(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2004-503778

(P2004-503778A)

(43)公表日　平成16年2月5日(2004.2.5)

(51)Int.Cl.[7]		F I			テーマコード（参考）
G01N	33/50	G01N	33/50	Z	2G045
C07K	14/62	C07K	14/62		2G054
C07K	19/00	C07K	19/00		4B024
C12N	15/09	C12Q	1/02		4B063
C12Q	1/02	G01N	21/78	C	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　有　（全 48 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002-510945(P2002-510945)
(86)(22)出願日	平成13年6月18日(2001.6.18)
(85)翻訳文提出日	平成14年12月16日(2002.12.16)
(86)国際出願番号	PCT/GB2001/002683
(87)国際公開番号	WO2001/096867
(87)国際公開日	平成13年12月20日(2001.12.20)
(31)優先権主張番号	0014838.7
(32)優先日	平成12年6月16日(2000.6.16)
(33)優先権主張国	イギリス(GB)

(71)出願人　301046765
ユニバーシティ・オブ・ブリストル
イギリス国エイヴォン　ビーエス８　１ティーエイチ，ブリストル，ティンダル・アベニュー，セナト・ハウス

(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫

(74)代理人　100076691
弁理士　増井　忠弐

(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰

(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男

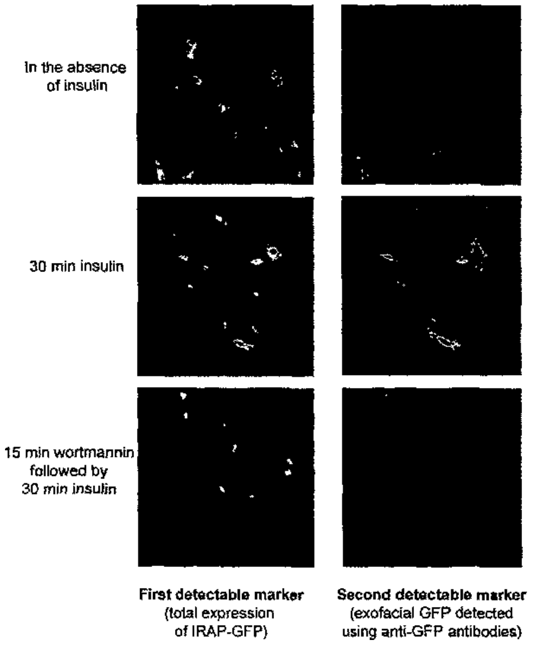
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アッセイ

(57)【要約】

候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかを決定する方法であって、（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と検出可能なタンパク質成分とを含むタンパク質構造を符号化する核酸配列を含む、トランスフェクトされた宿主細胞を提供し、その際、該検出可能なタンパク質成分は該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されており、更にその際、該検出可能なタンパク質成分は、該タンパク質成分を面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法と、該タンパク質成分を面外に位置する場合及び細胞内に位置する場合のどちらでも検出することができる第二の検出法とにより、アッセイすることができ；（ｂ）該トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させ；（ｃ）面外タンパク質成分を前記第一検出法により測定し、面外及び細胞内の検出可能なタンパク質成分の全量を前記第二検出法により測定し；そして、（ｄ）該面外の検出可能なタンパク質成分の量を、該面外及び細胞内の検出可能なタンパク質成分の全量と比較して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度の尺度



【特許請求の範囲】
【請求項１】
候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかを決定する方法であって、
（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と検出可能なタンパク質成分とを含むタンパク質構造を符号化する核酸配列を含む、トランスフェクトされた宿主細胞を提供し、その際、該検出可能なタンパク質成分は該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されており、更にその際、該検出可能なタンパク質成分は、該タンパク質成分を面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法と、該タンパク質成分を面外に位置する場合及び細胞内に位置する場合のどちらでも検出することができる第二の検出法とにより、アッセイすることができ；
（ｂ）該トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させ；
（ｃ）面外タンパク質成分を前記第一検出法により測定し、面外及び細胞内の検出可能なタンパク質成分の全量を前記第二検出法により測定し；そして、
（ｄ）該面外の検出可能なタンパク質成分の量を、該面外及び細胞内の検出可能なタンパク質成分の全量と比較して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度の尺度を提供すること、を含む方法。
【請求項２】
抗体エピトープが検出可能なタンパク質成分上に存在し、前記エピトープが、免疫学的検出法である第一検出法により検出可能である、請求項１記載の方法。
【請求項３】
免疫学的検出法が、抗体エピトープを該エピトープについて高いアフィニティーを有する蛍光標識された抗体を用いて標識する工程を含む、請求項２記載の方法。
【請求項４】
免疫学的検出法が、抗体エピトープを該エピトープについて高いアフィニティーを有する第一の抗体を用いて標識する第一の工程と、該第一抗体を該第一抗体について高いアフィニティーを有する蛍光標識された第二の抗体により検出する第二の工程とを含む、請求項２記載の方法。
【請求項５】
検出可能なタンパク質成分が、第二検出法により検出可能な特徴的な発光スペクトルを発することができるものである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
検出可能なタンパク質成分が蛍光タンパク質成分である、請求項５記載の方法。
【請求項７】
蛍光タンパク質成分が緑色蛍光タンパク質である、請求項６記載の方法。
【請求項８】
候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかを決定する方法であって、
（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と、該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されている第一の検出可能なタンパク質成分と、該ＩＲＡＰタンパク質成分の細胞質ドメインに融合されている第二の検出可能なタンパク質成分とを含むタンパク質構造を符号化する核酸配列を含む、トランスフェクトされた宿主細胞を提供し、その際、該第一の検出可能なタンパク質成分は、該第一タンパク質成分を面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法によりアッセイすることができ、該第二の検出可能なタンパク質成分は、該第二タンパク質成分を細胞内に位置する場合に検出することができる第二の検出法によりアッセイすることができ；
（ｂ）該トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させ；
（ｃ）該第一タンパク質成分の量を、面外に位置する該第一タンパク質成分の量を表す前記第一検出法により測定し、該第二の検出可能なタンパク質成分の量を、該第二の検出可能なタンパク質成分の全量を表す前記第二検出法により測定し；そして、
（ｄ）面外の第一の検出可能なタンパク質成分の量を、該第二の検出可能なタンパク質成分の全量と比較して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度の尺度を提供すること、を含む方法。

【請求項９】
第一の検出可能なタンパク質成分が抗体エピトープを含み、前記エピトープが、免疫学的検出法である第一検出法により検出可能である、請求項８記載の方法。
【請求項１０】
免疫学的検出法が、抗体エピトープを該エピトープについて高いアフィニティーを有する蛍光標識された抗体を用いて標識する工程を含む、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
免疫学的検出法が、抗体エピトープを該エピトープについて高いアフィニティーを有する第一の抗体を用いて標識する第一の工程と、該第一抗体を該第一抗体について高いアフィニティーを有する蛍光標識された第二の抗体により検出する第二の工程とを含む、、請求項９記載の方法。
【請求項１２】
第二の検出可能なタンパク質成分が、第二検出法により検出可能な特徴的な発光スペクトルを発することができるものである、請求項８、９、１０又は１１に記載の方法。
【請求項１３】
第二の検出可能なタンパク質成分が蛍光タンパク質成分である、請求項１２記載の方法。
【請求項１４】
蛍光タンパク質成分が緑色蛍光タンパク質である、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
インスリンのアンタゴニストを同定する方法であり、更に、トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させる前か又はその後にインスリンを添加する工程が含まれる、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させた後にインスリンを添加する、請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法により同定されたインスリンアンタゴニスト又は擬態。
【請求項１８】
ＩＲＡＰタンパク質成分及び検出可能なタンパク質成分を含むキメラＩＲＡＰタンパク質であって、該検出可能なタンパク質成分が該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されており、更に、該検出可能なタンパク質成分は、該タンパク質成分を細胞において面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法と、該タンパク質成分を細胞において面外に位置する場合及び細胞内に位置する場合のどちらでも検出することができる第二の検出法とにより、アッセイすることができる、キメラＩＲＡＰタンパク質。
【請求項１９】
（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と、（ｂ）該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されている第一の検出可能なタンパク質成分であって、該タンパク質成分を細胞において面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法によりアッセイすることができる前記第一の検出可能なタンパク質成分と、（ｃ）該ＩＲＡＰタンパク質成分の細胞質ドメインに融合されている第二の検出可能なタンパク質成分であって、該タンパク質成分を細胞内に位置する場合に検出することができる第二の検出法によりアッセイすることができる前記第二の検出可能なタンパク質成分とを含むキメラＩＲＡＰタンパク質。
【請求項２０】
請求項１８又は１９に記載のキメラＩＲＡＰタンパク質を符号化するＤＮＡ分子。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明は、候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかどうかを決定する

方法に関する。特に、本発明に従えば、ＧＬＵＴ４小胞転座のレベルを、キメラＴＲＡＰタンパクを発現する宿主細胞のインスリン刺激後に定量化することができる。本発明の方法は、特に、グルコース摂取に関してインスリンの作用に影響を与える可能性のある薬剤を探索する際の高処理量スクリーニング法において使用することができる。

【０００２】

発明の背景

インスリン刺激によるグルコース摂取は、生理的に関連のある主要なインスリンの効果である。細胞へのグルコース摂取を特異的に高める化合物を発見できれば、これによりタイプＩ及びタイプＩＩの糖尿病の両方の処置に相当な利益がもたらされるであろう。

【０００３】

インスリン応答性脂肪細胞及び筋肉細胞においては、２つのグルコース輸送体が存在する（ＧＬＵＴ１及びＧＬＵＴ４）。インスリンはこれらの輸送体の細胞内隔絶局在位置から原形質膜への転座を促進することにより、筋肉細胞及び脂肪細胞へのグルコース摂取を刺激する。正味のグルコース摂取に関して最も重要な効果は、ＧＬＵＴ４の転座である。更に、ＧＬＵＴ１は偏在して発現するので（ＧＬＵＴ４は筋肉細胞及び脂肪細胞に制限されている）、糖尿病を効果的に処置するには必ずＧＬＵＴ４の転座の促進について特異的でなければならない。

【０００４】

放射性グルコースを用いたグルコース摂取の伝統的なアッセイ、或いは、トリチウム標識サイトカラシンＢ結合、又はトリチウム標識若しくはビオチン標識ビスマンノース標識（直接、細胞表面グルコース輸送体に結合する）の結合といったリガンド結合アッセイでは、ＧＬＵＴ１又はＧＬＵＴ４のいずれか一方に関するインスリンの効果を区別できない。

【０００５】

ＷＯ９５／０９２４０は、検出可能な異種ポリペプチドに融合されたＧＬＵＴ輸送体ポリペプチドを含むキメラＧＬＵＴ輸送体を開示している。開示されたキメラＧＬＵＴ輸送体は、候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかどうかを決定する方法に使用することができる。

【０００６】

インスリン応答性アミノペプチダーゼ（ＩＲＡＰ）はＧＬＵＴ４含有性小胞の一成分であり、インスリンシグナル伝達経路に関与する。ＩＲＡＰ及びＧＬＵＴ４は完全に共に局在化する。ＷＯ９６／０９３１７を参照するとこのアミノペプチダーゼを「ＧＴＶａｐ」と呼んでいる。

【０００７】

Ｔｈｕｒｍｏｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２７３，　３３８７６－３３８８３（１９９８）には、Ｍｕｎｃ１８ｃの高発現により３Ｔ３Ｌ１含脂肪組織におけるインスリン刺激によるｅＧＦＰ－ＩＲＡＰ／ｖｐ１６５の転座が抑制されるという実験が記載されている。

【０００８】

発明の要旨

本発明の第一の側面によれば、候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかどうかを決定する方法であって：

（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と検出可能なタンパク質成分とを含むタンパク質構造を符号化する核酸配列を含む、トランスフェクトされた宿主細胞を提供し、その際、該検出可能なタンパク質成分は該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されており、更にその際、該検出可能なタンパク質成分は、該タンパク質成分を面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法と、該タンパク質成分を面外に位置する場合及び細胞内に位置する場合のどちらでも検出することができる第二の検出法とにより、アッセイすることができ；

（ｂ）該トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させ；

（ｃ）面外タンパク質成分を前記第一検出法により測定し、面外及び細胞内の検出可能な

タンパク質成分の全量を前記第二検出法により測定し；そして、
（ｄ）該面外の検出可能なタンパク質成分の量を、該面外及び細胞内の検出可能なタンパク質成分の全量と比較して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度の尺度を提供すること、を含む方法が提供される。

【０００９】

本発明の第二の側面によれば、候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかどうかを決定する方法であって：
（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と、該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されている第一の検出可能なタンパク質成分と、該ＩＲＡＰタンパク質成分の細胞質ドメインに融合されている第二の検出可能なタンパク質成分とを含むタンパク質構造を符号化する核酸配列を含む、トランスフェクトされた宿主細胞を提供し、その際、該第一の検出可能なタンパク質成分は、該第一タンパク質成分を面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法によりアッセイすることができ、該第二の検出可能なタンパク質成分は、該第二タンパク質成分を細胞内に位置する場合に検出することができる第二の検出法によりアッセイすることができ；
（ｂ）該トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させ；
（ｃ）該第一タンパク質成分の量を、面外に位置する該第一タンパク質成分の量を表す前記第一検出法により測定し、該第二の検出可能なタンパク質成分の量を、該第二の検出可能なタンパク質成分の全量を表す前記第二検出法により測定し；そして、
（ｄ）面外の第一の検出可能なタンパク質成分の量を、該第二の検出可能なタンパク質成分の全量と比較して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度の尺度を提供すること、を含む方法が提供される。

【００１０】

本発明の第一及び第二の側面の各々の工程（ｃ）における測定は、同時に又は逐次的に実施してもよい。それらを逐次的に実施する場合、実施する順序は重要ではない。本明細書中で使用する、「面外に位置する」という表現は形質膜の細胞外面上に位置することを意味する。「細胞内に位置する」という表現は、関連するタンパク質成分がその細胞内に位置することをいい、それには形質膜のシトソル面上に位置することが含まれ、並びにその細胞自身の内部の小胞内に位置することをいう。

【００１１】

本発明の第一及び第二の側面のアッセイは、例えば、化合物ライブラリーにおいて見出すことができるような「候補化合物」（化合物の混合物が含まれてもよい）がインスリンの擬態又はアンタゴニストであるかどうかを決定するのに使用することができる。本発明は、自動化された高処理量スクリーンにおいて化合物のライブラリーを試験するのに使用してもよい。本発明のアッセイは、インスリンのアンタゴニストである候補化合物を同定することにおいて最も関係があり；そのような化合物は主として医薬的な関心を集めている。

【００１２】

本発明の方法を使用してインスリンのアンタゴニストを同定する場合、本方法にはインスリンを添加する工程も含まれる。インスリンは、トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させる前かその後のどちらに添加してもよい。好ましくは、トランスフェクトされた宿主細胞を候補化合物と接触させた後にインスリンを添加する。本発明の方法を使用してインスリン擬態を同定する場合は、インスリンは試験系に導入しない。

【００１３】

本発明の第三の側面によれば、ＩＲＡＰタンパク質成分及び検出可能なタンパク質成分を含むキメラＩＲＡＰタンパク質であって、該検出可能なタンパク質成分が該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されており、更に、該検出可能なタンパク質成分は、該タンパク質成分を細胞において面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法と、該タンパク質成分を細胞において面外に位置する場合及び細胞内に位置する場合のどちらでも検出することができる第二の

検出法とにより、アッセイすることができる、キメラＩＲＡＰタンパク質が提供される。
【００１４】
本発明の第四の側面によれば、（ａ）ＩＲＡＰタンパク質成分と、（ｂ）該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されている第一の検出可能なタンパク質成分であって、該タンパク質成分を細胞において面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法によりアッセイすることができる前記第一の検出可能なタンパク質成分と、（ｃ）該ＩＲＡＰタンパク質成分の細胞質ドメインに融合されている第二の検出可能なタンパク質成分であって、該タンパク質成分を細胞内に位置する場合に検出することができる第二の検出法によりアッセイすることができる前記第二の検出可能なタンパク質成分とを含むキメラＩＲＡＰタンパク質が提供される。
【００１５】
発明の具体的な説明
本発明の第一の側面の方法は、一般的にいえば、インスリン感受性細胞を、ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合された検出可能なタンパク質成分を含有するキメラＩＲＡＰポリペプチドを符号化しているＩＲＡＰ構成体で、トランスフェクトすることからなる。検出可能なタンパク質成分は第一の検出法により検出することができ、その方法によれば、タンパク質成分が、細胞内ＧＬＵＴ４小胞におけるその出発位置から、検出可能なタンパク質成分が面外に存在する（すなわち、細胞外に位置する）場所である細胞表面膜へ転座された場合に、そのタンパク質成分を検出することができるが、かかる方法では、検出可能なタンパク質成分がそのように転座されずに細胞内に存在する場合は、その検出可能なタンパク質成分を検出することができない。また、検出可能なタンパク質成分は第二の検出法により検出することができ、その方法によれば、そのタンパク質成分が面外の位置に転座された場合と、そのように転座されずに細胞内に存在する場合の両方に、そのタンパク質成分を検出することができる。
【００１６】
従って、トランスフェクトされた宿主細胞がキメラＩＲＡＰポリペプチドを発現する場合は、第一の検出法を用いて検出される検出可能なタンパク質成分の量を第二の検出法により検出可能なタンパク質成分の量と比較することにより、ＧＬＵＴ４転座に関するインスリンの効果をアッセイで定量化することができる。本発明において使用する二重検出アプローチの利点は、ＴＲＡＰ発現レベルの変動を補正してアッセイに大きな信頼性を付与できることである。本発明を使用して、インスリンの効果を擬態するか又は拮抗する薬剤をスクリーニングすることができる。
【００１７】
本発明の第二の側面の方法は、キメラＩＲＡＰタンパク質に２種の検出可能なタンパク質成分が含まれ、一方はＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合され、他方は細胞質ドメインに融合されているということを除いては、第一の側面の方法と同等である。
【００１８】
第一の検出法は、好ましくは、検出可能なタンパク質成分上の抗体エピトープをそのエピトープについて高いアフィニティーを有する標識された抗体を用いて検出する、免疫学的検出法である。また、検出可能なタンパク質成分は、エピトープタグについて高いアフィニティーを有する第一の抗体と第一の抗体について高いアフィニティーを有する第二の蛍光標識された抗体とを用いて検出してもよい。そのような免疫学的アッセイによれば、面外に位置する場合にのみ検出可能なタンパク質成分が検出される。このタイプの免疫学的アッセイは当技術分野において周知である。適する標識抗体は当技術分野において既知の手順により生成することができる。
【００１９】
第一の検出法により検出されるべき検出可能なタンパク質成分上のエピトープは、その検出可能なタンパク質成分の天然エピトープであるものであってもよく；従って、検出可能なタンパク質成分がＧＦＰタンパク質成分である場合は、それについて特異的な抗体が出現する可能性のある多数のエピトープを含有する。代わりとして、検出可能なタンパク質

成分を組み換えて、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ｃ－ｍｙｃ、ＦＬＡＧ、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ又はＨｉｓ$_6$エピトープタグといった適するエピトープタグを含めてもよい。

【００２０】

第二の検出法は、好ましくは、特徴的な発光スペクトルの生成に依存するものであり、発光スペクトルは第一の方法を用いて得ることができるものと区別することができるので、分光光度計などの適する装置により分析することができる。例えば、検出可能なタンパク質成分は、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）などのような蛍光タンパク質成分を含んでいてもよい。本明細書中で使用される蛍光タンパク質とは、適当な電磁放射で励起した場合に蛍光を発することができるタンパク質のことをいい、そのアミノ酸配列が天然であるか又は組み換えられた蛍光タンパク質が含まれる。そのような蛍光タンパク質成分は、特定の波長での励起に応答して特徴的な発光スペクトルを生成するので、本質的には、分析する系におけるタンパク質成分の全量がアッセイされる。

【００２１】

本明細書中で使用する緑色蛍光タンパク質は、緑色光を発するタンパク質である。青色蛍光タンパク質（本発明において使用してもよい）は、青色光を発するタンパク質である。ＧＦＰは、北米太平洋岸北西地区のクラゲであるオワンクラゲ（Ａｅｑｕｏｒｅａ ｖｉｃｔｏｒｉａ）、ウミシイタケであるＲｅｎｉｌｌａ ｒｅｎｉｆｏｒｍｉｓ、及びコザラクラゲ（Ｐｈｉａｌｉｄｉｕｍ ｇｒｅｇａｒｉｕｍ）から単離される。Ｗ．Ｗ．Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．，３５：８０３－８０８（１９８２）；Ｌ．Ｄ．Ｌｅｖｉｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，７２Ｂ：７７－８５（１９８２）。

【００２２】

有用な励起及び発光スペクトルを有する種々のＡｅｑｕｏｒｅａ族のＧＦＰが、Ａｅｑｕｏｒｅａ ｖｉｃｔｏｒｉａからの天然ＧＦＰのアミノ酸配列を修飾することによって組み換えられている。（Ｄ．Ｃ．Ｐｒａｓｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１１１：２２９－２３３（１９９２）；Ｒ．Ｈｅｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，９１：１２５０１－０４（１９９４））

本発明において使用することができる別の蛍光タンパク質は、インド洋－西太平洋地域に生息するイソギンチャクの近縁種であるＤｉｓｃｏｓｏｍａ ｓｔｒｉａｔａから単離された赤色蛍光タンパク質であり、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，Ｃａ．，ＵＳＡから入手可能である。

【００２３】

他の適する検出可能なタンパク質成分は、シグナルの発生についての基質に依存するものである。例えば、酵素であるルシフェラーゼは、その基質であるルシフェリンと接触した場合に特徴的な発光スペクトルを生成する。別の例は、β－ガラクトシダーゼに基づく検出可能なタンパク質成分であり、その基質と接触した場合に特徴的な発光をもたらす。これらの例の両方においては、タンパク質成分の全量をアッセイすることができるタンパク質成分／基質の組合せを選択することが必要である。より特定的には、このことは、基質が細胞内に拡散して基質とタンパク質成分との間の必要な反応を起こすことを可能とするため、その基質は膜透過性のものでなければならないことを意味している。

【００２４】

現在のところ、本発明の第一の側面の検出可能なタンパク質成分は、キメラタンパク質においてＩＲＡＰのアミノペプチダーゼドメインを置き換える緑色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質成分が好ましい。これは、蛍光タンパク質成分のエピトープについて特異的な標識された抗体により免疫学的にアッセイすることができ、標準的な蛍光計を用いて蛍光測定によりアッセイすることができる。

【００２５】

本発明の第二側面の方法の場合は、現在のところ、第一の検出可能なタンパク質成分は、これまでに説明しようにエピトープタグを含むタンパク質成分であり、第二の検出可能なタンパク質成分は、キメラタンパク質においてＩＲＡＰのアミノペプチダーゼドメインを

置き換える緑色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質成分であることが好ましい。

【００２６】

キメラＩＲＡＰタンパク質について符号化している核酸構成体は、分子生物学の標準的な技術により生成することができる。ＩＲＡＰタンパク質のＤＮＡ配列は、細胞質ドメイン（アミノ酸残基１～１０９）、トランス膜部（アミノ酸残基１１０～１３１）、及び管腔部（アミノ酸残基１３２～９１６、そのうち残基１３２～１５４は「茎状（ｓｔａｌｋ）」であり、残基１５５～９１６はアミノペプチダーゼ触媒ドメインである）を含有するタンパク質を符号化している。ＩＲＡＰタンパク質の一部又は全てを符号化しているＤＮＡ配列を既知の方法により組み換えて、検出可能なタンパク質成分（又は複数の検出可能なタンパク質成分）を符号化する核酸配列を含ませてもよく、その結果、構成体により発現されるタンパク質産物は、検出可能なタンパク質成分（又は複数の検出可能なタンパク質成分）に融合されたＩＲＡＰタンパク質成分を含む。従って、例えば、機能的な蛍光タンパク質成分について符号化するＤＮＡ配列は商業的に入手可能であり、それを使用して、本発明のキメラＩＲＡＰタンパク質について符号化する核酸構成体を合成することができる。また、所望な符号化配列及び制御配列を含有する適するベクターの構成体は、当技術分野においてよく理解されている標準的な手法を使用する。

【００２７】

ＤＮＡ構成体において、検出可能なタンパク質成分について符号化するＤＮＡ配列は、ＩＲＡＰタンパク質の管腔部について符号化するＤＮＡ配列の末端で接合する（言い換えれば、ＩＲＡＰタンパク質の管腔部について符号化するＤＮＡ配列の全体はそのまま完全である）か、又はＩＲＡＰタンパク質の管腔部について符号化するＤＮＡ配列の全て若しくは一部を置き換える。

【００２８】

本発明の好ましい態様においては、その触媒アミノペプチダーゼドメインが欠けた不完全なＩＲＡＰタンパク質を符号化するＤＮＡ配列を使用して、キメラＩＲＡＰタンパク質について符号化する適するＤＮＡ構成体を合成する；従って、得られるＤＮＡ構成体においては、ＩＲＡＰのアミノペプチダーゼドメインについて符号化する配列は、検出可能なタンパク質成分について符号化する配列に換わる。実験結果は、そのようなＤＮＡ構成体により発現されたタンパク質は、内因性ＩＲＡＰ及びＧＬＵＴ４とは区別が付かない様式でインスリンに対して走行し応答することを示している。

【００２９】

宿主細胞を、当技術分野で既知の方法によりキメラＩＲＡＰ構成体を符号化するＤＮＡを含む適するベクターでトランスフェクトする。キメラＴＲＡＰタンパク質の発現について符号化する配列を有する細胞をトランスフェクトするのに使用する核酸は、ポリペプチドの発現について符号化するヌクレオチド配列に機能的に連結した発現制御配列を含む発現ベクターの形態である。使用されるポリペプチドの「発現についてコードするヌクレオチド配列」という語は、ｍＲＮＡの転写及び翻訳のときにポリペプチドを生成する配列をいう。これには、例えば、イントロンを含有する配列が含まれうる。本明細書中で使用する「発現制御配列」という語は、その配列が機能的に連結している核酸配列の発現を規定する核酸配列をいう。発現制御配列は核酸配列に機能的に連結し、その核酸配列の転写と適当であればその翻訳とを制御し規定する。従って、発現制御配列には、適当なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、タンパク質符号化遺伝子の上流の開始コドン（すなわち、ＡＴＧ）、イントロンについてのスプライシングシグナル、その遺伝子の正確な解読枠を維持してｍＲＮＡの適切な翻訳を可能とすること、及び終止コドンが含まれうる。キメラＩＲＡＰタンパク質の長期の発現は細胞にとって害となる可能性があることから、その構成体又は各々の構成体の発現が、テトラサイクリン応答性プロモーター（例えば、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ　Ｔ－Ｒｅｘ系）、エクジソンをベースとする系、及び周知のメタロチオネインプロモーターといった誘導プロモーターの制御に基づく場合は都合がよい。

【００３０】

得られるトランスフェクトされた宿主細胞は、好ましくは、誘導プロモーターの制御下で

キメラＩＲＡＰタンパク質を発現する。トランスフェクトして安定な細胞ラインを生成しうる適する宿主細胞には、含脂肪細胞（例えば、３Ｔ３－Ｌ１含脂肪細胞）、骨格筋細胞、又はあらゆる他のインスリン応答性細胞が含まれる。

【００３１】
キメラＩＲＡＰタンパク質を発現するトランスフェクト宿主細胞は、候補化合物がインスリンの効果を擬態するか又は拮抗するかどうかを決定するためのアッセイに使用することができる。

【００３２】
候補化合物がインスリンの効果を擬態するかどうかを決定するためのアッセイにおいては、本発明の第一又は第二の側面に従ったアッセイをインスリンなしで実施して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度を、候補化合物（及びインスリン）が存在しない対照実験において発生したものと比較する。ＧＬＵＴ４小胞転座の程度が対照より大きいということは、化合物がインスリンの擬態であることを示している。

【００３３】
候補化合物がインスリンの効果を拮抗するかどうかを決定するためのアッセイにおいては、本発明の第一の側面又は第二の側面に従ったアッセイをインスリンの存在下で実施して、ＧＬＵＴ４小胞転座の程度を、候補化合物が存在しない（しかし、同濃度のインスリン存在下の）対照実験において発生したものと比較する。ＧＬＵＴ４小胞転座の程度が対照より小さいということは、化合物がインスリンの効果を拮抗することを示している。

【００３４】
より詳細には、本発明のアッセイは次のように実施してもよい。安定なトランスフェクト細胞の培養物を候補化合物の存在下、適する成長培地の存在する適する条件のもと、インスリンの存在又は非存在下（アッセイを実施してインスリン擬態を同定するかアンタゴニストを同定するかに依存する）で既知の時間インキュベートする。例えば、５％CO_2を含有する加湿したインキュベーター中、３７℃で、Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅｓ培地（ＤＭＥＭ）又はＨＡＭＳ Ｆ１２培地などの成長培地中で適する時間（例えば、１５分～３時間）、細胞を候補化合物と共にインキュベートしてもよい。また、空気中、適するｐＨを維持するためＨＥＰＥＳ及び重炭酸ナトリウムを補給した培地中で、細胞を３７℃に維持する。全ての場合において、細胞には、インキュベーションの時間の間血清は添加しない。インスリンをその後に添加する場合は、これは例えば、５分～１時間までの間でよい。

【００３５】
キメラＩＲＡＰタンパク質の発現が誘導性プロモーターの制御に基づく場合は、ＩＲＡＰ－ＧＦ融合タンパク質は、誘導体を細胞に添加し、誘導体の添加から既知の時間インキュベーションを行うことにより誘導される。

【００３６】
インキュベーションの後、第一の検出法を用いて細胞表面に存在するキメラＩＲＡＰタンパク質の存在について細胞を分析する。次いで、発現したキメラＩＲＡＰ融合タンパク質の全体レベルを第二検出法を用いて決定する。第一検出法から得られる結果（典型的には、シグナル強度）を、第二検出法から得られる結果（同様に典型的には、シグナル強度）で割って、比を与える。この比は、生成データにおける追加の信頼性レベルを提供する。例えば、そのような比を計算することにより、視野にあるトランスフェクトされた細胞の数、誘導体による融合タンパク質発現の誘導レベル、及び細胞の健康（細胞が死んだりウェルの表面から見えなくなる場合はシグナル減少が観察される）の変動について補正することができる。この追加の補正の主要な結果は偽陽性頻度の減少である。

【００３７】
本発明のアッセイは、並行したアッセイを標準的なマルチウェルプレート上で自動化する高処理量スクリーニングアッセイとしての使用に適している。
また、本発明の第一及び第二の側面の方法は、候補化合物が、ＧＬＵＴ４小胞転座を引き起こすインスリン以外の刺激の効果を擬態するか又は拮抗するかどうかを決定するのに使

用してもよい。ＧＬＵＴ４小胞転座を引き起こすことができる他の刺激は、浸透ストレス（例えば、ソルビトールにより引き起こされうる）、非加水分解性ＧＴＰアナログの濃縮物（例えば、ＧＴＰγＳ）、ＡＭＰキナーゼ活性体（例えば、５－アミノ－４－イミダゾールカルボキサミドリボシド； ＡＩＣＡＲ）、及びチロシンフォスファターゼ阻害剤（例えば、バナデート）である。この代わりのアッセイにおいて、候補化合物とのインキュベーションの後に、細胞を代わりの刺激物、例えば、インスリンではなくソルビトールと接触させる。また、アッセイの方法論はインスリンのアンタゴニストを同定するためのアッセイと同じである。

【００３８】

本発明を現時点で以下の実施例を参照することにより説明する。

実施例１

ＧＬＵＴ４含有性小胞の形質膜へのインスリン誘導性転座の蛍光抗体法を用いた検出

この実施例で使用したＩＲＡＰ－ＧＦＰ構成体は、ＩＲＡＰ断片６６－５３３（出発部位から細胞外の「茎状」領域の末端まで）を用いて構築し、その断片は本発明者らが入手可能な部分的なｃＤＮＡ ＩＲＡＰクローンからの特異的なプライマーを用いてＰＣＲにより産出した。得られる断片をフランキング制限酵素部位を用いてｐｃＤＮＡ３ベクターへとクローニングした。また、Ｃ－末端 ｍｙｃ－タグを有するＧＦＰ３を、特異的なプライマーを用いてＰＣＲにより産出し、生成物をｐｃＤＮＡ３へとＩＲＡＰインサートの下流にクローニングした。

【００３９】

ＣＨＯ－Ｔ細胞にＩＲＡＰ－ＧＦＰ構成体をトランスフェクト又は顕微注射して、２４時間後に２００ｎＭインスリンの存在又は非存在下で３０分間刺激した。これをインスリンシグナル伝達の阻害剤（例えば、ウォルトマニン）での処理の前に行った。

【００４０】

その後、形質膜の表面上に曝露されたＧＦＰを可視化するためだけに、以下に説明するように、事前に易透化することなく、細胞を固定し抗ＧＦＰ抗体（Ｒｏｃｈｅ）で染色した。

【００４１】

細胞の免疫蛍光検査

ＰＢＳ中室温で２回洗浄後、４％（ｗ／ｖ）パラホルムアルデヒドを用いて室温で２０分間細胞を固定した。染色のため、固定した細胞を、３％（ｗ／ｖ）ＢＳＡを含有するＰＢＳ中に希釈した適当な抗体（この場合においては、抗ＧＦＰモノクローナル抗体）中で、３０分～１時間インキュベートしてから、ＴＲＩＴＣ複合二次抗体の１：２００希釈液中で３０分～１時間インキュベートした。全ての抗体インキュベーション工程の後、ＰＢＳ中で念入りに洗浄した。

【００４２】

全体のＩＲＡＰ－ＧＦＰ発現レベルはＧＦＰ蛍光のレベルで与えられる（これは本発明の第一の側面の第二の検出法に相当する）。細胞表面に曝露されたＩＲＡＰ－ＧＦＰは抗ＧＦＰ抗体での染色のレベルで与えられる（これは本発明の第一の側面の第一の検出法に相当する）。図１は、各々の検出法により得られる像の例を示している。

【００４３】

次いで、ＩＲＡＰ－ＧＦＰ蛍光による蛍光強度と表面ＩＲＡＰ－ＧＦＰ免疫染色とを、各々の処理条件について２０の視野において影像化された細胞から計算した。結果を表面：全ＩＲＡＰ－ＧＦＰの平均比で示す。得られる結果を表１及び図２に示す。

【００４４】

【表１】

表１

処理	平均 R/G	SD
基底	0.546	0.302
インスリン	1.252	0.514
ウォルトマニン	0.363	0.208

【００４５】
実施例２
３Ｔ３－Ｌ１含脂肪細胞におけるＧＬＵＴ４含有性小胞の形質膜へのインスリン誘導性転座の検出
３Ｔ３－Ｌ１繊維芽細胞の含脂肪細胞表現型への分化を以下のように行った：
３Ｔ３－Ｌ１繊維芽細胞（継代４～１２）を２２ｍｍのガラス製カバースリップ上に接種し、成長させて集合とした。１０％（ｖ／ｖ）ミオクローンプラス（ｍｙｏｃｌｏｎｅ－ｐｌｕｓ）ＦＣＳ、０．２５μＭ デクサメタゾン、０．５ｍＭ イソブチルメチルキサンチン及び１６６ｎＭ インスリンを含有するＤＭＥＭ中で２日間（０日～２日）、含脂肪細胞への分化を誘導した。更に２日間（２日～４日）、この培地を１０％（ｖ／ｖ）ミオクローンプラスＦＣＳ及び１６６ｎＭ インスリンを含有するＤＭＥＭと取り替えた。４日から先は１０％（ｖ／ｖ）ミオクローンプラスＦＣＳを含有するＤＭＥＭ中に細胞を維持し、２日ごとに培地を取り替えた。分化の開始後７日～１０日は、３Ｔ３－Ｌ１含脂肪細胞を使用した。
【００４６】
分化した３Ｔ３－Ｌ１含脂肪細胞に実施例１で使用したＩＲＡＰ－ＧＦＰ構成体（ｐｃＤＮＡ３）を顕微注射した。
顕微注射は、エッペンドルフ半自動システム（エッペンドルフ５１７１及びエッペンドルフ５４２４圧力インジェクタ）及びＺｅｉｓｓ Ａｘｉｏｖｅｒｔ １００ＴＶ反転顕微鏡を用いて行った。マイクロピペット（外径０．２～０．５μｍ）を、Ｓｕｔｔｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｃｏ． Ｍｏｄｅｌ Ｐ－９７ニードル抜き器を用いてホウケイ酸ガラス製キャピラリ（ＧＣ１２０Ｆ－１０；Ｃｌａｒｋ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）から抜いた。プラスミドを、インジェクション時間０．２～１．０ｓ、６０～２００ｈＰａの圧力で、０．２×ＴＥバッファー中２０～２００μｇ／ｍｌで顕微注射した。顕微注射の間、ｐＨ７．４の２５ｍＭ ＨＥＰＥＳ及び２ｍＭ $NaHCO_3$を補給した成長培地中で細胞をインキュベートした。顕微注射後、１００ｎＭインスリンの存在又は非存在下で３０分間刺激する前に２時間血清が枯渇しないうちに、細胞を適する成長培地中３７℃で１６～２４時間インキュベートして、注射したプラスミドＤＮＡにより符号化されたタンパク質を発現させた。
【００４７】
その後、これまでに説明したように、表面上に曝露されたＧＦＰを可視化するためだけに、事前に易透化することなく、４％パラホルムアルデヒド中で細胞を固定し、抗ＧＦＰ抗体で染色した。
【００４８】
ＩＲＡＰ－ＧＦＰ発現の全レベルは、検出されたＧＦＰ蛍光のレベルにより指示される（これは本発明の第一の側面の第二検出法に相当する）。細胞表面で曝露されたＩＲＡＰ－ＧＦＰは、抗ＧＦＰ抗体での染色のレベルにより与えられる（これは本発明の第一の側面の第一検出法に相当する）。ＩＲＡＰ－ＧＦＰを発現する顕微注射された細胞を、１６×対物レンズを用いた共焦顕微鏡により影像化した。図３は、各々の検出法により得ることができる像の例を示す。ＩＲＡＰ－ＧＦＰ蛍光による蛍光強度と表面ＩＲＡＰ－ＧＦＰ蛍光染色とを、Ｌｅｉｃａ Ｃｏｎｆｏｃａｌ Ｓｏｆｔｗａｒｅを用いて各々の個々の細胞について計算し、バックグラウンドの蛍光像を控除した。各々の細胞について、バックグ

ラウンド補正した表面ＩＲＡＰ－ＧＦＰ：全ＩＲＡＰ－ＧＦＰの比を計算した。得られた結果を図４に説明する。各々のデータ点は、一つの細胞についての赤色：緑色蛍光比を表す。表面ＩＲＡＰ－ＧＦＰ：全ＩＲＡＰ－ＧＦＰの比が高いということは、細胞がＩＲＡＰ－ＧＦＰの形質膜への転座を受けていることを示している。図４は、インスリン存在下において、有意な割合の細胞がこの方法を用いて検出可能な転座を受けていることを示している。

【図面の簡単な説明】

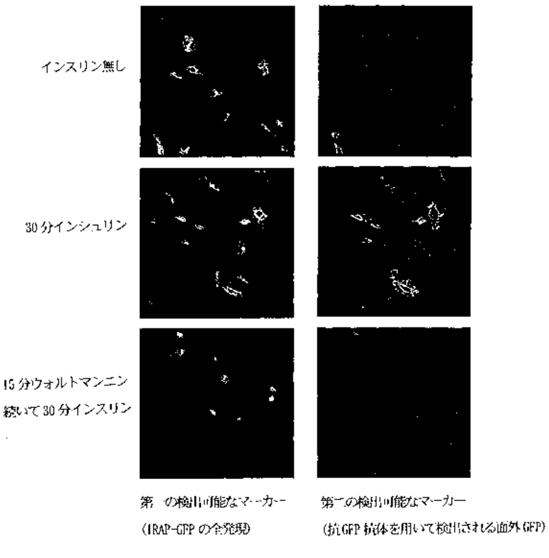
【図１】図１は、抗ＧＦＰ抗体を用いて映像化されたＣＨＯ－Ｔ細胞におけるＩＲＡＰ－ＧＦＰのインスリン誘発性転座を説明する代表的な像を示す図である。

【図２】図２は、インスリン処理後の抗ＧＦＰ抗体のＩＲＡＰ－ＧＦＰ構成体を発現する未易透化ＣＨＯ－Ｔ細胞表面への結合の増加を示す図である。

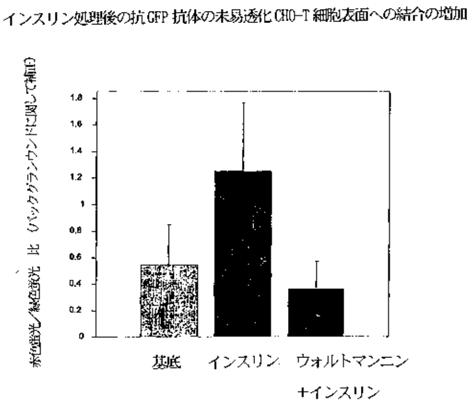
【図３】図３は、各々の検出法により得ることができる像の例を示す図である。

【図４】図４は、インスリン処理後の抗ＧＦＰ抗体の未易透化３Ｔ３－Ｌ１含脂肪細胞表面への結合の増加を表す図である。

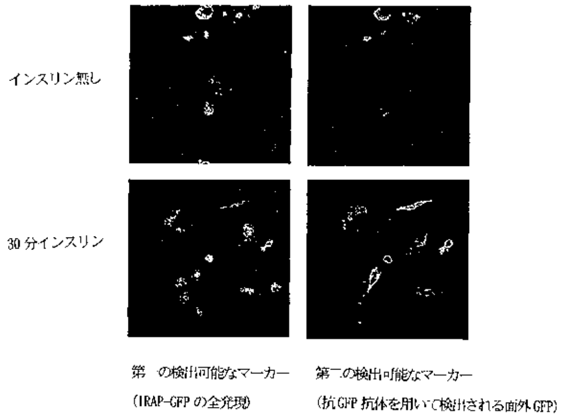
【図１】



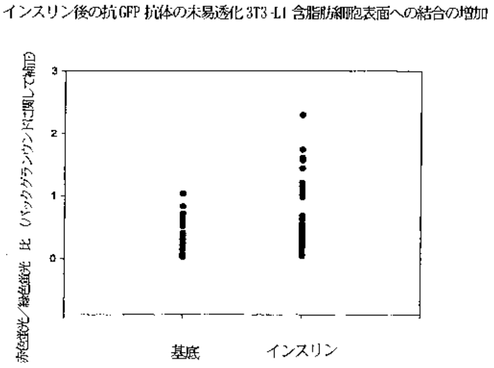
【図２】



【図３】


インスリン無し
30分インスリン
第一の検出可能なマーカー
(IRAP-GFPの全発現)
第二の検出可能なマーカー
(抗GFP抗体を用いて検出される面外GFP)

【図４】


インスリン後の抗GFP抗体の未易透化3T3-L1含脂肪細胞表面への結合の増加
赤色蛍光／緑色蛍光 比 (バックグラウンドに関して補正)
3
2
1
0
基底
インスリン

【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
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96867 A2

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/GB01/02683

(22) International Filing Date: 18 June 2001 (18.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0014838.7 16 June 2000 (16.06.2000) GB

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **UNIVERSITY OF BRISTOL** [GB/GB]; Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **FLETCHER, Laura, Margaret** [GB/GB]; University of Bristol, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, Bristol BS8 1TD (GB). **TAVARE, Jeremy, Myles** [GB/GB]; University of Bristol, School of Medical Sciences, Dept. of Biochemistry, Bristol BS8 1TD (GB).

(74) Agent: **NASH, David, Allan**; Haseltine Lake & Co., Imperial House, 15-19 Kingsway, London WC2B 6UD (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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, 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).

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

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:** AN ASSAY

(57) **Abstract:** There is disclosed a method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin, comprising: (a) providing a transfected host cell comprising a nucleic acid sequence which encodes a protein construct comprising an IRAP protein moiety and a detectable protein moiety, wherein the detectable protein moiety is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and further wherein the detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the protein moiety when located exofacially but not when located intracellularly and a second detection method capable of detecting the protein moiety both when located exofacially and when located intracellularly, (b) contacting the transfected host cell with a candidate compound; (c) measuring the amount of the exofacial protein moiety by the said first detection method and measuring the total amount of exofacial and intracellular detectable protein moiety by the said second detection method; and (d) comparing the amount of exofacial detectable protein moiety with the total amount of exofacial and intracellular detectable protein moiety to provide a measure of the extent of GLUT4 vesicle translocation. In an alternative method, the protein construct comprises an IRAP protein moiety, a first detectable protein moiety which is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and a second detectable protein moiety which is fused to a cytoplasmic domain of the IRAP protein moiety, wherein the first detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the first protein moiety when located exofacially but not when located intracellularly and wherein the second detectable protein moiety is capable of being assayed by a second detection method capable of detecting the second protein moiety when located intracellularly. The assays of the invention may be used to determine whether a "candidate compound" is a mimic or antagonist of insulin. The present invention may be used to test libraries of compounds in an automated high throughput screen.

WO 01/96867 A2

AN ASSAY

This invention relates to a method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin. In particular, in accordance with the present invention, the level of GLUT4 vesicle translocation can be quantified after insulin stimulation of host cells which express a chimeric IRAP protein. The method of the invention may, in particular, be used in a high-throughput screening method in the search for drugs that may potentially influence the action of insulin on glucose uptake.

Background of the Invention

Insulin stimulated glucose uptake is the major physiologically relevant effect of insulin. If a compound could be discovered that specifically increased glucose uptake into cells this would have considerable benefit for the treatment of both type I and type II diabetes.

Two glucose transporters exist (GLUT1 and GLUT4) in insulin responsive fat and muscle cells. Insulin stimulates glucose uptake into muscle and fat cells by promoting the translocation of these transporters from an intracellular sequestered localisation to the plasma membrane. The most important effect in terms of net glucose uptake is the translocation of GLUT4. Furthermore, as GLUT1 is ubiquitously expressed (GLUT4 is restricted to muscle and adipose cells) then any effective treatment of diabetes must necessarily be specific for promoting the translocation of GLUT4.

Traditional assays of glucose uptake using radioactive glucose, or ligand binding assays such as tritiated cytochalasin B binding or the binding of tritiated or biotinylated bis-mannose labels (which directly bind to cell surface glucose transporters), do not distinguish an effect of insulin on either GLUT1 or

GLUT4.

WO 95/09240 discloses a chimeric GLUT transporter including a GLUT transporter polypeptide fused to a detectable heterologous polypeptide. The chimeric GLUT transporter disclosed may be used in a method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin.

Insulin-responsive aminopeptidase (IRAP) is a component of GLUT4-containing vesicles and is involved in the insulin-signalling pathway. IRAP and GLUT4 completely co-localise. Reference is made to WO96/09317 which refers to this aminopeptidase as "GTVap".

Thurmond et al., J. Biol. Chem. 273, 33876-33883 (1998), describe an experiment in which increased expression of Munc18c inhibits insulin-stimulated translocation of eGFP-IRAP/vp165 in 3T3L1 adipocytes.

Summary of the Invention

According to a first aspect of the present invention, there is provided a method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin, comprising:

(a) providing a transfected host cell comprising a nucleic acid sequence which encodes a protein construct comprising an IRAP protein moiety and a detectable protein moiety, wherein the detectable protein moiety is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and further wherein the detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the protein moiety when located exofacially but not when located intracellularly and a second detection method capable of detecting the protein moiety both when located exofacially and when located intracellularly;

(b) contacting the transfected host cell with a

candidate compound;

(c) measuring the amount of the exofacial protein moiety by the said first detection method and measuring the total amount of exofacial and intracellular detectable protein moiety by the said second detection method; and

(d) comparing the amount of exofacial detectable protein moiety with the total amount of exofacial and intracellular detectable protein moiety to provide a measure of the extent of GLUT4 vesicle translocation.

According to a second aspect of the present invention, there is provided a method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin, comprising:

(a) providing a transfected host cell comprising a nucleic acid sequence which encodes a protein construct comprising an IRAP protein moiety, a first detectable protein moiety which is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and a second detectable protein moiety which is fused to a cytoplasmic domain of the IRAP protein moiety, wherein the first detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the first protein moiety when located exofacially but not when located intracellularly and wherein the second detectable protein moiety is capable of being assayed by a second detection method capable of detecting the second protein moiety when located intracellularly;

(b) contacting the transfected host cell with a candidate compound;

(c) measuring the amount of the first protein moiety by the said first detection method representing the amount of the first protein moiety located exofacially and measuring the amount of the second

detectable protein moiety by the said second detection method representing the total amount of the second detectable protein moiety; and

(d) comparing the amount of exofacial first detectable protein moiety with the total amount of the second detectable protein moiety to provide a measure of the extent of GLUT4 vesicle translocation.

The measurements in step (c) of each of the first and second aspects of the invention may be carried out simultaneously or sequentially. Where they are carried out sequentially, the order in which they are carried out is unimportant.

As used herein, the expression "located exofacially" means positioned on the extracellular face of the plasma membrane. The expression "located intracellularly" refers to the relevant protein moiety being located within the cell which includes being located on the cytosolic face of the plasma membrane as well as within vesicles within the cell itself.

The assays of the first and second aspects of the invention may be used to determine whether a "candidate compound" (which may include a mixture of compounds), for example as may be found in a compound library, is a mimic or antagonist of insulin. The present invention may be used to test libraries of compounds in an automated high throughput screen. The assays of the invention are of most interest in identifying candidate compounds which are antagonists of insulin; such compounds are of major pharmaceutical interest.

Where the method of the invention is used to identify an antagonist of insulin, the method will also include a step in which insulin is added. Insulin may be added either before or after the transfected host cell is contacted with the candidate compound. Preferably, insulin is added after the transfected host

cell is contacted with the candidate compound.

Where the method of the invention is used to identify an insulin mimic, insulin is not introduced into the test system.

According to a third aspect of the invention, there is provided a chimeric IRAP protein comprising an IRAP protein moiety and a detectable protein moiety, wherein the detectable protein moiety is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and further wherein the detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the protein moiety when located exofacially in a cell but not when located intracellularly and a second detection method capable of detecting the protein moiety both when located exofacially in a cell and when located intracellularly.

According to a fourth aspect of the invention, there is provided a chimeric IRAP protein comprising (a) an IRAP protein moiety, (b) a first detectable protein moiety which is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety, said first detectable protein moiety being capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the protein moiety when located exofacially in a cell but not when located intracellularly, and (c) a second detectable protein moiety which is fused to a cytoplasmic domain of the IRAP protein moiety, said second detectable protein moiety being capable of being assayed by a second detection method capable of detecting the protein moiety when located intracellularly.

According to a fifth aspect of the invention, there is provided a DNA molecule which encodes the chimeric IRAP protein of the third or fourth aspect of the invention.

Brief description of the drawing

Figure 1 displays representative images demonstrating insulin-induced translocation of IRAP-GFP in CHO-T cells visualised using anti-GFP antibodies; and

Figure 2 shows the increase in binding of anti-GFP antibodies to surface of unpermeabilised CHO-T cells expressing an IRAP-GFP construct after insulin treatment.

Detailed Description of the Invention

The method of the first aspect of the invention, in general terms, consists of transfecting insulin-sensitive cells with an IRAP construct which encodes a chimeric IRAP polypeptide containing a detectable protein moiety fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety. The detectable protein moiety is detectable by a first detection method which is capable of detecting the protein moiety when it has been translocated from its starting location in intracellular GLUT4 vesicles to the cell surface membrane where the detectable protein moiety will lie exofacially (that is to say positioned extracellularly), but which method is not capable of detecting the detectable protein moiety when it has not been so translocated and hence lies intracellularly. The detectable protein moiety is also detectable by a second detection method which is capable of detecting the protein moiety both when it has been translocated to an exofacial location and also when it has not been so translocated and hence lies intracellularly.

Thus, when a transfected host cell expresses the chimeric IRAP polypeptide, the effect of insulin on GLUT4 translocation can be quantified in an assay by comparing the amount of the detectable protein moiety detected using the first detection method with the amount of detectable protein moiety which is detected

by the second detection method. An advantage of the double detection approach employed in the present invention is that it allows one to correct for variations in IRAP expression level, and so adds an extra level of confidence to the assay. The invention can be used to screen for drugs which mimic or antagonize the effect of insulin.

The method of the second aspect of the invention is comparable with the first, with the exception that the chimeric IRAP protein includes two detectable protein moieties, one fused to the luminal domain and one fused to the cytoplasmic domain of the IRAP protein moiety.

The first detection method is preferably an immunological detection method in which an antibody epitope on the detectable protein moiety is detected using a labelled antibody having a high affinity for the epitope. Alternatively, the detectable protein moiety may be detected using a first antibody having a high affinity for the epitope tag and a second fluorescently labelled antibody having a high affinity for the first antibody. Such immunological assays will only detect the detectable protein moiety when located exofacially. Immunological assays of this type are well known in the art. Suitable labelled antibodies may be made by procedures known in the art.

The epitope on the detectable protein moiety which is to be detected by the first detection method may be one which is a natural epitope of the detectable protein moiety; thus, where the detectable protein moiety is a GFP protein moiety, this will contain a number of epitopes to which a specific antibody may be raised. As an alternative, the detectable protein moiety may be engineered to include a suitable epitope tag, such as a haemagglutinin (HA), c-myc, FLAG, Glu-

Glu or His_6 epitope tag.

The second detection method is preferably one which relies on the generation of a characteristic emission spectrum, which is distinguishable from that which may be obtained using the first detection method, which can then be analysed by a suitable device such as a spectrophotometer. For example, the detectable protein moiety may comprise a fluorescent protein moiety, such as a green fluorescent protein (GFP) or the like. A fluorescent protein as used herein refers to a protein capable of fluorescence when excited with appropriate electromagnetic radiation and includes fluorescent proteins whose amino acid sequences are either natural or engineered. Such fluorescent protein moieties generate a characteristic emission spectrum in response to excitation at a particular wavelength and so will inherently assay the total amount of the protein moiety in the system under analysis.

A green fluorescent protein, as used herein, is a protein that fluoresces green light. A blue fluorescent protein (which may also be used in the invention) is a protein that fluoresces blue light. GFPs have been isolated from the Pacific Northwest jellyfish, Aequorea victoria, the sea pansy, Renilla reniformis, and Phialidium gregarium. W. W. Ward et al., Photochem. Photobiol., 35:803-808 (1982); L. D. Levine et al., Comp. Biochem. Physiol., 72B:77-85 (1982).

A variety of Aequorea-related GFPs having useful excitation and emission spectra have been engineered by modifying the amino acid sequence of a naturally occurring GFP from Aequorea victoria. (D. C. Prasher et al., Gene, 111:229-233 (1992); R. Heim et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:12501-04 (1994)).

Another fluorescent protein which may be used in

the invention is red fluorescent protein isolated from the IndoPacific sea anemone relative Discosoma striata and available from Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Ca., USA.

Other suitable detectable protein moieties are those which rely on a substrate for generation of a signal. For example, the enzyme luciferase when contacted with its substrate luciferin generates a characteristic emission spectrum. Another example is a detectable protein moiety based on β-galactosidase which, when contacted with its substrate, yields a characteristic emission. In both of these examples it is necessary to select a protein moiety/substrate combination which allows the total amount of the protein moiety to be assayed. More particularly, this means that the substrate must be one which is membrane permeable in order that the substrate may diffuse into cells to enable the necessary reaction between substrate and protein moiety to take place.

It is presently preferred that the detectable protein moiety of the method of the first aspect of the invention is a fluorescent protein moiety such as a green fluorescent protein which replaces the amino peptidase domain of IRAP in the chimeric protein. This may be assayed immunologically by way of a labelled antibody specific for an epitope of the fluorescent protein moiety, and fluorometrically using a standard fluorimeter.

In the case of the method of the second aspect of the invention, it is presently preferred that the first detectable protein moiety is a protein moiety including an epitope tag as described above and the second detectable protein moiety is a fluorescent protein moiety such as a green fluorescent protein which replaces the amino peptidase domain of IRAP in the

chimeric protein.

The nucleic acid construct coding for the chimeric IRAP protein may be made by standard techniques of molecular biology. The DNA sequence of the IRAP protein encodes a protein which contains a cytoplasmic domain (amino acid residues 1 to 109), a trans-membrane portion (amino acid residues 110 to 131) and a luminal portion (amino acid residues 132-916 of which residues 132-154 represent a "stalk" and residues 155-916 the amino peptidase catalytic domain). DNA sequences encoding part or all of the IRAP protein may be engineered by known methods to include a nucleic acid sequence encoding the detectable protein moiety (or detectable protein moieties) such that the protein product expressed by the construct comprises the IRAP protein moiety fused to the detectable protein moiety (or detectable protein moieties). Thus, for example, DNA sequences coding for functional fluorescent protein moieties are available commercially and may be used to synthesise nucleic acid constructs coding for the chimeric IRAP protein of the invention. Additionally, construction of suitable vectors containing the desired coding and control sequences employs standard techniques that are well understood in the art.

In the DNA construct, a DNA sequence coding for the detectable protein moiety is joined at the end of the DNA sequence coding for the luminal portion of the IRAP protein (in other words, the whole of the DNA sequence coding for the luminal portion of the IRAP protein remains intact) or replaces all or a part of the DNA sequence coding for the luminal portion of the IRAP protein.

In a preferred embodiment of the invention, a DNA sequence encoding an incomplete IRAP protein missing its catalytic amino peptidase domain is used to

synthesise a suitable DNA construct coding for the chimeric IRAP protein; thus, in the resultant DNA construct, the sequence coding for the amino peptidase domain of IRAP is replaced by a sequence coding for the detectable protein moiety. Experimental results demonstrate that the protein expressed by such a DNA construct traffics and responds to insulin in a manner indistinguishable from endogenous IRAP and GLUT4 itself.

A host cell is transfected with a suitable vector including the DNA encoding the chimaeric IRAP construct by methods known in the art. Nucleic acids used to transfect cells with sequences coding for expression of the chimeric IRAP protein generally will be in the form of an expression vector including expression control sequences operatively linked to a nucleotide sequence coding for expression of the polypeptide. As used, the term "nucleotide sequence coding for expression of" a polypeptide refers to a sequence that, upon transcription and translation of mRNA, produces the polypeptide. This can include sequences containing, e.g., introns. As used herein, the term "expression control sequences" refers to nucleic acid sequences that regulate the expression of a nucleic acid sequence to which it is operatively linked. Expression control sequences are operatively linked to a nucleic acid sequence which the expression control sequences control and regulate the transcription and, as appropriate, translation of the nucleic acid sequence. Thus, expression control sequences can include appropriate promoters, enhancers, transcription terminators, a start codon (i.e., ATG) in front of a protein-encoding gene, splicing signals for introns, maintenance of the correct reading frame of that gene to permit proper translation of the mRNA, and stop codons. Since long

term expression of the chimeric IRAP protein may be toxic to cells, it is convenient if the expression of the or each construct is under the control of an inducible promoter, such as tetracycline responsive promoters (e.g. the Clontech T-Rex system), Ecdysone-based systems and the well known metallothionein promoter.

The resultant transfected host cell expresses the chimeric IRAP protein, preferably under the control of an inducible promoter. Suitable host cells which may be transfected to produce a stable cell line include adipocytes, for example 3T3-L1 adipocytes, skeletal muscle cells or any other insulin-responsive cell.

The transfected host cells expressing the chimeric IRAP protein may be used in an assay for determining whether a candidate compound mimics or antagonizes the effects of insulin.

In an assay for determining whether a candidate compound mimics the effects of insulin, the assay in accordance with the first or second aspect of the invention is carried out in the absence of insulin and the extent of GLUT4 vesicle translocation is compared with that which occurs in a control experiment from which the candidate compound (and insulin) is absent. A degree of GLUT4 vesicle translocation greater than the control indicates a compound which is a mimic of insulin.

In an assay for determining whether a candidate compound antagonizes the effects of insulin, the assay in accordance with the first aspect or the second aspect of the invention is carried out in the presence of insulin and the extent of GLUT4 vesicle translocation is compared with that which occurs in a control experiment in which the candidate compound is absent (but in the presence of the same concentration

of insulin). A degree of GLUT4 vesicle translocation less than the control indicates a compound which is antagonizes the effects of insulin.

In more detail, the assay of the invention may be carried out as follows. A culture of the stable transfected cells is incubated in the presence of a candidate compound under suitable conditions in the presence of a suitable growth medium, with or without insulin (depending on whether the assay is being carried out to identify an insulin mimic or antagonist), for a known period of time. For example, cells may be incubated with the candidate compound for a suitable length of time (e.g. 15 min - 3 hr) in a growth medium such as Dulbecco's Modified Eaglés Medium (DMEM) or HAMS F12 medium at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO_2. Alternatively, the cells would be maintained at 37°C in air and the medium supplemented by HEPES and sodium bicarbonate in order to maintain a suitable pH. In all cases, the cells would be in the absence of added serum for the incubation time. If insulin is subsequently added, this may for example be for a period of from 5 minutes up to an hour.

Where expression of the chimeric IRAP protein is under the control of an inducible promoter, the IRAP-GFP fusion protein will be induced by addition of inducer to the cells and the incubation carried out for a known period of time from addition of the inducer.

After the incubation period, the cells are analysed for the presence of the chimeric IRAP protein present at the cell surface using the first detection method. The total level of the chimeric IRAP fusion protein expressed is then determined using the second detection method. The result, typically a signal intensity, obtained from the first detection method

will be divided by the result, again typically a signal intensity, obtained from the second detection method to provide a ratio. This ratio provides an additional level of confidence in the data generated. For example, calculating such a ratio allows one to correct for any variabilities in the number of transfected cells in the field of view, the level of induction of expression of the fusion protein by inducer, and the health of the cells (a decrease in signal will be observed if cells die or drop off the surface of the well). A major result of this additional correction is a decrease in the frequency of false positives.

The assay of the invention is suitable for use as a high throughput screening assay in which parallel assays may be automated on standard multiwell plates.

The methods of the first and second aspects of the invention may also be used to determine whether a candidate compound mimics or antagonizes the effect of a stimulus other than insulin which causes GLUT4 vesicle translocation. Other stimuli which can cause GLUT4 vesicle translocation are osmotic stress (for example which may be caused by sorbitol), concentrations of non-hydrolysable GTP analogues (e.g. GTPγS), AMP kinase activators (e.g. 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside; AICAR) and tyrosine phosphatase inhibitors (e.g. vanadate). In this alternative assay, the cells would be contacted with an alternative stimulant, for example sorbitol rather than insulin, after incubation with the candidate compound. Otherwise, the methodology of the assay is the same as for the assay for identifying antagonists of insulin.

The invention will now be illustrated by reference to the following examples.

Example 1

Detection of insulin-induced translocation of GLUT4-containing vesicles to the plasma membrane using immunofluorescence

The IRAP-GFP construct used in this example was constructed using an IRAP fragment 66-533(from the start site to the end of the extracellular 'stalk' region) which was generated by PCR using specific primers from a partial cDNA IRAP clone available to the inventors. The resulting fragment was cloned into the pcDNA3 vector using the flanking restriction enzyme sites. GFP3 with a C-terminal myc-tag was also generated by PCR using specific primers and the product cloned into pcDNA3 downstream of the IRAP insert.

CHO-T cells were transfected or microinjected with the IRAP-GFP construct and 24h later were stimulated without or with 200nM insulin for 30 min. This was preceded by treatment with an inhibitor (e.g. wortmannin) of insulin signalling.

Subsequently cells were fixed and stained with anti-GFP antibodies (Roche) without prior permeabilisation, as described below, in order to visualise GFP exposed on the surface of the plasma membrane only.

Immunofluorescence of cells

After washing twice in PBS at room temperature, cells were fixed using 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. For staining, fixed cells were incubated in the appropriate antibodies (in this case anti-GFP monoclonal antibodies) diluted in PBS containing 3% (w/v) BSA for 30 min to 1 h followed by incubation in a 1:200 dilution of the TRITC-conjugated secondary antibody for 30 min to 1 h. All antibody incubation steps were followed by extensive washes in PBS.

The total IRAP-GFP expression level is given by the level of GFP fluorescence (and this corresponds to the second detection method of the first aspect of the invention). The IRAP-GFP exposed at the cell surface is given by the level of staining with the anti-GFP antibodies (and this corresponds to the first detection method of the first aspect of the invention). Figure 1 shows examples of the images that may be obtained by each detection method.

Fluorescence intensity due to IRAP-GFP fluorescence and surface IRAP-GFP immunostaining was then computed from cells imaged in 20 fields of view for each treatment condition. Results are expressed as an average ratio of surface : total IRAP-GFP. The results obtained are shown in Table 1 and Figure 2.

Table 1

TREATMENT	MEAN R/G	SD
Basal	0.546	0.302
Insulin	1.252	0.514
Wortmannin	0.363	0.208

Example 2

Detection of insulin-induced translocation of GLUT4-containing vesicles to the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes.

Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts into the adipocyte phenotype was performed as follows:

3T3-L1 fibroblasts (between passages 4 and 12) were seeded onto 22mm glass coverslips and allowed to grow to confluence. Differentiation into adipocytes was induced in DMEM containing 10% (v/v) myoclone-plus FCS, 0.25 μM dexamethasone, 0.5 mM

isobutylmethylxanthine and 166 nM insulin for 2 days (day 0 to day 2). This medium was replaced with DMEM containing 10% (v/v) myoclone-plus FCS and 166 nM insulin for a further 2 days (day 2 to day 4). From day 4 onwards cells were maintained in DMEM containing 10 % (v/v) myoclone-plus FCS, replacing the medium every two days. 3T3-L1 adipocytes were used between day 7 and day 10 after initiation of differentiation.

Differentiated 3T3-L1 adipocytes were microinjected with the IRAP-GFP construct used in Example 1 (pcDNA3).

Microinjection was carried out using an Eppendorf semi-automatic system (Eppendorf 5171 micromanipulator and Eppendorf 5424 pressure injector) and a Zeiss Axiovert 100TV inverted microscope. Micropipettes (0.2 to 0.5 μm external diameter) were pulled from glass borosilicate capillaries (GC120F-10; Clark Biomedical Instruments) using a Sutter Instrument Co. Model P-97 needle puller. Plasmids were microinjected at 20-200 μg/ml in 0.2x TE buffer with an injection time of 0.2-1.0 s and at 60-200 hPa pressure. During the period of microinjection, cells were incubated in growth medium supplemented with 25 mM HEPES pH 7.4 and 2 mM $NaHCO_3$. After microinjection, the cells were incubated at 37°C in the appropriate growth medium for 16-24 h to allow expression of protein encoded by the injected plasmid DNA, before being serum-starved for 2 hours prior to stimulation with or without 100nM insulin for 30 minutes.

Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with anti-GFP antibodies, as previously described, without prior permeabilisation, in order to visualise GFP exposed on the surface only.

The total level of the IRAP-GFP expression is

indicated by the level of GFP fluorescence detected (this corresponds to the second detection method of the first aspect of the invention). The IRAP-GFP exposed at the cell surface is given by the level of staining with the anti-GFP antibodies (and this corresponds to the first detection method of the first aspect of the invention). Microinjected cells expressing IRAP-GFP were imaged by confocal microscopy using a 16x objective. Figure 3 shows examples of the images that may be obtained by each detection method. The fluorescence intensity due to IRAP-GFP fluorescence and surface IRAP-GFP immunostaining was computed for each individual cell, using Leica Confocal Software, and a background fluorescence figure subtracted. For each cell, the ratio of background corrected surface: total IRAP-GFP was calculated. The results obtained are illustrated in Figure 4. Each data point represents the red:green fluorescence ratio for one cell. A high ratio of surface:total IRAP-GFP indicates that the cell has undergone a translocation of IRAP-GFP to the plasma membrane. Figure 4 demonstrates that in the presence of insulin, a significant proportion of cell undergo translocation detectable using this method.

CLAIMS:

1. A method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin, comprising:

(a) providing a transfected host cell comprising a nucleic acid sequence which encodes a protein construct comprising an IRAP protein moiety and a detectable protein moiety, wherein the detectable protein moiety is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and further wherein the detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the protein moiety when located exofacially but not when located intracellularly and a second detection method capable of detecting the protein moiety both when located exofacially and when located intracellularly;

(b) contacting the transfected host cell with a candidate compound;

(c) measuring the amount of the exofacial protein moiety by the said first detection method and measuring the total amount of exofacial and intracellular detectable protein moiety by the said second detection method; and

(d) comparing the amount of exofacial detectable protein moiety with the total amount of exofacial and intracellular detectable protein moiety to provide a measure of the extent of GLUT4 vesicle translocation.

2. A method according to claim 1, wherein an antibody epitope is present on the detectable protein moiety, said epitope being detectable by the first detection method which is an immunological detection method.

3. A method according to claim 2, wherein the immunological detection method comprises a step in which the antibody epitope is labelled using a

fluorescently labelled antibody having a high affinity for the epitope.

4. A method according to claim 2, wherein the immunological detection method comprises a first step in which the antibody epitope is labelled using a first antibody having a high affinity for the epitope and a second step in which the first antibody is detected by a fluorescently labelled second antibody having a high affinity for the first antibody.

5. A method according to any preceding claim, wherein the detectable protein moiety is one which is capable of generating a characteristic emission spectrum detectable by the said second detection method.

6. A method according to claim 5, wherein the detectable protein moiety is a fluorescent protein moiety.

7. A method according to claim 6, wherein the fluorescent protein moiety is a green fluorescent protein.

8. A method of determining whether a candidate compound mimics or antagonizes effects of insulin, comprising:

(a) providing a transfected host cell comprising a nucleic acid sequence which encodes a protein construct comprising an IRAP protein moiety, a first detectable protein moiety which is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and a second detectable protein moiety which is fused to a cytoplasmic domain of the IRAP protein moiety, wherein the first detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the first protein moiety when located exofacially but not when located intracellularly and wherein the second detectable protein moiety is capable

of being assayed by a second detection method capable of detecting the second protein moiety when located intracellularly;

(b) contacting the transfected host cell with a candidate compound;

(c) measuring the amount of the first protein moiety by the said first detection method representing the amount of the first protein moiety located exofacially and measuring the amount of the second detectable protein moiety by the said second detection method representing the total amount of the second detectable protein moiety; and

(d) comparing the amount of exofacial first detectable protein moiety with the total amount of the second detectable protein moiety to provide a measure of the extent of GLUT4 vesicle translocation.

9. A method according to claim 8, wherein the first detectable protein moiety comprises an antibody epitope, said epitope being detectable by the first detection method which is an immunological detection method.

10. A method according to claim 9, wherein the immunological detection method comprises a step in which the antibody epitope is labelled using a fluorescently labelled antibody having a high affinity for the epitope.

11. A method according to claim 9, wherein the immunological detection method comprises a first step in which the antibody epitope is labelled using a first antibody having a high affinity for the epitope and a second step in which the first antibody is detected by a fluorescently labelled second antibody having a high affinity for the first antibody.

12. A method according to claim 8, 9, 10 or 11, wherein the second detectable protein moiety is one

which is capable of generating a characteristic emission spectrum detectable by the said second detection method.

13. A method according to claim 12, wherein the second detectable protein moiety is a fluorescent protein moiety.

14. A method according to claim 13, wherein the fluorescent protein moiety is a green fluorescent protein.

15. A method according to any preceding claim which is a method of identifying an antagonist of insulin, and which further includes a step in which insulin is added before or after the transfected host cell is contacted with the candidate compound.

16. A method according to claim 15, wherein insulin is added after the transfected host cell is contacted with the candidate compound.

17. An insulin antagonist or mimic when identified by the method of any preceding claim.

18. A chimeric IRAP protein comprising an IRAP protein moiety and a detectable protein moiety, wherein the detectable protein moiety is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety and further wherein the detectable protein moiety is capable of being assayed by a first detection method capable of detecting the protein moiety when located exofacially in a cell but not when located intracellularly and a second detection method capable of detecting the protein moiety both when located exofacially in a cell and when located intracellularly.

19. A chimeric IRAP protein comprising (a) an IRAP protein moiety, (b) a first detectable protein moiety which is fused to a luminal domain of the IRAP protein moiety, said first detectable protein moiety being capable of being assayed by a first detection

method capable of detecting the protein moiety when located exofacially in a cell but not when located intracellularly, and (c) a second detectable protein moiety which is fused to a cytoplasmic domain of the IRAP protein moiety, said second detectable protein moiety being capable of being assayed by a second detection method capable of detecting the protein moiety when located intracellularly.

20. A DNA molecule which encodes the chimeric IRAP protein of claim 18 or 19.

Figure 1

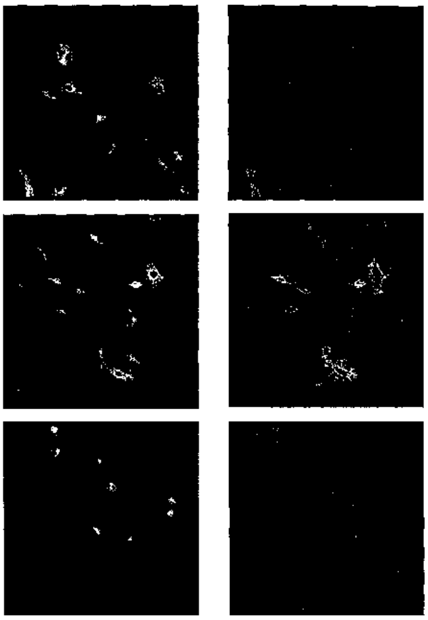

In the absence
of insulin
30 min insulin
15 min wortmannin
followed by
30 min insulin
First detectable marker
(total expression
of IRAP-GFP)
Second detectable marker
(exofacial GFP detected
using anti-GFP antibodies)

Figure 2

Increased binding of anti-GFP antibody to the surface of unpermeabilised CHO-T cells after insulin treatment

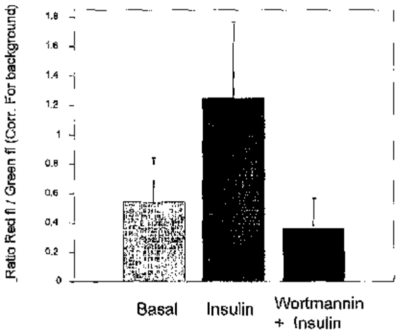


Figure 3

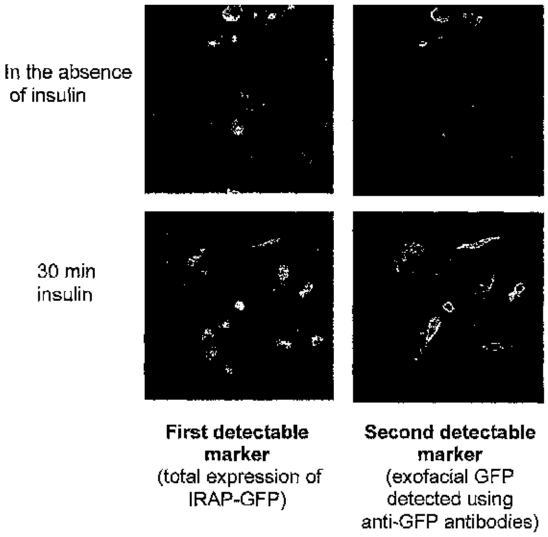
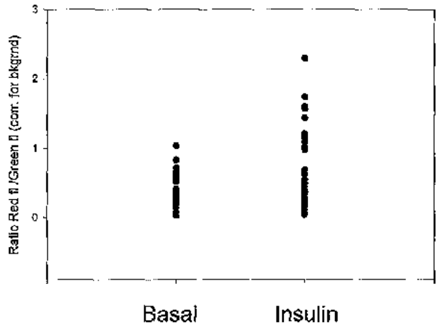

In the absence of insulin
30 min insulin
First detectable marker
(total expression of IRAP-GFP)
Second detectable marker
(exofacial GFP detected using anti-GFP antibodies)

Figure 4

Increase in binding of anti-GFP Ab to the surface of unpermeabilised 3T3-L1 adipocytes after insulin



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96867 A3

(51) International Patent Classification[7]: G01N 33/74, C12N 15/62

(21) International Application Number: PCT/GB01/02683

(22) International Filing Date: 18 June 2001 (18.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0014838.7 16 June 2000 (16.06.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF BRISTOL [GB/GB]; Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): FLETCHER, Laura, Margaret [GB/GB]; University of Bristol, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, Bristol BS8 1TD (GB). TAVARE, Jeremy, Myles [GB/GB]; University of Bristol, School of Medical Sciences, Dept. of Biochemistry, Bristol BS8 1TD (GB).

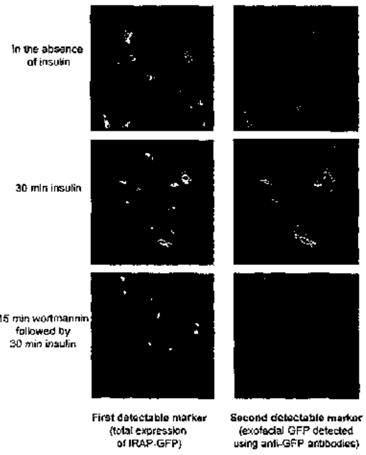
(74) Agent: NASH, David, Allan: Haseltine Lake & Co., Imperial House, 15-19 Kingsway, London WC2B 6UD (GB).

(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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, 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

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING INSULIN MIMICS OR ANTAGONISTS



(57) Abstract: Identification of insulin mimics or antagonists by measuring the extent of GLUT4 vesicle translocation using a fusion protein between insulin-responsive aminopeptidase (IRAP) and one or two Green Fluorescent Proteins

WO 01/96867 A3

WO 01/96867 A3

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).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report: 21 March 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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/74 C12N15/62

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 C07K C12N

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, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 09240 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL) 6 April 1995 (1995-04-06) cited in the application claim 18 ---	1-16
X	SUBTIL AGATHE ET AL: "Characterization of the insulin-regulated endocytic recycling mechanism in 3T3-L1 adipocytes using a novel reporter molecule." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 7, 18 February 2000 (2000-02-18), pages 4787-4795, XP002184015 ISSN: 0021-9258 the whole document --- -/--	1-16, 18-20

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 November 2001	13/12/2001

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Pellegrini, P

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/02683

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHNSON AMY O ET AL: "Identification of an insulin-responsive, slow endocytic recycling mechanism in Chinese hamster ovary cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 28, 10 July 1998 (1998-07-10), pages 17968-17977, XP002184016 ISSN: 0021-9258 the whole document ---	1-16, 18-20
A	WO 96 09317 A (BAYER AG) 28 March 1996 (1996-03-28) cited in the application abstract claim 1 -----	1-16, 18-20

1

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

International Application No. PCT/GB 01/02683

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 17

Claim 17 relates to a substance defined by reference to a desirable characteristic or property, namely an insulin antagonist or mimic being identified by the method of claims 1-16. The claim covers all substances having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for no such substances.
In the present case, the claim so lacks support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the subject-matter for which protection is sought in claim 17 is impossible.
Consequently, no search has been performed on this claim.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

ᵀERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. ational Application No
PCT/GB 01/02683

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9509240	A	06-04-1995	US	5989893	A	23-11-1999
			AU	7844894	A	18-04-1995
			EP	0721508	A1	17-07-1996
			WO	9509240	A1	06-04-1995
WO 9609317	A	28-03-1996	AU	709169	B2	26-08-1999
			AU	3719195	A	09-04-1996
			CA	2200354	A1	28-03-1996
			EP	0782581	A1	09-07-1997
			JP	10506015	T	16-06-1998
			WO	9609317	A1	28-03-1996
			US	5968764	A	19-10-1999
			US	5972680	A	26-10-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 21/78	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(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,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

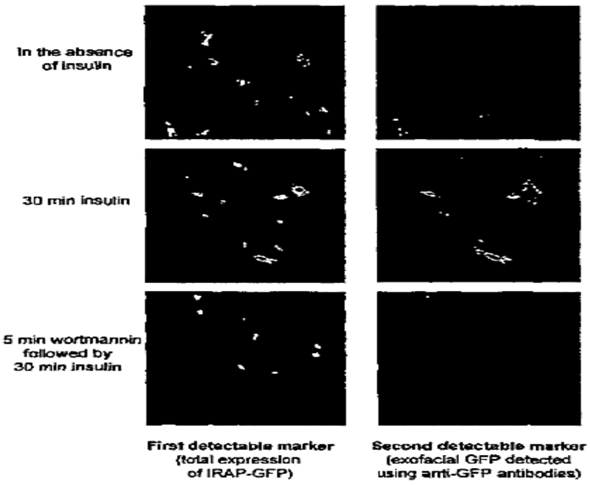
(74)代理人 100092015
弁理士 桜井 周矩
(72)発明者 フレッチャー，ローラ・マーガレット
イギリス国ブリストル ビーエス８・１ティーディー，ユニバーシティ・オブ・ブリストル，スクール・オブ・メディカル・サイエンシズ，デパートメント・オブ・バイオケミストリー
(72)発明者 タバーレ，ジェレミー・マイルズ
イギリス国ブリストル ビーエス８・１ティーディー，ユニバーシティ・オブ・ブリストル，スクール・オブ・メディカル・サイエンシズ，デパートメント・オブ・バイオケミストリー

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 BA11 DA36 FA11 FA16 FB03 JA01
2G054 AA06 AB02 AB05 BA04 CE02 EA03 EA05 GA04 GB02
4B024 AA01 AA11 BA55 CA01 CA07 HA15 HA20
4B063 QA05 QA20 QQ79 QQ96 QR48 QR56 QR66 QR77 QS33 QX01
4H045 AA30 BA70 DA38 EA50 FA74

【要約の続き】
を提供すること、を含む方法を開示する。別の方法においては、タンパク質構造は、ＩＲＡＰタンパク質成分と、該ＩＲＡＰタンパク質成分の管腔ドメインに融合されている第一の検出可能なタンパク質成分と、該ＩＲＡＰタンパク質成分の細胞質ドメインに融合されている第二の検出可能なタンパク質成分とを含み、その際、該第一の検出可能なタンパク質成分は、該第一タンパク質成分を面外に位置する場合に検出することができるが細胞内に位置する場合に検出することができない第一の検出法によりアッセイすることができ、該第二の検出可能なタンパク質成分は、該第二タンパク質成分を細胞内に位置する場合に検出することができる第二の検出法によりアッセイすることができる。本発明のアッセイを使用して、「候補化合物」がインスリンの擬態であるか又はアンタゴニストであるかを決定することができる。本発明は、化合物のライブラリーを自動化された高処理量スクリーニングにおいて試験するのに使用することができる。

专利名称(译)	化验		
公开(公告)号	JP2004503778A	公开(公告)日	2004-02-05
申请号	JP2002510945	申请日	2001-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	布里斯托尔大学		
申请(专利权)人(译)	布里斯托大学		
[标]发明人	フレッチャーローラマーガレット タバーレジェレミーマイルズ		
发明人	フレッチャー,ローラ·マーガレット タバーレ,ジェレミー·マイルズ		
IPC分类号	C07K14/54 C07K14/62 C07K19/00 C12N15/09 C12Q1/02 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/502 C07K14/54 C07K2319/00 G01N33/5008 G01N2333/43595 G01N2333/62		
FI分类号	G01N33/50.Z C07K14/62 C07K19/00 C12Q1/02 G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BA11 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/JA01 2G054/AA06 2G054/AB02 2G054/AB05 2G054/BA04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA05 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA55 4B024/CA01 4B024/CA07 4B024/HA15 4B024/HA20 4B063/QA05 4B063/QA20 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045/AA30 4H045/BA70 4H045/DA38 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	2000014838 2000-06-16 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)



确定候选化合物或拮抗模仿胰岛素的作用，其包含编码蛋白质结构，其包括（a）中IRAP蛋白质组分和可检测的蛋白质组分的核酸序列的方法，转染其中可检测的蛋白质组分与IRAP蛋白质组分的腔结构域融合此外，当蛋白质成分位于平面外时，可检测到可检测的蛋白质成分，但当蛋白质成分位于细胞内时，检测不到蛋白质成分。测定和第二种检测方法，当蛋白质组分位于平面外时和位于细胞中时，可以检测到这种方法（B）使转染的宿主细胞与候选化合物接触;（c）通过第一检测方法测量面外蛋白质组分以检测平面外和细胞内可检测的蛋白质组分通过第二检测方法测量样品的总量;然后，（d）检测的蛋白质组分的量外，所述表面，即与可检测蛋白成分的合计量相比，所述表面之外并进入细胞内，提供GLUT4小的胞的程度的量度転座，被披露。在另一种方法中，蛋白质结构，蛋白质IRAP组分，第一可检测蛋白质组分融合到IRAP蛋白质组分的腔结构域融合至所述IRAP蛋白质的胞质结构域第一可检测蛋白质组分和第二可检测蛋白质组分，其中所述第一可检测蛋白质组分包含当位于平面外它可以将由第一检测方法检测位于细胞内时不能被检测时，第二可检测的蛋白质组分的蛋白质组分可被检测它是所述第二蛋白质成分可以由第二检测方法来测定位于细胞内时可被检测。使用本发明的测定，就可以确定“候选化合物”是或拮抗剂是胰岛素的模拟物。本发明可用于在自动化高通量筛选中测试化合物库。