

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-512012
(P2004-512012A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	2 G O 5 4
G O 1 N 21/76	G O 1 N 21/76	4 B O 2 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78 C	4 B O 6 3
G O 1 N 33/48	G O 1 N 33/48 M	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 131 頁) 最終頁に続く

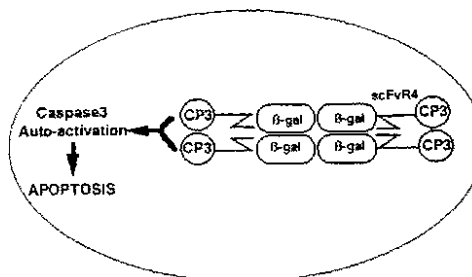
(21) 出願番号	特願2001-572878 (P2001-572878)	(71) 出願人	597166578 メディカル リサーチ カウンシル イギリス国 ダブリュ1エヌ 4エイエル ロンドン, パーク クレセント 20
(86) (22) 出願日	平成13年4月4日 (2001.4.4)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成14年10月4日 (2002.10.4)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/001540	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02001/075453		
(87) 国際公開日	平成13年10月11日 (2001.10.11)		
(31) 優先権主張番号	0008256.0		
(32) 優先日	平成12年4月4日 (2000.4.4)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	0008254.5		
(32) 優先日	平成12年4月4日 (2000.4.4)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞検出法

(57) 【要約】

本発明者らは、細胞が検出可能なシグナルを発生するように誘導する方法を記載する。本発明の方法は、構成要素を含む細胞を得る工程と、第1のレポーターおよび第2のレポーターを得る工程であって、前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとの安定な相互作用によって検出可能なシグナルの発生を得る工程とを含む。前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを前記構成要素に結合させることによって、前記構成要素への前記レポーターの結合により前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを安定に相互作用させ、シグナルを発生させる。シグナルは、好ましくは、細胞致死機構の活性化である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ある構成要素を含む細胞を提供する工程と、
(b) 第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターを提供する工程であって、前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターとの安定な相互作用によって検出可能なシグナルが発生し、
(c) 前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターとを前記構成要素に結合させることによって、前記構成要素への前記レポーターの結合により前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターを安定に相互作用させ、シグナルを発生させる工程とを含む細胞が検出可能なシグナルを発生するように誘導する方法。

10

【請求項 2】

(a) 第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターを提供する工程であって、前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターとの安定な相互作用によって、検出可能なシグナルが発生し、
(b) 前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターを細胞内のある構成要素に結合させることによって、前記構成要素への前記レポーターの結合により前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターを安定に相互作用させ、シグナルを発生させる工程と、
(c) 前記シグナルをモニタリングすることによって前記構成要素を検出する工程とを含む細胞内の構成要素の検出方法。

【請求項 3】

前記シグナルが細胞致死機構の活性化である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記細胞致死機構がアポトーシスである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記シグナルがシステインプロテアーゼ活性の発生である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記システインプロテアーゼ活性が、カスパーゼ活性である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターのそれぞれが、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 8 から選択されるカスパーゼ分子を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

前記レポーターの前記構成要素への結合により、前記細胞内での前記カスパーゼ分子の自己活性化およびアポトーシスの活性化が誘導される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記カスパーゼ分子がカスパーゼ 3 である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記シグナルが転写活性の発生である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターが転写因子のドメインを含む、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記第 1 のレポーターまたは前記第 2 のレポーターのいずれかが、Gal4 の DNA 結合ドメイン (DBD) を含み、前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの他方が VP16 活性化ドメインを含む、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記シグナルをレポーター遺伝子発現のモニタリングにより検出する、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

50

前記レポーター遺伝子がCD4である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記シグナルが発光誘導活性の発生である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項16】

前記シグナルが蛍光シグナルである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項17】

前記蛍光シグナルがフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、または赤色蛍光タンパク質によって発される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記蛍光シグナルが蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって調整される、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターの1つまたは両方が標的に特異的に結合するポリペプチドまたは核酸アプタマーを含む、請求項1~18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】

前記第1のレポーターおよび前記第2のレポーターの1つまたは両方が免疫グロブリンを含む、請求項1~18のいずれかに記載の方法。

【請求項21】

(a)ある構成要素を含む細胞を提供する工程と、
(b)第1の免疫グロブリンを含む第1のレポーターおよび第2の免疫グロブリンを含む第2のレポーターを提供する工程と、

(c)前記第1の免疫グロブリンに連結した第1のカスパーゼ分子および前記第2の免疫グロブリンに連結した第2のカスパーゼを提供する工程であって、前記第1のカスパーゼ分子と前記第2のカスパーゼ分子が安定に相互作用して前記細胞中にアポトーシスを生じさせるカスパーゼ活性を発生させることができ、

(d)前記第1の免疫グロブリンおよび前記第2の免疫グロブリンを前記構成要素に結合させて、前記レポーターの前記構成要素への結合により前記カスパーゼ分子が安定に相互作用して、前記細胞中にカスパーゼ活性およびアポトーシスを生じさせる工程と
を含む細胞を死滅させる方法。

【請求項22】

前記カスパーゼがカスパーゼ3である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記免疫グロブリンが、抗体、T細胞受容体、またはそれらのフラグメントである、請求項20~22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

前記免疫グロブリンが、Fv、一本鎖Fv(scFv)、Fab、またはF(ab')₂から選択される抗体である、請求項20~23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

前記免疫グロブリンが、細胞内一本鎖Fvである、請求項20~24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】

前記構成要素が、前記免疫グロブリンによって認識されるエピトープを含む、請求項20~25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

前記免疫グロブリンが、前記細胞内の核酸の発現によって得られる、請求項20~26のいずれかに記載の方法。

【請求項28】

前記核酸が、抗体またはT細胞受容体のレパートリーをコードするファージライブラリー

10

20

30

40

50

から得られる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ライブラリーが、抗原にさらされた生物から単離された核酸から構築される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記構成要素が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、新生ポリペプチド、細胞内ポリペプチド前駆体、ゲノム DNA、メッセンジャー RNA、転移 RNA、亜細胞構造体、および細胞内病原体から選択される、請求項 1 ~ 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記構成要素が、前記細胞または前記細胞に由来する生物の所定の病態に関連する、請求項 1 ~ 30 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 32】

前記病態がアルツハイマー病またはダウン症候群であり、前記構成要素が、神経原線維濃縮体、老人斑、変異 アミロイド前駆体タンパク質、変異ユビキチン B タンパク質、変異 アミロイド前駆体タンパク質をコードするフレームシフト RNA、および変異ユビキチン B タンパク質をコードするフレームシフト RNA から選択される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記病態が、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD)、新規の異型 CJD、またはウシ海綿状脳症であり、前記構成要素がプリオンタンパク質の感染形態 (PrP^{Sc}) である、請求項 31 に記載の方法。 20

【請求項 34】

前記病態が、AIDS または自己免疫疾患である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 35】

前記構成要素が変異オンコジーンタンパク質である、請求項 1 ~ 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

前記変異オンコジーンタンパク質が p21ras である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの一方が前記変異オンコジーンタンパク質に存在する標的には結合するが、対応する野生型タンパク質には結合せず、前記第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターの他方が、前記変異オンコジーンタンパク質と前記野生型タンパク質との両方に存在する標的に結合する、請求項 34 または 35 に記載の方法。 30

【請求項 38】

前記構成要素が染色体転座に起因するキメラ融合タンパク質である、請求項 1 ~ 31 および請求項 35 のいずれかに記載の方法。

【請求項 39】

前記キメラ融合タンパク質が BCR - ABL 融合タンパク質である、請求項 38 に記載の方法。 40

【請求項 40】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの一方が SH2 ドメインを含む標的に結合し、前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの他方が SH2 結合部位を含む標的に結合する、請求項 38 または 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記構成要素が変異 p53 タンパク質である、請求項 1 ~ 31 および請求項 35 のいずれかに記載の方法。

【請求項 42】

前記 p53 タンパク質が p53 サブユニットから形成された四量体である、請求項 41 に記載の方法。 50

【請求項 4 3】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターが前記変異 p 5 3 タンパク質の同一の標的に結合する、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの一方またはこれらの両方が融合タンパク質として提供される、請求項 1 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターの一方または両方が化学結合によって連結された 2 つの部分を含む、請求項 1 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターが異なる標的に結合する、請求項 1 ~ 4 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 7】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターが同一の標的に結合する、請求項 1 ~ 4 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤と共に免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質もしくは接合体、または免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質をコードする核酸を含む医薬組成物。

【請求項 4 9】

ヒトもしくは動物の癌の治療方法または予防方法における使用のための、免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質もしくは接合体、または免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 5 0】

ヒトもしくは動物の癌の治療方法または予防方法に用いる薬物を調製するための、免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質もしくは接合体、または免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質をコードする核酸の使用。

【請求項 5 1】

(a) ポリペプチドを含む細胞を提供する工程と、
 (b) 第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターを提供する工程であって、前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターとの安定な相互作用によってプロテアーゼ活性が発生し、
 (c) 前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターとを前記ポリペプチドに結合させることによって、前記ポリペプチドへの前記レポーターの結合により前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターを安定に相互作用させ、プロテアーゼ活性を発生させてポリペプチドをタンパク質分解させる工程と
 を含む細胞中のポリペプチドの分解方法。

【請求項 5 2】

(a) ポリペプチドをコードする遺伝子を含む細胞を提供する工程と、
 (b) 第 1 のレポーターおよび第 2 のレポーターを提供する工程であって、前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターの安定な相互作用によって、プロテアーゼ活性が発生し、
 (c) 前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターを前記ポリペプチドに結合させることによって、前記ポリペプチドへの前記レポーターの結合により前記第 1 のレポーターと前記第 2 のレポーターを安定に相互作用させ、プロテアーゼ活性を発生させてポリペプチドをタンパク質分解させる工程と、
 (d) 表現型を観察する工程と
 を含む遺伝子機能の識別方法。

【請求項 5 3】

前記シグナルがプロテアソーム、好ましくは 2 6 S プロテアソームに関連するプロテアー

10

20

30

40

50

ゼ活性の発生である、請求項 1 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

前記第 1 のレポーターおよび前記第 2 のレポーターがそれぞれ F - b o x モチーフの 1 つまたは複数のドメインを含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記レポーターの前記構成要素への結合により前記構成要素または前記構成要素を含むポリペプチドがユビキチン化される、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記レポーターの前記構成要素への結合により、前記構成要素または前記構成要素を含むポリペプチドがタンパク質分解される、請求項 5 3 ~ 5 5 のいずれかに記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、細胞内のタンパク質および他の構成要素、特に異常細胞に関連する構成要素の検出法に関する。

【0002】

[発明の背景]

癌は、細胞の成長制御、分化、および生存に影響を与える遺伝的異常によって特徴付けられる (Vogelstein, B. & Kinzler, K. W., 「ヒト癌の遺伝的根拠」、McGraw-Hill, 1998)。オンコジーンまたはキメラ融合タンパク質の発現を増強する、癌遺伝子および染色体転座における変異は、複数の腫瘍で頻繁に認められている (Rabbits, T. H., 1994, Nature, 372, 143 ~ 149)。これらの異常遺伝子のタンパク質産物は癌細胞特有であるので、腫瘍特異的抗原である。変異タンパク質の排除またはその機能の阻害が、癌の成長および進行の制御において有効であることが示されている (Chinra, 1999, Nature, 400, 468 ~ 472; Felshera, 1999, Mol. Cell 4, 199 ~ 207; Huettnera, 2000, Nat. Genet., 24, 57 ~ 60)。しかし、このようなタンパク質が治療介入用の潜在的な標的であるにもかかわらず、これらは主に細胞内タンパク質であるので、治療のストラテジーの設計は現実的には困難である。

20

【0003】

1つのアプローチは、変異タンパク質の中和 (Cochetra, 1998, Cancer Res., 58, 1170 ~ 6)、またはその効果を発揮するために必要な細胞区画への到達の防止 (Wrighta, 1997, Gene Ther., 4, 317 ~ 22) のいずれかによる変異タンパク質を不活化させるための抗体または抗体フラグメントの細胞内発現であった。しかし、特に細胞の内部環境内で、抗体が特定のタンパク質に結合するかどうかをいつも事前に予想することは可能ではない。細胞内で抗原に結合することができる抗体を直接識別する選択方法が提案されている (哺乳動物細胞内で結合能力を有する抗体を選択するためのインビボ 2 ハイブリッド系 (two-hybrid system) など)。このような方法は、本発明者らの先の英国特許出願番号 9905510.5 および国際特許出願番号 PCT/GB00/00876 (引用することにより、本明細書の一部をなすものとする。) に記載されている。

30

40

【0004】

しかし、インビボで結合すると考えられる候補抗体が識別されたとしても、この抗体が腫瘍タンパク質を中和させるかその細胞内局在化を防止することができるという保証はない。さらに、腫瘍表現型は 1 つ以上のタンパク質の変異によって誘導され得るので、変異タンパク質を中和させることは、必ずしも腫瘍細胞増殖の停止に有効ではない。したがって、抗体を用いて腫瘍細胞を殺傷する有効な方法が必要である。

【0005】

腫瘍関連抗原は癌細胞の特徴であり、これらの抗原の検出は、患者の癌診断のための手段として使用することができる。抗原の発現を、個体の遺伝子型分類手段として検出するこ

50

ともできる。さらに、特異的マーカーの検出を、組織分類手段として使用することができる。これら全ての場合、抗原の存在を、標識抗体の疑いのある細胞への曝露および抗体と抗原との結合の検出によって識別することができる。しかし、この方法は細胞外で発現した抗原の検出のみに適切である。したがって、細胞内マーカーの有効な検出手段が必要である。

【0006】

[発明の要旨]

本発明者らは、中和抗体の直接的標的として、細胞内腫瘍特異的抗原を使用する代わりに、細胞内で構成要素に結合し、協力して検出可能なシグナルを発生させる1対のレポーターの使用によって細胞を検出可能であることを見出した。このシグナルを使用して細胞を識別することができる。検出された細胞が腫瘍細胞または他の疾患細胞である場合、シグナルは細胞致死機構 (cell killing mechanism) の活性化に有利であり、腫瘍細胞または疾患細胞をこの方法で排除することができる。

10

【0007】

したがって、本発明の1つの態様では、本発明者らは、細胞が、検出可能なシグナルを発生するように誘導する方法であって、(a)ある構成要素を含む細胞を提供する工程と、(b)第1のレポーターおよび第2のレポーターを提供する工程であって、前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとの安定な相互作用によって検出可能なシグナルの発生を得る工程と、(c)前記第1のレポーターと前記第2のレポーターを前記構成要素に結合させることによって、前記構成要素への前記レポーターの結合により前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを安定に相互作用させ、シグナルを発生させる工程とを含む方法を提供する。

20

【0008】

本発明者らは、本発明の別の第2の態様により、細胞内のある構成要素の検出方法であって、(a)第1のレポーターおよび第2のレポーターを提供する工程であって、前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとの安定な相互作用によって、検出可能なシグナルを発生させる工程と、(b)前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを前記構成要素に結合させることによって、前記構成要素への前記レポーターの結合により前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを安定に相互作用させ、シグナルを発生させる工程と、(c)前記シグナルの監視によって前記構成要素を検出する工程とを含む方法を提供する。

30

【0009】

本発明の第3および他の態様により、細胞を死滅させる方法であって、(a)構成要素を含む細胞を提供する工程と、(b)第1の免疫グロブリンを含む第1のレポーターおよび第2の免疫グロブリンを含む第2のレポーターを提供する工程と、(c)前記第1の免疫グロブリンに連結した第1のカスパーゼ分子および前記第2の免疫グロブリンに連結した第2のカスパーゼ分子を提供する工程であって、前記第1のカスパーゼ分子と前記第2のカスパーゼ分子とが安定に相互作用して細胞中にアポトーシスを生じるためのカスパーゼ活性を発生させることができ、(d)前記第1の免疫グロブリンおよび前記第2の免疫グロブリンを前記構成要素に結合させて、前記レポーターの前記構成要素への結合により前記カスパーゼ分子と安定に相互作用して細胞中にカスパーゼ活性を発生させてアポトーシスを誘導する工程とを含む方法が得られる。

40

【0010】

「構成要素」とは、任意の細胞成分を意味する。この構成要素は、好ましくは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ゲノムDNA、メッセンジャーRNA、転移RNA、亜細胞構造、または細胞内病原体である。新生ポリペプチドおよび細胞内ポリペプチド前駆体もまた、用語「構成要素」の範囲に含まれる。好ましくは、この構成要素は、細胞または細胞に由来する生物の所定の病態に関連するポリペプチドである。

【0011】

細胞は、分化した細胞、または腫瘍細胞などの異常細胞、疾患細胞、または感染した細胞

50

であり得る。「異常細胞」とは、罹患しているか、感染しているか、正常な細胞の特徴または挙動を示さない細胞を意味する。したがって、構成要素は、アルツハイマー病またはダウン症候群（例えば、神経原線維変化または老人斑）に関連する細胞成分であり得る。構成要素はまた、変異アミロイド前駆体タンパク質または変異ユビキチンBタンパク質であり得る。アミロイド前駆体タンパク質またはユビキチンBタンパク質をコードするRNAのフレームシフト変異はアルツハイマー病およびダウン症候群に関連することが既知であるので、本発明の構成要素はこのようなタンパク質をコードするフレームシフトRNAであり得る。構成要素はまた、クロイツフェルトヤコブ病（CJD）、新規の異型CJD、またはウシ海綿状脳症（BSEまたは狂牛病）などの哺乳動物海面状脳症に関連する、プリオンタンパク質の感染形態（PrP^{Sc}）であり得る。構成要素はまた、AIDS（後天性免疫不全症候群）または自己免疫疾患に関連するタンパク質または他の分子であり得る。

10

【0012】

好ましくは、構成要素は、癌関連または腫瘍関連タンパク質または疾患特異的タンパク質である。最も好ましくは、構成要素は、細胞または細胞中の前駆体に起因するオンコジーンタンパク質である。変異オンコジーンタンパク質は、p21rasであり得る。好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターのうち的一方が変異オンコジーンタンパク質に存在する標的には結合するが、対応する野生型タンパク質には結合せず、第1のレポーターおよび第2のレポーターのうち他方が、変異オンコジーンタンパク質および野生型タンパク質のいずれにも存在する標的に結合する。

20

【0013】

あるいは、変異オンコジーンタンパク質は、染色体転座に起因するキメラ融合タンパク質である。染色体転移の例は、BCR-ABL融合タンパク質を発現するフィラデルフィア転座である。好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターのうち一方がSH2ドメインを含む標的に結合し、第1のレポーターおよび第2のレポーターの他方が、SH2結合部位を含む標的に結合する。

【0014】

変異オンコジーンタンパク質はまた、変異p53タンパク質であり得る。好ましくは、p53タンパク質はp53サブユニットから構成される四量体である。好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、変異p53タンパク質の同一の標的に結合する。

30

【0015】

一般に、構成要素が多量体を形成した天然の細胞成分である場合、第1および第2の分子は同一であり、構成要素が多量体形成によって会合し得る。構成要素が変異構成要素である場合、多量体形成能力が維持されることが好ましい。好ましくは、第1および第2の分子の一方または両方、またはさらなる第3の分子は、多量体形成する構成要素中でのより密接な集合によって、レポーター群の協力を改善する拘束能力を有し得る。

【0016】

本明細書中で使用される、「シグナル」とは、任意の検出可能な事象、好ましくは細胞致死機構（cell killing mechanism）の活性化である。本発明の好ましい実施形態では、細胞致死機構は、アポトーシスまたはプログラムされた細胞死である。好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、それぞれカスパーゼ分子を含み、レポーターのその標的への結合により、アポトーシスが誘導されるようにカスパーゼ分子を自己活性化させる。あるいは、シグナルは、プロテアーゼ活性、転写活性、または発光誘導活性などの酵素活性の発生であり得る。

40

【0017】

「安定な相互作用」とは、第1および第2のレポーターを機能的に協力させて検出可能なシグナルを発生させる相互作用と定義することができる。好ましくは、第1のレポーターおよび/または第2のレポーターは、シグナルを発生することができる分子の形成に関連するポリペプチドを含む。

【0018】

50

「プロテアーゼ活性」とは、プロテアーゼまたはタンパク質またはペプチドを分解することができる任意の他の酵素の活性を意味する。プロテアーゼを、当該分野で既知の方法による適切な基質の分解の監視によってアッセイすることができる。好ましくは、ポリペプチド基質は、検出される構成要素からなるか、これを含む。プロテアーゼ活性は、システムプロテアーゼ活性（例えば、カスパーゼ活性）であり得る。

【0019】

本発明の1つの実施形態では、プロテアーゼ活性は、カスパーゼ活性を含む。好ましくは、カスパーゼ活性は、第1のレポーターと第2のレポーターとの安定な相互作用によって発生する。したがって、この実施形態では、第1のレポーターと第2のレポーターとの安定な相互作用によって、プロテアーゼ活性化が直接発生する。好ましくは、カスパーゼ3またはカスパーゼ8である。さらに好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、それぞれカスパーゼ分子を含む。さらにより好ましくは、レポーターのその標的への結合により、カスパーゼ分子が自己活性化し、細胞中でアポトーシスが活性化する。最も好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、それぞれカスパーゼ3を含む。カスパーゼは、アポトーシスの誘導に関連するタンパク質群であり、用語「カスパーゼ」は、当該分野で公知である。カスパーゼの例は、Takahashi, Int. J. Hematol., 1999 Dec; 70(4): 226~32に記載されているものである。

10

【0020】

さらなる実施形態では、プロテアーゼ活性を、ユビキチン媒介タンパク質分解の一部としてタンパク質を分解するプロテアソームと関連付けることができる。好ましくは、プロテアソームは26Sプロテアソームである。第1および第2のレポーターは、ユビキチン媒介タンパク質分解経路に関連する成分のドメイン、好ましくは、F-boxタンパク質のドメインを含み得る。検出すべき構成要素の結合による第1および第2のレポーターの安定な相互作用による成分（例えば、F-box）の再構成により、構成要素または構成要素を含むポリペプチドにユビキチンが標識される。構成要素および/またはポリペプチドを破壊のために標的化され、その後プロテアソーム（好ましくは26Sプロテアソーム）によって破壊し、そのシグナルを当該分野で既知の手段によって検出することができる。この実施形態では、第1および第2のレポーターの会合自体は直接プロテアーゼ活性を発生しないが、このプロテアーゼ活性は、このような会合によって間接的に発生することが認識される。破壊されたポリペプチドが細胞の生存に不可欠である場合（代謝酵素、転写因子、膜タンパク質などの構造タンパク質など）、細胞死（これ自体を検出可能）を得ることができることがさらに認識される。例えば、アポトーシスの誘発によって別のポリペプチドの破壊が細胞死を誘導する場合、同一の状況が得られる。

20

30

【0021】

酵素活性は転写活性であってよく、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、好ましくは、転写因子のドメインを含み得る。「転写活性」は、転写単位からのメッセンジャーRNAの産生を誘導する活性を意味する。例えば、転写活性は、転写因子または細胞内の遺伝子発現を調整する任意の他の調節分子によって証明される。好ましくは、第1のレポーターまたは第2のレポーターのいずれかはGal4のDNA結合ドメイン（DBD）を含み、第1のレポーターまたは第2のレポーターの他方はVP16活性化ドメインを含む。シグナルを、レポーター遺伝子発現の監視によって検出することができる。レポーター遺伝子は、検出可能な終点での酵素反応を触媒しうる酵素をコードする。あるいは、レポーター遺伝子は、細胞増殖を調節することができる（必要な栄養を得ることができる）分子をコードする。好ましくは、レポーター遺伝子は、緑色蛍光タンパク質（GFP）、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）をコードする。最も好ましくは、レポーター遺伝子は、CD4である。

40

【0022】

本発明は、さらに、レポーター系として転写調節機構の使用を含む。例えば、ジフテリア毒素発現の転写調節は、第1および第2のレポーターの協力を依存し得る。したがって、

50

第1のレポーターは、わずかなバックグラウンド発現レベルを有する最小プロモーターの調節下で毒素をコードするコード配列を含み得る。第2のレポーターは内因的または外因的のいずれかで転写因子発現を調節する（つまり、毒素発現を情報制御する）ことができる。

【0023】

酵素活性は、発光誘導活性であり得る。「発光」とは、化学反応による光または他の放射物の発生をいい、これは生物発光および化学発光を含む。好ましくは、発光誘導活性は、ルシフェラーゼによって得られることが好ましい。より好ましくは、第1および第2のレポーターはルシフェラーゼのポリペプチドドメインを含み、これらが集結した場合にルシフェラーゼ活性を発生する。

10

【0024】

シグナルは、電磁放射（例えば、光）の放出または吸収であり得る。好ましくは、シグナルは、蛍光シグナルである。より好ましくは、蛍光化学物質または蛍光タンパク質から蛍光シグナルを発生する。好ましい蛍光化学物質は、フルオレセインイソチオシアネートおよびローダミンであり、好ましい蛍光タンパク質は、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、または赤色蛍光タンパク質である。最も好ましくは、蛍光シグナルは、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）によって調整される。蛍光シグナルは、好ましくは、蛍光標示式細胞分取器（FACS）によって検出する。

【0025】

第1のレポーターおよび第2のレポーターは、同一の標的部位に結合することができる。これが事実である場合、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、同一の標的部位に実質的に同時または連続して結合することができる。あるいは、好ましくは、第1のレポーターおよび第2のレポーターは異なる標的部位に結合する。レポーターが異なる標的部位に結合する場合、本発明にしたがってレポーターが機能的に協力することができるように標的部位は隣接することが有利である。

20

【0026】

好ましくは、第1のレポーターは第1の会合手段を含み、第2のレポーターは第2の会合手段を含み、第1および第2のレポーターはその各会合手段によって相互作用する。より好ましくは、第1のレポーターは構成要素上の第1の標的に結合する第1の結合手段を含み、第2のレポーターは、構成要素上の第2の標的に結合する第2の結合手段を含む。最も好ましくは、第1のレポーターは第1の結合手段に連結した第1の会合手段を含み、第2のレポーターは第2の結合手段に連結した第2の会合手段を含む。

30

【0027】

用語「連結」は、2つの部分の間の共有結合または非共有結合の任意の形態（例えば、結合手段および会合手段）を意味する。連結の例は、融合タンパク質中のペプチド結合である。部分の間の化学的なカップリングおよび結合も明らかに含まれる。さらに、結合手段および会合手段は直接的連結である必要はなく、リンカーペプチドを介して連結し得る。リンカーペプチドは、可動性のまたは構造化リンカーペプチドであり得る。適切な可動性リンカーペプチドは、任意選択的に他のアミノ酸残基と組み合わせた1つまたは複数のグリシン残基を含み得る。構造化リンカーは、1つまたは複数のプロリン残基を含み、規定の二次構造を含み得る。

40

【0028】

「結合手段」とは、標的に特異的に結合することができる全てのものを意味する。好ましくは、結合手段は分子である。より好ましくは、結合手段はポリペプチドまたはタンパク質である。

【0029】

最も好ましくは、第1の結合手段および/または第2の結合手段は、免疫グロブリン（例えば、抗体またはT細胞受容体またはそのフラグメント）を含む。好ましくは、抗体は、Fv、一本鎖Fv（ScFv）、Fab、またはF(ab')₂から選択される。より好

50

ましくは、抗体は一本鎖Fvである。最も好ましくは、抗体は細胞内一本鎖Fvである。構成要素がタンパク質またはポリペプチドを含む場合、免疫グロブリンを含むレポーターの使用が好ましい。したがって、構成要素は免疫グロブリンによって認識されるエピトープを含み得る。

【0030】

用語「免疫グロブリン」とは、T細胞受容体および抗体を含む免疫グロブリンスーパーファミリーの任意のメンバーをいい、これには、標的に結合することができる天然の免疫グロブリンの任意のフラグメントが含まれる。免疫グロブリンの総説は、Maleš, 1987, *Advanced Immunology*, J. B., Lippincott Company, Philadelphiaに記載されている。Fv、一本鎖Fv (ScFv)、Fab、またはF(ab')₂と同様に、インタクトな免疫グロブリンも用語「免疫グロブリン」の範囲内である。本明細書中で使用される、「細胞内」は、細胞の内側を意味する。「細胞内抗体」は、細胞環境内または細胞内環境を模倣した環境下でその標的または同族抗原に結合することができる抗体である。

10

【0031】

会合手段および結合手段が共にタンパク質を含む場合、レポーターは、好ましくは、結合手段に連結した各会合手段を含む融合タンパク質として得られる。好ましくは、細胞内の核酸の発現によって、第1のレポーターおよび/または第2のレポーターが得られる。結合手段が抗体またはT細胞受容体を含む場合、核酸は、抗体またはT細胞受容体のレポーターをコードするファージライブラリーから得ることが好ましい。「レポーター」は、複数の結合特異性を得るために核酸レベルで1つまたは複数のテンプレート分子の無作為、半無作為、または定方向変異によって得られた1組の分子をいう。

20

【0032】

より好ましくは、ライブラリーを、抗原に曝露された生物から単離された核酸から構築する。あるいは、会合手段は、化学的カップリングによる結合手段に連結している。

【0033】

構成要素が核酸を含む場合、第1のレポーターおよび/または第2のレポーターは、構成要素中に局在する配列を含む標的に結合することができる。好ましくは、第1のレポーターおよび/または第2のレポーターの各標的への結合は核酸ハイブリッド形成によって起こる。より好ましくは、第1のレポーターおよび/または第2のレポーターは、標的配列とハイブリッド形成することができる核酸結合手段を含む。最も好ましくは、核酸結合手段は、RNAまたは一本鎖DNAを含む。

30

【0034】

第1および/または第2のレポーターは、核酸配列を含む会合手段を介して相互作用することができる。レポーターの安定な相互作用は、この場合、照射（例えば、紫外線照射）の吸収の監視によって検出することができる。あるいは、核酸会合手段を、本明細書中に記載のシグナルを発生させることができる任意の成分に連結することができる、レポーター間の相互作用を、発生した特定のシグナルの監視によって検出することができる。

【0035】

会合手段および結合手段が共に核酸を含む場合、第1および/または第2のレポーターを、会合手段および結合手段を含む近接した核酸配列の形態で得ることができる。

40

【0036】

あるいは、第1および/または第2のレポーターを、核酸およびタンパク質を含むハイブリッドの形態で得ることができる。したがって、レポーターは、タンパク質を含む結合手段および核酸を含む会合手段を含むか、その逆に核酸を含む結合手段およびタンパク質を含む会合手段を含むことができる。重要なのは、第1のレポーターの結合手段のその標的への結合により第1のレポーターの会合手段が第2のレポーターの会合手段に安定に会合され、標的に結合した場合にシグナルを発生するという点だけである。

【0037】

本発明の第4の態様によれば、薬学的に許容可能なキャリアまたは希釈剤と共に免疫グロ

50

プリンカスパーゼ融合タンパク質もしくは接合体、または免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質をコードする核酸を含む医薬組成物が得られる。

【0038】

本発明の第5の態様では、本発明者らは、ヒトもしくは動物の癌の治療方法または予防方法に使用するための、免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質もしくは接合体、または免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

【0039】

本発明の第6の態様によれば、ヒトまたは動物の癌の治療方法または予防方法用の薬剤を調製するための、免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質もしくは接合体または免疫グロブリンカスパーゼ融合タンパク質をコードする核酸の使用が得られる。

10

【0040】

本発明の第7の態様では、細胞中のポリペプチドの分解方法であって、(a)ポリペプチドを含む細胞を得る工程と、(b)第1のレポーターおよび第2のレポーターを得る工程であって、前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとの安定な相互作用によってプロテアーゼ活性を発生させる工程と、(c)前記第1のレポーターと前記第2のレポーターを前記ポリペプチドに結合させることによって、前記ポリペプチドへの前記レポーターの結合により前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを安定に相互作用させ、プロテアーゼ活性を誘発させてポリペプチドをタンパク質分解させる工程とを含む方法を提供する。

【0041】

本発明の第8の態様によれば、本発明者らは、遺伝子機能の識別方法であって、(a)ポリペプチドをコードする遺伝子を含む細胞を提供する工程と、(b)第1のレポーターおよび第2のレポーターを提供する工程であって、前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとの安定な相互作用によって、プロテアーゼ活性を誘発させる工程と、(c)前記第1のレポーターと前記第2のレポーターを前記ポリペプチドに結合させることによって、前記ポリペプチドへの前記レポーターの結合により前記第1のレポーターと前記第2のレポーターとを安定に相互作用させ、プロテアーゼ活性を発生させてポリペプチドをタンパク質分解させる工程と、(d)表現型を観察する工程とを含む方法を提供する。

20

【0042】

この態様の方法は、機能的ゲノム研究に有用である。任意のタンパク質構成要素を標的することができる適切な結合構成要素を、その崩壊によってタンパク質機能を破壊するために本明細書中に記載の詳細な説明にしたがって構築することができる。したがって、機能的「ノックアウト」を容易に作製することができる。次いで、細胞または細胞を含む動物もしくは植物の表現型を観察して、ポリペプチドまたは遺伝子の機能の指標を得ることができる。したがって、例えば、標的化された細胞が細胞周期表現型の停止を示す場合、例えば、標的化された問題のタンパク質は細胞周期機能の役割を果たすと結論付けることができる。以下にさらに詳細に説明されている適切にデザインされたレポーターの使用による任意のタンパク質の標的能力の適用により広範な有用性を得ることができる。

30

【0043】

好ましくは、シグナルは、プロテアソーム、好ましくは26Sプロテアソームに関連するプロテアーゼ活性の発生である。より好ましくは、第1および第2のレポーターがそれぞれF-boxモチーフの1つまたは複数のドメインを含む。好ましくは、レポーターの構成要素への結合により構成要素または構成要素を含むポリペプチドがユビキチン化される。本発明の非常に好ましい実施形態では、レポーターの構成要素への結合により構成要素または構成要素を含むポリペプチドがタンパク質分解される。このようなタンパク質分解により、細胞が死滅することが好ましい。

40

【0044】

本発明の実施には、特記しない限り、当業者の能力の範囲内の従来化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学技術を使用する。このような技術は、文献で説明されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. M

50

aniatis, 1989, 「分子クローニング：実験マニュアル」, 第2版, 第1~3巻, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M.ら, 1995および定期増補版, 「現代の分子生物学プロトコール」, 第9, 13, および16章, John Wiley & Sons, New York, N.Y.; B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, 「DNA単離および配列決定：基本的技術」, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, 「in situハイブリッド形成：原理と実践」; Oxford University Press; M. J. Gait (編), 1984, 「オリゴヌクレオチド合成：実践アプローチ」, Irl Press; および D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, 「酵素学方法論 (Methods of Enzymology): DNA合成パートA: DNAの合成および物理分析」, Methods in Enzymology, Academic Pressを参照のこと。これらの各一般書を引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【0045】

[発明の詳細な説明]

本発明の方法により、構成要素を含む細胞中でシグナルが誘導され、細胞内で構成要素が検出され、構成要素を含む細胞が死滅する。本発明は、構成要素への第1および第2のレポーターの結合に依存する。したがって、第1のレポーターが構成要素への第1および第2のレポーターの結合を介して第2のレポーターと安定に相互作用する場合、シグナルが発生する。有利には、第1および第2のレポーター間の安定な相互作用は、レポーターがレポーターのその各標的への結合を伴わない限り起こらない。所望ならば、シグナルを検出することができる。したがって、第1および第2のレポーターは、相互作用によってシグナルを発生することができるシグナル発生因子の2つの部分である。

【0046】

本発明の方法を、一般に、任意の細胞を正常か異常かの識別（例えば、癌細胞または疾患細胞）に使用することができることに留意すべきである。したがって、一般に、本発明者らの方法を使用して、細胞内の任意のタンパク質、核酸、または他の構成要素を検出するか、さらに細胞内の任意の構成要素の亜細胞の位置を識別することができる。したがって、本発明者らの方法は、病態に関連する構成要素の有無によって細胞の病態を検出することができる。識別された細胞の排除を所望する場合、従来手段によってこれを行うことができる。その他で好ましくは、シグナルが細胞死であるように、レポーターの結合により細胞致死機構が直接活性化される。有利には、細胞死は、アポトーシスまたはプログラム細胞死に起因する。

【0047】

特定のアミノ酸配列を認識してアスパラギン酸後に標的タンパク質を切断するカスパーゼとして公知のシステインプロテアーゼのファミリーによってアポトーシスを行う (Thornberryら, 1998, Science, 281, 1312~6)。カスパーゼファミリーの1つのメンバーであるカスパーゼ3は、いわゆるアポトーシス経路の実行者であり、生存細胞の完全性の維持に重要な多数のタンパク質のタンパク質分解性切断を担う (Earnshawら, 1999, Ann. Rev. Biochem., 68, 383~424)。カスパーゼ3を酵素前駆体として合成し、イニシエーターまたは上流カスパーゼ (カスパーゼ8 (Srinivasulara, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14486~91) およびカスパーゼ9 (Liら, 1997, Cell, 91, 479~89) など) によって活性化して、活性四量体酵素を形成させる (Rotondaら, 1996, Nat. Struct. Biol., 3, 619~25)。2つのカスパーゼ3分子が非常に近接する場合、強制的な二量化によって、これらは自己活性化して不可逆的に細胞死を招くことが示されている (Colussiら, 1998, J. Biol. Chem., 273, 26566~70; MacCorkleら, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3655~60; 40

Fanら, 1999, Hum Gene Ther., 10, 2273~85)。

【0048】

したがって、本発明の好ましい実施形態では、第1のレポーターおよび第2のレポーターは、カスパーゼ3分子を含む。第1および第2のレポーターの構成要素への結合により、第1および第2のレポーター間で安定に相互作用し、カスパーゼ3分子が自己活性化し、カスパーゼ活性を発生する。これにより、細胞内でアポトーシスが誘発される。以下に記載のように、有利には、第1および第2のレポーターは抗体を介して各標的に結合し、好ましい実施形態では、細胞内抗体-カスパーゼ融合タンパク質の形態でカスパーゼ3が得られる。

【0049】

本明細書中で使用される、「カスパーゼ分子」または「カスパーゼ」には、カスパーゼ活性が保持されている限り、カスパーゼのポリペプチド配列のいくつかまたは全部を含むポリペプチド配列が含まれる。したがって、第1および第2の分子は、他のポリペプチド配列と共にカスパーゼ由来のポリペプチド配列を含み得る。カスパーゼ配列は、分子内または分子上に部分を形成することができる。

【0050】

カスパーゼのポリペプチド配列を、タンパク質の活性および機能に実質的に影響を与えない保存的アミノ酸置換を用いて変更することができる。その他で好ましくは、カスパーゼの自己中毒を減少させ、そして/またはアポトーシスの活性化により有効なカスパーゼを作製するための変異を移入することができる。カスパーゼ分子を、検出すべき構成要素の非存在下で二量体形成するカスパーゼ分子の傾向を防止するか低減させるように操作することもできる。カスパーゼのこのような変異型および変異体を、当該分野で公知の方法によって作製し、有効性について試験することができる。

【0051】

シグナルは、電磁放射(EM)(例えば、光)の放出または吸収であり得る。これには、蛍光、燐光、または照射の放出または吸収の強度または周波数の調整に関連する他のシグナル(例えば、FRETシグナル)が含まれる(以下にさらに詳細に記載する)。第1のレポーターおよび第2のレポーターは、それぞれ蛍光タンパク質または蛍光化学物質などの蛍光発色団を含み得る。蛍光化学物質の例には、アロフィコシアニン、フィコシアニン、フィコエリスリン、ローダミン、テトラメチルローダミン、7-ニトロ-ベンゾフラザンローダミンイソチオシアネート、オキサジン、クマリン、フルオレセイン誘導体(例えば、FAM(6-カルボキシ-フルオレセイン)、TET(6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン)、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)、およびカルボキシフルオレセインジアセテート)、テキサスレッド、アクリジンエロー/オレンジ、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、およびbis-ベンズアミド(HoechstからH33258の商標名で市販されている)が含まれる。

【0052】

好ましくは、第1および第2のレポーターは、蛍光ポリペプチドを含む。蛍光ポリペプチドおよびタンパク質の例には、Aequorea victoria由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)、Discosoma spp由来の赤色蛍光タンパク質(RFP)が含まれる。これらのタンパク質の誘導体および変異型(シアン蛍光タンパク質青色蛍光タンパク質、増強緑色蛍光タンパク質(EGFP; GFPmut1; Yang, T.T.ら, 1996, Nucleic Acids Res., 24(22), 4592~4593; Cormack, B.P.ら, 1996, Gene, 173, 33~38)、増強青色蛍光タンパク質(EBFP)、増強黄色蛍光タンパク質(EYFP; Ormora, 1996, Science, 273, 1392~1395)、不安定化増強緑色蛍光タンパク質(d2EGFP; Living Colors不安定化EGFPベクター(1998年4月)、CLONTECHniques XII(2), 16~17)、増強シアン蛍光タンパク質(ECFP)、およびGFPuv(Haas, J.ら, 1996, Curr. Biol., 6, 315~324)など)も使用することができる。これらの蛍光タ

10

20

30

40

50

ンパク質は、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California, USA) から市販されている。あるいは、第1および第2のレポーターは、蛍光ポリペプチドのポリペプチドドメインを含む。

【0053】

シグナルは、活性を誘導する発光であり得る。発光の間に光が発生するので、シグナルは同時に活性を誘導する発光および電磁放射線の放射であり得ることが認識される。

【0054】

シグナルはまた、酵素活性（例えば、転写活性）の発生であり得る。転写活性を、例えば蛍光抗体およびFACSによるCD4などのレポーター遺伝子の発現のアッセイによって検出することができる。

10

【0055】

あるいは、シグナルを、細胞増殖、細胞分裂、または細胞の分化として検出することができる。第1および第2のレポーターが安定に相互作用して、分化または細胞増殖のプログラムを活性化することができる転写活性を得ることができる。例えば、VEGF（血管内皮成長因子）および/または他の脈管形成成長因子を発現して血管新生を誘導することもできる。Lmo2 LIMのみのタンパク質は、血管新生に特異的に必要であることが示されているので（Yamadaら、2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97、320～324）、転写活性はLmo2活性であり得る。細胞の増殖および検出を、当該分野で公知のように顕微鏡によって適切な細胞表面マーカーを検出することができる。

20

【0056】

細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。好ましくは、細胞は、動物細胞またはヒト細胞である。好ましくは、細胞はヒト細胞である。構成要素は、任意の細胞区画、好ましくは細胞質または核に存在し得る。

【0057】

細胞は、正常な細胞であり得るので、本発明者らの方法は、例えば、特定の発生系統に関連する構成要素の検出による組織分類手段として使用することができる。あるいは、本方法を、例えば、細胞が癌性であるかどうかを細胞内の腫瘍関連構成要素の検出による、細胞の病態の識別手段として使用することができる。したがって、構成要素は、ポリペプチドをコードする核酸の点変異、欠失、挿入、または染色体転座による野生型タンパク質由来の変異癌タンパク質またはポリペプチドであり得る。例としては、対応する野生型タンパク質の1つまたは複数の変異に起因するp21rasである。腫瘍サプレッサー遺伝子の変異はしばしば癌細胞および癌細胞に関連し、この癌細胞によって産生されるタンパク質（例えば、変異p53タンパク質）を、本発明の方法を使用して検出することもできる。あるいは、癌タンパク質は、染色体転座に起因するキメラ融合タンパク質であり得る（フィラデルフィア転座由来のBCR-ABL融合体など）。

30

【0058】

構成要素はまた、異常細胞に関連するタンパク質または核酸であり得る。このような細胞は、正常な細胞では見出されない異常なタンパク質（例えば、感染の結果として発現するウイルスまたは最近特異的タンパク質）を発現し得る。例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）インテグラーゼタンパク質により、細胞がHIVに感染しているかどうかを識別する。したがって、本発明者らの方法を使用して、細胞が罹患しているか、感染しているか、または異常であるかどうかを識別することができる。他で好ましくは、罹患しているか、感染しているか、異常な細胞は、上記のアポトーシスの活性化によって死滅する。この場合、シグナルを検出する必要は全くないことが認識される。

40

【0059】

タンパク質を産生する対応核酸の検出によってタンパク質を検出することもできることが認識される。例えば、変異を有し、腫瘍関連タンパク質をコードするメッセンジャーRNAまたはDNA配列を検出することができる。

【0060】

50

好ましい実施形態では、第1および第2のレポーターは、結合手段を有し、この結合手段は細胞内での核酸の発現によって得られる免疫グロブリンである。核酸を、構成要素の検出に適切な亜細胞区画に局在化させることができる。例えば、構成要素が細胞質タンパク質である場合、核酸は細胞の細胞質に局在化し、そこで転写および/または翻訳される。分子はまた、任意の所望の亜細胞区画（核（例えば、核局在化シグナルへの融合による）、ER（ER保持シグナルの使用）、ミトコンドリア（ミトコンドリア標的配列（MTS）の使用）、原形質膜、または原形質膜などの他の場所など）に局在化することができる。このような標的配列については、一般に、Bakerら、1996、*Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 71, 637~702に記載されている。

【0061】

ミトコンドリア標的配列およびミトコンドリア膜によるタンパク質の指示および転座機構は、例えば、Omura, 1998, *Biochem (Tokyo)* 123, 1010~6, Glaserら、1998, *Plant Mol Biol*, 38, 311~38, およびVoosら、1999, *Biochim Biophys Acta* 1422, 235~54で考察されている。生物活性化合物のミトコンドリア標的は、Murphy, 1997, *Trends Biotechnol* 15, 326~30に概説されている。ミトコンドリアが多くの重要な細胞プロセスに関連しているので、本発明を使用して異常なミトコンドリアタンパク質またはミトコンドリアDNA疾患に関連するDNAを含む構成要素を検出することができる。異常なミトコンドリアタンパク質または変異mtDNAを含む細胞を、検出し、任意選択的に死滅させることができる。

【0062】

核局在化配列には、SV40巨大T抗原コンセンサス配列PKKKRKV（Dingwallら、1991, *Trends Biochem. Sci.* 16, 478~481に概説）または2つの核局在化配列（例として核質タンパク質）（Dingwallら、1987, *EMBO J.* 6, 69~74; Robbinsら、1991, *Cell* 64, 615~623）が含まれる。

【0063】

レポーターを原形質膜に標的化して、原形質膜に存在する構成要素（膜タンパク質など）を検出することもできる。p21-ras癌遺伝子産物を原形質膜に局在化し、標的化レポーターを適切に使用してrasタンパク質を検出することができることが公知である。レポーターを膜貫通タンパク質または膜局在化が可能な膜貫通タンパク質の一部（当該分野で公知の膜貫通ヘリックスなど）への連結によって、原形質膜への標的化を行うことができる。

【0064】

レポーターが組換えタンパク質として発現された場合、核標的配列、ミトコンドリア標的配列、ER保持シグナルなどを、発現構築物への適切な配列のクローニングによってレポーターに操作することができる。

【0065】

免疫グロブリンをコードする核酸を、複数のこのような分子をコードするライブラリーから得ることができる。例えば、抗体分子のファージディスプレイライブラリーは公知であり、このプロセスに使用することができる。有利には、ライブラリーは免疫グロブリン分子のレパートリーをコードする。レパートリーの産生方法は当該分野で十分に特徴付けられている。

【0066】

ライブラリーを、抗原に曝露された生物から単離された核酸からさらに構築することができる。抗原曝露により、通常、免疫グロブリンのポリクローナル集団が産生され、それぞれ抗原に結合することができるがエピトープ特異性または他の特徴について他と異なり得る。生物からの抗体遺伝子のクローニングにより、免疫グロブリンのポリクローナル抗体を選択に供して、本発明の方法に適切な免疫グロブリンを単離することができる。

【0067】

10

20

30

40

50

上記のように、第1および/または第2のレポーターは、ポリペプチドを含んでもよい会合手段を含み得る。会合手段がポリペプチドである場合、第1および第2のレポーターの一方または両方を、免疫グロブリンおよびポリペプチドを含む融合タンパク質の形態で得ることができる。本発明の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、細胞内抗体カスパーゼ3融合体である。融合タンパク質の一方または両方を、転写して第1または第2のポリペプチドと共に第1または第2の免疫グロブリンが得られる適切な核酸構築物から発現させることができる。核酸構築物を、上記のように細胞内で標的化することができる。核酸構築物は、本発明の方法が行われる細胞内の融合タンパク質をコードする核酸の発現を指示することができる発現ベクターであり得る。

【0068】

10

[結合部分]

本発明のレポーターは、好ましくは、上記の細胞構成要素に結合することができる部分を含む。これらは、免疫グロブリン、特に上記の細胞内抗体であり得るが、本発明はまた、細胞内で標的に結合することができるポリペプチドおよび核酸結合分子の使用を含む。このような結合分子は、典型的には抗体より小さいほうが有利であるので、細胞内でのレポーターを構成要素により良好に標的化することができる。

【0069】

したがって、本発明は、1つまたは複数の細胞標的に第1および/または第2のレポーターを指示するための標的特異的結合ポリペプチドおよび/または核酸アダプターの使用を提供する。本明細書中で使用される、「標的特異的結合ポリペプチドおよび/または核酸アダプター」は、細胞内で分子標的に特異的に結合することができるポリペプチドまたは核酸分子である。このようなペプチドまたはアダプターを免疫グロブリンの代わりに使用して本発明の細胞内の構成要素へのレポーターの標的化を行うことができる。

20

【0070】

結合活性を有するポリペプチドを、例えば、無作為なペプチド構造の組換えライブラリーから開発することができる。ファージディスプレイ、SELEX、mRNAディスプレイ、または表面プラスモン共鳴、必要であれば、その後の変異および選択のラウンドの反復による結合特異性および親和性の精密化などの技術による所望の標的結合親和性を有するポリペプチドの選択は、当業者に公知の技術である。

【0071】

30

例えば、mRNA選択による結合ポリペプチドの選択は、Wilsonら、Proc Natl Acad Sci U S A、2001 Mar 27; 98(7)、3750~3755に記載されている。Srebalsus and Clemmer、Proc Natl Acad Sci U S A、2001 Mar 27, 98(7): 3750~3755は、標的分子へのポリペプチドライブラリーの結合を特徴付けるためのMALDI-TOFMSの使用を記載している。ファージディスプレイの使用は、Nilssonら、Adv Drug Deliv Rev 2000 Sep 30; 43(2-3): 165~96およびMcGregor、Mol Biotechnol 1996 Oct; 6(2): 155~62に概説されている。核酸アダプターの使用は、Hermann and Patel、Science 2000 Feb 4; 287(5454): 820~5に概説されている。SELEXは、標的分子への高度に特異的な結合をする核酸分子のインビトロ進化法である。例えば、米国特許第5654151号、同第5503978号、同第5567588号、および同第5270163号ならびにPCT公開パンフレットWO96/38579に記載されている。

40

【0072】

ファージディスプレイおよびSELEXなどの反復選択法は、多数の可能な配列および構造を含むライブラリー中に所与の標的についての広範な種々の結合親和性が存在するという原理に基づく。例えば、20個のサブユニット無作為化ポリペプチドまたは核酸ポリマーを含むライブラリーは、 4^{20} 種の構造の可能性を有し得る。標的についてより高い親和定数を有するものは、ほぼ結合していると考えられる。分画、解離、および増幅プロセ

50

スによって、より多数の結合親和性候補が豊富な第2の核酸ライブラリーを産生される。さらなる選択ラウンドにより、得られたライブラリーが1つまたはいくつかの配列のみから支配的に構成されるまで最良のリガンドが徐々に優先される。次いで、これをクローン化し、配列決定し、それぞれ純粋なリガンドとして結合親和性について試験することができる。

【0073】

選択および/または変異/増幅サイクルを、所望の目的が達成されるまで繰り返す。最も一般的な例では、サイクルの反復で結合強度が有意に改善されなくなるまで、選択/増幅を継続する。反復選択/増幅法は、少なくとも 10^4 個の配列を含むライブラリー中の1つの配列変異体の単離に十分な感受性を示す。原則的にこの方法を使用して、約 10^{18} 個もの異なる核酸種をサンプリングする。ライブラリーのメンバーは、好ましくは、有効な増幅に必要な無作為化配列部分および保存配列を含む。無作為化核酸配列の合成および無作為に切断した細胞核酸からのサイズ選択を含む多数の方法において、配列変異体を産生することができる。変更可能な配列部分は、完全または部分的に無作為な配列を含み得る。無作為化配列を組み込んだ保存配列の下位部分(subportion)もまた含み得る。試験核酸の配列変形形態を、選択/増幅反復前またはその間の変異誘発および特異的改変によって導入または増加することができる。

10

【0074】

結合ポリペプチドおよびアプタマーの選択方法を、以下でさらに説明する。一般に、免疫グロブリン分子の選択技術を、本発明での使用のためにペプチド選択に容易に適用することができる。

20

【0075】

[免疫グロブリン]

免疫グロブリン分子は、広義では、免疫グロブリンスーパーファミリー(2つのシートおよび通常は保存されたジスルフィド結合を含む抗体分子の免疫グロブリン折りたたみ特性を含むポリペプチドファミリー)のメンバーである。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、免疫系(例えば、抗体、T細胞受容体分子など)の広範な役割、細胞接着への関与(例えば、ICAM分子)、および細胞内シグナル伝達(例えば、PDGF受容体などの受容体分子)を含むインビボでの細胞および非細胞相互作用の多数の局面に関連する。したがって、本発明の方法は、標的に結合することができる任意の免疫グロブリンスーパーファミリー分子を使用することができる。免疫グロブリン由来のペプチドまたはフラグメントも使用することができる。

30

【0076】

本明細書中で使用される、「抗体」は、選択した標的に結合することができる完全な抗体または抗体フラグメントをいい、これには、Fv、ScFv、Fab'、およびF(ab)₂、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラを含む操作抗体、CDR移植およびヒト化抗体、ファージディスプレイまたは別の技術を使用して産生された人為的に選択された抗体が含まれる。FvおよびScFvなどの小さなフラグメントは、その小さなサイズおよびそれによる優れた組織分散により診断および治療への適用に有利な性質を有する。好ましくは、抗体は、一本鎖抗体またはscFvである。

40

【0077】

抗体は、毒素または標識などのエフェクタータンパク質を含む変化した抗体であり得る。標識抗体の使用により、インビボでの抗体の分布が画像化される。このような標識は、患者の体内で容易に視覚可能な金属粒子などの放射性標識または放射性不透明標識であり得る。さらに、これらは、蛍光標識(本明細書中に記載のものなど)または患者から取り出した組織サンプルで視覚可能な他の標識であり得る。エフェクター群を有する抗体を、上記の任意の会合手段と連結することができる。

【0078】

抗体を、動物の血清から得るか、モノクローナル抗体またはそのフラグメントの場合、細胞培養により産生させることができる。組換えDNA技術を使用して、確立された手順に

50

したがって、細菌性、酵母、昆虫、または好ましくは哺乳動物細胞培養において抗体を産生させることができる。選択された細胞培養系は、好ましくは、抗体産物を分泌する。

【0079】

インビトロでのハイブリドーマ細胞または哺乳動物宿主細胞の増殖を、通例の標準的培養培地である適切な培養培地（例えば、任意選択的に哺乳動物血清（例えば、ウシ胎児血清）または微量元素および増殖維持補助物質（例えば、正常なマウス腹腔滲出細胞、脾臓細胞、骨髓マクロファージなどの支持細胞、2-アミノエタノール、インスリン、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、オレイン酸など）を補足したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）またはRPMI 1640培地）で行う。細菌細胞または酵母細胞である宿主細胞の増殖を、当該分野で公知の適切な培養培地（例えば、細菌についてはLB、NZCYM、NZYM、NZM、Terrific Broth、SOB、SOC、2xYT、またはM9最少培地、酵母についてはYPD、YEFD、最少培地、または完全最少ドロップアウト培地）で同様に行う。

10

【0080】

タンパク質発現用の宿主としての昆虫細胞の使用は、クローニングおよび発現プロセスが比較的容易で迅速であるという点で有利である。さらに、細菌または酵母発現と比較して、正確に折りたたまれた生物活性タンパク質が得られる可能性が高い。昆虫細胞を、血清含有培地と比較して安価で安全な無血清培地で培養することができる。組換えバキュロウイルスを発現ベクターとして使用することができ、この構築物を使用して任意の多数の鱗翅目細胞株、特に当該分野で公知の*Spodoptera frugiperda* Sf 9であってもよい宿主細胞株にトランスフェクトする。昆虫宿主細胞における組換えタンパク質発現の総説は、Altmannら, 1999, *Glycoconj J* 1999, 16, 109~23およびKost and Condreay 1999, *Curr Opin Biotechnol*, 10, 428~33に記載されている。

20

【0081】

インビトロ産生により、比較的純粋な抗体調製物が得られ、スケールアップにより大量の所望の抗体が得られる。細菌細胞、酵母、昆虫、および哺乳動物細胞培養技術は当該分野で公知であり、均一な浮遊培養（例えば、エアリフト反応器もしくは連続的攪拌反応または固定もしくは気体ため込み式（entrapped）細胞培養（例えば、中空糸、マイクロカプセル、アガロースマイクロビーズまたはセラミックカートリッジ））が含まれる。

30

【0082】

大量の所望の抗体を、インビボでの哺乳動物細胞の増殖によって得ることもできる。この目的のために、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を、組織適合哺乳動物に注射して、抗体産生腫瘍を増殖させる。任意選択的に、動物を、注射前に炭化水素、特にプリスタン（テトラメチルペンタデカン）などの鉱物油で感作する。1~3週間後、これらの哺乳動物の体液から抗体を単離する。例えば、適切な骨髓腫細胞のBalb/cマウス由来の抗体産生脾臓細胞との融合によって得たハイブリドーマ細胞または所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株Sp2/0由来のトランスフェクト細胞を、任意選択的にプリスタンで前処理したBalb/cマウスに腹腔内注射し、1~2週間後、動物から腹水を取り出す。

40

【0083】

上記および他の技術は、例えば、Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256: 495~497; 米国特許第4,376,110号; Harlow and Lane, 「抗体：実験マニュアル」, 1988, Cold Spring Harbor (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に考察されている。組換え抗体分子の調製技術は、上記引例および、例えば、EP 0623679、EP 0368684、及びEP 0436597 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) にも記載されている。

【0084】

50

細胞培養上清を、好ましくは免疫ブロッティングによる所望の標的を発現する細胞の免疫蛍光、酵素免疫アッセイ（例えば、サンドイッチアッセイまたはドットアッセイ）または放射免疫アッセイによって所望の抗体についてスクリーニングする。

【0085】

抗体の単離のために、腹水中の培養上清中の免疫グロブリンを、硫酸アンモニウムでの沈殿、ポリエチレングリコールなどの吸湿性物質に対する透析、選択膜による濾過などによって濃縮することができる。必要および/または所望である場合、抗体を、日常的なクロマトグラフィー法（例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロースでのクロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー（例えば、標的を含むタンパク質またはプロテインAでのアフィニティークロマトグラフィー））で精製する。

10

【0086】

上記手順で産生した抗体を、標準的手順によって細胞から核酸の単離によってクローン化することができる。通常、抗体の核酸可変ドメインを単離し、これを使用してscFvなどの抗体フラグメントを構築することができる。

【0087】

したがって、本発明は、好ましくは、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードするインサートを含む組換え核酸を使用する。定義によって、このような核酸は、コード核酸およびその相補的核酸またはこれらの法補的（一本鎖）核酸自体からなるコード一本鎖核酸、二本鎖核酸を含む。

【0088】

さらに、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードする核酸は、天然に存在する重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインまたはその変異体をコードする真の（authentic）配列を有する酵素合成または化学合成核酸であり得る。真の配列の変異体は、1つまたは複数のアミノ酸が欠失しているか1つまたは複数の他のアミノ酸と交換されている上記抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードする核酸である。好ましくは、前記改変は、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインのCDRの外側である。このような変異核酸は、1つまたは複数のヌクレオチドが同一のアミノ酸をコードする新規のコドンに置換されるサイレント変異であることも意図される。このような変異配列はまた、縮重配列である。縮重配列は、無制限のヌクレオチドが元のコードされたアミノ酸配列を変化することなく他のヌクレオチドと置換されるという点での遺伝コードの意味の範囲内で縮重している。このような縮重配列は、重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインの任意選択的発現を得るための特定の宿主（特に、酵母、細菌、または哺乳動物細胞）によって好まれる特定のコードのその異なる制限部位および/または頻度により有用であり得る。

20

30

【0089】

用語「変異」は、当該分野で公知のDNAのインビトロまたはインビボ変異誘発によって得られるDNA変異を含むことを意図する。

【0090】

組換えDNA技術を使用して、本発明の抗体を改良することができる。したがって、診断または治療への適用において免疫原性を減少させるためにキメラ抗体を構築することができる。さらに、免疫原性を、CDR移植（欧州特許第0239400（Winter））および任意選択的にフレームワークの改変（欧州特許第0239400；Riechmannら，1988、Nature 322：323～327，および国際特許出願WO 90/07861（Protein Design Labs）に概説されている）によるヒト化抗体によって最小にすることができる。

40

【0091】

したがって、本発明はまた、ヒト定常ドメイン（例えば 1、2、3、または 4、好ましくは 1または 4）に融合した抗体の重鎖可変ドメインをコードするインサートを含む組換え核酸を使用する。同様に、本発明は、ヒト定常ドメイン（または、好

50

ましくは) に融合した抗体の軽鎖可変ドメインをコードするインサートを含む組換え DNA に関する。

【0092】

より好ましくは、本発明は、好ましくは CDR 移植軽鎖および重鎖可変ドメインのみである CDR 色抗体を使用する。有利には、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは、任意選択的に宿主細胞中の抗体のプロセッシングを容易にするシグナル配列および/または抗体の精製を容易にするペプチドをコードする DNA および/または切断部位および/またはペプチドスペーサーおよび/または効果分子を含むスペーサー基によって連結している。このような抗体は scFv である。

【0093】

抗体を、抗体を抗体遺伝子の変異誘発によってさらに作製して、抗体の人工レパートリーを産生させることができる。下記にさらに考察されているように、この技術により抗体ライブラリーが調製される。抗体ライブラリーはまた、市販されている。したがって、本発明は、免疫グロブリン源として免疫グロブリンの人工レパートリー、好ましくは人工 scFv レパートリーを使用することが有利である。

【0094】

単離またはクローン化抗体を、他の分子(例えば、当該分野で公知のプロトコールを使用した化学的カップリングによる核酸またはタンパク質会合手段)に連結することができる(例えば、Harlow and Lane, 「抗体:実験マニュアル」, 1988, Cold Spring Harbor, and Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1991, 「分子クローニング:実験マニュアル」, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

【0095】

[ライブラリーおよび選択系]

本発明で使用する免疫グロブリンを、免疫グロブリンポリペプチドの人工レパートリーを含むライブラリーから単離することができる。有利には、免疫グロブリンを所望の標的に対するスクリーニングによって予め選択して、実質的に全てが意図する標的に特異的な免疫グロブリンを使用して本発明の方法を行う。

【0096】

任意のライブラリー選択系を、本発明と共に使用することができる。巨大ライブラリーの所望のメンバーの単離のための選択プロトコールは当該分野で公知であり、代表的にはファージディスプレイ技術である。種々のペプチド配列が糸状バクテリオファージ(Scott and Smith(前出)の表面上に表示されるこのような系は、標的抗原に結合する特異的抗体フラグメントのインビトロ選択および増幅用の抗体フラグメント(およびこれらをコードするヌクレオチド配列)のライブラリーの作製に有用であると証明されている。V_H および V_L 領域をコードするヌクレオチド配列を、大腸菌のペリプラズム領域に指向するリーダーシグナルをコードする遺伝子フラグメントに連結して、その結果得られた抗体フラグメントは、典型的にはバクテリオファージ被覆タンパク質(例えば、pIII または pVII)としてバクテリオファージの表面上に表示される。あるいは、抗体フラグメントは、ファージキャプシド(ファージボディ)上に外来的に表示される。ファージベースのディスプレイ系の利点は、これらは生物系であるので、選択したライブラリーメンバーを細菌細胞中の選択したライブラリーメンバーを含むファージの増殖によって簡単に増幅することができる点である。さらに、ポリペプチドライブラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列をファージまたはファージミドベクターに含むので、配列決定、発現、およびその後の遺伝子操作が比較的単純である。

【0097】

バクテリオファージ抗体ディスプレイライブラリーおよびファージ発現ライブラリーの構築法は、当該分野で周知である(McCaffertyら, 1990、前出; Kangら, 1991、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88, 4363

10

20

30

40

50

; Clacksonら, 1991, Nature, 352、624; Lowmanら, 1991、Biochemistry, 30, 10832; Burtonら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88、10134; Hoogenboomら, 1991, Nucleic Acids Res., 19、4133; Changら, 1991、J. Immunol., 147, 3610; Breitlingら, 1991, Gene, 104, 147, Marksら, 1991, 前出; Barbassら, 1992, 前出; Hawkins and Winter, 1992, J. Immunol., 22、867; Marksら, 1992, J. Biol. Chem., 267, 16007; Lernerら, 1992, Science, 258: 1313 (引用することにより本明細書の一部をなすものとする)。

10

【0098】

1つの特に有利なアプローチは、scFvファージライブラリーの使用であった (Bird, R.E.ら, 1988, Science 242: 423~6, Hustonら, 1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879~5883; Chaudharyら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066~1070; McCaffertyら, 1990、前出; Clacksonら, 1991, 前出; Marksら, 1991, 前出; Chiswellら, 1992, Trends Biotech., 10: 80; Marksら, 1992, 前出)。バクテリオファージ被覆タンパク質上に表示されるscFvライブラリーの種々の実施形態が記載されている。ファージディスプレイアプローチの精密化も公知であり、例えば、WO96/06213およびWO92/01047 (Medical Research Councilら) ならびにWO97/08320 (Morphosys、前出) (引用することにより本明細書の一部をなすものとする) に記載されている。

20

【0099】

別のライブラリー選択技術には、バクテリオファージプラークとしてか溶原菌のコロニーとして直接スクリーニングすることができるバクテリオファージ発現系 (共に、先に記載されている (Huseら, 1989, Science, 246: 1275; Caton and Koprowski, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87; Mullinaxら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 8095; Perssonら, 1991、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88: 2432) が含まれ、本発明で使用されている。これらの発現系を使用して、約 10^6 またはそれ以上のオーダーでライブラリーの多数の異なるメンバーをスクリーニングすることができる。他のスクリーニング系は、例えば、ライブラリーメンバーの直接的な化学合成に依存する。1つの以前の方法は、WO84/03564などに記載の1組のピンまたはロッド上でのペプチドの合成を含む。各ビーズが各ライブラリーメンバーであるペプチドライブラリーを形成するビーズ上でのペプチド合成を含む類似の方法は、米国特許第4,631,211号に記載されており、関連する方法は、WO92/00091に記載されている。ビーズベースの方法の有意な改良は、各ライブラリーメンバーのアミノ酸配列の識別を容易にするための固有の識別タグ (オリゴヌクレオチドなど) を使用した各ビーズのタグ化を含む。これらの改良ビーズに

30

40

【0100】

別の化学合成法は、アレイ上の異なる所定の位置でそれぞれ異なるライブラリーメンバー (例えば、固有のペプチド配列) を位置付ける様式での表面上でのペプチド (またはペプチド模倣物) のアレイ合成を含む。各ライブラリーメンバーの同一性をアレイ中のその空間的位置によって識別する。所定の分子 (例えば、受容体) と反応ライブラリーメンバーとの間に結合相互作用が起こった場合アレイ中の位置を識別し、それにより、空間的位置を基本とした反応性ライブラリーメンバーの配列が識別される。これらの方法は、米国特許第5,143,854号; WO90/15070およびWO92/10092; Fodorら, 1991、Science、251: 767; Dower and Fodor

50

、1991、Ann. Rep. Med. Chem., 26:271に記載されている。

【0101】

ポリペプチドまたはヌクレオチドライブラリーの他の作製系は、ライブラリーメンバーのインビトロ合成用の無細胞機構の使用を含む。1つの方法では、RNA分子を、標的リガンドに対する別の選択ラウンドおよびPCR増幅によって選択する(Tuerk and Gold, 1990, Science, 249:505; Ellington and Szostak, 1990, Nature, 346:818)。類似の技術を使用して、所定のヒト転写因子に結合するDNA配列を識別することができる(Thiesen and Bach, 1990, Nucleic Acids Res., 18:3203; Beaudry and Joyce, 1992, Science, 257:635; WO92/05258およびWO92/14843)。巨大ライブラリーの作製方法と類似の方法で、インビトロ翻訳を使用して、ポリペプチドを合成することができる。一般に安定化ポリソームを含むこれらの方法は、WO88/08453、WO90/05785、WO90/07003、WO91/02076、WO91/05058、およびWO92/02536にさらに記載されている。ファージに基づくものではない別のディスプレイ系は、WO95/22625などに開示されているものであり、WO95/11922(Affymax)は、選択のためにポリペプチドを表示するためのポリソームを使用している。これらおよび全ての上記の文献もまた、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

10

【0102】

ファージまたは他のクローン化ライブラリーの使用の代わりは、選択標的で免疫化された動物の脾臓由来の核酸、好ましくはRNAの使用である。このようにして得られたRNAは、免疫グロブリンの天然のライブラリーを示す。本発明によれば、V領域およびC領域のmRNAの単離により、抗体フラグメント(FabまたはFvなど)を細胞内に発現させることができる。

20

【0103】

簡単に述べれば、RNAを免疫化動物の脾臓から単離し、RNAプール由来のV_HおよびV_LcDNAの選択的増幅のためにPCRプライマーを使用する。このようにして得られたV_HおよびV_L配列を連結してscFv抗体を作製する。PCRプライマー配列は、公開したV_HおよびV_L配列に基づき、これらはキットの形態で市販されている。

30

【0104】

本発明の好ましい態様は、細胞内免疫グロブリン(例えば、細胞内抗体)の使用である。細胞内抗体または内部物質(intrabody)は、高等生物の細胞中での抗原認識において機能することが示されている(Cattaneo, A. & Biocca, S., 1997、「細胞内抗体:開発および適用」, Landes and Springer-Verlagに概説されている)。この相互作用は、細胞質、核、または分泌経路で首尾よく阻害される細胞タンパク質機能に影響を与えることができる。この効果は、植物生物学におけるウイルス耐性で証明されており(Tavladoraki, P.ら, 1993)、Nature 366:469~472)、HIVウイルスタンパク質(Mhashilkar, A.M.ら, 1995)、EMBO J 14:1542~51; Duhan, L. & Pomerantz, R.J., 1994)、Nucleic Acids Res 22:5433~8; Maciejewski, J.P.ら, 1995, Nat Med 1:667~73; Levy-Mintz, P.ら, 1996, J. Virol. 70:8821~8832)および癌産物(Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P. & Cattaneo, A., 1993, Biochem Biophys Res Commun 197:422~7; Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N. & Cattaneo, A., 1994, Biotechnology (N.Y) 12:396~9; Cochet, O.ら, 1998, Cancer Res 58:1170~6)への細胞内抗体結合のいくつかの適用が報告されている。

40

50

【0105】

s c F vライブラリー由来の細胞内免疫グロブリンの選択方法が記載されている（国際特許出願W O 0 0 5 4 0 5 7を参照のこと）。この選択方法（V i s i n t i n , M . , T s e , E . , A x e l s o n , H . , R a b b i t t s , T . H . a n d C a t t a n e o , A . , 1 9 9 9も参照のこと）。2ハイブリッドインビボ系を使用した細胞内機能についての抗体の選択（P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 6 , 1 1 7 2 3 ~ 1 1 7 2 8）は、酵素2ハイブリッド系などで認められる細胞環境内で検出されるべきタンパク質相互作用能力を利用している。これは、いくつかの抗体s c F vフラグメントはインビボで有利に折りたたまれてV H - V L依存様式（すなわち、抗体結合部位を介する）で抗原に結合し、それにより、十分なs c F vがスクリーニングされた場合に、種々の抗体特異性のライブラリーを使用してその識別が容易になるという事実に基づいている。スクリーニング系は、L e x A DNA結合ドメインに融合した「バイト（b a i t）」抗原の酵母細胞発現およびV P 1 6転写活性化ドメインに融合した「プレイ（p r e y）」s c F vのライブラリーを含む。酵母細胞内環境中での抗原バイトと任意の特異的抗体s c F vフラグメントとの相互作用により、DNA結合ドメインおよび活性化ドメインが隣接するタンパク質複合体が形成される。これにより、H I S 3およびL a c Zなどの染色体レポーター遺伝子が活性化されて識別が容易になるので、s c F vをコードするDNAベクターを含む酵母の単離される（すなわち、単離して抗原特異的s c F vのDNA配列を得ることができる）。このアプローチの主な制限は、酵母抗体と抗原との相互作用系でスクリーニングすることができるs c F v - V P 1 6融合プレイの数（便利には、2 ~ 5 × 1 0⁶個）である。しかし、例えば1つまたは複数のインビトロファージs c F vライブラリースクリーニング（パンニング）の使用によって有効なライブラリーサイズを増加させることができる。例えば、インビボ酵母抗体 - 抗原相互作用スクリーニング前の表面上に被覆された細菌産生抗原の使用。

10

20

【0106】

[レポーターの細胞への送達]

第1のレポーターおよび第2のレポーターを細胞内の構成要素に結合させるために、細胞の細胞内環境内にレポーターを得る必要がある。第1および/または第2のレポーターがポリペプチド（「ポリペプチドレポーター」）（例えば、抗体カスパーゼ3融合タンパク質）である場合、これを、第1および/または第2のレポーターをコードする適切な核酸での細胞のトランスフェクションによって行うことが好ましい。レポーターのいずれかまたは両方が核酸からなる場合（「核酸レポーター」）、核酸自体を細胞にトランスフェクトすることができる。

30

【0107】

ポリペプチドレポーターをコードする核酸を、発現用のベクターに組み込むことができる。本明細書中で使用される、「ベクター（またはプラスミド）」は、発現細胞への外来DNAの移入に使用される個別のエレメントをいう。このような伝達体の選択および使用は、十分に当業者の範囲内である。多数のベクターを利用可能であり、適切なベクターの選択は、意図するベクターの用途、ベクターに挿入される核酸のサイズ、およびベクターで形質転換される宿主細胞に依存する。各ベクターは、その機能に依存する種々の成分および適合する宿主細胞を含む。ベクター成分には、一般に、1つまたは複数の以下のものが含まれるが、これらに限定されない。複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、転写終止配列、およびシグナル配列。

40

【0108】

ベクターはまた、1つまたは複数の内部リボゾーム結合部位（I R E S）、を含んでよく、これらの部位は、好ましくは、遺伝子を挿入することができる1つまたは複数のマルチクローニング部位（M C S）に隣接するベクター中に配置されている。したがって、このようなベクターの使用により、発現構築物にクローン化される1つを超えるインサートが得られ、この構築物の転写により内部リボゾーム結合部位を含む各リボゾーム結合部位から転写が起こり、ニシストロンまたは多シストロンメッセンジャーRNAが得られる。こ

50

れにより、1つの発現構築物から1つを超える発現ポリペプチドが得られる。

【0109】

さらに、ポリペプチドをコードする核酸または核酸レポーターまたはこれらの任意の成分を、一般的操作および核酸増幅目的でクローニングベクターに組み込むことができる。

【0110】

発現ベクターおよびクローニングベクターの両方は、1つまたは複数の宿主細胞中でベクターを複製することができる核酸配列を含む。典型的には、クローニングベクターでは、この配列は、ベクターが宿主染色体DNAと独立して複製することができる配列であり、複製起点または自己複製配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスで周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適切であり、2ミクロンのプラスミド起点は酵母に適切であり、種々のウイルス起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス）は、哺乳動物細胞のクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点成分は、これらが高レベルDNA複製と競合する哺乳動物細胞（COS細胞など）で使用されない場合、哺乳動物発現ベクターに必要ではない。

10

【0111】

ほとんどの発現ベクターは、シャトルベクターである（すなわち、少なくとも1つの生物クラスで複製することができるが、発現用の別の生物クラスにトランスフェクトすることができる）。例えば、ベクターは、クローン化された大腸菌であり、宿主細胞の染色体で独立して複製することができないにもかかわらず、このベクターを酵母または哺乳動物細胞にトランスフェクトする。DNAを、宿主ゲノムへの挿入によって複製することもできる。しかし、核酸の切り出しに制限酵素消化が必要であるので、ゲノムDNAの回収は、外因的に複製したベクターの回収よりも複雑である。DNAをPCRによって増幅し、いかなる複製成分を使用することなく宿主細胞に直接トランスフェクトすることができる。

20

【0112】

有利には、発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択マーカーともいわれる選択遺伝子を含み得る。この遺伝子は、選択培養培地で成長する形質転換宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする。選択遺伝子を含むベクターで形質転換されていない宿主細胞は、培養培地で生存しない。典型的な選択遺伝子は、抗生物質および他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリン）への耐性を付与するか、栄養要求性欠損症を補足するか、天然培地から利用不可能な必須の栄養素を供給するタンパク質をコードする。

30

【0113】

酵母に適切な選択遺伝子マーカーに関して、マーカー遺伝子の表現型発現のための転写についての選択を容易にする任意のマーカー遺伝子を使用することができる。酵母の適切なマーカーは、例えば、抗生物質G418、ハイグロマイシン、またはブレオマイシンへの耐性を付与し、栄養要求性酵母変異体の表現型を提供する（URA3、LEU2、LYS2、TRP1、またはHIS3遺伝子）マーカーである。

【0114】

ベクターの複製が大腸菌で都合よく行われるので、大腸菌遺伝子マーカーおよび大腸菌の複製起点を有利に含む。これらは、大腸菌複製起点およびアンピシリンなどの抗生物質への耐性を付与する大腸菌遺伝子マーカーの両方を含む大腸菌プラスミド（pBR322）、Blue script（登録商標）、またはpUCプラスミド（例えばpUC18またはpUC19）から得ることができる。

40

【0115】

哺乳動物用の適切な選択マーカーは、所望の核酸を発現する細胞の識別が可能なマーカーである（ジヒドロホレートダクターゼ（DHFR、メトトレキセート耐性）、チミジンキナーゼ、またはG418もしくはハイグロマイシンへの耐性を付与する遺伝子など）。取り込まれてマーカーを発現する形質転換体のみが固有に生存に適應する選択下に哺乳動物細胞形質転換体を置く。DHFRまたはグルタミンシンターゼ（GS）マーカーの場合

50

、選択圧が段階的に増加して、両選択遺伝子および連結した核酸が（その染色体組み込み部位で）増幅する条件下での形質転換体の培養によって選択圧に課することができる。増幅は、所望のタンパク質をコードすることができる密接に関連する遺伝子と共に、増殖に重要なタンパク質の産生が要求される遺伝子を組換え細胞の染色体内にタンデムに反復しているプロセスである。所望のタンパク質の増加は、通常、増幅されたDNAから合成される。

【0116】

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主細胞によって認識され、所望の核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含む。このようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得る。プロモーターは、元のDNAからのプロモーターの除去およびベクターへの単離されたプロモーター配列の挿入によって作動可能に連結されている。天然のプロモーター配列および多数の異種プロモーターの両方を使用して、任意選択的に適切な会合手段と共に免疫グロブリンをコードする核酸の増幅および/または発現を指示することができる。用語「作動可能に連結した」は、記載の成分がその意図する様式で機能する関係である並列をいう。コード配列に「作動可能に連結した」調節配列は、コード配列の発現が調節配列と適合する条件下で行われるような方法でライゲートする。

10

【0117】

原核宿主での使用に適切なプロモーターには、例えば、ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系、およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。これらのヌクレオチド配列は公表されているので、当業者は、リンカーまたはアダプターを使用して所望の核酸にこれらをライゲートして、任意の必要な制限部位を得ることができる。細菌系用のプロモーターもまた、一般に、核酸に作動可能に連結したシャイン・ダルカルノ配列を含む。

20

【0118】

好ましい発現ベクターは、細菌中で機能することができるファージまたはT7などのバクテリオファージのプロモーターを含む細菌発現ベクターである。最も広く使用されている発現形のうちの1つでは、融合タンパク質をコードする核酸を、T7 RNAポリメラーゼによってベクターから転写することができる (Studierら, Methods in Enzymol. 185; 60~89, 1990)。pETベクターでの結合で使用される大腸菌BL21 (DE3) 宿主株では、T7 RNAポリメラーゼを、宿主細菌中で溶原菌DE3から産生され、IPTG誘導lacUV5プロモーターの調節下で発現する。この系は、多数のタンパク質の過剰産生に首尾よく使用されている。あるいは、ポリメラーゼ遺伝子を、市販のCE6ファージ (Novagen, Madison, USA) などのintファージでの感染によってファージに移入することができる。他のベクターには、PLEX (Invitrogen, NL) などのPLプロモーターを含むベクター、pTrcHisXpressTm (Invitrogen) またはpTrc99 (Pharmacia Biotech, SE) などのtrcプロモーターを含むベクター、またはpKK223-3 (Pharmacia Biotech) またはPMAL (New England Biolabs, MA, USA) などのtacプロモーターを含むベクターが含まれる。

30

40

【0119】

酵母宿主に使用する適切なプロモーターを調節することができるか構成性であり、好ましくは、高度に発現された酵母遺伝子、特にサッカロマイセス・セレヴィシエ遺伝子由来である。したがって、TRP1遺伝子、ADHIまたはADHII遺伝子、酸ホスファターゼ (PH05) 遺伝子のプロモーター、aまたは因子をコードする酵母交配表現型遺伝子のプロモーターまたは解糖酵素をコードする遺伝子由来のプロモーター (エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP)、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピ

50

ルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、またはグルコキナーゼ遺伝子、サッカロマイセス・セレヴィシエGAL4遺伝子、S.pombe nmt1遺伝子など)またはTATA結合タンパク質(TBP)由来のプロモーターを使用することができる。さらに、ある酵母の上流活性化配列(UAS)および別の酵母遺伝子の機能的TATAボックスを含む下流プロモーターエレメントを含むハイブリッドプロモーター(例えば、酵母PH05遺伝子のUASおよび酵母GAP遺伝子の機能的TATAボックスを含む下流プロモーターエレメントを含むハイブリッドプロモーター)を使用することが可能である。適切な構成性PH05プロモーターは、例えば、PH05遺伝子のヌクレオチド-173から始まってヌクレオチド-9で終わるPH05(-173)プロモーターエレメントなどの上流調節エレメント(UAS)を欠く短縮酸ホスファターゼPH05プロモーターである。

10

【0120】

哺乳動物宿主中のベクター由来の遺伝子転写を、ポリオマウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、レトロウイルス、およびサルウイルス40(SV40)などのウイルスゲノム由来のプロモーター、アクチンプロモーターまたは強力プロモーター(例えば、リボゾームタンパク質プロモーター)などの異種哺乳動物プロモーターおよび免疫グロブリン配列と正常に関連するプロモーターによって調節することができる。

【0121】

高等真核生物由来の核酸の転写を、ベクターへのエンハンサー配列の挿入によって増加することができる。例えば、pEF-BOSベクター(Mizushimaら, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 5322)は、クローン化遺伝子の発現レベルを上昇させる伸長因子1(EF-1)プロモーターおよびエンハンサーを含む。エンハンサーは比較的配向および位置依存性である。哺乳動物遺伝子由来の多数のエンハンサー配列(エラスターゼおよびグロビン)が公知である。しかし、典型的には、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例には、複製起点の後期側(bp100~270)のSV40エンハンサーおよびCMV初期プロモーターエンハンサーが含まれる。エンハンサーを、所望の核酸の5'または3'の位置で(好ましくは、プロモーターから5'部位に存在する)ベクターにスプライシングすることができる。

20

【0122】

有利には、真核生物発現ベクターは、遺伝子座調節領域(LCR)を含み得る。LCRは、ベクターの染色体取り込みが起こる恒久的にトランスフェクトされた真核細胞の状況で遺伝子が発現された場合に特に重要である、宿主細胞クロマチンに取り込まれた導入遺伝子の高レベル取り込み部位依存性発現を指示することができる。

30

【0123】

真核生物発現ベクターはまた、転写の終結またはmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、一般に、真核生物またはウイルスDNAまたはcDNAの5'および3'非翻訳領域から利用可能である。これらの領域は、免疫グロブリンをコードするmRNAの非翻訳部分のポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

40

【0124】

哺乳動物細胞中で核酸を一過性に発現する発現ベクターが本発明の実施で特に有用である。一過性発現は、通常、宿主細胞が多数の発現ベクターのコピーを蓄積する(つまり、高レベルで所望の遺伝子産物を合成する)ように、宿主細胞で有効に複製することができる発現ベクターの使用を含む。

【0125】

本発明のベクターの構築には、従来のライゲーション技術を使用することができる。単離したプラスミドまたはDNAフラグメントを、切断し、構成変更し、所望の形態にライゲートし必要なプラスミドを作製する。所望ならば、公知の様式で構築したプラスミドの正確な配列を確認する分析を行う。適切な発現ベクターの構築法、インビトロ転写物の調製

50

法、宿主へのDNAの移入法、および遺伝子産物発現および機能を評価するための分析法は、当業者に公知である。遺伝子の存在、増幅、および/または発現を、例えば、本明細書中に記載の配列に基づき得る適切な標識プローブを使用して、従来のサザンブロッティング、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロッティング、ドットブロッティング(DNAまたはRNA分析)、または*in situ*ハイブリッド形成サンプルを直接測定することができる。当業者は、所望ならばどのようにしてこれらの方法を改変することができるのかを予見することができる。

【0126】

第1および/または第2のレポーター、免疫グロブリン、ペプチドフラグメントなどを、微量注入法または細胞膜と融合することができるリポソームなどの小胞を使用した送達によって直接移入することができる。ウイルスおよび他の融合誘導ペプチドを使用して、膜融合を促進し、細胞の原形質に送達させることができる。

10

【0127】

他で好ましくは、レポーターなどを、原形質膜および/または核膜を通過することができるタンパク質とのタンパク質融合体または接合体として細胞に送達させることができる。好ましくは、レポーターを、転座活性を担うこのようなタンパク質由来のドメインまたは配列に融合するか結合する。好ましい転座ドメインおよび配列には、HIV-1トランス活性化タンパク質(Tat)、ショウジョウバエアンテナペディアホメオドメインタンパク質および単純ヘルペス1型ウイルスVP22タンパク質が含まれる。

【0128】

外来的に付加されたHIV-1トランス活性化タンパク質(Tat)は、原形質膜を介して転座して、核に到達してウイルスゲノムをトランス活性化することができる。転座活性は、アミノ酸37~72(Fawellら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 664~668)、37~62(Andersonら, 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 876~884)、および49~58(HIV-Tatの塩基配列RKKRRQRRRを有する)で識別されている。Vivesら, 1997, J. Biol. Chem. 272, 16010~7は、細胞遺伝子の転座、核局在化、およびトランス活性化に重要であると考えられるアミノ酸48~60(CGRKKRRQRPPQC)からなる配列を同定した。ガラクトシダーゼおよびHIV-TATタンパク質形質導入ドメインからなる融合タンパク質の腹腔内注射により、マウスの全ての組織に生物活性融合タンパク質が送達される(Schwarzeら, 1999, Science 285, 1569~72)。

20

30

【0129】

ショウジョウバエアンテナペディアホメオドメインタンパク質の第3のヘリックスはまた、類似の性質を有することが示されている(Prochiantz, A., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci., 886, 172~9に概説)。アンテナペディアの転座を担うドメインは、配列RQIKIWFQNRRMKWKKを有する塩基性アミノ酸に豊富な16個のアミノ酸長ペプチド(long peptide)に局在している(Derossiら, 1994, J. Biol. Chem., 269, 10444~50)。このペプチドを使用して、生物活性物質を細胞内の細胞の原形質および核に向けている(Theodoreら, 1995, J. Neurosci. 15, 7158~7167)。ショウジョウバエアンテナペディアホメオドメインの第3のヘリックスの細胞内面化は、レセプター独立性であるようであり、転座プロセスは膜リン脂質との直接的相互作用を含むと示唆されている(Derossiら, 1996, J. Biol. Chem., 271, 18188~93)。単純ヘルペスウイルスのVP22外被タンパク質は細胞内輸送が可能であり、細胞の下位集団で発現するVP22タンパク質が集団中の他の細胞に広がる(Elliott and O'Hare, 1997, Cell 88, 223~33)。融合タンパク質は、GFP(Elliott and O'Hare, 1999, Gene Ther. 6, 149~51)、チミジンキナーゼタンパク質(Dilberら, 1999, Gene Ther. 6, 12~21)、またはp53(Pheilanら, 1998,

40

50

Nat Biotechnol 16, 440~3) からなり、VP22 は、この様式で細胞に標的化されている。

【0130】

核および/または原形質膜を介して転座することができるタンパク質由来の特定のドメインまたは配列を、変異誘発または欠失を研究することによって識別することができる。あるいは、候補配列を有する合成または発現ペプチドを、レポーターに連結し、転座アッセイを行うことができる。例えば、合成ペプチドを、Vivesら, 1997, J Biol Chem 272, 16010~7に記載の方法によって蛍光に結合させ、転座を蛍光顕微鏡によって監視することができる。あるいは、レポーターとして緑色蛍光タンパク質を使用することができる (Pheilanら, 1998, Nat Biotechnol 16, 440~3)。

【0131】

任意のドメインまたは配列または上記または転座活性を有すると同定されているものを使用して、第1および/または第2のレポーターを細胞の細胞質または核に方向付けることができる。

【0132】

[シグナルの発生]

本発明の方法では、シグナルを、構成要素へのレポーターの結合と共に2つのレポーターの相互作用によって発生させることが有利である。したがって、発生したシグナルは、本発明の方法で使用した分子の性質に依存する。

【0133】

第1の実施形態では、シグナルは、細胞内のアポトーシスまたはプログラム細胞死の活性化である。第1および第2のレポーター上にそれぞれ配列した2つのカスパーゼ3部分の安定な相互作用は、カスパーゼ活性を自己活性化し、細胞内のアポトーシスが開始される。アポトーシス細胞死は、細胞の収縮、クロマチン濃縮、細胞質の気泡、膜浸透性の増加、および染色体内DNAの切断によって特徴付けられ (Kerrら, 1992, FASEB J. 6: 2450; and Cohen and Duke, 1992, Ann. Rev. Immunol. 10: 267)、シグナルを検出する必要がある場合、これらの任意の特徴を使用することができる。

【0134】

上記の実施形態では、細胞内のカスパーゼ活性のアッセイによってシグナルを検出することもできることが認識される。

【0135】

別の実施形態では、シグナルは、細部内のプロテアーゼ活性の発生であり得る。カスパーゼ活性は、上述のように、この方法で検出される。さらに、プロテアーゼ活性は、ユビキチン媒介タンパク質分解に関連する活性、好ましくはプロテアソーム活性、最も好ましくは26Sプロテアソーム活性であり得る。

【0136】

ユビキチン媒介タンパク質分解は、「細胞のユビキチン化および生物学」に概説されている (Jan-Michael Peters, J. Robin Harris and Dan Finley 編, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands)。ユビキチン媒介タンパク質分解では、ユビキチンとの共有結合の改変によってタンパク質を標的化する。ユビキチン活性化 (E1) 酵素、ユビキチン結合 (E2) 酵素、およびユビキチンライゲーション (E3) 酵素を含む3つの型の酵素がこの作業に関連する。ユビキチンは、標的タンパク質上でリジン残基と共有結合している (標識するため) 小型で高度に保存されたタンパク質である。ユビキチン関連酵素は、タンパク質構造およびアミノ酸配列の変化によって損傷またはミスフォールディングタンパク質を認識することができる。次いで、ユビキチン結合酵素が元の酵素にさらなるユビキチン分子を付加するように、標的タンパク質の結合部位でユビキチン分子の鎖が形成される。得られたポリユビキチン鎖を、プロテアソーム (プロ

テアソームのいずれかの末端でのタンパク質複合体は、認識プロセスに関連する)によって認識し、次いで、標識タンパク質を分解する。

【0137】

したがって、この実施形態を、ユビキチン媒介タンパク質分解経路の成分のドメインを含む第1のレポーターおよび第2のレポーターによって実現することができ、安定な相互作用の際にその成分に関連する活性を発生してタンパク質分解を誘導する。成分は、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、またはユビキチンリガーゼ (SCF など) を含む得る。本発明の特に好ましい実施形態では、第1および第2のレポーターは、F-boxタンパク質またはモチーフのドメインを含む。

【0138】

F-boxモチーフは、タンパク質-タンパク質相互作用を媒介するように機能する。F-boxタンパク質は、SCFユビキチン-リガーゼ (E3) 複合体として最初に説明されていた (Skowryaら, Cell 1997, 91:209~219; Feldmanら, Cell 1997, 91:221~230)。SCF複合体は、以下の4つの成分を含む。Skp1、クリン、Rbx1/Roc/Hrt1、およびF-boxタンパク質 (Tyers and Jorgensen, Curr Opin Genet Dev 2000, 10:54~64; Deshaies, Annu Rev Cell Dev Biol 1999, 15:435~467; Craig and Tyers, Prog Biophys Mol Biol 1999, 72:299~328)。SCF複合体は、基質とユビキチン結合酵素との間の相互作用を容易にし、基質にユビキチンを共有結合によって導入する。その後、ポリユビキチン化基質は26Sプロテアソームによって分解される (Hershko and Ciechanover, Annu Rev Biochem 1998, 67:425~479)。F-boxタンパク質は、特異的基質に結合するSCF複合体のサブユニットであり、これは、F-box自体によるSkp1の結合によって複合体に連結する。F-boxの詳細な概説およびユビキチン媒介タンパク質分解におけるその役割は、Kipreos and Pagano, 2000, Genome Biology, 1(5), reviews 3002, 1-3002, 7に記載されている。したがって、F-boxは、タンパク質分解のためのプロテアソームの利用に重要な役割を果たしている。

【0139】

第1および/または第2のレポーターは、F-boxモチーフを含み得る。しかし、F-boxモチーフが3つのヘリックスを含むので、第1のレポーターは1つまたは複数のヘリックスを含み、第2のレポーターは、残りのヘリックスを含むことが好ましい。好ましくは、第1のレポーターは第1のヘリックスを含み、第2のレポーターは第2および第3のヘリックスを含む。あるいは、第1のレポーターは第1および第2のヘリックスを含み、第2のレポーターは第3のヘリックスを含む。さらに、F-boxの他の部分は分裂してよく、完全なヘリックスを作製する必要はない。F-box部分のヘリックスドメインを含むこのようなレポーターの構築に、当該分野で公知の標準的な技術を使用することができる。

【0140】

構成要素への結合を介した第1のレポーターと第2のレポーターとの間の安定な相互作用により、種々のヘリックスドメインとF-boxモチーフ活性の再構築物との間で会合が可能である。これにより、構成要素または構成要素を含むポリペプチドがユビキチン標識され、構成要素/ポリペプチドのタンパク質分解を介して分解される。上記のように、このようなタンパク質分解を、当該分野で公知の手段によって容易に検出することができる。

【0141】

例えば、TRCPなどのF-boxタンパク質を、哺乳動物および/または単細胞もしくは組織からクローン化し、直接またはProリンカー (Pro₁₀) またはGly-Serリンカー ((Gly₄-Ser)₃) などのリンカーを介してscFvに融合すること

10

20

30

40

50

ができる。s c F v は、有利には、構築物の N 末端に存在する。F - b o x および W D ドメインを共に含む構築物もまた使用することができる。F - b o x の各ヘリックスを使用する場合、第 1 のレポーターは、有利には、H 1 または H 1 および H 2 を含み、第 2 のレポーターは、有利には H 2 および H 3 または H 3 をそれぞれ含む。F - b o x の構造についての詳細は、S c h u l m a n ら , 2 0 0 0 , N a t u r e 4 0 8 : 3 8 1 に記載されている。

【 0 1 4 2 】

任意の公知の F - b o x モチーフを、本発明の態様の基本として使用することができる。さらに、F - b o x コンセンサス配列、

K P F P L L R L P E E I L R K I L E K L D P I D L L R L R K V S K K W R S L V D 10
S L N I W F K F I E

を使用することもできる。F - b o x タンパク質のリストを、その配列のアクセッション番号とともに、以下の表に示す。

【 0 1 4 3 】

【 表 1 】

遺伝子記号案	文献の記号	別名	生物	配列アクセッション
<i>SKP2</i>	FBL1	FBXL1	ヒト	U33761
<i>FBXL2</i>	FBL2	FBL3	ヒト	AF176518 , AF174589 , AF186273
<i>FBXL3A</i>	FBL3A		ヒト	AF129532
<i>Fbxl3a</i>	Fbl3a		マウス	AF176521
<i>FBXL3B</i>	FBL3B		ヒト	AF129533
<i>FBXL4</i>	FBL4	FBL5	ヒト	AF174590 , AF176699 , AF199355
<i>FBXL5</i>	FBL5	FBL4, FLR1	ヒト	AF174591 , AF176700 , AF199420 , AF142481
<i>FBXL6</i>	FBL6		ヒト	AF174592
<i>Fbxl6</i>	Fbl6		マウス	AF176522
<i>FBXL7</i>	FBL7	FBL6, KIAA0840	ヒト	AF174593 , AF199356
<i>Fbxl8</i>	Fbl8		マウス	AF176523
<i>FBXL9</i>	FBL9		ヒト	AF176701
<i>Fbxl10</i>	Fbl10		マウス	AF176524
<i>FBXL11</i>	FBL11	KIAA1004 LILINA	ヒト	AB023221:G4589652 AF179221 AL117517
<i>Fbxl11</i>	Fbl11		マウス	AI154332
<i>Fbxl12</i>	Fbl12		マウス	AF176525
<i>BTRC</i>	FBW1A	betaTRCP1, FWD1	ヒト	AF129530 , Y14153
<i>FBXW1B</i>	FBW1B	betaTRCP2, KIAA0696	ヒト	AF176022
<i>FBXW2</i>	FBW2		ヒト	AF176698 , AF129531
<i>Fbxw2</i>	Fbw2	Fwd2, MD6	マウス	AA145853 , AF140683 , X54352
<i>FBXW3</i>	FBW3		ヒト	AF174606

10

20

30

40

【表1(つづき)】

<i>Fbxw4</i>	Fbw4		マウス	AF176519
<i>Fbxw5</i>	Fbw5		マウス	AF176520
<i>CCNF</i>	FBX1	FBXO1	ヒト	Z36714
<i>FBXO2</i>	FBX2		ヒト	AF174594, AF187318
<i>FBXO3</i>	FBX3		ヒト	AF174595, AF176702
<i>FBXO4</i>	FBX4		ヒト	AF129534, AF176703
<i>FBXO5</i>	FBX5		ヒト	AF129535
<i>FBXO6</i>	FBX6	FBG2	ヒト	AF129536
<i>Fbxo6a</i>	Fbx6a		マウス	AU067142
<i>Fbxo6b</i>	Fbx6b		マウス	AF176526
<i>FBXO7</i>	FBX7		ヒト	AF129537
<i>FBXO8</i>	FBX8		ヒト	AF174596
<i>Fbxo8</i>	Fbx8		マウス	AF176527
<i>FBXO9</i>	FBX9	NY-REN-57	ヒト	AF174597, AF176704
<i>FBXO10</i>	FBX10		ヒト	AF174598, AF176705
<i>FBXO11</i>	FBX11		ヒト	AF174599, AF176706
<i>Fbxo12</i>	Fbx12		マウス	AF176528
<i>Fbxo13</i>	Fbx13		マウス	AF176529
<i>Fbxo14</i>	Fbx14		マウス	AU066822
<i>Fbxo15</i>	Fbx15		マウス	AF176530
<i>Fbxo16</i>	Fbx16		マウス	AF176531
<i>Fbxo17</i>	Fbx17		マウス	AF176532
<i>Fbxo18</i>	Fbx18		マウス	AF184275
<i>Fbxo19</i>	Fbx19		マウス	AA501293
<i>FBXO20</i>	FBX20		ヒト	AF174600
<i>FBXO21</i>	FBX21	KIAA0875	ヒト	AF174601
<i>FBXO22</i>	FBX22		ヒト	AF174602
<i>FBXO23</i>	FBX23		ヒト	AF174603
<i>FBXO24</i>	FBX24		ヒト	AF174604
<i>FBXO25</i>	FBX25		ヒト	AF174605
<i>FBXO29</i>	FBX29		ヒト	AF176707
<i>Fbxo30</i>	Fbx30		マウス	AI836688

10

20

30

40

【0144】

好ましくは、F-boxドメインはレポーターのC末端に存在するので、本発明の特に好ましい実施形態では、レポーターは、F-boxドメインへのscFv融合されたN-Cを含む。

【0145】

第2の実施形態では、シグナルは、電磁放射の放出または吸収であり、シグナル発生分子は蛍光発色団であり得る。蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に關与する蛍光分子が特に好ましい。

【0146】

50

FRETは、異なる周波数で蛍光を発する2つの蛍光が一方の標識から他方へエネルギーを移動することができるのに十分に互いに隣接している場合に検出可能である。FRETは、当該分野で広く知られている（概説については、Matyus, 1992, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 12: 323~337（引用することにより本明細書の一部をなすものとする）を参照のこと）。FRETは、エネルギーが励起したドナー分子から受容体分子への移動である無放射プロセスである；この移動の効率は、下記のようにドナーと受容体分子との間の距離に依存する。エネルギー移動速度は、ドナーと受容体との間の距離の第6の力に反比例し、エネルギー移動効率は、距離の変化に非常に感度が高い。エネルギー移動は、1~10nmの距離範囲で検出可能な効率が得られるといわれているが、典型的には、ドナーと受容体との好ましい対には4~6nmである。 10

【0147】

したがって、第1および第2のレポーターの一方がドナー分子を含み、第1および第2のレポーターの他方が受容体分子を含むように、ドナーと受容体分子との適切な対の選択によって本発明を実施することができる。レポーターが構成要素に結合する場合、ドナー分子および受容体分子がエネルギー移動が起こるように合わせる。

【0148】

無放射エネルギー移動は、蛍光発色団の生物物理学的性質に基づく。これらの原理は、他で概説されている（Lakowicz, 1983, 「蛍光スペクトルの原理」、Plenum Press, New York; Jovin and Jovin, 1989, 「顕微分光蛍光分析による細胞構造および機能」、E. Kohen and J. G. Hirschberg 編, Academic Press（その両方を引用することにより本明細書の一部をなすものとする））。簡単に述べれば、蛍光発色団は特徴的な波長で光エネルギーを吸収する。この波長は、励起波長としても公知である。次いで、蛍光色素によって吸収されたエネルギーは、種々の経路によって放出され、そのうちの1つは蛍光を発生する光量子の放射である。放出した光の波長は、放射波長として公知であり、得意低の蛍光発色団の固有の特徴である。放射エネルギー移動は、1つの蛍光発色団の励起状態のエネルギーが実際に光量子を放射せずに第2の蛍光発色団に移動する。次いで、このエネルギーは、第2の蛍光発色団の放射波長で放出することができる。第1の蛍光発色団を、一般に、ドナー（D）とよび、第2の蛍光発色団（アクセプター（A）と呼ぶ）よりも高いエネルギーの励起状態を有する。このプロセスの不可欠の特徴は、ドナーの発光スペクトルが受容体の励起スペクトルと重複し、ドナーおよび受容体が十分に近接していることである。無放射エネルギー移動が有効な距離は、ドナーの蛍光量子効率、受容体の減衰係数、これらの各スペクトルの重複度、培地の屈折率、および2つの蛍光発色団の遷移モーメントの相対的配向（orientation）を含む多数の因子に依存する。他の蛍光発色団の励起波長に重複する至適放射範囲を有することに加えて、DとAとの間の距離は、蛍光発色団間のエネルギーの無放射移動が可能のように十分に短くなければならない。 20 30

【0149】

FRETアッセイでは、分子の1つ（受容体分子）の励起スペクトルが励起蛍光分子（ドナー分子）の発光スペクトルと重複するように蛍光分子を選択する。ドナー分子を、ドナーの励起スペクトルの範囲内での適切な強度の光によって励起させる。次いで、ドナーは、吸収したエネルギーのいくつかを蛍光として放射し、受容体蛍光分子に対するFRETによっていくらかのエネルギーを分散する。得られた蛍光エネルギーを、受容体蛍光分子によって消光する。FRETを、ドナー由来の蛍光シグナル強度の減少、その励起状態の寿命の短縮、および受容体の特徴的な長波長（低エネルギー）での蛍光の再放出として明らかにすることができる。ドナーおよび受容体分子が空間的に分離されると、FRETは減少、または除去される。 40

【0150】

適切な蛍光発色団は当該分野で公知であり、異なる波長または強度の蛍光を発する化学蛍光発色団および蛍光ポリペプチド（GFPなど）およびその変異体が含まれる（WO97 50

／ 2 8 2 6 1 を参照のこと)。化学蛍光発色団を、合成中の免疫グロブリンへの結合部位の組み込みによって免疫グロブリンに結合させることができる。

【 0 1 5 1 】

しかし、好ましくは、蛍光発色団は、有利には G F P またはその変異体である蛍光タンパク質である。G F P およびその変異体を、当該分野で周知の方法によって融合ポリペプチドとしての発現により結合手段（これが免疫グロブリンなどのポリペプチドである場合）とともに合成することができる。例えば、転写単位を、所望の G F P と免疫グロブリンとのインフレームでの融合体として構築し、上記のように従来の P C R クローニングおよびライゲーション技術を使用してベクターに挿入することができる。

【 0 1 5 2 】

第 3 の実施形態では、結合ドメインを、生物学的シグナルを発生することができる会合ドメインに連結する。好ましい会合ドメインは、有利に相互作用して転写因子または細胞内での遺伝子発現を調整する別の調節分子を形成するポリペプチド分子である。

【 0 1 5 3 】

転写因子分子の例は、文献（例えば、F i e l d s & S o n g , 1 9 8 9 , N a t u r e 3 4 0 : 2 4 5 ~ 2 4 6（引用することにより本明細書の一部をなすものとする））に記載されている。好ましい実施形態では、免疫グロブリン分子は、H S V 1 V P 1 6 分子の活性化ドメイン内の融合タンパク質として発現する。この転写因子ドメインは、D N A 結合活性を介して結合したプロモーター由来の遺伝子の転写をアップレギュレーションすることができる。後者は、免疫グロブリンポリペプチド内で融合タンパク質として発現する E . c o l i L e x A ポリペプチドの D N A 結合ドメインによって得られる。

【 0 1 5 4 】

生物学的シグナルは、検出可能な遺伝子産物発現の誘導などの任意の検出可能なシグナルであり得る。検出可能な遺伝子産物の例には、ルシフェラーゼなどの生物発光ポリペプチド、G F P などの蛍光ポリペプチド、ガラクトシダーゼおよび C A T などの特定のアクセシによって検出されるポリペプチド、および H I S 3 などの代謝に必要な酵素などの宿主細胞の特徴的な増殖を調整するポリペプチド、G 4 1 8 などの抗生物質耐性遺伝子が含まれる。本発明の好ましい態様では、シグナルは、細胞表面で検出可能である。例えば、シグナルは、細胞外から検出可能であり、F A C S または他の光学分取技術によって分取可能な発光または蛍光シグナルであり得る。あるいは、シグナルは、例えば蛍光基で自己標識できるか、標識抗体を使用して検出可能な C D 分子（例えば、C D 4 または C D 8）などの細胞表面マーカーの発現を含み得る。F A C S などの光学分取を使用して、パンされる（p a n n e d）細胞を回収し、構成要素を含む細胞を選択することができる。

【 0 1 5 5 】

以下の実施例は例示のみを目的とし、これらの実施例において本発明をさらに記載する。

【 0 1 5 6 】

[実施例]

< 実施例 1 : 発現プラスミドの構築 >

p M - g a l、p N L - s c F v R 4 - V P 1 6、p N L - s c F v F 8 - V P 1 6、および p N L - s c F v - I N 3 3 - V P 1 6 は以前に記載されている（V i s i n t i n r a , 1 9 9 9 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 6 , 1 1 7 2 3 ~ 1 1 7 2 8）。p R S V - L u c（ホタルルシフェラーゼ発現ベクター）もまた以前に記載されており（d e W e t , J . R . , 1 9 8 7 , M o l C e l l B i o l 7 , 7 2 5 ~ 3 7）、p E G F P - N 1（増強緑色蛍光タンパク質、G F P 発現ベクター）は、C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s、I n c .（P a l o A l t o , C a l i f o r n i a , U S A）から市販されている。

【 0 1 5 7 】

p E F - g a l（ガラクトシダーゼ発現ベクター）を、p E F - B O S 哺乳動物発現ベクター（M i z u s h i m a r a , 1 9 9 0 , N u c l . A c i d s R e s . 1 8 , 5 3 2 2）へのガラクトシダーゼおよび p B S p t - g a l 由来のガラクトシダーゼ

10

20

30

40

50

およびSV40ポリA (Greenbergら, 1990, Nature 344, 158~160) のコード配列のサブクローニングによって作製する。

【0158】

シャトルベクター pBS-R4 を、pBSpt への pNL-scfvR4-VP16 および pNL-scfvF8-VP16 の ClaI-EcoRI フラグメントのクローニングによって作製する。

【0159】

pEF-R4-DBD (scfvR4-GAL4DBD 融合発現ベクター) を、以下のよう
に構築する。Gal4 DNA 結合ドメイン配列 (pGALO から増幅した PCR, D
angら, 1991, Mol. Cell. Biol. 11, 954~962) を、pBS
-R4 の EcoRI 部位中で scfvR4 を用いてインフレームへクローン化する。pE
F-R4-DBD を、pEF-BOS への R4-Gal4 DNA 結合ドメイン融合体の
Cla-SpeI フラグメントのクローニングによって作製する。

10

【0160】

pEF-R4-CP3 および pEF-F8-CP3 (scfvR4 および scfvF8
-カスパーゼ3 融合発現ベクター) : ヒトカスパーゼ3 配列を、GENBANK アクセッ
ション番号 U26943 および U13737 として寄託されている。ヒトカスパーゼ3 配
列を、cDNA クローン (Marion MacFarlane から譲渡) から PCR 増
幅し、pBS-R4 および pBS-F8 の scfv 配列の 3' 末端で EcoRI-Spe
1 フラグメントとしてインフレームでサブクローン化する。scfv-カスパーゼ3 融合
体の ClaI-SpeI フラグメントを、pEF-BOS でクローン化して、それぞれ p
EF-R4-CP3 および pEF-F8-CP3 を得る。

20

【0161】

pEF-R4-CP3 (C163S) (scfvR4-カスパーゼ3 変異融合発現ベク
ター) を、製造者の指示にしたがって QuickChange (商標) 部位特異的変異誘発
キット (Stratagene) を使用した部位特異的変異誘発によるセリン (TCC)
への野生型カスパーゼ3 の 163 番目でのシステイン (TGC) の変異によって作製する
。

【0162】

pEF-IN33-CP3 および pEF-IN33-CP3 (C163S) (scfvI
N33-カスパーゼ3 および変異発現ベクター) : pNL-scfvIN33-VP16
の XhoI-EcoRI フラグメントを、XhoI および EcoRI で消化した pBS-
R4-CP3 および pBS-R4-CP3 (C163S) のベクター骨格にクローン化し
て、それぞれ pBS-IN33-CP3 および pBS-IN33-CP3 (C163S)
を作製する。pEF-IN33-CP3 および pEF-IN33-CP3 (C163S)
を、pEFBOS への pBS-IN33-CP3 および pBS-IN33-CP3 (C1
63S) の XhoI-SpeI フラグメントのクローニングによって構築する。

30

【0163】

pEF-HIVIN-gal (HIV インテグラーゼ (アミノ酸 259~288) -
ガラクトシダーゼ 融合発現ベクター) : pBlueScript-gal の NcoI-
SalI フラグメントを、pEF/myc/cyto (Invitrogen) にサブ
クローン化し、PCR 増幅 HIV-1 インテグラーゼ エピトープ (アミノ酸番号 259~
288) を、-gal 配列の 5' 末端での NcoI フラグメントとしてのインフレーム
でのクローン化により pEF-HIVIN-gal が得られる。

40

【0164】

<実施例 2 : 哺乳動物細胞培養およびトランスフェクション>

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を、10% のウシ胎児血清、ペニシリン、お
よびストレプトマイシンを含む 最少必須培地 (GIBCO BRL) で増殖させる。ト
ランスフェクションの 16~24 時間前に、35mm のペトリ皿に 2×10^5 個の CHO
細胞を播種する。50ng の pEF-IN33-CP3/CP3 (C163S) を使用す

50

る以外は製造者の指示に従って500 ngの pEF-gal、pEF-HIVIN-gal および pRSV-Luc、50 ngの pEGFP-N1 および 250 ngの pEF-scfv-CP3/CP3 (C163S) を使用する Lipofectamine (登録商標) (GIBCO BRL) を使用してトランスフェクションを行う。トランスフェクションから60時間後またはさらなる分析のために経時変化実験の間(12、24、36、48、および60時間後)に細胞を回収する。

【0165】

CHO-CD4株は、C.V. Dang博士から譲渡され、これは以前に記載されている (Fearonら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7958~7962)。これを、最少必須培地、10%のウシ胎児血清、および1 mg/mlのG418 (GIBCO BRL) と共に維持する。100 mm皿に50~60%の10 密集度に増殖させたCHO/CD4細胞のLipfectamine (商品名) トランスフェクションを、特記しない限り5 µgの各プラスミドを使用して行う。

【0166】

<実施例3: CD4発現のFACS分析>

トランスフェクションから48時間後、CHO-CD4細胞を、細胞分離溶液 (Sigma) で分離して、1つの細胞のPBS懸濁液を作製する。CD4発現を、1:50倍希釈のマウス抗ヒトCD4抗体 (Pharmingen) とフルオレセインイソチオシアネート (FITC) (Pharmingen) の1:100希釈物で標識した二次抗血清ヤギ抗マウスポリクローナル抗体との結合によって分析する。細胞の相対蛍光を、FACS Calibur (Becton Dickinson) を使用して測定し、データをソフトウェアCELLQuest (Becton Dickinson) によってさらに分析する。 20

【0167】

<実施例4: ウェスタンブロッティング>

CHO細胞を、scfvR4カスパーゼ3、scfvR40カスパーゼ (C163S)、およびscfvF8カスパーゼ3発現ベクターでトランスフェクトする。トランスフェクトから48時間後、細胞を、10 mMのHepes (pH 7.6)、250 mMのNaCl、5 mMのEDTA、および0.5%のNonidet P40を含む緩衝液で溶解する。溶解物を、12%のSDS-PAGEで分画し、ニトロセルロース膜に移す。膜を、抗ヒトカスパーゼ3抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および二次HRP結合抗ヤギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とインキュベートする。ECLウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham) を用いて検出を行う。 30

【0168】

<実施例5: ガラクトシダーゼおよびルシフェラーゼ活性アッセイ>

トランスフェクトCHO細胞を、トランスフェクションから特定の測定点で、35 mmのペトリ皿あたり300 µlのレポーター溶解緩衝液 (Promega) を使用して溶解する。ガラクトシダーゼ活性を、製造者の指示に従ってガラクトシダーゼ酵素アッセイ系 (Promega) を使用して測定する。ルシフェラーゼアッセイ系 (Promega) および照度計を使用してルシフェラーゼ活性の測定を行う。2つの異なる独立したトランスフェクションを行い、平均値を示す。 40

【0169】

<実施例6: アポトーシスアッセイ>

CHO細胞を、pEF-galの存在下または非存在下で、緑色蛍光タンパク質発現ベクターpEGFP-N1 および種々のscfv融合発現ベクターと同時トランスフェクトする。トランスフェクションから36時間後、GFP陽性CHO細胞を、フローサイトメーターで分取する。約5000個の細胞からゲノムDNAを抽出する。ApoAlert LM-PCRラダーアッセイキット (Clontech) を使用して、核DNA産物の有無を検出する。アポトーシスに起因するクロマチンビーズから得られるDNAを増幅す 50

る ApoAlert プライマーを使用して、ゲノム DNA を増幅する。1.5% のアガロースゲルでの分画後、PCR 産物を、臭化エチジウム染色によって視覚化する。FACS 分取細胞の各組で得られた DNA のコントロールとして、チャイニーズハムスターアクトンに特異的なプライマー (5' GGCGTGATGGTGGGCATGGGCCAG3' および 5' CTGGTCATCTTTTCACGGTTGGC3') を PCR で使用する。PCR 反応は、94 で 1 分間の変性、65 で 1 分間のアニーリング、および 72 で 1 分間の伸長の 35 サイクルからなる。産物を、1.5% のアガロースゲルで視覚化する。

【0170】

< 実施例 7 : 抗原に結合した抗 ガラクトシダーゼ ScFv - VP16 の近さによる転写の活性化 > 10

ガラクトシダーゼの結晶構造は公知であり、四量体には酵素活性が必要であることが示されている (Jacobson ら, 1994, Nature 369, 761 ~ 766)。したがって、ガラクトシダーゼに結合する抗体は、活性酵素あたり 4 つの異なる抗原部位で結合することができる。抗 ガラクトシダーゼ scFv は、細菌 (Martineau ら, 1998, J Mol Biol 280, 117 ~ 127) および哺乳動物 (Visintin ら, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 11723 ~ 11728) の両方において ガラクトシダーゼに結合するが、ガラクトシダーゼ機能に影響を与えない scFv - R4 が記載されている。このモデル細胞内抗体系を使用して、インビボでの scFv 抗体フラグメントの近さによって測定可能な生化学的効果が得られるかどうかを識別する。この評価のために、転写トランス活性化が抗原への scFv - R4 結合によって媒介することができるかどうかを最初に識別する。本発明者らのアッセイは、Gal4 DNA 結合ドメイン (DBD) と融合した scFv - R4 および VP16 転写トランス活性化ドメインと融合した scFv - R4 を有する ガラクトシダーゼの GAL4 プロモーターによって調節される CD4 レポーター遺伝子を含む CHO 細胞株での同時発現からなる (Fearon ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7958 ~ 7962)。レポーター遺伝子が活性化されている場合、CHO - CD4 細胞は、その細胞表面上に CD4 を発現する。したがって、細胞内抗体 scFv - R4 - DBD および scFv - R4 - VP16 は、CHO - CD4 細胞中で ガラクトシダーゼと結合し、CD4 遺伝子を活性化させる転写複合体を産生するはずである (図 1A を参照のこと)。 20 30

【0171】

種々のプラスミドの組み合わせを、CHO - CD4 細胞中でトランスフェクトし、トランスフェクションから 60 時間後に、細胞表面 CD4 を、FACS 分析によって測定する (図 1B)。ガラクトシダーゼ自体が GAL4 - DBD に直接連結するので、scFv - R4 - VP16 融合体の発現により有効な CD4 表面発現が得られる (パネル 2) 一方で、ガラクトシダーゼ抗原の非存在下での GAL4 - DBD または VP16 への scFv - R4 の同時発現は CD4 を活性化できなかった (パネル 3)。したがって、DBD - ガラクトシダーゼ融合体は、CD4 レポーターの DNA 結合部位と相互作用することができ、転写複合体が産生される。VP16 活性化ドメインに連結した scFv - R4 もまた DBD - ガラクトシダーゼ四量体上で ガラクトシダーゼエピトープを結合する。 40

【0172】

次に、ガラクトシダーゼを、DNA 結合ドメインおよび VP16 活性化ドメインと融合した scFv - R4 で同時発現させて、DNA が結合している複合体の形成を評価する。これを有効にするために、scFv - DBD および scFv - VP16 は共に同一の ガラクトシダーゼの異なる部位に結合していなければならない。したがって、本発明者らは、異なる量の発現ベクターを滴定して、scFv - DBD および scFv - VP16 融合タンパク質の比を変化させる (図 1B のパネル 4 ~ 9)。全ての細胞で CD4 レポーター遺伝子の活性化が認められるが、DBD - ガラクトシダーゼ同時発現よりも効果が低い (0.24% ~ 2.8% の範囲のこれらの一過性アッセイにおける CD4 発現細胞の割合 50

）。相対的な無効性は、おそらく転写アッセイにおけるタンパク質複合体のかさ高さを反映しており、各ガラクトシダーゼに複数の結合部位が必要である。CD4発現の程度はs c F v R 4 - V P 1 6とs v F v R 4 - D B Dとの間の比に依存し（図1 B、パネル6、7、および8）、これにより、2つの異なるs c F v R 4融合タンパク質がガラクトシダーゼ四量体上の同一の結合部位を競合すると予想される。ガラクトシダーゼの非存在下でs c F v R 4 - V P 1 6およびs c F v R 4 - D B Dが発現する場合、CD4活性化は起こらないので、s c F v R 4の間に二量体は形成されないことが確認される（図1 B、パネル3）。本発明者らは、s c F v R 4に連結したタンパク質ドメインは、s c F v R 4がガラクトシダーゼエピトープにインビボで結合する場合、生化学的相互作用のために極めて近接して存在し得ると結論付けた。

10

【0173】

上記の実験は、本発明の第1の態様の方法を使用して、細胞に検出可能なシグナルを誘導することが可能であることを示す。さらに、本発明の第2の態様の方法を使用して、転写活性からなるシグナルの検出によって細胞内タンパク質を含む構成要素を検出することができる。第1のレポーターから得られるV P 1 6活性化ドメインと第2のレポーターから得られるG A L 4 D B Dとの安定な相互作用によって転写活性が発現され、この安定な相互作用は、第1のレポーターおよび第2のレポーターの細胞内タンパク質上でのその標的との結合によって得られる。

【0174】

<実施例8：s c F v - カスパーゼ3融合により、抗原結合後にアポトーシスを起こす> 転写複合体に必要な成分をガラクトシダーゼ四量体の活性を得るのに十分に近接させることができるので、s c F v - R 4抗原部位間の分子の距離は、カスパーゼ3部分が互いに近接して自己活性化およびアポトーシスの誘発にするのに十分に短いと示唆された（図2 Aに例示）。

20

【0175】

レポーターガラクトシダーゼ発現プラスミドと種々のs c F v - R 4発現プラスミド（s c F v R 4とカスパーゼ3との融合体をコードするプラスミドを含む）とのCHO細胞への同時トランスフェクションによってこれを評価する。各s c F v融合タンパク質の発現を、発現ベクターでトランスフェクトしたCHO細胞由来のタンパク質抽出物のウェスタンブロットにおいて抗カスパーゼ3抗体を使用して確認する（図2 B）。トランスフェクションから60時間後、細胞を、ガラクトシダーゼ活性についてアッセイする（図2 C）。

30

【0176】

ガラクトシダーゼがコントロールのトランスフェクションで検出される一方で（パネル1）、s c F v - R 4がカスパーゼ3に連結する場合、ガラクトシダーゼ活性レベルはほとんど認められない（パネル3）。このガラクトシダーゼの損失は、触媒システインをセリンに変異させる（C 1 6 3 S、パネル4）カスパーゼ3変異の不活化効果によって判断したところ、カスパーゼ3の活性に依存する（MacCorkleら、1998、Proc Natl Acad Sci U S A 95, 3655~60）。さらに、ガラクトシダーゼレポーターをV P 1 6のみと融合したs c F v - R 4で同時発現させた場合（パネル2）、有意差は認められない。ガラクトシダーゼ活性の欠損に起因する抗体特異性は、カスパーゼ3と融合した非特異的s c F vの同時トランスフェクションによって示された（s c F v - F 8、Tavladorakiら、1993、Nature 366, 469~472）。この組み合わせは、ガラクトシダーゼレベルに対する効果はない。したがって、これらのデータにより、s c F v - R 4 - カスパーゼ3を同時トランスフェクトした場合、ガラクトシダーゼ活性の減少は、ガラクトシダーゼに対する中和効果によることが示唆される。むしろ、トランスフェクト細胞にアポトーシスを引き起こす活性化カスパーゼ3のタンパク質分解活性による。以前の報告と一致して（MacCorkleら、1998、Proc Natl Acad Sci U S A 95, 3655~60；Fanら、1999、Hum Gene Ther 10, 227

40

50

3 ~ 85 ; Yoshiokaら , 1999 , Gene Ther 6 , 1952 ~ 9) 、
s c F v - カスパーゼ 3 融合体のみでは細胞に有毒ではない (パネル 5) ことも留意される。

【 0 1 7 7 】

< 実施例 9 : S c F v - カスパーゼ 3 融合体によって誘導されたアポトーシスのルシフェラーゼアッセイ >

特異的 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 と ガラクトシダーゼ抗原との相互作用に依存する s c F v - カスパーゼ 3 融合体分子による細胞死滅の誘導を、 s c F v R 4 抗体が結合しない独立したレポーターを使用して確認する。

【 0 1 7 8 】

CHO細胞を、 ガラクトシダーゼ発現 (すなわち、 s c F v - R 4 抗原) の存在下または非存在下でのホタルルシフェラーゼを構成的に発現するレポーター p R S V - L u c と s c F v R 4 - カスパーゼ 3 、 s c F v R 4 - V P 1 6 、 変異 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 (C 1 6 3 s) 、 または s c F v F 8 - カスパーゼ 3 のいずれかとトランスフェクトする。ルシフェラーゼ活性を、 s c F v 融合タンパク質の存在下での細胞の生存度の測定としてトランスフェクションから 6 0 時間後に測定する (図 3 A) 。

【 0 1 7 9 】

これらのデータは、 ガラクトシダーゼと共に s c F v R 4 - カスパーゼ 3 が発現された場合にルシフェラーゼ活性が約 8 0 % 減少したことを示す (パネル 3 、 前列) 。しかし、これは、 s c F v - R 4 - カスパーゼ 3 が ガラクトシダーゼを含まない独立したレポーターで発現した場合は生存度は減少しないので、 s c F v - R 4 - カスパーゼ 3 でトランスフェクトした細胞中の ガラクトシダーゼ活性の欠如は、 s c F v - R 4 - カスパーゼ 3 のみの毒性よりも抗原依存性細胞死によるようである (パネル 3 後列) 。カスパーゼ依存を、 s c F v R 4 - カスパーゼ変異タンパク質融合体を発現する構築物でのトランスフェクションによって示され、 ガラクトシダーゼ発現の存在下および非存在下のいずれでもトランスフェクト細胞はルシフェラーゼ活性の減少が認められない。最後に、抗体特異性を、レポーター遺伝子活性に影響を受けない非特異性 s c F v - F 8 を使用して確認する。

【 0 1 8 0 】

トランスフェクト CHO細胞を使用して、 ガラクトシダーゼベクターを使用するか使用しないトランスフェクション後の種々の時間でアッセイしたルシフェラーゼ活性の経時変化を行う (それぞれ図 3 B および 3 C) 。 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 および ガラクトシダーゼの両方を発現する細胞では、ルシフェラーゼレベルは、 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 (C 1 6 3 S) または s c F v F 8 - カスパーゼおよび ガラクトシダーゼを発現する 2 つのコントロール中での対応するレベルよりも低いピークまでゆっくりと最初の 3 6 時間で上昇する (図 3 B) 。さらに、ルシフェラーゼレベルが上昇しつつける 2 つのコントロールとは異なり、 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 および ガラクトシダーゼでの同時トランスフェクト細胞における酵素レベルが低下する。それに対して、 ガラクトシダーゼの非存在下では、 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 は、ルシフェラーゼレベルに影響を与えず、 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 (C 1 6 3 S) および s c F v F 8 - カスパーゼ 3 に匹敵する (図 3 C) 。これらの結果は、誘導されたアポトーシスは抗体および抗原特異的であり、カスパーゼ 3 活性に依存することを示す。

【 0 1 8 1 】

< 実施例 1 0 : クロマチン分解によってアッセイされた S c F v - カスパーゼ 3 融合体によって誘導されたアポトーシス >

本発明者らの結果は、 ガラクトシダーゼを用いた以前の結果が得られ、ルシフェラーゼアッセイは、アポトーシスが活性なカスパーゼ 3 に依存し、 s c F v - カスパーゼ 3 により抗原への結合後にアポトーシスを引き起こすことを示す。これらの結果を、クロマチンビーズラダーの存在についてのトランスフェクト細胞のアッセイによって確認する。クロマチンビーズラダーの存在は、アポトーシス性細胞死の特徴であり、クロマチンのヌクレ

10

20

30

40

50

アーゼ消化によって引き起こされる (Wyllieら, 1980, Nature 284, 555~6)。

【0182】

CHO細胞を、種々のscFv融合タンパク質を発現するプラスミドと共に、ガラクトシダーゼ発現ベクターを用いるか用いないで、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するマーカープラスミドpEGFP-N1でトランスフェクトする。36時間後、GFP(したがって、scFvおよびガラクトシダーゼも)を発現するトランスフェクト細胞を、蛍光活性化細胞分取を用いた選択によって富化する。ゲノムDNAを、分取細胞から抽出する。アポトーシスに媒介されるクロマチン消化から拡大したDNAフラグメントを、ライゲーション媒介PCR手順によって発現する (Staleyら, 1996 Cell Death & Differen. 4, 66~75) (図4)。 10

【0183】

本発明者らは、scFvR4-カスパーゼ3およびガラクトシダーゼ(レーン2)での同時トランスフェクトした細胞から調製したDNA中でクロマチンピースの証拠のみを見出したが、ガラクトシダーゼおよびscFvR4-VP16(レーン1)、scFvR4-カスパーゼ3(CD163S)(レーン3)、またはscFvF8-カスパーゼ3(レーン4)でトランスフェクトした細胞では見出されない。それぞれのDNAの収量は、アクチン遺伝子プライマーを使用したPCRによって同定したものに匹敵する(図4B)。さらに、ガラクトシダーゼの非存在下でトランスフェクトされたscFvR4-カスパーゼ3は、DNAラダーを産生せず(レーン5)、これは、アポトーシスが細胞内抗体-カスパーゼ融合体(scFv-R4-カスパーゼ3)と抗原(ガラクトシダーゼ)との間の特異的相互作用に依存することを示す。 20

【0184】

したがって、本発明者らは、それぞれ細胞内標的およびカスパーゼ3分子に結合する抗体を含む第1および第2のレポーターの使用によって細胞内にアポトーシスを誘導することができることを示す。したがって、本発明の第3の態様による方法を使用して、構成要素に含まれる任意の細胞を死滅させることができる。

【0185】

<実施例11:細胞内抗体媒介アポトーシスの一般的な適用>

細胞内抗体媒介アポトーシスアプローチの一般的な適用性を確立するために、異なる高原および細胞内抗体対、すなわち、HIV-1インテグラーゼの小さな抗原エピトープおよびインビポでこのエピトープを認識する特異的抗体を使用して第2の系を開発する(scFvIN33; Levy-Mintzら, 1996, J. Virol. 70, 8821~8832)。 30

【0186】

ガラクトシダーゼの構造は、公知である(Jacobsonら, 1994, Nature 369, 761~766)。この構造からの予測は、ガラクトシダーゼ単量体のN末端で連結する任意のタンパク質は、四量体ガラクトシダーゼ分子の境界面に存在することである。結果として、連結部分の間の物理的距離は、これらに結合する特異的抗体の間の距離と同様に短いと予想される。したがって、HIV-1インテグラーゼアミノ酸259~288(すなわち、scFvIN33で認識される; Bizub-Benderら, 1994, AIDS Res Hum Retroviruses 10, 1105~115)をガラクトシダーゼのN末端で融合する発現構築物pEF-HIVIN-galを作製する。この構築物を、CHO細胞中でscFvIN33-カスパーゼ3融合タンパク質で同時発現する。図5Aに記載のように、抗体と抗原との相互作用により、カスパーゼ媒介アポトーシスが生じるはずである。 40

【0187】

トランスフェクションから60時間後、ガラクトシダーゼ活性をアッセイして細胞の生存度を識別する。抗ガラクトシダーゼscFvを使用した本発明者らの所見に応じて、HIV-インテグラーゼ-ガラクトシダーゼ機能がHIV-インテグラーゼ-ガラ 50

クトシダーゼ融合体のみと比較して s c F v N 3 3 - カスパーゼ 3 で同時発現した場合 (図 5 A、パネル 2、前列)、 ガラクトシダーゼの発現は顕著に減少する (パネル 1、前列)。さらに、野生型 ガラクトシダーゼでの s c F v I N 3 3 - カスパーゼ 3 の発現により、 ガラクトシダーゼ活性は有意に減少せず (図 5 A、パネル 2、後列)、これは、H I V - インテグラーゼ - ガラクトシダーゼ融合体に対する部位への結合後に s c F v - カスパーゼ 3 の二量体形成に反応し (図 5 A に示す)、 s c F v I N 3 3 - カスパーゼ 3 の自己毒性によって細胞死が起こることを示している。

【 0 1 8 8 】

活性なカスパーゼ 3 の要件を、変異 s c F v - カスパーゼ、 s c F v I N 3 3 - カスパーゼ 3 (C 1 6 8 S) (パネル 3) の使用によって証明し、非特異性抗体 s c F v F 8 - カスパーゼ 3 を使用して抗体特異性を示す (パネル 5)。これらの融合タンパク質で、 ガラクトシダーゼレベルに影響を与えることがみとめられたものはない。それに対して、抗 ガラクトシダーゼ抗体融合体 s c F v R 4 - カスパーゼ 3 は、予想されたように野生型 ガラクトシダーゼおよび H I V インテグラーゼ ガラクトシダーゼ融合体を発現する細胞において細胞死を引き起こす (パネル 4、前列および後列)。したがって、このモデル系における細胞死は、抗原特異的、抗体特異的、および活性カスパーゼ 3 依存性である。

【 0 1 8 9 】

< 実施例 1 2 : 蛍光シグナルの発生による細胞の検出 >
細胞内の構成要素の存在を、蛍光に連結した抗体からなる融合タンパク質の使用および蛍光シグナルの監視によって識別することができる。2つの構築物 (一方は黄色蛍光タンパク質 (Y F P) と融合した s c F v - R 4 からなる融合タンパク質を発現するものであり、他方はシアン蛍光タンパク質 (C F P) と融合した s c F v - R 4 からなる融合タンパク質を発現するものである) を作製する。これらの構築物を、 p N L - s c F v R 4 への p Y F P - N 1 由来のフラグメントをコードする Y P F または p C F P - N 1 (C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s) 由来のフラグメントをコードする C F P のサブクローニングによって作製する。

【 0 1 9 0 】

構築物を、 ガラクトシダーゼを発現する p E F - g a l プラスミドとともに C H O 細胞にトランスフェクトする。コントロールとして、C H O 細胞を s c F v - R 4 - Y F P を発現する構築物および s c F v - R 4 - C F P のみを発現するが p E F - g a l プラスミドを含まない構築物でもトランスフェクトする。さらなるコントロールには、 p E F - g a l プラスミドを使用するか使用しない、C F P および Y F P と融合した非特異的 s c F v でのトランスフェクションが含まれる。

【 0 1 9 1 】

トランスフェクションから 6 0 時間後、細胞を F A C S 分取に供する。C F P / Y F P F R E T フィルターセット (O m e g a O p t i c a l I n c o r p o r a t e d) を使用して、F R E T シグナルと通常の蛍光シグナルとを区別する。 ガラクトシダーゼ、 s c F v - R 4 - C F P 融合体、および s c F v - R 4 - Y F P を発現するプラスミドでトランスフェクトした細胞は、F R E T を示すことが見出される一方で、 s c F v - R 4 - C F P 融合体および s c F v - R 4 - Y F P のみ (ガラクトシダーゼなし) でトランスフェクトした細胞は F R E T を示さない。さらに、 s c F v - F 8 - C F P および s c F v - F 8 - Y F P 発現構築物 (ガラクトシダーゼを発現する構築物を使用してもしなくても) でトランスフェクトした細胞は、F R E T を示さない。

【 0 1 9 2 】

本発明者らは、2つまたはそれ以上の s c F v - カスパーゼ 3 融合タンパク質が近接した抗原のエピトープに結合する場合、カスパーゼ 3 部分を活性化してアポトーシスを誘発することができることを示す。この方法では、標的抗原を発現する細胞は選択的に死滅する。このプロセスの妥当性を、2対のモデル抗体 (すなわち、抗 ガラクトシダーゼ s c F v R 4 - カスパーゼ 3 融合体および抗 H I V インテグラーゼ s c F v I N 3 3 - カスパーゼ融合体) を使用して証明した。 ガラクトシダーゼが生理学的条件下で四量体として存

10

20

30

40

50

在するので (Jacobsonら, 1994, Nature 369, 761~766)、四量体中に s c F v R 4 の 4 つの結合部位が存在する。s c F v R 4 がカスパーゼ 3 の N 末端で連結している場合、四量体 ガラクトシダーゼへの s c F v R 4 - カスパーゼ 3 融合タンパク質の結合により、連結したカスパーゼ 3 部分が近接し得る。この結果により、カスパーゼ 3 が活性化されて、アポトーシスが誘発される。ガラクトシダーゼに連結した HIV インテグラーゼエピトープを使用した第 2 のモデルでは、本発明者らは、細胞内抗体 - カスパーゼ 3 融合タンパク質と各抗原との間の特異的結合によってアポトーシス誘発のさらなる証拠をさらに提供する。それぞれの場合、標的抗原を特異的に発現する細胞が死滅するので、これは、細胞内抗体媒介細胞死の一般的な適用性および特異性を示す。

10

【 0 1 9 3 】

上記の各出願書類および特許書類および上記の各出願書類および特許書類中で引用または参照された各文献 (上記各出願および特許の遂行中を含む) (「出願引例」) ならびに上記の各出願書類および特許書類に引用または記載されている製品の任意の製造者の説明書またはカタログは、本明細書中で引用することにより本明細書の一部をなすものとする。さらに、本明細書中で引用した全ての書類、本明細書中で引用した全ての書類または引用した書類中の参考文献、本明細書中で引用または言及した任意の製品の任意の製造者の説明書またはカタログは、本明細書中で引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

【 0 1 9 4 】

本発明に記載の方法および系の種々の修正形態および変形形態は、本発明の範囲および精神を逸脱することなく当業者に明白である。本発明は特定の好ましい実施形態に関して記載しているが、特許請求の範囲に記載の本発明はこのような特定の実施形態に過度に限定されないと理解すべきである。実際、分子生物学または関連分野の当業者に明白な本発明の遂行のために記載された方法の種々の修正形態は、特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】

哺乳動物の 2 ハイブリッド (two - hybrid) S c F v - ガラクトシダーゼ転写アッセイ。

30

図 1 A は、CHO - CD4 レポーター細胞株において抗 ガラクトシダーゼ抗体フラグメント s c F v R 4 - DBD 融合タンパク質 (DNA 結合ドメイン) および s c F v R 4 - VP16 (VP16 転写トランス活性化ドメイン) 融合タンパク質をコードする同時トランスフェクト発現ベクターの効果を示す図である。s c F v R 4 - DBD および s c F v R 4 - VP16 融合タンパク質は、ガラクトシダーゼ四量体に結合した場合、CD4 レポーター遺伝子の転写を調節する染色体 GAL4 DNA 結合部位 (DBS) に結合することができる転写複合体を形成することができる (Fearonら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 7958~7962)。この後、CD4 タンパク質分子が細胞表面に出現し、これを、蛍光活性化細胞分取器を使用してアッセイすることができる。

40

このような実験の結果を、図 1 B に示す。パネル A ~ I は、種々の発現ベクターとともにガラクトシダーゼ発現クローン pEF - gal と同時トランスフェクトした CHO - CD4 細胞の FACS 分析を示す。パネル 1 : pEF - BOS ベクターのみ ; パネル 2 : DBD - gal、および s c F v R 4 - VP16 ; パネル 3 : s c F v R 4 - VP16 および s c F v R 4 - DBD ; パネル 4 ~ 9 : 表示の種々の量の s c F v R 4 - VP16 および s c F v R 4 - DBD。pEF - gal プラスミド (5 μg) は、変化していない。

DBD = GAL4 DNA 結合ドメイン ; VP = 16 活性化ドメイン ; DBS = DNA 結合部位。

細胞表面 CD4 発現の誘導を、抗ヒト CD4 抗体を使用して 60 時間後にアッセイする。

50

48時間後の表示のCD4+細胞の割合をFACS Calibur装置を使用して評価する。

【図2】

ガラクトシダーゼに結合する細胞内抗体ScFv4-カスパーゼ3によって媒介される細胞死。

図2Aは、カスパーゼ3の二量体形成およびアポトーシスを誘発するその自己活性化を起こすガラクトシダーゼ(-gal)四量体へのscFvR4-カスパーゼ3融合の可能な結合モデル(scFv-CP3)を示す図である。

図2Bは、CHO細胞内で発現したscFv融合タンパク質のウェスタン分析の結果を示す。CHO細胞を、scFv-カスパーゼ3、svFvR4-カスパーゼ3(C163S) 10
)、またはscFvF8-カスパーゼ3発現ベクターで48時間トランスフェクトする。タンパク質抽出物を、調製し、分画し、ニトロセルロース膜に移す。これらを抗カスパーゼ3抗体および二次HRP結合抗ヤギ抗体とインキュベートする。ECL(増強化学発光)を使用して検出を行う。予め染色したタンパク質の分子量標準との同時電気泳動によって分子量を識別する。

図2Cは、CHO細胞をgalを発現するプラスミド(pEF-gal)および種々のscFv融合タンパク質でトランスフェクトした結果を柱状図に示す。トランスフェクションから60時間後のガラクトシダーゼレベルを測定し、データはそれぞれ二回行った2つの独立した代表的な実験である。ガラクトシダーゼレベルを、pEF-BOSベクターのみで同時トランスフェクトしたpEF-galで得られたレベル(100%と 20
する)と比較して示す。レーン1は空のベクターであり、レーン2はscFvR4-VP16であり、レーン3はscFvR4-カスパーゼ3であり、レーン4はscFv-カスパーゼ3(C163S)であり、レーン5はscFvF8-カスパーゼ3である。

【図3】

scFv融合およびガラクトシダーゼを同時発現するCHO細胞中のルシフェラーゼ活性。

図3Aは、CHO細胞を、特異的な細胞内抗原を得るために使用されるガラクトシダーゼ発現ベクターpEF-galの存在下(前列)または非存在下(後列)で種々のscFv融合発現プラスミドと共にRSV1uc、ルシフェラーゼ発現プラスミドでトランスフェクトした実験の結果を示す(deWetら, 1987, Mol Cell Biol 7, 725~37) 30
。トランスフェクションから60時間後にルシフェラーゼレベルを測定する。このレベルを、pEF-BOSベクターのみと同時トランスフェクトしたルシフェラーゼ発現で得られたレベル(100%)に基準化する。レーン1は空のベクターであり、レーン2はscFvR4-VP16であり、レーン3はscFvR4-カスパーゼ3であり、レーン4はscFv-カスパーゼ3(C163S)であり、レーン5はscFvF8-カスパーゼ3である。

図3Bは、特異的抗原の存在下でのルシフェラーゼ活性化の経時変化を示す。RSV1uc、pEF-gal発現プラスミド、表示の3つの異なるscFv融合タンパク質発現プラスミドでの同時トランスフェクションから12、24、36、48、および60時間後のルシフェラーゼ活性を測定する。三角はscFvR4-カスパーゼ3(C163S) 40
であり、四角はscFvF8-カスパーゼ3であり、丸はscFvR4-カスパーゼ3である。

図3Cは、特異的抗原の非存在下でのルシフェラーゼ活性化の経時変化を示す。ルシフェラーゼ活性を図3Bのように測定するが、細胞をガラクトシダーゼ発現構築物の非存在下でトランスフェクトする。三角はscFvR4-カスパーゼ3(C163S)であり、四角はscFvF8-カスパーゼ3であり、丸はscFvR4-カスパーゼ3である。

【図4】

scFv-カスパーゼを発現するCHO細胞および特異的抗原を使用したアポトーシスアッセイ。

図4Bは、CHO細胞をpEGFP-N1(緑色蛍光タンパク質を発現する)、種々のs 50

c F v 融合体をコードするクローンと同時トランスフェクトした実験の結果を示す。トランスフェクトした細胞を蛍光によって識別し、F A C S s c a l i b u r 細胞分取器を使用して分取する。ゲノムDNAを、選択した細胞から抽出し、A p o A l e r t L M - P C R L a d d e r アッセイキットを使用してP C R 増幅を行う。産物を1.5%アガロースゲル上で分画し、臭化エチジウム染色によって視覚化する。レーンは、s c F v R 4 - V P 1 6 + - g a l (レーン1)、s c F v R 4 - カスパーゼ3 + - g a l (レーン2)、s c F v R 4 - カスパーゼ3 (C 1 6 3 S) + g a l (レーン3)、s c F v F 8 - カスパーゼ3 + g a l (レーン4)、およびs c F v R 4 - カスパーゼ3のみ (レーン5) を発現するプラスミドでトランスフェクトした細胞のDNA由来のP C R 反応に対応する。ネガティブP C R コントロールは、テンプレートDNAを使用しない反応由来の産物を示す。

10

図4Bは、図4Aと同一のDNAサンプルを使用するが、チャイニーズハムスターアクチン遺伝子に特異的なプライマーを使用して行ったP C R 反応の結果を示す。ネガティブコントロールは図4Aに記載の通りである。ポジティブコントロールは精製C H OゲノムDNAでのP C R 増幅から得た反応産物である。

サイズマーカーは、H i n d I I I で消化した DNA と H a e I I I で消化した X 1 7 4 DNA との混合物である。

【図5】

ガラクトシダーゼ - インテグラーゼ活性に対する抗H I V インテグラーゼ - カスパーゼ3融合体の効果。

20

図5Aは、抗H I V インテグラーゼ s c F v I N 3 3 - カスパーゼ3融合体とガラクトシダーゼ四量体に融合したH I V - 1 インテグラーゼ部分との間の特異的な相互作用によって、どのようにしてアポトーシスを誘発することができるのかを示す図である。

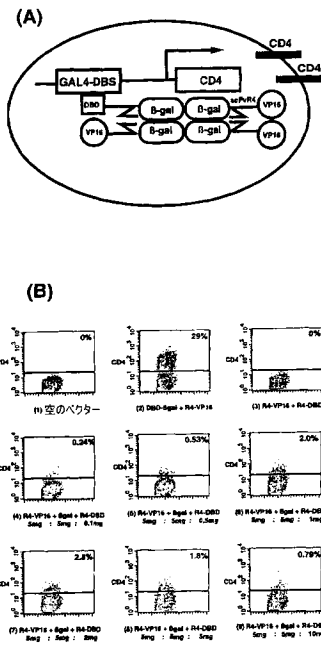
図5Bは、ガラクトシダーゼに融合したH I V インテグラーゼエピトープ (H I V I N - g a l) をコードする発現クローンの存在下、または野生型ガラクトシダーゼを発現するクローン (クローン p E F - g a l) の存在下での表示の種々のタンパク質を発現するプラスミドでC H O をトランスフェクトした実験の結果を示す。トランスフェクションから60時間後、細胞抽出物を作製し、ガラクトシダーゼレベルを測定する。データを、ガラクトシダーゼの比較活性として示す。各ガラクトシダーゼ発現クローン (H I V I N - g a l および p E F - g a l) を p E F - B O S (空のベクター) でトランスフェクトして得られたレベルを100%として、データをベータガラクトシダーゼの比較活性で示す。

30

前列の1は、p E F - B O S であり、2は、S c F v I N 3 3 - カスパーゼ3であり、3は、S c F v I N 3 3 - カスパーゼ3 (C 1 6 3 S) であり、4は、S c F v R 4 - カスパーゼ3であり、5は、S c F v F 8 - カスパーゼ3でのH I V I N - g a l である。後列は、H I V I N - g a l の代わりに p E F - g a l を同時トランスフェクトした以外は前列と同一である。

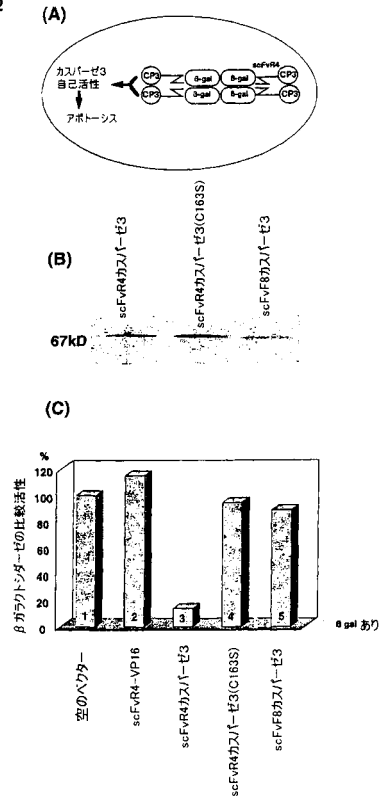
【 図 1 】

Figure 1



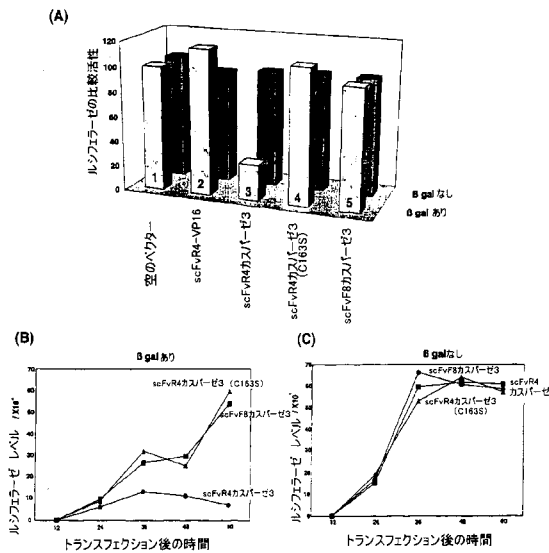
【 図 2 】

Figure 2



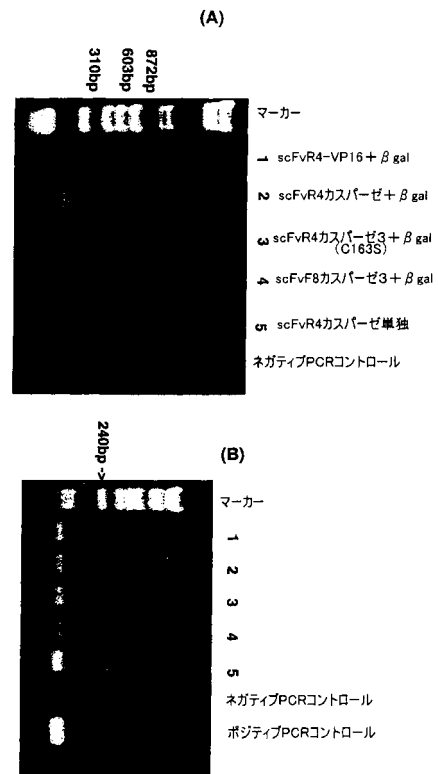
【 図 3 】

Figure 3



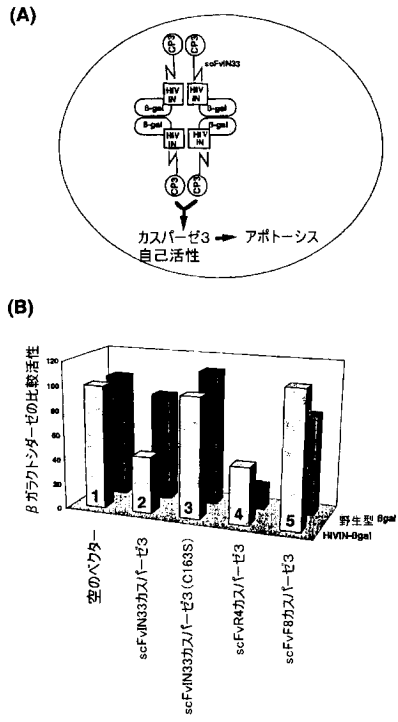
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/75453 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/GB01/01540
- (22) International Filing Date: 4 April 2001 (04.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0008256.0 4 April 2000 (04.04.2000) GB
0008254.5 4 April 2000 (04.04.2000) GB
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): MEDICAL RESEARCH COUNCIL [GB/GB]; 20 Park Crescent, London W1N 4AL (GB).
- Declaration under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): TSE, Eric [GB/GB]; MRC Laboratory of Molecular Biology, Division of Protein and Nucleic Acid Chemistry, Hills Road, Cambridge CB2 2QH (GB); RABBITS, Terence [GB/GB]; MRC Laboratory of Molecular Biology, Division of Protein and Nucleic Acid Chemistry, Hills Road, Cambridge CB2 2QH (GB).

- (74) Agents: MASCHIO, Antonio et al.; D Young & Co., 21 New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).

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



WO 01/75453 A2

(54) Title: METHODS OF DETECTING A CELL

(57) Abstract: We describe a method of inducing a cell to generate a detectable signal. The method comprises the steps of providing a cell comprising an entity and providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of a detectable signal. The first reporter and the second reporter are allowed to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter and generation of a signal. The signal is preferably the activation of a cell killing mechanism.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

1

METHODS OF DETECTING A CELL

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to methods of detecting proteins and other entities within a cell, in particular, an entity which is associated with an abnormal cell.

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Cancer is characterised by genetic abnormalities that affect growth control, differentiation and survival of cells (Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. *The Genetic Basis of Human Cancer* (McGraw-Hill, 1998)). Mutations in oncogenes and chromosomal translocations, which give rise to enforced expression of oncogenes or chimaeric fusion proteins, are frequently observed in tumours (Rabbits, T.H. 1994, *Nature* 372, 143-149). The protein products of these abnormal genes are unique to cancer cells and are therefore tumour specific antigens. Elimination of the mutant proteins or inhibition of their functions has been shown to be effective in controlling cancer growth and progression (Chin et al. (1999), *Nature* 400, 468-472; Felsher, et al., (1999) *Mol Cell* 4, 199-207; 10 Huettner, et al. (2000), *Nat Genet* 24, 57-60). However, although such proteins are potential targets for therapeutic intervention, they are mainly intracellular proteins and therefore present practical difficulties in the design of therapeutic strategies. 15

One approach has been the intracellular expression of antibodies or antibody fragments to inactivate mutant proteins, either by neutralising their functions (Cochet, et al. (1998), *Cancer Res* 58, 1170-6) or by preventing them from reaching the necessary cell compartments where they exert their effects (Wright et al., (1997) *Gene Ther* 4, 317-22). However, it is not always possible to predict in advance whether an antibody will bind to a particular protein, particularly within the internal environment of a cell. Selection methods which directly identify antibodies capable of binding intracellularly to antigens have been 20 proposed, such as an *in vivo* two-hybrid system for selecting antibodies with binding capability inside mammalian cells. Such a method is described in our earlier United 25

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

2

Kingdom application number 9905510.5 and International Patent Application number PCT/GB00/00876, hereby incorporated by reference.

5 However, even if a candidate antibody is identified which is likely to bind *in vivo*, there is no guarantee that this antibody will be able to neutralise the functions of the tumour protein or prevent its intracellular localisation. Furthermore, the tumour phenotype may be caused by mutation at more than one protein, so that neutralising the function of one of the mutant proteins will not necessarily be effective in halting tumour cell proliferation. There is therefore a need for a more effective way of killing tumour cells using antibodies.

10 As tumour associated antigens are characteristic of cancerous cells, detection of these antigens may be used as a means of diagnosis of cancer in a patient. Expression of antigen may also be detected as a means of genotyping an individual. Furthermore, detection of specific markers may be used as a means of tissue typing. In all these cases, presence of antigen may be determined by exposing a labelled antibody to suspect cells and detecting antibody-antigen binding. This method is however only suitable for
15 detection of antigens which are expressed extracellularly. There is therefore a need for an effective method of detecting intracellular markers.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 We have now found that instead of using intracellular tumour specific antigens as direct targets for a neutralising antibody, it is possible to detect a cell by the use of a pair of reporters which bind to an entity within the cell and co-operate to generate a detectable signal. This signal may be used to identify the cell. When the cell detected is a tumour cell or other diseased cell, the signal may advantageously be the activation of a cell-killing mechanism, and the tumour or diseased cell may be eliminated this way.

25 Accordingly, we provide in one aspect of the invention, a method of inducing a cell to generate a detectable signal, the method comprising the steps of: (a) providing a cell comprising an entity; (b) providing a first reporter and a second reporter, in which a

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

3

stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of a detectable signal; (c) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter and generation of a signal.

5 We provide, according to a second alternative aspect of the invention, a method of detecting an entity within a cell, the method comprising the steps of: (a) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of a detectable signal; (b) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity
10 leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter and generation of a signal; and (c) detecting the entity by monitoring the signal.

There is provided, according to a third and alternative aspect of the invention, a method of killing a cell, the method comprising the steps of: (a) providing a cell comprising an entity; (b) providing a first reporter comprising a first immunoglobulin and
15 a second reporter comprising a second immunoglobulin; (c) providing a first caspase molecule linked to the first immunoglobulin and a second caspase molecule linked to the second immunoglobulin, the first and the second caspase molecules being capable of stably interacting to generate a caspase activity to cause apoptosis in the cell; and (d)
20 allowing the first immunoglobulin and the second immunoglobulin to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the caspase molecules to generate caspase activity and apoptosis in the cell.

By "entity" we mean any cellular component. The entity is preferably a peptide, polypeptide, protein, genomic DNA, messenger RNA, transfer RNA, a subcellular structure or an intracellular pathogen. Nascent polypeptides and intracellular polypeptide
25 precursors are also included within the term "entity". Preferably, the entity is a polypeptide associated with a pre-determined condition of the cell or an organism from which the cell is derived.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

4

The cell may be a differentiated cell or an abnormal cell such as a tumour cell, a diseased cell or an infected cell. By "abnormal cell", we mean a cell which is diseased, infected or which otherwise does not exhibit the characteristics or behaviour of a normal cell. The entity may therefore be a cellular component associated with Alzheimer's disease
5 or Down's Syndrome, for example, a neurofibrillary tangle or a senile plaque. The entity may also be a mutant beta amyloid precursor protein or a mutant ubiquitin-B protein. It is known that frameshift mutations in a RNA encoding beta amyloid precursor protein or ubiquitin-B protein are associated with Alzheimer's Disease and Down's Syndrome, and accordingly, the entity of the invention may be a frameshifted RNA encoding such a
10 protein. The entity may also be an infectious form of the prion protein (PrPSc), which is associated with mammalian spongiform encephalopathies such as Creutzfeld-Jacob Disease (CJD), new variant CJD, or Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE or Mad Cow Disease). The entity may also be a protein or other molecule associated with AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) or an autoimmune disease.

15 Preferably, the entity is a cancer associated- or tumour associated protein or a disease specific protein. Most preferably, the entity is an oncogenic protein resulting from a mutation in the cell or a progenitor of the cell. The mutant oncogenic protein may be p21 ras. Preferably, one of the first reporter and second reporter binds to a target present in the mutant oncogenic protein but not in a corresponding wild type protein, and the other of the
20 first reporter and second reporter binds to a target present in both the mutant oncogenic protein and the wild-type protein.

Alternatively, the mutant oncogenic protein is a chimaeric fusion protein resulting from a chromosomal translocation. An example of a chromosomal translocation is the Philadelphia translocation which gives rise to the BCR-ABL fusion protein. Preferably,
25 one of the first reporter and the second reporter binds to a target comprising an SH2 domain, and the other of the first reporter and the second reporter binds to a target comprising an SH2-binding site.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

5

The mutant oncogenic protein may also be a mutated p53 protein; preferably the p53 protein is a tetramer made of p53 subunits. Preferably, the first reporter and the second reporter bind to identical targets present in the mutated p53 protein.

In general, where the entity is a natural cellular component which multimerises, the first and second molecule may be identical and may be brought into association through the multimerisation of the entity. Where the entity is a mutant entity, the ability to multimerise is preferably retained. Preferably, one or both of the first and second molecules, or an additional third molecule, may have a tethering activity in order to improve the cooperation of the reporter groups by bringing them closer together in the multimerised entity.

A "signal", as used here, is any detectable event, preferably the activation of a cell-killing mechanism. In a preferred embodiment of the invention the cell-killing mechanism is apoptosis or programmed cell death. Preferably, the first reporter and the second reporter each comprise a caspase molecule, and the binding of the reporters to their targets leads to auto-activation of the caspase molecules to initiate apoptosis. Alternatively, the signal may be the generation of an enzymatic activity, such as protease activity, transcriptional activity or luminescence inducing activity.

"Stable interaction" may be defined as an interaction which permits functional cooperation of the first and second reporters in order to give rise to a detectable signal. Preferably, the first reporter and/or the second reporter comprise polypeptides which associate to form a molecule which is capable of generating a signal.

By "protease activity", we mean the activity of a protease or any other enzyme which is capable of cleaving a protein or peptide. Protease activity may be assayed by monitoring degradation of a suitable substrate, by methods known in the art. Preferably, the polypeptide substrate consists of or comprises the entity which is detected. The protease activity may be a cysteine protease activity, for example, caspase activity.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

6

In one embodiment of the invention, the protease activity comprises a caspase activity. Preferably, the caspase activity is generated by the stable interaction of the first reporter with the second reporter. Thus, in this embodiment, stable interaction between the first reporter and the second reporter directly generates protease activity. Preferably, the caspase is caspase 3 or caspase 8. More preferably the first reporter and the second reporter each comprise a caspase molecule. Even more preferably, binding of the reporters to their targets leads to auto-activation of the caspase molecules and activation of apoptosis in the cell. Most preferably, the first reporter and the second reporter each comprise caspase 3. Caspases are a group of proteins which are involved in triggering apoptosis, and the term "caspase" is known in the art. Examples of caspases are those described in Takahashi, *Int J Hematol* 1999 Dec;70(4):226-32.

In a further embodiment, the protease activity may be associated with a proteasome which destroys proteins as part of ubiquitin-mediated proteolysis. Preferably, the proteasome is a 26S proteasome. The first and second reporters may comprise domains of a component involved in a ubiquitin-mediated proteolysis pathway, preferably domains of a F-box protein. Reconstitution of the component (e.g., F-box) by stable interaction of the first and second reporters by binding to the entity to be detected leads to ubiquitin labelling of the entity or a polypeptide comprising that entity. The entity and/or polypeptide is marked for destruction and subsequently destroyed by a proteasome (preferably the 26S proteasome), and the signal may be detected by means known in the art. It will be appreciated that in this embodiment, association of the first and second reporters does not itself generate protease activity directly, but that protease activity is generated indirectly by such association. It will further be appreciated that where the polypeptide that is destroyed is essential for cell viability, such as a metabolic enzyme, a transcription factor, a structural protein such as a membrane protein, etc, cell death (which is itself detectable) may result. The same situation arises where destruction of the polypeptide otherwise leads to cell death, for example, by triggering apoptosis.

The enzymatic activity may be a transcriptional activity, and the first reporter and the second reporter may preferably comprise domains of a transcription factor. By "transcriptional activity", we mean activity which induces production of messenger RNA

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

7

from a transcription unit. For example, transcriptional activity is demonstrated by a transcription factor or any other regulatory molecule which modulates gene expression within a cell. Preferably, either the first reporter or the second reporter comprises the DNA binding domain (DBD) of Gal4, and the other of the first reporter and the second reporter comprises a VP16 activation domain. The signal may be detected by monitoring the expression of a reporter gene. The reporter gene may encode an enzyme capable of catalysing an enzymatic reaction with a detectable end-point. Alternatively, the reporter gene may encode a molecule capable of regulating cell growth, such as providing a required nutrient. Preferably, the reporter gene encodes Green Fluorescent Protein (GFP), luciferase, β -galactosidase, or chloramphenicol acetyl transferase (CAT). Most preferably, the reporter gene is CD4.

The invention moreover comprises the use of transcriptional regulation mechanisms as reporter systems. For example, transcriptional regulation of diphtheria toxin expression may be dependent on the cooperation of the first and second reporters. Thus a first reporter may comprise a coding sequence encoding a toxin under the control of a minimal promoter, which has negligible background expression levels; a second reporter may regulate the expression of a transcription factor, either endogenous or exogenous, which in turn upregulates toxin expression.

The enzymatic activity may be luminescence inducing activity. "Luminescence" refers to the production of light or other radiation by a chemical reaction, and includes bioluminescence or chemiluminescence. Preferably, the luminescence inducing activity is preferably provided by luciferase. More preferably, the first and second reporter comprise polypeptide domains of luciferase, which when brought together produce luciferase activity.

The signal may be emission or absorption of electromagnetic radiation, for example, light. Preferably, the signal is a fluorescent signal. More preferably, the fluorescent signal is emitted from a fluorescent chemical or a fluorescent protein. Preferred fluorescent chemicals are fluorescein isothiocyanate and rhodamine, and preferred fluorescent proteins are Green Fluorescent Protein, Blue Fluorescent Protein,

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

8

Cyan Fluorescent Protein, Yellow Fluorescent Protein and Red Fluorescent Protein. Most preferably, the fluorescent signal is modulated by fluorescent resonance energy transfer (FRET). The fluorescent signal is preferably detected by means of a fluorescence activated cell sorter (FACS).

5 The first reporter and the second reporter may bind to the same target site. Where this is so, the first reporter and the second reporter may bind to the same target site substantially simultaneously, or sequentially. Alternatively and preferably, the first reporter and the second reporter bind to different target sites. Where the reporters bind to different target sites, the target sites are advantageously adjacent, such that the reporters
10 may cooperate functionally in accordance with the present invention.

 Preferably, the first reporter comprises a first association means and the second reporter comprises a second association means, and the first and second reporters interact via their respective association means. More preferably, the first reporter comprises first
15 binding means which binds to a first target on the entity, and the second reporter comprises second binding means which binds to a second target on the entity. Most preferably, the first reporter comprises the first association means linked to the first binding means, and the second reporter comprises the second association means linked to the second binding means.

 The term "link" is intended to mean any form of covalent or non-covalent
20 attachment between two moieties, for example the binding means and the association means. An example of a link is a peptide link in a fusion protein. Chemical coupling or conjugation between the moieties is expressly included. Furthermore, the binding means and the association means need not be linked directly, and linkage may occur via a linker peptide. The linker peptide may be a flexible or a structured linker peptide. Suitable
25 flexible linker peptides may comprise one or more glycine residues, optionally in combination with other amino acid residues. A structured linker may comprise one or more proline residues, and may comprise a defined secondary structure.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

9

By "binding means" we mean anything which is capable of specific binding to a target. Preferably, the binding means is a molecule; more preferably, the binding means is a polypeptide or protein.

Most preferably, the first binding means and/or the second binding means
5 comprises a immunoglobulin, for example, an antibody or a T-cell receptor, or a fragment thereof. Preferably, the antibody is chosen from a Fv, a single chain Fv (scFv), a Fab or a F(ab')₂. More preferably, the antibody is a single chain Fv. Most preferably, the antibody is an intracellular single chain Fv. Use of reporter(s) comprising immunoglobulins is preferred where the entity comprises protein or polypeptide. The entity may therefore
10 comprise an epitope which is recognised by the immunoglobulin.

The term "immunoglobulin" refers to any member of the immunoglobulin superfamily, including T-cell receptors and antibodies, and includes any fragment of a natural immunoglobulin which is capable of binding to a target. A comprehensive review of immunoglobulins is provided in Male et al (1987), *Advanced Immunology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia. Included within the term "immunoglobulin" are intact
15 immunoglobulins as well as antibody fragments such as Fv, a single chain Fv (scFv), a Fab or a F(ab')₂. "Intracellular" as used here means inside a cell. An "intracellular antibody" is an antibody which is capable of binding to its target or cognate antigen within the environment of a cell, or in an environment which mimics an environment within the
20 cell.

Where the association means and the binding means both comprise proteins, the reporter is preferably provided as a fusion protein comprising respective association means linked to binding means. Preferably, the first reporter and/or the second reporter are provided by expression of nucleic acid within the cell. Where the binding means
25 comprises an antibody or a T-cell receptor, the nucleic acid is preferably obtained from a phage library encoding a repertoire of antibodies or T-cell receptors. A "repertoire" refers to a set of molecules generated by random, semi-random or directed variation of one or more template molecules, at the nucleic acid level, in order to provide a multiplicity of binding specificities.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

10

Most preferably, the library is constructed from nucleic acids isolated from an organism which has been challenged with an antigen. Alternatively, the association means is linked to the binding means by chemical coupling.

5 Where the entity comprises a nucleic acid, the first reporter and/or the second reporter may bind to a target comprising a sequence located in the entity. Preferably, binding of the first and/or second reporter to the respective target occurs by means of nucleic acid hybridisation. More preferably, the first reporter and/or the second reporter comprises nucleic acid binding means capable of hybridising to a target sequence. Most preferably, the nucleic acid binding means comprises RNA or single stranded DNA.

10 The first and/or second reporters may interact via association means which comprise nucleic acid sequences. Stable interaction of the reporters may in this case be detected by monitoring absorbance of radiation, for example ultraviolet radiation. Alternatively, the nucleic acid association means may be linked to any components which are capable of generating the signals described here, and interaction between the reporters
15 may be detected by monitoring the particular signal generated.

Where the association means and the binding means both comprise nucleic acid, the first and/or second reporter may be provided in the form of a contiguous nucleic acid sequence comprising the association means and the binding means.

20 Alternatively, the first and/or second reporter may be provided in the form of a hybrid comprising both nucleic acid and protein. Thus, the reporter may comprise a binding means comprising protein and an association means comprising nucleic acid, or conversely, a binding means comprising nucleic acid and an association means comprising protein. All that is important is that the binding of the binding means of the first reporter to its target brings the association means of the first reporter into stable association with the
25 association means of the second reporter, when it is bound to its target, so that a signal is generated.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

11

There is provided, according to a fourth alternative aspect of the invention, a pharmaceutical composition comprising an immunoglobulin-caspase fusion protein or conjugate, or a nucleic acid encoding an immunoglobulin-caspase fusion protein, together with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

5 In a fifth alternative aspect of the invention, we provide an immunoglobulin-caspase fusion protein or conjugate, or a nucleic acid encoding an immunoglobulin-caspase fusion protein for use in a method of treatment or diagnosis of a cancer in a human or animal.

10 According to a sixth alternative aspect of the invention, there is provided these of an immunoglobulin-caspase fusion protein or conjugate, or a nucleic acid encoding an immunoglobulin-caspase fusion protein for the preparation of a medicament for the treatment or diagnosis of cancer in a human or animal.

In a seventh aspect of the present invention, there is provided a method of destruction of a polypeptide in a cell, the method comprising the steps of: (a) providing a cell comprising a polypeptide; (b) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of protease activity; and (c) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the polypeptide, such that binding of the reporters to the polypeptide leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter, generation of protease activity and proteolysis of the polypeptide.

20 According to an eighth aspect of the present invention, we provide a method of identifying the function of a gene, the method comprising the steps of: (a) providing a cell comprising a gene encoding a polypeptide; (b) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of protease activity; (c) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the polypeptide, such that binding of the reporters to the polypeptide leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter, generation of protease activity and proteolysis of the polypeptide; and (d) observing a phenotype.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

12

A method according to this aspect is useful for functional genomics studies. Appropriate binding entities capable of targeting any protein entity may be constructed by following the detailed description provided here, to disrupt the function of the protein by its destruction. Functional "knock-outs" may therefore be created readily. The phenotype
5 of the cell or animal or plant comprising the cell may then be observed to provide an indication of the function of the polypeptide or gene. Thus, for example, where a cell which has been targeted exhibits an arrested cell cycle phenotype, for example, it may be concluded that the protein in question which is targeted has a role in cell cycle function. The ability to target any protein by the use of suitably designed reporters, as described in
10 further detail below, enables this application to have wide utility.

Preferably, the signal is generation of a protease activity associated with a proteasome, preferably a 26S proteasome. More preferably, the first reporter and the second reporter each comprise one or more domains of a F-box motif. Preferably, the
15 binding of the reporters to the entity leads to ubiquitination of the entity, or a polypeptide comprising the entity. In a highly preferred embodiment of the invention, binding of the reporters to the entity leads to proteolysis of the entity, or a polypeptide comprising the entity. Such proteolysis preferably leads to death of the cell.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, molecular biology, microbiology, recombinant
20 DNA and immunology, which are within the capabilities of a person of ordinary skill in the art. Such techniques are explained in the literature. See, for example, J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John
25 Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak and James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; and, D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A:*

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

13

Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press. Each of these general texts is herein incorporated by reference.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Mammalian Two-Hybrid ScFv- β -Galactosidase Transcription Assay

5 Figure 1A is a diagram depicting the effect of co-transfecting expression vectors encoding the anti- β -galactosidase antibody fragment scFvR4-DBD fusion protein (DNA binding domain) and scFvR4-VP16 (VP16 transcriptional transactivating domain) fusion proteins in the CHO-CD4 reporter cell line. The scFvR4-DBD and scFvR4-VP16 fusion proteins, when bound to a β -galactosidase tetramer, can form a transcription complex
10 which can bind to the chromosomal GAL4 DNA-binding site (DBS) which controls transcription of the CD4 reporter gene (Fearon et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7958-7962). After this, CD4 protein molecules appear on the cell surface and can be assayed with the fluorescence activated cell sorter.

Results of such an experiment are shown in Figure 1B. Panels A-I show FACS
15 analyses of CHO-CD4 cells co-transfected with β -galactosidase expression clone pEF- β gal, together with various expression vectors. Panel 1: pEF-BOS vector only; Panel 2: DBD- β gal and scFvR4-VP16; Panel 3: scFvR4-VP16 and scFvR4-DBD; Panels 4-9: Variable amounts of scFvR4-VP16 and scFvR4-DBD as indicated. The amount of pEF- β gal plasmid (5 μ g) is not varied.

20 DBD= GAL4 DNA binding domain; VP16= VP16 activation domain; DBS= DNA binding sites.

Induction of cell surface CD4 expression is assayed after 60 hours using anti-human CD4 antibody. The indicated percentage of CD4+ cells after 48 hours is estimated using a FACSCalibur machine.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

14

Figure 2. Cell Death Mediated By Intracellular Antibody ScFvR4-Caspase3 Binding to β -Galactosidase

Figure 2A is a diagram illustrating a model for possible binding of scFvR4-caspase3 fusion (scFv-CP3) to β -galactosidase (β -gal) tetramer causing dimerisation of caspase 3 and its auto-activation to trigger apoptosis.

Figure 2B shows the results of Western analysis of scFv-fusion proteins expressed in CHO cells. CHO cells are transfected for 48 hours with scFvR4-caspase 3, scFvR4-caspase 3 (C163S) or scFvF8-caspase 3 expression vectors. Protein extracts are prepared, fractionated and transferred to nitrocellulose membranes. These are incubated with anti-caspase 3 antibody and secondary HRP conjugated anti-goat antibody. Detection is done by using ECL (enhanced chemiluminescence). Molecular weights are determined by co-electrophoresis of prestained protein molecular weight standards.

Figure 2C shows the results of experiments in which CHO cells are transfected with plasmids expressing β gal (pEF- β gal) and the various scFv fusion proteins as indicated on the histogram. β -galactosidase levels are measured 60 hours after transfection and the data are the representative of two independent experiments, each carried out in duplicate. β -galactosidase levels are expressed relative to that obtained with pEF- β gal co-transfected with pEF-BOS vector alone, which was taken as 100%. Lane 1: empty vector; Lane 2: scFvR4-VP16; Lane 3: scFvR4-caspase3; Lane 4: scFvR4-caspase3(C163S); Lane 5: scFvF8-caspase3.

Figure 3. Luciferase Activity in CHO Cells Co-Expressing ScFv-Fusions and β -Galactosidase

Figure 3A shows results from experiments in which CHO cells are transfected with RSVluc, a luciferase expression plasmid (de Wet, et al., 1987, *Mol Cell Biol* 7, 725-37) together with the various scFv fusion expression plasmids in the presence (front row) or absence (back row) of the β -galactosidase expression vector, pEF- β gal, which serves to provide specific intracellular antigen. Luciferase levels are measured 60 hours after transfection. Levels are normalised to the level obtained for luciferase expression (100%

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

15

value) when co-transfected with pEF-BOS vector only. Lane 1: empty vector; Lane 2: scFvR4-VP16; Lane 3: scFvR4-caspase3; Lane 4: scFvR4-caspase3(C163S); Lane 5: scFvF8-caspase3.

Figure 3B shows a time course of luciferase activation in the presence of specific antigen. Luciferase activities are measured at 12, 24, 36, 48 and 60 hours after co-transfection with RSVluc, pEF- β gal expression plasmids and the three different scFv fusion protein expression plasmids as shown. Triangles: scFvR4-caspase3(C163S); squares: scFvF8-caspase3; circles: scFvR4-caspase3.

Figure 3C shows a time course of luciferase activation in the absence of specific antigen. Luciferase activities are measured as in Figure 3B but cells are transfected in the absence of the β -galactosidase expression construct. Triangles: scFvR4-caspase3(C163S); squares: scFvF8-caspase3; circles: scFvR4-caspase3.

Figure 4. Apoptosis Assay with CHO Cells Expressing ScFv-Caspase and Specific Antigen

Figure 4B shows results of experiments in which CHO cells are co-transfected with pEGFP-N1, expressing green fluorescent protein, and clones encoding various scFv fusions. Transfected cells are identified by fluorescence and sorted using a FACScalibur cell sorter. Genomic DNA is extracted from selected cells and PCR amplifications are carried out using ApoAlert LM-PCR Ladder Assay Kit. The products are fractionated on 1.5% agarose gels and visualised by staining with ethidium bromide. The lanes correspond to PCR reactions from DNA of cells which have been transfected with plasmids expressing scFvR4-VP16 + β -gal (lane 1), scFvR4-caspase3 + β gal (lane 2), scFvR4-caspase3(C163S) + β gal (lane 3), scFvF8-caspase3 + β gal (lane 4) and scFvR4-caspase3 alone (lane 5). The negative PCR control represents a product from a reaction without template DNA.

Figure 4B shows results of PCR reactions which are performed with the same DNA samples as in Figure 4A, but using primers specific for Chinese hamster actin gene.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

16

The negative control as in Figure 4A; the positive control is the reaction product obtained from a PCR amplification with purified CHO genomic DNA.

Size markers are a mixture of λ DNA digested with HindIII and ψ X174 DNA digested with HaeIII.

5 **Figure 5. Effect of Anti-HIV Integrase-Caspase 3 Fusion on β -Galactosidase-Integrase Activity**

Figure 5A is a diagram depicting how apoptosis may be triggered by specific interaction between an anti-HIV integrase scFvIN33-caspase3 fusion and the HIV-1 integrase moieties fused to the β -galactosidase tetramer.

10 Figure 5B shows results of an experiment in which CHO cells are transfected with plasmids expressing the various proteins as indicated in the presence of an expression clone encoding the HIV integrase epitope fused to β -galactosidase (HIVIN- β gal) or in the presence of a clone expressing wild type β -galactosidase (clone pEF- β gal). 60 hours after transfection, cell extracts are made and β -galactosidase levels are measured. Data is
15 presented as relative β -galactosidase levels, with 100% being the level obtained when the respective β -galactosidase expressing clones (HIVIN- β gal and pEF- β gal) are co-transfected with pEF-BOS vector (empty vector) as 100%.

20 Front row HIVIN- β gal with 1. pEF-BOS; 2. ScFvIN33-caspase 3; 3. ScFvIN33-caspase 3(C163S); 4. ScFvR4-caspase 3; 5. ScFvF8-caspase 3. Back row is the same as the front row, except that pEF- β gal is co-transfected instead of HIVIN- β gal.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The methods of our invention allow the induction of a signal in a cell containing an entity, the detection of an entity within a cell, and the killing of a cell containing an entity. Our invention relies on the binding of first and second reporters to the entity. Thus, when
25 the first reporter is brought into stable interaction with the second reporter through binding of the first and second reporters to the entity, a signal is generated. Advantageously, a

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

17

stable interaction between the first and second reporters does not occur unless the reporters are brought together through binding of the reporters to their respective targets. The signal may be detected if desired. The first and second reporters are therefore two parts of a signal-generating agent, and which are capable of generating a signal by interacting.

5 It should be noted that our methods may be used generally to identify any cell, whether normal or abnormal (for example a cancerous or diseased cell). Generally, therefore, our methods may be used to detect any protein, nucleic acid or other entity present within a cell, or even to determine the sub-cellular localisation of any entity within a cell. Our methods are therefore capable of detecting the condition of a cell, according to
10 the presence or absence of an entity associated with that condition. If it is desired that a cell which has been identified be eliminated, then this may be done by conventional means. Alternatively and preferably, the binding of the reporters may lead directly to the activation of a cell killing mechanism, so that the signal is the death of the cell. Advantageously, death of the cell results from apoptosis or programmed cell death.

15 Apoptosis is carried out by a family of cysteine proteases known as caspases that recognise specific amino acid sequences and cleave target proteins after an aspartic acid (Thornberry et al., 1998, *Science* 281, 1312-6). One member of the caspase family, caspase 3, is the so-called executioner in the apoptotic pathway and is responsible for the proteolytic cleavage of many proteins that are important in maintaining the integrity of
20 living cells (Earnshaw et al., 1999, *Ann. Rev. Biochem.* 68, 383-424). Caspase-3 is synthesised as zymogen and is cleaved and activated by the initiator or upstream caspases such as caspase 8 (Srinivasula et al. (1996), *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14486-91) and caspase 9 (Li et al., 1997, *Cell* 91, 479-89) to form an active tetrameric enzyme (Rotonda et al., 1996, *Nat Struct Biol* 3, 619-25). It has been shown that when two molecules of
25 caspase 3 are brought into close proximity, by forced dimerisation, they can undergo self-activation and irreversibly lead to cell death (Colussi et al., 1998, *J Biol Chem* 273, 26566-70; MacCorkle et al, 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3655-60; Fan et al., 1999, *Hum Gene Ther* 10, 2273-85).

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

18

Accordingly, in a preferred embodiment of the invention, the first reporter and the second reporter comprise caspase 3 molecules. Binding of the first and second reporters to the entity leads to stable interaction between the first and second reporters, self-activation of the caspase 3 molecules and generation of caspase activity. This leads to triggering of apoptosis within the cell. As described below, the first and second reporters advantageously bind to their respective targets via an antibody, and in our preferred embodiment, the caspase 3 is provided in the form of an intracellular antibody-caspase 3 fusion protein.

As used here, a "caspase molecule" or "caspase" includes a polypeptide sequence comprising some or all of the polypeptide sequence of a caspase, so long as caspase activity is retained. Thus, the first and second molecules may include polypeptide sequence from a caspase, together with other polypeptide sequence. The caspase sequence may form a moiety in or on the molecule.

The polypeptide sequence of the caspase may be altered with conservative amino acid substitutions which do not substantially affect the activity and function of the protein. Alternatively and preferably, mutations may be introduced which diminish the auto-toxicity of the caspase, and/or to make the caspase more effective in activating apoptosis. The caspase molecules may also be engineered so as to prevent or lower the tendency of the caspase molecules to homodimerise in the absence of the entity to be detected. Such variants and mutants of caspase may be made, and tested for effectiveness, by methods known in the art.

The signal may be the emission or absorption of any electromagnetic (EM) radiation, for example, light. Included are fluorescence, phosphorescence or other signals which involve the modulation of the intensity or frequency of emission or absorption of radiation, for example, a FRET signal (described in further detail below). The first reporter and second reporter may each comprise a fluorophore such as a fluorescent protein or fluorescent chemical. Examples of fluorescent chemicals include allophycocyanine, phycocyanine, phycoerythrin, rhodamine, tetramethyl rhodamine, 7-nitro-benzofurazan rhodamine isothiocyanate, oxazine, coumarin, fluorescein derivatives, for example, FAM

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

19

(6-carboxy-fluorescein), TET (6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachloro-fluorescein), (FITC) fluorescein isothiocyanate and carboxyfluorescein diacetate, as well as Texas Red, acridine yellow/orange, ethidium bromide, propidium iodide and bis-benzamide (commercially available from Hoechst under the trade name H33258).

5 Preferably, the first and second reporters comprise fluorescent polypeptides. Examples of fluorescent polypeptides and proteins include Green Fluorescent Protein (GFP) from *Aequorea victoria* and Red Fluorescent Protein (RFP) from *Discosoma* spp. Derivatives and variants of these proteins, such as Cyan Fluorescent Protein, Blue
10 Fluorescent Protein, Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP; GFPmut1; Yang, T. T., et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(22):4592-4593; Cormack, B. P., et al. (1996) *Gene* 173:33-38.), Enhanced Blue Fluorescent Protein (EBFP), Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP; Ormö, et al. (1996) *Science* 273:1392-1395), Destabilised Enhanced Green
15 Fluorescent Protein (d2EGFP; Living Colors Destabilized EGFP Vectors (April 1998) CLONTECHniques XIII(2):16-17), Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP), and GFPuv (Haas, J., et al. (1996) *Curr. Biol.* 6:315-324). may also be used. These fluorescent proteins are available from CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California, USA). Alternatively, the first and second reporters comprise polypeptide domains of a fluorescent polypeptide.

20 The signal may be a luminescence inducing activity. It will be appreciated that as light is generated during luminescence, the signal may at the same time be a luminescence inducing activity and emission of electromagnetic radiation.

The signal may also be the generation of an enzymatic activity, for example, transcriptional activity. The transcriptional activity may be detected by assaying the expression of a reporter gene such as CD4, by fluorescent antibodies and FACs for
25 example.

Alternatively, the signal may be detected as cell growth, cell division or differentiation. The first and second reporters may stably interact to produce a transcriptional activity, which may activate a program of differentiation or cell growth.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

20

For example, VEGF (vascular endothelial growth factor) and/or other angiogenic growth factors may also be expressed to induce angiogenesis. It has been shown that the Lmo2 LIM-only protein is specifically needed for angiogenesis (Yamada et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 320-324), and accordingly the transcriptional activity may be Lmo2
5 activity. Cell growth and detection may be detected by microscopy, detecting appropriate cell surface markers, etc as known in the art.

The cell may be any prokaryotic or eukaryotic cell. Preferably, the cell is an animal cell or a human cell; most preferably, the cell is a human cell. The entity may be present in any cellular compartment, preferably the cytoplasm or nucleus.

10 The cell may be a normal cell, and our methods may therefore be used as a means of tissue typing, for example, by detecting an entity associated with a particular developmental lineage. Alternatively, the methods may be used as a means of determining the condition of a cell, for example, whether a cell is cancerous, by detecting a tumour associated entity within the cell. Thus, the entity may be a mutant oncogenic protein or
15 polypeptide, derived from a wild type protein by a point mutation, deletion, insertion or a chromosomal translocation in a nucleic acid encoding the polypeptide. An example is p21 ras, which results from one or more mutations in a corresponding wild type protein. Mutations in tumour suppressor genes are often associated with cancer cells, and the proteins they give rise to, for example, mutant p53 protein, may also be detected using the
20 methods of our invention. Alternatively, the oncogenic protein may be a chimaeric fusion protein resulting from a chromosomal translocation, such as the BCR-ABL fusion arising from a Philadelphia translocation.

The entity may also be a protein or nucleic acid associated with an abnormal cell. Such a cell may express aberrant proteins not found in a normal cell, for example, viral or
25 bacterial specific proteins expressed as a result of infection. For example, detection of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) integrase protein will allow determination of whether a cell is infected with HIV. Thus, our methods may be used to determine whether a cell is diseased, infected or abnormal. Alternatively, and preferably, the diseased,

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

21

infected or abnormal cell is killed by activation of apoptosis as described above. It will be appreciated that in this case, the signal does not need to be detected at all.

It will be appreciated that it is also possible to detect a protein by detecting a corresponding nucleic acid giving rise to the protein. For example, a messenger RNA or a
5 DNA sequence carrying a mutation and encoding a tumour associated protein may be detected.

In a preferred embodiment, the first and second reporters comprise binding means, which binding means are immunoglobulins provided by expressing nucleic acids within the cell. The nucleic acids may be localised to a subcellular compartment suitable for
10 detecting the entity. For example, if the entity is a cytoplasmic protein, the nucleic acids are localised to the cytoplasm of the cell, and transcribed and/or translated there. The molecules may also be localised to any desired subcellular compartment, such as the nucleus (for example by fusion to a nuclear localisation signal), to the ER, using an ER retention signal, to the mitochondria using a mitochondria-targeting sequence (MTS), the
15 plasma membrane or other locations such as the plasma membrane. Such targeting sequences are reviewed generally in Baker et al., 1996, *Biol Rev Camb Philos Soc* 71, 637-702.

Mitochondrial targeting sequences and mechanisms for directing and translocating proteins through the mitochondrial membranes, are discussed in, for example, Omura,
20 1998, *Biochem (Tokyo)* 123, 1010-6, Glaser et al., 1998, *Plant Mol Biol*, 38, 311-38 and Voos et al., 1999, *Biochim Biophys Acta* 1422, 235-54. Mitochondrial targeting of bioactive compounds is reviewed in Murphy, 1997, *Trends Biotechnol* 15, 326-30. Since mitochondria are involved in many critical cell processes, our invention may be used to
25 detect an entity comprising an abnormal mitochondrial protein or DNA associated with mitochondrial DNA diseases. Cells containing aberrant mitochondrial protein or mutant mtDNA may be detected, and optionally killed.

Nuclear localisation sequences include the SV40 large T antigen consensus sequence PKKKRKV (reviewed in Dingwall, et al., 1991, *Trends Biochem. Sci.* 16, 478-

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

22

481), or the bipartite nuclear localisation sequence as exemplified by nucleoplasmin protein (Dingwall, et al., 1987, *EMBO J.* 6, 69-74; Robbins, et al 1991, *Cell* 64, 615-623).

The reporter(s) may also be targeted to the plasma membrane, in order to detect an entity which is present in the plasma membrane, such as a membrane protein. It is known
5 that the p21-*ras* oncogene gene product is localised at the plasma membrane, and such targeted reporter(s) may suitably be used to detect the ras protein. Targeting to the plasma membrane may be achieved by linking the reporter(s) to a transmembrane protein, or a portion of the transmembrane protein responsible for membrane localisation, such as a transmembrane α helix as known in the art.

10 Where the reporters are expressed as recombinant proteins, the nuclear targeting sequences, mitochondrial targeting sequences, ER retention signals etc may be engineered into the reporter by cloning the suitable sequence into the expression construct.

Nucleic acids encoding immunoglobulins may be obtained from libraries encoding a multiplicity of such molecules. For example, phage display libraries of antibody
15 molecules are known and may be used in this process. Advantageously, the library encodes a repertoire of immunoglobulin molecules. Methods for generating repertoires are well characterised in the art.3

Libraries may moreover be constructed from nucleic acids isolated from organisms which have been challenged with an antigen. Antigen challenge will normally result in the
20 generation of a polyclonal population of immunoglobulins, each of which is capable of binding to the antigen but which may differ from the others in terms of epitope specificity or other features. By cloning antibody genes from an organism a polyclonal population of immunoglobulins may be subjected to selection in order to isolate immunoglobulins which are suitable for use in our methods.

25 As noted above, the first and/or second reporters may comprise association means, which may comprise a polypeptide. Where the association means is a polypeptide, one or both of the first and second reporters may be provided in the form of a fusion protein

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

23

comprising the immunoglobulin and the polypeptide. In a preferred embodiment of the invention, the fusion protein is an intracellular antibody-caspase 3 fusion. One or both fusion proteins may be expressed from appropriate nucleic acid constructs, which are transcribed to produce first or second immunoglobulin together with first or second polypeptides. The nucleic acid construct(s) may be targeted intracellularly as described above. The nucleic acid constructs may be expression vectors capable of directing expression of the nucleic acid encoding the fusion protein in the cell in which the methods of the invention is to be performed.

BINDING MOIETIES

The reporters according to the invention preferably comprise moieties which are capable of binding to cellular entities as described. These may be immunoglobulins, particularly intracellular antibodies as described below; however, the invention also includes the use of polypeptides and nucleic acid binding molecules which are capable of binding targets within a cell. Such binding molecules have the advantage of typically being smaller than antibodies, and thus better able to target a reporter to entities within a cell.

The invention thus provides the use of target-specific binding polypeptides and/or nucleic acid aptamers to direct the first and/or second reporter to one or more cellular targets. As used herein, a "target-specific binding polypeptide and/or nucleic acid aptamer" is a polypeptide or nucleic acid molecule which is capable of specific binding to a molecular target in a cell. Such peptides or aptamers may be used in place of immunoglobulins to achieve targeting or reporters to entities in cells in accordance with the invention.

Polypeptides having binding activity may be developed, for example, from recombinant libraries of random polypeptide structures. Selection of polypeptides having binding affinity for a desired target by techniques such as phage display, SELEX, mRNA display or surface plasmon resonance, followed if necessary by refinement of the binding

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

24

specificity and affinity by repeated rounds of mutation and selection, are techniques known to those skilled in the art.

For example, selection of binding polypeptides by mRNA selection is described by Wilson *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Mar 27;98(7):3750-3755. Srebalus and
5 Clemmer, Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Mar 27;98(7):3750-3755, describe the use of
MALDI-TOFMS to characterise the binding of a library of polypeptides to a target
molecule. The use of phage display is reviewed by Nilsson *et al.*, Adv Drug Deliv Rev
2000 Sep 30;43(2-3):165-96, and McGregor, Mol Biotechnol 1996 Oct;6(2):155-62. The
use of nucleic acid aptamers is reviewed by Hermann and Patel, Science 2000 Feb
10 4;287(5454):820-5. SELEX is a method for the in vitro evolution of nucleic acid
molecules with highly specific binding to target molecules. It is described, for example, in
U.S. patents 5654151, 5503978, 5567588 and 5270163, as well as PCT publication WO
96/38579.

Iterative selection procedures such as phage display and SELEX are based on the
15 principle that within a library containing a large number of possible sequences and
structures there is a wide range of binding affinities for a given target. A library
comprising, for example a 20 subunit randomised polypeptide or nucleic acid polymer can
have 4^{20} structural possibilities. Those which have the higher affinity constants for the
target are considered to be most likely to bind. The process of partitioning, dissociation
20 and amplification generates a second nucleic acid library, enriched for the higher binding
affinity candidates. Additional rounds of selection progressively favour the best ligands
until the resulting library is predominantly composed of only one or a few sequences.
These can then be cloned, sequenced and individually tested for binding affinity as pure
ligands.

25 Cycles of selection and mutation/amplification are repeated until a desired goal is
achieved. In the most general case, selection/amplification is continued until no
significant improvement in binding strength is achieved on repetition of the cycle. The
iterative selection/amplification method is sensitive enough to allow isolation of a single
sequence variant in a library containing at least 10^{14} sequences. The method could, in

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

25

principle, be used to sample as many as about 10^{18} different nucleic acid species. The members of the library preferably include a randomised sequence portion as well as conserved sequences necessary for efficient amplification. Sequence variants can be produced in a number of ways including synthesis of randomised nucleic acid sequences and size selection from randomly cleaved cellular nucleic acids. The variable sequence portion may contain fully or partially random sequence; it may also contain subportions of conserved sequence incorporated with randomised sequence. Sequence variation in test nucleic acids can be introduced or increased by mutagenesis before or during the selection/amplification iterations and by specific modification.

10 Methods for the selection of binding polypeptides and aptamers are further described below. In general techniques for the selection of immunoglobulin molecules may readily be adapted to the selection of peptides for use in the present invention.

IMMUNOGLOBULINS

15 Immunoglobulin molecules are in the broadest sense members of the immunoglobulin superfamily, a family of polypeptides which comprise the immunoglobulin fold characteristic of antibody molecules, which contains two β sheets and, usually, a conserved disulphide bond. Members of the immunoglobulin superfamily are involved in many aspects of cellular and non-cellular interactions *in vivo*, including widespread roles in the immune system (for example, antibodies, T-cell receptor molecules and the like), involvement in cell adhesion (for example the ICAM molecules) and intracellular signalling (for example, receptor molecules, such as the PDGF receptor). The methods of the present invention may therefore make use of any immunoglobulin superfamily molecule which is capable of binding to a target. Peptides or fragments derived from immunoglobulins may also be used.

25 Antibodies, as used herein, refers to complete antibodies or antibody fragments capable of binding to a selected target, and including Fv, ScFv, Fab' and F(ab')₂, monoclonal and polyclonal antibodies, engineered antibodies including chimeric, CDR-grafted and humanised antibodies, and artificially selected antibodies produced using

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

26

phage display or alternative techniques. Small fragments, such as Fv and ScFv, possess advantageous properties for diagnostic and therapeutic applications on account of their small size and consequent superior tissue distribution. Preferably, the antibody is a single chain antibody or scFv.

5 The antibodies may be altered antibodies comprising an effector protein such as a toxin or a label. Use of labelled antibodies allows the imaging of the distribution of the antibody *in vivo*. Such labels may be radioactive labels or radioopaque labels, such as metal particles, which are readily visualisable within the body of a patient. Moreover, they may be fluorescent labels (such as the ones described here) or other labels which are
10 visualisable on tissue samples removed from patients. Antibodies with effector groups may be linked to any association means as described above.

Antibodies may be obtained from animal serum, or, in the case of monoclonal antibodies or fragments thereof, produced in cell culture. Recombinant DNA technology may be used to produce the antibodies according to established procedure, in bacterial,
15 yeast, insect or preferably mammalian cell culture. The selected cell culture system preferably secretes the antibody product.

Multiplication of hybridoma cells or mammalian host cells *in vitro* is carried out in suitable culture media, which are the customary standard culture media, for example Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) or RPMI 1640 medium, optionally
20 replenished by a mammalian serum, e.g. foetal calf serum, or trace elements and growth sustaining supplements, e.g. feeder cells such as normal mouse peritoneal exudate cells, spleen cells, bone marrow macrophages, 2-aminoethanol, insulin, transferrin, low density lipoprotein, oleic acid, or the like. Multiplication of host cells which are bacterial cells or yeast cells is likewise carried out in suitable culture media known in the art, for example
25 for bacteria in medium LB, NZCYM, NZYM, NZM, Terrific Broth, SOB, SOC, 2 x YT, or M9 Minimal Medium, and for yeast in medium YPD, YEED, Minimal Medium, or Complete Minimal Dropout Medium.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

27

Use of insect cells as hosts for the expression of proteins has advantages in that the cloning and expression process is relatively easy and quick. In addition, there is a high probability of obtaining a correctly folded and biologically active protein when compared to bacterial or yeast expression. Insect cells may be cultured in serum free medium, which is cheaper and safer compared to serum containing medium. Recombinant baculovirus may be used as an expression vector, and the construct used to transfect a host cell line, which may be any of a number of lepidopteran cell lines, in particular *Spodoptera frugiperda Sf9*, as known in the art. Reviews of expression of recombinant proteins in insect host cells are provided by Altmann et al. (1999), *Glycoconj J* 1999, 16, 109-23 and Kost and Condeary (1999), *Curr Opin Biotechnol*, 10, 428-33.

In vitro production provides relatively pure antibody preparations and allows scale-up to give large amounts of the desired antibodies. Techniques for bacterial cell, yeast, insect and mammalian cell cultivation are known in the art and include homogeneous suspension culture, e.g. in an airlift reactor or in a continuous stirrer reactor, or immobilised or entrapped cell culture, e.g. in hollow fibres, microcapsules, on agarose microbeads or ceramic cartridges.

Large quantities of the desired antibodies can also be obtained by multiplying mammalian cells *in vivo*. For this purpose, hybridoma cells producing the desired antibodies are injected into histocompatible mammals to cause growth of antibody-producing tumours. Optionally, the animals are primed with a hydrocarbon, especially mineral oils such as pristane (tetramethyl-pentadecane), prior to the injection. After one to three weeks, the antibodies are isolated from the body fluids of those mammals. For example, hybridoma cells obtained by fusion of suitable myeloma cells with antibody-producing spleen cells from Balb/c mice, or transfected cells derived from hybridoma cell line Sp2/0 that produce the desired antibodies are injected intraperitoneally into Balb/c mice optionally pre-treated with pristane, and, after one to two weeks, ascitic fluid is taken from the animals.

The foregoing, and other, techniques are discussed in, for example, Kohler and Milstein, (1975) *Nature* 256:495-497; US 4,376,110; Harlow and Lane, *Antibodies: a*

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

28

Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor, incorporated herein by reference. Techniques for the preparation of recombinant antibody molecules is described in the above references and also in, for example, EP 0623679; EP 0368684 and EP 0436597, which are incorporated herein by reference.

5 The cell culture supernatants are screened for the desired antibodies, preferentially by immunofluorescent staining of cells expressing the desired target by immunoblotting, by an enzyme immunoassay, e.g. a sandwich assay or a dot-assay, or a radioimmunoassay.

10 For isolation of the antibodies, the immunoglobulins in the culture supernatants or in the ascitic fluid may be concentrated, e.g. by precipitation with ammonium sulphate, dialysis against hygroscopic material such as polyethylene glycol, filtration through selective membranes, or the like. If necessary and/or desired, the antibodies are purified by the customary chromatography methods, for example gel filtration, ion-exchange chromatography, chromatography over DEAE-cellulose and/or immunoaffinity chromatography, e.g. affinity chromatography with the a protein containing a target or
15 with Protein-A.

Antibodies generated according to the foregoing procedures may be cloned by isolation of nucleic acid from cells, according to standard procedures. Usefully, nucleic acids variable domains of the antibodies may be isolated and used to construct antibody fragments, such as scFv.

20 The invention therefore preferably employs recombinant nucleic acids comprising an insert coding for a heavy chain variable domain and/or for a light chain variable domain of antibodies. By definition such nucleic acids comprise coding single stranded nucleic acids, double stranded nucleic acids consisting of said coding nucleic acids and of complementary nucleic acids thereto, or these complementary (single stranded) nucleic
25 acids themselves.

Furthermore, nucleic acids encoding a heavy chain variable domain and/or for a light chain variable domain of antibodies can be enzymatically or chemically synthesised

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

29

nucleic acids having the authentic sequence coding for a naturally-occurring heavy chain variable domain and/or for the light chain variable domain, or a mutant thereof. A mutant of the authentic sequence is a nucleic acid encoding a heavy chain variable domain and/or a light chain variable domain of the above-mentioned antibodies in which one or more amino acids are deleted or exchanged with one or more other amino acids. Preferably said modification(s) are outside the CDRs of the heavy chain variable domain and/or of the light chain variable domain of the antibody. Such a mutant nucleic acid is also intended to be a silent mutant wherein one or more nucleotides are replaced by other nucleotides with the new codons-coding for the same amino acid(s). Such a mutant sequence is also a degenerated sequence. Degenerated sequences are degenerated within the meaning of the genetic code in that an unlimited number of nucleotides are replaced by other nucleotides without resulting in a change of the amino acid sequence originally encoded. Such degenerated sequences may be useful due to their different restriction sites and/or frequency of particular codons which are preferred by the specific host, particularly yeast, bacterial or mammalian cells, to obtain an optimal expression of the heavy chain variable domain and/or a light chain variable domain.

The term mutant is intended to include a DNA mutant obtained by *in vitro* or *in vivo* mutagenesis of DNA according to methods known in the art.

Recombinant DNA technology may be used to improve the antibodies of the invention. Thus, chimeric antibodies may be constructed in order to decrease the immunogenicity thereof in diagnostic or therapeutic applications. Moreover, immunogenicity may be minimised by humanising the antibodies by CDR grafting [European Patent 0 239 400 (Winter)] and, optionally, framework modification [European Patent 0239400; Riechmann *et al.*, (1988) Nature 322:323-327; and as reviewed in international patent application WO 90/07861 (Protein Design Labs)].

The invention therefore also employs recombinant nucleic acids comprising an insert coding for a heavy chain variable domain of an antibody fused to a human constant domain γ , for example $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ or $\gamma 4$, preferably $\gamma 1$ or $\gamma 4$. Likewise the invention

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

30

concerns recombinant DNAs comprising an insert coding for a light chain variable domain of an antibody fused to a human constant domain κ or λ , preferably κ .

More preferably, the invention employs CDR-grafted antibodies, which are preferably CDR-grafted light chain and heavy chain variable domains only.

5 Advantageously, the heavy chain variable domain and the light chain variable domain are linked by way of a spacer group, optionally comprising a signal sequence facilitating the processing of the antibody in the host cell and/or a DNA coding for a peptide facilitating the purification of the antibody and/or a cleavage site and/or a peptide spacer and/or an effector molecule. Such antibodies are known as scFvs.

10 Antibodies may moreover be generated by mutagenesis of antibody genes to produce artificial repertoires of antibodies. This technique allows the preparation of antibody libraries, as discussed further below; antibody libraries are also available commercially. Hence, the present invention advantageously employs artificial repertoires of immunoglobulins, preferably artificial ScFv repertoires, as an immunoglobulin source.

15 Isolated or cloned antibodies may be linked to other molecules, for example nucleic acid or protein association means by chemical coupling, using protocols known in the art (for example, Harlow and Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor, and Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1991), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

LIBRARIES AND SELECTION SYSTEMS

Immunoglobulins for use in the invention may be isolated from libraries comprising artificial repertoires of immunoglobulin polypeptides. Advantageously, the immunoglobulins may be pre-selected by screening against the desired target, such that the
25 methods of the invention are performed with immunoglobulins which substantially all are specific for the intended target.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

31

Any library selection system may be used in conjunction with the invention. Selection protocols for isolating desired members of large libraries are known in the art, as typified by phage display techniques. Such systems, in which diverse peptide sequences are displayed on the surface of filamentous bacteriophage (Scott and Smith (1990 *supra*),
5 have proven useful for creating libraries of antibody fragments (and the nucleotide sequences that encoding them) for the *in vitro* selection and amplification of specific antibody fragments that bind a target antigen. The nucleotide sequences encoding the V_H and V_L regions are linked to gene fragments which encode leader signals that direct them to the periplasmic space of *E. coli* and as a result the resultant antibody fragments are
10 displayed on the surface of the bacteriophage, typically as fusions to bacteriophage coat proteins (e.g., pIII or pVIII). Alternatively, antibody fragments are displayed externally on lambda phage capsids (phagebodies). An advantage of phage-based display systems is that, because they are biological systems, selected library members can be amplified simply by growing the phage containing the selected library member in bacterial cells.
15 Furthermore, since the nucleotide sequence that encodes the polypeptide library member is contained on a phage or phagemid vector, sequencing, expression and subsequent genetic manipulation is relatively straightforward.

Methods for the construction of bacteriophage antibody display libraries and lambda phage expression libraries are well known in the art (McCafferty *et al.* (1990)
20 *supra*; Kang *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4363; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Lowman *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Burton *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10134; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133; Chang *et al.* (1991) *J. Immunol.*, 147: 3610; Breitling *et al.* (1991) *Gene*, 104: 147; Marks *et al.* (1991) *supra*; Barbas *et al.* (1992) *supra*; Hawkins and Winter (1992) *J.*
25 *Immunol.*, 22: 867; Marks *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 16007; Lerner *et al.* (1992) *Science*, 258: 1313, incorporated herein by reference).

One particularly advantageous approach has been the use of scFv phage-libraries (Bird, R.E., *et al.* (1988) *Science* 242: 423-6, Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883; Chaudhary *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-
30 1070; McCafferty *et al.* (1990) *supra*; Clackson *et al.* (1991) *supra*; Marks *et al.* (1991)

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

32

supra; Chiswell *et al.* (1992) *Trends Biotech.*, 10: 80; Marks *et al.* (1992) supra). Various embodiments of scFv libraries displayed on bacteriophage coat proteins have been described. Refinements of phage display approaches are also known, for example as described in WO96/06213 and WO92/01047 (Medical Research Council *et al.*) and 5 WO97/08320 (Morphosys, supra), which are incorporated herein by reference.

Alternative library selection technologies include bacteriophage lambda expression systems, which may be screened directly as bacteriophage plaques or as colonies of lysogens, both as previously described (Huse *et al.* (1989) *Science*, 246: 1275; Caton and Koprowski (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87; Mullinax *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 8095; Persson *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 2432) 10 and are of use in the invention. These expression systems may be used to screen a large number of different members of a library, in the order of about 10^6 or even more. Other screening systems rely, for example, on direct chemical synthesis of library members. One early method involves the synthesis of peptides on a set of pins or rods, such as described 15 in WO84/03564. A similar method involving peptide synthesis on beads, which forms a peptide library in which each bead is an individual library member, is described in U.S. Patent No. 4,631,211 and a related method is described in WO92/00091. A significant improvement of the bead-based methods involves tagging each bead with a unique identifier tag, such as an oligonucleotide, so as to facilitate identification of the amino acid 20 sequence of each library member. These improved bead-based methods are described in WO93/06121.

Another chemical synthesis method involves the synthesis of arrays of peptides (or peptidomimetics) on a surface in a manner that places each distinct library member (e.g., 25 unique peptide sequence) at a discrete, predefined location in the array. The identity of each library member is determined by its spatial location in the array. The locations in the array where binding interactions between a predetermined molecule (e.g., a receptor) and reactive library members occur is determined, thereby identifying the sequences of the reactive library members on the basis of spatial location. These methods are described in U.S. Patent No. 5,143,854; WO90/15070 and WO92/10092; Fodor *et al.* (1991) *Science*, 30 251: 767; Dower and Fodor (1991) *Ann. Rep. Med. Chem.*, 26: 271.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

33

Other systems for generating libraries of polypeptides or nucleotides involve the use of cell-free enzymatic machinery for the *in vitro* synthesis of the library members. In one method, RNA molecules are selected by alternate rounds of selection against a target ligand and PCR amplification (Tuerk and Gold (1990) *Science*, 249: 505; Ellington and Szostak (1990) *Nature*, 346: 818). A similar technique may be used to identify DNA sequences which bind a predetermined human transcription factor (Thiesen and Bach (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 3203; Beaudry and Joyce (1992) *Science*, 257: 635; WO92/05258 and WO92/14843). In a similar way, *in vitro* translation can be used to synthesise polypeptides as a method for generating large libraries. These methods which generally comprise stabilised polysome complexes, are described further in WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058, and WO92/02536. Alternative display systems which are not phage-based, such as those disclosed in WO95/22625 and WO95/11922 (Affymax) use the polysomes to display polypeptides for selection. These and all the foregoing documents also are incorporated herein by reference.

15 An alternative to the use of phage or other cloned libraries is to use nucleic acid, preferably RNA, derived from the spleen of an animal which has been immunised with the selected target. RNA thus obtained represents a natural library of immunoglobulins. Isolation of V-region and C-region mRNA permits antibody fragments, such as Fab or Fv, to be expressed intracellularly in accordance with the invention.

20 Briefly, RNA is isolated from the spleen of an immunised animal and PCR primers used to amplify V_H and V_L cDNA selectively from the RNA pool. The V_H and V_L sequences thus obtained are joined to make scFv antibodies. PCR primer sequences are based on published V_H and V_L sequences and are available commercially in kit form.

25 A preferred aspect of the present invention is the use of intracellular immunoglobulins, for example intracellular antibodies. Intracellular antibodies or intrabodies have been demonstrated to function in antigen recognition in the cells of higher organisms (reviewed in Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997) *Intracellular Antibodies: Development and Applications*. Landes and Springer-Verlag). This interaction can influence the function of cellular proteins which have been successfully inhibited in the

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

34

- cytoplasm, the nucleus or in the secretory pathway. This efficacy has been demonstrated for viral resistance in plant biotechnology (Tavladoraki, P., *et al.* (1993) *Nature* **366**: 469-472) and several applications have been reported of intracellular antibodies binding to HIV viral proteins (Mhashilkar, A.M., *et al.* (1995) *EMBO J* **14**: 1542-51; Duan, L. & Pomerantz, R.J. (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 5433-8; Maciejewski, J.P., *et al.* (1995) *Nat Med* **1**: 667-73; Levy-Mintz, P., *et al.* (1996) *J. Virol.* **70**: 8821-8832) and to oncogene products (Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P. & Cattaneo, A. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 422-7; Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N. & Cattaneo, A. (1994) *Biotechnology (NY)* **12**: 396-9; Cochet, O., *et al.* (1998) *Cancer Res* **58**: 1170-6).
- 10 A method for the selection of intracellular immunoglobulins from scFv libraries has been described (see International patent application WO 0054057). This selection method (see also Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T.H. and Cattaneo, A. (1999). Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid *in vivo* system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11723-11728) takes advantage of the ability of
15 protein interactions to be detected in cellular environments, such as shown for the yeast two-hybrid system. It is based on the fact that some antibody scFv fragments can fold adequately *in vivo* to bind antigen in a VH-VL dependent way (i.e. via the antibody combining site) and thus using a library of diverse antibody specificities facilitates their identification, if sufficient scFv are screened. The screening system comprises the yeast
20 cell expression of a "bait" antigen fused to the LexA DNA binding domain and a library of "prey" scFv fused to the VP16 transcription activation domain. Interaction between the antigen bait and any specific antibody scFv fragment in the yeast intracellular environment results in the formation of a protein complex in which the DNA binding domain and the activation domain are in close proximity. This results in the activation of yeast
25 chromosomal reporter genes such as *HIS3* and *LacZ*, facilitating the identification and thus isolation of the yeast carrying the DNA vectors encoding the scFv, which in turn can be isolated to yield the DNA sequence of the antigen-specific scFv. The main limitation of this approach is the number of scFv-VP16 fusion preys that can be screened in yeast antibody-antigen interaction system (conveniently up to 2.5×10^6). The effective library
30 size may be increased, however, for example via the use of one or more round of *in vitro* phage scFv library screening (panning). For instance, using bacterially produced antigen

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

35

which is coated on a surface, prior to the *in vivo* yeast antibody-antigen interaction screening.

DELIVERY OF REPORTERS TO CELLS

In order for the first reporter and second reporter to bind to the entity within the cell, it is necessary to provide the reporters within the intracellular environment of the cell. 5 Where the first and/or second reporter is a polypeptide (a "polypeptide reporter"), for example an antibody caspase 3 fusion protein, this is preferably achieved by transfecting the cell with appropriate nucleic acids which encode the first and/or second reporters. If either or both of the reporters consists of a nucleic acid (a "nucleic acid reporter"), then the 10 nucleic acid itself may be transfected into the cell.

Nucleic acids encoding a polypeptide reporter can be incorporated into vectors for expression. As used herein, vector (or plasmid) refers to discrete elements that are used to introduce heterologous DNA into cells for expression thereof. Selection and use of such vehicles are well within the skill of the artisan. Many vectors are available, and selection 15 of appropriate vector will depend on the intended use of the vector, the size of the nucleic acid to be inserted into the vector, and the host cell to be transformed with the vector. Each vector contains various components depending on its function and the host cell for which it is compatible. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer 20 element, a promoter, a transcription termination sequence and a signal sequence.

The vector may also include one or more Internal Ribosome Entry Sites (IRES), and these site(s) are preferably arranged in the vector adjacent to one or more multiple cloning sequences (MCS) into each of which a gene may be inserted. Use of such a vector therefore allows more than one insert to be cloned into the expression construct, with 25 transcription of the construct resulting in a bi- or poly-cistronic messenger RNA. Translation occurs from each of the ribosome binding sites, including the Internal Ribosome Entry Sites. This allows for more than one polypeptide to be expressed from a single expression construct.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

36

Moreover, nucleic acids encoding a polypeptide reporter or a nucleic acid reporter, or any components of these, may be incorporated into cloning vectors, for general manipulation and nucleic acid amplification purposes.

Both expression and cloning vectors generally contain nucleic acid sequence that enable the vector to replicate in one or more selected host cells. Typically in cloning vectors, this sequence is one that enables the vector to replicate independently of the host chromosomal DNA, and includes origins of replication or autonomously replicating sequences. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 micron plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (e.g. SV 40, polyoma, adenovirus) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors unless these are used in mammalian cells competent for high level DNA replication, such as COS cells.

Most expression vectors are shuttle vectors, i.e. they are capable of replication in at least one class of organisms but can be transfected into another class of organisms for expression. For example, a vector is cloned in *E. coli* and then the same vector is transfected into yeast or mammalian cells even though it is not capable of replicating independently of the host cell chromosome. DNA may also be replicated by insertion into the host genome. However, the recovery of genomic DNA is more complex than that of exogenously replicated vector because restriction enzyme digestion is required to excise the nucleic acid. DNA can be amplified by PCR and be directly transfected into the host cells without any replication component.

Advantageously, an expression and cloning vector may contain a selection gene also referred to as selectable marker. This gene encodes a protein necessary for the survival or growth of transformed host cells grown in a selective culture medium. Host cells not transformed with the vector containing the selection gene will not survive in the culture medium. Typical selection genes encode proteins that confer resistance to antibiotics and other toxins, e.g. ampicillin, neomycin, methotrexate or tetracycline.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

37

complement auxotrophic deficiencies, or supply critical nutrients not available from complex media.

As to a selective gene marker appropriate for yeast, any marker gene can be used which facilitates the selection for transformants due to the phenotypic expression of the marker gene. Suitable markers for yeast are, for example, those conferring resistance to antibiotics G418, hygromycin or bleomycin, or provide for prototrophy in an auxotrophic yeast mutant, for example the URA3, LEU2, LYS2, TRP1, or HIS3 gene.

Since the replication of vectors is conveniently done in *E. coli*, an *E. coli* genetic marker and an *E. coli* origin of replication are advantageously included. These can be obtained from *E. coli* plasmids, such as pBR322, Bluescript® vector or a pUC plasmid, e.g. pUC18 or pUC19, which contain both an *E. coli* replication origin and an *E. coli* genetic marker conferring resistance to antibiotics, such as ampicillin.

Suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells expressing the desired nucleic acid, such as dihydrofolate reductase (DHFR, methotrexate resistance), thymidine kinase, or genes conferring resistance to G418 or hygromycin. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure which only those transformants which have taken up and are expressing the marker are uniquely adapted to survive. In the case of a DHFR or glutamine synthase (GS) marker, selection pressure can be imposed by culturing the transformants under conditions in which the pressure is progressively increased, thereby leading to amplification (at its chromosomal integration site) of both the selection gene and the linked nucleic acid. Amplification is the process by which genes in greater demand for the production of a protein critical for growth, together with closely associated genes which may encode a desired protein, are reiterated in tandem within the chromosomes of recombinant cells. Increased quantities of desired protein are usually synthesised from thus amplified DNA.

Expression and cloning vectors usually contain a promoter that is recognised by the host organism and is operably linked to the desired nucleic acid. Such a promoter may be inducible or constitutive. The promoters are operably linked to the nucleic acid by

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

38

removing the promoter from the source DNA and inserting the isolated promoter sequence into the vector. Both the native promoter sequence and many heterologous promoters may be used to direct amplification and/or expression of nucleic acid encoding the immunoglobulin, optionally together with an appropriate association means. The term "operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include, for example, the β -lactamase and lactose promoter systems, alkaline phosphatase, the tryptophan (*trp*) promoter system and hybrid promoters such as the *tac* promoter. Their nucleotide sequences have been published, thereby enabling the skilled worker operably to ligate them a desired nucleic acid, using linkers or adaptors to supply any required restriction sites. Promoters for use in bacterial systems will also generally contain a Shine-DeGarnon sequence operably linked to the nucleic acid.

Preferred expression vectors are bacterial expression vectors which comprise a promoter of a bacteriophage such as phage λ or T7 which is capable of functioning in the bacteria. In one of the most widely used expression systems, the nucleic acid encoding the fusion protein may be transcribed from the vector by T7 RNA polymerase (Studier et al, *Methods in Enzymol.* 185; 60-89, 1990). In the *E. coli* BL21(DE3) host strain, used in conjunction with pET vectors, the T7 RNA polymerase is produced from the λ -lysogen DE3 in the host bacterium, and its expression is under the control of the IPTG inducible *lac UV5* promoter. This system has been employed successfully for over-production of many proteins. Alternatively the polymerase gene may be introduced on a lambda phage by infection with an int- phage such as the CE6 phage which is commercially available (Novagen, Madison, USA). other vectors include vectors containing the lambda PL promoter such as PLEX (Invitrogen, NL), vectors containing the *trc* promoters such as pTrcHisXpressTm (Invitrogen) or pTrc99 (Pharmacia Biotech, SE), or vectors containing the *tac* promoter such as pKK223-3 (Pharmacia Biotech) or PMAL (New England Biolabs, MA, USA).

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

39

Suitable promoter sequences for use with yeast hosts may be regulated or constitutive and are preferably derived from a highly expressed yeast gene, especially a *Saccharomyces cerevisiae* gene. Thus, the promoter of the TRP1 gene, the ADHI or ADHII gene, the acid phosphatase (PH05) gene, a promoter of the yeast mating pheromone genes coding for the α - or α -factor or a promoter derived from a gene encoding a glycolytic enzyme such as the promoter of the enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP), 3-phospho glycerate kinase (PGK), hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triose phosphate isomerase, phosphoglucose isomerase or glucokinase genes, the *S. cerevisiae* GAL 4 gene, the *S. pombe* nmt 1 gene or a promoter from the TATA binding protein (TBP) gene can be used. Furthermore, it is possible to use hybrid promoters comprising upstream activation sequences (UAS) of one yeast gene and downstream promoter elements including a functional TATA box of another yeast gene, for example a hybrid promoter including the UAS(s) of the yeast PH05 gene and downstream promoter elements including a functional TATA box of the yeast GAP gene (PH05-GAP hybrid promoter). A suitable constitutive PH05 promoter is e.g. a shortened acid phosphatase PH05 promoter devoid of the upstream regulatory elements (UAS) such as the PH05 (-173) promoter element starting at nucleotide -173 and ending at nucleotide -9 of the PH05 gene.

Gene transcription from vectors in mammalian hosts may be controlled by promoters derived from the genomes of viruses such as polyoma virus, adenovirus, fowlpox virus, bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus (CMV), a retrovirus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters such as the actin promoter or a very strong promoter, e.g. a ribosomal protein promoter, and from promoters normally associated with immunoglobulin sequences.

Transcription of a nucleic acid by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. For example, the pEF-BOS vector (Mizushima, et al, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18, 5322) contains the elongation factor 1 α (EF-1 α) promoter and enhancer which allows for elevated levels of expression of a cloned gene. Enhancers are relatively orientation and position independent. Many enhancer sequences are known

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

40

from mammalian genes (e.g. elastase and globin). However, typically one will employ an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270) and the CMV early promoter enhancer. The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the desired nucleic acid, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Advantageously, a eukaryotic expression vector may comprise a locus control region (LCR). LCRs are capable of directing high-level integration site independent expression of transgenes integrated into host cell chromatin, which is of importance especially where the gene is to be expressed in the context of a permanently-transfected eukaryotic cell line in which chromosomal integration of the vector has occurred.

Eukaryotic expression vectors will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilising the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding the immunoglobulin.

Particularly useful for practising the present invention are expression vectors that provide for the transient expression of nucleic acids in mammalian cells. Transient expression usually involves the use of an expression vector that is able to replicate efficiently in a host cell, such that the host cell accumulates many copies of the expression vector, and, in turn, synthesises high levels of the desired gene product.

Construction of vectors according to the invention may employ conventional ligation techniques. Isolated plasmids or DNA fragments are cleaved, tailored, and religated in the form desired to generate the plasmids required. If desired, analysis to confirm correct sequences in the constructed plasmids is performed in a known fashion. Suitable methods for constructing expression vectors, preparing in vitro transcripts, introducing DNA into host cells, and performing analyses for assessing gene product expression and function are known to those skilled in the art. Gene presence, amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

41

Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA, dot blotting (DNA or RNA analysis), or in situ hybridisation, using an appropriately labelled probe which may be based on a sequence provided herein. Those skilled in the art will readily envisage how these methods may be modified, if desired.

- 5 The first and/or second reporters, immunoglobulins, peptide fragments etc may be directly introduced to the cell by microinjection, or delivery using vesicles such as liposomes which are capable of fusing with the cell membrane. Viral and other fusogenic peptides may also be used to promote membrane fusion and delivery to the cytoplasm of the cell.
- 10 Alternatively and preferably, the reporter(s) etc may be delivered into cells as protein fusions or conjugates with a protein capable of crossing the plasma membrane and/or the nuclear membrane. Preferably, the reporter(s) is fused or conjugated to a domain or sequence from such a protein responsible for the translocational activity. Preferred translocation domains and sequences include domains and sequences from the
- 15 HIV-1-trans-activating protein (Tat), *Drosophila* Antennapedia homeodomain protein and the herpes simplex-1 virus VP22 protein.

- Exogenously added HIV-1-trans-activating protein (Tat) can translocate through the plasma membrane and reach the nucleus to transactivate the viral genome. Translocational activity has been identified in amino acids 37-72 (Fawell et al., 1994,
- 20 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 664-668), 37-62 (Anderson et al., 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 876-884) and 49-58 (having the basic sequence RKKRRQRRR) of HIV-Tat. Vives et al. (1997), *J Biol Chem* 272, 16010-7 identified a sequence consisting of amino acids 48-60 (CGRKKRRQRRPPQC), which appears to be important for translocation, nuclear localisation and trans-activation of cellular genes.
- 25 Intraperitoneal injection of a fusion protein consisting of β -galactosidase and a HIV-TAT protein transduction domain results in delivery of the biologically active fusion protein to all tissues in mice (Schwarze et al., 1999, *Science* 285, 1569-72)

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

42

The third helix of the *Drosophila* Antennapedia homeodomain protein has also been shown to possess similar properties (reviewed in Prochiantz, A., 1999, *Ann N Y Acad Sci*, 886, 172-9). The domain responsible for translocation in Antennapedia has been localised to a 16 amino acid long peptide rich in basic amino acids having the sequence

5 RQIKIWFQNRRMKWKK (Derossi, et al., 1994, *J Biol Chem*, 269, 10444-50). This peptide has been used to direct biologically active substances to the cytoplasm and nucleus of cells in culture (Theodore, et al., 1995, *J. Neurosci* 15, 7158-7167). Cell internalisation of the third helix of the Antennapedia homeodomain appears to be receptor-independent, and it has been suggested that the translocation process involves direct interactions with

10 membrane phospholipids (Derossi et al., 1996, *J Biol Chem*, 271, 18188-93). The VP22 tegument protein of herpes simplex virus is capable of intercellular transport, in which VP22 protein expressed in a subpopulation of cells spreads to other cells in the population (Elliott and O'Hare, 1997, *Cell* 88, 223-33). Fusion proteins consisting of GFP (Elliott and O'Hare, 1999, *Gene Ther* 6, 149-51), thymidine kinase protein (Dilber et al., 1999, *Gene Ther* 6, 12-21) or p53 (Phelan et al., 1998, *Nat Biotechnol* 16, 440-3) with VP22 have been targeted to cells in this manner.

Particular domains or sequences from proteins capable of translocation through the nuclear and/or plasma membranes may be identified by mutagenesis or deletion studies. Alternatively, synthetic or expressed peptides having candidate sequences may be linked

20 to reporters and translocation assayed. For example, synthetic peptides may be conjugated to fluorescein and translocation monitored by fluorescence microscopy by methods described in Vives et al. (1997), *J Biol Chem* 272, 16010-7. Alternatively, green fluorescent protein may be used as a reporter (Phelan et al., 1998, *Nat Biotechnol* 16, 440-3).

25 Any of the domains or sequences or as set out above or identified as having translocational activity may be used to direct the first and/or second reporter(s) into the cytoplasm or nucleus of a cell.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

43

GENERATION OF A SIGNAL

In the methods of the present invention, a signal is advantageously generated by the interaction of two reporters, brought together by the binding of the reporters to the entity. The signal generated will thus be dependent on the nature of the molecules used in
5 the methods of the invention.

In a first embodiment, the signal is the activation of apoptosis or programmed cell death in the cell. Stable interaction of two caspase 3 moieties disposed on each of the first and second reporters auto-activates caspase activity, which leads to the initiation of apoptosis in the cell. Apoptotic cell death is characterised by cellular shrinkage, chromatin
10 condensation, cytoplasmic blebbing, increased membrane permeability and interchromosomal DNA cleavage (Kerr et al. (1992) FASEB J. 6:2450; and Cohen and Duke (1992) Ann. Rev. Immunol. 10:267), and any of these features may be used if necessary to detect the signal.

It will be appreciated that in the above embodiment, the signal may also be
15 detected by assaying caspase activity in the cell.

In a separate embodiment, the signal may be generation of protease activity within the cell. Caspase activity may be detected this way, as described above. Furthermore, the protease activity may be an activity associated with ubiquitin-mediated proteolysis, preferably proteasome activity, most preferably 26S proteasome activity.

20 Ubiquitin-mediated proteolysis is reviewed in *Ubiquitination and the Biology of the Cell* (Edited by Jan-Michael Peters, J. Robin Harris and Dan Finley, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands). In ubiquitin-mediated proteolysis, proteins are targeted for degradation by covalent modification with ubiquitin. Three types of enzyme are involved in this task including ubiquitin-activating (E1), ubiquitin-conjugating (E2)
25 and ubiquitin-ligating (E3) enzymes. Ubiquitin is a small and highly conserved protein that is covalently attached to a lysine residue on a target protein (to label it). The ubiquitin-associated enzymes are able to recognise damaged or misfolded proteins by changes in

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

44

protein structure and amino acid sequences. A chain of ubiquitin molecules then forms at the attachment site of the target protein as the ubiquitin-conjugating enzyme adds additional ubiquitin molecules to the original one. The resulting polyubiquitin chain is recognised by proteasomes (the protein complexes at either end of the proteasome are
5 involved in the recognition process) and the labelled protein is then degraded.

This embodiment may therefore be realised by the first reporter and the second reporter comprising domains of a component of the ubiquitin mediated proteolysis pathway, which, on stable interaction, generates an activity associated with that component and which leads to proteolysis. The component may comprise an ubiquitin-
10 activating enzyme, a ubiquitin-conjugating enzyme or a ubiquitin-ligase (such as SCF). In a highly preferred embodiment of the invention, the first and second reporters comprise domains of a F-box protein or motif.

The F-box motif functions to mediate protein-protein interaction. F-box proteins were first described as components of SCF ubiquitin-ligase (E3) complexes (Skowyra et al., *Cell* 1997, 91:209-219; Feldman et al., *Cell* 1997, 91:221-230). SCF complexes
15 contain four components: Skp1, a cullin, Rbx1/Roc1/Hrt1, and an F-box protein (Tyers and Jorgensen, *Curr Opin Genet Dev* 2000, 10:54-64; Deshaies, *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, 15:435-467; Craig and Tyers, *Prog Biophys Mol Biol* 1999, 72:299-328). SCF complexes facilitate interaction between substrates and ubiquitin-conjugating enzymes,
20 which then covalently transfer ubiquitin onto substrates. Poly-ubiquitinated substrates are subsequently degraded by the 26S proteasome (Hershko and Ciechanover, *Annu Rev Biochem* 1998, 67:425-479). The F-box protein is the subunit of the SCF complex that binds specific substrates, and it links to the complex by binding Skp1 through the F-box
25 itself. A detailed review of the F-box and its role in ubiquitin mediated proteolysis is provided by Kipreos and Pagano, 2000), *Genome Biology*, 1(5), reviews 3002, 1-3002.7). the F-box therefore has a crucial role in recruiting the proteasome for protein destruction.

The first and/or the second reporter may comprise an F-box motif. However, as the F-box motif comprises three helices preferably the first reporter comprises one or more of the helices, and the second reporter comprises the remaining helix or helices. Preferably,

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

45

the first reporter comprises the first helix and the second reporter comprises the second and third helices; alternatively, the first reporter comprises the first and second helices while the second reporter comprises the third helices. Moreover, other portions of the F-box may be split, not necessarily to produce complete helices. Standard techniques known
5 in the art may be used for construction of such reporters comprising helix domains or F-box portions.

Stable interaction between the first reporter and second reporter via binding to the entity enables association between the various helix domains and reconstitution of the F-box motif activity. This leads to ubiquitin labelling of the entity, or the polypeptide
10 comprising the entity, and the destruction via proteolysis of the entity/polypeptide. As noted above, such proteolysis may be readily detected by means known in the art.

For example, F-box proteins such as TRCP may be cloned from mammalian and/or other cells or tissues and fused to scFv either directly, or via linkers such as Pro linkers (Pro₁₀) or Gly-Ser linkers((Gly₄-Ser)₃). The scFv is advantageously located N-terminal in
15 the construct. Constructs comprising both the F-box and the WD domain may also be employed. Where individual helices of the F-box are used, a first reporter advantageously comprises H1 or H1 & H2, and a second reported advantageously comprises H2 & H3 or H3, respectively. Details on the structure of the F-box are set forth in Schulman *et al.*, (2000) Nature 408:381.

20 Any of the known F-box motifs may be used as a basis for this aspect of the invention. Furthermore, the F-box consensus sequence:

KPFLLRLPEILRKILEKLDPIDLLRLRKVSKKWRSLVDSLNIWFKFIE

may also be used. A list of F-box proteins, together with their sequence accessions, is provided in the table below.

Proposed Gene Symbol	Literature Symbol	Other Aliases	Organism	Sequence Accessions
SKP2	FBL1	FBXL1	human	U33761

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

46

<i>FBXL2</i>	FBL2	FBL3	human	AF176518, AF174589, AF186273
<i>FBXL3A</i>	FBL3A		human	AF129532
<i>Fbxl3a</i>	Fbl3a		mouse	AF176521
<i>FBXL3B</i>	FBL3B		human	AF129533
<i>FBXL4</i>	FBL4	FBL5	human	AF174590, AF176699, AF199355
<i>FBXL5</i>	FBL5	FBL4, FLR1	human	AF174591, AF176700, AF199420, AF142481
<i>FBXL6</i>	FBL6		human	AF174592
<i>Fbxl6</i>	Fbl6		mouse	AF176522
<i>FBXL7</i>	FBL7	FBL6, KIAA0840	human	AF174593, AF199356
<i>Fbxl8</i>	Fbl8		mouse	AF176523
<i>FBXL9</i>	FBL9		human	AF176701
<i>Fbxl10</i>	Fbl10		mouse	AF176524
<i>FBXL11</i>	FBL11	KIAA1004 LILINA	human	AB023221:G4589652 AF179221 AL117517
<i>Fbxl11</i>	Fbl11		mouse	AF154332
<i>Fbxl12</i>	Fbl12		mouse	AF176525
BTRC	FBW1A	betaTRCP1, FWD1	human	AF129530, Y14153
<i>FBXW1B</i>	FBW1B	betaTRCP2, KIAA0696	human	AF176022
<i>FBXW2</i>	FBW2		human	AF176698, AF129531
<i>Fbxw2</i>	Fbw2	Fwd2, MD6	mouse	AA145853, AF140683, X54352
<i>FBXW3</i>	FBW3		human	AF174606
<i>Fbxw4</i>	Fbw4		mouse	AF176519
<i>Fbxw5</i>	Fbw5		mouse	AF176520
CCNF	FBX1	FBXO1	human	Z36714
<i>FBXO2</i>	FBX2		human	AF174594, AF187318
<i>FBXO3</i>	FBX3		human	AF174595, AF176702
<i>FBXO4</i>	FBX4		human	AF129534, AF176703
<i>FBXO5</i>	FBX5		human	AF129535
<i>FBXO6</i>	FBX6	FBG2	human	AF129536
<i>Fbxo6a</i>	Fbx6a		mouse	AU067142
<i>Fbxo6b</i>	Fbx6b		mouse	AF176526
<i>FBXO7</i>	FBX7		human	AF129537
<i>FBXO8</i>	FBX8		human	AF174596

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

47

<i>Fbxo8</i>	Fbx8		mouse	AF176527
<i>FBXO9</i>	FBX9	NY-REN-57	human	AF174597, AF176704
<i>FBXO10</i>	FBX10		human	AF174598, AF176705
<i>FBXO11</i>	FBX11		human	AF174599, AF176706
<i>Fbxo12</i>	Fbx12		mouse	AF176528
<i>Fbxo13</i>	Fbx13		mouse	AF176529
<i>Fbxo14</i>	Fbx14		mouse	AU066822
<i>Fbxo15</i>	Fbx15		mouse	AF176530
<i>Fbxo16</i>	Fbx16		mouse	AF176531
<i>Fbxo17</i>	Fbx17		mouse	AF176532
<i>Fbxo18</i>	Fbx18		mouse	AF184275
<i>Fbxo19</i>	Fbx19		mouse	AA501293
<i>FBXO20</i>	FBX20		human	AF174600
<i>FBXO21</i>	FBX21	KIAA0875	human	AF174601
<i>FBXO22</i>	FBX22		human	AF174602
<i>FBXO23</i>	FBX23		human	AF174603
<i>FBXO24</i>	FBX24		human	AF174604
<i>FBXO25</i>	FBX25		human	AF174605
<i>FBXO29</i>	FBX29		human	AF176707
<i>Fbxo30</i>	Fbx30		mouse	AI836688

Preferably, the F-box domain is placed at the C-terminus of a reporter; thus, in a highly preferred embodiment of the invention, a reporter comprises an scFv fused N-C to an F-box domain.

In a second embodiment, the signal is the emission or absorption of
 5 electromagnetic radiation, and the signal-generation molecules may be fluorophores. Particularly preferred are fluorescent molecules which participate in energy transfer (FRET).

FRET is detectable when two fluorescent labels which fluoresce at different
 10 frequencies are sufficiently close to each other that energy is able to be transferred from one label to the other. FRET is widely known in the art (for a review, see Matyus, 1992, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 12: 323-337, which is herein incorporated by reference). FRET is a radiationless process in which energy is transferred from an excited donor molecule to an acceptor molecule; the efficiency of this transfer is dependent upon the distance between the donor and acceptor molecules, as described below. Since the rate of

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

48

energy transfer is inversely proportional to the sixth power of the distance between the donor and acceptor, the energy transfer efficiency is extremely sensitive to distance changes. Energy transfer is said to occur with detectable efficiency in the 1-10 nm distance range, but is typically 4-6 nm for favourable pairs of donor and acceptor.

- 5 Accordingly, the invention may be practised by choosing suitable pairs of donor and acceptor molecules, so that one of the first and second reporters comprises a donor molecule and the other of the first and second reporters comprises an acceptor molecule. When the reporters bind to the entity, the donor molecule and the acceptor molecule are brought together so that energy transfer occurs.
- 10 Radiationless energy transfer is based on the biophysical properties of fluorophores. These principles are reviewed elsewhere (Lakowicz, 1983, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York; Jovin and Jovin, 1989, *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry*, eds. E. Kohen and J.G. Hirschberg, Academic Press, both of which are incorporated herein by reference). Briefly, a
- 15 fluorophore absorbs light energy at a characteristic wavelength. This wavelength is also known as the excitation wavelength. The energy absorbed by a fluorochrome is subsequently released through various pathways, one being emission of photons to produce fluorescence. The wavelength of light being emitted is known as the emission
- 20 wavelength and is an inherent characteristic of a particular fluorophore. Radiationless energy transfer is the quantum-mechanical process by which the energy of the excited state of one fluorophore is transferred without actual photon emission to a second fluorophore. That energy may then be subsequently released at the emission wavelength of the second fluorophore. The first fluorophore is generally termed the donor (D) and has an excited state of higher energy than that of the second fluorophore, termed the acceptor (A).
- 25 The essential features of the process are that the emission spectrum of the donor overlap with the excitation spectrum of the acceptor, and that the donor and acceptor be sufficiently close. The distance over which radiationless energy transfer is effective depends on many factors including the fluorescence quantum efficiency of the donor, the extinction coefficient of the acceptor, the degree of overlap of their respective spectra, the
- 30 refractive index of the medium, and the relative orientation of the transition moments of

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

49

the two fluorophores. In addition to having an optimum emission range overlapping the excitation wavelength of the other fluorophore, the distance between D and A must be sufficiently small to allow the radiationless transfer of energy between the fluorophores.

In a FRET assay, the fluorescent molecules are chosen such that the excitation spectrum of one of the molecules (the acceptor molecule) overlaps with the emission spectrum of the excited fluorescent molecule (the donor molecule). The donor molecule is excited by light of appropriate intensity within the donor's excitation spectrum. The donor then emits some of the absorbed energy as fluorescent light and dissipates some of the energy by FRET to the acceptor fluorescent molecule. The fluorescent energy it produces is quenched by the acceptor fluorescent molecule. FRET can be manifested as a reduction in the intensity of the fluorescent signal from the donor, reduction in the lifetime of its excited state, and re-emission of fluorescent light at the longer wavelengths (lower energies) characteristic of the acceptor. When the donor and acceptor molecules become spatially separated, FRET is diminished or eliminated.

Suitable fluorophores are known in the art, and include chemical fluorophores and fluorescent polypeptides, such as GFP and mutants thereof which fluoresce with different wavelengths or intensities (see WO 97/28261). Chemical fluorophores may be attached to immunoglobulin by incorporating binding sites therefor into the immunoglobulin during the synthesis thereof.

Preferably, however, the fluorophore is a fluorescent protein, which is advantageously GFP or a mutant thereof. GFP and its mutants may be synthesised together with the binding means (where this is a polypeptide such as an immunoglobulin) by expression therewith as a fusion polypeptide, according to methods well known in the art. For example, a transcription unit may be constructed as an in-frame fusion of the desired GFP and the immunoglobulin, and inserted into a vector as described above, using conventional PCR cloning and ligation techniques.

In a third embodiment, the binding domain is linked to an association domain, the association domain being capable of giving rise to a biological signal. Preferred

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

50

association domains are polypeptide molecules, which advantageously interact to form a transcription factor, or another regulatory molecule, which modulates gene expression within the cell.

Exemplary transcription factor molecules have been described in the literature, for example by Fields & Song, (1989) Nature 340:245-246, which is incorporated herein by reference. In a preferred embodiment, the immunoglobulin molecule is expressed as fusion protein with the activation domain of the HSV1 VP16 molecule. This transcription factor domain is capable of upregulating gene transcription from a promoter to which it is bound through a DNA binding activity. The latter is provided by the DNA-binding domain of the *E. coli* LexA polypeptide, which is expressed as a fusion protein with an immunoglobulin polypeptide.

The biological signal may be any detectable signal, such as the induction of the expression of a detectable gene product. Examples of detectable gene products include bioluminescent polypeptides such as luciferase, fluorescent polypeptides such as GFP, polypeptides detectable by specific assays, such as β -galactosidase and CAT, and polypeptides which modulate the growth characteristics of the host cell, such as enzymes required for metabolism such as HIS3, or antibiotic resistance genes such as G418. In a preferred aspect of the invention, the signal is detectable at the cell surface. For example, the signal may be a luminescent or fluorescent signal, which is detectable from outside the cell and allows cell sorting by FACS or other optical sorting techniques. Alternatively, the signal may comprise the expression of a cell surface marker, such as a CD molecule, for example CD4 or CD8, which may itself be labelled, for example with a fluorescent group, or may be detectable using a labelled antibody. Use of optical sorting, such as FACS, enables a collection of cells to be panned and selects for cells which contain the entity.

The invention is further described, for the purposes of illustration only, in the following examples.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

51

EXAMPLES**Example 1. Construction of Expression Plasmids**

pM- β gal, pNL-scFvR4-VP16, pNL-scFvF8-VP16 and pNL-scFv-IN33-VP16 have been described previously (Visintin et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11723-11728). pRSV-Luc (Firefly luciferase expression vector) has also been described previously (de Wet, J.R., 1987, *Mol Cell Biol* 7, 725-37) and pEGFP-N1 (enhanced green fluorescence protein, GFP expression vector) is commercially available from CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California, USA).

The pEF- β gal (β -galactosidase expression vector) is created by subcloning the coding sequence of β -galactosidase and SV40 polyA from pBSpt- β gal (Greenberg, et al, 1990, *Nature* 344, 158-160) into the pEF-BOS mammalian expression vector (Mizushima, et al, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18, 5322).

The shuttle vectors pBS-R4 and pBS-F8 are made by cloning the ClaI-EcoRI fragment of pNL-scFvR4-VP16 and pNL-scFvF8-VP16 respectively into pBSpt

The pEF-R4-DBD (scFvR4-GAL4DBD fusion expression vector) is constructed as follows. The Gal4 DNA binding domain sequence (PCR amplified from pGALO, Dang, et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.* 11, 954-962) is cloned in-frame with the scFvR4 in the EcoRI site of pBS-R4. pEF-R4-DBD is made by cloning the ClaI-SpeI fragment of R4-Gal4 DNA binding domain fusion into pEF-BOS.

The pEF-R4-CP3 and pEF-F8-CP3 (scFvR4 and scFvF8-caspase 3 fusion expression vectors): The human caspase 3 sequence has been deposited as GENBANK accession numbers U26943 and U13737. The human caspase 3 sequence is PCR amplified from a cDNA clone (a gift from Dr. Marion MacFarlane) and subcloned as an EcoRI-SpeI fragment in-frame at the 3' end of the scFv sequence in both pBS-R4 and pBS-F8. The ClaI-SpeI fragments of the scFv-caspase 3 fusion are cloned into pEF-BOS to give pEF-R4-CP3 and pEF-F8-CP3 respectively.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

52

The pEF-R4-CP3(C163S) (scFvR4-caspase3 mutant fusion expression vector) is made by mutating the cysteine (TGC) at position 163 of wild type caspase 3 into a serine (TCC) by site directed mutagenesis using the QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions.

5 The pEF-IN33-CP3 and pEF-IN33-CP3(C163S) (scFvIN33-caspase3 and mutant expression vectors): XhoI-EcoRI fragment of pNL-scFvIN33-VP16 is cloned into the vector backbones of pBS-R4-CP3 and pBS-R4-CP3(C163S) digested with XhoI and EcoRI to create pBS-IN33-CP3 and pBS-IN33-CP3(C163S) respectively. pEF-IN33-CP3 and pEF-IN33-CP3(C163S) are constructed by cloning the XhoI-SpeI fragment of pBS-IN33-CP3 and pBS-IN33-CP3(C163S) into pEFBOS.

pEF-HIVIN-βgal (HIV integrase (a.a.259-288)-βgalactosidase fusion expression vector): NcoI-SalI fragment of pBlueScript-βgal is subcloned into pEF/myc/cyto (Invitrogen) and the PCR amplified HIV-1 integrase epitope (amino acid no. 259-288) is cloned as a NcoI fragment in-frame at the 5' end of the β-gal sequence to give pEF-HIVIN-βgal.

Example 2. Mammalian Cell Culture and Transfection

Chinese hamster ovary (CHO) cells are grown in α minimal essential medium (GIBCO BRL) with 10% foetal calf serum, penicillin and streptomycin. 2×10^5 CHO cells are seeded onto a 35mm petri-dish 16-24 hours before transfection. Transfection is performed using Lipofectamine® (GIBCO BRL) according to the manufacturer's instructions with 500ng of pEF-βgal, pEF-HIVIN-βgal and pRSV-Luc, 50ng of pEGFP-N1 and 250ng of pEF-scFv-CP3/CP3(C163S) except for pEF-IN33-CP3/CP3(C163S) for which 50ng is used. Cells are harvested 60 hours after transfection or for the time-course experiment, at 12, 24, 36, 48 and 60 hours for further analyses.

25 CHO-CD4 line is a gift from Dr. C.V. Dang and has been reported previously (Fearon, et al, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7958-7962). It is maintained with α minimal essential medium, 10% foetal calf serum and 1mg/ml G418 (GIBCO BRL).

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

53

Lipofectamine® transfection of CHO/CD4 cells growing on 100mm dishes at 50-60% confluence is performed using 5µg of each plasmid unless stated otherwise.

Example 3. FACS Analyses for CD4 Expression

48 hours after transfection, transfected CHO-CD4 cells are detached with Cell
5 Dissociation Solution (Sigma) and are made into single cell suspension in PBS. CD4
expression is analysed by binding a mouse anti-human CD4 antibody (Pharmingen) at
1:50 dilution and a second antiserum goat anti-mouse polyclonal antibody labelled with a
fluorescein isothiocyanate (FITC) (Pharmingen) at 1:100 dilution. The relative
fluorescence of the cells is measured with a FACSCalibur (Becton Dickinson) and the data
10 are further analysed by the software CELLQuest (Becton Dickinson).

Example 4. Western Blotting

CHO cells are transfected with scFvR4-caspase3, scFvR4-caspase3(C163S) and
scFvF8-caspase3 expression vectors. 48 hours after transfection, cells are lysed with buffer
containing 10mM Hepes pH7.6, 250mM NaCl, 5mM EDTA and 0.5% Nonidet P40. The
15 lysates are fractionated by 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane.
The membrane is incubated with anti-human caspase3 antibody (Santa Cruz
Biotechnology) and the secondary HRP conjugated anti-goat antibody (Santa Cruz
Biotechnology). Detection is performed with ECL Western blotting detection reagents
(Amersham).

20 Example 5. β-Galactosidase and Luciferase Activities Assays

Transfected CHO cells are lysed using 300µl Reporter Lysis Buffer (Promega) per
35mm petri-dish at the specified time points after transfection. β-galactosidase activities
are measured using β-galactosidase Enzyme Assay System (Promega) according to the
manufacturer's instructions. Luciferase activity measurements are performed using
25 Luciferase Assay System (Promega) and a luminometer. Two separate independent
transfection are done and the averaged result is presented.

Example 6. Apoptosis Assay

CHO cells are co-transfected with green fluorescent protein expression vector pEGFP-N1, the various scFv fusion expression vectors, and with or without pEF- β gal. 36 hours after transfection, GFP-positive CHO cells are sorted using a flow cytometer.

- 5 Genomic DNA is extracted from approximately 5000 cells. The presence or absence of nuclear DNA products is detected using the ApoAlert LM-PCR Ladder Assay Kit (Clontech). Genomic DNA is amplified using the ApoAlert primers which amplify DNA generated from the chromatin beads resulting from apoptosis. PCR products are visualised by ethidium bromide staining after fractionation on 1.5% agarose gels. As a control for
- 10 DNA yield in each set of FACS sorted cells, primers specific for Chinese Hamster actin are used (5'GGCGTGATGGTGGGCATGGGCCAG3' and 5'CTGGTCATCTTTTCACGGTTGGC3') for PCR. The PCR reaction consisted of 35 cycles of 94°C denaturing for 1 minute, 65°C annealing for 1 minute and 72°C extension for 1 minute. The products were also visualised on 1.5% agarose gels.

15 **Example 7. Activation of Transcription By Proximity of Anti- β -Galactosidase ScFv-VP16 Bound to Antigen**

The crystal structure of β -galactosidase is known, showing that a tetramer is necessary for enzyme activity (Jacobson et al, 1994, *Nature* 369, 761-766). Therefore antibodies which bind to β -galactosidase may do so at four separate antigenic sites per

20 active enzyme. An anti- β -galactosidase scFv has been described, scFv-R4, which binds to β -galactosidase in both bacterial (Martineau, et al., 1998, *J Mol Biol* 280, 117-127) and mammalian cells (Visintin, et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11723-11728) but does not affect β -galactosidase function. This model intracellular antibody system is used to determine if proximity of scFv antibody fragments *in vivo* would cause measurable

25 biochemical effects. For this assessment, we initially determine if transcriptional transactivation could be mediated by scFv-R4 binding to antigen. Our assay consists of co-expression of β -galactosidase with scFv-R4 fused to a Gal4 DNA-binding domain (DBD) and scFv-R4 fused to the VP16 transcriptional transactivation domain, in a CHO cell line with a CD4 reporter gene controlled by the GAL4 promoter (Fearon, et al., 1992, *Proc.*

30 *Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7958-7962). The CHO-CD4 cells express CD4 on their cell surface if the reporter gene is activated. Therefore, if the intracellular antibody scFv-R4-

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

55

DBD and scFv-R4-VP16 bind to β -galactosidase in CHO-CD4 cells, a transcription complex should be created which causes activation of the CD4 gene (illustrated in Fig. 1A).

5 Various combinations of plasmids are transfected in CHO-CD4 cells and, 60 hours after transfection, cell surface CD4 is measured by FACS analyses (Fig.1B). When β -galactosidase itself is directly linked to the GAL4-DBD, expression of scFv-R4-VP16 fusions results in efficient CD4 surface expression (panel 2) whereas co-expression of scFv-R4 fused to GAL4 DBD or to VP16 in the absence of β -galactosidase antigen fails to activate CD4 (panel 3). Therefore the DBD- β -galactosidase fusion can interact with the DNA-binding sites of the CD4 reporter and a transcription complex is created. scFv-R4, 10 linked to VP16 activation domain also binds to the β -galactosidase epitopes on the DBD- β -galactosidase tetramer.

Next, β -galactosidase is co-expressed with scFv-R4 fused to the DNA-binding domain or fused to the VP16 activation domain to assess the formation of a DNA-binding 15 complex. For this to be effective, both scFv-DBD and scFv-VP16 must bind to different sites on the same β -galactosidase tetramer. We therefore titrated different amounts of expression vectors to alter the ratio of scFv-DBD and scFv-VP16 fusion proteins (Fig. 1B panels 4-9). CD4 reporter gene activation is observed in all cases but less efficiently than the DBD- β -galactosidase co-expression (the percentage of cells expressing CD4 in these 20 transient assays ranging from 0.24% to 2.8%). The relative inefficiency presumably reflects the bulkiness of the protein complex in the transcription assay and the need for multiple binding sites on each β -galactosidase. The degree of CD4 expression is dependent on the ratio between scFvR4-VP16 and scFvR4-DBD (Fig.1B panels 6, 7 and 8) as expected since the two different scFvR4 fusion proteins compete for the same 25 binding sites on the β -galactosidase tetramer. It is confirmed that no detectable dimerisation occurs between scFvR4 since CD4 activation does not occur when the scFvR4-VP16 and scFvR4-DBD are expressed in the absence of β -galactosidase (Fig.1B panel 3). We conclude that protein domains that are linked to scFvR4 can be brought into

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

56

sufficiently close proximity for biochemical interactions when the scFvR4 binds to β -galactosidase epitopes *in vivo*.

The above experiments show that it is possible to induce a cell to generate a detectable signal using the method according to the first aspect of the invention. Moreover, the method according to the second aspect of the invention may be used to detect an entity comprising an intracellular protein, by detection of a signal consisting of transcriptional activity. The transcriptional activity is generated by the stable interaction of a VP16 activation domain provided on a first reporter with a GAL4 DBD provided on a second reporter, the stable interaction arising through binding of the first and second reporters to their targets on the intracellular protein.

Example 8. ScFv-Caspase 3 Fusion Causes Apoptosis After Binding to Antigen

If the necessary components of a transcription complex can be brought close enough on the β -galactosidase tetramer to give activity, it is suggested that the molecular distance between the scFv-R4 antigenic sites might be small enough to bring the caspase 3 moieties close enough together, to cause auto-activation and triggering of apoptosis (as illustrated in Fig. 2A).

An assessment of this is made by co-transfecting CHO cells with the reporter β -galactosidase expression plasmid along with various scFv-R4 expression clones, including one encoding a fusion of scFvR4 with caspase 3. Expression of each of the scFv fusion proteins is confirmed using anti-caspase3 antibody in Westerns blots of protein extracts from CHO cells transfected with the expression vectors (Fig. 2B). 60 hours after transfection, the cells are assayed for β -galactosidase activity (Fig. 2C).

While β -galactosidase is detected in the control transfection (panel 1), when the scFv-R4 is linked to caspase 3, however, we observe very little β -galactosidase activity level (panel 3). This loss of β -galactosidase activity is dependent on the activity of caspase 3, as judged by the effect of an inactivating caspase 3 mutation (MacCorkle, et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3655-60) in which the catalytic cysteine is mutated to a serine (C163S, panel 4). In addition, no significant difference is observed when the β -

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

57

galactosidase reporter is co-expressed with scFv-R4 fused to VP16 only (panel 2). The antibody specificity causing the lack of β -galactosidase activity is shown by co-transfecting a non-specific scFv (scFv-F8, Tavladoraki, et al., 1993, *Nature* 366, 469-472) fused with caspase 3. This combination has no effect on β -galactosidase levels. These data therefore suggest that the reduction in β -galactosidase activity when scFv-R4-caspase 3 is co-transfected is not due to a neutralising effect on β -galactosidase. Rather, it is due to the proteolytic activity of the activated caspase 3 causing apoptosis of the transfected cells. It is also of note that scFv-caspase 3 fusion alone is not toxic to cells (panel 5) which is consistent with previous reports (MacCorkle, et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3655-60; Fan, et al., 1999, *Hum Gene Ther* 10, 2273-85; Yoshioka, et al., 1999, *Gene Ther* 6, 1952-9).

Example 9. Luciferase Assay for Apoptosis Induced By ScFv-Caspase 3 Fusion

Induction of cell killing by the scFvR4-caspase 3 fusion molecule, dependent on the interaction of specific scFvR4-caspase 3 and β -galactosidase antigen, is confirmed using an independent reporter to which the scFvR4 antibody does not bind.

CHO cells are transfected with the reporter pRSV-Luc, constitutively expressing Firefly luciferase, together with either scFvR4-caspase 3, scFvR4-VP16, mutant scFvR4-caspase 3(C163S) or scFvF8-caspase 3 in the presence or absence of β -galactosidase expression (i.e. scFv-R4 antigen). Luciferase activity is measured 60 hours after transfection, as a measure of cell viability in the presence of scFv fusion proteins (Fig.3A).

These data show about 80% decrease in luciferase activity when scFvR4-caspase 3 is expressed along with β -galactosidase (panel 3, front row). However, this lack of β -galactosidase activity in cells transfected with scFv-R4-caspase 3 would appear to be due to antigen-dependent cell death, rather than toxicity of the expressed scFv-R4-caspase 3 alone, as no loss of viability is observed when scFv-R4-caspase 3 is expressed with an independent reporter without β -galactosidase (panel 3, back row). Caspase-dependence is demonstrated by transfection with a construct expressing the scFvR4-caspase mutant protein fusion, with the transfected cells showing no reduction in luciferase activity, either

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

58

in the presence and absence of β -galactosidase expression. Finally, antibody-specificity is confirmed using the non-specific scFv-F8 which does not affect reporter gene activity.

A time-course of luciferase activity is performed with transfected CHO cells, assayed at various times after transfection with or without the β -galactosidase vector (respectively Figs. 3B and 3C). In cells expressing both scFvR4-caspase 3 and β -galactosidase, the luciferase level increases slowly in the first 36 hours to a peak which is lower than the corresponding level in the two controls expressing scFvR4-caspase3(C163S) or scFvF8-caspase3 and β -galactosidase (Fig.3B). Furthermore, unlike the two controls in which luciferase levels continue to rise, there is a drop in the enzyme level in cells co-transfected with scFvR4-caspase3 and β -galactosidase. On the other hand, in the absence of β -galactosidase, scFvR4-caspase 3 does not affect luciferase level and is comparable to the scFvR4-caspase 3(C163S) and scFvF8-caspase 3 (Fig.3C). These results indicate that induced apoptosis is antibody and antigen specific, and dependent on caspase 3 activity.

15 **Example 10. Apoptosis Induced By ScFv-Caspase 3 Fusion Assayed By Chromatin Degradation**

Our results previous results with the β -galactosidase and luciferase assays show that apoptosis is dependent on active caspase 3, and that scFv-caspase 3 causes apoptosis after binding to antigen. These results are confirmed by assaying transfected cells for the presence of a chromatin bead ladder. The presence of a chromatin bead ladder is a hallmark of apoptotic cell death, and is caused by nuclease digestion of chromatin (Wyllie, et al., 1980, *Nature* 284, 555-6).

CHO cells are transfected with a marker plasmid, pEGFP-N1, which expresses green fluorescent protein (GFP), together with those expressing the various scFv fusion proteins, and with or without the β -galactosidase expression vector. After 36 hours, transfected cells which express GFP (therefore also scFv and β -galactosidase) are enriched by selection using a fluorescence activated cell sorter. Genomic DNA is extracted from the sorted cells. DNA fragments emanating from the apoptosis-mediated chromatin digestion

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

59

are assessed by the ligation-mediated PCR procedure (Staley, et al., 1996 *Cell Death & Differen.* 4, 66-75) (Fig. 4).

We only find evidence of chromatin beads in the DNA prepared from cells co-transfected with scFvR4-caspase 3 and β -galactosidase (lane 2) and not in those
5 transfected with β -galactosidase and scFvR4-VP16 (lane 1), scFvR4-caspase3(C1638) (lane 3) or scFvF8-caspase 3 (lane 4). Yields of DNA in each are comparable as determined by PCR using actin gene primers (fig. 4B). Moreover, scFvR4-caspase 3 transfected in the absence of β -galactosidase did not generate the DNA ladder (lane 5), indicating that the apoptosis is dependent on the specific interaction between the
10 intracellular antibody-caspase fusion (scFv-R4-caspase 3) and antigen (β -galactosidase).

We have therefore shown that it is possible to induce apoptosis within a cell by making use of first and second reporters each comprising an antibody which binds to an intracellular target and a caspase 3 molecule. The method according to the third aspect of our invention may therefore be used to kill any cell which comprises an entity.

15 **Example 11. General Applicability of Intracellular Antibody Mediated Apoptosis**

To consolidate the general applicability of the intracellular antibody mediated apoptosis approach, a second system is developed using a different antigen and intracellular antibody pair, namely a small antigenic epitope of HIV-1 integrase and specific antibody recognising this epitope *in vivo* (scFvIN33; Levy-Mintz, et al., 1996, *J.*
20 *Viro.* 70, 8821-8832).

The structure of β -galactosidase is known (Jacobson, et al., 1994, *Nature* 369, 761-766). A prediction from this structure is that any protein linked to the N-terminus of β -galactosidase monomer will be positioned at the interface of the tetrameric β -galactosidase molecule. As a result, the physical distance between the linked moieties is expected to be
25 short, as will the distance between the specific antibodies that bind to them. Therefore, an expression construct, pEF-HIVIN- β -gal, is made in which the HIV-1 integrase amino acids 259-288 (i.e., those recognised by scFvIN33; Bizub-Bender, et al., 1994, *AIDS Res Hum Retroviruses* 10, 1105-15) are fused at the N-terminus of β -galactosidase. This

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

60

construct is co-expressed in CHO cells with an scFvIN33-caspase 3 fusion protein. Interaction of antibody and antigen should cause caspase-mediated apoptosis as depicted in Figure 5A.

60 hours after transfection, β -galactosidase activity is assayed to determine cell viability. In parallel with our findings with anti- β -galactosidase scFv, the expression of β -galactosidase is markedly decreased when the HIV-integrase- β -galactosidase fusion is co-expressed with scFvIN33-caspase 3 (Fig.5A, panel 2, front row) compared with the HIV-integrase- β -galactosidase fusion alone (panel 1, front row). Furthermore, expression of scFvIN33-caspase 3 with wild type β -galactosidase did not result in significant reduction in β -galactosidase activity (Fig.5 panel 2, back row) indicating that cell death occurs in response to dimerisation of scFv-caspase 3 after binding to sites on the HIV-integrase- β -galactosidase fusion (as illustrated in Fig. 5A) and is not due to auto-toxicity of scFvIN33-caspase 3.

The requirement for active caspase 3 is demonstrated by using a mutant scFv-caspase, scFvIN33-caspase 3(C163S) (panel 3) and the antibody specificity is shown using the non-specific antibody scFvF8-caspase 3 (panel 5). Neither of these fusion proteins is seen to affect β -galactosidase levels. On the other hand, the anti- β -galactosidase antibody fusion, scFvR4-caspase 3, causes cell death in cells expressing wild type β -galactosidase and HIV integrase β -galactosidase fusion as expected (panel 4, back and front rows). Cell death in this model system is, therefore, antigen specific, antibody specific and dependent on active caspase 3.

Example 12. Detection of a Cell By Production of a Fluorescence Signal

The presence of an entity within a cell may be determined by utilising a fusion protein consisting of an antibody linked to a fluorophore, and monitoring a fluorescence signal. Two constructs are made, one expressing a fusion protein consisting of scFv-R4 fused with Yellow Fluorescent Protein (YFP), and the other expressing a fusion protein consisting of scFv-R4 fused with Cyan Fluorescent Protein (CFP). These constructs are made by subcloning a YFP coding fragment from pYFP-N1 or a CFP coding fragment from pCFP-N1 (CLONTECH Laboratories) into pNL-scFvR4.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

61

The constructs are transfected into CHO cells together with a pEF- β gal plasmid expressing β -galactosidase. As controls, CHO cells are also transfected with the construct expressing scFv-R4-YFP and the construct expressing scFv-R4-CFP only but without pEF- β gal plasmid. Further controls include transfection with co-transfecting non-specific

5 scFvs fused with CFP and YFP, with or without the pEF- β gal plasmid.

60 hours after transfection, cells are subjected to FACS sorting. A CFP/YFP FRET filter set (Omega Optical Incorporated) is used to distinguish FRET signals from ordinary fluorescent signals. The cells which are transfected with the plasmids expressing β -galactosidase, the scFv-R4-CFP fusion and the scFv-R4-YFP are found to exhibit FRET,

10 while the cells which are transfected with the scFv-R4-CFP fusion and the scFv-R4-YFP only (without β -galactosidase) do not exhibit FRET. Furthermore, cells which are transfected with scFv-F8-CFP and scFv-F8-YFP expressing constructs (with or without a construct expressing β -galactosidase) are found not to exhibit FRET.

We have shown that when two or more scFv-caspase 3 fusion proteins bind to the

15 epitopes of an antigen that are close together, the caspase 3 moieties can be activated and trigger apoptosis. In this way, cells which express a target antigen are selectively killed. The validity of this process has been demonstrated with two pairs of model antibodies, namely anti- β -galactosidase scFvR4-caspase 3 fusion and anti-HIV integrase scFvIN33-caspase fusion. Since β -galactosidase exists as tetrameric form under physiological

20 conditions (Jacobson et al, 1994, *Nature* 369, 761-766), there are four binding sites for the scFvR4 in the tetramer. When scFvR4 is linked at the N-terminus of caspase 3, the binding of the scFvR4-caspase3 fusion proteins to the tetrameric β -galactosidase can bring the linked caspase 3 moieties to close proximity. This results in activation of caspase 3 and leads to apoptosis. In the second model using an HIV integrase epitope linked to β -

25 galactosidase, we provide further proof of triggering apoptosis by the specific binding between intracellular antibody-caspase 3 fusion proteins and the respective antigen. In each case, the cells specifically expressing target antigen are killed, demonstrating the general applicability and specificity of intracellular antibody-mediated cell killing.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

62

Each of the applications and patents mentioned above, and each document cited or referenced in each of the foregoing applications and patents, including during the prosecution of each of the foregoing applications and patents ("application cited documents") and any manufacturer's instructions or catalogues for any products cited or mentioned in each of the foregoing applications and patents and in any of the application cited documents, are hereby incorporated herein by reference. Furthermore, all documents cited in this text, and all documents cited or referenced in documents cited in this text, and any manufacturer's instructions or catalogues for any products cited or mentioned in this text, are hereby incorporated herein by reference.

Various modifications and variations of the described methods and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

63

CLAIMS

1. A method of inducing a cell to generate a detectable signal, the method comprising the steps of:
 - (a) providing a cell comprising an entity;
 - 5 (b) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of a detectable signal; and
 - (c) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter and generation of a signal.
- 10 2. A method of detecting an entity within a cell, the method comprising the steps of:
 - (a) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of a detectable signal;
 - 15 (b) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter and generation of a signal; and
 - (c) detecting the entity by monitoring the signal.
3. A method according to Claim 1 or 2, in which the signal is the activation of a cell killing mechanism.
- 20 4. A method according to Claim 3, in which the cell killing mechanism is apoptosis.
5. A method according to any preceding claim, in which the signal is generation of a cysteine protease activity.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

64

6. A method according to Claim 5, in which the cysteine protease activity is a caspase activity.
7. A method according to any preceding claim, in which the first reporter and the second reporter each comprise a caspase molecule selected from caspase 3 and caspase 8.
- 5 8. A method according to Claim 7, in which the binding of the reporters to the entity leads to auto-activation of the caspase molecules and activation of apoptosis in the cell.
9. A method according to Claim 8, in which the caspase molecule is caspase 3.
10. A method according to Claim 1 or 2, in which the signal is generation of a transcriptional activity.
- 10 11. A method according to Claim 10, in which the first reporter and the second reporter comprise domains of a transcription factor.
12. A method according to Claim 10 or 11, in which either the first reporter or the second reporter comprises the DNA binding domain (DBD) of Gal4, and the other of the first reporter and the second reporter comprises a VP16 activation domain.
- 15 13. A method according to Claim 10, 11 or 12, in which the signal is detected by monitoring the expression of a reporter gene.
14. A method according to Claim 13, in which the reporter gene is CD4.
15. A method according to Claim 1 or 2, in which the signal is the generation of a luminescence inducing activity.
- 20 16. A method according to Claim 1 or 2 in which the signal is a fluorescent signal.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

65

17. A method according to Claim 16, in which the fluorescent signal is emitted by fluorescein isothiocyanate, rhodamine, Green Fluorescent Protein, Cyan Fluorescent Protein, Yellow Fluorescent Protein, Blue Fluorescent Protein or Red Fluorescent Protein.
18. A method according to Claim 16 or 17, in which the fluorescent signal is
5 modulated by fluorescent resonance energy transfer (FRET).
19. A method according to any preceding claim, wherein one or both of the first reporter and the second reporter comprises a target specific binding polypeptide or nucleic acid aptamer.
20. A method according to any one of claims 1 to 18, in which one or both of the first
10 reporter and the second reporter comprises an immunoglobulin.
21. A method of killing a cell, the method comprising the steps of:
- (a) providing a cell comprising an entity;
 - (b) providing a first reporter comprising a first immunoglobulin and a second reporter comprising a second immunoglobulin;
 - 15 (c) providing a first caspase molecule linked to the first immunoglobulin and a second caspase molecule linked to the second immunoglobulin, the first and the second caspase molecules being capable of stably interacting to generate a caspase activity to cause apoptosis in the cell; and
 - (d) allowing the first immunoglobulin and the second immunoglobulin to bind to
20 the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the caspase molecules to generate caspase activity and apoptosis in the cell.
22. A method according to Claim 21, in which the caspase is caspase 3.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

66

23. A method according to Claim 20, 21 or 22, in which the immunoglobulin is an antibody, a T-cell receptor, or a fragment thereof.
24. A method according to any of Claims 20 to 23, in which the immunoglobulin is an antibody selected from an Fv, a single chain Fv (scFv), a Fab or a F(ab')₂.
- 5 25. A method according to any of Claims 20 to 24, in which the immunoglobulin is an intracellular single chain Fv.
26. A method according to any of Claims 20 to 25, in which the entity comprises an epitope recognised by the immunoglobulin.
27. A method according to any of Claims 20 to 26, in which the immunoglobulin is
10 provided by expression of nucleic acid within the cell.
28. A method according to Claim 27, in which the nucleic acid is obtained from a phage library encoding a repertoire of antibodies or T-cell receptors.
29. A method according to Claim 28, in which the library is constructed from nucleic acids isolated from an organism which has been challenged with an antigen.
- 15 30. A method according to any preceding claim, in which the entity is selected from a peptide, a polypeptide, a protein, a nascent polypeptide, an intracellular polypeptide precursor, a genomic DNA, a messenger RNA, a transfer RNA, a subcellular structure and an intracellular pathogen.
31. A method according to any preceding claim, in which the entity is associated with
20 a pre-determined condition of the cell or an organism from which the cell is derived.
32. A method according to Claim 31, in which the condition is Alzheimer's Disease or Down's Syndrome, and the entity is selected from a neurofibrillary tangle, a senile plaque,

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

67

a mutant beta amyloid precursor protein, a mutant ubiquitin-B protein, a frameshifted RNA encoding a mutant beta amyloid precursor protein, and a frameshifted RNA encoding a mutant ubiquitin-B protein.

33. A method according to Claim 31, in which the condition is Creutzfeld-Jacob
5 Disease (CJD), new variant CJD, or Bovine Spongiform Encephalopathy, and the entity is an infectious form of the prion protein (PrP^{Sc}).
34. A method according to Claim 31 in which the condition is AIDS or an autoimmune disease.
35. A method according to any of Claims 1 to 31, in which the entity is a mutant
10 oncogenic protein.
36. A method according to Claim 35, in which the mutant oncogenic protein is p21 ras.
37. A method according to Claim 34 or 35, in which one of the first reporter and second reporter binds to a target present in the mutant oncogenic protein but not in a corresponding wild type protein, and the other of the first reporter and second reporter
15 binds to a target present in both the mutant oncogenic protein and the wild-type protein.
38. A method according to any of Claims 1 to 31 and 35, in which the entity is a chimaeric fusion protein resulting from a chromosomal translocation.
39. A method according to Claim 38, in which the chimaeric fusion protein is a BCR-ABL fusion protein.
- 20 40. A method according to Claim 38 or 39, in which one of the first reporter and the second reporter binds to a target comprising an SH2 domain, and the other of the first reporter and the second reporter binds to a target comprising an SH2-binding site.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

68

41. A method according to any of Claims 1 to 31 and 35, in which the entity is a mutant p53 protein.
42. A method according to Claim 41, in which the p53 protein is a tetramer formed of p53 subunits.
- 5 43. A method according to Claim 41 or 42, in which the first reporter and the second reporter bind to identical targets in the mutant p53 protein.
44. A method according to any preceding claim, in which one or both of the first and second reporters is provided as a fusion protein.
45. A method according to any of Claims 1 to 43, in which one or both of the first and
10 second reporters comprises two moieties linked by chemical coupling.
46. A method according to any preceding claim, in which the first reporter and the second reporter bind to different targets.
47. A method according to any of Claims 1 to 45, in which the first reporter and the second reporter bind to the same target.
- 15 48. A pharmaceutical composition comprising an immunoglobulin-caspase fusion protein or conjugate, or a nucleic acid encoding an immunoglobulin-caspase fusion protein, together with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
49. An immunoglobulin-caspase fusion protein or conjugate, or a nucleic acid
20 encoding an immunoglobulin-caspase fusion protein for use in a method of treatment or diagnosis of a cancer in a human or animal.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

69

50. Use of an immunoglobulin-caspase fusion protein or conjugate, or a nucleic acid encoding an immunoglobulin-caspase fusion protein for the preparation of a medicament for the treatment or diagnosis of cancer in a human or animal.
51. A method of destruction of a polypeptide in a cell, the method comprising the steps
5 of:
- (a) providing a cell comprising a polypeptide;
 - (b) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of protease activity; and
 - 10 (c) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the polypeptide, such that binding of the reporters to the polypeptide leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter, generation of protease activity and proteolysis of the polypeptide.
52. A method of identifying the function of a gene, the method comprising the steps
15 of:
- (a) providing a cell comprising a gene encoding a polypeptide;
 - (b) providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of protease activity;
 - 20 (c) allowing the first reporter and the second reporter to bind to the polypeptide, such that binding of the reporters to the polypeptide leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter, generation of protease activity and proteolysis of the polypeptide; and
 - (d) observing a phenotype.
53. A method according to any preceding claim, in which the signal is generation of a
25 protease activity associated with a proteasome, preferably a 26S proteasome.

WO 01/75453

PCT/GB01/01540

70

54. A method according to Claim 53, in which the first reporter and the second reporter each comprise one or more domains of a F-box motif.
55. A method according to Claim 53 or 54, in which the binding of the reporters to the entity leads to ubiquitination of the entity, or a polypeptide comprising the entity.
- 5 56. A method according to any of Claims 53, 54 or 55, in which the binding of the reporters to the entity leads to proteolysis of the entity, or a polypeptide comprising the entity.

Figure 1

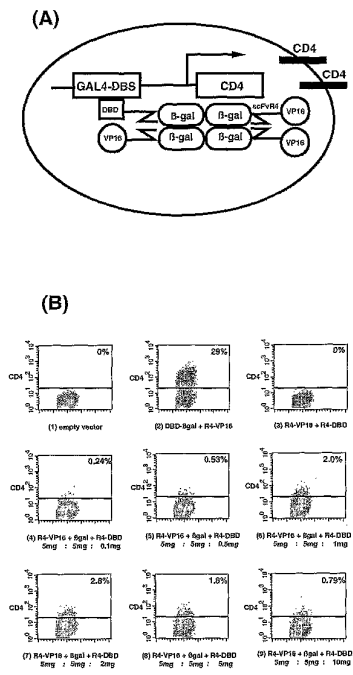
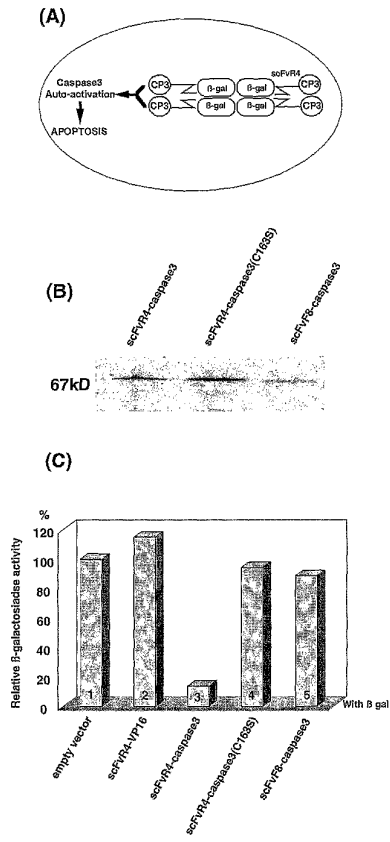
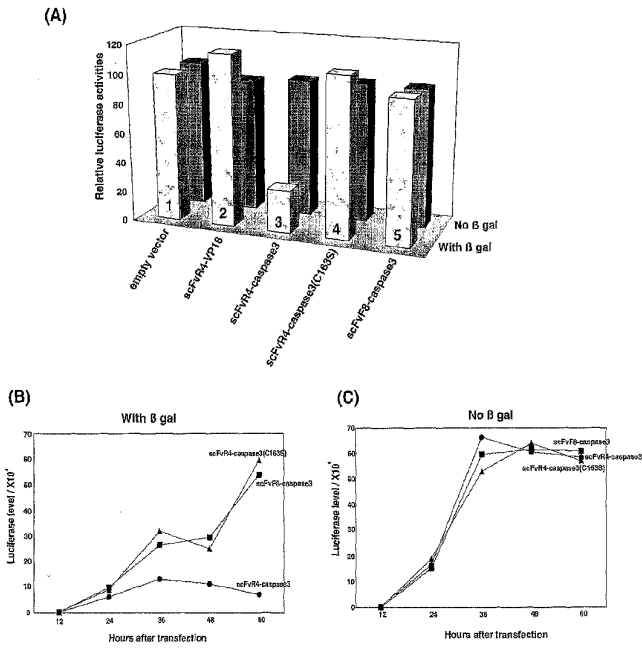


Figure 2



3/5

Figure 3



WO 01/75453

PCT/GB01/01540

4/5

Figure 4

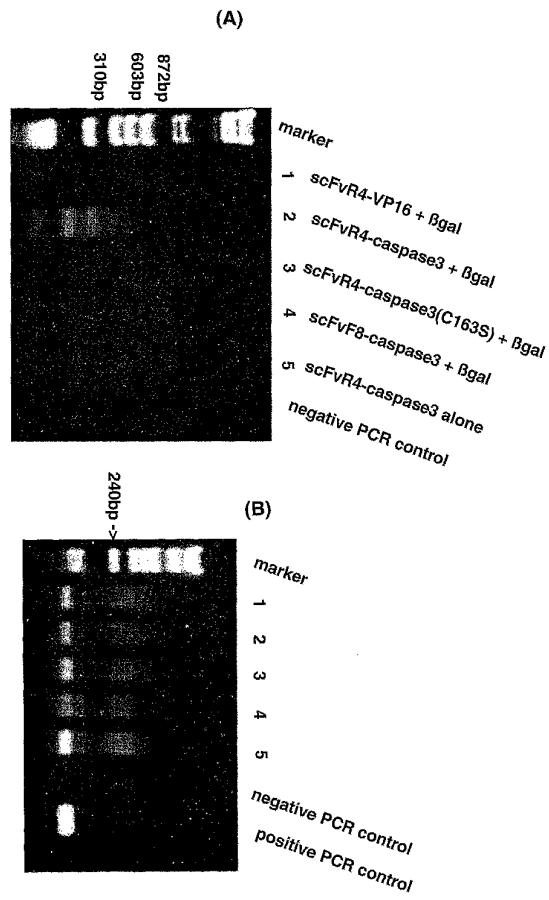
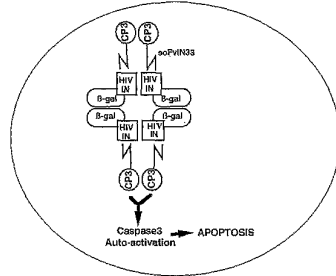
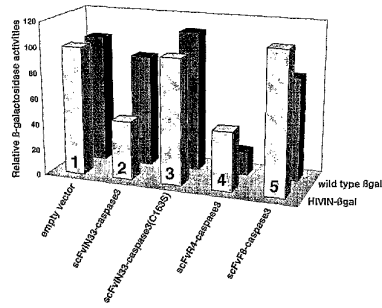


Figure 5

(A)



(B)



【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/75453 A3(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/68,
33/542, C12Q 1/68, A61K 49/00, 38/48

(21) International Application Number: PCT/GB01/01540

(22) International Filing Date: 4 April 2001 (04.04.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0008256.0 4 April 2000 (04.04.2000) GB
0008254.5 4 April 2000 (04.04.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): MEDICAL RESEARCH COUNCIL [GB/GB]; 20 Park Crescent, London W1N 4AL (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): TSE, Eric [GB/GB]; MRC Laboratory of Molecular Biology, Division of Protein and Nucleic Acid Chemistry, Hills Road, Cambridge CB2 2QH (GB); RABBITTS, Terence [GB/GB]; MRC Laboratory of Molecular Biology, Division of Protein and Nucleic Acid Chemistry, Hills Road, Cambridge CB2 2QH (GB).

(74) Agents: MASCHIO, Antonio et al.; D Young & Co., 21 New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

Declaration under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

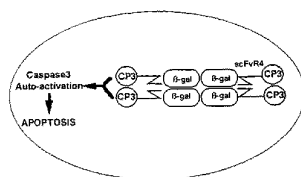
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
6 June 2002

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

(54) Title: METHODS INVOLVING INDUCED DIMERISATION BY CELLULAR COMPONENTS

WO 01/75453 A3



(57) Abstract: We describe a method of inducing a cell to generate a detectable signal. The method comprises the steps of providing a cell comprising an entity and providing a first reporter and a second reporter, in which a stable interaction of the first reporter with the second reporter leads to generation of a detectable signal. The first reporter and the second reporter are allowed to bind to the entity, such that binding of the reporters to the entity leads to stable interaction of the first reporter with the second reporter and generation of a signal. The signal is preferably the activation of a cell killing mechanism.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/01540
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/542 C12Q1/68 A61K49/00 A61K38/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 610 015 A (FIELDS STANLEY ET AL) 11 March 1997 (1997-03-11) the whole document abstract column 2, line 19 - line 51 column 5, line 16 - column 6, line 54 figures 1A-C claims 1,4,6-11,14,15	1,2, 10-13,19
A	---	3,14, 44-46
	---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 February 2002		Date of mailing of the international search report 06.03.02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2349, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Tuyman, A

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/01540

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BURGESS JANETTE K ET AL: "Physical proximity and functional association of glycoprotein Ibalpha and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 13, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 9758-9766, XP002190036 ISSN: 0021-9258 abstract ---	1,15-18
Y	WO 98 38324 A (NAGAMUNE TERUYUKI ;KUMAGAI IZUMI (JP); TODOKORO KAZUO (JP); TSUMOT) 3 September 1998 (1998-09-03) abstract page 6, line 11 -page 11, line 31 page 15, line 6 - line 14 ---	1-9, 19-36, 38-47
Y	FAN LIANGFEN ET AL: "Improved artificial death switches based on caspases and FADD." HUMAN GENE THERAPY, vol. 10, no. 14, pages 2273-2285, XP002179899 ISSN: 1043-0342 cited in the application the whole document abstract page 2275, right-hand column, line 40 -page 2277, left-hand column, line 2 page 2283, right-hand column, line 7 - line 25 ---	1-9, 19-36, 38-47
X A	---	48-50 37,51-56
A	US 6 043 082 A (CRABTREE GERALD R ET AL) 28 March 2000 (2000-03-28) the whole document claims 1,22,24,25 abstract column 41, line 63 -column 42, line 52 ---	1-9, 20-56
A	MACCORKLE ET AL: "SYNTHETIC ACTIVATION OF CASPASES: ARTIFICIAL DEATH SWITCHES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 95, 31 March 1998 (1998-03-31), pages 3655-3660, XP002116599 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document --- -/--	1-9, 19-50

2

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/01540

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TSE ERIC ET AL: "Intracellular antibody-caspase-mediated cell killing: An approach for application in cancer therapy." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 22, 24 October 2000 (2000-10-24), pages 12266-12271, XP002179900 October 24, 2000 ISSN: 0027-8424	1-9, 19-50
A	the whole document -----	51-56

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB 01/01540
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input checked="" type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB 01/01540

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 3-9,21,22,48-56 (fully) 1,2,19,20,23-47 (partially)

Methods of detection of cellular components within a cell,
the signal generated being protease activity

2. Claims: 10-14 (fully) 1,2,19,20,23-47 (partially)

Methods of detection of cellular components within a cell,
the signal generated being a transcriptional activity

3. Claims: 15-18 (fully) 1,2,19,20,23-47 (partially)

Methods of detection of cellular components within a cell,
the signal generated being a luminescence inducing activity

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No
 PCT/GB 01/01540

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5610015	A	11-03-1997	AU 3959795 A	08-10-1996
			EP 0765403 A1	02-04-1997
			JP 10500865 T	27-01-1998
			WO 9629429 A1	26-09-1996
			US 5677131 A	14-10-1997
			US 5750667 A	12-05-1998
WO 9838324	A	03-09-1998	JP 10234372 A	08-09-1998
			AU 6344198 A	18-09-1998
			CA 2252625 A1	03-09-1998
			EP 0898619 A1	03-03-1999
			WO 9838324 A2	03-09-1998
US 6043082	A	28-03-2000	US 5869337 A	09-02-1999
			US 5834266 A	10-11-1998
			US 6165787 A	26-12-2000
			US 6011018 A	04-01-2000
			US 6046047 A	04-04-2000
			US 5830462 A	03-11-1998
			US 6054436 A	25-04-2000
			US 6063625 A	16-05-2000
			US 6140120 A	31-10-2000
			US 6316418 B1	13-11-2001
			US 5994313 A	30-11-1999
			AU 690898 B2	07-05-1998
			AU 6240394 A	29-08-1994
			AU 7880798 A	08-10-1998
			CA 2155728 A1	18-08-1994
			CN 1119876 A	03-04-1996
			CZ 9502061 A3	17-04-1996
			EP 0804561 A1	05-11-1997
			FI 953812 A	11-08-1995
			HU 73101 A2	28-06-1996
			JP 8510896 T	19-11-1996
			PL 310327 A1	11-12-1995
			WO 9418317 A1	18-08-1994
			US 5871753 A	16-02-1999
			AU 3409295 A	14-03-1996
			CA 2197242 A1	29-02-1996
			EP 0776335 A1	04-06-1997
			JP 10507624 T	28-07-1998
			WO 9606111 A1	29-02-1996
			AU 696991 B2	24-09-1998
			AU 7336394 A	13-02-1995
			CA 2167282 A1	26-01-1995
CN 1130401 A	04-09-1996			
CZ 9600084 A3	16-06-1999			
EP 0776359 A1	04-06-1997			
FI 960165 A	26-01-1996			
HU 73100 A2	28-06-1996			
JP 9503645 T	15-04-1997			
PL 312586 A1	29-04-1996			
WO 9502684 A1	26-01-1995			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/68	G 0 1 N 33/68	
// C 0 7 K 16/00	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 N 15/00	C 0 7 K 19/00	

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

(72) 発明者 ツェー, エリック

イギリス国、シービー2 2 キューエイチ ケンブリッジ、ヒルズ・ロード、エムアールシー・ラボラトリー・オヴ・モレキュラー・バイオロジー、ディヴィジョン・オヴ・プロテイン・アンド・ニュクレイック・アシッド・ケミストリー

(72) 発明者 ラビッツ, テレンス

イギリス国、シービー2 2 キューエイチ ケンブリッジ、ヒルズ・ロード、エムアールシー・ラボラトリー・オヴ・モレキュラー・バイオロジー、ディヴィジョン・オヴ・プロテイン・アンド・ニュクレイック・アシッド・ケミストリー

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA36 FB03 FB07 FB12 FB13 GC15
 2G054 AA08 CA23 CE02 EA01
 4B024 AA11 CA01 CA04 CA07 CA11 DA02 EA02 EA04 FA02 GA11
 HA11
 4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ08 QQ13 QQ36 QR08 QR33 QR42
 QR59 QR62 QR67 QR77 QR80 QS05 QS31 QS36 QX02
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA89 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	细胞检测方法		
公开(公告)号	JP2004512012A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2001572878	申请日	2001-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	医药研究委员会		
申请(专利权)人(译)	医学研究理事会		
[标]发明人	ツェーエリック ラビッツテレンス		
发明人	ツェー,エリック ラビッツ,テレンス		
IPC分类号	G01N33/48 C07K16/00 C07K19/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/37 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/542 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/5005 G01N33/532 G01N2510/00		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C12Q1/37 G01N21/76 G01N21/78.C G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/68 C12N15/00.A C07K16/00 C07K19/00		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ36 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR67 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS31 4B063/QS36 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000008256 2000-04-04 GB 2000008254 2000-04-04 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明人描述了诱导细胞产生可检测信号的方法。本发明的方法包括获得包含组分的细胞，获得第一报道分子和第二报道分子的步骤，其中所述第一报道分子和所述第二报道分子之间的稳定相互作用。并获得可检测信号的出现。通过将所述第一报道分子和所述第二报告分子与所述组分结合，所述报道分子与所述组分的结合导致所述第一报道分子与所述第二报告分子的稳定相，生成信号。该信号优选是细胞致死率机制的激活。

