

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-514891

(P2004-514891A)

(43) 公表日 平成16年5月20日(2004.5.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 Z C C Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15 Z	
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 117 頁)

(21) 出願番号	特願2002-544662 (P2002-544662)	(71) 出願人	500586635 サネシス ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ, オイス ター ポイント ブールバード 341
(86) (22) 出願日	平成13年11月20日 (2001.11.20)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月20日 (2003.5.20)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044036	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/042773		
(87) 国際公開日	平成14年5月30日 (2002.5.30)		
(31) 優先権主張番号	60/252,294		
(32) 優先日	平成12年11月21日 (2000.11.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

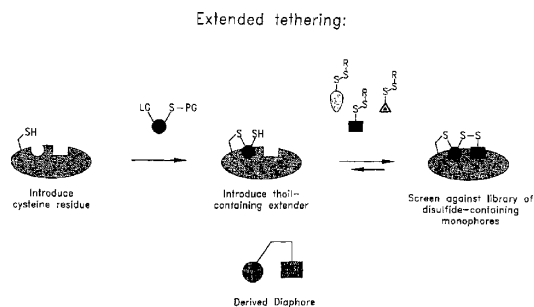
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リガンドの迅速な同定のための拡張されたテザー化アプローチ

(57) 【要約】

本発明は、標的分子に対する結合パートナーの迅速な同定および特徴付けのための、および改善された結合親和性を有する結合パートナーを提供するための方法に関する。より詳細には、本発明は、標的分子に互いに近くで結合する少なくとも2つの結合パートナーの迅速な同定のための、改善された係留方法に関する。

本発明は、拡張されたテザー化アプローチを使用することによる、標的分子上の異なる部位に対して固有の結合親和性を有するリガンドを迅速かつ確実に同定するための戦略を記載する。このアプローチは、低分子エキステンダー (SME) の設計に基づき、このSMEは、可逆的または不可逆的な共有結合を介して、目的の第1の部位または第1の部位付近で標的分子(TM)にテザー化(繋がれ)され、そしてTM上の目的の第2の部位に対する親和性についてスクリーニングされる有機低分子と反応性である、化学反応基を有する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロセスであって、以下：

(i) 標的生物学的分子 (T B M) を提供する工程であって、該 T B M は、該 T B M 上の目的の第 1 の部位付近に反応性の求核剤を含むかまたは含むように改変されている、工程；

(i i) (i) 由来の T B M を、第 1 の官能基および第 2 の官能基を有する低分子エキステンダーと接触させる工程であって、該第 1 の官能基は、該 T B M 上の求核剤と反応性である、工程；

(i i i) 該 T B M 上の求核剤と該低分子エキステンダー上の第 1 の官能基との間で共有結合が形成されるように条件を調整する工程であって、それによって、該 T B M と該低分子エキステンダーとを含む共有結合複合体を形成し、該複合体は、該 T B M 上の目的の第 2 の部位付近に第 2 の官能基を提示する、工程；

(i v) (i i i) 由来の該複合体に有機低分子のライブラリーを接触させる工程であって、各々の分子は、(i i i) 由来の該複合体中に存在する該低分子エキステンダー上の第 2 の官能基と反応し得る官能基を有し、該工程は、該 T B M 上の目的の第 2 の部位に対する最も高い親和性を有するライブラリーのメンバーが、該複合体と化学結合を形成するような条件下で行われる、工程；および

(v) (i v) 由来の該ライブラリーのメンバーを同定する工程を包含する、プロセス。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のプロセスであって、前記低分子エキステンダー上の前記第 2 の官能基が、遊離チオールまたは保護化チオールである、プロセス。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のプロセスであって、前記工程 (i v) において、工程 (i i i) 由来の前記複合体を有機低分子のライブラリーと接触させ、該分子の各々が、遊離チオールまたは交換可能なジスルフィド連結基を有する、プロセス。

【請求項 4】

請求項 3 に記載のプロセスであって、工程 (i i i) 由来の前記複合体と前記有機低分子のライブラリーとを、チオール交換条件下で接触させ、ここで、前記 T B M 上の目的の第 2 の部位に対する最も高い親和性を有する該ライブラリーのメンバーが、該複合体とジスルフィド結合を形成する、プロセス。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のプロセスであって、前記チオール交換条件が、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール (D T T)、ジチオエリスレイトール (D T E)、メルカプトプロパン酸、グルタチオン、システアミン、システイン、トリス (カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) およびトリス (シアノエチル) ホスフィンからなる群より選択されるジスルフィド還元剤の添加から生じる、プロセス。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のプロセスであって、前記低分子エキステンダーから本質的になる分子を合成する工程をさらに包含し、ここで、前記第 1 の官能基が、もはや前記 T B M 上の求核剤と反応性でなく、前記第 2 の官能基と工程 (i) で同定された前記ライブラリーのメンバーとの間のジスルフィド結合が、異なる基で置換される、プロセス。

【請求項 7】

前記ジスルフィド結合が、アルキル基で置換される、請求項 6 に記載のプロセス。

【請求項 8】

前記分子の誘導体を合成する工程をさらに包含する、請求項 6 に記載のプロセス。

【請求項 9】

前記反応性求核剤が、チオールである、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記第1の官能基が、前記チオールと不可逆的な共有結合を形成する、請求項9に記載のプロセス。

【請求項11】

請求項9に記載のプロセスであって、工程(i)の後に、以下：

(a) チオール交換条件下で、前記TBMを有機低分子のライブラリーと接触させる工程であって、各々の分子が、交換可能なジスルフィド連結基を有し、ここで、前記目的の第1の部位に対する最も高い親和性を有するライブラリーのメンバーが、該TBMとジスルフィド結合を形成する、工程；

(b) (a)由来の該ライブラリーのメンバーを同定する工程；

(c) (b)における該ライブラリーのメンバーの誘導体を形成する工程であって、該誘導体は、第1の官能基および第2の官能基を有する低分子エキステンダーであり、該第1の官能基は、前記求核剤と反応性であり、そして該第2の官能基は、チオールまたは保護

10

化チオールである、工程

をさらに包含する、プロセス。

【請求項12】

請求項11に記載のプロセスであって、工程(a)が、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスレイトール(DTE)、メルカプトプロパン酸、グルタチオン、システアミン、システイン、トリス(カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)およびトリス(シアノエチル)ホスフィンからなる群より選択されるジスルフィド還元剤を添加することをさらに包含する、プロセス。

20

【請求項13】

前記反応性の求核剤が、ヒドロキシル(-OH)基である、請求項1~8のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項14】

請求項13に記載のプロセスであって、前記求核剤と反応性の基が、活性化カルボニル、エポキシド、アジリジン、芳香族スルホネート、ヘミアセタール、ハロメチルケトン、アリールアシルオキシメチルケトン、ジスルフィド、チオスルホネート、およびチオスルフェートからなる群より選択される、プロセス。

【請求項15】

請求項14に記載のプロセスであって、該活性化カルボニルが、アルデヒド、ケトン、エステルまたはアシルハライドの形態である、プロセス。

30

【請求項16】

請求項15に記載のプロセスであって、前記活性化カルボニルが、ハロメチルケトン、アリールアシルオキシメチルケトンおよびチオエステルからなる群より選択される、プロセス。

【請求項17】

前記反応性の求核剤が、アミンである、請求項1~8のいずれか1項に記載のプロセス。

【請求項18】

前記同定する工程が、質量分析を含む、請求項1~17のいずれか1項に記載のプロセス。

40

【請求項19】

請求項3または11に記載のプロセスであって、交換可能なジスルフィド連結基を有する有機低分子の前記ライブラリーの各々の分子が、システアミン部分を含む、プロセス。

【請求項20】

請求項1~19のいずれか1項に記載のプロセスであって、前記TBMが、リンパ球細胞表面レセプター、酵素、ステロイドレセプター、核タンパク質、アロステリック酵素インヒビター、凝固因子、セリン/トレオニンキナーゼおよびデホスホリラーゼ、トレオニンキナーゼおよびデホスホリラーゼ、細菌酵素、真菌酵素およびウイルス酵素、シグナル伝達分子、転写因子、DNAおよび/またはRNAの合成または分解に関連するタンパク質、免疫グロブリン、ホルモン、サイトカインレセプター、ケモカインおよびそれらのレセ

50

プター、チロシンキナーゼに対するリガンドおよびレセプター、ニューロトロフィンおよびそのリガンド、ならびに他のホルモンおよびレセプターからなる群より選択される、プロセス。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のプロセスであって、前記 T B M が、エリスロポイエチン (E P O)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) レセプター、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) レセプター、トロンボポイエチン (T P O)、インターロイキン、例えば、 I L - 2、 I L - 3、 I L - 4、 I L - 5、 I L - 6、 I L - 1 0、 I L - 1 1、 I L - 1 2、成長ホルモン、プロラクチン、ヒト胎盤ラクトゲン (L P L)、 C N T F、オンコスタチン、 R A N T E S M T P、 I L - 8、インスリン、インスリン様増殖因子 1 (I G F - 1)、上皮増殖因子 (R G F)、ヘレグリン - およびヘレグリン - 、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F)、胎盤成長因子 (P L G F)、組織増殖因子 (T G F - および T G F -)、神経成長因子 (N G F)、骨形成因子、卵胞刺激ホルモン (F S H)、黄体化ホルモン (L H)、組織壊死因子 (T N F)、アポトーシス因子 - 1 およびアポトーシス因子 - 2 (A P - 1 および A P - 2)、および m d m 2 からなる群より選択される、プロセス。

10

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載のプロセスであって、前記 T B M が、 I g E / I g E R、 Z A P - 7 0、 I c k、 s y k、 I T K / B T K、 T A C E、カテプシン S およびカテプシン F、 C D 1 1 a、 L F A / I C A M、 V L A - 4、 C D 2 8 / B 7、 C T L A 4、 T N F および T N F、 (および p 5 5 および p 7 5 T N F レセプター)、 C D 4 0 L、 p 3 8 マップキナーゼ、 I L - 2、 I L - 4、 I L - 1 3、 I L - 1 5、 R a c 2、 P K C、 I L - 8、 T A K - 1、 j n k、 I K K 2、 I L - 1 8、カスパーゼ 1、カスパーゼ 3、カスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9、 I L - 1 / I L - 1 レセプター、 B A C E、 H I V インテグラーゼ、 P D E I V、 C 型肝炎ヘリカーゼ、 C 型肝炎プロテアーゼ、ライノウイルスプロテアーゼ、トリプターゼ、 c P L A (サイトゾルホスホリパーゼ A 2)、 C D K 4、 c - j u n キナーゼ、アダプタ、例えば、 G r b 2、 G S K - 3、 A K T、 M E K K - 1、 P A K - 1、 r a f、 T R A F 1 ~ 6、 T i e 2、 E r B 1 および E r B 2、 F G F、 P D G F、 P A R P、 C D 2、 C 5 a レセプター、 C D 4、 C D 2 6、 C D 3、 T G F -、 N F - B、 I K K、 S T A T 6、ニューロキニン - 1、 P T P - 1 B、 C D 4 5、 C d c 2 5 A、 S H I P - 2、 T C - P T P、 P T P -、 L A R およびヒト p 5 3、 b a x / b c l 2 および m d m 2 からなる群より選択される、プロセス。

20

30

【請求項 2 3】

請求項 1 に記載の工程 (v) において同定されたライブラリーのメンバーを含む、分子。

【請求項 2 4】

請求項 1 に記載の工程 (i i) において使用される低分子エキステンダーの少なくとも一部をさらに含む、請求項 2 3 に記載の分子。

【請求項 2 5】

共有結合によって連結された、前記ライブラリーのメンバーおよび前記低分子エキステンダーまたはその一部を含む、請求項 2 4 に記載の分子。

40

【請求項 2 6】

前記共有結合が、ジスルフィド結合以外である、請求項 2 5 に記載の分子。

【請求項 2 7】

共有結合によって連結された、前記ライブラリーのメンバーの機能的改変体および低分子エキステンダーまたはその一部を含む、請求項 2 4 に記載の分子。

【請求項 2 8】

前記共有結合が、ジスルフィド結合以外である、請求項 2 7 に記載の分子。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1】

50

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、一般に、標的分子に対する結合パートナーの迅速な同定および特徴付けのための、および改善された結合親和性を有する結合パートナーを提供するための方法に関する。より詳細には、本発明は、標的分子上で互いに近くで結合する低分子フラグメントの迅速な同定のための、改善されたテザー化 (tethering) 方法に関する。この方法は、より高い親和性の化合物を生成するために、標的生物学的分子 (TBM) (例えば、ポリペプチドまたは他の高分子) 上に予め形成されたリンカーを介して、目的の部位付近に弱く結合する低分子リガンドの迅速な同定に特に適切である。

【0002】

10

(関連分野の説明)

薬物発見プロセスは、通常、適度な親和性のリード (K_d 約 $1 \sim 10 \mu M$) を同定するための化合物ライブラリー (代表的には、数十万のメンバー) の大量のスクリーニングから開始する。いくつかの標的は、このスクリーニングプロセスに十分に適切であるが、ほとんどは、適度な親和性のリードが得るのが困難であることから、問題となる。より弱い結合化合物を同定およびその後最適化することは、この成功率を改善するが、高い濃度でのスクリーニングは、一般に、化合物の不溶性およびアッセイの人為的結果に起因して、実用的でない。さらに、代表的なスクリーニングプロセスは、薬物設計のための特定の部位を標的とせず、高スループットアッセイが利用可能である部位のみを標的とする。最後に、多くの従来スクリーニング方法は、阻害アッセイに依存し、これは、しばしば、

20

反応性化学種または変性剤によって生じる人為的結果を受けやすい。

【0003】

Erlansonら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 97: 9367-9372 (2000) は、「テザー化 (tethering)」と呼ばれる、新しいストラテジーを最近報告した。これは、中間のジスルフィド「テザー」を使用して、タンパク質または他の高分子上の特異的に標的化された部位に低い親和性で結合する小さい (約 $250 Da$) 可溶性薬物フラグメントを、迅速かつ確実に同定する。このアプローチに従って、ジスルフィド含有分子のライブラリーを、迅速なチオール交換を促進する部分的な還元条件下で、システイン含有標的タンパク質と反応させる。分子が、たとえ、その標的タンパク質に対して弱い親和性を有する場合であっても、その分子を標的タンパク質に連結

30

するジスルフィド結合 (「テザー」) は、エントロピー的に安定化される。次いで、このジスルフィドテザー化フラグメントを、種々の方法 (質量分析法 (MS) を含む) によって同定し得、そしてそれらの親和性が、ジスルフィドテザーの除去の際に従来のアプローチによって改善され得る。PCT公開番号 WO 00/00823 (2000年1月6日公開) もまた参照のこと。

【0004】

Erlansonらのテザー化アプローチは、小さい低親和性リガンドの迅速な同定において有意な利点を提示し、そして薬物リードを生成するための強力なツールであるが、薬物候補の理論的設計を容易にするためのさらなる改善された方法の必要性が存在する。

【0005】

40

(発明の要旨)

本発明は、拡張されたテザー化アプローチを使用することによる、標的分子上の異なる部位に対して固有の結合親和性を有するリガンドを迅速かつ確実に同定するためのストラテジーを記載する。このアプローチは、低分子エキステンダー (SME) の設計に基づき、この SME は、可逆的または不可逆的な共有結合を介して、目的の第1の部位または第1の部位付近で標的分子 (TM) にテザー化 (繋がれ) され、そして TM 上の目的の第2の部位に対する親和性についてスクリーニングされる有機低分子と反応性である、化学反応基を有する。従って、SME は、複数のリガンド候補をスクリーニングして、TM 上の目的の第2の部位に対する固有の結合親和性を有するリガンドを同定するために使用される。所望の場合、さらなる SME は、目的の第2の部位に対する結合親和性を有するリガ

50

ドの正体に基づいて設計され、そしてスクリーニングを繰り返して、同じTMまたは関連するTM上の目的の同じ部位または他の部位に対する固有の結合親和性を有するさらなるリガンドを同定し得る。

【0006】

本発明の1つの局面は、低分子エキステンダー(SME)の設計に関する。この局面に置いて、本発明は、以下の工程を包含するプロセスに関する：

(i) 目的の第1の部位および第2の部位を有する標的分子(TM)を、複数の第1の小さい有機リガンド候補と接触させる工程であって、このTMは、目的の第1の部位または第1の部位付近で反応性の求核剤または求電子剤を含むかまたは含むように改変されており、この候補は、この求核剤または求電子剤と反応性の官能基を有し、この工程は、この求核剤または求電子剤と目的の第1の部位に対する親和性を有する候補との間で、可逆的な共有結合が形成されて、TM-第1のリガンド複合体を形成するような条件下で行われる、工程；

10

(ii) (i)の複合体由来の第1のリガンドを同定する工程；および

(iii) (ii)で同定された第1のリガンドの誘導体を設計して、TM上の求核剤または求電子剤と反応性の第1の官能基、および目的の第2の部位に対する親和性を有する第2のリガンドと反応性の第2の官能基を有する、SMEを提供する工程。

【0007】

本発明のこの局面の1つの実施形態において、上記工程(iii)のSMEは、それがTMの求核剤または求電子剤と不可逆的な共有結合を形成し得るように、設計される。好ましい実施形態において、TM上の反応基は、求核剤であり、好ましくは、チオール基、保護化チオール基、可逆的ジスルフィド基、ヒドロキシル基、保護化ヒドロキシル基、アミノ基、保護化アミノ基、カルボキシル基、または保護化カルボキシル基であり、そしてSME上の好ましい第1の官能基は、SN2様の付加を受け得るかまたはその求核剤とマイケル型の付加物を形成し得る基である。次いで、この様式で設計されたSMEをTMと接触させて、可逆的なTM-SME複合体を形成する。次いで、この複合体を、複数の第2の小さい有機リガンド候補と接触させ、ここで、このようか候補は、TM-SME複合体中のSMEと反応性の官能基を有する。結果として、TM上の目的の第2の部位に対する親和性を有する候補物は、TM-SME複合体と可逆的な共有結合を形成し、それによって、目的の第2の部位に対する固有の結合親和性を有するリガンドが、同定される。

20

30

【0008】

本発明の代替的な実施形態において、上記工程(iii)のSMEは、TMの求核剤または求電子剤と第1の可逆的な共有結合を形成する、第1の官能基を含むように設計される。このTM上の反応基は、好ましくは、求核剤である。好ましくは、この可逆的な共有結合は、TM上のチオール、保護化チオールまたは可逆的ジスルフィド結合で形成される、ジスルフィド結合である。次いで、この様式で設計されたSMEを、チオール交換条件下で、TMと接触させ、その後かまたはそれと同時にのいずれかで、TMを複数の第2の小さい有機リガンド候補と接触させ、各々の小さい有機リガンド候補は、遊離チオール、保護化チオールまたは可逆的ジスルフィド基を有し、ここで、TM上の目的の第2の部位に対する親和性を有するリガンド候補が、TM-SME複合体とジスルフィド結合を形成し、それによって、第2のリガンドが同定される。このプロセスは、ジスルフィド還元剤(例えば、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスレイトール(DTE)、メルカプトプロパン酸、グルタチオン、システアミン、システイン、トリス(カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)およびトリス(シアノエチル)ホスフィン)の存在下で行われ得る。

40

【0009】

特定の実施形態において、SMEは、目的の部位または目的の部位付近にチオールを有する標的生物学的分子(TBM)によって、チオールまたは保護化チオール(ジスルフィドモノフォア(monophore))を有する有機低分子をこのような分子のライブラリーから選択に基づいて設計される。この場合、本発明の豊富尾は、以下の工程を包含する

50

プロセスである：

(i) チオール交換条件下で、TBMを有機低分子のライブラリーと接触させる工程であって、このTBMは、このTBM上の目的の第1の部位または第1の部位付近でチオール、保護化チオールまたは可逆的ジスルフィド基を含むかまたは含むように改変されており、各々の有機低分子は、遊離チオールまたは可逆的ジスルフィド基（ジスルフィドモノフォア（monophore））を有し、ここで、目的の第1の部位に対して親和性を有するライブラリーのメンバーは、このTBMとジスルフィド結合を形成する、工程；

(ii) (i)由来のライブラリーのメンバー（選択されたジスルフィドモノフォア）を同定する工程；

(iii) (ii)由来のライブラリーのメンバーの誘導体を設計する工程であって、この誘導体は、第1の官能基および第2の官能基を有するSMEであり、第1の官能基は、TBM上のチオールと反応性であり、そして第2の官能基は、チオール、保護化チオールまたは可逆的ジスルフィド基である、工程。

10

【0010】

先のように、SMEは、TBMと不可逆的または可逆的な共有結合を形成する第1の官能基を含むように設計され得、そして第2のリガンドを同定するために、上記のように、低分子の特定のライブラリーにおいて、低分子リガンド候補をスクリーニングするために使用され得る。

【0011】

従って、1つの実施形態において、工程(iii)のSMEは、TBM上のチオールと不可逆的な共有結合を形成する第1の官能基を含むように設計される。この実施形態の好ましい第1の官能基は、SN2様の付加を受け得るかまたはチオールとマイケル型の付加物を形成し得る基である。次いで、この様式で設計されたSMEをTBMと接触させて、不可逆的なTBM-SME複合体を形成する。次いで、この複合体を、チオール交換条件下で、有機低分子の第2のライブラリーと接触させ、各有機低分子は、遊離チオールまたは可逆的ジスルフィド基を有し、ここで、TBM上の目的の第2の部位に対する親和性（好ましくは、最も高い親和性）を有するライブラリーのメンバー（第2のリガンド）が、TBM-SME複合体とジスルフィド結合を形成する。

20

【0012】

代替的な実施形態において、工程(iii)の低分子エキステンダー（SME）は、TBMのチオールと第1の可逆的な共有結合を形成する、第1の官能基を含むように設計される。次いで、この様式で設計されたSMEを、チオール交換条件下で、TBMと接触させ、その後かまたはそれと同時かのいずれかで、TBMを第2の有機低分子のライブラリーと接触させ、各々の有機低分子は、遊離チオールまたは可逆的ジスルフィド基を有し、ここで、TBM上の目的の第2の部位に対する親和性（好ましくは、最も高い親和性）を有するライブラリーのメンバー（第2のリガンド）が、TBM-SME複合体とジスルフィド結合を形成する。

30

【0013】

このプロセスは、ジスルフィド還元剤（例えば、上記に列挙されるジスルフィド還元剤）の存在下で行われ得る。

40

【0014】

TMまたはTBM上の目的の第1の部位または第2の部位に対するリガンド候補（ライブラリーのメンバー）の親和性の決定は、プール中の異なるライブラリーメンバー間の競合によってか、または還元剤（例えば、上記に列挙される還元剤）との比較（すなわち、力価測定）によって行われ得る。

【0015】

特定の実施形態において、本発明は、以下の工程を包含するプロセスに関する：

(i) 標的生物学的分子（TBM）を、低分子エキステンダーと接触させる工程であって、このTBMは、そのTBM上の目的の第1の部位または第1の部位付近で求核剤を含むかまたは含むように改変されており、この低分子エキステンダーは、この求核剤と反応性

50

の第1の官能基、およびチオール、保護化チオールまたは可逆的ジスルフィド基である第2の官能基を有し、それによって、TBM-低分子エクステンダー(TBM-SME)複合体を形成する、工程；

(ii)チオール交換条件下で、このTBM-SME複合体を、有機低分子のライブラリーと接触させる工程であって、各々の有機低分子(リガンド)は、遊離チオール、保護化チオールまたは可逆的ジスルフィド基を有し、ここで、目的の部位に対する親和性を有するライブラリーのメンバーは、TBM-SME複合体とジスルフィド結合を形成し、それによって、TBM-SME-リガンド複合体を形成する、工程；および

(iii)(ii)由来のリガンドを同定する工程。

【0016】

別の特定の実施形態において、本発明は、以下を包含するプロセスに関する：

(i)標的生物学的分子(TBM)を提供する工程であって、このTBMは、このTBM上の目的の第1の部位付近に反応性の求核剤を含むかまたは含むように改変されている、工程；

(ii)(i)由来のTBMを、低分子エクステンダーと接触させる工程であって、この低分子エクステンダーは、TBM上の求核剤と反応性である基を有し、そして遊離チオールまたは保護化チオールを有する、工程；

(iii)TBM上の求核剤と低分子エクステンダー上の基との間で共有結合が形成されるように条件を調整する工程であって、それによって、TBMと低分子エクステンダーとを含む共有結合複合体を形成し、この複合体は、TBM上の目的の第2の部位付近に遊離チオールまたは保護化チオールを提示する、工程；

(iv)チオール交換条件下で、(iii)由来の複合体を、有機低分子のライブラリーと接触させる工程であって、各々の分子は、遊離チオールまたは交換可能なジスルフィド連結基を有し、ここで、TBM上の目的の第2の部位に対する最も高い親和性を有するライブラリーのメンバーが、この複合体とジスルフィド結合を形成する、工程；および

(v)(iv)由来のライブラリーのメンバーを同定する工程。

【0017】

特定の実施形態において、本発明のプロセスは、各メンバーがジスルフィド結合を形成するライブラリーで行われ得る。このようなライブラリーの1例は、各メンバーがシステアミンジスルフィドを形成するライブラリーである。ライブラリーのメンバーがジスルフィドを形成する場合、還元剤対総ジスルフィドの好ましいモル比は、約1:100~約100:1であり、そしてより好ましくは、約1:1~約50:1である。

【0018】

テザー化(tethering)プロセスは、ジスルフィドライブラリーのメンバーを、TBMとまたは2以上のプール中のTBMと一度に接触させることにより、行われ得る。プールが用いられる場合、1プールにつき5~15のライブラリーメンバーを用いることが好ましい。

【0019】

全ての実施形態において、SMEおよび/またはTMもしくはTBM上の目的の部位に結合する低分子のライブラリーの正体は、例えば、質量分析法(MS)によって、または検出可能なタグによって、決定され得る。TBMに結合するライブラリーメンバーを検出するために質量分析が用いられ、プールが用いられる場合、プールの各々のメンバーは、分子量が異なり、好ましくは、約10ダルトン異なることが好ましい。TBM-ライブラリーメンバーの複合体の質量を測定することにより、または最初にこの複合体からライブラリーメンバーを遊離するか、もしくは機能的アッセイ(例えば、ELISA、酵素アッセイなど)を用いることにより同定が行われ得る。

【0020】

異なる局面において、本発明は、上記で議論された方法のいずれかにより同定された第1のリガンドおよび/または第2のリガンドを含む分子に関する。特定の実施形態において、この分子は、互いに共有結合された第1および第2のリガンドを含む。共有結合は、任

10

20

30

40

50

意の共有結合（ジスルフィド結合が挙げられるが、これに限定されない）により提供され得る。

【0021】

さらなる局面において、本発明は、このような分子を合成するための方法に関する。得られた分子は、当然のことながら、例えば、改善された特性（例えば、溶解性、バイオアベイラビリティ、親和性、および半減期）を付与するためにさらに改変され得る。例えば、ジスルフィド結合は、標準的な生物学的条件下でより大きな安定性を有するリンカーにより置換され得る。可能なリンカーとしては、アルカン、アルケン、芳香族、ヘテロ芳香族、エーテルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

（発明の詳細な説明）

（1. 定義）

他に規定されない限り、本明細書中で用いられる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り通常理解される意味と同じ意味を有する。Singletonら、*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 第2版, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、および March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure*, 第4版, John Wiley & Sons (New York, NY 1992) は、本出願において用いられる用語の多くに対する一般的ガイドを当業者に提供する。

10

20

【0023】

当業者は、本発明の実施において用いられ得る、本明細書中に記載の方法および材料と類似のまたはこれと等価な多くの方法および材料を認識する。実際に、本発明は、記載の方法および材料にはいかようにも限定されない。本発明の目的に関しては、以下の用語が、以下に記載される。

【0024】

用語「標的」、「標的分子」、および「TM」は、交換可能にかつその最も広い意味で用いられ、リガンドが固有の結合親和性を有する化学的実体または生物学的実体をいう。この標的は、分子、分子の一部、または分子の凝集物であり得る。この標的は、可逆的共有結合を介してリガンドに可逆的に共有結合し得るか、または不可逆的に共有結合（テザー（tether））し得る。標的分子の特定の例としては、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、酵素（プロテアーゼ（例えば、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、およびアスパルチルプロテアーゼ）が挙げられる）、レセプター、転写因子、レセプターに対するリガンド、増殖因子、サイトカイン、免疫グロブリン、核タンパク質、シグナル伝達成分（例えば、キナーゼ、ホスファターゼ）、アロステリック酵素調節因子など、ポリヌクレオチド、ペプチド、糖質、糖タンパク質、糖脂質、および他の巨大分子（例えば、核酸-タンパク質複合体、クロマチンもしくはリボソーム）、脂質二重層含有構造（例えば、膜）または膜に由来する構造（例えば、小胞）が挙げられる。この規定は、具体的には、以下に規定される標的生物学的分子（TBM）を含む。

30

40

【0025】

本明細書中で記載される場合、「標的生物学的分子」または「TBM」は、互いに生物学的に関連する複合体を形成し得る単一の生物学的分子または複数の生物学的分子をいい、これらの分子に対して、低分子アゴニストもしくは低分子アンタゴニストが治療的重要性を有する。好ましい実施形態において、TBMは、2以上のアミノ酸を含み、有機低分子のライブラリーのメンバーに結合するための反応基を有するか、またはこの反応基を有するように改変され得るポリペプチドである。

【0026】

単数形もしくは複数形で用いられる場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、一般に、改変されていないRNAもしくはDNA、または改変されたRNAもしくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチドまたは任意のポリデオキシリボヌクレオチドをいう。従っ

50

て、例えば、本明細書中で定義される場合、ポリヌクレオチドとしては、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域を含むDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域を含むRNA、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子（これらは、一本鎖、もしくはより代表的には、二本鎖であり得、または一本鎖領域および二本鎖領域を含み得る）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本明細書中で用いられる場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域をいう。このような領域における鎖は、同じ分子に由来してもよいし、異なる分子に由来してもよい。この領域は、これらの分子の1以上の全てを含み得、より代表的には、これらの分子のいくつかのうちの領域のみを含み得る。三重らせん領域の分子のうちの1つは、しばしば、オリゴヌクレオチドである。用語「ポリヌクレオチド」は、具体的には、1以上の改変塩基を含む、DNAおよびRNAを含む。従って、安定性または他の理由のために骨格が改変されたDNAまたはRNAは、この用語が、本明細書中で意図される限り「ポリヌクレオチド」である。さらに、異常塩基（例えば、イノシン）もしくは改変塩基（例えば、トリチル化塩基）を含む、DNAまたはRNAは、本明細書中で規定される場合、用語「ポリヌクレオチド」内に含まれる。一般に、用語「ポリヌクレオチド」は、改変されていないポリヌクレオチドの化学的に改変された形態、酵素的に改変された形態および/または代謝的に改変された形態、ならびにウイルスおよび細胞（単細胞および多細胞を含む）に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態の全てを含む。

10

【0027】

本明細書中で規定される場合「リガンド」は、標的に対する固有の結合親和性を有する実体である。このリガンドは、この標的に結合する分子、またはこの標的に結合する分子の一部であり得、このリガンドは、代表的には、有機低分子であり、この有機低分子は、標的分子に対する固有の結合親和性を有するが、他の配列特異的結合分子でもあり得る。これらの配列特異的結合分子としては、ペプチド（D-、L-、またはD-およびL-の混合物）、ペプチド模倣物、複雑な糖質、または個々のユニットもしくはモノマーの他のオリゴマー（これらは、標的に特異的に結合する）が挙げられる。用語「モノフォア（monophore）」は、用語「リガンド」と交換可能に本明細書中で用いられ、リガンドのモノマーユニットをいう。用語「ダイアフォア（diaphore）」は、ユニットを形成するように共有結合した2つのモノフォアを示し、このユニットは、標的上の2つの別個であるが、近くにある部位に結合する2つの構成的モノフォアユニットもしくはリガンドが原因で標的に対してより高い親和性を有する。個々の成分の親和性の積より大きなダイアフォアの結合親和性は、「アビディティー」といわれる。用語ダイアフォアは、ユニットが標的に共有結合されているか、標的から遊離した後別々に存在しているか否かにかかわらず、用いられる。この用語はまた、種々の誘導体もしくは標的に対する結合を増強するために導入された改変を含む。

20

30

【0028】

本明細書中で用いられる場合、標的上の「目的の部位」は、特定のリガンドが結合する部位であり、この部位は、モノマーサブユニットの特定配列（例えば、アミノ酸残基、またはヌクレオチド）を含み得、3次元構造を有し得る。代表的には、リガンドと標的分子上の目的の部位との間の分子相互作用は、非共有結合であり、水素結合、ファンデルワールス相互作用、および静電相互作用が挙げられる。ポリペプチド（例えば、タンパク質標的）の場合、目的の部位は、広範に、標的の、インピボもしくはインピトロで天然の複合体を形成する分子に対する結合に関与するアミノ酸残基を含む。

40

【0029】

「低分子」は、通常は10kDa未満の分子量であり、合成の有機化合物もしくは合成の無機化合物、ペプチド、（ポリ）ヌクレオチド、（オリゴ）糖などが挙げられるが、これらに限定されない。低分子としては、具体的には、低分子の非ポリマー性（例えば、非ペプチドもしくは非ポリペプチド）有機分子または無機分子が挙げられる。多くの製薬会社は、このような分子の広範なライブラリーを有し、このライブラリーは、本発明の拡大結

50

合アプローチを用いることにより簡便にスクリーニングされ得る。好ましい低分子としては、約300Da未満の分子量を有し、より好ましくは、約650Da未満の分子量を有する。

【0030】

本明細書中で用いられる場合、用語「テザー (tether)」は、目的の部位の近辺において標的 (本明細書中上記で規定される標的生物学的分子を含む) と可逆性または不可逆性の共有結合し得る部分を含む構造をいう。

【0031】

本明細書中で用いられる場合、句「低分子エクステンダー (Small Molecule Extender) (SME)」とは、約75ダルトンから約1,500ダルトンの分子量を有し、かつTM上の求核基または求電子基と反応性の第1の官能基、およびリガンド候補物またはリガンド候補物のライブラリーのメンバーと反応性の第2の官能基を有する有機低分子をいう。好ましくは、第1の官能基は、TBM上の求核基と反応性であり (このような求核基と不可逆性もしくは可逆性の共有結合を形成し得る)、SMEの他の末端における反応基は、遊離チオール基もしくは保護されたチオール基であるか、または遊離チオール基もしくは保護されたチオールの基の前駆体の基である。1つの実施形態において、低分子エクステンダーの少なくとも一部分は、TBM上の目的の第1の部位と非共有結合を形成し得る (すなわち、このような目的の第1の部位に対して固有の親和性を有する)。この定義内には、Cd、Hg、およびAsのような、求核基 (例えば、TBMのSH) と結合を形成し得る金属を含む有機低分子 (非ポリマー性分子を含む) が含まれる。

10

20

【0032】

本明細書中で用いられる場合、句「可逆性共有結合」とは、好ましくは、標的を変性させない条件下で切断され得る共有結合をいう。例としては、ジスルフィド、シッフ塩基、チオエステルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

リガンドを参照する場合の用語「反応基」は、リガンド候補物 (例えば、ライブラリーのメンバーまたは有機低分子化合物) との共有結合が形成され得る部位を提供する化学基または部分を記載するために用いられる。従って、反応基は、ライブラリーのメンバーと共有結合を形成して、これに対してスクリーニングされるように選択される。

30

【0034】

用語「アンタゴニスト」は、最も広範な意味で用いられ、TBMのような標的により示される生物学的活性を部分的にまたは完全にブロックするか、阻害するか、または中和する任意のリガンドを含む。類似の様式で、用語「アゴニスト」は、最も広い意味で用いられ、TBMのような標的により示される生物学的活性を (例えば、このようなTBMの機能もしくは発現、またはこのようなTBMを介するシグナル伝達の効率を特異的に変化させ、それにより、既に存在する生物学的活性を改変する (増加または阻害する) か、または新たな生物学的活性を誘発することにより) 模倣する任意のリガンドを含む。

【0035】

句「含むように改変される」または「有するように改変される」は、交換可能に用いられ、標的の変異体、改変体もしくは誘導体、または反応性求核基もしくは反応性求電子基を作製することをいい、化学的改変が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、タンパク質において、当業者は、野生型残基の代わりに、求核基もしくは求電子基を含む側鎖を有するアミノ酸残基を用いて置換し得る。別の例は、システイン残基のチオール基をアミノ基に変換することである。

40

【0036】

本明細書中で用いられる場合、用語「反応性求核基」とは、標的 (例えば、TBM) を変性または損傷させない条件下で別の分子上の適合性官能基と共有結合を形成し得る求核基をいう。最も関連する求核基は、チオール、アルコール、活性化カルボニル、エポキシド、アジリジン、芳香族スルホネート、ヘミアセタール、およびアミンである。同様に、本

50

明細書中で用いられる場合、用語「反応性求電子基」とは、好ましくは、標的（例えば、TBM）を変性させない、そうでなければ損傷させない条件下で、別の分子上の適合性官能基と共有結合を形成し得る求電子基をいう。最も関連する求電子基は、イミン、カルボニル、エポキシド、アジリジン、スルホネート、およびヘミアセタールである。

【0037】

標的（例えば、TBM）上の「目的の第1の部位」とは、SMEの少なくとも一部分が反応性求核基もしくは反応性求電子基に共有結合した場合、SMEの少なくとも一部分により接触され得る部位をいう。目的の第1の部位は、SMEと非共有結合を形成する能力を有してもよいし、このような能力を有さなくてもよい。

【0038】

本明細書中で用いられる場合、句「求核基と反応性の基」、「求核反応基」、「求電子基と反応性の基」、および「求電子反応基」とは、TM（例えば、TBM）上の求核基/求電子基と、TM（例えば、TBM）を変性させないか、そうでなければ損傷させない条件下で共有結合を形成し得るSME上の官能基をいう。

【0039】

本明細書中で用いられる場合、用語「保護されたチオール」とは、共有結合を形成する基もしくは分子と既に反応しているチオールをいい、この共有結合により、チオール基が反応性でなくなり、保護されたチオールを脱保護して、遊離のチオールを再生し得る。

【0040】

本明細書中で用いられる場合、句「条件を調節する」とは、標的（例えば、TBM）を、リガンドと標的との間で共有結合を形成させるために必要な、任意の個々の反応条件、一連の反応条件の組み合わせ、または試薬（例えば、求核基およびSME上の求核基と反応性の基）、あるいは既に形成された共有結合を切断させるために必要な、任意の個々の反応条件、一連の反応条件の組み合わせ、または試薬に供することをいう。

【0041】

本明細書中で用いられる場合、用語「共有結合複合体」とは、SMEとTM（例えば、TBM）の結合をいい、この結合は、TM（例えば、TBM）上の求核基/求電子基を介してSME上の求核基/求電子基と反応性の基と共有結合されている複合体、および低分子エキステンダーの一部分とTM（例えば、TBM）上の目的の第1の部位を介して非共有結合されている複合体の両方である結合をいう。

【0042】

本明細書中で用いられる場合、句「交換可能なジスルフィド連結基」とは、チオール含有低分子エキステンダーを提示する共有結合複合体を用いてスクリーニングされる分子のライブラリーをいう。ここで、このライブラリーの各メンバーは、反応条件がこのようなチオール交換に好ましいように調節されている場合、共有結合複合体上に提示されたチオール基または保護されたチオール基と反応して、新たなジスルフィド結合を形成し得るジスルフィド基を含む。

【0043】

本明細書中で用いられる場合、句「目的の第2の部位に対する最高の親和性」とは、TM（例えば、TBM）上の目的の第2の部位に対してより高い熱力学的安定性を有する分子をいう。この分子は、ジスルフィド含有ライブラリーメンバーのライブラリーから優先的に選択される。

【0044】

本明細書中の分子の「機能的改変体」は、参照分子と共通した活性を有する改変体である。

【0045】

「活性な」または「活性」は、定量的な生物学的特性および/または免疫学的特性を意味する。

【0046】

(2. 標的)

10

20

30

40

50

本発明における使用が見出される標的（例えば、標的生物学的分子（TBM））としては、リガンド候補が結合し得る、分子、分子の一部、および分子の凝集体、例えば、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、酵素、レセプター、転写因子、レセプターに対するリガンド、増殖因子、免疫グロブリン、核タンパク質、シグナル伝達成分、アロステリック酵素調節因子など）、ポリヌクレオチド、ペプチド、炭水化物、糖タンパク質、糖脂質、および他の高分子（例えば、核酸-タンパク質複合体、クロマチン、またはリボソーム）、脂質二重層を含む構造（例えば、膜）、または膜に由来する構造（例えば、小胞）が挙げられるが、これらに限定されない。この標的は、種々の様式で入手され得、この様式としては、天然供給源からの単離および精製、化学合成、組換え生成、ならびにこれらの方法および類似する方法の任意の組み合わせが挙げられる。

10

【0047】

好ましい酵素標的ファミリーは、システインプロテアーゼ、アスパルチルプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、ポリメラーゼおよびインテグラーゼである。好ましいタンパク質：タンパク質標的は、4-ヘリカルサイトカイン、三量体サイトカイン、シグナル伝達分子、転写因子、およびケモカインである。

【0048】

特に好ましい実施形態において、その標的は、TBMであり、なおより好ましいのは、ポリペプチド（特に、タンパク質）である。リガンド（好ましくは、低分子有機リガンド）に結合するための標的として本明細書中で用途を見出されるポリペプチド（タンパク質を含む）としては、目的の2つ以上の結合部位を含み、かつ有機低分子または他のリガンド（例えば、ペプチド）に結合するための反応基を保有するかまたは保有するように改変され得る、事実上すべてのポリペプチド（ペプチドとも呼ばれる短いポリペプチドを含む）またはタンパク質が、挙げられる。目的のポリペプチドは、商業的にか、組換えによってか、化学合成によってか、天然供給源からの精製によってか、または他の方法によって、入手され得、そして大部分は、タンパク質（特に、特定のヒト疾患またはヒトの状態に関係するタンパク質（例えば、細胞表面可溶性レセプタータンパク質（例えば、リンパ球細胞表面レセプター）、酵素（例えば、プロテアーゼ（例えば、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、およびアスパラチルプロテアーゼ）およびチミジレートシンターゼ）、ステロイドレセプター、核タンパク質、アロステリック酵素、凝固因子、キナーゼ（セリンキナーゼおよびスレオニンキナーゼの両方）、およびデホスホリラーゼ（またはホスファターゼ（セリン/スレオニンホスファターゼまたはタンパク質チロシンホスファターゼ（例えば、PTP、特にPTP1B）のいずれか）、細菌酵素、真菌酵素、およびウイルス酵素（特に、HIVに関係する酵素、インフルエンザに関係する酵素、ライノウイルスに関係する酵素、およびRSVに関係する酵素）、シグナル伝達分子、転写因子、DNAおよび/もしくはRNAの合成または分解に関係するタンパク質、DNAおよび/もしくはRNAの合成または分解に関係する酵素、免疫グロブリン、ホルモン、種々のサイトカイン（例えば、エリスロポエチン（EPO））のレセプター、顆粒球コロニー刺激（G-CSF）レセプター、顆粒球マクロファージコロニー刺激（GM-CSF）レセプター、トロンボポエチン（TPO）、インターロイキン（例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-11、IL-12を含む）、成長ホルモン、プロラクチン、ヒト胎盤ラクトゲン（LPL）、CNTF、オンコスタチン、種々のケモカインおよびそのレセプター（例えば、RNATES、MIP、IL-8）、チロシンキナーゼの種々のリガンドおよびレセプター（例えば、インスリン、インスリン様増殖因子1（IGF-1）、上皮増殖因子（EGF）、ヘレグリン- およびヘレグリン-、血管内皮増殖因子（VEGF）、胎盤成長因子（PLGF）、組織成長因子（TGF- およびTGF-）、神経成長因子（NGF））、種々のニューロトロフィンおよびそのリガンド、他のホルモンおよびレセプター（例えば、骨形成因子、卵胞刺激ホルモン（FSH）、および黄体形成ホルモン（LH））、三量体ホルモン（組織壊死因子（TNF）を含む）、およびCD40リガンド、アポトーシス因子-1（AP-1）および

20

30

40

50

アポトーシス因子 - 2 (A P - 2)、p 5 3、b a x / b c l 2、m d m 2、カスパーゼ、ならびにこれらと 2 0 % 以上の配列同一性を共有するタンパク質およびレセプターである。

【 0 0 4 9 】

ヒトの炎症標的および免疫標的の重要な群としては、I g E / I g E R、Z A P - 7 0、l c k、s y k、I T K / B T K、T A C E、カテプシン S およびカテプシン F、C D 1 1 a、L F A / I C A M、V L A - 4、C D 2 8 / B 7、C T L A 4、T N F および T N F、(ならびに p 5 5 T N F レセプターおよび p 7 5 T N F レセプター)、C D 4 0 L、p 3 8 m a p キナーゼ、I L - 2、I L - 4、I L - 1 3、I L - 1 5、R a c 2、P K C、I L - 8、T A K - 1、j n k、I K K 2 および I L - 1 8 が、挙げられる。 10

【 0 0 5 0 】

なお他の重要な特定の標的としては、カスパーゼ 1、カスパーゼ 3、カスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9、I L - 1 / I L - 1 レセプター、B A C E、H I V インテグラーゼ、P D E I V、C 型肝炎ヘリカーゼ、C 型肝炎プロテアーゼ、ライノウイルスプロテアーゼ、トリプターゼ、c P L A (細胞質ゾルホルホリパーゼ A 2)、C D K 4、c - j u n キナーゼ、アダプター (例えば、G r b 2)、G S K - 3、A K T、M E K K - 1、P A K - 1、r a f、T R A F 1、T R A F 2、T R A F 3、T R A F 4、T R A F 5、T R A F 6、T i e 2、E r b B 1 および E r b B 2、F G F、P D G F、P A R P、C D 2、C 5 a レセプター、C D 4、C D 2 6、C D 3、T G F -、N F - B、I K K、S T A T 6、ニューロキニン - 1、P T P - 1 B、C D 4 5、C d c 2 5 A、S H I P - 2、T C - P T P、P T P -、L A R およびヒト p 5 3、b a x / b c l 2 および m d m 2 が、挙げられる。 20

【 0 0 5 1 】

目的の標的 (例えば、T B M) は、その標的上の目的の部位に対する固有の親和性を有するリガンドと可逆的または不可逆的な共有結合を形成することができる反応性基をその標的が保有するかまたは保有するように改変されるように、選択される。例えば、多くの標的が、リガンド (例えば、有機低分子ライブラリーのメンバー) が共有結合され得る反応性基 (例えば、アミン基、チオール基、アルデヒド基、ケトン基、ヒドロキシル基など) を天然に保有する。例えば、ポリペプチドは、しばしば、化学的反応性側鎖を有するアミノ酸 (例えば、システイン、リジン、アルギニンなど) を有する。さらに、合成技術により、現在では、例えば、自動ペプチド合成機または自動核酸合成機を使用して、目的の所定部位に化学的反応性基を保有する生物学的標的分子を合成することが、可能である。このように、化学的反応基が、自動合成の間に、標的 (例えば、T B M) 中に合成により導入され得る。 30

【 0 0 5 2 】

1 つの特定の形態において、その標的は、少なくとも 1 つの第 1 反応性基を含み、この第 1 反応性基は、その標的がポリペプチドである場合は、そのポリペプチドのシステイン残基と結合されても結合されなくてもよく、そして好ましくは、選択されるテザー (t e t h e r) が遊離チオール基または保護されたチオール基 (下記を参照のこと) である場合に、そのポリペプチドのシステイン残基と結合される。その標的は、好ましくは、限定数のみの遊離チオール基または保護されたチオール基 (好ましくは、約 5 個以下のチオール基、より好ましくは、約 2 個以下のチオール基、より好ましくは、1 個以下のチオール基) を含むかまたは含むように改変されるが、より多くの遊離チオール基を有するポリペプチドもまた、用途を見出される。目的の標的 (例えば、T B M) はまず、所望の数のチオール基をその標的がすでに保有しているかまたは保有するように改変され得るように、入手または選択され得る。 40

【 0 0 5 3 】

その標的がポリヌクレオチドである場合、テザーは、例えば、そのポリヌクレオチドに、任意の環外アミンまたは任意のビニル炭素の塩基 (例えば、ピリミジンの 5 位または 6 位 50

、プリン⁸位または²位)、^{5'}炭素または^{3'}炭素、糖リン酸骨格、またはヌクレオチド間リン原子にて、結合され得る。しかし、テザーはまた、他の位置(例えば、チミジンまたはウラシルの⁵位)にも導入され得る。二本鎖DNAの場合、例えば、テザーは、目的部位の近くではあるが立体障害を生じるほどには近くなく、主溝または副溝に位置され得る。上記立体障害は、目的部位での標的へのリガンドの結合を妨げ得る。

【0054】

当業者は、標的(例えば、目的のポリペプチド)を改変して、遊離チオール基を含むリガンド酵素への共有結合に利用可能な所望の数の遊離チオール基をその標的が保有するようにするために慣用的に使用され得る、種々の組換え技術、化学技術、合成技術、および/または他の技術に十分に気付く。そのような技術としては、例えば、標的ポリペプチドをコードする核酸配列を部位特異的変異誘発して、その核酸配列が異なる数のシステイン残基を含むポリペプチドをコードするようにすることが、挙げられる。特に好ましいのは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を使用する部位特異的変異誘発である(例えば、1987年7月28日発行の米国特許第4,683,195号;およびCurrent Protocols In Molecular Biology、第15章(Ausubelら編、1991)を参照のこと)。他の部位特異的変異誘発技術もまた、当該分野で周知であり、そして例えば、以下の刊行物中に記載される: Ausubelら(前出)第8章; Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(Sambrookら、1989); Zollerら、Methods Enzymol. 100: 468-500(1983); ZollerおよびSmith、DNA 3: 479-488(1984); Zollerら、Nucl. Acids Res.、10: 6487(1987); Brakeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646(1984); Botsteinら、Science 229: 1193(1985); Kunkelら、Methods Enzymol. 154: 367-82(1987)、Adelmanら、DNA 2: 183(1983); ならびにCarterら、Nucl. Acids Res.、13: 4331(1986)。カセット変異誘発(Wellsら、Gene 34: 315[1985])および制限選択変異誘発(Wellsら、Philos. Trans. R. Soc. London Ser A 317: 415[1986])もまた、使用され得る。

【0055】

1つより多くのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列改変体が、1つの様式またはいくつかの様式で生成され得る。それらのアミノ酸がそのポリペプチド鎖中でともに近くに位置する場合、それらのアミノ酸は、所望のアミノ酸置換すべてをコードする1つのオリゴヌクレオチドを使用して、同時に変異され得る。しかし、それらのアミノ酸が互いからいくらかの距離に位置する(例えば、10アミノ酸より大きく隔てられている)場合、所望の変化すべてをコードする単一オリゴヌクレオチドを生成することが、より困難である。代わりに、2つの代替法のうちの1つが、使用され得る。第1の方法において、置換されるべきアミノ酸各々について、別個のオリゴヌクレオチドが生成される。その後、それらのオリゴヌクレオチドが、一本鎖テンプレートDNAに同時にアニールされ、そのテンプレートから合成される第2鎖DNAが、所望のアミノ酸置換すべてをコードする。別の方法は、所望の変異体を生成するために2回以上の突然変異を包含する。

【0056】

新しい反応性基の供給源(例えば、システイン)が、その標的内のいずれの場所にも配置され得る。例えば、タンパク質-タンパク質相互作用に重要であることが公知である領域中のタンパク質の表面上にシステインが導入される場合、この表面に結合してその表面をブロックする、低分子が選択され得る。

【0057】

以下の表は、本発明に従って使用され得る、標的生物学的分子(TBM)を例証する。

【0058】

【表1】

10

20

30

40

50

標的の表

免疫学	適応症状
IL-6 B7/CD28 CD4 CD3 CD2 c-maf CD11a/LFA1 (ICAM)	炎症 移植片拒絶 免疫抑制 免疫抑制 腎移植 炎症/免疫抑制 免疫抑制/炎症

酵素	適応症
ホスホリパーゼA2 ZAP-70 ホスホジエステラーゼIV インターロイキン変換酵素(ICE) イノシン酸デヒドロゲナーゼ トリプターゼ CDK4 mTOR PARP(細胞死経路) ホスファターゼ Raf JNK3 MEK GSK-3 FABI(脂肪酸合成) FABH(脂肪酸合成) BACE IκB-ユビキチンリパーゼ リンホスファチジン酸アセチルトランスフェラーゼ CD26(ジペプチジルペプチダーゼIV) Akt TNF変換酵素	炎症 免疫抑制 喘息 炎症 自己免疫疾患 乾癬/喘息 癌 免疫抑制 発作 癌 癌 神経変性 癌 糖尿病 細菌性 細菌性 アルツハイマー病 炎症/糖尿病 炎症

10

20

ウイルス標的	適応症
リノウイルスプロテアーゼ バラインフルエンザノイミターゼ HIV融合gp41 C型肝炎ヘリカーゼ G型肝炎ヘリカーゼ	一般的な風邪 風邪/獣医学的用途 HIV感染/処置 肝炎 肝炎

30

タンパク質-タンパク質標的	適応症
ErbBレセプター ニューロキニン-1 IL-9 FGF PDGF TIE2 NFIB二量体化 組織因子/因子VII セレクチン TGFβ アンジオポエチン1 APAF-1/カスパーゼ9 CARD Bcl-2	癌 炎症、片頭痛 喘息 新脈管形成 新脈管形成 新脈管形成 炎症 心疾患 炎症 新脈管形成 新脈管形成 発作 癌

40

7回膜貫通	適応症
IL-8 ランテス CCケモカインレセプター GPR14/ウロテンシン オレキシンレセプター C5aレセプター ヒスタミンH3レセプター CCR5	発作、炎症 炎症、片頭痛 喘息 新脈管形成 食欲 敗血症/クローン病 アレルギー HIV付着

【 0 0 5 9 】

【 表 2 】

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造の参考文献
BACE	1FKN	GB AAF13715	Hong, L. et al., Science. 290(5489):150-3 (2000).
カスパーゼ1	1BMQ	SWS P29466	Okamoto, Y., et al., Chem Pharm Bull (Tokyo), 47(1):11-21 (1999).
カスパーゼ4	なし	SWS P49662	NA
カスパーゼ5	なし	SWS P51878	NA
カスパーゼ3	1CP3	SWS P42574	Mittl, PR, et al., J Biol Chem, 272(10):6539-47(1997).
カスパーゼ8	1I4E, 1QTN	SWS P08160; GB BAB32555	Xu, G., et al., Nature, 410(6827):494-7 (2001).
カスパーゼ9	3YGS	SWS P55211	Qin, H., et al., Nature, 399(6736):549-57 (1999).
RHV Prot	1CQQ	SWS P04936	Matthews, D., et al., 96(20):11000-7 (1999).
カテプシンK	1MEM	SWS P43235	McGrath, ME, et al., Nat Struct Biol, 4(2):105-107 (1997).
カテプシンS	1BXF (モデル)	SWS P25774	Fengler, A., et al., Protein Eng, 11(11):1007-13(1998).
トリプターゼ	1A0L	SWS P20231	Pereira, P. J. et al., Nature, 392(6673):306-11 (1998).
HCV Prot	1A1R, 1DY9	SWS Q81755	Di Marco, et al., J Biol Chem. 275(10):7152-7(2000).
CD26	なし	SWS P27487	NA
TACE	1BKC	GB U69612	Maskos, K., et al., PNAS, 95(7):3408-12 (1998).
ZAP-70	なし	SWS P43403	NA
p38 MAP	1P38	SWS P47811	Wang, Z., et al., PNAS, 94(6):2327-32 (1997).
CDK-4	なし	SWS Q9XTB6	NA
c-jun キナーゼ	NA	SWS P45983 (C-Jun キナーゼ1)	NA
	NA	SWS P45984 (C-Jun キナーゼ2)	NA
	1JNK	SWS P53779 (C-Jun キナーゼ3)	NA
GSK-3	NA	SWS P49840 (GSK- 3A)	NA
	NA	SWS P49841 (GSK- 3B)	NA
AKT	なし	SWS P31749	NA
MEK	なし	SWS Q02750	NA
Raf	なし	SWS P04049	NA
TIE-2	なし	SWS Q02763	NA
ILK	なし	SWS Q13418	NA
IκB	NA	SWS O15111 (IκBKinase)	NA
	NA	SWS O14920 (IκBKinBeta)	NA
Jak1	なし	SWS P23458	NA
Jak2	なし	SWS O60674	NA
Jak3	なし	SWS P52333	NA
Tyk2	なし	SWS P29597	NA
EGF キナーゼ	Vasc.参照		

10

20

30

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造の参考文献
	血管内皮増殖因子レセプター (VEGFR) およびEGFR (両方ともチロシンキナーゼ活性を有する(下記))		
VEGFR2/KDR キナーゼ	NA	SWS P35968	NA
EGFR	NA	SWS P00533	NA
TC-PTP	NA	SWS P17706	NA; T細胞タンパク質チロシンホスファターゼ
CDC25A	NA	SWS P30304	NA
CDC25A CDK	NA	GB O14757 (CHK1)	NA
CD45	NA	SWS P08575	NA
PTP α	NA	SWS P18433	NA
pol III (PolRIIA)	NA	SWS O14802	NA; DNA指向性RNAポリメラーゼIII
mur-Dリガーゼ	NA	GB O14802 (E. coli)	NA
	NA	SWS P14900 (E. Coli)	NA
SHP	NA	SWS Q15466	NA
PTP-1B	1PTP	SWS P00760	Finer-Moore, JS, et al., Proteins,12(3):203-22(1992).
SHIP-2	なし	SWS Q9R1V2	NA
MEKK-1	NA	SWS Q13233	NA
PAK-1	NA	SWS Q13153	NA
ICAM-1	NA	SWS P05362	Bella, J., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95(8):4140-5 (1998).
CD11A/LFA-1	NA	SWS P20701	Qu, A., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 92(22):10277-81 (1995).
TAF1	UNSURE	UNSURE (以下を参照)	UNSURE
	NA	SWS Q99142 (?? タバコタンパク質)	NA; タバコ腫瘍活性化因子
	NA	GB AAB30018	NA; 腫瘍由来接着因子
	NA	GB D45198	NA; テンプレート活性化因子
HIVインテグラーゼ	1BL3 (2.0)	SWS P12497	Maignan, S., et al., J Mol Biol, 282(2):359-68 (1998).
	1EXQ	SWS P04585	Chen, J. C-H., et al., PNAS USA, 97(15):8233-8 (2000).
	NA	SWS O56380	NA
	1HYZ	SWS O56381; GB AAC37875	Molteni, V., et al., Acta Crystallogr D Bio Crystallog., 57:536-44 (2001).
	1HYV	GB AAC37875	Molteni, V., et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 57(Pt 4):536-44 (2001).
	NA	SWS O56382	NA
	NA	SWS O56383	NA
	NA	SWS O56384	NA
	NA	SWS O56385	NA

10

20

30

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造の参考文献
HCVヘリカーゼ	1N13, 1DY9, 他	SWS Q81755 (1DY9) (インテグラーゼ)	Di Marco, S., et al., J Biol Chem., 275(10):7152-7 (2000).
	1HEI	SWS P2664 (ヘリカーゼ)	Yao, N., et al., Nat Struct Biol, 4(6):463-7 (1997).
インフルエンザノイロミダーゼ	1A4G; 多い	SWS P27907	Taylor, N., et al., J Med Chem, 41(6):798-807 (1998).
PDE-IV	1FOJ (PDE4B2B)	SWS Q07343	Xu, R. X., et al., Science., 288(5472):1822-5 (2000).
cPLA-2	1CJY	SWS P47712	Dessen, A., et al., Cell., 97(3):349-60 (1999).
IL-2	NA (ハウス内)	SWS P01585	NA
IL-4	1HIK (アホ)	SWS P05112 (2.60)	Muller, T., et al., J Mol Biol, 247(2):360-72 (1995).
	1IAR (複合体)	SWS P05112 (2.30) **	Hage, T., et al., Cell., 97(2):271-81 (1999).
IL-4R	1IAR	SWS P24394	Hage, T., et al., Cell., 97(2):271-81 (1999).
IL-5	1HUL	SWS P05113	Milburn, M. V., et al., Nature, 363(6425):172-6 (1993).
IL-6	1I1R (ウイルスIL-6)	GB AAB62676 (2.6)	Chow, D., et al., Science, 291(5511):2150-5 (2001).
	1ALU	SWS P05231 (1.9)	Somers, W., et al., EMBO J, 16(5):989-97 (1997).
IL-7	1IL7 (モデル)	SWS P13232	Cosenza, L., et al., Protein Sci., 9(5):916-26 (2000).
IL-9	なし	SWS P15248	NA
IL-13	1GA3 (NMR)	SWS P35225	NA
TNF	1TNF	SWS P01375 (TNF-alpha)	Eck, MJ, et al., J Biol Chem, 264(29):17595-605 (1989).
CD-40 L	1ALY	SWS P29965	Karpusas, M., et al., Structure, 3(12):1426 (1995).
OPGL	なし	SWS O14788	NA
BAFF	なし	SWS Q9Y275	NA
TRAIL	1DG6 (1.30)	GB AAC50332	Hymowitz, S. G., et al., Biochemistry, 39(4):633-40 (2000).
	1DU3 (2.2)	SWS P50591; GB AAC50332	Cha SS, et al., J Biol Chem, 275(40):31171-7 (2000).
	1D2Q	GB AAC50332	Cha and Oh, Immunity, 11(2):253-61 (1999).
IL-1	NA	SWS P01584 (IL-1 B Cytokine)	NA
IL-1R	1G0Y	SWS P14778	Vigers, GPA, et al., J Biol Chem., 275(47):36927-33 (2000).
IL-8	1QE6	SWS P10145	Gerber, N., et al., Proteins, 38(4):361-7 (2000).
RANTES-R	NA	SWS P32246	NA
RANTES	NA	GB XP_035842	NA
	NA	SWS P13501	NA; (T細胞特異的 ; RANTES タンパク質)
MCP-1	NA	SWS Q14805	NA; (中期染色体タンパク質)
MCP-1	1D0K	SWS P13500	Lubowski, J., et al., Nat Struct Biol., 4(1):64-9 (1997).
MCP-3	NA	SWS P80098	Nat Struct Biol, 4(1):64-9 (1997).
TRAF-A (TRAF-1?)	NA	SWS Q13077 (TRAF-1)	NA
TRAF-B (TRAF-2?)	NA	SWS Q12933 (TRAF-2)	NA

10

20

30

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造参考文献
	1D00 (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.0)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
TRAF-C (TRAF-3?)	NA	SWS Q13114 (TRAF-3)	NA
TRAF-D (TRAF-4?)	NA	GB XP_008483 (TRAF-4)	NA
TRAF-E (TRAF-5?)	NA	GB XP_010656 (TRAF-5)	NA
VEGF	1FLT	SWS P15692	Wiesmann, C., et al., Cell, 91(5):695-704 (1997).
鉍質コルチコイドレセプター	NA	SWS P08235	NA
エストロゲンレセプター	3ERD	SWS P03372	Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Cell, 95(7):927-37 (1998).
プロゲステロンレセプター	1A28	SWS P06401	Williams, S. P., Sigler, P. B, Nature, 393(6683):392-6 (1998).
NF- κ -B-1		SWS P19838	
P53	NA	SWS P04637	NA
	Y1CQ	GB AAA59989 (2.3)	Kussie, P. H., et al., Science,74(5289):948-53 (1996).
MDM2	1YCR	SWS Q00987	Kussie, P. H., et al., Science,74(5289):948-53 (1996).
STAT6	NA	SWS P42226	NA
IL4R- α	NA	SWS P24394	NA
IL6R- α	NA	SWS P08887	NA
IL6R- β 鎖	1BQU	SWS P40189	Bravo, J., Staunton, D., Heath, J. K., Jones, E. Y., EMBO J, 17(6):1665-74 (1998).
IL5R- α	NA	SWS Q01344	NA
IL7R	NA	SWS P16871	NA
IL2R- α	NA	SWS P01589	NA
IL2R- β	NA	SWS P14784	NA
HIV GP41	1AIK	SWS P19551	Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S., Cell, 89(2):263-73 (1997).
HIV GP41	1AIK	SWS P04582	Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S., Cell, 89(2):263-73 (1997).
HIV GP41		SWS P03378	
HIV GP41		SWS P03375	
HIV GP41		SWS P04582	
HIV GP41		SWS P12488	
HIV GP41		SWS P03377	
HIV GP41		SWS P05879	
HIV GP41		SWS P04581	
HIV GP41		SWS P04578	
HIV GP41		SWS P04624	
HIV GP41		SWS P12489	
HIV GP41		SWS P20871	
HIV GP41		SWS P31819	
HIV GP41		SWS Q70626	
HIV GP41		SWS P04583	
HIV GP41		SWS P19551	

10

20

30

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造参考文献
HIV GP41		SWS P05577	
HIV GP41		SWS P18799	
HIV GP41		SWS P20888	
HIV GP41		SWS P03376	
HIV GP41		SWS P04579	
HIV GP41		SWS P19550	
HIV GP41		SWS P19549	
HIV GP41		SWS P05878	
HIV GP41		SWS P31872	
HIV GP41		SWS P05880	
HIV GP41		SWS P35961	
HIV GP41		SWS P12487	
HIV GP41		SWS P04580	
HIV GP41		SWS P05882	
HIV GP41		SWS P05881	
HIV GP41		SWS P18094	
HIV GP41		SWS P24105	
HIV GP41		SWS P17755	
HIV GP41		SWS P15831	
HIV GP41		SWS P18040	
HIV GP41		SWS Q74126	
HIV GP41		SWS P05883	
HIV GP41		SWS P04577	
HIV GP41		SWS P32536	
HIV GP41		SWS P12449	
HIV GP41		SWS P20872	
c-mal	NA	GB NP_071884	NA; T-細胞分化タンパク質
	NA	GB CAA54102	NA
	NA	GB XP_017128	NA
Mal	NA	SWS P21145	NA; Tリンパ球成熟関連タンパク質
	NA	SWS P01732	NA; Tリンパ球成熟関連タンパク質抗原 T8/CD8(?)
Her-1	NA	SWS P34704	NA; C.elegans 性決定における細胞シグナル伝達
Her-2	NA	SWS P04626	NA; レセプタータンパク質-トリプシンキナーゼERBB-2
E2F-1	NA	SWS Q01094	NA
E2F-2	NA	SWS Q14209	NA
E2F-3	NA	SWS Q00716	NA
E2F-4	NA	SWS Q16254	NA
E2F-5	NA	SWS Q15329	NA
E2F-6	NA	SWS Q75461	NA
サイクリンA	1QMZ	SWS P20248	Brown, N. R., et al., Nat Cell Biol., 1(7):438-43 (1999).
mTOR/FRAP	1NSG	SWS P42345	Liang, J., et al., Acta Crystall D Biol Crystall, 55 (Pt 4):736-44 (1995).
スルビビン (Survivin)	1F3H	SWS O15392	Verdecia, M. A., et al., Nat Struct Biol., 7(7):602-8 (2000).
FGF-1	1EV2	SWS P05230	Plotnikov, A. N., et al., Cell., 101(4):413-24

10

20

30

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造の参考文献
			(2000),(ヘパリン結合増殖因子 I)
塩基性FGFレセプター-1	1FGK	SWS P11362	Mohammadi, M., et al., Cell, 86(4):577-87 (1996),(Basic FGF Rec. I)
FGF-2	1CVS	SWS P09038	Plotnikov, A. N., et al., Cell, 98(5):641-50 (1999).
FGF-3	NA	SWS P11487	NA
FGF-4	NA	SWS P08620	NA
FGF-5	NA	SWS P12034	NA
FGF-6	NA	SWS P10767	NA
FGF-7	NA	SWS P21781	NA
FGF-8	NA	SWS P55075	NA
FGF-9	1IHK	SWS P31371	Plotnikov, A. N., et al., J Biol Chem., 276(6):4322-9 (2001).
PARP	NA	SWS P09874	NA
PDGF- α	NA	SWS P04085	NA
PDGF- β	NA	SWS P01127	NA
C5aレセプター	NA	SWS P21730	NA
CCR5	NA	SWS P51681(CC Chemo R-V)	NA
GPR14/ウロテニンシン II R)	NA	SWS Q9UKP6	NA
組織因子	2HFT	SWS P13726	Muller, Y. A., et al., J Mol Biol, 256(1):144-59 (1996).
第VII因子	1JBU	SWS P08709	Eigenbrot, C., et al., Structure, 9:627 (2001).
ヒスタミン H3レセプター	NA	GB CAC39434	NA
ニューロキニン1	NA	GB SPHUB	NA
オレキシンレセプター-1	NA	SWS O43613	NA
オレキシンレセプター-2	NA	SWW O43614	NA
CD-3 δ 鎖	NA	SWS P04234	NA
CD-3 ϵ 鎖	NA	SWS P07766	NA
CD-3 γ 鎖	NA	SWS P09693	NA
CD-3 ξ 鎖	NA	SWS P20963	NA
CD-4	1CDJ	SWS P01730	Wu, H., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93(26):15030-5 (1996).
TGF- α	NA	SWS P01135	NA
TGF- β -1	NA	SWS P01137	NA
TGF- β -2	NA	SWS P08112	NA
TGF- β -3	NA	SWS P10600	NA
TGF- β -4	NA	SWS O00292	NA
GRB2	1GRI	SWS P29354 (3.1)	Maignan S, et al., Science, 268(5208):291-3 (1995).
		1ZFP	SWS P29354 (1.8) Rahuel, J., et al., J Mol Biol, 279(4):1013-22 (1998).
		1BMB	SWS P29354 (1.8) Ettmayer, P., et al., J Med Chem, 42(6):971-80 (1999).
LCK	1LKK	SWS P06239;(2nd=P07100)	Tong, L., et al., J Mol Biol, 256(3):601-10 (1996).

10

20

30

標的	PDBコード	登録番号	結晶構造参考文献
SRC	2SRC	SWS P12931	Xu, W., et al., Mol Cell., 3(5):629-36 (1999).
TRAFs ?	NA	SWS Q13077 (TRAF-1)	NA
	1CZZ (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.7)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
	1CZY (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.0)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
	1D00 (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.0)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
	NA	SWS Q12933 (TRAF-2)	NA
	1FLK (TRAF-3)	GB Q13114 (TRAF-3) (2.8)	Ni, C.-Z., et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 97(19):10395-9 (2000).
BAX/BCL-2	NA	SWS Q07812 (BAX alpha)	NA
	NA	SWS Q07814 (BAX beta)	NA
	NA	SWS Q07815 (BAX gamma)	NA
	NA	SWS P55269 (BAX delta)	NA
	NA	SWS P10415 (BCL-2)	NA
IgE	1F6A (3.5)	SWS P01854 (IgE chain C)	Garman, S. C., et al., T. S., Nature., 406(6793):259-66 (2000).
IgER	NA	SWS P06734 (IgE Fc Receptor)	NA
	1F6A (3.5)	SWS P12319 (IgE Fc Rec. alpha)	Garman, S. C., et al., T. S., Nature., 406(6793):259-66 (2000).
	1F2Q (2.4)	SWS P12319 (IgE Fc Rec. alpha)	Garman, S. C., Kinet, J. P., Jardetzky, T. S., Cell, 95(7):951-61 (1998).
	NA	SWS Q01362 (IgE FcRec. Beta)	NA
	NA	SWS P30273 (IgE FcRec. Gama)	NA
リノウイルスプロテアーゼ	NA	SWS P03303 (HRV-14 polyprot.)	NA
	NA	SWS P12916 (HRV-1B)	NA
	1CQQ	SWS P04936 (HRV-2) (1.85)	Matthews, D., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 96(20):11000-7 (1999).
	NA	SWS P07210 (HRV-89)	NA
	1C8M	SWS Q82122 (HRV-16)	Chakravarty, S., et al., to be published
B7/CD28LG/CD80	1DR9	SWS P33681	Ikemizu, S., et al., Immunity. 2000 Jan;12(1):51-60.
CD28	NA	SWS P10747	NA
APAF1	NA	SWS O14727	NA

10

20

30

(3 . 目的の部位)

広く、特定の標的（例えば、標的生物学的分子（TBM））上の「目的の部位」は、インビボまたはインビトロでその標的が自然な複合体を形成する分子にその標的が結合することに関与する残基によって、規定される。その標的が、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質である場合、目的の部位は、その標的のリガンドへの結合（通常は、非共有結合による結合）に関与するアミノ酸残基によって、規定される。

40

【 0 0 6 0 】

例えば、その標的生物学的分子が、別のタンパク質（例えば、ホルモン、サイトカイン、またはシグナル伝達に関与する他のタンパク質）への結合を介してその生物学的効果を発揮するタンパク質である場合、その標的分子は、1つ以上の他のタンパク質と、インビボで自然な複合体を形成し得る。この場合、目的の部位は、特定のタンパク質：タンパク質結合境界面に関係する重大な接触残基として規定される。重大な接触残基は、タンパク質B上のアミノ酸と直接接触するタンパク質A上のアミノ酸として規定され、かつ、アラニンに変異された場合には、直接結合アッセイまたは競合アッセイ（例えば、ELISAまたはRIA）を用いて測定すると、結合親和性が少なくとも10分の1、好ましくは少な

50

くとも20分の1に減少する、アミノ酸として規定される。ClackstonおよびWells、Science 267:383-386(1995)による、A Hot Spot of Binding Energy in a Hormone-Receptor InterfaceならびにCunninghamおよびWells, J. Mol. Biol. 234:554-563(1993)を参照のこと。タンパク質A中に同定された重大な接触残基の約4内にあるタンパク質Bのアミノ酸残基もまた、目的の部位の定義に含まれる。

【0061】

スキャンニングアミノ酸分析が、連続する配列に沿って1つ以上のアミノ酸を同定するために使用され得る。好ましいスキャンニングアミノ酸に含まれるのは、比較的小さい中性アミノ酸である。このようなアミノ酸としては、アラニン、グリシン、セリン、およびシステインが挙げられる。アラニンは、代表的には、この群に含まれる好ましいスキャンニングアミノ酸である。なぜなら、アラニンは、炭素を越える側鎖を排除し、そして改変体の主鎖立体構造を変化する可能性が小さいからである(CunninghamおよびWells、Science 244:1081-1085(1989))。アラニンはまた、代表的に好ましい。なぜなら、アラニンは、最も一般的なアミノ酸であるからである。さらに、アラニンは、埋もれた位置および露出した位置の両方において頻繁に見出される(Creighton、The Proteins(W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol. 150:1(1976))。アラニン置換が十分な量の改変体を生じない場合、等比体積(istic)アミノ酸が、

【0062】

その標的生物学的分子が酵素である場合、目的の部位としては、その酵素の結合した基質、インヒビター、アクチベーター、補因子、またはアロステリックモジュレーターと接触するかまたはこれらの約4内に存在する、アミノ酸が挙げられ得る。例として、その酵素がプロテアーゼである場合、目的の部位としては、P4からP4'までの基質結合チャネル、触媒機能に關与する残基(例えば、触媒性3つ組(triad)および任意の補因子(例えば、Zn)結合部位が、挙げられる。プロテインキナーゼについて、目的の部位としては、そのATP結合部位に加えて、(上記のような)基質結合チャネルが、挙げられる。デヒドロゲナーゼについて、目的の部位としては、その基質結合領域、ならびにNAD/NADHにより占められる部位が、挙げられる。ヒドロラーゼ(例えば、PDE4)においては、目的の部位としては、そのcAMP基質と接触するすべての残基、ならびにその触媒性二価カチオンとの結合に關与する残基が、挙げられる(Xu, R. X.ら、Science 288:1822-1825(2000))。

【0063】

アロステリック調節される酵素(例えば、グリコーゲンホスホリラーゼB)について、目的の部位としては、その基質結合領域中のすべての残基、天然のアロステリックインヒビターであるグルコース-6-リン酸と接触する残基、ならびに新規なアロステリック部位中の残基(例えば、他のインヒビター(例えば、CP320626)との結合の際に同定される残基)が挙げられる(Oikonomakos NGら、Structure Fold Des 8:575-584(2000))。

【0064】

このTBMは、目的の部位にかまたはその付近に、反応性残基を含むかまたは含むように改変されるかの、いずれかである。好ましくは、このTBMは、目的の部位にかまたはその付近に、チオール含有アミノ酸残基を含むかまたは含むように改変される。この場合、TBMが選択された後、目的の部位が算出される。一旦目的の部位が既知になると、目的の部位内またはその付近にあるどのアミノ酸残基を改変するかを決定するプロセスが、行われる。例えば、1つの好ましい改変は、目的の部位付近に位置する別のアミノ酸残基をシステイン残基に代える置換を生じる。

【0065】

10

20

30

40

50

目的の部位内またはその付近にあるどの残基を改変するかを選択は、以下の選択基準に基づいて決定される。まず、そのTBMの3次元の説明が、周知のいくつかの供給源のうちの一つから得られる。例えば、多くのTBMの3次構造が、X線結晶学実験を介して決定されている。これらのX線構造は、広範な供給源（例えば、<http://www.rcsb.org>にてインターネット上で見出され得る、Protein Databank (PDB)) から入手可能である。3次構造はまた、<http://www.psc.com>でPittsburg Supercomputer Centerに位置する、Protein Structure Database (PSdb)にて見出され得る。

【0066】

さらに、多くのタンパク質およびタンパク質複合体の3次構造が、コンピューターベースのモデリングアプローチを介して決定されている。従って、タンパク質3次元立体構造のモデルが、現在、広範に入手可能である。

【0067】

一旦そのTBMの3次元構造が既知になると、野生型または改変形態のその標的生物学的分子の構造モデルに基づく測定が、目的の部位内のアミノ酸の任意の原子からそのタンパク質表面に全体にわたり距離約10 Åについてなされる。所望の反応性基（例えば、チオール基またはチオール含有残基）を含むように改変された改変体は、目的の部位から半径約10 Å内にある、その標的生物学的分子の表面上の1つ以上の野生型アミノ酸の同定に基づく。この測定のために、目的の部位内にあるアミノ酸の任意の原子から半径約10 Å内にある少なくとも1つの原子を有する任意のアミノ酸は、チオール含有残基へと改変されることが可能な残基である。

【0068】

改変に好ましい残基は、溶媒接近可能な残基である。溶媒接近性は、標準的数値法 (Lee, B. および Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* 55: 379-400 (1971); Shrake, A. および Rupley, J. A. *J. Mol. Biol.* 79: 351-371 (1973)) または標準的分析法 (Connolly, M. L. *Science* 221: 709-713 (1983); Richmond, T. J. *J. Mol. Biol.* 178: 63-89 (1984)) を使用する構造モデルより算出され得る。例えば、潜在的システイン改変体は、Lee および Richards の方法 (Lee, B. および Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* 55: 379-400 (1971)) によって計算される場合に炭素-炭素 (CB) または硫黄-硫黄 (SG) の結合した表面面積が 21 \AA^2 より大きい場合、溶媒接近可能であるとみなされる。この値は、Creamer ら (Creamer, T. P. ら、*Biochemistry* 34: 16245-16250 (1995)) によって記載されるようなシステイン側鎖に接近可能な理論的表面面積の約33%に相当する。

【0069】

システイン、または別のチオール含有アミノ酸残基へと変異されるが骨格原子との水素結合に関係しない残基、あるいは、せいぜい1つの水素結合のみを介して骨格と相互作用する残基もまた、好ましい。その側鎖が、他の側鎖との複数 (> 1) の水素結合に関係する野生型残基はまた、より好ましくない。標準的回転異性体 (-60° 、 60° または 180° の χ_1 角) の全てが任意の他の残基のN原子、CA原子、C原子、O原子またはCB原子との好ましくない立体的接触を導入し得る改変体もまた、より好ましくない。好ましくない接触は、関係する原子のファンデルワールス半径の合計の80%未満の原子間距離として規定される。

【0070】

タンパク質の高度に可撓性の領域内にある野生型残基もまた、より好ましくない。X線データから得た構造において、高度に可撓性の領域は、骨格原子が弱い電子密度因子または高温因子 (この構造についての平均温度因子よりも4より大きい標準偏差) を有するセグメントとして規定され得る。NMRデータから得た構造において、高度に可撓性の領域は、1残基当たり5未満の実験的拘束 (距離、二面性結合およびH結合データ由来) を有す

るセグメントとしてか、またはこの集団におけるモデルの中で高度な可変性 ($> 2.0 A^2$ RMS 偏差) を示す領域として、規定され得る。さらに凹表面に隣接する凸面「ヒンジ」領域上に見出される残基はより好ましいが、凹面領域内の残基は、改変されるべきシステイン残基として好ましくない。凸面および凹面は、表面ベクター (Duncan, B. S. および Olson, A. J. *Biopolymers* 33: 219 - 229 (1993)) に基づいてか、または分子表面に沿って位置する水プロープの接近性 (Nicholls, A. ら、*Proteins* 11: 281 - 296 (1991); Brady, G. P., Jr. および Stouten, P. F. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 14: 383 - 401 (2000)) を測定することによって、計算され得る。L-アミノ酸に対してわずかに妨害される骨格コンフォメーションを有する残基 (Ramachandran, G. N. ら、*J. Mol. Biol.* 7: 95 - 99 (1963); Ramachandran, G. N. および Sasisekharahn, V. *Adv. Prot. Chem.* 23: 283 - 437 (1968)) は、システインに対する改変に好ましい標的ではない。妨害コンフォメーションは、一般に ϕ 角の陽性値を特色とする。

【0071】

他の好ましい改変体は、システインへと変異されそしてジスルフィド結合を介してアルキルテザーに結合される場合、このテザーの原子を目的の部位に指向させるコンフォメーションを有する、改変体である。一般的な2つの手順を使用して、これらの好ましい改変体を同定し得る。第1の手順では、検索は、ジスルフィド結合したシステインを位置 j に含む構造フラグメントを同定するための Protein Databank (Bernan, H. M. ら、*Nucleic Acids Research* 28: 235 - 242 (2000)) 中の独特な構造 (Hobohm, U. ら、*Protein Science* 1: 409 - 417 (1992)) から構成される。ここで、フラグメントの残基 $j-1$ 、 j および $j+1$ の骨格原子は、 $0.75 A^2$ 未満の RMSD を有する標的分子の残基 $j-1$ 、 j および $j+1$ の骨格原子上に重ねあわせられ得る。残基 i の CB 原子よりも目的の部位の任意の原子に近接する位置 j のシステイン (システインに変異された場合) にジスルフィド結合した残基の CB 原子を配置するフラグメントが同定された場合、位置 i は、好ましいとみなされる。代替の手順では、位置 i の残基は、コンピュータ上でシステインに「変異され」、そしてジスルフィド結合を介して S-メチル基でキャップされる。

【0072】

本発明の標的上の目的の部位を同定するためのさらなる詳細は、同時係属出願番号 60/310,725 号 (2001年8月7日出願) (この開示全体が本明細書中に明示的に参考として援用される) に提供される。

【0073】

(4. 低分子エキステンダー (SME))

(A) 静的 SME

本発明の1つの実施形態において、SME は、TBM 上の求核剤または求電子体 (好ましくは、求核剤) を介して「静的」共有結合または不可逆的共有結合を形成し、これにより、不可逆的 TBM-SME 複合体を形成する。この方法は、図2に例示される。必要に応じて、SME はまた、TBM 上の目的の第1の部位と非共有結合を形成する。さらに、SME は、有機低分子のライブラリーのライブラリーメンバーと可逆的結合を形成し得る第2の官能基を含み、このライブラリーの各分子は、SME の第2の官能基と可逆的結合を形成し得る官能基を有する。TBM-SME 複合体およびライブラリーは、TBM 上の目的の第2の部位に対して親和性 (好ましくは、最高の親和性) を有するライブラリーメンバーが、TBM-SME 複合体と可逆的結合を形成する条件に供される。

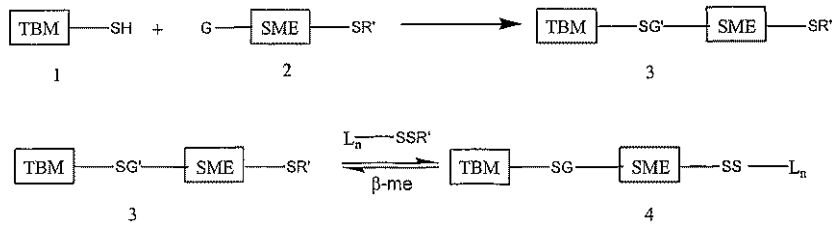
【0074】

好ましい TBM は、タンパク質であり、そして不可逆的 TBM-SME 複合体を形成するに適切な TBM 上の好ましい求核剤としては、 $-SH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ および $-COO$

H (それぞれ c y s、s e r もしくは t h r、l y s および a s p もしくは g l u の側鎖から通常生じる) が挙げられる。T B M は、これらの求核剤を含むように改変され得る (例えば、変異体または誘導体) か、または天然にこれらを含み得る。例えば、システインプロテアーゼ (例えば、カスパーゼ (特に、カスパーゼ 1、3、8 および 9) ; カテプシン (特に、S カテプシン および K カテプシン) など) および ホスファターゼ (例えば、P T P P T P 1 B、L A R、S H P 1、S H P 2 P T P および C D 4 5) は、天然に存在するシステインチオール求核剤を含む適切なタンパク質の例示である。静的 T B M - S M E 複合体を生成するようにこのような T B M を S M E により誘導体化することおよびライブラリーメンバーとのその反応を、以下に例示する。

【0075】

【化1】



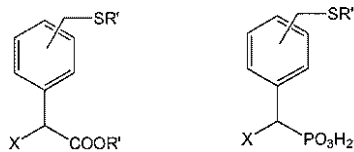
ここで、T B M 上の求核剤は、チオール (通常は、システイン) の硫黄であり、これは、(標的を変性しない条件下で) 不可逆的共有結合置換基を形成し得る G、および遊離チオール、保護チオールまたは誘導体化チオール S R ' を含む、S M E である 2 と反応させられる。好ましい G は、チオールによる S N 2 様アタックを受けるかまたはチオールを有する M i c h a e l 型付加物を形成して、新たな共有結合 - S G ' - を有するこのアタックの不可逆的反応生成物 3 を生成させ得る基である。以下は、S N 2 様付加または M i c h a e l 型付加を受け得る G 基の代表的な例である。

【0076】

1) - 八口酸 : S M E の一部である酸 C O O H、P O ₃ H ₂ または P (O R) O ₂ H に置換された F、C l および B r は、T B M のチオールとチオエーテルを形成し得る。このような G - S M E - S R ' の単純な例は ;

【0077】

【化2】



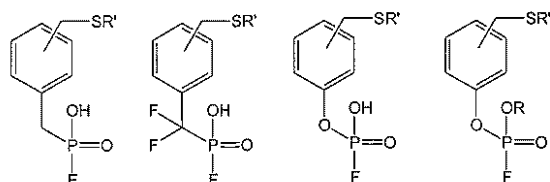
であり、ここで、X は、ハロゲンであり、そして R ' は、H、S C H ₃、S (C H ₂) _n A であり、ここで、A は、O H、C O O H、S O ₃ H、C O N H ₂ または N H ₂ であり、そして n は、2 または 3 である。

【0078】

2) フルオロホスフェート (フルオロホスホネート) : これらは、S H 求核剤および O H 求核剤の両方と容易に反応する S a r i n 様化合物であり得る。例えば、P T P 1 B の c y s 2 1 5 は、以下 :

【0079】

【化3】



によって示される単純な $G - S M E - S R'$ と反応させられ得、ここで、フェニル環は、単純化した $S M E$ を示し、 R は、置換または非置換の低級アルキルであり、そして R' は、上記で規定されるようなものである。これらの化合物は、チオール求核剤を有するチオホスフェート（チオホスホネート） $S M E$ を形成する。これらの化合物はまた、セリンもしくはトレオニンのホスファターゼまたはセリンもしくはトレオニンのラクタマーゼ由来の天然に存在する $-O H$ と静的 $T B M - S M E$ を形成し得る。

10

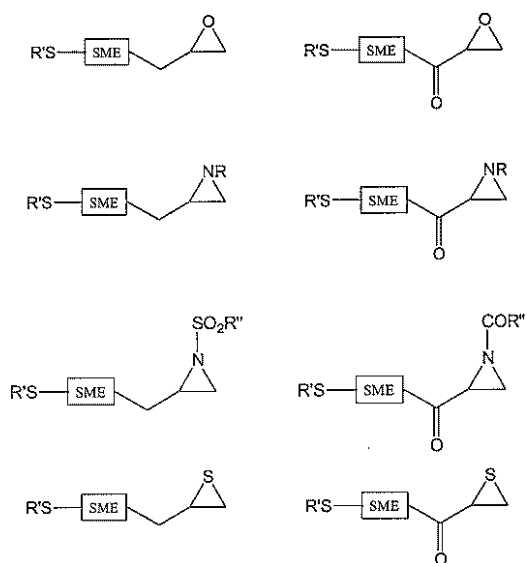
【0080】

3) エポキシド、アジリジンおよびチラン (thirane) : これらの反応性官能基を含有する $S M E$ は、求核剤 $-S H$ 、 $-O H$ および $-C O O H$ との $S N 2$ 環開裂反応を受け得る。後者の好ましい例は、アスパルチルプロテアーゼ様 - セクレターゼ (B A S E) である。エポキシド、アジリジンおよびチランの好ましい一般例を、以下に示す：

【0081】

【化4】

20



30

ここで、 R' は、上記に規定されるものであり、 R は、通常 H または低級アルキルであり、そして R'' は、低級アルキル、低級アルコキシ、 $O H$ 、 $N H_2$ または $S R'$ である。チランの場合、基 $S R'$ は、必要に応じて存在する。なぜなら、求核剤アタックおよび環開裂に際して、後の拡張されたテザリング反応において使用され得る遊離チオールが、生成されるからである。

40

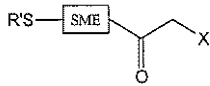
【0082】

4) ハロ - メチルケトン / アミド : これらの化合物は、 $-(C=O)-C H_2-X$ を有する。ここで、 X は、形態のハロゲン、 N_2 、 $O-R$ (ここで、 R は、置換または非置換のヘテロアリール、アリール、アルキル、 $-(P=O)A r_2$ 、 $-N=O-(C=O)$ アリール / アルキル、 $-(C=O)$ アリール / アルキル / アルキルアリールなどである)、 S -アリール、 S -ヘテロアリールおよびビニルスルホンのような、多くの良好な脱離基であり得る。

【0083】

【化5】

50



フルオロメチルケトン、チオール含有タンパク質と反応した場合にチオエーテルの形成を生じる、このクラスの活性化ケトンの単純な例である。他の周知の例としては、ベンゾイルオキシメチルケトンのようなアシルオキシメチルケトン、フェニルメチルアミノメチルケトンおよびスルホニルアミノメチルケトンのようなアミノメチルケトンが挙げられる。これらおよび他の型の適切な化合物は、*J. Med. Chem.* 43 (18) p 3351-71 (2000年9月7日) に総説される。

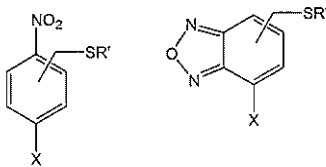
10

【0084】

5) 求電子体芳香族系：これらの例としては、7-ハロ-2,1,3-ベンズオキサジアゾールおよびオルソ/パラニトロ置換ハロベンゼンが挙げられる。

【0085】

【化6】



20

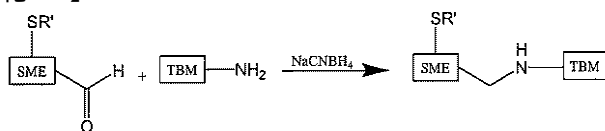
この型の化合物は、チオール含有TBMを有するアリールアルキルチオエーテルを形成する。

【0086】

6) TBM求核剤との静的共有結合の形成に適切な、他の適切なS_N2様反応は、アルデヒドと、DNA修復タンパク質様の酵素のリジンのアミン基との間のSchiff塩基の形成、その後の例えば、NaCNBH₄との還元を含む。

【0087】

【化7】



30

7) Michael型付加：形態 - RC=CR-Qまたは - C=C-Qの化合物（ここで、Qは、C(=O)H、C(=O)R（キニンを含む）、COOR、C(=O)NH₂、C(=O)NHR、CN、NO₂、SOR、SO₂R（ここで、各Rは独立して、置換または非置換の、アルキル、アリール、水素、ハロゲンである）であるか、あるいは別のQは、TBM上のSR（ここで、RはH、グルタチオンまたはNH₂またはOHで置換されたS-低級アルキルである）、OHおよびNH₂とMichael付加物を形成し得る。

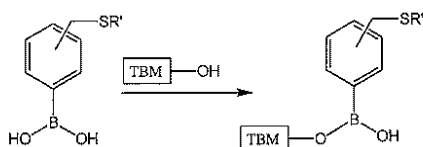
【0088】

40

8) ボロン酸 (boronic acid)：これらの化合物を使用して、serまたはthrのヒドロキシルを標識して、以下：

【0089】

【化8】



50

に示される形態の T B M - S M E 複合体を形成し得、ここで、R' は、上記で規定されるものである。

【 0 0 9 0 】

前述の場合の各々において、「静的」または不可逆的な共有結合は、T B M 上の求核剤を介して形成され。チオールまたは保護チオールを含有する不可逆的 T B M - S M E 複合体を生成する。次いで、これらの複合体は、T B M 上の第 2 の結合部位を結合し得る低分子リガンドの選択のための還元剤（例えば、メルカプトエタノール）の存在下で、チオールまたはジスルフィドを含有する有機化合物のライブラリーに曝露される。

【 0 0 9 1 】

上記したように、この静的アプローチにおいて、S M E は、T B M 上の第 1 の部位に対する結合親和性を有する（すなわち、結合し得る）部分を含み得るが、含む必要はない。S M E がこのような部分を含まない場合でさえ、リガンド候補は標的の目的の第 2 の部位に対する自由接近を有することを保障するために、適切な長さおよび可撓性であらねばならない。

10

【 0 0 9 2 】

(B) 動的 S M E

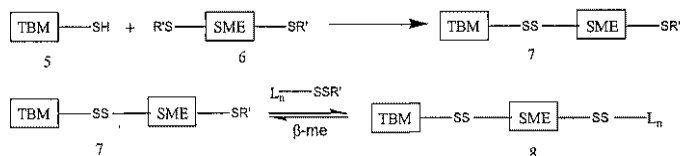
本発明の別の実施形態において、S M E は、二重の可逆的共有結合 S M E（「二重ジスルフィド」エキステンダー）であり、すなわち、この S M E は、二官能性であり、そして可逆的供給結合を形成し得る 2 つの官能基（通常は、ジスルフィド）を含む。この S M E は、S M E 上の第 1 の官能基を介して T B M 上の求核剤と「動的」共有結合または第 1 の可逆的共有結合を形成する。これにより、可逆的 T B M - S M E 複合体（以下の 7）を形成する。必要に応じて、S M E はまた、T B M 上の目的の第 1 の部位と非共有結合を形成する（T B M と非共有結合を形成する S M E 上の部分は、本明細書中で S M E といわれる）。さらに、S M E は、有機低分子の第 2 のライブラリーのライブラリーメンバーと第 2 の可逆的結合を形成し得る第 2 の官能基を含むか、または含むように改変され、各分子は、S M E の第 1 の官能基または第 2 の官能基と可逆的結合を形成し得る官能基を有する。T B M - S M E 複合体および第 2 のライブラリーは、T B M 上の目的の第 2 の部位に対して最高の親和性を有するライブラリーメンバーが T B M - S M E 複合体（以下の 8）と可逆的結合を形成する条件に、供される。好ましくは、共有結合は、ジスルフィドであり、これは、還元剤の存在下で可逆的であり得る。

20

30

【 0 0 9 3 】

【 化 9 】



拡張された動的テザリングプロセスは、図 3 に例示され、ここで、チオールまたは保護チオールを含むかまたは含むように改変された T M B は、ある条件下で（例えば、還元剤とともに）、チオールまたは保護チオール（ジスルフィド含有モノフォア）を含む有機低分子の第 1 のライブラリーとインキュベートされる。この条件において、ライブラリーの少なくとも 1 つのメンバーは、T B M と選択されたライブラリーメンバーとを連結するジスルフィド結合を形成する。必要に応じて、このプロセスは、チオールまたは保護チオールの位置によって互いに異なる T B M のライブラリー（すなわち、同一のタンパク質の異なるシステイン変異体）を用いて反復される。好ましくは、低分子ライブラリーの各メンバーは、分子量において他のライブラリーメンバーの各々と異なる。好ましくは、低分子ライブラリーは、1 ~ 100 メンバーを含み、より好ましくは、5 ~ 15 メンバー、そして最も好ましくは、約 10 メンバーを含む。必要に応じて、選択された低分子ライブラリーメンバー（選択されたモノフォア）はまた、T B M 上の目的の第 1 の部位と非共有結合を

40

50

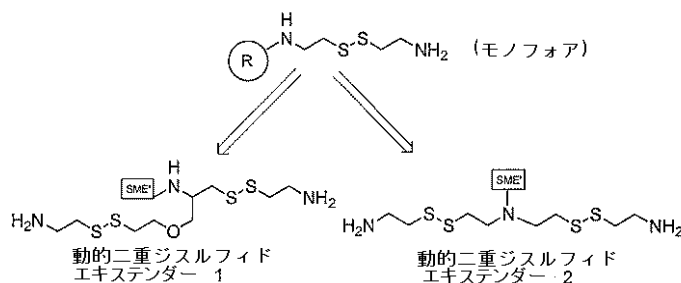
形成する。次いで、選択されたモノフォアまたはその誘導体は、第2のチオールまたは保護チオールを含むように改変され、これにより、「二重ジスルフィド」エキステンダーを形成する。次いで、この合成二重ジスルフィドエキステンダーは、ある条件下で（例えば、メルカプトエタノールのような還元剤と）チオールまたは保護チオールを含む有機低分子分子の第2のライブラリー（このライブラリーは、第1のライブラリーと同じであっても異なってもよい）の存在下で、TBMとインキュベートされる。この条件において、この第2のライブラリーの少なくとも1つのメンバーは、上記8に示されるような二重ジスルフィドエキステンダーを介して選択されたライブラリーメンバーをTBMと連結させる、ジスルフィド結合を形成する。必要に応じて、この後、ジアフォア（diaphore）が、この選択された2つのライブラリーメンバー（モノフォア）に基づいて、合成される。

【0094】

2つの基本戦略が、「二重ジスルフィド」エキステンダーを合成するために存在する。第1の戦略において、動的エキステンダーの合成が、一般的に行われ、これは、TBMと非共有結合を形成するモノフォアの部分のいかなる改変も伴わない、モノフォアリンカーの改変による。例示の目的で、エキステンダーは、通常、図3に示されるようなジスルフィドモノフォアライブラリーのスクリーニングから生じる。ライブラリーまたはプールから選択される代表的なモノフォアは、そのモノフォアをTBMシステインに連結させるジスルフィドと、TBM上の目的の第1の部位に非共有結合的に結合するそのモノフォアの部分との間に、2個または3個のメチレン単位のリンカーを含む。このモノフォアリンカーを以下に示されるように誘導体化して、二重ジスルフィドエキステンダーを生成し得、ここで、モノフォアの「R」または可変基は、不変であり続け、そしてTBM上の目的の第1の部位と非共有結合的に結合するエキステンダー（SME）の部分になる。

【0095】

【化10】



ここで、モノフォアは、システアミン窒素に最も近接するメチレンで誘導体化されて動的二重ジスルフィドエキステンダー1を生成するか、またはシステアミン窒素自体で誘導体化されて対称的な動的二重ジスルフィドエキステンダー2を生成するかのいずれかである。

【0096】

あるいは、モノフォアが3-メルカプトプロピオン酸誘導体である場合、炭素が、以下の3に示されるような形態の一般的動的二重ジスルフィドエキステンダーを生成するように誘導体化され得る。

【0097】

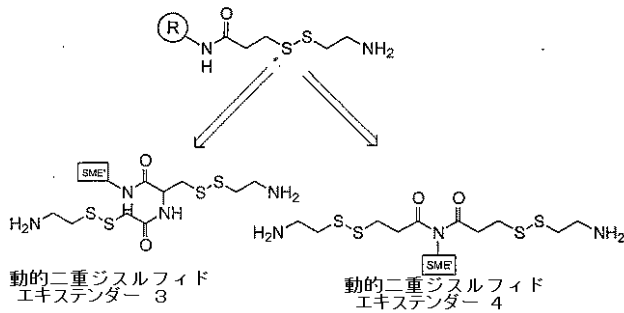
【化11】

10

20

30

40



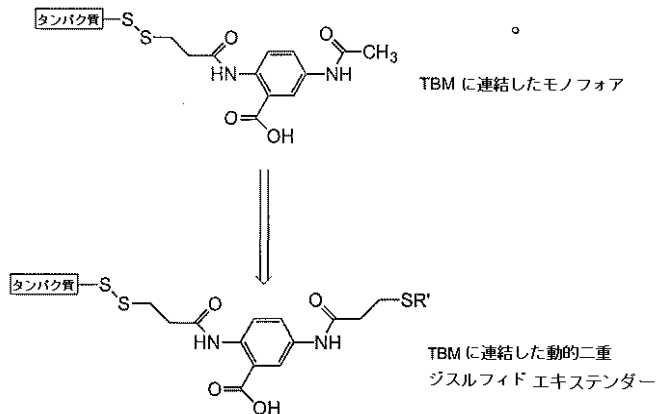
必要に応じて、アミド窒素は、上記 4 に示されるような形態のエキステンダーを精製するように、アシルまたはスルフォニルで誘導体化され得る。 10

【0098】

第二の戦略は、TBM上の目的の第一部位に非共有結合的に結合するモノフォア部分を誘導体化することを含む。この誘導体化は好ましくは、以下に例示するように、目的の第一部位へのモノフォアの結合を最小に変更する部位において実施される。

【0099】

【化12】



20

30

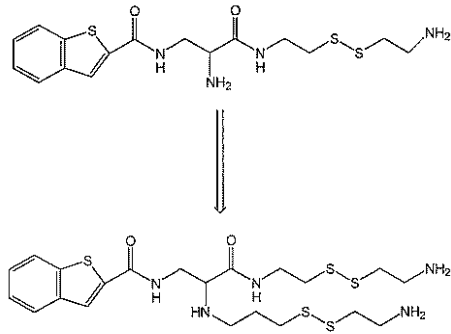
ここで、動的テザーは、TBM-SME複合体を形成するTBMチオールに結合して示されており、ここで、R'はシステアミン基である。次いで、この複合体をジスルフィドモノフォアまたはジスルフィドモノフォアのライブラリーと接触させて、SMEまたは選択されたモノフォア単独のいずれよりも高いTBM親和性を有する、連結した化合物が入手され得る。

【0100】

TBMに結合するジスルフィドモノフォアを形成するように設計されたSMEの第二の例を以下に示す。この動的SMEを、1以上のジスルフィドモノフォアの存在下でTBMと接触させて、TBM-SME-モノフォアの共有結合複合体を形成し得、ここで、このSMEは、目的の第一部位に対する親和性を有し、そしてこのモノフォアは、TBM上の目的の第二部位に対する親和性を有する。 40

【0101】

【化13】



10

T B M - S M E - モノフォア複合体の構造の検出および同定は、質量分析法または機能的アッセイ（例えば、E L I S A、酵素アッセイなど）における阻害によって実施され得る。

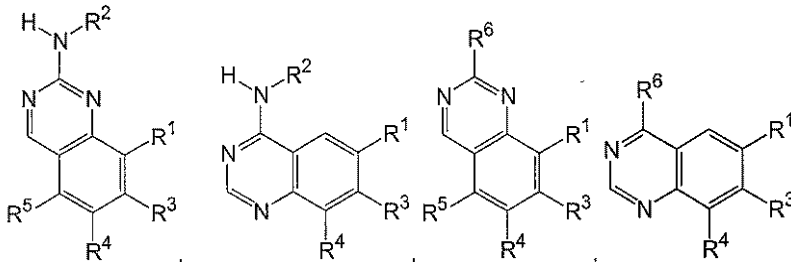
【 0 1 0 2 】

S M E はしばしば、特定の T B M または T B M のファミリーに応じて作製される。例えば、キナゾリン誘導体は、E G F レセプターまたは「R D」キナーゼと静的エクステンダーまたは動的エクステンダーを形成し得る。E G F レセプターの場合、c y s 7 7 3 は、以下に示すような静的キナゾリンエクステンダーまたは動的キナゾリンエクステンダーのいずれかについての適切な求核剤である；

20

【 0 1 0 3 】

【 化 1 4 】

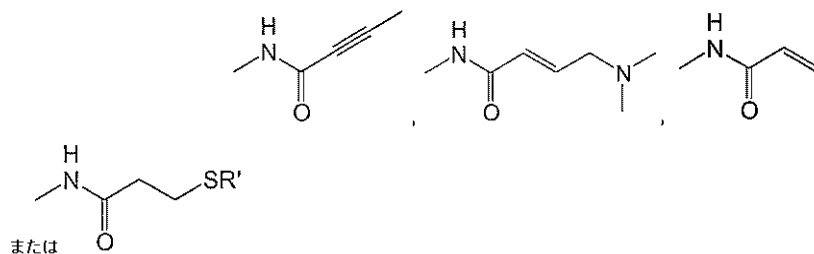


30

ここで、 R^1 は、M i c h a e l 受容体またはジスルフィドを介して c y s 7 7 3 へと連結され、 R^1 は、

【 0 1 0 4 】

【 化 1 5 】



40

から選択され；

R^2 は、 $-(CH_2)_n-SR'$ および $-C(=O)-(CH_2)_n-SR'$ であり；
 R^3 、 R^4 および R^5 は、 $-O-(CH_2)_n-SR'$ および $-(CH_2)_n-SR'$ であり；

R^6 は、 $-(CH_2)_n-SR'$ であり；ここで、 n は、1、2 または 3 であり、そして R' は、H、ジスルフィドまたはチオール保護基である。

【 0 1 0 5 】

ホスホチロシン (P - t y r)、ホスホセリン (P - s e r) およびホスホトレオニン (

50

P - t h r) の模倣物または代理物は、本発明においてエキステンダーとして用いられて、近傍のサブ部位と相互作用して標的ホスファターゼ (p h o s p h o t a s e) に対する特異性または親和性を改善するフラグメントが同定され得る。従って、エキステンダーを用いた標準的共有結合テザリングによって近傍のフラグメントを見出すための、既知の基材またはインヒビターを「アンカー」として用いる、拡張されたテザリングは、本発明の1つの好ましい実施形態である。

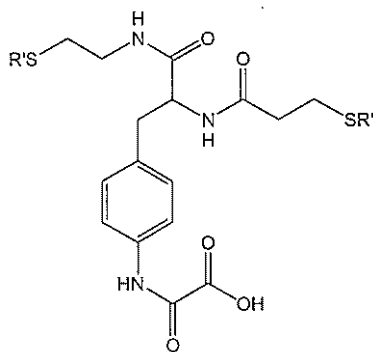
【 0 1 0 6 】

ホスホチロシン (P - t y r) 模倣物は、PTP - 1 B、LAR などのようなホスファターゼに応じて作製され得る S M E の例である。以下に示す、メルカプト - プロパン酸および/もしくはシステアミン (c y s t a e a m i n e) またはそれらの保護形態を用いて誘導体化された既知の P T P - 1 B P - t y r 模倣物は、P T P - 1 B c y s 変異体の活性部位に結合する。

10

【 0 1 0 7 】

【 化 1 6 】



20

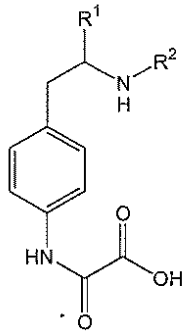
このような化合物を動的エキステンダーとして用いて、上記のような共有結合テザリングによって第二フラグメントを選択し得る。上記の化合物は、標的に結合し、そして -メルカプトエタノールに対してテザーされた場合 ()、約 2 . 5 m M の B M E ₅₀ (平衡時の、50%の結合化合物を標的から交換し得る -メルカプトエタノールの濃度) を示す。動的エキステンダーを用いる場合、動的エキステンダーについての B M E ₅₀ を測定し、そして動的エキステンダーの B M E ₅₀ 以下の総チオール濃度 (B M E + ライブラリーチオール) で、共有結合テザリングによって第二フラグメントについてスクリーニングすることが好ましい。例えば、2 . 5 m M の B M E ₅₀ を有する上記の動的エキステンダーに関して、第二フラグメントスクリーニング工程における総チオール濃度は、2 . 5 m M 以下、そしてより好ましくは約 2 倍低い (例えば、約 1 m M 以下) であるべきである。あるいは、動的エキステンダーは、静的エキステンダーへと変換され得、これによって、第二フラグメントスクリーニングにおける総チオール濃度の問題が取り除かれる。動的エキステンダーを静的エキステンダーへと変換する場合、標的への静的エキステンダーの非共有結合が破壊されないように、同じ原子数を維持することが重要である。同様の理由から、嵩高い他の原子または基の導入を最小にすることが重要である。これらの要因を心に留めて、上記の動的エキステンダーは、以下に規定される静的エキステンダーへと変換され得る。

30

40

【 0 1 0 8 】

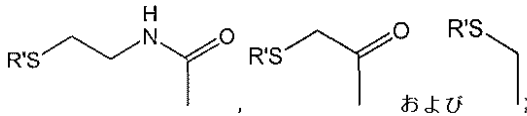
【 化 1 7 】



ここで、 R^1 は、

【0109】

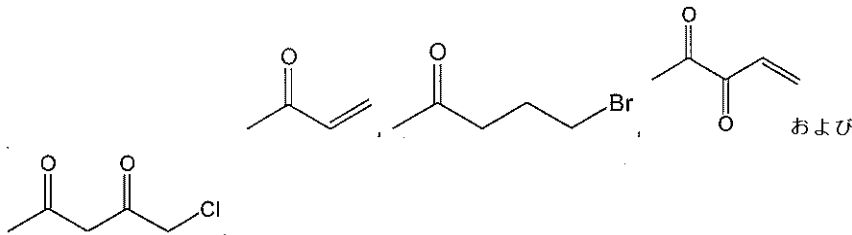
【化18】



から選択され、そしてここで R^2 は、

【0110】

【化19】



から選択される。

【0111】

本発明のなお別の実施形態では、エキステンダーは、TBMに可逆的または非可逆的のいずれかで結合したペプチドであり得る。この実施形態では、ペプチドは、約2~15残基長、好ましくは5~10残基であり、そして天然および/または人工のアミノ酸から構成され得る。このようなペプチドエキステンダーの一例は、深い疎水性裂溝中のMDM2のN末端ドメインにnMの親和性で結合し得るヘリックスp53フラグメントペプチド（またはより小さな既知の非天然ペプチド）である。BCL-2およびBCL-xLもまた、MDM2と類似した深いペプチド結合溝を含むことが公知である。これらの標的に結合するペプチドはまた、本発明に従って有用なペプチドエキステンダーであり得る。例えば、p53のフラグメントペプチドは、TBM上の既存のチオールまたは導入されたチオールと、このペプチド上の既存の（例えば、cys）チオールまたは導入されたチオール（導入されたcys、カルボキシル末端で誘導体化されたシステアミンまたはアミノ末端を通したメルカプト-プロパン酸）を通して、可逆的な（例えば、ジスルフィド）結合を形成し得る。この場合、その後の共有結合テザースクリーニングから、チオールまたはジスルフィドフラグメントを選択するために用いられ得るTBM-ペプチドエキステンダー複合体が形成される。この動的ペプチドエキステンダーは、1つの他の遊離のチオールまたは保護されたチオール（例えば、TBM-ペプチドエキステンダー複合体を形成するために用いられていない、上記のうちの1つ）を有し、これらは、TBMに対する親和性を有するフラグメントとの共有結合ジスルフィド結合を形成するに適切な条件下で、チオールまたは保護されたチオールフラグメントのライブラリーと接触させられる。必要に応じて、ペプチドエキステンダーは、上記のようにTBM上の求核剤または求電子体との不可逆的共有結合が形成される、静的ペプチドエキステンダーであり得る。必要に応じて、こ

10

20

30

40

50

の実施形態では、光親和性標識を用いて、ペプチドエクステンダーをTBMへと結合させ得る。上記のように、遊離のチオールまたは保護されたチオール（既存であるかまたは導入された）を用いて、その後のスクリーニングにおいてジスルフィドを形成して、TBMに対する親和性を有する低分子フラグメントを見出す。

【0112】

このようなペプチドエクステンダーはまた、「Z-WQPY」ペプチドのような合成ペプチドであり得、ここで、TBMはIL-1レセプターである。ここで、ペプチドFEWTPGYWQPYALPLまたはそのフラグメント、変異体もしくはアナログは、上記のように静的エクステンダーまたは動的エクステンダーとして用いられて、共有結合テザリングを介してフラグメントが見出され得、ここで、ジスルフィドテザーは、エクステンダー 10
に対してまたはエクステンダーとであり、そして非共有結合は、選択されたフラグメントとTBMとの間に存在する。

【0113】

SME上の反応性基と標的もしくはリガンドとの間でそれぞれ、または2つのリガンドの間で、可逆的または非可逆的な共有結合を形成するために利用可能な他の化学は当該分野で周知であり、そして基本書（例えば、March, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 第4版, 1992）に記載されている。アルデヒドとケトンとアミンとの間での還元的アミノ化は、例えば、Marchら, 前出, 898-900頁に；アミンを調製するための代替方法は1276頁に；ヒドラゾンおよびヒドラゾン誘導体（例えば、セミカルバゾン）を得るためのアルデヒドとケトンとヒドラジド誘導体との間の反応は904-906頁に；アミド結合形成は1275頁に；尿素の形成は1299頁に；チオカルバメートの形成は892頁に；カルバメートの形成は1280頁に；スルホンアミドの形成は1296頁に；チオエーテルの形成は1297頁に；ジスルフィドの形成は1284頁に；エーテルの形成は1285頁に；エステル形成は1281頁に；エポキシドへの付加は368頁に；アジリジンへの付加は368頁に；アセタールおよびケタールの形成は1269頁に；カルボネートの形成は392頁に；デアミンの形成は1264頁に；アルケンの転移は1146-1148頁に（Grubbsら, Acc. Chem. Res. 28: 446-453 [1995]もまた参照のこと）；ハロゲン化アリールおよびアリールスルホネートと、アルカンおよびアセチレンとの遷移金属触媒カップリング（例えば、Heck反応） 30
は717-718頁に；ハロゲン化アリールおよびアリールスルホネートと、有機金属試薬（例えば、有機ホウ素試薬）との反応は662頁に（Miyauraら, Chem. Rev. 95: 2457 [1995]もまた参照のこと）；有機錫試薬および有機亜鉛試薬、オキサゾリジンの形成（Edeら, Tetrahedron Letts. 28: 7119-7122 [1997]）；チアゾリジンの形成（Patekら, Tetrahedron Letts. 36: 2227-2230 [1995]）；イミドエステルを介してアミンをカップリングすることによって、アミジン基を介して連結されたアミン（Daviesら, Canadian J. Biochem. c50: 416-422 [1972]）などに記載されている。特に、ジスルフィド含有低分子ライブラリーは、Parlowら, Mol. Diversity 1: 266-269 (1995)の方法を適用することによって、市販のカルボン酸および保護されたシステアミン（例えば、mono-BOC-cysteamine）から作製され得、そして反応性システインを含むかまたは含むように改変されている、ポリペプチドへの結合についてスクリーニングされ得る。この節において引用された全ての文献は、本明細書中に明らかに参考として援用される。

【0114】

SMEの結合が標的を変性させないことが通常好ましいが、TBM-SME複合体はまた、変性条件下で形成され得、続いて当該分野で公知の方法によってこの複合体は再折畳みされ得る。さらに、リガンドが標的上の目的の部位を有用な部位特異性で認識して結合するように、SMEおよび共有結合は標的の三次元構造を実質的に変更するべきではない。最終的に、SMEは、反応条件下およびアッセイ条件下で、標的上の他の部位と実質的に 50

非反応性であるべきである。

【0115】

(5. 標的に結合したリガンドの検出および同定)

標的に結合したリガンドは、質量分析法(MS)によって容易に検出および同定され得る。MSは、質量対電荷比(m/z)に基づいて分子を検出し、従って、それらのサイズに基づいて分子を分離し得る(Yates, Trends Genet. 16: 5-8 [2000]に概説される)。質量分析計(mass spectrometer)は最初に、分子を気相イオンに変換し、次いで個々のイオンが m/z 比に基づいて分離され、そして最終的に検出される。質量分析器(mass analyzer)は、質量分析計の不可欠の部分であり、物理的特性(例えば、電場もしくは磁場、または飛行時間型[TOF])を使用して、特定の m/z 値のイオンを分離し、次いでこのイオン検出器に衝突する。質量分析計は、データを迅速に作製し得、従って高処理能力の分析についての大きな可能性を有する。MSは、薬物の発見に用いられ得る、非常に汎用性の高いツールを提供する。質量分析法は、単独で、または標的に結合した有機化合物リガンドの検出もしくは同定のための他の手段との組み合わせのいずれかで用いられ得る。質量分析法を用いる技術は、当該分野で周知であり、そして種々の適用のために用いられている(例えば、FitzgeraldおよびSiuzdak, Chemistry & Biology 3: 707-715 [1996]; Chur, J. Am. Chem. Soc. 118: 7827-7835 [1996]; Siudzak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11290-11297 [1994]; Burlingame, Anal. Chem. 68: 599R-651R [1996]; Wu, Chemistry & Biology 4: 653-657 [1997]; ならびにLoo, Am. Reports Med. Chem. 31: 319-325 [1996]を参照のこと)。

10

20

【0116】

しかし、本発明の範囲は、MSの使用に限定されない。実際、生物学的標的分子とライブラリーメンバーとの間で形成された付加物の検出のための任意の他の適切な技術が用いられ得る。例えば、種々のクロマトグラフィー技術(例えば、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなど)を、反応混合物から成分を分離して、共有結合した有機分子を同定する能力を増強するために用い得る。このようなクロマトグラフィー技術は、質量分析法と組み合わせるとは別々に用いられ得る。必要に応じて、(蛍光、放射性などで)標識したプローブを遊離の有機化合物にカップリングして、上記の技術のいずれかを用いるその同定を容易にし得る。なお別の実施形態では、新たな結合の形成は、標識したプローブを遊離させ、次いで、このプローブがモニタリングされ得る。簡便な機能的アッセイ(例えば、ELISAまたは酵素アッセイ)をまた用いて、標的へのエキステンダーまたは第二フラグメントの結合が、アッセイによって測定されるに必須の領域(例えば、タンパク質:タンパク質ELISAにおける「ホットスポット」への結合または酵素アッセイについての基質結合ポケットにおける結合)において生じた場合、結合を検出し得る。標的分子に結合した有機化合物を同定するために用途を見出し得る他の技術としては、例えば、核磁気共鳴(NMR)、キャピラリー電気泳動、X線結晶学などが挙げられる。これらの全ては、当業者に周知である。

30

40

【0117】

(6. 結合体分子(例えば、ダイアフォア(diafore)の調製)

2以上の有機分子リガンドを連結して結合体分子を生成するための用途が見出されるリンカーエレメントは、少なくとも2つの有機分子を、これらの分子によって保有される反応性官能基を介して一緒に共有結合するように機能し得る、多官能性(好ましくは二官能性)架橋分子である。リンカーエレメントは、少なくとも2つの有機分子を結合するために利用可能である少なくとも2つ(好ましくは2つのみ)の反応性官能基を有し、ここで、これらの官能基は、このリンカー上のどこにでも(好ましくはリンカーの各末端に)出現し得、そしてこれらの官能基は、連結されるべき有機分子が同じ反応性官能基を有するかまたは異なる反応性官能基を有するかに依存して、同じであっても異なってもよい。

50

本明細書中で用途が見出されるリンカーエレメントは、直鎖、分岐鎖、芳香族など（好ましくは直鎖）であり得、そして一般に少なくとも約2原子長であり、より一般的には約4原子長よりも長く、そしてしばしば、約12原子長以上もの長さである。リンカーエレメントは一般的に、水素飽和または水素不飽和のいずれかの炭素原子を含み、それゆえアルカン、アルケンもしくはアルキンおよび/または他のヘテロ原子（窒素、硫黄、酸素などを含む）を含み得、これらは（好ましくはアルキル基、アルコキシル基、ヒドロキシアルキル基またはヒドロキシアルキル基で）置換されていなくても置換されていてよい。用途が見出されるリンカーエレメントは、種々の長さであり得、それによって、それらから調製される結合体リガンド化合物の結合特性を最適化するための手段を提供する。標的生体分子に共有結合する第一の有機化合物は、それ自体、第二の有機化合物に対する結合部位を提供する化学反応性基を保有し得る。あるいは、第一の有機分子は、（化学的に、それに対する化学的反応基を含む化合物を結合することによって、または他の方法でのいずれかで）改変された後、有機化合物の第二のライブラリーに対してスクリーニングされ得る。

【0118】

（7．本発明の化合物）

本発明の化合物は、少なくとも1つ（好ましくは少なくとも2つ）のリガンド（このうちの少なくとも1つは、本明細書中に開示される拡張テザリングアプローチによって同定されている）およびこのような化合物のアナログを包含することによって特徴付けられる。従って、本発明の化合物は、有機低分子、ペプチド、（ポリ）ヌクレオチド、（オリゴ）糖などを含むがこれらに限定されない、多数の化学的クラスを包含する。本発明の方法によって同定されるリガンドは代表的に、以下の周知の技術によって設計されるさらなる改変体および誘導体の開発のためのリード化合物として役立つ。特に、同定されるリガンド（モノフォア、ダイアフォア、およびより複雑な構造体を含む）は、医薬品化学および親和性成熟に従い、そして構造補助設計を用いて容易に最適化され得る。本発明の拡張テザリングアプローチは、標的（例えば、TBM）上の異なる部位に結合することがすでに示されたリガンドに焦点を当てたさらなる化学的改変を可能にするという点で、他の公知の技術（コンビナトリアル化学を含む）よりも優れている。

【0119】

（8．同定された化合物の用途）

本発明の方法は、薬物リードを作製するための強力な技術であり、互いに近い部位で標的に弱くまたは中程度の結合性で結合する2以上のフラグメントの同定を可能にし、そしてより高い親和性の化合物を生成する、互いに共有結合的に連結された、同定されたフラグメント（モノフォア）を含むダイアフォアまたはより大きな分子の合成を可能にする。さらなるリガンド化合物を含む、ダイアフォアまたは同様のマルチマー化合物は、合理的薬物設計における貴重なツールであり、これらは、医薬品化学アプローチおよび構造補助設計を用いてさらに改変および最適化され得る。

【0120】

本発明に従って同定されたダイアフォア、ならびにそれらから設計された、改変された薬物リードおよび薬物を用いて、例えば、2つの分子の部位特異的相互作用を必要とするかまたはそれに依存する、種々のインビトロおよびインビボでの生物学的プロセスを調節し得る。ポリヌクレオチドに結合する分子を用いて、例えば、標的遺伝子の活性化に必要な因子の接近をブロックすることによって、遺伝子の活性化を阻害もしくは妨害し得るか、または二重鎖DNAを安定化することもしくは転写機構を妨害することによって転写を抑制し得る。

【0121】

（9．薬学的組成物）

本発明に従って同定されたリガンド、およびこのようなリガンドを含む化合物、ならびにこのような化合物の類似体は、標的の疾患または状態を予防および/または処置するために、薬学的組成物において使用され得る。標的の疾患または状態は、リガンドまたは化合

物がそのリガンドの結合に基づいて設計される標的（例えば、TBM）の生物学的/生理学的な機能に依存する。このような疾患および状態の例を、上記のTBMの表において列挙する。

【0122】

薬学的組成物の適切な形態は、一部、その用途または進入経路（例えば、経口、経皮、吸入、または注射による）に依存する。このような形態は、標的細胞が多細胞宿主中に存在しようと培養物中に存在しようと、その薬剤または組成物を標的細胞に到達させるのを可能とすべきである。例えば、血流中に注入される薬理学的薬剤または組成物は、可溶性であるべきである。他の要因は、当該分野で公知であり、そして毒性およびその薬剤または組成物がその効果を発揮するのを妨げる形態のような考慮事項を含む。

10

【0123】

適切な場合には、活性成分もまた、薬学的に受容可能な塩（例えば、酸付加塩）および/または錯体として処方され得る。薬学的に受容可能な塩は、それらが投与される濃度において非毒性である。薬学的に受容可能な塩としては、硫酸塩、塩酸塩、リン酸塩、スルホン酸塩、スルファミン酸塩、硫酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シクロヘキシルスルホン酸塩、シクロヘキシルスルファミン酸塩、およびキナ酸塩を含む塩のような、酸付加塩が挙げられる。

【0124】

薬学的に受容可能な塩は、塩酸、硫酸、リン酸、スルホン酸、スルファミン酸、酢酸、クエン酸、乳酸、酒石酸、マロン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、シクロヘキシルスルホン酸、シクロヘキシルスルファミン酸、およびキナ酸のような酸から得られ得る。このような塩は、例えば、遊離の酸または塩基の形態の生成物と、適切な塩基または酸の1つ以上の等価物とを、塩が不溶性の溶媒中もしくは媒体中または水のような溶媒中において反応させ、次いで、この溶媒または媒体を、真空中または凍結乾燥によって除去することによってか、あるいは、既存の塩のイオンを、適切なイオン交換樹脂上の別のイオンと交換することによって、調製され得る。

20

【0125】

キャリアまたは賦形剤もまた、化合物の投与を容易にするために使用され得る。キャリアおよび賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖類（例えば、ラクトース、グルコースもしくはスクロース、または様々な種類のデンプン）、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、および生理的に適合性の溶媒が挙げられる。組成物または薬学的組成物は、異なる経路によって投与され得る。この経路としては、静脈内、動脈内、腹腔内、心膜内、歯冠内、皮下、筋内、経口、局所、または経粘膜が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0126】

組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウムまたは他の薬学的に受容可能な薬剤（例えば、デキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、ポリオール（例えば、マンニトールおよびソルビトール））、または他の無機溶質もしくは有機溶質を使用して、達成され得る。

40

【0127】

薬学的処方物を製造するための技術および成分は、一般的に、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co.、Easton、PA 1990において見出され得る。WangおよびHanson、「Parental Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers」、Journal of Parental Science and Technology、Technical Report、第10号、補遺42-2S（1988）もまた参照のこと。適切な投与形式は、医療従事者によって、各疾患または状

50

態について個々に、そしてまた患者の状態を考慮して、最良に決定され得る。

【0128】

薬学的組成物は、一般的に認められている手順に従って、成分を混合することによって調製される。例えば、選択された成分を、単純にブレンダーまたは他の標準的デバイス中において混合して、濃縮混合物を生成し得、次いで、この濃縮混合物は、水または粘稠化剤、そしておそらくpHを制御するための緩衝剤または張度を制御するためのさらなる溶質の添加によって、最終の濃度および粘度に調整され得る。

【0129】

投与される本発明の組成物において使用するための種々の化合物の量は、標準的な手順によって決定され得る。一般的に、治療的有効量は、患者の年齢およびサイズ、ならびに患者に関連した疾患または障害に依存して、約100 mg/kgと 10^{-12} mg/kgとの間である。一般的に、治療的有効量は、処置される個体の1 kgあたり、約0.05 mgと50 mgとの間の量である。実際の用量の決定は、十分に当業者の技術の範囲内である。

10

【0130】

(10. 好ましい実施形態の説明)

好ましい実施形態において、本発明の方法を用いて、第1リガンドとタンパク質との間で形成される中間のジスルフィドのテザー化を介して標的タンパク質上の少なくとも2つの異なる目的の部位に結合する低分子量リガンド、ならびに第1リガンドおよび第2リガンドの各々の反応基を、同定する。

20

【0131】

本発明の好ましい実施形態においてスクリーニングされる低分子量リガンドは、大部分が、約2000ダルトン未満のサイズ、通常は約1500ダルトン未満のサイズ、より通常は約750ダルトン未満のサイズ、好ましくは約500ダルトン未満のサイズ、しばしば約250ダルトン未満のサイズ、よりしばしば約200ダルトン以下のサイズである、低分子化学分子である。しかし、サイズが2000ダルトンより大きい有機分子もまた本明細書中で用途を見い出す。1つの好ましい実施形態において、このような低分子化学分子は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド以外の、低分子有機分子である。別の好ましい実施形態において、この低分子有機分子は、非重合体である、すなわち、ペプチド、ポリペプチド、ポリヌクレオチドなどではない。

30

【0132】

有機分子は、市販原料または非市販原料から取得され得る。例えば、莫大な数の低分子有機化合物は、市販業者(例えば、Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WIおよびSigma Chemical Co., St. Louis, MO)から容易に取得可能であり、または化学合成によって取得され得る。好ましくは本発明の方法を用いて、適切な反応基(好ましくは、チオール基または保護チオール基)を有する低分子有機化合物のライブラリーを、スクリーニングする。

【0133】

近年、典型的に数ダースから数十万のメンバーを有する、コンビナトリアルライブラリーが、リガンドの発見および薬物の開発のための主要な手段となっている。一般に、本明細書中で用途を見い出す有機化合物のライブラリーは、少なくとも2つの有機化合物、しばしば少なくとも約25個の異なる有機化合物、よりしばしば少なくとも約100個の異なる有機化合物、通常少なくとも約300個の異なる有機化合物、好ましくは少なくとも約2500個の異なる有機化合物、および最も好ましくは少なくとも5000個以上の異なる有機化合物を含む。集団が選択または構築され得、その結果、この集団の各々の個別分子が、この集団の他の分子から(例えば、別々のマイクロタイターウェルに)空間的に分離され得るか、または、デコンヴォリューション(decovolution)のための方法が容易に利用可能である場合、この集団の2つ以上のメンバーが組み合され得る。通常、有機分子ライブラリーの各メンバーは同じ化学クラスである(すなわち、全ライブラリーメンバーがアルデヒドであり、全てのライブラリーメンバーが第1級アミンである、な

40

50

ど)、しかし、有機化合物のライブラリーはまた、2つ以上の異なる化学クラス由来の分子を含み得る。

【0134】

好ましい実施形態において、標的生体分子(TBM)は、チオール基、保護チオール基または可逆的ジスルフィド結合を含むか、またはこれらを含むように改変された、ポリペプチドである。次いで、このTBMは低分子エクステンダー(Small Molecule extender)(SME)と反応され、この低分子エクステンダーは、TBM上の第1の目的部位に対して親和性を有する部分、およびTBM上のチオール、保護チオールまたは可逆的ジスルフィド結合と反応する基を含む。上記で議論されるように、TBMとSMEとの間の結合は、TBM-SME複合体を形成するために、不可逆的共有結合(「静的な」拡張テザー化(extended tethering))、または可逆的共有結合(「動的な」拡張テザー化)のいずれかであり得る。静的なアプローチまたは動的なアプローチのどちらが使用されていても、次いで、TBM-SME複合体を用いてジスルフィド含有モノフォア(monophore)のライブラリーをスクリーニングして、標的分子上の第2結合部位(目的の部位)に対して、固有の親和性、最も好ましくは最も高い固有の親和性を有するライブラリーメンバーを同定する。好ましい実施形態において、改変されたTBM上の反応基は、エクステンダーによって提供される遊離チオール基であり、そして、このライブラリーは反応性チオール基を含む低分子量化合物から構成される。最も安定なリガンドを捕捉するためのジスルフィドのテザー化のために、反応は、平衡を可能にするための迅速な交換下になければならない。好ましい実施形態において、この反応は、還元剤(例えば、2-メルカプトエタノール)の触媒作用的な量の存在下において、実施される。還元剤存在下で到達した熱力学的平衡は、改変されたTBM上のエクステンダーのチオール基と、このTBMに対して固有の親和性を有するライブラリーのメンバーのチオール基との間で、ジスルフィド結合の形成を容易にする。従って、同一のTBM上の2つの異なる部位に対して固有の親和性を有する2つの異なるリガンドは、ダイアフォア(diaphore)を形成するために、共有結合的に連結される。このダイアフォアは、いずれの成分のモノフォアユニットよりも、より高い親和性でTBMに結合する。ダイアフォア中のモノフォアユニットは、同一の化学クラスまたは異なる化学クラス由来であり得る。「同一化学クラス」は、各モノフォア成分が同一の化学型(すなわち、両方がアルデヒドまたはアミンなどである)であることを意味する。

10

20

30

【0135】

特定の実施形態において、標的は、リガンド候補と接触したチップ上に、存在し得る。この場合、第1リガンドが標的に連結している共有結合はチップと形成され得、このような場合、このチップは「低分子エクステンダー(Small Molecule Extender)」の特別なクラスを表す共有結合の一部となる。

【0136】

リガンド候補物のライブラリー(例えば、低分子有機分子リガンド)は、固体表面に結合され得(例えば、ビーズ上に提示される)、例えば、PCT公開WO98/11436号(1998年3月19日発行)に記載される。特定の実施形態において、ビーズは反応基(例えば、低レベルのスルフィドリル基)を導入するように、改変される。次いで、リガンド候補物のライブラリーは改変されたビーズ上で、合成される。続いて、このライブラリーは、酸化条件下で、反応基(例えば、ジスルフィド結合が標的とビーズ上のスルフィドリルとの間で形成され得るような、スルフィドリル基)を含む、または含むように改変された標的とインキュベーションされる。次いで、このビーズは還元剤の存在下で洗浄され、続いてスルフィドリル失活剤(例えば、ヨード酢酸)の存在下でインキュベーションされる。次いで、このビーズは、全ての非共有結合標的を除去するために、変性条件下で洗浄され得る。

40

【0137】

(実施例)

本発明を、引続いての非制限的な実施例によってさらに例示する。他に記載しない限り、

50

標準的分子生体学的手順の全てを、以下において記載されるプロトコルに従って実施する：Molecular Cloning: A Laboratory Manual 1巻～3巻、Sambrook, J., Fritsch, E. F. およびManiatis, T. 編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989；Current Protocols in Molecular Biology、1巻～2巻、Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. およびStruhl, K. 編、Wiley Interscience、1987。

【0138】

基本的なテザー化アプローチの概念は、Eriansonら（前述）によって、およびPCT公開WO00/00823号中に記載されている。「拡張テザー化（extended tethering）」アプローチを、この適用において、標的分子（TBM）としてカスパーゼ-3を使用して、説明する。カスパーゼはシステインプロテアーゼのファミリーであり、このシステインプロテアーゼは、プログラム細胞死（アポトーシス）の開始および実行に参与することが既知である。第1カスパーゼ（ここで、カスパーゼ-1をいう）は、当初、インターロイキン-1-転換酵素（ICE）として命名されていた（Thornburryら、Nature 356:768-774（1992）；Cerrettiら、Science 356:97-100（1992））。続いて、莫大な数のカスパーゼが、カスパーゼファミリーを形成することを同定および特性付けられた。現在、このファミリー（カスパーゼ1～カスパーゼ10）には、少なくとも10のメンバーが存在する。カスパーゼは、酵素的に不活性な形態で細胞中で発現され、そして、アポトーシスの刺激に反応してタンパク質分解切断によって活性化される。不活性酵素前駆体は、阻害性N末端ドメインに加えて、大型ドメインおよび小型ドメイン（大型サブユニットおよび小型サブユニット）の構成をなす。カスパーゼの活性化は、大型サブユニットおよび小型サブユニットへのプロ酵素のプロセッシングに参与し、これは、分子内で内部的に起こる。カスパーゼを、自己凝集およびオートプロセッシングによってか（アポトーシス初期の場合）、または活性化した上流カスパーゼによる切断を介して（アポトーシスの実行段階の場合）のいずれかで、活性化する。総説として、例えばCohen G. M., Biochem. J. 326:1-16（1997）を参照のこと。

【0139】

公知の、カスパーゼのテトラペプチドインヒビターに基づいて（AtorおよびDolle, Current Pharmaceutical Design 1:191-210（1995））、エキステンダーを合成した：2,6-ジクロロ-安息香酸 3-(2-アセチルスルファニル-アセチルアミノ)-4-カルボキシル-2-オキシ-ブチルエステル（図4中の化合物5として示す）、この合成を、以下の実施例2に記載する。エキステンダーの遺伝子構造を、図4に示す。カスパーゼをエキステンダーと反応させることで改変し（実施例3）、続いて、拡張テザー化アプローチを使用して、実施例1中に記載されるように調製したジスルフィドライブラリーのスクリーニングのための生体学的標的分子として、使用した。

【0140】

市販の材料全てを、受け取ったまま使用した。合成した化合物の全てを¹H NMR [Bruker (Billerica, MA) DMX400 MHz Spectrometer] およびHPLC-MS (Hewlett-Packard Series 1100 MSD) によって、特徴付けた。

【0141】

（実施例1）

（ジスルフィドライブラリー）

ジスルフィドライブラリーを、以下の化合物クラスからの標準的な化学を使用して、合成した：アルデヒド、ケトン、カルボン酸、アミン、塩化スルホニル、イソシアネート、およびイソチオシアネート。例えば、ジスルフィド含有ライブラリーメンバーを、Parl

10

20

30

40

50

owおよび共同研究者らの方法 (ParlowおよびNorman sell、Mol. Diversity 1: 266~269 (1995)) を適用することによって、市販のカルボン酸およびモノ-N-(tert-ブトキシカルボニル)保護システイン(モノ-BOC-システイン)から、作製した。簡単に述べると、260 μmol の各カルボン酸を、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中で1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)を使用して、ポリスチレン樹脂上の130 μmol 当量の4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゾフェノンに、固定化した。室温で4時間後、DMF($\times 2$)、ジクロロメタン(DCM、 $\times 3$)、およびテトラヒドロフラン(THF、 $\times 1$)を用いて樹脂をリンスし、カップリングしていない酸およびDICを除去した。酸を、THF中の66 μmol のモノ-BOC保護システインを用いるアミド形成を介して、樹脂から切断した。外界温度にて12時間反応後、溶媒をエバポレートし、そして、BOC基を、DCM中で80%トリフルオロ酢酸(TFA)を使用することによって、各ジスルフィドのカップリングしていない半分から、除去した。生成物をHPLC-MSによって特徴付け、そして、実質的に純粋であるこれらの生成物を、さらなる精製なしで使用した。総計530の化合物を、この方法論を使用することによって、作製した。

10

【0142】

ライブラリーをまた、モノ-BOC-保護システインならびに種々の塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートから、構築した。塩化スルホニルの場合、10 μmol の各塩化スルホニルを、15 mgのポリ(4-ビニルピリジン)存在下で、THF(2%ジイソプロピルエチルアミンを用いて)中で、10.5 μmol のモノ-BOC-保護システインと結合させた。48時間後、ポリ(4-ビニルピリジン)を、ろ過を介して除去し、そして、溶媒をエバポレートした。BOC基を、DCM中で50%TFAを使用することで除去した。イソチオシアネートの場合、10 μmol の各イソシアネートまたはイソチオシアネートを、THF中で10.5 μmol のモノ-BOC-保護システインとカップリングさせた。外界温度にて12時間反応させた後、溶媒をエバポレートし、そして、BOC基を、DCM中で50%TFAを使用することによって、除去した。総計212の化合物を、この方法論を使用することによって、作製した。

20

【0143】

最後に、オキシムベースライブラリーを、1:1のメタノール/クロロホルム(2%酢酸を添加)中で、10 μmol の特定のアルデヒドまたはケトンと10.5 μmol のHO(CH₂)₂S-S(CH₂)₂ONH₂を外界温度にて12時間反応させることで構築し、オキシム生成物を得た。総計448の化合物を、この方法論を使用することによって作製した。

30

【0144】

個別のライブラリーメンバーを、50 mMまたは100 mMの最終濃度まで、アセトニトリルまたはジメチルスルホキシドのいずれか中に、溶解した。次いで、これらの各々のアリコート、8個~15個の別個の化合物群中へプールした(このプールの各メンバーは、固有の分子量を有する)。

【0145】

(実施例2)

(エキステンダー(SME)合成)

拡張テザー化アプローチのために、エキステンダー(2,6-ジクロロ-安息香酸3-(2-アセチルスルファニル-アセチルアミノ)-4-カルボキシル-2-オキソ-ブチルエステル、図4中の化合物5として示す)を、図4中に示すような一連の化学反応を使用して合成し、そして、以下に記載する。

40

【0146】

(2-(2-アセチルスルファニル-アセチルアミノ)-コハク酸4-tert-ブチルエステル(化合物2、図4)の合成)

アセチルスルファニル酢酸ペンタフルオロフェニルエステル(1.6 g、5.3 mmol)およびH-Asp(OtBu)-OH(1 g、5.3 mmol)を、乾燥ジクロロメタ

50

ン (D C M) (2 0 m l) 中 で 混 合 し た 。 次 い で 、 1 . 6 m l の ト リ エ チ ル ア ミ ン (1 1 . 5 m m o l) を 添 加 し 、 そ し て 、 反 応 を 、 外 界 温 度 に て 3 . 5 時 間 進 行 さ せ た 。 次 い で 、 有 機 層 を 1 5 m l の 1 M カ ル ボ ン 酸 ナ ト リ ウ ム を 用 い て 抽 出 し (× 3) 、 合 わ せ た 水 性 画 分 を 、 1 0 0 m l の 1 M 硫 酸 水 素 ナ ト リ ウ ム を 用 い て 酸 性 化 し 、 そ し て 3 0 m l の エ チ ル ア セ テ ー ト を 用 い て 抽 出 し た (× 3) 。 次 い で 、 結 合 し た 有 機 性 画 分 を 、 3 0 m l の 1 M ヒ ド ロ ゲ ン ス ル ホ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 、 3 0 m l の 5 M N a C l を 用 い て リ ン ス し 、 硫 酸 ナ ト リ ウ ム で 乾 燥 さ せ 、 ろ 過 し 、 そ し て 減 圧 下 で エ バ ポ レ ー ト し て 、 1 . 9 7 g の ほ ぼ 無 色 の シ ロ ッ プ を 得 、 さ ら な る 精 製 な し に 使 用 し た 。 分 子 量 = 3 0 5 (実 測 値 3 0 6 、 M + 1) 。

【 0 1 4 7 】

(3 - (2 - ア セ チ ル ス ル フ ァ ニ ル - ア セ チ ル ア ミ ノ) - 5 - ク ロ ロ - 4 - オ キ ソ - ペ ン タ ン 酸 t e r t - ブ チ ル エ ス テ ル (化 合 物 3 、 図 4) の 合 成)

遊 離 酸 (化 合 物 2) を 1 0 m l の 乾 燥 テ トラ ヒ ド ロ フ ラ ン (T H F) 中 に 溶 解 し 、 0 に 冷 却 し 、 そ し て 、 0 . 5 8 m l N - メ チ ル モ ル フ オ リ ン (5 . 3 m m o l) お よ び 0 . 6 9 イ ソ プ チ ル ク ロ ロ ギ 酸 を 用 い て 処 理 し た 。 濃 密 な 白 色 沈 澱 を 、 直 ち に 形 成 し 、 そ し て 3 0 分 後 、 反 応 物 を ガ ラ ス フ リ ッ ト を 介 し て ろ 過 し 、 そ し て 、 更 な る 1 0 m l の T H F を 有 す る 新 し い フ ラ ス コ に 移 し た 。 一 方 、 ジ ア ゾ メ タ ン を 、 1 - メ チ ル - 3 - ニ ト ロ - 1 - ニ ト ロ ソ グ ア ニ ジ ン (2 . 3 g 、 1 5 . 6 m m o l) と 7 . 4 m l の 4 0 % 水 性 K O H お よ び 2 5 m l ジ エ チ ル エ ー テ ル と を 、 0 に て 4 5 分 間 反 応 さ せ る こ と に よ っ て 、 調 製 し た 。 次 い で 、 黄 色 エ ー テ ル 層 を 、 混 合 ア ル デ ヒ ド を 含 有 す る 反 応 物 ヘ デ カ ン ト し 、 そ し て この 反 応 を 1 6 5 分 間 に わ た り ゆ っ く り 外 界 温 度 ま で 暖 め る 間 、 進 行 さ せ た 。 この 反 応 物 を 、 8 に 冷 却 し 、 そ し て ジ オ キ サ ン 中 の 1 . 5 m l の 4 N H C l (総 計 6 m m o l) を 滴 下 し た 。 こ れ は 、 多 く の 気 泡 を 生 じ 、 そ し て 黄 色 溶 液 は 無 色 と な っ た 。 この 反 応 を 、 徐 々 に 外 界 温 度 ま で 暖 め る 間 、 2 時 間 進 行 さ せ 、 次 い で 、 1 m l の 氷 酢 酸 を 用 い て ク エ ン チ し た 。 溶 媒 を 減 圧 下 で 除 去 し 、 そ し て 、 残 渣 を 7 5 m l の エ チ ル ア セ テ ー ト 中 に 再 溶 解 し 、 5 0 m l の 飽 和 ジ カ ル ボ ン 酸 ナ ト リ ウ ム 、 5 0 m l の 5 M N a C l で リ ン ス し (× 2) 、 硫 酸 ナ ト リ ウ ム で 乾 燥 し 、 ろ 過 し 、 そ し て 、 9 0 : 1 0 の ク ロ ロ ホ ル ム : エ チ ル ア セ テ ー ト を 使 用 す る フ ラ ッ シ ュ ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー に よ っ て 精 製 す る 前 に エ バ ポ レ ー ト し て 乾 燥 さ せ て 、 0 . 7 4 7 g の 淡 黄 色 油 (2 . 2 m m o l 、 (1) か ら 4 2 %) を 得 た 。 推 定 分 子 量 = 3 3 7 . 7 、 実 測 値 3 3 8 (M + 1) 。

【 0 1 4 8 】

(2 , 6 - ジ ク ロ ロ - 安 息 香 酸 3 - (2 - ア セ チ ル ス ル フ ァ ニ ル - ア セ チ ル ア ミ ノ) - 4 - t e r t - ブ ト キ シ カ ル ボ ニ ル - 2 - オ キ ソ - ブ チ ル エ ス テ ル (化 合 物 4 、 図 4) の 合 成)

ク ロ ロ メ チ ル ケ ト ン (化 合 物 3) (0 . 2 5 g 、 0 . 7 4 m m o l) を 、 5 m l の 乾 燥 N , N - ジ メ チ ル ホ ル ム ア ミ ド (D M F) (こ れ は 、 0 . 1 7 g の 2 , 6 - ジ ク ロ ロ 安 息 香 酸 (0 . 8 9 m m o l) お よ び 0 . 1 0 7 g の K F (1 . 8 4 m m o l) を 添 加 さ れ て い る) 中 に 溶 解 し た 。 反 応 を 、 1 9 時 間 、 外 界 温 度 に て 進 行 さ せ た 。 1 9 時 間 の 時 点 で 、 7 5 m l の エ チ ル ア セ テ ー ト で 希 釈 し 、 5 0 m l の 飽 和 炭 酸 水 素 酸 ナ ト リ ウ ム 、 5 0 m l の 1 M 硫 酸 水 素 ナ ト リ ウ ム 、 5 0 m l の 5 M N a C l を 用 い て リ ン ス し (× 2) 、 硫 酸 ナ ト リ ウ ム で 乾 燥 さ せ 、 ろ 過 し 、 そ し て 、 減 圧 下 で 乾 燥 さ せ て 、 黄 色 シ ロ ッ プ を 得 た 。 H P L C - M S は 約 7 5 % 生 成 物 お よ び 2 5 % 未 反 応 物 (3) で あ る こ と を 示 し た 。 こ れ を 、 さ ら な る 精 製 な し に 使 用 し た 。 推 定 分 子 量 4 9 2 . 3 7 、 実 測 値 4 9 3 (M + 1) 。

【 0 1 4 9 】

(2 , 6 - ジ ク ロ ロ - 安 息 香 酸 3 - (2 - ア セ チ ル ス ル フ ァ ニ ル - ア セ チ ル ア ミ ノ) - 4 - カ ル ボ キ シ - 2 - オ キ ソ - ブ チ ル エ ス テ ル (化 合 物 5 、 図 4) の 合 成)

以 前 の 工 程 の 生 成 物 (化 合 物 4) を 、 1 0 m l の 乾 燥 D C M 中 に 溶 解 し 、 0 に 冷 却 し 、 そ し て 、 9 m l の ト リ フ ロ ロ 酢 酸 (T F A) を 用 い て 処 理 し た 。 次 い で 、 この 反 応 物 を 氷 浴 か ら 取 り 出 し 、 そ し て 、 1 時 間 に わ た り 外 界 温 度 ま で 暖 め た 。 溶 媒 を 減 圧 下 で 除 去 し 、 そ し て 、 残 渣 を D C M 中 に 2 回 溶 解 し 、 そ し て 、 残 存 す る T F A を 除 去 す る た め に エ バ ポ

10

20

30

40

50

レートした。粗生成物を、逆相高圧液体クロマトグラフィーによって精製し、101.9 mg (0.234 mmol、(3) から32%) の白色吸湿性粉末を得た。推定分子量 = 436.37、実測値437 (M+1)。これをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、50 mM のストック溶液を得た。

【0150】

(実施例3)

(エキステンダーを用いたカスパーゼ3の改変)

カスパーゼ3を、標準的な技術 (Rotondaら、Nature Structural Biology 3(7): 619~625 (1996)) を使用してクローニングし、大量発現し、そして精製した。2 ml の0.2 mg/ml カスパーゼ3溶液に、実施例2において記載されたように合成した10 ml の50 mM 2,6-ジクロロ-安息香酸3-(2-アセチルスルファニル-アセチルアミノ)-4-カルボキシ-2-オキソ-ブチルエステル (化合物5、図3) を添加し、そして、反応を3.5時間、外界温度にて進行させた。3.5時間の時点で、質量分析は、カスパーゼ3大型サブユニットの完全な改変 (分子量16861 Da、計算分子量16860 Da) を示した。チオエステルを、PBS緩衝液中で緩衝化された0.2 ml の0.5 M ヒドロキシルアミンを加えることによって脱保護し、反応を18時間進行させた。18時間の時点で、この巨大なサブユニットは、16819 Da (計算16818 Da) の質量を有した。このタンパク質を、Ultrafree 5 MWCO ユニット (Millipore) 中で濃縮し、そして、緩衝液を、Nap-5 カラム (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して、0.1 M TES (pH 7.5) に交換した。得られた「拡張された」カスパーゼ-3の構造を、図6に示す。

10

20

【0151】

次いでこのタンパク質を、上記 (実施例1中) のように調製したジスルフィドライブラリーに対して、以下の実施例4に記載される方法論を使用して、スクリーニングした。

【0152】

(実施例4)

(ジスルフィドライブラリーのスクリーニング)

典型的な実験において、8個~15個のジスルフィド含有化合物のライブラリーを含む1 µl のDMSO溶液を、49 µl のエキステンダー改変タンパク質含有緩衝液に添加した。質量分析を結合リガンドの同定に用いた場合、化合物を各々が固有の分子量を有するように選択した。例えば、これらの分子量は、少なくとも10の原子質量単位まで異なり、その結果、デコンヴォルションは明白である。デコンヴォルションの簡便さに起因して、8個~15個のジスルフィド含有化合物のプールを、スクリーニングのために典型的に選んだが、より巨大なプールもまた、使用され得る。タンパク質は約15 µM の濃度で存在し、ジスルフィドライブラリーのメンバー各々は約0.2 mM で存在し、従って、全ジスルフィドライブラリーメンバーの総濃度は、約2 mM であった。反応を、25 mM リン酸カルシウム (pH 7.5) および1 mM 2-メルカプトエタノールを含有する緩衝液で行ったが、他の緩衝液および還元剤も使用し得る。この反応を少なくとも30分間、外界温度にて、平衡化した。これらの条件は、タンパク質が質量分析においてイオン化する容易さ、特定のシステイン (単数または複数) の反応性などに依存して、かなり変化し得る。

30

40

【0153】

アスパルチル結合体化カスパーゼ-3 (実施例3) およびライブラリー (実施例1) の平衡化の後、反応物を、HP1100 HPLC に注入し、質量分析器に装置したC₁₈ カラム (Finnigan-MAT LCQ, San Jose, CA) でクロマトグラフした。タンパク質から生じる複数の荷電イオンを、利用可能なソフトウェア (XCALIBUR) を用いてデコンヴォルトして、タンパク質の質量を得た。次いで、ジスルフィド結合を介してタンパク質に結合される任意のライブラリーメンバーの同定を、観察された質量から、改変されていないタンパク質の既知の質量を引くことによって、容易に決定

50

した。このプロセスは、ライブラリーメンバーの付着がタンパク質自身に特有なイオン化を劇的に変化しないということ（伝統的仮説）を、仮定する。なぜならば、多くの場合、タンパク質は、任意の所定のライブラリーメンバーよりも、少なくとも20倍大きいからである。この仮定を、1つのタンパク質によって選択された小型分子が、他のタンパク質によって選択されないことを立証することによって、確認した。

【0154】

代表的な実験の結果を、図6に示す。図6の右側のスペクトルは、「拡張」カスパーゼ-3（実施例3で記載したように合成した）が、拡張カスパーゼ3を改変するプールから同定されたジスルフィド含有分子と反応した結果を示す。得られた優意なピーク（17,094の質量）は、カスパーゼ3上の第2の目的部位に対して固有の親和性を有する低分子リガンドに、共有結合的に連結されたカスパーゼ3に対応し、結果として上記のピークに示されるダイアフォア化合物を生じる。

10

【0155】

左側に示される質量スペクトルは、改変されていないカスパーゼ3（システイン含有ポリペプチド標的）のデコンヴォリューター（*deconvoluter*）質量スペクトルであり、そして、上記で使用された同じジスルフィド含有低分子リガンドである。このスペクトルは、改変されていないカスパーゼ3の質量（16,614 DA）に対応する優意なピークを、示す。有意により小さいピークは、2-アミノエタンチオールにジスルフィド結合されたカスパーゼ-3（合わせた質量：16,691 Da）を表す。ここで、低分子リガンドの結合部位が反応性システインから非常に遠く、そして、エキステンダーが導入

20

【0156】

次いで、上記のように同定された初期リード化合物を、カスパーゼ-3への特異的結合における、種々の置換基の相対的な重要性を評価するために改変した。

【0157】

本明細書を通して引用された全ての参考文献を、参考として明白に援用する。

【0158】

本発明を、これらの特定の実施形態の参考とともに記載してきたが、種々の変更がなされ得、そして、当価物が、本発明の概念および範囲から逸脱することなく置換され得るということを、当業者は理解するべきである。多くの改変が、目的に対して、特定の、状況、材料、物質の組成、プロセス、プロセス工程を採用するようになされ得る。このような改変の全ては、本明細書に添付の特許請求項の範囲内にあることが、意図される。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、側鎖特異的リガンドの発見のための基本的結合アプローチの模式図である。遊離チオール基を含むか、または遊離チオール基を含むように改変された標的分子（例えば、システイン含有タンパク質）は、還元剤（例えば、2-メルカプトエタノール）の存在下でジスルフィド含有ライブラリーと平衡化される。大部分のライブラリーのメンバーは、標的分子に対してほとんどまたは全く固有の親和性を有さないため、質量作用により、非改変標的分子に向かって平衡になる。しかし、ライブラリーメンバーが、標的分子に対して固有の親和性を実際に示す場合、平衡が、改変された標的分子に向かってシフトし、この標的分子がライブラリーメンバーとジスルフィド結合により結合される。

40

【図2】

図2は、静止状態の拡大結合アプローチの模式図である。第1の工程において、遊離チオール基を含むか、または遊離チオール基を含むように改変された標的分子（例えば、システイン含有タンパク質）は、チオール含有エキステンダー（*extender*）（標的分子上のチオール基と不可逆性共有結合を形成し得る反応基を含む）、標的分子に対する固有の親和性を有する部分、およびチオール基により改変される。次いで、標的分子とチオール含有エキステンダーとの間で形成された複合体は、ジスルフィド含有モノフォア（*monophore*）のライブラリーをスクリーニングして、標的分子上の第2の結合部位

50

に対する最高の固有の結合親和性を有するライブラリーメンバーを同定するために用いられる。LG = リガンド ; PG = 保護基 ; R = 反応基。

【 図 3 】

図 3 は、動力学的な拡大結合ストラテジーを示し、ここでエクステンダーは、二官能性であり、2つの官能基（通常は、ジスルフィド）を含み、各々が、可逆性共有結合を形成し得る。R = 反応基。

【 図 4 】

図 4 は、実施例 2 に記載される、特定のエクステンダー（2,6-ジクロロ-安息香酸3-(2-アセチルスルファニル-アセチルアミノ)-4-カルボキシ-2-オキソ-ブチルエステル）の化学合成を示す。

【 図 5 】

図 5 は、カスパーゼ 3 の公知のテトラペプチドインヒビターと、このインヒビターに基づいて合成された包括的エクステンダーとの間の構造比較を示す。

【 図 6 A 】

図 6 A は、2つの代表的な拡大結合実験の質量スペクトルを示す。

【 図 6 B 】

図 6 B は、2つの代表的な拡大結合実験の質量スペクトルを示す。

【 図 1 】

質量分析によるスクリーニング反応の直接分析

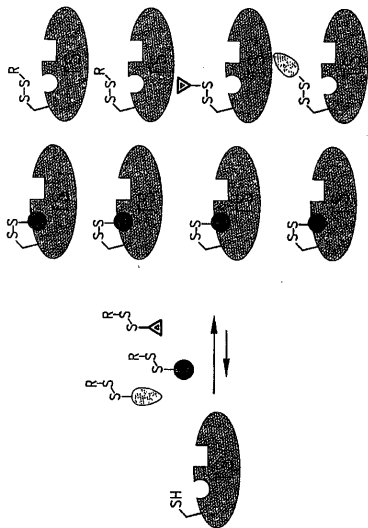
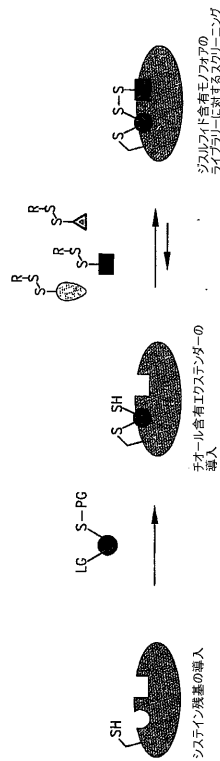


FIG. 1

【 図 2 】

拡大されたライゲーション:



スクリーニングされたライゲーション

FIG. 2

【 図 3 】

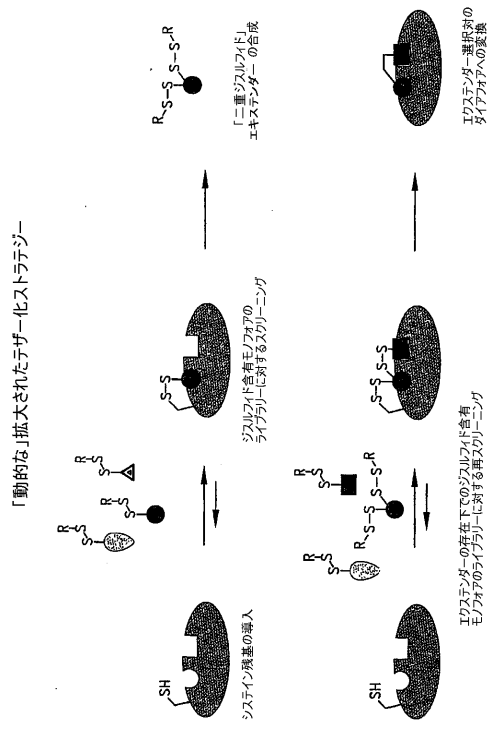


FIG. 3

【 図 5 】

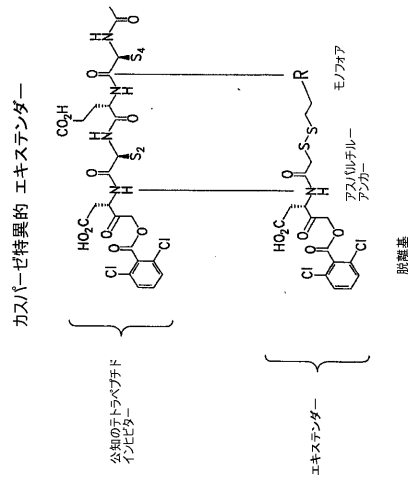


FIG. 5

【 図 6 A 】

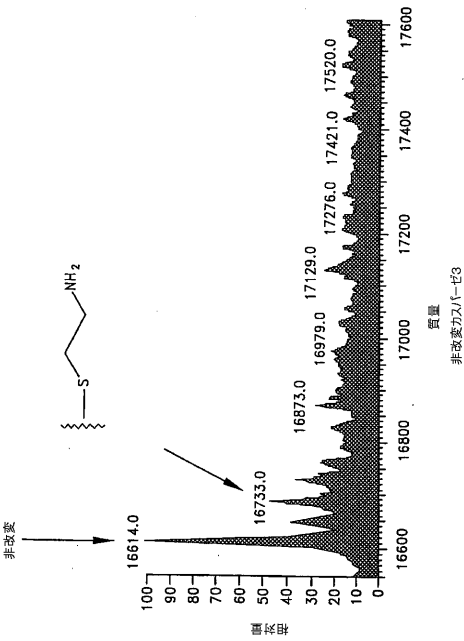


FIG. 6A

【 図 6 B 】

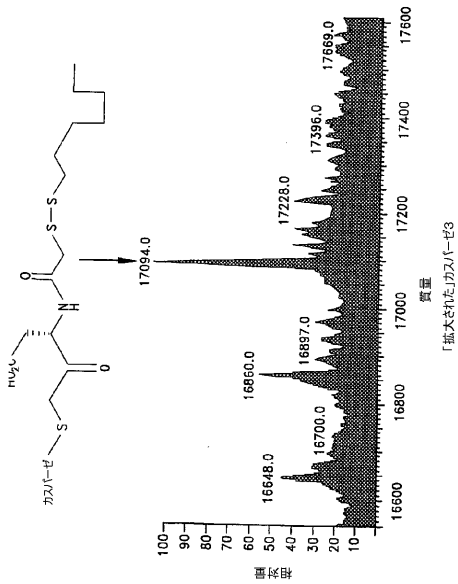


FIG. 6B

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/42773 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/53
(21) International Application Number: PCT/US01/44036
(22) International Filing Date: 20 November 2001 (20.11.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/252,294 21 November 2000 (21.11.2000) US

(74) Agent: DELANEY, Karoline, A., Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP, 620 Newport Center Drive, 16th Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GM, GU, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, ST, SV, SZ, TD, TH, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): SUNE-SIS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US], 341 Oyster Point Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

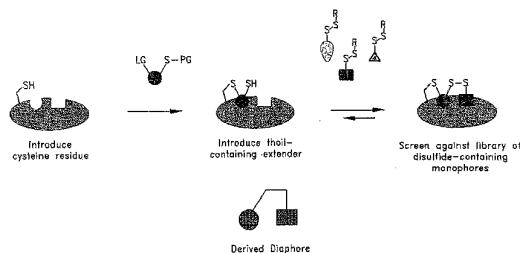
(72) Inventors: and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ERLANSON, Daniel, A. [US/US], 1312 32nd Avenue, San Francisco, CA 94122 (US); BRAISTED, Andrew [US/US], 738 Joost Avenue, San Francisco, CA 94127 (US); MCDOWELL, Robert [US/US], 1264 Church Street, San Francisco, CA 94114 (US); PRESCOTT, John [US/US], 1419 5th Avenue, San Francisco, CA 94122 (US).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report — entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau

[Continued on next page]

(54) Title: AN EXTENDED TETHERING APPROACH FOR RAPID IDENTIFICATION OF LIGANDS

Extended tethering:



(57) Abstract: The invention concerns a method for rapid identification and characterization of binding partners for a target molecule, and for providing binding partners with improved binding affinity. More specifically, the invention concerns an improved tethering method for the rapid identification of at least two binding partners that bind near one another to a target molecule.

WO 02/42773 A2

WO 02/42773 A2



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

AN EXTENDED TETHERING APPROACH FOR RAPID IDENTIFICATION OF LIGANDS

Background of the InventionField of the Invention

The present invention relates generally to a method for rapid identification and characterization of binding partners for a target molecule, and for providing modified binding partners with improved binding affinity. More specifically, the invention concerns an improved tethering method for the rapid identification of small molecule fragments that bind near one another on a target molecule. The method is particularly suitable for rapid identification of small molecule ligands that bind weakly near sites of interest through a preformed linker on a target biological molecule (TBM), such as a polypeptide or other macromolecule, to produce higher affinity compounds.

Description of the Related Art

The drug discovery process usually begins with massive screening of compound libraries (typically hundreds of thousands of members) to identify modest affinity leads ($K_d \sim 1$ to $10 \mu\text{M}$). Although some targets are well suited for this screening process, most are problematic because moderate affinity leads are difficult to obtain. Identifying and subsequently optimizing weaker binding compounds would improve the success rate, but screening at high concentrations is generally impractical because of compound insolubility and assay artifacts. Moreover, the typical screening process does not target specific sites for drug design, only those sites for which a high-throughput assay is available. Finally, many traditional screening methods rely on inhibition assays that are often subject to artifacts caused by reactive chemical species or denaturants.

Erlanson *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:9367-9372 (2000), have recently reported a new strategy, called "tethering", to rapidly and reliably identify small (~250 Da) soluble drug fragments that bind with low affinity to a specifically targeted site on a protein or other macromolecule, using an intermediary disulfide "tether." According to this approach, a library of disulfide-containing molecules is allowed to react with a cysteine-containing target protein under partially reducing conditions that promote rapid thiol exchange. If a molecule has even weak affinity for the target protein, the disulfide bond ("tether") linking the molecule to the target protein will be entropically stabilized. The disulfide-tethered fragments can then be identified by a variety of methods, including mass spectrometry (MS), and their affinity improved by traditional approaches upon removal of the disulfide tether. See also PCT Publication No. WO 00/00823, published on January 6, 2000.

Although the tethering approach of Erlanson *et al.* represents a significant advance in the rapid identification of small low-affinity ligands, and is a powerful tool for generating drug leads, there is a need for further improved methods to facilitate the rational design of drug candidates.

Summary of the Invention

The present invention describes a strategy to rapidly and reliably identify ligands that have intrinsic binding affinity for different sites on a target molecule by using an extended tethering approach. This

WO 02/42773

PCT/US01/44036

approach is based on the design of a Small Molecule Extender (SME) that is tethered, via a reversible or irreversible covalent bond, to a Target Molecule (TM) at or near a first site of interest, and has a chemically reactive group reactive with small organic molecules to be screened for affinity to a second site of interest on the TM. Accordingly, the SME is used for screening a plurality of ligand candidates to identify a ligand that

5 has intrinsic binding affinity for a second site of interest on the TM. If desired, further SME's can be designed based on the identification of the ligand with binding affinity for the second site of interest, and the screening can be repeated to identify further ligands having intrinsic binding affinity for the same or other site(s) of interest on the same or related TMs.

One aspect of the invention concerns the design of a Small Molecule Extender (SME). In this

10 aspect, the invention concerns a process comprising:

(i) contacting a Target Molecule (TM) having a first and a second site of interest, and containing or modified to contain a reactive nucleophile or electrophile at or near the first site of interest with a plurality of first small organic ligand candidates, the candidates having a functional group reactive with the nucleophile or electrophile, under conditions such that a reversible covalent bond is formed between the

15 nucleophile or electrophile and a candidate that has affinity for the first site of interest, to form a TM-first ligand complex;

(ii) identifying the first ligand from the complex of (i); and

(iii) designing a derivative of the first ligand identified in (ii) to provide a SME having a first functional group reactive with the nucleophile or electrophile on the TM and a second functional group

20 reactive with a second ligand having affinity for the second site of interest.

In one embodiment of this aspect of the invention, the SME of step (iii) above is designed such that it is capable of forming an irreversible covalent bond with the nucleophile or electrophile of the TM. In a preferred embodiment, the reactive group on the TM is a nucleophile, preferably a thiol, protected thiol, reversible disulfide, hydroxyl, protected hydroxyl, amino, protected amino, carboxyl, or protected carboxyl

25 group, and preferred first functional groups on the SME are groups capable of undergoing SN2-like additions or forming Michael-type adducts with the nucleophile. SME's designed in this manner are then contacted with the TM to form an irreversible TM-SME complex. This complex is then contacted with a plurality of second small organic ligand candidates, where such candidates have a functional group reactive with the SME in the TM-SME complex. As a result, a candidate that has affinity for the second site of interest on the TM forms a

30 reversible covalent bond with the TM-SME complex, whereby a ligand having intrinsic binding affinity for the second site of interest is identified.

In an alternative embodiment of the invention, the SME of step (iii) above is designed to contain a first functional group that forms a first reversible covalent bond with the nucleophile or electrophile on the TM. The reactive group on the TM preferably is a nucleophile. The reversible covalent bond preferably is a

35 disulfide bond which is formed with a thiol, protected thiol, or reversible disulfide bond on the TM. SME's

WO 02/42773

PCT/US01/44036

designed in this manner are then contacted with the TM either prior to or simultaneously with contacting the TM with a plurality of second small organic ligand candidates, each small organic ligand candidate having a free thiol; protected thiol, or a reversible disulfide group, under conditions of thiol exchange, wherein a ligand candidate having affinity for the second site of interest on the TM forms a disulfide bond with the TM-SME complex, whereby a second ligand is identified. The process may be performed in the presence of a disulfide reducing agent, such as mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythreitol (DTE), mercaptopropanoic acid, glutathione, cysteamine, cysteine, tris(carboxyethyl)phosphine (TCEP), and tris(cyanoethyl)phosphine.

In a particular embodiment, the SME is designed based on selection of a small organic molecule having a thiol or protected thiol (disulfide monophore) from a library of such molecules by a Target Biological Molecule (TBM) having a thiol at or near a site of interest. In this case, the method of this invention is a process comprising:

(i) contacting a TBM containing or modified to contain a thiol, protected thiol or reversible disulfide group at or near a first site of interest on the TBM with a library of small organic molecules, each small organic molecule having a free thiol or a reversible disulfide group (disulfide monophores), under conditions of thiol exchange wherein a library member having affinity for a first site of interest forms a disulfide bond with the TBM;

(ii) identifying the library member (selected disulfide monophore) from (i); and

(iii) designing a derivative of the library member in (ii) that is the SME having a first functional group reactive with the thiol on the TBM and having a second functional group which is a thiol, protected thiol or reversible disulfide group.

Just as before, the SME can be designed to contain a first functional group that forms an irreversible or reversible covalent bond with the TBM, and can be used to screen small molecule ligand candidates, in particular libraries of small molecules, as described above, to identify a second ligand.

Thus, in one embodiment, the SME of step (iii) is designed to contain a first functional group that forms an irreversible covalent bond with the thiol on the TBM. Preferred first functional groups of this embodiment are groups capable of undergoing SN2 like additions or forming Michael-type adducts with the thiol. SME's designed in this manner are then contacted with the TBM to form an irreversible TBM-SME complex. This complex is then contacted with second library of small organic molecules, each small organic molecule having a free thiol or a reversible disulfide group, under conditions of thiol exchange wherein the library member having affinity, preferably the highest affinity, for a second site of interest on the TBM (second ligand) forms a disulfide bond with the TBM-SME complex.

In an alternative embodiment, the small molecule extender (SME) of step (iii) is designed to contain a first functional group that forms a first reversible disulfide bond with the thiol on the TBM. SME's designed in this manner are then contacted with the TBM either prior to or simultaneously with contacting the TBM with a second library of small organic molecules, each small organic molecule having a free thiol or a reversible

WO 02/42773

PCT/US01/44036

disulfide group, under conditions of thiol exchange under conditions wherein the member of the second library having affinity, preferably the highest affinity, for a second site of interest on the TBM (second ligand) forms a disulfide bond with the TBM-SME complex.

5 The process may be performed in the presence of a disulfide reducing agent, such as those listed above.

Determining the affinity of a ligand candidate (library member) for a first or second site of interest on a TM or TBM can be carried out by competition between different library members in a pool, or by comparison (i.e. titration) with a reducing agent, such as those listed above.

In a particular embodiment, the invention concerns a process comprising:

10 (i) contacting a Target Biological Molecule (TBM) containing or modified to contain a nucleophile at or near a site of interest on the TBM with a small molecule extender having a first functional group reactive with the nucleophile and having a second functional group which is a thiol, protected thiol or reversible disulfide group, thereby forming a TBM-Small Molecule Extender (TBM-SME) complex;

15 (ii) contacting the TBM-SME complex with a library of small organic molecules, each small organic molecule (ligand) having a free thiol, protected thiol or a reversible disulfide group, under conditions of thiol exchange wherein a library member having affinity for the site of interest forms a disulfide bond with the TBM-SME complex thereby forming a TBM-SME-ligand complex and

(iii) determining the ligand from (ii).

In another particular embodiment, the invention concerns a process comprising:

20 (i) providing a Target Biological Molecule (TBM) containing or modified to contain a reactive nucleophile near a first site of interest on the TBM;

(ii) contacting the TBM from (i) with a small molecule extender having a group reactive with the nucleophile on the TBM and having a free thiol or protected thiol;

25 (iii) adjusting the conditions to cause a covalent bond to be formed between the nucleophile on the TBM and the group on the small molecule extender thereby forming a covalent complex comprising the TBM and the small molecule extender, the complex displaying a free thiol or protected thiol near a second site of interest on the TBM;

(iv) contacting the complex from (iii) with a library of small organic molecules, each molecule having a free thiol or exchangeable disulfide linking group, under conditions of thiol exchange wherein the library member having the highest affinity for the second site of interest on the TBM forms a disulfide bond with the complex; and

30 (v) identifying the library member from (iv).

In a particular embodiment, the processes of the present invention may be performed with a library in which each member forms a disulfide bond. An example of such a library is one in which each member forms

WO 02/42773

PCT/US01/44036

a cysteamine disulfide. When library members form disulfides, a preferred molar ratio of reducing agent to total disulfides is from about 1:100 to about 100:1 and more preferably from about 1:1 to about 50:1.

The tethering process may be performed by contacting members of the disulfide library one at a time with the TBM or in pools of 2 or more. When pools are used it is preferred to use from 5-15 library members
5 per pool.

In all embodiments, the identity of the small molecules that bind to the SME and/or a site of interest on a TM or TBM may be determined, for example, by mass spectrometry (MS), or by means of a detectable tag. When mass spectrometry is used to detect the library member that binds to a TBM and pools are used, it is preferred that each member of the pool differs in molecular weight, preferably by about 10 Daltons.

10 Identification can be performed by measuring the mass of the TBM-library member complex, or by releasing the library member from the complex first or by using a functional assay, e.g. ELISA, enzyme assay etc.

In a different aspect, the invention concerns a molecule comprising a first and/or second ligand identified by any of the methods discussed above. In a particular embodiment, the molecule comprises a first and a second ligand covalently linked to one another. The covalent linkage may be provided by any covalent
15 bond, including but not limited to disulfide bonds.

In a further aspect, the invention concerns methods for synthesizing such molecules. The molecules obtained can, of course, be further modified, for example to impart improved properties, such as solubility, bioavailability, affinity, and half-life. For example, the disulfide bond can be replaced by a linker having greater stability under standard biological conditions. Possible linkers include, without limitation,
20 alkanes, alkenes, aromatics, heteroaromatics, ethers, and the like.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic illustration of the basic tethering approach for site-directed ligand discovery. A target molecule, containing or modified to contain a free thiol group (such as a cysteine-containing protein) is equilibrated with a disulfide-containing library in the presence of a reducing agent, such as 2-
25 mercaptoethanol. Most of the library members will have little or no intrinsic affinity for the target molecule, and thus by mass action the equilibrium will lie toward the unmodified target molecule. However, if a library member does show intrinsic affinity for the target molecule, the equilibrium will shift toward the modified target molecule, having attached to it the library member with a disulfide tether.

Figure 2 is a schematic illustration of the static extended tethering approach. In the first step, a
30 target molecule containing or modified to contain a free thiol group (such as a cysteine-containing protein) is modified by a thiol-containing extender, comprising a reactive group capable of forming an irreversible covalent bond with the thiol group on the target molecule, a portion having intrinsic affinity for the target molecule, and a thiol group. The complex formed between the target molecule and the thiol-containing extender is then used to screen a library of disulfide-containing monophores to identify a library member that

WO 02/42773

PCT/US01/44036

has the highest intrinsic binding affinity for a second binding site on the target molecule. LG = ligand; PG = protecting group; R = reactive group.

Figure 3 illustrates the dynamic extended tethering strategy, where the extender is bifunctional and contains two functional groups (usually disulfide), each capable of forming reversible covalent bonds. R = reactive group.

Figure 4 illustrates the chemical synthesis of a specific extender (2,6-dichloro-benzoic acid 3-(2-acetylsulfanyl-acetylamino)-4-carboxy-2-oxo-butyl ester), as described in Example 2.

Figure 5 shows the structural comparison between a known tetrapeptide inhibitor of Caspase-3 and a generic extender synthesized based on the inhibitor.

Figure 6 shows mass spectra of two representative extended tethering experiments.

Detailed Description of the Invention

1. Definitions

Unless defined otherwise, technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), and March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, NY 1992), provide one skilled in the art with a general guide to many of the terms used in the present application.

One skilled in the art will recognize many methods and materials similar or equivalent to those described herein, which could be used in the practice of the present invention. Indeed, the present invention is in no way limited to the methods and materials described. For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

The terms "target," "Target Molecule," and "TM" are used interchangeably and in the broadest sense, and refer to a chemical or biological entity for which a ligand has intrinsic binding affinity. The target can be a molecule, a portion of a molecule, or an aggregate of molecules. The target is capable of reversible attachment to a ligand via a reversible or irreversible covalent bond (tether). Specific examples of target molecules include polypeptides or proteins (e.g., enzymes, including proteases, e.g. cysteine, serine, and aspartyl proteases), receptors, transcription factors, ligands for receptors, growth factors, cytokines, immunoglobulins, nuclear proteins, signal transduction components (e.g., kinases, phosphatases), allosteric enzyme regulators, and the like, polynucleotides, peptides, carbohydrates, glycoproteins, glycolipids, and other macromolecules, such as nucleic acid-protein complexes, chromatin or ribosomes, lipid bilayer-containing structures, such as membranes, or structures derived from membranes, such as vesicles. The definition specifically includes Target Biological Molecules (TBMs) as defined below.

A "Target Biological Molecule" or "TBM" as used herein refers to a single biological molecule or a plurality of biological molecules capable of forming a biologically relevant complex with one another for which

WO 02/42773

PCT/US01/44036

a small molecule agonist or antagonist would have therapeutic importance. In a preferred embodiment, the TBM is a polypeptide that comprises two or more amino acids, and which possesses or is capable of being modified to possess a reactive group for binding to members of a library of small organic molecules.

The term "polynucleotide", when used in singular or plural, generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. Thus, for instance, polynucleotides as defined herein include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA including single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA including single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or include single- and double-stranded regions. In addition, the term "polynucleotide" as used herein refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The strands in such regions may be from the same molecule or from different molecules. The regions may include all of one or more of the molecules, but more typically involve only a region of some of the molecules. One of the molecules of a triple-helical region often is an oligonucleotide. The term "polynucleotide" specifically includes DNAs and RNAs that contain one or more modified bases. Thus, DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons are "polynucleotides" as that term is intended herein. Moreover, DNAs or RNAs comprising unusual bases, such as inosine, or modified bases, such as tritylated bases, are included within the term "polynucleotides" as defined herein. In general, the term "polynucleotide" embraces all chemically, enzymatically and/or metabolically modified forms of unmodified polynucleotides, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells, including simple and complex cells.

A "ligand" as defined herein is an entity which has an intrinsic binding affinity for the target. The ligand can be a molecule, or a portion of a molecule which binds the target. The ligands are typically small organic molecules which have an intrinsic binding affinity for the target molecule, but may also be other sequence-specific binding molecules, such as peptides (D-, L- or a mixture of D- and L-), peptidomimetics, complex carbohydrates or other oligomers of individual units or monomers which bind specifically to the target. The term "monophore" is used herein interchangeably with the term "ligand" and refers to a monomeric unit of a ligand. The term "diaphore" denotes two monophores covalently linked to form a unit that has a higher affinity for the target because of the two constituent monophore units or ligands binding to two separate but nearby sites on the target. The binding affinity of a diaphore that is higher than the product of the affinities of the individual components is referred to as "avidity." The term diaphore is used irrespective of whether the unit is covalently bound to the target or existing separately after its release from the target. The term also includes various derivatives and modifications that are introduced in order to enhance binding to the target.

A "site of interest" on a target as used herein is a site to which a specific ligand binds, which may include a specific sequence of monomeric subunits, e.g. amino acid residues, or nucleotides, and may have a

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- three-dimensional structure. Typically, the molecular interactions between the ligand and the site of interest on the target are non-covalent, and include hydrogen bonds, van der Waals interactions and electrostatic interactions. In the case of polypeptide, e.g. protein targets, the site of interest broadly includes the amino acid residues involved in binding of the target to a molecule with which it forms a natural complex *in vivo* or *in vitro*.
- 5 "Small molecules" are usually less than 10 kDa molecular weight, and include but are not limited to synthetic organic or inorganic compounds, peptides, (poly)nucleotides, (oligo)saccharides and the like. Small molecules specifically include small non-polymeric (e.g. not peptide or polypeptide) organic and inorganic molecules. Many pharmaceutical companies have extensive libraries of such molecules, which can be
- 10 conveniently screened by using the extended tethering approach of the present invention. Preferred small molecules have molecular weights of less than about 300 DA and more preferably less than about 650 Da.
- The term "tether" as used herein refers to a structure which includes a moiety capable of forming a reversible or reversible covalent bond with a target (including Target Biological Molecules as hereinabove defined), near a site of interest.
- 15 The phrase "Small Molecule Extender" (SME) as used herein refers to a small organic molecule having a molecular weight of from about 75 to about 1,500 daltons and having a first functional group reactive with a nucleophile or electrophile on a TM and a second functional group reactive with a ligand candidate or members of a library of ligand candidates. Preferably, the first functional group is reactive with a nucleophile on a TBM (capable of forming an irreversible or reversible covalent bond with such nucleophile), and the
- 20 reactive group at the other end of the SME is a free or protected thiol or a group that is a precursor of a free or protected thiol. In one embodiment, at least a portion of the small molecule extender is capable of forming a noncovalent bond with a first site of interest on the TBM (i.e. has an inherent affinity for such first site of interest). Included within this definition are small organic (including non-polymeric) molecules containing metals such as Cd, Hg and As which may form a bond with the nucleophile e.g. SH of the TBM.
- 25 The phrase "reversible covalent bond" as used herein refers to a covalent bond which can be broken, preferably under conditions that do not denature the target. Examples include, without limitation, disulfides, Schiff-bases, thioesters, and the like.
- The term "reactive group" with reference to a ligand is used to describe a chemical group or moiety providing a site at which covalent bond with the ligand candidates (e.g. members of a library or small organic
- 30 compounds) may be formed. Thus, the reactive group is chosen such that it is capable of forming a covalent bond with members of the library against which it is screened.
- The term "antagonist" is used in the broadest sense and includes any ligand that partially or fully blocks, inhibits or neutralizes a biological activity exhibited by a target, such as a TBM. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any ligand that mimics a biological activity
- 35 exhibited by a target, such as a TBM, for example, by specifically changing the function or expression of such

WO 02/42773

PCT/US01/44036

TBM, or the efficiency of signaling through such TBM, thereby altering (increasing or inhibiting) an already existing biological activity or triggering a new biological activity.

The phrases "modified to contain" and "modified to possess" are used interchangeably, and refer to making a mutant, variant or derivative of the target, or the reactive nucleophile or electrophile, including but not limited to chemical modifications. For example, in a protein one can substitute an amino acid residue having a side chain containing a nucleophile or electrophile for a wild-type residue. Another example is the conversion of the thiol group of a cysteine residue to an amine group.

The term "reactive nucleophile" as used herein refers to a nucleophile that is capable of forming a covalent bond with a compatible functional group on another molecule under conditions that do not denature or damage the target, e.g. TBM. The most relevant nucleophiles are thiols, alcohols, activated carbonyls, epoxides, aziridines, aromatic sulfonates, hemiacetals, and amines. Similarly, the term "reactive electrophile" as used herein refers to an electrophile that is capable of forming a covalent bond with a compatible functional group on another molecule, preferably under conditions that do not denature or otherwise damage the target, e.g. TBM. The most relevant electrophiles are imines, carbonyls, epoxides, aziridines, sulfonates, and hemiacetals.

A "first site of interest" on a target, e.g. TBM refers to a site that can be contacted by at least a portion of the SME when it is covalently bound to the reactive nucleophile or electrophile. The first site of interest may, but does not have to possess the ability to form a noncovalent bond with the SME.

The phrases "group reactive with the nucleophile," "nucleophile reactive group," "group reactive with an electrophile," and "electrophile reactive group," as used herein, refer to a functional group on the SME that can form a covalent bond with the nucleophile/electrophile on the TM, e.g. TBM under conditions that do not denature or otherwise damage the TM, e.g. TBM.

The term "protected thiol" as used herein refers to a thiol that has been reacted with a group or molecule to form a covalent bond that renders it less reactive and which may be deprotected to regenerate a free thiol.

The phrase "adjusting the conditions" as used herein refers to subjecting a target, such as a TBM to any individual, combination or series of reaction conditions or reagents necessary to cause a covalent bond to form between the ligand and the target, such as a nucleophile and the group reactive with the nucleophile on the SME, or to break a covalent bond already formed.

The term "covalent complex" as used herein refers to the combination of the SME and the TM, e.g. TBM which is both covalently bonded through the nucleophile/electrophile on the TM, e.g. TBM with the group reactive with the nucleophile/electrophile on the SME, and non-covalently bonded through a portion of the small molecule extender and the first site of interest on the TM, e.g. TBM.

The phrase "exchangeable disulfide linking group" as used herein refers to the library of molecules screened with the covalent complex displaying the thiol-containing small molecule extender, where each

WO 02/42773

PCT/US01/44036

member of the library contains a disulfide group that can react with the thiol or protected thiol displayed on the covalent complex to form a new disulfide bond when the reaction conditions are adjusted to favor such thiol exchange.

The phrase "highest affinity for the second site of interest" as used herein refers to the molecule
5 having the greater thermodynamic stability toward the second site of interest on the TM, e.g. TBM that is preferentially selected from the library of disulfide-containing library members.

"Functional variants" of a molecule herein are variants having an activity in common with the reference molecule.

"Active" or "activity" means a qualitative biological and/or immunological property.

10

2. Targets

Targets, such as target biological molecules (TBMs), that find use in the present invention include, without limitation, molecules, portions of molecules and aggregates of molecules to which a ligand candidate may bind, such as polypeptides or proteins (e.g., enzymes, receptors, transcription factors, ligands for
15 receptors, growth factors, immunoglobulins, nuclear proteins, signal transduction components, allosteric enzyme regulators, and the like), polynucleotides, peptides, carbohydrates, glycoproteins, glycolipids, and other macromolecules, such as nucleic acid-protein complexes, chromatin or ribosomes, lipid bilayer-containing structures, such as membranes, or structures derived from membranes, such as vesicles. The target can be obtained in a variety of ways, including isolation and purification from natural source, chemical
20 synthesis, recombinant production and any combination of these and similar methods.

Preferred enzyme target families are cysteine proteases, aspartyl proteases, serine proteases, metalloproteases, kinases, phosphatases, polymerases and integrases. Preferred protein:protein targets are 4-helical cytokines, trimeric cytokines, signaling modules, transcription factors and chemokines.

In a particularly preferred embodiment, the target is a TBM, and even more preferably is a
25 polypeptide, especially a protein. Polypeptides, including proteins, that find use herein as targets for binding ligands, preferably small organic molecule ligands, include virtually any polypeptide (including short polypeptides also referred to as peptides) or protein that comprises two or more binding sites of interest, and which possesses or is capable of being modified to possess a reactive group for binding to a small organic molecule or other ligand (e.g. peptide). Polypeptides of interest may be obtained commercially,
30 recombinantly, by chemical synthesis, by purification from natural source, or otherwise and, for the most parts are proteins, particularly proteins associated with a specific human disease or condition, such as cell surface and soluble receptor proteins, such as lymphocyte cell surface receptors, enzymes, such as proteases (e.g., serine, cysteine, and aspartyl proteases) and thymidylate synthetase, steroid receptors, nuclear proteins, allosteric enzymes, clotting factors, kinases (both serine and threonine) and dephosphorylases (or
35 phosphatases, either serine/threonine or protein tyrosine phosphatases, e.g. PTP's, especially PTP1B),

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- bacterial enzymes, fungal enzymes and viral enzymes (especially those associate with HIV, influenza, rhinovirus and RSV), signal transduction molecules, transcription factors, proteins or enzymes associated with DNA and/or RNA synthesis or degradation, immunoglobulins, hormones, receptors for various cytokines including, for example, erythropoietin (EPO), granulocyte colony stimulating (G-CSF) receptor, granulocyte
- 5 macrophage colony stimulating (GM-CSF) receptor, thrombopoietin (TPO), interleukins, e.g. IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, growth hormone, prolactin, human placental lactogen (LPL), CNTF, oncostatin, various chemokines and their receptors, such as RANTES MIP β , IL-8, various ligands and receptors for tyrosine kinase, such as insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), epidermal growth factor (EGF), heregulin- α and heregulin- β , vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PLGF), tissue growth
- 10 factors (TGF- α and TGF- β), nerve growth factor (NGF), various neurotrophins and their ligands, other hormones and receptors such as, bone morphogenic factors, follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH), trimeric hormones including tissue necrosis factor (TNF) and CD40 ligand, apoptosis factor-1 and -2 (AP-1 and AP-2), p53, bax/bcl2, mdm2, caspases, and proteins and receptors that share 20% or more sequence identity to these.
- 15 An important group of human inflammation and immunology targets includes: IgE/IgER, ZAP-70, Ick, syk, ITK/BTK, TACE, Cathepsin S and F, CD11a, LFA/ICAM, VLA-4, CD28/B7, CTLA4, TNF alpha and beta, (and the p55 and p75 TNF receptors), CD40L, p38 map kinase, IL-2, IL-4, IL-13, IL-15, Rac 2, PKG theta, IL-8, TAK-1, jnk, IKK2 and IL-18.
- Still other important specific targets include: caspases 1, 3, 8 and 9, IL-1/IL-1 receptor, BACE, HIV
- 20 integrase, PDE IV, Hepatitis C helicase, Hepatitis C protease, rhinovirus protease, trypsin, cPLA (cytosolic Phospholipase A2), CDK4, c-jun kinase, adaptors such as Grb2, GSK-3, AKT, MEKK-1, PAK-1, raf, TRAF's 1-6, Tie2, ErbB 1 and 2, FGF, PDGF, PARP, CD2, C5a receptor, CD4, CD26, CD3, TGF-alpha, NF-kB, IKK beta, STAT 6, Neurokinin-1, PTP-1B, CD45, Cdc25A, SHIP-2, TC-PTP, PTP-alpha, LAR and human p53, bax/bcl2 and mdm2.
- 25 The target, e.g. a TBM of interest will be chosen such that it possesses or is modified to possess a reactive group which is capable of forming a reversible or irreversible covalent bond with a ligand having intrinsic affinity for a site of interest on the target. For example, many targets naturally possess reactive groups (for example, amine, thiol, aldehyde, ketone, hydroxyl groups, and the like) to which ligands, such as members of an organic small molecule library, may covalently bond. For example, polypeptides often have
- 30 amino acids with chemically reactive side chains (e.g., cysteine, lysine, arginine, and the like). Additionally, synthetic technology presently allows the synthesis of biological target molecules using, for example, automated peptide or nucleic acid synthesizers, which possess chemically reactive groups at predetermined sites of interest. As such, a chemically reactive group may be synthetically introduced into the target, e.g. a TBM, during automated synthesis.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

In one particular embodiment, the target comprises at least a first reactive group which, if the target is a polypeptide, may or may not be associated with a cysteine residue of that polypeptide, and preferably is associated with a cysteine residue of the polypeptide, if the tether chosen is a free or protected thiol group (see below). The target preferably contains, or is modified to contain, only a limited number of free or protected thiol groups, preferably not more than about 5 thiol groups, more preferably not more than about 2 thiol groups, more preferably not more than one free thiol group, although polypeptides having more free thiol groups will also find use. The target, such as TBM, of interest may be initially obtained or selected such that it already possesses the desired number of thiol groups, or may be modified to possess the desired number of thiol groups.

When the target is a polynucleotide, a tether can, for example, be attached to the polynucleotide on a base at any exocyclic amine or any vinyl carbon, such as the 5- or 6- position of pyrimidines, 8- or 2- positions of purines, at the 5' or 3' carbons, at the sugar phosphate backbone, or at internucleotide phosphorus atoms. However, a tether can be introduced also at other positions, such as the 5-position of thymidine or uracil. In the case of a double-stranded DNA, for example, a tether can be located in a major or minor groove, close to the site of interest, but not so close as to result in steric hindrance, which might interfere with binding of the ligand to the target at the site of interest.

Those skilled in the art are well aware of various recombinant, chemical, synthesis and/or other techniques that can be routinely employed to modify a target, e.g. a polypeptide of interest such that it possesses a desired number of free thiol groups that are available for covalent binding to a ligand candidate comprising a free thiol group. Such techniques include, for example, site-directed mutagenesis of the nucleic acid sequence encoding the target polypeptide such that it encodes a polypeptide with a different number of cysteine residues. Particularly preferred is site-directed mutagenesis using polymerase chain reaction (PCR) amplification (see, for example, U.S. Pat. No. 4,663,195 issued 28 July 1987; and Current Protocols In Molecular Biology, Chapter 15 (Ausubel *et al.*, ed., 1991). Other site-directed mutagenesis techniques are also well known in the art and are described, for example, in the following publications: Ausubel *et al.*, *supra*, Chapter 8; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition (Sambrook *et al.*, 1989); Zoller *et al.*, Methods Enzymol. 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, DNA 3:479-488 (1984); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:6487 (1987); Brake *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642-4646 (1984); Bolstein *et al.*, Science 229:1193 (1985); Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. 154:367-82 (1987); Adelman *et al.*, DNA 2:183 (1983); and Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986). Cassette mutagenesis (Wells *et al.*, Gene, 34:315 [1985]), and restriction selection mutagenesis (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 [1986]) may also be used.

Amino acid sequence variants with more than one amino acid substitution may be generated in one of several ways. If the amino acids are located close together in the polypeptide chain, they may be mutated simultaneously, using one oligonucleotide that codes for all of the desired amino acid substitutions. If,

WO 02/42773

PCT/US01/44036

however, the amino acids are located some distance from one another (e.g. separated by more than ten amino acids), it is more difficult to generate a single oligonucleotide that encodes all of the desired changes. Instead, one of two alternative methods may be employed. In the first method, a separate oligonucleotide is generated for each amino acid to be substituted. The oligonucleotides are then annealed to the single-stranded template DNA simultaneously, and the second strand of DNA that is synthesized from the template will encode all of the desired amino acid substitutions. The alternative method involves two or more rounds of mutagenesis to produce the desired mutant.

Sources of new reactive groups, e.g. cysteines can be placed anywhere within the target. For example, if a cysteine is introduced onto the surface of the protein in an area known to be important for protein-protein interactions, small molecules can be selected that bind to and block this surface.

The following tables exemplify target biological molecules (TBM's) that can be used in accordance with the present invention.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Tables of Targets

Immunology	Indications
IL-6	Inflammation
B7/CD28	Graft rejection
CD4	Immunosuppression
CD3	Immunosuppression
CD2	Renal Transplantation
c-maf	Inflammation/Immunosuppression
CD11a/LFA1 (ICAM)	Immunosuppression/Inflammation

Enzymes	Indications
Phospholipase A2	Inflammation
ZAP-70	Immunosuppression
Phosphodiesterase IV	Asthma
Interleukin converting enzyme (ICE)	Inflammation
Inosine monophosphate dehydrogenase	Autoimmune diseases
Tryptase	Psoriasis/asthma
CDK4	Cancer
mTOR	Immunosuppression
PARP (Cell death pathway)	Stroke
Phosphatases	Cancer
Raf	Cancer
JNK3	Neurodegeneration
MEK	Cancer
GSK-3	Diabetes
FAB1 (Fatty acid biosynthesis)	Bacterial
FABH (Fatty acid biosynthesis)	Bacterial
BACE	Alzheimer's
I κ B-ubiquitin Ligase	Inflammation/diabetes
Lysophosphatidic acid acetyltransferase	
CD26 (dipeptidyl peptidase IV)	
Akt	
TNF converting enzyme	Inflammation

Viral Targets	Indications
Rhinovirus protease	Common cold
Parainfluenza neuraminidase	Colds/Veterinary uses
HIV fusion gp41	HIV infection/ treatment
Hepatitis C Helicase	Hepatitis
Hepatitis C protease	Hepatitis

5

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Protein-Protein Targets	Indications
ErbB Receptors	Cancer
Neurokinin-1	Inflammation, Migraine
IL-9	Asthma
FGF	Angiogenesis
PDGF	Angiogenesis
TIE2	Angiogenesis
NFIB Dimerization	Inflammation
Tissue Factor/Factor VII	Cardiovascular Disease
Selectins	Inflammation
TGF- β	Angiogenesis
Angiopoietin I	Angiogenesis
APAF-1/Caspase 9 CARD	Stroke
Bcl-2	Cancer

7-Transmembrane	Indications
IL-8	Stroke, inflammation
Rantes	Inflammation, Migraine
CC Chemokine Receptors	Asthma
GPR14/Urotensin	Angiogenesis
Orexin/Receptor	Appetite
C5a receptor	Sepsis/ crohn's disease
Histamine H3 receptor	Allergy
CCR5	HIV attachment

5

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
BACE	1FKN	GB AAF13715	Hong, L. et al., Science, 290(5489):150-3 (2000).
Caspase 1	1BMQ	SWS P29466	Okamoto, Y., et al., Chem Pharm Bull (Tokyo), 47(1):11-21 (1999).
Caspase 4	none	SWS P49662	NA
Caspase 5	none	SWS P51878	NA
Caspase 3	1CP3	SWS P42574	Mittl, PR, et al., J Biol Chem, 272(10):6539-47(1997).
Caspase 8	1I4E, 1QTN	SWS P08160; GB BAB32555	Xu, G., et al., Nature, 410(6827):494-7 (2001).
Caspase 9	3YGS	SWS P55211	Qin, H., et al., Nature, 399(6736):549-57 (1999).
RHV Prot	1CQQ	SWS P04936	Mathews, D., et al., 96(20):11000-7 (1999).
Cathepsin K	1MEM	SWS P43235	McGrath, ME, et al., Nat Struct Biol, 4(2):105-119(1997).
Cathepsin S	1BXF (model)	SWS P25774	Fengler, A., et al., Protein Eng, 11(11):1007-13(1998).
Tryptase	1AOL	SWS P20231	Pereira, P. J. et al., Nature, 392(6673):306-11 (1998).
HCV Prot	1A1R, 1DY9	SWS Q81755	Di Marco, et al., J Biol Chem. 275(10):7152-7(2000).
CD26	none	SWS P27487	NA
TACE	1BKC	GB U69612	Maskos, K., et al., PNAS, 95(7):3408-12 (1998).
ZAP-70	none	SWS P43403	NA
p38 MAP	1P38	SWS P47811	Wang, Z., et al., PNAS, 94(6):2327-32 (1997).
CDK-4	none	SWS Q8XTB6	NA
c-jun kinase	NA	SWS P45983 (C-Jun Kinase-1)	NA
	NA	SWS P45984 (C-Jun Kinase-2)	NA
	1JNK	SWS P53779 (C-Jun Kinase-3)	NA
GSK-3	NA	SWS P49840 (GSK-3A)	NA
	NA	SWS P49841 (GSK-3B)	NA
AKT	none	SWS P31749	NA
MEK	none	SWS Q02750	NA
Raf	none	SWS P04049	NA
TIE-2	none	SWS Q02763	NA
ILK	none	SWS Q13418	NA
IkB	NA	SWS O15111 (IKappaBKinase)	NA
	NA	SWS O14920 (IKappaBKinBeta)	NA
Jak1	none	SWS P23468	NA
Jak2	none	SWS O60674	NA
Jak3	none	SWS P52333	NA
Tyk2	none	SWS P29597	NA
EGF Kinase	see	Vasc.	

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
	Endo. Growth Factor Receptor (VEGFR) and EGFR both with tyrosine kinase activity(Below):		
VEGFR2/KDR Kinase	NA	SWS P35968	NA
EGFR	NA	SWS P00533	NA
TC-PTP	NA	SWS P17706	NA: T-cell Protein Tyrosine Phosphatase
CDC25A	NA	SWS P30304	NA
CDC25A CDK	NA	GB O14757 (CHK1)	NA
CD45	NA	SWS P08575	NA
PTP alpha	NA	SWS P18433	NA
pol III (PolR1IIA)	NA	SWS O14802	NA: DNA directed RNA polymerase III
mur-D Ligase	NA	GB O14802 (E. coli)	NA
	NA	SWS P14900 (E. Coli)	NA
SHP	NA	SWS Q15466	NA
PTP-1B	1PTP	SWS P00760	Finer-Moore, JS, et al., Proteins,12(3):203-22(1992).
SHIP-2	none	SWS Q9R1V2	NA
MEKK-1	NA	SWS Q13233	NA
PAK-1	NA	SWS Q13153	NA
ICAM-1	NA	SWS P05362	Bella, J., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95(8):4140-5 (1998).
CD11A/LFA-1	NA	SWS P20701	Qu, A., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 92(22):10277-81 (1995).
TAF1	UNSURE	UNSURE (see below)	UNSURE
	NA	SWS Q99142 (?? Tobacco Prot.)	NA; tobacco Tumor Activating Factor
	NA	GB AAB30018	NA; Tumor-derived Adhesion Factor
	NA	GB D45198	NA; Template Activating Factor
HIV-Integrase	1BL3 (2.0)	SWS P12497	Maignan, S., et al., J Mol Biol, 282(2):359-68 (1998).
	1EXQ	SWS P04585	Chen, J. C-H., et al., PNAS USA, 97(15):8233-8 (2000).
	NA	SWS O56380	NA
	1HYZ	SWS O56381; GB AAC37875	Molteni, V., et al., Acta Crystallogr D Bio Crystallog., 57:536-44 (2001).
	1HYV	GB AAC37875	Molteni, V., et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr., 57(Pt 4):536-44 (2001).
	NA	SWS O56382	NA
	NA	SWS O56383	NA
	NA	SWS O56384	NA
	NA	SWS O56385	NA

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
HCV-Helicase	1N13, 1DY9, others	SWS Q81755 (1DY9) (Integrase)	Di Marco, S., et al., J Biol Chem., 275(10):7152-7 (2000).
	1HEI	SWS P2664 (Helicase)	Yao, N., et al., Nat Struct Biol, 4(6):463-7 (1997).
Infl. Neuraminidase	1A4G; many	SWS P27907	Taylor, N., et al., J Med Chem, 41(6):798-807 (1998).
PDE-IV	1FOJ (PDE4B2B)	SWS Q07343	Xu, R. X., et al., Science., 288(5472):1822-5 (2000).
cPLA-2	1CJY	SWS P47712	Dessen, A., et al., Cell., 97(3):349-60 (1999).
IL-2	NA (in-house)	SWS P01585	NA
IL-4	1HIK(apo)	SWS P05112 (2.60)	Muller, T., et al., J Mol Biol, 247(2):360-72 (1995).
	1IAR (complex)	SWS P05112 (2.30) **	Hage, T., et al., Cell., 97(2):271-81 (1999).
IL-4R	1IAR	SWS P24394	Hage, T., et al., Cell., 97(2):271-81 (1999).
IL-5	1HUL	SWS P05113	Milburn, M. V., et al., Nature, 363(6425):172-6 (1993).
IL-6	111R(viral IL6)	GB AAB62676 (2.6)	Chow, D., et al., Science, 291(5511):2150-5 (2001).
	1ALU	SWS P05231 (1.9)	Somers, W., et al., EMBO J, 16(5):989-97 (1997).
IL-7	1IL7 (model)	SWS P13232	Cosenza, L., et al., Protein Sci., 9(5):916-26 (2000).
IL-9	none	SWS P15248	NA
IL-13	1GA3 (NMR)	SWS P35225	NA
TNF	1TNF	SWS P01375 (TNF-alpha)	Eck, MJ, et al., J Biol Chem, 264(29):17595-605 (1989).
CD-40 L	1ALY	SWS P29965	Karpusas, M., et al., Structure, 3(12):1426 (1995).
OPGL	none	SWS O14788	NA
BAFF	none	SWS Q9Y275	NA
TRAIL	1DG6 (1.30)	GB AAC50332	Hymowitz, S. G., et al., Biochemistry, 39(4):633-40 (2000).
	1DU3 (2.2)	SWS P50591; GB AAC50332	Cha SS, et al., J Biol Chem, 275(40):31171-7 (2000).
	1D2Q	GB AAC50332	Cha and Oh, Immunity, 11(2):253-61 (1999).
IL-1	NA	SWS P01584 (IL-1 B Cytokine)	NA
IL-1R	1G0Y	SWS P14778	Vigers, GPA, et al., J Biol Chem., 275(47):36927-33 (2000).
IL-8	1QE6	SWS P10145	Gerber, N., et al., Proteins, 38(4):361-7 (2000).
RANTES-R	NA	SWS P32246	NA
RANTES	NA	GB XP_035842	NA
	NA	SWS P13501	NA; (T-cell specific RANTES protein)
MCP-1	NA	SWS Q14805	NA; (Metaphase chromosomal protein)
MCP-1	1D0K	SWS P13500	Lubowski, J., et al., Nat Struct Biol., 4(1):64-9 (1997).
MCP-3	NA	SWS P80098	Nat Struct Biol, 4(1):64-9 (1997).
TRAF-A (TRAF-1)	NA	SWS Q13077 (TRAF-1)	NA
TRAF-B (TRAF-2)	NA	SWS Q12933 (TRAF-2)	NA

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
	1D00 (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.0)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
TRAF-C (TRAF-3?)	NA	SWS Q13114 (TRAF-3)	NA
TRAF-D (TRAF-4?)	NA	GB XP_008483 (TRAF-4)	NA
TRAF-E (TRAF-5?)	NA	GB XP_010656 (TRAF-5)	NA
VEGF	1FLT	SWS P15692	Wiesmann, C., et al., Cell, 91(5):695-704 (1997).
Mineral Corticoid R.	NA	SWS P08235	NA
Estrogen Receptor	3ERD	SWS P03372	Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Cell, 95(7):927-37 (1998).
Progesterone Rec.	1A28	SWS P06401	Williams, S. P., Sigler, P. B., Nature, 393(6683):392-6 (1998).
NF-kappa-B-1	NA	SWS P19838	
P53	NA	SWS P04637	NA
	Y1CQ	GB AAA59989 (2.3)	Kussie, P. H., et al., Science,74(5289):948-53 (1996).
MDM2	1YCR	SWS Q00987	Kussie, P. H., et al., Science,74(5289):948-53 (1996).
STAT6	NA	SWS P42226	NA
IL4R-alpha	NA	SWS P24394	NA
IL6R-alpha	NA	SWS P08887	NA
IL6R-beta chain	1BQU	SWS P40189	Bravo, J., Staunton, D., Heath, J. K., Jones, E. Y., EMBO J, 17(6):1665-74 (1998).
IL5R-alpha	NA	SWS Q01344	NA
IL7R	NA	SWS P16871	NA
IL2R-alpha	NA	SWS P01589	NA
IL2R-beta	NA	SWS P14784	NA
HIV GP41	1AIK	SWS P19551	Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S., Cell, 89(2):263-73 (1997).
HIV GP41	1AIK	SWS P04582	Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S., Cell, 89(2):263-73 (1997).
HIV GP41		SWS P03378	
HIV GP41		SWS P03375	
HIV GP41		SWS P04582	
HIV GP41		SWS P12488	
HIV GP41		SWS P03377	
HIV GP41		SWS P05879	
HIV GP41		SWS P04581	
HIV GP41		SWS P04578	
HIV GP41		SWS P04624	
HIV GP41		SWS P12489	
HIV GP41		SWS P20871	
HIV GP41		SWS P31819	
HIV GP41		SWS Q70626	
HIV GP41		SWS P04583	
HIV GP41		SWS P19551	

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
HIV GP41		SWS P05577	
HIV GP41		SWS P18799	
HIV GP41		SWS P20888	
HIV GP41		SWS P03376	
HIV GP41		SWS P04579	
HIV GP41		SWS P19550	
HIV GP41		SWS P19549	
HIV GP41		SWS P05878	
HIV GP41		SWS P31872	
HIV GP41		SWS P05880	
HIV GP41		SWS P35961	
HIV GP41		SWS P12487	
HIV GP41		SWS P04580	
HIV GP41		SWS P05882	
HIV GP41		SWS P05881	
HIV GP41		SWS P13094	
HIV GP41		SWS P24105	
HIV GP41		SWS P17755	
HIV GP41		SWS P15831	
HIV GP41		SWS P18040	
HIV GP41		SWS O74126	
HIV GP41		SWS P05883	
HIV GP41		SWS P04577	
HIV GP41		SWS P32536	
HIV GP41		SWS P12449	
HIV GP41		SWS P20872	
c-mal	NA	GB NP_071884	NA; T-cell differentiation protein
	NA	GB CAA54102	NA
	NA	GB XP_017128	NA
Mal	NA	SWS P21145	NA; T-LYMPHOCYTE MATURATION-ASSOCIATED PROTEIN
	NA	SWS P01732	NA; T-LYMPHOCYTE DIFFERENTIATION ANTIGEN T8/CD8(?)
Her-1	NA	SWS P34704	NA; Cell Signaling in C. elegans Sex Determination
Her-2	NA	SWS P04626	NA; RECEPTOR PROTEIN-TYROSINE KINASE ERBB-2
E2F-1	NA	SWS Q01094	NA
E2F-2	NA	SWS Q14209	NA
E2F-3	NA	SWS O00716	NA
E2F-4	NA	SWS Q18254	NA
E2F-5	NA	SWS Q15329	NA
E2F-6	NA	SWS O75461	NA
Cyclin A	1QMZ	SWS P20248	Brown, N. R., et al., Nat Cell Biol., 1(7):438-43 (1999).
mTOR/FRAP	1NSG	SWS P42345	Liang, J., et al., Acta Crystall D Biol Crystall, 55 (Pt 4):736-44 (1995).
Survivin	1F3H	SWS O15392	Verdecia, M. A., et al., Nat Struct Biol., 7(7):602-8 (2000).
FGF-1	1EV2	SWS P05230	Plotnikov, A. N., et al., Cell., 101(4):413-24

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
			(2000),(Heparin Binding Growth Factor I)
Basic FGF Rec. I	1FGK	SWS P11362	Mohammadi, M., et al., Cell, 86(4):677-87 (1996),(Basic FGF Rec. I)
FGF-2	1CVS	SWS P09038	Plotnikov, A. N., et al., Cell, 98(5):641-50 (1999).
FGF-3	NA	SWS P11467	NA
FGF-4	NA	SWS P08620	NA
FGF-5	NA	SWS P12034	NA
FGF-6	NA	SWS P10767	NA
FGF-7	NA	SWS P21781	NA
FGF-8	NA	SWS P55075	NA
FGF-9	1IHK	SWS P31371	Plotnikov, A. N., et al., J Biol Chem., 276(6):4322-9 (2001).
PARP	NA	SWS P09874	NA
PDGF-alpha	NA	SWS P04085	NA
PDGF-beta	NA	SWS P01127	NA
C5a receptor	NA	SWS P21730	NA
CCR5	NA	SWS P51681(CC Chemo R-V)	NA
GPR14/Urotensin IIR)	NA	SWS Q9UKP6	NA
Tissue Factor	2HFT	SWS P13726	Muller, Y. A., et al., J Mol Biol, 256(1):144-59 (1996).
Factor VII	1JBU	SWS P08709	Eigenbrot, C., et al., Structure, 9:627 (2001).
Histamine H3 rec.	NA	GB CAC39434	NA
Neurokinin-1	NA	GB SPHUB	NA
orexin receptor-1	NA	SWS O43613	NA
orexin receptor-2	NA	SWW O43614	NA
CD-3 delta chain	NA	SWS P04234	NA
CD-3 epsilon chain	NA	SWS P07766	NA
CD-3 gamma chain	NA	SWS P09693	NA
CD-3 zeta chain	NA	SWS P20963	NA
CD-4	1CDJ	SWS P01730	Wu, H., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93(26):15030-5 (1996).
TGF-alpha	NA	SWS P01135	NA
TGF-beta-1	NA	SWS P01137	NA
TGF-beta-2	NA	SWS P08112	NA
TGF-beta-3	NA	SWS P10600	NA
TGF-beta-4	NA	SWS O00292	NA
GRB2	1GRI	SWS P29354 (3.1)	Maignan S, et al., Science, 268(5208):291-3 (1995).
	1ZFP	SWS P29354 (1.8)	Rahuel, J., et al., J Mol Biol, 279(4):1013-22 (1998).
	1BMB	SWS P29354 (1.8)	Eitmayer, P., et al., J Med Chem, 42(6):971-80 (1999).
LCK	1LKK	SWS P06239;(2nd=P07110)	Tong, L., et al., J Mol Biol, 256(3):601-10 (1996).

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Target	PDB Codes	Accession No.	Crystal Structure Ref.
SRC	2SRC	SWS P12931	Xu, W., et al., Mol Cell, 3(5):629-38 (1999).
TRAFs ?	NA	SWS Q13077 (TRAF-1)	NA
	1CZZ (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.7)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
	1CZY (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.0)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
	1D00 (TRAF-2)	GB S56163 (TRAF-2) (2.0)	Ye, H., et al., Mol Cell, 4(3):321-30 (1999).
	NA	SWS Q12933 (TRAF-2)	NA
	1FLK (TRAF-3)	GB Q13114 (TRAF-3) (2.8)	Ni, C.-Z., et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 97(19):10395-9 (2000).
BAX/BCL-2	NA	SWS Q07812 (BAX alpha)	NA
	NA	SWS Q07814 (BAX beta)	NA
	NA	SWS Q07815 (BAX gamma)	NA
	NA	SWS P55269 (BAX delta)	NA
	NA	SWS P10415 (BCL-2)	NA
IgE	1F6A (3.5)	SWS P01854 (IgE chain C)	Garman, S. C., et al., T. S., Nature., 406(6793):259-66 (2000).
IgER	NA	SWS P06734 (IgE Fc Receptor)	NA
	1F6A (3.5)	SWS P12319 (IgE Fc Rec. alpha)	Garman, S. C., et al., T. S., Nature., 406(6793):259-66 (2000).
	1F2Q (2.4)	SWS P12319 (IgE Fc Rec. alpha)	Garman, S. C., Kinet, J. P., Jardetzky, T. S., Cell, 95(7):951-61 (1998).
	NA	SWS Q01362 (IgE FcRec. Beta)	NA
	NA	SWS P30273 (IgE FcRec. Gamma)	NA
Rhinovirus Protease	NA	SWS P03303 (HRV-14 polyprot.)	NA
	NA	SWS P12916 (HRV-1B)	NA
	1CQQ	SWS P04936 (HRV-2) (1.85)	Matthews, D., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 96(20):11000-7 (1999).
	NA	SWS P07210 (HRV-89)	NA
	1C8M	SWS Q82122 (HRV-16)	Chakravarty, S., et al., to be published
B7/CD28/LG/CD80	1DR9	SWS P33681	Ikemizu, S., et al., Immunity. 2000 Jan;12(1):51-60.
CD28	NA	SWS P10747	NA
APAF1	NA	SWS O14727	NA

WO 02/42773

PCT/US01/44036

3. Site(s) of Interest

Broadly, the "site of interest" on a particular target, such as a Target Biological Molecule (TBM), is defined by the residues that are involved in binding of the target to a molecule with which it forms a natural complex *in vivo* or *in vitro*. If the target is a peptide, polypeptide, or protein, the site of interest is defined by the amino acid residues that participate in binding to (usually by non-covalent association) to a ligand of the target.

When, for example, the target biological molecule is a protein that exerts its biological effect through binding to another protein, such as with hormones, cytokines or other proteins involved in signaling, it may form a natural complex *in vivo* with one or more other proteins. In this case, the site of interest is defined as the critical contact residues involved in a particular protein:protein binding interface. Critical contact residues are defined as those amino acids on protein A that make direct contact with amino acids on protein B, and when mutated to alanine decrease the binding affinity by at least 10 fold and preferably at least 20 fold, as measured with a direct binding or competition assay (e.g. ELISA or RIA). See (A Hot Spot of Binding Energy in a Hormone-Receptor Interface by Clackson and Wells *Science* 267:383-386 (1995) and Cunningham and Wells *J. Mol. Biol.* 234:554-563 (1993)). Also included in the definition of a site of interest are amino acid residues from protein B that are within about 4 angstroms of the critical contact residues identified in protein A.

Scanning amino acid analysis can be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant (Cunningham and Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)). Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions (Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)). If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

When the target biological molecule is an enzyme, the site of interest can include amino acids that make contact with, or lie within, about 4 angstroms of a bound substrate, inhibitor, activator, cofactor or allosteric modulator of the enzyme. By way of illustration, when the enzyme is a protease, the site of interest would include the substrate binding channel from P4 to P4', residues involved in catalytic function (e.g. the catalytic triad) and any cofactor (e.g. Zn) binding site. For protein kinases, the site of interest would include the substrate-binding channel (as above) in addition to the ATP binding site. For dehydrogenases, the site of interest would include the substrate binding region as well as the site occupied by NAD/NADH. In hydrolases such as PDE4, the site of interest would include all residues contacting the cAMP substrate, as well as residues involved in binding the catalytic divalent cations (Xu, R. X. et al. *Science* 288:1822-1825 (2000)).

WO 02/42773

PCT/US01/44036

For an allosterically regulated enzyme, such as glycogen phosphorylase B, the site of interest includes all residues in the substrate binding region, residues in contact with the natural allosteric inhibitor glucose-6-phosphate, and residues in novel allosteric sites such as those identified in binding other inhibitors such as CP320626 (Oikonomakos NG, et al. *Structure Fold Des* 8:575-584 (2000)).

5 The TBMs either contain, or are modified to contain, a reactive residue at or near a site of interest. Preferably, the TBMs contain or are modified to contain a thiol-containing amino acid residue at or near a site of interest. In this case, after a TBM is selected, the site of interest is calculated. Once the site of interest is known, a process of determining which amino acid residue within, or near, the site of interest to modify is undertaken. For example, one preferred modification results in substituting a cysteine residue for another
10 amino acid residue located near the site of interest.

The choice of which residue within, or near, the site of interest to modify is determined based on the following selection criteria. First, a three dimensional description of the TBM is obtained from one of several well-known sources. For example, the tertiary structure of many TBMs has been determined through x-ray crystallography experiments. These x-ray structures are available from a wide variety of sources, such as the
15 Protein Databank (PDB) which can be found on the Internet at <http://www.rcsb.org>. Tertiary structures can also be found in the Protein Structure Database (PSdb) which is located at the Pittsburg Supercomputer Center at <http://www.psc.com>.

In addition, the tertiary structure of many proteins, and protein complexes, has been determined through computer-based modeling approaches. Thus, models of protein three-dimensional conformations are
20 now widely available.

Once the three dimensional structure of the TBM is known, a measurement is made based on a structural model of the wild type, or a variant form, of the target biological molecule from any atom of an amino acid within the site of interest across the surface of the protein for a distance of approximately 10 angstroms. Variant, which have been modified to contain the desired reactive groups (e.g. thiol groups, or
25 thiol-containing residues) are based on the identification of one or more wild-type amino acid(s) on the surface of the target biological molecule that fall within that approximate 10-angstrom radius from the site of interest. For the purposes of this measurement, any amino acid having at least one atom falling within the about 10 angstrom radius from any atom of an amino acid within the site of interest is a potential residue to be modified to a thiol containing residue.

30 Preferred residues for modification are those that are solvent-accessible. Solvent accessibility may be calculated from structural models using standard numeric (Lee, B. & Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* 55:379-400 (1971); Shrake, A. & Rupley, J. A. *J. Mol. Biol.* 79:351-371 (1973)) or analytical (Connolly, M. L. *Science* 221:709-713 (1983); Richmond, T. J. *J. Mol. Biol.* 178:63-89 (1984)) methods. For example, a potential cysteine variant is considered solvent-accessible if the combined surface area of the carbon-beta (CB), or
35 sulfur-gamma (SG) is greater than 21 Å² when calculated by the method of Lee and Richards (Lee, B. &

WO 02/42773

PCT/US01/44036

Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* 55:379-400 (1971)). This value represents approximately 33% of the theoretical surface area accessible to a cysteine side-chain as described by Creamer *et al.* (Creamer, T. P. *et al. Biochemistry* 34:16245-16250 (1995)).

5 It is also preferred that the residue to be mutated to cysteine, or another thiol-containing amino acid residue, not participate in hydrogen-bonding with backbone atoms or, that at most, it interacts with the backbone through only one hydrogen bond. Wild-type residues where the side-chain participates in multiple (>1) hydrogen bonds with other side-chains are also less preferred. Variants for which all standard rotamers (chi1 angle of -60°, 60°, or 180°) can introduce unfavorable steric contacts with the N, CA, C, O, or CB atoms of any other residue are also less preferred. Unfavorable contacts are defined as interatomic distances that
10 are less than 80% of the sum of the van der Waals radii of the participating atoms.

Wild-type residues that fall within highly flexible regions of the protein are less preferred. Within structures derived from x-ray data, highly flexible regions can be defined as segments where the backbone atoms possess weak electron density or high temperature factors (> 4 standard deviations above the mean temperature factor for the structure). Within structures derived from NMR data, highly flexible regions can be
15 defined as segments possessing < 5 experimental restraints (derived from distance, dihedral coupling, and H-bonding data) per residue, or regions displaying a high variability (> 2.0 Å² RMS deviation) among the models in the ensemble. Additionally, residues found on convex "ridge" regions adjacent to concave surfaces are more preferred while those within concave regions are less preferred. Cysteine residues to be modified. Convexity and concavity can be calculated based on surface vectors (Duncan, B. S. & Olson, A. J. *Biopolymers* 33:219-229 (1993)) or by determining the accessibility of water probes placed along the
20 molecular surface (Nicholls, A. *et al. Proteins* 11:281-296 (1991); Brady, G. P., Jr. & Stouten, P. F. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 14:383-401 (2000)). Residues possessing a backbone conformation that is nominally forbidden for L-amino acids (Ramachandran, G. N. *et al. J. Mol. Biol.* 7:95-99 (1963); Ramachandran, G. N. & Sasisekharahn, V. *Adv. Prot. Chem.* 23:283-437 (1968)) are less preferred targets for modification to a
25 cysteine. Forbidden conformations commonly feature a positive value of the *phi* angle.

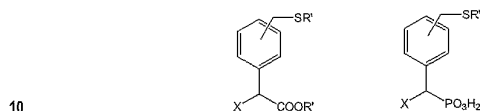
Other preferred variants are those which, when mutated to cysteine and linked via a disulfide bond to an alkyl tether, would possess a conformation that directs the atoms of that tether towards the site of interest. Two general procedures can be used to identify these preferred variants. In the first procedure, a search is made of unique structures (Hobohm, U. *et al. Protein Science* 1:409-417 (1992)) in the Protein Databank
30 (Berman, H. M. *et al. Nucleic Acids Research* 28:235-242 (2000)) to identify structural fragments containing a disulfide-bonded cysteine at position *j* in which the backbone atoms of residues *j-1*, *j*, and *j+1* of the fragment can be superimposed on the backbone atoms of residues *i-1*, *i*, and *i+1* of the target molecule with an RMSD of less than 0.75 Å². If fragments are identified that place the CB atom of the residue disulfide-bonded to the cysteine at position *j* closer to any atom of the site of interest than the CB atom of residue *i* (when mutated to

WO 02/42773

PCT/US01/44036

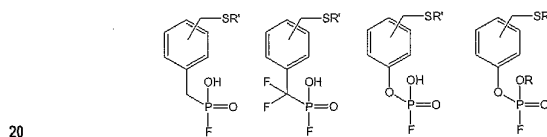
Here, the nucleophile on the TBM is the sulfur of a thiol, usually a cysteine, which is reacted with 2, a SME containing a substituent G capable of forming an irreversible (under conditions that do not denature the target) covalent bond and a free thiol, protected thiol or derivatized thiol SR'. Preferably G is a group capable of undergoing SN2-like attack by the thiol or forming a Michael-type adduct with the thiol to produce the irreversible reaction product 3 of that attack having a new covalent linkage -SG'. The following are representative examples of G groups capable of undergoing SN2-like or Michael-type addition.

1) -halo acids: F, Cl and Br substituted to a COOH, PO₃H₂ or P(OR)₂H acid that is part of the SME can form a thioether with the thiol of the TBM. Simple examples of such a G-SME-SR' are;



where X is the halogen and R' is H, S(CH₂)_nA, where A is OH, COOH, SO₃H, CONH₂ or NH₂ and n is 2 or 3.

15 2) Fluorophos(phon)ates: These can be Sarin-like compounds which react readily with both SH and OH nucleophiles. For example, cys 215 of PTP1B can be reacted with a simple G-SME-SR' represented by the following:



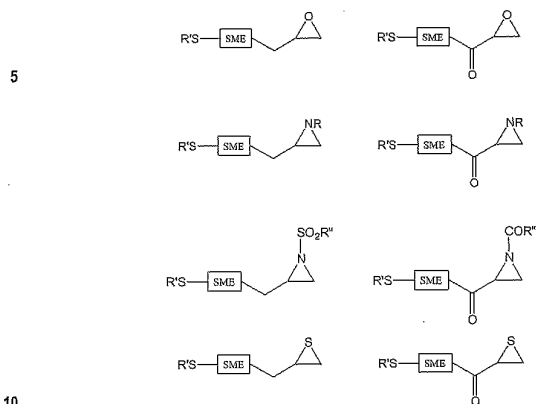
Here the phenyl ring represents a simplified SME, R is a substituted or unsubstituted loweralkyl and R' is as defined above. These compounds form thiophos(phon)ate SME's with the thiol nucleophile. These compounds also are capable of forming static TBM-SME's with naturally occurring -OH from serine or threonine phosphatases or -lactamases.

25 3) Epoxides, aziridines and thiranes: SME's containing these reactive functional groups are capable of undergoing SN2 ring opening reactions with -SH, -OH and -COOH nucleophiles. Preferred

WO 02/42773

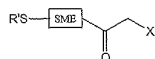
PCT/US01/44036

examples of the latter are aspartyl proteases like -secretase (BASE). Preferred generic examples of epoxides, aziridines and thiranes are shown below.



Here, R' is as defined above, R is usually H or lower alkyl and R'' is lower alkyl, lower alkoxy, OH, NH₂ or SR'. In the case of thiranes the group SR' is optionally present because upon nucleophilic attack and ring opening a free thiol is produced which may be used in the subsequent extended tethering reaction.

- 15 4) Halo-methyl ketones/amides: These compounds have the form $-(C=O)-CH_2-X$. Where X may be a large number of good leaving groups like halogens, N₂, O-R (Where R may be substituted or unsubstituted heteroaryl, Aryl, alkyl, $-(P=O)Ar_2$, $-N-O-(C=O)$ aryl/alkyl, $-(C=O)$ aryl/alkyl/alkylaryl and the like), S-Aryl, S-heteroaryl and vinyl sulfones.

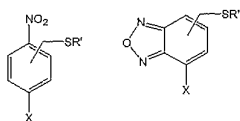


- 20 Fluoromethylketones are simple examples of this class of activated ketones which result in the formation of a thioether when reacted with a thiol containing protein. Other well known examples include acyloxymethyl ketones like benzyloxymethyl ketone, aminomethyl ketones like phenylmethylaminomethyl ketone and sulfonylaminomethyl ketones. These and other types of suitable compounds are reviewed in J. Med. Chem. 43(18) p 3351-71, September 7, 2000.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

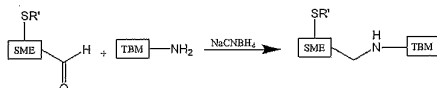
5) Electrophilic aromatic systems: Examples of these include 7-halo-2,1,3-benzoxadiazoles and ortho/para nitro substituted halobenzenes.



5

Compounds of this type form arylalkylthioethers with TBM's containing a thiol.

6) Other suitable SN2 like reactions suitable for formation of static covalent bonds with TBM nucleophiles include formation of a Schiff base between an aldehyde and the amine group of lysine an enzymes like DNA repair proteins followed by reduction with for example NaCNBH₄.



10

7) Michael-type additions: Compounds of the form -RC=CR-Q, or

-C=C-Q where Q is C(=O)H, C(=O)R (including quinines), COOR, C(=O)NH₂, C(=O)NHR, CN, NO₂, SOR, SO₂R, where each R is independently substituted or unsubstituted alkyl, aryl, hydrogen, halogen or another Q can form Michael adducts with SR (where R is H, glutathione or S-loweralkyl substituted with NH₂ or OH), OH and NH₂ on the TBM.

15

8) Boronic acids: These compounds can be used to label ser or thr hydroxyls to form TBM-SME complexes of the form shown below:



20

where R' is as defined above

In each of the foregoing cases a "static" or irreversible covalent bond is formed through the nucleophile on the TBM producing an irreversible TBM-SME complex containing a thiol or protected thiol.

25 These complexes are then exposed to a library of thiol or disulfide containing organic compounds in the

WO 02/42773

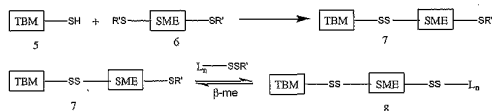
PCT/US01/44036

presence of a reducing agent (e.g. mercaptoethanol) for selection of a small molecule ligand capable of binding a second binding site on the TBM.

As noted above, in this static approach, the SME may, but does not have to, include a portion that has binding affinity (i.e. is capable of bonding to) a first site of interest on the TBM. Even if the SME does not include such portion, it must be of appropriate length and flexibility to ensure that the ligand candidates have free access to the second site of interest on the target.

(B) *Dynamic SME*

In another embodiment of the invention the SME is a double reversible covalent bond SME ("double disulfide" extender), that is, this SME is bifunctional and contains two functional groups (usually disulfide) capable of forming reversible covalent bonds. This SME forms a "dynamic" or first reversible covalent bond through a first functional group on the SME with the nucleophile on the TBM, thereby forming a reversible TBM-SME complex (7 below). Optionally the SME also forms a non-covalent bond with a first site of interest on the TBM (the portion of the SME that forms a non-covalent bond with the TBM is referred to herein as SME'). Additionally the SME contains or is modified to contain a second functional group capable of forming a second reversible bond with a library member of a second library of small organic molecules, each molecule having a functional group capable of forming a reversible bond with the first or second functional group of the SME. The TBM-SME complex and the second library are subjected to conditions wherein the library member having the highest affinity for a second site of interest on the TBM forms a reversible bond with the TBM-SME complex (8 below). Preferably the covalent bonds are disulfides, which may be reversible in the presence of a reducing agent.



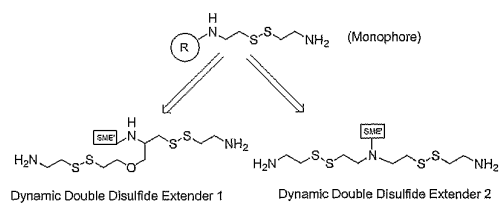
The dynamic extended tethering process is illustrated in Figure 3 where a TBM containing or modified to contain a thiol or protected thiol is incubated with a first library of small organic molecules containing a thiol or protected thiol (a disulfide-containing monophore) under conditions, such as with a reducing agent, wherein at least one member of the library forms a disulfide bond linking the selected library member with the TBM. Optionally this process is repeated with a library of TBMs differing from one another by the location of the thiol or protected thiol, i.e. different cysteine mutants of the same protein. Preferably each member of the small molecule library differs in molecular weight from each of the other library members. Preferably the small molecule library contains from 1-100 members, more preferable from 5-15 and most

WO 02/42773

PCT/US01/44036

preferably about 10 members. Optionally the selected small molecule library member (selected monophore) also forms a noncovalent bond with a first site of interest on the TBM. The selected monophore, or a derivative thereof, is then modified to contain a second thiol or protected thiol thereby forming a "double disulfide" extender. This synthetic double disulfide extender is then incubated with the TBM in the presence of a second library of small organic molecules containing a thiol or protected thiol (the library may be the same or different from the first library) under conditions, such as with a reducing agent like mercaptoethanol, wherein at least one member of the second library forms a disulfide bond linking the selected library member with the TBM through the double disulfide extender as shown in 8 above. Optionally thereafter a diaphore is synthesized based on the two selected library members (monophores).

Two basic strategies exist for synthesizing a "double disulfide" extender. In the first, synthesis of the dynamic extender proceeds generically, that is by modification of the monophore linker without any modification of the portion of the monophore that forms a non-covalent bond with the TBM. By way of illustration, the extender usually arises from the screening of a disulfide monophore library as shown in Figure 3. A typical monophore selected from the library or pool will contain a linker of 2 or 3 methylene units between the disulfide that links the monophore to the TBM cysteine and the portion of the monophore that binds non-covalently to the first site of interest on the TBM. This monophore linker can be derivatized as shown below to produce a double disulfide extender in which the "R" or variable group of the monophore remains invariant and becomes the portion of the extender (SME) that binds non-covalently with the first site of interest on the TBM.

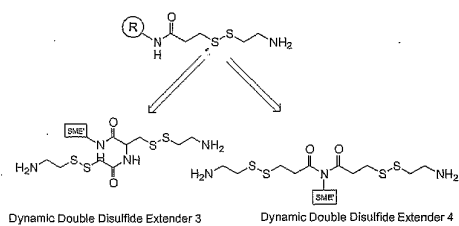


Here the monophore is derivatized either at the methylene nearest the cysteamine nitrogen to produce dynamic double disulfide extender 1 or at the cysteamine nitrogen itself to produce the symmetrical dynamic double disulfide extender 2.

Alternatively, when the monophore is a 3-mercaptopropionic acid derivative the alpha carbon can be derivatized to produce a generic dynamic double disulfide extender of the form shown in 3 below.

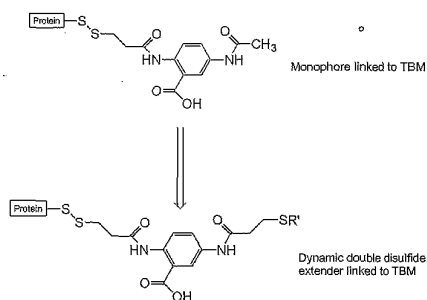
WO 02/42773

PCT/US01/44036



Optionally the amide nitrogen may be derivitized with an acyl or sulfonyl to produce an extender of the form shown in 4 above.

- 5 A second strategy involves derivitizing the portion of the monophore that binds non-covalently to the first site of interest on the TBM. The derivitization is preferably carried out at a site that minimally alters the binding of the monophore to the first site of interest as illustrated below.



10

Here the dynamic tether is shown bound to the TBM thiol forming the TBM-SME complex, where R' is the cysteamine radical. This complex can then be contacted with a disulfide monophore or library of disulfide monophores to obtain a linked compound having a higher affinity for the TBM than either the SME or selected monophore alone.

15

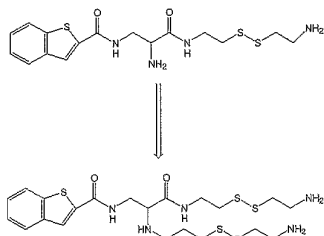
A second example of a SME designed from a disulfide monophore that binds to the TBM is shown below. This dynamic SME can be contacted with the TBM in the presence of one or more disulfide

WO 02/42773

PCT/US01/44036

monophores to form a covalent TBM-SME-monophore complex where the SME has an affinity for the first site of interest and the monophore has an affinity for the second site of interest on the TBM.

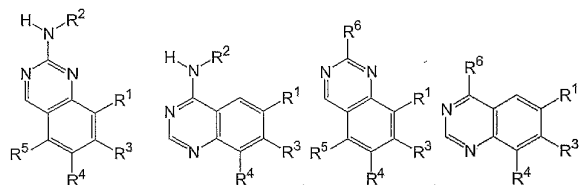
5



Detection and identification of the structure of the TBM-SME-monophore complex can be carried out by mass spectrometry or inhibition in a functional assay (e.g. ELISA, enzyme assay etc.).

10

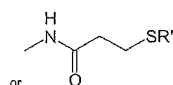
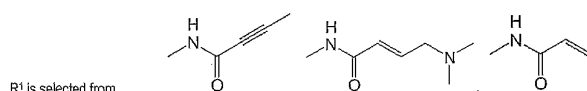
SME's are often customized for a particular TBM or family of TBMs. For example quinazoline derivatives are capable of forming static or dynamic extenders with the EGF receptor or an "RD" kinase. In the case of the EGF receptor, cys 773 is a suitable nucleophile for either a static or dynamic quinazoline extender as shown below;



15 where R¹ is linked to cys 773 through a Michael acceptor or disulfide,

WO 02/42773

PCT/US01/44036



R² is $-(CH_2)_n-SR'$ and $-C(=O)-(CH_2)_n-SR'$;

R³, R⁴ and R⁵ are $-O-(CH_2)_n-SR'$ and $-(CH_2)_n-SR'$;

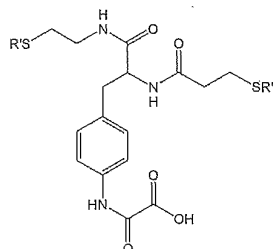
5 R⁶ are $-(CH_2)_n-SR'$; where n is 1, 2, or 3 and

R' is H, a disulfide or a thiol protecting group.

Phosphotyrosine (P-Tyr), phosphoserine (P-Ser) and phosphothreonine (P-Thr) mimetics or surrogates may be used as extenders in the present invention to identify fragments that interact with subsites nearby to improve specificity or affinity for a target phosphatase. Thus extended tethering using known substrates or inhibitors as "anchors" to find nearby fragments by standard covalent tethering with the extender is one preferred embodiment of the instant invention.

10

Phosphotyrosine (P-Tyr) mimetics are examples of SME's that may be customized for phosphatases like PTP-1B, LAR etc. Known PTP-1B P-Tyr mimetics derivitized with mercapto-propanoic acid and/or cysteamine or the protected forms thereof, shown below, bind to the active site of a PTP-1B cys mutant.



15

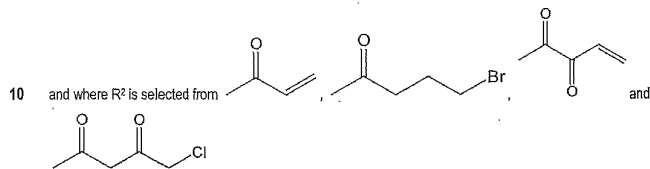
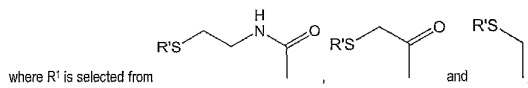
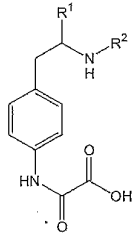
Such a compound may be used as a dynamic extender to select a second fragment by covalent tethering as described above. The compound shown above when bound to the target and titrated against -mercaptoethanol () displays a BME₅₀ (the concentration of -mercaptoethanol that, at equilibrium, is capable of displacing 50 % of the bound compound from the target) of about 2.5 mM. When using a dynamic extender

20 it is preferred to measure the BME₅₀ for the dynamic extender and to screen for a second fragment by covalent tethering at a total thiol concentration (BME + library thiols) at or below the BME₅₀ of the dynamic extender. For example, with the dynamic extender shown above having a BME₅₀ of 2.5 mM, the total thiol

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- concentration in the second fragment screening step should be 2.5 mM or less and more preferably about 2 fold less, e.g. about 1 mM or less. Alternatively the dynamic extender may be converted to a static extender removing the second fragment screening total thiol concentration issue. When converting a dynamic extender to a static extender it is important to maintain the same atom count so that non-covalent binding of the static extender to the target will not be distorted. For similar reasons it is important to minimize introduction of other other bulky atoms or groups. With these factors in mind, the above dynamic extender may be converted into the static extenders defined below.



- In still another embodiment of the invention, an extender may be a peptide either reversibly or irreversibly bound to the TBM. In this embodiment the peptide is from about 2-15 residues long, preferable from 5 to 10 residues, and may be composed of natural and/or artificial alpha amino acids. An example of such a peptide extender is an alpha helical p53 fragment peptide (or smaller known non-natural peptides) that are capable of binding to the N-terminal domain of MDM2 in a deep hydrophobic cleft with nM affinities. BCL-2 and BCL-xL are also known to contain deep peptide-binding grooves analogous the MDM2. Peptides that bind to these targets may also be useful peptide extenders according to the present invention. For example, a fragment peptide of p53 may form a reversible (e.g. disulfide) bond through an existing (e.g. cys) thiol or an introduced thiol (introduced cys, cysteamine derivatized with the carboxyl terminus or mercapto-propanoic acid through the amino terminus) on the peptide with an existing or introduced thiol on the TBM. In this case

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- a TBM-peptide extender complex will be formed which is capable of being used to select a thiol or disulfide fragment from a subsequent covalent tether screen. This dynamic peptide extender will have one other free or protected thiol (e.g. one of the above not used to form the TBM-peptide extender complex), which is contacted with a library of thiol or protected thiol fragments under conditions suitable for forming a covalent
- 5 disulfide bond with a fragment having affinity for the TBM. Optionally the peptide extender may be a static one where an irreversible covalent bond is formed with a nucleophile or electrophile on the TBM as described above. Optionally in this embodiment, a photoaffinity label may be used to attach the peptide extender to the TBM. As above, a free or protected thiol pre-existing or introduced is used to form a disulfide in a subsequent screen to find a small molecule fragment having affinity for the TBM.
- 10 Such a peptide extender may also be a synthetic peptide such as the "Z-WQPY" peptide where the TBM is the IL-1 receptor. Here, the peptide FEWTPGYWQPYALPL or fragments, mutants or analogues thereof can be used as a static or dynamic extender as described above to discover fragments via covalent tethering, where the disulfide tether is to or with the extender and the non-covalent bond is between the selected fragment and the TBM.
- 15 Other chemistries available for forming a reversible or irreversible covalent bond between reactive groups on a SME and a target or ligand, respectively, or between two ligands, are well known in the art, and are described in basic textbooks, such as, e.g. March, *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 4th edition, 1992. Reductive aminations between aldehydes and ketones and amines are described, for example, in March *et al.*, *supra*, at pp. 898-900; alternative methods for preparing amines at page 1276;
- 20 reactions between aldehydes and ketones and hydrazide derivatives to give hydrazones and hydrazone derivatives such as semicarbazones at pp. 904-906; amide bond formation at p. 1275; formation of ureas at p. 1299; formation of thiocarbamates at p. 892; formation of carbamates at p. 1280; formation of sulfonamides at p. 1296; formation of thioethers at p. 1297; formation of disulfides at p. 1284; formation of ethers at p. 1285; formation of esters at p. 1281; additions to epoxides at p. 368; additions to aziridines at p. 368; formation of acetals and ketals at p. 1269; formation of carbonates at p. 392; formation of denamines at p. 1264;
- 25 metathesis of alkenes at pp. 1146-1148 (see also Grubbs *et al.*, *Acc.Chem. Res.* 28:446-453 [1995]); transition metal-catalyzed couplings of aryl halides and sulfonates with alkanes and acetylenes, e.g. Heck reactions, at p.p. 717-178; the reaction of aryl halides and sulfonates with organometallic reagents, such as organoboron, reagents, at p. 662 (see also Miyaura *et al.*, *Chem. Rev.* 95:2457 [1995]); organotin, and organozinc reagents, formation of oxazolidines (Ede *et al.*, *Tetrahedron Letts.* 28:7119-7122 [1997]); formation of thiazolidines (Patek *et al.*, *Tetrahedron Letts.* 36:2227-2230 [1995]); amines linked through amidine groups by coupling amines through imidoesters (Davies *et al.*, *Canadian J. Biochem.* 50:416-422 [1972]), and the like. In particular, disulfide-containing small molecule libraries may be made from commercially available carboxylic acids and protected cysteamine (e.g. mono-BOC-cysteamine) by adapting
- 35 the method of Parlow *et al.*, *Mol. Diversity* 1:266-269 (1995), and can be screened for binding to polypeptides

WO 02/42773

PCT/US01/44036

that contain, or have been modified to contain, reactive cysteines. All of the references cited in this section are hereby expressly incorporated by reference.

While it is usually preferred that the attachment of the SME does not denature the target, the TBM-SME complex may also be formed under denaturing conditions, followed by refolding the complex by methods known in the art. Moreover, the SME and the covalent bond should not substantially alter the three-dimensional structure of the target, so that the ligands will recognize and bind to a site of interest on the target with useful site specificity. Finally, the SME should be substantially unreactive with other sites on the target under the reaction and assay conditions.

10 5. Detection and identification of ligands bound to a target

The ligands bound to a target can be readily detected and identified by mass spectroscopy (MS). MS detects molecules based on mass-to-charge ratio (m/z) and thus can resolve molecules based on their sizes (reviewed in Yates, *Trends Genet.* 16: 5-8 [2000]). A mass spectrometer first converts molecules into gas-phase ions, then individual ions are separated on the basis of m/z ratios and are finally detected. A mass analyzer, which is an integral part of a mass spectrometer, uses a physical property (e.g. electric or magnetic fields, or time-of-flight [TOF]) to separate ions of a particular m/z value that then strikes the ion detector. Mass spectrometers are capable of generating data quickly and thus have a great potential for high-throughput analysis. MS offers a very versatile tool that can be used for drug discovery. Mass spectroscopy may be employed either alone or in combination with other means for detection or identifying the organic compound ligand bound to the target. Techniques employing mass spectroscopy are well known in the art and have been employed for a variety of applications (see, e.g., Fitzgerald and Siuzdak, *Chemistry & Biology* 3: 707-715 [1996]; Chu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118: 7827-7835 [1996]; Siuzdak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11290-11297 [1994]; Burlingame *et al.*, *Anal. Chem.* 68: 599R-651R [1996]; Wu *et al.*, *Chemistry & Biology* 4: 653-657 [1997]; and Loo *et al.*, *Am. Reports Med. Chem.* 31: 319-325 [1996]).

25 However, the scope of the instant invention is not limited to the use of MS. In fact, any other suitable technique for the detection of the adduct formed between the biological target molecule and the library member can be used. For example, one may employ various chromatographic techniques such as liquid chromatography, thin layer chromatography and likes for separation of the components of the reaction mixture so as to enhance the ability to identify the covalently bound organic molecule. Such chromatographic techniques may be employed in combination with mass spectroscopy or separate from mass spectroscopy. One may optionally couple a labeled probe (fluorescently, radioactively, or otherwise) to the liberated organic compound so as to facilitate its identification using any of the above techniques. In yet another embodiment, the formation of the new bonds liberates a labeled probe, which can then be monitored. A simple functional assay, such as an ELISA or enzymatic assay may also be used to detect binding when binding of the extender or second fragment to the target occurs in an area essential for what the assay measures (e.g.

35

WO 02/42773

PCT/US01/44036

binding to a "Hot Spot" in a protein:protein ELISA or binding in the substrate binding pocket for an enzyme assay). Other techniques that may find use for identifying the organic compound bound to the target molecule include, for example, nuclear magnetic resonance (NMR), capillary electrophoresis, X-ray crystallography, and the like, all of which will be well known to those skilled in the art.

5

6. Preparation of conjugate molecules (e.g. diaphores)

Linker elements that find use for linking two or more organic molecule ligands to produce a conjugate molecule will be multifunctional, preferably bifunctional, cross-linking molecules that can function to covalently bond at least two organic molecules together via reactive functionalities possessed by those molecules.

10 Linker elements will have at least two, and preferably only two, reactive functionalities that are available for bonding to at least two organic molecules, wherein those functionalities may appear anywhere on the linker, preferably at each end of the linker and wherein those functionalities may be the same or different depending upon whether the organic molecules to be linked have the same or different reactive functionalities. Linker elements that find use herein may be straight-chain, branched, aromatic, and the like, preferably straight chain, and will generally be at least about 2 atoms in length, more generally more than about 4 atoms in length, and often as many as about 12 or more atoms in length. Linker elements will generally comprise carbon atoms, either hydrogen saturated or unsaturated, and therefore, may comprise alkanes, alkenes or alkynes, and/or other heteroatoms including nitrogen, sulfur, oxygen, and the like, which may be unsubstituted or substituted, preferably with alkyl, alkoxy, hydroxyalkyl or hydroxyalkyl groups. Linker elements that find use will be a varying lengths, thereby providing a means for optimizing the binding properties of a conjugate ligand compound prepared therefrom. The first organic compound that covalently bound to the target biomolecule may itself possess a chemically reactive group that provides a site for bonding to a second organic compound. Alternatively, the first organic molecule may be modified (either chemically, by binding a compound comprising a chemically reactive group thereto, or otherwise) prior to screening against a second library of organic compounds.

25

7. Compounds of the invention

The compounds of the present invention are characterized by encompassing at least one, preferably at least two, ligands at least one of which has been identified by the extended tethering approach disclosed herein, and analogs of such compounds. Accordingly, the compounds of the present invention encompass numerous chemical classes, including but not limited to small organic molecules, peptides, (poly)nucleotides, (oligo)saccharides, etc. The ligands identified by the present methods typically serve as lead compounds for the development of further variants and derivatives designed by following well known techniques. In particular, the ligands identified (including monophores, diaphores, and more complex structures) are amenable to medicinal chemistry and affinity maturation, and can be rapidly optimized using structure-aided

35

WO 02/42773

PCT/US01/44036

design. The present extended tethering approach is superior over other known techniques, including combinatorial chemistry, in that it allows further chemical modifications focused on ligands which have already been shown to bind to different sites on a target, e.g. a TBM.

5 8. Uses of compounds identified

The method of the present invention is a powerful technique for generating drug leads, allows the identification of two or more fragments that bind weakly or with moderate binding affinity to a target at sites near one another, and the synthesis of diaphores or larger molecules comprising the identified fragments (monophores) covalently linked to each other to produce higher affinity compounds. The diaphores or similar
10 multimeric compounds including further ligand compounds, are valuable tools in rational drug design, which can be further modified and optimized using medicinal chemistry approaches and structure-aided design.

The diaphores identified in accordance with the present invention and the modified drug leads and drugs designed therefrom can be used, for example, to regulate a variety of *in vitro* and *in vivo* biological processes which require or depend on the site-specific interaction of two molecules. Molecules which bind to
15 a polynucleotide can be used, for example, to inhibit or prevent gene activation by blocking the access of a factor needed for activation to the target gene, or repress transcription by stabilizing duplex DNA or interfering with the transcriptional machinery.

20 9. Pharmaceutical compositions

The ligands identified in accordance with the present invention, and compounds comprising such ligands, as well as analogues of such compounds, can be used in pharmaceutical compositions to prevent and/or treat a targeted disease or condition. The target disease or condition depends on the biological/physiological function of the target, e.g. TBM to which the ligand or the compounds designed based on such ligand(s) binds. Examples of such diseases and conditions are listed in the table of TBMs above.

Suitable forms of pharmaceutical compositions, in part, depend upon the use or route of entry, for example oral, transdermal, inhalation, or by injections. Such forms should allow the agent or composition to reach a target cell whether the target cell is present in a multicellular host or in culture. For example, pharmacological agents or compositions injected into the blood stream should be soluble. Other factors are known in the art, and include considerations such as toxicity and forms that prevent the agent or composition
30 from exerting its effect.

The active ingredient, when appropriate, can also be formulated as pharmaceutically acceptable salts (e.g., acid addition salts) and/or complexes. Pharmaceutically acceptable salts are non-toxic at the concentration at which they are administered. Pharmaceutically acceptable salts include acid addition salts such as those containing sulfate, hydrochloride, phosphate, sulfonate, sulfamate, sulfate, acetate, citrate,

WO 02/42773

PCT/US01/44036

lactate, tartarate, methanesulfonate, ethanesulfonate, benzenesulfonate, p-toluenesulfonate, cyclohexylsulfonate, cyclohexylsulfamate and quinate.

Pharmaceutically acceptable salts can be obtained from acids such as hydrochloric acid, sulfuric acid, phosphoric acid, sulfonic acid, sulfamic acid, acetic acid, citric acid, lactic acid, tartaric acid, malonic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, benzenesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, cyclohexylsulfonic acid, cyclohexylsulfamic acid, and quinic acid. Such salts may be prepared by, for example, reacting the free acid or base forms of the product with one or more equivalents of the appropriate base or acid in a solvent or medium in which the salt is insoluble, or in a solvent such as water, which is then removed *in vacuo* or by freeze-drying or by exchanging the ions of an existing salt for another ion on a suitable ion exchange resin.

Carriers or excipients can also be used to facilitate administration of the compound. Examples of carriers and excipients include calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars such as lactose, glucose, or sucrose, or types of starch, cellulose derivatives, gelatin, vegetable oils, polyethylene glycols and physiologically compatible solvents. The compositions or pharmaceutical compositions can be administered by different routes including, but not limited to, intravenous, intra-arterial, intraperitoneal, intrapericardial, intracoronary, subcutaneous, intramuscular, oral topical, or transmucosal.

The desired isotonicity of the compositions can be accomplished using sodium chloride or other pharmaceutically acceptable agents such as dextrose, boric acid, sodium tartarate, propylene glycol, polyols (such as mannitol and sorbitol), or other inorganic or organic solutes.

Techniques and ingredients for making pharmaceutical formulations generally may be found, for example, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990. See also, Wang and Hanson "Parental Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers," *Journal of Parental Science and Technology*, Technical Report No. 10, Supp. 42-2S (1988). A suitable administration format can be best determined by a medical practitioner for each disease or condition individually, and also in view of the patient's condition.

Pharmaceutical compositions are prepared by mixing the ingredients following generally accepted procedures. For example, the selected components can be mixed simply in a blender or other standard device to produce a concentrated mixture which can then be adjusted to the final concentration and viscosity by the addition of water or thickening agent and possibly a buffer to control pH or an additional solute to control tonicity.

The amounts of various compounds for use in the compositions of the invention to be administered can be determined by standard procedures. Generally, a therapeutically effective amount is between about 100 mg/kg and 10⁻¹² mg/kg depending on the age and size of the patient, and the disease or disorder associated with the patient. Generally, it is an amount between about 0.05 and 50 mg/kg of the individual to be treated. The determination of the actual dose is well within the skill of an ordinary physician.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

10. Description of preferred embodiments

In a preferred embodiment, the methods of the present invention are used to identify low molecular weight ligands that bind to at least two different sites of interest on target proteins through intermediary disulfide tethers formed between a first ligand and the protein, and a reactive group on the first ligand and a second ligand, respectively.

The low molecular weight ligands screened in preferred embodiments of the invention will be, for the most part, small chemical molecules that will be less than about 2000 daltons in size, usually less than about 1500 daltons in size, more usually less than about 750 daltons in size, preferably less than about 500 daltons in size, often less than about 250 daltons in size, and more often less than about 200 daltons in size, although organic molecules larger than 2000 daltons in size will also find use herein. In one preferred embodiment, such small chemical molecules are small organic molecules, other than polypeptides or polynucleotides. In another preferred embodiment, the small organic molecules are non-polymeric, i.e. are not peptide, polypeptides, polynucleotides, etc.

Organic molecules may be obtained from a commercial or non-commercial source. For example, a large number of small organic chemical compounds are readily obtainable from commercial suppliers, such as Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI and Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, or may be obtained by chemical synthesis. The methods of the present invention are preferably used to screen libraries of small organic compounds carrying appropriate reactive group, preferably thiol or protected thiol groups.

In recent years, combinatorial libraries, typically having from dozens to hundreds of thousands of members, have become a major tool for ligand discovery and drug development. In general, libraries of organic compounds which find use herein will comprise at least 2 organic compounds, often at least about 25 different organic compounds, more often at least about 100 different organic compounds, usually at least about 300 different organic compounds, preferably at least about 2500 different organic compounds, and most preferably at least about 5000 or more different organic compounds. Populations may be selected or constructed such that each individual molecule of the population may be spatially separated from the other molecules of the population (e.g. in separate microtiter well) or two or more members of the population may be combined if methods for deconvolution are readily available. Usually, each member of the organic molecule library will be of the same chemical class (i.e. all library members are aldehydes, all library members are primary amines, etc.), however, libraries of organic compounds may also contain molecules from two or more different chemical classes.

In a preferred embodiment, the target biological molecule (TBM) is a polypeptide that contains or has been modified to contain a thiol group, protected thiol group or reversible disulfide bond. The TBM is then reacted with a Small Molecule extender (SME), which includes a portion having affinity for a first site of interest on the TBM and a group reactive with the thiol, protected thiol or reversible disulfide bond on the

WO 02/42773

PCT/US01/44036

TBM. As discussed above, the linkage between the TBM and the SME may be either an irreversible covalent bond ("static" extended tethering), or a reversible covalent bond ("dynamic" extended tethering) to form a TBM-SME complex. Whether the static or dynamic approach is used, the TBM-SME complex is then used to screen a library of disulfide-containing monophores to identify a library member that has intrinsic affinity, most preferably the highest intrinsic affinity, for a second binding site (site of interest) on the target molecule. In a preferred embodiment, the reactive group on the modified TBM is a free thiol group contributed by the extender, and the library is made up of small molecular weight compounds containing reactive thiol group. For disulfide tethering to capture the most stable ligand, the reaction must be under rapid exchange to allow for equilibration. In a preferred embodiment, the reaction is carried out in the presence of catalytic amount of a reducing agent such as 2-mercaptoethanol. Thermodynamic equilibrium reached in the presence of a reducing agent will favor the formation of disulfide bond between thiol group of the extender on the modified TBM and thiol group of a member of the library having intrinsic affinity for the TBM. Thus, two different ligands with intrinsic affinity for two different sites on the same TBM will be covalently linked to form a diaphore. The diaphore will bind to the TBM with a higher affinity than any of the constituent monophore units. The monophore units in a diaphore may be from the same or different chemical classes. By "same chemical class" is meant that each monophore component is of the same chemical type, i.e., both are aldehyde or amines etc.

In a particular embodiment, the target can be present on a chip contacted with the ligand candidates. In this case, the covalent bond linking the first ligand to the target may be formed with the chip, in which case, the chip will become part of the covalent bond, representing a special class of "Small Molecule Extenders."

The library of the ligand candidates, e.g. small organic molecule ligands, can be attached to a solid surface, e.g. displayed on beads, for example as described in PCT publication WO 98/11436 published on March 19, 1998. In a particular embodiment, beads are modified to introduce reactive groups, e.g. a low level of sulfhydryl groups. A library of ligand candidates is then synthesized on the modified beads. Subsequently, the library is incubated, under oxidizing conditions, with the target containing or modified to contain a reactive group, e.g. a sulfhydryl group such that a disulfide bond can be formed between the target and the sulfhydryl on the bead. The beads are then washed in the presence of a reducing agent, followed by incubation in the presence of a sulfhydryl quenching agent, such as iodoacetate. The beads may then be washed under denaturing conditions to remove any non-covalently bound target.

30 EXAMPLES

The invention is further illustrated by the following, non-limiting examples. Unless otherwise noted, all the standard molecular biology procedures are performed according to protocols described in (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vols. 1-3, edited by Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, vols. 1-2, edited by Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J., and Struhl, K., Wiley Interscience, 1987).

WO 02/42773

PCT/US01/44036

The concept of basic tethering approach has been described by Erlanson *et al.*, *supra*, and in PCT Publication No. WO 00/00823. The "extended tethering" approach is illustrated in this application using caspase-3 as a target biological molecule (TBM). Caspases are a family of cysteine proteases, that are known to participate in the initiation and execution of programmed cell death (apoptosis). The first caspase 5 (now referred to as Caspase-1) was originally designated as interleukin-1 β -converting enzyme (ICE) (Thomburry *et al.*, *Nature* 356:768-774 [1992]; Cerretti *et al.*, *Science* 356:97-100 [1992]). Subsequently a large number of caspases have been identified and characterized forming a caspase family. Presently there are at least 10 members in the family (Caspase-1 to Caspase-10). Caspases are expressed in cells in an enzymatically inactive form and become activated by proteolytic cleavage in response to an apoptotic 10 stimulus. The inactive proenzyme form consists of a large and a small domain (subunit), in addition to an inhibitory N-terminal domain. Caspase activation involves the processing of the proenzyme into the large and small subunits, which occurs internally within the molecule. Caspases are activated either by self-aggregation and autoprocessing (as in the initiation of apoptosis), or via cleavage by an activated upstream caspase (as in the execution phase of apoptosis). For review, see, for example, Cohen G.M. *Biochem. J.* 326: 1-16 (1997).

15 Based on a known tetrapeptide inhibitor of caspase (Ator and Dolle, *Current Pharmaceutical Design* 1:191-210 (1995)), an extender was synthesized: 2,6-Dichloro-benzoic acid 3-(2-acetylsulfanyl-acetylamino)-4-carboxy-2-oxo-butyl ester (shown as compound 5 in Figure 4), the synthesis of which is described in Example 2 below. A generic structure of extender is shown in Figure 4. Caspase was modified by reacting with the extender (Example 3) and subsequently used as a biological target molecule for screening of 20 disulfide library prepared as described in Example 1, by using the extended tethering approach.

All commercially available materials were used as received. All synthesized compounds were characterized by ¹H NMR [Bruker (Billerica, MA) DMX400 MHz Spectrometer] and HPLC-MS (Hewlett-Packard Series 1100 MSD).

25 Example 1

Disulfide Libraries

Disulfide libraries were synthesized using standard chemistry from the following classes of compounds: aldehydes, ketones, carboxylic acids, amines, sulfonyl chlorides, isocyanates, and isothiocyanates. For example, the disulfide-containing library members were made from commercially 30 available carboxylic acids and mono-N-(*tert*-butoxycarbonyl)-protected cystamine (mono-BOC-cystamine) by adapting the method of Parlow and coworkers (Parlow and Normansell, *Mol. Diversity* 1: 266-269 [1996]). Briefly, 260 μ mol of each carboxylic acid was immobilized onto 130 μ mol equivalents of 4-hydroxy-3-nitrobenzophenone on polystyrene resin using 1,3-diisopropylcarbodiimide (DIC) in *N,N*-dimethylformamide (DMF). After 4 h at room temperature, the resin was rinsed with DMF (\times 2), dichloromethane (DCM, \times 3), and 35 tetrahydrofuran (THF, \times 1) to remove uncoupled acid and DIC. The acids were cleaved from the resin via

WO 02/42773

PCT/US01/44036

amide formation with 66 μmol of mono-BOC protected cystamine in THF. After reaction for 12 h at ambient temperature, the solvent was evaporated, and the BOC group was removed from the uncoupled half of each disulfide by using 80% trifluoroacetic acid (TFA) in DCM. The products were characterized by HPLC-MS, and those products that were substantially pure were used without further purification. A total of 530 compounds were made by using this methodology.

Libraries were also constructed from mono-BOC-protected cystamine and a variety of sulfonyl chlorides, isocyanates, and isothiocyanates. In the case of the sulfonyl chlorides, 10 μmol of each sulfonyl chloride was coupled with 10.5 μmol of mono-BOC-protected cystamine in THF (with 2% diisopropyl ethyl amine) in the presence of 15 mg of poly(4-vinyl pyridine). After 48 h, the poly(4-vinylpyridine) was removed via filtration, and the solvent was evaporated. The BOC group was removed by using 50% TFA in DCM. In the case of the isothiocyanates, 10 μmol of each isocyanate or isothiocyanate was coupled with 10.5 μmol of mono-BOC-protected cystamine in THF. After reaction for 12 h at ambient temperature, the solvent was evaporated, and the BOC group was removed by using 50% TFA in DCM. A total of 212 compounds were made by using this methodology.

Finally, oxime-based libraries were constructed by reacting 10 μmol of specific aldehydes or ketones with 10.5 μmol of $\text{HO}(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{ONH}_2$ in 1:1 methanol/chloroform (with 2% acetic acid added) for 12 h at ambient temperature to yield the oxime product. A total of 448 compounds were made by using this methodology.

Individual library members were redissolved in either acetonitrile or dimethyl sulfoxide to a final concentration of 50 or 100 mM. Aliquots of each of these were then pooled into groups of 8-15 discrete compounds, with each member of the pool having a unique molecular weight.

Example 2

Extender (SME) synthesis

For extended tethering approach, extender (2,6-Dichloro-benzoic acid 3-(2-acetylsulfanyl-acetylamino)-4-carboxy-2-oxo-butyl ester, shown as compound 5 in Figure 4) was synthesized using a series of chemical reactions as shown in Figure 4, and described below.

Synthesis of 2-(2-Acetylsulfanyl-acetylamino)-succinic acid 4-tert-butyl ester (compound 2,

Figure 4)

Acetylsulfanyl-acetic acid pentafluorophenyl ester (1.6 g, 5.3 mmol) and H-Asp(OtBu)-OH (1 g, 5.3 mmol) were mixed in 20 ml of dry dichloromethane (DCM). Then 1.6 ml of triethylamine (11.5 mmol) was added, and the reaction was allowed to proceed at ambient temperature for 3.5 hours. The organic layer was then extracted with 3 x 15 ml of 1 M sodium carbonate, the combined aqueous fractions were acidified with 100 ml of 1 M sodium hydrogensulfate and extracted with 3 x 30 ml ethyl acetate. The combined organic fractions were then rinsed with 30 ml of 1 M sodium hydrogensulfate, 30 ml of 5 M NaCl, dried over sodium

WO 02/42773

PCT/US01/44036

sulfate, filtered, and evaporated under reduced pressure to yield 1.97 g of a nearly colorless syrup which was used without further purification. MW = 305 (found 306, M+1).

Synthesis of 3-(2-Acetylsulfanyl-acetylamino)-5-chloro-4-oxo-pentanoic acid tert-butyl ester (compound 3, Figure 4)

5 The free acid (compound 2) was dissolved in 10 ml of dry tetrahydrofuran (THF), cooled to 0 °C, and treated with 0.58 ml N-methyl-morpholine (5.3 mmol) and 0.69 isobutylchloroformate. Dense white precipitate immediately formed, and after 30 minutes the reaction was filtered through a glass frit and transferred to a new flask with an additional 10 ml of THF. Meanwhile, diazomethane was prepared by reacting 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (2.3 g, 15.6 mmol) with 7.4 ml of 40% aqueous KOH and 25 ml diethyl ether for 45
10 minutes at 0 °C. The yellow ether layer was then decanted into the reaction containing the mixed anhydride, and the reaction allowed to proceed while slowly warming to ambient temperature over a period of 165 minutes. The reaction was cooled to 8 °C, and 1.5 ml of 4 N HCl in dioxane (6 mmol total) was added dropwise. This resulted in much bubbling, and the yellow solution became colorless. The reaction was allowed to proceed for two hours while gradually warming to ambient temperature and then quenched with 1
15 ml of glacial acetic acid. The solvent was removed under reduced pressure and the residue redissolved in 75 ml ethyl acetate, rinsed with 2 x 50 ml saturated sodium bicarbonate, 50 ml 5 M NaCl, dried over sodium sulfate, filtered, and evaporated to dryness before purification by flash chromatography using 90:10 chloroform : ethyl acetate to yield 0.747 g of light yellow oil (2.2 mmol, 42% from (1)). Expected MW = 337.7, found 338 (M+1).

20 Synthesis of 2,6-Dichloro-benzoic acid 3-(2-acetylsulfanyl-acetylamino)-4-tert-butoxycarbonyl-2-oxo-butyl ester (compound 4, Figure 4)

The chloromethylketone (compound 3) (0.25 g, 0.74 mmol) was dissolved in 5 ml of dry N,N-dimethylformamide (DMF), to which was added 0.17 g 2,6-dichlorobenzoic acid (0.89 mmol) and 0.107 g KF (1.84 mmol). The reaction was allowed to proceed at ambient temperature for 19 hours, at which point it was
25 diluted with 75 ml ethyl acetate, rinsed with 2 x 50 ml saturated sodium bicarbonate, 50 ml 1 M sodium hydrogen sulfate, 50 ml 5 M NaCl, dried over sodium sulfate, filtered, and dried under reduced pressure to yield a yellow syrup which HPLC-MS revealed to be about 75% product and 25% unreacted (3). This was used without further purification. Expected MW = 492.37, found 493 (M+1).

30 Synthesis of 2,6-Dichloro-benzoic acid 3-(2-acetylsulfanyl-acetylamino)-4-carboxy-2-oxo-butyl ester (compound 5, Figure 4)

The product of the previous step (compound 4) was dissolved in 10 ml of dry DCM, cooled to 0 °C, and treated with 9 ml trifluoroacetic acid (TFA). The reaction was then removed from the ice bath and allowed to warm to ambient temperature over a period of one hour. Solvent was removed under reduced pressure, and the residue redissolved twice in DCM and evaporated to remove residual TFA. The crude product was
35 purified by reverse-phase high-pressure liquid chromatography to yield 101.9 mg (0.234 mmol, 32 % from (3))

WO 02/42773

PCT/US01/44036

of white hygroscopic powder. Expected MW = 436.37, found 437 (M+1). This was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to yield a 50 mM stock solution.

Example 3

5 Modification of Caspase 3 with Extender

Caspase 3 was cloned, overexpressed, and purified using standard techniques (Rotonda *et al.*, Nature Structural Biology 3(7):619-625 (1996)). To 2 ml of a 0.2 mg/ml Caspase 3 solution was added 10 ml of 50 mM 2,6-Dichloro-benzoic acid 3-(2-acetylsulfanyl-acetylamino)-4-carboxy-2-oxo-butyl ester (compound 5, Fig. 3) synthesized as described in Example 2, and the reaction was allowed to proceed at ambient temperature for 3.5 hours, at which point mass spectroscopy revealed complete modification of the caspase 3 large subunit (MW 16861Da, calculated MW 16860Da). The thioester was deprotected by adding 0.2 ml of 0.5 M hydroxylamine buffered in PBS buffer, and allowing the reaction to proceed for 18 hours, at which point the large subunit had a mass of 16819Da (calculated 16818Da). The protein was concentrated in a Ultrafree 5 MWCO unit (Millipore) and the buffer exchanged to 0.1 M TES pH 7.5 using a Nap-5 column (Amersham Pharmacia Biotech). The structure of the resulting "extended" caspase-3 is shown in Figure 6.

15 The protein was then screened against a disulfide library prepared as described above, in Example 1, and using the methodology described in Example 4 below.

Example 4

20 Screening of Disulfide Library

In a typical experiment, 1 μ l of a DMSO solution containing a library of 8-15 disulfide-containing compounds was added to 49 μ l of buffer containing extender-modified protein. When mass spectroscopy was used for the identification of the bound ligand, the compounds were chosen so that each has a unique molecular weight. For example, these molecular weights differ by at least 10 atomic mass units so that deconvolution is unambiguous. Although pools of 8-15 disulfide-containing compounds were typically chosen for screening because of the ease of deconvolution, larger pools can also be used. The protein was present at a concentration of \sim 15 μ M, each of the disulfide library members was present at \sim 0.2 mM, and thus the total concentration of all disulfide library members was \sim 2 mM. The reaction was done in a buffer containing 25 mM potassium phosphate (pH 7.5) and 1 mM 2-mercaptoethanol, although other buffers and reducing agents can be used. The reactions were allowed to equilibrate at ambient temperature for at least 30 min. These conditions can be varied considerably depending on the ease with which the protein ionizes in the mass spectrometer, the reactivity of the specific cysteine(s), etc.

35 After equilibration of aspartyl-conjugated caspase-3 (Example 3) and library (Example 1), the reaction was injected onto an HP1100 HPLC and chromatographed on a C₁₈ column attached to a mass spectrometer (Finnigan-MAT LCQ, San Jose, CA). The multiply charged ions arising from the protein were

WO 02/42773

PCT/US01/44036

deconvoluted with available software (XCALIBUR) to arrive at the mass of the protein. The identity of any library member bonded through a disulfide bond to the protein was then easily determined by subtracting the known mass of the unmodified protein from the observed mass. This process assumes that the attachment of a library member does not dramatically change the ionization characteristics of the protein itself, a conservative assumption because in most cases the protein will be at least 20-fold larger than any given library member. This assumption was confirmed by demonstrating that small molecules selected by one protein are not selected by other proteins.

The results of a representative experiment are shown in Figure 6. The spectrum on the right side of Figure 6 shows the result of reacting "extended" Casase-3 (synthesized as described in Example 3), with a disulfide-containing molecule identified from a pool as modifying extended Caspase-3. The predominant peak obtained (mass of 17,094) corresponds to Caspase-3 covalently linked to the small molecule ligand which has an intrinsic affinity for a second site of interest on Caspase-3, resulting in the diaphore compound shown above the peak.

The mass spectrum shown on the left side is a deconvoluted mass spectrum of unmodified Caspase-3 (a cysteine-containing polypeptide target), and the same disulfide-containing small molecule ligand used above. The spectrum reveals a predominant peak corresponding to the mass of unmodified Caspase-3 (16,614 Da). A significantly smaller peak represents Caspase-3 disulfide-bonded to 2-aminoethanethiol (combined mass: 16,691 Da). Note that here the small molecule ligand is not selected because its binding site is too far from the reactive cysteine and no extender has introduced.

The initial lead compound, identified as describe above, was then modified in order to evaluate the relative importance of various substituents in specific binding to Caspase-3.

All references cited throughout the specification are hereby expressly incorporated by reference.

While the present invention has been described with reference to the specific embodiment thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes may be made and equivalents may be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. In addition, many modifications may be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the object, spirit and scope of the present invention. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process comprising:
 - (i) contacting a Target Biological Molecule (TBM) having a first and a second site of interest, and containing or modified to contain a nucleophile at or near the first site of interest with a plurality of first small organic ligand candidates, said candidates having a functional group reactive with the nucleophile, under conditions such that a reversible covalent bond is formed between the nucleophile and a candidate that has affinity for the first site of interest, to form a TBM-first ligand complex;
 - (ii) identifying the first ligand from the complex of (i); and
 - (iii) designing a derivative of the first ligand identified in (ii) to provide a small molecule extender (SME) having a first functional group reactive with the nucleophile on the TBM and a second functional group reactive with a second ligand having affinity for the second site of interest.
2. The process of claim 1 wherein said TBM is contacted with said ligand candidates sequentially.
3. The process of claim 1 wherein said first ligand candidates are members of a library.
4. The process of claim 1 wherein said TBM is a polypeptide.
5. The process of claim 4 wherein said TBM is a protein.
6. The process of claim 5 wherein said protein is selected from the group consisting of lymphocyte cell surface receptors, enzymes, steroid receptors, nuclear proteins, allosteric enzyme inhibitors, clotting factors, serine/threonine kinases and dephosphorylases, threonine kinases and dephosphorylases, bacterial enzymes, fungal enzymes and viral enzymes, signal transduction molecules, transcription factors, proteins associated with DNA and/or RNA synthesis or degradation, immunoglobulins, hormones, cytokine receptors, chemokines and their receptors, ligands and receptors for tyrosine kinase, neurotrophins and their ligands, and other hormones and receptors.
7. The process of claim 6 wherein said protein is selected from the group consisting of erythropoietin (EPO), granulocyte colony stimulating (G-CSF) receptor, granulocyte macrophage colony stimulating (GM-CSF) receptor, thrombopoietin (TPO), interleukins, e.g. IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12, growth hormone, prolactin, human placental lactogen (LPL), CNTF, oncostatin, RANTES MIP β , IL-8, insulin, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), epidermal growth factor (EGF), heregulin- α and heregulin- β , vascular endothelial growth factor (VEGF), placental growth factor (PLGF), tissue growth factors (TGF- α and TGF- β), nerve growth factor (NGF), bone morphogenic factors, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), tissue necrosis factor (TNF), apoptosis factor-1 and -2 (AP-1 and AP-2), and mdm2.
8. The process of claim 6 wherein said protein is selected from the group consisting of IgE/IgER, ZAP-70, Ick, syk, ITK/BTK, TACE, Cathepsin S and F, CD11a, LFA/ICAM, VLA-4, CD28/B7, CTLA4, TNF alpha and beta, (and the p55 and p75 TNF receptors), CD40L, p38 map kinase, IL-2, IL-4, IL-13, IL-15, Rac 2, PKC theta, IL-8, TAK-1, jnk, IKK2, IL-18, caspases 1, 3, 8 and 9, IL-1/IL-1 receptor, BACE, HIV

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- integrase, PDE IV, Hepatitis C helicase, Hepatitis C protease, rhinovirus protease, trypase, cPLA (cytosolic Phospholipase A2), CDK4, c-jun kinase, adaptors such as Grb2, GSK-3, AKT, MEKK-1, PAK-1, raf, TRAF's 1-6, Tie2, ErbB 1 and 2, FGF, PDGF, PARP, CD2, C5a receptor, CD4, CD26, CD3, TGF-alpha, NF-kB, IKK beta, STAT 6, Neurokinin-1, PTP-1B, CD45, Cdc25A, SHIP-2, TC-PTP, PTP-alpha, LAR and human p53, bax/bcl2 and mdm2.
- 5 9. The process of claim 1 wherein said nucleophile is selected from the group consisting of thiol, protected thiol, reversible disulfide, hydroxyl, protected hydroxyl, amino, protected amino, carboxyl and protected carboxyl groups.
- 10 10. The process of claim 4 wherein said nucleophile is selected from the group consisting of thiol, protected thiol, reversible disulfide, hydroxyl, protected hydroxyl, amino, protected amino, carboxyl and protected carboxyl groups.
11. The process of claim 10 wherein said nucleophile is associated with a wild-type or mutant Cys, Ser, Thr, Lys, Asp, or Glu present on the TBM.
- 15 12. The process of claim 4 wherein said nucleophile is thiol, protected thiol, or a reversible disulfide group.
13. The process of claim 12 wherein said nucleophile is associated with a wild-type or mutant Cys on the TBM.
14. The process of claim 12 wherein said ligand candidates have a thiol, protected thiol or reversible disulfide group.
- 20 15. The process of claim 14 wherein step (i) is performed under conditions of thiol exchange.
16. The process of claim 15 wherein said conditions are provided by a reducing agent selected from the group consisting of mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythreitol (DTE), mercaptoethanol, glutathione, cysteamine, cysteine, tri(carboxyethyl)phosphine (TCEP), and tris(cyanoethyl)phosphine.
- 25 17. The process of claim 9 wherein the first functional group on said SME of step (iii) is capable of forming an irreversible covalent group with the thiol, protected thiol, reversible disulfide bond, hydroxyl, protected hydroxyl, amino, protected amino, carboxyl or protected carboxyl on said TBM.
18. The process of claim 17 wherein said first functional group is capable of undergoing an SN2-like addition or form a Michael-type adduct with the thiol, protected thiol, reversible disulfide, hydroxyl, protected hydroxyl, amino, protected amino, carboxyl or protected carboxyl on said TBM.
- 30 19. The process of claim 18 wherein said first functional group is selected from the group consisting of α -halo-acid, fluorophos(phon)ate, epoxide, aziridine, thirane, halo-methyl-ketone, halo-methyl-amide groups, groups derived from electrophilic aromatic systems, aldehyde, boronic acids, and groups capable of forming Michael adducts with the nucleophile on said TBM.
20. The process of claim 17 further comprising the steps of (iv) contacting the SME with the
- 35 TBM to form a TBM-SME complex, and (v) contacting the TBM-SME complex with a plurality of second small

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- organic ligand candidates, said candidates having a functional group reactive with the SME in said TBM-SME complex, wherein a candidate that has affinity for said second site of interest on said TBM forms a reversible covalent bond with said TBM-SME complex, whereby a second ligand is identified.
21. The process of claim 20 wherein the second functional group on said TBM and the functional group on said second ligand candidates in step (v) is a thiol, protected thiol or reversible disulfide group.
22. The process of claim 21 wherein step (v) is conducted under conditions of thiol exchange.
23. The process of claim 22 wherein said conditions are provided by a reducing agent selected from the group consisting of mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythreitol (DTE), mercaptopropanoic acid, glutathione, cysteamine, cysteine, tri(carboxyethyl)phosphine (TCEP), and tris(cyanoethyl)phosphine.
24. The process of claim 23 wherein said second ligand candidates in step (v) are members of a library.
25. The process of claim 24 wherein the library member having the highest affinity for said second site of interest on the TBM forms a disulfide bond with the TBM-SME complex.
26. The process of claim 9 wherein the first functional group on said SME of step (iii) is capable of forming a reversible covalent group with the thiol, protected thiol, reversible disulfide bond, hydroxyl, protected hydroxyl, amino, protected amino, carboxyl or protected carboxyl on said TBM.
27. The process of claim 26 wherein the nucleophile of the TBM is a thiol, or protected thiol group.
28. The process of claim 27 further comprising the step of (iv) contacting said SME with the TBM to form a TBM-SME complex, and (v) contacting the TBM and SME with a plurality of second small organic ligand candidates, said candidates having a functional group reactive with the SME, wherein step (iv) precedes step (v), or steps (iv) and (v) are performed simultaneously, and wherein a candidate that has affinity for said second site of interest on said TBM forms a reversible covalent bond with the TBM-SME complex, whereby a second ligand is identified.
29. The process of claim 28 wherein the second functional group on said TBM and the functional group on said second ligand candidates in step (v) is a thiol, protected thiol or reversible disulfide group.
30. The process of claim 29 wherein step (v) is conducted under conditions of thiol exchange.
31. The process of claim 30 wherein said conditions are provided by a reducing agent selected from the group consisting of mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythreitol (DTE), mercaptopropanoic acid, glutathione, cysteamine, cysteine, tri(carboxyethyl)phosphine (TCEP), and tris(cyanoethyl)phosphine.
32. The process of claim 31 wherein said second ligand candidates in step (v) are members of a library.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

33. The method of claim 20 comprising identifying said second ligand having affinity for said second site of interest on the TBM.
34. The method of claim 33 wherein said second ligand is identified by mass spectrometry (MS).
- 5 35. The method of claim 33 wherein said second ligand is identified by means of a detectable tag.
36. The method of claim 28 comprising identifying said second ligand having affinity for said second site of interest on the TBM.
37. The method of claim 36 wherein said second ligand is identified by mass spectrometry (MS).
- 10 38. The method of claim 36 wherein said second ligand is identified by means of a detectable tag.
39. The method of claim 33 or claim 36, further comprising the step of synthesizing a molecule comprising said first and second ligands covalently linked to one another.
- 15 40. The method of claim 39 wherein said covalent linkage is provided by a disulfide bond.
41. The method of claim 40 wherein said molecule consists essentially of said first and second ligands, covalently linked through a disulfide bond.
42. The method of claim 41 further comprising the step of synthesizing derivatives of said molecule.
- 20 43. The method of claim 42 wherein the disulfide bond is replaced with a different covalent linkage.
44. A molecule comprising a second ligand identified in claim 33 or claim 36.
45. The molecule of claim 44 further comprising the first ligand identified in claim 1.
46. The molecule of claim 45 wherein said first and second ligands are linked by a covalent
- 25 bond.
47. The molecule of claim 46 wherein said covalent bond is other than a disulfide bond.
48. A molecule comprising functional variants of said first and second ligands linked by a covalent bond.
49. The molecule of claim 48 wherein said bond is other than a disulfide bond.
- 30 50. A process comprising:
- (i) providing a Target Biological Molecule (TBM) containing or modified to contain a reactive nucleophile near a first site of interest on the TBM;
- (ii) contacting the TBM from (i) with a small molecule extender having a group reactive with the nucleophile on the TBM and having a free thiol or protected thiol;

WO 02/42773

PCT/US01/44036

- (iii) adjusting the conditions to cause a covalent bond to be formed between the nucleophile on the TBM and the group on the small molecule extender thereby forming a covalent complex comprising the TBM and the small molecule extender, the complex displaying a free thiol or protected thiol near a second site of interest on the TBM;
- 5 (iv) contacting the complex from (iii) with a library of small organic molecules, each molecule having a free thiol or exchangeable disulfide linking group, under conditions of thiol exchange wherein the library member having the highest affinity for the second site of interest on the TBM forms a disulfide bond with the complex; and
- (v) identifying the library member from (iv).
- 10 51. The process of claim 50 further comprising the step of synthesizing a molecule consisting essentially of the small molecule extender having the electrophile group from step (ii) covalently linked through the disulfide with the library member identified in step (i).
52. The process of claim 51 further comprising the step of synthesizing derivatives of the molecule.
- 15 53. The process of claim 52 wherein the derivative contains a different group reactive with the nucleophile.
54. The process of claim 52 wherein the disulfide group is replaced with a different group.
55. The process of claim 50 further comprising synthesizing a molecule consisting essentially of the small molecule extender without the group reactive with the nucleophile covalently linked through the disulfide with the library member identified in step (e).
- 20 56. The process of claim 55 further comprising replacing the disulfide with a different group.
57. The process of claim 50 wherein the reactive nucleophile is a thiol.
58. The process of claim 57 further comprising, after step (i),
- 25 (a) contacting the TBM with a library of small organic molecules, each molecule having an exchangeable disulfide linking group, under conditions of thiol exchange wherein the library member having the highest affinity for the first site of interest forms a disulfide bond with the TBM;
- (b) identifying the library member from (i); and
- (c) forming a derivative of the library member in (ii) that is the small molecule extender having a group reactive with the nucleophile and having a thiol or protected thiol of step (b).
- 30 59. The process of claim 58 further comprising adding a disulfide reducing agent selected from the group consisting of mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), dithioerythreitol (DTE), mercaptopropionic acid, glutathione, cysteamine, cysteine, tris(carboxyethyl)phosphine (TCEP), and tris(cyanoethyl)phosphine.
60. The process of claim 50 wherein the reactive nucleophile is a hydroxyl (-OH) group.

WO 02/42773

PCT/US01/44036

61. The process of claim 60 wherein the group reactive with the nucleophile is selected from the group consisting of an activated carbonyl, epoxide, aziridine, aromatic sulfonate, hemiacetal, halomethylketone, aryloxyloxomethylketone, disulfide, thiosulfonate, and thiosulfate.
62. The process of claim 61 wherein said carbonyl is in the form of an aldehyde or ketone or an ester or acyl halide.
63. The process of claim 50 wherein the reactive nucleophile is an amine.
64. The process of claim 50 wherein the identifying step comprises mass spectrum analysis.
65. The process of claim 58 wherein the identifying step comprises mass spectrum analysis.
66. The process of claim 58 wherein the conditions comprising adding a disulfide reducing agent.
67. The process of claim 58 wherein each molecule in the library of small organic molecules having an exchangeable disulfide linking group contains the cysteamine moiety.
68. The process of claim 61 wherein the activated carbonyl is selected from the group consisting of halomethylketones, aryloxyloxomethylketones and thioesters.
69. A molecule comprising a library member identified in step (v) of claim 50.
70. The molecule of claim 69 further comprising at least part of the small molecule extender used in step (ii) of claim 50.
71. The molecule of claim 70 comprising said library member and said small molecule extender or part thereof, linked by a covalent bond.
72. The molecule of claim 71 wherein said covalent bond is other than a disulfide bond.
73. A molecule of claim 70 comprising functional variants of said library member and small molecule extender or part thereof, linked by a covalent bond.
74. The molecule of claim 73 wherein said covalent bond is other than a disulfide bond.

25

Direct analysis of screening reactions
by mass-spectroscopy

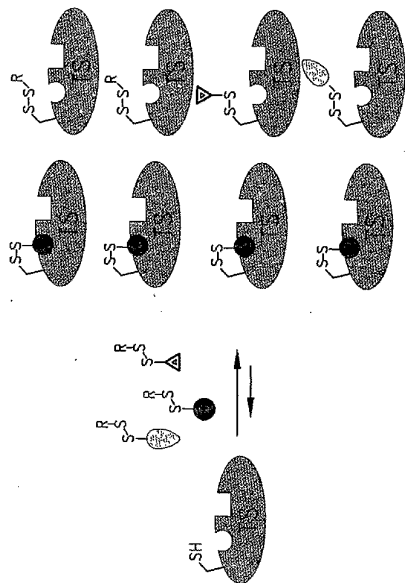
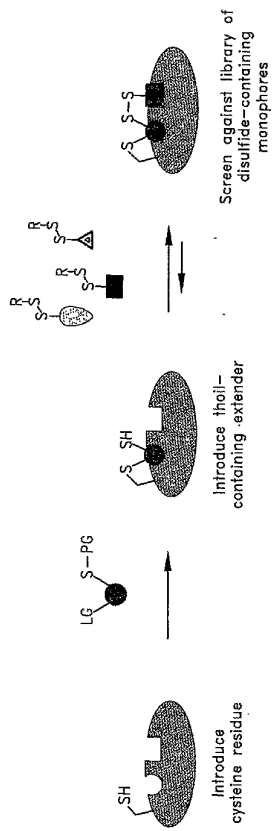


FIG. 1

Extended tethering:



Derived Diaphore

FIG. 2

"Dynamic" Extended Tethering Strategy

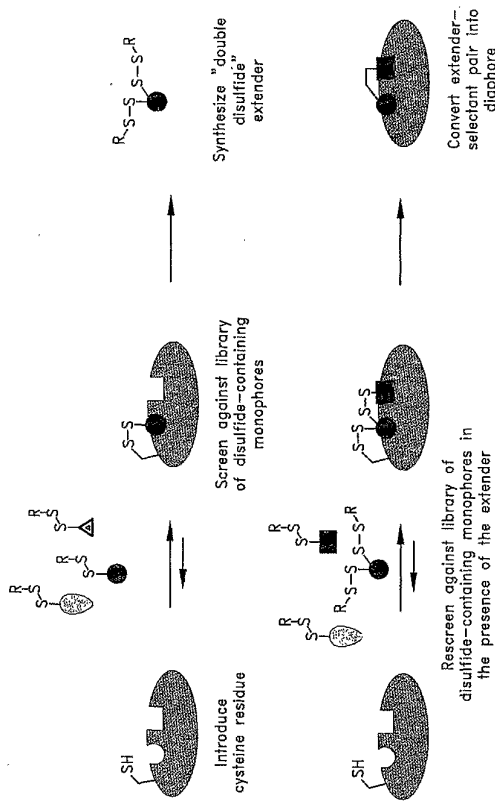


FIG. 3

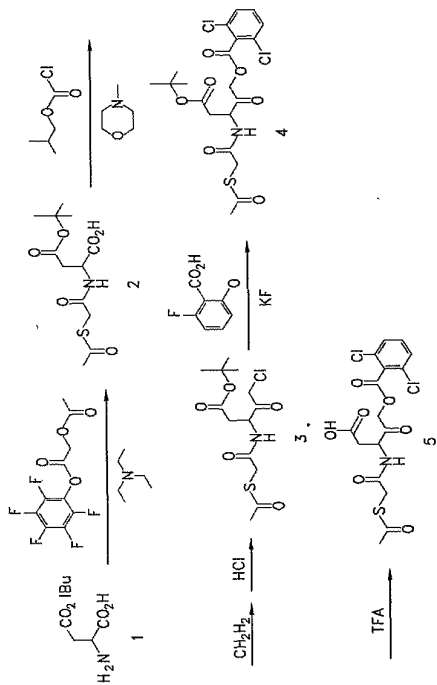


FIG. 4

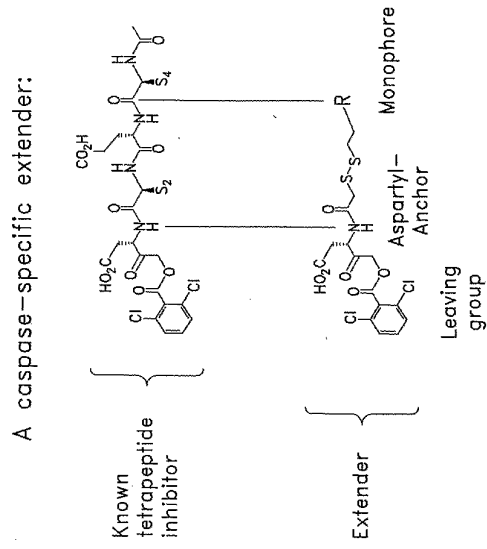


FIG. 5

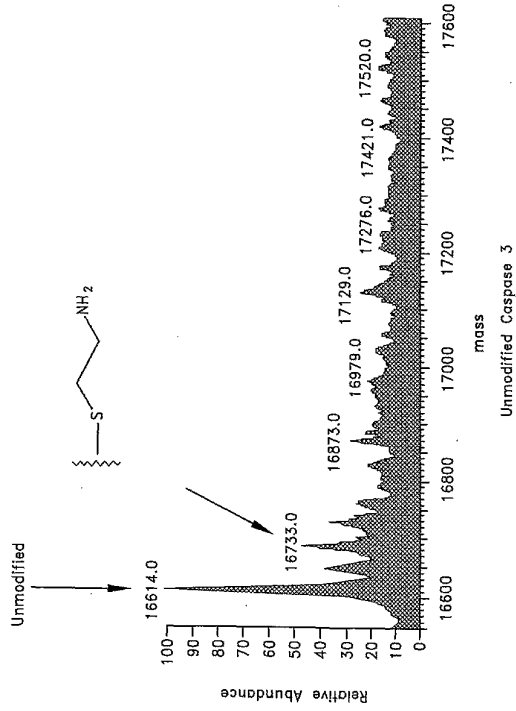


FIG. 6A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

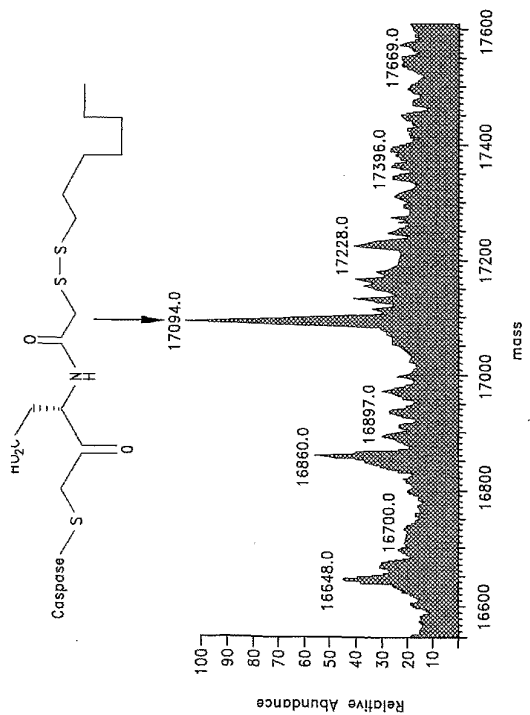


FIG. 6B

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/042773 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/44036
- (22) International Filing Date:
20 November 2001 (20.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/252,294 21 November 2000 (21.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SUNE-
SIS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 341 Oyster
Point Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ERLANSON,
Daniel, A. [US/US]; 3312 32nd Avenue, San Francisco,
CA 94122 (US). BRAISTED, Andrew [US/US]; 738
Joaquin Avenue, San Francisco, CA 94127 (US). MC-
DOWELL, Robert [US/US]; 1264 Church Street, San
Francisco, CA 94114 (US). PRESCOTT, John [US/US];
1419 5th Avenue, San Francisco, CA 94122 (US).
- (74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; Knobbe, Martens, Ol-
son & Bear, LLP, 620 Newport Center Drive, 16th Floor,
Newport Beach, CA 92660 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE (utility model), DE, DE (utility model), DK, DM,
DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI,
GB, GD, GI, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).
- Published:
— with international search report
entirely in electronic form (except for this front page) and
available upon request from the International Bureau
- (88) Date of publication of the international search report:
14 November 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/042773 A3

(54) Title: AN EXTENDED TETHERING APPROACH FOR RAPID IDENTIFICATION OF LIGANDS

(57) Abstract: The invention concerns a method for rapid identification and characterization of binding partners for a target molecule, and for providing binding partners with improved binding affinity. More specifically, the invention concerns an improved tethering method for the rapid identification of at least two binding partners that bind near one another to a target molecule.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 May 2002 (30.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/042773 A3

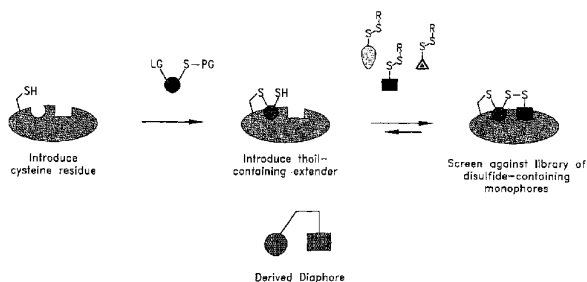
- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/44036
- (22) International Filing Date: 20 November 2001 (20.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/252,294 21 November 2000 (21.11.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SUNESIS PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 341 Oyster Point Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): ERLANSON, Daniel, A. [US/US]; 1312 32nd Avenue, San Francisco, CA 94122 (US). BRAISTED, Andrew [US/US]; 738 Joost Avenue, San Francisco, CA 94127 (US). MCDOWELL, Robert [US/US]; 1264 Church Street, San Francisco, CA 94114 (US). PRESCOTT, John [US/US]; 1419 5th Avenue, San Francisco, CA 94122 (US).
- (74) Agent: DELANEY, Karoline, A.; Knobbe, Martens, Olson & Bear, LLP; 620 Newport Center Drive, 16th Floor, Newport Beach, CA 92660 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GI, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, CZ, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
with amended claims

[Continued on next page]

(54) Title: AN EXTENDED TETHERING APPROACH FOR RAPID IDENTIFICATION OF LIGANDS

Extended tethering:



(57) Abstract: The invention concerns a method for rapid identification and characterization of binding partners for a target molecule, and for providing binding partners with improved binding affinity. More specifically, the invention concerns an improved tethering method for the rapid identification of at least two binding partners that bind near one another to a target molecule.

WO 02/042773 A3

WO 02/042773 A3 

(88) Date of publication of the international search report: 14 November 2002 *For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*
Date of publication of the amended claims: 12 December 2002

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/44036
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 60IN33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 60IN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 00823 A (BRAISTED ANDREW C ;SUNESIS PHARMACEUTICALS INC (US); WELLS JIM (US) 6 January 2000 (2000-01-06) cited in the application claim 36	1-4,50
Y	ERLANSON DANIEL A ET AL: "Site-directed ligand discovery." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 17, 15 August 2000 (2000-08-15), pages 9367-9372, XP002199107 August 15, 2000 ISSN: 0027-8424 cited in the application page 9371, right-hand column, paragraph 2	1-43, 50-68
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*1* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 May 2002	04/06/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cuendet, P	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/44036
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MALY DUSTIN J ET AL: "Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 6, 14 March 2000 (2000-03-14), pages 2419-2424, XP002199108 figure 1	44-49, 69-74
Y	figure 1	1-43, 50-68
X	WO 99 49314 A (UNIV CALIFORNIA) 30 September 1999 (1999-09-30) claim 32	44-49, 69-74
Y	claim 16	1-43, 50-68
A	SHUKER S B ET AL: "Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE., US, no. 274, 1996, pages 1531-1534, XP002074440 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-74

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No PCT/US 01/44036	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0000823	A	06-01-2000	US	6335155 B1	01-01-2002
			AU	4829999 A	17-01-2000
			EP	1090295 A1	11-04-2001
			WO	0000823 A1	06-01-2000
			US	2002022233 A1	21-02-2002
WO 9949314	A	30-09-1999	US	6344330 B1	05-02-2002
			AU	3211399 A	18-10-1999
			CA	2326341 A1	30-09-1999
			EP	1066522 A1	10-01-2001
			JP	2002507748 T	12-03-2002
			WO	9949314 A1	30-09-1999
			US	6344334 B1	05-02-2002

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 アーランソン, ダニエル エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2, サン フランシスコ, 3 2 エヌディー アベ
ニュー 1 3 1 2

(72)発明者 ブライステッド, アンドリュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 7, サン フランシスコ, ジュースト アベニュー
7 3 8

(72)発明者 マックドウェル, ロバート
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 4, サン フランシスコ, チャーチ ストリート
1 2 6 4

(72)発明者 プレスコット, ジョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 2, サン フランシスコ, 5 ティーエイチ アベ
ニュー 1 4 1 9

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA20 BB50 DA36 FB03

专利名称(译)	扩展的束缚方法用于快速鉴定配体		
公开(公告)号	JP2004514891A	公开(公告)日	2004-05-20
申请号	JP2002544662	申请日	2001-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	逊尼希思制药公司		
申请(专利权)人(译)	Saneshisu制药公司		
[标]发明人	アーランソンダニエルエイ ブライステッドアンドリュウ マックドウェルロバート プレスコットジョン		
发明人	アーランソン, ダニエル エイ. ブライステッド, アンDRリュウ マックドウェル, ロバート プレスコット, ジョン		
IPC分类号	G01N33/50 C07B61/00 C40B30/04 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C40B30/04 B01J2219/0072 C07B2200/11 C40B40/04 C40B50/14 G01N33/6845 G01N2500/04 Y02P20/55		
FI分类号	G01N33/50.ZCC.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA20 2G045/BB50 2G045/DA36 2G045/FB03		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/252294 2000-11-21 US		
其他公开文献	JP3836791B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及快速鉴定和表征靶分子的结合配偶体，以及为结合配偶体提供改善的结合亲和力的方法。更具体地，本发明涉及一种改进的束缚方法，用于快速鉴定至少两个彼此接近结合的结合配偶体与靶分子。

Extended tethering:

