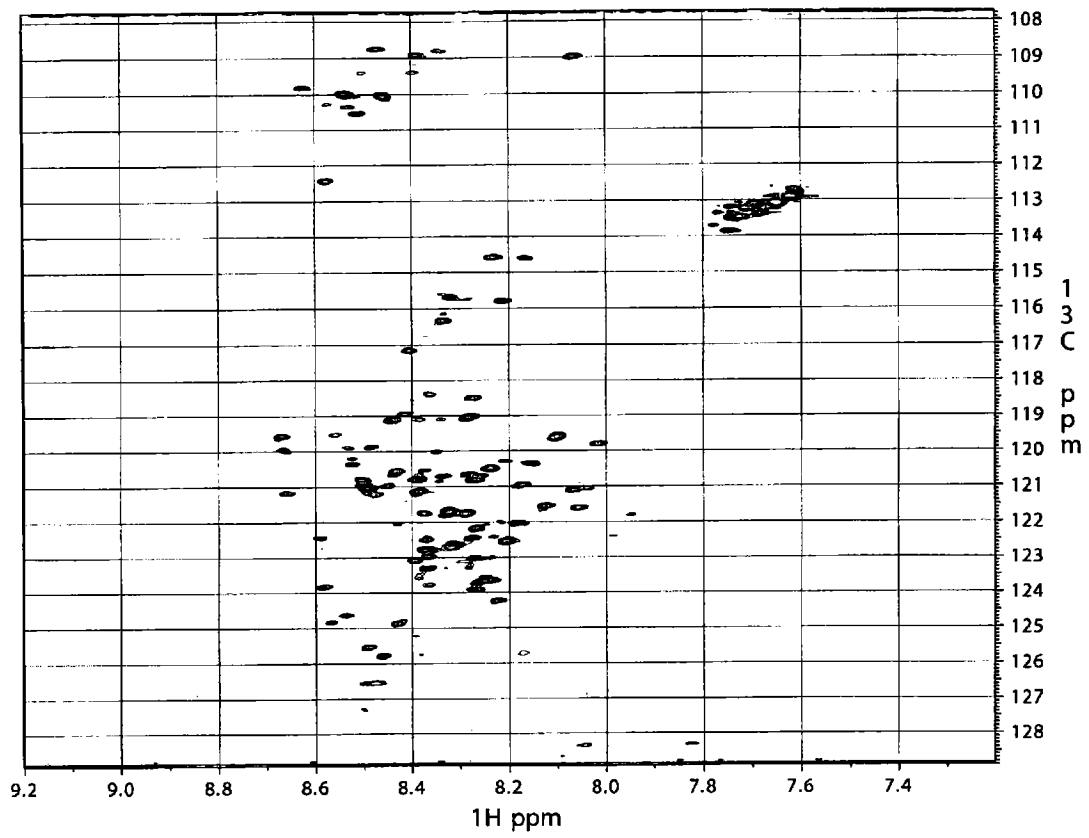


图 4

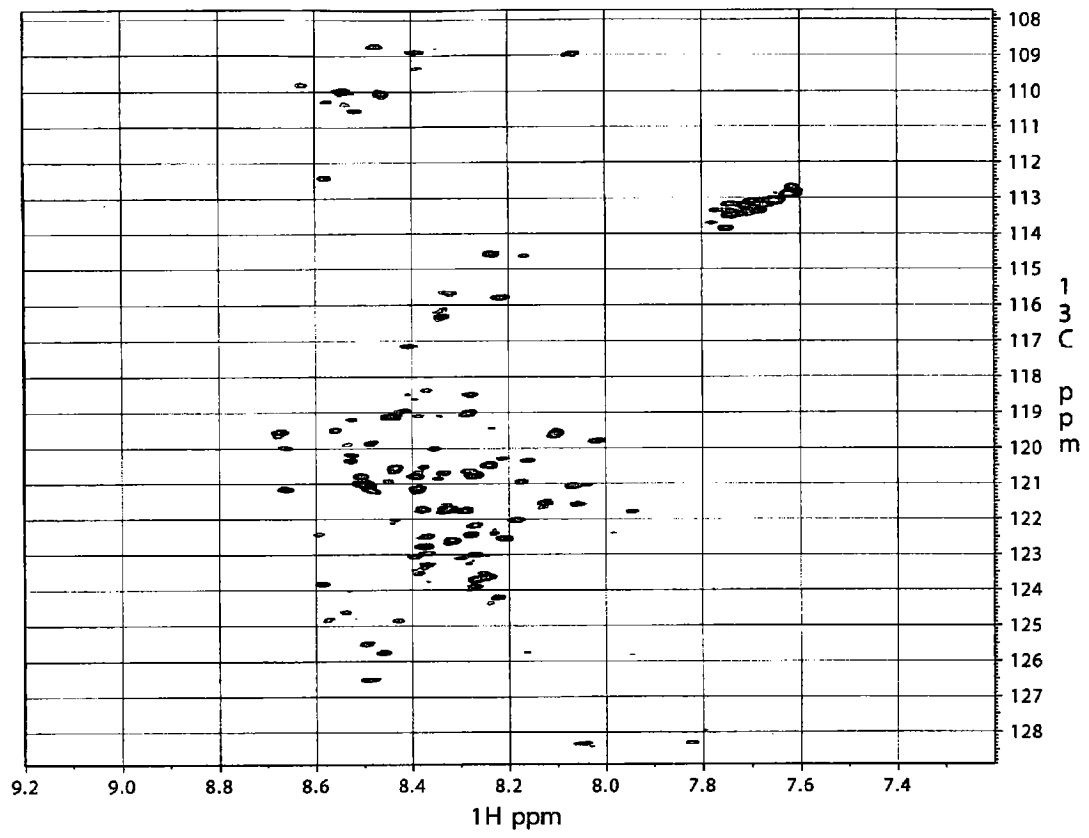


图 5

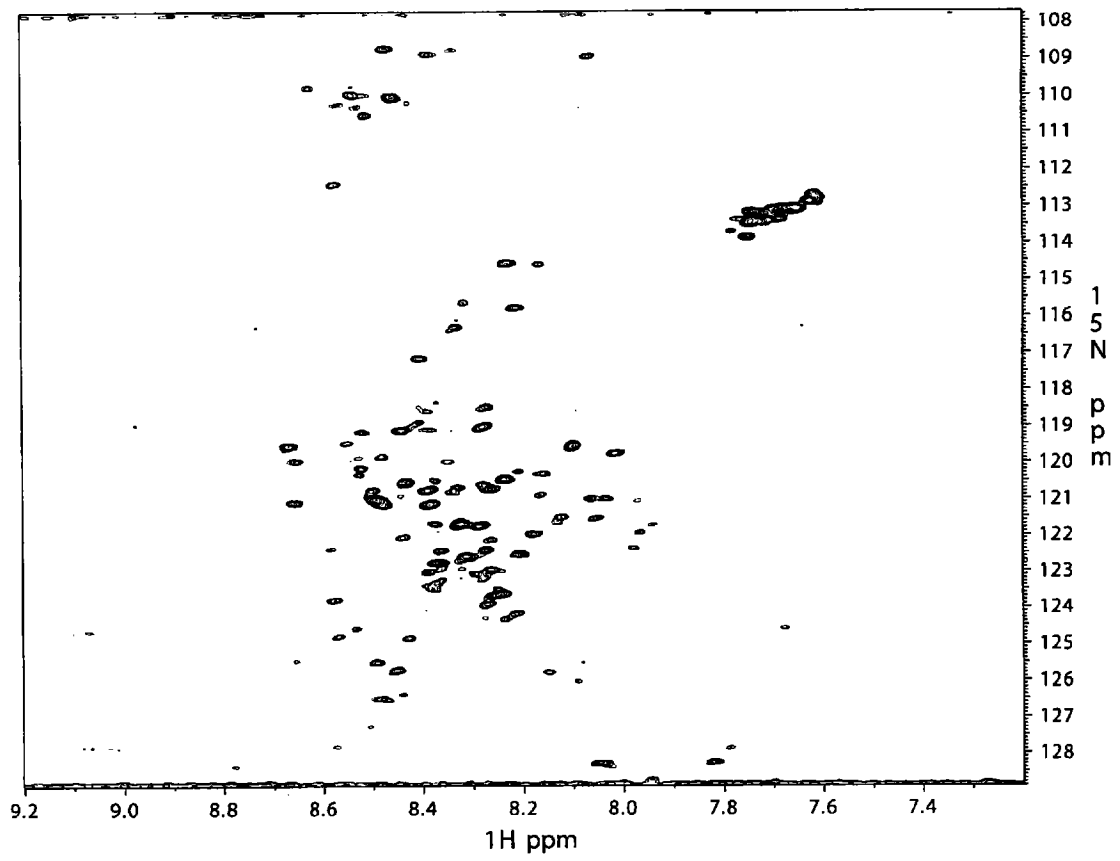


图 6

专利名称(译)	与天然变性蛋白质结合的化合物及其筛选方法		
公开(公告)号	CN102906566A	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN201180008060.2	申请日	2011-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社棱镜生物实验室		
申请(专利权)人(译)	株式会社棱镜生物实验室		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社棱镜生物实验室		
[标]发明人	小路弘行		
发明人	小路弘行		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	G01N2500/02 G01N2500/04 G01N33/6872		
代理人(译)	杨宏军		
优先权	2010022622 2010-02-03 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

对于以转录因子为首的具有多个不规则序列的蛋白质进行了调整蛋白质-蛋白质相互作用的低分子化合物的筛选，但几乎无法获得具有充分活性的低分子化合物。本发明人发现在调整天然变性蛋白质与协同蛋白的相互作用的蛋白质的筛选中，通过着眼于不规则序列进行筛选、进而从具有拟肽骨架且具有肽侧链或与其相类似侧链的拟肽化合物中选择候选化合物，可以高效地选择调整天然变性蛋白质活性的化合物，进而完成了本发明。

