

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-54683

(P2008-54683A)

(43) 公開日 平成20年3月13日(2008.3.13)

| (51) Int.Cl.                         | F I          | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|--------------|-------------|
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>          | C12N 15/00 A | 2G045       |
| <b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>           | C12Q 1/02    | 4B024       |
| <b>C07K 1/16 (2006.01)</b>           | C07K 1/16    | 4B063       |
| <b>C07K 14/00 (2006.01)</b>          | C07K 14/00   | 4H045       |
| <b>G01N 33/15 (2006.01)</b>          | G01N 33/15 Z |             |
| 審査請求 有 請求項の数 107 O L (全 72 頁) 最終頁に続く |              |             |

|              |                                     |          |   |
|--------------|-------------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号    | 特願2007-233019 (P2007-233019)        | (71) 出願人 | 503181196<br>スランツ アルフレッド イー.<br>アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 コ<br>ハセット ニコラス ロード 14   |
| (22) 出願日     | 平成19年9月7日 (2007.9.7)                | (74) 代理人 | 100102978<br>弁理士 清水 初志  |
| (62) 分割の表示   | 特願2002-558871 (P2002-558871)<br>の分割 | (72) 発明者 | スランツ アルフレッド イー.<br>アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 コ<br>ハセット ニコラス ロード 14  |
| 原出願日         | 平成13年11月19日 (2001.11.19)            | Fターム(参考) | 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA36<br>FA25 FA27 FA36 FB03 FB06<br>JA01<br>4B024 AA11 CA04 DA02 EA02 EA04<br>GA11 HA11 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/249,832                          |          |   |
| (32) 優先日     | 平成12年11月17日 (2000.11.17)            |          |   |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                             |          |   |
| (31) 優先権主張番号 | 60/329,463                          |          |   |
| (32) 優先日     | 平成13年10月15日 (2001.10.15)            |          |   |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                             |          |   |
| 最終頁に続く       |                                     |          |   |

(54) 【発明の名称】 標的分子機能の決定と薬物リード化合物の同定に関する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 化学リガンドを標的とする機能の決定および薬物リード化合物の同定に使用する  
方法の提供。

【解決手段】 機能未知な標的物質を使用し、続いてアッセイで使用する化学物質ライブラ  
リから小分子を選択する。化学ライブラリのメンバーを生化学的結合アッセイによりタン  
パク質と混合し、続いて結合するメンバーを(順番にまたは同時に)インビトロまたはイン  
ビボで生物学的アッセイを行い、生物学的あるいは病理学的条件下で、測定可能な表現  
型の変化から遺伝子機能を決定する。生物学的アッセイで表現型の変化を誘発する化学物  
質を使用して、標的物質の識別を決定する。少なくとも1つの生物学的アッセイで多数の  
可能性のあるリガンドをスクリーニングし、1つの生物学的アッセイで表現型の変化を生  
ずるリガンドを選択し、さらにそのリガンドを使用して標的候補物質をスクリーニングし、  
変化した表現型の原因である特定の標的物質を同定する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

標的分子に結合する候補リガンドを選択する方法であって、

(a) 標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、該標的分子と1つ以上の該候補リガンドとの間で複合体が形成され得る条件下で接触させる段階（ここで該ライブラリは少なくとも2つの異なる化学的骨格または少なくとも11種類の化合物を含む）、

(b) 前記複合体を単離する段階、

(c) 1つ以上の前記候補リガンドを前記複合体から回収する段階、および

(d) 1つ以上の回収した候補リガンドを同定する段階

を含む方法。

10

**【請求項2】**

段階(d)が、前記の回収した候補リガンドのMS、IR、FTIR、NMR、および/またはUVスペクトルを測定することを含む、請求項1記載の方法。

**【請求項3】**

少なくとも100個の異なる候補リガンドを同時に前記標的分子と接触させる、請求項1記載の方法。

**【請求項4】**

標的分子に結合する候補リガンドを選択する方法であって、

(a) 標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、該標的分子と1つ以上の該候補リガンドとの間で複合体が形成され得る条件下で接触させる段階、

20

(b) 前記複合体を単離する段階、

(c) 1つ以上の前記候補リガンドを前記複合体から回収する段階、および

(d) 回収した候補リガンドの質量スペクトル中の同位体ピークまたはフラグメントピークの質量/電荷比を決定する段階により、該回収候補リガンドを同定する段階を含む方法。

**【請求項5】**

少なくとも100個の異なる候補リガンドを同時に前記標的分子と接触させる、請求項4記載の方法。

**【請求項6】**

段階(d)が、前記回収候補リガンドの質量スペクトル中の親ピークの質量/電荷比を決定する段階を更に含む、請求項4記載の方法。

30

**【請求項7】**

標的分子に結合する候補リガンドを選択する方法であって、

(a) 未知の生物学的機能を持つ標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、該標的分子と1つ以上の該候補リガンドとの間で複合体が形成され得る条件下で接触させる段階、

(b) 前記複合体を単離する段階、

(c) 1つ以上の前記候補リガンドを前記複合体から回収する段階、ならびに

(d) 回収した候補リガンドのMS、IR、FTIR、NMR、および/またはUVスペクトルを測定することにより、該回収候補リガンドを同定する段階を含む方法。

40

**【請求項8】**

少なくとも100個の異なる候補リガンドを同時に前記標的分子と接触させる、請求項7記載の方法。

**【請求項9】**

標的分子に結合する候補リガンドを選択する方法であって、

(a) 標的分子を含むインビトロ試料と1つ以上の候補リガンドとを、該標的分子と1つ以上の該候補リガンドとの間で複合体が形成され得る条件下で接触させる段階、

(b) 前記複合体を単離する段階、

50

(c) 1つ以上の前記候補リガンドを前記複合体から回収する段階、ならびに

(d) 回収した候補リガンドのIR、FTIR、NMR、および/またはUVスペクトルを測定することにより、該回収候補リガンドを同定する段階を含む方法。

【請求項10】

少なくとも100個の異なる候補リガンドを同時に前記標的分子と接触させる、請求項9記載の方法。

【請求項11】

標的分子に結合する候補リガンドを選択する方法であって、

(a) 第一標的分子および第二標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、該第一標的分子と1つ以上の該候補リガンドとの間で複合体および該第二標的分子と1つ以上の該候補リガンドとの間で複合体が形成され得る条件下で接触させる段階

10

(b) 候補リガンドに結合した前記第一標的分子を含む第一複合体を単離する段階、および候補リガンドに結合した前記第二標的分子を含む第二複合体を単離する段階、

(c) 1つ以上の前記候補リガンドを前記第一複合体から、および/または前記第二複合体から回収する段階、ならびに

(d) 1つ以上の回収した候補リガンドを同定する段階を含む方法。

【請求項12】

前記試料を、前記標的分子、前記第一標的分子、または前記第二標的分子と結合することが知られている競合リガンドと接触させる段階を更に含む、請求項11記載の方法。

20

【請求項13】

標的分子の生物学的機能を決定する方法であって、

(a) 未知の生物学的機能を持つ標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、1つ以上の該候補リガンドが該標的分子に結合し得る条件下で接触させる段階

(b) 前記標的分子と結合する候補リガンドを選択する段階、および

(c) 選択した候補リガンドの生物学的アッセイにおける作用を測定することにより、前記標的分子の生物学的機能を決定する段階

30

を含む方法。

【請求項14】

前記の選択した候補リガンドを同定する段階を更に含む、請求項13記載の方法。

【請求項15】

標的分子の生物学的機能を決定する方法であって、

(a) 疾病状態、生理学的刺激物質の存在下、または特定の細胞的もしくは生物学的過程において上方制御または下方制御される標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、1つ以上の該候補リガンドが該標的分子に結合し得る条件下で接触させる段階、

(b) 前記標的分子と結合する候補リガンドを選択する段階、および

(c) 選択した候補リガンドの生物学的アッセイにおける作用を測定することにより、前記標的分子の生物学的機能を決定する段階

40

を含む方法。

【請求項16】

前記の選択した候補リガンドを同定する段階を更に含む、請求項15記載の方法。

【請求項17】

前記の選択した候補リガンドが前記生物学的アッセイにおける前記標的分子の活性を増大させる、請求項15記載の方法。

【請求項18】

前記の選択した候補リガンドが前記生物学的アッセイにおける前記標的分子の活性を低

50

下させる、請求項15記載の方法。

【請求項19】

標的分子の生物学的機能を決定する方法であって、

(a) 標的分子を含むインビトロ試料と候補リガンドのライブラリとを、1つ以上の該候補リガンドが該標的分子に結合し得る条件下で接触させる段階、

(b) 前記標的分子と結合した候補リガンドを選択する段階、および

(c) 選択した前記候補リガンドが、疾病もしくは障害を有するかまたは生理学的刺激物質の存在下もしくは非存在下で特定の細胞的もしくは生物学的過程にある生物体の組織に及ぼす効果を測定することにより、前記標的分子の生物学的機能を決定する段階を含む方法。

10

【請求項20】

前記組織がヒトの組織である、請求項19記載の方法。

【請求項21】

関心対象の標的分子に結合する2つのリガンドを反応させる方法であって、未知の二次構造または三次構造を有する標的分子を含む細胞またはインビトロ試料と、第一架橋剤を含む第一リガンドおよび第二リガンドとを、該標的分子が該第一リガンドおよび第二リガンドと結合しかつ該第一架橋剤が該第二リガンドと共有結合し得る条件下で接触させる段階により、該第一リガンドと該第二リガンドとを含む架橋生成物を形成させる段階を含む方法。

20

【請求項22】

関心対象の標的分子に結合する2つのリガンドを反応させる方法であって、標的分子を含む細胞またはインビトロ試料と、第一架橋剤を含む第一リガンドおよび第二リガンドとを接触（ここで該標的分子における該第一リガンドまたは該第二リガンドへの結合部位の位置または三次構造は未知であり、かつ該接触段階が、該標的分子が該第一リガンドおよび第二リガンドと結合しかつ該第一架橋剤が第二リガンドと共有結合し得る条件下で実施される）させることにより、該第一リガンドと該第二リガンドとを含む架橋生成物を形成させる段階を含む方法。

30

【請求項23】

関心対象の標的分子に結合する2つのリガンドを反応させる方法であって、標的分子を含む細胞またはインビトロ試料と、第一架橋剤を含む第一リガンドおよび第二リガンドとを接触（ここで該接触段階が、該標的分子が該第一リガンドおよび該第二リガンドと結合しかつ該第一架橋剤が該第二リガンドと共有結合し得る条件下で実施される）させることにより、該第一リガンドおよび該第二リガンドを含みかつ該標的分子に対して該第一リガンドまたは該第二リガンドより高い親和性を有する架橋生成物を形成させる段階を含む方法。

40

【請求項24】

異なる標的分子に結合する2つのリガンドを反応させる方法であって、第一標的分子および第二標的分子を含む細胞またはインビトロ試料と、第一架橋剤を含む第一リガンドおよび第二リガンドとを接触（ここで該接触段階が、

(i) 該第一タンパク質の該第一リガンドへの結合、

(ii) 該第二タンパク質の該第二リガンドへの結合、および

(iii) 該第一架橋剤の該第二リガンドへの共有結合

を可能にする条件下で実施される）させることにより、該第一リガンドと該第二リガンドとを含む架橋生成物を形成させる段階を含み、ここで、該第一標的分子における該第一リガンドへの結合部位の位置もしくは三次構造および/または該第二標的分子における該第二リガンドへの結合部位の位置もしくは三次構造は未知である方法。

40

【請求項25】

前記架橋生成物の形成が、前記第一タンパク質および前記第二タンパク質とがインビボで相互作用することを示す、請求項24記載の方法。

【請求項26】

50

第一タンパク質に結合する第二タンパク質を単離する方法であって、

(a) 第一タンパク質および第二タンパク質を含む細胞またはインビトロ試料と、第一架橋剤を含む第一リガンドおよび第二リガンドとを、

(i) 該第一タンパク質の該第一リガンドへの結合、

(ii) 該第二タンパク質の該第二リガンドへの結合、および

(iii) 該第一架橋剤の該第二リガンドへの共有結合

を可能にする条件下で接触させる段階により、該第一リガンドと該第二リガンドとを含む架橋生成物、ならびに該架橋生成物、該第一タンパク質、および該第二タンパク質を含む複合体を形成させる段階、

(b) 前記複合体を単離する段階、ならびに

(c) 前記複合体中で、または前記複合体から回収した、前記第一タンパク質および/または前記第二タンパク質を同定する段階

を含む方法。

【請求項 27】

前記第一タンパク質が検出可能な基を含む、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

前記第二リガンドが架橋剤を含む、請求項26記載の方法。

【請求項 29】

前記架橋生成物の形成が、前記第一タンパク質と前記第二タンパク質とがインビボで相互作用することを意味する、請求項26記載の方法。

【請求項 30】

前記架橋生成物の前記標的分子に対する親和性が、前記第一リガンドまたは前記第二リガンドの前記標的分子に対する親和性よりも高い、請求項26記載の方法。

【請求項 31】

前記架橋生成物が、薬物の発見もしくは開発またはリード化合物の最適化において使用される、請求項26記載の方法。

【請求項 32】

前記架橋生成物が、農業用または環境用の物質の開発に使用される、請求項26記載の方法。

【請求項 33】

関心対象の小分子と結合する候補標的分子を選択する方法であって、

(a) アミノ酸以外の部分を持つかまたは4000ダルトン未満の分子量を持つ関心対象の小分子を含むインビトロ試料と、標的分子候補のライブラリとを、該関心対象の小分子と1つ以上の該標的分子候補との間で複合体が形成され得る条件下で接触させる段階（ここで該標的分子はフェージ表面で発現されない）、

(b) 前記複合体を単離する段階、および

(c) 1つ以上の前記標的分子候補を前記複合体から回収する段階により、前記の関心対象の小分子に結合する1つ以上の標的分子候補を選択する段階を含む方法。

【請求項 34】

段階(a)に先立ち、前記の関心対象の小分子を、生物学的アッセイ中のその作用に基づいて小分子ライブラリから選択する、請求項33記載の方法。

【請求項 35】

関心対象の小分子に結合する標的タンパク質を選択する方法であって、

(a) 表面タンパク質に共有結合した標的タンパク質を含むタンパク質融合体を細胞集団内で発現させる段階（ここで該発現段階は該タンパク質融合体が該細胞表面にディスプレイされ得る条件下で実施する）、

(b) 前記細胞を、アミノ酸以外の部分を持つかまたは4000ダルトン未満の分子量を有する、関心対象の小分子と接触させる段階、および

(c) 前記の関心対象の小分子と結合した前記細胞を選択する段階により、前記の関心

10

20

30

40

50

対象の小分子に結合する前記標的タンパク質を選択する段階を含む方法。

【請求項36】

前記細胞が哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞または昆虫細胞である、請求項35記載の方法。

【請求項37】

関心対象の小分子に結合する標的タンパク質を選択する方法であって、

(a) 表面タンパク質に共有結合した標的タンパク質を含むタンパク質融合体を細胞集団内で発現させる段階（ここで該発現段階は、該タンパク質融合体がウイルスに感染した該細胞から遊離した該ウイルスの表面上でディスプレイされ得る条件下で実施する）、

(b) 前記ウイルスを関心対象の小分子と接触させる段階（ここで、関心対象の小分子とは、

- (i) 核酸である、
- (ii) 糖質である、
- (iii) 脂質である、
- (iv) アミノ酸以外の部分を有する、
- (v) 750ダルトン未満の分子量を有する、または
- (vi) 細菌により天然に生成されない分子ではない

）、および

(c) 前記の関心対象の小分子と結合した前記ウイルスを選択する段階により、前記の関心対象の小分子に結合する前記標的タンパク質を選択する段階を含む方法。

【請求項38】

前記ウイルスがバクテリオファージまたはアデノウイルスである、請求項37記載の方法。

【請求項39】

関心対象の小分子に結合する標的タンパク質を選択する方法であって、

(a) 標的タンパク質のライブラリを細胞集団またはインビトロ試料内で発現させる段階（ここで各標的タンパク質は、標的タンパク質をコードする核酸と共有結合している）

、

(b) 前記細胞またはインビトロ試料と、アミノ酸以外の部分を有するかまたは4000ダルトン未満の分子量を有する関心対象の小分子とを接触させる段階、および

(c) 前記の関心対象の小分子と結合した前記の標的タンパク質を選択する段階を含む方法。

【請求項40】

前記の選択された標的タンパク質を同定する段階を更に含む、請求項39記載の方法。

【請求項41】

少なくとも100個のヒト標的タンパク質を前記の関心対象の小分子に接触させる、請求項39記載の方法。

【請求項42】

前記の関心対象の小分子が天然に存在しない分子である、請求項39記載の方法。

【請求項43】

該標的分子を薬物標的として確認する前に、該標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物を選択する方法であって、

(a) 以前に薬物標的として確認されていない標的分子を含む細胞またはインビトロ試料と候補化合物のライブラリとを、1つ以上の該候補化合物が該標的分子に結合するかまたはその活性を調節し得る条件下で接触させる段階、および

(b) 前記標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物を選択する段階を含む方法。

【請求項44】

10

20

30

40

50

前記ライブラリが少なくとも5個の候補化合物を含む、請求項43記載の方法。

【請求項45】

(c) 前記の選択された候補化合物の作用を生物学的アッセイにおいて測定することにより前記標的分子の生物学的機能を決定する段階を更に含む、請求項43記載の方法。

【請求項46】

標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物を選択する方法であって、  
(a) 第一標的分子および第二標的分子を含む細胞またはインビトロ試料と候補化合物のライブラリとを、1つ以上の該候補化合物が該第一標的分子と結合するかまたはその活性を調節しかつ1つ以上の該候補化合物が該第二標的分子と結合するかまたはその活性を調節し得る条件下で接触させる段階、

10

(b) 該第一標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物を選択する段階、および

(c) 該第二標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物を選択する段階を含む方法。

【請求項47】

前記細胞またはインビトロ試料が少なくとも5個の標的分子を含み、かつ該標的分子各々に対して、該標的分子に結合するかまたはその活性を調節する候補化合物が選択される、請求項46記載の方法。

【請求項48】

20

前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するリガンドおよびその能力の記録に関連する該標的分子の記録を少なくとも10件含む、電子データベース。

【請求項49】

生物体プロテオーム中の少なくとも0.5%のタンパク質の記録を含む、請求項48記載のデータベース。

【請求項50】

標的ドメインに結合するリガンドおよびその能力の記録に関連する該標的分子ドメインの記録を少なくとも10件含む、電子データベース。

【請求項51】

30

前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するリガンドおよびその能力の記録に関連する、薬物標的として以前に確認されていない多数の該標的分子の記録を含む、電子データベース。

【請求項52】

請求項48、50、または51記載のデータベース、および、(i) コンピュータにその記録が保存されている標的分子に結合するかもしくはその活性を調節する1つ以上のリガンドを表示できる、または(ii) 該コンピュータにその記録が保存されているリガンドに結合するかもしくは該リガンドにより調節される活性を有する1つ以上の標的分子を表示できるユーザーインターフェースを含む、コンピュータ。

【請求項53】

40

前記化合物の影響を受ける1つ以上の生物学的アッセイにおける1つの表現型の記録に関連する、少なくとも1000件の該化合物の記録を含む電子データベースであって、該生物学的アッセイが該化合物に結合するタンパク質をコードする核酸の外因性コピーを含まない細胞またはインビトロ試料を含む、電子データベース。

【請求項54】

請求項53記載のデータベース、および、(i) コンピュータにその記録が保存されている化合物に対する1つ以上の生物学的アッセイにおける1つ以上の表現型を表示できる、または(ii) 該コンピュータにその記録が保存されている表現型に作用する1つ以上の化合物を表示できるユーザーインターフェースを含む、コンピュータ。

【請求項55】

標的分子の発現プロフィールまたは該標的分子の活性の記録に関連する、少なくとも10

50

件の該標的分子の記録を含む、電子データベース。

【請求項56】

標的分子の発現プロフィールまたは該標的分子の活性の記録に関連する、薬物標的として以前に確認されていない多数の該標的分子の記録を含む、電子データベース。

【請求項57】

請求項55または56記載のデータベース、および、(i) 前記コンピュータにその記録が保存されている標的分子の1つ以上の発現プロフィールもしくは活性の記録を表示できる、または(ii) 該コンピュータにその記録が保存されている発現プロフィールもしくは活性を有する1つ以上の標的分子を表示できるユーザーインターフェースを含む、コンピュータ。

10

【請求項58】

関心対象の表現型に關与する標的分子を同定する方法であって、

(a) リガンドおよび前記表現型に寄与するその能力の記録に関連する、生物学的アッセイにおける多数の該表現型の記録を含む第一の電子データベースを提供する段階、

(b) 関心対象の表現型の選択を受ける段階、

(c) 前記第一データベースにおいて、前記の関心対象の表現型を生じる1つ以上のリガンドを同定する段階、

(d) 前記リガンドに結合するかまたはその活性が該リガンドにより調節される標的分子の記録に関連する、多数の該リガンドの記録を含む第二電子データベースを提供する段階、および

20

(e) 前記第二データベースにおいて、前記の関心対象の表現型を生じる前記のリガンドに結合するかまたは該リガンドにより調節される1つ以上の標的分子を同定する段階により、関心対象の該表現型に關与する1つ以上の標的分子を同定する段階を含む方法。

【請求項59】

前記の関心対象の表現型が疾病状態に関連しており、前記標的分子が該疾病状態を促進するかまたは抑制するかが決定される、請求項58記載の方法。

【請求項60】

コンピュータで実行される、請求項58記載の方法。

【請求項61】

30

関心対象の標的分子に関連する表現型を同定する方法であって、

(a) リガンドおよび前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するその能力の記録に関連する、多数の該標的分子の記録を含む第一電子データベースを提供する段階、

(b) 関心対象の標的分子の選択を受ける段階、

(c) 前記第一データベースにおいて関心対象の前記の標的分子に結合するかその活性を調節する1つ以上のリガンドを同定する段階、

(d) 前記リガンドにより生じる生物学的アッセイ中の表現型の記録に関連する、多数の該リガンドの記録を含む第二電子データベースを提供する段階、ならびに

(e) 前記第二データベースにおいて前記リガンドにより生じる1つ以上の表現型を同定する段階により、関心対象の前記標的分子に関連する1つ以上の表現型を同定する段階を含む方法。

40

【請求項62】

コンピュータで実行される、請求項61記載の方法。

【請求項63】

関心対象の標的分子に結合するかまたはその活性を調節するリガンドを同定する方法であって、

(a) リガンドおよび前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するその能力の記録に関連する、少なくとも10件の該標的分子の記録を含む電子データベースを提供する段階、

(b) 関心対象の標的分子の選択を受ける段階、ならびに

50

(c) 前記データベースにおいて関心対象の前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節する1つ以上のリガンドを同定する段階を含む方法。

【請求項64】

前記リガンドを薬物の発見もしくは開発またはリード化合物の最適化に使用する、請求項63記載の方法。

【請求項65】

前記リガンドを農業用または環境用の物質の開発に使用する、請求項63記載の方法。

【請求項66】

コンピュータで実行される、請求項63記載の方法。

10

【請求項67】

関心対象の前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節する2つ以上のリガンドの化学構造を比較することにより、関心対象の該標的分子の結合または調節を促進する該リガンド中の官能基を同定する段階を更に含む、請求項63記載の方法。

【請求項68】

関心対象の前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節する2つ以上のリガンドの化学構造を比較することにより、該リガンド集団における1つ以上の官能基または骨格の頻度を決定する段階を更に含む、請求項63記載の方法。

【請求項69】

2つ以上の前記リガンド中に存在する1つ以上の官能基を有する化合物を1つ以上作成する段階を更に含み、ここで該化合物が薬物の発見もしくは開発またはリード化合物の最適化に使用される、請求項63記載の方法。

20

【請求項70】

関心対象のリガンドに結合するかまたは該リガンドにより調節される活性を有する標的分子を同定する方法であって、

(a) 前記リガンドに結合するかまたは該リガンドにより調節される活性を有する標的分子の記録に関連する、少なくとも10件の該リガンドの記録を含む電子データベースを提供する段階、

(b) 関心対象のリガンドの選択を受ける段階、および

(c) 前記データベースにおいて関心対象の前記リガンドに結合するかまたは該リガンドにより調節される活性を有する1つ以上の標的分子を同定する段階を含む方法。

30

【請求項71】

コンピュータで実行される、請求項70記載の方法。

【請求項72】

関心対象のリガンドの選択性を決定する方法であって、

(a) リガンドおよび前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するその能力の記録に関連する、少なくとも10件の該標的分子の記録を含む電子データベースを提供する段階、

(b) 関心対象のリガンドの選択を受ける段階、ならびに

(c) 前記データベースにおいて前記リガンドに結合するかまたは該リガンドにより調節される標的分子数を決定する段階により、関心対象の該リガンドの選択性を決定する段階

40

を含む方法。

【請求項73】

コンピュータで実行される、請求項72記載の方法。

【請求項74】

前記リガンドが標的分子の活性を増大させる請求項72記載の方法であって、該活性が疾病状態、有害な副作用、または毒性に関与しており、かつ該リガンドが薬物の発見もしくは開発またはリード化合物の最適化より除去される方法。

50

## 【請求項 75】

前記リガンドが標的分子の活性を低減させる請求項72記載の方法であって、該活性が疾病状態、有害な副作用、または毒性に関与しており、かつ該リガンドが薬物の発見もしくは開発またはリード化合物の最適化の為に選択される方法。

## 【請求項 76】

被験者の疾病または障害の治療、安定化、または予防のための治療法を選択する方法であって、

(a) 治療薬および前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するその能力の記録に関連する、少なくとも10件の該標的分子の記録を含む電子データベースを提供する段階、

(b) 被験者において前記疾病または障害に関与する突然変異を有する標的分子を決定する段階、ならびに

(c) 前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節する治療薬を前記データベースから選択する段階により、前記疾病もしくは障害を治療、安定化、または予防する段階を含む方法。

## 【請求項 77】

コンピュータで実行される、請求項75記載の方法。

## 【請求項 78】

被験者の疾病または障害の治療、安定化、または予防のための治療法を選択する方法であって、

(a) 治療薬および前記標的分子に結合するかまたはその活性を調節するその能力の記録に関連する、少なくとも10件の該標的分子の記録を含む電子データベースを提供する段階、

(b) 被験者において前記疾病または障害に関与する突然変異を有する標的分子を決定する段階、ならびに

(c) 前記標的分子に結合しないか、またはその活性を調節しない治療薬を前記データベースから選択する段階を含む方法。

## 【請求項 79】

前記標的分子がタンパク質である、請求項78記載の方法。

## 【請求項 80】

前記標的分子が核酸である、請求項78記載の方法。

## 【請求項 81】

コンピュータで実行される、請求項78記載の方法。

## 【請求項 82】

関心対象の化合物が試料中に存在するか否かを決定する方法であって、

(a) 化合物ライブラリから得た2つ以上の化合物の参照質量スペクトルを提供する段階、

(b) 前記ライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の被験質量スペクトルを提供する段階、および

(c) 参照質量スペクトルのピークが前記被験質量スペクトルに含まれているか否かを決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在するか否かを決定する段階を含む方法。

## 【請求項 83】

前記被験質量スペクトルの全ピークが1つの化合物に割り当てられるまで、前記参照質量スペクトルを順番にまたは同時に解析する、請求項82記載の方法。

## 【請求項 84】

段階(c)が、1つ以上の参照質量スペクトルのピークが前記被験質量スペクトルに含まれるか否かを連続して決定する段階を含む、請求項82記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 85】

請求項82記載の方法であって、

(i) 前記参照質量スペクトル中の全ピークが前記被験質量スペクトル中に存在すると決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在すると決定する、または

(ii) 該参照質量スペクトルの1つのピークが該被験質量スペクトル中に存在しないと決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在しないと決定する

まで、段階(c)が繰り返される方法。

## 【請求項 86】

段階(a)が、前記ライブラリの各化合物の質量スペクトルを決定する段階を含む、請求項82記載の方法。

## 【請求項 87】

前記参照スペクトル中の少なくとも1つのピークが同位体ピークまたはフラグメントピークである、請求項82記載の方法。

## 【請求項 88】

前記参照スペクトルの少なくとも1つのピークが親ピークである、請求項82記載の方法

## 【請求項 89】

前記参照質量スペクトルが、前記質量スペクトルを生成した化合物の参照に関連する該質量スペクトルの1つ以上の特性の記録を含むデータベースに含有される、請求項82記載の方法。

## 【請求項 90】

段階(c)がコンピュータで実行される、請求項82記載の方法。

## 【請求項 91】

関心対象の化合物が試料中に存在するか否かを決定する方法であって、

(a) 化合物ライブラリから得た2つ以上の化合物の参照質量スペクトルを提供する段階

(b) 前記ライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の被験質量スペクトルを提供する段階、

(c) 前記被験質量スペクトルの1つ以上のピークが参照質量スペクトルに含まれているか否かを決定する段階、および

(d) 参照質量スペクトルの全ピークが前記被験質量スペクトル中に存在するか否かを決定する(ここで該参照質量スペクトルは該被験質量スペクトル中に存在する1つのピークを含む段階(c)由来の参照質量スペクトルである)ことにより、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在するか否かを決定する段階を含む方法。

## 【請求項 92】

段階(d)が、1つ以上の参照質量スペクトルのピークが前記被験質量スペクトルに含まれるか否かを順番に決定する段階を含む、請求項91記載の方法。

## 【請求項 93】

段階(d)が、前記参照質量スペクトルの1つのピークが被験質量スペクトル中に存在するか否かを決定する段階を含む、請求項91記載の方法であって、

(i) 該参照質量スペクトルの全ピークが該被験質量スペクトル中に存在すると決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在すると決定する、または

(ii) 該参照質量スペクトル中の1つのピークが該被験質量スペクトル中に存在しないと決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が該試料中に存在しないと決定する

まで、該決定が繰り返される方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9 4】

段階 (a) が前記ライブラリの各化合物の質量スペクトルを決定する段階を含む、請求項91記載の方法。

## 【請求項 9 5】

前記参照スペクトルの少なくとも1つのピークが同位体ピークまたはフラグメントピークである、請求項91記載の方法。

## 【請求項 9 6】

前記参照スペクトルの少なくとも1つのピークが親ピークである、請求項91記載の方法。

## 【請求項 9 7】

前記参照質量スペクトルが、前記質量スペクトルを生成した化合物の参照に関連する1つ以上の該質量スペクトルの特性の記録を含むデータベースに含有される、請求項91記載の方法。

10

## 【請求項 9 8】

前記特性が、同位体ピークの質量 / 電荷比、フラグメントピークの質量 / 電荷比、親ピークの質量 / 電荷比、およびピーク強度からなる群より選択される、請求項97記載の方法。

## 【請求項 9 9】

段階 (c) または (d) がコンピュータで実行される、請求項97記載の方法。

## 【請求項 10 0】

関心対象の化合物が試料中に存在するか否かを決定するプログラムを内蔵したコンピュータ読み取り可能なメモリであって、

20

(a) 化合物ライブラリから得た2つ以上の化合物の参照質量スペクトル中、1つ以上のピークの質量 / 電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコード

(b) 前記ライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の被験質量スペクトル中、1つ以上のピークの質量 / 電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコード、および

(c) 参照質量スペクトル中のピークが前記被験質量スペクトルに含まれるか否かを決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在するか否かを決定するコンピュータコードを含むメモリ。

30

## 【請求項 10 1】

関心対象の化合物が試料中に存在するか否かを決定するプログラムを内蔵したコンピュータ読み取り可能なメモリであって、

(a) 化合物ライブラリから得た2つ以上の化合物の参照質量スペクトル中、1つ以上のピークの質量 / 電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコード

(b) 前記ライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の被験質量スペクトル中、1つ以上のピークの質量 / 電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコード、

40

(c) 前記被験質量スペクトルの1つ以上のピークが参照質量スペクトルに含まれるか否かを決定するコンピュータコード、および

(d) 参照質量スペクトル中の全ピークが前記被験質量スペクトル中に存在するか否かを決定する段階により、該参照質量スペクトルを生成した化合物が前記試料中に存在するか否かを決定するコンピュータコードを含むメモリ。

## 【請求項 10 2】

関心対象のタンパク質をコードする2つ以上のベクターを作製する方法であって、

(a) 関心対象の第一タンパク質をコードする第一核酸と第一バックボーン核酸とを、

50

それらの反応が生じ得る条件下、ロボット操作装置の第一区画においてロボット操作で接触させる段階により、該第一タンパク質をコードする第一ベクターを作成する段階、および

(b) 関心対象の第二タンパク質をコードする第二核酸と第二バックボーン核酸とを、それらの反応が生じ得る条件下、ロボット操作装置の第二区画内においてロボット操作で接触させる段階により、該第二タンパク質をコードする第二ベクターを作成する段階を含む方法。

【請求項103】

請求項102記載の方法であって、

(c) 前記第一ベクターと第一細胞とを、該第一細胞内に該第一ベクターが挿入され得る条件下でロボット操作で接触させる段階、および

(d) 前記第二ベクターと第二細胞とを、該第二細胞内に該第二ベクターが挿入され得る条件下でロボット操作で接触させる段階、  
を更に含む、方法。

【請求項104】

前記第一細胞が前記第一タンパク質を発現し、かつ前記第二細胞が前記第二タンパク質を発現する、請求項103記載の方法。

【請求項105】

少なくとも5個のベクターが同時に作製される、請求項102記載の方法。

【請求項106】

タンパク質を精製する方法であって、

(a) ロボット操作装置内の第一培養液中に前記第一タンパク質が分泌される条件下で、第一細胞において該第一タンパク質を発現させる段階、

(b) ロボット操作装置内の第二培養液中に前記第二タンパク質が分泌される条件下で、第二細胞において該第二タンパク質を発現させる段階、

(c) 前記第一培養液を第一クロマトグラフィーカラムに、また前記第二培養液を第二クロマトグラフィーカラムにロボット操作で移す段階、ならびに

(d) 前記第一タンパク質および前記第二タンパク質を精製する段階を含む方法。

【請求項107】

少なくとも5個のタンパク質が同時に精製される、請求項106記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

1. はじめに

本発明は、標的物質を膨大な数のリガンド中に曝露させ、リガンド-標的物質の対を収集し、そのリガンドを使用してその標的物質の生物学的機能を分析し、状況に応じてリガンドを化学的および/または構造的に同定する方法に関連する。本発明の1つの実施例では、製薬的に適切な標的に結合するリガンドが選択されている。本発明の別の実施例では、リガンド-標的対がゲノムスケールで収集され分析されている。本発明はさらに、表現型の1つの変異に対し少なくとも1つの生物学的アッセイ法で多数の可能なリガンドをスクリーニングし、ヒットしたリガンドを使用しそれに対応する標的分子を同定する方法に関連する。

【0002】

2. 本発明の背景

2.1. 新薬発見への従来法

過去50年間に発見された薬物は一般的に、200~300の標的に基づいており、現在全製薬会社がスクリーニングに使用している有効な標的は総計450個ほど存在している。これらの標的の大体は、典型的に従来の薬物発見方法によって開発されてきており、その方法で

10

20

30

40

50

、標的は、遺伝子過剰発現、遺伝子ノックアウト、機能ドメインの遺伝子配列相同性検索、X線結晶化学、または特異的な細胞および生物学的アッセイを含む還元主義生物学を使用して確認されている。さらに、今日実施されているような新薬発見では、標的確認、アッセイ開発、ハイスループットスクリーニング、およびリード化合物の生成が連続して実施されている。

【0003】

## 2.2. ゲノミクス

ヒトゲノム解析の完了により特性の未知な多数の遺伝子の配列が分かり、ヒトゲノム配列の価値を引き出すために正しい標的のみを確認し選択する段階は、製薬企業にとって困難であるが必須なこととなっている。ヒトゲノムの100,000個以上の遺伝子中、最大で10,000個の遺伝子が製薬的に有用な標的になると推定されている。遺伝子のこの膨大な数は、遺伝子確認への還元主義的アプローチを困難にし、その結果薬物発見の主たる障害となっている。

10

【0004】

DNA配列データの膨大な蓄積は、この問題の解決を約束する機能ゲノミクスの分野を立ち上げることになった。遺伝子発現のプロフィールはDNAアレイを使用して研究できる (De Risi JL et al., 1997, Science 278 ;680)。タンパク質発現プロフィールはタンパク質アレイによって実施可能である (Pawelitz CP et al., 2000, Drug Dev. Research 49:34)。遺伝子機能は、遺伝子を導入・変異させ、表現型に制御変化を誘発させることによって試験できる。これに代わって、遺伝子のアンチセンスまたはリボザイム型が、様々な細胞株や、トランスジェニックマウスまたはノックアウトマウス、線虫 (*C. elegans*)、キンカチョウ、ショウジョウバエまたは酵母などの生物内で発現される可能性がある (Couture LA et al., 1996, Trends in Genetics 12:510; Nadeau JH et al., 1998, Curr. Opin. Genet. Dev. 8, 311)。

20

【0005】

示差的遺伝子発現は以下のような各種技法によって検出できる。示差スクリーニング (Tedder TF et al. 1988 PNAS 85:208)、差し引きハイブリダイゼーション (Hedrick SM et al. 1984, Nature 308:149)、示差ディスプレイ (Liang P and Pardee A 1993 US5262311)、遺伝子マイクロアレイ (Lockhart, D et al., 1996, Nature Biotechnology 14:1675; Schena M et al., 1995, Science 270:467; 2000, Nature Genetics 24:236)、発現差解析法 (representational difference analysis: RDA法) (Hubank M et al., 1994, Nucleic Acids Research 22:5640)、発現配列タグ (EST) の大規模配列決定法、逆転写酵素PCR、遺伝子発現連続分析 (SAGE; Nacht M et al., 1999, Cancer Res.59:5464) およびレーザー捕獲顕微解剖 (Sgroi DC et al., 1999, Cancer Research 59:5656) などである。マイクロアレイ技法はゲノミクスにおける最新の技術であり、細胞サイクル、生化学経路、酵母のゲノム拡大発現、細胞成長、細胞分化、単一化合物への細胞反応、遺伝病などの研究に利用されてきている (M. Schena, 1998, TIBTECH 16:301)。

30

【0006】

## 2.3. 標的タンパク質の同定と特性決定

従来の生化学的技法では、以前未知であった小分子レセプターを、光架橋法、標識リガンド結合、および親和性クロマトグラフィーなどのインビトロ生化学方法によってタンパク質レベルで同定してきた (Jakoby WB et al., 1974, Methods in Enzymology 46:1)。これらの方法はタンパク質の精製を必要とする。レセプター遺伝子をクローン化するためには、ペプチドの配列をそれ以上に決定する必要があり、この配列はそのタンパク質を発現するcDNAをクローン化するのに使用される。小分子は標識化され、その分子標的を決定するために使用される (Kwon HJ et al., 1998, PNAS 95:3356)。代わって、小分子をアガロースマトリックスに固定化し、様々な細胞種および生物の抽出物のスクリーニングに使用できる。例えば、プルパラノールB (purvalanol B) (サイクリン依存キナーゼ阻害物質として既知) をアガロースマトリックスに固定化し、多様に収集した細胞種と生物の抽出物のスクリーニングに使用し、キナーゼ活性を持つ多数のタンパク質が単離された (

40

50

Knockaert M et al., 2000, Chem. Biol. 7:411)。一方、トラボキシンは、ヒストン脱アセチル化を阻害し、細胞サイクルを停止させるシクロペプチドである。トラボキシンと共有結合で修飾された親和マトリックス上で、2つの核タンパク質が、分画細胞抽出物からヒストン脱アセチラーゼ活性によって同時に精製された。続いて、これらのタンパク質の配列が決定され、タンパク質をコードするcDNAがcDNAライブラリからクローン化された (Taunton J et al., 1996, Science 272:408)。

#### 【 0 0 0 7 】

現時点で、タンパク質 - タンパク質間の相互作用を試験する主な系は酵母の2ハイブリッド系である。この方法では、1つのタンパク質がDNA結合ドメインに融合され、別のタンパク質が真核細胞転写因子のDNA活性ドメインに結合され、酵母を成長させるレポーター遺伝子の存在下で発現される。2つの異種タンパク質が2つのドメインを引き合わせると、次いで、相互作用するタンパク質を含んだ酵母が成長によって選択される (Fields S et al., 1989, Nature 340:245)。

10

#### 【 0 0 0 8 】

酵母の「3ハイブリッド」転写活性化系が、すでに同定された薬物FK506レセプターのコード遺伝子をクローン化するのに使用されている。この3ハイブリッド系は、転写活性化ドメインに融合したcDNAのライブラリに対する、活性リガンドの固着誘導体を表示する (Borchardt A. et al., 1997, Chem. Biol. 4:961; Licitra EJ et al., 1996, PNAS 93:12817)。Licitraらは、ラットの糖質コルチコイドレセプターのホルモン結合ドメインをLex A DNAドメインに融合させ、FK506レセプター (FKBP12) をコードするcDNAを転写活性化ドメインに融合させ、この2つを酵母2ハイブリッド系において発現させた。この酵母細胞はデキサメタゾンとFK506の共有結合ヘテロ二量体を含む培地で平板培養され、細胞は非二量体化FK506によって阻害される可能性のある経路で成長した。この実験を、FK506結合タンパク質をコードするcDNAに代わり、転写活性化ドメインに融合したcDNA発現ライブラリで繰り返すと、成長酵母はFK506結合タンパク質をコードするcDNAを含んでいた。しかし、この実験は既知標的と相互作用する化学物質を使用して行っている。Borchardt Aらは、FKBP12-GAL4 DNA結合ドメイン融合、FK506結合タンパク質ラパマイシン関連タンパク質のFRドメイン、およびラパマイシンなどの存在下で、酵母細胞にヒスチジン不在下で細胞を成長させてHIS3レポーター遺伝子3個を転写させている。

20

#### 【 0 0 0 9 】

発現クローニングは、少数プールのタンパク質内で標的を試験するために使用され得る (King RW et al., 1997, Science 277:973)。ペプチド (Kieffer et al., 1992, PNAS 89:12048)、ヌクレオチド誘導体 (Haushalter KA et al., 1999, Curr. Biol. 9:174)、および薬物-ウシ血清アルブミン (薬物-BSA) 結合体 (Tanaka et al., 1999, Mol. Pharmacol. 55:356) が発現クローニングに使用されてきた。

30

#### 【 0 0 1 0 】

標的コードDNAとリガンド結合に密接に関連する別な有用な技法は、ファージディスプレイである。ファージディスプレイは、モノクローナル抗体分野で主に利用されてきたが、ペプチドまたはタンパク質ライブラリがウィルス表面で作成され、活性がスクリーニングされる (Smith GP, 1985, Science 228:1315)。ファージは固相に接続された標的により分けられる (Parmley SF et al., 1988, Gene 73:305)。ファージディスプレイの利点の1つは、cDNAがファージ内に存在しているので、別のクローニング手順を必要としないことである。Dyaxはファージディスプレイ親和カラムを使用して、小分子ではなく、マクロ分子を単離した (US97/04425)。

40

#### 【 0 0 1 1 】

最近、Scheらは親和性プローブとして天然物質であるFK506を使用し、T7 cDNAファージディスプレイライブラリからFKBP12をクローン化した。彼らは、ビオチン化したFK506を支持する親和性マトリックスを使用して、ヒト脳cDNAから調製したファージライブラリをスクリーニングした。2ラウンドの親和性選択後、残存するファージ粒子は、完全な長さのFKBP12に対応する通常の450 bp 挿入部を共有していた。

50

## 【 0 0 1 2 】

ファージディスプレイの代わりとして、プラスミドディスプレイ (Cull et al., 1992, PNAS 89:1865; Schatz PJ et al., 1996, Methods Enzymol 267:171)、ポリソームディスプレイ (Mattheakis LC et al., 1996, PNAS 91:9022; Mattheakis LC, 1996, Methods Enzymol 267:195)、タンパク質タギング (Whitehorn EA et al., 1995, Biotechnology 13:1215)、リボソームディスプレイ (Hanes J et al., 1998, PNAS 95:14130)、および細菌および真核生物の細胞表面ディスプレイ (Georgiou G et al., 1997, Nat. Biotechnol 15:29; Chesnut J et al., 1996, J. Imm Methods 193:17) などがある。ペプチドまたはタンパク質も、プロマイシンをコードする mRNA に、プロマイシンを介して化学的に連結することができる (Roberts R et al., 1997, PNAS 94: 12297)。

10

## 【 0 0 1 3 】

## 2.4. 化学遺伝学

化学遺伝学は化学物質を使用して遺伝子機能を確認し、遺伝子発現や遺伝子機能に制御的变化を起こすための新たで強力と考えられるアプローチである。しかし、今日まで、その化学遺伝学的アプローチも、その対象薬物がすでに市場に出回っている既知標的を用いたハイスループット細胞に基づく従来のスクリーニングアッセイによって、これらの既知標的にヒットするより多くの物質を見出すという、伝統的な薬物発見プロセスから飛躍的な進歩は見られていない。化学遺伝学の現状は、Haggarty SJらによる研究 (2000, Chem Biol 7:275) によって説明されるが、その研究では139種類の化合物が、細胞に基づくアッセイにおいて、有糸分裂阻害に対する Chembridge Diverset ライブラリのハイスループットスクリーニングから同定され、続いてインビトロチューブリン重合アッセイ法によって分析された。139個の化合物のうち52個はコルヒチンと同じメカニズムでチューブリンを不安定にするアンタゴニストであった。1つの化合物はタキソールと同様なメカニズムによって、チューブリンを安定化させるアゴニストであることが実証された。86個の化合物には作用はなく、非チューブリン標的を通じ、有糸分裂をモジュールする傾向であった。染色体および細胞骨格に対する目で見える作用に基づいて、非チューブリン標的をターゲットする化合物に対し、7個がチューブリンの弱いアンタゴニストであると考えられており、1個 (モナステロール) はキネシン関連タンパク質 Eg5 を阻害することが認められた (Mayer et al., 1999, Science 286:971)。Haggarty SJらの実験では、20~50  $\mu$ M のリガンド濃度でアッセイが実施されたことから、低親和性リガンドが選択されている。しかし、標的機能を決定する段階では、低親和性リガンドの価値は限定される。

20

30

## 【 0 0 1 4 】

Rosania GRらはチューブリンに結合し、筋肉細胞の可逆的核分裂や増殖を誘発させる細胞形態学スクリーニング法によって、新規な小分子、ミロセベリン (myoseverin) を同定した。この最新の発明とは異なり、Schulzは標準の機能ゲノミクスである DNA アレイ法の力をかりて、メカニズムを解明している (Rosania GR et al., 2000, Nat Biotechnol 18:304)。1889年にコルヒチンが有糸核分裂に影響を与えることが認められて以来、化学物質が機能解明に使用されてきている (Eigsti O, 1949, Science 110:692)。しかし現在、実際には、既知標的あるいは特定な表現型を生ずる未同定標的に結合するリガンドを同定するだけに留まっている。

40

## 【 0 0 1 5 】

未知遺伝子の機能特性を知るために過去に行われた努力の結果は、オーファン (みなしご) レセプター解析によって裏付けられている。オーファンレセプターは、以前に同定されたレセプターと DNA 配列に類似性を持つ遺伝子によってコードされる。これに基づいて、それらの配列は自然の生理的役割やリガンドが未知なレセプターのスーパーファミリー内に挿入される。現時点での最新技術は、遺伝学技術を使用するか、あるいはファミリーの他のメンバーに結合することが知られている薬物またはタンパク質リガンドを使用して、それらの機能を決定する段階である (Werme M et al., 2000, Brain Res 863:112; Bordji K. et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:12243; Yang C., 1999, Cancer Res. 59:4519; Chiou L, 1999, Br. J. Pharmacol 128:103; Williams C, 2000, Curr. Opinion in

50

Biotechnology 11:42)。

【0016】

### 2.5. 標的化学物質の特性決定

一旦標的物質が確認されると、生物学的アッセイとメカニズムに基づくアッセイの2つの主なスクリーニング法が適用される (Gordon et. al., 1994, J. Med. Chem. 37:1386) (非特許文献1)。生物学的アッセイでは、生存度または代謝によってスクリーニングされた化合物の細胞1個に対する作用を測定する。例えば、ペニシリンは細菌培養中、成長が抑制されたことで発見された。メカニズムに基づくアッセイには、酵素活性への作用を測定する生化学的アッセイ、標的およびレポーターシステム (例えば、ルシフェラーゼまたは - ガラクトシダーゼ) が1つの細胞に導入された細胞ベースのアッセイ (Monks A et. al., 1997, Anticancer Drug Des. 12: 533)、または結合アッセイなどがある。結合アッセイは、ウェル、ビーズ (Boswoth N et al., 1989, Nature 1989, 341:167; Meldal M, 1994, PNAS 91, 3314)、またはチップ (Sunberg S, 2000, Curr. Opin. In Biotechnology 11:47) に固定された標的、あるいは固定化抗体によって捕獲された標的を用いて実施され、通常、結合したリガンドは熱量計により、または蛍光を測定することにより検出される (Sunberg S, 2000, Curr. Opin. In Biotechnology 11:47)。

10

【0017】

新たな結合アッセイの中には、既知機能を持つ標的に結合する分子をキャピラリー電気泳動によって分離する方法もある (US 5783397; US99/15458)。他の新規アッセイ法では、ライブラリを質量スペクトルによって分子量によりコード化し逆重畳積分している (Carrell T et al., 1995, Chem Biol. 2: 171; Fang AS et. al., 1998, Comb Chem High Throughput Screen 1:23; US 99/23837; US99/00024)。組み合わせライブラリの純度を測定し、血漿試料中の代謝物を分析するために、質量スペクトルと共にHPLCも使用されている (Korfmacher WA et al., 1999, Rapid Commun Mass Spectrom 13:1991; Zeng L et al., 1998, Comb Chem High Throughput Screen 1:101; Nedved ML et al., 1996, Anal Chem 68: 4228; Zimmer D et al., 1999, J. Chromatogr A 854:23; Aubagnac JL, Comb Chem High Throughput Screen 2:289)。

20

【非特許文献1】Gordon et. al., 1994, J. Med. Chem. 37:1386

【発明の開示】

【0018】

30

### 3. 本発明の要旨

本発明は、機能未知な標的物質を使用し、続いてアッセイで使用する化学物質ライブラリから小分子を選択し、標的の機能を決定する段階に関連する。本発明によれば、化学ライブラリのメンバーを生化学的結合アッセイによりタンパク質と混合し、続いて結合するメンバーを (順番にまたは同時に) インピトロまたはインピボで生物学的アッセイを行い、生物学的あるいは病理学的条件下で、測定可能な表現型の変化から遺伝子機能を決定する。

【0019】

また、本発明では、生物学的アッセイで表現型の変化を誘発する化学物質を使用して、標的物質の識別を決定する。本発明は、少なくとも1つの生物学的アッセイで多数の可能性のあるリガンドをスクリーニングし、1つの生物学的アッセイで表現型の変化を生ずるリガンドを選択し、さらにそのリガンドを使用して標的候補物質をスクリーニングし、変化した表現型の原因である特定の標的物質を同定する方法を提供している。

40

【0020】

本発明を使用して、遺伝子機能を確定し、同時に薬物標的を確認して薬物リード化合物を得ることにより、薬物発見方法を合理化することができる。構造活性相関の情報は、標的物質に結合するが表現型アッセイで異なる活性を示す、多数の多様な構造を有するヒット化合物を、同時に比較することにより得られ、その情報はリード化合物を迅速に最適化するのに使用できる。本発明によって、ゲノミクスから得た膨大な数の遺伝子が系統的に分類され、特定の疾患に対する有用な薬物標的が確認され、選択され得る。

50

## 【0021】

本発明は現在の技術とは異なっている、なぜなら現在の技術では既知標的についてスクリーニングし、一方本発明は標的の正体または機能に関して従前の知識を必要としないからである。さらに、本発明は、ライブラリ構築において、あらかじめ決定された特定質量のサブユニットによる制約は全く受けない。本発明によれば、組み合わせ法または単独法によって生成された、実質上すべてのリガンドライブラリを使用出来ると思われる。制限のない例として、化学物質、ペプチド、天然物質、天然様類似物質、糖質または抗体ライブラリが挙げられる。HIV TAT, HSV VP22またはタンパク質形質導入ドメインを含んだアンテナペディア (Antennapedia: 黄色ショウジョウバエ変異遺伝子群) ペプチドの1つの配列を利用してペプチドおよびタンパク質が細胞膜を交差するようにできる (Swartz SR et al., 2000, Trends in Cell Biology 10:290)。ライブラリは恐らくリガンドのプールから構成されるか、または個々にスクリーニングされた単一リガンドの収集されたものである。

10

## 【0022】

従って、1つの局面として、本発明は標的分子に結合するリガンド候補を選択する方法を特徴としている。その方法は、標的分子と1つ以上の候補リガンドとの複合体が形成できる条件下で、候補リガンドのライブラリを持つ標的分子を含むインビトロ試料との接触に関する。この複合体が単離され、その中から1つ以上の候補リガンドが回収される。さらに、回収された候補リガンドの1つ以上が同定される。

## 【0023】

上記局面に対する様々な態様において、標的分子は未知の生物学的機能を持つ分子であるかまたは薬物標的として以前に確認されていない分子である。他の実施例は、ライブラリに少なくとも2つの異なる骨格 (scaffolds) を、または少なくとも11種の異なる化合物を含んでいる。他の実施例では、複合体がサイズ除外法または2層クロマトグラフィーによって単離されている (すなわち、内部界面逆相 (ISRP)、GFF、またはGFFII樹脂を使用したクロマトグラフィー)。他の実施例では、MS、IR、FTIR、NMR、および/またはUV分析法を使用して、回収した候補リガンドを同定している。他の実施例では、本発明の方法として、回収候補リガンドの質量スペクトルにおいて、親ピーク、フラグメントピーク、および/または同位体ピークの質量/電荷比を決定する方法も含んでいる。1つの実施例には、その標的分子に結合することが既知な競合リガンドを持つ試料との接触方法も含んでいる。この競合リガンドは標的分子と結合する低親和性の候補リガンドの数を減少させ、より高い親和性の候補リガンドが選択されるようにできる。

20

30

## 【0024】

1つの局面として、本発明は、標的分子に結合するリガンド候補を選択する別な方法を特徴とする。この方法では、第一標的分子と1つ以上の候補リガンドとの複合体が形成され、また第二標的分子と1つ以上の候補リガンドとの複合体が形成される条件下で、第一標的分子と第二標的分子をリガンド候補ライブラリと共に含んだインビトロ試料との接触に関する。候補リガンドと結合した第一標的分子を含む複合体、および候補リガンドと結合した第二標的分子を含む複合体が単離される。第一複合体および/または第二複合体から1つ以上の候補リガンドが回収され同定される。1つの実施例には、第一標的分子または第二標的分子に結合することが既知な、競合リガンドと試料との接触方法も含んでいる。

40

## 【0025】

さらに、本発明は、天然にまたは人工的に存在するタンパク質、核酸、炭水化物あるいは他の有機分子など、標的分子の生物学的に機能を決定する様々な方法を提供する。この方法は、特定の疾病状態または特定の生物学的刺激物質 (例えば、TNF) の存在下で上方制御または下方制御される遺伝子またはタンパク質のような、対象とする遺伝子またはタンパク質の機能を決定するために使用され得る。この方法はまた、疾病状態の治療において、治療に有効な化合物を同定するために使用され得る。

## 【0026】

このような1つの局面において、本発明は標的分子の生物学的機能を決定する方法を提

50

供する。この方法は、1つ以上の候補リガンドが標的分子と複合体を形成できる条件下で、標的分子と候補リガンドのライブラリを含むインビトロ試料との接触に関する。標的分子と結合する候補リガンドが選択される。生物学的アッセイによって、選択した候補リガンドの作用が測定され、続いて標的分子の生物学的機能が決定される。様々な実施例において、標的分子とは、生物学的機能が未知の分子であるか、または薬物標的として以前に確認されていない分子である。他の実施例において、標的分子は、疾病状態、生理学的刺激物質の存在（例えば、TNFのようなサイトカイン）下、または特定の細胞または生物学的過程において、上方制御または下方制御される。特定の実施例において、標的分子は、脈管形成、分化、増殖、またはインスリン分泌中に上方制御または下方制御される。1つの実施例において、選択された候補リガンドは、MS、IR、FTIR、NMR、UVまたは他の適切な方法によって同定される。特定の実施例において、選択された候補リガンドにより生物学的アッセイ中に標的分子が増加する。例えば、候補リガンドは、標的分子の作用（酵素活性のような）を活性化し、標的分子の生成を促進し、標的分子の安定性を高め、標的分子の位置を変化させ、または標的分子と別の分子との会合を促進させることもある。他の実施例において、選択された候補リガンドは生物学的アッセイで測定すると標的分子の活性を低下させる。例えば、候補リガンドは、標的分子の活性を阻害し、標的分子の生成を阻害し、標的分子の安定性を低下させ、標的分子の位置を変化させ、または標的分子と別の分子との会合を抑制させることもある。代表的な生物学的アッセイには、非形質導入細胞株、細胞、組織、またはその標的が以前に知られていない他の生物学的システムによるスループットスクリーニングを含む。他の実施例において、生物学的アッセイには、疾病または異常を持つ生物、または生理学的刺激物質の有無にかかわらず特異的な細胞または生体過程が起こっている生物の1組織に対する選択した候補リガンドの作用を決定し、その結果、標的分子の生物学的機能を決定する段階が含まれる。1つの実施例における組織は、ヒト組織のような哺乳類組織である。

#### 【0027】

同じ標的分子に結合する2つのリガンドを架橋する方法も提供されている。これらの方法により、1つ以上の標的物質表面上で、2つのリガンドの反応が促進または触媒される。これらの方法をリガンドライブラリのスクリーニングに用い、どのリガンドが標的分子と結合するか、またリガンドと組んだどの架橋生成物が最も高い親和力で標的分子と結合するかを決定する段階もある。架橋生成物を、治療法開発においてリード化合物として使用するか、または標的分子の活性部位を特徴づけるために使用することもある。異なる標的分子に結合する2つのリガンドを架橋させるのに、関連方法を使用することもある。これらの方法を、どの標的分子が対象標的分子と相互作用するかを決定し、その結果、どの分子が対象標的分子と同じ経路に存在するかを決定するために使用することもある。

#### 【0028】

別の局面において、本発明は、関心対象の標的分子と結合する2つのリガンドを反応させる方法の特徴としている。この方法は、標的分子が第一リガンドと第二リガンド両方に結合し、さらに最初の架橋剤が第二リガンドと共有結合できる条件下で、第一リガンド（例えば、最初の架橋剤を有する第一リガンド）と第二リガンドを伴う標的分子を含む細胞またはインビトロ試料に接触し、その結果、第一リガンドと第二リガンドを含む架橋生成物の形成に関する。実施例によっては、標的分子は未知の二次および三次構造を有する分子である。他の実施例では、第一リガンドまたは第二リガンドの標的分子との結合部位の位置または三次構造は知られていない。特定の実施例では、架橋生成物の標的分子に対する親和性は、第一リガンドや第二リガンドよりも高い。別の実施例で、架橋生成物は、新薬発見または開発、リード化合物の最適化、または農業用または環境用の物質の開発に使用される。さらに別の実施例で、標的分子は、第一と第二リガンド間の反応を促進または触媒する。別の実施例で、第一リガンドは、標的分子と接触する前に架橋剤の反応を受ける。さらに別の実施例で、第一リガンド、第二リガンドおよび架橋剤は、標的分子の有無にかかわらず反応を受ける。

#### 【0029】

別の局面において、本発明は、異なる標的分子と結合する2つのリガンドを反応させる方法の特徴とする。この方法は、第一リガンド（例えば、最初の架橋剤を有する最初のリガンド）および第二リガンドを伴う、第一標的分子と第二標的分子を含む細胞またはインビトロ試料との接触を含む。接触は、(i)第一標的分子を第一リガンドに結合させる、(ii)第二標的分子を第二リガンドに結合させる、(iii)第一架橋剤を第二リガンドと共有結合させるという条件下で、実施され、その結果、第一リガンドと第二リガンドを含む架橋生成物が形成される。1つの実施例において、第一標的分子と第一リガンドとの結合部位の位置または三次構造、および/または第二標的分子と第二リガンドとの結合部位の位置または三次構造は知られていない。1つの実施例において、架橋生成物が形成することは、第一標的分子（例えばタンパク質）と第二標的分子（例えばタンパク質）が、インビボで相互作用を行うか、あるいは同じ生体経路の一部であることを示している。別の実施例で、架橋生成物は、新薬発見または開発、リード化合物の最適化、または農業用または環境用の物質の開発に使用される。さらに別の実施例で、1つまたは両方の標的分子は、第一と第二リガンド間の反応を促進するか、または触媒する。別の実施例で、第一リガンドは、標的分子と接触する前に架橋剤の反応を受ける。さらに別の実施例で、第一リガンド、第二リガンドおよび架橋剤は、標的分子の有無にかかわらず反応を受ける。

10

20

30

40

50

#### 【0030】

別の局面において、本発明は、第一タンパク質と結合する第二タンパク質を単離する方法を提供する。この方法は、第一架橋剤を持つ第一リガンドおよび第二リガンドを伴う第一タンパク質と第二タンパク質を含む、細胞またはインビトロ試料との接触に関する。その接触は、(i)第一タンパク質を第一リガンドに結合させる、(ii)第二タンパク質を第二リガンドに結合させる、(iii)第一架橋剤を第二リガンドと共有結合させるという条件下で、実施され、その結果、第一リガンドと第二リガンドを含む架橋生成物が形成され、さらに架橋生成物、第一タンパク質および第二タンパク質を含む複合体が形成される。この複合体は単離され、複体内の、あるいは複合体から回収された第一タンパク質および/または第二タンパク質が同定される。1つの実施例において、第一および/または第二タンパク質は検出可能な基を含んでいる。別な実施例において、第二リガンドは架橋剤を含む。1つの実施例において、架橋生成物が形成することは、第一タンパク質と第二タンパク質が、インビボで相互作用を行うか、あるいは同じ生体経路の一部であることを示している。別の実施例で、架橋生成物は、新薬発見または開発、リード化合物の最適化、または農業用または環境用の物質の開発に使用される。

#### 【0031】

本発明はまた、関心対象の化合物と結合する標的分子を選択する多数の方法を提供する。例えば、その化合物は、疾病状態を促進または阻害するように見える1つの分子であるかもしれない。選択された標的分子は、例えば、疾病の研究、疾病に關与する他の分子の同定、また標的分子に結合するか、またはその活性を調節する治療法の同定、あるいは疾病経路の別のメンバーの同定に、使用されることもある。

#### 【0032】

別の局面で、本発明は、関心対象の小分子と結合する標的分子候補を選択する方法を提供する。その方法は、関心対象の小分子と1つ以上の標的分子候補との複合体が形成できる条件下で、標的分子候補のライブラリを持つ小分子を含むインビトロ試料との接触に関する。複合体は単離され、複合体から1つ以上の標的分子候補が回収され、その結果、関心対象の小分子と結合する1つ以上の標的分子候補が選択される。様々な実施例で、標的分子候補ライブラリは、遺伝子組み換え的に生成されるか、または細胞、組織あるいは生物の抽出物から得られる。標的分子候補のライブラリは、関心対象の小分子との接触に先立ち、他の構成物質から精製されないか、部分的に精製されるか、または完全に精製され得る。様々な実施例で、標的分子はフェージ表面で発現されるか、または発現されない。1つの実施例で、標的分子候補ライブラリを持つ小分子との接触に先立ち、対象とするその小分子は、生物学的アッセイにおける作用に基づいて小分子ライブラリから選択される。1つの実施例で、この方法は、選択された標的タンパク質の同定も含む。特定の実施例

で、関心対象の小分子は、アミノ酸以外の部分を持つか、または5000、4000、3000、2000、1000、750、500、または250ダルトン未満の分子量を持つ。

【0033】

別の局面で、本発明は、関心対象の小分子と結合する、標的タンパク質を選択する方法を提供する。この方法は、細胞集団内で、表面タンパク質に共有結合した標的タンパク質を含むタンパク質融合の発現、すなわち、細胞表面上でタンパク質融合がディスプレイされる条件下で行われる発現を含む。細胞は関心対象の小分子と接触し、関心対象の小分子と結合する細胞が選択され、その結果、その関心対象の小分子と結合する標的タンパク質が選択される。代表的な細胞は、哺乳類、細菌、酵母および昆虫の細胞である。1つの実施例で、この方法は、選択された標的タンパク質の同定も含む。特定の実施例で、関心対象の小分子は、アミノ酸以外の部分を持つか、または5000、4000、3000、2000、1000、750、500、または250未満の分子量を持つ。

10

【0034】

別の局面において、本発明は、関心対象の小分子と結合する標的タンパク質を選択する別の方法を特徴とする。この方法は、細胞集団内で、表面タンパク質に共有結合した標的タンパク質を含むタンパク質融合の発現、すなわち、ウイルスに感染した細胞から遊離したウイルス表面上でタンパク質融合がディスプレイされる条件下で行われる発現に関する。ウイルスは関心対象の小分子と接触し、そして関心対象の小分子と結合するウイルスが選択され、その結果、その関心対象の小分子と結合する標的タンパク質が選択される。1つの実施例で、この方法は、選択された標的タンパク質の同定も含む。様々な実施例において、ウイルスはバクテリオファージまたはアデノウィルスである。特定の実施例で、関心対象の小分子は、アミノ酸以外の部分を持つか、または5000、4000、3000、2000、1000、750、500、または250未満の分子量を持つ。さらに他の実施例では、関心対象の小分子はビオチンを含まず、また細菌によって天然には生成されない。さらに別な実施例で、関心対象の小分子は、核酸、脂質あるいは炭水化物である。さらに別な実施例で、関心対象の小分子は、磁気または蛍光ビーズのような固体表面に固定化される。別の実施例で、アデノウィルスは293細胞またはperc6細胞を感染させるために使用され、またはバクテリオファージが細菌を感染させるために使用される。

20

【0035】

別の局面で、本発明は、関心対象の小分子と結合する標的タンパク質を選択する方法を特徴とする。この方法は、細胞またはインビトロ試料集団において、標的タンパク質ライブラリを発現することに関わっており、そのライブラリ内で各標的タンパク質はそれをコードする核酸に共有結合している。細胞またはインビトロ試料は関心対象の小分子と接触し、関心対象の小分子と結合する標的タンパク質が選択される。1つの実施例で、この方法は、選択された標的タンパク質の同定も含む。特定の実施例で、関心対象の小分子は、アミノ酸以外の部分を持つか、または5000、4000、3000、2000、1000、750、500、または250未満の分子量を持つ。

30

【0036】

標的分子または関心対象の小分子と結合する標的分子を選択する上述のいずれの方法に関する様々な態様において、少なくとも2、5、10、20、50、100、1000、10000、またはそれ以上の分子量の標的分子を小分子と接触させる。他の実施例で、標的ペプチドまたはタンパク質は、ファージディスプレイ、細胞表面ディスプレイ、プラスミドディスプレイ、リボソームディスプレイ、ウイルスディスプレイのような標準的方法によって、その標的をコードするポリヌクレオチドと会合されている。さらに別な実施例で、その小分子は、カラム、ビーズ、または磁気ビーズのような固体表面に固定化される。他の実施例で、小分子は蛍光基を含んでいるか、または小分子は間接あるいは直接的に蛍光基とリンクしており（例えば、蛍光標識抗体との結合によるリンク）、さらに小分子と標的分子の複合体はFACS識別法によって単離される。他の実施例で、関心対象の小分子は、天然に存在しない分子、または天然に存在する分子で細菌以外の生物の由来である（例えば、天然のヒト由来の分子）。

40

50

## 【0037】

本発明はまた、標的分子を薬物標的として実験的に確認する前に、標的分子に結合する化合物を同定する方法を提供する。さらに、2つ以上の標的分子に対するリガンドを同定する方法も提供される。例えば、複数の標的分子を含むアッセイを実施するか、複数のアッセイを同時に実施することにより、複数の標的分子に対する結合剤も同時に同定される。これらのハイスループットアッセイにより、分析する標的分子の数が大幅に増加する。

## 【0038】

従って、1つの局面において、本発明は、薬物標的として標的分子を確認する前に、標的分子と結合するか、またはその活性を調節する候補化合物を選択する方法を提供する。この方法は、1つ以上の候補化合物が標的分子と結合できるか、または標的分子の活性を調節できる条件下で、候補化合物のライブラリを持つ薬物標的として、以前に確認されていない標的分子を含む細胞またはインビトロ試料への接触に関する。標的分子と結合するか、その活性を調節する候補化合物が選択される。1つの実施例で、選択された候補化合物が同定される。他の実施例で、この方法は、生物学的アッセイによって選択した候補化合物の作用を測定し、その結果、標的分子の生物学的機能を決定する段階も含む。さらに他の実施例で、その細胞またはインビトロ試料は、少なくとも2、5、10、20、30、50、100個、またはそれ以上の標的分子を含み、各標的分子に対し、標的分子と結合あるいはその活性を調節する候補化合物が選択される。

10

## 【0039】

別の局面で、本発明は標的分子と結合するか、またはその活性を調節する候補化合物を選択する方法を特徴とする。この方法は、1つ以上の候補化合物を第一標的分子と結合させるか、またはその活性を調節させる条件下で、また1つ以上の候補化合物を第二標的分子と結合させるか、またはその活性を調節させる条件下で、候補化合物のライブラリを持つ第一および第二標的分子を含む、細胞またはインビトロ試料への接触に関する。第一標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物が選択され、さらに第二標的分子と結合するかまたはその活性を調節する候補化合物が選択される。1つの実施例で、1つ以上の選択された候補化合物が同定される。他の実施例で、この方法は、選択した1つ以上の候補化合物の作用を生物学的アッセイにより測定し、その結果、標的分子の生物学的機能を決定する段階も含む。さらに他の実施例で、その細胞またはインビトロ試料は、少なくとも5、10、20、30、50、100個、またはそれ以上の標的分子を含み、各標的分子に対し、標的分子と結合あるいはその活性を調節する候補化合物が選択される。

20

30

## 【0040】

本発明はまた多様なデータベースを特徴とする。これらのデータベースは、本発明のいずれかの方法によって得られる情報を保存するのに有用である。これらのデータベースは、治療法の開発、および特定な患者または特定なタイプの患者に対する好ましい治療法を選択する際に使用されることもある。これらのデータベースの他の利用法が、多数本書に記載されている。

## 【0041】

上述の1つの局面において、本発明は、標的分子と結合するかあるいはその活性を調節するリガンドおよびそのリガンド能力の記録に関連する標的分子の記録が、少なくとも10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、または $10^9$ 件含む電子データベースを特徴とする。関連する局面として、本発明は、生物学的機能が未知で薬物標的および/または標的分子として以前に確認されていない、標的分子の膨大な記録を含む電子データベースを提供する。それらの記録は、標的分子と結合するか、またはその活性を調節するリガンドとその能力に関する記録に関連している。別の関連する局面において、本発明は、ドメインと結合するリガンドとその能力についての記録に関連する、標的分子ドメインの記録が、少なくとも10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、または $10^9$ 件含む電子データベースを特徴とする。「ドメイン」とは、同じタイプの反応を触媒するか、または同じタイプの分子と結合する1つ以上のタンパク質中に見られるドメインを意味し、このドメインは、D

40

50

NAあるいはアミノ酸配列分析、X線結晶構造解析、または生物学的アッセイに基づき、異種タンパク質構造モチーフあるいは機能ファミリーとして同定される。例えば、データベースは、キナーゼドメイン（すなわち、1つ以上のキナーゼと結合する能力）またはホスファターゼドメイン（すなわち、1つ以上のホスファターゼと結合する能力）に結合するリガンドおよびその能力についての記録を含むことがある。このデータベースは、例えば、タンパク質または他の標的分子の結合部位の特性決定に、また特定の結合部位または特定の化合物族へのリガンドの選択性を決定する際に使用されることもある。

【0042】

上記データベースの様々な態様において、データベースは、細菌、酵母または哺乳類のような生物のプロテオーム中の、タンパク質あるいはタンパク質ドメインの少なくとも0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%の記録を含んでいる。特定の実施例で、データベースは、ヒトプロテオーム中のタンパク質あるいはタンパク質ドメインの少なくとも0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%の記録を含んでいる。さらに別の実施例で、データベースは、1つの生物のゲノム中の転写読取枠（open reading frames : ORF）の少なくとも0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%に対して、ORFによって発現された少なくとも1つのタンパク質の記録を含む。

10

【0043】

別の局面で、本発明は、本発明のデータベースを含み、さらに(i) その記録がコンピュータに保存されている標的分子に結合するか、あるいはその分子の活性を調節する1つ以上のリガンドを表示できる、または、(ii) その記録がコンピュータに保存されているリガンドに結合するか、あるいはそのリガンドによって調節される活性を有する1つ以上の標的分子を表示できる、ユーザーインタフェースを含むコンピュータを特徴とする。代表的なデータベースは、以前に確認されていない標的分子、あるいは生物学的機能が未知な標的分子のような標的について少なくとも10件の記録を含んでいる。

20

【0044】

別の局面で、本発明は、化合物によって影響を受ける1つ以上の生物学的アッセイにおいて、1つの表現型の記録に関連して、少なくとも $10^2$ 、 $10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、または $10^9$ 件の化合物の記録を含む電子データベースを提供する。生物学的アッセイは、化合物と結合するタンパク質をコードする核酸の外因性コピーを含まないか、あるいは外因性リポーター遺伝子を含まない、細胞またはインビトロ試料に関する。

30

【0045】

別な局面で、本発明は、上述の局面におけるデータベースを含み、さらに(i) その記録がコンピュータに保存されている化合物に対する1つ以上の生物学的アッセイ中で1つ以上の表現型を表示できるか、または、(ii) その記録がコンピュータに保存されている表現型に作用する1つ以上の化合物を表示できる、ユーザーインタフェースを含むコンピュータを特徴とする。

【0046】

別の局面で、本発明は、標的分子の発現プロフィールまたは活性の記録に関連して、少なくとも10件の標的分子記録を含む電子データベースを提供する。別の局面として、本発明は、標的分子の発現プロフィールまたは活性の記録に関連する、機能が未知で、薬物標的および/または標的分子として以前に確認されていない標的分子の膨大な記録を含む、電子データベースを特徴とする。いずれのデータベースの様々な実施例において0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%の生物プロテオームのタンパク質の記録、または、少なくとも $10^2$ 、 $10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、または $10^9$ 件の標的分子の記録を含む。他の実施例では、データベースは、生物プロテオーム（例えばヒトプロテオーム）中の少なくとも0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%のタンパク質の記録を含む。さらに別の実施例で、データベースは、1つの生物のゲノム中の転写読取枠（open reading frames : ORF）の少なくとも0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100%に対して、ORFによって発現された少なく

40

50

とも1つのタンパク質の記録を含む。

【0047】

さらに別の局面で、本発明は、本発明のデータベースを含み、さらに(i) その記録がコンピュータに保存されている標的分子の、1つ以上の発現プロフィールまたは活性を表示できるか、または、(ii) その記録がコンピュータに保存されている発現プロフィールまたは活性を有する、1つ以上の標的分子を表示できる、ユーザーインタフェースを含むコンピュータを特徴とする。様々な実施例において、データベースは、以前に薬物標的として確認されていない標的分子、あるいは生物学的機能が未知な標的分子のような標的分子の少なくとも10件の記録を含んでいる。

【0048】

データベースまたはコンピュータは共に、以下のいずれかの方法で使用できる。これらのデータベースの代表的な使用方法には、活性部位/タンパク質の共有する化学的骨格構造と種類の収集、結合特徴と重なりなど結合特性の広範囲なインデックス作成、標的分子の骨格の特異性の確認、化合物の潜在的毒性の確認、特定な生物学または病理学を探索する化合物の選択、特定な化合物の作用の原因となる標的分子の選択、薬理ゲノミクスに基づく治療法の選択、および薬物最適化のリード化合物として必要な骨格を選択する段階などを含む。

【0049】

そういった1つの局面において、本発明は、関心対象の表現型に關与する標的分子を同定する方法を特徴とする。この方法は、リガンドおよび表現型を引き起こすかまたはその一因となるリガンド能力の記録に關連する、生物学的アッセイにおける表現型の膨大な記録を含んだ電子データベースの使用に關する。関心対象の表現型の選択が受け入れられ、その表現型を導く一因となる1つ以上のリガンドが同定される。リガンドに結合するか、またはリガンドによって調節される活性を有する標的分子の記録に關連する、膨大なリガンドの記録を含む電子データベースを使用して、関心対象の表現型を導く一因となるリガンドに結合するか、またはそのリガンドによって調節される1つ以上の標的分子を同定し、その結果、関心対象の表現型に關与する1つ以上の標的分子を同定する。1つの実施例で、関心対象の表現型は疾病状態に關連しており、標的分子がその疾病状態を促進するかまたは阻害するかが決定される。1つの実施例で、この方法はコンピュータで実行される。

【0050】

さらに別の局面において、本発明は、関心対象の標的分子に会合している表現型を同定する方法を特徴とする。この方法は、標的分子に結合するか、またはその活性を調節するリガンドおよびリガンド能力の記録に關連する、膨大な標的分子の記録を含み、さらに関心対象の標的分子の選択を受け入れる電子データベースを提供することに関する。標的分子に結合するかその活性を調節する1つ以上のリガンドが同定される。生物学的アッセイ中のリガンドによりもたらされる表現型の記録に關連する、膨大なリガンドの記録を含む電子データベースが提供され、そのデータベースを使用して、その生物学的アッセイ中の1つ以上のリガンドによりもたらされる表現型を同定し、その結果、関心対象の標的分子に關与する1つ以上の表現型を同定する。1つの実施例で、この方法はコンピュータで実行される。

【0051】

さらに別の局面において、本発明は、結合するか、または関心対象の標的分子の活性を調節するリガンドを同定する方法を特徴とする。この方法は、標的分子に結合するか、またはその活性を調節するリガンドおよびリガンド能力の記録に關連する、少なくとも10件の標的分子の記録を含み、さらに関心対象の標的分子の選択を受け入れる電子データベースを提供することに関する。標的分子に結合するかその活性を調節する1つ以上のリガンドが同定される。様々な実施例において、本方法は、結合するか、または関心対象の標的分子活性を調節する2つ以上の化学構造を比較し、その結果、関心対象の標的分子の結合または調節を促進するリガンドが持つ官能基を同定する段階を含む。他の実施例では、本

10

20

30

40

50

方法は、関心対象の標的分子と結合するか、またはその活性を調節する2つ以上のリガンドの化学構造を比較し、その結果、リガンドの収集中に1つ以上の官能基または骨格の頻度を決定する段階も含む。他の実施例では、1つ以上の化合物が、薬物の発見または開発、あるいはリード化合物の最適化において使用する、2つ以上のリガンドに存在する1つ以上の官能基を持っている。1つの実施例で、この方法はコンピュータで実行されている。

【0052】

さらに別な局面において、本発明は、結合するか、または関心対象のリガンドによって調節される活性を有する標的分子を同定する方法を特徴とする。この方法は、結合するか、またはそのリガンドによって調節される活性を有する標的分子の記録に関連する、少なくとも10件のリガンドの記録を含み、さらに関心対象のリガンドの選択を受け入れる電子データベースを提供することに関する。結合するか、または関心対象のリガンドによって調節される活性を有する1つ以上の標的分子が同定される。様々な実施例において、本方法は、関心対象のリガンドと結合する2つ以上の標的分子の化学構造を比較し、その結果、関心対象のリガンドの結合を促進あるいは、その結合の一因となる標的分子内の官能基あるいはドメインを同定する段階を含む。

10

【0053】

さらに別の局面では、本発明は、関心対象のリガンドの選択性を決定する方法を特徴としている。この方法は、標的分子に結合するか、またはその活性を調節するリガンドおよびリガンド能力の記録に関連する、少なくとも10件の標的分子の記録を含み、さらに関心対象のリガンドの選択を受け入れる電子データベースを提供することに関する。結合するかまたはリガンドによって調節される、データベース中の標的分子の数が決定され、その結果、関心対象のリガンドの選択性を確認する。様々な実施例において、リガンドは、疾病状態、有害な副作用、または毒性に関与している標的分子の活性を増大させるが、そういったリガンドは、薬物の発見または開発、リード化合物の最適化、または農業用または環境用の物質の開発から除外される。他の実施例において、リガンドは、疾病状態、有害な副作用、または毒性に関与している標的分子の活性を抑制させるが、そういったリガンドは、薬物の発見または開発、リード化合物の最適化、または農業用または環境用の物質の開発向けに選択される。1つの実施例で、この方法はコンピュータで実行されている。

20

【0054】

さらに別な局面では、本発明は、被験者の疾病もしくは障害の治療、安定化、または予防のための治療法を選択する方法を提供する。この方法は、治療薬および標的分子に結合するかまたはその活性を調節する能力の記録に関連する、少なくとも10件の標的分子を含む電子データベースを提供し、さらに疾病または障害に関与する突然変異を有する被験者において標的分子を決定する段階を含む。標的分子と結合するかまたはその活性を調節する治療薬がデータベースから選択され、その結果、治療薬により疾病または障害が治療、安定化または予防される。他の実施例で、突然変異を有する被験者または被験者群が、その治療法の臨床試験のために選択されるか、またはその臨床試験の特定サブグループに分類される。特定の事例で、標的分子は、タンパク質または核酸である。1つの実施例で、この方法はコンピュータで実行されている。

30

【0055】

さらに別な局面では、本発明は、患者の疾病もしくは障害の治療、安定化、または予防のための治療法を選択する別法を特徴とする。この方法は、治療薬および標的分子に結合するかまたはその活性を調節する能力の記録に関連する、少なくとも10件の標的分子の記録を含む電子データベースを提供し、さらに疾病または障害に関与する突然変異を有する患者において標的分子を決定する段階を含む。標的分子に結合しないか、またはその活性を調節しない治療薬が、データベースから選択される。1つの実施例において、突然変異によって、データベース内の1つ以上の治療薬に対する標的分子の親和性が減少し、その結果、変異のある被験者では、変異のない被験者に比べ、治療薬の有効性が減少することもある。本実施例によれば、標的分子以外の分子と結合する治療薬が選択される。他の実施例で、突然変異を有する被験者または被験者群は、標的分子の変異型に対し親和性が減

40

50

少している治療薬の臨床試験から除外されるか、あるいはその被験者または被験者群は臨床試験の特定サブグループとして分類される。他の実施例で、突然変異を有する被験者または被験者群は、標的分子以外の分子と結合する治療薬の臨床試験で選択されるか、あるいはその被験者または被験者群は臨床試験の特定サブグループとして分類される。特定な実施例で、標的分子は、タンパク質または核酸である。1つの実施例で、この方法はコンピュータで実行されている。

【0056】

本発明はまた、関心対象の化合物が試料中に存在しているかを決定するための質量分析の改良方法の特徴とする。これらの方法を使用して、特定な標的分子に対するリガンドを同定し得る。

10

【0057】

上述のような1つの局面において、本発明は、関心対象の化合物が試料中に存在しているかを決定する方法を提供する。この方法は、(i) 化合物ライブラリから得た2つ以上の化合物の参照質量スペクトル、および(ii) そのライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の被験質量スペクトルの決定または提供を含む。参照質量スペクトルの1つ以上のピークが被験質量スペクトルに含まれているかを決定し、その結果、参照質量スペクトルを生成した化合物が試料中に存在しているかを決定する。様々な実施例において、被験質量スペクトルの全ピークが1つの化合物に割り当てられるまで、参照質量スペクトルを順にまたは同時に解析する。他の実施例では、参照質量スペクトルのピークが被験質量スペクトルに含まれているか否かを決定する段階は、1つ以上の参照質量スペクトルのピークが被験質量スペクトルに含まれているか否かを順番に決定する段階を含む。さらに他の実施例で、参照質量スペクトルのピークが被験質量スペクトルに含まれているか否かの決定は、(i) 参照質量スペクトルの全ピークが被験質量スペクトル中に存在すると決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成した化合物が試料中に存在することを決定するまで、または(ii) 参照質量スペクトルの1つのピークが被験質量スペクトル中に存在しないと決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成した化合物が試料中に存在しないと決定するまで、繰り返される。

20

【0058】

さらに別な局面において、本発明は、関心対象の化合物が試料中に存在しているかを決定する別法を提供する。この方法は、(i) 化合物ライブラリから得た2つ以上の化合物の参照質量スペクトル、および(ii) そのライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の被験質量スペクトルの決定または提供を含む。被験質量スペクトルの1つ以上のピークを解析し、それらのピークが参照質量スペクトルに含まれているかを決定する。被験質量スペクトル中に存在する1つのピークを含む参照質量スペクトルに対して、参照質量スペクトルの1つ以上の他のピークを解析し、それらのピークが被験質量スペクトル中に存在するかを決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成する化合物が試料中に存在するかを決定する。特定な実施例は、参照質量スペクトルのピークが被験質量スペクトル中に存在しているかを決定する段階は、1つ以上の参照質量スペクトルのピークが被験質量スペクトルに含まれているかを順番にまたは同時に決定する段階を含む。他の実施例で、参照質量スペクトルの1つのピークが被験質量スペクトル中に存在するかの決定は、(i) 参照質量スペクトルの全ピークが被験質量スペクトル中に存在することを決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成した化合物が試料中に存在することを決定するまで、または(ii) 参照質量スペクトルの1つのピークが被験質量スペクトル中に存在しないと決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成した化合物が試料中に存在しないと決定するまで、繰り返される。

30

40

【0059】

関心対象の化合物が試料中に存在するかを決定する上述のいずれかの方法についての様々な実施例において、ライブラリ中の各化合物質量スペクトルが決定される。さらに他の実施例では、参照スペクトルの少なくとも1つのピークは同位体ピーク、フラグメントピーク、または親ピークである。特定な実施例で、本方法は、参照スペクトルの全ピークが

50

被験質量スペクトル中に存在しているかの決定を含む。他の実施例では、参照質量スペクトルは、質量スペクトルを生成する化合物の記録に関連する、質量スペクトルの1つ以上の特性の記録を含むデータベースに含まれている。特定な実施例において、データベースには、同位体ピークの質量/電荷比、フラグメントピークの質量/電荷比、親ピークの質量/電荷比、同位体のピーク強度、フラグメントのピーク強度、および親ピークの強度からなる群より選択される1つ以上の特性に関するデータが含まれる。さらに他の実施例で、1つの被験質量スペクトルピークが参照質量スペクトル中に存在しているかを決定する1つ以上の操作は、コンピュータによって実行されている。

**【0060】**

本発明においてはまた、関心対象の化合物が試料中存在しているかを決定するプログラムを内蔵したコンピュータ読み取り可能なメモリを提供する。このコンピュータ読み取り可能なメモリは、参照質量スペクトル（すなわち、化合物のライブラリから得た個々の化合物の質量スペクトル）の1つ以上のピークの質量/電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコードを含む。このコンピュータ読み取り可能なメモリはまた、被験質量スペクトル（すなわち、ライブラリから得た1つ以上の化合物を含む試料の質量スペクトル）の1つ以上のピークの質量/電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコードを含む。コンピュータ読み取り可能なメモリはまた、参照質量スペクトルのピークが被験質量スペクトルに含まれているかを決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成する化合物が試料中に存在するかを決定する、コンピュータコードを有する。

10

20

**【0061】**

関連する局面において、発明は、関心対象の化合物が試料中存在しているかを決定するプログラムを内蔵したコンピュータ読み取り可能なメモリを特徴とする。そのメモリは、参照質量スペクトル（すなわち、化合物ライブラリから得た個々の化合物の質量スペクトル）の1つ以上のピークの質量/電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコード、および被験質量スペクトル（すなわち、ライブラリの1つ以上の化合物を含む試料の質量スペクトル）の1つ以上のピークの質量/電荷比を含む質量分析データを入力値として受け取るコンピュータコードを含む。またメモリは、被験質量スペクトルの1つ以上のピークが参照質量スペクトルに含まれているかを決定するコンピュータコード、および、参照質量スペクトルの全ピークが被験質量スペクトル中に存在しているかを決定し、それにより、参照質量スペクトルを生成した化合物が試料中に存在しているかを決定する、コンピュータコードも含む。

30

**【0062】**

本発明はまた、発現ベクター生産の自動化またはタンパク質の生産および生成の自動化方法の特徴とする。

**【0063】**

そのような1つの局面において、本発明は、関心対象のタンパク質をコードする2つ以上のベクターを作成する方法を特徴としている。この方法は、関心対象の第一タンパク質をコードする第一核酸と第一骨格核酸を、それらが反応し得る条件下で、ロボット操作装置を使用しロボット操作で接触させ、それにより、第一タンパク質をコードする第一ベクターを作成する段階、さらに、関心対象の第二タンパク質をコードする第二核酸と第二ベクター核酸を、それらが反応し得る条件下で、ロボット操作装置を使用しロボット操作で接触させ、それにより、第二タンパク質をコードする第二ベクターを作成する段階に關与する。いくつかの実施例では、本法はまた、第一ベクターを第一細胞に挿入し得る条件下で、第一ベクターを第一細胞にロボット操作で接触させる段階、ならびに第二ベクターを第二細胞に挿入し得る条件下で、第二ベクターを第二細胞にロボット操作で接触させる段階を含む。様々な実施例で、少なくとも3、4、5、8、10、15、30、60、90個またはそれ以上のベクターが同時に作製される。他の実施例では、骨格核酸は発現ベクターに線形化され、関心対象のタンパク質をコードする挿入片は、挿入片を含む円形ベクターを生成し得る条件下で、発現ベクターと連結される。他の実施例では、第一と第二ベクターまたは細胞は

40

50

ロボット操作装置の別々のフラスコまたはウェルに入れられる。他の実施例では、第一細胞は第一タンパク質を発現し、第二細胞は第二タンパク質を発現する。さらに他の実施例では、第一タンパク質と第二タンパク質は、以下の局面記載のように精製される。他の実施例で、第一細胞/第二細胞は、大腸菌のような細菌、シヨジョウバエ細胞のような昆虫細胞、またはCos、HEK293、またはCHOのような哺乳類の細胞である。他の実施例で、第一ベクターと第二ベクターは、第一タンパク質と第二タンパク質の生成のため、第一細胞と第二細胞から昆虫や哺乳類細胞のような別の細胞種に移される。他の実施例において、回転ボトルシステム、Stirタンクシステム、キャピラリー細胞培養システム、またはバイオリアクターを使って細胞が増殖される。第一ベクターおよび/または第二ベクターを使って、本発明のいずれの方法（例えば、タンパク質に結合するリガンドを同定する）でも使用されるタンパク質を生成できる。

10

**【0064】**

本発明の1つのタンパク質の生成および/または精製方法は、結果としてロボット操作装置内の第一培養液中に第一タンパク質が分泌される条件下で、第一タンパク質を第一細胞中で発現すること、また結果としてロボット操作装置内の第二培養液中に第二タンパク質を分泌する条件下で、第二タンパク質を第二細胞中で発現することを含む。ロボット操作装置により、第一培養液が第一クロマトグラフィーのカラムに移され、第二培養液が第二クロマトグラフィーのカラムに移される。1つの実施例で、第一タンパク質と第二タンパク質が単離され、それにより第一タンパク質および第二タンパク質を精製する。様々な実施例で、少なくとも3、4、5、8、10、15、30、60、90個またはそれ以上のタンパク質が同時に精製される。他の実施例では、第一と第二細胞はロボット操作装置の別々のフラスコまたはウェルに入れられる。他の実施例では、第一細胞/第二細胞は、大腸菌のような細菌、シヨジョウバエ細胞のような昆虫細胞、またはCos、HEK293、またはCHOのような哺乳類の細胞である。他の実施例で、第一細胞および/または第二細胞は、一過的に形質移入されたCos、HEK293、シヨウジョウバエ細胞、またはCHO細胞、あるいは安定して形質移入されたCos、HEK293、CHO、大腸菌、またはシヨウジョウバエ細胞である。さらに他の実施例で、第一タンパク質および/または第二タンパク質は哺乳類または昆虫の細胞中でグルコシル化される。様々な実施例において、第一タンパク質または第二タンパク質は、天然に分泌シグナルを有しているか、または分泌シグナルを持つように遺伝的に修飾されており、その結果、それらのタンパク質は細胞から培養液中に分泌される。第一タンパク質および/または第二タンパク質は、本発明のいずれの方法（例えば、タンパク質に結合するリガンドを同定する）においても使用できる。他の実施例で、ロボット操作装置を使用して、第一タンパク質および/または第二タンパク質を候補リガンドのライブラリと接触させ、本書に記載されているいずれかの方法によって、タンパク質と結合するリガンドを選択できる。さらに他の実施例では、関心対象の小分子とロボット操作で接触する標的分子ライブラリのメンバーとして、第一タンパク質および/または第二タンパク質を使用し、本書に記載されているいずれかの方法によって、関心対象の小分子と結合する標的分子を選択する。

20

30

**【0065】**

本発明のいずれかの局面の様々な態様において、リガンドは共有結合または非共有結合で標的分子と結合する。他の実施例で、リガンドは、標的分子と結合するかまたは標的分子と同じ経路内の別の分子と結合し、それにより、標的分子を活性化または阻害する。他の実施例で、リガンドの分子量は、5000、4000、3000、2000、1000、750、500または250ダルトン未満である。他の実施例で、リガンドは、5、4、3、または2個未満の水素結合ドナーを、または10、8、6、4、または3個の水素結合ドナーを有する。さらに他の実施例で、リガンドの $c \log P$  は4.15未満である。さらに他の実施例で、リガンドはFK506ではない。他の実施例で、選択された候補リガンドは、 $K_d$  が1 fM未満、1 fMから1 nMの間、1 nMから1  $\mu$ Mの間、または1  $\mu$ M未満で標的分子と結合する。他の実施例で、選択された候補リガンドは、IR、MS、NMR、UV、アミノ酸配列決定、核酸配列決定、またはそれらを併用した解析を受ける。他の実施例で、同位体またはフラグメントピークを使用し、ライ

40

50

ブラリの別の候補リガンドと同じ質量を持つ候補リガンドを同定する。

【0066】

本発明のいずれの局面の様々な他の態様において、候補リガンドおよび/または標的分子は溶液相に存在している。他の実施例では、リガンドまたは標的分子はビーズまたはチップのような固体表面に固定化される。他の実施例では、アッセイ培養液はクロマトグラフィーによって画分に分別される。特定の実施例では、複合体は、サイズ排除型（例えば、シリカ、またはポリマー樹脂を使用）、多モード型、二モード型、または二相型クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除型の逆相、サイズ排除型のアニオン交換、サイズ排除型のカチオン交換など2つ以上の特徴を有するクロマトグラフィー、または内部表面逆相（ISRP）、GFFあるいはGFFII樹脂）によって、単離される。代表的な樹脂は、ジオール、セファロース、スペロース、およびポリメチルメタクリレートを含む。他の好ましい樹脂は、5、50、500、500、5000、あるいは7000 psiを超えても安定である。特定の実施例で、異なる分離特性を持つ樹脂を含むカラムが順番に組み合わせられる。他の実施例では、カラムクロマトグラフィーが複合体の単離に使用され、複合体は60、30、20、15、10、5、3、2、または1分未満でカラムから溶出し、ポイド量は20、15、10、5、4、3、2、または1 mL未満であり、あるいは、カラム直径は、5、4、3、2、または1mm未満である。他の実施例では、HPLC、スピンカラム、キャピラリークロマトグラフィーまたはろ過を使用して、複合体を単離する。他の実施例では、HPLCのUV吸収の減少または非結合リガンドに相当する他のクロマトグラフィーピークを使用し、非結合リガンド量の減少を検出している（つまり、結合リガンド量の増加）。さらに他の実施例では、標的分子と結合候補リガンドの複合体には、結合リガンドを標的分子から分離するためのクロマトグラフィー操作を行う。本発明のいずれかの局面のまた他の実施例において、固定化された標的は、候補リガンドと接触され、さらに支持体は候補リガンド不含の培養液で洗浄され、すべての結合リガンドを標的から遊離する方法で処理される。さらに他の実施例では、標的を候補リガンドに曝露後、支持体を標的分子不含の培養液で洗浄し、支持体から候補リガンド分子およびあらゆる結合標的分子を取り除く方法で、支持対を処理する。他の局面において、この方法の1つ、複数またはすべての操作がロボット操作で自動化されるか、またはコンピュータで実行されている。

10

20

【0067】

本発明のあらゆる局面のさらに他の態様において、選択された標的の機能または活性は、化学的アッセイ、生化学的アッセイ、酵素アッセイ、生物学的アッセイ、またはそれらの組み合わせによって特徴づけられる。特定の実施例で、標的分子の機能は、アポトーシスアッセイ、増殖アッセイ、壊死アッセイ、血管形成アッセイ、浸潤アッセイ、またはそれらを併用して特徴づけられる。他の実施例で、候補標的分子は、生化学的抽出物、細胞、組織、生物体、または遺伝子組み換え源から単離される。さらに他の実施例で、選択された標的分子は、NMR、IR、UV、MS（例えばMALDITOF、MALDI、シングル4重極、トリプル4重極、または電子スプレイ、MSまたはMS-MS（タンデムマス））、アミノ酸配列決定法、または核酸配列決定法によって、同定される。他の実施例では、候補標的分子は全長タンパク質または全長に足りないタンパク質のフラグメントである。代表的な標的には、GPCR、キナーゼ、イオンチャネル、核レセプター、プロテアーゼ、ホスファターゼ、およびメチラーゼのような酵素およびレセプターが含まれる。標的には、治療薬として有効な化合物が以前に開発された、またはされていない分子または分子のクラスを含むこともある。

30

40

【0068】

候補リガンドについての本発明の様々な局面の全態様を、関心対象の小分子に適用することが指摘されている。

【0069】

ここで、「薬物標的として以前に確認されていない標的分子」とは、疾病の動物モデルで疾病状態を促進または阻害するための調節が、出版または公開発表の記述として、以前に実験的に測定されていない標的分子を意味する。例えば、未確認の標的分子には、分子

50

の活性化または阻害、あるいは分子発現レベルの減少または増加が、動物モデルの疾病状態を調節することが、実験的に示されていない分子が含まれる。これに対し、確認済みの薬物標的には、分子の量の増減または分子活性が、動物モデルの疾病状態を促進するか阻害するかが実験的に証明されている分子が含まれる。確認済みの標的例には、ノックアウト突然変異またはその他の遺伝子サイレンス方法（例えば、遺伝子発現のアンチセンス阻害）による過剰発現あるいは不活性化が、動物モデルの疾病状態を促進または阻害するか、実験的に明らかにされている標的が含まれる。

【0070】

「生物学的機能が未知の標的分子」とは、その活性が、出版または公開発表の記述として、以前に実験的に証明されていない標的分子を意味する。様々な実施例で、機能未知の標的分子とは、活性が実験的にすでに証明されている核酸またはタンパク質への配列同一性が60、50、40、30、20、または10%未満である核酸またはタンパク質のことである。他の実施例では、それらの核酸またはタンパク質は推定機能が以前に与えられていない。配列の同一性は、通常は、その中で指定された初期設定のパラメータで配列解析ソフトウェアを行い測定される（例えば、Genetics Computer GroupのSequence Analysis Software Package, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705）。このソフトウェアプログラムは、色々な置換、削除および他の変更に対する相同性の程度を与えることによって、類似配列と一致させる。

10

【0071】

「二次または三次構造が未知の標的分子」とは、二次または三次構造が、出版または公開発表の記述として、以前に実験的に決定されていない標的分子を意味する。いくつかの実施例で、二次または三次構造は、相同性分子の既知構造に基づいて以前に予測またはモデル化されていない。他の実施例で、標的分子の結合部位あるいは活性部位の場所または三次構造は、以前に実験的に決定されていない。

20

【0072】

「骨格」とは、候補化合物ライブラリ中の2つ以上の異なる分子が含まれる中心化学構造を意味する。様々な実施例では、ライブラリの少なくとも5、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 個またはそれ以上の分子が骨格を含んでいる。いくつかの実施例では、ライブラリは、少なくとも2、2、5、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 種またはそれ以上の異なる骨格を含んでいる。

30

【0073】

「ライブラリ」とは、またはそれ以上の異なる分子の集まりを意味する。2、5、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 個またはそれ以上の異なる分子の収集を意味する。様々な実施例において、各ライブラリのメンバーは異なる質量を有する。他の実施例では、少なくとも2、5、10、15、20、30、40、50個またはそれ以上のメンバーが、他のライブラリメンバーと同じ質量か、あるいはその差が1、0.5、0.1、0.05または0.01ダルトン未満の質量を有する。

【0074】

「プロテオーム」とは、生物体によって発現されるすべてのタンパク質を意味する。プロテオームは、生物体によって発現されるタンパク質の、すべての選択的スプライシング変異体を含む。

40

【0075】

「精製された」とは、天然に共存する他の成分から分離することを意味する。一般的に、化合物は、少なくとも重量の50%に、タンパク質、抗体および天然に会合する天然有機分子を含んでいない場合、実質的に純粋である。他の実施例では、化合物は、少なくとも重量で75%、90%または99%が純粋である。実質的に純水な化合物は、化学的合成、天然源からの化合物の分離、またはその化合物を天然に生成しない遺伝子組み換え宿主細胞中での化合物の生成によって得られ得る。タンパク質および有機化合物は、Ausubelらによって記述されたような標準技法を用い、熟練者により精製され得る。(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 2000)。出発物質に比べた精製

50

度は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、光学密度、HPLC分析、またはウェスタン分析（Ausubelら）のような標準方法によって測定できる。代表的な精製法には、免疫沈降、免疫親和性のようなカラムクロマトグラフィー、磁気ビーズ免疫親和性精製、およびプレート結合抗体によるパニングなどが含まれる。

#### 【0076】

本発明の方法は多数の利点を有している。例えば、本方法によって、生物体のプロテオーム（例えば、ヒトプロテオーム）のすべてのタンパク質の発現と精製、各タンパク質の高親和性薬物様骨格の同定ができる。本方法はまた、理論的には無制限に、候補化合物および候補骨格物をスクリーニングできる。本発明の方法は、迅速にまた大規模スケールで実施できるので、以前に薬物標的として確認されていない標的分子または生物学的機能が未知の標的分子をアッセイし、標的分子に結合および/またはその活性を調節するリガンドを選択するのに有用である。これに対し、標的分子と結合するリガンドを選択するための現行方法は、薬物標的として確認されている標的分子だけに限定されている。そのため、本方法はアッセイされる標的分子数を非常に拡大している。高親和性結合剤が選択される標的分子は、それで、薬物標的として確認することができる。

10

#### 【0077】

さらに、本発明の方法によって、同じ質量を持つ候補リガンドを区別することができる。例えば、質量スペクトル同位体およびフラグメントのピークは、一般的に同じ質量のリガンドであっても異なる。そのため、候補リガンドが化合物ライブラリの別の候補リガンドと同一の親ピークを有していたとしても、これらのピークを利用して候補リガンドを同定できる。この利点により、同一または類似質量数の複数化合物を含むライブラリを使用することができる。

20

#### 【0078】

本発明の溶液相の態様により、液相の結合を、血清または細胞中で起きていると思われる状態で生じさせることができる。標的タンパク質の特異的な作用を測定する多数の現行方法に比べ、本発明の方法は、カスタマイズせずにプロテオーム中のどの標的にもすぐに適用され得る。本方法はまた、非常に少量の試薬しか消費しない（200,000 化合物に対する各標的量は<300 ug であり、各標的に対する各化合物量は<35 ng である）。本方法により、スクリーニング前に、個々のライブラリメンバーをタギングまたは精製せずに、化合物のライブラリをスクリーニングでき、それにより、ライブラリのスクリーニングに要する時間を大幅に短縮できる。ライブラリのスクリーニングに要する時間もまた、複数のライブラリおよび/または複数の標的を同時に解析できる、本発明の自動化実施例によって短縮できる。

30

#### 【0079】

本発明の他の利点及び態様は、以下の詳細な説明と特許請求の範囲から明らかである。

#### 【0080】

### 5. 発明の詳細な説明

#### 5.1. 遺伝子型から表現型へ

1つの局面において、本発明は、タンパク質または核酸標的を多数の可能なリガンドに曝露させ、リガンド-標的対を収集し、そして標的と結合するリガンドを使用して標的物質の生物学的機能を分析する方法に関連する。1つの実施例を図1に概略する。この方法は、今まで知られていない標的物質の機能を決定するために使用され得る。標的分子に結合する候補リガンドを選択する他の多数の方法が本書に記載されている。セクション5.1.1~5.1.5の下にリストされた全実施例は、本発明のいずれの方法でも使用できる。

40

#### 【0081】

#### 5.1.1. 標的物質

本発明によれば、標的分子とは、それに結合または反応する分子が模索されている化合物である。好ましい実施例では、標的は、反応容器中の最大の濃度で存在する物質である。様々な好ましい実施例では、標的は、反応容器のリガンドと同じ濃度で存在している。さらに他の好ましい実施例で、その標的は、各リガンド濃度または、候補リガンドの全混

50

合物濃度よりも高いかまたは低い。他の好ましい実施例で、標的は、反応容器中の最小濃度で存在する物質である。発明の1つの実施例で、標的は、反応容器中の最大の分子量を有する物質である。標的は、インビボまたはインビトロで合成された天然に存在する生体分子であってもよい。標的は、アミノ酸、核酸、糖、脂質、天然物質またはそれらの組み合わせでもよい。instant発明の利点は、標的物質の正体または機能の予備知識を必要としないことである。

#### 【0082】

本発明の好ましい態様では、標的とは、アミノ酸、ペプチド、酵素、タンパク質、抗体、またはそれらの組み合わせから構成される。第一段階は、対象タンパク質をコードするポリヌクレオチドを選択し、発現系に導入することである。ポリヌクレオチドは、示差スクリーニング、差し引きハイブリダイゼーション、ディファレンシャル ディスプレイ（示差表示）、マイクロアレイ発現解析、発現差解析（RDA）、またはレーザー捕獲顕微解剖によって選択され得る。タンパク質は、細菌プラスミド、ファージ、一過性の細胞発現系、またはウイルス発現系としてインビボで合成される。また、選択されたタンパク質はインビトロの転写および翻訳（例えば、Promegaウェブサイト）、あるいは一般的なFMO Cオリゴペプチド合成化学によってインビトロで合成されることもある。発現されたタンパク質は、随意に精製され、続いてリガンドライブラリに曝露される。

#### 【0083】

本発明によれば、遺伝子は、ヒトあるいは他種の完全なcDNAまたは遺伝子ライブラリ、あるいは特定の疾患あるいは特定の刺激物中で識別発現用に選択した遺伝子のサブセットから発現され得る。疾病または刺激された細胞および組織中で識別的に発現される遺伝子は、差し引きハイブリダイゼーション、情報学、マイクロアレイ、SAGE、またはレーザー捕獲顕微解剖のような技法、またこれだけに限定されないが、これらの方法によって選択され得る。ESTのような部分的配列が回収されると、全長組織特異性cDNAsが全長ヒトcDNAライブラリからクローン化されることもあり、それらのいくつかは、CLONTECH、STRATAGENE、Life Technologies社、およびNCBIなどから入手可能である。この方法でクローン化された遺伝子の20%から60%は、組織にも依存するが、これまで同定されておらず、クローン化された実際にすべての遺伝子の機能は解明されていない。好ましい実施例において、これらの遺伝子はゲノミクスによって発見された。タンパク質を生成するために、cDNAの全長が、遺伝子のカルボキシ末端に挿入されたヘキサヒスチジン（6his）、およびアミノ末端のグルタチオンシンセターゼ（GST）によってタグが付けられる（各々にプロテアーゼサイトが存在）。また、プロテアーゼ処理を避けるために、New England Biolabs社によるインテインに基づく自己開裂タグも使用できる。これらの遺伝子は、発現され、パキョロウィスルの上澄み液に分泌される、例えば、HisタグとBIPタンパク質リーダーを伴うInvitrogen社シヨウジョウパエSchneider 2細胞系、CaHPO<sub>4</sub>による形質移入、および硫酸銅を用いるヒグロミシン誘発発現による選択などによって起こり、これにより、ニッケルカラムで精製される上澄み中には、5~10 mg/Lのタンパク質が生成され得る。代替発現系の限定されない例には、Fast Bacまたは別のパキョロウィルス系、あるいは哺乳類発現系（CHO、COS、293など）が含まれる。大腸菌はタンパク質生成に使用されるが、タンパク質をグリコシル化せず、またパキョロウィルスは同様に信頼性があり、確実にタンパク質をグリコシル化する。得られたタンパク質は続いて、精製の第一段階としてNi(2+)-NTAクロマトグラフィーによって、第二段階としてグルタチオン親和性クロマトグラフィーによって精製が可能で、次にタグの開裂による特異的なプロテアーゼ除去が行われる。インテインに基づく親和性システムが使用される場合、プロテアーゼは必要はでない。タンパク質は代替技法によって同様に発現および精製でき、あるいは全長または部分的なタンパク質がファージ中に発現または表面に結合される。

#### 【0084】

本発明の別の態様では、標的物質はオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとして、RNAまたはDNAから構成される。本発明の限定されない1つの実施例において、発現系内に導入される核酸は、ESTの大規模配列決定によって同定される。オリゴヌクレオチド標

10

20

30

40

50

的は、直接合成され得る。ポリヌクレチド標的は直接合成されるか、またはテンプレートポリヌクレオチドの増幅、例えばPCRにより、作製され得る。オリゴヌクレオチドあるいはポリヌクレオチド標的は、随意に精製され、続いてリガンドライブラリに曝露される。

【0085】

本発明の別の態様では、標的は単純または複合糖質から構成される。本発明の別の実施例では、標的は脂質から構成される。本発明の別の実施例では、標的は天然物から構成される。

【0086】

本発明の別の態様では、標的化合物は誘導体化されることもある。限定されない例として、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑蛍光タンパク質、放射性同位体、ヒスチジンタグ、磁気ビーズ、グルタチオンS トランスフェラーゼ、光活性化架橋剤あるいはそれらの組み合わせが含まれる。

10

【0087】

標的物質の調製において、必要なコンポーネントの部分的または不完全な精製の結果、少量の他の化合物が含まれることもある。

【0088】

#### 5.1.2. リガンド

本発明によれば、リガンドは、ターゲットに結合するか、生物学的アッセイで効果を発揮するかの両方または一方の可能性のある分子である。遺伝子型から表現型へのアプローチの様々な実施例において、リガンドまたは候補リガンドの混合物の濃度は、反応容器中でターゲット濃度よりも低い。遺伝子型から表現型へのアプローチの他の実施例において、リガンドまたは候補リガンドの混合物の濃度は、反応容器中でターゲット濃度と同じである。遺伝子型から表現型へのアプローチのさらに他の実施例において、リガンドまたは候補リガンドの混合物の濃度は、反応容器中でターゲット濃度よりも高い。標的は、アミノ酸、核酸、糖質、脂質、天然物質、天然物質様化合物またはそれらの組み合わせでもよい。リガンドは、化学的方法のいずれの組み合わせからも作製され得る。また、リガンドは天然に存在する生体分子をインビボまたはインビトロで合成された物かもしれない。リガンドは、別の化合物から随意に誘導体化され得る。この修正の1つの利点は、誘導体化する化合物を、リガンド-標的複合体の収集またはリガンドの収集を容易にするために、例えば、リガンドと標的を分離した後に、使用できることである。誘導体化グループの限定されない試料には、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑色蛍光タンパク質、放射性同位体、ポリヒスチジン、磁気ビーズ、グルタチオンS トランスフェラーゼ、光活性化架橋剤あるいはそれらの組み合わせが含まれる。

20

30

【0089】

リガンドは、標的がリガンドライブラリに曝露される条件下で、お互いの親和性は低くなければならない。

【0090】

リガンドライブラリは、質量、組成、構造またはその組み合わせが異なるリガンド混合物である。本発明では、少なくとも10個の異なるリガンド、あるいは少なくとも100個の異なるリガンド、また少なくとも1000個の異なるリガンドを含むライブラリを意図している。

40

【0091】

タンパク質に結合するリガンドライブラリは、多数のソース物質から誘導され得る。本発明では、化学物質、タンパク質、ペプチド、抗体、糖質、脂質、天然物質、天然物質様化合物またはそれらの組み合わせを使用している。これらの物質は、有機合成、組み合わせ化学、組み換えDNA、生化学抽出、精製などによって、調製される。本発明の好ましい実施例では、天然物質様合成ライブラリは、多様な化学的方法（例えば、ビーズ上または溶液における非対称分割プール合成、同時あるいは連続合成など）、また組み合わせ化学あるいは医薬品学などを駆使して生成される。合成で使用されるサブユニットは、できれば薬物類似であり、できるだけ高く多様化している。このユニットは、構造的に固定され

50

ていても柔軟性があってもよい。ユニットはその構造を修正する化学的反応を受ける（例えば、転位など）。ユニットに官能基が追加されることもある。

#### 【0092】

薬物様化合物は、異なる化学方法を用い、異なる骨格を使用して作製されるであろう（例えば、有機、無機、ペプチド、タンパク質、アルカロイド、糖質、脂質、天然物様化合物など）。薬物様化合物はスペクトル上の識別子を有していることがある。スペクトル識別子の限定のない例として、質量分析上で特徴的な同位体分裂パターンに分解する元素が挙げられる（例えば、Cl、Br、N、H）。薬物様化合物は、質量分析で特徴的な分裂パターンを持つ化合物から作製され得る（ペニシリン）。ライブラリを、他の分析法および逆重畳積分法（例えば、IR FTIR）で容易に測定できるようにデザインすることができる。

10

#### 【0093】

本発明の別の態様で、使用される可能性のある他のライブラリの限定されない例には、市販のライブラリも含まれ（例えば、Pharmacopeia、ArQule、およびChembridge）、特殊な化学ライブラリ、ペプチド、TAT、VP22またはANTENNAEDIA形質移入シグナルなどのペプチドまたはタンパク質、構造的に柔軟性のある小分子、天然物質、糖質、およびモノクロナール抗体などが含まれる。合成で使用されるサブユニットは、できれば薬物類似であり、できるだけ高く多様化している。

#### 【0094】

本発明のライブラリには、結合が観察された後、リガンド逆重畳積分法および再合成を容易にするためタグが付けられ得る。また、リガンドはタギングなしで逆重畳積分できる。リガンドは個別にまたは混合物として測定できる。液相または固相支持体での混合物として合成された多様なライブラリが使用できる。1つの実施例で、形質導入ペプチドまたはTAT、VP22またはANTENNAEDIAの変異体は、小分子と架橋し、細胞膜あるいはバリアーを横断する力が増強される。また、これらのペプチドの小分子同族体が開発され、同じ物質にリンクされ得る。

20

#### 【0095】

##### 5.1.3. 結合

本発明によれば、1対のリガンド - 標的対を用いて、解離定数 ( $K_d$ ) が20  $\mu$ M未満、好ましくは約1  $\mu$ M未満のリガンドと標的間の親和性を説明している。本発明はさらに、 $K_d$  100 nM、 $K_d$  100 pM、 $K_d$  100 fMのリガンド - 標的相互作用を予期している。これらの相互作用は共有結合性または、非共有結合性である。リガンド - 標的対のリガンドは、他の標的に親和性を示すことも示さないこともある。リガンド - 標的対の標的は、他のリガンドに親和性を示すことも示さないこともある。

30

#### 【0096】

本発明によれば、反応容器とは、標的が少なくとも1つのリガンドに曝露されると思われる容器中あるいは表面上のことである。本発明の好ましい実施例では、反応容器は、ハイスループットスクリーニングを容易に行えるように用意されている。このスクリーニングは、96個または384個のウェルを持つマイクロタイター用プレート上で実施される。別の可能性は、MacBeathらが示した、ガラススライド上で異なる標的タンパク質を高濃度に配置させる方法である（MacBeath et al., 2000, Science 289:1760）。本発明の他の実施例で、反応容器はカラム、樹脂、膜、マトリックス、ビーズまたはチップである。

40

#### 【0097】

標的がリガンドライブラリに曝露される条件は様々である。限定のない例では、結合反応の温度は、約5 未満、約5 から約 25 、約25 から約 40 、あるいは40 を超える。さらに、限定のない例で、結合反応の条件は、約pH 5未満、約pH 5から約9、あるいは約pH9を超える。さらに限定のない例で、結合反応の溶液は、水、アルコール、有機溶媒、またはそれらの組み合わせである。さらに限定のない例で、結合反応の条件として、添加剤はイオン、塩、洗剤、還元剤、酸化剤、またはそれらの組み合わせである。さらに限定のない例では、結合反応の条件として標的は固定化される。さらに限定のない例では、結合反応の条件としてリガンドは固定化される。さらに限定のない例では、結合反応の条

50

件として複数の標的は固定化される。さらに限定のない例では、結合反応の条件として標的トリグランドは溶液状態である。

#### 【0098】

さらに非限定的な実施例において、結合反応の条件として、リグランドはビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、緑蛍光タンパク質、放射性同位体、His(ヒスチジン)タグ、磁気ビーズ、酵素またはこれらの組み合わせを構成する。

#### 【0099】

本発明の1つの態様で、標的は機械装置に基づくアッセイ法でスクリーニングされる。機械装置に基づくアッセイは、標的と結合するリグランドを検出するアッセイであるが、それだけに限られない。このアッセイは、リグランド、タンパク質、または検出の指標となるいずれかの物質と固相または液相で結合するイベントを含む。また、機能が今までに確認されていないタンパク質をコードする遺伝子は、レポーター系(-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質など、しかしこれだけに限られない)によって細胞内に形質移入され、理想的にはハイスループットや超ハイスループット(例えば、チッププレート1枚に付き1560個のウェル)スクリーニング法、またはライブラリの個々のメンバーによって、ライブラリに対してスクリーニングされる。本発明の別の実施例では、他の機械装置に基づく結合アッセイが使用され得る。これらのアッセイには、酵素活性への作用を測定する生化学的アッセイ、標的およびレポーターシステム(例えば、ルシフェラーゼまたは -ガラクトシダーゼ)が1つの細胞に導入された細胞に基づくアッセイ、または自由エネルギーの変化を検出する結合アッセイなどの他のアッセイが入る。結合アッセイはウェル、ビーズ、またはチップに固定されるか、固定化抗体に捕獲されるか、またはキャピラリー電気泳動によって分離された標的を用いて実行できる。結合したリグランドは、比色分析、蛍光分析、あるいは表面プラズモン共鳴法によって通常検出される。カラムに基づく結合アッセイにおいて、結合はウェルまたは他の容器、ゲル上などで実施される。

10

20

#### 【0100】

これらのアッセイを行う多数の手段があるが、帰納的思考してみると、標的タンパク質に結合する化学物質のみが関連を持ちその機能を伝えることができる。さらに、液相が真の生体構造をより正確に反映している。さらに、反応において、タンパク質および化学物質ともタグされないのが好ましく、その結果、タンパク質がビーズプレートにカップリングすることにより、なんらかの様式で束縛されたり、またそのリグランドが、細胞や血液中に存在するであろう同じ液相で確認されないというような問題が減少する。結果として、本発明の好ましい実施例では、小容量(0.1  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ の好ましい範囲で1 fL~1 mL)中に、1~20,000個のリグランド(1000~10,000が好ましい)が1 ng~1 mgの各タンパク質(0.1  $\mu\text{g}$ ~100  $\mu\text{g}$ が好ましい)に混合され、濃度は0.1  $\mu\text{M}$ ~100  $\mu\text{M}$ となり、好ましい範囲は0.1  $\mu\text{M}$ から10  $\mu\text{M}$ である。本発明の特定な実施例において、各タンパク質にマイクロモルからナノモル単位の親和力で結合することが期待される、1~500個のリグランドのみに注目すれば、数百万種の組み合わせを個別にスクリーニングしなくても済むことになる。これにより、分子自身の質量、同位体パターンまたは分解パターン以外の方法でライブラリをタグする必要がなくなる。なぜなら、質量分析法では、1つのウェルに付き1から5個のヒット化合物を分解し、同定する段階ができるからである。また、IRとFTIRの両方または一方を単独で、または質量分析と併用して、ヒット化合物を分解・同定できる。

30

40

#### 【0101】

##### 5.1.4. リグランド-標的対の分離とリグランドの同定

本発明の好ましい実施例において、リグランド-標的対は液体クロマトグラフィーによって、非結合リグランドおよび非結合標的から分離され、次いで、リグランド-標的対は2段階目の液体クロマトグラフィーによって各対に分離され、さらに結合しているリグランドが質量分析によって同定される。本発明の様々な実施例において、溶液相中の結合は、ウェル、試験管、またはカラム内で起こり得る。キャピラリー電気泳動、および/または他の検

50

出方法が、ライブラリからリガンドを逆重畳積分するために使用され得る。特に、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) と質量分析またはキャピラリー電気泳動と質量分析で、非常に高感度で分子を測定できる。さらに、この技法は、化学ライブラリの少量の各メンバーを至適に利用するのに重要である、極少量の使用で実行できる。例えば、化学ライブラリの20,000未満のリガンドは、96個のウェルプレートの各ウェル内で、約100  $\mu\text{L}$  でタンパク質1  $\mu\text{g}$  中10  $\mu\text{M}$  以下の濃度で、再び結合するために、タンパク質とプールされる。好ましい実施例で、各ウェルのカラムとして作動するために、HPLC はカートリッジ付き96 (個) ウェルプレートで実行される。別の実施例で、分離は、カラム、ウェル、カートリッジ、チップ、またはフィルタを用い、384個、1536個、あるいは10,000個以上のウェル型で同時に実行される。また、この分離は、標準のHPLCカラム、スピンカラム、または他のカラムで実行され得る。最初のカートリッジ/カラムは、樹脂中の非結合分子を保持するが、結合リガンドとタンパク質を通過させるために、ゲル透過あるいはサイズ排除、またはゲル濾過型 (例えば、G25様樹脂、Pharmacia) であり得る。少量の試料量が望まれ (好ましくは1~100  $\mu\text{L}$  以下) るが、さらにこの手順で試料は1桁以上希釈され得る。その故、試料の希釈を最小にするため、好ましくは、直径1~2 mm以下、長さ5~200 mm (Rocket Column、BioradまたはPharmacia 社製カラム) の、小さくて径の狭いカラムを使用することが有用である。キャピラリー液体クロマトグラフィーも使用できる。この樹脂によって、高い親和性で ( $K_d = 1.0 \mu\text{M}$ ) で結合している小分子を伴ったタンパク質が分離される。次のカートリッジ/カラムでは、疎水性または親水性逆相HPLC樹脂を使用するであろう。使用するリガンドライブラリの疎水性によって以下のような樹脂を選択する。すなわち、C18 (シリカ疎水性-疎水性が低いリガンド用)、C8カラム (より親水性で、より疎水性なリガンド用)、シアノカラム (より親水性なリガンド用) または、親水性あるいは疎水性リガンドどちらにも使用できるAgilent社SB8Uである。これらの逆相HPLCで、タンパク質に結合している小分子リガンドをタンパク質から分離し、小分子とタンパク質試料を樹脂結合を通じて濃縮する。続いて、小分子はタンパク質と樹脂から溶出され、溶出物は96 (個) ウェルプレートで収集され得る。開始物質の量が既知であれば、この操作で親和性も測定し得る。また、後に、結合親和力を測定するために競合試験を実行できる。

10

20

#### 【0102】

これらの溶出物は、質量分析測定に回され、特性が決定され得る。この測定は、96 (個) ウェル型であっても、多分、同時多チャンネルマイクロチップシステムまたは同時スプレイントラフェースのいずれかを用いて、リアルタイムでロボット操作で実施される可能性があり得る。また、チップに基づくMALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) TOF (time of flight) 質量分析も使用され得る。この場合、カラム (スピン、HPLC、キャピラリー、その他) から分離されたタンパク質画分は、96個ウェル以上のアレイ型のチップまたはフィルタの1つにスポット可能である。Bruker Daltonics 社のOmniflexまたはAutoflex MALDI 機によって、試料100個と1536個の試料型から、各試料が自動的に脱着し分析される。使用され得る限定のない型の質量分析として、電子スプレイ型、イオントラップ型、フーリエ変換型、MALDI型、シングルMS (Mass Spectroscopy)、MS-MS (タンデムマス)、あるいはMS-MS-MS (トリプルマス) 型におけるシングルあるいはトリプル4重極であり得る。

30

40

#### 【0103】

溶出物は、使用するリガンドライブラリの情報を補充した質量分析計と併用されるソフトウェアパッケージを使用して、特性が決定され得る。質量分析法は、直接質量を測定することにより、化合物を同定するために使用され得る。しかし、また、質量分析は、化合物、特徴的な同位体パターン (例えば、 $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ) に分解する元素を含む骨格またはリンカー、または特異な分裂パターンを有する化合物 (例えばペニシリン) を検出するために使用され得る。例えば、塩素含有化合物は、3:1 の強度比を有し2 AMU 離れている2つの質量ピークを生じる、 $^{35}\text{Cl}$  と  $^{37}\text{Cl}$  から構成される。同様に、臭素含有化合物は、1:1 の強度比を有し2 AMU 離れている2つの質量ピークを生じる、 $^{79}\text{Br}$  と  $^{81}\text{Br}$  から構

50

成される。このアプローチは、化合物を同定する際、代替法として、または真の分子量と併用して使用され得る。

#### 【0104】

質量分析は質量、同位体、および分解パターンを正確に測定できるので、ソフトウェアと併用すると、異性体を除くライブラリの正確なメンバーが同定され得る。この操作の後、理論的に予測される500個前後のマイクロモルあるいはナノモル濃度のヒット分子を、元のライブラリから引き出し、大規模スケールで合成することができる。その分子がペプチドである場合、タンパク質が細胞膜を横断できるようなTAT形質移入配列に融合させることができる。

#### 【0105】

本発明の別の態様で、リガンドの特性は、質量分析に加えてまたはそれに代わって、IRまたはFTIRによって決定される。これらの技法により、リガンドの官能基または置換基（例えば、水酸基またはアミノ基）が同定できる。質量スペクトルと併用すると、同一分子量のリガンド間の相違を容易にさせ得る。

#### 【0106】

本発明によれば、リガンド-標的対の解離定数 ( $K_d$ ) は、約100  $\mu\text{M}$ 未満、好ましくは、約10  $\mu\text{M}$ 未満であるべきである。リガンド-標的対の解離定数 ( $K_d$ ) は、標的分子機能の決定、また薬物リード化合物として、リガンドを利用する方法に精通した人々を、リガンドの有用性を決定するのに際して、決定的ではないが、ガイドする因子の1つである。それ故、本発明では、その解離定数 ( $K_d$ ) が約1  $\mu\text{M}$ 未満、約100 nM未満、約10 nM未満、約1 nM未満、約100 pM未満、約10 pM未満のいずれかである、リガンド-標的対の相互作用を意図しているが、必ずしも選ぶ必要はない。

#### 【0107】

適切な親和性を持つヒット化合物が無いが、少数しか見出されない場合でも、化学ライブラリの構造的多様性の中から構造的または化学的ギャップがすでに同定されていることもあり得る。そのような場合、標的分子の直接合成を利用して、そのギャップを埋めることができる。低い親和性の結合体が見出された場合、その結合を1つの機能的ドメイン上で、光活性化（または他の）リンカーを含むライブラリと共に繰り返すことができる。最初のカラム使用後に、タンパク質とそれに結合している分子のみが存在している場合、光活性化操作が実施でき、その後小分子が逆相HPLCで溶出できる。この方法で、標的は、テンプレートとしてすでに使用されており、低い親和性で結合している2つの分子にリンクしているので、それらの分子は標的に対する親和性が増大している。好ましい実施例で、親和性は2倍～100倍増大する。

#### 【0108】

##### 5.1.4.1. 代表的な化学的アレイアッセイの実験方法と結果

##### HPLCに基づくアッセイ法

薬物様化学的骨格の収集物を表す薬物様化学的化合物 (Sigma-Aldrich, ICN, Calbiochem) の重さを量り、各最終濃度が20  $\mu\text{M}$  となるように50 mM 酢酸アンモニウムpH 7の10%メタノール溶液中で混合した。1  $\mu\text{M}$ ～20  $\mu\text{M}$  チューブリンまたはP38 MAP キナーゼ (Sigma) をHPLC用少量試料キュベットに入れ、0.5  $\mu\text{M}$ ～20  $\mu\text{M}$  の化合物と混合した。混合し37で15分間インキュベーション後、キュベットを氷上に置き、自動注入装置 (Waters) でHPLC (Waters 2690) に注入した。HPLCの条件は、デュアルサイズ排除および相分離型150 mm X 2.1mm ID Pinkerton GFF II カラム (Regis Technologies) を使用し、使用バッファは50 mM 酢酸アンモニウム10%メタノールであった。標的タンパク質と結合化合物はDiodeアレイ検出器によって検出され、カラムのボイド (空隙) 容量内で溶出され、ほとんどの化合物は波長243 nm でよく吸収された。ある場合には、低濃度の各化合物 (0.5～5 mM) および1個ずつの分離が容易と思われる10個未満の化合物を低濃度で使用すると、2つの標的タンパク質を滴定し、さらに標的タンパク質の1つに結合し、非特異的な対照物質には結合しないことが既知な特異的化合物のUV吸収波長においてその滴定を観察することが可能であった。

10

20

30

40

50

## 【0109】

本発明者らは、至適なカラムサイズおよび至適な樹脂を選択し、標的タンパク質と結合した化合物を非結合化合物から最大限に分離した。ポイド容量でタンパク質を溶出する樹脂、ポイド容量を最小限にする小径で短いカラムが使用された。このようなカラムによりタンパク質試料の希釈量を最小限にし、各アッセイの所要時間を最小にし、その結果、タンパク質から解離する結合化合物の量を最小限にする ( $K_{off}$  定数に依存)。これらの特徴により、最小量の試薬と感度の高い検出法の使用が可能となる。タンパク質が2~3分未満で溶出するようなカラムの長さを使用した。Regis 150 mm x 2.1 mm GFF II カラム、1.0 mm x 100 mm YMC Diol カラム、2.1 mm x 150 mm Phenomonex ポリヒドロキシメタ  
10  
アクリレート (Polysep) カラム、および Jordi 2.1 x 150 mm ジビニルベンゼンカラムを  
含む多くの HPLC カラムを試験した。同様に、塩とメタノール濃度を变化させ他のバッ  
ファーも試験し、結合反応に対する標的タンパク質と小分子の比率も 1000:1 ~ 1:1000 まで変  
化させた。異なるクラスの代表的な樹脂を使用して、薬物様小分子化合物からタンパク質  
画分を分離させる能力、さらに全化合物をカラムから溶出させるサイクル時間を最小にす  
る能力も試験した。これらのカラムの特徴は、表面の特性と、背圧下で樹脂が破壊するこ  
とによる流速の限界によって決定される。YMC ジオールカラムは、シリカベースのカラム  
で、圧に対する抵抗性があり、サイクル時間が10分未満であるが、図9に挙げた100種化合  
物の混合物のほんの約50%しかタンパク質から分離できなかった。Phenomonex ポリヒドロ  
キシメタアクリレートカラムは、100種類の化合物の約80%をタンパク質から分離でき、多  
20  
数の小分子化合物の溶出を達成するには、メタノール勾配が必要であった。つまり、600  
psi を超える背圧には耐久不能なため、比較的低い流速 (0.18 ml/min) で実施した。Phen  
omonex カラムのサイクル時間はメタノール勾配を使用すると1.5時間であり、勾配を使用  
せず単離できる化合物のサブセット (全体の15%) に対しては35分であった。他のポリマ  
ー使用カラム (例えば、ポリヒドロキシメタアクリレート (Phenomonex, Shodex, Waters  
社)、ポリメチルメタアクリレート (Shodex, Tosoh Biosep)、Sephacrose/Sephadex/Supe  
rose (Amersham Pharmacia Biotech)) も比較的低い流速でのみ耐久性があった。Jordi  
DVB カラムはジビニルベンゼンポリマーカラムであり、高圧 (4000 psi) で操作できる  
が、化合物同様にタンパク質も不要に結合してしまい、その結果、使用したバッファー系  
では分離ができなかった。非結合化合物からタンパク質を分離させるために他のバッファ  
ー系の使用が期待される。異なるカラムと樹脂が連続して組み合わせられ、化合物のタンパ  
ク質からの分離度合いを増加させたが、サイクル時間も長くなった。サイクル時間が長く  
ても (例えば、1測定に10分を超える) 構わない場合は、上述のカラムまたは上述のカラ  
ムシリーズが使用され得る。

## 【0110】

短いサイクル時間が必要な場合、他のカラムが使用され得る。例えば、Regis GFF II  
カラムは、測定した化合物の97%からタンパク質画分を分離した。8000 psiの圧定格は、  
これらのアッセイに使用する HPLC (Waters 2690) の定格、つまり6000 psiで操作する、  
を超えていた。この樹脂のサイクル時間は、容易に8分未満を示したので、圧力8000 psi  
まで耐久性のある HPLC では、より高速な流速を使用すると、さらに時間が短縮される可  
40  
能性がある。GFF II 樹脂および GFF 樹脂は、Thomas Pinkerton が、タンパク質吸着による  
妨害なしで、血清中の薬物および薬物代謝物の直接分析を目的として開発した内部表面  
逆相樹脂である。この樹脂は、分子量12,000 ダルトン未満の分子のみが内部に接近で  
きる、外部表面が親水性で内部ポアが疎水性な多孔質なシリカ支持体から構成されている。  
これらの表面は、グリシン-フェニルアラニン-フェニルアラニン (GFF)、またはグリ  
シドキシプロピリン-フェニルアラニン-フェニルアラニン (GFF II) のトリペプチドが  
シリカ表面に結合することにより、生成される。GFF または GFF II を骨格とするピーズは  
、続いてエキソペプチダーゼであるカルボキシペプチダーゼAで処理される。この酵素は  
、ポアから排除されるほど十分大きな分子量 (35,000 ダルトン) を持ち、その結果、外  
表面からフェニルアラニン-フェニルアラニン部分が開裂する。この処理により、グリシ  
ンまたはグリシドキシプロピル基は外表面にそのまま曝露され、外面は親水性になり内  
50

面にはそのまま元のトリペプチドが残り、その結果、内表面は疎水性となる（例えば、製造業者の添付文書に記載されている）。使用したGFF II樹脂カラムのカタログ番号は288-4である。これらの樹脂でパックされた他のカタログ番号のカラムもRegis technologiesで販売しており、使用できる。それで、外表面は、サイズ排除および親水性相互作用によって、大分子が内部相に入ることを防ぐ。疎水性作用に基づき化合物を保持し分離する、疎水性支持体を含む内表面に、小分子が入る。GFF II樹脂で実行できる短いサイクル時間と分離の程度から、GFF II カラムが次のアッセイに使用された。しかし、他の樹脂も使用できる。

#### 【0111】

HPLC カラムより得られたタンパク質画分を1%TFAに解離させ、100uLの試料が逆相カラム（Waters Symmetry Shield）に注入され、タンパク質に結合していた化合物が分離された。化合物はアセトニトリル勾配によって、UV検出器を通過後TOF質量分析計（Micromass LCT）に溶出された。バックグラウンドシグナルは、化合物が存在しないタンパク質を含む対照物質を使用して、各試料から差引かれた。質量スペクトルは化合物の分解が起こるのに十分なコーン型電極電圧（20～80 ボルト）で測定された。他の質量分析装置でも、衝突セル中で分解は可能である。各化合物の特徴的分解パターンは、化学物質またはその同位体の分解物を示す、大きな親ピークと他のピークからなる。標的タンパク質から遊離された化合物の分解パターンは、標準物質で観察された分解パターンの特徴と比較され、標的タンパク質に結合している化合物が同定された。また、化合物の分子量を示す親ピークに対する1つ以上の同位体の特徴的ピークが標準物質と比較され、標的タンパク質に結合する化合物が同定された。代替の別の分析では、化合物の分子量を示す親ピーク自身を標準物質と比較し、化合物を同定した。時々、これらの方法を併用して化合物が同定された。化合物の分解を誘発しないMS条件下で類似な方法が適用され、その結果、その化合物（例えば親ピーク）の分子量とその同位体を示すピークを含む質量スペクトルが得られた。

#### 【0112】

HPLCに基づいた方法による測定結果

SKB86002は、P38 MAPキナーゼ標的タンパク質とマイクロモル単位で親和性のあるリガンドである。P38 MAP キナーゼ（5 uM）を、5 uMの 86002 と混合させ、ジオールカラムのHPLCで分離した（図3）。タンパク質画分を採取し、質量分析計で分析した。スペクトル上の親ピーク、フラグメント、および同位体ピークは86002の標準物質に相当し、このことは、P38 MAP キナーゼがマイクロモル単位の親和性を持つ特異的なリガンドを単離し、抽出していることを示している。

#### 【0113】

SKB86002とキニン1塩酸塩（非特異的な対照物質）を各々の最終濃度が5 uM となるように混合した（図4）。P38 MAP キナーゼタンパク質を増量させながら（最終濃度0、2.5、5 および 10 uM）混合化合物と混合し、各最終濃度を5 uM とし、タンパク質をジオールカラムHPLC で分離した。UVスペクトル上で、86002ピークはP38濃度依存性の減少を示したが、キノンのピーク減少は無視できるほどであった。

#### 【0114】

P38 タンパク質画分を、図4で示す滴定（5 uM のP38 MAP キナーゼ + 5 uMの キニンと86002の混合物）の midpoint で採取する場合、混合物から抽出され、タンパク質から遊離された化合物は、遊離化合物の質量ベクトル上の親ピーク、フラグメント、および同位体ピークに基づいて、キニンではなく86002と同定された（図5）。

#### 【0115】

86002とコルヒチンを含む10種の薬物様化合物の等量混合物を調製した（図6）。P38 MAP キナーゼタンパク質を増量させながら（最終濃度0、3.5、および5 uM）、この10種の混合化合物と混合し、各々の最終化合物濃度を0.5 uM とし、タンパク質をGFF II カラムHPLC で分離した（図7）。UVスペクトル上で、86002ピークはP38濃度依存性の減少を示したが、コルヒチンのピークまたは混合物の他の化合物を表すピークの減少は無視できるほど

10

20

30

40

50

であった。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルが測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度に86002の特徴を示す親ピークと同位体ピークが現れた。

#### 【0116】

チューブリンタンパク質を増量しながら（最終濃度0、5、20  $\mu\text{M}$ ）この10種の混合化合物と混合し、各々最終化合物濃度を0.5  $\mu\text{M}$  とし、タンパク質をGFF II カラムHPLC で分離した（図8）。UVスペクトル上で、コルヒチンピークはチューブリン濃度依存性の減少を示したが、86002 のピークまたは混合物の他の化合物を表すピークの減少は無視できるほどであった。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度にコルヒチンの特徴を示すピークが現れた。

10

#### 【0117】

86002 とコルヒチンを含む100種の薬物様化合物の等量混合物を調製した（図9）。P38（2  $\mu\text{M}$ ）を100種の混合物と混合し、各化合物の最終濃度を20  $\mu\text{M}$  とし、GFF II カラムのHPLCによって、タンパク質を未結合化合物から分離した（図10）。タンパク質画分を採取し、化合物をタンパク質から遊離し、質量スペクトルを測定した。スペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度に86002の特徴を示すピーク得られた。このことから、P38 MAPキナーゼは、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からマイクロモル単位の親和性を持つ1つのリガンド（86002）と結合し、抽出する。質量スペクトルのバックグラウンドは、10種混合物（図7）が示したスペクトルの場合に匹敵するように見え、このことは、アッセイがより多数の化合物にスケールアップできる可能性を示している（例えば数千から数万種類の化合物）。例えば、これらの方法は、10、20、40、50、75、100、200、500、1000、2000、5000、10000個、もしくはそれ以上の化合物のライブラリ、またはより多くの化学骨格構造のライブラリを分析するのに使用でき得る。

20

#### 【0118】

チューブリン（5  $\mu\text{M}$ ）を100種類の化合物混合物と混合し、各化合物の最終濃度を5  $\mu\text{M}$  とし、GFF II カラムのHPLCによって、タンパク質を非結合化合物から分離した（図11）。タンパク質画分を採取し、化合物をタンパク質から遊離し、質量スペクトルを測定した。スペクトルには、他のピークよりもはるかに高いレベルに、コルヒチンの特徴を持つピークが現れた。このことから、チューブリンは、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からヒット化合物（コルヒチン）と結合し、抽出する。質量スペクトルのバックグラウンドは、10種混合物が示したスペクトルの場合に匹敵するように見え（図8）、このことは、アッセイがより多数の化合物にスケールアップできる可能性を示している（例えば数千から数万種類の化合物）例えば、これらの方法は、10、20、40、50、75、100、200、500、1000、2000、5000、10000個、あるいは それ以上の化合物のライブラリまた、より多くの化学骨格構造のライブラリを分析するのに使用でき得る。

30

#### 【0119】

アッセイの速度を上げる方法は、流速を高くすることである（図12）。カラムが耐えられる最大流速に影響する限定要因は、一般的に樹脂が破壊する前に耐えられる背圧である。GFF II樹脂を選択する理由の1つは、最大背圧が100~1500 psiであるサイズ排除ゲル（例えば、Sephacrose, Superose, Superdex、ポリメチルメタアクリレート、ポリヒドロキシメタアクリレートなど）と比べて、最大8000 psiまで耐久できるからである。GFF II カラムは高流速であっても、100種類の化合物からタンパク質は良好に分離された。

40

#### 【0120】

##### スピンカラムクロマトグラフィー

薬物様化学骨格構造（Sigma-Aldrich, ICN, Calbiochem）の収集を表す薬物様化学物質の重さを計り、各物質の最終濃度が20  $\mu\text{M}$  となるように、pH 7の50mM酢酸アンモニウム10%メタノール溶液に混合した。5  $\mu\text{M}$ ~20  $\mu\text{M}$  ウシ血清アルブミン（BSA）またはチューブリン（Sigma）をHPLC用 少量試料キュベット（Waters）に入れ、5  $\mu\text{M}$ ~20  $\mu\text{M}$  の化合物と混合した。混合後、37 インキュベーションを15分間し、キュベットを氷上に置いた。図9に挙げた100種混合化合物の50  $\mu\text{L}$  を、あらかじめ結合バッファーで2回洗浄し（すなわち

50

、各洗浄操作では、50 mM 酢酸アンモニウム10%メタノールバッファ-200 uL を加え、さらにカラムを通過させるようにしたバッファ-を1.5 mL の微量遠心管 (Eppendorf) 中で、回転数の最大設定値において30秒から1分間微量遠心機 (Eppendorf) で遠心させる)、バッファ-と平衡状態にしてある、MicroSpin G-25 (Amersham Pharmacia Biotech) スピнкаラムの上清に添加された。このようなスピнкаラムは、一般的に標識化後DNAプローブ用にバッファ-の脱塩および交換に使用されるが、G-25 は分子量が25KD以上の分子を削除する従来のサイズ排除樹脂の1つである。スピнкаラムを続いて1.5 mL の微量遠心管 (Eppendorf) に入れ、微量遠心機 (Eppendorf) の最大設定で30秒間遠心させた。また、吸引させるとスピнкаラムから溶液を引き出すことができ、スピнкаラムは、スピнкаラム/カートリッジを96 (個) ウェル型で整列し、吸引マニホールドを使用して、溶液を

10

#### 【0121】

BSAを用いる場合、微量遠心管の底部にある50 uL溶液をHPLCに注入し、UVスペクトルを可視化して分離前のBSA/100 化合物混合物に相当する量と比較した。チューブリンを用いる場合、微量遠心管の底部にある25uL の溶液を1%TFA で解離させ、逆相カラム (Waters Symmetry Shield) に注入し、化合物をアセトニトリル勾配によってUV検出器を通過させTOF MS (Micromass LCT) に溶出させた。バックグラウンドシグナルは、化合物が存在しないタンパク質を含む対照を使用して、各試料から電子工学的に差引かれた。質量スペクトルは化合物の分解が起こるのに十分なコーン型電極電圧 (20 ~ 80 ボルト) で測定された。他の質量分析装置でも、そのような分解は衝突セル中で可能である。各化合物の特徴的分解パターンは、化学物質またはその同位体の分解を示す、大きな親ピークと他のピークからなる。標的タンパク質から遊離された化合物の分解パターンを、標準物質で観察された分解パターンの特徴と比較し、標的タンパク質に結合した化合物が同定された。また、化合物の分子量を示す親ピークに対する1つの特徴的同位体を標準物質と比較し、標的タンパク質に結合した化合物が同定された。代替の別の分析では、化合物の分子量を示す親ピーク自身を標準物質と比較し、化合物を同定した。時々、これらの方法を併用して化合物を同定した。化合物の分解を誘発しないMS条件下で類似な方法を適用し、その結果、その化合物 (例えば親ピーク) の分子量とその同位体を示すピークを含む質量スペクトルが得られた。

20

#### 【0122】

スピнкаラムクロマトグラフィーに基づいた方法の結果

ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) 5 uM を、各化合物の最終濃度が5 uM となるように100種化合物に混合した (図13)。混合物の半量 (50 uL) をMicro-Spin G-25 カラムの上部に層状に添加し、遠心分離した。タンパク質を含む画分を遠心分離管の底部に採取した。初回のタンパク質/化合物混合物をスピнкаラム分離法によって分離した後のタンパク質/化合物混合物と比較し、タンパク質が十分生成されていることをUV吸収から観察した。同じプロトコルを20 uM のチューブリンと20 uM の100種混合物との混合に適用し、溶出タンパク質含有画分の質量スペクトルを測定すると、コルヒチンの特徴を持つピークが、他のピークよりはるかに高い強度に生じた。この場合のバックグラウンドピークは、HPLC カラムの分離によって観察されたものよりも僅かに高かったが (図14)、スピнкаラムによる分離速度および測定の拡張性は非常に魅力的である。例えば、これらの方法は、10、20、40、50、75、100、200、500、1000、2000、5000、10000個、あるいはそれ以上の化合物のライブラリまた、より多くの化学骨格構造のライブラリを分析するのに使用でき得る。

30

40

#### 【0123】

##### 5.1.4.2. 単離リガンドを同定するパターン認識ソフトウェアの代表的な使用方法

本発明は、標的タンパク質と本書で記載した分離法を用いて単離した混合物から、1つの化合物を同定するための、質量スペクトルのパターン認識分析の方法を提供する。

#### 【0124】

これらの方法では、候補化合物の最初の混合物中に存在する多数またはすべての化合物

50

について、質量スペクトルの分解パターンが測定される。また、同位体あるいは他の質量スペクトルパターンもこれらの化合物について測定される（例えば、M+1またはM+2 同位体ピーク）。質量分析計は、化合物、その同位体、および/またはそのフラグメントを、 $m/z$ で表す質量/電荷比に基づいて分類する。ほとんどあるいはすべてのピークが+1（または-1）の電荷を持つ分子となるように、質量分析の条件を調整できるので、その結果、いくつかのピーク値は親化合物、同位体または親化合物のフラグメントの質量に等しくなる（すなわち、 $m/z = m/1 = m$ ）。ある場合には、いくつかの、またはすべてのピークが+2以上（または-2以下）の電荷を持つ分子を示すように他の質量分析の条件を使用し、その結果、質量/電荷比が分子の質量未満となるため（例えば、 $m/z=m/2$ ）、いくらかのピークの値は親化合物、同位体、またはフラグメントの質量より小さくなる。そのため、質量分析パターンは、親化合物、そのフラグメントおよび/またはその同位体の質量（または分子の電荷が1を超える場合は質量/電荷比）に相当する質量ベクトルピークから構成される。

10

20

30

40

50

#### 【0125】

これらの各ピークの質量（または質量/電荷比）を情報検索システムのデータベースに入力する。標的タンパク質から遊離した対象化合物の質量スペクトルが得られ、続いてパターン認識ソフトウェアを使用して、測定したパターンとデータベースのパターンを比較する。明確にマッチすると、対象化合物が確実に同定される。1つの実施例では、2個、3個、またはそれ以上の最も特徴的な質量に相当するピーク（化合物1に相当するピークA、B、C、また化合物2に相当するピークD、Eなど）を、最初の混合物中の各化合物のデータベースとして入力する。ソフトウェア（例えば、Micromass社のMassLynxバージョン3.5）を使用して、標的タンパク質から遊離した化合物の質量スペクトルのピークAを検索し、続いてピークB、C、D、Eを順番に検索する。特定ピークの存在を第二のデータベースに入力し、そのピークが質量スペクトル上に現れていることを示す。別の可能な方法では、質量スペクトルの特定ピークの検索は、どんな順序でも実施される。質量スペクトルの解析には、対話型検索コマンドが使用され得る。例えば、特定化合物に相当するピークAが質量スペクトル上に生ずる場合、そのスペクトルを解析し、同じ化合物に相当する別のピーク（例えばピークB）の特徴がスペクトル上に出ているかを確認し得る。また、特定化合物に相当するピークの特徴が質量スペクトルに出ていない場合、そのスペクトルを解析し、別の化合物のピーク（例えばピークD）の特徴がスペクトル上に出ているかを確認し得る。さらに別に代わる方法では、マクロプログラムをMassLynxにオーバーレイして、複数のピークを同時に検索している。現時点で同定されたピークを、最初の混合物中の化合物より得られた最初のデータベース内のピークと比較し、標的タンパク質から遊離される化合物を同定する。図16 Aに、これらの方法の数例の実施例に対し、その操作を図解した代表的なフローチャートが記載されている。

#### 【0126】

別の態様では、質量分析パターンの最も特徴的なピークに相当する2個、3個、またはそれ以上の質量数値（または質量/電荷比）が、最初の混合物中の各化合物のデータベースとして入力される。代表的な方法において、このデータベースはMicrosoft ExcelまたはOracleのプログラムを使用している。一旦、標的タンパク質から遊離された試料の質量スペクトルが測定され、そのスペクトル上に2つまたは3つのピーク（例えば、最も高いシグナルを持つ2つまたは3つのピーク）の位置が確認されると、これらのピークに相当する質量数（または質量/電荷比）を用いて、最初の混合物のデータベースから検索が実行される。例えば、質量数を、プログラムの「検索」コマンドで入力し、その質量のピークを生ずる候補化合物の検索ができる。その検索で同定された質量数の組み合わせから、試料中に存在する化合物を同定する。

#### 【0127】

さらに別の態様では、特定の質量（または質量/電荷比）のシグナル強度を使用して、化合物が正しく同定されている。この技法は特に、使用パターンが同位体の場合に適用される。この場合、混合物中の化合物のデータベースが生成され、2つまたは3つの特徴的な

ピークの各質量と強度の両方を含んでいる。対象試料に関するこれらの情報が収集される。データベースプログラムの検索機能を利用して、質量と強度の相関パラメータが検索される。明確にマッチすると試料中に存在する化合物が確実に同定できる。

#### 【0128】

対象となる1つ以上の化合物（例えば、1つの標的から遊離された化合物）の同定に本発明方法を使用した様々な態様において、1つの化合物の1つ以上のフラグメントに相当する1つ以上質量スペクトルピーク、および/または1つの化合物の1つ以上の同位体に相当する1つ以上の質量スペクトルピークを利用してその化合物を同定している。他の実施例では、親ピークが化合物の同定に使用されている。様々な実施例で、親ピークは化合物の同定に使用される唯一のスペクトルピークである。さらに他の実施例で、化合物の同定において、親ピークは、フラグメントまたは同位体に相当する1つ以上のピークと併せて使用される。さらに他の実施例では、親ピークが化合物の同定に使用されていない。他の実施例では、化合物は対象標的と接触した少なくとも5、10、20、40、50、75、100、200、500、1000、2000、5000、10000個、あるいはそれ以上の化合物との混合から回収された構成成分である。他の実施例では、化合物は少なくとも、5、10、20、40、50、75、100、200、500、1000、2000、5000、10000、あるいはそれ以上の異なる化学骨格構造を含む化合物の混合から回収された構成成分である。特殊な実施例では、親ピークは、少なくとも5、10、20、40、50、75、100、200、500、1000、2000、5000、10000、あるいはそれ以上の異なる化学骨格構造を含む化合物の混合から、1つの化合物を同定するために使用される。

10

#### 【0129】

ここに記載されている方法はすべて、実際、いずれのコンピュータによっても実行され得る。図15は代表的なコンピュータシステムを示している。コンピュータシステム2は内部および外部コンポーネントを含んでいる。内部コンポーネントは、メモリ6に繋がったプロセッサ4である。外部コンポーネントは、質量データ保存装置8、例えば、ハードドライブなど、ユーザ入力装置10、例えばキーボードやマウス、ディスプレイ12、例えばモニター、および通常、コンピュータと他のコンピュータを繋ぎ、データや処理作業を共有することができる、ネットワークリンク14である。プログラムは、運転中本システム2のメモリ6に搭載される。これらのプログラムには、オペレーティングシステム16、例えばコンピュータを管理するMicrosoft Windowsなど、本発明の方法を実行するプログラムを補助する共通言語および機能をコードするソフトウェア18、および操作言語または記号パッケージで本発明の方法をコードするソフトウェア20が含まれる。それらの方法をプログラムするために使用できる言語は、Microsoft社のVisual C/C++など、特に限定されない。好ましい適用では、本発明の方法は、プログラムの実行に使用されるアルゴリズムを含んで、式の記号入力および特異性の高い処理が出来るような数学的ソフトウェアパッケージによってプログラム化され、その結果、ユーザーが、個々の式またはアルゴリズムの手順をプログラムする必要性がなくなる。この目的に役立つ代表的な数学的ソフトウェアパッケージはMathworks社(Natick, MA)のMatlabである。Matlabによって、Parallel Virtual Machine (PVM) モジュールおよびMessage Passing Interface (MPI) を適用でき、複数のプロセッサでの処理をサポートできる。本書の方法と共にPVMおよびMPIを実行するには、既存の方法を使用する。また、ソフトウェアやその一部が、既存の技法による専用回路でコードされる。

20

30

40

#### 【0130】

##### 5.1.5. 標的分子機能の解析

標的分子機能を系統的に分類するために、各標的のヒット化合物を細胞や組織を使用したアッセイによってスクリーニングし、疾病病因に対する主要分子の各メカニズムを示し得る。標的が示差的発現解析法に基づいて最初に選択される場所で、その示差的発現に特に関連するアッセイが好ましい（例えば、がん細胞の示差的発現解析から標的が生じた場所に特に関連することもある）。この一連のアッセイ法には、アポトーシス、増殖、虚血/壊死、炎症、線維症、血管形成、代謝シグナル伝達、感染および発生/分化などを検出または測定するアッセイを含むが、これだけに限定されない。病因発生経路に注目し、疾

50

病および細胞に特異的な標的を研究することにより、多数の治療領域に対する新しい標的分子が同定され得る。このパネルの目的は、重要な疾病、つまり慢性変性疾患（例えば、アルツハイマー病、変形性関節症、骨粗鬆症）、代謝疾患（例えば、糖尿病、肥満）、炎症疾患、がん、心血管系疾患（例えば、冠動脈疾患、高血圧、うっ血性心不全、心筋症、慢性腎不全）および感染症（例えば、ウイルス、細菌、原虫および薬剤耐性のメカニズム）を含み、これだけに限定されないが、これらの原因となる分子経路の小分子/タンパク質をスクリーニングすることである。アッセイは、同じアッセイが最初に細胞で使用され、疾患患者の生検組織での追跡検査が行えるようにデザインされる。有毒な可能性のある分子を同定するために、壊死アッセイがすべての分子に実施され得る。業界で標準の96ウェルのマイクロタイタープレートは、ハイスループットおよび超ハイスループットも除外されないが、表現型スクリーニングを実施するために十分なスケールを提供している。アッセイは細胞株、一次細胞培養、組織生検、組織モデル、インビボ動物モデル、または他の生物で実施され得る。好ましい実施例では、生物学的アッセイは、ヒト細胞株と組織を使って実施される。他の実施例によれば、生物学的アッセイは、細胞、組織、臓器またはいかなる種族の生物全体を使って実施され得る。これらのアッセイでリガンドがプールできるが、各表現型のアッセイは、1つのウェルに付き1種の分子に対し実施され、表現型の作用を隠すようなアゴニストならびにアンタゴニスト相互作用を避けることが有用である。アッセイでは、疾病細胞または組織を、疾病や治療反応に関連すると思われる遺伝子で豊富にさせるが、これだけに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0131】

がん、糖尿病、およびTGFによる細胞刺激などに対する標的分子同定への、本発明の適用が実施例に記載されているが、上述のアプローチはいずれの疾患、細胞刺激、生体調節物質（モジュレータ）または病態に対しても広く適用することができる。上述以外のアッセイまた、疾病に関連する他の分子経路のアッセイも使用できる。正常細胞や組織と相対的な疾病細胞、またはアゴニストやアンタゴニスト（またはそれらの一部）の存在する細胞内で、上方制御または下方制御される遺伝子を使ってこのアプローチを開始すると、特異性や良好な治療指数を持つ標的が豊富になる。この特異性を疾病病因の分子メカニズムと考え合わせると、治療に有用な標的が豊富となる。大きなライブラリから効率よい方法でヒット化合物を選択する、生化学的結合アッセイを順番に組み合わせ、またヒト疾病を反映する低スループット高品質表現型生物学的アッセイにおいてこれらのヒット化合物を使用すると、遺伝子機能を決定できる。

#### 【0132】

##### 5.2. 表現型から遺伝子型へ

別の一連の実施例において、本発明は、少なくとも1つの生物学的アッセイで多数の可能性のあるガンドをスクリーニングし、1つの生物学的アッセイで表現型の変化を生ずるリガンドを選択し、さらにそのリガンドを使用して標的候補物質をスクリーニングし、変化した表現型の原因となる特定の標的物質を同定する方法に関連する。様々な好ましい実施例で、個々のリガンド種は生物学的アッセイで別々にスクリーニングされる。生物学的アッセイで表現型に変化を与えるリガンドが、リガンド-標的相互作用を起こさせる条件下で多数の可能性のある標的に曝露され得る。本発明の様々な好ましい実施例において、標的はペプチドまたはタンパク質であり、各ペプチドや標的タンパク質はその標的をコードするポリヌクレオチドに關与している（例えば、ファージディスプレイまたは細胞表面ディスプレイ）。選択した標的とそれに対応するポリヌクレオチドが採取される。タンパク質の標的をコードするDNA配列が決定され、クローン化され、確認される。これら標的の示差的発現は、ヒト疾病組織生検、特に表現型の分子メカニズムが表現型に関連しているような組織で試験され得る。同様に、リガンドも、これらの疾病組織および/またはインビトロまたはインビトロの疾病モデルにおいて試験され得る。1つの実施例の概要を図2に示す。上述したように、5.1.1 ~ 5.1.5 の項で挙げた実施例はこれらのいずれの方法でも使用できる。

#### 【0133】

本発明によるハイスループット表現型細胞に基づくアッセイは、現在行われているハイスループットスクリーニング法と異なる。典型的なハイスループットスクリーニング法は、確認した標的の遺伝子がリポーターシステム（例えば、緑色蛍光タンパク質、ルシフェラーゼなど）によって細胞株に形質移入され、そのレポーターの活性から化学ライブラリのメンバーがスクリーニングされるという、メカニズムに基づくアッセイである。このタイプのスクリーニングを実施する代わりに、本発明では、1つの生物学的アッセイによる分子標的の予備的測定をせずに、細胞株における表現型の有意な変化を探すことに着目している。これらの生物学的アッセイは、重要な生体刺激物質または重要な発病メカニズムを調節するリガンドを探すことを目的としてデザインされている。限定のない実施例には、アポトーシス、増殖、虚血、壊死、炎症、線維症、浸潤、血管形成、代謝、感染および胚形成などが含まれる。さらに、多分化能効果を持つ細胞刺激物の個々の経路は、アンチセンス、転移ペプチド、抗体またはそれらの作用により特異的な標的を同定する他の技法によって、遮断することができる。この方法で本発明者らは、1つの生物学的アッセイからライブラリ（上述したような）のリガンドと表現型との関連性を得る。上記事項など、ただしそれだけに限定されないが、疾病の分子レベルメカニズムのアッセイは、ハイスループットスクリーニングに採用され得る。

#### 【0134】

癌の標的の同定に、本発明を適用することが本書で検討されているが、本発明はいかなる疾病、細胞刺激または病態に広く適用できる。生体刺激に関連した上述以外の他のアッセイ、さらに疾病または生物学に関連する他の分子経路のアッセイも使用できる。リガンドが対象とする特定の表現型変化に関連している生物学的アッセイを順番に組み合わせ、さらにこれらのヒット化合物を使って、タンパク質またはペプチドのディスプレイライブラリから標的分子を選択すると、標的の遺伝子をクローン化し同定できる。ヒト疾病組織における標的の示差的発現が、引き続き試験され得る。さらに、インビトロまたはインビボの生物学的アッセイにおけるリガンドの特異的作用から、生体への影響の調節あるいは特定疾患の治療における、そのリガンドの有用性が明らかにされ得る。

#### 【0135】

### 5.3. シグナル経路分子のマッピング

一旦、多くの遺伝子が発病の特定な分子経路に関連することが示されると、その標的分子は、相互に、さらに経路の既知メンバーに関連して分子経路内でマッピングされる。異なるタンパク質と結合するリガンドは、光活性化架橋剤で誘導体化され、経路中の各メンバーを位置づけるのに使用され得る。例えば、経路の1つのメンバーは最初に標識化される（例えば、GFP）。次に、架橋が可能な官能基を持つ誘導体化リガンドに、経路のメンバーが曝露される。続いて、その混合物が架橋刺激物に曝露される。最後に、経路内の選択されたメンバーが、標識化（例えば、GFP）によって採取され、それに会合するようになるなどの化合物も同定される。この段階が、前部のまたは後部の経路メンバーを同定するために、順番に繰り返され得る。これらの方法は、架橋に先立って、前もってリガンドの結合部位を同定したり、標的分子の二次または三次構造を決定する必要がない利点を有する。

#### 【0136】

経路メンバーは続いて、リガンドスクリーニングにおいて標的として使用され得る。各経路メンバーに選択的に結合する、各リガンドの表現型を比較することによって、他のメンバーと相対的な各メンバーの位置情報が得られる。この情報を利用して、特定の疾患適応症に対する最良の標的分子を確認・選択し、最終的に、薬理遺伝学に基づく診断を通してベストな治療法を選択し得る。

#### 【0137】

### 5.4. リード化合物の最適化

本発明は、リード化合物を最適化し、ヒットする割合を上げる方法を提供する。ここで、「リード化合物」とは、製薬的に好ましい特性を持つリガンドを意味する。好ましくは、そのリガンド分子は、技術的に「小さい」分子、例えば分子量が50~3000 ダルトンの

間の分子と考えられる。この方法は広い応用範囲を持っているが、タンパク質-タンパク質相互作用を妨害するリガンドを得るのに、特に有用である。

#### 【0138】

多数のリード化学物質が生化学的および表現型レベルで特徴付けられるので、構造活性相関が確認され、リード化合物の最適化の基礎となり得る。類似活性を持つ分子が同定されると、構造活性相関 (SAR) が決定できる。標的を目的とした合成技術を使用して、お互いに近くで結合している分子を架橋することができ、その結果、結合分子の活性が、タンパク質の同じサブサイトまたは、標的タンパク質の異なるサブサイトを通して仲介されるか否かが示される。1つの実施例で、分子の1つは光活性化架橋剤を含むかまたは、2番目の分子上の基と反応する反応基を含んでいる。この方法で、標的上で追加される別の機能を持つサブサイトがマップされ、異なるメカニズムを、これらのサブサイトで結合する分子による表現型の結果から解釈することができる (例えばアゴニスト対アンタゴニスト)。リガンド構造骨格上の1つの官能基にある光活性化架橋剤を使用して、標的と結合しているリガンドをリンクさせ、その結果標的分子をテンプレート (鋳型) として使用し得る。

10

#### 【0139】

この段階では、小分子A と小分子Bだけを混合することも、あるいは、標的と結合しない他の小分子の存在下で、A、B両分子を混合することができる。この条件下では、1つの官能基が保護され他は無保護であり、A、Bのどちらにも反応する二官能性基架橋剤が存在する。また、Aは、架橋剤と反応し、その生成物はBと反応する可能性がある。官能基として、アミン、カルボン酸、ニトリル、およびハロゲンがあるが、これだけに限定されず、あらゆる反応基が挙げられる。A、Bには同じまたは異なる官能基が存在してもよい。互いに反応する小分子A と B との1ペアについての1実施例において、Aはアミンの官能基を含み、Bはカルボン酸、活性化エステルおよび無水物、アシルハロゲン化物、またはアシル化またはアルキル化反応でアミドと反応する他の基を有する架橋剤を含む。リンカーは、2つの官能基のみを含むか、またはその官能基の間に1つの構成成分、ポリエチレングリコールなどを含むが、これに限定されない。代表的な保護基は、BOC、FMOC、またはベンジルのようなアミン保護基を含む。CBZ保護基を使用して、カルボン酸、ベンジルエステル、アリルエステル、およびニトリルを保護することができる。1つの実施例で、保護基は光活性化され、ニトロベンジルまたはアゾ基のような官能基を脱保護する。別の実施例では、タンパク質と反応しない官能基を含むリンカーと、タンパク質上に官能基を含まない化合物 (例えば、アミン類、カルボン酸類、アルコール、SH基など) が使用される。1つの実施例では、化合物はハロゲンを1つ (例えばCl) 含むか、またはハロゲンを1つ含むように修飾される。二重結合、三重結合、ハロゲン、または芳香族基を含むリンカーは続いて、Heckカップリング反応またはSuzuki 反応を通じてその化合物にリンクされ、その結果、タンパク質と反応せずにリンカーと化合物の結合が起きる。このような化合物はAldrich社から販売されている。リンカーおよび上述の反応の保護基はAdvanced ChemtechやNovobiochem、その他から販売されている。この結合は、好ましい実施例では、標的への結合親和性を2~100倍以上増大させ得る。そのため、高い親和性の優れたリード化合物が得られる。このアプローチを使用して、標的に着目した生体に関連する方法で、化学ライブラリの構造的多様性をさらに高めることができる。

20

30

40

#### 【0140】

### 6. 遺伝子型から表現型へ

#### 6.1. 実施例1：乳がん

##### 6.1.1. 標的物質

少なくとも1名の乳癌患者からまず生検を採取する。レーザー捕獲顕微解剖および、ANRNAまたはRT PCR をマイクロアレイ分析法と併用して、がん性細胞内で識別的に発現される遺伝子を単離し得る。例えば、これらの技法を使用して、同じ生検中に、非がん性細胞よりも2倍以上のレベルでがん細胞に存在する転写物を同定し得る。また、その遺伝子は非がん性細胞内では過剰発現され得る。また遺伝子として、試験患者の有意な画分からそ

50

のようなレベルで発現される遺伝子が選択され得る。

【0141】

組織はTissue Tek OCT 保存液 (VWR) に埋め込まれ、液体窒素で凍結し、低温槽で切断され得る。切片は、非コーティングガラススライド上で固定し、-80 で保存され得る。スライドは70%エタノール 中で30 秒間固定し、H&E で染色し、続いて70%、95%、および100%キシレン中で5秒間脱水し、さらにキシレンで5 分間脱水し得る。空気乾燥後、切片はPixCell I および II LCM システム (Arcturus Engineering) でレーザー捕獲顕微解剖され得る。形態学的に正常な乳房上皮細胞、悪性浸潤性乳がん細胞および悪性転移乳がん細胞 (例えば、腋窩リンパ節) の各  $5 \times 10^4$  が捕獲され得る。室温で接着細胞の付いた転移フィルムをイソチアン酸グアニジンに移動させ、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出し、イソプロパノール中で酢酸ナトリウムと  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  グリコーゲンによって沈殿させることによって、総RNAが、これらの細胞の各集団から単離され得る。続いてRNAペレットは、再懸濁され、RNASE 阻害物質 (Life Technologies) の存在下10ユニットのDNase (Gene Hunter) で37 で2時間処理され得る。再抽出と沈殿後、ペレットは  $27 \mu\text{L}$  のRNASE不含の水で再懸濁され得る。ANRNAまたはRT PCR が実施され、続いて配列決定され得る。ESTであるこの技法によって同定された配列を使用して、cDNAライブラリ (CLONTECH) からcDNAの全長を選択し得る。これらのcDNAは、罹患した正常でない細胞/組織に豊富に見られるが、それらの機能は未知であり得る。

【0142】

選択されたcDNAは、カルボキシ末端に挿入されたヘキサヒスチジン (6his)、および遺伝子のアミノ末端のグルタチオンシンセターゼ (GST) (各々にプロテアーゼ開裂部位を持つ) によってタグが付けられる。これらの遺伝子は、bipタンパク質リーダーによってショウジョウバエ発現系ベクター内でクローン化され、ハイグロマイシンベクターと共に  $\text{CaPO}_4$  によってショウジョウバエベクター内に共に形質移入され得る。細胞を選択培地に維持し、硫酸銅 (Invitrogen) を用いて遺伝子発現を誘導する。48 時間後、5-10 mg/L の各タンパク質を含む上清を収集する。その後、得られたタンパク質を最初の精製段階としてその上清よりNi(2+)-NTA クロマトグラフィーにより精製し、二段目の精製法としてグルタチオンアフィニティークロマトグラフィーを使用し、その後タグ開裂による特異的なプロテアーゼの除去が行われる。最高ミリグラム量の各タンパク質が回収される。

【0143】

6.1.2. 結合、リガンド - 標的対の選択、およびリガンドの同定

最大2百万個のリガンドを含む、多様な化学物質、天然物様物質およびペプチドの組み合わせライブラリが、液相中でプールされた様式で合成され得る。さらに、天然物ライブラリ (Terragen, Yonsei) および化学物質ライブラリ (Arqule, Coelocath) が購入され得る。1,000 ~ 10,000個のリガンドが最大  $100 \mu\text{L}$  中で  $1 \mu\text{g}$  のタンパク質と共に混合され、96ウェルプレートの1つのウェル内で  $1 \mu\text{M}$  の濃度となり得る。氷上で30分間インキュベーション後、試料は、カートリッジ付き96ウェルプレートに装填され、各ウェルにHPLC カラム (Waters 2790 HPLC) として操作され得る。最初のカートリッジ/カラムは、サイズ排除樹脂 (G25, Pharmacia) であり、樹脂中の非結合分子を保持するが、結合リガンドとタンパク質を通過させ得る。小型で狭いカラム (例えば、長さ2 mm x 直径5 mm のRocket Column, Biorad) を使用し、この操作の希釈を最小に留める。次に使用するカートリッジ/カラムは、疎水性または親水性逆相HPLC樹脂であり、その選択は、使用するリガンドライブラリの疎水性に依存する。例えば、疎水性C18シリカカラムは、疎水性が低いリガンドに使用され、親水性C8カラムは、より親水性の高いリガンドに使用され得る。別例として、疎水性または親水性どちらのリガンドにも使用され得る、Agilent 社のSB8Uカラムが挙げられる。逆相HPLCは、小分子とタンパク質を、樹脂に結合させることによりそれらを濃縮し、その後、小分子がタンパク質と樹脂から溶出され得る。小分子を含む溶出物は96 ウェルプレートで採取され得る。これらの溶出物は、続いて、質量分析計 (Micromass Quattro LC) に移動され、MassLynx、MAXENT ソフトウェア (Micromass) によってスペクトルが測定され得る。この方法は理論的にいって、1つのタンパク質に付き最大100個

のリガンドが逆重畳積分され、正確なライブラリのメンバーそのものが、鏡像異性体を除き同定され得る。特に、質量分析は化合物の同位体または分解パターンを検出するために使用でき、その同位体・分解パターンいずれも代替法として、または真の分子量と組み合わせ使用し、化合物を同定できる。さらに、IRまたはFTIR 分析を実施し、リガンドの官能基またはユニットが同定され得る。各リガンドが、続いて、合成されるか、または大規模スケールで合成され得る。ペプチドリガンドは、TAT形質移入配列で融合され得る。

【 0 1 4 4 】

同定されたリガンドの親和性はスクリーニングで使用するライブラリの濃度に一部に依存するが、少なくともナノモルまたはマイクロモル単位の範囲であるはずである。各リガンドの実際の親和性は競合試験で決定され得る。これらのリガンドは続いて、生物学的アッセイで試験され得る。

10

【 0 1 4 5 】

6.1.3. 生物学的アッセイ

cDNAががん細胞の示差的発現に基づいて選択される場合、リガンドは、アポトーシス、増殖、壊死、血管形成、炎症、または転移がん浸潤を検出・測定するアッセイで試験され得る。本発明によれば、アッセイは、ヒト疾病にできるだけ近く（例えば、病理組織の生検、インビトロ組織モデル、インビトロ疾病モデル、ヒト細胞株）、細胞株に基づきヒト病理試料の一次組織に容易に適用されるモデルからデザインされる。これらのアッセイは、がんに関与していることが知られている遺伝子bcl-2を導入したマウスの組織から、開発され得る。アッセイされ得るヒト乳がん細胞株は、MCF-7、NCI/ADR HS578T、MDA-MB-22231/ATCC、MDA-MB-4335、MDA-N、BT-549、T-47D（NCI、ATCC）である。他の細胞株と組織も使用され得る。生物学的アッセイの限定されない試料を表1に示す。

20

【 0 1 4 6 】

（表1）細胞株、ヒト組織生検、およびホストに移植されたヒト組織生検（例えば、ヌードマウス）

|         |  |
|---------|--|
| 病原メカニズム | 生物学的アッセイ[乳房、結腸、肺、および前立腺の細胞株(例えば、乳癌、MCF-7, NCI/ADR, HS578T, MDA-MB-22231/ATCC, MDA-MB-4335, MDA-N, BT-549, T-47D)]                                      |
| アポトーシス  | リガンドと1.5時間のインビトロインキュベーション、続いて、FITC AnnexinV染色、すなわち、DAPI染色核形態学的確認。  |
| 壊死      | リガンドと8時間のインキュベーション(ヌードマウスにおいて)、すなわちヨウ化プロピジウムまたはTOTO-3で生体色素染色、MTTアッセイで確認。   |
| 増殖      | リガンドと2時間のインキュベーション、続いて、FITC抗PCNAで染色、BRDUで確認。   |
| 血管形成    | ヌードマウスで腫瘍をリガンドとインキュベーション、フルオレセイン因子VIII関連抗原で染色し上皮細胞密度を測定、培養ヒト皮膚微少血管系上皮細胞の $\beta$ -FGFへの移動を確認。  |
| 炎症      | リガンドと2時間インキュベーションし、TNF, INF, IL-4, IL-2, IL-10, TGF $\beta$ , VCAM, ELISAによりN $\kappa$ Bを測定。   |
| 浸潤      | マトリゲル細胞浸潤房でCSFE色素で標識化した細胞を30時間インキュベーション、ヌードマウス試験で確認。   |
| 線維症     | リガンドと48時間インキュベーション後、フィブロネクチンELISAアッセイまたは免疫組織化学法の実施。  |
| 代謝      | インスリンとリガンドで2時間インキュベーションし、続いて、グルコース濃度を測定、すなわち、3T3-L1脂肪細胞株およびL6単球細胞株の試験後に、II型糖尿病を正常患者の脂肪生検と比較。   |
| 発生/分化   | リガンドをMHCクラスII-陰性細胞または単一の多能性ML-IC細胞のいずれかとインキュベーションし、Inaba K et al., 1993, PNAS 90:3038またはPunzel M et al., 1999, Blood 93:3750に従う細胞学および免疫学的技法による細胞運命の評価。 |

10

20

30

40

50

## 【0147】

## 6.1.3.1. アポトーシス

アポトーシスは、細胞膜ホスファチジルセリン結合色素 (FITC Annexin V、Cy5.5 のような別の色素も使用可) によって測定される。結合アッセイで同定された各タンパク質用を選択されたリガンドについて、色々な細胞株に対するアポトーシスが試験され得る。 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$  個の細胞を96ウェルプレートの各ウェルに入れ、 $1 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$  濃度の各リガンドを含む培養液がウェルに3ウェルづつ加えられる。少なくとも、陰性(リガンドなし)および陽性(bcl2 反応性リガンド)対照も実施される。1.5 時間後、FITC Annexin をウェルに加え、15分間細胞と共にインキュベートし、3回洗浄後、蛍光強度がプレートリーダーによって測定される。

## 【0148】

アッセイは、bcl-2 遺伝子導入マウス(Charles River)のbcl-2 発現細胞と組織を使用して、細胞から組織への移行が可能であることを実証し得る。アポトーシスを誘発するリガンドを、乳癌患者の採取直後の腫瘍生検によって試験し得る。一次組織生検を使用する利点は、組織採取後2時間以内、例えば組織が虚血に原因する変化を示す前に、アッセイが実施できることである。腫瘍生検の小片が96ウェルプレートに加えられ、上述と同じアッセイが各試料について2ウェルで繰り返される。蛍光強度を読みとった後、試料はDAPI (Molecular Probes, Eugene Oregon) 染色法によって染色され、細胞核の形態、つまり核の縮合および細分の確認のため、蛍光顕微鏡下で評価され得る。また、従来のTUNEL(末端デオキシヌクレオチド転移酵素の仲介によるピオチン化デオキシウリジン3リン酸ニック末端標識)法がDNAらせん構造の切断部を標識化するのに使用され得る。

## 【0149】

## 6.1.3.2. 増殖

細胞増殖は、増殖細胞核抗原（PCNA）に結合する、フルオレセインで標識化された抗PCNA抗体（例えば、PC-10、Santa Cruz Biotechnology）に、細胞を曝露させることによりアッセイされ得る。結合アッセイで同定した各タンパク質用を選択されたりリガンドについて、細胞株の増殖作用が試験され得る。 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 個の細胞が96ウェルプレートの各ウェル中に加えられ、各リガンドを $1 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ 含んだ培養液がウェルに3ウェルずつ加えられ得る。少なくとも、陰性（リガンドなし）および陽性対照も実施される。2時間後、FITC抗PCNAをウェルに加え、15分間細胞と共にインキュベートし、3回洗浄後、プレートリーダーを用いて蛍光強度が測定され得る。PCNAアッセイ法は細胞および組織中ですでに使用されている（Kulldorff Mら、2000、J. Clin Epidemiology 53:875）。増殖を阻害するリガンドは、乳がん患者の採取直後の腫瘍生検によって試験され得る。腫瘍生検の薄片が96ウェルプレートに加えられ、上述と同じアッセイが各試料について2ウェルずつ繰り返えされる。蛍光値を読みとった後、試料は、蛍光顕微鏡下で評価され、その増殖が本当に影響を受けている細胞が、がん細胞であることを確認し得る。細胞増殖を測定する第二のアプローチは、BRDUまたは $^3\text{H}$ -チミジン摂取を観察する従来法である。第三のアプローチによれば、細胞はCSFE色素（5、6カルボキシフルオレセイン2酢酸サクシニミジルエステル）で標識化され得る。細胞が7から8世代にわたり増殖すると、色素は希釈される。第四のアプローチでは、蛍光を使用したAttoPhosアッセイを利用し、内因性酵素酸性ホスファターゼを測定し、細胞数を測定する。増殖期決定のための7-ADD（7-アミノアクチノマイチンD）、またはKi67抗体による染色を含む、他の方法で増殖中の細胞を検出し得る。

10

20

## 【0150】

## 6.1.3.3. 壊死

壊死を検出する方法には、ヨウ化プロピジウムまたはTOTO-3のようなDNA結合色素による従来法があるが、これだけに限定されない。またミトコンドリア酵素の遊離を測定するメチルチアゾールテトラゾリウム（MTT）比色分析を使用して、細胞の生存度を決定し得る。本発明の好ましい実施例では、細胞生存度はDNA結合色素ヨウ化プロピジウムおよびTOTO-3で測定される。

## 【0151】

細胞株のこれらのアッセイを実行すると、壊死とアポトーシスを区別でき、このアッセイはまた、広く細胞毒性を示すリガンドと特異的な効果を持つリガンドとを区別するのにも役立つ。この区別は壊死とアポトーシスアッセイを同時に実行することで容易になり得る。結合アッセイで同定した各タンパク質用を選択したりリガンドについて、細胞株の壊死作用が試験され得る。 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^8$ 個の細胞を96ウェルプレートの各ウェル中に加え、各リガンドを $1 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ 含んだ培養液をウェルに3ウェルずつ加える。少なくとも、陰性（リガンドなし）および陽性対照も実施される。8時間後、ヨウ化プロピジウムまたはTOTO-3をウェルに加え、15分間細胞と共にインキュベートし、3回洗浄後、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度が測定され得る。

30

## 【0152】

壊死は、組織生検に移行させるのが難しいアッセイと思われる。その理由は、一般的に壊死は、少なくとも8時間後に測定され、その時点で組織生検中には虚血により多数の壊死が発生し、それが時間を経て高いバックグラウンドとして表れるからである。この問題を解決するために、ヒト生検組織をヌードマウスに移植し、その結果8時間のアッセイ中に起こる虚血により誘発される壊死を防ぎ得る。ヌードマウスにおける成長が腫瘍を変化させないことを確認するために、1ヶ月間ヌードマウスで成長した腫瘍を外植し、上述したように短期間のアポトーシスおよび増殖を試験し得る。腫瘍を組織学的に観察し、採取直後の腫瘍外植部と比較し、その差を評価し得る。同じ標的分子と結合し、50%の例で壊死を起こすリガンドを動物の腫瘍に注入し、8時間後に採取し、ヨウ化プロピジウムで染色し得る。組織学的検査は、腫瘍細胞では壊死が進行中であり、他の生検細胞では壊死は起

40

50

きていないことを示し得る。

【0153】

#### 6.1.3.4. 血管形成

血管形成の促進または抑制効果を試験するためにインビトロアッセイを使用し、培養したヒト皮膚微小血管内皮細胞の、 $-FGF$ またはウシ血清アルブミン（陰性対照）への移動を、阻害対照のアンジオスタチン濃度を増加し、また別なウェル中のリガンド濃度を増加することにより、測定する（Clonetics, San Diego; Polverini PJら、1991、Methods in Enzymology 198: 440）。血管形成もまた長期にわたるイベントであり、そのためヒト生検モデルではヌードマウスでの成長が絶対に必要である。将来、抗血管形成作用をもつリガンドが発見されるなら、腫瘍中へ毎日3 - 5日続けて注入し、その後その腫瘍を取り出し、抗原に関連する蛍光抗因子VIIIで染色し、内皮細胞密度を測定してそのリガンドをアッセイできるようになる。

10

【0154】

本発明では、血管形成の他のモデルも意図している。インビボモデルでは、それ上に試験分子を持つヒドロペレットを無血管ラットの角膜に移植する（角膜マイクロポケットアッセイ）。7日間の血管縁からペレットへの増殖を、タンパク質Aビーズ上の抗体により血管形成または抗血管形成タンパク質を取り除くことにより無効になる陽性反応としてそのスコアを付ける（Poverini PJら、1991、Methods in Enzymology 198: 440）。これらの血管の密度、長さ、および管腔サイズの特徴を測定できる。同様なアッセイが、マウスの眼においても実施できる（L Smith, Children's Hospital, Boston）。後肢虚血させたウサギのモデルを使って、血管形成分子を、インビボで試験できる（Shyu KGら、1998 Circulation 98:2081）。他のインビトロ組織モデル系では、未成熟な毛細血管に似ている管構造を形成する3次元培養の内皮細胞を含んでいる（Springhornら、1995、In vitro Cell Dev Biol Anim 31, 473; Sierra-Honigmann MRら、1998、Science 281:1683）。平滑筋細胞補充は、抗平滑筋アクチンの免疫組織化学によって測定できる。

20

【0155】

#### 6.1.3.5. 浸潤

腫瘍の浸潤は、マトリゲル（Matrigel）細胞外基質で被膜されたチャンパーである、細胞基底膜浸潤チャンパーを使用してアッセイされ得る。細胞外基質が使用するウェルを被覆し、24ウェルプレート中で1つのチャンパーと他方のチャンパーから分ける（Becton Dickinson Labware）。結合アッセイで同定した各タンパク質用を選択されたりリガンドについて、細胞株の浸潤作用が試験され得る。CSFE色素で標識化された細胞はFACSで測定されるか、インビボで細胞運命を追従するのに使用される。また、細胞は、 $^3H$ -チミジンまたは他のマーカーで標識化できる。約 $2 \times 10^5$ 個の標識細胞を各ウェルに加え、 $1 \mu M$ または $10 \mu M$ の各リガンドを含む培養液を、ウェルの上から半分に3ウェルづつ加える。 $CO_2$ 培養器でインキュベーションを30時間行った後、膜チャンパーの両側をDMEM/0.1%BSAで3回すすぎ、上部表面を綿棒でこする。ウェル底部にある色素量は、蛍光プレートリーダーを用いて定量され得る。陽性ウェル中の膜を切り取り、底部の細胞数を計測できる。このインビトロアッセイ中で腫瘍浸潤に影響を与えるリガンドは、ヌードマウスのヒト腫瘍生検の組織学分析によって、さらにインビボで試験され得る。

30

40

【0156】

#### 6.1.3.6. 発生および/または分化

細胞、組織、臓器または生体の発生および/または分化に対するリガンドの作用を試験するために、様々なアッセイが思索されている。限定のない実施例では、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスII陰性細胞か、単一多分化能骨髄リンパ開始細胞（ML-IC）のいずれかと共にリガンドをインキュベートし、さらにInaba Kら、1993、PNAS 90:3038またはPunzel Mら、1999、Blood 93:3750に従った細胞学および免疫学的方法により細胞発生運命が評価される。

【0157】

#### 6.2. 実施例2：糖尿病

50

末梢インスリン抵抗性は、II型糖尿病を引き起こす主な発病メカニズムであり、疾病による死亡原因の第4位であり、盲目、腎不全および切断の主要原因でもある。インスリンは、筋肉および脂肪細胞におけるグルコースの取り込み、肝および筋肉細胞におけるグリコーゲンの合成、脂肪細胞および肝細胞による脂肪生成、および肝細胞におけるグルコース生成の抑制などを促進させる。NIDDM（インスリン非依存性糖尿病）は、骨格筋および脂肪細胞へのインスリン刺激グルコース取り込みの障害、肝における糖新生の障害およびインスリン分泌調節障害の可能性などの特徴を有する。その経路は、部分的にしか分かっておらず、末梢インスリン抵抗性の原因となる分子は知られておらず、こういった状況は本発明の方法を適用するの適している

【0158】

インスリンは、そのインスリン二量体レセプタのサブユニットに結合して、レセプタの細胞質ゾルのサブユニットチロシンキナーゼ活性を誘発するように自身分子および近辺のタンパク質をリン酸化する。インスリンは、DNAおよびタンパク質合成、同化代謝経路の活性化および異化代謝経路の障害を起こす。IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, Gab-1 および p62 dok など一連のタンパク質すべてが、リン酸化インスリンレセプタと結合し、その基質となり得る。IRS-1 は、一番多くレセプタに関連しているように見えるが、これらのすべてが、ホスファチジルイノシトール3キナーゼの活性化物質であり、横紋筋/脂肪組織特異的グルコーストランスポーター-Glut 4 を、細胞質のゴルジ体から原形質膜に輸送させる。原形質膜では、グルコースが輸送され、その後ヘキソキナーゼによりリン酸化される。(Glut 2 は肝臓と膵臓の細胞に存在する)。インスリンはまた、グルコースをグリコーゲンに変換する最終段階を触媒するグリコーゲン合成酵素を上方制御するが、このシグナル経路の前半で欠損が起こると考えられている。

【0159】

肝臓および筋肉がグルコース代謝のほとんどを占めるので、本試験ではこれらの臓器からの細胞を使用する。糖尿病患者の筋肉生検は、健常人の筋肉生検と同様に、インスリンおよび/またはグリクラジドで刺激され得る。ここで健常人はおそらく患者の親族で、そのうち数人は糖尿病の顕在性症状を示さず、インスリンには完全に正常反応を示している。インスリン作用の欠損では顕在性疾患が先行し、糖尿病患者の非糖尿病親族に見られる。示差ディスプレイcDNAライブラリが、糖尿病患者および健常人から調製され得る。第二の示差ディスプレイcDNAライブラリが、インスリンおよび/またはグリクラジドで刺激された患者生検と、健常人の生検から調製され得る。これらのcDNAライブラリは、続いてタンパク質として発現され得る。発現したタンパク質と結合するリガンドは、本発明で記載されている方法によって、単離され得る（例えば、HPLC/質量分析）。

【0160】

リガンドは、インスリン刺激後のグルコース取り込み作用について、アッセイされ得る。3T3-L1 脂肪細胞およびL6筋細胞株(ATCC)は、グルコース代謝の細胞モデルとして使用され得る。 $2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 個の細胞を96ウェルプレートの各ウェル中に加え、既知濃度のグルコースと各リガンドを $1 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ 含んだ培養液を3ウェルずつ加え得る。少なくとも、陰性(インスリンなし、リガンドなし)および陽性(インスリン、リガンドなし)対照も測定される。次に低濃度および高濃度のインスリンがウェルに加えられ、CO<sub>2</sub>培養器でインキュベーションを2時間した後、グルコース値がグルコース計で測定され得る。細胞株内でのインスリン刺激後、グルコース代謝に影響を与えたりリガンドが、II型糖尿病患者の新鮮な骨格筋および脂肪組織生検を用いて、同じアッセイから試験され得る。組織生検より懸濁化した細胞が96ウェルプレートのウェル中に同じ密度で加えられ、各試料について上述と同じ方法が2ウェルずつ繰り返される。仮にリガンドが末梢インスリン抵抗性を減少させた場合、そのリガンドと遺伝子の組み合わせが、末梢インスリン抵抗の治療法として有用な標的となり得る。その標的は今後さらに試験され、インスリンの代謝的シグナル経路においてマップされ得る。

【0161】

### 6.3. 既知遺伝子の分子経路内標的の同定

10

20

30

40

50

上述のアプローチを使用して、多能性分泌タンパク質のシグナル経路内にある未知遺伝子の機能を同定確認し、組織特異的な方法で毒性作用から治療的応用効果を取り出し得る。TGF- $\beta$  1 は、多数の細胞種における強力な成長阻害物質としてよく知られており、またタイプ II TGF- $\beta$  レセプタ、Smad 2またはSmad 4 は、多数の癌細胞で変異することが知られている (Kim SJ, 2000, Cytokine Growth Factor Rev. 11: 159)。一部の腫瘍抑制遺伝子 (DPC4) はSMADファミリーのメンバーであり、T細胞免疫応答の強力なダウンレギュレーターである (Prud'homme GJ, 2000, J. Autoimmun. 14:23)。この成長阻害およびアポトーシス誘発経路調節を使用して、がん細胞の成長を阻害し、自己免疫中にT細胞の耐性を誘発し、TGF- $\beta$  経路の遮断によってがん抗原への耐性を破壊するような新規な治療薬が開発され得る。

10

#### 【0162】

こういった開発の限界要因の1つは、TGF- $\beta$  1 が細胞外基質の析出を誘発することであった (Massague, 1990, J Ann Rev Biochem 6:597.)。その析出には、フィブロネクチン、コラーゲン、プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1および基質メタロプロテアーゼの組織インヒビターを上方制御し、間質のコラゲナーゼのような基質分解プロテアーゼを下方制御する過程が含まれる。基質成分の過剰生産は、組織線維症における主な所見であり、腎臓および他の疾患を末期症状に導く重要な原因である。(Blobe GC, 2000, NEJM 342:1350)。フィブロネクチン生成の抑制はがんによく観察され、細胞接着を減少させ、転移を増大させる原因となる (Kornblihttら、1996、FASEB J 10:248)。c-jun N-末端キナーゼ (MAPキナーゼのファミリーメンバー、JNK) がcJUN (転写因子のAP-1 ファミリーメンバー) およびATF-2 (別の転写因子) を調節するように活性化されるSmad非依存性経路を通して、TGF- $\beta$  は、これらの作用をECM (細胞外基質) 上で誘発させる (Hocevarら、1999、EMBO J 18:1345)。TGF- $\beta$  の多能性効果はjunおよびsmad経路を別々に標的とすることによって、詳細に分析され得る。このために、ヒト一次T細胞および線維芽細胞を2分し、それらの細胞の半分が、アンチセンスjunまたはSMADを含むレトロウイルスで形質移入され得る。また、この移入は、異なるベクターで達成され、細胞がsmadまたはjunに反応性のあるペプチドで形質導入され得る。その結果得られた細胞株は、続いてTGF- $\beta$  によって刺激され、刺激を受けた細胞と受けない細胞間で示差的に発現されると思われるcDNAがクローン化され、いずれかの経路を持つ細胞が、マイクロアレイ解析または他の示差発現技法によって遮断され得る。一旦cDNAが1つの経路のみに関連する発現として同定されると (しかし、その機能は未知)、これらのcDNAは、タンパク質として発現され、そのタンパク質に結合するリガンドは、生化学的結合アッセイおよびHPLC分析と質量分析によって、単離され得る。細胞外基質の急増 (上述のPCNA に基づいたアッセイで) または分泌を遮断あるいは誘発する能力について、引き続きリガンドを試験できる。細胞外基質アッセイにおいて、48時間内で細胞外基質の主な成分であるフィブロネクチン沈着物が、96ウェルプレート上でフィブロネクチンELISAアッセイを用いて測定されるであろう。この方法で、遺伝子を同定でき、タンパク質の抗急増作用に関連するが、線維化促進作用には関連しない標的、またその逆の標的を確認することができる。同様なアプローチを使用して、細胞または組織刺激物質を観察し、分子経路の新たなメンバーを同定し、それらを薬物標的として確認し得る。

20

30

40

#### 【0163】

### 7.1. 表現型から遺伝子型へ

#### 7.1.1. 表現型の検出

6.1.3.1 項および6.1.3.2 項 で記載されている腫瘍細胞のアポトーシスおよび増殖アッセイを、例えば384ウェルプレート型を用いてハイスループットスクリーニングに適用し得る (Applied Biosystems FMAT 8100)。アポトーシスおよび壊死を同時にアッセイし得る。アポトーシスおよび壊死については、Cy5.5 Annexin V アッセイおよびTOTO 3 試薬をそれぞれ使用し得る (Applied Biosystems)。Cy5.5 標識化抗PCNA抗体 (PC-10、Santa Cruz Biotechnology) を、細胞増殖アッセイに使用し得る。アッセイされ得るヒト乳がん細胞株の限定されない例として、MCF-7、NCI/ADR HS578T、MDA-MB-22231/ATCC、MDA-

50

MB-4335、MDA-N、BT-549、T-47D (NCI、ATCC) が挙げられる。アッセイされ得るヒト前立腺がん細胞株の限定されない実施例は、DU-145、PC-3、LNCaPである。アッセイされ得るヒト大腸がん細胞株の限定されない例として、COLO 205、HCC-2998、HCT-15、HCT-116、H T29、KM12、SW-620が挙げられる。アッセイされ得るヒト肺がん細胞株の限定されない例として、A549/ATCC、EKVX、HOP-62、HOP-92、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H322M、NCI-H460、NCI-H522が挙げられる。1x10<sup>5</sup> ~ 1x10<sup>8</sup>個の細胞を384 ウェルプレートの各ウェル中に加え得る。1 pM ~ 1 M、好ましくは1 μM ~ 10 μM のリガンドライブラリ中の有望な各リガンドを含む培養液 (上述5.1.2 項でリストされている限定されない例) を試験するウェル中に3ウェルずつ加える。陰性 (リガンドなし) および陽性 (スタウロスポリン) の対照を含む。20 μM で表現型の作用を有するリガンドは、本発明によれば標的特定の優れた候補分子である。

10

【0164】

#### 7.1.2. 標的物質の特定

本発明の重要な利点は、従来技術と異なり、1つ以上の生物学的アッセイで作用を持つことが認められたリガンドの標的が、そのリガンドを用いて特定し得ることである。本発明によれば、標的を特定するのに使用し得るアプローチは多数存在する。

【0165】

最初の一連の態様では、可能性のある標的は、細胞表面上に表現されるタンパク質である。1つの限定されない例によれば、全長ヒトcDNAのライブラリは、pDisplayベクター (Invitrogen) 内で発現される。このベクターはタンパク質を標的とし、それを真核細胞表面上の細胞膜に固着させる。本発明の別の限定されない実施例では、全長ヒトcDNAライブラリは、pYD1酵母ディスプレイベクターまたはEBY100 出芽型酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 株に形質移入された類似ベクター内で発現される。さらに本発明の別な限定されない実施例では、全長ヒトcDNAライブラリは、バキュロウイルスベクターによる昆虫細胞の表面上で発現される (Ernst W ら、1998, *Nucleic Acids Research* 26:1718)。ペプチドの発現のみ起こさせる原核生物系とは反対に、これらの系では、全長タンパク質を表面で発現させる段階ができる。

20

【0166】

代替的態様では、ポリヌクレオチドライブラリを、ペプチド単独で、または1つの細胞またはウイルスの表面上の融合 (例えば、バクテリオファージT7またはM13) として発現できる。限定されない例は、ヒトまたは感染物質から作製されたポリヌクレオチドライブラリを含む。本発明の特異的な実施例で、cDNAは、pFliTrxベクター (Invitrogen) または類似ベクターにおいてドデカペプチドとして発現される。この実施例によれば、ベクターが大腸菌中で発現されると、ペプチドはチオレドキシタンパク質の活性部位ループおよび細菌フラジリン遺伝子内でディスプレイされる。本発明の別の実施例では、プロマイシンの処理により、ペプチドがそれをコードしているRNAに融合されるリボソームディスプレイ系で、有望な標的をペプチドとしてディスプレイし得る (Robert R W ら、1977, *PNAS* 94:12297)。本発明に従って、他のすべてのディスプレイ系 (レトロウイルス、アデノウイルスなど、しかしこれだけに限定されない) を利用して、cDNAまたはペプチドをディスプレイし得る。

30

40

【0167】

#### 7.1.3. 分離

上述のいずれの方法によってディスプレイされた有望な標的物質をリガンドに曝露し得る。リガンドを、表面、ビーズまたはカラム上に固定化されるか、または使用する分離方法に依存して溶液中に存在し得る。本発明の最初の実施例で、リガンドを、表面上で直接固定化、直接標識化、または検出され得る。本発明の第二の実施例では、これ以前の例で図解されているように、標的分子がディスプレイされているリガンド-標的分子対の採取を容易にするように、リガンドを親和性標識物質で誘導体化させ得る。このような親和性標識物質の限定されない例として、ビオチン、ジゴキシゲニン、または抗体が含まれる。リガンドと結合するディスプレイされた標的分子を、結合していない標的から分離し、そ

50

の標的をコードする配列を標準クローン化およびDNA配列決定法によって同定し得る。

【0168】

本発明の最初の態様で、細胞は、蛍光標識化されるかまたはビオチン化されたリガンドで「染色」され（後者は、FITC アビジンと結合）、フローサイトメーター（MoFlo HTS Cytometer, Becton Dickinson FACS）でプレートのウェルまたはチューブなどに分別される。この細胞は続いて、標準の細胞培養方法で増殖され得る。最初の限定されない例によれば、薬物レセプタをコードする遺伝子は、COS 1 細胞のプラスミドの回収から、複製のSV 40 起点に対する大型T抗原作用の効果を利用して、クローン化され得る。第二の限定されない例によれば、PCRがプラスミド挿入物を回収するために使用され得る。

【0169】

本発明の第二の態様では、細胞、ウイルス粒子またはペプチド-ヌクレオチド融合物が、薬物被覆磁気ビーズ、薬物被覆表面（例えば、パニング用ウェル）または薬物被覆カラムによって選択され得る。表面、ビーズ、またはカラム上の薬物リガンドは、低親和性相互作用における結合活性を増加させるために、高密度であることが好ましい。薬物は、親和性標識化合物（例えば、アビジン、ジゴキシゲニン）と通じて表面、ビーズ、またはカラムに付着し、1回以上の洗浄操作後溶出を達成し得る。磁気ビーズの場合、マグネットを使用し、洗浄中にビーズを単離し、結合細胞、ウイルス粒子またはペプチド-ヌクレオチド融合物を回収し得る。パニングの場合、ウェルで保持される細胞、ウイルス粒子またはペプチド-ヌクレオチド融合物に対する各連続洗浄操作を完了後、上清を注ぎながら捨てる。カラムの溶出は、標準的な方法で達成し得る。リガンドを親和性標識物質で誘導体化した場合、細胞、ウイルス粒子またはペプチド-ヌクレオチド融合物は、遊離の親和性標識物質をカラムに過剰に加えることにより、カラムから溶出し得る。

【0170】

標的発現細胞またはウイルスは一旦分離すると、適当に増殖できる。続いて、標的分子をコードするcDNAを標準的な分子生物学方法によって回収し得る（例えば、プラスミド回収またはPCR）。精製されたペプチド-ヌクレオチドの場合、cDNAの部分的配列がRT PCRによって、同定されるであろう。上述のアプローチによって、1回以上の選択を行い、標的を精製し、クローン化できる。この方法で、今まで未知であった薬物標的をコードするDNA配列を単離でき、その薬物標的をコードするcDNAをクローン化するのに使用できる。

【0171】

薬物標的をコードするcDNAを一旦同定すると、6.1項のように、疾病組織の細胞内の示差的発現を試験するのにcDNAを使用できる。標的が疾病と正常細胞間で示差的に発現されると、特異性が確立し、標的と相互作用するリガンドを、その疾病に対するインビトロおよびインビボの生物学的アッセイで試験し得る。

【0172】

そこで、表現型アッセイで機能に關与する標的を本発明を用いて同定する。

【0173】

## 7.2. プロテオミクスによる標的分子の同定

また、対象リガンドを複数の有望な標的と組み合わせるために6.1.2項で述べた方法を用い、リガンド-標的対を採取し、リガンドおよび標的を随意に解離させることによって、標的の同定を達成し得る。続いて、標的を同定し得る。本発明の1つの実施例で、標的は、一般的な方法（例えば、アミノ酸配列決定、質量分析および/またはNMR）によって同定され得るタンパク質である。タンパク質を一旦同定すると、標準のプロテオミクスによって疾病細胞との関連性を決定し得る。

【0174】

## 8.1. シグナル経路のマッピング

一旦、幾つかの遺伝子が発病の特定な分子経路に關与することが示されると、その標的成分を、他の分子経路の構成成分に關連して分子経路内でマッピングできる。異なる分子経路の構成成分に結合するリガンドは、光活性化架橋剤によって誘導体化され得る。少なくとも1つの既知分子経路の構成成分が、GFPのようなマーカーで融合される。以下示す物

10

20

30

40

50

質をインビボおよびインビトロで組み合わせ得る。(i) 既知分子経路の構成成分と結合する誘導体化リガンド、(ii) マークした経路の構成成分、例えば、GFP融合タンパク質、(iii) 別の分子経路の構成成分と結合あるいは結合する可能性のある、少なくとも1個の誘導体化リガンド、および(iv) 他の分子経路の構成成分。架橋を起こす刺激物質を適用して、得られる複合体の各成分を同定する。この方法で、各分子経路の構成成分を、分子が相互作用する他の成分に関連してマッピングし得る。本発明のさらなる利点は、経路エフェクターがこの方法によって同定され得ることである。さらに、各経路の構成成分のプロファイルが、もしあれば、その経路を通じて作用する既知薬物と比較し、さらに比較試験をその発病経路によって起こされる異なった疾病の細胞に基づいたアッセイで行うことができる。この情報は、特定の疾病適応に対し最適な標的を確認し選択するために使用できる。また代わりに、この情報は、特定の患者に対し、薬理遺伝学による最適な治療法を選択する場合にも使用し得る。

10

【0175】

#### 9.1. リード化合物の最適化

多数のリード化学物質が生化学的および表現型レベルで特徴付けられるので、構造活性相関(SAR)が確認され、リード化合物の最適化の基礎となり得る。類似活性を持つ2-3個の分子が同定されると、アッセイでその構造と活性を比較することによりSARを決定できる。標的に的を絞った合成技術を使用して、お互いに近くで結合している分子を架橋することができ、その結果、結合分子の作用が、タンパク質の同じサブサイトまたは、標的タンパク質の異なるサブサイトを通して仲介されるかを示すことができる。この方法で、標的上で追加される別の機能を持つサブサイトがマップされ、異なるメカニズムを、これらのサブサイトで結合する分子による表現型の結果から解釈することができる(例えばアゴニスト対アンタゴニスト)。

20

【0176】

標的分子に的を絞った合成の第二の利用法は、その標的に対するリガンドの親和性を増加し、その結果リガンドを、表現型を遺伝子型にリンクさせるのに役立て、より有効な薬物リード化合物にすることである。リガンド構造骨格上の1つの官能基にある光活性化架橋剤を使用して、標的と結合しているリガンドをリンクさせ、その結果標的分子をプレート(鑄型)として使用し得る。このリンクにより、標的分子への結合親和性が少なくとも2~10倍増大し、さらに標的分子に的を当てた生体関連方法でライブラリの構造多様性を強化することになる。

30

【0177】

#### 10. 表現型と遺伝子型をリンクするシリカ(IN SILICA)によるアプローチ

当該発明は、表現型を遺伝子型に関連づけるようにシリカ(in silica)でマッチする各リガンドまたはリガンドセットに対する、リガンド-標的(遺伝子型)およびリガンド-生物学的アッセイ(表現型)の化学的フィンガープリントを確立する方法を提供する。

【0178】

本発明は、リガンド-標的対の実験データを保存する第一情報検索システムを提供する。本発明は、試験した各生物学的アッセイ中の各リガンドの作用を保存する、第二の情報検索システムを提供する。本発明は、各標的の機能および/または発現パターンが、既知な場合、保存される第三の情報検索システムを提供する。これらのシステムは利用し易いように随意に統合され得る。

40

【0179】

本発明の1つの態様で、システムに入力されたデータは、すべての標的についてリガンドとの結合を試験するか、またはすべてのリガンドについて各生物学的アッセイで試験する、ショットガンアプローチによって得られ得る。例えば、標的セットは、最高全遺伝子までのすべての発現生成物まで、さらに選択した生物体のゲノム中の全遺伝子まで包括し得る。各標的は続いて、リガンドライブラリのスクリーニングを行うのに使用され、結合しているリガンドを同定する。このデータを第一情報検索システムに入力する。

【0180】

50

別の例によれば、リガンドの大規模組み合わせ化学ライブラリの各メンバーの作用が利用できる各々の生物学的アッセイで測定される。このデータを第二情報検索システムに入力する。

【0181】

本発明の別の態様では、特定疾患に対し選択された標的に結合する、または選択した生物学的アッセイで選択されたリガンドによって誘発された表現型に結合する、リガンドに絞った解析によって、システム入力されたデータが得られる。このデータを必要に応じて第一または第二情報検索システムに入力する。

続いて、これらのシステムを使用して、示差的発現データがないか、または特定の疾患に焦点を当てない場合でも標的機能を予測できるように導き得る。さらに、これらのシステムはユーザーを、特異的な作用を持つリガンドおよび標的を選択するように導き得る。さらなる利点は、本システムは必要な結合に関する実験および生物学的アッセイの数を減らし得ることである。他の利点は、熟練した技術者には明らかである。

10

【0182】

本発明の1つの態様で、ユーザーは対象標的を選択する。次に、ユーザーは、対象標的に結合するリガンドを、実験的にまたは第一情報検索システムから同定する。続いてユーザーは、同定したリガンドについて第二情報検索システムに検索要求をし、各リガンドに関連する表現型を決定する。この方法で、標的は1つ以上の表現型と関連づけられ得る。

【0183】

本発明の別の態様で、ユーザーは対象表現型を選択する。次に、ユーザーは、選択された表現型を調節するリガンドを、実験的にまたは第二情報検索システムから同定する。ユーザーは、同定したリガンドについて第一情報検索システムに検索要求し、リガンドが結合している標的を同定する。この方法で、表現型を1つ以上の標的と関連づけられ得る。

20

【0184】

本発明の別の態様では、これらの情報検索システムを、標的機能情報および/または発現解析データと組み合わせ、ユーザーが標的と薬物リード化合物を確認できるように導き得る。本実施例の最初の例で、ユーザーはタンパク質である標的XおよびYを選択し得る。Xをコードする遺伝子が正常細胞で発現されるが、腫瘍細胞で発現されないことを示す発現データを、ユーザーは得る。さらに、ユーザーは、Yをコードする遺伝子が正常細胞で発現されず、腫瘍細胞で発現されることを示す発現データを得る。続いて、ユーザーは第一情報検索システムに検索要求を行う。この検索要求の結果を表2に示す。

30

【0185】

(表2)

| 標的 | 結合リガンド |
|----|--------|
| X  | 1      |
| X  | 2      |
| X  | 3      |
| Y  | 2      |
| Y  | 3      |
| Y  | 4      |

10

20

## 【0186】

続いて、ユーザーは第二情報検索システムに検索要求を行う。この検索要求の結果を表3に示す。

## 【0187】

(表3)

| リガンド    | 表現型  |
|---------|------|
| 1, 2, 3 | 血管形成 |
| 2, 3, 4 | 増殖   |

30

## 【0188】

この例によれば、ユーザーは、がんの治療法用の有効な標的物質として標的Yを選択し、特異的にYと結合しXとは結合しない能力を有するリガンド4を選択し得る。従って、本発明は、標的を確認し、薬物リード化合物を同定するようにユーザーを導くことができる。

## 【0189】

本発明の第二の例では、表現型から遺伝子型へのアプローチを使用し、リガンド1、2、および3が生物学的アッセイでアポトーシスを誘発させること、リガンド3、4および5は、血管形成を刺激すること、およびリガンド1、3および6は壊死を誘発することを確認した。この情報は、情報検索システムに保存される。ハイスループット結合アッセイにおいて、リガンド3と4が $K_d < 50 \mu\text{M}$ で標的Xに結合することが認められた。情報検索システムによる検索は、熟練技術者に、(i) 標的Xは血管形成に関与し得ること、(ii) リガンド3は薬物リード化合物としては不十分な候補であること、および(iii) リガンド4は薬物リード化合物として優れた候補であることを示すことになる。

40

## 【0190】

11. 本発明方法の自動化

50

図18および19に図解したような高度に自動化されたアプローチは、本発明の別な実施例である。このアプローチには、化合物ライブラリからリガンドを決定するには量が不十分な場合でも、発現ベクターのハイスループット構築、タンパク質生成、および1週間に>20のタンパク質の生成を可能にする精製装置が含まれる。これに引き続き、化学アレイアッセイのようなハイスループットアッセイを行い、標的骨格構造の対を同定する。これらの標的骨格構造対は、図17に概略したような利用法を持つ化学アレイデータベースを構成する。

#### 【0191】

発現ベクターのハイスループット構築では、例えば、NCBI, Stratagene, または Incyte より得られるヒトプロテオーム内の1個のタンパク質をコードするcDNAを、96ウェル型の自動化液体処理システム (Tecan) を使用して、DES発現ベクター (Invitrogen) に挿入する。DES発現ベクターは、コードされたタンパク質に分泌シグナルとHisタグを加えるので、その結果、そのコードされたタンパク質は培養液中に分泌され、Hisタグと結合するニッケルカラムを使用して生成できる。ベクターは、続き形質転換受容性な大腸菌内に形質移入され、細胞が増殖される。この発現ベクターを、ロボット操作液体ハンドラーを用いて大腸菌細胞から抽出し、標準の溶解試薬を加え細胞を溶解させ、さらに溶解物をQiagenカラムに適用し発現ベクターを精製する段階ができる。特定な実施例において、QIAwell 96 Ultra Plasmid Kit を使用して溶解物を精製する。このキットでは、溶解物の除去にQia filter 96 ウェルプレート、プラスミドDNAの精製にはQIAwell 96ウェルプレートを、さらに QIAvac 96 自動吸引装置で各プレートを順番に脱塩するにはQIAprep 96 ウェルプレートを使用している。必要に応じて、適切な読み取りフレーム内でcDNAが挿入されている発現ベクターを含む細胞が、標準的な方法で選択される。例えば、発現ベクターは制限酵素で消化され、あるいはフレーム内にcDNA挿入を含むかを確認するために配列決定される。

#### 【0192】

挿入部を含む発現ベクターは続いて、リン酸カルシウムによる標準的な形質移入方法によってショウジョウバエS2細胞 (Invitrogen) に形質移入され、Select自動化組織培養システム (Automation Partnership) 中で、1ベクターにつき6~12個のフラスコ中のショウジョウバエ発現培養液 (Invitrogen) 内で増殖される。各Selectシステムで、最大150個のフラスコ、すなわち最大40個の異なるタンパク質を発現する細胞株を取り扱うことができ、同時に複数のSelectシステムを使用すると、1週間に600個のタンパク質まで処理量を増大できる。24時間後、硫酸銅を培養液に加え、タンパク質発現を誘発し、3日目と7日目に上清を採取し、Biorobot (Qiagen) 上の96 ウェル型のニッケルカラム (Qiagen QIAexpress タンパク質精製システム) 内に通す。続いて、SDS分析または他の品質管理分析 (Qc) を行うために、Tecan 液体ハンドラーによってこのタンパク質量がPHAST ゲル (Pharmacia) に移される。

#### 【0193】

残りの試料が、試薬保管検索システム (Haystack) によって、化学アレイアッセイ (例えば、本書に記載したいずれかのアッセイ法) および保存用フリーザーに移動する。例えば、ロボット操作液体ハンドラー (Tecan) を使用して、精製された標的タンパク質を候補リガンドのライブラリと組み合わせ、96 ウェルプレートのウェル内で1つ以上の候補リガンドを標的タンパク質に結合させることができる。続いて、標的タンパク質と候補リガンドを含むアッセイ混合物を96 ウェルプレートから注入し、リガンドが結合した標的タンパク質を単離するために同時に最大6 カラムまで運転可能なHPLC (Waters 2790) に、この96 ウェルプレートを移動できる。リガンドが結合した標的を含む画分がフラクションコレクタ (Gilson) によって採取される。代わりとなる実施例では、ロボット操作液体ハンドラー (Tecan) を使用して、精製された標的タンパク質を候補リガンドのライブラリと組み合わせ、96 ウェルプレートのウェル内で1つ以上の候補リガンドを標的タンパク質に結合させる。この96ウェルプレートは、例えば、標的タンパク質を未結合リガンドから分離させる樹脂を持つカートリッジを含んでおり、ロボット (TecanまたはQiagen) に

より全量を移動させ、結合リガンドと標的タンパク質を2番目の96ウェルプレート内に単離する。代替の実施例では、結合が96ウェルプレート内で起こり、続いて液体ハンドラー (Tecan) が試料を、分離用のカートリッジを含む2番目の96ウェルプレートへ移動させる。さらに別な実施例では、カートリッジは多ウェル型 (Pharmacia) で利用できるスピナカラムでもある。チップおよびキャピラリーLCを使用した分離方法も使用できる。洗剤または他の変性剤を液体ハンドラーで (Tecan) 加えて、結合リガンドをタンパク質から遊離させることができ、続いて、遊離リガンドを分析用の適切な機器に加える。例えば、リガンドは、自動インジェクタ (Waters) の付いたHPLCの逆相カラムによって、質量分析計に注入され、MALDITOF質量分析用にフィルター上にスポットされるか、またはNMR、IR、FTIR、またはUV分光計で測定される。代替の実施例では、結合リガンドを伴う標的タンパク質を、液体ハンドラー (Tecan) によって、96ウェル型MALDITOF質量分析計 (Bruker Daltonics) に装填するか、スポットする。別に代わる実施例では、結合リガンドを伴う標的タンパク質が、ロボット操作による吸引により、96ウェル型プレートのフィルター (例えば、ニトロセルロース) へ全量移動される (Tecan)。別の実施例では、この同じフィルター上への吸引を、フィルターをカートリッジと真空装置との間に置き、96ウェルカートリッジの吸引と同じ操作で実施する。続いて、MALDITOF質量分析計により、96個の各スポットから標的タンパク質とリガンドが解離し、化合物および/または複合物の質量スペクトルが生成する。本書で述べた情報システムによるデータ処理後、リガンドとその標的の同定結果が化学アレイデータベース (Chemical Array Database) に入力される。これらの方法のいずれも、384、1536 (個) ウェル、チップ使用、または他の型で実施できる。同様に、いずれのデータも、IDBS Activity BaseまたはPrice Waterhouseに基づく検査室情報管理システム (LIMS) または、他のLIMSソフトウェア/システムによって、入力管理できる。

10

20

30

40

50

#### 【0194】

HEK293細胞、CHOまたはCOS細胞を含む、他の一過性発現に基づく生産系に、同様な方法を適用できるが、これに限定されない。また、ローラーボトルシステム、攪拌タンクシステム (例えば、Celligen Plus社、New Brunswick) またはキャピラリー細胞培養システム (Amicon) のような、他の自動化または半自動化生産システムも使用できる。別の実施例では、New Brunswick社の1 L以上のバイオリアクターのような半自動段階を使用し、上述のようにベクターのpCDNAファミリー (Invitrogen) に基づいて構築した発現作成物が一過的に形質移入されたHEK293細胞 (Life Technologies) のような細胞を増殖させる。一過的に形質移入されたCHO細胞も使用できる。これらの細胞種の形質移入は、Lipofectamine 2000 (Life Technologies) を使用して効率よく実施できる。代替の実施例において、他の形質移入方法が使用される (例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム、リポフェクチン、Lipofectamine Plus (Life Technologies) または他の標準技法)。これらの細胞は、DMEM、または他の血清含有標準培養液や血清不含の標準方法で増殖される。さらに、Invitrogen社のカタログ、他のベクター企業、科学文献に記載されているような様々な細胞株に適切なベクター、または熟練技術者に明らかなベクターなど、別の発現ベクターも使用される。

#### 【0195】

必要に応じて、クローン化選択操作を実行し、その結果、生産システムに基づく安定な生成細胞株が得られる (例えば、CHOまたは大腸菌ベースのシステム)。代表的なクローン化選択操作には、多ウェル型で、例えばゲネチシンのような選択性抗生物質の存在下、細胞を増殖させ、発現ベクターを含んでいそうな細胞を選択する段階、および標準のELISAアッセイまたはタンパク質中のHisタグを検出するための他の標準アッセイによって、各ウェル中の分泌タンパク質の存在を確認することが含まれる。

#### 【0196】

さらに、ハイスループット生産およびスクリーニング技法は、本発明のいずれの方法にも使用できる。例えば、いかなる結合アッセイ (チップ、フィルター、放射同位体標識化、蛍光、表面プラズモン共鳴法など)、生産方法 (例えば、CHO、HEK 293、Cosのような哺乳

乳類の細胞、ショウジョウバエのような昆虫の細胞、大腸菌のような細菌、またはピチア (pichia) のような酵母)、生産システム (例えば、バイオリアクター (Brandel社のNew Brunswick システム、フラスコ使用、細胞キューブ、表面結合、懸濁培養、血清含有培養液、または血清不含培養液)、およびいかなる精製法 (Hisタグ/ニッケルカラム、GST/グルタチオン、インテイン、または他の親和性カラム) も使用できる。これらの自動化および/またはハイスループットのいずれの方法も、複数ロボットシステム (Automation Partnership社の複数Selectロボットのよう) のようなマルチシステム動作で同時に実行できる。例えば、2、4、5、6、8、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 個またはそれ以上の標的を同時にアッセイし、標的に結合するリガンドを選択できる。同様に、2、5、10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、または $10^9$ 個以上の関心対象の小分子を同時にアッセイし、小分子と結合する標的分子を選択できる。

10

【0197】

#### 他の実施例

前述の記載から、様々な利用および条件に本発明を適用するために、本書に記した本発明に変更および修飾を行い得ることは明らかである。そのような実施例は、また、特許請求の範囲内にある。

【0198】

様々な刊行物および特許出願が本書で引用されており、その内容は、各独立した刊行物および特許出願が参考文献として組み込まれることを具体的に個々に示す場合と同じ程度に、本明細書に参考としてその全体が組み込まれる。

20

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1】「遺伝子型から表現型へ」のアプローチの概略を示す。

【図2】「表現型から遺伝子型へ」のアプローチの概略を示す。

【図3-1】マイクロモル単位の親和性を持つ特異的リガンドを単離し抽出する、P38 MAPキナーゼの能力を図解した一連のスペクトルを示す。

【図3-2】マイクロモル単位の親和性を持つ特異的リガンドを単離し抽出する、P38 MAPキナーゼの能力を図解した一連のスペクトルを示す。

【図3-3】マイクロモル単位の親和性を持つ特異的リガンドを単離し抽出する、P38 MAPキナーゼの能力を図解した一連のスペクトルを示す。

30

【図4-1】P38 MAPキナーゼ濃度依存性による86002ピークの減少と、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離におけるキニンピークのごく僅かな減少を表す、一連のUVスペクトルを示す。

【図4-2】P38 MAPキナーゼ濃度依存性による86002ピークの減少と、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離におけるキニンピークのごく僅かな減少を表す、一連のUVスペクトルを示す。

【図5】混合物から抽出され、p38 MAPキナーゼから遊離した化合物が、86002であると同定されたことを表す一連の質量スペクトルを示す。

【図6-1】10種混合物中の各化合物とその分子量のリストである。

【図6-2】10種混合物中の各化合物とその分子量のリストである。

40

【図7-1】P38の濃度依存性の86002ピークの減少と、コルヒチンピークあるいは、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離中、混合物中の他の化合物を表すピークの、ごく僅かな減少を明らかにした一連のスペクトルを示す。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度に86002の特徴を示すピークが生じた。

【図7-2】P38の濃度依存性の86002ピークの減少と、コルヒチンピークあるいは、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離中、混合物中の他の化合物を表すピークの、ごく僅かな減少を明らかにした一連のスペクトルを示す。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度に86002の特徴を示すピークが生じた。

50

【図7-3】P38の濃度依存性の86002ピークの減少と、コルヒチンピークあるいは、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離中、混合物中の他の化合物を表すピークの、ごく僅かな減少を明らかにした一連のスペクトルを示す。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度に86002の特徴を示すピークが生じた。

【図8-1】チューブリン濃度依存性のコルヒチンピークの減少と、86002ピークあるいは、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離中、混合物中の他の化合物を表すピークの、ごく僅かな減少を表した一連のスペクトルを示す。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度にコルヒチンの特徴を示すピークが現れた。

10

【図8-2】チューブリン濃度依存性のコルヒチンピークの減少と、86002ピークあるいは、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離中、混合物中の他の化合物を表すピークの、ごく僅かな減少を表した一連のスペクトルを示す。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度にコルヒチンの特徴を示すピークが現れた。

【図8-3】チューブリン濃度依存性のコルヒチンピークの減少と、86002ピークあるいは、遊離化合物からのタンパク質結合化合物のHPLC分離中、混合物中の他の化合物を表すピークの、ごく僅かな減少を表した一連のスペクトルを示す。タンパク質画分を採取し、質量スペクトルを測定すると、そのスペクトルには、他のピークよりもはるかに高い強度にコルヒチンの特徴を示すピークが現れた。

20

【図9】100種混合物中の各化合物とその分子量のリストである。

【図10-1】P38 MAPキナーゼが、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からマイクロモルの親和性を持つ1つのリガンド(86002)と結合し、抽出することを表した一連のスペクトルを示す。

【図10-2】P38 MAPキナーゼが、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からマイクロモルの親和性を持つ1つのリガンド(86002)と結合し、抽出することを表した一連のスペクトルを示す。

【図10-3】P38 MAPキナーゼが、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からマイクロモルの親和性を持つ1つのリガンド(86002)と結合し、抽出することを表した一連のスペクトルを示す。

30

【図11-1】チューブリンが、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からのヒット化合物(コルヒチン)と結合し、抽出することを表した一連のスペクトルを示す。

【図11-2】チューブリンが、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からのヒット化合物(コルヒチン)と結合し、抽出することを表した一連のスペクトルを示す。

【図11-3】チューブリンが、特異的な濃度依存性様式で、100種の混合物からのヒット化合物(コルヒチン)と結合し、抽出することを表した一連のスペクトルを示す。

【図12】標的タンパク質を100種混合物中の非結合化合物から、高流速で良好に分離されることを表した一連のUVスペクトルを示す。

【図13-1】非結合化合物から標的タンパク質に結合した化合物を分離する、スピンカラムの能力を表した一連のスペクトルを示す。この方法を使用して、チューブリンに結合した100種混合物から主な化合物としてコルヒチンを同定する。

40

【図13-2】非結合化合物から標的タンパク質に結合した化合物を分離する、スピンカラムの能力を表した一連のスペクトルを示す。この方法を使用して、チューブリンに結合した100種混合物から主な化合物としてコルヒチンを同定する。

【図14】化学アレイアッセイの1つの実施例段階を表した図を示す。

【図15】代表的なコンピュータ配置図を表す。

【図16】試料中の化合物同定のために本発明の1つの実施例で使用する代表的なフローチャートを示す。

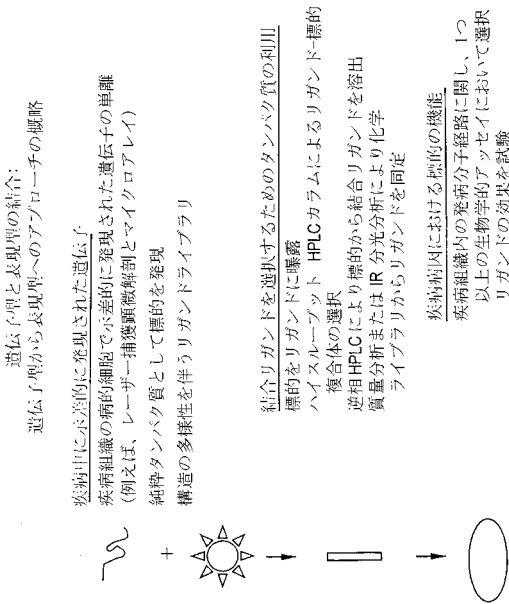
【図17】ヒトプロテオームの化学的フィンガープリントを生成するのに使用され得る、化学的骨格と標的タンパク質との組み合わせを表したグラフを示す。

50

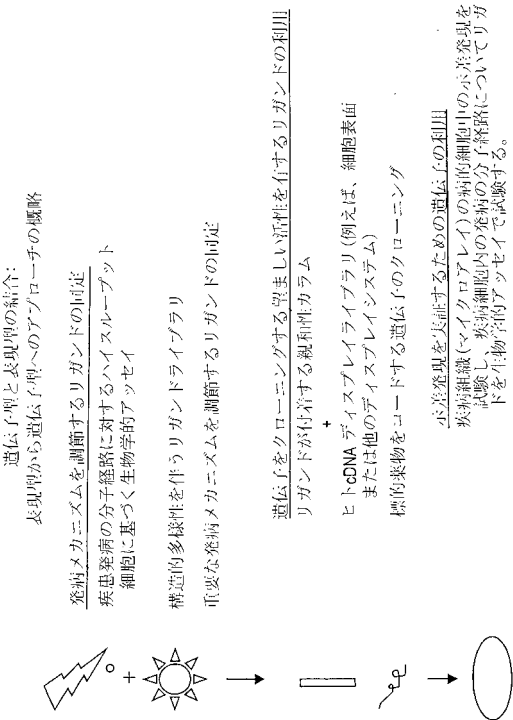
【図18】リガンド/標的対を生成するための本発明の自動化ハイスループット方法の1つの実施例の図解を示す。

【図19】自動クローニングおよび生成システムによって、1週当たり約600個の割合で約3年間にわたり、ヒトプロテオーム中の約90,000個の各タンパク質を約2 mgハイスループット生産するための1つの実施例の図解を示す。

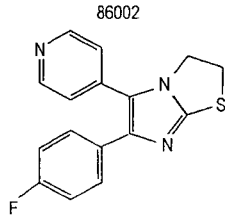
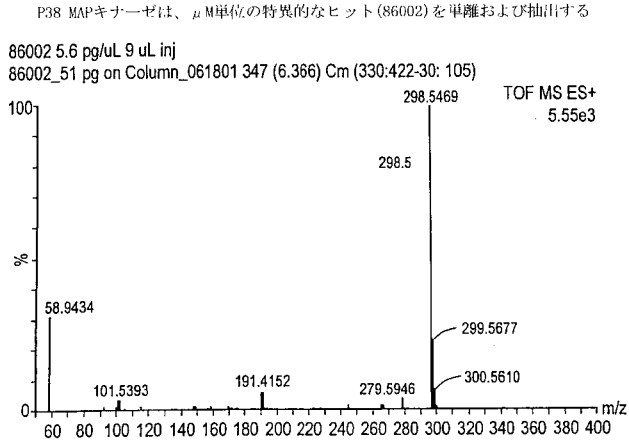
【 図 1 】



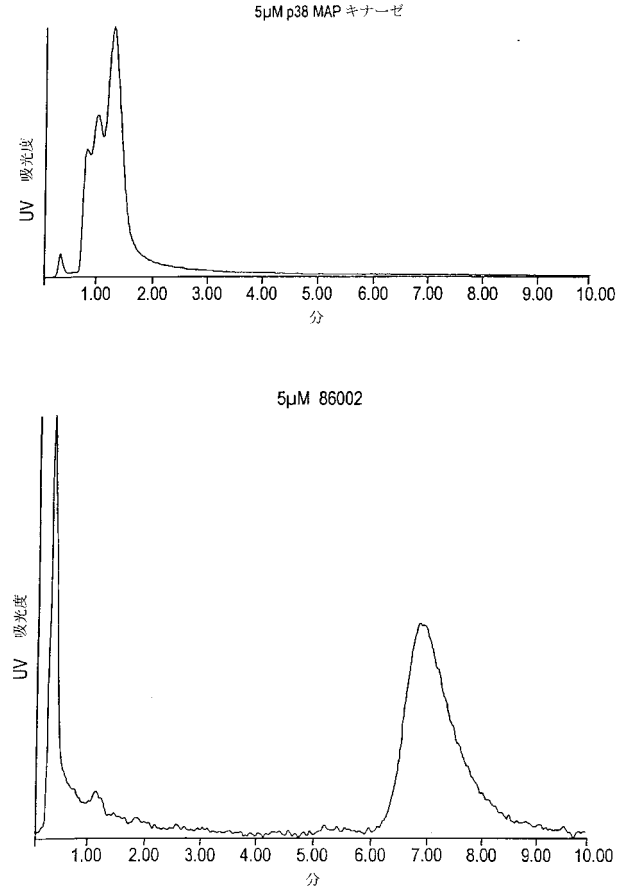
【 図 2 】



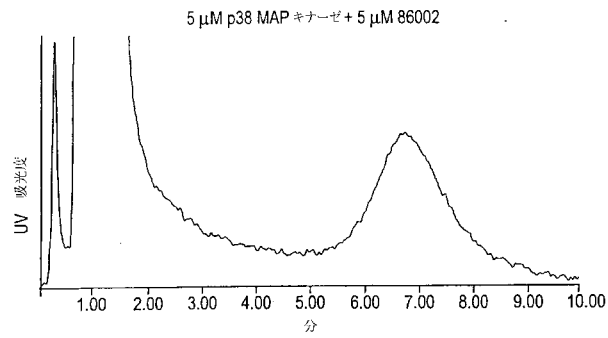
【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

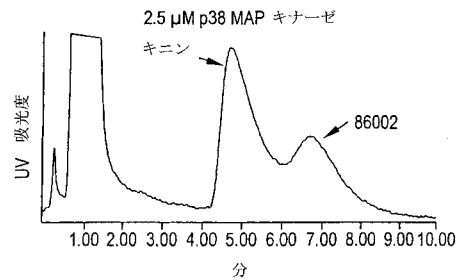
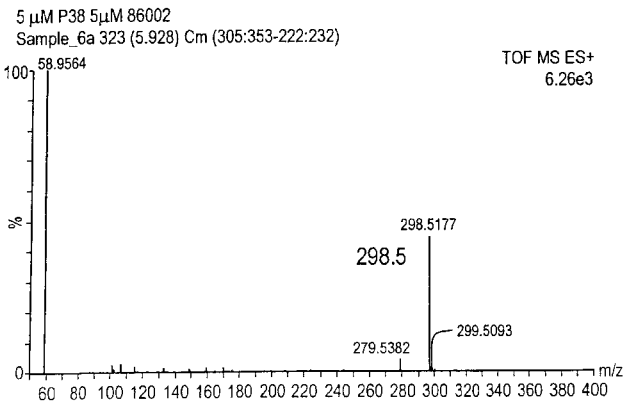
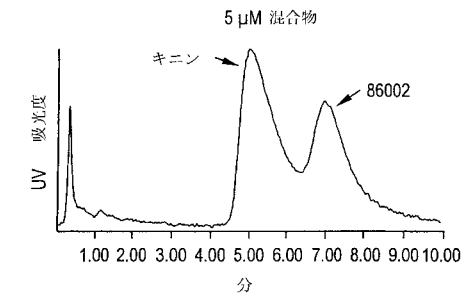


【 図 3 - 3 】

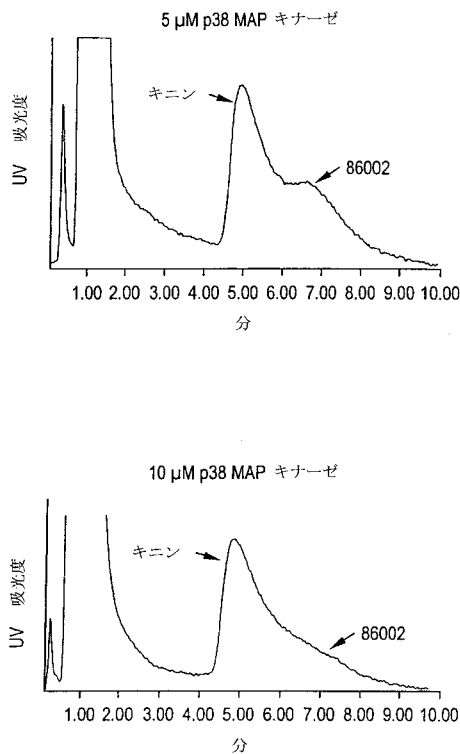


【 図 4 - 1 】

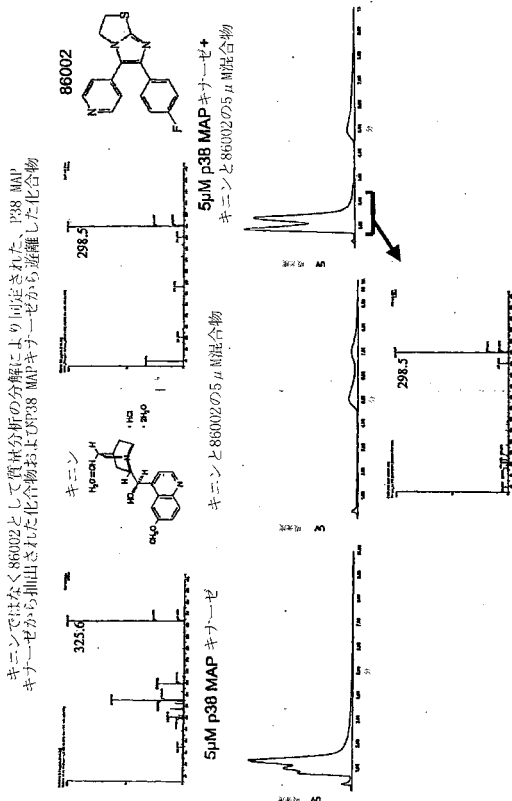
P38 MAPキナーゼは、濃度依存的様式で、非特異的対照(キニン)ではなく $\mu\text{M}$ 単位のヒット(86002)に結合し、抽出する



【 図 4 - 2 】

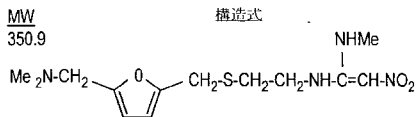


【 図 5 】

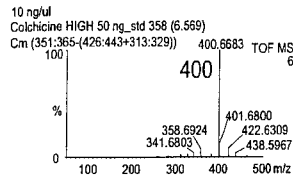


【 図 6 - 1 】

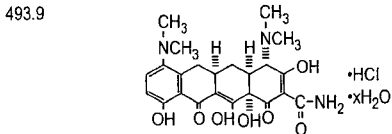
10種類の化合物の混合物  
化合物  
ラニチジン



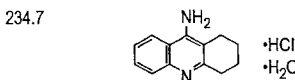
コルヒチン



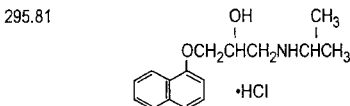
ミノサイクリン



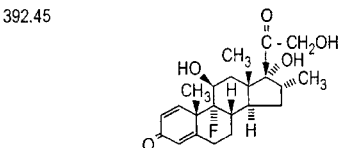
タクリン



プロプラノロール

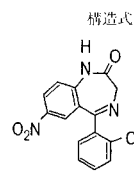


デキサメタゾン

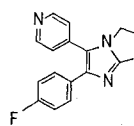
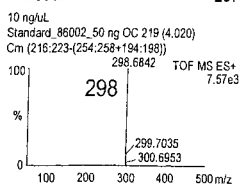


【 図 6 - 2 】

化合物 MW  
クラサゼパム 315.72



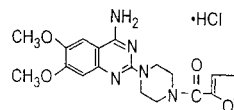
86002 297.4



ペンタクロロフェノール 226.34

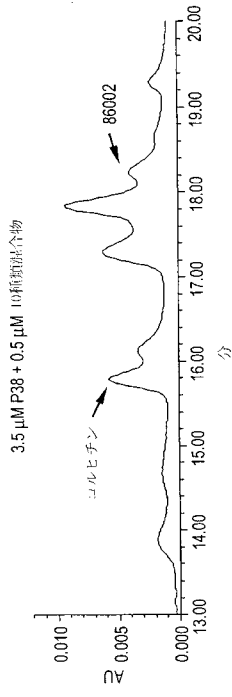
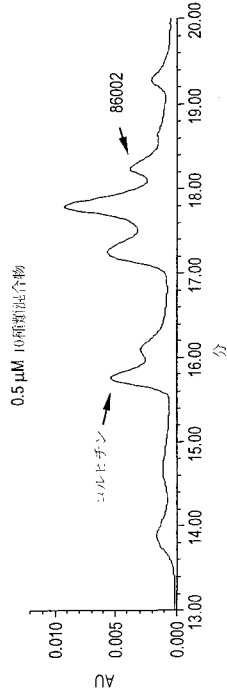


プラゾシン 419.9



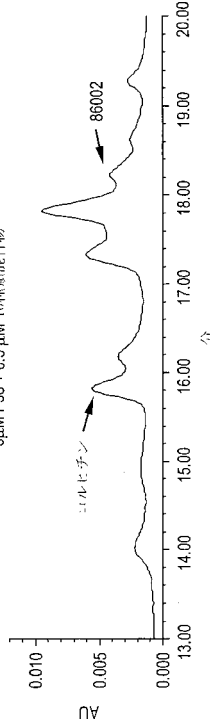
【 図 7 - 1 】

P38, MMAキナーゼは、特異的かつ濃度依存的な様式で、10種類の化合物混合物由来の $\mu\text{M}$ 単位のヒット (86002) と結合し、抽出する。



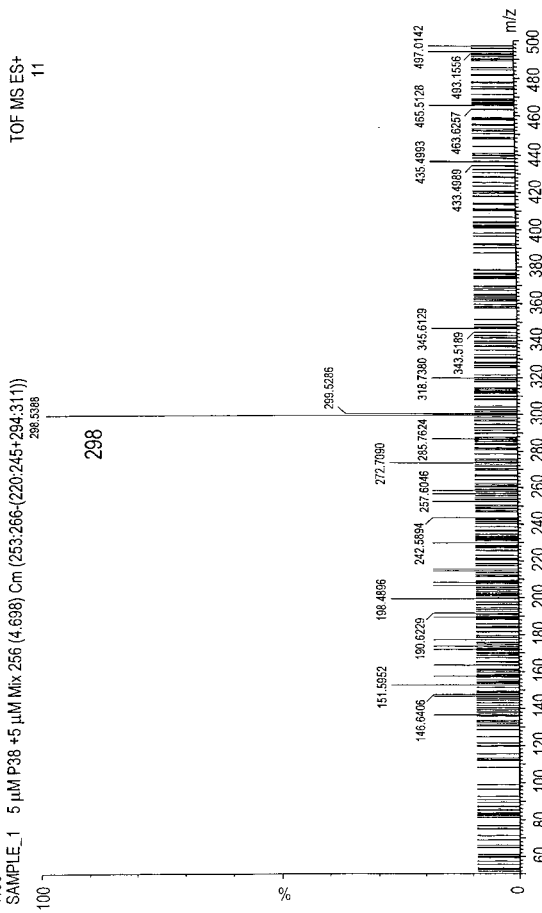
【 図 7 - 2 】

5 $\mu\text{M}$  P38 + 0.5  $\mu\text{M}$  10種混合物



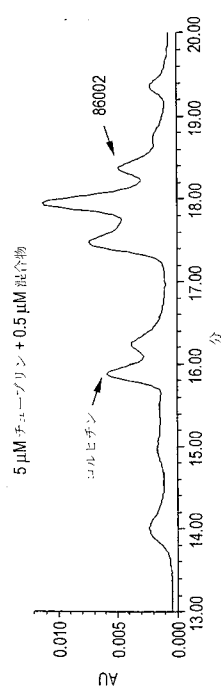
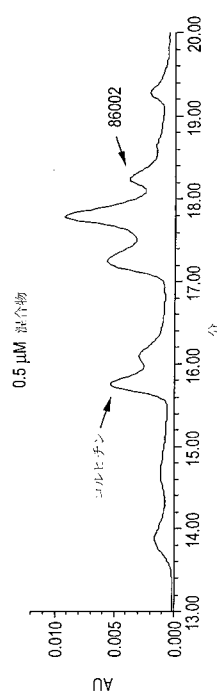
【 図 7 - 3 】

7/30  
 SAMPLE\_1 5  $\mu\text{M}$  P38 + 5  $\mu\text{M}$  Mix 266 (4.698) Cm (253:266-(220:245+294:311))  
 298.5388

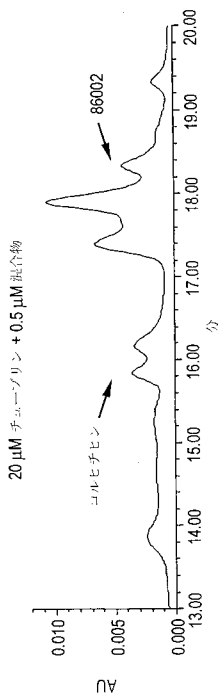


【 図 8 - 1 】

チューズリンは、特異的かつ濃度依存的な様式で、10種類の化合物由来のヒット (コルヒチン) と結合し、抽出する。



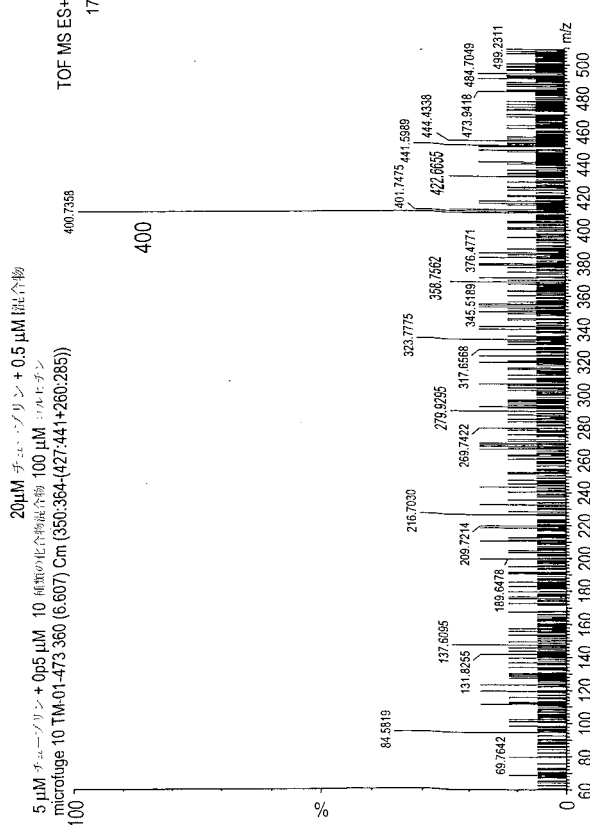
【 図 8 - 2 】



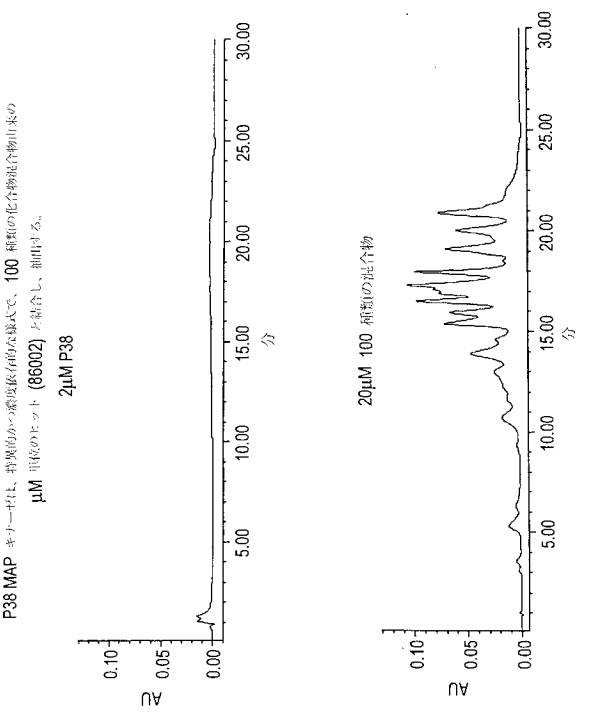
【 図 9 】

| 化合物名  | 分子量    | 保留時間   | 化合物名   | 分子量    | 保留時間   | 化合物名   | 分子量    | 保留時間   |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| コルヒチン | 350.9  | 370.33 | チューブリン | 148.75 | 330.7  | チューブリン | 148.75 | 330.7  |
| コルヒチン | 369.43 | 822.94 | チューブリン | 355.33 | 324.44 | チューブリン | 355.33 | 324.44 |
| コルヒチン | 463.9  | 343.47 | チューブリン | 780.95 | 144.18 | チューブリン | 780.95 | 144.18 |
| コルヒチン | 234.7  | 290    | チューブリン | 358.44 | 163.18 | チューブリン | 358.44 | 163.18 |
| コルヒチン | 295.81 | 454.46 | チューブリン | 594.7  | 286.74 | チューブリン | 594.7  | 286.74 |
| コルヒチン | 392.45 | 162.14 | チューブリン | 455.35 | 308.8  | チューブリン | 455.35 | 308.8  |
| コルヒチン | 315.72 | 321.16 | チューブリン | 308.37 | 286.32 | チューブリン | 308.37 | 286.32 |
| コルヒチン | 297.4  | 246.3  | チューブリン | 255.32 | 286.32 | チューブリン | 255.32 | 286.32 |
| コルヒチン | 226.34 | 392.47 | チューブリン | 388.32 | 286.38 | チューブリン | 388.32 | 286.38 |
| コルヒチン | 419.9  | 357.8  | チューブリン | 360.45 | 271.8  | チューブリン | 360.45 | 271.8  |
| コルヒチン | 195.6  | 252.27 | チューブリン | 382.5  | 1200   | チューブリン | 382.5  | 1200   |
| コルヒチン | 299.7  | 416.59 | チューブリン | 275.34 | 276.2  | チューブリン | 275.34 | 276.2  |
| コルヒチン | 510.4  | 346.3  | チューブリン | 324.44 | 270.72 | チューブリン | 324.44 | 270.72 |
| コルヒチン | 351.3  | 265.6  | チューブリン | 252.3  | 284.76 | チューブリン | 252.3  | 284.76 |
| コルヒチン | 375.9  | 313.9  | チューブリン | 270.8  | 288.7  | チューブリン | 270.8  | 288.7  |
| コルヒチン | 764.95 | 454.84 | チューブリン | 129.16 | 285.33 | チューブリン | 129.16 | 285.33 |
| コルヒチン | 684.8  | 451.0  | チューブリン | 248.26 | 260.27 | チューブリン | 248.26 | 260.27 |
| コルヒチン | 331.35 | 480.9  | チューブリン | 399.88 | 313.3  | チューブリン | 399.88 | 313.3  |
| コルヒチン | 265.1  | 236.27 | チューブリン | 345.8  | 299.36 | チューブリン | 345.8  | 299.36 |
| コルヒチン | 254.3  | 445.5  | チューブリン | 323.13 | 264.33 | チューブリン | 323.13 | 264.33 |
| コルヒチン | 352.8  | 209.3  | チューブリン | 515.87 | 345.9  | チューブリン | 515.87 | 345.9  |
| コルヒチン | 326.8  | 316.9  | チューブリン | 146.15 | 300.74 | チューブリン | 146.15 | 300.74 |
| コルヒチン | 232.2  | 232.37 | チューブリン | 444.43 | 226.27 | チューブリン | 444.43 | 226.27 |
| コルヒチン | 318.1  | 189.6  | チューブリン | 240.8  | 314.45 | チューブリン | 240.8  | 314.45 |
| コルヒチン | 205.29 | 248.33 | チューブリン | 230.27 |        | チューブリン | 230.27 |        |

【 図 8 - 3 】

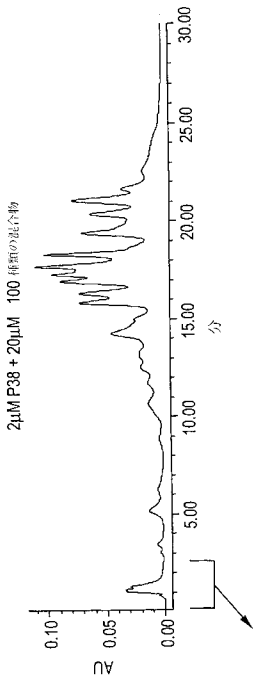


【 図 10 - 1 】

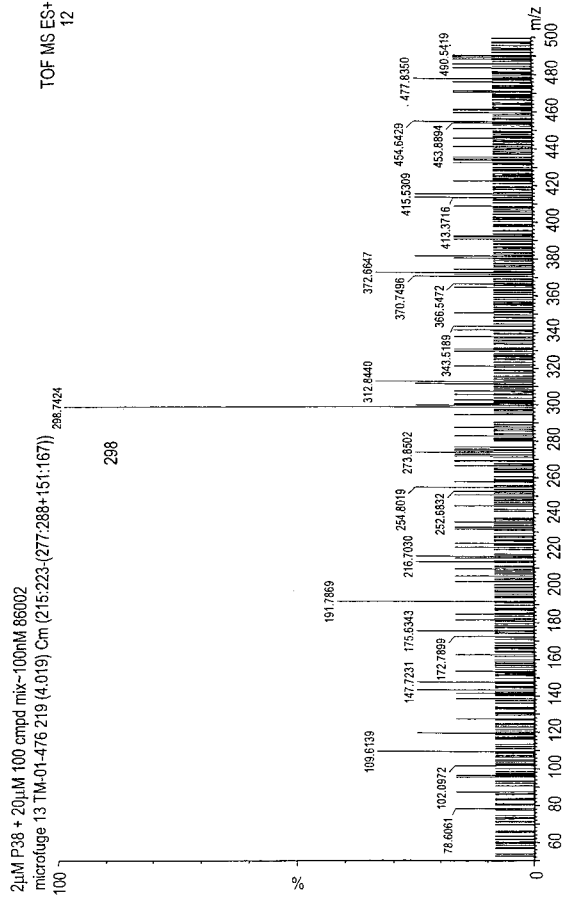


P38 MAP キナーゼは、特異的かつ濃度依存的な様式で、100 種類の化合物混合物由来の μM 単体のピット (86002) と混合し、抽出する。

【 10 - 2 】

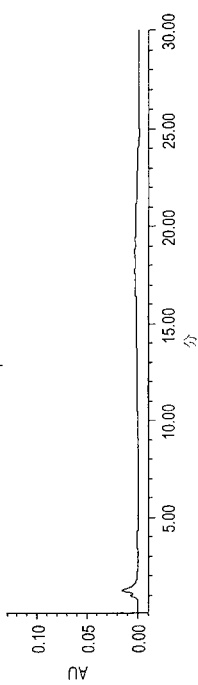


【 10 - 3 】

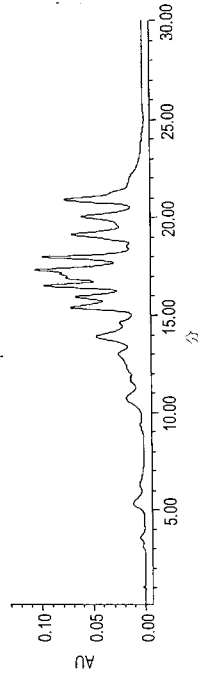


【 11 - 1 】

チューブリンは、物質的かつ濃度依存性な様式で、100種類の化合物混合物由来の  
レット (コルヒチン) と結合し、抽出する。  
5 $\mu$ M チューブリン

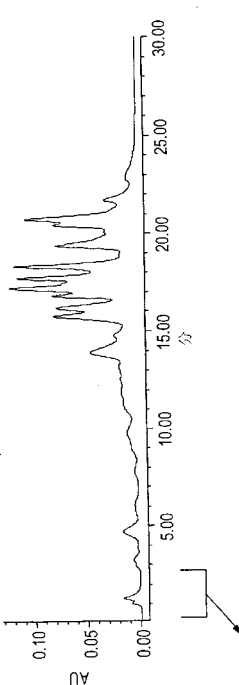


5 $\mu$ M 100 種類の混合物

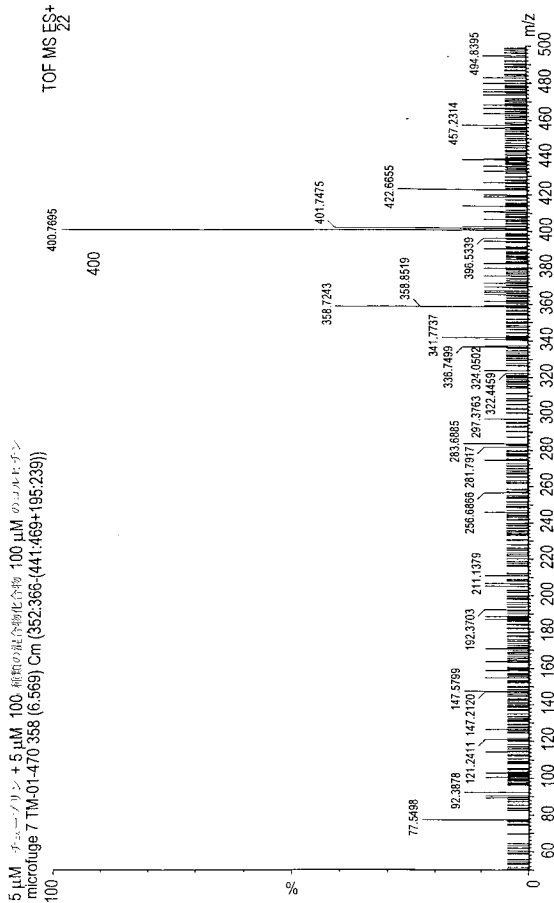


【 11 - 2 】

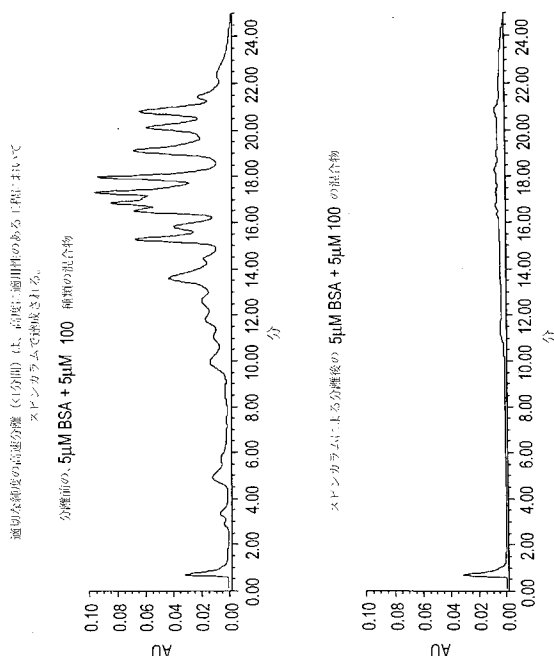
5 $\mu$ M チューブリン + 5 $\mu$ M 100 種類の混合物



【 1 1 - 3 】

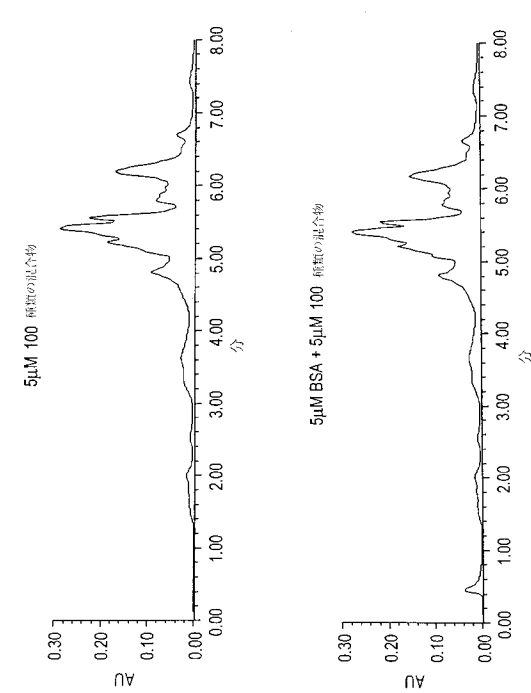


【 1 3 - 1 】

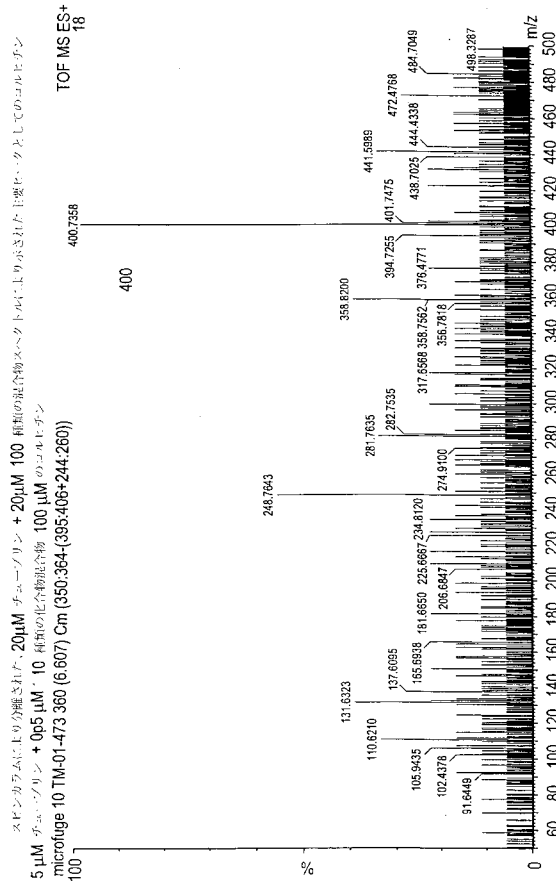


【 1 2 2 】

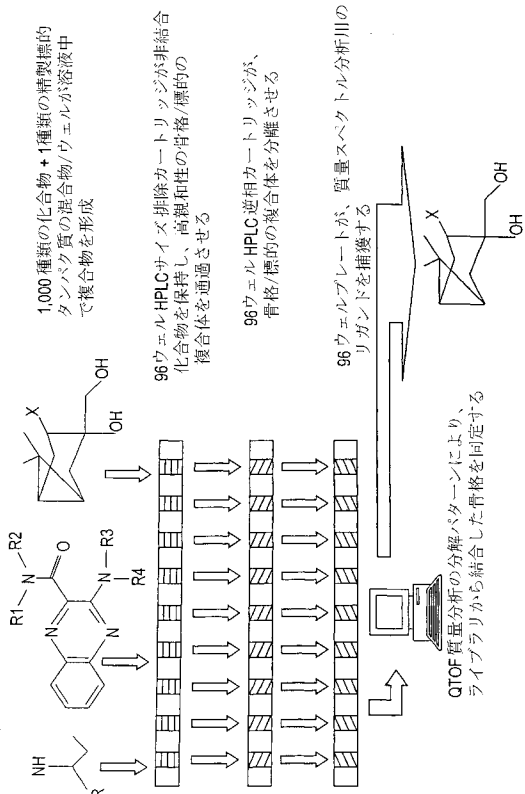
100種類の化合物混合物由来の標的タンパク質の長短体分離もまた、高流速で達成される。



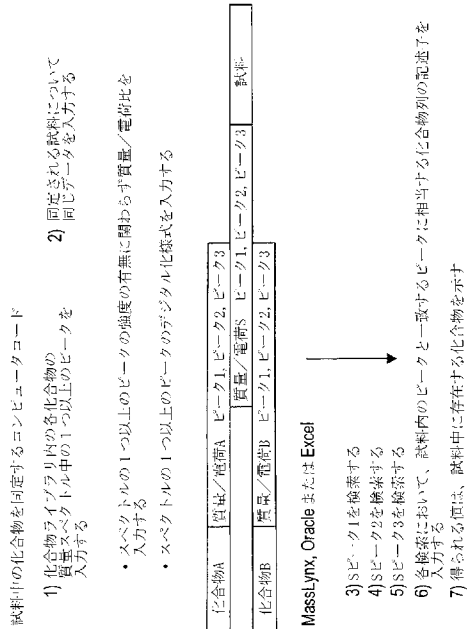
【 1 3 - 2 】



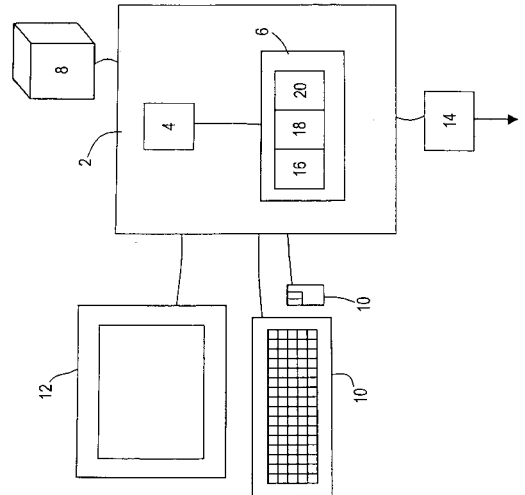
【 図 1 4 】



【 図 1 6 】



【 図 1 5 】



【 図 1 7 】

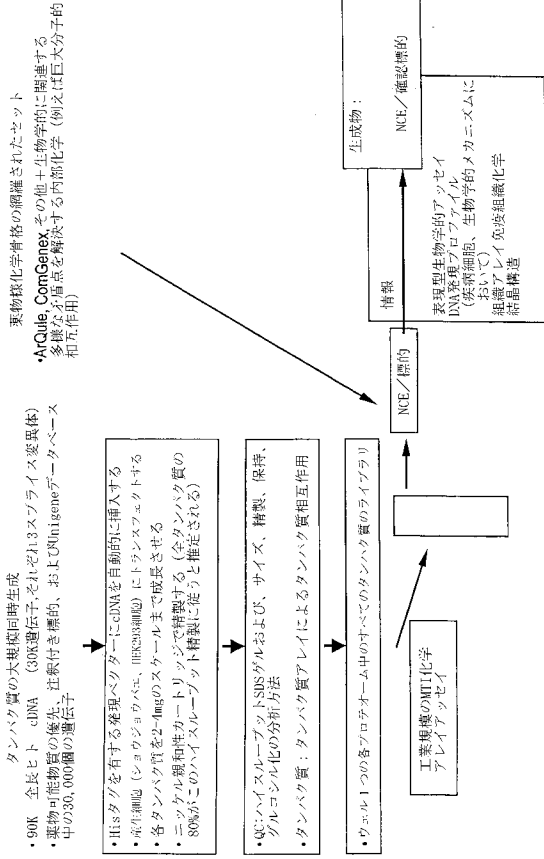
|      | 変異体1 | 変異体2 | 変異体3 | 変異体1 | 変異体2 | 変異体3 | 変異体1 | 変異体2 | 変異体3 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 遺伝子1 | +    | +    |      |      |      |      |      |      |      |
| 遺伝子2 |      |      |      | +    | +    |      |      |      |      |
| 遺伝子3 |      |      |      |      |      | +    | +    | +    |      |
| 遺伝子4 |      |      |      |      |      |      |      | +    |      |

試料のために使用される

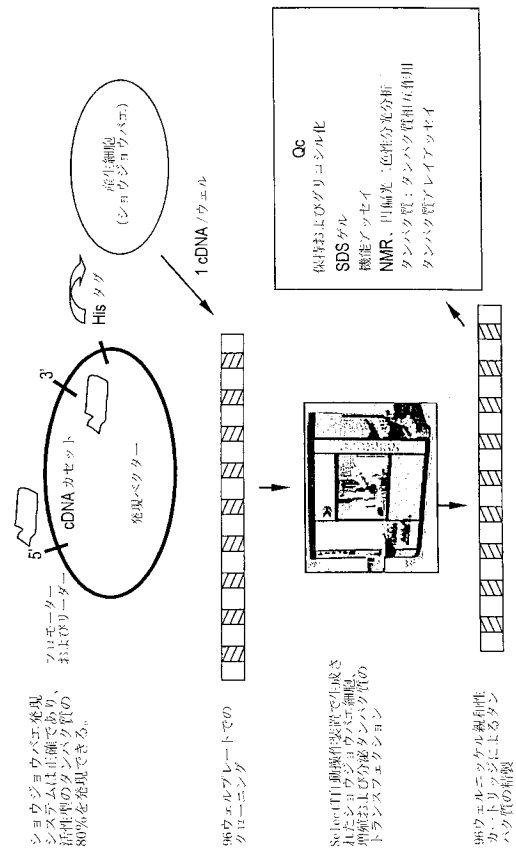
- 標的の骨格の特殊性
- 骨格の局所性
- 特定の生物学的または病理学的なために化合物を同定する
- 特定の化合物の作用の類似となる同位体を選択する
- 最も類似した骨格を持つ化合物を選択する
- 最も類似した骨格を持つ化合物を選択する

- 標的の骨格の特殊性
- 骨格の局所性
- 特定の生物学的または病理学的なために化合物を同定する
- 特定の化合物の作用の類似となる同位体を選択する
- 最も類似した骨格を持つ化合物を選択する
- 最も類似した骨格を持つ化合物を選択する

【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



---

フロントページの続き

| (51)Int.Cl.          |                  | F I     |       |  | テーマコード(参考) |
|----------------------|------------------|---------|-------|--|------------|
| <b>G 0 1 N 33/50</b> | <b>(2006.01)</b> | G 0 1 N | 33/50 |  | Z          |
| <b>G 0 1 N 33/53</b> | <b>(2006.01)</b> | G 0 1 N | 33/53 |  | D          |

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA20 QQ79 QR77 QR80 QS38  
4H045 AA20 BA10 CA40 EA50 FA74 GA26

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 靶分子功能的测定和药物先导化合物的鉴定方法   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2008054683A</a>   | 公开(公告)日 | 2008-03-13 |
| 申请号            | JP2007233019  | 申请日     | 2007-09-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 扫描兰兹艾尔弗雷德·E   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | Surantsu艾尔弗雷德·E   |         |            |
| [标]发明人         | スランツアルフレッドイー  |         |            |
| 发明人            | スランツ アルフレッド イー.   |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C12Q1/02 C07K11/16 C07K14/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N27/62 A61K31/055 A61K31/138 A61K31/165 A61K31/341 A61K31/4439 A61K31/4709 A61K31/517 A61K31/5513 A61K31/573 A61K31/65 C07K1/22 G01N33/566 G01N33/68 G06F17/30 G06F19/00 G06F19/18 G06F19/28  |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6803 G01N2500/00 G16B20/00 G16B50/00 G16C20/50 G16C20/90   |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.A C12Q1/02 C07K11/16 C07K14/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA25 2G045/FA27 2G045/FA36 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ79 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS38 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 |         |            |
| 代理人(译)         | 清水初衷  |         |            |
| 优先权            | 60/249832 2000-11-17 US<br>60/329463 2001-10-15 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于确定靶向化学配体的功能并鉴定药物先导化合物的方法。 解决方案：使用功能未知的目标物质，然后从化学物质库中选择一个分子以用于分析。 通过生物化学结合测定将化学文库的成员与蛋白质混合，然后在生物学或病理学条件下，对结合成员进行体外或体内（顺序或同时）的生物学测定，基因功能由可测量的表型变化决定。 在生物测定中诱导表型变化的化学物质可用于确定目标物质的身份。 在至少一种生物学检测中筛选大量潜在的配体，选择在一项生物学检测中产生表型变化的配体，然后使用该配体筛选靶标候选物，确定造成表型改变的特定目标物质。 [选择图]无

|         |  |
|---------|--|
| 病原メカニズム | 生物学的アッセイ [乳房、結腸、肺、および前立腺の細胞株 (例えば、MCF-7, XCL/ADR, HS578T, MDA-MB-2231/ATCC, MDA-MB-4335, MDA-N, BT-549, T-47D)]  |
| アポトーシス  | リガンドと1.5時間のインキュベーション、続いて、FITC AnnexinV染色、すなわち、DAPI染色核形態学的確認。   |
| 増殖      | リガンドと8時間のインキュベーション (ヌードマウスにおいて)、すなわちヨウ化プロピジウムまたは10T0-3で生体色素染色、MTTアッセイで確認。  |
| 血管形成    | リガンドと2時間のインキュベーション、続いて、FITC抗PCNAで染色、BRDUで確認。   |
| 炎症      | ヌードマウスで腫瘍をリガンドとインキュベーション、フルオレセイン因子V111関連抗原で染色し上皮細胞密度を測定、培養ヒト皮膚癌少血管系上皮細胞のβ-PGFへの移動を確認。  |
| 浸潤      | リガンドと2時間インキュベーションし、TNF, INF, IL-4, IL-2, IL-10, TGFβ, VCAM, ELISAによりKc199を測定。  |
| 浸潤      | マトリゲル細胞浸潤層でCFSE色素で標識化した細胞を30時間インキュベーション、ヌードマウス試験で確認。   |
| 神経症     | リガンドと48時間インキュベーション後、フィブロネクチンELISAアッセイまたは免疫組織化学法の実施。  |
| 代謝      | インスリンとリガンドで2時間インキュベーションし、続いて、グルコース濃度を測定、すなわち、3T3-L1脂肪細胞株およびC3H10T1/2細胞株の試験後に、11型糖尿病を正常患者の脂肪生検と比較。  |
| 発生/分化   | リガンドをMHCクラスII-陰性細胞または単一の多能性3D-IC細胞のいずれかとインキュベーションし、Inaba K et al., 1993, PNAS 90:3038またはPanzel M et al., 1999, Blood 93:3750に従う細胞学および免疫学的技法による細胞運命の評価。 |