

(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2004-500849
(P2004-500849A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	4 B 0 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 152 頁) 最終頁に続く		

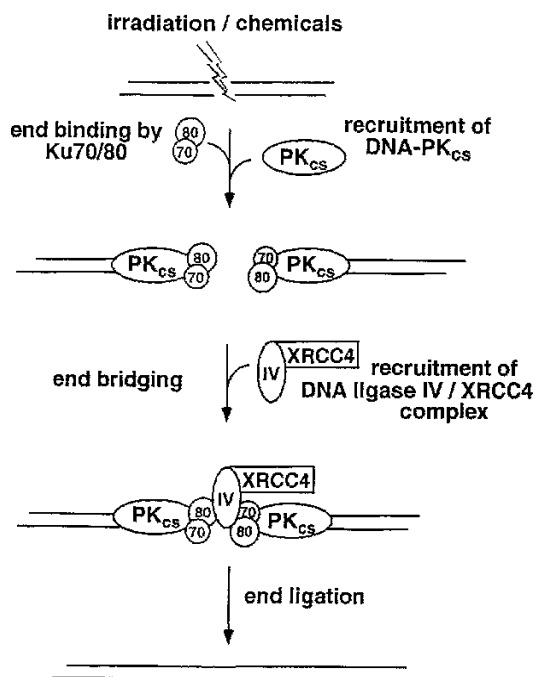
(21) 出願番号	特願2001-586599 (P2001-586599)	(71) 出願人	502418745 キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リミテッド イギリス・WC 2 A・3 P X・ロンドン・リンカーンズ・イン・フィールズ・6 1
(86) (22) 出願日	平成13年5月18日 (2001. 5. 18)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月19日 (2002. 11. 19)	(74) 代理人	100108578 弁理士 高橋 詔男
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/002180	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02001/090404	(74) 代理人	100101465 弁理士 青山 正和
(87) 国際公開日	平成13年11月29日 (2001. 11. 29)	(74) 代理人	100094400 弁理士 鈴木 三義
(31) 優先権主張番号	0012179. 8		
(32) 優先日	平成12年5月20日 (2000. 5. 20)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	60/221, 226		
(32) 優先日	平成12年7月25日 (2000. 7. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/268, 367		
(32) 優先日	平成13年2月14日 (2001. 2. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤スクリーニングシステム及びアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、NHE Jを実施する方法及びNHE Jのアッセイ；NHE Jを調節し、治療上有用な化合物のためのアッセイ；DNA - PK及び関連タンパク質キナーゼを調節し、治療上有用な化合物のためのアッセイ；前記アッセイ及び方法を実施するのに有用な組成物及びキット；並びにNHE Jを調節する方法を開発するために、これらの観察を使用する。本発明はまた、DNAのNHE Jを調節する方法、及びDNAのNHE Jを増大または減少する治療方法に関する。本発明はまた、患者がDNA修復または細胞周期チェックポイントコントロールにおける欠損を有するまたは有する疑いがあるかどうかを測定するための、患者におけるIP₆、または他の刺激性イノシトールリン酸の測定方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA の非相同的末端結合 (NHEJ) を刺激化する方法であって、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で DNA の NHEJ を実施する工程を含む方法。

【請求項 2】

DNA の非相同的末端結合 (NHEJ) のアッセイであって、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸を含むアッセイ。

【請求項 3】

IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸が、外因性の IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸である、請求項 1 記載の方法または請求項 2 記載のアッセイ。 10

【請求項 4】

NHEJ が *in vitro* で実施される、請求項 1 から 3 のいずれか一項記載の方法またはアッセイ。

【請求項 5】

DNA の NHEJ が、DNA 依存性プロテインキナーゼ、XRCC4、DNA リガーゼ I V 及び適切な DNA 基質を含む NHEJ 反応混合物で実施される、請求項 1 から 4 のいずれか一項記載の方法またはアッセイ。

【請求項 6】

DNA の非相同的末端結合を刺激化するための、IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸の使用。 20

【請求項 7】

IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸、並びに DNA 依存性プロテインキナーゼ、XRCC4、DNA リガーゼ I V 及び適切な DNA 基質の一つ以上を含むパーツのキット。

【請求項 8】

イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸、並びに DNA 依存性プロテインキナーゼ、XRCC4 及び DNA リガーゼ I V の一つ以上を発現する宿主細胞を含むパーツのキット。

【請求項 9】

DNA 依存性プロテインキナーゼ、XRCC4 及び DNA リガーゼ I V の一つ以上が、組換え核酸分子から発現される、請求項 8 記載のパーツのキット。 30

【請求項 10】

プロテインキナーゼのアッセイであって、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸を含むアッセイ。

【請求項 11】

プロテインキナーゼ、及びイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸を含むパーツのキット。

【請求項 12】

前記プロテインキナーゼが、組換え核酸分子から発現される、請求項 11 記載のパーツのキット。 40

【請求項 13】

前記プロテインキナーゼに対する基質をさらに含む、請求項 10 記載のアッセイまたは請求項 11 記載のパーツのキット。

【請求項 14】

イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸、及びプロテインキナーゼを発現する宿主細胞を含むパーツのキット。

【請求項 15】

前記プロテインキナーゼが、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼの触媒ドメインと類似であるドメインを有するプロテインキナーゼである、請求項 10 記載のアッセイまた 50

は請求項 11 から 14 のいずれか一項記載のパーツのキット。

【請求項 16】

前記プロテインキナーゼが、DNA 依存性プロテインキナーゼ、ATR、ATM、FRAP、または *Saccharomyces cerevisiae* 遺伝子産物 Tel1p、Mec1p、Tor1p 若しくは Tor2p、または *Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子産物 Rad3 のいずれか一つである、請求項 15 記載のアッセイまたはパーツのキット。

【請求項 17】

DNA の非相同的末端結合 (NHEJ) を刺激化する点で、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物の同定方法であって、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で DNA の NHEJ を実施する工程、及び DNA の NHEJ に対する試験化合物の効果を測定する工程を含む方法。

10

【請求項 18】

DNA の NHEJ が *in vitro* で実施される、請求項 17 記載の方法またはアッセイ。

【請求項 19】

DNA の NHEJ が、DNA 依存性プロテインキナーゼ、XRCC4、DNA リガーゼ IV 及び適切な DNA 基質を含む NHEJ 反応混合物で実施される、請求項 17 または 18 記載の方法。

20

【請求項 20】

DNA の非相同的末端結合 (NHEJ) を刺激化する点で、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物の同定方法であって、イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で、NHEJ 反応混合物中の前記成分の間の相互作用に対する試験化合物の効果を測定する工程を含む方法。

【請求項 21】

前記 NHEJ 反応の成分が、DNA 依存性プロテインキナーゼ (または Ku70/80 ヘテロダイマーまたはそのサブユニットのようなその成分)、XRCC4、DNA リガーゼ IV、適切な DNA 基質、ATP 及び Mg²⁺ である、請求項 20 記載の方法。

30

【請求項 22】

DNA の非相同的末端結合を調節する化合物の同定方法であって、DNA の非相同的末端結合に対するイノシトールリン酸またはその誘導体の効果を測定する工程を含む方法。

【請求項 23】

プロテインキナーゼに対するイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物の同定方法であって、IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で、プロテインキナーゼの触媒活性、または別の成分と相互作用するプロテインキナーゼの能力に対する試験化合物の効果を測定する工程を含む方法。

【請求項 24】

プロテインキナーゼに対する IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物の同定方法であって、試験化合物が、前記プロテインキナーゼまたはそのサブユニットに対する IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を減少または増大するかを測定する工程を含む方法。

40

【請求項 25】

前記プロテインキナーゼが、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼの触媒ドメインと類似であるドメインを有するプロテインキナーゼである、請求項 23 または 24 記載の方法。

【請求項 26】

前記プロテインキナーゼが、DNA 依存性プロテインキナーゼ、ATR、ATM、FRAP

50

P、または *Saccharomyces cerevisiae* 遺伝子産物 Tel1p、Mec1p、Tor1p 若しくは Tor2p、または *Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子産物 Rad3 のいずれか一つである、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

前記プロテインキナーゼが DNA 依存性プロテインキナーゼである、請求項 23 から 26 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

DNA 依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットと、Ku70、Ku80、DNA リガーゼ IV、XRCC4 またはその適切な DNA 基質の間の相互作用に対する試験化合物の効果が測定される、請求項 23 記載の方法。

10

【請求項 29】

前記サブユニットが、DNA-PK の Ku70/80 ヘテロダイマー、またはその Ku70 サブユニット、またはその Ku80 サブユニットである、請求項 24 記載の方法。

【請求項 30】

DNA-PK の Ku70/80 ヘテロダイマー、またはその Ku70 サブユニット、またはその Ku80 サブユニットに対する IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物の同定する方法であって、試験化合物が、前記 DNA-PK の Ku70/80 ヘテロダイマー、またはその Ku70 サブユニット、またはその Ku80 サブユニットに対する IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を減少または増大するかを測定する工程を含む方法。

20

【請求項 31】

XRCC4 または DNA リガーゼ IV に対する IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物の同定方法であって、試験化合物が、前記 XRCC4 または DNA リガーゼ IV に対する IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を減少または増大するかを測定する工程を含む方法。

【請求項 32】

前記試験化合物がイノシトール誘導体である、請求項 17 から 31 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 33】

前記試験化合物が、ホスホイノシチド、またはイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) の類似体、または別の刺激性イノシトールリン酸の類似体である、請求項 17 から 31 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 34】

イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を模倣するまたは調節する試験化合物が、さらなる研究のために選択される、請求項 17 から 33 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 35】

ガンの治療、ガンの放射線療法及び/または化学療法 of 摂生への増強、遺伝子治療摂生の改良、相同的組換えの促進、レトロウイルス感染の治療、及び免疫系の調節のための薬剤の開発において有用である化合物の同定するために使用される、請求項 17 から 22 及び 28 から 31 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 36】

イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸を模倣または調節する試験化合物を選択する工程、及びガンの治療、ガンの放射線療法及び/または化学療法 of 摂生への増強、遺伝子治療摂生の改良、相同的組換えの促進、レトロウイルス感染の治療、及び免疫系の調節のための薬剤としての適格性についてのさらなるスクリーニングにおいて試験化合物を試験する工程をさらに含む、請求項 17 から 22 及び 28 から 31 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 37】

プロテインキナーゼ活性または相互作用を調節するために薬剤の開発において使用される

50

、請求項 23 から 28 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 38】

前記プロテインキナーゼが DNA - PK、ATM、ATR または FRAP のいずれか一つであり、前記方法が、細胞周期チェックポイントのコントロールを調節する化合物を同定するために使用される、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

請求項 17 から 38 のいずれか一項記載の方法によって同定可能な化合物。

【請求項 40】

請求項 17 から 38 のいずれか一項記載の方法によって同定される化合物。

【請求項 41】

医薬における使用のための請求項 39 または 40 記載の化合物。

【請求項 42】

DNA の非相同的末端結合 (NHEJ) を減少する方法であって、NHEJ 反応におけるイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の量を減少する工程、またはその刺激効果を阻害する工程を含む方法。

【請求項 43】

DNA の非相同的末端結合 (NHEJ) を促進する方法であって、NHEJ 反応におけるイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の量を増大する工程、またはその刺激効果を促進若しくは模倣する工程を含む方法。

【請求項 44】

NHEJ の減少が細胞内において存在する、請求項 42 記載の方法。

【請求項 45】

前記細胞が、DNA の NHEJ の減少の必要のあるヒトまたは動物において存在する、請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

ガンの治療、ガンの放射線療法及び/または化学療法の摂生への増強、遺伝子治療摂生の改良、相同的組換えの促進、レトロウイルス感染の治療、及び免疫系の調節のための、請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

NHEJ の促進が細胞内において存在する、請求項 45 記載の方法。

【請求項 48】

前記細胞が、DNA の NHEJ の促進の必要のあるヒトまたは動物において存在する、請求項 47 記載の方法。

【請求項 49】

損傷した細胞周期チェックポイントのコントロールのため、免疫寛容化されたまたはガンに対する疑いのある患者を治療するための、請求項 48 記載の方法。

【請求項 50】

プロテインキナーゼの活性または相互作用を調節する方法であって、プロテインキナーゼと共に存在するイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) または他の刺激性イノシトールリン酸の量を変化する工程、またはプロテインキナーゼに対する IP₆ または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を阻害または促進する工程を含む方法。

【請求項 51】

前記プロテインキナーゼが、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼの触媒ドメインと類似であるドメインを有するプロテインキナーゼである、請求項 46 記載の方法。

【請求項 52】

前記プロテインキナーゼが細胞内において存在する、請求項 50 記載の方法。

【請求項 53】

前記細胞が、プロテインキナーゼ活性または相互作用の調節の必要のあるヒトまたは動物において存在する、請求項 52 記載の方法。

【請求項 54】

10

20

30

40

50

前記プロテインキナーゼが、DNA-PK、ATM、ATRまたはFRAPのいずれか一つであり、前記方法が、細胞周期チェックポイントのコントロールを調節するためのものである、請求項53記載の方法。

【請求項55】

患者が、DNA修復または細胞周期チェックポイントのコントロールにおける欠損を有するまたはその素因を有するかを測定する方法であって、(1)患者からサンプルを得る工程、(2)サンプル中のイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリン酸の濃度または細胞内局在を測定する工程、及び(3)スタンダードとその結果を比較する工程を含む方法。

【請求項56】

ここに記載されるDNAの非相同的末端結合を調節するいずれかの新規なスクリーニングアッセイまたは方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、非相同的末端結合(NHEJ)経路の成分を含むアッセイ及び薬剤スクリーニングシステムに関し、DNA-PK(DNA依存性プロテインキナーゼ)として既知のプロテインキナーゼ、並びにATR、ATM及びFRAPのような関連プロテインキナーゼを使用するスクリーニングシステムに関する。本発明はまた、イノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)、イノシトールペンタキスリン酸(IP₅)、イノシトールテトラキスリン酸(IP₄)、ジホスホイノシトールペンタキスリン酸(IP₇)、及びビスジホスホイノシトールテトラキスリン酸(IP₈)に関する。

【0002】

【従来技術】

DNAにおける二本鎖切断(DSB)の修復は、ゲノム安定性の維持に必須である。DSBを修復しないことは、遺伝的情報の欠失、染色体転座、及び細胞死を導き得る。DSBの修復のための二つのメカニズムが記載されており、それは相同的組換えまたは非相同的末端結合(NHEJ)のいずれかを含む。相同的組換えは、切断が娘染色分体から遺伝的情報を使用して修復できる場合のS期で特に有効であり、一方でNHEJは細胞周期の全ての時点で有効であると解される(Essers等, 2000; Takata等, 1998)。NHEJはまた、V(D)J組換えの間のDSB修復において重要な役割を果たす(Blunt等, 1995; Taccioli等, 1993)。

【0003】

非相同的末端結合による二本鎖切断の修復は、XRCC4、XRCC5、XRCC6及びXRCC7遺伝子の産物を必要とする(Chu, 1997; Critchlow及びJackson, 1998; Weaver, 1996にレビューされている)。XRCC4は、DNAリガーゼIVとヘテロダイマーを形成するタンパク質(XRCC4)をコードし、XRCC5及びXRCC6は、DNA末端結合タンパク質Kuの70及び80kDaサブユニットをコードし、XRCC7は、DNA依存性プロテインキナーゼDNA-PK_{cs}の触媒サブユニットをコードする。DNA-PK_{cs}の正確な標的は未知であるが、*in vitro*でXRCC4をリン酸化し、そのDNA結合活性を調節することが示されている(Leber等, 1998; Modesti等, 1999)。

【0004】

DNA-PK_{cs}は大きなタンパク質であり(~3500アミノ酸、分子量~465kDa)(Smith及びJackson, 1999)、そのカルボキシル末端は、ホスファチジルイノシトール3(PI3)キナーゼファミリーで見出されるものと関連する触媒ドメインを含む(Hartley等, 1995)。この相同性は最初、DNA-PK_{cs}がイノシトールリン脂質をリン酸化することができることを示唆したが、そのような活性は検出されていない。PI3キナーゼ関連ファミリーの他のメンバーは、毛細血管拡張性運動失調において欠損したタンパク質であるATM、及びAT関連性疾患を導く場合に欠

10

20

30

40

50

損しているATRを含む(Keith及びSchreiber, 1995; Smith及びJackson, 1999)。これらのタンパク質が、ホスファチジルイノシトールキナーゼの特徴的なタンパク質モチーフを維持している理由は、謎のままである。

【0005】

WO 90/00057は、細胞有糸分裂の病的に上昇した速度を有する生体哺乳動物組織における細胞有糸分裂の速度を調節する方法に関し、その方法は、イノシトールヘキサリン酸(または塩)及びイノシトール(または塩)のソースで細胞を還流し、細胞有糸分裂の上昇した速度を調節することを含む。この方法は疑わしくも、NK細胞活性が変化しているヒト及び哺乳動物疾患、例えば腫瘍、白血病を含む他のガン、免疫抑制患者、並びにウイルス、真菌、または原生動物感染において有用であるらしい。

10

【0006】

WO 95/05380は、セレクチンに結合する有効量のイノシトールポリアニオン(イノシトールヘキサキスリン酸を含む)を投与することによる、セレクチンの調節方法に関する。セレクチン結合は、微生物での感染、悪性腫瘍、または炎症及び自己免疫疾患を含む他の疾患と明らかに関連している。

【0007】

WO 98/30902は、細胞DNA修復活性に作用する、XRCC4とDNAリガーゼIV、並びにXRCC4とDNA-PKの相互作用の調節(タンパク質及び/または天然若しくは合成起源の化合物を使用する)を介したNHEJシステムの調節に関する。それはまた、XRCC4及び/またはDNAリガーゼIVが欠失した疾患に対する素因を有する患者のスクリーニングに関する。

20

【0008】

WO 99/04266は、ATM並びにATR及びDNA-PKのような関連プロテインキナーゼとのp53の相互作用、及びそれらによるp53のリン酸化に関する。当該タンパク質の活性は、DNAの存在で増大することが示されている。当該タンパク質と、p53または同様なリン酸化部位を有する他のタンパク質の間での相互作用によるリン酸化のモジュレーターのためのアッセイが提供されている。ATMまたはATRを生成するための方法もクレームされている。

【0009】

WO 00/00644は、DNA依存性プロテインキナーゼサブユニットの発現を防止するために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することによる、DNA損傷剤に対する細胞の感受性を増大する方法に関する。この発明は、患者における腫瘍を治療する方法にも関し、その方法は、患者にアンチセンスDNA-PKオリゴヌクレオチドを投与することを含む。

30

【0010】

Ishikawa等(1999) *Anticancer Res.* 19, 3749-3752は、IP₆をマウスに経口で与えた場合、それが皮膚ガンの発達の開始を遅延するがそれを促進はしないことを示唆している。

【0011】

Sarkaria等(1998) *Cancer Res.* 58, 4375-4382は、放射線感作剤であるウォルトマンニンによるホスホイノシチド3-キナーゼ関連キナーゼ(DNA依存性プロテインキナーゼ、ATR及びATMのような)の阻害を記載する。

40

【0012】

Karanjawa等(1999) *Curr. Biol.* 9, 1501-1504は、NHEJが一次線維芽細胞における染色体安定性に重要であることを示す。

【0013】

Hoekstra(1997) *Curr. Opin. Gen. Develop.* 7, 170-175は、ATMプロテインキナーゼファミリーによるDNA損傷に対する応答及び細胞周期チェックポイントの調節をレビューしている。

50

【0014】

Hall - Jackson 等 (1999) *Oncogene* 18, 6707 - 6713 は、ATR が DNA - PK とは別個の基質特異性を有するカフェイン感受性 DNA 活性化プロテインキナーゼであることを示している。

【0015】

Gao 等 (2000) *Nature* 404, 897 - 900 は、腫瘍生成、ゲノム安定性及び発達における p53 及び XRCC4 の相互作用を記載している。

【0016】

Featherstone & Jackson (1999) *Br. J. Cancer* 80, 14 - 19 は、DNA - PK、並びに DNA 修復及びゲノム完全性の維持におけるその役割をレビューしている。 10

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

非相同的末端結合のスキームが、図1に示されている。切断末端は、Kuヘテロダイマーによって認識され、それはDNA - PK_{cs}を集合し、それによってそのキナーゼ活性を活性化すると解されている。この大きな複合体は、ヌクレアーゼの攻撃からDNA末端を保護するように機能し、一方でXRCC4/DNAリガーゼIVヘテロダイマーの集合を容易にする。末端架橋がどのような達成されるかは現在まで明らかではないが、これらの反応は、DNAの再ライゲーションを引き起こし、DNAの完全性を回復する。

【0018】

NHEJのメカニズムを分子的に詳細に規定する試みでは、末端結合についての*in vitro*システムが最近開発された(Baumann及びWest, 1998)。この反応は、DNA - PK_{cs}、Ku70/80、XRCC4、及びDNAリガーゼIVについての見かけの必要性を示し、*in vivo*の必要性と一致した。しかしながら、予備的な分画化及び相補アッセイでは、これらの因子が有効な末端結合については不十分であること、及びこの反応の他の成分が同定されることが残っていることが明らかとなった。ここで記載された研究では、*in vitro*相補アッセイが、NHEJ反応のさらなる成分を精製するために使用されている。用語、Ku70/Ku80及びKu70/80は、他に示唆するところがないならば、Ku70とKu80の間のヘテロダイマーを指すように互換的に使用される。 20 30

【0019】

リンNMR、マススペクトロスコピー、及び強力なアニオン交換クロマトグラフィーの組み合わせを使用して、我々はこの因子をイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)と同定する。精製されたIP₆は、DNA - PK依存性末端結合を特異的に刺激し、DNA - PKによって結合される。DNA - PK依存性NHEJにおけるイノシトールリン酸の関与は、DNA - PK_{cs}の触媒ドメインが、ホスファチジルイノシトール3(PI3)キナーゼファミリーにおいて見出されるものと同じであるため、特に興味深い。

【0020】

かくして、DNAのNHEJの我々の継続的な調査で、驚くべきことに、イノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)及びイノシトールペンタキスリン酸ピロリン酸(IP₇)のような高度にリン酸化したイノシトール誘導体が、NHEJを刺激することが見出された。DNAのNHEJに対する刺激効果を介在するものに関するいずれかの理論によって結びつけられることを希望しないが、我々の結果は、少なくとも*in vitro*でNHEJの刺激を引き起こすDNA - PKにおける構造的変化のようなDNA - PKの関与を示唆している。特に我々の研究は、IP₆及びIP₇がKu70/80ヘテロダイマーを結合し、それがDNA - PKの触媒ユニット(DNA - PK_{cs})と組み合わせさせてDNA - PKを作製することを示す。IP₆はT4 DNAリガーゼ活性に対する効果を有さない。IP₆はKu70サブユニットまたはKu80サブユニットを結合することが可能である。 40 50

【0021】

【課題を解決するための手段】

本発明は、NHEJを実施する方法及びNHEJのアッセイ；NHEJを調節し、治療上
 有用な化合物のためのアッセイ；DNA-PK及び関連タンパク質キナーゼを調節し、治
 療上有用な化合物のためのアッセイ；前記アッセイ及び方法を実施するのに有用な組成物
 及びキット；並びにNHEJを調節する方法を開発するために、これらの観察を使用する
 。

【0022】

本発明はまた、DNAのNHEJを調節する方法、及びDNAのNHEJを増大または減
 少する治療方法に関する。本発明はまた、患者がDNA修復または細胞周期チェックポイ
 ントコントロールにおける欠損を有するまたは有する疑いがあるかどうかを測定するため
 の、患者におけるIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の測定方法に関する。

10

【0023】

本発明の第一の特徴点は、DNAの非相同的末端結合(NHEJ)の刺激方法を提供し、
 この方法は、イノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリ
 ン酸の存在下でDNAのNHEJを実施する工程を含む。典型的に、IP₆または他の刺
 激性イノシトールリン酸は、DNAの結合を刺激化するためにNHEJ反応に添加される
 。

【0024】

【発明の実施の形態】

「非相同的末端結合」は、DNA末端のライゲーション、典型的には分子間ライゲーション
 である。それは、互いにほとんどまたは全く相補性を示さないDNA末端の結合(つまり
 典型的に各末端は互いにハイブリダイズしない)を含み、いかなる場合も、ここで参照
 される論文及び特許出願の多くもその使用によって証明されている当該技術分野で
 周知の用語であり、これらの文献は参考としてここに取り込まれる。典型的に、NHEJ
 反応は、適切なDNA基質、及びDNA末端結合する反応を進める適切な成分を必要とす
 る。適切なDNA基質は、典型的に直鎖状DNA分子であるものであり、その長さはNH
 EJに
 関与する因子に適應するのに十分な長さのみ必要である。完全には、結合される各
 DNA断片は、独立に少なくとも50bp、好ましくは少なくとも70bp、より好まし
 くは少なくとも100bpであるが、より長くと良い。NHEJ反応の観察に関し、特
 くにスクリーニングアッセイにおいて、結合されるDNA分子(またはDNA末端)の一方
 または両方が、放射性ラベルされたリン酸または蛍光ラベルでというように検出可能にラ
 ベルされる。NHEJにおいて結合される二つの別個のDNA分子を使用することが簡便
 であるが、直鎖状プラスミドの末端のように同じ分子の二つの末端を結合することができ
 る。NHEJは典型的に、哺乳動物細胞を含む脊椎動物細胞のような真核生物細胞で生じ
 る(原核生物でもある環境では生じ得る)が、Baumann & West (199
 8) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14066-1407
 0に詳細に記載されているように、そこに記載されたようにヒト細胞から得られたもの
 のようなセルフリー抽出物でも生じ得る。セルフリー系における分子間ライゲーションは、
 DNAリガーゼIV、XRCC4、及びDNA依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK
 ;これは触媒サブユニットDNP-PKCS(XRCC7遺伝子によってコードされる)
 と、DNA結合に関与すると解される二つのさらなるサブユニット、特にKu70及びK
 u80サブユニット(それぞれXRCC6及びXRCC5遺伝子によってコードされる)
 から作製されるヘテロダイマーである)に正確に依存することが見出された。しかしなが
 ら、DNA-PKの不存在下でDNAリガーゼIVとXRCC4で、低レベルのNHEJ
 を得ることができ、より高い度合いのNHEJは、DNAリガーゼIV及びXRCC
 4がKu70とKu80と共に存在する場合に得られ、またさらなるNHEJは、DNA
 -PKの触媒サブユニットが存在する場合に達成される。本発明者が提供した研究に引き
 続き、NHEJはIP₆の存在下でかなりより達成でき、IP₇の存在下でさらにより達
 成できることが示されている。

20

30

40

【0025】

50

用語、「NHEJを刺激化する」は、IP₆が存在せず、反応混合物は同じである場合の速度と比較して、NHEJ反応混合物におけるIP₆の存在によりDNAのNHEJの速度が増大することを意味することを含む。刺激化は限界レベルに到達し、典型的に本発明の方法による刺激化は、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸が、IP₆）または他の刺激性イノシトールリン酸が以前に添加されていないNHEJ反応に含まれる場合に達成されることが予測されるであろう。いずれかの理論に結びつけられるものではないが、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の存在はNHEJに必須であり、そのためIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸が、結合が存在しないものから基質DNAの結合のいくらかの存在までのNHEJ反応を刺激するであろう。ヒトセルフリー抽出物は、Baumann & West (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14066-14070に記載されているように、IP₆の添加なしで適切な基質の存在下でNHEJを実施できることに注意すべきである；しかしながらこの場合では、このセルフリー抽出物は、すでに少量のIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸を含んでいるであろう。このセルフリー抽出物を部分的精製の間で分画化すると、関連するタンパク質成分を含んでいるのにも関わらず、NHEJを効率的に実施する能力を失うことを示した。IP₆またはIP₅またはIP₄のヒトセルフリー抽出物から由来するこの分画（実施例1で「PC-C」と称される）への添加は、DNAのNHEJを刺激化することが示された。いずれかの理論に結びつけられるものではないが、化学的性質によって、IP₆（または他のイノシトールリン酸）は、PC-C分画の調製において使用されるホスホセルロースカラムからフロースルーし、DNA-PK、XRCC4及びDNAリガーゼIVからそれを分離すると解される（実施例1参照）。

【0026】

かくして好ましい実施態様では、NHEJ反応混合物は、必要なタンパク質成分を含むが、いずれの天然の刺激性イノシトールリン酸もが除去されていない半精製細胞抽出物を含む。次いでこの半精製細胞抽出物は、NHEJを刺激化するために、IP₆のような適量の刺激性イノシトールリン酸で補われる。

【0027】

用語、「他の刺激性イノシトールリン酸」は、実施例1における反応条件を使用する、定義されたNHEJの刺激化に対するIP₆と質的に同様な効果であるNHEJの刺激化に対する効果を有する、いずれかの他のイノシトールリン酸またはイノシトールリン酸の誘導体（一つ以上のピロリン酸を有する誘導体のような）を含む。典型的に、刺激性イノシトールリン酸は、IP₆の刺激活性の少なくとも2%、好ましくは実施例1に記載されたものと同様な条件下でモルベースでIP₆の刺激活性の少なくとも5%または少なくとも10%を有するであろう。特定の刺激性イノシトールリン酸は、IP₆より高い刺激活性を有しても良い；かくして刺激性イノシトールリン酸は、IP₆とほぼ同じ刺激活性を有しても良く、またはIP₆の刺激活性の150%若しくは300%若しくは500%若しくは1000%といったより大きい活性を有しても良い。実施例に記載された実験は、IP₇（つまり5個の位置がリン酸残基によって占められ、一つがピロリン酸残基によって占められているイノシトール）が、IP₆より優れたNHEJの刺激性を有することを示す。IP₈（即ち4個の位置がリン酸残基によって占められ、二つがピロリン酸残基によって占められるイノシトール）も、「刺激性イノシトールリン酸」として含まれる。

【0028】

刺激性イノシトールリン酸は典型的に、イノシトールポリリン酸である（即ちそれははいくつかのリン酸基を有する）。イノシトールリン酸は、イノシトールリン酸部分が適切なリンカーによって結合しているイノシトールリン酸部分のオリゴマーまたはポリマーであっても良い。このオリゴマーまたはポリマーは、ホモ-オリゴマー/ポリマーであっても良く、その場合各イノシトールリン酸部分は同じであり、またはヘテロ-オリゴマーであっても良く、その場合少なくともいくつかのイノシトールリン酸部分は異なっても良い。

【0029】

NHEJを刺激化するために、刺激性イノシトールリン酸の混合物を使用することができ

る。

【0030】

「刺激性イノシトールリン酸」は、一つ以上のリン酸基がホスホン酸基によって置換されているイノシトールリン酸誘導体であっても良い。

【0031】

IP₆は、DNA-PKと相互作用する場合、変性またはさらにリン酸化（例えばピロリン酸形態に）することができる。いずれかのそのような変性は、もし定義されたような刺激性イノシトールリン酸を導くのであれば、本発明の範囲内に含まれる。

【0032】

イノシトールリン酸の誘導体は、イノシトールリン酸部分が、例えば遊離ヒドロキシル位置を通じた（もし存在すれば）またはリン酸基を通じた結合によって別の部分に結合している誘導体を含む。

10

【0033】

典型的な刺激性イノシトールリン酸は、天然に存在しているイノシトールリン酸またはその誘導体である。好ましくは刺激性イノシトールリン酸は、IP₆、IP₅またはIP₄のいずれか一つである。

【0034】

用語、「IP₆」は、イノシトールヘキサキスリン酸のいずれかの立体異性体を含む。IP₆はmyo-イノシトール1, 2, 3, 4, 5, 6-ヘキサキスリン酸であることが好ましい。

20

【0035】

用語、「IP₅」は、イノシトールペンタキスリン酸のいずれかの立体異性体を含む。IP₅はmyo-イノシトール1, 3, 4, 5, 6-ペンタキスリン酸であることが好ましい。

【0036】

用語、「IP₄」は、イノシトールテトラキスリン酸のいずれかの立体異性体を含む。IP₄はmyo-イノシトール1, 3, 4, 5-テトラキスリン酸であることが好ましい。

【0037】

前述のように、刺激性イノシトールリン酸は、IP₇またはIP₈またはさらなるリン酸残基を有するイノシトールリン酸であって良い。

30

【0038】

用語、「IP₇」は、ジホスホイノシトールペンタキスリン酸のいずれかの立体異性体を含む。IP₇はmyo-5-ジホスホイノシトール1, 2, 3, 4, 6-ペンタキスリン酸（IP₇-pp5）またはmyo-6-ジホスホイノシトール1, 2, 3, 4, 5-ペンタキスリン酸（IP₇-pp6）であることが好ましい。

【0039】

用語、「IP₈」は、ビス-ジホスホイノシトールテトラキスリン酸のいずれかの立体異性体を含む。

【0040】

これらの化合物は、Sigma及びCalbiochemのような化学供給者から広く入手可能である。Shears等（1995）J. Biol. Chem. 270, 10489-10497は、ビス-ジホスホイノシトールテトラキスリン酸の合成を開示している。Falcik等（1995）J. Am. Chem. Soc. 117, 12172-12175及びReddy等（1997）Tetrahedron Letters 38, 4951-4952は、各種のIP₇のアイソマーの合成を開示している。放射性ラベル化イノシトールリン酸は、DuPont-NENから入手可能である。

40

【0041】

他のイノシトールリン酸、特に4、5または6のリン酸基を有するものは、myo-イノシトール1, 2, 3, 4, 5, 6-ヘキサキスリン酸と実質的に同じNHEJにおける刺激効果を有しても良く、当業者は実施例に記載された方法を使用してこれを測定できるで

50

あろう。

【0042】

それ故本発明の方法及びアッセイは、実質的に同じ刺激効果を有するそのようなイノシトールリン酸の使用を含む。疑念を避け且つ本発明の目的のために、*myo*-イノシトール1, 3, 4, 5, 6ペンタキスリン酸及び*D*-*myo*-イノシトール1, 3, 4, 5テトラキスリン酸は、*myo*-イノシトール1, 2, 3, 4, 5, 6ヘキサキスリン酸と実質的に同じ刺激効果を有すると考慮されるが、それらは特定のIP₆ほどNHEJの刺激化において有効ではない。IP₇はNHEJの刺激化において特定のIP₆より有効である。

【0043】

イノシトールヘキサ硫酸(IS₆)は、末端結合を刺激化できない；*myo*-イノシトール1, 4, 5-トリリン酸は、末端結合を阻害することが示された。

【0044】

本発明の第二の特徴点の、DNAの非同相的末端結合(NHEJ)のアッセイを提供し、このアッセイは、イノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリン酸を含む。

【0045】

このアッセイは、DNAのNHEJを実施するために十分な成分を含む。特にNHEJの典型的なアッセイは、Baumann & West, 上記参照において記載されたような*in vitro*で実施できるものである。セルフリー系におけるNHEJは、Labhart (1999) Eur. J. Biochem. 265, 849-861にも記載されており、それは参考としてここに取り込まれる。NHEJの再構成は、組換え的に発現されたタンパク質成分(パキユロウイルス系を使用して発現されたような)を使用することによって達成されても良い；典型的にそのような再構成された系は、DNA-PK、XRCC4、DNAリガーゼIV、適切なDNA基質、及びIP₆のような刺激性イノシトールリン酸を含む。このアッセイは、例えばV(D)J結合を観察するためにデザインされたDNA基質を使用して、*in vivo*で実施されても良い(例えばSmith等(1998) J. Mol. Biol. 281, 815-825参照)。

【0046】

本発明の第一の特徴点の方法、または本発明の第二の特徴点のアッセイについては(及び、実際にアッセイまたは方法においてIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸に依存する本発明の全ての特徴点については)、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸が外因的に加えられることが好ましいが、IP₆刺激性イノシトールリン酸が、細胞または細胞抽出物に存在するソースから放出されることも可能である。典型的に、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸は、NHEJ反応の開始で加えられる。好ましくは、この反応における刺激性イノシトールリン酸の濃度は、10 nMから50 μMの間である；より好ましくは50 nMから10 μMの間である；さらにより好ましくは100 nMから1 μMの間である。これらの範囲は特にIP₆について好ましい。

【0047】

IP₇についての好ましい範囲は0.1から1 μMである。

【0048】

本発明の第一の特徴点の方法、または本発明の第二の特徴点のアッセイは、*in vivo*で実施されて良いが、もしそれが*in vitro*で実施されるのであれば好ましい；*in vitro*の方法は、以下に詳細に記載される薬剤スクリーニング方法について特に適している。

【0049】

本発明の第一の特徴点の方法、及び本発明の第二の特徴点のアッセイにおけるDNAのNHEJは典型的に、DNA依存性プロテインキナーゼ(好ましくはその全ての成分、特にDNA-PK_{cs}、Ku70及びKu80)、XRCC4、DNAリガーゼIV、及び適切なDNA基質を使用する。好ましくは、NHEJ反応はこれらの成分の全てを含む。そ

10

20

30

40

50

れはまた、この反応に必要なまたはこの反応を促進する、あるいは結合したDNA産物の検出をより容易に検出する他の成分をも含んで良い。そのような成分は、実施例1に記載されているようにATP及びMg²⁺を含む。あるプロセッシングが結合の前に予測されるであろうため、デオキシヌクレオチド(dNTP)の存在は、非相補的DNA末端を使用するNHEJ反応に必要である。

【0050】

本発明の各種の特徴点で有用なポリペプチドのアミノ酸及び核酸配列は、以下の登録番号の下でGenBankから入手可能である：ヒトKu70 - J04611；ヒトKu80 - M30938；ヒトDNAリガーゼIV - X83441；ヒトXRCC4 - U40622；ヒトDNP - PK_{CS} - U47077；*S. cerevisiae* Ku70 - X70379；*S. cerevisiae* Ku80 - Z49702；*S. cerevisiae* DNAリガーゼIV - Z74913。

10

【0051】

この情報は、当該技術分野で周知の標準的組換え法を使用してコードされたタンパク質を生産するために使用されて良いことが予測されるであろう。かくして、再構成化NHEJ反応混合物を使用する方法及びアッセイは、容易に入手可能な組換え的に生産されたポリペプチド成分を適切に使用して良い。

【0052】

各種の異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニングと発現のためのシステムが周知である。適切な宿主細胞は、最近、哺乳動物及び酵母のような真核生物細胞、並びにバキュロウイルスシステムを含む。異種ポリペプチドの発現のために当該技術分野で利用可能な哺乳動物細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、乳児ハムスター腎細胞、Cos細胞、及び多くの他のものを含む。一般的な好ましい細菌宿主は大腸菌である。

20

【0053】

プロモーター配列、ターミネーター断片、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカ-遺伝子、及び適切な他の配列を含む適切な調節配列を含む適切なベクターが選択または構築できる。ベクターは、プラスミド、ウイルス、例えば適切なファージ若しくはファージミドであって良い。さらなる詳細については、例えば" *Molecular Cloning; a Laboratory Manual* "：第2版， Sambrook等， 1989， Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。核酸の操作、例えば核酸構築物の調製、ミュタジェネシス、配列決定、細胞内へのDNAの導入と遺伝子発現、及びタンパク質の分析における多くの既知の技術及びプロトコルが、*Current Protocols in Molecular Biology*， Ausubel等編， John Wiley & Sons， 1992に詳細に記載されている。

30

【0054】

ポリペプチドは、当該技術分野で周知の方法を使用して宿主細胞から精製され単離できる。

【0055】

NHEJ反応混合物のポリペプチド成分はヒトである（例えばヒト細胞から抽出される、またはヒト細胞において発現されてもされなくても、ヒトコード配列から組換え法によって生産される）が、それらは例えば他の哺乳動物または他の脊椎動物からといった、いずれの適切なソースから得られても良い。哺乳動物におけるNHEJ反応の保存的な性質のため、前記成分は、*Saccharomyces cerevisiae*または*Schizosaccharomyces pombe*のような下等真核生物から由来しても良い。所定のNHEJ反応混合物におけるポリペプチド成分の全ては、同じソース（例えば全てヒトである）であることが好ましいが、前記成分がDNAのNHEJを実施できることを条件に、一つのソースから得たDNAリガーゼIV、及び他のソースから得たDNA-PK_{CS}を使用することによって、成分を「混合して適合する」ことが可能であって良い

40

50

。

【0056】

NHEJ反応混合物のポリペプチド成分は、天然で見出されるポリペプチドと同じアミノ酸配列を有して良い、またはそれはNHEJ反応における使用のための必要な活性を維持するその変異体でも良いことが予測されるであろう。タンパク質キナーゼを議論する場合（以下）、変異体は、そのタンパク質キナーゼ活性（即ち、触媒活性及び/または別の成分と相互作用する能力）を維持するものである。変異体は、一つ以上のアミノ酸が挿入、欠失、または置換されている変異体を含む。特に有用な変異体は、精製を容易にする別のペプチドまたはポリペプチドで当該ポリペプチドの融合物である。そのようなポリペプチドは、周知のグルタチオンS-トランスフェラーゼである。文脈が他に示すところがなければ、ポリペプチドに対する参照は、定義された変異体に対する参照を含む。疑念を避けるために、用語、変異体は、所定の活性を維持する断片を含む。プロテインキナーゼ、特に以下に記載されるPI3-キナーゼ関連キナーゼに関しては、適切な断片は、PI3-キナーゼと同等なC末端ドメインのようなドメインを維持するものを含む。このファミリーのタンパク質におけるPI3キナーゼ関連ドメインの部分は、Featherstone & Jackson (1999) Br. J. Cancer 80 (Suppl 1), 14-19に詳細に記載されている。

10

【0057】

本発明はまた、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸に加えて、DNA-PK_{cs}、Ku70、Ku80、XRCC4、DNAリガーゼIV、及び適切なDNA基質の少なくとも一つ（好ましくはこれらの全部）を含む水性組成物を含み、ここでIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸は、少なくとも10nM、好ましくは少なくとも50nM、より好ましくは少なくとも100nM、さらにより好ましくは少なくとも1μMの濃度で存在すると予測されよう。少なくともヒトから由来する成分では、IP₆。についてのK_dの粗い見積もりは1μM程度であり、簡便にはシステムを飽和するために、10μMのIP₆。が使用されて良い。この濃度では、IP₆。の増大は、NHEJにおけるさらなる増大を引き起こさないようである。IP₇。についてのK_dの見積もりは100nMであり、1μMで飽和が生じる。

20

【0058】

もし水性組成物のポリペプチド成分が、NHEJのための特異的な成分のみからなり、NHEJの促進に必要ではない細胞抽出物から由来するもののような他のポリペプチド成分を含まなければ、特に好ましい。

30

【0059】

水性組成物の各ポリペプチド成分は、組換え的に生産され精製されることが好ましい。

【0060】

本発明の第三の特徴点は、DNAの非相同的末端結合を刺激するためのIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の使用を提供する。本発明の前に、且つNHEJの過度の研究に関わらず、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸がNHEJを刺激できる（またはNHEJに必須でさえあろう）ことは認識されていなかったと予測されるであろう。本発明はまた、いずれでも良い手段によってNHEJを調節する成分についてのアッセイ、及びいずれでも良い手段によってNHEJを調節する方法における、IP₆。及び他の刺激性イノシトールリン酸の使用を提供する。このアッセイは、NHEJ活性の変化、NHEJ成分による基質の認識の変化。及び/またはDNA-PK、XRCC4若しくはDNAリガーゼIVのようなNHEJ反応の成分の細胞内局在の変化を含んでも良い。

40

【0061】

前述の本発明の方法及びアッセイを実施するために、NHEJにおいて使用される他の成分と、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸を組み合わせることが簡便である。かくして、本発明の第四の特徴点は、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸、並びに一つ以上のDNA依存性プロテインキナーゼ（またはその構成部分であるDNA-PK_{cs}、Ku70及びKu80）、XRCC4、DNAリガーゼIV、及び適切な基質を含む

50

パーツのキットを提供する。典型的にこのパーツのキットは、 IP_6 。または他の刺激性イノシトールリン酸、並びにDNA依存性プロテインキナーゼ、XRCC4、DNAリガーゼIV、及び適切なDNA基質のそれぞれを含む。このパーツのキットはまた、ATP、 Mg^{2+} 、及びある環境ではdNTPのようなNHEJアッセイを実施するために必要な他の成分を含む。

【0062】

典型的に、DNA依存性プロテインキナーゼ、XRCC4、及びDNAリガーゼIVは、実施例1に記載されたような分画といったセルフリー抽出物から得られる分画として提供される。それらはまた、組換え手段による個々の成分の発現によって提供されても良い。この方法は特に、NHEJが精製された成分から再構成されたものである場合に好ましい

10

【0063】

前述の本発明の方法及びアッセイを実施する際に、NHEJ反応に必要なポリペプチド成分を発現する組換え細胞と組み合わせ、 IP_6 。または他の刺激性イノシトールリン酸を提供することも簡便である。かくして、本発明の第五の特徴点は、イノシトールヘキサキスリン酸(IP_6)または他の刺激性イノシトールリン酸、並びにDNA依存性プロテインキナーゼ、XRCC4及びDNAリガーゼの一つ以上を発現する宿主細胞を含むパーツのキットを提供する。前述のNHEJ反応混合物を一つ以上のポリペプチド成分を発現する宿主細胞は、標準的な組換え法、及び当該技術分野で周知の成分をコードする適切な遺伝子/cDNAを使用して生産されて良い。

20

【0064】

IP_7 、 IP_6 、 IP_5 、及び IP_4 がNHEJを刺激することを示すのに加えて、驚くべきことに、 IP_6 及び IP_7 がプロテインキナーゼと相互作用し、プロテインキナーゼの活性を調節できることを我々は示した。我々が気付いている範囲では、 IP_6 及び IP_7 (または定義されているいずれかの他の刺激性イノシトールリン酸)がこの効果を有することは以前に示されていない。以下に記載されているように、 IP_6 及び IP_7 または IP_8 のような他の刺激性イノシトールリン酸と、プロテインキナーゼの組み合わせは、薬剤スクリーニングアッセイ等において有用である。

【0065】

本発明の第六の特徴点は、 IP_6 。または他の刺激性イノシトールリン酸を含む、プロテインキナーゼのアッセイを提供する。プロテインキナーゼのアッセイは前記プロテインキナーゼ、並びにプロテインキナーゼの触媒活性が測定されている場合、適切なリン酸化可能な基質(前記プロテインキナーゼの標的またはそれから由来するリン酸化可能なペプチドのような)及びATPまたは転移可能な γ -リン酸基を有するその類似体のような適切なホスファートドナーを含む。前記プロテインキナーゼの別の巨大分子成分(別のタンパク質またはDNAのような)に結合する能力がアッセイされている場合、前記アッセイはプロテインキナーゼ及び他の成分を含む。プロテインキナーゼは、そのタンパク質基質及び他の成分と相互作用することが既知である。これらの他の成分はアロステリックはエフェクターであっても良く、それらは他のタンパク質またはDNAのような巨大分子成分であっても良い。

30

40

【0066】

本発明の第七の特徴点は、プロテインキナーゼ、及び IP_6 。または他の刺激性イノシトールリン酸を含むパーツのキットを提供する。典型的にプロテインキナーゼは、組換えDNA法から発現される。

【0067】

本発明の第六の特徴点のアッセイ、及び本発明の第七の特徴点のパーツのキットでは、プロテインキナーゼは、それが天然で会合する他の成分を実質的に含まないことが好ましい。

【0068】

本発明はまた、少なくとも一つのプロテインキナーゼ(好ましくは、例えば組換え発現に

50

よって生産されるように、それが天然で会合する他の成分を実質的に含まないもの)、及びIP₆またはIP₇のような刺激性イノシトールリン酸を含む水性組成物を含む。好ましくはアッセイ、パーツのキット、または水性組成物に含まれるプロテインキナーゼは、実質的に純粋である(例えば少なくとも90%の純度である)。

【0069】

本発明の第八の特徴点は、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸、及びプロテインキナーゼを発現する宿主細胞を含むパーツのキットを提供する。

【0070】

プロテインキナーゼは、当該技術分野で周知のように組換え的に発現できる。例えば、プロテインキナーゼのクローニング、発現、及び単離は、前述の方法体系を使用して実施できる。

10

【0071】

我々は、DNA-PKがIP₆及びIP₇を結合するが、IP₃を結合しないことを示した。とりわけ我々は、IP₆及びIP₇が、DNA-PKのKu70/80ヘテロダイマー部分を結合することを示した。IP₆またはIP₇は、Ku70サブユニットまたはKu80サブユニットに結合して良い。触媒ユニット(DNA-PK_{CS})の存在は、Ku70/80に対するIP₆またはIP₇の結合に必要ではない。ATM、ATR及びFRAPと共にDNA-PKは、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼの触媒ドメインと類似である、好ましくはC末端ドメインであるドメインを有するプロテインキナーゼである、関連するプロテインキナーゼのファミリーに属する。DNA-PK、ATR及びFRAPは、イノシトール末端基結合ドメインを有する。このファミリーの他のメンバーは、*Saccharomyces cerevisiae* 遺伝子産物Tel1p、Mec1p、Tor1p及びTor2p、並びに*Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子産物Rad3を含む。本発明の第六、第七、または第八の特徴点におけるプロテインキナーゼは、このファミリーのメンバー、好ましくはDNA-PK、ATR、ATMまたはFRAPの一つであることが好ましい。

20

【0072】

ATMは、ヒト毛細血管拡張性運動失調においてミューテートされた遺伝子(または他の主における同等な遺伝子)によってコードされるタンパク質である。

【0073】

配列分析により、ヒトATM遺伝子は、~350kDaポリペプチドをコードすると明らかにされている(Savitsky等(1995) *Science* 268, 1749-175; Savitsky等(1995) *Hum. Mol. Genet.* 4, 2025-2032)。

30

【0074】

前述のように、このファミリーに含まれるものは、*Saccharomyces cerevisiae* Tor1p及びTor2p、並びにそれらの哺乳動物ホモログであるFRAPであり、それらはS期への進行を制御し、及び少なくとも部分的に翻訳を調節することによって機能する(Brown及びSchreiber(1996) *Cell* 86, 517-520)。またこのファミリーにおいては、DNA依存性プロテインキナーゼ(DNP-PK)触媒サブユニット(DNA-PK_{CS})は、IRに対する感受性を及び部位特異的V(D)J組換えを実施することの不能を導く欠陥を導く(Jackson及びJeggo(1995) *Trends Biochem. Sci* 20, 412-415; Jackson(1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 19-25にレビューされている)。同定されているPI3-キナーゼファミリーのATMサブグループの他のメンバーは、*S. cerevisiae* Tel1p及びMec1p、並びに*Schizosaccharomyces pombe* (rad3)、*Drosophila melanogaster* (mei-41)及びヒトFRP1/ATRのMec1pホモログを含む(Keith及びSchreiber(1995) *Science* 270, 50-51; Zakian(1995) *Cell*

40

50

82, 685-687; Jackson (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 19-25)。ATMと同様に、これらのタンパク質の欠失は、ゲノム不安定性、DNA損傷剤に対する超感受性、及びDNA損傷誘導性細胞周期チェックポイントのコントロールの欠損を導く。

【0075】

各種のこれらのタンパク質キナーゼをコードするcDNAに対するGenBank登録番号は以下の通りである：

FRAPヒトcDNA NM_004958
 ATRヒトcDNA NM_001184及びU76308
 ATMヒトcDNA NM_000051
 TEL1 *S. cerevisiae* Z35849 Y13134
 MEC1 *S. cerevisiae* U31109
 MEI-41 *Drosophila* U34925
 RAD3 *S. pombe* U76307

10

【0076】

WO 99/04266は参考としてここに取り込まれるが、ATM及びATRを精製する方法を記載する。

【0077】

このファミリーのメンバー（それらはPI3キナーゼ関連キナーゼと称されて良い）は、そのC末端で、DNA-PKcsのC末端ドメインと少なくとも25%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも30%または35%または40%または50%または70%または90%の配列同一性を有すると解される。ATMのPI3キナーゼドメインと比較すると、DNA-PKは28%のホモロジーを示し、RAD3は39%を示す（Hunter (1995) *Cell* 83, 1-4参照）。関連タンパク質のカルボキシ末端は、Keith & Schreiber (1995) *Science* 270, 50-51で比較されている。

20

【0078】

二つのポリペプチドの間のパーセント配列同一性は、例えばUniversity of Wisconsin Genetic Computing GroupのGAPプログラムといった適切なコンピュータプログラムを使用して測定されて良く、パーセント同一性が、最適にアライメントされている配列を有するポリペプチドに対して計算されることを予測するであろう。

30

【0079】

このアライメントは別法として、Clustal Wプログラムを使用して実施されても良い（Thompson等, 1994）。使用されるパラメーターは、以下の通りである。

【0080】

ファーストペアワイズアライメントパラメーター：K-tuple（ワード）サイズ；1、ウィンドウサイズ；5、ギャップペナルティー；3、トップ項の数；5、スコアリング法；xパーセント。複数アライメントパラメーター：ギャップオープンペナルティー；10、ギャップ伸長ペナルティー；0.05。スコアリングマトリックス：BLOSUM。

40

【0081】

NHEJは多くの重要な生物学的工程に関与し、NHEJの調節は、数多くの医学的実践に関連して提案されている。これらの工程を調節する化合物は、潜在的な薬剤として、またはNHEJのさらなる研究のため有用であって良い。かくしてこれらの化合物は、各種の目的のいずれかにとって有用であって良い。

【0082】

一つの目的は、抗腫瘍または抗ガン治療、特に放射線療法または化学療法の増強である。電離放射線及び放射線様薬剤は、DNA損傷を課すことによってガンを治療するために一般的に使用されている。DNA修復において欠損している細胞は、電離放射線及び放射線

50

様薬剤に超感受性である。化学療法は、トポイソメラーゼII毒素、及びDNAコントロールに関する他の化合物の使用を含む。別の目的は、遺伝子標的化及び遺伝子治療の増強である。NHEJの調節は、遺伝子標的化の効率を増大するために使用されて良く、遺伝子治療における興味ある且つ究極の使用を目指しても良い。

【0083】

高等真核生物細胞における自発的対立遺伝子組換えの頻度は非常に低く、その治療能力に主要な制限を加える。それ故、*in vivo*または*Ex vivo*遺伝子標的化による遺伝子治療は、標的化効率の劇的な改良が達成できなければ、実施不可能なままであろう。多くの遺伝子治療の応用について、宿主ゲノムの特異的なロカスにトランスジーンを挿入を標的化できることが所望されている。NHEJの障害を通じた標的細胞における相

10

【0084】

XRCC4及びDNAリガーゼIVといった成分を含むようなDNA修復経路は、宿主細胞のゲノム内へのレトロウイルス及びレトロトランスポゾン挿入に影響することに関与するため、さらなる関連する目的は抗レトロウイルス治療である。レトロウイルスは、ヒト及び動物の健康に重大な危険を有するものであり、とりわけ各種のガン及びヒト成人T細胞白血病/リンパ腫を引き起こす。ゲノム内へのレトロウイルスDNAの挿入は、効率的なウイルス増殖のために必須であり、DNA修復経路の成分の障害によって標的化されて

20

【0085】

さらに、NHEJの調節剤は、部位特異的V(D)J組換えによる成熟免疫グロブリン及びT細胞レセプター遺伝子の生成に必要であるため、この因子は免疫系の機能の調節に使用されて良い。

【0086】

かくして、そのような化合物を同定するためのさらなる方法は、製薬産業にとって有用である。

【0087】

本発明の第九の特徴点は、DNAの非相同的末端結合(NHEJ)を刺激するイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または

30

【0088】

典型的に前記方法は、例えば実施例1に記載され足せるフリー抽出物から得た適切な分画を使用して、または前記記載のNHEJに対する再構成化システムを使用することによって、*in vitro*で実施される。前記方法はまた、前記記載のように*in vivo*で実施されても良い。

【0089】

典型的にDNAのNHEJは、DNA-PK、XRCC4、DNAリガーゼIV、及び適切なDNA基質を含むNHEJ反応混合物で実施される。好ましくは、DNA-PK、XRCC4、及びDNAリガーゼIVは、反応混合物の唯一のポリペプチド成分である。好ましくは、DNA-PK、XRCC4、及びDNAリガーゼIVは、組み合わされる前にそれぞれ実質的に純粋である(例えば少なくとも90%の純度である)。

40

【0090】

好ましい実施態様では、NHEJは実施例1に記載された方法を使用して測定される。特にNHEJ反応によって結合されるDNA基質は好ましくは放射性活性でラベルされており、前記結合は、DNAをサイズ分離することによって、例えばアガロースゲル電気泳動によって測定され、前記DNAは燐光イメージングによって検出される。ハイスループットスクリーニングアッセイが開発されても良く、その例が実施例2に示されている。

50

【0091】

典型的にNHEJは、二つの直鎖状DNA分子のライゲーションに基づく（直線化プラスミドのライゲーション/環状化を測定しても良いが）。ハイスループットスクリーニングは、固相に固定化された第二のDNA分子に対するライゲーションに引き続き、固相に対するラベル化（例えば放射性ラベル化または蛍光的ラベルされた）DNA分子のリテンションの検出に基づいて良い。ライゲーション接合部を横切るPCR増幅（それ故ライゲーションに引き続いた産物のみを生産する）が使用されても良い。

【0092】

典型的に、非特異的な効果を有する化合物よりもむしろ、DNAのNHEJに対する刺激性イノシトールリン酸の効果を特異的に調節または模倣する化合物であることを確認（または否定）するために、試験化合物の効果を評価する一連の反応が実施される。かくして例えば、試験化合物は、添加の順序がNHEJ反応に対する効果を有するかを測定するために、IP₆またはIP₇のような他の刺激性イノシトールリン酸の添加の前または後のいずれかで、NHEJ反応に添加されて良い。別法としてまたは加えて、試験化合物を含み、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸を含む反応と、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸を含まず、試験化合物を含まない反応の間で比較をしてみても良い。

【0093】

NHEJにおける刺激性イノシトールリン酸の効果を特異的に促進する化合物は、典型的に増大したNHEJ活性を導く一方で、NHEJにおける刺激性イノシトールリン酸の効果を特異的に減少する化合物は典型的に減少したNHEJ活性を導く。構造的な意味で刺激性イノシトールリン酸を模倣する化合物は、もしその模倣体が機能的類似体であるならNHEJを増大しても良いが、もしその模倣体が機能的類似体でなければNHEJ活性を減少して良い。

【0094】

本発明の第九の特徴点の方法は、NHEJ反応の触媒性（即ちDNA結合活性）に対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物を同定するのに適している。本発明はまた、そのような調節がDNA結合活性の変化を直接的に導くかどうか、NHEJ反応の成分の間で相互作用を調節する化合物の同定を含む。かくして本発明の第十の特徴点は、DNAの非相同的末端結合（NHEJ）を刺激する、イノシトールヘキサキスリン酸（IP₆）または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物の同定方法を提供し、この方法は、イノシトールヘキサキスリン酸（IP₆）または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で、NHEJ反応の成分の間の相互作用に対する試験化合物の効果を測定する工程を含む。

【0095】

本発明の好ましい実施態様では、相互作用が測定されるNHEJ反応の成分は、DNA依存性プロテインキナーゼ（またはその成分、即ちDNA PK_{cs}、Ku70及びKu80）、XRCC4、DNAリガーゼIV、及び適切なDNA基質のいずれか一つ以上である。他の相互作用は、それ自体が複合体（Mre11/MBS/Rad50）を形成するMre11、NBS及びRad50のいずれか一つと、XRCC4、DNAリガーゼIV及びDNA基質のいずれか一つの相互作用を含む。Mre11/NBS/Rad50複合体は、DNA末端のプロセッシングにおいてDNA-PKの上流で最終的に機能すると解される。Mre11/NBS/Rad50複合体のさらなる詳細は、Labhart（1999）Eur. J. Biochem. 265, 849-861に見出される。

【0096】

我々は実施例4において、IP₆及びIP₇のような他の刺激性イノシトールリン酸は、DNA-PKのKu70/80ヘテロダイマーに結合することを測定したため、このヘテロダイマーが存在し、それと他のNHEJ成分の間の相互作用が測定されることが特に好ましい。Ku70/80及びDNAの間の相互作用でも良いが、Ku70/80及びDNA-PK_{cs}の間の相互作用が測定されても良い。これらの相互作用のいくつかはまた、DNAの存在を必要とする。例えば、Ku-70/80-IP₆及びDNA-PK_{cs}は

10

20

30

40

50

、超複合体を形成するためにDNAを必要とするであろう(図10参照)。ヘテロダイマーにおけるKu70及びKu80サブユニットの間の相互作用が測定されても良い。

【0097】

タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-DNA相互作用、及びタンパク質-小分子相互作用のような成分の間の相互作用を測定する方法の詳細は、他のプロテインキナーゼに関する本発明の特徴点の議論に引き続き以下に記載される。しかしながら、本発明のこの特徴点に関して、簡便には、非特異的な効果を有する化合物よりもむしろ、NHEJ反応の成分の間の相互作用に対するIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を特異的に調節または模倣する化合物であることを確認(または否定)するために、試験化合物の効果を評価する一連の測定がなされる。かくして例えば、前記試験化合物は、添加の順序が成分の間の相互作用に対する効果を有するかを測定するために、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の添加の前または後のいずれかで、測定される相互作用を有するNHEJ反応の成分を含むサンプルに添加されて良い。別法としてまたは加えて、試験化合物、及びIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸を含む、測定される相互作用を有するNHEJ反応の成分を含むサンプルにおける相互作用と、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸を含まず、または試験化合物を含まない同等なサンプル(NHEJ成分に関して)における相互作用の間での比較がなされても良い。

10

【0098】

刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物は、刺激性イノシトールリン酸の存在下である場合、前記成分の相互作用を調節または模倣する活性によって選択できる。

20

【0099】

本発明のこの特徴点の好ましい実施態様は、DNA-PKとそのDNAエフェクター；DNA-PKと共基質(ATPのような)；DNA-PKとXRCC4；DNA-PKとDNAリガーゼIV；XRCC4とDNAリガーゼIV；並びにDNAリガーゼIVとそのDNA基質及び/またはATPのような共基質の間で相互作用(IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で)を測定する。本発明のこの特徴点のさらに好ましい実施態様は、Ku70/80とDNA-PK_{cs}の相互作用(IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で)、並びにKu70とKu80の間の相互作用(DNA-PK_{cs}の存在下または不存在下で)を測定する。Ku70/80とDNA-PK_{cs}の間の相互作用は、DNAを必要としても良い。

30

【0100】

これらの成分のいずれか一つと、Mre11/NBS/Rad50複合体の成分のいずれか一つの間での相互作用が測定されても良い。

【0101】

これらの成分の特定のものの間での相互作用の測定はWO 98/30902に記載されており、これらの測定法は参考としてここに取り込まれる。前述のように、DNAのNHEJ、及びNHEJに必要とされる成分の間の相互作用におけるIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の重要性に関してWO 98/30902には何の認識も存在しないことに注意すべきである。本発明のこの特徴点では、もしこの方法が、DNA-PKの別の成分(そのエフェクターDNAまたはDNAリガーゼIVまたはXRCC4またはその同系DNAまたは基質若しくは共基質のような)との相互作用を改変することによって、あるいはDNA-PKの成分(即ちDNA-PK_{cs}及びKu70及び/またはKu80)の間の相互作用を改変することによって、NHEJを刺激することにおけるIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物を同定するために使用されるのであれば特に好ましい。

40

【0102】

本発明の第十一の特徴点は、プロテインキナーゼに対するイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物の同定方法を提供し、前記方法は、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の存在下で、

50

プロテインキナーゼの触媒活性、またはプロテインキナーゼの別の成分と相互作用する能力に対する試験化合物の効果を測定する工程を含む。

【0103】

プロテインキナーゼは、一般的に特異的な態様で、ATPからタンパク質に -リン酸基を転移することによって、ヒドロキシル含有アミノ酸残基（セリン、トレオニンまたはチロシン）においてタンパク質をリン酸化する。プロテインキナーゼに対する基質は典型的に同系タンパク質であるが、簡便にはそれは、そのタンパク質から由来し、リン酸化可能なアミノ酸残基を含む合成ペプチドであっても良い。プロテインキナーゼはまた、自己リン酸化可能である。

【0104】

典型的にプロテインキナーゼは、ホスホイノシチド3-キナーゼの触媒ドメインと類似であるドメイン、好ましくはC末端ドメインを有するプロテインキナーゼである。簡便にはプロテインキナーゼは、DNA修復応答に参与するもののような、ゲノム安定性の維持に参与するプロテインキナーゼである。好ましくはプロテインキナーゼは、DNA依存性プロテインキナーゼ、ATR、ATM、FRAP、または*Saccharomyces cerevisiae* 遺伝子産物Tel1p、Mec1p、Tor1p若しくはTor2p、または*Schizosaccharomyces pombe* 遺伝子産物Rad3のいずれか一つである。もしプロテインキナーゼがDNA-PK、ATR、ATMまたはFRAPのいずれか一つであれば特に好ましくは、もしプロテインキナーゼがDNA-PKであれば最も好ましい。

10

20

【0105】

DNA-PKはXRCC4をリン酸化することが既知であり、それ故XRCC4は適切な基質である。XRCC4のペプチド部分はまた、基質として適切であって良い。

【0106】

DNA-PK、ATR、ATM及びFRAPのそれぞれは、*in vitro*でp53をリン酸化できる。このリン酸化は、ATM、ATR及びDNA-PKについてp53におけるSer15にマップされており、そのためp53のN末端ペプチドは基質として使用されて良い(Hall-Jackson等(1999)及びそれに引用されている文献)。Yarosh等(2000) *J. Invert. Dermatol.* 114, 1005-1010は、FRAPがUV誘導性損傷と関連するDNA依存性プロテインキナーゼであることを示している。FRAPはまた、PHAS-1をリン酸化する(Brunn等(1997) *Science* 277, 99-101)。

30

【0107】

DNA-PK、ATR、ATMまたはFRAPのようなプロテインキナーゼの触媒活性は、ATPからの転移に引き続く基質における放射性ラベル化リン酸基の取り込みの測定によるような、当該技術分野で周知の方法を使用して容易に測定できる。典型的に、非特異的な効果を有する化合物よりもむしろ、プロテインキナーゼに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣する化合物であることを確認(または否定)するために、試験化合物の効果を評価する一連の反応が実施される。かくして例えば試験化合物は、添加の順序が触媒活性に対する効果を有するかを測定するために、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の添加の前または後のいずれかで、プロテインキナーゼ反応に添加されて良い。別法としてまたは加えて、試験化合物及びIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸を含む反応と、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸を含まず、あるいは試験化合物を含まない反応の間での比較がなされても良い。

40

【0108】

プロテインキナーゼの触媒活性は、ATPから基質(それは自己自身を含む、即ち自己リン酸化であって良い)への -リン酸の転移によって評価できる。典型的に -リン酸は放射性ラベルされ、そのため基質のリン酸化は、放射性活性を検出することによって検出できる(例えばシンチレーションカウンティング、オートラジオグラフィまたは蛍光イメージング)。別法として、それは非リン酸化基質からリン酸化基質を分離することによ

50

って、または例えば蛍光によるようなホスホタンパク質特異的抗体を使用することによって検出できる。

【0109】

プロテインキナーゼと別の成分との間の相互作用に対する試験化合物の効果が測定される場合、もしプロテインキナーゼがDNA-PKの触媒サブユニット（即ちDNA-PK_C）であり、別の成分がKu70、Ku80、DNAリガーゼIV、XRCC4またはそれらの適切なDNAエフェクターであれば特に好ましい。好ましくはプロテインキナーゼがDNA-PKである場合、他の成分はXRCC4である。

【0110】

DNA-PKと同様に、プロテインキナーゼATM及びATRは、DNAによって活性化される。FRAPは、DNA損傷応答によって刺激化できる。かくしてさらに好ましい実施態様では、プロテインキナーゼはDNA-PK、ATM、ATRまたはFRAPであり、そのエフェクターDNAとの相互作用が測定される。 10

【0111】

典型的に、非特異的な効果を有する化合物よりもむしろ、プロテインキナーゼに対するIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を特異的に調節または模倣する化合物であることを確認（または否定）するために、試験化合物の効果を評価する一連の反応が実施される。かくして例えば試験化合物は、添加の順序が成分間の相互作用に対する効果を有するかを測定するために、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の添加の前または後のいずれかで、プロテインキナーゼ及びそれが相互作用する化合物（その基質であるがATPの不存在下でといった、またはDNA-PKまたはATRまたはATMまたはFRAPの場合であればエフェクターDNAといった）を含むサンプルに添加されて良い。別法としてまたは加えて、試験化合物及びIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸を含むサンプルである、プロテインキナーゼ及びそれが相互作用する成分を含むサンプルにおける相互作用と、IP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸を含まず、あるいは試験化合物を含まない同等なサンプル（プロテインキナーゼ及び相互作用する成分の観点で）における相互作用の間での比較がなされても良い。 20

【0112】

プロテインキナーゼが相互作用する成分は、ATPまたは当該技術分野で周知の加水分解できない類似体といったATPの類似体を含む。 30

【0113】

本発明のさらなる特徴点は、プロテインキナーゼに対するIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物の同定方法を提供し、前記方法は、試験化合物が前記プロテインキナーゼまたはそのサブユニットに対するIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を減少または増大するかを測定する工程を含む。

【0114】

プロテインキナーゼのサブユニットは、DNA-PKのKu70/Ku80ヘテロダイマーであることが特に好ましい。

【0115】

刺激性イノシトールリン酸（IP₆。のような）のプロテインキナーゼまたはそのサブユニットとの相互作用（会合）、及びそれらからの解離は、当該技術分野で周知の方法を使用して測定されて良い。典型的にプロテインキナーゼは固定化され、検出可能にラベルされた刺激性イノシトールリン酸の結合が測定される。典型的にIP₆。のような刺激性イノシトールリン酸は、放射性ラベルまたは蛍光的にラベルされる。以下に記載されるようにシンチレーション近接アッセイが、結合アッセイにおいて特に有用である。 40

【0116】

我々は、IP₆。及びIP₇。がDNA-PKに結合することを示した。とりわけIP₆。及びIP₇。は、DNA-PKの一部を形成するKu70/80ヘテロダイマーに結合することが示されている。かくして、プロテインキナーゼは、ホスホイノシチド3-キナーゼの触媒ドメインと類似であるドメイン、好ましくはC末端ドメインを有するプロテインキナー 50

ゼであることが特に好ましい。プロテインキナーゼは好ましくは、前述のプロテインキナーゼのファミリーのメンバーのいずれか一つである。もしそれがDNA-PKであるが特に好ましい。DNA-PKは三つのサブユニットから作製されることに注意すべきである。結合アッセイは、前述のようにDNA-PK_{cs}、Ku70またはKu80のいずれか一つ、IP₆のような刺激性イノシトールリン酸に対する結合部位を維持したそれらのいずれかの機能的変異体（例えば断片）を使用して良い。好ましくは結合アッセイは、Ku70/Ku80ヘテロダイマーを使用する。

【0117】

本発明のまたさらなる特徴点は、DNA-PKのKu70/80ヘテロダイマーまたはそのKu70サブユニット若しくはそのKu80サブユニットに対する、IP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物の同定方法を提供し、その方法は、試験化合物が、前記Ku70/80ヘテロダイマーまたはそのKu70サブユニット若しくはそのKu80サブユニットに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を減少または増大するかを測定する工程を含む。

10

【0118】

好ましくは、Ku70/Ku80ヘテロダイマーが使用される。

【0119】

一つの実施態様では、イノシトールリン酸（例えばIP₅またはIP₆またはIP₇）は固体の基体（マイクロタイタープレートの床及び/または壁のような）に固定化され、Ku70/80ヘテロダイマーがそれに結合する。競合的結合アッセイが試験化合物で実施される。使用されるKu70/80は、イノシトールリン酸に結合したKu70/80の存在または不存在（または枯渇）が容易に検出できるように、適切に検出可能にラベルされて良い。

20

【0120】

さらにまたは別法として、Ku70/80（またはその成分のいずれか）に選択的に結合する検出可能にラベルされた抗体が、イノシトールリン酸に結合したKu70/80の存在または不存在（または枯渇）を検出するために使用されて良い。適切な抗体は、Neo Markers, LabVission Corporation, 47790 Westinghouse Drive, Fremont, CA 94539, USAから市販で入手可能である。

30

【0121】

本発明では、Ku70/80ヘテロダイマーまたはそのKu70サブユニット若しくはそのKu80サブユニットが、DNA-PK_{cs}の存在を必要としないことが予測されるであろう。Kuタンパク質（DNA-PK_{cs}とは独立に）はテロメア生物学に関与し、特にPeterson等（2001）Nature Genet. 27, 64-67は、テロメアRNAにおけるステムループの機能がDNA修復タンパク質Kuにリンクしていることを指摘する。かくして、Ku70/80ヘテロダイマーまたはそのKu70サブユニット若しくはそのKu80サブユニットに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物は、テロメアまたはテロメアーゼ機能を調節しても良い。

40

【0122】

好ましくは前記化合物は、Ku70/80ヘテロダイマーに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節するものである。

【0123】

本発明のまたさらなる特徴点は、XRCC4またはDNAリガーゼIVに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を調節する化合物の同定方法を提供し、前記方法は、試験化合物が、前記XRCC4またはDNAリガーゼIVに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の結合を減少または増大するかを測定する工程を含む。

【0124】

XRCC4またはDNAリガーゼIVに対する刺激性イノシトールリン酸の結合は、プロ

50

テインキナーゼに対する結合と類似の方法を使用して実施できる。

【0125】

本発明のスクリーニング方法またはアッセイに添加されて良い試験化合物または物質の量は、使用される化合物または方法のタイプに依存して試行錯誤によって通常決定されるであろう。典型的に試験化合物は、約0.01nmから100μMの濃度で使用されて良い。試験化合物として使用されて良い化合物は、天然または合成化合物であって良い。いくつかの特徴付けされたまたはされていない化合物を含んで良い植物の抽出物もまた使用されて良く、「試験化合物」と考慮される。

【0126】

ハイスループット操作が可能であるスクリーニングアッセイが特に好ましいことが予測されるであろう。例としては、細胞ベースのアッセイ及びタンパク質-タンパク質結合アッセイが含まれて良い。SPAベース(シンチレーション接近アッセイ(Scintillation Proximity Assay); Amersham International)のシステムが使用されても良い。例えば、プロテインキナーゼの活性を調節可能な化合物の同定のためのアッセイは、以下のように実施されて良い。シンチラント及びリン酸化されるポリペプチドを含むビーズを調製する。プロテインキナーゼ及び³²P-ATPまたは³³P-ATPを含むサンプルと、試験化合物とこのビーズを混合する。簡便にはこれは96穴ウェルフォーマットで実施される。次いでこのプレートを、³²Pまたは³³P SPAアッセイについての既知のパラメーターを使用して、適切なシンチレーションカウンターを使用して計測する。シンチラントに対して接近している³²Pまたは³³Pのみが、即ちポリペプチドに結合したもののみが検出される。そのようなアッセイの変形例、例えばポリペプチドが抗体に対する結合を介してシンチラントビーズに固定化されたものが使用されても良い。

【0127】

ポリペプチド/ポリペプチド相互作用を検出する方法は、イオンスプレームスペクトロスコピー/HP LC法または他の物理的及び分析的方法での超濾過を含む。例えば当業者に周知である、互いに非常に近接した場合に蛍光ラベルの相互作用を測定することによって、二つの蛍光ラベル化分子の結合が測定される、蛍光エネルギー共鳴転移(FRET)法が使用されても良い。

【0128】

例えばDNA、RNA、タンパク質、及びリン脂質といった巨大分子に対するポリペプチドの結合を検出する別法は、例えばPlant等(1995) Analyt Biochem 226(2), 342-348に記載されたような表面プラスモン共鳴アッセイを含む。方法は、例えば放射性活性または蛍光ラベルでラベルされたポリペプチドを使用しても良い。

【0129】

酵母トゥーハイブリッドシステムが、ポリペプチドの間の相互作用を検出するために使用されても良い。

【0130】

酵母トゥーハイブリッドシステムの使用の例は、NHEJ反応混合物の二つの成分のような二つの化合物の使用であり、それらはNHEJを調節する化合物の同定を容易にするために、NHEJに参与する複合体を形成するように相互作用する。これらの化合物は、ここに記載される使用について当該技術分野で周知の酵母トゥーハイブリッド発現システムを採用することによって検出される。転写活性化アッセイを介してタンパク質相互作用の検出を可能にするこれらのシステムは、Gyuris等, Cell 75: 791-803(1993)及びFields & Song, Nature 340: 245-246(1989)に一般的に記載されており、Clontech(Palo Alto, CA)から市販で入手可能である。酵母トゥーハイブリッドアッセイは、NHEJに対するIP₆の効果を調節または模倣する化合物を同定するために、IP₆の存在下で実施される。

【0131】

このアプローチでは、例えばKu70と相互作用する、例えばDNA-PK_{cs}の領域が、Clontechから市販で入手可能であるMATCHMAKER Two-Hybrid Systemキット(カタログ番号K1605-1)で提供される、発現ベクターpGBT9内にGAL4-DNA結合ドメインをコードするDNA断片をサブクローン化することによって、GAL4-DNA結合ドメインに融合される。Ku70の領域とGAL4活性化ドメインの融合物(それはDNA-PK_{cs}の領域と相互作用する)は、Clontechキットで提供される発現ベクターPGAD424内にKu70ドメインコード化DNA断片をサブクローン化することによって生成される。同様な発現ベクターもまた使用可能である。酵母トランスフォーメーション及びコロニーリフトフィルターアッセイは、MATCHMAKER Two-Hybrid Systemの方法及び当該技術分野で既知の各種の方法に従って実施される。コロニーフィルターアッセイの前に、トランスフォーム化酵母が、候補化合物で、及び適切にNHEJを調節する能力についてスクリーニングされるIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸で処理されて良い。次いで、酵母システムと組み合わせた候補化合物を使用して得られる相互作用の結果が、全ての他の因子(例えば細胞タイプ及び培養条件)が等しいものである、候補化合物で処理されていない(またはIP₆で処理されていない)酵母システムで観察された結果と比較されて良い。NHEJを調節可能な化合物は、DNA-PK_{cs}とKu70の間の相互作用を改変できる。

10

【0132】

このアプローチの別の実施態様では、Ku70に対するDNA-PK_{cs}の結合を破壊することによってNHEJを減少可能な化合物は、前述のような改変された酵母トゥーハイブリッドシステムを使用して単離されても良く、そこではレポーター遺伝子は、酵母に対して毒性であるリシンのようなタンパク質をコードする。そのようなリシンレポーターを含む酵母細胞は、もしKu70に対するDNA-PK_{cs}の結合が破壊されなければ死亡する。DNA-PK_{cs}/Ku70相互作用を破壊する化合物で処理された酵母細胞は生存コロニーを形成し、この結果から、化合物がNHEJを減少可能であり、おそらく阻害可能であることが推論されても良い。再言するとこのアッセイは、化合物がNHEJに対するIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を調節または模倣するものであることを測定するために、適切にIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸と実施される。

20

30

【0133】

類似の反応が、他の成分とのプロテインキナーゼ相互作用の観点で実施できることが予測されよう。

【0134】

前記記載から、本発明が薬剤またはリード化合物に対するスクリーニング方法に関することが予測されよう。

【0135】

当業者に周知にの用語である、薬剤スクリーニング方法であっても良い、前記記載の方法では、スクリーニングに引き続いて選択された化合物は、薬剤様化合物、または薬剤様化合物の開発のためのリード化合物であっても良いことが予測されるであろう。

40

【0136】

用語、「薬剤様化合物」は当業者に周知であり、例えば医薬における活性成分として、医薬における使用に適したものとして良い特徴を有する化合物の意味を含んで良い。かくして例えば薬剤様化合物は、有機化学の方法によって合成されて良い分子であっても良いが、分子生物学または生化学の方法によるのはあまり好ましくなく、好ましくは5000ドルトン未満であり、水溶性であっても良い小分子である。薬剤様化合物は、さらに特定のタンパク質と選択的に相互作用する特徴を示しても良く、生体利用可能であり、及び/または標的細胞膜を浸透可能であっても良いが、これらの特徴は必須でないことが予測されよう。

【0137】

50

薬剤様化合物は、例えばIP₆より増大した安定性と低い毒性を有して良い。それはまた、IP₆と比較して改良された刺激プロフィールを有して良い。

【0138】

用語、「リード化合物」は同様に当業者に周知であり、その化合物は、それ自体としては使用に適切ではない（例えばそれは企図された標的に対して弱い強さのみ有し、作用の点で非選択的であり、不安定であり、あまり可溶性ではなく、合成が困難であり、または微弱な生体利用可能性を有するため）が、より所望される特徴を有する他の化合物のデザインのための開始点を提供するという意味を含む。

【0139】

本発明のスクリーニング方法において見出される化合物の化学的性質に関しては、いずれかの理論によって結びつけられるものではないが、試験化合物がイノシトール誘導体であれば好ましく、より好ましくはイノシトールリン酸である。特に試験化合物は、ホスホイノシチドまたはIP₆の類似体であって良い。試験化合物は、適切なアッセイに取り込むことができることを条件に、いずれの試験化合物であっても良い。試験化合物のライブラリーは、IP₆の一般的構造及び電荷分布を参考にしてデザインされて良く、化合物のライブラリーは、当該技術分野で周知であるコンビナトリアルケミストリー法を使用して合成されても良い。試験化合物は、アッセイに存在する刺激性イノシトールリン酸ではないことが予測されるであろう。例えばIP₆に対して同様な空間的構造及び/または電荷分布を有する化合物を選択するように、例えばコンピューターで補助されたデザインを使用することによって、本発明のアッセイ及び方法におけるスクリーニングのための試験化合物を選択することが可能であって良い。

【0140】

本発明のスクリーニングアッセイで同定される化合物は、それら自体で医学的治療において有用であっても良く、または医学的治療のための薬剤を開発するために有用であっても良い。特に、本発明のスクリーニング方法によって同定される化合物は、DNAの異常なまたは不適切な非相同的末端結合が存在する疾患の治療のための薬剤の開発において有用であって良い。前記化合物は、ガンを治療するため、放射線療法及び/または化学療法増生に増強するため、遺伝子治療増生を改良するため、相同的組換えを促進するため、レトロウイルス感染を治療するため、並びに免疫系を調節するための薬剤の開発において有用であって良い。

【0141】

本発明の第九及び第十のスクリーニング方法に引き続き、NHEJ反応におけるIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を模倣または調節するものである化合物は、さらなる研究のため選択される。DNA-PK（またはそのサブユニット）またはXRCC4またはDNAリガーゼIVに対する刺激性イノシトールリン酸（IP₆のような）の結合を調節する化合物も、さらなる研究のため選択されて良い。簡便には、次いでこれらの化合物は、ガンの治療、ガン放射線療法及び/または化学療法増生の改良、遺伝子治療増生の改良、相同的組換えの増強、レトロウイルス感染の治療、または免疫系の調節に適した化合物の選択のためにデザインされる別のスクリーニングにおいてさらに試験される。典型的に前記スクリーニングは、問題となる疾患に関連した最終時点で見られる細胞ベースのアッセイを含むものである。細胞ベースのスクリーニング及び動物モデルは、ガン、ガンの放射線療法及び/または化学療法の増強、遺伝子治療、相同的組換え、レトロウイルス感染、及び免疫系の調節の少なくともいくつかに利用可能である。

【0142】

本発明の第十一の特徴点のスクリーニング方法に引き続き、化合物は、プロテインキナーゼに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を模倣または調節するものである。簡便には、次いでこれらの化合物は、プロテインキナーゼまたはその相互作用を調節する薬剤の選択のためにデザインされた別のスクリーニングで試験される。本発明の好ましい実施態様では、プロテインキナーゼはDNA-PK、ATM、ATRまたはFRAPのいずれか一つであり、本発明の方法は、細胞周期チェックポイントコントロールを

調節する薬剤の開発において有用である化合物を同定するために使用される。簡便には、本発明の第十一の特徴点の方法において選択される化合物のためのさらなるスクリーニングは、細胞周期チェックポイントコントロールを調製する薬剤を同定するために特別にデザインされるスクリーニングを含む。

【0143】

本発明の第十二の特徴点は、本発明のスクリーニング方法によって同定可能な化合物を提供する。本発明の第十三の特徴点は、本発明のスクリーニング方法によって同定される化合物を提供する。そのような化合物は、特に前述の疾患における医薬において有用である。前記化合物は、医薬における使用のために実装され提示されても良く、DNAの非相同的末端結合の調節から、またはプロテインキナーゼの機能の調節から得られる利益を患者に与える疾患の治療のための医薬の製造において使用されても良い。例えば、前記スクリーニングにおいて得られる化合物は、DNA-PK-IP₆。相互作用を破壊し、それによってNHEJを破壊することによる治療（例えばガンの化学療法または放射線療法）に対して細胞を感受性にしても良い。

10

【0144】

本発明の第十四の特徴点は、DNAの非相同的末端結合(NHEJ)を減少する方法を提供し、前記方法は、NHEJ反応におけるイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリン酸の量を減少する工程、またはその刺激効果を阻害する工程を含む。

【0145】

前述のように、myo-イノシトールトリリン酸(IP₃)はNHEJにおいて阻害的であり、NHEJを減少するために使用されて良い。

20

【0146】

本発明の第十五の特徴点は、DNAの非相同的末端結合(NHEJ)を促進する方法を提供し、前記方法は、NHEJ反応におけるイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)または他の刺激性イノシトールリン酸の量を増大する工程、またはその刺激効果を促進若しくは模倣する工程を含む。

【0147】

前記方法は*in vitro*で使用されても良いが、もしそれらが*in vivo*、例えばDNAのNHEJの減少または促進が所望されている細胞において使用されたならば特に好ましい。もしDNAのNHEJの減少または促進が本発明の方法に従って生じている細胞が、DNAのNHEJの減少または促進の必要のあるヒトまたは動物における細胞であれば好ましい。前述のように、動物またはヒトにおけるDNAのNHEJの減少が所望される疾患は、ガン、ガンの放射線療法及び/または化学療法の増強、遺伝子治療、相同的組換え、レトロウイルス感染、及び免疫系の調節を含む。かくして本発明は、これらの疾患を治療する方法、またはこれらの方法を実施する方法を含み、前記方法は、NHEJ反応におけるIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の量を減少する、またはその刺激効果を促進する化合物の有効量を患者に投与する工程を含む。本発明はまた、DNAのNHEJの減少が所望される疾患の治療のための医薬の製造における、NHEJ反応におけるIP₆。または他の刺激性イノシトールリン酸の量を減少する、またはその刺激効果を促進する化合物の使用を含む。

30

40

【0148】

相同的組換えによる二本鎖切断修復を促進するためにNHEJを減少し、より効率的な遺伝子標的化を導くことが望ましい。

【0149】

ヒスタミンは、細胞におけるIP₆。レベルに影響することが示されている(Sakuma等(1988) *Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 466-472)。

【0150】

抗イノシトールリン酸抗体は、IP₆。のような刺激性イノシトールリン酸の量を減少する

50

ため、またはその刺激効果を阻害するために使用されても良い。抗イノシトールリン酸抗体は、免疫原（またはハプテン）としてイノシトールリン酸を使用して、または合成抗体ディスプレイライブラリー（例えばファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングするためにそれを使用することによって、当該技術分野で周知の方法を使用して調製されて良い。用語、「抗体」は、抗体の抗原結合断片または合成抗体のような抗体様分子を含む。かくして用語、抗体は、当該技術分野で周知のようなFab、Fv、ScFv、dAb等を含む。IP₃に対する抗体は、Shieh & Chen (1995) Biochem. J. 311, 1009-1014及びGoa等 (1994) Biorg. Medicinal Chem. 2, 7-13に記載されており、IP₆に対する抗体は類似の方法によって調製されて良い。

10

【0151】

本発明のスクリーニング方法は、DNA-PK結合部位に対してIP₆と特異的に競合する高アフィニティーIP₆類似体を同定するために使用されても良い。

【0152】

細胞におけるIP₆レベルは、合成酵素（例えばSaccharomyces cerevisiaeにおけるIPK1）またはIP₆ターンオーバーに関与する酵素（例えばホスファターゼ）を標的化することによって上流または下流調節されて良い。当該技術分野で周知であり、特定のヌクレオチド配列（例えばIP₆合成酵素若しくはIP₆ホスファターゼをコードするmRNAまたは遺伝子）を参考にしてデザインされても良いアンチセンス化合物が使用されて良い。

20

【0153】

NHEJの促進は、ガンの傾向を有する患者、または免疫寛容化された患者において所望されて良い。それはA-T患者においても所望されて良い。かくして本発明はまた、これらの疾患の治療方法を含み、前記方法は、NHEJ反応におけるIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の量を増大する、またはその刺激効果を促進または模倣する化合物の有効量を患者に投与する工程を含む。本発明はまた、DNAのNHEJの促進が所望される疾患を治療するための医薬の製造における、NHEJ反応におけるIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の量を増大する、またはその刺激効果を促進または模倣する化合物の使用を含む。

【0154】

前述のように、ヒスタミンは細胞におけるIP₆レベルに影響することが示されており、抗体は刺激性イノシトールリン酸の量を減少する、またはその刺激効果を阻害するために使用されて良い。

30

【0155】

本発明の第十六の特徴点は、プロテインキナーゼの活性または相互作用を調節する方法を提供し、前記方法は、プロテインキナーゼで、イノシトールヘキサキスリン酸（IP₆）または他の刺激性イノシチオールリン酸の量を変化する工程、またはプロテインキナーゼに対するIP₆または他の刺激性イノシトールリン酸の効果を阻害若しくは促進する工程を含む。

【0156】

典型的にプロテインキナーゼは、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼの触媒ドメインと同様な、好ましくはC末端ドメインであるドメインを有するプロテインキナーゼである。

40

【0157】

前記方法は*in vitro*で使用されて良いが、もしそれが*in vivo*、例えばプロテインキナーゼの活性または相互作用を調節することが望ましい細胞において使用されたならば特に好ましい。典型的にプロテインキナーゼの調節は、そのような調節の必要のあるヒトまたは動物の身体における細胞において生じる。

【0158】

本発明のこの特徴点の好ましい実施態様では、プロテインキナーゼは、DNA-PK、A

50

T R、A T MまたはF R A Pのいずれか一つであり、前記方法は細胞周期チェックポイントのコントロールを調節するためにある。

【0159】

さらに好ましい実施態様では、プロテインキナーゼはA T MまたはA T Rである。ここで同定されるA T MまたはA T Rのモジュレーターは、毛細血管拡張性運動失調(A - T)の治療；免疫系の調節(A T Mは十分に機能的な免疫系の生成のために必要なようである)；テロメアの長さの調節(A - T患者の細胞は、正常な患者より迅速にそのテロメアを失う) - これは有用な加齢である、A I D S及び他の疾患；所用ノガンの治療；及びガンの放射線療法または化学療法の増強におけるような、各種の目的のいずれかを処理するのに有用であって良い。

10

【0160】

本発明の前述の化合物またはその製剤は、経口及び非経口(例えば皮下または筋肉内)の注射を含むいずれかの従来法によって投与されて良い。前記治療は、単一の投与量または一定期間の複数の投与量からなる良い。

【0161】

本発明の化合物を単独で投与することが可能である一方で、一つ以上の許容可能なキャリアーと共に、製薬製剤としてそれを提供することが好ましい。キャリアーは、本発明の化合物と適合可能で、その受容者に有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。典型的に前記キャリアーは、滅菌され病原体を含まない水または塩水であろう。

20

【0162】

本発明の第十七の特徴点は、患者が、D N A修復または細胞周期チェックポイントのコントロールにおける欠損を有する、またはその素因を有する稼働かを測定する方法を提供し、前記方法は、(1)患者からサンプルを得る工程、(2)サンプル中のイノシトールヘキサキスリン酸(I P₆)または他の刺激性イノシトールリン酸の濃度または細胞内局在を測定する工程、及び(3)スタンダードとその結果を比較する工程を含む。

【0163】

患者から得られたサンプルは、いずれの適切なサンプルでも良い。典型的にサンプルは、皮膚のような、D N A損傷または細胞周期チェックポイントコントロールの欠損が生じていると知られている組織のサンプル、及び腫瘍サンプルである。I P₆または他の刺激性イノシトールリン酸の濃度または細胞内局在は、いずれの適切な方法によって測定されても良い。例えば抗I P₆抗体は、I P₆を精製し、且つ例えば適切な染色及び共焦点顕微鏡、免疫蛍光顕微鏡のような顕微鏡的方法を使用することによって、並びに免疫組織化学によって、その細胞内局在を検出するために使用されて良い当該技術分野で周知の方法を使用して調製されて良い。別法として、定義されるようなI P₆及び他の刺激性イノシトールリン酸は、E L I S Aのような適切な分析的方法によって測定できる。細胞内局在は、例えば細胞質抽出物と比較した核抽出物におけるI P₆を測定することによって比較できる。

30

【0164】

本発明はまた、イノシトールリン酸またはそのアイソマーの有効な調節量の存在下で、D N A修復を実施する工程を含む、D N A修復活性の調節方法に関連して考慮されて良い。好ましくはイノシトールリン酸はI P₆である。

40

【0165】

ここで使用されるように、いずれのイノシトールリン酸に対して言及されている場合も、それはその塩、特に生理学的に許容可能な塩に対する言及を含む。

【0166】

本発明は、以下の実施例及び図面を参考にしてより詳細に記載されるであろう。

【0167】

【実施例】

実施例1：イノシトールリン酸によるD N A - P K依存性非相同的末端結合の刺激化結果

50

*in vitro*でDNA末端結合を刺激化する因子の精製

以前の研究では、DNA末端結合を促進可能なセルフリー抽出物が、ホスホセルロースクロマトグラフィーによって分画化された(Baumann及びWest, 1998)。一つの分画(PC-Cと称される)は、*in vivo*でNHEJに必要なことが知られている全ての成分(Ku70/80、DNA-PKcs、XRCC4、DNAリガーゼIV)を含み、*in vitro*でDNA末端を結合する制限された能力のみを示した。しかしながら末端結合を促進する能力は、第二の分画(PC-Aと称される)の添加によって回復できた。この相補アッセイは、我々がここで刺激因子A(SFA)と名付けるPC-Aにおける刺激因子の精製のための基礎を与えた。

【0168】

HeLa細胞の核及び細胞質分画への細胞内分画化は、細胞質にSFAが豊富であることを示した(データ示さず)。比較によって、比較的低いレベルのSFAが、核抽出物で検出された。しかしながら、NHEJに関与する因子に対して競合できる核抽出物中の切断された染色体DNAの存在は、これらの二つの細胞内区画における相対的なレベルのSFAを正確に評価することを困難にした。核の除去が、混在するDNAの量を最小化するであろうと考慮して、我々は300LのHeLa細胞の細胞質分画からSFAを調製するように選択した。

【0169】

予備的結合試験は、mono SまたはSP-セファロースのようなカチオン交換樹脂が、SFAを結合しないことを示した。それ故、各種の強度のアニオン交換樹脂を、精製スキームを通じて使用した(図2)。精製の間で、SFAが熱安定性であり、フェノールでの処理に対して非感受性であり、CHCl₃に不溶性であることを発見して、我々は幾分驚いた。UV吸収スペクトロスコピーは、濃縮したSFAのサンプルが280nmで吸収しないことを示し、芳香族アミノ酸が存在しないことを示した(データ示さず)。プロテアーゼ(トリプシン、V8プロテアーゼ、及びプロテイナーゼK+SDS)を使用するSFAを切断する全ての試みは失敗した(データ示さず)。以上よりこれらの観察は、以前にNHEJにおけるタンパク質関与者とであると推定されていたSAFが、ポリペプチドではないことを示唆する。

【0170】

SFAが核酸(RNAまたはDNA)であるかもしれない可能性を調査するために、SFAを、RNアーゼ、NaOH(60で0.1-1.0M)、DNアーゼI、または単球菌ヌクレアーゼのそれぞれで処理した。これらの処理は、末端結合を刺激化するSFAの能力に対して何の効果も有さなかった(データ示さず)。UV吸収スペクトロスコピーは、濃縮したSFAのサンプルが260nmで吸収しないことを示し、サンプル中にプリンまたはピリミジン部分が存在しないことを示した(データ示さず)。これらのデータは、SFAが核酸ではないことを示す。

【0171】

SFAの化学的分析

SFA中に活性成分を同定するために、サンプルをNMR及びマスマスペクトロスコピーにかけた。プロトン脱共役リンNMRスペクトル(図3A)は、リン酸スタンダードに近似する4個のピーク(1:2:2:1の比)を明らかにし、6個のリン酸基を示唆した。ピーク強度の1:2:2:1の比は、二つの独立のセットの等価のリン酸、並びに二つの不等価な個々のリン酸を示唆する。プロトンリン共役スペクトル(図3B)は、リンプロトンダブレットを明らかにし、それぞれのリン酸基が炭素-水素結合に関与する炭素に結合していることと一致した。これらのデータは、SFAサンプルがそれぞれ(-CH)基に直接結合した6個のリン酸を含む有機リン化合物を含むことを示唆する。

【0172】

SFAの分子量を、マスマスペクトロスコピーによって測定した(図3C)。巨大分子、ポリペプチド、またはポリマー状核酸と一般的に関連する範囲で有意なシグナルは観察されない一方、SFAサンプルは、数多くの低分子量の種を含むことが見出された。SFAサ

10

20

30

40

50

ンプルは不均一であることが見出されたが、はっきりとしたピークが660.9 Daの分子量で検出された。さらに、元の660.9 Daのピークからは22 Da (ナトリウムNa⁺の分子量)ごとに異なっているピークの整列が、660.9 Daのピークの下流に観察された。これらの分子量は、660.9 Daの種の+1 (Na⁺)、+2 (Na⁺)及び+3 (Na⁺)の塩に対応すると思われる。

【0173】

SFAの活性成分のIP₆としての同定

イノシトールは、モノからヘキサキスリン酸の範囲の数多くのリン酸化状態で見出される十分にヒドロキシル化した6の炭素環である。イノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆) (図4A)は、SFAと同じ分子量 (659.9 Da)を有し、同じリン含量を有する。IP₆における6個のリン酸の存在、及び水溶液におけるそれらの構造 (Barrientos及びMurthy, 1996; Costello等, 1976; Emsley及びNiaz, 1981)は、SFAの得られたプロトン脱共役³¹P NMRスペクトルで維持されて存在し、それはIP₆のモノイオン形態についてのプロトン脱共役³¹Pスペクトルとマッチする。さらに、IP₆の各リン酸基は、炭素-水素結合に参与する炭素に結合しており、それはプロトン共役リンNMRスペクトルと一致する (図3B)。これらの結果は、マスマススペクトロスコピーによって検出された660.9 Da種が、IP₆のプロトン化形態 ([659.9 + 1]⁺¹ Da)であり、前述のピークの整列が、IP₆での通常形成されるであろうナトリウム塩を表すことを示す。SFAにおける活性成分が実際にIP₆であることを確認するために、市販で入手可能なIP₆を、PC-Cによる末端結合を刺激化する能力についてアッセイした。図4Bに示されるように、IP₆は100 nMの領域の濃度で末端結合を刺激化し、その刺激化は1 µMで最大であった。

10

20

【0174】

IP₆に対するNHEJの特異性を評価するために、他のイノシトールリン酸 (IP₅、IP₄及びIP₃)と、末端結合の刺激化についてのIP₆の能力を比較した。さらにイノシトールヘキサ硫酸 (IS₆) - IP₆のもと同様な電荷分布を提供する一方で、リン酸基よりも硫酸基を提示するイノシトール化合物 - をも評価した。IS₆は末端結合を刺激化できないことが見出され、リン酸基の明らかな必要性を示した (図4C)。実際我々は、IP₆が試験されたものと比較して最も有効なイノシトールリン酸であることを証明した。IP₅及びIP₄も末端結合を刺激化可能であるが、この刺激化の能力はIP₆に対して減少していた。これらのデータは、末端結合がリン酸化イノシトール種を必要とすること、及びNHEJの刺激化がリン酸化の度合いに直接関連していることを示す。

30

【0175】

IP₆がSFAにおける活性成分であるというさらなる証拠は、イノシトールリン酸のような非常に荷電した分子を分離するために一般的に使用される樹脂を使用する、強力なアニオン交換 (SAX) クロマトグラフィーによって得られた。SFAにおけるNHEJ刺激化活性がIP₆と共分画化するかを測定するために、等量のSFAを微量の³H-IP₆でスパイクし、混合物をAG1-X8樹脂でクロマトグラフィーにかけた。相補アッセイをSFAの存在を検出するために実施し、³H-IP₆含量をシンチレーションカウンティングにより評価した。図5に示されるように、SFAのピークとの³H-IP₆ピークは一致した。

40

【0176】

IP₆は小さな分子サイズ (660 Da)であるが、分子量に対する高い荷電の比、及びリン酸基の間で観察される水素結合 (Emsley及びNiaz, 1981)は、低いイオン強度で水溶液においてより大きな見かけの分子サイズを生ずる。これは、低いイオン強度で透析膜によるIP₆のリテンション、及び高いイオン強度で同じ膜を通じたIP₆の通過によって観察されている (データ示さず)。平衡透析試験を、透析膜 (12 - 14 kDaのカットオフ)を横切るSFA及び³H-IP₆の移動を比較するために実施した。SFAと³H-IP₆の両者は、低いイオン強度で平衡透析膜の間で維持され、高いイオン強度では、SFAと³H-IP₆の両者が透析膜を通過した (データ示さず)。

50

これらの観察は、SFA及びIP₆によって共有される物理的特性のリストに加えられる。

【0177】

DNA-PK依存性末端結合に対するIP₆の特異性

前述のデータは、HeLa細胞から精製された刺激因子がイノシトールヘキサキスリン酸 (IP₆)であることを示す。多くの物質(例えばPEG、PVA)が、*in vitro*でのDNAリガーゼの有効性に対する非特異的な刺激効果を有するので、我々は次に、IP₆がDNA-PKによって介在されるNHEJに対して特異的であるかを測定した。これを実施するために我々は、IP₆の存在下または不存在下でのPC-C及びT4 DNAリガーゼのライゲーション有効性を比較した。IP₆はPC-Cによる末端結合を刺激化する一方で、T4 DNAリガーゼによるライゲーションの効力は影響されないことが見出された(図6)。

10

【0178】

DNA-PKによる³H-IP₆の結合

DNA-PK_{CS}の触媒ドメインは、イノシトールリン脂質をリン酸化するPI3-キナーゼで見出されたものに関連する。以前の研究は、PI3-キナーゼにおいては、イノシトール末端基の認識が、この保存されたドメイン内の所定の配列によって介在されることが示されている(図7A)(Bondева等, 1998)。NHEJがDNA-PKに依存的であり、IP₆の添加によって刺激化されると考慮すると、この刺激効果が、IP₆とDNA-PKの間の物理的相互作用のためであることが推測された。

20

【0179】

³H-IP₆とDNA-PKを使用するゲル濾過分析を、IP₆と相互作用するDNA-PKの応力を評価するために実施した。図7Bに示されるように、³H-IP₆はDNA-PKの不存在下でゲル濾過媒体によって維持され、溶出プロフィールにおいて遅い分画で観察された。この実験では、³H-IP₆のリテンションは、溶出プロフィールの質を確立し、³H-IP₆の移動度に対して効果を有さない選択非特異的なタンパク質を提供するように機能するタンパク質サイズスタンダードの存在下で観察された。DNA-PKの存在下では、³H-IP₆は、DNA-PK活性のピークに対応する溶出プロフィールの早期の分画でも観察された。DNA-PKの存在下でのゲル濾過媒体による³H-IP₆の改変されたリテンション、及び³H-IP₆とDNA-PK活性の共分画化は、DNA-PKがIP₆を結合可能であることを示す。

30

【0180】

DNA-PKによるIP₆の結合の特異性を評価するために、我々は別のイノシトールリン酸を結合するDNA-PKの能力を調べた。IP₃はNHEJを刺激化しないことを考慮して(図4C)、我々はこの比較のために³H-IP₃を選択した。³H-IP₆とは対照的に、ゲル濾過マトリックスによる³H-IP₃のリテンションは、DNA-PKの存在によって改変されなかった(図7C)。さらに、実質的なDNA-PK活性を示す分画は、バックグランドレベルの³H-IP₃のみを含む。これは、DNA-PKによるIP₆の観察された結合が、DNA-PKとIP₆の複数のリン酸基の間の非特異的な相互作用によるものであるという可能性に反論している。図7に示されたデータを合わせると、全てのイノシトールリン酸に亘るものではないDNA-PKとIP₆の間の物理的相互作用を示す。

40

【0181】

議論

我々は、*in vitro*でNHEJを刺激化する因子を単離し、この因子をイノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)と同定した。NHEJにおけるIP₆の役割は何であろうか? IP₆は10 μM以上の濃度でホスファターゼインヒビターとして機能することが示されている(Larsson等, 1997)。IP₆がこの濃度の1%でNHEJを刺激化可能であることを考慮すると、IP₆がホスファターゼのインヒビターとしてNHEJにおいて機能するようではない。T4 DNAリガーゼによる末端結合をIP₆が促進

50

できないことは、 IP_6 が容量の排除による巨大分子集合のような非特異的なメカニズムを介して $NHEJ$ を刺激化する可能性に反論している。より可能性のあるのは、 IP_6 が末端結合を刺激化できる低い濃度 ($100 \mu M$) は、刺激化が末端結合装置のいくつかの成分との、直接的または間接的のいずれかの、 IP_6 の相互作用から生じていることを示す。

【0182】

我々は、 IP_5 及び IP_4 もまたより少ない程度ではあるが末端結合を刺激化できることを見出したため、 $NHEJ$ を刺激化する能力は、 IP_6 に制限されるものではないようである。実際、刺激化の効率は、イノシトールリン酸のリン酸化の度合いに直接比例するようである。この相関関係は、 IP_6 が、リガンドとして機能し、リガンド結合種によって結合されるモデルにフィットする。そのようなモデルでは、リガンドの構造における小さい改変 (この場合、 IP_6 から IP_5 または IP_4 への変化) が、リガンド結合相互作用のアフィニティーまたは安定性の大きな減少を引き起こすと予測されるであろう。もしリガンド結合が末端結合に必須であれば、リガンドの構造におけるこれらの小さい改変は、末端結合の効率の大きな減少として表されるであろう。このモデルによってなされる重要な予測は、 IP_6 に結合し且つ $NHEJ$ に関与する種が、 $PC-C$ 分画に存在するに違いないことである。我々は、この IP_6 結合種を $DNA-PK$ と同定した。

10

【0183】

$NHEJ$ における IP_6 の明らかな必要性は、 $DNA-PK$ が非結合状態で不活性な $NHEJ$ にある態様で存在し、 $NHEJ$ 活性種を引き起こすリガンド (IP_6) 結合の差異に転移が存在することを示唆する。従って、 IP_6 の結合は、 $NHEJ$ 装置の他の成分と相互作用する $DNA-PK$ の能力に影響するかもしれない。

20

【0184】

$DNA-PK$ による IP_6 結合の結果は、おそらく IP_6 との会合に際したアロステリックなシフトにより天然で構成的であろう。別法として、 IP_6 の結合は、単に $DNA-PK$ の表面電荷分布を変更するであろう。そのような局所的静電ポテンシャルの改変は、ホスホグリセラートムターゼに対する IP_6 の結合で観察されている (*Rigden* 等, 1999)。この場合、リガンド結合は、水素結合相互作用と、活性部位の裂け目の強力なポジティブ静電ポテンシャルの両者によって介在された。 IP_6 によるこの高度に荷電した裂け目の占有は、溶媒に対していくつかのリン酸をさらし、それが非結合状態に対して局所的静電ポテンシャルに対する重大な効果を有する。この種の別のものは、 $DNA-PK$ の $NHEJ$ 不活性状態から $NHEJ$ 活性状態に、より激しい転移を引き起こすであろう。もちろんこれらの二つの可能性は相互に排他的ではなく、両者のメカニズムが、 $DNA-PK$ の基質特異性、並びに大規模なタンパク質複合体に関与する能力に影響するであろう。

30

【0185】

我々が気付いた範囲では、 $DNA-PK$ は、 IP_6 を結合することが示されている $NHEJ$ に関与することが既知の唯一のタンパク質である。 $DNA-PK$ は、 ATM 及び ATR と同様に、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ ($PI3K$) 関連キナーゼのメンバーである。全ての3種のタンパク質は、特にホスファチジルイノシトールのホスホイノシトール末端を結合してリン酸化する触媒コアダメインにおいて、 $PI3$ -キナーゼに対して強力な配列ホモロジーを示す。しかしながら、脂質基質のリン酸化は、 $DNA-PK_C$ 、またはこの $PI3K$ -関連キナーゼのファミリーの他のメンバーによっては観察されていない (*Carpenter* 及び *Cantley*, 1996; *Hunter*, 1995; *Keith* 及び *Schreiber*, 1995; *Wyman* 及び *Pirola*, 1998)。

40

【0186】

$PI3K$ -関連キナーゼが、プロテインキナーゼと脂肪キナーゼ機能の両者を有する共通の先祖から由来することを仮定する傾向にある。 $PI3K$ 触媒ドメインのミュレーションは、脂質キナーゼ活性の損失を引き起こす一方で、ホスホイノシトール末端に対するア

50

フィニティーを維持しているのであろう。この仮説は、PI3K の推定のホスホイノシトール末端相互作用部位の置換が、*in vitro*で脂質キナーゼ活性を改変または破壊できる一方で、プロテインキナーゼ機能は影響されないままにすることを示す Bondева等 (Bondева等, 1998) による研究で支持されている。明らかに、NHEJとPI3K-関連キナーゼの両者の調査における重要な次の工程は、DNA-PKとIP₆の間の相互作用を特徴付けすること、及びこの結合現象の重要性を調べることであろう。

【0187】

実験法

物質

myo-イノシトール1,4,5-トリリン酸 (IP₃)、D-myo-イノシトール1,3,4,5-テトラキスリン酸 (IP₄)、myo-イノシトール1,3,4,5,6-ペンタキスリン酸 (IP₅)、及びイノシトールヘキサ硫酸 (IS₆)は、Sigmaから購入した。myo-イノシトール1,2,3,4,5,6-ヘキサキスリン酸 (IP₆)は、Sigmaから購入し、Calbiochemからも購入した。³H-IP₆ (10-30 Ci/mmol)は、NENから購入した。

【0188】

PC-Cの精製及び相補アッセイ

HeLa全細胞抽出物を調製し、記載されたようにホスホセルロースに対して段階的に分画化した (Baumann及びWest, 1998)。PC-C分画を、Lバッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0、25 mM KOAc、0.5 mM EDTA、10%グリセロール、1 mM DTT) に対して2時間透析し、-80 で貯蔵した。末端結合反応物 (10 µl)を、2-3 µl (3-5 µg)のPC-C及びHindIII直線化5'-³²Pラベル化pDEA7Z DNA (10 ng)を含む、50 mM HEPES pH 8.0、40 mM KOAc、0.5 mM Mg(OAc)₂、1 mM ATP、1 mM DTT、0.1 mg/ml BSAにおいて実施した。インキュベーションを37 で1時間実施した。³²Pラベル化DNA産物を脱タンパク質処理し、0.6%アガロースゲルで電気泳動し、引き続きオートラジオグラフィによって分析した。結合効率の定量を、燐光イメージングによって実施し、他に述べるところがなければ、データは(%全末端結合サンプル) - (%全末端結合PC-C)として表される。イノシトールリン酸のアッセイのため、水溶液を末端結合反応物に直接加えた。カラム分画のスクリーニングのため、0.5-1 µlの希釈 (Lバッファーで) または非希釈カラム分画を加えた。

【0189】

細胞質抽出物の調製

300 LのHeLa細胞を、5 × 10⁵ 細胞/mlの密度に懸濁液中で培養し、遠心分離によって回収し、PBSで二度洗浄し、液体窒素で瞬間冷凍し、-80 で貯蔵した。必要な場合は、2のパックした細胞容量の低張性溶解バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、1 mM DTT) を加え、細胞を氷上で20分維持した。細胞を、プロテアーゼインヒビター (1 mM PMSF、2.2 ng/ml アプロチニン、1 ng/ml ロイペプチン、1 ng/ml ペプスタチンA、及び1 ng/ml キモスタチン) の存在下で穏やかなホモジェナイゼーション ('B' 棒で35回のストローク) によって開かせた。精製したホモジェネートを10,000 rpmで30分遠心分離し、膜細胞破片と完全な核をペレット化した。精製した細胞質分画を、Lバッファーで4 で2時間透析し、次いでBeckman Ti45ローターで4 で45,000 rpmで45分遠心分離した。全ての透析工程を、12-14 kDaの分子量カットオフでチューピングにおいて実施した。

【0190】

SFAの精製

細胞質抽出物 (100 Lの培養細胞の等量物から得た) を、4 で30分穏やかに揺り動かすことによって、1/3容量のホスホセルロース (Wharman P-11) に吸収

10

20

30

40

50

することによってバッチで最初に分画した。遠心分離に引き続き、非結合分画を保存した。樹脂を等量のLバッファーで二度洗浄した。非結合分画と2回の洗浄物をプールし、Beckman Ti45ローターで4 で45,000rpmで45分遠心した。次いで上清を、Lバッファーで平衡化した5×10cmホスホセルロースカラムに乗せた。フロースルーを、同じバッファーで平衡化した5×10cmアフィゲルブルーカラム(Bio-Rad)に直接通過させた。フロースルーをLバッファーで平衡化した1.6×39cm DEAE Fast Flowカラム(Pharmacia)に乗せ、それをLバッファー中の15カラム容量の0.05M KCl直線勾配で溶出した。0.2-0.25M KClで溶出する活性分画をプールし(DEAE SFAと称する)、全ての300Lの等量物のHeLa細胞細胞質が分画化されるまで-80 で貯蔵した。

10

【0191】

DEAE-SFA分画を、15-20分間沸騰することによって熱変性し、次いでBeckman Ti45ローターで4 で45,000rpmで45分遠心分離し、不溶性の凝集物を除去した。上清をLバッファーで6時間透析し、同じバッファーで平衡化した2.6×37cmアフィゲルヘパリンカラム(Bio-Rad)に適用し、15カラム容量のLバッファー中の0-1.0M KCl直線勾配で溶出した。0.28-0.33M KClの間で溶出した活性分画をプールし、Lバッファーで6時間透析し、次いでMono P Hr5/20カラム(Pharmacia)に乗せた。カラムを5カラム容量のLバッファーで洗浄し、次いで14容量のポリバッファー74-HCl(pH4.0)で洗浄し、最後に50カラム容量の0-2.0M KCl直線勾配で溶出した。1.2-1.35M KClの間で溶出する活性分画をプールし、フェノール/CHCl₃で抽出し、Lバッファーで6時間透析し、Lバッファーで平衡化したMono Q Hr5/5カラム(Pharmacia)に乗せ、30カラム容量のLバッファー中の0-1.0M KCl直線勾配で溶出した。0.18-0.23M KClの間でカラムから溶出する活性分画をプールし、dH₂Oで4 で一晩透析し、-20 で貯蔵した。

20

【0192】

強力なアニオン交換クロマトグラフィー

AG1-X8樹脂(200-400メッシュ、ホルマー形態、BioRad)を、5容量の1.0M ギ酸で洗浄し、次いで15カラム容量のdH₂Oで洗浄した。SFAを4 で一晩dH₂Oで透析した。微量(4nM)の³H-IP₆を加え、サンプルをdH₂Oで平衡化した1.0×1.3cm AG1-X8カラムに適用した。カラムを10カラム容量のdH₂Oで洗浄し、次いで30カラム容量の0.1Mギ酸中の0-2.75Mギ酸アンモニウム直線勾配で溶出した。

30

【0193】

マススペクトロメトリー

SFAナトリウム塩を、約pH2.0に1M HClで酸性化し、1等量の70%メタノール/30%ギ酸で希釈し、10μlのサンプルをカーボン被膜化ナノスプレーキャピラリー針(Protana)に乗せ、分子量をイオントラップ(LCQ Thermoquest)を使用してマススペクトロメトリーによって測定した。

【0194】

NMR

SFAを凍結乾燥し、D₂Oに再懸濁した。プロトン³¹Pスペクトロスコピー(100mmブロードバンドプローブにおいて5mmサンプル)に対して300.13MHzで、及びブロードバンドプロトン脱共役(複合パルス)で121.497MHzで操作する、Bruker AC-300パルスFourierトランスフォームNMRスペクトロメーターを使用して測定を実施した。リファレンス³¹Pシグナルを、+/-50ppmウィンドウで検出した。

40

【0195】

平衡透析

低イオン強度での分析のため、サンプル(1ml)を攪拌しながら4 で21時間0.5

50

L d H₂ Oで透析した。高イオン強度のため、サンプルを4 で48時間0.25 Lの2.5 M NaClで透析した。12 - 14 kDaの分子量カットオフでの透析チュービングを使用した。

【0196】

T4 DNAライゲーションアッセイ

T4 DNAリガーゼ (NEB) を含む反応 (10 μl) を、イノシトールリン酸の存在下及び不存在下で25 で1×T4 DNAリガーゼバッファー (NEB) で実施した。反応を停止し、脱タンパク質化し、アガロースゲル電気泳動によって産物を分析した。

【0197】

DNA - PKに結合する³H - IP₆のゲル濾過分析

結合反応 (55 μl) を、30分4 で、5000ユニットのDNA - PK (Promega) または1.8 mg/mlのゲル濾過用のタンパク質サイズスタンダード (BioRad)、及び100 nM³H - IP₆ または³H - IP₃ を含む、25 mM HEPES pH 7.5、50 mM KCl、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、10%グリセロール、0.1% NP - 40で実施した。複合体を、40 μl/分で、50 mM HEPES pH 8.0、40 mM KOAc、0.1 M KCl、10%グリセロール、1 mM DTTにおいてSuperose 12 PC3.2/30カラムを稼働して分離した。50 μlの分画を回収した；各分画の20 μlのサンプルを、³Hシンチレーションカウンティング (5 ml Ecoscint Aにおいて10分/サンプル) に対して使用し、10 μlをSignaTECT DNA - PKアッセイシステム (Promega) を使用してDNA - PKキナーゼ活性についてアッセイした。

10

20

【0198】

実施例1に対する参考文献

【参考文献】

Barrientos, L. G., and Murthy, P. P. N. (1996). Conformational studies of myo-inositol phosphates. *Carbohydr. Res.* 296, 39-54.

Baumann, P., and West, S. C. (1998). DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14066-14070.

Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C. M., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A., and Jackson, S. P. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* **80**, 813-823. 10

Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., and Wymann, M. P. (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* **282**, 293-296. 20

Carpenter, C. L., and Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2**, 153-158.

Chu, G. (1997). Double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* **272**, 24097-24100.

Costello, A. J. R., Glonek, T., and Myers, T. C. (1976). ³¹P nuclear magnetic resonance-pH titrations of *myo*-inositol hexaphosphate. *Carbohydr. Res.* **46**, 159-171. 30

Critchlow, S. E., and Jackson, S. P. (1998). DNA end-joining: from yeast to man. *TIBS* **23**, 394-398.

Emsley, J., and Niazi, S. (1981). The structure of *myo*-inositol hexaphosphate in solution: ³¹P N.M.R. investigation. *Phosphorus and Sulfur* **10**, 401-408. 40

Essers, J., van Steeg, H., de Wit, J., Swagemakers, S. M. A., Vermeij, M., Hoeijmakers, J. H. J., and Kanaar, R. (2000). Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J.* **19**, 1703-1710.

Hartley, K. O., Gell, D., Smith, G. C. M., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M. A., Admon, A., Leesmiller, S. P., Anderson, C. W., and Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* **82**, 849-856. 10

Hunter, T. (1995). When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* **83**, 1-4. 20

Keith, C. T., and Schreiber, S. L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell-cycle checkpoints. *Science* **270**, 50-51.

Larsson, O., Barker, C. J., Sjöholm, A., Carlqvist, H., Michell, R. H., Bertorello, A., Nilsson, T., Honkanen, R. E., Mayr, G. W., Zwiller, J., and Berggren, P. O. (1997). Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺ channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science* **278**, 471-474. 30

Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., and Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 1794-1801.

Modesti, M., Hesse, J. E., and Gellert, M. (1999). DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *EMBO J.* 18, 2008-2018.

Rigden, D. J., Walter, R. A., Phillips, S. E., and Fothergill-Gilmore, L. A. (1999). Polyanionic inhibitors of phosphoglycerate mutase: combined structural and biochemical analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 691-699. 10

Smith, G. C. M., and Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916-934.

Taccioli, G. E., Rathbun, G., Oltz, E., Stamato, T., Jeggo, P. A., and Alt, F. W. (1993). Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 260, 207-210. 20

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17, 5497-5508. 30

Weaver, D. T. (1996). Regulation and repair of double-strand DNA breaks. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 6, 345-375.

Wymann, M. P., and Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 127-150. 40

【 0 1 9 9 】

実施例 2 : NHEJ についてのハイスループットスクリーニングアッセイ
ELISA アッセイと同様に機能するマイクロタイタープレート (96 穴) アッセイを使用する。「標的」二本鎖 DNA を、プレートに接着する (相補的で露出した非変性末端を有するオリゴ 1 及び 2 の配列と称される)。細胞抽出物を、「検出」二本鎖 DNA と混合する。それは直鎖状二本鎖 - 相補的であるオリゴ 3 及び 4 - であり、一つの露出した非変性末端 (標的 DNA にライゲートされる) を有し、他の末端はビオチンによって 5' 及び 3' の両方がブロックされている; オリゴ 3 は 5' がビオチン化され、オリゴ 4 は 3' がビオチン化されている。ビオチン部分は二つの機能を果たす: 1) DNA の末端をブロックし、マルチマー形成と活性の非直線状の記録を引き起こすであろうさらなるライゲーション 50

ンを防止する、及び2)検出用。IP₆を含むNHEJ反応成分を、検出DNA(及びバッファー及びMg⁺⁺及びATP)の存在下でプレート(標的二本鎖を提示する)でインキュベートする。プレートを洗浄してタンパク質と過剰な検出DNAを除去する。検出DNAをプレートに維持する唯一の方法は、標的DNAとのライゲーションによる。検出二本鎖の存在はNHEJを示す - このリテンションは定量的であるはずである。ビオチンの検出/定量は、アビジン結合酵素と発色性酵素基質を使用するELISAアッセイで実施されて良い。

【0200】

実施例3: IP₇はIP₆よりNHEJを刺激化する

IP₆はIP₇へとさらにリン酸化できる。これは、イノシトール環の一つの炭素でリン酸化された種で生じる。我々は、これらのリン酸化イノシトールがPC-CによってNHEJを刺激化するかどうか調べるために、IP₇pp5及びIP₇-pp6を試験した。図8に示されるように、両者のIP₇種はPC-Cによる末端結合を刺激化し、この刺激化はIP₆で達成されるものより約10倍優れている。これらのデータは、IP₆がNHEJの刺激化に非常に有効である一方で、IP₆はイノシトールリン酸の中でNHEJの結いイルの生物学的に関連するエフェクターではないことを示唆する。

【0201】

実施例4: DNA-PKのKu70/80ヘテロダイマーは特異性を持ってIP₆に結合する

以前に記載されたように、DNA-PK(Ku70/80ヘテロダイマーとPI-3様キナーゼDNA-PK_{cs}からなる)は、特異性を持ってIP₆に結合する。我々は、このヘテロダイマーの中で、Ku70/80ヘテロダイマーがこの結合活性に関与していることを決定した。さらに、Ku-IP₆複合体は、より高い次元の複合体を形成するDNAを結合できる。最後に、Ku、IP₆、DNA-PK_{cs}及びDNAを含む超複合体が形成できる。

【0202】

DNA-PKによるIP₆認識の特異性は、イノシトールヘキサ硫酸(IS₆)を使用した競合試験によって評価された。図9に示されるように、トリチウム化IP₆(³H-IP₆)は、ゲル濾過カラムを矯正するために使用される分子量スタンダード(diamonds, STDs)のいずれによっても結合されず、カラムプロフィールの後期で溶出する遠い場所に含まれる容量で検出される。DNA-PKの添加は、複合体形成を示す³H-IP₆の移動度の増大を引き起こす。10から100倍モル過剰で提供されるIS₆は、DNA-PKによって結合される³H-IP₆の量に効果を有さない。これらのデータは、³H-IP₃を使用する結合試験と合わせると、DNA-PKによるIP₆の特異的結合を示す。

【0203】

Ku70/80及びDNA-PK_{cs}が均一に精製され、DNA-PKによるIP₆の結合を調べるために使用された。³H-IP₆がこれらの結合実験で使用され、図10に表される曲線は、各種の条件下のゲル濾過カラムに沿った³H-IP₆の分布を表す。17kDより低いピークで観察された³H-IP₆は、非結合³H-IP₆を表す。精製されたKu70/80(±DNA-PK_{cs})の存在下では、³H-IP₆は150MWの時点に近いカラムから早期に溶出する。これらの曲線は、DNA-PK_{cs}の存在が、ゲル濾過カラムに沿ったKu-³H-IP₆複合体の移動度を改変しないという事実を強調するために、図11に重ねられている。これは、1)Kuが³H-IP₆を結合すること、及び2)DNA-PK_{cs}が³H-IP₆またはKu-IP₆複合体のそれぞれと相互作用しないことを示唆する。DNA-PKはDNAにアセンブリーし、DNAの不存在下では、Ku及びDNA-PK_{cs}は溶液中に分離すると解されている。Ku-³H-IP₆複合体に対するDNAの添加は、ゲル濾過カラムからの溶出プロフィールのシフトを生じる - そのピークはより広くなり(おそらくDNAの移動度のためであろう)、より早期の開始時点を有する。このデータは、Ku-³H-IP₆-DNA複合体が、溶液中で形

10

20

30

40

50

成できることを示唆する。最後に、Ku-IP₆-DNA合体に対するDNA-PK_{CS}の添加は、ゲル濾過カラムに沿った移動度のさらなる増大を引き起こす。この種は非常に大きい-670kD近い-ようであり、それはKu70/80、³H-IP₆、DNA-PK_{CS}、及びDNAを含むものと一致する。

【0204】

ゲル濾過を、DNAの存在下または不存在下でDNA-PK + ³H-IP₆で実施し、図12における曲線を精製した。これらの分画のウエスタンブロット分析を、カラム分画中のDNA-PK_{CS}またはKu70/80の存在を検出するために実施した。図11に示されるように、³H-IP₆のピークは、Ku70/80のピークと一致するが、DNA-PK_{CS}のピークとは一致しない。しかしながらDNAの存在下では、全ての3つのピーク(³H-IP₆、Ku70/80、及びDNA-PK_{CS})は一致し、それはKu70/80、³H-IP₆、DNA-PK_{CS}、及びDNAを含む超複合体と一致する。

10

【0205】

KuによるIP₆結合の特異性を、IP₃、IP₆及びIP₇を使用して競合分析によって調べた(図13)。図13に示されるように、1モル等量のIP₆またはIP₇は³H-IP₆結合における約50%の損失を引き起こす一方、3倍モル過剰のIP₃は何の効果も有さなかった。さらに、IP₆及びIP₇がKuによって等しく認識されることは、Kuによるイノシトールポリリン酸(IP)の結合が、IP₇で観察されたNHEJ刺激の10倍の増大のソースではないことを示す。これらの発見は、IP₆がKuによって結合される一方、NHEJに対するIP₆の刺激効果は、おそらくIP₆-Ku複合体の形成によって調節されるさらなる相互作用から生じるであろうという推測に拡大されるであろう。

20

【0206】

実施例5：イノシトールリン酸結合種を調べるために使用されるスピンカラム
ゲル濾過は、複合体形成に関する豊富な情報を提供できる一方で、それは時間を浪費し、単一のサンプルでの調査に制限される。Ku-IP相互作用の研究を容易にするために、Kavran等(1998) J. Biol. Chem. 273, 30497-30508の研究に基づくスピンカラム法が開発された。IP₆の高い分子量に対する電荷の比は、水溶液において大きな見かけの分子サイズをそれに与える。そのためこの方法は、40kDの分子排除サイズを有するBio-Gel P-30樹脂(BioRad)を使用する。このスピンカラム法を使用する特異性試験の結果が図14に提示されている。明らかに、これらのスピンカラムを使用して観察される特異性のレベルは、図9及び13に示されるものと同一である。この方法は、IP結合種の調査を容易にするであろう。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、非相同的末端結合による二本鎖切断の修復を表す模式図である。この模式図では、放射線または化学的攻撃のいずれかによって引き起こされる二本鎖切断(DSB)が、Kuヘテロダイマー(Ku70/80)及びDNA依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット、DNA-PK_{CS}によって結合される。結合は、ヌクレアーゼの攻撃から遊離末端を保護し、同時にNHEJ装置のアセンブリーを開始する。まだ定義されていない工程を通じてDNA末端は架橋され、XRCC4/DNAリガーゼIV複合体が、修復に作用するDSBに集合する。

40

【図2A】図2AはSFAの精製を示す図である。HeLa細胞質抽出物からSFAを精製するために採用されたクロマトグラフィー工程の模式的説明図である。

【図2B】図2BはSFAの精製を示す図である。PC-Cに対する非希釈DEAE分画の添加によるDNA末端結合の完成を示す図である。サンプルはゲル電気泳動によって分析され、³²P-ラベル化DNAがオートラジオグラフィーによって視覚化された。

【図2C】図2CはSFAの精製を示す図である。mono Qから溶出した分画がLバフファーで1:50に希釈され、PC-Cによる末端結合を完成する能力についてアッセイされた。PC-C単独(-)、及び各カラム溶出プロファイルの選択された領域による末端結合が示されている。直鎖状、ダイマー状、及びトリマー状DNA種の移動度が示さ

50

れている。

【図3A】図3AはSFAの物理的特徴を示す図である。プロトン脱共役リンスペクトルは、1.4909ppm(強度2.582)、1.0003ppm(強度5.465)、0.5554ppm(強度6.002)及び-0.0850ppm(強度2.927)でのリン酸レファレンスに近接する4個のピーク(割合1:2:2:1)を明らかにし、リン酸基を示唆し、リン酸-リン酸共役の証拠を示さなかった。

【図3B】図3BはSFAの物理的特徴を示す図である。プロトンリン共役スペクトルは、炭素水素結合に結合したリンと一致するリンプロトンダブレットを明らかにした。

【図3C】図3CはSFAの物理的特徴を示す図である。イオントラップスペクトルは、660.9Daの分子量を明らかにし、それは $[mass + 1]^{+1}$ -イオンまたは $[659.9 + 1]^{+1}$ -イオンを表す、引き続き682.9Da(+1Na⁺)、704.9Da(+2Na⁺)、726.9Da(+3Na⁺)で関連する一連のナトリウム塩を表す。 10

【図4A】図4Aは、イノシトールリン酸によるDNA-PK依存性末端結合の刺激を表す図である。IP₆の模式図を表す。

【図4B】図4Bは、イノシトールリン酸によるDNA-PK依存性末端結合の刺激を表す図である。IP₆によるPC-Cの完成を表す図である。末端結合アッセイが、増大する量のIP₆で補われたPC-Cを使用して実施された。

【図4C】図4Cは、イノシトールリン酸によるDNA-PK依存性末端結合の刺激を表す図である。DNA-PK依存性NH₂に対するイノシトールリン酸の効果を現す図である。イノシトールヘキサキスリン酸(IP₆)、イノシトールペンタキスリン酸(IP₅)、イノシトールテトラキスリン酸(IP₄)、イノシトールトリキスリン酸(IP₃)、またはイノシトールヘキサ硫酸(IS₆)が、PC-CによるDNA末端結合を刺激するそれらの能力についてアッセイされた。 20

【図5】図5は、強力なアニオン交換クロマトグラフィーによるSFA及びIP₆の共分画化を示す図である。微量(4nM)の³H-IP₆を、1mlの等量のSFAに添加した。精製したサンプルを、AG1-X8樹脂に適用し、物質と方法に記載されたように溶出した。上図、シンチレーションカウンティングによって測定された³H-IP₆の溶出プロフィール。下図、PC-C介在性末端結合の完成によって測定されたSFAの溶出プロフィール。 30

【図6A】図6Aは、DNA-PK介在性の末端から末端のライゲーシオンに対するIP₆の特異性を示す図である。PC-Cによって触媒されるDNA末端結合反応が、2μMのIP₆の存在下または不存在下で分析された。

【図6B】図6Bは、DNA-PK介在性の末端から末端のライゲーシオンに対するIP₆の特異性を示す図である。PC-Cの代わりにT4DNAリガーゼ(0.1u/μl)を使用して、同様な反応が実施された。

【図7A】図7AはDNA-PKによるIP₆の結合を示す図である。DNA-PK_{CS}の模式図を示す。グレーの棒は、PI3-キナーゼの触媒ドメインと類似である配列を有するC末端380aaを表し(Hartley等, 1995)、黒い棒は、PI3-キナーゼの推定のイノシトールリン酸末端結合ドメインの位置を示す(Wymann等, 1998)。ウォルトマニン相互作用の標的と解されるリジン(K)残基が示され、同様にプロテインキナーゼのATP結合活性部位に位置すると解される二つのアスパラギン酸(D)残基が示される。 40

【図7B】図7BはDNA-PKによるIP₆の結合を示す図である。DNA-PKによる³H-IP₆結合のゲル濾過分析を示す。上図、非特異的タンパク質の存在下(1.8mg/ml)での³H-IP₆の溶出プロフィール。中図、DNA-PKの存在下での³H-IP₆の溶出プロフィール。下図、Bの中図に示された分画のDNA-PKキナーゼ活性の溶出プロフィール。

【図7C】図7CはDNA-PKによるIP₆の結合を示す図である。DNA-PKによる³H-IP₃のゲル濾過分析を示す。上図、タンパク質サイズスタンダード(1.8m 50

g / ml) での ³ H - I P ₃ の溶出プロフィール。中図、DNA - PK での ³ H - I P ₃ の溶出プロフィール。下図、C の中図に示された分画の DNA - PK キナーゼ活性の溶出プロフィール。

【図 8】図 8 は、I P ₇ - p p 5 及び I P ₇ - p p 6 の両者が P C - C によって N H E J を刺激し、この刺激化が I P ₆ によって達成されたものより約 10 倍優れていることを示す図である。

【図 9】図 9 は、I S ₆ が DNA - PK に対する結合において I P ₆ と競合しないことを示す図である。

【図 10】図 10 は、各種の条件の下でのゲル濾過カラムに沿った ³ H - I P ₆ の分布を示す図である。Superdex 200 ゲル濾過、50 μl 分画、シンチレーションカウンティング 20 μl / 分画 100 nM ³ H - I P ₆、100 nM Ku、100 nM DNA (200 nM DNA 末端)、100 nM PKCS。ランニングバッファー：50 mM HEPES, pH 8.0、40 mM KOAc、10% グリセロール、0.1 M KCl、1 mM DTT。

【図 11】図 11 は、図 10 から得た Ku + ³ H - I P ₆ 及び Ku + DNA - PKCS + ³ H - I P ₆ の曲線を重ねた図であり、DNA - PKCS の存在が、図 10 から得た Ku - ³ H - I P ₆ 曲線の移動度を変更しないことを強調し、DNA - PKCS の存在が、ゲル濾過カラムに沿った Ku - ³ H - I P ₆ 複合体の移動度を変更しないことを強調する。

【図 12】図 12 は、DNA の存在下または不存在下での DNA - PK + ³ H - I P ₆ で実施されたゲル濾過の結果を示す図である。

【図 13】図 13 は、I P ₃、I P ₆ 及び I P ₇ を使用する Ku による I P ₆ 結合の競合分析の結果を示す図である。

【図 14】図 14 は、スピンカラム法を使用する特異性試験の結果を示す図である。

【図 1】

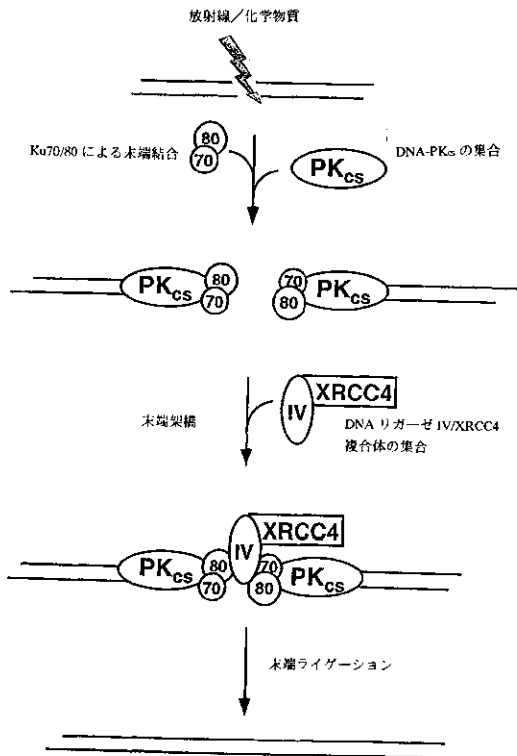
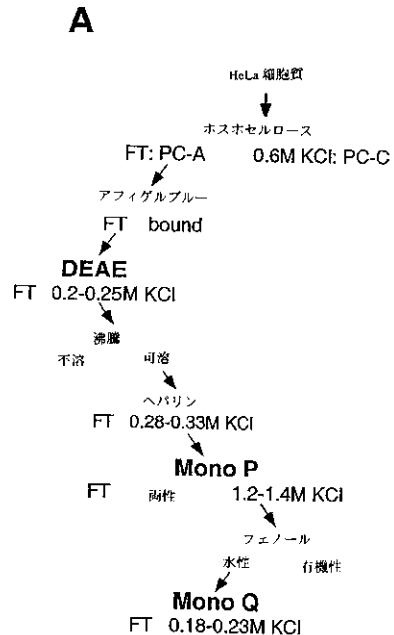


Figure 1

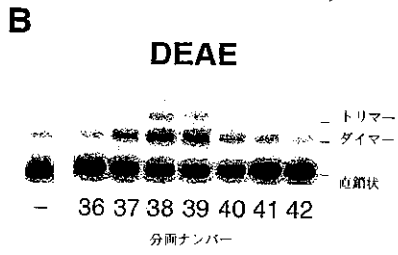
【図 2 A】

Figure 2 (page 1 of 2)

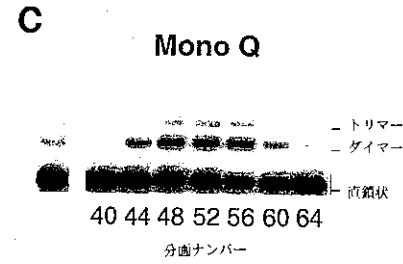


【 図 2 B 】

Figure 2 (page 2 of 2)

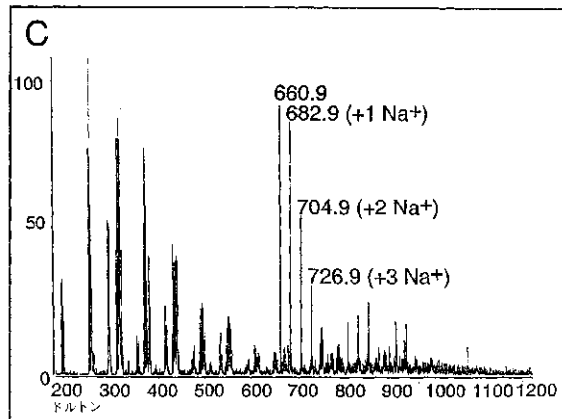


【 図 2 C 】



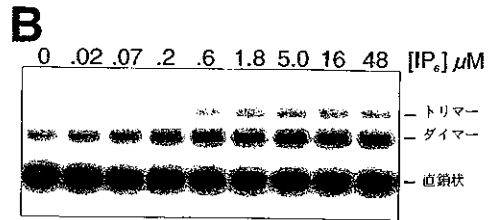
【 図 3 C 】

Figure 3 (page 2 of 2)



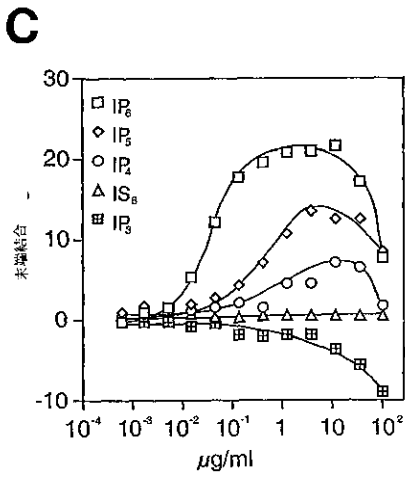
【 図 4 B 】

Figure 4



【 図 4 C 】

Figure 4



【 図 5 】

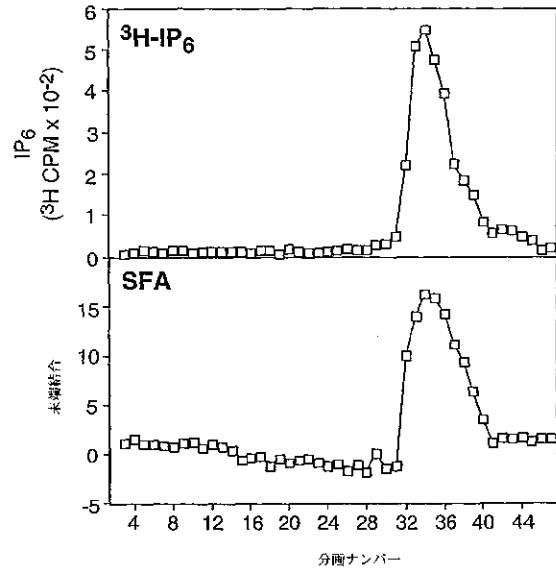
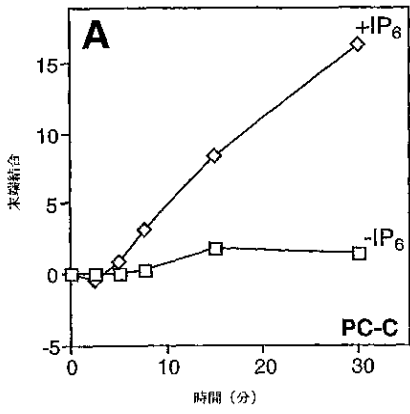


Figure 5

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

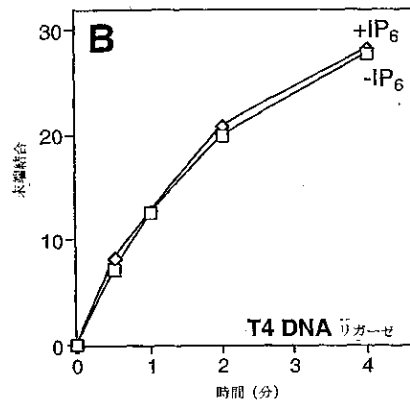


Figure 6

【 図 7 A 】

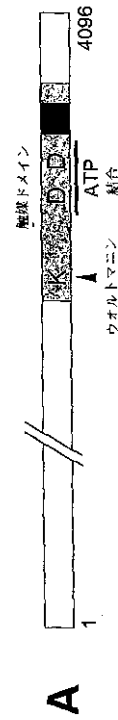
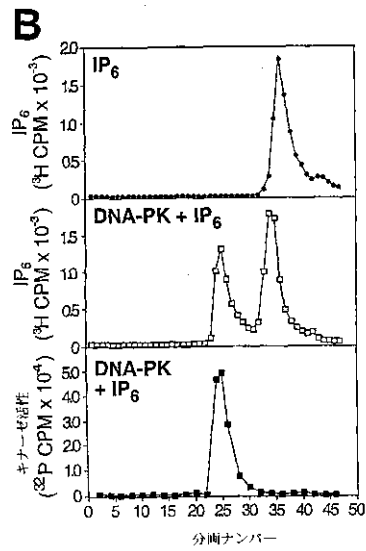
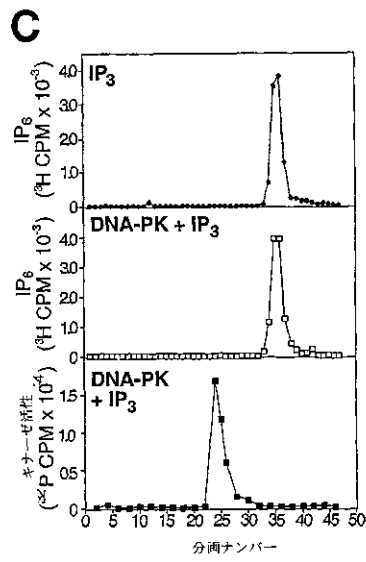


Figure 7 (page 1 of 2)

【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 】

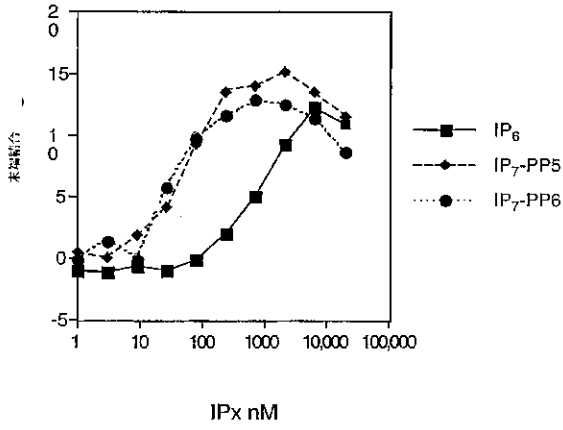


Figure 8

【 図 9 】

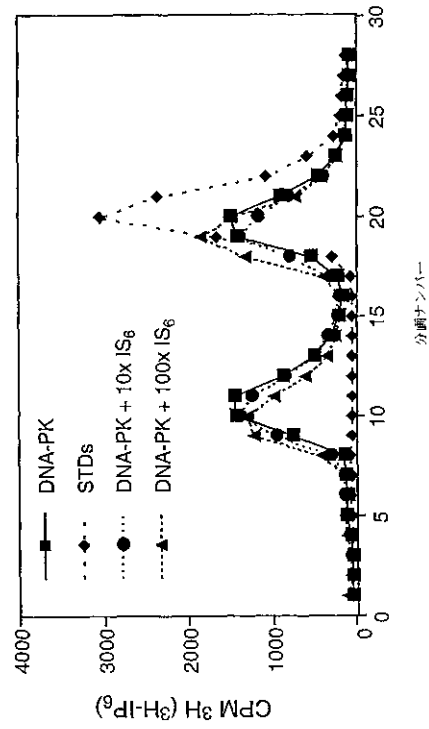


Figure 9

【 図 10 】

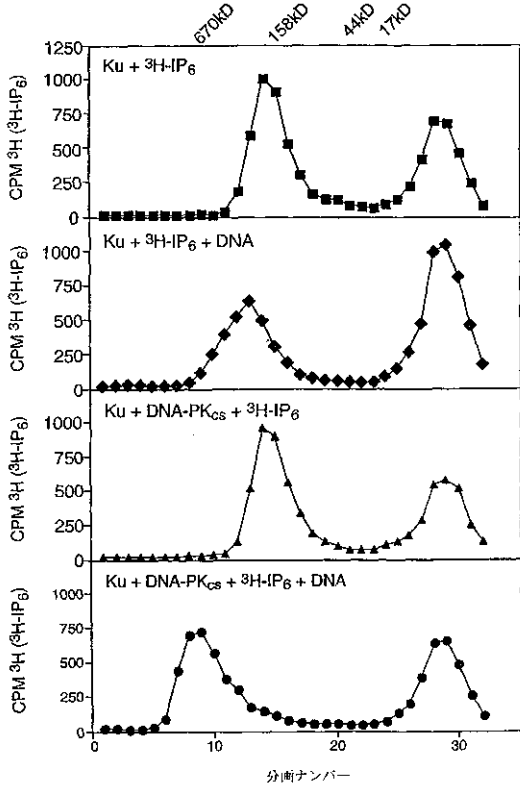


Figure 10

【 図 11 】

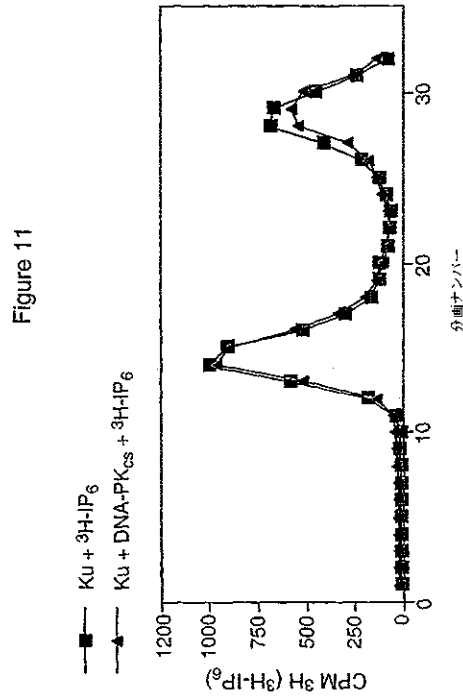


Figure 11

【 図 13 】

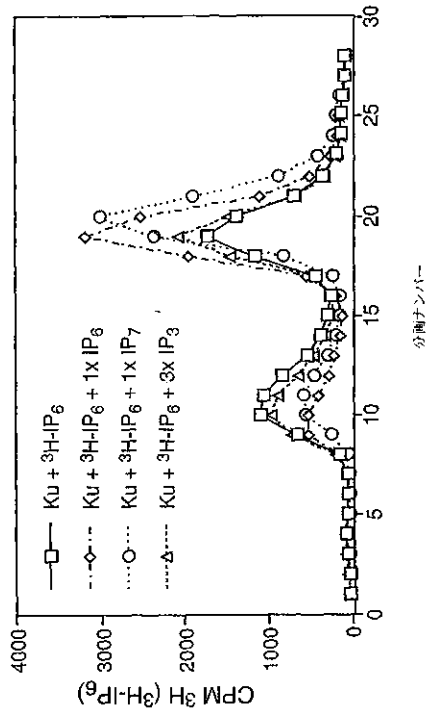


Figure 13

【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
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90404 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/48
A61P 35/00, 31/12, 37/02

(21) International Application Number: PCT/GB01/02180

(22) International Filing Date: 18 May 2001 (18.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0012179.8 20 May 2000 (20.05.2000) GB
60/221,226 25 July 2000 (25.07.2000) US
60/298,367 14 February 2001 (14.02.2001) US

(71) Applicant for all designated States except (5): IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED (GB/GB); Sardinia House, Sardinia Street, London WC2A 3NL (GB).

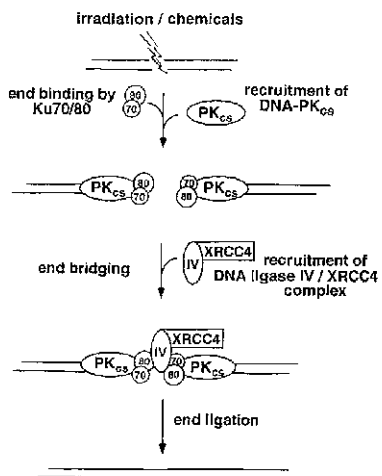
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WEST, Steve, Craig (GB/GB); Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire EN6 3LD (GB); HANAKAHI, Leslyn, Ann, Akemi (US/GB); Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire EN6 3LD (GB); BARTLET-JONES, Michael (GB/GB); Imperial Cancer Research Fund, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX (GB).

(74) Agent: MILES, John, Sr.; Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DD (GB).

(81) Designated States (national): AU, AT, AL, AM, AR, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GM, GN, GU, HK, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: DRUG SCREENING SYSTEMS AND ASSAYS



(57) Abstract: A method of stimulating non homologous end joining (NHEJ) of DNA the method comprising performing NHEJ of DNA in the presence of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate. An assay of a protein kinase wherein the assay comprises inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate. The invention also provides screening assays for compounds which may modulate NHEJ and which may be therapeutically useful; and screening assays for compounds which may modulate DNA PK and related protein kinases and which may be therapeutically useful. Methods of modulating NHEJ and protein kinases are also disclosed.



WO 01/90404 A1

WO 01/90404 A1 

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 (GL, GM, KH, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, UJ, UB), 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, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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.

DRUG SCREENING SYSTEMS AND ASSAYS

The present invention relates to assays and drug screening systems involving components of the non-homologous end joining (NHEJ) pathway, and to screening systems which make use of the protein kinase known as DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) and related protein kinases such as ATR, ATM and FRAP. The invention also relates to inositol hexakisphosphate (IP₆), inositol pentakisphosphate (IP₅), inositol tetrakisphosphate (IP₄), diphosphoinositol pentakisphosphate (IP₇) and bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate (IP₈).

The repair of double strand breaks (DSBs) in DNA is essential for the maintenance of genomic stability. Failure to repair DSBs can result in the loss of genetic information, chromosomal translocations and cell death. Two mechanisms for the repair of DSBs have been described, involving either homologous recombination or non-homologous end-joining (NHEJ). Homologous recombination is particularly effective in S-phase when the break can be repaired using genetic information from a sister chromatid, whereas NHEJ is thought to be effective at all times in the cell cycle (Essers *et al*, 2000; Takata *et al*, 1998). NHEJ also plays an important role in DSB repair during V(D)J recombination (Bhuit *et al*, 1995; Taccioli *et al*, 1993).

The repair of double-strand breaks by non-homologous end joining requires the products of the *XRCC4*, *XRCC5*, *XRCC6* and *XRCC7* genes (reviewed by Chu, 1997; Critchlow and Jackson, 1998; Weaver, 1996). *XRCC4* encodes a protein (XRCC4) that forms a heterodimer with DNA ligase IV, *XRCC5* and *XRCC6* encode the 70 and 80 kDa subunits of the DNA end-binding protein Ku, and *XRCC7* encodes the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase DNA-PK_{cs}. Although the precise targets of DNA-

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

2

PK_{cs} are unknown, it has been shown to phosphorylate XRCC4 *in vitro* and to modulate its DNA binding activity (Leber *et al.*, 1998; Modesti *et al.*, 1999).

5 DNA-PK_{cs} is a large protein (~3500 amino acids, M_w ~465 kDa) (Smith and Jackson, 1999), the carboxyl terminus of which contains a catalytic domain that is related to that found in the phosphatidylinositol 3 (PI 3)-kinase family (Hartley *et al.*, 1995). This similarity initially suggested that DNA-PK_{cs} might be capable of phosphorylating inositol phospholipids, but no
10 such activity has been detected. Instead, DNA-PK_{cs} was shown to be a serine/threonine protein kinase. Other members of the PI 3-kinase related family include ATM, a protein deficient in Ataxia telangiectasia, and ATR, defects in which lead to an AT-related disorder (Keith and Schreiber, 1995; Smith and Jackson, 1999). Why these proteins should have retained the
15 protein motifs characteristic of a phosphatidylinositol kinase remains a mystery.

WO 90/00057 relates to a method for moderating the rate of cellular mitosis in a living mammalian tissue having a pathologically elevated rate of
20 cellular mitosis, which comprises perfusing the tissue with inositol hexaphosphate (or salt) and a source of inositol (or salt) to moderate the elevated rate of cellular mitosis. The method allegedly is useful in human and mammalian diseases wherein NK cell activity is altered, eg tumours, other cancers including leukaemia, immunosuppressed individuals, and in
25 viral, fungal or protozoal infections.

WO 95/05380 relates to a method of modulating selectin by administering an effective amount of inositol polyanion (including inositol hexakisphosphate) which binds to the selectin. Selectin binding is apparently

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

3

associated with infection with a microorganism, malignancy or other disorders including inflammation and autoimmunity.

5 WO 98/30902 relates to modulation of the NHEJ system *via* regulation (using protein and/or natural or synthetic compounds) of the interactions of XRCC4 and DNA ligase IV, and XRCC4 and DNA-PK to effect cellular DNA repair activity. It also relates to screens for individuals predisposed to conditions in which XRCC4 and/or DNA ligase IV are deficient.

10 WO 99/04266 relates to the interaction of p53 with, and its phosphorylation by, ATM and related protein kinases such as ATR and DNA-PK. The activity of the proteins is shown to increase in the presence of DNA. Assays for modulators of phosphorylation by the interaction between the proteins and p53 or other proteins having similar phosphorylation sites are provided.
15 Methods of purifying ATM or ATR are also claimed.

WO 00/00644 relates to a method for increasing the susceptibility of a cell to DNA-damaging agents by using an antisense oligonucleotide so as to prevent expression of a DNA dependent protein kinase subunit. This
20 invention also relates to a method of treating a tumour in a subject, comprising administering to the subject an antisense DNA-PK oligonucleotide.

Ishikawa *et al* (1999) *Anticancer Res.* 19, 3749-3752 suggests that when IP_6
25 is given to mice orally it reduces initiation of skin cancer development but not its promotion.

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

4

Sarkaria *et al* (1998) *Cancer Res.* **58**, 4375-4382 describes the inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases (such as DNA-dependent protein kinase, ATR and ATM) by the radiosensitizing agent, wortmannin.

- 5 Karanjawala *et al* (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1501-1504 shows that NHEJ is important for chromosome stability in primary fibroblasts.

Hoekstra (1997) *Curr. Opinion Gen. Develop.* **7**, 170-175 reviews the responses to DNA damage and regulation of cell cycle check points by the
10 ATM protein kinase family.

Hall-Jackson *et al* (1999) *Oncogene* **18**, 6707-6713 shows that ATR is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK.

15 Gao *et al* (2000) *Nature* **404**, 897-900 describes the interplay of p53 and XRCC4 in tumourigenesis, genome stability and development.

Featherstone & Jackson (1999) *Br. J. Cancer* **80**, 14-19 review DNA-PK
20 and its role in repairing DNA and maintaining genomic integrity.

A scheme for non-homologous end-joining is shown in Figure 1. It is thought that broken termini are recognized by the Ku heterodimer, which then recruits DNA-PK_{cs}, thereby activating its kinase activity. This large
25 complex serves to protect the DNA ends from nuclease attack, while also facilitating the recruitment of the XRCC4/DNA ligase IV heterodimer. Although it is not at present clear how end-bridging is achieved, these reactions result in the religation of the DSB restoring the integrity of the DNA.

In an attempt to define in molecular detail the mechanism of NHEJ, an *in vitro* system for end-joining was recently developed (Baumann and West, 1998). The reactions exhibited an apparent requirement for DNA-PK_{cs},
5 Ku70/80, XRCC4 and DNA ligase IV, consistent with the *in vivo* requirements. Preliminary fractionation and complementation assays, however, revealed that these factors were not sufficient for efficient end-joining, and that other components of the reaction remained to be identified. In the work described here, an *in vitro* complementation assay has been
10 used to purify an additional component of the NHEJ reaction. The terms Ku70/Ku80 and Ku70/80 are used interchangeably to denote the heterodimer between Ku70 and Ku80 unless the context suggests otherwise.

Using a combination of phosphorus NMR, mass spectroscopy and strong
15 anion exchange chromatography, we identify this factor as inositol hexakisphosphate (IP₆). Purified IP₆ specifically stimulates DNA-PK-dependent end joining and is bound by DNA-PK. The involvement of inositol phosphate in DNA-PK dependent NHEJ is of particular interest since the catalytic domain of DNA-PK_{cs} is similar to that found in the
20 phosphatidylinositol 3 (PI 3)-kinase family.

Thus, in our continued investigations of NHEJ of DNA we have
surprisingly found that highly phosphorylated inositol derivatives, such as
inositol hexakisphosphate (IP₆) and inositol pentakisphosphate
25 pyrophosphate (IP₇), stimulate NHEJ. Although not wishing to be bound by any theory as to what mediates the stimulatory effect on the NHEJ of DNA, our results suggest an involvement of DNA-PK, such as a conformational change in DNA-PK that results in the stimulation of NHEJ at least *in vitro*. In particular, our work shows that IP₆ and IP₇ bind the Ku70/80 heterodimer

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

6

which, in combination with the catalytic subunit of DNA-PK (DNA-PK_{cs}), makes up DNA-PK. IP₆ has no effect on T4 DNA ligase activity. It is possible that IP₆ binds the Ku70 subunit or the Ku80 subunit.

- 5 The present invention makes use of these observations in order to develop further methods of performing NHEJ and assays of NHEJ; screening assays for compounds which may modulate NHEJ and which may be therapeutically useful; screening assays for compound which may modulate DNA-PK and related protein kinases and which may be therapeutically
10 useful; compositions and kits of part which may be useful in performing the assays and methods; and methods of modulating NHEJ.

The present invention also relates to methods of modulating NHEJ of DNA and therapeutic methods wherein NHEJ of DNA is enhanced or reduced.

- 15 The present invention also relates to methods of measuring IP₆ or other stimulatory inositol phosphates in an individual in order to determine whether the individual may have, or be susceptible to, a defect in DNA repair or cell cycle checkpoint control.

- 20 A first aspect of the invention provides a method of stimulating non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising performing NHEJ of DNA in the presence of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate. Typically, IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is added to a NHEJ reaction in order to
25 stimulate joining of DNA.

"Non-homologous end-joining" is the ligation of DNA termini, typically intermolecular ligation. It includes the joining of DNA ends which exhibit little or no complementarity to each other (and so, typically, each end does

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

7

not hybridise to the other) and, in any event, is a term well known in the art as is evidenced by its use in many of the papers and patent applications referred to herein, all of which are incorporated herein by reference. Typically, a NHEJ reaction requires a suitable DNA substrate, and suitable
5 components for the reaction of joining the DNA ends to proceed. Suitable DNA substrates are those that, typically, are linear DNA molecules the length of which need only be large enough to accommodate the factors which participate in NHEJ. Conveniently, each DNA fragment to be joined is, independently, at least 50 bp, preferably at least 70 bp, more preferably
10 at least 100 bp but may be bigger. In relation to the observation of a NHEJ reaction, particularly in a screening assay, one or both of the DNA molecules (or DNA ends) to be joined are detectably labelled such as with radiolabelled phosphorus or with fluorescent labels. Although it is convenient to use two separate DNA molecules to be joined in the NHEJ,
15 two ends of the same molecule can be joined such as the ends of a linearised plasmid. NHEJ typically takes place in a eukaryotic cell, such as a vertebrate cell including mammalian cells (although it can also occur in some circumstances in prokaryotes) but, as is described in detail in Baumann & West (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95, 14066-14070, it
20 can also occur in cell-free extracts, such as those obtained from human cells as therein described. Intermolecular ligation in this cell-free system was found to be accurate and to depend on DNA ligase IV, XRCC4 and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK; this is a heterotrimer made up of a catalytic subunit DNA-PKcs (encoded by the XRCC7 gene) and two further
25 subunits which are believed to be involved in DNA binding, namely Ku70 and Ku80 subunits (which are encoded by the XRCC6 and XRCC5 genes, respectively). However, it is possible to get a low level of NHEJ with DNA ligase IV and XRCC4 in the absence of DNA-PK, but a greater extent of NHEJ is obtained when DNA ligase IV and XRCC4 are present with Ku70

and Ku80, and still further NHEJ is achieved when the catalytic subunit of DNA-PK is present. Following the inventors present work, it has now been shown that NHEJ is far better in the presence of IP₆, and even better in the presence of IP₇.

5 By "stimulating NHEJ" we include the meaning that the rate of NHEJ of DNA is increased by the presence of IP₆ in a NHEJ reaction mixture compared to the rate when IP₆ is not present and the reaction mixture is otherwise the same. It will be appreciated that the stimulation will reach a
10 threshold level and that, typically, stimulation according to the method is achieved when IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is included in a NHEJ reaction to which no IP₆ or other stimulatory inositol phosphate has been added previously. Although not being bound by any theory, it is possible that the presence of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is
15 essential for NHEJ and so the presence of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate may stimulate a NHEJ reaction from there being no joining to there being some joining of substrate DNA. It is noted that human cell-free extracts can perform NHEJ in the presence of a suitable substrate, as described in Baumann & West (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,
20 14066-14070, without the addition of IP₆; however, in this instance it is possible that the cell-free extract already contains a small amount of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate. We have now shown that when this cell-free extract is fractionated during partial purification it loses its ability to carry out NHEJ efficiently despite containing the relevant protein
25 components. Addition of IP₆ or IP₅ or IP₄ to the fraction (termed "PC-C" in Example 1) derived from the human cell-free extract has been shown to stimulate NHEJ of DNA. Although not being bound by any theory, it is believed that, by its chemical nature, IP₆ (and other inositol phosphates) flow through the phosphocellulose column used in the preparation of the

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

9

PC-C fraction separating it from DNA-PK, XRCC4 and DNA ligase IV (see Example 1).

Thus, in a preferred embodiment the NHEJ reaction mixture contains a
5 semi-purified cell extract which contains the necessary protein components
but from which any natural stimulatory inositol phosphates have been
removed. This semi-purified cell extract is then supplemented with a
suitable amount of a stimulatory inositol phosphate, such as IP_6 , in order to
stimulate NHEJ.

10 By "other stimulatory inositol phosphates" we include any other inositol
phosphates or derivatives of inositol phosphate (such as derivatives with
one or more pyrophosphates) which have an effect on the stimulation of
NHEJ which is qualitatively the same as the effect of IP_6 on the stimulation
15 of NHEJ as defined using the reaction conditions in Example 1. Typically,
the stimulatory inositol phosphate will have at least 2% of the stimulatory
activity of IP_6 and preferably at least 5% or at least 10% of the stimulatory
activity of IP_6 on a molar basis under the same conditions as described in
Example 1. Certain stimulatory inositol phosphates may have greater
20 stimulatory activity than IP_6 ; thus, the stimulatory inositol phosphate may
have about the same stimulatory activity as IP_6 or it may be greater, such as
150% or 300% or 500% or even 1000% of the stimulatory activity of IP_6 .
Experiments described in the Examples show that IP_7 (that is to say inositol
wherein five positions are occupied by phosphate residues, and one by a
25 pyrophosphate residue) is better at stimulatory NHEJ than IP_6 . IP_8 (ic
inositol wherein four positions are occupied by phosphate residues and two
by pyrophosphate residues) are also included as "stimulatory inositol
phosphates".

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

10

The stimulatory inositol phosphate is typically an inositol polyphosphate (ie it has several phosphate groups). The inositol phosphate may be an oligomer or polymer of inositol phosphate moieties wherein the inositol phosphate moieties are joined by a suitable linker. The oligomer or
5 polymer may be a homo-oligomer/polymer in which case each inositol phosphate moiety is the same, or it may be a hetero-oligomer in which case at least some of the inositol phosphate moieties may be different.

It is possible to use a mixture of stimulatory inositol phosphates in order to
10 stimulate NHEJ.

The "stimulatory inositol phosphate" may be an inositol phosphate derivative wherein one or more of the phosphate groups have been replaced by phosphonate groups.
15

It is possible that IP_6 , when interacting with DNA-PK is modified or further phosphorylated (eg to a pyrophosphate form). Any such modification, if it leads to a stimulatory inositol phosphate as defined is included within the scope of the invention.
20

Derivatives of inositol phosphate include derivatives in which an inositol phosphate moiety is attached to another moiety, for example by linkage through a free hydroxyl position (if present) or through phosphate.

25 Typically the stimulatory inositol phosphate is a naturally-occurring inositol phosphate or derivative thereof. Preferably, the stimulatory inositol phosphate is any one of IP_6 , IP_5 or IP_4 .

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

11

By "IP₆" we include any stereoisomer of inositol hexakisphosphate. It is preferred that the IP₆ is *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate.

By "IP₅" we include any stereoisomer of inositol pentakisphosphate. It is preferred that the IP₅ is *myo*-inositol 1,3,4,5,6 pentakisphosphate.

By "IP₄" we include any stereoisomers of inositol tetrakisphosphate. It is preferred that the IP₄ is D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate.

As noted, the stimulatory inositol phosphate may be IP₇ or IP₈ or an inositol phosphate with further pyrophosphate residues.

By "IP₇" we include any stereoisomer of diphosphoinositol pentakisphosphate. It is preferred that the IP₇ is *myo*-5-diphosphoinositol 1,2,3,4,6-pentakisphosphate (IP₇-pp5) or *myo*-6-diphosphoinositol 1,2,3,4,5-pentakisphosphate (IP₇-pp6).

By "IP₈" we include any stereoisomer of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate.

20

These compounds are widely available from chemical suppliers such as Sigma and Calbiochem. Shears *et al* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10489-10497 discloses the synthesis of bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate. Falck *et al* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12172-12175 and Reddy *et al* (1997) *Tetrahedron Letters* **38**, 4951-4952 disclose the synthesis of various isomers of IP₇. Radiolabelled inositol phosphates are available from DuPont-NEN.

25

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

12

Other inositol phosphates, particularly those which have four, five or six phosphate groups may have substantially the same stimulatory effect in NHEJ as *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate and the skilled person will be able to determine this using the methods described in the Examples.

5

The methods and assays of the invention therefore include the use of such inositol phosphates with substantially the same stimulatory effect. For the avoidance of doubt, and for the purposes of the invention, *myo*-inositol 1,3,4,5,6 pentakisphosphate and D-*myo*-inositol 1,3,4,5 tetrakisphosphate are considered to have substantially the same stimulatory effect as *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisphosphate, although they are not as effective in stimulating NHEJ as the particular IP₆. IP₇ is more effective than the particular IP₆ in stimulating NHEJ.

15 Inositol hexasulphate (IS6) is unable to stimulate end-joining; *myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate was shown to inhibit end-joining.

A second aspect of the invention provides an assay of non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA wherein the assay comprises inositol
20 hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate.

The assay contains sufficient components in order to carry out NHEJ of DNA. In particular, typical assays of NHEJ are those which can be performed *in vitro* such as described in Baumann & West *supra*. NHEJ in
25 cell-free systems is also described in Labhart (1999) *Eur. J. Biochem.* 265, 849-861, incorporated herein by reference. Reconstitution of NHEJ may be achieved by using recombinantly expressed protein components (such as expressed using a baculovirus system); typically, such a reconstituted system includes DNA-PK, XRCC4, DNA ligase IV, a suitable DNA

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

13

substrate and a stimulatory inositol phosphate such as IP₆. The assay may also be carried out *in vivo* using DNA substrates which, for example, are designed to observe V(D)J joining (see Smith *et al* (1998) *J. Mol. Biol.* 281, 815-825 for an example).

5

It is preferred for the method of the first aspect of the invention or the assay of the second aspect of the invention (and indeed for all aspects of the invention which rely on IP₆ or other stimulatory inositol phosphate in an assay or method) that the IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is added exogenously, although it is possible that the IP₆ stimulatory inositol phosphate is released from a source present in a cell or cell extract. Typically, the IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is added at the start of a NHEJ reaction. Preferably, the concentration of stimulatory inositol phosphate in the reaction is between 10 nM and 50 μM; more preferably between 50 nM and 10 μM; still more preferably between 100 nM and 1 μM. These ranges are particularly preferred for IP₆.

Preferred ranges for IP₇ are between 0.1 and 1 μM.

20 Although the method of the first aspect of the invention or the assay of the second aspect of the invention may be carried out *in vivo*, it is preferred if it is carried out *in vitro*; *in vitro* methods are particularly suitable for the drug screening methods described in more detail below.

25 The NHEJ of DNA in the method of the first aspect of the invention and in the assay of the second aspect of the invention typically make use of a NHEJ reaction mixture which includes DNA-dependent protein kinase (and preferably all components thereof, namely DNA-PKcs, Ku70 and Ku80), XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate. Preferably, the

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

14

NHEJ reaction contains all of these components. It may also include other components which are required for, or enhance, the reaction or make detection of the joined DNA products more readily detected. Such components include ATP and Mg^{2+} as is described in Example 1. The presence of deoxynucleotides (dNTPs) is required in NHEJ reactions in which non-complementary DNA termini were used since some processing would be expected prior to rejoining.

Amino acid and nucleic acid sequences of polypeptides useful in various aspects of the invention are available from GenBank under the following Accession Nos: human Ku70 - J04611; human Ku80 - M30938; human DNA ligase IV - X83441; human XRCC4 - U40622; human DNA - PKcs - U47077; *S. cerevisiae* Ku70 - X70379; *S. cerevisiae* Ku80 - Z49702; *S. cerevisiae* DNA ligase IV - Z74913.

It will be appreciated that this information may be used to produce the encoded proteins using standard recombinant methods as well known in the art. Thus, the methods and assays which employ a reconstituted NHEJ reaction mixture may suitably make use of recombinantly produced polypeptide components which are readily available.

Systems for cloning and expression of a polypeptide in a variety of different host cells are well known. Suitable host cells include bacteria, eukaryotic cells such as mammalian and yeast, and baculovirus systems. Mammalian cell lines available in the art for expression of a heterologous polypeptide include Chinese hamster ovary cells, HeLa cells, baby hamster kidney cells, COS cells and many others. A common, preferred bacterial host is *E. coli*.

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

15

Suitable vectors can be chosen or constructed, containing appropriate regulatory sequences, including promoter sequences, terminator fragments, polyadenylation sequences, enhancer sequences, marker genes and other sequences as appropriate. Vectors may be plasmids, viral eg phage, or
5 phagemid, as appropriate. For further details see, for example, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual": 2nd edition, Sambrook *et al*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Many known techniques and protocols for manipulation of nucleic acid, for example in preparation of nucleic acid constructs, mutagenesis, sequencing, introduction of DNA into cells and
10 gene expression, and analysis of proteins, are described in detail in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al*, eds. John Wiley & Sons, 1992.

Polypeptides can be purified and isolated from the host cells using
15 techniques well known in the art.

Although it is preferred that the polypeptide components of the NHEJ reaction mixture are human (for example extracted from human cells or produced by recombinant techniques from human coding sequences,
20 whether or not expressed in human cells), it will be appreciated that they may be from any suitable source, for example from other mammals or other vertebrates. Because of the conserved nature of the NHEJ reaction in eukaryotic cells, the components may come from lower eukaryotes such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe*. Although it is
25 preferred that all of the polypeptide components in a given NHEJ reaction mixture are from the same source (eg all are human), it may be possible to "mix and match" the components, for example by using a DNA ligase IV from one source and a DNA-PKcs from another source, provided that the components are able to perform NHEJ of DNA.

It will be appreciated that the polypeptide components of the NHEJ reaction mixture may have the same amino acid sequence as the polypeptide as found in nature or it may be a variant thereof which retains the necessary activity for use in a NHEJ reaction. When discussing protein kinases (below) variants are ones which retain their protein kinase activity (ie catalytic activity and/or ability to interact with another component). Variants include variants in which one or more amino acids have been inserted, deleted or replaced. A particularly useful variant is a fusion of the polypeptide with another peptide or polypeptide which facilitates purification. Such a polypeptide is the well known glutathione S-transferase. Unless the context indicates otherwise, a reference to a polypeptide includes a reference to a variant as defined. For the avoidance of doubt, the term variant included a fragment which retains a defined activity. In relation to protein kinases, in particular the PI 3-kinase related kinases described below, suitable fragments include those which retain the domain, such as a C-terminal domain, homologous to PI 3-kinase. The position of the PI 3-kinase-related domain in this family of proteins is detailed in Featherstone & Jackson (1999) *Br. J. Cancer* 80 (Suppl 1), 14-19.

It will be appreciated that the invention also includes aqueous compositions that contain at least one of DNA-PKcs, Ku70, Ku80, XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate (and preferably all of these) in addition to IP₆ or other stimulatory inositol phosphate wherein the IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is at a concentration of at least 10 nM, preferably at least 50 nM, more preferably at least 100 nM, still more preferably at least 1 μM. At least with components derived from humans, a crude estimate of the K_d for IP₆ is 1 μM and so, conveniently, to saturate the

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

17

system 10 μM IP_6 may be used. At this level, increases in IP_6 do not appear to result in further increase in NHEJ. The estimate of the K_d for IP_7 is 100 nM and saturation occurs at 1 μM .

- 5 It is particularly preferred if the polypeptide components of the aqueous composition consist only of the specific components for the NHEJ and does not include other polypeptide components, such as those derived from a cell extract, which are not required for or enhance NHEJ.
- 10 It is preferred that each polypeptide component of the aqueous composition is recombinantly produced and purified.

A third aspect of the invention provides the use of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate for stimulating non-homologous end-joining of DNA. It will be appreciated that before the present invention, and despite the extensive study of NHEJ, it was not realised that IP_6 or other stimulatory inositol phosphate could stimulate (or may even be essential for) NHEJ. The invention also provides the use of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate in assays for compounds which modulate NHEJ by whatever means, and in methods which modulate NHEJ by whatever means. The assays may involve changes in NHEJ activity, changes in the recognition of substrates by the NHEJ components and/or changes in subcellular localisation of components of the NHEJ reaction such as DNA-PK, XRCC4 or DNA ligase IV.

25 In order to carry out the methods and assays of the invention so far described, it is convenient to make combinations of IP_6 or other stimulatory inositol phosphates with other components which are used in an NHEJ. Thus, a fourth aspect of the invention provides a kit of parts comprising IP_6

or other stimulatory inositol phosphate and one or more of a DNA-dependent protein kinase (or its constituent parts DNA-PKcs, Ku70 and Ku80), XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate. Typically the kit of parts comprises IP₆ or other stimulatory inositol phosphate and
5 each of a DNA-dependent protein kinase, XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate. The kit of parts may also include other components that are required to carry out an NHEJ assay such as ATP, Mg²⁺ and, in some circumstances, dNTPs.

10 Typically, the DNA-dependent protein kinase, XRCC4 and DNA ligase IV are provided as a fraction from a cell free extract, such as the fraction as is described in Example 1. They may also be provided by expression of the individual components by recombinant means. This method is particularly preferred when the NHEJ is to be reconstituted from purified components.

15 In carrying out the methods and assays of the invention described so far, it is also convenient to provide IP₆ or other stimulatory inositol phosphate in combination with recombinant cells which express polypeptide components required for a NHEJ reaction. Thus, a fifth aspect of the invention provides
20 a kit of parts comprising inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphates and a host cell expressing one or more of a DNA-dependent protein kinase, XRCC4 and DNA ligase. The host cells expressing one or more of the polypeptide components of the NHEJ reaction mixture as said may be produced using standard recombinant
25 methods and the appropriate genes/cDNAs encoding the components as is well known in the art.

In addition to showing that IP₇, IP₆, IP₅ and IP₄ stimulates NHEJ, we have also shown that, surprisingly, IP₆ and IP₇ interact with, and may modulate

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

19

the activity of protein kinases. As far as we are aware, it has not been shown previously that IP_6 and IP_7 (or indeed any other stimulatory inositol phosphates as defined) has this effect. As is described below, combinations of IP_6 and other stimulatory inositol phosphates such as IP_7 or IP_8 with a protein kinase are useful in drug screening assays and the like.

A sixth aspect of the invention provides an assay of a protein kinase wherein the assay comprises IP_6 or other stimulatory inositol phosphate. An assay of a protein kinase contains the said protein kinase and, when the catalytic activity of the protein kinase is being measured, a suitable phosphorylatable substrate (such as the target of the said protein kinase or a phosphorylatable peptide therefrom) and a suitable phosphate donor such as ATP or an analogue thereof which has a transferable γ -phosphate group. When the ability of the said protein kinase to bind to another macromolecular component (such as another protein or DNA) is being assayed, the assay contains the protein kinase and the other component. Protein kinases are known to interact with their protein substrate and with other components. These other components may be allosteric effectors and they may be macromolecular components such as other proteins or DNA.

A seventh aspect of the invention provides a kit of parts comprising a protein kinase and IP_6 or other stimulatory inositol phosphates. Typically, the protein kinase is expressed from a recombinant DNA molecule.

In the assay in the sixth aspect of the invention, and the kit of parts in the seventh aspect of the invention it is preferred that the protein kinase is substantially free of other components with which it is naturally associated.

WO 01/60404

PCT/GB01/02180

20

The invention also includes aqueous compositions that contain at least one protein kinase (preferably substantially free of other components with which it is naturally associated, for example as produced by recombinant expression) and a stimulatory inositol phosphate such as IP₆ or IP₇.
5 Preferably, the protein kinase included in an assay, kit of parts or aqueous composition is substantially pure (eg at least 90% pure).

An eighth aspect of the invention provides a kit of parts comprising IP₆ or other stimulatory inositol phosphate and a host cell expressing a protein
10 kinase.

Protein kinases can be expressed recombinantly as is well known in the art. For example, the cloning, expression and isolation of protein kinases can be carried out using the methodology described above.

15 We have shown that DNA-PK binds IP₆ and IP₇ but not IP₃. More particularly, we have shown that IP₆ and IP₇ binds the Ku70/80 heterodimer portion of DNA-PK. IP₆ or IP₇ may bind to the Ku70 subunit or to the Ku80 subunit. The presence of the catalytic subunit (DNA-PK_{cs}) is not
20 required for binding of IP₆ or IP₇ to Ku70/80. DNA-PK along with ATM, ATR and FRAP belong to a family of related protein kinases wherein the protein kinase is a protein kinase which has a domain, preferably a C-terminal domain, with similarity to the catalytic domain of phosphatidylinositol 3-kinase. DNA-PK, ATM, ATR and FRAP have an
25 inositol head group binding domain. Other members of the family include the *Saccharomyces cerevisiae* gene products Tel1p, Mec1p, Tor1p and Tor2p, and the *Schizosaccharomyces pombe* gene product Rad3. It is preferred that the protein kinase in the sixth, seventh or eighth aspects of the

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

21

invention is a member of this family, most preferably one of DNA-PK, ATR, ATM or FRAP.

ATM is the protein encoded by the gene mutated in human ataxia-telangiectasia (or equivalent genes in other species).

Sequence analysis reveals that the human ATM gene encodes a ~350 kDa polypeptide (Savitsky *et al* (1995) *Science* 268, 1749-175; Savitsky *et al* (1995) *Hum. Mol. Genet.* 4, 2025-2032).

10

As noted above, included in the family are *Saccharomyces cerevisiae* Tor1p and Tor2p and their mammalian homologue FRAP, which control progression into S-phase and, at least in part, function by regulating translation (Brown and Schreiber (1996) *Cell* 86, 517-520). Also in this family is the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit (DNA-PKcs), defects in which lead to sensitivity to IR and an inability to perform site-specific V(D)J recombination (reviewed in Jackson and Jeggo (1995) *Trends Biochem. Sci* 20, 412-415; Jackson (1996) *Curr. Opinion Genet. Dev.* 6, 19-25). Other members of the ATM sub-group of the PI 3-kinase family that have been identified include *S. cerevisiae* Tellp and Mec1p, together with the Mec1p homologues of *Schizosaccharomyces pombe* (rad3), *Drosophila melanogaster* (mei-41) and humans FRP1/ATR; (Keith and Schreiber (1995) *Science* 270, 50-51; Zakian (1995) *Cell* 82, 685-687; Jackson (1996) *Curr. Opinion Genet. Dev.* 6, 19-25). As with ATM, defects in these proteins lead to genomic instability, hypersensitivity towards DNA damaging agents and defects in DNA damage-induced cell cycle checkpoint controls.

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

22

The Gen Bank Accession Nos for cDNAs encoding various of these protein kinases is as follows:

- FRAP human cDNA NM_004958
5 ATR human cDNA NM_001184 and U76308
ATM human cDNA NM_000051
TEL1 *S. cerevisiae* Z35849 Y13134
MEC1 *S. cerevisiae* U31109
MEI-41 *Drosophila* U34925
10 RAD3 *S. pombe* U76307

WO 99/04266, incorporated herein by reference, describes methods of purifying ATM and ATR.

- 15 It is believed that members of the family (which may be termed PI3 kinase related kinases) share, in their C-terminal domain at least 25% amino acid sequence identity with the C-terminal domains of DNA-PKcs, more preferably at least 30% or 35% or 40% or 50% or 70% or 90% sequence identity. When compared with the PI3-kinase domain of ATM, DNA-PK
20 shows 28% homology, and RAD3 shows 39% (see Hunter (1995) *Cell* 83, 1-4). The carboxy termini of the relevant proteins are compared in Keith & Schreiber (1995) *Science* 270, 50-51.

- The percent sequence identity between two polypeptides may be determined
25 using suitable computer programs, for example the GAP program of the University of Wisconsin Genetic Computing Group and it will be appreciated that percent identity is calculated in relation to polypeptides whose sequence has been aligned optimally.

The alignment may alternatively be carried out using the Clustal W program (Thompson *et al.*, 1994). The parameters used may be as follows:

Fast pairwise alignment parameters: K-tuple(word) size; 1, window size; 5, gap penalty; 3, number of top diagonals; 5. Scoring method: x percent.

Multiple alignment parameters: gap open penalty; 10, gap extension penalty; 0.05.

Scoring matrix: BLOSUM.

10 NHEJ is involved in many important biological processes, and modulation of NHEJ has been proposed in relation to a number of medical practices. Compounds that modulate these processes may be useful as potential drugs or for further studies on NHEJ. Thus, these compounds may be useful for any of a variety of purposes.

15

One is anti-tumour or anti-cancer therapy, particularly augmentation of radiotherapy or chemotherapy. Ionising radiation and radiomimetic drugs are commonly used to treat cancer by inflicting DNA damage. Cells deficient in DNA repair are hypersensitive to ionising radiation and radiomimetics. Chemotherapy includes the use of topoisomerase II poisons and other compounds involved in DNA control. Another is the potentiation of gene targeting and gene therapy. Modulation of NHEJ may be used to increase efficiencies of gene targeting, of interest and ultimate use in gene therapy.

20

The frequency of spontaneous allelic recombination in higher eukaryotic cells is extremely low, and poses a major limitation to its therapeutic potential. Gene therapy by *in vivo* or *ex vivo* gene targeting may therefore remain impractical unless dramatic improvements in targeting efficiency

25

can be achieved. For many gene therapy applications, it is desirable to be able to target the integration of the transgene in a specific locus of the host genome. Enhancing the frequency of homologous recombination in the target cells, through inhibition of NHEJ, may prepare the cells for targeted
5 gene integration by homologous recombination.

A further, related, purpose is in anti-retroviral therapy, since DNA repair pathways such as involving the components XRCC4 and DNA ligase IV are involved in effecting retroviral and retrotransposon integration into the
10 genome of a host cell. Retroviruses are of considerable risk to the health of humans and animals, causing, *inter alia*, AIDS, various cancers and human adult T-cell leukaemia/lymphoma. Integration of retroviral DNA into the genome is essential for efficient viral propagation and may be targeted by inhibition of DNA repair pathway components.

15 Additionally, modulators of NHEJ may be used in modulation of immune system function, since such factors are required for generation of mature immunoglobulin and T-cell receptor genes by site-specific V(D)J recombination.

20 Thus, further methods for identifying such compounds are useful for the pharmaceutical industry.

A ninth aspect of the invention provides a method of identifying a
25 compound which modulates or mimics the effect of inositol hexakisphosphate (IP_6) or other stimulatory inositol phosphate in stimulating non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising performing NHEJ of DNA in the presence of inositol

hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate and determining the effect of a test compound on the NHEJ of DNA.

Typically, the method is carried out *in vitro*, for example, using a suitable
5 fraction from a cell-free extracts as described in Example 1, or by using reconstituted systems for NHEJ as described above. The method may also be carried out *in vivo* as described above.

Typically the NHEJ of DNA is carried out in a NHEJ reaction mixture
10 which includes DNA-PK, XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate. Preferably, DNA-PK, XRCC4 and DNA ligase IV are the only polypeptide components of the reaction mixture. Preferably, the DNA-PK, XRCC4 and DNA ligase IV are each substantially pure (eg at least 90% pure) before combination.

15 In a preferred embodiment, NHEJ is measured using the methods described in Example 1. In particular, the DNA substrates which are joined by the NHEJ reaction are preferably radioactively labelled and the joining is measured by size-separating the DNA, and for example by agarose gel
20 electrophoresis, and the DNA detected by phosphorimaging. High throughput screening assays may be developed, and an example is given in Example 2.

Typically, the NHEJ is based on the ligation of two linear DNA molecules
25 (although ligation/recircularisation of a linearised plasmid may be measured). High throughput screens may be based on the detection of the retention of a labelled (eg radiolabelled or fluorescently labelled) DNA molecule on a solid support (eg microtitre well) following ligation to a second DNA molecule immobilised on the solid support. PCR

amplification across the ligation junction (hence producing a product only following ligation) may also be used.

Typically, a series of reactions are carried out which assess the effect of the
5 test compound in order to confirm (or deny) that it is a compound which
specifically modulates or mimics the effect of the stimulatory inositol
phosphate on the NHEJ of DNA rather than a compound which has a non-
specific effect. Thus, for example, the test compound may be added to the
NHEJ reaction either before or after the addition of IP₆ or other stimulatory
10 inositol phosphate such as IP₇ to determine whether the order of addition
has an effect on the NHEJ reaction. Alternatively, or additionally,
comparisons may be made between a reaction which contains the test
compound and contains IP₆ or other stimulatory inositol phosphate and
reactions which do not contain IP₆ or other stimulatory inositol phosphate or
15 do not contain the test compound.

Compounds which specifically enhance the effect of the stimulatory inositol
phosphate in the NHEJ typically lead to increased NHEJ activity, whereas
compounds which specifically reduce the effect of the stimulatory inositol
20 phosphate in the NHEJ typically lead to decreased NHEJ activity.
Compounds which mimic the stimulatory inositol phosphate in a structural
sense may increase the NHEJ activity if the mimic is a functional analogue
but may decrease NHEJ activity if the mimic is not a functional analogue.

25 The methods of the ninth aspect of the invention are suitable for identifying
compounds which modulate or mimic the effect of IP₆ or other stimulatory
inositol phosphate on the catalytic (ie DNA joining activity) of the NHEJ
reaction. The invention also includes the identification of compounds that
modulate the interactions between components of a NHEJ reaction whether

or not such modulation leads directly to a change in DNA joining activity. Thus, a tenth aspect of the invention provides a method of identifying a compound which modulates or mimics the effect of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate in stimulating non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising determining, in the presence of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate, the effect of a test compound on the interactions between the components NHEJ reaction.

10 In a preferred embodiment of the invention the components of the NHEJ reaction between which an interaction is measured is any one or more of a DNA-dependent protein kinase (or its components ie DNA-PK_{cs}, Ku70 and Ku80), XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate. Other interactions include interaction of any one of XRCC4, DNA ligase IV and
15 the DNA substrate with any one of Mre11, NBS and Rad50 which themselves form a complex (Mre11/NBS/Rad50). The Mre11/NBS/Rad50 complex is believed to not act upstream of DNA-PK in the processing of DNA ends. Further details of the Mre11/NBS/Rad50 complex are found in Labhart (1999) *Eur. J. Biochem.* 265, 849-861.

20 Since we have determined in Example 4 that IP₆ and other stimulatory inositol phosphates such as IP₇ bind to the Ku70/80 heterodimer of DNA-PK, it is particularly preferred that this heterodimer is present and that interactions between it and other NHEJ components are measured. The
25 interaction between Ku 70/80 and DNA-PK_{cs} may be measured, as may the interaction between Ku 70/80 and DNA. Some of these interactions also require the presence of DNA. For example, Ku70/80-IP₆ and DNA-PK_{cs} may require DNA to form a supercomplex (see Figure 10). The interaction

between the Ku70 and Ku80 subunits in the heterodimer may also be measured.

Details of methods of measuring interactions between components, such as
5 protein - protein interactions, protein - DNA interactions and protein - small
molecule interactions are described below following the discussion of the
aspect of the invention relating to other protein kinases. However, in
relation to the present aspect of the invention, conveniently a series of
measurements are made which assess the effect of the test compound in
10 order to confirm (or deny) that it is a compound which specifically
modulates or mimics the effect of IP_6 or other stimulatory inositol
phosphate on the interaction between components of a NHEJ reaction rather
than a compound which has a non-specific effect. Thus, for example, the
test compound may be added to the sample containing components of the
15 NHEJ reaction whose interaction is to be measured either before or after the
addition of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate to determine whether
the order of addition has an effect on the interaction between components.
Alternatively, or additionally, comparisons may be made between the
interactions in a sample containing components of the NHEJ reaction whose
20 interaction is to be measured which sample contains the test compound and
 IP_6 or other stimulatory inositol phosphate with equivalent samples (in
terms of the NHEJ components) which do not contain IP_6 or other
stimulatory inositol phosphate or do not contain the test compound.

25 Compounds which modulate or mimic the effect of the stimulatory inositol
phosphate can be selected by their activity to modulate or mimic the
interactions of the components when in the presence of the stimulatory
inositol phosphate.

Preferred embodiments of this aspect of the invention measure the interaction (in the presence of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate) between DNA-PK and its DNA effector; DNA-PK and a cosubstrate (such as ATP); DNA-PK and XRCC4; DNA-PK and DNA ligase IV; XRCC4 and DNA ligase IV; and DNA ligase IV and its DNA substrate and/or a co-substrate such as ATP. Further preferred embodiments of this aspect of the invention measure the interaction (in the presence of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate) of Ku70/80 with DNA-PK_{cs}, and the interaction between Ku70 and Ku80 (whether or not in the presence of DNA-PK_{cs}). The interaction between Ku70/80 and DNA-PK_{cs} may require DNA.

Interactions between any one of these components and any one of the components of the Mre11/NBS/Rad50 complex may also be measured.

The measurement of interactions between certain of these components is described in WO 98/30902 and these measurement techniques are incorporated herein by reference. It should be noted that, as discussed above, there is no realisation in WO 98/30902 of the importance of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate in NHEJ of DNA or in the interaction between components required for NHEJ. In this aspect of the invention, it is particularly preferred if the method is used to identify compounds which modulate or mimic the effect of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate in stimulating NHEJ by altering the interaction of DNA-PK with another component (such as its effector DNA or DNA ligase IV or XRCC4 or its cognate DNA or a substrate or cosubstrate) or by altering the interactions between the components of DNA-PK (ie DNA-PK_{cs} and Ku70 and/or Ku80).

An eleventh aspect of the invention provides a method of identifying a compound which modulates or mimics the effect of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate on a protein kinase the method comprising determining, in the presence of IP₆ or other
5 stimulatory inositol phosphate, the effect of a test compound on the catalytic activity of the protein kinase or on the ability of the protein kinase to interact with another component.

Protein kinases phosphorylate, generally in a specific manner, proteins in
10 hydroxyl-containing amino acid residues (serine, threonine or tyrosine), by transferring the γ -phosphate group from ATP to the protein. The substrate for the protein kinase is typically the cognate protein but, conveniently, it may be a synthetic peptide derived from the protein and which contains the phosphorylatable amino acid residue. Protein kinases are also able to
15 autophosphorylate.

Typically, the protein kinase is a protein kinase which has a domain, preferably a C-terminal domain, with similarity to the catalytic domain of phosphoinositide 3-kinase. Conveniently, the protein kinase is a protein
20 kinase involved in the maintenance of genome stability, such as those which are involved in a DNA repair response. Preferably, the protein kinase is any one of a DNA-dependent protein kinase, ATR, ATM, FRAP, or the *Saccharomyces cerevisiae* gene products Tel1p, Mec1p, Tor1p or Tor2p, or the *Schizosaccharomyces pombe* gene product Rad3. It is particularly
25 preferred if the protein kinase is any one of DNA-PK, ATR, ATM or FRAP, and most preferred if the protein kinase is DNA-PK.

DNA-PK is known to phosphorylate XRCC4 which is, therefore, a suitable substrate. Peptide portions of XRCC4 may also be suitable as substrates.

Each of DNA-PK, ATR, ATM and FRAP can phosphorylate p53 *in vitro*. This phosphorylation has been mapped to Ser15 in p53 for ATM, ATR and DNA-PK so an N-terminal peptide of p53 may be used as a substrate (Hall-
5 Jackson *et al* (1999) and references cited therein). Yarosh *et al* (2000) *J. Invert. Dermatol.* 114, 1005-1010 shows that FRAP is a DNA-dependent protein kinase which is associated with UV-induced damage. FRAP also phosphorylates PHAS-1 (Brumm *et al* (1997) *Science* 277, 99-101).

10 Catalytic activity of a protein kinase, such as DNA-PK, ATR, ATM or FRAP, can readily be determined using methods well known in the art, such as by measuring the incorporation of a radiolabelled phosphate group in the substrate following transfer from ATP. Typically, a series of reactions are carried out which assess the effect of the test compound in order to confirm
15 (or deny) that it is a compound which modulates or mimics the effect of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate on a protein kinase rather than a compound which has a non-specific effect. Thus, for examples the test compound may be added to the protein kinase reaction either before or after the addition of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to determine
20 whether the order of addition has an effect on the catalytic activity. Alternatively, or additionally, comparisons may be made between a reaction which contains the test compound and IP₆ or other stimulatory inositol phosphate and reactions which do not contain IP₆ or other stimulatory inositol phosphate or do not contain the test compound.

25 The catalytic activity of the protein kinase can be assessed by the transfer of the γ -phosphate from ATP to a substrate (which may include itself ie autophosphorylation). Typically, the γ -phosphate is radiolabelled and so phosphorylation of the substrate can be detected by detecting the

radioactivity (eg by scintillation counting, autoradiography or phosphorimaging). Alternatively, it can be detected by separating the phosphorylated substrate from non-phosphorylated substrate, or by using phosphoprotein specific antibodies, for example by fluorescence.

5

When the effect of a test compound on the interaction between a protein kinase and another component is determined, it is particularly preferred if the protein kinase is the catalytic subunit of DNA-PK (ie DNA-PKcs) and the other component is any one of Ku70, Ku80, DNA ligase IV, XRCC4 or a suitable DNA effector thereof. Preferably, when the protein kinase is 10 DNA-PK, the other component is XRCC4.

The protein kinases ATM and ATR, like DNA-PK, are activated by DNA. FRAP can be stimulated by a DNA damage response. Thus, in a further 15 preferred embodiment, the protein kinase is DNA-PK, ATM, ATR or FRAP and the interaction with its effector DNA is determined.

Typically, a series of measurements are made which assess the effect of the test compound in order to confirm (or deny) that it is a compound which 20 specifically modulates or mimics the effect of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate on the protein kinase rather than a compound that has a non-specific effect. Thus, for example, the test compound may be added to a sample containing the protein kinase and a compound with which it interacts (such as its substrate but in the absence of ATP or such as an 25 effector DNA as is the case with DNA-PK or ATR or ATM or FRAP) before or after the addition of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate to determine whether the order of addition has an effect on the interaction between components. Alternatively, or additionally, comparisons may be made between the interactions in a sample containing the protein kinase and

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

33

a component with which it interacts which sample contains the test compound and IP₆ or other stimulatory inositol phosphate with equivalent samples (in terms of protein kinase and interacting component) which do not contain IP₆ or other stimulatory inositol phosphate or do not contain the
5 test compound.

A component with which a protein kinase interacts includes ATP or an analogue thereof, such as a non-hydrolysable analogue as is well known in the art.

10

A further aspect of the invention provides a method of identifying a compound which modulates the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to a protein kinase, the method comprising determining whether a test compound reduces or increases the binding of IP₆ or other stimulatory
15 inositol phosphate to the said protein kinase or a subunit thereof.

It is particularly preferred that the subunit of the protein kinase is the Ku70/Ku80 heterodimer of DNA-PK.

20 The interaction (association) of the stimulatory inositol phosphate (such as IP₆) with, and dissociation from the protein kinase or subunit thereof may be measured using methods well known in the art. Typically, the protein kinase is immobilised and the binding of detectably-labelled stimulatory inositol phosphate is measured. Typically, the stimulatory inositol
25 phosphate, such as IP₆, is radiolabelled or fluorescently labelled. Scintillation proximity assays, as described below, are particularly useful in binding assays.

We have shown that IP_6 and IP_7 binds to DNA-PK. More particularly, IP_6 and IP_7 have been shown to bind to the Ku70/80 heterodimer which forms part of DNA-PK. Thus, it is particularly preferred that the protein kinase is a protein kinase which has a domain, preferably a C-terminal domain, with
5 similarity to the catalytic domain of phosphoinositide 3-kinase. The protein kinase is preferably any one of the members of this family of protein kinases as discussed above. It is particularly preferred if it is DNA-PK. As noted DNA-PK is made up of three subunits. The binding assay may use any one of DNA-PK_{cs}, Ku70 or Ku80 or, as noted above, any functional
10 variants (eg fragments) thereof which retain the binding site for the stimulatory inositol phosphate such as IP_6 . Preferably, the binding assay uses the Ku70/Ku80 heterodimer.

A still further aspect of the invention provides a method of identifying a
15 compound which modulates the binding of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate to the Ku70/Ku80 heterodimer of DNA-PK or Ku70 subunit thereof or Ku80 subunit thereof, the method comprising determining whether a test compound reduces or increases the binding of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate to the said Ku70/Ku80 heterodimer or the
20 Ku70 subunit thereof or the Ku80 subunit thereof.

Preferably, the Ku70/Ku80 heterodimer is used.

In one embodiment the inositol phosphate (for example, IP_5 or IP_6 or IP_7) is
25 immobilised onto a solid substrate (such as the floor and/or wall of a microtitre plate) and the Ku 70/80 heterodimer is bound thereto. A competition binding assay is carried out with test compounds. The Ku 70/80 used may be suitably detectably labelled so that the presence or

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

35

absence (or depletion) of Ku 70/80 bound to the inositol phosphate can readily be detected.

5 Additionally or alternatively, a detectably labelled antibody which selectively binds to Ku 70/80 (or to either component thereof) may be used to detect the presence or absence (or depletion) of Ku 70/80 bound to the inositol phosphate. Suitable antibodies are commercially available from Neo Markers, LabVission Corporation, 47790 Westinghouse Drive, Fremont, CA 94539, USA.

10 It will be appreciated that in this aspect of the invention the Ku70/80 heterodimer or Ku70 subunit thereof or Ku80 subunit thereof do not require the presence of DNA-PK_{cs}. The Ku protein (independent of DNA-PK_{cs}) is involved in telomere biology and, in particular, Peterson *et al* (2001) *Nature*
15 *Genet.* 27, 64-67 indicate that the function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. Thus, compounds which modulate the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to Ku70/80 heterodimer or Ku70 subunit thereof or Ku80 subunit thereof may modulate telomeres or telomerase function.

20 Preferably, the compound is one which modulates the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to the Ku70/80 heterodimer.

25 A still further aspect of the invention provides a method of identifying a compound which modulates the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to XRCC4 or DNA ligase IV, the method comprising determining whether a test compound reduces or increases the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to the said XRCC4 or DNA ligase IV.

Binding of the stimulatory inositol phosphate to XRCC4 or DNA ligase IV can be done using analogous methods as for binding to protein kinases.

5 The amount of test compound or substance which may be added to a screening method or assay of the invention will normally be determined by trial and error depending on the type of compound or method used. Typically, the test compound may be used at a concentration of around 0.01 nm to 100 μ M. Compounds which may be used as test compounds may be
10 natural or synthetic compounds. Extracts of plants which may contain several characterised or uncharacterised compounds may also be used and are considered "test compounds".

It will be appreciated that screening assays which are capable of high
15 throughput operation will be particularly preferred. Examples may include cell based assays and protein-protein binding assays. An SPA-based (Scintillation Proximity Assay; Amersham International) system may be used. For example, an assay for identifying a compound capable of modulating the activity of a protein kinase may be performed as follows.
20 Beads comprising scintillant and a polypeptide that may be phosphorylated may be prepared. The beads may be mixed with a sample comprising the protein kinase and 32 P-ATP or 33 P-ATP and with the test compound. Conveniently this is done in a 96-well format. The plate is then counted using a suitable scintillation counter, using known parameters for 32 P or 33 P
25 SPA assays. Only 32 P or 33 P that is in proximity to the scintillant, i.e. only that bound to the polypeptide, is detected. Variants of such an assay, for example in which the polypeptide is immobilised on the scintillant beads *via* binding to an antibody, may also be used.

Methods of detecting polypeptide/polypeptide interactions include ultrafiltration with ion spray mass spectroscopy/HPLC methods or other physical and analytical methods. Fluorescence Energy Resonance Transfer (FRET) methods, for example, well known to those skilled in the art, may
5 be used, in which binding of two fluorescent labelled entities may be measured by measuring the interaction of the fluorescent labels when in close proximity to each other.

Alternative methods of detecting binding of a polypeptide to
10 macromolecules, for example DNA, RNA, proteins and phospholipids, include a surface plasmon resonance assay, for example as described in Plant *et al* (1995) *Analyt Biochem* 226(2), 342-348. Methods may make use of a polypeptide that is labelled, for example with a radioactive or fluorescent label.

15 The yeast two-hybrid system may be used to detect interactions between polypeptides.

An example of the use of the yeast two-hybrid system is the use of two
20 compounds, such as two components of the NHEJ reaction mixture, and, which interact to form a complex involved in NHEJ, to facilitate the identification of compounds that modulate NHEJ. These compounds are detected by adapting yeast two-hybrid expression systems known in the art for use as described herein. These systems which allow detection of protein
25 interactions *via* a transcriptional activation assay, are generally described by Gyuris *et al*, *Cell* 75:791-803 (1993) and Fields & Song, *Nature* 340:245-246 (1989), and are commercially available from Clontech (Palo Alto, CA). The yeast two-hybrid assay is carried out in the presence of IP_6 in order to identify compounds which modulate or mimic the effect of IP_6 on NHEJ.

In this approach, a region of, for example, DNA-PKcs, which interacts with, for example, Ku70, is fused to the GAL4-DNA-binding domain by subcloning a DNA fragment encoding this into the expression vector, pGBT9, provided in the MATCHMAKER Two-Hybrid System kit commercially available from Clontech (catalogue number K1605-1). A fusion of the GAL4 activation domain with the region of Ku70 (which interacts with the region of DNA-PKcs) is generated by subcloning the Ku70 domain-encoding DNA fragment into the expression vector, PGAD424, also provided in the Clontech kit. Analogous expression vectors may also be used. Yeast transformations and colony lift filter assays are carried out according to the methods of MATCHMAKER Two-Hybrid System and various methods known in the art. Prior to the colony filter assay, transformed yeast may be treated with candidate compounds and, as appropriate, with IP₆ or other stimulatory inositol phosphate being screened for the ability to modulate NHEJ. The interaction results obtained using the candidate compound in combination with the yeast system may then be compared to those results observed with the yeast system not treated with the candidate compound (or not treated with IP₆), all other factors (eg cell type and culture conditions) being equal. A compound capable of modulating NHEJ is able to alter the interaction between DNA-PKcs and Ku70.

In another embodiment of this approach, a compound capable of decreasing NHEJ by disrupting the binding of DNA-PKcs to the Ku70 may be isolated using the modified yeast two-hybrid system described above, in which the reporter gene encodes a protein, such as ricin, that is toxic to yeast. Yeast cells containing such a ricin reporter die unless the binding of DNA-PKcs to Ku70 is disrupted. Yeast cells treated with a compound that disrupts the

WO 01/90404

PCT/GB01/02180

39

DNA-PKcs/Ku70 interaction form viable colonies, and from this result it may be inferred that the compound is capable of decreasing, and possibly inhibiting, NHEJ. Again, the assay is carried out, as appropriate, with IP₃ or other stimulatory inositol phosphate to determine that the compound is one
5 which modulates or mimics the effect of IP₃ or other stimulatory inositol phosphate on NHEJ.

It will be appreciated that analogous reactions can be carried out with respect to protein kinase interactions with other components.
10

It will be appreciated from the foregoing that the present invention relates to screening methods for drugs or lead compounds.

It will be appreciated that in the methods described herein, which may be
15 drug screening methods, a term well known to those skilled in the art, the compound selected following the screen may be a drug-like compound or lead compound for the development of a drug-like compound.

The term "drug-like compound" is well known to those skilled in the art,
20 and may include the meaning of a compound that has characteristics that may make it suitable for use in medicine, for example as the active ingredient in a medicament. Thus, for example, a drug-like compound may be a molecule that may be synthesised by the techniques of organic chemistry, less preferably by techniques of molecular biology or
25 biochemistry, and is preferably a small molecule, which may be of less than 5000 daltons and which may be water-soluble. A drug-like compound may additionally exhibit features of selective interaction with a particular protein or proteins and be bioavailable and/or able to penetrate target cellular membranes, but it will be appreciated that these features are not essential.

The drug-like compound may have increased stability and lower toxicity than, for example, IP₆. It may also have an improved stimulatory profile compared to IP₆.

5 The term "lead compound" is similarly well known to those skilled in the art, and may include the meaning that the compound, whilst not itself suitable for use as a drug (for example because it is only weakly potent against its intended target, non-selective in its action, unstable, poorly soluble, difficult to synthesise or has poor bioavailability) may provide a
10 starting-point for the design of other compounds that may have more desirable characteristics.

While not being bound by any theory as to the chemical nature of compounds which may be found in the screening methods of the invention,
15 it is preferred if the test compounds are inositol derivatives, more preferably inositol phosphates. In particular, the test compounds may be phosphoinositides or analogues of IP₆. The test compounds may be any test compounds, provided that they can be introduced into a suitable assay. Libraries of test compounds may be designed by reference to the general
20 structure and charge distribution of IP₆, and libraries of compounds may be synthesised using combinatorial chemistry techniques as are well known in the art. It will be appreciated that the test compound is not the stimulatory inositol phosphate present in the assay. It may be possible to select test
25 compounds for screening in the assays and methods of the invention, for example by using computer aided design to select compounds which eg have a similar spatial structure and/or charge distribution to IP₆.

The compounds identified in the screening assays of the invention may themselves be useful in medical treatment or may be useful in developing

agents for medical treatment. In particular, the compounds identified by the screening methods of the invention may be useful in developing agents for the treatment of conditions where there is abnormal or inappropriate non-homologous end-joining of DNA. It is envisaged that the compounds may

5 be useful in the development of agents for treating cancer, augmenting cancer radiotherapy and/or chemotherapy regimes, improving gene therapy regimes, enhancing homologous recombination, treating retroviral infections, and modulating the immune system.

10 Compounds which, following the screening method of the ninth and tenth aspects of the invention, are ones which mimic or modulate the effect of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction are selected for further study. Compounds which modulate the binding of the stimulatory inositol phosphate (such as IP_6) to DNA-PK (or a subunit thereof) or

15 XRCC4 or DNA ligase IV may also be selected for further study. Conveniently, these compounds are then tested further in another screen which is designed for the selection of compounds which are suitable for treating cancer, augmenting cancer radiotherapy and/or chemotherapy regimes, improving gene therapy regimes, enhancing homologous

20 recombination, treating retroviral infections, or modulating the immune system. Typically, the screens are ones which involve cell-based assays which look at end-points relevant to the condition in question. The screens may also involve animal models of the relevant condition. Cell-based screens and animal models are available for at least some of cancer,

25 augmentation of cancer radiotherapy and/or chemotherapy, gene therapy, homologous recombination, retroviral infections and immune system modulation.

Compounds which, following the screening method of the eleventh aspect of the invention, are ones which mimic or modulate the effect of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate on protein kinases. Conveniently, these compounds are then tested in another screen which is designed for the selection of agents which modulate protein kinase or its interactions. In a preferred embodiment of the invention, the protein kinase is any one of DNA-PK, ATM, ATR or FRAP and the method of the invention is used to identify compounds which may be useful in developing agents which modulate cell cycle checkpoint control. Conveniently, further screens for compounds selected in the method of the eleventh aspect of the invention include screens specifically designed to identify agents which modulate cell cycle checkpoint control.

A twelfth aspect of the invention provides a compound identifiable by the screening methods of the invention. A thirteenth aspect of the invention provides a compound identified by the screening methods of the invention. Such compounds are useful in medicine, particularly in the conditions mentioned above. The compounds may be packaged and presented for use in medicine, or may be used in the manufacture of a medicament for treating conditions in which the patient may benefit from modulation of non-homologous end-joining of DNA or from modulation of protein kinase function. For example, compounds obtained in the screens may disrupt DNA-PK- IP_6 interaction and thereby sensitise cells to therapy (eg cancer chemo- or radiotherapy) by disrupting NHEJ.

A fourteenth aspect of the invention provides a method of reducing non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising reducing the amount of, or inhibiting the stimulatory effect of, inositol

WO 01/90404

PCT/GB01/02180

43

hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction.

As noted above, myo-inositol trisphosphate (IP₃) is inhibitory in a NHEJ
5 and may be used to reduce NHEJ.

A fifteenth aspect of the invention provides a method of enhancing non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising increasing the amount of, or enhancing or mimicking the stimulatory effect of, inositol
10 hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction.

The methods may be used *in vitro*, but it is particularly preferred if they are used *in vivo*, for example in a cell where it is desirable to reduce or enhance
15 NHEJ of DNA. It is preferred if the cell where reduction or enhancement of NHEJ of DNA takes place according to the method of the invention is a cell in a human or animal in need of reduction or enhancement of NHEJ of DNA. As noted above, conditions where reduction of NHEJ of DNA in an animal or human may be desired include cancer, augmentation of cancer
20 radiotherapy and/or chemotherapy, gene therapy, homologous recombination, retroviral infections and immune system modulation. Thus, the invention includes a method of treating these conditions or carrying out these procedures, the method comprising administering to the patient an effective amount of a compound which reduces the amount of, or enhances
25 the stimulatory effect of, IP₆ or other stimulatory inositol phosphate in NHEJ reaction. The invention also includes the use of a compound which reduces the amount of, or enhances the stimulatory effect of, IP₆ or other stimulatory inositol phosphate in NHEJ reaction in the manufacture of a

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

44

medicament for treating a condition where reduction of NHEJ of DNA is desired.

It is desirable to reduce NHEJ in order to enhance double-stranded break repair by homologous recombination, leading to more efficient gene targeting.

Histamine has been shown to affect IP_6 levels in cells (Sakuma *et al* (1988) *Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 466-472).

Anti-inositol phosphate antibodies may be used to reduce the amount of, or inhibit the stimulatory effect, of the stimulatory inositol phosphate, such as IP_6 . Anti-inositol phosphate antibodies may be made using methods well known in the art using the inositol phosphate as an immunogen (or hapten) or by using it to screen synthetic antibody-display libraries (eg phage display libraries). By "antibody" we include antibody-like molecules such as antigen binding fragments of antibodies or synthetic antibodies. Thus, the term antibody includes Fab, Fv, ScFv, dAb and the like as are well known in the art. Antibodies to IP_3 are described in Shieh & Cheu (1995) *Biochem. J.* 311, 1009-1014 and Goa *et al* (1994) *Biorg. Medicinal Chem.* 2, 7-13 and antibodies to IP_6 may be made by analogous methods.

The screening methods of the invention may be used to identify high affinity IP_6 analogues which may specifically compete with IP_6 for the DNA-PK binding site.

IP_6 levels in the cell may be up- or downregulated by targeting the synthetic enzyme (eg IPK1 in *Saccharomyces cerevisiae*) or enzymes involved in IP_6 turnover (eg phosphatases). Antisense compounds, which are well known

in the art and may be designed by reference to a particular nucleotide sequence (eg to the mRNA or gene encoding the IP_6 synthetic enzyme or to an IP_6 phosphatase), may be used.

5 Enhancement of NHEJ may be desirable in patients who are cancer prone or who are immuno-compromised. It may also be desirable in A-T patients. Thus, the invention also includes a method of treating these conditions, the method comprising administering to the patient an effective amount of a
10 compound which increases the amount of, or enhances or mimics the stimulatory effect of, IP_6 or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction. The invention also includes the use of a compound which increases the amount of, or enhances or mimics the stimulatory effect of, IP_6
15 or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction in the manufacture of a medicament for treating a condition where enhancement of NHEJ of DNA is desired.

As noted above, histamine has been shown to alter IP_6 levels in a cell, and antibodies may be used to reduce the amount of, or inhibit the stimulatory effect of the stimulatory inositol phosphate.

20 A sixteenth aspect of the invention provides a method of modulating the activity or interaction of a protein kinase the method comprising changing the amount of inositol hexakisphosphate (IP_6) or other stimulatory inositol phosphate present with the protein kinase, or inhibiting or enhancing the
25 effect of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate on the protein kinase.

Typically, the protein kinase is a protein kinase which has a domain, preferably a C-terminal domain, with similarity to the catalytic domain of phosphatidylinositol 3-kinase.

The method may be used *in vitro*, but it is particularly preferred if it is used *in vivo*, for example in a cell where it is desirable to modulate the activity or interaction of the protein kinase. Typically, the modulation of the protein kinase takes place in a cell in a human or animal body, in need of such modulation.

In a preferred embodiment of this aspect of the invention, the protein kinase is any one of DNA-PK, ATR, ATM or FRAP and the method is for modulating cell cycle checkpoint control.

In a further preferred embodiment the protein kinase is ATM or ATR. Modulators of ATM or ATR, as identified herein, may be useful for treating any of a variety of purposes such as in therapy of ataxia-telangiectasia (A-T); modulation of the immune system (ATM appears to be required for the generation of a fully functional immune system); modulating telomere length (cells of A-T patients lose their telomeres more quickly than normal individuals) – this may be useful ageing, AIDS and other conditions; tumour/cancer therapy; and in augmenting of cancer radiotherapy or chemotherapy.

The aforementioned compounds of the invention or a formulation thereof may be administered by any conventional method including oral and parenteral (eg subcutaneous or intramuscular) injection. The treatment may consist of a single dose or a plurality of doses over a period of time.

Whilst it is possible for a compound of the invention to be administered alone, it is preferable to present it as a pharmaceutical formulation, together with one or more acceptable carriers. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense

of being compatible with the compound of the invention and not deleterious to the recipients thereof. Typically, the carriers will be water or saline which will be sterile and pyrogen free.

- 5 A seventeenth aspect of the invention provides a method of determining whether an individual has or is predisposed to a defect in DNA repair or cell cycle checkpoint control, the method comprising the steps of (1) obtaining a sample from the patient, (2) determining the concentration of, or subcellular localisation of, inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol
10 phosphate in the sample, and (3) comparing the result with a standard.

The sample obtained from the patient may be any suitable sample. Typically the sample is a sample of a tissue in which DNA repair or cell cycle checkpoint control defects are known to occur, such as skin and in
15 tumour samples. The concentration, or subcellular localisation, of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate may be determined by any suitable method. For example, anti-IP₆ antibodies may be made using methods well known in the art which may be used to quantify IP₆, and also to detect its sub cellular location, for example by using suitable staining and
20 microscopic techniques such as confocal microscopy, immunofluorescence microscopy and by immunohistochemistry. Alternatively, IP₆ and other stimulatory inositol phosphates as defined can be measure by suitable analytical techniques such as ELISA. Subcellular localisation can be compared, for example, by measuring IP₆ in a nuclear extract compared to a
25 cytoplasmic extract.

The invention may also be considered to relate to a method of modulating DNA repair activity comprising performing DNA repair in the presence of

an effective modulating amount of an inositol phosphate, or isomer thereof.
Preferably, the inositol phosphate is IP₆.

As used herein, when reference is made to any inositol phosphate it includes
5 reference to a salt thereof, particularly a physiologically acceptable salt.

The invention will now be described in more detail by reference to the
following Example and Figures wherein:

10 **Figure 1.** Repair of double-strand breaks by non-homologous end-joining.
In this schematic model DSBs, caused by either irradiation or chemical
assault, are bound by the Ku heterodimer (Ku70/80) and the catalytic
subunit of the DNA-dependent protein kinase, DNA-PK_{cs}. Binding protects
the free ends from nuclease attack while simultaneously initiating the
15 assembly of the NHEJ apparatus. Through an as yet undefined process,
DNA ends are bridged, and the XRCC4/DNA ligase IV complex is
recruited to the DSB where it effects repair.

Figure 2. Purification of SFA. **A.** Schematic representation of the
20 chromatographic steps taken to purify SFA from HeLa cytoplasmic extracts.
B. Complementation of DNA end-joining by the addition of undiluted
DEAE fractions to PC-C. Samples were analyzed by gel electrophoresis
and ³²P-labeled DNA visualized by autoradiography. **C.** Fractions eluting
from mono Q were diluted 1:50 in L buffer and assayed for the ability to
25 complement end-joining by PC-C. End-joining by PC-C alone (-), and a
selected region of each column elution profile is shown. Mobilities of
linear, dimer and trimer DNA species are indicated.

Figure 3. Physical characteristics of SFA. **A.** Proton decoupled phosphorus spectra revealed four peaks (ratio 1:2:2:1) close to the phosphoric acid reference at 1.4909 ppm (intensity 2.582), 1.0003 ppm (intensity 5.465), 0.5554 ppm (intensity 6.002) and -0.0850 ppm (intensity 2.927), suggesting phosphate groups and showing no evidence of phosphorus-phosphorus coupling. **B.** Proton phosphorus coupled spectrum revealed phosphorus proton doublets consistent with the phosphorus being linked to a carbon hydrogen bond. **C.** Ion-trap spectrum revealed a mass of 660.9 Da, which represents the $[\text{mass} + 1]^{\text{+1}}$ -ion or $[\text{mass} + 1]^{\text{+1}}$ -ion followed by a series of related sodium salts at 682.9 Da ($+1\text{Na}^+$), 704.9 Da ($+2\text{Na}^+$), 726.9 Da ($+3\text{Na}^+$).

Figure 4. Stimulation of DNA-PK dependent end-joining by inositol phosphates. **A.** Schematic representation of IP_6 . **B.** Complementation of PC-C by IP_6 . End-joining assays were carried out using PC-C complemented with increasing amounts of IP_6 . **C.** Effect of inositol phosphates on DNA-PK dependent NHEJ. Inositol hexakisphosphate (IP_6), inositol pentakisphosphate (IP_5), inositol tetrakisphosphate (IP_4), inositol trisphosphate (IP_3) or inositol hexasulphate (IS_6) were assayed for their ability to stimulate DNA end-joining by PC-C.

Figure 5. SFA and IP_6 co-fractionate by strong anion exchange chromatography. A trace amount (4 nM) of $^3\text{H}\text{-IP}_6$ was added to a 1 ml aliquot of SFA. The resulting sample was applied to AG 1-X8 resin and eluted as described in Materials and Methods. Top, elution profile of $^3\text{H}\text{-IP}_6$ as measured by scintillation counting. Bottom, elution profile of SFA, determined by the complementation of PC-C mediated end-joining.

Figure 6. Specificity of IP_6 for DNA-PK mediated end-to-end ligation. **A.** DNA end-joining reactions catalyzed by PC-C were analyzed in the presence or absence of $2 \mu M IP_6$. **B.** Similar reactions carried out using T4 DNA ligase ($0.1 u/\mu l$) in place of PC-C.

5

Figure 7. Binding of IP_6 by DNA-PK. **A.** Schematic representation of DNA-PKcs. The grey bar represents the C-terminal 380aa which share sequence similarity to the catalytic domain of the PI 3-kinases (Hartley *et al*, 1995) and the black box indicates the location of the putative inositol phosphate headgroup binding domain of the PI 3-kinases (Wymann and Pirola, 1998). The lysine (K) residue believed to be the target of wortmannin interaction is shown as are the two aspartate (D) residues believed to be located in the ATP binding active site of the protein kinase. **B.** Gel filtration analysis of $^3H-IP_6$ binding by DNA-PK. Top, elution profile of $^3H-IP_6$ in the presence of non-specific proteins ($1.8 mg/ml$). Middle, elution profile of $^3H-IP_6$ in the presence of DNA-PK. Bottom, elution profile of DNA-PK kinase activity of fractions shown in B, middle. **C.** Gel filtration analysis of $^3H-IP_3$ binding by DNA-PK. Top, elution profile of $^3H-IP_3$ with protein size standards ($1.8 mg/ml$). Middle, elution profile of $^3H-IP_3$ with DNA-PK. Bottom, elution profile of DNA-PK kinase activity of fractions shown in C, middle.

Figure 8 shows that both IP_{7-pp5} and IP_{7-pp6} stimulate NHEJ by PC-C and that this stimulation is approximately 10-fold better than that achieved by IP_6 .

25

Figure 9 shows that IS_6 does not compete with IP_6 in binding to DNA-PK.

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

51

Figure 10 shows the distribution of $^3\text{H-IP}_6$ along a gel filtration column under various conditions. Superdex 200 gel filtration, 50 μl fractions, scint. counting 20 μl /fraction 100 nM $^3\text{H-IP}_6$, 100 nM Ku, 100 nM DNA (200 nM DNA ends), 100 nM PK_{cs}. Running buffer: 50 mM HEPES, pH 8.0, 40 mM KOAc, 10% Glycerol, 0.1 M KCl, 1 mM DTT.

Figure 11 is an overlay of the Ku + $^3\text{H-IP}_6$ and Ku + DNA-PK_{cs} + $^3\text{H-IP}_6$ curves from Figure 10 which emphasises that the presence of DNA-PK_{cs} does not alter the mobility of the Ku- $^3\text{H-IP}_6$ curves from Figure 10 which emphasises that the presence of DNA-PK_{cs} does not alter the mobility of the Ku- $^3\text{H-IP}_6$ complex along the gel filtration column.

Figure 12 shows the result of gel filtration carried out on DNA-PK + $^3\text{H-IP}_6$ in the presence or absence of DNA.

15

Figure 13 shows the result of competition analysis of IP_6 binding by Ku using IP_3 , IP_6 and IP_7 .

Figure 14 shows the results of specificity trials using the spin column method.

20

Example 1: Stimulation of DNA-PK dependent non-homologous end-joining by inositol phosphate

25 **Results**

Purification of a factor that stimulates DNA end-joining *in vitro*

In previous studies, cell-free extracts capable of promoting DNA end-joining were fractionated by phosphocellulose chromatography (Baumann and West, 1998). One fraction (designated PC-C), which contained all
5 components known to be required for NHEJ *in vivo* (Ku70/80, DNA-PK_{cs}, XRCC4, DNA ligase IV), showed only limited ability to join DNA ends *in vitro*. The ability to promote end-joining, however, could be restored by addition of a second fraction (designated PC-A). This complementation assay provided the basis for the purification of the stimulatory factor in PC-
10 A, which we now designate Stimulatory Factor A (SFA).

Subcellular fractionation of HeLa cells into nuclear and cytoplasmic fractions, showed the cytoplasm to be rich in SFA (data not shown). By comparison, relatively low levels of SFA were detected in nuclear extracts.
15 The presence of sheared chromosomal DNA in the nuclear extracts, which could compete for the factors involved in NHEJ, however, made it difficult to accurately assess the relative levels of SFA in these two subcellular compartments. Given that the removal of nuclei would minimize the amount of contaminating DNA, we chose to prepare SFA from the
20 cytoplasmic fraction of 300 L of HeLa cells.

Preliminary binding trials showed that cation-exchange resins such as mono S or SP-sepharose failed to bind SFA. Therefore, anion-exchange resins of various strengths were used throughout the purification scheme (Figure 2).
25 During purification, we were somewhat surprised to discover that SFA was heat-stable, insensitive to treatment with phenol, and insoluble in CHCl₃. UV absorbance spectroscopy demonstrated that a sample of concentrated SFA did not absorb at 280 nm, indicating a lack of aromatic amino acids (data not shown). All attempts to degrade SFA using proteases (trypsin, V8

protease and proteinase K + SDS) failed (data not shown). Taken together, these observations suggest that SFA, previously assumed to be a protein participant in NHEJ, is not a polypeptide.

- 5 To investigate the possibility that SFA might be a nucleic acid (RNA or DNA), SFA was treated with either RNase A, NaOH (0.1-1.0 M at 60°C), DNase I or micrococcal nuclease. These treatments had no effect on the ability of SFA to stimulate end-joining (data not shown). UV absorbance spectroscopy demonstrated that a sample of concentrated SFA did not
10 absorb at 260 nm, indicating a lack of purine or pyrimidine moieties in the sample (data not shown). These data demonstrate that SFA is not a nucleic acid.

Chemical analysis of SFA

- 15 To identify the active component in SFA, the sample was subjected to NMR and mass spectroscopy. Proton decoupled phosphorus NMR spectra (Figure 3A) revealed four peaks (ratio 1:2:2:1) close to the phosphoric acid standard suggesting six phosphate groups. The 1:2:2:1 ratio of peak intensities suggests two independent sets of equivalent phosphates as well as two non-
20 equivalent individual phosphates. Proton phosphorus coupled spectra (Figure 3B) revealed phosphorus proton doublets, consistent with each of the phosphate groups being linked to a carbon participating in a carbon-hydrogen bond. These data suggest that the SFA sample contains an organophosphorus compound containing 6 phosphates, each directly linked
25 to a (-CH) group.

The molecular mass of SFA was determined by mass spectroscopy (Figure 3C). While no significant signal was observed in the range commonly associated with macromolecules, polypeptides or polymeric nucleic acids,

the SFA sample was found to contain a number of species of low molecular mass. Although the SFA sample was found to be heterogeneous, a clear peak was detected at a mass of 660.9 Da. Additionally, an array of peaks which differed from the original 660.9 Da peak by 22 Da (the mass of sodium Na^+) were observed downstream of the 660.9 Da peak. These masses appear to correspond to the +1 (Na^+), +2 (Na^+) and +3 (Na^+) salts of the 660.9 Da species.

Identification of the active component of SFA as IP_6

Inositol is a fully hydroxylated six-carbon ring which is found in a number of phosphorylation states ranging from mono- through hexakisphosphate. Inositol hexakisphosphate (IP_6) (Figure 4A) shares the same molecular weight as SFA (659.9 Da) and has the same phosphorus content. The presence of six phosphates in IP_6 and their conformation in aqueous solution (Barrientos and Murthy, 1996; Costello *et al.*, 1976; Emsley and Niazi, 1981) is in keeping with the obtained proton-decoupled ^{31}P NMR spectra of SFA (Figure 3A) which matches the proton-decoupled ^{31}P spectrum for the mono-ionic form of IP_6 . Furthermore, each phosphate group of IP_6 is linked to a carbon participating in a carbon-hydrogen bond, which is in accord with the proton coupled phosphorus NMR spectrum (Figure 3B). These results indicate that the 660.9 Da species detected by mass spectroscopy is the protonated form of IP_6 ($[659.9 + 1]^{+1}$ Da), and that the above described array of peaks represent the sodium salts that would readily form with IP_6 . To confirm that the active component in SFA is indeed IP_6 , commercially available IP_6 was assayed for its ability to stimulate end-joining by PC-C. As shown in Figure 4B, IP_6 stimulated end-joining at concentrations in the region of 100 nM and stimulation was maximal at 1 μM .

To assess the specificity of NHEJ for IP_6 , we compared the ability of IP_6 to stimulate end-joining with other inositol phosphates (IP_5 , IP_4 and IP_3). In addition, inositol hexasulphate (IS_6) – an inositol compound which would provide a charge distribution similar to that of IP_6 , while presenting sulfate rather than phosphate groups – was also assayed. It was found that IS_6 was unable to stimulate end-joining, demonstrating a clear requirement for phosphate groups (Figure 4C). Indeed, we found that IP_6 proved to be the most effective inositol phosphate compound of those tested. IP_5 and IP_4 were also able to stimulate end-joining, but the efficiency of this stimulation was reduced relative to IP_6 . These data show that end-joining requires a phosphorylated inositol species, and that the stimulation of NHEJ is directly related to the extent of phosphorylation.

Further evidence that IP_6 is the active component in SFA was obtained by strong anion exchange (SAX) chromatography, using a resin that is commonly utilized to separate highly charged molecules such as the inositol phosphates. To determine whether the NHEJ stimulating activity in SFA co-fractionated with IP_6 , an aliquot of SFA was spiked with a trace amount of 3H - IP_6 (4 nM), and the mixture was chromatographed on AG 1-X8 resin. Complementation assays were performed to detect the presence of SFA, and the 3H - IP_6 content was assessed by scintillation counting. As shown in Figure 5, the peaks of SFA and 3H - IP_6 were coincident.

Although IP_6 is of small molecular size (660 Da), its high charge to mass ratio and the hydrogen bonding observed between phosphate groups (Emsley and Niazi, 1981) results in a larger apparent molecular size in aqueous solutions at low ionic strength. This has been observed by the retention of IP_6 by dialysis membranes at low ionic strength, and the passage of IP_6 through the same membrane at high ionic strength (data not

shown). Equilibrium dialysis trials were performed to compare the movement of SFA and $^3\text{H-IP}_6$ across a dialysis membrane (12-14 kDa cutoff). Both SFA and $^3\text{H-IP}_6$ were retained during equilibrium dialysis at low ionic strength, and at high ionic strength both SFA and $^3\text{H-IP}_6$ passed through the dialysis membrane (data not shown). These observations add to the list of physical properties shared by SFA and IP_6 .

Specificity of IP_6 for DNA-PK dependent end-joining

The data presented above show that the stimulatory factor purified from HeLa cells is inositol hexakisphosphate (IP_6). Because many substances (eg PEG, PVA) have non-specific stimulatory effects on the efficiency of DNA ligases *in vitro*, we next determined whether IP_6 was specific for NHEJ mediated by DNA-PK. To do this, we compared the ligation efficiencies of PC-C and T4 DNA ligase in the presence or absence of IP_6 . It was found that IP_6 stimulated end-joining by PC-C, whereas the efficiency of ligation by T4 DNA ligase was unaffected (Figure 6).

Binding of $^3\text{H-IP}_6$ by DNA-PK

The catalytic domain of DNA-PK_{cs} is related to that found in the PI 3-kinases which phosphorylate inositol phospholipids. Previous studies have shown that in the PI 3-kinases recognition of the inositol phosphate headgroup is mediated by defined sequences within this conserved domain (Figure 7A) (Bondeva *et al.*, 1998). Given that NHEJ is dependent upon DNA-PK and is stimulated by the addition of IP_6 it was plausible that this stimulatory effect is due to a physical interaction between IP_6 and DNA-PK.

Gel filtration analysis using $^3\text{H-IP}_6$ and purified DNA-PK was carried out to assess the ability of DNA-PK to interact with IP_6 . As shown in Figure 7B

$^3\text{H-IP}_6$ was retained by the gel filtration media in the absence of DNA-PK and observed in fractions late in the elution profile. In this experiment the retention of $^3\text{H-IP}_6$ was observed in the presence of protein size standards which serve to establish the quality of the elution profile and provide a selection non-specific proteins which have no effect on the mobility of $^3\text{H-IP}_6$. In the presence of DNA-PK $^3\text{H-IP}_6$ was also observed in early fractions of the elution profile which correspond to the peak of DNA-PK activity. The altered retention of $^3\text{H-IP}_6$ by gel filtration media in the presence of DNA-PK and the cofractionation of $^3\text{H-IP}_6$ and DNA-PK activity indicate that DNA-PK is capable of binding IP_6 .

To assess the specificity of IP_6 binding by DNA-PK we examined the ability of DNA-PK to bind another inositol phosphate. Given that IP_3 does not stimulate NHEJ (Figure 4C) we selected $^3\text{H-IP}_3$ for this comparison. In contrast with $^3\text{H-IP}_6$, the retention of $^3\text{H-IP}_3$ by the gel filtration matrix is not altered by the presence of DNA-PK (Figure 7C). Furthermore, the fractions which show substantial DNA-PK activity contain only background levels of $^3\text{H-IP}_3$. This argues against the possibility that the observed binding of IP_6 by DNA-PK (Figure 7B) might be due to non-specific interactions between DNA-PK and the multiple phosphate groups of IP_6 . Taken together the data presented in Figure 7 demonstrate a physical interaction between DNA-PK and IP_6 which does not extend to all of the inositol phosphates.

25 Discussion

We have isolated a factor that stimulates NHEJ *in vitro*, and have identified this factor as inositol hexakisphosphate (IP_6). What is the role of IP_6 in NHEJ? IP_6 has been shown to function as a phosphatase inhibitor at

concentrations of 10 μM or greater (Larsson *et al.*, 1997). Given that IP_6 is capable of stimulating NHEJ at 1% of this concentration it is unlikely that IP_6 functions in NHEJ as an inhibitor of phosphatases. The inability of IP_6 to enhance end-joining by T4 DNA ligase argues against the possibility that
5 IP_6 stimulates NHEJ via a non-specific mechanism such as macromolecular crowding by volume exclusion. More likely, the low concentration at which IP_6 can stimulate end-joining (100 μM) indicates that stimulation results from the interaction of IP_6 , either directly or indirectly, with some component of the end-joining apparatus.

10 The ability to stimulate NHEJ does not appear to be restricted to IP_6 , because we found that IP_5 and IP_4 were also able to stimulate end-joining, though to a lesser extent. Indeed, the efficiency of stimulation appears to be directly proportional to the degree of phosphorylation of the inositol
15 phosphate. This correlation fits a model in which IP_6 functions as a ligand and is bound by a ligand binding species. In such a model, small alterations in the structure of the ligand (in this case changes from IP_6 to IP_5 or to IP_4) would be predicted to result in incremental decreases in the affinity or stability of the ligand binding interaction. If ligand binding is essential for
20 end-joining, then these small alterations in ligand structure would be apparent as incremental decreases in end-joining efficiency. The important prediction made by this model is that a species which both binds IP_6 and participates in NHEJ must be present in the PC-C fraction. We have identified this IP_6 binding species as DNA-PK.

25 The apparent requirement for IP_6 in NHEJ suggests that DNA-PK is in some way NHEJ-inactive in the unbound state, and that there is a transition upon ligand (IP_6) binding resulting in an NHEJ-active species.

Additionally, binding of IP_6 may influence the ability of DNA-PK to interact with other components of the NHEJ apparatus.

The consequences of IP_6 binding by DNA-PK might be structural in nature, possibly due to an allosteric shift upon association with IP_6 . Alternatively, binding of IP_6 could simply alter the surface charge distribution of DNA-PK. Such an alteration of local electrostatic potential has been observed in the binding of IP_6 to phosphoglycerate mutase (Rigden *et al*, 1999). In this case, ligand binding was mediated by both hydrogen bonding interactions and by the strong positive electrostatic potential of the active site cleft. Occupancy of this highly charged cleft by IP_6 exposes several phosphates to the solvent, which has a pronounced effect on the local electrostatic potential relative to the unbound state. An alteration of this kind would result in a more passive transition from the NHEJ-inactive to the NHEJ-active state of DNA-PK. Of course these two possibilities are not mutually exclusive and both mechanisms might influence the substrate specificity of DNA-PK as well as its potential to participate in extensive protein complexes.

As far as we are aware, DNA-PK is the only protein known to participate in NHEJ that has been demonstrated to bind IP_6 . DNA-PK is a member of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-related kinase family, as are ATM and ATR. All three proteins exhibit a strong sequence homology to the PI 3-kinases, especially in the catalytic core domain that binds and phosphorylates the phosphoinositol headgroup of phosphatidylinositol. However, no phosphorylation of lipid substrates has been observed by DNA-PK_{cs}, or by other members of this PI3K-related family of kinases (Carpenter and Cantley, 1996; Hunter, 1995; Keith and Schreiber, 1995; Wymann and Pirola, 1998).

It is tempting to postulate that the PI3K-related kinases are derived from a common ancestor that possessed both protein kinase and lipid kinase functions. Mutation of the PI3K catalytic domain could result in loss of lipid kinase activity, while retaining an affinity for the phosphoinositol headgroup. This hypothesis is supported by the work by Bondeva *et al* (Bondeva *et al*, 1998) demonstrating that substitution of the putative phosphoinositol headgroup interaction site of PI3K γ can alter or abort lipid kinase activity *in vitro*, while leaving protein kinase function unaffected. Clearly an important next step in the investigation of both NHEJ and the PI3K-related kinases will be to characterize the interaction between DNA-PK and IP $_6$ and to examine the consequences of this binding event.

Experimental Procedures

15

Materials

myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP $_3$), D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate (IP $_4$), *myo*-inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate (IP $_5$) and inositol hexasulphate (IS $_6$) were purchased from Sigma. *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (IP $_6$) was purchased from Sigma and also from Calbiochem. ^3H -IP $_6$ (10-30 Ci/mmol) was purchased from NEN.

20

Preparation of PC-C and complementation assay

HeLa whole cell extracts were prepared and fractionated step-wise over phosphocellulose as described (Baumann and West, 1998). Fraction PC-C was dialyzed for 2 hours against L buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM KOAc, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT) and stored at -80°C .

25

End joining reactions (10 μ l) were carried out in 50 mM HEPES pH 8.0, 40 mM KOAc, 0.5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, contained 2-3 μ l (3-5 μ g) of PC-C and HindIII-linearized 5'-³²P-labeled pDEA7Z DNA (10 ng). Incubation was for 1 hour at 37°C. ³²P-labeled
5 DNA products were deproteinized and analyzed by electrophoresis through 0.6% agarose gels followed by autoradiography. Quantification of joining efficiency was carried out by phosphorimaging and the data are presented as (% total ends-joined_{sample}) - (% total ends-joined_{PC-C}) unless otherwise stated. For assays of inositol phosphates, aqueous solutions were added
10 directly to the end-joining reactions. For the screening of column fractions; 0.5-1 μ l of diluted (in L buffer) or undiluted column fractions were added.

Preparation of cytoplasmic extracts

300 L of HeLa cells were cultured in suspension to a density of 5 x 10⁵
15 cells/ml, harvested by centrifugation, washed twice with PBS, flash-frozen on liquid nitrogen and stored at -80°C. When required, 2 packed cell volumes of hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) was added and the cells were held on ice for 20 min. The cells were opened by dounce homogenization (35 strokes with a "B" pestle) in
20 the presence of protease inhibitors (1 mM PMSF, 2.2 ng/ml aprotinin, 1 ng/ml leupeptin, 1 ng/ml pepstatin A and 1 ng/ml chymostatin). The resulting homogenate was centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm to pellet membranous cellular debris and intact nuclei. The resulting cytoplasmic fraction was dialyzed for 2 hours at 4°C against L buffer and
25 then centrifuged for 45 min at 45,000 rpm at 4°C in a Beckman Ti45 rotor. All dialysis steps were carried out in tubing with a molecular weight cutoff of 12-14 kDa.

Purification of SFA

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

62

Cytoplasmic extracts (from the equivalent of 100 L cultured cells) were first batch fractionated by absorption to 1/3 vol phosphocellulose (Whatman P-11) by gently rocking for 30 min at 4°C. Following centrifugation, the unbound fraction was reserved. The resin was washed twice with an equal volume of L buffer. The unbound fraction and the 2 washes were pooled, and spun for 45 min at 45,000 rpm at 4°C in a Beckman Ti45 rotor. The supernatant was then loaded onto a 5 x 10 cm phosphocellulose column equilibrated in L buffer. The flow through passed directly onto a 5 x 10 cm affigel blue column (Bio-Rad) equilibrated in the same buffer. The flow through was loaded onto a 1.6 x 39 cm DEAE Fast Flow column (Pharmacia) equilibrated in L buffer, which was eluted with 15 column volumes of a 0-0.5 M KCl linear gradient in L buffer. Active fractions eluting between 0.2-0.25 M KCl were pooled (designated DEAE SFA) and stored at -80 °C until all 300 L equivalent of HeLa cell cytoplasm had been fractionated.

DEAE-SFA fractions were heat denatured by boiling for 15-20 minutes, then centrifuged for 45 min at 45,000 rpm at 4°C in a Beckman Ti45 rotor to remove insoluble aggregates. The supernatant was dialyzed for 6 hours against L buffer, applied to a 2.6 x 37 cm affi-gel heparin column (Bio-Rad) equilibrated in the same buffer, then eluted with a 15 column volume 0-1.0 M KCl linear gradient in L buffer. Active fractions eluting between 0.28-0.33 M KCl were pooled, dialyzed for 6 hours against L buffer, then loaded onto a Mono P Hr 5/20 column (Pharmacia). The column was washed with 5 column volumes of L buffer, then with 14 volumes of polybuffer 74-HCl (pH 4.0) and finally eluted with a 50 column volume 0-2.0 M KCl linear gradient. Active fractions eluting between 1.2-1.35 M KCl were pooled, extracted with phenol/CHCl₃, dialyzed for 6 hours against L buffer, loaded onto a Mono Q Hr 5/5 column (Pharmacia) equilibrated in L buffer, and

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

63

then eluted with a 30 column volume 0-1.0 M KCl linear gradient in L buffer. Active fractions eluting from the column between 0.18-0.23 M KCl were pooled, dialyzed overnight at 4°C against dH₂O and stored at -20°C.

5 **Strong anion exchange chromatography**

AG 1-X8 resin (200-400 mesh, formate form, Bio-Rad) was washed with 5 volumes of 1.0 M formic acid, then with 15 column volumes of dH₂O. SFA was dialyzed against dH₂O overnight at 4°C. A trace (4 nM) amount of ³H-IP₆ was added, and the sample was applied to a 1.0 x 1.3 cm AG 1-X8 column equilibrated with dH₂O. The column was washed with 10 column volumes of dH₂O, then eluted with a 30 column volume 0-2.75 M ammonium formate linear gradient in 0.1 M formic acid.

Mass spectrometry

15 SFA sodium salt was acidified with 1M HCl to approximately pH 2.0, diluted with 1 equivalent of 70% methanol/30% formic acid and a 10µl sample was loaded into a carbon coated nano spray capillary needle (Profana) and the molecular weight determined by mass spectrometry using an ion-trap (LCQ Thermoquest).

20

NMR

SFA was lyophilized and resuspended in D₂O. Measurements were carried out using a Bruker AC-300 pulse Fourier transform NMR spectrometer operating at 300.13 Mhz for protons ³¹P spectroscopy (5 mm sample in 10 mm broad band probe), and at 121.497 Mhz with broad band proton decoupling (composite pulse). Reference ³¹P signals were detected in a +/- 50ppm window.

25

Equilibrium dialysis

For analysis at low ionic strength, samples (1 ml) were dialyzed against 0.5 L dH₂O for 21 hours at 4°C with stirring. For high ionic strength, samples were dialyzed against 0.25 L of 2.5 M NaCl for 48 hours at 4°C. Dialysis tubing with a molecular weight cutoff of 12 - 14 kDa was used.

5

T4 DNA ligation assay

Reactions (10 µl) containing T4 DNA ligase (NEB) were carried out in 1x T4 DNA ligase buffer (NEB) at 25°C in the presence and absence of inositol phosphates. Reactions were stopped, deproteinized and the products analyzed by agarose gel electrophoresis.

10

Gel filtration analysis of ³H-IP₆ binding by DNA-PK

Binding reactions (55 µl) were carried out in 25 mM HEPES pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.1% NP-40 with 5000 units of DNA-PK (Promega) or 1.8 mg/ml of protein size standards for gel filtration (BioRad) and 100 nM ³H-IP₆ or ³H-IP₃ at 4°C for 30 min. Complexes were resolved on a Superose 12 PC3.2/30 column run in 50 mM HEPES pH 8.0, 40 mM KOAc, 0.1M KCl, 10% glycerol, 1 mM DTT at 40 µl/min. 50 µl fractions were collected; 20 µl samples of each fraction were used for ³H scintillation counting (10 min/sample in 5 ml EcocintA) and 10µl were assayed for DNA-PK kinase activity using the SignaTECT DNA-PK assay system (Promega).

15

20

References for Example 1

25

Barrientos, L. G., and Murthy, P. P. N. (1996). Conformational studies of *myo*-inositol phosphates. *Carbohydr. Res.* 296, 39-54.

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

65

- Baumann, P., and West, S. C. (1998). DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14066-14070.
- Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C. M., Demengeot, J.,
5 Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A., and
Jackson, S. P. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is
linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the
murine scid mutation. *Cell* 80, 813-823.
- 10 Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., and
Wymann, M. P. (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of
PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282, 293-296.
- Carpenter, C. L., and Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases.
15 *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2, 153-158.
- Chu, G. (1997). Double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272, 24097-
24100.
- 20 Costello, A. J. R., Glonek, T., and Myers, T. C. (1976). ³¹P nuclear
magnetic resonance-pH titrations of *myo*-inositol hexaphosphate.
Carbohydr. Res. 46, 159-171.
- Critchlow, S. E., and Jackson, S. P. (1998). DNA end-joining: from yeast
25 to man. *TIBS* 23, 394-398.
- Emsley, J., and Niazi, S. (1981). The structure of *myo*-inositol
hexaphosphate in solution: ³¹P N.M.R. investigation. *Phosphorus and
Sulfur* 10, 401-408.

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

66

Essers, J., van Steeg, H., de Wit, J., Swagemakers, S. M. A., Vermeij, M.,
Hoeijmakers, J. H. J., and Kanaar, R. (2000). Homologous and non-
homologous recombination differentially affect DNA damage repair in
5 mice. *EMBO J.* 19, 1703-1710.

Hartley, K. O., Gell, D., Smith, G. C. M., Zhang, H., Divecha, N., Connelly,
M. A., Admon, A., Leesmiller, S. P., Anderson, C. W., and Jackson, S. P.
(1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of
10 phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product.
Cell 82, 849-856.

Hunter, T. (1995). When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a
protein kinase. *Cell* 83, 1-4.

15 Keith, C. T., and Schreiber, S. L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair,
recombination, and cell-cycle checkpoints. *Science* 270, 50-51.

Larsson, O., Barker, C. J., Sjöholm, A., Carlqvist, H., Michell, R. H.,
20 Bertorello, A., Nilsson, T., Honkanen, R. E., Mayr, G. W., Zwitter, J., and
Berggren, P. O. (1997). Inhibition of phosphatases and increased Ca²⁺-
channel activity by inositol hexakisphosphate. *Science* 278, 471-474.

Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., and Meek, K. (1998). The XRCC4
25 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein
kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 1794-1801.

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

67

- Modesti, M., Hesse, J. E., and Gellert, M. (1999). DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. *EMBO J.* **18**, 2008-2018.
- 5 Rigden, D. J., Walter, R. A., Phillips, S. E., and Fothergill-Gilmore, L. A. (1999). Polyanionic inhibitors of phosphoglycerate mutase: combined structural and biochemical analysis. *J. Mol. Biol.* **289**, 691-699.
- Smith, G. C. M., and Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein
10 kinase. *Genes Dev.* **13**, 916-934.
- Taccioli, G. E., Rathbun, G., Olitz, E., Stamato, T., Jeggo, P. A., and Alt, F. W. (1993). Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* **260**, 207-210.
- 15 Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance
20 of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **17**, 5497-5508.
- Weaver, D. T. (1996). Regulation and repair of double-strand DNA breaks. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6**, 345-375.
- 25 Wymann, M. P., and Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 127-150.

Example 2: High throughput screening assay for NHEJ

A microtiter-plate (96-wells) assay which would work like an ELISA assay is used. A "target" duplex DNA is adhered to the plate (call the sequence oligos 1 and 2 which are complementary and have an exposed, unmodified terminus). Cell extracts are mixed with a "detection" duplex DNA (linear duplex – oligos 3 and 4 which are complementary – which have one exposed, unmodified terminus (which will be ligated to the target DNA) and the other terminus is both 5' and 3' blocked by biotin; oligo 3 is 5' biotinylated, oligo 4 is 3' biotinylated. The biotin moieties serve two functions: 1) block the end of the DNA and prevent additional ligation which would result in multimerization and non-linear report of activity and 2) for detection. NHEJ reaction components, including IP₆, are incubated in the plate (which presents the target duplex) in the presence of the detection DNA (and buffer and Mg²⁺ and ATP). The plate is washed to remove proteins and excess detection DNA. The only way for the detection DNA to remain on the plate is by ligation with the target DNA. The presence of the detection duplex indicates NHEJ – this retention should be quantitative. Detection/quantification of the biotin may be carried out as with an ELISA assay – using avidin coupled enzymes and a chromogenic enzyme substrate.

Example 3: IP₇ stimulates NHEJ better than IP₆

IP₆ can be additionally phosphorylated to IP₇. This results in a species that is pyrophosphorylated at one carbon of the inositol ring. We tested IP₇pp5 and IP₇pp6 to see if these polyphosphorylated inositols would stimulate end-joining by PC-C. As shown in Fig 8 both IP₇ species do stimulate NHEJ by PC-C and this stimulation is approximately 10-fold better than that achieved with IP₆. These data suggest that, while IP₆ is highly effective at stimulating NHEJ, IP₆ may not be the only biologically relevant effector of NHEJ among the inositol polyphosphates.

Example 4: The Ku70/80 heterodimer of DNA-PK binds IP₆ with specificity

As previously described, DNA-PK (composed of the Ku 70/80 heterodimer and PI-3-like kinase DNA-PK_{cs}) binds IP₆ with specificity. We have determined that within this heterodimer the Ku 70/80 heterodimer is responsible for this binding activity. Furthermore, the Ku-IP₆ complex is capable of binding DNA forming a higher-order complex. Finally, a super-complex can be formed that contains Ku, IP₆, DNA-PK_{cs} and DNA.

The specificity of IP₆ recognition by DNA-PK was assessed by competition trials using inositol hexasulphate (IS₆). As shown in Fig 9, tritiated IP₆ (³H-IP₆) is not bound by any of the molecular weight standards used to calibrate the gel filtration column (diamonds, STDs) and is detected in the far-included volume which elutes late in the column profile. Addition of DNA-PK results in an increase in the mobility of the ³H-IP₆ indicating complex formation. IS₆, presented in 10- and 100-fold molar excess have no effect on the amount of ³H-IP₆ bound by DNA-PK. These data, when

taken together with binding trials using $^3\text{H-IP}_3$, indicate specific binding of IP_6 by DNA-PK.

Ku 70/80 and DNA-PK_{cs} were purified to homogeneity and used to examine
5 the binding of IP_6 by DNA-PK. $^3\text{H-IP}_6$ was used in these binding
experiments and the curves presented in Fig 10 represent the distribution of
 $^3\text{H-IP}_6$ along a gel filtration column under various conditions. $^3\text{H-IP}_6$
observed in a peak below 17 kD represents unbound $^3\text{H-IP}_6$. In the presence
of purified Ku 70/80 (\pm DNA-PK_{cs}) $^3\text{H-IP}_6$ elutes early from the column
10 near the 150 MW point. These curves have been overlaid in Fig 11 to
emphasize the fact that the presence of DNA-PK_{cs} does not alter the
mobility of the Ku- $^3\text{H-IP}_6$ complex along the gel filtration column. This
suggests that 1) Ku binds $^3\text{H-IP}_6$ and that 2) DNA-PK_{cs} does not interact
with either the $^3\text{H-IP}_6$ or the Ku- IP_6 complex. It is believed that DNA-PK
15 assembles on DNA and that in the absence of DNA that Ku and DNA-PK_{cs}
are separate in solution. The addition of DNA to the Ku- $^3\text{H-IP}_6$ complex
results in a shift in the elution profile from the gel filtration column – the
peak is broader (possibly owing to the mobility of the DNA) and has an
earlier start point. This data suggests that a Ku- $^3\text{H-IP}_6$ -DNA complex can
20 be formed in solution. Finally, the addition of DNA-PK_{cs} to the Ku- IP_6 -
DNA complex results in an additional increase in mobility along the gel
filtration column. The species appears very large – near 670 kD – which is
consistent with it containing Ku 70/80, $^3\text{H-IP}_6$, DNA-PK_{cs} and DNA.

25 Gel filtration was carried out on DNA-PK + $^3\text{H-IP}_6$ in the presence or
absence of DNA to generate the curves in Fig 12. Western blot analysis of
these fractions was performed to detect the presence of DNA-PK_{cs} or Ku
70/80 in column fractions. As shown in Fig 11 the peak of $^3\text{H-IP}_6$ is
coincident with the peak of Ku 70/80, but not with the peak of DNA-PK_{cs}.

However, in the presence of DNA all 3 peaks ($^3\text{H-IP}_6$, Ku 70/80 and DNA-PK $_{cs}$) are coincident which is consistent with a supercomplex containing Ku 70/80, $^3\text{H-IP}_6$, DNA-PK $_{cs}$ and DNA.

- 5 The specificity of IP_6 binding by Ku was examined by competition analysis (Fig 13) using IP_3 , IP_6 and IP_7 . As shown in Fig 13, one molar equivalent of IP_6 or IP_7 resulted in an approximate 50% loss in $^3\text{H-IP}_6$ binding, while a 3-fold molar excess of IP_3 had no effect. These data indicate that Ku specifically recognizes IP_6 . In addition, that IP_6 and IP_7 are recognized
10 equally by Ku indicates that the binding of an inositol polyphosphate (IP) by Ku is not the source of the 10-fold increase in NHEJ stimulation observed with IP_7 . These findings may be extended to postulate that, while IP_6 is bound by Ku, that the stimulatory effect of IP_6 on NHEJ probably results from additional interactions that may be regulated by formation of
15 the IP_6 -Ku complex.

Example 5: Spin columns used to examine inositide phosphate binding species

- 20 While gel filtration can provide a wealth of information regarding complex formation it is time-consuming and limited to the examination of single samples. To facilitate the study of Ku-IP interactions a spin-column method based on the work of Kavran *et al* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 30497-30508 was developed. The high charge-to-mass ratio of IP_6 gives it a large
25 apparent molecular size in aqueous solution. As such, this method uses the Bio-Gel P-30 resin (BioRad) which has a molecular exclusion size of 40 kD. The results of specificity trials using this spin column method are presented in Fig 14. Clearly, the level of specificity observed using these

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

72

spin-columns is identical to that presented in Figs 9 and 13. This method will facilitate the examination of IP binding species.

CLAIMS

1. A method of stimulating non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising performing NHEJ of DNA in the presence of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate.
5
2. An assay of non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA wherein the assay comprises inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate.
10
3. A method according to Claim 1 or assay according to Claim 2 wherein the IP₆ or other stimulatory inositol phosphate is exogenous IP₆ or other stimulatory inositol phosphate.
15
4. A method or assay according to any one of the preceding claims wherein the NHEJ is performed *in vitro*.
5. A method or assay according to any one of the preceding claims wherein the NHEJ of DNA is performed in a NHEJ reaction mixture which includes DNA-dependent protein kinase, XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate.
20
6. Use of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate for stimulating non-homologous end-joining of DNA.
25
7. A kit of parts comprising IP₆ or other stimulatory inositol phosphate and one or more of a DNA-dependent protein kinase, XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate.

8. A kit of parts comprising inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate and a host cell expressing one or more of a DNA-dependent protein kinase, XRCC4 and DNA ligase IV.
- 5
9. A kit of parts according to Claim 8 wherein one or more of a DNA-dependent protein kinase, XRCC4 and DNA ligase IV are expressed from a recombinant nucleic acid molecule.
- 10
10. An assay of a protein kinase wherein the assay comprises inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate.
11. A kit of parts comprising a protein kinase and inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate.
- 15
12. A kit of parts according to Claim 11 wherein the protein kinase is expressed from a recombinant nucleic acid molecule.
13. An assay according to Claim 10 or a kit of parts according to Claim 20 11 further comprising a substrate for said protein kinase.
14. A kit of parts comprising inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate and a host cell expressing a protein kinase.
- 25
15. An assay according to Claim 10 or a kit of parts according to any one of Claims 11 to 14 wherein the protein kinase is a protein kinase which has a domain with similarity to the catalytic domain of phosphatidylinositol 3-kinase.

16. An assay or kit of parts according to Claim 15 wherein the protein kinase is any one of a DNA-dependent protein kinase, ATR, ATM, FRAP, or the *Saccharomyces cerevisiae* gene products Tel1p, Mec1p, Tor1p or Tor2p, or the *Schizosaccharomyces pombe* gene product Rad3.
5
17. A method of identifying a compound which modulates or mimics the effect of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate in stimulating non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising performing NHEJ of DNA in the presence of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate and determining the effect of a test compound on the NHEJ of DNA.
10
18. A method according to Claim 17 wherein the NHEJ of DNA is performed *in vitro*.
15
19. A method according to Claim 17 or 18 wherein the NHEJ of DNA is performed in a NHEJ reaction mixture which includes DNA-dependent protein kinase, XRCC4, DNA ligase IV and a suitable DNA substrate.
20
20. A method of identifying a compound which modulates or mimics the effect of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate in stimulating non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising determining, in the presence of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate, the
25

effect of a test compound on the interactions between the components in the NHEJ reaction mixture.

21. A method according to Claim 20 wherein the components of the NHEJ reaction are a DNA-dependent protein kinase (or a component thereof such as the Ku 70/80 heterodimer or a subunit thereof), XRCC4, DNA ligase IV, a suitable DNA substrate, ATP and Mg^{2+} .
22. A method of identifying a compound which modulates the non-homologous end-joining of DNA, the method comprising determining the effect of an inositol phosphate or derivative thereof on non-homologous end-joining of DNA.
23. A method of identifying a compound which modulates or mimics the effect of inositol hexakisphosphate (IP_6) or other stimulatory inositol phosphate on a protein kinase the method comprising determining, in the presence of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate, the effect of a test compound on the catalytic activity of the protein kinase or on the ability of the protein kinase to interact with another component.
24. A method of identifying a compound which modulates the binding of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate to a protein kinase, the method comprising determining whether a test compound reduces or increases the binding of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate to the said protein kinase or a subunit thereof.

25. A method according to Claim 23 or 24 wherein the protein kinase is a protein kinase which has a domain with similarity to the catalytic domain of phosphatidylinositol 3-kinase.
- 5 26. A method according to Claim 25 wherein the protein kinase is any one of a DNA-dependent protein kinase, ATR, ATM, FRAP, or the *Saccharomyces cerevisiae* gene products Tel1p, Mec1p, Tor1p or Tor2p, or the *Schizosaccharomyces pombe* gene product Rad3.
- 10 27. A method according to any one of Claims 23 to 26 wherein the protein kinase is a DNA-dependent protein kinase.
28. A method according to Claim 23 wherein the effect of a test compound on the interaction between the catalytic subunit of a DNA-dependent protein kinase and any one of Ku70, Ku80, DNA ligase IV, XRCC4 or a suitable DNA substrate thereof is determined.
- 15 29. A method according to Claim 24 wherein the subunit is the Ku 70/80 heterodimer of DNA-PK or the Ku70 subunit thereof or the Ku80 subunit thereof.
- 20 30. A method of identifying a compound which modulates the binding of IP₅ or other stimulatory inositol phosphate to the Ku 70/80 heterodimer of DNA-PK or the Ku70 subunit thereof or the Ku80 subunit thereof, the method comprising determining whether a test compound reduces or increase the binding of IP₅ or other stimulatory inositol phosphate to the said Ku 70/Ku 80 heterodimer or the Ku70 subunit thereof or the Ku80 subunit thereof.
- 25

31. A method of identifying a compound which modulates the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to XRCC4 or DNA ligase IV, the method comprising determining whether a test compound reduces or increases the binding of IP₆ or other stimulatory inositol phosphate to the said XRCC4 or DNA ligase IV.
- 5
32. A method according to any one of Claims 17 to 31 wherein the test compound is an inositol derivative.
- 10
33. A method according to any one of Claims 17 to 31 wherein the test compound is a phosphoinositide or an analogue of inositol hexakisphosphate (IP₆) or analogue of another stimulatory inositol phosphate.
- 15
34. A method according to any one of Claim 17 to 33 wherein a test compound which mimics or modulates the effect of inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate is selected for further study.
- 20
35. A method according to any one of Claims 17 to 22 and 28 to 31 wherein the method is used for identifying compounds which may be useful in developing agents for treating cancer, augmenting cancer radiotherapy and/or chemotherapy regimes, improving gene therapy regimes, enhancing homologous recombination, treating retroviral infections, and modulating the immune system.
- 25
36. A method according to any one of Claims 17 to 22 and 28 to 31 comprising the further steps of selecting a test compound which mimics or modulates the effect of inositol hexakisphosphate (IP₆) or

- 5 other stimulatory inositol phosphate and testing it in a further screen for its suitability as an agent for treating cancer, augmenting cancer radiotherapy and/or chemotherapy regimes, improving gene therapy regimes, enhancing homologous recombination, treating retroviral infections, or modulating the immune system.
- 10 37. A method according to any one of Claims 23 to 28 wherein the method is used for identifying compounds which may be useful in developing agents for modulating protein kinase activity or interactions.
- 15 38. A method according to Claim 37 wherein the protein kinase is any one of DNA-PK, ATM, ATR or FRAP and the method is used for identifying compounds which modulate cell cycle checkpoint control.
- 20 39. A compound identifiable by the method of any one of Claims 17 to 38.
40. A compound identified by the method of any one of Claims 17 to 38.
41. A compound according to Claim 39 or 40 for use in medicine.
- 25 42. A method of reducing non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising reducing the amount of, or inhibiting the stimulatory effect of, inositol hexakisphosphate (IP₆) or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction.

WO 01/80404

PCT/GB01/02180

80

43. A method of enhancing non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA the method comprising increasing the amount of, or enhancing or mimicking the stimulatory effect of, inositol hexakisphosphate (IP_6) or other stimulatory inositol phosphate in a NHEJ reaction.
- 5
44. A method according to Claim 42 wherein the reduction of NHEJ is in a cell.
45. A method according to Claim 44 wherein the cell is in a human or animal in need of reduction in NHEJ of DNA.
- 10
46. A method according to Claim 45 for treating cancer, augmenting cancer radiotherapy and/or chemotherapy regimes, improving gene therapy regimes, enhancing homologous recombination, treating retroviral infections, or modulating the immune system.
- 15
47. A method according to Claim 45 wherein the enhancement of NHEJ is in a cell.
- 20
48. A method according to Claim 47 wherein the cell is in a human or animal in need of enhancement in NHEJ of DNA.
49. A method according to Claim 48 for treating patients who are immunocompromised or susceptible to cancer due to impaired checkpoint cell cycle control.
- 25
50. A method of modulating the activity or interaction of a protein kinase the method comprising changing the amount of inositol hexakisphosphate (IP_6) or other stimulatory inositol phosphate

present with the protein kinase, or inhibiting or enhancing the effect of IP_6 or other stimulatory inositol phosphate on the protein kinase.

51. A method according to Claim 46 wherein the protein kinase is a
5 protein kinase which has a domain with similarity to the catalytic domain of phosphatidylinositol 3-kinase.
52. A method according to Claim 50 wherein the protein kinase is in a
10 cell.
53. A method according to Claim 52 wherein the cell is in a human or
animal in need of modulation of protein kinase activity or interaction.
54. A method according to Claim 53 wherein the protein kinase is any
15 one of DNA-PK, ATM, ATR or FRAP and the method is for modulating cell cycle checkpoint control.
55. A method of determining whether an individual has or is predisposed
20 to a defect in DNA repair or cell cycle checkpoint control, the method comprising the steps of (1) obtaining a sample from the patient, (2) determining the concentration of, or subcellular localisation of, inositol hexakisphosphate (IP_6) or other stimulatory inositol phosphate in the sample, and (3) comparing the result with a
25 standard.
56. Any novel screening assay or method of modulating non-homologous end-joining of DNA as herein described.

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

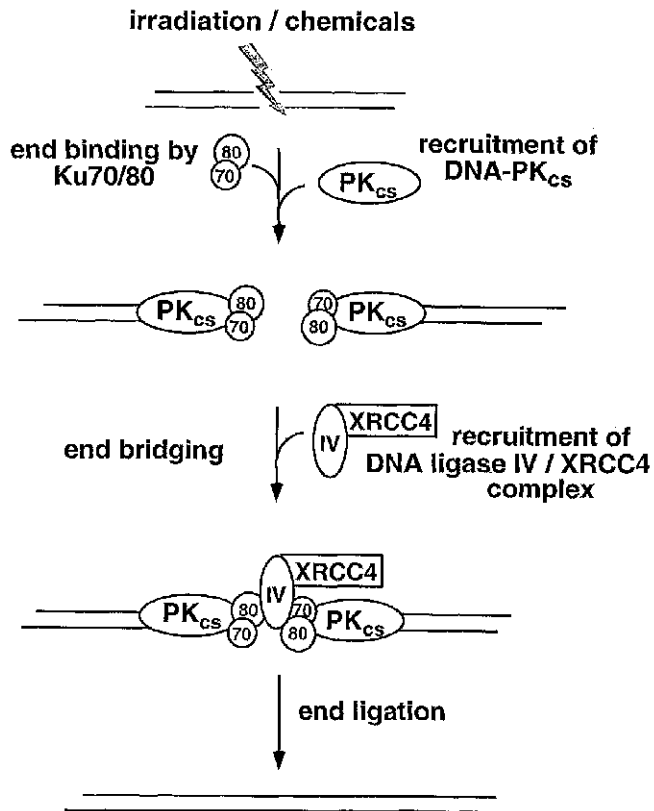


Figure 1

Figure 2 (page 1 of 2)

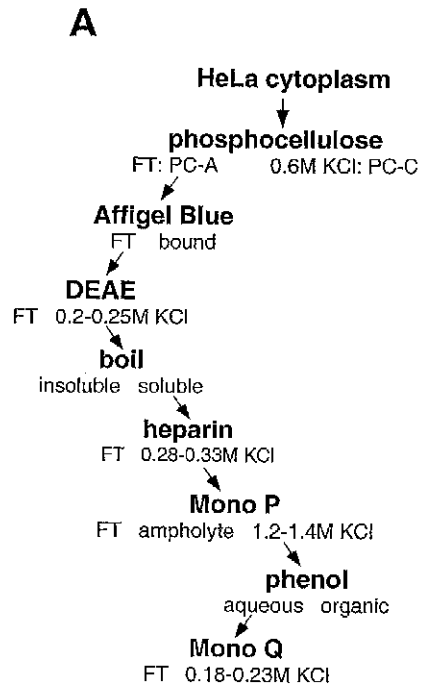


Figure 2 (page 2 of 2)

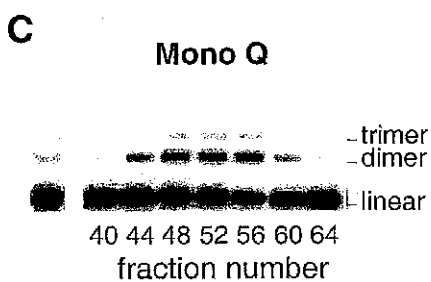
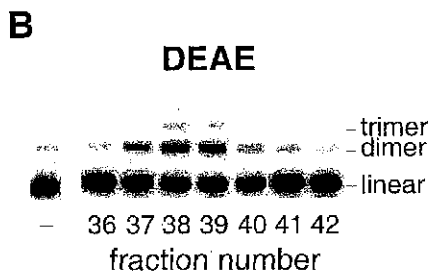
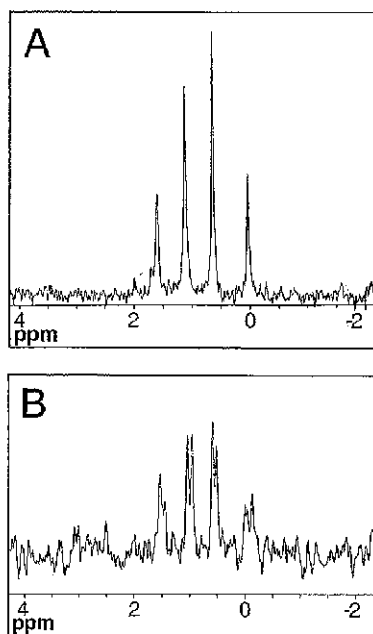


Figure 3 (page 1 of 2)



WO 01/80404

PCT/GB01/02180

Figure 3 (page 2 of 2)

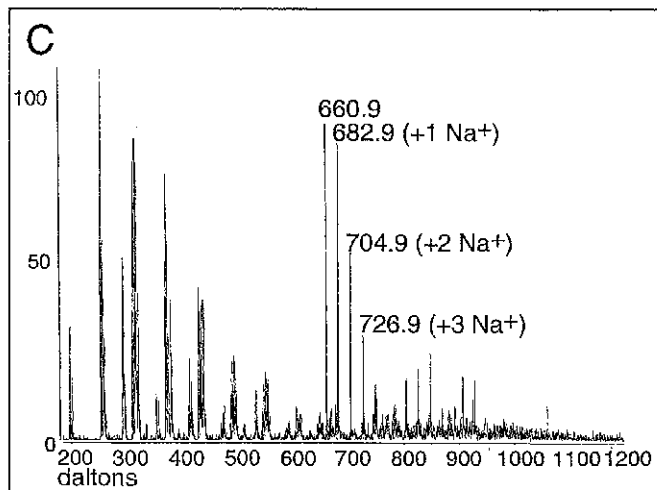


Figure 4 (page 1 of 2)

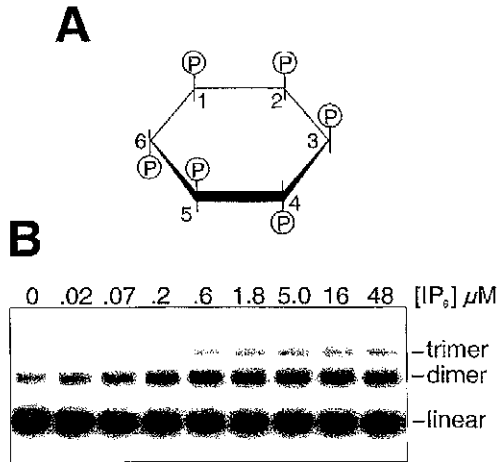
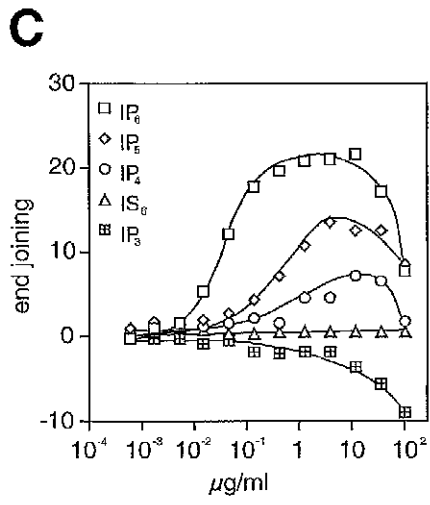


Figure 4 (page 2 of 2)



WO 01/50404

PCT/GB01/02180

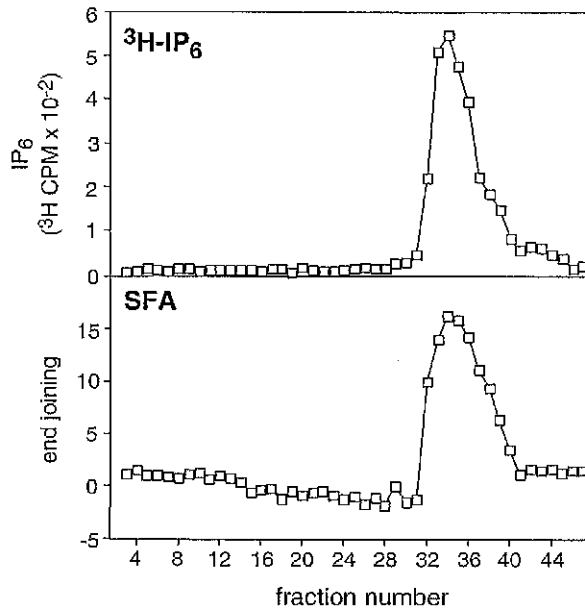


Figure 5

8/18

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

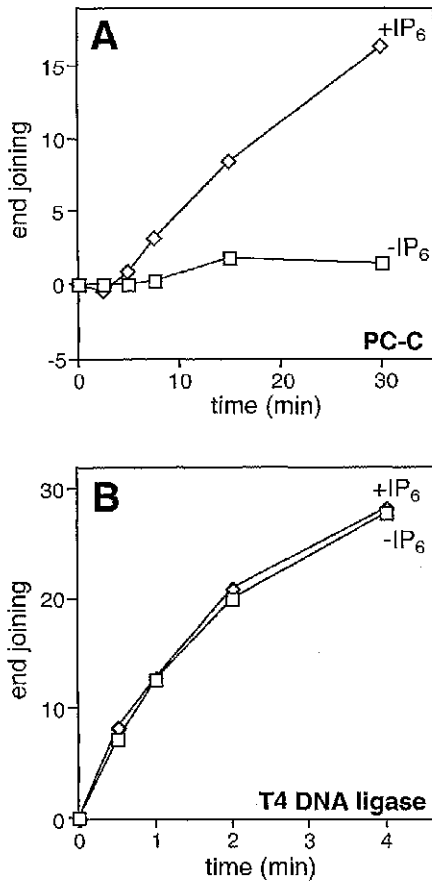


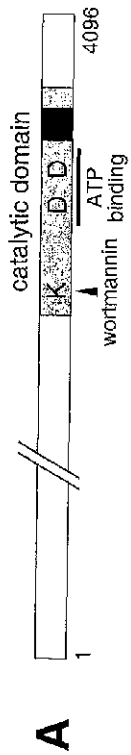
Figure 6
9/18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

Figure 7 (page 1 of 2)



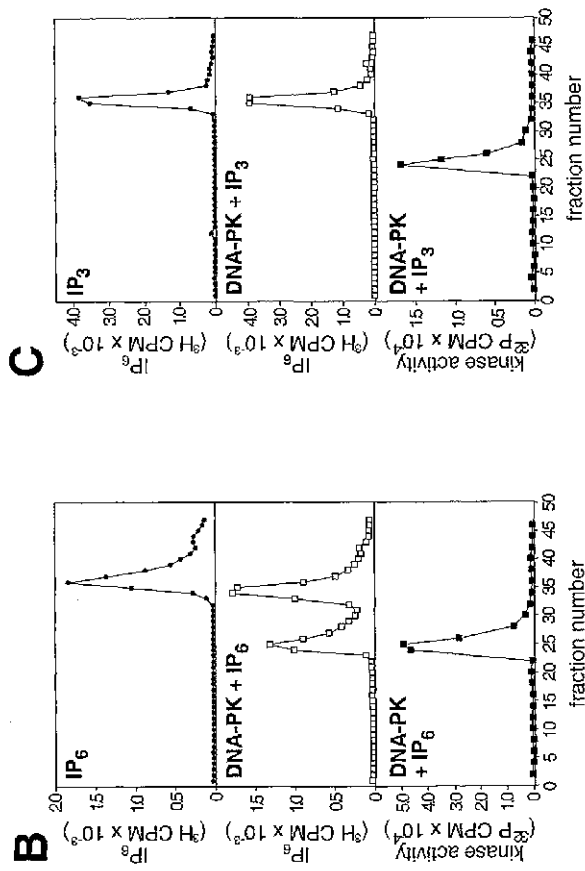
A

10/18

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

Figure 7 (page 2 of 2)



WO 01/50404

PCT/GB01/02180

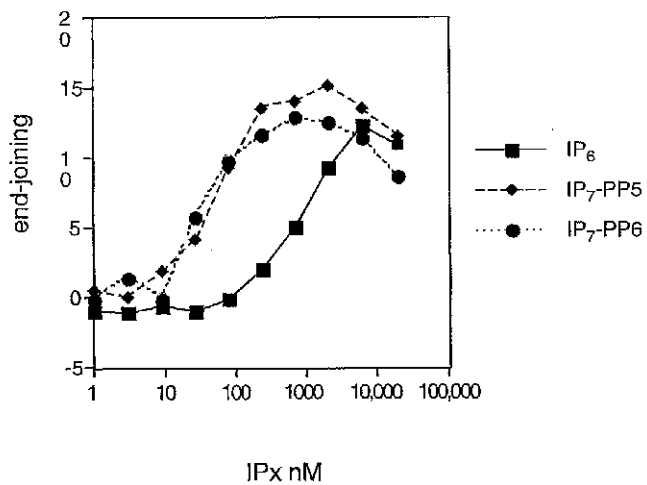


Figure 8

12/18

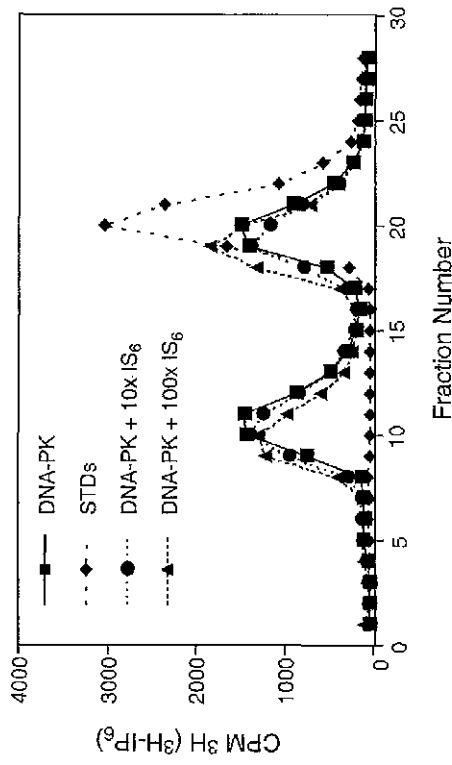


Figure 9

13/18

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

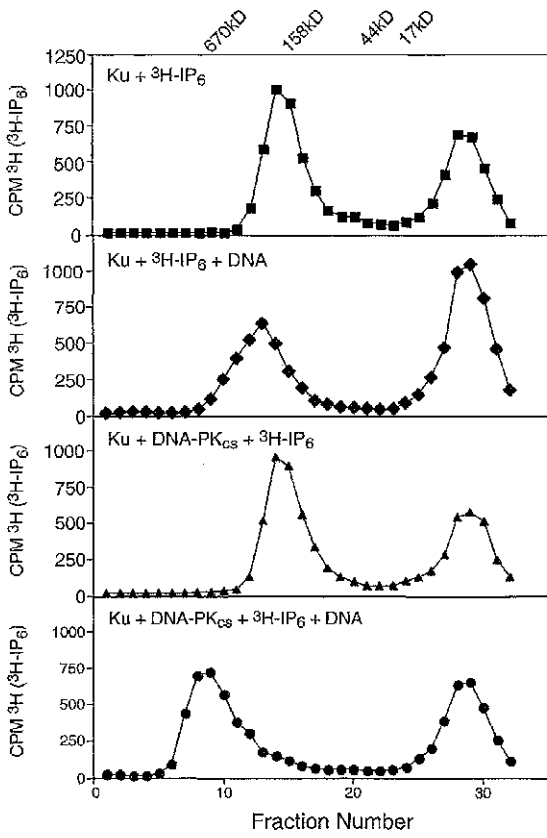


Figure 10

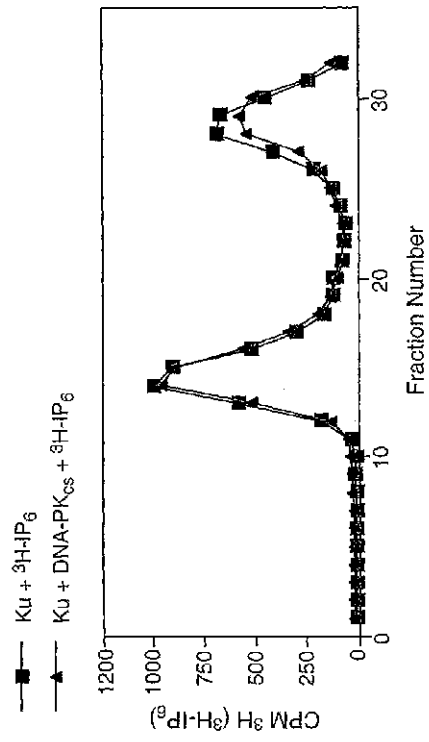
14/18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/50404

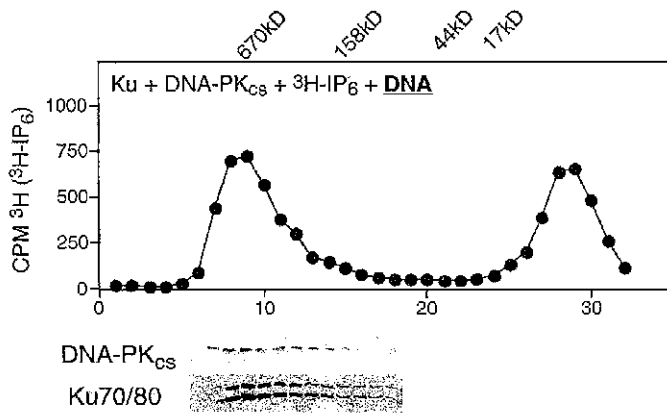
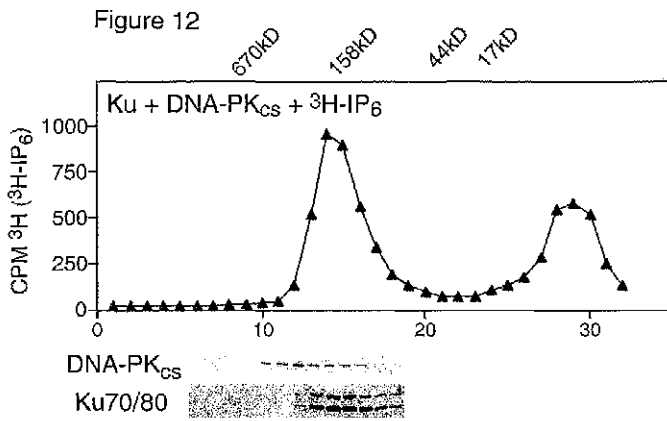
PCT/GB01/02180

Figure 11



WO 01/50404

PCT/GB01/02180



16/18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

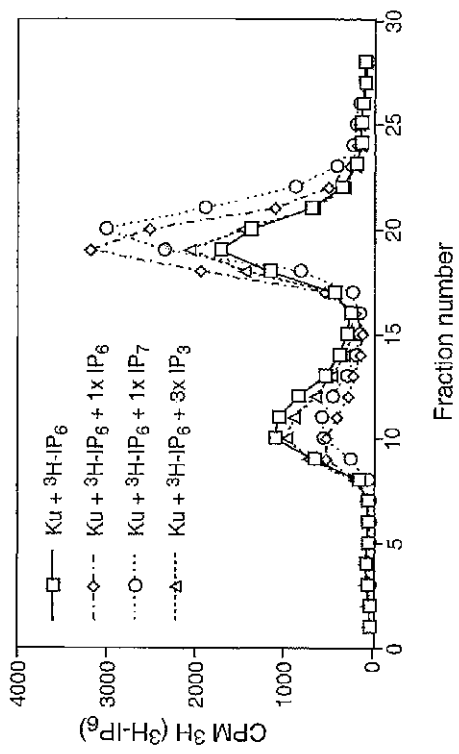


Figure 13

WO 01/50404

PCT/GB01/02180

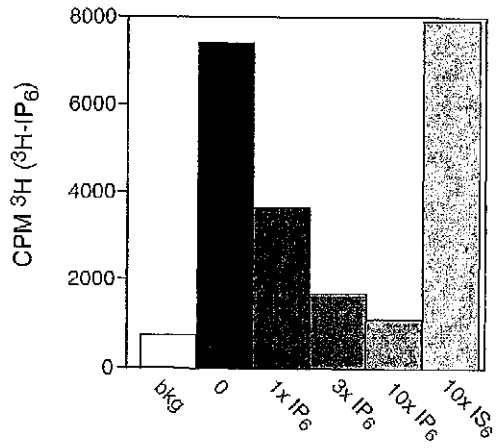


Figure 14

18/18

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT)		Internat. Application No. PCT/GB 01/02180
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/48 A61P35/00 A61P31/12 A61P37/02		
According to International Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Factors taken into consideration during the international search (name of data base used, where practical, search other than used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2 329 248 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH) 17 March 1999 (1999-03-17) the whole document	1, 2, 6-8, 10, 11, 14, 17, 20, 22-24, 30, 31, 42, 43, 50, 55
	---	-/-
<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" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier documents 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 claim or other special reason (see specification) "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 documents 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	Date of mailing of the international search report	
19 October 2001	29/10/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5516, Pertenlaan 2 NL - 2001 PH The Hague Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 e.z.o.nl Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer Moreno, C	

Form PCT/ISA/210 (continued from July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 01/02180
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	HANAKAHI, L A ET AL: "Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair" CELL, vol. 102, no. 6, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 721-729, XP001032987 the whole document	1, 2, 6-8, 10, 11, 14, 17, 20, 22-24, 30, 31, 42, 43, 50, 55
P, X	SHEARS S B: "Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate" CELLULAR SIGNALING, vol. 13, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 151-158, XP001032988 the whole document	1, 2, 6-8, 10, 11, 14, 17, 20, 22-24, 30, 31, 42, 43, 50, 55

*Note: PCT(A)S(2)(C) (classification of second search) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT)				International Application No.
Information on patent family members				FCT/GB 01/02180
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
GB 2329248 A	17-03-1999	GB 2329469 A , B	24-03-1999	
		AU 724108 B2	14-09-2000	
		AU 5568198 A	03-08-1998	
		AU 729066 B2	25-01-2001	
		AU 5568498 A	03-08-1998	
		EP 0966683 A1	29-12-1999	
		EP 0965040 A1	22-12-1999	
		WO 9830902 A1	16-07-1998	
		WO 9830903 A1	16-07-1998	
		GB 2321702 A , B	05-08-1998	
		GB 2322193 A , B	19-08-1998	
		JP 2001508868 T	03-07-2001	
		JP 2001508175 T	19-06-2001	
		US 6242175 B1	05-06-2001	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M

(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 100107836

弁理士 西 和哉

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 スティーヴ・クレイグ・ウェスト

イギリス・ハートフォードシャー・EN6・3LD・サウス・マイムズ・(番地なし)・キャンサー・リサーチ・ユーカー・クリア・ホール・ラボラトリーズ

(72) 発明者 レズリン・アン・アケミ・ハナカヒ

イギリス・ハートフォードシャー・EN6・3LD・サウス・マイムズ・(番地なし)・キャンサー・リサーチ・ユーカー・クリア・ホール・ラボラトリーズ

(72) 発明者 マイケル・パートレット・ジョンズ

イギリス・ロンドン・WC2A・3PX・リンカーンズ・イン・フィールズ・44・キャンサー・リサーチ・ユーカー

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB14 BB46 BB51 CB01 FB06 FB08

4B024 AA01 AA11 BA07 BA10 CA01 DA02 EA04 FA02 HA01

4B063 QA01 QA18 QQ27 QQ40 QQ42 QR07 QR20 QR32 QR57 QS26

QS31 QX07

4C084 AA16 NA14 ZB072 ZB262 ZB332 ZC41 ZC542

专利名称(译)	药物筛选系统和分析		
公开(公告)号	JP2004500849A	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2001586599	申请日	2001-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	癌症研究科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	癌症研究科技有限公司		
[标]发明人	スティーヴクレイグウェスト レズリンアンアケミハナカヒ マイケルパートレットジョーンズ		
发明人	スティーヴ・クレイグ・ウェスト レズリン・アン・アケミ・ハナカヒ マイケル・パートレット・ジョーンズ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P43/00 C12N15/09 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/485		
FI分类号	C12N15/00.A A61K45/00 A61P31/14 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.111 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB46 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/FB06 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA10 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ27 4B063/QQ40 4B063/QQ42 4B063/QR07 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR57 4B063/QS26 4B063/QS31 4B063/QX07 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZC41 4C084/ZC542		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	2000012179 2000-05-20 GB 60/221226 2000-07-25 US 60/268367 2001-02-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及进行NHEJ的方法和NHEJ的测定;治疗上可用于调节NHEJ的化合物的测定;用于调节DNA-PK和相关蛋白激酶,用于治疗上有用的化合物;这些观察结果用于开发可用于进行所述测定和方法的组合物和试剂盒;以及调节NHEJ的方法。本发明还涉及调节DNA的NHEJ的方法和增加或减少DNA的NHEJ的处理方法。本发明还涉及用于确定患者是否已经或怀疑具有DNA修复或细胞周期检查点控制缺陷的方法,包括IP 6或其他刺激性肌醇磷酸盐一种测量酸的方法。

